

分子伴侣 CsaA 过表达及 wprA 蛋白酶的缺失对枯草芽孢杆菌分泌表达外源蛋白的影响

蒋红亮, 张 虹, 赵辅昆, 丁 明

(浙江理工大学蛋白质组学与分子酶学研究室, 杭州 310018)

摘 要: 在枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*168 菌株, 以及在其改造菌株 *B. subtilis*168wprA⁻ 和 *B. subtilis*168/wprA⁺;:csaA 中表达来自碱性芽孢杆菌 C-125 的碱性果胶酶和来自巨大芽孢杆菌的青霉素酰化酶。碱性果胶酶在 *B. subtilis* 中分泌表达时, 敲除了 wprA 蛋白酶基因的 *B. subtilis*168wprA⁻ 菌株相对于其野生型菌株 *B. subtilis*168 分泌表达的总的酶活力下降了 36%, 再次整合 csaA 进 wprA 位点后的 *B. subtilis*168/wprA⁺;:csaA 菌株, 其表达量又恢复到相当于野生型菌株的表达水平。青霉素酰化酶在 *B. subtilis*168wprA⁻ 菌株中的表达与野生型相比没有明显差异; 而整合 csaA 分子伴侣进 wprA 位点后的菌株 (*B. subtilis*168/wprA⁺;:csaA), 相对于野生型其总的酶活力高出 66%, 说明分子伴侣 CsaA 数量的增加可以明显提高酶的表达量, 并显示出普遍提高蛋白总活力的作用, 而蛋白酶 wprA 基因的敲除, 对某些蛋白的表达量能够产生明显的影响, 在提高表达的稳定性方面表现出普遍的促进作用。本实验表达的青霉素酰化酶酶活力 (14.7 U/mL) 比工业应用中的酶活力 (10 U/mL) 高出了 47%。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 分子伴侣 CsaA; 蛋白酶 wprA

中图分类号: Q786

文献标识码: A

0 引 言

枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*), 是一种基因工程中广泛使用的革兰氏阳性菌, 在科学研究和工业生产上都有着可观的应用价值和实际意义^[1-2]。但是由于自身分泌蛋白酶多, 构建的表达质粒不稳定等因素的影响, 其应用受到了一定程度的限制^[3-6]。对于枯草芽孢杆菌表达系统的改造一直在进行, 目前主要工作都集中于敲除枯草芽孢杆菌胞外蛋白酶基因, 也有一部分是针对枯草芽孢杆菌分泌表达元件以及分子伴侣方面的改造及优化。CsaA 是枯草芽孢杆菌的一种促进蛋白正确折叠, 促进蛋白分泌的分子伴侣。CsaA 是研究者在克隆枯草芽孢杆菌的 secA 基因抑制大肠杆菌的 secA51(Ts) 突变时发现并证明它是该菌的一个必需基因; 它可以抑制大肠杆菌的 dnaK, dnaJ, grpE 突变, 并且在 secB, groES, dnaJ 突变的菌株中促进蛋白的输出^[7-10]; 在枯草芽孢杆菌胞外蛋白酶中, wprA 是一种结合在细胞壁上的蛋白 (cell-wall-bound proteins, CWBP)。wprA 由两个结合在细胞壁上的功能区组成, 一个功能区具有丝氨酸蛋白酶的活性 (CWBP52), 另一个功能区具有分子伴侣的活性 (CWPP23)。wprA 也相应表现出两种功能, 一方面 wprA 可以降解折叠错误的或者部分的外源蛋白, 另一方面 wprA 也可以帮助分泌蛋白形成正确的折叠。当删除了 wprA 基因之后, 一些特异性的结合在枯草芽孢杆菌细胞壁的蛋白出现在了培养基中。wprA 的双重功能在枯草芽孢杆菌分泌表达蛋白的过程中起到了质量控制的作用, 具体表现为, 枯草芽孢杆菌在蛋白分泌的时候一方面降解掉错误折叠蛋白和一些外源蛋白, 另一方面又帮助了蛋白正确折叠从而顺利地分泌到培养基中^[11-13]。

