

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(3):410–416; 4 March 2011
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

不吸水链霉菌 ZB01 *cyp107z* 基因的克隆及原核表达纯化

刘卫德, 蒋细良, 冀颖, 牛静, 李梅*

中国农业科学院植物保护研究所, 农业部生物防治重点开放实验室, 北京 100081

摘要:【目的】克隆不吸水链霉菌 ZB01 中的 *cyp107z* 基因, 在 *E. coli* 中异源表达纯化, 测定重组酶蛋白的酶动力学参数, 为该基因的进一步研究奠定基础。【方法】根据 *cyp* 基因保守区序列设计引物, 扩增不吸水链霉菌 ZB01 基因组中 *cyp107z* 基因的部分序列, 通过染色体步移技术获取全长基因。利用 pET28a 表达载体构建该基因原核表达载体并于 *E. coli* 中诱导表达, 以 Ni-NTA 亲和层析纯化表达出的重组蛋白。以阿维菌素为底物, 构建重组蛋白体外催化体系, 通过测定体系中 NADPH 的消耗, 计算重组蛋白催化阿维菌素反应的酶动力学参数。【结果】从不吸水链霉菌 ZB01 基因组扩增出一条 *cyp107z* 基因同源基因, 全长 1290 bp, 编码 429 个氨基酸残基, 命名为 *cyp107z13*, 在 *E. coli* 中诱导表达了该重组酶蛋白, 纯化后的重组酶蛋白催化阿维菌素的 K_m 值为 $1.4 \mu\text{mol/L}$, V_{\max} 为 $0.041 \mu\text{mol/min} \cdot \text{mg}$, k_{cat} 为 0.033 s^{-1} 。【结论】从不吸水链霉菌 ZB01 中克隆到 *cyp107z13* 基因, 异源表达的 CYP107Z13 重组蛋白能够催化以阿维菌素为底物的氧化反应。

关键词: 不吸水链霉菌, *cyp107z13*, 基因克隆, 原核表达, 阿维菌素

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 03-0410-07

细胞色素 P450 酶系 (cytochrome P450 enzyme system, CYPs) 是生物体内广泛存在的一类代谢酶系。由于其种类、催化反应类型的多样性及底物的广泛性使其成为自然界中最具催化多样性的生物催化剂之一^[1-2], 细胞色素 P450 (CYP) 是 CYPs 的关键组分, CYP 的主要功能是对不同底物进行单加氧化, 需要提供分子氧和来自 NADPH 或 NADH 的还原态等价物, 将氧原子引入烯丙基、双键甚至非活性的 C—H 键。链霉菌含有数量众多不同家族的 CYP^[3], 是重要的资源微生物, 来源于或在链霉菌中表达的 CYP 功能已有报道, 包括能够催化次级代谢物及甾类的位点专一性氧化反应^[4-5] 以及活化和代谢异生物质^[6] 等。

阿维菌素是迄今已发现的最有效的杀昆虫剂、

杀螨虫剂和杀寄生虫剂之一, 其衍生物甲胺基阿维菌素苯甲酸盐 (简称甲维盐, emamectin benzoate) 比阿维菌素的杀虫活性更高, 毒性更低, 被确认为高毒农药的替代品种^[7-8]。目前, 甲维盐是以阿维菌素为原料, 通过化学方法合成^[9-10]。其中, 阿维菌素 4"-OH 氧化为 4"-O 是甲胺基阿维菌素合成中最关键的反应步骤。由于阿维菌素 5-OH 比 4"-OH 更活泼, 进行 4"-OH 的氧化必须先对 5-OH 进行保护, 将 4"-OH 氧化为 4"-O 后, 再对 5-OH 去保护。这个保护-氧化-去保护过程步骤复杂、反应条件要求苛刻, 限制了甲维盐的大规模商品化生产和应用。Jungmann 等^[11] 筛选到 17 株能位点特异性氧化阿维菌素 4"-OH 的菌株, 且全为链霉菌, 其中以 *S. tubercidicus* I-1529 的转化效率最高, 在 96 h 内对初

