

三角酵母 D-氨基酸氧化酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达

罗 晖 童忆舟 李 强 于慧敏 沈忠耀*

(清华大学化工系 北京 100084)

摘 要:从三角酵母中提取总 RNA,反转录后进行 PCR 扩增得到 D-氨基酸氧化酶(D-Amino Acid Oxidase, DAAO)基因。经测序可知,与文献中三角酵母的 DAAO 基因序列的同源性在 99% 以上。将 DAAO 基因用 *Nco* I 和 *Bam* H I 双酶切后,与相同酶切的大肠杆菌表达载体 pET-28a 连接,转化大肠杆菌 TOP-10F',并筛选得到重组质粒 pET-DAAO,转化 BL21(DE3)感受态细胞,得到重组大肠杆菌 BL21(DE3)pET-DAAO。对重组大肠杆菌中的 D-氨基酸氧化酶进行了诱导表达,考察了诱导温度、菌浓度、诱导剂 IPTG 用量以及溶氧等因素对酶活的影响。结果表明,在 28℃、菌浓度(OD_{600})1.0、IPTG 浓度 1mmol/L 时,DAAO 酶活最高达 23.3U/mL。研究进一步显示,用廉价无毒的乳糖可以替代 IPTG 进行诱导,当乳糖浓度为 2mmol/L,DAAO 酶活可达 22.7U/mL。经过补料分批培养和乳糖诱导,DAAO 酶活可以达到 175U/mL。

关键词:D-氨基酸氧化酶,三角酵母,大肠杆菌,乳糖

中图分类号:Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-6209(2004)03-0336-04

7-氨基头孢烷酸(7-Aminocephalosporanic acid, 7-ACA)是生产半合成头孢菌素的重要中间体,一般由头孢菌素 C(Cephalosporin C, CPC)经化学法或酶法脱去其侧链得到^[1,2]。目前,人们研究较多的是两步酶法制备 7-ACA。首先,头孢菌素 C 在 D-氨基酸氧化酶(D-Amino Acid Oxidase, DAAO)的作用下,产生一个具酮基的中间体和一个 H_2O_2 ,这个中间体不稳定,很容易被同时产生的 H_2O_2 化学氧化脱羧,转变成戊二酰基-7-氨基头孢烷酸(Glutaryl-7-aminocephalosporanic Acid, GL-7-ACA),然后在 GL-7-ACA 酰化酶的作用下脱去侧链,生成 7-ACA。

D-氨基酸氧化酶是一种典型的黄素蛋白,广泛存在于动物内脏及微生物中。DAAO 的底物专一性较低,可以作用于几乎所有的 D-氨基酸,也可以作用于各种具有 D-氨基的化合物(如头孢菌素 C)。通常认为 DAAO 是由几个亚基构成的多聚体,并且非共价结合了一个辅酶——FAD^[3]。DAAO 的主要来源有:三角酵母(*Trigonopsis variabilis*)^[3,4]、猪肾(Porcine kidney)^[5]、腐皮镰孢霉(*Fusarium solani*)^[6]、红酵母(*Rhodotorula gracilis*)^[7]、尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)^[8]和曲霉(*Aspergillus*)^[9]等,其中三角酵母的 DAAO 在 7-ACA 工业上应用最广。由于野生菌株的培养条件较高,表达的 DAAO 水平也较低,人们通常将野生株的 DAAO 基因在重组大肠杆菌或酵母菌

中进行表达,但表达水平仍有待于进一步提高。本文以三角酵母为出发菌株,对 DAAO 进行了分子克隆并在重组大肠杆菌中进行了表达条件的优化。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株

pET-28a(+) 购自 Novagen 公司;大肠杆菌 BL21(DE3) TOP-10F' 分别购自 Promega 公司和 Invitrogen 公司;三角酵母(*Trigonopsis variabilis*)为本实验室保藏。

1.2 工具酶和试剂

各种试剂盒购自 Promega 公司,工具酶购自 TaKaRa 公司,微生物培养用 Yeast extract、Peptone 为 OXOID 公司产品,其他化学试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 PCR 引物

根据三角酵母 D-氨基酸氧化酶 cDNA 核酸序列,设计了引物,上游引物序列为 5'-CATGCCATG-GCTAAAATCGTTG-3',下游引物序列为 5'-CGG-GATCCCTAAAGGTTT GGACG-3'(北京赛百盛基因技术有限公司合成),分别引入了 *Nco* I 和 *Bam* H I 酶切位点。

