

一种不依赖钙离子的酸性 α 淀粉酶基因的克隆表达

杨键^{1,2} 王青艳^{1,2} 金辉^{1,2} 秦艳² 王成华^{2,3} 黄日波^{1,2*}

- (1. 广西大学生命科学与技术学院 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室 广西 南宁 530005)
(2. 广西科学院国家非粮生物质能源研究工程中心 广西 南宁 530007)
(3. 南京工业大学生物与制药工程学院 江苏 南京 210009)

摘要: 以产酸性淀粉酶菌株 *Bacillus* sp. CN7 的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增到 α 淀粉酶成熟肽基因, 将该基因插入表达质粒 pSE380 中, 构建重组质粒 pSE380-cn7a。将重组质粒导入到 *Escherichia coli* JM109 中, IPTG 诱导表达。重组酶经 Sephacryl S300、Ni-NTA 纯化后测定其酶学性质。重组酶 CN7A 的最适温度为 65°C, 最适 pH 为 5.5-6.0, 对可溶性淀粉的 K_m 值为 3.784 g/L, 最大反应速度为 101.2 mg/(L·min), 该酶的热稳定性不依赖钙离子。

关键词: 酸性淀粉酶, 不依赖钙离子, 克隆表达, pKa

Cloning and Expression of Ca-independent Acid α -amylase Gene

YANG Jian^{1,2} WANG Qing-Yan^{1,2} JIN Hui^{1,2} QIN Yan² WANG Cheng-Hua^{2,3}
HUANG Ri-Bo^{1,2*}

- (1. Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bio-resource Conservation and Utilization, College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005, China)
(2. National Non-grain Bio-energy Engineering Research Center, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China)
(3. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: The α -amylase gene *cn7a* was amplified by PCR from *Bacillus* sp. CN7 genome DNA. The recombinant plasmid pSE380-*cn7a* was constructed by inserting gene *cn7a* into expression vector pSE380 and then transformed into *Escherichia coli* JM109. The purified amylase CN7A showed an optimal activity at pH 5.5-6.0 and 65°C, the K_m value is 3.784 g/L taking soluble starch as substrate, and the maximum velocity was determined as 101.2 mg/(L·min). Ca ion was not required for the thermal stability of CN7A.

Keywords: Acid amylase, Ca-independent, Cloning and expression, pKa

α 淀粉酶是一种重要的工业酶,被广泛应用于食品、纺织、洗涤剂及生物能源等行业。自上世纪80年代以来工业用 α 淀粉酶大多来自 *Bacillus licheniformis*, 该酶的最适作用温度为 90°C, 最适 pH 为 6.5, 且该酶的热稳定性依赖于钙离子^[1]。而淀粉液的 pH 约 4.5, 且后续的糖化酶最适作用 pH 也在 4.5 左右, 为了让淀粉转化为葡萄糖使用到的两种酶都能起到最佳效果往往需要在液化前后加入碱或酸调整 pH, 这样既增加了工序又抬高了成本。因此开发耐酸且不依赖钙离子的淀粉酶显得尤为重要。

本实验室从堆肥中筛选到一株产淀粉酶菌株 *Bacillus* sp. CN7, 该菌株所产淀粉酶耐酸性能优越, 酶活也较高。为了更深入地了解该淀粉酶的结构与功能, 本文对 *Bacillus* sp. CN7 的 α 淀粉酶基因进行了克隆表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: *Bacillus* sp. CN7 为本实验室筛选; 克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司; 质粒 pSE380 购自 Invitrogen 公司; *Escherichia. coli* JM109 为本实验室保存。

1.1.2 酶和试剂: LA *Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶、 λ DNA/*Hind* III marker、T4 连接酶及 Protein molecular mass marker 均购自 MBI 公司; 其余为国产分析纯。

1.1.3 培养基: LB 培养基(每升含: 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, 调 pH 至 7.0) 氨苄青霉素终浓度为 100 mg/L。

