耐高温酸性α-淀粉酶基因部分序列的克隆与分析

王淑军[1,3],邓祥元[2],李富超[2],秦　松[2],陆兆新[1]

(1. 南京农业大学 食品科技学院,江苏 南京 210095;2. 中国科学院 海洋研究所,山东 青岛 266071;3. 淮海工学院,江苏省海洋生物技术重点建设实验室 江苏 连云港 222005)

摘要:利用已报道的α-淀粉酶基因序列的保守区域设计引物,通过聚合酶链式反应(PCR)获得了高温球菌 *Thermococcus* sp. HJ21 的耐高温酸性α-淀粉酶基因的部分序列。通过对该序列的同源性比较分析发现,高温球菌 *Thermococcus* sp. HJ21 与热水高温球菌 *Thermococcus hydrothermalis* 和 *Thermococcus* sp. OGL-20P 的亲缘关系最近,序列相似度达到 95 % 以上;利用 Swiss Model 预测该基因产物的 3 级结构,显示其具有典型的$(\beta\alpha)_8$桶状结构;通过分析密码子的使用情况得知,该α-淀粉酶存在着密码子的兼并性和使用的偏向性问题。

关键词:高温球菌;α-淀粉酶;基因克隆;序列分析

中图分类号:Q785　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-3096(2007)12-0069-07

α-淀粉酶,系统名称为α-1,4-葡聚糖-4-葡聚糖水解酶(α-1,4-glucan-4-glucanohydrolase EC.3.2.1.1),是重要的工业酶制剂之一[1],约占整个酶制剂市场的 25 %,已被广泛应用在食品、发酵、纺织、造纸和制药等诸多行业[2];但现在应用的α-淀粉酶大部分都存在着热稳定性较差和 pH 范围较窄等方面的缺陷,导致工业生产成本的增加。要使工业生产过程中α-淀粉酶的主要特性与生产过程相适应[3],就需要开发热稳定性好、活性强、pH 适应范围广的α-淀粉酶,为此,众多国内外研究者把目光从陆地投向海洋,尤其是深海。

α-淀粉酶的来源非常丰富,在动植物及微生物中均发现有该酶的存在,尤其是芽孢杆菌 *Bacillus* 属的微生物现已被深入地研究和应用[3],但其最适活力温度在 60 ℃左右,远达不到淀粉分解过程中要求的 100～110 ℃[4]。而大部分嗜热细菌和古菌的最适生长温度在 80 ℃以上,且其中蕴藏了大量的超嗜热酶,而且这些酶对有机变性剂、金属离子等有很好的耐受性[5],因此,研究开发嗜热菌在工业生产中具有重要的意义。但由于大部分嗜热细菌和古菌较难培养,因此,利用分子生物学和基因工程技术,将α-淀粉酶基因克隆转化到基因工程菌株中进行高效表达,获得所需要的热稳定性高的α-淀粉酶,已成为解决现有α-淀粉酶不足的重要手段和途径。另外,对α-淀粉酶基因序列的分析在基因的克隆表达过程中起着重要作用,如密码子使用的偏向性问题等都会影响α-淀粉酶基因的表达。

本研究利用分离自深海热液喷口的高温球菌为研究对象,通过 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)数据库中报道的已知序列,设计引物,扩增了α-淀粉酶基因的部分序列。该菌的最适生长温度为 88 ℃,属典型的嗜热厌氧菌,而且在其培养液中检测到了α-淀粉酶的活性,初步研究发现该α-淀粉酶热稳定性好且具有较好的耐酸性,但由于其难于培养,故利用 PCR 的方法获得了α-淀粉酶基因的部分序列,并进行了初步分析,以期为在工程菌株中的表达起到作用。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌种与质粒载体

高温球菌 *Thermococcus* sp. HJ21 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) TOP10 均由淮海工学院江苏省海洋生物技术重点建设实验室保存;T-A 克隆载体 pMD18-T 为 TaKaRa(大连)公司产品。

收稿日期:2007-07-24;修回日期:2007-10-10

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX3-SW-223,KZCX2-YW-209),江苏省"六大人才高峰"第三批资助项目(06-A-017);江苏省教育厅自然科学基金项目(06KJB550004)

