

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(5):602-610; 4 May 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

一株假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*) L-1 菌株 γ -丁基甜菜碱羟化酶基因 *bbh* 的克隆、表达及酶学性质

卢向锋, 张鹏程, 李倩延, 刘辉, 林小清, 马晓航*

(浙江大学生命科学院微生物研究所, 杭州 310058)

摘要: 【目的】 γ -丁基甜菜碱羟化酶是生物体内合成 L-肉碱的关键酶。从假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*) L-1 中克隆 γ -丁基甜菜碱羟化酶基因, 实现其在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中的高效表达, 并对表达产物进行酶学性质分析, 为生物转化生产 L-肉碱奠定基础。【方法】通过 PCR 克隆 γ -丁基甜菜碱羟化酶基因, 并将其开放阅读框 (ORF) 克隆至融合表达载体 pET-15b; 表达产物经 His·Bind Resin 纯化后对 BBH 进行酶学性质及三维空间结构分析; 并以静止细胞进行 L-肉碱的转化。【结果】成功地克隆了一个 γ -丁基甜菜碱羟化酶基因 *bbh* (GenBank: JQ250036), 并实现了其在 *E. coli* 中的高效表达。融合蛋白以同源二聚体的形式存在, 单个亚基的分子量约 46.5 kDa, 最适反应温度为 30℃, 最适反应 pH 为 7.5。该酶在 45℃ 以下稳定。在 pH 6.0 时该酶有最高的 pH 稳定性。以表达 *bbh* 基因的重组大肠杆菌静止细胞转化 L-肉碱, L-肉碱产量可达 12.7 mmol/L。【结论】*Pseudomonas sp.* L-1 γ -丁基甜菜碱羟化酶与现有报道的 *bbh* 基因有较大的差异。由该基因表达的 γ -丁基甜菜碱羟化酶能有效地转化 γ -丁基甜菜碱生成 L-肉碱。本研究不仅丰富了 γ -丁基甜菜碱羟化酶基因资源, 而且为 L-肉碱的生物转化提供了一种新的转化方案。

关键词: 假单胞菌, γ -丁基甜菜碱羟化酶, *bbh*, 克隆, 表达

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 05-0602-09

L-肉碱 [L-(-)-Carnitine, 又称左旋肉碱、维生素 BT], 化学名称为 L- β -羟基- γ -三甲胺丁酸, 是一种基本的细胞成分, 主要功能是促进长链脂肪酸穿过线粒体内膜, 进行 β -氧化, 为细胞提供能量。此外在维持线粒体膜的稳定及氮代谢中起重要作用, 还能刺激支链氨基酸氧化, 具有抗细胞凋亡等生物效应^[1]。在临床上, L-肉碱及其衍生物可用于治疗心肌缺血引起的心脏疾病, 以及慢性肾功能衰竭、有机酸血症、慢性肝病等^[2]。在调节大脑能量代谢和神经突触信号传导中具有一定作用, 可延缓早老性

痴呆病症的发展^[3]。L-肉碱还可作为功能性食品添加剂, 用于食品、饮料和保健品, 增强人体营养供应及提高运动员体能, 还有一定的减肥功效。L-肉碱应用广泛, 市场需求大, 使得人们不断研究和提高 L-肉碱的生产工艺。

L-肉碱的生产主要有化学合成, 微生物发酵和微生物酶法转化等。其中工业合成 L-肉碱的经典方法是先合成 DL-肉碱, 然后将其拆分, 操作复杂、产率低、生产成本低。利用生物法生产 L-肉碱可降低生产成本, 减少环境污染以及能源消耗^[4]。目前

* 通信作者。Tel: +86-571-88206725; Fax: +86-571-88206725; E-mail: maxiaohong@zju.edu.cn

作者简介: 卢向锋 (1987-), 男, 浙江东阳人, 硕士研究生, 主要从事应用微生物研究。E-mail: 05swkxlf@sina.com

收稿日期: 2011-12-14; 修回日期: 2012-03-12

研究较多的微生物转化方法有多种,主要是利用微生物体内产生的一些脱氢酶及水合酶将相应的前体如 γ -丁基甜菜碱、巴豆甜菜碱和 D-肉碱等转化成 L-肉碱^[4]。但现有的微生物转化工艺也还存在一些缺陷:这些转化过程一般都需要有多步酶促反应。并且由于这些由脱氢酶及水合酶催化的反应大多是可逆的,因此产物的积累会抑制转化过程,使转化效率降低。

γ -丁基甜菜碱羟化酶 (BBH) 为 2-酮戊二酸依赖型加氧酶,该酶在有 2-酮戊二酸、 O_2 和 Fe^{2+} 存在的条件下可催化 γ -丁基甜菜碱 (γ -Butyrobetaine) 生成 L-肉碱^[5]。BBH 广泛存在于各种动物的体内。它们的主要功能是在体内转化 γ -丁基甜菜碱生成 L-肉碱,以提供机体代谢所需的 L-肉碱。由于该酶在脂肪代谢中的重要性,人们对动物及人类来源的 BBH 已经进行了深入的研究^[5-6]。近年来对微生物基因组大规模测序发现许多微生物染色体中也都携带有 BBH 基因序列。但迄今为止对微生物来源的 BBH 性能的具体研究相对较少。仅有的报道为 Lindstedt 等对 *Pseudomonas* sp. AK 1 菌株的 γ -丁基

