

毛白杨环氧水解酶的异源表达及其在催化拆分手性环氧化物中的应用

赵晶¹, 鞠鑫¹, 潘江¹, 李春秀¹, 王敏杰², 许建和^{1,*}

¹华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

²中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091

摘要: 对已公布的全基因组进行检索发现, 杨树 (*Populus tomentosa*) 至少含有 24 个预测为可溶性环氧水解酶的基因. 从中选取了 7 个可能的环氧水解酶基因进行克隆, 通过扩增得到其中 5 个毛白杨 (*Populus tomentosa* Carr) 环氧水解酶基因. 序列分析显示, 它们与已克隆的巨大芽胞杆菌环氧水解酶的同源性仅为 24%~26%. 对该系列基因进行了在 *E. coli* 中的异源表达, 并将得到的 5 个环氧水解酶 (PTEH 1~5) 用于缩水甘油苯基醚和对硝基苯乙烯氧化物的酶促水解反应. 结果发现, 其中 3 个重组酶具有显著的环氧水解酶活性. 进一步研究表明, PTEH1 和 PTEH2 对于缩水甘油苯基醚显示了一定的反常规的 (*R*)-选择性, 而 PTEH5 则优先水解 (*S*)-构型的缩水甘油苯基醚. 因此, 毛白杨中环氧水解酶表现出多样性.

关键词: 毛白杨; 环氧水解酶; 异源表达; 缩水甘油苯基醚; 对硝基苯乙烯氧化物; 催化拆分

中图分类号: O643 文献标识码: A

收稿日期: 2011-08-12. 接受日期: 2011-09-26.

*通讯联系人. 电话: (021)64252498; 传真: (021)64250840; 电子信箱: jianhexu@ecust.edu.cn

基金来源: 国家自然科学基金 (20902023); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划, 2009CB724706).

Heterogeneous Expression of Epoxide Hydrolase Genes from *Populus Tomentosa* and Application of the Enzyme for Biocatalytic Resolution of Chiral Epoxides

ZHAO Jing¹, JU Xin¹, PAN Jiang¹, LI Chunxiu¹, WANG Minjie², XU Jianhe^{1,*}

¹State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

²Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China

Abstract: The genome of *Populus tomentosa* was the first to be reported in trees. Based on the mining results of the database, a gene pool encoding 24 potential soluble epoxide hydrolases was proposed. In which, 7 genes were selected in this study, and 5 genes were successfully cloned and sequenced. Sequence analysis showed that the cloned epoxide hydrolases had merely 24%–26% similarity to the newly cloned *Bacillus megaterium* epoxide hydrolase. Then the 5 genes were heterogeneously expressed in *E. coli* and used for hydrolytic reactions of two model substrates, phenyl glycidyl ether and *p*-nitrostyrene oxide. Epoxide hydrolysis activity was detected in 3 recombinant epoxide hydrolases, in which PTEH1 and PTEH2 showed (*R*)-selectivity in hydrolysis of phenyl glycidyl ether, while PTEH5 preferred to hydrolyze (*S*)-phenyl glycidyl ether. This work proves the diversity of epoxide hydrolases from *P. tomentosa*.

Key words: *Populus tomentosa*; epoxide hydrolase; heterogeneous expression; phenyl glycidyl ether; *p*-nitrostyrene oxide; catalytic resolution

Received 12 August 2011. Accepted 26 September 2011.

*Corresponding author. Tel: +86-21-64252498; Fax: +86-21-64250840; E-mail: jianhexu@ecust.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (20902023) and the National Basic Research Program of China (973 Program, 2009CB724706).

手性环氧化物是有机合成中重要的手性合成砌块, 其环氧基团中含有一个或两个手性碳原子, 通过

选择性开环反应可以合成诸多具有生物活性的重要化合物,如 β -肾上腺素阻断剂、昆虫信息素、白三烯等,在医药、农药、香料和精细化学品工业中具有广阔的应用前景^[1~3]。因此,合成高附加值的光学纯手性环氧化物,例如缩水甘油苯基醚(PGE)和对硝基苯乙烯氧化物(pNSO)的单一对映体,已成为催化合成领域的研究热点之一。