1.2 方法

1.2.1 淀粉酶成熟肽基因的克隆: *Bacillus* sp. CN7 基因组 DNA 提取方法见华舜细菌基因组 DNA 提取试剂盒。设计引物 amy-sense: 5'-GGCCGAATTCGAAACTGCAAACAAATCGAATG-3', amy-antisense: 5'-GCGCAAGCTTATGCGGAAGATAACCATTCAA A-3', 上下游引物分别含有 *Eco*R I、*Hind* III 酶切位点。以基因组 DNA 为模板扩增 α 淀粉酶成熟肽基因, PCR 条件为: 95°C 5 min; 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物经 *Eco*R I、*Hind* III 双酶切后与 pSE380 载体连接, 测序分析正确后进行表达。

1.2.2 α 淀粉酶基因的表达与纯化: 挑取重组子于 37°C、220 r/min 摇床培养至 OD_{600} 为 0.6, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 于 37°C、220 r/min 诱导表达 10 h, 收集菌体超声破碎, 粗酶液分别经 Sephacryl S300 和 Ni-NTA 进行纯化。

1.2.3 淀粉酶酶活的检测: 将 500 μ L、pH 6.0 的柠檬酸缓冲液配制成 0.1 g/L 可溶性淀粉置于 65°C 水浴保温 5 min, 加入 10 μ L 纯酶液反应 5 min, DNS 法测定生成还原糖的量。一个酶活力单位(U)定义为在上述反应条件下, 每分钟转化等价于 1 μ mol 葡萄糖的还原糖所需的酶量。

1.2.4 序列分析及同源建模: 基因序列测定委托鼎安生物工程公司完成, 核苷酸及氨基酸序列利用 Vector NTI 及 NCBI BLAST 在线工具进行分析。蛋白质同源模型的构建使用 M4T sever^[2], 活性中心位点 pKa 值的计算利用 PROPKA^[3]程序完成。

2 结果

2.1 淀粉酶基因 *cn7a* 的克隆

以 *Bacillus* sp. CN7 基因组 DNA 为模板, amy-sense 和 amy-antisense 为引物, PCR 扩增得到约 1.8 kb 的片段, 并将其酶切后与 pSE380 连接。对重组子测序结果分析表明获得的淀粉酶基因 *cn7a* 与来自 *Bacillus subtilis* 的 α 淀粉酶基因同源性最高为 98%, 对应的氨基酸同源性为 97%。此外, CN7A 与来自 *Bacillus amyloliquefaciens* (95%)、*Streptococcus bovis* (54%)、*Lactobacillus amylovorus* (52%)的 α 淀粉酶均有一定的同源性。

2.2 淀粉酶基因 *cn7a* 的表达与纯化

SDS-PAGE 结果(图 1)表明淀粉酶成熟肽基因 *cn7a* 在 *Escherichia coli* JM109 中成功表达, 66 kD 附近出现了明显的蛋白表达条带, 与预测的蛋白大小相符。粗酶液经 Sephacryl S300 和 Ni-NTA 纯化后得到单一的电泳条带, 可用于酶学性质分析。

2.3 重组酶 CN7A 的酶学性质

用不同 pH 的缓冲液 (pH 3.0-8.0: 柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液, pH 9.0-10.0: 甘氨酸-NaOH 缓冲液) 配制 0.1 g/L 的可溶性淀粉, 于 65°C 分别测酶活, 可得到 pH 与酶活之间的关系曲线(图 2), 确定 CN7A 最适作用 pH 为 5.5-6.0, 是酸性淀粉酶。

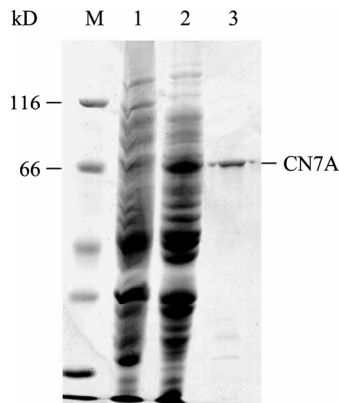


图1 重组大肠杆菌表达淀粉酶基因 *cn7a* 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of *cn7a* gene expressed in *Escherichia coli* JM109

Note: M: Protein weight marker; 1: Crude extract of *E. coli* JM109 with pSE380; 2: Crude extract of *E. coli* JM109 with pSE380-*cn7a*; 3: Purification of CN7A.

