

# 一株链霉菌菌株 NCPC-1020 中棘白霉素 B 脱酰基酶基因的克隆与功能分析

徐冬梅<sup>1,2Δ</sup> 可爱兵<sup>2Δ</sup> 路新华<sup>2</sup> 陈文青<sup>1,3</sup> 邓子新<sup>1,3\*</sup>

(1. 上海交通大学 生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200030)

(2. 华北制药集团新药研究开发有限责任公司 河北 石家庄 050015)

(3. 武汉大学 药学院 组合生物合成与药物发现教育部重点实验室 湖北 武汉 430071)

**摘要:** 【目的】从一株土壤放线菌来源的野生型链霉菌菌株 NCPC-1020 中克隆一个具有棘白霉素 B 脱酰基酶活性的新基因。【方法】采用 Degenerate 和 TAIL PCR 两种方法, 从链霉菌菌株 NCPC-1020 基因组中快速克隆获得了该基因序列, 然后将基因在变铅青链霉菌 TK24 中进行异源表达, 并进行全细胞催化底物脱酰基反应, 采用 LC-MS 检测反应产物。【结果】LC-MS 检测证实, 棘白霉素 B 结构中脂肪链被酶促水解, 从而证实该基因具有脱酰基酶活性。【结论】采用 Degenerate 以及 TAIL PCR 的方法能够快速获得未知功能的新基因。此基因的克隆, 奠定了进行半合成棘白霉素类药物的研发基础。

**关键词:** 链霉菌, 棘白霉素 B, Degenerate PCR, TAIL PCR, 脱酰基酶

## Molecular cloning and functional analysis of a gene encoding echinocandin B deacylase from *Streptomyces* sp. NCPC-1020

XU Dong-Mei<sup>1,2Δ</sup> KE Ai-Bing<sup>2Δ</sup> LU Xin-Hua<sup>2</sup> CHEN Wen-Qing<sup>1,3</sup> DENG Zi-Xin<sup>1,3\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

(2. NCPC New Drug Research and Development Co., Ltd, North China Pharmaceutical Group Corporation, Shijiazhuang, Hebei 050015, China)

(3. Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery (Wuhan University), Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

**Abstract:** [Objective] Cloning of a new gene possessing a function of Echinocandin B (ECB) side-chain deacylation from a wild type *Streptomyces* strain NCPC-1020 of soil source. [Methods] Using degenerate PCR and TAIL PCR strategy, we successfully cloned the target gene, which was heterologously expressed in *S. lividans* TK24, then a whole-cell catalysis method was developed to detect the deacylation activity of ECB deacylase by LC-MS. [Results] The ECB deacylase gene was cloned and its function was confirmed. [Conclusion] Combined the two PCR techniques, degenerate

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2012CB721004)

\*通讯作者: Tel/Fax: 86-21-62933404; ✉: zxdeng@sjtu.edu.cn

Δ并列第一作者

收稿日期: 2013-10-15; 接受日期: 2013-12-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-12-11

and TAIL PCR, a new gene could be cloned quickly. The obtain of the new ECB deacylase gene lays a good foundation for the researches on semibiosynthetic of ECB related drugs.

**Keywords:** *Streptomyces*, Echinocandin B, Degenerate PCR, Thermal asymmetric interlaced PCR, Deacylase

环脂肽类抗生素棘白霉素 B (ECB) (图 1, 左) 产自构巢曲霉, 是一种有效的抗真菌环肽类抗生素, 其通过抑制真菌细胞壁上 1,3- $\beta$ -D-葡聚糖的合成发挥抑菌功能<sup>[1]</sup>。常用的 ECB 类半合成药物包括米卡芬净、阿尼芬净以及卡泊芬净类药物<sup>[2]</sup>, 这些半合成药物有一个共同的特点, 即拥有相同的 ECB 环肽母核。利用脱酰基酶催化 ECB 底物脱掉酰基侧链, 可以有效得到环肽母核。

Degenerate PCR 从方法建立至今一直是个发

现新基因(基因家族、抗生素基因簇)的有效手段<sup>[3]</sup>。与普通 PCR 不同的是, Degenerate PCR 利用的是一组混合的简并引物, 此引物设计的原理基于密码子的简并性。通过对一组功能相关的蛋白进行比对分析, 找到其中相对保守的序列, 在 3'-端设计具有简并性的引物, 调整 Degenerate PCR 的反应条件, 可获得新基因保守区域的核酸序列。热不对称 PCR (TAIL PCR) 是一种获得已知核酸侧翼序列的有效方法<sup>[4]</sup>, 此方法主要是利用不对称的上下游引

