

张婷婷,马 磊. 枯草杆菌启动子 P43 及 Pamy 的转录活性[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):56-58.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.016

枯草杆菌启动子 P43 及 Pamy 的转录活性

张婷婷,马 磊

(石河子大学生命科学学院,新疆石河子 832000)

摘要:利用报告基因 β -半乳糖苷酶,分析了枯草杆菌启动子 P43 及 Pamy 的转录活性。结果表明,在基本培养基条件下,启动子 P43 在对数前期开始表现转录活性,随菌量增大活性迅速提高,稳定期逐步平稳;在富营养培养基条件下,启动子 P43 转录活性在对数前期与基本培养基条件下相似,在对数期转录活性增加速率则高于基本培养基条件下的增加速率;启动子 P43 转录活性在 *E. coli* 和 *B. subtilis* 体内基本一致。启动子 Pamy 在淀粉诱导下转录活性较高,在添加葡萄糖以及无诱导条件下酶活较低。

关键词:枯草杆菌;启动子;转录活性;基因表达

中图分类号: Q933 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0056-02

启动子是实现外源基因高效表达的关键,是表达载体的核心成分,启动子的转录活性分析是表达载体构建工作的重点之一^[1]。在枯草杆菌中常见启动子重叠和串连现象,例如 RNA 聚合酶 σ^{43} (σ^A) 和 σ^{37} (σ^B) 的识别区在胞嘧啶脱氨酶基因启动子 P43 序列内重叠^[2]。 σ^{43} 负责营养期的基因起始转录,而 σ^{37} 负责对数晚期和平台期早期的基因起始转录,因而启动子 P43 可在多个时期起始转录,是理想的发酵工程启动子^[3-4]。本研究应用报告基因 β -半乳糖苷酶基因(*bgaB*),分析启动子 P43 及枯草杆菌 α -淀粉酶基因启动子 Pamy 的转录活性,为进一步开发高效表达系统奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株 *B. subtilis* 1A747 和 *E. coli* DH5 α 购自中国典型培养物保藏中心;质粒 pEB-*bgaB* 为笔者所在实验室构建,该质粒为大肠杆菌-枯草杆菌穿梭载体,携带 β -半乳糖苷酶基因(*bgaB*)。限制性核酸内切酶、碱性磷酸酶、T₄ DNA 连接酶购自 Promage 公司,Taq DNA 聚合酶和 LA Taq DNA 聚合酶购自宝生物公司,质粒提取、DNA 回收试剂盒购自杭州维特洁公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 NCBI 数据库中 *B. subtilis* 基因组上的 P43 和 Pamy 序列设计引物,P43 片段扩增后保留其原有起始密码子(ATG),上下游引物分别为 5'-CCGGATCCTG-TAGAGCTCAGCAT-3'(下划线为 *Bam*H I 酶切位点)和 5'-GGTCTGACGATGTGTACATTCCTC-3'(下划线为 *Pst* I 酶切位点);Pamy 片段扩增后保留了原有信号肽序列,上下游引物

分别为 5'-AAGGATCCGCTCATGCCGAGAATAGAC-3'(下划线为 *Bam*H I 酶切位点)和 5'-ATCTGCAGTTCAG-CACTCGCAGCCG-3'(下划线为 *Pst* I 酶切位点)。PCR 扩增条件:92 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 复性 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,循环 30 次。

1.2.2 载体构建 在载体 pEB-*bgaB* 上 *bgaB* 5'端的 *Bam*H I 和 *Pst*I 酶切位点之间,分别插入经回收并酶切的 PCR 产物 P43 和 Pamy,获得质粒 pEB-P43-*bgaB* 和 pEB-Pamy-*bgaB*;载体构建成功后,启动子片段 P43 和 Pamy 可起始转录 *bgaB*。载体电转入 *E. coli* DH5 α 后,将感受态细胞涂布在含 X-gal 平板,挑选 18 h 内出现明显蓝色菌落,提取质粒,酶切鉴定。挑取单菌落摇菌,测定整个生长期 β -半乳糖苷酶活性。

