



## 一种高 R-选择性水解 *R,S*-甲霜灵的酯酶基因的克隆表达及表征

张朝晖<sup>1\*</sup>, 彭康<sup>1</sup>, 卢亚南<sup>2</sup>, 陆跃乐<sup>1</sup>

<sup>1</sup>浙江工业大学生物工程学院, 浙江 杭州 310014

<sup>2</sup>上海艾跃生物科技有限公司, 上海 201100

**摘要:**【目的】将一种可以高选择性水解 *R*-甲霜灵的新酯酶基因, 在大肠杆菌中进行克隆和表达, 并研究重组酯酶的性质。【方法】根据已知的目标酯酶 N 端 10 个氨基酸序列, 在已测序的 *Albibacters sp. zjut528* 基因组中找到相匹配的一个酯酶基因, 它全长 969 bp, 编码 322 个氨基酸, 将该基因命名为 *RMest*。通过引物扩增得到该基因的 DNA 片段, 将它与表达载体 pET-28a(+)连接后, 转化大肠杆菌 BL21Gold(DE3), 构建重组菌, IPTG 诱导表达该酯酶, 并用 Ni<sup>2+</sup>亲和和层析介质进行纯化。【结果】在重组菌 *RMest*-pET-28a(+)-*E. coli* BL21 Gold (DE3)中成功表达了重组酯酶 *RMesterase*, 大小约为 46 kDa。用胞内重组酶液催化水解 *R,S*-甲霜灵, 底物浓度 10 g/L, 反应 6 h, 底物转化率为 49.8%, 产物(甲霜灵酸)的 *ee<sub>p</sub>* 为 99.3%, 对底物的对映体 *R*-构型具有专一(选择性)。该酶最适温度和 pH 分别为 40 °C 和 pH 9.0。该酶的活性受到产物甲醇的抑制。通过 Blast+在 Uniprot KB 数据库中搜寻与酯酶 *RMest* 同源的蛋白, 采用邻近法构建该酶的蛋白系统发育树, 结果显示它与某些 Lysophospholipase、AB hydrolase-1 domain-containing protein 和 Esterase 的同源性最高, 但是与它们均存在较大的进化距离, 表明该酶是一种相对独立进化的新酯酶。【结论】在大肠杆菌中成功克隆和表达了一种新的酯酶基因 *RMest*, 重组酯酶 *RMesterase* 可以高手性选择性水解 *R,S*-甲霜灵生成 *R*-甲霜灵酸。

**关键词:** *R,S*-甲霜灵, 对映体选择性水解, 酯酶基因, 克隆和表达, *Albibacters sp. zjut528*

甲霜灵[N-(2,6-二甲基苯基)-N-(2-甲氧基乙酰)丙氨酸甲酯]是一种重要的乙酰苯胺类杀菌剂, 它对病原真菌中的卵菌纲(*Oomycetes*)病菌有特殊的杀灭能力。对由卵菌引起的霜霉病、疫霉病、白锈病等均有很好的防治作用<sup>[1]</sup>。甲霜灵含

有一个手性 C 原子, 有两个对映体, 其抗真菌活性主要来源于 *R*-对映体<sup>[2]</sup>。*R*-和 *S*-对映体具有相同的作用方式, 但它们在达到受体或与受体结合方面表现出相当大的差异。生物体外试验显示 *R*-对映体的活性大约是 *S*-对映体的 1000 倍, 在

基金项目: 国家自然科学基金(31601390)

\*通信作者。Tel: +86-576-88320571; E-mail: zzh@zjut.edu.cn

收稿日期: 2020-02-26; 修回日期: 2020-05-26

体内 *R*-对映体仍然是 *S*-对映体的 3–10 倍<sup>[3]</sup>。目前市售的甲霜灵产品有普通甲霜灵(外消旋体)和精甲霜灵(*R* 体为主)两种。光学纯产品取代外消旋产品不仅可以提高单位药效,而且减少了非活性异构体对非靶标生物以及土壤的潜在副作用,因此预料未来精甲霜灵将逐渐取代普通甲霜灵成为市场的主流产品。

现阶段精甲霜灵(*R*-甲霜灵为主)生产方法主要是以手性原料作前体的化学合成法<sup>[4]</sup>。利用生物催化剂进行生物拆分生产 *R*-甲霜灵已有一些报道,采用的生物催化剂主要是脂肪酶<sup>[5–11]</sup>或含有脂肪酶的微生物细胞<sup>[12]</sup>,但它们拆分的底物都是生产普通甲霜灵的中间体 *R*, *S*-*N*-(2, 6-二甲基苯基)丙氨酸甲酯(*R*, *S*-MAP),而 *R*-MAP 还需一步反应才能生成 *R*-甲霜灵,这步反应会降低精甲霜灵产品的手性纯度。本文作者近期报道了一株直接水解拆分 *R*, *S*-甲霜灵生产 *R*-甲霜灵的菌株 *Albibacters* sp. zjut528<sup>[13]</sup>,它的手性选择性极高。利用该菌株细胞作催化剂直接拆分 *R*, *S*-甲霜灵,可以生产手性纯度极高的精甲霜灵产品。同时,通过盐析、离子交换层析和凝胶过滤层析从 *Albibacters* sp. zjut528 菌株的胞内液中得到了纯化的目标酯酶蛋白,并测得 N 端的 10 个氨基酸序列为 NH<sub>2</sub>-Ala-Ala-Lys-Ala-Pro-Leu-Arg-Leu-Lys-Glu。

本研究将从菌株 *Albibacters* sp. zjut528 的基因组中找出目标酯酶的基因序列,然后将该基因在大肠杆菌中进行克隆表达,研究重组酶的性质和酶基因的蛋白进化关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂:** 普通甲霜灵(*R*, *S*-甲霜灵)由某厂赠

送,其他化学试剂均为国药分析纯。限制性内切酶 *Xho* I、*Bam*H I、DNA Marker DL5000、DNA Marker DL10000 购于 TaKaRa 公司;基因组抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒 DNA 少量抽提试剂盒购于 Axyprep 公司。

**1.1.2 培养基:** 种子培养基和发酵摇瓶培养基,参见文献[13]。

### 1.2 甲霜灵的分析方法

采用高效液相色谱(HPLC)<sup>[13]</sup>。

### 1.3 酯酶基因的扩增和重组菌的构建

以 *Albibacters* sp. zjut528 的基因组 DNA 为模板,扩增酯酶基因的引物为: RMest-F (5'-CGGGA TCCACGCCGATAGAGGGTCAAAG-3', *Bam*H I) 和 RMest-R (5'-CCGCTCGAGCGTTTATAGCCTGCCAC-3', *Xho* I)。PCR 扩增: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s; 65 °C 20 s; 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增的条带和 pET-28a(+)用限制性内切酶进行酶切,并用 T4 连接酶连接,转化 *E. coli* BL21Gold(DE3),构建的重组菌命名为 RMest-pET-28a(+)-*E. coli* BL21 Gold(DE3)。挑单菌落,提取质粒,进行质粒 PCR 验证和 DNA 序列测序。