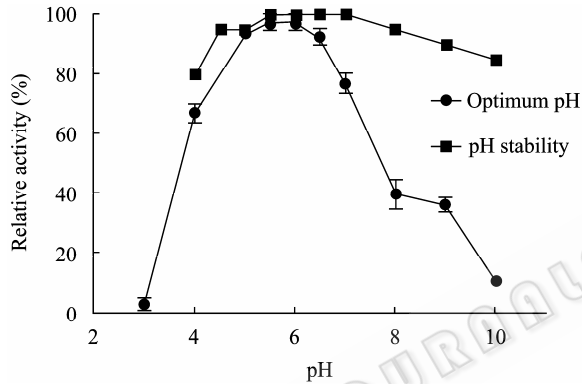


图2 pH 对 CN7A 酶活的影响
Fig. 2 Effects of pH on activity of amylase CN7A

纯酶液保存于不同 pH 的缓冲液中, 4°C 放置 30 min 后在最适作用条件下测定残余酶活力, 由图 2 可知 CN7A 在 pH 4.0–10.0 均能保持 80% 以上的酶活。

在 pH 5.5 的条件下, 于不同温度中测定 CN7A 的酶活, 温度-相对酶活力曲线如图 3 所示, 由图可知 CN7A 的最适温度为 65°C。

在纯酶液中分别添加 EDTA 和 CaCl₂ 使其终浓度为 1 mmol/L, 4°C 下放置过夜, 然后 65°C 水浴。分别在 1、3、5、10、15 min 后取出 10 μ L 酶液测定其残余酶活力, 得到时间与残余酶活之间的关系曲线如图 4。由图可知, CN7A 在金属螯合剂 EDTA 或 Ca²⁺ 存在的条件下, 热稳定性均与未添加外源离子的酶液保持一致, 因而可证明 CN7A 的热稳定性不依赖钙离子。

以不同浓度的可溶性淀粉为底物, 在最适作用条件下测定其反应速度, 得到 1/v 与 1/[S] 之间的关系线(图 5), 由计算结果可知, CN7A 对可溶性淀粉的 K_m 值为 3.784 g/L, 其最大反应速度为 101.2 mg/(L·min)。