1.4 总 RNA 的提取

三角酵母用 YPD 培养基培养约 20h,取 2mL 菌

* 通讯作者。Tel 86-10-62785514;Fax 86-10-62770304;E-mail SZY-DCE@mail.tsinghua.edu.cn

作者简介:罗 晖(1975-)男,江西人,在读博士生,研究方向为分子生物学。E-mail:luohui99@mails.tsinghua.edu.cn

收稿日期 2003-08-29,修回日期 2003-12-19

液,离心收集菌体,用 SV Total RNA 提取试剂盒(Pro-mega 公司)从三角酵母中提取总 RNA。

1.5 反转录

4 μ L 的总 RNA 于 70 $^{\circ}$ C 温育 10min,置于冰上,加入终浓度为 100pmol/L 的随机引物、250 μ mol/L dNTPs 及 1 \times 反转录缓冲液,反应总体积为 20 μ L,42 $^{\circ}$ C 保温 45min。

1.6 目的基因的扩增

在 50 μ L 反应体系中进行 DAAO 基因的 PCR 扩增,加入 5 μ L 反转录产物作为模板,加入 2.5 U 的 *pfu* DNA 聚合酶,加入终浓度为 50pmol/L 的引物,200 μ mol/L dNTPs,1 \times PCR 缓冲液,PCR 条件为:94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 1min,58 $^{\circ}$ C 1.5min,72 $^{\circ}$ C 2.5min,共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。

1.7 目的基因的克隆

将 PCR 扩增的 DAAO 基因片段和 pET-28a 质粒分别用 *Nco* I 和 *Bam* H I 进行酶切,用 T4 DNA 连接酶连接目的基因和载体片段,连接产物转化大肠杆菌 TOP-10F',挑取菌落进行 PCR 筛选,得到重组 pET-DAAO 质粒,转化 BL21(DE3)感受态细胞,得到重组大肠杆菌 BL21(DE3)pET-DAAO。

1.8 DAAO 的诱导表达

重组大肠杆菌 BL21(DE3)pET-DAAO 于 37 $^{\circ}$ C 过夜培养,转接适量菌液至 LB 培养基(含卡那霉素浓度 50 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 培养 2h 后,加入一定浓度的 IPTG 或乳糖进行诱导,不同温度下继续培育约 20 ~ 24h,收集菌体,测定酶活或进行 SDS-PAGE 分析。

1.9 DAAO 酶活的测定

取 1mL 菌液,离心收集菌体,用 1mL 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH8.0)将菌体重悬,加入 0.1mL 100mmol/L 丙氨酸溶液和 0.1mL 牛肝过氧化氢酶(400U),37 $^{\circ}$ C 反应 15min 后加入 0.48mL 2mg/mL 对二硝基苯肼溶液(用 2mol/L HCl 溶液配制)终止反应,放置 10min,然后加入 1.7mL 3mol/L NaOH 溶液显色,于 550nm 处测定吸光度。DAAO 酶活力单位定义为每分钟氧化脱氨生成 1 μ mol 酮酸所需的酶量。

1.10 补料分批培养

种子培养基:每升含酵母粉 5g,蛋白胨 10g,氯化钠 10g,pH 值 7.0。发酵培养基:每升含葡萄糖 5g,蛋白胨 10g,酵母粉 5g,Na₂HPO₄·12H₂O 6g,KH₂PO₄ 1.5g,CaCl₂ 0.02g,MgSO₄·7H₂O 0.5g,卡那霉素 50mg,pH 值 7.0。接种前加入 CaCl₂、MgSO₄、卡那霉素和葡萄糖。补料用葡萄糖浓度为 300g/L。

上罐培养时,将种子以 5% 的接种量接种于 5L 发酵罐中(装液量为 2L),进行补料分批培养,通气量约为 2 ~ 4 L/min,溶氧控制在 10% ~ 20%,发酵温度 37 $^{\circ}$ C,用 4mol/L NaOH 调节 pH7.0。培养 3h 后,流加葡萄糖,流加速度为 15mL/h,流加 3h。菌体生长到对数中期时,降温至 28 $^{\circ}$ C,并加入 2mmol/L 的乳糖进行诱导。

2 结果和讨论

2.1 三角酵母 DAAO 基因的克隆

从三角酵母中提取得到总 RNA,经过反转录和 PCR 扩增后,扩增产物用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示,扩增得到一条特异性很好的 DNA 条带,其分子大小与 DAAO 基因推测值(1071bp)相符,表明 DAAO 基因的克隆成功。

