

## 大肠杆菌中青霉素 G 酰化酶成熟的限制性因素

徐京宁\*<sup>1</sup> 杨运桂<sup>2</sup> 龚毅<sup>2</sup> 杨胜利<sup>2</sup> 俞俊棠<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

<sup>2</sup>(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

**摘 要** 为了研究大肠杆菌中青霉素 G 酰化酶(Penicillin G acylase, PAC)成熟的限制性步骤,分别构建了 PAC 表达质粒 pKKpacSP, pETpacSP, 并将它们在大肠杆菌宿主中表达。通过酶活性的测定及 Western blotting 分析,分别在 PAC 自身表达系统, Tac, T7 及氧调控表达系统中,研究 PAC 前体蛋白加工成  $\alpha$  亚基、 $\beta$  亚基的效率及亚基折叠组装形成活性酶的能力。结果表明:PAC 成熟过程中的限制性步骤因宿主/载体系统而异;PAC 本身表达系统中,前体肽加工成  $\alpha$  亚基、 $\beta$  亚基的效率为 57.2%,亚基组装能力为 0.72;Tac 启动子表达调控系统中  $\alpha$  亚基的折叠和稳定成为限制性步骤;T7 及氧调控表达系统中,PAC 前体肽加工成  $\alpha$  亚基、 $\beta$  亚基的效率达 90% 左右,亚基组装成活性酶的能力分别为 1.82、2;低氧调控系统表达 PAC 时,成熟的效率最高,PAC 表达的单位重量活性提高 10 倍。

**关键词** 青霉素 G 酰化酶, 成熟过程, 宿主/载体系统

**中图分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0570-05

PAC 是工业化生产半合成青霉素的重要酶<sup>[1]</sup>。但是,利用基因工程技术大量生产 PAC 仍需要提高成熟为活性酶的效率。在大肠杆菌中,PAC 的加工成熟过程与许多真核生物蛋白相似,细胞内先合成一条带信号肽的前体肽(proprePAC, 94kD);前体肽在跨越细胞膜过程中,切除信号肽(prePAC, 91kD);在周质区被蛋白酶水解去除间隔肽,形成  $\alpha$  亚基(24kD)、 $\beta$  亚基(65kD),并组装成活性酶<sup>[2]</sup>。故 PAC 可以作为一个理想的模型,用于研究大肠杆菌中重组蛋白表达的成熟过程。对于 PAC 前体肽分泌的研究已有报道<sup>[3]</sup>,而前体肽形成  $\alpha$  亚基、 $\beta$  亚基的效率和这两个亚基折叠成熟为活性酶的效率研究得很少。这方面的研究不仅有利于采用重组技术大量生产 PAC,同时为大肠杆菌中重组蛋白的可溶性高表达提供了可借鉴的思路。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和质粒:** *E. coli* BL21 [F<sup>-</sup>, *dcm*, *ompT*, *hsdS*(*r<sub>B</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>B</sub>*<sup>-</sup>)]; *E. coli* BL21 (DE3) [F<sup>-</sup>, *dcm*, *ompT*, *hsdS*(*r<sub>B</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>B</sub>*<sup>-</sup>), *gal*, (DE3)]; 质粒 pPA6(包

含 *pac* 的 *Hind*III-*Eco*R I 片段,其中含有 *pac* 的启动子、翻译起始区和结构基因)<sup>[3]</sup>; pK-T7、pKKH、pET5 $\alpha$  均为本中心保存。PAC 表达质粒 pKKpacSP、pETpacSP 为本实验构建。

**1.1.2 主要试剂:** 限制酶及 T4DNA 连接酶等分子克隆试剂购自 Promega 公司, Taq DNA polymerase 用 TaKaRa Biotech 产品。6-硝基 3-苯乙酰氨基-苯甲酸(6-nitro-3-phenylacetamido benzoic acid, NIPAB)为上海东风丽珠公司产品;鼠酶联二抗 IgG-Ap 购自华美生物工程公司,杂交尼龙膜购自 Boehringer 公司;鼠抗 PAC 多克隆抗体由赵国屏教授(中国科学院上海生物工程研究中心)赠送。

