

## 高温 $\alpha$ -淀粉酶基因突变体在大肠杆菌、毕赤酵母中的表达

杜冰冰<sup>1,2</sup>, 郝 帅<sup>1,2</sup>, 李运敏<sup>3</sup>, 岳丽丽<sup>3</sup>, 矫庆华<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(<sup>2</sup> 中国科学院研究生院 北京 100049)

(<sup>3</sup> VA Medical Centre 111C5, Department of Medicine University of California at San Francisco 4150 Clement Street San Francisco, CA 94121 USA)

**摘 要** 对地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)高温  $\alpha$ -淀粉酶(*amyE*)基因进行改造获得的基因突变体(*amyEM*)通过 PCR 扩增,将此基因分别克隆至大肠杆菌表达载体 pBV220 和毕赤酵母表达载体 pPIC9K 上,并分别转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和毕赤酵母 GS115 感受态细胞,获得重组大肠杆菌和重组毕赤酵母。通过表达产物的酶活性检测和 SDS-PAGE 分析,证明突变  $\alpha$ -淀粉酶(*AmyEM*)在大肠杆菌、毕赤酵母中获得有效表达。对重组大肠杆菌产生的  $\alpha$ -淀粉酶的粗酶性质分析表明,此酶分子量约为 55kDa。其最适反应温度为 80°C ~ 90°C,与野生型基因相比,其最适 pH 均为 6.0,但不同的是突变体在 pH 5.0 ~ 5.5 时表现出较高的酶活力,在毕赤酵母细胞的表达产物可分泌至胞外。由于酵母可对蛋白进行糖基化,酶分子量增加到 60kDa,最适 pH 也改变为 5.5。此高温  $\alpha$ -淀粉酶突变体所具有的在微酸性环境具有较高酶活性的性质,具有重要的潜在工业应用价值。

**关键词**: 高温  $\alpha$ -淀粉酶; 基因突变体; 酶活力; 最适 pH

**中图分类号**: Q78 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2006)05-0827-04

高温  $\alpha$ -淀粉酶 ( $\alpha$ -1, 4-glucan-4-glucanohydrolase, EC.3.2.1.1)是一种重要的工业酶制剂,在淀粉的加工中起重要作用<sup>[1]</sup>。淀粉的加工包括以下 3 个步骤:糊化、液化和糖化。淀粉糊化后的自然 pH 为 4.5,液化过程是在高温下进行的,常用的高温  $\alpha$ -淀粉酶作用的最适 pH 为 5.8 ~ 6.5,糖化过程的最佳 pH 4.2 ~ 4.5,在上述过程中就要反复调节 pH, pH 值的调整大大增加了化学试剂的消耗,调整不当还会产生大量的副产物<sup>[2]</sup>。如果能研究出既耐高温、又在偏酸性环境中稳定的  $\alpha$ -淀粉酶,将会大大改善淀粉加工的工艺。

来自地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)高温  $\alpha$ -淀粉酶<sup>[3]</sup>。因其具有的耐高温、高活力等优良特性,是工业上应用最广泛的高温  $\alpha$ -淀粉酶之一<sup>[4]</sup>。随着生物技术的发展,人们对于此种蛋白从结构到性质都进行了深入的研究<sup>[5]</sup>,通过对其编码基因的改造,来改变酶的性质已成为可能<sup>[6]</sup>。

巴斯德毕赤酵母表达系统近年来被广泛应用,由于其含有分泌信号,可将重组蛋白分泌到胞外,人们已成功表达了多种外源蛋白<sup>[7-9]</sup>。本文主要报道的是本实验室得到的一个高温  $\alpha$ -淀粉酶基因的突变体,在大肠杆菌及毕赤酵母中进行了表达,并对其产生的高温  $\alpha$ -淀粉酶进行了相关酶学性质的研究分析。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、载体和培养基**:大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、表达载体 pBV220、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 及其表达载体 pPIC9K 均由本实验室保存;质粒 pUCmT 购自上海 Sangon 公司;pBV-*amyE*(含野生型  $\alpha$ -淀粉酶基因)和 pUCmT-*amyEM*(含突变体  $\alpha$ -淀粉酶基因)由本实验室构建(文章待发表)。大肠杆菌培养和转化使用 LB 培养基。酵母的培养、转化、筛选和诱导表达使用 YPD、RDB、MD、MM、BMGY 及 BMMY 等培养基<sup>[7]</sup>。

**1.1.2 主要试剂和仪器**:各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 *Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司,所用化学试剂均为分析纯。引物合成由上海博亚公司完成。PE2400 扩增仪 (Applied Biosystems)。