环氧水解酶(epoxide hydrolase, EH, EC 3.3.2.3)能够立体选择性催化外消旋环氧化物的水解,得到手性环氧化物和相应的邻位二醇。在生物体内,环氧化物是较为活泼的亲电试剂,一些多环芳烃类环氧化物在生物体内可以和DNA等带有亲核官能团的生物分子反应,具有致癌性。EHs可以降解这些具有潜在毒性的代谢中间体,因此广泛存在于哺乳动物、植物、昆虫和微生物等生物体内^[4~6]。研究表明,巨大芽孢杆菌环氧水解酶广泛应用于PGE的拆分中^[7~9]。

虽然已经陆续发现拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水芹(*Oenanthe javanica*)^[10]、烟草(*Nicotiana tabacum*)、甘蓝(*Brassica napus*)、大豆(*Glycine max*)、土豆(*Solanum tuberosum*)、绿豆(*Vigna radiata*)^[11, 12]等植物中存在EHs,并成功克隆表达了来源于拟南芥、甘蓝、大豆、烟叶和土豆等少数几种植物的EHs基因,但是其多用于生理功能和生化特性研究,很少用于催化有机合成反应。而对来源于木科植物的环氧水解酶的研究目前还未见报道。

杨树(*P. tomentosa*)是木科类植物中第一个完成全基因组测序的树木。根据数据库预测,毛白杨基因组中至少含有24个预测为可溶性环氧水解酶的基因,然而迄今为止并未见有关杨树环氧水解酶的报道。本文从毛白杨中克隆了多个EHs基因,并成功地在*E. coli*大肠杆菌中进行了异源表达,初步研究了这些毛白杨EHs催化两种常见模型环氧底物(PGE和pNSO)的水解反应,为后续深入研究奠定了一定基础。

1 实验部分

1.1 培养基

LB液体培养基:蛋白胨(Oxoid)10 g/L,酵母提取物(Oxoid)5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0, 121 °C

高压蒸汽灭菌 20 min. 抗生素使用氨苄青霉素(Amp, 100 μ g/ml)或硫酸卡那霉素(Kan, 50 μ g/ml)(上海生物工程公司)。

1.2 毛白杨环氧水解酶基因的克隆

1.2.1 基因的选取

在杨树全基因组数据库(<http://www.jgi.doe.gov/>)中,以关键词“epoxide hydrolase”搜索,得到1295个相关结果。其中有24个预测为可溶性环氧水解酶(soluble EH)。我们选取7个有全长序列、且和植物来源的土豆和绿豆EH的氨基酸序列相似性都较高的基因进行了克隆。

1.2.2 引物设计

根据选取的7个杨树EH基因,设计的引物如表1所列。引物序列中的下划线部分分别为限制性内切酶BamHI和SalI的酶切位点。引物由上海生物工程公司合成。

表 1 克隆所用引物
Table 1 Primers used for cloning

Gene	Sequence
<i>pteh1F</i>	GGA GGA TCC ATG GCC TCC TCC ATA GAA CAC AGA
<i>pteh1R</i>	GAA GTC GAC CTA GAG CTT TTG AAA GA AGTC GTA
<i>pteh2F</i>	CCT GGA TCC ATG GAG AAG ATA GAG CAC ACA ACT
<i>pteh2R</i>	CCA GTC GAC CTA ATT AAA CTT CTT GAT GAA ATC
<i>pteh3F</i>	CGA GGA TCC ATG GCC TCC TCC ATA GAA CAC AGA
<i>pteh3R</i>	CGT GTC GAC CGC TTG CTT GGT TTC CTT CCT GTT
<i>pteh4F</i>	CAC GGA TCC ATG GAC TCC ATA GAA CAC AGA ACC
<i>pteh4R</i>	CTC GTC GAC CTA GAA CTT TTG AAA GAA ATC ATA
<i>pteh5F</i>	GTT GGA TCC ATG GAG GGG ATA AGC CAT AGA ATG
<i>pteh5R</i>	GCT GTC GAC CAG TAT TTG CTA ATG TAG TCA TAA
<i>pteh6F</i>	CAC GGA TCC ATG GAT TTG GGA GAG GTT AAT CAC
<i>pteh6R</i>	GGC GTC GAC CTA ATC CAC AGA AAG CTT TTG AAG
<i>pteh7F</i>	CCT GGA TCC ATG GAT AAG ATA GAG CAC CAA ACT
<i>pteh7R</i>	GGT GTC GAC TTA AAA CTT CTT GAT GAA ATC GTA