**1.1.3 PCR 引物的设计与合成:** 根据 *pac* 基因序列设计了如下 PCR 扩增引物(表 1),均加入了合适的限制性酶切位点。引物由中科院上海生物工程研究中心蛋白质工程研究室合成。

**1.1.4 培养基:** 种子培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 10, NaCl 5; 发酵培养基(g/L): 酵母粉 30, NaCl 5, 苯乙酸 2, pH8.0。

#### 1.2 方法

**1.2.1 质粒的提取、DNA 连接、转化、酶切鉴定、**

收稿日期:2001-03-19,修回日期:2001-06-29。

\* 通讯作者。Tel:86-21-64232380; Fax:86-21-64232380; E-mail: fanchao@npc.haplink.com.cn

表 1 作为 PCR 引物的寡聚核苷酸片段

Table 1 Oligonucleotides used for PCR

Primer	Sequence
P1(28bases, 5' <i>Eco</i> R I site)	5'-gctgaattcATGAAAAATAGAAATCGTA-3'
P2(28bases, 5' <i>Nde</i> I site)	5'-gctcatatgATGAAAAATAGAAATCGTA-3'
P3(29bases, 5' <i>Bgl</i> II site)	5'-gtcagatctCTTTGCCCTTTTCTGCGGTG-3'
P6(30bases, 5' <i>Bgl</i> II site)	5'-cacagatctGAAGCGGGATAATCTTTTGG-3'
P7(30bases, 5' <i>Hind</i> III site)	5'-ccaagcttGTTATCTCTGAACGTGCAACAC-3'
P8(23bases, 5' <i>Eco</i> R I site)	5'-ctgaattcGTTATCTCTGAACGT-3'

PCR 扩增:参照《分子克隆实验指南》第二版。

**1.2.2 PAC 的诱导表达及活性检测:**将待表达菌株接种于 3mL 种子培养基中,30℃ 培养过夜,以 1% 的接种量接于 150mL 发酵培养基中,旋转式摇床转速 150r/min,22℃ 培养至菌体密度达到  $OD_{600}$  为 0.6 ~ 0.8 时,根据各表达质粒启动子的类型,分别加入诱导剂或转至低氧(按文献[5]),发酵过程中间隔一定时间取样,按文献[4]测定酶活性。

**1.2.3 PAC 的 Western blotting 分析:**取样、收集等量菌体制备菌体总蛋白作为待分析样品,经 10% SDS-PAGE 后,电转移到杂交尼龙膜上,按试剂盒说明书推荐的方法进行 Western blotting 分析。用四星胶成像分析系统,定量测定 PAC 各种表达前体的含量。

## 2 结果

### 2.1 构建过程

质粒 pPA6 中含 PAC 基因(*pac*),大小 3.5kb 的 *Hind* III - *Eco*R I 片段作为模板,采用 PCR 技术,用引物(表 1),分别扩增 PAC 操纵子起始密码 ATG 至终止密码子 TAA 约 2.5kd 的 *pac* 片段,构建成不同启动子控制的表达质粒。

**2.1.1 pKKpacSP:**引物对 P1-P3, P6-P7 分别扩增得到含有 *Eco*R I - *Bgl* II (1.6kb); *Bgl* II - *Hind* III (0.9kb) 的 *pac* 片段,分别酶切和回收,得到两条 *pac* 的片段。用 T4DNA 连接酶使这两片段的 *Bgl* II 粘性末端连接,得到 2.5kb 完整的 *pac* 结构基因片段。该片段插入质粒 pkkH 的 *Eco*R I - *Hind* III 位点间构建成质粒 pKKpacSP。 *pac* 基因位于 *Tac* 启动子控制下(见图 1A)。

