

· 研究报告 ·

## 地衣芽孢杆菌耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因的克隆、烟草瞬时表达及转化拟南芥的研究

李潇<sup>1</sup>, 孙海彦<sup>1, 2\*</sup>, 阮孟斌<sup>2</sup>, 王霏虹<sup>3</sup>, 彭明<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>海南大学, 海口 570228; <sup>2</sup>中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101

<sup>3</sup>北京市科学技术情报研究所, 北京 100048

**摘要** 从地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)中克隆到耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因全长, 构建了原核表达载体, 转入大肠杆菌(*Escherichia coli*)中, 使用IPTG于28°C诱导6小时后, 通过SDS-PAGE检测到目的蛋白, 分子量约为55 kDa, 并通过酶活力检测实验证明该蛋白具有耐高温 $\alpha$ -淀粉酶活性。同时构建了该基因融合GFP的植物表达载体, 通过农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导瞬时转化烟草(*Nicotiana tabacum*)下表皮细胞并在荧光显微镜下观察, 发现在烟草下表皮细胞的细胞质和液泡中均有绿色荧光。使用I<sub>2</sub>-KI溶液对乙醇脱色后的烟草叶片进行染色, 显色反应表明在烟草中表达的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶具有酶活性。最后, 采用农杆菌介导的花蕾浸泡法将重组载体转化到拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, 筛选到稳定遗传的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因的拟南芥纯合子。研究结果为后期开展表达耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的转基因植物的相关研究奠定了实验基础。

**关键词** 地衣芽孢杆菌, 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因, 烟草瞬时表达, 拟南芥

李潇, 孙海彦, 阮孟斌, 王霏虹, 彭明 (2015). 地衣芽孢杆菌耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因的克隆、烟草瞬时表达及转化拟南芥的研究. 植物学报 50, 354–362.

耐高温 $\alpha$ -淀粉酶(thermostable  $\alpha$ -amylase)是一种在食品、发酵和淀粉工业中广泛应用的淀粉水解酶(王春铭等, 2007), 其主要作用是在淀粉液化过程中将淀粉水解成短链糊精。该酶普遍存在于细菌、真菌和植物体内。地衣芽孢杆菌产生的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶具有耐高温、活力高和易大规模生产等优良特性, 因而成为目前工业上应用的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的主要来源(王慧超等, 2010)。由于地衣芽孢杆菌耐高温 $\alpha$ -淀粉酶具有广泛的应用价值, 近年来国内外学者开展了一系列的相关研究, 例如产酶菌株的筛选诱变、发酵条件的优化、淀粉酶基因的克隆、原核与真核的表达、酶的纯化与性质研究及酶的应用研究等(林剑等, 2002; 潘风光等, 2004; 杜承等, 2010; Liu et al., 2010; 秦亚楠等, 2011; 林必博, 2011)。尽管上述研究取得了一定的进展, 但是多局限于从地衣芽孢杆菌生产耐高温 $\alpha$ -淀粉酶, 然后将其添加到淀粉原料

中应用。随着微生物法生产该酶技术的日益成熟, 单纯从微生物发酵技术角度来提高酶的生产技术水平, 以达到降低工业成本的方法已不具优势(林剑等, 2003), 必须从新的思路进行研究和技术开发。随着近年来基因工程技术的发展, 一些微生物来源的基因已经在植物中进行了成功表达并实现了产业化应用。例如将来源于苏云金芽孢杆菌的**bt**基因转化到棉花(*Gossypium* spp.)中得到**bt**抗虫棉(文学和张宝红, 2000); 将来源于曲霉的植酸酶基因转化到玉米(*Zea mays*)中得到含有植酸酶的玉米(姚斌和范云六, 2000)。木薯(*Manihot esculenta*)是一种热带亚热带特色作物, 新鲜块根中淀粉含量约30%, 干片中淀粉含量约70%, 有“淀粉之王”和“地下粮仓”之称, 是目前生产乙醇的一种重要原料。因此, 将地衣芽孢杆菌耐高温 $\alpha$ -淀粉酶转化到木薯中, 实现耐高温 $\alpha$ -淀粉酶在木薯块根中的直接表达, 获得的含有耐高温

收稿日期: 2014-11-15; 接受日期: 2015-01-27

基金项目: 国家高技术研究发展计划重点项目(No.2012AA101204)、国家自然科学基金(No.31000029)、海南省自然科学基金(No.ZDFD 20120765)、海南省引进集成应用专项(No.YJJC2011004)、海南省研究生创新科研课题(No.Hyb2011-4)和海南省重大科技项目(No.ZDZX2013023-1)

\* 通讯作者。E-mail: sunhaiyan@itbb.org.cn; pengming@itbb.org.cn

$\alpha$ -淀粉酶的木薯淀粉原料再用于生产中,可减少加工过程中加入耐高温 $\alpha$ -淀粉酶,降低生产成本(赵淑娟等, 2000; Lin et al., 2008)。本研究从一株高产耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的地衣芽孢杆菌中克隆得到的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因为全长,通过序列比对、原核表达和对酶功能进行验证,确认克隆到的序列为耐高温 $\alpha$ -淀粉酶全长。把该基因在模式植物烟草(*Nicotiana tabacum*)中瞬时表达,通过烟草叶柄环割对叶片中淀粉运输途径进行阻断,使得叶片中淀粉含量积累至可检测范围后,经乙醇脱色并使用 $I_2$ -KI进行染色,实验结果证实了本研究克隆到的地衣芽孢杆菌耐高温 $\alpha$ -淀粉酶可以在烟草中进行表达,并通过亚细胞定位确认了该酶的合成位置及活性。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)作为转基因模式植物,不仅基因转化技术比较成熟,而且生长周期短,容易培养。通过比对克隆得到的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因与拟南芥全基因组序列,发现拟南芥自身不含有耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因。因此,本研究通过将构建的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因转入拟南芥中来验证该基因能否转入植物并进行稳定遗传,以期今后进一步将耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因转入木薯,获得含有耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的转基因木薯新品种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

