

# 宇佐美曲霉环氧化物水解酶基因的克隆与生物信息学分析

胡蝶<sup>1</sup>, 朱利娟<sup>2</sup>, 邬敏辰<sup>\*3</sup>, 汪俊卿<sup>1</sup>, 唐存多<sup>1</sup>, 冯峰<sup>2</sup>, 余涛<sup>2</sup>

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 环氧化物水解酶(Epoxide hydrolase, EH)是酶法拆分消旋体环氧化物, 制备光学活性环氧化物和邻二醇的重要酶之一。通过 RT-PCR 和新构建的 THSO-PCR 侧翼未知 DNA 序列扩增技术, 克隆了一种来源于宇佐美曲霉(*Aspergillus usamii*)E001 的 EH 基因, 命名为 *Aueh2* (GenBank No. KF061095), 并对该基因进行了相关生物信息学分析。*Aueh2* 的 DNA 序列长度为 2 481 bp, 其中包含了 5' 端和 3' 端侧翼调控序列, 6 个内含子序列和编码 cDNA 序列。开放阅读框序列长度为 1 188 bp, 编码 395 个氨基酸, 对应的蛋白质命名为 AuEH2; 该蛋白质为无信号肽的亲水蛋白质, 其理论相对分子质量 44.6 kD; 其三维结构包含 EH 典型的“ $\alpha/\beta$ ”核心催化结构域和“帽子”结构域, 活性中心由催化三联体 Asp<sup>191</sup>、His<sup>369</sup> 和 Glu<sup>343</sup> 组成。本课题研究成果为深入研究 AuEH2 及其应用奠定了基础。

**关键词:** 宇佐美曲霉; 环氧化物水解酶; 侧翼未知 DNA 序列; 基因克隆; 生物信息学分析

**中图分类号:** Q 78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)12—1244—09

## Cloning and Bioinformatics Analysis of Epoxide Hydrolase Gene from *Aspergillus usamii*

HU Die<sup>1</sup>, ZHU Li-Juan<sup>2</sup>, WU Min-Chen<sup>\*3</sup>, WANG Jun-Qing<sup>1</sup>, TANG Cun-duo<sup>1</sup>, FENG Feng<sup>2</sup>, YU Tao<sup>2</sup>

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Medicine Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Epoxide hydrolase can be effectively used in the resolution of epoxides for producing optically active epoxides and vicinal diols. A gene encoding a novel epoxide hydrolase from *Aspergillus usamii* E001 was cloned by using reverse transcription PCR and newly constructed T-hairpin structure-mediated PCR amplification (THSO-PCR) techniques. The cloned gene (named *Aueh2*) is 2,481 bp in length, harboring 5' and 3' flanking regulatory regions and the encoded cDNA sequence interrupted by six introns. The open reading frame of *Aueh2* encodes a protein of 395-aa (designated AuEH2) with the calculated molecular weight of 44.6 kD. The primary structure

收稿日期: 2013-06-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101229); 国家自然科学基金项目(31271811)。

\* 通信作者: 邬敏辰(1962—), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程研究。

E-mail: biowmc@126.com

analysis of AuEH2 demonstrated that it is a hydrophilic protein, and belongs to the  $\alpha/\beta$  hydrolase fold family. The structure of AuEH2 displays that the catalytic center is situated between the  $\alpha/\beta$  core domain and the lid domain with a catalytic triad consisting of Asp<sup>191</sup>, His<sup>369</sup>, and Glu<sup>343</sup>. The results will lay a foundation for further research of the AuEH2 and its application in depth.

**Keywords:** *Aspergillus usami*, epoxide hydrolase, unknown flanking DNA sequence, gene cloning, bioinformatics analysis

手性环氧化物和邻二醇是合成许多药物、农药、精细化工产品、香料等各种活性物质的重要中间体,具有广阔的应用前景和市场需求<sup>[1]</sup>。环氧化物水解酶(EC 3.3.2.x)是一类催化环氧化物水解为相应邻二醇的水解酶类,是一种典型  $\alpha/\beta$  折叠型水解酶。传统的化学法拆分环氧化物往往需要用到重金属类有毒物质<sup>[2]</sup>,不仅面临着环境的巨大挑战,且很难获得高产率的手性纯化合物。而 EH 酶法拆分因反应条件温和、立体选择性强、产率高、绿色无污染等特点深受广大研究者的青睐<sup>[3]</sup>。

