

慢分泌突变基因的构建及其应用研究

戚蓓静 吴自荣 陈阜东 王林发

(华东师范大学生物系分子生物学研究室, 上海)

利用同阅读框插入突变方法, 在编码枯草杆菌中性蛋白酶基因(*nprE*)的前肽部分插入了一段约300bp的人体cDNA顺序。此顺序对*nprE*基因的体内转译及基因产物的加工, 折叠无明显影响, 但使蛋白质分泌速率下降了10倍以上。本文还报道应用此慢分泌突变基因通过诱变得到了影响枯草杆菌蛋白酶产量的温度敏感突变体, 以及对比突变体初步鉴定的结果。

关键词 枯草杆菌; 蛋白质分泌; 中性蛋白酶; 前肽

作为遗传工程的一个活跃分支, 蛋白质分泌的研究及应用在近几年中取得了很大进展。枯草杆菌由于其能够分泌大量工业、食品用酶的特性, 在历史上一直被用作生产蛋白酶, 淀粉酶、糖化酶等酶制剂的生产用菌^[1]。但是, 迄今为止, 尚未见到有关研究枯草杆菌蛋白质分泌机制的系统报道。我们选择了枯草杆菌中性蛋白酶基因 *nprE* 作为研究蛋白质分泌的模型基因。这是因为: (1) 枯草杆菌蛋白质分泌系统发达, 分泌产物能直接进入培养液; (2) 中性蛋白酶作指示酶很容易被检测; (3) 最重要的是 *nprE* 基因在信号肽与成熟酶分子之间还编码一段长达 194 个氨基酸残基的前肽(Pro-peptide)^[2]。前肽的功能尚不十分清楚, 可能与酶分子分泌以后的折叠有关, 但与酶活力无直接关系^[3]。这就使我们有可能在此前肽区域通过DNA重组手段插入一定的外源DNA顺序, 继而研究这些在非信号肽区插入的DNA顺序对蛋白质分泌的影响。我们的目标是寻找能使蛋白质分泌速率下降, 但对蛋白质折叠, 加工无影响的“分泌衰减顺序”(Secretion attenuating sequence), 并以此构建慢分泌突变基因。然后

通过诱变或鸟枪克隆方法, 进一步研究与蛋白质分泌速率有关的组成部分及其作用机制。

材料和方法

(一) 材料

除特殊提到以外, 所有分子生物学试剂均为华美公司产品。所有菌种及质粒来源详见有关参考文献^[5,6,9]。培养基为Difco产品。兔抗NprE抗体由加州大学Doi教授提供。其他Western blot试剂为Bio-Rad产品。卡那霉素由上海药检所提供。

(二) 方法

1. 一般DNA方法: 除特别提到外, DNA纯化、酶切、连接等方法均按Maniatis等^[4]方法进行。

2. 枯草杆菌质粒DNA转化: 参照Wang等^[5]方法。

3. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及Western blot: 参照Wang等^[6]方法。具

本文于1990年8月3日收到。

本文为国家自然科学基金资助项目。朱霖, 古小文参加部分工作, 一并致谢。

中所用的 Blocking 缓冲液为含有 1% 脱脂奶粉的 PBS 缓冲液。碱性磷酸酯酶显色参照 Bio-Rad 试剂盒所附步骤进行。

4. 中性蛋白酶活性测定方法: (1) 半定量平板测定法: 用 10 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 5 mmol/L CaCl₂ 缓冲液制备含有 1% 脱脂奶粉和 1% 琼脂糖的平板, 在平板上放置直径为 5 mm 的滤纸片, 然后把含有蛋白酶的样品 (1—20 μl) 点到滤纸片上, 37℃ 保温 5—20 h。根据平板上透明圈的大小算出蛋白酶的相对含量。(2) 比色法: 参照 Wang 等^[6]的方法。

