

# 枯草芽孢杆菌麦芽糖诱导型启动子 Pglv-M1 的改造<sup>\*</sup>

程 媛,汪桂萍,孙 畅,米慧芝,韦宇拓<sup>\*\*</sup>

(广西大学生命科学与技术学院,广西南宁 530005)

**摘要:**通过定点突变对麦芽糖诱导型启动子 Pglv-M1 进行改造,提高启动子启动能力。分析 Pglv-M1 的 Sextama-35 区与 Pri-bmow-10 区,通过对这些区域模拟随机突变,软件打分后获得最高分的新片段。将新启动子与载体 pHCMC04-*sva* 连接,并在枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 1A857 中诱导表达,每 12 h 取粗酶液进行酶活测定。研究结果表明:除突变启动子 Pglv-35 以外,其余突变体启动效果均有所下降,有突变体构成的表达载体 Pglv-35-pHCMC04-*sva* 诱导表达后,得到的单位粗酶活力最高点出现在 36 h 处,较突变前提高 1.31 倍。Pglv-M1 作为诱导型启动子 *Pglv* 的改造产物,其各个区域的相互影响较为紧密。通过对启动子关键区域单独或同时突变,仅获得一组启动能力有所提高的启动子 Pglv-35,这为今后针对启动子的思考、研究方向提供参考。

**关键词:**枯草芽孢杆菌 *Pglv* 启动子 改造

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2019)02-0228-05

## 0 引言

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种十分重要的工业生产菌株,具有非致病性、遗传背景清晰、易分离培养、分泌蛋白能力强等优点,是表达异源蛋白的理想宿主。实现外源蛋白的高效表达影响因素有很多,其中高效可控的启动子是关键因素之一。根据诱导机制,启动子可分为组成型启动子、诱导型启动子、自诱导启动子和时期特异性启动子<sup>[1]</sup>。因此研究启动子的作用机理与各区域的协调作用,获得新的高效启动子十分关键。对于典型的原核启动子,其保守区域特征有转录起始位点(TSS)、Sextama-35 区

(TTGACA)、Pri-bmow-10 区(TATAAT)<sup>[2]</sup>,其中, Sextama-35 区和 Pri-bmow-10 区序列之间的间隔距离通常为 16~18 bp。枯草芽孢杆菌表达载体常用的启动子按照其诱导的方式可以分为组成型和诱导型启动子<sup>[3]</sup>。已经报道的枯草芽孢杆菌启动子有 Papre、P43、PHpa II、Plapsd 等<sup>[4]</sup>。Phan 等<sup>[5]</sup>在 IPTG 诱导型启动子 Pspac 的基础上进行调控元件的优化,获得强启动子 Pgrac100。目前常见的诱导型启动子是麦芽糖诱导型启动子 *Pglv*,该启动子上含有一个能与葡萄糖代谢蛋白 CcpA 结合进而抑制启动子表达的 *Cre* 序列, Yang 等<sup>[6]</sup>将 *Cre* 序列上的 CG 碱基突变为 AT 后,得到新的启动子 Pglv-M1 使

<sup>\*</sup> 广西科学研究与技术开发计划项目(16449-01)资助。

### 【作者简介】

程 媛(1994—),女,硕士研究生,主要从事分子酶工程研究。

### 【\*\*通信作者】

韦宇拓(1971—),男,教授,主要从事发酵与酶工程研究,E-mail: weiyutuo@gxu.edu.cn。

### 【引用文本】

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20190506.002

程媛,汪桂萍,孙畅,等. 枯草芽孢杆菌麦芽糖诱导型启动子 Pglv-M1 的改造[J]. 广西科学,2019,26(2):228-232.

CHENG Y, WANG G P, SUN C, et al. Modification of *Bacillus subtilis* maltose inducible promoter Pglv-M1 [J]. Guangxi Sciences, 2019, 26(2): 228-232.