地衣芽孢杆菌菌种、根癌农杆菌LBA4404、原核表达载体pET-22b及植物GFP融合表达载体G1300,由中国热带农业科学院热带生物技术研究所以彭明课题组保存。大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达菌株BL21(DE3)、大肠杆菌克隆菌株DH5 $\alpha$ 以及T载体零背景快速连接载体购自天根生化科技有限公司。抗生素3号培养基(antibiotic medium 3)购自DIFCO公司。农杆菌侵染重悬液(MES、MgCl<sub>2</sub>和乙酰丁香酮), 121°C高温灭菌20分钟, pH5.6。普通质粒小提试剂盒和琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自中科瑞泰生物技术有限公司。FastQuant cDNA第1链合成试剂盒购自天根生化科技有限公司。感受态的制法和转化等参照分子克隆实验指南。引物合成及相关测序工作由华大基因公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 地衣芽孢杆菌耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的酶活及其耐高温稳定性检测

将地衣芽孢杆菌保藏菌种在含1%淀粉抗3培养基上划线,分离能产生耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的单菌落,配制浓度为1.8%的抗3培养基, 121°C高温灭菌30分钟,将分离得到的单菌落接种于培养基中, 220 rpm, 37°C培养16小时。吸取2 mL菌液至发酵培养基中, 220 rpm, 37°C发酵5天。将发酵液离心,回收上清,于100°C分别保温0、10、20、30、40、50和60分钟后,参照GB8275-2009中所述方法,检测耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的酶活。

#### 1.2.2 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因的获得

根据已报道的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的基因序列(GenBank登录号: AY630336.1)设计1对引物,上游引物: 5'-ATGAAACAACAAAAACGG-3',下游引物: 5'-CT-ATCTTTGAACATAAAT-3'。以本实验室保存的地衣芽孢杆菌为模板,进行菌落PCR。PCR反应程序:预变性94°C3分钟;变性94°C30秒,退火50°C30秒,延伸72°C2分钟,35个循环;72°C10分钟。使用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒,按照DNA提取纯化操作手册回收目的DNA片段,按零背景快速连接试剂盒使用说明书进行连接反应,构建重组质粒pZero-Back- $\alpha$ 。挑取阳性克隆送华大基因公司测序,并用DNAMAN软件对测序结果进行分析。

#### 1.2.3 原核表达载体和植物GFP融合表达载体的构建

根据原核表达载体和植物GFP表达载体质粒图谱设计2对引物, pET-22b上游引物: 5'-CGGGATCCGATGAAACAACAAAAACGG-3',下游引物: 5'-CCGCTC GAGTCTTTGAACATAAATTGA-3',酶切位点为XhoI和BamHI; G1300上游引物: 5'-GCTCTAGAATGAAACAACAAAAACGG-3',下游引物: 5'-CGGGATC CTCTTTGAACATAAATTGA-3',酶切位点为BamHI和XbaI。以1.2.2中构建的重组质粒pZeroBack- $\alpha$ 为模板,分别使用上述引物按照1.2.2中方法进行PCR扩增并回收2条目的片段;按零背景快速连接试剂盒使用说明书进行连接反应,分别构建重组质粒pZero-Back-pET-22b- $\alpha$ 和pZeroBack-G1300- $\alpha$ 。按照DNA

提取纯化操作手册提取上述2种质粒并进行双酶切,回收目的片段后与经过同样方法酶切回收的表达载体连接,构建原核表达载体pET-22b- $\alpha$ 和植物GFP融合表达载体G1300- $\alpha$ ,并转化DH5 $\alpha$ 受体菌。挑取阳性克隆送华大基因公司测序,并使用DNAMAN软件进行分析。

#### 1.2.4 重组原核表达菌株的筛选及其透明圈鉴定

参照DNA提取纯化操作手册提取1.2.3中构建的原核表达载体pET-22b- $\alpha$ ,转化BL21 (DE3)受体菌。挑取阳性克隆BL21 (DE3)/pET-22b- $\alpha$ ,在含有淀粉的LB培养基上分3个区域划线。区域1为耐高温 $\alpha$ -淀粉酶成品酶,区域2为BL21 (DE3)/pET-22b- $\alpha$ ,区域3为BL21 (DE3)/pET-22b (CK),37°C培养2–3天,在平板中加I<sub>2</sub>-KI染色后观察透明圈的情况。

#### 1.2.5 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶在大肠杆菌中的表达

将鉴定后的阳性重组菌株BL21 (DE3)/pET-22b- $\alpha$ 加入LB培养基振荡培养4小时,检测菌液OD<sub>600</sub>达到0.8后,加入0.1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG,28°C低转速诱导6小时,离心收集菌体。使用PBS缓冲液重悬后,在冰浴环境下超声破碎,将破碎前发酵液、破碎后沉淀、破碎后上清以及BL21 (DE3)/pET-22b (CK)菌体加考马斯亮蓝染色液后沸水浴10分钟,进行SDS-PAGE电泳分析(诸葛健和唐是雯,1994)。

#### 1.2.6 重组植物GFP表达菌株的筛选

参照DNA提取纯化操作手册提取1.2.3中构建的植物GFP融合表达载体,转化农杆菌LBA4404,在含有kan<sup>+</sup>、rif<sup>+</sup>和chl<sup>+</sup>三抗LB平板上筛选阳性克隆LBA-4404/G1300- $\alpha$ 。

