

透明颤菌血红蛋白基因在提高枯草芽孢杆菌产脂肽功能中的研究

王大威² 胡鸢雷¹ 刘永建² 林忠平¹

(¹ 北京大学, 北京 100871; ² 大庆石油学院, 大庆 163318)

摘要: 脂肽是一类具有特殊作用的生物表面活性剂。本实验将血红蛋白基因 (vhb) 置于 RDR 细菌启动子驱动下的质粒 PSET 中, 构建 PSET-RDR-vhb 重组质粒, 并通过电激作用转入脂肽代谢菌株 - 枯草芽孢杆菌株 (*Bacillus subtilis*) ZW-3 中, 转化菌株经酶切和 PCR 电泳检测鉴定, Southern-blot 杂交显示部分转化菌株中外源基因插入基因组 DNA, 采用一氧化碳差示色谱法测定了血红蛋白的表达量。实验进一步对转化菌株的生长曲线、总蛋白量、过氧化氢酶活性、脂肽的产率进行了测定, 结果显示, 相比于原始菌株, 转化菌株数据均有明显提高。

关键词: 透明颤菌血红蛋白基因 枯草芽孢杆菌 脂肽 表达

Studies on the Function of *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene in Improving Surfactin Producing Rate of *Bacillus subtilis*

Wang Dawei¹ Hu Yuanlei² Liu Yongjian² Lin Zhongping¹

(¹ Peking University, Beijing 100871; ² Daqing Petroleum Institute, Daqing 163318)

Abstract: Hemoglobin of the gram-negative bacterium *Vitreoscilla* can bind oxygen strongly and reduce the oxygen requirement of the bacterium. A recombinant plasmid PEST-RDR-vhb was constructed and transferred into strain ZW-3 (*Bacillus subtilis*). The results showed that the expression of vhb gene could improve cell growth and enhance the production of surfactin with 31.8% higher than that of control under different dissolved oxygen concentrations. Besides, vhb gene also increased the expression of total protein quantity and CAT.

Key words: *Vitreoscilla* hemoglobin gene *Bacillus subtilis* Surfactin Expression

脂肽 (lipopeptide) 是一类主要由芽孢杆菌产生的生物表面活性剂, 由于它具有良好的降低表面张力、乳化、抗菌抗病毒等重要作用, 自发现以来一直受到人们的关注。其中, 由枯草芽孢杆菌产生的表面活性素 (surfactin) 已成为研究的热点。但目前分离到的芽孢杆菌代谢脂肽能力较低, 同时这类细菌发酵时需氧量大, 不仅增大搅拌的能耗, 还因搅拌产生大量泡沫而影响发酵^[1]。因此如何提高芽孢杆菌代谢脂肽能力, 降低生产成本成为目前研究脂肽类生物表面活性剂中亟待解决的问题。

透明颤菌是一种专性好氧的革兰氏阴性丝状菌, 在低氧环境中诱导合成一种可溶性的血红蛋白, 该蛋白由透明颤菌血红蛋白基因 (*Vitreoscilla* hemoglobin gene, 简称 vhb) 编码, 由两个完全相同的蛋白亚基和二分子 b 型血红素组成的同型一聚体, 其光谱学性质及氧合动力学与氧合肌红蛋白、氧合血红蛋白等非常相似^[2]。资料表明^[3-7], 血红蛋白的表达可加快细胞的生长速度, 提高细胞的呼吸强度, 降低细胞的临界氧浓度。使细菌在大幅度的溶氧变化中保持恒定的呼吸率, 从而改善了细胞的生长特性, 使其在低氧条件下仍然具有生长优势。

自从 vhb 基因在大肠杆菌中成功地进行表达以来, 越来越多地被应用到微生物发酵工业的许多领域,

收稿日期: 2007-04-18

作者简介: 王大威 (1978-), 男, 在读博士, 从事微生物表面活性剂的研究工作; E-mail: wdw78913@163.com; Tel: 13466642489

