

枯草芽孢杆菌 CAS15 嗜铁素基因 *dhbC* 的克隆、表达及功能鉴定

余贤美^{1,2}, 林超^{2,3}, 郑服从^{2,3}, 贺春萍², 张修国¹

1 山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018

2 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 儋州 571737

3 海南大学环境与植物保护学院, 儋州 571737

摘要: 通过 PCR 技术扩增得到 *dhbC* 基因, 对其进行序列分析发现, *dhbC* 基因片段长为 1197 bp, 预期编码 398 个氨基酸, 蛋白分子量大小为 43.8 kD。将目的片段连接到表达载体 pET-30a(+), 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 获得重组菌株 BL21(DE3)/pET-30a-*dhbC*, 以 IPTG 在 30°C 诱导 4 h 实现高效表达, 获得一个分子量为 48.8 kD 的融合蛋白。重组蛋白可溶性分析结果表明: 融合蛋白主要为可溶性蛋白。Western blotting 分析结果表明: 重组蛋白可与兔抗 His-tag 多克隆抗体发生特异性反应, 在 48.8 kD 处有特异条带, 与预期结果一致, 证明重组质粒中含有 *dhbC* 基因。通过同源重组的策略将 *dhbC* 基因敲除后重新导入, 验证了 *dhbC* 基因与嗜铁素的生物合成密切相关。

关键词: 枯草芽孢杆菌, *dhbC* 基因, 基因克隆, 序列分析, 原核表达, 基因敲除

Cloning, expression and functional analysis of the *dhbC* gene from the siderophore producing bacterium *Bacillus subtilis* CAS15

Xianmei Yu^{1,2}, Chao Lin^{2,3}, Fucong Zheng^{2,3}, Chunping He², and Xiuguo Zhang¹

1 Plant Protection College, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

2 Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China

3 Environment and Plant Protection College, Hainan University, Danzhou 571737, China

Abstract: We amplified *dhbC* gene from the siderophore producing bacterium CAS15 by PCR. After ligated the PCR product to pMD18-T vector and then sequenced, we obtained a 1197 bp fragment. The blast result showed that the nucleotide acids of *dhbC* gene (Accession No. FJ194456) of CAS15 shared 99.7% identity with that of *dhbC* gene of *Bacillus subtilis* (GenBank Accession No. Z99120), and was predicted to encode a 43.8 kD polypeptide with 398 amino acid residues. We cloned the *dhbC* gene into expression vector pET-30a(+) and then transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) via calcium chloride transformation method, and obtained

Received: September 15, 2008; **Accepted:** March 16, 2009

Supported by: Central Basic R & D Special Fund for Public Welfare Institutes of China (Nos. 2008hzs1J013, 2008hzs1J014), National Support Project for Science and Technology (No. 2007BAD48B04), National Special Fund for Public Welfare Industry (No. nyhyzx07-033-2-3).

Corresponding author: Xiuguo Zhang. Tel: +86-538-8249095; E-mail: zhxg@sdau.edu.cn

中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Nos. 2008hzs1J013, 2008hzs1J014), 国家科技支撑计划(No. 2007BAD48B04), 公益性行业(农业)科研专项(No. nyhyzx07-033-2-3)资助。

the recombinant *E. coli* BL21(DE3)/pET-30a-dhbC. Induced by 1 mmol/L IPTG, the fusion protein 6His-DhbC, a 48.8 kD polypeptide was successfully expressed mainly in soluble form in *E. coli* BL21(DE3), and the amount reached highest at 30°C for 4 h. According to the N-terminal fusion 6 His-tag, we purified the recombinant polypeptide by Ni²⁺ metal affinity chromatography and finally identified it by Western blotting. The result indicated that the recombinant Dhbc had the antigenicity to rabbit anti-his-tag polyclonal antibody, which provides the basis for the study of practical utilization in production and the biocontrol mechanism of *B. subtilis*. Finally, we deleted *dhbC* gene by gene knockout and then retransformed it into the *dhbC* gene-deleted mutant, which confirmed that *dhbC* gene play an important role in siderophore biosynthesis.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *dhbC* gene, gene cloning, sequence analysis, prokaryotic expression, gene knockout

铁离子是所有生命体的必需微量元素之一。铁是地壳中含量居于第 4 位的元素,但其溶解性差,生物有效性低,大部分不能被微生物和植物利用。在缺铁环境中,嗜铁微生物通过分泌嗜铁素,提高土壤中Fe的生物有效性,供微生物和植物直接利用,通过与病原微生物竞争土壤中有限的铁离子,达到控制植物病害的目的,并能够促进植物的生长发育,提高植物的抗病性^[1]。

