

假单胞菌 sp.130 GL-7-ACA 酰化酶的 核苷酸和蛋白质序列分析

茅 翔¹ 张 菁¹ 李 勇² 何宇炯¹ 王思多²
杨蕴刘¹ 焦瑞身¹ 姜卫红^{1*} 赵国屏^{3*}

¹(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所 上海 200032)

²(中国科学院上海生命科学研究院生物化学研究所 上海 200031)

³(中国科学院上海生命科学研究院 上海 200031)

摘 要 对来源于假单胞菌 sp.130 的戊二酰-7-氨基头孢烷酸(GL-7-ACA)酰化酶结构基因的全序列及所编码蛋白质的 α , β 亚基的 N 末端和 C 末端的氨基酸序列进行了测定。将蛋白质序列与其他同类的 GL-7-ACA 酰化酶进行了同源性比较,结果显示该酶与来源于假单胞菌 GK16 和 C427 的酰化酶的序列有较高同源性,而与其它同类酰化酶的同源性较低。这些酶的 α 亚基 N-末端差别较大,但是 β -亚基的 N-末端有较高的保守性。

关键词 假单胞菌, 戊二酰-7-氨基头孢烷酸, 酰化酶 C130

中图分类号 Q71 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0045-06

随着青霉素类抗生素的广泛应用,逐渐暴露出其种种局限性,如抗菌谱窄,能引起超敏反应,抗药性等。而头孢菌素类抗生素与之相比,则优势明显,其研究和生产也越来越受到重视。大多数半合成的头孢菌素类抗生素是母核 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)的衍生物。抗菌活性比孢菌素 C(CPC)有很大提高,设法除去 CPC 的侧链并接上新的侧链是得到高效头孢菌素类抗生素的有效途径^[1]。

7-氨基头孢烷酸可以通过 CPC 化学裂解法和酶转化方法制得,常用的化学方法有亚酰氯法和硅脂法^[2,3],但是化学法反应条件苛刻,工艺复杂,成本较高,污染严重。因此酶转化制备 7-氨基头孢烷酸的方法近年在工业上有很大发展。该方法分为一步酶法和两步酶法。一步酶法是指头孢菌素 C 在头孢菌素酰化酶的作用下,侧链酰胺键断裂,直接得到 7-氨基头孢烷酸。但迄今为止,还没有得到高活性的头孢菌素 C 酰化酶的菌株。两步酶法中,头孢菌素 C 先在 D-氨基酸氧化酶的作用下脱氨基得到戊二酰-7-氨基头孢烷酸(GL-7-ACA)^[4,5],戊二酰基-7-

氨基头孢烷酸在 GL-7-ACA 酰化酶的作用下水解为戊二酸和 7-氨基头孢烷酸。到目前为止国际上已经有一些来源不同的 GL-7-ACA 酰化酶的分离、鉴定及酶的特性研究的报道。有些已用于工业生产,但酶活力还有待于进一步提高^[6]。本实验室从假单胞菌 sp.130 中克隆并将其在大肠杆菌中表达,得到了 GL-7-ACA 酰化酶(以下简称酰化酶 C130)^[7],并对其酶学性质进行了初步研究^[8]。本文将报道该酶结构基因的核苷酸序列,其 α , β 亚基的 N 末端、C 末端氨基酸序列测定的结果,以及它与同类酰化酶的序列比较结果。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

携带有戊二酰-7-氨基头孢烷酸酰化酶结构基因质粒的大肠杆菌基因型是 XL1-Blue: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F' [proA⁺ B⁺ lac^F lacZ Δ M15::Tn(tet^r)]*。携带 GL-7-ACA 酰化酶结构基因的质粒 pMR204 是 pMR10⁽⁷⁾ 的衍生

收稿日期:2001-07-03,修回日期:2001-10-17。

基金项目:国家 863 高技术研究发展计划项目资助(No. 863-103-13-02-01)。

* 通讯作者: Tel:86-21-64042090-4705; Fax:86-64042385; E-mail:wjiang@iris.sipp.ac.cn。

本文涉及的核苷酸序列已提交 GenBank 数据库,Accession number 为 AF085353。

物,它带有 *par* 基因可以改善其稳定性。

1.2 试剂

限制酶、T4 DNA 连接酶购自 Promega,核酸测序所用的试剂盒购自 Amersham Ltd,7-氨基头孢烷酸购自山东鲁南抗生素厂,戊二酰-7-氨基头孢烷酸由本实验室合成。

