

三角酵母 D-氨基酸氧化酶基因的克隆、测序及表达*

刘洪波 姜卫红** 杨蕴刘** 赵国屏 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所 微生物次生代谢分子调控开放实验室 上海 200032)

摘 要 利用跨越内含子的 PCR 技术,从三角酵母(*Trigonopsis variabilis*)变种 FA1-10 中扩增得到 D-氨基酸氧化酶基因(*daao*),并通过 TA 克隆的方法将其克隆至 pGEM-T 载体。序列测定结果表明,所得 *daao* 基因的 5' 端内含子已被删除,基因总长度为 1071bp,它与 *Trigonopsis variabilis* 的 D-氨基酸氧化酶同源性达 98.3%,与 *Fusarium solanii* 和 *Rhodotorula gracilis* 的同源性分别是 38.9% 和 30.8%。为提高表达水平,又将此基因转移至高表达载体 pET-28b 上,在大肠杆菌 BL-21(DE3)中进行诱导表达。经 IPTG 诱导,目的蛋白的产生量可占菌体总蛋白量的 46%,分子量约为 38kD。D-氨基酸氧化酶的活力可达 802u/L。

关键词 三角酵母, D-氨基酸氧化酶, PCR, 高表达

分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0337-42

D-氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase, DAAO; EC 1.4.3.3)广泛存在于动物和许多种属的微生物中^[1-3],它催化 D-氨基酸氧化脱氨生成酮酸的反应^[4]。此酶的重要用途之一是在两步酶法生产抗生素母核 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)的过程中催化第一步反应。即作用于头孢菌素 C,使其脱氨产生一个酮酸中间体,α-酮基-己二酰-ACA 和过氧化氢,该中间体易氧化脱羧生成戊二酰基-7-氨基头孢烷酸(GL-7ACA)^[4]。GL-7ACA 在 GL-7ACA 酰化酶作用下可水解生成 7-ACA 和戊二酸。鉴于 7-ACA 是半合成头孢菌素的起始原料,因而对于 7-ACA 的酶法制造中关键酶 DAAO 的研究则十分重要。已有研究表明,三角酵母是 DAAO 的主要来源之一^[5]。李维泉等^[6]构建的三角酵母二倍体菌株 *Trigonopsis variabilis* FA1-10 产酶能力已有所增加,但存在其他副反应的干扰,限制了此酶在生产上的应用。为进一步提高产酶能力并减少副反应,本项研究对三角酵母的 D-氨基酸氧化酶基因进行克隆,并使之在大肠杆菌中表达,以期在抗生素生产中得到应用。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

实验所用菌株和质粒见表 1。

1.2 培养条件

大肠杆菌采用 37℃ 振荡培养。所用 LB 培养基和 2×YT 培养基参照 Sambrook^[7]的方法。三角酵母培养基及培养条件参照李维泉等^[6]的方法。根据实验需要添加不同抗

* “九五”国家攻关和上海市科学技术发展基金资助项目。

** 通讯作者。

收稿日期:1998-04-20,修回日期:1999-04-30。

生素,浓度如下:氨苄青霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,四环素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,氯霉素 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$,卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3 DNA 操作

三角酵母总 DNA 的抽提按 D. R. Cryer^[8]的方法。质粒 DNA 的制备和纯化,电泳洗脱法回收 DNA, α -互补现象的检测,大肠杆菌感受态细胞的制备和转化, M13 噬菌体感染,复制型及单链 DNA 抽提,均参照 Sambrook《分子克隆》的方法^[7]。限制酶的反应按公司说明书进行。DNA 序列测定,采用 Sanger 的双脱氧链终止法^[9]。

1.4 PCR 扩增产物的纯化及 TA 克隆

参照 Sambrook^[7]的方法和 Promega 公司试剂盒的说明。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

	Relevant characteristics	Source
Strain		
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue	<i>supE44hsdR17recAendAlgyrA46thi relA1</i> <i>lacF'</i> [proAN + lacI ^q Tn10lacZ & M15Tn10(tet ^r)]	This lab.
BL21	DE3F' ompTrB-mB-	This lab.
DH5 α	<i>supE44hsdR17recAendAlgyrA96thi-relA1</i>	This lab.
<i>T. vaviabilis</i> FA1-10	See reference[6]	This lab.
Plasmid		
pGEM-T	Amp ^r , α GEM-5zf(+) cut with EcoRV, add 3'-T to both ends	Promega
pET-28b	Kan ^r , T7 lac promoter, His-tag sequence	Novagen
pLysS	Cm ^r	Novagen
pLHB-3	Kan ^r , <i>daao</i> in pET-28b	This study
pLHB	Amp ^r , <i>daao</i> in pGEM-T	This study

