

古菌 *Pyrococcus furiosus* 嗜热 α -淀粉酶基因在酿酒酵母中的表达*

沈 微 华国强 王正祥 唐雪明 诸葛健**

(江南大学生物工程学院和教育部工业生物技术重点实验室 无锡 214036)

摘要: 用 PCR 方法从嗜热古菌 *Pyrococcus furiosus* 的基因组 DNA 中扩增出胞外 α -淀粉酶成熟肽结构基因, 插入 pUC19 中构建质粒 pUC19-amy。将 pUC19-amy 外源片段接入酿酒酵母表达载体 pYX212 多克隆位点, 构建载体 pYX212-amy, 电转化酿酒酵母 W303-1A。转化子成功表达出有活性的高嗜热 α -淀粉酶。重组酶具有与 *P. furiosus* 产生的胞外 α -淀粉酶相似的酶学性质: 最适 pH 为 5.0, 最适温度约为 90℃, 在 121℃ 下热处理 30min 酶活仍能保持 50% 以上。

关键词: *Pyrococcus furiosus*, 胞外 α -淀粉酶, 酿酒酵母

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 03-0022-04

EXPRESSION OF A HYPERTHERMOPHILIC α -AMYLASE OF THE ARCHAEON *PYROCOCCLUS FURIOSUS* IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

SHEN Wei HUA Guo-Qiang WANG Zheng-Xiang TANG Xue-Ming ZHUGE Jian

(Core Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education and School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract: The structural gene encoding mature peptide of extracellular α -amylase was amplified from the genome DNA of hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by PCR. The recombinant plasmid pUC19-amy was constructed by inserting the amplified segment into vector pUC19. The recombinant vector pYX212-amy was constructed by ligate the heterogeneous fragment of pUC19-amy into the multiple cloning site of pYX212, an expression vector of yeast. *Saccharomyces cerevisiae* W303-A1 were transformed with pYX212-amy by electroporation. The transformant expressed the activity of the thermophilic α -amylase successfully. The recombinant enzyme has the similar enzymatic properties as the extracellular α -amylase produced by *Pyrococcus furiosus*: it shows an enzymatic activity optimum at pH 5.0, and its optimal temperature for enzymatic activity is about 90℃, more than 50% of its initial enzymatic activity is still detectable after it was incubated at 121℃ for 30 minutes.

Key words: *Pyrococcus furiosus*, Extracellular α -Amylase, *Saccharomyces cerevisiae*

耐高温 α -淀粉酶是淀粉水解工艺中最重要的酶制剂之一。目前工业上最常用的耐高温 α -淀粉酶来源于地衣芽孢杆菌, 该酶具有较高的热稳定性, 但其最适 pH 为 6.0 左右^[1], 而目前最常用的来源于黑曲霉的糖化酶的最适 pH 为 4.5, 两者有较大差异, 淀粉用淀粉酶水解后获得的液化液用于糖化前需要调整 pH 值, 因此获得耐酸性的耐高温 α -淀粉酶对改进淀粉转化工艺有重要意义^[2]。近年来人们从嗜热古菌中分离了多种耐热 α -淀粉酶^[3], 其中 *Pyrococcus furiosus* 的胞外 α -淀粉酶具有极高的热稳定性, 最适 pH 4.5 ~ 5.0, 而且活性完全不依赖于金属离子, 因此受到研究者的关注^[2-4]。*P. furiosus* 胞外 α -淀粉酶基因的全序列及其在大肠杆菌和枯草杆菌中的表达国外已有报道^[5, 6]。

* 教育部教师科研基金资助项目 (No. 教技司 2000-65)

** 联系人

收稿日期: 2002-06-22, 修回日期: 2002-10-15

古菌基因的密码子组成往往与真核生物相似,有时更适合在真核生物中表达,但有关 *P. furiosus* 胞外 α -淀粉酶基因在真核生物中的表达国内外尚未见报道。本文将 *P. furiosus* 的胞外 α -淀粉酶成熟肽结构基因插入酵母菌表达载体 pYX212 多克隆位点,重组质粒转入酿酒酵母中,重组酵母菌成功表达出高嗜热 α -淀粉酶活性。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

