

节杆菌 BT801 N-氨甲酰氨基酸水解酶基因的克隆与表达

郝淑凤^{1,2} 张惟材^{1*} 李迎丽¹ 袁红杰¹ 黄留玉¹

¹(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

²(中国科学院沈阳应用生态研究所,沈阳 110016)

摘 要 通过 PCR 从质粒 pUC18-169 中扩增得到 N-氨甲酰氨基酸水解酶基因(*hyuC*),置于原核表达载体 pQE60 的 T5 启动子下游构成表达质粒 pQE60-*hyuC*,并在大肠杆菌 M15 中实现了该基因的高表达。SDS-PAGE 检测表达产物,在相对分子量 44kD 处有一表达带,经薄层扫描分析目的蛋白占全菌蛋白的 40%,主要以可溶性形式存在。酶活性分析结果表明,工程菌 M15/pQE60-*hyuC* 的 N-氨甲酰氨基酸水解酶的比活分别比原始菌株 *Arthrobacter* BT801 和亚克隆 DH5 α /pUC18-169 提高了 52 倍和 72 倍。在节杆菌 BT801 和大肠杆菌 DH5 α /pUC18-169 的反应体系中加入等量菌体的工程菌 M15/pQE60-*hyuC*,可使乙内酰脲酶总比活分别提高 8.1 倍和 3.0 倍。

关键词 N-氨甲酰氨基酸水解酶,基因表达,苯丙氨酸

中图分类号 Q939 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)02-0174-04

乙内酰脲酶是能够催化 5-单取代乙内酰脲类化合物水解的一类酶,在动物、植物和微生物中分布广泛。乙内酰脲酶实际为 3 种酶组成的酶系,包括乙内酰脲消旋酶(Hydantoin racemase)、乙内酰脲水解酶(Hydantoin hydrolase)和 N-氨甲酰氨基酸水解酶(N-Carbamoylase)。在 3 种酶的协同作用下外消旋底物可以完全转化为特定的手性氨基酸^[1-3]。节杆菌 BT801 是本室筛选得到的一株 L-乙内酰脲酶产生菌,该菌可将 DL-5-苄基乙内酰脲特异水解为 L-苯丙氨酸。我们构建了节杆菌 BT801 的基因文库,并从文库中筛选得到了 1 个产生乙内酰脲酶的阳性克隆,通过亚克隆分离得到了含乙内酰脲酶全长基因的 DNA 片段(4361bp,GenBank 登录号 AY069990),编码这 3 个酶的基因即乙内酰脲消旋酶基因(*hyuR*)、乙内酰脲水解酶基因(*hyuH*)和 N-氨甲酰氨基酸水解酶基因(*hyuC*)构成 1 个操纵子。本文对 N-氨甲酰氨基酸水解酶在大肠杆菌中进行了高表达,现将结果报道于下。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 JM109、DH5 α 系本室保存,节杆菌 BT801 为本室筛选得到的一株乙内酰脲酶产生菌;质粒 pUC18-169 系在 pUC18 的 *Bam*H I 位点插入了

一段长为 4361bp 的节杆菌 BT801 乙内酰脲酶全长基因片段,由本室构建;表达载体 pQE60 和大肠杆菌 M15/pREP4 购自 Qiagen 公司,其中质粒 pREP4 含有 *lac* I 和 *neo* 基因。

1.2 培养基

LB 培养基参照文献 4 方法配制。

1.3 工具酶

Hind III, *Nco* I, *Xho* I 等限制酶、T4 DNA 聚合酶和 Ex Taq 酶等购自大连宝生物工程公司,T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品。

