

研究报告

# 分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NwIB-01 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶基因的克隆、异源表达及分离纯化

范书玥, 魏巍, 王凤清, 魏东芝

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 鲁华生物技术研究所, 上海 200237

**摘要:** 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶(KSH)是微生物甾体降解途径中的关键酶, 在甾体药物制备中有重要价值。以本实验室从土壤中自行筛选的分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NwIB-01 为出发菌株, 利用红平红球菌 *Rhodococcus erythropolis* SQ1 已报道的 *ksh* 序列与已全基因组测序的分枝杆菌序列数据库进行比对分析, 根据同源基因设计简并引物获得部分 *ksh* 序列, 通过染色体步移扩增出全长 *ksh*(命名为 *M.S.-ksh*), 该基因与耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 的 *ksh* 同源率为 85%。构建 pET32-*ksh* 表达载体, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 获得高表达重组转化子菌株, 经 IPTG 低温诱导, SDS-PAGE 电泳分析, 目的蛋白主要为可溶性表达, 表达量占菌体总蛋白的 30%以上, 用 Ni<sup>2+</sup> 亲和层析柱纯化, 纯度达 90%以上。本研究为利用基因工程菌进行工业化生产甾体药物奠定了基础。

**关键词:** 分枝杆菌 NwIB-01, 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶, 甾体降解, 异源表达, 分离纯化

## Cloning, heterologous expression and purification of a 3-ketosteroid-9 $\alpha$ -hydroxylase (KSH) from *Mycobacterium* sp. NwIB-01

Shuyue Fan, Wei Wei, Fengqing Wang, and Dongzhi Wei

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Newworld Institute of Biotechnology, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China

**Abstract:** 3-ketosteroid-9 $\alpha$ -hydroxylase (KSH), a key enzyme in the microbial steroid degradation, is highly valuable for the production of some steroid drugs. Degenerate primers were designed by comparing the *ksh* from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 and its homologous sequences in the reported genome of *Mycobacteria*. Subsequently, a gene fragment of KSH was cloned from *Mycobacterium* sp. NwIB-01, a sterol-transforming bacterium isolated from soil in our lab. According to the conservative sequence, the full-length 1188 bp gene encoding *ksh* (designated as *M.S.-ksh*) was obtained by chromosome walking, which showed 85% identity with the *ksh* of *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. The heterologous expression of KSH was achieved in *Escherichia coli* BL21(DE3) using the pET-32a-c(+) vector system. The expressed KSH protein was mostly in soluble form after IPTG induction at 30°C and accounted for more than 30% of total bacterial proteins according to SDS-PAGE electrophoresis. The molecular mass of KSH was about 45 kD, which was exactly the size predicted. After Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography, the purity of the target protein was more than

**Received:** September 25, 2009; **Accepted:** November 2, 2009

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2008AA02Z209).

**Corresponding author:** Fengqing Wang. Tel: +86-21-64252981; Fax: +86-21-64250068; E-mail: fqwang@ecust.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2008AA02Z209)资助。

90%. Our work will definitely contribute to the industrial production of some steroid drugs by developing KSH genetically engineered bacteria.

**Keywords:** *Mycobacterium* sp. NwIB-01, 3-ketosteroid-9 $\alpha$ -hydroxylase, steroid degradation, heterologous expression, purification

甾体激素在临床上有广泛应用,是仅次于抗生素的第二大类药物,对机体起着非常重要的调节作用。目前甾体药物的合成主要依赖于半合成,常用方法是利用微生物转化和化学修饰相结合的方式对天然甾体化合物进行结构改造<sup>[1]</sup>,其中一些关键反应通过化学法很难进行,一般采用微生物转化法<sup>[1-3]</sup>来实现,例如A环C<sub>1,2</sub>-位脱氢<sup>[4]</sup>、9 $\alpha$ -羟基化<sup>[5]</sup>、11 $\alpha$ -羟基化<sup>[6]</sup>、11 $\beta$ -羟基化<sup>[7]</sup>等。这些反应往往是甾体药物制备过程中的瓶颈环节,所用微生物催化剂一般存在效率低、副产物多等缺陷,因此针对这些微生物转化反应,开发经济高效的微生物工程菌株是众多甾体制药企业的努力方向。而对上述关键反应酶基因的分析鉴定,则是开发相应微生物工程菌株的基础。

