

研究报告

新型苏云金芽孢杆菌(-) γ -内酰胺酶基因的克隆与表达

孙康 鲁明杰 于爽 迟乃玉*

大连大学生命科学与技术学院 辽宁 大连 116622

摘要:【背景】 γ -内酰胺是一种重要的医药中间体,其自身具备手性不利于药物合成,通过 γ -内酰胺酶选择性拆分可实现光学纯 γ -内酰胺的制备。【目的】挖掘来源苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的 γ -内酰胺酶基因,探索光学纯 γ -内酰胺的制备工艺。【方法】通过“acetamidase/formamidase”关键词检索苏云金芽孢杆菌基因组,对检索出的两条序列进行异源表达,而后通过高效液相色谱法检测重组菌对 γ -内酰胺的降解情况,确定克隆的基因是否为 γ -内酰胺酶基因。利用构建的重组菌进行5 L发酵、底物拆分、产物回收的生产应用尝试。【结果】构建的skA2重组菌株具有(-) γ -内酰胺酶活性,其在小规模制备生产中表现良好。【结论】A基因是一段未经报道的(-) γ -内酰胺酶基因,丰富了生产者的酶工具箱。构建的skA2菌株可以满足工业制备(+) γ -内酰胺的生产需求,为合成光学纯药物奠定坚实基础。

关键词: γ -内酰胺酶, γ -内酰胺, 基因发掘, 手性拆分

Cloning and expression of a novel (-) γ -lactamase gene from *Bacillus thuringiensis*

SUN Kang LU Ming-Jie YU Shuang CHI Nai-Yu*

School of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China

Abstract: [Background] γ -lactam is an important pharmaceutical intermediate and its chiral property makes against drug synthesis. The preparation of optically pure γ -lactam can be realized by γ -lactamases' selective resolution. [Objective] To explore the gene of γ -lactamase from *Bacillus thuringiensis* and the technology of optically pure γ -lactam preparation. [Methods] The genome sequence of *Bacillus thuringiensis* was searched by the key words “acetamidase/formamidase”, two sequences were selected and heterologously expressed. The degradation of γ -lactam by recombinant bacteria was monitored by HPLC method to determine whether the cloned gene was a γ -lactamase gene. The application of 5 L fermentation, substrate separation and product recovery were also performed using the constructed recombinant bacteria. [Results] The skA2 recombinant strain had activity of (-) γ -lactamase and showed good performance in small scale production. [Conclusion] The A gene is an unreported new (-) γ -lactamase gene, which enriches producers' enzyme toolbox. The skA2 strain can meet the need of industrial production of (+) γ -lactam and lay a solid foundation for the preparation of optically pure drugs.

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2018YFC0311100)

*Corresponding author: E-mail: cny7566@126.com

Received: 07-01-2020; Accepted: 24-03-2020; Published online: 26-04-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC0311100)

*通信作者: E-mail: cny7566@126.com

收稿日期: 2020-01-07; 接受日期: 2020-03-24; 网络首发日期: 2020-04-26

Keywords: γ -lactamase, γ -lactam, Gene discovery, Chiral separation

γ -内酰胺酶是酰胺酶(EC 3.5.1.4)的一种^[1-2], 由于其能选择性降解工业上的(\pm) γ -内酰胺(2-氮杂二环-[2.2.1]-庚烷-5-烯-3-酮, CAS:49805-30-3), 因而被命名为 γ -内酰胺酶(图 1)。(±) γ -内酰胺则是一种可以合成数十种药物的医药中间体, 如治疗艾滋病的阿巴卡韦以及治疗甲型流感的帕拉米韦^[3]。 γ -内酰胺市场需求巨大, 但(±) γ -内酰胺自身却是外消旋体, 包含(±)两种旋光构型: (+) γ -内酰胺[(1S,4R)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮, CAS:130931-83-8]以及(-) γ -内酰胺[(1R,4S)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮, CAS:79200-56-9]。利用外消旋体原料进行药物合成存在弊端, 会致使由其合成的药物也带有手性, 而手性药物存在不同对映体具有不同药理活性的潜在危害。如 20 世纪 60 年代, 镇静药沙利度胺(thalidomide, 又名“反应停”)以未经拆分的外消旋体形式上市, 结果引发了“海豹儿”的悲剧, 原因在于沙利度胺的(R)对映体具有缓解妊娠反应作用, 而(S)对映体是一种强力致畸剂^[4]。因而在药物合成过程中进行单一构型合成十分必要, 研究表明从 γ -内酰胺合成这一步实现构型拆分是最经济的选择^[5]。临床上已知阿巴卡韦的药理活性来源于(-)阿巴卡韦, 因而科学工作者们的目光都锁定在了挖掘(+) γ -内酰胺酶上, 试图利用

(+) γ -内酰胺酶拆分(±) γ -内酰胺, 从而得到光学纯的(-) γ -内酰胺以满足生产需要^[5-6]。但实际上(+) γ -内酰胺也可以通过溴化作用实现构型翻转, 随后进行碳环核苷类药物的合成^[5], 因而(-) γ -内酰胺酶在工业应用上同样具有价值。