#### 1.2 表达载体的构建

根据 GenBank 中 *amyE* 基因的序列以及大肠杆菌和毕赤酵母表达载体上的多克隆位点的特征,设计合成了两对引物 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 和 P<sub>3</sub>、P<sub>4</sub>(表 1)。

基金项目: 国家科技攻关计划(2001BA708B03-03)

\* 通讯作者。Tel: 86-10-62628482; E-mail: jqh5678@yahoo.com.cn

作者简介: 杜冰冰(1981-)男,河南汝州人,硕士研究生,主要从事酶工程研究。E-mail: du-bing117@sohu.com

收稿日期: 2005-12-05; 接受日期: 2006-01-10; 修回日期: 2006-01-13

表1 PCR引物序列及其所含酶切位点

Table 1 Sequence of PCR primer and its restrict site

Primer	Sequence(5'-3')	Restrict site
P <sub>1</sub>	ATGAATTCATGAAACAACAAAACGG(26bp)	EcoR I
P <sub>2</sub>	CCGGATCCCTATCTTTGAACATAAATGA(29bp)	BamH I
P <sub>3</sub>	CCGAATTCATGGCAAATCTTAATGGG(26bp)	EcoR I
P <sub>4</sub>	CTGCGGCCGCTATCTTTGAACATAA(26bp)	Not I

以质粒 pUCmT-amyEM 为模板,分别以 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 和 P<sub>3</sub>、P<sub>4</sub> 为引物,进行 PCR 扩增,P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 扩增产物经过 EcoR I、BamH I 双酶切连接至 pBV220,P<sub>3</sub>、P<sub>4</sub> 扩增产物经过 EcoR I、Not I 双酶切连接至 pPIC9K。

### 1.3 转化及转化子筛选

将重组质粒 pBV220-amyEM、pPIC9K-amyEM 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,在含氨苄青霉素的抗性 LB 平板上筛选转化子,提取质粒并进行酶切鉴定。将转化子(DH5 $\alpha$ /pBV220-amyEM)点种在含 1% 可溶性淀粉的 LB 平板上,观察是否出现透明的淀粉水解圈。

提取 pPIC9K-amyEM 质粒,经 Bgl II 酶切后,回收大片段,电击法转化毕赤酵母 GS115,涂布 RDB 平板,30 $^{\circ}$ C 培养直至转化子出现,用牙签挑取转化子对应点种到 MM 和 MD 平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 2d,在 MD 平板上生长正常,在 MM 平板上不生长或者生长不正常的转化子为阳性转化子(GS115/pPIC9K-amyEM)<sup>[7]</sup>。

## 1.4

### 1.4 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

1.4.1 SDS-PAGE 参照文献 [10] 进行。

1.4.2 重组蛋白的诱导表达和样品制备:重组大肠杆菌的培养与诱导参照文献 [11] 进行,离心收集菌体,用 0.5mL 5mol/L NaCl 溶液重悬菌体,剧烈震荡破碎细胞,离心取上清,在 100 $^{\circ}$ C 下水浴煮沸 10min,进行 SDS-PAGE 检测。重组酵母的培养与诱导参照文献 [7] 进行。离心取上清在 100 $^{\circ}$ C 下水浴煮沸 10min,进行 SDS-PAGE 检测。

### 1.5 重组 $\alpha$ -淀粉酶活性测定和酶学性质分析

1.5.1  $\alpha$ -淀粉酶活力的测定:参考文献 [12] 测定酶活力。

1.5.2 蛋白含量测定:用考马斯亮蓝染色法(Bradford 法)<sup>[13]</sup>测定粗酶液中的蛋白质含量。

1.5.3 酶的最适反应温度:在不同温度下测定酶活力,以酶活最高者为 100%。

1.5.4 酶的最适反应 pH:将酶液分别用 pH 3.5~7.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液稀释,测定酶活力,以酶活最高者为 100%。

## 2 结果和分析

### 2.1 表达载体 pBV220-amyEM 和 pPIC9K-amyEM 的构建

以 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 为引物扩增出的 amyEM 基因片段大小约为 1.5kb,PCR 产物经 EcoR I 和 BamH I 酶切。将双酶切基因连接至 pBV220 上,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。提取质粒以