1 材料与方法

1.1 试剂

Primer STAR DNA polymerase, T4 ligase, 碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, CIAP), 限制性内切酶 *EcoR* I, *Nde* I, *Bma*H I, 蛋白分子量标准购自宝生生物公司; Taq DNA polymerase, DNA 分子量标准购自上海天根生物有限公司; 细菌基因组抽提试剂盒购自 BioDev 公司; 质粒抽提试剂盒, 胶回收抽提试剂盒购自博大泰克公司; 丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺, 十二烷基苯磺酸钠(SDS)购自 Pharmacia AB 公司; N, N, N', N'-四甲基乙二酰(TEMED), 过硫酸铵购自 SIGMA 公司; 考马斯亮蓝 G-250 购自 Amresco 公司; 电泳级琼脂糖购自 Biowest 公司; 细菌培养所用蛋白胨(Typtone), 酵母抽提物(Yeast Exact)购自 Oxoid 公司; 可溶性淀粉购自华东医药公司。其余试剂为国产试剂分析纯。

1.2 菌株及质粒

本实验用到的菌株及质粒见表 1。

表 1 菌株及质粒

菌株/质粒	描述	来源
pACC Vector	由 pBSK 质粒改造	本实验室保存
pUB110 Vector	枯草芽孢杆菌表达质粒	本实验室保存
pACC-pga-pUB110 plasmid	青霉素酰化酶穿梭质粒	本实验室保存
pACC-pel-4A-pUB110 plasmid	碱性果胶酶穿梭质粒	本实验构建
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	碱性芽孢杆菌 C-125	本实验室保存
<i>Bacillus subtilis</i> 168	枯草芽孢杆菌	本实验室保存
<i>B. subtilis</i> 168 <i>wprA</i> ⁻	敲除了 <i>wprA</i> 基因的枯草芽孢杆菌	本实验构建
<i>B. subtilis</i> 168/ <i>wprA</i> : <i>csaA</i>	整合了 <i>csaA</i> 进 <i>wprA</i> 位点的 <i>B. subtilis</i> 168 <i>wprA</i> ⁻ 菌株	本实验构建

实验用抗生素浓度: 氨苄青霉素(Amp)100 μg/mL, 卡那霉素(Kan)15 μg/mL

1.3 分子生物学操作

1.3.1 碱性果胶酶枯草芽孢杆菌表达载体的构建

以引物 P1, P2(见表 2)作为引物, 以 *Bacillus halodurans* C-125 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到碱性果胶酶基因 *pel4-A* 的编码区, PCR 产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化。纯化之后的 *pel-4A* PCR 片段及 pACC 载体示意图见图 1, 具体为: 用 *Nde* I 和 *EcoR* I 酶切 pACC 载体及纯化后的 PCR 产物两者 16℃ 连接过夜, 然后转化感受态大肠杆菌 *DH5α*; 转化后菌体质粒经 PCR 以及酶切鉴定之后测序, 测序正确的质粒命名为 pAcc-Pel-4A, 见图 2。

表 2 引物

引物名称	序列 5'—3'	描述
P1	ATA CATATGGTAGAAATGAAAAAATAGTTTCTTA	<i>Nde</i> I; <i>pel4-A</i> 5'端引物
P2	AAT GAATTCTTACTTACCTGCTCCAGCATTGTT	<i>EcoR</i> I; <i>pel4-A</i> 3'端引物
P3	ACACTATTCTATTGGAATCTTAATCATT	正反鉴定引物 5'端引物
P4	AAAATATTGATTACAACGAACGTGTC	正反鉴定引物 3'端引物

注: 下划线为限制性酶切位点, 斜体为保护性碱基。

将质粒 pACC-Pel-4A 及 pUB110(图 3)用 *Bam*H I 酶切消化, 载体以碱性磷酸酶处理, 以产物纯化试剂盒回收, 回收后的消化产物与插入片段在 16℃ 连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌 *DH5α*。Amp/LB 平板筛选。由于是单酶切, 连接时就会产生两种方向相反的连接产物, 如图 4 所示, 正向连接的即是笔者想要的穿梭质粒。现用 pACC 上启动子区域内引物 P3(见表 2)和 pUB110 上靠近 *Bam*H I 酶切位点引物 P4(见表 2), 鉴定正向连接的转化子, 如果是正向连接 PCR 产物的大小应该是 600 bp。PCR 鉴定是正向连接的克隆转入含 Amp 的 LB 液体培养基扩增, 提取质粒, 命名为 pACC-Pel-4A- pUB110。将 pACC-Pel-4A- pUB110 质粒用 *EcoR* I 单酶切, 回收 5.3 kb 片段, 16℃ 自连后回收连接产物。获得表达质粒 pUB110+Pel-4A, 见图 5。

