

坚强芽孢杆菌三个淀粉酶基因的克隆和表达

陈 炜 何秉旺 张建华 陈乃用

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 以 pUC18 为载体,用鸟枪法从产淀粉水解酶的坚强芽孢杆菌 725 菌株中得到三个产淀粉水解酶的重组质粒,在大肠杆菌中表达。用高压液相色谱分析了三个表达的酶的淀粉水解产物,其中 pBA135 和 pBA150 表达的酶的淀粉水解产物主要是麦芽糖,具 β -淀粉酶的性质。pBA140 表达的酶的淀粉水解主要产物除麦芽糖外还有一糖,三糖和四糖。pBA135 编码的酶有较好的热稳定性,60℃保温 30min,活性保留 70% 以上,最适反应温度 55~60℃。而在同样条件下 pBA150 编码的酶仅保留 37% 的酶活,最适反应温度 50℃。

关键词 淀粉水解酶,坚强芽孢杆菌,基因的克隆和表达

淀粉酶在淀粉工业中有重要的应用价值,其研究多年来一直很受重视。已选育了多种淀粉水解酶产生菌,很多淀粉水解酶基因已克隆和表达^[1]。何秉旺等在选育耐热 β -淀粉酶时得到一株坚强芽孢杆菌 725 号,该菌株产生的酶水解淀粉的主要产物为麦芽糖,酶的热稳定性较好。为进一步研究该菌株产生酶的性质,对该菌株的淀粉酶基因进行分离、克隆和表达,得到三个淀粉水解酶基因。

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

供体菌坚强芽孢杆菌 725 (*Bacillus firmus* No 725) 为何秉旺等从土壤中筛选,经蔡妙英等鉴定。

受体菌大肠杆菌 HB101 和 DH5 α 为实验室常用菌株。克隆用载体为质粒 pUC18。

1.2 培养基

LB 培养基: 1% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母粉, 0.5% NaCl, pH7.0。

LS 培养基: LB 培养基中加 1% 可溶性淀粉, pH7.0。

LB 和 LS 培养基需要时加氨苄青霉素 (Ap) 至 100 μ g / ml。制平板用固体培养基添加 1.5% 琼脂粉。

测定淀粉酶活性用 SP 培养基: 0.04mol / L

磷酸钠盐缓冲液, pH5.8, 1% 可溶性淀粉, 1.5% 琼脂粉, 制平板时加氯霉素至 100 μ g / ml。

1.3 药品和试剂

限制性内切酶和其它工具酶, 质粒载体, 分子量参照物等分别购自北京协和医科大学友谊公司, 华美公司, Promega 公司, Pharmacia 公司等厂家, X-gal, IPTG 为中科院生态中心产品。

1.4 核酸的分子生物学方法

DNA 的制备、酶切、连接、转化等参照文献 [2] 进行。

1.5 淀粉酶基因的筛选

重组转化子点种在含 Ap 的 LS 平板上, 37℃ 培养过夜, 按文献 [3] 用细胞原位裂解法测定淀粉酶活性。用无菌滤纸贴下菌落, 用含 2mg / ml 溶菌酶的 50mol / L Tris-HCl (pH7.5), 0.1% Triton X-100 裂解后, 贴放在 SP 平板上, 37℃ 放置过夜, 0.1% I₂-KI 染色检测。

1.6 淀粉水解产物分析

取淀粉酶阳性克隆的菌体, 0.85% NaCl 洗涤, 悬浮于 0.85% NaCl 中, 超声破碎, 离心取上清。取 100 μ l, 加 100 μ l 2% 可溶性淀粉 (pH5.8 缓冲液中), 55℃ 水浴保温 4h, 沸水浴中 10min, 离