### 1.4 酯酶基因 RMest 的表达和 SDS-PAGE 分析

将重组菌在含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中,37 °C 培养至菌液 OD<sub>600</sub> 约为 0.5–0.8,分别标记为诱导组和非诱导组。在空载体(宿主菌)组和诱导组中添加 IPTG 至终浓度为 0.6 mmol/L,25 °C、180 r/min 诱导培养 10 h。未诱导组和诱导组菌液,4 °C、8000 r/min 离心 10 min 后弃上清液,细胞悬浮于 100 mmol/L 的 pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液中,4 °C 下高压匀浆破碎,12000 r/min 离心 20 min 取上清液(粗酶液),进行 SDS-PAGE 分析。

## 1.5 重组蛋白的纯化

使用 10 倍体积的缓冲液(50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 8.0, 0.3 mol/L NaCl, 10 mmol/L imidazole) 与  $\text{Ni}^{2+}$ 亲和层析介质平衡, 取适当粗酶液与亲和层析介质结合 30 min, 用 2 倍体积的清洗缓冲液(50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 8.0, 0.3 mol/L NaCl, 50 mmol/L imidazole)清洗 3 次, 再用 2 倍体积的洗脱缓冲液(50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 8.0, 0.3 mol/L NaCl, 200 mmol/L imidazole)洗脱, 重复 3 次。收集洗脱样品, 进行 SDS-PAGE 分析。将含目的蛋白的样品用透析缓冲液(25 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 8.0, 0.5 mmol/L NaCl, 10 mmol/L imidazole) 4 °C 过夜透析除去咪唑后, 贮存在 -20 °C。

## 1.6 重组酶 RMesterase 的酶学性质

**1.6.1 酶的立体选择性:** 取 2 mL 重组菌胞内粗酶液, 0.2 g *R, S*-甲霜灵为底物, 一定量的磷酸缓冲液(100 mmol/L, pH 8.0), 总反应体系为 20 mL, 37 °C、180 r/min 摇床中反应 10、30 min 和 2、6、12 h, 取样分析底物消耗和产物生成。

**1.6.2 温度和 pH 对酶的活性和稳定性的影响:** 取适量纯化酶液(pH 8.0)分别在 20、30、40、50、60 °C 下测定酶活, 测定方法见 1.6.1; 另将酶液分别放在上述不同温度的水浴中保温 4 h, 测定残存酶活考察温度稳定性。37 °C 下, 将酶液在 100 mmol/L 不同的 pH 缓冲液中 (pH 4.0、5.0、6.0 为柠檬酸钠缓冲液, pH 7.0、8.0、9.0 为巴比妥钠-HCl 缓冲液, pH 10.0 为  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液) 测定酶活。另外, 将酶液在上述不同 pH 条件下, 4 °C 下保温 48 h, 测定剩余酶活考察 pH 稳定性。

**1.6.3 酶反应动力学测定:** 方法参见文献[13]。

**1.6.4 甲醇浓度对酶活的影响:** 取适量纯化酶液

分别在浓度为 0、10、25、50、100 mmol/L 甲醇浓度下测定酶活, 测定方法见 1.6.1。

## 2 结果和分析

### 2.1 在 *Albibacters sp. zjut528* 菌株基因组中寻找目标酯酶基因

本文作者曾报道<sup>[13]</sup>, 通过盐析、离子交换层析和凝胶过滤层析从 *Albibacters sp. zjut528* 菌株的胞内液中得到了纯化的目标酯酶蛋白, 并测得 N 端的 10 个氨基酸序列为  $\text{NH}_2$ -Ala-Ala-Lys-Ala-Pro-Leu-Arg-Leu-Lys-Glu。作者另将菌株的基因组 DNA 送交某生物公司测序, 虽然未得到基因组完成图, 但得到基因组框架图(包括 198 个长度不等的核苷酸序列片段)。从其中一个核苷酸序列片段中找到了和 N 端 10 个氨基酸序列完全一致的核苷酸序列(仅此一处), 从而找到了相应的酶基因序列。该基因以 GCT(氨基酸 A)开始, 终止于 TAG, 全长 969 bp, 编码 322 个氨基酸, 推测该基因即目标酯酶基因, 将其命名为 *RMest*, 并将该基因在 *Albibacters sp. zjut528* 中表达的酶蛋白表示为 *RMest*。

### 2.2 目标酯酶基因 *RMest* 的克隆和表达

以 *Albibacters sp. zjut528* 菌株的基因组 DNA 为模板, 根据酯酶基因 *RMest* 上下游适当位置的核苷酸序列设计引物, 进行 PCR 扩增, 扩增后琼脂糖凝胶电泳检测, 如图 1, 可以看出, 1000–1500 bp 有一个明显条带, 无非特异性条带, 与预期大小相符合。使用胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段, 将该片段与 pET-28a(+)经双酶切、T4 连接酶连接后得到重组质粒, 然后转化到 *E. coli* BL21 Gold(DE3), 获得重组菌 *RMest*-pET-28a(+)-*E. coli*

BL21 Gold(DE3)。随机挑取平板上的两个单菌落，LB 液体培养基(含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素)过夜富集培养。提取重组质粒，进行质粒 PCR 验证(图 2)。将重组质粒送样测序，测序结果表明，重组大肠杆菌构建成功。

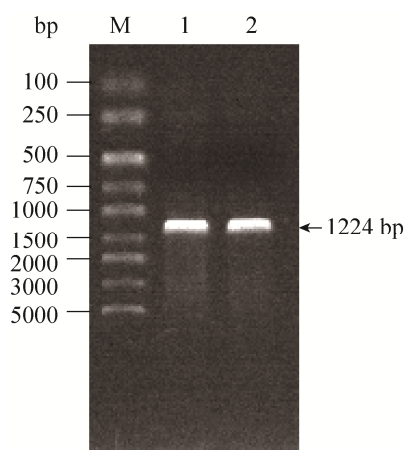


图 1. PCR 扩增的基因 *RMest* 的 DNA 片段琼脂糖电泳图

Figure 1. Agarose electrophoresis of gene *RMest*'s DNA segment amplified by PCR.