葡萄糖的抑制作用大大降低。此后, Yang 等<sup>[6]</sup>还尝试通过突变启动子上的关键区域再次提高其启动能力, 以获得更加高效的、可供工业化应用的启动子。本研究从实验室保藏的枯草芽孢杆菌中克隆到一个 *Pglv* 基因, 并将其与实验室现有载体 pHCMC04-*sva* 连接, 通过一系列定点突变获得连接有新的启动子的载体, 转入枯草芽孢杆菌诱导表达后取粗酶液测酶活力, 对新启动子的启动能力进行初步分析。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

菌株: 枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 1A857、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  由本实验室保藏。

试剂: PrimeSTAR<sup>TM</sup> HS DNA 聚合酶、dNTP、 $\lambda$ /*Hind* III DNA Marker、In-Fusion HD Cloning Kit 等均购买于 TaKaRa 公司; 质粒 DNA 小量提取试剂盒、胶回收试剂盒均购买于 BioFlux 公司; SDS、丙烯酰胺、TEMED、过硫酸铵、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、柠檬酸等试剂购买于上海生工生物工程公司, 其他试剂为国产分析纯。

仪器: PCR 仪 (Biometra), 离心机 (Eppendorf Centrifuge 5415D), 恒温培养箱 (Binder), 恒温摇床 (ZHWHY-211B), 超净工作台 (CLEAN BENCH ZHJH-C1109B)、恒温水浴锅 (SHEL LAB W20M-2)、酶标仪 (U Quamt TM)、扫描仪 (Bio-RAD GS 800)、SDS-PAGE 电泳系统 (Amershan Biosciences)、凝胶成像系统 (SYNGENE PTC-200) 等。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 重组质粒 pHCMC04-*sva*-Pglv 的构建

设计引物, 上游引物 P1: 5'-CAGTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTCGGCATGTATCCGAA-TCGTACAAA-3', 下游引物 P2: 5'-CATGGATCGGATCGGATCGGATCCACGACCTCCTTGATAA-ATTTTACA-3'。以枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* WB600 为模板, 通过 PCR 获得 *Pglv* 的克隆序列。PCR 反应程序: 98 $^{\circ}$ C 10 min; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 69 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

设计引物, 上游引物 PH1: 5'-GGATCCGATCGATCCGATCCATGAAACAACAA-3', 下游引物 PH2: 5'-GAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCACTGGCCGTCGTTT-3'。以实验室保存的 pHCMC04-*sva* 为模板, 通过 PCR 获得载体 pHCMC04-*sva* 的克隆序列。PCR 反应程序: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 64 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 7 min 36 s, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 得到的两个片段分别进行胶回收处理, 处理后

使用 In-Fusion HD Cloning Kit 进行连接, 连接体系: 5X In-Fusion HD Enzyme Premix 2  $\mu$ L, *Pglv* 片段 2  $\mu$ L, pHCMC04-*sva* 片段 2  $\mu$ L, dH<sub>2</sub>O 4  $\mu$ L。将反应体系置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 然后 50 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 后置于冰上 2 min, 即可得到连接产物 pHCMC04-*sva*-Pglv。将连接产物转入大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 转入成功后从 *E. coli* DH5 $\alpha$  中提取重组质粒 pHCMC04-*sva*-Pglv。

#### 1.2.2 改造获得质粒 pHCMC04-*sva*-Pglv-35

利用引物, 上游引物 Cre-1: 5'-GTAAACGT-TATCAAGGAGGTCGT G-3', 下游引物 Cre-2: 5'-GATAACGTTTACAATTCCATTTAT-3'。以重组质粒 pHCMC04-*sva*-Pglv 为模板, 进行 *Cre* 序列的突变, 获得连接有 Pglv-M1 的序列。反应程序: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 56.5 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 8 min, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 得到的片段经过胶回收纯化后, 转入大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 转化成功后提取质粒即可获得质粒 pHCMC04-*sva*-Pglv-M1。