EcoR I、BamH I 双酶切检测,得到两个片段,分别为 1.5kb 和 3.6kb,证明正确插入了外源基因。

以 P<sub>3</sub>、P<sub>4</sub> 为引物扩增出的 amyEM 基因,PCR 产物经 EcoR I、Not I 双酶切,将双酶切基因连接至 pPIC9K 上,克隆至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中。提质粒,经 EcoR I、Not I 酶切鉴定,得到 1.5kb 和 9.3kb 的两个片段(图略),表明重组 pPIC9K-amyEM 质粒构建成功,pPIC9K-amyEM 质粒经 Bgl II 酶切,回收大片段,电击转化毕赤酵母 GS115。

### 2.2 重组大肠杆菌和毕赤酵母的筛选

2.2.1 重组大肠杆菌的筛选:点种在含 1% 淀粉的 LB (Amp<sup>r</sup>) 平板上,由于  $\alpha$ -淀粉酶水解淀粉可以产生透明圈,以不含 amyE 基因的 DH5 $\alpha$ /pBV220 做对照,对照没有观察到淀粉水解圈,而含有 amyEM 基因的 pBV220-amyEM 转化子均出现水解圈。

2.2.2 重组毕赤酵母的筛选:用 RDB 筛选到 92 个 His<sup>+</sup> 转化子,进一步用 MM/MD 筛选,得到 73 个醇氧化酶破坏(mut<sup>-</sup>) 的克隆。对这些转化子进行诱导表达,利用淀粉遇碘变蓝色的原理,定性测定  $\alpha$ -淀粉酶的活力,从 73 个阳性转化子中筛选到 2 个较高  $\alpha$ -淀粉酶活力的菌株。

### 2.3 重组蛋白的诱导表达和酶活检测

重组大肠杆菌 DH5 $\alpha$  经诱导培养,破碎细胞后所得即为粗酶液;重组毕赤酵母,经过甲醇诱导培养,上清即为粗酶液,在相同条件下,进行初步酶活检测:在重组大肠杆菌中,AmyE 的比活力为 7.9U/mg,AmyEM 的比活力为 8.1U/mg;而在重组酵母中的 AmyEM 比活力高达 102U/mg。

此粗酶液在 100 $^{\circ}$ C 处理 10min,再次离心收集上清,经 SDS-PAGE 检测重组蛋白;图 1-A 泳道 1 和 2 分别为 AmyEM 与 AmyE 经温度诱导表达产物,泳道 3 为不含基因的空白对照,泳道 1、2 在大约 55 kDa 的位置出现一条明显的蛋白条带,表明 AmyEM 在重组大肠杆菌得到有效表达,这与所报道的一致<sup>[14]</sup>。

将粗酶液表明  $\alpha$ -淀粉酶由于毕赤酵母能将外源蛋白进行分泌表达,粗酶液中其它蛋白含量很少。在大约 60kDa 的位置出现了明显的条带(图 1-B 泳道 3)。表明毕赤酵母经过诱导也高效表达了  $\alpha$ -淀粉酶。

### 2.4 重组 $\alpha$ -淀粉酶的酶学性质

2.4.1 酶作用的最适温度和温度稳定性:pH 6.0 时,在不同温度下,测定  $\alpha$ -淀粉酶活力。获得温度活力曲线;高温  $\alpha$ -淀粉酶突变体(AmyEM)与野生型(AmyE)基本一致,酶的最适反应温度均为 80~90 $^{\circ}$ C,在 85 $^{\circ}$ C 水浴 30min,AmyEM 和 AmyE 剩余酶活力为 90% 以上。

2.4.2 酶作用的最适 pH 和 pH 稳定性:85 $^{\circ}$ C 时,在不同 pH 下( $\leq 7$  酸性环境)测定酶活力。获得 pH-活力曲线:重组大肠杆菌高温  $\alpha$ -淀粉酶(AmyE)与突变体(AmyEM)的最适 pH 均为 6.0,但 AmyEM 在 pH 5.0~5.5 酶活力远远高于 AmyE,尤其在 pH 5.0 前者比后者酶活力高 58%。由此可见,更适

合用于淀粉的加工过程。重组毕赤酵母  $\alpha$ -淀粉酶的最适反应 pH 为 5.5, 在 pH 5.0 ~ 7.0, 重组蛋白有较高的酶活力, 毕赤酵母中表达的重组蛋白比大肠杆菌中的 pH 下降 0.5, 在 pH 5.0 放置 30min, 最适条件下, AmyEM 和 AmyE 剩余酶活力 80% 左右。

