

(S)-酮基布洛芬拆分用脂肪酶基因的克隆及表达

许丽娟, 赵玉红, 刘瑞恩, 赵运英, 张金红

南开大学生命科学学院, 天津 300071

摘要: 本实验室筛选出一株具有不对称拆分消旋酮基布洛芬氯乙酯的菌株 NK13 为材料, 经鉴定为巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*。通过构建其基因文库, 从中筛选得到阳性克隆重组子 pUC-NK1。测序分析表明, 该重组子质粒中包含一长度为 633 bp 的脂肪酶基因的完整开放阅读框, 核苷酸同源性对比证明该脂肪酶基因属首次发现 (GenBank Accession No. EU381317), 将此基因克隆到原核表达载体 pET21b(+) 中构建重组表达质粒 pET-NKest1, 转化 *Escherichia coli* BL21, 经 Isopropyl-β-D-Thiogalactoside (IPTG) 诱导在宿主菌中得到表达, 经 SDS-PAGE 电泳检测证明该脂肪酶成熟蛋白分子量约为 20 kDa。薄层层析与 HPLC 检测结果显示, 表达菌株转化外消旋酮基布洛芬氯乙酯得到 (S)-酮基布洛芬过量 (e.e. %), 由野生菌 NK13 的 5.84% 提高到 75.28%, 提高约 15 倍, 说明该脂肪酶具有优先拆分得到 (S)-酮基布洛芬的特性。

关键词: 不对称拆分, (S)-酮基布洛芬, 脂肪酶, 克隆, 表达

Cloning and expression of lipase gene to enantioselective resolution of (S)-ketoprofen

Lijuan Xu, Yuhong Zhao, Ruien Liu, Yunning Zhao, and Jinhong Zhang

College of Life Science of Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: We screened a strain NK13 for a certain extent asymmetric hydrolysis the *rac*-ketoprofen Chloroethyl ester to (S)-Ketoprofen. As identified, NK13 was *Bacillus megaterium*. Digested NK13 genomic DNA with *Sau*3AI partially and recovered the fragment from 2 kb to 6 kb, cleaved the plasmid of pUC18 with *Bam*H I, ligated the 2–6 kb fragment of NK13 genomic DNA into pUC18 plasmid, and then transformed an *Escherichia coli* strain DH5α. We created the gene library of NK13 and obtained a positive clone, pUC-NK1 in the library from the tributyrin flat. The result of sequencing showed that there was a whole open read frame (ORF) of 633 bp lipase gene in the plasmid of pUC-NK1. To compare with the genes of GenBank, this lipase gene was reported firstly (GenBank Accession No. EU381317). The lipase gene was amplified by PCR, using pUC-NK1 plasmid as template, and subcloned into the high expression vector pET21b(+) under the control of T7 promoter. The recombinant plasmid, pET-NKest1, was then transformed into an *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) for the production of recombinant lipase protein. After 3 hours of induction by isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG), lipase was expressed. SDS-PAGE analysis showed that the relative molecular mass of the lipase protein was about 20 kDa. The result of high performance liquid chromatography (HPLC) showed that the conversion rate of the recombinant strain was fifty times than the wild strain NK13's. The (S)-Ketoprofen enantiomeric excess of the recombinant strain was 75.28%, which indicated that the

Received: July 3, 2009; **Accepted:** November 5, 2009

Supported by: Natural Science Foundation of Tianjin (No. 05YFJMJC01100).

Corresponding author: Jinhong Zhang. Tel: +86-21-23508233; E-mail: jinhzhang@nankai.edu.cn

天津市自然科学基金项目 (No. 05YFJMJC01100) 资助。

lipase could hydrolyze (S)-Ketoprofen Chloroethyl ester firstly. If we research the conditions of the hydrolysis *rac*-ketoprofen Chloroethyl ester of this lipase further, maybe it could offer a foundation to product (S)-Ketoprofen industrially.

