

枯草芽孢杆菌寡聚-1,6-葡萄糖苷酶基因的 克隆及其在大肠杆菌中的表达*

蒋思婧 马立新**

(湖北大学生命科学院分子微生物与基因工程研究室 武汉 430062)

摘 要 本研究用鸟枪法构建了枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) HB002 的基因组文库,经平板法筛选得到了六株能水解合成底物对-硝基苯- α -D-葡萄糖吡喃糖苷的阳性克隆,经鉴定均含克隆了寡聚-1,6-葡萄糖苷酶基因的重组质粒(命名为 pHBM001 ~ pHBM006)。选择 pHBM003,对其插入片段测序分析,此片段内有一编码 561 个氨基酸的开放阅读框,该蛋白质的计算分子量为 65.985kD。HB002 的寡聚-1,6-葡萄糖苷酶的氨基酸序列与 *Bacillus* sp. 和凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*) 的寡聚-1,6-葡萄糖苷酶的氨基酸序列一致性分别为 81%、67%,相似性分别为 89%、79%。从 pHBM003 中扩增出寡聚-1,6-葡萄糖苷酶基因,克隆到 pBV220 上,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α ,得到三个能水解对-硝基苯- α -D-葡萄糖吡喃糖苷的阳性克隆 HBM003-1 ~ HBM003-3,将此三个菌株热诱导表达,SDS-PAGE 电泳可检测到特异表达的蛋白质,其中 HBM003-1、HBM003-2 表达的蛋白约 66kD,为完整的寡聚-1,6-葡萄糖苷酶,而 HBM003-3 表达的蛋白质偏小,表达的蛋白质均有寡聚-1,6-葡萄糖苷酶活性。

关键词 枯草芽孢杆菌,寡聚-1,6-葡萄糖苷酶,鸟枪法克隆,基因表达

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2002)02-0145-08

寡聚-1,6-葡萄糖苷酶(糊精-6- α -D-葡萄糖水解酶) [EC3.2.1.10] 是从多糖的非还原端水解 α -1,6-糖苷键的外切酶,且能水解合成底物对-硝基苯- α -D-葡萄糖吡喃糖苷。Suzuki 等人系统研究了适宜不同生长温度的五种芽孢杆菌(*Bacillus cereus* ATCC 7064, 10 $^{\circ}$ C ~ 40 $^{\circ}$ C; *Bacillus coagulans* ATCC 7050, 30 $^{\circ}$ C ~ 55 $^{\circ}$ C; *Bacillus thermoamyloliquefaveius* KP 1071, 30 $^{\circ}$ C ~ 66 $^{\circ}$ C; *Bacillus thermoglucosidasius* KP 1006, 42 $^{\circ}$ C ~ 69 $^{\circ}$ C; and *Bacillus flavocaldarius* KP 1228, 51 $^{\circ}$ C ~ 82 $^{\circ}$ C) 的寡聚-1,6-葡萄糖苷酶^[1-8]的酶学性质、氨基酸组成和蛋白质结构后,提出了脯氨酸法则,即增加脯氨酸出现在 β -折叠中的频率和在疏水氨基酸中的比例会增强蛋白质的热稳定性。随后一系列利用定点诱变进行脯氨酸替换提高酶的热稳定性的报道^[6,7,8]都支持了脯氨酸法则,但脯氨酸法则是否具有普适性尚需更多的实验依据。

枯草芽孢杆菌是芽孢杆菌属的模式菌,迄今为止尚未见有关枯草芽孢杆菌的寡聚-1,6-葡萄糖苷酶的任何报道,因此,本研究克隆了枯草芽孢杆菌的寡聚-1,6-葡萄糖苷酶基因并在大肠杆菌中进行了表达。

* 本研究受国家自然科学基金资助(39900003)

