

通过串联启动子实现纳豆激酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达

葛春蕾, 刘中美, 崔文璟, 周丽, 郭军玲, 胡云峰, 周哲敏

(江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘要: 本研究通过串联启动子方式实现纳豆激酶在枯草芽孢杆菌 WB800 中的高效分泌表达。通过对几种现有报道的强启动子的比较并对其进行串联操作, 确定生产纳豆激酶的最优启动子及纳豆激酶的最高产量。本研究首先在枯草芽孢杆菌 WB800 中成功构建五种含不同强启动子的重组质粒 pSG101 (P_{HpalI}), pSG102 (P_{BcaprE}), pSG103 (P_{luxS}), pSG104 (P_{gsiB}) 和 pSG105 (P_{yxiE}), 实现纳豆激酶分泌表达, 并对其纤溶活性进行测定。结果表明, 启动子 P_{HpalI} 介导的纳豆激酶纤溶活性 (110.80 FU/mL) 明显优于其他四种启动子。通过对启动子 P_{HpalI} 进行多次串联, 成功构建质粒 pSG106 ($P_{HpalI}-P_{HpalI}$), pSG107 ($P_{HpalI}-P_{HpalI}-P_{HpalI}$) 和 pSG108 ($P_{HpalI}-P_{HpalI}-P_{HpalI}-P_{HpalI}$)。数据显示, 菌株 *Bacillus subtilis* WB800/pSG107 ($P_{HpalI}-P_{HpalI}-P_{HpalI}$) 纳豆激酶产量最高为 213.30 FU/mL, 相比单个启动子 P_{HpalI} , 提高了 92.51%。通过对五种强启动子的比较以及对其进行串联操作, 成功实现纳豆激酶在枯草芽孢杆菌 WB800 的高效表达, 纤溶活性最高为 213.30 FU/mL, 与现有相关报道相比有明显优势。

关键词: 纳豆激酶; 串联启动子; 分泌表达; 枯草芽孢杆菌 WB800

文章编号: 1673-9078(2016)11-72-77

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.011

Efficient Overexpression of Recombinant Nattokinase in *Bacillus subtilis* by Tandem Promoters

GE Chun-lei, LIU Zhong-mei, CUI Wen-jing, ZHOU Li, GUO Jun-ling, HU Yun-feng, ZHOU Zhe-min

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In *Bacillus subtilis* WB800, the efficient secretory expression of nattokinase by tandem promoters was investigated. Several previously reported strong promoters were compared and arranged in tandem repeat sequence, and the optimal promoter for nattokinase and its maximum yield were determined. In this study, five recombinant strains harboring five different strong promoters were successfully constructed in *Bacillus subtilis* WB800, including pSG101 (P_{HpalI}), pSG102 (P_{BcaprE}), pSG103 (P_{luxS}), pSG104 (P_{gsiB}), and pSG105 (P_{yxiE}), the secretory expression of nattokinase was achieved and the fibrinolytic activity was measured. The results indicated that the fibrinolytic activity of nattokinase mediated by promoter P_{HpalI} (110.80 FU/mL) was higher than that mediated by the other four promoters. Subsequently, three plasmids were built by arranging the promoter P_{HpalI} in multi-tandem sequences, including pSG106 ($P_{HpalI}-P_{HpalI}$), pSG107 ($P_{HpalI}-P_{HpalI}-P_{HpalI}$), and pSG108 ($P_{HpalI}-P_{HpalI}-P_{HpalI}-P_{HpalI}$). The data showed that the highest yield of nattokinase (213.30 FU/mL) was achieved under promotion mediated by $P_{HpalI}-P_{HpalI}-P_{HpalI}$, which increased the production of nattokinase by 92.51% compared with that achieved by mediation by the single promoter P_{HpalI} . Through comparing five strong promoters and arranging them in tandem repeat sequences, the efficient expression of nattokinase was successively achieved in *B. subtilis* WB800. The highest fibrinolytic activity reached 213.30 FU/mL, significantly higher than that reported in the literature.

