

β -脱卤酶的基因克隆表达及其酶学性质

常晓婷 林春娇 吴坚平 杨立荣*

(浙江大学 化学工程与生物工程学系 浙江 杭州 310027)

摘要: 根据 GenBank 中的序列设计引物, 克隆芽孢杆菌中的 β -脱卤酶基因(命名为 *bhd*)。以 pET30a(+) 为载体、*Escherichia coli* BL21(DE3)-CondonPlus 为宿主菌, 实现了 *bhd* 的高效表达。使用 HisTrapTMFF 亲和层析柱纯化重组 β -脱卤酶, 分子量约为 23.1 kD。酶学性质研究表明, 纯化的重组 β -脱卤酶水解 3-氯丙酸制备 3-羟基丙酸的最适反应体系为 30 °C, 100 mmol/L, pH 7.0 的磷酸钠缓冲液。在最适反应条件下, 重组 β -脱卤酶的比活为 16.2 U/mg, K_m 和 V_{max} 分别为 3.26 μ mol/L 和 17.86 mmol/(min·g protein)。在最适反应条件下, 以 10 mmol/L 3-氯丙酸为底物, 反应 36 h 的转化率在 93% 以上。

关键词: 芽孢杆菌, β -脱卤酶, 3-羟基丙酸

Cloning, expression and characterization of β -dehalogenase

CHANG Xiao-Ting LIN Chun-Jiao WU Jian-Ping YANG Li-Rong*

(Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China)

Abstract: The β -dehalogenase gene from *Bacillus* sp. was amplified by PCR with primers designed according to the sequence of the β -dehalogenase gene (named *bhd*) in GenBank. Then the *bhd* was overexpressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)-CondonPlus with plasmid pET-30a(+). The recombinant β -dehalogenase (rBhd) was purified with HisTrapTMFF affinity chromatography and the molecular mass of the protein was about 23.1 kD. Further study on the enzymatic characteristics showed that, the hydrolysis reaction of 3-chloroproionic acid to 3-hydroxypropionic acid catalyzed by the purified rBhd should be carried out in 100 mmol/L sodium phosphate buffer at 30 °C. Under the optimum conditions, the specific activity, K_m and V_{max} of the enzyme were 16.2 U/mg, 3.26 μ mol/L and 17.86 mmol/(min·g protein), respectively. When 10 mmol/L of 3-chloropropanoic acid was used as substrate, the conversion ratio reached 93% after reaction for 36 h.

Keywords: *Bacillus* sp., β -dehalogenase, 3-hydroxypropionic acid

3-羟基丙酸(3-Hydroxypropionic acid, 简称 3-HP), 是三碳无手性直链有机酸, 该分子两端分别带有一个羟基和一个羧基, 化学性质活泼, 工业上作为一种重要的化学中间体, 可用来合成多种重要的化工产品, 还可以用于生产涂料、交联剂以及个人护理品等^[1]。聚 3-羟基丙酸(P[3-HP])具有良好的机械性质, 且可被生物降解^[2], 对环境友好, 因此 P[3-HP]作为新型的生物可再生资源, 具有重要的应用前景。基于 3-HP 的优良特性, 2004 年美国能源部报告将 3-HP 列为当前世界上 12 种最具开发潜力的平台化工产品之一。目前, 3-HP 的国际需求量已达每年三百多万 t, 2006 年的市场价格为 1 100 美元/t^[3]。

目前市售的 3-HP 主要是通过化学合成法生产, 但是存在高能耗、高成本、高污染等缺点。而生物制造法具有反应条件温和、操作简单、对环境友好等优点, 逐渐成为国内外学者的研究热点。目前, 国内外有关生物法生产 3-HP 的研究以发酵法为主, 按照底物的不同, 可分为以葡萄糖为底物的生物转化路线^[4]和以甘油为底物的生物转化路线^[5-7]。但是发酵法在生物代谢过程中会产生许多副产物, 增加了后期分离纯化的难度, 且 3-HP 的得率不高。通过前期的工作, 我们从土壤中筛选得到了一株可以利用 3-氯丙酸(3-CPA)为底物, 代谢产生 3-HP 的芽孢杆菌 *Bacillus* sp. CGMCC No. 4196, 并通过构建基因文库的方法, 得到了催化该水解反应的 β -脱卤酶基因 *bhd* (GenBank accession number HQ585877)。本研究对 *bhd* 基因进行了克隆表达, 并对纯化后的重组 β -脱卤酶(rBhd)进行了酶学性质研究, 结果表明 rBhd 可以水解 3-CPA 生成单一产物 3-HP, 从而建立了酶法制备 3-HP 的新路线。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒和菌种: 质粒 pET-30a(+)购自默克公司。*Bacillus* sp. CGMCC No. 4196 由本实验室筛选获得, 保藏在中国普通微生物菌种保藏管理中心; *Escherichia coli* BL21(DE3)-CondonPlus 购自默克