3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶(KSH)是微生物甾体降解途径中的关键酶<sup>[8]</sup>,KSH能够在甾体母核9 $\alpha$ 位导入羟基,因而在甾体药物制备过程中有两个重要作用<sup>[8-11]</sup>:一是制备具有9 $\alpha$ -羟基结构的甾体药物中间体,9 $\alpha$ -羟基甾体化合物是制备9-卤代肾上腺皮质激素与11-酮基甾体的重要前体物;二是作为甾醇微生物侧链降解制备雄甾酮类化合物的关键酶,KSH与3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶共同作用使甾体母核开环,最终使甾体降解为水和二氧化碳。通过对其基因进行改造(失活或强化)可获得生产雄甾-4-烯-3,17-二酮、雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮或9 $\alpha$ -羟基-雄甾-4-烯-3,17-二酮等重要甾体药物中间体的基因工程菌株。

长久以来,人们对KSH在甾体药物生物合成中所起的作用知之甚少,直到2002年van der Geize等首次从能够以甾醇为唯一碳源生长的红平红球菌 *Rhodococcus erythropolis* SQ1<sup>[8]</sup>中鉴定出KSH基因(*kshA*)及其降解甾醇的生物学功能<sup>[11-14]</sup>,之后于2008年在 *R. erythropolis* 中鉴定出第2个KSH基因(*kshB*),并确定对于依赖甾醇生长的 *Rhodococcus* sp. 而言KshB是必需的<sup>[15]</sup>。通过氨基酸序列分析,KSH属于单加氧酶IA家族<sup>[8,16]</sup>,其电子传递链系统由末端加氧酶(KshA)和铁氧还蛋白还原酶(KshB)组

成。Rieske型铁硫簇和非铁血红素结合域是末端加氧酶的保守结构域,而还原酶部分则是一个包含NAD结合域和植物型铁硫簇的黄素蛋白。2009年van der Geize所在课题组通过纯化和体外重构KshA与KshB组分对KSH进行了生物化学性质的鉴定<sup>[17]</sup>。与 *Rhodococcus* sp. 相似,分枝杆菌 *Mycobacterium* 也具有甾醇代谢能力,并且有较高的活性,因此其基因组中也可能包含具有类似功能的KSH基因。分枝杆菌多为致病性分枝杆菌,如肺结核杆菌、麻疯杆菌等。能以胆固醇等甾醇为唯一碳源生长,是分枝杆菌致病性的一个重要属性。2006年Andor等在耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 中发现并鉴定了9 $\alpha$ -羟基化酶基因 *ksh*<sup>[18]</sup>。2009年Capyk等对肺结核分枝杆菌的KSH进行了研究,获得KshA的晶体结构,并对该酶的催化机制进行了分析<sup>[19]</sup>。而非致病性分枝杆菌,由于具有较强的甾醇转化能力,早已被广泛应用于甾体药物的生产之中<sup>[18,20-22]</sup>。因此,对具有甾体药物转化能力非致病性分枝杆菌关键酶KSH的研究,有助于开发相应的甾体药物基因工程生产菌株。

本实验室以从土壤中筛选出的具备甾醇降解能力的 *Mycobacterium* sp. NwIB-01 为出发菌株,为研究其关键酶基因 *ksh*, 对该菌的KshA进行了基因克隆、异源表达与分离纯化等相关工作,首次揭示了非致病性分枝杆菌KshA的一些性质,为进一步利用基因工程手段改造分枝杆菌菌株,提高其转化甾醇的能力从而制备甾体药物奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

分枝杆菌 NwIB-01(武汉中国典型培养物保藏中心 保藏编号 CCTCC M 209094)为本实验室从土壤中筛选并保存。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)及质粒 pET-22b(+), pET-28a(+), pET-32a-c(+)均购自 Novagen 公司。

## 1.2 培养基和主要试剂

分枝杆菌 MYC/01 培养基( $K_2HPO_4$  0.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g,  $NH_4NO_3$  2 g, 柠檬酸铁铵 0.05 g, 柠檬酸 2 g, 甘油 20 g, 加水至 1000 mL, pH 7.5)。大肠杆菌 LB 培养基(Tryptone 10 g, Yeast Extract 5 g, NaCl 10 g, 加水至 1000 mL, 若配置固体培养基, 再加入 15 g 琼脂)。限制性内切酶、LA Taq 酶、T4 DNA 连接酶、pMD19-T Simple Vector、Genome Walking Kit 均购自 TaKaRa 公司。Plasmid Miniprep Kit、DNA Gel Extraction Kit、PCR Cleanup Kit 均购自爱思进生物技术(杭州)有限公司。引物均由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