作者简介:王淑军(1965-),女,山东济南人,硕士,教授,主要从事海洋微生物及功能基因的研究,电话:0518-85895421,E-mail:shujunwang86@hotmail.com

1.1.2 仪器设备与试剂

常/低温台式离心机(Labofuge 300/Biofuge Stratos),美国 Therm electron 公司;天平(BP610),德国 Sartorius ®公司;PCR 仪(Tpersonal),德国 Biometra ®公司;电泳仪(PAC300),美国 Bio-Rad ®公司;凝胶成像分析系统(ImageMaster ®VDS),日本 FuJiFilm 公司;恒温水浴锅,江苏省沙洲医疗器械厂;T-A 克隆载体连接试剂盒和质粒酶切试剂盒,TaKaRa(大连)有限公司;凝胶回收试剂盒,上海飞捷(Fastagen)生物技术有限公司;质粒提取试剂盒,北京博大泰克生物基因技术有限公司;试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基

大肠杆菌的培养与转化使用 LB 培养基,转化子的筛选所用抗生素的浓度:氨苄青霉素(Amp)为 50～100 mg/L;高温球菌的培养用自行设计的厌氧培养装置,培养基为改良的 YPS 培养基[6]:基础盐溶液 1 000 mL,微量盐溶液 10 mL,质量分数为 1 %的 $CaCl_2 \cdot H_2O$ 5 mL,含 N-P 溶液 10 mL,含 Fe 和 EDTA 溶液 2 mL,刃天青溶液 5 mL,PIPES 3.35 g,酵母粉 3 g,蛋白胨 3 g,麦芽糖 5 g,硫 10 g,pH 6.5。

1.2 方法

1.2.1 高温球菌 *Thermococcus* sp. HJ21 基因组 DNA 的提取

离心收集菌体,液氮冻融 2 次后,研磨菌体;用 500 μL 裂解液(0.1 mol/L Tris-basec pH 8.0);0.05 mol/L EDTA (pH 8.0);1 % Tween-20;0.1 mol/L NaCl 和1.25 mol/L KAc)重悬研磨过的菌体,加入 125 μL,10 %的 SDS 和 70 μL,1 g/L 的蛋白酶 K,混匀后于 50 ℃水浴中保温 30 min;然后冰浴 30 min,加入 100 μL,3 mol/L 的 NaAc,混匀后再次冰浴 30 min;酚仿抽提 2 次,取水相,加入 2 倍体积的 4 ℃预冷的无水乙醇,于 - 20 ℃过夜沉淀;离心后再次用无水乙醇洗沉淀,将沉淀溶于含 RNase 的 TE Buffer 中,- 20 ℃保存备用。

1.2.2 α-淀粉酶基因的克隆、回收

根据 NCBI 数据库中已报道的耐高温α-淀粉酶的基因序列,利用 ClustalX 和 Oligo 软件设计合成如下引物:

正向引物(P1):5'-GGCGGCGTYATAATGCAGGC-3';

反向引物(P2):5'-GAGGTTRCCRGTGTACTCGTG-3'。

引物合成由 Sangon(上海)生物工程技术有限公司完成,然后以高温球菌 *Thermococcus* sp. HJ21 基因组为模板,进行目的片段的 PCR 扩增。

PCR 反应体系(20 μL),成分组成为:10 ×buffer 2 μL;Mg^{2+} (25 mmol/L) 1.6 μL;P1 (100 μmol/L) 1 μL;P2 (100 μmol/L) 1μL;dNTP (10 mmol/L) 0.5 μL;Taq 酶(5 u/μL) 0.2 μL;模板 1 μL;ddH_2O 定容至 20 μL。再加 10 μL 石蜡油防止反应体系在 PCR 仪中蒸发。

PCR 按照如下程序进行扩增:94 ℃预变性 5 min,然后进入以下循环:94 ℃1 min,60 ℃1 min,72 ℃,2 min,共进行 30 个循环。循环结束后,72 ℃,10 min,4 ℃保存。

取 15 μL PCR 反应产物以 1 %琼脂糖凝胶电泳进行分析和回收;目的 DNA 片段的胶回收参阅 Fastagen 公司的小量胶回收试剂盒说明书,凝胶的制备和操作参考分子克隆实验指南(第 3 版)[7]。

