

阎光宇, 孙继鹏, 易瑞灶, 等. 基于枯草芽孢杆菌重组菌株构建技术制备海洋源金属硫蛋白[J]. 渔业研究 2018 40(2): 89-97.

基于枯草芽孢杆菌重组菌株构建技术制备海洋源金属硫蛋白

阎光宇^{1 5}, 孙继鹏^{1 2 3*}, 易瑞灶^{2 3}, 苏永全⁴

(1. 厦门海洋职业技术学院, 福建 厦门 361100;

2. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005;

3. 国家海洋局海洋生物资源综合利用工程技术研究中心, 福建 厦门 361005;

4. 厦门大学, 福建 厦门 361005;

5. 东山出入境检验检疫局综合技术服务中心, 福建 东山 363400)

摘要: 为构建安全高效表达海洋源金属硫蛋白的益生菌重组菌株, 以海洋源褶牡蛎内脏团为模板, PCR 克隆得到褶牡蛎金属硫蛋白基因 (Op-MT), 大小为 324 bp, 经 pMD19-T 载体亚克隆到融合表达载体 pHT43-SUMO 中, 然后通过电转化法将重组质粒转入八种蛋白酶缺陷的宿主枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) WB800N 中。SDS-PAGE 电泳显示诱导表达的融合蛋白 SUMO-Op-MT 分子量约为 23 kD, 与预期一致, 说明可溶性融合蛋白 SUMO-Op-MT 在宿主菌中得到了表达, 且通过 Western blotting 进一步得到验证。同时, HPLC 检测重组枯草芽孢杆菌发酵液, 结果也表明重组枯草芽孢杆菌成功表达了可溶性目的蛋白 Op-MT。通过对重组工程菌中 MT 活性检测发现, 其对重金属镉耐受力增强, 说明重组工程菌成功表达出有活性的金属硫蛋白。这为以后开发天然、高效海洋源重金属解毒剂提供理论基础。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 海洋源金属硫蛋白; 可溶性融合蛋白

中图分类号: S986.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-5601(2018)02-0089-09

金属硫蛋白 (Metallothionein, MT) 是一类普遍存在于生物体内的、高度可诱导性的内源金属结合蛋白, 具有维持生物体内必须金属含量动态平衡、重金属解毒、清除自由基, 改善机体免疫力、增强机体抗应激能力等多种作用^[1-3], 且与动物机体的生长发育及部分疾病的发病机理有着密切的关系。因此, MT 在医学、化妆品、保健食品添加剂、环保等方面得到了广泛应用。

目前, 国内市场上常见的 MT 多数是从兔肝

脏中提纯^[4], 提取工艺中使用大量有机溶剂^[5-7], 且步骤繁复, 产量极低, 致使 MT 的价格极其昂贵, 从而使其应用和研究受到限制。采用基因重组技术规模化生产制备金属硫蛋白, 对其大规模开发和作用机理的研究有重要意义。目前利用大肠杆菌作为工业生产蛋白质的优选宿主细胞研究 MT 表达方法多有文献报道^[8-9], 但其缺少蛋白翻译后进行加工和修饰的功能, 且目的蛋白极易形成包涵体, 分离纯化繁琐, 给生产实

收稿日期: 2018-02-06

基金资助: 福建省科技计划项目 (2017N0016); 国家海洋局第三海洋研究所基本科研业务费专项资金资助项目 (海三科 2016031) 共同资助。

作者简介: 阎光宇 (1983-), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 分子生物技术. E-mail: guangyu0502@163.com

通讯作者: 孙继鹏 (1980-), 男, 助理研究员, 研究方向: 海洋药物化学. E-mail: jpsun@tio.org.cn

践带来困难。

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是一种传统的酶制剂工业生产菌株, 具有可操作性强、发酵周期短的优点, 可直接将表达产物分泌到培养基中, 也是分泌表达外源基因的良好受体菌^[10-11]。同时枯草芽孢杆菌不分泌内毒素, 具有较好的生物安全性, 是美国 FDA 和我国农业部批准使用的食品安全菌种, 其发酵产物可直接用于食品生产中。近年来枯草芽孢杆菌作为外源基因表达的宿主系统发展迅速并展现出良好的工业应用前景^[12-16]。

滤食性的底栖双壳类海洋动物对重金属有较强的生物累积能力, 海洋贝类 MT 对重金属具有高敏感的应激效应^[17-22], 且相对于陆地源 MT, 海洋源 MT 具有独特的化学结构和特殊的生物活性。本研究旨在解决制约 MT 产业发展原料来源瓶颈, 应用基因重组技术, 将褶牡蛎 (*Ostrea plicatula*) 金属硫蛋白基因全长序列 Op-MT, 插入到表达载体 pHT43-SUMO 的相应位点, 并转入八种蛋白酶缺失的枯草芽孢杆菌 WB800N, 拟构建安全高效分泌表达的重组枯草芽孢杆菌 MT 基因工程菌。以期能获得具有高安全性、高产量和高活性的高纯目标蛋白, 使海洋源 MT 具有极大地应用于实际工业生产潜能, 为天然高效重金属生物解毒剂的成功开发和推广提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和培养基

枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* WB800N 为厦门大学某博士惠赠, *E. coli* DH-5 α 购自宝生物工程(大连)有限公司; 质粒载体 pMD19-Tvector 购自宝生物工程(大连)有限公司, 枯草芽孢杆菌表达载体 pHT43 为本实验室保藏。*E. coli* DH-5 α 和枯草芽孢杆菌生长和发酵培养基为 LB 培养基。

1.1.2 主要试剂

TaqDNA 聚合酶、PCR 反应试剂、限制性内切酶 SacII/BamHI/SmaI、T4 DNA 连接酶、质粒提取和胶回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司, 胰蛋白胨、酵母浸提粉(英国 OX-OID 公司产品)购自厦门绿茵公司, 氨苄青霉素、氯霉素、新霉素为 Solarbo 公司产品。PCR

引物及 DNA 测序均由上海生物工程技术有限公司完成。氯化镉 (CdCl₂) 购自厦门绿茵试剂有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 褶牡蛎金属硫蛋白基因的克隆以及分泌表达载体的构建

运用 TRIzol 试剂盒提取褶牡蛎内脏团总 RNA, 采用 TaKaRa Prime-Script TM RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa, Japan) 进行反转录。根据 GeneBank 褶牡蛎金属硫蛋白基因序列 Op-MT (登录号: KP875559) 设计引物 (表 1, F1/R1), PCR 扩增 Op-MT 基因序列。PCR 产物经过回收、连接至克隆载体 pMD-19, 并转化到 *E. coli* DH-5 α 中, 送至上海生物工程技术进行序列测定。用 BamHI/SmaI 酶切质粒 pMD-19-Op-MT 和 pHT43-SUMO 表达载体, 各自胶回收后用 T4 DNA 连接酶并转化到 *E. coli* DH-5 α 细胞, 在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素 (Amp) LB 平板上筛选阳性转化子并加以验证。

1.2.2 重组工程菌构建和筛选

以枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* WB800N 为表达宿主, 用电转法转化分泌表达载体 pHT43-SUMO, 在含有 10 μ g/mL 氯霉素和 50 μ g/mL 新霉素的 LB 平板上筛选。得到阳性转化子菌株, 命名为 *B. subtilis* WB800N/pHT43-SUMO-Op-MT (图 1)。

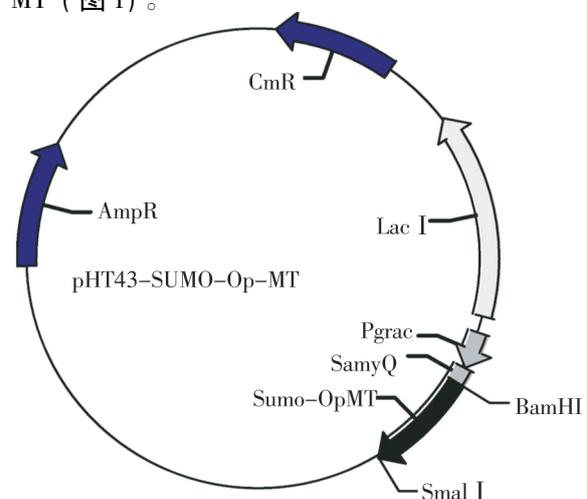


图 1 重组质粒 pHT43-SUMO-Op-MT 的构建
Fig.1 The construction map of recombinant plasmid pHT43-SUMO-Op-MT

将 *B. subtilis* WB800N/pHT43 - SUMO - Op - MT 接种到 LB 液体培养基 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 新霉素) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 收集菌

液并提取总 DNA, 以 F2/R2 (表 1) 为引物进行 PCR 鉴定。

表 1 褶牡蛎金属硫蛋白 cDNA 克隆测序及 PCR 中所用引物
Tab. 1 Primers used to amplify the MT cDNA full length and PCR

引物 Primer	序列 Sequence(5' - 3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature
F1	TGG ACC GGA TGT AAT GTG GT	58
R1	TTG GGT CCT TTG TTA CAC GC	58
F2	ATG TCT GAT CCA TGT AAC	52
R2	TC ATT TCT TAC AGA CAC ATC	52

1. 2. 3 融合蛋白诱导表达和分离纯化

100 mL WB800N/pHT43 - SUMO - Op - MT 菌液扩大诱导培养, 培养条件: 37 $^{\circ}\text{C}$, 4 h, 1 mmol/L IPTG, 220 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.8 ~ 1.0。2、4 h 分别离心收集发酵液上清, 进行 SDS - PAGE 凝胶电泳定性, 分离胶 12%, 浓缩胶 5%。另一组空白 *B. subtilis* WB800N 作为对照。电泳结束后凝胶染色 4 ~ 6 h, 将脱色后的凝胶保存于去离子水中, 用 Bio - Rad 凝胶成像系统拍照。

