



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20180080

## 增加雷斯青霉 $15\alpha$ -羟化酶基因拷贝数提高甾体转化效率

李雪龙<sup>1</sup>, 李改<sup>1</sup>, 谢东奇<sup>1</sup>, 金鹏<sup>2</sup>, 毛淑红<sup>1</sup>, 王正祥<sup>2</sup>, 刘晓光<sup>2</sup>

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 天津科技大学化工与材料学院, 天津 300457)

**摘要:** 孕二烯酮是第三代高效避孕药的主要成分. 雷斯青霉 (*Penicillium raistrickii*) ATCC10490 催化甾体左旋乙基甾烯双酮的  $C15\alpha$ -羟基化反应合成孕二烯酮的重要中间体  $C15\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮. 为了提高现有生产菌株的转化效率, 本文研究了在雷斯青霉 ATCC10490 中增加甾体  $C15\alpha$ -羟化酶基因 (*PRH*) 拷贝数对转化效率的影响. 分别构建了 *PRH* 基因的诱导型和组成型过表达载体 pPZP-p800-*PRH* 和 pPZP-TrpC-*PRH*, 并通过同源重组的方法定点整合到雷斯青霉基因组. 转化实验表明, 在出发菌株中增加一个 *PRH* 基因拷贝显著提高了甾体左旋乙基甾烯双酮转化效率, 重组菌 PRH-P800 和 PRH-TrpC 的摩尔转化率分别提高了 13% 和 20%, 同时转化时间均缩短了 12 h.

**关键词:** 雷斯青霉; 孕二烯酮;  $15\alpha$ -羟化酶; 左旋乙基甾烯双酮

中图分类号: Q781

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2019)04-0016-06

## Increasing $15\alpha$ -Hydroxylase Gene Copy Number in *Penicillium raistrickii* to Enhance the Transformation Efficiency of Steroid

LI Xuelong<sup>1</sup>, LI Gai<sup>1</sup>, XIE Dongqi<sup>1</sup>, JIN Peng<sup>2</sup>, MAO Shuhong<sup>1</sup>,  
WANG Zhengxiang<sup>2</sup>, LIU Xiaoguang<sup>2</sup>

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. College of Chemical Engineering and Materials Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Gestodene is the main component of the third generation of high-performance contraceptives. *Penicillium raistrickii* ATCC10490 can catalyze  $15\alpha$ -hydroxylation of steroid  $13\beta$ -ethyl-4-gonene-3,17-dione to synthesize  $15\alpha$ -hydroxy- $13\beta$ -ethyl-4-gonene-3,17-dione, a key intermediate of gestodene. To improve the transformation efficiency of *P. raistrickii* ATCC10490, the effect of copy number of  $15\alpha$ -hydroxylase gene (*PRH*) in ATCC10490 on steroid transformation efficiency was studied. Vectors pPZP-p800-*PRH* and pPZP-TrpC-*PRH* for inducible and constitutive expression of *PRH* were constructed and integrated into the targeted genome region of ATCC10490 by homologous recombination. Transformation experiments showed that the addition of extra copy of *PRH* in ATCC10490 significantly increased the conversion of  $13\beta$ -ethyl-4-gonene-3,17-dione. The molar transformation rates of the two engineered strains PRH-P800 and PRH-TrpC, compared with the starting strain, increased by 13% and 20%, respectively, while the transformation time was shortened by 12 h.

**Key words:** *Penicillium raistrickii*; gestodene;  $15\alpha$ -hydroxylase;  $13\beta$ -ethyl-4-gonene-3,17-dione

甾体药物在临床上主要用于治疗类风湿性关节炎、哮喘、抗病毒、抗肿瘤和生育控制, 此外还用于麻醉和心血管、淋巴白血病等疾病的治疗, 是仅次于抗生素的第二大类药物<sup>[1-3]</sup>.

孕激素中孕二烯酮避孕效果好、副作用小, 是第

三代高效口服避孕药的主要成分<sup>[4-5]</sup>.  $15\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮是合成口服避孕药孕二烯酮的关键中间体, 过去主要通过有机合成来完成; 但化学合成具有反应步骤多且专一性不强、得率低、使用大量有机溶剂等缺点<sup>[6]</sup>. 目前工业上已采用微生物转化的生产

收稿日期: 2018-03-20; 修回日期: 2018-05-05

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2011AA02A211)

作者简介: 李雪龙(1993—), 男, 河南周口人, 硕士研究生; 通信作者: 刘晓光, 教授, liu\_xg@tust.edu.cn

工艺,主要利用丝状真菌雷斯青霉(*Penicillium raistrickii*)细胞催化直接在左旋乙基甾烯双酮的 C15 $\alpha$ 位引入羟基,合成 15 $\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮<sup>[7]</sup>.