** 通讯作者

作者简介 蒋思婧(1968 -)女,湖北省天门市人,湖北大学生命科学院讲师,硕士,主要从事基因工程和酶工程的研究。

收稿日期 2001-06-13, 修回日期 2001-10-15

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 见表 1。

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

Strain/Plasmid	Characteristics	Source
<i>E. coli</i> DH 5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gryA966</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Store in this lab.
<i>Bacillus subtilis</i> HB002		Store in this lab.
Plasmid pBluescript KS(+)	Amp ^r clone vector	Store in this lab.
Plasmid pBV220	Amp ^r expression vector.	Store in this lab.
Plasmid pHBM001 ~ pHBM006	Fragments containing oligo-1.6-glucosidase gene cloned in pBlue-	This work
Plasmid pHBM003-1 ~ pHBM003-3	script KS(+) Fragments containing oligo-1.6-glucosidase gene cloned in pBV220	This work

1.1.2 培养基 :大肠杆菌培养基 LB、SOB 见文献 [10] ;枯草芽孢杆菌培养基 :可溶性淀粉 2% ,蛋白胨 2% ,酵母抽提物 0.2% ,K₂HPO₄0.3% ,KH₂PO₄0.1%。

1.1.3 酶和试剂 :限制性内切酶、Klenow 大片段、T4 连接酶、*Taq* 酶、溶菌酶分别购自华美、Promega、TaKaRa 公司 ,X-gal、IPTG、4 种 dNTP 购自 TaKaRa 公司 ,Triton-X-100、对-硝基苯- α -D-葡萄糖吡喃糖苷购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒的分离和纯化 按文献 [10] 用碱法提取 ,PEG 纯化。

1.2.2 染色体 DNA 的分离 :1.5mL 细菌培养物 12000r/min 离心 2min ,去上清 ,沉淀用 200 μ L 裂解液(40mmol/L Tris-Ac ,pH7.8、20mmol/L NaAc、1mmol/L EDTA \ , 1% SDS)悬液 ;剧烈震荡破碎细胞 ,加 200 μ L 5mol/L NaCl 混和均匀 ,12000r/min 离心 10min ,将上清转移至另一无菌 eppendorf 管中 ,加入等体积氯仿 ,轻柔颠倒混和 ,直至形成奶状悬浊液 ;12000r/min 离心 3min ,将上层水相移至另一 eppendorf 管中 ,用二倍体积无水乙醇沉淀 15min ;离心 ,去上清 ,用 70% 乙醇洗涤沉淀 ,再离心 ,去上清 ,真空干燥沉淀 ,然后溶于 50 μ L TE 中。

1.2.3 DNA 的酶切 ,片段回收 ,半补平 ,连接和转化 :质粒或染色体 DNA 的酶切按公司说明书进行 ,DNA 片段用 Clontech 公司的 AdvantageTM PCR-pure Kit 或 Gel-extract Kit 回收 ,半补平 ,连接 ,转化均按文献 [10] 进行。

1.2.4 枯草芽孢杆菌基因组文库的构建 :枯草芽孢杆菌 HB002 染色体 DNA 用 *Sau3A*I 部分酶切 ,回收 2 ~ 6kb 间的片段 ,加 ATP 和 dGTP ,用 Klenow 大片段部分补平 ,与经 *Sal*I 酶切 ,加 dTTP 和 dCTP ,用 Klenow 大片段部分补平的载体 pBluescript KS(+)连接 ,转化大肠杆菌 DH5 α 。

1.2.5 含枯草芽孢杆菌寡聚-1.6-葡萄糖苷酶基因的克隆的筛选 按文献 [11] 方法进行。

1.2.6 DNA 序列测定 :

测序引物 PrimerT3 5 'AATTAAACCCTCACTAAAGGG3 ' ,

PrimerT7 5 'TAATACGACTCACTATAGGG3 ' ,

PrimerP1 5 'AAAGACCTGCGGATCATTC3 ' ,

PrimerP2 5 'GGAGAACGCCTAATGACIGAG3 ' ,

PrimerP3 5' TAAATTGGGAAAACGAAGCC3'
 PrimerP11 5' TTGGCGAGTTTTGTCTCTGA3'
 PrimerP22 5' CGTTTATGGGCTTCATCAAT3'
 PrimerP33 5' GCCGTTTATTACCAGGGAG3'