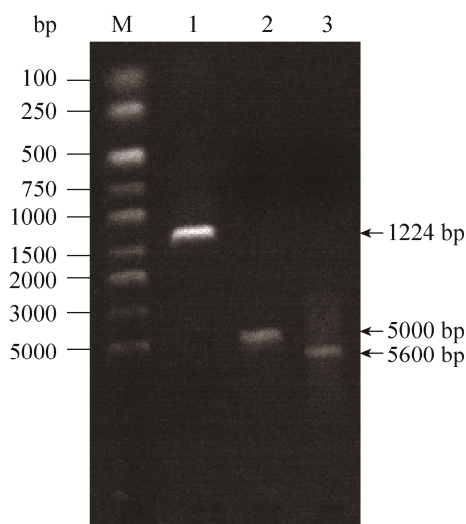


图 2. 重组质粒的 PCR 验证

Figure 2. PCR verification of recombinant plasmid. M: marker; lane 1: amplified *RMest* DNA segment; lane 2: pET-28a(+) empty plasmid; lane 3: *RMest*-pET-28a(+).

分别取宿主菌(含空载体)、未诱导和诱导的重组菌胞内液(发酵液离心获菌体，超声破碎后，离心取上清液)进行 SDS-PAGE 分析，如图 3 可知，经 IPTG 诱导，重组大肠杆菌有目的蛋白表达，大小约为 46 kDa，与预期相符，表明酯酶基因 *RMest* 在大肠杆菌 *RMest*-pET-28a(+)-*E. coli* BL21 Gold(DE3) 成功异源表达。

### 2.3 重组蛋白的纯化

用  $\text{Ni}^{2+}$  亲和层析介质纯化重组蛋白。选用 200 mmol/L 的咪唑洗脱目的蛋白，从图 4 可以看出，纯化后目的蛋白的纯度大幅提高(泳道 2)。在第一次洗脱过程中，已经将大部分的蛋白洗脱下来(泳道 2)。第二次和第三次洗脱下来的蛋白几乎没有了(泳道 3 和 4)。

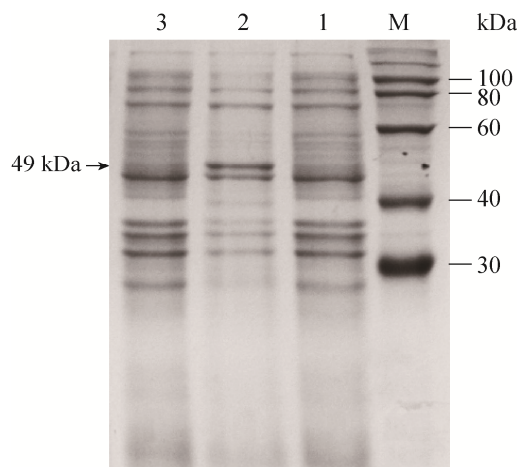


图 3. 重组菌 *RMest*-pET-28a(+)-*E. coli* BL21 Gold(DE3) 表达产物的 SDS-PAGE 图

Figure 3. SDS-PAGE analysis of expression product of recombinant strain *RMest*-pET-28a(+)-*E. coli* BL21 Gold (DE3). M: marker; lane 1: without IPTG induction; lane 2: with IPTG induction; lane 3: host strain with empty plasmid.

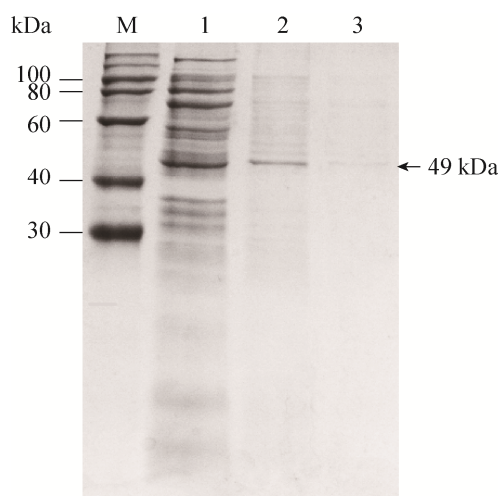


图4. 用 $\text{Ni}^{2+}$ 亲和层析介质纯化重组蛋白的SDS-PAGE图  
Figure 4. SDS-PAGE analysis of recombinant protein's purification by affinity adsorption with  $\text{Ni}^{2+}$  resin. M: marker; lane 1: supernatant after adsorption; lane 2: 200 mmol/L imidazole first eluate; lane 3: 200 mmol/L imidazole second eluate; lane 4: 200 mmol/L imidazole third eluate.

## 2.4 重组酯酶 RMesterase 的酶学性质

**2.4.1 酶的立体选择性:** 将重组菌破壁, 离心取上清酶液, 用获得的粗酶液催化水解 *R, S*-甲霜灵, 底物终浓度为 10 g/L (35.8 mmol/L)。若甲霜灵水解, 产物是甲霜灵酸和甲醇。在反应初始(如图 5-A), *S*-甲霜灵和 *R*-甲霜灵各占一半, 保留时间分别在 11 min 和 35.7 min。反应 6 h (如图 5-B), *R*-甲霜灵的峰完全消失, 底物的转化率达到 49.8%; 而产物仅为 *R*-甲霜灵酸(16.9 min), 产物的  $ee_p$  值为 99.3%, 表明酶的对映体选择性为严格 *R* 型。当反应再进行 6 h (总时间到 12 h), 如图 5-C 所示, 在 10.07 min 出现了一个较小的 *S*-甲霜灵酸的产物峰, 相应地, *S*-甲霜灵的峰(11 min)有所下降。这时底物的转化率达到 56.5%, 产物的  $ee_p$  值降到 82.9%。因此, 对该酯酶来说, 只有当 *R* 型底物降解完之后, 才会缓慢降解 *S* 型底物。

**2.4.2 温度和 pH 对酶活性及稳定性的影响:** 取适量纯化重组酶液, 分别测定不同温度下的酶活, 以最高酶活为 100%, 结果如图 6。该酯酶在 40 °C 时酶活最高, 在 60 °C 时几乎完全失活。将酶在不同温度下保温 4 h 后, 20–40 °C 下剩余酶活仍保留 85%以上(图 6-A、6-B), 50 °C 下剩余酶活迅速下降, 60 °C 已经很难检测到活性, 表明该酶在 50 °C 及以上不稳定。

分别测定不同 pH 下的酶活, 以最高酶活为 100%, 如图 7-A 所示, 酶在 pH 为 9.0 时酶活最高, pH 为 10.0 时仍有 80%以上的酶活; 随着酸性的增加该酶酶活迅速下降, 在 pH 为 4.0 时, 只有最大活性的 8%。pH 稳定性研究表明, 该酶在 4 °C、pH 5.0–10.0 下保温 48 h, 剩余酶活仍保留 90%以上(图 7-B), 而在 pH 4.0 下, 剩余酶活只为初始的 40%, 表明该酶在 pH 4.0 及以下不稳定。

