耐盐性谷氨酰胺酶在 *Bacillus subtilis* 168 中的整合表达

徐朝阳[1,2]，张 昱[1,2]，徐美娟[1,2]，杨套伟[1,2]，饶志明[*1,2]

（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：微生物质粒过表达外源基因，会由于质粒分离稳定性低、种子培养基中需添加抗生素等原因，限制其在工业生产中的应用。为了得到一株可用于工业生产谷氨酰胺酶的菌株，选择食品安全级 *Bacillus subtilis* 168 作为宿主，将来源于 *Micrococcus luteus* K-3 的编码耐高浓度盐的谷氨酰胺酶基因（*Mglu*）插入到其染色体上进行整合表达。选择了 2 个内源性蛋白酶基因作为整合表达位点，通过 *lox* 序列的重组消除抗性基因，得到无抗性基因的重组谷氨酰胺酶表达菌株。遗传稳定性研究表明，在不添加抗生素的条件下，通过连续传代重组菌株并测定发酵酶活，发现重组菌株连续传 42 代时，酶活基本不变。随后，采用 5 L 发酵罐对重组菌株进行分批补料发酵，最高酶活达到了 41.5 U/mL。本研究对提高谷氨酰胺酶重组菌株遗传稳定性提供了借鉴。

关键词：谷氨酰胺酶；*Bacillus subtilis* 168；整合表达；蛋白酶；遗传稳定性

中图分类号：Q 939.97　**文章编号**：1673-1689(2020)06-0022-08　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.06.004

Over-Expression of Salt-Tolerant Glutaminase by Integration of *Mglu* Genes in *Bacillus subtilis* 168

XU Zhaoyang[1,2]，*ZHANG Xian*[1,2]，*XU Meijuan*[1,2]，*YANG Taowei*[1,2]，*RAO Zhiming*[*1,2]

（1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China；2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

Abstract：Heterologous over-expression of glutaminase in microorganisms has been extensively studied and its application in industrial production has been limited by its poor separation stability under nonresistant conditions with free plasmids. To obtain a strain used in industrial glutaminase production, glutaminase （from *Micrococcus luteus* K-3） was successfully over-expressed by integration of the *Mglu* gene in chromosome of GRAS strain *Bacillus subtilis* 168. Two genes encoding specific protease were blocked by integration of *Mglu* gene, and the *zeo* resistance marker was deleted by Cre recombinase catalyzing the recombination of DNA between *lox* sequences. After continuous cell culture without adding any antibiotics, the enzyme activity was basically unchanged when the recombinant strain was transmitted for 42 generations. By using 5 L bioreactor for fed-batch fermentation of recombinant glutaminase producing strain, the highest enzyme activity was about 41.5 U/mL. This study provides a reference for improving the genetic stability of glutaminase

收稿日期：2018-01-23

基金项目：国家自然科学基金项目（31570085, 31500065）；江苏省杰出青年科学基金项目（BK20150002）；江苏省青年自然科学基金项目（BK20150142）；中国博士后科学基金资助项目（2015M570407、2016T90421）；中央高校基本科研业务费专项资金资助项目（JUSRP51708A）。

* **通信作者**：饶志明(1975—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事应用微生物与代谢工程研究。E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

recombinant strain.

Keywords: glutaminase, *Bacillus subtilis* 168, integration, protease, genetic stability

谷氨酰胺酶(EC 3.5.1.2)能将谷氨酰胺分解为谷氨酸和游离的氨气。人体内的谷氨酰胺酶主要分为肾型谷氨酰胺酶和肝型谷氨酰胺酶[1]，与细胞生长、代谢有关，可维持人体的酸碱平衡和内环境稳定。谷氨酰胺酶还广泛存在于曲霉、酵母、细菌等微生物中。其中，在微生物中，研究较多的有 *Micrococcus luteus* K-3[2-3]，*Aspergillus oryzae* RIB40[4-5]，*Bacillus* sp LKG-01[6]，*Lactobacillus reuteri* KCTC 3594[7]和 *Cryptococcus nodaensis*[8]。谷氨酰胺酶在日本酱油发酵过程中起着至关重要的作用，不仅可以增加酱油的风味，还可以增加酱油的营养成分。但是，酱油酿造过程中的 18%左右的高盐环境限制了谷氨酰胺酶的应用。MaMoru wakayama 等人[2]研究表明，来源于 *Micrococcus luteus* K-3 在 8-16%的盐浓度下可以稳定表达，并且相对于无盐条件下，酶活提高了 1.3 倍。所以，我们合成编码该谷氨酰胺酶的基因，将其在 *B. subtilis* 168 中表达。

枯草芽孢杆菌是一类非致病性细菌，被美国食品和药物管理局评定为安全菌株(GRAS)[9]。食品工业在全球商业应用中，枯草芽孢杆菌被人类和动物当作益生菌使用[10]，同时，它还能治疗胃肠道疾病[11]。枯草芽孢杆菌是一个食品级表达宿主[12]，可用于异源表达蛋白质和维生素[13]。

