

嗜热菌 *Thermus* sp. YBJ-1 的分离和淀粉酶基因的克隆

熊鹏钧 文建军*

(国家海洋局第三海洋研究所 海洋生物工程重点实验室 厦门 361005)

摘要 从西藏热泉水样分离得到一株嗜热菌(YBJ-1),其 16S rDNA(1511bp)序列与栖热菌(*Thermus scotoductus* ITI-252T)的同源性为 98%。通过 PCR 技术将 *Thermus* sp. YBJ-1 的淀粉酶基因(*amyT*)全长开放阅读框克隆到 T 载体。分析表明,*amyT* 的 ORF 全长为 1767bp,编码 588 个氨基酸。推导的氨基酸序列与嗜热脂肪芽孢杆菌的阿尔法环糊精酶(*Bacillus stearotherophilus* alpha-cyclodextrinase)和栖热菌 *Thermus* sp. IM6501 的麦芽糖淀粉酶(*Thermus* sp. IM6501 maltogenic amylase)分别有 99% 和 96% 的同源性,与嗜热脂肪芽孢杆菌的新普鲁兰酶(*neopullulanase*)的同源性为 81%。

关键词 嗜热菌,麦芽糖淀粉酶,环糊精酶,新普鲁兰酶

中图分类号 Q93 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0434-03

自从 Brock 等从美国黄石公园分离并报道了水生栖热菌^[1](*Thermus aquaticus*)后,嗜热微生物对高温的抗性吸引越来越多的研究者的关注。来源于嗜热微生物的酶(嗜热酶)在高温条件下的良好活性拥有巨大的商业价值,如 PCR 技术中使用的 Taq DNA 聚合酶和用于核酸纯化的丝氨酸蛋白酶 PRETaq 分别来源于 *Thermus aquaticus* 和 *Thermus* Rt41A^[2]。我国西藏羊八井地区地热资源丰富,拥有温度高达 90℃ 的热泉,是分离嗜热微生物的良好来源。

淀粉酶是应用广泛的酶种之一,提高淀粉酶对高温的稳定性是改造淀粉酶的重要方向。淀粉酶研究者尝试了不同的途径以提高酶的热稳定性,开发来自嗜热菌的淀粉酶就是其中的有效途径。国外报道了对不同来源嗜热淀粉酶基因的克隆^[3],而国内少见报道。

本文报道从采自西藏羊八井常年温度在 90℃ 左右的热泉样品中分离出嗜热菌 *Thermus* sp. YBJ-1,及其淀粉酶基因的克隆。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 样品采自西藏羊八井热泉输气管出口处,包括气凝水样和泥样。保存于 4℃ 冰箱。

1.1.2 菌种和质粒 *E. coli* DH5 α 为本实验室保存, T-载体购自 Promega。

1.1.3 试剂 :Phytigel 和 Starch 购自 Sigma,GENECLEAN II KIT 购自 BIO101, Taq 酶等 PCR 用品购自 MBI,其他为国产

析纯试剂。

1.1.4 平板培养基 :LB 培养基稀释 5 倍,加 2% (W/V) Phytigel 固化。

1.1.5 选择培养基平板 :平板培养基加 1% (W/V) 淀粉。

1.1.6 生长培养基 :5 倍稀释的 LB 培养基。

1.1.7 单碳源培养基 (g/L) :NH₄Cl 1.0 ; K₂HPO₄ 0.3 ; KH₂PO₄ 0.3 ; MgCl₂ 0.2 ; NaCl 2.0 ; KCl 0.2 ; CaCl₂ 0.05 ; Yeast Extract 1.0 ;以 1% (W/V) 淀粉为唯一碳源。

1.2 方法

1.2.1 菌种分离 :在 1.5 mL 灭菌离心管中将样品与灭菌 ddH₂O 按 1:100 比例混合,稀释后接种于 5mL 生长培养基中,分别于 70℃、80℃、90℃、100℃ 水浴中培养 3~7d,菌体生长后稀释涂布在分离平板培养基上,65℃ 过夜。挑平板上长出的单菌落,接种于 5 mL 生长培养基,65℃ 过夜培养,保种备用。

1.2.2 淀粉酶试验 :碘熏长有嗜热菌的选择培养基平板,若有胞外淀粉酶分泌,在菌落周围会出现水解圈。

1.2.3 总 DNA 提取及核酸操作 :参考文献 [4,5]。

1.2.4 16S rDNA 的扩增和克隆 :使用通用引物^[6] FD1 :5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' 和 rP2 :5' ACGGCTACCTTGT-TACGACTT3' (上海生工合成) 扩增细菌 16S rDNA。扩增参数为 95℃ 2min,然后以 94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 2min 为一个循环,共进行 30 个循环。PCR 产物经 GENECLEAN II KIT 纯化后连接到 T-载体,转化 *E. coli* DH5 α 。

