

过表达 PNP 对肌苷生产菌合成利巴韦林的影响

杨书尧, 刘 莉, 马跃超, 陈 宁, 谢希贤

(代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘 要: 采用 PCR 技术从枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 168 基因组 DNA 中扩增其编码嘌呤核苷磷酸化酶 (purine nucleoside phosphorylase, PNP) 的两个基因 *deoD* (PNP₇₀₂) 和 *pupG* (PNP₈₁₆)。以肌苷生产菌枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) Q60 为出发菌株, 分别采用胞内与胞外分泌过表达 PNP 的方式构建 4 株重组菌株, 通过外源添加底物 1, 2, 4-三氮唑-3-羧氨酰 (TCA) 的方式直接合成利巴韦林。摇瓶发酵数据显示, 胞内过表达 PNP₇₀₂ 和 PNP₈₁₆ 的利巴韦林产量分别为 (8.33 ± 0.57) g/L 和 (11.00 ± 0.38) g/L。胞外分泌过表达 PNP₇₀₂ 和 PNP₈₁₆ 的利巴韦林产量分别为 (9.06 ± 0.17) g/L 和 (12.67 ± 0.60) g/L。PNP₈₁₆ 的催化效率高于 PNP₇₀₂, 胞外分泌过表达比胞内过表达高, 其中胞外分泌过表达 PNP₈₁₆ 重组菌 Q60/pBSA_{pupG} 最高, 比出发菌 (2.02 ± 0.72) g/L 提高了 5.3 倍。

关键词: 利巴韦林; 肌苷; 嘌呤核苷磷酸化酶; 发酵

中图分类号: Q812

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2015)03-0014-05

Effect of Overexpression of Purine Nucleoside Phosphorylase on Ribavirin Production from Inosine Producing Strain

YANG Shuyao, LIU Li, MA Yuechao, CHEN Ning, XIE Xixian

(National and Local United Engineering Lab of Metabolic Control Fermentation Technology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Purine nucleoside phosphorylase (PNP) genes *deoD* (PNP₇₀₂) and *pupG* (PNP₈₁₆) were amplified from *Bacillus subtilis* 168 genome through polymerase chain reaction. Inosine producing strain *B. subtilis* Q60 was used as the starting strain. Four recombined strains were constructed by overexpression of intracellular and extracellular secretion of PNP. By adding 1 H-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide (TCA) into the culture medium, the recombined strains could be used for ribavirin synthesis. The results showed that the production of ribavirin through intracellular overexpression of PNP₇₀₂ and PNP₈₁₆ of the recombined strains was (8.33 ± 0.57) g/L and (11.00 ± 0.38) g/L, and that from the extracellular secretion overexpression of PNP₇₀₂ and PNP₈₁₆ of the recombined strains was (9.06 ± 0.17) g/L and (12.67 ± 0.60) g/L. The catalytic efficiency of PNP₈₁₆ was higher than that of PNP₇₀₂, and extracellular secretion was better than intracellular overexpression. The titer of ribavirin of Q60/pBSA_{pupG}, in which PNP₈₁₆ was overexpressed extracellularly, was up to (12.67 ± 0.60) g/L, resulting in a 5.3 folds enhancement compared with the control strain.

Key words: ribavirin; inosine; purine nucleoside phosphorylase; fermentation

利巴韦林, 化学名 1-β-D-呋喃核糖基-1 H-1, 2, 4-三氮唑-3-羧氨酰, 又名病毒唑, 是一种高效广谱的核苷类抗病毒药物, 对多种 DNA 和 RNA 病毒均有较好的抑制作用^[1]。利巴韦林的生产方法有化学合成法、酶催化法和微生物发酵法。目前化学合成法

是合成利巴韦林的主要生产方法, 但是化学合成法步骤繁琐、条件苛刻。酶催化法主要是利用嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP) 催化底物核苷或 D-核糖-1-磷酸酯与 1, 2, 4-三氮唑-3-羧氨酰 (TCA) 反应, 直接合成利巴韦林^[2]。虽然酶催化法可以简化反应步骤、条件简

