

# 利用细胞壁锚定蛋白 MbA 构建 新型苏云金芽胞杆菌表面展示系统

吕婷 沈霏 邵小虎 李华 江梦天 李林

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 从苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)野生型菌株 YBT-9602 基因组中通过 PCR 扩增到编码一种具有细胞壁锚定活性的芽胞皮层水解酶的编码基因 *mbA*。序列测定和编码产物结构域预测分析显示, *mbA* 编码产物在结构上由 1 个具有肽聚糖结合性能的 N-末端结构域和 1 个具细胞壁水解酶活性的 C-末端结构域组成, 具有作为细胞表面展示系统的运载蛋白的潜力。通过体外构建 *mbA* 与绿色荧光蛋白基因 *gfp* 的融合基因 (*mbA-gfp*) 并导入苏云金芽胞杆菌受体菌中进行表达, 经对重组菌全细胞免疫荧光显微镜观测、蛋白酶 pronase 消化试验和 SDS 处理, 证实 GFP 被成功展示于受体菌细胞表面; 经流式细胞仪测定, 以细菌  $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖酶为靶蛋白的表面展示系统有 42.97% 的重组菌细胞可展示融合酶, 重组菌具有 13.5 U/mL 的全细胞酶活性。结果表明, MbA 作为一种细胞壁锚定蛋白可用于构建新的苏云金芽胞杆菌细胞表面展示系统。

**关键词** 苏云金芽胞杆菌; 表面展示系统; 细胞壁锚定蛋白; 芽胞皮层溶解酶; 绿色荧光蛋白基因

**中图分类号** Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)01-0007-05

细菌细胞表面展示系统 (bacterial cell surface display system) 可用于活体疫苗开发、蛋白质及多肽文库筛选、抗体合成、生物传感器研制、全细胞生物催化剂和生物吸附剂开发等领域<sup>[1-2]</sup>。尽管苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 因其可合成对多种农业害虫具有毒性的杀虫晶体蛋白而一直受到重视, 但迄今该菌除杀虫活性以外的其他生物学活性并未被充分开发。鉴于该菌具有很强的蛋白质生物合成性能和优良的耐高温性能, 是一种发展细菌表面展示系统的良好菌种材料, 本研究通过搜寻蜡状芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) 菌群已测序基因组中的细胞壁结合蛋白基因, 从 1 株苏云金芽胞杆菌野生型菌株中扩增到 1 种推断的编码细胞壁结合蛋白的基因 *mbA*, 利用该基因作为运载蛋白基因和利用绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因作为报告基因, 构建该菌的一种新型细胞表面展示系统, 并进一步测定该系统展示 1 种细菌  $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖酶的重组菌全细胞酶活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 细菌菌株、质粒、培养基和培养条件

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  用于构建各种重组质粒; 苏云金芽胞杆菌拟步行甲亚种 (*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*) 野生型菌株 YBT-9602 提供 *mbA* 基因来源; 苏云金芽胞杆菌突变株 BMB171<sup>[3]</sup> 作为受体菌用于构建表面展示重组菌株。以上菌株均为笔者所在实验室保存。前期构建的质粒 pMB138<sup>[4]</sup> 作为枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)  $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖酶基因 *gls* 的来源质粒; 携带有营养期活性的启动子 P<sub>cry3Aa</sub> 和绿色荧光蛋白基因 *gfp* 的苏云金芽胞杆菌表达载体 pMB164<sup>[5]</sup> 被用于构建携带融合基因 “*mbA-gfp*” 的质粒 pMB176, 以及携带融合基因 *mbA-gls* 的重组质粒 pMB220。

所有细菌菌株均采用 Luria-Bertani (LB) 培养基<sup>[6]</sup> 进行培养, 但在培养大肠杆菌重组菌株时额外添加氨苄青霉素 (Amp) 至终质量浓度为 100

收稿日期: 2013-01-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30670054, 31070111)