1.2.5 PCR 扩增淀粉酶基因 *amyT* 及其克隆 :以基因组 DNA

收稿日期 2003-09-09,修回日期 2004-01-02。

基金项目 国家十五“863”项目(No. 2001AA620111),国家大洋协会项目(No. 4-2-4)。

* 通讯作者。 Tel 86-592-2195303 ; Fax 86-592-2085376 ; E-mail : wenjian6308@yahoo.com.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

为模板,参考文献[7]设计 PCR 引物,扩增 *amyT*。引物: w6790(pstart) 5'-ATG AGG AAA GAA GCC ATC CAC CAC-3' 和 w6790(pend) 5'-TTA CCA GCT TTC GAC CGC GTA AA-3', 由上海生工合成。PCR 反应体系为: Buffer 10 μ L, dNTP 10 μ L, 引物各加 10pmol, Mg²⁺ 浓度为 1mmol/L, Taq 酶 2u/100 μ L, 补 ddH₂O 到 100 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 2min, 然后以 94 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 2min 为一个循环, 共进行 30 个循环。产物由 BIO101 的 GENECLAN II KIT 纯化后按 3:1 连接到 Promega 的 T-载体, 转化 *E. coli* DH5 α , 菌落 PCR 筛选含有淀粉酶基因 *amyT* 的克隆。

1.2.6 核酸测序及同源性分析: 上海生工完成所有测序及拼接工作, 序列同源性分析在 NCBI 网站完成。

2 结果与讨论

2.1 嗜热菌分离

样品接种在生长培养基之后, 经过 3d, 只有 70 $^{\circ}$ C 水浴培养的试管出现明显浑浊, 80 $^{\circ}$ C 到 100 $^{\circ}$ C 的培养未见浑浊。取 70 $^{\circ}$ C 的培养物, 经适当稀释后在基本平板培养基上划线, 65 $^{\circ}$ C 培养过夜后挑单菌落继续在 65 $^{\circ}$ C 培养、保种备用。

2.2 淀粉酶试验

2.2.1 胞外淀粉酶试验 经过碘熏之后, 在菌落周围无可见水解圈, 说明该菌不分泌胞外淀粉酶。

2.2.2 胞内淀粉酶试验 在以淀粉为唯一碳源的培养基中, 65 $^{\circ}$ C 培养条件下, 培养基可见明显浑浊。

2.3 菌种鉴定

用基因组 DNA 为模板, 16S rDNA 通用引物扩增出 1.5kb 带, 测序后与 GenBank 的序列比较, 发现它与 *Thermus* sp. (栖热菌属) 各种之间同源性高达 97% 以上, 与 *Thermus* sp. NMX2 A.1 和 *Thermus scotoductus* 同源性为 98%。因此将所分离嗜热菌归为栖热菌属 (*Thermus* sp.), 记做 *Thermus* sp. YBJ-1。其 16S rDNA 的 GenBank 注册号为: AF448817。

2.4 PCR 扩增淀粉酶基因 *amyT* 及其克隆

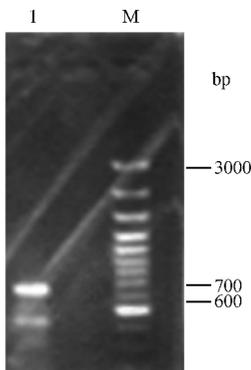


图1 简并引物 PCR 扩增淀粉酶基因

Fig.1 PCR amplification of amylase gene with degenerate primer

M :100bp DNA ladder ;

1 : PCR product about 680bp

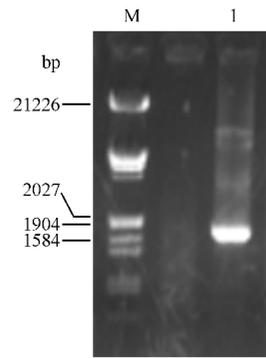


图2 PCR 扩增 *amyT* 基因

Fig.2 PCR amplification of *amyT* gene

M : DNA/ EcoR I + Hind III ;