#### 1.2.7 农杆菌侵染下烟草叶片下表皮细胞的瞬时表达

挑取1.2.6中筛选到的阳性克隆LBA4404/G1300- $\alpha$ 以及含有空白载体的农杆菌LBA4404/G1300 (CK),置于加入抗生素kan<sup>+</sup>、rif<sup>+</sup>和chl<sup>+</sup>的LB液体培养基中,28°C振荡过夜培养后接种于新鲜培养基上,4小时后使用分光光度计在600 nm波长下测定农杆菌的菌液浓度,离心后用MgCl<sub>2</sub>重悬液重悬菌体,使最终OD<sub>600</sub>为1.2,将重悬菌液于室温放置4小时或过夜后注射烟草叶片下表皮,2–4天后进行显微检测。

#### 1.2.8 GFP绿色荧光观察

在共聚焦荧光显微镜下观察,用蓝色激发光以观察GFP蛋白所发出的绿色荧光,并利用计算机拍摄储存。

#### 1.2.9 烟草叶片环割

为在烟草叶片中积累淀粉,使用环割方法,限制叶片中合成的临时淀粉向其它位置转移,用刀片在1.2.7所侵染的叶片茎秆部位剥除表皮,深至筛管,切断向外运输的途径,并在伤口处涂抹凡士林防止水分流失导致组织细胞死亡(Dai and Dong, 2011)。由于在高等植物中,光合作用产物通常在白天以临时淀粉的形式储存于叶片中,在夜晚通过筛管向下运输至其它组织(Lin et al., 2008),故环割时间选取上午较为合适。

#### 1.2.10 瞬时表达烟草叶片的染色

将1.2.9中处理的烟草叶片放入乙醇中煮3–5分钟脱色,用清水洗去叶片表面的乙醇后放入培养皿中,用稀释5倍的I<sub>2</sub>-KI (3 g碘化钾、1 g碘和100 mL水)溶液对其进行染色,观察叶片的颜色变化。

#### 1.2.11 重组载体的拟南芥转化

使用1.2.6中LBA4404/G1300- $\alpha$ ,通过花蕾浸泡(floral dip) (Clough and Bent, 1998)法转化拟南芥。将转化后收获的拟南芥T<sub>0</sub>代种子经无菌处理后,均匀铺于含有潮霉素的MS培养基平板上,于光照培养箱中培养10–14天,筛选出已转入G1300- $\alpha$ 重组质粒的拟南芥植株,单株收集T<sub>1</sub>代种子后使用潮霉素对转基因拟南芥植株进行筛选,直至得到纯合株系。

#### 1.2.12 拟南芥转化植株的PCR鉴定

称取0.1–0.3 g转基因拟南芥纯合株系的嫩叶,采用CTAB法提取总RNA,使用FastQuant cDNA第1链合成试剂盒对提取的RNA进行反转录,获得转基因拟南芥纯合株系cDNA。分别使用目的基因引物、潮霉索引物以及GFP引物对其进行PCR扩增,验证外源基因的整合情况并进行凝胶电泳分析。

#### 1.2.13 转基因拟南芥叶片中淀粉酶的酶活染色检测

将转基因拟南芥纯合株系叶片按照1.2.10中所述的方

法处理后染色, 观察叶片的颜色变化。

## 2 结果与讨论

### 2.1 地衣芽孢杆菌耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的酶活检测及耐高温的稳定性

将地衣芽孢杆菌在含1%淀粉的抗3培养基上划线, 使用 $I_2$ -KI溶液对平板进行染色, 结果如图1A所示。从图1A可以看出, 由于地衣芽孢杆菌合成了耐高温 $\alpha$ -淀粉酶, 淀粉被水解, 产生透明圈。按照1.2.1中方法处理发酵液后, 参照GB8275-2009所述方法测定耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的活性, 结果见表1。表1显示, 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的初始酶活性为 $1\ 533\ U\cdot mL^{-1}$ , 经60分钟 $100^\circ C$ 保温后, 酶活性降低至 $1\ 373\ U\cdot mL^{-1}$ , 但仍保持89.6%, 由此可以确定耐高温 $\alpha$ -淀粉酶具有耐高温稳定性。

### 2.2 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的全长扩增

使用1.2.3中设计的引物对地衣芽孢杆菌进行菌落PCR, 对其产物进行凝胶电泳分析, 结果如图1B所示。结果显示, 在1 500 bp处出现了明显的特异性扩增条带, 且符合目的片段的大小。将测序结果使用DNAMAN软件进行分析, 并与GenBank上的同源序列进行比对, 比对结果显示回收后获得的1 539 bp目的片段, 与同源序列一致性达100%。序列由+1位Ala至+18位Asp与先前报道的成熟淀粉酶基因N端序列一致, 由此判断地衣芽孢杆菌耐高温 $\alpha$ -淀粉酶前体物质包含一段含有29个氨基酸序列的信号肽, 且该信号肽可以被大肠杆菌识别(蔡恒等, 2008)。根据测序结果, 回收的目的片段含有ATG起始密码子以及TAG终止密码子。由此推断扩增得到的是地衣芽孢杆菌耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因的完整阅读框, 可以翻译出具有生物学功能活性的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶。