通过软件分析找到启动子 Pglv-M1 的关键区域 Sextama-35 区和 Pri-bmow-10 区, 模拟在这两处的随机突变, 通过软件分析得到得分较高的突变体, 最终确定 Sextama-35 区的一处突变, 即将 Pglv-M1 序列上的 TTGTAA 突变为 TTGACA。设计引物, 上游引物 35-1: 5'-GCT ATCTCATGGTATAAATGGAATTGACAAATTTA-3'; 下游引物 35-2: 5'-CACGACCTCCTTGATAAATTTGTCAATTCC-ATTTA-3'。以重组质粒 pHCMC04-*sva*-Pglv-M1 为模板, 通过 PCR 进行定点突变, 反应程序: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 64 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 8 min, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物胶回收后转入大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 转入成功后从 *E. coli* DH5 $\alpha$  中提取改造过的质粒 pHCMC04-*sva*-Pglv-35。

#### 1.2.3 高温淀粉酶 *sva* 粗酶活力的测定分析

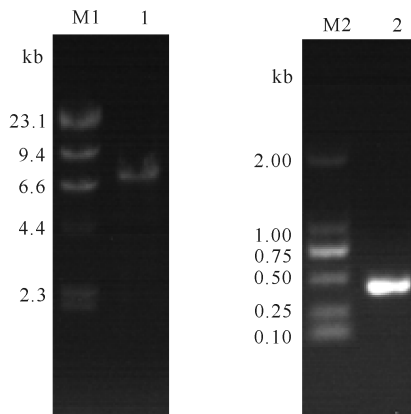
用化学转化的方法将重组质粒 pHCMC04-*sva*-Pglv-M1 和 pHCMC04-*sva*-Pglv-35 分别转入宿主菌 *B. subtilis* 1A857, 表达后分别以 4% 的接种量接种于 50 mL 培养基中 (含 100  $\mu$ g/mL 的 Cm), 在 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床中震荡培养, 同时相同条件下培养没有转入质粒的 *B. subtilis* 1A857 作为对照。做出葡萄糖标准曲线, 并且从接种开始, 每隔 12 h 取发酵液一次, 采用 DNS 法测定发酵液粗酶酶活力。选取二者粗酶酶活力最高时间点的发酵液, 浓缩后进行 SDS-PAGE 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒构建及突变改造

#### 2.1.1 启动子及载体的克隆

以枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* WB600 为模板, 利用引物 P1、P2 克隆出 *Pglv*; 以质粒载体 pHCMC04-*sva* 为模板, 利用引物 PH1 和 PH2 克隆出 pHCMC04-*sva*, 经过琼脂糖凝胶电泳条带大小分别位于 500 bp 附近和 6.6 kb 附近(图 1)。



M1:  $\lambda$ DNA/*Hind* III DNA Mark; M2: DL2000 DNA Mark; 1: PCR product of pHCMC04-*sva*; 2: PCR product of *Pglv*

图 1 质粒载体 pHCMC04-*sva* 和 *Pglv* 启动子的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis analysis of pHCMC04-*sva* DNA and *Pglv* promoter DNA

将 PCR 产物胶回收后, 用 In-Fusion HD Cloning Kit 连接, 转入大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 提取得到重组质粒 pHCMC04-*sva*-*Pglv*, 测序结果正确, 得到该重组质粒。

#### 2.1.2 pHCMC04-*sva*-*Pglv*-35 的构建

以重组质粒 pHCMC04-*sva*-*Pglv* 为模板, Cre-1、Cre-2 为引物, 对 *Cre* 序列进行定点突变, 得到质粒 pHCMC04-*sva*-*Pglv*-M1, 启动子测序结果如图 2 所示。经过软件分析打分, *Pglv*-M1 的 Sextama-35 区为 TTGTAA, 分数为 47 分; 将其中的 TA 突变为 AC 后, 分数提高为 66 分。以 pHCMC04-*sva*-*Pglv*-M1 作为模板, 35-1、35-2 为引物对其进行定点突变, 得到 pHCMC04-*sva*-*Pglv*-35, 琼脂糖凝胶检测和测序结果完全正确(图 3), 表明 pHCMC04-*sva*-*Pglv*-35 构建成功。