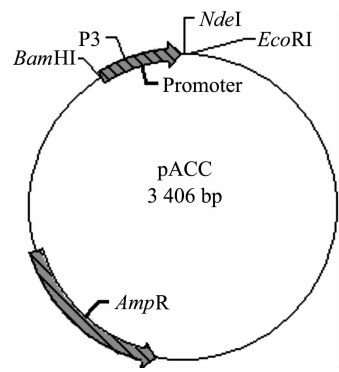


图 1 pACC 质粒

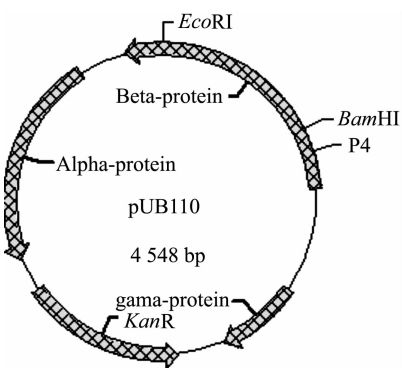


图 2 pUB110 质粒

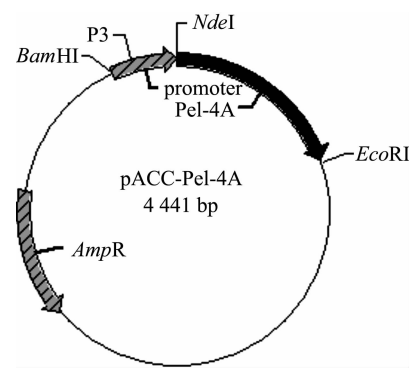


图 3 pACC-Pel-4A

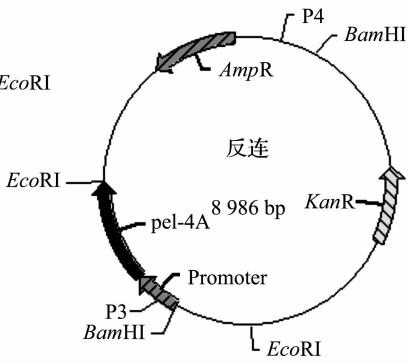
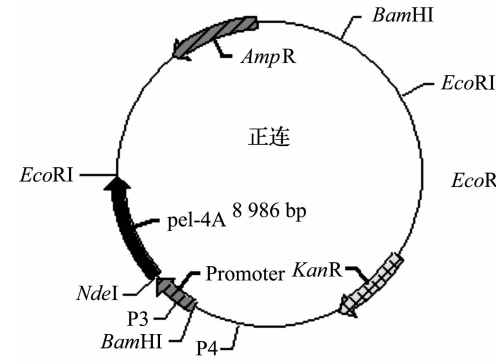


图 4 pACC-Pel-4A 及 pUB110 单酶切连接的两种方式

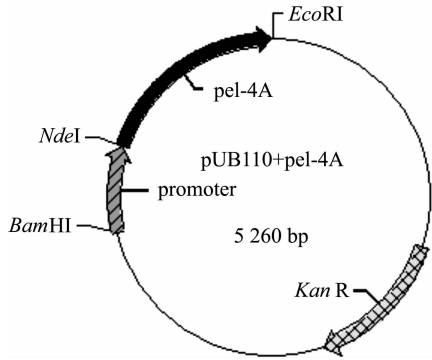


图 5 pUB110+Pel-4A 为碱性果胶酶在枯草芽孢杆菌中的表达质粒

以 pACC-Pel-4A 和 pUB110 连接产物转化 DH5 α 所得转化子为模板,用 pACC 上启动子区域内引物 P3 和 pUB110 上靠近 BamH I 酶切位点引物 P4,鉴定 pAcc-Pel-4A 和 pUB110 连接的正反所得结果如图 6 所示。共挑选了 12 个克隆,其中,1、2 和 3 泳道的 PCR 产物大小在 600 bp 附近,说明 pAcc-Pel-4A 和 pUB110 正向连接;其余的泳道未见扩增条带,为反向连接或者 pAcc-Pel-4A 的自连。

