

# 一种具有立体选择性新酯酶的菌种筛选和基因克隆

陈少欣, 史炳照

(上海医药工业研究院生物部 上海 200040)

**摘 要:** 从土样分离到一株产生具有立体选择性酯水解酶的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* NH33)。构建 *P. putida* NH33 的基因组文库,并在 *E. coli* 中进行酯酶活性筛选,得到一个含有 4.7kb 插入片段的阳性克隆。对这个克隆的 DNA 片段进行序列分析,表明它含有一个 1142 个碱基的开放阅读框,为编码 381 个氨基酸的酯酶。推测的酯酶氨基酸序列与其它丝氨酸酯水解酶具有共同的保守基序 GXSXG。把该蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)中进行表达,并用金属亲和层析纯化至单一条带。利用纯化的酶水解 2-芳基丙酸乙酯制备 2-芳基丙酸的 S 型异构体,产物的光学纯度  $ee_p > 99\%$ ,说明此酶可用于手性药物的合成。该酯酶是一个新酶,其基因序列已递交 GenBank,登记号为 AY896293。

**关键词:** 酯酶; *P. putida* NH33 克隆; 序列

中图分类号: Q78, Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)03-0452-04

随着人们对手性药物需求的增加,微生物或酶催化的方法已经被成功应用于单一对映体药物及中间体的合成。在这些酶中,以水解酶类如脂肪酶、酯酶和蛋白酶最为主要<sup>[1]</sup>。脂肪酶和酯酶可催化合成或者断裂酯键,具有较宽的底物识别和高的立体化学选择性。酯、醇、酸以及酰胺类有机物等都是它们很好的反应底物,有着重要的工业应用价值<sup>[2]</sup>。

由于脂肪酶和酯酶催化的化学反应和底物结构有很多,因此提供符合反应要求的酶源是非常关键的<sup>[3]</sup>。目前虽然有些商品化脂肪酶或酯酶可供研究,但是它们可选择的品种不多,而且价格很贵。因此发现新的酯水解酶<sup>[4-6]</sup>,或者对现有的酶进行蛋白质工程改造<sup>[7,8]</sup>,以拓宽酯水解酶的酶源及其应用范围已经成为酶学研究的热点。本文从土样中筛选到多株具有酯水解活性的微生物,从其中一株菌株中克隆了一个具有高度立体化学选择性的酯酶基因,进行基因表达和初步的酶学功能分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂:** 限制性内切酶、TaKaRa *Ex Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准、蛋白质分子量标准均购自大连宝生物工程公司(TaKaRa); DNA 胶回收试剂盒、IPTG、氨苄青霉素(Amp)购自上海 Sangon 公司; Histrap FF 柱购自 Amersham 公司; 其它试剂均为分析级产品,购自上海化学试剂公司。

**1.1.2 菌株和质粒:** 大肠杆菌(*Escherichia coli*)

DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3), pUC18 均为本实验室保藏; pET-22b(+) 为 Novagen 公司产品。

**1.1.3 培养基:** ① 筛土用富集培养基: 每升含蛋白胨 5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1g, 氟比洛芬乙酯 1mmol/L, pH 7.2 ~ 7.5; ② 发酵培养基: 每升含蛋白胨 10g, 酵母提取物 3g, NaCl 5g, pH 7.2 ~ 7.4; ③ LB 培养基按文献 9 配制。

### 1.2 产酶微生物筛选

取土样 1g 加入含 30mL 富集培养基中, 30℃、250r/min 培养 3d。将培养液稀释,涂布平板, 30℃培养 2 ~ 3d。挑取产透明圈的菌落至 5mL 发酵培养基中, 30℃、250r/min 培养 24h, 加入 1mmol/L 的氟比洛芬乙酯, 继续培养 36h。选出产生氟比洛芬的菌株。

