

热带假丝酵母 1230 细胞色素 P450 基因 *CYP14* 与 *CYP16* 的克隆和表达

何 峰 陈远童*

(中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

摘 要 细胞色素 P450(CYP)是一种单加氧酶,在热带假丝酵母(*Candida tropicalis*) ω -氧化过程中发挥关键作用。通过对来源不同的 P450 基因进行同源性分析,首先克隆到热带假丝酵母 1230 中 P450 基因的部分序列,再利用基因组步行法克隆其未知序列,结果分别获得了两个 P450 同工酶基因 *CYP14* 和 *CYP16* 的完整序列。经 PCR 方法证实,二者在染色体上的位置相邻,其读码框分别编码 522 和 540 个氨基酸残基的肽链。经 NCBI BLAST 搜索比较后发现,二者与热带假丝酵母 ATCC 20336 中的 P450 成员 *CYP52A14* 和 *CYP52A16* 分别编码的序列几乎完全一致,与热带假丝酵母 ATCC 750 中的 P450 成员 *CYP52A2* 和 *CYP52A1* 也具有较高的相似性。同时,对经诱变后的几株二元酸生产菌株的 *CYP14* 与 *CYP16* 也进行了克隆和序列比较,发现部分序列中的个别氨基酸残基发生了突变。*CYP14* 和 *CYP16* 均在酿酒酵母中获得了有效表达,其中 *CYP16* 的 P450 表达含量高于 *CYP14*,后者有部分表达产物发生了变性。

关键词 热带假丝酵母, *CYP14*, *CYP16* 表达, P450 含量

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)04-0504-06

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)是一种重要的工业微生物,它能够吸收和利用石油烷烃,并可将其转化生成长链二元酸^[1]。后者是化工上合成高性能工程塑料等多种高档化工产品的重要原料,有着极其广泛的用途。用微生物发酵法生产长链二元酸比化学合成法具有成本低、安全性高以及绿色环保等诸多优势^[2,3]。热带假丝酵母内二元酸的产生是通过 ω -氧化途径实现的,此过程可将作为底物的烷烃氧化生成单羧酸,然后进一步氧化为 α 、 ω -二羧酸,也可以直接利用脂肪酸生成二元酸^[4]。 ω -氧化过程主要涉及的生化反应由细胞色素 P450 单加氧酶系、醇氧化酶和醛脱氢酶等催化完成,细胞色素 P450 参与催化对 n -烷烃末端碳原子进行单加氧的羟化反应,反应在细胞内的微粒体中发生^[5]。CYP 催化的一般反应过程为: $\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 + \text{RH} \Rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O} + \text{R-OH}$,这个催化过程同时还需要 NADPH-P450 还原酶(CPR)的协助。CPR 的主要功能是为 CYP 传递电子,与 CYP 同为 ω -氧化过程中的限速酶^[6]。通过氧化途径产生的二元酸经过酯酰辅酶 A 合成酶激活后,进入细胞内的过氧化氢酶体,被 β -氧化所降解,为细胞提供物质和能量^[7]。

CYP 与 CO 的结合体在 450nm 处具有特征光吸

收峰,属于 P450 代谢酶系中的末端氧化酶(以铁卟啉原 IX 作为辅基)。P450 代谢酶系是生物界中普遍存在的一类极为重要的代谢酶系,涉及到很多的生命过程,包括内源物质的代谢与转化或者外源化合物的活化与降解等^[8]。细胞色素 P450 种类繁多,目前已报道的 P450 基因数以千计,根据其氨基酸序列的相似性可分出不同的家族和亚家族^[9]。仅在 *C. tropicalis* ATCC 750 和 ATCC 20336 中,就先后发现和报道了 17 个 CYP 基因的家族成员,它们与从麦芽糖假丝酵母(*Candida maltosa*)中发现的 P450 基因等一起被归为 CYP52 家族^[10,11]。

本文在获得 P450 基因部分序列的基础上,利用反向巢式 PCR 技术,克隆到 *C. tropicalis* 1230 中两个 P450 同工酶基因 *CYP14* 和 *CYP16*,并将其在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中进行了表达。同时也克隆了各二元酸生产菌株的 *CYP14* 和 *CYP16*,并进行了序列比较和分析。由于 P450 是整个 ω -氧化过程的限速酶,其基因的研究对于二元酸代谢分析及代谢工程上的应用具有基础性价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *C. tropicalis* 1230 及二元酸生