1.5 基因序列的计算机分析

用 PCGENE(Version 6.7)软件对克隆的 *daao* 基因进行序列分析。用 FASTA3 软件对推测的蛋白序列进行分析,并在 SWALL DATABASE 中与其他种属的 DAAO 进行同源比较。

1.6 D-氨基酸氧化酶的活力测定

酶活力测定参照 A. Deshpande^[10]和 Brodelius^[11]的方法。酶活力单位定义为每分钟氧化脱氨生成 1 μmol 酮酸所需的酶量。

计算公式:酶活力(u/mL) = 标准曲线斜率 \times OD₅₅₀ \times 发酵液稀释倍数/反应时间(min)

1.7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白量的确定

电泳凝胶浓度为 10%,采用 Promega 公司的低分子量标准蛋白。整细胞蛋白电泳方法参照 Novagen 公司的 pET System Manual 和文献[12]。利用 IS-1000 Digital Imaging

System (Alpha Innotech Corporation) 确定蛋白的量。

1.8 主要试剂和试剂盒来源

测序用³⁵[S]-dATP 购自 Amersham 公司。限制酶, T4DNA 连接酶, T7 DNA polymerase 测序试剂盒, TA 克隆试剂盒, 回收 DNA 的 Qiagen 试剂盒和 PCR 扩增所用试剂均购自 Promega 公司。其它为国产分析纯试剂。

2 结果与讨论

2.1 D-氨基酸氧化酶基因的扩增和克隆

2.1.1 扩增引物的设计: 根据已发表的 D-氨基酸氧化酶基因的全序列^[13], 可知其 5'-端从第 24 位开始有一个 42bp 的内含子, 不编码氨基酸。由于带有内含子的真核基因不能在原核系统中表达, 因此设计了一个由 34 个核苷酸组成的较长引物, 通过跨越内含子而扩增目的基因。为进一步克隆之便, 在引物 1 的 5'-端起始位置添加了一个 *Nde*I 酶切位点。

引物 1: 5'-GCATATGGCTAAAATCGTTGTTATTGGTGCCGGT-3'
 $\xrightarrow{\text{NdeI}}$

引物 2: 5'-CTAAAGGTTTGGACGAGTAAG-3'

扩增的 DNA 产物经纯化回收后作凝胶电泳分析, 结果如图 1。产物长度略大于 1kb, 与报道的 D-氨基酸氧化酶基因的大小基本一致。

2.1.2 扩增产物的 TA 克隆: 鉴于 TaqDNA 聚合酶会在扩增链的末端自动加上一个碱基 A, 该碱基可以和线性化的 pGEM-T 载体末端的一个碱基 T 配对连接, 形成环状质粒。利用这一特点, 将扩增的片段与 pGEM-T 载体用 T4DNA 连接酶连接。用氯化钙法转化大肠杆菌 XL1-blue, 并在带有氨苄青霉素和 X-gal, IPTG 的 LB 平板上挑选含目的基因的转化子。从而获得带有 D-氨基酸氧化酶基因 *daao* 的重组质粒 pLHB。

2.1.3 重组质粒 pLHB-3 的构建: 为了提高 *daao* 基因的表达水平, 则进一步把该基因克隆到高表达载体 pET-28b 上。首先挑选带有 *daao* 基因反向插入的 pLHB 重组质粒, 用 *Sal*I 和 *Nde*I 双酶切后, 连入 pET-28b 载体, 并转化大肠杆菌 DH5 α , 得到重组质粒 pLHB-3。

2.2 D-氨基酸氧化酶基因的序列测定和分析

2.2.1 扩增产物的 5'-端序列测定: 采用双脱氧链终止法对 TA 克隆后的基因进行单链测序。结果表明, 正如引物设计时所预期, PCR 扩增产物中已去除了 5'-端的内含子序列。这一段扩增序列与所报道的序列一致。图 2 表示了带有内含子的三角酵母 D-氨基酸氧化酶基因 5'-端的序列及重组质粒 pLHB-3 上该基因 5'-端的测序图。

