

枯草芽孢杆菌 *pgsA* 基因的克隆及序列分析*

温海燕¹, 秦晓冰¹, 温建新¹, 单 虎^{1*}, 牛晋国², 聂玉霞³

(1. 青岛农业大学动物科技学院, 山东青岛 266109;

2. 山西省农业科学院畜牧兽医研究所, 山西太原 030032; 3. 山东省蚕业研究所, 山东烟台 265147)

摘要:根据 GenBank 中已发表的枯草芽孢杆菌 *pgsA* 的基因序列, 设计合成了一对能扩增 1 225 bp 基因片段的引物。以枯草芽孢杆菌染色体 DNA 为模板, 经 PCR 扩增得到目的片断, 然后将其克隆到 pMD18-T 载体上, 经蓝白斑筛选和酶切鉴定选择阳性克隆进行序列测定。经 DNA Star 软件将其与 GenBank 上的 *pgsA* 序列进行同源性比较, 结果表明, 核苷酸同源性均在 90% 以上, 氨基酸同源性为 94% 以上。核苷酸序列系统进化树分析, 发现该试验株与浙江株亲缘关系最近。经 ProtScale 软件分析表明, 该基因所编码蛋白在靠近其 N 端存在一个跨膜区, 为跨膜表达体系的建立和新型口服基因工程疫苗的研制奠定了一定的基础。

关键词:枯草芽孢杆菌; *pgsA* 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q785; S852.616

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2008)04-0038-04

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是农业部批准的可应用在新型微生态饲料添加剂中的一种益生菌, 是一种短杆状、无荚膜、能运动的革兰氏阳性好氧菌, 具有很强的蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活性及耐酸、耐盐、耐高温和耐挤压的特性, 作为饲用微生态制剂及污水处理剂已得到广泛应用^[1-4]。

枯草芽孢杆菌的染色体上有聚- γ -谷氨酸合成酶复合体 A (poly- γ -glutamic acid synthetase A, *pgsA*) 基因, 由 1 143 个核苷酸组成, 编码 381 个氨基酸。*pgsA* 基因与 *pgsB*、*pgsC* 共同组成聚- γ -谷氨酸合成酶系的基因簇, 这 3 个基因对聚- γ -谷氨酸 (poly- γ -glutamic acid, γ -PGA) 的合成缺一不可, 其中 *pgsA* 基因能使 γ -PGA 合成酶系稳定地锚定在细胞膜上, 是 γ -PGA 的运输载体, 并对 γ -PGA 的延长起重要作用^[5-6]。*pgsA* 蛋白在靠近其 N 端 26~42 氨基酸残基处有一个跨膜区^[7], 该跨膜区的存在, 为建立 *pgsA* 跨膜表达体系提供了条件。将 *pgsA* 基因与目的基因连接进行融合性表达, 并运用乳酸杆菌作为递送外源抗原载体的优点, 构建新型的口服基因工程疫苗并加以运用, 将具有极其广阔前景。基于 *pgsA* 基因的特殊功能, 研究对枯草芽孢杆菌 *pgsA* 基因进行克隆及序列分析, 为跨膜表达体系的建立和新型口服基因工程疫苗的研制奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试剂和细菌

高保真 *Taq* DNA 聚合酶、各种限制性内切酶均购自北京赛百盛基因技术有限公司; pMD18-T Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司; 超薄琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和细菌 DNAout (G^+) 均购自绵阳高新区天泽基因工程有限公司; *E. coli* DH5 和 *Bacillus subtilis* 由动物传染病实验室保存。

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 中已发表 *Bacillus subtilis pgsA* 的基因序列, 应用 Primer5.0 软件设计合成了一对能扩增 1 225 bp 基因片段的引物, 序列如下:

P1: 5'-AA GGTGTGTCAAACGATG-3'

P2: 5'-ATGAACACGATGGCTACG-3'

