

嗜热脂肪芽孢杆菌 α -淀粉酶基因的克隆和表达

任大明 何超刚 钱祖卫 邓小晨*

杨庆云 沈仁权 盛祖嘉

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

用 pBR322 作为克隆载体, 从嗜热脂肪芽孢杆菌 658 染色体上克隆了两个 α -淀粉酶同功酶基因, 这两个基因分别位于 5.4kb 和 9kb 的两个 Hind 酶切片上。带有这两个基因的两个大肠杆菌克隆株所产生的 α -淀粉酶活力在不同程度上比原来的嗜热脂肪芽孢杆菌 658 菌株的活力高; 除了它们的酶反应的最适 pH 值相同外, 它们的酶活力、耐热性、分泌性、酶反应的最适温度均不相同。

关键词 鸟枪法; 基因克隆; 耐热型 α -淀粉酶基因; 同功酶基因

耐热型 α -淀粉酶具有良好的热稳定性, 反应温度高, 在工业上应用该酶可以缩短反应时间, 因而在酒精、啤酒酿造、制糖、纺织工业生产中将产生较大的经济效益。耐热型 α -淀粉酶已成了目前国际市场上深受欢迎的酶种。

比利时^[1]、日本^[2]、法国^[3]的几家实验室从地衣芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌中克隆了耐热型 α -淀粉酶基因, 克隆株的 α -淀粉酶活性都比出发菌株有不同程度的提高, 但仍保留了该酶的耐热性状。

国外文献报道过嗜热脂肪芽孢杆菌中存在两个 α -淀粉酶同功酶基因^[4], 但有关这两个同功酶基因的克隆工作尚未见报道。本文报道用 pBR322 作为载体, 从不同于文献报道的嗜热脂肪芽孢杆菌菌株的染色体上, 克隆了两个 α -淀粉酶同功酶基因和克隆菌株的性质。

材料与 方法

(一) 菌株与质粒

嗜热脂肪芽孢杆菌 658 菌株能在 65°C 温度时生长, 并能在含 1% 淀粉的 LB 固体培养基上产生水解圈, 此菌株由中国科学院上海生物化学研究所赠送。

大肠杆菌 HB101 (*hsdR*, *hsdM*, *recA13*, *supE44*, *lacY*, *leuB6*, *thi-1*) 质粒 pBR322 带有青霉素、四环素耐药性标记。

(二) 培养基与抗菌素

培养基组成 (%) : 蛋白胨 (日本大五营养化学株式会社) 1; 酵母粉 (英国 OXOID) 0.5; 氯化钠 0.5, pH 7.4。半固体培养基含 0.6% 琼脂粉, 固体培养基含 1.5% 琼脂粉。

抗菌素最终浓度: 氨苄青霉素 (Ap) 50 μ g/ml, 四环素 (Tc) 10 μ g/ml

(三) 嗜热脂肪芽孢杆菌 658 染色体 DNA 的提取

按照 Tsukagoshi, N. 等人的方法^[2]制备。快速煮沸法提取质粒 DNA 的方法

本文于 1986 年 4 月 15 日收到。

• 四川大学进修教师

同前。

(四) 染色体DNA酶切

按Maniatis, T. 等人所著的实验手册“Molecular Cloning”中的有关部分进行。10 μ g染色体DNA用Hind III (BioLabs产品) 20u, 反应总体积200 μ l。酶切后的DNA在65 $^{\circ}$ C水浴中处理 10min, 用无水乙醇沉淀DNA, 最后将干燥后的DNA溶解于10 μ l的TE(10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH7.5) 中待用。

(五) 载体DNA的制备

载体 pBR322DNA 用氯化铯梯度离心制备。2 μ g 载体用 20u 的 Hind III 酶切, 酶切反应完全后, DNA 用酚抽提二次, 氯仿和异戊醇抽提一次, 然后用无水乙醇沉淀, DNA 干燥后溶于 10 μ l 无菌水中。为了防止载体在 T4 DNA 连接酶作用时的自身环化, 载体 DNA 按“Molecular Cloning”一书中有关部分进行去磷反应, 反应中所用的牛小肠碱性磷酸酯酶 (CIP) 是西德 Boehringer mannheim 公司的产品, 2 μ g DNA 加 5u 的 CIP 反应体积 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 30min。

