

# α-淀粉酶基因研究进展

张丽娟\*

赵保国

(黑龙江省应用微生物研究所, 哈尔滨)

α-淀粉酶作为一种有效的水解剂普遍应用于食品、酿造、轻纺和造纸等工业中, 是目前生产及销售最大的酶制剂之一。用传统的诱变法筛选高产淀粉酶菌株以提高淀粉酶活性是有限的, 远不能满足生产之需求。如何用遗传工程的手段构建新的淀粉酶产生菌, 提高淀粉酶活性, 是迫切需要解决的问题。

分子克隆 α-淀粉酶基因, 对于提高目的基因的拷贝数, 进而提高淀粉酶产量, 以及对于构建普遍用于 *Bacillus* 的分泌性载体和比较广泛分布于微生物、动植物中的 α-淀粉酶基因的进化关系都具有重要意义<sup>[3,13]</sup>。

## 一、克隆 α-淀粉酶基因的常用方法

1. 鸟枪法克隆 α-淀粉酶基因 自从 Keggins 等<sup>[4]</sup> 首次以 pUB110 为载体鸟枪法克隆枯草芽孢杆菌 *trpC2* 片段后, 又陆续有人使用此法克隆了其它几个基因<sup>[1,7]</sup>。Palva 用该方法成功地克隆了解淀粉芽孢杆菌的 α-淀粉酶基因<sup>[2]</sup>。他用内切酶 *MboI* 部分降解染色体 DNA, 经蔗糖密度梯度离心分离, 纯化 2—5kb 片段, 与经 *BamHI* 切割的 pUB110 连接转化感受态枯草芽孢杆菌 IA289。对重组质粒 pKTH10 分析表明, 一个 2.3kb 片段插入到 pUB110 的 *BamHI* 位点。该菌株产生的 α-淀粉酶是供体菌的 5 倍, 是野生型的 2500 倍。

2. 重组获救法克隆 α-淀粉酶基因 Contente 等发展的质粒重组获救系统是枯草芽孢杆菌分子克隆获得高转化频率的重要手段。载体 DNA 进入细胞后, 可通过与受体细胞中预存的与载体 DNA 同源部分发生重组, 产生有活性的质粒分子。该方法在分子克隆中特别是克隆异源 DNA 时是十分有效的。该系统要求受体菌是 *rec+* 系统。

Stephen<sup>[13]</sup> 等采用 pBU110 (受体)/pBD64 载体系统, 成功地克隆了地衣芽孢杆菌高温 α-淀粉酶基因。他用 *EcoRI* 降解 FD02 染色体 DNA, 与经 *EcoRI* 切割的 pBD64 连接转化含有 pUB110 的受体菌枯草芽孢杆菌 SO103, 筛选出不含 pUB110 的转化子。该方法可以提高转化频率 100—1000 倍。外源基因在受体菌中可以稳定地维持并表达。一长度为 3.55kb 的片段插入到 pBD64 的 *EcoRI* 位点。对插入片段进行位点专一性诱

变证明, α-淀粉酶基因约 1.8kb。

3. 前噬菌体转化法克隆 α-淀粉酶基因 在枯草杆菌染色体中, α-淀粉酶基因与 *AroI* 基因连锁, 用噬菌体 PBSI 得到的 *AroI*-*AmyE* 共转导频率为 85%, 而用 DNA 转化法得到的共转化频率为 33%。由于噬菌体转化容易克隆到目的基因, 外源基因在转化体内不易丢失, 故很多人用此法构建基因文库, 从中分离目的基因与载体质粒连接转化相应的受体菌。

