

产 GL-7-ACA 酰化酶重组大肠杆菌的构建和表达*

罗 晖 胡晓佳 周 航 童忆舟 于慧敏

(清华大学化工系生物化学研究所 北京 100084)

摘要: 为了实现 GL-7-ACA 酰化酶在大肠杆菌中的成功表达, 将 GL-7-ACA 酰化酶基因用 PCR 的方法去除其信号肽序列, 并将其连接到质粒 pET-28 a, 通过筛选得到了表达 GL-7-ACA 酰化酶的重组菌 BL21 (DE3) / pET-ACY。分别考察了诱导温度、菌浓 (OD_{600})、诱导剂 IPTG 的用量等因素对重组菌表达 GL-7-ACA 酰化酶的影响。在优化条件下, GL-7-ACA 酰化酶酶活可达 266 U/L。GL-7-ACA 酰化酶经一步 DEAE-Sephrose 纯化即可达到 80% 的纯度, 酶活收率为 50%。

关键词: GL-7-ACA 酰化酶, 大肠杆菌, 表达

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0038-05

Cloning and Expression of GL-7-ACA Acylase in *E. coli*

LUO Hui HU Xiao-Jia ZHOU Hang TONG Yi-Zhou YU Hui-Min

(Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract: To facilitate the expression of GL-7-ACA acylase gene in a recombinant *E. coli*, a fragment of the gene, in which the signal peptide was deleted by PCR method, was inserted into a prokaryotic expression vector, pET-28a. By colony-PCR method screening, a recombinant plasmid pET-ACY was obtained and then transformed into the expression host BL21 (DE3). The influences of induction conditions such as IPTG concentration, the time of induction and the induction temperature on the expression of the recombinant protein were investigated. Under optimal condition, the enzyme activity could reach 266 U/L. Finally, the recombinant GL-7-ACA acylase can be easily isolated to a purity of about 80% by a simple anion-ion exchange chromatography with enzyme activity recovery of 50%.

Key words: GL-7-ACA acylase, *E. coli*, Expression

7-氨基头孢烷酸 (7-aminocephalosporanic acid, 7-ACA) 是生产头孢菌素类半合抗的重要原料, 一般由头孢菌素 C (Cephalosporin C) 经化学法或酶法脱去其侧链得到^[1,2]。目前, 人们研究较多的是两步酶法制备 7-ACA^[1-4]: 首先, 头孢菌素 C 在 D-氨基酸氧化酶 (D-Amino Acid Oxidase) 的作用下, 产生一个具酮基的中间体和 H_2O_2 , 这个中间体很容易被同时产生的 H_2O_2 氧化脱羧, 转变成戊二酰基-7-氨基头孢烷酸 (Glutaryl-7-aminocephalosporanic acid, GL-7-ACA), 最后被 GL-7-ACA 酰化酶催化生成 7-ACA。

国外对 GL-7-ACA 酰化酶进行了多年的研究, 并已将其用于 7-ACA 的酶法工业生产^[3,4]。由于酶活等方面的原因, 国内的 7-ACA 生产还在采用污染严重的化学法。因此, 得到高酶活的 GL-7-ACA 酰化酶生产菌株至关重要。为此, 本文构建了产 GL-7-ACA 酰化酶的重组大肠杆菌, 考察了多种因素对 GL-7-ACA 酰化酶酶活表达的影响, 为 GL-

* 全国优秀博士学位论文作者专项资金项目 (No.200345)

作者还有: 李 强, 沈忠耀**

** 联系人 Tel: 010-62785514, E-mail: szy-dce@mails.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2003-09-01, 修回日期: 2003-12-05

7-ACA 酰化酶的工业应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 工具酶与试剂

各种工具酶均购自 TaKaRa 公司 (大连), GL-7-ACA 按文献方法制备^[3], 大肠杆菌表达质粒 pET-28a 购自 Novagen 公司, 宿主菌 BL21 (DE3)、TOP-10F' 分别购自 Promega 公司和 Invitrogen 公司, GL-7-ACA 酰化酶基因重组质粒 pGEM-ACY 为本实验室构建。其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 引物

根据 GL-7-ACA 酰化酶基因序列 (EMBL 核酸数据库序列 AY311487、AY311488 和 AY311489) 设计去除了信号肽的引物, 由北京赛百盛基因技术有限公司合成。上游引物为 5' -GGAATTCATATGGAGCCGACCTCGACGCCG-3', 下游引物序列为 5' -GCTC AAGCTTCGCTCGTTCATGTCAGGC-3', 分别引入了 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点。