甜菜碱羟化酶进行的纯化和性质研究^[7-8],和 Rüetschi 等对该酶进行的氨基酸序列测定^[9]。

由于 BBH 在动物体内本身的作用就是用于 L-肉碱的合成,而该酶所催化的 L-肉碱转化过程与现有的生物转化过程相比仅有一步催化反应,过程更为简单,且反应过程为氧分子参与的不可逆氧化过程,不存在产物的抑制作用。故整个 L-肉碱的转化更易于进行。因此利用微生物来源的 BBH 转化 γ -丁基甜菜碱生产 L-肉碱可能是一种更为合理和有前途的生产工艺。本研究对一株从土壤中分离得到的假单胞菌的 BBH 基因 *bbh* 进行了克隆,并在大肠杆菌中进行了重组表达,对重组酶的性质及其对 L-肉碱转化的可行性进行了初步研究,以为生物法生产 L-肉碱提供一种新的转化工艺。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:本实验所用菌株和质粒见表 1。

表 1 实验所用的菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this work

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG ϕ80dlacZΔM15Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(<i>r_k⁻ m_k⁺)</i> , λ-Stored in this Lab</i>	
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dem lon hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻)</i> λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-77 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Stored in this Lab
<i>Pseudomonas</i> sp. L-1	Wide type, isolated from soil	This Lab
Plasmids		
pMD19-T	T-vector, 2.7kb, Amp ^R , <i>lacZ</i>	TaKaRa Co.
pMD19-T-BBH	pMD19-T containing L-1 <i>bbh</i> gene	This Lab
pET-15b	bacterial expression vector carries an N-terminal His•Tag [®] , Amp ^R , IPTG induced	Novagen
pET-15b-BBH	pET-15b containing L-1 <i>bbh</i> gene	This Lab

1.1.2 主要试剂:所有分子生物学工具酶、DNA marker 以及标准蛋白 marker 均购自 TaKaRa 公司;乙醇脱氢酶购自 SIGMA 公司;牛血清白蛋白和卵清蛋白购自上海生工生物工程有限公司;其余生化试剂为分析纯试剂;基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒及胶回收试剂盒均购自 AXYGEN 公司;重组蛋白纯化采用 His•Bind Resin (MERCK) 树脂。

1.1.3 培养基和培养条件:①LB 培养基用于培养大肠杆菌;②重组蛋白表达采用 TB 培养基;③假单胞菌 L-1 的培养基:每升含 γ -丁基甜菜碱 10 g,酵母

膏 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, KH_2PO_4 3.9 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2 g, 微量元素液 (5.2% $ZnSO_4$, 5.0% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5.0% $CuSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% $MnSO_4 \cdot H_2O$) 10 mL, pH 6.0。如需制备固体培养基,斜面加 1.6% 的琼脂粉,平板加 2% 的琼脂粉。*E. coli* 在 37℃ 进行培养,假单胞菌 L-1 在 30℃ 进行培养。抗生素使用浓度:Amp(氨苄青霉素)为 100 mg/L。

1.2 DNA 操作

假单胞菌 L-1 基因组提取采用 AXYGEN 细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒。*E. coli* 质粒提取采用 AXYGEN 质粒小量制备试剂盒。*E. coli* 质粒转

化采用 $CaCl_2$ 法。

1.3 L-1 菌株 *bbh* 基因扩增及测序

首先用 OMIGA 2.0 软件对已知的 *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, *Pseudomonas mendocina* ymp 和 *Pseudomonas fluorescens* SBW25 四个菌株的 γ -丁基甜菜碱羟化酶基因进行序列比对。根据保守序列设计引物,以 L-1 菌株的基因组为模板,扩增得到 L-1 菌株的部分 *bbh* 基因序列。然后根据已知的部分序列,使用 DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit II 试剂盒对未知部分进行扩增,分别得到 *bbh* 已知序列的上下游两端序列,最终拼接得到 *bbh* 全序列。

引物 U-BBH-1 (5'-TGTGGCTGCGTGACAACCTG-3') 和 D-BBH-1 (5'-TAGCAGCCCTGAAAATGTCG-3') 是根据保守序列设计的引物,用于扩增部分 *bbh* 序列。PCR 反应体系 (50 μ L): ddH₂O 38 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 (含 Mg^{2+}) 5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 1.5 μ L, 引物各 2 μ L, 模板 1 μ L, *Taq* 酶 0.25 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

根据 *bbh* 部分序列,按 DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit II 试剂盒说明书的要求,设计以下引物用于扩增上游未知序列: BBH-U-TSP1 (5'-CTTGACTGCACGTTGAACA-3'), BBH-U-TSP2 (5'-TTGCTCTCGCAATGAAGGC-3'), BBH-U-TSP3 (5'-CGAGAGGCATCCTCATAGGCA-3'); 设计以下引物用于扩增下游未知序列: BBH-D-TSP1 (5'-GAGTCGCTTTGTGCGATGGC-3'), BBH-D-TSP2 (5'-CGTGAGTTTCGCAACAAGG-3'), BBH-D-TSP3 (5'-GAAATCCGCATGGCGAAGCTT-3')。按试剂盒说明书的操作方法进行上下游未知序列的扩增。

根据拼接得到的全序列,设计带有酶切位点的引物 U-EXP-BBH (5'-ACGCTCATATGTTGCCCGTG AACGCCA-3', 划线处为 *Nde* I 酶切位点) 和 D-EXP-BBH (5'-ATTAAGGATCCTCAGCGCTGCAACACC-3', 划线处为 *Bam*H I 酶切位点), 扩增完整的 *bbh* 序列,并将 PCR 产物克隆至 pMD19-T 载体中构成 pMD19-T-BBH,转化至 *E. coli* DH5 α 进行保存。PCR 反应体系: ddH₂O 35 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 (含 Mg^{2+}) 5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L, 引物各 2 μ L, 模板 2 μ L, *Pyrobest*® DNA Polymerase 高保真酶 0.25 μ L, 二甲基亚砷 (DMSO) 1.5 μ L。PCR 反应

