

# 地衣芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因的克隆和及其启动子功能鉴定

牛丹丹, 徐 敏, 马骏双, 王正祥\*

(江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

**摘 要** 根据已知  $\alpha$ -淀粉酶编码基因保守区核苷酸序列, 通过 PCR 和反向 PCR 技术克隆出 *Bacillus licheniformis* CICIM B0204  $\alpha$ -淀粉酶编码基因 *amyL* 全长序列及其上下游序列。 *B. licheniformis* CICIM B0204 *amyL* 由 1539bp 组成, 其上游 180bp 为启动子序列, 下游 160bp 为终止子序列, 成熟肽由 512 个氨基酸残基组成, 氨基端的 29 个氨基酸残基为  $\alpha$ -淀粉酶的信号肽。通过基因及其氨基酸序列比对发现, *amyL* 及其编码产物与芽孢杆菌来源的  $\alpha$ -淀粉酶具有高度相似性。将 *amyL* 的结构基因在  $P_{T7}$  介导下于大肠杆菌中诱导表达, 获得具有  $\alpha$ -淀粉酶活性的表达产物。将 *amyL* 的启动子序列和信号肽序列与 *B. licheniformis* CICIM B2004 的  $\beta$ -甘露聚糖酶结构基因进行读框内重组, 在大肠杆菌中获得了  $\beta$ -甘露聚糖酶的分泌表达, 重组大肠杆菌表达 295U/mL 的  $\beta$ -甘露聚糖酶酶活。

**关键词**: 地衣芽孢杆菌;  $\alpha$ -淀粉酶;  $\beta$ -甘露聚糖酶; 基因克隆; 启动子; 信号肽

**中图分类号**: Q78 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2006)04-0576-05

$\alpha$ -淀粉酶 (EC 3.2.1.1), 即  $\alpha$ -1, 4-葡聚糖-4-葡聚糖水解脱 (  $\alpha$ -1, 4-glucan-4-glucanohydrolase ), 从分子内部切开  $\alpha$ -1, 4-糖苷键, 使淀粉分子量迅速降低, 降解为水溶性的糊精、麦芽糖和葡萄糖。产物的末端葡萄糖残基  $C_1$  碳原子为  $\alpha$ -构型。

目前, 工业生产中都是以微生物发酵法大规模生产  $\alpha$ -淀粉酶。 $\alpha$ -淀粉酶工业生产菌株包括: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*)、凝乳芽孢杆菌 (*B. coagulans*)、淀粉液化芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、嗜碱芽孢杆菌 (*B. alkalophilic*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、黑曲霉 (*A. niger*) 和拟内孢霉 (*Endomy copsisfimbriiger*) 等<sup>[1~3]</sup>。枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (BSA)、地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (BLA)、嗜热脂肪芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (BStA)、解淀粉芽孢杆菌 (BAA) 等均属于糖基水解酶家族 13。通过氨基酸序列比对发现,  $\alpha$ -淀粉酶至少含有 4 个保守区<sup>[4]</sup>, 这些为通过定点突变等技术改造  $\alpha$ -淀粉酶提供了基础。1995 年前后, BLA、BSA 和 BStA 经过 X 光衍射获得了晶体结构图, 结果显示, 这些淀粉酶虽然与糖基水解酶家族 13 的其他成员在酶学性质上有很大差异, 但结构基本相似<sup>[4]</sup>。

基于对我国 BLA 生产菌种的耐高温  $\alpha$ -淀粉酶编码基因及其转录特征的了解, 同时为分子改造 BLA 以及为具有优良性质的异源  $\alpha$ -淀粉酶基因高效表达提供分子表达元件, 本研究报道从我国 BLA 生

产菌株 *B. licheniformis* CICIM B0204 中克隆和功能鉴定 BLA 编码基因及其上下游 DNA 序列。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒**: 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) CICIM B0204 为我国 BLA 工业生产菌株, 由江南大学工业微生物资源和信息中心 (<http://cicim-cu.sytu.edu.cn>) 提供。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) XL-1、*E. coli* JM109 和表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 为本室保藏。载体 pGEM-T Easy 购自 Promega 公司。载体 pET28a 购自 Invitrogen 公司。重组质粒 pT-*amyL'*、pET28a-*amyL*<sub>NEW</sub> 和 pBL-*man* 及重组菌 XL-1 (pT-*amyL'*)、DE3 (pET28a-*amyL*<sub>NEW</sub>) 和 DE3 (pBL-*man*) 为本研究中构建。