通讯作者: 胡鸢雷, E-mail: huy1@pku.edu.cn

并取得了显著效果。1990 年 Khosravi 和 Webster 等^[8]将 *vhb* 基因应用于 α -淀粉酶的生产。发现 *vhb* 基因对 α -淀粉酶产率的提高具有很大的作用; 此外, *vhb* 基因在链霉菌 (*Streptomyces*) 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 乃至真核生物霉菌 (*Acremonium chrysogenum*) 中也都能成功表达, 并大大改善发酵过程中的供氧矛盾, 大幅度提高产物的产量^[9]。

因此, 将 *vhb* 基因导入代谢脂肽的枯草芽孢杆菌中, 从而达到降低氧耗, 提高脂肽代谢效率的目的。章银梅, 李心治等^[1]报道利用 *vhb* 基因提高枯草芽孢杆菌携带氧气能力, 但并未对枯草芽孢杆菌主要功用- 脂肽代谢能力进行测定。本研究将在 RDR 细菌启动子驱动下的 *vhb* 基因通过电激转化入枯草芽孢杆菌 ZW-3, 以期获得脂肽产率较高的重组菌株。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒、PCR 引物

带有 *vhb* 基因的质粒 PSET-RDR-*vhb* 由北京大学基因和蛋白质工程实验室构建 (图 1); 菌种枯草芽孢杆菌 ZW-3 (*Bacillus subtilis*) 为大庆石油学院微生物采油教研室分离筛选; *vhb* 基因 PCR 引物: *vhb*5' - TCATG TTAGA CCAGC AAACC AGCAA AC-3', *vhb*3' - TAGTG ATTCC TGAAG CGGCC TGAAA CT-3', 由北京三博远志生物技术公司合成。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的电激转化方法见文献^[10]略有改动。

1.2.2 重组质粒的提取、酶切、PCR、RT-PCR 鉴定等分子生物学技术均参照“分子克隆实验指南”的方法^[11]。

1.2.3 DNA 的 southern blot 杂交方法参照“分子克隆实验指南”的方法^[11]。

1.2.4 菌株生长曲线的制作 为研究 *vhb* 基因的导入在氧含量发生变化时对生物生长的影响, 将菌株接入 LB 培养基中, 通过液体石蜡的封盖控制氧气含量, 以培养时间为横坐标, 以菌液 OD₆₀₀ 的吸光度为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.5 菌株总蛋白量的测定, 采用考马斯亮蓝法^[12]测定各蛋白质提取液中总蛋白质的含量。

1.2.6 过氧化氢酶活测定参照碧云天过氧化氢酶检测试剂盒说明书。

1.2.7 血红蛋白的测定采用一氧化碳差色谱法, 方法参照文献^[13]。

1.2.8 脂肽生物表面活性剂产率的测定 脂肽表面活性剂纯化方法见文献^[14]。纯化样品采用高效液相色谱 (HPLC) 进行含量检测, 流动相 A (40%乙腈+60%10mmol/L 醋酸铵, pH6.9), 流动相 B (乙腈), 进行梯度洗脱, 0~10min 内 B 相由 10%变到 25%, 流动相 1.0ml/min、反相 C18 柱、紫外 215nm 检测即可。

2 结果

2.1 转化子的检测

2.1.1 *vhb* 基因 PCR 及酶切检测 将重组质粒 PSET-RDR-*vhb* 转化到枯草芽孢杆菌 ZW-3 后, 用安普霉素筛选转化子。选取转化子提取质粒进行 *vhb* 基因 PCR (图 2) 及酶切检测 (图 3), 通过检测获得 10 株阳性克隆, 做进一步的检测。