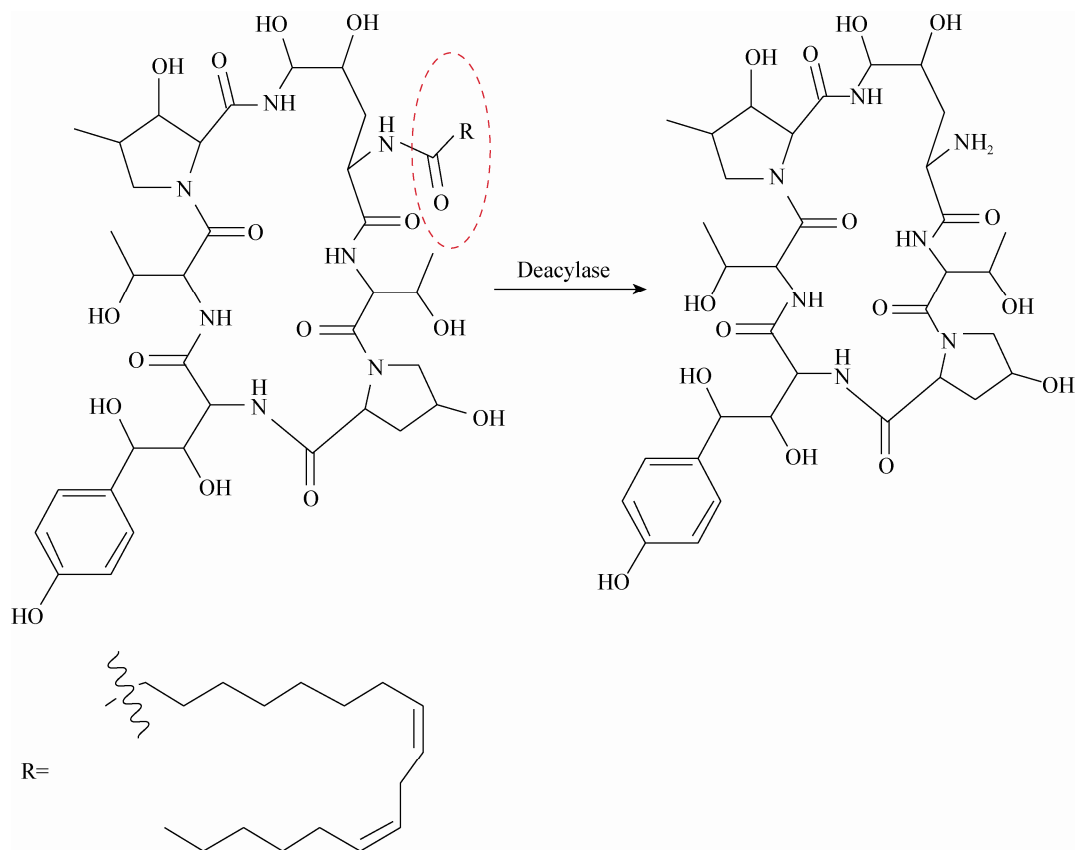


图 1 棘白霉素 B 脱酰基酶催化生成棘白霉素 B 母核

Figure 1 The production of the ECB nucleus is catalyzed by a deacylase

注: 棘白霉素 B 中的脂肪酸侧链(R)以酰胺键的形式与棘白霉素母核相连, 棘白霉素 B 脱酰基酶特异性的催化侧链酰胺键的断裂。

Note: The fatty acid side chain of echinocandin B ligated to the nucleus with amino bond, and the ECB deacylase catalyzes the breakage of the bond specially.

物,即在已知核酸序列的两端各设计至少一组(3条)巢式特异性引物作为上游引物,在远离已知序列的另一侧设计短随机引物(AD)作为下游引物,在特定的反应条件下,经过(3轮)巢式PCR扩增获得未知核酸序列。

众所周知,链霉菌在稳定期持续产生各种次级代谢产物,包括胞外酶、抗生素、酶抑制剂等。通过优化链霉菌菌株的培养条件,可大规模发酵生产有用的次级代谢产物。而 *Streptomyces lividans* TK24 经过修饰改造,去掉其生长非必需的基因元件后,已经成为一株表达外源高 G+C 含量基因/基因簇的通用菌株,同时很多配套载体已被构建并得到大量应用<sup>[5-7]</sup>。

前期工作中,丁彦博等从 NCPC 菌种库中筛选得到几株具有转化 ECB 脱酰基活性的阳性放线菌菌株,并对其发酵特性进行了分析<sup>[8]</sup>。本文综合 Degenerate PCR<sup>[9]</sup>以及热不对称 PCR<sup>[10]</sup>的方法,从一株阳性链霉菌菌株 *S. sp.* NCPC-1020 中克隆得到编码 ECB 脱酰基侧链活性的基因,并在 *S. lividans* TK24 中进行了异源表达。同青霉素酰化酶在 6-氨基青霉烷酸中间体生产中所发挥的重要作用一样,ECB 脱酰基酶基因的获得对抗真菌类抗生素以及其他相关半合成衍生抗生素的研究有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、载体及培养基

ECB 脱酰基酶产生菌 *S. sp.* NCPC-1020 分离自云南蒙自常绿阔叶林土壤。*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* ET12567/pUZ8002<sup>[11]</sup>以及 *S. lividans* TK24<sup>[12]</sup>等保藏于本实验室。pGEM T-Easy [宝生物工程(大连)有限公司]、pKC1139<sup>[12]</sup>等保存于本实验室。

*E. coli* 菌株在 LB 培养基中 37 °C 培养, *S. sp.* NCPC-1020、*S. lividans* TK24 以及接合子在固体 MS 培养基<sup>[12]</sup>中 28 °C 培养产孢等。ET12567/pUZ8002 菌株具有氯霉素抗性, pGEM T-Easy 和 pKC1139 质粒分别具有氨苄青霉素和阿

伯拉霉素抗性。

链霉菌中 ECB 脱酰基酶表达所用的种子培养基配方为(g/L): 葡萄糖 0.10、可溶性淀粉 0.20、棉籽粉 0.30、黄豆饼粉 0.15、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.10 和碳酸钙 0.02。发酵配方为(g/L): 葡萄糖 0.6、酵母提取物 0.1、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 (灭菌前调 pH 6.0)。基因组 DNA 的提取,大肠杆菌与链霉菌属间接合转移参照实用链霉菌操作手册所述<sup>[12]</sup>。*E. coli* 感受态细胞制备使用的 CaCl<sub>2</sub> 法及质粒提取采用的碱裂解法参照分子克隆<sup>[13]</sup>。

