胆固醇氧化酶基因的克隆及在 *E. coli* 中的表达

王龙刚　邬敏辰　王　武

（江南大学工业生物技术教育部重点实验室　无锡　214036）

摘要：根据 NCBI 中报道的 *Brevibacterium sterolicum* ATCC21387 胆固醇氧化酶基因序列，采用 PCR 方法以 *Brevibacterium* sp. DGCDC-82 的基因组为模板，扩增得到了编码胆固醇氧化酶的基因，该基因与来源于 *Brevibacterium sterolicum* ATCC21387 的胆固醇氧化酶基因（*cho*B）同源性为 98%。将得到的基因定向克隆到 pET28a 载体中，转化至含有编码 *arg*U 和 *pro*L 基因的大肠杆菌 BL21-CodonPlus（DE3）-RP 中表达。经过 IPTG 诱导后，经 SDS-PAGE 检测在约 55kD 处有一蛋白表达条带，目的蛋白表达量约占总蛋白的 16%，经测定酶活为 340U/L。

关键词：*Brevibacterium* sp. DGCDC-82，胆固醇氧化酶，克隆，原核表达

中图分类号：Q93　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2654（2006）06-0039-04

Cloning and Expression of *Brevibacterium* sp. DGCDC-82 Cholesterol Oxidase Gene in *Escherichia coli*

WANG Long-Gang　WU Min-Chen　WANG Wu

（*Key Laboratory of Industury Biotechnology Under Ministry of Education, Southern Yangtze Univiersity, Wuxi* 214036）

Abstract: Based on DNA sequence encoding cholesterol oxidase reported on the NCBI, cholesterol oxidase gene was cloned from *Brevibacterium* sp. DGCDC-82 by PCR methods, which showed homology of 98% to the previously reported cholesterol oxidase gene from *Brevibacterium sterolicum* ATCC21387. Subsequently, the resulting products were digested with *Nco*I and *Eco*RI and ligated to the pET28a vector by T4 DNA ligase. The recombinant plasmid, pET28a-*cho*B, was transformed into *Escheriehia coli* BL21-CodonPlus（DE3）-RP which contain extra copies of the *arg*U and *pro*L genes. The positive clone was induced with IPTG, and enzyme expressed in BL21-CodonPlus（DE3）-RP, the enzyme activity was about 340U/L. The expression products were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis indicating that about 55kD protein was obtained, which accounted for about 16% of the total cell protein.

Key words: *Brevibacterium* sp. DGCDC-82, Cholesterol oxidas, Cloning, Prokaryotic expression

胆固醇氧化酶（EC1.1.3.6）是依赖辅酶 FAD，能专一性地催化胆固醇转化为胆甾-4-烯-3-酮[1]，在食品开发、医疗保健、临床检测、生物农药等方面具有广泛的应用价值的 GMC 氧化还原酶家族酶类。产胆固醇氧化酶的微生物有多种，不同来源的胆固醇氧化酶的生理特性及底物特异性也不同[2]。本实验室从土壤中筛选得到一株胆固醇氧化酶生产菌 *Brevibacterium* sp. DGCDC-82[3]。

Ohta 曾报道在大肠杆菌中表达了来源于 *Brevibacterium sterolicum* ATCC21387 的胆固醇氧化酶（*cho*B），但获得的活性酶蛋白仅占总蛋白的 0.02%[4]。Ohta 又将胆固醇氧化酶基因与 *Lac*Z 基因进行融合表达，但是主要的酶蛋白以包涵体的形式表达[5]。

通讯作者　E-mail：wanglongang2004@yahoo.com.cn

收稿日期：2006-01-20，**修回日期**：2006-04-11

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

根据NCBI公布的*Brevibacterium sterolicum*ATCC21387胆固醇氧化酶基因序列设计了一对引物，以*Brevibacterium* sp. DGCDC-82的基因组为模板，扩增得到了编码胆固醇氧化酶的基因，由于胆固醇氧化酶GC含量达到66%。并且含有大肠杆菌稀有密码子，因此为了获得胆固醇氧化酶在大肠杆菌中的高效表达，作者采用低温诱导和在含有编码*arg*U和*pro*L基因的大肠杆菌中表达，成功地使其在*E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP中进行了活性表达，酶蛋白占总蛋白的16%，本文报道有关研究结果。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

胆固醇氧化酶生产菌*Brevibacterium* sp. DGCDC-82由本实验室筛选并保存；*E. coli* JM109由本实验室保存；pET28a载体和*E. coli* CodonPlus-RP由南京师范大学生命科学学院邵蔚蓝教授惠赠；pMD18-T载体购自大连宝生物公司。

1.2 培养基、酶及试剂

Brevibacterium sp. DGCDC-82的培养基配制参照文献[3]；*Eco*RI、*Nco*I内切酶、T4 DNA连接酶、RNase A、Ex Taq DNA聚合酶、PCR试剂均为大连宝生物公司产品；酵母提取物和蛋白胨为Oxiod公司产品；DNA纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自大连宝生物公司。其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 基因操作和蛋白质操作