## 1.3 模板制备

从培养了 36 h 的摇瓶中取 1.5 mL 分枝杆菌菌液, 10 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 沉淀用 1.5 mL 4% NaOH 重悬浮, 37°C 水浴振荡 30 min, 然后 10 000 r/min 离心 1 min, 弃上清。用去离子水洗涤 2 次, 离心弃上清, 加入 600  $\mu$ L TE 缓冲液, 沸水浴加热 10 min 后立即将离心管静置于 -20°C 冰箱中 30 min。加入 40  $\mu$ L (20 mg/mL) 溶菌酶, 37°C 水浴振荡 120 min, 加入蛋白酶 K 和 SDS 至终浓度分别为 250  $\mu$ g/mL 和 1%, 并提高水浴温度至 65°C, 振荡 30 min, 加入 CETAB 和 NaCl 至终浓度为 1%, 再置于 65°C 水浴中 20 min。用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, V/V/V)沉淀蛋白质, 并用 2 倍体积的乙醇沉淀, 离心得 *Mycobacterium* sp. NwIB-01 基因组。

## 1.4 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶基因保守序列的获得

进行基因鉴定研究时, 分枝杆菌中的 KSH 基因均未见报道, 因此本实验利用 2002 年报道的

*R. erythropolis* SQ1 的 KSH 序列(GenBank Accession No. AY083508.1), 分别对以下 3 株已经全基因组测序的分枝杆菌(*Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1、*Mycobacterium smegmatis* str. MC<sup>2</sup> 155、*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra)进行序列比对, 从各自基因组序列中都找到同源性很高的相关基因, 序列号分别为: GenBank Accession No. CP000511.1、GenBank Accession No. CP000480.1、GenBank Accession No. CP000611.1。这 3 个保守性的基因序列可能是分枝杆菌中负责编码 KSH 的基因。将上述 4 个基因序列进行比对(比对结果见图 1), 根据保守区的同源序列设计简并引物 KSH-1: 5'-TGCCCGTTCCACGACTG-3'和 KSH-2: 5'-CAGCAGCGGRTTGTTCGAT-3', 以上述方法提取的全基因组 DNA 为模板, 利用降落及热不均 PCR 扩增分枝杆菌 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶基因的保守序列。反应体系: 模板 DNA 2  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR Buffer 2  $\mu$ L, 25 mmol/L  $MgCl_2$  1.6  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 1.6  $\mu$ L, 引物(20  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶 1 U, 补水至总体积 20  $\mu$ L。反应条件: 95°C 变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 56°C 复性 30 s, 72°C 延伸 60 s, 30 个循环; 72°C 保温 10 min。

## 1.5 全长 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶基因的获得

根据保守序列分别设计染色体步移引物: up-1: 5'-CCCTCGTGGTCATGCCAGACGAAGAGCAG-3'和 up-2: 5'-GCCACTACCCGGTCAGTCAGGACTCCTT-3'; 用于扩增保守序列的上游片段; down-1: 5'-CGCATACTGCGCCAACTGCCGTTTTGTAG-3'和 down-2: 5'-CGGCTTGCCGTCGAGGTAGTCCTTAC-3'; 用于扩增保守序列的下游片段。分别用粘性

<i>M. vanbaalenii</i> (262)	GCGACGAGGTCGCCTGCCCGTTCCACGACTGGCGCTGGGGCGGCG
<i>M. smegmatis</i> (250)	GCGACGAGGTCGCCTGCCCGTTCCACGACTGGCGCTGGGGCGGCG
<i>M. tuberculosis</i> (256)	GCGACGAGGTCGCCTGCCCGTTCCACGACTGGCGCTGGGGTGGCG
<i>R. erythropolis</i> (298)	GCGATTCGATCGCCTGCCCGTTCCACGACTGGCGTTGGGGCGGTA
Consensus	TGCCCGTTCCACGACTG
<i>M. vanbaalenii</i> (946)	AGCACAAAGACCCGCAATCGACAATCCGCTGCTGGTGGAGGAGGACG
<i>M. smegmatis</i> (934)	AGCACAAAACCCGCAATCGACAATCCGCTGCTGGTGGAGGAGGACG
<i>M. tuberculosis</i> (940)	AGCACAAAGACCCGCAATCGACAATCCGCTGCTGGTGGAGGAGGACG
<i>R. erythropolis</i> (982)	AGAACAAAGGCCCGCAATCGACAATCCGCTGCTTGGAGGAGGACG
Consensus	ATCGACAARCCGCTGCTG

图 1 四种已经报道的 *ksh* 核苷酸序列部分比对结果

Fig. 1 Comparison of four reported *ksh* genes from different resources.

