

嗜热古菌高温酸性淀粉酶基因合成和大肠杆菌中的表达*

柯 涛¹,熊 兰²,石晴芳²,马向东²

1(南阳师范学院 生命科学与技术学院,河南 南阳,473061) 2(湖北大学 生命科学学院,湖北 武汉,430062)

摘 要 BD5088 是来源于 1 种嗜热球菌 *Thermococcus* sp. 的高温酸性 α -淀粉酶的人工突变体,研究中根据 BD5088 基因的氨基酸序列,经密码子优化,用 2 步 PCR 法合成去信号肽后的成熟肽基因。该基因全长 1311 bp,由 436 个氨基酸组成。现将其克隆到大肠杆菌的表达载体 pET30a 上,在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达,表达出的目的蛋白分子量约为 48 ku,大小与理论值一致,经过 Ni^{2+} 树脂纯化,得到纯化后的重组酶 BD5088。重组 α -淀粉酶 BD5088 具有 α -淀粉酶的活性,最适反应温度范围为 70~85℃,最适反应 pH 值为 5.6~6.0,在 100℃下酶活性半衰期约 30 min。活性不依赖于 Ca^{2+} 。本研究为该基因在毕赤酵母中的表达和基因的定向进化改造打下了基础。

关键词 高温酸性 α -淀粉酶,基因合成,表达,酶学性质

α -淀粉酶为内切型淀粉酶,能够以淀粉为底物,从淀粉内部水解 1,4- α -D-葡萄糖苷键。耐高温淀粉酶更广泛应用于淀粉加工、制糖、味精、酒精等发酵工业^[1]。发酵工业中对淀粉原料的加工工艺现广泛使用双酶法, α -淀粉酶需要与糖化酶配合使用,依次对淀粉原料进行液化和糖化处理。液化过程现广泛采用喷射液化,淀粉大颗粒经喷射液化器,在 105~110℃的高温下胶化,淀粉糊的自然 pH 值为 3.5~4.2,目前淀粉加工过程需要将 pH 值调到 6.0~6.2,在糖化过程中,糖化酶的最适作用温度、pH 等均与淀粉酶不同,因此在淀粉液化和糖化过程中需要反复用酸碱调整 pH 值,这样不仅提高了浆液中的离子浓度,而且调节不当会产生大量的副产物,影响发酵效率,增加了后续工艺的复杂程度。因此现行淀粉加工工艺迫切要求开发一种最适 pH 值与糖化酶(pH4.2~5.0)相仿的高温酸性 α -淀粉酶,以简化工业流程、节省生产成本,减少环境污染^[2,3]。

对耐热淀粉酶的研究目前以嗜热古菌淀粉酶基因为研究热点,因为它们能在酸性环境、80~110℃的环境下生长良好,产生的耐热酶在高温和酸性条件下具有很好的稳定性,而细菌来源的淀粉酶无法满足 pH 的要求。目前已发现来源于嗜热古菌的 α -淀粉酶基因已有 30 多个^[4],但并不是所有基因都能符合现行工艺要求,其中只有来自 *Pyrococcus furiosus* 的高温酸性淀粉酶基因得到深入的研究^[5],国内对高

温酸性淀粉酶的研究也大多集中在这个基因的表达上。但现有基因还不能满足生产的要求。因此,进一步开发嗜热古菌淀粉酶基因资源是首先要解决的问题。

Richardson 等从环境微生物 DNA 文库中克隆到的一系列可能来源于 1 种嗜热球菌属(*Thermococcus*)的高温酸性 α -淀粉酶基因,并通过定向进化筛选到一个高温酸性 α -淀粉酶的人工突变体 BD5088,在荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 获得表达^[3]。该基因全长 1311 bp,编码 436 个氨基酸,蛋白质的理论分子质量约 48 ku,肽链上不存在任何潜在 N-连接糖基化位点。最适 pH 4.5,最适温度 95℃,活性不依赖于 Ca^{2+} 存在,是一种高温酸性 α -淀粉酶,从热稳定性、最适 pH 和最适温度等酶学特性综合比较,其综合性质均优于其它突变体基因,具有较大的应用潜力。为了能达到生产的目的,和对该基因进行进一步的定向进化研究,本研究首先利用 2 步 PCR 法人工合成经过密码子优化 BD5088 基因,采用特殊处理矫正基因合成过程中的碱基突变。该基因在大肠杆菌中进行表达,验证其酶学性质。为进一步的酵母系统表达及该基因的定向进化筛选奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α ,BL21(DE3),T 载体,pET-30a,购于 Invitrogen 公司。pET30a-Muts 由 Peggy Hsieh 博士馈赠。

