

串珠镰孢霉 D-泛解酸内酯水解酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达 Cloning and Expression of *Fusarium moniliforme* CGMCC 0536 D-Lactonohydrolase Gene in *Escherichia coli*

柳志强¹, 孙志浩^{1,2*}

LIU Zhi-Qiang¹ and SUN Zhi-Hao^{1,2*}

1. 江南大学生物工程学院生物催化研究室, 无锡 214036

2. 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036

1. Laboratory of Biocatalysis, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214036, China

摘 要 利用 D-泛解酸内酯水解酶 N 末端序列, 并根据 NCBI 中公布的 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 序列设计了一个特异引物, 该引物结合 Oligo(dT)₁₅, 以串珠镰孢霉 (*Fusarium moniliforme*) CGMCC 0536 mRNA 反转录得到的总 cDNA 为模板进行扩增, 获得约 1.5kb 左右的片段, 将其克隆到 T 载体上进行测序, 对测得的序列进行分析, 重新设计了一对引物, 并在引物两端分别加上限制酶 *Eco*R I 和 *Sal* I 的识别位点序列, 利用热启动 PCR 成功地扩增出了 D-泛解酸内酯水解酶基因, 基因片段长度为 1146bp, 该序列同来源于尖镰孢霉菌 (*F. oxysporum*) AKU 3702 菌株的编码 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 结构基因的同源性为 90.06%。将所得片段定向克隆到 pTre99a 载体中, 转化至 JM109 感受态细胞, 筛选出了阳性克隆。经 IPTG 诱导阳性菌, 进行 SDS-PAGE 电泳, 检测出在约 40kD 处有一蛋白表达带。对两株重组基因工程菌的比活力进行测定, 结果分别为 37U 和 41U。

关键词 串珠镰孢霉菌, D-泛解酸内酯水解酶基因, cDNA, 克隆, 原核表达

中图分类号 Q939 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0390-06

Abstract The total cDNA obtained through reverse transcription of *F. oxysporum* CGMCC 0536 mRNA used as template, a fragment about 1.5kb was amplified with oligo(dT)₁₅ primer and a gene specific primer designed on the base of the sequence of both NH₂-terminus and the cDNA sequence encoding D-lactonohydrolase of *Fusarium oxysporum* reported on the NCBI, then the fragment was cloned to the pMD18-T vector and sequenced. The sequence encoding D-lactonohydrolase of *F. moniliforme* CGMCC 0536 shows a high homology of 90.06% with that of *F. oxysporum* indicating that the gene encoding D-lactonohydrolase is highly conservative. Two specific primers were designed according to the sequence result, and a fragment, 1146bp, was amplified using hot start PCR with these two specific primers. Subsequently, the resulting products were digested with *Eco*R I and *Sal* I and ligated to the pTre99a vector digested with the same enzymes using T4 DNA ligase. the recombinant plasmid, pTre99a-LAC, was transformed into *Escherichia coli* JM109. The two positive clones were induced with IPTG, and enzymes expressed in *Escherichia coli* JM109, the enzyme activity was about 37U and 41U respectively. The expression products were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis indicating that about 40kD protein was obtained.

Key words *Fusarium moniliforme*, D-lactonohydrolase, cDNA, cloning, Prokaryotic expression

Received: October 21, 2004; Accepted: December 27, 2004.

This work was supported by Grant from the State Key Basic Research and Development Plan of China (No. 2003CB716008) and the National Natural Science Foundation of China (No. 20476039).