程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 64.9 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

引物设计采用软件 Primer premier 5.0, 引物合成由 Invitrogen 公司完成。DNA 测序由上海生工生物工程有限公司完成。*bbh* 序列拼接采用 SeqMan 5.01 软件。

1.4 重组表达质粒的构建

以 pMD19-T-BBH 为模板,用引物 U-EXP-BBH 和 D-EXP-BBH 扩增带有酶切位点的 *bbh* 序列。用 *Nde* I 和 *Bam*H I 进行双酶切后与同样进行双酶切的 pET-15b 连接,构建成 BBH 和载体中 His-tag 融合表达的质粒 pET-15b-BBH,经 $CaCl_2$ 介导转化入 *E. coli* BL21 (DE3)。

1.5 γ -丁基甜菜碱羟化酶的诱导表达与纯化

将含有质粒 pET-15b-BBH 的 *E. coli* BL21 (DE3) 种子接种于含氨苄青霉素的 TB 培养基中,在 37 $^{\circ}$ C, 180 r/min 条件下培养 4.5 h,加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L),在 30 $^{\circ}$ C, 120 r/min 条件下诱导培养 18 h。离心收集菌体,用 25 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 悬浮菌体,并用超声波破碎机进行破壁,离心去除细胞壁等沉淀后,得到含 His-tag-BBH 的融合蛋白上清液。His-tag-BBH 融合蛋白经 His·Bind Resin 柱 (MERCK) 进行纯化,洗脱液用 15 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 透析,透析后用硫酸铵沉淀进行浓缩,最后将蛋白溶于 15 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 中,于 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

纯化后蛋白通过 SDS-PAGE 电泳以及分子筛层析检测蛋白的分子量。分子筛层析填料采用 sephadex G-200,层析柱规格为 2 cm \times 70 cm,平衡及洗脱缓冲液采用 25 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (NaCl 浓度为 0.1 mol/L, pH7.0),洗脱液流速为 2 mL/10 min。分子筛层析采用乙醇脱氢酶 (MW: 150 kDa)、牛血清白蛋白 (MW: 66.43 kDa) 及卵清蛋白 (MW: 44.287 kDa) 为标准蛋白,以洗脱体积为横坐标,lgMW 为纵坐标进行标准曲线的绘制。

1.6 γ -丁基甜菜碱羟化酶活性测定

γ -丁基甜菜碱羟化酶活性测定根据文献^[7]进行适当调整,反应体系含: 12.5 mmol/L K-PB (pH 7.0), 10 mmol/L γ -丁基甜菜碱 (对照组加入等体积蒸馏水), 3 mmol/L 2-酮戊二酸, 1.5 mmol/L 抗坏血酸, 0.08 mmol/L 硫酸亚铁, Catalase 98 U/mL, γ -丁基甜菜碱羟化酶 8-9 mU/mL。37 $^{\circ}$ C 水浴反应 1 h

后煮沸 3 min 停止 BBH 反应,稀释 5 倍作为样品进行肉碱含量测定。肉碱含量检测采用酶分光光度法根据文献^[10]进行适当调整,3 mL 反应体系含:50 mmol/L dPB (pH8.9),4 mmol/L β -NAD,1.5 mL 待测样品,肉碱脱氢酶 0.2 U。37℃ 水浴反应 1 h,测定 340 nm 处的吸光值。蛋白质的定量采用 Folin-苯酚法(Lowry 法),以牛血清白蛋白为标准。

一个酶活力单位(U)定义为:在反应体系中(pH7.0 的 K-PB 缓冲液,37℃),每分钟生成 1 μ mol 肉碱所需要的酶量。

1.7 温度和 pH 对 γ -丁基甜菜碱羟化酶活性的影响

在 20–60℃ 的温度范围内,每隔 5℃ 测定酶活力,以确定酶的最佳反应温度。将酶液在不同温度下处理 30 min,再测定其剩余酶活力,确定酶的热稳定性。在 pH4.0–11.0 的缓冲液中测定酶活力(其中 pH4.0–6.0 为 25 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液;pH6.0–8.0 为 25 mmol/L 磷酸钾缓冲液;pH8.0–9.5 为 12.5 mmol/L 硼砂-硼酸缓冲液;pH9.5–11.0 为 12.5 mmol/L 硼砂-NaOH 缓冲液),以确定酶的最佳反应 pH。在上述不同 pH 值的缓冲液中加入酶液,于 25℃ 保温 18 h,在 pH7.0 下测定剩余酶活力,确定酶的 pH 稳定范围。

1.8 多重比对及系统发育分析

反映 L-1 菌株 γ -丁基甜菜碱羟化酶 BBH 及相近 BBH 的系统发育关系树在 MEGA4.0.2 软件的辅助下构建;各数据的计算采用 P-distance 模型,并通过邻接法(Neighbor-joining)计算。各序列间的多重比较采用 MEGA4.0.2 整合的 Clustal W 程序进行。

1.9 三维结构预测

将氨基酸序列上传至 SWISS-MODEL^[11–13]进行自动比对和建模,结果用 Swiss-PdbViewer V4.0.4 进行分析。

1.10 重组大肠杆菌静止细胞与纯化的 BBH 分别转化生产 L-肉碱

将含有质粒 pET-15b-BBH 的 *E. coli* BL21 (DE3) 种子接种于含氨苄青霉素的 TB 培养基中(250 mL 摇瓶中装 50 mL 培养基),在 37℃,180 r/min 条件下培养 4.5 h,加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L),在 20℃,120r/min 条件下诱导培养 18h。离心收集菌体,用等体积的反应液(根据文献^[7]进行适当调整,含 1% 的 γ -丁基甜菜碱,1% 的

