

节杆菌 BT801 基因文库构建及其乙内酰胺酶基因分离与表达

郝淑凤^{1,2} 张惟材^{1*} 袁红杰¹ 王恒梁¹ 黄留玉¹

¹(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

²(中国科学院沈阳应用生态研究所,沈阳 110016)

摘 要 L-乙内酰胺酶产生菌节杆菌 BT801 的染色体 DNA 经 *Sau3A* I 部分酶切后分离 30kb 左右的片段,与经 *Hpa* I 和 *Pst* I 酶切的黏粒载体 pKC505 进行连接,将连接产物用包装蛋白包装,转染大肠杆菌 DH5 α 得到 10 000 多个转化子,构建成节杆菌 BT801 的基因组文库。通过薄层层析等方法筛选得到了 1 个阳性克隆,通过亚克隆得到了乙内酰胺酶的完整基因,该基因能分别利用自身的启动子和 T5 启动子在大肠杆菌中进行表达产生有活性的蛋白。

关键词 乙内酰胺酶,节杆菌,基因文库,基因表达

中图分类号 Q939 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)03-0281-05

乙内酰胺酶(Hydantoinases)是能够催化 5-单取代乙内酰胺类化合物水解的一类酶,实际为 2~3 种酶组成的酶系,包括乙内酰胺水解酶(Hydantoin hydrolase)和 N-氨甲酰氨基酸水解酶(N-Carbamoylase),有的还有乙内酰胺消旋酶(Hydantoin racemase)。三种酶协同作用可使外消旋底物完全转化为特定的手性氨基酸^[1~3]。乙内酰胺类底物的转化包括三个环节(1)5-取代乙内酰胺类化合物的化学或酶法消旋(2)乙内酰胺水解酶水解乙内酰胺开环产生 N-氨甲酰氨基酸(3)N-氨甲酰氨基酸水解酶水解 N-氨甲酰氨基酸产生氨基酸。自然界存在 L-和 D-型两种不同立体选择性的乙内酰胺酶,可分别应用于 L-和 D-型手性氨基酸的酶法生产。由于底物消旋作用的存在,可使外消旋底物全部转化为光学活性产物。因此乙内酰胺酶酶法生产氨基酸应用范围广,转化率高。此外,根据对地球原始环境的推测和分析,原始水圈的氨基酸可能多以对应的 N-氨甲酰氨基酸或乙内酰胺类化合物的形式存在。乙内酰胺酶是在微生物三界系统形成之前就已经存在的一种将 N-氨甲酰氨基酸或乙内酰胺转化为游离氨基酸的原始酶类,因此乙内酰胺酶及其产生菌是研究生命起源和进化的重要生物材料^[1]。

本室筛选得到的了 2 株乙内酰胺酶产生菌节杆

菌 K1108^[4-5]和 BT801,该菌可将 DL-5-苄基乙内酰胺特异水解为苯丙氨酸,该产物业已通过红外、紫外、核磁、质谱、元素分析和旋光分析确定为 L-苯丙氨酸,证实其乙内酰胺酶为 L-选择性(未发表)。本文以黏粒 pKC505 为载体,构建了 BT801 的基因文库,并从文库中筛选得到了 1 个产生乙内酰胺酶的阳性克隆,该阳性克隆可将底物 5-苄基乙内酰胺转化为苯丙氨酸。通过亚克隆得到了节杆菌 BT801 的 L-乙内酰胺酶的序列,并实现了其在大肠杆菌中的表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 乙内酰胺酶产生菌节杆菌(*Arthrobacter* sp.)BT801 系本室筛选得到, *Escherichia coli* DH5 α 、JM109 和 BL21(DE3)及黏粒 pKC505 均由本室保存, *E. coli* LE392 购自 Promega 公司,表达载体 pQE70 和大肠杆菌 M15 为 Qiagen 公司产品。