1.2.3 β -半乳糖苷酶活性测定方法和定义^[5] 将一定体积菌液离心收集菌体,重悬于 700 μ L Z-buffer (0.06 mol/L Na₂HPO₄·7H₂O,0.04 mol/L NaH₂PO₄,0.01 mol/L KCl,0.001 mol/L MgSO₄·7H₂O 和 0.05 mol/L β -巯基乙醇,pH 值 7.0),加入 10 μ L Triton X 100 (10%) 和溶菌酶 10 μ L (10 g/L),静置 30 min 后加入邻硝基苯- β -D-半乳糖苷糖苷(ONPG)200 μ L (4 g/L),混匀后置于 55 ℃ 水浴 15 min,加入 Na₂CO₃ 500 μ L (1 mol/L) 终止反应,离心,取上清并测量其 $D_{420\text{nm}}$ 。

酶活性(U) = $\frac{D_{420\text{nm}} \times 1000}{D_{595\text{nm}} \times 15(\text{min}) \times V}$ ($D_{595\text{nm}}$ 为测前菌液吸光度;V 为所用菌液的体积,mL)。

2 结果与分析

PCR 扩增获得的 P43 片段大小在 250 ~ 500 bp 之间,Pamy 片段大小在 500 ~ 750 bp 之间(图 1),与预计大小相符。

在基本培养基(胰蛋白胨 1%,酵母提取物 0.5%,氯化钠 1%)条件下,*E. coli* DH5 α (pEB-P43-*bgaB*) 合成的 β -半乳糖苷酶活性在对数前期开始表现,随着菌量增大活性迅速提高,稳定期后逐步平稳,最高可达 6 650 U,稳定期后随菌群衰退酶活下降(图 2)。在富营养培养基(胰蛋白胨 2%,酵母提取物 1%,氯化钠 1%)条件下,*E. coli* DH5 α (pEB-P43-*bgaB*) 合成的 β -半乳糖苷酶活性在对数前期与基本培养基

收稿日期:2014-01-08

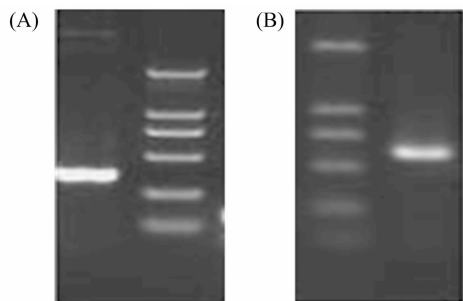
基金项目:国家自然科学基金(编号:31272416);石河子大学高层次人才科研启动专项(编号:RCZX201137);石河子大学优秀青年项目(编号:2012ZRXYQ13);石河子大学青年骨干教师培养计划。

作者简介:张婷婷(1984—),硕士,讲师,从事微生物生态研究。

E-mail:120978935@qq.com。

通信作者:马 磊,博士,副教授,从事生物信息学与分子遗传研究。

E-mail:mlei@shzu.edu.cn。



(A) P43 片段; (B) Pamy 片段; marker 自上而下为: 2 000、1 000、750、500、250、100 bp

图1 PCR 扩增 P43 和 Pamy 结果

的结果相似,进入稳定期酶活性增加速率则逐渐超过在基本培养基中速率,最高为 9 200 U (图 2)。

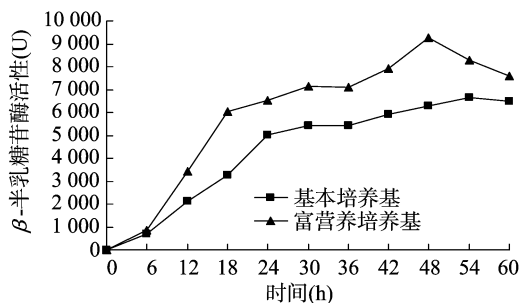


图2 不同培养条件下 P43 转录活性

B. subtilis (pEB - P43 - *bgaB*) 在富营养培养基条件下, β -半乳糖苷酶活性与 *E. coli* DH5 α (pEB - Pamy - *bgaB*) 在富营养培养基条件下相似,对数前期开始表现,随着菌量增长活性迅速提高,稳定期后逐步平稳,最高可达 9 550 U,在稳定期后随着菌群衰退酶活性下降 (图 3)。