1.3 GL-7ACA 酰化酶结构基因的亚克隆和核苷酸序列测定

使用 Amersham 公司的测序试剂盒,抽取单链 DNA 进行双向测序,测序所用引物为通用引物和合成的特异引物,使用 Bio-Rad 公司的测序仪。核酸

序列又经上海 GeneCore 公司测序验证。

1.4 酶的纯化和 SDS-PAGE 分析

酶的纯化方法参照文献[8],SDS-PAGE 的方法按照 Hermann 方法^[9]。

1.5 α 亚基 C 末端的测定

电泳结束后,将 SDS-PAGE 凝胶浸入冷 KCl 溶液中(0.025mol/L,4℃)。很快可以看见 α、β 亚基的条带。将 α 亚基的条带从凝胶上割下,切碎。放入 Bio-Rad 公司 422 型电洗脱装置中进行洗脱。将洗脱液从装置中移入 eppendorf 管中。加入 4 倍体积冰冻的丙酮(-20℃),冰浴 15min, 然后 12000r/min

1	AT CCG TGG TTC GTA CGC GCC GCC TAC AAG TGG TGA TCT AGG GGA ACG TTC CGG GGG CGT CGC TGC AAC GGC GCT TCC GGA TCT	83
84	GGG TGA GAG GGG AAA TCC ATG CTG AGA GTT CTG CAC CGG GCG GCG TCC GCG TTG GTT ATG GCG ACT GTG ATC GGC CTT GCG CCC	167
1	M L R V L H R A A S A L V M A T V I G L A P	22
168	GCC GTC GCC TTT GCG CTG GCC GAG CGC ACC TGG ACG CGG CAG GCG CGG ATT CGG GCC TAT AAA CCG AGA AGC AAT GAG ATC CTG	251
23	A V A F A L A E P T S T P Q A P I A A Y K P R S N E I L	50
252	TGG GAC GGC TAC GGC GTC CCG CAC ATC TAC GGC GTC GAC GCG CCC TCA GCG TTC TAC GGC TAT GGC TGG GCG CAG GCG CGC AGC	335
51	W D G Y G V P H I Y G V D A P S A F Y G Y G W A Q A R S	78
336	CAC GGC GAC AAT ATC CTG CGC CTG TAT GGA GAA GCG GCG AAG GGG GCG GAA TAC TGG GCG CGG CAT TAC GAA CAG ACC ACC	419
79	H G D N I L R L Y G E A R G K G A E Y W G P D Y E Q T T	106
420	GTC TGG CTG CTG ACC AAC GGC GTG CCG GAG CGC GCT CAG CAG TGG TAT GCG CAG CAG TCG CCT GAT TTC CGC GCC AAC CTC GAC	503
107	V W L L T N G V P E R A Q Q W Y A Q Q S P D F R A N L D	134
504	GCC TTC GCG GCG GGC ATC AAC GCC TAT GCG CAG CAG AAC CCC GAC GAC ATC TCG CCC GAC GTG CCG CAG GTG CTG CCG GTT TCC	587
135	A F A A G I N A Y A Q Q N P D D I S P D V R Q V L P V S	162
588	GGC GCC GAC GTG GTG GCC CAC GCC CAC CGC CTG ATG AAC TTC CTC TAT GTC GCG TCG CCC GGC CGC ACC CTG GCG GAG GGC GAC	671
163	G A D V V A H A H R L M N F L Y V A S P G R T L G E G D	190
672	CCG CCG GAC CTG GCC GAT CAA GGA TCC AAC TCC TGG GCG GTG GCG CGG GGA AAG ACG GCG AAC GGG AAC GCC CTG CTG CTG CAG	755
191	P P D L A D Q G S N S W A V A P G K T A N G N A L L L Q	218
756	AAC CCG CAC CTG TCC TGG ACC ACG CAC TAC TTC ACC TAC TAC GAG GCG CAT CTC GTC ACG CCG GAC TTC GAA ATC TAT GCG GCG	839
219	N P H L S W T T D Y F T Y Y E A H L V T P D F E I Y G G A	246
840	ACC CAG ATC GGC CTG CGC GTC ATC CGC TTC GCG TTC AAC CAG CCG ATG GGC ATC ACC AAT ACC GTC AAC GGC ATC GTG GCG GCG	923
247	T Q I G L P V I R F A F N Q R M G I T N T V N G M V G A	274
924	ACC AAC TAT CCG CTG ACG CTT CAG GAC GGC GGC TAT CTG TAT GAC GGT CAG GTG CCG CCG TTC CAG CCG CGT CAG GCC TCG TAT	1007
275	T N Y R L T L Q D G G Y L Y D G Q V R P P F E R R Q A S Y	302
1008	CGC CTG CGT CAG GCG GAC GGG ACG ACG GTC GAC AAG CCG TTG GAG ATC CCG TCC ACG GTC CAT GGC CCG GTC TTC GAG CCG GCG	1091
303	R L R Q A D G T T V D K P L E I R S S V H G P V F E R A	330
1092	GAC GGC ACG GCG GTC GCC GTT CCG GTC GCC GGT CTG GAC CCG CCG GCG ATG CTC GAG CAG TAT TTC CAG ATG ATC ACG GCG GAC	1175
