

大鼠 α -酰胺酶在变铅青链霉菌中的克隆及表达研究

武兵元 李 元*

(中国医学科学院中国协和医科大学医药生物技术研究所 北京 100050)

摘 要 α -酰胺酶(α -amidase α -AE)催化神经和内分泌系统中活性多肽的 C-端酰胺化,对多肽的生物活性至关重要。以大鼠心房组织的总 RNA 为模板,采用 RT-PCR 技术扩增获得编码 α -酰胺酶的 cDNA,并进行了克隆和测序。为了使 α -酰胺酶能在链霉菌中分泌表达,将其 cDNA 与链霉菌酪氨酸酶(melC1)信号肽的编码序列融合得到融合基因 mel/AE,将 mel/AE 插入链霉菌质粒 pIJ680,获得重组质粒 pIJ-mel/AE680。SDS-PAGE 和生物活性测定证实,携带 pIJ-mel/AE680 的重组菌株 *S. lividans* TK54 pIJ-mel/AE680 能分泌表达 α -酰胺酶。

关键词 α -酰胺酶 基因克隆表达 变铅青链霉菌

中图分类号 Q784 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0574-04

神经和内分泌系统产生的活性多肽对机体生命活动具有非常重要的调节作用,大部分活性肽的 C-端是酰胺化的,而且 α -酰胺基为多肽的生物活性所必需; α -酰胺基来自多肽的翻译后加工,由 α -酰胺酶(α -AE 或 PAM)催化完成,是酰胺化多肽生物合成途径中的限速步骤^[1]。尽管我们能够通过 DNA 重组技术在细菌生产多种具有药理活性的蛋白质,然而却不能直接获得酰胺化多肽,因为细菌中没有 α -AE^[2]。

链霉菌是一类重要工业微生物,绝大多数的抗生素都是由它产生的,而且链霉菌作为一个新型的异源基因表达系统,在过去 10 年中得到长足的发展。链霉菌表达体系与目前普遍使用的大肠杆菌表达体系相比较,一个突出的优点是能使异源蛋白分泌表达。本研究在链霉菌中分泌表达了大鼠的 α -AE,为利用链霉菌产生酰胺化多肽奠定了基础。该酶的质量为 75kD(α -AE₇₅),是一个双功能酶,催化如下反应:

$-X-Gly + \text{抗坏血酸} + O_2 \rightarrow -X-NH_2 + \text{乙醛酸} + \text{脱氢抗坏血酸} + H_2O$

这是目前在链霉菌中获得分泌表达的结构功能最复杂的异源酶蛋白。

1 材料和方法

1.1 试剂与酶

硫链丝菌素(Thio)由美国 Bristol-Myers Squibb 公司赠送;氨苄青霉素(Amp)为美国 Sigma 公司产

品;限制酶、连接酶、T4 DNA 聚合酶、Klenow 大片段酶、RNA 酶和牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)为美国 Gibco BRL、德国 Boehringer-Mannheim、中国医学科学院友谊开发公司产品;溶菌酶购自中国科学院上海生化所东风生化技术公司;杂交试剂盒 Gene Images CDP-Star detection module 和 Gene Images random prime labelling module 购自美国 Amersham Life Science 公司;三肽 Dns-Tyr-Val-Gly 购自美国 Sigma 公司,Dns-Tyr-Val-NH₂ 由赛百盛公司合成。

1.2 质粒和菌株

质粒 pUC18、pUC19-mel、菌株 *E. coli* JM109 为本室保存,*S. lividans* TK54 及质粒 pIJ680 为英国 John Innes 研究所 Hopwood D 教授惠赠。

1.3 *S. lividans* TK54 原生质体的制备与 DNA 转化
参照 Hopwood 等链霉菌遗传操作实验手册^[3]。

1.4 α -AE cDNA 的 RT-PCR 扩增和克隆

抽提大鼠心房组织的总 RNA,以随机六聚体作引物,以 RNase H 阴性的逆转录酶催化,42℃ 逆转录延伸 50min 后,99℃ 加热 6min、95℃ 加热 5min,然后加入 2u RNase H 37℃ 保温 20min,产物 -20℃ 保存备用。根据文献报道的 α -AE cDNA 序列^[4]设计一对引物:

5'AGCCCACTTTCTGTCTTTAAG3'

5'TCAAAGTGACCGATGCTCCATT3'

