

诺卡氏菌酰胺酶基因的分子克隆及在大肠杆菌中表达的初步研究 Molecular Cloning of an Amidase Gene from *Nocardia* sp. and Its Expression in *Escherichia coli*

许 晔¹, 于慧敏^{2*}, 谭天伟¹, 朱燕勤², 沈忠耀²

XU Mi¹, YU Hui-Min^{2*}, TAN Tian-Wei¹, ZHU Yan-Qin² and SHEN Zhong-Yao²

1 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

2 清华大学化学工程系, 北京 100084

1 Life Science and Technology Department, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

2 Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

摘 要 酰胺酶是一种重要的工业酶。利用生物信息学手段, 在和已知酰胺酶基因序列分析比对的基础上, 首次从 *Nocardia* sp. YS-2002 中成功地克隆得到酰胺酶基因 *ami*, 并对其基因序列及氨基酸序列的性质进行了分析。结果表明, 所得酰胺酶基因 *ami* 片段大小共为 1446bp, 由启动子区、阅读框和回文结构终止区三部分构成。序列分析和进化树分析表明, *Nocardia* sp. YS-2002 酰胺酶是一种比较特殊的酰胺酶, 不含大多数酰胺酶共同具有的保守区序列。进一步将酰胺酶基因连接到 pET-28a (+) 上, 转入大肠杆菌 BL21(DE3) 中筛选获得重组菌株 PEAB。酶活测定结果表明, 重组菌具有酰胺酶酶活, 但较低, 其原因可能是因为大量表达的产物主要以包涵体的形式存在。

关键词 诺卡氏菌 酰胺酶基因 分子克隆

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0682-04

Abstract The amidase of *Nocardia* sp. is one of important industrial enzymes. Based on DNA and protein sequence alignment from different strains, a new gene of amidase was successfully cloned from *Nocardia* YS-2002, which is widely used for industrial production of acrylamide in China. DNA sequence analyses showed that the 1466bp cloned-fragment contains promoter, open reading frame and terminating-palindrome. Protein sequence alignment and phylogenetic tree analyses showed that the amidase coming from *Nocardia* sp. YS-2002 is a kind of specialamidase, without the typical conserved sequence of the amidases. Enzymatic characteristics predictions indicated that the molecular weight and pI of the new amidase is approximately 38.05kD and 4.88, respectively, and it would be stable when heterogeneously expressed in *E. coli*. By inserting the ORF of the amidase into plasmid pET-28a(+), a recombinant strain, pEAB, was selected using *E. coli* BL21(DE3) as the host. SDS-PAGE analyses of both the whole cells and ultrasonic-treated cells confirmed the feasibility of the heterogeneous expression of amidase in the recombinant *E. coli*. But the activity of amidase in *E. coli* BL21(DE3) not more than 0.5u/mg, because most of the enzymes expressed were formed as inclusion bodies.

Key words amidase, *Nocardia* sp., molecular cloning, *E. coli*

Received: February 15, 2006; Accepted: April 16, 2006.

This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (No. 20206014).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62788568; E-mail: yuhm@tsinghua.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No.20206014)

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

丙烯酰胺是一种应用广泛的重要化工原料,它在石油、冶金、采矿、造纸等行业都有重要的应用。目前工业上丙烯酰胺主要是利用微生物水合酶催化丙烯腈生产。这种方法生产的主要问题是微生物中所含有的酰胺酶将会使产物丙烯酰胺进一步代谢为丙烯酸,从而使丙烯酰胺产品的纯度和质量下降,造成较大经济损失。利用同源重组的方法阻断酰胺酶的表达,不失为一条很好的途径。而要做到这一点,就必须首先获取酰胺酶基因序列。

丙烯酸同样是一种重要的化工产品中间体,目前主要采用丙烯两步氧化法进行生产^[1]。在获取酰胺酶基因序列的基础上,对其序列结构及表达调控机制进行研究,可以实现丙烯酸的微生物催化法生产。因此,酰胺酶基因的克隆和表达研究受到工业生物催化研究者的关注,具有重要的学术意义及实际价值。

