

Sinorhizobium morelens S-5 中 N-氨甲酰基水解酶基因的克隆、 表达和纯化

吴 胜, 王建军, 杨 柳, 孙万儒*

(中国科学院微生物研究所 微生物资源国家重点实验室 北京 100080)

摘 要 :N-氨甲酰基水解酶是一种非常具有工业应用价值的水解酶,可用于制备光学纯氨基酸。通过 LA-PCR 从 *Sinorhizobium morelens* S-5 菌中克隆到 1.3kb 的 DNA 片段,测序表明该片段上含有一个完整的 N-氨甲酰基水解酶的基因(*hyuC*)序列。将 *hyuC* 基因克隆到表达载体 pET30a 上,重组质粒 pET30a-*HyuC* 在大肠杆菌中获得了高水平表达。重组的 N-氨甲酰基水解酶经过热处理和三步柱色谱分离而纯化。纯化倍数为 16.1 倍,收率 21.2%。该酶为同源四聚体,亚基分子量是 38kDa。最适温度是 60℃,最适 pH 为 7.0。该酶有较高的热稳定性和氧化稳定性。 Fe^{2+} 和 Ca^{2+} 对酶的活性有一定的促进作用,而金属螯合剂和巯基试剂对酶活无明显影响。

关键词 :*Sinorhizobium morelens* ;N-氨甲酰基水解酶基因 ;蛋白纯化 ;表达

中图分类号 :Q78,Q814 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2006)04-0565-06

光学纯氨基酸是重要的化学中间体,在制药工业、食品工业上有广泛的应用,如用于制备半合成青霉素和头孢菌素、杀虫剂和甜味剂等^[1]。目前发现少数几种微生物可将外消旋 5-取代海因直接转化为 D-氨基酸^[2~7]。5-取代海因在碱性条件下或者在消旋酶的作用下通过酮醇互变异构实现两个对映体互相转变,其中 D-型海因衍生物在专一性很强的 D-海因酶作用下水解内酰胺键生成 N-氨甲酰基-D-氨基酸,后者在 N-氨甲酰基水解酶的作用下水解去除氨甲酰基生成相应的 D-氨基酸。在这一过程中,转化效率理论上可达到 100%。因此,这种利用酶法制备光学纯氨基酸的方法要远比“化学法”经济、环保。海因酶已在工业生产中得到广泛的应用,但由于活性和稳定性方面的原因,N-氨甲酰基水解酶到目前为止还没有实现工业化应用。在实际生产中,氨甲酰基的水解还是通过化学法实现的。但由于这一反应是在强酸条件下通过重氮化完成,存在安全、环境和收率问题,因此人们希望用更加环保和高效的酶解反应来取代化学法^[2]。为实现这一目标,有必要寻找新的高活性和高稳定性的 N-氨甲酰基水解酶或者利用蛋白质工程对已知的一些 N-氨甲酰基水解酶进行结构改造以便能满足工业生产的需要^[8,9]。

我们筛选到一株同时含有 D-海因酶和 D-氨甲酰基水解酶的新菌株 *Sinorhizobium morelens* S-5^[10],

纯化了其中的 D-氨甲酰基水解酶,测定了其 N 端的氨基酸序列,在此基础上,本文报道了 D-氨甲酰基水解酶基因的克隆、表达和一些酶学性质的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 :*Sinorhizobium morelens* S-5 是本实验室筛选并保存的同时产 D-海因酶和 D-氨甲酰基水解酶的菌株;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 作为克隆的受体菌;大肠杆菌 BL21(DE3)作为蛋白表达用的受体菌;克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司。表达载体 pET-30a 为本实验室保存。

1.1.2 培养基 :LB 培养基按文献 [1] 配制;发酵培养基按文献 [10] 配制。

1.1.3 主要试剂 :各种氨基酸的氨甲酰基衍生物按 Stark 和 Smyth 等^[12]的方法制备;LA-Taq DNA 聚合酶和 LA-PCRtm *in vitro* Cloning Kit 试剂盒、各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。甲醇和乙腈是色谱纯级。

