

自剪切及活性相关位点的组合突变提高头孢菌素C酰化酶水解活力*

梅婷^{1,2} 张大龙² 冯进辉² 王敏¹ 吴洽庆^{2**} 朱敦明^{2**} 马延和²

¹天津科技大学生物工程学院, 教育部工业发酵微生物重点实验室 天津 300457

²中国科学院天津工业生物技术研究所, 工业酶国家工程实验室, 天津市生物催化技术工程中心 天津 300308

摘要 7-氨基头孢烷酸是合成头孢类抗生素的重要中间体, 利用头孢菌素C酰化酶直接催化头孢菌素C获得7-氨基头孢烷酸的一步酶法与其它方法相比更加经济和环保, 其关键是获得高活性的头孢菌素C酰化酶。本文以来源于 *Pseudomonas* sp. KAC-1 的 I 类头孢菌素C酰化酶 (CPCase-kac) 蛋白序列为模版, 对其基因进行全局优化设计, 人工合成目的基因, 并克隆至表达载体 pET28b, 实现了 CPCase-kac 的高效表达。但是重组蛋白 CPCase-kac 表达活性较低, 且自剪切不彻底, 表达蛋白中存在前体形式的 CPCase-kac, 而头孢菌素C酰化酶的自剪切和活性往往相关。对 CPCase-kac 分子中影响活性的 Y150、Q220、F347 氨基酸位点进行饱和突变发现, 活力提高的突变体 Q220W、Q220G 其第二次自剪切明显降低, 而活力提高的突变体 Y150R、Y150N、Y150H、Y150W 及 F347H、F347Y, 自剪切却没有显著影响。将这些突变进行组合, 最终得到了比活力提高了 8.3 倍的突变体 Y150W/Q220G/F347Y。虽然 Y150W/Q220G/F347Y 突变体活性显著提高, 但是其也具有 Q220G 较差的第二次剪切的特性。同时发现, 外部条件改变可以影响 CPCase 前体或 α' 亚基的继续自剪切。这些发现为进一步提高 CPCase-kac 活性及应用打下了基础。图 6 表 2 参 41

关键词 头孢菌素C酰化酶; 7-氨基头孢烷酸; 头孢菌素C; 定点突变; 自剪切

CLC Q939.9 : TQ464

Combining sites related to autoproteolytic cleavage and activity to improve the deacylation activity of cephalosporin C acylase*

MEI Ting^{1,2}, ZHANG Dalong², FENG Jinhui², WANG Min¹, WU Qiaqing^{2**}, ZHU Dunming^{2**} & MA Yanhe²

¹Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

²Tianjin Biocatalysis Technology Engineering Center, National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) is an important intermediate for the preparation of semi-synthetic cephalosporin antibiotics. Compared to other methods, the one-step process in which cephalosporin C is converted directly into 7-ACA by cephalosporin C acylase is more economical and environment-friendly, therefore attempts have been undertaken to achieve cephalosporin C acylase with high activity for the single-step preparation. A CPCase gene from *Pseudomonas* sp. KAC-1 (CPCase-kac) was optimally designed for artificial gene synthesis, and then cloned into the expression vector pET28b. An overexpression of CPCase-kac was achieved. However, CPCase-kac showed low activity toward cephalosporin C with some precursors of incompletely autoproteolytic cleavage. It was deduced that the autoproteolytic cleavage efficiency of precursors was associated to the activity of expressed CPCase-kac. In this study, we chose the sites Y150, Q220 and F347 related to the activity for saturated mutation. The results showed that the mutants Q220W and Q220G increased the activity and delayed the cleavage of α' subunit to α subunit. Mutants Y150R, Y150N, Y150H, Y150W, F347H and F347Y enhanced the activity of CPCase-kac with unobvious impact on autoproteolytic cleavage. Eventually, we obtained a combined mutant Y150W/Q220G/F347Y with the activity increased 8.3-fold by combining beneficial mutations. Although the mutant Y150W/Q220G/F347Y had significantly increased activity, it also inherited the poor second autoproteolytic cleavage of mutant Q220G. At the same time, the *in vitro* continued autoproteolytic cleavage of precursor and α' subunit could be influenced by external conditions. The study provides scientific knowledge for further enhancement of the CPCase-kac activity.

Keywords cephalosporin C acylase; 7-aminocephalosporanic acid; cephalosporin C; site-directed mutagenesis; autoproteolytic cleavage

收稿日期 Received: 2014-12-05 接受日期 Accepted: 2015-01-19

*中国科学院重点项目 (KSZD-EW-015) 资助 Supported by the Key Project of Chinese Academy of Sciences (KSZD-EW-015)

**通讯作者 Corresponding authors (E-mail: wu_qq@tib.cas.cn; zhu_dm@tib.cas.cn)

头孢菌素类抗生素是继青霉素之后的世界上第二大类应用于临床的 β -内酰胺类抗生素,而7-氨基头孢烷酸(7-aminocephalosporanic acid, 7-ACA)作为头孢菌素类抗生素的关键中间体,在医药工业中具有重要价值。7-ACA一般通过化学法^[1-2]或生物酶法脱去头孢菌素C(Cephalosporin C, CPC)的侧链(D - α -氨基己二酸)而得到。生物酶法因其反应条件比较温和,且对环境友好而获得人们的关注。生物酶法又分为两步酶法和一步酶法,现在国外和极少国内厂家比较成熟应用的是二步酶法^[3],即利用 D -氨基酸氧化酶^[4](D -amino acid oxidase, DAAO)和戊二酰-7-氨基头孢烷酸(Glutaryl-7-aminocephalosporanic acid, GL-7-ACA)酰化酶两步催化CPC裂解得到7-ACA。两步酶法涉及两个酶的催化,酶的制备仍相对复杂,而且反应中产生的副产物 H_2O_2 会对产物和酶造成分解和失活,从而造成催化效率降低等^[5-6]。因此,利用头孢菌素C酰化酶(Cephalosporin C acylase, CPCase, EC 3.5.1.11)直接脱去CPC侧链而获得7-ACA的高效一步酶法具有广阔的发展前景。

GL-7-ACA酰化酶根据其基因结构、同源性和相对分子质量大小分为5大类^[7],对GL-7-ACA都有催化活力,其中只有I类^[8]和III类^[9]对CPC有催化活力,称为CPCase,其活力仅为对GL-7-ACA的2%-4%,不能满足工业生产的需要。因此,近年来人们对不同来源的CPCase进行研究和改造以提高其活性,如CAD^[10-11]、N176^[12-17]和SE83^[18-21]等。据报道目前对N176和SE83的改造颇有成效,其酶活得到明显提高,分别达到了约4 U/mg和10 U/mg^[22],但是仍不能满足工业生产的需要。国内沈忠耀教授课题组对SE83做了一系列的工作,包括SE83的重组表达、条件优化、固定化以及敲除宿主细胞内一些影响转化效率的杂酶基因等,使其总酶活大幅度提高^[23-28]。

