

携有巨大芽孢杆菌淀粉酶基因的两种质粒 在枯草杆菌中产酶性质的比较

杨丽珠 马明 王诚一 纪永刚
陈启民 蒋如璋

(南开大学生物系生物工程研究室, 天津 300071)

摘要 携带巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* 糖化型 α 淀粉酶基因的质粒 pBX95 和 pBX96 (pBX96 在枯草杆菌中传代时自发缺失 0.65kb 片段的衍生质粒) 在枯草杆菌 *Bacillus subtilis* 中表达的 α 淀粉酶分子量分别为 64 kD 和 58kD。它们的比活力相差两倍。并且在等电点、米氏常数、最适温度、最适 pH、热稳定性方面均有差别。但二者的淀粉水解产物的层析谱带相同。

关键词: 巨大芽孢杆菌; α 淀粉酶; 枯草芽孢杆菌; pBX95; pBX96

我室吕向阳和蒋如璋等人从 *B. megaterium* AS 1.1127 中克隆到了 α 淀粉酶基因。携带此基因的质粒 pBX95 在枯草杆菌中传代时自发缺失 0.65kb 片段, 得到其衍生质粒 pBX96^[1]。此质粒的基因缺失是在 3' 端区^[2]。为了弄清区域缺失对酶结构的影响, 为了比较研究淀粉酶结构与理化性质的关系, 我们将携有 pBX95 和 pBX96 枯草杆菌分别发酵, 进行酶的提纯。前者产生的酶(以下称 pBX95 酶)的分子量为 64kD, 后者产生的酶(以下称 pBX96 酶)的分子量为 58kD, 两者的分子量相差 6kD。仅此差别使得分子量小的酶的比活力提高了 1 倍。相应地在理化性质方面也有了一些差别。本文主要报道它们理化性质的比较。

材 料 和 方 法

一、菌株

我室构建保藏的 *B. subtilis*(pBX95)、*B. subtilis*(pBX96)。

二、培养基

LB 固体培养基用做斜面培养基, LB 液体培养基用做前培养, LBS 培养基用做液体产酶

培养基。

三、主要化学试剂

DEAE-纤维素(DE-32)购自 Whaman 公司, 丙烯酰胺和 N.N.-甲叉双丙烯酰胺购自 Sigma 公司, 其它化学试剂均为国产分析纯。

四、测定方法

1. 酶活力测定: 用 DNS 法^[3]测定 α 淀粉酶活性。在 50°C 每分钟使淀粉水解产生 1 μ mol 麦芽糖量定为 1 个酶活力单位。

2. 蛋白质含量测定: 采用 Lowry 法^[4]。

3. 分子量的测定: 采用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳完毕后将凝胶切成两半, 其中一半以考马斯亮兰染色显带; 另一半按 Blank 法^[5]使蛋白质原位复性后, 放在含有 0.2% 可溶性淀粉的琼脂板上, 置 50°C 温箱保温 30min, 以碘蒸汽显示淀粉酶活性带的位置。

4. 等电点的测定: 等电聚焦电泳在 Pharmacia 公司的恒功率电源 ECPS 3000/150 和平床电泳仪 FBE 3000 上进行。按该公司推荐的方法操作。两性电解质 Pharmalyte 3-10; 以等电点测定校正盒(pI 3.5-10.3)为样品 pI 值校正参比物。

五、 α 淀粉酶的制备

B.subtilis(pBX95)与 B.subtilis(pBX96)分别以一菌环接入液体培养基进行前培养过夜, 按 1% 接种新鲜发酵培养基, 37°C 往复摇床培养 48h, 离心收集上清液, 两次硫酸铵盐析, 收集饱和度 35%—65% 盐析物, 溶于水并对水充分透析, 得淀粉酶粗提物。样品上已用 0.02mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 6.5)平衡过的 DEAE 纤维素柱层析, 再用含 0—0.3 mol/L NaCl 的磷酸钠缓冲液进行梯度洗脱, 收集淀粉酶活性部分, 透析浓缩后以 Sephadex G-100 柱过滤, 收集淀粉酶活性峰部分, 浓缩即得精制酶制剂。