1.1.4 仪器 :722S 型分光光度计(上海分析仪器厂);Beckman GS-15R 离心机;dr. hielscher UP200S 超声波破碎仪;ÄKTA FPLC 系统(Pharmacia 公司);HP1050 HPLC 系统(HP 公司);Beckman P/ACE System MDQ 型毛细管电泳仪(Beckman 公司)。

* 通讯作者。Tel :86-10-62587206 ;Fax :86-10-62653468 ;E-mail :sunwr@sun.im.ac.cn

作者简介:吴 胜(1976-),男,山西人,博士研究生,研究方向为手性药物的生物不对称合成。E-mail :wush@sun.im.ac.cn

收稿日期 2005-10-17 ;接受日期 2005-12-21 ;修回日期 2006-03-01

1.2 DNA 操作

DNA 的提取、连接、转化和质粒的提取按文献 [11] 进行。

1.3 基因的克隆

D-氨甲酰基水解酶基因 (*hyuC*) 克隆利用 LA PCR *in vitro* cloning kit 进行。*Sinorhizobium morelens* S-5 的基因组 DNA 经 *Sau*3A I 部分酶切后, 用乙醇沉淀回收。将部分酶切的基因组 DNA 与试剂盒中提供的包含 *Bam*H I 酶切位点的 cassette DNA 相连接。连接产物作为第一轮 PCR 反应所用的模板。根据纯化的天然 D-氨甲酰基水解酶的 N 端序列 (Thr-Arg-Gln-Met-Ile-Leu-Ala-Val-Gly-Gln-) 设计简并引物 S1 为 5'-ATGACNCNCARATGATNCT-3' (R 是 A 或 G; N 代表任何碱基)。利用设计的简并引物 S1 和试剂盒中提供的根据 cassette DNA 序列设计的引物 C1 和 C2 进行两轮 PCR 反应。其中第一轮 PCR 反应的产物作为第二轮 PCR 反应所需的模板。模板 DNA (0.5 μ g) 加入到 40 μ L 超纯水中, 预变性 10min 后, 分别加入 dNTP 至 0.2mmol/L, 引物各 25pmol, LA *Taq* DNA 聚合酶 2.5U 至终体积为 50 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 3min, 进行 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。第一轮扩增的 PCR 产物浓度很低, 电泳未见明显的 DNA 条带。第二轮 PCR 扩增出两条明显的条带, 约为 400bp 和 1300bp。回收两段 PCR 产物, 进行 TA 克隆后测序。测序结果表明 415bp 的 DNA 序列与 1354bp DNA 序列中 5' 端的序列完全相同。而对 1354bp DNA 序列的分析结果表明从其 5' 端的 ATG 开始, 到 915bp 处的终止密码有一个完整的阅读框架, 编码 304 个氨基酸残基。其中的 N 端氨基酸序列中第一个氨基酸残基是 Met, 而其后的 10 个氨基酸残基与天然的氨甲酰基水解酶完全相同。*hyuC* 基因已提交 GenBank, 登录号为 AY787759。

1.4 D-氨甲酰基水解酶基因表达载体的构建、转化和重组蛋白的表达

设计引物 P1 (5'-CGCATATGACACGTCAGATGATACTTG-3') 和 P2 (5'-GCGGATCCTCAGAGTTCCGCGATCAG-3''), 其中分别引入 *Nde* I 和 *Bam*H I 两个酶切位点。50 μ L 的反应体系中, 含 0.2mmol/L dNTP, 引物各 25pmol, 0.5 μ g 的模板 DNA (插入 1354bp DNA 的重组质粒), Ex *Taq* DNA 聚合酶 1U。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 进行 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。回收 PCR 产物, 经 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切后与表达载体 pET30a 连

接构建重组质粒 pET30a-HyuC。将重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 的感受态细胞, 转化的阳性克隆用 PCR 的方法鉴定。将重组的大肠杆菌 BL21 (DE3) pET30a-HyuC 的单菌落接种到含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600} 约 0.6 ~ 0.7 时, 加入终浓度为 0.4mmol/L 的 IPTG 于 30 $^{\circ}$ C 诱导 5h, 通过离心富集收获细胞, 用于酶的活性分析和蛋白的纯化。