1.1.2 培养基 :LB 培养基参照文献[8]方法配制, LBBH 培养基为含 0.1% 5-苄基乙内酰胺(5-BH)的 LB 培养基。

1.1.3 工具酶 :限制酶、核酸分子量标准物、牛肠碱性磷酸酶 CIAP、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶等

购自大连宝生物工程公司, λ 噬菌体包装蛋白为 Promega 公司产品, RNA 酶为华美生物工程公司产品。

1.1.4 试剂 IPTG 和 X-gal 为 Sigma 公司产品, 5-苄基乙内酰胺为本室化学合成, 其他均为分析纯化学试剂。底物悬液: 将 1g 5-BH 溶于 2mol/L NaOH, 用 2mol/L HCl 中和至 pH7.0, 再加 $\text{CoCl}_2 \cdot 6.5\text{mg}$ 及十六烷基三甲基溴化铵 10mg, 溶解后定容至 100mL。

1.2 方法

1.2.1 基因文库构建 细菌染色体 DNA 提取方法参考文献 [6], DNA 的部分酶切参考文献 [7], DNA 的碱性磷酸酶处理、连接等按产品说明书进行, DNA 片段的回收及纯化采用 Promega 公司的 DNA Purification System 进行, 黏粒与外源 DNA 片段连接产物的体外包装用 λ 噬菌体包装蛋白按产品说明书进行。其他分子生物学常规操作按文献 [8] 进行。

1.2.2 产酶菌体乙内酰胺酶活性的检测 从平板上挑取单菌落接种于含 5mL LBBH 液体培养基的试管中, 30℃ 200r/min 振荡培养 16 h, 10 000r/min 离心收集菌体, 用生理盐水洗涤 2 次, 重悬于 1mL 0.2mol/L pH 7.0 Tris-HCl 缓冲液中。取此细胞悬液 50 μ L, 加底物悬液 50 μ L 混合, 于 37℃ 恒温水浴中反应 4 h, 离心, 上清液在硅胶 G 薄板上点样, 用正丁醇-醋酸-水 (4:1:1) 展开, 0.5% 茚三酮的丙酮溶液喷雾显色, 以 L-苯丙氨酸标准品为对照, 样品中检测到有产物苯丙氨酸斑点者为乙内酰胺酶阳性。

1.2.3 乙内酰胺酶活力测定 取 4 mL 过夜培养物, 离心收集菌体, 用生理盐水洗涤 2 次, 重悬于 2 mL 底物 (5-BH) 悬液, 于 37℃ 反应 1 h, 加入 12% 三氯乙酸 1 mL 终止反应, 离心, 取 0.2 mL 上清, 加入 0.4 mL 茚三酮试剂, 沸水浴 15 min, 冷却后加 50% 乙醇 4.4 mL, 混匀, 于 570 nm 处测定吸光度, 用 L-苯丙氨酸标准品绘制标准曲线, 从标准曲线上计算转化产物苯丙氨酸的含量。以 5-BH 为底物 1 h 内生成 1 mg 苯丙氨酸的酶量定义为 1 个酶活力单位 (u), 酶的比活定义为每 mg 菌体蛋白所含有的酶活力单位 (u/mg protein)。

1.2.4 菌体蛋白含量的测定 按 Lowry 法^[9] 进行。

1.2.5 表达产物 SDS-PAGE 分析 取 1mL 经 IPTG 诱导培养的培养物, 离心收集菌体, 重悬于 50 μ L 蒸馏水中, 加入 50 μ L 2 \times 上样缓冲液混匀, 煮沸 5min, 离心, 取 10 μ L 上清进行 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 按文献 [8] 进行, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 10%, 电泳完毕用考马斯亮蓝 R250 染色。通过薄层