将初筛到的菌种接种于 30mL 发酵培养基中, 30℃、250r/min 培养 24h。取 5mL 发酵液离心, 收集细胞, 用 dH<sub>2</sub>O 洗涤后, 悬浮于 0.9mL 100mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0), 加入 0.1mL 10mmol/L 的氟比洛芬乙酯。在 30℃、250r/min 下反应 36h, 分析反应产物的含量和光学纯度。

### 1.3 基因操作及蛋白质操作

常规的分子克隆操作、表达产物 SDS-PAGE 分析参照文献 9, 10 进行。

### 1.4 *P. putida* NH33 基因文库的构建及筛选

*P. putida* NH33 染色体 DNA 经过 *Sau* 3AI 部分酶切后与 *Bam* HI 酶切过的 pUC18 质粒连接, 电击转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 转化子涂布含 100 $\mu$ g/mL Amp 的 LB 平板中, 37℃培养 1d。把菌落

转印至含 100μg/mL Amp、1% 三丁酸甘油酯 (W/V) 的新 LB 平板中, 37℃ 培养 3d, 挑取菌落周围产生透明圈的转化子, 接种于 5mL 的 LB 液体培养基, 37℃ 培养过夜, 离心收集菌体, 分析酯酶的活性。

1.5 PPEst 基因的扩增及克隆

设计引物 PPFP: 5'-GGGAATTCCATATGCAGATCCAGGGTCACTATGAG-3' 和 PPBP: 5'-CCCAAGCTTGATCAAAGGCAACTGGCAAG-3', 在两条引物的 5' 端分别加上 Nde I 和 Hind III 酶切位点。以 *P. putida* NH33 基因组 DNA 为模板, 用上述两条引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50μL, PCR 扩增条件: 94℃ 30s, 64℃ 1min, 72℃ 1min, 30 个循环, 72℃ 10min。PCR 产物用 0.7% 琼脂糖凝胶分析和回收目标 DNA 片段。

PCR 产物经 Nde I 和 Hind III 双酶切后, 与同样双酶切的 pET-22b(+) 连接, 转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞。挑单菌落, 提质粒, 用 Nde I 和 Hind III 双酶切验证和 DNA 序列测定。

1.6 重组酯酶的表达及纯化

重组 *E. coli* 接种于含 100μg/mL Amp 的 LB 培养基, 37℃、250r/min 培养至 OD<sub>600</sub> = 0.6 左右, 把培养温度降至 28℃, 加入 0.5mmol/L IPTG, 诱导过夜。培养液离心, 收集菌体, 分别分析酯酶活力和蛋白质表达量。

2g 重组菌细胞溶于含 0.5mol/L NaCl, 30mmol/L 咪唑的 20mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.4), 超声破壁, 离心, 上清液用 Histrap FF 柱进行纯化, 具体操作方法参见厂商说明。

1.7 反应 pH 和温度对酯酶活性的影响

在 30℃ 条件下, 测定酯酶在不同 pH 值 (6.0 ~ 12.0) 的酶活性来考察反应的最适 pH。为了研究最适的反应温度, 在 pH10.0 条件下, 测定酯酶在 20 ~ 50℃ 的活性。酶活性分析见 1.8, 反应 pH 和温度根据具体实验要求做相应改变。

1.8 酶活性测定

以外消旋氟比洛芬乙酯为底物, 反应体系为: 100mmol/L 氟比洛芬乙酯 10μL, 适量的菌体或纯酶, 50mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH10.0) 补足至总体积 1mL, 35℃ 反应 10 ~ 20min, 加入等体积甲醇终止反应。酶活力单位定义为: 在 35℃、pH10.0 条件下, 每分钟水解产生 1μmol 氟比洛芬所需的酶量为 1 个酶活力单位 (U)。

1.9 反应产物的 HPLC 分析

反应产物用 C<sub>18</sub> 柱 (Kromasil) 分析, 流动相为甲醇/水 (86:14), 流速 0.8mL/min。产物光学纯用手性色谱柱 CHI-TBB (Kromasil) 测定, 流动相为正己烷/叔

