

假单胞菌海因酶基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达

李志强^{*}, 刘景晶, 胡卓逸, 王正华, 明欣

(中国药科大学生物化学研究室, 南京 210009)

摘要 目的: 构建海因酶基因工程菌, 以便实现对羟基苯甘氨酸的工业化生产。方法: 利用 PCR 技术从恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) 9801 中扩增得到海因酶基因, 将该基因插入 pMD18-T 质粒, 转化大肠杆菌(*Escherichia coli*), 通过地高辛标记原位杂交和海因酶活力测定两种方法, 筛选出具有海因酶活力的阳性转化子。结果: 工程菌 *E. coli* BL21/pMD-dht 的海因酶活力达到 1700 U/L, 比野生菌恶臭假单胞 9801 菌的酶活力提高 8 倍。SDS-PAGE 显示海因酶的单体分子量约为 53 KDa, 海因酶的表达量约占菌体总可溶性蛋白的 20%。结论: 构建的海因酶基因工程菌已初步具有工业化应用价值。

关键词 海因酶; 恶臭假单胞菌; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: Q785; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2001)03-0227-04

D-对羟基苯甘氨酸(*D*-*p*-hydroxyphenylglycine, *D*-*p*-HPG)是制备羟氨苄青霉素、羟氨苄头孢菌素和羟氨唑头孢菌素等 β -内酰胺类抗生素的重要中间体, 同时它也用于多种多肽类激素及农药的合成^[1], 因此, *D*-*p*-HPG 的生产在医药工业中占有重要地位。

D-*p*-HPG 的制备方法主要有化学拆分法、氨基酰化酶拆分法和生物酶转化法^[2]。由于前两种拆分法工艺复杂、产率低、成本高、光学纯度低、严重污染环境, 所以人们已把研究重点转移到了具有原料易得、工艺简单、耗能少、产率高、成本低、光学纯度高、三废污染少等优势的酶法生产 *D*-*p*-HPG 上。

生物酶转化法是利用海因酶(*D*-hydantoinase)又称二氢嘧啶酶(dihydropyrimidinase, EC 3.5.2.2)将底物对羟基苯海因(*DL*-hydroxyphenylhydantoin, *DL*-HPH)转化成 *N*-氨基甲酰-对羟基苯甘氨酸(*N*-carbamyl-*D*-*p*-hydroxyphenylglycine, CpHPG), 然后再经化学处理或再由第 2 种酶 *N*-氨基甲酰酶(*N*-carbamylase)催化脱去氨甲酰基而得到 *D*-*p*-HPG, 因而海因酶在 *D*-*p*-HPG 的酶法合成中具有重要意义。

据文献报道, 假单胞菌(*Pseudomonas*)、土壤杆菌(*Agrobacterium*)等^[3,4]野生菌含有海因酶, 但这

些野生菌的海因酶活力都比较低, 不能直接用于工业化生产, 为此我们构建了海因酶基因工程菌, 以便为以后利用生物酶工程技术实现 *D*-*p*-HPG 的大规模工业化生产奠定基础。

1 材料

1.1 质粒和菌种

pMD18-T 质粒购自宝生物工程(大连)有限公司; pMD-dht 重组质粒由中国药科大学生物化学研究室构建, 将海因酶基因插入 pMD18-T 质粒而得到。

恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 9801 由本室筛选。 *E. coli* BL 21、*E. coli* CPU 210009、*E. coli* DH 5 α 和 *E. coli* JM 109 由中国药科大学酶工程实验室保存。

工程菌 *E. coli* BL21/pMD-dht、*E. coli* CPU 210009/pMD-dht、*E. coli* DH 5 α /pMD-dht 和 *E. coli* JM109/pMD-dht 由本工作构建, 分别由 pMD-dht 质粒转化 *E. coli* BL 21、*E. coli* CPU 210009、*E. coli* DH 5 α 和 *E. coli* JM 109 而得到。

