生物工程学报 1（1）：29—35，1985
Chinese Journal of Biotechnology

青霉素酰化酶基因的克隆与表达

Ⅰ．青霉素酰化酶基因的克隆

杨胜利　吴汝平　姜增莲　冯一民　杨莉娟
张继宝　李美英　王镜新
（中国科学院上海药物研究所，上海）

用*Eco*RⅠ-*Pst*Ⅰ双酶解的pBR322作为克隆载体，从大肠杆菌D816染色体克隆了青霉素酰化酶基因，这个基因位于9.1Kb *Eco*RI片段上。所得克隆株整体细胞酶学特性与大肠杆菌D816一致，酶反应最适温度为55℃，最适pH为7.8—8.0。以青霉素G作为底物时Km为10.3mM，转化产物为6-氨基青霉烷酸。克隆株大肠杆菌C600（pPA1）合成青霉素酰化酶仍需苯乙酸诱导并被葡萄糖阻遏，细胞青霉素酰化酶的活性比大肠杆菌D816高2—4倍。

关键词：鸟枪法；基因克隆；青霉素酰化酶

青霉素酰化酶可将青霉素水解为6-氨基青霉烷酸和相应的侧链。按酶的底物专一性可分为青霉素G酰化酶、青霉素V酰化酶和氨苄青霉素酰化酶，其中青霉素G酰化酶已广泛用于工业生产，这类酰化酶主要由细菌产生，常用的生产菌种为大肠杆菌和巨大芽胞杆菌。大肠杆菌合成青霉素G酰化酶需用苯乙酸诱导，而且酶合成受葡萄糖阻遏[1,2]。Голуб等得到一葡萄糖输送缺陷的变种，合成青霉素酰化酶能力提高30%[3]。许多实验室试图通过筛选天然菌株和诱变方法得到高比活性的青霉素酰化酶产生菌，但收效不大。Mayer等首先用考司质粒克隆了青霉素酰化酶基因，再用pBR322进行次级克隆，构建了高比活性的青霉素酰化酶产生菌，比活性比原种高6倍左右[4,5]。本文报道用*Eco*R Ⅰ-*Pst*Ⅰ双酶解的pBR322作为载体，从大肠杆菌D816染色体克隆青霉素酰化酶基因和克隆菌株的性质。

材料与方法

（一）菌种与质粒

大肠杆菌D816为青霉素酰化酶产生菌，由上海第三制药厂赠送。

大肠杆菌HB101（hsdR⁻，hsdM⁻，rec A13，supE44，lac Y，leu B6，pro A2，thi-1）。

大肠杆菌C600（thr，leu，thi，sup E46，lac Y，ton A，F⁻）为基因工程研究常用宿主。

质粒pRK733.2为pBR322-R6K复合复制子，2.45Kb，带有青霉素耐药标记。

（二）培养基与培养条件

1．青霉素酰化酶种子与发酵培养基：蛋白胨1%，酵母粉1%，NaCl 0.5%，pH

本文于1984年10月22日收到。
中国科学院微生物研究所赠送SPP1 DNA特此致谢。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

8.0。诱导剂苯乙酸浓度为0.2%，培养温度为24℃。

2. 3-苯乙酰胺-6-硝基苯甲酸（NIPAB）琼脂培养基组成(%)：蛋白胨0.5，酵母粉0.2，NaCl 0.5，谷氨酸0.4，维生素$B_1$0.005，琼脂2，NIPAB400μg/ml，苯乙酸0.2，pH8.0。

（三）DNA体外重组方法

质粒DNA分离，DNA酶切，连接及转化方法分别参考文献〔7—10〕。

（四）青霉素酰化酶活性测定

用3-苯乙酰胺-6-硝基苯甲酸为底物测定青霉素酰化酶活性，具体方法参考文献〔11〕。

结 果

（一）青霉素酰化酶基因克隆

用鸟枪法从大肠杆菌染色体DNA中克隆某一特定基因，如克隆DNA片段平均长度为10Kb时，2,000多个带重组质粒转化子中才可能出现一个带目的基因的转化子，因此尽可能改进DNA体外重组方法，以提高重组质粒比例和简便的大量筛

