



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20180351

枯草芽胞表面 CotC 和 CotG 共展示海藻糖合酶研究

刘洪玲¹, 刘浩¹, 王腾飞²

(1. 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457;
2. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物工程学院, 济南 250353)

摘要: 为了实现海藻糖合酶(TreS)在胞外的应用及避免胞内表达的不便利, 构建了芽胞表面展示 TreS 的重组枯草芽胞杆菌. 以枯草芽胞杆菌芽胞表面锚定蛋白 CotC、CotG 作为 TreS 融合展示蛋白, 通过荧光共聚焦显微镜、Western blot、Dot blot 及酶活性分析表明, TreS 成功展示于枯草芽胞杆菌的芽胞表面, 且由 CotC 和 CotG 共展示 TreS 芽胞表面酶活力大于 CotC、CotG 单独展示 TreS 酶活力之和. 通过在 TB 培养基中培养, 共展示重组芽胞表面酶活力(以芽胞干质量计)达到 1 511.6 U/g, 表面展示分子数达到 7.366×10^9 .

关键词: 重组枯草芽胞杆菌; 芽胞表面展示; 基因敲除; 海藻糖合酶

中图分类号: Q814.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2020)01-0018-08

Surface Display Trehalose Synthase on *Bacillus subtilis* Spore by CotC and CotG

LIU Hongling¹, LIU Hao¹, WANG Tengfei²

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. School of Bioengineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250353, China)

Abstract: In order to realize the application of trehalose synthase (TreS) in the extracellular domain and avoid the inconvenient expression in cells, recombinant *Bacillus subtilis* WB800n was constructed to display TreS on spore surface. CotC and CotG were used as TreS display proteins. The results of fluorescence confocal microscopy, Western blot, Enzyme activity and Dot blot analysis showed that TreS was successfully displayed on the spore surface of *Bacillus subtilis* WB800n, and the enzyme activity of the co-displayed on the surface of spores by CotC and CotG exceeded the sum of the singly displayed on the spore surface. The surface enzyme activity of recombinant spore reached 1 511.6 U/g (calculated by spore dry weight) and the number of displayed molecules reached 7.366×10^9 in the shaking flask culture using TB medium.

Key words: recombinant *Bacillus subtilis*; spore surface display; gene knockout; trehalose synthase

芽胞是有某些细菌产生的坚韧且不具有繁殖能力的结构, 可以使这些细菌在不利的条件下处于休眠状态. 芽胞的结构由外到内依次为芽胞外壁、芽胞衣壳、芽胞皮层和芽胞髓质. 芽胞髓质由芽胞壁、芽胞质膜、芽胞质和染色体核心这四部分组成的^[1]. 芽胞的形成是一系列调控基因和结构基因按一定时序调控表达的过程, 这些基因包括芽胞衣壳蛋白基因以及调控基因, 如 *cotA*、*cotB*、*cotC*、*cotF*、*cotG* 等 20 余

种^[2]. 芽胞衣壳是一种由至少 70 种蛋白组成的复杂结构^[3]. 芽胞外壁从结构上又可详细分为 Crust 层、外层、内层和基底层^[4-5]. 虽然芽胞对热、辐射、静水压、极端 pH 环境和一些有毒化学物品等有很强的抵抗能力^[6], 但当芽胞遇到合适的萌发条件时却极为敏感, 芽胞会迅速进入萌发状态, 迅速出芽生长, 恢复到营养细胞的状态^[7]. 芽胞表面展示技术, 是一项在芽胞表面展示具有生物活性外源蛋白的技术. 该技

收稿日期: 2018-10-10; 修回日期: 2018-12-17

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(31501413)

作者简介: 刘洪玲(1980—), 女, 山东青州人, 博士研究生; 通信作者: 王腾飞, 教授, wangtengfei1981@163.com

术将外源蛋白基因与芽胞衣壳蛋白基因进行融合,进而将外源蛋白和锚定蛋白共同展示于芽胞表面. Isticato 等^[4]首次成功实现了枯草芽胞杆菌芽胞衣壳蛋白融合展示外源蛋白的表达,此后芽胞表面展示技术受到了广泛的关注. 枯草芽胞表面展示技术应用最普遍的原因主要是芽胞具有结构清楚^[8-9]、基因改造简单^[10]、全基因组数据已公布^[11]等优点. 枯草芽胞表面的衣壳蛋白分子质量较大,这使得芽胞表面展示系统能够展示分子质量较大的蛋白,而且由于芽胞衣壳蛋白是内源性蛋白,所以在引导外源蛋白展示的过程中,能够大幅度地提高外源蛋白的折叠效率和展示效率^[2]. Mauriello 等^[5]通过将携带外源蛋白基因的锚定蛋白 CotC 和枯草芽胞杆菌基因组中淀粉酶基因进行同源重组的方式,成功地在芽胞表面展示了破伤风毒素(TTFC)和埃希氏大肠杆菌嗜热毒素(LTB). Isticato 等^[4]利用 CotB 作为芽胞表面展示外源抗原的载体蛋白,将破伤风毒素(TTFC)C 末端的 459 个氨基酸片段展示在枯草芽胞杆菌芽胞表面. Kwon 等^[12]以 CotG 为蛋白载体将半乳糖苷酶展示于枯草芽胞杆菌芽胞表面,重组芽胞在水-有机相反应体系中具有半乳糖苷酶催化活性,并且较化学方法固定于芽胞表面的半乳糖苷酶有更好的稳定性. Nguyen 等^[13]也利用锚定蛋白 CotB、CotC 和 CotG 在芽胞表面成功展示了 GFPuv 蛋白,并利用 CotB 自身的启动子和替换后的 IPTG 诱导启动子,实现了 GFPuv 蛋白的调控表达.