P. furiosus DSM3638 基因组 DNA 由日本京都大学刘吉泉教授惠赠。宿主菌 *Escherichia coli* JM109, 克隆载体 pUC19 为复旦大学遗传学教研室惠赠。表达宿主菌 *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A (*ade2-1*, *his3-11*, *leu2-3*, *trp1-1*, *ura3-1*)、酿酒酵母表达载体 pYX212 为南非 Stellenbosch 大学 Prior 教授惠赠。

1.2 培养基

YPD 培养基: 酵母膏 10g, 蛋白胨 20g, 葡萄糖 20g, 定容至 1L; SC 培养基: Difco 酵母氮基 O/O: 6.7g, 组氨酸 0.02g, 色氨酸 0.12g, 亮氨酸 0.02g, 腺嘌呤 0.12g, 葡萄糖 20g, 定容至 1L。

1.3 酶和试剂

耐热 DNA 聚合酶 *Pyrobest*TM、限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、连接酶和 DNA 标准分子量 Marker 等为宝生物工程(大连)有限公司产品。PCR 产物纯化试剂盒、从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片断的试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品。

扩增 *P. furiosus* 胞外 α -淀粉酶基因的引物为:

引物 P1: 5' - CAAGGAATTCATGGCAAATACTTGGAGC - 3'

引物 P2: 5' - AATTGTCGACAGTATTTCACACTTCTCC - 3'

其中,引物 P1 与 *P. furiosus* α -淀粉酶成熟肽结构基因 5' 端互补,并增加了起始密码 ATG。引物 P1 下划线表示引物中增加的 *EcoR* I 切点。引物 P2 与结构基因下游的序列互补,下划线表示引物中增加的 *Sal* I 切点。

1.4 PCR 扩增

PCR 的反应条件为: 94℃ 变性 10min, 50 μ L 反应体系中加入 *Pyrobest*TM DNA 聚合酶 1.5 个单位,混合后加入矿物油 30 μ L 进行 PCR 反应 (94℃ 60s, 58℃ 60s, 72℃ 120s), 经过 30 个循环后,在 72℃ 延伸 10min。

1.5 DNA 重组、转化、阳性转化子筛选和测序^[7]

PCR 扩增产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化, *EcoR* I、*Sal* I 酶切、电泳分离、回收约 1.4kb 的 PCR 产物,与经相同酶切的 pUC19 连接获重组质粒 pUC19-amy, 酶切电泳鉴定后送上海生工生物工程公司测序。质粒 pUC19-amy 以 *EcoR* I、*Sal* I 酶切、电泳分离、回收约 1.4kb 片段,与经相同酶切的 pYX212 连接,转化大肠杆菌 JM109,在含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上筛选转化子,提取质粒酶切鉴定,所获重组质粒即为 pYX212-amy。

1.6 酵母菌的转化、重组酵母的鉴定、酶活测定

大量提取重组质粒 pYX212-amy,用 pYX212-amy 和 pYX212 空载体分别电转化^[8]酿酒酵母 W303-1A,利用 URA3 标记在 SC 培养基上筛选转化子。各取 5 个转化子分离纯化后用酵母溶壁酶 *Zymolase* 制成原生质体^[9],用 0.1% SDS 破细胞,以细胞破碎液为底

物, P1、P2 为引物作 PCR 扩增, 电泳鉴定 PCR 结果。将经鉴定的 pYX212-amy 转化的酵母菌和空载体 pYX212 转化的酵母菌分别接种 150mL YPD 液体培养基, 30℃ 振荡培养至稳定期。离心收集细胞, 用 5mL 生理盐水悬浮细胞, 细胞悬液用超声波处理破细胞, 细胞破碎液测定酶活。测定方法参照国家行业标准 QB/T2306-97^[1] 的分光光度计法, 其中 1 个酶活力单位定义为: 1min 液化可溶性淀粉 1mg 成为糊精所需酶量, 缓冲液采用磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液, 即以不同比例的 0.2mol/L 的磷酸氢二钠溶液与 0.2mol/L 的柠檬酸溶液相混合获得所需 pH 的缓冲液。

