

文章编号:1009-038X(2003)06-0001-04

耐热 β -半乳糖苷酶基因 *bgaB* 在枯草芽孢杆菌中的整合表达

张 灏, 夏 雨, 傅晓燕, 陈 卫, 丁霄霖

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 来源于嗜热脂肪芽孢杆菌 *Bacillus stearothermophilus* 的耐热 β -半乳糖苷酶基因 *bgaB* 被克隆到大肠杆菌—枯草芽孢杆菌穿梭质粒 pMA5 中, 然后将外源基因及其表达调控序列亚克隆到枯草芽孢杆菌整合载体 pSAS144 中, 转化 *Bacillus subtilis* 受体菌 BD170, 在 5 $\mu\text{g/mL}$ 的氯霉素抗性平板上筛选抗性转化子. 经摇瓶发酵后, 得到耐热乳糖酶的比酶活为 0.32 U/mg, 是出发菌株比酶活的 2 倍.

关键词: 耐热 β -半乳糖苷酶; 枯草芽孢杆菌; 整合表达

中图分类号: Q 78

文献标识码: A

Integration and Expression of a Thermostable β -galactosidase Gene *bgaB* in *Bacillus subtilis*

ZHANG Hao, XIA Yu, FU Xiao-yan, CHEN Wei, DING Xiao-lin

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The thermostable beta-galactosidase gene *bgaB* from *Bacillus stearothermophilus* was cloned into *E. coli*-*B. subtilis* shuttle vector pMA5. Then *bgaB* gene and its regulatory sequence were subcloned to *B. subtilis* integrative vector pSAS144 and formed a new integrative vector pSAS144-*bgaB*. This vector was then transformed to a chloramphenicol. Sensitive host *B. subtilis* BD170 and the transformants were received on LB agar medium with chloramphenicol to a final concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$. The integrative strain showed thermostable β -galactosidase activity of 0.32 U/mg, twice of that from original strain *Bacillus stearothermophilus*.

Key words: thermostable beta-galactosidase; *Bacillus subtilis*; integration and expression

β -半乳糖苷酶(EC 2.3.1.23)俗称乳糖酶, 能将乳糖水解为葡萄糖和半乳糖, 工业上可用于生产低乳糖牛奶. 来源不同的乳糖酶理化性质有很大差别, 其中之一就是热稳定性不同, 例如酵母乳糖酶

热稳定性较差, 是一种常温水解酶, 而来源于嗜热细菌和霉菌的乳糖酶热稳定性较好. 来源于嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)的乳糖酶具有良好的热稳定性, 由该菌染色体基因 *bgaB*

收稿日期: 2003-06-26; 修回日期: 2003-09-10.

作者简介: 张 灏(1962-), 男, 江苏苏州人, 副教授, 工学硕士.
万方数据

编码的乳糖酶,在 70℃ 仍具有较高的稳定性^[1]。

本课题组已经从 *Bacillus stearothermophilus* 染色体扩增得到编码耐热乳糖酶的 *bgaB* 基因,并克隆到大肠杆菌表达系统中进行了表达研究^[2]。枯草芽孢杆菌表达体系广泛应用于酶制剂的工业生产,与大肠杆菌表达体系相比具有许多优点,但含有外源基因的自主复制载体在枯草杆菌宿主中不易稳定,克服这个缺点的方法之一是将外源基因整合到染色体上。作者构建了含有外源耐热乳糖酶基因 *bgaB* 的枯草杆菌整合载体,利用这一载体将 *bgaB* 基因整合到枯草杆菌宿主染色体上并实现了该基因的表达。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌宿主菌 TG1(*supE* *hsd* Δ 5 *thi* Δ (*lac-proAB*) *F'*[*traD*36 *proAB*⁺ *lacI*^a *lacZ* Δ M15]) 和 DH5 α (*supE*44 *lacU*169 (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hds*R17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*-1 *relA*1),由作者所在实验室保存。枯草芽孢杆菌宿主菌 *B. subtilis* BD170(*thr*-5 *trpC*2)^[3] 和整合载体 pSAS 144^[4] 以及大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒 pMA5 由中科院上海植物生理研究所杨晟副研究员惠赠。穿梭质粒 pMA5-*bgaB* 由作者所在实验室构建并保存。

1.1.2 工具酶和试剂 各种限制性内切酶、小牛肠碱性磷酸酶(CIP)、RNA 酶和 T4 DNA 连接酶均购自 Takara 公司;氯霉素购自 Sigma 公司;DNA 胶回收试剂盒购自华舜公司;DNA 相对分子质量标准 DL2000 购自 Takara 公司;MBI 1 kb DNA ladder 相对分子质量标准购自生工(Sangon);其余试剂为国产分析纯。