基金项目: 植物病虫害生物学国家重点实验室开放课题 (2006PD5)

* 通信作者。Tel: +86-10-82106381; Fax: +86-10-82106381; E-mail: limei@caas.net.cn

作者简介: 刘卫德 (1984-), 男, 江西吉安人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物分子生物学与基因工程。E-mail: liuweide84@126.com

收稿日期: 2010-11-09; **修回日期:** 2010-12-06

始浓度为 0.75 g/L 的阿维菌素转化率为 16%。进一步研究发现这些菌中具有催化作用的酶为 CYP,其编码基因组成了一个新的亚家族 *cyp107z*。笔者经过大量筛选,获得一株能够位点特异性氧化阿维菌素 4"-OH 生成 4"-O 的不吸水链霉菌 ZB01 (*Streptomyces ahygroscopicus* ZB01,国家菌种保藏中心 CGMCC NO. 2804),该菌株在 72 h 内对初始浓度为 1 g/L 的阿维菌素转化率达 36%,其催化效率远高于 *S. tubercidicus* I-1529,有较高的开发应用价值。本研究从不吸水链霉菌 ZB01 基因组中克隆到一个 *cyp107z* 亚家族基因同源基因,经国际 P450 命名委员会命名为 *cyp107z13*,在 *E. coli* 表达系统中表达并纯化了该蛋白,并测定了以阿维菌素为底物时重组蛋白的酶动力学参数。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体:不吸水链霉菌 ZB01 为本实验室筛选保存,*E. coli* DH5α 及 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞购于北京全式金生物技术有限公司。TA 克隆载体 pMD18-T 及 pMD18-T simple 购于大连 TaKaRa 公司,pET28a 原核表达载体为本实验室保存。

1.1.2 培养基与抗生素:*E. coli* 培养基为 LB 培养基,链霉菌培养基为 ISP-2;氨苄青霉素 (Amp) 使用浓度 50 μg/mL,硫酸卡那霉素 (Kan) 使用浓度 25 μg/mL。

1.1.3 试剂:Genome Walking Kit 购于 TaKaRa 公司,质粒小提试剂盒及琼脂糖凝胶回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司,*Taq* 酶、限制性核酸内切酶 *Nco* I、*Xho* I、T4 连接酶、IPTG 购于 TaKaRa 公司,氨苄青霉素、硫酸卡那霉素、δ-氨基乙酰丙酸、铁氧还蛋白及铁氧还蛋白还原酶为 Sigma 公司产品,还原型 NADPH 为 Roche 公司产品,阿维菌素原药由宁波保税区世佳化工有限公司提供,其它生化试剂为国产分析纯试剂。

1.1.4 引物:文中涉及的引物序列见下表,以下划线部分为限制性核酸内切酶识别序列。

1.2 菌株筛选

1.2.1 筛选方法:于 30 mL ISP-2 液体培养基中接入链霉菌孢子悬液 1 mL,30℃ 200 r/min 培养 3 d

后,加入阿维菌素 (DMSO:吐温 40 = 1:1 溶解) 至终浓度 1 g/L,30℃ 150 r/min 继续培养 3 d。混合物中加入等体积的 MTBE 抽提,离心,取醚相于通风橱中吹干,残留物以 1 mL 乙腈重溶,HPLC 检测^[11]。

表 1 引物序列
Table 1 Sequences of primers

Primer	Sequence(5'→3')	Size/bp	Restriction site
f1	CGCGGCCGGTTTCATGGACGAC	21	\
r1	ACCGCACCCAGCGCATCAGCTC	21	\
Fsp1	GACCTCATTCGCGACTTCGCCTAT	24	\
Fsp2	ATCACCGTCATCTGCGAACTGG	22	\
Fsp3	AGCTGCAACTGCTCAAGTCCGA	22	\
Rsp1	ATGTGGTCGATCATCTCCGGGAAC	24	\
Rsp2	AATCCCCACCACTTCGCAGATGAC	24	\
Rsp3	GATAGGCGAAGTGCGGAATGA	21	\
F1	<u>CCATGGGGACCGAACTA</u> ACGGACTCC	26	<i>Nco</i> I
R1	<u>CTCGAGGTTCA</u> ACCGCAGCGGCA	23	<i>Xho</i> I