1.5 D-氨甲酰基水解酶活性的测定方法

400 μ L 的反应体系中含有 100mmol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液, 25mmol/L N-氨甲酰基-D-对羟苯甘氨酸和酶溶液 (0.1 ~ 20mg/mL)。反应在 40 $^{\circ}$ C 保温 5 ~ 60min 后, 加入 400 μ L 无水乙醇终止反应。在实验条件下, 每分钟生成 1 μ mol D-对羟苯甘氨酸或 1 μ mol NH_4^+ 为 1 个活力单位。D-对羟苯甘氨酸的测定采用 HPLC 法^[10]。 NH_4^+ 的测定采用 Berthelot 分光光度法^[13]。两种方法所得结果的偏差大约 3%。

1.6 D-氨甲酰基水解酶的纯化

培养收获的大肠杆菌 (DE3) pET30a-HyuC 细胞沉淀后, 重新悬浮于 Buffer A (50mmol/L pH7.2 Tris-HCl, 1mmol/L DTT) 溶液, 超声破碎 (400W, 15min), 50 $^{\circ}$ C 加热 10min, 13000r/min 离心除去细胞碎片和变性灭活的蛋白。将上清液应用于经 Buffer A 溶液充分平衡的 DEAE-sepharose 柱, 在彻底洗涤除去杂蛋白后, 用含有 0 ~ 1.0mmol/L NaCl 的 Buffer A 线性梯度洗脱, 收集并合并有酶活的酶液。向酶液中加入 NaCl 直至浓度为 2.0mol/L 左右, 过滤后应用于经含 2.0mol/L NaCl 的 Buffer A 充分平衡的 Phenyl 柱, 在彻底洗涤除去杂蛋白后, 用含有 2.0 ~ 0mmol/L NaCl 的 Buffer A 线性梯度洗脱, 收集并合并有酶活的酶液, 在 Buffer A 中透析过夜, 然后通过超滤浓缩蛋白样品。后者进一步应用于经含有 0.15mol/L NaCl 的 Buffer A 溶液充分平衡的 Superdex HR200 柱, 用同样的缓冲液洗脱, 测定酶活, 用 SDS-PAGE 分析纯度。将纯酶脱盐后, 存放于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.7 蛋白浓度的确定

采用 Bradford 法^[14], 以 BSA 为标准蛋白。

1.8 分子量的测定

酶分子量通过凝胶过滤的方法确定。用含有 0.15mol/L NaCl 的 Buffer A 溶液充分平衡的 Superdex HR200 柱, 以转铁蛋白 (450kDa)、醛缩酶 (158kDa)、牛血清蛋白 (66kDa)、卵清蛋白 (43kDa) 和胰凝乳蛋白酶原 A (25kDa) 作为标准蛋白, 以同样的流速和缓冲液测定纯酶的洗脱体积, 进而确定其分子量。亚