1.1.2 酶和试剂

第一作者:博士。

*河南省教育厅自然科学研究计划项目(编号:2008B80010);湖北省教育厅重点课题资助(编号:D20081004)

收稿日期:2008-06-16,改回日期:2008-09-02

Bgl II、*Xho* II、*Eco*RI、*Hind* III等限制性内切酶、T4DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、Pyrobest DNA 聚合酶、回收试剂盒、抗生素、DNA marker、蛋白质分子量标准,及其它化学试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司,PCR 引物合成和测序由上海 Sangon 公司完成。

1.1.3 培养基

筛选培养基是含 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 琼脂培养基。鉴定淀粉酶活性的培养基是在 LB 培养基的基础上添加 1% 淀粉和 0.01% 曲利苯兰^[6]。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取及操作

质粒的快速提取、检测及 DNA 的酶切、连接、大肠杆菌感受态的制备、转化和表达产物的 SDS-PAGE 分析等按文献^[7]进行。

1.2.2 基因序列的设计和 PCR 合成

根据 BD5088 基因的序列,去除自身信号肽序列,对基因成熟肽核苷酸序列进行密码子优化设计。全序列共 436 个氨基酸,全长 1311bp,根据设计的序列长度,利用 DNAWORKS3.0 软件^[8],优化 PCR 引物参数,设计了 46 条寡聚核苷酸用于 PCR 合成 BD5088 基因。其中分别在第一个和最后一个引物的 5'端增加 *Xho* II 和 *Eco*RI 限制性酶切位点和保护碱基。采用两步 PCR 合成法^[9],第 1 步先将该基因分成约 400 bp 大小的 4 个小片段,用 PCR 的方法分别合成,PCR 条件为:分别取寡聚核苷酸混合,首尾引物的浓度为 10 μ mol/L,中间引物浓度为 1 μ mol/L,90 $^{\circ}$ C 30 s;58 $^{\circ}$ C 45 s;72 $^{\circ}$ C 50 s(20 cycle);72 $^{\circ}$ C 8 min。第 2 步将 4 个 PCR 产物回收纯化和 Muts 蛋白处理,等量混匀,加两端的引物 1 和 46 进行第 2 次 PCR,PCR 条件为:引物浓度 10 μ mol/L,94 $^{\circ}$ C 2 min;94 $^{\circ}$ C 30 s;56 $^{\circ}$ C 30 s;72 $^{\circ}$ C 2 min(20 cycle);72 $^{\circ}$ C 10 min。获得的 PCR 产物纯化回收后连接到 T 载体上进行测序分析。

1.2.3 PCR 产物的 Muts 蛋白处理

将质粒 pET30a-Muts 转化 *E. coli* BL21(DE3),并纯化出 Muts 蛋白,与扩增得到的 PCR 产物混合,20 min 内从 94 $^{\circ}$ C 缓慢降温到 50 $^{\circ}$ C,然后 60 $^{\circ}$ C 处理 20 min,再用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳回收 Muts 蛋白处理的 PCR 产物^[10,11]。

1.2.4 重组质粒 pET-BD5088 的构建和鉴定

连接到 T 载体的 BD5088 基因测序正确后,将 PCR 扩增得到的基因 BD5088 及质粒 pET30a,用

Xho II 和 *Eco*RI 双酶切,用 T4DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,卡那霉素抗性平板筛选转化子,分别用 PCR 法和酶切法进行鉴定,并测序。

1.2.5 重组蛋白 BD5088 的诱导表达和纯化

将 pET-BD5088 和 pET30a 质粒分别转化 *E. coli* BL21(DE3),挑取单菌落分别接种于 2 mL LB (Kan⁺)液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,按 1% 的接种量转接于 100 mL 培养基继续培养到 OD 值为 0.6,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,30 $^{\circ}$ C 诱导表达 4 h 后,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min,5 min 离心收集菌体,将菌体重悬于 pH5.6,0.2 mmol/L 的磷酸缓冲液中,超声波破碎(功率 400W,超声 10 次,每次 10 s),4 $^{\circ}$ C,12000 rpm 离心 15 min,分别取样用于 SDS-PAGE,检测蛋白表达情况。超声波破碎后上清经过 90 $^{\circ}$ C 加热后,离心去除沉淀,再用固化 Ni²⁺ 树脂进行纯化后用 150 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱,即得到纯化的 BD5088 重组蛋白。