扫描对各蛋白条带进行定量分析。

2 结 果

2.1 节杆菌 BT801 基因组文库的构建

提取节杆菌 BT801 染色体 DNA, 用 *Sau3A*I 部分酶切, 分离长度为 30kb 左右的片段。载体 pKC505 先用 *Hpa*I 完全酶切, 然后用碱性磷酸酶 (CIAP) CIAP 去磷酸化, 再用 *Bam*H I 酶切, 得到大小为 2.0kb 和 16.7kb 的两条 DNA 片段, 分别为杂种噬菌体的短臂和长臂。将载体两片段与 BT801 染色体 DNA 部分酶切片段按 2:1 的摩尔比混合, 使混合液中 DNA 浓度达 0.5 μ g/ μ L, 加入 T4 DNA 连接酶, 16℃ 保温 16h, 取 2 μ L 连接产物 (约 1 μ g DNA), 用 λ 噬菌体包装蛋白进行体外包装, 然后感染大肠杆菌 DH5 α 菌株, 进入大肠杆菌的重组质粒 DNA 在细胞内环化、复制, 可在含 50 μ g/mL 安普霉素的 LB 平板上筛选转化子, 结果 1 份包装蛋白的体外包装物得到大约 10 000 个转化子。随机挑取 2000 个转化子, 接种于含 50 μ g/mL 安普霉素的 200 μ L LB 的 96 孔板中, 37℃ 培养过夜, 加甘油至终浓度为 20%, 于 -70℃ 保存。

2.2 基因文库的鉴定

随机挑取转化子提取质粒, 用琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明所有转化子的重组质粒都明显大于对照质粒 pKC505, 用 *Pst*I 完全酶切后进行凝胶电泳检测, 结果如图 1。在所检测重组质粒中, 除含有 13.7kb 的载体片段外, 连接到载体上的外源 DNA 被酶切为大小不等的片段, 没有发现未携带外源 DNA 片段的载体以及自连的载体片段。

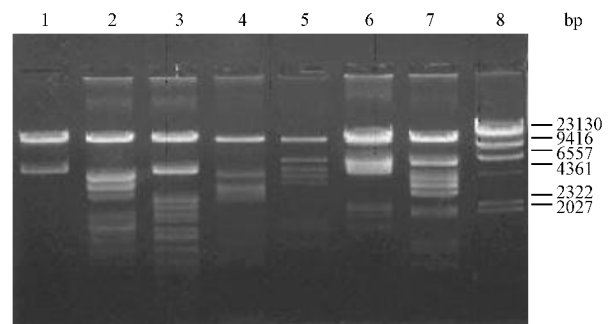


图 1 基因文库中重组黏粒用 *Pst*I 酶切后的电泳结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of recombinant cosmids digested with *Pst*I

1. pKC505/*Pst*I ; 2~7. Recombinant cosmids/*Pst*I ;
8. λ DNA/*Hind*III marker

2.3 重组子的筛选

挑取转化子单菌落接种于 5mL 含 50 μ g/mL 安普霉

素的 LBBH 液体培养基的试管中,37℃ 200r/min 振荡培养 12~16h,薄层层析法检测乙内酰胺酶活性。结果从文库中筛选得到 1 个有乙内酰胺酶活性的阳性转化子 BT802(图 2)。