* Corresponding Author. Tel/Fax: 86-510-5808498; E-mail: sunw@publi1.wx.js.cn

国家 973 项目 (No. 2003CB716008)、国家自然科学基金项目 (No. 20476039) 资助。

作为维生素类药物, D-泛解酸钙(右旋泛解酸钙)广泛应用于医药、食品、饲料工业。泛解酸作为食品和饲料添加剂的需求量很大。目前世界 D-泛解酸钙年产量 15 000t, 随着食品和饲料工业的发展, 对 D-泛解酸钙的需求量将有大规模增加^[1]。

D-泛解酸钙生产的主要技术难题是泛解酸内酯的手性拆分技术。由于化学拆分法存在环境污染和所用试剂价格昂贵等问题, 因此研究者把目光放在微生物酶法上。1995 年, Kataoka 等报道了用微生物酶法选择性水解 DL-泛解酸内酯, 得到 D-泛解酸, 再经内酯化反应生成 D-泛解酸内酯的方法^[2,3]。本实验室对保存的菌种进行筛选并经诱变, 得到一株具有很高 D-泛解酸内酯水解酶活力的串珠镰孢霉菌 (*Fusarium moniliforme*) CGMCC 0536, 并且对该菌株的产酶条件和酶法拆分泛解酸内酯的过程以及酶的固定化进行了深入的研究^[4-6], 日前该菌株已成功应用于工业化生产并取得了较好的环境效益、经济效益和社会效益。日本学者对尖镰孢霉 (*Fusarium oxysporum*) AKU 3702 中的 D-泛解酸内酯水解酶进行了研究^[7,8], 对该酶进行了分离纯化, 并对其编码基因进行了克隆^[9]。本文作者参考相关文献^[9]并根据 NCBI 公布的尖镰孢霉 (*F. oxysporum*) AKU 3702 中编码 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 基因序列, 同时结合 mRNA 3' 端具有 poly(A) 的特点, 设计了一对引物, 利用串珠镰孢霉菌 (*F. moniliforme*) CGMCC 0536 mRNA 反转录获得的产物为模板, 扩增得到了编码 D-泛解酸内酯水解酶的 cDNA, 并对其结构进行分析, 根据分析结果设计了一对特异引物, 扩增到了编码 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 的结构基因(该序列已在 GenBank 登记, 登记号为 AY728018), 并构建了含有编码 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 结构基因的原核表达载体, 成功地使其在 *E. coli* JM109 中进行了活性表达, 本文报道有关研究结果。

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

串珠镰孢霉菌 (*F. moniliforme*) CGMCC 0536 由本实验室筛选并保存^[10], *E. coli* JM109 由本实验室保存; pTrc99a 载体由南京师范大学生命科学学院邵蔚蓝教授惠赠, pMD18-T 载体购自大连宝生物公司。

1.2 培养基、酶及试剂

大肠杆菌的 LB 培养基配制参照文献^[11], 串珠镰孢霉菌的培养基配制参照文献^[10]; *Eco*R I、*Sal*I 内切酶、T4 DNA 连接酶、RNase A、PCR 试剂均为

大连宝生物公司产品; 酵母提取物和蛋白胨为 Oxoid 公司产品。mRNA 分离试剂盒购自 Promega 公司; cDNA 合成试剂盒购自 BD Clontech 公司; DNA 纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自大连宝生物公司。D-泛解酸内酯由浙江鑫富股份有限公司提供。其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 总 RNA 的提取

取处理过的串珠镰孢霉 (*F. moniliforme*) CGMCC 0536 菌丝体 0.4g, 液氮速冻并研磨(加入少量石英砂)成粉末, 快速将粉末移入 50mL 离心管中, 加 12mL 变性液(异硫氢酸胍 6mol/L, 柠檬酸 37.5mmol/L, 十二烷基肌酸钠 0.75mmol/L, β -巯基乙醇 0.15mol/L), 充分摇匀后, 参照文献^[12]提取串珠镰孢霉 (*F. moniliforme*) CGMCC 0536 总 RNA。取适量总 RNA 样品, 利用核酸蛋白测定仪测定其在不同波长的吸光度, 计算总 RNA 的浓度。同时进行甲醛变性电泳, 确定总 RNA 的完整性。

1.4 mRNA 的分离

从串珠镰孢霉 (*F. moniliforme*) CGMCC 0536 总 RNA 中分离提取 mRNA, 参照 Promega 公司 mRNA 分离试剂盒说明书进行操作。