对发酵液进行 His - tag 标签亲和纯化。首先, 用 3 个柱体积的 TBS (pH 8.0) 缓冲液平衡镍柱。然后, 将上清液上样, 流速约为 1 mL/min。上样完毕后, 再用 3 个柱体积的 TBS (含 50 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 进行洗涤; 随后, 用洗脱缓冲液 (含 300 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 洗脱目的蛋白, 收集各个洗脱峰进行 12% 的 SDS - PAGE 凝胶电泳检测。最后利用 Bradford method 定量目的蛋白。

1. 2. 4 融合蛋白的 Western blotting 鉴定

将重组工程菌诱导表达 48 h 后的发酵液和空白对照组 (*B. subtilis* WB800N) 的发酵液, 经丙酮沉淀后进行 SDS - PAGE 凝胶电泳, 转膜 (湿转: 300 mA, 1 h), 用 5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, 加入用 TBST (Tris 缓冲盐 - 吐温溶液, 含 10 mmol/L pH 7.6 Tris - HCl、150 mmol/L NaCl、0.05% 吐温 - 20) 1:10 000 稀释的 His 一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min; 加入用 TBST 1:20 000 稀释的 His 二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min; HRP - DAB 底物显色试剂盒显色, 用 Bio - Rad

凝胶成像系统拍照。

1. 2. 5 褶牡蛎金属硫蛋白 HPLC 检测

将取出的菌液 7 000 r/min 10min 收集菌液, 于 80 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 5 min, 12 000 rpm/min 离心 10 min, 后取上清。

MT 含量测定: 取 MT 上清液 20 μL , 依次加入 20% (W/V) TCEP 溶液 3 μL 、5 mg/mL 的 SBD - F 溶液 10 μL 及反应缓冲液 (1 mol/L 硼酸、30 mmol/L EDTA、0.8 mol/L KOH, pH 10.5) 75 μL , 震荡混匀, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴反应 30 min, 反应完成后加入 HCl (4 mol/L) 10 μL 终止反应, 然后用 20 mmol/L 定容缓冲液 (pH 7.5) 定容至 1 mL, 旋涡震荡混匀, 过 0.22 μm 水系膜后上 HPLC 进行 MT 含量测定。采用 HPLC 方法测定其中 -SH 含量以进行 MT 间接定量^[23]。

色谱条件: 流动相为乙腈: 磷酸缓冲液 (25 mmol/L, pH = 7.5) : 甲醇 = 18: 80: 2, 色谱柱: ODS - BP (填料: Sinochrom, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) C₁₈ 柱; 进样量: 40 μL ; 洗脱时间: 20 min; 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 激发波长 380 nm, 发射波长 510 nm。图 6 (A) 为色谱条件下得到的兔肝 MT 标样色谱图, MT 保留时间为 7.3 ~ 7.7 min。

1. 2. 6 融合蛋白活性检测

配置 50、100、200、500、700 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 CdCl₂ 工作液各 100 μL , 分别将其涂布于 LB 固体培养基平板上, 待其完全吸收后, 取 100 μL OD₆₀₀ 为 4.0 的枯草芽孢杆菌重组 Op - MT 工程菌均匀涂布于上述平板上, 同时以枯草芽孢杆菌 WB800N 菌株为对照组, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 12 ~ 16 h

观察菌落生长情况。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增 Op-MT 及分泌表达载体的构建
以褶牡蛎内脏团总 RNA 反转录得到的 DNA 为模板, PCR 扩增得到目的基因 Op-MT 与预计

大小相符 (约为 324 bp), 见图 2。用 BamHI/SmaI 分别双酶切此 PCR 产物和分泌表达载体 pHT43-SUMO-Op-MT。该质粒的酶切验证见图 2。酶切片段大小约为 660 bp, 与预期相符, 此片段为目的基因 SUMO-Op-MT。

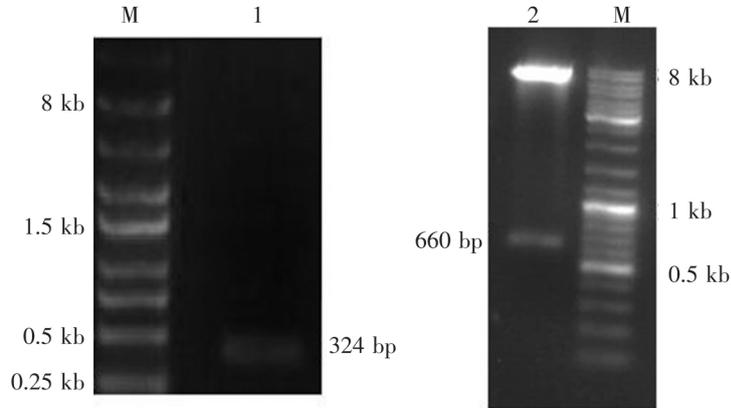


图 2 SUMO-Op-MT 基因的 PCR 扩增(左)及其表达载体的酶切鉴定(右)