丁基甲醚/冰醋酸 (70:30:0.1), 流速 1.0mL/min。紫外检测器波长为 254nm。产物的光学纯度用对映体过量值 (ee<sub>p</sub>) 表示,  $ee_p = \frac{[S] - [R]}{[S] + [R]} \times 100\%$ 。其中 [S] 为产物中 (S)-异构体的含量, [R] 为产物中 (R)-异构体的含量。反应的对映体选择性 (E) 用下式计算<sup>[11]</sup>:  $E = \ln[1 - \alpha(1 + ee_p)] / \ln[1 + \alpha(1 - ee_p)]$ , α 为反应的转化率。

2 结果和讨论

2.1 微生物的筛选

从不同地区采集土样 100 份, 经过液体培养基富集培养后, 在含氟比洛芬乙酯的平板进行初筛, 共分离到 500 多株微生物, 其中有 150 多株产生的透明圈较大, 用于进一步的筛选。比较这些菌株水解氟比洛芬乙酯的反应速度和产物的立体选择性, 部分结果见表 1。在这些菌株中, 有 5 种菌株的拆分产物为 ee<sub>p</sub> > 90% 的 S-氟比洛芬。其中编号为 NH33 的菌株水解产物的光学纯度最高, 生成 98% ee<sub>p</sub> 的 S-氟比洛芬。因此本文选择 NH33 菌株用于进一步研究。该微生物经过上海疾病预防控制中心微生物工程研究所通过菌株的形态、生化和生理分析, 鉴定为恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida* NH33)。

表 1 产酯水解酶微生物的部分筛选结果

Table 1 Partial results of isolated microorganisms producing lipolytic enzyme.					
Strain	Conversion /%	ee <sub>p</sub> % (S-isomer)	Strain	Conversion /%	ee <sub>p</sub> % (S-isomer)
NH32	25.0	52	Y55	19.3	97
NH33	28.0	98	C81	15.7	57
NH53	23.5	80	S11	30.0	47
Y51	30.4	97	Z21	10.5	91
Y52	36.5	77	B1.583	9.1	95

2.2 基因文库的构建和筛选

构建 *P. Putida* NH33 基因文库, 文库包含约 25000 个 *E. coli* 转化子。随机挑选 10 个转化子, 通过酶切分析知道插入片段的大小约在 3 ~ 8kb 左右, 片段大小在理论上包含一个完整的外源蛋白质基因, 能在 *E. coli* 中表达活性的酯水解酶, 这样就可以利用筛选模型直接在平板上进行快速的筛选, 这是一种简便分离酯水解酶功能基因的方法。共从平板中挑取到 22 株具有水解三丁酸甘油酯产生透明圈的转化子。通过进一步分析, 只有 1 个转化子 (编号为 pNH10) 能够水解氟比洛芬乙酯产生 > 99% ee<sub>p</sub> 的 S-氟比洛芬。

提取 pNH10 的质粒, 经过酶切分析, 表明它含有一个 9.2kb 的插入片段。对该片段进一步经过不同单酶切和双酶切后克隆至 pUC18, 转化 *E. coli*