2-酮戊二酸和 0.5% 的吐温 80) 悬浮(100 mL 摇瓶中装 50 mL),在 30℃,120 r/min 条件下转化 L-肉碱,于不同时间取样,检测 L-肉碱含量。

采用纯化的 BBH 转化 L-肉碱时的条件与静止细胞转化时一致,加入的酶量与静止细胞所含酶量相当。

2 结果

2.1 L-1 菌株 *bbh* 基因的克隆

以 L-1 菌株的基因组 DNA 为模板,以 U-BBH-1 和 D-BBH-1 为引物,扩增得到一条约 1000 bp 的 *bbh* 片段。测序后,以该段序列作为已知片段,用 DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit II 试剂盒对未知部分进行扩增,分别得到 *bbh* 已知序列的上下游两端序列,最终拼接得到 *bbh* 全序列(GenBank 登录号:JQ250036)。该基因 ORF 全长 1161bp,编码 386 个氨基酸和一个终止密码子。

2.2 L-1 菌株 BBH 系统发育分析

L-1 菌株 γ -丁基甜菜碱羟化酶 BBH 和已报道的其他种属 BBH 氨基酸序列的系统发育分析表明,L-1 菌株 BBH 与多个假单胞菌属和伯克氏菌属的 γ -丁基甜菜碱羟化酶在系统发育上较为接近(图 1),与 *Burkholderia oklahomensis* EO147 和 *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 菌株的 BBH 氨基酸序列相似度最高,但相似度只达到 76% 和 75%。以上表明 L-1 菌株的 BBH 与已报道的其他来源的 γ -丁基甜菜碱羟化酶差异性较大。

2.3 BBH 三维结构预测

到目前为止,对 γ -丁基甜菜碱羟化酶结构研究很少。本次建模以人类 γ -丁基甜菜碱羟化酶^[5]的三维结构为模板,对 L-1 菌株的 BBH 进行三维结构预测,结果如图 2 所示,具有两个结构域:其中较大的为 C 端结构域(Leu132–Arg386),是主要的酶反应活性中心,包含底物结合位点及 Fe^{2+} 结合区域。较小的为功能未知的 N 端结构域(Ser16–Gln116)。

2.4 带有 L-1 菌株 *bbh* 基因的重组质粒 pET-15b-BBH 的构建及融合蛋白的诱导表达

为了研究 *bbh* 基因在大肠杆菌中的表达,按材料与方法中介绍的方式将 *bbh* 开放阅读框插入 pET-15b 载体中,构建了 pET-15b-BBH 表达质粒(图 3)。 γ -丁基甜菜碱羟化酶 *bbh* 和 His-tag 融合蛋

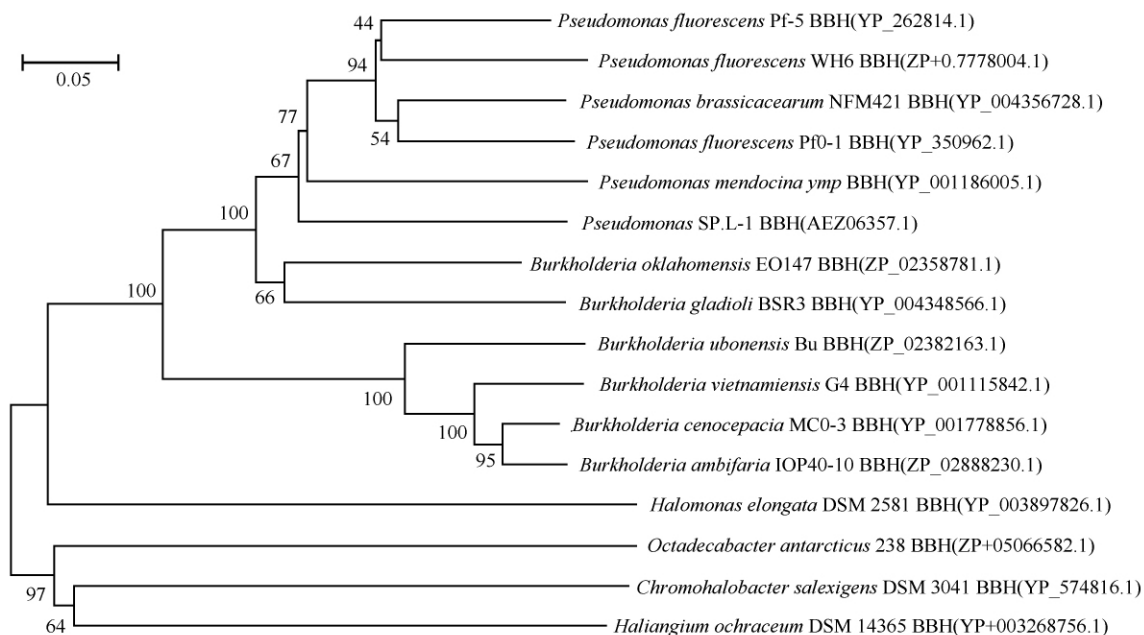


图1 以 L-1 菌株 γ -丁基甜菜碱羟化酶 BBH 的氨基酸序列进行系统发育分析

Fig. 1 Phylogeny analysis on amino acid sequence of *Pseudomonas sp.* L-1 BBH. The tree was constructed using the neighbor-joining method, with bootstrap values calculated from 1000 resampling. Accession numbers are shown in the parenthesis next to the corresponding species. The number at each branch point represents the percentage bootstrap support. Bar, 5 substitutions at any nucleotide position per 100 nucleotide positions.

