

GL-7ACA 酰化酶表达检测系统的建立

李祥 张伟 茅翔 蔡焯 杨蕴刘 赵国屏 姜卫红*

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所 上海 200032)

摘要 戊二酰-7-氨基头孢烷酸(GL-7ACA)酰化酶能够催化 GL-7ACA 分解生成 7-ACA,后者是工业半合成生产头孢类抗菌素所需的重要前体。为了准确地检测 GL-7ACA 酰化酶及其突变体的表达,本研究通过构建一系列质粒载体,建立了两个简便有效地测定 GL-7ACA 酰化酶基因 *acy* 表达量的系统,从而可对酶的比活力进行定量。我们将两个报告基因,即儿茶酚双加氧酶基因(*xylE*)和 β -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)分别置于 *acy* 基因的下游,使之与 *acy* 基因共用一个启动子,进行串联表达,各自构成一个多顺反子系统。实验证明,基因融合后的儿茶酚双加氧酶或 β -半乳糖苷酶的活力可以间接反映 *acy* 的表达量。

关键词 GL-7ACA 酰化酶, 表达, 检测

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0673-05

头孢菌素类抗生素具有专一性强、副作用小的特点,已被广泛应用于医药产业。由于直接发酵得到的天然头孢菌素 C(CPC)的抗菌活力很低^[1],所以目前工业生产主要是在母核 7-ACA 上连接侧链,半合成高抗菌活性的衍生物。7-ACA 通常由 CPC 经 D-氨基酸氧化酶、GL-7ACA 酰化酶两步催化得到^[2],而 GL-7ACA 酰化酶的表达量和酶活性的增加是提高 7-ACA 的产量的关键。因此,利用蛋白质工程技术研究和改造 GL-7ACA 酰化酶具有重要的理论意义和应用价值。

为了对 GL-7ACA 酰化酶进行功能优化的突变改造,并能较准确地检测突变酶的表达情况,以减少从大量突变体中筛选高比活菌株的工作量,我们选择了儿茶酚双加氧酶基因(*xylE*)^[3]和 β -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)^[4]作为报告基因,并将之与 GL-7ACA 酰化酶基因 *acy* 相连,建立了两个简单有效的、可以定量测定 GL-7ACA 酰化酶及其突变体表达量的多顺反子系统。

1 材料及方法

1.1 菌株及质粒

大肠杆菌 JM109 购自 Promega 公司。质粒

pIJ4083(Thi^r, *xylE*)来源于链霉菌^[5], pTrc99-A(Amp^r, Trc 启动子, *lacIⁿ*)购自 Clonetech; pKKCAIS(Amp^r, Trc 启动子, *acy*)由中科院生化所提供; pBCACY(Cm^r, lac 启动子, *acy*)、pMLB1034(Amp^r, *lacZ*)、pMR24(Amp^r, Trc 启动子, *acy*, *galK*)均由本实验室构建。

1.2 酶与试剂

限制酶和连接酶等购自 Pomega、Gibco、TaKaRa 等公司。PCR 引物由 TaKaRa 公司合成; 7-ACA 购自山东鲁抗制药集团; GL-7ACA 由本实验室合成; 其它试剂均为国产分析纯。

1.3 儿茶酚双加氧酶活力的测定方法

儿茶酚双加氧酶活力测定所用的溶液为:分析缓冲液(0.1mol/L pH7.5 的磷酸钾缓冲液)和酶活测定液(0.2mmol 的儿茶酚)。将携带 *xylE* 基因的大肠杆菌 JM109 于 37℃ 过夜培养,培养液 100 μ L 用 5mL 分析缓冲液稀释,取 0.5mL 菌体稀释液加入等体积酶活测定液,迅速混匀,并于 375nm 比色。酶活以每分钟 OD₃₇₅ 值的变化表示^[6]。

1.4 β -半乳糖苷酶活力的测定方法

β -半乳糖苷酶活力测定所用溶液为:100 \times Mg²⁺ 溶液(1mol/L MgCl₂, 4.5mol/L 巯基乙醇); ONPG 溶液(4mg/mL ONPG 溶于 0.1mol/L pH7.5 的磷酸缓冲

收稿日期:2001-04-17,修回日期:2001-08-07。

基金项目:国家“863”计划资助项目(103-13-02-01)。

* 通讯作者。 Tel:86-21-64170709; Fax:86-21-64042385; Email:wjiang@iris.sipp.ac.cn

液); 0.1mol/L pH7.5 的磷酸钠; 终止液 (1mol/L Na₂CO₃)。将 3μL 100 × Mg²⁺ 溶液、66μL ONPG、201μL 0.1mol/L 磷酸钠、30μL 大肠杆菌细胞混合, 37℃温育 30min 或至黄色出现, 加入 500μL 终止液, 离心 5min, 在 420nm 波长读取反应混合液的 OD 值^[4]。