331	D G T A V A V R V A G L D R P G M L E Q Y F D M I T A D	358
1176	AGC TTC GAC GAC TAC GAA GCC GCT TTG GCG CCG ATG CAG CTG CCG ACC TTC AAC ATC GTC TAC GCC CAG CCG GAA GGC ACC ATC	1259
359	S F D D A A L A R M Q V P T F N I Y Y A D R C G T I	386
1260	AAC CTG AGC TTC AAC GGC GTG GCG CCG AAA CCG GCC GAG GGC GAC ATC GCC TTC TGG CAG GGG CTC GTG CCG GGC GAT TCC TCG	1343
387	N Y S F N G V A P K R A E G D I A F W Q G L V P G D S S	414
1344	CGT TAC CTG TGG ACC GAG ACA CAC CCG CTG GAC GAT CTG CCG GTC ACC AAT CCG CCG GGC TTC GTG CAG AAC TCC AAT	1427
415	R Y L W T E T H P L D L P R V Y T N P P G C F V Q N S N	442
1428	GAT CCG CCG TGG ACG CCG ACC TGG CCC GTC ACC TAC ACG CCC AAG GAC TTC CCC TCC TAT CTG GCG CCG CAG ACC CCC CAT TCC	1511
443	D P P W T P T W P V T Y T P K D F P S Y L A P Q T P H S	470
1512	CTG CGT GCG CAA CAA AGC GTG CGT CTG ATG TCC GAG AAC GAC CAG CTG ACG CTG GAG CCG TTC ATG GCG CTG CAG TTG ACC CAT	1595
471	L R A Q Q S V R L M S E N D D L T L E R F M A L Q L S H	498
1596	GCG GCC GTC ATG GCC CAG CGC ACC TTG CCG GAC CTG ATC CCG GCC GCG CTG ATC GAC CCC GAT CCC GAG GTC CAG CCG GCG GCG	1679
499	R A V M A D R T L P D I P A A L I D P D P E V Q A A A	526
1680	GCG CTG CTG GCG GCG TGG GAT CCG GAG TTC ACC ACG GAC ACG CCC GCC GCG CTG CTG TTC GAG GAA TGG GCG CGT CTG TTC GCC	1763
527	R L L A A W D R E F T S D S R A A L L F E E W A R L C F A	554
1764	GGC CAG AAT TTC GCA GGC CAG GCC GGC TTC GCG ACG CCG TGG TCG CTG GAT AAG CCG GTC ACG ACG CCT TAC GGC GTC CCG GAC	1847
555	G Q N F A G Q A G F A T P W S L D K P V S T P Y G V R D	582
1848	CCC AAG GCC GGC GTC GAT CAA CTG CCG ACC GCC ATC GCC AAC ACC AAG CCG AAA TAC GGC GCG ATC GAC CCG CCG TTC GCG GAC	1931
583	P K A A V D Q L R T A I A N T K R K Y G A I D R P P F G D	610
1932	GCC TCG CCG ATG ATC CTG AAC GAC GTG AAT GTT CCG GCG GCC GCC GCG TAC GCG AAC CTG GGT TCC TTC CCG GTC TTC ACC TGG	2015
611	A S R M I L N D V N V P G A A G Y G N L G S F R V F T W	638
2016	TCC GAT CCT GAC GAA AAC GGG GTT CCG ACG CCG GTC CAG GCG GAG ACG TGG GTG GCG ATG ATC GAG TTC TCC ACG CCG GTG CCG	2099
639	S D P D E N G V R T P V H G E T W V A M I E F S T P V R	666
2100	GCC TAT GCG CTG ATG AGC TAC GGC AAC TCT CCG CAG CCG GCG ACC ACG CAC TAC AGC GAT CAG ATC GAA CCG GTG TCG CCG GCC	2183
667	A Y G L M S Y G N S R Q P G T T H Y S D Q I E R T P F N F K P *	694
2184	GAC TTC CCG GAA CTG TTG CTG CCG CGA GAG CAG GTC GAG GCC GCC GTC CAG GAA CCG ACG CCC TTC AAC TTC AAG CCA TGA AAG	2267
695	D F R E L L L R R E Q V E A A V Q E R T P F N F K P *	721
2268	GCC TGA CCA CAC GAC GGA TTG CGT ATT CCG CCG GCG CCG GTT CCG GCG TGA TGG TCG CCG CCT CTG GAG CCG CCG GCG	2351
2352	GCC ACG CCG CCT TCA CTT CCG TTC AGG TCG ACG GCT TTT CCG TTC CCG GCG CTC TGT CGA ACG CCT GGG CCG ACT TCG ACA ACG	2435
2436	ACG GCG ACC TGG ACC TGG CCG TCT CCT GGA AGA GCG CCG AAG CTT	2480