公司。

1.1.2 酶与主要试剂: 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司; 质粒抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒、PCR 回收试剂盒购自 Axygen 公司; 其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 含有 β -脱卤酶基因的重组 pET30a(+)质粒的构建: 根据 β -脱卤酶基因 *bhd* (GenBank accession number HQ585877)的完整阅读框设计引物, 上游引物为 5'-CGGAATTCGTGTACCAGCTG-3', 下游引物为 5'-CCAAGCTTTCAGTGATTCGAGC-3' (下划线分别为 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶识别位点)。采用上述引物, 以 *Bacillus* sp. CGMCC No. 4196 为模板进行菌落 PCR 反应。扩增片段用 PCR 回收试剂盒回收, 以 *EcoR* I-*Hind* III 双酶切该片段, 克隆至 *EcoR* I-*Hind* III 双酶切的 pET30a(+), 转化至 *E. coli* BL21(DE3)-CondonPlus 感受态细胞, 从转化子分离获得重组质粒 pET30a(+)-*bhd*, 酶切验证并进行序列测定(上海生工生物技术有限公司)。

1.2.2 重组菌的诱导表达: 将重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)-CondonPlus/pET30a(+)-*bhd* 接种至 5 mL 含卡那霉素(50 mg/L)和氯霉素(30 mg/L)的 LB 培养基中, 37 °C 培养过夜, 按 1%的接种量转接至 100 mL 含有卡那霉素(50 mg/L)和氯霉素(30 mg/L)的 LB 培养基中, 37 °C 培养至 OD_{600} 达到 0.6-0.8, 加入 0.1 mol/L IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 25 °C 诱导 8 h。

1.2.3 重组蛋白的纯化: 收集菌体, 重悬于预冷的结合缓冲液(20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.5)中, 置于冰浴进行超声破碎, 4 °C、20 000 \times g 离心 20 min, 收集上清, 利用镍离子亲和层析柱 HisTrapTMFF (GE Healthcare, 1 mL)纯化重组蛋白。具体纯化过程参照 GE Healthcare 说明书。得到的酶液再利用脱盐柱 (HisTrap Desalting, GE)进行脱盐处理更换为反应缓冲液。用纯化后的 rBhd 进行酶学性质研究。

1.2.4 rBhd 活性的测定: 以 3-CPA 为底物测定纯化 rBhd 的活性, 反应体系包括 100 μ L 适当稀释的酶液和 900 μ L 含有 10 mmol/L 3-CPA 的磷酸钠缓

冲液(50 mmol/L, pH 7.0)。30 °C、180 r/min 反应 1 h, 加入 100 μ L 5 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 离心分离后取上清液, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后, 利用液相色谱法测定 3-CPA 和产物 3-HP 的浓度, 具体检测方法如下: 液相色谱分析仪使用安捷伦公司的 1100 系统。色谱柱为有机酸分析柱 Bio-Rad HPX-87H (30 cm \times 7.8 cm), 流动相为 5 mmol/L 硫酸, 流速为 0.6 mL/min。室温下测定紫外(UV) 210 nm 下的吸收值。3-HP 的保留时间为 13.12 min, 3-CPA 的保留时间为 20.73 min, 采用外标法进行定量。酶活单位 (IU) 定义为每分钟催化 3-CPA 生成 1 μ mol 3-HP 所需的酶量。

1.2.5 rBhd 最适反应温度和热稳定性: 在 25 °C–60 °C (间隔 5 °C) 条件下, 测定酶活力, 以确定最适反应温度。将初始酶液在不同温度(4 °C–70 °C)下保温 1 h, 测定剩余酶活, 以 0 h 酶活作对照, 计算相对活力, 以确定酶的热稳定性。