**2.4.3 甲醇浓度对酶活性的影响:** 甲醇是甲霜灵水解的产物之一。取适量纯化重组酶液分别在 0、10、25、50、100 mmol/L 的甲醇浓度下测定酶活, 结果如图 8。图中显示甲醇浓度在 0–25 mmol/L 时, 随着甲醇浓度的升高, 酶活迅速降低, 当甲醇浓度为 25 mmol/L 时酶活只有无甲醇时的约 20%, 但高于 25 mmol/L 时, 甲醇对酶活的抑制不再随浓度的升高而增加。上述结果表明, 甲霜灵的酶水解存在较严重的产物(甲醇)抑制。该性质将对酶催化水解拆分 *R, S*-甲霜灵生产 *R*-甲霜灵造成不利影响。

**2.4.4 重组酶的酶反应动力学:** 用纯化的重组酶测定了不同甲霜灵浓度下的酶反应速度, 结果见图 9, 反应速率和底物浓度的关系符合米氏方程。

再用 Lineweaver-Burk 双倒数作图(见图 9 小图), 求得  $V_{\max}=0.114 \text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ ,  $K_m=2.04 \text{ mmol}/\text{L}$ 。测

定时反应体系中酶(蛋白)浓度  $[E]=0.156\times 10^{-3} \text{ mol}/\text{L}$ , 由  $k_{\text{cat}}=V_m/[E]$ , 得  $k_{\text{cat}}=0.73 \text{ min}^{-1}$ 。

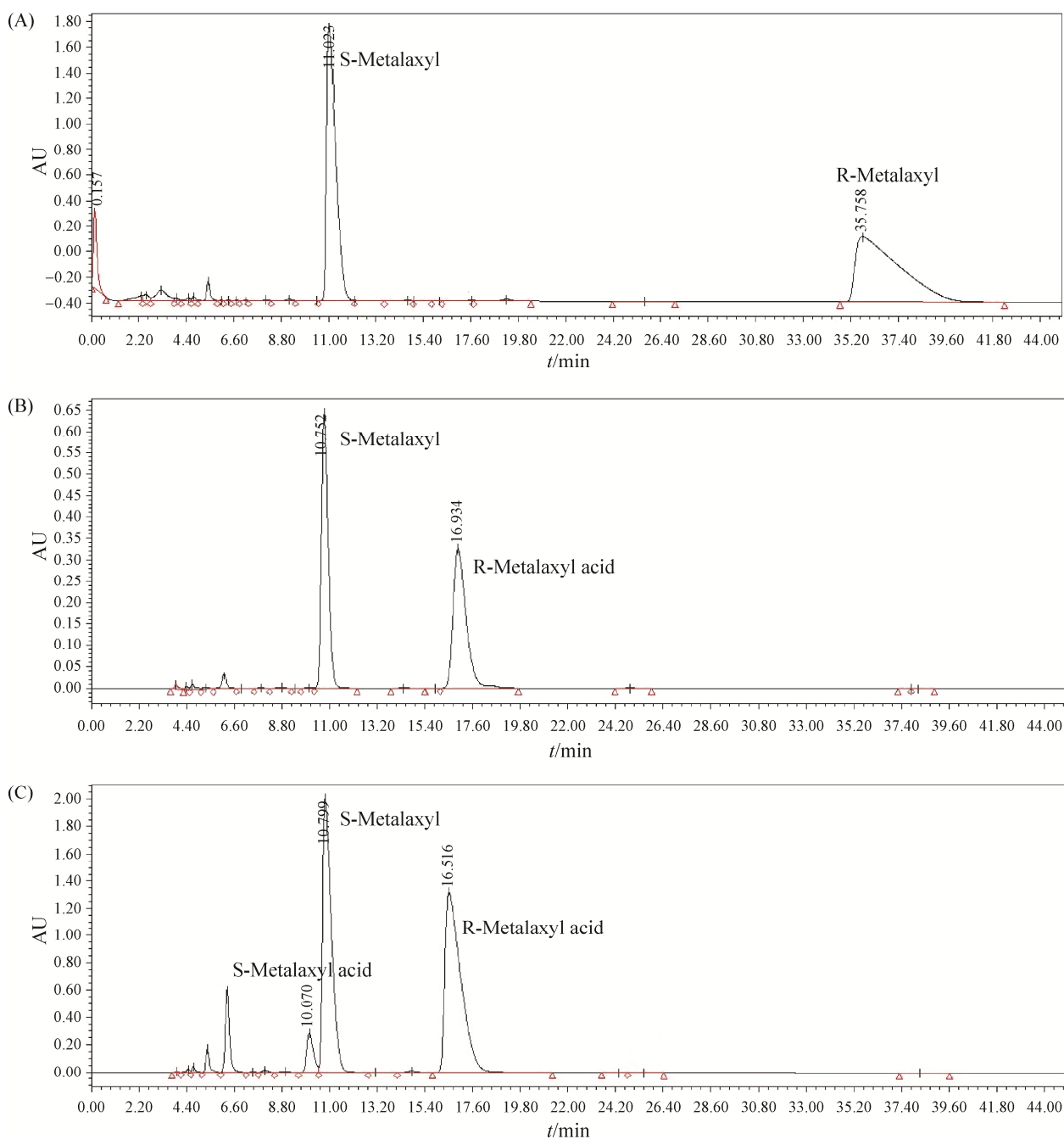


图 5. HPLC 分析重组酯酶粗酶液催化水解 *R,S*-甲霜灵的过程

Figure 5. Process of enantioselective hydrolysis of *R,S*-metaxyl catalyzed by crude recombinant RMesterase. A: reaction 0 h; B: reaction 6 h; C: reaction 12 h.

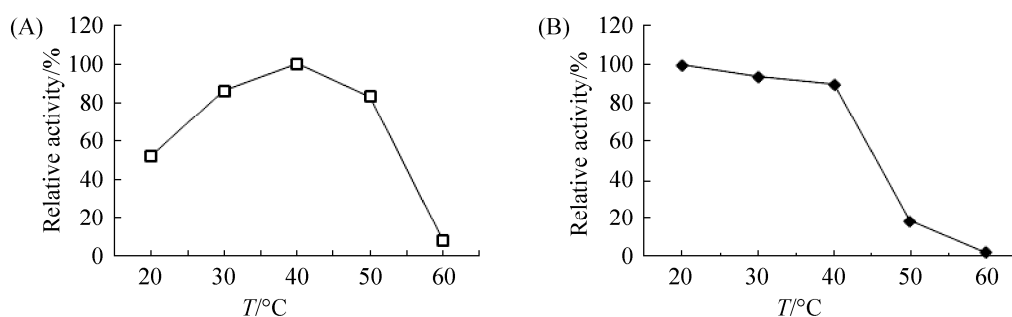


图 6. 温度对重组酯酶活性(A)及稳定性(B)的影响

Figure 6. Effect of temperature on RMesterase activity (A) and stability (B). A: The maximum activity was defined as 100% level. B: The initial activity was defined as 100% level.