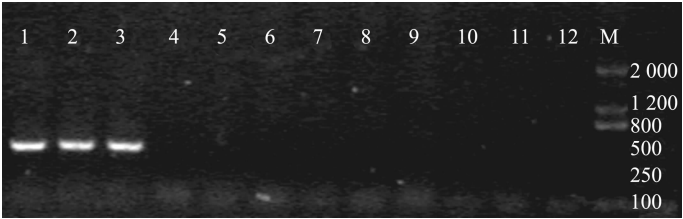


图 6 穿梭质粒的 PCR 鉴定

注:1、2、3 泳道出现大约 600 bp 的条带,为正向连接的结果。其余没有条带的为反向连接或者 pAcc-pel-4A 自连。1~12 为随机挑选的 12 个克隆的编号,M 为分子量 marker。

1. 3. 2 枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*168 及其改造型菌株的转化及表达

枯草芽孢杆菌的转化采用 SP 法^[14],具体操作如下。

a) *B. subtilis*168 甘油菌划 LB 平板在 37℃ 培养箱培养 8 h;挑取单菌落分别接种于 3 mL LB 培养基中,37℃、200 r/min 培养过夜;取 160 μ L 培养液转接至 8 mL SPI 培养基中,37℃,200 r/min 培养至对数生长末期;取 0.2 mL 生长至对数期末的培养液至 2 mL SPII 培养基中,37℃,100 r/min 培养 90 min;加入 20 μ L 10 mmol/L 的 EGTA 溶液,37℃ 100 r/min 培养 10 min;将上述处理后的菌液分装成 0.5 mL 每管,各加入适量质粒,200 r/min 培养 90 min,取菌液涂布相应 Kan15 筛选平板。

b) 将经过 Kan 抗性筛选平板筛选的转化子转入 3 mL 含有 15 μ g/mL 的 Kan 的 LB 液体培养基中 37℃、200 r/min 培养过夜。将过夜培养的菌液 1/30 转接到含有 30 μ g/mL 的 Kan 的 3 mL 的表达培养基中 37℃、200 r/min 培养 24 h。

1. 3. 3 碱性果胶酶及青霉素酰化酶的测活

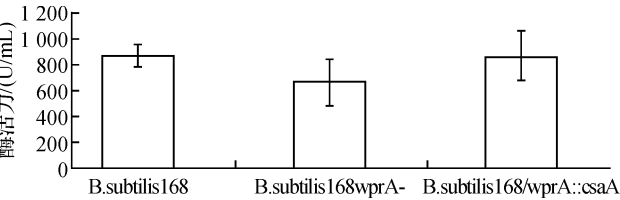
碱性果胶酶的测活^[15]：
将聚二聚半乳糖醛酸 PGA,NaCl 和 CaCl₂ 溶于 pH 10.5 的 50 mM 的 Gly-NaOH 缓冲液中使其终浓度分别达到 0.2%,50 mM 和 0.6 mM,即为碱性果胶酶 Pel-4A 的反应底物溶液。将反应底物溶液分装成每 990 μL 每管,30℃水浴预热 10 min。取适量上清稀释 300 倍。
碱性果胶酶工程菌表达 24 h 后,5 000 r/min,4℃低温离心 15 min,取上清稀释 300 倍,将 10 μL 稀释上清加入 990 μL 的反应地物溶液中,30℃水浴反应 3 min,沸水浴 5 min 终止反应并测量其在 235 nm 处的吸光值 OD₂₃₅ 值。
酶活力单位 U 定义为:在 30℃,pH10.5 条件下,每分钟分解 PGA 生成 1 μM 二聚半乳糖醛酸所需要的酶量。
二聚半乳糖醛酸的摩尔消光系数是 4 600 M⁻¹cm⁻¹。在上述条件下该酶的比活力为 943 U/mg^[44]。碱性果胶酶 Pel-4A 的表达量可以通过换算得到。