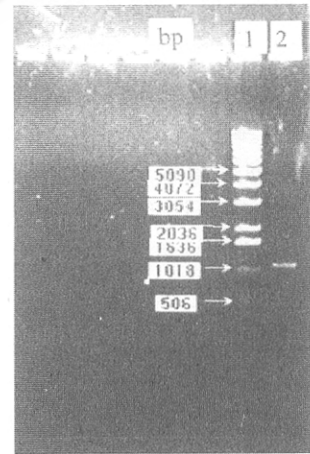
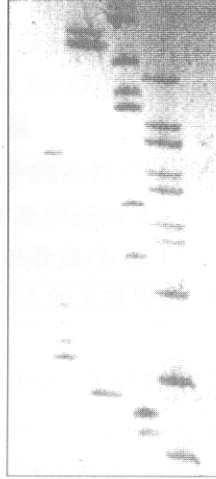
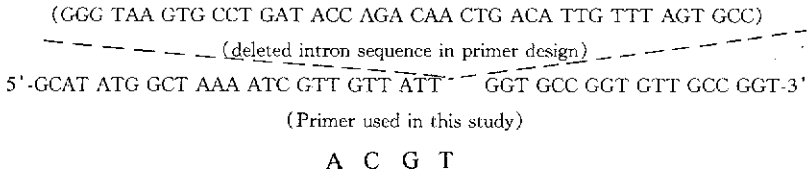


图 1 纯化后的 PCR 扩增产物的电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of purified PCR amplified products
 1. 1kb ladder; 2. Purified PCR product



图中序列:5'-ATG GCT AAA ATC GTT GTT ATT GGT GCC GGT-3'

图2 去内含子的三角酵母 *daao* 基因 5'端引物序列及重组质粒 pLHB-3 中 *daao* 基因 5'端序列图

Fig. 2 Designed 5'-end primer sequence of *daao* gene in *T. variabilis* (deleted the intron) and the 5'-end sequence of *daao* gene in pLHB-3

2.2.2 D-氨基酸氧化酶基因的全序列测定以及与其他来源 *daao* 的序列比较: 所得 *daao* 基因的全序列测定结果表明,该基因与小松谦一等^[13]发表的序列基本一致,开放阅读框架长度为 1071bp,起始密码子是 ATG,终止密码子是 TAG。其中有一个点突变,106 位的 C 突变成 G,从而导致 Arg 突变成 Gly。此蛋白三维结构计算机模拟的初步结果表明,突变位点处于蛋白表面,不在活性中心^[14],推测这一点突变不会影响其活力。DNA 序列分析显示此基因的 G+C 含量为 50.1%。用 FASTA3 软件对推测的蛋白序列进行分析,发现它与 SWALL DATABASE 中的 *Trigonopsis variabilis* 的 D-氨基酸氧化酶同源性达 98.3%,与 *Fusarium solanii* 和 *Rhodotorula gracilis* 的同源性分别是 38.9% 和 30.8%。

2.3 D-氨基酸氧化酶基因在宿主菌中的诱导高表达

2.3.1 pLysS 质粒的导入: 用带有 *daao* 基因的重组质粒 pLHB-3 转化大肠杆菌 BL-21, 得到转化菌株 BL-21(pLHB-3)。同时将另一带有溶菌酶基因的质粒 pLysS 导入,得到转化菌株 BL-21(LHB-3)(pLysS)。pLysS 质粒可表达一定量的 T7 溶菌酶,利于菌体的裂解处理和胞内产物的释放。

2.3.2 诱导表达蛋白的检测: pET-28b 是一个可诱导的高表达载体,在宿主菌 BL-21 中质粒上的外源基因可被 1mmol/L IPTG 诱导表达,产生大量目的蛋白。BL-21(pLHB-3) 和 BL-21(pLHB-3)(pLysS) 的整细胞 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如图 3。从图上可明显看出诱导蛋白的表达,该蛋白可占菌体总蛋白的 46%,亚基分子量约 38kD。与推测的分子量基本一致。

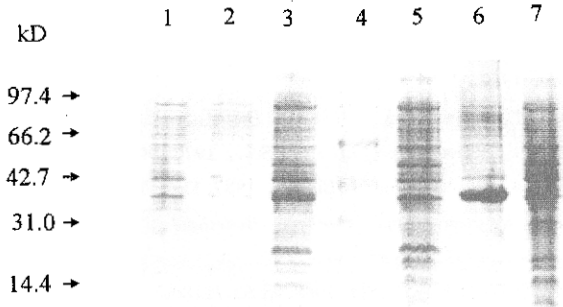


图 3 BL-21(pLHB-3)(pLysS)和 BL-21(pLHB-3)的整细胞 SDS-凝胶电泳

Fig. 3 SDS-PAGE of BL-21(pLHB-3)(pLysS) and BL-21(pLHB-3) whole cell protein

1. BL21(pET-28b)induced; 2. BL21(pET-28b)uninduced; 3. BL21(pLHB-3)(pLysS)induced;
4. Marker; 5. BL21(pLHB-3)(pLysS)uninduced; 6. BL21(pLHB-3)induced; 7. BL21(pLHB-3) uninduced