图 1 来源于假单胞菌 *sp.*130 的 GL-7-ACA 酰化酶基因的核苷酸序列及其所编码的蛋白的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of GL-7-ACA acylase from *Pseudomonas sp.*130

(The amino acid in this figure is deduced from the nucleotide sequence)

离心 10min。弃上清,将沉淀用去离子水溶解,用去离子水透析 24h,真空浓缩至干粉。用 TEABI precise-490 蛋白序列测定仪测定 α 亚基 C 末端氨基酸序列。

1.6 α, β 亚基 N 末端序列的测定

将 SDS-PAGE 胶用 $20\mu\text{g/mL}$ 的 DTT 溶液漂洗,然后在含有 $20\mu\text{g/mL}$ 的 DTT 和 10% 甲醇的 10mmol/L CAPS 溶液中浸泡 10min(换 2 次缓冲液)。将凝胶与 hyperbond 膜按照夹心饼方式固定并放入转膜装置中。转移完成后,将 hyperbond 膜在 $20\mu\text{g/mL}$ DTT 溶液中漂洗,考马斯亮蓝染色 30min,脱色至背景为白色。从膜上将对应 α, β 亚基的两条色带割下,用 Beckman LF-3200 测序仪测定 N 末端氨基酸序列。

1.7 序列比较方法

序列比较使用 CLUSTALW1.7 程序。

2 结果与讨论

2.1 GL-7-ACA 酰化酶结构基因核苷酸序列及其所编码酶蛋白 N, C-末端氨基酸残基组成

我们对本实验室克隆得到酰化酶 C130 结构基因进行了核苷酸全序列测定及其氨基酸序列推测。最长的读框有 2163 个核苷酸,编码 720 个氨基酸。结果见图 1。

SDS-PAGE 实验表明酰化酶 C130 由 2 个亚基组成。重组的酰化酶 C130 的 α 亚基存在 2 条带(图 2)。对 α 亚基的 N 末端氨基酸序列测定结果表明, α 亚基的 N 端氨基酸的前 5 个残基分别是 Thr-Pro-Gln-Ala-Pro 和 Ala-Tyr-Lys-Pro-Arg。这一异常表明两者加工方式上可能有所不同。这在同类 GL-7-ACA