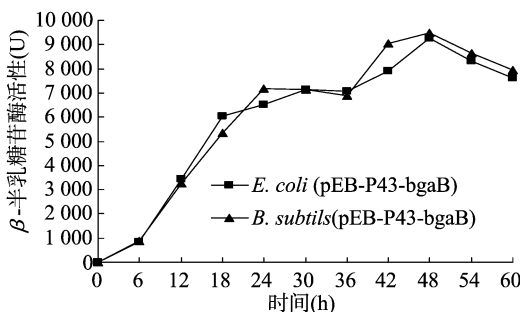


图3 不同宿主内 P43 转录活性

E. coli DH5 α (pEB - Pamy - *bgaB*) 在添加 1% 可溶性淀粉诱导条件下, β -半乳糖苷酶活性可达 1 000 U;而在添加 1% 葡萄糖以及无诱导条件下酶活很低,最高只有 30 U。*B. subtilis* (pEB - Pamy - *bgaB*) 在无诱导条件下 β -半乳糖苷酶活性略高 (750 U)。

3 讨论

本研究通过检测 β -半乳糖苷酶活性,研究了启动子 P43 及 Pamy 在 *B. subtilis* 和 *E. coli* 中的转录活性。本研究发现 P43 转录合成的 β -半乳糖苷酶活性,在 (pEB - P43 - *bgaB*) 和 (pEB - P43 - *bgaB*) 中的结果相似,对数前期开始表现,随着菌量增长活性迅速提高,稳定期逐步平稳,同样在稳定期后

随着菌群衰退,酶活性下降。在 *B. subtilis* (pEB - P43 - *bgaB*) 中 β -半乳糖苷酶活性可达 9 500 U 以上。本研究结果与 Ye 等在质粒 pUB110 基础上,以枯草杆菌 WB700 为宿主菌,利用 P43 启动子和果聚糖蔗糖酶信号肽,在普通培养条件下分泌表达葡萄糖菌激酶的结果基本一致^[6]。启动子 P43 在 *E. coli* 中, β -半乳糖苷酶转录的水平可达 9 200 U,这可能是由于 *E. coli* RNA 聚合酶 σ^{70} 与 *B. subtilis* σ^{43} 具有同源性^[6-10],能够识别结合启动子 P43,使之在 *E. coli* 中同样能转录。因而可利用启动子 P43 先在 *E. coli* 中表达检测外源基因,再转入 *B. subtilis* 中表达。

序列分析比对发现 P43 序列与 σ^{43} 和 σ^{37} 的识别序列并不完全保守, σ^{43} 和 σ^{37} 识别序列的保守性显然与启动子的高活性不相符。因而 Wang 等推测在 σ^{43} 和 σ^{37} 识别序列之外还存在其他能够影响启动子活性的因素^[8]。在本实验室,另一研究将启动子 P43 的核糖体结合序列删除后,替换上原核典型的核糖体结合序列,发现其转录效率仍然较高,说明影响因素可能不是核糖体结合序列。