1.3 PCR 条件

以重组质粒 pGEM-ACY 为模板进行 GL-7-ACA 酰化酶基因的 PCR 扩增, PCR 按常规方法进行, 条件为: 94℃ 1 min, 58℃ 1.5 min, 72℃ 2.5 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。取 5μL 扩增产物用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 重组大肠杆菌的构建

将 PCR 扩增的 GL-7-ACA 酰化酶基因片段和 pET-28 a 质粒分别用 *Nde* I 和 *Hind* III 进行酶切, 酶切产物用琼脂糖凝胶电泳纯化回收, 4℃ 下用 T4 DNA 连接酶过夜连接目的基因和质粒片段, 连接产物转化大肠杆菌 TOP-10F', 挑取菌落进行 PCR 筛选 (扩增条件同 1.3), 得到重组 pET-ACY 质粒, 转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 得到重组大肠杆菌 BL21 (DE3) /pET-ACY。

1.5 重组菌的培养和诱导表达

重组大肠杆菌 BL21 (DE3) /pET-ACY 于 37℃ 过夜培养, 转接适量菌液至 LB 培养基 (含卡那霉素浓度 50 μg/mL), 37℃ 培养 2 h 后, 加入一定浓度的 IPTG 或乳糖进行诱导, 不同温度下继续培育约 20 ~ 24 h, 收集菌体, 用于测定酶活或进行 SDS-PAGE。

1.6 GL-7-ACA 酰化酶的分离纯化

离心收集菌体, 重悬于 0.1 mmol/L pH8.0 的磷酸缓冲液中, 菌体经超声波破碎后, 15,000 r/min 离心 20 min, 取上清。采用 HiTrap DEAE-Sepharose 柱 (Pharmacia) 进行分离纯化, 流动相为 0.1 mol/L pH8.0 的磷酸缓冲液, 用 1 mol/L NaCl 进行梯度洗脱, 收集活性组分。

1.7 GL-7-ACA 酰化酶活性测定

菌体经离心、洗涤, 加入 GL-7-ACA 溶液 (5 mg/mL), 37℃ 反应 30 min 后加入反应终止液, 反应产物用对二甲氨基苯甲醛显色法^[3]进行分析。

2 结果与讨论

2.1 GL-7-ACA 酰化酶基因 PCR 扩增结果

GL-7-ACA 酰化酶包括一段约 30 个氨基酸的信号肽, 将信号肽序列去除之后的 GL-7-ACA 酰化酶基因可以大大增加其在重组大肠杆菌中的表达量^[5,6]。本文设计了一条去

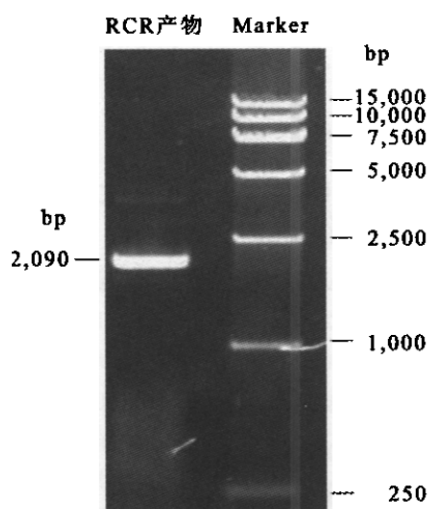
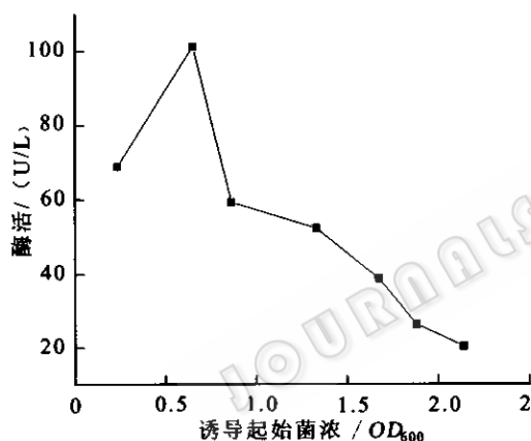


图1 PCR产物琼脂糖凝胶电泳图

图2 OD_{600} 对IPTG诱导的酶活的影响

除了信号肽序列的引物,以重组质粒 pGEM-ACY 为模板进行 PCR 扩增,得到了将 GL-7-ACA 酰化酶信号肽去除的合适大小的 DNA 片段,如图 1 所示。

