

# 芝田硫化叶菌新型 $\alpha$ -淀粉酶基因在大肠杆菌的克隆和表达<sup>\*</sup>

刘 莉<sup>1</sup> 陈 炜<sup>1</sup> 金 城<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所 酶学研究室 北京 100080)

(<sup>2</sup>中国科学院微生物研究所 微生物资源国家重点实验室 北京 100080)

关键词 新型  $\alpha$ -淀粉酶, 芝田硫化叶菌, 大肠杆菌, 基因的克隆和表达

分类号 Q933 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2000)03-0323-26

海藻糖(Trehalose)是由两个葡萄糖残基通过  $\alpha$ -1,1 键连接的非还原二糖,广泛存在于微生物、植物和昆虫中。海藻糖是一种应急代谢物,它赋予生物体抵抗干旱、冷冻和高渗等恶劣环境的能力,可用作微生物冷冻干燥制品、疫苗、多种药品、化妆品及食品的稳定剂和保护剂,从而引起人们的重视,成为生物界的研究热点。

近年来关于酶法合成海藻糖的研究很活跃。在常温细菌和嗜热古菌中发现了由淀粉(或淀粉部分水解物及大于三个葡萄糖基的麦芽寡糖)合成海藻糖相关的两个酶。第一个酶是麦芽寡糖基海藻糖合酶(maltooligosyltrehalose synthase)将淀粉或麦芽寡糖还原末端的  $\alpha$ -1,4 葡萄糖苷键转化为  $\alpha$ -1,1 葡萄糖苷键,生成非还原性的麦芽寡糖基海藻糖,是一种分子内转糖基酶。第二种酶是麦芽寡糖基海藻糖海藻糖基水解酶(maltooligosyl trehalose trehalohydrolase),是一种新型  $\alpha$ -淀粉酶(novel  $\alpha$ -amylase),水解上述生成物的海藻糖基和麦芽寡糖基间的  $\alpha$ -1,4 葡萄糖苷键,生成海藻糖和比初始底物少两个葡萄糖基的麦芽寡糖,此外也有较弱的内切水解酶活性<sup>[1~5]</sup>。

本文报道芝田硫化叶菌(*Sulfolobus shibatae*)新型  $\alpha$ -淀粉酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达以及在大肠杆菌中表达的两种重组酶作用直链淀粉或淀粉部分水解物生成海藻糖的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供体菌芝田硫化叶菌(*Sulfolobus shibatae*)B12 染色体 DNA 为本所黄力先生惠赠。

质粒 pBV220 为中国预防医学科学院张智清先生等人构建<sup>[6]</sup>,是含  $P_{RPL}$  启动子的原核表达载体,可表达外源基因,产生非融合蛋白。

受体菌 DH5 $\alpha$ , XL1-blue JM109, TG1 为本实验室保存。

### 1.2 酶和试剂

限制性内切酶、T4DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶等工具酶及核酸和蛋白质分子量标准等分别购自华美公司、上海生工公司、Promega 公司、Sigma 公司等。直链淀粉购自 Sigma 公司,淀粉部分水解物为北京酱油厂产品。

### 1.3 培养基、培养条件及热诱导表达条件

参照文献[6]进行。

<sup>\*</sup> 微生物资源国家重点实验室课题(981024)和北京市自然科学基金课题(5982010)

作者简介 刘 莉(1967-),女,内蒙古包头人,讲师,现为南开大学生命科学院博士研究生,1996~1999 年为中国科学院微生物研究所代培研究生,主要从事分子生物学研究

陈 炜为通讯作者

收稿日期:1999-01-04,修回日期:1999-07-14

1.4 分子克隆技术和表达产生物的 SDS-PAGE 分析

参照文献 [7] 进行。

1.5 酶活力测定方法

1.5.1 新型  $\alpha$ -淀粉酶活力测定 采用 Fuwa 方法<sup>[8]</sup> ,实验室用微量比色法测定。一个酶活力单位定义为 60℃ 下每分钟液化 0.1mg 可溶性淀粉所需的酶量。

