

3-甾酮-9 α -羟基化酶基因在分枝杆菌中的异源表达与 9 α -羟基雄烯二酮的制备

袁家代*, 陈贵英*, 程世君, 葛方兰, 王琼, 李维, 李江

四川师范大学生命科学学院, 四川 成都 610068

袁家代, 陈贵英, 程世君, 等. 3-甾酮-9 α -羟基化酶基因在分枝杆菌中的异源表达与 9 α -羟基雄烯二酮的制备. 生物工程学报, 2015, 31(4): 523–533.

Yuan JD, Chen GY, Cheng SJ, et al. Accumulation of 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione by co-expressing *kshA* and *kshB* encoding component of 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase in *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805. Chin J Biotech, 2015, 31(4): 523–533.

摘要: 9 α -羟基雄烯二酮 (9-OH-AD) 是制备甾体类药物的重要中间产物。3-甾酮-9 α -羟基化酶 (KSH) 能够转化雄烯二酮 (AD) 产生 9 α -羟基雄烯二酮 (9-OH-AD), 该酶由 *KshA* 和 *KshB* 两个亚基构成。为获得高效积累 9-OH-AD 的重组菌株, 本研究选择耻垢分枝杆菌 *Mycobacterium smegmatis* mc²155 和戈登氏菌 *Gordonia neofelifaecis* NRRL B-59395, 对其在胆固醇为唯一碳源条件下表达明显上调的 *kshA* 和 *kshB* 候选基因进行克隆, 插入到分枝杆菌表达载体 pNIT 中, 构建共表达质粒, 并将它们导入分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 中, 获得重组菌株。利用重组菌株分别对植物甾醇、胆固醇和谷甾醇进行生物转化, 分离纯化转化产物, 采用光谱学方法鉴定其化学结构, 确定该转化产物为 9 α -羟基雄烯二酮, 说明分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 由积累雄烯二酮变为积累 9 α -羟基雄烯二酮 (9-OH-AD), 进而证明导入的候选基因 *kshA* 和 *kshB* 确实为有功能的基因。生物转化实验表明, 与胆固醇、谷甾醇相比, 植物甾醇作为底物更易于转化; 而来源于耻垢分枝杆菌的 *kshA*、*kshB* 构建的重组菌转化率更高, 可达 90%, 具有较高的应用价值。本研究通过对 KSH 编码基因的异源表达, 成功地进行了分枝杆菌生物转化特性的改造, 为探索各种甾体药物中间体的工业生产奠定了基础。

关键词: 分枝杆菌 NRRL B-3805, 9 α -羟基雄烯二酮, 3-甾酮-9 α -羟基化酶, 异源表达, 生物转化

Received: August 12, 2014; **Accepted:** November 15, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31271332), Sichuan Provincial Science & Technology Department (Nos. 2009JY0067, 2012SZ0074), Sichuan Provincial Department of Education (No. 13ZA0145), Sichuan Normal University (No. 2013-12).

Corresponding author: Wei Li. Tel: +86-28-84480654; E-mail: weelee201@aliyun.com

*These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (No. 31271332), 四川省科技厅项目 (Nos. 2009JY0067, 2012SZ0074), 四川省教育厅项目 (No. 13ZA0145), 四川师范大学校级重点科研基金 (No. 2013-12) 资助。

Accumulation of 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione by co-expressing *kshA* and *kshB* encoding component of 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase in *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805

Jiadao Yuan*, Guiying Chen*, Shijun Cheng, Fanglan Ge, Wang Qiong, Wei Li, and Jiang Li

College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610068, Sichuan, China

Abstract: 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione (9-OH-AD) is an important intermediate in the steroidal drugs production. 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase (KSH), a two protein system of KshA and KshB, is a key-enzyme in the microbial steroid ring B-opening pathway. KSH catalyzes the transformation of 4-androstene-3,17-dione (AD) into 9-OH-AD specifically. In the present study, the putative KshA and KshB genes were cloned from *Mycobacterium smegmatis* mc²155 and *Gordonia neofelifaecis* NRRL B-59395 respectively, and were inserted into the expression vector pNIT, the co-expression plasmids of *kshA-kshB* were obtained and electroporated into *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 cells. The recombinants were used to transform steroids, the main product was characterized as 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione (9-OH-AD), showing that *kshA* and *kshB* were expressed successfully. Different from the original strain *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 that accumulates 4-androstene-3,17-dione, the recombinants accumulate 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione as the main product. This result indicates that the putative genes *kshA*, *kshB* encode active KshA and KshB, respectively. The process of biotransformation was investigated and the results show that phytosterol is the most suitable substrate for biotransformation, *kshA* and *kshB* from *M. smegmatis* mc²155 seemed to exhibit high activity, because the resultant recombinant of them catalyzed the biotransformation of phytosterol to 9-OH-AD in a percent conversion of 90%, which was much higher than that of *G. neofelifaecis* NRRL B-59395. This study on the manipulation of the *ksh* genes in *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 provides a new pathway for producing steroid medicines.