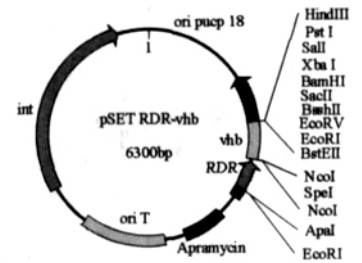


图 1 原核表达质粒 PSET-RDR-*vhb*

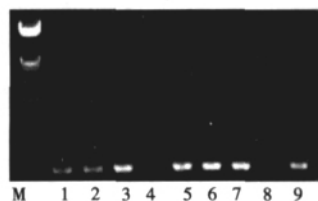


图 2 转化菌株质粒 *vhb* 基因 PCR 电泳分析

M: λ DNA/*Hind* III+*Eco*R I;
1~7: 阳性克隆子 PCR 产物 8: 负对照 9: 正对照



图 3 转化菌株质粒限制酶切电泳分析

M: λ DNA/*Hind* III+*Eco*R I
1: *Spe* I + *Eco*R V 2: PSET-RDR-*vhb*

2.1.2 vhb 基因 RT-PCR 检测 选取 PCR 和酶切检测结果阳性的菌株,用 TRIZOL 提取其总 RNA,进行 RT-PCR,电泳结果显示(图 4),vhb 基因在转化菌株内进行了表达。

2.1.3 vhb 基因的 Southern blot 检测 由于以 PSET 载体的外源基因曾有定位于基因组 DNA 的报道^[15],所以为检测外源基因是否定位于基因组 DNA 中,提取阳性克隆的总 DNA,电泳使质粒和基因组 DNA 分离,然后并不进行酶切,直接进行 Southern blot 杂交鉴定。杂交结果显示(图 5),的确有 4 株阳性克隆中存在外源基因定位于基因组 DNA 的现象。

2.2 血红蛋白作用的研究

2.2.1 菌株生长曲线的制作 在有氧条件下培养,从生长曲线可以看到(图 6),转化菌株和原始菌株相比,接入种子培养基后 10~25 h 进入对数生长期,25~30h 对数生长期结束,进入稳定期,35h 后都进入衰退期,但转化菌株的 OD₆₀₀ 值培养 35h 时为 0.98,明显高于原始菌株的 0.63,转化菌株的 OD₆₀₀ 值培养 50h 时为 0.53,也高于原始菌株的 0.31;缺氧条件下培养,原始菌株在 35h 后,OD₆₀₀ 值开始下降,而转化菌株在 50h 后 OD₆₀₀ 值才开始下降,转化菌株的 OD₆₀₀ 值培养 50h 时为 0.44,也明显高于原始菌株的 0.30。说明 vhb 基因的导入可以有效的提高转化菌株的生物量并在缺氧的情况下延长其稳定生产期,这对今后将该菌株用于发酵生产具有重要的意义。

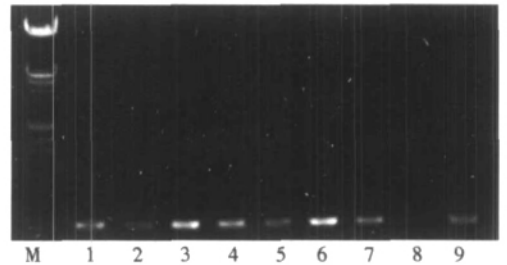


图 4 转化菌株质粒 vhb 基因 RT-PCR 电泳分析 M:λDNA/Hind III+EcoR I 1~7:阳性克隆子 PCR 产物 8:负对照 9:正对照