课题组前期根据该菌种转录组测序的结果,从预测的 61 个细胞色素 P450 基因中筛选出 15 个候选 C15 $\alpha$ -羟化酶 CYP 基因,并利用实时荧光定量 PCR 定量扩增考察了菌株底物诱导与非诱导条件下候选基因的表达差异情况,最终确定了 12820 和 6138 两个基因受菌株底物的高度诱导. 菌株转化实验表明, 6138 基因(简称 8 号)对左旋乙基甾烯双酮没有转化活性,而 12820 基因能够转化左旋乙基甾烯双酮,生成 15 $\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮,表明 12820 基因为 15 $\alpha$ -羟化酶基因. 从雷斯青霉 ATCC10490 中克隆鉴定了参与左旋乙基甾烯双酮 C15 $\alpha$ -羟化反应的基因 12820 (*PRH*),该基因编码一种细胞色素 P450 羟化酶<sup>[8]</sup>,其羟化反应所需的电子由雷斯青霉 NADPH-细胞色素 P450 还原酶提供<sup>[9]</sup>.

转化效率偏低是目前工业上利用雷斯青霉转化左旋乙基甾烯双酮急需解决的问题(底物投料 2 g/L,转化 60 h,摩尔转化率 75%). 为了增加左旋乙基甾烯双酮 C15 $\alpha$ -羟化效率,本文通过增加 C15 $\alpha$ -羟化酶基因 *PRH* 的拷贝数以提高其表达水平. 考虑大多数真菌的细胞色素 P450 酶位于微球体的膜上,而 8 号预测编码一个受菌株底物高度诱导的 P450 酶,将 *PRH* 基因定点整合至雷斯青霉 ATCC10490 基因组的 8 号基因位点,导致 8 号基因失活. 这样一方面增加了 15 $\alpha$ -羟化酶基因的拷贝数,另一方面微球体膜可能有多余的空间容纳过表达的目标 C15 $\alpha$ -羟化酶. 鉴于雷斯青霉 C15 $\alpha$ -羟化酶基因的表达受底物左旋乙基甾烯双酮的高度诱导<sup>[9-10]</sup>,分别构建过表达载体 pPZP-p800-*PRH* 和 pPZP-TrpC-*PRH*,使 *PRH* 基因的表达受本身的诱导型启动子或外源组成型启动子的控制,通过同源重组的方法定点整合到雷斯青霉的基因组,达到增加基因拷贝数的目的,以期获得转化效率提高的基因工程菌株.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

雷斯青霉(*Penicillium raistrickii*) ATCC10490、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) AGL-1,天津科技大学微生物菌种保藏中心. 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 以及质粒 pCSN44、pPZP-*HYG2* 均为本实

验保存.

#### 1.1.2 酶与试剂

限制性内切酶(*EcoR* I、*Not* I、*Sac* I、*Hind* III、*Kpn* I)、Solution I 连接试剂盒及 Pyrobest DNA 聚合酶, Takara 公司; 甲醇、乙腈、乙酸乙酯及石油醚,天津市化学试剂六厂; 其他常规试剂为进口分装或国产分析纯. 引物的合成及序列的测定由北京华大公司完成.

#### 1.1.3 主要溶液及缓冲液

K buffer: 用 1.25 mol/L  $K_2HPO_4$  溶液调节 1.25 mol/L  $KH_2PO_4$  溶液的 pH = 4.8, 121 °C 灭菌 20 min 备用.

MN buffer: 3.0 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1.5 g NaCl 溶于去离子水,定容至 100 mL, 121 °C 灭菌 20 min 备用.

IM Trace elements: 0.1 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.1 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、0.1 g  $H_3BO_3$ 、0.1 g  $MnSO_4$ 、0.1 g  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  溶于去离子水,定容至 100 mL, 121 °C 灭菌 20 min 备用.

APS + N: 2.61 g KCl、7.48 g  $KH_2PO_4$ 、29.75 g  $NaNO_3$  用去离子水溶解,定容至 100 mL,用 5 mol/L 的 KOH 溶液调节 pH = 5.5, 121 °C 灭菌 20 min 备用.

CM Trace elements: 2.1 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1.1 g  $H_3BO_3$ 、0.5 g  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 、0.5 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.17 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、0.15 g  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、5.1 g EDTA 用去离子水溶解,定容至 100 mL, 121 °C 灭菌 20 min 备用.

#### 1.1.4 培养基

PDA 培养基(g/L): 土豆 200, 葡萄糖 20, 115 °C 灭菌 15 min.

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, NaCl 10, 酵母粉 5, 121 °C 灭菌 20 min.

YPD 培养基(g/L): 蛋白胨 20, 酵母粉 10, 葡萄糖 20, 115 °C 灭菌 20 min.