1.2.2 HPLC 检测条件:安捷伦 HP1100 液相色谱仪;安捷伦 SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm);柱温:30℃;流动相 A 为乙腈,B 为水,梯度洗脱 (0 min - 30 min,50% A-100% A;30min - 40 min,100% A-50% A);流速:1.2 mL/min;检测波长:243 nm;进样量 5 μL。

1.3 克隆功能基因

1.3.1 提取链霉菌基因组:链霉菌基因组的提取方法参考链霉菌遗传操作实验手册^[12]稍作修改。

1.3.2 克隆功能基因:根据 GenBank 数据库中 P450 基因保守区设计简并引物 f1/r1 (表 1),以不吸水链霉菌 ZB01 基因组为模板,扩增出一段与 *cyp107z* 家族基因同源的部分序列。依据这段序列设计两组 (Fsp1-3 及 Rsp1-3,表 1) 引物,经 3 次巢式 PCR 反应,扩增已知序列的侧翼序列 (参见 TaKaRa Genome Walking Kit 说明书,TaKaRa Code: D316)。PCR 产物分别与 pMD18-T 载体连接,转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,鉴定筛选阳性转化子,测序并拼接出连续序列。过程中所涉及的核酸纯化、连接及转化等操作参考分子克隆实验指南^[13]及试剂盒说明书。

1.3.3 PCR 扩增条件:采用普通 PCR 体系及条件扩增 P450 同源基因的部分序列。染色体步移采用热不对称 PCR 反应扩增侧翼序列,除 PCR 体系中使用的是 TaKaRa 的 2 × GC Buffer I 外,其余条件同

试剂盒说明书。

1.4 序列分析

获得的序列通过 NCBI 中的 blastn 及 blastx 程序,与 GenBank 数据库中的已知序列进行比对分析。利用 EMBOSS 程序包 (<http://emboss.umdj.edu/emboss/>) 中的 getorf 及 dottup 等程序进行分析,找出该基因的开放阅读框(ORF)及可能的启动子及终止子元件。用 DNAMAN 将该基因与其同源基因进行多序列比对并构建系统发育树。

1.5 原核表达载体构建

1.5.1 PCR 扩增 *cyp107z13* 基因:以不吸水链霉菌 ZB01 基因组为模板,以 F1/R1(表 1)为引物,扩增 *cyp107z13* 基因全长序列。20 μ L PCR 反应体系中含:2 \times GC Buffer I 10.0 μ L, dNTP (各 2.5 mmol/L) 3.2 μ L, 引物 (10 pmol/ μ L) 各 1.0 μ L, LA Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.4 μ L, 模板 (约 25 ng/ μ L) 1.0 μ L, ddH₂O 补足至 20.0 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,63 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,32 次循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.5.2 表达载体构建:PCR 扩增 *cyp107z13* 基因,与 pMD18-T simple 载体连接,转化 *E. coli* DH5 α ,筛选阳性克隆并测序验证,挑取已鉴定的阳性克隆于 10 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,提取质粒后双酶切 (*Nco* I/*Xho* I) 并回收 *cyp107z13* 基因片段,该片段与经相同酶消化后的载体 (pET28a) 片段连接,获得 pET-*cyp107z13* 重组质粒,重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) 细胞,涂布含 Kan 的 LB 平板,培养并筛选阳性克隆。

1.6 重组蛋白诱导表达及纯化

转入 pET-*cyp107z13* 重组质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 阳性转化子转接至 5 mL 含 Kan 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 200 r/min 培养过夜,菌液以 1:100 比例接种到含 Kan 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 200 r/min 培养 3 h,加入 δ -氨基乙酰丙酸及 IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 电泳检测重组蛋白表达情况。

诱导表达后的菌体经超声波破碎,离心取上清,以 Ni-NTA 亲和层析纯化带 His 标签的重组蛋白。纯化后重组蛋白溶液以分子截留量为 10 kDa 超滤管超滤浓缩脱盐,以 BCA 法测定浓缩后的重组蛋白浓度。