### 2.3 原核表达载体pET-22b- $\alpha$ 及植物GFP表达载体G1300- $\alpha$ 的鉴定

根据DNA提取纯化操作手册中所述方法提取1.2.3中构建的2种表达体质粒, 使用XhoI和BamHI对pET-22b- $\alpha$ 进行双酶切, 用BamHI和XbaI对G1300- $\alpha$ 进行双酶切, 电泳结果如图1B所示。从图1B可以看出, 第3泳道有长度约为5.5 kb和1 500 bp的2个条带,

分别是pET-22b载体和目的DNA; 第5泳道有长度约为10 kb和1 500 bp的2个条带, 分别是G1300载体和目的DNA, 由此证明目的片段成功插入了两载体并转入DH5 $\alpha$ 中。

### 2.4 原核表达菌株在含淀粉培养基中的透明圈鉴定

使用 $I_2$ -KI溶液对1.2.4中平板进行染色, 由图1C可观察到, 区域1因涂有耐高温 $\alpha$ -淀粉酶成品酶, 淀粉被水解, 产生透明圈。区域2为BL21 (DE3)/pET-22b- $\alpha$ 阳性菌株, 可以表达具有活性的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶, 因此淀粉被水解, 产生透明圈。区域3为BL21 (DE3)/pET-22b (CK), 无法表达能够水解淀粉的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶, 故无透明圈产生。由此判断, BL21 (DE3)/pET-22b- $\alpha$ 可以分泌具活性的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶至胞外。

### 2.5 重组目的蛋白的SDS-PAGE分析

按照1.2.5中的操作方法, SDS-PAGE结果显示, 在55 kDa处1、3泳道均出现明显条带, 与4泳道中条带对比有明显差异, 且大小与预期效果相符, 证明BL-21 (DE3)/pET-22b- $\alpha$ 经IPTG诱导6小时后表达了目的蛋白耐高温 $\alpha$ -淀粉酶(图1D)。泳道1中出现目的蛋白条带, 进一步证明耐高温 $\alpha$ -淀粉酶经过诱导表达后可以分泌至胞外。

### 2.6 烟草瞬时表达

图2A左图为注射含有空白载体农杆菌LBA4404/G1300 (CK)的烟草叶片下表皮细胞的显微成像, 可以看出在细胞核和细胞壁中有绿色荧光; 右图为注射含有目的载体农杆菌LBA4404/G1300- $\alpha$ 的烟草叶片下表皮细胞的显微成像, 可见其绿色荧光信号与对照相比在亚细胞定位上有明显的区别, 且细胞核无荧光出现。由此判断耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因在烟草下表皮细胞中成功表达。

### 2.7 瞬时表达烟草叶片的染色检测

图2B上图为未染色的侵染叶片, 其中叶片1为LBA-4404/G1300 (CK)侵染叶片, 叶片2为LBA4404/G1300- $\alpha$ 侵染叶片, 经脱色后使用稀释 $I_2$ -KI染色, 结果如图2B下图所示。从图2B下图可以看出, 两叶片颜色有明显差异, 染色后的叶片1颜色明显深于表达淀粉酶基因的叶片2 (因淀粉酶降解叶片中的淀粉)。