1.2.6 淀粉酶活性测定

纯化后酶液用 YOO 改良法^[12]测定酶活性。酶活性单位定义为在最适反应条件下,每分钟水解 1 mg 的淀粉所需的酶量为 1 个酶活力单位。

1.2.7 α -淀粉酶酶学性质研究^[11,12]

分别在不同温度、pH5.6 条件下测定酶活性,确定其作用的最适温度。分别在不同 pH、80 $^{\circ}$ C 条件下测定酶活性,确定其作用的最适 pH。将酶液在 95 $^{\circ}$ C、100 $^{\circ}$ C 条件下分别处理不同时间,冰浴后再测定残留酶活性,评价酶的热稳定性。在底物中添加不同浓度的 Ca²⁺,在 95 $^{\circ}$ C 条件下处理不同时间测定酶活残留活性,确定 Ca²⁺ 对酶热稳定的影响。

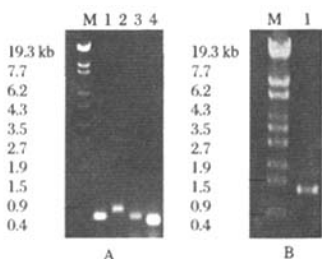
2 结果与分析

2.1 BD5088 基因的 2 步法 PCR 合成

第 1 步合成的 4 个小片段的 PCR 产物经电泳分析结果如图 1A,4 个小片段别为 357 bp,376 bp,352 bp,317 bp,回收纯化并用 Muts 蛋白处理后,用于第 2 步反应。第 2 步 PCR 获得的产物大小约为 1.3 kb (如图 1B),与理论值(1311 bp)大小相符。回收纯化 PCR 产物并构建到 T 载体,进行 DNA 测序。

2.2 测序后基因的突变位点矫正

测序结果显示,经 Muts 处理的合成基因 BD5088 上有 3 个碱基的点突变,突变率为 0.2%,平均 447 个碱基内有 1 个突变位点。以此全长基因为模板,用 3 对包含突变位点处的寡核苷酸引物和首尾



(A) M, λ -EcoT14 DNA Marker; 1, PCR 产物 F1; 2, PCR 产物 F2; 3, PCR 产物 F3; 4, PCR 产物 F4;
(B) M, λ -EcoT14 DNA Marker; 1, BD5088 全基因的 PCR 产物

图 1 BD5088 基因的合成产物

引物,按照 2 步 PCR 法,重新获得矫正后基因。测序结果显示,矫正后基因序列全部正确,无突变位点,获得了正确的 BD5088 基因。

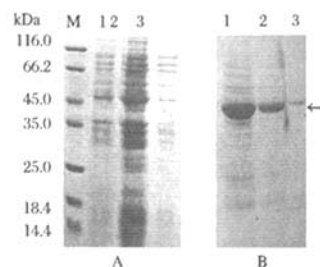
2.3 pET-BD5088 表达载体的建构

矫正正确的 BD5088 基因用 *Xho*II 和 *Eco*RI 进行双酶切与经相同酶切的表达载体 pET30a 连接,转化 *E. coli* DH5 α ,挑选正确转化子,提取质粒,分别用 PCR 法和酶切法进行鉴定(图 2),并测序。经测序验证后,得到的重组表达质粒命名为 pET-BD5088。

2.4 pET-BD5088 的诱导表达

将重组质粒 pET-BD5088 转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 中,进行诱导表达,超声波破碎后取样进行 SDS-PAGE 分析(图 3),表达出的目的蛋白分子量约为 48 ku,大小与理论值一致,经过 Ni^{2+} 树脂纯化,得到纯化后的重组酶 BD5088。

1, pET30a(+) 双酶切; 2, λ -EcoT14 I digest DNA Marker; 3, 重组质粒 pXAWT 的双酶切鉴定
图 2 pET-BD5088 载体的构建和验证

