

# 地衣芽孢杆菌 - 淀粉酶信号肽的序列分析及其在大肠杆菌中的分泌特性

蔡 恒<sup>1</sup>, 陈忠军<sup>2</sup>, 万红贵<sup>1</sup>, 王 涛<sup>1</sup>, 杜连祥<sup>3</sup>

(1. 南京工业大学 制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009;

2. 内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 3. 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300222)

**摘要:**为使地衣芽孢杆菌信号肽序列实现异源基因在大肠杆菌中的分泌表达,将地衣芽孢杆菌中编码耐高温 - 淀粉酶的基因克隆在大肠杆菌表达载体 pET- 22b 的 T7 启动子下游,转化大肠杆菌 BL21 (DE3)。重组菌株经乳糖诱导后,在上清液中能够检测到淀粉酶活性。表明该芽孢杆菌淀粉酶基因 5 端信号肽序列能够将大肠杆菌中的重组 - 淀粉酶引导到胞外,完成分泌表达。同时,用该信号肽序列还实现了甜蛋白 *monellin* 基因在大肠杆菌中的分泌表达。

**关键词:** - 淀粉酶;地衣芽孢杆菌;分泌表达;信号肽

中图分类号:Q81 文献标识码:A 文章编号:1000 - 7091(2008)02 - 0106 - 04

## The Sequence Analysis of Signal Peptide of - amylase from *Bacillus licheniformis* and Its Secretory Characteristic

CAI Heng<sup>1</sup>, CHEN Zhong - jun<sup>2</sup>, WAN Hong - gui<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>1</sup>, DU Lian - xiang<sup>3</sup>

(1. College of Pharmacy and Life Science, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China;

2. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China;

3. College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

**Abstract:** The gene encoding a hyperthermostable - amylase from a *Bacillus licheniformis* strain was cloned in pET - 22b transcription vector containing T7 promoter, and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The recombinant strain can secrete the active recombinant enzyme into the medium. These indicated the signal peptide of this *Bacillus* sp. could be recognized by *E. coli* secretory system. At the same time, the signal peptide secreted sweet protein monellin from periplasm to the medium too. This study gives a theory support for other foreign proteins expressed in *E. coli* through the use of this signal peptide.

**Key words:** - amylase; *Bacillus licheniformis*; Secretory expression; Signal peptide

- 淀粉酶(- 1, 4 - 葡聚糖 - 4 - 葡聚糖水解酶)是内切酶,它基本上无规则水解淀粉骨架 - 1, 4 - 糖苷键而产生麦芽糖糊精。很多生物包括植物、真菌和细菌都表现出 - 淀粉酶活性。 - 淀粉酶广泛应用于淀粉加工、酒精、洗涤剂生产以及纺织工业中的淀粉脱浆等。因其极大的商用价值,各国科学家对其进行了大量研究<sup>[1, 2]</sup>。其中,耐高温 - 淀粉酶由于其热稳定性好,适合在高温下液化淀粉,因此被广泛应用于食品、制药等行业,是目前工业上用途最广泛的一种酶。目前,大部分商品淀粉酶来源于细菌,如地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌或嗜热脂肪芽孢杆菌等<sup>[3]</sup>。

本研究将来源于地衣芽孢杆菌的耐高温 - 淀粉酶基因克隆在大肠杆菌表达载体 pET - 22b 的 T7 启动子下游,转化大肠杆菌 BL21 (DE3)。发现 - 淀粉酶表达产物能够部分分泌到胞外,说明该 - 淀粉酶基因的信号肽序列能够被大肠杆菌分泌系统识别。这为使用该信号肽序列实现异源基因在大肠杆菌中的分泌表达提供了理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒 *E. coli* 菌株:BL21 (DE3),地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 020401 由本实验

室保存。质粒 pUAM 由本实验室构建(含完整地衣芽孢杆菌 - 淀粉酶基因)。质粒 pET - 22b 购自 NOVAGEN 公司(含 T7 启动子的高效表达载体)。

1.1.2 工具酶和试剂 限制性内切酶 *Nde*I、*Hind*III、T4DNA 连接酶、PolyrestDNA 高保真聚合酶购自 TaKaRa 公司; Protein Marker、核酸分子量标准、氨苄青霉素购自上海生物工程公司; 所用试剂盒购自 Promega 公司。

1.1.3 培养基和培养条件 LB 液体培养基用于细菌培养, 在 LB 培养基中添加 1.5% 的琼脂即为 LA 培养基, LB 培养基在需要时加入氨苄青霉素 50  $\mu$ g/mL, LA 培养基加倍; 筛选培养基为含抗菌素和 1% 淀粉的 LA 培养基, 用作透明圈选择。其中抗菌素氨苄青霉素浓度 100  $\mu$ g/mL。