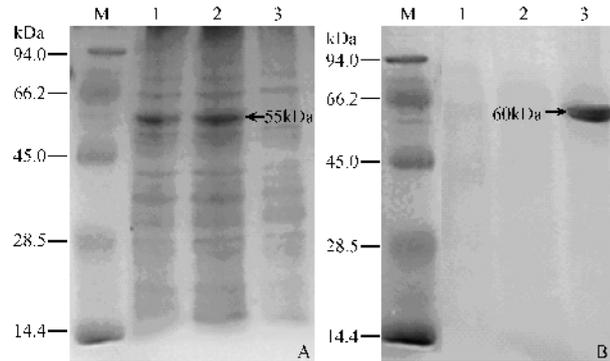


图 1 重组  $\alpha$ -淀粉酶 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis for the  $\alpha$ -amylase in *E. coli* (A) and *P. pastoris* (B). M, Molecular weight marker; The AmyE showed as arrowhead. A: 1. Recombinant protein produced by DH5 $\alpha$ /pBV220-amyE; 2. Recombinant protein produced by DH5 $\alpha$ /pBV220-amyEM; 3. Negative control of DH5 $\alpha$ /pBV220. B: 1. Negative control of GS115/pPIC9k; 2. Culture supernatant of Yeast/pPIC9k-amyEM without induction; 3. Recombinant protein secreted by GS115/pPIC9k-amyEM.

**2.4.3 酶的保存稳定性** 粗酶液在室温 (20 ~ 37 $^{\circ}$ C, 5 ~ 9 月) 和冰箱冷藏 (4 $^{\circ}$ C) 放置 120d, 剩余酶活力分别为 60% 和 90%, 与无锡赛德生物工程有限公司的产品报道基本一致, 表明重组毕赤酵母产生的  $\alpha$ -淀粉酶突变体具有良好的稳定性。

### 3 讨论

本研究构建的重组大肠杆菌和重组毕赤酵母经过诱导, 均可有效的产生高温  $\alpha$ -淀粉酶。高温  $\alpha$ -淀粉酶基因突变体在大肠杆菌中表达, SDS-PAGE 结果显示, 除了目的蛋白外, 还含有很多其他杂蛋白, 这将不利于  $\alpha$ -淀粉酶的后处理。酶学性质分析表明, 其最适反应温度、pH 均与林剑等<sup>[15]</sup>报道的一致, 突变体  $\alpha$ -淀粉酶的作用 pH 与报道<sup>[14]</sup>的有差异, 突变体 (AmyEM) 比野生型 (AmyE) 酶蛋白在 pH 5.0 ~ 5.5 有更高的酶活力。

本研究发现在毕赤酵母中真正能产生高酶活  $\alpha$ -淀粉酶的转化子只有表型鉴定为阳性转化子的 2.7%, 这可能与基因的同源重组有关, 外源基因首先要整合到染色体上, 而且要在正确位置发生替换, 读码框正确, 基因才能得到有效表达。突变体基因在毕赤酵母中的表达, 酶学性质研究表明, 其重组蛋白性质与大肠杆菌中表达的有较大差异, 其分子量为 60kDa, 比重组大肠杆菌中的大了 5kDa, 最适 pH 值与 pH 稳定性比前者下降了 0.5 个 pH, 这可能都与酵母表达系统对蛋白质的后加工有关, 某些位点发生糖基化修饰, 这也与顾园等的报道<sup>[16]</sup>一致。酶的比活力结果也显示重组毕赤酵母

经过发酵, 所分泌的蛋白中的高温  $\alpha$ -淀粉酶含量较高。毕赤酵母表达系统可以通过优化培养条件, 改善发酵工艺来提高外源蛋白的表达量, 由此可见, 此突变体基因有望进一步提高蛋白的表达量。本实验所构建的重组毕赤酵母所表达的高温  $\alpha$ -淀粉酶突变体, 除了拥有所报道耐高温的性质外, 还有在微酸性环境中具有较高酶活力的特点, 因而它具有重要的潜在的工业应用前景。