Fig.2 PCR amplification of SUMO-Op-MT (left) and the enzyme digestion of its expression vector pHT43-SUMO-Op-MT(right)

注: 左为 PCR 扩增 SUMO-Op-MT 基因; M: DNA Marker; 1: SUMO-Op-MT 扩增产物。右为 SUMO-Op-MT 表达载体的酶切图; M: DNA Marker; 2: 表达质粒双酶切。

Notes: Amplification of SUMO-Op-MT gene by PCR (left); M: DNA Marker; 1: Gene of SUMO-Op-MT. Restrictive enzyme digestion of SUMO-Op-MT (right); M: DNA Marker; 2: Restrictive enzyme digestion of SUMO-Op-MT.

2.2 高效分泌表达 Op-MT 重组工程菌筛选
将重组质粒 pHT43-SUMO-Op-MT 运用化学转化法转化宿主枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* WB800N, 经过氯霉素和新霉素抗性筛选、PCR

鉴定, 得到一株高效表达 Op-MT 的枯草杆菌工程菌 *B. subtilis* WB800N/pHT43-SUMO-Op-MT, 见图 3。

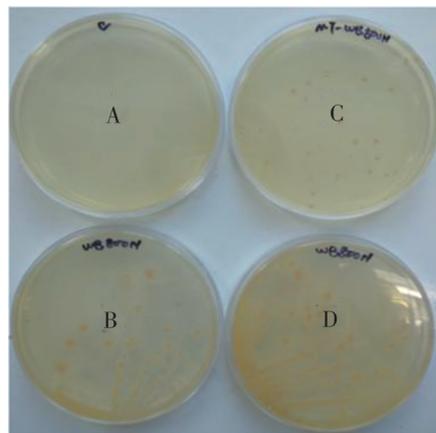


图 3 转化平板图

Fig.3 Transformation plate

注: A: 阴性对照; B: 枯草芽孢杆菌 WB800N 对照; C: 重组 WB800N-MT 枯草芽孢杆菌工程菌; D: 枯草芽孢杆菌 WB800N 对照。

Notes: A: Negative control; B: Control of WB800N bacteria; C: Recombinant bacteria of WB800N-MT; D: Control of WB800N bacteria.

2.3 重组蛋白的诱导表达、分离纯化和 Western blotting 鉴定

100 mL WB800N/ pHT43 - SUMO - Op - MT 菌液扩大诱导培养, 培养条件: 37°C, 4 h, 1 mmol/L IPTG。2、4 h 分别离心 (12 000 r/min, 4°C, 30 min) 收集发酵液上清, 进行 SDS - PAGE 电泳分析。以未转入表达载体的枯草芽孢杆菌培养液为空白对照 (图 4)。分析图 4 发现在 23 kD (其中 Op - MT 编码蛋白大小为 10.5 kD) 位置出现了一条明显的特异性条带, 且融合蛋白为可溶形式表达。

利用 His - tag 标签亲和纯化 SUMO - Op - MT 融合蛋白, 并用含 500 mmol/L 咪唑、pH 8.0 TBS 洗脱液进行洗脱。收集洗脱峰并进行 12% SDS - PAGE 凝胶电泳分析。结果显示, 洗脱液中含有分子量约为 23 kD 的目的条带 (图 4)。Bradford method 分析结果表明, 蛋白纯度在 95% 以上 (图 4) (目的蛋白得率 0.436 mg/mL)。然后将纯化后的目的蛋白进行 Western blotting 鉴定, 结果显示融合蛋白能与 His - Tag 单克隆抗体产生阳性反应 (图 5), 且与 SDS - PAGE 中 SUMO - Op - MT 融合蛋白的位置相符, 说明融合蛋白在宿主菌中得到了表达。

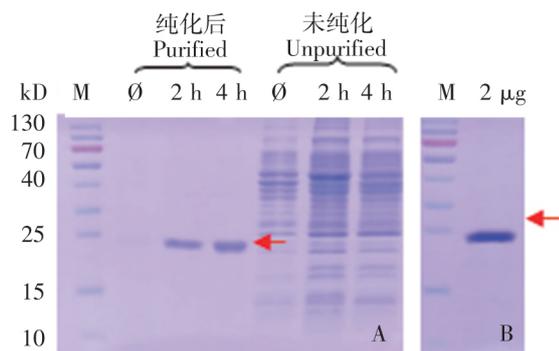


图 4 pHT43-SUMO-Op-MT 的 SDS-PAGE 电泳检测
Fig.4 SDS-PAGE analysis of pHT43-SUMO-Op-MT expression

注: M: 虹彩蛋白 Marker; Ø: 未转化 (阴性对照); 红色箭头为目的蛋白。

Notes: M: Protein Marker; Ø: Non - transfectant (negative control); Red arrowhead: Target protein.

2.4 重组枯草芽孢杆菌发酵液中 Op - MT 的 HPLC 检测

以兔肝 MT 为标样, 兔肝 MT 标品 (0.1 mg/mL) 和枯草芽孢杆菌重组工程菌发酵液 HPLC 结果见图 6。兔肝 MT 目的峰的保留时间为 7.3 ~ 7.7 min。结果显示, 枯草芽孢杆菌重组工程菌发酵液在 7.7 min 有峰出现, 说明枯草芽孢杆菌重组工程菌发酵液中含有目的蛋白, 枯草芽孢杆菌重组工程菌成功表达了目的蛋白 Op - MT, 表达量为 0.13 mg/mL。

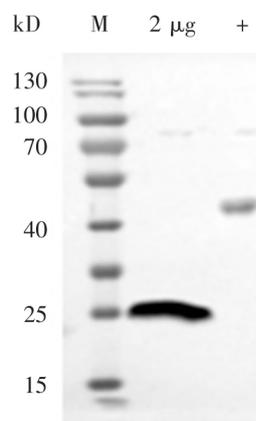


图 5 pHT43-SUMO-Op-MT 的 SDS-PAGE 电泳检测
Fig.5 SDS-PAGE analysis of pHT43-SUMO-Op-MT expression

注: M: 蛋白 Marker; +. 阳性对照。

Notes: M: Protein Marker; +: Positive control.

2.5 褶牡蛎金属硫蛋白的活性检测

将含有 SUMO - Op - MT 质粒的重组枯草芽孢杆菌工程菌和不含 SUMO - Op - MT 质粒的空载体枯草芽孢杆菌空载体分别涂布于含有 CdCl₂ 的培养基上, 37°C 培养 12 ~ 16 h 后发现 (图 7), 在浓度为 50 µmol/L 的 CdCl₂ 平板上, 空载体的菌落少于含有 MT 的重组工程菌; 当 CdCl₂ 浓度达到 100 µmol/L 时, MT 重组工程菌生长较差, 而空载体平板上未能检测到菌落; 说明含有 SUMO - Op - MT 的重组枯草芽孢杆菌工程菌对重金属镉耐受能力增强。但是当 CdCl₂ 浓度达到 200 µmol/L 及以上时, 两种菌落都未能被检测到, 说明在高浓度 CdCl₂ 胁迫下金属硫蛋白活性受到了抑制。

