

# 假单胞菌生物合成 L-半胱氨酸途径中脱硫基酶的研究\*

余养盛 李 洋 金永杰 白 钢\*\* 杨文博

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

**摘要:** 通过 PCR 方法扩增得到假单胞菌 TS1138 L-半胱氨酸脱硫基酶基因 (*cd*), 将其克隆至 pBluescript SKII 载体, 测定了含有 L-半胱氨酸脱硫基酶基因的 1.2kb DNA 片段序列, 并与其它菌株的脱硫基酶基因进行了同源性比较; 同时, 将其克隆至表达载体 pET-21a (+), IPTG 诱导表达, 表达产物经 Ni-NTA 柱亲和层析后, 得到纯化的重组蛋白。利用脱硫基酶的活性染色方法对重组表达的 L-半胱氨酸脱硫基酶进行了鉴定, 并探讨了 L-半胱氨酸脱硫基酶的酶学性质, 以及在生物转化合成 L-半胱氨酸途径中的关键作用。

**关键词:** L-半胱氨酸脱硫基酶, 假单胞菌, 基因克隆, 基因表达, 酶学性质

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0021-06

## Research of Desulphydrase Involved in L-cysteine Biosynthetic Pathway in *Pseudomonas* sp. \*

YU Yang-Sheng LI Yang JIN Yong-Jie BAI Gang\*\* YANG Wen-Bo

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071)

**Abstract:** The L-cysteine desulphydrase gene (*cd*) of *Pseudomonas* sp. TS1138 was amplified by PCR, and the amplified gene was recombined in the cloning vector pBluescript SKII. The 1.2kb DNA fragment containing *cd* was sequenced, and its homology with other desulphydrases was blast; then the *cd* was cloned into the expression vector pET-21a (+), and afterward expressed by IPTG inducement. The expression protein was purified by Ni-NTA His-Bind Resin. Then the expression protein was identified by the method of activity staining of desulphydrase, and the characterization of L-cysteine desulphydrase and the critical role it played in the L-cysteine biosynthetic pathway were discussed.

**Key words:** L-cysteine desulphydrase, *Pseudomonas* sp., Gene cloning, Gene expression, Enzymology characterization

L-半胱氨酸在医药、食品、化妆品等领域具有较广泛的用途。1977 年, Sano 等<sup>[1]</sup>人发现土壤中的嗜硫氮杂环戊烯假单胞菌 (*Pseudomonas thiozolinophilum*) 可以将 DL-2-氨基- $\Delta^2$ -噻唑啉-4-羧酸 (DL-2-Amino- $\Delta^2$ -thiazoline-4-carboxylic Acid, DL-ATC) 转化为 L-半胱氨酸。这种以化学合成的 ATC 为底物, 经微生物酶法合成 L-半胱氨酸的方法, 与传统的水解毛发制取 L-半胱氨酸的方法相比, 具有低能耗、产物均一、易提取和减少环境污染等优点。

本实验室从土壤中筛选获得的假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) TS1138 菌株, 可以将 DL-ATC 经中间产物 S-氨甲酰-L-半胱氨酸 (S-carbamyl-L-cysteine) 转化生成 L-半胱氨酸

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30470053)

天津市重点基金资助项目 (No. 05YFJZJC00900)

\*\* 通讯作者 Tel: 022-23508371, E-mail: gangbai@nankai.edu.cn

收稿日期: 2005-09-28, 修回日期: 2005-12-09

酸<sup>[2]</sup>，但是菌体内的 L-半胱氨酸脱巯基酶可将生成的 L-半胱氨酸分解为丙酮酸、 $H_2S$  和  $NH_3$ <sup>[3]</sup>，使得 L-半胱氨酸的产量大为降低。日本学者 Sano<sup>[1]</sup> 与韩国学者 Pae<sup>[4]</sup> 分别通过传统的诱变手段获得了脱巯基酶缺陷的产 L-半胱氨酸菌株，但传统的诱变方法有其工作量大、效率低等不足。虽然目前国外已经有关于大肠杆菌 (*Escherichia coli*)<sup>[5]</sup>、棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*)<sup>[6]</sup>、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)<sup>[7]</sup>、齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)<sup>[8]</sup>、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)<sup>[9]</sup> 等一些菌株中 L-半胱氨酸脱巯基酶的研究报道，但在假单胞菌生物合成 L-半胱氨酸途径中，L-半胱氨酸脱巯基酶的性质及其作用，国内外尚未见有相关研究。