LB培养基、分子克隆技术和表达产物的SDS-PAGE分析，参照文献[6，7]进行。

1.4 胆固醇氧化酶基因的扩增

根据GenBank中报道的的胆固醇氧化酶基因序列（GenBank登录号D00712）设计并合成一对引物：

引物1：5’-TTCCATGGCCGATAGCCGGGCGAACAG-3’；

引物2：5’-GCGAATTCTCACTGGATGTCGGACGAGATGA-3’。

利用引物1引物2以*Brevibacterium* sp. DGCDC-82的基因组为模板，PCR反应参数为：95℃ 4 min，95℃ 1 min，60℃ 60 s，72℃ 90 s，重复30个循环后72℃继续延伸10 min。用0.9% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR产物。

1.5 目的片段的回收

PCR产物约50μL，用1% 的琼脂糖电泳回收目的片段。利用DNA胶回收试剂盒进行回收，方法参见DNA胶回收试剂盒说明书。

1.6 诱导表达

挑取阳性克隆单菌落并接种于4mL含有浓度为50μg/mL Kan和50μg/mL Cam的LB液体培养基中，于37℃ 250r/min震荡过夜。取1mL培养物，将其转接于50mL含有浓度为50μg/mL Kan和50μg/mL Cam的LB液体培养基中37℃ 、250 r/min震荡至菌体浓度OD_{600}约为0.6～0.8左右。向培养物中加入IPTG至终浓度为1mmol/L诱导培养。收集菌体供电泳分析及酶活力测定。

1.7 菌体破碎

12,000r/min，4℃离心5min收集菌体后，用50mmol/L的pH7.5的磷酸洗涤悬浮菌体，超声波破碎仪400W，工作5 s，间歇5 s，99个循环，超声破碎菌体。4℃ 12,000r/min离心15 min去除细胞碎片沉淀，取上清酶活分析。

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

1.8 酶活力测定

3mL 溶液 A（4-氨基-安替比林，1mmol/L；苯酚，6mmol/L；叠氮钠，0.2g/L；过氧化物酶，5,000U/L；磷酸钾缓冲液，25mmol/L，pH7.5），150μL 溶液 B（胆固醇，8.26g/L；Triton X-100，4.26%；异丙醇为溶剂），50μL 酶液，37℃，反应 5 min，沸水浴 3 min，于 500nm 测吸光值。酶活（U/mL）$=1.6832\times A_{500}$。

酶活力单位定义：37℃，1 分钟转化 1μmol 胆固醇生成胆甾-4-烯-3-酮的酶量定义为 1 个酶活单位（U）。

2 结果与讨论

2.1 胆固醇氧化酶基因扩增及序列分析

由于甾短杆菌胆固醇氧化酶的基因长度为 1,700bp 左右，且 GC 含量达到 66%，所以 PCR 扩增较困难。作者将第 2 位的 Thr（ACC）点突变为 Ala（GCC），在引物 1 中引入 1 个 *Nco*I 酶切位点。引物 2 中引入 1 个 *Eco*RI 酶切位点并且含有一个终止密码子，这样既可以将胆固醇氧化酶基因克隆到质粒载体 pET28a 上，进行非融合表达，又便于将胆固醇氧化酶基因亚克隆到其他质粒载体上。经 PCR 反应扩增得到了 1,656bp 的基因片段（图 1）。切胶回收目的条带，将回收的目的片段同载体 pMD18-T 进行连接，将重组质粒电转化到 *E. coli* JM109 宿主菌中，涂布于含 IPTG/ X-gal/ Amp 的 LB 琼脂平板上，过夜培养。挑取阳性转化子提取质粒验证后，用自动序列仪进行测序（由大连宝生物公司完成）。测序结果在 GenBank 上登录（登录号 DQ345780）。利用 BLAST 软件进行同源性分析，发现该序列同来源于 *Brevibacterium sterolicum* ATCC21387 的胆固醇氧化酶基因（登录号 D00712）的同源性达到 98%，表明本实验室筛选保藏的胆固醇氧化酶生产菌 *Brevibacterium* sp. DGCDC-82 与目前胆固醇氧化酶重要的工业生产菌株 *Brevibacterium sterolicum* ATCC21387 有较高的亲缘性。

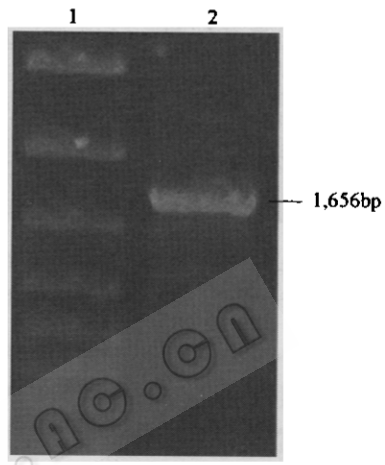

图 1　胆固醇氧化酶基因 PCR 扩增 agarose 电泳图

1 100bp DNA marker（3.0kb，2.0kb，1.5kb，1.2kb，1.0kb，0.9kb，0.8kb，0.7kb），2 用引物 1 引物 2 扩增得到的 PCR 产物