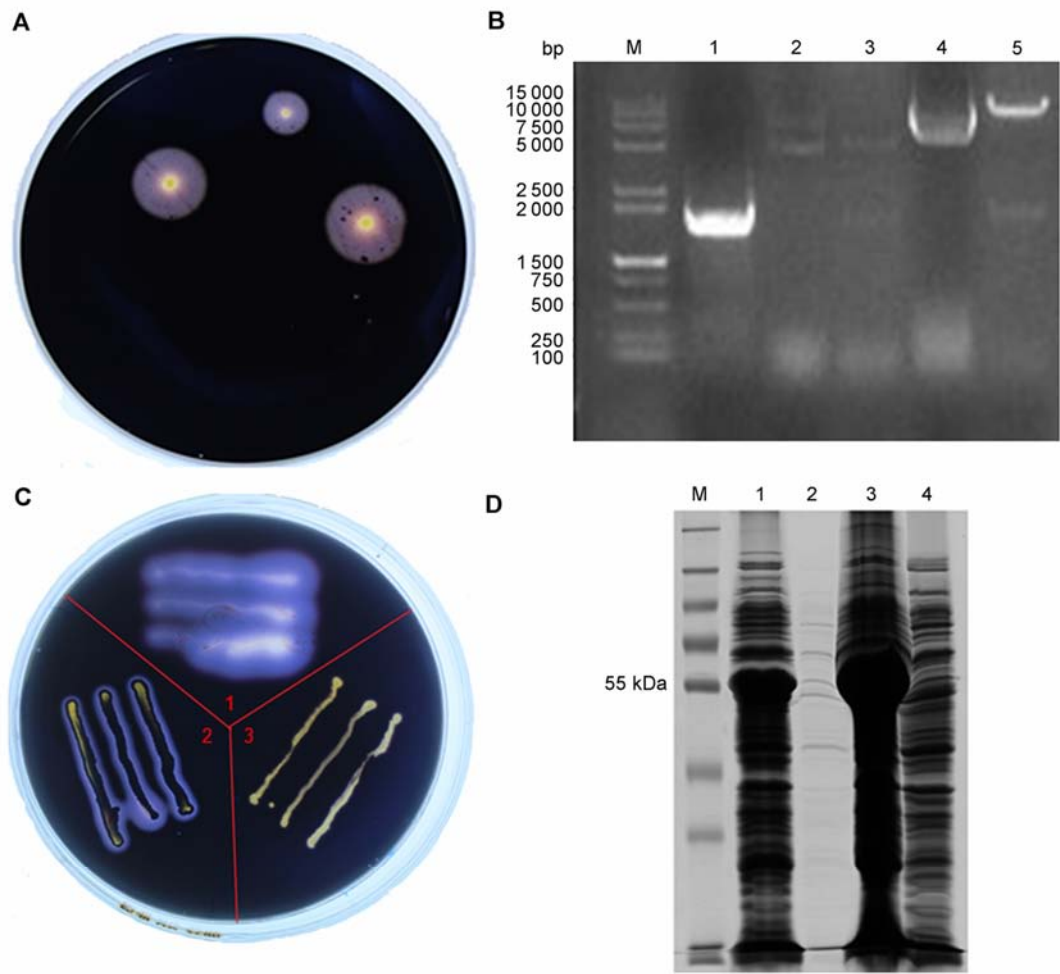


图1 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因的PCR扩增及酶活性鉴定

(A) 地衣芽孢杆菌的淀粉水解圈; (B) 地衣芽孢杆菌耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因的PCR扩增片段及重组质粒的酶切验证(M: 15 000–2 000 marker; 1: 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因; 2: pET-22b- $\alpha$ 重组载体; 3: pET-22b- $\alpha$ 酶切验证/*Bam*HI/*Xho*I; 4: G1300- $\alpha$ 重组载体; 5: G1300- $\alpha$ 酶切验证/*Bam*HI/*Xba*I); (C) BL21 (DE3)/pET-22b- $\alpha$ 淀粉透明圈(1: 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶商品酶; 2: BL21 (DE3)/pET-22b- $\alpha$ ; 3: BL21 (DE3)/pET-22b (CK)); (D) BL21 (DE3)/pET-22b- $\alpha$ 诱导6小时后的SDS-PAGE (M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; 1: 破碎前发酵液; 2: 破碎后上清; 3: 破碎后沉淀; 4: BL21 (DE3)/pET-22b菌体(对照))

Figure 1 PCR product of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* and identification of the activity of amylase

(A) The transparent zone of *Bacillus licheniformis* on an Antibiotic Medium 3 plate containing 1% soluble starch; (B) PCR product of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* and identification of the recombinant plasmid (M: 15 000–2 000 marker; 1: The gene of thermostable  $\alpha$ -amylase; 2: Recombinant plasmid pET-22b- $\alpha$ ; 3: Identification of enzyme digestion of pET-22b- $\alpha$  by *Bam*HI and *Xho*I; 4: Recombinant plasmid G1300- $\alpha$ ; 5: Identification of enzyme digestion of G1300- $\alpha$  by *Bam*HI and *Xba*I); (C) The transparent zone of BL21 (DE3)/pET-22b- $\alpha$  on a LB plate containing 1% soluble starch (1: Commercial thermostable  $\alpha$ -amylase; 2: BL21 (DE3) with pET-22b- $\alpha$ ; 3: BL21 (DE3) with pET-22b (CK)); (D) SDS-PAGE analysis of BL21 (DE3)/pET-22b- $\alpha$  after induction for 6 hours (M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; 1: Untreated fermentation liquid; 2: Supernatant after ultrasonication; 3: Precipitate after ultrasonication; 4: Bacterium solution of BL21 (DE3)/pET-22b (CK))

表1 高温处理后耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的酶活性变化

Table 1 The change of enzyme activity of thermostable  $\alpha$ -amylase after high-temperature treatments

Treatment time (min)	0	10	20	30	40	50	60
Enzyme activity (U·mL <sup>-1</sup> )	1 533	1 538	1 528	1 509	1 489	1 458	1 373

图2B上图显示叶片2大部分显露农杆菌侵染后的黄色菌斑, 仅边缘为深绿色未被侵染; 而图2B下图叶片2可以明显观察到与图2B上图叶片2形状一致的显色差别, 说明被菌液侵染的部分有淀粉酶合成, 导致淀粉降解, 未被侵染的部分则受到较小的影响。综合2.5中所得结果判断, 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶在烟草叶片中不仅表达, 而且具有相应的生物学功能活性。

## 2.8 重组载体的拟南芥转化

将经花蕾浸泡法转化后得到的拟南芥 $T_0$ 代种子消毒, 铺于含潮霉素抗性的MS培养基上, 筛选得到转入G1300- $\alpha$ 重组质粒的 $T_1$ 代拟南芥植株, 如图2C上图所示。经移栽收种后, 将种子铺于含潮霉素抗性的MS培养基上, 筛选抗性与非抗性植株比例为391:131 (约2.98:1), 符合单拷贝基因分离比。将其中一部分抗性植株移栽收种后, 将其种子铺于含潮霉素抗性的MS培养基上, 结果如图2C下图所示。所得 $T_3$ 代植株全部为抗性植株, 由此判断 $T_3$ 代为纯合株系。

## 2.9 拟南芥转化植株的PCR鉴定

采用CTAB法提取2.8中获得的转基因拟南芥纯合株系总RNA, 按照FastQuant cDNA第1链合成试剂盒使用说明书对其进行反转录, 获得转基因拟南芥纯合株系cDNA。分别使用目的基因引物、潮霉素引物以及GFP引物对其进行PCR扩增, 凝胶电泳检测结果如图2D上图所示。从图2D上图可以看出, 在第1泳道1 700 bp左右、第2泳道750 bp左右及第3泳道750 bp左右分别发现目的条带, 表明重组载体中基因不仅转入拟南芥, 而且能在拟南芥中表达。

## 2.10 转基因拟南芥叶片中耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的酶活性染色检测

图2D下图左侧为野生型拟南芥叶片, 右侧为转基因拟南芥叶片, 叶片中耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的表达使得淀粉被降解, 经 $I_2$ -KI染色后, 野生型拟南芥叶片明显变蓝, 而转基因拟南芥叶片仅有很小部分变蓝。由此可以判断在转基因拟南芥中表达的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶具有正确的淀粉酶活性。

