

Ralstonia eutropha CH34 酯酶基因的克隆和序列分析*

宋水山

(河北省科学院生物研究所 石家庄 050051)

Alexander Steinbüchel

(Institut für Mikrobiologie, Münster University, Germany)

摘 要:采用含 α -乙酸萘酯和固兰 RR 的表面琼脂法从 *Ralstonia eutropha* CH34 的基因文库中筛选酯酶基因 *estA*, 对含有 *estA* 的 1.7kb DNA 片段的核苷酸序列分析表明, 该基因全长 825bp, 编码由 275 个氨基酸组成的 EstA 蛋白, 分子量为 30785D。经推导氨基酸序列的同源性分析, 发现 EstA 与参与芳香化合物代谢中间位裂解途径的水解酶有很高的同源性。

关键词: *Ralstonia eutropha* CH34, 酯酶基因, DNA 序列, 大肠杆菌, 克隆表达

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2001) 04-0402-06

酯酶属于丝氨酸水解酶家族, 其作用在于优先水解水溶性短链酯类的酯键^[1]。随着酶学的发展, 酯酶的众多新特性被发现, 如它们在有机相中可以完成酯化, 转酯和酯交换等众多反应, 而且其中的大多数反应具有不对称选择性, 可以专一性用于制备许多利用化学法难以合成的手性化合物(如液晶、光学活性药物和农药等)及其前体。另外, 酯酶催化的反应还具有反应条件温和、反应介质的选择性大、产物的分离纯化容易及酶本身易于回收等优点^[2]。因此与酯酶有关的课题成为当今应用酶学研究的热点之一。

国外对酯酶基因的克隆研究很活跃, 已有几种微生物酯酶基因得到克隆和表达, 并证实有的酯酶参与半纤维素的降解^[3], 有的参与芳香烃类化合物的降解代谢^[4], 有的在有机合成中发挥重要作用^[5]。而国内这方面的研究起步较晚。*Ralstonia eutropha* CH34 能够利用苯甲酸、苯胺、酯类化合物以及内酯类化合物等为唯一碳源生长, 说明该菌可能含有酯酶或其它水解酶。因此我们从 *Ralstonia eutropha* CH34 的基因文库中筛选酯酶基因, 并对其进行了克隆和测序。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:酯酶基因供体菌 *Ralstonia eutropha* CH34, *Escherichia coli* S17-1, XL1-Blue 和质粒 pHC79、pBluescriptSK⁻ 由德国明斯特大学微生物研究所 Steinbüchel 教授提供。

1.1.2 培养基:LB 和 NB 培养基按文献[6]的方法配制。

1.1.3 抗生素:氨苄青霉素(Ap)、四环素(Tc), 终浓度分别为 100 μ g/mL 和 12.5 μ g/mL。

1.1.4 主要酶制剂:所用工具酶包括各种限制性内切酶、RNase、溶菌酶、DNA 聚合酶 I 大片段、T4DNA 连接酶、牛小肠碱性磷酸酶等购自美国 Promega, Bio-Labs 等公司。

* 本研究由德国教育科研部(BMBF)部长基金资助

作者简介:宋水山(1963-), 男, 河北隆尧人, 河北省科学院生物研究所, 硕士, 主要从事生物化学和分子生物学研究。

收稿日期:2000-08-02, 修回日期:2000-10-25

1.2 方法

1.2.1 DNA 的操作:总 DNA 和质粒 DNA 提取、限制性内切酶酶切反应、琼脂糖凝胶电泳、DNA 片段的分离和回收、DNA 连接、转化等均按文献[6]方法进行。

1.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化:按文献[6]方法进行。

1.2.3 酯酶基因阳性克隆的筛选:将 *Ralstonia eutropha* CH34 的总 DNA 用 *Eco*RI 部分酶切,酶切产物与质粒 pHC79 连接、连接物用 Promega 的包装试剂盒进行体外包装,之后感染大肠杆菌 S17-1。在含 TC(25mg/mL)的 LB 平板上筛选抗性菌落,从而在大肠杆菌 S17-1 中构建 *Ralstonia eutropha* CH34 的基因文库。基因文库中的各抗性克隆转接至 2 个平行的 LB+TC 平板上,37℃ 过夜培养。培养完备后,向其中的一个平板表面倒入 5~7mL 0.5% 的表面琼脂,其中含 80μL α-乙酸萘酯(20mg 溶于 1mL 二甲基甲酰胺中)和 80μL 的固兰 RR (80mg 溶于 1mL 二甲基亚砷中)。2~5min 后酯酶基因阳性克隆的菌落显现褐色。从另一个保存板上挑取相对应的克隆保存和分析。