吕婷, 硕士研究生, 研究方向: 微生物生物技术, E-mail: lvting\_lt@yahoo.com.cn

通信作者: 李林, 博士, 教授, 研究方向: 微生物生物技术, E-mail: lilin@mail.hzau.edu.cn

$\mu\text{g}/\text{mL}$ ;而在培养苏云金芽胞杆菌重组菌时添加红霉素(Erm)至终质量浓度为  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。大肠杆菌采用  $37^\circ\text{C}$  培养,苏云金芽胞杆菌于  $28^\circ\text{C}$  进行培养。

### 1.2 基因 *mbA* 的扩增与重组质粒构建

参照蜡状芽胞杆菌 AH1271 基因组中的一种芽胞皮层溶解酶(spore cortex-lytic enzyme, SCLE)序列(GenBank 登录号: ZP\_04186473. 1)而设计引物 A1:  $5'-\text{CTGTCTAGA ATGCGCCAAAAGCTATT}-3'$ (下划线序列为 *Xba* I 酶切位点)和 A2:  $5'-\text{GGCAGATCT ACAGAAAATATGTTTACCG}-3'$ (下划线序列为 *Bgl* II 酶切位点),以苏云金芽胞杆菌 YBT-9602 基因组 DNA 为模板,经聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增到 1 个约 780 bp 的片段。PCR 反应程序为:  $94^\circ\text{C}$  5 min;  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $55^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  1 min, 25 个循环;  $72^\circ\text{C}$  10 min,  $4^\circ\text{C}$  保存。扩增片段经测序后,用 *Xba* I 和 *Bgl* II 酶切,并连接到质粒 pMB164 的 *Xba* I/*Bgl* II 位点,得到重组质粒 pMB176(Amp<sup>r</sup> Erm<sup>r</sup>, 8 305 bp)。另外,将质粒 pMB138 用 *Bgl* II 和 *Pst* I 进行酶切,并将其中的 660 bp 酶切片段(*gls* 基因)连接到质粒 pMB176 的 *Bgl* II/*Pst* I 位点,得到重组质粒 pMB220(Amp<sup>r</sup> Erm<sup>r</sup>, 8 767 bp)。

### 1.3 分析方法

GFP 单克隆抗体(Chemicon, 1 : 3 000)用于免疫荧光显微镜观测重组蛋白在细胞表面的定位。重组细菌免疫荧光显微镜观测、蛋白酶 pronase 消化与 SDS 处理,均按照文献[5]的方法进行。细菌  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖的多克隆抗体由笔者所在实验室预先制备而成,并用于表面展示工程菌的流式细胞仪分析[7]。

### 1.4 全细胞 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶活测定

根据文献[7]的方法进行,相对酶活单位定义为从  $\beta$ -葡聚糖每分钟水解产生  $1 \mu\text{mol}$  葡萄糖的全细胞菌液( $D_{600 \text{ nm}}=1$ )所需的酶量。

## 2 结果与分析

### 2.1 芽胞皮层溶解酶基因 *mbA* 的扩增与序列分析

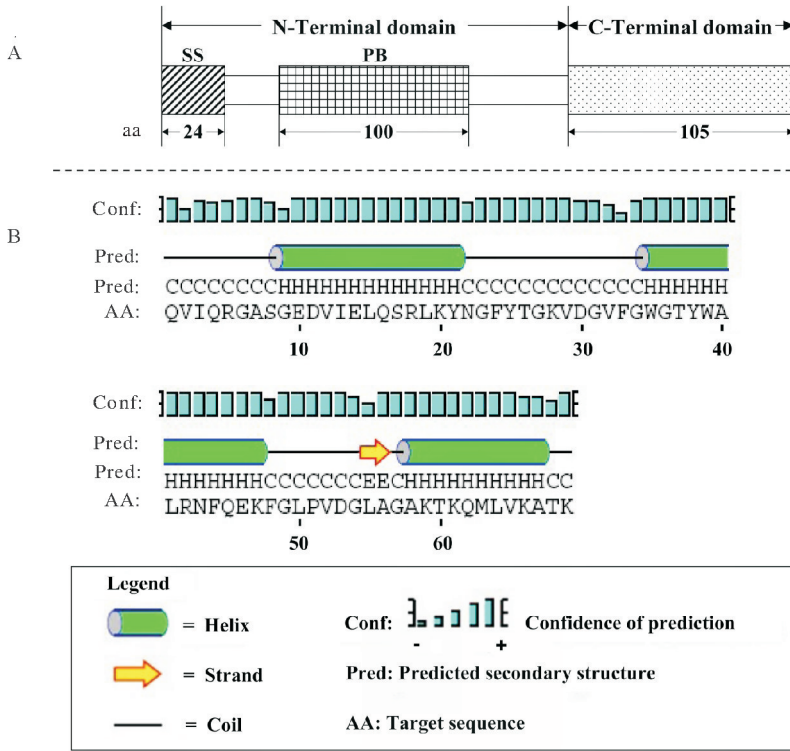
从多个蜡状芽胞杆菌菌群已测序基因组中,搜寻到多种编码芽胞皮层溶解酶的基因。根据其中 1 个基因的编码序列(GenBank: ZP\_04186473. 1)设计特定引物,从苏云金芽胞杆菌 YBT-9602 菌株基因组扩增得到 1 条特异性片段。将纯化后的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体后进行测序分析,结果