本实验室前期已从环境中筛选出了一株产(+) γ -内酰胺酶的菌株——苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)^[7], 在后续实验中发现该菌株也产(-) γ -内酰胺酶。(±) γ -内酰胺酶共存于一种菌里的情况并不少见, 如氧化烃微杆菌(*Microbacterium hydrocarbonoxydans*)就先后被发现产(+) γ -内酰胺酶和(-) γ -内酰胺酶^[8-9]。野生菌同时包含(±) γ -内酰胺酶不利于生产应用, 因而十分有必要将单一 γ -内酰胺酶基因进行异源表达以提高对异构体的选择性。表 1 列出了文献报道的已知 γ -内酰胺酶基因, 其中发掘 γ -内酰胺酶基因的策略主要有 3 种^[29]: (1) 建立基因文库法: 将已知有 γ -内酰胺酶活性的野生菌基因组随机打断成小片段构建到大肠杆菌, 再通过高通量筛选方法筛选阳性克隆体, 对插入的序列进行测序即得到 γ -内酰胺酶基因。(2) 蛋白逆推法: 从已知有 γ -内酰胺酶活性的野生菌中纯化出 γ -内酰胺酶蛋白, 再通过蛋白测序等方法逆推产酶基因。但由于野生蛋白表达量不高、脱离全细胞环境不稳定

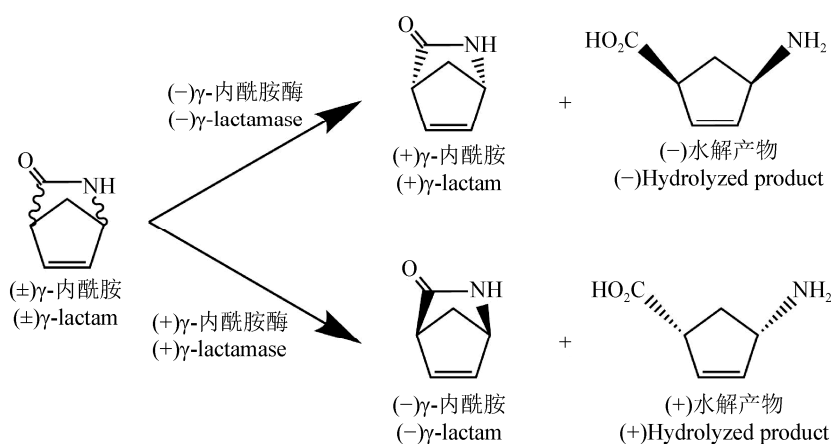


图 1 γ -酰胺酶选择性降解(±) γ -内酰胺示意图

Figure 1 Schematic diagram of selective degradation of (±) γ -lactam by γ -lactamase

等缺陷,野生蛋白的纯化很难,少有成功案例^[1,5,9]。

(3) 信息挖掘法:利用已报道的 γ -内酰胺酶序列进行相似性比对,或者利用甲酰胺酶、乙酰胺酶等关键词进行检索^[25],对潜在的目的序列进行克隆表达、酶活验证,也常能发掘出 γ -内酰胺酶基因。本研究采用第三种方法,从已知有 γ -内酰胺酶活性的苏云金芽孢杆菌的基因组里,通过“acetamidase/formamidase”关键词检索潜在目的序列,结果检索出了两条序列,分别用 A 序列和 B 序列指代,对它们分别进行了克隆表达。最终结果表明克隆表达的 A 序列具有(-) γ -内酰胺酶活性,是一段未经报道的

(-) γ -内酰胺酶基因。通过 5 L 的发酵中试及产物回收实验,发现重组菌 skA2 具有生产光学纯(+) γ -内酰胺的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

引物由苏州泓迅生物科技股份有限公司合成(表 2);质粒 pMD19-T 购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒 pET-28a、*E. coli* TOP10、*E. coli* BL21 由大连大学生命科学与技术学院高凤山老师课题组提供;苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)为本实验室保存。

表 1 已报道的 γ -内酰胺酶

Table 1 Previously reported γ -lactamases

年份 Year	菌种来源 Strain origin	选择性 Selectivity	发现方法 Discovery method	参考文献 References
1999	<i>Comamonas acidovorans</i>	+	基因文库法 Gene library method	[10-11]
2004	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	+	信息挖掘法 Information mining	[12-13]
2010	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	+	Unknown	[14]
2012	<i>Aeropyrum pernix</i>	+	信息挖掘法 Information mining	[15-16]
2012	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	+	信息挖掘法 Information mining	[1,17]
2014	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	-	Unknown	[18]
2014	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	±	基因文库法 Gene library method	[9,19]
2014	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	-	蛋白逆推法 Protein counter-inference	[9,20-22]
2014	<i>Pseudomonas putida</i>	+	信息挖掘法 Information mining	[23]
2014	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	+	信息挖掘法 Information mining	[23]
2014	<i>Nocardia farcinica</i>	-	信息挖掘法 Information mining	[23]
2014	<i>Rhodococcus globerulus</i>	-	信息挖掘法 Information mining	[23]
2014	<i>Escherichia coli</i>	+	信息挖掘法 Information mining	[24]
2015	<i>Delftia</i>	+	信息挖掘法 Information mining	[25-26]
2018	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	+	信息挖掘法 Information mining	[27]
2019	<i>Microbacterium testaceum</i>	±	信息挖掘法 Information mining	[28]

表 2 实验所用引物

Table 2 Primers used in the experiment

引物名称	序列
Primers name	Sequence (5'→3')
AF	ACGCGTCGACATGGGTAGTAGTGGAAGTATGGTAAAGC
AR	CCGCTCGAGCTAAGAATGAATCGTTTTTTTACTGGA
BF	ACGCGTCGACATGTCACCAGAAAATAAGCCGT
BR	CCGCTCGAGCTATTTAATATGAAATTTACTAAAAATAAATCCT

注：引物序列中下划线为相应酶切位点。
Note: The underlined are restriction enzymes cutting sites.