(六) 连接反应

反应系统中有去磷载体 DNA 1 μ g, 酶切后染色体 DNA 5 μ g, T4 DNA 连接酶 (BioLabs 产品) 5u, 反应总体积 50 μ l。缓冲液中有 66mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM MgCl₂, 5mM 巯基乙醇, 1mM ATP 16 $^{\circ}$ C 反应 18h。

(七) 质粒DNA转化

大肠杆菌转化按“Molecular Cloning”一书中有关部分进行。在含氨苄青霉素的平板上选择转化子。复印一定数目的转化子至含四环素的平板上, 根据对四环素敏感的菌落比例数, 得到转化子中的重组频率。

(八) α -淀粉酶活力的测定

用 0.5% 可溶性淀粉作为底物在培养皿上检测 α -淀粉酶活性, 具体方法根据文献〔2〕。有淀粉酶活性的菌落经裂解后会释放胞内的 α -淀粉酶而分解淀粉, 鉴定培养皿中的淀粉, 使该处染色时不被碘液染色而呈透明。

定量测定 α -淀粉酶的活性同样根据文献〔2〕。

(九) α -淀粉酶反应最适温度的测定方法

20kHz 的超声波处理菌液 2min (于冰浴中), 使菌液变澄清。用 50mM 的乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH6) 将处理后的不同菌液分别稀释到每毫升 1—2 国际酶活力单位。

(Ca²⁺终浓度为 10mM), 加入 0.5% 的淀粉溶液后在各种温度下保温 10min, 然后测定其消化淀粉的程度, 据此计算不同温度反应时的酶活性 (图 1)。

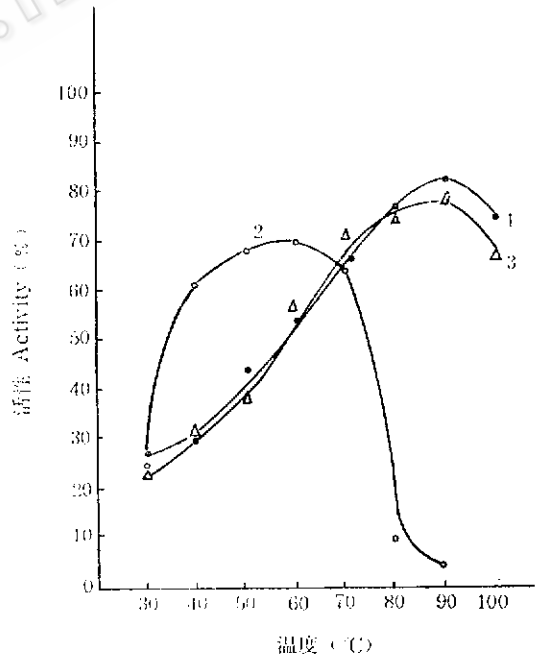


图 1 不同菌株产生的 α -淀粉酶的最适反应温度
Fig. 1 Optimal reaction temperature of α -amylase produced by different strains

1. *E. coli* HB101 (pAMY60)
2. *E. coli* HB101 (pAMY3)
3. *B. stearothermophilus* 658

(十) 质粒 pAMY3、pAMY60 的 Southern 吸印法杂交方法

嗜热脂肪芽孢杆菌 658 菌株经三次单菌落分离纯化,挑单菌落于 65°C 摇瓶培养菌体,抽提染色体 DNA。重组质粒 pAMY3、pAMY60 DNA 各 1 μ g 经 Hind III 酶切,用低熔点琼脂糖电泳分离出 5.4kb 和 9kb 的插入片段,分别用切口移动 (nick translation) 法参入 α -³²P-ATP。嗜热脂肪芽孢杆菌 658 菌株染色体 DNA 10 μ g、重组质粒 pAMY3, pAMY60 DNA 各 2 μ g,用 Hind III 完全酶切并经 0.7% 琼脂糖电泳后转移到硝酸纤维素滤膜上。切口移动法、Southern 转移法、低熔点琼脂糖电泳分离 DNA 方法分别根据 “Molecular Cloning” 一书中的有关部分。