Key words: nattokinase, tandem promoter, secretory expression, *Bacillus subtilis* WB800

纳豆激酶 (Nattokinase, NK) 是一种由纳豆枯草

收稿日期: 2015-12-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31400078); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2014AA021304); 江苏省产学研联合创新资金-前瞻性联合研究项目 (BY2014023-21)

作者简介: 葛春蕾 (1992-), 女, 硕士研究生, 发酵工程

通讯作者: 周哲敏 (1969-), 男, 教授, 研究方向: 生物酶学、发酵工程

杆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) 分泌产生的碱性丝氨酸蛋白酶, 于 1987 年首次被日本学者 Sumi 等^[1]从纳豆中分离得到。研究表明, 纳豆激酶具有特殊的溶血栓活性, 既能预防也能治疗血栓疾病^[2]。与其它溶栓药物相比, 它具有安全性能好、无免疫原性、易被人体消化吸收、可静脉注射也可以口服、作用时间长与生产价格低廉等优点^[3]。然而纳豆激酶野生菌的产酶

量低, 严重限制了其发展, 因此提高纳豆激酶的产量具有重要的意义。

目前, 国内外研究学者大多通过菌株筛选与生产工艺条件优化, 以及利用基因工程手段构建高效表达载体等方法来提高纳豆激酶产量。2014年, Suwanmanon 等^[4]通过单因素和正交实验确定了枯草芽孢杆菌的最佳发酵培养基和发酵工艺条件, 纳豆激酶表达量达到 130.96 FU/mL; 黄磊等^[5]通过构建基因工程菌的方法成功实现了纳豆激酶在枯草芽孢杆菌中的表达 (60 U/mL); 本课题组也已通过信号肽筛选构建了重组纳豆激酶的高效分泌表达质粒, 表达量达到 190 mg/L^[6]。然而目前纳豆激酶的产量仍不满足生产需求。

外源蛋白在枯草芽孢杆菌中的高效表达是实现其在工业应用上的重要途径, 而使用强启动子是外源蛋白高效表达的有效手段之一。启动子是基因表达调控的重要顺式调控元件, 也是基因工程表达载体中的重要元件。Zhang 等^[7]于 2007 年从枯草芽孢杆菌中表征了一种新的启动子 P_{ysiE}, 该启动子在以 β-半乳糖苷酶为

报告基因时所表现的活性较公认的强启动子 P_{P43} 更强, β-半乳糖苷酶的表达量更高。Yang 等^[8]也于 2013 年通过启动子探针系统筛选到强启动子 P_{lucS}, 该启动子活力是 P_{P43} 的 8 倍。同时, 有研究报道, 由两个或三个启动子串联形成的复合启动子调控的基因表达水平较单个启动子有明显提高^[9-10]。

同一蛋白质在不同启动子的作用下, 表达效果往往相差甚远, 有的甚至无法表达。本实验通过比较五种不同的强启动子, 包括 P_{HpalI}^[6]、P_{gsiB}^[11]、P_{ysiE}、P_{BcaprE}^[12] 以及 P_{lucS}, 并对效率较高的启动子进行了不同拷贝的串联, 以纳豆激酶纤溶活性为指标, 研究了启动子对重组纳豆激酶表达的影响, 为进一步提高纳豆激酶的生产效率提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

实验所用菌株和质粒详见表 1。

表 1 菌株和载体

Table 1 Strains and vectors

Strains and vectors	Main properties	Source
<i>E. coli</i> JM109	<i>RecA1 pupE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB) F*[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i>	本实验室保存
<i>B. subtilis</i> WB800	<i>nprE aprE epr bpr mpr::ble nprB::bsr Δvpr wprA::hyg</i>	本实验室保存
<i>B. subtilis</i> WB800/ pMA0911	<i>E. coli/B. subtilis</i> 穿梭载体, P _{HpalI} , SP _{wapA} , Amp ⁺ , Kan ⁺	本实验室保存
pMA0911- <i>wapA-pro-NK</i> (pSG101)	<i>E. coli/B. subtilis</i> 穿梭载体, P _{HpalI} , SP _{wapA} , <i>pro-NK</i> , Amp ⁺ , Kan ⁺	本实验室保存 ^[6]
pSG102	P _{BcaprE} , SP _{wapA} , <i>pro-NK</i>	本研究构建
pSG103	P _{lucS} , SP _{wapA} , <i>pro-NK</i>	本研究构建
pSG104	P _{gsiB} , SP _{wapA} , <i>pro-NK</i>	本研究构建
pSG105	P _{ysiE} , SP _{wapA} , <i>pro-NK</i>	本研究构建
pSG106	P _{HpalI} -P _{HpalI} , SP _{wapA} , <i>pro-NK</i>	本研究构建
pSG107	P _{HpalI} -P _{HpalI} -P _{HpalI} , SP _{wapA} , <i>pro-NK</i>	本研究构建
pSG108	P _{HpalI} -P _{HpalI} -P _{HpalI} -P _{HpalI} , SP _{wapA} , <i>pro-NK</i>	本研究构建

