

胆固醇氧化酶基因的克隆与表达

季文明 张和春 王 武

(无锡轻工大学生物工程学院 无锡 214036)

关键词: 胆固醇氧化酶基因, 克隆, 表达

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)03-0224-04

胆固醇是人体中主要的固醇类化合物, 人体内胆固醇主要来源于自身的合成, 也有一部分来自食物。胆固醇代谢和输送的异常往往与动脉粥样硬化相关联, 能够引起心肌梗死、中风、动脉瘤和胆石症等疾病。胆固醇的一些代谢产物如类固醇和类甾烷酮有致癌作用。所以检测血浆中和食物中胆固醇的含量在临床上具有重要的意义^[1-3]。

胆固醇氧化酶可以和胆固醇脂酶和过氧化氢酶复合在一起, 作为血浆总胆固醇含量的诊断试剂, 也可将这 3 种酶固定在膜上, 做成酶电极, 这样使用起来更方便。胆固醇氧化酶能够降低食品中的胆固醇含量, 也可以将胆固醇氧化酶基因克隆到食品微生物中, 降低某些发酵食品胆固醇的含量^[4]。胆固醇氧化酶可以抑制某些昆虫的生长, 将胆固醇氧化酶基因克隆到植物如烟草中, 可以选育出抗虫害新种。

通常, 微生物的产酶量在 300U/L 左右, 常规的诱变处理很难大幅度提高酶产量。因此, 要想实现工业化生产, 采用现代生物技术—基因克隆来高效表达酶基因, 获得高产菌株, 不失为有效方法之一。

1 胆固醇氧化酶基因的克隆与表达

能够产生胆固醇氧化酶的微生物有很多种, 研究得比较深入的胆固醇氧化酶基因主要来自于链霉菌 *Streptomyces* sp. 和短杆菌 *Brevibacterium sterolicum* 这两种微生物。下面分别介绍:

1.1 链霉菌 *Streptomyces* sp. 的胆固醇氧化酶基因 *choA* 1986 年 Yoshikatsu Murooka 等人^[4], 以质粒 pLJ702 为载体, 用内切酶 BamHI 部分水解链霉菌 *Streptomyces* sp. 的染色体 DNA (取大于 5kb 的片段), 用内切酶 BglIII 水解质粒 pLJ702, 然后将 BamH I

DNA 片段与质粒连接, 构成重组质粒 pCO-1 (11.6kb), 见图 1。将此重组质粒转化入宿主细胞 *S. lividans* 中, 通过链霉素抗性筛选和胆固醇氧化酶活性筛选出转化子。用内切酶 Pst I, Sac I 切割质粒 pCO-1 和用内切酶 Bgl II 将 Km^r 抗性基因插入质粒 pCO-1, 分别获得重组质粒 pCO-2、pCO-3 和 pCO-k (如图 1 所示), 再分别转化宿主细胞 *S. lividans*, 结果含质粒 pCO-2 或 pCO-3 的转化子有酶活而含质粒 pCO-k 的没有酶活。从这个结果可以确定含 Bgl II 切点的 2.5kb 的 DNA 片段 (图 1 中阴影部分) 是表达胆固醇氧化酶活性的必需片段。含质粒 pCO-3 的转化子总酶活是含质粒 pCO-1 的转化子的 4 倍。