Keywords: *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805, 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione, 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase, heterologous expression, biotransformation

甾醇化合物又称固醇，为细胞膜的重要组成部分，广泛存在于动植物体内，它们种类繁多，资源极为丰富，但多作为工农业生产中的副产物而被废弃，未能得到有效利用。从上世纪 50 年代以来，微生物降解植物甾醇和胆固醇而制备甾体药物重要中间体的研究逐渐受到人们广泛关注，微生物转化被认为是取代传统工业中化学分解方法生产甾体类药物的重要途径^[1]。研究表明，甾醇化合物经微生物细胞吸收进入

胞内，通过类似 β -氧化的循环途径降解甾醇的侧链，获得雄烯二酮 (AD)，后者经过各种转化修饰，可以进一步合成睾酮、雌二醇、炔雌醇、睾酮内酯、可的松、皮质醇、泼尼松等多种重要的类固醇衍生物。但多数甾醇降解菌株如马红球菌、诺卡氏菌等能彻底分解甾醇化合物而无法积累上述甾体药物中间体。

3-甾酮-9 α -羟基化酶 (KSH) 是甾体微生物转化中的一个关键酶^[2]，它可在 AD(D) 多元环

的第 9 位引入一个羟基 (9 α -OH), 将 AD(D) 转化为 9-OH-AD(D)^[3]。9-OH-AD 在化学结构上由于 9 α -羟基的存在, 可利用化学方法形成 C_{9,11}-双键体系, 进而在 C₉-位引入一个卤族原子, 同时在 C₁₁ β -位上形成重要的功能羟基, 该中间体可进一步合成糖皮质激素抗炎药和高效含卤(氟, 氯)的皮质激素。该工艺流程的实现可根本解决目前工业生产中存在的 C₁₁ α -羟基化转化率低、副产物多的问题, 具有极高的商业价值^[4]。

3-甾酮-9 α -羟基化酶广泛存在于甾醇化合物降解菌中, 属于单加氧酶 IA 家族, 由 *kshA* 编码的 Rieske 型加氧酶和 *kshB* 编码的还原酶两个亚基构成^[5]。2002 年, van der Geize 等首先对红平红球菌 *Rhodococcus erythropolis* SQ1 的 3-甾酮-9 α -羟基化酶编码基因 *kshA* 和 *kshB* 进行了分子鉴定^[2]。2006 年, Andor 等发现了耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc²155 中的 *kshA* 基因并获得异源表达^[6]。2009 年, Petrusma 等在大肠杆菌中表达了来自紫红红球菌 *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43269 的 *kshA* 和 *kshB* 基因, 并证明 *kshB* 将来自 NADH 的还原力传递给 *kshA*, 后者催化底物的羟基化反应^[7]。2009 年, 范书玥等对分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NwIB-01 中的 *kshA* 进行了异源表达和表达蛋白的纯化^[8]。2011 年, van der Geize 所在课题组分析了存在于紫红红球菌 *R. rhodochrous* DSM 43269 基因组中的 5 个 *kshA* 基因产物的酶学特性^[9]。

本研究在戈登氏菌 *G. neofelifaecis* NRRL B-59395 和耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc² 155 的转录组测序的基础上, 克隆受胆固醇诱导的 *ksh* 候选基因, 构建 *kshA* 和 *kshB* 基因共表达质粒, 将其导入甾醇转化的模式菌-分枝杆菌

Mycobacterium sp. NRRL B-3805, 构建了 *kshA* 和 *kshB* 基因共表达的重组菌, 并利用该重组菌转化甾醇化合物, 制备获得了 9-OH-AD。本研究成功利用基因工程手段对甾醇转化模式菌株的 3-甾酮-9 α -羟基化酶基因进行改造, 为甾体药物中间体 9 α -雄烯二酮的工业生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

戈登氏菌 *G. neofelifaecis* NRRL B-59395 为胆固醇高效降解菌, 由本实验室从肉食动物肠道中分离获得^[10]; 耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc²155、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805, 均保存于本实验室。分枝杆菌表达质粒 pNIT 由 Christopher M. Sassetia 教授 (University of Massachusetts Medical School) 构建、西南大学谢建平教授转赠。

1.2 培养基和主要试剂

基础培养基: MgSO₄·7H₂O 0.25 g, NH₄NO₃ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.25 g, FeSO₄·7H₂O 1.0 mg, 酵母粉 5 g, 葡萄糖 1 g, 加水至 1 000 mL, pH 调为 7.2。

大肠杆菌 LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 氯化钠 10 g, 琼脂粉 10 g, 加水至 1 000 mL。

限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司; 卡那霉素购自 Amresco 公司。

1.3 DNA 的常规操作方法

质粒提取、DNA 限制性酶切、DNA 片段连接以及大肠杆菌的转化等分子生物学常规操作

方法参照分子克隆实验指南^[11]以及相关产品说明书。

1.4 总 DNA 的提取

戈登氏菌 *G. neofelifaecis* NRRL B-59395 和耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc²155 的总 DNA 提取方法参照文献^[12]。

1.5 目的 DNA 片段的 PCR 扩增

本研究所用引物如表 1 所示,由北京华大基因服务技术有限公司合成。PCR 反应体系 (50 μ L): 模板 1 μ L,上下引物各 0.5 μ L,10 \times 缓冲液 5 μ L, *Taq* 酶 0.6 μ L, MgCl₂ 3 μ L, 加水补足 50 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 扩增反应 36 个循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 52 $^{\circ}$ C 复性 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min), 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。

