

季俊杰. 定向改造棒状链霉菌青霉素扩环酶的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 13-15.

定向改造棒状链霉菌青霉素扩环酶的研究进展

季俊杰

[中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京 100083]

摘要:青霉素扩环酶是实现酶法转化青霉素生产各种半合成头孢菌素的关键前体 7-ADCA 的关键酶。获得对青霉素 G 具有高催化能力的扩环酶突变体, 是将其引入工业化生产需要解决的关键问题。目前利用非理性和理性的方法对改酶进行改造, 取得了一些活性提高的突变株。本文对改造青霉素扩环酶的研究进展进行总结, 并结合其自身的工作对改酶的进一步研究提供理论基础。

关键词:定向改造; 棒状链霉菌; 青霉素扩环酶

中图分类号: Q933 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0013-02

β -内酰胺类抗生素是临床使用最多、应用最广和评价最高的一类抗生素^[1]。 β -内酰胺环的抗生素中最重要的两类是青霉素和头孢类抗生素。青霉素因为高效和低毒的优势成为临床上应用最广的重要抗生素, 但是随着青霉素的大量使用, 人们也慢慢地发现了它的一些不足, 如青霉素抗菌谱相对比较窄、致病菌耐药性、对酸不稳定、不能口服等^[2]。此时, 头孢菌素应运而生, 它是意大利科学家 Brotzu 在 1945 年对意大利撒丁岛近海污水做药物研究时发现的一种对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌有强抑制的广谱抗生素^[3-4]。与青霉素相比, 头孢菌素具有抗菌谱广、耐青霉素酶、毒性低等优点。目前, 工业上从青霉素 G 到 7-ADCA 的合成需要多步化学扩环, 成本高, 污染重, 因此, 利用青霉素扩环酶使青霉素 G 扩环得到 G-7-ADCA(7-苯乙酰基脱乙酰氧基头孢菌素 C)

是更为有效的方法(图 1)。但青霉素扩环酶的天然性底物是青霉素 N, 不能大规模合成, 所以人们利用各种方法对青霉素扩环酶进行改造, 以提高它对非天然性底物青霉素 G 的催化活性。本文总结了利用非理性和理性方法对棒状链霉菌来源的青霉素扩环酶进行改造的研究, 并结合笔者所在的实验室进行理性改造工作, 为青霉素扩环酶的进一步研究提供了理论基础。其中, 非理性改造可以在对酶的高级结构一无所知的条件下进行, 但需要构建一个比较大的重组表达文库, 从而能以较大可能获得所需活性改变的产物。理性的方法是基于对酶的高级结构以及与底物的结合关系等一系列结构信息的基础上进行有目的突变的方法。对 scDOACS 构效关系的研究而言, 这 2 种方法都获得了很多有用的信息, 并得到了一系列活性提高的突变体。

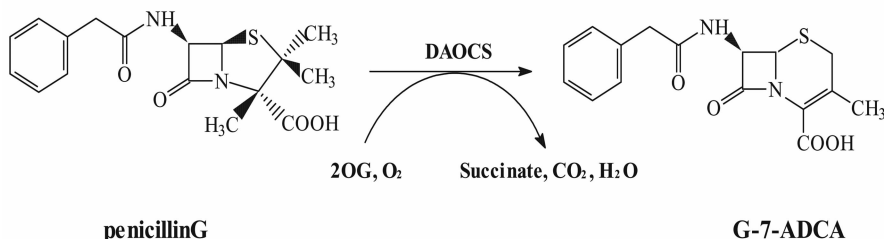


图1 青霉素扩环酶催化反应

1 非理性的方法

该方法又称为直接进化的方法, 其基本原理在于通过随机突变来模仿蛋白本身的进化过程, 配合高效的筛选方式来选择得到所需要的突变体, 有效的筛选方式是必需的, 并且通

常需要较大的重组文库。

1.1 化学诱变

Wei 等为获得对青霉素 G 的高活性突变体, 利用化学诱变剂羟胺对 scDAOCS 进行诱变, 从包含 5 500 个个体的突变库中得到了 6 株活性提高的突变体, 它们包含的点突变为 G79E、V275I 和 C281Y。由于这 3 个位点都距离底物结合口袋较远, 因此推测它们可能通过一种整体效应来影响活性位点的结构^[5]。

1.2 同源重组

2002 年 Adrio 等通过体内同源重组构建了来源于棒状链霉菌 (*Streptomyce clavuligerus*) 和耐内酰胺诺卡氏菌 (*Nocardia lactamdurans*) 的 DAOCS 的重组体, 最终得到了相对于棒状链霉菌对青霉素 G 有更高活性的重组体^[6-7]。2004 年 Hsu 等