1.1.2 主要试剂和仪器

DNA 聚合酶、各种限制性内切酶等, 购自日本宝生物工程 (大连) 有限公司; 质粒 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒, 购自上海生物工程公司; 牛血纤维蛋白原和凝血酶, 购自 Sigma 公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯; UV 1100 紫外-可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司。

1.1.3 培养基

种子培养基成分为: 胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 10 g/L; 枯草芽孢杆菌 WB 800 的表达培养基成分: 胰蛋白胨 12 g/L、酵母提取物 24 g/L、

甘油 4 g/L、KH₂PO₄ 2.3 g/L、K₂HPO₄·3H₂O 16.4 g/L、CaCl₂ 0.2 g/L。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

含有启动子 P_{HpalI} 的大肠-枯草穿梭载体 pMA0911-*wapA-pro-NK* (pSG101) 由本实验室保存^[6]。根据来源于 *B. subtilis* 的 P_{gsiB}、P_{ysiE}, 来源于 *B. clausii* (GenBank: HQ849486.1) 的 P_{aprE} (本文中命名为 P_{BcaprE}), 以及来源于 *B. licheniformis* 的 P_{lucS} 的启动子序列, 人工合成上述启动子。设计引物 P1~P8 (表 2),

以合成的质粒为模板扩增得到含有目的启动子的 DNA 片段。再以大肠-枯草杆菌穿梭质粒 pSG101 为模板, 含有目的启动子的 DNA 片段为引物, 进行大引物 PCR^[13]。将大引物 PCR 后的产物分别转化大肠杆菌 JM109 获得重组质粒 pSG102 (P_{BcaprE})、pSG103 (P_{luxS})、pSG104 (P_{gsiB})、pSG105 (P_{ysiE})。

于质粒 pSG101 上启动子 P_{HpaII} 后插入多个重复 P_{HpaII} 片段的方法为: 设计引物 P9、P10 (表 2), 以质

粒 pSG101 为模板, 扩增得到含有目的基因的 DNA 片段。并以此作为引物, pSG101 为模板进行第二轮 PCR (大引物 PCR), 将 PCR 产物转化大肠杆菌 JM109 获得重组质粒 pSG106 (P_{HpaII}-P_{HpaII}), 重复上述操作, 获得重组质粒 pSG107 (P_{HpaII}-P_{HpaII}-P_{HpaII})、pSG108 (P_{HpaII}-P_{HpaII}-P_{HpaII}-P_{HpaII})。上述质粒均经过测序验证。

表 2 引物序列表

Table 2 List of primers

Name	Primer sequence (5'-3')	Notes
P1	<u>GGCAAGGGTTTAAAGGTGGAGATTTTTGAGTTGCCGAATTCCATG</u> AACGAGACTTAAACG	Upstream of P _{BcaprE}
P2	<u>CCTTTTAAAGTTTCGCCTCTTCTTTTTTTCATATGTCGGTTCCTCC</u> TCATTTTTATACCAACTTG	Downstream of P _{BcaprE}
P3	<u>GGCAAGGGTTTAAAGGTGGAGATTTTTGAGTGATCGTCACAATGC</u> GCCATCAAACCG	Upstream of P _{luxS}
P4	<u>CCTTTTAAAGTTTCGCCTCTTCTTTTTTTCATATGGGATCCCACTTT</u> ATGGACGCCGCAGTGTCTG	Downstream of P _{luxS}
P5	<u>GGCAAGGGTTTAAAGGTGGAGATTTTTGAGTCTATCGAGACACGT</u> TTGGCTGG	Upstream of P _{gsiB}
P6	<u>CCTTTTAAAGTTTCGCCTCTTCTTTTTTTCATATGTTCCCTCTTAAT</u> TGGTGTGGTGTGTGATTC	Downstream of P _{gsiB}
P7	<u>GGCAAGGGTTTAAAGGTGGAGATTTTTGAGTGATCATTAAATTGA</u> AGCGCGGAAGC	Upstream of P _{ysiE}
P8	<u>CCTTTTAAAGTTTCGCCTCTTCTTTTTTTCATATGGCTCTTCCC GCC</u> TTTCGGACTGTGGGTGG	Downstream of P _{ysiE}
P9	<u>CATTGTGCCACCTAAAAAGGAGCGATTAGATCTTCTCAAAAAAT</u> ACTACCTGTCCC	Upstream of multi-tandem promoters
P10	<u>CCTTTTAAAGTTTCGCCTCTTCTTTTTTTCATATGTAAATCGCTCCT</u> TTTTAGGTGGCACAATGTG	Downstream of multi-tandem promoters