重组质粒 pHBM003、pHBM003-3 分别由 TaKaRa 公司(大连)、上海博亚公司用 377 全自动测序仪,采用 Sanger 的链末端双脱氧终止法对 DNA 双链进行引物步行测序。

1.2.7 DNA 和蛋白质序列分析:用 BLASTN 软件通过 Internet 进行分析,本文报道的序列已被 GenBank 收录,登记号为 AY008307。

1.2.8 PCR 扩增:按文献[10]进行,用 PE2400 型扩增仪扩增。

扩增引物 PrimerP1、PrimerP2、PrimerP3、PrimerP11 同上,

Primer0078 5' ACGGAATTCGCCTAATGAGTGAATGGTGG 3'

Primer0079 5' ACCGTCGACAGGGATATTGATTTGTCTCGC 3'

扩增条件:94℃ 5min 94℃ 30s 55℃ 45s 72℃ 2min 35 个循环,72℃ 7min。

1.2.9 表达载体的构建及诱导表达:利用引物 Primer0078、Primer0079,以重组质粒 pHBM003 为模板扩增,所得产物用 *Sal*I 和 *Eco*RI 双酶切后克隆到表达载体 pBV220 上,转化大肠杆菌 DH5 α 。经酶切鉴定为克隆了寡聚-1 β -葡萄糖苷酶基因的重组子接入含氨苄青霉素(终浓度为 100 μ g/mL)的 LB 培养液中,30℃ 培养过夜,然后按 1:100 比例放大培养至 $OD_{600} = 0.6$ 42℃ 诱导 6h,收集菌体,进行 SDS-PAGE 电泳或测酶活力。

1.2.10 SDS-PAGE:参照 BIO-RAO 实验手册进行。

1.2.11 酶活测定:按文献[1]进行,菌体悬浮于 33mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.8)中,用超声波破碎,即制得粗酶液。酶反应体系(1.0mL):0.9mL 2mmol/L 对-硝基苯- α -D-葡萄糖吡喃糖苷溶液(用 33mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.8)配制)加 0.1mL 粗酶液,60℃ 反应;一个酶活单位定义为:在上述条件下,1min 水解 1 μ mol 对-硝基苯- α -D-葡萄糖吡喃糖苷所需的酶量。

2 结果

2.1 寡聚-1 β -葡萄糖苷酶基因的克隆

本研究从构建的枯草芽孢杆菌基因组文库中得到了 4220 个重组子,按方法所述筛选到六个能水解对-硝基苯- α -D-葡萄糖吡喃糖苷的阳性克隆(命名为 HBM001 ~ HBM006),从中抽出质粒(相应命名为 pHBM001 ~ pHBM006)。用限制性内切酶 *Kpn*I 酶切,琼脂糖凝胶电泳分析表明这六个质粒均比 pBluescript KS(+)大(图 1);用 *Kpn*I 和 *Sma*I 双酶切,电泳检测显示插入的片段在 2 ~ 4.5kb 之间(图 2)。这六个重组子,以 HBM003 水解合成底物对-硝基苯- α -D-葡萄糖吡喃糖苷的反应最迅速,且菌落周围出现最大黄色水解圈,因此选择了 HBM003 菌株,对其重组质粒 pHBM003 的插入片段进行了测序分析。

测序结果显示整个插入片段长为 2501bp(图 3),其中有一个 1683bp 的开放阅读框,编码一个 561 个氨基酸残基组成的蛋白质,其计算分子量为 65.989kD,SD 序列为 AAG-GAGAACG,跟芽孢杆菌的 SD 一致序列十分相似。