2.2 GL-7-ACA 酰化酶重组大肠杆菌的构建

将扩增得到的 GL-7-ACA 酰化酶基因用 *Nde* I 和 *Hind* III 进行酶切,并与相同酶切处理的质粒 pET-28 a 片段进行连接,连接产物转化大肠杆菌 TOP-10F', 经筛选得到重组质粒 pET-ACY。经 DNA 测序验证,所得的重组质粒中基因序列正确,信号肽序列已被去除。将重组质粒转化宿主 BL21 (DE3), 得到重组大肠杆菌 BL21 (DE3) / pET-ACY。

将重组大肠杆菌用 0.5 mmol/L IPTG 在 28℃ 下诱导,收集菌体用于催化 GL-7-ACA,能够检测到催化产物 7-ACA,证明 GL-7-ACA 酰化酶的重组大肠杆菌构建成功。

2.3 GL-7-ACA 酰化酶的诱导表达

2.3.1 对诱导最佳的菌龄的确定:实验表明,重组菌在不同的生长时期进行诱导,最终的酶活和比活有很大的不同,图 2 是 28℃ 下不同生长时期加入 IPTG 诱导的酶活曲线。对于本菌株, OD_{600} 在 0.6 左右(属于对数生长中前期)加入诱导剂效果比较好。

2.3.2 诱导剂对 GL-7-ACA 酰化酶表达的影响:诱导剂 IPTG 有一定毒性,对菌体生长不利,对外源蛋白的表达影响也很大。用不同浓度的 IPTG 对重组菌进行诱导,然后分别检测 GL-7-ACA 酰化酶活性(图 3)。

在不加入诱导剂的情况下,基本没有酰化酶活性,表明 pET-28 a 的 T7 lac 表达系统十分严密,不产生泄漏表达。IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 时酶活达到最高值,此后随着 IPTG 用量的增大,菌体的酶活反而有所下降。

本文对廉价无毒的乳糖替代 IPTG 作为诱导剂进行了初步研究。实验结果表明,在乳糖浓度为 5 mmol/L 的时候诱导效果较好,但其酶活仅相当于 IPTG 诱导时的 30% 左右。

2.3.3 诱导温度对 GL-7-ACA 酰化酶表达的影响:重组大肠杆菌在高温下诱导表达外源蛋白时,往往容易生成没有活性的包涵体。将 BL21 (DE3) / pET-ACY 分别在 25℃、28℃、30℃、34℃ 温度下进行诱导,在 21 h 时取样检测菌体的酰化酶活性(图 4)。从图中可见,温度太高对 GL-7-ACA 酰化酶的表达不利,而较低温度(28℃)的诱导可以得到相对较高的酶活。这与文献中的结论相符,但最适诱导温度稍有不同^[6]。

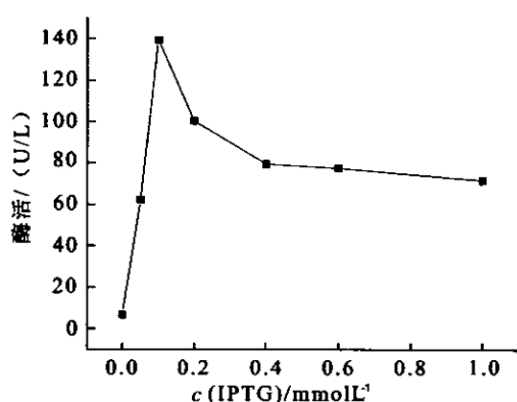


图3 IPTG 浓度对酶活的影响

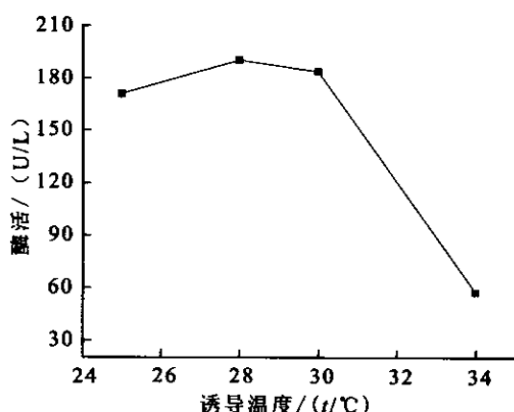


图4 诱导温度对酶活的影响

对不同温度下诱导的菌体进行 SDS-PAGE 检测, 结果发现, 随着诱导温度的升高, 活性蛋白占总蛋白的比例逐渐降低, 这与菌体 GL-7-ACA 酰化酶酶活的测定结果相吻合。说明诱导温度过高, 不利于 GL-7-ACA 酰化酶的表达及其后加工。这可能是由于菌体表达外源蛋白的速度过快, 前体蛋白来不及自我修饰并折叠成有活性的蛋白, 大量的蛋白积累导致了前体蛋白形成没有活性的包涵体。