由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.3 枯草芽孢杆菌基因组 DNA 的提取

挑取枯草芽孢杆菌单菌落, 接种到 5 mL 营养肉汤中, 37℃ 振荡培养过夜, 参考细菌 DNAout (G^+) 试剂盒说明书提取全基因组。

1.4 PCR 体系与反应条件

以提取的枯草芽孢杆菌全基因组 DNA 为模板, 用合成的引物进行 PCR 扩增, 采用 25 μ L 的 PCR 反应体系: 5 ng DNA 模板, 2.5 μ L 10 \times PCR

* 收稿日期: 2007-12-23

作者简介: 温海燕(1981-), 女, 山东郓城人, 硕士研究生, 主要从事动物传染病学研究。* 通讯作者

buffer, 0.5 μ L 上游引物 (25 μ mol/L), 0.5 μ L 下游引物 (25 μ mol/L), 1.25 U *Taq* DNA 聚合酶, 19.25 μ L ddH₂O, 优化的 PCR 反应条件为: 94 5 min; 94 1 min, 52.2 1 min, 72 1 min 30 s, 30 个循环; 72 10 min。5 μ L PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳, 观察结果。

1.5 目的片段的回收、纯化及序列测定

参照超薄琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明回收纯化目的片段, 然后将其与 pMD18-T 载体连接, 将连接产物转化感受态细胞 DH5, 挑斑, 扩大培养, 抽提重组质粒进行酶切鉴定和 PCR 鉴定^[8], 将鉴定为阳性克隆的菌液送宝生物工程(大连)有限公司测序。

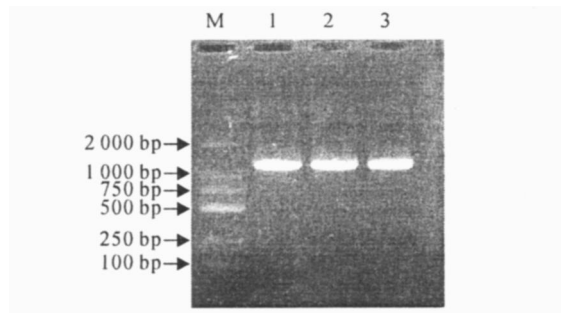
1.6 pgsA 基因序列分析

利用 DNA Star 软件对所测定的 pgsA 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列进行编辑, 并与 GenBank 中的序列进行同源性比较, 然后用 ProtScale 软件对 pgsA 蛋白的空间进行模拟分析。

2 结果

2.1 pgsA 基因的 PCR 扩增

以枯草芽孢杆菌 DNA 基因组为模板, 应用合成的 P1 和 P2 引物进行 PCR 反应扩增 pgsA 基因, 所获得的 PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳呈单一条带, 大小约为 1 225 bp, 与预期结果相符(图 1)。



M. DNA 标准 DL 2 000; 1~3. Products of PCR

M. DNA Marker DL 2 000; 1-3. PCR 扩增产物

图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of PCR

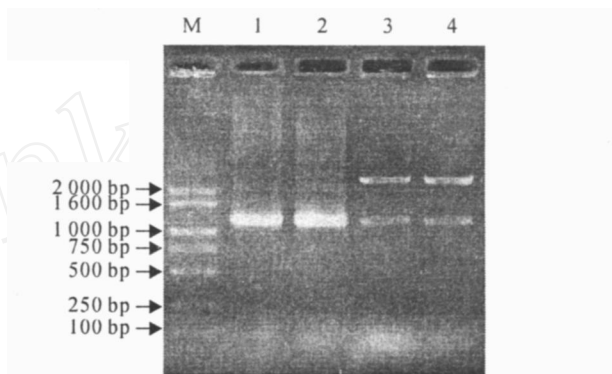
2.2 重组质粒 pT pgsA 的 PCR 鉴定

将重组质粒 pT pgsA 转化 *E. coli* DH5 感受态细胞, 获得大量重组转化子。从中随机挑选几个

重组子单菌落, 以 PCR 方法进行鉴定, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 以引物 P1 和 P2 扩增得到了大小约为 1 225 bp 的特异性片段, 表明所检测的克隆中含有目的片段。