本研究发现不同营养条件可影响启动子 P43 的转录活性。对数前期,在基本培养基和富营养条件下启动子 P43 的转录活性差异不大;进入稳定期后,出现差距, P43 在基本培养基转录表达的 β -半乳糖苷酶活性增长逐渐进入了平稳期,而富营养条件下其活性增长速率依然很高,持续向上增长。这种差异可能由于启动子 P43 转录效率较高与合成 mRNA 及蛋白质原料有限之间的矛盾引起。对数前期及对数期,菌量小,营养充足,差异不明显,进入稳定期后,随着菌群扩大及启动子 P43 高效率转录,营养矛盾造成的差异逐步突出,因而优化营养条件有助于提高启动子 P43 的转录活性。

启动子 Pamy 在 *E. coli* 中转录活性较低, β -半乳糖苷酶活性在诱导条件下最高为 1 000 U。活性弱的原因可能是虽然启动子 Pamy 也是由 *B. subtilis* RNA 聚合酶 σ^{43} 识别转录,但对 *E. coli* 的 σ^{70} 因子亲和性低,因而在 *E. coli* 中转录水平低;另一原因也可能是携带 α -淀粉酶的信号肽的 β -半乳糖苷酶融合元,在 *E. coli* 胞内未能切除信号肽,以无活性的蛋白形式存在。启动子 Pamy 在 *B. subtilis* 中转录活性本身可能就不太高, Gat^[11] 以绿色荧光蛋白为报告基因,利用 *B. subtilis* WB600 和 pUB110 衍生载体,发现 Pamy 活性较低。因此 Pamy 的序列还有待改造提高其活性。

参考文献:

- [1] 徐友强, 马翠卿, 陶 飞, 等. 细菌启动子识别及应用研究进展 [J]. 生物工程学报, 2010, 26(10): 1393-1403.
- [2] Wang P Z, Doi R H. Overlapping promoters transcribed by *Bacillus subtilis* sigma 55 and sigma 37 RNA polymerase holoenzymes during growth and stationary phases [J]. Journal of Biological Chemistry, 1984, 259(13): 8619-8625.
- [3] Blombach B, Eikmanns B J. Current knowledge on isobutanol production with *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum* [J]. Bioengineered, 2011, 2(6): 346-350.
- [4] Lu Y P, Lin Q, Wang J, et al. Overexpression and characterization in *Bacillus subtilis* of a positionally nonspecific lipase from *Proteus vulgaris* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37(9): 919-925.

于一帆,朱小彬,葛会敏,等. 基于绿色荧光蛋白瞬时表达的植物亚细胞定位方法[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):58-61.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.017

基于绿色荧光蛋白瞬时表达的植物亚细胞定位方法

于一帆,朱小彬,葛会敏,陈 云

(扬州大学生物科学与技术学院,江苏扬州 225009)

摘要:细胞是生命活动的基本单位,各种蛋白质都按照其功能有序地分布在细胞的每个分区中。蛋白质的亚细胞定位是功能基因组学的重要内容。目前植物蛋白质的亚细胞定位方法中应用较普遍的是借助于报告基因表达产物来实现目标蛋白定位的融合报告基因定位法,其中绿色荧光蛋白应用最为广泛。综述了基于绿色荧光蛋白瞬时表达的植物亚细胞定位方法,包括拟南芥原生质体瞬时表达、烟草叶片瞬时表达、洋葱表皮细胞瞬时表达等,同时对上述几种方法进行了比较分析。

关键词:蛋白质;亚细胞定位;绿色荧光蛋白;瞬时表达

中图分类号: Q-331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0058-04

蛋白质是生物功能的直接体现者,有序分布、动态调控的蛋白质是保证生命个体正常生长发育的前提。基因表达产物在组织中的亚细胞定位是功能基因组学、蛋白质组学的重要研究内容之一,是系统理解植物形态建成、生长发育以及对逆境的耐受性、抵抗性不可或缺的环节,也是生物学家们初步推断蛋白质生物学功能的重要依据。蛋白质的亚细胞定位可采取多种方法,包括生物信息学预测^[1]、免疫胶体金标记^[2]、多肽序列分析^[3]以及与报告基因融合瞬时表达^[4]等。目前植物蛋白的亚细胞定位应用主要是借助于融合报告基因定位法,其中绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)应用最为广泛。瞬时表达技术结合报告基因,可以有效跟踪融合产物在细胞内的运输、亚细胞定位及代谢^[5]。GFP 是水母(*Aequorea victoria*)体内的天然蛋白,自 1994 年 Chalfie 等揭示了该蛋白作为报告蛋白的潜在应用价值^[6]以来,已作为报告蛋白在多种植物、动物、微生物中成功获得表达。由于 GFP 作为报告蛋白不需抗体、辅助因子、酶底物等其他成分,也不影响宿主细胞,因而可以鉴定、跟踪、分选表达 GFP 的细胞;同