青霉素酰化酶 PGA 测活^[16]：
青霉素酰化酶工程菌表达 24 h 后,5 000 r/min,4℃低温离心 15 min,取上清,稀释 30 倍后,取 5 μL 加入到 37℃预热 10 min 的 750 μL 0.09% (w/v) NIPAB(6-硝基 3-苯乙酰氨基苯甲酸)(50mM pH7.5 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液)中,混匀,37℃反应 4 min 后,加入 500 μl 0.2 M 的 HCl 试剂终止反应,混匀后测定 405 nm 处光吸收值,空白对照中酶液用相同体积的磷酸缓冲液代替。
水解 NIPAB 的活力单位定义为:在上述条件下,1 min 水解生成 1 μmol 的 6-硝基 3-氨基-苯甲酸所需要的酶量为一个活力单位(U)。

2 实验结果与分析

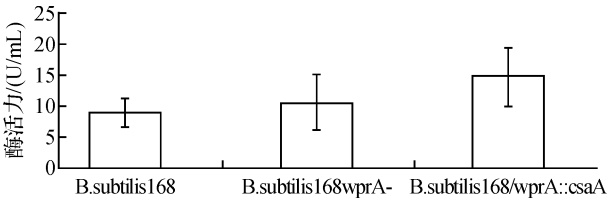
2.1 实验结果

图 7 为碱性果胶酶在个菌株中表达的酶的平均总活力,图 8 为青霉素酰化酶在各个菌株中表达的酶的总活力。



每个菌株 14 个样本测活, *B. subtilis*168 菌株平均总酶活 870 U/mL,组内方差 S=89; *B. subtilis*168wprA⁻ 菌株的平均总酶活 665.5 U/mL,组内方差 S=180; *B. subtilis*168/wprA⁺::csaA 菌株平均总酶活 870 U/mL,组内方差 S=190。

图 7 碱性果胶酶平均活力



每个菌株 15 个样本测活, *B. subtilis*168 菌株平均总酶活 8.925 U/mL,组内方差 S=2.2; *B. subtilis*168wprA⁻ 菌株的平均总酶活 10.5 U/mL,组内方差 S=4.5; *B. subtilis*168/wprA⁺::csaA 菌株平均总酶活 14.7 U/mL,组内方差 S=4.7。

图 8 青霉素酰化酶的平均活力

2.2 结果分析

2.2.1 碱性果胶酶在各菌株中表达的总酶活差异性分析

*B. subtilis*168wprA⁻ 菌株的平均总酶活为 *B. subtilis*168 菌株平均总酶活的 63%,而且 $P<0.05$,两个菌株表达量差异显著;
*B. subtilis*168wprA⁻ 菌株的平均表达量为 *B. subtilis*168/wprA⁺::csaA 菌株平均表达量的 65%,而且 $P<0.01$,可以认为两者表达差异极其显著;

*B. subtilis*168 菌株和 *B. subtilis*168/wprA⁺::csaA 菌株平均表达量相近,而且 $P>0.05$,可以认为没有差异性。

2.2.2 青霉素酰化酶在各菌株中的表达总酶活差异性分析

*B. subtilis*168wprA⁻ 菌株与 *B. subtilis*168 菌株表达的酶的总活力比较, $P>0.05$,两个菌株表达的总酶

活差异不显著;

*B. subtilis*168*wprA*⁻菌株与 *B. subtilis*168/*wprA*::*csaA* 菌株的表达的总酶活比较, $P < 0.05$, 两者总酶活差异显著, *B. subtilis*168/*wprA*::*csaA* 平均总酶活比 *B. subtilis*168*wprA*⁻ 高出 40%;

*B. subtilis*168 菌株与 *B. subtilis*168/*wprA*::*csaA* 菌株平均总酶活比较, $P < 0.01$, 两者差异极显著, *B. subtilis*168/*wprA*::*csaA* 菌株比 *B. subtilis*168 菌株表达的总酶活高出 66%。

3 讨论

枯草芽孢杆菌是重要的工业用酶生产菌, 具有应用价值的酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达意义重大。本实验表达的两种酶, 一种为青霉素酰化酶, 是在抗生素工业上广泛应用的酶, 它可以水解青霉素 G 等生产抗生素母核 6-APA 或 7-ADCA, 该法已经替代传统的化学方法并广泛应用于抗生素的生产。用改造后的菌株 *B. subtilis*168/*wprA*::*csaA* 在试管中发酵后的酶活力即可以达到 14.7 U/mL, 比工业中现在采用的要高出 47%, 而与之相对照的野生型菌株只有 8.925 U/mL。在优化了培养条件的情况下, 野生型枯草芽孢杆菌也能够达到 10 U/mL。所以说, 改造菌株表达青霉素酰化酶的潜力还可以通过优化培养条件进一步地释放。碱性果胶酶的表达水平没有获得突破, 平均表达酶活力和现在所报道的最高酶活力接近。