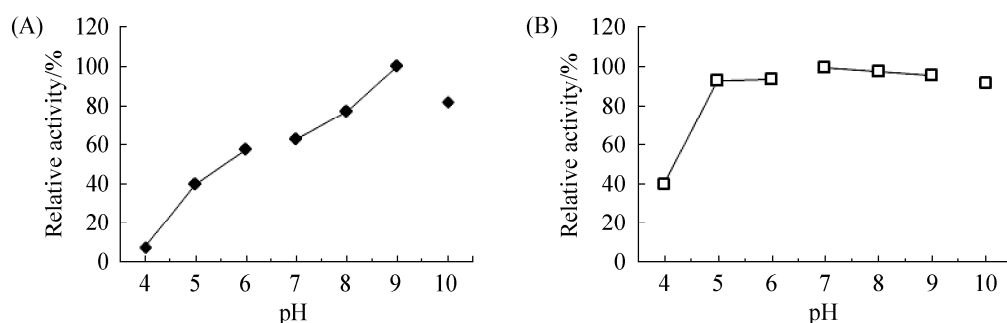


图 7. pH 对重组酯酶活性(A)及稳定性(B)的影响

Figure 7. Effect of pH on RMesterase activity (A) and stability (B). A: The maximum activity was defined as 100% level. B: The initial activity was defined as 100% level.

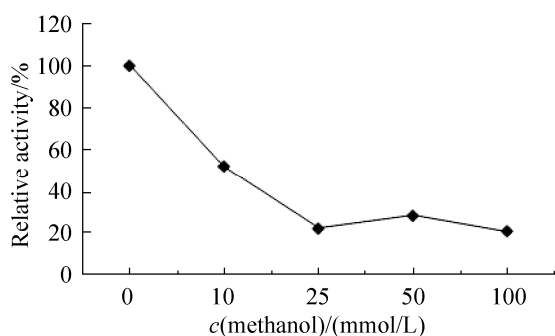


图 8. 甲醇浓度对重组酶催化 *R, S*-甲霜灵的水解活性的影响

Figure 8. Effect of methanol on activity of RMesterase catalyzing hydrolysis of *R, S*-metalaxyl.

## 2.5 酯酶 RMest 与其他蛋白的序列比对

### 2.5.1 酯酶 RMest 与数据库中其他蛋白的氨基酸序列比对及进化树的构建: 在 EBI 网站采用 Blast+

对酯酶 *RMest* 进行氨基酸序列比对, 选择的数据库是 Uniprot KB (include UnitProt KB/Swiss-Prot and uniProt KB/TrEMBL), 其他参数为缺省值。在返回的前 50 个最匹配的条目中, 去掉“uncharaterized protein”的条目, 剩下 23 个条目。表 1 中列出了这 23 个条目中的前 3 个和最后一个。从表中可知, 与 *RMest* 同源性最高的蛋白是来自 *Hyphomicrobium* sp. 的 AB hydrolase-1 domain-containing protein (AB 指 Alpha/Beta), *E* 值为  $2.4E-69$ , 序列一致性 40.2%, 相似性 57.3%。表中第 23 个匹配蛋白是来自 *Ramlibacter* sp. WS9 的 Lysophospholipase, *E* 值是  $3.8E-51$ , 序列一致性 36.9%, 相似性 52.7%。而 *E* 值  $<0.01$  就能用来可靠地推断同源性。

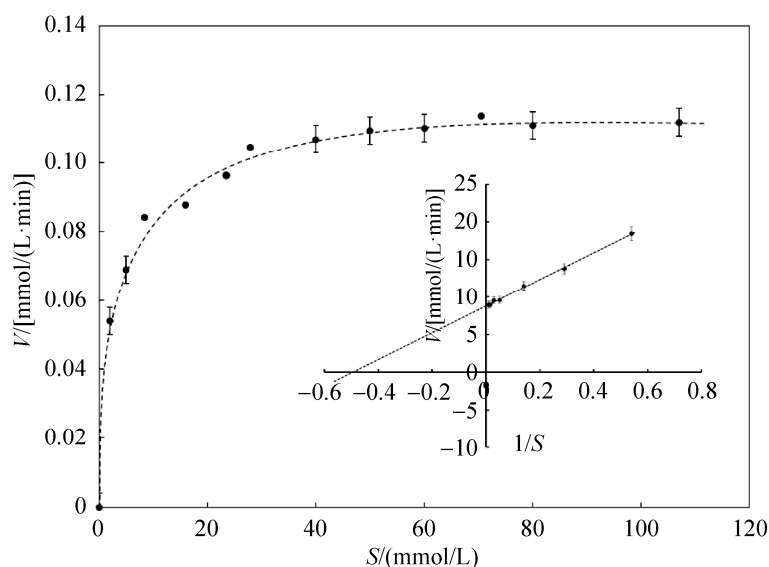


图 9. 不同甲霜灵浓度下的重组酶反应速率及它的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Figure 9. Rates of reaction catalyzed by purified RMesterase at different metalaxyl concentration and its Lineweaver-Burk plot.

表 1. 用 Blast+ 在 UniProt KB 数据库中对酯酶 RMest 进行氨基酸序列比对的结果\*

Table 1. Result from Blast+ of esterase RMest against proteins in UniProt KB database\*

No.	DB:ID	Source	Length	Score (Bits)	Identities/%	Positives/%	E
1	F8J9E5	AB hydrolase-1 domain-containing protein OS= <i>Hyphomicrobium</i> sp.	387	230.3	40.2	57.3	2.4E-69
2	A0A4Q0M384	Lysophospholipase OS= <i>Hansschlegelia zhihuaiae</i>	372	209.1	39.1	56.9	2.7E-61
3	A0A0Q7HBR2	Lysophospholipase OS= <i>Variovorax</i> sp. Root434	343	206.8	40.9	56.1	9.5E-61
23	A0A4Y7B509	Lysophospholipase OS= <i>Ramlibacter</i> sp. WS9	349	182.2	36.9	52.7	3.8E-51

\*: Blast+ run returned first 50 matching items. After deleting "uncharacterized protein" items, 23 ones remained among which the first 3 and last ones were showed in the table.

