

乙内酰脲水解酶基因在大肠杆菌中的克隆表达

李迎丽^{1,2} 张惟材^{1*} 汪建华¹ 黄留玉¹

(¹ 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

(² 南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘 要: 杆菌 BT801 的乙内酰脲酶系能够水解 5-苄基乙内酰脲生成 L-苯丙氨酸,其中乙内酰脲水解酶负责乙内酰脲的水解开环。乙内酰脲水解酶的表达对于乙内酰脲酶的催化机制研究及氨基酸的生物不对称合成都具有重要意义。通过 PCR 技术扩增得到乙内酰脲水解酶基因(*hyuH*),置于表达载体 pT221 的 T7 启动子下游,将构建的重组质粒引入大肠杆菌 BL21(DE3)。SDS-PAGE 分析在相对分子量 50kD 处有一较强的表达带,经薄层扫描分析目的蛋白占全菌蛋白的 40%,主要以可溶性形式存在,活性分析表明表达产物具有天然的酶活性。

关键词: 乙内酰脲酶,乙内酰脲水解酶,基因表达

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)06-0771-04

乙内酰脲酶(Hydantoinase)是广泛存在于自然界中的一种酶系,一般包括乙内酰脲水解酶(Hydantoin hydrolase)和 N-氨甲酰基氨基酸水解酶(N-Carbamoylase),有些情况下还有乙内酰脲消旋酶(Hydantoin racemase)^[1,2]。乙内酰脲酶在植物、动物和微生物细胞中分布广泛。利用乙内酰脲酶的立体选择性,外消旋的乙内酰脲类衍生物在几个酶的协同作用下,可以完全转化为相应的手性氨基酸,因此乙内酰脲酶在各类手性氨基酸的酶法不对称合成中具有广泛的应用前景,其中 N-氨甲酰基氨基酸水解酶是整个反应的限速酶。我们自 1 株 L-乙内酰脲酶产生菌 *Arthrobacter* BT801 中分离得到了编码乙内酰脲酶系的基因片段^[3],其 3 个基因排列成 1 个操纵子,依次编码乙内酰脲消旋酶(酶 I)、乙内酰脲水解酶(酶 II)和 N-氨甲酰基氨基酸水解酶(酶 III)。其中乙内酰脲消旋酶和 N-氨甲酰基氨基酸水解酶在大肠杆菌中的高效表达已获得成功^[4],但乙内酰脲水解酶的表达比较困难,曾做过一些尝试,一般表达量都很低,表达产物没有生物活性。我们就乙内酰脲水解酶的表达问题进行了探索,实现了该酶在大肠杆菌中的活性表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21

(DE3)载体质粒 pT221 为本室保存,乙内酰脲酶产生菌杆菌(*Arthrobacter* sp.)BT801 系本室筛选得到,M15/pQE60-*hyuC* 为高效表达 N-氨甲酰基苯丙氨酸水解酶的重组菌株,pUC18-169 是包含乙内酰脲酶完整操纵子序列的亚克隆质粒,均由本室构建。

1.1.2 工具酶和试剂: *EcoR* I、*Sac* I、T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和 *Ex Taq* 酶等购自 TaKaRa 公司,dNTP 购自上海 Sangon 公司,5-苄基乙内酰脲(5-BH)、N-氨甲酰基苯丙氨酸(N-CP)为本室化学合成,RNase A、氨苄青霉素(Amp)购于华北制药有限公司,其它均为市售分析纯化学试剂。底物悬液:将 0.5g 底物(5-BH 或 N-CP)溶于 2mol/L NaOH,用 2 mol/L HCl 将 pH 调至 7.0,再加 10mg 十六烷基三甲基溴化铵和 6.5mg CoCl₂,充分溶解后定容至 100mL;Ehrlich 试剂:10% 对二氨基苯甲醛溶于 6mol/L HCl;茚三酮试剂按文献^[5]配制。

1.1.3 培养基: LB 培养基参照文献^[6]方法配制。

1.2 重组质粒在大肠杆菌中诱导表达

挑取 LB 平板上的单菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃ 200r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5~1 时加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L,继续培养 4~5h,收集菌体,供电泳分析和测定酶活。