**1.1.2 酶和试剂**: 牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP)、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶和蛋白质分子量标准均为晶美生物工程有限公司产品; *Pfu* DNA 多聚酶、*Taq* DNA 多聚酶、卡那霉素、氨苄青霉素购于上海 Sangon 公司; PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒为上海华瞬生物技术有限公司产品; *Ex Taq* DNA 多聚酶、X-gal 和 IPTG 为 TaKaRa (大连) 公司产品。引物由上海 Sangon 公司合成。其他试剂药品皆为国产或进口的分析纯和生化试剂。

### 1.2 培养基和培养条件

大肠杆菌的培养采用 LB 培养基 (每升含有 10g

基金项目: 新世纪优秀人才支持计划 (NCET-04-0497)、国家 863 计划 (2003AA241160)

\* 通讯作者。Tel: 86-510-5879781; E-mail: zwxwang@sytu.edu.cn

作者简介: 牛丹丹 (1980-), 女, 河南周口人, 博士研究生, 研究方向为工业微生物学和分子育种学。

收稿日期: 2005-10-08; 接受日期: 2005-12-12; 修回日期: 2006-03-04

胰蛋白胨、5g 酵母浸提物、5g NaCl),添加 1.5% 琼脂即为 LB 固体培养基。必要时补加终浓度为25 $\mu$ g/mL 的卡那霉素(Kan)或终浓度为 60 $\mu$ g/mL 的氨苄青霉素(Amp)。培养在 37℃ 进行。

大肠杆菌转化用培养基包括 :大肠杆菌生长培养基为每升含有 10g 胰蛋白胨、5g 酵母浸提物、5g NaCl 和 0.5mol/L 葡萄糖 ,大肠杆菌复苏培养基为每升含有 10g 胰蛋白胨、5g 酵母浸提物、5g NaCl 和 0.1mol/L 蔗糖。蓝白鉴定时另加入 40 $\mu$ g/mL X-gal 和 48 $\mu$ g/mL IPTG。

**1.3 *B. licheniformis* CICIM B0204 染色体 DNA 的提取**  
地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis* CICIM B0204 染色体 DNA 提取方法按文献 [5] 进行。

**1.4 DNA 操作技术**

DNA 片段胶回收、PCR 产物纯化用华舜试剂盒进行。质粒 DNA 提取、DNA 的酶切、连接、转化等参照文献 [5] 进行。DNA 扩增在 0.2mL PCR 薄壁管中进行。PCR 反应条件为 :94℃ 5min ;94℃ 50s ,56℃ 60s ,72℃ 60s ,35 个循环 ,72℃ 10min。

**1.5 *B. licheniformis* CICIM B0204 高温  $\alpha$ -淀粉酶编码基因的克隆**

根据已报道的地衣芽孢杆菌 584  $\alpha$ -淀粉酶(BLA) 枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶(BSA) 嗜热脂肪芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶(BStA) 和淀粉液化芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶(BAA) 基因序列(GenBank 登录号分别为 :X03236、M79444、X59476 和 J01542), 比对这些序列 ,分析表明在结构基因内部存在着相当保守的序列。根据保守序列 ,先设计了一对引物 amyL P1 和 amyL P2 ,用于 PCR 扩增结构基因内部 1.0kb 片段 amyL'。再根据片段 amyL' 的测序结果 ,设计引物 amyP3 和 amyP4 ,反向 PCR 扩增 amyL' 两端的序列。测序得到上下游序列后 ,通过与片段 amyL' 的序列拼接 ,得出全长的淀粉酶基因序列。再根据全长基因序列 ,设计了引物 BL-EP-3(up) 和 BLamy2 ,PCR 扩增淀粉酶结构基因。其中引物 BL-EP-3(up) 与结构基因 5' 端序列互补 ,引物 BLamy2 与终止密码子下游 180bp 以下的序列互补。两个引物的 5' 端都增加了 *Eco*RI 切点。PCR 扩增淀粉酶全长基因时 ,设计合成了引物 BLamy1 和 BLamy6 ,上游引物 BLamy1 与启动子上游序列互补 ,下游引物 BLamy6 与终止子下游 182bp 以下序列互补。由此扩增出的淀粉酶全长基因 amyL 包括了启动子和信号肽序列 ,两个引物的 5' 端都增加了 *Bam*HI 切点。各条引物序列如下 :引物 amyL P1 :5'-GGACGCTGATGCAGTATTTTGAATGG-3' ;引物 amyL P2 :5'-TGTGAGAATAAAAGCGTAAGCAAGCG-3' ;