1.5.2 新型  $\alpha$ -淀粉酶活力定性测定方法 用原位裂解法<sup>[9,40]</sup>测定 ,在 55℃ 温箱中保温过夜 , $I_2$ -KI 显色。

1.6 生成海藻糖反应

用 1.5 单位麦芽寡糖基海藻糖合酶<sup>[11]</sup>与 0.4 单位新型  $\alpha$ -淀粉酶作用于 10% 的直链淀粉( Sigma 公司产品 )和淀粉部分水解物各两份样品 ,体积 10mL 在 pH5.5 ,50mmol/L 的醋酸钠缓冲液中 ,58℃ 反应 48h。用 HPLC 检测 ,以 Sigma 公司的海藻糖作标准。

1.7 高压液相层析 (HPLC) 分析

用柱为 Bio-Red 公司的 Aminex HPX-87H 柱体积 300×7.8mm ,加样量 5 $\mu$ L ,流速 0.50 $\mu$ L/min ,温度 45℃。

2 结果和讨论

2.1 含新型  $\alpha$ -淀粉酶基因重组质粒的构建

部分序列分析已表明 芝田硫化叶菌 B12 新型  $\alpha$ -淀粉酶基因同 硫矿硫化叶菌( *Sulfolobus solfataricus* )KM1 新型  $\alpha$ -淀粉酶基因<sup>[12]</sup>的核苷酸序列的序列有很高的同源性。参照硫矿硫化叶菌 KM1 的相应核苷酸序列 ,设计合成如下引物 :

上游引物 5'-AAAGAATTCATGACGTTTGCTTATAAAAT-3'

下游引物 5'-CTCGGATCCTAAAGTTTATATAAAGCAAAT-3'

上游引物的 5'端含 *Eco*R I 位点 ,下游引物的 5'端含 *Bam* H I 位点。

以 芝田硫化叶菌 B12 染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增 ,扩增条件为 :94℃ 50s ;53℃ 50s ;72℃ 100s , 30 个循环 ,电泳检测扩增产物约 1.7kb( 图 1 )。

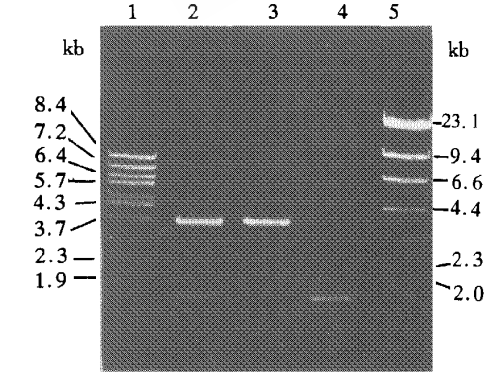


图 1 重组质粒 pSBAM 构建过程及质粒酶切的琼脂糖凝胶电泳图

1.  $\lambda$ DNA/*Bst* EI ; 2. pSBAM/*Eco*RI/*Bam* HI ;  
3. pBV220/*Eco*RI/*Bam* HI ; 4. PCR products (1.7kb) ; 5.  $\lambda$ DNA/*Hind* III .

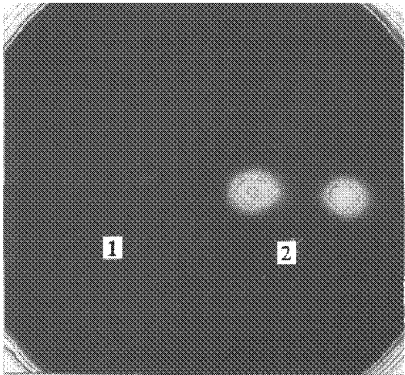


图 2 携带重组质粒 pSBAM 的 *E. coli* 在淀粉平板上形成的淀粉水解圈

1. DH5 $\alpha$  (pBV220) ; 2. DH5 $\alpha$  (pSBAM) .

载体 pBV220 和 PCR 扩增产物分别用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切,电洗脱回收后连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,以可溶性淀粉为底物,用原位裂解法筛选到有淀粉水解圈的阳性克隆(图 2)。提取阳性克隆质粒,称 pSBAM,用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切,得 3.7kb 和 1.7kb 两个片段(图 1),与预期大小一致。