1.2 工具酶和化学试剂

Taq DNA 聚合酶、pfu DNA 聚合酶购自华美公

* 收稿日期 2001-02-18 * 通讯作者 Tel: 025-3271240 E-mail: ZQL258@163.net

基金项目: 江苏省应用基础研究基金资助项目(BJ97080)

司; DNA marker 购自 Fementas 公司; dNTP 购自华美公司; 十二烷基硫酸钠(SDS)、溴化乙锭(EB)购自 Serva 公司; Tryptone, Yeast extract 购自 OXOID 公司; 地高辛标记 kit 购自 Boehringer Mannheim 公司; 对二甲氨基苯甲醛购自上海试剂三厂; 海因酶底物对羟基苯海因采用乙醛酸法制备^[5]。其他试剂均为市售分析纯。

2 方 法

2.1 PCR 扩增 *D*-海因酶基因

按文献^[6]方法提取 *Pseudomonas putida* 9801 菌的染色体 DNA 作为 PCR 扩增模板。根据海因酶基因序列设计一对引物:

LPH₁: 5'-AGTCAGTCAATAACCCCTGA-3'

LPH₃: 5'-TCACGGTTGTAGCCTCTCTC-3'

94℃, 预变性 5 min 后, 加入 pfu DNA 聚合酶, 然后采用梯度降温程序: 94℃, 变性 1 min; 65℃, 63℃, 60℃, 55℃, 50℃, 5 个退火温度, 各 2 min; 72℃ 延伸 3 min 30 s, 以上各进行 3 个循环。最后, 94℃, 变性 1 min; 57℃ 退火 2 min; 72℃ 延伸 3 min 30 s, 维持 20 个循环。

2.2 DNA 序列分析

以双脱氧核苷酸链终止法测定序列。

2.3 重组质粒 pMD-dht 的构建

在 PCR 扩增的末轮循环加入 0.5 U Taq DNA 聚合酶, 72℃, 延伸 10 min, 使 PCR 产物的 3' 末端补加上 A, 然后将 PCR 产物用酚-氯仿法纯化, 加入 pMD18-T 质粒, 用高效连接液 12℃ 连接过夜, 连接产物转化 *E. coli* DH5α。

2.4 阳性转化子的筛选

2.4.1 用地高辛标记法进行菌落克隆的原位筛选

用内部引物 LPH₁: 5'-AGTCAGTCAATAACC-CCTGA-3' 和 LPH₂: 5'-TCACAAATGGTTTCGGCAA-TAC-3', 通过 PCR 扩增出 *D*-海因酶基因的一个 800bp 片段作为探针。按 kit 说明对探针进行地高辛标记。准备 A、B 两个 Amp 抗性平板, 背面划好格子并编号, 其中一个平板铺上灭菌的硝酸纤维薄膜, 用灭菌牙签逐个将同一菌落点到 A、B 两个平板上, 37℃ 培养过夜。待菌落长出后, 取下硝酸膜, 菌落面朝上, 依次在变性液饱和的、中和液饱和的、2×SSC 饱和的 3 mm 滤纸上分别处理 7 min、3 min、和 5 min。将膜室温干燥 30 min 后, 夹在 3 mm 滤纸之间, 80℃

烘 2 h, 以固定变性的 DNA。然后进行预杂交、杂交和显影。

2.4.2 用海因酶活力测定法进行复筛 将地高辛标记法筛选出的阳性转化子进一步用海因酶活力测定法进行复筛。方法如下:

将单菌落接入 LB 液体培养基(含 Amp 100 μg/ml) 5 ml, 37℃ 培养 10 h, 取 1ml 培养液于 Eppendorf 管中, 8000 r/min, 离心 2 min。用生理盐水洗涤菌体后, 加入 0.2 ml 1% 的对羟基苯海因底物溶液(用 pH 8.5 的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液配制), 37℃, 反应 30 min。