注: 下划线表示与载体同源的部分。

1.2.2 重组纳豆激酶在枯草芽孢杆菌 WB800 中的表达

将上述测序正确的重组质粒转化枯草芽孢杆菌 WB800, 获得纳豆激酶重组菌 *B. subtilis* WB800/pSG101 (P_{HpaII})、*B. subtilis* WB800/pSG102 (P_{BcaprE})、*B. subtilis* WB800/pSG103 (P_{luxS})、*B. subtilis* WB800/pSG104 (P_{gsiB})、*B. subtilis* WB800/pSG105 (P_{ysiE})、*B. subtilis* WB800/pSG106 (P_{HpaII}-P_{HpaII})、*B. subtilis* WB800/pSG107 (P_{HpaII}-P_{HpaII}-P_{HpaII})、*B. subtilis* WB800/pSG108 (P_{HpaII}-P_{HpaII}-P_{HpaII}-P_{HpaII})。分别挑取平板单菌落于 5 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素的种子培养基中, 37 °C、200 r/min 过夜培养。将上述过夜培养物以最终 OD₆₀₀ 为 0.02 (V/V) 转接 30 mL 含 50 μg/mL

卡那霉素的表达培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 72 h。每隔 12 h 取样, 4 °C、10000 r/min 离心 4 min, 发酵上清液用于进一步的实验研究。

1.2.3 重组纳豆激酶的纤溶活性测定

根据降解纤维蛋白的能力来确定纳豆激酶的活性。纤维蛋白平板法定性测定纳豆激酶纤溶活性, 纤维蛋白平板的制备参照文献^[14]并稍作改进, 分别取质粒 pSG101~pSG105 在枯草芽孢杆菌中的表达产物于纤维蛋白平板上点样检测酶活性, 每孔点样 40 μL, 37 °C 孵育 4 h。紫外分光光度计法定量测定纳豆激酶纤溶活性, 按照日本纳豆激酶协会建立的方法 (http://j-nattokinase.org/jnka_nk_english.html) 并稍作改进, 将 1.4 mL、0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH

8.0) 和 0.4 mL、0.72 % (m/V) 的纤维蛋白原溶液混合, 震荡后于 37 °C 放置 5 min, 向上述溶液中加入 0.1 mL 凝血酶溶液 (20 U/mL) 充分混匀, 37 °C 放置 10 min。再向上述溶液中加入 0.1 mL 稀释酶液, 37 °C 水浴保温反应 1 h。随后加入 2 mL、0.2 M 的三氯乙酸 (TCA) 终止反应并于 37 °C 水浴中保温 20 min。上述反应于 15000 r/min 离心 10 min。测定 275 nm 处的吸光值。每个样品做三次平行, $\alpha=0.05$ 。一个酶活力单位 (FU) 定义为 37 °C, pH 8.0 的条件下, 每分钟在 275 nm 处吸光值变化 0.01 所需的酶量。

1.2.4 SDS-PAGE 分析

取 40 μ L 离心后的发酵上清液, 向其中加入 10 μ L 含有 PMSF 的 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液, 室温放置 30 min 后, 沸水浴 5 min。使用 5% 的浓缩胶, 12% 的分离胶进行蛋白分离, 考马斯亮蓝 R-250 染色显示蛋白带。

2 结果与讨论

2.1 表达载体的构建

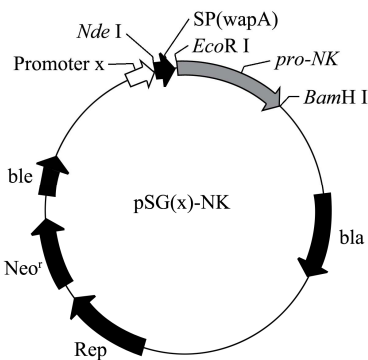


图1 枯草芽孢杆菌 WB800 中含不同启动子的表达质粒的构建

Fig.1 Construction of expression plasmids for *Bacillus subtilis*

WB800 with different promoters

注: Promoter x 中的 x 分别代表 P_{HpaII} 、 P_{BcaprE} 、 P_{luxS} 和 P_{gsiB} 等不同启动子。

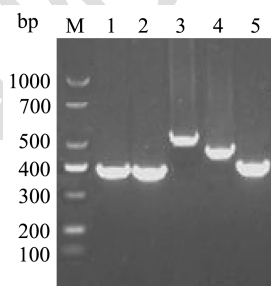


图2 不同启动子的 PCR 扩增产物

Fig.2 PCR products of different promoters

注: M, DNA marker; 1, P_{gsiB} 的 PCR 产物; 2, P_{HpaII} 的 PCR 产物; 3, P_{BcaprE} 的 PCR 产物; 4, P_{yxiE} 的 PCR 产物; 5,