1.2.3 目的 DNA 片段的连接及转化

大肠杆菌感受态细胞的制备和连接转化等操作参考分子克隆实验指南(第 3 版);按照 TaKaRa(大连)公司的 T-A 克隆载体连接试剂盒的说明书,将目的 DNA 片段与 pMD18-T 质粒载体 16 ℃过夜连接;连接后转化已制备好的大肠杆菌感受态细胞,37 ℃培养箱中过夜培养。

1.2.4 阳性克隆的筛选与检测

挑取能在含有 Amp^+ 的 LB 培养基平板上生长的单菌落,37 ℃过夜培养后提取质粒,进行 PCR 和酶切检测,质粒提取的操作依照北京博大泰克生物基因技术有限公司的质粒提取试剂盒说明书进行。PCR 检测用上述引物、反应体系和条件;酶切检测参考 TaKaRa(大连)公司的酶切试剂盒进行操作;检测结果均用 1 %琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.2.5 测序

将检测结果为阳性的单菌落,37 ℃过夜培养后,送 Sangon(上海)生物工程技术有限公司进行测序。

1.2.6 序列分析

1.2.6.1 同源性分析

本研究进行序列同源性分析时参照了 NCBI 数据库中已经报道的其他微生物的α-淀粉酶基因序列:热水高温球菌 *Thermococcus hydrothermalis* (AAC97877.1), *Thermococcus* sp. OGL-20P (AAT11125.1), *Thermococcus* sp. GU5L5 (AAM48112.1),强烈炽热球菌 *Pyrococcus furiosus*

DSM 3638(NP578206.1),乌兹炽热球菌 *Pyrococcus woesei* (*AAD*54338.1), *Thermococcus* sp. NA1 (ABA26948.1), *Pyrococcus woesei* (AAF44693.1), 地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* (ABL75259.1),巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* (AAK00598.1),盐盒菌 *Haloarcula hispanica* (CAI64586.1)。所用分析软件为:NCBI 数据库中的 Blastp;Clustal X;Mega 3.1 以及 Tree View 等。

1.2.6.2 功能域分析

进一步用 NCBI 数据库中的软件 ORF Finder 分析获得的核苷酸序列,提示该基因 ORF(开放阅读框)的部分信息。将该 α-淀粉酶基因编码的氨基酸序列提交瑞士生物信息研究所网站(http://swiss-model.expasy.org)上的数据库,利用 Swiss Model 预测该序列的 3 级结构。

2 结果与分析

2.1 高温球菌 *Thermococcus* sp. HJ21 基因组 DNA 的提取

对提取的基因组 DNA 用 1%琼脂糖凝胶电泳进行分析,结果如图 1 所示。获得的基因组 DNA 大小约为 20 kb,且条带较集中,说明获得了较好质量的基因组 DNA,可用作 PCR 实验。

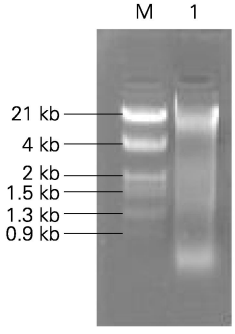

图 1 高温球菌 *Thermococcus* sp. HJ21 的基因组 DNA

Fig.1 Genomic DNA of the *Thermococcus* sp. HJ21

M. λDNA\ *EcoR* Ⅰ + *Hind* ⅢDNA 大小标记;

1. 基因组 DNA

M. λDNA\ *EcoR* Ⅰ + *Hind* ⅢDNA size marker;

1. Genomic DNA

2.2 PCR 扩增结果

取 15 μL PCR 反应的产物上样,用 1%琼脂糖凝胶电泳分析,结果见图 2。在约 1.2 kb 处获得了一条具有明显特异性的条带,所得到的 DNA 片段大小与预期结果相符。