1.1.4 PCR 引物 根据测序结果设计合成了 PCR 所需引物: 引物 A 5' - AACATATGAAACAACAAAA CGGCTTTACG - 3', 引入 *Nde*I 酶切位点; 引物 B 5' - GCAAGCTTCCTGAGGGCTGATGACACTTTG - 3', 引入 *Hind*III 酶切位点; 引物 C 5' - AACCATGGCCGCTGCTCAGAATGAGG - 3', 引入 *Nco*I 酶切位点; 引物由中科院上海生物工程中心合成。

## 1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 *B. licheniformis* 染色体 DNA 的提取及质粒 DNA 的快速提取参考文献[3]

1.2.2 PCR 扩增 扩增 - 淀粉酶基因 反应体系为: 10  $\times$ PCR 缓冲液 5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 引物 A 和引物 B 各 2  $\mu$ L、质粒 pUAM 1  $\mu$ L、PolyrestDNA 高保真聚合酶 1  $\mu$ L、加双蒸水至 50  $\mu$ L。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 63  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环后, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

扩增 - 淀粉酶基因信号肽序列 反应体系为: 10  $\times$ PCR 缓冲液 5  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L 引物 A 和引物 C 各 2  $\mu$ L、质粒 pETAM 1  $\mu$ L、PolyrestDNA 高保真聚合酶 1  $\mu$ L、加双蒸水至 50  $\mu$ L。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 25 个循环后, 在 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

扩增产物用 PCR 回收纯化试剂盒进行纯化, 纯化产物进行酶切后经过凝胶纯化试剂盒回收特异性扩增片段。

1.2.3 重组 DNA 技术和分子克隆技术 质粒 DNA 的制备, DNA 片断的亚克隆, 酶切和连接转化技术参考文献[5]进行。

1.2.4 淀粉酶阳性菌落的检测 将转化细胞涂布在含有 1% 可溶性淀粉的固体 LA 平板上, 37  $^{\circ}$ C 过夜培养, 将 I<sub>2</sub> - KI 溶液倒入平板, 周围出现透明圈的

即为淀粉酶阳性菌落

1.2.5 重组子质粒在大肠杆菌中的诱导表达 将阳性转化子接入 100 mL LB 的 500 mL 三角瓶中, 置 37  $^{\circ}$ C 振荡培养 5 h 至 OD<sub>600</sub> 约为 0.1。加入乳糖至终浓度 20 mmol/L, 诱导表达 2, 4, 6, 8, 16 h 后, 3 000  $\times$  g 离心 15 min。上清液中加入蛋白酶抑制剂 PMSF 至终浓 1.0 mmol/L, Pepstain - A 至终浓 1.0  $\mu$ mol/L, 即为胞外处理液。沉淀用裂解缓冲液 (10 mg/mL 溶菌酶, 1.0 mmol/L PMSM, 1.0  $\mu$ mol/L Pepstain - A, 50 mmol/L Tris - HCl pH 7.0) 洗涤, 再重悬于 2 mL 相同缓冲液中进行超声波破碎。破碎液加入终浓为 1 mg/mL DNase 后冰浴 30 min。12 000  $\times$  g 离心 20 min 以除去细胞碎片, 得到的上清液即为胞内处理液。

1.2.6 酶活力的测定 - 淀粉酶活力测定方法参照文献[6]。原理是以 EPS (Ethylidene 4 - nitrophenyl - D - maltoheptaoside) 作底物, 在 37  $^{\circ}$ C, 20 mmol/L, pH 7.5 Tris - HCl 缓冲液中反应, 底物渐进水解, 逐步释放出生色物质 4 - nitrophenyl, 该物质在 405 nm 处有一最大吸收峰。

