

# WprA 基因在 *Bacillus subtilis* WB800 中的克隆表达

柴海云, 崔堂兵

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 对源自 *Bacillus subtilis* 168 的具有纤溶活性的基因序列 (*WprA*) 进行克隆, 然后将 *WprA* 基因克隆到大肠杆菌-枯草杆菌穿梭载体 pBE<sub>3</sub> 中, 构建表达载体 pBE-*WprA*, 将重组载体转化到 *Bacillus subtilis* WB800 中, 实现了 *WprA* 基因在 *Bacillus subtilis* WB800 中的表达。结果表明, *WprA* 基因在 *Bacillus subtilis* WB800 中的对数生长期和平衡期均获得了表达, 且产物被分泌到胞外。

**关键字:** *Bacillus subtilis* WB800; 纤溶活性; *WprA* 基因; 表达

文章编号: 1673-9078(2012)8-927-929

## Cloning and Expression of a *WprA* gene in *Bacillus subtilis* WB800

CHAI Hai-yun, CUI Tang-bing

(School of Biosciences and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** A fibrinolytic enzyme gene (*WprA*) was cloned from *Bacillus subtilis* 168. To efficiently express *WprA* in *Bacillus subtilis* WB800, *WprA* gene was inserted into pBE<sub>3</sub> to yield a novel vector pBE-*WprA*. Then the vector pBE-*WprA* was transformed and expressed in *Bacillus subtilis* WB800. Results showed *WprA* gene was efficiently expressed during the exponential and stationary growth stages, and *WprA* was secreted into the medium.

**Key words:** *Bacillus subtilis* WB800; fibrinolytic activity; *WprA* gene; expression

据世界卫生组织统计, 每年全球因患心血管病导致死亡的人数达 1750 万人<sup>[1-3]</sup>, 预计到 2015 年, 每年因心血管疾病而死的人数将达到 2000 万, 死亡率还仍有上升趋势。因此血栓性疾病引起了医学界的高度重视和关注。治疗血栓性疾病的最广泛和有效的手段仍是药物溶栓, 鉴于此开发、研制预防和治疗血栓性疾病的药物就成了研究热点。

随着分子生物学技术的发展, 利用基因工程菌来提高纤溶酶产量是一种有效的手段。近几年, 我国学者在纤溶酶研究领域<sup>[4-11]</sup>取得了一定的成绩, 特别在纤溶酶基因的克隆和表达<sup>[12-16]</sup>方面取得了重大突破。本文主要对源自 *Bacillus subtilis* 168 的纤溶活性蛋白 *WprA* 的基因进行了克隆, 并在 *Bacillus subtilis* WB800<sup>[15]</sup>中表达, 为 *WprA* 蛋白在体内溶栓的机制、药理效果研究及进一步的应用奠定了基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌株与质粒

*Bacillus subtilis* 168 为本实验室保存, 克隆宿主菌为缺陷 8 种蛋白酶的 *Bacillus subtilis* WB800, 由加拿

收稿日期: 2012-04-16

基金项目: 中央高校基本科研业务费项目 (2011ZM0136)

通讯作者: 崔堂兵

大 Calgary 大学 Wong Sui-Lam 教授惠赠; 大肠杆菌-*Bacillus subtilis* 穿梭质粒 pBE<sub>3</sub> 由加州理工学院 Frances 教授惠赠。克隆宿主菌 *E. coli* DH5a 为本实验室保存。

##### 1.1.2 试剂

聚合酶 premix LA Taq, DNA 标准分子质量 1kb Marker, T4 DNA 连接酶, 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*HI 为 TaKaRa 产品; 酵母浸出物和胰蛋白胨为 OXOID 产品; 氨苄青霉素和卡那霉素为 Sigma 产品; 含有 60 μg/mL 氨苄青霉素或 30 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基用于细菌的培养; 牛源纤维蛋白原、牛凝血酶和尿激酶标准品购自中国药品生物制品检定所, 其它化学试剂均为国产或进口分析纯产品。