1.3 酶活性的定性检测

利用薄层层析法(TLC)进行酶活的定性测定。取 0.5mL 培养物,再加入 1/2 体积的 M15/pQE60-

* 通讯作者。Tel: 86-10-66948826; E-mail: zhangweicai@hotmail.com

作者简介:李迎丽(1977-),女,河南三门峡人,博士研究生,研究方向为资源细菌及其工程学。

收稿日期:2004-04-02,修回日期:2004-08-16

hyuC 培养物,离心收集菌体,用生理盐水洗涤 2 次,重悬于 0.5mL 0.5% 5-BH 底物悬液中,37℃ 水浴反应 4h,12000r/min 离心 1min,取上清液在硅胶 G 薄层板上展开,展开剂为正丁醇:乙酸:水 = 4:1:1,用 0.3% 茚三酮显色,阳性转化子可将 5-BH 转化为 N-氨甲酰基苯丙氨酸,并进一步在 M15/pQE60-*hyuC* 的作用下转化为苯丙氨酸,以苯丙氨酸标准品为对照,在相对应的位置可出现紫红色斑点。

1.4 N-氨甲酰基氨基酸的测定

在试管中加 2mL 反应液,加 0.5mL 12%(W/V) 三氯乙酸终止反应,再加入 0.5mL Ehrlich 试剂并用 3mL dH₂O 稀释,离心除去菌体细胞,取上清于 420nm 测定吸光度,以 N-氨甲酰基苯丙氨酸标准品绘制标准曲线,在此曲线上计算反应转化的中间产物 N-氨甲酰基苯丙氨酸的含量。以 5-苄基乙内酰脲为底物酶解生成 N-氨甲酰基苯丙氨酸的速率计算乙内酰脲水解酶的活力。在上述条件下 1h 内催化底物转化生成 1mg 产物的酶量定义为 1 个活力单位(U)。

1.5 蛋白含量测定

按 Lowry 法^[7]进行。

1.6 引物合成和测序

根据乙内酰脲水解酶基因序列设计了一对特异性引物,P1:5'-CGGAATTCTAATGTTTGACGTAATCGTGAAGAATTGC-3',下划线部分为 *EcoR* I 位点;P2:5'-CGGAGCTCTCATTTGGGATCCTGGCTTTC-3',下划线部分为 *Sac* I 位点,引物合成及测序均由上海博亚公司完成。

2 结果

2.1 重组质粒 pT221-*hyuH* 的构建

P1,P2 为上下游引物,质粒 pUC18-169 为模板,PCR 扩增 *hyuH* 片段,PCR 扩增条件:94℃ 5min;94℃ 30s,54℃ 30s,72℃ 80s,30 个循环;72℃

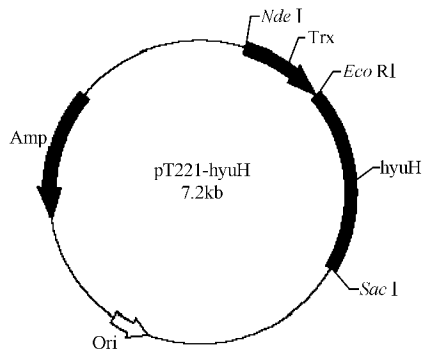


图 1 重组质粒 pT221-*hyuH* 结构图

Fig.1 Construction map of recombinant plasmid pT221-*hyuH*

5min. 纯化 PCR 产物,用 *EcoR* I 和 *Sac* I 双酶切;将质粒 pT221 用相同的酶作双酶切,回收纯化片段。用 T4 DNA 连接酶连接两片段,构建成重组表达质粒 pT221-*hyuH*(图 1)。连接产物转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,在含 100μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上培养 24h,选择单菌落进行检测。