CPCase属于N端亲核水解酶家族,由信号肽、 α 亚基、间隔肽和 β 亚基组成,在表达过程中先翻译成一个没有活力的前体多肽,需要经过两次自剪切才能得到成熟的具有催化活力的CPCase^[8, 29]。第一步是分子内自剪切,对前体进行剪切,发生在 β 亚基的起始位置,形成一个 β 亚基和一个C末端带间隔肽的 α 亚基(α' 亚基);第二步是分子间自剪切,得到一个由成熟的 α 亚基和 β 亚基组成的成熟的异源二聚体,并释放不同大小(7-11个氨基酸)的间隔肽:来源*Pseudomonas* sp. SE83的是7个氨基酸

(SDAAGGG)^[20],来源*Pseudomonas* C427的是8个氨基酸(PPDLADQG)^[30],来源*Pseudomonas* sp. GK16的是9个氨基酸(DPPDLADQG)^[31-34],来源*Pseudomonas* sp. 130的是10个氨基酸(GDPPDLADQG)^[8],来源*Pseudomonas diminuta*的是11个氨基酸(EGDPPDLADQG)^[35]。具体剪切过程见图1(以*Pseudomonas* sp. 130的I类CPCase为例)。Yin J等发现Glu159和Gly160这两个位点氨基酸的替换会影响其自剪切,而且在CPCase释放间隔肽后 α 亚基C末端会发生很大的构象变化来弥补Glu159与Ser170之间的缺口,才能与 β 亚基形成异源二聚体得到成熟的CPCase^[36]。

Kim等根据I类CPCase的蛋白晶体结构,通过把酶分子与底物GL-7-ACA进行分子对接,发现Y149 α 、Q50 β 和F177 β 这3个位点与CPCase的侧链结合口袋有关,是影响活性的关键氨基酸残基^[37]。对这些位点进行定点突变发现, Y149 α 和Q50 β 位点氨基酸的替换提高了对CPC的催化活力,而F177 β 位点氨基酸的替换不但影响对CPC的催化活性,还对I类CPCase的自剪切有很大的影响^[38-39]。Jing Z等对SE83的研究发现,靠近第二次剪切位点的G229位点是影响该酶两步自剪切的关键氨基酸, G229位点在位置上对应于I类CPCase中的Y149 α ,因此推测I类CPCase中的Y149 α 也有相同的作用^[20]。综上所述, Y149 α (Y150)、Q50 β (Q220)和F177 β (F347)位点不仅和I类CPCase的催化活性相关,而且还影响CPCase的自剪切。

本文以来源于*Pseudomonas* sp. KAC-1^[40]的CPCase-kac(属于I类CPCase)蛋白序列为模版,对其基因进行全局优化设计^[41],人工合成目的基因,并克隆至表达载体pET28b。选择Y150、Q220、F347这几个与CPCase-kac活性及自剪切相关的位点进行饱和突变,深入分析这几个位点氨基酸的替换对CPCase-kac自剪切及酶活的影响,以期筛选到高活性的CPCase-kac,提高该酶裂解CPC产生7-ACA的效率。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及主要试剂

宿主菌*Escherichia coli* Top10和*E. coli* BL21(DE3)及表达载体pET28b均由本实验室保存; FastDigest限制性内切酶均购自Fermentas公司; KOD-plus聚合酶购自TOYOBO公司; 蛋白胨和酵母提取物均来自BD公司; 蛋白定量试剂盒购自北京

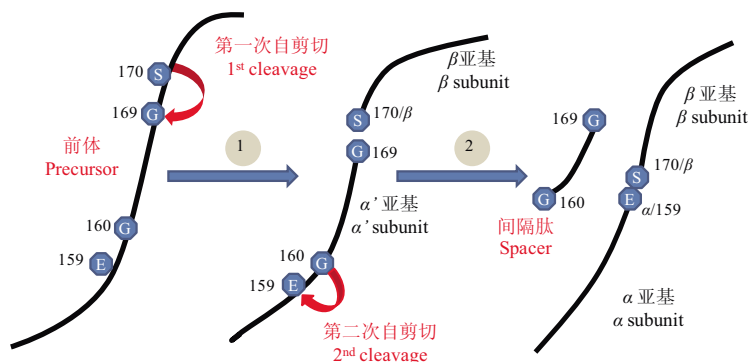


图1 两步自剪切过程示意图。

Fig. 1 Schematic diagram of two-step autoproteolytic cleavage.

康为世纪生物科技有限公司;考马斯亮蓝R250购自Solarbio公司;7-ACA标准品购自国药集团。

1.2 主要仪器

蛋白纯化仪ÄKTA purifier10和所用层析柱均购自GE公司;SCIENTZ-II型超声破碎仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司;6306-2Z/C3型高压匀浆机购自APV公司;RC6⁺高速冷冻离心机购自Thermo公司;高效液相色谱仪Agilent 1200和Eclipse XDB-C18 column (4.6 mm×150 mm×5 μm)购自Agilent公司;Powerpac Basic电泳电源和Gel Doc XR+型凝胶成像仪均购自Bio-Rad公司。

1.3 CPCase-kac基因的优化、合成及表达载体的构建

以来自*Pseudomonas* sp. KAC-1的CPCase-kac蛋白质序列为模版,利用在线服务器DNAworks反向获取CPCase-kac的基因序列,对CPCase-kac基因序列进行全局优化,包括密码子替换、鸟嘌呤和胞嘧啶含量调整以及在C末端加上6×His标签,并去掉29个氨基酸的信号肽,在上游引入NcoI酶切位点,下游引入HindIII酶切位点,人工合成目的基因(2103bp),将目的基因酶切、连接至表达载体pET28b上,获得重组质粒pET28b-CPCase-kac。将重组质粒转化*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,获得重组大肠杆菌*E. coli* BL21(DE3)/pET28b-CPCase-kac。

1.4 CPCase-kac的定点突变

以重组质粒pET28b-CPCase-kac作为模版,突变引物见表1。PCR反应程序为:94℃,2 min;(94℃,15 s;55℃,30 s;68℃,8 min)×25个循环;68℃,20 min;16℃,30 min。向PCR产物中加入1 μL DpnI,于37℃消化去除模板,转化*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,挑取单克隆送北京六合华大基因科技有限公司测序。