引物 amyP3 :5'-CCATTCAAAAATACTGCATCAGCGTCC-3' ;引物 amyP4 :5'-CGCTTGCTTACGCTTTTATTCTCAC-3' ;引物 BL-EP-3(up) :5'-CGGAATTCCTTAATGGGACGCTGATGC-3' ;引物 BLamy2 :5'-TAGGAATTCCTACATCAGATAACGTTGCC-3' ;引物 BLamy1 :5'-AATGAATTCATTGCTAACTGTATCTCAGC-3' ;引物 BLamy6 :5'-TAGGGATCCCTACATCAGATAACGTTGCC-3'。

**1.6 酶活测定**

耐高温  $\alpha$ -淀粉酶酶活测定方法参照国家行业标准 QB/T2306-97 进行<sup>[6]</sup>。酶活单位定义为 :在相应条件下 ,1min 液化可溶性淀粉 1mg 成为糊精所需要的酶量 ,即为 1 个酶活力单位 ,以 1U 表示。大肠杆菌菌质蛋白的制备 ,按文献 [7] 进行。 $\beta$ -甘露聚糖酶酶活测定方法按文献 [8] 进行。蛋白质浓度测定 :采用 Bradford 法<sup>[9]</sup> ,以牛血清白蛋白 BSA 作为标准。

**1.7 SDS-PAGE**

采用 5% 浓缩胶、12% 分离胶的不连续垂直板电泳 ,25mA 电泳 4h。考马斯亮蓝 R-250 染色<sup>[10]</sup>。

**1.8 发酵试验**

大肠杆菌的发酵温度为 37℃ ,培养基为 LB ,发酵试验在 250mL 三角瓶中进行 ,培养基装液量为 20mL。

**2 结果**

**2.1 *B. licheniformis* CICIM B0204 高温  $\alpha$ -淀粉酶编码基因的克隆**

以 *B. licheniformis* CICIM B0204 染色体 DNA 为模板 ,amyL P1 和 amyL P2 为引物 ,在 *Taq* DNA 多聚酶的作用下 ,PCR 扩增出 1.0kb 大小的  $\alpha$ -淀粉酶结构基因片段 amyL'。将此 PCR 产物直接连接到 pGEM-T-Easy 载体中 ,酶切验证得到了重组质粒 pT-amyL'。对重组质粒 pT-amyL' 上的 amyL' 片段进行序列测定。通过测序和 DNA 比对分析 ,我们确认了此 PCR 扩增片段为 *B. licheniformis* 高温  $\alpha$ -淀粉酶编码基因片段(amyL')。

提取 *B. licheniformis* CICIM B0204 染色体 DNA ,用 *Sau*3AI 进行部分酶切 ,得到 3~5kb 片段。胶回收纯化这些片段后 ,在 T4 DNA 连接酶作用下让其自身环化。以此自身环化片段为模板 ,amyP3 和 amyP4 为引物 ,在 *Ex Taq* DNA 多聚酶作用下进行 PCR 扩增 ,扩增得到了约 3.0kb 的片段 amyX。将此片段克隆入 pGEM-T-Easy 载体上 ,得到了重组质粒 pT-amyX。以 amyP3 和 amyP4 为测序引物 ,对重组质粒 pT-amyX 进行测序和序列拼接 ,得到了 *B.*