**2.1.2 pETpacSP:**引物 P2-P3 和 P6-P8 分别扩增得到含有 *Nde* I - *Bgl* II 和 *Bgl* II - *Eco*R I *pac* 片段,分别酶切和回收,得到 1.6kb, 0.9kb 的 *pac* 片段。这两片段的 *Bgl* II 粘性末端连接,得到 2.5kb *pac* 结构

基因片段。该片段插入质粒 pET5 $\alpha$  的 *Nde* I - *Eco*R I 位点间构建成质粒 pETpacSP。 *pac* 基因位于 T7 启动子控制下(见图 1B)。

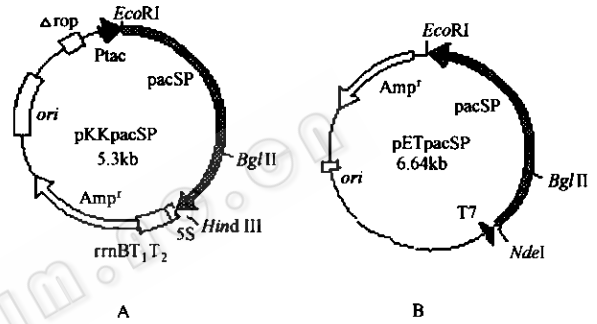


图 1 青霉素 G 酰化酶表达质粒的物理图谱

Fig.1 Physical maps of PAC expression plasmids

### 2.2 在不同调控模式下青霉素 G 酰化酶的表达

采用  $CaCl_2$  法将 pKKpacSP、pPA6 分别转化 *E. coli* BL21; pETpacSP 转化溶源性宿主 *E. coli* BL21 (DE3); pK-T7 和 pETpacSP 共转化 *E. coli* BL21, 在含 NIPAB 的平皿上筛选黄色菌落, 获得了不同调控模式的表达菌株:(1) *E. coli* BL21(pKKpacSP) 在 *Tac* 启动子控制下, 由 IPTG 诱导表达 PAC;(2) *E. coli* BL21 (DE3) (pETpacSP) 采用溶源性宿主 *E. coli* BL21 (DE3), 其中 T7RNA 聚合酶基因在 *lacUV5* 启动子的控制下, IPTG 诱导其表达;(3) *E. coli* BL21 (pK-T7, pETpacSP) 低氧诱导表达的透明颤菌血红蛋白(Vgb) 启动子控制表达 T7RNA 聚合酶, 从而调控 PAC 的表达。(4) *E. coli* BL21 (pPA6), 由苯乙酸诱导 PAC 自身启动子表达 PAC。

**2.2.1 PAC 表达活性:**4 个表达 PAC 的菌株发酵, 分别用 IPTG, PAA, 低氧诱导, 在产酶活性最高时间段检测 PAC 活性, 同时经 SDS-PAGE 电泳, 进行 Western 分析。表 2 显示了这些菌株所表达的 PAC 酶活性  $u/(L \cdot \min \cdot OD_{600})$  情况(表 2)。

表 2 宿主/载体系统对青霉素 G 酰化酶表达的影响

Table 2 The effect of different host/vector systems on PAC expression

Strains	Host	Plasmid	Start codon	Inducer	S. A. *
1	BL21	PKKpacSP	Tac	IPTG	32.6
2	BL21(DE3)	pETpacSP	LacUV <sub>5</sub> + T <sub>7</sub>	IPTG	100.2
3	BL21	pETpacSP, pK-T <sub>7</sub>	VHb + T <sub>7</sub>	O <sub>2</sub>	120.1
4	BL21	pPA6	Pac	PAA	10.1

\* S. A. specific activity in  $u/(L \cdot \min \cdot OD_{600})$ . Results are averages of three identical cultures.