表1 定点突变引物

Table 1 Primers of site-directed mutagenesis

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
CPCase-kac-Y150N-F	ATTTTCTGAACGTTGCCAGTCC
CPCase-kac-Y150N-R	GGACTGGCAACGTTTCAGAAAAAT
CPCase-kac-Y150R-F	ATTTTCTGCGTGTGGCCAGTCC
CPCase-kac-Y150R-R	GGACTGGCAACACGCAGAAAAAT
CPCase-kac-Y150H-F	ATTTTCTGCATGTTGCCAGTCC
CPCase-kac-Y150-R	GGACTGGCAACATGCAGAAAAAT
CPCase-kac-Y150W-F	ATTTTCTGTGGGTTGCCAGTCC
CPCase-kac-Y150W-R	GGACTGGCAACCCACAGAAAAAT
CPCase-kac-Q220W-F	ATTTACGGCGCGACCTGGATTGGCCT
CPCase-kac-Q220W-R	AGGCCAATCCAGGTCGCGCCGTAAT
CPCase-kac-Q220T-F	ATTTACGGCGCGACCACTTGGCCT
CPCase-kac-Q220T-R	AGGCCAATGGTGGTTCGCGCCGTAAT
CPCase-kac-Q220G-F	ATTTACGGCGCGACCGGTATTGGCCT
CPCase-kac-Q220G-R	AGGCCAATACCGGTCGCGCCGTAAT
CPCase-kac-F347H-F	GTTCCAACGCATAACATCGT
CPCase-kac-F347H-R	ACGATGTTATGCGTTGGAAC
CPCase-kac-F347Y-F	GTTCCAACGTACACATCGT
CPCase-kac-F347Y-R	ACGATGTTGTACGTTGGAAC

1.5 CPCase-kac的重组表达

把重组质粒pET28b-CPCase-kac转化*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,挑取成功转化的单克隆接种于4 mL含有终浓度为50 mg/L卡那霉素的LB液体培养基中,37℃、200 r/min

振荡培养10-12 h,然后以1% (V/V) 接种量转接到50 mL或600 mL含有终浓度为50 mg/L卡那霉素的LB液体培养基中,37℃、200 r/min条件下振荡培养,待其OD₆₀₀值为0.8-1.0,向培养基中添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为1.0 mmol/L,转入25℃诱导表达10-12 h,5 000 r/min离心15 min,收集菌体,-20℃保存备用。

1.6 CPCase-kac的蛋白纯化

1.6.1 CPCase-kac的小量纯化 将上述菌体用缓冲液A [100 mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 8.0, 含有50 mmol/L NaCl, 5% (V/V) 甘油]重悬,超声波低温破碎法(工作1 s, 间歇4 s, 10 min)破碎细胞,14000 r/min离心5 min,收集上清液。利用His标签纯化蛋白,取适量上清与柱子中的Ni Sepharose High Performance混合,先用缓冲液A冲洗,然后缓冲液B [100 mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 8.0, 含有50 mmol/L NaCl, 30 mmol/L 咪唑, 5% (V/V) 甘油]冲洗,最后用2 mL缓冲液C [100 mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 8.0, 含有50 mmol/L NaCl, 300 mmol/L 咪唑, 5% (V/V) 甘油, pH 8.0]洗脱目的蛋白,即得到纯化的CPCase-kac。所得纯酶用超滤管进行浓缩和去除咪唑,并用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

1.6.2 CPCase-kac的大量纯化 将上述大量菌体用缓冲液A重悬,4℃高压匀浆破碎,12 000 r/min离心30 min,收集上清液,用0.45 μm的滤膜过滤,利用ÄKTA purifier 10蛋白纯化仪进行Ni-NTA柱纯化。先用缓冲液A冲洗,再用缓冲液C进行线性洗脱,收集200 mmol/L咪唑的洗脱峰即得到纯化的CPCase-kac。所得纯酶用超滤管进行浓缩和去除咪唑,并用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

1.7 CPCase-kac的酶活测定

取100 μL纯化的酶,加入50 μL底物溶液[100 mmol/L头孢菌素C钠盐溶液,用磷酸钠缓冲液(100 mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 8.0)溶解头孢菌素C钠盐,调节pH至8.0],补加磷酸钠缓冲液至终体积为500 μL,于37℃反应3 h,取出200 μL,加入600 μL终止液[20% (V/V) 的乙酸:50 mmol NaOH = 2:1 (V/V)]终止反应,离心后取上清液进行HPLC分析(Eclipse XDB-C18 column 4.6 mm × 150 mm × 5 μm; 流速:0.6 mL/min; 流动相:1%乙酸 (V/V):乙腈 = 95:5 (V/V); 柱温:30℃; 检测波长:254 nm),7-ACA的保留时间是3.3 min, CPC的保留时间是7.9 min。酶活单位定义为每分钟催化生成1 μmol 7-ACA所需的酶量。

2 结果与分析

2.1 CPCase-kac基因的优化合成及重组表达

经过全局优化设计的CPCase-kac基因与其原始基因序列有74.0%的序列一致性。将去掉信号肽序列,并在C末端加上6×His tag标签的目的基因克隆至表达载体pET28b,实现了CPCase-kac的过量表达。CPCase-kac重组表达的SDS-PAGE分析如图2所示,由图可知,CPCase-kac由α亚基和β亚基两个亚基组成,β亚基的相对分子质量(*M_r*)约为54 × 10³,α亚基的相对分子质量约(*M_r*)为16 × 10³,前体的相对分子质量(*M_r*)约为70 × 10³,皆与理论值相符。目的蛋白为可溶性表达,表明优化后的CPCase-kac在重组大肠杆菌中可高效表达。

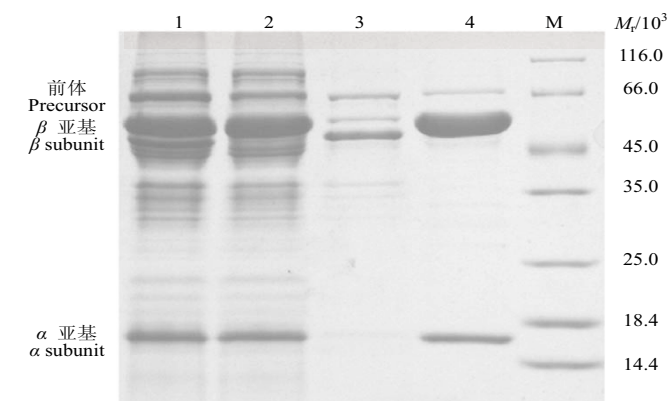


图2 CPCase-kac重组表达的SDS-PAGE分析. M: 表示分子质量标记 (Fermentas), 其大小分别是116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4和14.4 × 10³; 1: 全细胞破碎液; 2: 上清; 3: 沉淀; 4: 纯化的CPCase-kac.
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of CPCase-kac expressed in the recombinant. M: molecular mass markers (Fermentas), with the size of 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4 and 14.4 × 10³, respectively; Lane 1: whole cell disruption; Lane 2: supernatant of cell disruption; Lane 3: precipitation of cell disruption; Lane 4: purified CPCase-kac.

