

## 脱乙酰氧基头孢菌素 C 合成酶/羟化酶 基因 *cefEF* 的克隆及序列分析

陈 晖 韩 辉 徐冠珠\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 利用氯化苄分别从真菌顶头孢(*Cephalosporium acremonium*)和产黄头孢(*Acremonium chrysogenum*)中提取总 DNA,通过 PCR 方法扩增脱乙酰氧基头孢菌素 C 合成酶/羟化酶基因 *cefEF*,结果只能从产黄头孢 DNA 中扩增出 *cefEF* 基因。测序结果表明,其与已报道的基因序列只有 3 个碱基的差异,推断的氨基酸序列只有 2 个氨基酸有差异,并未涉及活性中心。同时表明,国外所指的与该酶有关的顶头孢(*Cephalosporium acremonium* 或 *Acremonium chrysogenum*)对应的是国内的产黄头孢(*Acremonium chrysogenum*)。

**关键词** 脱乙酰氧基头孢菌素 C 合成酶/羟化酶,PCR,真菌顶头孢,产黄头孢

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0297-03

头孢菌素是医药行业中一种重要的抗生素,早在 1994 年其销售额已超过青霉素。但目前头孢菌素都是以青霉素进行化学扩环生产的。由于化学法的种种弊端,使得酶法扩环得到各国医药行业的普遍重视。

脱乙酰氧基头孢菌素 C 合成酶/羟化酶(Deacetoxycephalosporin C Synthetase/Hydroxylase, DAOCs/DACS)是真菌中的双功能扩环酶(Expandase),也是头孢菌素 C 生物合成的一个关键酶,催化其中的限速步骤<sup>[1]</sup>。自从 1987 年该酶基因的克隆<sup>[2]</sup>和 1989 年链霉菌扩环酶基因的克隆<sup>[3]</sup>以来,扩环酶的基因便利用来改造各种菌种,以期获得简便、可行、高产头孢菌素 C 的方法,还提出利用蛋白质工程的手段来改造扩环酶,以克服其底物专一性狭窄的缺点<sup>[4]</sup>。这方面的研究国外尚处于开始阶段,而国内尚未开展。

本文以国内的菌株为材料,成功地克隆出脱乙酰氧基头孢菌素 C 合成酶/羟化酶基因 *cefEF*,并对其序列进行分析,为今后改造该酶打下了坚实基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌株与质粒

顶头孢(*C. acremonium*, CGMCC3.4008),产黄头孢(*A. chrysogenum*, CGMCC 3.3795)由本所菌种保藏

管理中心保藏,大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 由本实验室保存,pGEM-T Vector 购自 Promega 公司。

#### 1.2 酶及试剂

Pfu DNA 聚合酶购自上海生工生物工程技术服务有限公司,DNA 限制酶、T4DNA 连接酶购自 Promega 公司,主要生化试剂均购自 Sigma 公司,头孢菌素 C 标准品购自中国药品生物制品检定所,其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.3 顶头孢及产黄头孢的培养

参照文献[5]的方法进行。

#### 1.4 头孢菌素 C 效价的测定

采用文献[6]的 260nm 紫外吸收法。

#### 1.5 染色体 DNA 的提取

参考文献[7]用氯化苄法提取。所提取的 DNA 直接作为 PCR 反应的模板。

#### 1.6 *cefEF* 的 PCR 扩增及克隆

根据已报道的基因序列<sup>[2]</sup>,设计 PCR 反应的引物:

5' 端引物:5'-GTACCATATGACTTCCAAGGTC-  
CCCCGTC-3' NdeI

3' 端引物:5'-TAGGATCCCTAAGTGGCTATAG-  
GAGC-3' Bam HI

PCR 反应条件为:97 $^{\circ}$ C 变性 7min 后加入 DNA 聚合酶,95 $^{\circ}$ C 变性 1min,60 $^{\circ}$ C 复性 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min,共 35 个循环,最后一轮 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖检查 ,参照分子克隆用低熔点琼脂糖纯化。

按照试剂盒说明 将 PCR 产物与 T-vector 连接 ,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态 ,在含有 IPTG 和 X-gal 的 LB/Amp 平板上挑选白色阳性克隆。

### 1.7 序列测定及分析

阳性克隆经 PCR 检测并用 *Bam*HI 和 *Nde*I 双酶切鉴定 ,由宝生物工程有限公司进行序列测定。所得结果用 DNASIS 软件进行分析 ,并与报道的资料进行比较。