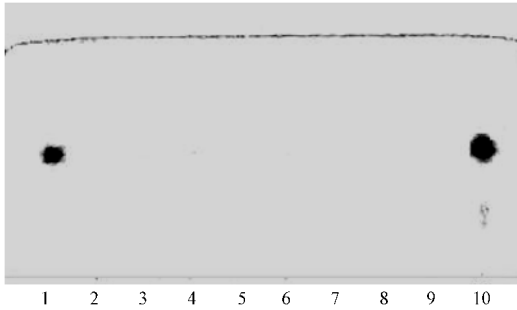


图 2 阳性转化子的筛选

Fig. 2 Screening of positive transformants

1. L-Phe; 2. 5-BH; 3. DH5α/pKC505;
4~10. Transformants

2.4 亚克隆

质粒 pUC18 经 *Bam*H I 酶切,CIAP 去磷酸化,提取阳性转化子 BT802 的重组黏粒 DNA,用 *Sau*3A I 进行部分酶切,分离长度为 3~9kb 的部分酶切片段。将上述载体片段和黏粒酶切片段按 1:3 的摩尔比混合,加 T4 DNA 连接酶,16℃ 保温 16h,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,用含 IPTG 和 X-gal 的 LB/Amp 平板筛选表现为白色菌落的重组子,得 1 000 余个重组子,通过薄层层析检测,从 200 个转化子中筛选得到 12 个具有乙内酰胺酶活性的阳性转化子。选取其中插入外源 DNA 片段较小的 1 个阳性转化子,提取重组质粒 pUC18-169 进行测序分析,测定了长为 4261bp 的外源片段(有关中国专利申请号为 02116788.5,GenBank Accession No. AY069990)。通过读框分析、同源搜索和序列比对发现,该片段含有 3 个完整的开放阅读框(ORF):第一个为 711 bp 的乙内酰胺消旋酶基因(*hyuR*),第二个为 1377 bp 的乙内酰胺水解酶基因(*hyuH*),第三个为 1239 bp 的 N-氨甲酰氨基酸水解酶基因(*hyuC*)。3 个基因构成 1 个操纵子。在第一个开放阅读框的起始密码子 ATG 的上游-7 bp 处有一富含嘌呤碱基的 AGGAG 序列,可能是为核糖体结合位点。

2.5 乙内酰胺酶基因在自身启动子控制下表达

提取重组质粒 pUC18-169,分别转化大肠杆菌 DH5α、JM109 和 BL21(DE3),用薄层层析法检测转化子的乙内酰胺酶活性,结果所有转化子均呈阳性。对 DH5α/pUC18-169 的转化产物进行了氨基酸组成分析,结果表明(图 3)转化产物的主要成分为苯丙

氨酸和 NH₃。其中前者为预期的转化产物,后者 NH₃ 是乙内酰胺酶催化乙内酰胺类化合物水解产生的副产物。

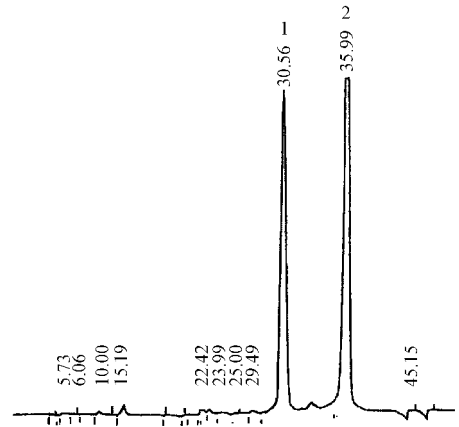


图 3 转化产物的氨基酸组成分析

Fig. 3 Amino acids analysis of transformation products

1. L-Phe; 2. NH₃

2.6 乙内酰胺酶基因在 T5 启动子控制下表达

根据 L-乙内酰胺酶基因的 3 个结构基因序列设计 PCR 扩增引物:

5' ATCGGAATTCATATCATCAACCCG 3' 和

5' CCGAGATCTGAATTCATATCATCAACCCG 3',

以质粒 pUC18-169 为模板扩增 L-乙内酰胺酶全长基因。PCR 条件为:94℃ 变性 4 min 进入循环;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 3min,30 个循环后 72℃ 继续延伸 5 min。将 PCR 产物用 T4 DNA 聚合酶削平后用 *Bgl* II 酶切,与经 *Sph* I 酶切、T4 DNA 聚合酶补平后 *Bgl* II 酶切的表达载体 pQE70 连接构成重组表达质粒 pQE70-*hyu*。将 pQE70-*hyu* 导入大肠杆菌 M15 经 IPTG 诱导,取菌体和超声波破碎菌体后的上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析,电泳显示在相对分子量约 30kD 处有一浓的乙内酰胺消旋酶蛋白表达带,占全菌蛋白的 30% 以上,主要以可溶形式存在;在 56kD 处有一较弱的乙内酰胺水解酶蛋白表达带,不到全菌蛋白的 5%,且主要以包涵体形式存在;而 44 kD 处的 N-氨甲酰氨基酸水解酶蛋白表达带很弱(图 4)。用 5-BH 为底物分别测定节杆菌 BT801、DH5α/pUC18-169 和 M15/pQE70-*hyu* 的 L-乙内酰胺酶的总酶比活力,结果如表 1。由表可以看出 M15/pQE70-*hyu* 乙内酰胺酶的比活力分别是出发菌株节杆菌 BT801 和 DH5α/pUC18-169 的 2.6 和 2.7 倍。我们还对组成乙内酰胺酶的 3 个结构基因分别进行了高表达,结果将另文发表。