1.6 分枝杆菌电转化感受态细胞的制作

分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 电转化感受态细胞的制作参照文献^[13]。

1.7 分枝杆菌的电转化

取 100 μ L 分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 感受态细胞与 2 μ L 重组质粒混

匀,冰上放置 30 min,吸取感受态细胞与质粒混合液垂直加入电转杯中,设定电压为 2 500 V 进行电转化,吸出转化混合液,加入 500 μ L 液体基础培养基,于 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下恢复培养 3 h 后,5 000 r/min 离心 2 min,倒掉培养液,用 100 μ L 无菌水重悬细胞,将其涂布于含 20 μ g/mL 卡那霉素的基础培养基平板上,28 $^{\circ}$ C 倒置培养 8–10 d,统计菌落数。挑取平板上长出的抗性单菌落进行 PCR 快速鉴定^[14]。

1.8 转化产物化学结构的鉴定

转化产物经分离纯化后,采用 ¹³C NMR、¹H NMR、高分辨质谱、红外光谱进行分析,鉴定其结构,得到的波谱数据如下: TOF-MS m/z 303 [M+H]⁺; IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3304,1735,1655; ¹³C NMR (CDCl₃,400 MHz) δ : 29.2(C-1), 33.4(C-2), 180.36(C-3), 125.1(C-4), 172.0(C-5), 31.6(C-6), 23.0(C-7), 35.8(C-8), 76.1(C-9), 37.1(C-10), 26.8(C-11), 28.2(C-12), 44.2(C-13), 42.0(C-14), 21.1(C-15), 35.3(C-16), 200.8(C-17), 11.8(C-18), 18.9(C-19)。 ¹H NMR (CDCl₃) 0.93(3H,s,H-18), 1.38(3H,s,H-19), 2.03 (1H,ddd,H-8), 6.05 (1H,s,H-4)。

表 1 本研究中所用引物

Table 1 PCR primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
MSMEG_5925-F	ACTCATATGGCTACCGAGACTGTCGG (the underline indicates <i>Nde</i> I)	26
MSMEG_5925-R	AGCGAATTCAGCTCGACTGCTCCGCCTTC (the underline indicates <i>EcoR</i> I)	29
MSMEG_6039-F	CTAGAATTCGGAGGAATCACTTCGCAATGGTGACTGATGAGCCCCTGG (the underline indicates <i>EcoR</i> I)	48
MSMEG_6039-R	GCAAAGCTTCTATTTCGTAGGTGACTTCG (the underline indicates <i>Hind</i> III)	31
SCNU_16633-F	CAGCATATGATGGCTGACACCGACATCCG (the underline indicates <i>Nde</i> I)	29
SCNU_16633-R	ATCGGATCCTTCGTCGGCGGAGTCATCAGAC (the underline indicates <i>Bam</i> H I)	32
SCNU_18062-F	ATAGGATCCGGAGGAATCACTTCGCAATGACCGAACTGACCCCGCAC (the underline indicates <i>Bam</i> H I)	47
SCNU_18062-R	GCTAAGCTTCAGAACTCGATCTTGAGCTTGTCGG (the underline indicates <i>Hind</i> III)	34

1.9 甾醇的生物转化及定量分析

将重组菌株接种于 100 mL 分别含植物甾醇、胆固醇、谷甾醇 (0.5 g/L) 的液体基础培养基中 (加入 0.05% Tween-80 乳化底物), 于 30 °C、180 r/min 振荡培养。当菌液 OD_{600} 约为 0.8 时加入己内酰胺 (终浓度为 28 mmol/L), 诱导表达 24 h^[15]。每隔 12 h 取样, 乙酸乙酯振荡萃取, 薄层层析检测, 展层剂为环己烷: 乙酸乙酯=6:4。将萃取样品真空干燥后, 甲醇溶解, 用于 HPLC 分析, 计算其转化率^[16]。采用岛津 Essentia LC-15C 高效液相色谱仪进行 HPLC 分析; 色谱柱为岛津 WondaSil C18 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μ m), 柱温 35 °C, 检测波长 254 nm, 流动相为甲醇:水=65:35, 流速: 1 mL/min, 进样量: 20 μ L。转化率计算方法为: 转化率=(9-OH-AD 产生量/底物量)×100%。

1.10 重组分枝杆菌稳定性分析

将重组菌株接种于 50 mL 液体基础培养基中, 振荡培养, 分别于 48、96、144 h 吸取菌液, 用无菌水稀释, 浓度梯度为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} , 分别涂布于不含卡那霉素和含 20 μ g/mL 卡那霉素的基础培养基平板上, 28 °C 培养 7 d, 对单菌

落数进行计数^[1]。

2 结果与分析

2.1 3-甾酮-9 α -羟基化酶候选基因转录与同源性分析

对耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc²155 基因组进行搜索, 结果显示 *MSMEG_2870* 和 *MSMEG_5925* 为 *kshA* 候选基因, *MSMEG_2893* 和 *MSMEG_6039* 为 *kshB* 候选基因, 而戈登氏菌 *G. neofelificis* NRRL B-59395 基因组中存在着 3 个 *kshA* 候选基因, 分别是 *SCNU_16633*、*SCNU_18995*、*SCNU_20231*; 同时有 2 个 *kshB* 候选基因, 它们分别是 *SCNU_18062*、*SCNU_05586*。在前期研究中, 我们分别对耻垢分枝杆菌和戈登氏菌在不同甾醇化合物为唯一碳源条件下的转录组进行了测序 (该研究结果另文报道), 对所得数据进行分析, 结果表明耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc²155 的 2 个 *kshA* 候选基因中, *MSMEG_5925* 在 3 种碳源条件下表达量均相对较高, RPKM 值为分别为 101.47、288.50、100.33, 而且该基因在胆固醇条件下表达明显上调, 如表 2 所示; 其两个 *kshB* 候选基