1.2.6 rBhd 最适 pH 和 pH 稳定性: 配制 pH 值范围为 5–10 (间隔 0.5) 的反应缓冲液(其中 pH 值 4.0–7.0 用 100 mmol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液, pH 值 7.0–9.0 用 100 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, pH 值 9.0–10.0 用 100 mmol/L 的 NaHCO₃-NaOH 缓冲液), 测定酶在不同 pH 缓冲液中的酶活力, 以确定酶的最适反应 pH。将不同 pH (5.0–10.0, 间隔 1.0 单位) 缓冲液适当稀释的酶液保温于 30 °C, 1 h 后, 将酶液放入透析袋, 在浓度为 100 mmol/L、pH 为 7.0 的 Tris-H₂SO₄ 缓冲液中透析 6 h, 将酶液的 pH 值调回至 7.0, 并将各酶液样品用 100 mmol/L、pH 为 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液稀释至相同蛋白浓度。测定剩余酶活, 以 0 h 为对照, 计算相对酶活, 以确定酶的 pH 稳定性。

1.2.7 缓冲体系对反应活性的影响: 选取摩尔浓度为 100 mmol/L、pH 值为 7.0 的 Tris-H₂SO₄、Na₂HPO₄-NaH₂PO₄、Na₂HPO₄-KH₂PO₄、K₂HPO₄-KH₂PO₄、Na₂HPO₄-柠檬酸、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液, 测定酶的比活力, 确定最适反应缓冲体系。

1.2.8 底物浓度的选择: 选择最适反应缓冲体系,

在最适反应条件下, 考察不同浓度的底物 40 h 内的反应过程曲线, 根据反应时间和反应转化率确定反应的较适底物浓度。

2 结果

2.1 β -脱卤酶基因的克隆

β -脱卤酶基因 *bhd* 的大小为 465 bp, 在上下游引物中引入酶切位点后, 以 *Bacillus* sp. CGMCC No. 4196 基因组为模板, 经 PCR 扩增得到长度为 481 bp 的 PCR 产物, 经 *Eco*R I-*Hind* III 双酶切后连接至 pET30a(+) 中, 构建得到表达载体 pET30a(+)-*bhd*。将 pET30a(+)-*bhd* 进行 *Eco*R I-*Hind* III 双酶切、*Eco*R I 单酶切和 *Hind* III 单酶切验证(图 1), 并切胶回收双酶切得到的大小约为 480 bp 的目的基因片段, 经上海生工生物工程有限公司测序, 酶切位点间的序列与 GenBank accession number HQ585877 的 β -脱卤酶基因 *bhd* 完全相同。

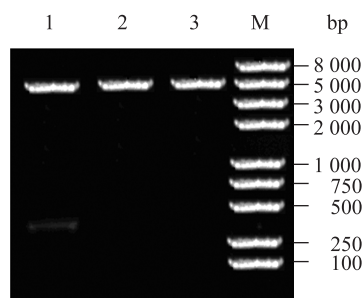


图 1 表达质粒酶切验证电泳图

Fig. 1 Identified by enzyme digestion

注: 1: *Eco*R I-*Hind* III 双酶切; 2: *Eco*R I 酶切; 3: *Hind* III 酶切; M: DNA 分子量标准。

Note: 1: Digestion by *Eco*R I-*Hind* III; 2: Digestion by *Eco*R I; 3: Digestion by *Hind* III; M: DNA marker.

2.2 重组菌的诱导表达

重组菌诱导表达经 SDS-PAGE 验证(图 2), 得到分子量约为 23.1 kD 的重组酶, 与理论计算值(465 bp 基因表达产物, 加上重组蛋白 C 端、N 端所带组氨酸标签和蛋白酶、肠激酶酶切位点, 共约 23.1 kD)相符。表达量约为 1.4 g/L, 目标蛋白占细胞总蛋白的 50% 以上, 实现了较高效的表达。

2.3 rBhd 的纯化

经镍离子亲和层析柱 HisTrapTMFF 纯化的诱导产物, 经 SDS-PAGE 检测得到单一条带(图 2), β -脱卤酶的纯度达到了 96%以上, 说明 β -脱卤酶已被成功纯化。蛋白的纯化倍数为 11.4 倍, 回收率为 76%。每升发酵液经纯化可得纯酶 7.1 g。对纯化的 rBhd 进行酶学性质的研究。