本研究对假单胞菌 TS1138 的 L-半胱氨酸脱巯基酶基因进行了克隆与鉴定，为利用现代分子生物学手段敲除脱巯基酶基因奠定基础，对最终构建 L-半胱氨酸高转化率菌株具有重要的实际意义。此外，对 L-半胱氨酸脱巯基酶在假单胞菌 TS1138 生物合成 L-半胱氨酸途径中功能的探讨，也为阐明 L-半胱氨酸完整的代谢途径奠定了实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种：**假单胞菌 TS1138、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21 (DE3)、质粒 pBluescript SKII 和 pET-21a (+) 均为本实验室保存。

**1.1.2 培养基：**种子培养基：葡萄糖 20g，ATC 3g，玉米浆 5g，尿素 3g，NaCl 1.5g， $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.1g， $K_2HPO_4$  3g， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g， $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01g，定容至 1L，pH 7.5；产酶培养基：葡萄糖 30g，ATC 4g，玉米浆 1g，尿素 3g，NaCl 1.5g， $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.1g， $K_2HPO_4$  3g， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g， $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01g，定容至 1L，pH 7.5。

**1.1.3 工具酶和主要试剂：**各种工具酶，大连宝生物生物工程公司产品；Ni-NTA 纯化系统，Invitrogen 公司产品；L-半胱氨酸，华美生物工程公司产品；2, 4-二硝基苯胍，北京化工厂产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养方法：**从斜面上挑取一环菌接入 25mL 种子培养基中，28℃ 120r/min 培养 16h 后，以 10% 接种量转接至 50mL 产酶培养基，28℃ 120r/min 培养 16h。

**1.2.2 L-半胱氨酸脱巯基酶基因克隆：**根据恶臭假单胞菌 KT2440 的脱巯基酶基因序列<sup>[10]</sup>，自行设计 L-半胱氨酸脱巯基酶基因上游引物 5' CCG GGA TCC ATG AAG TTG CCG ATC TAC CTT G-3' (引入 *Bam*HI 切点)，下游引物 5' CCC AAG CTT TTA GTG GGC GGC CCA CTC-3' (引入 *Hind*III 切点)。以假单胞菌 TS1138 基因组 DNA 为模板，PCR 扩增得到 1.2kb 大小的片段，将该片段克隆到 pBluescript SKII 载体，转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。

**1.2.3 L-半胱氨酸脱巯基酶的重组表达与分离纯化：**将 L-半胱氨酸脱巯基酶基因克隆到表达载体 pET-21a (+)，转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，加 IPTG (终浓度 1mmol/L) 于 30℃ 诱导表达 14h。表达产物经 Ni-NTA 柱进行分离纯化。

**1.2.4 L-半胱氨酸脱巯基酶活力测定：**采用 2, 4-二硝基苯胍法<sup>[11]</sup>，L-半胱氨酸脱巯基酶分解 L-半胱氨酸生成丙酮酸。丙酮酸与 2, 4-二硝基苯胍生成红棕色化合物，其颜色深浅与丙酮酸生成量成正比关系。取 1mL 底物溶液 (0.75mL 0.05% L-半胱氨酸，

0.25mL 6%  $K_2HPO_4$ ), 加入 0.5mL L-半胱氨酸脱巯基酶液, 37℃ 反应 2h, 取 0.25mL 反应液, 加入 0.25mL 2, 4-二硝基苯肼溶液, 37℃ 水浴反应 20min, 然后加入 0.4mol/L NaOH 2.5mL, 10min 后于 500nm 波长下比色。酶活力定义: 每分钟生成 1 $\mu$ mol 产物丙酮酸所需的酶量作为一个酶活力单位。

**1.2.5 L-半胱氨酸脱巯基酶活性染色:** 采用脱巯基酶活性染色方法<sup>[12]</sup> 鉴定 L-半胱氨酸脱巯基酶活性。对 L-半胱氨酸脱巯基酶粗酶液<sup>[13]</sup> 进行 8% 非变性 PAGE 分析, 凝胶用酶染液 (100mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L EDTA, 50mmol/L L-半胱氨酸, 20mmol/L 磷酸吡哆醛, 1.6mmol/L  $BiCl_3$ , pH7.5) 染色, 室温振荡显色, 照相保存。