P_{luxS} 的 PCR 产物。

重组质粒的物理图谱如图 1 所示, 启动子串联的结构示意图如图 3 所示。通过 PCR 方法, 成功扩增得到 5 条基因片段, 分别为: 563 bp 的 P_{BcaprE} ; 368 bp 的 P_{gsiB} ; 374 bp 的 P_{luxS} ; 468 bp 的 P_{yxiE} 以及 350 bp 的 P_{HpaII} , 大小均与预期的相符合 (图 2)。再以扩增的片段为引物, pSG101 为模板, 进行大引物 PCR。PCR 产物转大肠杆菌 JM109, 挑取单菌落送测序, 测序结果显示上述启动子成功连接到表达载体上, 成功构建质粒 pSG102~pSG108 (表 1)。

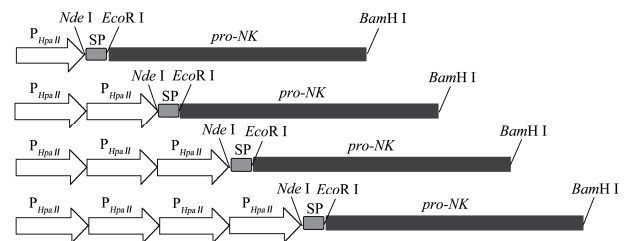


图3 串联启动子的结构示意图

Fig.3 Schematic diagram of tandem promoters

注: 灰色方框表示信号肽 (SP), 黑色方框表示纳豆激酶基因 (*pro-NK*), 白色箭头表示启动子 P_{HpaII} 。

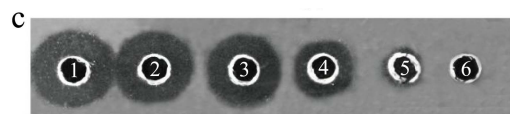
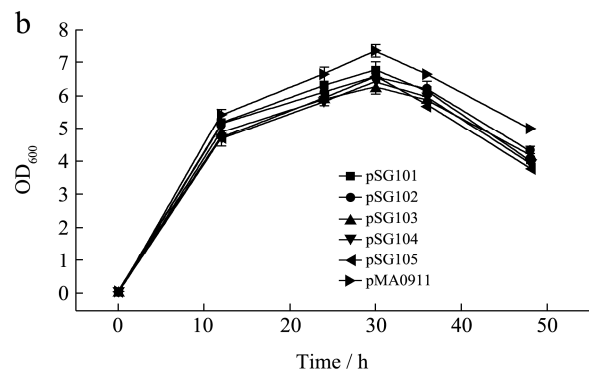
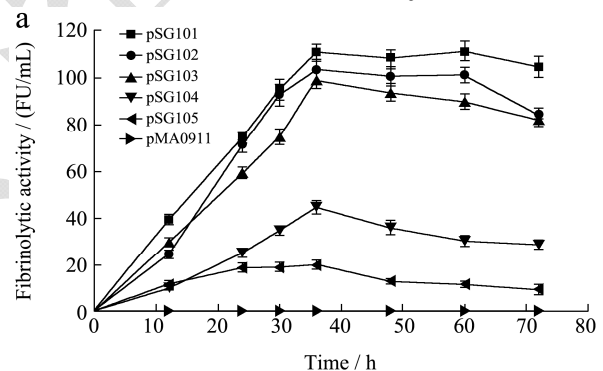


图4 重组菌表达产物的纤溶活性分析及各菌株生长曲线

Fig.4 Fibrinolytic activity analysis and growth curve of recombinant strains

注: 标记 (■), (●), (▲), (▼), (◀), (▶) 分别代表重组菌株 *B. subtilis* WB800/pSG101 (P_{HpaII}), *B. subtilis* WB800/pSG102 (P_{BcaprE}), *B. subtilis* WB800/pSG103 (P_{luxS}), *B. subtilis* WB800/pSG104 (P_{gsiB}), *B. subtilis* WB800/pSG105 (P_{yxiE}) 以及对照菌 *B. subtilis* WB800/pMA0911。a: 各菌株发酵上清液中纳豆激酶活性随时间的变化曲线。b: 各菌株生长曲线。c: 纤维蛋白平板法检测发酵上清液中纳豆激酶的活性。1, *B. subtilis* WB800/pBG101 (P_{HpaII}) 的表达产物; 2, *B. subtilis* WB800/pBG102 (P_{BcaprE}) 的表达产物; 3, *B. subtilis* WB800/pBG103 (P_{luxS}) 的表达产物; 4, *B. subtilis* WB800/pBG104 (P_{gsiB}) 的表达产物; 5, *B. subtilis* WB800/pBG105 (P_{yxiE}) 的表达产物; 6, 对照菌 *B. subtilis* WB800/pMA0911 的表达产物。