2.2 DAAO 基因 DNA 测序和重组质粒的构建

将扩增得到的 DAAO 基因用 *Nco* I 和 *Bam* H I 双酶切,切胶回收对应的 DNA 条带,与用相同酶切处理的质粒 pET-28a 连接,连接产物转化大肠杆菌 TOP-10F',挑取菌落进行 PCR 筛选,得到重组 pET-DAAO 质粒。经 DNA 测序验证,所得的质粒为 DAAO 重组质粒,且基因序列正确,与文献[4]报道的三角酵母 DAAO 基因相比,基因的同源性在 99% 以上。

将重组质粒转化宿主 BL21(DE3),得到重组大肠杆菌 BL21(DE3)pET-DAAO。在 28 $^{\circ}$ C 下将重组大肠杆菌用 0.5mmol/L 的 IPTG 诱导,诱导前后的菌体用 SDS-PAGE 检测(图 1),可以看到:在 39kD 的位置上有一明显的诱导蛋白条带,其大小与 DAAO 的分子量相符,说明 DAAO 在大肠杆菌中能够顺利表达。

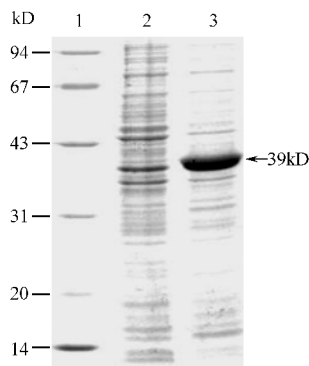


图 1 诱导前后全菌 SDS-PAGE 图

Fig.1 SDS-PAGE chromatography of whole cell protein of pre-and post-induction

1. Standard protein marker; 2, 3. Whole cell protein of pre- and post-induction respectively.

经 HPLC 法检测菌体催化头孢菌素 C 的产物,可以发现在 GL-7-ACA 的对应位置上出峰(结果未列出)即重组菌表达出了有活性的 D-氨基酸氧化酶。而出发菌株三角酵母野生株的 DAAO 活性很低,几乎不能催化 CPC 生成 GL-7-ACA,由此证明了三角酵母 DAAO 基因的重组大肠杆菌构建成功。

2.3 重组大肠杆菌的诱导表达

2.3.1 最佳诱导菌龄的确定 :实验表明,在不同的生长时期进行重组菌的诱导,得到的酶活和比活有很大的不同。对于本菌株,28℃下,加入诱导剂 IPTG 浓度为 0.5mmol/L 时,菌体浓度 OD_{600} 在 0.8 ~ 1.0 左右(属于对数生长中期)加入诱导剂效果比较好。由于 DAAO 会影响到菌体细胞壁的合成,即对菌体的生长有毒性,如果过早加入 IPTG,诱导产生的 DAAO 会抑制菌体的生长,从而影响酶活和比活的提高。

如果在酶催化反应体系中加入 $1\mu\text{mol/L}$ 的辅酶 FAD,DAAO 的酶活将有所提高,提高幅度甚至可达 80%左右。这说明在 DAAO 的表达过程中,DAAO 和 FAD 的生成量并非十分匹配,由于菌体合成的 FAD 量不够,因此影响了部分 DAAO 的活性。

2.3.2 诱导剂 IPTG 浓度对酶活的影响 :诱导剂 IPTG 有一定毒性,对菌体生长不利,对外源蛋白表达的影响也很大。在 28℃下,当菌体浓度 OD_{600} 约为 1 时,用不同浓度的 IPTG 对重组菌进行诱导,然后分别检测 DAAO 活性。诱导剂 IPTG 浓度为 1mmol/L 时酶活达到最高值,此后随着 IPTG 用量的增大,菌体的酶活反而有所下降。在 0.05mmol/L 的 IPTG 浓度下,DAAO 酶活也能达到一个较高水平。

2.3.3 诱导温度对 DAAO 酶活表达的影响 :在高温下诱导表达重组大肠杆菌的外源蛋白时,很容易生成没有活性的包涵体。当 BL21(DE3) / pET-DAAO 菌体浓度 OD_{600} 为 1 时,加入诱导剂 IPTG 浓度为 0.5mmol/L,然后分别在 25℃、28℃、30℃、34℃下进行诱导,菌体的 DAAO 活性检测结果显示:在 28℃下诱导可以得到相对较高的酶活,温度过高或过低对 DAAO 的表达都不利。