收稿日期: 2013-01-09

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(编号: 2009ZX08009-130B); 中央高校基本科研业务费专项(编号: 2010YH05)。

作者简介: 季俊杰(1984—), 男, 山东临沂人, 博士研究生, 研究方向为酶学改造及抗生素生产。Tel: (010) 64807457; E-mail: jijunjie_2009@126.com。

为获得对青霉素 G 高活性的扩环酶突变体,在体外对不同来源的 DAOCS 编码基因进行同源重组后筛选对青霉素 G 高活性的突变体,得到了 FF1 和 FF8 对青霉素 G 具有高催化活性的突变株。相对于 scDAOCS,FF1 的 k_{cat}/K_m (k_{cat} 、 K_m 均为动力学参数)提高 9 倍,而 FF8 则提高了 118 倍,这也是目前报道的对青霉素 G 活性提高程度最高的突变体^[8]。

1.3 易错 PCR

Wei 等利用易错 PCR 的方法得到 6 000 个个体的突变库,并通过高通量筛选得到了活性有不同程度提高的 6 个单突变和 6 个双突变。在获得的双突变体的基础上对其他位置进行了单突变,L277Q 对青霉素 G 的活性提高 6 倍,而 M73T、G79E、T91A、Y184H、M188V、H244Q 的 k_{cat}/K_m 值提高 2~5 倍。对这些单突变进行基因重组,得到 10 000 个个体随机突变库。通过筛选得到了一个 k_{cat}/K_m 相对野生型 DAOCS 提高约 41 倍的四突变体 C155Y/Y184H/V275I/C281Y^[9]。

比较 Wei 等通过非理性突变的方法得到的 scDAOCS 的部分突变体^[8-10] 氨基酸残基,结果发现,只有 M73T、N304K 和 I305M/L 突变位于活性中心,通过其侧链与底物发生相互作用,scDAOCS 的底物特异性并非仅由活性中心和底物与产物进出通道的氨基酸残基所控制的,一些距离活性中心比较远的氨基酸残基也对底物的选择起很大的作用。然而,没有高级结构,很难对这些位点影响酶活的机制进行解释,因此还需要通过理性的方法对结果进一步分析,并且使理性突变的目标更加明确,更容易得到活性提高的突变株。

2 理性的方法

2.1 定点突变改造青霉素扩环酶

Chin 等对 DAOCS 的 R74、R160、R266 和 N304 进行定点突变,结果表明只有 N304L 突变体活性有提高^[11]。Wei 等也证明 N304K、I305L 和 I305M 突变体活性有提高^[5]。季俊杰等利用基于结构信息学及多重序列比对的方法对 scDAOCS 进行定点突变,得到 Y184A、Q126M、T213V、S261A 和 S261M 等 5 株活性提高的突变株,为将来 scDAOCS 定点突变位点的选择提供了优良突变体^[12]。

2.2 饱和突变改造青霉素扩环酶

Chin 等对 N304 进行了饱和突变,当 N304 突变为碱性氨基酸时针对几种包含疏水侧链的青霉素底物的活性较高,突变为脂肪族氨基酸活性较低^[11]。Goo 等还对 R306 进行了饱和突变,结果发现 R306 氨基酸残基侧链的长度和疏水性质对酶的功能有重要影响,R306L 活性提高,R306P 突变体活性丧失^[13]。结合 scDAOCS 结构信息的饱和突变的方法可以发现,青霉素扩环酶活性提高了,其突变株变得更理想。

2.3 迭代组合突变改造青霉素扩环酶

季俊杰等在 2012 年利用迭代组合突变的方法对 scDAOCS 进行改造,在具有 4 个点突变 C155Y、Y184H、V275I、C281Y 的突变株 H4 上进行了 4 轮迭代组合突变,共构建 20 株组合突变株。其中 11 株的组合突变株在比活力测定中比出发菌株提高,其中 C155Y、Y184H、V275I、C281Y、I305M、T213V、M73T 等 7 株组合突变株比活力较野生型高 22.5 倍,是文献报道中比活力最高的突变株。在对 6 株比活力较高的突变株进行动力学参数的测定,结果发现其比野生

型高 40~87 倍。从结果来看,迭代组合突变的方法对于酶学改造是一种极为有效的方法^[14]。

3 小结

随着绿色环保化学的提出,scDAOCS 越来越多地被用于生产新的更有效的头孢菌素。尽管早期研究认为 scDAOCS 底物范围很狭窄,但是通过改造 scDAOCS 的底物范围可以改变。ScDAOCS 晶体结构的解析催化机制的研究提供了非常重要的信息,而对 DAOCS 的蛋白工程改造也提高了其对于青霉素 G 的转化活性,期望可以逐步满足工业化生产的需求。各国科学家利用多种方法对青霉素扩环酶进行改造,包括理性和非理性的方法。非理性的方法目标性差,需要构建大型突变库和高通量的筛选方法,比如易错 PCR、shuffling 等方法,费时费力。而理性突变主要是基于 scDAOCS 的晶体结构的结构信息学对底物与蛋白的结合位点进行分析,目标靶向明确,有的放矢,是未来酶学改造的有效方法。而笔者所在的实验室所采用的迭代组合突变的策略可以很好地将良性突变体进行理性和有机的组合,得到催化活性具有质的提高的组合突变株,该策略可以广泛推广应用至工业用酶改造上。