Keywords: enantioselectivity, (S)-Ketoprofen, lipase, cloning, expression

2-芳基丙酸类药物属于非甾体消炎镇痛药,是解热镇痛、消炎抗风湿的基本药物和主要产品,它是目前处方药和非处方药处方量最大的一类药物。常用的有布洛芬、奈普生和酮基布洛芬 3 种,其 α 位有一个手性碳原子存在(S)-构型和(R)-构型一对光学对映体,临床上一般以外消旋体的形式供应。其中酮基布洛芬的消炎镇痛作用是阿司匹林的 150 倍,解热作用是阿司匹林的 100 倍,临床上用于治疗慢性类风湿性关节炎、变性性关节炎、外伤和术后疼痛等。药理实验表明,其(S)-异构体的消炎镇痛作用是外消旋酮基布洛芬的 2 倍,而(R)-异构体的活性很低,但有其他方面药用价值,它对牙周病的骨质疏松有治疗作用^[1]。

目前,(S)-酮基布洛芬的制备方法主要有不对称合成、酶法拆分、非对映体结晶拆分等。其中利用微生物脂肪酶催化的立体选择性拆分^[2-6]获得单一对映体具有立体专一性强、拆分效率高、生产条件温和、无环境污染等诸多优点,已经成为研究的热点。然而酶法拆分在工业化生产中也有着许多缺点,如需对过量的生物量进行处理,对营养供应进行适当的控制,每批反应的产率并不稳定等,目前我国工业化生产条件尚未成熟。

近年来,研究微生物酯酶/脂肪酶拆分酮基布洛芬的报道也有很多^[7-9]。意大利 Menarini 公司开发的(S)-酮基布洛芬于 1996 年首次在西班牙上市,现在我国尚无生产此药的厂家。本实验室经过筛选得到了一株具有不对称拆分外消旋酮基布洛芬氯乙酯的野生菌 NK13,前期研究^[10]已表明该野生菌中存在不止一种能够拆分消旋酮基布洛芬氯乙酯的酶,其中已经得到一个新的酯酶基因^[11],本研究通过构建其基因文库,克隆表达了另一个脂肪酶基因,并对该酶的性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* NK13 菌株,

从生产奈普生药厂附近的土壤中分离得到;pUC18 为本实验室保存;*E. coli* DH5 α 为本实验室保存;pET21b(+) 及 *E. coli* BL21(DE3)由南开大学生命科学学院蔡宝立教授惠赠。

1.2 试剂和培养基

各种限制性内切酶、DNA marker、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase)、T4 DNA 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒购自大连宝生物 TaKaRa 公司。溶菌酶、RNase、蛋白酶 K、氨苄青霉素购自北京鼎国生物技术公司。其他试剂均为分析纯。NK13 菌株液体培养基:葡萄糖 1.2%;蛋白胨 0.5%;NaCl 1%,pH 7.0。LB 培养基用于 *E. coli* DH5 α 培养,SOC 培养基用于转化后菌体复苏。

1.3 基因组 DNA 文库的构建

提取 NK13 基因组 DNA,用 *Sau*3AI 进行部分酶切后,琼脂糖凝胶回收 2~6 kb 的 DNA 片段,质粒 pUC18 用 *Bam*H I 酶切后用去磷酸化酶(CIAP)处理。回收 DNA 片段和酶切后的去磷酸化载体用 T4 DNA 连接酶连接后,用电转化^[12]方法转化 *E. coli* DH5 α ,涂布在含有三丁酸甘油酯和罗丹明 B 的 Amp 抗性 LB 平板上培养,构建基因文库,筛选有水解圈的阳性克隆,命名为 pUC-NK1。将过夜培养的阳性克隆 pUC-NK1 菌液送三博远志公司进行测序。

1.4 脂肪酶基因的扩增

根据测序结果,在脂肪酶基因两侧设计一对引物,P1:5'-TTCCATATGCGGAAGCAAACCATAATCCG-3',P2:5'-TTGGATCCGTTTGTATTTTGTCCCCCGC-3' (在上下游引物 5'端分别引入 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切位点,下划线标识),以阳性克隆 pUC-NK1 的质粒 DNA 为模板,PCR 扩增脂肪酶基因。PCR 反应条件:94℃预变性 3 min;94℃变性 50 s,51℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 30 个循环。