表 2 耻垢分枝杆菌与戈登氏菌 3-甾酮-9 α -羟基化酶编码基因及其转录水平分析

Table 2 Transcription analysis of KSH-encoding genes in *M. smegmatis* mc²155 and *G. neofelificis* NRRL B-59395

Gene ID	Encoding subunit of KSH	AD (RPKM)	Cholesterol (RPKM)	Glycerin (RPKM)
<i>MSMEG_2870</i>	KshA	13.13	10.67	1.42
<i>MSMEG_5925</i>	KshA	101.47	288.50	100.33
<i>MSMEG_2893</i>	KshB	0	6.2	0
<i>MSMEG_6039</i>	KshB	0	28.2	0
<i>SCNU_16633</i>	KshA	54.87	214.60	113.7
<i>SCNU_18995</i>	KshA	70.12	11.23	2.33
<i>SCNU_20231</i>	KshA	23.62	104.63	12.39
<i>SCNU_18062</i>	KshB	88.22	61.095	40.52
<i>SCNU_05586</i>	KshB	3.22	5.23	3.10

RPKM: reads per kilobase of coding sequence, per million mapped reads.

因表达量均较低,其中 *MSMEG_6039* 在胆固醇条件下表达上调。戈登氏菌 *G. neofelifaecis* NRRL B-59395 转录组测序表明, *kshA* 候选基因 *SCNU_16633* 和 *SCNU_20231* 的表达均受到胆固醇的诱导,其中 *SCNU_16633* 表达量较高,RPKM 值为 214.60 *kshB* 候选基因 *SCNU_18062* 在雄烯二酮条件下表达上调。综合上述分析,我们推测差异表达的候选基因 *MSMEG_5925*、*MSMEG_6039*、*SCNU_16633*、*SCNU_18062* 参与了甾醇化合物的羟基化,因此对其进行克隆并用于重组菌株的构建。

氨基酸同源性分析表明耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc²155 中的 *MSMEG_5925* 与结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37RV 的 *KshA*^[17] 编码基因 *Rv3526* 在氨基酸水平的同源性高达 82%,同红平红球菌 *R. erythropolis* SQ1 中 *KshA*^[2] 同源性为 61%,同紫红红球菌 *R. rhodochrous* DSM 43269 中的 *KshA*^[7] 同源性为 58%。*MSMEG_6039* 与结核分枝杆菌 *M. tuberculosis* H37RV 编码 *KshB* 的基因 *Rv3571* 在氨基酸水平的同源性为 73%,同红平红球菌 *R. erythropolis* SQ1 中 *KshB*^[2] 的氨基酸同源性为 60%,同紫红红球菌 *R. rhodochrous* DSM 43269 中的 *KshB* 同源性为 58%。

戈登氏菌 *G. neofelifaecis* NRRL B-59395 中的 *SCNU_16633* 同结核分枝杆菌 *M. tuberculosis* H37RV 的 *Rv3526* (*kshA*) 基因在氨基酸水平的同源性达到 53%,同红平红球菌 *R. erythropolis* SQ1 中 *KshA*^[2] 的氨基酸同源性为 61%,与紫红红球菌 *R. rhodochrous* DSM 43269 中 *KshA*^[6] 同源性为 55%。*SCNU_18062* 与结核分枝杆菌 *M. tuberculosis* H37RV 编码 *KshB* 的 *Rv3571* 在氨基酸水平的同源性达到 52%,与红平红球菌

R. erythropolis SQ1 中的 *KshB*^[2] 同源性为 64%,同紫红红球菌 *R. rhodochrous* DSM 43269 中的 *KshB*^[7] 同源性为 65%。

2.2 重组质粒的构建与转化

构建的共表达质粒图谱如图 1 所示。以耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc²155 总 DNA 为模板,分别用引物 *MSMEG_5925*-F/R 和 *MSMEG_6039*-F/R 进行 PCR 扩增,得到目的片段 *MSMEG_5925* (大小为 1 151 bp) 和 *MSMEG_6039* (大小为 1 061 bp),如图 2A 泳道 1、2 所示。用 *Nde* I/*Eco*R I 双酶切 DNA 片段 *MSMEG_5925*,将其插入经过同样酶切处理的表达载体 pNIT 中,获得的中间质粒再经 *Eco*R I/*Hind* III 双酶切,与经过同样酶切处理的 *MSMEG_6039* 连接,从而与 *MSMEG_5925* 融合,获得含有 *MSMEG_5925* 和 *MSMEG_6039* 融合基因的表达质粒,命名为 pNIT-Mksh (图 1A)。