本文拟以 CotC、CotG 作为 TreS 的锚定蛋白,构建整合型表达质粒,将 TreS 展示于芽胞表面. 通过芽胞表面展示技术,将 TreS 展示于枯草芽胞杆菌表面,形成微固定化酶,实现 TreS 在芽胞表面的展示表达.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株、质粒与培养基

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α ,由本实验室保存;枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)WB800n,德国 MoBiTec 公司;pDG1730,华中农业大学;pPIC9k、pPIZ α A,杭州宝赛生物科技有限公司.

DSM 培养基:营养肉汤 8 g/L, KCl 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.25 g/L, 121 °C 高压灭菌 20 min 后加入无菌的 Ca(NO₃)₂ 1 mmol/L、MnCl₂ 0.01 mmol/L 和 FeSO₄ 0.01 mmol/L.

LB 培养基:蛋白胨 10 g/L, 酵母浸粉 5 g/L, NaCl 10 g/L. 在液体培养基中添加 20 g/L 的琼脂,即为固体培养基.

GM 培养基:蛋白胨 10 g/L, 酵母浸粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, 山梨醇 0.5 mol/L, 用去离子水定容至 1 L.

ETM 培养基:山梨醇 0.5 mol/L, 甘露醇 0.5 mol/L, 甘油 10%, 用去离子水定容至 1 L.

RM 培养基:蛋白胨 10 g/L, 酵母浸粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, 山梨醇 0.5 mol/L, 甘露醇 0.38 mol/L, 用去离子水定容至 1 L.

TB 培养基:胰蛋白胨 12 g/L, 酵母提取物 24 g/L, 甘油 4 mL/L, K₂HPO₄ 72 mmol/L, KH₂PO₄ 17 mmol/L.

1.1.2 主要试剂

壮观霉素,北京吉美生物技术有限公司;氨苄青霉素,上海慕远生物科技有限公司;氯霉素、细菌 DNA 小量提取纯化试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、蛋白 marker,上海生工生物工程有限公司;高纯度质粒小提试剂盒、多片段无缝克隆试剂盒、核酸 DL5000 marker、Taq DNA 聚合酶、2 × Phanta Max Master Mix,南京诺唯赞生物科技有限公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶,赛默飞世尔科技(中国)公司;溶菌酶,NOVO 公司;电泳级琼脂糖,西班牙 Biowest Agarose 公司;10 × Loading Buffer,日本 Takara 公司;6 × His、His-Tag 鼠单克隆抗体,美国 Proteintech 公司;BSA、山羊血清、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、FITC-羊抗小鼠 IgG,武汉博士德生物工程有限公司;辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(H + L),北京中杉金桥生物技术有限公司;吐温 20,上海阿拉丁生化科技股份有限公司.

1.2 锚定蛋白的基因克隆

1.2.1 cotC、cotG 基因及 treS 基因的克隆

检索 GenBank 中已登录的 cotC 和 cotG 基因序列,通过软件 CE Design V1.04 设计多片段无缝克隆特异性引物,以本实验室构建质粒 pET-15b-treS 为模板扩增获得 treS 基因序列,以 *B. subtilis* WB800n 基因组 DNA 为模板扩增 cotC 和 cotG 基因序列. 将 PCR 扩增所得的 cotC、cotG 基因片段及其对应的 treS 基因片段,利用多片段无缝克隆技术分别连接获得融合基因 cotC-treS 及 cotG-treS 序列. 所用引物见表 1,下划线为酶切位点. PCR 扩增条件为:95 °C 预

变性 3 min, 95 °C 变性 15 s, 63 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存. 将 PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检验, 并使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行胶回收, -20 °C 保存.

1.2.2 双 *cot-treS* 展示体系中的基因克隆

根据 1.2.1 节所述融合基因 *cotC-treS* 及 *cotG-treS* 序列, 用 1.2.1 节方法进行双 *cot-treS* 展示体系中的基因克隆.

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequence

引物名称	引物序列	酶切位点
<i>cotC</i> -F	aaaactggctctgatcggatccGATAAATCGTTTGGGCCGATG	<i>Bam</i> H I
<i>cotG</i> -F	aaaactggctctgatcggatccCGTAAAGCGGTAAATTGGATTGA	<i>Bam</i> H I
<i>cotC</i> -R	ggctgggtcatGTAGTGTTTTTATGCTTTTTATACTCTACAA	
<i>cotG</i> -R	cgggctgggtcatTTTGTATTCTTTTTGACTACCCAGC	
<i>treS</i> -R	ctgcaggaattcgataagcttTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT	<i>Hind</i> III
<i>cotC-treS</i> -F-1	aaacactacATGACCCAGCCCCGACCCG	
<i>cotG-treS</i> -F-1	atacaaaaATGACCCAGCCCCGACCCG	
<i>cotC-treS</i> -F-2	aaaactggctctgatcggatccGGTGGCGGTGGCTCGGGC	<i>Bam</i> H I
<i>cotC-treS</i> -R-2	taccgctttacgTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT	
<i>cotG-treS</i> -F-2	accactgaCGTAAAGCGGTAAATTGGATTGA	
<i>cotG-treS</i> -R-2	ctgcaggaattcgataagcttTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT	<i>Hind</i> III