结 果

(一) α -淀粉酶基因的克隆

从嗜热脂肪芽孢杆菌提取总 DNA,用限制性内切酶 Hind III 完全消化,然后以 5:1 的比例与经去磷酸处理的载体质粒 pBR322 Hind III 酶切片段相混合,连接并转化大肠杆菌 HB101,得到了 5468 个转化子。为了检查这些转化子中重组子的比例,我们随机挑了 200 个单菌落于含 Tc 的 LB 平皿上,约有 70% 的菌落对 Tc 敏感。再随机挑选 10 个 Ap^rTc^s 菌落,分别培养,用快速煮沸法提取质粒,经 Hind III 酶切后,发现有大小不同的插入片段。最后,用菌落原位裂解检测淀粉-琼脂培养基淀粉水解圈方法,我们从全部的转化子中得到了两个淀粉酶阳性克隆 HB101 (pAMY3) 和 HB101 (pAMY60) (图 2)。抽提两个克隆株的质粒,用 Hind III 酶切,发现两个质粒分别带有 5.4kb 和 9kb 的插入片段。两个重组质粒分别转化大肠杆菌 HB101,得到的每个转化子都具有 α -淀粉

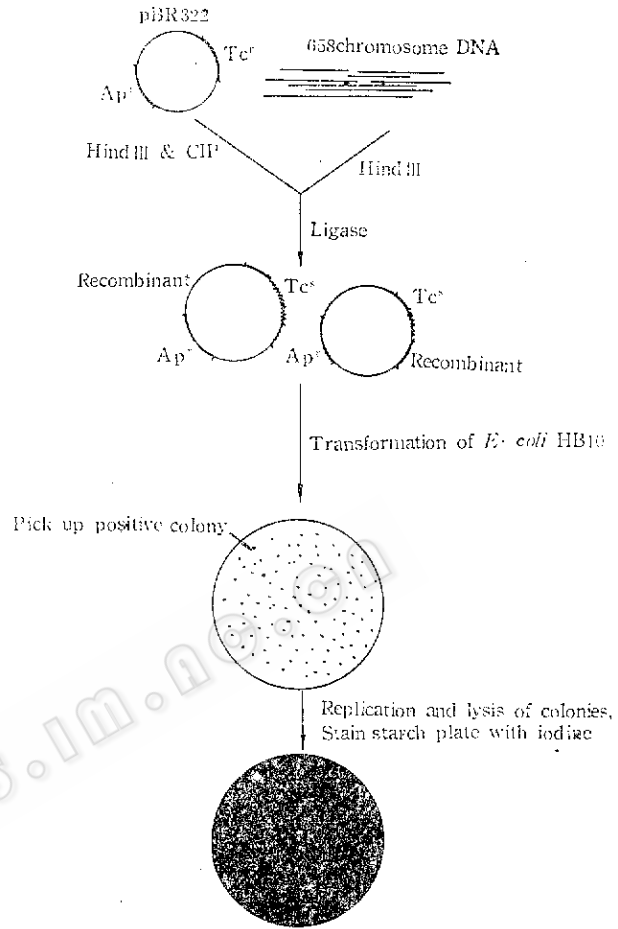


图 2 α -淀粉酶基因克隆示意图

Fig. 2 Scheme for cloning of α -amylase gene

酶活性。HB101 (pAMY60) 产生的 α -淀粉酶能部分地分泌到培养基中,使菌落周围的淀粉水解 (见图 3)。

(二) Southern 吸印法杂交

pAMY3、pAMY60 用 Hind III 完全酶切,用低熔点琼脂凝胶电泳方法分离出 5.4kb 和 9kb 的插入片段,分别用 α -³²P-ATP 标记这两个插入片段,作为杂交探针,逐一和吸附到硝酸纤维素滤膜上的酶切后染色体 pAMY60 和 pAMY3 进行分子杂交。放射自显影结果表明 5.4kb 的探针能和 658 染色体以及自身杂交,但不和 pAMY60 的 9kb 插入片段杂交; 9kb 的探针