在微生物中，用质粒过表达外源基因时，在复制的过程中常出现不稳定的状态(ssDNA)[14]，而导致质粒的丢失。不添加抗生素条件下，会使这种现象很突出，从而限制了其在食品工业中的应用。在之前的一项研究中，单拷贝 β 半乳糖苷酶基因被整合到枯草芽孢杆菌的基因组 DNA 中[15-16]，重组菌株的酶活很低，我们可以通过提高外源基因的拷贝数来提高其表达量。碱性蛋白酶 E(*apr*E)和中性蛋白酶 E(*npr*E)被认为是主要的蛋白酶，因为它们的活性在枯草芽孢杆菌分泌总蛋白酶活性的 20%和 70%[17-19]。选用蛋白酶作为整合表达位点，既可以增加外源基因的拷贝数，又可以降低蛋白酶对外源蛋白的降解。本研究将来源于 *Micrococcus luteus* K-3 的谷氨酰胺酶基因(*Mglu*)[2]以 *lox* 序列重组的方式定点整合入 *B. subtilis* 168 中的 *npr*E 和 *apr*E 基因位点，进而得到食品级表达谷氨酰胺酶的重组菌株。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

菌株、质粒、引物如表 1 所示。

表 1 菌株、质粒、引物一览表

Table 1 Strains, plasmids and primers

菌株/质粒/引物	特征	来源
菌株		
E. coli JM109	recA1, endA1, gyrA96, thi^{-1}, hsd R17 (rk^{-} mk^{+}) supE44	Invitrogen
B. subtilis 168	trpC2	作者所在实验室保存
BSM	*B. subtilis* 168 containing pMA5-*Hpa*II-*Mglu*(KmR)	作者所在实验室保存
BSM1	*B. subtilis* 168 containing *Mglu* integrated in *apr*E site	本研究
BSM2	*B. subtilis* 168 containing *Mglu* integrated in *npr*E site.	本研究
BSM3	*B. subtilis*168 containing *Mglu* integrated in *apr*E and *npr*E site.	本研究
质粒		
pUC-*Mglu*	*E.coli* (Amp^{R}); *Mglu*	Sangon Biotech
pMA5-*Hpa*II-*Mglu*	*E.coli* (Amp^{R}); *B. subtilis* (Km^{R});*Mglu*	作者所在实验室保存
P7Z6	pMD18-T ligated with *lox71-zeo-lox66* cassette	[20]
pSTC	*E.coli* (Amp^{R}); *B. subtilis* (Km^{R}) temperature sensitive in *B. subtilis*; containing $P_{spac-cre}$ expression cassette	[20]
引物		
P1	ATGTCTTTGCTTGGCGAATGTTCATCTTATTTCTTCCTCCCTCTCAAT	

续表 1

菌株/质粒/引物	特征	来源
P2	ATTTTTATTTTGTCCGTTTTGTCTAGCTTATTGAACCTTTCCGCCTTTTTC	
P3	TGTTATTTCTGAAAAAGGCGGAAAGGTTCAATAAGCTAGACAAAACGGACA	
P4	GGGTACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTGCTAGCTTGAGCTCGACTCT	
P5	CTAATCCTCTAGAGTCGAGCTCAAGCTAGCACCATGATTACGAATTCGAG	
P6	TTCCGTTATAAGCGCCGTAAGTGCCTCCAG ATTCTACCGTTCGTATAATG	
P7	GTATAGCATACATTATACGAACGGTAGAATCTGGAGGCACTTACGGCGCT	
P8	TTACATCGGTCTGGCTGGCTATTTGCTCGTGTCGCTCGCCGGATTTTATG	
P9	GTGGGTTTAGGTAAGAAATTGTCTGTTGCTGTCGCTGCTTCGTTTATGAG	
P10	ATTTTTATTTTGTCCGTTTTGTCTAGCTTATTTTGCAAATCATATGTGAT	
P11	CACCCAAATCATCACATATGATTTGCAAAATAAGCTAGACAAAACGGACA	
P12	GGGTACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTGCTAGCTTGAGCTCGACTCT	
P13	CTAATCCTCTAGAGTCGAGCTCAAGCTAGCACCATGATTACGAATTCGAG	
P14	ACAAGCGTGCCCGGAAGGCGGCTTTGTCTGGTGCCAAGCTTGCATGCCTG	
P15	CGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACCAGACAAAGCCGCCTTCCGG	
P16	TTACAATCCAACAGCATTCCAGGCTGCTTCAACTTTAGCGGCATCAGT	

1.2 培养基和试剂

LB 培养基(g/dL):蛋白胨 1,酵母膏 0.5,NaCl 1。

发酵培养基(g/dL):葡萄糖 2.5,安琪酵母 4,NH_4Cl 0.4,KH_2PO_4 0.1125,$K_2HPO_4\cdot 3H_2O$ 0.187 5,$CaCl_2$ 0.2,L-谷氨酸钠 0.2;pH 7.0。