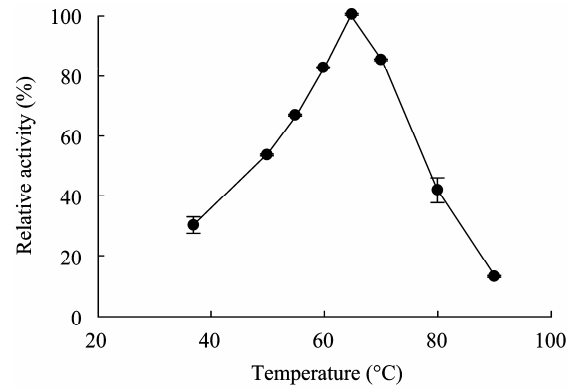


图3 温度对 CN7A 酶活的影响
Fig. 3 Effects of temperature on activity of amylase CN7A

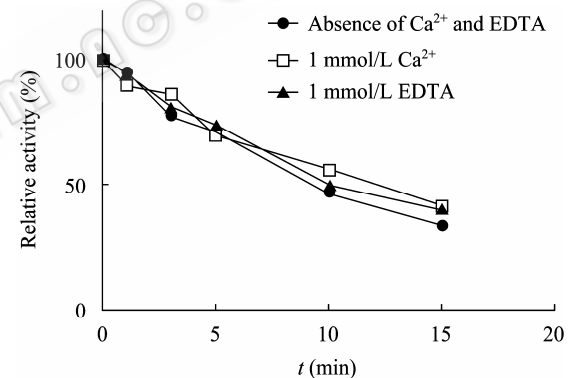


图4 CN7A 在 65°C 下的热稳定性
Fig. 4 Irreversible thermostability of CN7A at 65°C

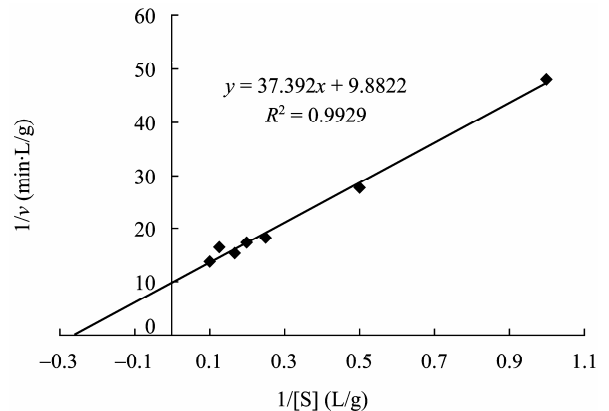


图5 CN7A 对可溶性淀粉为底物的 Lineweaver-Burk 图
Fig. 5 Lineweaver-Burk plot for determination of K_m value for soluble starch

2.4 CN7A 的同源建模

以来自 *Bacillus subtilis* α 淀粉酶的三维结构 (PDB 登录号为 1ua7) 为模板, 利用 M4T 服务器对 CN7A 进行同源建模。CN7A 的三维结构如图 6, 由图可发现明显的 $(\alpha/\beta)_8$ 桶结构即结构域 A, 该结构为 α 淀粉酶家族所共有, 活性中心 D173、E205、D266 位于 $(\alpha/\beta)_8$ 桶中央。结构域 B、C 分别位于 A 区的两侧。

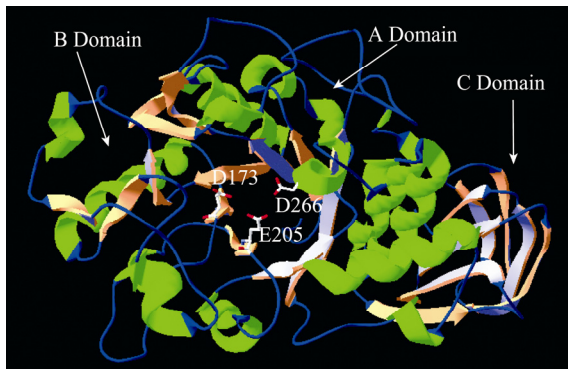


图 6 淀粉酶 CN7A 的同源建模结构
Fig. 6 Homology modeling structure of CN7A

3 讨论

α 淀粉酶的活性中心高度保守, 都由 2 个天冬氨酸和 1 个谷氨酸组成。其中谷氨酸在催化过程中是质子供体, 而第一位天冬氨酸 (对应 CN7A 的 D173) 起亲核试剂的作用, 另外 1 个天冬氨酸不直接参与催化反应, 但对提高谷氨酸的 pKa 值以及使底物分子变形起到重要的作用^[4-5]。Mcintosh 等^[6]以木糖异构酶为材料证实了酶的最适作用 pH 与活性中心 pKa 值有关, 并提出这种现象可能普遍存在于水解糖苷酶家族中。PROPKA 程序^[3] 用来预测蛋白质极性氨基酸残基的 pKa 值, 我们找到了来自芽孢杆菌属具有代表性的酸性、中性、碱性 α 淀粉酶, 其预测的 pKa 值见表 1。由表中可以发现作为质子供体的谷氨酸的 pKa 越小, 作为亲核基团的第一位天冬氨酸的 pKa 值就越大, 其最适 pH 值便越小。

几乎所有已知三维结构的 α 淀粉酶都含有至少 1 个钙离子结合位点, 其中在 A 结构域与 B 结构域接口处的钙离子结合位点 Ca I 高度保守^[11]。Ca I 连接 A、B 两区对催化中心结构的稳定以及底物结合域的形成起着极其重要的作用^[12]。然而对来自 *Bacillus*

sp. KSM-K38 的一种不依赖钙离子的 α 淀粉酶 (Amyk38) X 射线衍射结果表明, 在 Ca I 相应的位置并没有结合上钙离子, 而是被钠离子所取代^[13]。本文研究的 CN7A 也不依赖于钙离子, 但其同源性与 Amyk38 的同源性非常低 (仅为 25%), 是否其 Ca I 位点被钠取代还有待其三维结构得到详细解析才能确定。