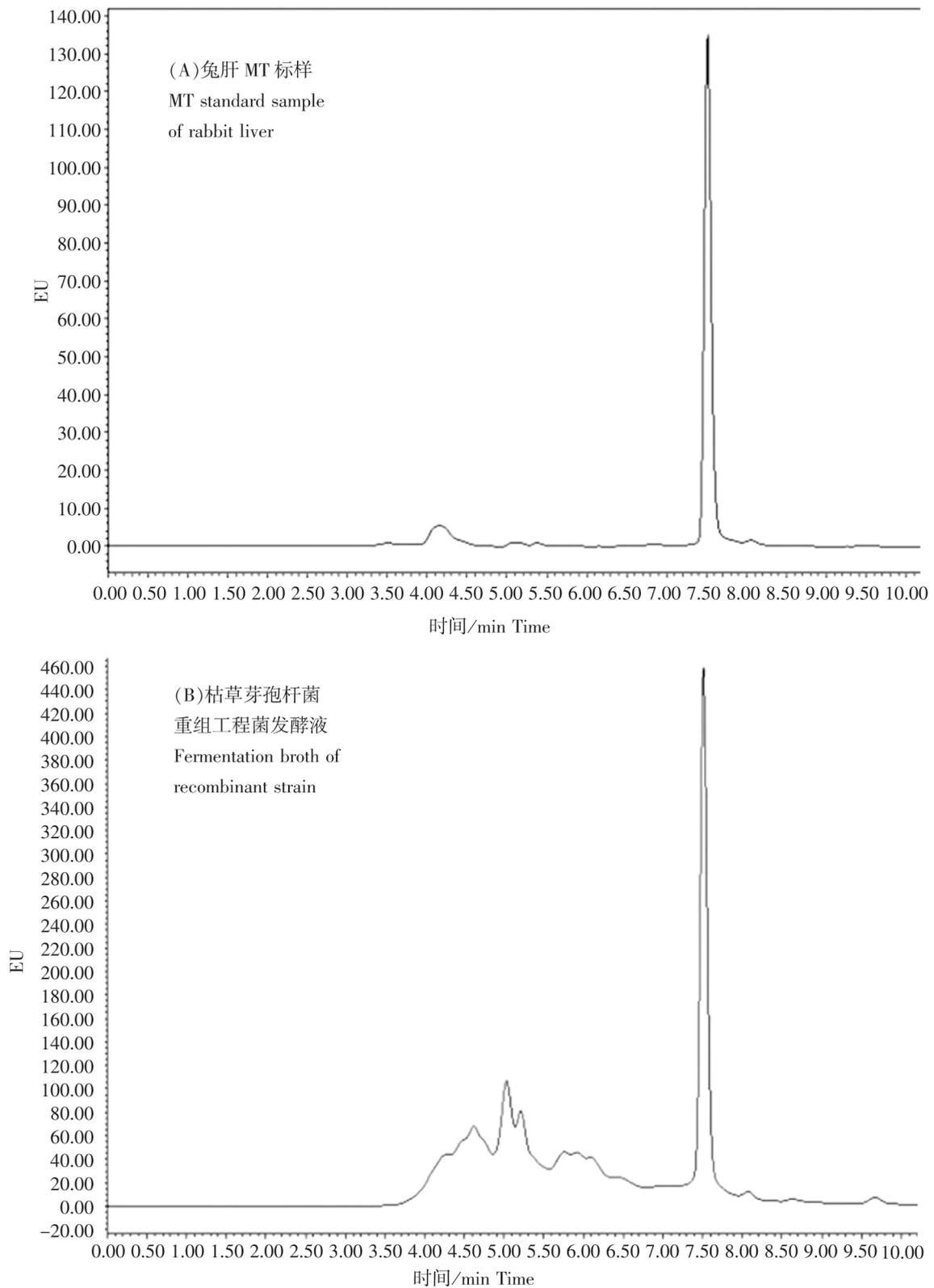


图6 兔肝 MT 标品(A)和枯草芽孢杆菌重组工程菌发酵液(B)HPLC 色谱图

Fig.6 HPLC chromatogram of MT

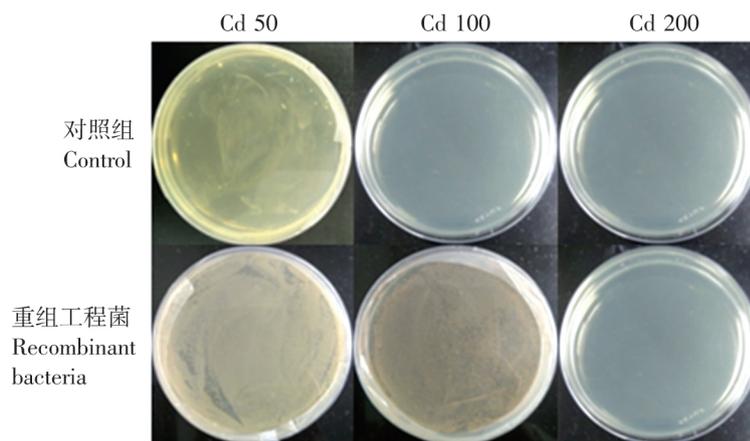


图 7 LB 固体培养基上重组工程菌对镉的耐受能力

Fig.7 Tolerance of recombination strain to heavy metal cadmium on the LB medium

3 讨论

目前,国内对 MT 的基因工程方面研究大多集中在大肠杆菌表达系统和微生物 MT 解毒,对 MT 工业化应用关注较少,具有工业化生产价值的基因工程菌株报道更是极少。近年来,国内外学者针对 MT 大肠杆菌表达系统研究做了大量工作,取得了较大进展,但 *E. coli* 直接表达 MT,其表达量极低,通常需使用同位素标记才能检测到^[24-26],或因形成大量无生物活性的包涵体,而复性效果不明显^[27-30]。本课题组前期研究也证实尽管大肠杆菌 (*E. coli*) 直接表达 MT 也能高效表达,但是表达的蛋白仍以包涵体的形式存在。

枯草芽孢杆菌作为宿主菌,具有表达和分泌活性蛋白、直接将表达产物分泌到培养基中、不分泌内毒素、其发酵产物可直接用于食品生产中等优点,具有良好的工业应用前景。随着研究的不断深入及对芽孢杆菌的多种特性的揭示,芽孢杆菌的研究已在多种领域开展^[31],并利用枯草芽孢杆菌实现了某些外源基因的表达^[32-35],且所表达的蛋白保留原有的生物学活性^[36],但尚未见利用枯草芽孢杆菌实现海洋源 MT 的报道。本研究运用八种蛋白酶缺陷的枯草芽孢杆菌 WB800N 作为宿主,实现 SUMO (Small ubiquitin-related modifier) 与海洋源 MT 在枯草芽孢杆菌 WB800N 中融合表达,得到可溶性目的蛋白,成功实现了海洋源金属硫蛋白在枯草芽孢杆菌中

的分泌表达,并获得具有活性的海洋源金属硫蛋白,为解决制约 MT 产业发展原料来源瓶颈、开发天然高效海洋源重金属生物解毒剂提供理论依据,也为实现海洋源 MT 的工业化生产奠定了基础。

参考文献:

- [1] Amiard J C, Amiard - Triquet C, Barka S, et al. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 76 (2): 160 - 202.
- [2] Babula P, Masarik M, Adam V, et al. Mammalian metallothioneins: properties and functions [J]. *Metallomics*, 2012, 4 (8): 739 - 750.
- [3] Vasák M. Advances in metallothionein structure and functions [J]. *Journal of Trace Elements in Medicine & Biology Organ of the Society for Minerals & Trace Elements*, 2005, 19 (1): 13 - 17.
- [4] 付亮剑. 兔肝脏中的宝——金属硫蛋白. *中国畜牧业* [J]. 2007, (6): 85 - 85.
- [5] 党蕊叶, 齐凡, 赵淑琳, 等. 兔肝金属硫蛋白提取工艺研究 [J]. *西北农业学报*, 2012, 21 (6): 22 - 25.
- [6] 彭新君, 徐丽霞, 刘平安, 等. 家兔肝脏中锌 - 金属硫蛋白提取工艺的优化 [J]. *药物生物技术*, 2004, 11 (2): 99 - 103.
- [7] 徐丽霞. 兔肝锌金属硫蛋白 (MT) 的诱导方法和制备工艺研究 [D]. 长沙: 湖南中医学院, 2002.
- [8] Hong S H, Toyama M, Maret W, et al. High yield

- expression and single step purification of human thio-
nein/metallothionein [J]. Protein Expression & Pur-
ification, 2001, 21 (1): 243 - 250.
- [9] Yang F, Zhou M, He Z, et al. High - yield expres-
sion in *Escherichia coli* of soluble human MT2A with
native functions [J]. Protein Expression & Purifica-
tion, 2007, 53 (1): 186 - 194.
- [10] Chang S. Engineering for protein secretion in gram -
positive bacteria [J]. Methods in Enzymology, 1987,
153: 507 - 516.
- [11] Doi R H, Wong S L, Kawamura F. Potential use of
Bacillus subtilis for secretion and production of foreign
proteins [J]. Trends in Biotechnology, 1986, 4
(9): 232 - 235.
- [12] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al. The com-
plete genome sequence of the Gram - positive bacteri-
um *Bacillus subtilis* [J]. Nature, 1997, 390
(6657): 249 - 256.
- [13] Ogasawara N. Systematic function analysis of *Bacillus
subtilis* genes [J]. Research in Microbiology, 2000,
151 (2): 129 - 134.
- [14] Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed J D H, et al. Sig-
nal peptide - dependent protein transport in *Bacillus
subtilis*: a genome - based survey of the secretome
[J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews, 2000,
64 (3): 515 - 547.
- [15] Tjalsma H, Noback M A, Bron S, et al. *Bacillus
subtilis* contains four closely related type I signal pepti-
dases with overlapping substrate specificities. Consti-
tutive and temporally controlled expression of different
sip genes [J]. Journal of Biological Chemistry, 1997,
272 (41): 25983 - 25992.
- [16] Van Dijl J M, Braun P G, Robinson C, et al. Func-
tional genomic analysis of the *Bacillus subtilis* Tat
pathway for protein secretion [J]. Journal of biotech-
nology, 2002, 98 (2 - 3): 243 - 254.
- [17] 苏文, 吴惠丰, 廖春阳, 等. 锌铅暴露条件下菲
律宾蛤仔消化腺和鳃内金属和金属硫蛋白的变化
[J]. 中国科学院大学学报, 2010, 27 (4): 456
- 462.
- [18] 刘维青. 海湾扇贝金属硫蛋白 cDNA 序列克隆及
其在镉和鳃弧菌诱导下的表达研究 [D]. 青岛:
中国海洋大学, 2005.
- [19] 李春娣, 颜文, 龙爱民, 等. Cu 暴露条件下翡翠
贻贝 (*Perna viridis*) 消化腺内金属和类金属硫蛋
白的变化 [J]. 环境科学, 2007, 28 (8): 1788
- 1795.
- [20] Roesijadi G. Metallothionein induction as a measure
of response to metal exposure in aquatic animals [J].
Environmental Health Perspectives, 1994, 102
(Suppl 12): 91 - 95.
- [21] Bebianno M J, Serafim M A. Comparison of metallo-
thionein induction in response to cadmium in the gills
of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and
Ruditapes decussatus [J]. Science of the Total Envi-
ronment, 1998, 214 (2): 83 - 88.
- [22] Damiens G, Mouneyrac C, Quiniou F, et al. Metal
bioaccumulation and metallothionein concentrations in
larvae of *Crassostrea gigas* [J]. Environmental Pollu-
tion, 2006, 140 (3): 492 - 499
- [23] Ndayibagira A, Sunahara G I, Robidoux P Y. Rapid
isocratic HPLC quantification of metallothionein - like
proteins as biomarkers for cadmium exposure in the
earthworm *Eisenia andrei* [J]. Soil Biology & Bio-
chemistry, 2007, 39 (1): 194 - 201.
- [24] Vasák M. Advances in metallothionein structure and
functions [J]. Journal of Trace Elements in Medicine
& Biology Organ of the Society for Minerals & Trace
Elements, 2005, 19 (1): 13 - 17.
- [25] Theocharis S E, Margeli A P, Koutselinis A. Metal-
lothionein: a multifunctional protein from toxicity to
cancer [J]. International Journal of Biological Mark-
ers, 2003, 18 (3): 162 - 169.
- [26] Butt T R, Jonnalagadda S, Monia B P, et al. Ubiq-
uitin Fusion Augments the Yield of Cloned Gene Prod-
ucts in *Escherichia coli* [J]. Proceedings of the Na-
tional Academy of Sciences of the United States of A-
merica, 1989, 86 (8): 2540 - 2544.
- [27] 邓小亮. 蟹多拷贝串联重组金属硫蛋白基因的原
核表达载体构建及表达 [D]. 广州: 广州医学
院, 2010.
- [28] He Y, Ma W, Li Y, et al. Expression of metallo-
thionein of freshwater crab (*Sinopotamon henanense*)
in *Escherichia coli* enhances tolerance and accumula-
tion of zinc, copper and cadmium [J]. Ecotoxicology,
2014, 23 (1): 56 - 64.
- [29] 曹晓敏, 李冰, 陈祯, 等. 中华绒螯蟹重组金属
硫蛋白的原核表达与分离纯化 [J]. 生物医学工
程学杂志, 2007, 24 (2): 409 - 412.
- [30] Zhang F Q, Wang Y S, Sun C C, et al. A novel
metallothionein gene from a mangrove plant *Kandelia
candel* [J]. Ecotoxicology, 2012, 21 (6): 1633