对这 23 个条目, 用 MEGA7.0 软件构建蛋白系统发育树。先对它们进行 Clustal W 多重比对, 然后采用邻近法建立进化树, 得图 10。由图知, 树中的祖先蛋白共分出 4 个蛋白谱系。第一个谱系是上部的 Lysophospholipases, 共 14 个成员; 第三个谱系是中下部的 AB hydrolase-1 domain-containing proteins, 共 3 个成员; 第四个是下部的 Esterases, 共 6 个成员; 而本文的酯酶 RMest 为第二个谱系, 只有自己 1 个成员。

由于这些 Lysophospholipases、AB hydrolase-1 domain-containing proteins 和 Esterases 同属 Alpha/Beta 水解酶家族, 所以酯酶 RMest 是一种 Alpha/Beta 水解酶, 它最可能的功能是 Lysophospholipase 或 Esterase。另外, 由于酯酶 RMest 是树中第二个蛋白谱系的唯一成员, 它与树中的其他蛋白均存在较大的进化距离, 表明它是一个相对独立进化的 Alpha/Beta 水解酶(本文证明它是一个酯酶)。



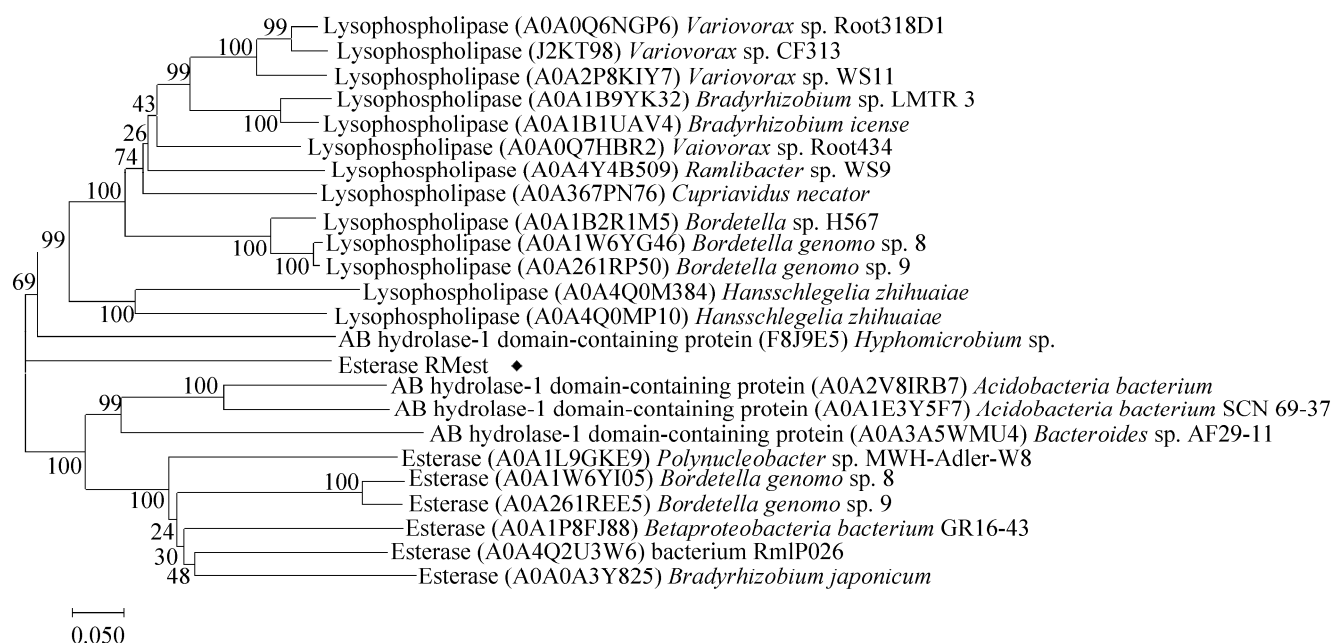


图 10. 酯酶 RMest 的蛋白系统发育树

Figure 10. Protein phylogenetic tree of esterase RMest. The tree was constructed by N-J method with bootstrap values calculated from 1000 resampling. The numbers on branches indicate bootstrap values. 0.050 Bar indicates 5% sequence divergence. The serial numbers in parentheses represent protein ID in Unitprot.

**2.5.2 酯酶 RMest 与 EHest (水解甲霜灵中间体 MAP)的氨基酸序列比对和催化性质比较:** 将酯酶 RMest (对甲霜灵有 R-选择性水解活性)与酯酶 EHest<sup>[14]</sup>(对甲霜灵中间体 MAP 有良好 R-选择性水解活性, 本实验室报道)的氨基酸序列进行比对, 结果显示(图 11)二者存在较大差异。同大多数丝氨酸水解酶一样, 两种酯酶均含有  $\alpha/\beta$  水解酶家族的五肽保守区域(Gly-x-Ser-x-Gly)。酯酶 RMest 的五肽保守区域为 GHSAG 与 EHest 的 GHSFG 有一个氨基酸不同(图 11 黑框处)。

甲霜灵 [N-(2,6-二甲基苯基)-N-(2-甲氧基乙酰)丙氨酸甲酯]与甲霜灵中间体 MAP [N-(2,6-二甲基苯基丙氨酸甲酯)]的结构相比, 只在 N 原子上多了一个“2-甲氧基乙酰基”支链。两种重组酯酶 RMesterase 和 EHesterase 对这两种外消

旋底物的催化性质见表 2。首先, 两种酯酶都对 MAP 有强水解活性, 说明两者的活性中心结构有一定的相似之处。上文提到, 两者氨基酸序列的差异较大, 因此对底物 MAP 的水解而言, 两者是一个异源同功的关系。另一方面, RMesterase 对 R, S-MAP 无立体选择性, 而 EHesterase 对它却有较强的 R-选择性, 说明它们的底物结合口袋的结构有一定的差异性。其次, RMesterase 对甲霜灵有较强的活性和极高的 R-选择性, 说明 RMesterase 的底物结合口袋与 R-甲霜灵的结合具有很强的专一性。而 EHesterase 对甲霜灵无活性, 可能是甲霜灵结构中多出的支链造成了 EHesterase 与其结合的巨大障碍, 这也反映了两种酶底物结合口袋结构的差异性。