2.2 表达载体的构建

将 2.1 中扩增得到的 DNA 产物及载体 pET28a 分别用限制酶 *Nco*I 和 *Eco*R I 酶切，酶切产物纯化后进行连接，构建表达载体 pET28a-*cho*B，转化至 *E. coli* JM109 受体菌，37℃培养过夜，随机挑取 12 个转化子接种到含 50μg/mL Kan 的 LB 培养基中，提取重组质粒，用限制酶对重组质粒进行鉴定，pET28a-*cho*B 能被 *Nco*I 和 *Eco*R I 双酶切获得一条 1.7kb 左右的片段，该片段同用 PCR 扩增的方法获得的胆固醇氧化酶基因大小一致；而在约 5.4kb 处存在一条片段，该片段小于分别用 *Nco*I 和 *Eco*R I 酶切的 pET28a-*cho*B 大片段，初步证明目的 *cho*B 基因已成功同载体 pET28a 连接并转入到宿主菌 *E. coli* JM109 中。将提取的质粒测序，验证读码框正确后，将重组质粒 pET28a-*cho*B 电转化到 *E. coli* BL21-CodonPlus（DE3）-RP 中，涂布于含 Cam、Kan 的 LB 琼脂平板上，37℃培养过夜，挑取阳性转化子。

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

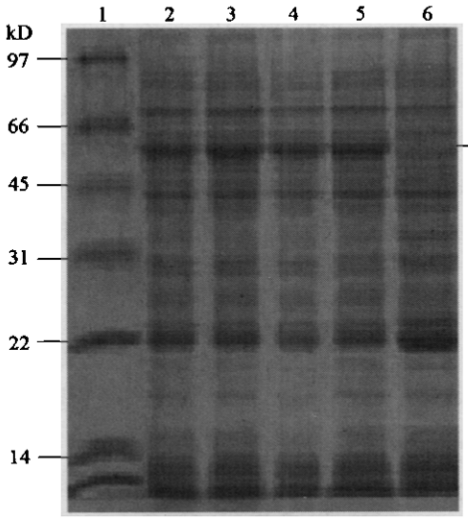

图2 胆固醇氧化酶SDS-PAGE

1 蛋白质分子量标记，2～6 分别为诱导后 2h、4h、6h、8h、0h

2.3 SDS-PAGE检测

鉴定为阳性的 *E. coli* BL21-CodonPlus（DE3）-RP/pET28a-*cho*B 经 IPTG 诱导后收集菌体，加上样缓冲液煮 10min，进行 SDS-PAGE。从电泳图谱上可以看出，经 IPTG 诱导后，含重组质粒 pET28a-*cho*B 的大肠杆菌有分子量约为 55kD 的蛋白表达条带见图 2，这进一步证明了重组表达载体构建成功。

2.4 酶活鉴定

按照“材料与方法”所述，在添加了适当浓度抗生素的 LB 培养基中培养 *E. coli* BL21-CodonPlus（DE3）-RP/pET28a -*cho*B 至菌体浓度 OD_{600} 为 0.6 左右时，向培养基中加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L，诱导培养 4h。收集菌体，破碎细胞后，测定酶活力。同时以 BL21-CodonPlus（DE3）-RP，未经 IPTG 诱导的 pET28a-*cho*B 转化子和含 pET28a 的空载体为对照分别测定酶活力。各转化子的酶活测定结果见表 1。

表1 胆固醇氧化酶酶活力测定结果

Strains/plasmid	Activity(U/L)
BL21-CodonPlus(DE3)-RP	0
BL21-Codon Plus(DE3)-RP/pET28a	0
BL21-Codon Plus(DE3)-RP/pET28a-*cho*B	0
BL21-Codon Plus(DE3)-RP/pET28a-*choB*/IPTG	340

2.5 讨论

根据 GenBank 中报道的的胆固醇氧化酶基（*cho*B）设计并合成特异引物，以本实验室筛选保藏的菌株基因组为模板，PCR 扩增得到胆固醇氧化酶基因并将该基因克隆到含有强 T7 启动子的 pET28a 载体上，在含有编码 *arg*U 和 *pro*L 基因的大肠杆菌 *E. coli* BL21-CodonPlus（DE3）-RP 中进行了活性表达。结果表明已成功地扩增得到了 *Brevibacterium* sp. DGCDC-82 胆固醇氧化酶基因，并在在大肠杆菌中进行了活性表达。

参考文献

[1] Fujishiro K, Ohta T, Hasegawa M, *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1990, **172** (2): 721～727.

[2] MacLachlan J, Wotherspoon A, Ansell R, *et al.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2000, **72** (5): 169～195.

[3] 王龙刚，吕陈峰，王 武，等. 食品与生物技术，2003，**22** (2)：34～37.

[4] Ohta T, Fujishiro K, Yamaguchi K, *et al.* Gene, 1991, **103** (1): 93～96.

[5] Ohta T, Fujishiro K, Yamaguchi K, *et al.* Biosci Biotechnol Biochem, 1992, **56** (11): 1786～1791.

[6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratorymanual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

[7] Weaver R F. Molecular Biology. 北京：科学出版社，2001.

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