耐热糖化酶基因的克隆及其在枯草杆菌中的表达*

李　颖[1]　宋存义[1]　邱并生[2]　汪　兵[3]　杨建国[2,3]**

(北京科技大学　北京　100083)[1]　(中国科学院微生物研究所　北京　100080)[2]
(北京中天诺亚体育科技有限公司　北京　100089)[3]

摘要：应用 PCR 技术从嗜热古生菌硫磺矿硫化叶菌（*Sulfolobus solfataricus*）中扩增到大小约为 1.9kb 编码嗜热糖化酶的 DNA 片段，并将其插入枯草杆菌诱导型表达载体 pSBPYF，获得含有该糖化酶基因的重组质粒 pSGAYF，转化枯草芽孢杆菌 DB1342。经蔗糖诱导后，该糖化酶在枯草杆菌 DB1342（pSGAYF）中获得胞外分泌表达，酶活为 3.6U/mL，最适温度为 90℃，最适 pH6.0。

关键词：糖化酶，基因表达，枯草芽孢杆菌
中图分类号：Q78　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2654（2006）05-0045-05

Cloning of a Thermostable Glucoamylase Gene and its Secretive Expression in *Bacillus subtilis**

LI Ying[1]　SONG Cun-Yi[1]　QIU Bing-Sheng[2]　WANG Bing[3]　YANG Jian-Guo[2,3]**

(*University of Science and Technology Beijing*, *Beijing* 100083)[1]
(*Institute of Microbiology*, *Chinese Academy of Science*, *Beijing* 100080)[2]
(*Beijing ZhongTian-Noah Sports Science Co.*, *Ltd. Beijing* 100089)[3]

Abstract: The gene encoding a putative thermostable glucoamylase in a hyperthermophilic archaeon, *Sulfolobus solfataricus*, was amplified by PCR. After DNA sequence analysis, it was inserted into the inducible expressive vector pSBPYF of *Bacillus subtilis*, which was constructed in this lab, and the resultant plasmid pSGAYF was then transformed into competent cells of the *Bacillus subtilis* strain DB1342. The positive transformant DB1342 (pSGAYF) was grown on *Bacillus subtilis* common fermentation medium, which contained 50μg/mL kanamycin. After 2h's cultivation, sucrose was added and increased to the final concentration of 2% for induction. The results showed that this glucoamylase was secreted into the medium, and the enzyme activity was 3.6U/mL, optimal temperature 90℃ and pH 6.0.

Key words: Glucoamylase, Gene express, *Bacillus subtilis*

糖化酶是酒精生产工艺中最常用的工业酶制剂之一。我国传统酒精生产是用淀粉质原料，利用酵母进行发酵。但因为酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）不具有淀粉水解酶的活性，不能直接发酵淀粉。在酒精生产工艺中原料淀粉需先经过液化和糖化等工序水解成葡萄糖后才能被酵母发酵。液化工艺中使用的高温淀粉酶最适 pH6.0，最适温度 90℃～95℃，糖化时由于目前我国所用的黑曲霉的糖化酶，最适 pH4.5，最适温度在 60℃[1]，因而需要降温和加酸下调 pH，若能研发出耐高温和 pH6.0 左右的糖化酶，则可以简化工艺，降低成本。

硫磺矿硫化叶菌（*Sulfolobus solfataricus*）属于极端嗜热古生菌，最佳生长温度为

* 北京中天诺亚体育科技有限公司资助
** 通讯作者　E-mail：jiangyangg@yahoo.com
收稿日期：2005-12-19，修回日期：2006-02-27

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

80℃，最适 pH 值为3。近来国外的文献报道，从该菌中克隆到糖化酶的基因，并在大肠杆菌中以包涵体形式胞内表达，其重组糖化酶最适温度为90℃，最佳 pH 范围为5.5～6.0[2]。在大肠杆菌中以包涵体形式胞内表达的弊端是需要破碎细菌，对其包涵体更需要变性和复性的复杂处理，因此不符合工业化大规模生产需要。目前国内外有关硫磺矿硫化叶菌糖化酶（*Sulfolobus solfataricus* glucoamylase，GASS）基因在枯草杆菌中胞外分泌表达尚未见到报道。