1.4 试剂

5-苄基乙内酰脲(5-BH)、N-氨甲酰基苯丙氨酸(N-CP)和 5-苄基乙内酰脲(5-PH)系本室化学合成,L-苯丙氨酸系日本味之素公司产品,其他均为分析纯化学试剂。底物悬液:将 1g 底物(5-BH 或 N-CP)溶于 2mol/L NaOH,用 2mol/L HCl 中和至 pH7.0,再加 CoCl₂ 6.5mg,十六烷基三甲基溴化铵 10mg,溶解后定容至 100mL。茚三酮试剂按文献 5 配制。

1.5 PCR 扩增 *hyuC* 基因

根据节杆菌 BT801 的 N-氨甲酰氨基酸水解酶序列,设计了一对引物,上游引物 P1:5' ACGTCGCT-TAGAGCACAAGC 3';下游引物 P2:5' CACAAGCT-TCACCTATCGAGCGCCGTCA 3',AAGCTT 为 *Hind* III 酶切位点。以质粒 pUC18-169 为扩增模板,PCR 反

应参数为 94℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 70s, 重复 30 个循环后 72℃ 继续延伸 4min。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.6 PCR 检测阳性克隆

用于重组子的快速筛选。将转化平板中的菌落接种于含有适当抗生素的 LB 平板中, 37℃ 培养过夜。从长出的菌落中挑取少量菌体制备模板, 通过 PCR 检测转化子。采用 pQE 载体测序引物(P3: 5' CCCGAAAAGTGCCACCTG 3'; P4: 5' GTTCTGAGGT-CATTACTGG 3') 和 P1、P2 两对引物进行 PCR 扩增, 如均有特异扩增带出现则为阳性克隆。

1.7 诱导表达

挑取重组子单菌落接种于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 25 μ g/mL 卡那霉素的 5mL LB 液体培养基中, 37℃ 200r/min 培养过夜, 将菌液按 5% 的接种量接种于 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 25 μ g/mL 卡那霉素的 30mL LB 液体培养基中, 37℃ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5~1 时加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 继续培养 5h, 收集菌体供电泳分析和测定酶活。

1.8 表达产物 SDS-PAGE 分析

取 1mL 经诱导培养的培养物, 离心收集菌体, 重悬于 50 μ L 蒸馏水中, 加入 50 μ L 2 \times 上样缓冲液混匀, 煮沸 5min, 离心, 取 10 μ L 上清进行 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 按文献 [4] 进行, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 10%, 电泳完毕用考马斯亮蓝 R250 染色。通过薄层扫描对各蛋白条带进行定量分析。

1.9 表达产物的可溶性分析

取 20mL 细菌培养物, 离心收集菌体, 重悬于 1mL 蒸馏水中, 用超声波破碎菌体, 离心, 分别收集上清, 另将所得沉淀重悬于 1mL 蒸馏水, 分别取 50 μ L 上清和沉淀, 各加入 50 μ L 2 \times 上样缓冲液混匀后煮沸 5min。取 10 μ L 进行 SDS-PAGE 分析。

1.10 酶活力测定

取 4mL 培养物, 离心收集菌体, 用生理盐水洗涤 2 次, 重悬于 2mL 缓冲液中, 加入 2mL 底物悬液, 于 37℃ 反应 1h, 加入 12% 三氯乙酸 1mL 终止反应, 离心, 用比色法测定上清液中转化产物的含量。以 5-BH 为底物酶解生成苯丙氨酸的速率计算乙内酰胺酶活力, 以 N-CP 为底物酶解生成苯丙氨酸的速率计算 N-氨甲酰氨基酸水解酶活力。在上述分析条件下 1h 内催化底物转化生成 1mg 苯丙氨酸的酶量定义为 1 个活力单位 (u)。

1.11 氨基酸的比色测定

按文献 [5] 进行。在洁净试管中加 0.2mL 样品

及 0.4mL 茚三酮试剂, 沸水浴 15min, 冷却后加 50% 乙醇 4.4mL, 混匀, 于 570nm 处测定吸光度, 用 L-苯丙氨酸标准品绘制标准曲线, 从标准曲线上计算转化产物苯丙氨酸的含量。