2.2 酶活力测定

DH5 $\alpha$  (pSBAM) 在 30℃ 培养至 *OD*<sub>600</sub> 值约 0.5,42℃ 热诱导 4h,超声波破碎离心的菌体,离心后取上清测定酶活力,每 100mL 发酵液的菌体含新型  $\alpha$ -淀粉酶酶活力约 8 单位。把 pSBAM 质粒分别转入 *E. coli* 的 XL1-blue、JM109 和 TG1 菌株中,用上述方法进行产物的表达,酶活力分别为 8.76、8.07 和 8.41 单位。

2.3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

DH5 $\alpha$  (pSBAM) 培养和热诱导 4h 后,离心取样,菌体直接加到 SDS-PAGE 上样缓冲液中,100℃ 煮沸 5min 离心。将上清液进行电泳,考马斯亮兰 R-250 染色,脱色,样品 DH5 $\alpha$  (pSBAM) 比 DH5 $\alpha$  (pBV220) 在约 61kD 处增加了一蛋白带(图 3),与硫矿硫化叶菌 KM1 的新型  $\alpha$ -淀粉酶的大小相近。经岛津 CS-930 蛋白扫描仪在 550nm 下扫描,表达的新型  $\alpha$ -淀粉酶蛋白占细胞总蛋白约 20%(图略)。

2.4 海藻糖的生成

用 HPLC 检测海藻糖生成。Sigma 公司的海藻糖出峰时间为 9.03min,用淀粉部分水解物为底物的样品在 9.04 和 9.05min 分别有明显的峰,用直链淀粉为底物的样品在 9.02 和 9.03min 分别有明显的峰。表明所检测的四份样品均有海藻糖的生成。用直链淀粉为底物,海藻糖收率 67.2%。

重组菌株 DH5 $\alpha$  (pSBAM) 表达的酶蛋白其可溶部分较少,大部分以无活性的不溶形式存在(数据另文发表)。该新型  $\alpha$ -淀粉酶主要作用于麦芽寡糖基海藻糖,从海藻糖基末端切下海藻糖基,对淀粉的内切水解酶活性较弱。上述两点可能是淀粉水解酶活力不够高的原因。提高表达酶活力的工作正在进行中。

据报道,日本麒麟公司从硫矿硫化叶菌 KM1 得到麦芽寡糖基海藻糖合酶和新型  $\alpha$ -淀粉酶基因,在大肠杆菌中克隆和表达<sup>[12]</sup>,用基因工程菌株产生的酶作用于淀粉产生海藻糖,认为该方法很有应用前景<sup>[13]</sup>。

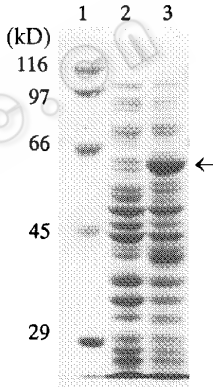


图 3 重组质粒 pSBAM 表达产物的 SDS-PAGE 电泳图

- 1. Protein molecular weight markers ;
- 2. DH5 $\alpha$  (pBV220) ;3. DH5 $\alpha$  (pSBAM) .