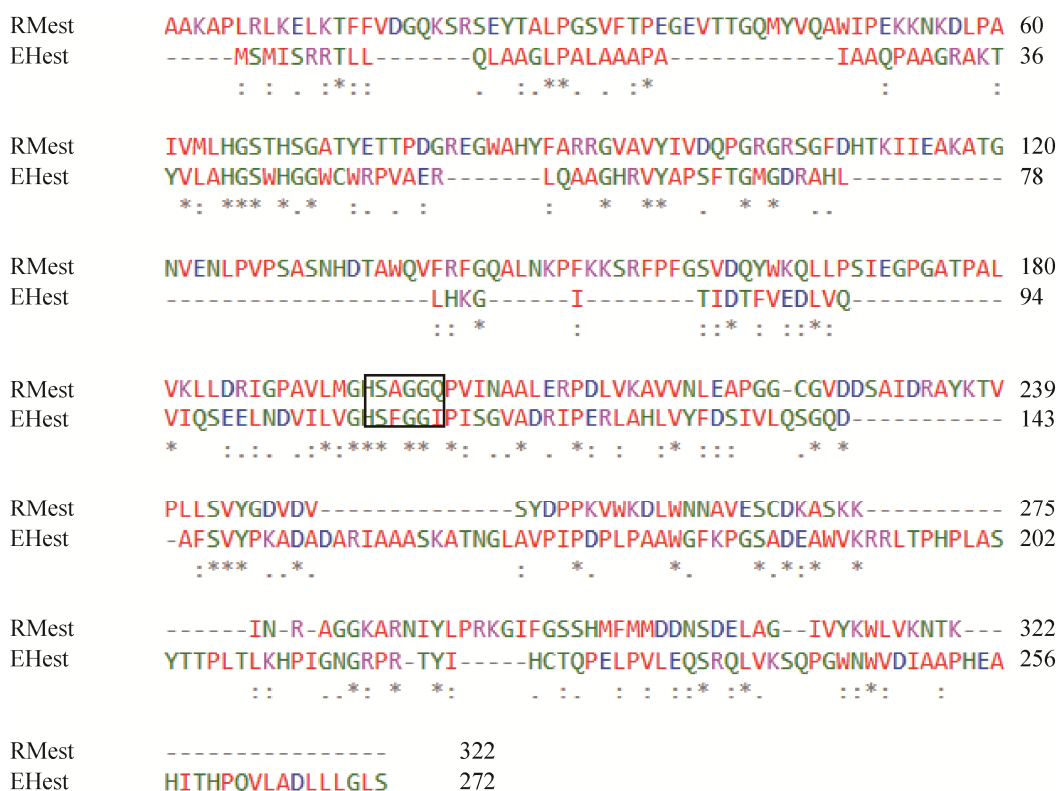


图 11. 酯酶 RMest 与 EHest 的氨基酸序列比对

Figure 11. Alignment of amino acid sequence of esterase RMest with EHest. \*: identical amino acid; :: highly similar; .: low similar.

表 2. 重组酯酶 RMesterase 和 EHesterase 对外消旋甲霜灵和甲霜灵中间体 MAP<sup>\*</sup> 的催化性质

Table 2. Catalytic properties of RMesterase and EHesterase on hydrolysis of racemic metalaxyl and MAP<sup>\*</sup>

Recombinant enzyme	<i>R, S</i> -MAP <sup>*</sup>		<i>R, S</i> -metalaxyl	
	Activity	Enantioselectivity	Activity	Enantioselectivity
RMesterase	High	No	Fairly high	<i>R</i> -, Very high
EHesterase <sup>[14]</sup>	High	<i>R</i> -, high	No	

\* *R, S*-MAP: *R, S*-methyl N-(2, 6-dimethylphenyl) alanine, the precursor for production of *R, S*-metalaxyl.

### 3 讨论

将本文获得的重组酯酶 RMesterase 和文献[13]报道的组成型酯酶(分离于 *Albibacters* sp. zjut528 胞内液)的主要酶学性质进行比较, 结果如下: (1) 两者分子量大小一致。本文报道的重组酯酶的分子量约 46 kDa (图 3), 文献[13]报道的组成型酯酶的分子量约 40 kDa。首先, 在构建重组菌时, 因酶切位点的选择问题以及 His 标签的添加等,

重组酶 N 端多了 33 个氨基酸, 分子量多了 4 kDa 多。此外, 两个分子量均来自 SDS-PAGE 图, 有一定的估计误差。(2) 两者立体选择性一致。本文用重组酯酶水解外消旋甲霜灵, 底物转化率 49.8% 时, 主产物为 *R*-甲霜灵酸,  $ee_p > 99.3\%$ 。文献[13]报道, 用含组成型酯酶的菌株 *Albibacters* sp. zjut528 水解外消旋甲霜灵, 产物收率 47.1% (约等于底物转化率) 时, 主产物为 *R*-甲霜灵酸,  $ee_p > 99.9\%$ ; (3) 温度和 pH 对两者的活性和稳定性的影响一致。温

度和 pH 对重组酶和组成型酯酶的活性和稳定性的影响曲线完全类似, 两种酯酶的最优温度和 pH 完全相同, 均为 40 °C 和 pH 9.0。(4) 两者的酶反应动力学一致。重组酶和组成型酯酶反应动力学均符合米氏方程。重组酶的米氏常数  $K_m$  (2.04 mmol/L) 与组成型酶 (2.29 mmol/L) 相当, 而重组酶的  $k_{cat}$  值 ( $0.73 \text{ min}^{-1}$ ) 小于组成型酶 ( $0.85 \text{ min}^{-1}$ ), 可能原因是纯化的重组酯酶的纯度不如组成型酶。通过以上比较可以确定: 本文研究的酯酶基因 *RMest* 就是使 *Albibacters* sp. zjut528 菌具有 R, S-甲霜灵水解拆分活性的组成型酯酶的基因。

本文报道了一种酯酶的基因序列 *RMest*, 该基因来自于 *Albibacters* sp. zjut528 的基因组, 是该菌株具有 R,S-甲霜灵拆分能力的根本原因。本研究的新意主要表现在以下两点: (1) 具有本文性能的酯酶基因在国内外属首次报道, 该报道对生物拆分法生产精甲霜灵 (R 体为主) 具有很大的应用价值, 对进一步研究该酶结构和活性关系也具有重要的意义。(2) 通过与 Uniprot KB 数据库中其他蛋白质的氨基酸序列进行比对, 结果显示酯酶 *RMest* 与某些 Lysophospholipases、AB hydrolase-1 domain-containing proteins 和 Esterases 的同源性较高, 它与同源性最高的 AB hydrolase-1 domain-containing proteins 的氨基酸序列一致性只有 40.2%, 序列相似性只有 57.3% (表 1), 表明该酶是一种序列特异性强的新酯酶蛋白。

## 4 结论

本文从 *Albibacters* sp. zjut528 的基因组中找到一种可以高选择性水解 R-甲霜灵的酯酶基因 *RMest*, 全长 969 bp, 编码 322 个氨基酸残基, 属于  $\alpha/\beta$  水解酶家族。本文成功构建了重组菌 *RMest*-

pET-28a(+)-*E. coli* BL21 Gold(DE3), 它能表达大小约为 46 kDa 的重组酶蛋白。用胞内重组酶液催化水解外消旋甲霜灵, 当底物转化率为 49.8% 时, 产物(甲霜灵酸)的  $ee_p$  为 99.3%, 对底物的对映体 R-构型具有专一(选择)性, 并且只有当 R 型底物水解完之后, 才会缓慢水解 S 型底物。该酶最适温度和 pH 分别为 40 °C 和 pH 9.0。该酶的活性受到产物甲醇的抑制。与 Uniprot KB 数据库中其他蛋白质的氨基酸序列进行比对, 采用邻近法构建蛋白系统发育树, 结果显示酯酶 *RMest* 与某些 Lysophospholipases、AB hydrolase-1 domain-containing proteins 和 Esterases 的同源性最高, 但是与它们均存在较大的进化距离, 表明该酶是一种相对独立进化的新酯酶蛋白。