1.2.4 核苷酸序列分析:用 4000I DNA 自动测序仪(美国 LI-CoR 公司)以双脱氧末端终止法测定重组质粒 pSKH1.7a 中的插入片段 H1.7 的全长核苷酸序列,首先用通用引物进行序列测定,得到了该片段上下游各 600bp 的核苷酸序列,根据已知序列,设计接力引物 SongUP1(5'-GGA AGC CGC CCA AGC AT-3')和 SongRP1(5'-CGC TGG CGC GGT GCC GGA-3')。PCR 法扩增插入片段,其反应条件为:100℃ 预变性 2min 后,94℃ 变性 1.5min,65℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min,共进行 30 个循环。

1.2.5 酯酶活性分析:按文献[7]方法提取细胞粗提取物并测定酯酶活性。一个酶单位定义为在本分析条件下每分钟释放 1μmol 的 *p*-nitrophenol 所需要的酶量。

2 结果和讨论

2.1 *R. eutropha* CH34 酯酶基因的克隆和亚克隆

用含 α-乙酸萘酯和固兰 RR 的表面琼脂对在 *E. coli* S17-1 中构建的 *R. eutropha* CH34 基因文库进行酯酶活性的筛选,得到一个阳性克隆。抽提阳性克隆的质粒,用 *Eco*RI 酶切,结果显示一个约 33.5kb 的 *Eco*RI 片段插入质粒 pHC79 的 *Eco*RI 位点。用 *Hind*III 酶切这一重组质粒,产生若干个 *Hind*III 片段,这些酶切产物混合与经同样酶切后的质粒 pBlue-script SK⁻ 连接,随后转化 *E. coli* S17-1。重组子再经酯酶活性筛选,获得一个阳性亚克隆(II33)。提取 II33 的质粒,该质粒命名为 pII33。*Hind*III 酶切 pII33,电泳结果表明一个 1.7kb 的 *Hind*III 片段被克隆于 pSK⁻ 的 *Hind*III 位点,编码酯酶的基因位于这一片段,该片段命名为 H1.7。经不同的限制性内切酶酶切 H1.7,根据各酶切片段大小得到 H1.7 的酶切图谱(见图 1)。

2.2 H1.7 的核苷酸序列及其编码的酯酶的同源性分析

核苷酸序列分析表明,H1.7 全长 1 711bp,其中存在一个 825 的开放阅读框(ORF)。该 ORF 的起始密码子(ATG)位于 495 位,在起始密码子上游 8 个碱基处有一个典型的核糖体结合位点(GGAG),上游 33 个碱基处,是一典型的启动子序列(TTGTTA-N₃-TATTGC)。在 1320 位有一终止密码子(TAA),紧随其后的是一终止转录的反向重复序列(见图 2)。