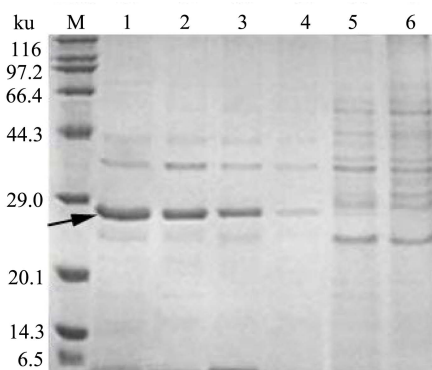


图5 重组菌表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of expression products of recombinant strains

注: M, 蛋白质分子质量标准; 1, *B. subtilis* WB800/pBG101 (P_{HpaII}) 的表达产物; 2, *B. subtilis* WB800/pBG102 (P_{BcaprE}) 的表达产物; 3, *B. subtilis* WB800/pBG103 (P_{luxS}) 的表达产物; 4, *B. subtilis* WB800/pBG104 (P_{gsiB}) 的表达产物; 5, *B. subtilis* WB800/pBG105 (P_{yxiE}) 的表达产物; 6, 对照菌 *B. subtilis* WB800/pMA0911 的表达产物。

2.2 不同启动子对纳豆激酶重组菌株 *B. subtilis* WB800 表达水平的影响

通过测定不同时间点发酵上清液中纳豆激酶的活性变化 (图 4a), 发现, P_{HpaII} 、 P_{BcaprE} 、 P_{luxS} 、 P_{gsiB} 以及 P_{yxiE} 五种不同启动子介导的纳豆激酶的表达水平相差较大。纳豆激酶活性曲线显示, 发酵培养 36 h 后, 各重组菌的发酵上清液中纳豆激酶活性达到最高。其中, 启动子 P_{HpaII} 、 P_{BcaprE} 以及 P_{luxS} 调控的纳豆激酶的活性明显高于另外两种重组质粒, 36 h 时活性分别为 110.80 ± 3.60 FU/mL、 100.84 ± 3.80 FU/mL、 98.17 ± 3.40 FU/mL。结果表明, 菌株 WB800/pSG101 (P_{HpaII}) 的纳豆激酶酶活最高 ($\alpha=0.05$)。该试验结果与纤维蛋白平板法检测的纳豆激酶纤溶活性结果相一致 (图 4c)。

SDS-PAGE 鉴定结果表明, 五种重组菌的培养上清液在 29 ku 下方有一条表达条带 (图 5) 为纳豆激酶目的条带, 其中 P_{HpaII} 介导的纳豆激酶的表达量最高, 条带最粗, 该结果与纤溶活性结果一致。上述结果表明, 在五种纳豆激酶枯草表达体系中, 启动子 P_{HpaII} 的表达效果最好, 明显优于其他四种启动子。各菌株生长曲线如图 4b, 数据表明, 纳豆激酶活性的变化不是由菌体浓度引起的。