国家自然科学基金资助项目

1996-12-16-收稿

心取上清,用 Warters244 型高压液相色谱仪分析淀粉水解产物(委托中国林业科学研究院分析中心进行分析)。

1.7 淀粉酶活力测定

待测菌在 LS 培养基中振荡培养,离心收集菌体,悬浮于缓冲液中,超声破碎,离心取上清,以可溶性淀粉为底物,用 DNS 法^[4]测定上清液酶活。

2 结果与讨论

2.1 淀粉酶基因的克隆和筛选

从坚强芽孢杆菌 725 提取染色体 DNA, *Sau3AI* 部分酶切,琼脂糖凝胶电泳,电洗脱回收 2.5~8kb 片段,同 *Bam*HI 酶切并脱磷的 pUC18 连接,转化 *E. coli* HB101 或 DH5 α , 转化子经原位裂解筛选到三个淀粉酶阳性克隆, HB101 (pBA135), HB101 (pBA140) 和 HB101 (pBA150)。其中 HB101 (pBA135) 和 HB101 (pBA150) 的淀粉水解圈经 I₂-KI 染色后为紫红色半透明,为 β -淀粉酶特征水解圈, HB101 (pBA140) 的淀粉水解圈为中间透明,外周紫红色。用碱法提取上述三个克隆的质粒 DNA, 转

化 *E. coli*, 随机挑选转化子, 上述三个质粒的转化子均有淀粉水解圈(图 1), 表明淀粉酶活性确由质粒上的基因所决定的。

2.2 淀粉水解产物分析

用高压液相色谱对 HB101 (pBA135), HB101 (pBA140) 和 HB101 (pBA150) 的酶的淀粉水解产物的分析结果列于表 1。pBA135 和 pBA150 编码的酶淀粉水解产物以麦芽糖为主, 是 β -淀粉酶的特征, 占水解总糖(以一至四糖为总糖算)的 90% 以上, pBA140 编码的淀粉酶水解产物不同于 pBA135 和 pBA150 的酶, 二糖约占 50%, 其余为一糖、三糖、四糖等。

表 1 淀粉酶水解产物的高压液相色谱结果

菌株		四糖	三糖	二糖	葡萄糖	总糖
HB101	含量(mg)	7.85	11.77	418.7	-	438.3
(pBA135)	%	1.8	2.7	95.5	-	100
HB101	含量(mg)	20.92	70.62	135.06	29.09	255.7
(pBA140)	%	8	28	52	12	100
HB101	含量(mg)	-	11.77	244.5	2.04	258.3
(pBA150)	%	-	4.6	94.6	0.8	100

注: 总糖为按一至四糖之和算

2.3 比较质粒 pBA135 和 pBA150 的限制性内切酶图谱及所表达的酶的性质

质粒 pBA135 和 pBA150 编码的酶的淀粉水解主要产物都是麦芽糖, 为研究是否为同一基因编码, 研究了两个质粒的插入片段的主要酶切位点及所产生的酶的性质。

2.3.1 重组质粒 pBA135 和 pBA150 的限制性内切酶图谱及亚克隆的制备: 质粒 pBA135 和 pBA150 用若干限制性内切酶单酶切或双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分析片段大小, 列于表 2。图 2 为部分琼脂糖凝胶电泳图。根据酶切电泳结果绘制的酶切图谱如图 3。从酶切电泳结果估算, 质粒 pBA135 插入片段约 3.3kb, 其中有一个 *Eco*RI 切点, 一个 *Hind*III 切点, 一个 *Sac*I 切点, 两个 *Pst*I 切点, 无 *Sal*I, *Sma*I, *Kpn*I 切点。pBA150 的插入片段约 4.2kb, 其中 *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I 各一个切点, 两个 *Sma*I 个切点, 无 *Sal*I 和 *Sac*I 切点。此外 pBA135 和 pBA150 均无