SPI 培养基(g/dL):KH_2PO_4 0.6,$K_2HPO_4\cdot 3H_2O$ 1.83,$(NH_4)_2SO_4$ 0.2,$Na_3C_6H_5O_7\cdot 2H_2O$ 0.1,$MgSO_4\cdot 7H_2O$ 0.02,葡萄糖 0.5,酪蛋白水解物 0.02,酵母提取物 0.1,色氨酸 0.005;115 ℃,灭菌 25 min。

SPII 培养基:SPI 培养基体积分数 98%,$CaCl_2$ 2.7 mg/L,$MgCl_2$ 0.48 mg/L;115 ℃,灭菌 25 min。

100×EGTA:10 mmol/L EGTA 溶液,NaOH 调 pH 值至 8.0。

质粒提取试剂盒、蛋白纯化试剂盒、基因组提取试剂盒、PCR 试剂:购于中国大连市 TaKaRa 公司。

1.3 重组 *B. subtilis* 168 的构建

1.3.1 *B. subtilis* 168 基因组的提取　*B. subtilis* 168 基因组的提取按照基因组提取试剂盒操作手册进行。

1.3.2 整合片段同源臂的扩增　通过 NCBI 查询可得到 *B. subtilis* 168 *apr*E、*npr*E 基因的序列,选择两侧大约 600~700 bp 的片段作为同源臂,设计引物扩增同源臂。同源臂 PCR(聚合酶链式反应)体系中,模板为 *B. subtilis* 168 基因组,*apr*E 基因上下游同源臂引物对分别是 P1、P2 和P7、P8,*npr*E 基因上下游同源臂引物为 P9、P10 和 P15、P16。PCR 扩增产物核酸胶回收后,用胶回收试剂盒纯化并测定核酸浓度。

1.3.3 *lox71-zeo-lox66* 基因片段的扩增　通过 NCBI 网站查询到 p7Z6 质粒全基因序列,根据其中 *lox71-zeo-lox66* 的基因序列,设计引物扩增 *lox71-zeo-lox66*。PCR 体系中,模板为 p7Z6,*apr*E 基因位点 *lox71-zeo-lox66* 基因的引物为 P3 和 P4,*npr*E 基因位点 *lox71-zeo-lox66* 基因的引物为 P11 和 P12。PCR 扩增产物核酸胶回收后,用胶回收试剂盒纯化并测定核酸浓度。

1.3.4 *Hpa*II-*Mglu* 基因片段的扩增　根据 *Hpa*II 和 *Mglu* 基因的序列设计引物对扩增 *Hpa*II-*Mglu* 基因,PCR 体系中,模板为 pMA5-*Hpa*II-*Mglu*,*apr*E 基因插入位点 *Hpa*II-*Mglu* 基因的扩增引物为 P5 和 P6,*npr*E 基因插入位点 *Hpa*II-*Mglu* 基因的扩增引物为 P13 和 P14。PCR 扩增产物核酸胶回收后,用胶回收试剂盒纯化并测定核酸浓度。

1.3.5 上下游同源臂、*lox71-zeo-lox66* 基因、*Hpa*II-*Mglu* 基因的融合　4 个基因片段的融合,参照两步法融合方法[21],操作具体如下:

第 1 步 PCR 体系如表 2 所示:

PCR 条件:98 ℃预变性 3 min;98 ℃解链 8 s,61 ℃退火 5 s,72 ℃延伸 4 min,共 13 个循环;72 ℃保温 20 min。

表 2　4 片段融合第 1 步 PCR 体系

Table 2　First step PCR fusion consists of four segments

组分名称	体积
5×PrimeSTAR Buffer	10 μL
dNTP Mixture	4 μL
上游同源臂(40 ng/μL)	4 μL
下游同源臂(40 ng/μL)	4 μL
*Hpa*II–*Mglu* 基因片段(80 ng/μL)	4 μL
lox71–*zeo*–*lox66* 基因片段(30 ng/μL)	4 μL
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	1 μL
ddH_2O	19 μL

第 2 步 PCR 体系如表 3 所示:

PCR 条件:98 ℃预变性 3 min;98 ℃解链 10 s,61 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 4 min,共 28 个循环;72 ℃保温 20 min。

表 3　4 片段融合第 2 步 PCR 体系

Table 3　Second step PCR confusion consists of four segments

组分名称	体积/μL
5×PrimeSTAR GXL Buffer	10
dNTP Mixture	4
P1/P9(10 mmol/μL)	1
P8/P16(10 mmol/μL)	1
PCR 产物	2
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	1
ddH_2O	31