5. 诱变及突变体的筛选: 参照 Miller^[7]的方法。用浓度为 3% 的甲基硫酸乙酯 (EMS) 处理菌株 DB403 (pEU-3), 振荡 30 min, 在含有 5 μg/ml 卡那霉素和 1% 脱脂奶粉的 SG 平板上挑选透明圈大的菌落, 同时点种两块与上述相同的 SG 平板, 分别置于 30℃ 和 46℃ 培养过夜, 挑选温度敏感突变体, 即与 30℃ 下培养的平板比较, 在 46℃ 下生长菌落较小而透明圈大的菌落。

6. 枯草杆菌质粒 DNA 的消除: 参照 Kawamura 等^[8]方法, 通过加热去除质粒。

结 果

(一) 慢分泌突变基因的构建

如图 1 所示, 把带有中性蛋白酶基因 nprE 的原始质粒 pEU-1 (即 Wang 等^[6]报道的 pWL267) 上的 nprE 前肽编码区的单一 Fsp I 切点通过 Linker 转换成单一的 BamH I 切点, 形成质粒 pEU-2。然后用 BamH I 和 Hind III 双切去除前肽中的 96 bp 片段, 取而代之插入一段约 300 bp 的人体 cDNA 片段 (BamH I - Hind III 限制片段), 由此得到慢分泌突变基因 nprEh300

及重组质粒 pEU-3。nprEh300 基因中的阅读框仍与野生型的 nprE 相同。所以, 理论上讲这一插入顺序不会影响重组突变基因的转译。

(二) 慢分泌突变基因 nprEh300 在枯草杆菌 DB403 中的表达

用于本研究的 DB403 菌株是 Wang 等^[6]最近构建成功的胞外蛋白酶三缺突变体 (trpC 2, ΔnprE1, ΔaprE1, Δepre1)。与以往类似的菌株不同, DB403 染色体上的 3 个外分泌蛋白酶基因不但其活性部位被破坏, 而且其启动子及信号肽部分也被删除。这样就降低了枯草杆菌自身分泌蛋白酶的表达。从而使更多的“分泌通道” (Secretion channel) 可用于外源蛋白质的分泌^[9]。

我们用转化方法^[5]把 pEU-1 和 pEU-3 分别导入 DB403 形成菌株 DB403 (pEU-1) 和 DB403 (pEU-3)。然后用这两株菌接种 10 ml 产孢子培养基 2 × SG^[5], 37℃ 培养至 T₁ 期 (即孢子开始分化后 3 h)。培养终止后, 离心把培养液分成上清液和细胞沉淀, 分别测定这两部分蛋白酶含量。图 2 为利用平板法比较 DB403 (pEU-1) 和 DB403 (pEU-3) 产蛋白酶的结果。图中透明圈的大小清楚地显示, 前者的酶产量要比后者高出 10 倍以上。

为了进一步研究造成这一显著差异的原因, 我们应用 Western blot 对这两个菌株细胞内外的基因产物量加以分析比较。结果如图 3 所示。

在相同量 (50 μl) 的培养液中, DB403 (pEU-1) 所表达的中性蛋白酶, 95% 以上存在于细胞外的培养液中, 而 DB403 (pEU-3) 所产生的中性蛋白酶只有约 5—10% 分泌到胞外的培养液中。从图中也可看出, 存在于细胞内的 nprEh300 产物, 即 Pre-Pro(h300)-NprE (样品 2) 要比相应