2.3.3 BL-21(pLHB-3)(pLysS)、BL-21(pLHB-3)和三角酵母的 DAAO 活力及产酶率比较: 对带有重组质粒的 BL-21(pLHB-3)(pLysS)和 BL-21(pLHB-3)两株菌的 D-氨基酸氧化酶进行活力测定,计算其产酶率,并与三角酵母 FA1~10 的产酶率比较。表 2 结果表

表 2 不同菌株的 D-氨基酸氧化酶活力和产酶率的比较
Table 2 The comparison of *daao* activities in different strains

Strain	BL-21(pLHB-3)	BL-21(pLHB-3)(pLysS)	<i>Trigonopsis variabilis</i>
<i>OD</i> ₆₀₀	6.015	6.550	73.20
Protein/(mg/mL)	0.612	0.656	7.224
Activity/(u/mL)	0.664	0.802	0.724
Productivity/(u/ <i>OD</i> ₆₀₀)	0.110	0.122	0.010
(u/mg protein)	1.085	1.523	0.101

明,三者每毫升发酵液所含 D-氨基酸氧化酶的活力单位相差不多,但 BL-21(pLHB-3)(pLysS)和 BL-21(pLHB-3)的 D-氨基酸氧化酶的产酶率远高于三角酵母 FA 1~10,即单位生物量的酶活力提高了 10 倍多。若能配合发酵条件的优化,提高工程菌密度,可望达到更高产酶水平。从而为 DAAO 工程菌的构建,7ACA 生产工艺的简化及产量的提高打下了基础。

参 考 文 献

- [1] B. Curti, S. Ronchi, M. S. Pilone. *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, 1992, 3:69~94.
- [2] E. M. Kubicek-Pranz, M. Rohr. *J Appl. Biochem.*, 1985, 7:104~113.
- [3] K. Fukui, F. Watanabe, T. Shibata *et al.* *Biochemistry*. 1987, 26:3612~3618.
- [4] M. S. Pilone, S. Buto, L. Pollegioni. *Biotechnol. Lett.* 1995, 17:199~204.
- [5] P. C. Berg, F. A. Rodden. *Anal. Biochem.* 1976, 71:214~222.

- [6] 李维泉, 焦瑞身. 微生物学报, 1991, 31(5):371~375.
- [7] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis *et al.* Molecular Cloning; A laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [8] D. R. Cryer, R. Eccleshall, J. Marmur. *Methods in Cell Biology*, 1975, 12:39~44.
- [9] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson. *Proc Natl Acad Sci.*, 1977, 74:5463~5467.
- [10] D. Ashwin, S. F. D' Souza, G. B. Nadkarni. *J. Biosci.*, 1987, 11:137~144.
- [11] P. Brodelius, K. Nilsson, K. Mosbach. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1981, 6:293.
- [12] F. W. Studier. *J. Mol. Biol.*, 1991, 219:37~44.
- [13] 小松谦一, 松田昭生, 松浦弘吉. 公开特许公报, 1988, 昭 63-71180.
- [14] L. Pollegioni, K. Fukui, V. Massey. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269:31666~31673.

Cloning, Sequencing and Expression of D-amino Acid Oxidase Gene*

Liu Hongbo Jiang Weihong** Yang Yunliu** Zhao Guoping Jiao Ruishen

(Laboratory of Molecular Regulation for Microbial Secondary Metabolism Shanghai
Institute of Plant Physiology, The Chinese Academy of Sciences Shanghai 200032)

Abstract The D-amino acid oxidase gene(*daao*) was cloned from the total DNA of *Trigonopsis variabilis* by intron-deleting PCR amplification and TA cloning methods. The *daao* gene consists of 1071bp encoding a protein of 357 amino acids. Comparing its nucleotide and amino acid sequences with DAAOs from other sources, considerable homologies were observed. The insertion of the *daao* gene into the high-expression vector pET-28b allowed the expression of recombinant DAAO in *E. coli* as a soluble and catalytically active enzyme with a fermentation yield, in terms of DAAO units, of 802u/L. After IPTG induction target protein amounts to 46% of the total cell protein, its molecular weight is about 38 000 dalton.

Key words *Trigonopsis variabilis*, PCR, high-expression, induce

* Supported by the Shanghai Foundation for Science and Technology.

** Corresponding author.