单, 但诱导剂的添加提高了生产成本且不利于后续的分选纯化。发酵法合成利巴韦林原料简单、污染小, 具有工业化生产的潜力。古屋晃等^[3]利用产核苷的枯草芽孢杆菌属和短杆菌属的微生物进行发酵培养积累利巴韦林, 但利巴韦林产量小于 1 g/L。武改红等^[4]以鸟苷产生菌枯草芽孢杆菌 TM903 为供试菌, 在 5 L 发酵罐发酵 60 h 积累利巴韦林 5.86 g/L。谢希贤等^[5]利用枯草芽孢杆菌 TM903 和谷氨酸棒杆菌 TL1105 进行发酵罐混菌发酵, 采用变温控制模式和分阶段供氧控制模式发酵 60 h, 利巴韦林产量达到 5.96 g/L。

PNP 是嘌呤核苷补救合成途径的关键酶之一, 该酶的主要功能是催化核苷分解为核糖-1-磷酸和相应的嘌呤碱基。在体外反应时, 若加入另外一种嘌呤碱基或其类似物, 可以合成新的嘌呤核苷或其类似物, 现已广泛用于酶催化法生产核苷类抗病毒药物^[6]。Bzowska 等^[7]根据 PNP 底物专一性和相对分子质量大小的不同将 PNP 分为低相对分子质量同源三聚体类和高相对分子质量同源六聚体类。某些微生物会同时存在两种聚体的 PNP, 如枯草芽孢杆菌。

影响发酵法合成利巴韦林的主要因素是前体物核苷和 PNP。理论上嘌呤核苷和嘧啶核苷都可作为利巴韦林的合成前体, 但综合考虑生产成本与 PNP 的催化效率, 嘌呤核苷更合适。研究表明, 肌苷是 PNP 的最适底物^[8]。本文以肌苷生产菌枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* Q60 为出发菌, 通过基因工程技术提高 PNP 的表达量, 比较了两种 PNP 的催化效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和培养基

肌苷生产菌枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) Q60、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 168、大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 和质粒 pBE43 (大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒, 含有 P43 启动子)、pBSA43 (大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒, 含有 P43 启动子和 *sacB* 基因信号肽)、pWB980 (枯草芽孢杆菌质粒, 含有 P43 启动子和 *sacB* 信号肽) 均为本实验室保藏。

活化斜面培养基 (g/L): 葡萄糖 1, 蛋白胨 10, 牛肉膏 10, 酵母膏 5, NaCl 2.5, 琼脂 20, pH 7.0 ~ 7.2。

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母浸膏 15, 玉米浆 12, NaCl 2.5, 尿素 2, pH 7.0 ~ 7.2。

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 140 (单独灭菌), 玉米浆 16, 酵母粉 15, (NH₄)₂SO₄ 22, MgSO₄·7H₂O 5, KH₂PO₄ 5, CaCO₃ 20, pH 7.0 ~ 7.2。

1.1.2 试剂及仪器

限制性内切酶 *Kpn* I、*Sal* I 和 *Xho* I, Fermentas 公司; Solution I、*Taq* DNA 聚合酶、1 kbp DNA Ladder, 大连宝生物工程有限公司; 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒, 天津为科生物有限公司; TCA, 纯度 99%, 山东阳成生物科技有限公司; 其他试剂为国产分析纯试剂。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; SBA-40C 型生物传感仪, 山东生物科学研究所。DNA 序列分析比较采用 DNAMAN 2.0 软件, 引物设计采用 Primer Premier 5 软件, 电泳图分析采用 Image master Total Lab v1.00 软件。

1.2 实验方法

1.2.1 过表达 PNP 质粒的构建

根据 *B. subtilis* 168 的 *deoD* 的基因序列 (Gene ID: 940038) 和 *pupG* 的基因序列 (Gene ID: 938731) 设计引物, 见表 1。PCR 反应体系: 首先 94 °C 预变性 3 min, 然后 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 进行 30 轮循环扩增, 最后一个循环完成后, 72 °C 继续延伸 10 min。质粒构建流程: (1) 使用引物 *deoD*_{in}-S 和 *deoD*-A 扩增 *deoD* 基因片段, *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切后连接到载体 pBE43, 构建 *deoD* 胞内表达质粒 pBE*deoD*。(2) 使用引物 *pupG*_{in}-S 和 *pupG*-A 扩增 *pupG* 片段, *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切后连接到载体 pBE43, 构建 *pupG* 胞内表达质粒 pBE*pupG*。(3) 以质粒 pWB980 为模板, 引物 *sacB*-S 和 *sacB*-A 扩增 *sacB* 信号肽序列 (144 bp); 引物 *deoD*-S 和 *deoD*-A 扩增 *deoD* 基因, 通过重叠 PCR 将 *sacB* 信号肽与 *deoD* 连接, *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切后连接到载体 pBE43, 构建分泌表达质粒 pBSA*deoD*。(4) *pupG*-S 和 *pupG*-A 扩增 *pupG* 片段, *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切后连接到载体 pBSA43, 构建分泌表达质粒 pBSA*pupG*。所有连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 提取阳性转化子质粒进行双酶切验证, 并送华大基因公司测序。