同时,以戈登氏菌 *G. neofelifaecis* NRRL B-59395 的总 DNA 为模板,用引物 *SCNU_16633*-F/R 和 *SCNU_18062*-F/R 分别扩增得到 DNA 片段 *SCNU_16633* (图 2B 泳道 1, 1 170 bp) 和 *SCNU_18062* (图 2B 泳道 2, 1 056 bp)。经 *Nde* I/*Bam*H I 双酶切将 *SCNU_16633* 重组入 pNIT 载体,获得的中间质粒再经 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切,与经过同样酶切的 DNA 片段 *SCNU_18062* 连接,获得含有 *SCNU_16633* 和 *SCNU_18062* 融合的表达质粒,命名为 pNIT-Gksh (图 1B)。

用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III 对两重组质粒 pNIT-Mksh 和 pNIT-Gksh 分别进行双酶切,琼脂糖电泳显示,pNIT-Mksh 经双酶切产生两条 DNA 条带 (图 2A 泳道 4),其中较大的条带大小为 6 261 bp,与原载体 pNIT 相符,大小约

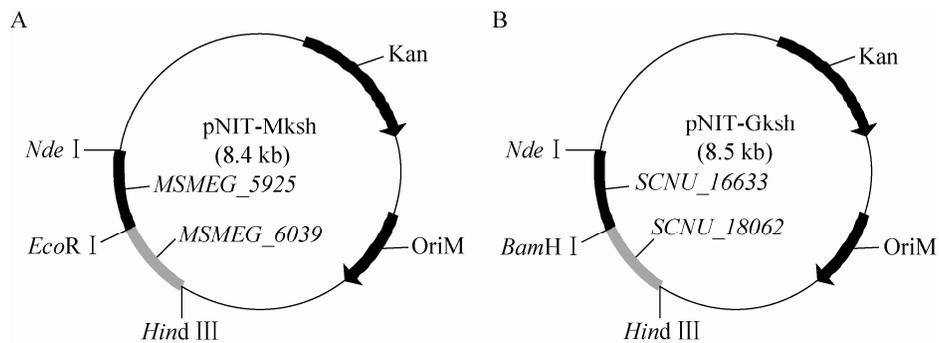


图 1 表达质粒 pNIT-Mksh 和 pNIT-Gksh 示意图

Fig. 1 The construction of expression plasmids pNIT-Mksh and pNIT-Gksh.

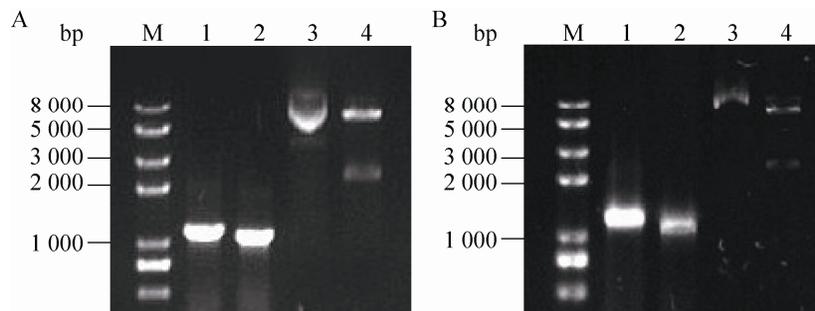


图 2 共表达重组质粒琼脂糖电泳分析

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis of recombinant plasmids of pNIT-Mksh and pNIT-Gksh. (A) 1: the PCR product of *MSMEG_5925*; 2: the PCR product of *MSMEG_6039*; 3: pNIT; 4: pNIT-Mksh/*Nde* I, *Hind* III; M: DNA marker. (B) 1: the PCR product of *SCNU_16633*; 2: the PCR product of *SCNU_18062*; 3: the pNIT; 4: pNIT-Gksh/*Nde* I, *Hind* III; M: DNA marker.

为 2 kb 的 DNA 条带是 *MSMEG_5925*、*MSMEG_6039* 融合片段。图 2B 泳道 4 为 pNIT-Gksh 双酶切的结果，产生的条带为 *SCNU_16633*、*SCNU_18062* 融合片段 (2 226 bp) 和原载体 pNIT (6 261 bp)，同样与预期相符。

采用电转化方法将上述表达质粒分别导入分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 感受态细胞中，涂布于含卡那霉素的培养基中培养，挑取单菌落进行菌落 PCR 扩增，阳性菌落即为构建的基因重组菌株。质粒 pNIT-Mksh 电转入分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 得到的重组菌株命名为 3805-Mksh，质粒 pNIT-Gksh

电转入分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 得到的重组菌株命名为 3805-Gksh。

2.3 重组菌株转化产物的鉴定

分别利用原始菌株和重组菌株对胆固醇、植物甾醇和谷甾醇进行生物转化，用薄层层析 (图 3A) 和 HPLC (图 3B) 检测转化产物的变化。原始菌株分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 转化产物是大量 AD 和极少量 ADD (图 3A 泳道 1，图 3B 曲线 c)，而导入 *kshA-kshB* 共表达质粒的重组菌株的转化产物中，AD 产量变低甚至消失，并产生了新的转化产物 (图 3A 泳道 7-12，图 3B 曲线 a)。图 3B (曲线 a、c) 还

