

重组枯草芽孢杆菌的构建及对甾体的 C_{1,2} 位脱氢

李 玉 路福平 王稳航 杜连祥

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院 天津 300222)

摘要: 本文将简单节杆菌 3-甾酮-1-脱氢酶基因克隆到分泌表达载体 pWB980 上, 并转入枯草芽孢杆菌 WB600 中, 得到重组芽孢杆菌菌株。重组芽孢杆菌表达出的目的蛋白的分子量为 55KDa, 分光光度法检测到胞内和胞外可溶性部分的酶活分别为 $110 \pm 0.5 \text{ mU}$ 和 $15 \pm 0.6 \text{ mU}$ 每毫克蛋白, 对甾体底物 4-AD 的转化率为 45.3%, 比出发菌简单节杆菌提高了将近 10 倍。

关键词: 3-甾酮-1-脱氢酶; 重组枯草芽孢杆菌; 甾体转化; 4-AD

中图分类号: Q789, Q815 **文献标识码:** A

Researches on construction of recombinant *Bacillus subtilis* and C_{1,2} dehydrogenation of steroids

LI Yu, LU Fu-ping, WANG Wen-hang, DU Lian-xiang

(Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology; college of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 30022, China)

ABSTRACT: 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase gene from *Arthrobacter Simplex* was cloned onto the expression vector pWB980 and then was transformed into *Bacillus subtilis* WB600. The molecular weight of the enzyme expressed by recombinant *Bacillus subtilis* was about 55KDa. The activity assayed by spectrophotometry of extracellular and intracellular soluble enzyme was $110 \pm 0.5 \text{ mU}$ and $15 \pm 0.6 \text{ mU}$ per milligram of protein respectively, and the transformation rate of androst-4-ene-3,17-dione was 45.3%. Compared with *Arthrobacter Simplex*, the transformation level of androst-4-ene-3,17-dione of *Bacillus subtilis* recombination cells was improved about ten-fold.

Key words: 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase; Recombinant *Bacillus subtilis*; Steroid transformation; 4-AD

前言

甾体的生物转化是指利用微生物细胞对甾体化合物某一特定部位(基团)的作用,使它转变为结构上相类似的另一种化合物。与化学方法相比具有生产周期短、产品收率高、反应专一性强、无有毒物质残留等特点,已在甾体激素类药物生产中被广泛采用^[1]。目前已发现微生物几乎对甾体各位点(包括甾体母核和侧链)都能进行催化反应,这些反应至今已经发现的主要有氧化、还原、水解、酯化、酰化、异构化、卤化、A 环开环、边链降解等,其中比较重要的生物转化反应主要有羟基化、脱氢、边链降解等,而在脱氢反应中尤以 C_{1,2} 脱氢最为重要^[2]。

微生物对甾体的转化不同于微生物的次级代谢,它是通过微生物体内的一种酶或酶系而发挥作用的。简单节杆菌(*Arthrobacter Simplex*)是常用的在甾体母核 A 环 C_{1,2} 位引入双键的微生物,如利用简单节杆菌使醋酸可的松 A 环 C_{1,2} 脱氢生产醋酸泼尼松,早已实现了工业化。简单节杆菌在甾体母核 A 环的 C_{1,2} 位脱氢反应中起关键作用的酶是 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶(KSDH),也称 C_{1,2} 位脱氢酶,它是一种单亚基酶,相对分子质量为 54.3KDa,等电点为 6.6,酶反应的最适温度和 pH 值分别是 40℃ 和 10.0^[3]。该酶既是胞内酶、诱导酶,还是一种膜蛋白,两个位于 193-214 和 379-401 位的疏水性氨基酸区段可能构成了它的跨膜区^[4]。目前膜蛋白的高效表达在研究膜蛋白的结构和功能方面,一直是一个需要克服的瓶颈问题^[5]。

本文利用枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)分泌表达载体 pWB980^[6],实现简单节杆菌 KSDH 在 *B. subtilis* 中的高效表达,提高 KSDH 的酶活力,并利用 *B. subtilis* 对 4-AD 进行转化,为工业化生产 ADD 开辟新的途径。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

简单节杆菌(*Arthrobacter Simplex*)、大肠杆菌 JM109 和质粒 pUC19 均为本实验室保存。*B. subtilis* 质粒 pWB980 和菌株 WB600 为加拿大 Calgary 大学 Sui-Lam Wong 博士惠赠。

1.2 培养基

大肠杆菌和 *B. subtilis* 培养用 LB 培养基,简单节杆菌液体培养基组成为(W/V):1%葡萄糖,1%玉米浆,0.5%蛋白胨和 0.25%的 KH_2PO_4 , pH 值 7.0。

1.3 酶与主要试剂

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、DNA 分子量标准和 DNA 片段的琼脂糖凝胶回收试剂盒等均购自 Takara 公司,氨苄青霉素、卡那霉素、T4 DNA 连接酶、蛋白质分子量标准等均购自上海生物工程有限公司。

1.4 PCR 扩增及重组质粒构建

参照 Genbank(序列号: D37969)上报道的简单节杆菌 C_{1,2} 位脱氢酶基因(ksdD)序列设计引物,上游引物 P1: 5'-CC-CAAGCTTTTGGCCATGGACTGGCAGAGGAGTA-3'下划线部分为加入的 Hind III 酶切位点),下游引物 P2: 5'-CGCGGATCCTCATCGCGCGTCTCGG-3' (下划线部分为加入的 BamH I 酶切位点)。基因组 DNA 提取、质粒 DNA 制备等方法及操作均见文献^[7]。以提取的简单节杆菌染色体 DNA(10ng)为模板,63℃退火,扩增目的基因。将 PCR 产物以及提取的质粒 pUC19,分别用 Hind III 和 BamH I 进行双酶切,酶切产物经纯化回收后,用 T4 DNA 连接酶于 16℃连接过夜,利用电转化法转入大肠杆菌 JM109 中,通过氨苄青霉素抗性平板筛选转化子,

作者简介:李玉,(1977-),女,在读博士,研究方向:微生物制药

E-mail: liyu7702@yahoo.com.cn

通讯作者:路福平, Tel: 022-60272061;

Fax: 022-60273079; E-mail: lfip@tust.edu.cn

(收稿日期: 2006-06-11 接受日期: 2006-07-16)

然后对转化子质粒分别用 PCR 和双酶切法进行鉴定,并挑取阳性转化子进行测序。再将阳性转化子的质粒用 HindⅢ 和 BamHⅠ 进行双酶切,回收目的基因,与 pWB980 质粒 16℃ 连接过夜,利用化学法^[8]转化 *B. subtilis* WB600,利用卡那霉素抗性平板筛选转化子。

1.5 重组枯草杆菌 KSDH 的表达

接种一环重组枯草杆菌于 20 mL 含 10(g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,于 37℃ 180r/min 振荡培养过夜。按 2% 的接种量接种过夜培养物于 20 mL 含 10(g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养 24h 后加入 0.1% (W/V) 的 4-AD 和 0.1% (v/v) Tween-80,继续培养 48h。取 1mL 菌液于 12000r/min 离心 5min,收集上清液和菌体。上清液先利用低温离心浓缩系统进行浓缩,菌体先加溶菌酶进行破壁,然后分别将它们与上样缓冲液混合,沸水浴 5min-10min,离心取上清进行 SDS-PAGE(10%分离胶,5%浓缩胶)电泳,检测蛋白表达情况。经过浓缩的上清液可直接进行酶活检测,菌体细胞需用 PH 值 7.4 的磷酸钾缓冲液洗涤后,冰浴超声破碎(400W,超声 10S,间隔 60s,超声 20 次),12000r/min 离心,取上清进行酶活检测。

1.6 酶活检测

酶活检测采用分光光度法^[9]。KSDH 的酶活检测是通过测定 570nm 处的光密度值,该值反映了由 NBT 形成产物 diformazan 的情况。1ml 反应混合物由 0.85mol/L Tris-Cl(pH9.0)、150μmol/L NBT(硝基四氮唑蓝)、550μmol/L PMS(吩嗪硫酸甲酯)、200μmol/L 4-AD(溶于 2% 甲醇)和适量的细胞浸提液组成。酶活用 mU/mg 蛋白来表示,一个酶活单位(u)定义为一分钟内产生 1μmol diformazan($\epsilon_{570} = 13\text{cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$)所需要的酶量。

1.7 菌体转化分析

接种简单节杆菌于液体培养基中,接种重组 *B. subtilis* 于含 10(g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37℃ 培养过夜,按 5% 接种量转接于 50mL 新鲜培养基中培养 24h,按 0.1% (W/V) 的投料量加入底物 4-AD 和 0.1% (v/v) Tween-80,继续培养 48h,每隔 8 取样进行分析。用甲醇从发酵液中提取出菌体化合物,并稀释一定倍数后 HPLC 法^[9]分析产物生成情况。采用反向 C18 柱进行 HPLC 分析,70% 的甲醇作为流动相,检测波长 254 nm,样品进样量为 10(L,流速为 0.8mL/min,ADD 和 4-AD 的保留时间分别为 7.0min 和 10.5min,利用内标法(以黄体酮作为内标物)计算底物 4-AD 的转化率。

2 结果和分析

2.1 简单节杆菌基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

以提取的染色体 DNA 为模板,扩增出的目的条带如图 1 所示。从图中可知,目的片段出现在 1.5kb 左右,大小与报道的 1548bp 相符。

2.2 克隆载体的构建及转化

将 PCR 扩增得到的目的基因进行纯化,用 HindⅢ 和 BamHⅠ 双酶切,酶切产物再经纯化后,琼脂糖凝胶电泳检测。同时也将质粒 pUC19 用 HindⅢ 和 BamHⅠ 进行双酶切,纯化,最后采用 T₄ DNA 连接酶 16℃ 过夜连接,构建重组质粒 pUC-ksdD。利用电转化法将该重组质粒转入大肠杆菌 JM109 中,双酶切和 PCR 验证结果表明 ksdD 基因已成功克隆到载体 pUC19 上。

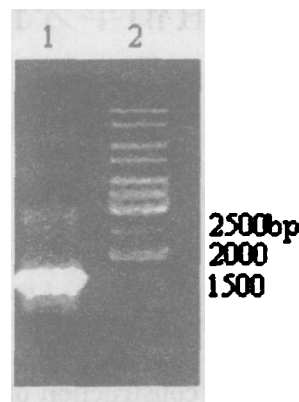


图 1 PCR 扩增结果

(Fig1: The result of PCR product)

1: PCR 产物(PCR product) 2: 1kb marker (1kb DNA ladder)

2.3 ksdD 基因的序列分析

对重组质粒 pUC-ksdD 上的目的片段 ksdD 进行核苷酸序列测定(上海英俊生物工程公司),所得到的基因全长为 1548bp,大小与 Genebank 中所报道的一致,只是在 1115bp 的位置发生了碱基置换,T→C,相应的氨基酸也发生了改变,Leu→Pro,但该氨基酸并不位于酶的活性中心,从理论上讲并不影响酶的活性。KSDH 的活性中心是位于 219 位至 245 位的 27 个氨基酸残基: RRAIRARRGVLLAACGFEANDEL RQKY^[4]。

2.4 枯草杆菌表达载体的构建及转化

分别用 HindⅢ 和 BamHⅠ 双酶切重组载体 pUC-ksdD 和质粒 pWB980,连接构建重组表达载体 pWB-ksdD(构建示意图如图 2 所示),并将该重组质粒转入 *B. subtilis* WB600。

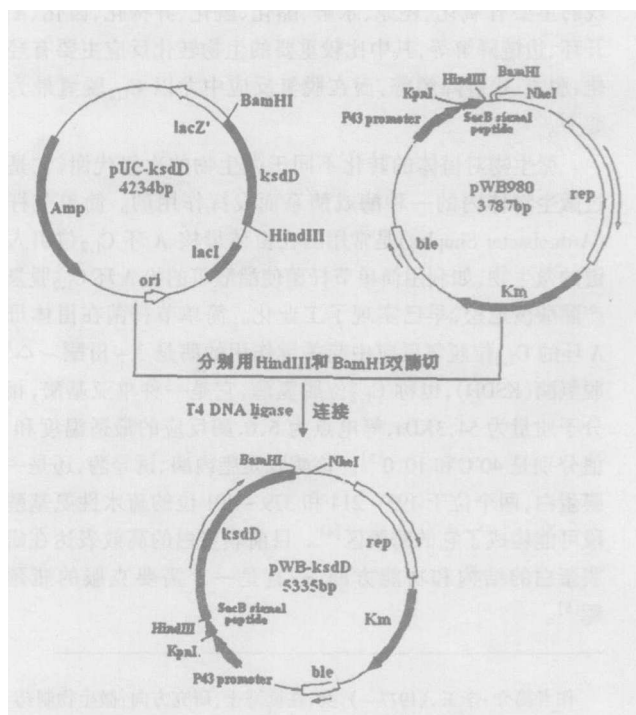


图 2 重组质粒 pWB-ksdD 的构建图

(Fig2. Plasmid pWB-ksdD constructed for the expression of KSDH in *B. subtilis*.)

2.5 KSDH 在枯草杆菌中的表达

利用卡那抗性筛选阳性转化子,并将进一步通过酶切和 PCR 验证完全正确的转化子接种培养,利用 SDS-PAGE 分析全细胞和发酵液中目的蛋白分布情况。结果如图 4 所示。从图中可以看出,目的蛋白主要位于胞内,胞外部分含量很少。

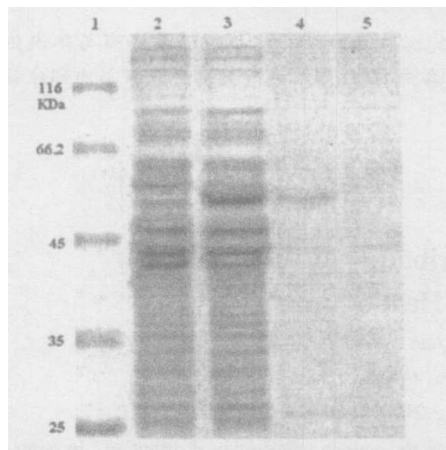


图 3 SDS-PAGE 分析 KSDH 的表达情况

(Fig 3. SDS-PAGE analysis of KSDH expressed in *B. subtilis*).

1: 分子量标准(molecular weight markers); 2: 含空质粒的 *B. subtilis* 对照菌的全细胞蛋白(control proteins in *B. subtilis* cells); 3: 带重组质粒 pWB-ksdD *B. subtilis* 全细胞蛋白(Total cell proteins in *B. subtilis* WB600 harboring pWB-ksdD); 4: 重组 *B. subtilis* 发酵液上清(culture supernatant of *B. subtilis* WB600 harboring pWB-ksdD); 5: 对照菌发酵液上清(control culture supernatant of *B. subtilis*)

2.6 KSDH 酶活检测和菌体转化

利用前面提到的方法检测发酵液上清和破碎后的细胞浸出物中的 KSDH 酶活,结果分别为 $15 \pm 0.6 \text{ mU}$ 和 $110 \pm 0.5 \text{ mU}$ 每毫克蛋白,这一结果也表明表达出的目的蛋白主要位于胞内,与 SDS-PAGE 的分析结果一致。利用重组 *B. subtilis* 对 4-AD 进行转化的结果如图 4 所示,当投入底物 4-AD 继续培养到 40h 左右时 4-AD 的转化率达到最高,为 45.3%,即发酵液中生成的 ADD 的浓度达到了 $453 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而此时简单节杆菌对 4-AD 的转化率只有 5.2%。

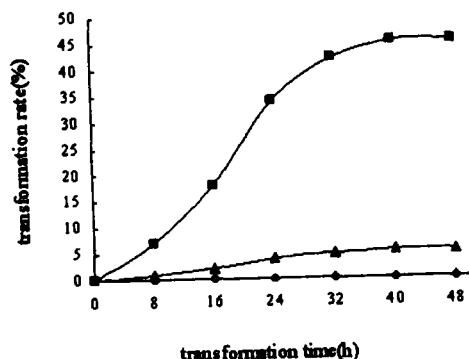


图 4 不同菌株对 4-AD 的转化结果

(Fig 4 The result of transformation for 4-AD)

▲代表简单节杆菌 (*Arthrobacter simplex*, ▲), ◆代表 *B. subtilis* 对照 (*Bacillus subtilis* control strain, ◆), ■代表重组 *B. subtilis* (*B. subtilis* WB600 harboring pWB-ksdD, ■)

3 讨论

由于简单节杆菌 3-甾酮-1-脱氢酶(KSDH)是一种跨膜蛋白,直接从菌体中分离纯化出来非常困难,而利用大肠杆菌异源表达往往导致其在膜内聚集而形成包涵体,影响酶的活性。Patrich^[10]等实现了睾丸酮假单胞菌(*Pseudomonas testosteroni*)3-甾酮-1-脱氢酶在大肠杆菌中的表达,尽管没有形成包涵体,但是通过制备原生质体、破碎细胞和超高速离心(100000g)等方法,对目的产物的定位结果表明有 82.7% 的活性成分存在于内膜部分,12.3% 存在于外膜部分,只有 3.3% 的部分是可溶的。本文利用 *B. subtilis* 分泌表达载体表达出的 KSDH 尽管大部分位于胞内,而没有完全分泌到发酵液中,但是其在胞内是以可溶性形式存在的,与膜结合的部分很少,酶活力比出发菌株提高了将近 30 倍,重组细胞对 4-AD 的转化率也提高了近 10 倍。与 Choi 等人^[11]报道的其在链霉菌中的表达情况相比,酶活力的提高尽管有一定差距,但是从生产实际来考虑,链霉菌对培养条件要求较高,生长周期较长,*B. subtilis* 则克服了这些缺点,因此更适于工业化生产。

另外,微生物对甾体化合物的生物转化不仅与酶本身有关,还与细胞结构,底物的溶解性,底物的立体构象,酶与底物的结合情况,以及转化条件等多种因素有关,因此要提高微生物菌株对底物的转化率,除通过基因工程手段提高酶的活力外,还应在其它方面进行进一步的摸索和优化,并确定最优的产物后提取和纯化步骤,以期得到产物的最大产出量,为大规模工业化生产奠定基础。

4 结论

本文利用枯草芽孢杆菌表达系统,实现了简单节杆菌 3-甾酮-1-脱氢酶的高效可溶性表达,表达出的目的蛋白的分子量为 55KDa,主要位于细胞内,利用分光光度法检测到的胞内和发酵液中的酶活分别为 $110 \pm 0.5 \text{ mU}$ 和 $15 \pm 0.6 \text{ mU}$ 每毫克蛋白,总的酶活力较出发菌株提高了近 30 倍,对 4-AD 的转化率提高了近 10 倍,为工业化生产 ADD 开辟了一条新的途径。

参考文献

- [1] 李荣贵.有机溶剂/水两液相体系中菌体微生物 C_{12} 脱氢研究[D]. 浙江工业大学硕士学位论文,2003:2-3
- [2] 郭勇.生物制药技术[M].北京:轻工业出版社,2000:225-245
- [3] Choi, K. P., Molnar, I. J., Yamashita M, et al. Purification and characterization of the 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase of *Arthrobacter simplex* produced in *Streptomyces lividans*[J]. *Biochem (Tokyo)*. 1995 May;117(5):1043-9
- [4] Istvan Molnar, Kwang-Pil Choi, Mitsuo Yamashita, et al. Molecular cloning, expression in *Streptomyces lividans*, and analysis of a gene cluster from *Arthrobacter simplex* encoding 3-Ketosteroid- Δ^1 -Dehydrogenase, 3-Ketosteroid- Δ^5 -isomerase and a hypothetical regulatory protein[J]. *Mol. Microbiol.* 1995,15(5):895-905
- [5] David E. Drew, Gunnar von Heijne, Par Nordlund, et al. Green fluorescent protein as an indicator to monitor membrane protein overexpression in *Escherichia coli*[J]. *FEBS Letters*. 2001,507:220-224

(下转第 23 页)

VEGF-D对VEGFR-3的激活还可使毛细淋巴管内皮间连接从复杂型向简单型转变,使内皮细胞容易被拉开,形成开放性通道,促使瘤细胞进入淋巴管产生转移^[14]。

本试验显示在90例乳腺癌组织中VEGF-D表达与淋巴道转移显著相关,符合Veikkola对动物模型报道。根据VEGF-D与淋巴道转移的密切关系可推断VEGF-D是影响乳癌预后的重要因子。目前乳癌前哨淋巴结活检术已广泛应用于临床,如能结合检测VEGF-D确定淋巴结是否转移,则可对保乳术提供更有力的依据。具体什么机制促使VEGF-D表达目前尚不清楚,本试验显示VEGF-D与患者的年龄、肿瘤大小、病理分型、临床分级无关,表明VEGF-D的表达并不能说明乳癌的恶性程度;VEGF-D与ER、PR无关,提示VEGF-D的表达可能不受雌孕激素调控;针对目前国内乳癌术后常规检测的另一指标CerbB-2,VEGF-D表达与其呈正相关,说明VEGF-D的表达可能受控于CerbB-2基因。在癌细胞浸润边缘及淋巴管内皮上VEGF-D表达相对增加,显示VEGF-D分泌可能遵循Achen的旁分泌模式,即淋巴管内皮上的VEGF-D是肿瘤细胞分泌游走而至,并非内皮细胞本身表达。VEGFR-3与淋巴道转移显著相关,提示VEGF-C、VEGF-D/VEGFR-3体系在乳腺癌淋巴道转移中扮演着重要角色,对此通路进行阻断,可以抑制淋巴管生成和瘤细胞淋巴道转移。

抗淋巴管生成治疗,不会诱导肿瘤细胞的耐药性,对正常组织很少作用,因此可在反复治疗周期中使用。Makinen^[16]对抗VEGF-D/VEGFR-3通路作过前瞻性研究,但目前还没有抗VEGF-D或VEGFR-3的药物问世,在未来,我们要深入研究VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3等促淋巴管生成因子的具体生发机制,为抗淋巴管生成治疗打好理论基础。

参考文献

- [1] 左文述,徐忠法,刘奇主编.乳腺癌学[M].第1版.山东:山东科学技术出版社,1996:1
- [2] Partanen TA, Paavonen K. Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans [J]. Microsc Res Tech, 2001,55(2):108-21
- [3] Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics [J]. Nat Med, 2001,7(2):186-191
- [4] Veikkola T, Jussila L, Makinen T, et al. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice [J]. The EMBO Journal, 2001,20(6):1223-1231
- [5] Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, Licence D, et al. Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma [J]. Br J Cancer, 2003,88(22):237-244
- [6] Funaki H, Wishimura G, Harada S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-D is associated with lymph node metastasis in human colorectal carcinoma [J]. Oncology, 2003,64(4):416-422
- [7] NiKi T, Iba S, Tokunou M. Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2000,6:2431-2439
- [8] Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and VEGF-D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma [J]. Japanese Journal of Clinical Oncology, 2003,33:21-27
- [9] Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Prognostic Significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up [J]. Clin Cancer Res, 2003,9(2):716-721
- [10] 许良中主编.乳腺病理学[M].第1版.上海:上海医科大学出版社,1999:359
- [11] Achen MG, Jeltsch M, KuK E, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (FLK1) and VEGF receptor 3 (FLT4) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998,95(2):548-553
- [12] Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R, et al. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the Platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 1996,93:11675-11680
- [13] Fournier E, Blaikie P, Rosnet O, et al. Role of tyrosine residues and protein interaction domains of SHC adaptor in VEGF receptor 3 signaling [J]. Oncogene, 1999,18(2):507-14
- [14] Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995,92(8):3566-3570
- [15] Achen MG, Williams RA, Baldwin ME, et al. The angiogenic and lymphangiogenic factor vascular endothelial growth factor-D exhibits a paracrine mode of action in cancer [J]. Growth Factors, 2002,20(2):99-107
- [16] Makinen T, Jussila L, Veikkola T, et al. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3 [J]. Nature Medicine, 2001,7(2):199-205
- [6] Sau-Ching Wu, Sui-Lam Wong. Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in Bacillus subtilis [J]. Journal of Biotechnology, 1999,72:185-195
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual [M]. Cold Spring Harbor, New York. 1989
- [8] Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strain of B. subtilis by deoxyribonucleate [C]. Proceeding of National Academy of Science USA. 1958,44,1072
- [9] Robert van der Geize, Cerdia I. Hessels, Lubbert Dijkhuizen. Molecular and functional characterization of the kstD2 gene of Rhodococcus erythropolis SQ1 encoding a second 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase isoenzyme [J]. Microbiology. 2002,148:3285-3292
- [10] Patrick Plesiat, Michel Grandguillot, Shigeaki Harayama, et al. Cloning, sequencing, and expression of Pseudomonas testosteroni gene encoding 3-oxosteroid Δ^1 -Dehydrogenase [J]. Journal of Bacteriology. 1991,9:7219-7227
- [11] Choi K. P., Molnir I., Y. Murooka. Secretory overproduction of Arthrobacter simplex 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase by Streptomyces lividans with a multi-copy shuttle vector [J]. Appl Microbiol-Biotechnol. 1995,43:1044-1049

(上接第17页)