基的分子量通过 SDS-PAGE(12% 丙烯酰胺胶)测定。

2 结果

2.1 D-氨甲酰基水解酶基因的克隆和序列比较

hyuC 基因通过 LA PCR 克隆获得 ,片段大小为 915kb。该基因编码 304 个氨基酸残基 ,蛋白的理论分子量是 34363Da ,与从 *Sinorhizobium morelens* S-5 中纯化的天然蛋白的分子量(38kDa)接近。通过对 NCBI 蛋白质数据库的 BLAST 搜索 ,结果表明 D-氨甲酰基水解酶与氨基水解酶家族的蛋白具有高的相似性。其中与 8 个已发表的 D-氨甲酰基水解酶的序列相似性范围为 46% ~ 99% ,而与 L-氨甲酰基水解酶的相似度很低。这 8 个蛋白分别源自 *Agrobacterium radiobacter* CCRC14924 , *Agrobacterium tumefaciens* NRRL B1129 (GenBank 登录号 :X91070) , *Agrobacterium* sp. IP I-671 (GenBank 登录号 :AF335479) , *Agrobacterium* sp. KNK712 (GenBank 登录号 :AB007368) , *Arthrobacter crystallopoietes* (GenBank 登录号 :AY185303) , *Pseudomonas* sp. KNK003A (GenBank 登录号 :AB007369) , *Ralstonia pickettii* (GenBank 登录号 :AF320814) , and *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (GenBank 登录号 :NC004463)。其中来自 *Agrobacterium* sp. , *Arthrobacter* sp. 和 *Pseudomonas* sp. 的 D-氨甲酰基水解酶的活性已有报道 ,而来自 *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 蛋白的功能是通过基因组测序后注释的 ,还未得到实验验证。而目前还没有来自 *Ralstonia pickettii* 中的 D-氨甲酰基水解酶性质的报道^[15]。 *Sinorhizobium morelense* S-5 的 D-氨甲酰基水解酶与来自 *Agrobacterium* sp. KNK712 和 *Agrobacterium radiobacter* CCRC 14924 的 D-氨甲酰基水解酶氨基酸序列的相似性分别为 98% 和 96%。两株 *Agrobacterium* sp. 中的 D-氨甲酰基水解酶的相似度为 97% ,且这两个酶蛋白的晶体结构已被解析^[16 , 17] ,可以推断来自 *Sinorhizobium morelense* S-5 的 D-氨甲酰基水解酶与上述两个酶的晶体结构几近相同。 *Sinorhizobium morelens* S-5 的 D-氨甲酰基水解酶与 *Agrobacterium* sp. KNK712 的 D-氨甲酰基水解酶的蛋白序列仅相差 3 个不同的氨基酸残基 ,分别是 Tyr30Asp ,Phe50Leu 和 Pro118Ser。 3 个氨基酸残基的变化并未改变以 Cys172-Glu47-Lys127 构成的酶的催化中心 ,第 50 位的氨基酸残基紧邻酶与底物相结合的结构域部分 ,而 Leu 变为 Phe 疏水性增强 ,这一变化可能对底物与酶的结合造成一定的影响。另外

Pro 的结构中含有一个吡咯环 ,在以往氨基酸残基的突变实验中发现 ,Pro 的增加与酶的热稳定性和活力变化有明显的相关性 ,Pro118Ser 的变化可能影响酶的稳定性。

2.2 D-氨甲酰基水解酶的表达和纯化

hyuC 基因在大肠杆菌中得到高水平的表达 ,氨甲酰基水解酶在粗酶液中的比活是 1.33U/mg ,与原始菌 *Sinorhizobium morelens* S-5 相比 ,活性提高 27 倍。经过热处理和三步柱色谱 ,获得电泳纯的重组 D-氨甲酰基水解酶(纯化过程中每步的 SDS-PAGE 检测见图 1)。纯酶的比活是 21.4U/mg ,收率为 21.2% ,纯化倍数为 16.1 倍(表 1)。

表 1 *E. coli* BL21(DE3)pET30a-HyuC 中重组的 D-氨甲酰基水解酶的分离纯化表

Table 1 Purification of the recombinant D-carbamoylase from <i>E. coli</i> BL21(DE3)pET30a-HyuC				
Purification step	Total protein /mg	Total activity /U	Specific activity (U/mg)	Yield /%
Crude extract	546	726	1.33	100
Heat treatment	254	718	2.83	98.9
DEAE-sepharose	50	420	8.40	57.8
Phenyl-sepharose	16	276	17.3	38.0
Superdex HR200	7.2	154	21.4	21.2

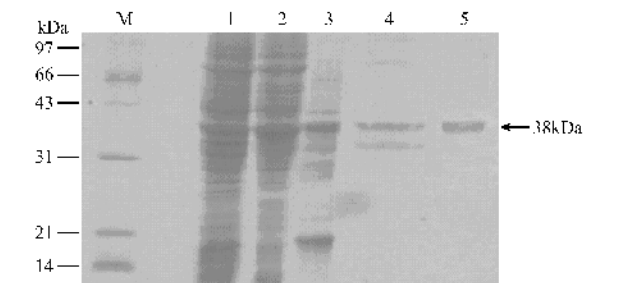


图 1 重组 D-氨甲酰基水解酶的 SDS-PAGE 分析
Fig.1 SDS-PAGE analysis of samples from each step in the purification of the D-carbamoylase from *E. coli* BL21(DE3)pET30a-HyuC. M. Molecular mass markers ; 1. Crude extract ; 2. Heat treatment ; 3. DEAE-sepharose fractions ; 4. Phenyl-sepharose fractions ; 5. Superdex HR200 fractions.