2.3.4 乳糖诱导的初步研究 :由于 IPTG 价格昂贵且有毒,而乳糖作为一种廉价无毒的诱导剂,引起了人们的关注。本文对乳糖替代 IPTG 作为诱导剂进行了初步研究。28℃下,分别用 0.5、1、1.5、2、3、5、10、15、20mmol/L 浓度的乳糖进行诱导,结果表明:在乳糖浓度为 2mmol/L 时即能起到很好的诱导效果,酶活达到 22.7U/mL,相当于 IPTG 诱导时的 97%左

右(IPTG 诱导时,DAAO 酶活最高可达 23.3U/mL)。乳糖诱导 DAAO 的规律与 IPTG 类似。由于乳糖不仅可作为诱导剂,同时还能被菌体代谢利用,因此涉及到乳糖转运以及菌体生理代谢等方面的一系列复杂变化^[11],使乳糖的诱导规律比较复杂。

2.3.5 溶氧对 DAAO 酶活的影响 :在 DAAO 诱导过程中,通过对溶氧的控制有时能够得到较高酶活。对相同培养状态的菌液分别在不同溶氧情况(200mL 和 50mL 的摇瓶)下进行 IPTG 诱导表达,结果发现:尽管二者总酶活相当,但低溶氧(50mL 摇瓶)情况下诱导的比酶活更高。这可能是因为 DAAO 的辅因子 FAD 的氧化受氧浓度的影响所致。

表 1 溶氧状态对 DAAO 表达的影响			
Table 1 Influence of dissolved oxygen(D.O.) on DAAO activity			
	DAAO activity (U/mL)	Cell density OD_{600}	Specific activity (U / $OD_{600} \cdot \text{mL}$)
High D.O. condition	21.8	5.7	3.82
Low D.O. condition	20.9	3.8	5.50

2.4 补料分批培养表达 DAAO

对于大肠杆菌的高密度培养,LB 培养基不足以提供足够碳源,需采用补加碳源的方法来提高菌体密度和酶活。经过补料分批培养及乳糖诱导,发酵液的菌浓度 OD_{600} 可以达到 27,DAAO 酶活最高达到 175 U/mL,而文献报道的三角酵母 DAAO 的重组菌的最高表达值为 23 U/mL^[12],因此本研究中 DAAO 酶活的表达已能满足工业应用的需求。在补料分批培养过程中,DAAO 比活也比摇瓶中的高,达到 6.5 U($OD_{600} \cdot \text{mL}$)。但是仍存在菌体合成辅酶 FAD 量不足的问题,如果菌液中适当添加 FAD,DAAO 酶活甚至能达到 208 U/mL(图 2)。

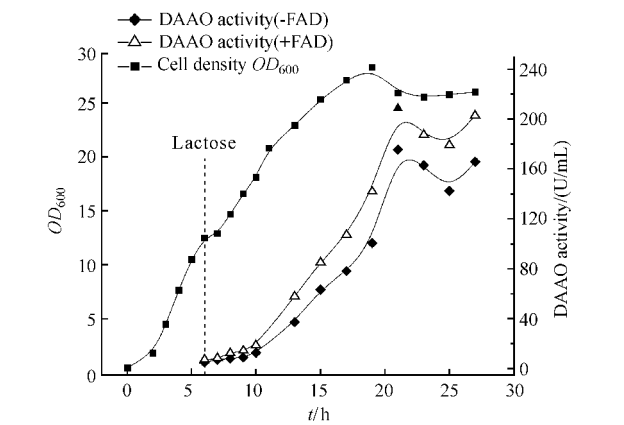


图 2 补料分批培养的菌体浓度和酶活曲线
Fig.2 Curves of cell density and DAAO activity in fed-batch culture
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

3 结论

从三角酵母中提取总 RNA ,反转录后进行 PCR 扩增 ,得到 DAAO 基因 ,并将其克隆到大肠杆菌表达载体 pET-28a ,经筛选得到重组菌 BL21(DE3) / pET-DAAO 。对重组菌进行了诱导表达 ,结果表明 ,诱导温度、诱导初始菌浓 OD_{600} 、诱导剂 IPTG 用量等对酶活的表达均有较大的影响。用乳糖替代 IPTG 作为诱导剂也有较高的 DAAO 表达水平。通过补料分批培养 ,可以使菌浓和酶活都达到一个很高的水平。