## 参考文献

- [1] Fisher DJ, Hayes AL. Mode of action of the systemic fungicides furalaxyl, metalaxyl and ofurace. *Pesticide Science*, 1982, 13(3): 330–339.
- [2] Liu XL, Ma AJ, Lin JB, Liu PF. The comparison of inhibitory action between stereoisomers of metalaxyl. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2003, 5(3): 45–49. (in Chinese)  
刘西莉, 马安捷, 林吉柏, 刘鹏飞. 精甲霜灵与外消旋体甲霜灵对掘氏疫霉菌的抑菌活性比较. *农药学报*, 2003, 5(3): 45–49.
- [3] Zadra C, Marucchini C, Zazzerini A. Behavior of metalaxyl and its pure R-enantiomer in sunflower plants (*Helianthus annuus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(19): 5373–5377.
- [4] Sun JL. Modern pesticide synthesis technology. Beijing: Chemical Industry Press, 2011: 386. (in Chinese)  
孙家隆. 现代农药合成技术. 北京: 化学工业出版社, 2011: 386.
- [5] Park OJ, Lee SH, Park TY, Lee SW, Cho KH. Enzyme-catalyzed preparation of methyl

- (*R*)-*N*-(2,6-dimethylphenyl) alaninate: a key intermediate for (*R*)-metalaxyl. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, 16(6): 1221–1225.
- [6] Huang LQ, Chen DW, Yang H. Enzymatic resolution of methyl ( $\pm$ )-*N*-(2,6-dimethylphenyl) alanine. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2005, 25(12): 1575–1579. (in Chinese)  
黄丽琴, 陈道文, 杨红. 酶法拆分( $\pm$ )-*N*-(2,6-二甲苯基)-丙氨酸甲酯. *有机化学*, 2005, 25(12): 1575–1579.
- [7] Huang LQ, Yang H. The lipase catalyzed reaction of methyl ( $\pm$ )-*N*-(2,6-dimethylphenyl) alanine and determination of conversion. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2007, 30(4): 135–139. (in Chinese)  
黄丽琴, 杨红. ( $\pm$ )-*N*-(2,6-二甲苯基)-丙氨酸甲酯的脂肪酶酶促水解拆分方法. *南京农业大学学报*, 2007, 30(4): 135–139.
- [8] 王岩. 精甲霜灵的合成研究. 吉林大学硕士学位论文, 2008.
- [9] 王世辉. 微胶囊法固定脂肪酶及拆分手性胺的研究. 吉林大学硕士学位论文, 2010.
- [10] 郑良玉. 脂肪酶催化拆分 *N* 取代苯基  $\alpha$  氨基丙酸的研究. 吉林大学博士学位论文, 2004.
- [11] Park OJ, Lee SH, Park TY, Chung WG, Lee SW. Development of a scalable process for a key intermediate of (*R*)-metalaxyl by enzymatic kinetic resolution. *Organic Process Research & Development*, 2006, 10(3): 588–591.
- [12] Park OJ, Lee SH. Stereoselective lipases from *Burkholderia* sp., cloning and their application to preparation of methyl (*R*)-*N*-(2,6-dimethylphenyl)alaninate, a key intermediate for (*R*)-metalaxyl. *Journal of Biotechnology*, 2005, 120(2): 174–182.
- [13] Zhang ZH, Zhang LK, Lu YL. Production of *R*-metalaxyl by resolution of racemic metalaxyl using biocatalyst. *CIESC Journal*, 2017, 68(11): 4229–4238. (in Chinese)  
张朝晖, 张利坤, 陆跃乐. 生物法拆分外消旋甲霜灵制备 *R*-甲霜灵. *化工学报*, 2017, 68(11): 4229–4238.
- [14] Lu YN, Zhang ZH, Zhang LK, Lu YL. Cloning and expression of an esterase gene from a new strain capable of enantioselective hydrolyzing methyl (*R,S*)-*N*-(2,6-dimethylphenyl) alaninate. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(8): 1335–1347. (in Chinese)  
卢亚南, 张朝晖, 张利坤, 陆跃乐. 不对称水解(*R,S*)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯新菌种的分离鉴定及酯酶基因的克隆、表达. *微生物学报*, 2016, 56(8): 1335–1347.

# Cloning, expression and characterization of a gene encoding the esterase hydrolyzing *R,S*-metalaxyl high *R*-enantioselectively

Zhaohui Zhang<sup>1\*</sup>, Kang Peng<sup>1</sup>, Yanan Lu<sup>2</sup>, Yuele Lu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Biological Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China

<sup>2</sup> Active Motif Shanghai Limited, Shanghai 201100, China

**Abstract:** **[Objective]** A gene encoding the esterase to hydrolyze *R, S*-metalaxyl high enantioselectively to *R*-metalaxyl acid was cloned and expressed in *E. coli*. The properties of the recombinant esterase were studied. **[Methods]** Based on known N-terminal 10 amino acid sequence of the target esterase, a candidate esterase gene matching with it was found in the sequenced *Albibacters* sp. zjut528 genome. It had a length of 969 bp encoding 322 amino acids and was named *RMest*. The *RMest* DNA segment was amplified by PCR, ligated with pET-28a(+), transformed into *E. coli* BL21Gold(DE3) to construct the recombinant strain. The recombinant esterase was expressed by induction with IPTG and purified with Ni<sup>2+</sup> resin. **[Results]** The recombinant RMesterase was expressed successfully in *RMest*-pET-28a(+)-*E. coli* BL21 Gold (DE3). Its size was about 46 kDa in SDS-PAGE. Hydrolysis of 10 g/L of *R,S*-metalaxyl for 6 h catalyzed by intracellular crude enzyme from the recombinant strain, the substrate conversion rate reached 49.8% with product (metalaxyl acid) *ee<sub>p</sub>* of 99.3%. The main product was *R*-metalaxyl acid. The optimal temperature and pH of RMesterase was 40 °C and 9.0 respectively. The activity of RMesterase was inhibited by methanol, the other product of metalaxyl hydrolysis. After aligning the amino acid sequence of *RMest* with other proteins in Uniprot KB database by Blast+, the neighboring-joining phylogenetic tree was constructed. It shows that the esterase *RMest* had a long evolution distance with homologous Lysophospholipases, AB hydrolase-1 domain-containing proteins and other esterases. That indicates that the esterase *RMest* was a new one that evolved relative independently. **[Conclusion]** The esterase gene *RMest* was successfully cloned and expressed in *RMest*-pET-28a(+)-*E. coli* BL21 Gold (DE3). The recombinant RMesterase could hydrolyze *R, S*-metalaxyl high *R*-enantioselectively to produce *R*-metalaxyl acid.

**Keywords:** *R, S*-metalaxyl, enantioselective hydrolysis, esterase gene, cloning and expression, *Albibacters* sp. zjut528

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31601390)

\*Corresponding author. Tel: +86-576-88320571; E-mail: zzh@zjut.edu.cn

Received: 26 February 2020; Revised: 26 May 2020