

## 枯草杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因的克隆和表达

熊占涂 祖新 周和山 黄筱萍

(江西科学院微生物研究所, 南昌)

以自构的质粒 pBE1 为载体, 采用鸟枪法克隆枯草杆菌 168 突变株 GR10 的  $\alpha$ -淀粉酶基因, 获得了在大肠杆菌中的表达。该基因片段位于 7367bp 的 Bgl I 酶切片段上。利用质粒 pUB110 将此片段亚克隆到枯草杆菌中, 同样也获得了表达。本文还测定了该基因克隆子是否有 GR10 的抗葡萄糖阻遏效应。

**关键词** 基因克隆; 鸟枪法;  $\alpha$ -淀粉酶基因; 抗葡萄糖阻遏效应

淀粉酶是酶制剂工业中生产量最大, 应用最广的产品, 约占酶制剂总量的四分之三, 因此, 尽管淀粉酶工业生产历史悠久, 但为了适应生产和应用迅速发展的需要, 世界各国对淀粉酶基础理论和应用技术的研究一直很活跃。本文报道从枯草杆菌 168 的诱变菌株 GR10 中克隆  $\alpha$ -淀粉酶基因, 并在大肠杆菌和枯草杆菌中获得了表达。

### 材料和方法

#### (一) 材料

1. 菌株: 所用菌株列于表 1。
2. 培养基: 采用 LB 肉汤及其固体培养基, 特殊培养基均按有关文献报道配制。
3. 抗生素: 氨苄青霉素 (Amp), 卡那霉素 (Km) 均为国产医用粉状针剂, 工作浓度为 50 $\mu$ g/ml。
4. 酶: 所用工具酶均为华美公司产品。核糖核酸酶为中国科学院上海生物化学所产品。溶菌酶为上海市禽蛋品公司禽蛋二厂产品。

#### (二) 方法

1. 枯草杆菌 GR10 染色体的提取: 参照文献〔2〕的方法。

2. 质粒的大量提取及纯化: 按照文献〔3〕的方法进行。用作重组的质粒再用北京东方仪器厂生产的 DF-17 型 DNA 电洗脱槽进行 cccDNA 回收, 方法按厂家使用说明书。

3. DNA 的酶切、连接和转化大肠杆菌: 基本按文献〔4〕的方法进行。枯草杆菌转化按文献〔5〕进行。

### 结果与讨论

#### (一) $\alpha$ -淀粉酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达

1. 外源片段的重组: 将 GR10 染色体 DNA 和质粒 pBE1 cccDNA 分别用 Bgl I 限制酶进行酶解(图1), 电泳检测, 用 DF-17 型 DNA 电洗脱槽回收 2kb 至 10 kb 之间的染色体 DNA 酶切片段, 与酶切后的质粒 pBE1 DNA 进行酶连接反应, 酶连接反应液转化大肠杆菌 HB101 感受

本文于 1991 年 5 月 20 日收到。

本工作得到中国科学院微生物所郭兴华副教授和华东工学院王二力副教授的指导和帮助, 在此一并致谢。

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids

Strains	Main genotype	Source
<i>E. coli</i> HB101	F <sup>-</sup> , hsdS20(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20(Sm <sup>r</sup> ), xyl-5, mtl-1, supE44, $\lambda$ <sup>-</sup>	Institute of Microbiology, China Academy of Sciences
<i>E. coli</i> HB101 (pBE1)	as above, Amp <sup>r</sup> , Kn <sup>r</sup>	This Institute <sup>[1]</sup>
<i>E. coli</i> C600	F <sup>-</sup> , thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, $\lambda$	This Institute
<i>E. coli</i> DH1	F <sup>-</sup> , recA1, endA1, gyrA86, thi-1 hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ), supE44, recA1, $\lambda$ <sup>-</sup>	This Institute
<i>B. subtilis</i> GR10	trpC gra-10	Institute of Microbiology, China Academy of Sciences
<i>B. subtilis</i> BRB1	metB, sacA, Amy <sup>-</sup>	Given by Dr. Palva, I.
<i>B. subtilis</i> AS1.1098(pUB110)	tryC2, metB5, lys3, Kn <sup>r</sup>	This Institute