1.5 cDNA 第一链合成

利用 BD Clontech 逆转录试剂盒, 以方法 1.4 中分离得到的 mRNA 为模板, 合成 cDNA 第一链, 参照 BD Clontech 公司 cDNA 合成试剂盒说明书进行操作。

1.6 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 基因的扩增

根据 mRNA 的结构及编码 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 基因的同源序列分析, 利用软件 DNAMEN 设计下列引物:

引物 1: ATGGCTAAGCTTCCTCTACGGC

引物 2: Oligo(dT)₁₅

利用引物 1 引物 2 以总 cDNA 第一链为模板, 扩增串珠镰孢霉菌 (*F. moniliforme*) CGMCC 0536 菌株的 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 基因, PCR 反应参数为: 94℃ 30s, 56℃ 60s, 68℃ 90s, 重复 30 个循环后 72℃ 继续延伸 10min。用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.7 目的片段的回收

PCR 产物约 50 μ L, 用 1% 的琼脂糖电泳回收目的片段。利用 DNA 胶回收试剂盒进行回收, 方法参见 DNA 胶回收试剂盒说明书。

1.8 克隆载体的构建与鉴定

1.8.1 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 基因的克隆: 将

回收的目的片段同载体 pMD18-T 进行连接,具体方法按 pMD18-T 载体试剂盒说明书进行,构建重组质粒 pMD18-T-LAC。然后按文献的方法^[11]将重组质粒电转化到 *E. coli* JM109 宿主菌中。

1.8.2 阳性克隆的筛选:将转化后的菌液涂布到含 24 μ g/mL 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)、50 μ g/mL 氨苄青霉素 (Amp)、40 μ g/mL 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷 (Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside, X-gal) 的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。利用蓝白斑筛选,从平板上挑取白色菌落,提取质粒后用自动序列仪进行测序(由大连宝生物公司完成),并用 DNAMAN 软件分析测序结果。

1.9 表达载体的构建与鉴定

1.9.1 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 结构基因的扩增:在 1.8.2 测序结果的基础上,设计引物 3 及引物 4:

引物 3: CCGGAATTCATGGCTAAGCTTCCTTCTACGGC
画线区域为 *Eco*R I 酶切位点;

引物 4: ATTCGGTTCGACCTAATCATAGAGCTTGGGAC
画线区域为 *Sal* I 酶切位点。

利用引物 3 引物 4,以 pMD18-T-LAC 为模板扩增 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 结构基因,PCR 反应参数为:94 $^{\circ}$ C 30s, 58 $^{\circ}$ C 60s, 68 $^{\circ}$ C 90s, 重复 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10min。用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.9.2 目的片段的回收:方法同 1.7。

1.9.3 表达载体的构建:纯化后的 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 结构基因用 *Eco*R I 和 *Sal* I 37 $^{\circ}$ C 酶解 3h,用 DNA 回收试剂盒回收 1146bp 的 DNA 片段。将 pTrc 99a 质粒用 *Eco*R I 和 *Sal* I 37 $^{\circ}$ C 酶解 3h,用 DNA 回收试剂盒回收。将回收的目的片段和载体质粒连接,构建表达载体 pTrc99a-LAC。

1.9.4 阳性克隆的筛选:将 1.9.3 中构建好的表达载体电转化至 *E. coli* JM109 受体菌中并涂布到含 100 μ g/mL Amp 的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。从平板上筛选阳性菌落,接种于含 100 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜。按文献[11]的方法从菌液中提取质粒,用 *Eco*R I 和 *Sal* I 37 $^{\circ}$ C 酶解 3h,对酶解产物电泳。

1.10 诱导表达

挑取阳性克隆单菌落并接种于 4mL 含有浓度为 100 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 250 r/min 震荡过夜。取 1mL 培养物,将其转接于 50mL

含有浓度为 100 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 震荡至菌体浓度 OD_{600} 约为 0.6~0.8 左右。向培养物中加入 IPTG 至终浓度为 3mmol/L 诱导培养。收集菌体供电泳分析及酶活力测定。