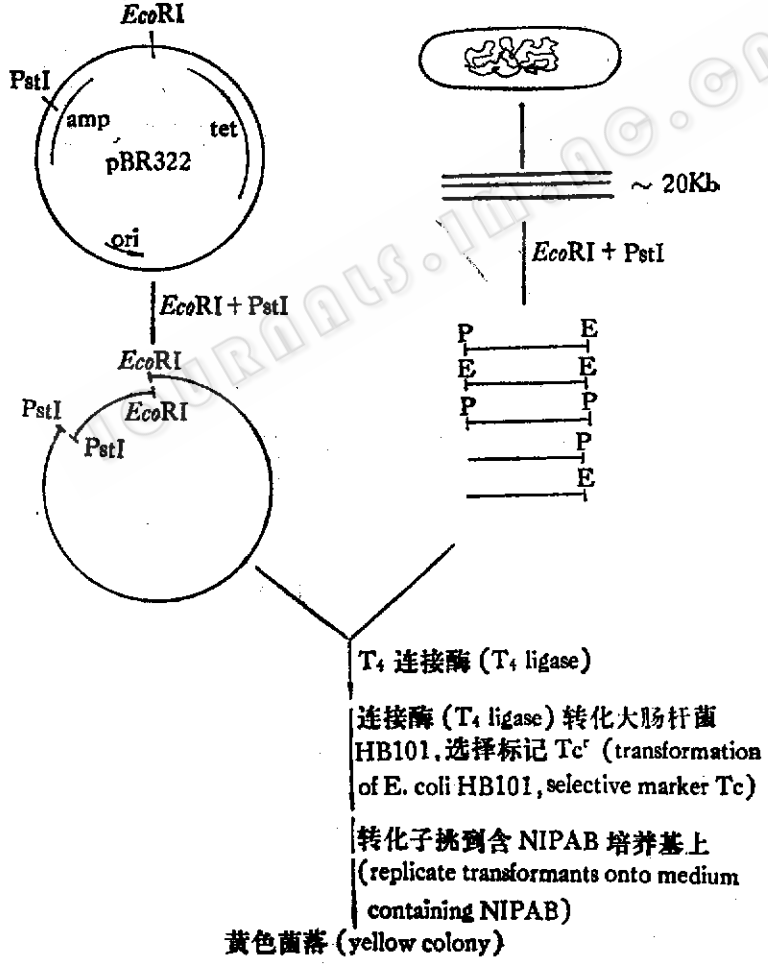

图1 青霉素酰化酶基因克隆流程图

Fig.1 Protocol for cloning of the penicillin G acylase gene

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

选方法是十分重要的。

用pBR322 作为克隆载体时，如用单一酶切的载体与染色体 DNA 连接，重组质粒仅占1—5%，而95—99%为自身连接环化的pBR322 DNA 分子。为提高重组质粒的比例，我们用 *EcoR* I-*pst* I双酶解的pBR322作为载体进行鸟枪法克隆试验〔图1〕。取 *E.coli* D816 染色体及pBR322 DNA各12μg，用*EcoR* I 和 *Pst* I 于 37℃酶解2h，65℃保温10min中止反应，用T_4 DNA连接酶16℃，连接1小时后转化用氯化钙处理的 *E.coli* HB101细胞，转化细胞涂于20只含四环素的琼脂平皿上，37℃培养24h。挑2,000个转化菌落在NIPAB琼脂平皿上，并用 *E.coli* HB 101，*E.coli* D816，*E.coli* HB101 (pBR 322)，*E.coli* HB101 (PACYC184) 作为对照，对照菌落中只有青霉素酰化酶产生菌 *E.coli* D816呈NIPAB阳性反应。在2,000个转化菌落中66%带重组质粒呈现四环素抗性、青霉素敏感表型，其余菌落带 pBR322 是四环素和青霉素抗性表型。带重组质粒转化子中有一个呈 NIPAB 阳性反应，菌落略带黄色，菌落周围有黄色扩散带。从这个黄色菌落分出质粒DNA，再转化HB101，所有转化子均呈NIPAB阳性反应。摇瓶培养所得菌体可分别将 NIPAB及青霉素G转化为3-氨基-6-硝基苯甲酸和6-氨基青霉烷酸，证明黄色菌落具有青霉素酰化酶活性，这个初级克隆株称为大肠杆菌HB101(pPA1)。