2.2 重组质粒 pT221-*hyuH* 的酶切和 PCR 鉴定

挑取平板上单菌落接种于含氨苄的 LB 液体培养基中,37℃ 200r/min 培养 12~16h,提取质粒,用 *EcoR* I 和 *Sac* I 双酶切鉴定,在 1400bp 出现电泳带,与预期产物大小(1377bp)相符合。采用全菌 PCR 进行转化子的快速筛选。取少量菌液制备模板,用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增,1.0% 的琼脂糖凝胶电泳可检测到均有特异性扩增带出现,与预期产物大小(1389bp)一致。对阳性转化子质粒进行测序,结果表明重组质粒构建正确。

2.3 BL21(DE3) pT221-*hyuH* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

取经 IPTG 诱导表达的菌体及超声波破碎后菌体的上清、沉淀进行 SDS-PAGE 分析。重组子在相对分子量约 50kD 处有一较强的蛋白带(图 2),与根据节杆菌 *Arthrobacter* BT801 乙内酰脲水解酶的一级结构即氨基酸组成推测的理论分子量(49572 Da)一致,乙内酰脲水解酶基因在大肠杆菌中得到较强的表达。沉淀(第 1 泳道)中几乎没有目的产物的条带,上清(第 2 泳道)中含有明显的目的蛋白带,表明表达蛋白主要以可溶性形式存在。

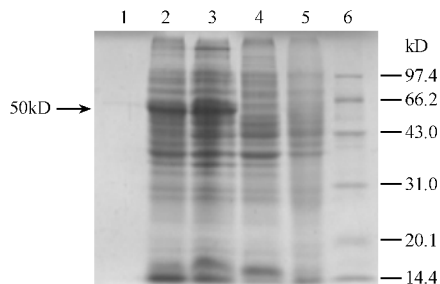


图 2 BL21(DE3) pT221-*hyuH* 表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of BL21(DE3) pT221-*hyuH*

1. Precipitate from lysate of BL21(DE3) pT221-*hyuH* after induction; 2. Supernatants from lysate of BL21(DE3) pT221-*hyuH* after induction; 3. Total cell lysate of BL21(DE3) pT221 after induction; 4. Total cell lysate of BL21(DE3) pT221; 5. Total cell lysate of BL21(DE3); 6. Low molecular weight protein marker.

2.4 表达产物的生物学活性分析

由于乙内酰脲水解酶水解 5-BH 开环产生的 N-氨甲酰基苯丙氨酸不易通过显色进行检测,我们在反

应体系中添加过量的 N-氨甲基苯丙氨酸水解酶 ,使之进一步转化为苯丙氨酸 ,以便于用茚三酮进行显色 ,这个方法也可用于乙内酰脲水解酶活性的定量分析。

取 0.5mL 菌液 ,加入 1/2 体积 M15/pQE60-*hyu*C 细胞悬液 ,离心收集菌体 ,与 0.5% 5-BH 反应后 ,取反应产物的上清液 3μL ,薄层层析法检测(图 3)。由图可见不加底物的菌体和酶 III(M15/pQE60-*hyu*C)加底物 5-BH 没有出现产物显色斑点 ,而有重组子 BL21(DE3)pT221-*hyu*H 和酶 III 存在时 ,有紫红色斑点 ,表明重组子能够把底物 5-BH 转化为中间产物 N-CP ,并进一步在酶 III 的催化下 ,转化为苯丙氨酸 ,显示重组子具有生物活性。

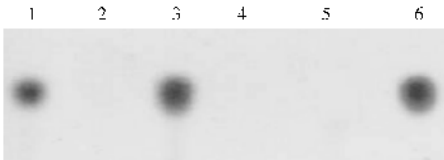


图 3 转化产物的 TLC 检测

Fig.3 TLC detection of bio-conversion products

1. BL21(DE3)pT221-*hyu*H + M15/pQE60-*hyu*C + 5-BH ; 2. BL21(DE3)pT221-*hyu*H ; 3. M15/pQE60-*hyu*C + N-CP ; 4. BL21(DE3)pT221-*hyu*H + 5-BH ; 5. M15/pQE60-*hyu*C + 5-BH ; 6. L-phe.

2.5 转化产物的氨基酸组成分析

利用日立 L-8500 型高速氨基酸分析仪对转化产物进行了氨基酸组成分析(图 4)。

从图 4 可以看到 ,转化产物中主要成分为苯丙氨酸和 NH₃ ,而其他杂质很少。苯丙氨酸为水解底物 5-BH 后预期的终产物 ,NH₃ 则是在底物被转化的过程中由 N-氨甲基氨基酸水解酶切下中间产物的氨甲酰基团分解形成的 ,是预期的转化副产物。表明重组子 BL21(DE3)pT221-*hyu*H 中的乙内酰脲水解酶基因在大肠杆菌中得到表达 ,表达产物具有生物学功能。

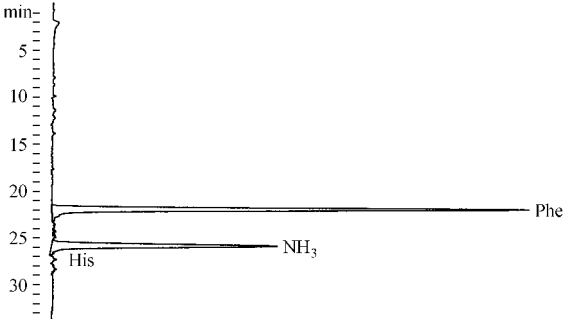


图 4 转化产物的氨基酸分析

Fig.4 Amino acid analysis of transformation products

2.6 重组菌株乙内酰脲水解酶活力测定

以 5-BH 为底物分别测定了节杆菌 BT801、DH5α/pUC18-169 和 BL21(DE3)pT221-*hyu*H 的乙内酰脲水解酶活性(表 1)。

表 1 乙内酰脲水解酶的活性	
Table 1 The activity of Hydantoin hydrolase	
Strains	Specific activity(U/mg protein)
Arthrobacter BT801	0.78
DH5α/pUC18-169	0.65
BL21(DE3)pT221- <i>hyu</i> H	1.08

由表 1 可以看出 BL21(DE3)pT221-*hyu*H 的乙内酰脲水解酶的比活比原始菌株节杆菌 BT801 和亚克隆 DH5α/pUC18-169 分别提高 38.4% 和 66.1%。

3 讨论

在成功分离到 *Arthrobacter* BT801 的 L-乙内酰脲酶基因后 ,已实现了其中 2 个酶的可溶性高表达 ,而乙内酰脲水解酶基因的表达却遇到了许多难题。我们曾用大肠杆菌和酵母表达系统的多种载体 ,但结果往往是不表达或者表达不稳定 ,或者表达产物没活性。大肠杆菌由于其遗传背景清楚、易于操作、生产成本低廉等优点 ,而成为基因工程中常用的表达系统宿主菌 ,实验中我们用原核表达载体质粒 pT221 构建了重组菌株 BL21(DE3)pT221-*hyu*H ,其乙内酰脲水解酶活力虽然与相应蛋白的表达量相比还不算太高 ,但表达产物大部分为可溶 ,而且显示了相对较高的生物活性。这项作为阐明乙内酰脲水解酶具有生物活性的条件、酶的催化机制及酶结构与功能关系等奠定了一定基础。

为了提高酶的活性 ,我们尝试了多种方法 ,如使用乳糖代替 IPTG 作为诱导剂 ,同时利用低温诱导等方法 ,试图提高表达蛋白中的可溶性蛋白含量及酶的活性。实验结果表明 ,利用乳糖诱导可以增加酶的比活 ,但是提高幅度不大 ,低温诱导对酶活性却没有太大影响。影响酶活性的原因可能有许多因素 ,BT801 乙内酰脲水解酶含有 6 个 Cys ,可形成 3 对二硫键 ,能否正确形成二硫键可能是影响酶活性的一个重要因素 ;另外共价的肽键、大量极其复杂的弱次级键的共同作用、蛋白质的修饰也可能会影响酶的天然构象 ,进而影响其活性 ,这些还有待于进一步探讨。一般认为可溶是蛋白质正确折叠的一个标志 ,但表达产物可溶是否一定意味着折叠正确还没有明确结论 ,大幅度提高表达蛋白的可溶性 ,酶活性是否也会有相应的提高 ,如何提高酶活性的问题还需在