1.11 表达产物 SDS-PAGE 分析^[11]

以转入空载体的 *E. coli* JM109 菌体作为对照。鉴定为阳性的 *E. coli* JM109/pTrc99a-LAC 重组菌经 IPTG 诱导培养一定时间后,取 0.5mL 诱导培养物,离心收集菌体,重悬于 50 μ L 蒸馏水中,加入 50 μ L 上样缓冲液,混匀后煮沸 10min,进行 SDS-PAGE 电泳分析。浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%。电泳结束后用考马斯亮蓝 R250 染色。

1.12 酶活力测定

1.12.1 底物溶液配制^[13]:A 液:4% D-泛解酸内酯溶液;B 液:1 mol/L Tris-HCl 缓冲液,pH 7.5。

1.12.2 D-泛解酸内酯水解酶酶活定义^[14-16]:以未经转化的 *E. coli* JM109 菌株和未经诱导的重组菌株作为对照,挑取两个阳性重组菌落,利用含有抗生素的 LB 培养基进行培养,并用 IPTG 进行诱导,将诱导一定时间的培养物进行离心(5 000 \times g,4 $^{\circ}$ C 10min),取 0.5g 湿菌体作为催化用酶。加入上述反应底物(25mL A 液和 25mL B 液),置于 250mL 三角瓶中,30 $^{\circ}$ C 摇床 150r/min 条件下反应 60min,离心去除菌体,用 HPLC 分析测定 D-泛解酸生成量。HPLC 分析条件:柱型 Zorbax SBC¹⁸, 5 μ mol/L 250 \times 4.6mm,流动相为乙腈:0.02mol/L KH_2PO_4 = 1:9,用 HCl 调 pH 到 3.0,流速 1mL/min,波长 215nm,柱温 25 $^{\circ}$ C,样品的 pH 值为 5~7 左右。D-泛解酸的出峰时间为 4.0min,D-泛解酸内酯的出峰时间为 6.9min。

酶活力单位定义:在上述反应条件下,1min 水解 1 μ mol D-(-)-泛解酸内酯生成 D-(+)-泛解酸的酶量定义为 1 个酶活单位(u)。

1.13 菌体蛋白含量的测定

按 Bradford 法测定^[17]。

2 结果

2.1 RNA 的提取及 PCR 扩增

将提取的串珠镰孢霉菌 (*F. moniliforme*) CGMCC 0536 总 RNA 充分溶解于 DEPC 水中,吸取适量并用 DEPC 水稀释一定倍数后,利用核酸测定仪测定总 RNA 在不同波长下的吸光度,计算总 RNA 的浓度。同时取一定量的总 RNA 溶液,进行琼脂糖-甲醛变性电泳^[12],观察 RNA 的质量与完整性。提取的总 RNA 经检测质量及浓度达到要求,进行

mRNA 的分离。

以从总 RNA 中分离得到的 mRNA 为模板, Oligo (dT)₁₅ 为引物, 在反转录酶的作用下合成 cDNA 第一链。用 cDNA 第一链混合物为模板, 利用引物 1 和引物 2 进行 PCR 扩增。扩增产物进行 0.8% 琼脂糖电泳, 与标准分子量对照, 在 1.5kb 处出现明亮的特异性带, 见图 1。

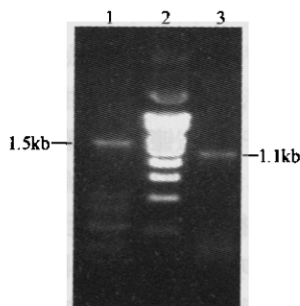


图 1 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 基因 PCR 扩增 agarose 电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of resulting PCR fragment
1: resulting PCR fragment amplified with primer 1 and primer 2; 2: 3S 250bp DNA plus Marker (9.0kb, 4.0kb, 2.5kb, 2.0kb, 1.5kb, 1.25kb, 1.0kb, 0.75kb, 0.5kb, 0.25kb); 3: resulting PCR fragment amplified with primer 3 and primer 4.