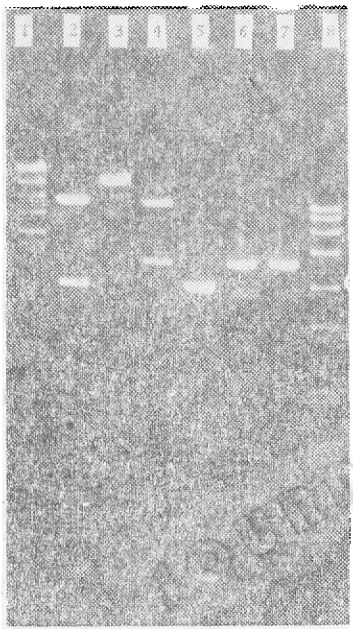

图2　重组质粒pPA1的电泳分析

Fig. 2　The electrophoresis analysis of recombinant plasmid pPA1

1%琼脂糖凝胶电泳，3V/cm. 1. 标准分子量，*EcoR*I酶切的λ及*Bgl* II 酶切的λ混合物 2. *EcoR*I及*Pst*I双酶切的pPAI 3. *Pst*I酶切的pPAI. 4. *EcoR*I酶切的pPA I 5. *EcoR*I及 *Pst* I双酶切的 p*BR*322. 6. *Pst*I 酶切的 pBR322 7. *EcoR*I酶切的pBR322. 8. 标准分子量，*EcoR*I酶切的SPP1.

Electrophorsis was on a 1% agarose slab gel run at 3V/om. 1. The standard of molecular weight, the mixture of *EcoR*I digested λ DNA and *Bgl* II diges ed λ DNA. 2. *EcoR*I and *Pst*I dgested pPA1. 3. *Pst*I digested pPAI. 4. *EcoR*I digested pPAI. 5. *EcoR*I and *Pst*I digested pBR322. 6. *Pst*I digested pBR322. 7. *EcoR*I digested pBR322. 8. The standard of molecular weight, *EcoR*I digested SPP1.

（二）质粒 pPA1 的酶切及电泳分析

培养过夜的大肠杆菌 HB101(pPA1) 用碱性法提取质粒DNA。pPA1及pBR322的DNA分别用 *EcoR*I，*EcoR*I-*Pst*I，和 *Pst* I 酶切，37℃保温2*h*后进行琼脂糖凝胶电泳〔图2〕。电泳分析结果表明pPA 1的分子量约为13.5Kb，有2个*EcoR*I切口，1个*Pst*I切口，因此，pPA1 中克隆了两个DNA片段，一个是9.1Kb的 *EcoR*I 片段，另一个是0.8Kb的*EcoR*I-*Pst*I片段，它比pBR322中*EcoR*I-*Pst*I 小片段大50个碱基对左右，而且从 pPAI 的四环素抗性青霉素敏感表型也可证明 0.8Kb 的 *EcoR*I-*Pst*I片段来自 *E.coli* D816 染色体，而不是来自pBR322。

（三）青霉素酰化酶基因的次级克隆

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

质粒 pPA1 有两个片段来自 *E.coli* D816染色体，它们是 9.1Kb *EcoRI* 片段和 0.8Kb *EcoRI-PstI* 片段。将 pPA1 和 pRK 733.2分别用 *EcoRI* 酶解，再经T_4 DNA连接酶连接后转化大肠杆菌 HB101，在青霉素-NIPAB平板上选择青霉素抗性，NIPAB阳性转化菌落。该转化菌落的质粒 DNA 经酶切电泳分析（图3），结果表明 pPA2 为 pRK733.2 和 9.1Kb *EcoRI*片段的重组体（图4）。大肠杆菌 HB101 (pPA2) 产生青霉素酰化酶的能力及苯乙酸对酰化酶合成的诱导效应均与大肠杆菌HB101(pPA1)相同，表明9.1Kb 的 *EcoRI* 片段包含青霉素酰化酶的结构基因和调控基因。

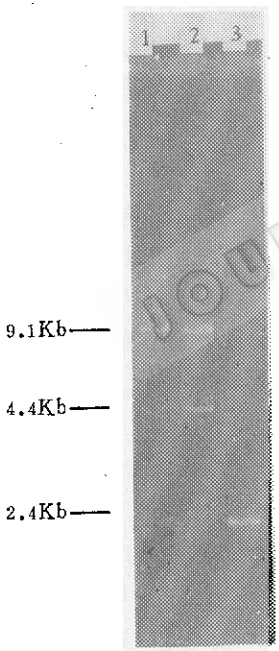

图3 质粒pPA2的电泳分析

Fig.3 The electrophoresis analysis of plasmid pPA2

1%琼脂糖凝胶平板电泳，3V/cm. 1. *EcoRI*酶切的pPA2 2. *EcoRI*酶切的pPA1 3. *EcoRI*酶切的pRK733.2

Eiectrophoresis was on a 1% agarose slab gel run at 3V/cm.