1.7 重组蛋白酶学参数测定

在纯化的重组蛋白溶液中加入终浓度为

3.5 μ mol/L 铁氧还蛋白 (ferredoxin), 终浓度为 40 mU/mL 铁氧还蛋白还原酶 (ferredoxin-NADP-reductase), 终浓度为 30 mg/L 的异丙醇溶解的阿维菌素 B_{1a}, 反应体系为 500 μ L, 混合物在 30 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后,加入终浓度 0.2 mmol/L NADPH 启动反应。同时以不加阿维菌素的体系为对照,分光光度法测定 30 $^{\circ}$ C 孵育 5–10 min 后 NADPH 在 340 nm 处的消耗,记录数据并计算酶学参数^[11]。

2 结果和分析

2.1 菌株筛选

经过大量筛选,发现不吸水链霉菌 ZB01 (*Streptomyces ahygroscopicus* ZB01) 具有位点特异性氧化阿维菌素 4"-OH 的功能,经 HPLC 检测,在 72 h 内,该菌株对初始浓度为 1 g/L 的阿维菌素转化率达 36% (图 1)。是已报道的转化率最高菌株 (*S. tubercidicus* I-1529) 的 2.5 倍,因此对该菌株的相关

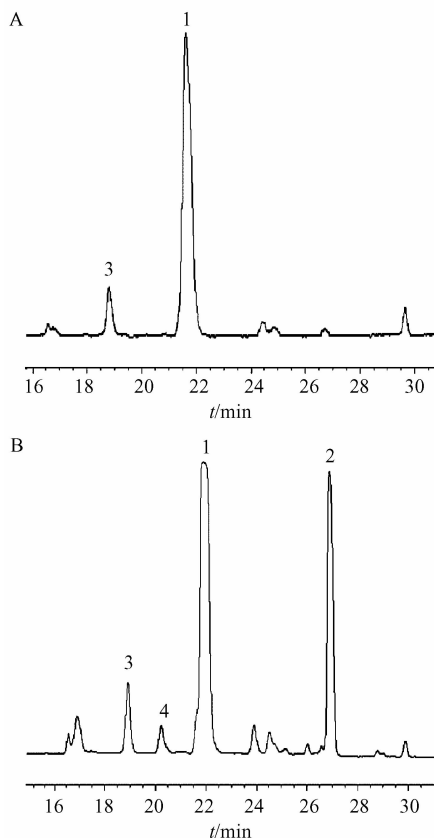


图 1 不吸水链霉菌 ZB01 氧化阿维菌素的 HPLC 检测

Fig. 1 HPLC analysis for oxidation of avermectin by *Streptomyces ahygroscopicus* ZB01; A: Avermectin standard; B: Avermectin oxidated by *Streptomyces ahygroscopicus* ZB01; 1. Avermectin B_{1a}; 2. 4"-O-avermectin B_{1a}; 3. Avermectin B_{1b}; 4. Side product.

催化酶基因进行进一步研究。

2.2 功能基因的克隆及序列分析

以简并引物从不吸水链霉菌 ZB01 基因组中共扩增出 4 个片段,他们分属 CYP450 的 105D、105H、107L 和 107Z 亚家族。已知 107Z 亚家族基因具有位点特异性氧化阿维菌素 4"-OH 的功能^[11],因此我们根据已获得长 1062 bp 的 *cyp107z* 同源序列设计引物,通过染色体步移扩增出了该片段上游 1297 bp,下游 785 bp 序列。经 blast 分析及 EMBOSS 程序包中的 getorf 程序分析,从扩增出的总长为 3144 bp 的序列中找到一个全长为 1290 bp 的开放阅读框 (Genbank 登录号: HQ439501),该基因 GC 含量高达 70.1%,共编码 429 个氨基酸,根据 P450 基因分类原则^[15],该基因属于 *cyp107z* 亚家族,经国际 P450 命名委员会命名为 *cyp107z13*。经 blastn 分析发现其与 *cyp107z* 亚家族其它 12 个同源基因核酸序列的最大相似性为 76% - 86%,以 DNAMAN 软件对此亚家族蛋白的氨基酸序列进行多序列比对,发现 CYP107Z13 同其它亚家族蛋白一样均具有保守的血红素结合位点及氧结合位点 (图 2)。