图 5 vhb 基因的 Southern 杂交分析

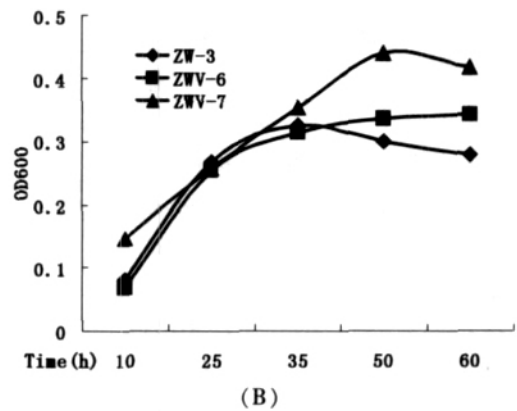
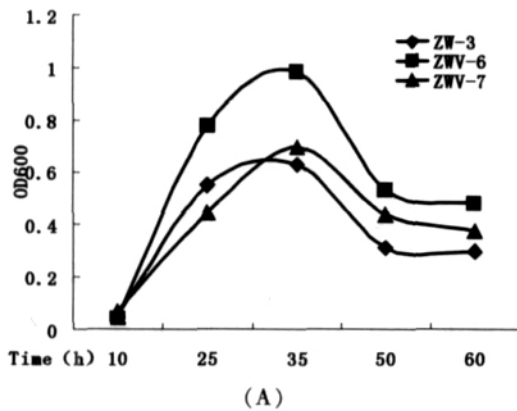


图 6 原始菌株 ZW-3 和转化菌株 ZWV-6/ ZWV-7 生长曲线量的比较

2.2.2 菌株总蛋白量的测定 比较 vhb 基因转化前后原始菌株和转化菌株在有氧和缺氧条件下细菌总蛋白的变化。如图 7 所示,有氧条件下,转化菌株 ZW-3 的总蛋白量可以达到 19.2mg/ml,远远高于原始菌株 ZW-3 的 6.0mg/ml;无氧条件下,转化菌株 ZWV-6 的总蛋白量为 8.3mg/ml,也高于原始菌株的 4.4mg/ml。说明 vhb 基因的导入可以在蛋白水平提升转化菌株的总蛋白量。

2.2.3 过氧化氢酶活测定 Dikshit 和 Webster^[15]曾报道 vhb 基因可以提升细菌中过氧化氢酶(CAT, chloramphenicol acetyl Transferase)的代谢水平,过氧化氢酶是一类广泛存在于动物、植物和微生物体内的末端氧化酶,其功能是催化细胞内过氧化氢分解,防止膜脂过氧化。本实验对 vhb 基因转化前后原始菌株和转化菌株在有氧和缺氧条件下过氧化氢酶活性进行了测定,结果如图 8 所示。从图 8 中可以看到,有氧条件下转化菌株 ZWV-6 的 CAT 酶活可达 23.2U/mg,相比于原始菌株提高酶活 21.5%;缺氧条件下转化菌株 ZWV-6