酰化酶 A14 中也有报道^[10]。它们分别是从小亚基的 C 末端的氨基酸序列的测定结果来看, α 亚基 C-末端最后 3 个氨基酸残基是 Leu-Gly-Glu。因此酰化酶 C130 存在空间肽,它由 10 个氨基酸残基组成: Gly-Asp-Pro-Pro-Asp-Leu-Ala-Asp-Gln-Gly。对 α 亚基的 C 末端测定工作有助于 α 亚基、 β 亚基的正确定位。从末端氨基酸序列的测定结果可以确定,我们得到的 GL-7-ACA 酰化酶是由三部分组成,即小亚基(α 亚基)、空间肽、大亚基(β 亚基)。表 1 列出了已知的 GL-7-ACA 酰化酶 α 亚基、 β 亚基的 N, C-末端的氨基酸序列。

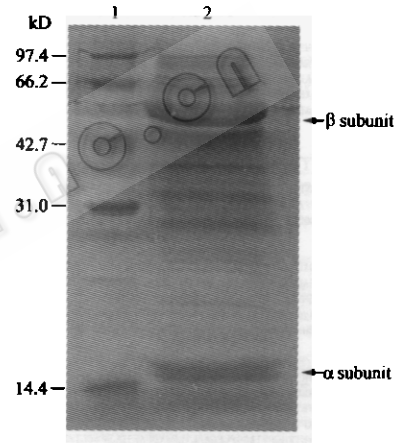


图 2 纯化的 GL-7-ACA 酰化酶 C130 的 SDS-PAGE 图谱
Fig.2 SDS-PAGE showing purified GL-7-ACA acylase C130
1. Protein marker; 2. Purified GL-7-ACA acylase

表 1 已知 GL-7-ACA 酰化酶 α, β 亚基 N, C-末端氨基酸序列^[11]

Table 1 N, C-terminals of the subunits of known GL-7-ACA acylases

Sources	N-terminal of α subunit	C-terminal of α subunit	N-terminal of β subunit
<i>Pseudomonas</i> sp. 130	TPQAP 和 AYKPR	GDPDDLADQG	SNSWAVAPGK
<i>Pseudomonas</i> sp. GK16	EPTSTPQAPIA	ND. *	SNSWAVAPGKT
<i>Pseudomonas</i> sp. C427	LAEPTSTPQAP	PPDLADQC ^[12]	SNSWAVAPGKT
<i>Pseudomonas</i> sp. A14	ADTAPSATPP	ND.	SNNXVIS PQ
<i>Pseudomonas</i> sp. SE83(II)	TMAAKTDREAVL	ND.	SNNWAVAPGRT
<i>Pseudomonas diminuta</i> N176	TMAANTDRAVL	No spacer peptide ^[13]	SNSWAVAPGKT
<i>Pseudomonas diminuta</i> V22	NAPVPVPRVAD	ND.	TTHVTVADAMG
<i>Pseudomonas</i> sp. SE83(I)	NAPVPVPRVA	ND.	TTHVTVADMG
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	VTLDGGAVAAD	ND.	TTHFSIVDKDG
<i>Bacillus Laterosporus</i> J1		QSEQWKADEL (single peptide)	

* ND. Not determined.

序列比较表明来源于假单胞菌 GK16, C427 的 GL-7-ACA 酰化酶和酰化酶 C130 结构基因编码的 α 亚基蛋白质序列完全相同,但是从 α 亚基 N-末端的氨基酸序列来看,它们的加工方式可能有所不同。尽管酰化酶 C130 与来源于假单胞菌 N176, SE83 (II) 和 A14 的酰化酶 α 亚基 N-末端差别较大,但是这些酶 β 亚基的 N-末端有几个氨基酸高度保守。研究表明 N-末端的丝氨酸是酶的催化活性和自水解活化的重要残基^[14]。从表 1 来看,前 9 个酰化酶的 β 亚基的 N-末端可以分为两类,一类是丝氨酸作为第一残基,一类是苏氨酸作为第一残基。从序列比较的结果来看,第一类的酰化酶序列之间有显著的同源性,第二类酰化酶序列间有显著同源性,而两