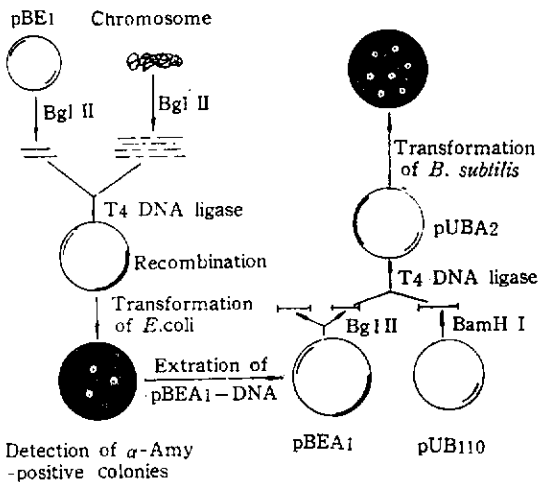


图 1  $\alpha$ -淀粉酶基因克隆示意图

Fig. 1 Scheme for cloning of  $\alpha$ -amylase gene

态细胞, 涂布在每毫升含氨基苄青霉素 (Amp) 50 $\mu$ g 的选择性平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 16h, 共获得转化子 422 个, 再将这 422 个菌落用牙签分别对点于 Amp 单抗平板和 Amp、Km (50 $\mu$ g/ml) (卡那霉素) 的双抗平板上, 得到 Km 插入失活的重组子 41 个。

2.  $\alpha$ -淀粉酶基因片段的筛选: 将 41

个 Km 插入失活的重组子接种在含 1% 可溶性淀粉和 Amp (50 $\mu$ g/ml) 的 LB 平板上, 用原位裂解法<sup>[6]</sup>进行检查, 有 6 个菌落显示有水解圈 (图 I-A), 将此 6 个菌落编号进行快速质粒检查, 电泳结果显示: 1 号、4 号菌无质粒带, 2 号、5 号、6 号菌含有质粒, 但分子量比载体质粒 pBE1 小, 仅一个 3 号菌所含质粒分子量比载体质粒 pBE1 大。

重新制备 3 号菌的杂合质粒, 再次转化大肠杆菌 HB-101, 菌落置 4 $^{\circ}$ C 过夜即能显示明显的水解圈。此外, 我们还将杂合质粒转化大肠杆菌 C600 和 DH1, 同样显示出水解圈, 因此, 初步可以断定该杂合质粒含有  $\alpha$ -淀粉酶基因片段, 将此杂合质粒定名为 pBEA1。

3. 外源片段的分析: 提取重组质粒 pBEA1 DNA 再经过 Sepharose 2B 柱分离纯化, 获得了较纯的质粒 DNA, 我们用 BamH I、EcoR I、Bgl II、Pst I、Hind III 和 Pvu II 等 6 种限制酶对其进行单

酶酶解，酶解反应物通过 1%浓度的琼脂糖凝胶电泳进行分析测定，对以上所得的各片段按照文献〔7〕的方法进行数据处理，计算出每一片段的分子量，见表 2。在此基础上又进一步对整个重组质粒进行排序分析，绘制出 pBEA1 的物理图谱，见图 2。

表 2 质粒 pBEA1 的限制片段的分子量  
Table 2 Size of restriction fragment of pBEA

酶切类型 Restriction enzyme	片段大小 (kb) Size fragment			
Bgl II	7.367	4.230		
EcoR I	8.730	2.867		
BamH I	6.010	3.646	1.941	
Pst I	6.040	4.440	1.117	
Hind III	6.050	3.900	1.647	
Pvu II	6.300	2.930	1.281	1.086

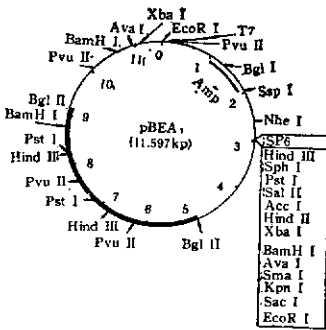


图 2 pBEA1 重组质粒图谱  
Fig.2 Restriction map of recombinant plasmid pBEA1

(二) α-淀粉酶基因在枯草杆菌中的克隆和表达

重组质粒 pBEA1 经 Bgl II 酶切，用 DE-81 滤纸从琼脂糖凝胶中回收外源片段，并进行分离纯化。同时，用 BamH I 酶解 pUB110 质粒，与外源片段连接，并转化枯草杆菌 BRB1 和 AS1.1176，用 Km(50 μg/ml) 平板进行筛选，转化率为 10<sup>3</sup>/μg DNA，其中 80% 菌落在含 1% 可溶性淀粉 LB 平板上显示明显的水解圈(图版 I -B)。

随机挑选 5 个有水解圈的重组子快速提取质粒检查，电泳结果显示分子量为 8730 bp，比 pUB110 大(图版 I -C,D)，将此重组质粒命名为 pUBA2，经酶切分析确定了外源 DNA 连接方向，并得出该重组质粒的物理图谱(图 3)。