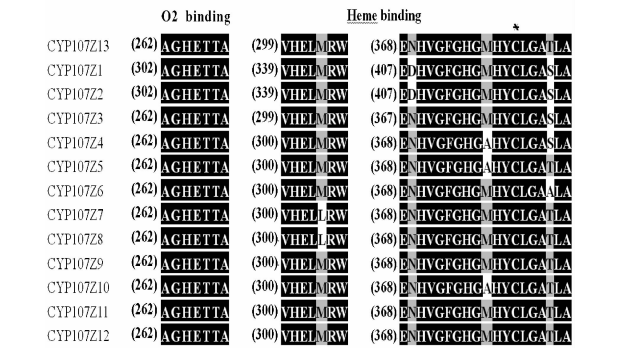


图 2 CYP107Z 亚家族蛋白氨基酸序列保守位点多序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment for conserved sites of CYP107Z subfamily amino acid sequences.

利用 EMBOSS 程序包中的 dottup 等程序对该基因的侧翼序列进行分析,发现在起始密码子 5'端上游 -38 bp 至 -68 bp 之间存在着一段顺式重复 3 次的序列 (图 3-A 粗体),然而并未找到原核生物典型的 -10 及 -35 序列,这符合链霉菌启动子序列特征^[14];在起始密码子 5'端上游 -5 bp 至 -14 bp 区富含嘌呤,推测其为 SD 序列 (图 3-A 斜体);另外在该基因终止密码子下游存在一段长达 20 bp 以上不

完全配对的反向互补序列 (图 3-B 粗体),推断其为该基因的终止子,并且是一个强终止子。

(A).....CCGTCA**CGCCTTCGA**TTCGCCTTCGATTTCGCCTTCGA
GCCCAGCTCATTTCTACTGCACGCCACAGGAGAGCGCAC
ATG.....
(B).....TGAAAGCGGACCGCACCCGGGTCCGCACGGAGTGGCGC
CCGGCGGACCCGGGCGGTGCGCGG.....

图 3 *cyp107z13* 基因侧翼序列分析

Fig. 3 Analysis flanking sequence of *cyp107z13*; A: Leader sequence; B: Trailing sequence.

2.3 原核表达载体构建

构建好的表达载体 pET - *cyp107z13* 转化表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3) 后,菌落 PCR 筛选出阳性克隆,经测序证实 *cyp107z13* 基因已按正确读码框插入 pET28a 表达载体中,位于 T7 启动子及 T7 终止子之间,并加上了组氨酸标签 (His6)。

2.4 重组蛋白诱导表达及纯化

重组蛋白体外诱导表达,经 SDS-PAGE 电泳检测,在目的蛋白预期大小 (48 kDa) 处有一条特异性表达的条带 (图 4 - 2)。优化后的重组蛋白诱导表达条件为:37℃ 200 r/min 培养 3 h 后,加入终浓度 0.2 mmol/L IPTG,28℃ 200 r/min 诱导表达 8 h。诱导表达温度及 IPTG 浓度过高都不利于可溶性重组