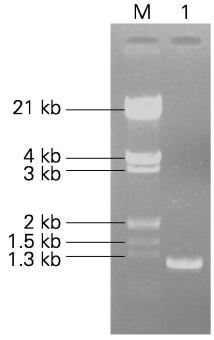

图 2 耐高温酸性 α-淀粉酶基因的 PCR 结果

Fig.2 PCR production of thermostable acid α-amylase

M. λDNA\ *EcoR* Ⅰ + *Hind* ⅢDNA 大小标记;

1. PCR 结果

M. λDNA\ *EcoR* Ⅰ + *Hind* ⅢDNA size marker;

1. PCR production

2.3 阳性克隆筛选与检测结果

因 T-A 克隆载体 pMD18-T 含有 Amp^+,故阳性克隆能在含有 Amp 的 LB 培养基平板上生长,长出的单菌落均可视为阳性克隆,但仍需要进一步的 PCR 检测和酶切检测,检测结果(图略)说明所得到的单菌落均为阳性克隆,而且检测到目的 DNA 片段的大小约为 1.2 kb 与预期结果相符。

2.4 PCR 扩增目的 DNA 片段的测序结果

经 Sangon(上海)生物工程技术服务有限公司测序,获得 α-淀粉酶基因的部分序列(共 1164 bp),编码 388 个氨基酸。在克隆到的 α-淀粉酶基因片段中 G 和 C 所占比例为 58.85 %,所占比例较 Lee[8] 报道的稍高。

2.5 对 α-淀粉酶基因部分序列的分析

2.5.1 同源性分析结果

经生物信息学软件分析获得如图 3 所示的进化树。从图中可以看出,高温球菌 *Thermococcus* sp. HJ21 与 *Thermococcus hydrothermalis* 和 *Thermococcus* sp. OGL-20P 的亲缘关系最近,相似度达到 95%以上,可判断为同一属,这与 16S 的鉴定结果(另文发表)基本一致,也验证了 16S 进化分析的结果,同时说明 α-淀粉酶基因具有较好的保守性。

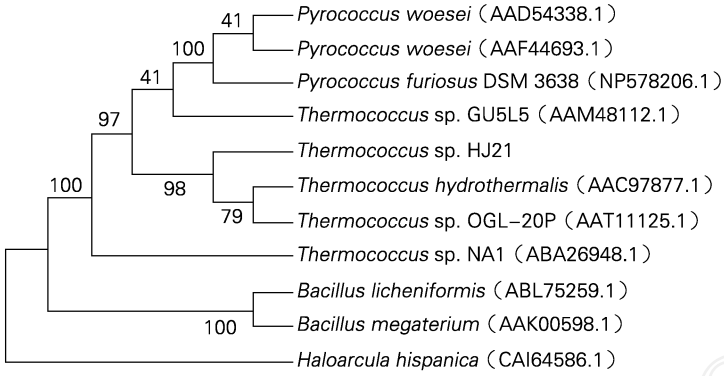

图 3　耐高温酸性α-淀粉酶基因部分序列的进化树

Fig. 3　Phylogenetic tree of partial thermostable acid α-amylase gene

2.5.2　功能域研究

2.5.2.1　序列分析

利用 NCBI 数据库中的 ORF Finder 分析该序列获得了 6 种可能的 ORF(图 4) ,但比较分析发现第 1 个较为正确 ,同时说明了该α-淀粉酶基因的 ORF 从第 13 个核苷酸开始 ,但没有预测到终止密码子。通过与文献[8 ,9]分析比较得知 ,该α-淀粉酶基因片段已包含 4 个保守区域 ,如图 5 所示。在上述 10 株微生物所产生的α-淀粉酶基因中 ,除 *Bacillus megaterium* 没有第 4 个保守域外 ,其余的均包含完整的 4 个保守区域 ,结果见表 1。