PCR 在 50 μ L 的反应体积中加有上下游引物各 300nmol/L,dNTPs 350 μ mol/L,Mg²⁺ 1.75mmol/L,逆

转录产物 2.5 μ L, Taq 酶 3u。扩增条件为 94℃ 变性 4min 后开始循环 94℃ 变性 20s 60℃ 退火 30s 68℃ 延伸 2min 35 个循环 最后 68℃ 延伸 7min。PCR 产物进行低熔点琼脂糖凝胶电泳,制备分离 2.1kb 的片段,经 T4 DNA 聚合酶修平,与 SmaI 酶切的 pUC18 连接,得到插入 α -AE₇₅ cDNA(约 2.1kb)的重组质粒,命名为 pUC18-AE。

1.5 核苷酸序列分析

采用 ABI 公司 373 型 DNA 自动测序仪,测定所克隆 cDNA 的核苷酸序列。

1.6 α -AE₇₅ cDNA 与酪氨酸酶信号肽序列(melC1)的融合

用 PstI 酶切含有 melC1 调节序列和信号肽序列的重组质粒 pUC19-mel^[5],经 T4 DNA 聚合酶修平并用 CIAP 脱磷酸化;以 DpnI 酶切 pUC18-AE,分离 2.02kb 的片段并与上述处理的 pUC19-mel 连接,得到重组质粒 pUC19-mel/AE;由于该质粒中融合基因两侧可供利用的酶切位点较少,为便于表达载体的构建,以 SmaI/HindIII 双酶切,从 pUC19-mel/AE 获得融合基因,并以 Klenow 大片段酶补平,然后与 SmaI 酶切并经脱磷酸化处理的 pUC18 连接,得到重组质粒 pUC18-mel/AE。

1.7 构建克隆有 α -AE 基因的重组质粒

以 XbaI 酶切 pUC18-mel/AE 并用 CIAP 脱磷酸化处理,然后与 XbaI 酶切的链霉菌高拷贝质粒 pIJ680 连接,转化大肠杆菌后,筛选 mel/AE 以正确方向插入到氨基糖苷磷酸转移酶启动子(Paph)下游的重组质粒 pUC18-mel/AE-IJ680(10.4kb)。用 EcoRI/HindIII 酶切该重组质粒,分离约 7.7kb 的片段,并且 Klenow 补平,自身环化后转化 S. lividans TK54,得到克隆有 mel/AE 的重组质粒 pIJ-mel/AE680。

1.8 α -AE 的活性测定^[6]

在发酵的不同时间,取发酵上清液经 20%~60%(NH₄)₂SO₄ 沉淀处理后,离心收集沉淀部分,溶解透析后进行测活。 α -AE 活性测定的底物是荧光标记的合成三肽 Dns-Tyr-Val-Gly。在 100 μ L 的反应体系中,含有 100mmol/L MES/KOH (pH6.0),30 mmol/L KCl,30 mmol/L KI,1 μ mol/L CuSO₄,100 μ g/mL 过氧化氢酶,1%(V/V)乙醇,0.001%(V/V)Triton X-100,10mmol/L 抗坏血酸,20 μ mol/L Dns-Tyr-Val-Gly,50 μ L 粗酶制备物,37℃ 反应 30min,反应结束后加入 20 μ L 6%(V/V)TFA 终止反应。酰胺化反应的底物和产物经 RP-HPLC 荧光检测:C₁₈ 反相层析柱的型号为 Nova Pak C₁₈

3.9 \times 150mm,4 μ m;洗脱流动相为 100mmol/L NaAc(pH 6.5)40%(V/V)CH₃CN,流速 1.2mL/min,荧光检测的激发波长是 360nm,发射波长是 455nm。1 个单位 α -AE 定义为:37℃、1min 内催化产生 1 pmol Dns-Tyr-Val-NH₂ 所需要的 α -AE 的量。

1.9 SDS-PAGE

参照《分子克隆实验指南》的有关方法^[6],聚丙烯酰胺凝胶浓度为 10%,采用考马斯亮蓝染色。

2 结果

2.1 α -AE₇₅ cDNA 的 RT-PCR 扩增和克隆

RT-PCR 扩增的结果如图 1 所示,得到大小分别约为 2.1kb 和 2.4kb 的片段,前者编码 α -AE₇₅, α -AE₇₅ cDNA 经克隆、亚克隆和测序证实其序列与文献报道完全一致^[4]。