1. *EcoRI* digested pPA2. 2. *EcoRI* digested pPA1. 3. *EcoRI* digested pRK733.2

（四）青霉素酰化酶克隆株的酶学特性

将大肠杆菌 HB101(pPA1) 和大肠杆菌D816完整细胞的酶学特性进行了比较。用0.2*M*磷酸缓冲液测定了两种整体细胞的酶反应最适 *pH*。图5表明大肠杆菌D816完整细胞的最适pH为7.8，大肠杆菌HB101(pPA1)为7.8—8.0。

在 pH7.8，0.2*M* 磷酸缓冲液中分别测定了在35°，40°，45°，50°，55°，60°及65℃时两种完整细胞的酶促反应速度。图6表明两种细胞酶反应最适温度均为55℃。我们还测定了以青霉素G 作为底物时的米氏常数。两种完整细胞的米氏常数是一致的，大肠杆菌D816为10m*M*，大肠杆菌HB101(pPA1)为10.3m*M*。

（五）青霉素酰化酶克隆株的转化产物分析

将大肠杆菌D816和大肠杆菌 HB101 (pPA1)细胞分别悬浮于含 2 %青霉素的

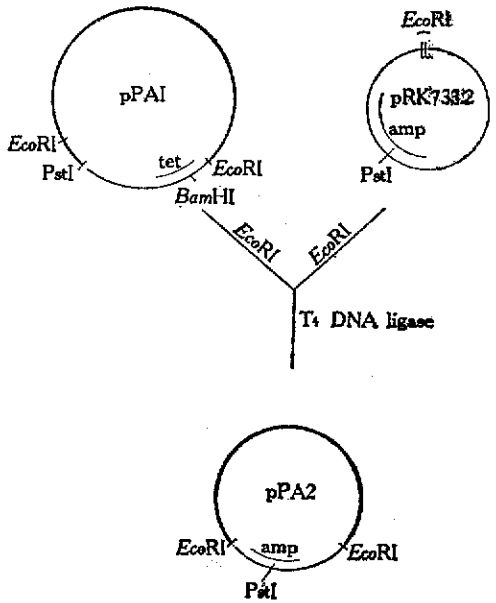

图4 青霉素酰化酶基因的次级克隆

Fig.4 Subcloning of the penicillin G acylase gene

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

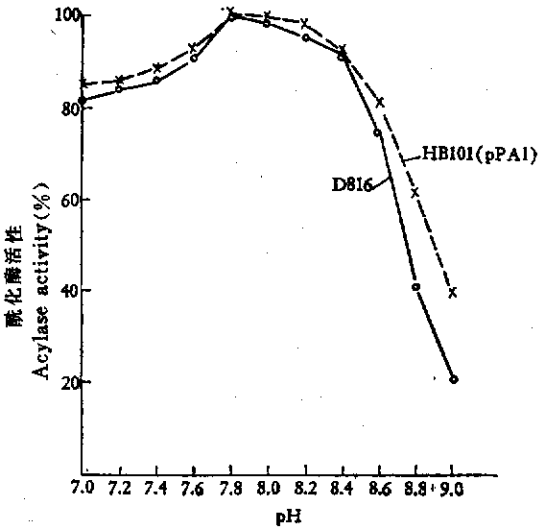

图5　大肠杆菌D816及HB101（pPA1）整体细胞青霉素酰化酶反应最适pH

Fig.5　Optimum pH of the penicillin G acylase in whole cells of *E.coli* D816 and HB101(pPA1)

底物：2%青霉素G，45℃反应1h

2% penicillin G was used as substrate, 45℃, 1h

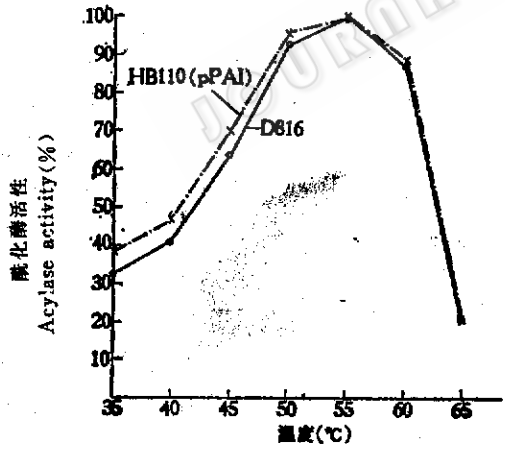

图6　大肠杆菌D816及HB101(pPA1)整体细胞青霉素酰化酶反应最适温度

Fig.6　Optimum temperature of penicillin G acylase in ashole cells of *E.coli* D816 and HB101(pPA1)