1.2.2 过表达 PNP 重组菌的构建

将 4 个重组质粒分别电转化导入肌苷生产菌 *B. subtilis* Q60^[12], 37 °C 培养, 次日挑取转化子, 提取质粒, 进行双酶切验证, 正确的分别命名为过表达 PNP 菌株 Q60/pBE*deoD* 和 Q60/pBE*pupG*; 分泌过表达 PNP 菌株 Q60/pBSA*deoD* 和 Q60/pBSA*pupG*。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers in this study

引物名称	引物序列 5'-3'
deoD _{in} -S	ATCGGGTACCGTTTCATCATGACATTCGTTG (<i>Kpn</i> I)
sacB-S	CGAAGGTACCAGGAGGGCTGGAAGAAG (<i>Kpn</i> I)
sacB-A	CACCTATATGTACTGGCAAAAGCTTGAGTTG
deoD-S	CAAGCTTTTGCCAGTGACATATAGGTGCTG
deoD-A	TATAGTCGACCCAGCACGCCTCTTGAT (<i>Sal</i> I)
pupG _{in} -S	CCAGGGTACCGAGAATTTATGAAGGACAGAATTGAACG (<i>Kpn</i> I)
pupG-S	AGGCCTCGAGCAAGGACAGAATTGAACGC (<i>Xho</i> I)
pupG-A	TGTAGTCGACCATATTTATTCGTACTGAGCG (<i>Sal</i> I)

1.2.3 重组菌发酵生产利巴韦林

将 4 个重组菌株和只含有空质粒 pBE43 的对照菌株进行 500 mL 摇瓶发酵实验.

活化培养: 取斜面保藏菌种划线接种于活化斜面, 32 ℃ 培养 12 ~ 14 h, 转接后重复 1 次.

种子培养: 从新鲜活化斜面上挑取两环菌体接入种子培养基中, 500 mL 三角瓶装液量为 30 mL, 10 μg/mL 卡纳霉素抗性, 32 ℃、200 r/min 振荡培养 8 ~ 10 h 至 $A_{600} = 8 \sim 10$.

发酵培养: 10% 接种量, 36 ℃、200 r/min 振荡培养 96 h. 从发酵 12 h 开始每隔 12 h 添加 0.2 g TCA, 共添加 3 次.

1.2.4 分析方法

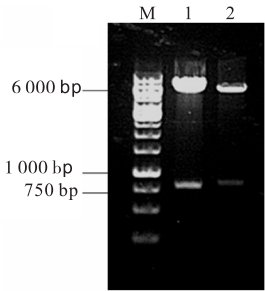
发酵过程中每 12 h 测定波长 600 nm 下的吸光度. 采用 SBA-40C 型生物传感仪测定发酵液中残糖: 将发酵液离心, 取上清液, 用去离子水稀释 100 倍后, 取 25 μL 稀释液进样直接读数. 采用高效液相色谱法测定发酵液中的利巴韦林和肌苷含量: 色谱柱为 Kromasil C18 柱 (250 mm × 416 mm, 5 μm). 利巴韦林测定条件: 发酵液用离子水稀释 100 倍, 流动相为 $V(\text{乙腈}):V(\text{水}) = 4:96$ 的乙腈水溶液, 流量 1.0 mL/min, 柱温 18.5 ℃, 检测波长 207 nm. 肌苷测定条件: 发酵液用 1 mol/L NaOH 溶液稀释 10 倍, 沸水浴 5 min 后离心取上清液, 上清液用去离子水稀释 100 倍, 流动相为 $V(\text{乙腈}):V(\text{水}) = 10:90$ 的乙腈水溶液, 流量 1.0 mL/min, 柱温 25 ℃, 检测波长 248 nm.