末端 DNA 内切酶(*Eco*R I、*Hind* III、*Sau*3 AI 和 *Pst* I) 将基因组消化并分别纯化, 将纯化的片段分别与相应接头 Cassette(*Eco*R I Cassette、*Hind* III Cassette、*Sau*3 AI Cassette 和 *Pst* I Cassette)连接, 即得 4 种 Genome Walker Libraries, 以其为模板采用巢式和嵌套 PCR 得到保守序列的上、下游片段, 拼接后得全长基因。将所获得的全长序列用 NCBI 提供的序列提交工具 BankIt(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/nph-bankit.cgi>)登录 GenBank。

## 1.6 进化树分析

运用 GenBank 中的 ORF finder 将测序得到的 DNA 序列翻译成氨基酸序列, 利用 NCBI 数据库上的 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 程序对核酸和蛋白序列进行比对。根据测序和比对结果, 以 Clustal 算法, 利用 Phylip 软件包(seqboot、dnamlk、consense 和 treeview 软件)进行进化树的构建及分析。

## 1.7 重组质粒的构建

根据 KSH 基因全长序列, 设计扩增引物 KSH-Q: 5'-CGCCCATGGCCGTGACTACCGAGACAG-3' (下划线部分为 *Nco* I 酶切位点)和 KSH-H: 5'-CGAAGCTTTCAGCTCGGCTGCGCGGACT-3' (下划线部分为 *Hind* III 酶切位点)。以上述方法提取的分枝杆菌全基因组 DNA 为模板, 以 KSH-Q 和 KSH-H 为引物, 进行 PCR 扩增, 反应条件如下: 95°C 变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 56°C 复性 30 s, 72°C 延伸 90 s, 扩增反应 30 个循环; 72°C 保温 10 min。

PCR 产物和提取的质粒 pET-32a-c(+)分别用 *Nco* I、*Hind* III 进行双酶切, 酶切产物经纯化回收(回收大片段)后, 用 T4 DNA 连接酶于 16°C 连接过夜, 转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 中, 对阳性克隆分别用 PCR 和双酶切法进行验证, 并挑取阳性转化子进行测序。再将验证完全正确的阳性转化子的质粒转入宿主菌 BL21(DE3)中, 获得生产 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶的基因工程菌。

## 1.8 重组 pET32-*ksh* 的诱导表达

将构建好的工程菌 BL21/pET32-*ksh* 和对照菌 BL21/pET32 分别接种于 10 mL 含有 75  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37°C、200 r/min 培养过

夜, 按 1%接种量转接于装有 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中继续培养 1 h, 菌体浓度  $OD_{600}$  约为 0.6 时加入 IPTG(终浓度为 0.2 mmol/L), 30°C、150 r/min 诱导表达。在诱导的不同时间点(例如 2 h、4 h、6 h、8 h)取样, 离心收集菌体, 冰浴超声破碎菌体, 冷冻离心, 取上清液用于 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达情况。

## 1.9 表达蛋白的分离纯化

将大量培养获得的 BL21/pET32-*ksh* 菌体反复冻融、冰浴超声破碎, 10 000 r/min、4°C 离心 10 min, 收集上清, 获得粗酶液, 然后用 Ni<sup>2+</sup> 亲和层析柱纯化, 获得纯酶。具体方法如下: His-蛋白质镍亲和层析树脂柱先用平衡缓冲液(50 mmol/L Sodium Phosphate pH 8.0, 0.3 mol/L Sodium Chloride, 10 mmol/L Imidazole)平衡, 然后上样, 流速控制在 0.4~1.0 mL/min, 再用 15 个柱体积的平衡缓冲液洗涤, 依次用含不同浓度咪唑(例如 50 mmol/L、200 mmol/L、300 mmol/L、500 mmol/L)的洗脱液梯度洗脱, 收集各个样品用于 SDS-PAGE 验证目的蛋白纯化效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶基因(*ksh*)的获得

以提取的分枝杆菌 NwIB-01 全基因组 DNA 为模板, 利用降落和热不均衡 PCR 获得了部分 *ksh* 序列, 扩增出的目的条带如图 2 所示。回收 500~800 bp 目的片段, 并将其克隆至载体 pMD19-T Simple 中测序, 测序结果显示 PCR 产物为 702 bp, 经比对确认与已知 *ksh* 的保守序列具有较高的相似性, 符合预期。基于所获基因片段, 合成用于扩增全长 *ksh* 的染色体步移引物, 采用巢式和嵌套 PCR, 分别克隆得到了该基因片段的上、下游序列。拼接所获基因序列, 并经核苷酸序列测定, 得到了大小为 1798 bp 的基因序列, 其中包含了长度为 1188 bp 的基因阅读框, 命名为 *M.S.-ksh*。该基因经过注释提交 GenBank 数据库, 序列登录号为 GQ476982, 推测编码的蛋白质为 395 aa, 分子量为 45340.2 Da, 理论等电点为 4.99。