### 1.2 酶、引物和测序、抗生素、ECB 以及 ECB-n (棘白霉素 B 母核)标准品

限制性内切酶、ExTaq、T4 DNA 连接酶以及其它常用化学试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司。ECB 底物以及 ECB-n 环肽母核标准品来自华北制药集团新药研发中心。Ampicillin (50 mg/L), Apramycin (20 mg/L), Chloramphenicol (30 mg/L), Kanamycin (50 mg/L)和 Nalidixic acid (25 mg/L)购自 Sigma 公司。核苷酸引物在上海生工合成,核酸序列在宝生物工程(大连)有限公司测定。所用引物列于表 1 中,热不对称 PCR 反应条件见表 2,普通 PCR 均参考说明书,除退火温度外。

### 1.3 主要试剂及仪器

Thermo 冷冻高速离心机, Thermo 公司; DYY-III-6B 电泳仪,上海达平; Bio-Rad MyCycler<sup>TM</sup> PCR 仪、Bio-Rad 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 5  $\mu$ m Diamonsil C<sub>18</sub> 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm), Dikma 公司; Waters515 高效液相色谱仪, Waters 公司; ZMD Micromass 质谱仪, Waters 公司。

### 1.4 ECB 脱酰基酶基因的克隆

用 16S rDNA 引物, pA 和 pH<sup>[14]</sup>, 以链霉菌基因组 DNA 为模板,扩增 16S rDNA 保守序列。根据 CodeHop program<sup>[9]</sup>设计两对简并引物, ECB-CODEHOP-F1/ECB-CODEHOP-R1 和 ECB-CODEHOP-F2/ECB-CODEHOP-R2<sup>[3,9]</sup>用于扩增 ECB 脱酰基酶基因的保守区域。Degenerate PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 61 °C 30 s, 72 °C

表 1 引物序列 Table 1 Sequence of primers		
引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	备注 Note
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rDNA 扩增
pH	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	
ECB-CODEHOP-F1	GCTGCTGGCCAACccncaytwycc	
ECB-CODEHOP-R1	GGCGGCGATGGTrtnaccangg	保守的“NPH”
ECB-CODEHOP-F2	GAACCAGCTACGGCrtnccncayat	保守的“PWVN”
ECB-CODEHOP-R2	CGGTGCTCACGGTrtgnswccange	保守的“PHI”
TR3-SP-F1	CCCGGCGGAAGTAGAGGTCG	保守的“HTV”
TR3-SP-F2	GGTTCTTCGTCGGGAGGACAG	
TR3-SP-F3	CCGAAGTACCGCGACCGCTC	
TR3-SP-R1	ACGCCGGTCTCGGCCTCGGA	TAIL-PCR 特异性引物
TR3-SP-R2	GCAGCACCGCGGACATCCAG	
TR3-SP-R3	TGCGCCGTACCCAGGGGCT	
TR3-SP-R4	GGCGGAGGTACGGAGTCGCTC	
TR3-SP-R5	GGAACAAGACGGAACCGGTGTG	
TR3-SP-R6	CGGCGGCCGCGCGCTACCG	
AD <sub>6</sub>	SAWGGAWGWCCAGG	TAIL PCR AD 随机简并引物
AD <sub>8</sub>	SAWGWGAWGTCGAA	
F1-TR3	GCTCTAGAGCCGATGAGGTACGCGC	
R2-TR3	CGGGATCCCGCCAAGTCCGTATC	蛋白表达引物

表 2 反应条件 Table 2 Reaction condition			
反应 Reaction	序号 No.	循环 Cycles	温度及时间 T <sub>m</sub> and time
第一轮 The first round	1	1	94 °C 2 min; 97 °C 5 min
	2	5	95 °C 30 s; 62 °C 1 min; 72 °C 2.5 min
	3	1	94 °C 30 s; 30 °C 3 min; up to 72 °C slowly (over 3 min) and 72 °C 2.5 min
	4	15	94 °C 30 s; 65 °C 1 min; 72 °C 2.5 min
第二、第三轮 The second /third round			94 °C 30 s; 65 °C 1 min; 72 °C 2.5 min
			94 °C 30 s; 44 °C 1 min; 72 °C 2.5 min
	5	1	72 °C 5 min
	6	1	94 °C 4 min
	7	12	94 °C 30 s; 65 °C 1 min; 72 °C 2.5 min
			94 °C 30 s; 65 °C 1 min; 72 °C 2.5 min
			94 °C 30 s; 44 °C 1 min; 72 °C 2.5 min
	8	1	72 °C 5 min

40 s，共 35 个循环；72 °C 10 min 补足未扩增完全的产物。Degenerate PCR 扩增获得的核酸片段(经测序鉴定)认为是基因的保守区域。利用 TAIL PCR 扩增保守区域侧翼序列，引物序列见表 1，反应条件见表 2<sup>[10,15-16]</sup>。反向引物使用两条短随机简并引物(AD 引物)：AD<sub>6</sub>和 AD<sub>8</sub><sup>[17]</sup>。正向引物采用(3 条

分3轮)巢式PCR特异性引物。其中,在保守区域上游一侧设计了一组巢氏引物,TR3-SP-F1/TR3-SP-F2/TR3-SP-F3(依次缩进),分别同随机简并引物AD<sub>6</sub>一同扩增未知序列;在保守区域下游一侧设计了两组巢氏特异性引物,首先用TR3-SP-R1/TR3-SP-R2/TR3-SP-R3分别同AD<sub>8</sub>扩增,接着跟进设计另一组巢式引物TR3-SP-R4/TR3-SP-R5/TR3-SP-R6,同AD<sub>8</sub>继续扩增保守区域下游的全部序列至包含其终止密码子。3轮巢氏PCR反应中,第1轮的PCR产物稀释100倍后用作第2轮反应的模板,依次类推至第3轮反应,三轮反应后回收琼脂糖凝胶中核酸片段。理论上,三轮反应的产物大小依次缩短,将最后一轮的PCR产物纯化回收后,连接T-载体,转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,菌液送宝生物工程(大连)有限公司测序。