* 通讯作者。Tel 86-10-62554387; E-mail: chenyt@sun.im.ac.cn

作者简介:何 峰(1972-)男,湖北安陆人,博士研究生,从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: hef@sun.im.ac.cn

收稿日期:2005-01-11,修回日期:2005-04-29

产菌株 D1、D2、D3 和 D4 为本实验室保存的野生型菌株 ;表达宿主菌 *S. cerevisiae* W303-1B(MATa/a , *ura3-1/ura3-1* , *ade2-1/ade2-1* , *leu2-3 ,112/leu2-3 ,112* , *his3-11 ,15/his3-11 ,15* , *trp1-1/trp1-1*)由 Al. brown 教授馈赠 ;大肠杆菌 XL1-Blue 作为转化受体菌 ;酵母表达穿梭载体 pYES2(含有 *GAL1* 启动子、*CYC1* 终止子及 *URA3* 筛选标记)购自 Invitrogen 公司 ;克隆和测序载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 培养基 :YPD 培养基按文献 [11] 配制 ;LB 培养基按文献 [12] 配制 ;SC-U 基本培养基由 0.67% 酵母氮碱、2% 棉子糖和 0.01% 不含尿嘧啶的省却混合物组成 ;Induct medium 由 SC-U 培养基 + 2% 半乳糖组成。

1.1.3 主要试剂 :LA *Taq* DNA 聚合酶和 LA PCR™ *in vitro* Cloning Kit(TaKaRa 公司) ,各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶(华美生物工程公司) ,*Pfu* DNA 聚合酶、尿嘧啶、棉子糖和半乳糖(上海 Sangon 公司) ,DNA purification kit、蛋白酶 K(北京鼎国生物技术公司) ,氨苄青霉素由华北制药厂生产。

1.2 DNA 操作

参照文献 [12] 中的玻璃珠制备法提取酵母 DNA ,DNA 连接、转化和质粒提取均按文献 [13] 进行。

1.3 基因克隆和序列分析

参照分析已报道 *CYP* 编码区中的保守序列 ,设计引物 A1、A2 ,以基因组 DNA 为模板 ,PCR 扩增 *CYP* 基因的部分片段。50μL 反应体系中含 dNTP 0.2mmol/L ,引物各 25pmol ,模板 DNA 0.5μg ,LA *Taq* DNA 聚合酶 2.5U。PCR 反应条件 :94℃ 10min ,94℃ 30s ,52℃ 30s ,72℃ 50s ,共进行 30 个循环 ;72℃ 10min。

根据测序结果设计引物 A3、A4 ,分别用以扩增基因的上游和下游序列。选择不同限制性内切酶对菌株 1230 基因组 DNA 进行充分消化。回收酶切片段 ,与相应的 Cassette 连接。利用设计的嵌套引物与 Cassette 引物 C1、C2 连续进行两轮 PCR ,PCR 条件为 50μL 反应体系 ,预先将 1μL 模板 DNA (0.5μg) 加入到 40.5μL 去离子水中 ,预变性 10min 后 ,分别补加 dNTP 0.2mmol/L ,引物各 25pmol ,LA *Taq* DNA polymerase 2.5U 至体积 50μL。按以下程序进行 30 个循环 :94℃ 40s ,55℃ 40s ,72℃ 180s ;最后 72℃ 10min。回收扩增后的特异性产物 ,进行 TA 克隆后测序。按测序结果重新设计引物 ,PCR 扩增目的基因 ,克隆后测序。所用引物序列见表 1。

测序采用双脱氧链终止法 ,由上海基康生物技术公司完成。利用 DNAMAN 进行序列比较。核酸序列和氨基酸序列分析采用 BLAST 方法。

表 1 本研究所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study	
Name	Sequence(5'-3')
A1	CTATGTTGAGACCACAATTTCG
A2	CTGGTTCAAACCATCTTTCTGG
A3	GAAATTGTTCTTCAGATTGACCG
A4	AGTAATCTCTTCAACACGAGC
A5	TGGACCGAAGGTGTGACTC
A6	TGAGCGAGCAACGAAGGTAG
CYP11	GACGAGCTCTACACTATGTCGTCTTCTCCA
CYP12	GTCCTCGAGATTACGAAGGAAAAGCAACC
CYP21	GACGGATCCTATCTTACACACATCAGACC
CYP22	GTCGAATTCCTAATACATCTCAATGTTGGC