1.1.2 培养基

筛选培养基(g/L): 酵母浸粉 0.1, N-乙酰-L-苯丙氨酸 2.0, NH₄Cl 2.0, Na₂HPO₄ 0.1, NaH₂PO₄ 0.1, MgSO₄ 0.1, 调节 pH 7.0。

产酶培养基(g/L): 酵母浸粉 5.0, 葡萄糖 5.0, KH₂PO₄ 7.0, NaHPO₄ 2.0, MgSO₄ 0.4, FeSO₄ 0.02, CaCl₂ 0.02, NH₄Cl 5.0, 调节 pH 7.0。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, NaCl 10.0, 调节 pH 7.2。抗性筛选时添加浓度为 50 μg/mL 的氨苄青霉素或 30 μg/mL 的卡那霉素。

1.1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组提取试剂盒、IPTG, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、限制性内切酶、*Taq* 酶、T4 DNA 连接酶, 宝生物工程(大连)有限公司; 2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮, 上海麦克林生化科技有限公司; 色谱级异丙醇、乙腈、正丁醇, 天津市科密欧化学试剂有限公司。

梯度 PCR 仪, 赛默飞世尔科技公司; 凝胶成像系统, 通用电气公司; 低温水浴锅, 东京理化器械株式会社; 液相色谱仪, 岛津公司; AS-H 手性色谱柱, 大赛璐公司; 超声波细胞粉碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 旋转蒸发仪, IKA 集团; 台式冻干机, Labconco 公司; 5 L 发酵罐, 上海百仑生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 目的片段 A 以及 B 的扩增

以 *Bacillus thuringiensis* 基因组数据(GenBank

登录号: CM000759.1)为参考, 通过“acetamidase/formamidase”关键词检索出 2 条潜在的目的蛋白编码基因, 分别用 A 序列(protein_id: EEN01695.1)和 B 序列(protein_id: EEN02965.1)指代, 对其分别设计了包含 *Sal* I 和 *Xho* I 限制性内切酶位点的引物(表 2)。按照细菌基因组提取试剂盒使用说明从 28 °C、150 r/min 培养过夜的 *Bacillus thuringiensis* 菌液中提取细菌基因组。

PCR 反应体系(25 μL): ddH₂O 16 μL, 5×SF buffer 5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 细菌基因组 DNA 1 μL, *Taq* 酶(5 U/μL) 0.5 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 64 °C 45 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min; 18 °C 2 min。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳和琼脂糖凝胶回收试剂盒回收。

1.2.2 TA 克隆载体构建

回收后的 PCR 产物加 polyA 尾, 加尾体系 (50 μL): ddH₂O 8 μL, 10×*Taq* buffer 5 μL, dATP (10 mmol/L) 1 μL, 回收产物 35 μL, *Taq* 酶(5 U/μL) 1 μL。反应条件为 72 °C 15 min。加尾产物用 1%琼脂糖凝胶电泳分离和琼脂糖凝胶回收试剂盒回收。回收产物用 T4 DNA 连接酶连接 pMD19-T 载体, 随后转化 *E. coli* TOP10 感受态细胞, 转化后将菌液均匀涂布在含 50 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 抗性平板上, 37 °C 倒置培养 12–16 h。挑取单菌落到 5 mL 上述抗性的液体 LB 培养基中 37 °C、200 r/min 培养过夜, 提取重组质粒进行 *Sal* I/*Xho* I 双酶切验证, 将验证成功的重组质粒命名为 pMD19-T-skA、pMD19-T-skB, 交由生工生物工程(上海)股份有限

公司对插入片段进行测序。

1.2.3 表达载体构建

提取 pET-28a 质粒进行 *Sal* I/*Xho* I 双酶切, 酶切后的质粒用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离和琼脂糖凝胶回收试剂盒回收。对测序结果无误的 pMD19-T-skA、pMD19-T-skB 克隆载体菌株进行质粒提取, 而后进行双酶切、1% 琼脂糖凝胶电泳和琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的条带。将酶切后的 pET-28a 质粒与酶切回收的 skA、skB 片段连接后转化到 *E. coli* BL21 感受态细胞中, 涂布在含 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 抗性平板上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12–16 h。挑取单菌落到 5 mL 上述抗性的液体 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜, 提取重组质粒进行 *Sal* I/*Xho* I 双酶切验证, 将验证成功的质粒送到生工生物工程(上海)股份有限公司进行目的片段测序。