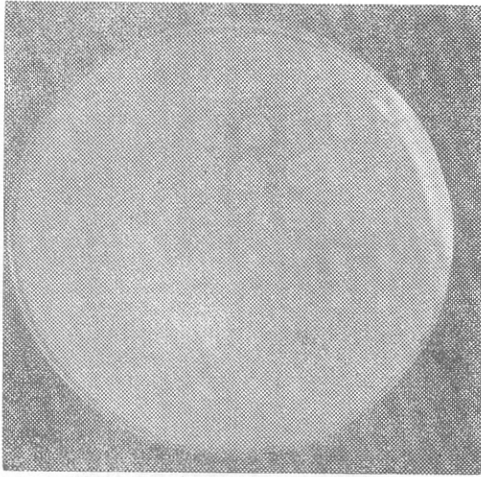


图3 生长在淀粉平板上的大肠杆菌

Fig. 3 Colonies of *E. coli* grow on the plate containing starch

菌落周围有透明水解圈的3个大肠杆菌菌落是HB101 (pAMY60), 它们产生的 α -淀粉酶能分泌到培养基中
Three colonies, which have transparent hydrolytic zone around them, are HB101 (pAMY60), they produced α -amylase which could secrete onto the medium

能和658染色体以及自身杂交, 但不和pAMY3的5.4kb插入片段杂交(见图版I)

(三) 嗜热脂肪芽孢杆菌658菌株、HB101 (pAMY3) HB101 (pAMY60) 克隆株的 α -淀粉酶活力

根据国际单位测定 α -淀粉酶活力, 即1毫升酶液1分钟内分解0.1mg可溶性淀粉定义为1国际单位/ml酶液。酶反应温度为40 $^{\circ}$ C, 反应体系pH为6。

表1 不同菌株的 α -淀粉酶活性比较

Table 1 Comparison of α -amylase activity produced by different strains

菌 株 Strains	酶活性 Activity (u/ml)
<i>B. stearothermophilus</i> 658	1
<i>E. coli</i> HB101	0
<i>E. coli</i> HB101 (pAMY3)	5
<i>E. coli</i> HB101 (pAMY60)	275

(四) 嗜热脂肪芽孢杆菌658、大肠杆菌HB101 (pAMY3)、HB101 (pAMY60) 菌株的 α -淀粉酶的耐热性

将Ca²⁺离子浓度为10mM的菌液在各种温度的热水浴中分别预处理15min, 然后在40 $^{\circ}$ C中测定其残存酶活性(图4)。

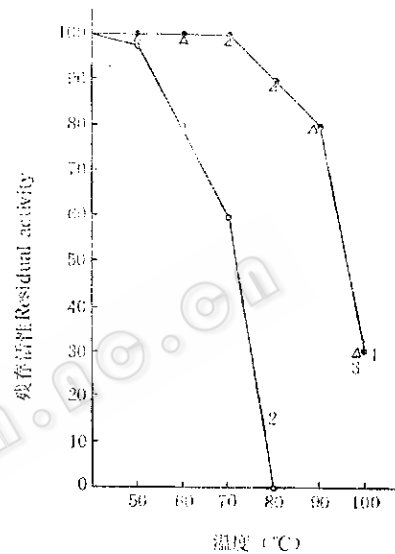


图4 不同菌株产生的 α -淀粉酶的耐热性比较

Fig. 4 Comparison of the thermostability of α -amylase produced by different strains

1. *E. coli* HB101 (pAMY60)
2. *E. coli* HB101 (pAMY3)
3. *B. stearothermophilus* 658

(五) 嗜热脂肪芽孢杆菌658、HB101 (pAMY3)、HB101 (pAMY60) 菌株的 α -淀粉酶的分秘性能

HB101 (pAMY3) 克隆株产生的 α -淀粉酶存在于细胞内, 破碎细胞之后, 方能测出酶活性。HB101 (pAMY60) 克隆株产生的 α -淀粉酶能部分地分泌到胞外。根据测定结果, 分泌到胞外的酶量占胞内外总酶量的1/10。嗜热脂肪芽孢杆菌658菌株产生的 α -淀粉酶则全部分泌至胞外。