如表 2 所示, *E. coli* BL21 (pK-T<sub>7</sub>, pETpacSP), *E. coli* BL21 (DE3) (pETpacSP), *E. coli* BL21 (pKKpacSP) 表达的 PAC 酶活分别为 PAC 自身启动子表达的 12, 10, 3.2 倍。虽然 *E. coli* BL21 (pKKpacSP) 与 *E. coli* BL21 (DE3) (pETpacSP) 都是 IPTG 诱导表达, 可 *E. coli* BL21 (pKKpacSP) 中 IPTG 直接诱导 PAC 表达, 靠大肠杆菌的 RNA 聚合酶转录; *E. coli* BL21 (DE3) (pETpacSP) 中由 IPTG 诱导表达 T7 噬菌体的 RNA 聚合酶, T7RNA 聚合酶识别 T7 启动子表达 PAC。 *E. coli* BL21 (DE3) (pETpacSP) 较 *E. coli* BL21 (pKKpacSP) 的 PAC 表达活性提高 3.07 倍。

2.2.2 翻译后加工为  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基的状况: Western blotting 分析单位菌体中前体蛋白和  $\alpha$  亚基、 $\beta$  亚基的情况见图 2。

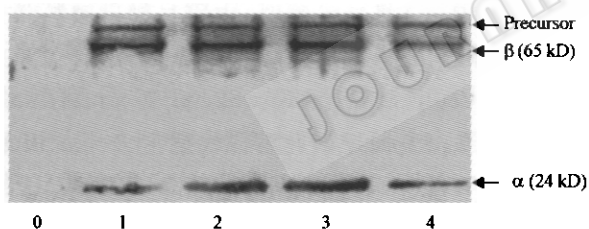


图 2 不同宿主/载体系统中青霉素 G 酰化酶表达的 western 印迹分析

Fig.2 Western-blotting analysis of whole-cell extracts from different host/vector systems of PAC expression

0. *E. coli* BL21 (negative control); 1. *E. coli* BL21 (pKK-SP) in the presence of IPTG; 2. *E. coli* BL21 (DE3) (pET-SP) in the presence of IPTG; 3. *E. coli* BL21 (pK-T<sub>7</sub>, pETpacsp) expressing PAC with 2% dissolved oxygen; 4. *E. coli* BL21 (pPA6) with PAA; Equal numbers of cells were prepared for 12% SDS-PAGE analysis as described in [7]

(1) PAC 前体加工形成  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基的效率: 从图 2 Western blots 的结果, 可见 4 个菌株在不同调控模式下表达 PAC 时, 前体蛋白加工形成  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基的情况和加工效率  $(\alpha + \beta)/(\alpha + \beta + \text{precursor})$ 。扫描分析结果如表 3。

可见, 苯乙酸存在的条件下发酵时, PAC 前体蛋

表 3 不同青霉素 G 酰化酶表达系统中亚基形成效率

Table 3 The efficiency of forming subunits in different host/vector systems of PAC expression

Strains	1	2	3	4
Inducor	IPTG	IPTG	O <sub>2</sub>	PAA
S. A.	32.6	100.2	120.1	10.1
Precursor	26%	10.7%	9.6%	42.8%
$\beta$	52%	47.6%	47.8%	28.6%
$\alpha$	21%	41.6%	42.5%	28.6%
$(\alpha + \beta)/(\alpha + \beta + \text{precursor})$	73%	89.2%	90.3%	57.2%

1. *E. coli* BL21 (pKK-SP); 2. *E. coli* BL21 (DE3) (pET-SP); 3. *E. coli* BL21 (pET-SP, PT7); 4. *E. coli* BL21 (pPA6)

白加工为  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基的效率最低 57.2%, PAC 自身启动子表达时, 前体加工成为限制性步骤; 在 T7 启动子控制下表达 PAC 的两个系统中, 前体加工效率 90% 左右。表明了 T7 启动子控制表达系统中, 大肠杆菌在表达 T7RNA 聚合酶的生理条件下有利于 PAC 前体肽加工成  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基。低氧诱导时, Vgb 启动子和 T7 启动子的两极系统的控制下表达的 PAC 发酵, 加工效率最高 90.3%, PAC 表达活性较另一 T7 系统提高 20%。