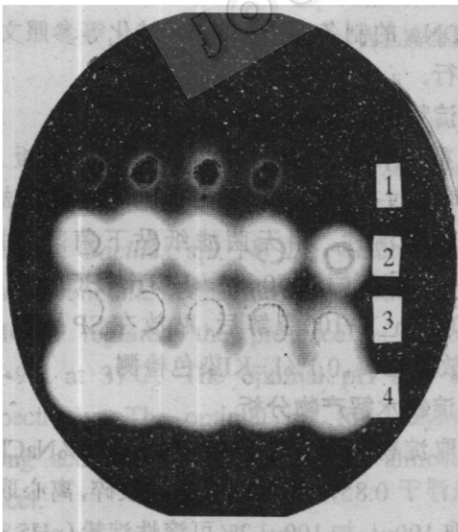


图 1 携带重组质粒的 *E. coli* 在淀粉平板上形成的淀粉水解圈

1. HB101(pUC19);
2. HB101(pBA135);
3. HB101(pBA140);
4. HB101(pBA150)

*Bam*HI 切点。

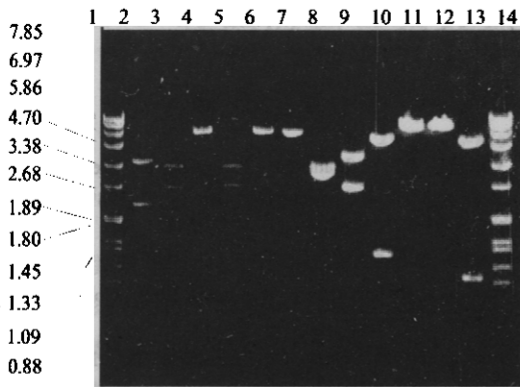


图2 重组质粒 pBA135 和 pBA150 的限制性内切酶电泳图

1. SPPI/ *Eco*RI; 2. pBA135/ *Eco*RI; 3. pBA135/ *Hind*III;
4. pBA135/ *Kpn*I; 5. pBA135/ *Sac*I; 6. pBA135/ *Sa*II;
7. pBA135/ *Sma*I; 8. pBA150/ *Eco*RI; 9. pBA150/ *Hind*III;
10. pBA150/ *Kpn*I; 11. pBA150/ *Sac*I; 12. pBA150/ *Hind*III;
13. pBA150/ *Sma*I; 14. SPPI/ *Eco*RI

表2 重组质粒 pBA135 和 pBA150 的限制性内切酶酶切片大小

质粒	限制性内切酶	片段大小 (kb)			
pBA135	<i>Pst</i> I	4.7	0.5	0.75	
	<i>Eco</i> RI	2.2	3.7		
	<i>Hind</i> III	3.3	2.6		
	<i>Kpn</i> I	6.0			
	<i>Sac</i> I	2.7	3.3		
	<i>Sa</i> II	6.0			
	<i>Sma</i> I	6.0			
	<i>Eco</i> RI+ <i>Hind</i> III	2.1	2.6	1.1	
	<i>Eco</i> RI+ <i>Sa</i> II	2.65	2.2	1.1	
	<i>Sa</i> II+ <i>Sac</i> I	2.65	2.6	0.7	
<i>Bam</i> HI	无切点				
pBA150	<i>Eco</i> RI	3.4	3.3		
	<i>Hind</i> III	4.1	2.7		
	<i>Kpn</i> I	1.25	5.5		
	<i>Sac</i> I	6.9			
	<i>Sa</i> II	6.9			
	<i>Sma</i> I	5.5	0.9	0.5	
	<i>Eco</i> RI+ <i>Hind</i> III	2.6	1.8	1.4	1.0
<i>Bam</i> HI	无切点				

从质粒 pBA135 和 pBA150 的插入片段的相应酶切位点制备了若干亚克隆,测定淀粉酶活力(图3),表明 pBA135 的 *Eco*RI 和 *Sac*I 在酶活力必需的编码区内, *Hind*III 位点不在活力必需编码区内。pBA150 插入片段的 *Eco*RI 位点在活力必需区外,而 *Hind*III 在活力必需区内。此外,对 pBA150 基因的测序结果(陈炜等,另文发表)亦表明 *Hind*III 位点, *Kpn*I 位点和一个 *Sma*I 位点均在编码区内。

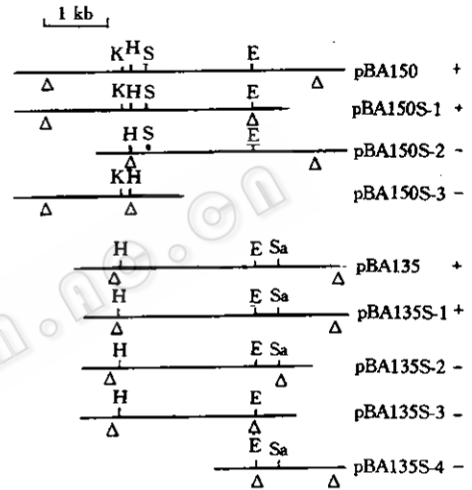


图3 重组质粒 pBA135 和 pBA150 插入片段的限制性内切酶图谱及其亚克隆的酶活性

+ 为有淀粉酶活性, - 为无淀粉酶活性。粗线为来自坚强芽孢杆菌染色体的 DNA, 细线为来自载体的 DNA, Δ 代表载体上的多克隆位点, E. *Eco*RI; H. *Hind*III; K. *Kpn*I; S. *Sma*I; Sa. *Sac*I