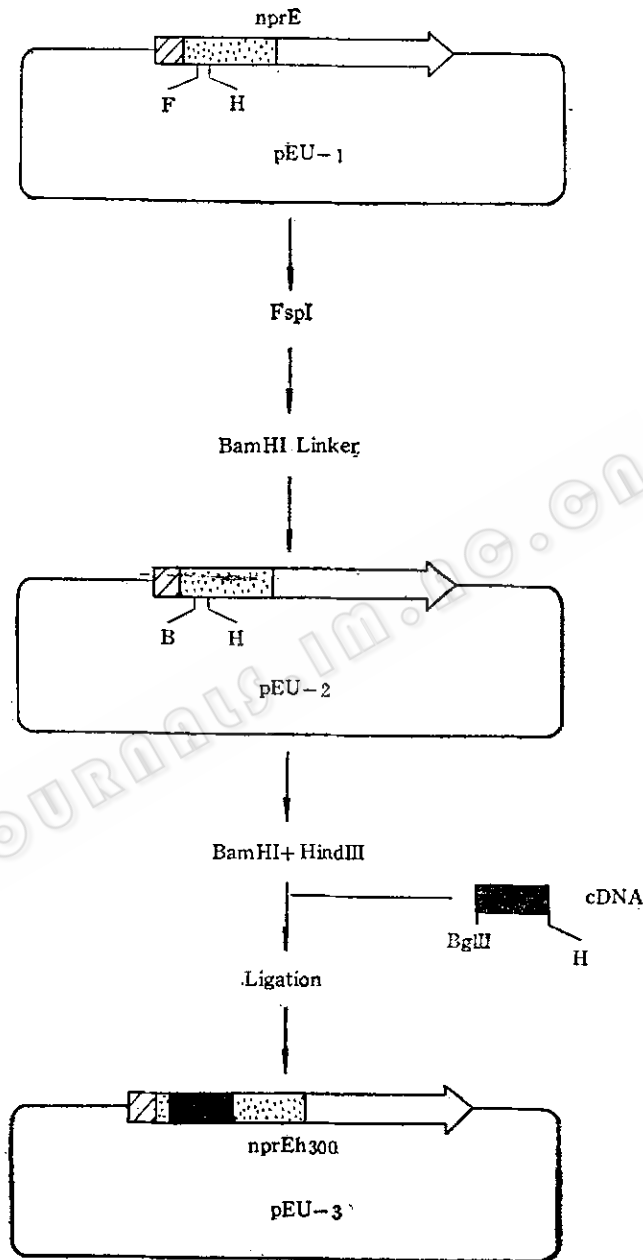


图 1 慢分泌突变基因nprEh300及重组质粒 pEU-3 的构建

Fig.1 Construction of recombinant plasmid pEU-3 and slow-secreting mutant gene nprEh300

图中斜线部分为信号肽, 点阵部分为前肽, 空心部分为成熟酶, 实心部分为人体cDNA

The signal peptide coding region is hatched in the figure pro-peptide dotted. The open area represents mature enzyme while the solid region indicates human cDNA sequence, Restriction enzymes F, Fsp I, B, BamH I; H, Hind III

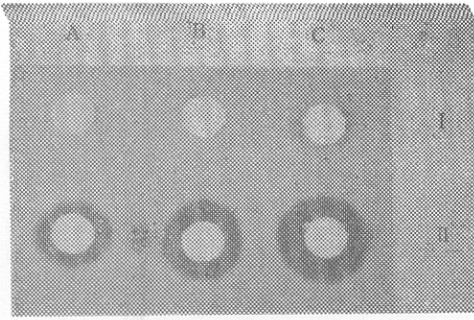


图 2 DB403(pEU-1)和DB403(pEU-3)所产外分泌中性蛋白酶活性的比较

Fig.2 Comparison of protease activity secreted by DB403(pEU-1)and DB403(pEU-3)

I. DB403(pEU-3); II. DB403(pEU-1)
A. 2 μl culture supernatant; B. 4 μl culture supernatant; C. 8 μl culture supernatant.

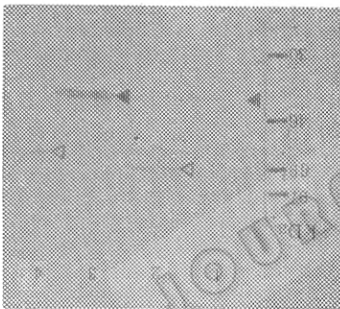


图 3 细胞内外NprE分布的Western blot分析

Fig.3 Western blot analysis of the contents distribution of intracellular and extracellular NprE products