1.3 pDG1730-*cotC/G-treS* 和 pDG1730-*cotC-treS-cotG-treS* 重组质粒的构建

根据 1.2.1 节所述, 获得 *cotC*、*cotG* 基因及其对应的 *treS* 基因. 根据整合型质粒 pDG1730 的 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切位点, 用这两个酶将 pDG1730 质粒双酶切, 并利用多片段无缝克隆技术将 *cotC* 和 *treS* 基因、*cotG* 和 *treS* 基因连接到 pDG1730 质粒上, 获得 pDG1730-*cotC/G-treS* 重组质粒. 再进一步利用多片段无缝克隆技术, 将获得的 *cotC-treS* 和 *cotG-treS* 基因片段连接到经过 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切的 pDG1730 质粒上, 获得重组质粒 pDG1730-*cotC-treS-cotG-treS*. 构建流程如图 1 所示.

1.4 *B. subtilis* WB800n 感受态的制备与电转化

将 *B. subtilis* WB800n 在 LB 平板中划线, 长出单菌落后, 挑取一个单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基中, 过夜培养. 取 500 μL 过夜培养的菌液转接至 50 mL GM 培养基中, 使 $A_{600} = 0.1 \sim 0.2$, 37 °C、200 r/min 培养至 $A_{600} = 1.0$. 将 GM 培养基及所有枪头、离心管置于冰上冷却 10 min. 将 GM 培养基转移至 50 mL 离心管, 4 °C、5 000 r/min 离心 8 min. 用 20 mL ETM 培养基重悬菌体, 4 °C、5 000 r/min 离心 8 min, 重复 3 次. 将洗涤后的菌体重悬于 500 μL ETM 中, 分装到 1.5 mL 离心管中, 每管 60 μL. 在 60 μL 感受态中加入 6 μL 重组质粒, 冰浴 5 min, 加入到预冷的电转杯 (2 mm) 中电击 1 次 (电压 2 500 V, 时间 5.0 ms). 电转完毕后, 加入 1 mL 37 °C 预热的 RM 培养基, 转入 1.5 mL 离心管中, 37 °C、200 r/min

复苏 3 h. 将复苏后的菌液离心, 除去多余上清液, 留 100 μL 上清液重悬菌体, 涂布在含有壮观霉素 (终质量浓度 100 μg/mL) 的 LB 平板上, 37 °C 培养箱中倒置培养.

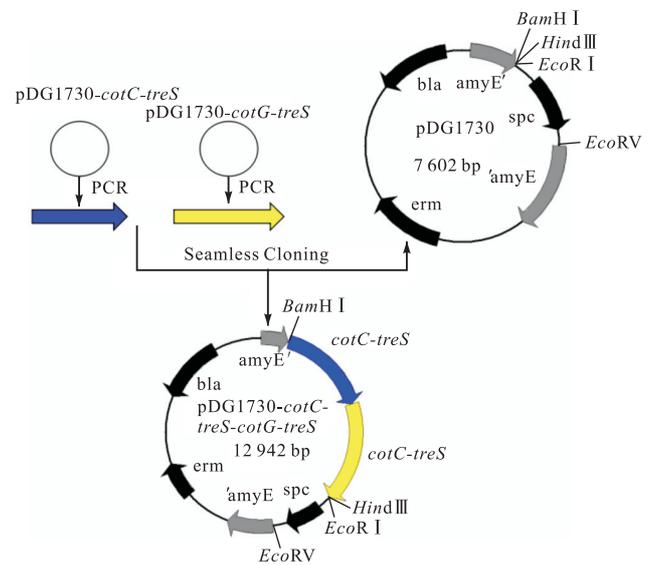


图 1 重组质粒 pDG1730-*cotC-treS-cotG-treS* 的构建
Fig. 1 Construction of recombinant pDG1730-*cotC-treS-cotG-treS*

1.5 芽胞表面展示 TreS 的分析

1.5.1 免疫印迹 (Western blot) 分析

将重组菌于含壮观霉素的 LB 平板 (终质量浓度 100 μg/mL) 上划线活化, 挑取单菌落至 50 mL 含有壮观霉素的 LB 液体培养基中过夜培养. 按 1% 的接种量接种于 TB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养

96 h. 7 500 r/min 离心 10 min, 2 mg/mL 溶菌酶 37 °C 处理 30 min 后沉淀芽胞. 取适量芽胞溶于 5 mL 的 SDS-DTT 溶液中, 置于 37 °C 水浴中保温 2 h. 用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 洗涤 3 次, 最后用裂解液悬浮. 将离心管置于冰上进行超声破碎 (功率 300 W, 工作 2 s, 间隔 4 s, 工作总时间为 15 min). 将破碎后的溶液在 4 °C、8 000 r/min 离心 20 min, 收集芽胞, 用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 重悬沉淀, 收集上清液 (上清液即为提取的含有 His tag 的芽胞衣壳蛋白溶液), 进行 SDS-PAGE 电泳检测或将上清液浓缩后进行 SDS-PAGE 检测.