2.3 重组质粒 pT pgsA 的双酶切鉴定

重组质粒 pT pgsA 经 *Bam*H 和 *Hind* 双酶切后, 得到大约 1 261 bp 的插入片段和大约 2 656 bp 的载体片段, 证明所挑取的克隆为正确的重组转化子(图 2)。



M. DNA 标准 DL 2 000; 1~2. 重组质粒 pT pgsA 的 PCR 鉴定;

3~4. 重组质粒 pT pgsA 的双酶切鉴定

M. DNA Marker DL 2 000; 1-2. PCR identification of pT pgsA;

3-4. pT pgsA digested with *Bam*H / *Hind* (1 261 bp + 2 656 bp)

图 2 重组质粒 pT pgsA 鉴定结果

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pT pgsA

2.4 pgsA 基因的序列测定

将阳性克隆的菌液进行测序, 测定序列与 GenBank 中的序列进行同源性比较, 结果表明, pgsA 基因开放阅读框大小为 1 143 bp, 编码 381 个氨基酸。用 DNA Star 软件将其与 GenBank 中的序列进行同源性比较, 结果表明, 试验株 pgsA 基因与 GenBank 中 AB016245 (pgsA)、AB039950 (capA)、AB046355 (ywtB)、Z92594 (ywtB)、DQ086153 (pgaA) 基因核苷酸同源性分别为 90.1%、90.2%、90.0%、90.0%、89.9% (表 1)。再根据它们的核苷酸序列绘制系统进化树(图 3), 结果表明, 试验株与浙江株在进化上亲缘关系最近。用 ProtScale 软件对 pgsA 蛋白的分析结果表明, pgsA 蛋白靠近 N 端存在一个跨膜区(图 4)。

表 1 不同枯草芽孢杆菌 pgsA 相似基因的核苷酸同源性比较

Table 1 Nucleotide homologies between similar pgsA genes of different *B. subtilis*

		Percent Identity							
		1	2	3	4	5	6		
Divergence	1	■	90.1	90.2	90.0	90.0	89.9	1	test(pgsA)
	2	10.7	■	99.8	99.7	99.5	99.2	2	AB016245(pgsA)
	3	10.6	0.2	■	99.8	99.3	99.2	3	AB039950(capA)
	4	10.8	0.4	0.2	■	99.1	99.0	4	AB046355(ywtB)
	5	10.9	0.5	0.7	0.9	■	99.2	5	Z92594(ywtB)
	6	11.1	0.8	0.8	1.0	0.8	■	6	DQ08153(pgaA)
		1	2	3	4	5	6		