1.2.3 PCR 扩增和表达载体的构建

PCR反应体系如下:2 \times Taq PCR Master Mix(上海莱枫生物)10 μ l;毛白杨cDNA(中国林业科学研究院林业研究所王敏杰助理研究员赠予)1 μ l;上下游引物各0.5 μ l; dd H₂O 8 μ l。PCR反应仪为MJ Mini(BioRad)。PCR反应条件:95 °C 3 min; 94 °C 30 s, 68 °C 1.5 min, 进行35个循环; 72 °C 7 min。利用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(北京艾德莱生物)回收PCR产物,取其4.5 μ l与0.5 μ l的pMD18-T载体(TaKaRa)进行连接。将重组质粒转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,得到的阳性克隆由上海

生物工程公司进行测序,以验证序列是否正确.然后用限制性内切酶 *Bam*H I和 *Sal* I (TaKaRa) 分别对连接有目的基因的 pMD18-T 重组质粒和 pET28a(+) 质粒进行双酶切,构建表达质粒 pET28a-*pteh*. 将验证后得到的阳性重组质粒 pET28a-*pteh* 转入到表达宿主大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中,涂布到含有 Kan 的平板上,37 °C 恒温倒置培养 12 h 后,挑取单菌落接入到含 3 ml Kan 的 LB 液体培养基中培养,12 h 后加入甘油(终浓度 25%)置于 -20 °C 保藏备用.

1.3 目的蛋白的诱导表达

从保藏的甘油管中取 5 μ l 菌液,加入到 3 ml 含 Kan 的 LB 液体培养基中,于 37 °C,180 r/min 培养过夜.取 1 ml 菌液接种到 100 ml 含有 Kan 的 LB 液体培养基中,于 37 °C,180 r/min 摇床培养至 OD₆₀₀ 达到 0.6 左右时(约需 2 h),加入 IPTG (上海生物工程公司)至终浓度为 0.2~0.4 mmol/L,然后于 25 或 15 °C 诱导培养 12~20 h. 培养结束后以 9300 \times g 离心 5 min,得到的细胞用生理盐水清洗 2 次,然后将菌体重新悬浮于磷酸钾缓冲液中(100 mmol/L, pH 7.0),利用超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物, JY92-II 型)进行超声波破碎(功率 400 W, 每个循环超声 4 s, 间隙 6 s, 共循环 99 次),得到的酶液用于 SDS-PAGE 电泳分析或环氧化物酶促水解研究.

1.4 环氧化物的酶促水解

取一定量的破碎上清酶液(见表 3)加到磷酸钾缓冲液(100 mmol/L, pH 7.0)中(反应体系总体积为 0.5 ml),在 30 °C 保温 5 min 后,加入一定体积的环氧底物 PGE (购于 TCI 公司)或 *p*NSO (本课题组合成)储备液(200 mmol/L, 溶于二甲基亚砜中),底物

终浓度见表 3,反应在 Eppendorf 混匀仪中进行(30 °C, 1100 r/min). 当底物转化率达 60% 左右时停止反应,加入 0.5 ml 的乙酸乙酯进行萃取,离心(13800 \times g, 3 min)后,上层有机相用无水硫酸镁干燥,经 0.22 μ m 滤膜过滤后进行手性 HPLC 分析,计算剩余底物的对映体过量值(ee 值)、转化率 *c* 和对映选择率(*E* 值). 使用高效液相色谱仪(Shimadzu 公司, LC-10AT)对 PGE 和 *p*NSO 进行手性分析,流动相为正己烷/异丙醇(90:10, *V/V*),流速为 1.0 ml/min,检测器波长 254 nm,柱温为室温;使用 Chiralcel OD-H 柱(Dailcel, ϕ 0.46 cm \times 25 cm)分析 PGE, 出峰时间为:(*R*)-PGE 8.9 min, (*S*)-PGE 14.7 min; 使用 Chiralcel AD-H 柱(Dailcel, ϕ 0.46 cm \times 25 cm)分析 *p*NSO, 出峰时间为:(*R*)-*p*NSO 11.4 min, (*S*)-*p*NSO 12.5 min. 转化率根据转化的环氧化物浓度/总的环氧化物浓度计算;转化的环氧化物浓度由总的环氧化物浓度减去剩余的环氧化物浓度计算. 环氧化物的浓度根据标准曲线求取.