Nomura 等<sup>[4]</sup> 采用枯草芽孢杆菌温和噬菌体 ρ11 构建了含有 *AroI*-*AmyE* 的专一性转导噬菌体。并发现, 用 *EcoRI* 降解染色体 DNA, *AroI* 与 *AmyE* 之间的连锁关系完全丧失, 用 *BamHI* 降解时则保留 3—5% 的共转化频率。对转导噬菌体淀粉酶活性测定表明, 90% 以上的 *AroI*<sup>+</sup> 转导子是 *AmyE*<sup>+</sup>。Yosntoshi 等<sup>[14]</sup> 从该 ρ11-*AroI*-*AmyE* 转导噬菌体中分离出 DNA, 用 *Sau3A* 部分降解, 与 *BamHI* 切割的 pUB110 连接转化枯草芽孢杆菌。从阳性转化子中分离到一个 6.8kb 的重组质粒 pTUB4, 其中插入的外源 DNA 片段为 2.3kb。用此 pTUB4 质粒转化 *Amy* 阳性感受态细胞, 所有的卡那霉素抗性转化子均为 *AmyE* 阳性。

由于 ρ11 DNA 分子约 78Md, 上面带有单一酶的多个切点, 造成回收目的基因的困难。为解决这一问题, Shoji 等<sup>[12]</sup> 采用分子量为 24Md 的 ϕ105 噬菌体, 通过前噬菌体转化法组建了一个含有 *Therphophive V2* 高温淀粉酶基因 *amy V2*<sup>+</sup> 的 ϕ105 转导噬菌体。在重组的 ϕ105-*amy V2*<sup>+</sup> 中, *amy V2* 基因可以从一个 1.5Md 的 *BamHI*-*BglIII* DNA 片段中回收。

Piorre<sup>[10]</sup> 等用 λNM 781 经体外酶切连接包装组建了含有凝结芽孢杆菌 *AmyE* 基因的转导噬菌体。从该噬菌体中分离插入片段克隆到 p<sup>BR322</sup> 上。发现在 *E. coli* 中, 不论是革兰氏阳性菌产生的信号肽, 还是革兰氏阴性菌某些胞外酶的信号肽, 都能促使 α-淀粉酶从细胞中释放。这一特性对于构建用于分子克隆的普

Zhang Lijuan et al.: Progress of Research on α-amylase Gene

\* 本人现在北京, 中国药品生物制品检定所工作。  
本文于 1986 年 11 月 17 日收到。

遍性分泌载体具有重要意义。

## 二、高温淀粉酶基因的遗传保守性

重组 DNA 技术的应用为比较基因之间的进化关系提供了方便。Richard 等<sup>[11]</sup> 用鸟枪法克隆了地衣芽孢杆菌的高温淀粉酶基因, 将此淀粉酶基因与另外两个高温淀粉酶基因比较时发现, 它们的酶切图谱极为相似。这三株菌的  $\alpha$ -淀粉酶基因在最适温度及对高温的耐受性方面是不同的。三株菌编码的酶是有差异的, 但其基因的酶切图谱很相似, 说明编码热稳定  $\alpha$ -淀粉酶的 DNA 区域是高度保守的。推测酶分子的耐热性及最适温度的区别仅在于少数几个氨基酸残基的不同。Perutz<sup>[9]</sup> 已经证明, 来自两种嗜温芽孢杆菌的铁氧还原蛋白基因, 其中两个碱基对的替换可使一个热不稳定蛋白变成热稳定蛋白。可以确信, 在比较了 pRP1 和 pSA33 二者的淀粉酶基因编码区的核苷酸序列以后,<sup>[11]</sup> 即可找出由于个别氨基酸残基的不同导致二者在特性上的不一致。

## 三、 $\alpha$ -淀粉酶基因的分子结构

Maria<sup>[5]</sup> 成功地克隆了枯草芽孢杆菌淀粉酶基因, 并对编码区进行了序列分析, 首次揭示了  $\alpha$ -淀粉酶基因的分子结构。 $\alpha$ -淀粉酶基因具有三个可能的核糖体结合位点。第一个结合区域位于 420Nt 附近, 该区域具有与枯草芽孢杆菌 16S rRNA 同源顺序。第二个结合区域位于 440Nt 附近, 起始密码是 TTG 而不是 ATG, TTG 在枯草芽孢杆菌中作为起始密码<sup>[6]</sup>, TTG 后面的第四个 TAA 是终止密码。第三个核糖体结合位点在 490Nt 附近, 以 ATG 为起始密码合成  $\alpha$ -淀粉酶。因为转译是以 RNA 为模板, 所以从 DNA 分子转录下的 mRNA 带有几个核糖体结合位点, 在有效转录酶分子中起重要作用。