在缺铁条件下,枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)通过合成儿茶酚型嗜铁素 2,3-Dihydroxybenzoate (DHB)从体外获取所需要的铁离子^[2-4]。*B. subtilis* 染色体 291°处有一个 DHB 合成相关的基因簇,包含 *dhbA*、*dhbB*、*dhbC*、*dhbE*、*dhbF* 五个基因,*dhbA*、*dhbB*、*dhbC* 和 *dhbE* 分别编码 2, 3-dihydroxy-benzoate dehydrogenase, isochorismatase, isochorismate synthase 和 2, 3-dihydroxybenzoate-AMP ligase, *dhbF* 涉及 2, 3-dihydroxybenzoate 的生物合成^[5]。*dhbC* 为该基因簇的第 2 个基因,负责编码的 DHB 合成酶 (Isochorismate synthase, EC 5.4.99.6)是 DHB 合成过程中最重要的酶^[6]。*B. subtilis* 基因组中有 2 个 Isochorismate synthase 基因,分别由 *menF* 和 *dhbC* 基因编码,*menF* 位于 MK (Menaquinone, 呼吸链成分之一)生物合成基因簇, *MenF* 和 *DhbC* 在 DNA 水平和氨基酸水平上分别具有 47%和 35%的同源性^[6,7]。但是,对于 *dhbC* 基因的表达研究及功能验证迄今未见报道。

本研究通过 PCR 技术扩增获得 *B. subtilis dhbC* 基因片段,对 *dhbC* 基因在大肠杆菌中的表达进行了研究,并通过基因敲除和重新导入,验证了 *dhbC* 基因表达产物的功能,旨在为嗜铁细菌 *B. subtilis* 在实际生产上的应用及生防机制的研究提供一定的分子基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株

供试菌株 *Bacillus subtilis* CAS15 分离自海南岛橡胶树根际土壤;克隆载体 pMD 18-T vector、表达载体 pET-30a(+)购自宝生物(大连)有限公司;大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 由本实验室保存;*E. coli* BL21(DE3)购自天根生物科技公司;质粒 pEGFP-N1(含有新霉素抗性基因 *neo'*)购自 Clontech 公司。

1.1.2 生化试剂

DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、DNA Marker、PCR 产物回收试剂盒、DNA 回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒购自宝生物(大连)有限公司;IPTG、Protein Marker 购自上海生工生物工程技术服务有限公司;兔抗 His-tag 多克隆抗体、加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG-HRP、DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物科技公司;Ni-NTA His Bind resin 及聚丙烯空色谱柱购自 Novagen(Merck)公司;免疫印迹 PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司(Bio-Rad, CA);DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 购自 Roche 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

根据 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 基因组序列(GenBank Accession No. Z99120)设计一对特异引物:

*dhbC*1: 5'-GCGAATCCATGTTGGATCAAACGTTAT-3';

*dhbC*2: 5'-GCCTCGAGTCATATGTGATCCACGCCCA-3'。

根据 pEGFP-N1 质粒上新霉素抗性基因(*neo'*)的核苷酸序列,设计一对基因敲除引物:

pKO-F: 5'-GCATGTTGGATCAAACGTTATG

CGGAACCCCTATTTGTTTATT-3';

pKO-R: 5'-GCTCATATGTGATCCACGCCAG
CTTGGTCGGTCATTTTCG-3'.

为便于克隆及表达载体的构建, *dhbC1*、*dhbC2* 分别引入 *EcoR* I、*Xho* I 限制性酶切位点(下划线标出), 酶切位点前均加入保护性碱基; 引物 pKO-F 和 pKO-R 中下划线部分为 CAS15 *dhbC* 基因部分序列, 用于同源重组。引物由北京赛百盛生物技术有限公司合成。

1.2.2 *dhbC* 基因的克隆与序列分析

以 37°C 培养过夜的菌液为模板, 用高保真 DNA 聚合酶, 通过 PCR 技术扩增 *dhbC* 基因。PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min; 94°C 40 s, 51°C 40 s, 72°C 90 s, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用 PCR 产物回收试剂盒回收目的片段。

PCR 产物与克隆载体 pMD 18-T vector 用 T4 DNA 连接酶 16°C 反应过夜。连接产物经 CaCl₂ 法转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 在转化平板上经氨苄青霉素(Amp)100 μ g/mL、蓝白斑初步筛选, 挑取白色菌落振荡培养, 以菌液为模板(以无菌水为阴性对照, 以原 PCR 产物为阳性对照), 经 PCR 鉴定, 获得阳性克隆, 委托上海英骏生物技术有限公司进行测序。通过 Blast 搜索对测序结果进行分析。