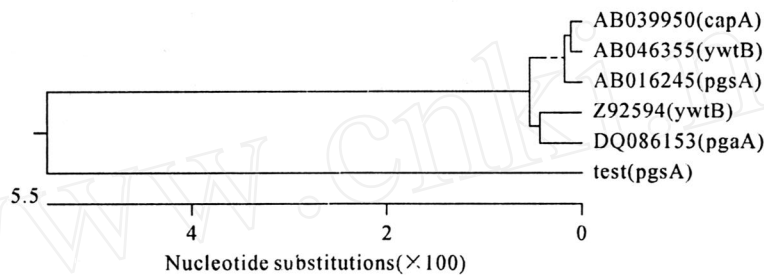


图 3 枯草芽孢杆菌 pgsA 相似基因核苷酸序列系统进化树

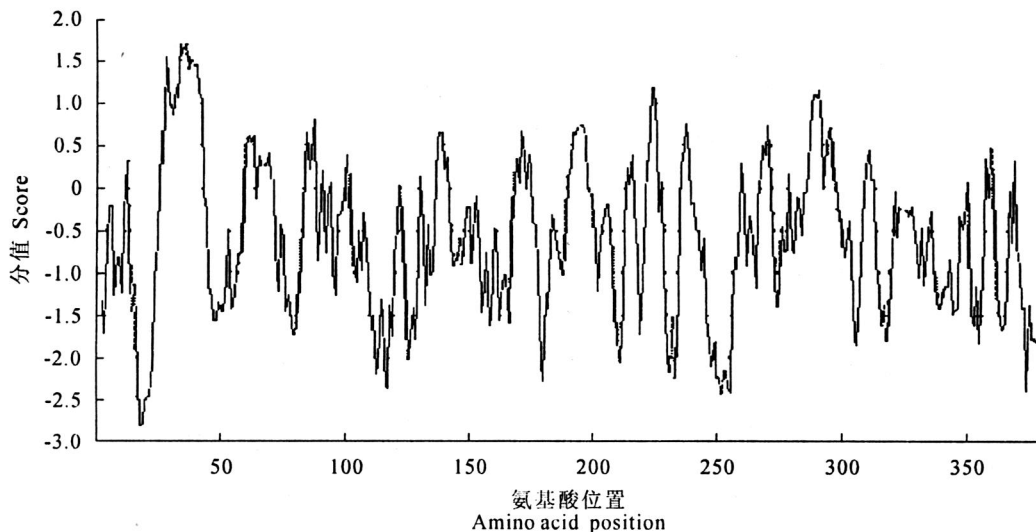
Fig. 3 Phylogenetic tree of deduced amino acid of *B. subtilis* pgsA gene

图 4 pgsA 蛋白跨膜区分析

Fig. 4 The analysis of transmembrane domain of the pgsA protein

3 讨论

本研究用 DNA 基因组为模板,通过 PCR 方法成功克隆得到了 pgsA 基因,进一步说明了 pgsA 基因位于枯草芽孢杆菌的染色体上,与 Onodera K 等^[9]报道的编码 -PGA 聚合酶的基因位于染色体上的结果是一致的。试验株 pgsA 基因与 GenBank 中 AB016245 (pgsA), AB039950 (capA), ABO46355 (ywtB), Z92594 (ywtB), DQ08153 (pgaA) 基因序列进行分析比较,是因为它们都是编码枯草芽孢杆菌 -PGA 聚合酶的部分基因,且它们开放阅读框大小相同,序列同源性很高,达到 90% 以上,有的甚至

于达到 99.8%,并且其编码蛋白的功能相似。基因命名不同的原因可能因为不同来源的枯草芽孢杆菌产生 -PGA 的过程差异或编码蛋白功能存在差别所造成。因为发现有的菌株产生 -PGA,有的菌株不产生 -PGA,还有的基因却是用来合成细菌荚膜的等等。由于枯草芽孢杆菌培养条件和遗传特性的不同,只有少数的枯草芽孢杆菌产生 -PGA,再者对枯草芽孢杆菌 -PGA 合成酶酶系的了解有限,研究很少。虽然提出了一些关于 -PGA 合成机制的假说,但运用该方法发现对 -PGA 合成的重复性极差,因而关于基因命名的统一仍有待于进一步的研

究与交流。

试验株 pgsA 基因核苷酸序列同源性低的原因可能有以下两种: 本研究所用的枯草芽孢杆菌为实验室分离株, 由于时间和地点的差异可能导致核苷酸序列的差异; 对 pgsA 基因的研究很少, GenBank 中登录的 pgsA 基因只有 6 个, 分别为日本、中国、法国 3 个国家提交。系统进化树中试验株与 ZU-7 株在进化上距离最近, 同属于中国株, 进化树上距离的远近从一定程度上体现了地域的差别, 这与因地理位置的差异而引起核苷酸序列的差别的说法是吻合的。pgsA 基因在靠近其蛋白的 N 端存在一个跨膜区, 这与 Ashiuchi M 等^[10]报道的 pgsA 蛋白靠近其 N 端 26 个~42 个氨基酸处存在一个跨膜区是相符的, 与 pgsA 基因能使 -PGA 合成酶系稳定地锚定在细胞膜上的功能也是一致的。

pgsA 蛋白跨膜区的存在, 为跨膜表达体系的建立奠定了良好的基础。Lee J S 等^[11]用 pgsA 基因建立了一种新的表达体系, 使 SARS S 糖蛋白表达在干酪乳杆菌的外表面, 并成功地诱导了黏膜免疫的产生, 避免了弱毒疫苗毒力返强和灭活疫苗不能有效诱导黏膜免疫的缺点。本研究成功地克隆得到了 pgsA 基因, 从而为跨膜表达体系的建立和新型口服基因工程疫苗的研制奠定了一定的基础。