1.5 GL-7ACA 酰化酶活力测定和计算方法

所用溶液: pH7.0, 0.1mol/L 的磷酸缓冲液; 5mg/mL 的 GL-7ACA; 反应终止液 (20% 冰醋酸和 0.05mol/L NaOH 以 2:1 的体积比混合); 显色剂 (0.5% 对-二甲氨基甲醛乙醇溶液)。

取适当体积的菌悬液, 离心弃上清, 用 150μL 磷酸缓冲液悬浮菌体, 37℃预热 10min, 加入 150μL 预热的 0.5mg/mL GL-7ACA, 37℃反应 30min, 立即加入 900μL 终止液、300μL 显色液, 12000 r/min 离心 5min, 于 415nm 比色^[6]。将 37℃, pH7.0, 每分钟水解 GL-7-ACA 产生 1μmol 7-ACA 所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

2 结果与讨论

在筛选 *acy* 随机突变的转化子时, 发现在高活力筛选培养基上长出的菌落经液体培养后, 其 GL-7ACA 酰化酶活力有时并不高于对照。说明用酰化酶活力对菌体 OD₆₀₀ 的比值来近似地反映酰化酶的比活时, 干扰因素多, 波动性大。因此, 进行酰化酶表达量的测定很有必要。

不同的细胞在表达同一个基因时, 主要在 DNA 水平、mRNA 水平、翻译水平或翻译后加工水平上进行调控。其中前两种水平起着决定性的作用, 而后两种水平的调控会引起相对稳定的差异^[7]。在同一启动子控制下的两个或多个基因在 DNA 水平和转录水平上的调控是相似的, 因此两个基因的表达量之间应该存在比较稳定的比例关系。根据这一原理, 我们构建了 *acy-xylE* 和 *acy-lacZ* 的 GL-7ACA 酰化酶表达检测系统。

2.1 *acy-xylE* 多顺反子表达系统的构建

xylE 基因来自假单胞菌, 编码儿茶酚双加氧酶。该酶催化儿茶酚两个羟基的氧化, 形成黄色的醌类化合物, 活力检测简单方便。*xylE* 基因起始密码子上游附近的序列如图 1 所示, 在 *EcoRI* 和 *ATG* 之间没有启动子。将它与 *acy* 基因融合作为酰化酶表达量的间接指标, 比较直观准确。

用 *EcoRI* - *PstI* 将 *xylE* 基因从载体 pIJ4033 切下, 并连接到大肠杆菌质粒 pTrc99-A 中, 构建成

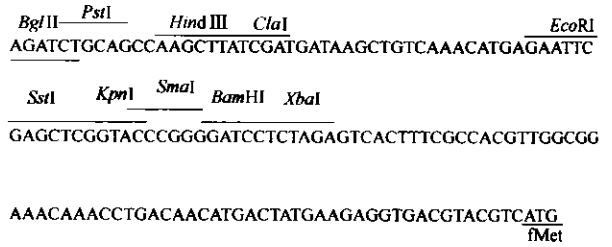


图 1 *xylE* 基因起始密码子上游附近的序列

Fig.1 Upstream sequence of start codon of *xylE* gene

pJLX 质粒。*XylE* 受启动子 *Trc* 控制, 可在大肠杆菌中表达。再从 pJLX 质粒中以 *EcoRI* - *HindIII* 切下 *xylE* 克隆到载体 pBCACY 上得到重组载体 pEXR。在 pEXR 中 *acy* 基因和 *xylE* 基因之间没有启动子, 二者通过 *acy* 上游的启动子共同转录。由于质粒 pEXR 中 *acy* 和 *xylE* 的表达量较低, 我们又用酰化酶的高表达载体质粒 pKKCAIS 与 pEXR 共同构建了 pMK, 见图 2。上述质粒均被转化至大肠杆菌宿主 JM109, 构成 *acy-xylE* 表达系统。