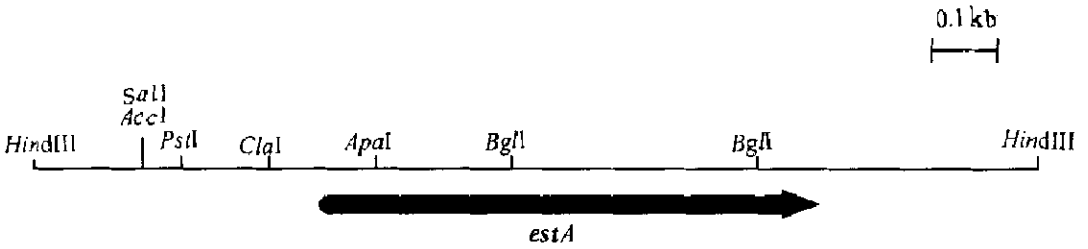


图 1 片段 H1.7 及酯酶基因 *estA* 的物理图谱

Fig.1 Physical map of fragment H1.7 and esterase gene *estA*

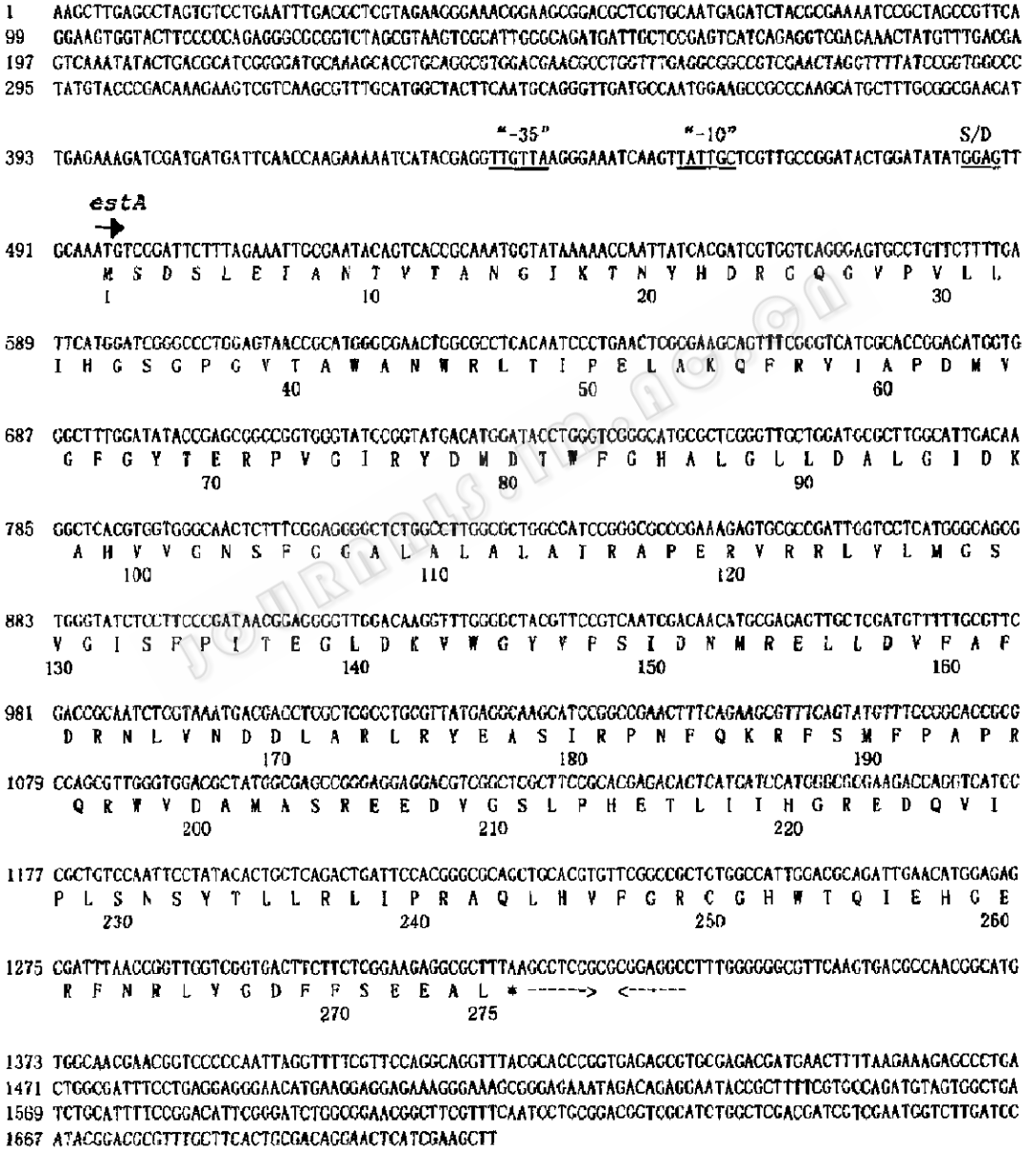


图 2 *estA* 基因的核苷酸序列和编码的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence of the 1711bp *HindIII*-fragment representing the esterase gene *estA* from

R. eutropha CH34 and deduced amino acid of the esterase

Putative ribosome binding site are underlined and indicated in S/D position. The inverted repeats are indicated by dotted line with arrow showing the length and orientation of the stems. “-35” and “-10” indicate the putative promoter motif.