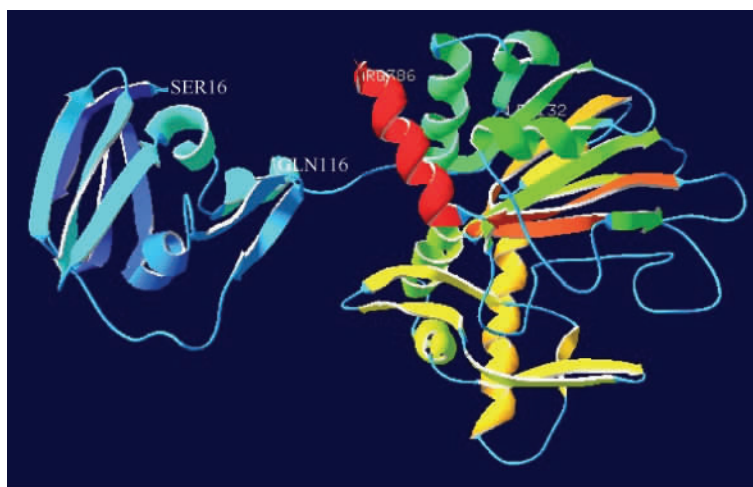


图2 通过 SWISS-MODEL Workspace 构建 BBH 单体三维结构模型

Fig. 2 Three-dimensional structure of BBH monomer modeled by SWISS-MODEL Workspace. The BBH monomer contains two domains: a double-strand β -helix catalytic domain (residues 132 – 386) and a smaller N-terminal domain (residues 16 – 116) of unknown function.

白经 IPTG 诱导后,表达产物经 His·Bind Resin 柱 (MERCK) 纯化,用硫酸铵沉淀浓缩后,通过 SDS-PAGE 检测单体的分子量(图4)。电泳结果与融合蛋白的理论分子量(46.5 kDa)相近,表明 pET-45b-

BBH 携带的 *bbh* 基因在大肠杆菌中实现了表达。细胞裂解的初始酶活约为 0.037U/mg,经 His·Bind Resin 柱纯化后酶活为 0.067U/mg,经硫酸铵浓缩沉淀后酶活为 0.115U/mg,酶活回收率约 9.22%。

有研究表明,许多不同来源的 γ -丁基甜菜碱羟化酶都是以二聚体的形式存在^[6-7,9]。为了确定 L-1 菌株来源的 BBH 是否为多聚体,采用分子筛层析法对纯化后的 BBH 进行分析。据图 5 所示,L-1 来源的 BBH 洗脱体积为 125.51 mL,据标准曲线换算可得其分子量约 83.19 kDa,与单体分子量相比较可知该酶以二聚体形式存在。

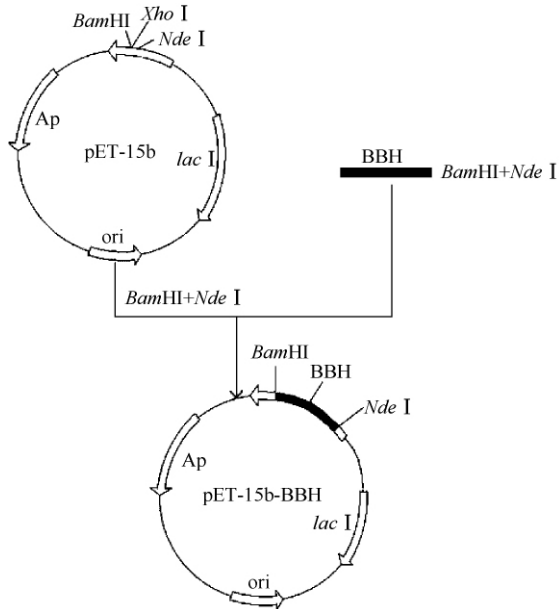


图 3 表达质粒 pET-15b-BBH 的构建

Fig. 3 Construction of expression vector pET-15b-BBH.

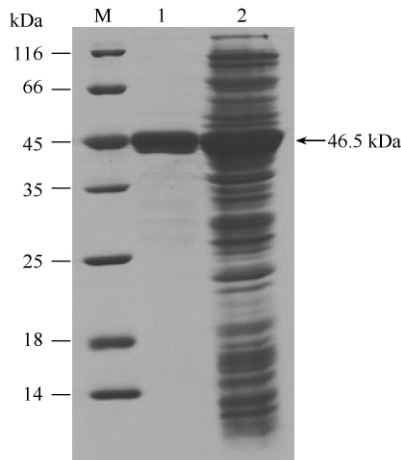


图 4 BBH 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析结果

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of BBH expressed in *E. coli*. M: Protein Marker; Lane 1: purified enzyme; Lane 2: crude extract.

2.5 温度对重组 γ -丁基甜菜碱羟化酶活性及稳定性的影响

本研究在 20°C - 60°C 的范围内测定了 γ -丁基

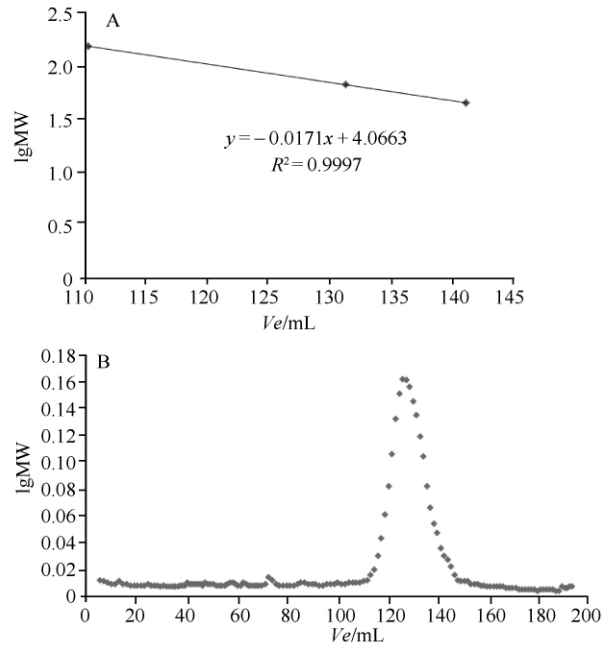


图 5 BBH 分子筛层析结果

Fig. 5 Gel filtration chromatography result of BBH. A: standard curve, from left to right was Alcohol Dehydrogenase (MW: 150 kDa), Bovine Serum Albumin (MW: 66.43 kDa) and Ovalbumin from Egg White (44.287 kDa); B: elution curve of BBH.