1.5 重组表达质粒 pET-NKest1 的构建

提取 pUC-NK1 菌株质粒并以其为模板,用引物 P1 和 P2 扩增目的基因,试剂盒回收 PCR 产物,与

T-vector 连接转化 *E. coli* DH5 α , PCR 鉴定的阳性重组质粒用 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切,回收脂肪酶基因片段,与经同样双酶切处理的 pET21b(+) 载体连接,构建酯酶基因重组表达质粒 pET-NKest1,转化 *E. coli* BL21(DE3),用于脂肪酶的表达。

1.6 脂肪酶的表达

接 pET-NKest1 表达菌株单菌落于 20 mL 氨苄青霉素终浓度为 100 μ g/mL 的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。按 1% 接种量转入 500 mL 培养基,至 OD_{600} 值为 0.6~0.8 之间时,加入 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 培养 3 h,收获菌体,SDS-PAGE 电泳观察结果。

1.7 薄层层析法检测表达菌株对酮基布洛芬氯乙酯转化率

在诱导 3 h 后的 pET-NKest1 表达菌株液体培养基中加入 10 μ L 酮基布洛芬氯乙酯 (20 mg/mL),间隔 2 h 取出一份加入盐酸和乙酸乙酯萃取,取有机相,进行薄层层析 (TLC),美国 UVP 公司 GDS-8000 型凝胶成像分析系统测定转化率。

1.8 高压液相色谱 (HPLC) 检测产物光学纯度

将层析板上与酮基布洛芬对应的点取下分别放到离心管中,再加 1 mL 乙酸乙酯充分振荡萃取;12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液作为 HPLC 检测样品。在 CHIROBIOTIC V 柱上,以四氢呋喃:柠檬酸+柠檬酸钠 (pH 6.3, 0.05 mol/L)=10:90 缓冲液为流动相检测酮基布洛芬的光学纯度 (*e.e.*值)。进样量 20 μ L/次,流速 1 mL/min。

2 结果

2.1 基因文库的构建

将 *Sau*3AI 部分酶切的 NK13 基因组 DNA 和质粒 pUC18 用 *Bam*H I 酶切后,用去磷酸化酶 (CIAP) 处理,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (图 1)。

构建 NK13 基因文库得到了约 20000 个转化子,从其中筛选得到一株具有水解三丁酸甘油酯能力的阳性克隆 pUC-NK1 (图 2)。

2.2 脂肪酶基因的扩增

测序结果显示 pUC-NK1 阳性质粒中插入的外源片段长度为 3038 bp,经 DNASTar 软件进行分析,

发现一长度为 633 bp 的开放阅读框 (图 3),编码的蛋白在其 N 端有一段信号肽序列 (斜体部分)。将该核苷酸序列与 NCBI 的 GenBank 数据库中的基因核

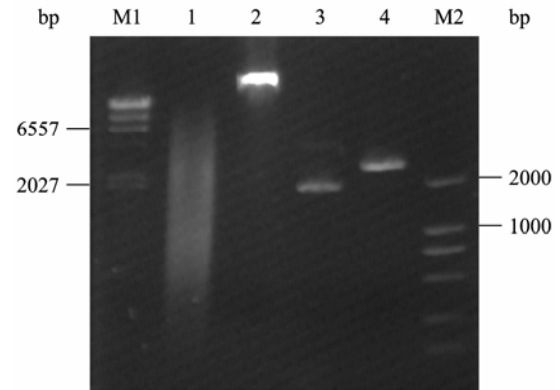


图 1 NK13 基因组 DNA 和 pUC18 质粒的酶切结果

Fig. 1 Enzyme digestion of NK13 genomic DNA and plasmid pUC18. M1: λ -Hind III marker; M2: DL2000 marker; 1: NK13 DNA digested with *Sau*3AI; 2: genomic DNA of NK13; 3: plasmid pUC18; 4: pUC18 digested with *Bam*H I.