2 结果与讨论

2.1 P. furiosus 胞外 α-淀粉酶基因的扩增与重组质粒的构建

以 *P. furiosus* 染色体 DNA 为底物, 用引物 P1、P2 作 PCR 扩增, 电泳表明, 在 1.4kb 左右有一条明显的带, 而非特异扩增带很少。将所获重组质粒 pUC19-amy 序列分析表明, 其所含外源片段序列与文献^[5,6] 报道的 *P. furiosus* 胞外 α-淀粉酶成熟肽基因序列完全一致, 并增加了起始密码 ATG。进行 PCR 扩增时, 常常会出现碱基突变, 而本研究所获 PCR 扩增片段与报道的序列完全一致, 这可能是由于扩增时采用的 *Pyrobest*TM 是一种具有纠错功能的 DNA 多聚酶。酶切分离 pUC19-amy 所含外源片段与 pYX212 连接, 获重组质粒 pYX212-amy (图 1 和图 2)。

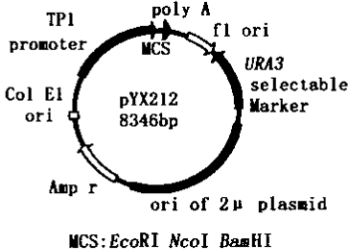


图 1 酿酒酵母表达载体 pYX212

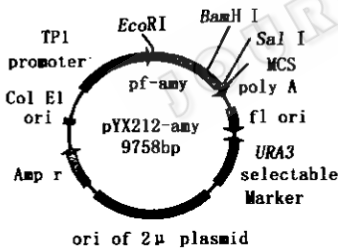


图 2 重组质粒 pYX212-amy

所获重组质粒酶切图谱显示, 其 *EcoR* I、*Sal* I 位点间含有一略大于 1.4kb 的片段, 中间含 *BamH* I 位点。酶切图谱符合 pYX212-amy 应有特征 (图 3)。

2.2 重组酵母菌的构建与重组酶的表达

用重组质粒 pYX212-amy 和空载体 pYX212 分别电转化酿酒酵母 W303-1A, 在不含尿嘧啶的 SC 平板上各获得了 100 多个转化子。其中 pYX212-amy 转化子细胞破碎液以 P1、

P2 为引物作 PCR 扩增, 可获得一条 1.4kb 左右的扩增片段, 分离该片段酶切鉴定, 酶切图谱与 pUC19-amy 的外源片段一致, 充分证明所获转化子确为含有 pYX212-amy 的重组酵母菌。空载体 pYX212 的转化子不能获得 1.4kb 左右的扩增片段。

pYX212-amy 和 pYX212 空载体的转化子细胞破碎液在文献报道的最适条件下 (95℃、pH4.5)^[6] 测定淀粉酶活性。其中, pYX212-amy 转化子的破碎液有明显酶活, pYX212 空载体转化子的破碎液没有酶活。

本文所用酵母菌表达载体 pYX212 是一种酵母菌游

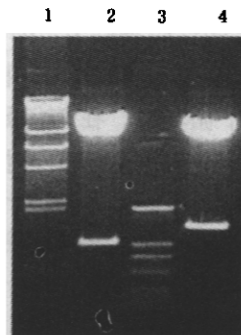


图 3 重组质粒 pYX212-amy 酶切图谱

1 λDNA/*Hind* III, 2 pYX212/*Eco* R I、*Bam*H I, 3 DL2000, 4 pYX212/*Eco* R I、*Sal* I。
在 *P. furiosus* 结构基因内含有一 *Bam*H I 酶切位点, 以 *Eco* R I、*Bam*H I 酶切应产生一略大于 1.0kb 的片段。标准分子量 DL2000 各条带分子量为: 2.0kb、1.0kb、0.75kb、0.5kb、0.25kb、0.1kb。

离型载体,也是一种穿梭载体,在大肠杆菌和酵母菌中都能稳定存在。载体 pYX212 携带的 TP1 启动子是一控制组成型表达的启动子。本研究所获 pYX212-amy 转化子破碎液的酶活约为 8U/mL,相对细胞破碎液可溶性总蛋白的比酶活为:16U/mg,由此推算发酵液酶活约为 0.27U/mL。