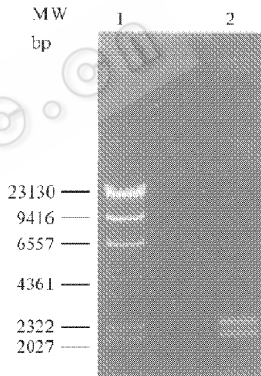


图 1 RT-PCR 扩增 α -AE cDNA 的电泳图

Fig.1 Electrophoresis of α -AE cDNA amplified by RT-PCR
1. Molecular weight marker λ -HindIII
2. Product amplified by PCR

2.2 α -AE₇₅ cDNA 与 melC1 信号肽序列的融合

重组质粒 pUC18-mel/AE 经 HindIII 酶切得到大小分别约 650bp 和 4.45kb 的片段,说明 α -AE cDNA 以正确的方向插入到 melC1 信号肽序列下游,形成一个融合基因 mel/AE,大小约 2.4kb。

2.3 链霉菌表达载体的构建

表达载体 pIJ-mel/AE680 的构建过程见图 2;酶切鉴定和 Southern 杂交的结果如图 3 所示,插入片段的大小约 2.4kb,而且呈杂交阳性,证明表达载体中的插入片段是我们要表达的融合基因。

2.4 α -AE₇₅ 的 SDS-PAGE 鉴定

按“1.8”方法将 20%~60%(NH₄)₂SO₄ 沉淀所得蛋白质经溶解透析后,进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 4 所示,表达的异源蛋白出现在质量约 75kD 的位置,与文献报道的 α -AE 大小相一致^[4]。

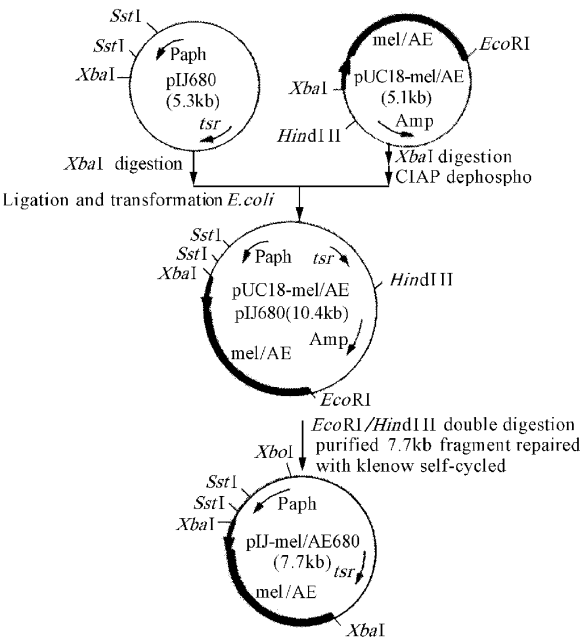


图 2 重组质粒 pIJ-mel/AE680 的构建

Fig.2 Construction of recombinant plasmid pIJ-mel/AE680

Amp^r :Ampicillin resistant gene ;tsr :Thiostrepton resistant gene

Paph :Promoter of amino-glycoside phosphotransferase gene

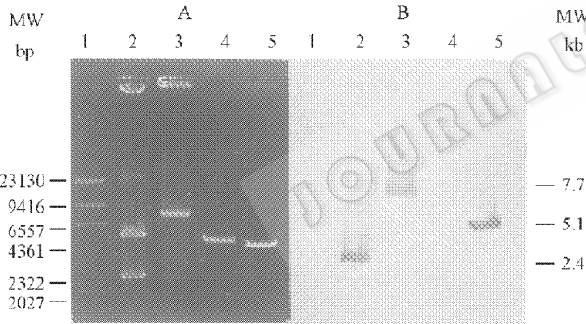


图 3 重组质粒 pIJ-mel/AE680 的酶切鉴定和 Southern 杂交分析

Fig.3 Restriction endonuclease analysis of (A) and (B) Southern hybridization

1. Molecular weight marker λ /HindIII 2. pIJ-mel/AE680/XbaI

3. pIJ-mel/AE680/XhoI 4. pIJ680/XhoI

5. pUC18-AE/EcoRI

2.5 α -AE 的活性测定

以荧光标记的三肽 Dns-Tyr-Val-Gly 为底物 酰胺化反应完成后产物和底物通过 RP-HPLC 很容易分离 ,Dns-Tyr-Val-Gly 的保留时间大约是 1.50min ,而 Dns-Tyr-Val-NH₂ 的保留时间大约是 2.70min。重组 α -AE 催化的反应混合物的 RP-HPLC 色谱图中 ,在保留时间约 2.70min 处出现了一个新的色谱峰 ,与 Dns-Tyr-Val-NH₂ 的保留时间一致 ,说明重组 α -AE 有酰胺化活性(图 5)。