类酰化酶之间在序列上没有同源性。据此,可以将 GL-7-ACA 酰化酶根据 β 亚基的 N-末端的第一氨基酸不同进行分类。

2.2 同类 GL-7-ACA 酰化酶的蛋白质序列同源性比较

从氨基酸序列比较结果来看,酰化酶 C130 分别与来源于假单胞菌 GK16(发表的部分序列)和 C427 的 GL-7-ACA 酰化酶有 100% 和 90% 的同源性。酰化酶 C130 与其他的丝氨酸类酰化酶的同源性都不高,与来源于假单胞菌 sp. A14, sp. N176 和 sp. SE83 (II) 的 GL-7-ACA 酰化酶蛋白质序列的同源性分别为 27%、26% 和 26% (图 3)。

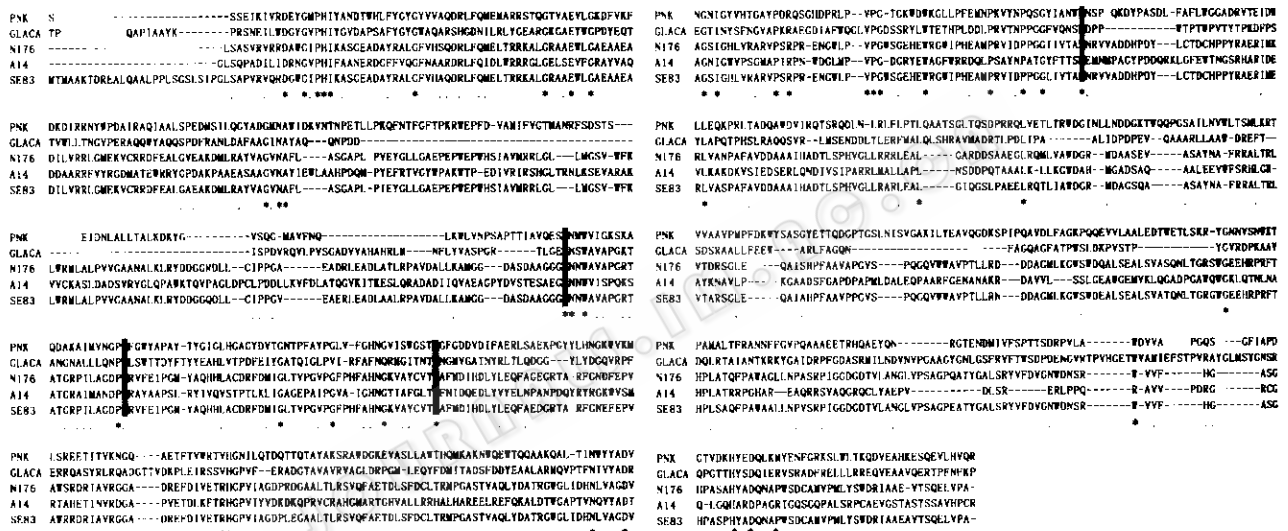


图 3 一些来源于假单胞菌的 GL-7-ACA 酰化酶和青霉素 G 酰化酶氨基酸序列比较

Fig.3 The sequence alignment of some GL-7-ACA acylases from *Pseudomonas* and penicillin G acylase (PNK is penicillin G acylase, GLACA is the GL-7-ACA acylase in this work, N176, A14 and SE83 II is acylase from *Pseudomonas* sp. N176, sp. A14 and sp. SE83 (II)). The four key residues for the catalytic reaction are shaded.)

2.3 GL-7-ACA 酰化酶与青霉素 G 酰化酶的比较

1995 年报道了青霉素 G 酰化酶的空间结构^[15], 青霉素 G 酰化酶的底物与 GL-7-ACA 酰化酶的底物同属 β -内酰胺类化合物,其结构信息对于了解 GL-7-ACA 酰化酶的结构具有重要意义。青霉素 G 酰化酶属于 N-末端亲核进攻水解酶,这类水解酶的特点是,使用 N-末端的丝氨酸、苏氨酸或半胱氨酸作为催化残基。从青霉素 G 酰化酶与丝氨酸类 GL-7-ACA 酰化酶的序列比较的结果来看(图 3),与催化有关的残基在青霉素 G 酰化酶和丝氨酸类 GL-7-ACA 酰化酶中比较保守(图 3 中的阴影部分),其中第一个阴影中的丝氨酸是催化残基,第二,三,四个阴影中的氨基酸对催化反应有促进作用,第二个阴