### 2.2 进化树分析

运用 GenBank 中的 ORF finder 将测序得到的

DNA 序列翻译成氨基酸序列,再用 BLAST 程序对核酸和蛋白序列进行比对。根据测序和比对结果,以 Phylip 软件(Clustal 算法)进行进化树分析,结果如图 3 所示。扩增所得基因 *M.S.-ksh* 为新的 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶基因,与已报道 *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155<sup>[18]</sup> KSH 的核苷酸序列一致性为 85%,与 *Rhodococcus rhodochrous* DSM(43269) KSH 的核苷酸序列一致性为 71%,与 *Rhodococcus erythropolis* SQ1<sup>[8]</sup> KSH 的核苷酸序列一致性为 70%。

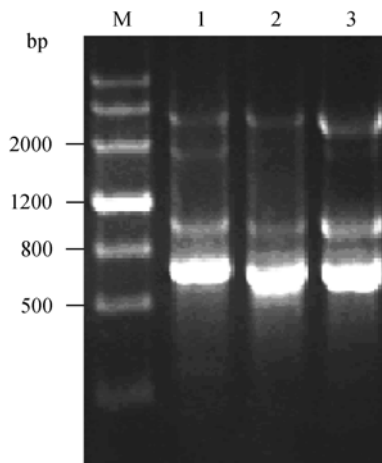


图 2 保守序列的琼脂糖电泳分析  
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of conservative sequence. 1-3: conservative sequence; M: DNA marker.

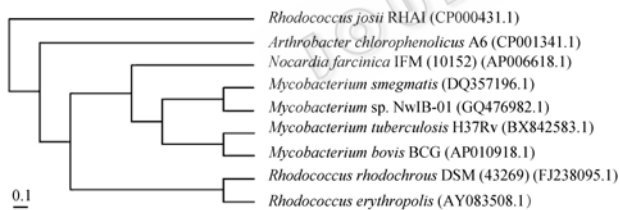


图 3 Clustal 算法构建的 KSH 进化树  
Fig. 3 Phylogenetic tree of KSH registered in GenBank through the clustal alignment method.

	Rieske[2Fe-2S]domain				Non-haem Fe(II) domain				
	C	H	C	H	D	D	H	H	
KSH	63	GYCRHMGGNLAQGTIKGDTVACPFH	DWRWGGDG	95	171	I	D	NVTDMAHFFFYIH	184
M.s. 9 $\alpha$ -hydroxylase	63	AYCRHMGGDLSEGTVKGDVACPFH	DWRWGGDG	95	171	I	D	NVTDMAHFFFYIH	184
Rv3526	65	GYCRHMGGDLSEGTVKGDVACPFH	DWRWGGDG	97	173	I	D	NVTDMAHFFFYIH	186
R.e.KshA	78	AYCRHMGGNLAQGTIKGDSIACPFH	DWRWGGNG	110	186	V	D	NVVDMAHFFFYVH	199
R.r.KshA	65	AYCRHMGGNLAQGTIKGDTIACPFH	DWRWNGQG	97	173	V	D	NVVDMAHFFFYVH	186

图 4 *M.S.-KSH* 与已知末端加氧酶铁硫蛋白结合域和非铁血红素结合域的同源性比对  
Fig. 4 Identification of a Rieske [2Fe-2S] domain and a non-haem Fe(II) domain in the KSH by alignment with known class IA terminal oxygenases. KSH: KSH in *Mycobacterium* sp. NwIB-01; M.s.9 $\alpha$ -hydroxylase: terminal oxygenase of 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155; Rv 3526: putative terminal oxygenase of 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase in *M. tuberculosis* H37Rv; R.e.KshA: terminal oxygenase of 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase in *R. erythropolis* SQ1; R.r.KshA: terminal oxygenase of 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase in *R. rhodochrous* DSM (43269).

蛋白序列的同源分析显示(图 4),分枝杆菌 NwIB-01 KSH 与 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155、*M. tuberculosis* H37Rv、*R. erythropolis* SQ1、*R. rhodochrous* DSM (43269) 的 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶同源性较高,且都含有末端单加氧酶的两个典型保守结构域,分别为铁硫蛋白结合域(C-X-H-X<sub>16</sub>-C-X<sub>2</sub>-H)和非铁血红素结合域(D/E-X<sub>3</sub>-D-X<sub>2</sub>-H-X<sub>4</sub>-H),由此进一步证实了 *M.S.-KSH* 是一个新的 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶,并且属于末端单加氧酶 IA 家族。

2.3 重组质粒的构建及转化

根据 *M.S.-ksh* 全长序列设计并合成扩增引物,以提取的分枝杆菌 NwIB-01 全基因组 DNA 为模板,扩增出的目的条带如图 5 所示,回收大小为 1188 bp 的片段。