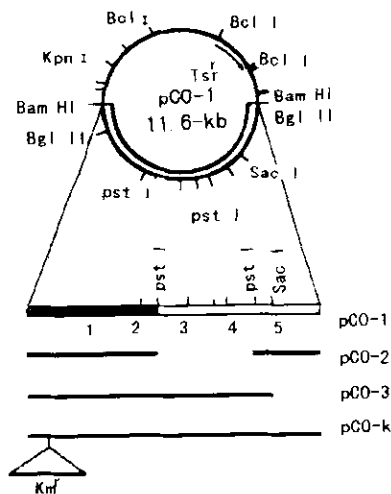


图1 重组质粒pCO-1的结构

1989 年, Tomoyuki Ishizaki 等人用双脱氧核苷酸终止法和聚丙烯酰胺凝胶电泳分析质粒 pCO-1 上的

收稿日期: 1999-03-08, 修回日期: 1999-06-14

Pst I-BamHI / Bgl II 2.5kb 的 DNA 片段,测定了链霉菌 *Streptomyces* sp. 的胆固醇氧化酶基因 *choA* 的 DNA 序列^[5]。整个序列有 2143 个碱基对,包含了 *choA* 的编码基因。在第 399 和 2038bp 处分别有起始密码 GTG 和终止密码 TAA;在起始密码的上游有与宿主 16S rRNA 结合的位点 (GAAAGG * * AGGT),但不能确定启动子的存在;在 DNA 的 3' 端有回文序列,可能与转录终止有关。从 DNA 序列翻译出来的氨基酸序列中可以发现,其 N-端有一个疏水区域,与信号肽特征相似;而对分泌到胞外的酶的 N-端 21 个氨基酸进行了分析 (Asp-Asn-Gly-Gly-Tyr-Val-Pro-Ala-Val-Val-Ile-Gly-Thr-Gly-Thr-Gly-Ala-Ala-Val-Ser-Ala),它与翻译的第 43~64 位的氨基酸是一致的。所以确定原酶的总长为 546 个氨基酸,分子量为 58.96kD,信号肽为前 42 个氨基酸,成熟的胆固醇氧化酶为单一肽链,有 504 个氨基酸,分子量为 54.913kD。

因为没有找到启动子,所以 Masami Horii 等人对重组质粒 pCO-3 进行了更为详细的研究^[6]。用内切酶 Kpn I 和 Pst I 对重组质粒 pCO-3 进行处理,获得质粒 pCO-6、pCO-51 和 pCO-7。从图 2 可以看出,质粒 pCO-6 比质粒 pCO-3 少了 1.5kb 的 Kpn I-Sac I 片段,质粒 pCO-7 比质粒 pCO-6 少了 0.3kb 的 Pst I 片段,而质粒 pCO-51 比质粒 pCO-3 少了 2.1kb 的片段。用这些质粒转化链霉菌 *S. lividans*,结果含质粒 pCO-6 和 pCO-7 的有酶活,而含质粒 pCO-51 的没有酶活。由此可以看出 *choA* 的启动子可能在 0.7kb 的 Pst I-Kpn I 片段之内。通过对 *choA* 上游序列的分析,发现距 *choA* 上游 1.3kb 处可能是 *choA* 的启动子,并意外地发现了一个 41kD 的蛋白质编码基因 *choP*。这个新发现的基因有 1039 个碱基对,在第 141bp 和 1284bp 处分别为起始密码 ATG 和终止密码 TGA,在其上游序列中有相似的 -10 和 -35 保守序列并有宿主 rRNA 结合位点 (GAAGG),但没有终止转录的回文序列。利用合成的引物进行转录实验,发现在 *choP* 的 -41bp 和距 *choA* C-端 1384bp 处有转录起始点。显然,位于 *choP* 的 -41bp 处的起始点可以转录成完整的 *choP* 和 *choA* 的 mRNA。RNA 探针杂交实验也证明了 *choP* 和 *choA* 是共用一个启动子,是连锁在一个多顺反子上的两个基因。*ChoP* 编码的蛋白质是一个与细胞色素蛋白 P-450 相似的蛋白质。



图2 重组质粒的结构对比

1993 年,意大利的 P. Brigidi 等人将 *choA* 基因克隆到大肠杆菌 HB101 和路氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri* 中^[2]。以内切酶 Kpn I 切割质粒 pUC19 和 pCO-3,构建重组质粒 pCHOA 和 pCHOB (*choB* 方向与质粒启动子方向相反)。以此质粒转化 HB101,结果含质粒 pCHOA 的有酶活,以 IPTG 诱导,可以使酶活显著提高,而含质粒 pCHOB 的没有酶活。可见, pCHOA 与 LacZ 启动子方向一致才可以表达酶活。这说明 pCHOA 的启动子不被宿主认可,必须依靠质粒的启动子进行转录。转化路氏乳杆菌,虽然有 *choA* 存在,但没有酶活表达,可能是 *choA* 基因的启动子不被宿主路氏乳杆菌接受。

从 *choA* 转化不同细菌的情况可以看出, *choA* 所在的操纵子上的启动子可以被宿主 *S. lividans* 识别、转录,在产酶的同时,也产生了似 P-450 蛋白;而对于其它宿主如大肠杆菌 HB101, *choA* 的启动子不被接受,必须利用质粒上的启动子才能进行转录,有酶活表达。