六、淀粉水解产物的纸层析

取酶精品 10 个单位加入 10mg 可溶性淀粉, 在 50°C 恒温水浴中作用, 不同时间取样, 样品迅速冷却, 用新华滤纸层析^[7]。

结果与讨论

一、比活力

比较发酵液, 精酶中 pBX95 酶和 pBX96 酶的比活力。Table 1 可见, pBX96 酶的比活力无论在发酵液, 还是在精制品中都比 pBX95 酶高于 1 倍。

二、分子量及等电点

采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定 pBX95 酶分子量是 64kD, pBX96 酶分子量

Table 1 To Compare Specific Activity of pBX95 and pBX96 Enzyme

Step	Enzyme	Activity U/mL	Protein mg/mL	Specific activity u/mg
Crude extract	pBX95	236	5.82	40.5
	pBX96	452	5.55	81.4
Sephadex G-100	pBX95	253	0.81	312
	pBX96	1861	2.43	766

是 58kD(Fig.1)。用等电聚焦电泳测定两者的等电点分别为 5.35 和 5.05, 4.9。见(Fig.2)。

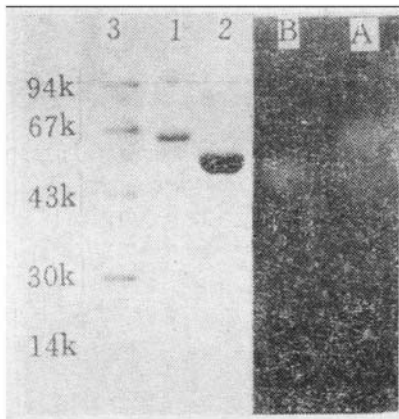


Fig.1 SDS polyacrylamide gel electrophoresis lanes 1 and 2 showed protein band pattern of pBX95 and pBX96 enzyme stained by Coomassie Brilliant Blue R-250, lane 3 M.W. marker lanes A and B showed the band of pBX95 and pBX96 enzyme activity after protein renaturation

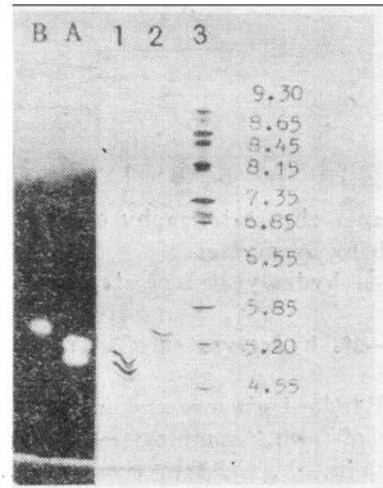


Fig.2 Isoelectric focusing electrophoresis of α -amylases
lane 1: pBX95 α -amylase (PI=5.35)
lane 2: pBX96 α -amylase (PI=5.05, 4.9)
lane 3: calibration kit for PI
(PI 3.5—10.3, Pharmacia)
A and B, active bands of pBX95 and pBX96 α -amylase respectively

三、米氏常数的测定

用 Lineweaver 和 Burk 法测定了 pBX95 酶, pBX96 酶的米氏常数(Fig.3), pBX95 酶的 K_m 值是 0.0072%, 而 pBX96 酶的 K_m 值是 0.014%, 约为 pBX95 酶的两倍。