2.3.2 温度对淀粉酶活力的影响: pBA135 和 pBA150 产生的酶在 0.04mol/L 磷酸盐缓冲液, pH5.8, 在 30、40、50、55、60、65 和 70 $^{\circ}$ C 分别测定酶活, 来自 pBA135 淀粉酶在 55-60 $^{\circ}$ C 酶活最高, 来自 pBA150 酶在 50 $^{\circ}$ C 酶活最高。

2.3.3 酶的热稳定性: 来自 pBA135 的酶和 pBA150 的酶在 30、40、50、60、70 和 80 $^{\circ}$ C 分别保温 30min, 测定酶活。pBA135 酶于 60 $^{\circ}$ C 保温 30min 后仍有 70% 以上的活力, 而 pBA150 酶在同样条件下仅存约 37% 的酶活力。pBA135 酶的热稳定性优于 pBA150 酶。

以上结果表明,来自 pBA135 和 pBA150 的酶为不同的酶。坚强芽孢杆菌 725 产生的淀粉酶热稳定性较好,但酶活较低。自然菌株产生的淀粉酶往往是多种类型,如多粘芽孢杆菌 α -淀粉酶和 β -淀粉酶是由同一基因转录,翻译后经蛋白水解酶加工而成^[5]。我们试图通过基因工程方法研究坚强芽孢杆菌 725 产生的酶的性质,并为构建稳定性高效表达的基因工程菌株打基础。本工作中得到三个淀粉水解酶基因,其中两个酶的淀粉水解产物主要为麦芽糖,质粒 pBA150 中的淀粉酶活力编码区的核苷酸已测序(陈炜等,另文发表),同多粘芽孢杆菌 β -淀粉酶基因有很高的同源性,含 β -淀粉酶基因的几个特征同源保守区,属 β -淀粉酶家族。质粒 pBA135 产生的酶的热稳定性优于多粘芽孢杆菌 β -淀粉酶^[6,7]和蜡状芽孢杆菌 β -淀粉酶^[8]。pBA135 酶和 pBA150 酶的淀粉水解产物基本相同,但基因和酶的性质均不相同,这对于研究

酶的结构和功能提供了好的材料。对克隆的三个淀粉酶基因及其酶的性质详细研究正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Vihinen M., Mantsala P. Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology, 1989, 24(4): 329-418.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Lab Press.
- [3] Tsukagoshi N, Ihara H, Yamagata H. Mol Gen Genet, 1984, 193: 58-63.
- [4] Miller G L. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426.
- [5] Uozumi N, Sakurai K, Sasaki T, et al. J Bacteriol, 1989, 171: 375-382.
- [6] 何秉旺,郭君君,姜兆元等. 微生物学报. 1980, 20(4): 421-426.
- [7] Kawazu T, Nakanishi Y, Uozumi N, et al. J Bacteriol, 1987, 169: 1564-1570.
- [8] Takashi N, Ryu S, Kenji A. et al. Agric. Biol. Chem., 1983, 47(5), 941-947.

CLONING AND EXPRESSION OF THREE AMYLASE GENES FROM *BACILLUS FIRMUS*

Chen Wei He Bingwang Zhang Jianhua Chen Naiyong

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing, 100080)

Abstract Three genes encoding amylase from *Bacillus firmus* 725 were cloned and expressed in *E. coli* using pUC18 as vector, to give recombinant plasmids pBA135, pBA140 and pBA150. The starch digested products with the amylases encoded by pBA135 and pBA150 were composed mainly of maltose, whereas the main products for the amylase from pBA140 were composed of glucose, maltose, maltotriose and maltotetrose. The restriction mapping analysis indicated that the amylase genes in pBA135 and pBA150 were different. The thermostability of the amylase from pBA135 was better than that of pBA150, more than 70% of the enzyme activity retained after heat treatment at 60°C for 30 min, whereas, only about 37% of the activity of the enzyme from pBA150 retained. The optimum activity temperatures of the amylases from pBA135 and pBA150 were 55-60°C and 50°C respectively.

Key words amylase, *Bacillus firmus*, gene cloning and expression