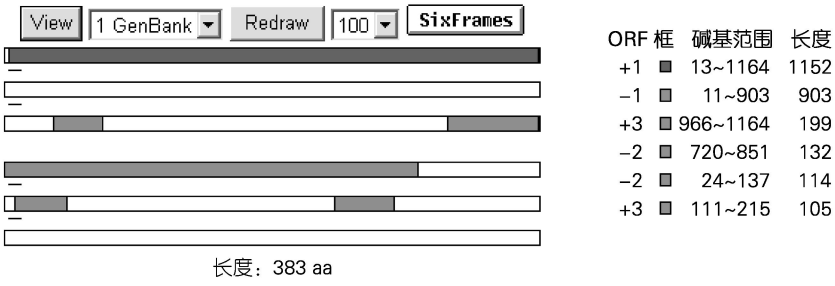

图 4　α-淀粉酶基因 ORF 的预测结果

Fig. 4　Prediction results of ORF for α-amylase gene

表 1　不同微生物所产生α-淀粉酶的保守区域

Tab. 1　Conservative regions of α-amylase in different microorganisms

α-淀粉酶的微生物来源	保守区域 I	保守区域 II	保守区域 III	保守区域 IV	NCBI 中的序列号
Pyrococcus woesei	DVVI NH	GWRFDYVK G	EYWD	FVANHD	AAD54338.1
Pyrococcus woesei	DVVI NH	GWRFDYVK G	EYWD	FVANHD	AAF44693.1
Pyrococcus furiosus DSM 3638	DVVI NH	GWRFDYVK G	EYWD	FVANHD	NP578206.1
Thermococcus hydrothermalis	DIVI NH	AWRFDYVK G	EYWD	FVANHD	AAC97877.1
Thermococcus sp. OGL-20P	DIVI NH	AWRFDYVK G	EYWD	FVANHD	AAT11125.1
Thermococcus sp. HJ21	DIVI NH	AWRFDYVK G	EYWD	FVANHD	
Thermococcus sp. GU5L5	DIVI NH	AWRFDYVK G	EYWD	FVANHD	AAM48112.1
Thermococcus sp. NA1	DIVI NH	AWRFDYVK G	EYWD	FVANHD	ABA26948.1
Bacillus licheniformis	DVVI NH	NGNYDYLMYA DID	ELQL	FVDNHD	ABL75259.1
Bacillus megaterium	DVVM NH	NGNYDYLMYA DLD	ELNL	-	AAK00598.1
Haloarcula hispanica	DAVI NH	GIRWDAAKHV PES	EVLD	FVSNHD	CAI64586.1

```
1     GGCGGCGTTATAATGCAGGCCTTCTACTGGGACGTCCCCGGTGGGGGAATC
1                     M  Q  A  F  Y  W  D  V  P  G  G  G  I
52    TGGTGGGACACCATAGCCCAGAAGATACCAGACTGGGCGAGCGCAGGAATT
14     W  W  D  T  I  A  Q  K  I  P  D  W  A  S  A  G  I
103   TCGGCAATATGGATTCCCCCCGCGAGCAAGGGCATGAGCGGCGGCTACTCC
31     S  A  I  W  I  P  P  A  S  K  G  M  S  G  G  Y  S
154   ATGGGCTACGATCCCTACGACTACTTCGACCTCGGCGAGTACTACCAGAAG
48     M  G  Y  D  P  Y  D  Y  F  D  L  G  E  Y  Y  Q  K
205   GGAACCGTTGAGACCCGCTTCGGCTCCAAGGCCGAGCTGGTGAACATGATA
65     G  T  V  E  T  R  F  G  S  K  A  E  L  V  N  M  I
256   AACACCGCCCACGCCTACAACATGAAGGTCATAGCCGACATAGTCATCAAC
82     N  T  A  H  A  Y  N  M  K  V  I  A  D  I  V  I  N   ← 保守区域Ⅰ
307   CACCGCGCCGGCGGAGACCTCGAGTGGAACCCCTTCGTGAACGACTACAGC
99     H  R  A  G  G  D  L  E  W  N  P  F  V  N  D  Y  S
358   TGGACCGACTTCTCCAAGGTTGCCTCCGGCAAGTACACCGCCAACTACCTC