将 PCR 扩增得到的目的基因 *M.S.-ksh* 和提取的质粒 pET-32a-c(+)分别用 *Nco* I、*Hind* III 进行双酶切,酶切产物经纯化回收(回收大片段)后,用 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,从 Amp<sup>r</sup> 平板上随机挑选可能的 pET32-*ksh* 阳性重组子,提取质粒,分别用 *Hind* III 和 *Nco* I-*Hind* III 进行单酶切/双酶切。琼脂糖电泳检测酶切结果如图 6A 所示,双酶切产生与目的基因大小一致的条带(1188 bp),由此可初步断定该重组子质粒中带有目的基因 *ksh*。

以经过鉴定的重组子的质粒为模板,进行 PCR 扩增,由图 6B 可以看出所检测的重组子扩增出的条带均符合预期值。据此可以得出结论,目的基因成功与 pET-32a-c(+)连接并转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  内。提取验证正确的阳性转化子的质粒转化宿主菌 BL21(DE3),获得生产 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶的基因工程菌。

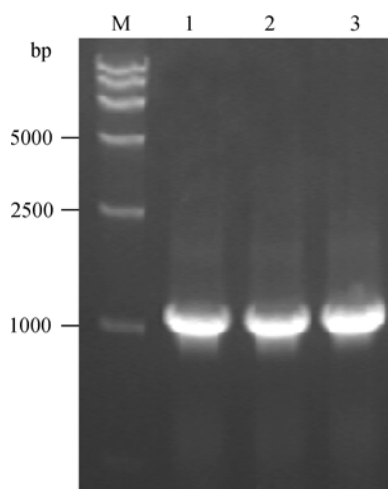


图5 *ksh* 全长基因 PCR 的琼脂糖电泳分析

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis analysis of full-length *ksh* gene. 1–3: Full-length gene; M: DNA marker DL15000.

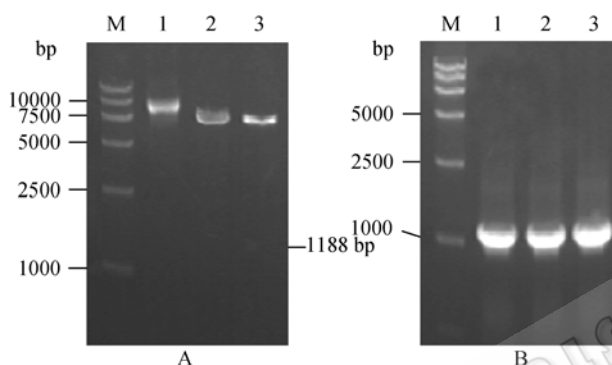


图6 pET32-*ksh* 阳性克隆的酶切(A)和 PCR(B)鉴定琼脂糖电泳分析

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis analysis of pET32-*ksh* positive clone treated with restriction endonuclease (A) and PCR identification (B). (A) 1: pET32-*ksh*; 2: pET32-*ksh* digested by *Hind* ; 3: pET32-*ksh* digested by *Hind* III and *Nco* I; M: DNA marker DL15000. (B) 1–3: PCR product; M: DNA marker DL15000.

## 2.4 KSH 的诱导表达

将构建好的工程菌株 BL21/pET32-*ksh* 按材料与方法中的方法进行诱导, 然后通过 SDS-PAGE(分离胶浓度为 15%, 浓缩胶浓度为 5%)检测目的蛋白的表达情况, 结果如图 7 所示, *M.S.*-KSH 蛋白表达量较高, 约占菌体总蛋白的 30%, 且主要为可溶性表达, 可在 43 kD 附近看到清晰的条带, 与预期的 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶大小(45340.2 Da)吻合, 随着诱导时间的延长, 蛋白表达量不断提高。

## 2.5 表达蛋白的纯化

将大量培养获得的 BL21/pET32-*ksh* 菌体反复冻

融、冰浴超声破碎, 高速冷冻离心收集上清, 获得粗酶液, 然后用  $\text{Ni}^{2+}$  亲和层析柱纯化, 收集经 His-蛋白质镍亲和层析树脂柱纯化后的样品, 通过 SDS-PAGE 验证目的蛋白纯化效果, 结果如图 8 所示, 在 43 kD 附近有一特异条带, 与目的蛋白理论推算的相对分子量(约 45.3 kD)相符, 且纯度达 90%以上。

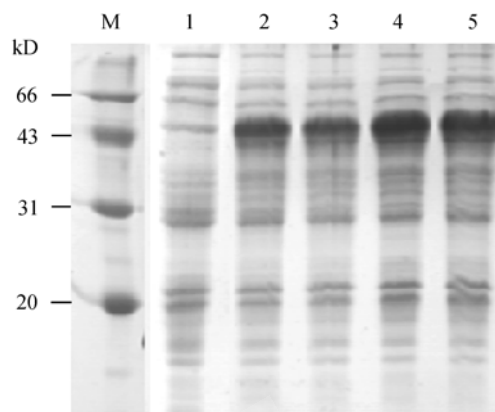


图7 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of recombinant protein. 1: BL21/pET32-*ksh* before induction; 2: cells after induction 4 h; 3: supernatant fraction after induction 4 h; 4: cells after induction 6 h; 5: supernatant fraction after induction 6 h; M: protein marker.