### 参考文献

- [1] 孔显良, 王俊英.  $\alpha$ -淀粉酶的研究及应用. 微生物学通报, 1989, 16(5): 282-287.
- [2] Crabb WD, Mitchinson C. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends in Biotechnol*, 1997, 15: 349-352.
- [3] Toshifumi Y, Takako N, Hidetoshi T, et al. Complete nucleotide sequence of a gene coding for Heat- and pH-stable  $\alpha$ -Amylase of *Bacillus licheniformis*: Comparison of the amino acid sequences of three bacterial liquefying  $\alpha$ -Amylase deduced from the DNA Sequences. *J Biochem*, 1985, 98: 1147-1156.
- [4] 张礼星. 耐高温  $\alpha$ -淀粉酶研究概况. 江苏食品与发酵, 1996, 3: 29-32.
- [5] MacGregor E Ann, Janecek S, Svensson B. Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1546: 1-20.
- [6] Rivera M, Heriberto M, Munguía L, et al.  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. *Protein Engineering*, 2003, 16(7): 505-514.
- [7] 姚斌, 张春义, 王建华, 等. 高效表达具有生物学活性的植酸酶的毕赤酵母. 中国科学(C辑) 1998, 28(3): 237-243.
- [8] Cao S, Wang H, Luhur A, et al. Yeast expression and characterization of SARS-CoV N protein. *Journal of Virological Methods*, 2005, 130(1-2): 83-88.
- [9] 杜中军, 朱永芳, 黄文胜, 等. 毕赤酵母外源基因表达系统研究进展. 生物技术通报, 2002, 4: 7-11.
- [10] 夏其昌. 蛋白质化学研究技术与进展. 北京: 科学出版社, 1997, 102-107.
- [11] 张智清, 姚立红, 侯云德. 含 PRPL 启动子的原核高校表达载体的组建及其应用. 病毒学报, 1990, 6(2): 111-115.
- [12] 王福荣, 唐景春. 耐高温  $\alpha$ -淀粉酶活力测定方法的研究. 食品与发酵工业, 1995, 2: 7-30.
- [13] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术, 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1997, 138-140.
- [14] 赵荧, 刘红岩, 宫正宇, 等. 地衣芽孢杆菌 A.4041 耐高温  $\alpha$ -淀粉酶的纯化和性质. 吉林大学自然科学学报, 1997, 7(3): 85-89.
- [15] 林剑, 郑舒文, 孙利芹. 温度和 pH 值对耐高温  $\alpha$ -淀粉酶活力的影响. 中国食品添加剂, 2003, 5: 66-67.
- [16] 顾园, 诸欣平, 王少华. 毕赤酵母表达蛋白质的糖基化. 生命的化学, 2004, 24(4): 353-355.

## Expression of a thermostable $\alpha$ -amylase mutant into *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*

DU Bing-bing<sup>1,2</sup>, HAO Shuai<sup>1,2</sup>, LI Yun-min<sup>3</sup>, YUE Li-li<sup>3</sup>, JIAO Qing-hua<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(<sup>2</sup> Graduated School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(<sup>3</sup> VA Medical Centre 111 C5, Department of Medicine University of California at San Francisco 4150 Clement Street, San Francisco, CA 94121, USA)

**Abstract**  $\alpha$ -amylase are of considerable commercial value. It can be produced by a wide variety of microorganism. The  $\alpha$ -amylase gene (amyE) from *Bacillus licheniformis*, which is widely used for the industrial hydrolysis of starch, was mutated (amyEM), then amplified by PCR and inserted into pBV220 and pPIC9k to obtain the recombinant vector pBV220-amyEM and pPIC9k-amyEM. These recombinant vectors were transformed into corresponding competent cell *E. coli* DH5 $\alpha$  and *P. pastoris* GS115 respectively. The resulting recombinant strains, DH5 $\alpha$ /pBV220-amyEM and GS115/pPIC9k-amyEM, were then screened by measuring the enzymatic activity and SDS-PAGE. DH5 $\alpha$ /pBV220-amyEM was induced by temperature and GS115/pPIC9k-amyEM by methanol. In contrast to the parent cells, the  $\alpha$ -amylases were expressed in both the recombinant strains. In *E. coli* the molecular weight was approximately 55kDa; optimal temperature and pH of the recombinant  $\alpha$ -amylase were 80°C ~ 90°C and 6.0 respectively. The recombinant amylase had high activity in pH 5.0 ~ 5.5 compared to wild type. In *Pichia pastoris*, the recombinant amylase was secreted to the medium; molecular weight was 60kDa for the putative post-translational modifications; optimal pH shifted to 5.5. The specific activities of  $\alpha$ -amylase produced by *E. coli* and *P. pastoris* were 8.1U/mg and 102U/mg respectively. This result indicated that the  $\alpha$ -amylase were secreted into the culture medium with high efficiency in the recombinant *P. pastoris*. High activity in high temperature and lower pH properties impart the recombinant amylase potential applications in industry.

**Keywords** : Thermostable  $\alpha$ -amylase ; Mutant ; Expression ; Enzymatic properties

Foundation item : Chinese National Programs for Science and Technology Development (2001BA708B03-03)

\* Corresponding author. Tel : 86-10-62628482 ; E-mail : jqh5678@yahoo.com.cn

Received : 5 December 2005 / Accepted : 10 January 2006 / Revised : 13 January 2006