本实验用青霉素酰化酶基因 PGA 和碱性果胶酶基因 *pel4-A* 在改造的菌株中表达, 得到了以下结果:

青霉素酰化酶的表达, 不受蛋白酶 *wprA* 的影响, 敲除 *wprA* 的菌株 *BS168wprA*⁻ 和野生型菌株 *B. subtilis*168 的表达量没有显著差异 ($P > 0.05$); *CsaA* 的过表达促进了青霉素酰化酶的表达, *B. subtilis*168/*wprA*::*csaA* 相比较于野生型菌株 *BS168* 平均表达量提高了 66%, 且表达差异极其显著 ($P < 0.01$); 而碱性果胶酶的表达中, 发现蛋白酶 *wprA* 对其分泌表达影响非常显著, 敲除 *wprA* 基因的菌株与其野生型菌株相比, 表达量下降了 36%, 差异显著 ($P < 0.05$); 敲除了 *wprA* 的菌株当整合进 *csaA* 后, 碱性果胶酶表达量恢复到和其野生型相当的表达量说明 *CsaA* 对碱性果胶酶的表达具有促进作用。

由实验结果可知, 分子伴侣蛋白 *CsaA* 具有促进蛋白分泌的能力, 可以显著的提高蛋白的分泌表达水平。本实验中, 整合了 *csaA* 的 *B. subtilis*168*wprA*⁻ 菌株的分泌表达青霉素酰化酶和碱性果胶酶的水平都有明显的提高。在表达外源蛋白的过程中, 分子伴侣 *CsaA* 起着促进性的作用, 有着提高分泌效率进而提高外源蛋白表达量的作用。而蛋白酶基因的敲除可以减少枯草芽孢杆菌蛋白酶对外源蛋白的水解, 维持外源蛋白的稳定性, 进而表现为提高外源蛋白的表达量。分子伴侣 *csaA* 基因作为枯草芽孢杆菌体内的必需基因, 研究已经证明 *CsaA* 具有促进蛋白的输出, 促进变性蛋白的复性, 抑制变性蛋白的聚合, 还可以作用于枯草芽孢杆菌转位酶促进分泌蛋白的分泌^[5,7-9]。因此笔者认为, 提高 *CsaA* 的表达量能够对分泌表达外源蛋白起到促进作用。

本实验中, 在表达碱性果胶酶时, *wprA* 基因敲除后的改造菌株与其野生菌株相比较, 表达量下降了 36%。可以认为, 对碱性果胶酶的表达量受 *wprA* 的蛋白水解作用影响并不大, 而其作为分子伴侣的功能对于碱性果胶酶具有重要的影响。 *wprA* 蛋白是枯草芽孢杆菌细胞壁结合蛋白 (Cell-wall-bound-proteins, CWBP), 由两个功能区蛋白 CWBP52 与 CWBP23 组成, CWBP52 具有丝氨酸蛋白酶活性, CWBP32 具有类似分子伴侣的功能^[17]。 *wprA* 蛋白酶与细胞的生长相关, 在枯草芽孢杆菌对数生长期, *wprA* 明显地表达, 并通过水解细胞壁上的肽聚糖协助细胞的生长和分裂^[12]。 *wprA* 蛋白酶的敲除会影响到菌体生长和分裂。在有报道中关于 *wprA* 基因对外源蛋白表达的影响, 全部都是 *wprA* 基因敲除或抑制表达后, 外源蛋白的表达量获得提高或者外源蛋白的稳定性获得增强。Sun-ching Wu 等在枯草芽孢杆菌 WB700 和由 WB700 菌株敲除 *wprA* 基因获得的 WB800 中表达单链抗体 MH-1 (SCA MH-1) 时发现, 在 WB700 中不能够被表达的单链抗体 MH-1 可以在 WB800 中大量地被表达^[18]; Gota Kabayashi 等在敲除了 *wprA* 基因的枯草芽孢杆菌中表达细胞壁结合的脂肪酶 (cell-wall-binding lipase) 时发现, *wprA* 的缺失可以显著地提高脂肪酶在菌体生正的稳定期的稳定性^[19]; Lee Sang Jun 等在枯草芽孢杆菌中表达葡萄球菌激酶 (staphylokinase) 时发现, 在敲除了 *wprA* 的菌株中表达葡萄球菌激酶的表达量 (181 mg/L) 远远大于未敲除 *wprA* 的菌株的表达量 (45 mg/L), 且敲除了 *wprA* 后葡萄球菌激酶在培养基中的稳定性大大增强^[20]; Keith Stephenson 等, 在枯草芽孢杆菌中表达 α -淀粉酶 (α -Amylase) 时发现, 当 *wprA* 被抑制表达时 α -淀粉酶可以大量地被分泌表