1.1.3 培养基 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌宿主菌培养采用 LB(Luria-Bertani)培养基,整合质粒转化大肠杆菌所得重组菌的选择采用 LB+Ampicillin (100 μ g/mL)培养基,整合质粒转化枯草芽孢杆菌 BD170 所得整合菌株转化子的选择采用 LB+chloramphenicol(5 μ g/mL)培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒 DNA 操作技术 DNA 的提取、纯化、酶切、电泳、连接、PCR 扩增等操作见文献^[5],胶回收方法按照试剂盒产品说明书。

1.2.2 DNA 的转化 质粒 DNA 的大肠杆菌转化方法见文献^[5],整合质粒的枯草芽孢杆菌转化方法见文献^[6]。

1.2.3 枯草芽孢杆菌的染色体 DNA 提取 BD170 整合菌株的染色体 DNA 提取方法见文献^[7]。

1.2.4 酶活测定方法 采用修改的 Gist-Brocades 法^[8],酶反应温度为 55℃,酶活单位定义为 1 min 内水解底物 ONPG 产生 ONP 的微摩尔数。

1.2.5 蛋白质含量的测定 采用考马斯亮蓝法,以牛血清白蛋白 BSA 为标准。

2 结果与讨论

2.1 整合载体 pSAS144-*bgaB* 的构建

整合质粒 pSAS144 上含有 *B. subtilis* 染色体 DNA 的位点专一性重组区 *dif*,该区位于 *B. subtilis* 染色体的 166°位置附近,即从 *B. subtilis* 基因组序列的 1 941 798~1 941 825 范围,共 28 bp。该区的功能是在细菌细胞染色体复制之后,到分配至子代细胞之前的这段时间里,将染色体复制和重组所形成的二聚体或多聚体进行拆分,以保证染色体以单拷贝方式分配到子代细胞之中。这一过程需要重组酶 *codV* 和 *ripX* 的参与,而不需要 *recA* 的参与,因此发生的是位点专一性重组而非同源重组^[4]。含有该区序列的整合载体可以与 *B. subtilis* 宿主菌发生位点专一性重组,并携带外源基因整合到细菌染色体上。另外此质粒还含有氯霉素抗性基因 *cat*,当它整合到 *B. subtilis* 染色体上后,可表达氯霉素乙酰转移酶,使得原本为氯霉素敏感的宿主菌在发生整合以后具有氯霉素抗性。

穿梭质粒 pMA5 中包含有 *Hpa* II 启动子,将耐热乳糖酶基因 *bgaB* 的完整编码序列通过 *Nde*I 和 *Bam*HI 两个酶切位点克隆到 pMA5 中 *Hpa* II 启动子及其核糖体结合位点的下游,构成质粒 pMA5-*bgaB*。在 *Hpa* II 启动子上游有 *Bgl*III 酶切位点,它与 *Bam*HI 酶切位点能产生互补的对合末端。整合载体 pSAS144 中包含有一个 *Bam*HI 酶切位点,单酶切后可与 pMA5-*bgaB* 的 *Bgl*III-*Bam*HI 酶切片断连接。

将 pMA5-*bgaB* 用 *Bgl*III 和 *Bam*HI 双酶切后胶回收,得到含有完整 *bgaB* 基因及其表达调控序列的片段;将 pSAS144 用 *Bam*HI 单酶切后经 CIP 酶去磷酸化并胶回收,这两个片断用 T4 DNA 连接酶连接。连接液转化大肠杆菌宿主菌 TG1,涂布含有 100 μ g/mL Ampicillin 的 LB 平板,挑转化子抽提质粒,用酶切电泳方法和 PCR 法检验,质粒构建方案见图 1。