本研究首次采用枯草芽孢杆菌分泌表达系统表达古菌糖化酶基因，旨在获得胞外分泌型的耐热（pH6.0）糖化酶，用于工业生产。以硫磺矿硫化叶菌 P2 古菌基因组 DNA 为模板，用 PCR 方法扩增到该基因，将糖化酶基因构建到带有信号肽分泌型枯草表达载体上，转入枯草杆菌中，成功地表达出具有活性的耐热糖化酶。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒：嗜热古菌硫磺矿硫化叶菌 P2 基因组 DNA 由中国科学院微生物研究所黄　力教授惠赠，枯草杆菌 DB1342 为中山大学罗进贤教授惠赠，为3个蛋白酶缺陷的宿主菌，基因型是：his nprR2 nprE18 aprAS epr，质粒 pSBPYF 为本实验室构建。

1.1.2 培养基：大肠杆菌培养用 LB 培养基，枯草芽孢杆菌转化用 GM Ⅰ、GM Ⅱ培养基[3]，枯草芽孢杆菌发酵培养基成分为：3%酵母浸出物、2%蛋白胨、0.2% $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$、0.1% KH_2PO_4、1% NaCl。

1.1.3 主要试剂：本实验室所用的限制性内切酶和 Taq 酶均为 TaKaRa Biotech 公司产品，T4 DNA 连接酶为 NEB 公司产品，pGEM® -T Easy Vector 试剂盒为 Promega 公司产品，葡萄糖测定试剂盒（葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法）为中生北控生物科技公司产品，余为国产分析纯试剂。

1.2 枯草芽孢杆菌转化

枯草芽孢杆菌转化参照 Spizizen 的方法[4]。

1.3 PCR 扩增及扩增产物的纯化

PCR 扩增条件设定为：94℃，预变性 10min；94℃ 变性 30s，45℃退火 50s，68℃延伸 100s，反应5个循环；94℃ 变性30s，55℃退火50s，68℃延伸100s，反应30个循环；最后68℃，延伸 10min。

扩增产物的纯化使用 DEAE 纤维素纸（膜）插片电泳法[5]。

1.4 序列分析

根据 Promega 公司 pGEM® -T Easy Vector，采用 T7 和 SP6 引物对含有 GASS 基因的重组质粒进行测序，由北京擎科生物技术有限公司完成。

1.5 SDS-PAGE 鉴定表达产物的分子量

参考文献［6］的方法进行鉴定，其中浓缩胶浓度为5%，分离胶浓度为12%。

1.6 糖化酶活力测定

取200μL 阳性转化子培养液上清与 300μL pH6.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液，再加100μL 0.5%的可溶性淀粉溶液混匀，80℃反应30min，冰浴终止反应。空载体转化子对照做同样的处理。反应液中生成的葡萄糖用葡萄糖测定试剂盒测定[7]。酶活力定义是80℃ 1h 水解淀粉产生1毫克葡萄糖的酶量为一个酶活力单位。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2　结果与讨论

2.1　嗜热古菌硫磺矿硫化叶菌糖化酶基因的 PCR 扩增

2.1.1　扩增引物的设计与合成根据 GenBank 中已知的硫磺矿硫化叶菌（gi：15897867）糖化酶基因的全序列，我们设计了 2 条引物：

引物 Ⅰ：5'-AACTGCAGGAATGAGAGTTTCTTCTATAGGAAACG-3'
（5'端）　　*Pst* Ⅰ
引物 Ⅱ：5'-CCCAAGCTTTTATATATGGTTTAAGAGCTT-3'
（3'端）　　*Hind* Ⅲ

在引物 Ⅰ 5' 端加一个 *Pst* Ⅰ 位点，在引物 Ⅱ 加一个 *Hind* Ⅲ 位点，且在这两位点前设有保护碱基。为了保证阅读框架的正确，在 5' 端引物酶切位点之后加上两个碱基 GA。并且考虑到枯草芽孢杆菌基因中密码子的偏爱性，把糖化酶基因的第 4 个和第 5 个氨基酸的密码子 TCC 改为枯草芽孢杆菌最偏好密码子 TCT（引物序列波浪线显示）。

2.1.2　PCR 扩增结果：以嗜热古菌硫磺矿硫化叶菌基因组 DNA 作模板，按照 1.3 的方法进行 PCR，扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，在 1,500 ~ 2,000bp 之间可以看到一条明显的特异带，片段长度与预期相符，约为 1,900bp（图 1）。扩增产物按照 1.3 的方法进行纯化。