微生物的酰胺酶(EC 3.5.1.4)由单亚基构成,不含金属离子。酰胺酶最初被界定为硫醇酶,而Kobayashi的研究则证实了酰胺酶与天冬氨酸蛋白酶之间的进化关系^[2]。

本文所用诺卡氏菌 *Nocardia* sp. YS-2002 是在我国广泛应用于工业生产丙烯酰胺的菌株。本研究在对已知酰胺酶基因序列分析的基础上,首次从该菌株中成功地克隆得到了酰胺酶基因,并对其基因序列结构和推测的氨基酸序列进行了分析,同时在大肠杆菌中成功地得到了表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:本文所用 *Nocardia* sp. YS-2002 是在原化工部上海生物工程中心筛选得到的菌株基础上,经诱变和驯化获得的。大肠杆菌 TOP10 和质粒 pGEM-T 购自 Promega 公司。

1.1.2 培养基 (a) LB 培养基 (g/L):胰蛋白胨 5,酵母浸出粉 5,NaCl 10,抗性筛选时加卡那霉素至 40 μg/mL。(b) 发酵培养基 (g/L):葡萄糖 20 (单独灭菌),酵母膏 5,尿素 7.5,谷氨酸钠 1, KH₂PO₄ 0.5, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5。

1.1.3 酶和其它试剂:T4 连接酶, Ex-Taq 酶, 各种 DNA 限制性内切酶均购自 TaKaRa (宝生物) 公司; DNA 基因组纯化试剂盒、DNA 回收纯化试剂盒均购自赛百盛公司; DNA marker 购自鼎国公司; PCR 扩增引物由上海生工合成。其它试剂均为国产或者进口分析纯试剂。蛋白质 marker 购自 Tiangen 公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及纯化:基因组 DNA 提取纯化, 质粒 DNA 的提取, DNA 切胶回收纯化均按照赛百盛公司试剂盒操作说明进行。

1.2.2 酰胺酶基因 *ami* 的 PCR 扩增:由于 *Nocardia* sp. YS-2002 是一种基因组序列未知的菌株, 只能根据与它亲缘性相近的红球菌酰胺酶基因序列进行引物设计。搜索已知红球菌酰胺酶序列, 发现两种具有典型性的红球菌酰胺酶序列: *Rhodococcus rhodochrous* J1 (E12517) 和 *Rhodococcus rhodochrous* M8 (AY971688), 以此来设计引物 P1, P2 和 P3, P4。序列如下:

P1 5'-TGCGGACGGCGGATAACGT-3'

P2 5'-CGACAATCCGACCTGACGACAATG-3'

P3 5'-TGCGGACGGCGGATAACGT-3'

P4 5'-GGTACCGTCTCAATCCGATTCC-3'

T_m 值分别为 59.7°C, 57.5°C, 60.2°C, 57.3°C。这两种菌具有两个共同特点: 两种菌都是工业生产用菌, 它们与 *Nocardia* sp. YS-2002 腈水合酶序列 (Genbank Accession No. AY168347) 的同源性都很高 (分别为 99% 和 97%)。反应条件: 94°C 5min, 94°C 30s, 根据引物的 *T_m* 值选取数个不同退火温度, 退火时间为 1min30s, 72°C 下分别延伸 3min。最后一轮 72°C 延伸 5min。共 25 个循环。

1.2.3 酰胺酶基因 *ami* 的序列测定:将 PCR 产物纯化后连接到 pGEM-T 上, 转化进大肠杆菌 TOP10 中, 挑取阳性克隆, 送 TaKaRa 公司测序。

1.2.4 重组质粒 PEAB 的构建:分别设计带 *Nde* I, *Hind* III 酶切位点的引物 A1, A2, 将扩增所得阅读框序列插入 pET-28a (+) 多克隆位点中, 得到重组质粒 PEAB。将质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中得到重组菌 PEAB。引物序列如下:

A1 5'-AATCATATG ATGAGACACGGGGACAT-3'