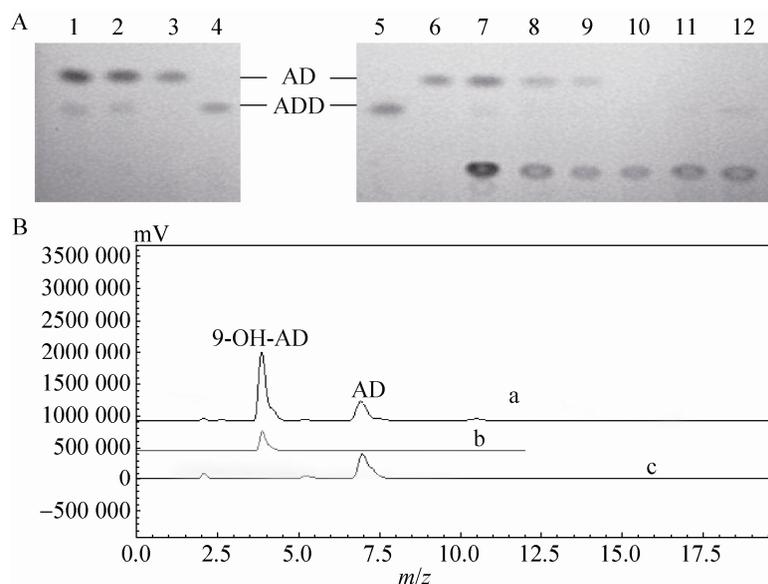


图3 转化产物的薄层层析 (A) 和 HPLC (B) 分析

Fig. 3 TLC and HPLC analysis of products. (A) TLC analysis of products. 1: the products of strain NRRL B-3805; 2: the products of NRRL B-3805 with pNIT; 3–6: the standard samples of AD, ADD, ADD and AD; 7–9: the products of strain 3805-Mksh cultured in phytosterol, sitosterol or cholesterol; 10–12: the products of strain 3805-Gksh cultured in phytosterol, sitosterol or cholesterol. (B) HPLC analysis for the transformation products. a–c: HPLC analysis for the products of the recombination strains, the standard sample of 9-OH-AD and the products of the strain NRRL B-3805.

显示, 原始菌株 *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 和重组菌株的转化产物中除目的产物外均含有少量副产物或杂质, 但并未对其做进一步分析和鉴定。从薄层层析板上刮取产物, 乙酸乙酯萃取, 减压蒸馏, 获得纯化的样品, 进行光谱学分析以鉴定其化学结构。红外光谱出现了数值为 3 304 的吸收峰, 说明转化产物中含有羟基基团; TOF-MS 谱显示其 $[M+H]^+$ 处于 m/z 303, 说明该产物分子量为 302, 与 9-OH-AD 的分子质量 302.4 相符合; 对比 AD 的 ^{13}C NMR 谱, C9 的吸收峰值从 δ 53.8 ppm 位置化学位移到 δ 76.1 ppm, 验证了 C9 出现 1 个羟基基团, 这与文献[18]报道的相符。 1H NMR 光谱分析表明存在两个甲基基团, 其 δ 值分别为 0.93(s) 和 1.35(s) ppm, 6.05(d) ppm 表示存在 1 个双键; 未出现 δ 3.5–4.5 范围的化学位移, 推测羟基应

该存在于一个三级碳原子上, 这与 Horinouchi 等的报道一致^[19], 确定该基团应存在于 9α -位上。因此重组菌株转化甾醇底物获得产物 9-OH-AD, 证明导入的基因 *kshA*, *kshB* 成功表达出了有活性的 KSH, 重组菌株直接将胆固醇、植物甾醇和谷甾醇转化为 9-OH-AD。

2.4 重组菌株对不同底物的转化

分别以植物甾醇、胆固醇、谷甾醇为底物, 利用构建的重组菌株进行转化, 取样, HPLC 检测, 结果表明, 重组菌株转化 36 h 时, 3 种不同底物的转化液中均开始积累 9-OH-AD。菌株 3805-Mksh 在转化 108 h 时, 以植物甾醇或以胆固醇为底物的培养液中, 9-OH-AD 积累量达到最大, 分别为 453.1 μ g/mL 和 34 μ g/mL。其中, 植物甾醇的最高转化率达到了 90.6% (图 4A); 而以谷甾醇为底物转化, 转化 120 h 后, 培养液

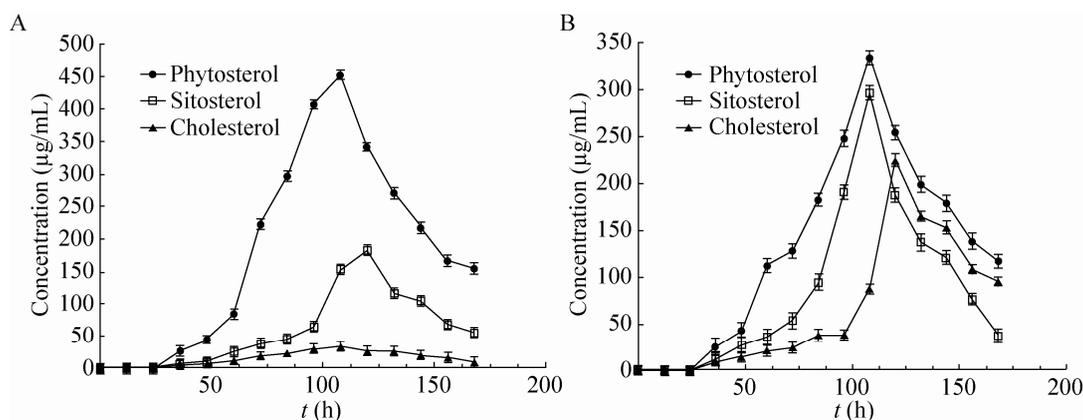


图 4 菌株 3805-Mksh (A) 和 3805-Gksh (B) 对几种底物的转化

Fig. 4 The transformation of the several substrates by 3805-Mksh (A) and 3805-Gksh (B).