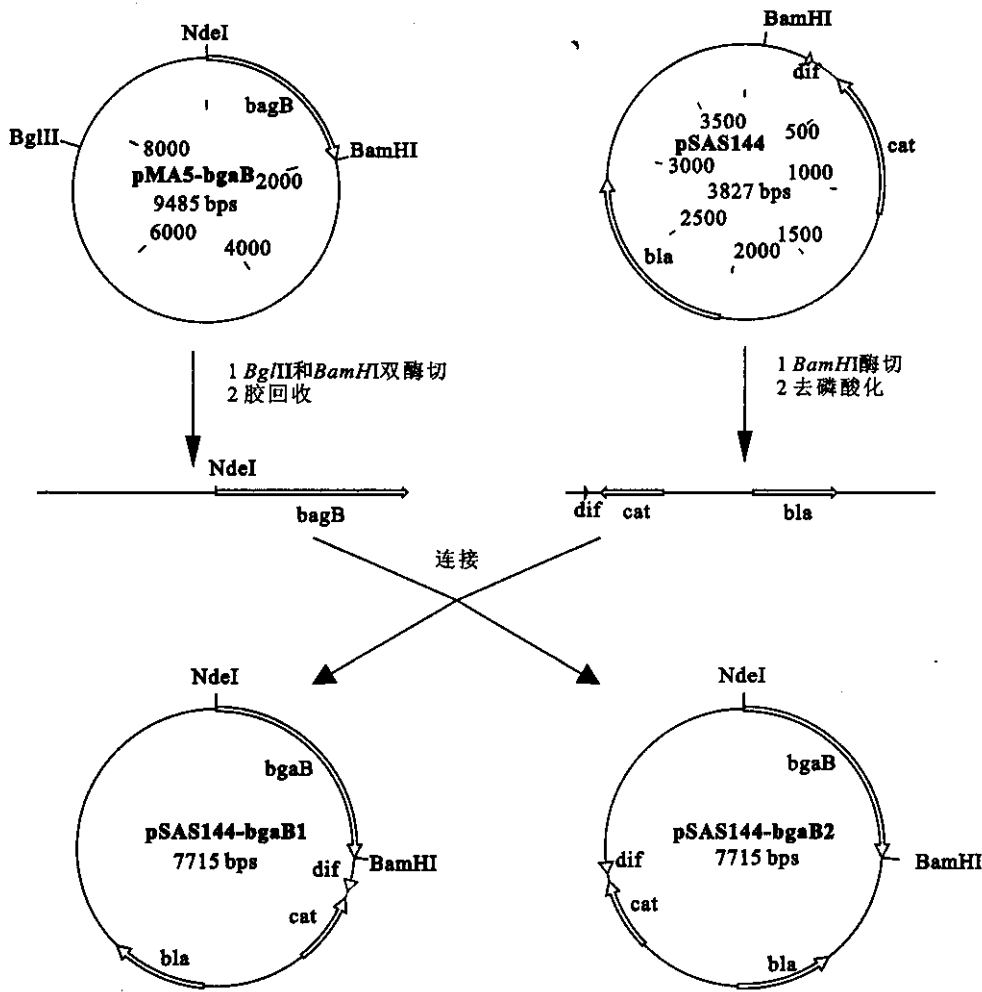


图 1 整合质粒 pSAS144-bgaB 的构建

Fig. 1 Construction of integrative plasmid pSAS144-bgaB

从转化平板上挑取的转化子,经质粒抽提和单酶切电泳鉴定后,初步确定为所要的重组质粒,然后用 *bgaB* 基因的上下游引物 (5'-CGGAATTCATGAATGTGTTATCCTC-3' 和 5'-CGCTGCAGCTAAACCTTCCCGGCTTC-3') 对该质粒进行 PCR 鉴定,扩增出一条 2 kb 左右的条带,证明重组整合质粒 pSAS144-bgaB 中携带 *bgaB* 基因,结果见图 2. 整合质粒 pSAS144-bgaB 中包含启动子和 *bgaB* 基因的片段插入方向有两种,将上述经 PCR 检验得到的整合质粒用 *Bam*HI 和 *Sac*I 双酶切后电泳,得到一条约 1.1 kb 和 6.6 kb 左右的条带,证明该整合质粒为 pSAS144-bgaB1,结果见图 3.

2.2 整合质粒 pSAS144-bgaB 的枯草杆菌转化和整合

将所得整合质粒 pSAS144-bgaB 转化大肠杆菌宿主菌 DH5 α 以扩增该整合载体.在 LB+Ampicillin(100 μ g/mL)选择性平板上得到转化子后,大量提取该质粒.将质粒 pSAS144-bgaB 转化感受态的 *B. subtilis* BD170,在含有 5 μ g/mL 氯霉素的 LB

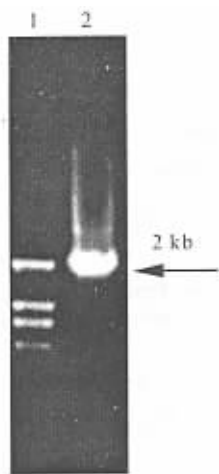
平板上筛选转化子. *B. subtilis* BD170 宿主菌为氯霉素敏感菌,在含有 5 μ g/mL 氯霉素的 LB 平板上不能生长;整合质粒 pSAS144-bgaB 与出发质粒 pSAS144 同样不含有 *B. subtilis* 可辨认的质粒复制起点,在宿主菌中无法完成自主复制,只有与宿主染色体发生整合才能得以保留.该整合质粒依靠 *dif* 位点专一性重组区与宿主菌染色体发生整合,整合质粒中携带的氯霉素抗性基因 *cat* 和耐热乳糖酶基因 *bgaB* 连同其表达调控序列被插入 *B. subtilis* BD170 染色体 DNA 中,因而整合菌株获得氯霉素抗性,并可表达耐热乳糖酶.整合机理见图 4.能够在氯霉素平板上生长的菌落均为发生了染色体整合的菌株所形成.