表 1 来自芽孢杆菌 α 淀粉酶活性中心 pKa 值的预测
Table 1 Predicted pKa value of active sites from *Bacillus* α -amylase

PDB ID	Source	Optimum pH	Asp	Glu	Asp
1vjs	<i>B. licheniformis</i>	6.5 ^[11]	6.73	3.71	10.04
3BH4	<i>B. amyloliquefaciens</i>	6.0 ^[7]	9.36	2.99	3.25
Predicted	<i>Bacillus</i> sp. XY	5.0 ^[8]	9.17	1.25	10.07
Predicted	<i>Bacillus</i> sp. KSM-1378	8.0 ^[9]	7.39	3.02	9.91
Predicted	<i>B. subtilis</i> X-23	5.5 ^[10]	9.30	5.50	0.64
Predicted	Uncultured GXAA	7.0	9.52	2.96	7.50
Predicted	<i>Bacillus</i> sp. CN7	5.5-6.0	9.26	1.01	9.63

本文研究的 α 淀粉酶热稳定性不依赖钙离子, 最适作用 pH 为 5.5-6.0, pH 5.0 时可达最高酶活力的 90% 以上, 且在 pH 4.0-10.0 范围内稳定, 该 α 淀粉酶的性质与糖化酶基本一致, 有望在同步糖化工艺中得到应用。

参考文献

- [1] M Violet, JC Meunier. Kinetic study of the irreversible thermal denaturation of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase. *Biochem J*, 1989, **263**(3): 665-670.
- [2] Fernandez-Fuentes N, Rai BK, Madrid-Aliste CJ, et al. Comparative protein structure modeling by combining multiple templates and optimizing sequence-to-structure alignments. *Bioinformatics*, 2007, **23**(19): 2558-2565.
- [3] Bas DC, Rogers DM, Jensen JH. Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes. *Proteins*, 2008, **73**(3): 765-783.
- [4] Strokopytov B, Penninga D, Rozeboom HJ, et al. X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with acarbose. Implications for the catalytic mechanism of glycosidases. *Biochemistry*, 1995, **34**(7): 2234-2240.
- [5] Uitdehaag JC, Mosi R, Kalk KH, et al. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *Nat Struct Biol*, 1999(6): 432-436.
- [6] McIntosh LP, Hand G, Johnson PE, et al. The pKa of the general acid/base carboxyl group of a glycosidase cycles

- during catalysis: a ^{13}C -NMR study of *Bacillus circulans* xylanase. *Biochemistry*, 1996, **35**(31): 9958–9966.
- [7] Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol*, 2003, **89**(1): 17–34.
- [8] Xu DL, Yan X. A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization. *Bioresour Technol*, 2008, **37**(7): 4315–4320.
- [9] Kazuaki I, Yuji H, Hiroshi H, *et al.* Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic bacillus isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(9): 3282–3289.
- [10] Kohji O, Takashi K, Hiroki K, *et al.* Characteristics of two forms of α -amylases and structural implication. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(10): 4652–4658.
- [11] Machius M, Wiegand G, Huber R. Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* α -amylase at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol*, 1995, **246**(4): 545–559.
- [12] Machius M, Declerck N, Huber R, *et al.* Activation of *Bacillus licheniformis* α -amylase through a disorderorder transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. *Structure*, 1998, **6**(3): 281–292.
- [13] Nonaka T, Fujihashi M, Kita A, *et al.* Crystal structure of calcium-free α -amylase from *Bacillus* sp. strain KSM-K38 (AmyK38) and its sodiumion binding sites. *J Biol Chem*, 2003, **278**(27): 24818–24824.

编辑部公告

中国科学院微生物研究所期刊广告部简介

中国科学院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 已取得北京市工商局正式批准的广告经营许可证(京朝工商广字第 8154 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)及《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如有刊登广告的需要, 欢迎与我们联系或 E-mail 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

各公司与此四刊签订的广告费用请汇入以下账号:

收款单位: 中国科学院微生物研究所

开户银行: 中国工商银行北京分行海淀西区支行

帐号: 0200004509089117425

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武文 王闵

电子信箱: gg@im.ac.cn

网 址: <http://journals.im.ac.cn>