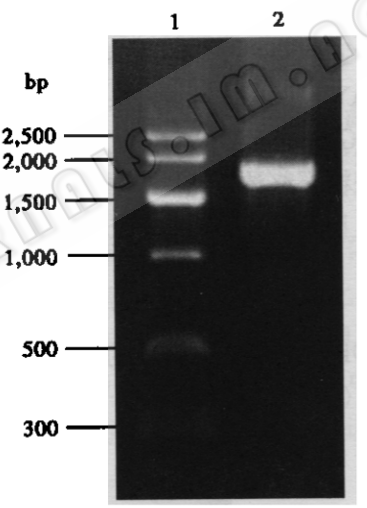

图 2　PCR 扩增产物的电泳图
1 DNA ladder, 2 PCR product

2.2　嗜热古菌硫磺矿硫化叶菌糖化酶基因的克隆

采用 Promega 的 pGEM® -T Easy 载体试剂盒对纯化后的扩增产物进行克隆，得到阳性转化子后挑取一个单克隆，命名为 pT-GAS，提取质粒 DNA，用限制性内切酶 *Pst* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切初步鉴定，获得与预期相符的结果。进行 DNA 测序，测序结果与 GenBank 中发表的序列有 99% 的同源性。充分证明克隆到的基因确实是硫磺矿硫化叶菌糖化酶的基因。与韩国 Mi-Sun Kim 等人[2]克隆到的该糖化酶基因相比，在保守氨基酸序列上仅有一个氨基酸发生改变，由天冬氨酸（Asp，D）变为了谷氨酸（Glu，E）。

2.3　嗜热古菌硫磺矿硫化叶菌糖化酶基因诱导型表达和分泌载体的构建

将 *Pst* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切后回收到的糖化酶基因与质粒 pSBPYF 用 *Pst* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切后回收到的片断进行连接，转化到大肠杆菌 Top10 感受态细胞，通过 Amp 抗性

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

筛选，挑选阳性克隆，提质粒，双酶切鉴定，获得重组质粒 pSGAYF。质粒构建图与双酶切分析鉴定图分别见图2、图3。

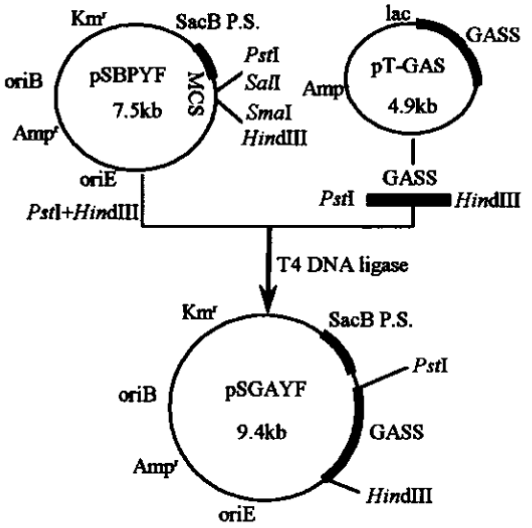

图2　重组质粒 pSGAYF 的构建

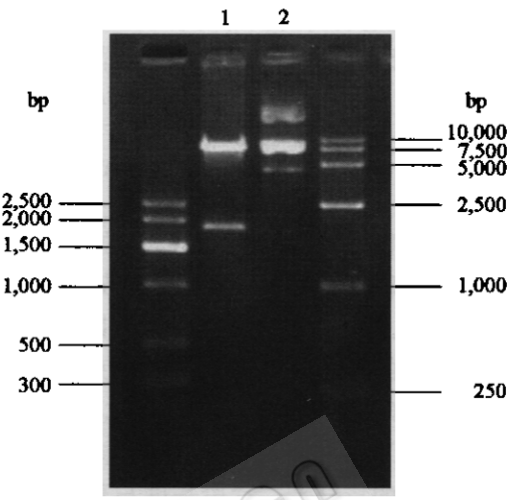

图3　重组质粒 pSGAYF 的双酶切分析

1 pSGAYF/*Pst* I + *Hind* Ⅲ，2 pSGAYF

2.4　嗜热古菌硫磺矿硫化叶菌糖化酶基因在枯草杆菌中的表达及酶活测定

构建好的重组质粒 pSGAYF 按照1.2的方法转化到 DB1342 中，Km 抗性筛选，挑到一个阳性转化子，命名为 GpfD。菌落 PCR 检测有目的 DNA 条带，用枯草普通发酵培养基发酵，接菌2h后加蔗糖至终浓度2%诱导表达，24h后取发酵菌液6,000 r/min离心，10min，弃去菌体，取上清液按照1.6的方法测酶活。测得上清发酵液酶活力为3.6U/mL。