达,之后诱导表达了 wprA α -淀粉酶的量急剧下降^[17]。当 *wprA* 基因敲除或抑制其表达后,这些外源蛋白的表达量获得增加或者稳定性获得增强,研究者们都倾向于认为外源蛋白表达量增加和稳定性增强是因为 wprA 蛋白的 CWBP52 结构域具有的丝氨酸蛋白酶水解活性的丧失而得到的,但是关于 CWBP32 结构域具有的分子伴侣功能以及 wprA 蛋白作为细胞壁组成部分,在其敲除过后对枯草芽孢杆菌表达外源蛋白时的负面效应尚没有涉及^[17-20]。而研究中,首次发现 *wprA* 基因的敲除,导致了碱性果胶酶表达量的急剧下降(下降了 36%)。从而第一次涉及到了 wprA 蛋白在调控外源蛋白表达的另一种效应。作为具有分子伴侣及作为枯草芽孢杆菌细胞壁重要组成部分的 wprA 蛋白,在理论上应该具有更加复杂的功能,而不应该等同于枯草芽孢杆菌其他的胞外蛋白酶。在实验研究中发现并验证了这样的推测。

笔者认为,细胞壁结合蛋白 wprA 在枯草芽孢杆菌表达外源蛋白时的作用是复杂的,并具有双重性,符合其既具有蛋白水解酶的活性以及部分分子伴侣的活性。wprA 与 HtrA/B 组成了枯草芽孢杆菌分泌蛋白的质量控制系统,作为一个重要组成部分,wprA 的缺失使得分泌蛋白控制系统不再完整,影响了分泌蛋白的质量控制^[21-23];wprA 的 CWBP32 结构域具有分子伴侣的功能,作为枯草芽孢杆菌胞外仅有的两个具有分子伴侣功能的蛋白质之一(另一个为 PrsA),wprA 的缺失必然造成对部分蛋白质的折叠效率和正确折叠能力的影响。

实验中青霉素酰化酶的表达,敲除了 *wprA* 的菌株与野生型菌株没有明显差异,表达量也相当地接近。在表观上可以得出 wprA 所具有的分子伴侣功能以及质量控制功能对青霉素酰化酶的重组表达量不起作用。而碱性果胶酶的分泌表达对于 wprA 的依赖比较明显,一旦敲除了 *wprA*,表达的总的酶活力下降 36%。再由相关文献对于敲除 *wprA* 基因后枯草芽孢杆菌表达外源蛋白的效果来看,wprA 都是表现在水解外源蛋白上^[17-20]。可见,wprA 蛋白对于外源蛋白表达的控制作用是复杂的,具有双重性并有一定程度的特异性。

参考文献:

- [1] Chuan M. Extracellular expression of a functional recombinant ganoderma lucidum Immunomodulatory protein by *bacillus subtilis* and *lactococcus lactis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(4): 1039-49.
- [2] Zweers J C. Towards the development of *bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes [J]. Microb Cell Fact, 2008, 7(10): 1-20.
- [3] Moks T. Expression of human insulin-like growth factor I in bacteria: use of optimized gene fusion vectors to facilitate protein purification[J]. Biochemistry, 1987, 26(17): 5239-5244.
- [4] Simonen M. Protein secretion in *bacillus* species[J]. Microbiol Rev, 1993, 57(1): 109-137.
- [5] Harold Talsma. Proteomics of protein secretion by *bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, 68(2): 207-233.
- [6] Janine Kirstein. Localization of general and regulatory proteolysis in *bacillus subtilis* cell[J]. Molecular Microbiology, 2008, 70(3): 682-694.
- [7] Endo A, Kurusu Y. Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL from *bacillus subtilis*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(4): 1073-1077.
- [8] Kerner M J. Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *escherichia coli*[J]. Cell, 2005, 122(2): 209-220.
- [9] Müller J P. Interaction of *bacillus subtilis* CsaA with SecA and precursor proteins[J]. Biochem J, 2000, 348(2): 367-73.
- [10] Linde D. Interaction of the *bacillus subtilis* chaperone CsaA with the secretory protein YvaY[J]. Fems Microbiol Lett, 2003, 226(1): 93-100.
- [11] Stragier P, Losick R. Molecular genetics of sporulation in *bacillus subtilis*[J]. Annu Rev Genet, 1996, 10(30): 297-241.
- [12] Philippe Margot. The *wprA* gene of *Bacillus subtilis* 168, expressed during exponential growth, encodes a cell-wall-associated protease[J]. Microbiology, 1996, 142(12): 3437-3444.
- [13] Hiroki Yamamoto. Localization of the vegetative cell wall hydrolases LytC, LytE, and LytF on the *bacillus subtilis* cell surface and stability of these enzymes to cell wall-bound or extracellular proteases[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185

(22): 6666-6667.

- [14] Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1958, 44(10): 1072-1078.
- [15] Kobayashi T. Highly alkaline pectate lyase Pel-4A from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain P-4-N: its catalytic properties and deduced amino acid sequence[J]. Extremophiles, 2000, 4(6): 377-383.
- [16] 上海第三制药厂. 一种快速简便的测量青霉素酰化酶的方法[J]. 医药工业, 1978, 15(1): 22-24.
- [17] Keith Stephenson. Influence of a cell-wall-associated protease on production of α -Amylase by *bacillus subtilis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(8): 2875-2891.
- [18] Wu Sau-Ching. Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production[J]. Environmental Microbiology, 2002, 68(7): 3261-3269.
- [19] Gota Kobayashi. Accumulation of an artificial cell wall-binding lipase by *Bacillus subtilis* wprA and/or sigD mutants[J]. FEMS Microbiology, 2000, 188(2): 165-169.
- [20] Lee Sang Jun. Enhancement of secretion and extracellular stability of staphylokinase in *bacillus subtilis* by wprA gene disruption[J]. Environmental Microbiology, 2000, 66(2): 476-480.
- [21] Haike Antelmann. Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis[J]. Bacterio, 2000, 182(16): 4478-4490.
- [22] Haike Antelmann. The extracellular proteome of *Bacillus subtilis* under secretion stress conditions[J]. Genome Res, 2003, 49(1): 143-56.
- [23] Haike Antelmann. Stabilization of cell wall proteins in *Bacillus subtilis*: a proteomic approach[J]. Proteomics, 2002, 2(5): 591-602.

The Influence of Over-expression Molecular Chaperone of CsaA and Deletion WprA Protease on the *Bacillus subtilis* Secreting Foreign Protein

JIANG Hong-liang, ZHANG Hong, ZHAO Fu-kun, DING Ming

(Laboratory of Proteomics and Molecular Enzymology, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The alkaline pectinase of *Bacillus halodurans* C-125 and the Penicillin acylase of *bacillus megaterium* is expressed in the *B. subtilis*168 strain and the transformation strain (*B. subtilis*168wprA⁻, *B. subtilis*168/wprA::csaA). Alkaline pectinase secretion level is decreased by 36% when knocking out the wprA gene, while the csaA integrated into the *B. subtilis*168wprA⁻ strain makes the expression capability to return to the level as well as the wide type *B. subtilis*168 strain. There is no difference between *B. subtilis*168wprA⁻ strain and the wide type *B. subtilis*168 strain in penicillin acylase expression. With the integration of csaA into wprA sites, the expression levels higher than that of wild-type is by 66%. It can be concluded that the molecular chaperones csaA can significantly promote the enzyme expression, and show general influence on protein expression. While the protease wprA deletion can decrease some foreign protein secret expression levels, there is no general influence on protein expression. While, the stability of expression foreign protein is significantly improved when wprA gene is deleted. In this study, the penicillin acylase enzyme activity (14.7U/mL) is higher than that in industrial application (10 U/mL) by 47%.

Key words: *Bacillus subtilis*; molecular chaperone CsaA; protease wprA

(责任编辑: 许惠儿)