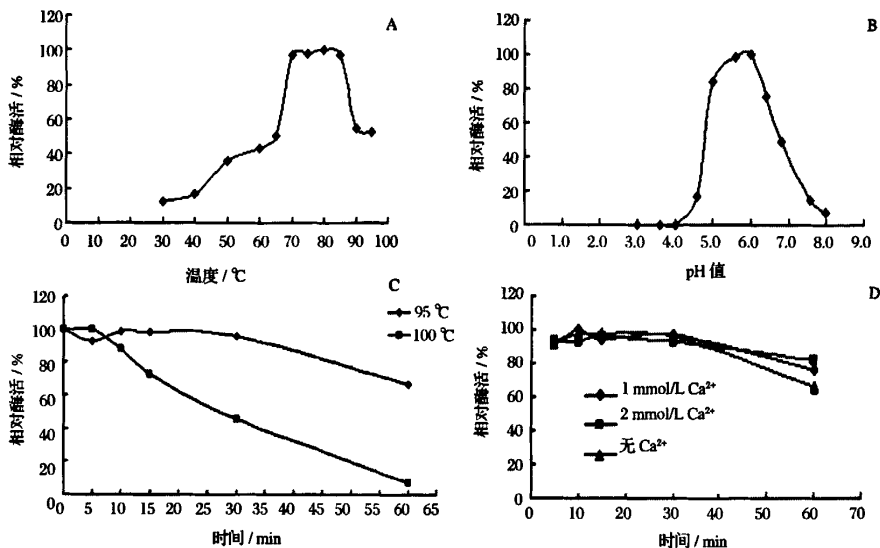


(A) M, 蛋白质分子量标准; 1, BL21/pET-BD5088 诱导前菌体; 2, BL21/pET-BD5088 诱导后菌体; 3, BL21/pET30a 诱导后菌体; (B) 1, BL21/pET-BD5088 重组菌株破碎后上清液经过加热处理后的表达蛋白; 2-3, Ni^{2+} 树脂纯化后重组蛋白

图 3 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

2.5 重组高温酸性淀粉酶的酶学性质研究

在 pH5.6, 不同的温度条件下, 测定 BD5088 的酶活力。获得温度活力曲线, 图 4A 显示, 该酶的最适反应温度范围为 70~85 $^{\circ}\text{C}$, 60~100 $^{\circ}\text{C}$ 相对酶活可保持 50% 以上。



(A) 温度对淀粉酶 BD5088 的影响; (B) pH 条件对淀粉酶 BD5088 的影响;
(C) 重组酶 BD5088 的热稳定性; (D) 不同浓度的 Ca^{2+} 对酶热稳定性的影响

图 4 重组高温酸性淀粉酶的酶学性质研究

在 80℃,不同 pH 条件下,测定 BD5088 的酶活力,获得 pH-活力曲线,图 4B 显示,该酶的最适 pH 范围为 5.6~6.0,在 pH 值 5~6.4,相对酶活在 90% 以上,pH 值 4 以下失活。

对淀粉酶 BD5088 进行热稳定性分析,分别在 100℃,95℃ 条件下,对酶进行加热处理不同的时间。图 4C 显示,95℃ 热处理 0.5 h,其酶活基本没有下降;处理 1 h,酶活仍能保持 70% 以上,在 100℃ 条件下酶活性半衰期约 30 min,说明该酶有很好的热稳定性。在 pH5.6,95℃ 条件下,分别加入不同浓度的 CaCl_2 ,处理不同时间后测定 BD5088 的酶活,图 4D 显示,在不同 Ca^{2+} 浓度下,酶稳定性基本不受影响,表明 BD5088 该酶活性不依赖于 Ca^{2+} 的存在。

3 讨论

随着生物工程技术的飞速发展,人工合成寡聚核苷酸片段已经成为分子生物学中的一项常规技术,这项技术为修改和克隆基因提供了强有力的工具。本实验综合二重不对称 PCR 和重叠扩增 PCR 技术人工合成淀粉酶基因 BD5088,并实现其在大肠杆菌中的表达。目前,各种基因全合成方法所共同面临的难题是合成费用和突变问题。引物的寡核苷酸数越长,越容易引入突变^[8]。在合成的过程中,为了减少突变,利用 DNAWORKS3.0 软件来设计引物,并且用 Muts 蛋白处理 PCR 产物,测序只有 3 个碱基发生了突变,有效的将突变率降低到 0.3% 之内,最终正确的得到了耐高温酸性 α -淀粉酶基因。将 Muts 蛋白用于基因合成中,可以在常规合成方法的基础上把错误率降低到 1/15。

Richardson 得到 BD5088 后将其在荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 中获得表达,最适 pH4.5,最适温度 95℃,活性不依赖于 Ca^{2+} 存在。在本实验中,利用了含有 T7 强启动子的 pET-30a 作为表达载体,以 BL21 作为宿主菌,实现了高温酸性 α -淀粉酶基因 BD5088 的高效表达,重组 BD5088 的最适温度范围为 70~85℃,最适 pH 范围为 5.6~6.0,有较好的热稳定性,对 Ca^{2+} 没有依赖性。与 Richardson 所做的工作比较,耐温和耐酸的性质有所下降。这种表达系统的不同而引起的酶性质的差异有待进一步的研究。从本实验将基因 BD5088 在大肠杆菌中表达所得的结果可以看出,该基因仍然有很好的工业应用前景,为该基因在毕赤酵母中的表达和