2.5　SDS-PAGE 结果

GpfD 经蔗糖诱导后在69kD处有一条明显的特异的蛋白表达条带，与软件预测大小一致，比文献报道值略大（图4）[2]。

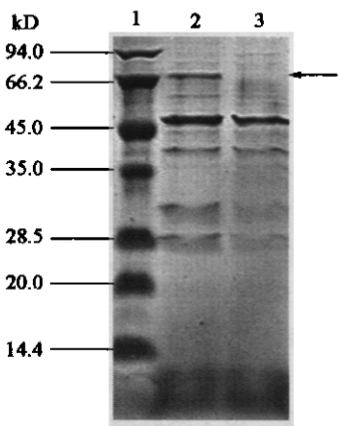

图4　枯草杆菌 DB1342（pSGAYF）表达的糖化酶 SDS-PAGE

1 Protein marker, 2 DB1342（pSGAYF）induced, 3 DB1342（pSBPYF）induced

The arrow indicates the glucoamylase specific band

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

2.6 重组酶的性质

用 pSGAYF 转化子的发酵上清液进一步初步研究重组酶活性与 pH、温度的关系，结果见图 5、图 6。

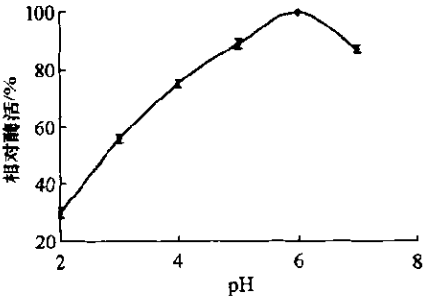

图 5　枯草杆菌 DB1342（pSGAYF）表达的糖化酶酶活与 pH 的关系

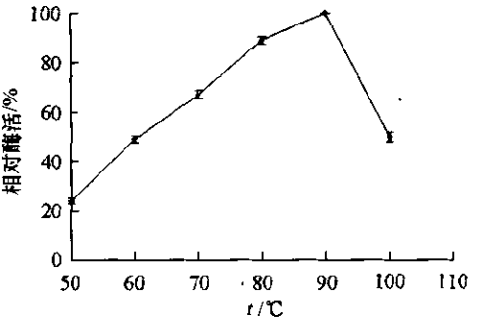

图 6　枯草杆菌 DB1342（pSGAYF）表达的糖化酶酶活与温度的关系

重组酶活性以单位体积发酵上清液所含酶活单位（U/mL）计算（下同），以最佳的酶活为 100%。

由图 5 可见重组酶的最适 pH 为 6.0，这与韩国 Mi-Sun Kim 等[2]人报道的大肠杆菌胞内表达的重组酶的最适 pH 基本一致。目前酒精工业生产中淀粉液化时使用的高温淀粉酶的最适 pH 也为 pH6.0，如在糖化时使用该酶可省去调 pH 一步，节省了成本。

图 6 表明：重组酶的热稳定性非常好，90℃为最适温度，100℃时仍有活性。其耐热性与目前工业常用的来源于地衣芽孢杆菌的耐高温淀粉酶相近，如使用该重组酶用于酒精工业在糖化工艺时可以不用降温，节省了能源。可能由于测定方法的差异，不同研究者对重组酶的最适温度的报道有差异，但该酶具有耐热性将是一致的结论。

由上述实验可以看到，克隆到嗜热古菌硫磺矿硫化叶菌糖化酶的基因，并且在枯草芽孢杆菌中得到胞外分泌表达，表达产物在高温下具有较好的酶活。至此，嗜热菌硫矿硫化叶菌的糖化酶基因的克隆及其在枯草芽孢杆菌中的胞外分泌表达获得了成功，为下一步研究酶学性质，进一步提高其酶活和稳定性，进而为产业化打下基础。

致谢　衷心感谢张树政院士、马毓甲先生和汤懋竑教授对本实验的指导和帮助！

参 考 文 献

[1] 罗贵民，曹淑桂，张　今. 酶工程. 北京：化学工业出版社，2002.

[2] Mi S K, Jong T P, Young W K, *et al*. Applied and Environmental Microbiogy, 2004, **70** (7): 3933 ~ 3940.

[3] 李瑞芳，罗进贤，张添元，等. 中山大学学报（自然科学版），2004, **43** (5): 73 ~ 75.

[4] Spizizen J. Proc Nat Acad Sci USA, 1958, **44** (3): 1072 ~ 1078.

[5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Habor Laboratory Press, 1994.

[6] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京：科学技术出版社，1993.

[7] 唐国敏，杨开宇. 生物工程学报，1995, **11** (4): 321 ~ 324.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn