

季俊杰, 张红梅. 定点突变改造棒状链霉菌青霉素扩环酶[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 53–54.

# 定点突变改造棒状链霉菌青霉素扩环酶

季俊杰<sup>1</sup>, 张红梅<sup>2</sup>

[1. 中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京 100083; 2. 中国科学院大学, 北京 100049]

**摘要:**利用定点突变技术对 ScDAOCS 进行改造, 得到 3 个突变体 Q166E、D28E、M73I, 生物活性检测和比活力数据表明 2 个突变体 D28E、M73I 的催化活性提高, 为 7-ADCA 的合成提供了技术支持。

**关键词:**定点突变; 青霉素扩环酶; 棒状链霉菌

**中图分类号:** Q933 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0053-02

头孢菌素作为  $\beta$ -内酰胺类抗生素类被广泛应用于治疗各种细菌感染。棒状链霉菌青霉素扩环酶 (*Streptomyces clavuligerus* deacetoxycephalosporin C synthase, ScDAOCS) 催化青霉素中的五元噻唑环扩环生成六元噻嗪环, 是实现生物法转化青霉素、生产多种半合成头孢菌素中间体 7-氨基-3-脱乙酰氧基头孢烷酸 (7-ADCA) 的关键酶<sup>[1]</sup>。由于野生型青霉素扩环酶的天然底物青霉素 N 不能大规模工业合成, 而对大量存在的青霉素 G 的转化活性又很低, 我们利用定点突变的方法对改酶进行改造, 以提高其对青霉素 G 的催化活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料菌株质粒

大肠杆菌 BL21(DE3) (*E. coli*), 大肠杆菌 ESS (*E. coli*), 棒状链霉菌 P1 (*S. clavuligerus*); pET-SC 载体。Penicillin G 购自 Sigma-Aldrich, 青霉素酶购自 Becton-Dickinson。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 定点突变** 以构建好的野生型 ScDAOCS 的表达载体 pET-SC 为模板, 设计均含有突变位点的、部分互补的突变引物进行 PCR。在 PCR 产物中加入 1  $\mu$ L Dpn I 酶, 37  $^{\circ}$ C 酶

切 1 h, 酶切产物转化 *E. coli* BL21(DE3), 对得到的克隆进行 DNA 序列测序, 筛选得到构建正确的突变体表达质粒。

**1.2.2 菌体的培养与青霉素扩环酶的诱导表达** 突变体建立以后, 提取质粒转化至 *E. coli* BL21 中, 将转化的克隆挑至 3 mL LB 液体培养基 (kanamycin 终浓度为 50  $\mu$ g/mL), 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 摇床培养, 培养至  $D_{600\text{nm}} = 1.0$  左右时按照 1% 接种量转接至 10 mL LB 液体培养基 (kanamycin 终浓度为 50  $\mu$ g/mL), 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 摇床培养至  $D_{600\text{nm}} = 0.6 \sim 0.8$  时加入 5  $\mu$ L 100 mg/mL 的 IPTG 诱导目的蛋白青霉素扩环酶的表达, 25  $^{\circ}$ C、220 r/min 摇床培养 3 h。

**1.2.3 蛋白的 SDS-PAGE 检测** 取适量蛋白溶液加入相当于其体积 1/5 的 6 $\times$ 蛋白上样 buffer, 沸水煮 5 min, 进行上样。浓缩过程电压为 8 V/cm, 当染料前沿进入分离胶后, 将电压调至 15 V/cm, 电泳时间约为 4 h。用 0.25% 考马斯亮蓝 R-250 冰醋酸甲醇溶液染色 1 h, 用 7% 冰醋酸甲醇溶液脱色过夜<sup>[2]</sup>。

**1.2.4 生物活性测定 (抑菌圈方法)** 取出 10  $\mu$ L 的各反应液点在孔内并在 37  $^{\circ}$ C 培养过夜 (平板正放)。青霉素酶被加在 LB 培养基中以消除没有转化的青霉素 G 底物<sup>[3]</sup>。

**1.2.5 HPLC 产物测定** HPLC Water 717 配以 Water 2487 双波长 (220、260 nm) 紫外监测器, 固定相为 10 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (用高浓度磷酸溶液调 pH 值至 3.0) 和乙腈。该方法的测量结果精密度良好, 是一种简洁、快速、有效的方法<sup>[4]</sup>。

首先分别用 100% 的乙腈和 30% 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  冲洗色谱柱, 再依次上样 (40  $\mu$ L), 观察记录吸收峰的面积, 即产物

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。

[11] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstap[J]. Evolution, 1985, 39: 783–791.

[12] Lian B, Zang J P, Hou W G, et al. PCR-based detection of the edible fungus *Boletus edulis* from rDNA ITS sequences[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2008, 11(3): 1–8.

[13] Rodrigues K F, Sieber T N. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1–5.8S–ITS2 sequences[J]. Mycological Research, 2004, 108(1): 45–52.

[14] Schoch C L, Seifert K A, Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi[J]. PNAS, 2012, 109(16): 6241–6246.

[15] 金伟, 陈文静, 姚斌, 等. 一株产纤维素酶的耐热烟曲霉筛选及产酶条件研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(6): 61–64.

[16] 潘虎, 董俊德, 卢向阳, 等. 高效纤维素降解菌群的构建及其生物多样性分析[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2012, 38(2): 139–145.

[17] 芦光新, 陈秀蓉, 杨成德, 等. 一株纤维素分解菌的鉴定及对两种草坪草凋落物分解活性的研究[J]. 草业学报, 2011, 20(6): 170–179.

[18] 唐蕊. 土壤中纤维素分解菌的分离与鉴定研究[J]. 北方园艺, 2011(13): 41–42.

[19] 张进良. 高温纤维素分解菌的分离和鉴定[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2011, 39(3): 141–143, 147.

G-7-ADCA(DAOG) 的浓度<sup>[5]</sup>。

从 SDS-PAGE 电泳可以检测到我们需要的目的蛋白(图 1),并且表达量很高,应用 BandScan 软件,根据灰度来确定此目的蛋白条带在所有条带中所占的比值,即为酶蛋白的相对含量,WT、D28E、M73I、Q166E 菌株蛋白表达中扩环酶所占总蛋白的比例依次为 14%、11.6%、10.2%、12.0%。

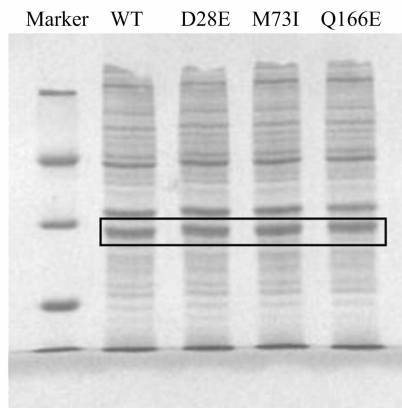


图1 野生型与突变体扩环酶的表达(SDS-PAGE)

## 2 青霉素 G 转化的生物学方法检测

在加有青霉素酶和新鲜的 *E. coli* ESS 菌液的半固体 LB 培养基上,用无菌滴管依次打 4 个孔(图 2),再分别加入 10  $\mu$ L 野生型 ScDAOCS,突变体 D28E、M73I、Q166E 的催化青霉素 G 的反应液以及阳性对照 DAOG<sup>[6]</sup>。

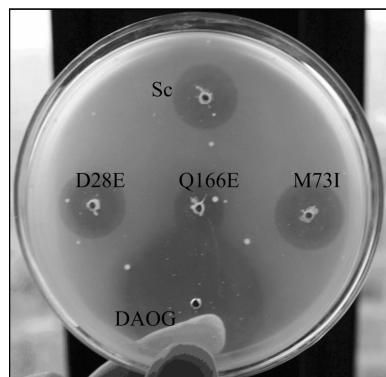


图2 定点突变体粗酶液的抑菌圈检测

从图 2 可以看出突变体 M73I 和 D28E 抑菌圈较野生型抑菌圈大,表明其催化活性较高,而突变体 Q166E 抑菌圈较野生型抑菌圈小,表明其催化活性较低。

## 3 青霉素 G 转化的 HPLC 方法检测

由于抑菌圈法只能提供定性的结果,为了准确描述突变体酶的活性,并与相关研究报道进行横向比较,我们又用 HPLC 法对野生型酶和各突变体转化青霉素 G 的活力进行了测试,结果(图 3)表明突变株 M73I 和 D28E 相对于野生型扩环酶活力都有所提高,与抑菌圈法结果一致。

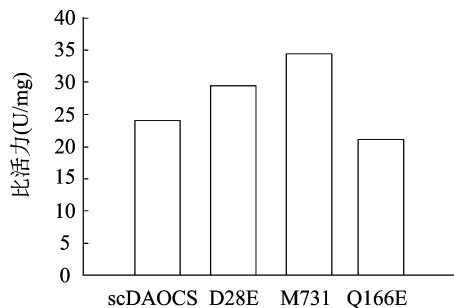


图3 突变株比活力测定(U=1 g DAOG/min)

## 4 讨论

M73 位于底物进出口附近,突变为疏水性氨基酸 I 增强了底物进出口附近的疏水作用(溶剂进不去而底物容易进去),可能对酶与底物的结合起到促进作用,所以酶活性会有所提高。而 D28E 是由极性的天冬氨酸突变成极性的谷氨酸,氨基酸性质没有发生变化,但是可能因为氨基酸本身侧链的大小对扩环酶的整体稳定性有一定的影响,较大的亲水性侧链可能会使扩环酶稳定性增加,进而使酶活性得到一定的提高。突变体 Q166E 使得扩环酶活性降低的原因解释:不在扩环酶的活性中心也不在底物进出口附近,位于蛋白表面的螺旋上面,Q166 由谷氨酰胺突变为谷氨酸,破坏了扩环酶与附近氨基酸形成的氢键,对酶的稳定性有一定的影响,但由于位于表面,所以影响力较小。

从我们的试验结果和其他研究人员所报道的数据来看,利用定点突变法对 ScDAOCS 所获得的突变体远远未达到实际应用要求,因此很有必要继续对相关位点或采用其他的突变方法进行 DAOCS 底物专一性的改造,更加高效地能催化青霉素 G 的扩环酶仍有待构建。

## 参考文献:

- [1] Demain A L, Elander R P. The beta-lactam antibiotics: past, present, and future[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1999, 75: 5-19.
- [2] Sambrook P, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual//Cold spring harbor[M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [3] Mildvan A S, Weber D J, Kuliopulos A. Quantitative interpretations of double mutations of enzymes[J]. Arch Biochem Biophys, 1992, 294: 327-340.
- [4] Lloyd M D, Lee H J, Harlos K, et al. Studies on the active site of deacetoxycephalosporin C synthase [J]. J Mol Biol, 1999, 287: 943-960.
- [5] 王明林, 林陟昕, 田威, 等. 高效液相色谱法测定棒状链霉菌发酵液中克拉维酸的含量[J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(5): 267-268.
- [6] 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: 2306-2312.