1.2.4 重组菌的诱导表达

对载有正确目的序列的重组菌及未能转化的空载体菌进行诱导表达, 将过夜活化的菌株按 1% 接种量接种到 100 mL 卡那霉素抗性 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养, 待培养液 OD_{600} 值达到 0.6–0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 另设空白组不加 IPTG, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 5–6 h 后将菌液 8 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 10 mL 0.05 mol/L 磷酸钠缓冲液重悬, 冰浴下进行超声破碎处理 (10 min, 200 W, 超声 3 s, 间隙 5 s), 破碎完毕后 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.5 酶活检测

取菌液 2 mL, 8 000 r/min 离心 5 min 留沉淀, 加 10 g/L 的 (\pm) γ -内酰胺溶液 1.5 mL, 充分混匀, 25 $^{\circ}$ C 摇床反应 1 h。或者取超声破碎上清 2 mL, 加入 0.5 mL 50 g/L 的 (\pm) γ -内酰胺溶液, 充分混匀, 25 $^{\circ}$ C 摇床反应 1 h。而后将反应液 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清 0.75 mL, 加等体积正丁醇反复颠倒混匀数次, 8 000 r/min 离心 5 min, 注射器吸取上层, 经有机滤膜过滤制备上样品。使用高效液相色谱进行底物降解情况检测, 采用 AS-H 手性色谱柱, 流动相为乙腈:异丙醇 9:1 (体积比), 总流速为 0.6 mL/min, 230 nm 波长检测, 待基线平上样 10 μ L。

1.2.6 全细胞催化的中试放大

按 5 L 的发酵体积准备 LB 培养基, 将培养基粉末加入 5 L 发酵罐, 加水至约 4.5 L (灭菌过程中水位会上涨), 开蒸汽进夹套阀门使罐温升至 100 $^{\circ}$ C, 开蒸汽进罐体阀门使罐体温度维持在 121 $^{\circ}$ C, 灭菌 30 min。关闭蒸汽进夹套阀门、蒸汽进罐体阀门, 通空气吹干空气滤芯, 通空气进罐体降温, 开恒温水泵使温度下降到设定温度 37 $^{\circ}$ C。按 3% 接种量接种重组菌, 待菌液 OD_{600} 值达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度 5 g/L 的乳糖。37 $^{\circ}$ C 继续培养 6 h 后 8 000 r/min 离心 30 min 收获菌体, 加入含有 50 g/L (\pm) γ -内酰胺的 1 L 反应罐, 反应过夜, 翌日将反应液 8 000 r/min 离心 30 min, 上清用 500 mL 正丁醇萃取, 使用旋转蒸发仪干燥, 再将干燥产物溶于少量水, 利用冷冻干燥机冻干。取少量冻干产物溶于正丁醇, 过 0.45 μ m 针头式滤膜, 通过高效液相色谱检测产物纯度。

2 结果与分析

2.1 A、B 基因的扩增

以提取的 *Bacillus thuringiensis* 菌株基因组 DNA 为模板, 利用设计的引物成功扩增出了目的片段 (图 2), 电泳结果表明, A 序列引物扩出的基因大小在 1 000 bp 左右, B 序列引物扩出的基因大小在 900 bp 左右, 与预期相符。

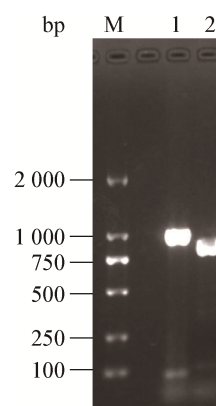


图 2 A、B 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析
Figure 2 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR amplification products of A and B genes

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: A 扩增序列; 2: B 扩增序列。
Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR product of A; 2: PCR product of B.

2.2 A、B 片段的克隆

将目的片段进行凝胶回收, 连接至 pMD19-T 载体, 而后转化至 *E. coli* Top10, 利用氨苄青霉素抗性的 LB 培养基筛选重组菌。提取重组菌质粒, 进行双酶切验证(图 3)。由图 3 可见, A_T1、A_T2、A_T3、A_T4、B_T5、B_T6、B_T7 切出了目的条带, 连接成功; B_T8 未酶切出目的条带, 连接失败。对双酶切验证成功的 7 个样品进行测序, 测序结果为 A 序列的 4 个样品测序结果一致, B 序列的 3 个样品中 B_T5 与 B_T6、B_T7 测序结果有一个碱基的差别。需要注意的是扩增出来的 A 序列与设计引物时参考的 A 序列(protein_id: EEN01695.1)有 25 个碱基不一致, 扩增出来的 B 序列与设计引物时参考的 B 序列(protein_id: EEN02965.1)有 29 个碱基不一致, 鉴于测序样品间的高度一致, 合理解释为本实验筛选保藏的苏云金芽孢杆菌与用作参考的苏云金芽孢杆菌 IBL 4222 (GenBank 登录号: CM000759.1)有细微差别。

2.3 A、B 表达载体构建

对 A_T1、B_T6 的重组质粒 pMD19-T-A、pMD19-T-B 进行双酶切, 回收目的片段, 与双酶切过的 pET-28a 载体连接, 转化至 *E. coli* BL21。利用卡那霉素抗性 LB 培养基筛选重组菌。提取重组菌质粒, 并进行双酶切验证(图 4), 仅 skA2 切出了目的条带。将 skA2 送去测序, skA2 测序结果与 TA 克隆时测