## 2 结果与分析

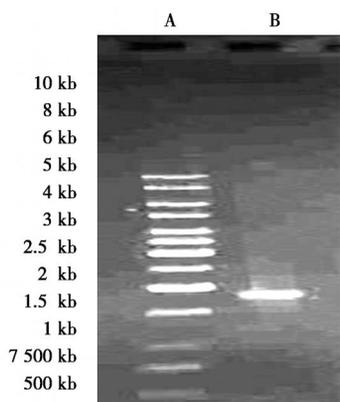
### 2.1 含 - 淀粉酶基因的重组表达质粒 pETAM 的构建

以质粒 pUAM 为模板, 用合成的引物 A 和 B 进行 PCR 扩增, 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1)。图中显示, 扩增的 DNA 片段与预期一致, 约 1.7 kb, 是包含起始密码子 ATG 的完整的 - 淀粉酶基因。通过 PCR 纯化试剂盒和凝胶回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行纯化后, 用 *Nde*I 和 *Hind*III 双酶切, 同时质粒 pET - 22b 也用 *Nde*I 和 *Hind*III 双酶切, 试剂盒纯化回收, 再用 T4DNA 连接酶连接, 获得重组表达质粒 pETAM (图 2)。该重组质粒经 *Nde*I 和 *Hind*III 双酶切, 凝胶电泳得到验证。在该重组质粒中 - 淀粉酶基因由 T7 启动子控制。

### 2.2 - 淀粉酶基因信号肽编码区的核苷酸序列

来自地衣芽孢杆菌的耐高温 - 淀粉酶基因全核酸序列已被测定。图 3 是该基因 5 端的核苷酸序列, 由该序列推导出的氨基酸序列也被列出。经序列分析, 从 +1 位 (Ala) 到 +18 位 (Asp) 的氨基酸序列与早先报道<sup>[6]</sup>的成熟淀粉酶的 N 端氨基酸序列一致, 说明该地衣芽孢杆菌的淀粉酶前体物质含有 29 个氨基酸残基的信号肽序列。同时发现该信号肽的 3 个氨基酸残基, 分别位于 - 2, - 4, - 7 位, 具有 *E. coli* 信号肽酶 LepB 能够特异性结合的氨基酸

序列的典型结构特征。



A. 1 kb DNA 标准分子量 ;B. 扩增产物

A. 1 kb Marker ;B. The amplified products

图 1 地衣芽孢杆菌耐高温 - 淀粉酶基因 PCR 扩增片段

Fig. 1 PCR products of *B. licheniformis* - amylase gene

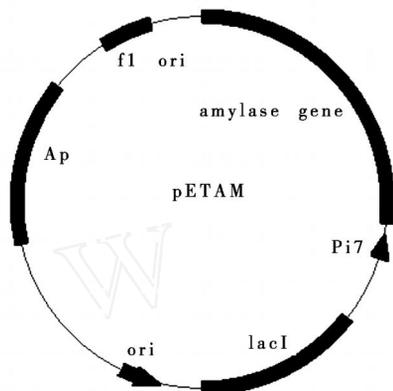


图 2 表达质粒的结构图

Fig. 2 The structure of the expression plasmid

-29 -21

2) f-Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu  
1) ATG AAA CAA CAA AAA CGG CTT TAC GCC CGA TTG CTG  
-17 -7 -6

2) Thr Leu Leu Phe Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His  
1) ACG CTG TTA TTT GCG CTC ATC TTC TTG CTG CCT CAT  
-4 -2 +1

2) Ser Ala Ala Ala Ala Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu  
1) TCT GCA GCA GCG GCG GCA AAT CTT AAT GGG ACG CTG  
+10 +18

2) Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro Asn Asp  
1) ATG CAG TAT TTT GAA TGG TAC ATG CCC AAT GAC

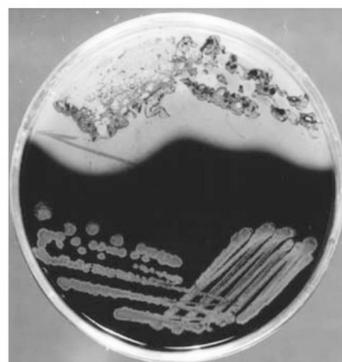
图 3 淀粉酶基因 5 端核苷酸序列(1)及  
推导的氨基酸序列(2)

Fig. 3 Nucleotide sequence(1) and deduced amino  
sequence(2) of the 5 region of - amylase gene

### 2.3 重组质粒 pETAM 在大肠杆菌中的表达

将重组质粒 pETAM 转化 *E. coli* BL21 (DE3)。为验证重组淀粉酶基因在 *E. coli* BL21 (DE3) 中是否表达,将重组转化子画线在含 1% 淀粉的 LA 氮苜平板上,同时将含 pET - 22b 空质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 转化子画线于同一块平板作为阴性对照。培养 2 d 后,经 I<sub>2</sub> - KI 显色反应,重组转化子与

阴性对照相比,有很强淀粉酶的表达(图 4)。



上部. BL21 (DE3) / pETAM; 下部. BL21 (DE3) / pET - 22b  
Upper. BL21 (DE3) / pETAM; Down. BL21 (DE3) / pET - 22b