Nde I

A2 5'-ATTAAGCTTTCAGGCATCCATGGTT-3'

Hind III

1.2.5 SDS-PAGE 电泳:按照文献 [3], 制备 4% 的浓缩胶和 12.5% 的分离胶进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳。

1.2.6 酰胺酶酶活的测定 (1) 酶活单位定义:本文所用酶活单位 m/mL (μmol 丙烯酸·min⁻¹·mL⁻¹ 菌液), 为酰胺酶的总酶活力, 即每分钟每毫升菌液反应生成的丙烯酸微摩尔数。μ/mg 为比酶活单位, μ/mg·min (mg 干菌重/mL 菌液)。

(2) 酰胺酶催化反应: 将 19mL 50mmol/L pH7 的混和磷酸盐缓冲液注入 50mL 具塞磨口三角瓶中, 再加入一定量重组菌菌液, 在 28℃、200r/min 的摇床中恒温 10min 之后, 加入 1mL 的反应底物丙烯酰胺, 准确反应一定时间, 最后加入 0.5mL 2.5mol/L 盐酸充分混和使反应有效终止。得到的反应液 10 000r/min 离心 10min, 取上清液与一定浓度的内标物溶液 (一般采用 40g/L 的乙酰胺) 等体积充分混合, 用气相色谱测定出峰面积, 在文献 [4] 基础上修正得到酶活计算公式:

$$u/mL = \frac{A_{\text{丙烯酸}} \times K \times C_{\text{乙酰胺}} \times V_{\text{反应}} \times 10^6}{A_{\text{乙酰胺}} \times t \times V_{\text{菌}}}$$

式中, $A_{\text{丙烯酸}}$ (mm^2) 和 $A_{\text{乙酰胺}}$ (mm^2) 分别为产物丙烯酰胺和内标物乙酰胺的峰面积; K 为内标常数, 本文中为 0.5288; $C_{\text{乙酰胺}}$ (mol/L) 为内标物乙酰胺的摩尔浓度, 为 0.6772mol/L; $V_{\text{反应}}$ (L) 为反应体系的总体积; $V_{\text{菌}}$ (mL) 为实际加入的菌液体积; t (min) 为反应时间。

2 结果与分析

2.1 *Ncordia* sp. YS-2002 酰胺酶基因的分子克隆

2.1.1 酰胺酶基因的克隆与鉴定: 对扩增产物进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 1。方法一、二均未能扩出预期大小条带。P1、P2 扩增出了符合预期的大小约为 1.5kb 的条带, P3、P4 未能扩增出预期条带。

2.1.2 *Ncordia* sp. YS-2002 酰胺酶基因序列分析: 根据测序结果, 本研究所得酰胺酶基因 *ami* 片段大小共为 1446bp。阅读框分析表明, 编码酰胺酶的阅读框以 337 位 ATG 为起始密码子, 1372 位 TGA 为终止密码子, 共编码 345 个氨基酸。经计算大小约为 38.05kD, pI 值 4.88。在起始密码子上游有推测的典型核糖体结合位点 AGGAG, 该区域中心到起始位点距离为 8 个碱基, 这与一般认为的 7~9 个碱基的最适距离相一致。在起始位点上游还有一个推测的 -35 区 TTGTCG 和 -10 区 TAACGT, 构成启动子。在终止密码子的下游存在着一个较为典型的回文结构

TTCGACCCGTGGCGACCAAAAACCTCGGCGTGAA, 转录时可形成一茎环状的发卡结构, 使 RNA 聚合酶转录终止或者减弱。如图 1 所示。

2.1.3 *Ncordia* sp. YS-2002 酰胺酶氨基酸序列分析: 根据本研究获得的酰胺酶核苷酸序列推测其氨基酸序列, 并将其与已发表的几种红球菌酰胺酶的



图 1 酰胺酶基因部分序列结构分析
Fig.1 Structure analysis of the amidase gene cloned from *Ncordia* sp. YS-2002