## 2.2 高温淀粉酶 *sva* 粗酶活力的测定

### 2.2.1 最高粗酶活力时间的测定

由图 4 可知, 在发酵过程中, pHCMC04-*sva*-*Pglv*-M1 和 pHCMC04-*sva*-*Pglv*-35 的粗酶活力最高

点是在 36 h 处, 分别为 4.95 U/mL 和 6.32 U/mL, 经改造后的启动子构建的质粒使菌体酶活力较改造前提高 1.28 倍。

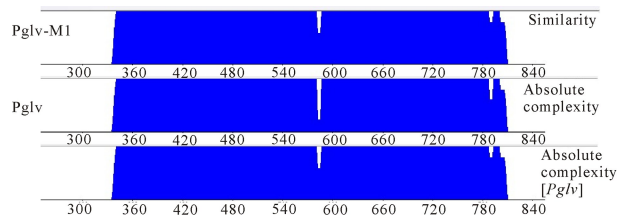


图 2 启动子测序结果比对

Fig. 2 The comparison of the promoters sequencing results

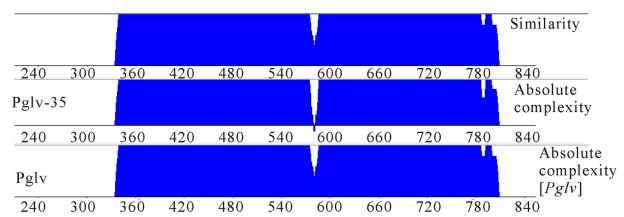


图 3 启动子测序结果比对

Fig. 3 The comparison of the promoters sequencing results

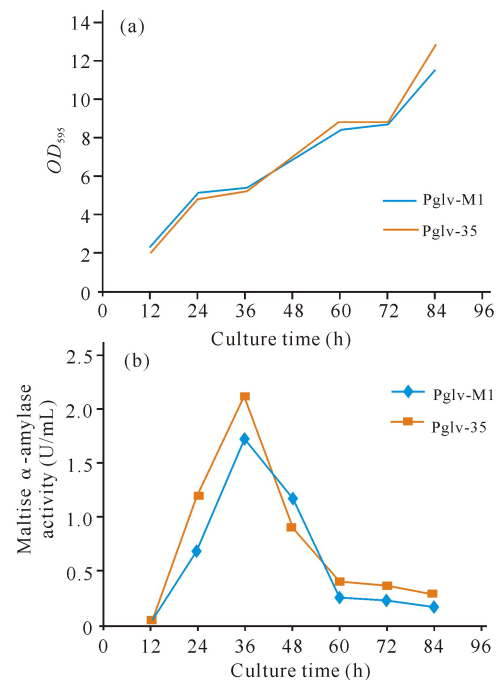


图 4 重组菌的生长曲线与不同培养时间下的粗酶活力

Fig. 4 Growth curve of recombinant strain and the enzyme activity in different incubation time

如图 5 所示, 二者的单位酶活力最高点仍出现在 36 h 处, 分别为 0.91 U/mL 和 1.19 U/mL, 经改造后的启动子构建的质粒使菌体酶活力较改造前提高 1.31 倍。

### 2.2.2 菌体分泌蛋白的确定

将分别含有重组质粒 pHCMC04-*sva*-*Pglv*-M1、

pHCMC04-*sva*-Pglv-35 的重组菌和原始菌种 *B. subtilis* 1A857 的发酵液浓缩适当的倍数后进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 6 所示, 在 55 kDa 附近有明显的条带, 与 *sva* 淀粉酶蛋白质的分子量大小一致, 说明启动子 Pglv-M1 与 Pglv-35 均成功表达了麦芽糖  $\alpha$ -淀粉酶基因。