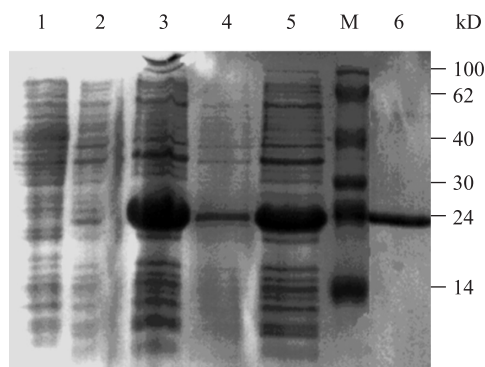


图 2 重组蛋白诱导表达图

Fig. 2 SDS-PAGE for the overexpression of rBhd

注: 1: *E. coli* BL21(DE3)-CondonPlus/pET30a(+); 2: *E. coli* BL21(DE3)-CondonPlus/pET30a(+)-*bhd* 未诱导; 3: *E. coli* BL21(DE3)-CondonPlus/pET30a(+)-*bhd* 全细胞 IPTG 诱导 8 h; 4: *E. coli* BL21(DE3)-CondonPlus/pET30a(+)-*bhd* IPTG 诱导 8 h 破胞后沉淀; 5: *E. coli* BL21(DE3)-CondonPlus/pET30a(+)-*bhd* IPTG 诱导 8 h 破胞后上清液; M: 蛋白分子量标准; 6: 纯化后的 rBhd。

Note: 1: *E. coli* BL21(DE3)-CondonPlus/pET30a(+); 2: *E. coli* BL21(DE3)-CondonPlus/pET30a(+)-*bhd*, uninduced; 3: Whole cell of *E. coli* BL21(DE3)-CondonPlus/pET30a(+)-*bhd* induced by IPTG for 8 h; 4: Precipitation of *E. coli* BL21(DE3)-CondonPlus/pET30a(+)-*bhd* after sonicated induced by IPTG for 8 h; 5: Supernatant of *E. coli* BL21(DE3)-CondonPlus/pET30a(+)-*bhd* after sonicated induced by IPTG for 8 h; M: Protein marker; 6: Purified rBhd.

2.4 酶学性质的研究

2.4.1 rBhd 的最适反应温度和热稳定性: 如图 3A 所示, 以 pH 7.5 的 Tris-H₂SO₄ 为缓冲体系, rBhd 在 25 °C–30 °C 具有较高的活性, 当温度上升到 40 °C 以后, 酶活迅速下降, 在 60 °C 以上基本检测不到酶活。对热稳定性实验结果分析发现, 酶在 20 °C–30 °C 条件下稳定性较好。当温度超过 60 °C, 酶完全失活。因此, 综合酶的反应活性和稳定性, 30 °C 为反应的最适温度。

2.4.2 rBhd 的最适反应 pH 和 pH 稳定性: 如图 3B 所示, 在最适反应温度下, 在 pH 6.5–7.5 范围内相对酶活在 80%以上, 而当 pH<6.0 或 pH>8.0 时, 酶活迅速下降。rBhd 的最适反应 pH 为 7.0。在 pH 稳定性实验中, 酶在 pH 7.0–8.0 范围内稳定性较好, 而在 pH<6.0 条件下不稳定。

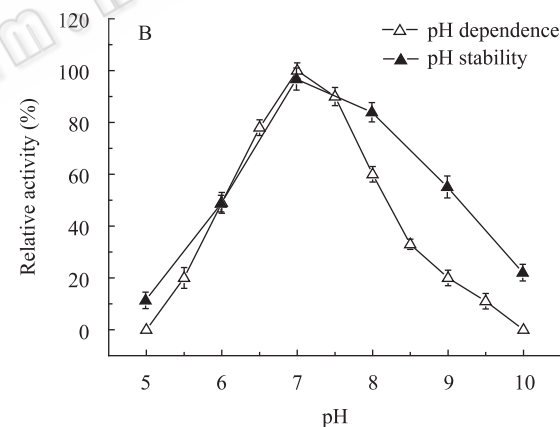
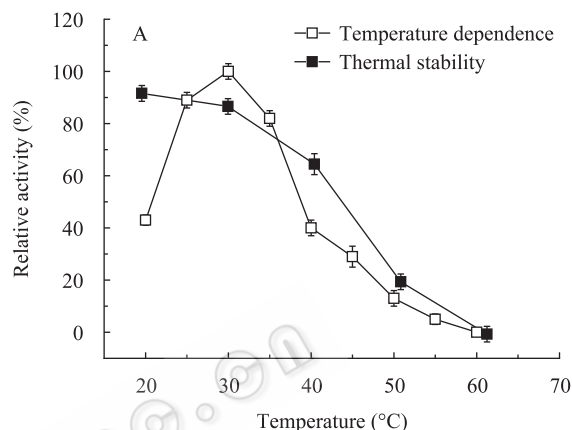