2.3 D-氨甲酰基水解酶的分子量和亚基结构

通过 SDS-PAGE 检测纯酶的分子量大约 38kDa ,而通过凝胶过滤测得纯酶的分子量为 150kDa ,因此重组的 D-氨甲酰基水解酶是一个同源四聚体 ,这与 *Sinorhizobium morelens* S-5 中天然酶的实验结果是一致的。

2.4 D-氨甲酰基水解酶的一些生化性质

检测了纯酶在 pH3.8 ~ 9.0 之间的活性变化 ,发

现酶在磷酸缓冲体系中的最适 pH 是 7.0。该酶的 pH 稳定范围在 6.5 ~ 8.2 之间。检测了酶在 20 ~ 80℃ 之间的活性变化,活性随着温度的增加而呈上升趋势,在 60℃ 达到最高,60℃ 以后酶的活力下降很快,可能与酶的热变性有关。考察了酶的热稳定性,结果显示酶在 50℃ 保温 30min 活力仅丧失约 2%,说明此酶具有较高的热稳定性(图 2)。

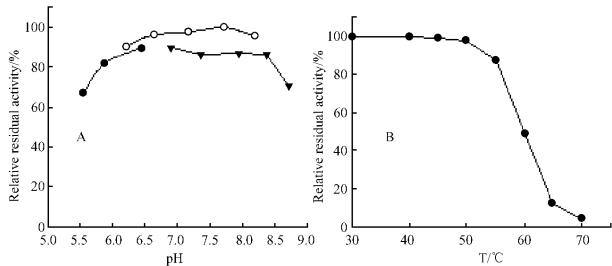


图 2 pH 和温度对 D-氨甲酰基水解酶稳定性的影响
Fig.2 Effect of pH (A) and temperature (B) on the stability of D-carbamoylase. (A) 10mU D-carbamoylase was added into 5mmol/L of test buffer in a total volume of 0.1mL (dilution factor 10) and incubated at 30℃ for 30min, and then 0.3mL of 25mmol/L N-carbamoyl-D-*p*-hydroxyphenylglycine in 100mmol/L sodium phosphate buffer (pH7.0) was added immediately. NH₄⁺ ions formed during 10min reaction were determined for estimation of the remaining activity. NaH₂PO₄/citric acid buffer was used for pH 5.5 ~ 6.4 (●), sodium phosphate buffer for pH 6.2 ~ 8.2 (○), Tris/HCl buffer for 6.9 ~ 8.7 (▼). (B) 10mU of D-carbamoylase in 0.1mL of 100mmol/L sodium phosphate buffer (pH 7.0) was incubated for 30min at various temperatures. The remaining activity was measured under the standard assay conditions. The relative remaining activity is expressed as the percentage of the maximum remaining activity attained under the experimental conditions.

对来自 *Agrobacterium* sp. 的 D-氨甲酰基水解酶的研究结果表明,在该酶的活性中心有一个 Cys 残基,由于这个 Cys 残基的氧化而造成酶活性的丧失^[18]。为了检测来自 *Sinorhizobium morelens* S-5 的 D-氨甲酰基水解酶的氧化稳定性,我们考察了纯酶对 H₂O₂ 的耐受性。随着 H₂O₂ 浓度的增加,酶的活力逐渐降低,当酶在终浓度为 0.1 和 0.2mmol/L H₂O₂ 中作用 30min 后,活力分别丧失 32% 和 57%。与来自 *Agrobacterium radiobacter* NRRL B11291 中的 D-氨甲酰基水解酶相比,酶对 H₂O₂ 的耐受力提高了,这意味着酶氧化稳定性的提高。

考察了各种金属离子和一些化学试剂对纯酶活力的影响。2mmol/L 的 Fe²⁺ 和 Ca²⁺ 对酶活有一定的促进作用(与对照相比,能提高 10% 左右),而下列其他的金属离子对酶活有不同程度的抑制作用: Zn²⁺ (98%), Cu²⁺ (98.4%), Ag⁺ (97.6%), Ba²⁺ (8%), Mg²⁺ (24.6%), Sn²⁺ (46.5%), Mn²⁺ (58%)