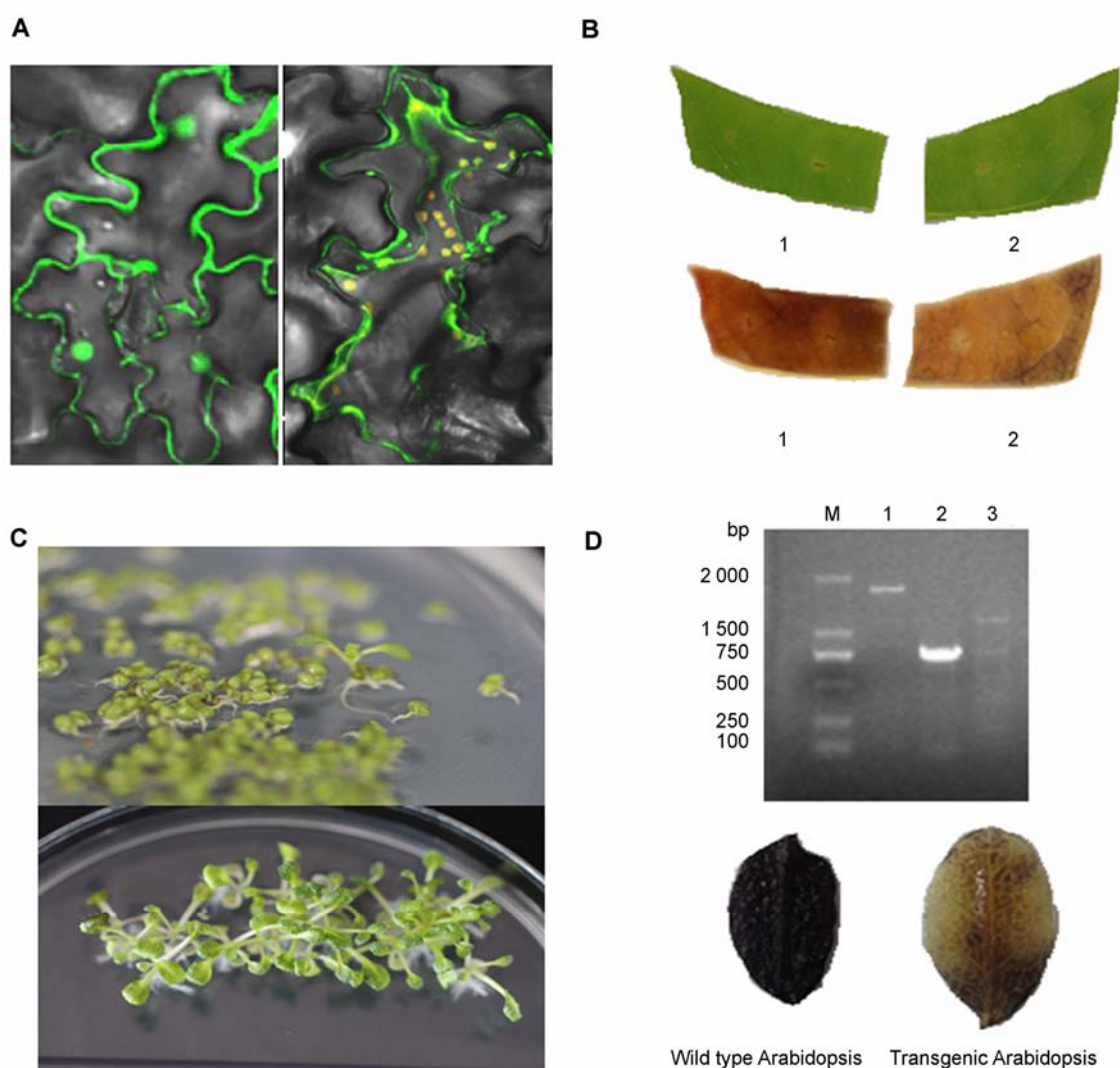
## 2.11 讨论

耐高温 $\alpha$ -淀粉酶在工业中的应用已越来越广泛, 基因

工程的发展为作物育种提供了新的技术手段。鉴于苏云金芽孢杆菌中的 $bt$ 基因和曲霉中的植酸酶基因等来源于原核及真核微生物的基因在转基因植物中的成功表达和应用, 把耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因转入高淀粉含量的薯类作物将成为该工业酶未来新的发展方向。本研究首先对地衣芽孢杆菌进行发酵培养, 之后处理发酵液并检测其酶活性, 结果显示, 该酶在100°C保温60分钟后, 仍保持89.6%的酶活性, 由此确定其耐高温具稳定性。利用PCR从原核微生物地衣芽孢杆菌中扩增得到耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的基因全长, 通过测序确认所得序列为一段大小为1 539 bp且包含ATG起始密码子、TAG终止密码子以及29个氨基酸组成的信号肽的完整开放阅读框, 与Rivera等(2003)报道的序列一致。转化大肠杆菌后, 通过淀粉平板进行酶活检测以及SDS-PAGE凝胶电泳分析, 在55 kDa处发现目的条带, 证实了耐高温 $\alpha$ -淀粉酶在大肠杆菌中的表达及活性。通过烟草瞬时表达系统, 在烟草下表皮细胞中观察到GFP融合蛋白绿色荧光, 由此可以确认耐高温 $\alpha$ -淀粉酶在烟草中的表达位置。此外, 通过乙醇脱色及使用 $I_2$ -KI溶液对烟草叶片中的淀粉进行染色, 结果显示, 经LBA4404/G1300- $\alpha$ 侵染后的叶片, 在菌斑处染色无变化, 而边缘未被侵染的叶片部分染成蓝色, 对比LBA4404/G1300 (CK)侵染后的叶片, 可以认定在烟草叶片中表达的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶具有酶活性。该实验结果与Pen等(1992)的报道有所不同, 分析原因可能有2点, 一是由于后者未进行烟草叶柄环割处理, 故光合作用产物临时淀粉转运出叶片而导致含量过低无法染色至肉眼可见; 二是瞬时表达结果显示, 荧光亚细胞定位检测到该酶合成位置在细胞质和液泡中, 乙醇脱色时, 经煮沸后细胞破裂, 导致耐高温 $\alpha$ -淀粉酶在高温条件下可以接触到叶绿体中的淀粉粒并迅速反应降解。本实验结合显微与瞬时表达技术, 进一步确认了耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的合成位置及酶活性。