中 9-OH-AD 积累量达到最高, 为 183.3 $\mu\text{g/mL}$ 。

随着转化时间的延长, 9-OH-AD 积累量逐渐降低。

重组菌 3805-Gksh 以植物甾醇或谷甾醇为底物转化, 9-OH-AD 最大积累量出现在 108 h, 达到 335 $\mu\text{g/mL}$ 、296 $\mu\text{g/mL}$; 而以胆固醇为底物转化, 则出现在 120 h, 达到 225.7 $\mu\text{g/mL}$, 底物的最大转化率为 67% (图 4B)。其 9-OH-AD 积累量同样随着转化时间延长而降低。

2.5 重组分枝杆菌稳定性分析

选取转化能力较强的重组分枝杆菌 3805-Mksh 进行质粒稳定性分析, 结果如表 3 所示, 经过 144 h 的发酵培养, 含有质粒的菌落由 98.97% 降到了 85%, 因而随着培养时间的

表 3 重组分枝杆菌 3805-Mksh 的质粒稳定性分析

Table 3 The stability analysis of the plasmid 3805-Mksh

Time (h)	Dilution factor	CFU		
		Kan(-)	Kan(+)	Kan(+)/kan(-)
48	10^{-3}	291	288	98.97%
	10^{-4}	29	28	96.55%
96	10^{-4}	273	252	92.31%
	10^{-5}	23	21	91.30%
144	10^{-4}	236	209	88.56%
	10^{-5}	20	17	85.00%

延长, 质粒稳定性略有下降, 但总体稳定性良好。

3 讨论

KSH 为双组分酶, 由 KshA 和 KshB 组成。KshA 是 9 α -羟基化起主体作用的酶, 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。目前, 仅有耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc²155 的 *kshA*、红平红球菌 *R. erythropolis* SQ1 的 *kshA* 和 *kshB* 来自紫红红球菌 *R. rhodochrous* DSM 43269 的 *kshA* 和 *kshB*^[20] 以及分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NwIB-01 中的 *kshA* 获得了功能验证。我们依据基因在胆固醇条件下基因表达上调的情况, 从耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc²155 的 2 个 *kshA* 候选基因和 2 个 *kshB* 候选基因中选择了 *MSMEG_5925* (*kshA* 候选基因)、*MSMEG_6039* (*kshB* 候选基因) 进行克隆并用于基因重组菌的构建; 从戈登氏菌 *G. neofelifaecis* NRRL B-59395 基因组的 3 个 *kshA* 候选基因、2 个 *kshB* 候选基因中, 选择了 *SCNU_16633* (*kshA* 候选基因)、*SCNU_18062* (*kshB* 候选基因) 进行克隆并用于基因重组菌的构建。

为了实现 *kshA* 和 *kshB* 的共表达和增加翻译

效率,构建表达质粒时,在 *kshB* 基因上游引物中设计了核糖体结合位点 SD 序列和间隔序列(CGGAGGAATCACTTCGCA),依次将 *kshA* 和 *kshB* 克隆到分枝杆菌表达质粒 pNIT 中时,从而在两个基因之间引入了核糖体结合位点序列(SD)和间隔序列。分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 是研究甾醇微生物转化的模式菌,能够转化胆固醇、植物甾醇积累大量雄烯二酮和少量雄二烯二酮。将 *kshA* 和 *kshB* 的共表达质粒转入分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805,构建重组菌株,利用该重组菌株转化胆固醇、植物甾醇和谷甾醇,进而诱导 *kshA* 和 *kshB* 进行表达,但可能由于表达载体在宿主细胞中拷贝数过低,表达量较少,因而在蛋白质电泳中并未检测到目的蛋白质条带,但是通过分离纯化转化产物,进行光谱学鉴定,确定该转化产物为 9 α -羟基雄烯二酮,可表明导入的 *kshB* 和 *kshA* 获得了有效表达,从而证明将出发菌株积累的雄烯二酮转化为 9 α -羟基雄烯二酮。同时也证明了来自耻垢分枝杆菌的 *MSMEG_5925*、*MSMEG_6039* 和戈登氏菌的 *SCNU_16633*、*SCNU_18062* 分别为有功能的 *kshB* 和 *kshA* 编码基因。

各重组菌株分别以 3 种甾醇化合物为底物进行转化时,以植物甾醇为底物较胆固醇和谷甾醇的转化率要高;利用重组分枝杆菌 3805-Mksh 以植物甾醇为底物转化时,转化率最高达到 90.6%,而重组分枝杆菌 3805-Gksh 最大转化率仅为 67%,显示来自耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc²155 的 *kshA* 和 *kshB* 基因产物具有更高的羟基化活性。