底物：2%青霉素G，pH7.8，反应1h

2% penicillin was used as substrate, the pH was 7.8; 1h

pH7.8磷酸缓冲液中，于37℃保温4h后，取反应液在硅胶HF薄板上进行层析分析，大肠杆菌HB101(pPA1)和大肠杆菌D816的转化产物用溶剂系统醋酸丁酯:正丁醇:乙酸:水=80:15:40:24展层时，R_f值均为0.23。反应产物纯化后测定熔点与比旋度。表1结果表明两者的熔点与比旋度均一致。这两个转化产物混合熔点不变为208—209℃，表明大肠杆菌HB101(pPA1)与大肠杆菌D816的转化产物为同一物质。它们的理化性质与文献报道的6-氨基青霉烷酸一致。

（六）青霉素酰化酶克隆株的基因表达

大肠杆菌D816合成青霉素酰化酶需苯乙酸诱导，受葡萄糖强烈阻遏。我们对克隆株大肠杆菌HB101(pPA1)和大肠杆菌C600(pPA1)也进行了诱导和阻遏试验（表2）。实验结果表明大肠杆菌HB101(pPA1)和大肠杆菌C600(pPA1)合成青霉素酰化酶均需苯乙酸诱导，均被葡萄糖阻遏。证明在质粒pPA1中克隆了青霉素酰化酶的结构基因和调控基因，包括启动子、操作基因、CAP结合位点及阻遏物基因。大肠杆菌C600(pPA1)的青霉素酰化酶活性在本文试验条件下比原种高4倍，比原种在工业生产发酵条件下的活性高2倍；但大肠杆菌HB101(pPA1)的酰化酶活性比原种还低。

讨　论

本文报道了用鸟枪法从大肠杆菌D816染色体克隆青霉素酰化酶基因，由于采用*Eco*RI-*Pst*I双酶解的pBR322作为克隆载体，使带重组质粒的转化子高达60%以上。并用适合于大量筛选的NIPAB琼脂平板法，易于检出青霉素酰化酶基因克隆株，从两千个转化子中筛选出一个青霉素酰化酶克隆株。此克隆株完整细胞的酶

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

表1 大肠杆菌D816及HB101(pPA1)整体细胞水解青霉素G产物的理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of the penicillin G hydrolyzing products by whole cells of both *E.coli* D816 and *E.coli* HB101(pPA1)

	熔点 Melting point (℃)	比旋度 *1		R_f *2
		温度℃	$[\alpha]_D^t$	
大肠杆菌D816	208—209	23	+269	0.23
大肠杆菌HB101(pPA1)	208—209	23	+277	0.23
文献记载的6-APA[12]	209—210	31	+273	—

*1. 在0.1N HCl中测定

*2. 薄板层析展层溶剂系统：醋酸丁酯:正丁醇:冰醋酸:水=80:15:40:24

薄板层析载体：硅胶HF

*1. in 0.1N HCl

*2. The solvent system for thin layer chromatography: BuOAc:BuOH:HAc:H_2O=80:15:40:20

表2 苯乙酸、葡萄糖对青霉素酰化酶基因表达的影响*

Table 2 The effect of phenylacetic acid and glucose on the expression of penicillin G acylase

菌株 Strain	酰化酶活性Activity of acylase (u/100ml)		
	诱导 Induce	不诱导 No induce	诱导加1%葡萄糖 Induce+1% glucose
大肠杆菌D816	11.7	1.7	0.2
大肠杆菌HB101(pPA1)	7.8	1.6	0.8
大肠杆菌C600(pPA1)	43.5	4.8	1.8

* 培养基 1%酵母粉，1%蛋白胨，0.5%NaCl，诱导加0.2%苯乙酸

培养条件：24℃，48小时，200转/分，100ml/250ml三角瓶

* medium: 1%yeast extract, 1%peptone, 0.5%NaCl, 0.2%phenylacetic acid for induction