2 结果与分析

2.1 重组质粒和重组菌株的构建及鉴定

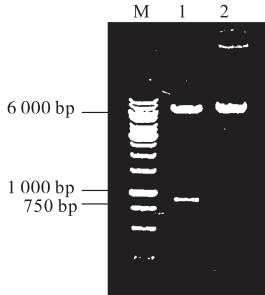
胞内过表达质粒 pBEdeoD、pBEpupG 和分泌过表达质粒 pBSAdeoD、pBSApupG 的酶切验证结果如图 1 所示. 图 1(a) 中, pBEdeoD 用 *Kpn* I 和 *Sal* I 双

酶切后在 800 bp 左右出现目的条带. pBEpupG 用 *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切后在 830 bp 左右出现目的条带, 与预期相符. 图 1(b) 中, pBSAdeoD 用 *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切后在 870 bp 左右出现目的条带, 符合 sacB 信号肽序列和 deoD 重叠后的片段大小. pBSApupG 用 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切后在 830 bp 左右出现目的条带, 与预期相符. 重组质粒测序, 结果与 GenBank 上报道的基因序列一致.



M. 1 kbp DNA Marker; 1. pBEdeoD (*Kpn* I 和 *Sal* I); 2. pBEpupG (*Kpn* I 和 *Sal* I)

(a) 重组质粒 pBEdeoD 和 pBEpupG 双酶切图谱



M. 1 kbp DNA Marker; 1. pBSAdeoD (*Kpn* I 和 *Sal* I); 2. pBSApupG (*Xho* I 和 *Sal* I)

(b) 重组质粒 pBSAdeoD 和 pBSApupG 双酶切图谱

图 1 pBEdeoD、pBEpupG、pBSAdeoD 和 pBSApupG 的验证
Fig. 1 Identification of the recombined plasmids pBEdeoD, pBEpupG, pBSAdeoD and pBSApupG

2.2 重组菌发酵合成利巴韦林

为了研究两种结构的 PNP 在肌苷生产菌中过表

达以及不同的表达方式对合成利巴韦林的影响, 将 4 株重组菌株和只含有 pBE43 空质粒的对照菌进行摇

瓶发酵实验, 定期取样测定菌体生长吸光度、肌苷和利巴韦林的产量, 发酵过程曲线如图 2 所示。

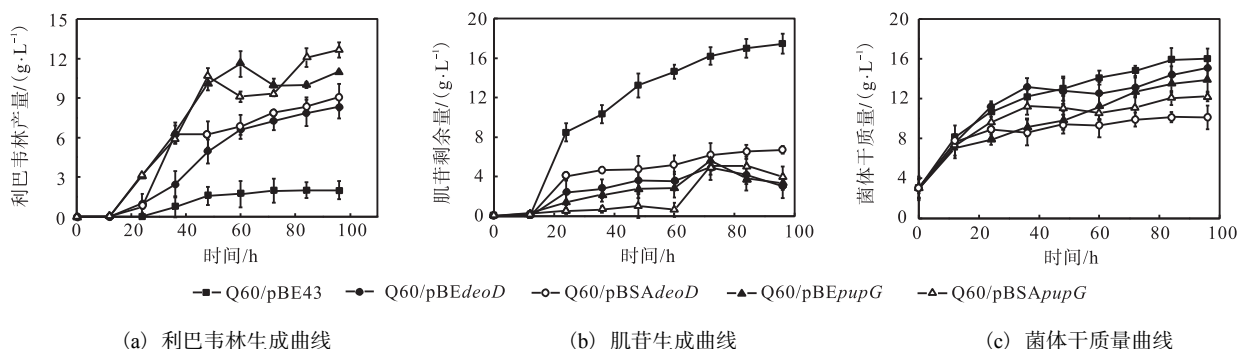


图 2 利巴韦林摇瓶发酵过程曲线

Fig. 2 Fermentation parameters of ribavirin

结果显示: 4 株重组菌的菌体干质量都小于对照菌, 胞外分泌过表达重组菌 Q60/pBSAdeoD 和 Q60/pBSApupG 减少明显, 而且这两株菌的对数期缩短, 20 h 后即进入平稳期; 而胞内表达重组菌 Q60/pBEdeoD 和 Q60/pBEpupG 与对照菌相似, 在 40 h 左右才进入平稳期. 其原因可能是酶的过表达给菌体的生长造成了不同程度的负担. 对照菌从 10 h 开始积累肌苷, 产量平稳上升, 发酵 80 h 后趋于平缓. 对照菌在添加 TCA 后开始有少量的利巴韦林积累, 但是积累量保持在 2 g/L, 不随着肌苷的增长而上升. 4 株重组菌株的肌苷含量与对照菌相比则明显