和 Co²⁺ (67%)。2mmol/L 的金属螯合剂 EDTA 和 8-hydroxyquinoline 对酶活没有影响。一些巯基试剂,如 dithiothreitol, 2-mercaptoethanol 和 phenylmethanesulfonyl fluoride 对酶活影响不大。

2.5 底物的专一性和立体选择性

表 2 显示的是纯酶对一系列的氨基酸的氨甲酰基衍生物的水解情况。从中可见,酶对脂肪族和芳香族的氨甲酰基氨基酸的化合物都有水解作用,作用范围较广。但酶对底物的选择有严格的立体专一性,作用于 D-型的化合物。按照文献[10]的方法,通过毛细管电泳分析反应产物结果表明酶在催化水解 N-Carbamoyl-DL-*p*-hydroxyphenylglycine 的过程中,只作用于 N-Carbamoyl-D-*p*-hydroxyphenylglycine,生成 D-*p*-hydroxyphenylglycine,而不水解 N-Carbamoyl-L-*p*-hydroxyphenylglycine。N-Carbamoyl-β-alanine 是嘧啶分解代谢的中间体,该酶对此化合物无水解作用。此外,酶对 α-碳位的双取代化合物如(RS)-α-ethyl-N-carbamoylphenylglycine 也无水解作用。

表 2 D-氨甲酰基水解酶的底物选择性		
Table 2 Substrate specificity of the D-carbamoylase		
Compound	Relative activity/%	
N-Carbamoyl-D- <i>p</i> -hydroxyphenylglycine	100	
N-Carbamoyl-D-phenylglycine	58	
N-Carbamoyl-D-alanine	13	
N-Carbamoyl-D-leucine	43	
N-Carbamoyl-D-methionine	48	
N-Carbamoyl-DL- <i>p</i> -hydroxyphenylglycine	90	
N-Carbamoyl-DL-valine	38	
N-Carbamoyl-DL-tryptophan	14	
N-Carbamoyl-DL-leucine	40	
N-Carbamoyl-L-leucine	0	
N-Carbamoyl-L-phenylalanine	0	
N-Carbamoylglycine	0	
N-Carbamoyl-β-alanine	0	
(RS)-α-ethyl-N-carbamoylphenylglycine	0	

A compound (20mmol/L) was incubated under the standard assay conditions with the purified D-carbamoylase. Ammonium release was assayed.

3 讨论

在以前的工作中我们分离到一株新的产 D-海因酶和 D-氨甲酰基水解酶菌株 *Sinorhizobium morelens* S-5^[10]。本文报道了 D-氨甲酰基水解酶基因的克隆表达、纯化和一些基本的酶学性质的研究。通过对氨基酸序列比较发现,不同种属来源的 D-氨甲酰基水解酶有较高的同源性,表明在进化上可能存在共同的祖先。特别值得注意的是来自 *Agrobacterium* sp. 和 *Sinorhizobium* sp. 的 D-氨甲酰基

水解酶相似度在 96% 以上,而 *Agrobacterium* sp. 和 *Sinorhizobium* sp. 都是与植物相互作用的微生物,是否在两类微生物之间存在遗传信息的交流?已证明来自 *Agrobacterium* sp. IP 1671, *Agrobacterium tumefaciens* NRRL B11291 和 *Agrobacterium* sp. KNK 712 的 D-氨甲酰基水解酶基因都位于所属菌株的内源性质粒上,但质粒的大小不同,进一步通过比较 *Agrobacterium* sp. KNK712 和 *Agrobacterium* sp. IP 1671 的碱基序列发现消旋酶基因在 *Agrobacterium* sp. KNK 712 中缺失了^[5]。此外并不是每株 *Agrobacterium* sp. 中都具有氨甲酰基水解酶的活力,因此 *Agrobacterium* sp. 的氨甲酰基水解酶基因的获得极可能是通过质粒的转移获得的。*Sinorhizobium* sp 生存的环境中有 *Agrobacterium* sp. 的存在,那么 *Sinorhizobium morelens* S-5 中 *hyuC* 基因的获得是否是通过从 *Agrobacterium* sp. 中转移而来?到目前为止, *Sinorhizobium meliloti* 的基因组 DNA 的测序工作已结束,通过与测定的基因组序列比较发现从 *Sinorhizobium morelens* S-5 中克隆的 *hyuC* 基因及氨基酸序列与 *Sinorhizobium meliloti* 的一些基因的同源性很低,因此从反面可以推导出 *hyuC* 基因也可能存在于 *Sinorhizobium morelens* S-5 的内源性质粒上,当然这需要进行进一步的实验验证(如通过脉冲凝胶电泳确定菌株中是否存在内源性质粒,其次通过 Southern Blot 确定基因的位置)。内源性质粒在生产过程中容易发生丢失从而造成菌株的衰退,因此用原始菌株作为生产菌株不是一种理想的选择。