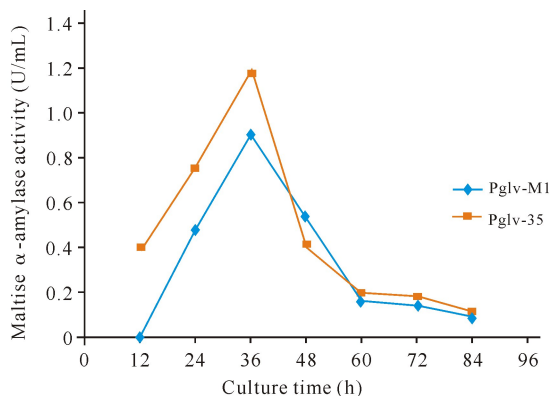
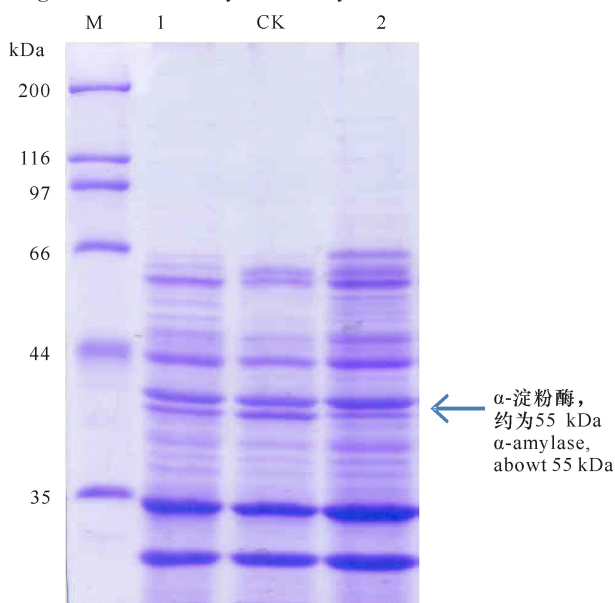


图 5 不同培养时间下重组菌的单位酶活

Fig. 5 The unit enzyme activity in different incubation time



M: Protein marker; 1: Total soluble proteins in *B. subtilis* 1A857 of pHCMC04-*sva*-Pglv-M1; 2: Total soluble proteins in *B. subtilis* 1A857 of pHCMC04-*sva*-Pglv-35; CK: Total soluble proteins in *B. subtilis* 1A857

图 6 重组菌表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 6 SDS-PAGE electrophoresis analysis of expression products for recombinant strain

### 3 讨论

枯草芽孢杆菌表达系统具有非致病性、分泌表达等优点, 比大肠杆菌表达系统更适合应用在食品医药行业<sup>[7]</sup>。缺点是枯草芽孢杆菌表达系统的基因表达能力较差。启动子作为调控基因表达的关键元件, 可在转录水平上调控目的基因表达的时机与强度<sup>[8]</sup>, 因

此得到更强的启动子十分关键。通过对启动子进行区段操作、易错 PCR、定点突变、DNA shuffling 和启动子串联<sup>[9]</sup>等改造方式, 可以提高其启动能力。改变麦芽糖启动子的碳代谢调节蛋白 CcpA 的 Cre 结合序列, 可以减弱葡萄糖代谢反馈抑制<sup>[10]</sup>, 提高转录水平。杨燕芳<sup>[11]</sup>通过串联两个启动子的关键位点, 得到较之前提高 1.2 倍和 1.6 倍的启动子。

在前人改造的基础上<sup>[6]</sup>, 本研究再次改造诱导型启动子 Pglv-M1, 通过定点分析得到可能提高其启动能力的碱基, 分别进行单次、多次的定点突变, 通过报告基因的表达情况, 分析比较启动子 Pglv-M1 改造前后启动能力的高低。通过把启动子 Sextama-35 区的 TTGTAA 序列突变为 TTGACA, 获得改造后的启动子 Pglv-35。以 pHCMC04 为表达载体, 以高温淀粉酶 *sva* 为报告基因, 并在枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 1A857 中表达, 使用 DNS 法测定每 12 h 发酵液的粗酶活力, 比较分析启动子改造前后启动能力的高低。在发酵进行到 36 h 时, pHCMC04-*sva*-Pglv-M1 和 pHCMC04-*sva*-Pglv-35 的粗酶活力最高, 分别为 4.95 U/mL 和 6.32 U/mL, 经改造后的启动子构建的质粒载体使宿主菌表达的粗酶活力较改造前提高 1.28 倍。二者的单位酶活力最高点仍出现在 36 h 处, 分别为 0.91 U/mL 和 1.19 U/mL, 经改造后的启动子构建的质粒使菌体酶活力较改造前提高 1.31 倍, 成功实现了启动子 *Pglv* 的进一步正向改造, 表明将启动子的核心保守序列进行突变, 可能会带来正向影响。