*licheniformis* CICIM B0204 高温  $\alpha$ -淀粉酶编码基因的全序列及其上下游序列。再以 BLamy1 和 BLamy6 为引物,以 *B. licheniformis* CICIM B0204 染色体 DNA 为模板,在 *Pfu* DNA 聚合酶的作用下,PCR 扩增出 *B. licheniformis* CICIM B0204 高温  $\alpha$ -淀粉酶全长编码基因 *amyL* 及其上下游序列。所得 PCR 产物送测序公司进行序列测定。由此获得,*B. licheniformis* CICIM B0204 高温  $\alpha$ -淀粉酶的编码基因序列(1539bp)及其上游启动子序列长 180bp 和下游终止子序列为 160bp。与已报道的地衣芽孢杆菌 584  $\alpha$ -淀粉酶编码基因的上游序列比对发现,基因 *amyL* 的启动子-64 碱基发生改变(G $\rightarrow$ C)。所克隆的基因在 GenBank 的登录号为 DQ407266。

2.2 *B. licheniformis* CICIM B0204 高温  $\alpha$ -淀粉酶与其它微生物  $\alpha$ -淀粉酶之间的进化关系

*B. licheniformis* CICIM B0204 和 584 淀粉酶的氨基酸序列比较发现,有 99.4% 的氨基酸是等同的,

其中有 3 个氨基酸残基不同,分别是 163 位的 Arg(584)变成了 Leu(B0204),339 位的 Ser(584)变成了 Gly(B0204)和 349 位的 Ala(584)变成了 Ser(B0204)。

进一步将 *B. licheniformis* CICIM B0204 高温  $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列与其他 17 种细菌的  $\alpha$ -淀粉酶氨基酸序列进行比对,得到了如图 1 所示的遗传进化关系。在芽孢杆菌属中,除了环状芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶与地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶具有很低的相似性(与其同源性只有 8.7%)外,其余芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶都与 *B. licheniformis* CICIM B0204  $\alpha$ -淀粉酶具有较高相似性。其中与 *B. licheniformis* 584  $\alpha$ -淀粉酶有着最高的相似性,同源性为 99.4%;其余依次为解淀粉芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶、炭疽芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶、蜡状芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶、巨大芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶和嗜热芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶,相应的同源性分别为 77.9%、72.5%、71.0%、70.7% 和 62.9%;与大肠杆菌的相似性较低,同源性仅 38.3%。

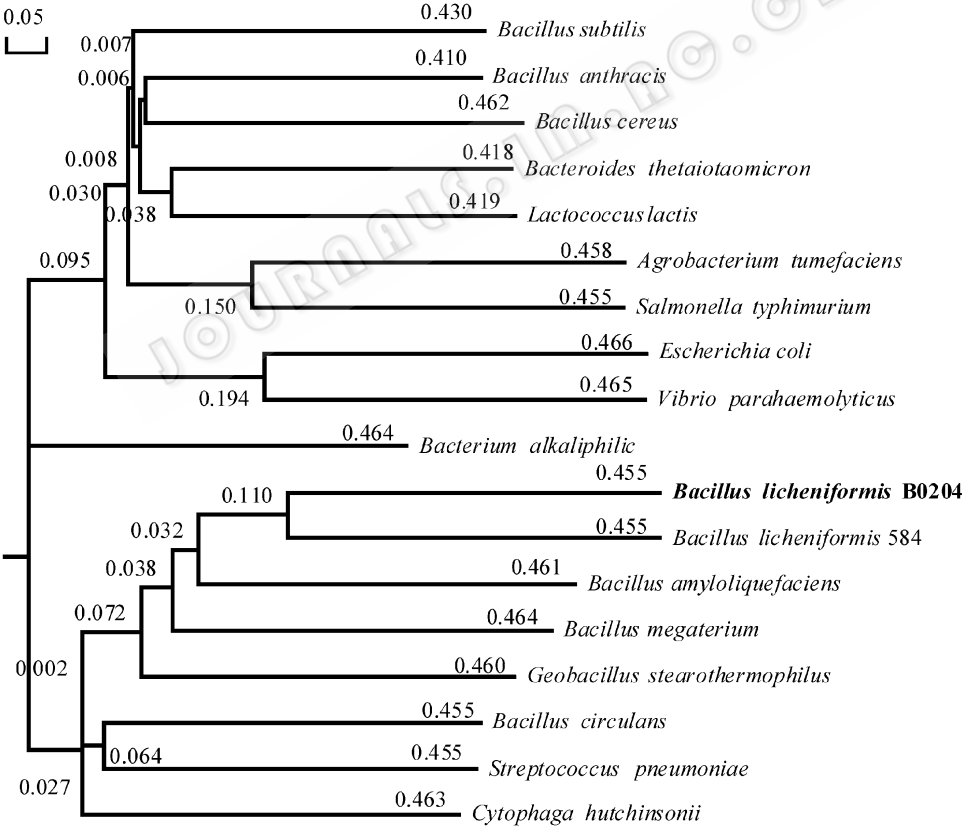


图 1 细菌  $\alpha$ -淀粉酶系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of bacterial  $\alpha$ -amylases.