学特性及转化产物的理化性质均与出发菌株大肠杆菌D816一致。

带质粒 pPA1 的克隆株大肠杆菌HB101(pPA1)及大肠杆菌C600(pPA1)合成青霉素酰化酶受葡萄糖阻遏，而苯乙酸诱导对青霉素酰化酶合成有促进作用。这表明在 pPA1 中除了青霉素酰化酶结构基因外，还有它的调控基因包括启动子、操纵基因、阻遏物基因和 CAP结合位点，因而在带pPA1的克隆株中基因表达的调控与原种大肠杆菌 D816一样。在克隆株中青霉素酰化酶的结构基因、阻遏物基因与调控基因同时扩增了15—20倍，但阻遏物基因表达经常是自身调控的，这样在克隆株的细胞中青霉素酰化酶基因组的操纵基因与阻遏物分子比要比原种大肠杆菌D816为高，从而使更多启动子起始转录，提高了青霉素酰化酶基因的表达，使克隆株大肠杆菌C600(pPA1) 的青霉素酰化酶活性比原种高2—3倍。但克隆株大肠杆菌 HB101(pPA1) 的青霉素酰化酶活性比原种还低。大肠杆菌 HB101是rec A^- 菌株，rec A 编码的蛋白质除了参与DNA重组外，还具有降解入噬菌体 cⅠ阻遏物和大肠杆菌素E阻遏物的能力[13,14]。可能 rec A 蛋白质对青霉素酰化酶阻遏物也有降解作用，这样在 rec A^- 细胞中阻遏物分子比rec A^+细胞中要高得多，加强了阻遏物作用，减弱了青霉素酰化酶基因的表达。青霉素酰化酶基因表达的研究正在进行中。

参 考 文 献

〔1〕 Vandamme, E.J., J.P.Voets: *Adv.Appl. Microbiol.*, 17:311, 1974.

〔2〕 Vandamme, E.J.: *Economic Microbiol.*,

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

5:468. 1981.
〔3〕 Golub, E. I. et al.: *Antibiotiki*, 18:882. 1973.
〔4〕 Mayer, H. et al.: Plasmids of Medical, Enviromental and Commercial Importance, 1979. pp459.
〔5〕 Mayer, H. et al.: *Enzyme Engineering*, 5:61. 1979.
〔6〕 Kolter, R., D.R.Helinski: *J.Mol. Biol.*, 161:45. 1982.
〔7〕 Birnboim, H.C., J.Doly: *Nucleic Acids Res.*, 7:1513. 1979.
〔8〕 Maniatis, T. et al.: Molecular Cloning, 1982. p104.
〔9〕 Dugaiczyk, A. et al.: *J.Mol. Biol.*, 96:171. 1975.
〔10〕 Cohen, S.N. et al.: *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 69:2110. 1973.
〔11〕 张启先等：微生物学报19(3):302—308,1979.
〔12〕 Grayson, M.: Antibiotics, Chemotherapeutics, and Antibacterial Agents for Disease Control, 1980. p90.
〔13〕 Craig, N.L., J.W.Roberts: *Nature*, 283: 26, 1980.
〔14〕 Tessman, E. et al.: *J. Bacteriol.*, 135:29. 1978.

CLONING AND EXPRESSION OF THE PENICILLIN ACYLASE GENE

I. CLONING OF THE PENICILLIN ACYLASE GENE

Yang Shengli　Wu Ruping　Jiang Zhenlian　Fen Yiming
Yang Lijuan　Zhang Jibo　Li Meiying　Wang Jingxing
(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai)

The penicillin G acylase gene has been cloned using *EcoRI-PstI* digested pBR322 as vector from the chromosome of *E.coli* D816. This gene is located on a 9.1Kb *EcoRI* fragment of the chromosome DNA. The enzymatic properties of the acylase from the hybrid strain *E.coli* HB101(pPA1) is consistent with those of the parent strain *E.coli* D816, and its K_m was determined to be 10.3 mM for penicillin G at pH7.8 and 45℃. The pH optimum lies at 7.8—8.0 and the optimun temperature is 55℃. The physico-chemical properties of the transformation product of the hybrid strain *E.coli* HB101 (pPA1) is identical with that of *E.coli* D816. Phenylacetic acid induces and glucose represses the synthesis of the penicillin acylase in both hybrid and parent strains and the activity of the penicillin acylase of *E.coli* C600(pPA1) is 2—4 fold higher than of *E.coli* D816.

Key words

Penicillin G acylase; gene cloning; shotgun experiment

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn