

坚强芽孢杆菌 β -淀粉酶基因的核苷酸序列分析*

陈 炜 何秉旺 楼晓东 官 菲** 叶 忱***

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 β -淀粉酶, 坚强芽孢杆菌, 核苷酸序列

分类号 Q933

淀粉水解酶广泛用于淀粉加工业中, 何秉旺等在选择产耐热 β -淀粉酶菌株中得到一株坚强芽孢杆菌 (*Bacillus firmus*) 725, 该菌株产生的淀粉酶有较好的热稳定性, 水解淀粉的主要产物为麦芽糖。自然菌株产生的淀粉酶往往是多种淀粉酶的混合, 为进一步研究该菌株产生的淀粉酶的性质和在工业上应用的可能性, 分离了三个淀粉酶基因, 在大肠杆菌中克隆和表达^[1]。其中重组质粒 pBA150 产生的淀粉酶的淀粉水解产物主要是麦芽糖^[1]。 β -淀粉酶 (EC. 3.2.1.2) 水解淀粉的主要产物是麦芽糖, 工业上可用于生产高麦芽糖浆, 近年来又有 β -淀粉酶用于啤酒工业的报道^[2]。本文报道重组质粒 pBA150 的 β -淀粉酶基因的序列分析及推导出的氨基酸序列同已知 β -淀粉酶的氨基酸序列比较。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

pBA150 是以 pUC18 为载体, 从 *Bacillus firmus* 725 中得到的产淀粉水解酶的重组质粒, 含 4.2kb 的插入片段^[1]。大肠杆菌 DH5 α 为实验室常用菌株, 为本实验室保存。

1.2 培养基^[1]

1.3 试剂和工具酶

DNA 测序试剂盒购自 USB 公司, [α -³⁵S] dATP 购自 NEN 公司, 外切核酸酶 III、核酸酶 S1、T₄ DNA 连接酶和限制酶等分别购自华美公司、Pharmacia 公司和 Promega 公司。

1.4 核酸的分子生物学方法

参照文献 [3] 进行。

1.5 表达淀粉酶的阳性克隆的检测

参照文献 [4] 用原位裂解法检测。

1.6 核苷酸序列分析

用双脱氧链终止法测定, 按 USB 公司的 DNA 测序试剂盒的说明书进行。有两个亚克隆的序列在

* 国家自然科学基金资助项目。

** 北京师范大学1995年毕业实习生, *** 北京大学1997年毕业实习生。

参加工作的还有周健、陈乃用。

收稿日期: 1997-01-09

CyberSyn 公司的 377DNA 自动测序仪上测定。

2 结果和讨论

2.1 重组质粒 pBA150 的亚克隆的制备

用外切核酸酶 III 的方法^[3,5]制备了若干成套缺失的亚克隆用于测序,此外也用质粒插入片段中的一些限制酶酶切位点, KpnI, SmaI 和 HindIII 制备测序用的亚克隆。

