

链霉菌来源的 UDP-葡萄糖-4-差向异构酶基因的克隆表达及酶性质研究

张天宇 王玲燕 姜 蓉 李 元*

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医药生物技术研究所 北京 100050)

摘 要 经同源性比较,链霉菌 139(*Streptomyces* sp. 139)产生胞外多糖依博素的生物合成基因簇中 *ste19* 基因编码的蛋白 Ste19 与 UDP-葡萄糖-4-差向异构酶有较高同源性。将 *ste19* 基因克隆至质粒 pET30a,在大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行了异源表达。产生的可溶性 Ste19 重组蛋白,占细胞总蛋白的 26%,说明该基因高 GC 含量(73.8%)及第三位碱基偏向使用 GC(96.2%)并未影响其高效表达。SDS-PAGE 结果显示重组蛋白的分子量约 37kD,与理论推测值基本相同。经亲和层析纯化后得到了较高纯度的重组蛋白,经 HPLC 分析纯度为 92.9%。酶活性分析表明 Ste19 蛋白可将 UDP-葡萄糖转化为 UDP-半乳糖,因此 Ste19 蛋白是 UDP-葡萄糖-4-差向异构酶,它可能参与了依博素的生物合成。

关键词 链霉菌,差向异构酶,表达,依博素生物合成

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)06-0881-04

细菌胞外多糖的生物合成基因成簇存在,其中某些基因在胞外多糖的生物合成前体核苷酸糖的合成起着重要的作用。链霉菌 139(*Streptomyces* sp. 139)能够产生胞外多糖依博素,该糖在体内具有明显抗类风湿性关节炎的活性。依博素由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖和半乳糖醛酸共 8 种单糖组成^[1]。我们已经克隆了依博素生物合成基因簇(*ste*)^[2],其中 *ste19* 基因编码的蛋白经同源性比较分析可能为 UDP-葡萄糖-4-差向异构酶。UDP-葡萄糖-4-差向异构酶(EC 5.1.3.2)通过催化 UDP-葡萄糖(UDP-Glc)和 UDP-半乳糖(UDP-Gal)之间的转换在 Gal 的代谢中起着关键的作用。该酶可能参与了依博素合成前体核苷酸糖的合成。

本文对 *ste19* 基因进行了克隆和表达,经酶活性分析确证其编码产物为 UDP-葡萄糖-4-差向异构酶。这为进一步研究该基因在依博素生物合成中的作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 链霉菌 139(*Streptomyces* sp. 139)和大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 为我室保存菌种。质粒 pET30a 和宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)

由陈松森教授惠赠。

1.1.2 试剂 DNA 凝胶抽提试剂盒和 Taqplus DNA 聚合酶购自上海 Sangon 公司。所有限制性内切酶、DNA 分子量标准、dNTP、IPTG 和 T4 DNA 连接酶均购自大连 TaKaRa 公司或 Promega 公司。BugBuster Ni-NTA His·Bind 纯化试剂盒购自 Novagen 公司。NAD⁺、UDP-Glc 和 UDP-Gal 购自 Sigma 公司。

1.2 PCR 扩增

根据 *ste19* 基因及其两侧序列设计引物:Pr:5'-CGGTTGAACATATGCGCGTACTGCTCACC-3'(划线碱基为 *Nde* I 酶切位点);Pf:5'-ATCTCGAGCGACCGCCACCGCAGGGTG-3'(划线碱基为 *Xho* I 酶切位点)。以 *S. sp.* 139 总 DNA 为模板,进行 PCR 反应,反应条件:95℃ 3min,94℃ 45s,50℃ 50s,72℃ 1min,共 28 个循环;72℃ 10min。DNA 测序由大连 TaKaRa 公司进行。