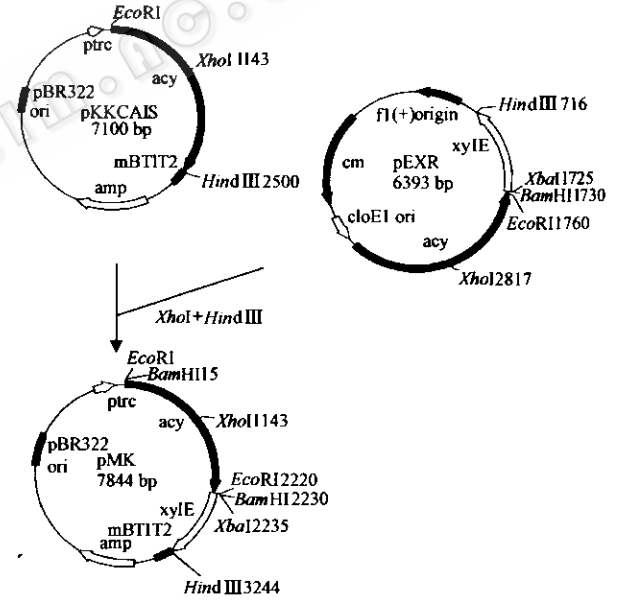


图 2 质粒 pMK 的构建过程

Fig.2 Construction of plasmid pMK

2.2 *acy-xylE* 多顺反子表达系统的检测

对 pEXR/JM109 菌株中的 *acy-xylE* 系统进行检测, 观察 GL-7ACA 酰化酶活力与儿茶酚加氧酶活力、GL-7ACA 酰化酶活力与菌体 OD₆₀₀ 的比值。前者的变异系数 (c. v) 为 11.4%, 后者的变异系数为 31.4%。GL-7ACA 酰化酶和儿茶酚双加氧酶的比活力是定值, 如果两种酶的活力近似成正比的话, 则说明 *acy* 和 *xylE* 表达量基本成正比, 也就可以用儿茶酚双加氧酶的活力近似地反映酰化酶的表达量。

表 1 *acy-xylE* 表达系统的检测
Table 1 Detection of *acy-xylE* expression systems

Strains	<i>OD</i> ₆₀₀	AG(u)	AC(u)	AG(u)/ <i>OD</i> ₆₀₀	AG(u)/AC(u)
JM109/pEXR	3.330 ± 0.733	1.296 ± 0.176	0.778 ± 0.081	0.396 ± 0.070	1.583 ± 0.100
JM109/pMK3	1.008 ± 0.055	0.433 ± 0.049	0.785 ± 0.104	0.427 ± 0.045	0.562 ± 0.034

Notes: AG, activity of GL-7ACA acylase; AC, activity of catechol dioxygenase

表 1 中的数据是 6 次重复实验的结果,可以看出,酰化酶活力和儿茶酚双加氧酶的活力之间的比值的误差较小,这说明 *acy* 和 *xylE* 的表达量成正比。对以上结果我们作出如下推测:

假定 *acy* 的表达量 a 和 *xylE* 的表达量 x 存在一个常数关系 (N),即

$$a = N \cdot x$$

设纯酰化酶的比活为 A ,活力为 M_A ,纯儿茶酚双加氧酶的比活为 X ,活力 M_X ,依据我们的假设推理得到如下的关系:

$$M_A/A = N \cdot (M_X/X)$$

$$M_A = N \cdot M_X \cdot (A/X)$$

$$M_A/M_X = N(A/X)$$

因为 A/X 为常数,如果 M_A 、 M_X 的比值恒定,那么我们的设想就是正确的。测定的结果证实了我们的假设, M_A/M_X 的比值较为恒定。

由上述的关系可以推得:

$$a = N \cdot (M_X/X) \text{ 或 } a = (N/X) \cdot M_X$$

也就是说,酰化酶的表达量可以近似地以儿茶酚双加氧酶的活力来表示。

同时,在含有高表达质粒 pMK3 的大肠杆菌 JM109 中,也分别测定了 LG-7ACA 酰化酶活力/儿茶酚双加氧酶活力、酰化酶活力/菌体 *OD*₆₀₀ 的比值,前者的变异系数为 15.0%,远比后者 31.4% 要稳定。另外,表 1 的误差分析显示, JM109/pEXR 和 JM109/MK3 中的酰化酶和融合酶活力比值的重复误差都在 6% 左右,准确度较高。

实际上,在平时的用菌体 *OD*₆₀₀ 表示的比活测定中,经常会发现同一菌株的平行样品,有的酰化酶活力较高,有的却很低。以酰化酶活力和儿茶酚双加氧酶活力的比值来反映酰化酶的比活时,则可以减