以测序的三对引物 P1 和 P2、P1 和 P3、P11 和 P2 分别作为 PCR 扩增引物,以质粒 pHBM003 DNA 为模板进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物大小分别为 1.4kb、

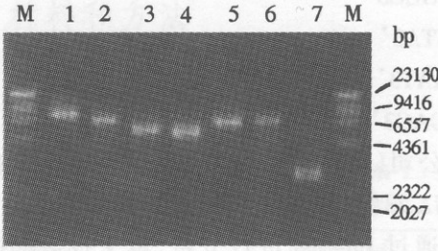


图1 重组质粒 *Kpn*I 单酶切电泳图

Fig.1 *Kpn*I digestion of recombinant plasmids pHBM001 ~ pHBM006, plasmid pBluescript KS(+) M. λ DNA/*Hind* III; 1. pHBM001; 2. pHBM002; 3. pHBM003; 4. pHBM004; 5. pHBM005; 6. pHBM006; 7. pBluescript KS(+)

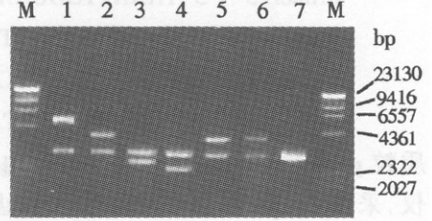


图2 重组质粒 *Kpn*I 和 *Sma*I 双酶切电泳图

Fig.2 *Kpn*I and *Sma*I digestion of recombinant plasmids pHBM001 ~ pHBM006. M. λ DNA/*Hind* III; 1 ~ 6. Represent pHBM001, pHBM002, pHBM003, pHBM004, pHBM005, pHBM006, respectively; 7. pBluescript KS(+)/*Kpn*I.