### 参考文献

- [1] 熊海涛, 韦宇拓. 枯草芽孢杆菌表达系统及其启动子的研究进展[J]. 广西科学, 2018, 25(3): 233-241.
- [2] BRON S, MEIJER W, HOLSAPPEL S, et al. Plasmid instability and molecular cloning in *Bacillus subtilis* [J]. Research in Microbiology, 1991, 142(7/8): 875-883.
- [3] 张晓舟. 枯草杆菌新型表达系统和遗传操作体系的建立及应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [4] 王金斌, 陈大超, 李文, 等. 食品级枯草芽孢杆菌表达系统的最新研究进展[J]. 上海农业学报, 2014, 30(1): 115-120.
- [5] PHAN T T P, NGUYEN H D, SCHUMANN W. Development of a strong intracellular expression system for *Bacillus subtilis* by optimizing promoter elements [J]. Journal of Biotechnology, 2012, 157(1): 167-172.
- [6] YANG M M, ZHANG W W, CHEN Y L, et al. Development of a *Bacillus subtilis*, expression system using the improved Pglv promoter [J]. Microbial Cell

- Factories, 2010,9:55.
- [7] RAO B, FAN J Y, SUN J A, et al. An auto-inducible expression system based on the RhlI-RhlR quorum-sensing regulon for recombinant protein production in *E. coli* [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2016, 21(1):160-168.
- [8] 王靖宇,陈涛,班睿,等. 蜡样芽孢杆菌 ATCC14579 核黄素操纵子的克隆及在枯草芽孢杆菌中的表达[J]. 生物加工过程,2004,2(2):68-73.
- [9] 孙先花,苏小运. 丝状真菌启动子的基因工程改造进展[J]. 广西科学,2017,24(1):73-76.
- [10] 张云雁,杨明明,周煌凯,等. 麦芽糖诱导耐碱性木聚糖酶基因在枯草芽孢杆菌中的表达[J]. 西北农业学报, 2011, 20(1):14-17,23.
- [11] 杨燕芳. 枯草芽孢杆菌启动子的克隆及功能分析[D]. 南宁:广西大学,2017.

## Modification of *Bacillus subtilis* Maltose Inducible Promoter Pglv-M1

CHENG Yuan, WANG Guiping, SUN Chang, MI Huizhi, WEI Yutuo

(College of Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China)

**Abstract:** The maltose-inducible promoter Pglv-M1 was modified by site-directed mutagenesis to improve the start-up ability of the promoter. The Sextama-35 and Pri-bmow-10 areas of Pglv-M1 were analyzed, and by simulating random mutations in these areas, the software scored the new fragments with the highest score. The new promoter was ligated to the vector pHCMC04-*sva*, and express in *Bacillus subtilis* 1A857, and the enzyme activity was measured every 12 h. The results showed that except for the mutant promoter Pglv-35, the start-up effect of the other mutants reduced. After the expression vector Pglv-35-pHCMC04-*sva* was expressed by the mutant, the highest activity of the crude enzyme per unit appeared at 36 h, which was 1.31 times higher than that of the mutant before the mutation. As a modified product of the inducible promoter *Pglv*, Pglv-M1 has a relatively close interaction with each other. By separately or simultaneously mutating the key regions of the promoter, only one promoter Pglv-35 with improved starting ability is obtained, which provides a reference for thinking and research directions of the promoter in the future.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, *Pglv*, promoter, modification

责任编辑:陆 雁



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxkx@gxas.cn

投稿系统网址:<http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>