加入 12% 三氯乙酸 0.1 ml 终止反应, 8000 r/min, 离心 2 min, 加入 0.3 ml 显色剂(5% 对二甲氨基苯甲醛的 6 mol/L 盐酸溶液), 呈明显黄色反应的, 为阳性转化子。将活力最高的阳性转化子进行单菌落划线培养。

2.5 海因酶活力测定

采用修饰的 Cecere 法^[7]。酶活力单位定义为每分钟催化生成 1 μmol *N*-氨基甲酰-对羟基苯甘氨酸所需的酶量为一个酶活力单位。

2.6 蛋白质 SDS-PAGE

参见文献[8]。

3 结 果

3.1 *D*-海因酶基因的扩增

通过 PCR 扩增得到一长约 1.8 kb 的单一 DNA 片段, 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。

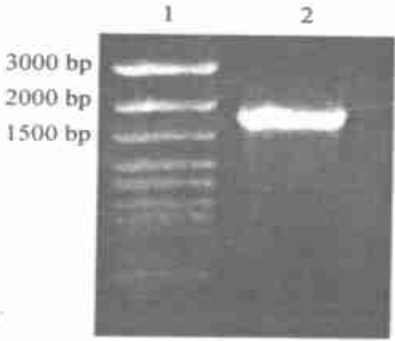


Fig 1. Agarose gel electrophoreses of PCR product. lane 1: DNA molecular weight (bp) Marker. lane 2: PCR product by using chromosome DNA of *Pseudomonas putida* 9801 as template; LPH₁, LPH₃ as primer. Approx 1.8 kb

经 DNA 序列分析, 该 DNA 片段包含海因酶基因的自身启动子和编码序列。

3.2 重组质粒 pMD-dht 的构建

用酚-氯仿法将 PCR 产物纯化后, 将 1.8 kb 的 DNA 片断插入 pMD18-T 质粒, 转化 *E. coli* DH5 α 。在 LB 平板(含 Amp 100 μ g/ml)上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 用地高辛标记进行初筛, 从 100 多个菌落中筛选到了 23 个含有海因酶基因的阳性转化子(图 2)。

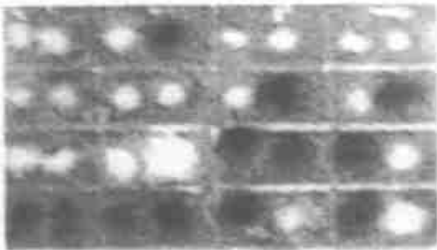


Fig 2 *In situ* hybridization isolation of positive bacterial colonies by digoxigenin DNA labeling. The black spots indicate positive colony. The white spots indicate negative colony.

将这 23 个阳性转化子分别接入 LB 培养基(含 Amp 100 μ g/ml), 进行海因酶活力测定筛选, 结果有 10 个转化子具有海因酶活力, 其中 28 号转化子的酶活力最高, 达到 700 U/L, 将这个转化子进行单菌落划线培养。

用碱变性法抽提 28 号转化子的质粒, 将这种带有海因酶基因的重组质粒命名为 pMD-dht。

3.3 宿主菌对海因酶基因表达的影响

将重组质粒 pMD-dht 分别转化 *E. coli* BL21、*E. coli* CPU210009、*E. coli* DH5 α 和 *E. coli* JM109, 分别得到相应的转化子 *E. coli* BL21/pMD-dht、*E. coli* CPU210009/pMD-dht、*E. coli* DH5 α /pMD-dht 和 *E. coli* JM109/pMD-dht。培养各转化子, 比较其产酶能力。结果表明各转化子差异明显, 其中以 *E. coli* BL21 作为宿主菌的转化子酶活力显著高于其他转化子(表 1)。

Tab 1. Effect of uracil on the D-hydantoinase activity of transformants

Strains	D-hydantoinase activity (U. L ⁻¹)	
	Control	uracil induction
<i>P. putida</i> 9801	130	217
<i>E. coli</i> BL21/pMD-dht	1700	1880
<i>E. coli</i> CPU210009/pMD-dht	416	420
<i>E. coli</i> DH5 α /pMD-dht	750	738
<i>E. coli</i> JM109/pMD-dht	240	249

The concentration of uracil in the medium was 0.05% (w/v).