将提取的芽胞衣壳蛋白经 SDS-PAGE 分离后, 用电转移法将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上, 然后用 5% 的脱脂奶粉室温下封闭 1 h, 将膜上封闭液洗净, 于 4 °C 条件下一抗孵育过夜. 回收一抗, 用 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 5 min. 将封闭液稀释的二抗加到膜上, 室温孵育 1 h. 回收二抗, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min. 最后将膜放入显色液中显色后扫描.

1.5.2 免疫荧光分析

将重组菌转接至 DSM 培养基中 37 °C、200 r/min 培养 48 h. 取 48 h 培养物 2 mL, 12 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 重悬于相同体积的 GTE buffer (50 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L EDTA, 20 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl, 2 mg/mL 溶菌酶) 中, 37 °C 处理 30 min 破坏营养细胞. 12 000 r/min 离心 15 min 沉淀芽胞, 用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液 (8 g/L NaCl、0.24 g/L KH₂PO₄、0.2 g/L KCl、3.63 g/L Na₂HPO₄·12H₂O 溶于 800 mL 蒸馏水中, HCl 调 pH 为 7.4, 加水定容至 1 L, 121 °C 灭菌 25 min, 室温保存) 洗涤 5 次, 用于免疫荧光分析. 用 100 μL 抗体结合 buffer (PBS 中加入 BSA 和山羊血清使其体积分数都为 3%) 悬浮芽胞, 在 1.5 mL EP 管内操作, 加入适当浓度的一抗, 冰上放置 2 h. 用抗体结合缓冲液洗涤芽胞 4 次, 4 000 r/min 离心 15 min, 完全除去上清液. 用 100 μL 抗体结合 buffer 悬浮芽胞, 加入适当浓度 FITC 标记的二抗, 冰上放置 2 h. 用抗体结合缓冲液洗涤细胞 3 次, 5 000 r/min 离心 10 min, 完全除去上清液. 将 100 μL 悬液滴到载玻片上, 盖上盖玻片, 黑暗中待其吹干后立刻用共聚焦显微镜观察.

1.5.3 芽胞表面展示酶活力分析

将重组菌在含壮观霉素的 LB 平板上划线, 将长出的单菌落接种于含壮观霉素的液体 LB 中过夜培养后转接至 TB 培养基中 37 °C、200 r/min 培养 96 h,

测芽胞干质量并进行芽胞计数. 将芽胞离心, 用 pH 8.0 的 PBS 重悬芽胞, 超声破碎 (功率 300 W, 间歇时间 5 s, 工作时间 5 s, 全程 15 min). 加入适量麦芽糖溶液使麦芽糖终体积分数为 30%, 25 °C 条件下反应转化 1 h. 将转化反应后的样品煮沸 10 min 使酶失活, 检测生成的海藻糖浓度, 并计算海藻糖合酶的酶活力. 酶活力单位 (U) 定义为在 25 °C、pH 8.0、10 mmol/L 的磷酸缓冲体系中, 1 h 转化生成 1 μmol 的海藻糖.

1.5.4 斑点印迹杂交 (Dot blot) 分析

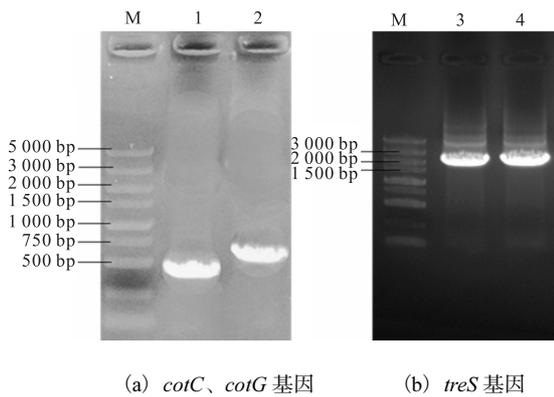
利用 Dot blot 分析方法对重组菌 *B. subtilis* WB800n/*cotC-treS*、*B. subtilis* WB800n/*cotG-treS* 和 *B. subtilis* WB800n/*cotC-treS-cotG-treS* 的芽胞所携带的 TreS 分子进行分析. 用 TBST 溶液将 TreS 标准品溶液及提取的重组菌的芽胞衣壳蛋白溶液进行梯度稀释, 成排点于 PVDF 膜上并风干, 记录好样品顺序, 然后将风干好的 PVDF 膜用封闭液室温振荡孵育 1 h, 在室温下用一抗振荡孵育 1 h, 并用 TBST 溶液洗涤 3 次, 每次 5 min, 接着再在室温下二抗振荡孵育 1 h, 并用 TBST 溶液洗涤 3 次, 每次 10 min, 最后将膜放入显色液中显色后扫描, 显色结果利用 Image J 软件进行分析, 输出结果的平均灰度值, 转化为吸光度后进行阳性信号的量化. 在 Excel 软件中利用该公式计算各平均灰度值对应的吸光度, 乘以所测区域的面积 (Image J 软件可同时给出), 从而获得所测区域总吸光度, 该值代表测量区域中物质的含量.