基因的定向进化改造打下了基础。

致谢:感谢 Peggy Hsieh 博士馈赠的 pET30a-Muts 质粒。

参考文献

- 1 van der Maarel M J, van der Veen B, Uitdehaag J C, et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family [J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 94(2): 137~155
- 2 Suganuma T, Fujita K, Kitahara K. Some distinguishable properties between acid-stable and neutral types of α -amylases from acid-producing koji [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 104(5): 353~362
- 3 Richardson T H, Tan X, Frey G, et al. A novel, high performance enzyme for starch liquefaction: discovery and optimization of a low pH, thermostable α -amylase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(29): 26 501~26 507
- 4 <http://www.cazy.org/fam/GH13.html>
- 5 Laderman K A, Asada K, Uemori T, et al. Alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. Cloning and sequencing of the gene and expression in *Escherichia coli* [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(32): 24 402~24 407
- 6 马向东,柯 涛,熊 兰,等.一种鉴定多糖水解酶类及其产生菌的新方法[J]. *微生物学报*, 2007, 47(6): 176~178
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 2nd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 8 David M H, Jacek L. DNA Works: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(10): 43
- 9 Lei Y, Qi H D. Two-step total gene synthesis method [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(7): 59
- 10 Xiong A S, Yao Q H, Peng R H, et al. A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based DNA synthesis method for long gene sequences [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(12): 98
- 11 Stemmer W P, Cramer A, Ha K D, et al. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligonucleotides [J]. *Gene*, 1995, 164: 49~53
- 12 Yoo Y J, Hong J, Hatch R T. Comparison of α -amylase activities from different assay methods [J]. *Biotechnology Bioengineering*, 1987, 30: 147~151

(下转第 39 页)

Changes of N-nitrosamine and Sodium Nitrite Contents in Cooked Ham During Storage and Study on the Corresponding Correlations

Sun Jing, Huan Yanjun, Zhan Wenyuan, Lu Ruiqi, Yu Peng

(The State Key Laboratory of Storage and processing of agricultural products,
School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT In order to study the effect of nitrite contents during storage on the formation of N-nitrosodiethylamine (NDEA) in cooked ham, the changes of concentrations of NDEA as well as nitrite in cooked ham containing various levels of initial nitrite under different storage conditions were determined respectively. The NDEA concentrations and its correlation with nitrite contents during storage were studied in cooked ham. The chosen storage conditions (e. g. 4°C and 25°C) were intended to reflect these ones which could occur in the routine storage management in the Supermarket. With the increase of storage time, the concentrations of nitrite significantly decreased under $P < 0.05$. Nitrite reduction at room temperature was more rapid than under refrigeration. The levels of NDEA gradually increased with the increase of storage time, after which it decreased. The rate of the increase of NDEA at room temperature was more rapid than under refrigeration, however, it decreased slowly at room temperature than at lower temperature. The correlation analysis showed that both the correlative coefficients with the respect of different storage conditions were relatively lower under $P > 0.05$, however, the total correlative coefficient with the respect of refrigeration was slightly higher than that of room temperature. In addition, the correlative coefficient varied largely with the increase of added nitrite contents.

Key words cooked ham, storage, sodium nitrite, N-nitrosodiethylamine

(上接第 33 页)

Gene Synthesis and Expression of Thermoacidophili α -amylase in *Escherichia coli*

Ke Tao¹, Xiong Lan², Shi Qingfang², Ma Xiangdong²

1(College of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China)

2(College of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China)

ABSTRACT α -Amylase BD5088 is a thermostable and acid-resistance α -amylase from *Thermococcus* sp. In this research, the BD5088 gene with optimal codon usage was synthesized by two-step synthesis method. This synthesized amylase gene encodes a protein of 436 amino acids, without the nature signal peptide sequence. It was cloned into expression vector pET30a, and the reconstructed vector was designed as pET-BD5088 and transformed into BL21 (DE3). Positive transformant was cultivated and IPTG was added into culture to induce expression of the α -amylase. The recombinant enzyme BD5088 had a molecular mass of 48 ku which was analyzed by SDS-PAGE. The optimum reaction temperature and pH scope of the recombinant α -amylase were 70~85°C and 5.6~6.0 respectively. The half life of the enzymatic activity at 100°C was 30 min, and the activity of BD5088 was not depended on the addition of Ca^{2+} .

Key words thermoacidophili α -amylase, gene synthesis, expression, enzyme characterization