时可以在活细胞中进行图像分析,在固定细胞中进行检测^[7]。瞬时表达(transient expression)是指引入细胞的外源 DNA 与宿主细胞染色体 DNA 并不发生整合,而是随载体进入细胞,约 12 h 左右可表达,基因产物在 2~4 d 内即可被检测出,是 1 种快速研究基因表达、蛋白质亚细胞定位及基因间互动的重要手段。瞬时表达能表达多种外源基因,具有时间短、重复性好等优点,弥补了常规转基因方式中周期长、转化效率低等缺点^[8]。与传统的转基因相比,瞬时表达不需要整合到染色体上,因此具有简单、快速、周期短、准确等优点^[9]。瞬时表达不受基因位置效应、基因沉默的影响,表达效率较稳定,转化率高。目前,植物瞬时表达系统已被陆续应用到生物学研究中,如利用该系统进行基因功能的鉴定分析、发现新型强启动子、蛋白质互作、亚细胞定位等。亚细胞定位瞬时表达的宿主载体主要有拟南芥原生质体、烟草叶片、洋葱表皮细胞等。本研究对常用的基于绿色荧光蛋白瞬时表达的植物蛋白质亚细胞定位方法进行总结,并对相关研究进行展望,以期更高效地进行植物蛋白质的亚细胞定位。

1 拟南芥原生质体瞬时表达

拟南芥瞬时表达系统由 Jen Sheen 教授实验室建立并完善^[10]。该方法在蛋白定位、启动子研究以及蛋白质相互作用等方面很有效。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)是 1 种模式植物,一直以来,拟南芥原生质体都是植物基因工程、植物细胞学研究的经典材料。原生质体作为 1 种细胞水平的研究系

收稿日期:2014-02-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:30970249)。

作者简介:于一帆(1989—),男,江苏常州人,硕士,研究方向为植物细胞信号转导。E-mail: yuyifan916@gmail.com。

通信作者:陈 云,博士,副教授,研究方向为植物细胞信号转导。
E-mail: yunchen@yzu.edu.cn。

[5] Harwood C R, Cutting S M. Molecular biological methods for *Bacillus*; vol. 707[M]. New York: Wiley, 1990.

[6] Ye R Q, Kim J H, Kim B G, et al. High level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 62(1): 87-96.

[7] Lin X, Wong S L, Miller E S, et al. Expression of the bacillus licheniformis PWD-1 keratinase gene in *B. subtilis* [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1997, 19(2): 134-138.

[8] Yang S, Huang H, Zhang R, et al. Expression and purification of extracellular penicillin G acylase in *Bacillus subtilis* [J]. Protein

Expression and Purification, 2001, 21(1): 60-64.

[9] Stülke J, Hillen W. Regulation of Carbon catabolism in *Bacillus species* [J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 54(1): 849-880.

[10] Braaz R, Wong S L, Jendrosseck D. Production of PHA depolymerase A (PhaZ5) from *Paucimonas lemoignei* in *Bacillus subtilis* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 209(2): 237-241.

[11] Gat O, Inbar I, Aloni - Grinstein R, et al. Use of a promoter trap system in *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis* for the development of recombinant protective antigen - based vaccines [J]. Infection and Immunity, 2003, 71(2): 801-813.