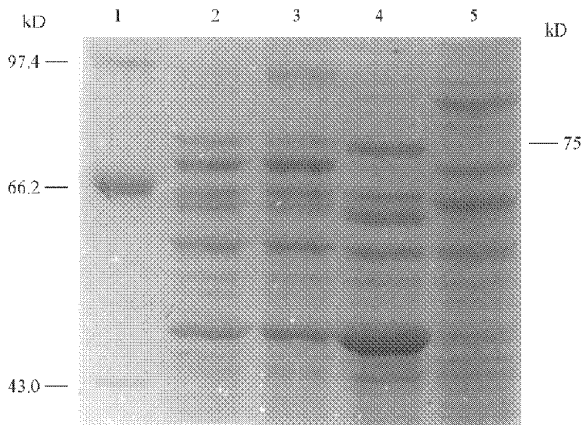


图 4 *S. lividans* [pIJ-mel/AE680] 培养上清液的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis for culture supernatant of *S. lividans* TK54 [pIJ-mel/AE680]

1. Molecular weight marker of protein 2. 24h culture supernatant ;

3. 48h culture supernatant 4. 72h culture supernatant ;

5. Culture supernatant of *S. lividans* TK54 [pIJ680] as control

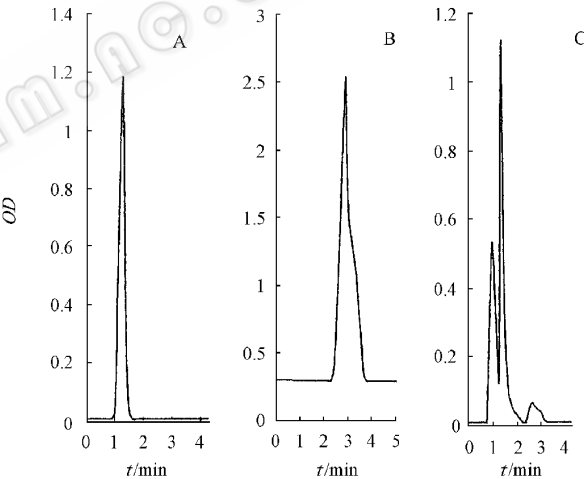


图 5 RP-HPLC 荧光法测定 α -AE 活性

Fig.5 RP-HPLC fluorescence analysis of α -AE activity

A. Fluorescence absorption peak of substrate Dns-Tyr-Val-Gly

B. Fluorescence absorption peak of product Dns-Tyr-Val-NH₂

C. RP-HPLC fluorescence analysis of reaction products catalyzed by recombinant α -AE

S. lividans TK54 [pIJ-mel/AE680] 在酶解酪蛋白培养基中培养不同时间 ,分别测定 α -AE 活性、菌丝干重和 pH 结果如图 6 所示 ,工程菌在 48h 分泌表达 α -AE 最高。

3 讨论

本文通过优化 RT-PCR 的条件 ,成功地扩增了长约 2.1kb 的 α -AE₇₅ cDNA 片段 ,而且经克隆和测序证实该 cDNA 与文献报道的 α -AE₇₅ 编码序列完全

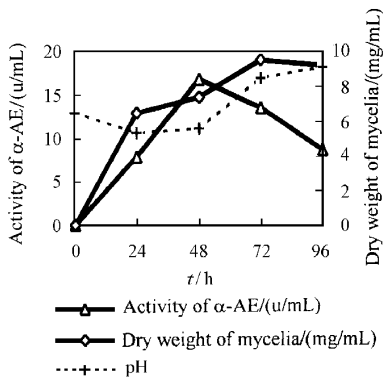


图 6 重组菌株 *S. lividans* TK54 [pIJ-mel/AE680] 的酰胺化酶表达曲线

Fig.6 Expression curve of α -AE produced by recombinant strain *S. lividans* TK54 [pIJ-mel/AE680]

一致。为了使 α -AE₇₅ 能在链霉菌中获得分泌表达，将 α -AE₇₅ cDNA 与 melC1 的信号肽编码序列融合，得到一个融合基因 mel/AE，并构建了融合基因的链霉菌表达载体 pIJ-mel/AE680，用 pIJ-mel/AE680 转化 *S. lividans* 得到能分泌表达 α -AE₇₅ 的重组菌株 *S. lividans* TK54 [pIJ-mel/AE680]。