2.2 PCR 产物克隆

将利用胶回收的 cDNA 片段与 pMD18-T 载体连接, 构建克隆载体 pMD18-T-LAC 并转化至 *E. coli* JM109 受体菌, 涂布于含 Amp、IPTG、X-gal 的 LB 琼脂平板上, 37℃ 培养过夜后, 平板上长出许多蓝、白色菌落。随机挑取白色克隆提取质粒进行测序(结果未列出), 利用序列分析软件对测序结果进行分析, 发现该序列含有一个开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)。为了进一步研究 D-泛解酸内酯水解酶基因, 根据测序结果设计了引物 3、引物 4, 用以扩增 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 结构基因。

2.3 cDNA 结构基因的扩增

利用引物 3 与引物 4 以 2.2 中的双链 cDNA 为模板进行扩增, 对扩增产物进行 0.8% 琼脂糖电泳, 与标准分子量对照, 在 1146bp 处出现明亮的特异性带见图 1, 对 PCR 产物进行测序, 并利用软件 DNAMAN 对测序结果进行分析, 分析结果见图 2。利用 Blast 软件进行同源性分析, 发现该序列同来源于尖镰孢霉菌(*F. oxysporum*) AKU 3702 菌株的编码 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 结构基因的同源性为 90.06%, 表明不同来源的 D-泛解酸内酯水解酶基因在进化上具有一定的保守性。

```

1      ATGGCTAAGCTTCCTTCTACGCCAGATTATGACAGAAAGTCCTTAATGCTTGAAG
61     GATGTGCCGCCTCCCGCAGTGGCCAAATGACTCTCTGGTGTTCACCTGGCGTGTGACT
121    GAGGAGTCTCTTGTGAGAAGCCTTTTCATGCTACGATGAAGAGTTTACGACGTCATC
181    GGAAAGGACCCCTCTTTGACCCCTCATCGAACATCGGACACCAGCCCAATCTCCATGAG
241    GCTGTGGTATGGTATCCCTACTGAAGAGGTCTTCTTCTGTCAGAAATGCTGGCGTCCC
301    GCTGCTGGCACTGGCTTGAACAAGTCTTCCATCATTTCAGAAAGATTCCCTCAAGGAGGCC
361    GACGAGTCCCGCAAGGGCAAGAAGGATGAGGTCAGGTCGCGGTGTGTGACTCAAACCTT
421    CAGGTCATCAACCCCAATGGTGGCATTACTACAAGGGCAACATCATCTTTGCTGGTGAG
481    GGCCAGGGCGACGATGTTCCCTCCGGCTGTACTGTSAACCTCTCCCTCTTACAACT
541    ACCACACCCTCTCTCAACAACACTTGTGGTGGCAGTTCACCTCCCTCAACGACGCTGGT
601    ATCAACCCCGAAGCGGTGACTTGTACTTCACCGATACCCTCTATGGATACCTCCAGGAC
661    TTCCGTCCTGTCCTGGTCTCGAAACCAAGTCTATGTTACAACTTTCACACCGCGGCC
721    GTCACCTGCTGCTGATGACTTTACCCCTAACCGTATTGGCTTTGGCCCGACGGC
781    AAGAAGTCTATGTCACCGACACTGGTATCGCTTGTGGCTTTACGGCCGCAACCTCTCT
841    TCACCCGCTCTGTTTACTCTCTCGATGTAACAGGACGGTACTCTCCAGAACCCGAAAG
901    ACCTTTGCTTACGTCGGCTCTTTCATCCCGATGGTGTTCATACCGACTCCAAGGGCCGT
961    GTTATGCGGGTTCGGCGGATGGTGTCCACGCTTGGAAACCTTCGGGCAAGCTAATCGGC
1021   AAGATCTACACCGGTACTGTGCTGCTAATCTCCAGTTTGGCGCAAGGGAAGGATGATT
1081   ATTACTGGACAGACCAGTGTCTATGTACTTATAGGGGCTTCGGGTCCCAAGCTCTAT
1141   GATTAG