### 1.5 载体的构建、接合转移以及异源表达

根据ECB脱酰基酶基因全序列信息设计特异性引物,F1-TR3/R2-TR3(分别含有Xba I和BamH I酶切位点),以基因组DNA为模板,用ExTaq酶扩增包含启动子区的全部ECB脱酰基酶基因。产物经琼脂糖凝胶电泳纯化回收后,连接pGEM-T载体,转化*E. coli* DH5 $\alpha$ 。构建好的克隆载体经酶切以及PCR验证后,菌液送宝生物工程(大连)有限公司测序。测序结果经信息学分析后提交至GenBank数据库。然后,将克隆载体用Xba I和BamH I双酶切,回收脱酰基酶DNA片段连至载体pKC1139,构建表达载体pKCE1139,转化大肠杆菌ET12567/pUZ8002进行大肠杆菌与链霉菌的属间接合转移。经过抗性筛选以及PCR验证后,将ECB脱酰基酶接合转至*S. lividans* TK24宿主中表达<sup>[12]</sup>。

### 1.6 ECB脱酰基试验

将异源表达菌*S. lividans* TK24/pKCE1139、阳性和阴性对照菌株*S. sp.* NCPC-1020和*S. lividans* TK24/pKC1139分别接入种子培养基,28℃、220 r/min培养3 d,然后以2%的接种量将种子培养物接至发酵培养基继续培养3 d。ECB底物溶于甲醇,以底物终浓度500 mg/L以及1%甲醇终浓度

加入发酵液中,同时加入1/3体积的0.05 mol/L磷酸二氢钾-磷酸二氢钠缓冲液(pH 6.0),28℃、220 r/min反应7 h。1 min高速离心分离上清和菌体。在210 nm下,将反应后的上清进行LC/MS检测。LC/MS条件是Hypersil C<sub>18</sub> 250 mm×4.6 mm,10  $\mu$ m柱,流动相乙腈-水(0.05% TFA),梯度洗脱程序0–5 min (4%乙腈)、5–10 min (4%–55%乙腈)、10–20 min (55%乙腈),流速1 mL/min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 ECB脱酰基酶基因保守区域的扩增

对阳性菌的16S rDNA保守区域进行信息学分析发现,其序列与链霉菌属菌株具有99%的相似性,可初步鉴定其属于链霉菌属。以来自*Actinoplanes utahensis*具有相似功能的ECB酰化酶(BAJ14711)为对象,在GenBank中寻找功能相似的蛋白,选择以下同源酶蛋白Aculeacin A acylase (BAJ14711.1)、Cyclic lipopeptide acylase (BAD07025.1)、Peptidase S45 (YP001536921.1)、Aculeacin-A acylase (P29958.1)、Penicillin V acylase (ZP06914907.1)和Acyl-homoserine lactone acylase (AA0411103.1)进行Clustal W比对。选择比较保守的两个区域,通过CodeHop在线分析软件(<http://blocks.fhcr.org/codehop/codehop.html>)(图2A),设计了保守性强、有交叉重复的两对简并引物ECB-CODEHOP-F1/ECB-CODEHOP-R1和ECB-CODEHOP-F2/ECB-CODEHOP-R2(图2B),进行PCR扩增分别获得了长度为526 bp和795 bp的两条核酸序列,最终拼接获得大约1 149 bp的核酸序列。经信息学比对分析,此酶蛋白与酰化酶相似性高(50%–80%),初步确定了ECB脱酰基酶保守区域的核酸序列。

### 2.2 ECB脱酰基酶基因全序列的获得

在保守区域上下游分别设计正向巢式特异性引物,同下游反向AD引物一起,采用TAIL PCR的方法扩增侧翼未知序列。为了扩增保守区域下游的核酸序列,设计了两组(每组3条)巢式PCR引