2.2 自剪切相关位点突变影响CPCase-kac活性
2.2.1 Y150及F347位点突变可提高活力而不影响其自剪切 对Y150位点饱和突变分析表明: 与野生型相比, 突变体Y150H、Y150N、Y150W和Y150R的酶活分别提高了3.4、2.9、2.7和1.8倍. 对F347位点饱和突变分析表明: 突变体F347H和F347Y

的酶活相比于野生型提高了1.1倍 (表2). 对这些突变体进行SDS-PAGE分析 (图3A), 结果表明突变体Y150H、Y150N、Y150W、Y150R、F347H和F347Y的自剪切情况与野生型相当, 没有产生明显的改变. 这说明Y150和F347位点这几个氨基酸的替换主要提高了CPCase-kac的活力, 而对自剪切则没有明显影响.

表2 活力提高突变体的相对比活力
Table 2 Relative activity of mutant with increased activity

突变位点 Mutation site	突变体 Mutant	对CPC的相对比活力 (λ/%) Relative activity toward CPC
—	Wild-type	100
Y150	Y150H	339
	Y150N	291
	Y150W	267
	Y150R	176
Q220	Q220W	334
	Q220G	107
	Q220T	98
F347	F347H	113
	F347Y	111
Y150/Q220/F347	Y150W/Q220G/F347Y	832

“—”表示没有突变.
“—” indicates no mutation.

2.2.2 Q220位点突变可提高活力而减弱自剪切效率 对Q220位点进行饱和突变, 除突变体Q220W活力提高了3.3倍及突变体Q220G和Q220T的活力基本保持不变外 (表2), 大部分突变不利于催化活性提高.

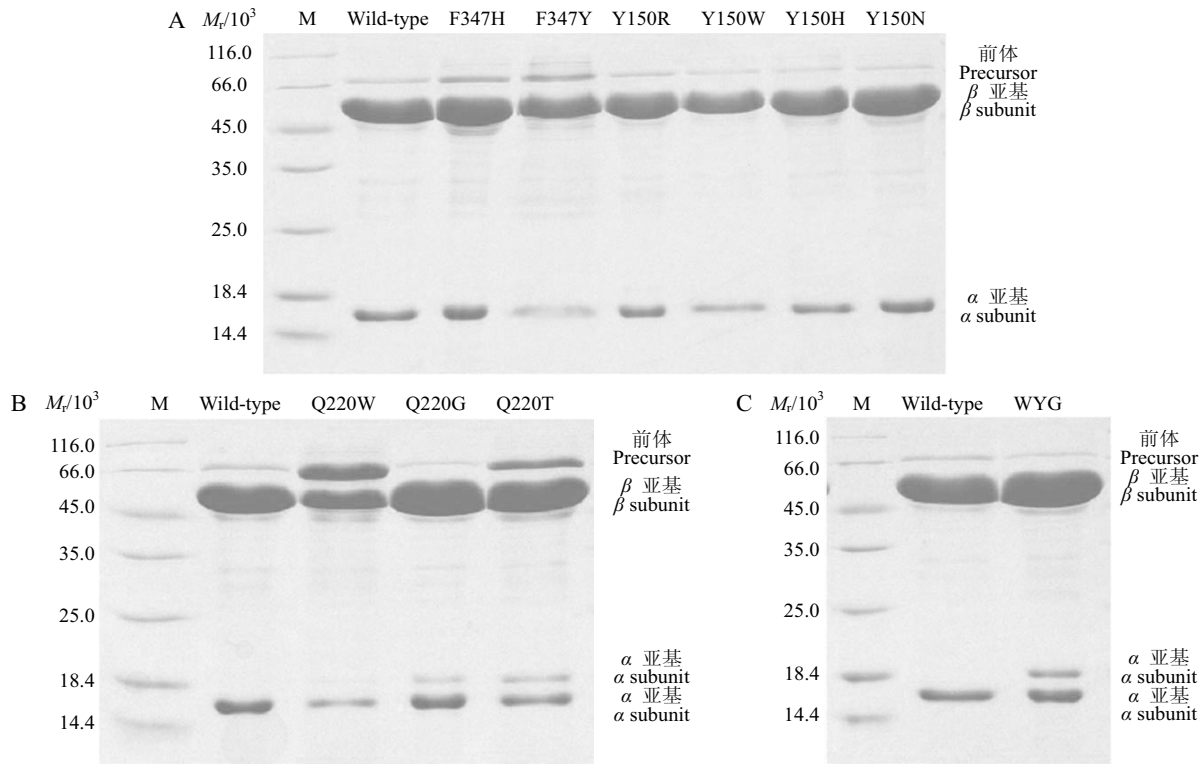


图3 活力提高突变体的SDS-PAGE分析. A: 突变体F347H、F347Y、Y150R、Y150W、Y150H和Y150N的SDS-PAGE分析; B: 突变体Q220W、Q220G和Q220T的SDS-PAGE分析; C: 组合突变体Y150W/Q220G/F347Y的SDS-PAGE分析.
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the mutants with increased activity. A: SDS-PAGE analysis of mutants F347H, F347Y, Y150R, Y150W, Y150H and Y150N; B: SDS-PAGE analysis of mutants Q220W, Q220G and Q220T; C: SDS-PAGE analysis of combined mutant Y150W/Q220G/F347Y.