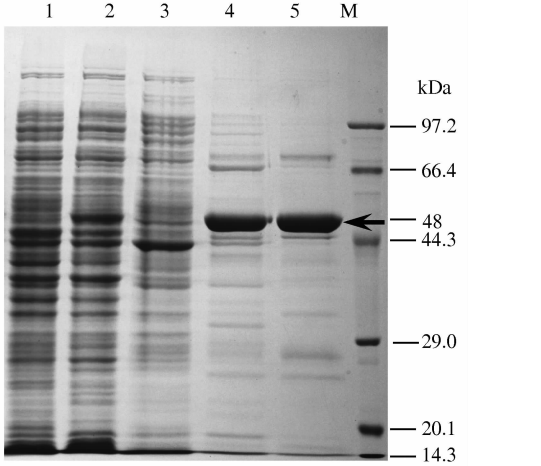


图 4 SDS-PAGE 电泳检测 CYP107Z13 蛋白在 *E. coli* 中诱导表达及其纯化

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of CYP107Z13 protein expressed in *E. coli*; 1. Total proteins of engineering strain without induction by IPTG; 2. Total proteins of Engineering strain induction by IPTG; 3. Protein eluted by balance buffer (Containing 20 mmol/L imidazole); 4. Protein eluted by elution buffer (Containing 50 mmol/L imidazole); 5. Protein eluted by elution buffer (Containing 100 mmol/L imidazole); M. Protein Marker.

蛋白的表达,降低温度及 IPTG 浓度,延长诱导表达时间,不仅可以增加蛋白的表达量,还能增加可溶蛋白的比例。

为测定重组蛋白的酶学参数,以 Ni-NTA 亲和层析纯化表达出的重组蛋白(图 4-4,5),浓缩脱盐后,250 mL 培养物共获得重组蛋白溶液 4.5 mL。由于含血红素基团,蛋白溶液呈红色,与文献[11]报道一致。经 BCA 法测定蛋白浓度约为 420 $\mu\text{g/mL}$,纯度 >90%,基本能满足后续酶学参数测定要求。

2.5 重组蛋白酶学参数测定

以纯化重组蛋白与铁氧还蛋白、铁氧还蛋白还原酶构建体外重组酶催化体系,测定了纯化重组蛋白催化阿维菌素反应的酶动力学参数,其 K_m 值为 1.4 $\mu\text{mol/L}$, V_{\max} 为 0.041 $\mu\text{mol/min} \cdot \text{mg}$, k_{cat} 为 0.033 s^{-1} 。

3 讨论

已知能够位点特异性氧化阿维菌素 4"-OH 生成 4"-O 的微生物均为链霉菌,但催化效率较低^[11]。笔者针对链霉菌进行筛选,获得一株能够高效氧化阿维菌素 4"-OH 生成 4"-O 的不吸水链霉菌 ZB01,该菌株在 72 h 内对初始浓度为 1 g/L 的阿维菌素转化率达 36%,而已报道的其它野生菌在 96 h 内对初始浓度为 0.75 g/L 的阿维菌素最高转化效率仅为 16%^[11]。从不吸水链霉菌 ZB01 中克隆的 *cyp107z13* 基因,是 *cyp107z* 亚家族基因中新发现的第 13 位成员,已知的 12 个 CYP107Z 亚家族蛋白均具有位点特异性氧化阿维菌素 4"-OH 生成 4"-O 的功能^[11],因此本研究中获得 *cyp107z13* 具备解决甲维盐合成高成本问题的潜在价值。

测定纯化的 CYP107Z 蛋白的酶动力学参数,有助于深入研究 CYP107Z 本身的结构与催化功能之间的关系。CYP107Z1-12 重组蛋白的 K_m 值为 1.1-6.9 $\mu\text{mol/L}$, V_{\max} 为 0.001-0.060 $\mu\text{mol/min} \cdot \text{mg}$, k_{cat} 为 0.001-0.048 s^{-1} ^[11]。本研究中克隆的 *cyp107z13* 基因,经体外异源表达纯化,建立体外重组酶催化体系,获得了其酶学参数。从酶学参数看,CYP107Z13 的催化效率并不高,可能是因为阿维菌素不是该酶的天然底物的缘故。另外,CYP107Z 功能的实现需要辅酶的参与,其氧化阿维菌素的效率不仅受到 CYP107Z 本身特性的影响,同时还受到其电子传递体系的影响。在已报道的 17 株功能链霉