116    W  T  D  F  S  K  V  A  S  G  K  Y  T  A  N  Y  L
409   GACTTCCACCCGAACGAGCTTCACGCGGGCGATTCCGGAACCATTGGCGGC
133    D  F  H  P  N  E  L  H  A  G  D  S  G  T  I  G  G
460   TATCCGGACATATGCCACGACAAGAGCTGGGACCAGTACTGGCTCTGGGCC
150    Y  P  D  I  C  H  D  K  S  W  D  Q  Y  W  L  W  A
511   AGCCAGGAGAGCTACGCCGCCTACCTCAGGAGCATCGGCGTTGATGCCTGG
167    S  Q  E  S  Y  A  A  Y  L  R  S  I  G  V  D  A  W   ← 保守区域Ⅱ
562   CGCTTCGACTACGTGAAGGGCTACGGCGCTTGGGTGGTCAAGGACTGGCTC
184    R  F  D  Y  V  K  G  Y  G  A  W  V  V  K  D  W  L
613   AGCTGGTGGGGCGGCTGGGCGGTAGGAGAGTACTGGGACACCAACGTCGAT
201    S  W  W  G  G  W  A  V  G  E  Y  W  D  T  N  V  D   ← 保守区域Ⅲ
664   GCCCTCCTGAGCTGGGCCTACGACAGCGGTGCCAAGGTCTTCGACTTCCCG
218    A  L  L  S  W  A  Y  D  S  G  A  K  V  F  D  F  P
715   CTCTACTACAAGATGGACGAGGCCTTCGATAACAACAACATTCCCGCGCTG
235    L  Y  Y  K  M  D  E  A  F  D  N  N  N  I  P  A  L
766   GTAGATGCCCTCAGGAACGGTGGAACGGTTGTGAGCCGCGACCCATTCAAG
252    V  D  A  L  R  N  G  G  T  V  V  S  R  D  P  F  K
817   GCCGTTACCTTCGTCGCCAACCACGACACCGACATAATCTGGAACAAGTAC
269    A  V  T  F  V  A  N  H  D  T  D  I  I  W  N  K  Y   ← 保守区域Ⅳ
868   CCGGCCTACGCGTTCATTCTCACCTACGAGGGGCAGCCGGTCATATTCTAC
286    P  A  Y  A  F  I  L  T  Y  E  G  Q  P  V  I  F  Y
919   CGCGATTATGAAGAGTGGCTCAACAAGGACAGGCTTAAGAACCTCATATGG
303    R  D  Y  E  E  W  L  N  K  D  R  L  K  N  L  I  W
970   ATACACGACCACCTCGCAGGAGGGAGCACCGACATAGTCTACTACGACAGC
320    I  H  D  H  L  A  G  G  S  T  D  I  V  Y  Y  D  S
1021  GACGAGCTGATCTTTGTCAGAAACGGCTACGGGGACAAGCCAGGACTGATA
337    D  E  L  I  F  V  R  N  G  Y  G  D  K  P  G  L  I
1072  ACCTACATCAACCTCGGCTCAAGCAAAGCCGGAAGGTGGGCCTACGTTCCG
354    T  Y  I  N  L  G  S  S  K  A  G  R  W  A  Y  V  P
1123  AAGTTCGCCGGCTCCTGCATACACGAGTACACCGGCAACCTC
371    K  F  A  G  S  C  I  H  E  Y  T  G  N  L
```