对这些突变体进行SDS-PAGE分析(图3B),结果表明,突变体Q220W表达的CPCase-kac的前体与 β 亚基的量接近1:1,而且还存在少量 α' 亚基(C末端带着间隔肽的 α 亚基),这说明该位点的Gln被Trp替换后,不但严重抑制了CPCase-kac的第一次自剪切,阻碍了 β 亚基的形成,而且还抑制了CPCase-kac的第二次自剪切,阻碍了 α' 亚基释放间隔肽形成成熟的 α 亚基,从而减少了成熟CPCase-kac的形成.而突变体Q220W的活力相比于野生型提高了3.3倍(表2).推测如果Q220W突变体能够剪切彻底,那么CPCase-kac的催化活力会进一步提高.突变体Q220G的第一次自剪切情况与野生型相当(图3B),但是存在大量 α' 亚基,这说明该位点的Gln突变为Gly后严重抑制了CPCase-kac的第二次自剪切,但是对第一次剪切则没有明显影响.相比于野生型,突变体Q220T的第一次自剪切效率略有降低,而且还存在大量的 α' 亚基,这说明该突变严重抑制了CPCase-kac的第二次自剪切,阻碍了成熟的 α 亚基的形成,同时还抑制了CPCase-kac的第一次自剪切.对剪切加工后的成熟CPCase-kac分析,突变体Q220G和Q220T的比活力应该比野生型高.

由于自剪切对形成成熟的具有催化活力的CPCase至关重要,靠近两次自剪切位点附近的氨基酸对其自剪切和酶学特性很重要^[20],而Q220位点靠近 β 亚基的N末端,这可能是该位点对CPCase-kac的活力和自剪切造成重大影响的原因之一.总的来说,Q220位点突变在提高CPCase-kac活力的同时减弱了其第一次和/或第二次自剪切效率.

2.2.3 自剪切及活性相关位点的组合突变提高催化效率 由

于合成的CPCase-kac(野生型)的活力很低,而且还存在部分没有经过剪切的前体,因此希望通过定向进化提高其活力及剪切效率.通过定点突变得一系列突变体,分别测定比活力(表2),并从中筛选出活力提高的突变体.

由于这几个位点的突变对CPCase-kac的活力和自剪切的影响不尽相同,有些位点的突变提高了CPCase-kac活力而减弱了其第一次和/或第二次自剪切效率,因此对这些位点的突变进行组合以获得活性和自剪切都提高的突变体.通过组合突变得到了催化活力提高了8.3倍的组合突变体Y150W/Q220G/F347Y(简称WYG)(表2).SDS-PAGE分析(图3C)表明突变体WYG的第一次自剪切比较彻底,但是还存在明显的 α' 亚基,且 α' 亚基的量与Q220G突变体相当,而这个组合突变中Y150W和F347Y突变体对CPCase-kac的自剪切影响不大,说明这种组合叠加了不利于自剪切的Q220G突变.

2.3 外部条件影响CPCase-kac表达前体的自剪切

CPCase通常首先表达为前体,随后在体内发生自剪切,那么前体酶在体外是否可以继续发生自剪切?基于此考察了CPCase-kac在不同温度下温育不同时间后的自剪切情况.

2.3.1 外部条件对CPCase-kac第一次自剪切的影响 CPCase-kac的第一次自剪切是完成由前体到 β 亚基和 α' 亚基的转变,因此可以通过前体和 β 亚基的量来判断第一次剪切的情况.突变体Y150R/Q220W/F347H(简称RHW)第一次自剪切很不彻底,前体与 β 亚基的比例接近1:1,而对其活力进行分析发现该酶的活力很低,可能是其自剪切不彻底造成的.体外不同温度孵育(图4A)不同时间发现,RHW突变体在37℃温育

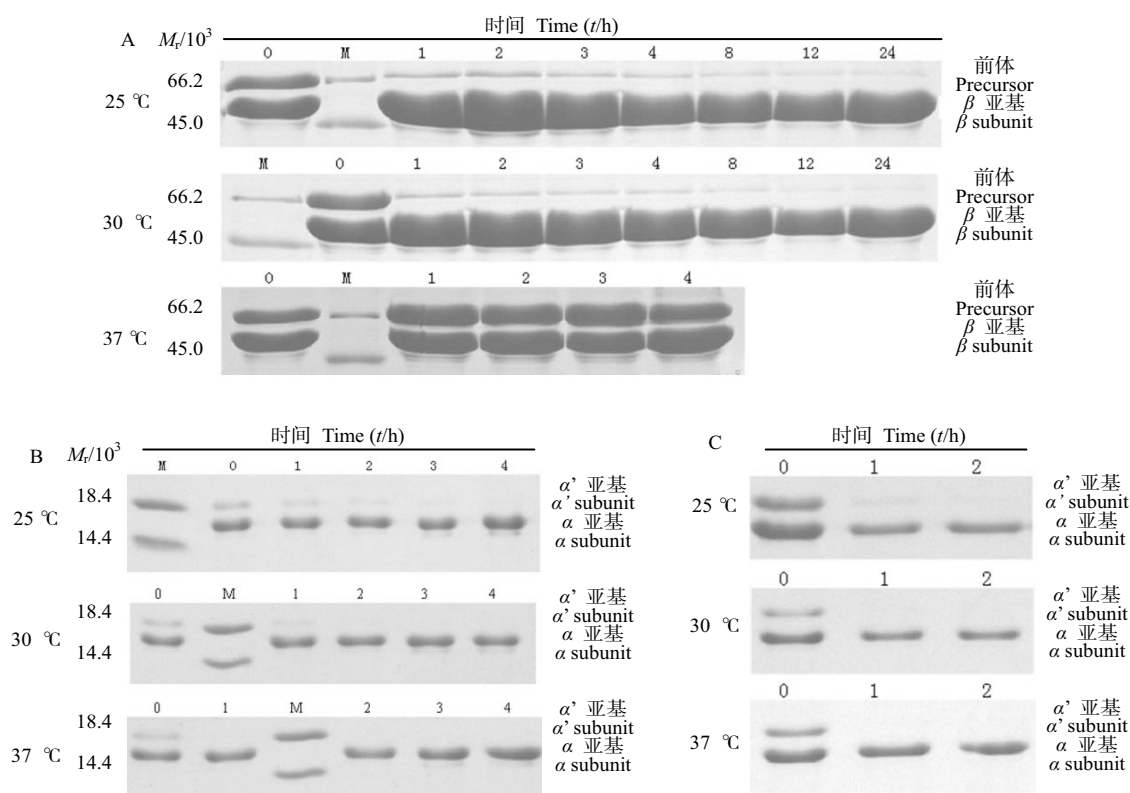


图4 CPCase-kac自剪切分析. A: 组合突变体RHW体外第一次自剪切分析; B: 突变体Q220G体外第二次自剪切分析; C: 组合突变体WYG体外自剪切分析.

Fig. 4 Autoproteolytic cleavage of CPCase-kac. A: Time-course experiments of first autocleavage *in vitro*; B: Time-course experiments of second autoproteolytic cleavage *in vitro*; C: Time-course experiments of autoproteolytic cleavage of combined mutant WYG *in vitro*.