减少, 添加 TCA 后, 利巴韦林合成量明显增长, PNP₈₁₆ 重组菌 Q60/pBEpupG 和 Q60/pBSApupG 的增长程度较大. PNP₇₀₂ 重组菌 Q60/pBEdeoD 和 Q60/pBSAdeoD 的利巴韦林合成趋势虽然与前者一致, 但是合成量低 20% 左右. 另外, 相同的 PNP 采用分泌过表达利巴韦林合成量比胞内过表达高.

4 株重组菌的利巴韦林产量是对照菌的 4 ~ 6 倍; 肌苷剩余量仅为对照菌的 15% ~ 30%, 说明过表达 PNP 可以提高利巴韦林的合成效率. 重组菌的利巴韦林产量、肌苷转化率和 TCA 利用率见表 2.

表 2 重组菌的核苷总产量及转化率比较

Tab. 2 Comparison of the yields of total nucleoside and inosine utilization of the recombined strains

菌株	利巴韦林 产量/(g·L ⁻¹)	<i>c</i> 利巴韦林/(mol·L ⁻¹)	肌苷剩余量/ (g·L ⁻¹)	<i>c</i> 肌苷/(mol·L ⁻¹)	肌苷转化率/%	TCA 利用率/%
Q60/pBEdeoD	8.33±0.57	0.034	3.04±0.40	0.011	75.2	19.1
Q60/pBSAdeoD	9.06±0.17	0.037	6.71±0.21	0.025	59.7	20.8
Q60/pBEpupG	11.00±0.38	0.045	3.33±0.57	0.012	78.4	25.3
Q60/pBSApupG	12.67±0.60	0.052	4.02±0.10	0.015	77.7	29.2
Q60/pBE43	2.02±0.72	0.008	19.60±0.62	0.073	10.1	4.5

注: 肌苷转化率 = $c_{\text{利巴韦林}} / (c_{\text{利巴韦林}} + c_{\text{肌苷}})$.

由表 2 可以看出重组菌 Q60/pBEpupG 的利巴韦林产量比 Q60/pBEdeoD 高 32.5%; Q60/pBSApupG 的利巴韦林产量比 Q60/pBSAdeoD 高 39.6%, 说明过表达 PNP₈₁₆ 更有利于利巴韦林的合成. 胞外分泌型过表达重组菌 Q60/pBSAdeoD 的产量比 Q60/pBEdeoD 高 9.6%; Q60/pBSApupG 比 Q60/pBEpupG 高 15.5%, 4 株重组菌的 TCA 利用率也呈现同样的趋势, 与对照菌相比, 分别提高了 3.2 ~ 5.5 倍, 说明 PNP 的分泌表达有利于利巴韦林的合成.

3 讨论

发酵法合成利巴韦林需要核苷作为前体物, PNP 作为催化剂. 研究表明 3 种嘌呤核苷中肌苷是最适底物, 所以本研究以肌苷生产菌作为出发菌, 构建 4 株不同类型的 PNP 过表达菌株, 通过外源添加 TCA 的方法将利巴韦林的合成和肌苷的发酵相偶联, 随着菌体生长、前体物肌苷的积累和酶的表达, 实现一步

法合成利巴韦林.

发酵结果显示,在肌苷生产菌中过表达 PNP₈₁₆ 利巴韦林的合成效率和底物 TCA 的利用率都高于 PNP₇₀₂,这与已发表的研究结果一致. Xie 等^[9]发现当以肌苷作为反应底物时,PNP₇₀₂ 和 PNP₈₁₆ 的酶促动力学参数 K_m 值分别为 $(1.23 \pm 0.01) \mu\text{mol/L}$ 和 $(0.31 \pm 0.01) \mu\text{mol/L}$,PNP₈₁₆ 具有更强的亲和力,所以利巴韦林产量更高.另外三聚体酶蛋白每形成 1 个具有催化活性的酶分子需要 3 条肽链;而六聚体酶蛋白每形成 1 个具有催化活性的酶分子需要 6 条肽链,当利用同样的表达质粒,在同样的发酵条件下,相同时间的转录量相近,三聚体形成具有催化活性的酶分子所需要的能量少于六聚体,效率更高^[10].