2.3 串联启动子对纳豆激酶重组菌株 *B. subtilis* WB800 表达水平的影响

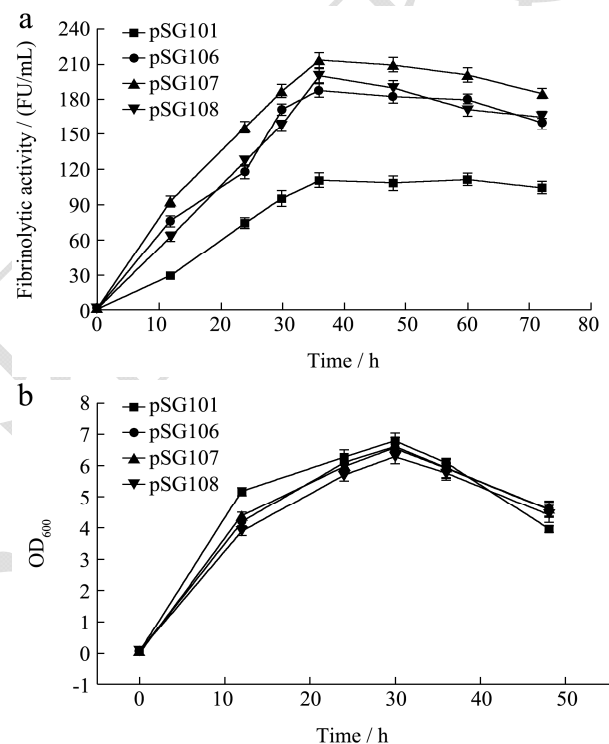


图6 重组菌表达产物的纤溶活性分析及各菌株生长曲线

Fig.6 Fibrinolytic activity analysis and growth curve of recombinant strains

注: 标记 (■), (●), (▲) 和 (▼) 分别代表重组菌株 *B. subtilis* WB800/pSG101 (P_{HpaII}), *B. subtilis* WB800/pSG106 (P_{HpaII} - P_{HpaII}), *B. subtilis* WB800/pSG107 (P_{HpaII} - P_{HpaII} - P_{HpaII}) 和 *B. subtilis* WB800/pSG108 (P_{HpaII} - P_{HpaII} - P_{HpaII} - P_{HpaII})。a: 各菌株发酵上清液中纳豆激酶活性随时间的变化曲线; b: 各菌株的生长曲线。

对上述筛选出来纤溶活性最高的启动子 P_{HpaII} 进行串联, 成功构建质粒 pSG106 (P_{HpaII} - P_{HpaII})、pSG107 (P_{HpaII} - P_{HpaII} - P_{HpaII}) 和 pSG108 (P_{HpaII} - P_{HpaII} - P_{HpaII} - P_{HpaII})。对上述质粒所在菌株进行发酵表达, 测定不同时间点各菌株纤溶活性变化情况 (图 6a) 及菌株的生长情况 (图 6b)。纳豆激酶活性曲线表明, 发

酵培养 36 h 后,各重组菌的发酵上清液中纳豆激酶活性达到最高。且相较于原始单个启动子,串联后的启动子所介导的纳豆激酶的纤溶活性都有明显的提高。其中,串联数为 3 时,即启动子 $P_{HpaII}-P_{HpaII}-P_{HpaII}$,它所在的菌株 *B. subtilis* WB800/pSG107 的纳豆激酶纤溶活性在各个时间段均最高,且在 36 h 时达到最高值 213.30 ± 6.76 FU/mL。其次,串联数为 2 的菌株 *B. subtilis* WB800/pSG108 ($P_{HpaII}-P_{HpaII}$) 的纳豆激酶产量也相对较高,36 h 时最高纤溶活性为 199.40 ± 6.15 FU/mL。菌株 *B. subtilis* WB800/pSG108 ($P_{HpaII}-P_{HpaII}-P_{HpaII}$) 的纳豆激酶产量较单个启动子 P_{HpaII} 介导的纳豆激酶产量也提高了 67.24%。研究结果表明,启动子的大小对纳豆激酶的表达有一定的影响,随着串联数的增加,酶活也随之增加,当串联数达到某一值时,酶活达到最高。此时,再增加串联数时,纳豆激酶纤溶活性则逐渐降低。SDS-PAGE 鉴定结果表明,串联启动子对应的蛋白条带较原始单个启动子的蛋白条带更粗(图 7),且三个 P_{HpaII} 串联的启动子对应的蛋白条带最粗,该结果与纤溶活性结果一致。

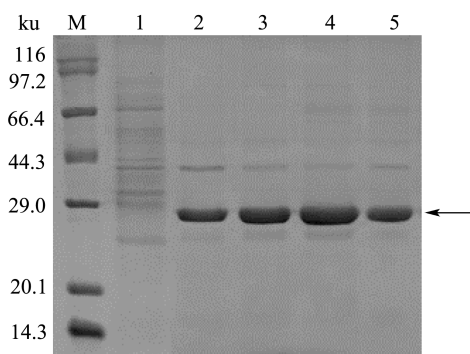


图 7 重组菌表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.7 SDS-PAGE analysis of expression products of recombinant strains

注: M, 蛋白质分子质量标准; 1, *B. subtilis* WB800/pMA0911 的表达产物; 2, *B. subtilis* WB800/pBG101 (P_{HpaII}) 的表达产物; 3, *B. subtilis* WB800/pBG106 ($P_{HpaII}-P_{HpaII}$) 的表达产物; 4, *B. subtilis* WB800/pBG107 ($P_{HpaII}-P_{HpaII}-P_{HpaII}$) 的表达产物; 5, *B. subtilis* WB800/pBG108 ($P_{HpaII}-P_{HpaII}-P_{HpaII}$) 的表达产物。