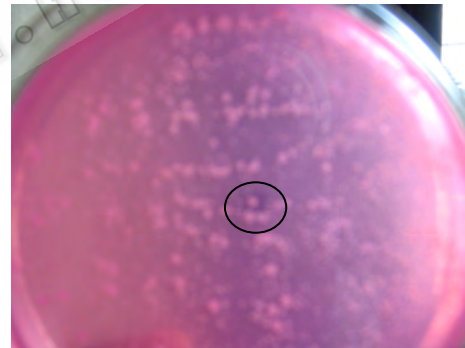


图 2 基因文库中的阳性克隆

Fig. 2 Positive clones of pUC-NK1 in gene libraries.

```
ATGAAGAAAACGTTTGTGCGATTAATTTTTCCTTTATCCCTGGTGTATCTGCATTAGGAATTCAGCCTTGAATGCTAAGGC
M K K T F V A L I F A L S L V V S A L G I Q P S N A K A
CGAAGCAAAACCATATCGGGTTGTTCTGTTCATGGAATCAGCGGTGCGTCTATAACTTTATTGCTATCAAAAACATCTAA
E A N H N P V V L V H G I S G A S Y N F I A I K N Y L
TCGCTCAAGGGTGGGATCGCAATGATCTTTATGCTATTGATTTTATAGATAAGACAGGCAACAAATTTGAATAATGACCTCAG
I A Q G W D R N D L Y A I D F I D K I G N N L N N G P Q
CTTGCTGATACATTGATCAAGTGTGAAAGAGACGGAGCTAAGAAAGGTAGATATTGTTGCTCATAGTATGGGGAGCAAA
L A R Y I D Q V L K E T G A K K V D I V A H S M G G A N
CAGCCTGTACTATATTAATATCTAGGGGAGGGAATAAGATTGAAAATGTCGTACGTTAGGAGGGGCGAATGTTAGTTT
T L Y Y I K Y L G G G N K I E N V V I L G G A N G L V
CTTGACAGCAGCTCCCGGTACAGATCTCAATCAAAAAATTTCTTTATAGTCGATCTACAGCAATAATGATCAAAATGTTGTTt
S S T A L P G T D L N Q K I L Y T S I Y S I N D Q I V V
AATAGTCTCTTAGGCTGCAAGGAGCAAGAAATATCAACTTTATGGCATTGGACATATTGGATTGCTTTCGAAATAGTCAGGT
N S L S R L Q G X R N I Q L Y G I G H I G L L S N S Q V
TAAGCGTACATAAAGAGGGCTGAATGGGGGGACAAAAACAACTAA
N A Y I K E G L N G G G Q N T N
```

图 3 脂肪酶基因序列

Fig. 3 Sequence of the lipase gene and its deduced amino acid.

苷酸序列进行比对, 结果显示其与 *Bacillus subtilis* lipase (lipW) 基因同源性最高, 为 77%。其推导的氨基酸序列与 *Bacillus subtilis* subsp. 酯酶同源性最高, 为 85%。该脂肪酶基因已录入 NCBI 数据库, GenBank 登录号为 EU381317。

2.3 重组表达质粒的构建

以基因文库中得到的 pUC-NK1 质粒为模板, 用引物 P1 和 P2 成功扩增出与预期大小相符的条带 (图 4)。

回收 PCR 产物, 与 T-vector 连接测序, 结果表明重组质粒中的基因片段与预期的脂肪酶基因序列一致。用 *Nde* I 和 *Bam*H I 从质粒 T-vector 上双酶切脂肪酶基因, 与经相同酶切的 pET21b(+) 载体连接, 成功构建重组表达质粒 pET-NKest1, 转化 *E.coli* BL21(DE3) 宿主菌。筛选阳性转化子, 提质粒用 *Nde* I 和 *Bam*H I 进行双酶切检验 (图 5), 证明构建的表达质粒 pET-NKest1 已成功转入 *E.coli* BL21(DE3)。

2.4 脂肪酶的表达

pET-NKest1 表达菌株经 IPTG 诱导 3 h 后, 目的蛋白得到表达, 经 10% SDS-PAGE 电泳检测, 发现重组蛋白的分子量约为 20 kDa (图 6)。

2.5 表达菌株中酮基布洛芬氯乙酯的转化率

表达菌株中酮基布洛芬氯乙酯转化率随着转化时间的增加而提高, 转化 20 h 时, 酮基布洛芬氯乙酯转化率超过 50% (图 7)。

2.6 HPLC 检测产物光学纯度

分别将 2~20 h 的转化产物进行高效液相色谱分析 (图 8), 其中 4 h 时的转化产物 (S)-酮基布洛芬对映体过量值 (*e.e.*%) 最高, 达 75.28%。