1.2 甾短杆菌 *Brevibacterium sterolicum* 的胆固醇氧化酶基因 *choB* 因为克隆链霉菌 *Streptomyces* sp. 的胆固醇氧化酶基因 *choA* 表达水平不高,所以 Kinya Fujishio 等人于 1990 年开始研究甾短杆菌 *Brevibacterium sterolicum* 的胆固醇氧化酶基因 *choB*^[7]。以内切酶 Sau 3A1 切割甾短杆菌 *B. sterolicum* 的总 DNA,用蔗糖梯度密度超速离心,选取 3~5kb 的 DNA 片段,与内切酶 Bam HI 切割的质粒 pUC19 连接,构成重组质粒,转化宿主大肠杆菌 MM294 和其它几种微生物。通过分析酶氨基酸序列、逆翻译出 *choB* 的基因序列,再人工合成酶基因保守片段探针。通过 DNA 杂交试验,证明 *choB* 基因存在于宿主细胞内,但没有酶活表达。

1994 年, Toshio Ohta 等人分析了 *choB* 基因的序

列(2.4kb Mlu I 片段)^[5]。Mlu I 片段全长 2385bp, 其中编码区为 1656bp, 从 617~2272bp, 代表 552 个氨基酸密码。在翻译起始密码(第 617bp, ATG)上游有宿主 rRNA 的结合位点(GAGG)。在 2282~2326bp 处有一个大的回文序列, 可能是转录的终止结构。在结构基因的上游没有发现原核微生物启动子所具有的-10和-35 序列片段。虽然在结构基因的上游有 2.5kb 长的 DNA 片段, 但是没有酶活表达, 可能是在这 2.5kb 的片段中没有启动子或不被宿主识别, 也可能是缺少 RNA 聚合酶的激活蛋白因子。通过与酶蛋白 N-端氨基酸序列的对比, 确定成熟酶蛋白包含 507 个氨基酸, 分子量为 54.902kD, 与 SDS 凝胶电泳分析的结果(54kD)一致, 另有 45 个氨基酸长的信号肽。整个编码区的 G + C 含量为 64.9%。

表1 *choB*在大肠杆菌中的表达

菌株	胞内酶活(mU/mg)
JM105(pUC119)	0
JM105(pCHS43-445)	13
JM105(pCHS43-255)	6
JM105(pCHS43-25)	57
JM105(pCHS43-24)	176
JM105(pCHS43+2)	7
JM105(pCHS43+82)	357
JM105(pCHS43+110)	0

1992 年 Fujishiro Kinya 等人, 以质粒 pUC19 为载体, 用内切酶 *Sau* 3A1 切割总 DNA, 构建重组质粒, 将 *choB* 克隆到变青链霉菌 *S. lividans* 中。转化结果是发酵液中的酶活达到 150U / mL, 是原来的 100 倍多。^[9]

为了研究 *choB* 的表达情况, Toshio Ohta 等人对 *choB* 的上游 DNA 序列进行了更为细致的研究^[10]。

用不同的内切酶把 *choB* 编码区上游的 DNA 切成不同长度的片段, 构建二个系列的重组质粒 pCHS43 和 pCHS51 / 52 (pCHS51、pCHS52 与质粒连接的方向相反), 分别转化大肠杆菌 JM105 和变青链霉菌 *S. lividans*。

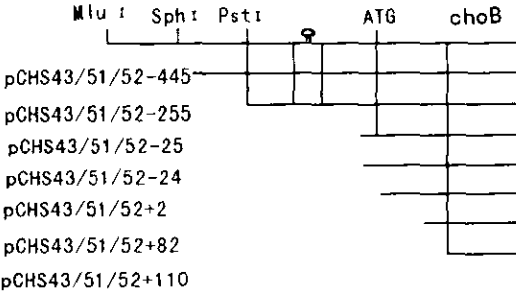


图3 重组质粒pCHS43、pCHS51/52系列的结构对比

从表 1 中可以看出, 转化子 JM105(pCHS43-24, 起始密码上游有 24 个碱基对) 和转化子 JM105 (pCHS43 + 82, 从起始密码开始缺少 82 个碱基对) 的酶活明显高于其它转化子。表明在-24bp 与-255bp 之间可能存在转录抑制序列, 亦或编码基因上游序列过长影响了转录。JM105(pCHS43-24) 和 JM105(pCHS43 + 82) 的酶与半乳糖苷酶的肽链融合在一起即部分半乳糖苷酶的肽链与胆固醇氧化酶连接在一起, 用 SDS 凝胶电泳检测, 酶分子量比原来的增加许多, 在克隆酶中没有发现辅酶。如果在酶蛋白的纯化和添加外源辅酶方面有所研究的话, 将会充分地发挥酶活力。