图 5　耐高温酸性α-淀粉酶基因部分序列的 4 个保守区域

Fig. 5　Partial sequence and four conservative regions of thermostable acid α-amylase gene

2.5.2.2　结构域预测

根据 Swiss Model 的预测结果，如图 6 所示，可以明显地看出该结构具有典型的 $(\beta\alpha)_8$ 桶状结构[10]，同时结合该淀粉酶基因序列的保守区域分析，此部分片段已经具备了淀粉酶的活性位点，预测该部分酶蛋白结构可能具有α-淀粉酶的功能，但有待进一步的实验进行验证。

图 6　α淀粉酶的三级结构模型

Fig. 6　Tertiary structure model of α amylase with Swiss Model

2.5.2.3　密码子使用情况的统计

根据所得到的α淀粉酶基因序列,分析其密码子的使用情况,结果见表 2。在该α淀粉酶基因的序列中,密码子的第 3 位核苷酸碱基使用情况统计为:27 个 T;210 个 C;36 个 A 和 111 个 G。因此使用 A 和 T 的比率为 16.41 %;使用 G 和 C 的比率为 83.59 %,二者的差距很大,G 和 C 的使用比率是 A 和 T 的使用比率的 5 倍多,这可能与该基因序列中 G 和 C 的高频率使用有关。而且其中密码子 TAC 和 GAC 的使用频率最高,分别为 30 次和 28 次;而编码 Leu 的 TTA、TTG、CTC 和 CTA,编码 Arg 的 CGT、CGA 和 CGG,编码 Ser 的 TCT 和 AGT,编码 Thr 的 ACT 和 ACA,编码 Pro 的 CCT,编码 His 的 CAT,编码 Gln 的 CAA,编码 Asn 的 AAT,编码 Cys 的 TGT 的密码子及终止密码子在该基因序列中均没有出现。以上现象说明高温球菌 *Thermococcus* sp. HJ21 在合成α淀粉酶的过程中,存在密码子的兼并性和使用的偏向性问题。因此在下一步转化表达的过程中要考虑到密码子的兼并性和使用的偏向性问题,尽量使用 *E. coli* 或酵母等工程菌株偏爱使用的密码子,以免造成目的产物在工程菌株中不能表达或者表达量很低的后果。另外,经统计分析发现疏水氨基酸所占总氨基酸的质量分数为 60.94 %,亲水氨基酸所占总氨基酸的质量分数为 32.29 %,中性氨基酸所占总氨基酸的质量分数为6.77 %,其中含硫的氨基酸 Cys 仅为 2 个,Met 为 6 个。

表 2　密码子的使用情况

Tab. 2　Codon usage of α-amylase

密码子	氨基酸	简称	数量	密码子	氨基酸	简称	数量	密码子	氨基酸	简称	数量	密码子	氨基酸	简称	数量
TTT	Phe	F	1	CTT	Leu	L	2	ATT	Ile	I	5	GTT	Val	V	6
TTC	Phe	F	15	CTC	Leu	L	0	ATC	Ile	I	6	GTC	Val	V	10
TTA	Leu	L	0	CTA	Leu	L	0	ATA	Ile	I	14	GTA	Val	V	2
TTG	Leu	L	0	CTG	Leu	L	20	ATG	Met	M	6	GTG	Val	V	5
TCT	Ser	S	0	CCT	Pro	P	0	ACT	Thr	T	0	GCT	Ala	A	1
TCC	Ser	S	6	CCC	Pro	P	6	ACC	Thr	T	14	GCC	Ala	A	24
TCA	Ser	S	1	CCA	Pro	P	3	ACA	Thr	T	0	GCA	Ala	A	3
TCG	Ser	S	1	CCG	Pro	P	6	ACG	Thr	T	1	GCG	Ala	A	6
TAT	Tyr	Y	2	CAT	His	H	0	AAT	Asn	N	0	GAT	Asp	D	7
TAC	Tyr	Y	30	CAC	His	H	9	AAC	Asn	N	20	GAC	Asp	D	28
TAA	End		0	CAA	Gln	Q	0	AAA	Lys	K	1	GAA	Gln	E	1
TAG	End		0	CAG	Gln	Q	6	AAG	Lys	K	18	GAG	Glu	E	12
TGT	Cys	C	0	CGT	Arg	R	0	AGT	Ser	S	0	GGT	Gly	G	3
TGC	Cys	C	2	CGC	Arg	R	5	AGC	Ser	S	15	GGC	Gly	G	20
TGA	End		0	CGA	Arg	R	0	AGA	Arg	R	1	GGA	Gly	G	10
TGG	Trp	W	22	CGG	Arg	R	0	AGG	Arg	R	4	GGG	Gly	G	4

3 讨论与小结

深海热液口缺乏淀粉等物质,而糖原是这些环境中的微生物和动物产生的主要储存物质,α-淀粉酶实际的底物可能是生存于这些环境中的微生物和动物产生的糖原,并在这些极端微生物的代谢过程中起着重要作用[11,12]。作者对菌株分别进行了以可溶性淀粉、糖原、麦芽糖、葡萄糖等为碳源的产酶发酵试验,结果表明糖原较淀粉和麦芽糖等碳源物质更有利于 HJ21 菌株产淀粉酶(另文发表)。而淀粉和麦芽糖则是来自陆地微生物如 *Aspergillus oryzae* 产淀粉酶的最好底物[13]。