3 结论

本研究成功构建了五种含有不同启动子的纳豆激酶重组质粒 pSG101 (P_{HpaII})、pSG102 (P_{BcaprE})、pSG103 (P_{luxS})、pSG104 (P_{gsiB})、pSG105 (P_{yxiE}), 并对其纤溶活性进行测定, 其中重组菌 *B. subtilis* WB800/pSG101 (P_{HpaII}) 的纳豆激酶纤溶活性最高 (110.80 FU/mL)。接着, 本研究又采用对启动子串联

的方式进一步提高纳豆激酶的表达量, 成功构建了重组质粒 pSG106 ($P_{HpaII}-P_{HpaII}$)、pSG107 ($P_{HpaII}-P_{HpaII}-P_{HpaII}$)、pSG108 ($P_{HpaII}-P_{HpaII}-P_{HpaII}-P_{HpaII}$)。串联后的启动子介导的纳豆激酶的活性较单个启动子有明显的提高, 其中纳豆激酶活性最高的菌株是 *B. subtilis* WB800/pSG107 ($P_{HpaII}-P_{HpaII}-P_{HpaII}$), 最高纤溶酶活为 213.30 FU/mL。该酶活明显高于 Suwanmanon 等^[3] (2014) 报道的经优化后的纳豆激酶纤溶活性 (130.96 FU/mL), 实现了纳豆激酶在枯草芽孢杆菌 WB800 中的高水平表达。本研究选用的质粒 pMA0911 是 pMA5 的衍生质粒, 拷贝数较高, 为 30~50。而选用强的启动子并进一步串联, 更加促进了目的蛋白的大量表达。本研究成功实现了纳豆激酶在枯草芽孢杆菌中的高效分泌表达, 为纳豆激酶基因工程改造奠定了一定的基础, 同时推动纳豆激酶的工业化生产。

参考文献

- [1] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet [J]. *Experientia*, 1987, 43(10): 1110-1111
- [2] Fujita M, Hong K, Ito Y, et al. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1995, 18(10): 1387-1391
- [3] Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, et al. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase [J]. *Acta Haematologica*, 1990, 84(3): 139-143
- [4] Suwanmanon K, Hsieh P C. Isolating *Bacillus subtilis* and optimizing its fermentative medium for GABA and nattokinase production [J]. *CyTA-Journal of Food*, 2014, 12(3): 282-290
- [5] 黄磊, 谢玉娟, 李申, 等. 纳豆激酶基因的克隆及其在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中的表达 [J]. *食品科学*, 2007, 28(5): 199-202
- [6] HUANG Lei, XIE Yu-juan, LI Shen, et al. Molecular clone and expression of nattokinase gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [J]. *Food Science*, 2007, 28(5): 199-202
- [7] 何孝天, 刘中美, 崔文璟, 等. 介导纳豆激酶分泌表达的信号肽比较 [J]. *现代食品科技*, 2014, 5: 62-68
- [8] HE Xiao-tian, LIU Zhong-mei, CUI Wen-jing, et al. Comparison of signal peptides for nattokinase secretory expression [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 5: 62-68
- [9] Zhang A L, Liu H, Yang M M, et al. Assay and

- characterization of a strong promoter element from *B. subtilis* [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2007, 354(1): 90-95
- [8] Yang M, Zhang W, Ji S, et al. Generation of an artificial double promoter for protein expression in *Bacillus subtilis* through a promoter trap system [J]. Plos One, 2013, 8(2): e56321
- [9] Widner B, Thomas M, Sternberg D, et al. Development of marker-free strains of *Bacillus subtilis* capable of secreting high levels of industrial enzymes [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2000, 25(4): 204-212
- [10] Wei W, Xiang H, Tan H. Two tandem promoters to increase gene expression in *Lactococcus lactis* [J]. Biotechnology Letters, 2002, 24(20): 1669-1672
- [11] Jurgen B, Schweder T, Hecker M. The stability of mRNA from the *gsiB* gene of *Bacillus subtilis* is dependent on the presence of a strong ribosome binding site [J]. Molecular & General Genetics Mgg, 1998, 258(5): 538-545
- [12] Farazmand A. *Bacillus clausii* and *Bacillus halodurans* lack GlnR but possess two paralogs of *glnA* [J]. Journal of Proteomics & Bioinformatics, 2011, 4(9)
- [13] Kentaro M, Misa T. Creating random mutagenesis libraries using megaprimer PCR of whole plasmid [J]. Biotechniques, 2002, 33(5): 1033-4, 1036-8
- [14] Weng M, Zheng Z, Bao W. Enhancement of oxidative stability of the subtilisin nattokinase by site-directed mutagenesis expressed in *Escherichia coli* [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2009, 1794(11): 1566-1572
- [11] Jurgen B, Schweder T, Hecker M. The stability of mRNA