菌中,尽管有些菌株的功能基因完全相同,但其氧化阿维菌素的效率却不同,CYP107Z10 是从转化效率最高的菌株 *S. tubercidicus*I-1529 中克隆表达的蛋白,其 K_m 为 3.7 $\mu\text{mol/L}$, V_{\max} 为 0.014 $\mu\text{mol/min} \cdot \text{mg}$, k_{cat} 为 0.011 s^{-1} ,从酶学参数看,其催化效率并不是已知 CYP107Z 蛋白中最高的^[11]。可见,辅酶系统的电子传递效率对菌体转化阿维菌素的效率有很大的影响。因此,开展 CYP107Z13 蛋白的改性研究提高底物专一性,同时优化该酶的电子传递体系,对于提高该酶的催化效率具有重要意义。

CYPs 属于氧化酶系,其催化的反应需要通过多个辅酶的参与最终将电子传递给底物实现氧化。对于这种以蛋白复合物形式发挥催化作用的酶,利用 CYP 纯蛋白进行催化并不可取,而以含有功能性酶的全细胞参与催化反应则更为有效^[16-17]。因此通过基因工程手段将辅酶再生体系与具催化功能的酶重组构建于同一细胞中,或依据代谢工程利用适当辅助底物促进所需辅酶的胞内再生,以全细胞的形式应用,将成为这类酶得以充分利用的有效手段,对于其实现产业化应用具有重要意义^[18]。将 CYP 转入酵母菌,实现辅酶再生及全细胞催化反应已有成功的报道^[19]。我们尝试将 *cyp107z13* 转化至毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中进行表达,但并未检测到特异表达的目的蛋白条带和重组菌的目的活性,可能酵母菌及其 CYP 辅酶系统并不适合本研究中链霉菌来源的 *cyp107z13* 的表达及功能发挥。

CYP 含有血红素基团,而 δ -氨基乙酰丙酸是血红素合成的前体。Jungmann 等^[11]在诱导表达 CYP107Z 亚家族蛋白时添加了 0.5 mmol/L 的 δ -氨基乙酰丙酸。因此我们在初期研究中也添加了 δ -氨基乙酰丙酸作为诱导物,但后续研究发现其对 CYP107Z13 蛋白表达量影响并不明显,因此在之后的诱导表达中并未添加该前体物质。至于 CYP107Z13 重组蛋白的总体表达量不高,可能与目的基因 GC 含量高导致活化能较高及密码子的偏好性有关,从而影响了目的基因的转录效率,具体原因还有待探讨。