发现该片段为 1 个完整的编码框,全长 780 bp。其序列与上述蜡状芽胞杆菌的芽胞皮层水解酶基因具有 99% 的序列相似性,初步确定所扩增的产物属于该菌的一种芽胞皮层水解酶的编码基因,命名为 *mbA*。

利用 NCBI 在线工具 CDART 和信号肽预测工具 SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对 *mbA* 编码产物(命名为 MbA)进行了结构模块预测,发现该 MbA 蛋白酶在一级结构上可明显分为 1 个 N-末端结构域和 1 个 C-末端结构域(图 1A)。其中,N-末端结构域由大约 100 aa 组成,主要具有细胞壁肽聚糖结合活性,在其前端含有 1 个由大约 24 aa 组成的信号肽序列;而 C-末端结构域大约由 105 aa 组成,具有肽聚糖水解活性。该蛋白 N-末端结构域这种具有跨膜分泌信号和能与细胞壁相结合的性质是细胞表面展示系统的运载蛋白必须具有的性能,因而预期这种蛋白酶具有应用于构建细胞表面展示系统的潜力。进一步对 MbA 的 N-末端结构域的二级结构利用在线工具“PSIPRED”(<http://bioinf.c.ucl.ac.uk/psipred/>)进行了分析,发现其中含有一个“ $\alpha\alpha\alpha$ ”折叠结构,与已报道的某些肽聚糖水解酶,如大肠杆菌的 MltD<sup>[8]</sup>和苏云金芽胞杆菌的 Mbg<sup>[5]</sup>等通常含有的“ $\beta\alpha\alpha\beta$ ”折叠结构是不同的(图 1B)。

### 2.2 以 MbA 作为运载蛋白的细胞表面展示系统的构建与融合蛋白的定位分析

尽管对 MbA 的结构预测显示该蛋白可能具有跨膜分泌转运和细胞壁锚定活性,但该蛋白是否可作为表面展示系统的运载蛋白,尤其是可否作用于苏云金芽胞杆菌的营养体细胞仍需实验验证。因此,选取绿色荧光蛋白基因 *gfp* 作为报告基因,通过构建携带融合基因“*mbA-gfp*”的重组质粒 pMB176,并导入苏云金芽胞杆菌受体菌 BMB171,筛选得到重组菌株 MB176。对该菌营养期细胞总蛋白进行的 SDS-PAGE 分析(结果未显示),可检测到 55 ku 的蛋白质条带,与融合蛋白 MbA-GFP 预期分子质量大小相符。利用免疫荧光显微镜可分别观测到重组细胞发出的绿色荧光以及 Cy5 在细胞表面的红色荧光(图 2)。由于细胞外大分子的 Cy5 不可能穿过细胞膜屏障而与细胞内表达的 GFP 相结合,因此反映出细胞内表达的融合蛋白 MbA-GFP 发生了跨膜转运并结合于细胞表面。



A: MbA 结构域示意图 General map of MbA; B: 预测的 MbA 的 N-末端结构域二级结构 The predicted secondary structure of MbA N-terminal domain; SS: 信号肽序列 Signal sequence; PB: 肽聚糖结合结构域 Peptidoglycan-binding domain; aa: 氨基酸 Amino acid.