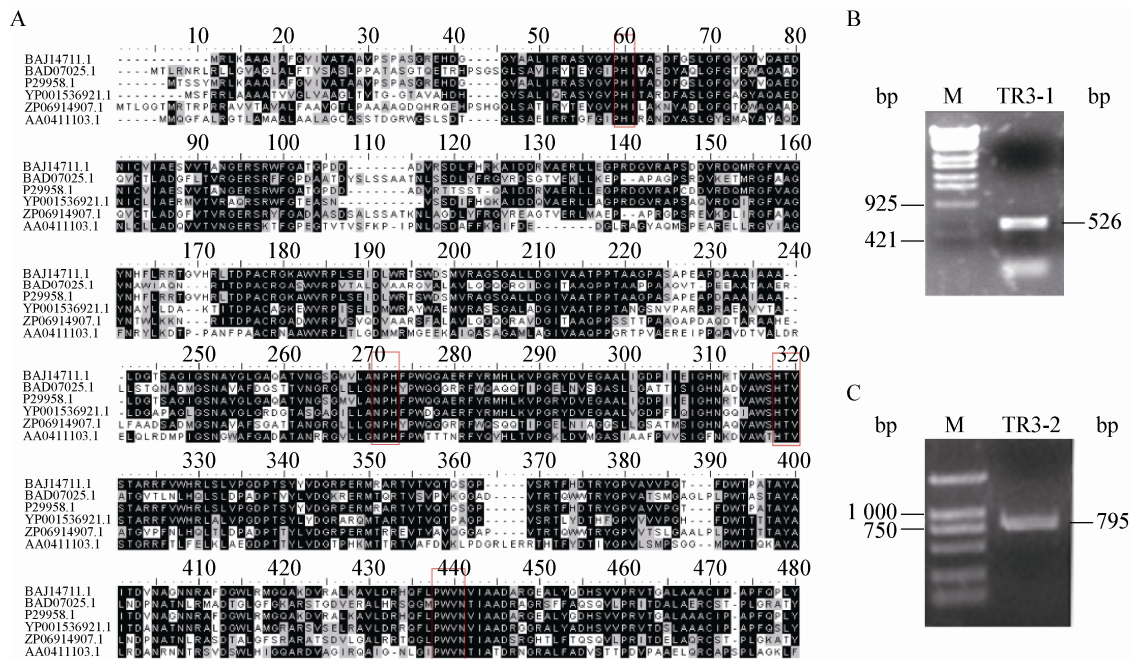


图 2 ECB 脱酰基酶同源蛋白的信息学分析、简并引物设计以及琼脂糖凝胶电泳

**Figure 2 Analysis of the conserved regions of homologous proteins related to an ECB deacylase, degenerate primers design and agarose electrophoresis**

注: A: 红色框内为同源蛋白的保守氨基酸残基, 用于简并 PCR 引物的设计; B: TR3-1 是保守区核酸 DNA 片段, 根据保守区(“NPH”和“PWVN”)设计的简并引物扩增获得; C: TR3-2 是保守区核酸 DNA 片段, 根据保守区(“PHI”和“HTV”)设计的简并引物扩增获得。

Note: A: The conserved amino acid of homologous protein indicated by red box; B: TR3-1 indicated the conserved DNA fragment, the degenerate primer obtained according to the conserved amino acid (“NPH” and “PWVN”); C: TR3-2 indicated the conserved DNA fragment, the degenerate primer obtained according to the conserved amino acid (“PHI” and “HTV”).

物。结果表明, 两组 TAIL PCR 扩增获得了足以覆盖至终止密码子位置的完整基因序列。另外, 在保守区域上游, 设计了一组巢式 PCR 引物进行扩增。结果表明, 一轮热不对称 PCR 获得了基因保守区域上游(包含启动区)的未知序列(图 3, 表 2)。

根据 Degenerate 以及 TAIL PCR 获得的全基因序列信息, 设计特异性引物 F1-TR3/R2-TR3, PCR 扩增获得了 3 210 bp 的带有自身启动子的 ECB 脱酰基酶核酸片段(图 4A、B)。生物信息学分析显示, 克隆到的基因与来源于 *S. sp.* FERM BP-5809 菌株的环脂肽酰化酶(BAD07025.1)相似性为 80%, 与来源于 *S. sviceps* 的青霉素 V 酰化酶(ZP06914907.1)相似性为 74%, 与来源于 *A.*

*utahensis* 的 Aculeacin-A 酰化酶(P29958.1)相似性为 43%。尽管获得外源基因核酸序列的方法众多(如构建基因文库等), 但是利用 Degenerate 以及 TAIL PCR 两种方法节省了财力、物力以及缩短了研究的时间。

### 2.3 基因序列号

ECB 脱酰基酶基因在 GenBank 中的序列号为 HM851181, 其来源菌株 16S rDNA 保守区域核酸序列号为 HQ836153。

### 2.4 ECB 脱酰基酶基因的异源表达

将包含自身启动子的 3 210 bp ECB 脱酰基酶基因的表达载体 pKCE1139 接合转移至 *S. lividan* TK24 宿主中进行异源表达。阳性接合子经过 2 d 的种子培养, 3 d 的发酵培养后, 在发酵液中加入

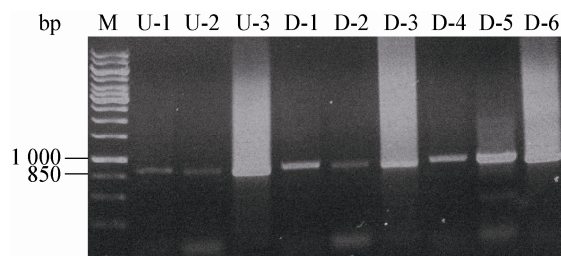


图3 琼脂糖凝胶电泳分离热不对称 PCR (TAIL PCR) 获得的保守区侧翼的 DNA 片段

**Figure 3 The flanking sequences obtained by TAIL PCR separated by agarose electrophoresis**

注：热不对称 PCR 扩增 ECB 脱酰基酶基因保守区侧翼序列。其中 U-1、U-2 和 U-3 是由巢式前引物 TR3-SP-F1、TR3-SP-F2、TR3-SP-F3 分别与 AD<sub>6</sub> 扩增获得的侧翼片段；D-1、D-2 和 D-3 是由巢式前引物 TR3-SP-R1、TR3-SP-R2、TR3-SP-R3 分别与 AD<sub>8</sub> 扩增获得的侧翼片段；D-4、D-5 和 D-6 是由巢式前引物 TR3-SP-R4、TR3-SP-R5、TR3-SP-R6 分别与 AD<sub>8</sub> 扩增获得的侧翼片段。

Note: The flanking DNA fragment obtained by TAIL PCR. The U-1, U-2 and U-3 obtained by the nested forward primers TR3-SP-F1, TR3-SP-F2, TR3-SP-F3 with AD<sub>6</sub> as the reverse primer. D-1, D-2 and D-3 obtained by the nested forward primers TR3-SP-R1, TR3-SP-R2, TR3-SP-R3 with AD<sub>8</sub> as the reverse primer. D-4, D-5 and D-6 obtained by the nested forward primers TR3-SP-R4, TR3-SP-R5, TR3-SP-R6 with AD<sub>8</sub> as the reverse primer.