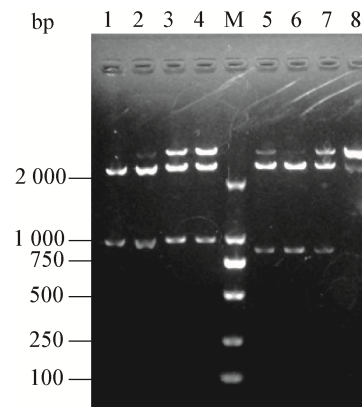


图 3 重组 pMD19-T-A、pMD19-T-B 质粒双酶切验证
Figure 3 Dual enzyme digestion of recombinant pMD19-T-A and pMD19-T-B plasmids

注: 1: A_T1 双酶切产物; 2: A_T2 双酶切产物; 3: A_T3 双酶切产物; 4: A_T4 双酶切产物; M: DL2000 DNA Marker; 5: B_T5 双酶切产物; 6: B_T6 双酶切产物; 7: B_T7 双酶切产物; 8: B_T8 双酶切产物。

Note: 1: Dual enzyme digestion of A_T1; 2: Dual enzyme digestion of A_T2; 3: Dual enzyme digestion of A_T3; 4: Dual enzyme digestion of A_T4; M: DL2000 DNA Marker; 5: Dual enzyme digestion of B_T5; 6: Dual enzyme digestion of B_T6; 7: Dual enzyme digestion of B_T7; 8: Dual enzyme digestion of B_T8.

序结果一致。

2.4 skA2 的诱导表达及蛋白鉴定

skA2 诱导表达后离心菌体并超声破碎, 破碎上清进行 SDS-PAGE 电泳(图 5), 可见 37 kD 处条带表达量明显增加, 该处蛋白与预期的 A 序列表达的

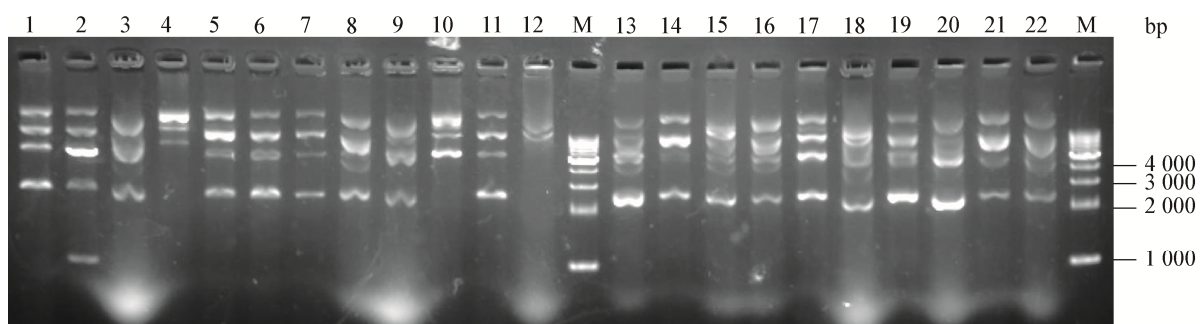


图 4 重组 pET-28a-skA、pET-28a-skB 质粒双酶切验证

Figure 4 Dual enzyme digestion of recombinant pET-28a-skA and pET-28a-skB plasmids

注: 1-12: skA1 至 skA12 重组菌的质粒双酶切产物; M: 1 kb DNA Ladder; 13-22: skB1 至 skB10 重组菌的质粒双酶切产物。

Note: 1-12: Dual enzyme digestion of plasmid from skA1 to skA12; M: 1 kb DNA Ladder; 13-22: Dual enzyme digestion of plasmid from skB1 to skB10.

蛋白分子量相当。但在后期纯化中发现，由于最初引物设计缺陷，目的蛋白并未与 His 标签实现融合，因此无法通过 Ni-NTA 亲和层析法纯化。为了证明该蛋白正是 A 基因表达的蛋白，将该块条带切胶，送由上海拜谱生物科技有限公司进行胶条蛋白质鉴定分析。鉴定结果表明该条带蛋白正是来源于 *Bacillus thuringiensis* 的 Formamidase，A 基因在大肠杆菌中被成功诱导表达。如表 3 所示，有 4 条肽段的二级质谱图打分非常高，Mascot 打分超过 20 即认为可靠，说明本次蛋白鉴定结果准确。

2.5 酶活检测

将新鲜培养的 skA2 菌液离心，加底物反应。反应底物经 HPLC 检测(图 6)，(+) γ -内酰胺在 12 min 左右出峰，(-) γ -内酰胺在 15 min 左右出峰，由图 6 可见，skA2 的 IPTG 诱导组(-) γ -内酰胺被降解，证明 skA2 在诱导后有(-) γ -内酰胺酶活性；skA2 未诱