诱导培养基(IM): 900 mL 去离子水, 121 °C 灭菌 20 min. 加入预先灭菌的 K buffer 0.8 mL、MN buffer 20 mL、1%  $CaCl_2$  溶液 1 mL、0.01%  $FeSO_4$  溶液 10 mL、IM Trace elements 5 mL、20%  $NH_4NO_3$  溶液 2.5 mL、1 mol/L MES 40 mL、50% 甘油 10 mL、20% 葡萄糖 10 mL, 摇匀备用. 固体培养基将去离子水中加入 15 g 琼脂粉, 121 °C 灭菌 20 min 备用.

真菌生长完全培养基(CM): 在 900 mL 去离子水中加入琼脂粉 15 g, 121 °C 灭菌 20 min. 使用前用微波炉加热至琼脂完全溶解, 然后加入预先灭菌的 APS + N 20 mL、1 mol/L  $MgSO_4$  溶液 2 mL、CM Trace

elements 1 mL、10% 酪蛋白水解物 10 mL、10% 酵母浸出物 50 mL、50% 葡萄糖 20 mL.

### 1.1.5 甾体化合物

左旋乙基甾烯双酮(底物,英文缩写 GD)和 15 $\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮(产物,英文缩写 15 $\alpha$ -OH-GD)均由北京紫竹药业有限公司提供.

## 1.2 方法

### 1.2.1 雷斯青霉 ATCC10490 重组菌的构建

为了将 C15 $\alpha$ -羟化酶基因 *PRH* 定点整合至雷斯青霉 ATCC10490 基因组的 8 号位点<sup>[8]</sup>,以雷斯青霉的 8 号基因为同源臂,设计引物(8-L-F/R 和 8-R-F/R),以雷斯青霉基因组为模板,PCR 得到同源臂.用 *Hind*III 和 *Xba*I 双酶切质粒 pCSN44,胶回收后得到潮霉素抗性基因(*HYG*, 2.2 kbp).用 *Sac*I 和 *Kpn*I 双酶切质粒 pBluescript II KS+,回收后得到 3.0 kbp 的线性载体骨架片段.用引物(PRH-TT-F/R、p800-PRH-TT-F/R),以雷斯青霉基因组为模板,PCR 扩增得到 PRH-TT 和 p800-PRH-TT,用 *Xba*I 和 *Hind*III 双酶切 *HYG*,获得 *TrpC* 启动子.将上述酶切体系进行切胶回收,获得目的片段与载体.

引物序列为 8-L-F:GGTACCTTCACTTTGCT TGGATTGAGCG, 8-L-R:AAGCTTACTTGAGAT TACTGAGGATGATGG; 8-R-F:GAATTCGCCGAAT AAGCAAGTCGAATG, 8-R-R:GAGCTCGATAGTC TCGAACTTACTTGCGTC; PRH-TT-F:AAGCTTAT GGCTGTCCTCACCGAATTG, PRH-TT-R:GAATTC TTGTGCGGTCTGGAGTTCATG; p800-PRH-TT-F:TCTAGAGAGACTCAAGGCGTAGCTCCAG, p800-PRH-TT-R:GAATCTTGTGCGGTCTGGAGTTCATG.

将回收的目的片段与载体连接分别得到重组质粒 pBlue-L-HYG、pBlue-p800-PRH-TT-R 和 pBlue-*TrpC*-PRH-TT-R.使用 *Sac*I 和 *Xba*I 双酶切重组质粒 pBlue-L-HYG,胶回收片段 pBlue-L-HYG;使用 *Sac*I 和 *Xba*I 分别双酶切重组质粒 pBlue-p800-PRH-TT-R 和 pBlue-*TrpC*-PRH-TT-R,胶回收片段 p800-PRH-TT-R 和 *TrpC*-PRH-TT-R.将 pBlue-L-HYG 分别与 p800-PRH-TT-R 和 *TrpC*-PRH-TT-R 两个片段进行连接,将连接产物分别转化 *E. coli* JM109,得到相应的重组质粒:pBlue-L-HYG-p800-PRH-TT-R 和 pBlue-L-HYG-*TrpC*-PRH-TT-R.

采取 DNA 体外重组的方法分别构建雷斯青霉甾体 15 $\alpha$ -羟化酶的 2 个表达载体:pPZP-L-HYG-p800-PRH-TT-R 和 pPZP-L-HYG-*TrpC*-PRH-TT-R.

### 1.2.2 雷斯青霉 ATCC10490 孢子悬液的制备

用接种环将雷斯青霉 ATCC10490 的孢子划线接种于 PDA 试管斜面上,28 °C 培养 3~5 d.待孢子成熟后,用预先灭菌的 1 mol/L 山梨醇溶液洗涤,用灭菌的玻璃珠将其打散(震荡约 15~30 min),用血球计数板计数,再稀释至相应浓度,分装,4 °C 保存备用.