图 1 苏云金芽胞杆菌 MbA 蛋白质结构示意图与 N-末端结构域的二级结构预测

Fig. 1 Schematic map of *B. thuringiensis* MbA and the predicted secondary structure of the N-terminal domain

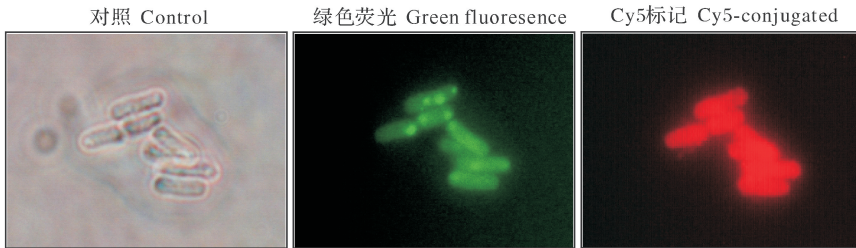


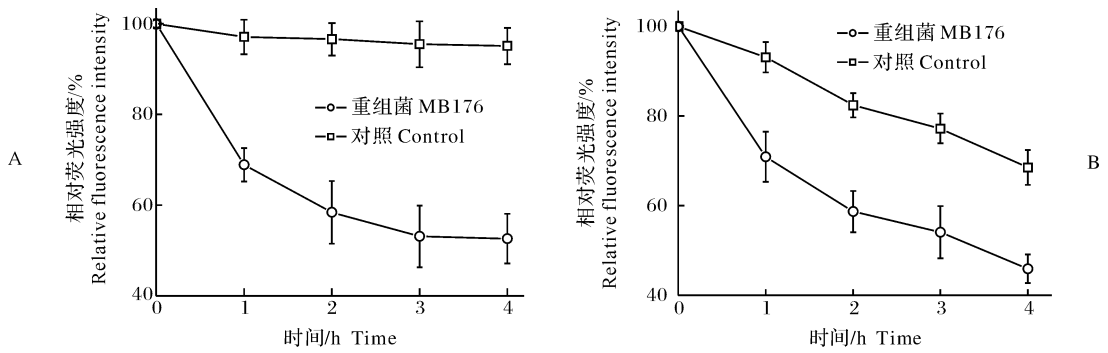
图 2 免疫荧光显微镜观测苏云金芽胞杆菌重组菌 MB176 细胞镜象

Fig. 2 Immunofluorescence micrographs of *B. thuringiensis* MB176 intact cells

融合蛋白 MbA-GFP 在细胞表面的定位进一步被蛋白酶 pronase (GFP 对大部分细胞内的蛋白酶具有较强的抗性,但对 pronase 敏感)消化实验和 SDS 敏感性实验所证实。如图 3 所示,该蛋白酶对表达细胞内 GFP 的对照细胞的相对 GFP 荧光活性几乎无影响(因为大分子的 pronase 酶不能穿越细胞膜进入到细胞内),但是对重组菌 MB176 的 GFP 相对荧光活性下降达 50%左右。SDS 敏感性实验

证实,SDS 处理对重组菌细胞壁的影响较对照菌株更大,反映出重组菌细胞壁经锚定融合蛋白后的整体结构已发生一定改变,从而对 SDS 更为敏感<sup>[9]</sup>。这些结果表明,芽胞皮层溶解酶 MbA 在苏云金芽胞杆菌营养生长阶段亦可发生跨膜转运作用,并通过与细胞壁中的肽聚糖成分发生结合而锚定于细胞壁上。因此,这一蛋白表现出可作为细胞表面展示系统的运载蛋白的性能。





A:蛋白酶 pronase 消化实验 Pronase accessibility assay; B:SDS 敏感性测定 SDS sensitivity assay.