图 4 BL21 (DE3) / pETAM 在淀粉平板上的水解圈

Fig. 4 BL21 (DE3) / pETAM on a LA plate  
containing 1 % soluble starch

### 2.4 乳糖诱导下的 - 淀粉酶基因的表达

将重组子接种于含抗性的 LB 培养基中,培养 5 h 后加入乳糖诱导表达。分别在不同的诱导时间测定上清液和胞内的淀粉酶活性,结果见图 5。胞内酶活在诱导 6 h 时达到峰值,继续诱导,胞内酶活开始下降。而胞外酶活随着诱导时间的延长逐渐增加,16 h 时达到最大。

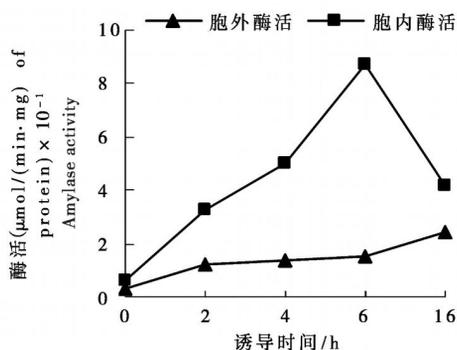


图 5 乳糖诱导下大肠杆菌 BL21 (OE3)

转化细胞 pETAM 质粒表达的淀粉酶活性变化

Fig. 5 Amylase activity in *E. coli* BL21 (DE3) transformed  
cells pETAM expression plasmid under lactose inducing

### 2.5 植物甜蛋白 monellin 基因在 - 淀粉酶信号肽引导下的分泌表达

以 pETAM 为模板,用合成的引物 A 和引物 C 进行 PCR 扩增,得到大小约 100 bp 的 - 淀粉酶信号肽序列(图略)。回收纯化后用 *Nde*I 和 *Nco*I 双酶切,与同样双酶切的 pETMO<sup>[7]</sup> 的大片段连接,得到重组分泌载体 pEAMO (构建过程见图 6 所示),转化大肠杆菌 BL21 (DE3)。将重组子接种于含抗性的 LB 培养基中,培养 5 h 后加入乳糖诱导表达。诱导 24 h 后,发酵液离心,用 SDS - PAGE 电泳检测上清中蛋白表达情况。以 BL21 (DE3) / pETMO 作为对照,结果见图

7. 在诱导上清液中能够检测到大小约 11 kD monellin 的电泳条带,而对对照没有相应条带。且发酵上清液经离心浓缩后进行品尝,具有甜味。说明甜蛋白在 - 淀粉酶信号肽引导下能被分泌胞外。

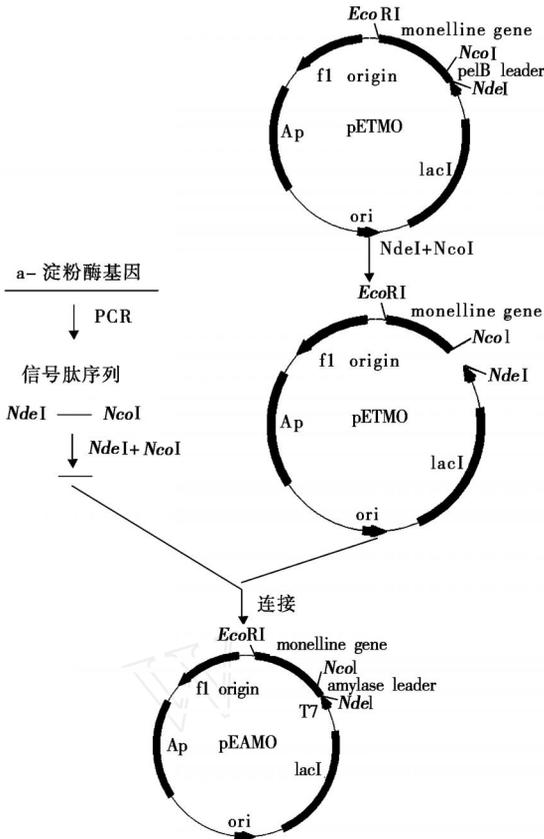
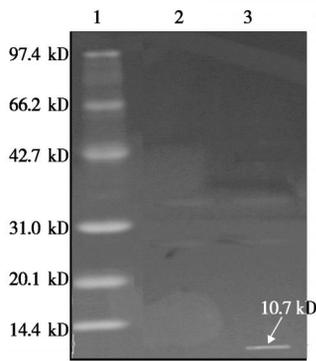