1.2.3 表达载体的构建及工程菌的筛选

对测序鉴定后的质粒 pMD-dhbC 和表达载体 pET-30a(+)分别进行 *EcoR* I/ *Xho* I 双酶切, 回收双酶切后的 *dhbC* 基因片段和表达载体 pET-30a(+)大片段, T4 DNA 连接酶 16°C 连接过夜。连接产物通过 CaCl₂ 法转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 经卡那霉素(Kan)100 μ g/mL、蓝白斑初步筛选, 然后通过菌落 PCR 和 *EcoR* I/ *Xho* I 双酶切筛选和鉴定阳性重组质粒。

1.2.4 *dhbC* 基因的诱导表达

随机挑取 3 个含重组表达质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)单菌落, 接种于含 Kan 100 μ g/mL 的适量培养基中, 30°C 振荡培养过夜, 次日按 2% 的接种量转接, 加入 IPTG 到终浓度 1 mmol/L, 30°C 诱导 4 h, 收集菌体, 进行 10% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, 观察目的蛋白的表达情况, 预期获得 48.8 kD 的融合蛋白。以未经诱导的菌体和不含 *dhbC* 基因的空白表达载体为对照。

取其中一个 *E. coli* BL21(DE3)/pET-30a-dhbC 的

新鲜菌落于 5 mL 含 100 μ g/mL Kan 的 LB 培养基中 30°C 振荡培养过夜, 次日按 2% 的接种量转接, 加入 IPTG 到终浓度 1 mmol/L, 分别在 26°C、28°C、30°C、32°C、34°C 诱导 4 h, 收集菌体, 进行 10% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色观察结果, 并通过凝胶薄层扫描测定其表达量。

1.2.5 重组蛋白 DhbC 可溶性分析

诱导后的菌体用 50 mmol/L PBS(pH 7.4)重悬, 然后用超声波破碎 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清和沉淀分别取样进行 SDS-PAGE, 以分析表达产物的存在状态。

1.2.6 表达产物的纯化

表达产物的纯化按 Novagen 多聚组氨酸(His)标签融合蛋白纯化操作手册说明书进行。回收树脂反应液、漂洗液、洗脱液 D 和洗脱液 E, 经 10% SDS-PAGE 电泳, 并进行考马斯亮蓝染色, 分析各步收集液。

1.2.7 重组蛋白 DhbC 的 Western blotting 分析

取诱导后的菌体进行 SDS-PAGE, 以未经诱导的菌体为对照, 纯化后的重组蛋白 DhbC 为阳性对照, 将表达谱带从凝胶经电转仪转移至 PVDF 膜上, 先用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h, 再以兔抗 His-tag 多克隆抗体为一抗, 羊抗兔 IgG-HRP 为二抗, DAB 显色, 做蛋白印迹检测重组蛋白。

1.2.8 *dhbC* 基因的功能验证

以质粒 pEGFP-N1 为模板, 通过 PCR 技术扩增含有新霉素抗性基因(*neo*^r)DNA 片段的产物, PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min; 94°C 1 min, 59°C 50 s, 72°C 90 s, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收。目的片段与克隆载体 pMD 18-T 连接后测序, 通过电转化(转化参数为电压 2.5 kV, 电容 25 μ F, 电阻 200 Ω)将含有 *neo*^r 基因的片段导入 CAS15 感受态细胞(参照 Zeigler DR 的方法制备^[8]), 通过同源重组, 使 *neo*^r 基因片段替换 CAS15 的 *dhbC* 基因, 经 G418(100 mg/mL)初步筛选阳性克隆, 菌落 PCR 鉴定后, 获得 *dhbC* 基因缺失突变体。

通过电转化将质粒 pMD-dhbC 重新导入 *dhbC* 基因缺失突变体, 使之与缺失突变体中 *neo*^r 基因发生替换, 以 *dhbC1* 和 *dhbC2* 为引物, 经菌落 PCR 鉴定和 Southern dot blotting(参照罗氏地高辛试剂盒“DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I”说明书进行), 获得 *dhbC* 基因互补株。

将 *dhbC* 基因缺失突变株和互补株分别接种在 CAS 检测平板上, 以 CAS15 为参照, 通过观察橘黄色晕圈的产生^[9], 进行缺失突变体和互补株的表型鉴定, 以验证 *dhbC* 基因的功能。