源自 *Sinorhizobium morelens* S-5 的 D-氨甲酰基水解酶的最适底物是 N-氨甲酰基-D-对羟苯甘氨酸,而 *Agrobacterium* sp. 中的最适底物是 N-氨甲酰基-D-甲硫氨酸。此外本实验中在大肠杆菌表达的重组 D-氨甲酰基水解酶是同源四聚体,且亚基的分子量为 38kDa,这与 *Sinorhizobium morelens* S-5 中天然酶的实验结果是一致的。来自 *Agrobacterium* sp. 和 *Pseudomonas* sp. 的 D-氨甲酰基水解酶是由 38kDa 的亚基组成的同源二聚体,而来自 *Blastobacter* sp. 和 *Comamonas* sp. 的 D-氨甲酰基水解酶则是由 40kDa 的亚基组成的同源三聚体。显然来自不同种属的 D-氨甲酰基水解酶有不同的亚基数。而亚基的聚集形态对酶的活性和稳定性都有一定的影响^[19, 20]。重组的 D-氨甲酰基水解酶比 *Sinorhizobium morelens* S-5 天然酶蛋白的 N 端多一个 Met,比较两酶的酶学性质发现,它们的最适温度、最适 pH、立体和底物选择性相同,热稳定性和氧化稳定性亦非常接近^[21]。源

自 *Sinorhizobium morelens* S-5 的 D-氨甲酰基水解酶的热稳定性要高于 *Agrobacterium* sp. KNK712,同时该酶的抗氧化能力要高于 *Agrobacterium tumefaciens* NRRL B11291^[18]。稳定性和抗氧化能力的提高对酶在工业上的应用是非常有利的。酶的性能的改进可能与酶结构的变化有正相关性,因此有必要对酶的结构进行模拟,对不同空间位置上氨基酸的变化导致的催化性质和稳定性方面的改变的现象进行分析和进一步的试验。

参 考 文 献

- [1] Syldatk C, Laufer A, Muller R, et al. Production of optically pure D- and L- α -amino acids by bioconversion of DL-5-monosubstituted hydantoin derivatives. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1990, **41**: 30 - 51.
- [2] Olivieri R, Fascetti E, Angelini L, et al. Microbial transformation of racemic hydantoins to D-amino acids. *Biotechnol Bioeng*, 1981, **23**: 2173 - 2183.
- [3] Yasuhiro I, Hirokazu N, Yukio Y, et al. Screening, characterization, and cloning of the gene for N-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase from thermotolerant soil bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, **62**: 882 - 886.
- [4] Louwrier A, Knowles CJ. The purification and characterization of a novel D(-)-specific carbamoylase enzyme from an *Agrobacterium* sp. *Enzyme Microb Technol*, 1996, **19**: 562 - 571.
- [5] Hils M, Münch P, Altenbuchner J, et al. Cloning and characterization of genes from *Agrobacterium* sp. IP 1671 involved in hydantoin degradation. *Appl Microb Biotechnol*, 2001, **57**: 680 - 688.
- [6] Ogawa J, Chung MCM, Hida S, et al. Thermostable N-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase: screening, purification and characterization. *J Biotechnol*, 1994, **38**: 11 - 19.
- [7] Möller A, Syldatk C, Schulze M. Stereo- and substrate-specificity of a D-hydantoinase and D-N-carbamoyl-amino acid amidohydrolase of *Arthrobacter crystallopoietes* AM2. *Enzyme Microb Technol*, 1988, **10**: 618 - 625.
- [8] Chen CY, Chiu WC, Liu JS, et al. Structural basis for catalysis and substrate specificity of *Agrobacterium radiobacter* N-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 26194 - 26201.
- [9] Oh KH, Nam SH, Kim HS. Improvement of oxidative and thermostability of N-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase by directed evolution. *Protein Eng*, 2002, **15**: 689 - 695.
- [10] Wu S, Yang L, Liu YB, et al. Enzymatic production of D-p-hydroxyphenylglycine from DL-5-p-Hydroxyphenylhydantoin by *Sinorhizobium morelens* S-5. *Enzyme Microb Technol*, 2005, **36**: 520 - 526.
- [11] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Gold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.