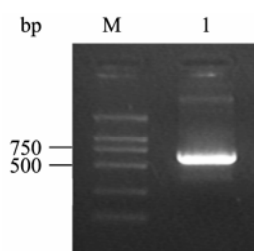


图 4 PCR 扩增脂肪酶基因产物

Fig. 4 PCR products of the lipase gene. M: DL2000 marker; 1: PCR products.

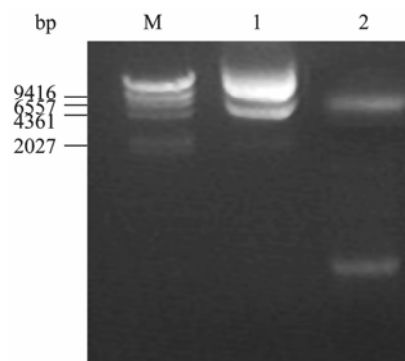


图 5 pET-NKest1 质粒的酶切鉴定

Fig. 5 Identification of plasmid pET-NKest1 by enzyme digestion. M: λ -Hind III marker; 1: plasmid pET-NKest1; 2: pET-NKest1 digested with *Nde* I and *Bam*H I.

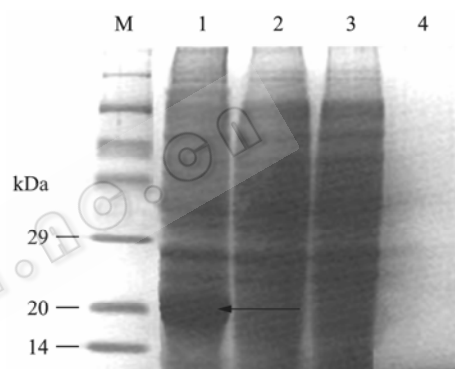


图 6 SDS-PAGE 分析 *E. coli* BL21(DE3) 中脂肪酶的表达

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein expressed in the *E. coli* BL21(DE3). M: protein marker; 1: the cell of pET-NKest1 induced at 3 h; 2,3: *E. coli* BL21(DE3) including pET21b(+) plasmid; 4: supernatant of pET-NKest1 induced at 3 h.

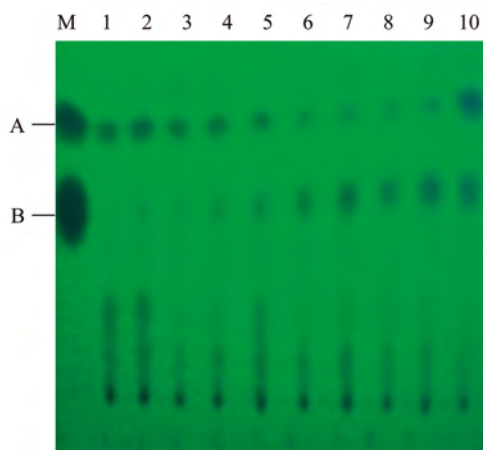


图 7 *E. coli* BL21(DE3) 转化酮基布洛芬氯乙酯 TLC 结果

Fig. 7 Transformation for ketoprofen chloroethyl ester in *E. coli* BL21(DE3). M: protein marker; 1-10: the transformed products at 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 18 h, 20 h; A: ketoprofen chloroethyl ester; B: ketoprofen.