##### 1.1.3 PCR 引物

根据 *WprA* 基因序列及质粒 pBE<sub>3</sub> 多克隆序列特征设计用于 *WprA* 基因表达的 PCR 引物。设计引物如下:

P<sub>1</sub>: 5'-CCGGAATTCGGTCCACAGCGGAGGATGG-3' *Eco*RI

P<sub>2</sub>: 5'-CGCGGATCCGCGGAAGGGACAGGAGACC-3' *Bam*HI

引物由上海英骏公司合成。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 *WprA* 基因的克隆

将 *Bacillus subtilis*168 基因组按照 Saito and Miura<sup>[17]</sup>的方法进行提取, 以此作为模板以 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 作为引物, 扩增 *WprA* 基因。扩增条件: 94 °C 45 s; 53 °C 60 s; 72 °C 165 s, 30 个循环。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。将 PCR 扩增产物送深圳华大基因进行序列测定。

### 1.2.2 表达载体 pBE-*WprA* 的构建

用 *EcoR* I 和 *BamH* I 两种内切酶同时酶切 pBE<sub>3</sub> 质粒和 *WprA* 基因, 进行胶回收, 在 T4 连接酶的作用下, 进行连接, 构建表达载体 pBE-*WprA*。将表达载体 pBE-*WprA* 转入 *E.coli* DH5a 中, 将转化液涂布在含 60 μg/mL Amp/LB 平板进行阳性转化子的筛选。

### 1.2.3 *Bacillus subtilis* WB800 的转化

将表达载体 pBE-*WprA* 转入 *Bacillus subtilis* WB800 中, 将转化液涂布在含 30 μg/mL Kan/LB 平板, 37 °C 过夜培养, 进行阳性转化子的筛选。

### 1.2.4 转化子纤溶活性的测定

纤维蛋白平板配置参照文献<sup>[18]</sup>, 将尿激酶标准品 (6.25、12.5、25、50、100 U/mL) 各取 10 μL 点样于新配制的纤维蛋白平板上, 放置 10 min, 37 °C 培养箱保温 18 h 后取出, 量取透明水解圈直径, 以水解圈的面积的自然对数为纵坐标, 以标准酶活力的自然对数为横坐标, 做标准曲线。采用同样的方法, 以尿激酶作为对照, 测定发酵上清液的纤溶酶活性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *WprA* 基因的克隆及序列的分析

#### 2.1.1 *WprA* 基因的克隆

以抽提的 *Bacillus subtilis* 168 基因组作为模板, 以 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 为引物, 在 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 引物中分别引入 *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切位点, 用 PCR 的方法扩增出 *WprA* 基因片段, 大小为 2.4 kb, 与预期片段大小相符 (图 1)。

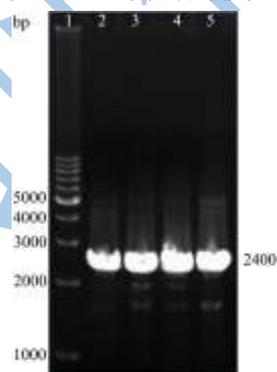


图1 *WprA*的PCR产物电泳

Fig.1 Electrophoresis of PCR product amplified by primer *WprA*

FR

注: Lane 1: 1 kb; Lane 2~5: *WprA*。

#### 2.1.2 *WprA* 基因序列的分析

PCR 反应液的测序结果在 NCBI 中进行 Blast N 比对发现, 测定的序列与公布的 *Bacillus subtilis* 168 的 *WprA* 基因的同源性为 99%。因此说明已经成功的将 *Bacillus subtilis* 168 中的 *WprA* 基因克隆出来。

### 2.2 表达载体 pBE-*WprA* 的构建

为了实现 *WprA* 基因在 *Bacillus subtilis* WB800 中的成功表达, 将带有自身启动子的 *WprA* 基因经过 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切后插入到穿梭载体 pBE<sub>3</sub> 的相应位点。重组质粒经过双酶切后电泳结果显示两条带, 一条为 2.4 kb, 另一条为 6.4 kb, 与预期的结果相符, 命名为 pBE-*WprA*, 如图 2。