2 结果与分析

2.1 *dhbC* 基因的克隆与序列分析

以培养过夜的菌液为模板, 通过 PCR 扩增, 获得约 1200 bp 的片段(图 1)。将 PCR 产物连接到克隆载体 pMD 18-T, 通过菌落 PCR 筛选阳性克隆, 经测序分析, 该片段为 1197 bp。Blast 比对结果显示, 该片段与 GenBank 数据库 *B. subtilis dhbC* 基因序列 (GenBank Accession No. Z99120) 同源性为 99.7%, 预期编码 398 个氨基酸残基、大小约 43.8 kD 的蛋白质。与 Z99120 相比, 仅 4 个碱基不同, 分别是: 第 411 个碱基由 C 变为 G, 第 550 个碱基由 T 变为 A, 第 586 个碱基由 C 变为 T, 第 846 个碱基由 C 变为 G。在氨基酸序列上, 第 184 个氨基酸残基由丝氨酸变为苏氨酸, 第 196 个氨基酸残基由亮氨酸变为苯丙氨酸, 第 137 及 282 个氨基酸残基保持不变。将 CAS15 *dhbC* 基因片段提交 GenBank (Accession No. FJ194456)。

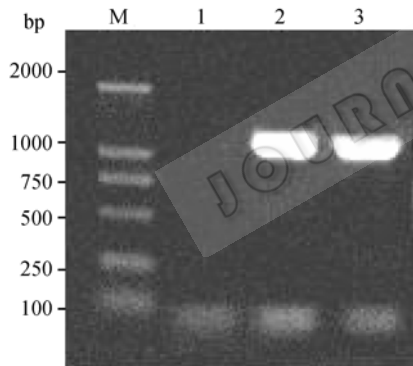


图 1 *dhbC* 基因 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR product of *dhbC* gene. M: DNA marker; 1: negative control; 2, 3: PCR products of *dhbC* gene.

2.2 表达载体的构建与工程菌的筛选

以 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切含有 *dhbC* 基因的 pMD 18-T, 回收目的基因片段, 插入 pET-30a(+) 载体的相同酶切位点得到重组表达质粒 pET-30a-*dhbC*, 转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 得到重组菌 BL21(DE3)/pET-30a-*dhbC*。挑取 3 个重组子, 经菌落 PCR (以水为阴性对照) 和酶切鉴定确定为阳性重组子, 说明表达载体构建成功。菌落 PCR 结果显示, 3 个重组子均获得了目的片段, 而阴性对照中未扩

增到相应片段。酶切鉴定结果显示, 3 个重组子均获得了约 1200 bp 的片段, 说明 3 个重组子均含有 *dhbC* 基因片段, 为阳性重组子。

2.3 *dhbC* 基因在大肠杆菌中的表达

以终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 作为诱导剂, 30°C 摇床诱导目的蛋白在大肠杆菌中表达, 同时将仅含空载体 pET30-a(+) 的 BL21(DE3) 在相同条件下也进行诱导表达, 作为对照。结果表明, BL21(DE3)/pET-30a-*dhbC* 经诱导后, 在分子质量 48.8 kD 处有一条明显的新增蛋白带(融合蛋白), 而对照在此处没有条带(图 2)。这一新增蛋白带的分子质量与基因表达产物分子质量预测值相符, 证明 *E. coli* BL21(DE3)/pET-30a-*dhbC* 表达了目的融合蛋白 DhbC。

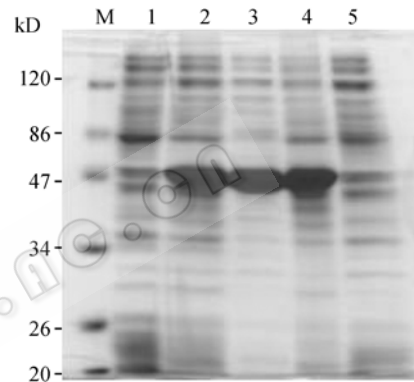


图 2 *dhbC* 基因在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达

Fig. 2 Expression of *dhbC* gene in *E. coli* BL21(DE3). M: protein marker; 1: control without induction; 2-4: 3 random clones; 5: BL21(DE3)/pET-30a.