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆及重组质粒的构建

2.1.1 *cotC*、*cotG* 基因及 *treS* 基因的克隆

以 *B. subtilis* WB800n 的基因组为模板, 分别以 *cotC*-F 和 *cotC*-R、*cotG*-F 和 *cotG*-R 为引物进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2(a) 所示. 由图 2(a) 可知, *cotC* 基因在 500 bp 左右出现特异性条带, 理论长度为 408 bp, *cotG* 基因在 750 bp 左右出现特异性条带, 理论长度为 763 bp, 与理论长度相符, 表明已成功获得 *cotC* 和 *cotG* 基因. 以突变的 pET15b-*treS* 基因组为模板, 分别以 *cotC-treS*-F-1/*treS*-R 和 *cotG-treS*-F-1/*treS*-R 为引物进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2(b) 所示. 由图 2(b) 可知, 在 2 000 bp 左右出现特异性条带, 与理论长度 2 085 bp 相符, 表明已成功获得突变 *treS*(C)、*treS*(G) 基因片段.

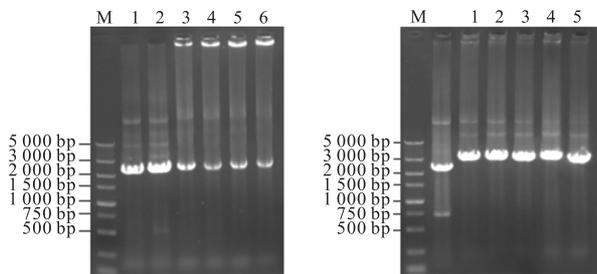


(a) *cotC*、*cotG* 基因 (b) *treS* 基因
M. DL5000 marker; 1. *cotC* 基因; 2. *cotG* 基因. 3. *treS*(C) 基因; 4. *treS*(G) 基因

图2 *cotC*、*cotG* 基因及 *treS* 基因的 PCR 扩增电泳图
Fig. 2 PCR amplification electrophoresis of *cotC*, *cotG* and *treS* genes

2.1.2 重组质粒 pDG1730-*cotC/cotG-treS* 的构建

将 PCR 扩增所得的 *cotC*、*cotG* 基因及其对应的 *treS* 基因, 利用多片段无缝克隆技术连接到 pDG1730 质粒中, 并转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中. 利用特异性引物进行菌落 PCR 验证, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测. 检测结果如图 3 所示, 表明 *cotC/cotG-treS* 基因已成功连接到 pDG1730 质粒.



(a) 重组质粒 pDG1730-*cotC-treS* (b) 重组质粒 pDG1730-*cotG-treS*
(a)中, M. DL5000 marker; 1—6. *cotC-treS* 基因. (b)中, M. DL5000 marker; 1—5. *cotG-treS* 基因

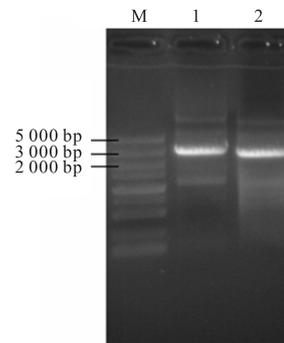
图3 重组质粒 pDG1730-*cotC/cotG-treS* 的菌落 PCR
Fig. 3 PCR of recombinant plasmid pDG1730-*cotC/cotG-treS*

2.1.3 双 *cot-treS* 体系中基因的克隆

以重组质粒 pDG1730-*cotC-treS* 为模板, 以 *cotC-treS*-F-2 和 *cotC-treS*-R-2 为引物进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 4 所示. *cotC-treS* 基因在 2 493 bp 出现特异性条带, 与 *cotC-treS* 基因理论长度相符, 说明已成功获得 *cotC-treS* 基因.

以重组质粒 pDG1730-*cotG-treS* 为模板, 以 *cotG-treS*-F-2 和 *cotG-treS*-R-2 为引物进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 4 所示. *cotG-*

treS 基因在 2 847 bp 出现特异性条带并高于 *cotC-treS* 基因, 与 *cotG-treS* 基因的理论长度相符, 说明已成功获得 *cotG-treS* 基因.

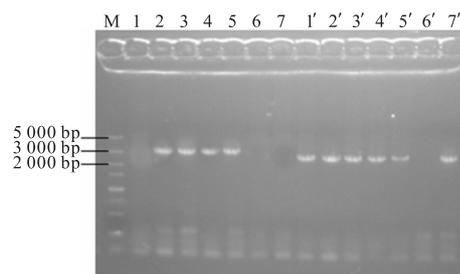


M. DL5000 marker; 1. *cotG-treS* 基因; 2. *cotC-treS* 基因
图4 双 *cot-treS* 体系中 *cotC-treS* 和 *cotG-treS* 基因的 PCR

Fig. 4 PCR of *cotC-treS* and *cotG-treS* genes in double *cot-treS* system

2.1.4 重组质粒 pDG1730-*cotC-treS-cotG-treS* 的构建

将 PCR 获得的 *cotC-treS* 基因和 *cotG-treS* 基因, 利用多片段无缝克隆技术连接到整合型质粒 pDG1730 上, 并转化至 *E. coli* DH5 α 中. 分别利用特异性引物 *cotC*-F 和 *cotC-treS*-R-2、*cotG*-F 和 *cotG-treS*-R-2 对同一菌株进行菌落 PCR 验证, 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 检测结果如图 5 所示. 由图 5 可知, 2—5 号菌同时扩增出特异性条带 *cotC-treS* 和 *cotG-treS*, 表明 *cotC-treS* 基因和 *cotG-treS* 基因已成功连接至 pDG1730 质粒中.