1.3.6　*B. subtilis* 168 感受态制备及转化　将–40 ℃甘油管保存的 *B. subtilis* 168 在 LB 固体琼脂平板上划线活化,37 ℃恒温培养箱中培养 12 h,取单菌落接种于 10 mL LB 液体培养基中,在 37 ℃ 180 r/min 培养 12 h。转接 200 μL 菌液于 SPI 培养基中,37 ℃、180 r/min 培养 5 h,转接 1 mL 菌液于 SPII 培养基中,37 ℃、180 r/min 培养 1.5 h。接着,于 SPII 培养基中加入 110 μL 100×EGTA,37 ℃、180 r/min 培养 10 min。所得菌液即为 *B. subtilis* 168 感受态细胞,将菌液分装,500 μL 每管。转化时加入重组 DNA 片段,轻轻振荡混匀。37 ℃、180 r/min 条件下培养 90 min,涂布含有博莱霉素(25 mg/L)的 LB 固体琼脂平板,置于 37 ℃恒温培养箱中倒置培养 12 h[22]。

1.3.7　抗性基因的敲除　pTSC 质粒表达 CRE 酶,会引导 *lox* 序列重组,消除抗性基因。将上述方法得到的 *B. subtilis* 168 转化子,再次制作成感受态。将 pTSC 质粒转化入感受态细胞中,涂布到含有卡那霉素(100 mg/L)的固体 LB 平板,37 ℃恒温培养箱培养 12 h。将得到含有阳性转化子在 51 ℃恒温培养箱中培养 24 h,使温度敏感型质粒 pTSC 丢失。

1.3.8　重组 *B. subtilis* 168 的构建　按照上述方法制作 *B. subtilis* 168 感受态之后,将得到的 *apr*E、*npr*E 位点的融合片段分别转化到 *B. subtilis* 168 感受态中,筛选到阳性转化子,按照上述方法将抗性基因敲除后得到重组菌株 BSM1 和BSM2。接着,在 BSM1 的基础上,将 *npr*E 位点的融合片段转化到 BSM1 的感受态中,筛选到阳性转化子,敲除抗性基因,得到 BSM3。

1.4　重组 *B. subtilis* 168 的发酵

将重组菌株分别在 LB 平板上划线,挑选单菌落接种于 10 mL LB 培养基中,37 ℃、180 r/min 培养 12 h。将 1 mL 菌液转接入 100 mL 发酵培养基中(500 mL 锥形瓶),于 24 ℃、180 r/min 培养 24 h。收集得到的菌体用于酶活测定和 SDS–PAGE 分析。

1.5　重组谷氨酰胺酶的蛋白纯化及 SDS–PAGE 分析

1.5.1　粗酶液的制取　将发酵得到的菌体,10 000 r/min 离心 5 min 后收集菌体,用 50 mmol/L 的 Tris–HCl(pH 7.5)缓冲液洗涤 2 次后,用破碎缓冲液悬浮菌体。加入溶菌酶(终浓度为 1 mg/mL),混匀,在 4 ℃条件下放置 2 h。将离心管置于冰中,超声破碎细胞,条件为:功率 400 W,工作 1 s 停 2 s,总时间为 5 min。将破碎后的菌液,在 4 ℃条件下,10 000 r/min 离心 20 min,获得上清液。将上清液用 0.45 μm 滤膜过滤,即可得到粗酶液。

1.5.2　蛋白质纯化　将粗酶液用 Ni–NTA 蛋白纯化柱进行纯化。纯化操作按照 AKTA 蛋白纯化仪说明书进行。上样体积为 5 mL,洗脱流量为 0.5 mL/min。

1.5.3　谷氨酰胺酶的 SDS–PAGE 分析　分别吸取 80 μL BSM3 重组菌株的纯酶液、粗酶液和 *B. subtilis* 168 的粗酶液,加入 20 μL 5×Loading Buffer,混匀后煮沸 20 min,进行 SDS–PAGE 分析。分离胶浓缩胶体积分数分别为 12%和 4%。上样量为 15 μL。

1.6　酶活测定

本研究使用的是通过测定产物谷氨酸的含量[23],进而测定谷氨酰胺酶酶活的方法。具体如下:

酶活测定体系(1 mL)为:850 μL 用 50 mmol/L Tris–HCl(pH 7.5)溶解 50 mmol/L 谷氨酰胺的底物溶液,37 ℃水浴锅预热 5 min,加入 20 μL 粗酶液,

对照加入 100 μL 15 g/dL 的三氯乙酸,混匀后在 37 ℃恒温水浴锅反应 5 min,迅速加入 100 μL 15 g/dL 的三氯乙酸并混匀,对照加入 20 μL 粗酶液并混匀,反应终止。将反应液 10 000 r/min 离心 10 min,以去除蛋白质,接着,取 25 μL 反应液测定谷氨酸含量。酶活定义:在 37 ℃条件下,1 min 内反应生成 1 μmol 的谷氨酸所需的酶量定义为一个酶活单位。