2.4 最佳诱导温度分析

工程菌于 30°C 下培养过夜, 次日分别于 26°C、28°C、30°C、32°C 和 34°C 下, 经 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h, 然后取菌体进行 SDS-PAGE 分析, 如图 3 所示, 重组蛋白在 30°C 时表达量最高, 凝胶薄层扫描分析显示, 约占菌体总蛋白的 58%。

2.5 重组蛋白 DhbC 可溶性分析

诱导后的菌体经超声波破碎后离心, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE。结果显示, 重组蛋白以可溶和包涵体 2 种形式存在, 上清中的蛋白含量比包涵体中的大, 而且主要以可溶形式存在(图 4)。

2.6 表达产物的纯化

按 Novagen 多聚组氨酸(His)标签融合蛋白纯化操作手册进行纯化, 取部分回收树脂反应液、漂洗液、洗脱液 D 和洗脱液 E, 进行 SDS-PAGE 电泳, 结果显示, 重组蛋白 DhbC 主要存在于洗脱液 D 中(图 5)。

2.7 重组蛋白 DhbC 的 Western blotting 分析

菌体经诱导后进行 SDS-PAGE, 电转移后做 Western blotting 分析。结果显示, 阳性对照及 3 个重组菌株在 48.8 kD 处均有一条明显的特异条带, 阴性对照, 即未经诱导的菌株没有出现相应的条带(图 6), 表明重组蛋白可与兔抗 His-tag 多克隆抗体发生特异性反应, 与预期结果一致。

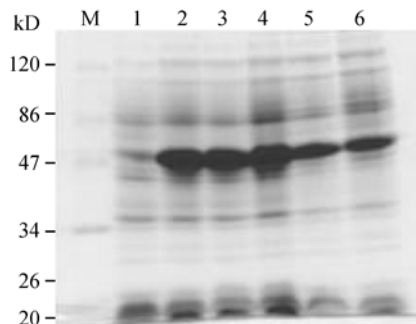


图 3 *E. coli* BL21(DE3)/pET-30a-*dhbC* 最佳诱导温度分析
Fig. 3 Effect of inducing temperature on the expression of recombinant DhbC. M: protein marker; 1: control without induction; 2-6: induced at 26°C, 28°C, 30°C, 32°C, 34°C, respectively.

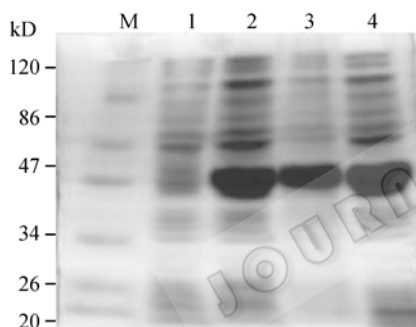


图 4 重组蛋白 DhbC 可溶性分析
Fig. 4 Solubility of recombinant DhbC. M: protein marker; 1: control without induction; 2: total protein after induction; 3: precipitant after ultrasonication; 4: supernatant after ultrasonication.

2.8 *dhbC* 基因的敲除和重新导入

以质粒 pEGFP-N1 为模板, 经 PCR 扩增, 获得大小约 1350 bp 的特异性条带(图 7), 与预期的一致, 初步确认为新霉素抗性基因 *neo^r*。连接到克隆载体后测序, 该片段为 1366 bp。引物 pKO-F 和 pKO-R 中各含有 20 bp CAS15 的 *dhbC* 基因片段, 因此, 扩增获得的 *neo^r* 基因片段为 1326 bp, Blast 搜索结果表明, 扩增的新霉素抗性基因 *neo^r* 与生物谷质粒信息数据库上公布的 pEGFP-N1 质粒上的 *neo^r* 序列完全一致, 确认重组质粒 pMD 18-*neo* 构建成功。

重组质粒 pMD 18-*neo* 经电转化导入 CAS15 感

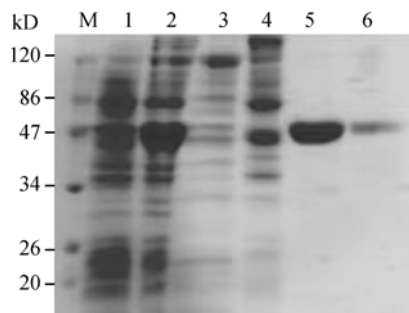


图 5 重组蛋白 DhbC 的纯化
Fig. 5 Purification of recombinant DhbC. M: protein marker; 1: control without induction; 2: supernatant after ultrasonication; 3: resin suspension; 4: washing buffer; 5: dilution D; 6: dilution E.

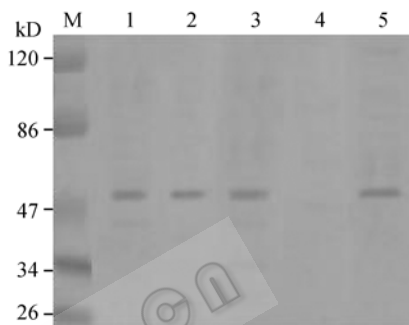


图 6 重组蛋白 DhbC 的 Western blotting 分析
Fig. 6 Western blotting of recombinant DhbC. M: protein marker; 1-3: 3 recombinant strains after induction; 4: control without induction; 5: purified recombinant DhbC.