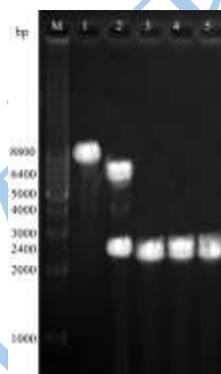


图2 重组载体pBE-*WprA*的鉴定

Fig.2 Identification of the plasmid pBE-*WprA*

注: Lane M: 1 kb ladder Marker; Lane 1: pBE-*WprA*/EcoRI;

Lane 2: pBE-*WprA*/EcoRI+BamHI; Lane 3~5: *WprA* 基因。

### 2.3 *Bacillus subtilis* WB800/pBE-*WprA* 的构建

从阳性转化子中提取重组质粒, 转化到 *Bacillus subtilis* WB800 中, 涂布在含 30 μg/mL Kan/LB 平板上, 挑取单菌落提取质粒, 以质粒作为模板, 通过 *WprA* 的克隆进行阳性转化子的鉴定, 如图 3。

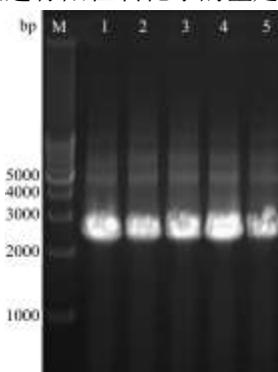


图3 *Bacillus subtilis* WB800/pBE-*WprA*的PCR鉴定

Fig.3 Identification of *Bacillus subtilis* WB800/pBE-*WprA*

注: Lane M: 1 kb; Lane 1~5: *WprA*。

### 2.4 尿激酶的标准曲线

不同浓度的尿激酶 (0、6.25、12.5、25、50、100 U/mL) 分别点样于纤维蛋白平板, 如图 4。据此求得

标准曲线方程为  $Y=0.69274X+2.011$  ( $R^2=0.98276$ ), 其中  $X$  表示酶浓度的自然对数;  $Y$  表示水解圈面积的自然对数。

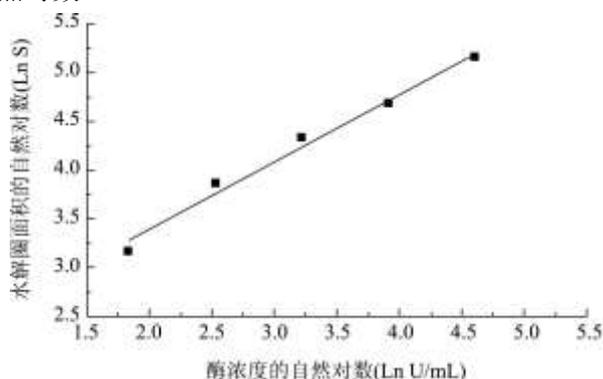


图4 尿激酶的纤溶酶活性标准曲线

Fig.4 Calibration curve of urokinase

### 2.5 *WprA* 在 *Bacillus subtilis* WB800 中的表达

将两菌株 WB800 和 WB800/pBE-*WprA* 接种于 5 mL LB 培养基中于 37 °C 培养 12 h。再按照 2% 接种量接种于 50 mL 同样的培养基中, 于 37 °C, 220 rpm 培养 24 h 和 48 h。发酵培养物经 4 °C, 10000×g 离心 15 min, 上清液用于纤溶活性的测定。图 5 结果表明, *Bacillus subtilis* WB800 在纤维蛋白平板上没有水解圈, 而重组菌 WB800/pBE-*WprA* 在 24 h 时的纤溶活性为 7.6 U/mL, 发酵至 48 h, 菌体进入稳定期后纤溶活性有所下降, 为 5.3 U/mL。