图 3 温度、pH 对 rBhd 活性的影响

Fig. 3 Effects of temperature and pH on rBhd activity

2.4.3 缓冲体系对反应活性的影响: 缓冲体系对酶活性有较大的影响(图 4), 磷酸缓冲液缓冲效果较好, 其中磷酸钠缓冲液效果最佳, 因此选用磷酸钠缓冲液作为反应的缓冲体系。在 α -脱卤酶的报道中, 反应缓冲液多为 Tris 缓冲体系^[8-10], 不同缓冲体系对反应的影响机制还未见报道。在上述最适反应条件下, rBhd 的酶活为 1 150.2 U/L, 比活可达 16.2 U/mg。

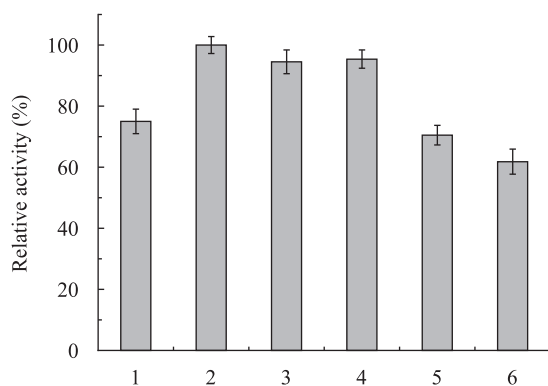


图4 不同缓冲液对酶活的影响

Fig. 4 Effect of different kinds of buffer on β -dehalogenase activity

注: 1: Tris-H₂SO₄; 2: Na₂HPO₄-NaH₂PO₄; 3: K₂HPO₄-KH₂PO₄; 4: Na₂HPO₄-KH₂PO₄; 5: Na₂HPO₄-Citric acid; 6: 柠檬酸-柠檬酸钠.

Note: 1: Tris-H₂SO₄; 2: Na₂HPO₄-NaH₂PO₄; 3: K₂HPO₄-KH₂PO₄; 4: Na₂HPO₄-KH₂PO₄; 5: Na₂HPO₄-Citric acid; 6: Citric acid-Sodium citrate.

2.5 利用 rBhd 制备 3-HP

本文通过克隆表达和纯化, 得到了纯 rBhd, 并建立了酶法水解 3-CPA 制备 3-HP 的生物合成途径。不同底物浓度下的反应过程曲线如图 5 所示, 随着底物浓度的增加, 初始反应速率不断上升, 在 20 h 后, 反应速度都显著降低, 36 h 后基本停止, 可能原因是酶在反应过程中逐渐失活。考虑到 3-CPA 和 3-HP 的极性相近, 分离较困难, 所以选择可将 3-CPA 完全转化的底物浓度为宜。确定最适初始底物浓度为 10.2 mmol/L, 反应 32 h 后底物已基本转化完全, 此时 3-CPA 的转化率约为 93%, 3-HP 的浓度为 9.4 mmol/L, 说明反应的 3-CPA 全部转化为 3-HP, 基本没有副产物生成。目前所报道的水解脱卤酶大多为 α -脱卤酶, 关于 β -脱卤酶的报道很少, 且鲜见利用 β -脱卤酶制备 3-HP 的研究。Mesri 等^[11]筛选到了一株 *Pseudomonas* sp. B6P, 其胞内提取物可以水解 3-氯丙酸, 比活为 5.58 U/mg, 但报道未对发酵液的酶活和水解产物进行说明。根据 Michaelis-Menten 方程 $v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$

的变形方程 $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$, 通过双倒数作图法, 测得反应的 K_m 和 V_{\max} 分别为 3.26 $\mu\text{mol/L}$ 和 17.86 mmol/(min·g protein)。