受态细胞, 通过 G418(100 μg/mL)初步筛选, 获得 *neo^r* 基因片段替换重组子, 经 PCR 鉴定, 替换 *dhbC* 基因的片段大小与预期的完全一致, 证明成功获得了 *dhbC* 基因缺失突变体。

dhbC 基因完整编码区经电转化重新导入 *dhbC* 基因缺失突变体, 通过 PCR 筛选, 并通过菌液 Southern 点杂交进行验证(图 8), 获得了 *dhbC* 基因互补株。

2.9 *dhbC* 基因功能验证

CAS 检测平板观察结果显示, *dhbC* 基因缺失突变株在 CAS 检测平板上未能产生橘黄色晕圈(图 9A), 而互补株产生明显的橘黄色晕圈(图 9B), 表明互补株产生了嗜铁素, 验证了 *dhbC* 基因与嗜铁素的产生密切相关。

3 讨论

在众多已鉴定的植物根际促生菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)中, 芽孢杆菌属是分布较广、研究较多的一类。 *B. subtilis* 基因组含有 2 个 isochorismate 合成酶基因, 分别位于 MK 生物合

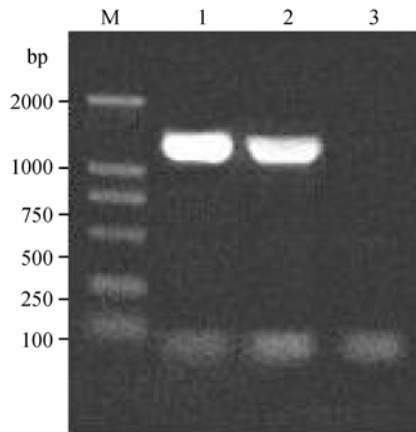


图7 *neo^r* 基因 PCR 扩增产物

Fig. 7 PCR product of *neo^r* gene. M: DL2000 marker; 1,2: PCR product of *neo^r* gene; 3: negative control.

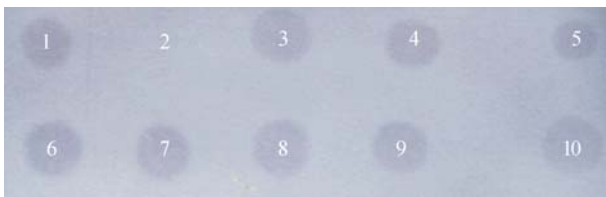


图8 CAS15 *dhbC* 基因互补株 Southern 点杂交验证

Fig. 8 Southern dot blotting of CAS15 *dhbC⁺* mutant. 1: CK1 (DIG labeled DNA); 2: CK2 (ddH₂O); 6: plasmid pMD-*dhbC*; 7: overnight-cultured liquid of CAS15; 3-5, 8-10: 2 *dhbC⁺* mutants (3 repeats respectively).

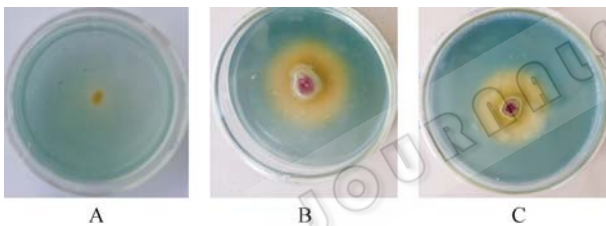


图9 *dhbC* 基因缺失突变株和互补株表型鉴定

Fig. 9 Phenotype analysis of a *dhbC* deletion mutant and complementation mutant. (A) CAS15 *dhbC*-del. (B) CAS15. (C) CAS15 *dhbC*-com.

成基因簇(*menF*) 和 DHB 生物合成基因簇(*dhbC*)。Rowland 和 Taber^[10]研究发现, *menF* 基因缺失体产生的 MK 和 DHB 能够达到野生型水平, 说明 *DhbC* 能够为 MK 的生物合成提供充足的 isochorismate, 然而, *dhbC* 基因缺失体未能检测到 DHB 的合成, 表明 *MenF* 不能为 DHB 的生物合成提供足够的 isochorismate, 可能原因是 *dhbC* 基因缺失体的 *MenF* 合成量不足, 从而降低了 isochorismate 生物合成的水平, 不能够满足 DHB 生物合成的需要。说明了 *dhbC* 基因在 *B. subtilis* isochorismate 生物合成过程中的重要性。因此, 对 *B. subtilis dhbC* 基因进行克隆及表达分析具有重要的意义。