M. DL5000 marker; 1—7. *cotG-treS* 基因; 1'—7'. *cotC-treS* 基因
图5 重组质粒 pDG1730-*cotC-treS-cotG-treS* 菌落 PCR

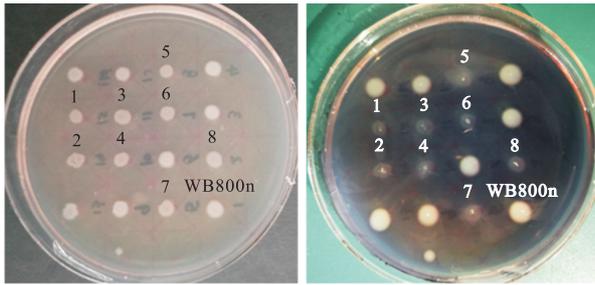
Fig. 5 PCR of recombinant plasmid pDG1730-*cotC-treS-cotG-treS*

2.2 重组菌的构建

2.2.1 重组菌的筛选

将重组质粒电转化至 *B. subtilis* WB800n 感受态中, 涂布至含有壮观霉素的 LB 平板上. 利用特异性引物进行菌落 PCR 验证, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测. 整合型质粒 pDG1730 电转至 *B. subtilis* WB800n

中,目的基因在两侧 α -淀粉酶同源臂的作用下,以双交换整合到 WB800n 的染色体中. 将 *B. subtilis* WB800n 和重组 *B. subtilis* WB800n 同时点种在含有淀粉的 LB 平板中, 37 °C 过夜培养, 如图 6(a) 所示. 喷洒碘液后, *B. subtilis* WB800n 原始菌有明显的淀粉水解圈, 而重组菌无明显的淀粉水解圈, 表明目的基因成功整合染色体淀粉酶基因位点, 如图 6(b) 所示.



(a) 未加碘液 (b) 加碘液

1—2. *B. subtilis* WB800n/*cotC-treS*; 3—4. *B. subtilis* WB800n/*cotG-treS*; 5—8. *B. subtilis* WB800n/*cotC-treS-cotG-treS*

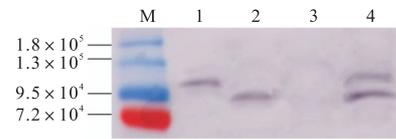
图 6 重组菌的淀粉板验证

Fig. 6 Starch plate validation of recombinant *B. subtilis* WB800n

2.2.2 芽胞表面展示 TreS 的 Western blot 分析

将重组菌 *B. subtilis* WB800n/*cotC-treS*、*B. subtilis* WB800n/*cotG-treS*、*B. subtilis* WB800n/*cotC-treS-*

cotG-treS 分别接种至 TB 培养基中, 培养 96 h 后收集芽胞并纯化. 提取芽胞衣壳蛋白后, 进行 Western blot 分析, 结果如图 7 所示. 由图 7 可知, 构建的重组菌芽胞分别成功表面展示 CotC-TreS、CotG-TreS 及表面共展示 CotC-TreS 和 CotG-TreS. 图中 1、2 泳道条带分别对应的相对分子质量约为 9.95×10^4 和 8.44×10^4 ; 3 泳道无相应条带; 4 泳道条带为两条, 分别对应 9.95×10^4 和 8.44×10^4 . 这与衣壳蛋白 CotC 和 TreS 加和的理论相对分子质量、CotG 与 TreS 加和的理论相对分子质量相一致, 表明芽胞表面分别成功展示了 CotC-TreS、CotG-TreS 融合酶及共展示两者的融合酶.



M. 蛋白 marker; 1. CotG-TreS; 2. CotC-TreS; 3. *B. subtilis* WB800n; 4. CotC-TreS-CotG-TreS

图 7 重组菌的芽胞衣壳蛋白 Western blot 分析

Fig. 7 Analysis of the capsid protein Western blot of recombinant bacteria

2.2.3 芽胞表面展示 TreS 的免疫荧光分析

将重组菌接种至 DSM 培养基中, 培养 48 h 后收集芽胞. 对芽胞进行处理后, 荧光共聚焦显微镜进行观察, 结果如图 8 所示.