1.4 *CYP14* 和 *CYP16* 表达载体的构建、转化和重组蛋白的表达

利用引入 *Sac* I、*Xho* I 酶切位点的引物 A11、A12 ,用 PCR 方法扩增 *CYP16* 编码区序列。用引入 *Bam* H I、*Eco* R I 位点的引物 A21、A22(表 1) ,PCR 扩增 *CYP14* 编码区序列。50μL PCR 反应体系中 ,含 dNTP 0.2mmol/L ,引物各 25pmol ,0.5μg 模板 DNA ,*Pfu* DNA polymerase 2.5U。PCR 反应条件 :94℃ 10min ,94℃ 30s ,54℃ 30s ,72℃ 180s ,进行 30 个循环 ;72℃ 10min。将 PCR 产物酶切后与表达载体 pYES2 连接 ,分别产生质粒 pYCP1 和 pYCP2。将重组质粒在大肠杆菌中进行扩增后 ,转化 *S. cerevisiae* W303-1B。转化采用醋酸锂方法参照文献 [12] 进行。同时将载体 pYES2 也进行转化 ,作为对照。转化后的阳性克隆通过 PCR 方法鉴定。

将携带有重组质粒的酵母单菌落接种到 SC-U 培养基中 ,30℃ 培养过夜。取一定量培养液 ,离心去上清 ,转到含 2% 半乳糖的 Induct medium 中(*OD*₆₀₀ = 0.4) 培养 20h。

1.5 酵母微粒体的制备

制备方法参见文献 [14] 。

1.6 P450 含量测定方法

操作方法参照文献 [15] 将数毫克 Na₂S₂O₄ 加入到蛋白含量为 1mg/mL 的待测溶液中 ,分成两份。静置几分钟后 ,对其中一管通入 CO(时间 1min)至饱和。记录基线后 ,在 400 ~ 500nm 波长范围内对通气后的样品进行光谱扫描。P450 含量按消光系数 91 (mmol/L)⁻¹ cm⁻¹ 计算。

1.7 蛋白含量测定

采用考马斯亮蓝法 [16] 。以牛血清蛋白组分 V

制作标准曲线。

2 结果

2.1 *CYP*A14 和 *CYP*A16 的克隆

利用引物 A1、A2,以基因组 DNA 为模板,通过 PCR 方法获得一条 0.9kb 的 DNA 产物。测序鉴定后,以 A2、A4 作为嵌套引物扩增目的基因的上游未知序列,A1 和 A3 作为扩增下游未知序列的引物。进行两轮 PCR 后,电泳结果显示两组分别扩增出一条大小约 1.5~2kb 的明显条带,将 PCR 产物进行 T-A 克隆后分别测序。对测序结果分析后发现,通过 PCR 扩增出的目的基因上、下游序列分别与 *C. tropicalis* ATCC 20336 中的 P450 基因 *CYP*52A14 的上游部分序列及 *CYP*52A16 的下游部分序列几乎完全一致(同一性达到 99%)。同时发现,二者分别与 *C. tropicalis* ATCC 750 中的 *CYP*52A2 上游部分序列及 *CYP*52A1 的下游部分也有较高的相似性,其编码区的同一性分别为 75.6% 和 76.2%。由于文献报道 *CYP*52A2 与 *CYP*52A1 在染色体中位置相邻,呈前后排列^[17],设想我们的菌株可能也具有同样的结构特征,才会产生如此的实验结果。在已测上、下游序列中分别设计特异性引物 A5、A6,以基因组 DNA 为模板进行 PCR,获得了大小约 5kb 的扩增产物。克隆后再次测序的结果证实了这个推测。通过对读码框分析,将其按位置的前后顺序分别命名为 *CYP*A14 和 *CYP*A16。二者的基因序列作为两个相邻基因已提交 GenBank(注册号:AY961988)。