- 1641.
- [31] Zhang X Z , Cui Z L , Hong Q , et al. High - level expression and secretion of methyl parathion hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800 [J]. Applied & Environmental Microbiology , 2005 , 71 (7) : 4101 - 4103.
- [32] Lam K H , Chow K C , Wong W K. Construction of an efficient *Bacillus subtilis* system for extracellular production of heterologous proteins [J]. Journal of Biotechnology , 1998 , 63 (3) : 167 - 77.
- [33] Wang G L , Yi Q , Fang H J. Transforming and secreting expression of human egf in mutant strain WYBS2001 of *Bacillus* and its functions [J]. Acta Genetica Sinica , 2003 , 30 (2) : 97 - 102.
- [34] Ye R , Kim J , Kim B , et al. High level secretory production of intact , biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology & Bioengineering , 1999 , 62 (1) : 87 - 96.
- [35] Olmos - Soto J , Contreras - Flores R. Genetic system constructed to overproduce and secrete proinsulin in *Bacillus subtilis* [J]. Applied Microbiology & Biotechnology , 2003 , 62 (4) : 369.
- [36] Emf M , Duc L H , Istatico R G , et al. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using Cot C as a fusion partner [J]. Vaccine , 2004 , 22 (10) : 1177 - 1187.

Preparation of marine sources metallothionein based on construction of recombinant strain of *Bacillus subtilis*

YAN Guangyu^{1 5} , SUN Jipeng^{1 2 3*} , YI Ruizao^{2 3} , SU Yongquan⁴

(1. Xiamen Ocean Vocational College , Xiamen 361100 , China;

2. Third Institute of Oceanography , State Oceanic Administration , Xiamen 361005 , China;

3. Engineering Research Center for Marine Biological Resource Comprehensive Utilization , State Oceanic Administration , Xiamen 361005 , China;

4. Xiamen University , Xiamen 361005 , China;

5. Dongshan Entry - Exit Inspection & Quarantine Bureau of P. R. C , Integrated Technical Service Center , Dongshan 363400 , China)

Abstract: In order to facilitate marine sources metallothionein , safe and high - level expression system as an efficient tool in *Bacillus subtilis* was reconstructed in this study. The metallothionein (MT) gene was obtained by PCR amplification using *Ostrea plicatula* genome DNA as a template and sub - cloned into the expression plasmid pHT43 via pMD19 - Tvector. Then the plasmid was electro - transformed into *B. subtilis* WB800N. The molecular weight of expressed fusion protein SUMO - Op - MT was about 23 kD , which was confirmed by Western blotting. This showed that the soluble fusion protein SUMO - Op - MT was expressed in the host bacteria. At the same time , the fermentation broth of recombinant *Bacillus subtilis* was detected by HPLC , and the results also showed that the soluble protein Op - MT was expressed in recombinant *Bacillus subtilis* successfully. Furthermore , through the detection of MT activity in recombinant bacteria , it was found that recombinant bacteria's tolerance to heavy metal cadmium was increased , indicating that active MT was successfully expressed in recombinant bacteria. It provides a theoretical basis for the future development of heavy metal antidote of natural and efficient marine sources.

Key words: *Bacillus subtilis*; marine sources metallothionein; soluble fusion protein