**1.2.6 L-半胱氨酸脱巯基酶酶学性质实验:** 按文献 [13] 的方法进行。

**1.2.7 L-半胱氨酸含量测定:** 采用酸式茚三酮法<sup>[14]</sup>, 200 $\mu$ L 反应液 (1mL 粗酶液与 2mL 底物溶液 37℃ 反应 3h, 底物溶液: 1.5% DL-ATC, 1.5%  $K_2PO_4$ , 0.01% 羟胺) 加入 200 $\mu$ L 冰醋酸, 再加入 200 $\mu$ L 酸式茚三酮试剂, 于沸水浴中反应 10min, 然后立即在冷水中冷却, 最后加入 2.4mL 工业酒精, 总体积 3mL, 于 560nm 波长下比色。

## 2 结果与分析

### 2.1 L-半胱氨酸脱巯基酶基因的克隆、鉴定及同源性比较

以假单胞菌 TS1138 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到 L-半胱氨酸脱巯基酶基因, 克隆至 pBluescript SKII 载体, 进行酶切鉴定和 PCR 鉴定 (图 1)。测序后确定其开放阅读框框架长为 1,215bp, 编码 404 个氨基酸, 申请并获得 GenBank 序列号为 AY675347。

通过 NCBI 的 BLAST 程序与其它菌株所包含的脱巯基酶基因进行同源性比较 (图 2)。发现它同一些假单胞菌属的菌株 (*P. putida*, *P. syringae*, *P. aeruginosa*) 具有 88% ~ 99% 的同源性 (*P. fluorescens* 例外, 只有 73%); 同其它一些革兰氏阴性菌 (*Burkholderia*

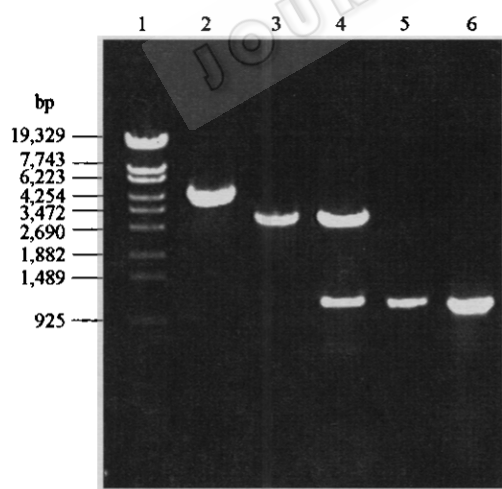


图 1 重组克隆载体的酶切鉴定、PCR 鉴定

1  $\lambda$ -DNA/*Eco*T14 I digest, 2 重组克隆载体/*Hind*III, 3 空 pBluescript SKII/*Bam*HI + *Hind*III, 4 重组克隆载体/*Bam*HI + *Hind*III, 5 以重组克隆载体为模板的 PCR 产物, 6 以 TS1138 基因组 DNA 为模板的 PCR 产物