致谢 黄力先生提供芝田硫化叶菌 B12 染色体 DNA,并对本工作给予多方面的支持。江宁、贺鹏帮助 HPLC 测定。在此表示感谢。

参 考 文 献

[ 1 ] Maruta K , Nakada T , Kubota M , et al . Biosci Biotech Biochem ,1995 ,59( 10 ) :1829~1834 .  
[ 2 ] Kato M , Miura Y , Kettoku M ,et al . Biosci Biotech Biochem ,1996 ,60( 5 ) :921~924 .  
[ 3 ] Maruta K , Nakada T , Kubota M , et al . Biosci Biotech Biochem ,1995 ,59( 12 ) :2210~2214 .  
[ 4 ] Kato M , Miura Y , Kettoku M ,et al . Biosci Biotech Biochem ,1996 ,60( 3 ) :546~550 .  
[ 5 ] Kato M , Miura Y , Kettoku M ,et al . Biosci Biotech Biochem ,1996 ,60( 5 ) :925~928 .  
[ 6 ] 陈 炜 ,何秉旺 ,张建华 ,等 .微生物学报 ,1997 ,37( 34 ) :270~275 .  
[ 7 ] J . 萨姆布鲁 E .F 弗里奇 ,T . 曼尼阿蒂斯( 金冬雁 ,黎孟枫 ,侯云德等译 ) 分子克隆实验指南 ,第二版 .北京 .科

学出版社,1993.

[ 8 ] Fuwa H. *J Biochem* ,1954 **41** 583~603.  
[ 9 ] 陈 炜,何秉旺,张建华,等.微生物学通报,1997 **24**( 4 ):199~202.  
[ 10 ] Tsukagoshi N, Ihara H, Yamagata H. *Mol Gen Genet* ,1984 **193** 58~63.  
[ 11 ] 陈 炜,刘 莉,孙培钰,等.微生物学报,2000 **40**( 1 )57~61.  
[ 12 ] Kobayashi K, Kato M, Miura Y, *et al.* *Biosci Biotech Biochem* ,1996 **60**( 11 ):1882~1885.  
[ 13 ] Kobayashi K, Komeda T, Miura Y, *et al.* *J Ferment Bioengin* ,1997 **83**( 3 )296~298.

CLONING AND EXPRESSION OF THE GENE ENCODING NOVEL  
 $\alpha$ -AMYLASE FROM *SULFOLOBUS SHIBATAE* IN *E. COLI* \*

Liu Li<sup>1</sup>    Chen Wei<sup>1</sup>    Jin Cheng<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Laboratory of Enzymology , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 )  
(<sup>2</sup>State Key Laboratory of Microbial Resources , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 )

**Abstract** : A novel  $\alpha$ -amylase gene was amplified from *Sulfolobus shibatae* by using PCR technique. The amplified 1.7kb DNA fragment was inserted into an expression vector pBV220 to yield the recombinant plasmid pSBAM. The novel  $\alpha$ -amylase gene in pSBAM was expressed in *E. coli*. The production of the novel  $\alpha$ -amylase activity reached over 8 units/100mL of the culture. The molecular weight of this enzyme was about 61kD by SDS-PAGE. The expressed novel  $\alpha$ -amylase protein in *E. coli* DH5 $\alpha$  accounted for about 20% of the total protein in the recombinant cell. The cooperative action of the novel  $\alpha$ -amylase and the maltotigosyltrehalose synthase from *Sulfolobus shibatae* was investigated and trehalose was detected by using HPLC analysis when using amylose and partial starch hydrolysates as substrates.

**Key words** : Novel  $\alpha$ -amylase , Gene cloning and expression , *Sulfolobus shibatae* , *E. coli*

\* This work was supported by Grand from State Key Laboratory of Microbial Resource ( 981024 ) and Beijing Science Foundation ( 5982010 ).

致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了适应改革开放的需要,使科研成果尽快得到交流,本刊自2000年40卷第1期开始扩版,双月刊,每册112面。全部道林纸印刷,内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。内容丰富翔实,能及时反映我国微生物学科前沿和最新研究水平。

欢迎投稿!欢迎订阅!欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部