氨基酸序列用软件 DNAMAN 进行同源性比对, 绘制进化树, 结果如图 2 所示。从进化树可以看出, *Ncordia* sp. YS-2002 的酰胺酶氨基酸序列处于树的顶端, 说明它进化的时间相对较长。除了与 *Rhodococcus rhodochrous* M8 酰胺酶氨基酸序列完全

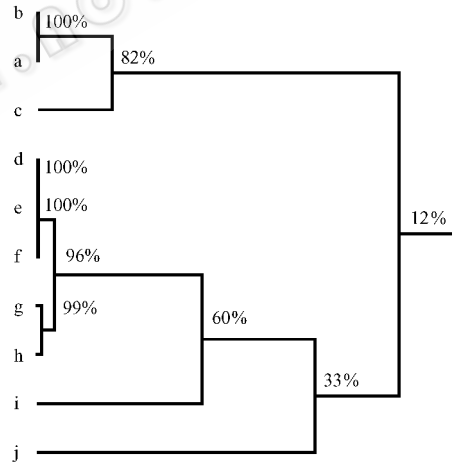


图 2 *Ncordia* sp. YS-2002 与其它几种红球菌酰胺酶氨基酸序列的同源进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of amidase from different strains

a: *Ncordia* sp. YS-2002; b: *Rhodococcus rhodochrous* M8; c: *Rhodococcus erythropolis*; d: *Rhodococcus* sp. N-771; e: *Rhodococcus* sp. N-774; f: *Rhodococcus erythropolis*; g: *Rhodococcus globerulus* A-4; h: *Rhodococcus rhodochrous*; i: *Rhodococcus rhodochrous* J1; j: *Rhodococcus* sp. .

一致外, 它与 *Rhodococcus erythropolis* 酰胺酶亲缘关系较近, 同源性高达 82%, 而与其它几种红球菌酰胺酶氨基酸序列同源性较差, 最多只有 12%。

2.2 重组质粒 PEA1 的构建和鉴定

用 A1、A2 扩增酰胺酶阅读框序列, 经 *Nde* I、*Hind* III 双酶切纯化后连到同样经过双酶切纯化的 pET-28a(+) 上, 转化进大肠杆菌 BL21(DE3) 中。得到重组质粒和重组菌分别命名为 pPEA1 和 PEAB。

双酶切验证,重组质粒被切割成 5.4kb 和 1.0kb 两条带,证明 PEAB1 构建成功。

2.3 *Ncordia* sp. YS-2002 酰胺酶在重组大肠杆菌中的初步表达及酶活测定

将重组菌接种于含卡那霉素的 LB 培养基中,37℃ 下过夜培养,转接在 20℃、28℃ 和 37℃ 下分别生长至 $OD = 0.8 \sim 1.0$ 时各加入 0.2mmol/L、0.5mmol/L、1.0mmol/L IPTG 进行诱导。15h 后取样进行 SDS-PAGE 全细胞蛋白质电泳,同时做诱导前后的对比。同时测定其酶活。

结果如图 3(A)所示。由图可见,重组菌 PEAB 在 1.0 和 0.5mmol/L IPTG 诱导下均有一条大小 38kD 左右的条带出现,与酰胺酶的理论计算值相符。

用气相色谱检测混合反应中产物丙烯酸含量,重组菌 PEAB 在 0.5mmol/L、1.0mmol/L IPTG 诱导下,在 20℃、28℃ 温度下均检测到有丙烯酸生成,但出峰面积较小。经计算,在 20℃、0.5mmol/L、1.0mmol/L IPTG 诱导下,酰胺酶酶活经计算分别为 0.021u/mg、0.016u/mg。在 28℃、0.5mmol/L、1.0mmol/L IPTG 诱

导下,酰胺酶酶活略高,约为 0.032u/mg、0.027u/mg。37℃ 下没有检测到酰胺酶的酶活。

进一步对超声破碎后的上清和沉淀进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳,结果表明,上清液中有可溶的酰胺酶存在。但沉淀中也含有大量不溶的包涵体。这可能是造成大肠杆菌中酰胺酶酶活较低的原因。结果如图 3(B)所示。