的CAT酶活相比较低,只有6.9 U/mg,但相比于原始菌株仍提高酶活33.6%。

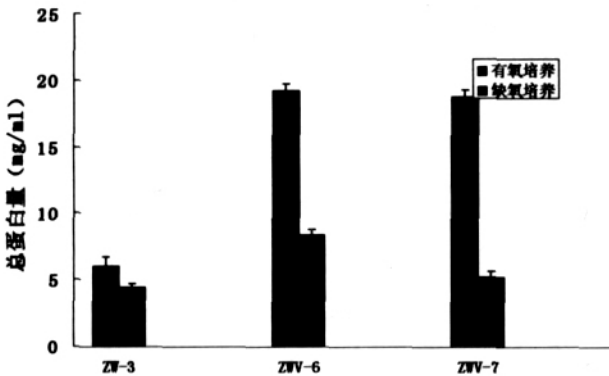


图7 原始菌株 ZW-3 和转化菌株 ZWV-6/ZWV-7 总蛋白量的比较

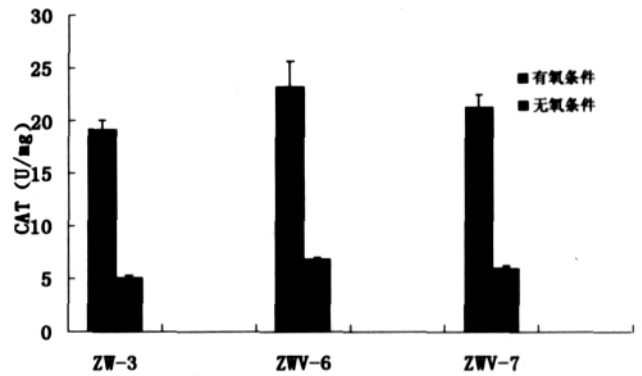


图8 原始菌株 ZW-3 和转化菌株 ZWV-6/ ZWV-7 过氧化氢酶活的比较

2.2.4 血红蛋白表达量的测定 CO 差异色谱实验结果显示 (图 9), 低氧条件下诱导的枯草芽孢杆菌 ZWV-6 中表达出的 Vhb 蛋白在 430nm 处有明显吸收峰, 与之前的报道相符^[16], 而相同条件下诱导的原始菌株 ZW-3 的蛋白粗提物中没有出现特征性吸收峰。这说明重组质粒 PSET-RDR-vhb 中的 vhb 基因在枯草芽孢杆菌中得到了成功表达, 且表达出的 Vhb 蛋白具有结合 CO 的生物活性。

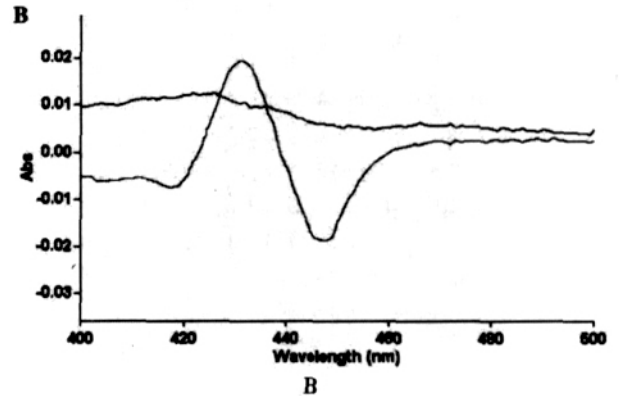
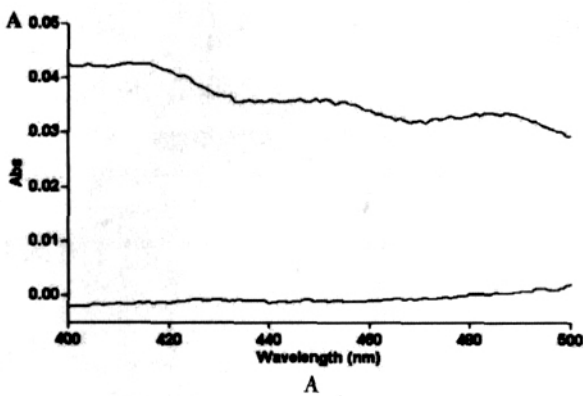


图9 原始菌株 ZW-3(A)和阳性菌株 ZWV-6(B)CO 差异色谱曲线

2.2.5 脂肽生物表面活性剂产率的测定 采用 HPLC 对从发酵液中提纯的脂肽生物表面活性剂的含量进行测定, 结果如图 10 所示。转化 vhb 基因的枯草芽孢杆菌 ZWV-6 的脂肽产率为 111.6mg/L, 比原始菌株 ZW-3 提高 31.8%, 说明 vhb 基因的转入对提高菌株的脂肽产率具有重要的作用。

3 结论

vhb 基因在被克隆时, 就证明能在大肠杆菌中表达。本实验结果证明其受氧调控的启动子同样能在枯草芽孢杆菌中在低溶解氧条件下大量诱导合成血红蛋白, 血红蛋白的表达明显的提高了枯草芽孢杆菌 ZW-3 总蛋白的表达量, 同时提高了过氧化氢酶活和脂肽生物表面活性剂产率, 分别为 33.6%和 31.8%。因此, vhb 基因的表达成为解决供氧限制的一种新办法。vhb 基因的应用不仅可以降低氧气及能量的消耗, 还不需要附加的设备投

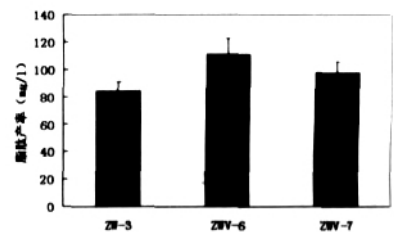


图10 原始菌株 ZW-3 和转化菌株 ZWV-6/ ZWV-7 脂肽产率的比较

(下转第 127 页)