参考文献:

- [1] 郭兴华. 益生菌-基础与应用[M]. 北京:北京科学技术出版社, 2002.
[2] 汤保贵,徐中文,张金燕,等. 枯草芽孢杆菌的培养条件及对水

质的净化作用[J]. 淡水渔业,2007,37(3):45-48.

- [3] 王红宁,吴琦. 芽孢杆菌植酸酶基因在毕赤酵母中的分泌表达[J]. 浙江大学学报,2005,31(5):621-627.
[4] 陈雄. 枯草芽孢杆菌高产聚聚-谷氨酸及其应用研究[D]. 湖北武汉:华中农业大学微生物学,2005:19-30.
[5] Dekie L, Toncheva V, Dubruel P, et al. Poly-L-glutamic acid derivatives as vectors for gene therapy [J]. Control Release, 2000,65(1-2):187-202.
[6] Ashiuchi M, Nawa C, Kamei T, et al. Physiological and biochemical characteristics of poly-gamma-glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis* [J]. Biochem,2001,268(20):5321-5328.
[7] Ashiuchi M, Soda K, Misono H. A poly-gamma-glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336 gene cloning and biochemical analysis of poly-gamma-glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999,263(1):6-12.
[8] 刘进元,张淑平,武耀廷. 分子生物学实验指导[M]. 2版. 北京:高等教育出版社,2006.
[9] Onodera K, Sakurai M, Moriyama H, et al. Three-dimensional structures of chimeric enzymes between *Bacillus subtilis* and *Thermus thermophilus* 3-isopropylmalate dehydrogenases [J]. Protein Eng,1994,7(4):453-459.
[10] Ashiuchi M, Shimanouchi K, Horiuchi T, et al. Genetically engineered poly-gamma-glutamate producer from *Bacillus subtilis* ISW1214[J]. Biosci Biotechnol Biochem,2006,70(7):1794-1797.
[11] Lee J S, Poo H, Han D P, et al. Mucosal immunization with surface-displayed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein on *Lactobacillus casei* induces neutralizing antibodies in mice[J]. Virology, 2006,80(8):4079-4087.

Cloning and Sequence Analysis of pgsA Gene of *Bacillus subtilis*

WEN Hai-yan¹, QIN Xiao-bing¹, WEN Jian-xin¹, SHAN Hu¹, NIU Jin-guo², NIE Yu-xia³

(1. College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong, 266109, China;

2. Institute of husbandry and veterinary, Agricultural Academy of Shanxi, Taiyuan, Shanxi, 030032, China;

3. Sericulture Research Institute of Shandong Province, Yantai, Shandong, 265147, China)

Abstract: Based on the pgsA gene of *Bacillus subtilis* published in GenBank, a pair of primers were designed and 1 225 bp fragment of *Bacillus subtilis* pgsA gene was amplified from chromosome DNA of the bacteria by PCR. The amplified partial gene of pgsA was purified and cloned into pMD18-T vector and the positive recombinants were identified by blue-white screening and restriction endonuclease digestion, and then the gene was sequenced and analyzed. The result showed that pgsA gene is about 90% identical to the other similar sequences from GenBank, while 94% at the amino acid levels. Phylogenetic tree indicated that tested strain is the nearest relative to Zhejiang strain. In addition, the pgsA protein was analyzed with ProtScale software, there is one transmembrane domain near its N terminus, which suggests that it be a good path for further establishing transmembrane expressing systems and development of new oral vaccine.

Key words: *Bacillus subtilis*; pgsA gene; cloning; sequence analysis