大肠杆菌具有遗传背景清楚, 技术操作简便, 研究周期短, 培养条件简单以及利于高密度发酵等优点, 常作为高效表达研究的首选体系。 *E. coli* BL21(DE3) 由于缺乏降解外源蛋白的蛋白酶, 间接提高了外源蛋白的表达水平。另外, *E. coli* BL21(DE3) 是一类 T7 启动子表达菌株, 其染色体上携带一拷贝由 *lacUV5* 控制的 T7 RNA 聚合酶基因, T7 RNA 聚合酶的选择性和活性保证了 T7 启动子对外源蛋白表达的高效性和专一性, 使得几乎所有细胞资源都用于目标基因表达, 适于高效表达外源基因^[11,12]。 *E. coli* BL21(DE3) 已被成功用于蜡样芽孢杆菌铜锌超氧化物歧化酶(*sodC*)基因、力生长因子(Mechano-growth factor, MGF)、重组胸腺素 $\alpha 1$ (Thymosin $\alpha 1$, TM- $\alpha 1$) 与复合 α 干扰素 (IFN α -con) 融合蛋白等的高效原核表达^[13-15]。

全基因组序列分析显示, *B. subtilis dhbC* 基因片段全长 1197 bp, 编码 398 个氨基酸残基、分子量大小为 43.8 kD 的蛋白质^[5]。本研究通过 PCR 技术, 扩增 *dhbC* 基因片段为 1197 bp, 与预期结果一致, 该片段与 *B. subtilis dhbC* 基因序列 (Accession No. Z99120) 的同源性为 99.7%。

利用大肠杆菌表达重组蛋白时常常形成包涵体, 而对包涵体的变性、复性等操作不但烦琐, 而且是影响重组蛋白生物活性的重要因素。因此, 在构建表达载体时, 将 *dhbC* 基因与表达载体 pET-30a(+) 中 N 端的 6 His-tag 进行融合表达, 不但有利于增加重组蛋白的可溶性, 避免形成包涵体, 而且便于后续对重组蛋白所进行的表达分析和分离纯化等。结果表明, *dhbC* 基因在大肠杆菌中经 1 mmol/L IPTG 30°C 诱导 4 h 实现了高效表达, 获得一个 48.8 kD 的融合蛋白, 而且融合蛋白主要以可溶形式存在, 约占菌体总蛋白的 58%。

为验证 *dhbC* 基因的功能, 采用同源重组的策略, 将 CAS15 基因组中 *dhbC* 基因敲除后再重新导入, 通过 CAS 检测平板上橘黄色晕圈的产生情况^[9], 对 *dhbC* 基因功能进行验证。基因敲除引物中包括部分 *dhbC* 基因的部分序列, 便于同源重组; 而且利用 pKO-F 和 pKO-R 这一对引物扩增的片段包含新霉素表达所需的启动子和终止子, 为完整的基因片段, 因此, *dhbC* 基因缺失突变体可以通过新霉素或 G418 进行筛选。但是, 在实验过程中, 新霉素抗性平板上有真菌的污染, 可能原因是实验室菌种混杂, 因此, 本研究通过新霉

素结构类似物 G418 进行转化子的筛选。

同源重组法已成功用于构建枯草芽孢杆菌孢子形成早期因子基因 *spo0A* 缺失突变株^[16]、枯草芽孢杆菌转酮酶(*tkt*)缺失突变菌株^[17]和枯草芽孢杆菌 224 溶血样基因 *yugS* 缺失突变株^[18]。同源重组法作为一种可以使外源基因在宿主中稳定复制表达的方式,对质粒本身和宿主菌没有特殊要求。余志强等^[16]以大肠杆菌(*E. coli*)质粒 pBluescript IIKs(+)为骨架,构建了基于枯草杆菌 *spo0A* 基因位点的整合载体 pYZQ-1,然后转化枯草杆菌,从新霉素和壮观霉素双抗性平板上挑取转化子,通过 PCR 鉴定,获得了 *spo0A* 基因缺失突变株。

本研究结果进一步验证了同源重组法用于构建芽孢杆菌基因缺失突变株的可行性,以及大肠杆菌质粒可以直接转化枯草杆菌;同时也证明,同源重组法可用于芽孢杆菌基因缺失突变株的基因重新导入,获得互补株。表型鉴定结果表明,*dhbC* 基因在嗜铁素生物合成中发挥重要作用。

本研究通过 PCR 技术克隆了 *B. subtilis dhbC* 基因,进行原核表达,并通过基因敲除和重新导入,验证了 *dhbC* 基因的功能,具有重要的意义,将为嗜铁细菌 *B. subtilis* 的筛选利用提供分子理论依据,为嗜铁微生物的研究及其在促进植物生长和植物病害生物防治中的应用奠定基础。