小这种误差。

2.3 *acy* 和 *lacZ* 多顺反子表达系统的建立

在 *acy* 和 *xylE* 共表达系统中, *xylE* 的产物儿茶酚双加氧酶在大肠杆菌中不够稳定,因此我们又尝试了此 *lacZ* 代表 *xylE* 构建多顺反子系统。*LacZ* 来自大肠杆菌,表达产物在大肠杆菌中可以稳定存在。通过定点突变将 pMK 中 *acy* 上游的一个 *Bam*HI 位点去除后,得到 pMK3。再将 pMK3 中的 *acy* 基因以 *Eco*R I 和 *Xba* I 酶切后,借助于接头插入到 pMLB1034 中的 *Eco*R I 和 *Bam*H I 位点(图 3)。

接头的一端为 *Xba* I 的粘端,另一端为 *Bam*H I 的粘端,但该末端和 pMLB1034 中的末端连接后, *Bam*H I 位点就消失了,因为该处的序列为 CGATCC 而不是 GGATCC。接头中还有一个起始密码子 ATG 和一个 SD 序列 TAAGGAGG,两者相距 5 个碱基。接头插入到 pMLB1034 中后,β-半乳糖苷酶 N 端的几个氨基酸有所改变,但 *lacZ* 表达的读框没有改变。活力测定的结果表明,这一改变对 β-半乳糖苷酶的功能没有大的影响。

将 *acy* 基因插入含有 *lacZ* 基因的质粒 pMLB1034 中的 *Eco*R I 和 *Hind* III 位点后,得到 pMKZ。然后将质粒 pMR24 中 *acy* 上游的 *Tac* 启动子接到 pMKZ 中使 *acy* 和 *lacZ* 共同表达。最终得到的质粒命名为 pMKR。

2.4 *acy-lacZ* 多顺反子表达系统的检测

含有报告基因 *lacZ* 的重组质粒 pMKR 被转入大肠杆菌 JM109 后, GL-7ACA 酰化酶活力与 β-半乳糖苷酶活力的比值在 1.324 ~ 1.659 之间波动,变异系数为 9.65%,重复误差小于 5%,大大优于 *acy-xylE* 系统(表 2)。这说明用融合 β-半乳糖苷酶活力表示酰化酶表达量比用融合儿茶酚双加氧酶活力表示更为准确。

表 2 菌株 JM109/pMKR 中 *acy-lacZ* 表达系统的检测

Table 2 Detection of *acy-lacZ* expression systems in JM109/pMKR

Activity	1	2	3	4	5	$\bar{X} \pm SD$
AG(u)	1.313	1.130	1.416	1.087	1.098	1.209 ± 0.066
AB(u)	0.849	0.854	0.854	0.796	0.702	0.811 ± 0.029
AG/AB(u/u)	1.547	1.323	1.658	1.366	1.564	1.492 ± 0.064