1. DB403(pEU-3)supernatant;
2. DB403(pEU-3)cell pellet,
3. DB403(pEU-1)supernatant,
4. DB403(pEU-1)cell pellet

The numbers on the left indicate molecular weight standards(kDa). The solid arrows point to mature NprE protease whereas the open arrows to pre-pro-NprE

的 pre-pro-NprE(样品 4)约大 8 kDa, 与前肽中插入的 300bp DNA 顺序产物相吻合。由于 nprEh300 产物的分泌速度大大下降, 再加上其前肽中含有外源 DNA 顺序, 所以其在细胞内未能及时分泌到胞

外的蛋白呈现降解现象(样品 2), 而 nprE 产物则无此现象(样品 4)。

(三) 利用慢分泌突变基因 nprEh300 筛选突变体

建立了上述的“慢分泌”表型以后, nprEh300 基因成为进一步研究蛋白质分泌的理想模型基因。我们以 DB403(pEU-3) 作为出发菌株, 通过 EMS 化学诱变以后, 直接在含有 1% 脱脂奶粉的 SG 平板上筛选产生大透明圈(相对起始菌株所产生的透明圈大小而言)的突变体。考虑到蛋白质分泌系统中许多功能蛋白为膜蛋白, 而膜蛋白突变可能导致致死效应(Lethal effect), 所以我们着重筛选条件突变体。经过上万个菌落的筛选, 获得了两株温度敏感突变体, 经鉴定均为染色体突变(鉴定过程见后), 分别将这两株突变体命名为 EUB1(pEU-3) 和 EUB2(pEU-3)。如图 4 所示, 与出发菌株 DB403(pEU-3) 相比, 在 30℃ 时, 其产酶量大致相同, 但在 46℃ 时, 突变株产生的蛋白酶的比活力显然高于原始菌株。同时在 46℃ 培养时, 突变菌株的菌落要比原始菌株小得多, 表明这两个突变体在 46℃ 条件下, 对细菌正常生长有抑制作用。就其表型而言也不尽相同, 在 37℃ 下, EUB1(pEU-3) 的生长明显受到抑制, 而 EUB2(pEU-3) 则不受影响。

由于 EMS 对染色体和质粒均有诱变作用, 所以在获得一定表型的突变体后, 有必要区分这两株突变体是属于染色体突变还是质粒突变。从 EUB1(pEU-3) 和 EUB2(pEU-3) 提取质粒, 分别转化正常的受体菌 DB403, 所得转化子均呈现出出发菌株 DB403(pEU-3) 的正常表型; 参照 Kawamura 等^[8]方法, 加热消除这两株突变体的质粒, 并以消除质粒后的菌株作受体, 再用正常质粒 pEU-3 分别对其转