1.3 *ste19* 基因的克隆和表达

扩增的片段经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后克隆至同样酶切的 pET30a 质粒,转化至 *E. coli* JM109。对重组质粒 pET30a-*Ste19* 进行酶切鉴定后,再转化至 *E. coli* BL21(DE3),重组质粒进行 DNA 测序分析。将 *E. coli* BL21(DE3)pET30a-*Ste19* 及 *E. coli* JM109/pET30a-*Ste19* 接种于含有 50μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基,37℃ 培养。当 OD₆₀₀ 达到 0.6 时,加入

基金项目:国家 863 计划(2001AA21409)

* 通讯作者。Tel:86-10-63153320 E-mail: yuanwli@263.net

作者简介:张天宇(1976-),男,北京人,博士生,主要从事微生物与生化药学研究。E-mail: ztypyx@163.com

收稿日期:2005-03-23,修回日期:2005-07-31

IPTG(终浓度为 0.1mmol/L),培养 3h,收集菌体,用 20mmol/L Tris-HCl(pH7.9)洗涤两遍。用 2~5mL $1 \times \text{Ni}^{2+}$ -NTA 结合缓冲液(50mmol/L NaH_2PO_4 , 300mmol/L NaCl, 10mmol/L 咪唑, pH 8.0)重悬每克湿重细胞,超声破碎。离心收集上清,以备纯化。

1.4 重组 Ste19 蛋白的纯化

在 1mL 50%的 Ni^{2+} -NTA His·Bind slurry 中加入 4mL 细菌裂解物上清。4℃混合 1h。将裂解物- Ni^{2+} -NTA His·Bind 混合物装入空柱。用 5 倍体积的 $1 \times \text{Ni}^{2+}$ -NTA 洗涤缓冲液(50mmol/L NaH_2PO_4 , 300mmol/L NaCl, 20mmol/L 咪唑, 5mmol/L β -巯基乙醇, pH 8.0)洗柱。依次用 $1 \times \text{Ni}^{2+}$ -NTA 洗脱缓冲液(50mmol/L NaH_2PO_4 , 300mmol/L NaCl, 250mmol/L 咪唑, 5mmol/L β -巯基乙醇, pH8.0)和 $2 \sim 4 \times \text{Ni}^{2+}$ -NTA 洗脱缓冲液(咪唑浓度分别为 500mmol/L, 750mmol/L 和 1mol/L,其余与 $1 \times \text{Ni}^{2+}$ -NTA 洗脱缓冲液相同)进行洗脱,并分别收集,进行 SDS-PAGE 检测。含有高纯度 Ste19 蛋白的洗脱液以 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)在 4℃进行透析,换液 6 次,冷干后于 -20℃保存。

1.5 蛋白质测定

SDS-PAGE 凝胶染色后,利用凝胶图象分析系统成像,然后通过分析软件(Alpha Ease FC™程序)对蛋白条带进行定量分析,确定 Ste19 蛋白占菌体总蛋白的百分含量。用 HPLC 分析纯化蛋白的纯度,采用反相 SUPELCIL LC-308 柱(C8)流动相(A)乙腈(20%→80%);(B)0.05% TFA(80%→20%),流速 0.5mL/min,于 280nm 检测。蛋白质浓度采用 Bradford 等^[3]的方法测定。

1.6 酶活性测定

反应总体积为 200 μ L,含 20 μ L 酶液(4 μ g),10 μ L UDP-Glc(终浓度为 1mmol/L),170 μ L 20mmol/L Tris-HCl(pH 7.9)。室温反应 30min,加入 10 μ L 5mol/L HCl 终止反应。经 HPLC 检测反应产物:采用反相 COSMOSIL C18 柱(4.6mm \times 15mm),流动相为 40mmol/L 三乙胺磷酸(pH 6.5),流速为 0.4mL/min,检测波长为 254nm。上样体积为 20 μ L,室温进行。

2 结果

2.1 ste19 基因序列分析及同源性比较

克隆的 ste19 基因序列与本实验室以往报道一致^[2]。该基因具有很高 GC 含量(73.8%)并且密码子第三位碱基明显具有 GC 偏向性(96.2%),与其他链霉菌接近^[4]。BLAST 比较显示:与 Ste19 蛋白具

有较高同源的蛋白有两类:dTDP-Glc-4,6-脱水酶和 UDP-Glc-4-差向异构酶。这两种酶同属扩展的短链脱氢酶/还原酶超家族,用 NAD 催化反应,并且在 Ste19 中发现了该超家族的信号模体序列 YXXKX(Y140-K144)和位于 N 端的以 GXXGXXG 模体为特征的 NAD 结合结构域^[5]。由于 Ste19 与 4,6-脱水酶和 4-差向异构酶均具有较高的同源性,而且后两者的氨基酸序列之间又有很高的同一性(25%)并且其三维结构相似^[6](PDB 号:IBXK),所以仅仅通过同源性比较,很难推断出 Ste19 究竟属于哪一类酶。进一步研究发现:一方面,同源性比较结果表明,Ste19 与差向异构酶的同源性比与 4,6-脱水酶的同源性要略高些。另一方面,Hegeman 等^[6]发现,UDP-Glu-4,6-脱水酶多处保守的氨基酸与 UDP-Glu-4-差向异构酶的相似位置的同样保守的氨基酸不同。其中, Glu198 和 Lys199 在 35 个 4,6-脱水酶中都保守,而 4-差向异构酶中对应为 Asn/Asn。相似地,4,6-脱水酶的 Thr134 在绝大多数 4,6-脱水酶中都保守,但 4-差向异构酶的残基为 Ala。上述 3 个保守的残基在 Ste19 中为 Asn183, Asn184 和 Ala113。所以我们判断,Ste19 为 UDP-Glu-4-差向异构酶。

2.2 ste19 基因的克隆和表达

经过 IPTG 诱导, *E. coli* BL21(DE3)pET30a-Ste19 主要以可溶形式表达 Ste19,经凝胶扫描确定约占菌体总蛋白的 26%(图 1)。分子量与预期的大小基本一致,约为 37kD。这表明我们采用的表达

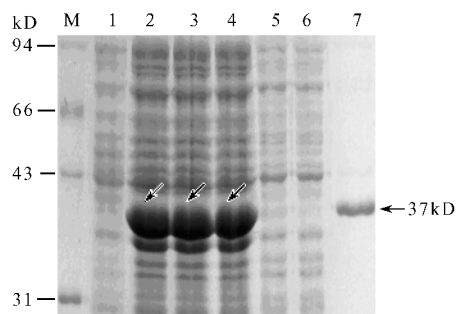


图 1 重组 Ste19 蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化

Fig.1 Expression and purification of the recombinant Ste19 protein in *E. coli*

1. Total bacterial proteins of *E. coli* BL21(DE3)pET30a; 2. Total bacterial proteins of *E. coli* BL21(DE3)pET30a-Ste19 after induced 3h by dH₂O; 3. Total bacterial proteins of *E. coli* BL21(DE3)pET30a-Ste19 after induced 3h by 0.1mmol/L IPTG; 4. The supernatant of the cells after induced 3h by 0.1mmol/L IPTG; 5. Total bacterial proteins of *E. coli* JM109; 6. Total bacterial proteins of *E. coli*/JM109 pET30a-Ste19 after induced 3h by 0.1mmol/L IPTG; 7. Eluted Ste19 protein; M. Molecular mass marker. The arrow indicates the Ste19 protein.

体系和条件适宜表达并能获得可溶性的重组 Ste19 蛋白,而且该基因的高 GC 含量及密码子第三位对 GC 的偏好并未影响其高效表达。

2.3 重组 Ste19 蛋白的纯化

Ni^{2+} -NTA 亲和柱可有效结合带有 His-tag 的重组蛋白。经过一次分离, $3 \times \text{Ni}^{2+}$ -NTA 洗脱缓冲液的洗脱部分便含有高纯度的重组蛋白(图 1),HPLC 分析显示纯度为 92.9%(图 2)。推算,由 1L 菌体可获得重组 Ste19 蛋白约 40mg。

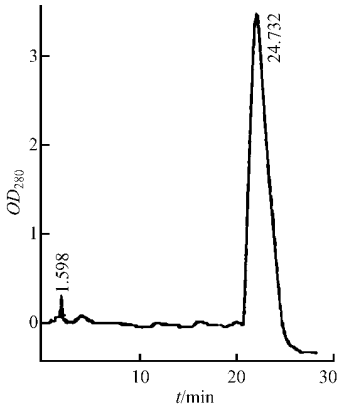


图 2 HPLC 分析纯化的 Ste19 蛋白

Fig.2 HPLC analysis of purified Ste19 protein

2.4 ste19 基因编码蛋白的酶活性测定

HPLC 分析结果表明:酶促反应混合物中出现了两个保留时间分别为 29.993min 和 33.488min 的峰,其保留时间分别与标准品 UDP-Gal 峰的保留时间(30.127min)和 UDP-Glc 峰的保留时间(34.073min)基本一致(图 3),说明在重组蛋白的催化下,底物 UDP-Glc 可转化为 UDP-Gal。这表明 ste19 基因编码的蛋白是 UDP-Glc-4-差向异构酶。

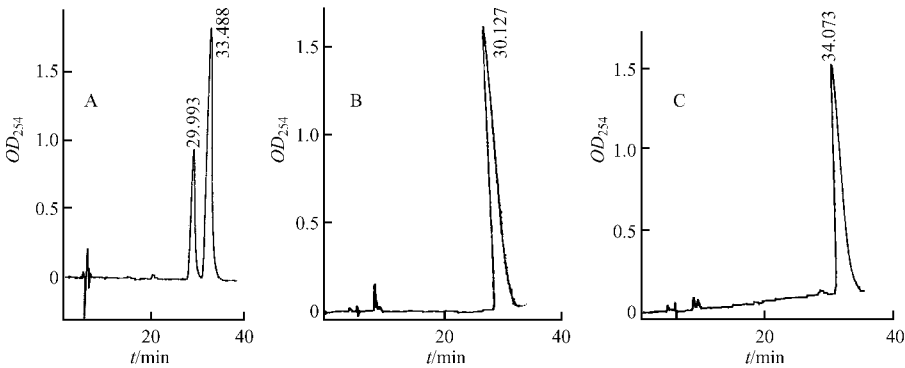


图 3 ste19 基因编码蛋白的酶活性分析

Fig.3 UDP-Glc was changed into UDP-Gal catalyzed by recombinant Ste19 protein

HPLC profiles of enzyme assays with UDP-glucose as substrate are shown. 1. Enzyme assay with purified recombinant Ste19 protein ;
2. Standard UDP-galactose ;3. Standard UDP-glucose.

3 讨论

本实验克隆了链霉菌 139 依博素生物合成基因簇中的 ste19 基因并在大肠杆菌中进行了高效表达,获得了高纯度有生物活性的重组蛋白,经酶活性分析证明其为 UDP-Glc-4-差向异构酶。SDS-PAGE 结果表明,纯化的 Ste19 蛋白与破碎细胞中的 Ste19 大小有明显差异,估计有两种可能:一种可能是由于目标蛋白的浓度不同,因为本实验室其他人员在实验中也发现了类似的现象;另一种可能是,两种样品的盐浓度不同,纯化的 Ste19 蛋白样品未经透析,含盐较多,而且其中还有一定浓度咪唑,因而可能影响蛋白的泳动速度。而在 Ste19 中的 3 个保守的残基 Asn183、Asn184 和 Ala113 可作为区分 UDP-Glc-4-差向异构酶和 UDP-Glc-4- β -脱水酶的标志。我们在实验中发现,无需 IPTG 诱导,重组 Ste19 蛋白亦可大量表达,与文献 5 报道的现象相同。

在大肠杆菌和酵母中,此差向异构酶负责将外源的 Gal 转化为 Glc。然而,在链霉菌 139 中,该酶很可能是将 Glc 转化为 Gal 以作为依博素生物合成的前体。例如,实验验证在 *L. lactis* NIZO B40 中,UDP-Gal 均是由 UDP-Glc 通过异构酶的作用产生并用于胞外多糖的生物合成^[7]。依博素中含 Glc 和 Gal 单糖组分,因此,ste19 基因在依博素的生物合成中,对调解依博素的 Glc 和 Gal 的合成起关键作用。本实验证实 Ste19 蛋白为 UDP-Glc-4-差向异构酶,为进一步研究 ste19 基因在依博素的生物合成中所起的作用奠定了基础。研究表明,链霉菌 139 中的 UDP-Glc-4-差向异构酶(Ste19)不需要外加辅助因

子 NAD^+ , 与来源于大肠杆菌和一些藻类^[8,9] 中的 UDP-Glc-4-差向异构酶相同。

本研究在国内外首次报道, 链霉菌中存在 UDP-Glc-4-差向异构酶基因, 并通过在大肠杆菌中对该基因进行异源表达及其产物的活性分析进行功能鉴定。

参 考 文 献

- [1] Chen J, Wu J, Li Y, *et al.* A new IL-1 receptor inhibitor 139A: fermentation, isolation, physico-chemical properties and structure. *J Antibiot*, 2003, **56**: 87–90.
- [2] Wang L, Li S, Li Y. Identification and characterization of a new exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **220**: 21–27.
- [3] Bradford M M, McRorie R A, Williams W L. 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.
- [4] Wright F, Bibb M J. Codon usage in the G + C-rich *Streptomyces* genome. *Gene*, 1992, **113**: 55–65.
- [5] Fry B N, Shi F, CHEN Y Y, *et al.* The *galE* gene of *Campylobacter jejuni* is involved in lipopolysaccharide synthesis and virulence. *Infect Immun*, 2000, **68**(5): 2594–2601.
- [6] Hegeman A D, Gross J W, Frey P A, *et al.* Probing catalysis by *Escherichia coli* dTDP-glucose-4,6-dehydratase: Identification and preliminary characterization of functional amino acid residues at the active site. *Biochemistry*, 2001, **40**(22): 6598–6610.
- [7] Laws A, Gu Y, Marshall V E. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol Adv*, 2001, **19**(8): 597–625.
- [8] Chen X, Kowal P, Hamad S, *et al.* Cloning, expression and characterization of a UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli*. *Biotech Lett*, 1999, **21**: 1131–1135.
- [9] Goularda F, Pondavenb P, Diourisa M, *et al.* Partial purification and characterization of UDP-glucose-4-epimerase from *Solieria chordalis* (Rhodophyceae). *Botanica Marina*, 2003, **46**: 107–111.

Cloning and expression of UDP-glucose-4-epimerase gene from *Streptomyces* and characteristics of the enzyme

ZHANG Tian-yu WANG Ling-yan JIANG Rong LI Yuan*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: The *ste19* gene is identified to encode a UDP-Glucose-4-epimerase by data base comparison and experimental validation. The enzyme catalyzes the interconversion of UDP-Glucose and UDP-Galactose. The gene amplified by PCR with the total DNA of *Streptomyces* sp. 139 as template was cloned into plasmid pET30a at *Xho* I - *Nde* I sites. After the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and induced by IPTG, the protein was expressed as high as 26% of the total cell proteins and dominantly as soluble protein form. The high GC content (73.8%) and the preferential usage of G or C as third base of codons (96.2%) seems not to affect its good expression in *E. coli* BL21 (DE3). The purity of the recombinant protein purified by Ni^{2+} affinity chromatography is 92.9% by HPLC analysis. Enzyme activity assay shows the recombinant protein is a UDP-Glucose-4-epimerase and its activity is not dependent on exogenous NAD^+ . The above research lays a very good foundation for study on functions of the *ste19* gene in Ebosin biosynthesis.

Key words: *Streptomyces*, Epimerase, Expression, Ebosin biosynthesis