2.3 *B. licheniformis* CICIM B0204 高温  $\alpha$ -淀粉酶基因在大肠杆菌 *E. coli* 中的表达

为了在大肠杆菌中表达 *B. licheniformis* B0204 高温  $\alpha$ -淀粉酶基因 *amyL*,构建了含 *B. licheniformis*

CICIM B0204 高温  $\alpha$ -淀粉酶结构基因 *amyL*<sub>NEW</sub> 的重质质粒 pET28a-*amyL*<sub>NEW</sub>。构建过程中,先利用引物 BL-EP-3(up)与 BLamy2,以 *B. licheniformis* CICIM B0204 染色体 DNA 为模板,PCR 扩增出了 1.6kb 不

带信号肽序列的 *B. licheniformis* CICIM B0204 耐高温  $\alpha$ -淀粉酶结构基因及其下游终止序列 *amyL*<sub>NEW</sub>。然后用 *Eco*RI 单酶切质粒 pET28a, 用碱性磷酸酶 CIAP 对线性质粒去磷酸化。在 T4 DNA 连接酶作用下, 与同样用 *Eco*RI 单酶切过的 *amyL*<sub>NEW</sub> 连接, 最后转化感受态 *E. coli* BL21( DE3 )。在含有卡那霉素的 LB 平板上筛选阳性转化子。用 *Sal*I 酶切重组质粒, 选择出正向连接的重组质粒 pET28a-*amyL*<sub>NEW</sub>, 高温  $\alpha$ -淀粉酶结构基因 *amyL*<sub>NEW</sub> 在 *P*<sub>T7</sub> 控制下表达。

将含有重组质粒 pET28a-*amyL*<sub>NEW</sub> 的 *E. coli* BL21( DE3 ) 转化子[ DE3( pET28a-*amyL*<sub>NEW</sub> )]用 LB 培养基培养至 *OD*<sub>600</sub> = 0.8 左右, 添加 1mmol/L IPTG 继续培养 6h 后, 离心收集菌体, 以磷酸盐缓冲液( pH 6.0 )洗涤悬浮, 超声波细胞破碎仪破壁, 再进行酶活测定。结果表明, 经 IPTG 诱导的重组转化子的细胞破碎液有高温  $\alpha$ -淀粉酶活性, 其活力为 13.5U/mL 培养液, 而对照细胞的破碎液无高温  $\alpha$ -淀粉酶活性。我们同时也分别测定了培养液中的酶活, 结果表明培养上清液均没有酶活。

细胞用超声波破碎后, 取 20 $\mu$ L 细胞破碎液, 加入 5 $\mu$ L 5 $\times$  样品缓冲液, 于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 6min。低速离心后取 15 $\mu$ L 上样。SDS-PAGE 结果表明( 图 2 ), 经 IPTG 诱导后  $\alpha$ -淀粉酶基因在 *E. coli* BL21( DE3 ) 中得到了较好的表达。在 55kDa 附近出现了明显的蛋白条带, 与理论推导的 BLA 分子量相一致。

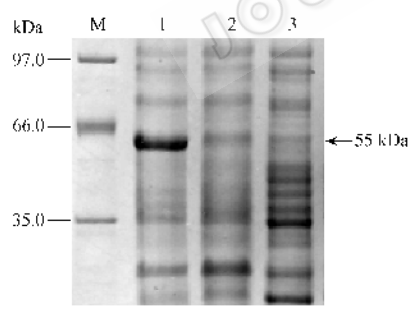


图 2 重组大肠杆菌表达  $\alpha$ -淀粉酶的 SDS-PAGE 分析  
Fig.2 The profile of SDS-PAGE of the recombinant *E. coli* expressed *B. licheniformis* B0204  $\alpha$ -amylase. M. Molecular weight marker ; 1. *E. coli* ( harboring pET28a-*amyL*<sub>NEW</sub> ) induced by IPTG ; 2. *E. coli* ( harboring pET28a-*amyL*<sub>NEW</sub> ) without induction ; 3. *E. coli* ( harboring pET28a ) as a control. Arrow indicated a recombinant  $\alpha$ -amylase with molecular weight of 55kDa.