REFERENCES

- [1] Yu XM, Zheng FC. The development and utilization of siderophore on plant growth promotion and plant disease control. *Chin Agric Sci Bull*, 2007, **23**(8): 507–510.
余贤美, 郑服丛. 嗜铁素在促进植物生长及病害防治等方面的应用. *中国农学通报*, 2007, **23**(8): 507–510.
- [2] Boyd J, Oza MN, Murphy JR. Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria *tox* iron-dependent regulatory element (*dtxR*) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 5968–5972.
- [3] Peters WJ, Warren RAJ. Itoic acid synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1968, **95**: 360–366.
- [4] Peters WJ, Warren RAJ. Phenolic acids and iron transport in *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta*, 1968, **165**: 225–232.
- [5] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 1997, **390**: 249–256.
- [6] Rowland B, Grossman T, Osburne M, et al. Sequence and genetic organization of a *Bacillus subtilis* operon encoding 2,3-dihydroxybenzoate biosynthetic enzymes. *Gene*, 1996, **178**: 119–123.
- [7] Rowland B, Hill K, Miller P, et al. Structural organization of a *Bacillus subtilis* operon encoding menaquinone biosynthetic enzymes. *Gene*, 1995, **167**: 105–109.
- [8] Zeigler DR. *Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains*. 7th Ed. 2003. http://www.bgsc.org/_Catalogs/Catpart4.pdf.
- [9] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*, 1987, **160**: 47–56.
- [10] Rowland B, Taber H. Duplicate isochorismate synthase genes of *Bacillus subtilis*: Regulation and involvement in the biosyntheses of menaquinone and 2,3-eihydroxybenzoate. *J Bacteriol*, 1996, **178**(3): 854–861.
- [11] Lee L, Walsh P, Prater C, et al. Characterization of an autoantigen associated with chronic ulcerative stomatitis: The CUSP autoantigen is a member of the P53 family. *J Invest Dermatol*, 1999, **113**(2): 146.
- [12] Zeng X, Zhu Y, Lu H. NBP is the p53 homolog p63. *Carcinogenesis*, 2001, **22**(2): 215.
- [13] Mo XD, Wang YJ, Wang Q, et al. Clone of CuZn-superoxide dismutase (*sodC*) gene from *Bacillus cereus* 905 and its expression in *Escherichia coli*. *J Agri Biotech nol*, 2008, **16**(3): 521–525.
莫小丹, 王勇军, 王琦, 等. 蜡样芽孢杆菌 905 铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆及原核表达. *农业生物技术学报*, 2008, **16**(3): 521–525.
- [14] Zhang BB, Jiang P, Xian CY, et al. Expression of mechano-growth factor in *Escherichia coli* and activity analysis. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(7): 1180–1185.
张兵兵, 江鹏, 鲜成玉, 等. 力生长因子在大肠杆菌中的表达及活性分析. *生物工程学报*, 2008, **24**(7): 1180–1185.
- [15] Liu XJ, Liu FX, Li B, et al. Expression and activity analysis of interferon α -con and thymosin- α 1. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(7): 1168–1173.
刘先俊, 刘方欣, 黎波, 等. 胸腺素 α 1 与复合 α 干扰素融合蛋白的表达及其生物学活性. *生物工程学报*, 2008, **24**(7): 1168–1173.
- [16] Yu ZQ, Yang MM, Yang ZX, et al. The construction of *Bacillus subtilis spoO A⁻* mutant by homologous recombination method. *J Wuhan Univ (Nat Sci Ed)*, 2004, **50**(2): 229–233.
余志强, 杨明明, 杨朝霞, 等. 同源重组法构建枯草杆菌 *spoO A⁻* 基因缺失突变株. *武汉大学学报(理学版)*, 2004, **50**(2): 229–233.
- [17] Peng QA, Zhang XF, Wu SF, et al. Construction of *Bacillus subtilis tkt⁻* mutant by homologous recombination. *Biotech*, 2006, **16**(6): 23–26.
彭其安, 张西峰, 吴思方, 等. 同源重组法构建枯草芽孢杆菌转酮酶缺失突变菌株. *生物技术*, 2006, **16**(6): 23–26.
- [18] Liu J, Fang CH, Li W, et al. Construction of *Bacillus subtilis* 224 *yugS* mutant by homologous recombination method. *Biotech Bull*, 2007, **4**: 148–151.
刘杰, 房春红, 李琬, 等. 同源重组法构建枯草芽孢杆菌 224 *yugS* 基因缺失突变株. *生物技术通报*, 2007, **4**: 148–151.