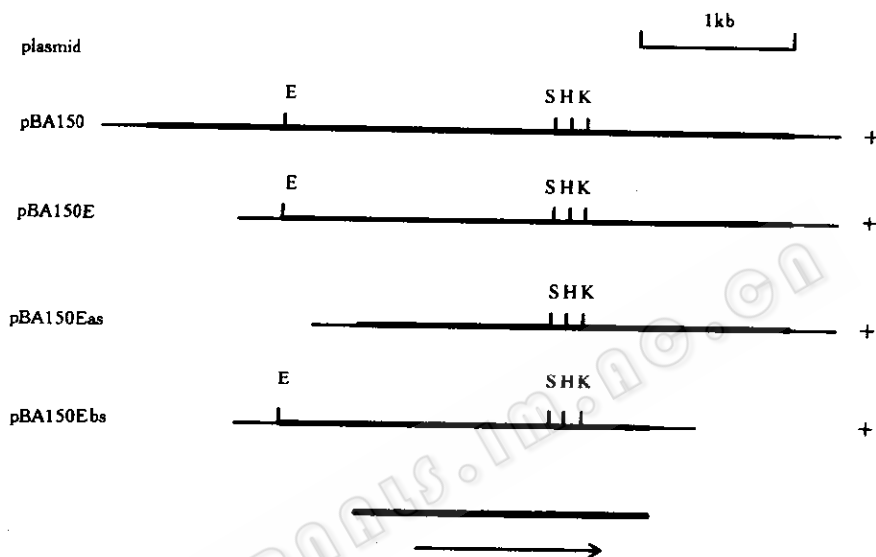


图 1 重组质粒 pBA150 及其衍生质粒的限制性内切酶图谱

■ 为来自 *Bacillus firmus* 的 DNA, — 为来自载体的 DNA, + 表示有淀粉酶活性。

下面的线表示测序范围, 箭头表明转录方向。H, HindIII; K, KpnI; S, SmaI。

从质粒 pBA150 中切下并回收 3.3kb 的 EcoRI-EcoRI 片段, 其中一个 EcoRI 位点来自插入的染色体 DNA, 另一个来自载体, 将该片段同 EcoRI 酶切的 pUC19 连接, 得到两个插入方向的质粒 pBA150Ea 和 pBA150Eb 都有淀粉酶活性(图 1), 表明 3.3kb 的 EcoRI 片段含淀粉酶结构基因及自身的启动子, 用外切核酸酶 III 删除的方法从 pBA150Ea 和 pBA150Eb 各制备了一套嵌套缺失的亚克隆, 分别用 M13 / pUC 的正向和反向通用引物进行核苷酸序列的测定。用正向引物方向测序的最大的亚克隆为有淀粉酶活性的 pBA150Eas, 含插入的 DNA 片段约 2.8kb, 用反向引物方向测序的最大的亚克隆为有淀粉酶活性的 pBA150Ebs, 含插入片段约 2.4kb, 图 1 标出本工作的测序范围。

2.2 坚强芽孢杆菌 β -淀粉酶基因的核苷酸序列

测定了重组质粒 pBA150 中包括 β -淀粉酶基因及其上游序列的 2012 个核苷酸序列。有一个长的阅读框, 607 位的 TTG 作为可能的翻译起始密码, 阅读框的 1406 个核苷酸编码 468 个氨基酸, 在翻译起始密码子上游有可能的核糖体结合位点序列 GGAGG 和可能的启动子区的 -35 区 TTGTCC 和 -10 区 TAAATT。该阅读框没有翻译终止密码子, 同 *Bacillus polymyxa* β -淀粉酶基因的情况相似^[6~8]。*B. polymyxa* 的 β -淀粉酶和 α -淀粉酶由同一个基因编码, 翻译后由蛋白水解酶加工而成^[8]。*Bacillus firmus* 的 β -淀粉酶基因和 *Bacillus polymyxa* 的 β -淀粉酶基因有很高的同源性, 可能有相似的翻译后加工机制。

1) 1.....10	V M G P L	14.....41	D V W W G	45.....77	I I S T H K C G G N V G D	89
2) 1.....10	V M G P L	14.....41	D V W W G	45.....77	I I S T H K C G G N V G D	89
3) 1.....10	V M G P L	14.....41	D V W W G	45.....77	I I S T H K C G G N V G D	89
4) 1.....10	V M G P L	14.....41	D V W W G	45.....77	I I S T H R C G G N V G D	89
5) 1.....10	V M G P L	14.....41	D I W W G	45.....77	I M S T H A C G G N V G D	89
6) 1.....15	L M A P L	19.....49	D F W W G	53.....85	I I S T H Q C G G N V G D	97
7) 1.....15	L M A P L	19.....49	D F W W G	53.....85	I I S T H Q C G G N V G D	97
8) 1.....14	V M L P L	18.....51	D V W W G	55.....87	I M S F H Q C G G N V G D	99
9) 1.....18	V M L P L	22.....55	D V W W G	59.....91	I M S F H Q C G G N V G D	103
1)91	C N I P L P S W	98.....139	S F A Q N	143.....159	G P S G E L R Y P S Y	169
2)91	C N I P L P S W	98.....139	S F A Q N	143.....159	G P S G E L R Y P S Y	169
3)91	C N I P L P S W	98.....139	S F A Q N	143.....159	G P S G E L R Y P S Y	169
4)91	C N I P L P S W	98.....139	S F A Q N	143.....159	G P S G E L R Y P S Y	169
5)91	V N I P L P S W	99.....139	S F A S N	143.....159	G P S G E L R Y P S Y	169
6)99	C N V P L P S W	107.....148	A F A A A	152.....168	G P A G E L R Y P S Y	178
7)99	C N V P L P S W	107.....148	A F A A A	152.....168	G P A G E L R Y P S Y	178
8)101	V N I P L P Q W	109.....158	S F R E N	162.....180	G P A G E M R Y P S Y	190
9)105	V N I P L P Q W	112.....162	S F R E N	166.....184	G P A G E L R Y P S Y	194
1)242	G K D F L S W Y	249.....279	K I S G L H W	285.....299	A G G Y Y	303
2)242	G K D F L S W Y	249.....279	K I S G L H W	285.....299	A G G Y Y	303
3)242	G K D F L S W Y	249.....279	K I S G L H W	285.....299	A G G Y Y	303
4)242	G K D F L S W Y	249.....279	K I S G I H W	285.....299	A G G Y Y	303
5)241	G N D F L T W Y	248.....278	K I A G V H W	284.....299	A G Y Y N	303
6)250	G K D Y L E W Y	257.....287	K I A G V H W	293.....308	A G Y N	311
7)250	G K D Y L E W Y	257.....287	K I A G V H W	293.....308	A G Y N	311
8)257	G R F F L A W Y	264.....293	K I S G I H W	299.....312	A G Y Y N	316
9)261	G K F F L T W Y	268.....297	K V S G I H W	303.....316	A G Y Y N	320
1)321	F T C L E M S D S	329.....359	E N A L Q	363.....		
2)321	F T C L E M S D S	329.....359	E N A L P	363.....		
3)321	F T C L E M S D S	329.....359	E N A L P	363.....		
4)321	F T A L E M Y D S	329.....359	E N A L P	363.....		
5)320	F T C L E M D D S	328.....359	E N A L A	363.....		
6)329	F T C L E M T D K	337.....367	E N A L S	371.....		
7)329	F T C L E M T D K	337.....367	E N A L S	371.....		
8)339	F T C A E M R D L	346.....378	E N A L P	382.....		
9)343	F T C L E M R D S	351.....382	E N A L P	386.....		