### 1.2.3 根癌农杆菌 AGL-1 的转化和培养

将重组菌(pPZP-L-HYG-p800-PRH-TT-R 和 pPZP-L-HYG-*TrpC*-PRH-TT-R)通过电击转化的方法转入根癌农杆菌 AGL-1 感受态中,挑取长势良好的转化子,进行菌落 PCR 验证.PCR 引物为 HYG-F/HYG-R, HYG-F:GTACCTGTGCATTCTGGGTAA ACG, HYG-R:TGTTTATCGGCACTTTGCATCGGC.

将验证成功的阳性单克隆转化子在 LB(含卡那霉素 50  $\mu$ g/mL)平板上划线,28 °C 培养 72 h 后放于 4 °C 备用.

将根癌农杆菌接种于 5 mL LB 液体培养基中,28 °C、200 r/min 摇床培养 24 h 后,转接于装有 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 的摇瓶中,28 °C、200 r/min 摇床培养至  $A_{600} = 0.8$ ;5 000 r/min 离心 10 min,弃上清液.使用 IM 培养基重悬菌体,28 °C、200 r/min 摇床诱导培养 5 h.将诱导好的根癌农杆菌与雷斯青霉孢子悬液按体积比 1:1 均匀混合,涂布于 IM 平板上,25 °C 共培养 48 h.用 1 mL 生理盐水将菌丝洗下,并用涂布器打碎涂布于 CM 平板上.

### 1.2.4 雷斯青霉过表达转化子的筛选与验证

待 CM 平板上生长出单菌落,在其产孢前,随机挑选雷斯青霉阳性转化子于含 300  $\mu$ g/mL HYG 抗性的 PDA 平板进行复筛,于 28 °C 培养箱培养 3~5 d.挑取长势良好的菌落于含有 300  $\mu$ g/mL HYG 抗性的 PDA 试管斜面中,28 °C 培养箱培养 3~4 d.待试管中转化子产生孢子后,用生理盐水将孢子洗下并保菌.余下的孢子悬液接种于 PDA 液体培养基培养菌丝,提取雷斯青霉转化子的基因组,并以雷斯青霉出发菌株基因组作为对照,以 L-F、HYG-R 为引物进行 PCR 验证.L-F:CAGAACTTCTCGACAGACG T, HYG-R:GATCTTCCAAACCACATAGGTG.

### 1.2.5 重组雷斯青霉 *PRH* 基因的拷贝数检测

本课题组前期从雷斯青霉 ATCC10490 中克隆鉴定了参与左旋乙基甾烯双酮 C15 $\alpha$ -羟化反应的基因 *12820*(*PRH*),根据 *PRH* 基因的 cDNA 的序列设计目的基因的引物 PRH-F 和 PRH-R,根据转录组测序结果中提供的内参 cDNA 基因序列设计一对特异性引

物 tublin-F 和 tublin-R, 该基因是雷斯青霉整个生长过程中表达稳定的内参基因. PRH-F: GAATTCATG GCTGTCCTCACCGAAT, PRH-R: CTCGAGCTACT CTCCCAAGAACTCA; Tublin-F: AACCATCTCCG GTGAGCACG, Tublin-R: GCATGCAGATATCGTAC AGAGC.

将过表达 PRH 基因与内参基因进行实时荧光定量 PCR (Real-time PCR). 反应体系 (20  $\mu$ L): 2  $\times$  SYBR Green Mix 10  $\mu$ L, ROX 0.4  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ L, 模板 (基因组) 1  $\mu$ L, dd H<sub>2</sub>O 7.6  $\mu$ L. 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 10 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环. 实验过程中 Ct 值表明扩增产物的荧光信号达到设定阈值时所经过的扩增循环数, 利用每个模板的 Ct 值与该模板起始拷贝数的对数存在的线性关系, 以检测不同菌株之间表达差异. 表达差异倍数按照文献[11]方法计算.

#### 1.2.6 雷斯青霉重组菌的菌体转化实验

鉴于雷斯青霉 C15 $\alpha$ -羟化酶基因的表达受底物左旋乙基甾烯双酮的高度诱导, 其 PRH 基因前面是诱导型启动子. 为提高雷斯青霉对甾体底物的转化效率, 后续实验中在 PRH 基因前面添加一个组成型启动子 TrpC. 为了初步探索重组菌的甾体 15 $\alpha$ -羟化活性, 将雷斯青霉出发菌株、诱导型 PRH-p800 重组菌株和组成型 PRH-TrpC 重组菌株各 1 mL (计数为 10<sup>7</sup>) 到 30 mL YPD 培养基中, 24 h 后加入 2 g/L 的左旋乙基甾烯双酮, 分别诱导转化 12、24、36、48、60、72、84 h, 28  $^{\circ}$ C、180 r/min 培养, 适时取样测定转化率.