2.2 DNA 序列分析

*CYP*A14 和 *CYP*A16 的读码框分别由 1569 和 1623 个核苷酸组成,分别编码 522 和 540 个氨基酸。通过 NCBI BLAST 的搜索比较发现,二者分别与 *CYP*52A14 及 *CYP*52A16 (GenBank 注册号:AY230500;AY230502)的核酸与氨基酸序列几乎完全一致,因此不能作为新报道的基因。但二者在染色体中位置相邻,呈前后排列的特征并没有被发现和报道。而这一点却与 *CYP*52A2 和 *CYP*52A1 (GenBank 注册号:M63258)的特征相符,说明这两对基因之间具有一定的种内相似性和关联性。从编码区核酸序列同一性和氨基酸序列相似性的比较来看,这两对基因之间也具有很高的同源性。其中 *CYP*14 与 *CYP*52A2 之间的同一性为 77.9%,相似性达到 87.4%。而 *CYP*A16 与 *CYP*52A1 之间的同一性为 77.6%,相似性为 84%,前者比后者少编码 3 个氨基酸,分别是位于后者编码肽链 C 末端的 Leu、

Ile、Leu。另外,*CYP*A14、*CYP*A16 之间也具有较高同源性,其同一性为 66.5%,接近于 *CYP*52A2 与 *CYP*52A1 之间的比较结果(68.2%)。在调控区内,*CYP*A14 的 TATA box 位于-75 处(*CYP*52A14 -63),*CYP*A16 启动子区 TATA box 位于-137 处(*CYP*52A16 -138)。同时,在 *CYP*A14、*CYP*A16 上游启动子区各发现了一个与转录控制有关的特征序列 5'-CATGTGAA,可能与底物(烷烃)的诱导作用有关^[18]。另外,*CYP*A14 下游存在 5'-TAG...TAATT...TTT 序列,*CYP*A16 的下游区则存在 5'-TAG...TATTT...TTT 特征序列,它们与 5'TAG...-TA(T/A)GT...TTT 结构类似,可能与转录终止有关^[18]。这些调控序列特征与 *CYP*52A2、*CYP*52A1 的调控模式具有一定程度的相似性。

从氨基酸水平看,*CYP*A14 与 *CYP*A16 肽链在 N 端显示出较大的差别。与此同时,它们在肽链结构上存在与 *CYP*52A2 和 *CYP*52A1 相似的几个推测的功能区^[17](图 1)。图中的 A 框(*CYP*A16 28~48;*CYP*A14 14~34)表示的是肽链中的跨膜区,B 框(*CYP*A16 59~81)则是 *CYP*A16 的另一个跨膜区,二者之间的氨基酸组成差别较大。C 框(*CYP*A16 233~282;*CYP*A14 215~264)的功能主要是与底物的识别有关,其氨基酸顺序的差异可能造成 *CYP*A16 与 *CYP*A14 在底物诱导上存在一定的差别。D 框(*CYP*A16 327~350;*CYP*A14 309~332)是血红素的远端结合区,其氨基酸序列较为保守,*CYP*A16 与 *CYP*A14 在此区仅存在两个氨基酸的差别。E 框(*CYP*A16 489~500;*CYP*A14 461~482)为血红素近端结合区,它显示出完全的保守性,二者没有任何差别,其中包含的一个 Cys 残基可能与血红素的铁离子直接相连。

2.3 各突变菌株 *CYP*A16、*CYP*A14 的克隆与序列比较

利用引物 A11、A12 和 A21、A22 直接从菌株 D1、D2、D3 和 D4 中通过 PCR 方法扩增出特异性产物,T-A 克隆后进行鉴定(图 2)。将各菌株 *CYP*A14 和 *CYP*A16 的氨基酸序列与 *C. tropicalis* 1230 进行比较,发现只有菌株 D3 的 *CYP*A14 和 *CYP*A16 序列均未发生改变,而其它菌株的序列都有个别氨基酸残基发生了突变。*CYP*A16 中只有菌株 D4 的序列中发生了一个点突变(Thr-317,其它菌株中是 Ala)。*CYP*A14 则有较多的突变发生,如菌株 D1 序列中的 Ser-13(其它菌株是 Leu) His-47(其它菌株是 Gln)和 Thr-51(其它菌株是 Ala)菌株 D2 序列中的 Gln-