图2 各种来源的β-淀粉酶氨基酸序列的同源区β-淀粉酶的同源区用框子划出

1. *Bacillus firmus*; 2. *Bacillus polymyxa* 72; 3. *Bacillus polymyxa* ATCC8523; 4. *Bacillus circulans*;
5. *Clostridium thermosulfurogenes*; 6. *Bacillus cereus* BQ10-S1; 7. *Bacillus cereus* var. *mycoides*;
8. Barley; 9. Soybean.

本工作的核苷酸序列已录入 GenBank / DDBJ / EMBL 核苷酸序列资料库, 入藏号为 AB000264.

2.3 不同来源的 β -淀粉酶氨基酸序列比较

从 *Bacillus firmus* β -淀粉酶基因的核苷酸序列推导出的氨基酸序列同已报道的微生物来源的 β -淀粉酶^[6-12]和两种植物来源的 β -淀粉酶^[13,14]的氨基酸序列进行了比较. 同 *B. polymyxa* 72^[6]、*B. polymyxa* ATCC8523^[7]、环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)^[9]、热硫酸状芽孢杆菌 (*Clostridium thermosulfurogenes*)^[10]、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) BQ10-S1^[11]、*Bacillus cereus* var. *mycoides*^[12]、大麦^[13]和大豆^[14]的同源性分别为 98%、98%、82%、54%、49%、50%、36% 和 36%. 图 2 为上述 9 种 β -淀粉酶比较得到的同源区. *Bacillus firmus* β -淀粉酶含有 β -淀粉酶特征的 11 个保守区.

参 考 文 献

- [1] 陈 炜, 何秉旺, 张建华, 等. 微生物学通报, 1997, 24(4): 199~202.
- [2] 徐桃献, 何秉旺, 朱 峰, 等. 微生物学通报, 1994, 21(6): 336~338.
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [4] Tsukagoshi N, Ihara H, Yamagata H et al. Mol Gen Genet, 1984, 193: 58~63.
- [5] Henikoff S. Gene, 1984, 28: 351~359.
- [6] Kawazu T, Nakanishi Y, Uozumi N et al. J Bacteriol, 1987, 169: 1564~1570.
- [7] Rhodes C, Sasser J, Friedberg F. Nucleic Acids Reseach, 1987, 15(9): 3934.
- [8] Uozumi N, Sakurai K, Sasaki T et al. J Bacteriol, 1989, 171(1): 375~382.
- [9] Siggins K W. Molecular Microbiology, 1987, 1: 86~91.
- [10] Kitamoto N, Yamagata H, Kato T et al. J Bacteriol, 1988, 170: 5848~5854.
- [11] Nanmori T, Nagai M, Shimizu Y et al. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(2): 623~627.
- [12] Yamaguchi T, Matsumoto Y, Shiraiawa M et al. Biosci Biotech Biochem, 1996, 60(8): 1255~1259.
- [13] Kreis M, Williamson M, Buxton B et al. Eur J Biochem, 1987, 169: 517~525.
- [14] Mikami B, Morita Y, Fuzazawa C. Seikagaku, 1988, 60: 211~216.

SEQUENCING OF A β -AMYLASE GENE FROM *BACILLUS FIRMUS*

Chen Wei He Bingwang Lou Xiaodong Guan Fei Ye Chen

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract The gene encoding a β -amylase from *Bacillus firmus* 725 was sequenced. The sequenced DNA of 2012 bp contains one open reading frame of 1406 nucleotides without a translation stop codon. The deduced amino acid sequence homology with those known bacterial and some plant β -amylase was 98% for *Bacillus polymyxa* 72, 98% for *Bacillus polymyxa* ATCC8523, 82% for *Bacillus circulans*, 54% for *Clostridium thermosulfurogenes*, 49% for *Bacillus cereus* BQ10-S1, 50% for *Bacillus cereus* var. *mycoides*, 36% for barley, and 36% for soybeen Eleven well-conserved regions were found among the amino acid sequences of the nine β -amylases.

Key words β -amylase, *Bacillus firmus*, Nucleotide sequence