2 结果与讨论

2.1 目的基因克隆

从预测的杨树环氧水解酶基因中选取 7 个基因序列设计引物,以毛白杨 cDNA 为模板,其 PCR 结果如表 2 所列. 这 7 个基因的碱基序列长度在 900~1008 bp 间,在目前常见 EHs 的 DNA 序列大小范围内. 由这些基因 DNA 序列推测的氨基酸序列与绿豆 EH 和土豆 EH 的同源性在 41%~68% 间. 经过 PCR 扩增,成功克隆出其中 5 个基因.

将双酶切得到的目的基因 DNA 片段和 pET28a(+) 表达载体连接,转化到大肠杆菌 DH5 α 中,培养后进行菌落 PCR 鉴定,结果示于图 1. 可以看

表 2 选取的毛白杨环氧水解酶基因

Table 2 Selected epoxide hydrolase genes from *Populus tomentosa* Carr.

Gene	Accession number ^a	Length (bp)	Molecular mass (kDa)	PCR result	Identity (%)
<i>pteh1</i>	EEF00542	972	36.48	ok	95
<i>pteh2</i>	EEE98648	954	36.29	ok	98
<i>pteh3</i>	EEF00539	1008	37.71	failure	n.a.
<i>pteh4</i>	eugene3.00100120 ^b	900	33.79	failure	n.a.
<i>pteh5</i>	EEE94903	954	35.78	ok	95
<i>pteh6</i>	EEE91276	966	36.55	ok	95
<i>pteh7</i>	EEE81997	951	36.02	ok	96

^aEuropean Nucleotide Archive (ENA) database: <http://www.ebi.ac.uk/ena/> ^bDOE Joint Genome Institute: <http://www.jgi.doe.gov/>

n.a.—not available.

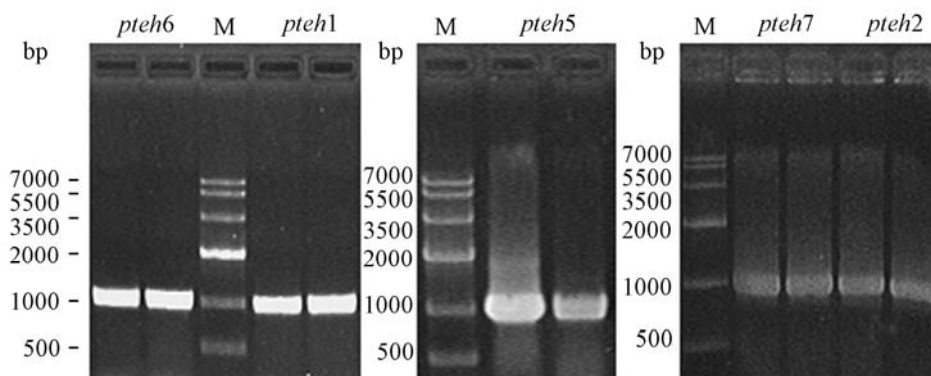


图 1 重组表达质粒的菌落 PCR 鉴定

Fig. 1. Strain PCR identification of the positive recombinant pET28a vectors.

出, 菌落 PCR 得到大小在 1000 bp 左右的条带, 说明目的基因已经成功连接到表达载体 pET28a 上. 提取成功连接的质粒并将其转化到大肠杆菌 BL21 中进行表达.

2.2 序列同源性分析

利用 Clustal W 软件将已经克隆的 5 个毛白杨

基因的氨基酸序列与本课题组前期克隆得到的巨大芽孢杆菌环氧水解酶 BMEH 的氨基酸序列^[13]进行比对, 结果见图 2. 可以看出, 5 个毛白杨基因同 BMEH 一样, 具有典型的 α/β -折叠型 EH 的保守区域, 如 H-G-F-P motif, 其中 H, G, F 和 P 分别代表组氨酸残基, 甘氨酸残基, 苯丙氨酸残基和脯氨酸残