该 ORF 被命名为酯酶基因 *estA*, 编码由 275 个氨基酸组成的蛋白质, 分子量为 31785D, 该蛋白质称为 EstA。我们已将 *estA* 的基因序列输往 EMBL 数据库登录注册, 登录号为 AJ251831。

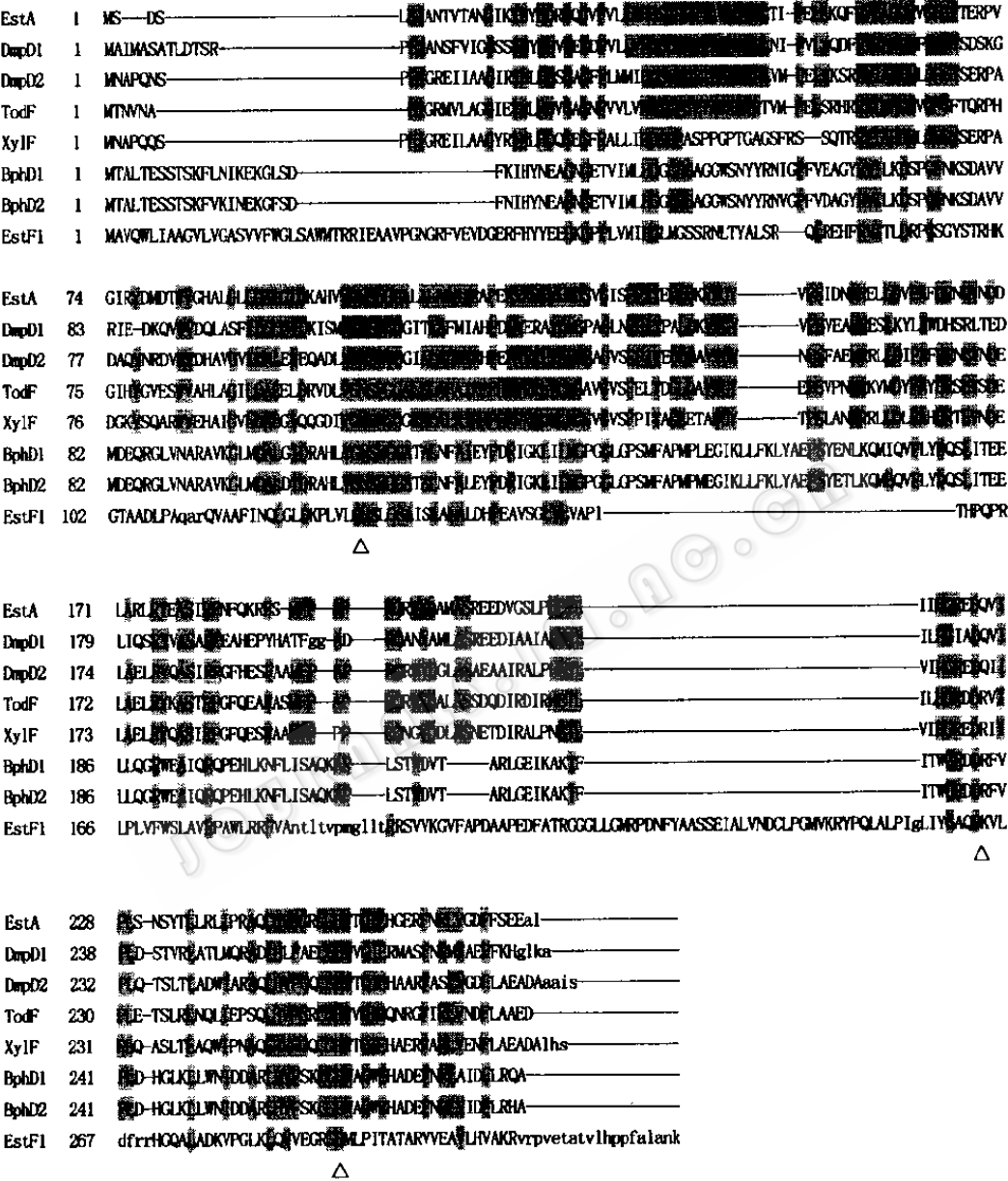


图 3 EstA 与其它几种水解酶氨基酸序列的排列比较

Fig. 3 Multiple amino acid sequence alignment of EstA and other hydrolases.