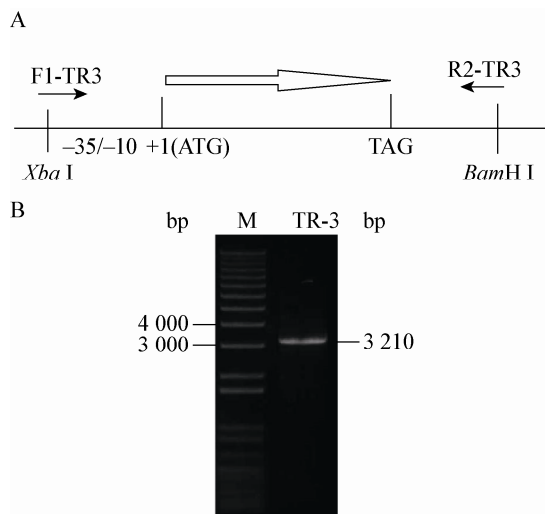


图4 ECB 脱酰基基因的获得

**Figure 4 Obtain the gene of ECB deacylase**

注：A：扩增到的 ECB 脱酰基酶基因片段，包含其自身启动子，片段两端含有 Xba I 和 BamH I 酶切位点。B：1%的琼脂糖凝胶电泳验证 ECB 脱酰基酶基因。

Note: A: The ECD deacylase gene fragment including the promoter itself, on the sides of the DNA fragment have the Xba I and BamH I sites. B: Confirmation of the ECB deacylase gene cloned by 1% agarose gel electrophoresis.

ECB 底物以及一定浓度的缓冲液，继续摇培 7 h 以使酶底物充分反应。高速离心，取上清液检测反应产物 ECB 环肽母核。LC-MS 检测结果显示：在 8.8 min 左右有一个核质比为 798.19  $[m/z]$  吸收峰 (图 5)，表明 ECB 经过全细胞脱酰基酶催化产生了环肽母核产物。其中，阳性结果参考于 ECB-n 标准品 (图 5D)。在同等条件下，ECB-n 标品在 8.8 min 左右有吸收峰，而负对照菌株 *S. lividans* TK24/pKC1139 的发酵液进行脱酰基反应后，液相图谱上没有 ECB-n 峰产生，表明其不具有转化棘白霉素 B 的活性 (图 5E)。

进一步分离菌体与发酵液上清，分别进行脱酰基试验发现：大部分的环肽母核产物分布在菌体沉淀的反应体系中，这与成熟的 Aculeacin-A 酰化酶 (P29958.1) 位于细胞膜上是相似的<sup>[18]</sup>。由于基因在游离载体上多拷贝表达，异源表达在 *S. lividans* TK24 中的 ECB 脱酰基酶的催化活性高于野生型菌株，这与预测结果一致，在此次反应条件下粗略估计约是其 3 倍左右 (数据未列出)。

## 2.5 ECB 脱酰基酶蛋白的信息学分析

生物信息学分析，ECB 脱酰基酶属于青霉素酰化酶 (EC: 3.5.1.11) 家族，最初是以没有活性的前体形式存在，其前体蛋白包括信号肽、A/B 两个亚基、以及中间的连接肽 4 个部分。ECB 脱酰基酶属于 Ntn (N-terminal nucleophile) 脱水酶超家族，此家族中酶前体蛋白的自我催化成熟机制是保守的。大部分的酶蛋白前体是通过自我催化激活 N-末端亲核氨基酸，然后激活的氨基酸发生亲核攻击催化酰胺键的断裂，使其成为有活性的成熟蛋白，ECB 脱酰基酶的成熟蛋白是一个异源二聚体。

PSIPRED 蛋白结构预测软件 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 分析了其前体蛋白的二级结构，图 6 中标示了  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠，以及同源蛋白的保守区域 (活性氨基酸)，图上也显示出了一级结构上 4 种不同功能域的划分，如信号肽、小亚基、大亚基及其连接肽等。