参 考 文 献

- [1] Parmar A , Kumar H , Marwaha S S , *et al.* Recent trends in enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA). *Crit Rev Biotechnol* , 1998 , **18** (1) : 1 - 12 .
- [2] 罗 晖 , 李 强 , 沈忠耀 , 等 . 酶法生产 7-氨基头孢烷酸的研究进展 . 现代化工 , 2002 , **22** (12) : 18 - 22 .
- [3] Schrader T , Andreesen J R . Properties and chemical modification of D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* . *Arch Microbiol* , 1996 , **165** : 41 - 47 .
- [4] Alonso J , Barredo J L , Armisen P , *et al.* Engineering the D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* to facilitate its overproduction in *Escherichia coli* and its downstream processing by tailor-made metal chelate supports . *Enzyme Microb Technol* , 1999 , **25** : 88 - 95 .

- [5] Ciccarelli E , Massaer M , Guillaume J P , *et al.* Porcine D-amino acid oxidase : production of the biologically active enzyme in *Escherichia coli* . *Biochem Biophys Res Comm* , 1989 , **161** (2) : 865 - 872 .
- [6] Isogai T , Ono H , Ishitani Y , *et al.* Structure and expression of cDNA for D-amino acid oxidase active against cephalosporin C from *Fusarium solani* . *J Biochem* , 1990 , **108** : 1063 - 1069 .
- [7] Pollegioni L , Molla G , Campaner S , *et al.* Cloning , sequencing and expression in *E. coli* of a D-amino acid oxidase cDNA from *Rhodotorula gracilis* active on cephalosporin C . *J Biotechnol* , 1997 , **58** (2) : 115 - 123 .
- [8] Gabler M , Fischer L . Production of a new D-amino acid oxidase from the fungus *Fusarium oxysporum* . *Appl Environment Microbiol* , 1999 , **65** (8) : 3750 - 3753 .
- [9] Mujawar S K , Shewale J G . Production of D-amino acid oxidase by *Aspergillus* sp. strain 020 active on cephalosporin C . *Can J Microbiol* , 1997 , **43** : 292 - 295 .
- [10] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . 分子克隆实验指南 . 金冬雁 , 等译 . 第二版 . 北京 : 科学出版社 , 1992 , 880 - 886 .
- [11] 张 毅 , 屈贤铭 , 杨胜利 . 乳糖作为诱导剂对重组目的蛋白表达的影响 . 生物工程学报 , 2000 , **16** (4) : 464 - 468 .
- [12] Yu J , Li D Y , Zhang Y J , *et al.* High expression of *Trigonopsis variabilis* d-aminoacid oxidase in *Pichia pastoris* . *J Mol Catal* , 2002 , **18** : 291 - 297 .

Cloning and Expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino Acid Oxidase in *Escherichia coli*

LUO Hui TONG Yi-Zhou LI Qiang YU Hui-Min SHEN Zhong-Yao*

(Department of Chemical Engineering , Tsinghua University , Beijing 100084 , China)

Abstract : A gene of DAAO was obtained by isolating total RNA from *Trigonopsis variabilis* and then amplified by reverse transcription (RT)-PCR . Comparing its nucleotide sequence with other DAAO genes from *Trigonopsis variabilis* reported in literature , considerable homology (more than 99%) was observed . The DAAO gene , digested with *Nco* I and *Bam* H I , was inserted into a prokaryotic expression vector , pET-28a . By colony-PCR method screening , a recombinant plasmid pET-DAAO was obtained and then transformed into the expression host BL21 (DE3) . The influences of induction conditions such as IPTG concentration , the time of induction , the induction temperature and dissolved oxygen condition on expression of the recombinant protein were investigated . Under optimal condition , the enzyme activity could reach 23.3U/mL . The possibility of using lactose as an alternative inducer of IPTG was also studied . After induction of 2mmol/L lactose , the DAAO enzyme activity amounts to 22.7U/mL . A high DAAO activity of 175 U/mL was obtained by fed-batch culture and lactose induction .

Key words : D-amino acid oxidase , *Trigonopsis variabilis* , *Escherichia coli* , Lactose

* Corresponding author . Tel 86-10-62785514 ; Fax 86-10-62770304 ; E-mail SZY-DCE@mail . tsinghua . edu . cn

Received date : 08-29-2003