第10卷 无锡轻工业学院学报 Vol.10
第2期 JOURNAL OF THE WUXI INSTITUTE OF LIGHT INDUSTRY 1991 No.2

碱性高温淀粉酶基因的克隆与表达及酶特性的初步研究

许赣荣 高木昌宏 森川正章 今中忠行

（无锡轻工业学院发酵工程系） （日本大阪大学工学部发酵工学科）

摘要 从土壤中筛选到一能分泌碱性高温淀粉酶的芽孢杆菌属菌株。用质粒pTB522作载体，该淀粉酶基因(amyA)被克隆并在枯草芽孢杆菌ANA-1中得到表达。又通过亚克隆，得到含酶基因的更小重组质粒 pTBX32 (14.6kb)。携带该重组质粒的枯草芽孢杆菌ANA-1分泌的淀粉酶的特性与供体菌的相同。该酶作用最佳pH为8.5、最适温度为75℃，但在65℃,pH8.5条件下处理1h，该酶活性不降低。通过硫铵沉淀、热处理、DEAE——纤维素色谱和亲和色谱等分离技术，从培养液中部分纯化了该酶，其分子量估计为56000。

关键词 碱性高温淀粉酶；分子克隆

0 前 言

早在50年代，Stark Tetrault[1]和Campbell[2]曾报道过能产生耐热性α-淀粉酶的嗜热脂肪芽孢杆菌(Bacillus Stearothermophilus)。Ogasahara等[3]曾研究了该淀粉酶的生理生化特性。

在极端条件下，如高温、酸性及碱性环境中，一般的酶都会变性失活；而在这样的环境条件下，有些酶不仅能发挥正常的催化功能，而且稳定性良好。因此，在理论和实际应用中这种酶都具有重要的价值。近些年来的研究表明，以嗜热菌中分离出来的酶比嗜温菌中分离出来的酶耐热性更好。在许多方面，这两种类型的酶却很相似。可以说，高温酶的热稳定性的分子机理至今不甚清楚。

本文主要叙述耐高温碱性淀粉酶基因的分子克隆及在枯草芽孢杆菌 ANA-1 中的表达，并简述该淀粉酶的某些特性。

1 材料和方法

1.1 培养基

肉汤培养基如前人所述[4],LSS肉汤培养基是在肉汤培养基中补加 0.5%(Wt./Vol.)可溶性淀粉。用来筛选淀粉酶生产菌的LSA——琼脂培养基含0.25%的蓝淀粉(Starch azure)(Sigma)，其余成分同肉汤培养基。用于筛选重组转化子的 LSD-琼脂培养基含0.25%的蓝淀粉，0.2%的胰化蛋白胨(Difco)，0.2%的酵母浸提物(Yeast extracts)，0.2%NaCl，

本文1990年1月8日收到。
本研究工作得到联合国教科文组织及日本政府资助，特此致谢。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5%的琼脂。

1.2 菌株和质粒

受体菌　枯草芽孢杆菌ANA-1 (arg15、hsrM、hsmM、Npr⁻、Amy⁻, Apr⁻)；

供体菌　XAL601，是从土壤中筛选得到的一产淀粉酶的菌株(见2.1部分)；

质粒　pTB522(5)(含四环素抗性基因Tc^r)，用作克隆载体，pTB524 (Tc^r)用作于亚克隆载体。

1.3 酶活性分析

测定在50℃时反应混合物中释放的还原糖。反应混合物(1 ml)组成：0.25ml4%可溶性淀粉，0.25ml0.2mol的Na_2HPO_4/NaH_2PO_4缓冲液(pH8.4)，0.5ml酶液。50℃反应 5min 后在反应液中加入 1 ml3,5-二硝基水杨酸试剂(6)，并于沸水中保持 5min，冷却后测O.D_{540}. 1 酶活单位定义为：在50℃每3min释放1mg还原糖(以麦芽糖计)所需要的酶量。

1.4 蛋白质含量的测定

使用BCA 蛋白质测定专用试剂(BCA protein assay reagent, Pierce公司出品)测定蛋白质浓度。分析方法遵循厂商推荐的方法。

1.5 淀粉酶产生菌菌落的检定

用LSD——琼脂培养基(含25μg/ml四环素)直接检定淀粉酶阳性 (Amy^+) 菌落。在蓝色的琼脂背景下，阳性菌落的外围有一明显的褪色圈。

1.6 质粒DNA和染色体DNA的制备

有两种方法用于制备质粒DNA：快速碱性提取法及 $CsCl$-ethidium bromide 沉降密度梯度离心法，后者也用来提取供体菌中的染色体 DNA。

1.7 限制酶的使用方法、连接及转化

用限制酶处理DNA及用T_4DNA连接酶连接各种类型的DNA都遵循厂商(Takara公司)推荐的方法。

转化方法　感受态细胞法(6)。

1.8 DNA的凝胶电泳

按标准方法(7)用1%琼脂糖凝胶进行DNA片段的分离。

1.9 酶的纯化

DEAE-Cellulose柱色谱：(DE52, Whatman)；HPCL 凝胶过滤法：(TSK-gel, G3000SW, TOSOH)

亲和柱色谱　Sephadex G-100(Pharmacia)。

其它纯化方法在本文中有关部分叙述。

1.10 酶分子量的测定

利用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，(SDS-PAGE)，同时点入经一定方法处理的酶样品及标准分子量蛋白质样品(Pharmacia)，通过比较两者的泳动性来估计淀粉酶的分子量。

2 结　果

2.1 嗜热碱性淀粉酶生产菌的筛选及特性测定

使用LSA琼脂培养基(初始pH为10.0)在 65℃ 培养，从土壤样品中筛选到一株能分泌淀粉酶的嗜热碱性细菌，此菌被定名为XAL 601。该菌为短杆状，能形成孢子，革兰氏染色阳

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

性，过氧化氢酶阳性。这些特性表明此菌属于芽孢杆菌。在pH9.0的肉汤培养基中培养时，生长温度范围为37—62℃. 在50℃液态培养时，该菌在pH7.0至10.0范围内能正常生长。最佳生长pH为9.0—9.5.在含1%可溶性淀粉的肉汤培养基中，该菌能分泌最适作用pH为8.5的淀粉酶。

2.2 淀粉酶基因的克隆及在枯草芽孢杆菌ANA-1中的表达

将供体菌XAL601染色体DNA(20μg)用限制性内切酶PstI处理，把分子量处于2.0kb和9.4kb的DNA片段分离提取出来，然后用T_4DNA连接酶把这些片段与质粒pTB522(用PstI处理)连接。连接混合物用于转化枯草芽孢杆菌ANA-1。细胞涂布于LSD琼脂平板(含2.5μg/ml四环素)上，在2000多个菌落中，获得了一个产淀粉酶的阳性菌落。将该菌落划线于新的LSA琼脂平板上37℃培养过夜，在大量菌落中得到6个产淀粉酶的阳性菌落。把其中的一个菌落划线于新的LSA琼脂平板上培养，几乎所有的菌落都显示出Tc^rAmy^+表型，这表明携带重组质粒的ANA-1产淀粉酶的能力是稳定的。用大规模分离提取法从转化子中制备了重组质粒DNA. 该重组质粒被定名为pTBX12。用pTBX12再次转化枯草芽孢杆菌ANA-1，得到了100%的Tc^rAmy^+菌落。(图1)这表明该重组质粒中确实含有淀粉酶基因。该基因定名为amyA.

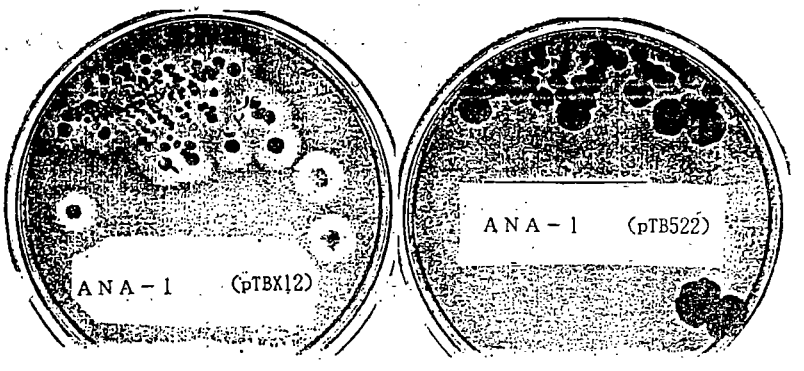


图1 左图：携带重组质粒 pTBX12的B.subtilis ANA-1
右图：携带质粒 pTB522 的B.subtilis ANA-1

2.3 淀粉酶基因amyA的定位

用数种不同的限制性内切酶分别处理重组质粒pTBX12，琼脂糖凝胶电泳图谱表明重组质粒确由pTB522及7.7k*b*的外源DNA片断所组成。限制酶切图如图2所示。

为了亚克隆到一个更小的含amyA的DNA片段，需要准确地确定amyA的位置。我们构造了两个缺失型质粒。已知复制子位于原质粒8.5kb的PstI-HindⅢ片段中。从pTBX12中切去含有外源DNA断片的4.9k*b*的HindⅢ片段，把剩余的DNA片段(13.6k*b*)连接后转化到枯草芽孢杆菌ANA-1中去，得到的是淀粉酶阴性表型。另一策略是用HindⅢ和PstI处理PTBX12，再通过电泳分离，把2.6k*b*的Psti-HindⅢ片段和8.5k*b*的HindⅢ-PstI片段挑取出来，连接并转化后，结果仍然是淀粉酶阴性表型。亚克隆2.6 kb的Psti-HinⅢ片段以及5.1kb HindⅢ-PstI片段都未得到淀粉酶阳性表型，这一事实表明HindⅢ位于淀粉酶基因之内。

我们注意到另一载体质粒pTB524和重组质粒一样也具有PstI和BamHI酶切点，于是用PstI和BamHI处理重组质粒pTBX12以及pTB524，然后，把pTBX12中的4.6kbp PstI-

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

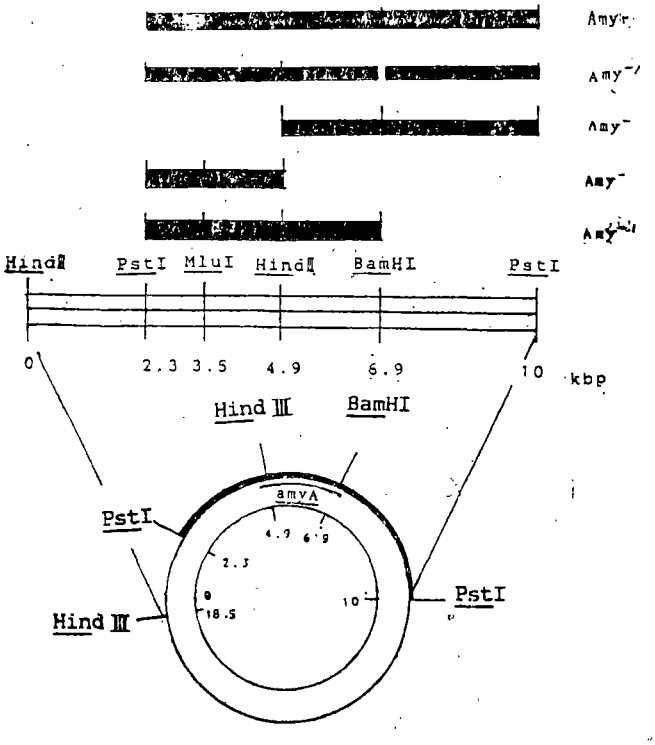


图 2　pTBX12 的各种衍生物的结构示意图

BamHI片段与pTB524中的相关的片段连接，并转化 ANA-1，仍然未发现淀粉酶阳性菌落故我们推定 BamHI 位点也位于淀粉酶基因之内。为了证实这一点，在BamHI位点引入了编码结构转移突变。其方法是：用BamHI处理pTBX12，然后用钝性末端试剂及E.Coli DNA多聚酶 I 的 Klenow片段把突出的 3′ 末端填补上，再用T_4连接酶把线性DNA连接起来转化，结果确实没有发现淀粉酶阳性菌落，这就证实了BamHI也位于淀粉酶基因之内。由图 2 可看出各种pTBX12的衍生物的结构。

2.4 amyA 的亚克隆

我们又用一些限制酶理处理重组质粒 pTBX12，构建了一个更为详细的限制性酶切图。从而找到了一个亚克隆amyA的最佳方案。图3为亚克隆的流程示意图。

先用限制酶MIuI和PstI确理 pTBX12，把两段较大的 PstI-MIuI 片段连接起来，得到一个较小的质粒。该质粒定名为pTBX22，其酶切图如图3—B所示。携带 pTBX22 的 ANA-1能分泌淀粉酶。第二步再用 PstI 处理pTBX22，接着用 Bal31 核酸酶处理线性D NA，把多余的DNA片段切去(处理时间分别为15、17、20、22 和 24min)，中止酶切反应后，把反应24 min后的DNA提取出来并用 T_4DNA 连接酶连接。转化后，在LSA琼脂平板上培养过夜，约有三分之一的菌落显示淀粉酶阳性表型。取其中一菌落提取质粒，其限制酶切图如图 3—C所示。该质粒定名为pTBX32

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

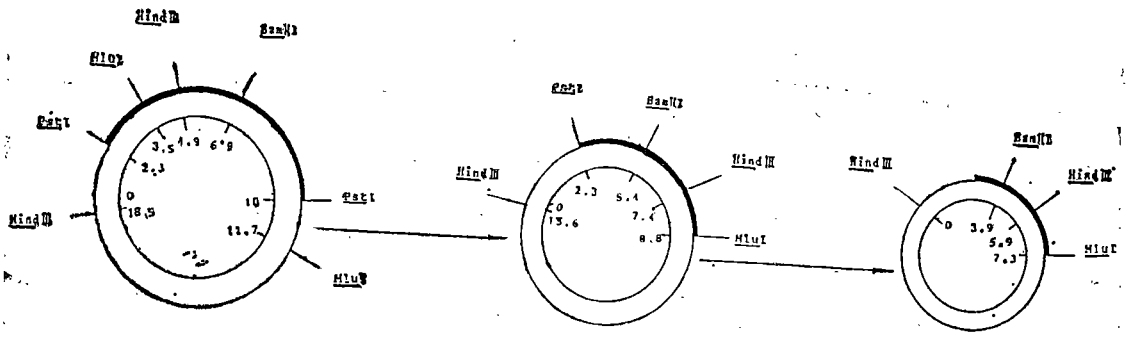


图 3 亚克隆过程示意图

2.5 淀粉酶的部分纯化及酶分子量的估计

为纯化淀粉酶，我们分别在37℃和50℃肉汤培养基中培养携带重组质粒pTBX32的枯草芽孢杆菌ANA-1及供体菌XAL601。在培养物的上清液中加入硫铵(至80%的饱和度)，然后在4℃静止过夜，离心收集沉淀物，再用0.02mol的Na_2HPO_4/NaH_2PO_4，pH8.1缓冲液溶解沉淀物。再用相同的缓冲液透析，得到的浓缩酶液再经60℃，15min处理，其上清液用于测定酶的部分特性并用于进一步纯化。

下列方法曾用于进一步纯化：

DEAE-Cellulose柱色谱(DE52)；

HPLC凝胶过滤(TSK-gel，G3000SW)，

亲和柱色谱：(Sephadex G-100)。

各种类型的柱的流出液经过适当处理后，再用SDS-PAGE方法测定淀粉酶的分子量。由于时间关系，还未曾得到淀粉酶的单一区带，但根据上述色谱柱流出液样品的SDS-PAGE图及酶活性曲线的综合分析，可推测淀粉酶的分子量为56000。

2.6 来自供体菌和转化子淀粉酶的特性

我们初步研究了来自供体菌及转化子的淀粉酶的某些特性，发现它们的最佳作用温度都是75℃(如图4—A所示)。此外，最佳作用pH都是8.5(如图4—B所示)。在pH 8.4左右，酶活最为稳定，在pH8.5，65℃时热处理1 h，酶活也不受影响，(如图4—C及图4—D所示)。

3 讨 论

在酶的纯化过程中，我们碰巧发现在低盐浓度时，淀粉酶能吸附在凝胶过滤树脂上，故我们又用亲和色谱柱(Sephadex G-100)进一步纯化。当把酶样施加到G-100柱上时，酶被滞流、然后随低分子量蛋白质流出。再用凝胶过滤树脂(TSK G-3000 Silica base)在高盐浓度情况下，可成功地排除低分子量蛋白质。故这两种柱联合应用可能更适合于进一步纯化淀粉酶，以便精确测定淀粉酶的各项性质。

pTBX32虽不是含淀粉酶基因的最小质粒，但用相同的方法(见2.4)可以亚克隆到含淀粉酶基因的最小片段(延长Bal 31核酸酶的处理时间)。故可以测定酶基因的DNA序列，并进一步阐明淀粉酶的分子机理。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

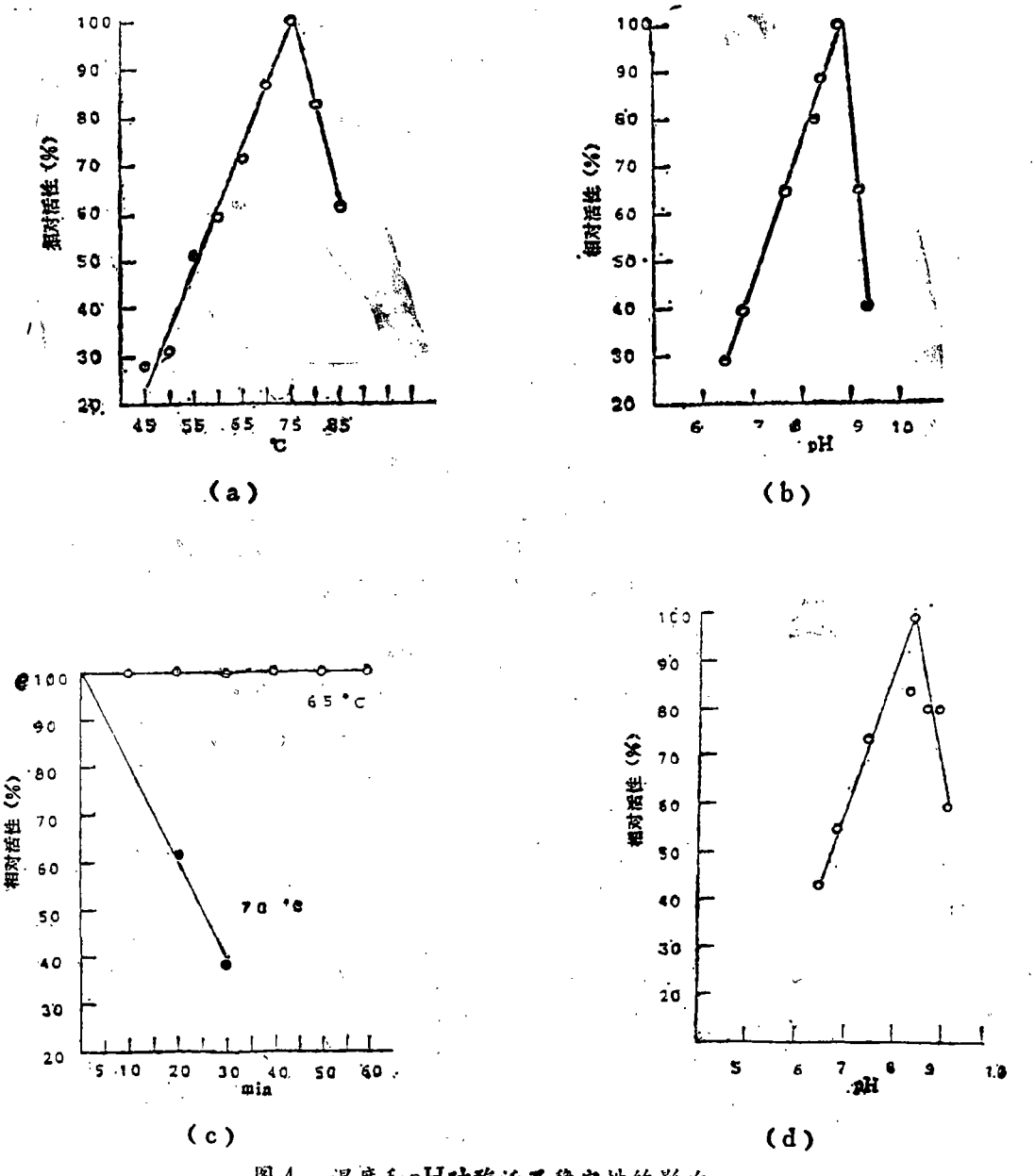


图 4　温度和pH对酶活及稳定性的影响

参　考　文　献

1 Stark E & Tetrault P A. J Bacteriol, 1951; 62: 264—249
2 Campbell L L Jr. Arch Biochem Biophys, 1955; 54: 154—161
3 Ogasahara K, Imanishi A, & Isemura T J Biochem, 1970; 67: 65—75
4 Imanaka T, Fujii M, Aramori I, & Aiba S. J Bacteriol, 1982; 149, 824
5 Imanaka T, Himeno T, & Aiba S. J Gen Microbiol, 1985; 131, 1753
6 Aiba S, Kitai K, & Imanaka T. Appl EnvironMicrobiol, 1983; 46: 105

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

7 Maniatis T, Fritsch E F, & Sambrook J. Molecular Clon-ing, Cold Spring Harbor Laboratory, Clod spring Harbor. New York: 1982; 149

Cloning in Bacillus Subtilis of thermostable and Alkalophilic amylase From a Thermophilic Bacillus sp

Xu Ganrong (Wuxi Instiute of Light Industry)
Masahiro Takagi, Masaaki Morikawa, and Tadayuki Imanaka
(Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University, Japan)

Abstract A thermostable and alkalophilic Bacillus strain XAL601 (rod, Spore-forming, gram-positive, catalase positive), With the ability to secrete thermostable amylase active at high pH, has been screened from soil samples. The amylase gene (amyA) was cloned and expressed in Bacillus subtilis ANA-1 (arg15, hsmM, hsrM, Npr⁻, Amy⁻, Apr⁻) by using $P^{TB522(T_c^r)}$ as a vector plasmid. Restriction map of the recombinant plasmid pTBX12 vas constructed. Since amyA is contained in the 7.7 kbp pstl fragment of the plasmid pTBX12 (18.5 kbp), a smaller plasmid pTBX32 (14.6 kbp) carrying the amylase gene was obtained. Bacillus subtilis ANA-1 carrying the recombinant plasmid pTBX12 secretes the amylase which exhibits the same charateristics with those of enzyme from the parental strain XAL 601. The optimum pH and temperature for the enzyme activity were around 8.5 and 75℃, respectively. The enzyme activity was not changed after the heat treatment at 65℃, pH8.5, for one hour. The amylase was partially purified by ammonium sulfate precipitation, heat treatment, DEAE-cellulose column chromatography and affinity column chromatography. According to the patterns of SDS-PAGE, molecular weight of the amylase was estimated to be 56,000.

Keywords thermostable; alkolophilic; amylase; Bacillus; Moleculoning

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net