```

图 2 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 结构基因

Fig.2 Nucleotide sequence of D-lactonohydrolase

2.4 表达载体的构建

将 2.3 中扩增的 cDNA 产物及载体 pTrc99a 分别用限制酶 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切, 酶切产物纯化后进行连接, 构建表达载体 pTrc99a-LAC, 结构示意图见图 3, 转化至 *E. coli* JM109 受体菌, 37℃ 培养过夜, 随机挑取 8 个转化子接种到含 100μg/mL Amp 的 LB 培养基中, 提取重组质粒, 用限制酶对重组质粒进行鉴定, pTrc99a-LAC 能被 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切获得一条 1.1kb 的片段, 该片段同利用方法 1.9.1 中 PCR 扩增获得的片段大小一致; 而在约 4.1kb 处存在一条片段, 该片段小于分别用 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切的 pTrc99a-LAC 大片段, 如图 4, 初步证明目的 LAC 基因已成功同载体 pTrc99a 连接并转入到宿主菌 *E. coli* JM109 中。

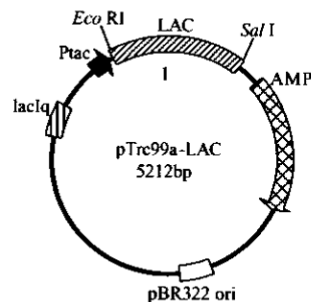


图 3 重组表达质粒 pTrc99a-LAC 结构示意图

Fig.3 Construction of recombinant expression plasmid pTrc99a-LAC

2.5 SDS-PAGE 检测

鉴定为阳性的 *E. coli* JM109/pTrc99a-LAC 经

IPTG 诱导后收集菌体,加上样缓冲液煮沸 10min,进行 SDS-PAGE 电泳。从电泳图谱上可以看出,经 IPTG 诱导后,含有重组质粒 pTrc99a-LAC 的大肠杆菌有分子量约为 40kD 的蛋白表达带,见图 5。这进一步证明了重组表达载体 pTrc99a-LAC 构建成功。

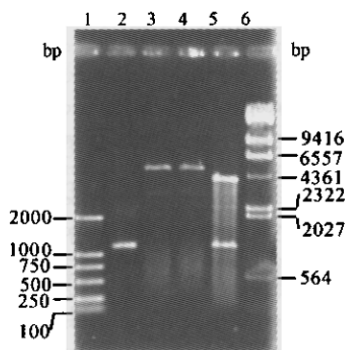


图 4 阳性克隆酶切鉴定 agarose 胶电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of positive clone treated with restriction endonuclease

1: DL2000 DNA marker; 2: structural cDNA gene encoding D-lactonohydrolase; 3: pTrc-LAC/ EcoR I; 4: pTrc-LAC/ Sal I; 5: pTrc-LAC/ EcoR I and Sal I; 6: λ DNA/ Hind III DNA marker.

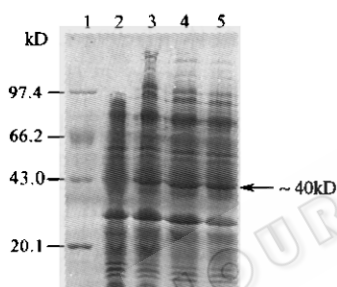


图 5 D-泛解酸内酯水解酶 SDS-PAGE

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of expression products in JM109

1: Protein molecular weight markers; 2: *E. coli* JM109/pTrc-LAC before induction; 3: *E. coli* JM109/pTrc-LAC after 2h induction; 4: *E. coli* JM109/pTrc-LAC after 4h induction; 5: *E. coli* JM109/pTrc-LAC after 6h induction.