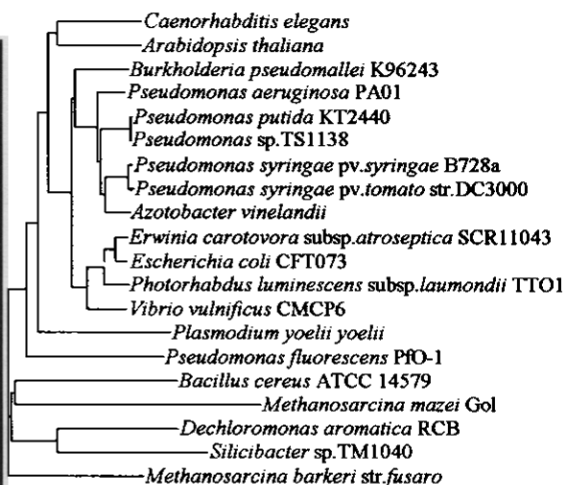


图 2 脱巯基酶基因同源性聚类分析

*pseudomallei*, *Azotobacter vinelandii*, *Erwinia carotovora* subsp., *Escherichia coli* 和 *Vibrio vulnificus*) 分别具有 73% ~ 89% 的同源性; 与一些革兰氏阳性菌 (*Photorhabdus luminescens* subsp., *Bacillus cereus*, *Methanosarcina mazei*) 以及真菌 (*Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Plasmodium yoelii yoelii*, *Dechloromonas aromatica* RCB, *Methanosarcina barkeri* str. *Fusaro*) 分别具有 19% ~ 73% 的同源性。分析结果表明, 假单胞菌 TS1138 菌株与恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) KT2440 具有最近的亲缘关系 (98.3%), 可能同属于恶臭假单胞菌。

## 2.2 L-半胱氨酸脱巯基酶的重组表达、分离纯化与活性鉴定

将 L-半胱氨酸脱巯基酶基因克隆入 pET-21a (+) 表达载体, 得到 pET-*cd*, 对阳性克隆菌株进行 IPTG 诱导表达, 表达产物通过 Ni-NTA 亲和层析进行分离纯化。对表达产物进行 12% SDS-PAGE 和 8% 非变性-PAGE 分析, 结果如图 3 所示。与包含空载体 pET-21a (+) 的菌株相比较 (图 3A 第 1 道), 包含 pET-*cd* 的菌株大量表达了分子量约为 53kD 的重组蛋白 (图 3A 第 3 道), 与野生型假单胞菌 TS1138 表达的脱巯基酶蛋白分子量相一致 (图 3A 第 5 道)<sup>[13]</sup>。虽然大肠杆菌自身也含有相对分子量约 53kD 的脱巯基酶 (图 3B 第 1 道), 但经 pET-21a (+) 表达的重组蛋白带有 His 标签, 并可通过 Ni-NTA 亲和层析得以分离纯化, 因而与大肠杆菌的脱巯基酶相区分 (图 3A、B 第 2、4 道)。

酶活性染色的结果显示, 从假单胞菌 TS1138 纯化得到的 L-半胱氨酸脱巯基酶与重组表达的 L-半胱氨酸脱巯基酶在相同位置都呈现出单一条带 (图 3B 第 4、6 道)。

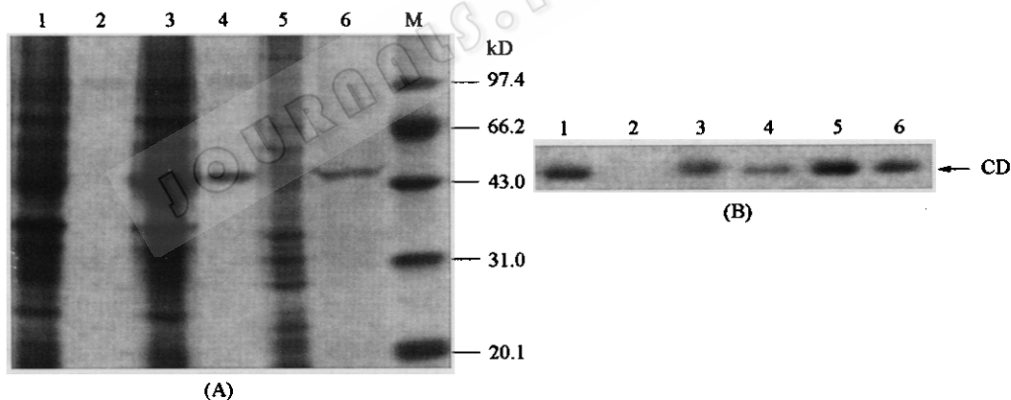


图 3 脱巯基酶的 SDS-PAGE (A) 和酶活性染色 (B)

(A): M 标准蛋白, 1 包含空载体 pET-21a (+) 的 BL21 (DE3), 3 包含 pET-*cd* 的 BL21 (DE3), 5 假单胞菌 TS1138, 2 和 4 包含 pET-21a (+) 的 BL21 (DE3) 和包含 pET-*cd* 的 BL21 (DE3) 经 Ni-NTA 纯化产物, 6 假单胞菌 TS1138 的纯化产物, (B): 非变性 PAGE 及脱巯基酶活性染色, 1~6 样品同 (A)