TCCAGCGGAACGGCCTCTTTACCAGAATTGGTCATGGGACAAGAATTCCTCCGCTCCAATTTTATTAAGCAGGCAGATGTTCC 80
 TCCAAGGCATTATCTTTTTAATGACCGTTTTACAATGGAAGAAAAACGGCGAAATTTTGAATTTTATGACCGGATGACT 160
 GTTCAATCAAGCCTATCCGCCCTCTGTCCATCGGATTCCTCGCAGCCGAACTCAAGCTGGAAAAGAAAGCGCTCGAAT 240
 ATATAAGCGCACAGCAAGGCTTGATCTGTGATAATTACAATCATGATGATGACGAAAGGCTTGCATATTACTTCAATGACGG 320
 GTAGCTGGCTGGCAATCGTTCATGGCTTTGCAGGCATGCCACCGCGAATGAGACGCTGTCAATTTGCTCCGTTTTTGCCA 400
 AAAGAATGGGACGAATATTCATCAACATCAATATCGAAAACCGATTAATCAATGTGACGGTTGACGAAAAGCGCGTTAT 480
 TTTGAGCTTGTAAAAGCGGAGCCGCTGCACATGAACGTTTATGACGAACCGGTTGCTCTACAGGGACATGTGAAAGGA 560
 GAACCGCTAATGAGTGAATGGTGGAAAAGCTGCTGTTTTATCAAAATTTACCCGCGCAGTTTTTATGATGCCAATGGAGA 640
 SD M S E W W K E A V V Y Q I Y P R S F Y D A N G D 720
 TGGATTCCGGGATTTGCAAGGTGTGATTCAAAAGCTGGATTACATCAAAAATCTCGGGCGGATGTCATCTGGCTGCC 720
 G F G D L Q G V I Q K L D Y I K N L G A D V I W L S 800
 CGGTATTTGATTTCCCGCAGGATGACAACGGATATGATATCAGCGATTACAAAACATGTACGAAAAGTTGGGACAAA 800
 P V F D S P Q D D N G Y D I S D Y K N M Y E K F G T N 880
 GAAGATATGTTTACGCTGATGATGAAGCCATAAACCGGGAATGAAAATCGTCATGCATTTGGTCGTGAACCCACATC 880
 E D M F Q L I D E A H K R G M K I V M H L V V N H T S 960
 AGATAGCATGCTGGTTTGTCTGAAAAGCCGCAAGTCGAAGGACAATCCTTACCGGGATTTATTTTGGAAAAGATCCTA 960
 D E H A W F A E S R K S K D N P Y R D Y Y F W K D P 1040
 AATCCGACCGCTCAGAGCCGAATAATTTGGGATCGATCTTTTCCAGCTCAGCGTGGACATACGATGAAGGAACAGGGCAG 1040
 K S D G S E P N N W G S I F S G S A W T Y D E G T G Q 1120
 TATTATTTGCACTACTTTTGGAAAACAGCGCTGATTTAAATTTGGGAAAAGCAAGCGGTTCCGCGGGAAGTTTATGATGT 1120
 Y Y L H Y F S K K Q P D L N W E N E A V R R E V Y D V 1200
 AATGAGATTTCTGGATAGAGCGGTTGACGGCTGGCGGATGGATGATTAATCCGCTTATTTCTAATAACACCGATTTC 1200
 M R F W M D R G V D G W R M D V I G S I S K Y T D F 1280
 CGGACTACGAAACGGATCACAGCCCGACCTATATTTGTTGGCGTTATCACTTAACGGCCACGCTTTCATGATTTTAT 1280
 P D Y E T D H S R S Y I V G R Y H S N G P R L H D F I 1360
 CAAGAGATGAACAGGGAAGTGCTTTCTCATTACGACTGCATGACAGTGGAGAGGCAACCGGCTCTGATATTGAAGAGGC 1360
 Q E M N R E V L S H Y D C M T V G E A N G S D I E E A 1440
 GAAAAAGTACACAGATGCAAGCAGGCAAGAGCTGAAATATGATCTTTACATTTGAACATATGGAATTTGACAGAACAA 1440
 K K Y T D A S R Q E L N M I F T F E H M D I D T E Q 1520
 ACTCCGCAAAATGGAAATGGCAGATCAAGCCGTTTGATTTGATTTGCTTTAAAAAGACGATGACAAGGTCGGCAGACCGG 1520
 N S P N G K W Q I K P F D L I A L K K T M T R W Q T G 1600
 TTAATGAATGTCGGCTGGAATACCCGTGATTTTGAACCATGACCAGCCGAGGTTATTTCCGCGTGGGGCAATGATGG 1600
 L M N V G W N T L Y F E N H D Q P R V I S R W G N D G 1680
 GAAGCTCGTAAAGATGTGCAAGGCATTTGCAACGGATCTGGACCGCATGAAAGGAACCGCGTTATTTACCAGCGAG 1680
 K L R K E C A K A F A T D L D G M K G T P F I Y Q G 1760
 AAGAAATCGGCATGGTCAACCCGATATGCCGCTGGAGATGATGATGATGAAATAAAGAATGCATATCGTGAACACTA 1760
 E E I G M V N R D M P L E M Y D D L E I K N A Y R E L 1840
 GTCGTCGAAAACAAACGATGTCAGAAAAGAGTTTGTCAAAGCGGTGATGATAAAGGAAGGGATCATCGAGAACACC 1840
 V Y E N K T M S E K E F V K A V M I K G R D H A R T P 1920
 GATGCAGTGGGATCCCGGAAAACATGCGGGATTGACAGCCGGAGACCCGTTGATACCCGTTAAATTTCCCGCTATCAAGATA 1920
 M Q W D A G K H A G L T A G D P W I P V N S R Y Q D 2000
 TCAATGTGAAAGACTCTTTGGAAGATCAAGATTCCGATTTCTTTTACTACTCAGAAGCTCATCAATACGAAAGCAATAT 2000
 I N V K E S L E D Q D S I F F Y Y Q K L I Q L R K Q Y 2080
 AAGTATGATATATGGCGATTATCAGTGTGTCAGGAGAATGATCCGCGGCTTTTCTTACCTTCGAGAATATCGAGG 2080
 K I M I Y G D Y Q L L Q E N D P Q V F S Y L R E Y R G

```

GGAAAAGCTTCTTGTGCGTTGIGAATTTATCGGAAGAAAAGGCTCTGTTGGAAGCGCCTCCAGAACTGATTCATGAGCGTT 2160
E K L L V V V N L S E E K A L F E A P P E L I H E R
GGAAAGTGCCTGATTTCAAACCTATCCGCAGGAGCGGGCTGACTTAAAGAGTATTAGCCTCAAACCTTATGAAGCAGTGTG 2240
W K V L I S N Y P Q E R A D L K S I S L K P Y E A V M
GGCATTAGTATATGAAAGCGGTCATTTTGTATTAGACGGAGTGATAACAGATACTGCTGAATATCATTTTCTCGCTTGG 2320
G I S I
AAGCACATCGCAGAACAAATCAATATCCCTTTTGACAGAGACATGAATGAAAGGCTAAAAGGAATCAGCAGAGAAGAGTC 2400
ACTTGAAGCATATTGATCTTTGGCGGTGCGGAAACAAAGTATACAAATGCGGAGAACCAAGAGCTTATGCATCGGAAAA 2480
ATCGCGATTATCAAATGCTGA 2501
    
```