- [12] Stark GR , Smyth DG . The use of cyanate for the determination of nh₂-terminal residues in proteins. *J Biol Chem* ,1963 **238** :214 – 225.
- [13] Weatherburn MW . Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem* ,1976 **39** :971 – 974.
- [14] Bradford MM . 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.
- [15] 许 祯 ,姜卫红 ,焦瑞身 ,等 . *Burkholderia pickettii* 中 D-乙内酰胺酶基因(*dha*)的克隆、测序及表达 . 生物工程学报 ,2002 ,**18** (2) :149 – 154.
- [16] Nakai T , Hasegawa T , Yamashita E , *et al.* . Crystal structure of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases. *Structure* ,2000 **8** :729 – 739.
- [17] Wang WC , Hsu WH , Chien FT , *et al.* . Crystal structure and site-directed mutagenesis studies of N-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase from *Agrobacterium radiobacter* reveals a homotetramer and insight into a catalytic cleft. *J Mol Biol* ,2001 ,**306** :251 – 261.
- [18] Grifantini R , Pratesi C , Galli G , *et al.* . Topological mapping of the cysteine residues of N-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase and their role in enzymatic activity. *J Biol Chem* ,1996 **271** :9326 – 9331.
- [19] Salminen T , Teplyakov A , Kankare J , *et al.* . An unusual route to thermostability disclosed by the comparison of *Thermus thermophilus* and *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatases. *Protein Sci* ,1996 ,**5** :1014 – 1025.
- [20] Rietveld AW , Ferreira ST . Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM : the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry* ,1998 **37** :933 – 937.
- [21] Wu S , Liu YB , Zhao GG , *et al.* . Thermostable d-carbamoylase from *Sinorhizobium morelens* S-5 : purification , characterization and gene expression in *Escherichia coli* . *Biochimie* ,2006 **88** :237 – 244.

Cloning , expression and purification of D-carbamoylase from *Sinorhizobium morelens* S-5

WU Sheng , WANG Jian-jun , YANG Liu , SUN Wan-ru *

(State Key Laboratory of Microbial Resources , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract : A N-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase gene(*hyuC*) from *Sinorhizobium morelens* S-5 was cloned by LA PCR , and its nucleotide sequence was determined. The deduced amino acid sequence encoded by the *hyuC* gene exhibited high homology to the amino acid sequences of D-carbamoylase from other sources. The gene could be highly expressed in *Escherichia coli* , and the recombinant enzyme was purified 16.1-fold to homogeneity with a yield of 21.2% by heat treatment and three steps of column chromatography. The results of gel filtration on Superdex 200 HR and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis suggested that the enzyme was a tetramer protein of identical 38-kDa subunits. The recombinant enzyme catalyzed the hydrolysis of N-carbamoyl alpha-amino acid to the corresponding free amino acid , and it was strictly D-specific. The enzyme showed broad substrate specificity , and exhibited high activity in the hydrolysis of N-carbamoyl-D-p-hydroxyphenylglycine as substrate. The enzyme did not hydrolyze N-carbamoyl-beta-alanine. The optimum pH and temperature of the enzyme were pH 7.0 and 60°C , respectively. Enzyme activity was slightly improved by Ca²⁺ and Fe²⁺ , and nearly not affected by metal chelators and sulfhydryl reagents. The enzyme showed high thermal and oxidative stability. These results show that the enzyme has great potential for industrial application.

Keywords : *Sinorhizobium morelens* ; D-carbamoylase ; Protein purification ; Gene Expression

* Corresponding author. Tel : 86-10-62587206 ; Fax : 86-10-62653468 ; E-mail : sunwr@sun.im.ac.cn