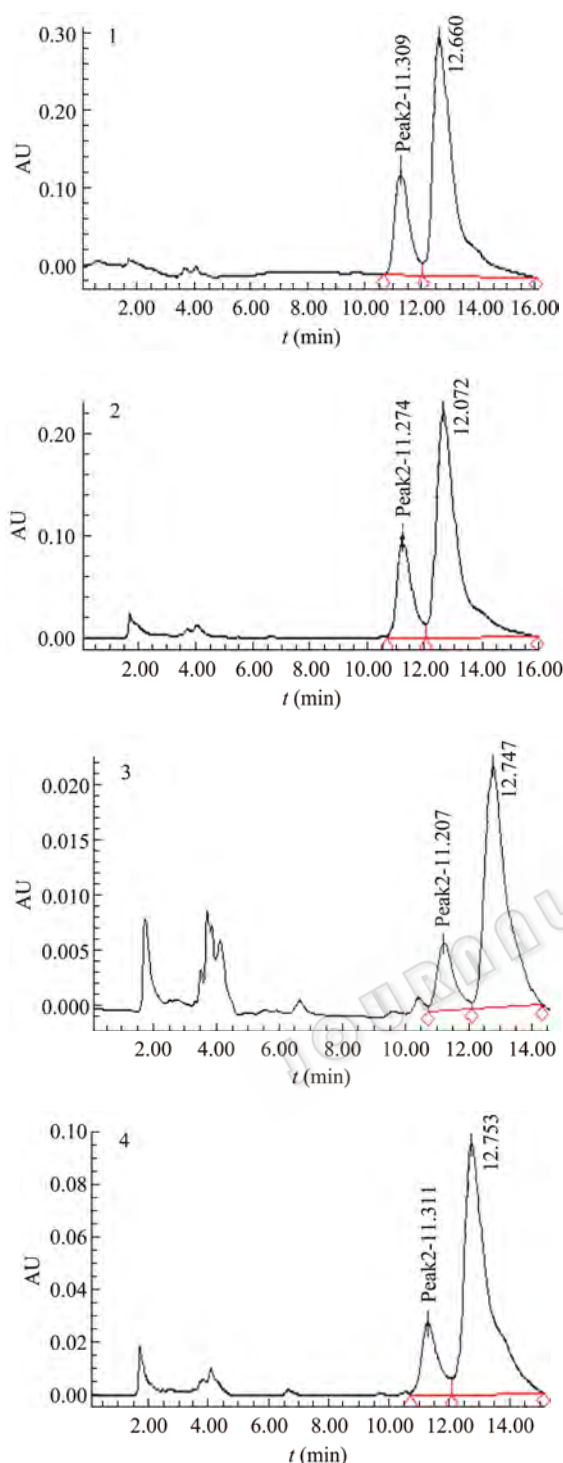


图8 HPLC检测转化产物的光学纯度

Fig. 8 HPLC analysis of the transformed products. 1-4: HPLC analysis of the transformed products at 2 h, 4 h, 10 h, 20 h.

3 讨论

脂肪酶是一类重要的水解酶，在食品、医药、皮革和洗涤等行业中都有广泛的应用。随着酶学研

究的发展，脂肪酶的很多特性被发现，其中脂肪酶可以专一性用于制备许多用化学方法难以合成的手性化合物及其前体，而且由于脂肪酶催化的反应还有选择立体专一性强、拆分效率高、生产条件温和、无环境污染等诸多优点，成为手性分离技术的研究热点之一。国外对脂肪酶的研究报道较多，而国内这方面的研究起步较晚，不同微生物产的脂肪酶在酶活、酶学性质及应用领域等方面都存在很大的差异。

本实验室以自筛选得到的一株具有不对称能力的菌株 *Bacillus megaterium* NK13 为材料，前期的研究已发现野生 NK13 菌中存在不止一种可以拆分酮基布洛芬氯乙酯的酶，本研究成功地从 NK13 中克隆到了其中一个能够拆分酮基布洛芬氯乙酯的脂肪酶基因 (GenBank Accession No. EU381317)，构建了其重组表达质粒并在大肠杆菌中表达出具有生物活性的脂肪酶，检测了表达菌株对底物的转化效率及产物的光学纯度，4 h 时转化产物(S)-酮基布洛芬达到 75.28%，是野生菌的 15 倍。如果进一步优化脂肪酶的表达及拆分条件，或进一步筛选 NK13 中其他立体选择性更高的酶，将具有更好的工业应用前景。