#### 1.2.7 硅胶薄层层析(TLC)分析

取 1 mL 菌体发酵液, 加入 500  $\mu$ L 的乙酸乙酯混匀, 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清液 (乙酸乙酯层)

200  $\mu$ L, 用直径为 0.2 mm 的毛细管点样于硅胶层析板上. 在距层析板边缘 1 cm 处点样, 样点间距 0.5 cm. 在展开之前用展开剂将层析缸饱和 30 min. 将点有样品的硅胶板放入层析缸中展开, 加盖, 密封, 待展开剂前沿快到顶端时, 取出点样板, 烘干. 采用紫外检测仪观察转化产物.

#### 1.2.8 转化产物的高效液相色谱(HPLC)分析

取样萃取后静置, 取 100  $\mu$ L 上层有机相于干净的 1.5 mL EP 管中, 待乙酸乙酯挥发完, 加入 100  $\mu$ L 乙腈溶解后用 0.22  $\mu$ m 膜过滤. 色谱条件: 色谱柱为 C18 柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为乙腈-水溶液 (体积比为 4 : 1), 流量 0.8 mL/min, 柱温 25  $^{\circ}$ C, 进样量 10  $\mu$ L, 检测波长 240 nm.

#### 1.2.9 雷斯青霉重组菌转化效率测定

通过色谱图中生物转化产物曲线下的峰面积确定获得的 HGD 的质量. GD 到 15 $\alpha$ -OH-GD (HGD) 的摩尔转化率按照式 (1) 计算<sup>[12]</sup>.

$$\text{摩尔转化率} = \frac{m_{\text{HGD}} / M_{\text{HGD}}}{m_{\text{GD}} / M_{\text{GD}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $m_{\text{HGD}}$  和  $m_{\text{GD}}$  分别为 HGD 和 GD 的质量,  $M_{\text{HGD}}$  和  $M_{\text{GD}}$  分别为 HGD 和 GD 的相对分子质量.

## 2 结果与分析

### 2.1 雷斯青霉 ATCC10490 诱导型启动子与组成型启动子过表达载体的构建

为了改进现有生产菌种雷斯青霉 ATCC10490 转化 GD 合成 15 $\alpha$ -OH-GD 的效率, 探讨增加目标基因 PRH 拷贝数对 GD 转化活性的影响. 首先构建 GD15 $\alpha$ -羟化酶基因 PRH 的表达载体, 表达载体构建示意图如图 1 所示.

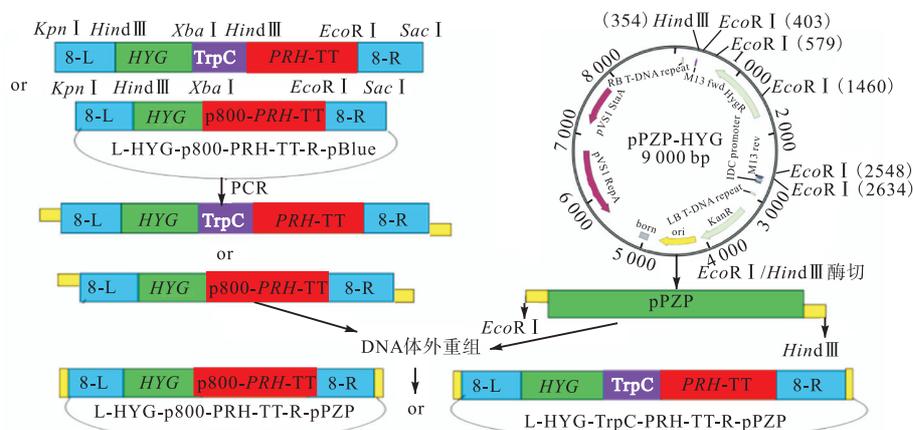


图 1 过表达载体构建示意图

Fig. 1 Schema of overexpression vector construction

构建的过表达载体,将重组质粒分别进行酶切分析.载体 pPZP 为 6.7 kbp,其中 *HYG* 抗性基因及其启动子为 2.2 kbp, p800-*PRH*-TT 片段为 3.3 kbp, *TrpC*-*PRH*-TT 片段为 2.8 kbp. 经 *Xho* I/*Xba* I 双酶切后,琼脂糖凝胶电泳结果(图 2(a))显示约 10 kbp 的载体片段和 3.3 kbp 的目的基因片段,证实过表达载体构建成功,命名为 pPZP-L-*HYG*-p800-*PRH*-TT-R. 而经 *Hind* III 单酶切后 3 个片段应为 7.9、2.7、2.5 kbp. 酶切电泳结果(图 2(b))显示所得片段大小与理论值一致,证实 *PRH* 基因组成型过表达载体构建成功,表达载体命名为 pPZP-L-*HYG*-*TrpC*-*PRH*-TT-R.