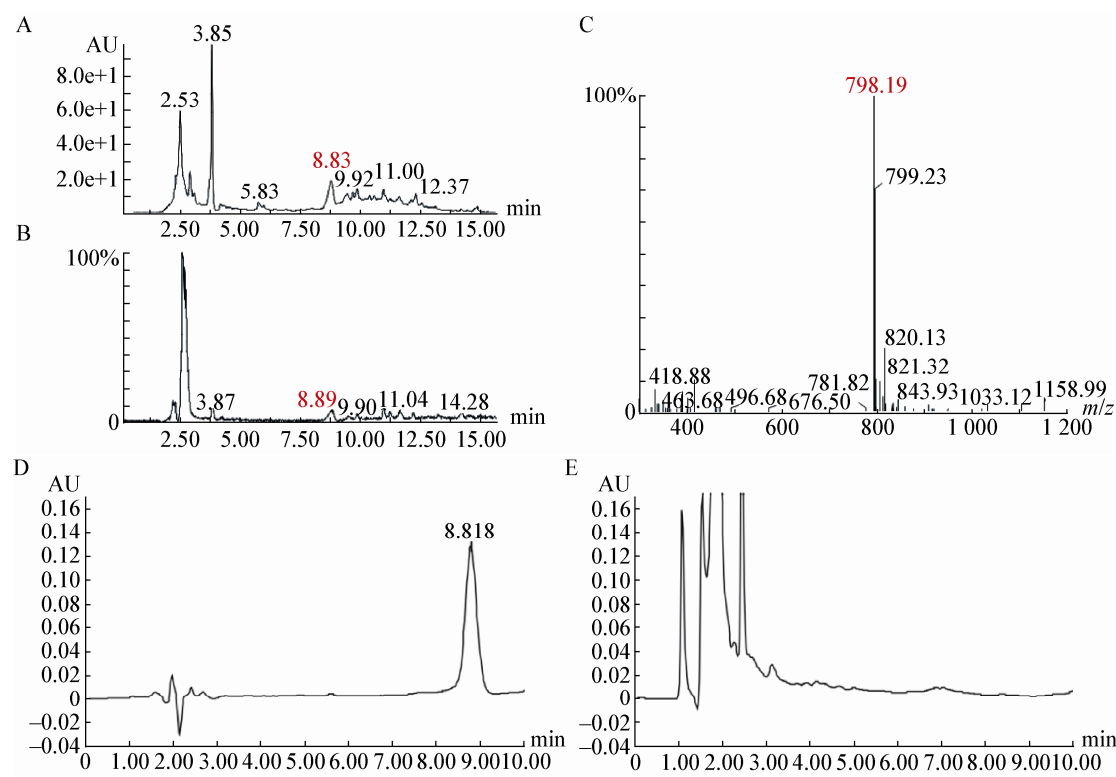


图 5 LC-MS 检测分析 ECB 脱酰基酶催化反应产物

Figure 5 LC-MS analysis of the catalyzed product of the ECB deacylase

注：A：HPLC 图，ECB 脱酰基反应的结果(UV 210 nm)，8.83 min 为产物峰。B：总离子流图，显示 8.89 min 的产物峰。C：MS 图，显示了 8.83 min 产物峰的核质比[M+H]<sup>+</sup>为 798.19。D：ECB-n 标准品 HPLC 图。E：负对照 HPLC 图。

Note: A: HPLC analysis of the product of ECB deacylation (UV 210 nm), the product peak is at 8.83 min. B: The graph of the total ion chromatogram, the product peak is at 8.89 min. C: the MS analysis indicated the [M+H]<sup>+</sup> of product is 798.19. D: HPLC analysis of ECB standard. E: HPLC analysis of the negative control.

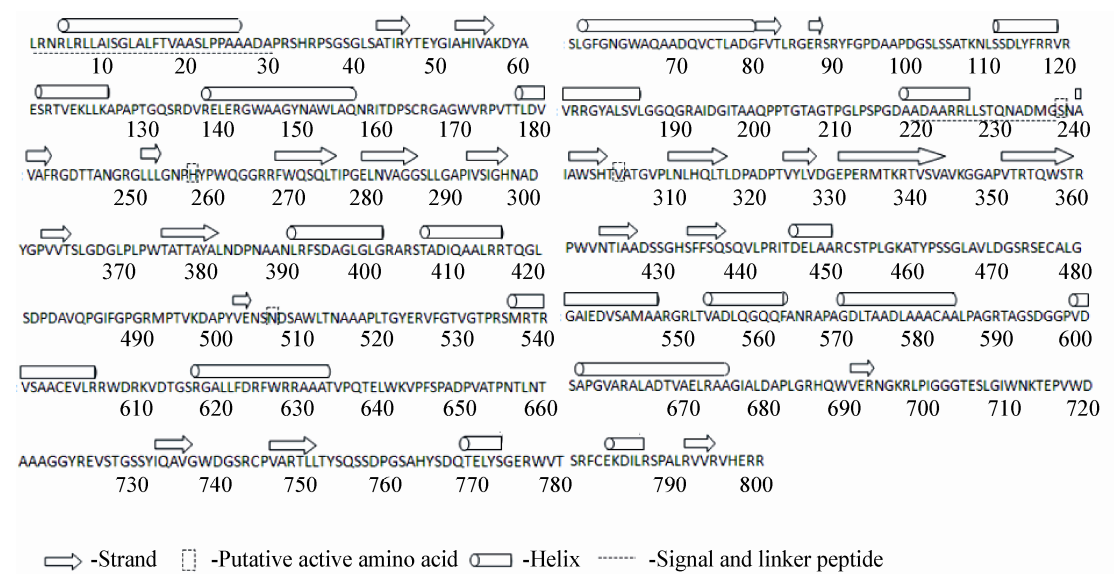


图 6 信息学分析 ECB 脱酰基酶的二级结构以及相关的活性位点

Figure 6 Analysis of the secondary structure of ECB deacylase and the active site related *in silico*

经 Signal P 3.0 Server 软件分析, ECB 脱酰基酶前体蛋白信号肽的断裂位点位于 ADA-PR 中间的酰胺键。另外, 与蛋白相似性较高的( $e$ -值为  $2.70\text{e-}118$ ) *S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350 的青霉素酰化酶 (pfam01804) 进行对比分析 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), 其前体蛋白的成熟机制与发挥功能的活性氨基酸位点 Ser240、His262、Asn511 和 Val309 有密切关系。ECB 脱酰基酶前体蛋白的成熟分为两步, 第一次催化发生在 Ser240 和 Gly239 之间的自我剪切, 其中 Ser240 上的氢基氧作为一个亲核原子攻击 Gly239 上的羧基碳, 接着水分子参与其中促进完成了第一次剪切成熟的过程<sup>[19]</sup>。酶前体蛋白成熟的第二次催化机制还不是很明确, 最近殷俊等<sup>[20]</sup>提出的有关 Ntn 家族头孢酰化酶新的分子内水解机制暗示 ECB 脱酰基酶前体蛋白成熟的第二次剪切可能也是分子内的水解。