2.3 重组酶的性质

用 pYX212-amy 转化子的破碎液进一步研究重组酶活性与 pH、温度等的关系,结果见图 4、图 5 和图 6。

重组酶活性以单体积破碎液所含酶活单位 (U/mL) 计算(下同),以 pH5.0、90℃酶活为 100%

由图 4 可见,重组酶的最适 pH 为 5.0,这与 Jorgensen S 等报道的重组酶最适 pH 基本一致。重组酶的热稳定性非常好,100℃长时间保温酶活下降很少,在完全没有淀粉存在的情况下 121℃处理 30min 酶活仍能保持 50%以上,其热稳定性明显超过目前常用的来源于地衣芽孢杆菌的耐高温 α -淀粉酶。可能是由于测定方法的差异,不同的研究者对重组酶或由 *P. furiosus* 自身产生的胞外 α -淀粉酶的最适温度的报道有一些差异^[4-6],但该酶具有极高的热稳定性是一致的结论。

真核生物有复杂的翻译后修饰和不同于原核生物转录终止机制,原核基因在真核生物中表达,有时会因为错误修饰、转录提前终止等原因而不能获得有活性的产物。本研究表明 *P. furiosus* 胞外 α -淀粉酶基因虽然来源于古菌,但其成熟肽结构基因能在真核生物酿酒酵母中表达,表达产物的性质与 *P. furiosus* 自身产生的胞外 α -淀粉酶或由原核表达系统表达的产物基本一致,这为采用更强的真核生物表达系统实现 *P. furiosus* 胞外 α -淀粉酶的高表达提供了依据和参考模式。

致谢 本校生物工程学院邵蔚蓝老师对本研究提供了指导和帮助,特此致谢。

参考文献

- [1] 姜锡瑞,莫湘筠,曹本昌,等. 酶制剂应用手册. 北京:中国轻工业出版社,1999.276~283.
- [2] 唐雪民,王正祥,诸葛健. 食品与发酵工业,2001,27(5):65~70.
- [3] Emmanuel L, Stefan J, Bernard H, et al. Enzyme Microbial Technol, 2000, 26(1):3~14.
- [4] Brown S H, Costantino H R, Kelly R M. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(7):1,985~1,991.
- [5] Dong G, Vieille C, Savchenko A, et al. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(9):3,569~3,576.
- [6] Jorgensen S, Vorigas C E, Antranikian G. J Biol Chem, 1997, 272(26):16,335~16,342.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1.21~1.84.
- [8] F. 奥斯伯, R. 布伦特, R. E. 金斯顿等著. 颜子颖,王海林译. 精编分子生物学实验指南. 北京:科学出版社,1998. 512~514.
- [9] 王正祥,诸葛健. 工业微生物实验技术. 北京:中国轻工业出版社,1994.487~491.

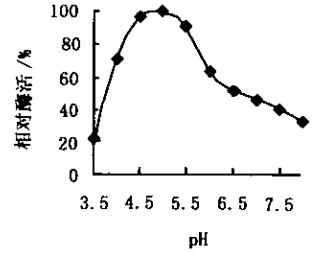


图 4 重组酶活性与 pH 的关系

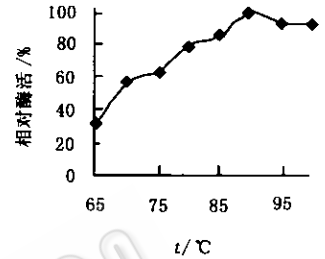


图 5 重组酶活性与温度的关系
以 pH5.0、90℃酶活为 100%

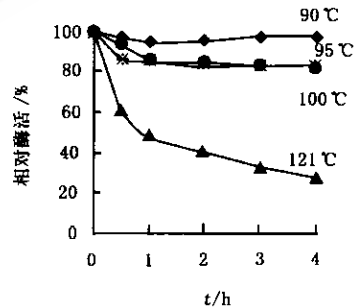


图 6 重组酶的热稳定性

将酶样品在如图所示条件下保温,然后在最适条件下(pH5.0、90℃)测定残余酶活,121℃保温在手提式灭菌锅内进行,升温时间未计,以未经保温酶液的酶活为 100%