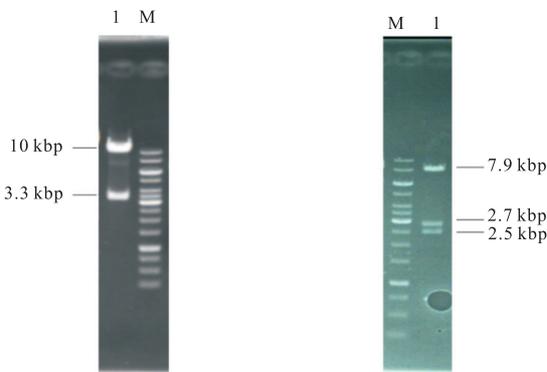


图 2 过表达载体的酶切验证  
 (a) pPZP-L-*HYG*-p800-*PRH*-TT-R (b) pPZP-L-*HYG*-*TrpC*-*PRH*-TT-R  
 M. 10 kbp DNA ladder; (a) 中 1. 重组表达载体酶切验证 (*Xba* I + *Xho* I); (b) 中 1. 重组表达载体酶切验证 (*Hind* III).

图 2 过表达载体的酶切验证

Fig. 2 Enzymatic digestion verification of overexpression vector

### 2.2 雷斯青霉过表达载体转化根癌农杆菌

将过表达载体 pPZP-L-*HYG*-p800-*PRH*-TT-R 和 pPZP-L-*HYG*-*TrpC*-*PRH*-TT-R 电转至已经制备好的根癌农杆菌感受态中. 因为载体在根癌农杆菌 AGL-1 中的拷贝数较低,因此无法通过质粒提取的方法验证载体是否成功转化至根癌农杆菌,需通过菌落 PCR 的方法验证载体是否成功转化至根癌农杆菌 AGL-1. PCR 结果如图 3 所示,菌落 PCR 得到约 2.1 kbp 的条带,与 *HYG* 基因设计引物 PCR 预测结果大小一致,证实过表达载体 pPZP-L-*HYG*-p800-*PRH*-TT-R 和 pPZP-L-*HYG*-*TrpC*-*PRH*-TT-R 已经成功转入根癌农杆菌 AGL-1 中.

### 2.3 雷斯青霉重组菌株的鉴定

利用根癌农杆菌介导雷斯青霉 ATCC10490 转化,将 15 $\alpha$ -羟化酶基因 *PRH* 表达盒转入雷斯青霉中,通过同源重组定点整合的方式增加雷斯青霉

*PRH* 基因的拷贝数. 同源重组的原理及基因重组菌株验证策略见图 4. 将过表达重组菌株的基因组作为模板,以 L-F、*HYG*-R 为引物进行 PCR 验证. 扩增结果如图 5 所示,PCR 产物大小约为 1.2 kbp 条带,与理论结果大小一致,表明成功得到了过表达 *PRH* 基因重组菌株.

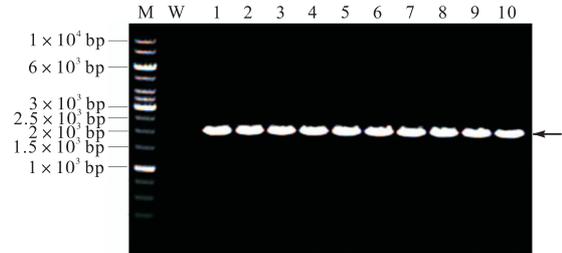


图 3 根癌农杆菌 AGL-1 pPZP-L-*HYG*-p800-*PRH*-TT-R 和 pPZP-L-*HYG*-*TrpC*-*PRH*-TT-R 转化子菌落 PCR 验证  
 M. 10 kbp DNA ladder; W. 根癌农杆菌 AGL-1 野生型; 1—10. 电转根癌农杆菌转化子

图 3 根癌农杆菌 AGL-1 pPZP-L-*HYG*-p800-*PRH*-TT-R 和 pPZP-L-*HYG*-*TrpC*-*PRH*-TT-R 转化子菌落 PCR 验证

Fig. 3 PCR verification of the *A. tumefaciens* AGL-1 transformants of pPZP-L-*HYG*-p800-*PRH*-TT-R and pPZP-L-*HYG*-*TrpC*-*PRH*-TT-R