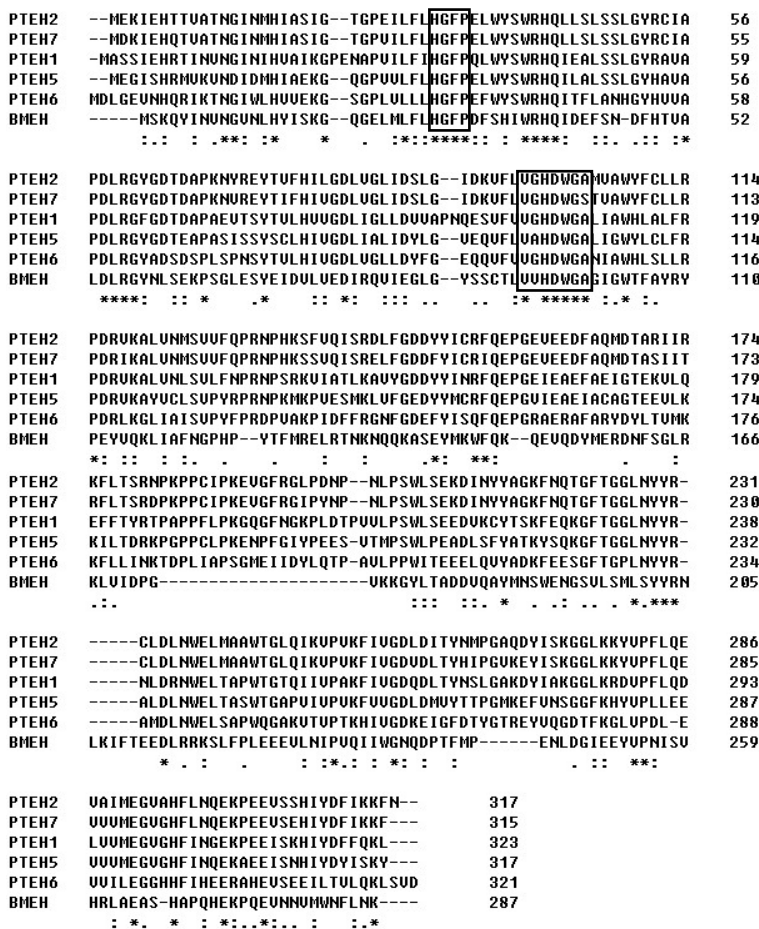
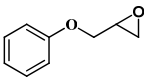
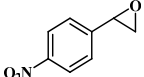


图 2 多序列比对结果

Fig. 2. Sequence alignment of EHs. Regions of putative motif are boxed.

表 3 重组杨树 EHs 生物水解环氧化物结果

Table 3 Results for enzymatic resolution of epoxides using *Populus trichocarpa* EHs

Substrate	Enzyme	Substrate concentration (mmol/L)	Time (h)	ee, ^a /(%) (configuration)	Conversion ^b (%)	<i>E</i> value ^c
	PTEH1	5	6	96/(<i>S</i>)	73	7.0
	PTEH2	5	0.5	94/(<i>S</i>)	74	6.1
	PTEH5	5	0.5	16/(<i>R</i>)	50	1.6
	PTEH1	1	14	n.d.	n.d.	n.d.
	PTEH2	1	0.5	22/(<i>R</i>)	32	3.4
	PTEH5	5	6	19/(<i>S</i>)	68	1.4

^aDetermined by chiral HPLC or GC as described in Section 1.4.

^bCalculated from the remaining substrate concentration and the initial substrate concentration.

^cCalculated by the equation $E = \ln[(1-c)(1-ee_s)] / \ln[(1-c)(1+ee_s)]$.

n.d.—not determined.

基. 利用 DNAMAN 软件, 分别将毛白杨 EH 与 BMEH 的氨基酸序列进行比对, 发现它们的相似性为 24%~26%, 表明植物来源和细菌来源的 EH 序列相似性很低.

2.3 重组蛋白的诱导表达

含有目的基因的重组大肠杆菌经过 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 分析结果示于图 3. 可以看出, 除了 *pte7* 外, 其余四个基因都有明显表达 (蛋白质分子量见表 1). 但是, 表达的蛋白皆为包涵体. 将诱导表达的温度和 IPTG 浓度分别降低至 15 °C 和 0.2 mmol/L, 以期提高基因可溶性表达的程度, 但目的蛋白的可溶性表达并未得到明显改善. 推测因为高等木科植物来源的基因在原核生物中表达受到限制. 因此, 下文采用 25 °C 诱导表达的细胞破碎液的上清部分进行研究.