从上述枯草杆菌整合型转换子平板上随机挑取 2 个转化子,抽提染色体 DNA 并用上述的 *bgaB* 引物对其作 PCR 鉴定,同时做整合菌的菌落 PCR 鉴定以及 BD170 宿主菌染色体 DNA 的 PCR 阴性对照,证明宿主菌 BD170 基因组不含 *bgaB* 基因,这点也通过核对 *B. subtilis* 基因组序列得以证

实^[9];而从整合菌株 BD170/pSAS144-*bgaB* 染色体 DNA 扩增出 2 kb 左右的条带,证明其中确实含有 *bgaB* 基因,结果见图 5。

2.3 整合菌株的发酵和酶活的测定

整合菌株 BD170/pSAS144-*bgaB* 中 *bgaB* 基因的启动子为非诱导型。将此菌用 LB 淀粉培养基在 37 °C、200 r/min 培养 18 h,离心收集细胞后用超声波破碎,测定酶活为 0.20 U/mL,比酶活为 0.32 U/mg 蛋白质,与出发菌株 *B. stearothermophilus* 产酶水平 0.145 U/mg 蛋白质相比^[2],比酶活提高了 1.1 倍。SDS-PAGE 电泳显示出在相对分子质量为 70 000 左右有一条弱带,为重组菌表达的耐热乳糖酶。

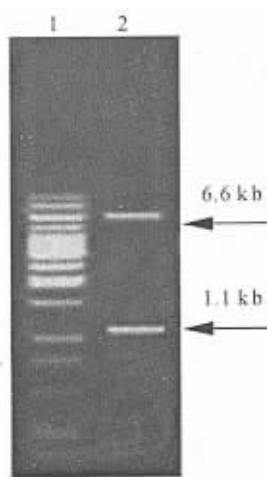


1. Takara DNA Marker DL 2000.

2. 从 pSAS144-*bgaB* 扩增的 *bgaB* 基因条带

图 2 整合载体 pSAS144-*bgaB* 的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of integrative plasmid pSAS144-*bgaB*



1. MBI GeneRuler 1 kb DNA Ladder

2. 质粒 pSAS144-*bgaB* 双酶切条带

图 3 整合载体 pSAS144-*bgaB* 的双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of integrative plasmid pSAS144-

质粒经 *Bam*HI 和 *Sac*I 酶切

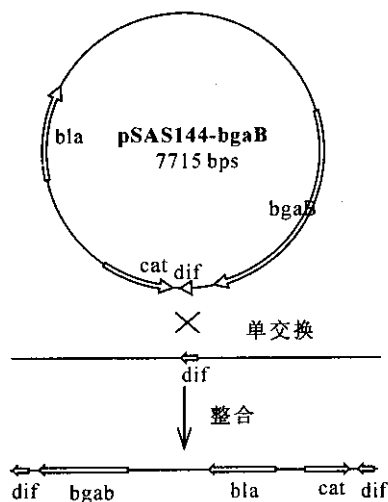
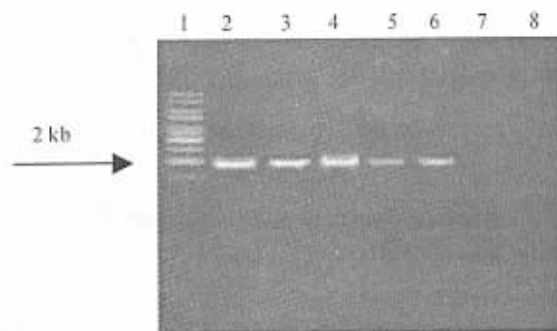


图 4 整合质粒 pSAS144-*bgaB* 与宿主细胞染色体的整合

Fig. 4 Integration of pSAS144-*bgaB* into host chromosome



1: MBI GeneRuler 1 kb DNA ladder

2: 从质粒 pSAS144-*bgaB* 扩增条带(阳性对照)