Tac 启动子调控表达的菌株 *E. coli* BL21 (pKK-SP) 由 IPTG 诱导表达 PAC 时, 形成  $\alpha$  亚基的量明显少于  $\beta$  亚基,  $\alpha/(\alpha + \beta + \text{precursor})$  为 21%,  $\beta/(\alpha + \beta + \text{precursor})$  为 52%, 因为内肽酶在周质区加工切除信号肽、间隔肽后形成 24kD 的  $\alpha$  亚基与 65kD  $\beta$  亚基的比例是固定的, 由此看来, 未折叠的  $\alpha$  肽不稳定被蛋白酶水解或聚集成包涵体, 所以在此系统中  $\alpha$  亚基的折叠和稳定成为限制性步骤, 以致最终有效形成活性酶的亚基量少。

(2) 亚基折叠成熟为活性酶的效率: 结合图 2 Western blots 的结果和各个表达系统的 PAC 表达活性, 分析亚基折叠成熟为活性酶的能力。根据体外 PAC 复性折叠的研究:  $\alpha$  肽的正确折叠, 在 PAC 的前

体折叠中具有关键作用<sup>[6]</sup>。而且,α亚基与β亚基的比例是固定的,所以假设大肠杆菌细胞内与体外相同,采用单位重量菌体的 PAC 活性与单位重量菌体的 α亚基含量之比表示 α亚基折叠组装成活性酶的能力,并以此表示亚基正确折叠组装的程度。

重组菌 *E. coli* BL21 (pK-T7, pETpacSP), *E. coli* BL21 (DE3) (pETpacSP), *E. coli* BL21 (pKKpacSP) 和 *E. coli* BL21 (pPA6) 的亚基成熟为活性酶的能力分别为 2, 1.82, 0.81, 0.72。由此可见, PAC 自身的表达调控系统和 Tac 启动子表达系统中, α亚基折叠成熟为活性酶能力不高。在 T7 启动子控制下表达 PAC 的两个系统中, α亚基正确折叠成熟为活性酶能力是 pac 和 Tac 系统的 2 倍。阐明了 T7 启动子控制表达系统中, 大肠杆菌表达 T7 RNA 聚合酶的生理条件下有利于 PAC 亚基正确折叠成活性酶。

**2.2.3 宿主的影响:** 为了确定宿主的遗传特性对 PAC 成熟过程的影响, 用 pac 自身表达系统的 D816 菌株和 Tac 表达系统的菌株 HB101 (pKKpacSP) 进行了研究。

表 4 不同菌株的青霉素 G 酰化酶成熟效率

Table 4 The efficiency of maturation in different strains on PAC expression

	HB101 (pKKpacSP)	D816
S. A.	28.3	30.8
$(\alpha + \beta) / (\alpha + \beta + \text{precursor})$	93%	88%
S. A. / α	0.94	0.74

可见更换宿主后, Tac 表达系统的 *E. coli* HB101 (pKKpacSP), Pac 表达系统的 *E. coli* D816 PAC 前体肽加工为 α、β亚基的效率分别提高至 93%, 88%; 但是, α亚基折叠组装成活性酶的能力分别为 0.94, 0.74 变化不大。因此, 在 Tac 和 Pac 自身表达系统中, α亚基折叠组装成活性酶是提高 PAC 表达活性的限制性步骤。

### 3 讨论

大肠杆菌的 pac 自身的表达调控系统中, 苯乙酸存在时, 大肠杆菌中 PAC 前体蛋白成熟为活性酶的效率不高; PAC 前体肽加工成 α、β亚基及 PAC 亚基正确折叠成活性酶的步骤都会受到限制。采用强

启动子表达 PAC 时, Tac 启动子表达调控系统中 α亚基的折叠和稳定, 亚基组装成活性酶成为限制性步骤。T7 启动子控制表达系统中, 大肠杆菌表达 T7RNA 聚合酶的生理条件下 PAC 前体肽可以有效地加工成活性酶。4 个表达系统中, Vgb 启动子和 T7 启动子在两级系统的控制下, 由于 T7 启动子具有强的转录、转译能力, 这个系统低氧诱导 T7RNA 聚合酶表达的状况下, PAC 能够高效率的翻译后加工(通过内膜分泌, 加工切除信号肽, 间隔肽, 折叠成稳定构象的可溶性活性蛋白), 这些步骤协调地增强, 使得 PAC 表达活性最高。