四、淀粉的酶解产物的纸层析

pBX95 酶和 pBX96 酶的水解淀粉产物均为葡萄糖和麦芽糖(Fig.4)。可见它们水解淀粉的专一性相同。

五、酶反应的最适温度

在 0.02mol/L pH 6.5 的磷酸盐缓冲液条件下, 测定不同温度对酶活力的影响, 结果

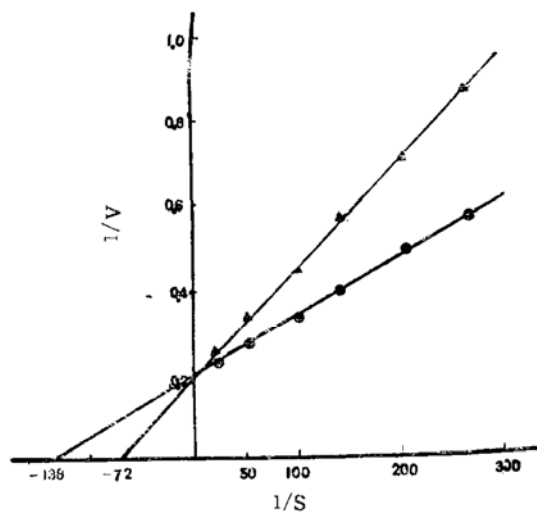


Fig.3 Lineweaver-Burk plots of α -amylase
●—● pBX95 α -amylase
▲—▲ pBX96 α -amylase

(Fig.5)表明 pBX95 酶最适温度是 55℃, 而 pBX96 酶最适温度是 65℃。

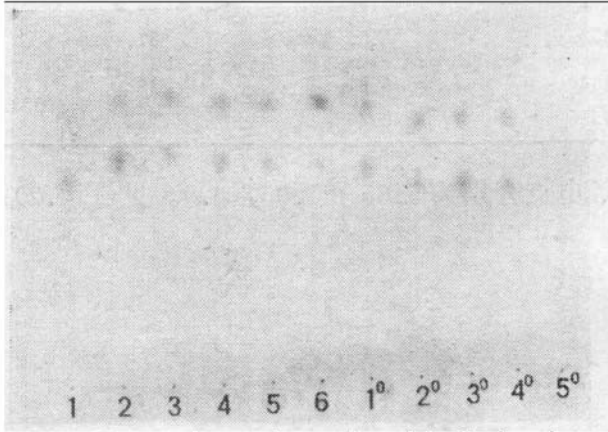


Fig.4 Paper chromatography of hydrolysates of starch by α -amylases
lanes 1—5, hydrolysates of starch by pBX95 α -amylase
lanes 1⁰—5⁰, hydrolysates of starch by pBX96 α -amylase
lane 6, standard glucose and maltose
the time of taking samples 1—5 and 1⁰—5⁰ is 1min, 30min, 1h, 2h, 24h, respectively

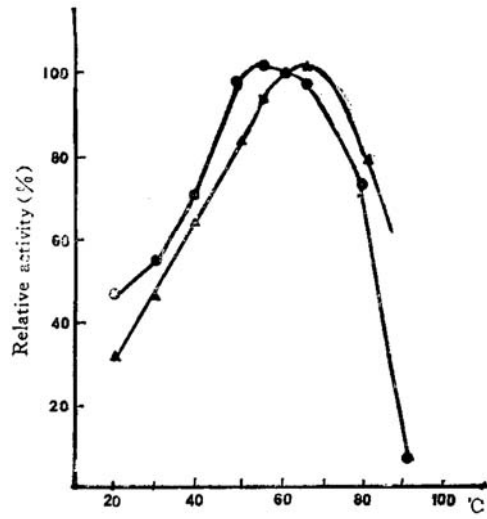


Fig.5 Effect of temperature on the activity of enzyme
●—● pBX95 α -amylase
▲—▲ pBX96 α -amylase

六、酶反应的最适 pH

用 0.2mol/L 的 Na_2HPO_4 -0.1 mol/L 的柠檬酸配制 pH 3—8 的缓冲液, 按 DNS 法测定 α 淀粉酶活力, 从 Fig.6 可看出 pBX95 酶的最适 pH 为 5.5, 而 pBX96 酶的最适 pH 为 6.0。