3 讨论

本文在已知红球菌酰胺酶基因序列的基础上,对已知酰胺酶基因序列进行分析比对,筛选出两种具有典型性的红球菌酰胺酶基因序列,并以此为模板设计引物,最终成功地获得了 *Ncordia* sp. YS-2002 酰胺酶基因的序列。

本文还进一步对 *Ncordia* sp. YS-2002 酰胺酶基因序列和氨基酸序列进行分析,预测了其可能的启动子结构和下游的茎环状发卡结构,讨论了本研究所获得的 *Ncordia* sp. YS-2002 酰胺酶氨基酸序列与其它几种红球菌氨基酸序列的同源性及其进化关系。

在对 *Ncordia* sp. YS-2002 酰胺酶基因序列和氨基酸序列进行分析的基础上,进一步将 *Ncordia* sp. YS-2002 酰胺酶基因序列连入载体,转入大肠杆菌中获得了成功表达。

但由于大量包涵体的生成,导致酰胺酶的酶活较低,为了进一步提高酰胺酶的酶活,防止或减少包涵体的生成,本研究正在进行酰胺酶的表达载体、宿主及表达条件的优化。上述研究结果将对微生物催化法生产丙烯酰胺和丙烯酸均具有一定的参考价值。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Fan HQ(范会强),Liao LW(廖列文). The actuality and progress of acrylic acid. Shanghai Chemical Engineering(上海化工) 2002, 17: 33-36
- [2] Kobayashi M, Fujiwara Y, Goda M *et al.* Identification of active sites in amidase: Evolutionary relationship between amide bond- and peptide bond-cleaving enzymes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(22): 11986-11991
- [3] Yu BX(余冰宾), Zhou GY(周广业), Duan MX(段明星) *et al.* Biochemistry Experiment. Department of Chemical Engineering, 2001
- [4] Sun XD, Shi Y, Yu HM *et al.* Bioconversion of acrylonitrile to acrylamide using hollow-fiber membrane bioreactor system. *Biochemical Engineering Journal* 2004, 18(3): 239-243

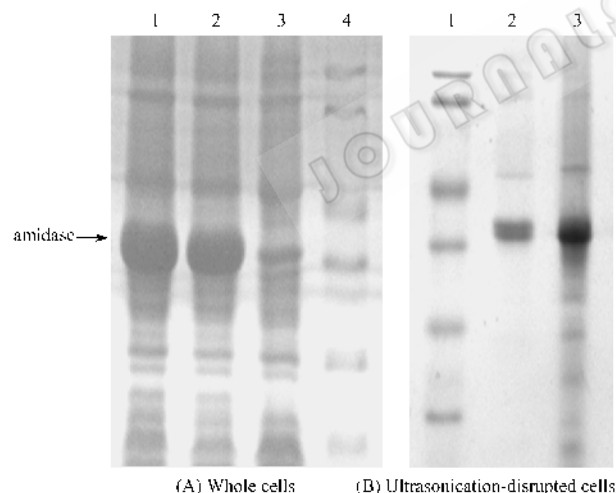


图 3 重组大肠杆菌 PEAB1 的全细胞和超声破碎细胞的 SDS-PAGE 蛋白质电泳

Fig.3 SDS-PAGE analyses of the whole cells and ultrasonic disrupted cells

(A) Lane 1 and 2: PEAB grew at 28℃, with 1.0, 0.5mmol/L IPTG; Lane3: PEAB before inducing; Lane4: protein size marker with molecular weights of 94, 67, 45, 35, 24 and 15 kD;

(B) Lane 1: protein size marker which molecular weights are 94, 67, 45, 35, 24 and 15kD; Lane 2: supernatant of ultrasonic treated cells of PEAB1 grew at 28℃, with 1.0mmol/L IPTG; Lane 3: pellet of ultrasonic treated cells of PEAB1 grew at 28℃, with 1.0mmol/L IPTG.