青霉素 G 酰化酶(Penicillin G acylase, PGA)、头孢菌素酰化酶(Cephalosporin acylase, CA)以及 Aculeacin-A 酰化酶(Aculeacin A acylase)都属于  $\beta$ -内酰胺类酰化酶家族。PGA 和 CA 在促进 6-氨基青霉烷酸(6-APA)和 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)产青霉素和头孢菌素的工艺化生产中发挥了重要作用。虽然二者基因的序列同源性低, 但酶蛋白却有高度的结构相似性, 突出表现在含有保守的 Ntn 水解酶折叠结构。而 ECB 脱酰基酶和 Aculeacin A 酰化酶有 43% 的序列相似性, 却有相似的特异催化 ECB 脱酰基产生环肽母核的功能, 猜测这应该是由成熟酶蛋白的高级结构决定的, 二者也可能有高度相似的蛋白高级结构。因此, 作为前体蛋白成熟必须经历的自我催化步骤, 以及成熟蛋白在高级结构上是如何与底物相互作用的机制仍需深入研究, 这也将为后期进行 ECB 半合成药物相关的工艺研究提供理论基础。

### 3 总结

本文中, 采用 Degenerate 以及 TAIL PCR 的方

法, 快速地从野生型菌株中克隆到了新链霉菌来源的 ECB 脱酰基酶基因, 在 *S. lividans* TK24 中的异源表达进一步证实了 ECB 脱酰基酶基因的功能, 系统的克隆以及功能验证工作为以后获得其他功能的新基因奠定了方法学的基础。

### 参考文献

- [1] Sucher AJ, Chahine EB, Balcer HE. Echinocandins: the newest class of antifungals[J]. The Annals of Pharmacotherapy, 2009, 43(10): 1647-1657.
- [2] Boeck LD, Fukuda DS, Abbott BJ, et al. Deacylation of echinocandin B by *Actinoplanes utahensis*[J]. Journal Antibiotics (Tokyo), 1989, 42(3): 382-388.
- [3] Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, et al. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences[J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26(7): 1628-1635.
- [4] Antal Z, Rascle C, Fevre M, et al. Single oligonucleotide nested PCR: a rapid method for the isolation of genes and their flanking regions from expressed sequence tags[J]. Current Genetics, 2004, 46(4): 240-246.
- [5] Murooka Y, Ishizaki T, Nimi O, et al. Cloning and expression of a *Streptomyces* cholesterol oxidase gene in *Streptomyces lividans* with plasmid pIJ702[J]. Applied Environment Microbiology, 1986, 52(6): 1382-1385.
- [6] Bierman M, Logan R, O'Brien K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.[J]. Gene, 1992, 116(1): 43-49.
- [7] Luzhetskii AN, Ostash BE, Fedorenko VA. Interspecies conjugation of *Escherichia coli*-*Streptomyces globisporus* 1912 using integrative plasmid pSET152 and its derivatives[J]. Genetika, 2001, 37(10): 1340-1347.
- [8] 丁彦博, 可爱兵, 蔡超靖, 等. 新来源棘白霉素 B 脱酰基酶产生菌的筛选和转化条件优化[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(6): 449-454.
- [9] Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S. CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3763-3766.
- [10] Liu YG, Whittier RF. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking[J]. Genomics, 1995, 25(3): 674-681.
- [11] MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, et al. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector[J]. Gene, 1992, 111(1): 61-68.
- [12] Kieser T, Bibb MJ, Chater KF, et al. Practical Streptomyces Genetics[M]. 2nd ed. Norwich: John Innes Foundation, 2000: 162-516.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor

- Laboratory Press, 2001: 27-96.
- [14] Edwards U, Rogall T, Blocker H, et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA[J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17(19): 7843-7853.
- [15] Liu YG, Mitsukawa N, Whittier RF. Rapid sequencing of unpurified PCR products by thermal asymmetric PCR cycle sequencing using unlabeled sequencing primers[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(14): 3333-3334.
- [16] Liu YG, Huang N. Efficient amplification of insert end sequences from bacterial artificial chromosome clones by thermal asymmetric interlaced PCR[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1998, 16(2): 175-181.
- [17] Chen M, Liu H, Bai Y, et al. Homologous-restraint polymerase chain reaction: an efficient and rapid protocol to clone multiple homologous genes[J]. Current Microbiology, 2008, 57(1): 51-54.
- [18] Kreuzman AJ, Hodges RL, Swartling JR, et al. Membrane-associated echinocandin B deacylase of *Actinoplanes utahensis*: purification, characterization, heterologous cloning and enzymatic deacylation reaction[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2000, 24(3): 173-180.
- [19] Kim Y, Kim S, Earnest TN, et al. Precursor structure of cephalosporin acylase. Insights into autoproteolytic activation in a new N-terminal hydrolase family[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(4): 2823-2829.
- [20] Yin J, Deng Z, Zhao G, et al. The N-terminal nucleophile serine of cephalosporin acylase executes the second autoproteolytic cleavage and acylpeptide hydrolysis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(27): 24476-24486.

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不受理。

### 3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

#### 3.1 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏),大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

#### 3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“et al.”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整,不用缩写,不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰,成子强,史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔,黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬,张树政,方宣钧,等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华珞等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No. )

\*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2014-00-00; 接受日期: 2014-00-00; 优先数字出版日期([www.cnki.net](http://www.cnki.net)): 2014-00-00

(下转 p.1683)