影中的氨基酸主链氮原子可以与催化残基丝氨酸的羟基形成氢键,有利于羟基质子的离去,形成亲核进攻基团,而第三、四个阴影部分中的残基可以与底物的羰基氧形成氢键,有利于稳定反应过渡态^[15]。从酰化酶 C130 两个亚基分别与青霉素 G 酰化酶的两个亚基比较来看(图 4 和图 5),两个酶在 α 、 β 亚基的 N 末端氨基酸序列有保守性,其中 β 亚基的 N 末端的第一个氨基酸是催化残基。其它保守的残基散落各处,这些保守的残基可能仅仅同这一类酰化酶(N-末端亲核进攻水解酶^[16])的特殊的空间结构有关。从 Ntm 水解酶家族的特点来看,苏氨酸类酰化酶的 β -亚基 N-末端苏氨酸可能是催化残基。

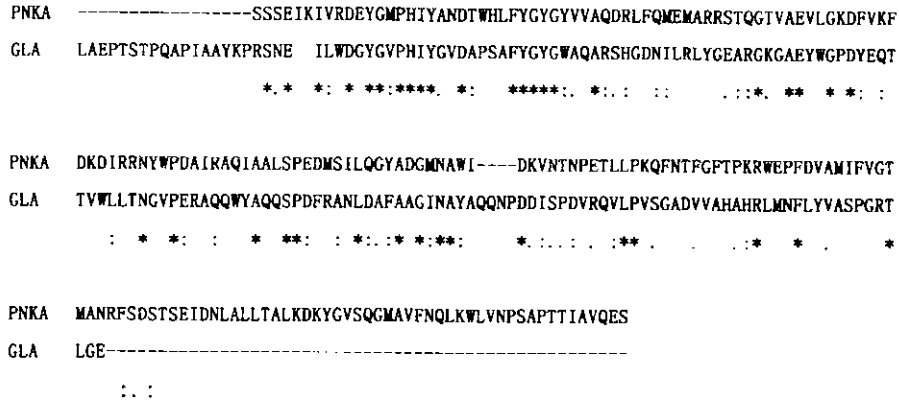


图 4 酰化酶 C130 α亚基与青霉素 G 酰化酶 α亚基的序列联配

Fig.4 The sequence alignment α subunit of acylase C130 and penicillin G acylase (PNKA is α-subunit of penicillin G acylase, GLA is α-subunit of acylase C130)



图 5 酰化酶 C130 β亚基与青霉素 G 酰化酶 β亚基的序列联配

Fig.5 The sequence alignment β subunit of acylase C130 and penicillin G acylase (PNKB is β subunit of penicillin G acylase, GLA is β subunit of acylase C130)

酶学的研究表明,酰化酶 C130 的酶活(13u/mg 蛋白)高于 GK-16 酰化酶及其他类似酰化酶的酶活(< 10u/mg 蛋白),但次于酰化酶 N176 的酶活(46 ~ 100u/mg 蛋白);其 K_m 值(0.5mmol/L)略高于酰化酶 GK16(0.16mmol/L),但低于其他类似酰化酶(> 1mmol/L)^[17]。通过酰化酶 C130 和其它酰化酶的序列比较,可以确定一些对于其功能有作用的保

守的残基。这些对于设计定点突变,从而找到具有高活力或不同底物专一性的酰化酶具有重要的意义。我们已经根据青霉素 G 酰化酶的空间结构,用分子模拟技术建模了酰化酶 C130 的空间结构。结合空间结构模型,以及酰化酶 C130 与其它酰化酶的序列比较结果,并进行了一系列的定点突变研究,目前工作正在进行。

REFERENCES(参考文献)