1.7 重组菌株的稳定性分析

单细胞微生物的生长繁殖,细胞呈现几何级数 2^n 增长,当 n=7 时,2^7=128,将静止期的菌液按体积分数 1%接种量接种,再将其培养至静止期,即可认为细胞已连续传代 7 次[24-25]。分别将 BSM、BSM3 重组菌株在 LB 琼脂平板上划线,37 ℃恒温培养箱培养 12 h。接着,分别挑选 BSM、BSM3 重组菌株单菌落接种至 LB 液体培养基中,37 ℃、180 r/min 条件下培养 12 h,作为种子液。分别将 1 mL 菌液转接至 100 mL 发酵培养基(500 mL 锥形瓶),24 ℃、180 r/min 条件下培养 24 h 后,分别取样测酶活,同时继续将 1 mL 菌液转接至 100 mL 新鲜发酵培养基(500 mL 锥形瓶)。依此类推,每隔 24 h 取样测定酶活,共测定 6 次。

1.8 重组菌 BSM3 5 L 发酵罐发酵水平分析

将重组菌株 BSM3 在 LB 固体平板划线,37 ℃恒温培养箱培养 12 h。挑取单菌落接种至 10 mL LB 培养基中,37 ℃、180 r/min 条件下培养 12 h。吸取 1 mL 菌液转接于 100 mL LB 培养基中(1 000 mL 锥形瓶),37 ℃、180 r/min 条件下培养 10 h,作为种子液。接着将种子液全部转接进 5 L 发酵罐中(2 L 发酵培养基),控制条件:温度为 24 ℃,pH 为 7.0(体积分数 50%磷酸和 50%氨水控制)、转速为 450 r/min。

2 结果与讨论

2.1 重组菌株构建

重组菌株构建过程,见图 1,我们根据上述方法扩增出了各个片段(见图 2),并构建了 2 个蛋白酶基因位点的融合片段(见图 3),并成功转化入 *B. subtilis* 168 感受态中,通过博莱霉素抗生素平板筛选到阳性转化子,接着用 pTSC 质粒去除抗性基因,成功得到无抗性基因的重组菌株 BSM1 和 BSM2。在重组菌株 BSM1 的基础上,在 *npr*E 基因位点插入 *Mglu* 基因,去除抗性基因后,得到重组菌株 BSM3。通过增加谷氨酰胺酶基因 *Mglu* 的整合表达位点,可能能解决单拷贝基因表达产物低的问题。

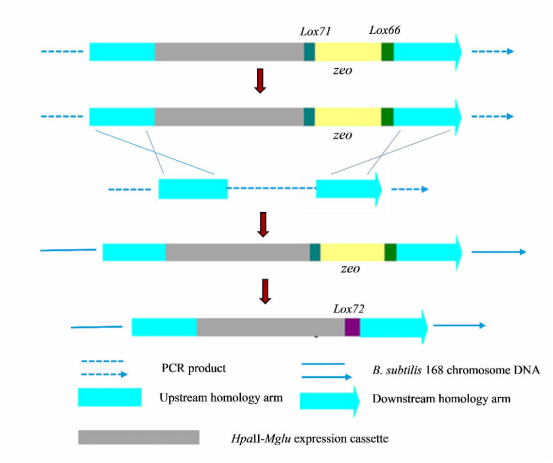
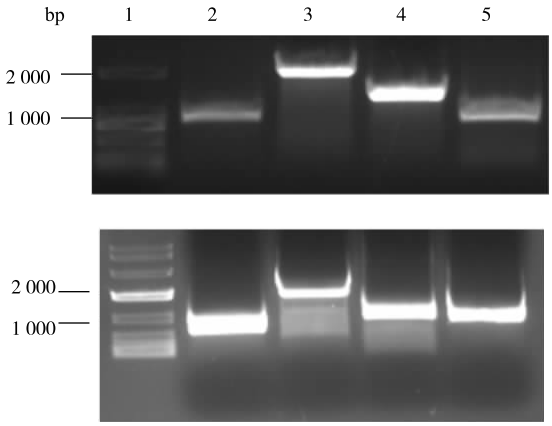


图 1 *Mglu* 基因整合入 *B. subtilis* 168 染色体 DNA 过程示意图

Fig. 1 Strategy for integrating *Mglu* gene in *B. subtilis* 168 chromosome DNA

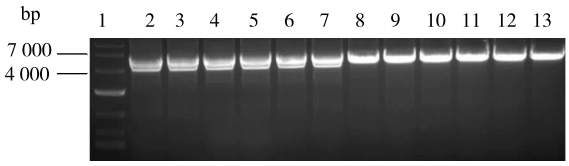
一个融合片段包括两段同源臂、*Hpa*II-*Mglu* 基因和 *lox71-zeo-lox66* 基因。由于同源区域的存在,*B. subtilis* 168 染色体 DNA 会在敲除基因(*apr*E 或 *npr*E)的同时,引入 *Hpa*II-*Mglu* 基因和 *lox71-zeo-lox66* 基因。接着,会通过 CRE/*loxp* 系统敲除 *lox71* 序列和 *lox66* 序列之间的 *zeo* 抗性基因,并形成了 *lox72* 序列。