2.4 环氧化物的酶促水解

表 3 为重组杨树 EHs 生物水解环氧化物反应结果. 可以看出, 以含有空质粒的大肠杆菌诱导表

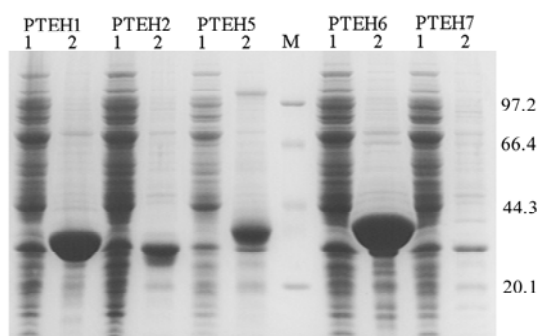


图 3 诱导表达重组蛋白的 SDS-PAGE 图

Fig. 3. SDS-PAGE analysis of recombinant proteins expressed by 0.4 mmol/L IPTG induction at 25 °C for 20 h. Lane 1, soluble fraction; Lane 2, insoluble fraction; Lane M, protein markers (in kDa) indicated on the right.

达后的破碎上清液为催化剂, 两种模型底物 PGE 和 *p*NSO 均没有 EHs 活性. 在表达的四个重组蛋白中, PTEH1, PTEH2 和 PTEH5 对模型底物 PGE 和 *p*NSO 表现出不同程度的环氧水解酶活性: PTEH1 和 PTEH2 对于底物 PGE 的对映选择性是反常规 (*R*)-选择性的, 与文献[14,15]报道相反; 而 PTEH5 优先水解 (*S*)-构型的 PGE, 显示了毛白杨 EHs 的多样性. 对于底物 *p*NSO, 只有 PTEH2 和 PTEH5 表现出一定的活性, 但对映选择性都很低 ($E < 5$). 毛白杨 EHs 相对低的活性, 可能与植物来源的基因在大肠杆菌中的可溶性表达比较困难有关. 下一步可以将酶液进行冻干或者浓缩, 以提高反应体系中的酶浓度, 从而改善催化效果.

3 结论

从杨树全基因组基因数据库中选取 7 个预测为可溶的 EH 基因进行克隆, 首次成功克隆表达出其中 5 个毛白杨环氧水解酶, 其中 3 个对缩水甘油苯基醚和对硝基苯乙烯氧化物显示了一定的环氧水解活性和对映选择性. 木科植物毛白杨中多个环氧水解酶的克隆表达, 为今后研究它们的生理功能, 以及进一步利用蛋白质工程技术改善其活性或对映选择性等特性奠定了前期工作基础.

参 考 文 献

- 1 金浩, 李祖义. 有机化学 (Jin H, Li Z Y. *Chin J Org Chem*), 2000, **20**: 641
- 2 Kamal A, Damayanthi Y, Rao M V. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1992, **3**: 1361
- 3 Żelazczyk D, Kieć-Kononowicz K. *Curr Med Chem*, 2007, **14**: 53
- 4 Smit M S, Labuschagné M. *Curr Org Chem*, 2006, **10**: 1145

- 5 Fretland A J, Omiecinski C J. *Chem Biol Interact*, 2000, **129**: 41
- 6 Tang Y F, Xu J H, Ye Q, Schulze B. *J Mol Catal B*, 2001, **13**: 61
- 7 唐燕发, 许建和, 叶勤 (Tang Y F, Xu J H, Ye Q), Schulze B. 催化学报 (*Chin J Catal*), 2001, **22**: 1
- 8 宫鹏飞, 许建和. 催化学报 (Gong P F, Xu J H. *Chin J Catal*), 2002, **23**: 299
- 9 贾涛, 许建和, 杨晟. 催化学报 (Jia T, Xu J H, Yang Sh. *Chin J Catal*), 2008, **29**: 47
- 10 Morisseau C, Beetham J K, Pinot F, Debernard S, Newman J W, Hammock B D. *Arch Biochem Biophys*, 2000, **378**: 321
- 11 Xu W, Xu J H, Pan J, Gu Q, Wu X Y. *Org Lett*, 2006, **8**: 1737
- 12 鞠鑫, 潘江, 许建和. 催化学报 (Ju X, Pan J, Xu J H. *Chin J Catal*), 2008, **29**: 696
- 13 Zhao J, Chu Y Y, Li A T, Ju X, Kong X D, Pan J, Tang Y, Xu J H. *Adv Synth Catal*, 2011, **353**: 1510
- 14 van Loo B, Kingma J, Arand M, Wubbolts M G, Janssen D B. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**: 2905
- 15 Zhang Z F, Sheng Y M, Jiang K Y, Wang Z, Zheng Y G, Zhu Q. *Biotechnol Lett*, 2010, **32**: 513