为研究克隆得到的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因能否转入植物体内, 本实验将重组载体通过农杆菌介导的花蕾浸泡法转入模式植物拟南芥, 经筛选获得 $T_3$ 代纯合子转基因株系, 以 $T_3$ 代植株cDNA为模板, 通过PCR扩增, 证明重组载体已经转入拟南芥中表达, 并可以稳定遗传。为验证转入拟南芥中的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶是否具有活性, 将叶片用乙醇脱色后使用 $I_2$ -KI溶液染





**图2** 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶在真核植物中的表达

(A) 绿色荧光融合蛋白在烟草表皮细胞中的表达(左图为LBA4404/G1300侵染烟叶(对照); 右图为LBA4404/G1300- $\alpha$ 侵染烟叶); (B) 用 $I_2$ -KI溶液对瞬时表达烟草叶片染色(上图为未染色叶片(1: LBA4404/G1300侵染烟叶(对照); 2: LBA4404/G1300- $\alpha$ 侵染烟叶)); 下图为 $I_2$ -KI染色后叶片(1: LBA4404/G1300侵染烟叶(对照); 2: LBA4404/G1300- $\alpha$ 侵染烟叶)); (C) 转基因拟南芥的筛选(上图为转基因拟南芥 $T_1$ 代, 下图为转基因拟南芥 $T_3$ 代); (D) 转基因纯合子株系cDNA的PCR检测及 $I_2$ -KI溶液对叶片染色(上图为转基因纯合子株系cDNA的PCR检测(M: 2 000 marker; 1: 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因的目的条带; 2: *Hyg*基因的目的条带, 3: *GFP*基因的目的条带); 下图为野生型和转基因拟南芥叶片)

**Figure 2** The expression of thermostable  $\alpha$ -amylase in plants

(A) Expression of fluorescent fusion proteins in tobacco epidermal cells (Tobacco epidermal cells infected by LBA4404/G1300 (CK) (left); Tobacco epidermal cells infected by LBA4404/G1300- $\alpha$  (right); (B)  $I_2$ -KI dyeing of the tobacco leaf of transient expression with  $I_2$ -KI solution (Leaf without dyeing (above) (1: Tobacco leaf infected by LBA4404/G1300 (CK); 2: Tobacco leaf infected by LBA4404/G1300- $\alpha$ ); Leaf dyed with the  $I_2$ -KI solution (below) (1: Tobacco leaf infected by LBA4404/G1300 (CK); 2: Tobacco leaf infected by LBA4404/G1300- $\alpha$ )); (C) Screening of transgenic Arabidopsis (Transgenic Arabidopsis of  $T_1$  generation (above); Transgenic Arabidopsis of  $T_3$  generation (below); (D) The analysis of PCR amplification for the cDNA of homozygous transgenic lines and the leaf of Transgenic Arabidopsis dyed with  $I_2$ -KI solution (The analysis of PCR amplification for the cDNA of homozygous transgenic lines (above) (M: 2000 marker; 1: The objective band of thermostable  $\alpha$ -amylase genes; 2: The objective band of *Hyg*; 3: The objective band of *GFP*); The leaf of wild type and transgenic Arabidopsis dyed with  $I_2$ -KI (below))

色, 通过对比, 可观察到转基因拟南芥叶片中的淀粉被降解, 由此确认在转基因拟南芥中表达的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶具有正确的酶活性。Rubio等(2014)认为, 淀粉酶的表达量与葡萄糖打破春化存在一定的联系。因此, 表达耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因的转基因拟南芥纯合株系将为今后继续研究耐高温 $\alpha$ -淀粉酶对植物生长以及代谢途径的影响提供帮助。

本研究通过原核表达及酶活力检测, 验证了来源于地衣芽孢杆菌的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因可以在大肠杆菌中表达, 并证实了所得基因的准确性。另外, 通过注射烟草叶片瞬时表达, 验证了耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因可以在真核植物中被转录并翻译成蛋白质, 经 $I_2$ -KI染色实验, 证实该蛋白具有正确的酶功能活性; 并通过转化拟南芥, 证明了该基因可以在拟南芥中表达并稳定遗传, 且具有淀粉酶活性。这些研究为下一步利用基因工程手段构建含有耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的转基因植物新品种奠定了基础。