1:DL2000 DNA Marker;2:*apr*B 和 *npr*E 上游同源臂基因;3:*Hpa*II-*Mglu* 基因;4:*lox71-zeo-lox66* 基因;5:*apr*E 和 *npr*E 下游同源臂基因。

图 2 *lox71-zeo-lox66*、*Hpa*II-*Mglu* 和上下游同源臂片段的 PCR 电泳图

Fig. 2 PCR electrophoresis of *lox71-zeo-lox66*, *Hpa*II-*Mglu* and two homologous arm segments



1:DL10000 DNA Marker;2,3,4,5,6,7:*apr*E 插入位点融合片段;8,9,10,11,12,13:*npr*E 插入位点融合片段

图 3 融合片段 PCR 电泳图

Fig. 3 PCR electrophoresis of fusion segaments

2.2 重组菌株的发酵酶活对比

为了探究不同重组菌株的谷氨酰胺酶表达水平，按照上述方法对菌株 *B. subtilis* 168、BSM1、BSM2、BSM3 进行发酵培养。如图 4 所示,重组菌株的生长趋势和野生型菌株 *B. subtilis* 168 趋势基本保持一致，在 18 h 时达到最大菌浓,OD_{600} 为 9 左右。重组菌株的最大发酵酶活如图 5 所示,野生型菌株 *B. subtilis* 168 无谷氨酰胺酶酶活，重组菌株 BSM1、BSM2 和 BSM3 的最大发酵酶活分别为 0.5、0.6 U/mL 和 1.0 U/mL。重组菌株 BSM1 和BSM2 中 *Mglu* 基因的拷贝数都是 1，但 BSM2 相对于 BSM1 的谷氨酰胺酶酶活要高,原因可能是中性蛋白酶对表达的谷氨酰胺酶降解量更多,将其敲除之后更有利于谷氨酰胺酶的表达。很显然,重组菌株 BSM3 的发酵酶活最高，重组菌株 BSM3 相对于 BSM1 酶活提高了 100%(图 5)。使用整合表达外源基因可以避免游离质粒表达分离不稳定的问题,但是目的基因表达量低成为整合表达的一大障碍。我们可以通过增加整合表达位点和敲除内源性蛋白酶的方法增加目的蛋白基因的表达量。

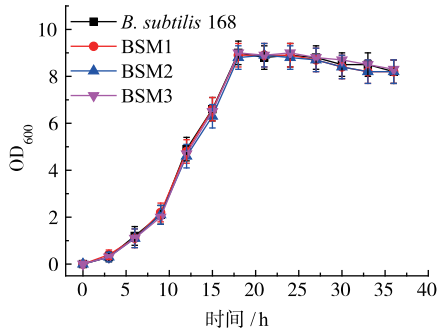
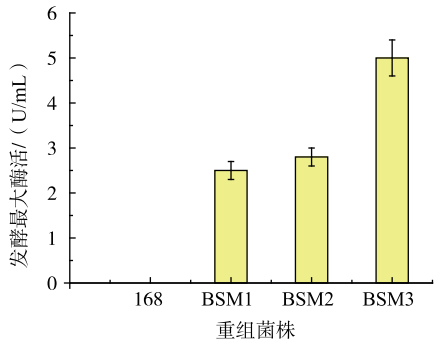


图 4 重组菌株生长曲线

Fig. 4 Growth curve of recombinant strains

2.3 重组谷氨酰胺酶的蛋白质纯化

在重组菌株构建过程中,*Mglu* 基因前面 3'端添加了 His-tag 序列,所以可以通过 Ni^{2+}亲和层析分离出谷氨酰胺酶。纯化后的谷氨酰胺酶的 SDS-

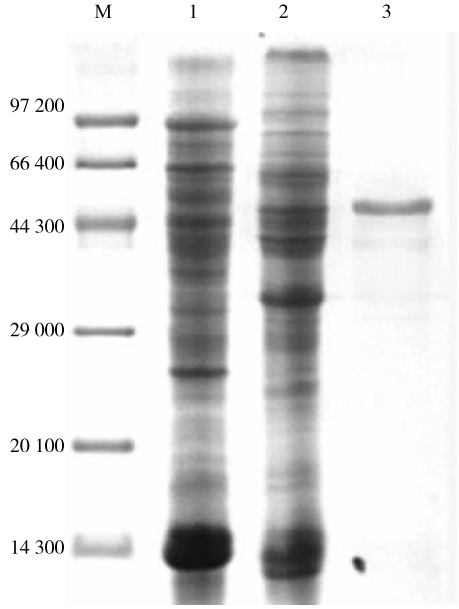


168 为 *B. subtilis* 168 菌株,作为阴性对照

图 5 重组菌株和 *B. subtilis* 168 最大发酵酶活对比分析

Fig. 5 Maximum fermentation glutaminase activities of the recombinant strains and *B. subtilis* 168