表 3 蛋白质谱检测的肽段匹配情况

Table 3 Peptide matching detected by protein mass spectrometry

质谱检测质荷比	实测分子量	理论分子量	氨基酸位置	Mascot 打分	肽段序列
Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Position	Mascot score	Peptide sequence
1 705.881 5	1 704.874 2	1 704.858 3	267–281	124	R.LGWGLENNIYNLGS.R.G
1 999.972 0	1 998.964 7	1 998.946 9	188–204	132	R.ISGYSTOVSEOWMLTNR.S
2 201.112 5	2 200.105 2	2 200.080 0	248–266	132	R.NPWEIVTAEVYPELADQAR.L
2 919.600 8	2 918.593 5	2 918.557 6	2–29	120	M.GSSGSMVKPISGFLTALIQYPVPVVESR.A

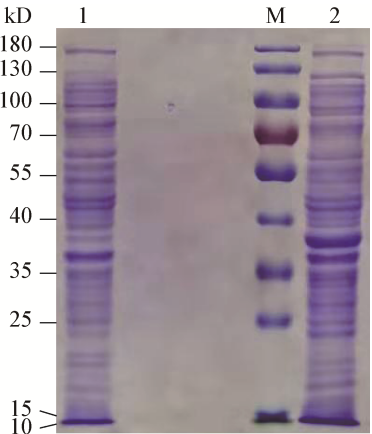


图 5 skA2 诱导表达及 skA2 未诱导表达的破碎上清 SDS-PAGE 电泳

Figure 5 SDS-PAGE electrophoresis of fragmented supernatants of skA2 induced and skA2 uninduced

注：1：skA2 未诱导表达的破碎上清；M：蛋白 Ladder；2：skA2 诱导表达的破碎上清。

Note: 1: The supernatant of uninduced skA2; M: Protein Ladder; 2: The supernatant of induced skA2.

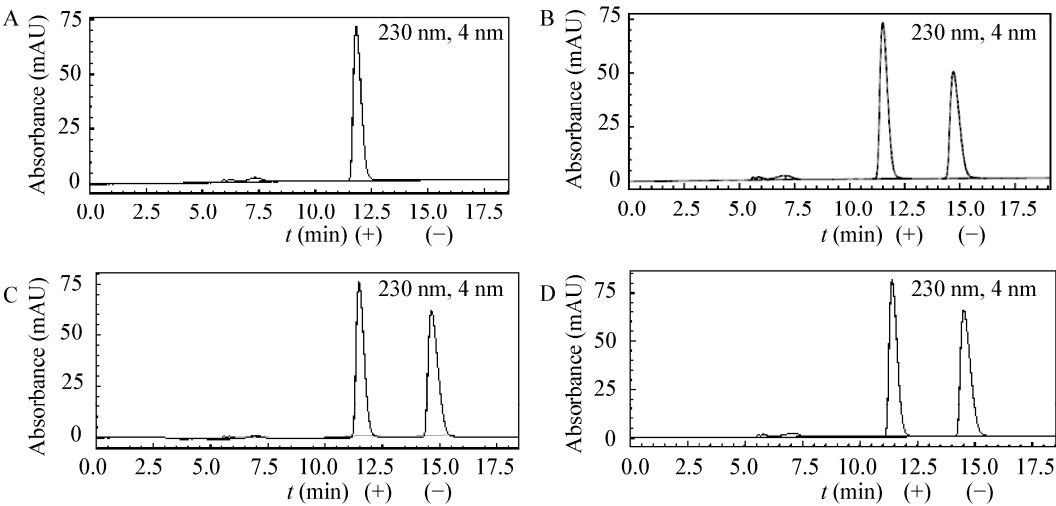


图 6 skA2 诱导/未诱导和 skB5 诱导/未诱导的降解底物 HPLC 图

Figure 6 HPLC chart of substrate degradation by skA2 induced/uninduced and skB5 induced/uninduced

注：A：skA2 加 IPTG 诱导后对底物的作用；B：skA2 未加 IPTG 诱导对底物的作用；C：空载体 skB5 加 IPTG 诱导后对底物的作用；D：空载体 skB5 未加 IPTG 诱导对底物的作用。

Note: A: The effect of skA2 with IPTG on the substrate; B: The effect of skA2 without IPTG on the substrate; C: The effect of blank vector skB5 with IPTG on the substrate; D: The effect of blank vector skB5 without IPTG on the substrate.

导组有轻微酶活,可解释为 LB 培养基中的蛋白胨中含有微量乳糖^[25],也调控了乳糖操控子表达了少量重组蛋白。空载体菌株 skB5 无论是否 IPTG 诱导都无酶活。以上结果说明外源序列 A 表达的蛋白确实具有(-) γ -内酰胺酶活性,是一种未经报道的新(-) γ -内酰胺酶。

2.6 中试放大

5 L 发酵罐培养 skA2, 1 L 反应罐用于底物与菌体反应,反应后水溶液中包含(-) γ -内酰胺的水解产物开环氨基酸和(+) γ -内酰胺。利用正丁醇萃取(+) γ -内酰胺,旋转蒸发仪干燥,再溶于一定量的单蒸水,过夜冻干即得到初步实验产物。取少量冻干粉末溶于正丁醇,进行高效液相色谱检测。由图 7 可见初步实验产物 e.e.值已达到 83.2%,具备工业应用前景。