DmpD1, 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase from *Pseudomonas* sp. DJ77; DmpD2, 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase from *Pseudomonas* sp. CF600; TodF, 2-hydroxy-6-oxo-2,4-heptadienoate hydrolase from *Pseudomonas putida*; XylF, 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase from *Pseudomonas putida*; BphD1, 2,6-dioxo-6-phenylhexa-3-enotae hydrolase from *Pseudomonas putida*; BphD2, 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase from *Burkholderia cepacia*; EstF1, lactone-specific esterase from *Pseudomonas fluorescens*. The triangles indicated the amino acids of the catalytic triad. The box showed the consensus sequence of serine esterase.

通过 BLAST 程序将 EstA 与 EMBL 蛋白数据库进行同源性搜寻,发现 EstA 与许多丝氨酸水解酶有很高的同源性,这些酶包括假单胞菌,不动细菌和 *Sphingomonas* 的 2-羧基己二烯二酸半缩醛水解酶(HMSH)^[8-10], *Acetobacter pasteurianus* 的酯酶^[11],以及 *Pseudomonas fluorescens* 对内酯有特异性的酯酶^[12],哺乳动物环氧化物水解酶^[13]。所有这些酶的共同特征是具有一所谓的 α/β 水解酶折叠和一个由丝氨酸,组氨酸和天冬氨酸组成的催化三合体(见图 3)。在 EstA 中,Ser104、Asp224 和 His252 组成催化三合体(见图 3 中的三角下标),并在丝氨酸活性位点附近存在丝氨酸水解酶的特征保守序列(G-X-S-X-GG)。进一步比较 EstA 与其它几种水解酶的序列发现,EstA 与参与裂解单环芳香化合物如邻苯二酚及其衍生物的酶如 DmpD、XylF 和 TodF 有较高的同源性(同源性 60% ~ 72%),而与参与裂解双环的芳香化合物如双羟基二苯酚及其衍生物的酶如 BphD 的同源性较低(同源性 35% ~ 41%)。另外还发现其结构中心区域与 DmpD、XylF 和 TodF 的相似而与 BPbD 的不同。Diaz 和 Timms 提出结构基因的中心区域决定新编码酶的底物特异性^[13],由此推测 EstA 很可能参与 *R. eutropha* CH34 降解单环芳香烃类化合物的代谢过程,催化较少见的反应类型,即 C—C 键的水解。

2.3 EstA 在大肠杆菌中的表达

将 H1.7 克隆于 pSK⁻ 的 *Hind*Ⅲ 位点,转化 *E. coli* XL1-Blue,筛选正向重组子和反向重组子,正向重组质粒命名为 pSKH1.7c,反向重组质粒命名为 pSKH1.7a。分光光度计法检测重组子 *E. coli* XL1-Blue(pSKH1.7a)和 *E. coli* XL1-Blue(pSKH1.7c)的细胞粗提物的酯酶活性,结果见表 1。由表 1 可以看出两向重组质粒均赋予 *E. coli* XL1-Blue 酯酶活性,但 *E. coli* XL1-Blue (pSKH1.7c)的酯酶活性是 *E. coli* XL1-Blue (pSKH1.7a)的 10 倍。说明酯酶基因 *estA* 的启动子能够被表达系统所识别并发挥启动功能,且其转录可能不仅受其自身启动子的控制,而且也受 *lacZ* 启动子的控制。