图 6 重组质粒 pEAMO 构建图

Fig. 6 Construction of recombinant expression vector pEAMO



1. Molecular weight marker; 2. pETMO; 3. pEAMO

图 7 重组菌上清液的 SDS - PAGE 分析

Fig. 7 SOS - PAGE analysis of the supernatant fluid of recombinant strain

### 3 讨论

本研究将来自地衣芽孢杆菌的 - 淀粉酶基因克隆在大肠杆菌诱导表达载体 pET - 22b,由载体所带的强启动子 - T7 控制。当重组子被诱导剂诱导时,在发酵液中能够检测到明显的淀粉酶活性。同

时,随着诱导时间的延长,上清液酶活增大,说明大肠杆菌中 - 淀粉酶可在自身信号肽的引导下分泌胞外。同时,本研究用 - 淀粉酶信号肽序列取代位于重组质粒 pETMO 中甜蛋白 monellin 基因上游 pelB 信号肽,诱导后在发酵上清液中检测到甜蛋白 monellin。进一步说明来自芽孢杆菌的信号肽序列能够被大肠杆菌分泌系统所识别。

对由该基因 5 端核苷酸序列推导出的氨基酸序列进行序列分析可看出,从 + 1 位(Ala) 到 + 18 位(Asp)的氨基酸序列与早先报道的成熟淀粉酶的 N 端氨基酸序列一致,说明地衣芽孢杆菌的淀粉酶前体物质含有 29 个氨基酸残基的信号肽序列。而该信号肽序列又具有大肠杆菌典型信号肽酶 LepB<sup>[9]</sup> (一个完整的细胞质膜蛋白)所识别氨基酸序列的典型特征。根据文献 [10],大多数成熟蛋白前体被 LepB 信号肽酶识别切割的位点在 His 功能区下游 5 ~ 7 个氨基酸残基处,同时在相对于切割位点 - 2 和 - 4 位(通常是 Ala 或 Gly)是小氨基酸残基,在 - 7 位是诱导形成 转角的氨基酸残基(通常是 Gly 或 Pro)。所有这些结构特征都与该芽孢杆菌的信号肽序列特征完全一致。这些数据充分说明了该重组淀粉酶能够被大肠杆菌分泌系统识别加工,进而分泌胞外。如果将 - 17 位 Thr 定点突变为 Pro 残基,该淀粉酶基因的信号肽序列可能会更好地被大肠杆菌分泌系统识别,从而提高分泌表达量<sup>[10]</sup>。因此,本研究建议在大肠杆菌中表达其他外源蛋白时,可以使用该信号肽完成蛋白的分泌表达。

### 参考文献:

- [1] Watanabe H, Nishimoto T, Kubota M, et al. Cloning, sequencing, and expression of the genes encoding an isocyclomaltooligosaccharide glucanotransferase and an alpha - amylase from a Bacillus circulans strain [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70(11): 2690 - 2702.
- [2] Pandey A, Nigam P, Soccol C R, et al. Advances in microbial amylases [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2000, 31(12): 135 - 152.
- [3] 张美琴, 马建华, 赵丹美, 等. 植物联合固氮菌及其促生作用研究进展 [J]. 内蒙古农业科技, 2007(4): 80 - 83.
- [4] 李永明, 赵玉琪. 实用分子生物学手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 145 - 146.
- [5] J. 萨姆布鲁克 D. W. 拉塞尔. 分子克隆指南 [M]. 第 3 版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002: 11 - 341.
- [6] Lorentz, K. Routine alpha - amylase assay using protected 4 - nitrophenyl - 1, 4 - a - D - maltoheptaoside and a novel alpha - glucosidase [J]. Clinical Chemistry, 2000, 46(5): 644 - 649.
- [7] Kuhn H, Fietzek P P, Lampen J O. N - terminal amino acid sequence of Bacillus licheniformis alpha - amylase: comparison with Bacillus amyloliquefaciens and Bacillus subtilis Enzymes [J]. J Bacteriol, 1982, 149(1): 372 - 373.
- [8] 陈忠军, 蔡 恒, 路福平, 等. 甜蛋白 Monellin 基因在大肠杆菌中的高效表达 [J]. 生物工程学报, 2005, 21(4): 64 - 68.
- [9] Dalby R E. Leader peptidase [J]. Molecular Microbiology, 1991, 5(12): 2855 - 2860.
- [10] Pugsley A P. The complete general secretory pathway in gram - negative bacteria [J]. Microbiological Review, 1993, 57(1): 50 - 108.