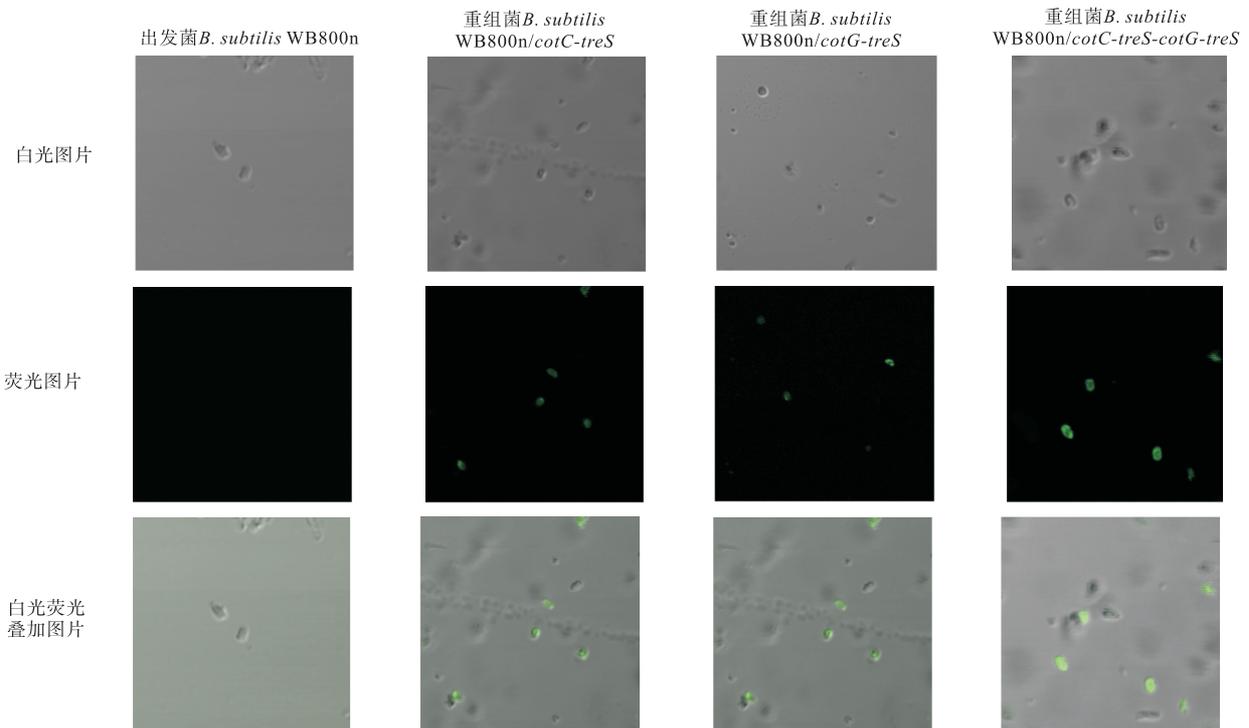


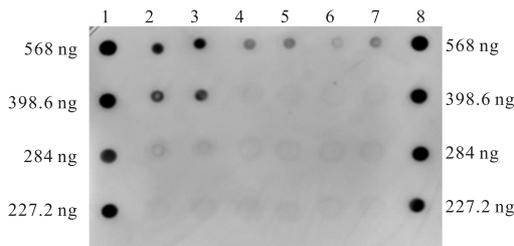
图 8 重组菌的免疫荧光分析

Fig. 8 Immunofluorescence analysis of recombinant bacteria

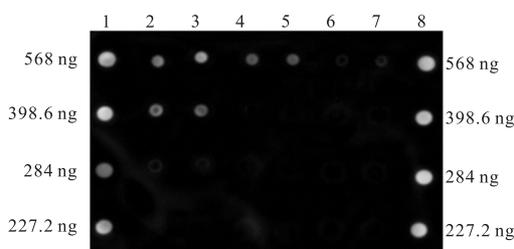
出发菌株所产芽胞无荧光现象,重组菌所产芽胞均有荧光现象,且共展示重组菌芽胞荧光较单 Cot 展示重组菌芽胞荧光量明显增强,这说明重组菌成功将海藻糖合酶展示于芽胞表面,且共展示的海藻糖合酶量较单个展示的海藻糖合酶量有明显的优势.

2.2.4 芽胞表面展示 TreS 的 Dot blot 分析

取 10^7 个重组菌芽胞,提取芽胞衣壳蛋白,进行 Dot Blot 分析,结果如图 9 所示. 利用 Image J 软件对结果图像进行分析. 通过对 Dot blot 结果图的分析可得 3 种重组菌的单个重组芽胞中所展示的海藻糖合酶分子数. 其中重组菌 *B. subtilis* WB800n/*cotC-treS* 和 *B. subtilis* WB800n/*cotG-treS* 单个芽胞所展示的海藻糖合酶分子数分别为 4.318×10^9 和 2.361×10^9 ,而重组菌 *B. subtilis* WB800n/*cotC-treS-cotG-treS* 单个芽胞所展示的分子数为 7.366×10^9 . 由此可知,双 Cot 共展示的蛋白分子数大于 CotC 和 CotG 展示分子数之和.



(a) Dot blot 分析



(b) 软件 Image J 转换后

1、8. TreS standard; 2、3. *B. subtilis* WB800n/*cotC-treS-cotG-treS* 的表面展示 TreS; 4、5. *B. subtilis* WB800n/*cotC-treS* 的表面展示 TreS; 6、7. *B. subtilis* WB800n/*cotG-treS* 的表面展示 TreS

图 9 表面展示 TreS 的 Dot blot 分析

Fig. 9 Dot blot analysis of surface display of TreS

2.2.5 芽胞表面展示 TreS 的酶活力分析

芽胞表面展示 TreS 的酶活力分析(以芽胞干质量计)结果如图 10 所示. 由图 10 可知,重组菌 *B. subtilis* WB800n/*cotG-treS* 的酶活力为 484.51 U/g, *B. subtilis* WB800n/*cotC-treS* 的酶活力为 886.11 U/g, *B. subtilis* WB800n/*cotC-treS-cotG-treS* 的酶活力为 1511.6 U/g. 由此可知, *B. subtilis* WB800n/*cotC-treS-*

cotG-treS 的芽胞表面展示酶活力大于 *B. subtilis* WB800n/*cotG-treS* 和 *B. subtilis* WB800n/*cotC-treS* 的芽胞表面展示酶活力之和. 这一现象与 Dot blot 分析的 CotC 与 CotG 共展示在单个芽胞表面的 TreS 酶分子数大于由单个 Cot 独立展示的 TreS 酶分子数之和相一致. 在相同菌体细胞生成相同的芽胞数所呈现的单位菌体酶活力与这一现象一致,即单位酶分子的酶活力是相同的,而展现的酶活力增加主要是因为酶的表面展示的分子数增加造成的.