甜菜碱羟化酶的活性,结果见图 6-A, BBH 的最适反应温度为 30°C。热稳定性试验结果(图 6-B)显示,在 45°C 以下 BBH 的热稳定性较好。45°C 处理 30 min 后,剩余酶活为 79.9%,但在 50°C 处理 30 min 后,酶活下降到 29.5%。相比之下,Lindstedt 等研究发现,*Pseudomonas sp.* AK 1 菌株来源的 BBH 稳定性较差,在 -20°C 或 4°C 保存一周后酶活即下降 40% - 50%^[8]。

2.6 pH 对重组 γ -丁基甜菜碱羟化酶活性的影响

在不同 pH 值条件下, γ -丁基甜菜碱羟化酶的活性检测结果如图 7-A 所示。在 pH 5.5 - 8.0 的范围内, BBH 活性较高,其最适反应 pH 为 pH 7.5,与 *Pseudomonas sp.* AK 1 来源的 BBH 最适反应 pH (在 pH 7.0 - 7.2 之间) 相近^[7]。当 pH > 8.5 或 pH < 5 的情况下,酶活下降至较低水平。pH 稳定性试验结果(图 7-B)表明, BBH 在 pH 6.0 左右最稳定。从图 7-B 可以看出,总的来说 BBH 在碱性条件下相对较为稳定,当 pH < 5 时,酶活下降严重。

2.7 重组大肠杆菌静止细胞与纯化的 BBH 分别转化生产 L-肉碱

将含有质粒 pET-15b-BBH 的 *E. coli* BL21

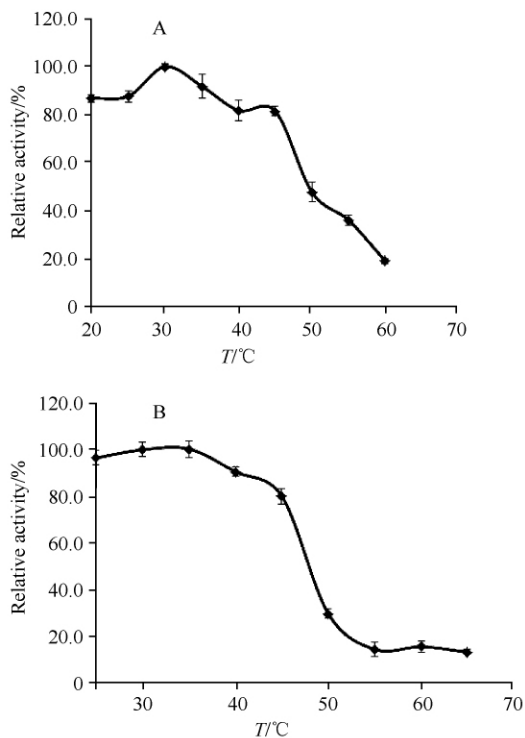


图6 温度对 BBH 催化活性 (A) 及稳定性 (B) 的影响

Fig. 6 The effect of temperature on the activity (A) and stability (B) of BBH.

(DE3) 进行培养和诱导表达,离心收集细胞,用静止细胞直接转化 L-肉碱,结果见图 8。随着转化时间延长,L-肉碱不断积累,在反应体系中转化 8h 后,L-肉碱浓度达到 5.4 mmol/L;在 31h 后 L-肉碱浓度接近最大值,为 12.7 mmol/L。而采用酶活相当的纯化后的 BBH 在相同条件下进行 L-肉碱转化时,情况有所不同。由图 8 可知,纯化的 BBH 可以更快的积累 L-肉碱,而且 L-肉碱的最终浓度也比静止细胞直接转化要高出一些,达到了 17.37 mmol/L。这可能是由于重组的大肠杆菌转运底物 γ -丁基甜菜碱的效率低下造成的。在不加入吐温 80 的情况下静止细胞无法催化底物生成 L 肉碱,这一现象表明重组的大肠杆菌没有转运底物的能力,只有在加入吐温 80 增加细胞壁通透性之后静止细胞才能转化生产 L-肉碱。