1.12 菌体蛋白含量的测定

按 Lowry 法 [6]。

2 结果

2.1 *hyuC* 基因的 PCR 扩增

以质粒 pUC18-169 为模板, P1、P2 为引物的 PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳胶上呈单一特异性条带, 大小为 1240bp, 与预计完全吻合(图 1)。

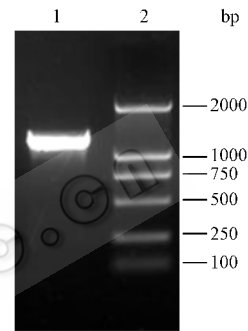


图 1 *hyuC* 基因的 PCR 扩增
Fig.1 Analysis of PCR products
1. PCR products, 2. DL 2000 marker

2.2 pQE60-*hyuC* 重组质粒的构建

PCR 产物用 T4 DNA 聚合酶将 3' 末端补平后, 用 *Hind* III 酶切, 回收纯化片段。表达载体 pQE60 经 *Nco* I 酶切, T4 DNA 聚合酶补平, 再用 *Hind* III 酶切, 回收纯化片段。将上述两种片段按 3:1 的摩尔比进行连接反应。将连接产物转化大肠杆菌 M15 感受态细胞, 在含 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上挑取单菌落。经 PCR 检测, 分别得到长度为 1500bp 和 1240bp 的特异扩增电泳带(图 3), 提取质粒用 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切鉴定, 出现 1450bp 的电泳带(图 4), 分离得到阳性克隆。对阳性克隆质粒进行测序, 测序结果表明重组质粒构建完全正确。

2.3 表达质粒 pQE60-*hyuC* 在大肠杆菌中的表达

2.3.1 表达产物 SDS-PAGE 分析: 取诱导表达后的菌体和超声波破碎菌体后的上清及沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 5。重组子在相对分子量约 44kD 处有一浓的蛋白表达带。根据节杆菌 BT801 N-氨甲酰氨基酸水解酶的氨基酸组成计算, 理论分子量为 44413D, 两者相吻合。薄层扫描分析显示目的蛋白占全菌蛋白的 40%, 且主要以可溶性

形式存在。

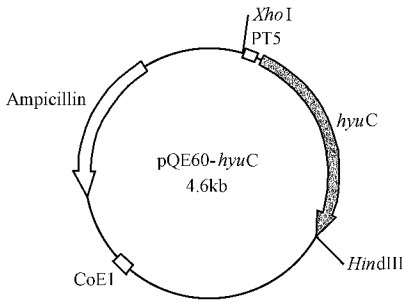


图 2 重组质粒 pQE60-hyuC 结构示意图

Fig.2 Construction of recombinant plasmid pQE60-hyuC

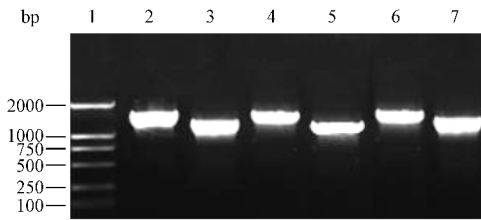


图 3 重组子 M15/pQE60-hyuC 的 PCR 检测

Fig.3 PCR analysis of recombinant plasmid M15/pQE60-hyuC
1. DL2000 marker ; 2-4. PCR/PrimerP3, P4 ; 3-5. PCR/PrimerP1, P2

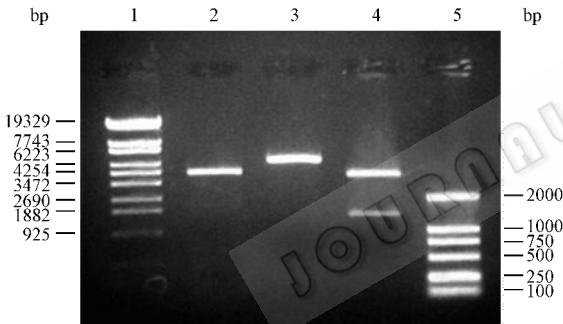


图 4 重组质粒 pQE60-hyuC 的酶切鉴定

Fig.4 Digestion patterns of recombinant plasmid pQE60-hyuC
1. λ -EcoT14 marker , 2. pQE60/Hind III 3. pQE60-hyuC/Hind III ,
4. pQE60-hyuC/Xho I + Hind III , 5. DL2000 marker