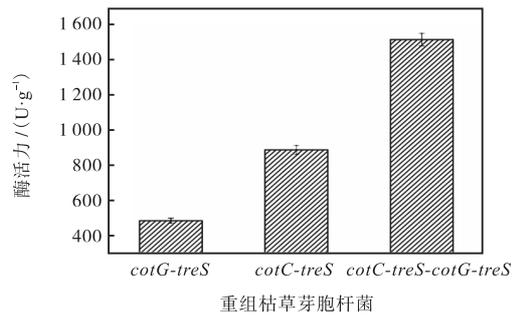


图 10 芽胞表面展示 TreS 的酶活力

Fig. 10 Enzyme activity of TreS on the surface of spore

3 结论

枯草芽胞杆菌的芽胞表面有多种锚定蛋白,报道有多种锚定蛋白已成功用来展示外源蛋白. 本实验通过 CotC 和 CotG 分别在芽胞表面成功展示了外源海藻糖合酶,并且通过 CotC 和 CotG 两种锚定蛋白在芽胞表面共展示了海藻糖合酶,经免疫荧光、Western blot、Dot blot 和酶活力检测分析后,表明海藻糖合酶成功展示于芽胞表面,且双 Cot 共展示的效果较单 Cot 展示具有明显的增强效果. 在 TB 培养基中,重组菌 *B. subtilis* WB800n/*cotC-treS-cotG-treS* 培养 96 h 后,芽胞表面展示的酶活力(以芽胞干质量计)达到 1511.6 U/g,芽胞表面展示的酶分子数为 7.366×10^9 ,大于 CotC 和 CotG 独立展示海藻糖合酶的酶活力(484.51 U/g 和 886.11 U/g)及芽胞表面展示的酶分子数(4.318×10^9 和 2.361×10^9)之和,该现象目前尚未有报道进行解释. 这一结果给了我们一些启示:多个 Cot 共展示外源蛋白时,可能存在一定的独立性,即不同的 Cot 蛋白在芽胞表面的展示分布具有自己独立的位点或在展示过程中具有区域性;当多 Cot 展示时,不同 Cot 之间在转运和锚定过程中可能存在一种相互影响机制,这种机制或许具有增强作用,或许在其他 Cot 和锚定蛋白间存在消减作用,有

待进一步探索;不同 Cot 蛋白在芽胞表面展示外源蛋白的分子数之间的差异性,可能存在一个表面结合位点初始表达量或是转运过程中的多 Cot 竞争性选择特性,有待进一步探索. 本实验在给出上述启发的同时,也给外源酶的微固定化应用提供了一个思路,即通过芽胞这一微小的稳定载体,可以通过多种 Cot 展示的方法,提高芽胞表面展示外源酶、蛋白和疫苗的量,降低单位制备成本,提高效率,可以根据不同 Cot 间的芽胞展示分子数差异展示不同的外源酶,实现多酶的协同应用效果.

参考文献:

- [1] Setlow P. Spore of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101 (3) : 514–525.
- [2] Henriques A O, Moran C P Jr. Structure, assembly, and function of the spore surface layers[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2007, 61 : 555–588.
- [3] Mckenney P T, Eichenberger P. Dynamics of spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 83 (2) : 245–260.
- [4] Isticato R, Cangiano G, Tran H T, et al. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183 (21) : 6294–6301.
- [5] Mauriello E M, Duc L H, Isticato R, et al. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner[J]. *Vaccine*, 2004, 22 (9/10) : 1177–1187.
- [6] Kopjar M, Hribar J, Simcic M, et al. Effect of trehalose addition on volatiles responsible for strawberry aroma [J]. *Natural Product Communications*, 2013, 8 (12) : 1767–1770.
- [7] Warth A D, Ohye D F, Murrell W G. The composition and structure of bacterial spores[J]. *Journal of Cell Biology*, 1963, 16 (3) : 579–592.
- [8] Setlow P. Resistance of bacterial spores[M]//Storz G, Hengge-Aronis R. *Bacterial stress responses*. Washington D C: American Society for Microbiology, 2000 : 217–230.
- [9] Paidhungat M, Setlow P. Spore germination and outgrowth[M]//Hoch J A, Losick R, Sonenshein A L. *Bacillus subtilis* and its relatives: From genes to cells. Washington D C: American Society for Microbiology, 2002 : 537–548.
- [10] Yu H, Yang S, Yuan C, et al. Application of biopolymers for improving the glass transition temperature of hairtail fish meat[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 98 (4) : 1437–1443.
- [11] Driks A. *Bacillus subtilis* spore coat[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63 (1) : 1–20.
- [12] Kwon S J, Jung H C, Pan J G. Transgalactosylation in a water-solvent biphasic reaction system with beta-galactosidase displayed on the surfaces of *Bacillus subtilis* spores[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2007, 73 (7) : 2251–2256.
- [13] Nguyen Q A, Schumann W. Using of IPTG-inducible promoters for anchoring recombinant proteins on the *Bacillus subtilis* spore surface[J]. *Protein Expression and Purification*, 2014, 95 : 67–76.

责任编辑: 郎婧