进一步的工作中研究,该酶也可以作为研究可溶表达与正确折叠这个问题的一个模型。

参 考 文 献

- [1] Syldatk C , May O , Altenbuchner J , *et al.* Microbial hydantoinases-industrial enzymes from the origin of life ? *Appl Microbial Biotechnol* , 1999 , **51** :292 – 309 .
- [2] 张惟材 . 微生物乙内酰胺酶及其研究进展 . 生物技术通讯 , 1999 , **10** (2) :141 – 144 .
- [3] 郝淑凤 , 张惟材 , 袁红杰 , 等 . 节杆菌 BT801 基因文库构建及其乙内酰胺酶基因分离与表达 . 生物工程学报 , 2003 , **19** (3) :281 – 285 .

- [4] 郝淑凤 , 张惟材 , 李迎丽 , 等 . 节杆菌 BT801N-氨甲酰氨基酸水解酶基因的克隆与表达 . 生物工程学报 , 2003 , **19** (2) :174 – 177 .
- [5] Moore S , Stein W H . Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids . *J Biol Chem* , 1948 , **176** :367 – 388 .
- [6] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . Molecular Cloning : A Laboratory Manual . 2nd ed . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 .
- [7] Lowry O I , Rosebrough N J , Farr A L , *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent . *J Biol Chem* , 1951 , **193** (1) :265 – 276 .

Expression of Hydantoin Hydrolase Gene in *Escherichia coli*

LI Ying-Li^{1 2} ZHANG Wei-Cai^{1*} WANG Jian-Hua¹ HUANG Liu-Yu¹

(¹ Beijing Institute of Biotechnology , Beijing 100071 , China)

(² College of Life Science , Nankai University , Tianjin 300071 , China)

Abstract : Hydantoin hydrolase with responsibility for the ring opening of hydantoin is one of the components of hydantoin utility enzymes of *Arthrobacter* BT801 which can convert 5-benzylhydantoin into L-phenylalanine . The expression of hydantoin hydrolase gene (*hyuH*) is very important in elucidation of mechanisms of bio-catalysis and its application in asymmetry synthesis of amino acids . To improve the production and activity of the enzyme , the hydantoin hydrolase gene was amplified by PCR and cloned into *E. coli* by using vector pT221 . The hydantoin hydrolase gene was highly expressed in *E. coli* BL21(DE3) under the control of T7 promoter . A protein band about 50kD was detected by SDS-PAGE in the recombinant cell lysate . The objective protein in BL21(DE3)/pT221-*hyuH* accounted for 40% of total cellular protein , mostly in soluble form . The products in the recombinant strain showed biological activity .

Key words : Hydantoinase , Hydantoin hydrolase , Gene expression

* Corresponding author . Tel : 86-10-66948826 ; E-mail : Zhangweicai@hotmail.com

Received date : 04-02-2004

《微生物学报》真诚欢迎刊登广告

《微生物学报》(双月刊)创刊于1953年,由中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,是我国微生物学领域唯一的综合性学报级期刊和国家自然科学基金核心期刊,被国内外多家重要的文摘刊物和数据库收录。

本刊历史悠久,发行量大,内容涵盖面广,主要报道普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、病毒学、免疫学以及生物工程等方面的研究成果和科研进展。一直受到国内外科研工作者、高等院校师生和相关企业界的欢迎。

本刊可以为您定期发布与微生物学相关的试剂、药品、仪器、设备及生物技术等方面的产品信息,可为您开拓在微生物学领域新的发展空间。另外,与生命科学有关的各类服务信息也在本刊发布之列。

本刊态度严谨,信守协议,由中国科学院科学出版社广告部代理广告业务(广告经营许可证:京东工商广字第0034号),编辑部备有最新的期刊简介和报价单,欢迎与我们联系。

电 话 (010) 62630422 传 真 (010) 62554303 电子信箱 actamicro@sun.im.ac.cn