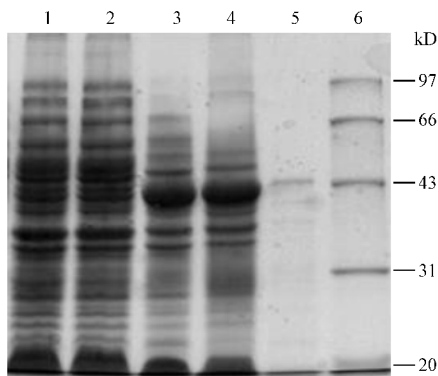


图 5 pQE60-hyuC 在大肠杆菌 M15 中表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of M15/pQE60-hyuC

1. M15/pQE60 ; 2. M15/pQE60-hyuC ; 3. M15/pQE60-hyuC/IPTG ;
4. M15/pQE60-hyuC/IPTG soluble protein ; 5. M15/pQE60-hyuC/IPTG
insoluble protein 6. Protein marker

2.3.2 表达产物的生物学活性分析 :以 N-CP 为底物分别测定节杆菌 BT801、*E. coli* DH5 α /pUC18-169 和 *E. coli* M15/ pREP4·pQE60-hyuC 的 N-氨甲酰氨基酸水解酶的活性(表 1)。由表 1 可以看出后者 N-氨甲酰氨基酸水解酶的比活比出发菌株节杆菌 BT801 和亚克隆 *E. coli* DH5 α /pUC18-169 分别提高 52 倍和 72 倍。

表 1 N-氨甲酰氨基酸水解酶的活性

Table 1 The activity of N-carbamoylase

Strains	Specific activity(u/mg protein)
<i>Arthrobacter</i> BT801	1.12
<i>E. coli</i> DH5 α /pUC18-169	0.81
<i>E. coli</i> M15/ pREP4·pQE60-hyuC	59.21

2.3.3 表达产物对乙内酰脲酶转化作用的影响 :在节杆菌 BT801 及 *E. coli* DH5 α /pUC18-169 中分别加入等体积 *E. coli* M15/pQE60-hyuC 的菌悬液,以 5-BH 为底物分别测定乙内酰脲酶的总活力,结果如表 2。从这个结果可以看出 *E. coli* M15/ pREP4·pQE60-hyuC 使出发菌株节杆菌 BT801 和亚克隆 *E. coli* DH5 α /pUC18-169 乙内酰脲酶的总比活力分别提高 8.1 倍和 3.0 倍。

表 2 N-氨甲酰氨基酸水解酶对总反应体系的影响

Table 2 The effect of N-carbamoylase on total hydantoinase activity

Strain/plasmid	Specific activity (u/mg protein)
<i>Arthrobacter</i> BT801	0.71
<i>Arthrobacter</i> BT801 + <i>E. coli</i> M15/ pREP4·pQE60-hyuC	6.44
<i>E. coli</i> DH5 α /pUC18-169	0.67
<i>E. coli</i> DH5 α /pUC18-169 + <i>E. coli</i> M15/ pREP4·pQE60-hyuC	2.69

3 讨 论

通过 PCR 扩增得到节杆菌 BT801 N-氨甲酰氨基酸水解酶的结构基因,将该基因置于原核表达载体 pQE60 的 T5 强启动子控制之下,实现了该酶在大肠杆菌 M15 中的高表达,表达产物可达全菌蛋白的 40%。节杆菌 BT801 *hyuC* 基因在大肠杆菌中的表达产物主要以可溶形式存在,且具有生物活性。这项工作为 N-氨甲酰氨基酸水解酶的纯化以及该酶的结构与功能关系研究奠定了基础。