表 2 不同菌株产生的 α -淀粉酶在胞内外的比例
Table 2 Proportion of α -amylase inside and outside cell

菌株 Strain	培养液的上清部分的酶活力 Activity of supernatant liquid medium (u/ml)	超声波处理后的培养液总酶活力 Total activity of liquid medium treated with ultrasonic (u/ml)
<i>B. stearothermophilus</i> 658	1	1
HB101 (pAMY3)	0	5
HB101 (pAMY60)	25	275

讨 论

DNA Southern 吸印法分子杂交实验证明, HB101 (pAMY60) 和 HB101 (pAMY 3) 两个克隆株所带的重组质粒中的两个不同插入片段都是来自嗜热脂肪芽孢杆菌 658 菌株的染色体, 但是这两个插入片段不能相互进行分子杂交, 说明它们同源部分并不多。HB101 (pAMY 3),

HB101 (pAMY60) 两个克隆株所产生的 α -淀粉酶在耐热性、酶活性、酶反应最适温度、分泌性能方面均不相同。HB101 (pAMY60) 产生的 α -淀粉酶属于耐热型的, 而 HB101 (pAMY 3) 产生的 α -淀粉酶则属于非耐热型的。现在我们将耐热型 α -淀粉酶基因次级克隆到枯草杆菌质粒 pUB110 上, 该基因已在枯草杆菌中稳定地表达, 且酶活性比在大肠杆菌中产生的有进一步的提高。日本的 K. Yutani 等人发现 1 株嗜热脂肪芽孢杆菌菌株在 55 $^{\circ}$ C 生长时, 生成的 α -淀粉酶用 DEAE-纤维素层析为 2 个同功酶。主要组份的耐热性比次要组份的高^[4]。目前尚未见有 α -淀粉酶同功酶基因克隆的报道。对两个不同的 α -淀粉酶基因进行基因结构分析, 将有助于了解高温细菌的耐热机制和进行信号顺序的分离。我们得到的两个克隆株的 α -淀粉酶活性都在不同程度上比出发菌株高, 因此如何利用遗传工程方法并结合传统选育种方法改造和构建新的高产 α -淀粉酶生产菌株是摆在我们面前的一个新课题。

参 考 文 献

- [1] Joyet, K. et al.; *FEMS Microbiology Letters*, 21:353-358, 1984.
- [2] Tsukagoshi, N. et al.; *Mol. Gen. Genet.*, 193:58-63, 1984.
- [3] Pierre, C. et al.; *Mol. Gen. Genet.*, 186:507-511, 1982.
- [4] Yutani, K. et al.; *J. Biochem.*, 74:573-579, 1973.

CLONING AND EXPRESSION OF TWO α -AMYLASE GENE FROM *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* IN *E. COLI*

Ren Daming He Chaogang Qian Zuwei Deng Xiaochen
Yang Qingyun Shen Renquan Sheng Zujia
(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai)

With a strain of *Bacillus stearothermophilus* 658 as donor and plasmid pBR322 as vector, two different clones of the α -amylase gene were obtained,

the properties of the α -amylase produced by the two clones are quite different.

Hybridization experiment bore out that the two different genes code for isozymes of α -amylase of the same strain.

One gene has been subcloned and expressed in *Bacillus subtilis*. Analysis of the structure of this gene is under way.

Key words

Shotgun; gene cloning; thermostable α -amylase; isozyme

图 版 说 明

A—D, K—N; 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳照相; E—G, H—J; 杂交放射自显影照相; A, N; Hind III 酶切的 λ DNA; B, K; Hind III 酶切的 pAMY60; C, L; Hind III 酶切的 pAMY3; D, M; Hind III 酶切的嗜热脂肪芽孢杆菌658染色体DNA; E; 探针 (9kb) 和自身杂交; F; 探针 (9kb) 不和pAMY3的5.4kb插入片段杂交; G; 探针 (9kb) 和嗜热脂肪芽孢杆菌658染色体DNA杂交; H; 探针 (5.4kb) 不和pAMY60的9kb插入片段杂交; I; 探针 (5.4kb) 和自身杂交; J; 探针 (5.4kb) 和嗜热脂肪芽孢杆菌658染色体DNA杂交