	A	B	
CYP1A16	MSSSPSFAQEVLATTSPYIEYFLDNYTRWYFIPLVLLSLNFISLHTKYLERRFHAKPLGNVVLDPDTFGIATPLILYI		80
CYP1A14	MT.....AQDIIAT.....YITKWYVIVPLALIAAYRVLDYFYGRYLMYKLGAKPFFQKQTDGYFGFKAPLELLKK		65
	aq at t wy pl l yl akp d fg pl l		
CYP1A16	KSKGTVMKFAWSFNNKYIVKD PKYKTTGLRIVLPLIETIDPENIKAVLATQFNDFSLGTRHDFLYSLLDGIGFTLDGA		160
CYP1A14	KSDGTLIDFTLERIQ...ALNRDPDIPTFTFPIFSINLISTLEPENIKAILATQFNDFSLGTRHSHFAPLSGDGIGFTLDGA		142
	ks gt f p t i li t penika latqfndfslgtrh l gdgigtldga		
CYP1A16	GWKHSRTMLRPQFAREQVSHVKLLEPHVQVFFKHVRKHGQTFDIQELFFRLTVD SATEFLFGESAESLRDDSVGLTPTT		240
CYP1A14	GWKHSRSMLRPQFAREQISHVKLLEPHMQVFFKHVRKAQGKTFDIQELFFRLTVD SATEFLFGESVESLRDEISIGMSINA		222
	gwkhsr mlrpqfareq shvkllleph qvffkhvrk g tfdiqelffrltvdsateflfges eslrds g		
	C		
CYP1A16	KDFEGRGDFADAFNYSQTYQAYRFLQQMYWILNGAEFRKSIAIVHKFADHYVQKALELTDDDLQKQDGYVFLYELAKQT		320
CYP1A14	LDFDGKAGFADAFNYSQNYLASRAVMQQLYWVWLNKKFKCNAKVHKFADYVYSKALDLTPEQLEKQDGYVFLYELVKQT		302
	df g fadafnysq y a r qq yw lng f a vkhfad yv kal lt l kqdgyvflyel kqt		
	D		
CYP1A16	RDPKVLRDQLLNILVAGRDTTAGLLSFVFFELSRNPEVFAKLREEVENRFGLGEEARVEEISFESLKSCEYLKAVINEAL		400
CYP1A14	RDRQVLRDQLLNIMVAGRDTTAGLLSFVFFELARNPEVINKLREEIEDKFGNGENARVEDISFESLKSCEYLKAVINETL		382
	rd vlrdqllni vagrdttagllsfvf el rnpev klree e fglge arve isfeslksceylkav ne l		
CYP1A16	RLYPSVPHNFRVATRNNTTLPRGGGKDGCSPIVVKKGQVVMYTVIGTHRDPSIYGADADVFRPERWFEPETRKLGWAVVFF		480
CYP1A14	RLYPSVPQNFRVATKNTTLPRGGGKDGSLSPVLVRKGQTVMYGVYAAHRNPAVYGKDALEFRPERWFEPETKKLGWAFLEF		462
	rlypsvp nfrvat nttlprgggkdg sp v kgq vmy v hr p yg da fiperwfepet klgwa pf		
	E		
CYP1A16	NGGPRICLGQQFALTEASYVTVRLLQEFQGNLSLDPNAEYPPKLQNTLTLSLFDGADVRM		539
CYP1A14	NGGPRICLGQQFALTEASYVTVRLLQEFQGLSMDPNTEYPPRKMSHLTMSLFDGTNIEM		521
	nggpriclgqqfalteasyvtvrrllqefg ls dpn eypp lt slfdg m		

图 1 CYP1A16、CYP1A14 氨基酸水平的比较

Fig.1 Comparison of CYP1A16 and CYP1A14 at the amino acid level

Box A , B. Membrane-spanning domain ; Box C. Substrate recognizing region ;Box D. Distal heme-binding region ; Box E. Proximal heme-binding region .

269(其它菌株是 Lys) ,菌株 D4 序列中的 Ala-50(其它菌株是 Thr) 。但对照图 1 发现 ,这些氨基酸残基的突变都未发生在功能区内 ,可能对蛋白的功能影响不大。

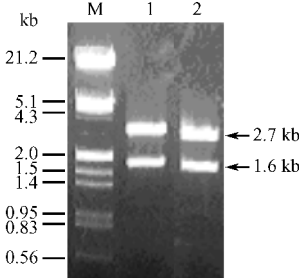


图 2 插入片段 T 载体的酶切电泳图

Fig.2 Electrophoresis of digested T-vectors with inserts
M. λ DNA digested with *Eco*R III and *Hind* III ; 1. T-CYP1A16 digested with *Pst* I and *Xba* I derived from D1 to D4 ; 2. T-CYP1A14 digested with *Pst* I and *Xba* I derived from D1 to D4.

2.4 CYP1A16、CYP1A14 在酿酒酵母中的 P450 表达含量测定

利用 PCR 方法扩增 *C. tropicalis* 1230 中 *CYP1A14* 和 *CYP1A16* 的编码区序列 ,分别获得大小约为 1.6kb 的 DNA 片段。构建的表达载体 pYCP1 经

Sac I 和 *Xho* I 酶切鉴定、pYCP2 经 *Bam* H I 和 *Eco* R I 酶切鉴定均正确。将转入了不同重组质粒的 *S. cerevisiae* W303-1B 菌株用半乳糖进行诱导培养后 ,制备细胞内微粒体组分。对 *C. tropicalis* 1230 微粒体 P450 比含量的测定结果见图 3。光谱扫描结果显示 ,CYP1A16 和 CYP1A14 表达后均出现了还原型的 P450 吸收峰 ,其中前者的峰值接近于后者的两倍。

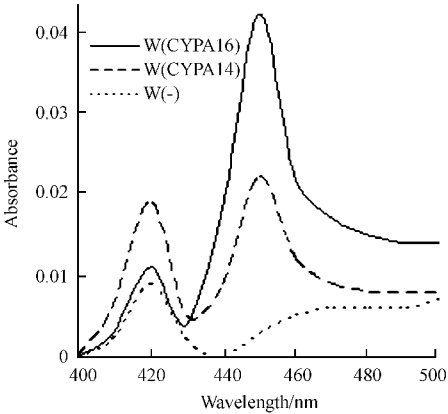


图 3 携带不同 P450 表达载体的酵母微粒体 CO 差示光谱

Fig.3 CO-difference spectra of microsomal fractions of transformed with the P450 expression vectors

Protein concentrations in each cuvette were 1mg/mL.

二者的 P450 比含量的计算结果分别为 0.46nmol/mg 蛋白和 0.24nmol/mg 蛋白。从扫描结果看, CYP14 在 420nm 处出现了另一个峰值, 这个峰值是细胞色素 P450 发生变性后的特征, 说明其合成的 P450 相对不太稳定。而直接导入空载体 pYES2 后并未出现 P450 特征峰, 仅在 420nm 处出现一个较小的峰值, 无法计算其有效的 P450 含量。

将从各生产菌株克隆的 CYP16 与 CYP14 也在同一宿主内分别进行了表达, 其 P450 表达含量与 *C. tropicalis* 1230 相比均未发生明显变化。

3 讨论

细胞色素 P450 广泛分布于动、植物、昆虫和微生物等不同生物体内, 其种类多样。P450 基因数量繁多, 从已知序列中划分出了多个不同的基因家族和亚家族。本文正是从其家族特征出发, 通过一种相对简易的方法, 从基因组 DNA 中一次克隆到了两个 P450 同工酶基因。当然, 基因组内可能还存在其它 P450 基因。可以通过建立基因文库, 利用分子杂交的方法做进一步的筛选。虽然这两个基因的序列与 *C. tropicalis* ATCC 20336 的两个 P450 成员呈对应关系, 但通过我们的克隆方法发现了二者在染色体上为上、下游基因关系。有趣的是, 这一点和 *C. tropicalis* ATCC 750 中的 CYP52A1、CYP52A2 特征相同。不仅如此, 我们发现这两对基因在序列特征上也具有较高的相似性。

对 CYP14、CYP16 的序列的比较和分析主要是在氨基酸水平上进行的。总体来看, 二者在 N 端的差异明显大于其它区域。而几个推断的功能区中, 跨膜区的氨基酸组成差别很大, 可能与跨膜机制的差异有关^[20]。底物识别区的氨基酸顺序也有明显的差别, 这一点十分重要, 说明二者在不同底物诱导时, 在生物转化过程中可能发挥不同程度的作用^[17]。作为参与血红素结合的 D 区和 E 区, 二者显示出较高的保守性。尤其是后者作为近端结合区其结合方式应该具有唯一性, 任何改变可能导致整个酶功能的破坏。在已报道的多个存在于同一宿主内的 P450 基因之间, 与血红素结合区域共同的保守性体现出它们在基本功能上的一致性, 即必须与血红素有效结合才能发挥自身的功能^[10]。另外, *C. tropicalis* 1230 各突变菌株的部分 CYP14 和 CYP16 氨基酸顺序发生了点突变。但通过功能区分析, 这些点突变不太可能对酶的功能造成大的影响。这一点从它们在同一宿主体内的表达效果也得

到证实。

从不同表达载体导入宿主菌后 P450 含量的比较来看, CYP14 和 CYP16 在酿酒酵母中均获得了有效的表达。与菌株 1230 相比, 各生产菌株 CYP14 和 CYP16 在酿酒酵母中的 P450 表达含量并没有发生显著的变化, 说明个别氨基酸的突变并未对酶的性质产生影响。当然这并不意味着二者在不同的诱变菌株中也会产生相同的酶量, 因为基因调控区的某些变化可能会使其调节功能发生改变, 从而造成在不同底物诱导条件下, 酶的表达量可能不同。这有待进一步的研究。此外, 可以利用底物转化试验对来进一步研究表达后 P450 的生物催化活性, 从而验证其生物学功能。在由 P450 催化的烷烃或脂肪酸转化试验中, 反应混合液需由 NADP⁺ (或 NADPH) 带放射性标记的底物 (如 [1-¹⁴C] 脂肪酸或长链烷烃) NADPH 再生系统 (包含 6-磷酸葡萄糖、6-磷酸葡萄糖脱氢酶) 以及酶溶液共同组成, 产物分析可利用薄层层析或气相色谱进行^[21-22]。不仅如此, 二者在热带假丝酵母体内的表达情况也需要做进一步研究, 特别是在不同烷烃诱导条件下的表达情况。通过设计针对不同 P450 基因的寡核苷酸探针及利用 Northern blot 方法, Seghezzi 等^[10]发现在菌株 ATCC 750 的各 P450 基因中, CYP52A2 可表现出比其它成员更强的被不同烷烃诱导的能力。而对于菌株 ATCC 20336, Craft 等^[11]则利用竞争性定量 RT-PCR 的方法证明, CYP52A13 和 CYP52A14 在各 P450 成员中被油酸或十八烷诱导的 mRNA 水平最高, 同时成员 CYP52A17 和 CYP52A18 也具有相对较高的诱导水平。研究不同 P450 基因的底物特异性对于了解其与菌株产酸能力之间的关系有着重要的意义。

CYP14 和 CYP16 的克隆和功能鉴定, 对于二元酸生产研究, 特别是构建新型工程菌方面具有重要的实际意义。如可以通过增加关键酶基因的拷贝数, 或增强其表达能力, 使菌株的 ω -氧化能力增强, 从而提高其产酸能力。

参 考 文 献

- [1] Shioi I. Microbial production of long-chain dicarboxylic acids from n-alkane. *Agric Biol Chem*, 1971, 35: 2033-2042.
- [2] 陈远童. 新兴的绿色化学工业——微生物发酵生产长链二元酸. *微生物学通报*, 2000, 27(6): 467.
- [3] Picataggio S, Rohrer T, Deanda K, et al. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic acids. *Biotechnology*, 1992, 10: 894-898.

- [4] Rehm H J, Reiff I. I: Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. *Adv Biochem Eng*, 1981, **19**:175 – 215.
- [5] Sanglard D, Kappeli O, Fiechter A. Metabolic conditions determining the composition and catalytic activity of cytochrome P450 monooxygenase in *Candida tropicalis*. *J Bacteriol*, 1984, **157**:297 – 302.
- [6] Sutter T R, Sanglard D, Loper J C. Isolation and characterization of the alkane-inducible NADPH cytochrome P450 oxidoreductase gene from *Candida tropicalis*. *J Biol Chem*, 1990, **265**:16428 – 16436.
- [7] Poosch M S, Yamazaki R K. The oxidation of dicarboxylic acid CoA esters via peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. *Biochem Biophys Acta*, 1989, **1006**:291 – 298.
- [8] 冷欣夫, 邱星辉 编著. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景. 北京: 科学出版社, 2001, 1 – 7.
- [9] Nelson D R, Kamataki T, Waxman D J, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol*, 1993, **12**:1 – 51.
- [10] Seghezzi W, Meili C, Ruffiner R, et al. Identification and characterization of additional members of the cytochrome P450 multigene family *CYP52* of *Candida tropicalis*. *DNA and Cell Biology*, 1992, **11**:767 – 780.
- [11] Craft D L, Madduri K M, Eshoo M, et al. Identification and characterization of the *CYP52* family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and alkanes to α , ω -dicarboxylic acids. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**:5983 – 5991.
- [12] Adams A, Gottschling D E, Kaiser C A, et al. 酵母遗传学方法实验指南. 刘子铎译. 北京: 科学出版社, 2000, 81 – 82; 87 – 88.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [14] Scheller U, Zimmer T, Kargel E, et al. Characterization of the n-alkane and fatty acid hydroxylating cytochrome P450 forms 52A3 and 52A4. *Arch Biochem Biophys*, 1996, **328**(2):245 – 254.
- [15] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I: Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, 1964, **239**:2370 – 2378.
- [16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**:248 – 254.
- [17] Seghezzi W, Sanglard D, Fiechter A. Characterization of a second alkane-inducible cytochrome P450-encoding gene, *CYP52A2*, from *Candida tropicalis*. *Gene*, 1991, **106**:51 – 60.
- [18] Giniger E, Varnum S M, Ptashne M. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*, 1985, **40**:767 – 774.
- [19] Zaret K S, Sherman F. DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell*, 1982, **28**:563 – 573.
- [20] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 1982, **157**:105 – 132.
- [21] Sanglard D, Kappeli O, Fiechter A. The distinction of different types of cytochromes P-450 from the yeasts *Candida tropicalis* and *Saccharomyces uvarum*. *Arch Biochem Biophys*, 1986, **251**:276 – 286.
- [22] Blasig R, Mauersberger S, Riege P, et al. Degradation of long-chain n-alkanes by the yeast *Candida maltosa*, II. Oxidation of n-alkanes and intermediates using microsomal membrane fractions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, **28**:589 – 597.

Cloning and expression of P450 genes *CYP14* and *CYP16* from *Candida tropicalis* 1230

HE Feng CHEN Yuan-tong*

(State Key Laboratory of Microbiology Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Cytochrome P450 (CYP) as a monooxygenase catalyzes the limiting-rate reaction in the oxidation pathway of *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*). Two members of P450 gene *CYP16* and *CYP14* were isolated from *C. tropicalis* 1230 by cassette PCR method, based on cloning of the P450 partial gene. They are tandemly arranged on the chromosome, encoding the gene products of 522 and 540 amino acid residues respectively. The deduced amino acid sequences of *CYP14* and *CYP16* are identical to those of *CYP52A14* and *CYP52A16* respectively and highly similar to those of *CYP52A2* and *CYP52A1* from *C. tropicalis* ATCC 750 respectively. Simultaneously, *CYP14* and *CYP16* from several dicarboxylic-acid-producing strains were also cloned, and some site-mutations were found in their sequence. *CYP14* and *CYP16* were expressed in the *Saccharomyces cerevisiae* strain. It was shown that the recombinant P450 content of *CYP14* was lower than that of *CYP16*, and part of them were denatured. Comparing to *C. tropicalis* 1230, no significant changes were observed in recombinant P450 contents of *CYP14* and *CYP16* from every dicarboxylic-acid-producing strain.

Key words: *Candida tropicalis*, *CYP14*, *CYP16*, Expression, P450 content

* Corresponding author. Tel 86-10-62554387, E-mail: chenyt@sun.im.ac.cn

Received date 01-11-2005