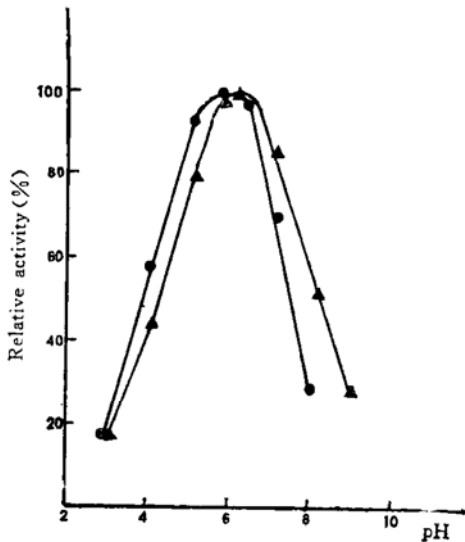


Fig.6 Effect of PH on enzyme activity
●—● pBX95 α -amylase
▲—▲ pBX96 α -amylase
Buffer system: pH3—8 phosphate-citric acid
pH9—10 sodium carbonate

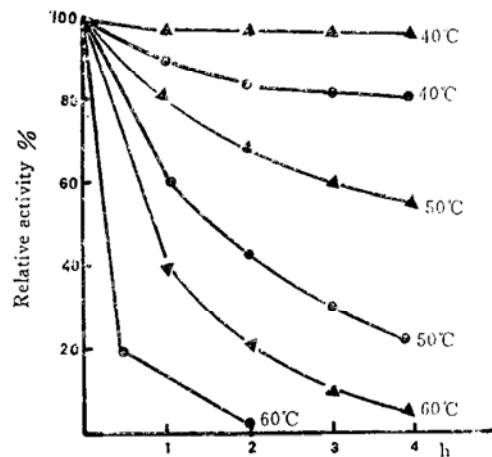


Fig.7 Effect of temperature on enzyme stability
●—● pBX95 α -amylase
▲—▲ pBX96 α -amylase

七、酶的热稳定性

以 0.02 mol/L pH6.5 磷酸盐缓冲液配制酶液, 分别置于 40°C, 50°C, 60°C 恒温水浴中保温, 在无底物保护的条件下, 保温不同时间后测定剩余酶活力, 结果(Fig.7)表明 pBX96 酶在 40°C 保温 4 h 活力几乎不丧失, 在 50°C 保温 4 h 剩余活力仍有 50% 以上, 而 pBX95 酶在 50°C 保温 4 h 剩余活力只有 20%。

由本文结果可见, 质粒 pBX96 所携带的 α 淀粉酶基因比 pBX95 缺失 0.65Kb 片段而导致其表达的酶的分子量不同。pBX96 酶比 pBX95 酶比活力高出一倍, 而其它理化性质也有某些差异。pBX96 酶的比活力提高可能是酶分子的催化速率常数 K_0 ($ES \rightarrow E + P$) 变大的结果, 表现为催化效率提高, 这与 pBX96 酶 K_m 值约为 pBX95 酶 K_m 值两倍的结果也相符。

参 考 文 献

- 1 吕向阳, 等. 遗传学报, 1991, 2: 185—192
- 2 李隽. 硕士论文, 1990
- 3 蒋传葵, 等. 工具酶的活力测定, 北京: 科学出版社, 1983: 75
- 4 Fowa H J. *Biochem*, 1954, 41: 583—603
- 5 Blank A. *Analytical Biochem*, 1982, 120: 276
- 6 柯秉旺, 等. 微生物学报, 1983, 1: 75—83

Comparative Studies on the Properties of α -Amylase in B. Subtilis Produced by the Two Plasmids Carrying B. Megaterium Gene

Yang, Li-zhu Ma, Ming Wang, Cheng-yi Ji, Yong-gang Chen, Qi-min
Jiang, Ru-zhang

(Laboratory for Biotechnology, Dept of Biology, Nankai Univ, Tianjin 300071)

Abstract Plasmids pBX95 and pBX96 having carried α -amylase gene of *Bacillus megaterium* (pBX96 is a derivative plasmid which lacked spontaneously 0.65kb fragment during heredity) expressed two kind of molecular weight of enzyme in *Bacillus subtilis*: 64,000 and 58,000 Dalton. Their specific activities have two fold difference. They are different in pI, K_m , thermostable, optimum temperature and pH. But they have same chromatography stain of hydrolytic production on starch. Valine is their N-terminal amino acid.

Key words: *Bacillus megaterium*; α -Amylase; *Bacillus-subtilis*; pBX95; pBX96