图3 pHBM003的插入片段的核苷酸序列(此片段内有一个1683bp的开放阅读框,SD序列用下划线表示)

Fig.3 The nucleotide sequence of 2.5kb DNA insert of HBM003

Which consists of an open reading frame of 1683bp. The putative Shine-Dalgarno(SD) ribosome binding sequence is underlined.

0.9kb,0.8kb,这与以 HB002 的染色体 DNA 为模板,同样的三对引物进行 PCR 扩增得到的三种扩增产物的大小是一致的(图4)。这说明质粒 pHBM003 上插入的片段的确来自枯草芽孢杆菌 HB002。

以 P1 和 P2 为引物,分别用六个重组质粒 pHBM001 ~ pHBM006 为模板,进行 PCR 扩增,均扩增出一条大小相同的 DNA 带(约 1.4kb)(图5)。据此可断定这六个阳性克隆均含有来自 HB002 的寡聚-1,6-葡萄糖苷酶基因。

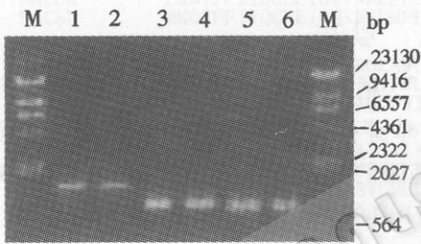


图4 PCR 扩增 HB002 和 pHBM003 的产物电泳图

Fig.4 Electrophoretic analysis of PCR products of HB002 chromosomal DNA and pHBM003 plasmid DNA

1,2. PCR products of HB002 chromosomal DNA、pHBM003 plasmid DNA respectively amplified by using P1&P2 as primer pairs; 3,4. PCR products of HB002 chromosomal DNA、pHBM003 plasmid DNA respectively amplified by using P1&P3 as primer pairs; 5,6. PCR products of HB002 chromosomal DNA、pHBM003 plasmid DNA respectively amplified by using P11&P2 as primer pairs; M. λ DNA/*Hind* III.

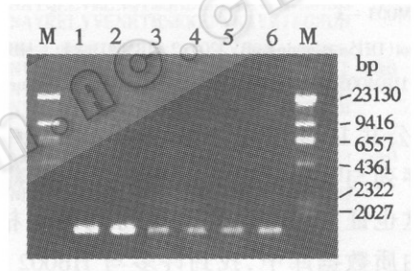


图5 PCR 扩增 pHBM001 ~ pHBM006 的产物电泳图

Fig.5 Electrophoretic analysis of PCR products of pHBM001 ~ pHBM006 plasmids DNA

M. λ DNA/*Hind* III, 1 ~ 6. PCR products of pHBM001 ~ pHBM006 plasmids DNA respectively amplified by using P1, P2 as primer pairs.