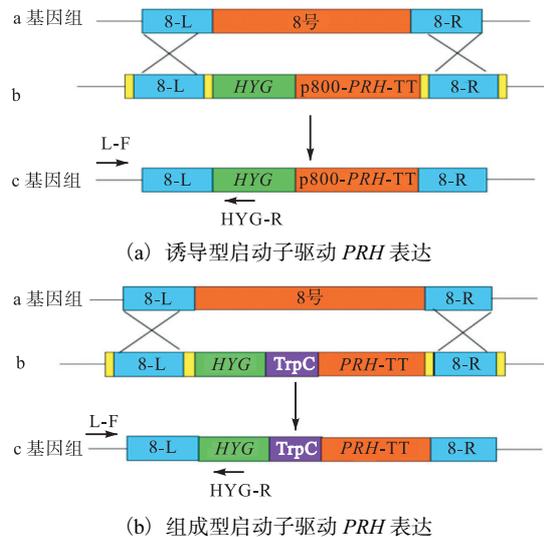


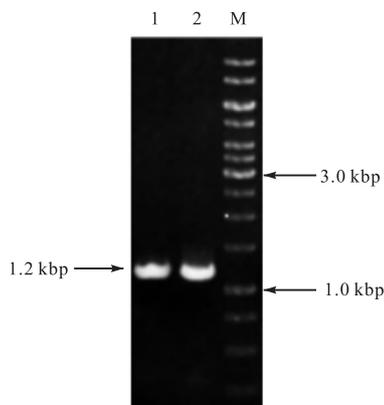
图 4 PRH-P800 和 PRH-*TrpC* 基因表达盒定点整合

Fig. 4 Targeted integration of PRH-P800 and PRH-*TrpC* expression cassette

### 2.4 PRH 过表达重组菌株拷贝数的确定

利用实时定量 PCR 检测野生型菌株、诱导型菌株 PRH-P800 和组成型菌株 PRH-*TrpC* 的 *PRH* 基因拷贝数. 基因组 DNA 定量 PCR 扩增结果(图 6)显示:如果将野生型菌株 *PRH* 基因的相对拷贝数定量为 1.0015,则菌株 PRH-P800 的 *PRH* 基因相对拷贝数为 2.0433,菌株 PRH-*TrpC* 的相对拷贝数为 1.8462. 这说明重组菌的 *PRH* 基因相对拷贝数是野

生菌的2倍,达到预期结果。



M. 10 kbp DNA ladder; 1. 过表达菌株 PRH-P800 转化子; 2. 过表达菌株 PRH-TrpC 转化子

图5 重组菌 PCR 验证

Fig. 5 PCR validation of recombinant strains

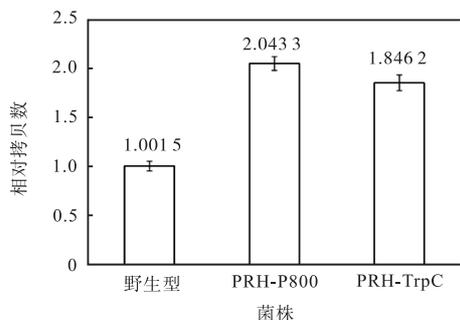


图6 雷斯青霉重组菌株 PRH 基因拷贝数的定量 PCR 测定

Fig. 6 Determination of PRH copy number in *P. raistrickii* recombinant strains with qPCR

## 2.5 增加甾体羟化酶基因一个拷贝对转化效率的影响

为了考察雷斯青霉重组菌株的左旋乙基甾烯双酮 15 $\alpha$ -羟化酶活性,比较了野生型菌株、诱导型启动子重组菌株 PRH-P800 和组成型启动子重组菌株 PRH-TrpC 在底物投样量为 2 g/L 时左旋乙基甾烯双酮转化情况。15 $\alpha$ -羟化酶的特异性强,在转化产物中几乎没有副产物产生,但是在工业上转化效率偏低,增加甾体羟化酶基因一个拷贝后,与野生型菌株相比较,过表达 PRH 基因重组菌株对左旋乙基甾烯双酮的转化效率明显提高。实验结果如图 7 所示,重组菌 PRH-TrpC 在 48 h 左右摩尔转化率最高达到 90%,重组菌 PRH-P800 在 48 h 左右摩尔转化率达到 85%,而野生型菌株在 60 h 左右才达到 75%。以上结果表明 PRH 基因重组菌株 PRH-P800 同出发菌株相比摩尔转化率高出 13%,PRH-TrpC 同出发菌株相比摩尔转化率高出 20%,而且转化时间均缩短了 12 h。

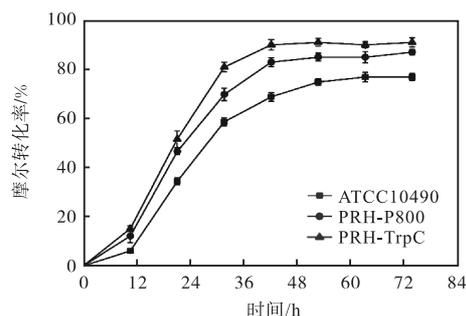


图7 不同雷斯青霉过表达 PRH 基因重组菌株的 GD 转化曲线

Fig. 7 Transformation curves of GD by PRH-overexpressing recombinant *P. raistrickii* strains