## 2 结 果

### 2.1 头孢菌素 C 效价的测定

按如上方法测定 ,顶头孢和产黄头孢都产生头孢菌素 C ,其发酵液中的头孢菌素 C 含量分别为 386 $\mu$ g/mL 和 369 $\mu$ g/mL。

### 2.2 *cefEF* 基因的 PCR 扩增

对比分别以产黄头孢和顶头孢 DNA 为模板的 PCR 产物(图 1),可以看到 ,前者在约 1kb 处有一条很亮的特异带 ,与预测的结果完全一致 ,而后者却没有该条带 ,用其他条件也不能扩增出带。说明只有以产黄头孢 DNA 为模板才能扩增出文献报道的 *cefEF* 基因。将得到的 PCR 产物用低熔点琼脂糖纯化。

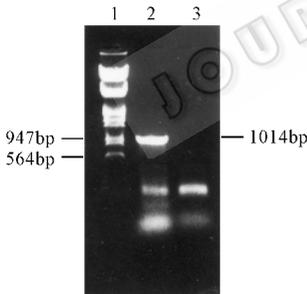


图 1 PCR 结果凝胶电泳

Fig. 1 Agarose Gel electrophoresis of PCR products

- 1.  $\lambda$  EcoRI + *Hind*III marker
- 2. PCR product from *A. chrysogenum* ;
- 3. PCR product from *C. acremonium*

### 2.3 PCR 扩增产物的克隆及分析

将纯化的 PCR 扩增产物与 T-Vector 连接后转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  ,将阳性克隆用 PCR 检测并用 *Bam*HI 和 *Nde*I 双酶切鉴定重组质粒 ,产生约 1kb 的片段 (图 2) ,与预期结果一致。

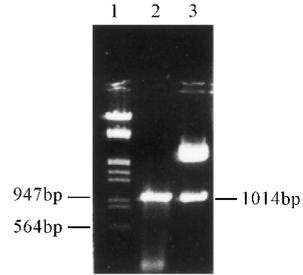


图 2 重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 2 Analysis of recombinant plasmid by restriction enzyme *Bam*HI and *Nde*I

- 1.  $\lambda$  EcoRI + *Hind*III marker
- 2. PCR product from *A. chrysogenum* ;
- 3. Digestion of *Bam*HI and *Nde*I

### 2.4 *cefEF* 基因的序列测定结果及分析

阳性克隆由宝生物工程有限公司进行全序列测定 ,结果显示 ,克隆片段全长 1014bp ,含有 1 个 999bp 的 ORF ,编码一个含 333 个氨基酸的蛋白质。该基因序列已为国际核酸数据库收录 ,DDBJ 号为 I035489。与报道的基因序列<sup>[2]</sup>相比(表 1),其仅在第 31、328 和 948 位存在 3 个碱基的差异 ,同源性的 99.7% 根据密码子推断的氨基酸序列其中仅第 11、130 位两个氨基酸不同 ,同源性为 99.4% ,这两个氨基酸分别位于推测的二级结构的  $\alpha_1$  和  $\alpha_6$  螺旋<sup>[8]</sup> ,并且不位于推测的酶的活性中心<sup>[9,10]</sup>。

PCR 结果及测序结果显示 ,我国的产黄头孢 (*A. chrysogenum*) 脱乙酰氧基头孢菌素 C 合成酶/羟化酶基因 *cefEF* 与国外文献报道的顶头孢 (*C. acremonium* 或 *A. chrysogenum*) 该酶基因完全一致 ,而我国的顶头孢 (*C. acremonium*) 却不含有至少是完全一致的该酶基因 ,从该点可以看出 ,国外所指的与 *cefEF*

表 1 *cefEF* 基因的序列分析

Table 1 Sequence analysis of gene *cefEF*

Source of sequence	Bases	Location	Amino acids deduced	Location
Amplification by our lab	5'-TAC-3'	31 ~ 33	Tyr	11
	5'-ACC-3'	388 ~ 390	Thr	130
	5'-GCA-3'	946 ~ 948	Ala	316
Literature reported	5'-GAC-3'	31 ~ 33	Asp	11
	5'-GCC-3'	388 ~ 390	Ala	130
	5'-GCG-3'	946 ~ 948	Ala	316

基因有关的顶头孢( *C. acremonium* 或 *A. chrysogenum* )对应的是我国的产黄头孢( *A. chrysogenum* )而不是顶头孢( *C. acremonium* )。

### 3 讨 论

扩环酶在头孢菌素 C 的生物合成和酶法合成中都占有重要地位,尤其在生物工程中有重要的应用价值,但其底物专一性狭窄,天然酶只能以青霉素 N 为底物进行扩环,这就需要对其进行改造,使其能利用易得的青霉素 G 或 V 为底物,因此该酶确切的基因序列就十分重要,这样才能对其某些序列进行定点突变。我们将作进一步的报道。

*cefEF* 基因由于不含内含子,故可直接以 DNA 为模板进行 PCR,但由于真菌的染色体较为复杂,在 PCR 时预先在 97℃ 变性 7min 后加入 DNA 聚合酶,有利于染色体 DNA 充分变性,又使聚合酶不易失活。由于 Pfu DNA 聚合酶有校对功能,延长时间应稍长些。