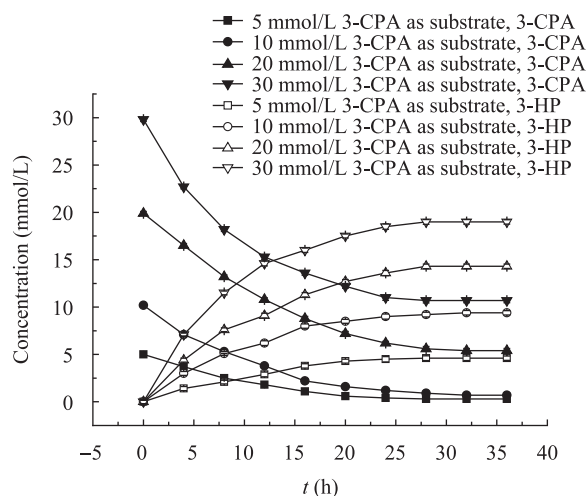


图5 不同初始底物浓度下的反应过程曲线

Fig. 5 Process of reaction on different concentrations of substrate

3 讨论

本文首次克隆表达并纯化了重组 β -脱卤酶 rBhd, 并实现了催化水解 3-CPA 制备 3-HP 的过程。原始菌 *Bacillus* sp. 可以以 3-CPA 为唯一碳源生长, 水解产生 3-HP。但是 3-HP 作为代谢的中间产物, 在菌体代谢过程中被进一步分解利用, 发酵液中只有极少量的 3-HP 存在, 不能大量积累; 且发酵法产生过多副产物, 增加了产品分离纯化的难度。而 rBhd 具有专一性, 利用克隆纯化后的 rBhd 进行反应, 使得 3-HP 成为反应唯一的终产物得到积累, 且产物的得率较高, 可达 93% 以上, 为酶法大量制备 3-HP 奠定了基础。酶在反应体系中的稳定性较差, 具体原因还有待考察。酶的稳定性与其结构和活性位点的氨基酸组成有关, 今后的工作将在对酶的结构和功能进行解析的基础上通过定点突变等方法确定影响酶活性的因素, 并通过固定化的方法提高酶的稳定性和重复利用性。

目前, 国外已有对水解脱卤酶反应机制的研究^[12], 但上述脱卤酶都为 α -脱卤酶, 即仅能水解 α 位的卤素取代基, 不能水解 β 位的卤素取代基, 说明 α -脱卤酶和 β -脱卤酶有着不同的反应机制, 而 β -脱卤酶目前还尚未有人报道。因此 β -脱卤酶的水解机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 张鸿达, 刘成, 高卫华, 等. 微生物发酵法生产 3-羟基丙酸的研究进展[J]. 化工进展, 2007, 26(1): 33-36.
- [2] Zhang DH, Hillmyer MA, Tolman WB. A new synthetic route to poly [3-hydroxypropionic acid] (P [3-HP]): ring-opening polymerization of 3-HP macrocyclic esters[J]. *Macromolecules*, 2004, 37(22): 8198-8200.
- [3] Raj SM, Rathnasingh C, Jung WC, et al. Effect of process parameters on 3-hydroxypropionic acid production from glycerol using a recombinant *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(4): 649-657.
- [4] Gokarn RR, Selifonova OV, Jessen HJ, et al. 3-Hydroxypropionic acid and other organic compounds: US, 7638316B2[P]. 2009-11-29.
- [5] Suthers PF, Cameron DC. Production of 3-hydroxypropionic acid in recombinant organisms: US, 6852517 B1[P]. 2005-2-8.
- [6] Rathnasingh C, Raj SM, Jo JE, et al. Development and evaluation of efficient recombinant *Escherichia coli* strains for the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104(4): 729-739.
- [7] Raj SM, Rathnasingh C, Jo JE, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain[J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(12): 1440-1446.
- [8] Liu JQ, Kurihara T, Miyagi M, et al. Reaction mechanism of L-2-haloacid dehalogenase of *Pseudomonas* sp. YL Identification of Asp₁₀ as the active site nucleophile by ¹⁸O incorporation experiments[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(31): 18309-18312.
- [9] Cairns SS, Cornish A, Cooper R. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of two *Rhizobium* sp. genes encoding haloalkanoate dehalogenases of opposite stereospecificity[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 235(3): 744-749.
- [10] Ridder IS, Rozeboom HJ, Kalk KH, et al. Crystal structures of intermediates in the dehalogenation of haloalkanoates by L-2-haloacid dehalogenase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(43): 30672-30678.
- [11] Mesri S, Wahab RA, Huyop F. Degradation of 3-chloropropionic acid (3CP) by *Pseudomonas* sp. B6P isolated from a rice paddy field[J]. *Annals of Microbiology*, 2009, 59(3): 447-451.
- [12] de Jong RM, Dijkstra BW. Structure and mechanism of bacterial dehalogenases: different ways to cleave a carbon-halogen bond[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2003, 13(6): 722-730.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名变更

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自 2010 年起变更为“Microbiology China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。