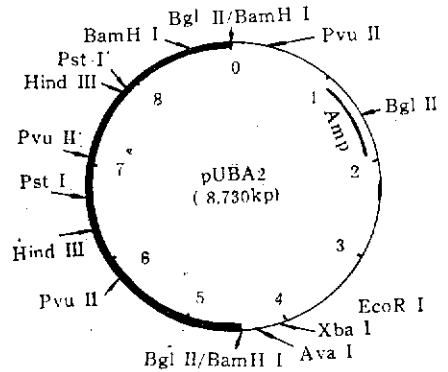


图 3 pUBA2 重组质粒图谱  
Fig.3 Restriction map of recombinant plasmid pUBA2

我们重新提取重组质粒 pUBA2 DNA，再次转化枯草杆菌 BRB1 和 AS 1.1176 均得到 α-淀粉酶阳性表达。

含 pBEA1 的大肠杆菌 HB101 和含 pUBA2 的枯草杆菌 BRB1 菌株，置 4℃ 冰箱保藏 2 个月。另外，分别每日转管一次，共 40 次。重新检测 α-淀粉酶阳性率。在含 1% 可溶性淀粉的平皿上，大肠杆菌 100% 有水解圈。枯草杆菌 95% 有水解圈。此外，分别提取质粒 DNA，电泳检测得其分子量大小与原来的相同。

(三) 酶分析

α-淀粉酶活力测定及葡萄糖效应测定均按 Wayne, L 方法进行〔8〕。葡萄糖效应测试结果表明，供体菌 GR10 在有 1% 葡萄糖存在的培养基中有明显的抗葡萄糖阻遏作用，而 168 菌株和含 pUBA2 重组质粒的工程菌均无抗葡萄糖阻遏作用，在有葡萄糖存在的条件下，酶活明显减少，

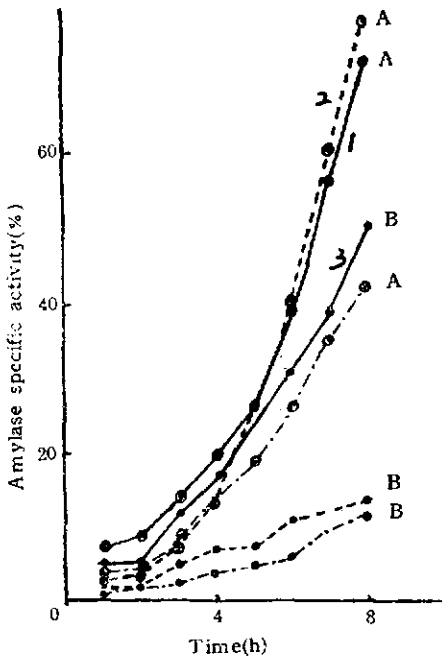


图 4 葡萄糖对 $\alpha$ -淀粉酶合成的调节作用

Fig.4 Regulation of  $\alpha$ -amylase synthesis in GR10 (2), AS. 1.1176 (1) and 168(3) with (A) or without (B) added glucose

见图 4。关于这方面的原因有待进一步研究。

$\alpha$ -淀粉酶的活力是在菌体培养 48h 后进行测定的。供体菌 GR10 的活力为 232 u/ml, 工程菌的活力为 310 u/ml, 受体菌未测出活力。

国外已有很多文献报道从各种菌(包括枯草杆菌)中克隆到的 $\alpha$ -淀粉酶基因, 如果片段中包含有结构基因(amyE)和调节基因(amyR), 则克隆子在枯草杆菌和大肠杆菌中都能获得表达。据此我们可以确定重组质粒 pBEA1 携带有完整的编码 $\alpha$ -淀粉酶的基因。由于枯草杆菌 GR10 菌株具有抗葡萄糖阻遏作用, 我们取该菌株作出发株, 原想在工程菌中获得这种抗葡萄糖阻遏功能, 但克隆的结果, 重组子未能表现此功能。因此, 我们认为抗葡萄糖阻遏作用并非受单一的基因控制, 而是多基因协同作用的结果。

### 参 考 文 献

- [1] 郭兴华等, 生物工程学报, 7(3):224-229, 1991.
- [2] Marmur, J., *J. Mol. Biol.*, 3:208, 1961.
- [3] Kimber, G., Hardly, *Bacillus Cloning Methods, DNA Cloning Vol. I, A Practical Approach*, Edited by DM Clover, 1985.
- [4] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning CSH, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory*, pp.98-104, 1982.
- [5] 郭兴华等, 微生物学报, 22(3) 263-268, 1982.
- [6] Tsukagoshi, N. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 193:58-63, 1982.
- [7] D. Rickwood, et al., *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids*, p.52 1982.
- [8] Wayen, L., et al., *J. Bacteriology*, 161(3):875-881, 1985.