1 : PCR product about 1.7kb

Thermus sp. YBJ-1 可在以淀粉为唯一碳源的培养基中生长, 而胞外酶试验为阴性, 说明该菌具有内源性淀粉酶。在比较若干条淀粉酶的氨基酸序列后, 合成了简并引物如下: w4449(+) 5'-A(CT)A(AGC)GCTT(ACCT)T(ACCT)T(CT)TG-3', w4449(-) 5'-TCGTTCCACA(TCAGCT)A(AG)AGCT(C)C-3'。扩增出预期约 680bp 的条带, 如图 1 所示。测序表明, 这扩增的片段与嗜热脂肪芽孢杆菌的阿尔法环糊精酶 (*Bacillus stearothermophilus* alpha-cyclodextrinase) 和栖热菌 IM6501 的麦芽糖淀粉酶 (*Thermus* sp. IM6501 maltogenic amylase gene) 高度相似, 于是参考文献合成扩增全长基因的引物对: Pstart 和 Pend。扩增的 *amyT* 全长基因约 1.7kb, 如图 2 所示。将 *amyT* 克隆到 T 载体后双向测序, 序列全长 1767bp, GenBank 注册号为: AY064726。分析表明, *amyT* 片段与多数淀粉水解酶类同源性高, 包括 *Bacillus stearothermophilus* alpha-cyclodextrinase (CDase) (99%), *Thermus* sp. IM6501 maltogenic amylase (ThMA) (96%), *Bacillus stearothermophilus* IMA6503 neopullulanase (NPLase) (81%), *Bacillus stearothermophilus* (TRS40) neopullulanase (NPLase T) (81%)。

2.5 讨论

Thermus sp. YBJ-1 最高生长温度不过 80 $^{\circ}$ C, 属于好氧菌, 而采样地区地下热水气体成分主要是 CO₂, 其含量最高达 99.8%, 还有少量还原性气体^[8], 采用厌氧技术可能会分离到最高生长温度超过 80 $^{\circ}$ C 的微生物。

Thermus sp. YBJ-1 可以在以淀粉为唯一碳源的培养基上生长, 但用碘熏平板后看不见明显水解圈, 只是在菌落表面略现棕色, 说明它含有不分泌到胞外的淀粉水解酶, 简并引物扩增所得片段的序列跟分布在周间质的 CDase 和 ThMA 高度相似, 也证明胞内淀粉酶的存在。

从氨基酸序列比较来看, *amyT* 翻译产物跟 *Bacillus stearothermophilus* 的 CDase 的同源性最高 (核酸水平比较也一样, 为 99%), 其次是同属的 *Thermus* sp. IM6501 的 ThMA, 同源性为 96% ; 然后是 *Bacillus stearothermophilus* IMA6503 的 NPLase 和 *Bacillus stearothermophilus* (TRS40) 的 NPLase T, 同源性都为 81%。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Brock TD, Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol*, 1969 **98** 289 - 297
- [2] Vieille C, Zeikus GJ. Hyperthermophilic enzymes :sources ,uses and molecular mechanisms for thermostability. *Mircobilol Mol Biol Rev*, 2001 **65** (1) :1 - 43
- [3] Niehaus F, Bertoldo C, Kähler M *et al.* Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999 **51** 711 - 729
- [4] Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [5] Fred Ausubel, Roger Brent, Robert E Kingston *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed, John Wiley & Sons Inc., 1995
- [6] Weisburg WG, Barns SM, Lane DJ *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenic study. *J Bac*, 1991 **173** (2) 697 - 703
- [7] Kim JS, Cha SS, Kim HJ *et al.* Crystal structure of a maltogenic amylase provides insights into a catalytic versatility. *J Bio Chem*, 1999 **274** (37) 26279 - 26286
- [8] Yan BR(阎宝芮), Zhang XG(张锡根). Microbial mineralogy. Beijing : Science Press(科学出版社), 1999

Isolation of Thermophilic Bacteria *Thermus* sp. YBJ-1 and Cloning of Amylase Gene

XIONG Peng-Jun WEN Jian-Jun*

(The Key Laboratory of Marine Biotechnology, The Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China)

Abstract Thermophilic bacteria strain YBJ-1 was isolated from hot spring samples collected from Yangbajing, Tibet. The 16sr DNA sequence of YBJ-1(1511bp in length) shares 98% identity with that of *Thermus. scotoductus* strain ITI-252T. The full-length ORF of amylase gene of YBJ-1(*amyT*) was amplified by PCR technique and cloned into T-vector. The complete sequence of *amyT* is 1767bp in length, coding for 588 amino acids. The deduced amino acids share 99% similarity with alpha-cyclodextrinase of *Bacillus sterothermophilus* 96% with maltogenic amylase of *Thermus. sp* IM6501 and 81% with neopullulanase of *Bacillus sterothermophilus*.

Key words thermophile, maltogenic amylase, cyclodextrinase neopullulanase

Received : 09-09-2003

This work was supported by Grants from the 15th National High-Tech Research & Development Project and China Ocean Mineral Resources R&D Association (No. 4-2-4).

* Corresponding author. Tel 86-592-2195303; Fax 86-592-2085376; © 中国海洋大学 6308 研究所 期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>