3.4 重组海因酶的 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 结果见图 3, 可见工程菌 *E. coli*

BL21/pMD-dht 出现一条分子量约为 53 kDa 的蛋白带。这与文献报道的海因酶分子量相近。薄层扫描结果显示该蛋白质约占菌体总可溶性蛋白的 20%。

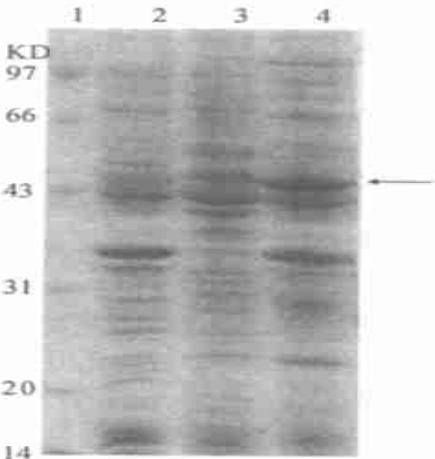


Fig 3. The SDS-PAGE result of cell extracts.
lane 1: protein molecular weight marker(dalton) (Rabbit phosphor-orylase b 97400; Bovine serum albumin 66200; Rabbit actin 43000; Bovine carbonic anhydrase 31000; Trypsin inhibitor 20100; Hen egg white lysozyme 14400;)
lane 2: crude cell extract of *E. coli* BL21.
lane 3: crude cell extract of *Pseudomonas putida* 9801.
lane 4: crude cell extract of genetic engineering strain *E. coli* BL21/pMD-dht. The arrow indicates the protein lane of D-hydantoinase.

3.5 尿嘧啶对转化子海因酶活力的影响

在培养基中添加适量尿嘧啶能提高假单胞菌的海因酶活力, 但尿嘧啶对工程菌的海因酶表达无影响(表 1)。

4 讨 论

经 DNA 序列分析, 扩增出的 1.8 kb 海因酶全基因含有其自身启动子和编码序列。该启动子的一10 区和-35 区相隔 17 bp, 与 *E. coli* 中启动子一10 区和-35 区二者之间的距离相一致。但该启动子的一10 区为 tctagc, -35 区为 tcttga, 这与 *E. coli* 中启动子的一10 区一致序列 tataat 和-35 区一致序列 ttgaca 有所不同。然而构建的重组质粒在 *E. coli* 中能够表达海因酶活力, 说明尽管恶臭假单胞菌和 *E. coli* 分属假单胞菌科和肠杆菌科, 二者亲缘关系较远, 但 *E. coli* 的 RNA 聚合酶能够识别和结合来自恶臭假单胞菌海因酶基因的启动子, 该启动子在 *E. coli* 中同样能够工作。将重组质粒 pMD-dht 分别转化不同的 *E. coli* 宿主细胞, 结果发现他们的海因酶活力有明显的差异, 由于在 *E. coli*

宿主细胞中不存在能对海因酶基因进行调控的调节基因, 因此这种酶活力上的差异估计不应是反式作用因子对基因调控造成的, 而应是在不同的 *E. coli* 宿主细胞中, 重组质粒的拷贝数不同导致的。

有文献报道, 海因酶是一种组成酶, 不受诱导物的影响^[9], 但也有文献报道, 海因酶是一种诱导酶, 添加适量的尿嘧啶等诱导物可使酶活力提高^[10]。本文实验结果表明, 适量的尿嘧啶能提高野生菌 *Pseudomonas putida* 9801 的海因酶活力, 但对工程菌的海因酶表达无影响。由此推测, 在野生菌中海因酶的表达是受基因调控的, 在海因酶基因的上游或下游还存在一个调节基因, 其调控机制应属于负调控, 但这需进一步实验证实。