2.2 寡聚-1,6-葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达

根据寡聚-1,6-葡萄糖苷酶基因序列,在开放阅读框的5'和3'端设计了一对引物 Primer 0078、Primer 0079(5'端和3'端分别引进了 *Eco*RI 和 *Sal*I 酶切位点),以 HBM003 为模板进行 PCR 扩增,得到的寡聚-1,6-葡萄糖苷酶基因片段经 *Eco*RI 和 *Sal*I 双酶切,克隆在表达载体 pBV220 上,转化大肠杆菌 DH5 α 。随机挑选几个转化子,按方法所述筛选,得到了三个能水解对-硝基苯- α -D-葡萄糖吡喃糖苷的阳性克隆(分别命名为 HBM003-1 ~ HBM003-3),其中 HBM003-1, HBM003-2 水解能力较强, HBM003-3 较弱;从中提取质

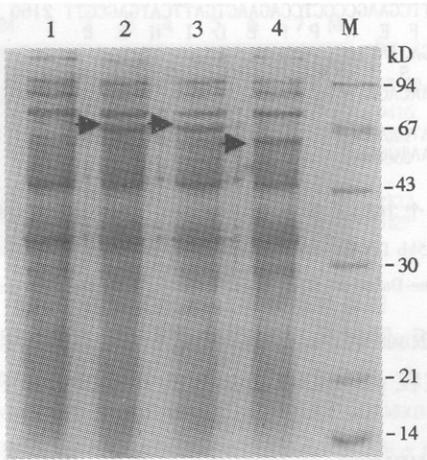


图6 HBM003-1~HBM003-3蛋白粗提物的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of protein extract from HBM003-1~HBM003-3

1. Control (DH5 α contains pBV220); 2. HBM003-1; 3. HBM003-2; 4. HBM003-3; M. Protein molecular weight marker.

粒(相应命名为 pHBM003-1~pHBM003-3),经酶切鉴定,确定为克隆了寡聚-1,6-葡萄糖苷酶基因的重组质粒。将 HBM003-1~HBM003-3 按方法所述诱导培养,进行 SDS-PAGE 电泳,与含空载体 pBV220 的菌株比较, HBM003-1 和 HBM003-2 特异表达的蛋白质的分子量约 66kD,与寡聚-1,6-葡萄糖苷酶的计算分子量是一致的,而 HBM003-3 特异表达的蛋白质比 66kD 小,分子量约 55kD(图 6)。

2.3 寡聚-1,6-葡萄糖苷酶的酶活测定

按材料和方法所述,测得 HBM003-1~HBM003-3 寡聚-1,6-葡萄糖苷酶活性分别为 0.24U/mL,0.28U/mL,0.16U/mL。

3 讨论

枯草芽孢杆菌的基因组全序列已发表,

在公共 DNA 序列数据库(GenBank)中,发现枯草芽孢杆菌基因组中一假定蛋白质的核苷酸序列与我们已克隆的寡聚-1,6-葡萄糖苷酶基因的核苷酸同源性高达 98%(资料未显示);这也证实了本研究克隆得到的是枯草芽孢杆菌的寡聚-1,6-葡萄糖苷酶基因。在公共蛋白质数据库中,找到许多与 HBM003 寡聚-1,6-葡萄糖苷酶相似的蛋白质,同源性比较后发现,枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* HBM003 与 *Bacillus* sp.、*Bacillus coagulans* 的寡聚-1,6-葡萄糖苷酶的氨基酸序列的一致性分别为 81% 和 67%,相似性为 89% 和 79%(图 7),其中有 14 个脯氨酸在这三种不同来源的寡聚-1,6-葡萄糖苷酶中都出现在相同的位置。