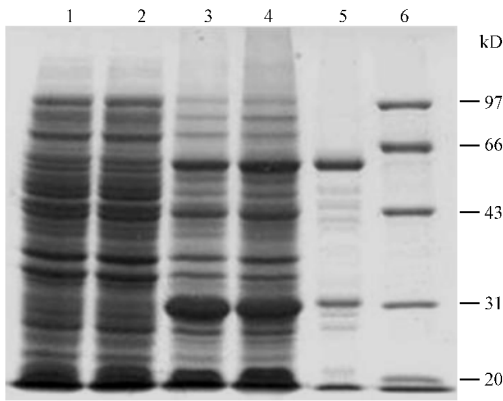


图 4 pQE70-*hyu* 在大肠杆菌 M15 中表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of pQE70-*hyu*

1. M15/pQE70; 2. M15/pQE70-*hyu*; 3. M15/pQE70-*hyu*/IPTG; 4. M15/pQE70-*hyu*/IPTG soluble protein; 5. M15/pQE70-*hyu*/IPTG insoluble protein; 6. Protein marker

表 1 L-乙内酰胺酶的比活力

Table 1 The activity of L-hydantoinase

Strains/Plasmids	Specific activity/(u/mg)
A. BT801	0.70
DH5 α /pUC18-169	0.67
M15/pQE70- <i>hyu</i>	1.80

3 讨 论

利用黏粒 pKC505 构建了节杆菌 BT801 的基因文库,并从中分离得到含 L-乙内酰胺酶完整基因的片段。序列分析结果表明,其乙内酰胺酶的 3 个基因由一个启动子控制,其启动子序列的 -10 区和 -35 区与大肠杆菌的启动子序列的 -10 区和 -35 区完全不同,然而构建的重组质粒能利用自身的启动子在大肠杆菌中表达产生有活性的蛋白,说明尽管节杆菌和大肠杆菌亲缘关系较远,但 *E. coli* 的 RNA 聚合酶能够识别和结合来自节杆菌乙内酰胺酶基因的启动子并进行转录。我们还利用乙内酰胺酶的启动子成功控制了枯草杆菌 α -淀粉酶基因的表达(结果未发表),支持了上述结论。

当乙内酰胺酶的 3 个基因在 T5 启动子控制下共表达时,乙内酰胺消旋酶基因的表达量总是大于 30% 且很稳定,而乙内酰胺水解酶基因和 N-氨甲酰氨基酸水解酶基因的表达量则不很稳定,有时表达量很低(SDS-PAGE 未见电泳条带),可能是由于乙内酰胺消旋酶的高水平表达使代谢负担加重而影响了蛋白的生物合成机制。我们对 N-氨甲酰氨基酸水

解酶基因单独进行了表达,取得了满意结果^[11]。

目前有关 L-乙内酰胺酶的报道还比较少, Wilms^[10]等曾报道过节杆菌 DSM3747 L-乙内酰胺酶基因的序列,我们比较发现两者 DNA 序列的同源性为 57%,而 3 种酶氨基酸序列的同源性分别为 75%、83% 和 78%。研究表明,两种乙内酰胺酶在底物专一性等方面存在一些差异。这两种乙内酰胺酶的比较研究将有助于揭示乙内酰胺酶底物专一性与酶蛋白一级结构的关系。节杆菌 BT801 乙内酰胺酶基因的分离也为 L-乙内酰胺酶的高表达以及在酶法生产氨基酸中的应用奠定良好基础。

致 谢 沈阳药科大学的夏焕章教授在基因文库构建中给予了热忱帮助,山东鲁抗医药集团公司研究所宋爱刚所长惠赠了安普霉素,特此致谢!