Notes: AG, activity of GL-7ACA acylase; AB, activity of β-galactosidase

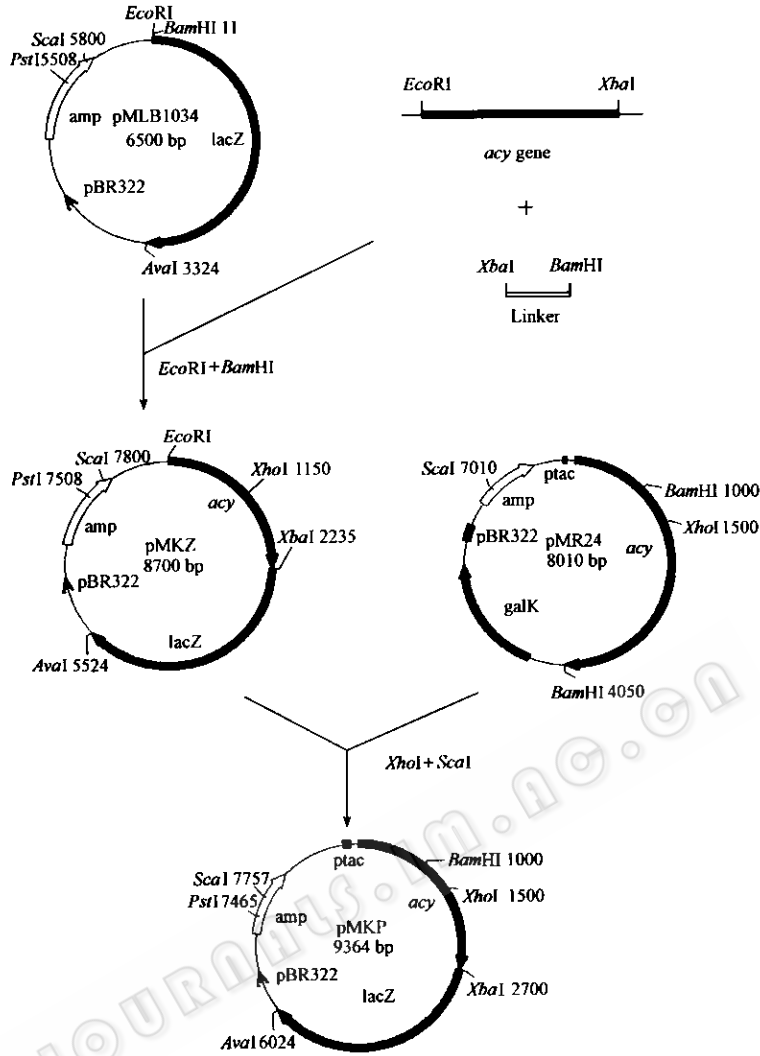


图3 质粒 pMKR 的构建过程图

Fig.3 Construction of plasmid pMKR

在不进行诱导的情况下,对上述两种酶进行活力测定的结果表明,在 GL-7ACA 酰化酶检测不到活力时,也检测不到 β -半乳糖苷酶活力,系统关闭,调控有效。

可见,利用报告基因 *xylE* 和 *lacZ* 建立的两个 GL-7ACA 酰化酶表达检测系统,可以较准确地定量测定该酶及其突变体的表达和比活力,从而在进行 *acy* 突变子筛选过程中十分有效地排除干扰,减少工作量,为 GL-7ACA 酰化酶结构与功能的研究、蛋白质工程改造提供了很大便利。

致谢:中科院上海生化细胞所的王恩多研究员为本研究提供了表达质粒,并予以指导和帮助,特此致谢。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Aramori I, Fukagawa M, Tsumura M *et al.* Cloning and nucleotide sequencing of new glutaryl 7-ACA and cephalosporin C acylase genes from *Pseudomonas* strains. *J Ferment Bioeng*, 1991, 72:232 ~ 243
- [2] LIU G R(刘光荣), ZHANG J(张捷), LI W J(李文筠) *et al.* Studies on the selection of high-yield GL-7-ACA acylase producer, *pseudomonas* 79U-18 and its μ L tural characteristics. *Chinese Journal of Antibiotics* (中国抗生素杂志), 1993, 18:434 ~ 438
- [3] Timothy M, Clayton, Mervyn J Bibb. *Streptomyces* promoter-probe plasmids that utilize the *xylE* gene of *pseudomonas putida*. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18:1077 ~ 1078
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989
- [5] Shigaki Ichikawa, Yoshihiro Murai, Syuji Yamamoto. The isolation and properties of *Pseudomonas* mutants with an enhanced productivity of 7 β -(4-Carboxybutanamido)cephalosporanic acid acylase. *Agric Biol Chem*. 1981, 45:2225 ~ 2229

[6] Jose M, Sala-Trepat, Charles Evans W. The meta cleavage of catechol by azotobacter species 4-oxalocrotonate pathway. *Eur J Biochem.* 1971, **20**:400 ~ 413

[7] SUN N E(孙乃恩), SUN D X(孙东旭), ZHU D X(朱德熙) *et al.* Nanjing: Molecular Genetics (分子遗传学). Nanjing: Nanjing University Press, 1996, pp. 281 ~ 332

Establishment of Detective Systems for GL-7ACA Acylase Expression

LI Xiang ZHANG Wei MAO Xiang CAI Xuan YANG Yun-Liu

ZHAO Guo-Ping JIANG Wei-Hong*

(*Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China*)

Abstract Glutaryl-7-amino cephalosporanic acid (GL-7ACA) acylase catalyzes the conversion of GL-7ACA to 7-amino cephalosporanic acid (7-ACA). The product 7-ACA is a starting compound for semi-synthetic cephalosporin antibiotics in industry. In order to detect the expression and specific activity of protein-engineered GL-7ACA acylase accurately, two useful detective systems for its expression has been established, in which reporter genes *xylE* and *lacZ* were fused to the downstream the GL-7ACA acylase gene *acy* respectively and the activity of catechol dioxygenase or β -galactosidase could indicate the amount of *acy* expression.

Key words GL-7ACA acylase, expression, detective system

Received: April 17, 2001

This work was supported by a grant(103-13-02-01) from the National "863" Hi-Tech Program.

* Corresponding author. Tel: 86-21-64170709; Fax: 86-21-64042385; E-mail: wjiang@iris.sipp.ac.cn