在生物转化的过程中,9-OH-AD 会随着转化时间的延长而降解,其可能的原因是分枝杆

菌 *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 大量积累 AD 的同时,也能产生少量的 ADD,说明其细胞中仍有少量的类固醇脱氢酶(3-ketosteroid D¹-dehydrogenase, KsdD)活性,将 AD 转变 ADD,ADD 在羟基化酶的催化作用下,打开核心环,从而进一步被降解,因而 9-OH-AD 会随着转化时间的延长而减少。因此,要进一步提高 9-OH-AD 产率,需要敲除 *ksdD* 基因,消除其脱氢酶活性。本研究在甾醇化合物转化模式菌株中实现了 3-甾酮-9 α -羟基化酶基因共表达,使其由积累 AD 变为积累 9-OH-AD,因而成功地进行分枝杆菌生物转化特性的改造,为探索各种甾体药物中间体的工业生产奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Wei W, Fan SY, Wang FQ, et al. Accumulation of androstadiene-dione by overexpression of heterologous 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase in *Mycobacterium neoaurum* NwIB-01. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 30(7): 1947–1954.
- [2] 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 α -hydroxylase, a class IA monooxygenase, in *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. *Mol Microbiol*, 2002, 45(4): 1007–1018.
- [3] Sukhodolskaya GV, Nikolayeva VM, Khomutov SM, et al. Steroid-1-dehydrogenase of *Mycobacterium* sp. VKM-Ac-1817D strain producing 9 α -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione from sitosterol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74(4): 867–873.
- [4] Yang SK, Yang YL, Wu ZL, et al. Microbial fermentation of phytosterol side chain cleaved for production of 17-keto steroids. *Chin J Bioproc Eng*, 2010, 8(5): 69–77 (in Chinese).
杨顺楷, 杨亚力, 吴中柳, 等. 微生物发酵降解植物甾醇侧链生产 17-酮甾体研究进展. *生物加工过程*, 2010, 8(5): 69–77.

- [5] Hu Y, van der Geize R, Besra GS, et al. 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase is an essential factor in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 2010, 75(5): 107–121.
- [6] 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 α -hydroxylase in *Mycobacterium smegmatis* mc²155. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(10): 6554–6559.
- [7] Petrusma M, Dijkhuizen L, van der Geize R. *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43269 3-ketosteroid- 9 α -hydroxylase, a two-component iron-sulfur-containing monooxygenase with subtle steroid substrate specificity. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(16): 5300–5307.
- [8] Fan SY, Wei W, Wang FQ, et al. Cloning, heterologous expression and purification of a 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase (KSH) from *Mycobacterium* sp. NwIB-01. *Chin J Biotech*, 2009, 25(12): 2014–2021 (in Chinese).
范书玥, 魏巍, 王凤清, 等. 分歧杆菌 *Mycobacterium* sp. NwIB-01 3-甾酮-9 α -羟基化酶基因的克隆、异源表达及分离纯化. *生物工程学报*, 2009, 25(12): 2014–2021.
- [9] Mirjan P, Gerda H, Lubbert D, et al. Multiplicity of 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase enzymes in *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43269 for specific degradation of different classes of steroids. *J Bacteriol*, 2011, 193(15): 3931–3940.
- [10] Liu YC, Chen GY, Li W, et al. Efficient biotransformation of cholesterol to androsta-1,4-diene-3,17-dione by a newly isolated actinomycete *Gordonia neofelifaecis*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27(4): 759–765.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20–25.
- [12] Liu YC, Ge F, Li W, et al. *Gordonia neofelifaecis* sp. nov., a cholesterol side-chain-cleaving actinomycete isolated from the faeces of *Neofelis nebulosa*. *Internat J System Evolut Microbiol*, 2011, 61(1): 1–5.
- [13] Veiga-Crespo P, Feijoo-Siota L, de Miguel T, et al. Proposal of a method for the genetic transformation of *Gordonia jacobaea*. *J Appl Microbiol*, 2006, 100(3): 608–614.
- [14] Daniel B, Matthias A, Alexander S. Transfer of megaplasmid pKB1 from the rubber-degrading bacterium *Gordonia westfalica* strain Kbl to related bacteria and its modification. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 77(6): 1317–1327.
- [15] Chen T, Zhao QJ, Li W, et al. *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS17 promotes the death of host cell and cytokines secretion via Erk kinase accompanying with enhanced survival of recombinant *Mycobacterium smegmatis*. *J Interf Cytok Res*, 2013, 33 (8): 452–458.
- [16] Wei W, Fan SY, Wang FQ, et al. A new steroid-transforming strain of *Mycobacterium neoaurum* and cloning of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in NwIB-01. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 162(5): 1446–1456.
- [17] Capyk J K, Angelo I D, et al. Characterization of 3-ketosteroid- 9 α -hydroxylase, a rieske oxygenase in the cholesterol degradation pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 2009, 284(15): 9937–9946.
- [18] Mohammad AF, Maryam A, Mojtaba TY. Metabolism of androst-4-en-3,17-dione by the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Steroids*, 2008, 73 (1): 13–18.
- [19] Horinouchi M, Hayashi T, Yamamoto T, et al. A new bacterial steroid degradation gene cluster in *comamonas testosteroni* TA441 which consists of aromatic-compound degradation genes for seco-steroids and 3-ketosteroid dehydrogenase genes. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69 (8): 4421–4430.
- [20] Wilbrink MH, Petrusma M, Dijkhuizen L, et al. FadD19 of *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269, a steroid-coenzyme ligase essential for degradation of C-24 branched sterol side chains. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(13): 4455–4464.

(本文责编 陈宏宇)