在工业生产中,淀粉的液化和糊化过程需要较高的温度(100～110 ℃),因此对 α淀粉酶热稳定性的要求较高,否则就需要增加冷却循环装置使工业生产成本增加,为解决这一问题,有必要对高温球菌中的耐热 α淀粉酶进行研究。尽管作者用自行设计的厌氧装置培养了高温球菌 *Thermococcus* sp. HJ21,使其细胞数量由 10^5 增加到 10^8,而且从其培养液中检测到了α-淀粉酶的活性,并进一步通过蛋白分离技术,获得了胞外的α-淀粉酶并对其理化性质、热稳定性及酶活力进行了测定(另文发表),但由于其培养条件苛刻,培养装置复杂,不适宜直接在工业生产中应用。因此利用分子生物学手段,从工程菌株中直接获得热稳定性高的α-淀粉酶,是使α-淀粉酶走向工业应用的途径。作者在获得高温球菌 *Thermococcus* sp. HJ21 基因组 DNA 的基础上,通过 PCR 扩增的方法获得了α-淀粉酶基因的部分序列,并利用生物学软件对该序列进行了同源性比较分析、功能结构域的预测、氨基酸使用频率的统计等,获知了该序列的部分信息,这将为α-淀粉酶基因在工程菌株中的转化表达打下基础。

参考文献:

[1] Noman A S M, Hoque M A, Sen P K, *et al*. Purification and some properties of α-amylase from post-harvest *Pachyrhizus erosus* L. tuber [J]. **Food chemistry**, 2006, **99**(3): 444-449.

[2] 胡欣洁,邓斌,胡承. 微生物α-淀粉酶的研究进展[J]. 中国防伪,2005,9: 58-60.

[3] Sajedi R H, Manesh H N, Khajeh K, *et al*. A Ca-independent α-amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2005, 36: 666-671.

[4] Gomes I, Gomes J, Steiner W. Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization [J]. **Bioresource Technology**, 2003, 90: 207-214.

[5] Lim W J, Park S R, An C L, *et al*. Cloning and characterization of a thermostable intracellular α-amylase gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritime* MSB8 [J]. **Research in Microbiology**, 2003, 154: 681-687.

[6] Jolivet E, Corre E, L'Haridon S, *et al*. *Thermococcus marinus* sp. nov., and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov., two hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal vents that resist ionizing radiation [J]. **Extremophiles**, 2004, 8: 219-227.

[7] 萨姆布鲁克,拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂译. 北京:科学出版社,2002.

[8] Lee J T, Kanai H, Kobayashi T, *et al*. Cloning, nucleotide sequence, and hyperexpression of α-amylase gene from an archaeon, *Thermococcus profundus*[J]. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 1996, **82**(5): 432-438.

[9] Léveque E, Haye B, Belarbi A. Cloning and expression of an α-amylase encoding gene from the hyperthermophilic archaebacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterization of the recombinant enzyme [J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2000, 186: 67-71.

[10] MacGregor E A, Janecek š, Svensson B. Relationship of sequence and structure to specificity in the α-amylase family of enzymes [J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2001, 1546: 1-20.

[11] Bertoldo C, Antranikian G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria [J]. **Curr Opin Chem Biol**, 2002, 6: 151-160.

[12] Léveque E, Janeček S, Haye B, *et al*. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes [J]. **Enz Microbiol Technol**, 2000, 26: 3-14.

[13] Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, *et al*. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective [J]. **Process Biochemistry**, 2003, 38: 1 599-1 616.

(下转第 94 页)

(上接第 75 页)

Cloning and sequence analysis of partial thermostable acid α-amylase gene

WANG Shu-jun[1,3], DENG Xiang-yuan[2], LI Fu-chao[2], QIN Song[2], Lu Zhao-xin[1]

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Huaihai Institute of Technology, Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang 222005, China)

Received: Jul., 24, 2007

Key words: *Thermococcus*; α-amylase; gene cloning; sequence analysis

Abstract: A fragment of α-amylase gene (1164bp) was cloned, sequenced and analyzed from a hyperthermophilic archae *Thermococcus* sp. HJ21 by PCR method, where the primers were designed via analysis of the known α-amylase on the website. The results of phylogenetic analysis showed that the similarities of α-amylase gene with homologous gene in *Thermococcus hydrothermalis* and *Thermococcus* sp. OGL-20P were over 95 %. There were problems of degenerate and preference of codon usage in α-amylase through analysing the sequence of amimo acid. And the deduced protein three-tier structure of α-amylase with Swiss Model displayed that there was a typical $(\beta/\alpha)_8$ structure on the protein three-tier structure.

(本文编辑:康亦兼)