致谢 感谢中国农业科学院植物保护研究所农药剂型与分析及农药残留与环境毒理创新课题组全体成员在菌体生物活性检测中给予的支持与帮助。

参考文献

- [1] Wojtasek H, Leal WS. Degradation of an alkaloid pheromone from the palebrown chafer, *Phyllopertha diversa* (Coleoptera:carabaeidae), by an insect olfactory cytochrome P450. *FEBS Letters*. 1999, 458(3): 333-336.
- [2] 冷欣夫, 邱星辉. 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.
- [3] 李梅, 曾凡荣. 链霉菌细胞色素 P450 研究进展. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2008, 35(7): 1107-1112.
- [4] Walczak RJ, Hines JV, Strohl WR, Priestley ND. Bioconversion of the anthracycline analogue desacetyladiamycin by recombinant DoxA, a P450-monooxygenase from *Streptomyces* sp. strain C5. *Organic Letters*, 2001, 3(15): 2277-2279.
- [5] Berrie JR, Williams RA, Smith KE. Microbial transformations of steroids. XI. Progesterone transformation by *Streptomyces roseochromogenes*——purification and characterization of the 16-hydroxylase system. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 71(3-4): 153-165.
- [6] Taylor M, Lamb DC, Cannell R, Dawson M, Kelly SL. Cytochrome P450105D1 (CYP105D1) from *Streptomyces griseus*: heterologous expression, activity, and activation effects of multiple xenobiotics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 263(3): 838-842.
- [7] 第四批高毒农药的替代品种公布. 今日农药 (*the New Century of Agrochem*), 2009, 2: 10-13.
- [8] 倪珏萍, 侯华民, 曾霞, 黄春霞. 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐与阿维菌素生物活性比较. 现代农药 (*Modern Agrochemicals*), 2003, 2(3): 38-40.
- [9] Mrozik HH, Matawan NJ. 4"-keto- and 4"-amino-4"-deoxy avermectin compounds and substituted amino derivatives thereof. US, 4427663, 1984-01-24.
- [10] Mrozik HH, Matawan NJ. 4"-Deoxy-4-N-methylamino avermectin B1a/B1b. US, 4874749, 1989-10-17.
- [11] Jungmann V, Molnar I, Hammer PE, Hill DS, Zirkle R, Buckel TG, Buckel D, Ligon JM, Pachlatko JP. Biocatalytic conversion of avermectin to 4"-Oxo-Avermectin: characterization of biocatalytically active bacterial strains and of cytochrome P450 monooxygenase enzymes and their genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 6968-6976.
- [12] Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrepf H. Genetic Manipulation of *streptomyces*: a laboratory manual. Norwich: John Innes Foundation, 1985.
- [13] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 王栋梁, 周晓薇, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [14] 杨闰英, 胡志浩, 邓子新, 李季伦. 链霉菌表达系统的研究进展. 农业生物技术学报 (*Journal of Agricultural Biotechnology*), 1996, 4(3): 260-268.
- [15] Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology*, 1993, 12(1): 1-51.
- [16] Chenualt HK, Whitesides GM. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1987, 14(2): 147-162.
- [17] Burton SG, Cowan DA, Woodley JM. The search for the ideal biocatalyst. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(1): 37-45.
- [18] 聂尧, 徐岩. 生物催化立体选择性氧化还原中存在的问题及其发展策略. 生物加工过程 (*Chinese Journal of Bioprocess Engineering*), 2008, 6(2): 1-9.
- [19] 程婕, 龚毅, 杨凌. 细胞色素 P450 酶系的异源表达研究. 河北大学学报 (自然科学版) [*Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*], 2006, 26(3): 331-336.

Cloning and prokaryotic expression of *cyp107z* gene from *Streptomyces ahygroscopicus* ZB01

Weide Liu, Xiliang Jiang, Ying Ji, Jing Niu, Mei Li*

Key Laboratory for Biological Control of Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081 China

Abstract: [**Objective**] We cloned and expressed a cytochrome P450 gene *cyp107z* from *Streptomyces ahygroscopicus* ZB01, and determined the kinetic parameters of the recombinant enzyme *in vitro*. [**Method**] Degenerate primers were designed by the conserved sequence of *cyp* genes and were used to amplify partial sequence of *cyp107z* gene from *Streptomyces ahygroscopicus* ZB01 genome. The full-length *cyp107z* gene sequence was obtained by genome walking, and linked with pET28a to construct pET-*cyp107z13* expressing vector which was then transferred into *Escherichia coli*, and the expressed recombinant protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography. The catalysis system of the recombinant protein was constructed with avermectin as substrate, and the kinetic parameters of the recombinant protein were determined by monitoring the consumption of NADPH in the system *in vitro*. [**Results**] A *cyp107z* homologous gene named *cyp107z13* was cloned from *Streptomyces ahygroscopicus* ZB01 genome, which was 1290 bp in length encoding 429 amino acid residues. The K_m of purified recombinant protein of CYP107Z13 expressed in *E. coli* was 1.4 $\mu\text{mol/L}$, the V_{\max} was 0.041 $\mu\text{mol/min}\cdot\text{mg}$ and the k_{cat} was 0.033 s^{-1} in a reaction system with avermectin as substrate. [**Conclusion**] A *cyp107z13* gene from *Streptomyces ahygroscopicus* ZB01 was cloned, the heterologous expressed recombinant protein can catalyze the oxidizing reaction with avermectin as substrate.

Keywords: *Streptomyces ahygroscopicus*, *cyp107z13*, Gene cloning, Prokaryotic expression, Avermectin

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Open Project of the State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests(2006PD5)

* Corresponding author. Tel: +86-10-82106381; Fax: +86-10-82106381; E-mail: limei@caas.net.cn

Received: 9 November 2010/Revised: 6 December 2010

《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,5-7个月之内发表。

(1)收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。

(2)完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给出作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。