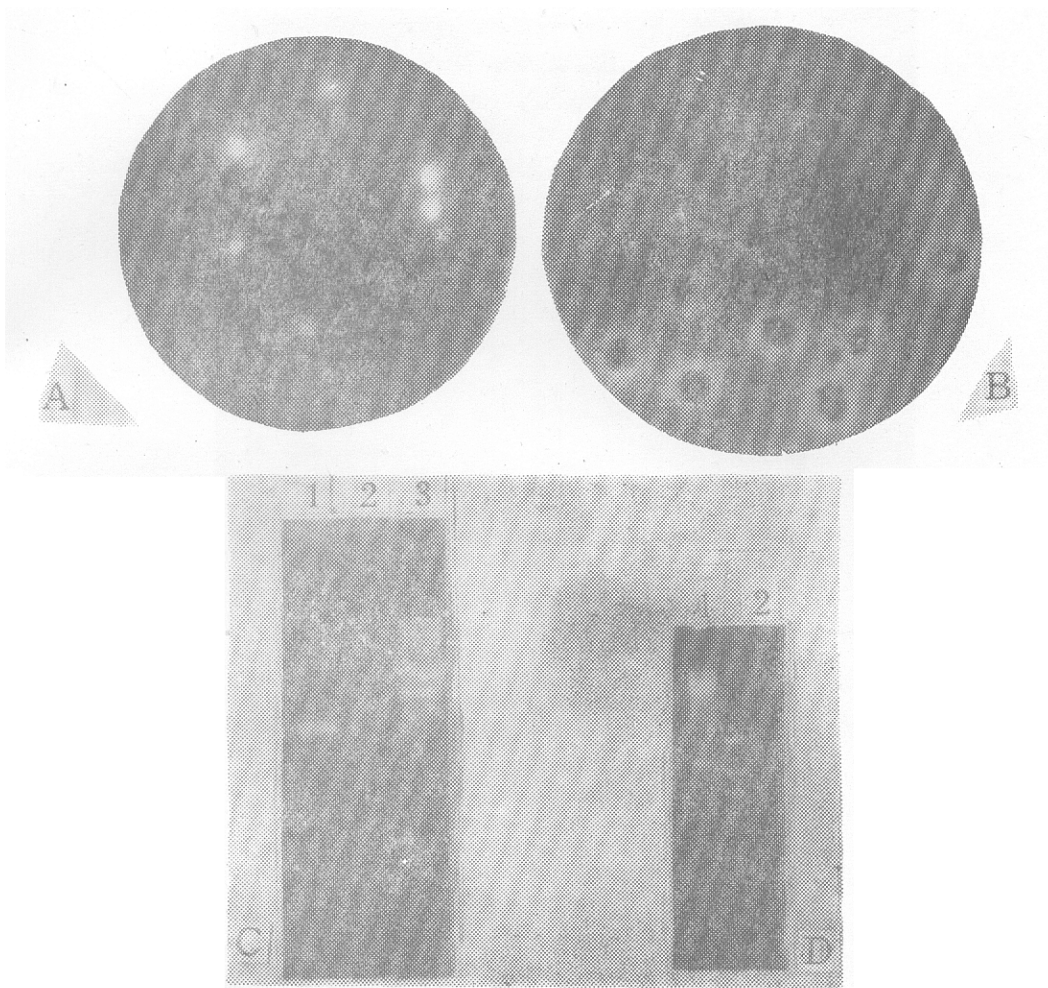
## Cloning and Expression of $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*

Xiong Zhan Tu Zhuxing Zhou Heshang Wang Xiaoping  
(Institute of Microbiology, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang)

With a mutant strain of *Bacillus subtilis* 168 as a donor and plasmid pBE1 constructed by ourselves as a vector, the  $\alpha$ -amylase gene was successfully cloned and expressed in *E. coli* by means of Shutgun method. This  $\alpha$ -amylase gene was situated in 7367 bp Bgl II restriction fragment, which was then subcloned and expressed in *Bacillus subtilis* by using plasmid pUB110 as a vector. It was also examined whether the fragment mediated glucose repression resistance of GR10 to the synthesis of  $\alpha$ -amylase in this paper.

### Key words

Gene cloning; shutgun;  $\alpha$ -amylase; glucose repression resistance



A. 生长在淀粉平板上的大肠杆菌

Colonies of *E. coli* grew on starch plate

B. 生长在淀粉平板上的枯草杆菌

Colonies of *B. subtilis* grew on starch plate

C. pUBA2 电泳图

Agarose gel electrophoresis of pUBA2

1. pUBA2 DNA; 2. pUB<sub>110</sub> DNA; 3. DNA digested by BglI

D. pUBA2 双酶切电泳图

Agarose gel electrophoresis of pUBA2 digested with BglI and PstI

DNA digested by BglI; 2. pUBA2 digested by BglI and PstI