利用表达质粒 pBV220 在大肠杆菌中表达寡聚-1,6-葡萄糖苷酶基因,SDS-PAGE 电泳检测,HBM003-1,HBM003-2 均表达了完整的寡聚-1,6-葡萄糖苷酶,而 HBM003-3 表达的蛋白质变小了,约少了 100 个氨基酸残基,但它仍有部分寡聚-1,6-葡萄糖苷酶活性。将质粒 pHBM003-3 的插入片段进行测序分析(结果未显示),根据其核苷酸序列推导出寡聚-1,6-葡萄糖苷酶的氨基酸序列,并与出发菌 HBM003 的寡聚-1,6-葡萄糖苷酶的氨基酸序列进行比较,结果显示,来源于 HBM003-3 寡聚-1,6-葡萄糖苷酶有 8 个位点的氨基酸被替换(第 97 位的 H 被 D 替换、第 179 位的 R 被 W 替换、第 235 位的 D 被 E 替换、第 357 位的 D 被 V 替换、第 359 位的 D 被 H 替换、第 378 位的 R 被 S 替换、第 435 位的 L 被 F 替换和第 453 位的 V 被 A 替换),我们推测某些位点氨基酸的替换使寡聚-1,6-葡萄糖苷酶产生了蛋白酶敏感位点,表达的寡聚-1,6-葡萄糖苷酶被细胞内的蛋白酶酶切,丢失一段约 100 个氨基酸的多肽,并且丧失了一部分酶活性。

目前,本室正在对枯草芽孢杆菌寡聚-1,6-葡萄糖苷酶进行定向进化,筛选热稳定性增强了的突变体,分析其氨基酸组成和蛋白质三维结构,以期得到更多的有关蛋白质结构、组成和性质关系的信息,从而为证实脯氨酸法则是否具有普遍性提供更多的证据。

ratory, 1989.

[11] Nicholas F P, Robertl A. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 1: 208 ~ 209.

Cloning and Expression in *Escherichia coli* of Oligo-1 β -glucosidase Gene from *Bacillus subtilis* HB002*

Jiang Sijing Ma Lixin

(College of Life science, Hubei University, Wuhan 420062, China)

Abstract : The gene coding for oligo-1 β -glucosidase of *Bacillus subtilis* HB002 was cloned by the shotgun-cloning method and sequenced by the chain-termination method of Sanger et al. It consists of an open reading frame of 1683 bp. The amino acid sequence of oligo-1 β -glucosidase deduced from its nucleotide sequence predicts a protein of 561 amino acid residues with a Mr of 65.985kD, which is 81% and 67% identical to those of oligo-1 β -glucosidase from *Bacillus* sp. and *Bacillus coagulans*, respectively, 89% and 79% similar to those of oligo-1 β -glucosidase from *Bacillus* sp. and *Bacillus coagulans*, respectively. The oligo-1 β -glucosidase gene of *Bacillus subtilis* HB002 was cloned into *Escherichia coli* expression plasmid pBV220, the result of SDS-PAGE showed that the oligo-1 β -glucosidase gene had been expressed in *Escherichia coli* DH5 α , the expressed oligo-1 β -glucosidase has enzymatic activity.

Key words : *Bacillus subtilis*, Oligo-1 β -glucosidase, Gene cloning, Gene expression

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39900003)

《微生物学报》第七届编辑委员会名单

顾 问	张树政								
主 编	李季伦								
副主编	陆德如	朱关福	李阜棣	王敖全	谭华荣				
编 委	王修垣	邓子新	田 波	刘志恒	朱庆裴	孙志浩	李焕菱		
	陈世平	陈永青	杨苏声	周培瑾	范云六	范孝用	钱新民		
	钱世钧	诸葛健	徐怀恕	翟中和					