Tac 和 T7 两个强启动子表达 PAC 的差异说明了亚基正确折叠组装成活性酶是利用基因重组技术高效表达 PAC 需要解决的问题之一。人们可以选择适合于 PAC 蛋白折叠的宿主/载体系统或采用适当的发酵工艺加以解决。然而, 周质区亚基正确折叠组装成活性酶的条件和规律正在进一步研究中。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] Valle F, Balbas P, Merino E, Bolivar F. The role of penicillin amidases in nature and industry. *Trends Biochem Sci*, 1991, 16(1): 36-40
- [2] Sizmann D, Keilmann C, Bock A. Primary Structure requirements for the maturation *in vivo* of penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *Eur J Biochem*, 1990, 192: 143-151
- [3] YANG Y G (杨运桂), TONG Q (童芹), ZHENG W D (郑卫东) *et al.* The Effect of Over-expression of Chaperones on the Secretion and the Solubility of Proteins. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2000, 16(3): 76-81
- [4] Szewczak A, Siewinski M, Slowinska R. Colorimetric assay of penicillin amidase activity using phenylacetyl-aminobenzoic acid as substrate. *Anal Biochem*, 1980, 103: 166-169
- [5] TONG Q (童芹), YANG S L (杨胜利), GONG Y (龚毅). A new system for expressing heterologous gene in *Escherichia coli* regulated by the dissolved oxygen consistence in the environment. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1999, 15(3): 322-326
- [6] Christopher D L, Roger H P. The folding and solution conformation of penicillin G acylase. *Eur J Biochem*, 1990, 192: 133-141
- [7] Dai M H, Wang E D, Xie Y, *et al.* Site-directed mutagenesis of the active center of penicillin acylase from *E. coli* ATCC11105. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1999, 31(5): 558-562
- [8] Yang S, Huang Y H, Huang X D *et al.* High expression of penicillin G acylase gene from *Bacillus megaterium* in *Bacillus subtilis*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1999, 31(5): 601-603

## The Bottleneck Steps Limiting Maturation of Penicillin G Acylase in *Escherichia coli*

XU Jing-Ning<sup>1\*</sup> YANG Yun-Gui<sup>2</sup> GONG Yi<sup>2</sup> YANG Sheng-Li<sup>2</sup> YU Jun-Tang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

<sup>2</sup> (Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China)

**Abstract** We have identified the bottleneck steps limiting maturation of penicillin G acylase (PAC) through comparison of the maturation performance for various PAC-expression systems (Pac, Tac, T7, Vgb + T7) with different efficiencies of proteolysis, subunit folding and assembly. The maturation of PAC could be limited by various steps, such as translocation, periplasmic proteolysis, subunit folding and assembly depending on the host/vector systems. In BL21(pPA6) cells, maturation of PAC were limited by proteolysis and folding steps; the efficiency of proteolysis was 57.2%; the subunit folding and assembly capacity was 0.72. In BL21(pKKpacSP) cells, the stability and folding of  $\alpha$  subunit was bottleneck steps. In T7 and dissolved-oxygen regulation expression systems, PAC proprecursor could be matured efficiently. Results also indicate that the folding of a peptide plays a key role in folding of precursor for PAC in *E. coli*. Developing proper host/vector systems and fermentation technology with superior abilities on subunit folding and assembly of precursor for PAC could be plausible for enhancing production of PAC. In this study, pac could be expressed (transcribed, translated and matured) efficiently under the control of T7 promoter.

**Key words** penicillin G acylase, maturation performance

Received: March 19, 2001

\* Corresponding author. Tel: 86-21-64232380; Fax: 86-21-64232380; E-mail: fanchao@100.cnhaplink.com.cn  
©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>