

假交替单胞菌 XM2107 嘌呤核苷磷酸化酶基因克隆表达、重组蛋白纯化及酶学性质

王光路, 夏俊刚, 谢希贤, 徐庆阳, 陈宁*

(天津科技大学生物工程学院, 教育部工业微生物重点实验室, 天津 300457)

摘要:【目的】嘌呤核苷磷酸化酶(PNP, EC. 2. 4. 2. 1)在酶法合成核苷类药物及中间体中具有广泛应用。本文研究的目的是, 获得极地嗜冷菌假交替单胞菌 *Pseudoalteromonas* sp. XM2107 嘌呤核苷磷酸化酶编码基因, 并对该酶酶学性质进行研究, 以考察该酶在核苷类中间体及药物合成中的潜在应用价值。【方法】利用同源序列 PCR 技术从 *Pseudoalteromonas* sp. XM2107 基因组 DNA 中扩增出其编码嘌呤核苷磷酸化酶基因, 测序获得编码序列。将该基因在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行重组表达以及金属螯合层析纯化, 对其酶学性质进行初步研究。【结果】经过测序获得了该酶编码基因序列, 全长 702 bp, 共编码 233 个氨基酸, 大小为 25 kDa, Genbank 登录号为 GQ475485。酶学性质研究发现, 该重组酶最适反应温度为 50℃, 最适酶促反应 pH 为 7.6 (25 mmol/L 磷酸盐缓冲液), 最适酶促反应底物为肌苷 (K_m 值 0.389 mmol/L, 37℃), 且对底物腺苷和鸟苷也有磷酸解活性, 在普通温度下具有较高催化活性和较好热稳定性。【结论】来源于 *Pseudoalteromonas* sp. XM2107 的嘌呤核苷磷酸化酶在普通温度条件下具有较高的催化活性及良好热稳定性性质, 在核苷类中间体和药物合成中具有较广泛的应用价值。

关键词: 假交替单胞菌; 嘌呤核苷磷酸化酶; 酶学性质

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0222-06

嘌呤核苷磷酸化酶 (Purine nucleoside phosphorylase, EC 2. 4. 2. 1) 是嘌呤补救合成途径的关键酶之一, 该酶可逆地催化底物嘌呤核苷磷酸化反应, 将底物嘌呤核苷分解成对应的碱基及核糖-1-磷酸。生物体中存在有两种结构不同的嘌呤核苷磷酸化酶, 且具有不同的底物特异性。一种为三聚体结构, 单体分子量约 31 kDa, 可催化底物鸟苷和肌苷, 在原核生物及真核生物中均有存在。另一种为六聚体结构, 单体分子量约 25 kDa, 广泛存在于原核生物, 具有更广泛的底物特异性, 肌苷、鸟苷、腺苷均可做为催化底物^[1], 已被应用于酶法合成阿糖腺苷、去氧氟尿苷、双脱氧肌苷^[2]、利巴韦林^[3]等一系列核苷类药物或中间体的合成。常规的嘌呤核苷磷

酸化酶最适反应温度高 (65℃ - 70℃), 在常温下酶活较低, 限制了该类酶在核苷类药物生物合成中的发展和应用范围。

近年来, 低温酶已成为研究的热点, 主要来源于海洋深处等极端环境条件 (环境温度 < 5℃) 下的嗜冷微生物。这类酶在低温条件下就可以表现出较高的催化活性以使代谢途径获得足够的通量, 抵消由于温度的降低对酶活水平的抑制以及底物溶解度和传质水平下降的影响, 使菌体能够维持足够的代谢水平以生存^[4-5]。Li 等^[6] 研究假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas* sp.) Bsi590 重组嘌呤核苷磷酸化酶发现, 该酶在低、常温下比常温酶表现出更高的催化效率^[7], 预示着该酶在酶法合成核苷类药物中

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金计划项目 (20070903)

* 通信作者。Tel: +86-22-60272182; Fax: +86-22-60602298; E-mail: ningch@tust.edu.cn

作者简介: 王光路 (1986 -), 男, 硕士研究生, 专业方向为发酵工程。E-mail: wangguanglu@163.com

收稿日期: 2009-08-18; **修回日期:** 2009-10-16

具有潜在应用价值。为进一步研究此类型酶的催化效率及其性质,本实验室利用基因工程技术,从嗜冷菌假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.) XM2107 菌株中成功获得其嘌呤核苷磷酸化酶编码基因,构建了高效的表达纯化重组质粒,并采用金属螯合层析方法纯化目的嘌呤核苷磷酸化酶,对其酶学性质进行了较为细致的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *Pseudoalteromonas* sp. XM2107, 分离于东太平洋海底沉积物,由第三海洋研究所曾润颖博士馈赠。大肠杆菌(*Escherichia coli*) XL-Blue、大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3), 本实验室保藏。

1.1.2 培养基:高盐培养基(g/L):蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 26.91, MgSO₄ 3.36, MgCl₂ 2.09, CaCl₂ 1.11, KCl 0.745, 用于 *Pseudoalteromonas* sp. XM2107 培养。LB 培养基(g/L):蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 用于大肠杆菌培养。抗生素使用浓度为氨苄青霉素 100 μg/mL, 固体培养基中加入 15 g/L 琼脂。

1.1.3 主要试剂和仪器:限制性内切酶 *Bam*HI、*Eco*RI, T4 DNA 连接酶, *Taq* DNA 聚合酶购于 TaKaRa 公司;PCR 产物纯化试剂盒、质粒小样快速提取试剂盒、细菌基因组提取试剂盒购于北京博迈德公司;考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所;咪唑、Ni⁺-NTA 树脂及重力沉降柱均购于 BIO BASIC 公司;其余试剂均为国产分析纯。高效液相色谱 Agilent HP 1100 series 购于美国 Agilent Technologies;细胞超声破碎仪购于宁波新芝生物科技股份有限公司;PCR 仪及核酸蛋白分析仪购于美国 BIO-RAD Laboratories。

1.2 PCR 扩增反应

1.2.1 *Pseudoalteromonas* sp. XM2107 嘌呤核苷磷酸化酶简并引物设计:根据 GenBank 中 *Pseudoalteromonas* sp. Bsi590、*Escherichia coli* K-12 MG1655、*Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 的嘌呤核苷磷酸化酶基因序列、经多序列比对获得较保守的序列以设计简并引物,并通过密码子偏好性降低引物简并度:上游:5'-ATGAG (G/T) ACTCC (A/G) CATAT (C/T) AATGC-3', 下游:5'-TTAGAT AGACTCTAA (A/T) GC-3'。

1.2.2 PCR 引物合成:根据测序获得的嘌呤核苷磷

酸酶编码基因序列设计用于构建重组质粒引物,上游:5'-GATCGGATCCATGAGGACTCCACATA TT-3 (*Bam*HI 酶切位点), 下游:5'-GATCGAATTC TTA GATAGACTCTAATGC-3 (*Eco*RI 酶切位点), 由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.3 扩增条件:95℃ 3 min; 94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 30 个循环;72℃ 10 min。DNA 片段的回收、酶切、纯化、与载体的连接、转化等操作参见文献[8]。

1.3 嘌呤核苷磷酸化酶的表达

1.3.1 嘌呤核苷磷酸化酶基因的克隆与测序:PCR 反应产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳检测,切下目的条带。用 DNA 凝胶回收试剂盒回收。以质粒 pMD-18T 为载体,与回收的 PCR 产物直接进行连接,连接产物转化感受态 *E. coli* XL-Blue。在含 IPTG (24 mg/mL) 和 X-gal (20 mg/mL) 的 Amp 抗性 (100 μg/mL) LB 平板上 37℃ 培养 16 h, 随机挑取白色菌落进行菌落 PCR 及提取质粒单双酶切验证,对阳性重组质粒 pXMT 进行测序和序列分析。

1.3.2 嘌呤核苷磷酸化酶基因表达载体的构建:分别用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切重组质粒 pXMT 和质粒 pET-His, 琼脂糖凝胶电泳回收酶切片段,按照质粒 DNA: 目的基因 = 1: 5 进行连接转化,在氨苄青霉素抗性平板上筛选转化子,随机挑取单菌落进行菌落 PCR 及提取质粒单双酶切验证,得到重组表达质粒 pXMH。

1.3.3 重组嘌呤核苷磷酸化酶在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的诱导表达:经鉴定的阳性 pXMH 重组质粒转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 中。挑取单菌落到含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃, 200 r/min 培养 16 h 后以 1% 接种量转接至新鲜 LB 培养基中,37℃ 培养至菌体光密度值 $OD_{600} \approx 0.6 - 0.7$ 时,加入 1.0 mmol/L (终浓度) IPTG 诱导,继续培养 3 h 后取适量菌液进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析。

1.4 重组嘌呤核苷磷酸化酶的纯化

重组酶具体纯化步骤可参考 BD TALON™ Metal Affinity Resins User Manual, SDS-PAGE 蛋白电泳检测目的蛋白。纯化液分采用 50 mmol/L pH 7.6 的磷酸盐缓冲液透析后,使用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。

1.5 重组嘌呤核苷磷酸化酶的标准酶活测定条件

反应体系为 25 mmol/L、pH 7.6 磷酸钠缓冲液中,一定浓度的底物及重组酶,催化温度 37℃, 反应

时间 3 min, 煮沸 5 min 以终止酶促反应。高效液相色谱测定产物次黄嘌呤生成量^[9], 检测波长 254 nm, 室温检测。酶活单位定义: 在 37°C, 25 mmol/L, pH 7.6 的磷酸缓冲液中, 每分钟催化底物肌苷生成 1 μmol 次黄嘌呤所需酶量为一个酶活单位。

1.6 酶学性质的研究

1.6.1 最适酶促反应温度及 pH 测定^[10]: 反应体系中底物肌苷浓度为 4 mmol/L, 于 0°C - 70°C 温度梯度(间隔 5°C)下反应, 按标准酶活测定方法测定酶活。pH 梯度选定为 4 - 11^[6], 为消除离子浓度对酶催化活性的影响, 在柠檬酸-柠檬酸钠和甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中均加入 25 mmol/L(终浓度)磷酸钠(pH 7.0)。

1.6.2 热稳定性及 pH 稳定性测定: 热稳定性实验中, 将重组酶置于各温度梯度保温 30 min, 按标准酶活测定方法测定酶活。pH 稳定性实验中将重组酶置于各 pH 梯度缓冲液冰浴 120 min, 按标准酶活测定方法测定酶活。

1.6.3 酶促动力学参数测定: 底物肌苷浓度范围为 1 - 8 mmol/L, 重组酶含量为 0.21 μg , 按标准酶活测定方法测定酶活。

1.6.4 底物特异性测定^[11]: 反应体系中底物分别

为 1 mmol/L 浓度的肌苷、鸟苷、腺苷、脱氧鸟苷、胞苷、尿苷、胸苷, 按标准酶活测定方法测定酶活。

2 结果和分析

2.1 假交替单胞菌嘌呤核苷磷酸化酶基因的扩增及重组子 pXMH 鉴定

以 *Pseudoalteromonas* sp. XM2107 基因组 DNA 为模板, 采用简并引物扩增出一条约 700 bp 大小 DNA 片段。将片断同载体 pMD-18T 连接, 转化 *E. coli* XL-Blue 感受态, 蓝白筛选获得阳性重组子 pXMT, 测序获得目的基因。将目的基因连接质粒 pET-His(大小 2.9 kb), 转化 *E. coli* BL21(DE3), 进行抗性筛选获得重组子 pXMH。对该重组质粒进行单、双酶切验证, 电泳显示重组质粒 pXMH 构建正确。

2.2 嘌呤核苷磷酸化酶氨基酸序列分析

将测序获得目的基因提交至 GenBank (Accession no. GQ475485), 与已报道的假交替单胞菌嘌呤核苷磷酸化酶基因进行多序列对比, 结果如图 1 所示 (DNAMAN 6.0)。 *Pseudoalteromonas* sp. XM2107 同 *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 嘌呤核苷磷酸化酶编码氨基酸序列相似性为 92.27%, 共有 18 个编码氨基酸不同。同

P. TAC125	MSTPHINANVGDFAE TVLMPGDPLRAKYIAENFLDDAKQV	40
P. Xm2107	M RTPHINANVGDFAE TVLMPGDPLRAQYIAENFLDDAVQV	40
P. Bsi590	M RTPHINANVGDFAE TVLMPGDPLRAQYIAENFLDDAVQV	40
Consensus	m tphinanvgdfaetv lmpgdplra yiaenfldda qv	
P. TAC125	TSVRNMLGFTGT YK GKPV SIMSGMGIPSMSIYARELIVT	80
P. Xm2107	TGVRNMYGFTGTI YK GKPV SIMSGMGIPSMSIYARELIVS	80
P. Bsi590	TGVRNMF GFTGTI YK GKPV SIMSGMGIPSMSIYARELIVS	80
Consensus	t vrnml gftgt yk gkpv simsgmgipsms yareliv	
P. TAC125	FGVKNLIRIGTCGGIGSDVKIRDVIFAQGACTDSNVNRAR	120
P. Xm2107	FGVKNLIRIGTCGGIGTDIKIRDVIFAQGASTDSNVNRAR	120
P. Bsi590	FGVKNLIRIGTCGGIGTDIKIRDVIFAQGASTDSNVNRAR	120
Consensus	fgvkn irigtccgig d kirdvifaqga tdsnvnrar	
P. TAC125	VRCTDFAAIA DFDLLNGVNAAKDLGKAKVGNVFTTDTF	160
P. Xm2107	VRGYDFAAIA NFDLLNGVNAAKELGKAKVGNVFTTDTF	160
P. Bsi590	VRGYDFAAIA DFDLLNGVNAAKELGKAKVGNVFTTDTF	160
Consensus	vrg df aia fdllngvnaak lgikakvgnvfttdtf	
P. TAC125	YQADDTFYKDLDKLGVLA VDMETAGLYGVA AEYGA KAMAL	200
P. Xm2107	YQADDSFYKDLDKLGM LA VDMETAGLYGVA AEYGANAMAL	200
P. Bsi590	YQADDTFYKDLDKLGV LA VDMETAGLYGVA AEYGANAMAL	200
Consensus	yqadd fykdldklg lavdmetaglygva ae yga amal	
P. TAC125	FTVSDHVITGEATPADERQSTFNEMVKIALES	232
P. Xm2107	FTVSDHVITGEATPADERQSTFNEMVKIALES	232
P. Bsi590	FTVSDHVITGEATPADERQSTFNEMVKIALES	232
Consensus	ftvsdhvitgeatpaderqstfnemvkiales	

图 1 测序结果同已报道的低温嘌呤核苷磷酸化酶的氨基酸序列比对分析

Fig. 1 Alignment of the amino acid sequences with other cold-adapted PNPs.

Pseudoalteromonas sp. Bsi590 嘌呤核苷磷酸化酶编码氨基酸序列相似性 97.42%, 共有 6 个氨基酸不同。根据氨基酸序列推导计算, 其编码多肽链分子量约为 25 kDa。

2.3 重组嘌呤核苷磷酸化酶 (XmPNP) 在大肠杆菌中的表达及纯化

将重组质粒 pXMH 转化至 *E. coli* BL21 (DE3), 经 1 mmol/L IPTG 诱导后, 超声破碎细胞, 并将上清采用金属螯合层析纯化目的蛋白。将细胞破碎及金属螯合层析结果一同进行 SDS-PAGE 蛋白电泳对比分析, 结果如图 2 所示。

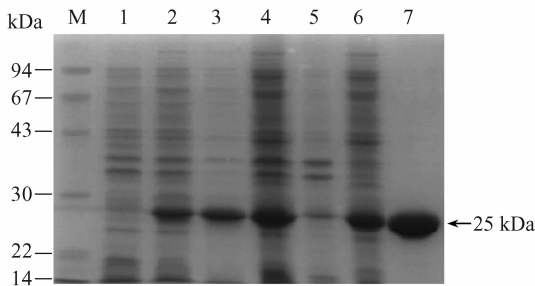


图 2 SDS-PAGE 分析重组蛋白 XmPNP 的表达及金属螯合层析纯化

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed product. M. Protein marker; 1. BL21; 2. pXMH/BL21; 3. pXMH/BL21 induced by IPTG; 4. pXMH/BL21 cell disruption mixture; 5, 6. Precipitate and supernatant of disruption mixture by centrifuge; 7. Purification of XmPNP by Ni^{2+} affinity chromatography column.

在 3 号泳道 25 kDa 大小位置出现明显目的条带, 同计算分子量大小一致, 而对照空菌无此带, 说明载体构建正确, 目的蛋白成功表达 (由于载体 pET-His 的 T7 启动子本底表达水平较高, 故未诱导的重组菌亦有此目的条带)。将菌体超声破碎后的混合液、离心获得的破碎沉淀及破碎上清进行对比分析发现, 目的蛋白主要为可溶状态, 在破碎上清中大量存在。将上清采用镍柱金属螯合层析纯化, 获得条带单一的目的蛋白, 重组酶 XmPNP (泳道 7 所示), 透析后用于后续酶学性质测定实验。

2.4 重组嘌呤核苷磷酸化酶 XmPNP 酶学性质

2.4.1 酶促动力学参数: 由于嘌呤核苷磷酸化酶对底物肌苷表现出最高的催化活性, 且底物肌苷及产物次黄嘌呤溶解度高, 利于选择底物浓度梯度及精确检测, 故在酶促反应动力学参数测定试验中选用肌苷做为催化底物。将测得反应产物中次黄嘌呤含量换算为反应催化速度, 并对底物浓度和反应速度求倒数, 采用双倒数作图法作图求得重组酶酶促动力学参数, 线性拟合如图 3 所示。

经计算获得重组酶 XmPNP 表观米氏常数为 $K_m = 0.382 \pm 0.006$ mmol/L, 最大反应速度 $V_{\max} = 1.59 \times 10^5 \pm 43000$ (U/mg), 专一性常数 $k_{\text{cat}}/K_m = 2.65 \times 10^8$ ($\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)。

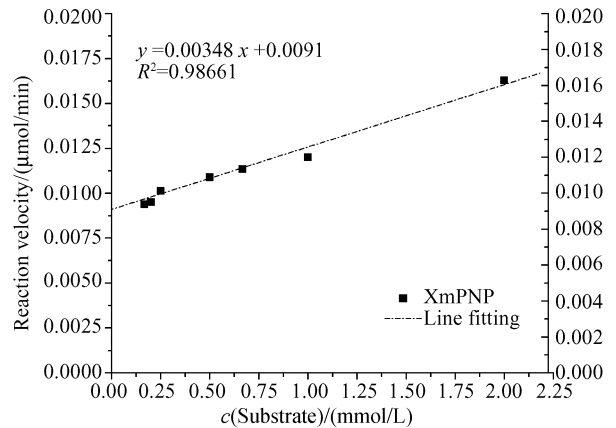


图 3 双倒数作图法计算重组酶 XmPNP 酶促动力学参数 (底物肌苷, 37°C)

Fig. 3 Lineweaver-Burk plot of XmPNP with inosine as substrate at 37°C.

2.4.2 酶的最适反应温度与热稳定性: 实验结果表明, 重组酶 XmPNP 的最适酶促反应温度为 50°C (将此处催化活性设定为 100%)。在 45°C 条件下的相对酶活为 96.20%, 40°C 时为 83.19%。而在 65°C 温度下已丧失大部分催化活性 (< 30%)。对热稳定性实验结果分析发现, 重组酶 XmPNP 在 50°C 保温 30 min 后几乎丧失全部催化活性, 在 45°C 时的相对酶活约为 84.2%。但在 40°C 时保留了 96% 的相对酶活, 酶活性在 30 min 保温条件下损失很小, 40°C 以下温度则几乎没有活性损失, 为酶促反应较适的催化温度选择范围。

2.4.3 酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性: 按方法 1.6.1 测得重组酶 XmPNP 在不同 pH 缓冲液中的相对活性 (同样将酶活最高值设定为 100%) 发现, 具有较广泛的 pH 适应范围 (pH 6 - 10 范围内均有较高的催化活性, > 55%), 其最适反应 pH 为 7.6 (磷酸钠缓冲液)。且在 pH 稳定性实验中, 重组酶 XmPNP 在 pH 7 - 8 范围的磷酸盐缓冲液中保温 120 min 而几乎不损失活性。

2.5 重组酶 XmPNP 底物特异性

以催化肌苷反应时催化活性设定为酶活标准 (100%), 按照标准酶活测定方法测定重组酶 XmPNP 对不同底物的催化活性, 计算为相对活性后将结果汇总 (表 1)。实验结果说明重组酶 XmPNP 拥有广泛的底物特异性, 可以催化底物肌苷、鸟苷、

腺苷以及脱氧核苷的磷酸解反应,但不能以嘧啶类核苷为催化底物。经过活性对比得出肌苷为该酶最适的催化底物,催化活性最高,其次为鸟苷和腺苷,对脱氧鸟苷的催化活性则相对最低。

表 1 重组酶 XmPNP 底物特异性
Table 1 Substrate specificity of XmPNP

Substrate	Relative activity/%
Purine nucleoside	
Inosine	100
Guanosine	56.2 ± 1.4
Adenosine	45.4 ± 0.8
2'-Deoxyguanosine	4.2 ± 0.3
Pyrimidine nucleosides	
Uridine	no activity
Cytidine	no activity
Thymidine	no activity

3 讨论

嘌呤核苷磷酸化酶可催化底物核苷磷酸解反应,在酶法合成核苷类药物中具有重要价值,目前已被广泛应用于阿糖腺苷、双脱氧肌苷、利巴韦林等多种核苷类药物或中间体的合成,其中最成熟的工业应用为酶法合成利巴韦林。目前酶法合成所采用的嘌呤核苷磷酸化酶多为常温酶,对酶促反应温度要求较高(目前酶法转化温度普遍要求 60 - 70℃ 左右^[12-13]),因此该法能耗较高。若能够降低嘌呤核苷磷酸化酶最适反应温度的同时仍保证有较高的催化效率,就可以降低酶法对反应温度的要求,有效拓宽其应用范围。

对同样来源于嗜冷微生物的嘌呤核苷磷酸化酶编码基因进行序列对比发现,*Pseudoalteromonas* sp. XM2107 嘌呤核苷磷酸化酶氨基酸序列与 *Pseudoalteromonas* sp. Bsi590 的嘌呤核苷磷酸化酶氨基酸序列相似性较高(97.42%),共有 6 个氨基酸不同,与 *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 有 18 个编码氨基酸不同。氨基酸位点的不同会对酶的高级结构及催化性质产生影响,而哪些氨基酸位点的差异导致了酶的最适反应温度及热稳定性等关键性质的不同有待于进一步研究。酶学性质研究表明该酶最适酶促反应温度为 50℃,低于已报道的常温嘌呤核苷磷酸化酶 10 - 15℃,如应用于利巴韦林酶法合成的乙酰短杆菌嘌呤核苷磷酸化酶最适酶促反应温度为 65 - 70℃^[10]、大肠杆菌嘌呤核苷磷酸化酶为 65℃ 左右^[6]、枯草芽孢杆菌嘌呤核苷磷酸化酶为 65℃^[14]。在 35℃ - 40℃ 范围内,该酶比常温酶拥有更高的催化效率^[6-7]。热稳定性实验发现,

该酶在 40℃ 时仍拥有最高酶活的 83.19%,而文献报道大肠杆菌嘌呤核苷磷酸化酶在 40℃ 仅拥有其最高酶活的 55%^[6],枯草芽孢杆菌嘌呤核苷磷酸化酶在 40℃ 时拥有其最高酶活的 60%^[14],乙酰短杆菌嘌呤核苷磷酸化酶在 40℃ 时仅拥有其最高酶活的 35%^[10]。另外,该酶在 40℃ 及以下温度具有很好的热稳定性(40℃ 时仍保留了 96% 的相对活性)。在普通温度(35 - 40℃)下良好的催化活性以及热稳定性使得该酶适合于酶法合成核苷类药物,将有助于降低合成过程对催化温度的要求^[9,13],进而降低能耗成本、缩短反应时间和提高生产效率,因此具有较高的应用价值。

经过底物特异性验证得出,肌苷、鸟苷、腺苷、脱氧鸟苷等均可作为该酶的催化底物。较为广泛的底物特异性以及近中性的最适反应 pH(7.6)均说明该酶对反应催化条件要求较低,因此应用范围会更广泛。而该酶在常温条件下催化核苷类药物合成的研究工作目前正在进行中。

参考文献

- [1] Pugmire MJ, Ealick SE. Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. *Biochemical Journal*, 2002, 361: 1-25.
- [2] Shirae H, Kohayashi K, Dhriagami H, et al. Production of 2',3'-dideoxyuridine and the corresponding purine bases by resting cells of *Escherichia coli* AJ2595. *Applied and Environment Microbiology*, 1989, 55(2): 419-424.
- [3] Shirae H, Yodozeki K, Uchiyama M, et al. Enzymatic production of ribavirin from purine nucleosides by *Brevibacterium acetylum* ATCC954. *Agricultural Biology Chemistry*, 1998, 52(4): 1777-1783.
- [4] Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1997(53): 830-841.
- [5] Georlette D, Damien B, Blaise V, et al. Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic, and thermophilic DNA ligases. *Biological Chemistry*, 2003, 278: 37015-37023.
- [6] Li X, Jiang X, Li H, et al. Purine nucleoside phosphorylase from *Pseudoalteromonas* sp. Bsi590: molecular cloning, gene expression and characterization of the recombinant protein. *Extremophiles*, 2008, 12: 325-333.
- [7] Lorentzen MS, Moe E, Willassen NP, et al. Cold adapted features of *Vibrio Salmonicida* catalase: characterization and comparison to the mesophilic counterpart from *Proteus mirabilis*. *Extremophiles*, 2006, 10: 427-440.

- [8] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. 精编分子生物学实验指南. 马学军, 舒跃龙, 等译. 第四版. 北京: 科学出版社, 2005.
- [9] 武改红, 徐庆阳, 李爱涛, 等. 混合菌发酵法生产三氮唑核苷工艺条件的优化. 化工学报 (*Journal of Chemical Industry and Engineering (china)*), 2007, 58 (6): 1535-1540.
- [10] Shirae H, Yokozek K. Purification and Properties of Purine Nucleoside Phosphorylase from *Brevibacterium acetylicum* ATCC954. *Agricultural Biology Chemistry*, 1991, 55 (2): 493-499.
- [11] Bennet EM, Li C, Ealick SE, et al. Structural Basis for Substrate Specificity of *Escherichia coli* Purine Nucleoside Phosphorylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 47110-47118.
- [12] 周长林, 邱蔚然, 王欣荣, 等. 产核苷磷酸化酶大肠杆菌的培养及 2'-脱氧-5-氟尿苷的酶法合成. 华东理工大学学报 (*Journal of East China University of Science and Technology*), 1997, 23 (5): 530-534.
- [13] 邱蔚然, 唐洁宇, 董志雄, 等. 酶法合成三氮唑核苷新工艺的研究. 上海化工 (*Shanghai Chemical Industry*), 1997, 22 (3): 1-6.
- [14] 刘淑云, 赵希景, 谢希贤, 等. 枯草芽胞杆菌 TM903 嘌呤核苷磷酸化酶的纯化及酶学性质研究. 生物技术通讯 (*Letters In Biotechnology*), 2008, (193): 391-393.

Molecular cloning, gene expression and characterization of purine nucleoside phosphorylase from *Pseudoalteromonas* sp. XM2107

Guanglu Wang, Jungang Xia, Xixian Xie, Qingyang Xu, Ning Chen*

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Key Laboratory of Industrial Microbiology of Education Ministry, Tianjin 300457, China)

Abstract: [**Objective**] Purine nucleoside phosphorylase (PNP, EC 2.4.2.1) is an important enzyme which is applied in nucleoside medication and intermediate biosynthesis. In this paper, we aimed to obtain the PNP gene from cold-adapted marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. XM2107 and study the characteristics of enzyme for applying in nucleoside medication and intermediate biosynthesis. [**Methods**] Purine nucleoside phosphorylase gene which amplified from the cold-adapted marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. XM2107 genome by homology-based PCR cloning was cloned, sequenced and expressed at *E. coli* BL21 (DE3) by using expression vector pET-His. The recombinant purine nucleoside phosphorylase enzyme (XmPNP) was purified by metal chelate chromatography and its several characteristics were determined completely. [**Results**] Analysis of entire sequences of XmPNP revealed that the whole sequence is 702 bp and coded a peptide of 233 amino acids with a calculated molecular mass of 25 kDa. Compared with mesophilic counterparts, XmPNP showed a lower temperature optimum (50°C). The optimal pH for inosine phosphorolysis catalyzed by XmPNP was around 7.6 at sodium phosphate buffer. XmPNP showed the highest activity toward inosine (K_m value, 0.382 mmol/L, at 37°C) and the activity decreased in the order of guanosine and adenosine. Furthermore, XmPNP still expressed high catalytic activity and excellent thermal stability at ordinary temperature. [**Conclusion**] Both high catalytic activity and good thermal stability at ordinary temperature indicated that it will provide attractive candidate for prodrug activation and nucleoside medication biotransformation.

Keywords: *Pseudoalteromonas*; purine nucleoside phosphorylase; enzymatic properties

(本文责编:王晋芳)