经过诱导条件的优化, 在 250 mL 摇瓶中, 28°C 下, OD_{600} 为 0.6 时用 0.1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 重组菌的 GL-7-ACA 酰化酶酶活可达 266 U/L, 比活约为 200 U/g 干菌。

2.4 GL-7-ACA 酰化酶的纯化

诱导表达的菌体经超声波破碎后, 离心得到酶粗提液, 用阴离子交换柱 HiTrap DEAE-Sepharose 柱进行纯化, 1 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱, 收集活性组分 (见图 5)。将菌体破碎液上清、离心沉淀和洗脱活性组分进行 SDS-PAGE 检测 (见图 6)。菌体破碎液上清中所含 GL-7-ACA 酰化酶基本由 α 、 β 亚基组成, 没有检测到前体 (大小为 70 kd) 的存在。经一步离子交换纯化, 蛋白纯度即能达到约 80%, 酶活收率为 50%。而菌体破碎沉淀部分则主要是 GL-7-ACA 酰化酶前体的不溶性蛋白, 表明菌体中的 GL-7-ACA 酰化酶前体可能都以包涵体的形式存在。

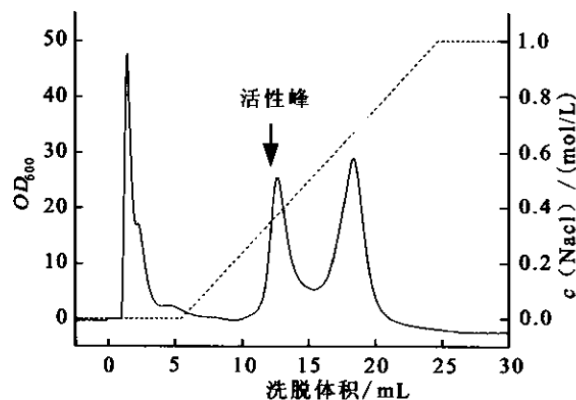


图5 DEAE-Sepharose 色谱图

实线为 280nm 吸收曲线, 虚线为 NaCl 洗脱梯度

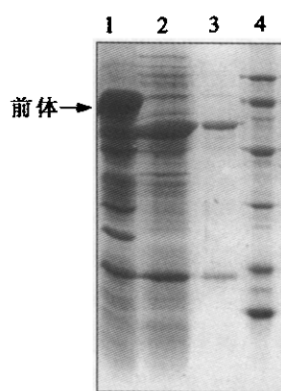


图6 菌体破碎后蛋白的 SDS-PAGE 图

1~4 分别为: 菌体破碎离心沉淀, 菌体破碎离心上清液, 色谱纯化活性峰, Marker, 对应条带分子量分别为 94, 67, 43, 31, 20, 14kD

3 结论

将去除了自身信号肽的 GL-7-ACA 酰化酶基因连接到质粒 pET-28 a 上, 构建得到产 GL-7-ACA 酰化酶重组大肠杆菌 BL21 (DE3) / pET-ACY。对重组菌进行了诱导表达, 结果发现, 诱导温度、诱导初始菌浓 OD_{600} 、诱导剂 IPTG 的用量等对 GL-7-ACA 酰化酶的表达均有较大的影响。在优化的表达条件下, GL-7-ACA 酰化酶的酶活可达 266 U/L, 在文献中属于较高水平^[2,5,6], 具有很好的工业应用前景。诱导的 GL-7-ACA 酰化酶经一步 DEAE-Sepharose 纯化即可达到 80% 的纯度, 酶活收率为 50%。

参考文献

- [1] Parmar A, Kumar H, Marwaha S S, *et al.* Crit Rev Biotechnol, 1998, 18 (1): 1 ~ 12.
- [2] 罗 晖, 李 强, 童忆舟, 等. 现代化工, 2002, 22 (12): 18 ~ 22.
- [3] Shibuya Y, Matsumoto K, Fujii T. Agric Biol Chem, 1981, 45 (7): 1561 ~ 1567.
- [4] Conlon H D, Baqai J, Baker K. *et al.* Biotechnol Bioeng, 1995, 46: 510-513
- [5] Li Y, Jiang W H., Yang Y L, *et al.* Protein Expres Purif, 1998, 12: 233 ~ 238.
- [6] Kim D W, Yoon K H. Biotechnol Lett, 2001, 23: 1067 ~ 1071.