- [1] ZHU Z Y(诸志义). Biosynthetic pharmacology《生物合成药理学》. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 1991
- [2] Suzuki N. Jpn. Pat. Announce 52-86490, 1976
- [3] Morin R B. *et al.* Chemistry of Cephalosporin antibiotics(XIV) the reaction of cephalosporin C with nitrosyl chloride, *Journal of American Chemical Society*, 1969, **91**:1369 ~ 1400
- [4] 日本公开特许 50-101584, 1975
- [5] LIU G R(刘光荣) *et al.* Studies on the selection of high-yield GL-7ACA acylase producer *Pseudomonas* 79U-18 and its cultural characteristics. *Chinese Journal of Antibiotics*(中国抗生素杂志), 1993, **18**(6):434 ~ 438
- [6] Isogai, T. Fukagawa, M. Shibuya, Y. Enzymatic Synthesis of 7-ACA, *Nippon Nogeikogaku Kaishi*, 1989, **63**:1847 ~ 1853
- [7] YANG Y L(杨蕴刘), YUN D F(恽定芳), GUAN Y Q(关颖谦) *et al.* Cloning of GL-7-ACA acylase gene from *Pseudomonas* sp. 130 and its expression in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1991, **7**(2):99 ~ 107
- [8] ZHOU H W(周宏伟) WEI Z D(魏中获), YANG Y L(杨蕴刘), CHIAO J S(焦瑞身). Cloning of GL-7-ACA acylase gene from *Pseudomonas* sp. 130 and its expression in *Escherichia coli*. Studies of purification and properties of GL-7-ACA acylase from CU334. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报), 1997, **37**(3):196 ~ 202
- [9] Hermann S, Gebhard V J Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation in the range from 1 to 100kD. *Anal biochem*, 1987, **166**(2):368 ~ 379
- [10] Ichiro aramori, Masao Fukagawa, *et al.* Cloning and nucleotide sequencing of new glutaryl 7-ACA and cephalosporin C acylase genes from *Pseudomonas* Strains. *J Fermentation and bioengineering*, 1991, **72**(4):232 ~ 243
- [11] Yun-Huey Lee, Te-sheng chang, Hon-ju liu, Wen-shen chu. An acidic glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase from *Pseudomonas nitroreducens*. *Biotechnol Appl Biochem*, 1998, **28**(2):113 ~ 118
- [12] Yoshinori Ishii *et al.* A novel 7- β -(4-carboxybutanamido)-cephalosporanic acid acylase isolated from *Pseudomonas* strain C427 and its high-level production in *Escherichia coli*. *Journal of Fermentation and bioengineering*, **77**(6):591 ~ 597
- [13] Yoshinori ISHII, *et al.* High-level production, chemical modification and site-directed mutagenesis of a cephalosporin C acylase from *Pseudomonas* strain N176. *Eur J Biochem*, 1995, **230**(2):773 ~ 778
- [14] Lee Y S, Park S S. Two-step autocatalytic processing of the glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase from *Pseudomonas* sp. strain GK16. *J Bacteriol*, 1998, **180**(17):4576 ~ 4582
- [15] Hellen J Duggleby *et al.* Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic center. *Nature*, 1995, **373**(6511):264 ~ 268
- [16] James A Brannigan *et al.* A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature*, 1995, **378**(6555):416 ~ 418
- [17] Ichiro aramori *et al.* Comparative characterization of new glutaryl 7-ACA and Cephalosporin C acylase. *Journal of Fermentation and bioengineering*, 1992, **73**(2):185 ~ 192

Nucleotide Sequence and Protein Sequence Analysis of GL-7-ACA Acylase from *Pseudomonas* sp.130

MAO Xiang¹ ZHANG Jing¹ LI Yong² HE Yu-Jiong¹ WANG En-Duo² YANG Yun-Liu¹
JIANG Wei-Hong^{1*} ZHAO Guo-Ping³ CHIAO Jui-Sheng¹

¹(Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

²(Shanghai Institute of Biochemistry, Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

³(Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract The nucleotide sequence and N-, C-terminal amino acid sequences of α , β -subunit of glutaryl 7-ACA acylase C130 from *Pseudomonas* sp.130 were determined. The alignment of the acylase C130 with the other acylases shows that it has high homology with the acylases from *Pseudomonas* sp. GK16 and C427, but low homology with the others. There is large difference in the N-terminal of α -subunit, while the N-terminal of β -subunit has significant conservation.

Key words *Pseudomonas*, glutaryl-7-ACA, acylase C130

Received:07-03-2001

This work was supported by a grant from the State 863 High Technology R&D Project of China (No.863-103-13-02-01).

* Corresponding author. Tel:86-21-64042090 ext 4705; Fax:86-21-64042385; E-mail:wjiang@iris.sipp.ac.cn