DH5 $\alpha$ 。菌株经过培养后,分析它们的酶活,结果表明质粒 pUC18-EST( *Xho* I )具有酯水解活性,含有 4.7kb 的外源片段。

### 2.3 酯酶编码基因的 DNA 和氨基酸序列分析

对质粒 pUC18-EST( *Xho* I )的 DNA 片段进行测序,利用 Vector NTI 8.0 软件分析,表明这段 DNA 序列编码 3 个 ORF。分别推测出这 3 个 ORF 所编码的氨基酸序列,并用 Vector NTI 8.0 的对比功能与 GenBank 的蛋白质数据库进行同源性分析。结果发现 ORF3 所编码的氨基酸序列与已知功能的 *Pseudomonas fluorescens* 羧基酯酶( 2006221A )<sup>[12]</sup>、*Pseudomonas* sp.( AAA25813 )酯酶<sup>[13]</sup>和 *P. fluorescens* 酯酶( AAQ02789 )分别具有 85.6%、83.5% 和 87.4% 的同源性。与另外 4 个来源 *Pseudomonas* 菌属,具有可能的酯酶功能的 AAY90566, NP-793880, AAG04436, AA234288 有 80% ~ 85% 同源性。与其它微生物来源的酯酶 AAK46838( 35.8% ), NP-822479( 40.2% ), NP-627378( 38.6% ), AAK22242( 37.4% ), CAA78842( 38.4% )也具有一定的同源性。但是与报道的来源于 *P. putida* NRRL B18435 和 *P. putida* KT 2440 的酯酶 EstZ 只有 12% 的同源性<sup>[14]</sup>,说明它们不是同一种蛋白质。进一步对这些酯酶的氨基酸序列进行比对分析,它们都含有共同的 G-G-S-X-G 序列,这与多数丝氨酸酯水解酶催化活性中心的丝氨酸残基周围都有 G-X-S-X-G 保守序列相一致<sup>[15]</sup>,说明 ORF3 的表达产物可能具有酯酶的功能,命名 ORF3 为 PPEst,其 DNA 序列已提交 GenBank,登记号为 AY896293。PPEst 的 DNA 长度为 1142bp,以 GTG 为起始密码子,以 TGA 为终止密码子,表达产物含有 381 个的氨基酸,计算分子量为 41kDa,等电点 pI 为 5.31。

### 2.3 *P. Putida* NH33 酯酶基因表达、纯化和基本酶学性质

为了验证 PPEst 基因的酶学功能,根据 PPEst 的 DNA 序列设计引物,从 *P. putida* NH33 基因组扩增得到 PPEst 基因,并把 PPEst 基因的起始密码子 GTG 改为 *E. coli* 常用的 ATG 密码子。经过 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切后,连接到 pET-22b( + )构建在 PPEst 下游含 6 个组氨酸( His )密码子的表达载体 pET-ppEST,转化 *E. coli* BL21( DE3 )。重组菌在 LB 培养基中进行培养和 IPTG 诱导外源蛋白的表达,SDS-PAGE 分析蛋白质的表达情况(图 1)。从图可知,与对照相比,重组菌在 42kDa( 包括 6 个 His )位置有一明显的诱导条带,与估计的 PPEst 基因编码的蛋白质相一致,蛋白质的表达量占菌体总蛋白 30% 左右。菌体经过超声破壁,取上清液测定酶活性为 25U/mL。上清液经过含 Ni<sup>2+</sup> 金属亲和层析介质吸

附,洗脱得到分子量为 42kDa 的单一蛋白条带。

以 1mmol/L 氟比洛芬乙酯为底物,分别测定重组酯酶在不同 pH 值( 6.0 ~ 12.0 )的水解活性,结果表明重组酯酶的最适 pH 为 10.0,这与大多数微生物来源的脂肪酶或酯酶的最适反应 pH 偏碱性相一致。考察酶在 20 ~ 50℃ 之间的酶活力,表明在 30 ~ 45℃ 具有较高的水解活性,35℃ 时的酶活性最高。

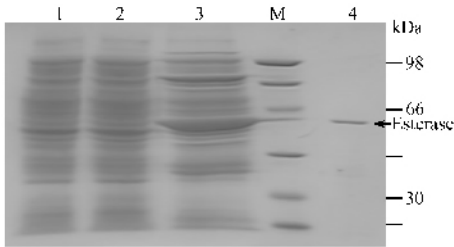


图 1 *P. putida* NH33 酯酶表达及纯化的 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE analysis of expression and purification of esterase from *P. Putida* NH33. 1. *E. coli* BL21( DE3 ); 2. Recombinant *E. coli* BL21( DE3 ) PPEst without IPTG induction ; 3. Recombinant *E. coli* BL21( DE3 ) PPEst with IPTG induction ; 4. Protein molecular mass markers ; 5. Purified esterase of *P. putida* NH33.