图 3 苏云金芽胞杆菌重组菌 MB176 细胞的蛋白酶 Pronase 和 SDS 处理结果

Fig. 3 Pronase accessibility and SDS sensitivity assays of *B. thuringiensis* MB176 cells

### 2.3 表面展示 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖的重组菌全细胞酶活性

为进一步验证 MbA 在与其他功能蛋白以融合蛋白形式存在时,是否仍然具有跨膜转运活性并保持该蛋白质的功能或活性,选取来自于枯草芽胞杆菌的  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖作为目标蛋白进行了分析。通过体外构建融合基因 *mbA-gIS* 并导入受体菌 BMB171 中进行表达,利用流式细胞仪对重组菌表达和展示这种水解酶的效率进行了分析,结果显示表达  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖的苏云金芽胞杆菌重组菌 MB220 有 42.97% 细胞检测到 Cy5 荧光活性,远高于对照菌株 BMB171,表明该重组菌内所表达的融合酶也发生了跨膜转运,并定位于细胞表面,从而证实 MbA 具有作为细胞表面展示系统的运载蛋白的活性。对重组菌 MB220 全细胞  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶活进行了测定,结果显示作为阴性对照的受体菌 BMB171 未检测到酶活,而重组菌株的酶活达到 13.5 U/mL。

## 3 讨论

细胞表面展示技术由于具有使酶促反应在细胞表面直接快速进行、减少反应基质扩散限制和使反应速率大为提高等优势,已在许多生物技术领域显示出应用潜力<sup>[11-12]</sup>。苏云金芽胞杆菌由于在芽胞形成时期可以合成超过 30% 细胞干质量的伴胞晶体 (parasporal crystal) 物质<sup>[13]</sup>,以及作为芽胞杆菌本身具有的抗高温耐逆性能,被认为是构建细胞表面展示系统良好的受体菌系统之一。但是,目前有关苏云金芽胞杆菌表面展示系统的运载蛋白还很少,尤其是具有高效跨膜转运和表面锚定性能的运载蛋白还缺乏,成为该菌细胞表面展示系统发展的一

种制约因素。本研究通过搜寻芽胞杆菌基因组中与细胞壁组分具有结合活性的蛋白质编码基因,确定其中的一种芽胞皮层溶解酶 MbA 具有推断的细胞壁锚定活性,而分别用报告蛋白 GFP 和外源功能蛋白  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶进行研究,证实这种芽胞皮层溶解酶具有在苏云金芽胞杆菌营养生长期的跨膜分泌和细胞壁锚定活性,将与其呈融合状态的目标蛋白以具有活性的形式锚定于营养体细胞表面,因而可作为表面展示系统的运载蛋白。MbA 分子的 N-末端结构域中含有可结合肽聚糖成分的结构模体,而对其二级结构分析显示在该结构域中含有 3 个串联重复的  $\alpha$  螺旋 (“ $\alpha\alpha\alpha$ ”),推测其可能通过折叠螺旋而形成一种筒状结构,并嵌入肽聚糖层的空隙中,从而可锚定到细胞壁上。由于目前革兰氏阳性菌细胞壁结合蛋白与细胞壁结合分子机制涉及较少,因此, MbA 蛋白与细胞壁结合作用的分子机制仍需进一步研究。

MbA 虽然具有表面展示的能力,但是表面展示效率不足 50%,分析其原因主要有以下几点:(1)从结构上看, MbA 的 N-末端结构域为 3 个单一的  $\alpha$ -螺旋结构域,形成的高级结构缺少  $\alpha$ -螺旋与  $\beta$ -折叠片相间的二元重复结构单元,而二元重复结构对于细胞壁成分的结合具有更强的协同效应,可以形成发夹状的高级结构<sup>[8]</sup>,从而优于单一结构单元的重复;(2) MbA 具有信号肽序列,在细胞膜的转运过程中可能有部分滞留于膜间隙,从而阻止进一步的转运过程。事实上,目前发现的一些展示效率高的运载蛋白,如丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 的冰核蛋白 (ice nucleation protein)<sup>[10]</sup> 和苏云金芽胞杆菌自溶素蛋白 Mbgs<sup>[5]</sup> 等,在其分子结构中无明显的信号肽序列,但它们是如何进行跨膜转运