## 参考文献

- 蔡恒, 陈忠军, 万红贵, 王涛, 杜连祥 (2008). 地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶信号肽的序列分析及其在大肠杆菌中的分泌特性. 华北农学报 23, 106–109.
- 杜承, 孟宪梅, 卢士英, 潘风光, 柳增善 (2010). 地衣芽孢杆菌耐高温 $\alpha$ -淀粉酶在毕赤酵母中的表达及其活性分析. 食品科技 35, 44–48.
- 林必博 (2011). 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的研究进展. 河北农业科学 15, 77–80.
- 林剑, 郑舒文, 郭尽力, 鞠宝, 金海珠 (2002). 溶氧等参数对耐高温 $\alpha$ -淀粉酶发酵的影响. 食品科学 23, 54–57.
- 林剑, 郑舒文, 孙利芹 (2003). 温度和pH值对耐高温 $\alpha$ -淀粉酶活力的影响. 中国食品添加剂 (5), 65–67, 53.
- 潘风光, 宋德群, 任洪林, 艾永兴, 柳增善 (2004). 地衣芽孢杆菌 $\alpha$ -耐高温淀粉酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达. 沈阳农业大学学报 35, 42–44.
- 秦亚楠, 孟宪梅, 潘风光, 孙肖明, 李凤祥, 石彦忠 (2011). 重组毕赤酵母生产耐高温 $\alpha$ -淀粉酶发酵条件的优化. 食品科学 32, 266–269.
- 王春铭, 雷恒毅, 王国惠, 陈桂珠, 李丕学, 黄洁妍 (2007). 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶菌的产酶条件、酶性质与环境应用研究. 环境科学学报 27, 600–607.
- 王慧超, 陈今朝, 韩宗先 (2010).  $\alpha$ -淀粉酶的研究与应用. 重庆工商大学学报(自然科学版) 27, 368–372.
- 文学, 张宝红 (2000). 转基因抗虫棉研究现状与展望. 农业生物技术学报 8, 194–199.
- 姚斌, 范云六 (2000). 植酸酶的分子生物学与基因工程. 生物工程学报 16, 1–5.
- 赵淑娟, 黄祥辉, 王水平 (2000). 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因在马铃薯中的表达. 实验生物学报 33, 157–162.
- 诸葛健, 唐是雯 (1994). 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社.
- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 16, 735–743.
- Dai JL, Dong HZ (2011). Stem girdling influences concentrations of endogenous cytokinins and abscisic acid in relation to leaf senescence in cotton. Acta Physiol Plant 33, 1697–1705.
- Lin KH, Fu HY, Chan CH, Lo HF, Shih MC, Chang YM, Chen LFO (2008). Generation and analyses of the transgenic potatoes expressing heterologous thermostable  $\beta$ -amylase. Plant Sci 174, 649–657.
- Liu YQ, Chen HK, Li RX (2010). Studies on the isolation and screening of  $\alpha$ -amylase producing strain and their enzymatic properties. Agric Sci Technol 11, 56–58, 90.
- Pen J, Molendijk L, Quax WJ, Sijmons PC, van Ooyen AJJ, van den Elzen PJM, Rietveld K, Hoekema A (1992). Production of active *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase in tobacco and its application in starch liquefaction. Nat Biotechnol 10, 292–296.
- Rivera MH, López-Munguía A, Soberón X, Saab-Rincón G (2003).  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. Protein Eng 16, 505–514.
- Rubio S, Donoso A, Pérez FJ (2014). The dormancy-breaking stimuli “chilling, hypoxia and cyanamide exposure” up-regulate the expression of  $\alpha$ -amylase genes in grapevine buds. J Plant Physiol 171, 373–381.
- Xu XL, Fang J, Wang W, Guo JL, Chen PN, Cheng JA, Shen ZC (2008). Expression of a bacterial  $\alpha$ -amylase gene in transgenic rice seeds. Transgenic Res 17, 645–650.



## Studies of the Transient Expression and Transformation of Cloned Thermostable $\alpha$ -Amylase Genes from *Bacillus licheniformis* in Tobacco and Arabidopsis

Xiao Li<sup>1</sup>, Haiyan Sun<sup>1, 2\*</sup>, Mengbin Ruan<sup>2</sup>, Peihong Wang<sup>3</sup>, Ming Peng<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Hainan University, Haikou 570228, China; <sup>2</sup>Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; <sup>3</sup>Beijing Institute of Science and Technology Information, Beijing 100048, China

**Abstract** The full-length thermostable  $\alpha$ -amylase gene from a *Bacillus licheniformis* strain was cloned in a prokaryotic expression vector and a plant expression vector with GFP as reporter gene. Thermostable  $\alpha$ -amylase was overexpressed in *Escherichia coli* by IPTG induction for 6 h at 28°C, protein bands at 55 kDa were detected with SDS-PAGE, and activity of the enzyme was confirmed by amylolysis experiments. The plant expression vector was transformed into tobacco via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. GFP expression was observed both in cytoplasm and vacuoles of the lower epidermis of tobacco by fluorescence microscopy. Staining of the tobacco leaf by I<sub>2</sub>-KI revealed that the thermostable  $\alpha$ -amylase expressed in tobacco leaf had enzyme activity. Finally, the gene was introduced into Arabidopsis by the floral dip method and homozygous transgenic plants expressing  $\alpha$ -amylase gene were identified. The results of this research provide further information for overexpression of thermostable  $\alpha$ -amylase in transgenic plants.

**Key words** *Bacillus licheniformis*, thermostable  $\alpha$ -amylase gene, tobacco transient expression, Arabidopsis

Li X, Sun HY, Ruan MB, Wang PH, Peng M (2015). Studies of the transient expression and transformation of cloned thermostable  $\alpha$ -amylase genes from *Bacillus licheniformis* in tobacco and Arabidopsis. *Chin Bull Bot* **50**, 354–362.

---

\* Authors for correspondence. E-mail: sunhaiyan@itbb.org.cn; pengming@itbb.org.cn

(责任编辑: 孙冬花)