## 3 结语

本文考察了增加雷斯青霉 ATCC10490 C15 $\alpha$ -羟化酶基因 PRH 的拷贝数对转化左旋乙基甾烯双酮效率的影响。分别构建了 PRH 基因的诱导型和组成型过表达载体 pPZP-P800-PRH 和 pPZP-TrpC-PRH,并通过同源重组的方法定点整合到雷斯青霉基因组。转化实验表明,在出发菌株中增加一个 PRH 基因拷贝显著提高了甾体左旋乙基甾烯双酮转化效率,重组菌 PRH-P800 和 PRH-TrpC 的摩尔转化率分别提高了 13% 和 20%,同时转化时间均缩短了 12 h。

## 参考文献:

- [1] Fernandes P, Cruz A, Angelova B, et al. Microbial conversion of steroid compounds: Recent developments[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32(6): 688-705.
- [2] Bhatti H N, Khera R A. Biological transformations of steroidal compounds: A review[J]. Steroids, 2012, 77(12): 1267-1290.
- [3] 韩广甸, 韩卫亚. 关于我国皮质激素药物的发展策略[J]. 中国医药工业杂志, 1997, 28(12): 559-562.
- [4] Fotherby K, Caldwell A D. New progestogens in oral contraception[J]. Contraception, 1994, 49(1): 1-32.
- [5] Lemus A E, Zaga V, Santillán R, et al. The oestrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-ring reduced metabolites[J]. Journal of Endocrinology, 2000, 165(3): 693-702.
- [6] 陈绍怡, 杨秀, 秦玉静. 手性药物合成中的生物转化[J]. 生物工程进展, 2000, 20(4): 60-63.

(下转第 29 页)

- toris*[J]. *Protein Expression & Purification*, 2016, 127: 35–43.
- [ 20 ] Peng H, Liu H P, Chen B, et al. Optimized production of scygonadin in *Pichia pastoris* and analysis of its antimicrobial and antiviral activities[J]. *Protein Expression & Purification*, 2012, 82(1): 37–44.
- [ 21 ] Meng D M, Lv Y J, Zhao J F, et al. Efficient production of a recombinant *Venerupis philippinarum* defensin (VpDef) in *Pichia pastoris* and characterization of its antibacterial activity and stability[J]. *Protein Expression & Purification*, 2018, 147: 78–84.
- [ 22 ] Jung S, Sönnichsen F D, Hung C W, et al. Macin family of antimicrobial proteins combines antimicrobial and nerve repair activities[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(17): 14246–14258.
- [ 23 ] Shen W, Chen Y, Yao H, et al. A novel defensin-like antimicrobial peptide from the skin secretions of the tree frog, *Theloderma kwangsiensis*[J]. *Gene*, 2016, 576(1): 136–140.
- [ 24 ] Cao X, Zhang Y, Mao R, et al. Design and recombination expression of a novel plectasin-derived peptide MP1106 and its properties against *Staphylococcus aureus*[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2015, 99(6): 2649–2662.
- [ 25 ] Fjell C D, Hiss J A, Hancock R E, et al. Designing antimicrobial peptides: Form follows function[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2011, 11(1): 37–51.
- [ 26 ] Ahn H S, Cho W M, Kang S K, et al. Design and synthesis of novel antimicrobial peptides on the basis of  $\alpha$ -helical domain of Tenecin 1, an insect defending protein, and structure-activity relationship study[J]. *Peptides*, 2006, 27(4): 640–648.

责任编辑: 郎婧

(上接第 21 页)

- [ 7 ] 杨柳青, 何南, 张玉彬. 手性药物的生物转化[J]. *中国新药杂志*, 2000, 9(12): 817–820.
- [ 8 ] Jia L G, Dong J Z, Wang R J, et al. Identification and characterization of the steroid 15 $\alpha$ -hydroxylase gene from *Penicillium raistrickii*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(1): 6409–6418.
- [ 9 ] 贾龙刚, 姜海琪, 郭凯, 等. 雷斯青霉 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因的克隆及生物信息学分析[J]. *天津科技大学学报*, 2016, 31(1): 27–30.
- [ 10 ] Irrgang S, Schlosser D, Schmauder H P. The steroid 15 $\alpha$ -hydroxylase of *Penicillium raistrickii* I 477 is inducible[J]. *Biotechnology Letter*, 1992, 14(1): 33–38.
- [ 11 ] 林本凤, 职亚飞, 刘晓光, 等. 黑曲霉 ATCC1015 催化 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -环氧黄体酮 11 $\alpha$ -羟基化及相关 P450 基因诱导表达[J]. *天津科技大学学报*, 2017, 32(6): 8–14.
- [ 12 ] Sripalakit P, Wichai U, Saraphanchotiwitthaya A. Bio-transformation of various natural sterols to androstenones by *Mycobacterium* sp. and some steroid-converting microbial strains[J]. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2006, 41(1/2): 49–54.

责任编辑: 郎婧