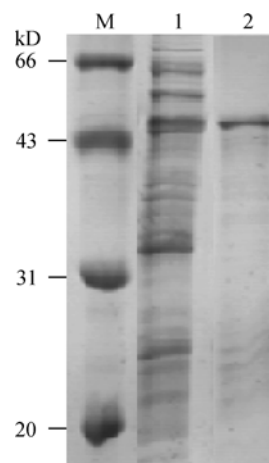


图8 重组蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of purity of recombinant protein. 1: total insoluble protein; 2: purified protein; M: protein marker.

## 3 讨论

本实验室从自行筛选的菌株 NwIB-01(CCTCCM 209094)中克隆出一个全新的分枝杆菌 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶基因——*M.S.*-*ksh*。其序列与已报道 *R. erythropolis* SQ1<sup>[8]</sup>中 KSH(为最早报道的 KSH)的核苷酸序列一致性为 70%, 与 2006 年报道的 *M.*

*smegmatis* mc<sup>2</sup>155<sup>[18]</sup> 中 KSH(为最早报道分枝杆菌中的 KSH)的核苷酸序列一致性为 85%。为实现 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶的异源表达, 相继选用了 pET-22b(+), pET-28a(+), 和 pET-32a-c(+)作为载体, 并考虑到后续蛋白纯化操作, 分别加上 His-Tag, 共构建了 3 个重组质粒, 依次为 pET22b-*ksh*/His-Tag、pET28a-*ksh*/His-Tag 和 pET32a-*ksh*/His-Tag, 并转化大肠杆菌 BL21(DE3)。结果表明: pET22b-*ksh*/His-Tag 的蛋白表达量很低; pET28a-*ksh*/His-Tag 的蛋白表达情况有所改善, 但是利用 Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱得不到纯化的目的蛋白; pET32a-*ksh*/His-Tag 的蛋白表达情况较好, 目的蛋白主要为可溶性表达, 表达量占菌体总蛋白的 30%以上, 且表达产物经 Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱纯化后, 纯度达 90%以上。

KSH 是一个双组分的酶<sup>[8]</sup>, 由 KshA 和 KshB 组成(其中 KshB 为 KshA 的还原酶组分), 分别由基因 *kshA* 和 *kshB* 编码。KshA 是起 9 $\alpha$ -羟基化主体作用的酶, 而 KshB 为铁氧还蛋白还原酶, 对 KshA 起还原和电子循环传递作用。对 *R. erythropolis* SQ1 所进行的基因敲除研究表明, *kshA* 和 *kshB* 都是 KSH 显示催化活性所必需的组分<sup>[8]</sup>。扩增所得的 *M.S.-ksh* 实为 *kshA*, NwIB-01 中原生的 *kshB* 还未被克隆到。有报道称<sup>[18]</sup>, 分枝杆菌 KshA 可以利用大肠杆菌本身的还原酶体系完成电子链传递实现甾核 9 $\alpha$ -羟基化反应。但由于 KSH 酶活测定体系较为复杂, 目前尚没有办法对酶活进行定量测定<sup>[8,18]</sup>。本研究用构建的大肠杆菌基因工程菌 BL21/pET32-*ksh* 细胞胞浆, 加入底物 AD 孵育后, 经液质联用(LC-MS)分析显示有分子量 Mr302.42(Mr<sub>AD</sub>=286.42)的物质产生, 且与标品出峰时间及分子量一致, 此结果说明异源表达的 *M.S.-KSH* 也可以利用大肠杆菌中还原酶系统实现底物 AD 的 9 $\alpha$ -羟基化, 但由于大肠杆菌中还原酶对 *M.S.-KSH* 的电子传递能力远不如原生 KshB, 因此 9 $\alpha$ -羟基化能力较弱。而且 KshA 经纯化后失去电子传递链供体而极易失活<sup>[18,22]</sup>, 故无法进行相关酶活动力学研究。

本实验室现在正着手于分枝杆菌 NwIB-01 *kshB* 的基因克隆, 以实现 *kshA* 和 *kshB* 的共表达, 从而对 KSH 进行酶活测定和相关生化特性的研究, 并希望