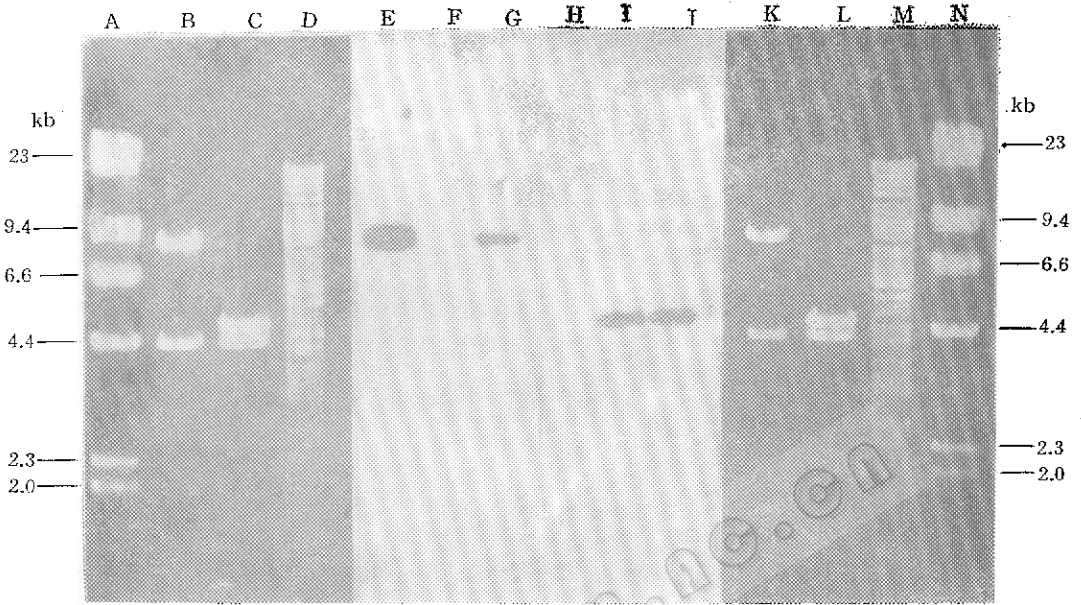
A—D, K—N; Photograph of 0.7% agarose gel electrophoresis; E—G, H—J; Autoradiography of hybridization; A, N; λ DNA digested with Hind III; B, K; pAMY60 digested with Hind III; C, L; pAMY 3 digested with Hind III; D, M; *B. stearothermophilus* 658 chromosome DNA digested with Hind III; E; probe (9kb) hybridized with itself; F; probe (9kb) didn't hybridize with 5.4kb insert of pAMY3; G; probe (9kb) hybridized with *B. stearothermophilus* 658 chromosome DNA; H; probe (5.4kb) didn't hybridize with 9kb insert of pAMY60; I; probe (5.4kb) hybridized with itself; J; probe (5.4kb) hybridized with *B. stearothermophilus* chromosome DNA

任大明等：嗜热脂肪芽孢杆菌 α -淀粉酶基因的克隆和表达

Ren Daming et al.: Cloning and expression of two α -amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in *E. coli*

图版 I

Plate I

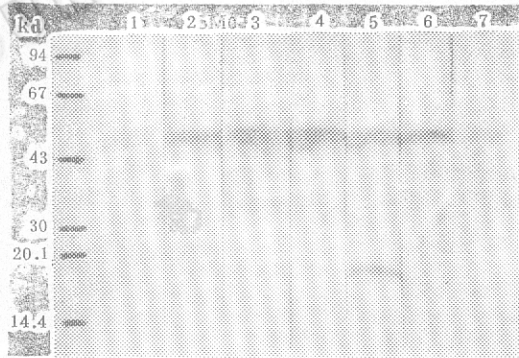


杨太成等：抗尿激酶单克隆抗体的研制

Yang Taicheng et al.: Monoclonal antibodies to urokinase

图版 I

Plate I



McAbs reaction to immunoblotting of crude urokinase specimen

1. S13 2. S26 3. N14 4. N17-2 5. N30 6. N34 7. N36