我们构建的海因酶基因工程菌酶活力比野生菌提高 8 倍, 已初步具有工业化应用研究价值。这为以后通过优化培养条件、改换强启动子等途径进一步构建高表达高活力的海因酶工程菌打下了基础。

参 考 文 献

[1] Takahashi S, Ohasai T, Kii Y, *et al.* Microbial transformation of

hydantoinase to *N*-carbamyl-*D*-amino acids[J] . *J Ferment Technol*, 1979, **57**(4): 328-332.
[2] Takahashi S, Kii Y, Kumagai H, *et al.* Purification crystallization and properties of hydantoinase from *Pseudomonas striata*[J] . *J Ferment Technol*, 1978, **56**(5): 492-498.
[3] Yamada H, Takahashi S, Kii Y, *et al.* Distribution of hydantoin hydrolyzing activity in microorganism[J] . *J Ferment Technol*, 1978, **56**(5)484-491.
[4] Runser S, Chirski N, Ohleyer E. *D*-*p*-Hydroxyphenylglycine production from *DL*-5-*p*-hydroxyphenylhydantoin by *Agrobacterium sp* [J] . *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990 **33**:382-388.
[5] Ohashi T, Takahashi S, Nagamachi T, *et al.* A new method for 5-(4-hydroxyphenyl)hydantoin synthesis[J] . *Agric Biol Chem*, 1981, **45**(4):831-835.
[6] 吴梧桐, 丁锡申, 刘景晶编著. 基因工程药物——基础与临床[M] . 北京: 人民卫生出版社, 1996. 70
[7] Cecere F, Galli G, Monisi F. Substrate and steric specificity of hydroxymethylhydantoinase[J] . *FEBS Letter*, 1975, **57**(2): 192-194.
[8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*[M] . 2nd. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 49
[9] Kim D and Kim H. Enzymatic synthesis of *D*-*p*-hydroxyphenylglycine from *DL*-*p*-hydroxyphenylhydantoin in presence of organic co-solvent[J] . *Enzyme Microb Technol*, 1993 **15**: 530-534.
[10] 孙万儒(Sun WR). 产二氢嘧啶酶的菌种筛选及发酵条件的研究[J] . 微生物学报(*Acta Microbiol Sin*), 1983, **23**(2): 133-142.

Cloning of *D*-hydantoinase Gene from *Pseudomonas* and Its Expression in *E. coli*

LI Zhi-Qiang, LIU Jing-Jing, HU Zhuo-Yi, WANG Zheng-Hua, MING Xin
Devision of Biochemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract **AIM** The purpose is to construct *D*-hydantoinase genetic engineering strain for the purpose of the industrial production of *D*-*p*-hydroxyphenylglycine. **METHODS** *D*-hydantoinase gene was created from *Pseudomonas putida* 9801 by PCR technique and inserted into pMD18-T vector. The recombinant plasmid was transformed into several *Escherichia coli* strains. The positive transformants with *D*-hydantoinase activity were obtained by the two step screening, digoxigenin DNA labeling *in situ* hybridization and *D*-hydantoinase activity assay. **RESULTS** The *D*-hydantoinase activity of the genetic engineering strain *E. coli* BL21/pMD-dht was 1700 U·L⁻¹ and increased as high as 8 times compared with those of wild-type strain *Pseudomonas putida* 9801. The subunit molecular weight of recombinant *D*-hydantoinase was about 53 kDa measured by SDS-PAGE. The amount of the recombinant *D*-hydantoinase was about 20 percent of total bacterial soluble proteins. **CONCLUSION** The genetic engineering strain *E. coli* BL21/pMD-dht possesses the initial industrial production prospects.
Key words *D*-hydantoinase; *Pseudomonas putida*; Gene cloning; Gene expression
Foundation item This work was supported by the Applied Basic Research Foundation of Jiangsu Province (BJ97080)