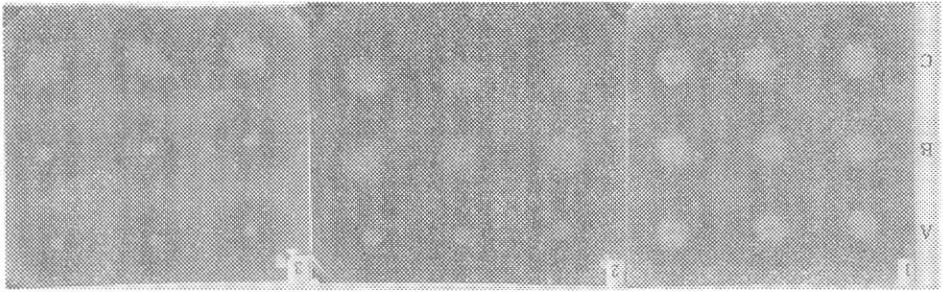


图 4 原始菌株和突变菌株产透明圈大小的比较

Fig.4. Comparison of halo size produced by parental and mutant strains

A. EUB 1 (pEU-3); B. EUB 2 (pEU-3); C. DB403(pEU-3).

1. 30°C; 2. 37°C; 3. 46°C

化, 所得转化子则均呈现温度敏感突变表型。这些结果表明这两株突变体均属染色体突变。

讨 论

1. 枯草杆菌 *nprE* 基因作为研究蛋白质分泌的指示基因具有许多优点。*NprE* 蛋白酶的活性测定既简便又经济, 只要在适当培养基中加入 1% 脱脂奶粉即可。另外一个重要特点是 *nprE* 基因含有很长一段编码前肽的区域, 我们利用 *nprE* 基因的优点, 在前肽区域同框插入一段 300bp 的人体 cDNA 顺序, 构建了一个慢分泌的 *nprEh300* 突变基因。虽然对于造成分泌衰减的确切机制尚不清楚, 可能与插入的外源 DNA 所编码的蛋白质氨基酸顺序有一定关系, 也可能与外源 DNA 顺序插入前肽区域的不同位点有关, 但我们仍然可以把慢分泌突变基因 *nprEh300* 作为研究蛋白质分泌机制的一个理想模型。

2. 慢分泌突变基因 *nprEh300* 所表达的中性蛋白酶总量 (即胞内和胞外酶量的总和) 经 Western blot 分析与野生型

nprE 的表达量相差不大, 说明插入顺序对蛋白质表达过程无太大影响。此外, 图 3 Western blot 结果还显示留在胞内的基因产物为带信号顺序的前体蛋白, 而分泌到胞外的基因产物则为成熟的中性蛋白酶 (*NprE*)。说明分泌到胞外的蛋白酶是经过加工的, 而留在胞内的是未经加工的, 这和野生型 *NprE* 加工前后的情况完全一样。由此证明, 插入外源 DNA 顺序只影响中性蛋白酶的分泌, 而对加工过程并无明显影响。

3. 筛选到的两株温度敏感突变体 EUB 1 (pEU-3) 和 EUB 2 (pEU-3) 其产酶量在 30°C 与出发菌株 DB403 (pEU-3) 大致相同, 但在 46°C 时, 突变体的生长受到明显抑制, 而产生的胞外蛋白酶的比活力则明显高于出发菌株。从两个突变体在 37°C 的培养特征有明显差异来看, 它们的突变位点可能是在同一基因的不同位点上。对于突变定位工作目前正在进行研究。对在 46°C 时出现的突变明显促进中性蛋白酶的比活性究竟是由表达还是由分泌引起的具体机制将有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Kornberg, A, et al.; *Ann, Rev, Biochem.*, 37:51-58, 1968,

- [2] Yang, M. Y. et al.: *J. Bacteriol.*, 160:15—21, 1984.
[3] Ikemura, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 262(16):7859—7864, 1987.
[4] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
[5] Wang, L. F. and Doi, R. H.: *Mol. Gen. Genet.*, 207:114—119, 1987.
[6] Wang, L. F. and Doi, R. H.: *J. Bacteriol.*, 169:4190—4195, 1987.
[7] Miller, J. H.: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972.
[8] Kawamura, F. and Doi, R. H.: *J. Bacteriol.*, 160:442—444, 1984.
[9] Wang, L. F. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 35:487—492, 1989.

Construction of Slow-secreting Mutant Gene and Its Application

Qi Beijing Wu Zirong Chen Fudong Wang Linfa
(*Molecular Biology Laboratory, Department of Biology, East
China Normal University, Shanghai*)

A 300 bp human cDNA sequence was introduced through in-frame insertion into the pro-peptide coding region of the *Bacillus subtilis* extracellular neutral protease gene (nprE). The inserted sequence had no significant effect on the translation, processing and folding of the gene product, but reduced the rate of secretion more than ten fold. The "slow-secreting" phenotype of the mutant gene and the easy detection of the indicating enzyme has opened up a new direction for us to study protein secretion in *B. subtilis*. Also reported in this communication is the preliminary characterization of two temperature sensitive mutants affecting the neutral protease production, which were isolated using the newly constructed slow-secreting mutant gene.

Key words

Bacillus subtilis; protein secretion; neutral protease; pro-peptide