重组菌株在 0~48h 内生长迅速，代谢旺盛，pH 低于 6.0，72h 菌丝干重最大，已经进入稳定期，pH 上升到 8.0 以上。 α -AE 的活性在 0~48h 内逐步上升，然后开始下降。这可能是因为 α -AE 发挥作用

的生理 pH 是 4.5~5.5，当它在链霉菌中分泌表达时只有 0~48h 内 pH 值在此范围，72h 以后 pH 高达 8.0 以上，酶可能会部分失活。Erpicum *et al*^[7] 在链霉菌中表达 β -内酰胺酶基因时，也发现酶的失活部分地与 pH 的升高有关，如果把 pH 维持在 7.4 就可以改善酶的活性。

当 *S. lividans* TK54 [pIJ-mel/AE680] 以 YEME 作为种子和发酵培养基时，上清液检测不到 α -AE₇₅ 活性；当它在酶解酪蛋白培养基中发酵时，无论种子培养基是 YEME 还是酶解酪蛋白培养基， α -AE₇₅ 的活性水平很相似，说明发酵培养基的成分对 α -AE₇₅ 的表达有重要影响。我们还检测了菌丝内的 α -AE 活性，除了在 24h 可以检测到很弱的活性外，继续培养菌丝内都没有检测到酰胺化活性，可见 α -AE₇₅ 大部分分泌到了胞外，这说明以 melC1 信号肽介导 α -AE₇₅ 的分泌是比较有效的。

根据计算，本工程菌在目前采用的条件下 α -AE 的比活性能达到约每毫克蛋白质 820u，比大肠杆菌中表达的酶的比活性 (150u/mg) 高得多，这可能是因为链霉菌分泌的异源蛋白能形成正确的空间构象。不过，影响异源蛋白在链霉菌中表达的因素很多， α -AE₇₅ 的表达条件还有待于进一步优化。

α -AE₇₅ 在链霉菌中的成功表达为利用链霉菌直接生产酰胺化的活性多肽奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Eipper B A , Stoffers D A , Mains R E . *Annu. Rev. Neurosci.* , 1992 , **15** : 57~85
[2] Merkler D J . *Enzyme Microb Technol.* , 1994 , **16** (6) : 450~456
[3] Hopwood D *et al.* 著 , 邓子新 , 唐纪良译 . 链霉菌遗传操作实验手册 , 长沙 : 湖南科学技术出版社 , 1989
[4] Bertelsen A H , Beaudry G A , Galella E A *et al.* . *Arch Biochem Biophys* , 1990 , **279** : 87~96
[5] HONG Bin , LI Yuan , Li Si-Yin *et al.* . *Chinese Journal of Genetics* , 1998 , **25** (3) : 225~231
[6] Jones B N , Tamburini P P , Consalvo A P *et al.* . *Anal. Biochem.* , 1988 , **168** : 272~279
[7] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T *et al.* . *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* , 2nd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Manual , 1989
[8] Erpicum T , Granier B , Delcour M *et al.* . *Biotechnol Bioeng* , 1990 , **35** : 719~726
[9] Engels J M , Koller K P . *Gene Expression and Secretion of Eukaryotic Foreign Proteins in Streptomyces* in : *Transgenesis* ed. by Murray J A H , John Wiley & Sons Ltd , 1992

Studies of Cloning and Expression of Rat α -amidase Gene in *streptomyces lividans*

WU Bin-Yuan LI Yuan

(Institute of Medicinal Biotechnology , Chinese Academy of Medical Sciences , Peking Medical College , Beijing 100050)

Abstract α -Amidase catalyzes the C-terminal amidation of active polypeptides in the Nerve-Endocrine system. It is important for full biological activity of the polypeptides. By using the total RNA of rat atrium as a templet , the cDNA encoding α -amidase was amplified by RT-PCR and sequenced. The cDNA was fused with the coding sequence of mel C1 signal peptide to produce fusion gene mel/AE for secretive expression in *Streptomyces lividans*. The fusion gene mel/AE was inserted into plasmid pIJ680 and the recombinant plasmid pIJ-mel/AE680 was obtained. The results of SDS-PAGE and biological activity showed that the recombinant strain *S. lividans* TK54 [pIJ-mel/AE 680] produced secretly α -amidase.

Key words α -amidase gene cloning and expression , *Streptomyces lividans*