## 2.4 地衣芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因的启动子和信号肽序列在 *E. coli* 中具有功能

将地衣芽孢杆菌 CICIM B2004  $\beta$ -甘露聚糖酶基因 *man*<sup>\*</sup> 克隆到地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶基因的启动

子 *P*<sub>*amyL*</sub> 和信号肽序列 *S*<sub>*amyL*</sub> 的下游, 在其控制下表达 12h( 图 3 )。离心收集菌体, 细胞破碎后测定酶活。重组菌表达  $\beta$ -甘露聚糖酶的活性为 295U/mL 发酵液。相似地, 分离重组大肠杆菌周质蛋白, 同上测定  $\beta$ -甘露聚糖酶酶活, 重组菌周质中的  $\beta$ -甘露聚糖酶的活性为 205U/mL 发酵液, 约占总表达量的 69.5%。表明地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶的信号肽在大肠杆菌中具有引导蛋白质分泌的能力。

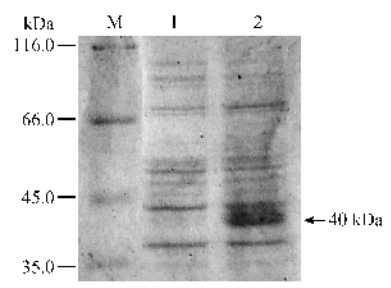


图 3 在 *P*<sub>*amyL*</sub> 和 *S*<sub>*amyL*</sub> 控制下重组大肠杆菌表达  $\beta$ -甘露聚糖酶的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 The profile of SDS-PAGE of the recombinant *E. coli* expressed  $\beta$ -mannosidase under the control of *P*<sub>*amyL*</sub> and *S*<sub>*amyL*</sub>. M. Molecular weight marker ; 1. *E. coli* DE3 as a control ; 2. *E. coli* DE3 ( pBL-*man* ). Arrow indicated a recombinant  $\beta$ -mannosidase with molecular weight of 40kDa.

## 3 讨论

对于一个工业生产菌株而言, 清楚地了解其产物的相关分子生物学信息, 对提高产物性能和实际生产都有积极的现实意义。我们通过分子生物学手段, 克隆了高温  $\alpha$ -淀粉酶生产菌株 *B. licheniformis* CICIM B0204 的高温  $\alpha$ -淀粉酶基因 *amyL*, 并在大肠杆菌中实现了异源活性表达。通过与已克隆的多种微生物的  $\alpha$ -淀粉酶氨基酸序列进行比对, 发现芽孢杆菌属来源的  $\alpha$ -淀粉酶在氨基酸序列组成上具有高度相似性<sup>[11]</sup>。

以克隆和序列测定获得的 *B. licheniformis* CICIM B0204 高温  $\alpha$ -淀粉酶基因上下游序列为基础, 通过对地衣芽孢杆菌 CICIM B2004 的  $\beta$ -甘露聚糖酶编码基因<sup>\*</sup> 以及其它基因, 如嗜碱芽孢杆菌甘露聚糖酶编码基因, 巨大芽孢杆菌乳糖酶编码基因等( 未发表数据 )在大肠杆菌中的表达, 证实了 *B. licheniformis* CICIM B0204 高温  $\alpha$ -淀粉酶基因的启动子在大肠杆菌中具有引导异源基因表达的功能<sup>[12]</sup>, 其信号肽在大肠杆菌中具有引导基因产物分泌到周质空间的能力。

研究中还发现, 本研究克隆到的  $\alpha$ -淀粉酶基因

\* 马骏双. 饲料用  $\beta$ -甘露聚糖酶和内切  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的研究. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2005.  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