PAGE 电泳图如图 6 所示,以 *B. subtilis* 168 作为阴性对照，粗酶液和纯酶液在大约 4.8×10^4 位置有一条明显的条带。酶活测定可知,BSM3 表达的谷氨酰胺酶比酶活为 1 326 U/mg,大小基本与报道一致[2]。



1:Protein Marker;2:*B. subtilis* 168 粗酶液;3:BSM3 粗酶液;4:BSM 纯酶液。

图 6 重组菌株 BSM3 表达谷氨酰胺酶 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 6 SDS -PAGE analysis of the expression of glutaminase in BSM3

2.4 重组菌株 BSM3 的遗传稳定性分析

整合型菌株的遗传稳定性是衡量工业生产菌株的一个重要因素。相对于游离质粒表达,整合表达可以提高外源基因的遗传稳定性。在无抗生素条件下，我们通过连续转接重组菌株并测定酶活,分

析重组菌株的遗传稳定性,结果如图 7 所示,重组菌株 BSM3 在连续传代 42 次之后,酶活依然稳定,遗传稳定性较好。然而,游离质粒表达 *Mglu* 基因重组菌株 BSM 在连续传代 14 次之后,酶活明显下降,遗传稳定性很差。微生物使用游离质粒过表达谷氨酰胺酶的优势很明显,可以大大的提高酶活。但是,质粒的分离稳定性很差,被认为是其表达的一大问题,限制了在工业中的应用。所以,整合型表达谷氨酰胺酶菌株 BSM3 更适合工业生产。

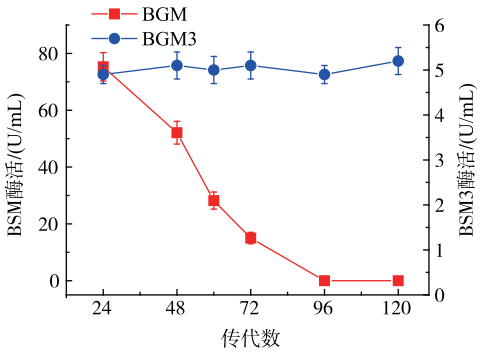


图 7　重组菌株 BSM3、BSM 遗传稳定性分析

Fig. 7　Analysis of genetic stability of the recombinant strains BSM3 and BSM

2.5　5 L 发酵罐的分批补料发酵

由于摇瓶发酵营养物质有限,限制了重组菌株 BSM3 的生物量,为了提高谷氨酰胺酶的产量,我们选择使用 5 L 发酵罐进行分批补料发酵。结果如图 8 所示,重组菌株 BSM3 在 7 h 左右时进入对数期。在 32 h 左右时,OD_{600} 达到了最大,约为 92。我们发现,产酶曲线和生长曲线存在一定的相关性。酶活在 32 h 左右是达到了最大,为 41.5 U/mL。32 h 之后,谷氨酰胺酶酶活有逐渐降低的趋势,这可能是因为该谷氨酰胺酶不稳定,发生了变性,导致酶活降低。

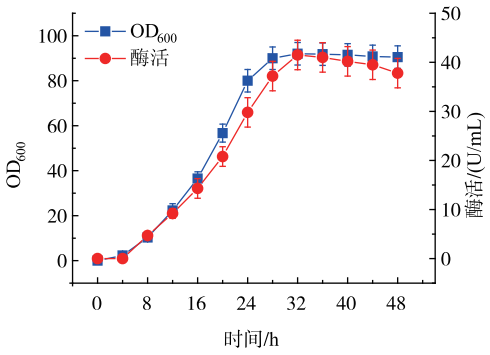


图 8　重组菌株 BSM3 5L 发酵罐发酵水平分析

Fig. 8　Fed-batch fermentation of the recombinant strain BSM3

3　结　语

本实验构建稳定的重组谷氨酰胺酶表达菌株,选择对 *B. subtilis* 168 进行定点整合,来表达谷氨酰胺酶,提高 *Mglu* 基因的遗传稳定性。增加基因表达产物活性可以通过在基因上游插入强启动子、增加结构基因拷贝数、对结构基因进行改造、降低降解或抑制表达产物活性物质的表达等方式进行。本实验中在使用强启动子 *Hpa*II 的基础上,在敲除 2 个内源性蛋白酶基因 *apr*E、*npr*E 的同时,插入谷氨酰胺酶基因。既增加了谷氨酰胺酶的拷贝数,又降低了蛋白酶对表达产物谷氨酰胺酶的降解。通过对比发现,增加谷氨酰胺酶基因拷贝数,可有效提高谷氨酰胺酶表达水平。本实验中采用 *lox* 序列重组的方式将 *Mglu* 基因整合到 *B. subtilis* 168 染色体上,抗性基因也插入到了染色体上,表达 pTSC 质粒上重组酶 CRE,引导 *lox* 序列重组,消除抗性基因,因此,该重组表达谷氨酰胺酶菌株 BSM3 可直接用于食品发酵。

参考文献:

[1] ALEDO J C,GOMEZ-FABRE P M,OLALLA L,et al. Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes[J]. **Mamm Genome**,2000,11(12):1107-1110.