本研究得到的这个脂肪酶是从 *Bacillus megaterium* NK13 中获得的第 2 个具有不对称拆分外消旋酮基布洛芬氯乙酯能力的酶。与前期 NK13 中发现第一个具有拆分外消旋酮基布洛芬氯乙酯能力的酯酶^[11]相比，本试验发现的脂肪酶具有优先选择拆分(S)-酮基布洛芬的能力，拆分得到(S)-酮基布洛芬过量达到了 75.28%，但该脂肪酶的转化速率比酯酶要慢，酯酶 45 min 时对底物的转化率已接近 50%，而该脂肪酶需要 10 h 转化率才能达到一半。这个结果有利于揭示野生菌 *Bacillus megaterium* NK13 对外消旋酮基布洛芬氯乙酯的转化率高、而光学专一性不强是否与微生物中具有转化不同光学对映体化合物的酶的共存直接相关。

REFERENCES

- [1] Famaey JP, Paulus HE. Therapeutic Applications of

- NSAIDs. New York: Marcel Dekker, 1992.
- [2] Kato K, Gong Y, Saito T, *et al.* Efficient preparation of optically active ketoprofen by *Mucojavanicus* lipase immobilized on an inorganic support. *J Biosci Bioeng*, 2000, **90**(3): 332–334.
- [3] Berglund P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. *Biomol Eng*, 2001, **18**(1): 13–22.
- [4] Shen D, Xu JH, Gong PF, *et al.* Isolation of esterase producer *trichospron brassicae* and its catalytic performance in kinetic resolution of ketoprofen. *Microbiology*, 2002, **29**(1): 46–49.
- 沈端, 许建和, 宫鹏飞, 等. 酮基布洛芬拆分用酯酶产生菌的筛选及其催化特性. *微生物学通报*, 2002, **29**(1): 46–49.
- [5] Wu JC, Chua PS, Chow Y, *et al.* Extraction of *Candida rugosa* lipase from aqueous solutions into organic solvents by forming an ionpaired complex with AOT. *J Chem Technol Biotechnol*, 2006, **81**(6): 1003–1008.
- [6] Friedrich W, Friedrich AR, Reiner M, *et al.* Identification of environment strains of *Bacillus mycoides* by fatty acid analysis and species-specific 16S rDNA oligonucleotide probe. *FEMS Microbiol Ecol*, 1997, **24**(3): 201–209.
- [7] Choi GS, Kim JY, Kim JH, *et al.* Construction and characterization of a recombinant esterase with high activity and enantioselectivity to (S)-ketoprofen ethyl ester. *Protein Express Purif*, 2003, **29**(1): 85–93.
- [8] Yoons, Kims, RyuY, *et al.* Identification and characterization of a novel (S)-ketoprofen-specific esterase. *Int J Biol Macromol*, 2007, **41**(1): 1–7.
- [9] Long ZD, Xu JH, Zhao LL, *et al.* Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen. *J Mol Catal B: Enzym*, 2007, **47**(3/4): 105–110.
- [10] Zhang JH, Guan R, Tan ZL, *et al.* Purification and properties of lipases/esterases from a bacillus strain for enantioselective resolution of (S)-Ketoprofen. *Art Cells Blood Subst Immob Biotechnol*, 2005, **33**(4): 435–445.
- [11] Xu LJ, Tan ZL, Liu G, *et al.* Cloning and expression of esterase gene to enantioselective resolution of (S)-ketoprofen in NK13. *Chin J Biotechnol*, 2008, **28**(2): 32–36.
- 许丽娟, 谭之磊, 刘刚, 等. NK13中(S)-酮基布洛芬拆分用酯酶基因的克隆及表达. *中国生物工程杂志*, 2008, **28**(2): 32–36.
- [12] Ausubel F, Brent R, Kingston RE, *et al.* Yan ZY, Wang HL, trans. *Short Protocols in Molecular Biology*. Beijing: Science Press, 2001.
- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, 等著. 颜子颖, 王海林译. *精编分子生物学实验指南*. 北京: 科学出版社, 2001.

本期广告索引

企 业	版 位	企 业	版 位
GE Healthcare 公司	封 底	美国 Promega 公司	内 页
Roche 诊断产品有限公司	封 二	生物谷网站	内 页
赛默飞世尔科技有限公司	封 三	上海国强生化工程装备有限公司	内 页
艾本德(上海)国际贸易有限公司	内 页	镇江东方生物工程公司	内 页