## 2.3 L-半胱氨酸脱巯基酶的酶学性质

按照文献 [13] 的方法, 对纯化后的重组 L-半胱氨酸脱巯基酶进行了酶学性质测定。

以不同浓度 L-半胱氨酸为反应底物时, 测得 L-半胱氨酸脱巯基酶的米氏常数  $K_m$  值为 2.63mmol/L; 最大反应速度  $V_{max}$  为 0.10mmol/mL · min, 数值与从假单胞菌 TS1138 纯化得到的 L-半胱氨酸脱巯基酶的  $K_m$  值和  $V_{max}$  基本一致。

图 4 的结果表明, 重组 L-半胱氨酸脱巯基酶的 pH 耐受范围为 pH6.0 ~ 9.0, 最适

作用 pH 值为 pH7.5；该酶在 0℃ ~ 50℃ 下较稳定，为适中温型酶，最适反应温度为 35℃ ~ 37℃。同样也发现， $Zn^{2+}$  对该酶有很强的抑制作用，而  $Pb^{2+}$  对该酶则有很强的激活作用，羟胺可作为该酶的特异性抑制剂<sup>[13]</sup>。

2.4 L-半胱氨酸脱巯基酶在 L-半胱氨酸生物合成途径中的作用

为了鉴定 L-半胱氨酸脱巯基酶在假单胞菌 TS1138 合成 L-半胱氨酸过程中的作用，进行了如下实验：取 4mL 粗酶液与 8mL 的底物溶液（0.75% DL-ATC，11mmol/L  $K_2HPO_4$ ，170mmol/L NaCl，pH7.5）在 37℃ 下反应，底物溶液中分别添加或不添加 L-半胱氨酸脱巯基酶抑制剂（1mmol/L 羟胺，5mmol/L  $ZnSO_4$ ）。在不同反应时间分别测定 L-半胱氨酸和丙酮酸的含量。

图 5 的结果表明，在合成 L-半胱氨酸的同时也伴随着脱巯基酶对 L-半胱氨酸的分解过程，随着反应时间的延长，L-半胱氨酸产量也随之下降，而丙酮酸量则持续增加。与不含 L-半胱氨酸脱巯基酶抑制剂的对照相比，加入抑制剂后，明显延缓了 L-半胱氨酸分解为丙酮酸的过程，在反应 4h 时，L-半胱氨酸有最大生成量，为 3.28mmol/L，同时丙酮酸累积量减少了 0.55mmol/L。

上述结果表明，L-半胱氨酸脱巯基酶对 L-半胱氨酸的分解起关键作用，L-半胱氨酸脱巯基酶的存在严重影响了目的产物 L-半胱氨酸的积累。

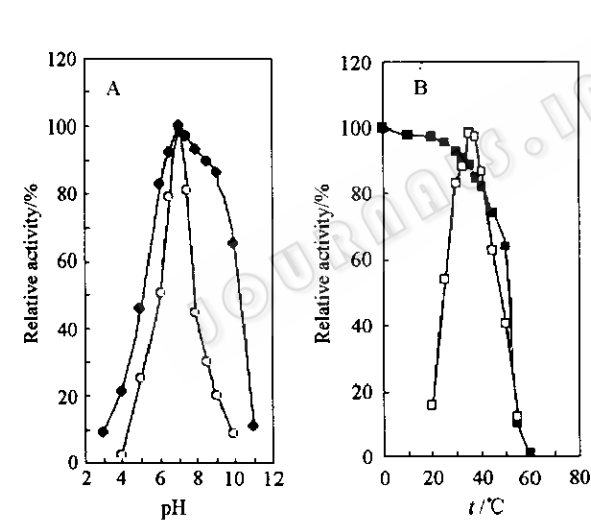


图 4 pH 和温度对脱巯基酶活性的影响

A: 最适反应 pH (○) 和 pH 耐受性 (●), B: 最适反应温度 (□) 和温度耐受性 (■)