表 1 *R. eutropha* CH34 酯酶基因在大肠杆菌 XL1-Blue 中的表达

Table 1 Expression of *estA* gene of *R. eutroph* CH34 in *E. coli* XL1-Blue

Plasmids	Protein concentration/(mg/mL)	Volume activity/(U/mL)	Specific activity/(U/mg)
pBluescript SK ⁻	9.65	0.04	0.004
pSKH1.7a	11.86	10.07	0.85
pSKH1.7c	16.17	141.36	8.72

Cells were cultivated in LB liquid medium with 12.5μg/mL of tetracyclin and 100μg/mL of ampicillin at 37℃ for 20h. The soluble fractions of crude cell extracts were prepared as described in Materials and methods. The esterase activity was determined photometrically by using *p*-nitrophenol acetate as substrate at 25℃ and $\lambda = 410\text{nm}$. One unit of enzyme activity was defined as the amount that released 1μmole *p*-nitrophenol per min under assay conditions.

以上实验结果表明,本实验克隆的 *R. eutropha* CH34 的酯酶 EstA 可以有效地作用于酯酶的特异性底物 *p*-nitrophenol acetate,表达了很高的酯酶活性,同时通过推导氨基酸序列的同源性分析,发现 EstA 与其它微生物降解芳香烃化合物代谢过程中参与 *meta* 裂解的水解酶有很高的同源性,因而推测其对于 *R. eutropha* CH34 利用芳香烃化合物为唯一生长碳源具有重要的意义。因此 EstA 不仅可以作为常规的酶酯用于洗涤、化工、有机合成中,而且有潜力应用于环境中芳香化合物类污染物的生物整治。

参 考 文 献

- [1] 张树政. 酶制剂工业(下册). 北京: 科学出版社, 1984. 655 ~ 670.
- [2] Dordick J S. Principles and Application of Nonaqueous Enzymology. *Marcel Dekker Inc*, 1991. 1 ~ 52.
- [3] Dalrymple B P, Swadling Y, Cybinski D H, *et al*. *FEMS Lett*, 1996, **143**: 115 ~ 120.
- [4] Norlund I, Shingler V. *Biochem Biophys Acta*, 1990, **1049**: 227 ~ 230.
- [5] Nishizawa M, Gomi H, Kishimoto F. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, **57**: 594 ~ 598.
- [6] Sambrook D J, Holt P J, Lowe C R, *et al*. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [7] Krebsfaenger N, Zoehrer F, Alterbuchner J, *et al*. *Enz Microbiol Technol*, 1998, **22**: 641 ~ 646.
- [8] Takeo M, Fujii T, Takenaka K, *et al*. *J Ferment Bioeng*, 1998, **85**: 514 ~ 517.
- [9] Yrjala K, Paulin L, Romantschuk M. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **154**: 403 ~ 408.
- [10] Kashima Y, Nakajima Y, Nakano Y, *et al*. *J Biosci Bioeng*, 1999, **87**: 19 ~ 27.
- [11] Khilameyzer V, Fischer I, Bornscheuer U T, *et al*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 477 ~ 482.
- [12] Sandberg M, Meijer J. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **221**: 333 ~ 339.
- [13] Diaz E, Timmis K N. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 6403 ~ 6411.

CLONING AND SEQUENCING OF THE GENE ENCODING ESTERASE *estA* FROM *RALSTONIA EUTROPHA* CH34

Song Shuishan

(Biology Institute , Hebei Academy of Sciences , Shijiazhuang 050051 , China)

Alexander Steinbüchel

(Institut für Mikrobiologie , Münster University , Münster , Germany)

Abstract: An esterase-positive clone was isolated by screening a genomic library of *Ralstonia eutropha* CH34 constructed in *Escherichia coli* S17-1 with top agar containing α -naphthyl acetate and Fast Blue RR. A gene encoding esterase activity, *estA* was subcloned from this clone. Nucleotide sequencing of *estA* showed that it was a 825bp open reading frame, encoding an esterase EstA, composed of 275 amino acids with a predicted molecular mass of 30785 D. Homology analysis revealed that EstA exhibited significant amino acid similarity with the enzymes involved in the *meta*-cleavage pathway in the metabolism of aromatic acid compounds.

Key words: *Ralstonia eutropha* CH34, Esterase gene, DNA sequence, *Escherichia coli*, Cloning and expression