图5 纤维蛋白平板测定纤溶酶活性

Fig.5 Determination of fibrinolytic enzyme activity on fibrin plates

注: 1~4 酶活性分别为: 100、50、25、12.5 U/mL; 5: 巴比妥那缓冲液; 6: WB800 培养上清液; 7: WB800/pBE-*WprA* 培养上清液(48 h); 8: WB800/pBE-*WprA* 培养上清液(24 h)。

### 3 结论

本研究从 *Bacillus subtilis* 168 克隆到 *WprA* 基因, 并以带有自身启动子的 *WprA* 基因克隆到大肠杆菌-*Bacillus subtilis* 穿梭表达载体中, 转化 *Bacillus subtilis* WB800 使之能够表达 *WprA* 蛋白质并分泌到培养基,

为研究 *WprA* 蛋白在体内溶栓的机制和药理效果及进一步的应用奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Beilin B, Shavit, Razumovsky J, et al. Effect of mild perioperative hypother on cellular immune responses [J]. Anesthesiology, 1998, 89(5): 1133-1140
- [2] 北京晨报. 心血管疾病成全球第一位死因, 药物可预防[EB/OL], [http://www.ce.cn/health/jkxw/gz/200804/12t20080412\\_15132819.shtml](http://www.ce.cn/health/jkxw/gz/200804/12t20080412_15132819.shtml), 2008-04-12
- [3] 光明日报. 心血管疾病成为全球第一号杀手, 世卫发布风险指南 [EB/OL], <http://news.xhby.net/system/2007/09/15/010122842.shtml>, 2007-09-15
- [4] Mine Y, Wong AHK, Jiang B. Fibrinolytic enzyme in Asian traditional fermented foods [J]. Food Res. Int., 2005, 38 : 243-250
- [5] 邹和昌. 溶栓剂的发展及研究[J]. 中国药学杂志, 1997, 32(5): 263-267
- [6] 丁文惠, 李建平. 基因重组链激酶静脉溶栓治疗急性心肌梗塞临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2000, 16(4): 259-261
- [7] 王卫东, 孙月娥. 豆豉纤溶酶生产菌发酵液营养和活性成分分析[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2): 58-60
- [8] 黎金兰, 冯一森, 曹峻松, 等. 两步固态发酵生产豆豉纤溶酶的研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(12): 1304-1307
- [9] 江侧燕, 赵树进, 郭勇. 富含纤溶酶豆豉冻干粉体外溶栓作用及急性毒性[J]. 现代食品科技, 2009, 25(10): 1154-1155
- [10] 刘政辉. 第三代溶栓剂研究进展[J]. 国外医学: 输血及血液学分册, 1997, 20(4): 28-231
- [11] 罗文华, 郭勇. 食品纤溶酶研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(8): 111-114
- [12] Nakamura T, Yamagata Y and Ichishima E. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene. aprN of *Bacillus subtilis* (natto) [J]. Biosci Biotech Biochem, 1992, 56(11): 1869-1871
- [13] 黄志立, 罗立新, 凌均建, 等. 纳豆激酶基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 广东药学院学报, 2000, 16(4): 265-267
- [14] 谢秋玲, 孙奋勇. 纳豆激酶原基因的克隆及表达[J]. 华南理工大学(自然科学版), 2002, 30(6): 19-21
- [15] 彭勇, 张义正. 解淀粉芽孢杆菌 DC-4 豆豉溶栓酶成熟肽编码序列的克隆及表达[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(3): 285-289
- [16] Luo Wenhua, Guo Yong, Han Shuangyan. Cloning and Expression of Douchi Fibrinolytic Enzyme (DFE) Gene from *Bacillus subtilis* [J]. Journal of South China University of Technology (Nature Science Edition), 2007, 35(11): 115-119

- [17] Saito H, Miura K. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim Biophys Acta*, 1963, 72: 619-629
- [18] Astrup T, Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1952, 40: 346-351

现代食品科技