24 h后,其前体的量几乎没有变化,表明该酶在37 °C条件下不能在体外继续进行自剪切。而且37 °C温育4 h后产生了白色沉淀,这表明突变体RHW表达的CPCase-kac前体在体外37 °C不能继续进行自剪切。突变体RHW在25 °C和30 °C温育1 h后,前体明显减少,且 β 亚基逐渐增多,在温育24 h后前体全部消失,这说明突变体RHW前体在25 °C和30 °C条件下可以在体外快速地继续发生第一次自剪切。

RHW突变体是由Y150R、Q220W和F347H这3个突变进行组合突变得到的多重突变体,其中Q220W突变抑制了CPCase-kac的第一次自剪切和第二次自剪切,Y150R和F347H这两个突变则对CPCase-kac的自剪切没有明显影响,而组合之后的突变体的第一次自剪切很不彻底,叠加了Q220W突变对CPCase-kac第一次自剪切的抑制作用。

2.3.2 外部条件对CPCase-kac第二次自剪切的影响 CPCase-kac的第二次自剪切是完成由 α' 亚基到 α 亚基和的转变,因此可以通过 α' 亚基的多寡来判断第二次剪切的情况。突变体Q220G在不同温度温育不同时间后的自剪切情况如图3B所示,在25 °C、30 °C和37 °C温育1 h后 α' 亚基都明显减少,且随着温育时间的递增 α' 亚基逐渐减少, α 亚基逐渐增多。在25 °C

温育4 h后 α' 亚基全部消失,而在30 °C和37 °C分别温育2 h和1 h后, α' 亚基就全部消失了。这表明外部温度可以影响前体的第二次剪切,与第一次剪切不同,高温(37 °C)优于低温条件。与此同时,还考察了温度对组合突变体WYG体外继续自剪切的影响(图3C),结果表明在30 °C和37 °C温育1 h后 α' 亚基均消失,而在25 °C温育1 h后还存在少量的 α' 亚基,2 h后 α' 亚基才完全消失。这些都表明外部条件可以影响CPCase-kac的自剪切,这为今后通过优化CPCase-kac的表达条件来促进WYG突变体在蛋白表达过程中的自剪切从而提高WYG突变体表达的CPCase-kac的活力提供了依据。

2.4 间隔肽对自剪切的影响

CPCase-kac在表达过程首先先翻译成一个没有活力的前体多肽,经过两次自剪切并释放10个氨基酸的间隔肽,才能形成成熟的具有催化活力的CPCase-kac。为检测去掉中间肽是否影响CPCase-kac表达及活性,因此考察了 α 亚基和 β 亚基的共表达和串联表达及间隔肽截短后CPCase的表达情况。

首先,构建 α 亚基和 β 亚基串联表达的突变体SP1(完全去掉间隔肽160-GDPPDLADQG-169)和间隔肽截短的突变体SP2(去掉部分间隔肽163-PDLADQG-169,保留靠近 α 亚基C

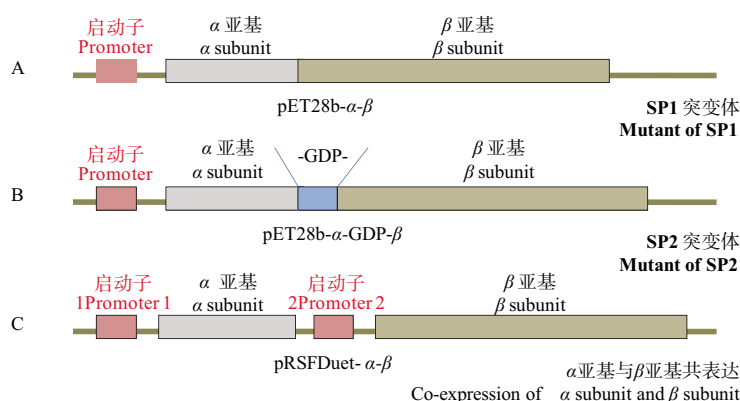


图5 CPCase-kac的 α 亚基和 β 亚基共表达和串联表达及间隔肽截短构建示意图。A: SP1突变体示意图,完全去掉间隔肽160-GDPPDLADQG-169; B: SP2突变体示意图,去掉部分间隔肽163-PDLADQG-169,保留靠近 α 亚基C末端的3个氨基酸160-GDP-162; C: 共表达载体pRSFDuet- α - β 结构示意图, α 亚基和 β 亚基分别连接在启动子1和启动子2后面的多克隆位点区域。

Fig. 5 Schematic diagram of common and tandem expression of subunits α and β and truncated peptide of constructions. A: schematic diagram of mutant of SP1 after deleting spacer 160-GDPPDLADQG-169; B: schematic diagram of mutant of SP2 after deleting a part of spacer 163-PDLADQG-169, and retaining 160-GDP-162 close to the C-terminal of α subunit; C: schematic diagram of co-expressive vector pRSFDuet- α - β , with α subunit and β subunit being ligated into the backward positions of promoter 1 and promoter 2 respectively.

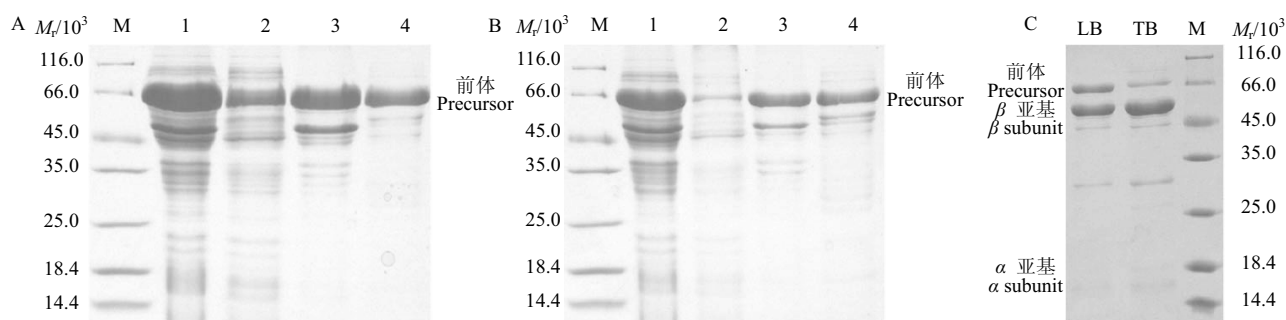


图6 突变体SP1 (A) 和SP2 (B) 以及 α 亚基和 β 亚基共表达 (C) 的SDS-PAGE分析。1: 全细胞破碎液; 2: 上清; 3: 沉淀; 4: 纯化的CPCase-kac。

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of mutants SP1 (A), SP2 (B) and co-expression of subunits α and β (C). Lane 1: whole cell disruption; Lane 2: supernatant of cell disruption; Lane 3: precipitation of cell disruption; Lane 4: purified CPCase-kac.