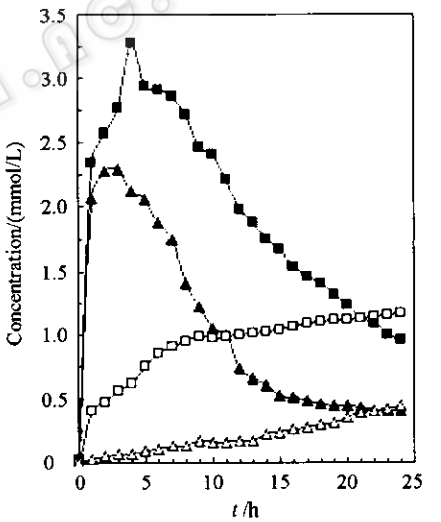


图 5 脱巯基酶对 L-半胱氨酸的作用

包含抑制剂时 L-半胱氨酸含量 (■), 不包含抑制剂时 L-半胱氨酸含量 (▲), 包含抑制剂时丙酮酸含量 (△), 不包含抑制剂时丙酮酸含量 (□)

3 讨论

本实验克隆并鉴定了假单胞菌 TS1138 的 L-半胱氨酸脱巯基酶基因，并利用 pET-21a (+) 表达载体进行了表达。在采用脱巯基酶活性染色方法对 L-半胱氨酸脱巯基酶进行鉴定的基础上，对 L-半胱氨酸脱巯基酶的酶学性质进行了考察，发现羟胺和  $Zn^{2+}$  能够有效地抑制其活性，而  $Pb^{2+}$  对该酶有很强的激活作用。并进一步确认了 L-半胱氨酸脱巯基酶在 L-半胱氨酸合成途径中的作用。

由于 L-半胱氨酸脱巯基酶的存在明显降低了 L-半胱氨酸的产量, 因此需要寻找一种抑制其活性的方法。除了使用 L-半胱氨酸脱巯基酶抑制剂的方法外, 利用传统的物理或化学诱变的方法可以进行脱巯基酶缺陷菌株的筛选; 同时, 采用现代分子生物学技术手段也可以对脱巯基酶基因进行敲除, 从而有可能构建 L-半胱氨酸的高转化率菌株。

L-半胱氨酸脱巯基酶基因的克隆及其在 L-半胱氨酸合成途径中功能的探讨, 为我们进一步研究假单胞菌 TS1138 生物合成 L-半胱氨酸的代谢途径和利用酶法合成 L-半胱氨酸的大量生产奠定了重要的实验基础。

### 参 考 文 献

- [1] Sano K, Yokozeki K, Tamura F, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1977, **34** (6): 806 ~ 810.
- [2] 刘 忠, 杨文博, 白 钢, 等. 微生物学通报, 2003, **30** (6): 16 ~ 21.
- [3] Zheng L, White R H, Cash V L, *et al.* Biochemistry, 1994, **33**: 4714 ~ 4720.
- [4] Pae K M, Ryu O H, Yoon H S, *et al.* Biotechnol Lett, 1992, **4** (12): 1143 ~ 1148.
- [5] Awano N, Wada M, Kohdoh A, *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 2003, **62**: 239 ~ 243.
- [6] Zheng L, White R H, Cash V L, *et al.* Proc Natl Acad Sci, 1993, **90**: 2754 ~ 2758.
- [7] Fukamachi H, Nakano Y, Yoshimura M, *et al.* FEMS Microbiol Lett, 2002, **215** (1): 75 ~ 80.
- [8] Kurzban G P, Chu L, Ebersole J L, *et al.* Oral Microbiol Immunol, 1999, **14** (3): 153 ~ 164.
- [9] Wada M, Awano N, Haisa K, *et al.* FEMS Microbiol Lett, 2002, **217** (1): 103 ~ 107.
- [10] Nelson K E, Weinelt C, Paulsen I T, *et al.* Environmental Microbiology, 2002, **4** (12): 799 ~ 808.
- [11] 吴良欢, 蒋式洪, 陶勤南. 土壤通报, 1998, **29** (3): 136 ~ 138.
- [12] Zdych E, Peist R, Reidl J, *et al.* J Bacteriol, 1995, **177**: 5035 ~ 5039.
- [13] 金永杰, 杨文博, 刘 忠, 等. 南开大学学报 (自然科学版), 2004, **37** (4): 100 ~ 104.
- [14] 金永杰, 杨文博, 刘 忠, 等. 微生物学通报, 2004, **31** (6): 68 ~ 72.