REFERENCES(参考文献)

- [1] Syldatk C, May O, Altenbuchner J *et al.* Microbial hydantoinases— industrial enzymes from the origin of life? *Appl Microbial Biotechnol*, 1999, **51**(3):293–309
- [2] Ogawa J, Shimizu S. Diversity and versatility of microbial hydantoin-transforming enzymes. *J Mol Catal B: Enzym*, 1997, **2**:163–176
- [3] ZHANG W C(张惟材). An Overview of Microbial Hydantoinases Research. *Letters in Biotechnology*(生物技术通讯),1999, **10**(2):141–144
- [4] ZHANG W C(张惟材), HAO S F(郝淑凤), YUAN H J(袁红杰) *et al.* Studies on hydantoinase producing conditions of *Arthrobacter* K1108. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报),2002, **43**(2):214–219
- [5] ZHANG W C(张惟材), YUAN H J(袁红杰), HAO S F(郝淑凤) *et al.* Studies on bioconversion conditions and stereoselectivity of *Arthrobacter* K1108 hydantoinase. *Chinese J Biotechnol*(生物工程学报),2001, **17**(6):635–638
- [6] LU S D(卢圣栋). *Current Protocols for Molecular Biology*(现代分子生物学实验技术). 2nd ed. Beijing: Peking Union Medical College Press, 1999
- [7] Ausubel F M, Berni R, Kingston R E *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd ed, New York: John Wiley & Sons, 1995
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [9] Lowry O I, Rosebrough N J, Farr AL *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1):265–276
- [10] Wilms B, Wiese A, Syldatk C *et al.* Cloning, nucleotide sequence and expression of a new L-N-carbamoylase gene from *Arthrobacter aur-scens* DSM 3747 in *E. coli*. *J Biotechnol*, 1999, **68**:101–113
- [11] HAO S F(郝淑凤), ZHANG W C(张惟材), LI Y I(李迎丽) *et al.* Cloning and expression of L-N-Carbamoylase gene from *Arthrobacter* BT801 In *E. coli*. *Chinese J Biotechnol*(生物工程学报),2003, **19**(3):174–177

Construction of Gene Library of *Arthrobacter* BT801 and Isolation & Expression of Hydantoinase Gene

HAO Shu-Feng^{1,2} ZHANG Wei-Cai^{1*} YUAN Hong-Jie¹ WANG Heng-Liang¹ HUANG Liu-Yu¹

¹(Beijing Institute of Biotechnology , Beijing 100071 , China)

²(Institute of Applied Ecology , Chinese Academy of Sciences , Shenyang 110016 , China)

Abstract Hydantoinase can be widely used in enzymic production of various amino acids. In order to obtain the hydantoinase genes in *Arthrobacter* BT801 , its chromosomal DNA is isolated and partially digested with *Sau*3A I to collect fragments of about 30kb. Then , this fragment is inserted into the *Hpa* I and *Pst* I site of cosmid pKC505 . The genomic library was thus constructed by packing in vitro with λ phage package protein and transfecting *E. coli* DH5 α . A positive transformant was selected from the library using thin layer chromatography and other methods. A DNA fragment containing complete hydantoinase genes was sequenced by sub-cloning into pUC18. The gene can express active protein under control of its own promoter and T5 promoter in *E. coli* . The isolation of the gene established foundation for research and application of the hydantoinase .

Key words hydantoinase , *Arthrobacter* , gene library , gene expression

Received : 12-03-2002

* Corresponding author. Tel : 86-10-66948827 ; Fax : 86-10-63895646 ; E-mail : zhangweicai@hotmail.com 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>