由于 *C. acremonium* 重新分类为 *A. chrysogenum*<sup>[11]</sup>,国外一直将这两个拉丁名用来指同一个菌。但头孢属的分类仍不十分统一,国内这两个拉丁名仍命名两个菌。通过本文对 *cefEF* 基因的研究表明,国外所指的与 *cefEF* 基因有关的顶头孢( *C. acremonium* 或 *A. chrysogenum* )对应的是我国的产黄头孢( *A. chrysogenum* )而不是顶头孢( *C. acremonium* )。这不仅有利于今后对脱乙酰氧基头孢菌素 C 合成酶/羟化酶的进一步研究,也有利于这两个菌株的区分和规范命名。

### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Dotzloff J E, Yeh W-K. Purification and properties of deacetoxycephalosporin C synthase from recombinant *Escherichia coli* and its comparison with the native enzyme purified from *Streptomyces clavuligerus*. *J Biol Chem*, 1989, **264**( 17 ): 10219 ~ 10227
- [ 2 ] Samson S M, Dotzloff J E, Slisz M L *et al.* Cloning and expression of the fungal expandase/hydroxylase gene involved in cephalosporin biosynthesis. *Bio/Technology*, 1987, **5**: 1207 ~ 1214
- [ 3 ] Kovacevic S, Weigel B J, Tobin M B *et al.* The  $\beta$ -lactam biosynthesis genes for isopenicillin N epimerase and deacetoxycephalosporin C synthetase are expressed from a single transcript in *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol*, 1989, **171**( 2 ): 764 ~ 760
- [ 4 ] CHEN H(陈晖), HAN H(韩辉), XU G Z(徐冠珠). Progress in expandase and its prospects of application. *Progress in Biotechnology* (生物工程进展) 2000, **20**( 1 ): 27 ~ 36
- [ 5 ] SHEN Y Q, Wolfe S, Demain A L. Levels of isopenicillin N synthetase and deacetoxy cephalosporin C synthetase in *Cephalosporium acremonium* producing high and low levels of cephalosporin C. *Bio/Technology*, 1986, **4**: 62 ~ 64
- [ 6 ] Claridge C A, Vaughan R W, Kresel P *et al.* Spectrophotometric assay for cephalosporin C in fermentation broths. *Antimicrob Agents Chemother*, 1969, pp. 131 ~ 134
- [ 7 ] ZHU H(朱衡), QU F(瞿峰), ZHU L H(朱立煌). Isolation of genomic DNAs from fungi using benzyl chloride. *Acta Mycologica Sinica*(真菌学报), 1994, **13**( 1 ): 34 ~ 40
- [ 8 ] Roach P L, Clifton I J, Fulop V *et al.* Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes. *Nature*, 1995, **375**: 700 ~ 704
- [ 9 ] Valegard K, Terwisscha van Scheltinga A C, Lloyd M D *et al.* Structure of a cephalosporin synthase. *Nature*, 1998, **394**: 805 ~ 809
- [ 10 ] Lloyd M D, Lee H-J, Harlos K *et al.* Studies of the active site of deacetoxycephalosporin C synthase. *J Mol Biol*, 1999, **287**: 943 ~ 960
- [ 11 ] Gams W. *Cephalosporium-artige Schimmelpilze* ( *Hyphomycetes* ). Stuttgart, Germany, G Fischer-Verlag, 1971

## Cloning Sequence Analysis of Deacetoxycephalosporin C Synthetase/Hydroxylase Gene *cefEF*

CHEN Hui HAN Hui XU Guan-Zhu\*

( Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China )

**Abstract** Chromosomal DNA preparations were made from the fungi *C. acremonium* and *A. chrysogenum* respectively by a method using 1-Chloro methyl benzene solution. Then the *cefEF* gene of deacetoxycephalosporin C synthetase/hydroxylase was amplified by polymerase chain reaction. The *cefEF* gene could only be amplified from the chromosomal DNA of *A. chrysogenum*. This fragment about 1.0 kb was cloned into pGME-T vector and then sequenced. The sequence indicates that the cloned *cefEF* gene contains 999 nucleotides encoding for 333 amino acids and there are three bases and two amino acids different from those that have been reported. Both of the two amino acids are not in active site. The result also indicates that the reported *C. acremonium* or *A. chrysogenum* generating deacetoxycephalosporin C synthetase/hydroxylase corresponds with *A. chrysogenum* but not *C. acremonium* in China.

**Key words** Deacetoxycephalosporin C synthetase/hydroxylase, PCR, *Cephalosporium acremonium*, *Acremonium chrysogenum*

Received: November 24, 2000

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62554488, Fax: 86-10-62560912, E-mail: xuguanzhu@263.net

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