3 讨论

作为生物体内合成 L-肉碱的重要酶类, γ -丁基甜菜碱羟化酶已在多种生物体内分离得到,如

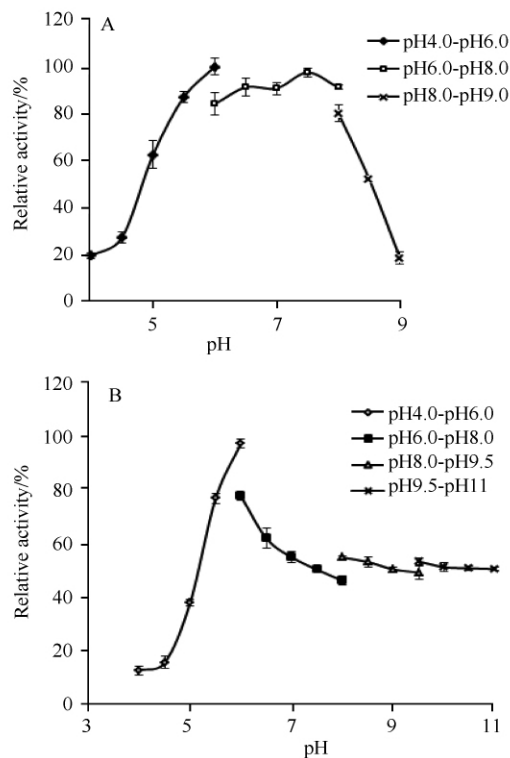


图7 不同 pH 对酶活力 (A) 及稳定性 (B) 的影响

Fig. 7 Effects of pH on the activity (A) and stability (B) of BBH. pH4.0 - 6.0: 25 mmol/L citrate buffer solution; pH6.0 - 8.0: 25 mmol/L phosphate buffer solution; pH8.0 - 9.5: 12.5 mmol/L broate buffer solution; pH9.5 - 11.0: 12.5 mmol/L borax-NaOH buffer solution.

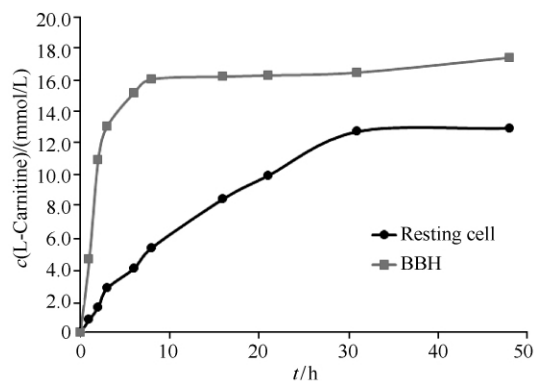


图8 静止细胞与 BBH 转化 L-肉碱

Fig. 8 L-carnitine production with resting cells and BBH. The resting *E. coli* BL21 (DE3) cells containing pET-15b-BBH were collected after induced by 1mmol/L IPTG. Biotransformation was performed aerobically at 30°C and pH 7.0.

Pseudomonas sp AK 1^[7],大鼠肝脏^[6]和人类肾脏^[9]等。这些不同来源的 γ -丁基甜菜碱羟化酶结构具有一定的相似性,且均以二聚体的形式存在。

Pseudomonas sp. AK 1 的 BBH 经沉降平衡离心法测得分子量为 95 kDa, N-端氨基酸测序结果表明存在两种不同的亚基^[8]。大鼠肝脏来源的 BBH 由两个分子量为 43 kDa 的亚基组成^[6]。人类肾脏来源的 BBH 存在三种形式的二聚体, α_2 、 $\alpha\beta$ 和 β_2 三种不同形式的二聚体, 亚基分子量为 42 kDa^[9]。本研究获得的 *bbh* 基因片段长 1161 bp, 编码一段 386 个氨基酸的多肽, 编码 BBH 的单个亚基。该酶经大肠杆菌重组表达后, 能够检测到 BBH 活性, 经 SDS-PAGE 和分子筛层析法分析表明, L-1 菌株的 BBH 以同源二聚体的形式存在。多重比对和系统发育分析结果表明, L-1 菌株的 BBH 氨基酸序列与已报道的 γ -丁基甜菜碱羟化酶氨基酸序列均不相同, 与多个假单胞菌属和伯克氏菌属的 γ -丁基甜菜碱羟化酶在系统发育上虽较为接近, 但也只有不到 76% 的相似性。

从图 7 中可发现, 在相同 pH 条件下缓冲液种类对 γ -丁基甜菜碱羟化酶的活性以及稳定性均有一定的影响, 这与之前的一些研究结果相符^[7-8]。本研究中, 采用柠檬酸盐缓冲液时, 相对酶活最高, pH 稳定性最佳。Lindstedt 等研究发现, *Pseudomonas* sp. AK 1 来源的 γ -丁基甜菜碱羟化酶在磷酸盐缓冲液中的稳定性优于 Tris-HCl 和 Tris-glycine 缓冲液中的稳定性^[8]。

本文以人类 γ -丁基甜菜碱羟化酶为模板, 通过 SWISS-MODEL Workspace 首次构建了微生物来源的 BBH 单体的三维结构模型。结果显示 BBH 单体具有一大一小两个结构域, 其中较大的为 C 端结构域, 是主要的酶反应活性中心, 较小的为功能未知的 N 端结构域。人类 γ -丁基甜菜碱羟化酶单体同样存在较小的 N 端结构域, 且具有 Zn^{2+} 结合位点。此外, 多种 2-酮戊二酸加氧酶具有额外的 C 端或 N 端结构域, 但功能各不相同^[5]。

本研究所得的重组大肠杆菌经诱导表达, 通过加入表面活性剂增加细胞壁通透性后, 能够在 2-酮戊二酸、 O_2 和 Fe^{2+} 存在的条件下将 γ -丁基甜菜碱直接转化为 L-肉碱, 使 L-肉碱最终浓度达到了 12.7 mmol/L, 该酶由于具有这一催化特性, 如果通过转化工艺的改进和发酵条件的优化, 将可被应用于工业化的 L-肉碱生物转化。Castellar 等, 利用一株重组大肠杆菌以巴豆甜菜碱和 D-肉碱为底物进行了 L-肉碱的生产研究^[14]。最终在优化后的条件