能够获得 KSH 的晶体结构, 研究其催化机理, 为最终可以利用基因工程菌株进行工业化生产甾体药物奠定基础。

## REFERENCES

- [1] Kieslich K. Microbial side-chain degradation of sterols. *J Basic Microbiol*, 1985, **25**(7): 461-474.
- [2] Marsheck WJ, Kraychy S, Muir RD. Microbial degradation of sterols. *Appl Environ Microbiol*, 1972, **23**(1): 72-77.
- [3] Wovcha MG, Antosz FJ, Knight JC, et al. Bioconversion of sitosterol to useful steroidal intermediates by mutants of *Mycobacterium fortuitum*. *Biochim Biophys Acta*, 1978, **531**(3): 308-321.
- [4] Itagaki E, Hatta T, Wakabayashi T, et al. Spectral properties of 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Nocardia corallina*. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1040**(2): 281-286.
- [5] Vezina C, Sehgal SN, Singh K, et al. Microbial aromatization of steroids. *Prog Ind Microbiol*, 1971, **10**: 1-47.
- [6] Peterson DH, Murray HC. Microbial oxygenation of steroids at carbon 11. *J Am Chem Soc*, 1952, **74**(7): 1871-1872.
- [7] Akhrem AA, Titov A. Steroidy i Mikroorganizmy //Steroids and Microorganisms. *Nauka*, 1970: 526.
- [8] van der Geize R, Hessels GI, Van Gerwen R, et al. Molecular and functional characterization of *kshA* and *kshB*, encoding two components of 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase, a class IA monooxygenase, in *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. *Mol Microbiol*, 2002, **45**(4): 1007-1018.
- [9] van der Geize R, Hessels GI, Van Gerwen R, et al. Targeted disruption of the *kstD* gene encoding a 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase isoenzyme of *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(5): 2029-2036.
- [10] van der Geize R, Hessels GI, Dijkhuizen L. Molecular and functional characterization of *kshA* and *kshB*, encoding two components of 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase, a class IA monooxygenase, in *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. *Microbiology*, 2002, **148**: 3285-3292.
- [11] van der Geize R, Dijkhuizen L. Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Curr Opin Microbiol*, 2004, **7**(3): 255-261.
- [12] Finnerty WR. The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annu Rev Microbiol*, 1992, **46**: 193-218.
- [13] Larkin MJ, Kulakov LA, Allen CC. Biodegradation and *Rhodococcus*-masters of catabolic versatility. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, **16**(3): 282-290.

- [14] McLeod MP, Warren RL, Hsiao WW, *et al.* The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(42): 15582–15587.
- [15] van der Geize R, Hessels GI, Nienhuis-Kuiper M, *et al.* Characterization of a second *Rhodococcus erythropolis* SQ1 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase activity comprising a terminal oxygenase homologue, KshA2, active with oxygenase-reductase component KshB. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(23): 7197–7203.
- [16] Batie CJ, Ballou DP, Correll CJ. Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases. *Chem Biochem Flavoenzymes*, 1991, **3**: 543–556.
- [17] Petrusma M, Dijkhuizen L, van der Geize R. *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43269 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase, a two-component iron-sulfur-containing monooxygenase with subtle steroid substrate specificity. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**(16): 5300–5307.
- [18] Andor A, Jekkel A, Hopwood DA, *et al.* Generation of useful insertionally blocked sterol degradation pathway mutants of fast-growing mycobacteria and cloning, characterization, and expression of the terminal oxygenase of the 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase in *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(10): 6554–6559.
- [19] Cpyk JK, Angelo ID, Strynadka NC, *et al.* Characterization of 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase, a Rieske oxygenase in the cholesterol degradation pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 2009, **284**(15): 9937–9946.
- [20] Voishvillo NE, Turuta AM, Kamemitskii AV, *et al.* Microbiological transformations of 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -H-pregnanes to their  $\Delta^4$ -3-keto-9 $\alpha$ -hydroxy derivatives. *Khim-Farm Zh*, 1992, **26**: 64–68.
- [21] Brzostek A, S'liwin'ski T, Rumijowska-Galevicz A, *et al.* Identification and targeted disruption of the gene encoding the main 3-ketosteroid dehydrogenase in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*, 2005, **151**(7): 2393–2402.
- [22] Arnell R, Johannisson R, Lindholm J, *et al.* Biotechnological approach to the synthesis of 9 $\alpha$ -hydroxylated steroids. *Prep Biochem Biotechnol*, 2007, **37**(4): 309–321.

JOURNALS.IM.AC.CN