参考文献:

- [1] Brown A G, Butterworth D, Cole M, et al. Naturally - occurring β - lactamase inhibitors with antibacterial activity[J]. J Antibiot (Tokyo), 1976, 29 (6): 668 - 669.
- [2] Cierpucha M, Panfil I, Danh T T, et al. Synthesis of 3 - substituted - clavams: antifungal properties, DD - peptidase and β - lactamase inhibition[J]. J Antibiot (Tokyo), 2007, 60 (10): 622 - 632.
- [3] Brakhage A A. Molecular regulation of β - lactam biosynthesis in filamentous fungi[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62 (3): 547 - 585.
- [4] Zapun A, Contreras - Martel C, Vernet T. Penicillin - binding proteins and β - lactam resistance[J]. FEMS Microbiol Rev, 2008, 32 (2): 361 - 385.
- [5] Wei C L, Yang Y B, Wang W C, et al. Engineering Streptomyces clavuligerus deacetoxycephalosporin C synthase for optimal ring expansion activity toward penicillin G[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (4): 2306 - 2312.
- [6] Adrio J L, Demain A L. Improvements in the formation of cephalosporins from penicillin G and other penicillins by bioconversion[J]. Org Process Res Dev, 2002, 6 (4): 427 - 433.
- [7] Adrio J, Hintermann G, Demain A, et al. Construction of hybrid bacterial deacetoxycephalosporin C synthases (expandases) by *in vivo* homologous recombination[J]. Enzyme Microb Technol, 2002, 31: 9.
- [8] Hsu J S, Yang Y B, Deng C H, et al. Family shuffling of expandase genes to enhance substrate specificity for penicillin G[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70 (10): 6257 - 6263.
- [9] Wei C L, Yang Y B, Deng C H, et al. Directed evolution of Streptomyces clavuligerus deacetoxycephalo - sporin C synthase for enhancement of penicillin G expansion[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71 (12): 8873 - 8880.
- [10] Robin J, Bonneau S, Schipper D, et al. Influence of the adipate and dissolved oxygen concentrations on the β - lactam production during continuous cultivations of a Penicillium chrysogenum strain expressing the expandase gene from Streptomyces clavuligerus[J]. Metab Eng, 2003, 5 (1): 42 - 48.

钱荷英,张月华,郭锡杰,等. 家蚕斑纹突变基因(*q*)的 SSR 标记定位分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):15-18.

家蚕斑纹突变基因(*q*)的 SSR 标记定位分析

钱荷英^{1,2}, 张月华^{1,2}, 郭锡杰¹, 王小强^{1,2}, 孙平江², 徐安英¹

(1. 江苏科技大学, 江苏镇江 212003; 2. 中国农业科学院蚕业研究所, 江苏镇江 212018)

摘要:对家蚕幼虫斑纹突变基因(*q*)进行分子标记定位,有助于对性状的分子标记辅助选择和对该基因的定位克隆研究。利用家蚕雌性染色体在减数分裂过程中不发生交换的特点,采用幼虫斑纹为鹌斑(*q*)的家蚕品系 g03 和幼虫斑纹为素斑(*p*)的家蚕品系 C108,组配正反交群体 g03 ♀ × (g03 × C108) F₁ ♂ 和 (g03 × C108) F₁ ♀ × g03 ♂,分别记作 BC₁M 和 BC₁F。用已经构建的家蚕 SSR 分子标记连锁图谱中第 7 连锁群上的 12 对 SSR 标记引物在亲本间进行多态性筛选。BC₁F 群体中的普斑个体均表现出与 (g03 × C108) F₁ 相同的杂合型带型,而所有个体的带型与亲本 g03 一致,为纯合型。结果筛选出 S0703、S0707 和 S0710 共 3 个与 *q* 基因连锁的 SSR 标记。利用 BC₁M 群体构建了家蚕 *q* 基因及其连锁的 SSR 标记遗传连锁图,图距为 18.0 cM,3 个 SSR 标记及 *q* 基因的排列次序为 S0703 - *q* - S0707 - S0710, *q* 位于 4.5 cM 处,与 *q* 基因最近的标记为 S0703,遗传距离为 4.5 cM。