3 讨论与结论

本文通过“acetamidase/formamidase”关键词从苏云金芽孢杆菌的基因组中检索潜在的 γ -内酰胺酶

基因,对其进行克隆表达及酶活检测。由于最初引物设计不合理,skA 序列未能成功融合 His 标签,因而无法通过 Ni-NTA 亲和层析法纯化。通过将诱导表达后表达量上调的 37 kD 处蛋白切胶,送上海拜谱生物科技有限公司进行质谱鉴定,最终确认该条带的确是来源于 *Bacillus thuringiensis* 的外源蛋白。活性检测显示,导入 A 基因的工程菌 skA2 有(-) γ -内酰胺酶活性,携带有 pET-28a 空载质粒的 *E. coli* BL21 菌株 skB5 没有(-) γ -内酰胺酶活性,说明 A 基因表达的蛋白具有(-) γ -内酰胺酶活性,是一种未报道的新(-) γ -内酰胺酶。经初步 5 L 发酵、底物拆分、产物回收实验,构建好的 skA2 重组菌株具备生产制备光学纯(+) γ -内酰胺的工业应用潜力。本研究的意义在于发掘出一段未报道的(-) γ -内酰胺酶基因,丰富了生产者的酶工具箱,在对基因进行挖掘的过程中构建了表达该基因的工程菌株 skA2,其可以满足工业制备光学纯(+) γ -内酰胺的需要,从而为合成单构型药物奠定基础。

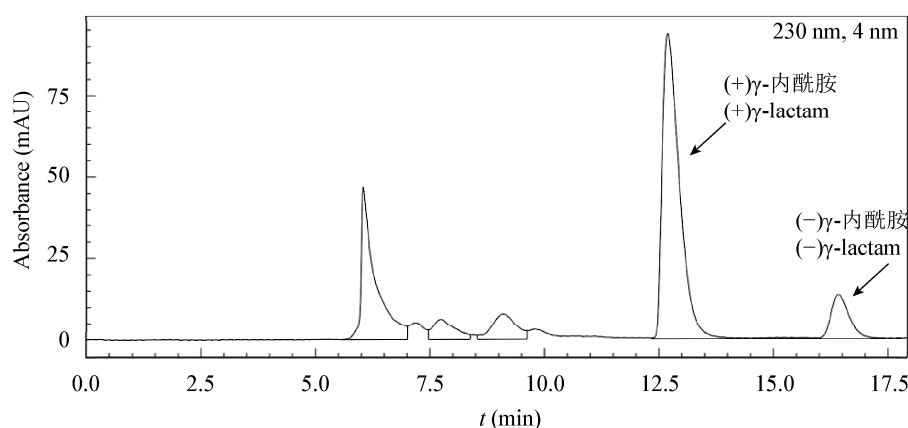


图 7 终产物液相分析图

Figure 7 HPLC analysis of end product

REFERENCES

- [1] Zhu SZ, Gong CY, Song DW, et al. Discovery of a novel (+)- γ -lactamase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6 by rational genome mining[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(20): 7492-7495
- [2] Wang JJ, Zheng GJ, Wu S. Advances in lactamases from microbes-A review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(8): 988-994 (in Chinese)
- [3] 王建军, 郑国钧, 吴胜. 微生物来源的 γ 内酰胺酶研究进展[J]. 微生物学报, 2010, 50(8): 988-994
- [3] Singh R, Vince R. 2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one: chemical profile of a versatile synthetic building block and