在乙内酰脲酶反应体系中加强 N-氨甲酰氨基

酸水解酶的活力,能够明显促进整个反应体系中 5-苄基乙内酰脲转化产生苯丙氨酸的速率,进一步证实 N-氨甲酰氨基酸水解酶催化的反应是乙内酰脲酶法生产氨基酸中的一个限速步骤^[7],本工作是通过基因工程方法提高微生物转化中关键酶产量的一个例证。本文工作也为实现通过乙内酰脲酶高效酶法生产 L-苯丙氨酸奠定了良好基础。

业已证实节杆菌 BT801 N-氨甲酰氨基酸水解酶在许多特性上不同于目前发现的其他 N-氨甲酰氨基酸水解酶^[7],有关该酶的性质和结构与功能研究正在进行中。

REFERENCES(参考文献)

[1] Syldatk C May O , Altenbuchner J , Mattes R *et al.* Microbial hydantoinases-industrial enzymes form the origin of life? *Appl Microbial*

Biotechnol , 1999 , **51** : 292 – 309

- [2] Ogawa J , Shimizu S . Diversity and versatility of microbial hydantoin-transforming enzymes . *J Mol Catal B : Enzyme* , 1997 , **2** : 163 – 176
- [3] Rozzel J D , Wager F . *Biocatalytic production of amino acids and derivatives* . New York : Hanser Publishers , 1992 , pp. 75 – 176
- [4] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* . 2nd ed . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [5] Moore S , Stein W H . Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids . *J Biol Chem* , 1948 , **176** : 367 – 388
- [6] Lowry O I , Rosebrough N J , Farr A L *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent . *J Biol Chem* , 1951 , **193** (1) : 265 – 276
- [7] ZHANG W C (张惟材) . An overview of microbial hydantoinases research . *Letters in Biotechnology* (生物技术通讯) , 1999 , **10** (2) : 141 – 144

Cloning and Expression of L-N-Carbamoylase Gene from *Arthrobacter* BT801 in *Escherichia coli*

HAO Shu-Feng² ZHANG Wei-Cai^{1*} LI Ying-Li¹ YUAN Hong-Jie¹ HUANG Liu-Yu¹

¹(Beijing Institute of Biotechnology , Beijing 100071 ; ²Institute of Applied Ecology , Chinese Academy of Sciences , Shenyang 110016 , China)

Abstract Hydantoin-utility-enzyme is widely used in enzymic production of various amino acids. One of its component , carbamoylase is responsible for the conversion of N-carbamylamino acids to corresponding amino acids , which is crucial for the stereoselectivity and rate limiting. To improve the production of the enzyme , an L-N-carbamoylase gene from *Arthrobacter* BT801 , a hydantoinase producing strain being able to convert 5-benzylhydantoin to phenylalanine , was cloned into *E. coli* . The gene was highly expressed in *E. coli* M15 under control of T5 promoter. A protein band about 44kD was detected by SDS-PAGE in the recombinant cell lysate. The objective product , which is principally in soluble form , represented 40% of total cell protein. The N-carbamoylase specific activity of the recombinant M15/pQE60-*hyuC* is 53 times higher than that of *Arthrobacter* BT801 . The total biotransformation activity increased 8.1 times when M15/pQE60-*hyuC* was added into the *Arthrobacter* BT801 reaction system. The successful expression of the enzyme is significant for the application of the hydantoinase producing strain or the enzyme thereof.

Key words N-carbamoylase , gene expression , phenylalanine

Received : 07-01-2002

* Corresponding author . Tel : Tel : 86-10-66948827 ; Fax : 86-10-63895646 ; E-mail : zhangweicai@hotmail.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>