末端的3个氨基酸-GDP-) (图5中A和B)。通过对SP1和SP2的SDS-PAGE分析(图6, A和B), 结果表明二者表达的CPCase-kac均为前体, 不能进行自剪切形成成熟的CPCase-kac, 而且还形成了许多包涵体蛋白。接着, 对 α 亚基和 β 亚基进行共表达, 成功构建了共表达载体pRSFDuet- α - β (图5C), 实现了 α 亚基和 β 亚基的共表达, 从图6C中可知 α 亚基表达量很低, 而且也没有检测到对CPC的催化活力。这说明间隔肽对形成成熟的具有催化活力的CPCase-kac具有至关重要的作用, CPCase-kac经过两次剪切形成成熟的 α 亚基和 β 亚基后, 还可能要经过一系列复杂的空间结构上的变化才能形成成熟的具有催化活力的CPCase-kac。

3 结论

本文以来源于*Pseudomonas* sp. KAC-1的CPCase-kac蛋白序列为模版, 对其基因进行全局优化设计, 人工合成得到目标基因并克隆至表达载体pET28b, 实现了CPCase-kac的高效表达。但是其SDS-PAGE表明表达的CPCase-kac剪切不彻底, 仍有一部分以前体形式存在, CPCase-kac活性较低。通过定点饱和突变发现, Q220位点饱和突变活力提高的突变体其第二次自剪切明显降低, 而Y150及F347位点突变体活力提高而其自剪切却没有变化。将这些突变进行组合, 最终得到了比活力提高了8.3倍的组合突变体Y150W/Q220G/F347Y, 这为后面在此基础上利用蛋白质工程进一步提高CPCase-kac的活力奠定了基础。从CPCase-kac的自剪切来分析, 外部条件可以影响CPCase-kac的自剪切, 在体外25℃和30℃条件下, 温育1 h可以明显提高其第一次和第二次自剪切, 这意味着可以通过条件优化来提高CPCase-kac的自剪切效率从而提高总酶活。

本文还考察了 α 亚基和 β 亚基的共表达和串联表达及间隔肽截短后CPCase的表达情况, 结果表明表达的CPCase都以前体形式存在, 不能进行自剪切, 这说明在没有间隔肽的情况下, α 亚基和 β 亚基也可以形成异源二聚体, 但是不能形成具有正确构象的二聚体, 从而不能表现出对CPC的催化活力, 再次证实间隔肽在CPCase前体自剪切形成具有活力的CPCase的过程中起着至关重要的作用, 也为利用基因工程技术方法进一步提高CPCase活性提供了线索。

参考文献 [References]

- Morin RB, Jackson BG, Flynn EH, Roeske RW, Andrews SL. Chemistry of cephalosporin antibiotics XIV: reaction of cephalosporin C with nitrosyl chloride [J]. *J Am Chem Soc*, 1969, **91** (6): 1396-1400
- Cabri W, Verga R, Cambiaghi S, Bernasconi E. Environmentally friendly production of 7-ACA [J]. *Chim Ind*, 1999, **81**: 461-464
- Tischer W, Giesecke U, Lang G, Roder A, Wedekind F. Biocatalytic 7-aminoccephalosporanic acid production [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1992, **672**: 502-509
- Pollegioni L, Molla G. New biotech applications from evolved D-amino acid oxidases [J]. *Trends Biotechnol*, 2011, **29** (6): 276-283
- 罗晖, 李强, 童忆舟, 司颖涛, 沈忠耀. 酶法生产7-氨基头孢烷酸的研究进展[J]. 现代化工, 2002, **22** (12): 18-22 [Luo H, Li Q, Tong YZ, Si

- YT, Shen ZY. Progress in enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminoccephalosporanic acid [J]. *Mod Chem Ind*, 2002, **22** (12): 18-22
- Tan Q, Song QX, Wei DZ. Single-pot conversion of cephalosporin C to 7-aminoccephalosporanic acid using cell-bound and support-bound enzymes [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2006, **39** (5): 1166-1172
- Rosini E, Monelli CS, Pollegioni L, Riva S, Monti D. On the substrate preference of glutaryl acylases [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2012, **76**: 52-58
- Li Y, Chen J, Jiang W, Mao X, Zhao G, Wang E. *In vivo* post-translational processing and subunit reconstitution of cephalosporin acylase from *Pseudomonas* sp. 130 [J]. *Eur J Biochem*, 1999, **262** (3): 713-719
- Aramori I, Fukagawa M, Tsumura M, Iwami M, Isogai T, Ono H, Ishitani Y, Kojo H, Kohsaka M, Ueda Y, Imanaka H. Cloning and nucleotide sequencing of new glutaryl 7-ACA and cephalosporin C acylase genes from *Pseudomonas* strains [J]. *J Ferment Bioeng*, 1991, **72** (4): 232-243
- Koller KP, Lange G, Sauber K. Mutant glutaryl amidase and uses thereof: GER, WO02072806-(A3) [P]. 2003-05-30
- Zhang W, Liu YA, Zheng HB, Yang S, Jiang WH. Improving the activity and stability of GL-7-ACA acylase CA130 by site-directed mutagenesis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71** (9): 5290-5296
- Ishii Y, Saito Y, Fujimura T, Sasaki H, Noguchi Y, Yamada H, Niwa M, Shimomura K. High-level production, chemical modification and site-directed mutagenesis of a cephalosporin C acylase from *Pseudomonas* strain N176 [J]. *Eur J Biochem*, 1995, **230** (2): 773-778
- Saito Y, Fujimura T, Ishii Y, Noguchi Y, Miura T, Niwa M, Shimomura K. Oxidative modification of a cephalosporin C acylase from *Pseudomonas* strain N176 and site-directed mutagenesis of the gene [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** (8): 2919-2925
- Pollegioni L, Lorenzi S, Rosini E, Marcone GL, Molla G, Verga R, Cabri W, Pilone MS. Evolution of an acylase active on cephalosporin C [J]. *Protein Sci*, 2005, **14** (12): 3064-3076
- Conti G, Pollegioni L, Molla G, Rosini E. Strategic manipulation of an industrial biocatalyst-evolution of a cephalosporin C acylase [J]. *FEBS J*, 2014, **281** (10): 2443-2455
- Golden E, Paterson R, Tie WJ, Anandan A, Flematti G, Molla G, Rosini E, Pollegioni L, Vrielink A. Structure of a class III engineered cephalosporin acylase: comparisons with class I acylase and implications for differences in substrate specificity and catalytic activity [J]. *Biochem J*, 2013, **451** (2): 217-226
- Li Q, Huang XQ, Zhu YS. Evaluation of active designs of cephalosporin C acylase by molecular dynamics simulation and molecular docking [J]. *J Mol Model*, 2014, **20** (7): 2314-2325
- Shin YC, Jeon JYJ, Jung KH, Park MR, YK. Cephalosporin C acylase mutant and method for preparing 7-ACA using same: USA, US0207519 [P]. 2006-05-17
- Wang Y, Yu H, Song W, An M, Zhang J, Luo H, Shen Z. Overexpression of synthesized cephalosporin C acylase containing mutations in the substrate transport tunnel [J]. *J Biosci Bioeng*, 2012, **113** (1): 36-41
- Zhang J, Yu HM, Wang Y, Luo H, Shen ZY. Determination of the second autoproteolytic cleavage site of cephalosporin C acylase and the effect of deleting its flanking residues in the alpha-C-terminal region [J]. *J Biotechnol*, 2014, **184**: 138-145
- Ren Y, Lei YL, Zhu YS. Site-directed mutagenesis of cephalosporin C acylase and enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminoccephalosporanic acid [J]. *Turk J Biochem*, 2014, **39** (1): 51-56
- Pollegioni L, Rosini E, Molla G. Cephalosporin C acylase: dream