与已报道的 *B. licheniformis* 584 淀粉酶基因<sup>[13]</sup>存在一定的差异,反映在氨基酸残基水平上,出现 3 个氨基酸残基的改变。我们在实验中反复验证了此一突变非经基因克隆过程中产生。3 个氨基酸残基的改变对 *B. licheniformis* CICIM B0204 产高温  $\alpha$ -淀粉酶的水平及其酶学性质的影响是我们下一步研究的内容之一。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Yang M, Galizzi A, Henner D. Nucleotide sequence of the amylase gene from *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*, 1983, **11**: 237 – 249.
- [ 2 ] Veith B, Herzberg C, Steckel S, *et al.* The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2004, **7**: 204 – 211.
- [ 3 ] Bertoldo C, Antranikian G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr Opin Chem Bio*, 2002, **6**: 151 – 160.
- [ 4 ] Nielsen JE, Borchert TV. Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylase. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1543**: 253 – 274.
- [ 5 ] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [ 6 ] 姜锡瑞编著. 酶制剂应用手册. 北京:中国轻工业出版社, 1999, 33 – 34.
- [ 7 ] Jacobi A, Huber-Wunderlich M, Hennecke J, *et al.* Elimination of all charged residues in the vicinity of the active-site helix of the disulfide oxidoreductase DsbA. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 21692 – 21699.
- [ 8 ] Talbot G, Sygusch J. Purification and characterization of thermostable  $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 3505 – 3510.
- [ 9 ] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 – 254.
- [ 10 ] 诸葛健,王正祥编著. 工业微生物实验技术手册. 北京:中国轻工业出版社,1994.
- [ 11 ] Janacek S, Svensson B, MacGregor EA. Relation between domain evolution, specificity, and taxonomy of the  $\alpha$ -amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain. *Eur J Biochem*, 2003, **270**: 635 – 645.
- [ 12 ] Shahhoseini M, Ziaee AA, Ghaemi N. Expression and secretion of an alpha-amylase gene from a native strain of *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* by T7 promoter and putative signal peptide of the gene. *J Appl Microbiol*, 2003, **95**: 1250 – 1254.
- [ 13 ] Gray GL, Mainzer SE, Rey MW, *et al.* Structural genes encoding the thermophilic alpha-amylases of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus licheniformis*. *J Bacteriol*, 1986, **166**: 635 – 643.

# Cloning of the gene encoding a thermostable $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* CICIM B0204 and functional identification of its promoter

NIU Dan-dan, XU Min, MA Jun-shuang, WANG Zheng-xiang\*

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

**Abstract:** Thermostable  $\alpha$ -amylase, catalyzing the hydrolyzation of starch to dextrin, maltose and glucose at higher temperature, is one of the most industrial important enzymes. Several species of *Bacillus* have been found and genetic improved to produce the thermostable  $\alpha$ -amylases. In present study, a gene, amyL, coding for a thermostable  $\alpha$ -amylase with its flanking sequences was cloned from an industrial *Bacillus licheniformis* CICIM B0204 by using a combination of routine polymerase chain reactions (PCR) and inverse PCR with a pair of initial primers derived from the highly conserved region of bacterial  $\alpha$ -amylase genes and the functional identifications of the cloned amyL and the activities of its promoter and signal peptide in *Escherichia coli* were investigated. The amyL was composed of 1539 bp with 180 bp at upstream for its promoter and 160 bp at downstream for its terminator. The deduced mature peptide of the  $\alpha$ -amylase was composed of 512 amino acid residues and its signal peptide 29 amino acid residues at N-terminal. The nucleotide and deduced amino acid sequences of amyL were extremely similarity to those from *Bacillus* species with three amino acid residues difference (Arg163→Leu, Ser339→Gly, Ala349→Ser) comparison to that from a laboratory strain *B. licheniformis* 584. Under the control of T<sub>7</sub> promoter, the structural region of amyL was functionally expressed in *Escherichia coli*. Additionally, the structural region of the gene coding for a  $\beta$ -mannosidase from *B. licheniformis* CICIM B2004 was inframe inserted into the downstream of the promoter and signal sequence of amyL and expressed in *E. coli*. The amyL promoter and signal sequence was functionally directed the expression and secretion of the  $\beta$ -mannosidase in *E. coli* cells with the expression level of 295U/mL.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*;  $\alpha$ -amylase;  $\beta$ -mannosidase; Gene cloning; Promoter; Signal peptide

Foundation item: Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-04-0497); Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2003AA241160)

\* Corresponding author. Tel 86-510-5879781; E-mail: zxwang@sytu.edu.cn

Received 8 October 2005/Accepted 12 December 2005/Revised 4 March 2006