表 1 D-泛解酸内酯水解酶酶活力测定结果

Table 1 Assay results of D-lactonohydrolase activity

Strains/plasmid	Activity (u/g wet cells)
<i>E. coli</i> JM109	0
<i>E. coli</i> JM109/pTrc99a	0
<i>E. coli</i> JM109/pTrc99a-LAC	8
<i>E. coli</i> JM109/pTrc99a-LAC-1/IPTG	37
<i>E. coli</i> JM109/pTrc99a-LAC-2/IPTG	41

2.6 酶活鉴定

以对照组全细胞作为酶进行催化反应,经检测 *E. coli* JM109 及 *E. coli* JM109/pTrc99a 未有 D-泛解酸生成,未经诱导的重组菌株有微量的 D-泛解酸生

成。这是因为载体 pTrc99a 存在一定的本底表达,而利用转化了编码 D-泛解酸内酯水解酶基因的 *E. coli* JM109 全细胞为酶源催化 D-泛解酸内酯水解反应,有 D-泛解酸生成。利用随机挑取的 2 株阳性克隆菌株进行催化反应,酶活力稍有差别。酶活力测定结果见表 1。

3 讨论

产 D-泛解酸内酯水解酶的微生物菌株主要有:镰孢霉菌,赤霉菌,粘帚霉菌,黑曲霉菌,以及柱盘孢菌等,其中来源于串珠镰孢霉菌 (*F. moniliforme*) CGMCC 0536 的 D-泛解酸内酯水解酶具有较高的对映体选择性,能选择性水解 DL-泛解酸内酯,得到 D-泛解酸,该酶已成功应用于工业化生产,并创造了很好的综合效益。近年来,该酶还被应用于 D-泛醇的生产,因此 D-泛解酸内酯水解酶已成为 D-泛解酸生物转化研究领域的“热点酶”。但对该酶的研究大多停留在产酶条件及酶催化条件的优化等方面,缺乏对酶在分子水平上的研究和了解。本实验室对网上数据库 NCBI 中公布的同源序列进行对比,设计了一个特异引物,该引物结合通用引物,利用 PCR 技术,成功获得了一约 1.5kb 的片段。对该片段进行克隆测序,并用软件 DNAMAN 对测序结果进行分析,结果表明:该片段含有一长为 1146bp 的开放阅读框。利用 Blast 软件进行同源性分析,发现该阅读框同编码源于尖镰孢霉菌 (*F. oxysporum*) AKU 3702^[9] 中的 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 结构基因的同源性为 90.06%,表明不同来源的 D-泛解酸内酯水解酶基因在进化上具有一定的保守性。将编码 D-泛解酸内酯水解酶结构基因定向克隆到具有强 tac 启动子的 pTrc99a 载体上,利用含有表达重组质粒的 *E. coli* JM109/pTrc99a-LAC 为酶源,检测到了 D-泛解酸内酯水解酶活性。以上结果表明我们已成功扩增 D-泛解酸内酯水解酶结构基因,并在大肠杆菌中进行了活性表达。对于从真核生物中钓取同源性较高的单一基因,我们采取的路线同构建基因文库筛选结构基因的方法相比,不仅方便、快速,而且耗费低。D-泛解酸内酯水解酶基因的克隆及在大肠杆菌中的活性表达,为研究该酶催化机制及提高该酶在工业化应用中的适应性奠定了基础。

由于大肠杆菌表达系统密码子存在一定的偏好性,而编码来源于丝状真菌串珠镰孢霉 (*F. moniliforme*) CGMCC 0536 的 D-泛解酸内酯水解酶基因含有大肠杆菌稀有密码子,可能对表达水平有较

大影响,因此 D-泛解酸内酯水解酶产物在 *E. coli* JM109 中的表达量较低,同时由于表达产物是融合蛋白形式(N-端带有 Met-Glu),对酶活力略有影响。另外,考虑到 D-泛解酸内酯水解酶在实际操作中遇到的一些问题如:在低 pH 反应体系中酶活力下降迅速,在最适催化温度条件下酶易受到污染等,因此有必要选择合适的表达系统,并对 D-泛解酸内酯水解酶基因进行改造,以期在基因水平上提高酶的表达量和酶活力。考虑到酶在实际生产中的应用,我们准备把随后的研究放在提高酶的活力和提高酶耐受操作环境的能力方面,这部分工作正在进行中。