- and (/or) reality [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, **97** (6): 2341-2355
- 23 安明, 于慧敏, 罗晖, 宋文斯, 沈忠耀. CPC酰化酶基因的人工合成与重组表达[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2008, **48** (9): 1499-1503 [An M, Yu HM, Luo H, Song WS, Shen ZY. Artificial synthesis and expression of the CPC acylase gene in recombinant *E. coli* [J]. *J T Singhua Univ (Sci Tech)*, 2008, **48** (9): 1499-1503]
 - 24 Zhu XW, Luo H, Chang YH, Su HB, Li QA, Yu HM, Shen ZY. Characteristic of immobilized cephalosporin C acylase and its application in one-step enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid [J]. *World J Microb Biotechnol*, 2011, **27** (4): 823-829
 - 25 Wang Y, Yu H, Zhang J, Luo H, Shen Z. Double knockout of beta-lactamase and cephalosporin acetyl esterase genes from *Escherichia coli* reduces cephalosporin C decomposition [J]. *J Biosci Bioeng*, 2012, **113** (6): 737-741
 - 26 罗晖, 何华, 常雁红, 魏艳梅, 于慧敏, 沈忠耀. 一种制备固定化头孢菌素C酰化酶的方法: 中国, CN103436517A [P]. 2013-12-11
 - 27 于慧敏, 王颖, 张婧, 罗晖, 沈忠耀. 一种降低头孢菌素C分解的方法: 中国, CN102533920A [P]. 2012-07-04
 - 28 姚舜, 罗晖, 常雁红, 于慧敏, 李强, 沈忠耀. 一步酶法生产7-氨基头孢烷酸的研究进展[J]. 现代化工, 2013, **33** (2): 11-16 [Yao S, Luo H, Chang YH, Yu HM, Li Q, Shen ZY. Research progress in one-step enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid [J]. *Mod Chem Ind*, 2013, **33** (2): 11-16]
 - 29 Brannigan JA, Dodson G, Duggleby HJ, Moody PCE, Smith JL, Tomchick DR, Murzin AG. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation [J]. *Nature*, 1995, **378** (6557): 644-644
 - 30 Ishii Y, Saito Y, Isogai T, Kojo H, Yamashita M, Niwa M, Kohsaka M, Fujimura T. A novel 7-Beta-(4-Carboxybutanamido)-cephalosporanic acid acylase isolated from *Pseudomonas* strain C427 and its high-level production in *Escherichia coli* [J]. *J Ferment Bioeng*, 1994, **77** (6): 591-597
 - 31 Lee YS, Park SS. Two-step autocatalytic processing of the glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase from *Pseudomonas* sp. strain GK16 [J]. *J Biotechnol*, 1998, **180** (17): 4576-4582
 - 32 Kim JK, Yang IS, Rhee S, Dauter Z, Lee YS, Park SS, Kim KH. Crystal structures of glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase: insight into autoproteolytic activation [J]. *Biochem-US*, 2003, **42** (14): 4084-4093
 - 33 Kim JK, Yang IS, Shin HJ, Cho KJ, Ryu EK, Kim SH, Park SS, Kim KH. Insight into autoproteolytic activation from the structure of cephalosporin acylase: a protein with two proteolytic chemistries [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103** (6): 1732-1737
 - 34 Lee YS, Kim HW, Park SS. The role of α -amino group of the N-terminal serine of beta subunit for enzyme catalysis and autoproteolytic activation of glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275** (50): 39200-39206
 - 35 Kim Y, Kim S, Earnest TN, Hol WGJ. Precursor structure of cephalosporin acylase-Insights into autoproteolytic activation in a new N-terminal hydrolase family [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (4): 2823-2829
 - 36 Yin J, Deng Z, Zhao G, Huang X. The N-terminal nucleophile serine of cephalosporin acylase executes the second autoproteolytic cleavage and acylpeptide hydrolysis [J]. *J Biol Chem*, 2011, **286** (27): 24476-24486
 - 37 Kwon TH, Rhee S, Lee YS, Park SS, Kim KH. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase from *Pseudomonas* sp. GK16 [J]. *J Struct Biol*, 2000, **131** (1): 79-81
 - 38 Oh B, Kim M, Yoon J, Chung K, Shin Y, Lee D, Kim Y. Deacylation activity of cephalosporin acylase to cephalosporin C is improved by changing the side-chain conformations of active-site residues [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **310** (1): 19-27
 - 39 Kim S, Kim Y. Active site residues of cephalosporin acylase are critical not only for enzymatic catalysis but also for post-translational modification [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (51): 48376-48381
 - 40 Matsuda A, Komatsu KI. Molecular-cloning and structure of the gene for 7-beta-(4-carboxybutanamido) cephalosporanic acid acylase from a *Pseudomonas* strain [J]. *J Bacteriol*, 1985, **163** (3): 1222-1228
 - 41 牛丹丹, 王正祥. 全基因合成方法学研究 [J]. 应用与环境生物学报, 2007, **13** (4): 515-518 [Niu DD, Wang ZX. Methodological studies on total gene synthesis [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2007, **13** (4): 515-518]