下, 采用高浓度静止细胞使 L-肉碱产率达到了 11.3 g/L/h。且静止细胞可以回收利用, 在重复利用 8 次后, L-肉碱产量仍维持在 50% 以上。本研究所得的重组大肠杆菌, 通过加入表面活性剂增加细胞壁通透性后, 能够将 γ -丁基甜菜碱直接转化为 L-肉碱, 相对于 Castellar 等采用的重组菌代谢更为简单, 如通过适当的条件优化, 有望达到较高的 L-肉碱产率。本研究不但丰富了 γ -丁基甜菜碱羟化酶基因资源, 而且为生物转化生产 L-肉碱提供了一种新的生产方案。

参考文献

- [1] 洪卫国. L-肉碱的生物学作用. 国外医学:生理、病理科学与临床分册 (*Foreign Medical Sciences: Pathophysiology and Clinical Medicine*), 1997, 17 (4): 356-359.
- [2] 梁彦辉, 玉莲. 肉碱的临床研究和应用. 医学综述 (*Medical Recapitulate*), 2004, 10(7): 443-445.
- [3] Inazu M, Matsumiya T. Physiological functions of carnitine and carnitine transporters in the central nervous system. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, 2008, 28 (3): 113-200.
- [4] Bernal V, Sevilla á, Cánovas M, Iborra JL. Production of L-carnitine by secondary metabolism of bacteria. *Microbial Cell Factories*, 2007, 6: 31.
- [5] Tars K, Rumnieks J, Zeltins A, Kazaks A, Kotelovica S, Leonciks A, Sharipo J, Viksna A, Kuka J, Liepinsh E, Dambrova M. Crystal structure of human gamma-butyrobetaine hydroxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 398: 634-639.
- [6] Galland S, Borgne LF, Guyonnet D, Clouet P, Demarquoy J. Purification and characterization of rat liver gamma-butyrobetaine hydroxylase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1998, 178: 163-168.
- [7] Lindstedt G, Lindstedt S, Toft M. γ -Butyrobetaine Hydroxylase from *Pseudomonas* sp AK 1. *Biochemistry*, 1970, 9(22): 4336-4342.
- [8] Lindstedt G, Lindstedt S, Nordin I. Purification and Properties of γ -Butyrobetaine Hydroxylase from *Pseudomonas* sp AK 1⁺. *Biochemistry*, 1977, 16(10): 2181-2188.
- [9] Rüetschi U, Nordin I, Odelhög B, Jörnvall H, Lindstedt S. γ -butyrobetaine Structural characterization of the *Pseudomonas* enzyme. *European journal of biochemistry/FEBS*, 1993, 213: 1075-1080.

- [10] Jiro A , Akifumi U , Hitoshi M , Nobuhiro M⁺. Biochemical Characterization of L-Carnitine Dehydrogenases from *Rhizobium* sp. and *Xanthomonas translucens*. *Bioscience , biotechnology , and biochemistry* , 2010 , 74 (6) : 1237-1242.
- [11] Arnold K , Bordoli L , Kopp J , Schwede T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics* , 2006 , 22: 195-201.
- [12] Schwede T , Kopp J , Guex N , Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* , 2003 , 31: 3381-3385.
- [13] Guex N , Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* , 1997 , 18: 2714-2723.
- [14] Castellar MR , Obon JM , Marin A , Canovas M , Iborra JL. L-(-)-carnitine production using a recombinant *Escherichia coli* strain. *Enzyme and Microbial Technology* , 2001 , 28: 785-791.

Cloning , expression and characterization of a Gamma-butyrobetaine hydroxylase gene *bbh* from *Pseudomonas* sp. L-1

Xiangfeng Lu , Pengcheng Zhang , Qianyan Li , Hui Liu , Xiaoqing Lin , Xiaohang Ma^{*}
Institute of Microbiology , College of Life Science , Zhejiang University , Hangzhou 310058 , China

Abstract: [Objective] Gamma-butyrobetaine hydroxylase is an enzyme that catalyzes the last step in the biosynthesis of L-carnitine. We cloned , expressed and characterized a gamma-butyrobetaine hydroxylase gene *bbh* from *Pseudomonas* sp. L-1 , to facilitate the production of L-carnitine using microorganisms. [Methods] We cloned *bbh* gene by PCR , and then cloned the open reading frame of *bbh* into pET-15b vector and expressed by Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induction. After His-Bind Resin purification , the characteristics of BBH were studied. The three-dimensional structure of BBH monomer was modeled by SWISS-MODEL Workspace and resting cells were used for L-carnitine transformation. [Results] We cloned a gamma-butyrobetaine hydroxylase gene *bbh* (GenBank: JQ250036) from *Pseudomonas* sp. L-1 and expressed the gene in *Escherichia coli* BL21 (DE3) . BBH fusion protein was a homodimer , and the molecular weight of subunit was about 46.5 kDa. The optimal temperature and pH was 30 $^{\circ}$ C and pH 7.5. The enzyme was stable below 45 $^{\circ}$ C. The enzyme was most stable at pH 6.0. We used resting cells of recombinant *E. coli* for L-carnitine biotransformation , after incubated at 30 $^{\circ}$ C and pH 7.0 for 31 h , the concentration of L-carnitine reached 12.7 mmol/L. [Conclusion] The *bbh* gene from *Pseudomonas* sp. L-1 strain is remarkably different from that of reported one. The gamma-butyrobetaine hydroxylase expressed by this gene could effectively transform γ -butyrobetaine for L-carnitine production. Beside by reporting of a *bbh* gene from bacteria , this research also provided a new process for biotransformation of L-carnitine.

Keywords: *Pseudomonas* sp. , gamma-butyrobetaine hydroxylase , *bbh* , cloning , expression

(本文责编: 张晓丽)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-571-88206725; Fax: +86-571-88206725; E-mail: maxiaohong@zju.edu.cn

Received: 14 December 2011 / Revised: 12 March 2012