- 5 豆长明,李继承.中国中西医结合杂志,2003,23(11):848-851.
- 6 Dou CHM, Li JCH. World Journal of Gastroenterology, 2004, 10(14):2091-2094.
- 7 Jiang GY, Jin DM, et al. Botanica Sinica, 1999, 41(3):334-336.
- 8 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- 9 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术.北京:科学出版社,1998.
- 10 He XH, Shaw PC, Xu LH, et al. Life Science, 1999, 64: 1163-1175.
- 11 Chan SH, Shaw PC, Mulot SF, et al. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 270: 279-285.
- 12 姚宏兵,吴仲,董贻诚,等.中国生物化学与分子生物学报,1998,3:264-268.
- 13 KB Wong, YB Ke, YC Dong, et al. Eur J Biochem, 1994, 221: 787-791.
- 14 李元元,安成才,廖靖军,等.高技术通讯,2000,9:5-8.
- 15 安群星,穆士杰,张献清,等.中国生物制品学杂志,2006,19(6):557-563.

(上接第119页)

资,因此可大大降低发酵成本。可以说,vhb基因的发现及研究进展为利用分子克隆技术解决微生物发酵过程中的氧气供求矛盾及实现高密度发酵培养提供了良好途径。

参考文献

- 1 章银梅,李心治.遗传学报,2000,27(2):183-188.
- 2 于慧敏,沈忠耀.微生物学报,1999,39(5):478-482.
- 3 Pringsheim EJ. Gen Microbid, 1951, 5: 124-149.
- 4 Webster DA, Eichhorn GC, Marzilli LG. Elsevier Science Publ, 1987, 245-265.
- 5 Dikshit KL, Dikshit RP, Webster DA. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 4149-4155.
- 6 Wakabayashi S, Matsubara H, Webster DA. Nature, 1986, 322: 481-483.
- 7 Dikshit KL, Webster DA. Gene, 1988, 70: 377-386.
- 8 Khosravi M, Webster DA, Stark BC. Plasmid, 1990, 24: 190-94.
- 9 郭宏秋,杨胜利.微生物学通报,1996,23(4):227-230.
- 10 Xue GP, Johnson SJ, Dalrymple PB. Journal of Microbiological Method, 1999, 34: 183-191
- 11 J.萨姆布鲁克, D.W 拉塞尔著,黄培堂等译.分子克隆实验指南第3版[M].北京:科学出版社,2002.
- 12 B.斯德尔乌赫著.钱嘉渊译.酶的测定方法[M].北京:中国轻工业出版社,1992,8.
- 13 Dikshit KL, Webster DA. Gene, 1988, 70: 377-386.
- 14 Cooper DG, Macdonald CR. Appl Environ Microbid, 1981, 42(3):408-412.
- 15 Dikshit KL, Dikshit RP, Webster DA. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 4149-4155.
- 16 Joshi M, Dikshit KL, Dikshit KL. Applied and Environment Microbiology, 1998, 6: 2220-2228.

(上接第123页)

DB104为蛋白酶深入研究提供了一个良好平台。

参考文献

- 1 Von der Laan JC, G Gerritse, et al. Appl Environ Microbid, 1991, 57: 901-909.
- 2 唐雪明,邵蔚蓝,沈微,等.生物技术,2001,11(4):3-6.
- 3 Hardd Tjalsma, Albert Bdhuis, Jand H, Jongbloed, Serd Bron. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(3):515-547.
- 4 傅晓燕,陈卫,张灏.中国酿造,2004,8:16-18.
- 5 Gang-Ping Xue, Jennifer S, Johnson, Brian P. Journal of Microbiological Methods, 1999, 34: 183-191.
- 6 邓兵兵,熊凌霜.生物工程进展,2000,20(5):63-65.