### 2.4 重组恶臭假单孢菌酯酶的立体选择性

为了研究 *P. putida* NH33 重组酯酶的立体选择性,我们选择 3 种 2-芳基丙酸乙酯外消旋化合物为底物,加入纯化的重组 PPEst 蛋白进行水解反应(表 2)。从表可知,恶臭假单孢菌酯酶对不同底物的水解速度存在差异,但是它们的水解产物都是( S )-异构体,且产物的光学纯度  $ee_p$  % 达到 99% 以上,反应的对映体选择性  $E > 100$ 。对于商品化的脂肪酶,来源于皱褶假丝酵母( *Candida rugosa* )脂肪酶对酮布洛芬乙酯的水解活性较强<sup>[16]</sup>,但它的立体选择性不高。相比较,本文 *P. putida* NH33 酯酶具有很高的立体化学专一性,而且反应条件简单,可为制备单一光学纯的手性药物提供新酶源。

表 2 重组 *P. putida* NH33 酯酶水解 2-芳基丙酸酯

Table 2 Hydrolysis of esters of 2-arylpropanoic acid by recombinant esterase of <i>P. putida</i> NH33 <sup>*</sup>			
Substrate	Time/h	Conversion/ %	$ee_p$ ( % ) of ( S )-acid
Flurbiprofen ethyl ester	12	48.6	> 99
Ethyl 2-phenylpropanoate	2.5	49.6	> 99
Ketoprofen ethyl ester	5	49.2	> 99

\* Reactions were conducted in 1mL potassium phosphate buffer( 50mmol/L, pH10.0 ) containing 40U esterase, 50mmol/L ester and 0.5% ( W/V ) Tween - 80 at 35℃.

### 2.5 结论

通过菌株筛选和构建基因文库,从 *P. putida* NH33 克隆到一个具有立体选择性的酯水解酶,和已知的酯酶氨基酸序列进行比对分析,表明来源于 *P. putida* NH33 的酯酶是一个新酶,具有保守序列

GXSXG 属于典型的丝氨酸水解酶类。由于它有很高的立体结构选择性,在手性化合物的合成中有潜在应用价值。通过构建该酯酶的 *E. coli* 表达系统,可以方便以后的大规模发酵和蛋白质的分离纯化,用于进一步的酶学和应用研究。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Faber K. Biotransformation in organic chemistry. 3<sup>rd</sup> ed. New York : Berlin Heidelberg Springer , 1997.
- [ 2 ] Gotor-Fernandez V, Brieva R, Gotor V. Lipase Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J Mol Catal B : Enzymatic* , 2006 , **40** ( 3-4 ) : 111 – 120.
- [ 3 ] Hwang BY, Kim JH, Kim J, *et al.* Screening of *Exiguobacterium acetylicum* from soil samples showing enantioselective and alkalotolerant esterase activity. *Biotechnol Bioprocess Eng* , 2005 , **10** ( 4 ) : 367 – 371.
- [ 4 ] Kumar I, Manju K, Jolly RS. A new biocatalyst for the preparation of enantiomerically pure 2-arylpropanoic acids. *Tetrahedron : Asymmetry* , 2001 , **12** ( 10 ) : 1431 – 1434.
- [ 5 ] Tripathi MK, Roy U, Jinwal UK, *et al.* Cloning, sequencing and structural features of a novel *Streptococcus* lipase. *Enzyme Microb Technol* , 2004 , **34** ( 5 ) : 437 – 445.
- [ 6 ] Lee JH, Rhee SK, Kim CH. Expression and activation of an esterase from *Pseudomonas aeruginosa* 1001 in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* , 2004 , **35** ( 6-7 ) : 563 – 567.
- [ 7 ] Svendsen A. Lipase protein engineering. *Biochimica Biophysica Acta* , 2000 , **1543** ( 2 ) : 223 – 238.