- its impact on the development of therapeutics[J]. Chemical Reviews, 2012, 112(8): 4642-4686
- [4] Dong JX. Study on asymmetric synthesis of (2S,5S)-2,5-hexandiol with *Saccharomyces cerevisiae* sp. strain HD-5[D]. Quanzhou: Master's Thesis of Huaqiao University, 2006 (in Chinese)
董建勋. 酵母细胞 HD-5 催化(2S,5S)-2,5-己二醇的不对称合成研究[D]. 泉州: 华侨大学硕士学位论文, 2006
- [5] Taylor SJC, McCague R, Wisdom R, et al. Development of the biocatalytic resolution of 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one as an entry to single-enantiomer carbocyclic nucleosides[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1993, 4(6): 1117-1128
- [6] Taylor SJC, Sutherland AG, Lee C, et al. Chemoenzymatic synthesis of (-)-carbovir utilizing a whole cell catalysed resolution of 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one[J]. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1990(16): 1120-1121
- [7] Zhang XJ, Chi NY, Wang Q, et al. Isolation and identification of a (+) γ -lactamases producing strain and preliminary study on its enzymatic properties[J]. Chinese Brewing, 2016, 35(5): 52-55 (in Chinese)
张旭姣, 迟乃玉, 王强, 等. (+) γ -内酰胺酶菌株的筛选鉴定及其部分酶学特性研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(5): 52-55
- [8] Brabban AD, Littlechild J, Wisdom R. Stereospecific γ -lactamase activity in a *Pseudomonas fluorescens* species[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1996, 16(1): 8-14
- [9] Wang JJ, Zhu YX, Zhao GG, et al. Characterization of a recombinant (+)- γ -lactamase from *Microbacterium hydrocarbonoxydans* which provides evidence that two enantiocomplementary γ -lactamases are in the strain[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(7): 3069-3080
- [10] Taylor SJC, Brown RC, Keene PA, et al. Novel screening methods—the key to cloning commercially successful biocatalysts[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1999, 7(10): 2163-2168
- [11] Gonsalvez IS, Isupov MN, Littlechild JA. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a γ -lactamase[J]. Acta Crystallographica Section D, 2001, 57(2): 284-286
- [12] Wang JJ, Zhang X, Min C, et al. Single-step purification and immobilization of γ -lactamase and on-column transformation of 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(1): 81-87
- [13] Toogood HS, Brown RC, Line K, et al. The use of a thermostable signature amidase in the resolution of the bicyclic synthon (*rac*)- γ -lactam[J]. Tetrahedron, 2004, 60(3): 711-716
- [14] Zhang X. One-step purification and immobilization of poly-histidine-tagged γ -lactamase, and on-column transformation of 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one (γ -lactam)[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing University of Chemical Technology, 2010 (in Chinese)
张星. 一步纯化固定化 γ -内酰胺酶及柱上拆分(±) γ -内酰胺研究[D]. 北京: 北京化工大学硕士学位论文, 2010
- [15] Zheng GJ, Zhu SZ, Ren L. Gamma-lactamase, its coding gene and application: CN, CN102796719A[P]. 2012-11-28 (in Chinese)
郑国钧, 朱绍洲, 任璐. 一种(+) γ -内酰胺酶及其编码基因与应用: 中国, CN102796719A[P]. 2012-11-28
- [16] Ren L, Zhu SZ, Shi Y, et al. Enantioselective resolution of γ -lactam by a novel thermostable type II (+)- γ -lactamase from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(1): 170-184
- [17] Gao SH. Study on the cloning, expression and enzymatic properties of (+) γ -lactamase[A]//Proceedings of the First Beijing University of Chemical Technology Innovation and Entrepreneurship Forum[C]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2012: 189-195 (in Chinese)
高帅华. (+)- γ -内酰胺酶的克隆表达及酶学性质研究[A]//第一届北京化工大学大学生创新创业论坛论文集[C]. 北京: 北京化工大学, 2012: 189-195
- [18] Zhu SZ, Ren L, Yu SZ, et al. Enzymatic preparation of optically pure (+)-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one by(-)- γ -lactamase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2014, 24(20): 4899-4902
- [19] Li HX, Zheng GJ, Zhu SZ. Construction of an organelle-like nanodevice via supramolecular self-assembly for robust biocatalysts[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17: 26
- [20] Wang JJ, Guo XY, Zheng GJ, et al. Purification and characterization of a novel (-) gamma-lactamase from *Microbacterium hydrocarbonoxydans*[J]. Annals of Microbiology, 2009, 59(2): 345-348
- [21] Yang M, Gao Q, Wu S, et al. Characterization of a recombinant (-) γ -lactamase from *Microbacterium hydrocarbonoxydans*[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(2): 275-279
- [22] Yan XD, Wang JJ, Sun Y, et al. Facilitating the evolution of esterase activity from a promiscuous enzyme (Mhg) with catalytic functions of amide hydrolysis and carboxylic acid perhydrolysis by engineering the substrate entrance tunnel[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(22): 6748-6756
- [23] Assaf Z, Eger E, Vitnik Z, et al. Identification and application of enantiocomplementary lactamases for vince

- lactam derivatives[J]. ChemCatChem, 2014, 6(9): 2517-2521
- [24] Wang JJ, Zhu JG, Wu S. Immobilization on macroporous resin makes *E. coli* RutB a robust catalyst for production of (-) vince lactam[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(11): 4691-4700
- [25] Xue TY. Heterologous expression of γ -lactamase from *Delftia* sp. CGMCC 5755 and its application in preparation on chiral γ -lactam[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2015 (in Chinese)
薛天芸. 来源于 *Delftia* sp. CGMCC 5755 的 γ -内酰胺酶的克隆表达及应用研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2015
- [26] Xue TY, Xu GC, Han RZ, et al. Soluble expression of (+)- γ -lactamase in *Bacillus subtilis* for the enantioselective preparation of abacavir precursor[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(6): 1687-1699
- [27] Li HX, Zhu SZ, Zheng GJ. Promiscuous (+)- γ -lactamase activity of an amidase from nitrile hydratase pathway for efficient synthesis of carbocyclic nucleosides intermediate[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2018, 28(6): 1071-1076
- [28] Li HX, Gao SH, Qiu Y, et al. Genome mining integrating semi-rational protein engineering and nanoreactor design: roadmap for a robust biocatalyst for industrial resolution of vince lactam[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(3): 1109-1123
- [29] Zhu SZ, Zheng GJ. Dynamic kinetic resolution of vince lactam catalyzed by γ -lactamases: a mini-review[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2018, 45(12): 1017-1031

征订启事**欢迎订阅《微生物学通报》**

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 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、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物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改革等。

本刊为中文核心期刊, 中国科技核心期刊, CSCD 核心期刊, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012 年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2020 年每册定价 130 元, 全年 1560 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413