的还不清楚;(3)MbA可能是属于芽胞期活性的一种蛋白,在营养生长期的活性不高,等等。如何提高这一运载蛋白的活性需要进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] DAUGHERTY P S. Protein engineering with bacterial display [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17: 474-480.
- [2] DESVAUX M, DUMAS E, CHAFSEY I, et al. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 256: 1-15.
- [3] 李林, 喻子牛. 苏云金芽胞杆菌无质粒突变株 BMB171 的转化和表达性能 [J]. *应用与环境生物学报*, 1999, 5(4): 395-399.
- [4] 李小华, 黄新风, 邵小虎, 等. 利用乳酸乳球菌 AcmA 表面展示  $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖酶 [J]. *生物工程学报*, 2009, 25(1): 89-94.
- [5] SHAO X, JIANG M T, YU Z, et al. Surface display of heterologous proteins in *Bacillus thuringiensis* using a peptidoglycan hydrolase anchor [J]. *Microb Cell Fact*, 2009, 8: 48.
- [6] SAMBROOK J, RUSSELL D W. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [7] SHAO X H, NI H, LU T, et al. An improved system for the surface immobilisation of proteins on *Bacillus thuringiensis* vegetative cells and spores through a new spore cortex-lytic enzyme anchor [J]. *New Biotechnol*, 2012, 29: 302-310.
- [8] BATEMAN A, BYCROFT M. The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD) [J]. *J Mol Biol*, 2000, 299: 1113-1119.
- [9] SHI H, WEN S W. Display of green fluorescent protein on *Escherichia coli* cell surface [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2001, 28: 25-34.
- [10] LI Q Q, YAN Q, HE Y, et al. Molecular characterization of the ice nucleation protein (InaQ) from *Pseudomonas syringae* and the analysis of its transmembrane transport activity in *Escherichia coli* [J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8: 1097-1108.
- [11] 邵小虎, 李林. 细菌运载蛋白及在表面展示技术中的应用进展 [J]. *生物技术通讯*, 2008, 19(6): 911-915.
- [12] 张红星, 李茜茜, 叶婷, 等. 细菌表面展示技术在有机磷农药降解中的应用 [J]. *生物技术*, 2008, 18(2): 90-93.
- [13] AGAISSE H, LERECLUS D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? [J]. *J Bacteriol*, 1995, 177: 6027-6032.

## Development of a novel cell-surface display system in *Bacillus thuringiensis* using cell wall-binding protein MbA as the anchoring motif

LYU Ting SHEN Fei SHAO Xiao-hu LI Hua JIANG Meng-tian LI Lin

*College of Life Science and Technology/State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** A *Bacillus* spore cortex-lytic enzyme with the cell wall-binding activity, MbA, was used to develop a novel cell-surface display system of *Bacillus thuringiensis*. The full-length of *mbA* gene from *B. thuringiensis* wild-type strain YBT-9602 genome was PCR-amplified, sequenced and the structural features of its encoding domains were characterized. It showed that the predicted protein MbA was structurally distinguished by an N-terminal domain with peptidoglycan-binding activity and a C-terminal domain with cell wall-hydrolysis activity. By constructing and expressing the fused *mbA-gfp*, it showed that the heterologous GFP was successfully immobilized onto the surface of *B. thuringiensis* cells through the immunofluorescence microscopic observation and the assays of pronase accessibility and SDS sensitivity. Furthermore, the recombinant *B. thuringiensis* cells expressing the MbA-fused chimeric protein with a bacterial  $\beta$ -1, 3-1, 4-glucanase, were determined the surface-display efficiency using flow cytometry analysis, which showed that a 42.97% recombinant cells exhibited surface-displaying activity. The whole-cell enzymatic activity of the recombinant *B. thuringiensis* MB220 expressing the *mbA-gls* fusion gene was detected to be 13.5 U/mL. These results indicated that the MbA protein can be served as a functional carrier protein for developing a novel *B. thuringiensis* cell-surface display system.

**Key words** *Bacillus thuringiensis*; cell-surface display system; cell wall-binding protein; MbA; *gfp*

(责任编辑:张志钰)