- [ 8 ] Pleiss J, Fischer M, Peiker M, *et al.* Lipase engineering database : Understanding and exploiting sequence structure function Relationships. *J Mol Catal B : Enzymatic* , 2000 , **10** ( 5 ) : 491 – 508.
- [ 9 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory manual 3<sup>rd</sup> ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 2001.
- [ 10 ] Marshak DR, Kadonaga JT, Burgess RR, *et al.* Strategies for protein purification and characterization : A Laboratory course manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1996.
- [ 11 ] Chen CS, Fujimoto Y, Girdaukas G, *et al.* Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. *J Am Chem Soc* , 1982 , **104** ( 25 ) : 7294 – 7299.
- [ 12 ] Kim YS, Lee HB, Choi KD, *et al.* Cloning of *Pseudomonas fluorescens* carboxylesterase gene and characterization of its product expressed in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* , 1994 , **58** ( 1 ) : 111 – 116.
- [ 13 ] McKay DB, Jennings MP, Godfrey EA, *et al.* Molecular analysis of an esterase-encoding gene from a lipolytic psychrotrophic *pseudomonad*. *J Gen Microbiol* , 1992 , **138** ( 4 ) : 701 – 708.
- [ 14 ] Hasona A, York SW, Yomano LP, *et al.* Decreasing the level of Ethyl acetate in ethanolic fermentation broths of *Escherichia coli* KO11 by expression of *Pseudomonas putida* estZ esterase. *Appl Environ Microbiol* , 2002 , **68** ( 6 ) : 2651 – 2659.
- [ 15 ] Arpigny JL, Jaeger KE. Bacterial lipolytic enzymes : classification and properties. *Biochem J* , 1999 , **343** ( 1 ) : 177 – 183.
- [ 16 ] Wu SH, Guo ZW, Sih CJ. Enhancing the enantioselectivity of Candida lipase-catalyzed ester hydrolysis via noncovalent enzyme modification. *J Am Chem Soc* , 1990 , **112** ( 5 ) : 1990 – 1995.

## Screening of strain producing an novel esterase with high enantioselectivity and molecular cloning of the enzyme gene

CHEN Shao-xin\* , SHI Bing-zhao

( Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry , Shanghai 200040 , China )

**Abstract** : A novel strain producing an enantioselective lipolytic enzyme was isolated from soil samples , and identified as *Pseudomonas putida* NH33. A genomic library of *P. putida* NH33 was constructed and screened for esterase activity in *E. coli*. One positive clone was isolated , and subsequent analyses of the plasmid by restriction mapping revealed a 4.7kb DNA fragment carrying esterase gene. The nucleotide sequence of the DNA was found to contain an open reading frame of 1142 nucleotides encoding esterase of 381 amino acid residues and designated PPEst. The primary structure of the esterase exhibited 35% ~ 40% homology to those of related enzymes from various sources and 80% ~ 90% homology to esterases from the genus *Pseudomonas*. Amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence contains of the consensus active site sequence , GXSXG , of serine esterase. The PPEst fragments were cloned into the expression vector pET-22b( + ) and transformed into *E. coli* BL21 ( DE3 ) , and the recombinant protein fused with 6 × His at its C-terminus was purified to homogeneity by a single immobilized metal ion affinity chromatographic step. The molecular mass of the esterase was determined to be approximately 42kDa by SDS-PAGE. The purified enzyme could convert ethyl esters of 2-arylpropanoic acid to S-isomer of 2-arylpropanoic acids with an optical purity of > 99% . The result suggests that this esterase is excellent biocatalyst for synthesis of chiral pharmaceuticals. The enzyme is an novel esterase , and its nucleotide sequence has been submitted to GenBank under accession number AY896293.

**Keywords** : Esterase , *P. putida* NH33 , Cloning , sequence