EH 广泛存在于各种生物体内,与动植物来源的 EH 相比,微生物所产 EH 因其来源广泛、底物谱宽广、不依赖辅因子,且具有高区域和对映体选择性而成为一种极具应用潜力的工业生物催化剂<sup>[4-5]</sup>。目前已发现多种产 EH 的微生物,如细菌来源的 *Corynebacterium sp*, *Agrobacterium radiobacter AD1*, *Novosphingobium aromaticivorans*, 真菌来源的 *Aspergillus niger*, *Rhodotorula glutinis*, *Xanthophyllomyces dendrorhous* 等。其中许多 EH 基因也进一步实现了异源表达。研究表明,这些微生物中的 EH 表现出了良好的对映体选择性。鉴于不同来源的 EH 酶活性及对不同环氧化物对映体选择性均存在很大的差异。因此通过对生物资源的进一步“挖掘”,寻找具有更高活性和对映体选择性的新型环氧化物水解酶,构建高产工程菌,仍然是目前环氧化物水解酶研究发展的趋势。

宇佐美曲霉(*Aspergillus usami*)E001 是由作者所在研究室筛选并保藏的一株曲霉,初步研究发现 *A. usami* E001 的发酵产物具有水解环氧化物的活性且具有良好的对映体选择性。国内有关 EH 的研究报道较少,而关于宇佐美曲霉 EH 基因克隆的研究国内外尚未见报道。本研究通过对 EH 同源序列的比对并设计两条简并引物,利用 RT-PCR 和作者

所在研究室建立的 THSO-PCR 侧翼未知 DNA 序列测定技术,首次克隆了 *A. usami* E001 的一种 EH 基因(*Aueh2*)的部分 cDNA 序列和 DNA 序列,并对其进行了生物信息学分析,为进一步研究其在酶法拆分制备手性环氧化物和手性二醇上的应用奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、载体和培养基

*A. usami* E001, 由作者所在研究室筛选和保存; *E. coli* JM109, 由作者所在研究室保存; 克隆载体 pUCm-T, 购自上海 Sangon 公司; 宇佐美曲霉种子活化培养基、液体培养基和 LB 培养基的配制参照 Shi 等人的方法<sup>[6]</sup>。

### 1.2 工具酶和试剂

*rTaq* 酶、*ExTaq* 酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、各种限制性内切酶、RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 试剂盒、DNA Marker、低分子量蛋白质 Marker、X-Gal、IPTG, 均购自大连 TaKaRa 公司; UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒、EZ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒、酵母粉、蛋白胨等, 购自上海 Sangon 公司; 其它化学试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.3 宇佐美曲霉总 RNA 及基因组 DNA 的提取

挑取 *A. usami* E001 单菌落于 25 mL 种子活化培养基中, 于 30 °C、220 r/min 条件下振荡培养 24 h 后, 以 3% 的接种量转至 30 mL 液体培养基中, 于上述条件下振荡培养 36 h 后, 抽滤培养液并用无菌水洗涤 2 次收集菌体。使用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取 *A. usami* E001 总 RNA。采用简化 CTAB<sup>[7]</sup>法提取 *A. usami* E001 基因组。

### 1.4 PCR 扩增引物和 HSO-T 合成

将来源于 *Aspergillus kawachii* (GAA87738.1)、*Talaromyces marneffeii* (XP\_002144609.1)、

*Talaromyces stipitatus* (XP\_002340919.1) 和 *Aspergillus niger*(CAB59812.1)的 EH 氨基酸序列进行比对,在 C 端选取两段保守序列(SCKAVHLN 和 WIGE(K/R)F),分别设计简并引物 EH-F1、EH-F2,与 RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0 中的引物 Oligo dT-AP、M13PrimerM4 用于扩增 *Aueh2* 基因的 3' 端 cDNA。原核生物“终止子”的回文序列中富含 GC 碱基对,具有较强的发卡结构形成能力,参考其结构及序列特征设计可形成稳定发卡结构 HSO 寡聚核苷酸序列,并参考 pUCm-T 载体用于克隆含有 A 末端 PCR 产物的原理,在 HSO 的 3' 端设计带有一个突出的碱基“T”。设计 HSO-T 寡聚核苷酸序列作为