致谢:感谢中国科学院上海生物化学研究所袁中一教授、杨晟博士;南京师范大学生命科学学院邵蔚蓝教授;江南大学工业生物技术教育部重点实验室王正祥教授;江南大学生物工程学院许正宏博士、沈微博士在实验过程中给予的指导和帮助;感谢法国 Alain Archelas 博士提供相关文献资料。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Sun ZH (孙志浩), Tang YX (汤一新). Advances of several studies on producing D-pantothenic acid by biotechnology. *Pharmaceutical Biotechnology*(药物生物技术), 2002, **9**(3): 178 - 182
- [2] Sakamoto K, Yamada H, Shimizu S. Process for the preparation of D-pantolactone. U.S. Patent 5275949, 1994
- [3] Sakamoto K, Yamada H, Shimizu S. D-pantolactone hydrolase and process for the preparation thereof. U.S. Patent 5372940, 1994
- [4] Sun ZH (孙志浩). Process for preparing D-pantoyl lactone by microbe enzyme method (D-泛解酸内酯的微生物酶法制备方法). Chinese Patent(中国专利)01104070.X, 2001
- [5] Tang YX, Sun ZH, Hua L. *et al.* Kinetic resolution of DL-pantolactone by immobilized *Fusarium moniliforme* SW-902. *Process Biochem.* 2002, **38**: 545 - 549
- [6] Hua L (华蕾), Sun ZH (孙志浩), Zheng P (郑璞) *et al.* Biocatalytic resolution of DL-pantolactone by glutaraldehyde cross-linked cells of *Fusarium moniliforme* CGMCC 0536. *Enzyme Microb Technol.* 2004, **35**: 161 - 166
- [7] Shimizu S, Kataoka M, Shimizu K *et al.* Purification and characterization of a novel lactonohydrolase, catalyzing the hydrolysis of aldinate lactones and aromatic lactones, from *Fusarium oxysporum*. *Eur J Biochem.* 1992, **209**: 383 - 390
- [8] Shimizu S, Kataoka M. Optical resolution of pantolactone by a novel fungal enzyme, lactonohydrolase. *Annals New York of Sciences.* 1996, 650 - 658
- [9] Kobayashi M, Shinohara M, Sakoh C *et al.* Lactone-ring-cleaving enzyme: Genetic analysis, novel RNA editing, and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998, **95**: 12787 - 12792
- [10] Tang YX (汤一新), Sun ZH (孙志浩), Hua L (华蕾) *et al.* Production of D-pantolactone hydrolase by *Fusarium moniliforme* SW902. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2002, **42**: 81 - 87
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [12] Chomczynski P, Sacchi N. Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction. *Anal Biochem.* 1987, **162**: 156 - 159
- [13] Tang YX (汤一新). Optical Resolution of Racemic Pantolactone with a Fungal Enzyme, D-Lactonohydrolase. Southern Yangtze University Master Degree Thesis (江南大学硕士学位论文), 2002
- [14] Kataoka M, Shimizu K, Sakamoto K *et al.* Lactonohydrolase-catalyzed optical resolution of pantoyl lactone: selection of a potent enzyme producer and optimization of culture and reaction conditions for practical resolution. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1995, **44**: 333 - 338
- [15] Lanzilotta RP, Bradley DG, McDonald KM. Microbial reduction of ketopantoyl lactone to pantoyl lactone. *Appl Microbiol.* 1974, **27**: 130 - 134
- [16] China Food Additive Association (中国食品添加剂生产应用工业协会). Handbook of food additive analysis and examination (食品添加剂分析检验手册). Beijing: China Light Industry Press, 1999, 286 - 287
- [17] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995