3&4: 从 BD170/*bgaB* 染色体 DNA 扩增的 *bgaB* 基因条带

5&6: 从 BD170/pSAS144-*bgaB* 菌落 PCR 扩增的 *bgaB* 基因条带

7&8: 宿主菌 *B. subtilis* BD170 的 PCR 阴性对照

图 5 整合菌 BD170/pSAS144-*bgaB* 的 PCR 鉴定

Fig. 5 Verification of BD170/pSAS144-*bgaB* by PCR

3 结 论

构建了位点专一性重组整合载体 pSAS144-*bgaB*,将耐热乳糖酶基因 *bgaB* 及其表达调控序列成功地整合到枯草芽胞杆菌宿主菌 BD170 中,得到的整合菌株具有耐热乳糖酶活力,比酶活约为出发菌株的 2 倍。但酶活较游离载体 pMA5-*bgaB* 低,这是因为目的基因在染色体上拷贝数低所致。通过在整合菌株培养基中增加抗生素浓度的办法,可在一定程度上增加目的基因在染色体上的拷贝数^[10],从而进一步提高重组菌酶活。

(下转第 14 页)

参考文献：

[1]章克昌. 发展燃料酒精的建议[J]. 中国工程科学,2000,2(6):89—93.

[2]谢林,张禾. 美国考察漫谈[J]. 酿酒科技,2000,1:85—89.

[3]蔡定域. 酿酒工业分析手册[M]. 北京:轻工业出版社,1988.

[4]诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994.

[5]北京大学生物系. 生物化学实验指导[M]. 北京:人民教育出版社,1979.

[6]Thomas K C. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very high gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Appl Environ Microbiol**,1994,60:1519—1524.

[7]Thomas K C, Ingledew W M. Fuel alcohol production;effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mash[es][J]. **Appl Environ Microbiol**, 1990,56:2046—2050.

[8]Thomas K C, Hynes S H, Ingledew W M. Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology;effect of sugar concentration and temperature[J]. **Appl Biochem and Biotechnol**, 1993,43:211—226.

[9]黄宇彤,伍松陵,杜连祥,等. 玉米酒精超高浓度发酵工艺条件的优化[J]. 食品工业科技,2002,23(8):67—70.

[10]秦成国. 玉米粉高浓度酒精发酵的研究[J]. 酿酒科技,1997,4:52—54.

[11]戚以政,汪叔雄. 生化反应动力学与反应器[M]. 北京:化学工业出版社,1999.

[12]S Aiba,M Shoda,M Nagatani. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1968, 10(6):845—864.

[13]山根恒夫. 生物反应工学[M]. 东京:产业图书株式会社, 1980.

[14]Michael L Shuler,Fikret Kargi. Bioprocess Engineering(second edition)[M]. Englewood Cliffs N J: Prentice Hall PTR Prentice-Hall Inc, 2002.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 4 页)

参考文献：

[1] Hirata, Negoro, Okada. Molecular basis of isozyme formation of beta-galactosidase in *Bacillus stearothermophilus*: isolation of two beta-galactosidase genes, *bgaA* and *bgaB*[J]. **J Bacteriol**,1984, 160: 9—14.

[2] 陈卫,葛佳佳,张灏,等. 半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中过量表达及 IPTG 诱导条件[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(5): 492—495.

[3] Quirk PG, Dunkley EA , Lee P, *et al.* Identification of a putative *Bacillus subtilis rho* gene[J]. **J Bacteriol**, 1993, 175(3):647—654.

[4] Sciochetti SA, Piggotpj, Blakely GW. Identification and characterization of the *dif* site from *Bacillus subtilis*[J]. **J Bacteriol**,2001, 183:1058—1068.

[5] Josephs, David WR. Molecular cloning :A Laboratory Mannual(3rd Edition)[M]. New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

[6] Yasbin RE, Wilson GA , Young FE. Transformation and transfection in lysogenic strains of *Bacillus subtilis*: Evidence for selective induction of prophage in competent cells[J]. **J Bacteriol**,1975,121:296—304.

[7] Colinrh,Simon MC. Molecular Biological Methods for *Bacillus*[M]. England:John Wiley & Sons Ltd,1990.

[8] 施特尔马赫 B. 酶的测定方法[M]. 钱嘉译. 北京:中国轻工业出版社,1992.

[9] Kunst F. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*[J]. **Nature**,1997,390 (6657): 249—256.

[10] 王磊,马平,唐上华. 碱性蛋白酶基因在 *Bacillus licheniformis*2709 中的整合和扩增[J]. 工业微生物,1998,28(2):4—9.

(责任编辑:李春丽)