[2] WAKAYAMA M,NAGANO Y,RENU N,et al. Molecular cloning and determination of the nucleotide sequence of a gene encoding salt-tolerant glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3 [J]. **Journal of Fermentation and Bioengineering**,1996,82(6):592-597.

[3] YOSHIMUNE K,SHIRAKIHARA Y,WAKAYAMA M,et al. Crystal structure of salt-tolerant glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3 in the presence and absence of its product L-glutamate and its activator Tris[J]. **FEBS Journal**,2010,277(3):738-748.

[4] MASUO N,ITO K,YOSHIMUNE K,et al. Molecular cloning,overexpression,and purification of *Micrococcus luteus* K-3-type

glutaminase from *Aspergillus oryzae* RIB40[J]. **Protein Expr Purif**,2004,38(2):272-278.

[5] MASUO N,YOSHIMUNE K,ITO K,et al. *Micrococcus luteus* K-3-type glutaminase from *Aspergillus oryzae* RIB40 is salt-tolerant[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,2005,100(5):576-578.

[6] KUMAR L,SINGH B,ADHIKARI D K,et al. A temperature and salt-tolerant L-glutaminase from gangotri region of uttarakhand himalaya:enzyme purification and characterization[J]. **Appl Biochem Biotechnol**,2012,166(7):1723-1735.

[7] JEON J M,LEE H I,HAN S H,et al. Partial purification and characterization of glutaminase from *Lactobacillus reuteri* KCTC3594[J]. **Appl Biochem Biotechnol**,2010,162(1):146-154.

[8] SATO I,KOBAYASHI H,HANYA Y,et al. Cryptococcus nodaensis sp nov,a yeast isolated from soil in Japan that produces a salt-tolerant and thermostable glutaminase[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**,1999,22(3):127-132.

[9] SIETSKE A D B,DIDERICHSEN B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*:a review[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**,1991,36(1):1.

[10] MU W,ZHANG W,FENG Y,et al. Recent advances on applications and biotechnological production of D-psicose[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2012,94(6):1461-1467.

[11] NEGRI A,POTOCKI W,IWANICKI A,et al. Expression and display of *Clostridium difficile* protein FliD on the surface of *Bacillus subtilis* spores[J]. **Journal of Medical Microbiology**,2013,62(9):1379-1385.

[12] HARWOOD C R,WIPAT A. Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168[J]. **FEBS Lett**,1996,389(1):84-87.

[13] XIE J,ZHAO Y,ZHANG H,et al. Improving methyl parathion hydrolase to enhance its chlorpyrifos-hydrolysing efficiency[J]. **Lett Appl Microbiol**,2014,58(1):53-59.

[14] BROCKMEIER U,WENDORFF M,EGGERT T. Versatile expression and secretion vectors for *Bacillus subtilis*[J]. **Current Microbiology**,2006,52(2):143-148.

[15] FLEMING G T,PATCHING J W. Plasmid instability in an industrial strain of *Bacillus subtilis* grown in chemostat culture[J]. **Journal of Industrial Microbiology**,1994,13(2):106-111.

[16] 张灏,夏雨,傅晓燕,等. 耐热 β- 半乳糖苷酶基因 *bgaB* 在枯草芽孢杆菌中的整合表达[J]. 食品与生物技术学报,2003,12(6):1-4,14.

[17] KAWAMURA F,DOI R H. Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases[J]. **Journal of Bacteriol**,1984,160(1):442-444.

[18] STAHL M L,FERRARI E. Replacement of the *Bacillus subtilis* subtilisin structural gene with an in vitro-derived deletion mutation[J]. **Journal of Bacteriol**,1984,158(2):411.

[19] YANG M Y,FERRARI E,HENNER D J. Cloning of the neutral protease gene of *Bacillus subtilis* and the use of the cloned gene to create an in vitro-derived deletion mutation[J]. **Journal of Bacteriol**,1984,160(1):15-21.

[20] YAN X,YU H J,HONG Q,et al. Cre/lox system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*[J]. **Appl Environ Microbiol**,2008,74(17):5556-5562.

[21] NA S,AV B,YA N,et al. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously [J]. **Nucleic Acids Research**,2004,32(2):e19.

[22] ANAGNOSTOPOULOS C,SPIZIZEN J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Bacteriol**,1961,81(5):741.

[23] 张美丹. 谷氨酰胺酶的表达、酶学性质研究及发酵优化[D]. 无锡:江南大学,2017.

[24] 何伟伟. D- 阿洛酮糖 3- 差向异构酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达及应用研究[D]. 无锡:江南大学,2017.

[25] 蒋岚,杨永华,龚毅,等. 稀有密码子对 *proUK* 基因在大肠杆菌中高表达的影响[J]. 生物工程学报,1999,2(1):14-17.