关键词:家蚕;鹌斑基因;SSR 标记;基因定位;遗传连锁图

中图分类号:S881.2⁺6 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)07-0015-04

家蚕(*Bombyx mori*)作为鳞翅目昆虫的模式生物,其幼虫斑纹种类繁多,且易于检测和识别,是遗传学研究的绝好材料。鉴于各种斑纹间又可以相互合成复合斑纹,田中(1928)将斑纹划分为基础斑纹(能单独表现者)和附加斑纹(不能单独表现者)。在家蚕中通常把普通斑(+^p, 2-0.0)作为幼虫斑纹正常型,表现为蚕体背面第 2 胸节有眼状纹,第 2 腹节有半月纹,第 5 腹节有星状纹。鹌斑基因(quaile, *q*, 7-0.0)是家蚕幼虫斑纹的突变基因之一,是第 7 染色体的标志基因,其性状表现为在普通斑表现的同时,蚕体背面覆盖破布状斑纹,半月纹和星状纹之后缘模糊,似有向后流动状,体表微红^[1]。

昆虫的体色(斑纹和线条颜色)主要由真皮细胞和上表皮中色素^[2](黑色素、蝶啶和眼黄素)的性质、分布及相互作用形成。一直以来,关于昆虫体色系统的研究都是发育生物学和进化生物学的研究热点。近年来,根据对果蝇(*Drosophi-*

la melanogaster)体色系统的研究结果建立了有关黑色素代谢的关键通路,通路中涉及的酶在一些家蚕体色突变体中都找到了相应的表型^[3-4]。Futahashi 等在 2008 年首先通过分析黑色素合成代谢通路的相关酶,发现家蚕 Yellow 蛋白的突变导致了赤蚁突变体(ch)的产生;而 *ebony* 基因的突变则导致了煤灰色突变体(so)的产生^[5]。2010 年, Dai 等^[6]和 Zhan 等^[7]通过 SSR 连锁定位结合候选基因筛查的方法,独立证实了与 *ebony* 基因发挥平行作用的家蚕乙酰转移酶 NAT 的突变造成了家蚕暗化型(mln)突变。这也是在昆虫中首次发现由于 NAT 的缺失造成异常体表型。

另外, Ito 等于 2009 年发现家蚕的另一种突变体(ow)是由于该突变体的家蚕 Varp 蛋白在编码区有一个 25 bp 的插入造成的^[8]; Meng 等发现了家蚕中墨喋呤还原酶的突变决定了家蚕黄色幼虫突变体(lemon)的产生^[9]。以上 2 种突变体对应的基因均不在经典的昆虫黑色素代谢途径中^[10]。因此,开展以家蚕体色系统为模型的研究,对于生物多样性与生物的选择进化研究是有力的补充。此外,开展家蚕斑纹突变的研究,对培育斑纹限性品种,提高蚕种生产的劳动效率,实现雌雄分养生产高品位的雄蚕茧丝具有重要的实用意义。

家蚕中基于形态学标记所构建的经典遗传图,包括家蚕各时期的体色、体形、斑纹、茧色、血色以及生理生化突变基因约 240 个^[11],是家蚕突变性状基因分子标记定位和功能研究、利用的基础。近年来,随着分子标记技术的快速发展,多

收稿日期:2013-03-12

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-22);

江苏省镇江市科技支撑计划(农业)项目(编号:NY2010026)。

作者简介:钱荷英(1971—),女,江苏溧阳人,硕士,副研究员,主要研究方向为家蚕遗传育种与分子生物学。Tel: (0511) 85616613; E-mail: qianheyin123@163.com。

通信作者:徐安英,女,研究员,硕士生导师,主要研究方向为家蚕物质资源与遗传育种。Tel: (0511) 85616575; E-mail: srixay@126.com。

[11] Chin H S, Sim J, Sim T S. Mutation of N304 to leucine in Streptomyces clavuligerus deacetoxycephalosporin C synthase creates an enzyme with increased penicillin analogue conversion[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287(2): 507-513.

[12] Ji J, Tian X, Fan K, et al. New strategy of site-directed mutagenesis identifies new sites to improve Streptomyces clavuligerus deacetoxycephalosporin C synthase activity toward penicillin G[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93(6): 2395-2401.

[13] Goo K S, Chua C S, Sim T S. Relevant double mutations in bioengineered Streptomyces clavuligerus deacetoxycephalosporin C synthase result in higher binding specificities which improve penicillin bioconversion[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(4): 1167-1175.

[14] Ji J, Fan K, Tian X, et al. Iterative combinatorial mutagenesis as an effective strategy for generation of deacetoxycephalosporin C synthase with improved activity toward penicillin G[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(21): 7809-7812.