从 DNA 序列分析中可以发现, 在淀粉酶基因终止信号下游有两个反向重复结构, 该结构在转录终止中起作用。第一个在 2506Nt 区有 12Nt 长, 具有自由能  $-21.9\text{kcal/mol}$ 。该序列之后有一 T 丰富区, 与大肠杆菌的终止结构相似。第二个在 2571Nt 区, 有 14Nt 长, 具有自由能  $-20.1\text{kcal/mol}$ 。在淀粉酶基因前有几个区域与 sigma 55 聚合酶识别位点具有同源序列。由于枯草芽孢杆菌具有多个 sigma 因子, 可以识别不同的序列, 所以淀粉酶基因很可能受控于某 sigma 因子识别的启动子。

淀粉酶基因两端分别与两个衣霉素抗性基因连接。位于淀粉酶基因 5'-端上游的 tnrA 具有超过量生产  $\alpha$ -淀粉酶的功能。tnr B 位于基因 3'-端下游, 对淀粉酶的产生无影响。由于衣霉素影响细菌细胞壁和葡聚糖肽的合成, 衣霉素抗性突变一定会改变细胞壁的某些功能。这一现象可以用来解释为什么  $\alpha$ -淀粉酶基因在大肠杆菌宿主中不稳定的原因。经内切酶降解的 DNA 片段往往不仅含有目的基因本身, 在其上游和下游带有与其相邻基因的 DNA 片段。如果带有与影响细胞壁合成及基因产物分泌有关的基因则对大肠杆菌的生长有不良影响, 造成克隆基因的不稳定性。

枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌的  $\alpha$ -淀粉酶在酶学特性及免疫学特性上完全不同, 其氨基末端的氨基酸序列没有同源性, 但两基因的信号肽序列是一致的。这一现象说明信号肽在蛋白质运输中起的作用是相同的。同时也暗示不同的枯草杆菌在淀粉酶分泌过程中具有一相同的调节机制。

## 参 考 文 献

- [1] Gryczan, T. J. et al.: 1982. In: The Molecular Biology of the Bacilli, Vol. I, *Bacillus subtilis*, pp. 307—329.
- [2] Iikka Palva: 1982. *Gene*, 19: 81—87.
- [3] Kazumasa, H.: 1979. *Agric. Biol. Chem.*, 43(11) 2343—2349.
- [4] Keggins, K. M. et al.: 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 1423—1427.
- [5] Maria Yang et al.: 1983. *Nucleic Acids Res.*, 11 (2): 237—249.
- [6] McLaughlin, et al.: 1981. *J. Biol. Chem.*, 256 11283—11291.
- [7] Michel, B. et al.: 1980. *Gene*, 12: 147—154.
- [8] Nomura, S.: 1979. *Agric. Biol. Chem.*, 43(12) 2637—2638.
- [9] Petruzz, M. F. et al.: 1975. *Nature*, 255: 256—259.
- [10] Pierre, Cornelis: 1982. *Mol. Gen. Genet.*, 186: 507—511.
- [11] Richard et al.: 1984. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 122: 175—183.
- [12] Shoji, S.: 1984. *Agric. Biol. Chem.*, 49(5) 1339—1341.
- [13] Stephen, A. Ortlepp, et al.: 1983. *Gene*, 23. 267—276.
- [14] Yasutoshi et al.: 1983. *Agric. Biol. Chem.*, 47(1) 159—161.