而在变青链霉菌 *S. lividans* 中, 见表 2, 上游片段大于 255bp 的酶活基本相同, 酶基因片段与质粒连接的方向对酶活的表达也没有影响, 而小于 255bp 的几乎没有酶活。这一情况说明宿主可以识别 *choB* 的启动序列, 直接进行转录。测定特征光谱比值 E280nm/E470nm, S

表2 *choB*在链霉菌*S.lividans*中的表达

菌株	发酵液酶活U/mL	菌株	发酵液酶活U/mL
TK23(pIJ703)	0	TK23(pCHS52)	144
TK23(pCHS51)	155	TK23(pCHS52-445)	168
TK23(pCHS51-445)	187	TK23(pCHS52-255)	144
TK23(pCHS51-255)	161	TK23(pCHS52-25)	0.7
TK23(pCHS51-25)	0.2	TK23(pCHS52-24)	0.2
TK23(pCHS51-24)	0.1	TK23(pCHS52+2)	0
TK23(pCHS51+2)	0.1	TK23(pCHS52+82)	0
TK23(pCHS51+82)	0	TK23(pCHS52+110)	0
TK23(pCHS51+110)	0.1		

lividans 产生的克隆酶含有辅酶 FAD, 其比值为 1 摩尔 FAD: 1 摩尔酶蛋白分子。

在 *choB* 上游序列中, 没有发现大肠杆菌的同源序列, 大肠杆菌不能识别 *choB* 的上游序列, 只能通过质粒的启动子来转录酶基因; 在 *choB* 上游虽然没有与 *S. lividans* 启动子相似的序列, 但可能在上游 255bp 片段内有与宿主 RNA 聚合酶多功能 sigma 因子识别序列相似的 DNA 片段, 所以 *choB* 可以直接被宿主 *S. lividans* 识别并转录。

2 *choA* 与 *choB* 的比较

在 DNA 分子水平上, *choA* 与 *choB* 的相似性为 64%, 但在基因的 5'-端和 3'-端没有相似区域。在酶氨基酸序列上, 有 58% 的相似性。至少有 6 个在酶结构和功能上有重要作用的高度保守区域如底物结合位点、催化活性中心和辅酶结合位点等。这说明两种微生物可能有共同的祖先。当然, 它们之间也有很多差异: *choB* 只有一个半胱氨酸 Cys, 而 *choA* 则有 4 个, 其共有的 1 个半胱氨酸与酶活性有关; 信号肽的长度和氨基酸的序列也不一样; 基因 5'-端的差异显示了不同种属之间的差别; 在基因结构方面, *choA* 是与 *choP* 连锁在一起的处于一个多顺反子上的, 和 *choB* 显然不同^[8]。

总的来说, *choA* 和 *choB* 的序列已经确定, 基因结构基本清楚, 在基因的表达方面也有了许多认识。这为胆固醇氧化酶基因克隆到其他微生物中以及其它微生物的胆固醇氧化酶基因的克隆提供了许多有益的帮

助。

参 考 文 献

- [1] R. 蒙哥马利, R. L. 德赖尔, T. W. 康韦等. 生物化学. 北京: 人民卫生出版社, 1988 年.
- [2] Brigidi P, Bolognani F, Rossi M *et al.* Letters in Applied Microbiology, 1993, 17: 61~64.
- [3] Somkuti George A, Solaiman Daniel K Y, Steinberg Dennis H Appl. Microbiol. Biotechnol, 1992, 37: 330~334.
- [4] Murooka Yoshikatsu, Ishizaki Tomoyuki, Nimi Osamu *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 1986, 52(6): 1382~1385.
- [5] Ishizaki Tomoyuki, Hirayama Noriaki, Shinkawa Hidenori *et al.* J. Bacteriology, 1989, 171(1): 596~601.
- [6] Masami Hori, Ishizaki Tomoyuki, Paik Soon young *et al.* J. of Biotechnology, 1990, 172(7): 3644~3653.
- [7] Fujidhiro Kinya, Ota Toshio, Hasegawa Mamoru *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commu, 1990, 172(2): 721~727.
- [8] Ohta Toshio, Yamaguchi Kazuo, Fujishiro Kinya *et al.* Gene, 1991, 103: 93~96.
- [9] Fujishiro Kinya, Ota Norio, Hasegawa Mamoru *et al.* Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 14, 210, 592 [1992, 210, 592].
- [10] Ohta Toshio, Fujishiro Kinya, Yamaguchi Kazuo *et al.* Biosci. Biotech. Biochem, 1992, 56(11): 1786~1791.