利巴韦林的合成过程中外源添加的底物 TCA 存在于发酵液中,将 PNP 分泌到胞外可能会提高反应效率,实验结果也显示分泌过表达重组菌的利巴韦林产量和 TCA 的利用率都高于胞内表达的重组菌,但是肌苷的利用率并没有胞内表达高.利巴韦林是核苷类似物,含有 1 分子 5-磷酸核糖,从两种核苷类产物的总量上看,分泌表达比胞内表达积累的核苷总量更高,可能原因是底物肌苷直接与 TCA 在胞外进行反应,减少了 TCA 跨膜输入和利巴韦林跨膜输出的消耗,菌株的负担更小.转化率低的可能是酶的表达方式不同,导致酶量和活性方面存在差异;另外,胞内和胞外的催化环境不同,酶的催化活性也可能受到了影响^[11].

研究表明^[12]:当催化以肌苷为底物反应时的催化活性设定为酶活标准(100%)时,PNP₇₀₂ 催化鸟苷的活性为 46.2%;PNP₈₁₆ 催化鸟苷的活性为 87.7%;等质量的纯化重组 PNP 在磷酸盐缓冲液中以鸟苷为核糖基供体时两种酶的利巴韦林终产率均略高于肌苷.理论上鸟苷的分解产物鸟嘌呤较肌苷的分解产物次黄嘌呤溶解性低,有利于反应向利巴韦林合成方向进行^[13];但是目前还未见通过改造鸟苷生产菌提高 PNP 活性来研究利巴韦林合成的相关报道.因此,今后的研究方向可以考虑以鸟苷作为核苷前体物,对鸟苷高产菌进行改造,提高其 PNP 的酶活性,研究对利巴韦林合成的影响.

参考文献:

- [1] 郑人华,孙莉,裴文.三氮唑核苷合成研究进展[J].浙江工业大学学报,2003,31(3):336-339.
- [2] 张绍谭,倪孟祥,阮期平.核苷类药物的酶法合成[J].药学进展,2005,29(2):56-62.
- [3] 古屋晃,菊地惠子,佐藤章.发酵法生产利巴韦林:日本,17830[P].1979-07-03.
- [4] 武改红,赵希景,徐庆阳,等.微生物发酵法生产利巴韦林的初步研究[J].中国医药工业杂志,2007,38(10):701-705.
- [5] 谢希贤,武改红,陈宁.利巴韦林混合菌发酵工艺条件优化[J].现代化工,2007,27(增刊2):303-305.
- [6] 郭勇莉,丁庆豹,欧伶,等.酶法合成抗病毒药物阿糖腺苷[J].生物技术,2006,16(1):32-35.
- [7] Bzowska A, Kulikowska E, Shugar D. Purine nucleoside phosphorylases: Properties, functions, and clinical aspects[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2000, 88(3): 349-425.
- [8] 蔡显鹏,储炬,庄英萍,等.芽孢杆菌生产嘌呤核苷研究进展[J].中国生物工程杂志,2002,22(5):9-14.
- [9] Xie X X, Xia J G, He K F, et al. Low-molecular-mass purine nucleoside phosphorylase: Characterization and application in enzymatic synthesis of nucleoside antiviral drugs[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(6): 1107-1112.
- [10] 沈同,王镜岩.生物化学[M].北京:高等教育出版社,1993.
- [11] 邱蔚然,唐孝宣,沈荣坤.酶法生产三氮唑核苷的进展[J].中国生化药物杂志,1995,16(2):87-90.
- [12] Shi S B, Shen Z, Chen X, et al. Increased production of riboflavin by metabolic engineering of the purine pathway in *Bacillus subtilis*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 46(4): 28-33.
- [13] 夏俊刚,何逵夫,谢希贤,等.枯草芽孢杆菌嘌呤核苷磷酸化酶酶学性质研究及在利巴韦林酶法合成中的应用[J].中国生物工程杂志,2010,30(12):53-59.

责任编辑:周建军