THSO-PCR 的连接头,并设计 HSO-T 上特异性引物 HSO-F 用于扩增 *Aueh2* 基因侧翼未知 DNA 序列。根据获得的 *Aueh2* 基因 3' 端 cDNA 序列设计下游引物 EH-R1、EH-R2,结合 THSO-PCR 技术扩增 *Aueh2* 基因 5' 端 DNA 序列。根据获得的 *Aueh* 基因 5' 端 DNA 序列设计上游引物 EH-F3、EH-F4,用于扩增 3' 端 DNA 序列。然后,设计上游引物 EH-F(包含 *EcoR*)和下游序列 EH-R(包含 *NotI*),用于克隆 *Aueh2* 基因编码序列。除试剂盒内引物外,其余 PCR 引物和发卡结构序列均由上海 Sangon 公司合成,见表 1。

表 1 PCR 扩增引物和 T-发卡结构

Table 1 Sequences of the PCR primers and T-hairpin structure for PCR amplification

片段	引物名	引物序列(5'-3') <sub>a</sub>
3'-end cDNA	EH-F1	TGCAAAGCBGTCAYTTGAAY
	EH-F2	MTGGATYGGRGAGARRTT
	Oligo dT-AP	GTTTTCCCAGTCACGAC-Oligo dT
	M13PrimerM4	GTTTTCCCAGTCACGAC
THSO-PCR	HSO-T	GACTACTGGCATGGGCGAGTAATCCGCCCATGCCAGTAGTCT
	HSO-F	ATCCGCCCATGCCAGTAG
5'-DNA sequence	EH-R1	AGCCCAATCGAGGAACCTTCT
	EH-R2	AAACGGCTTGCGAATGTACC
3'-DNA sequence	EH-F3	TCATGATGCTTGCAAAGCC
	EH-F4	GGAGAGAAGCTCCTCGAT
Encoding cDNA sequence	EH-F	<u>GAATTC</u> ATGGCACTCGCTTACAGCAA
	EH-R	GCGGCCGCTCATT <u>TTCT</u> ACCAGCCATAC

a: Y=T/C, B=T/G/C, K= G/T, M=A/C, and R=A/G. The underlined letters in primers EH-F and EH-R are the *EcoR* and *NotI* restriction sites, respectively.

### 1.5 *Aueh2* 基因 3' 端 cDNA 的克隆

以 *A. usamii* E001 总 RNA 为模板,按照 TaKaRa RNA PCR Kit (Ver.3.0) 说明书进行反转录,获得 cDNA 的第 1 条链;以 cDNA 第 1 条链为模板、M13 Primer M4 和 EH-F1 为引物进行第一轮 PCR 扩增。以第一轮 PCR 产物为模板、M13Primer M4 和 EH-F2 为引物进行第二轮 PCR 扩增,获得 *Aueh2* 基因 3' 端 cDNA 片段。PCR 扩增产物分别经琼脂糖凝胶电泳鉴定、割胶回收、与 pUCm-T 载体连接,转化 *E. coli* JM109,转化子经蓝白斑筛选阳性,及质粒双酶切验证后,送上海 Sangon 公司测序。

### 1.6 THSO-PCR 扩增侧翼未知序列模板的构建

THSO-PCR 技术由 5 个步骤组成:1)基因组酶

切;2)酶切基因修饰;3)HSO-T 接头制备;4)酶切修饰后基因组与 HSO-T 接头连接;5)巢式 PCR 扩增目的片段。THSO-PCR 扩增已知 DNA 片段侧翼未知序列流程图,以扩增 *Aueh2* 基因侧翼未知序列为例(图 1)。

由于酶切位点在基因组中的位置具有随机性,因此选择多个常用的限制性内切酶 *XbaI*、*HindIII*、*PstI*、*EcoRI*,分别对 *A. usamii* 基因组进行酶切,其中 *XbaI* 和 *HindIII* 酶切后产生 3'粘性末端,*PstI* 酶切后产生 5'粘性末端,*EcoRI* 酶切后产生平末端。酶切体系以 *XbaI* 为例:10×M Buffer 1 μL,*XbaI* 0.5 μL,0.1 M BSA 1 μL,基因组 DNA 5 μL,ddH<sub>2</sub>O 2.5 μL;37 °C 反应 4 h。对酶切

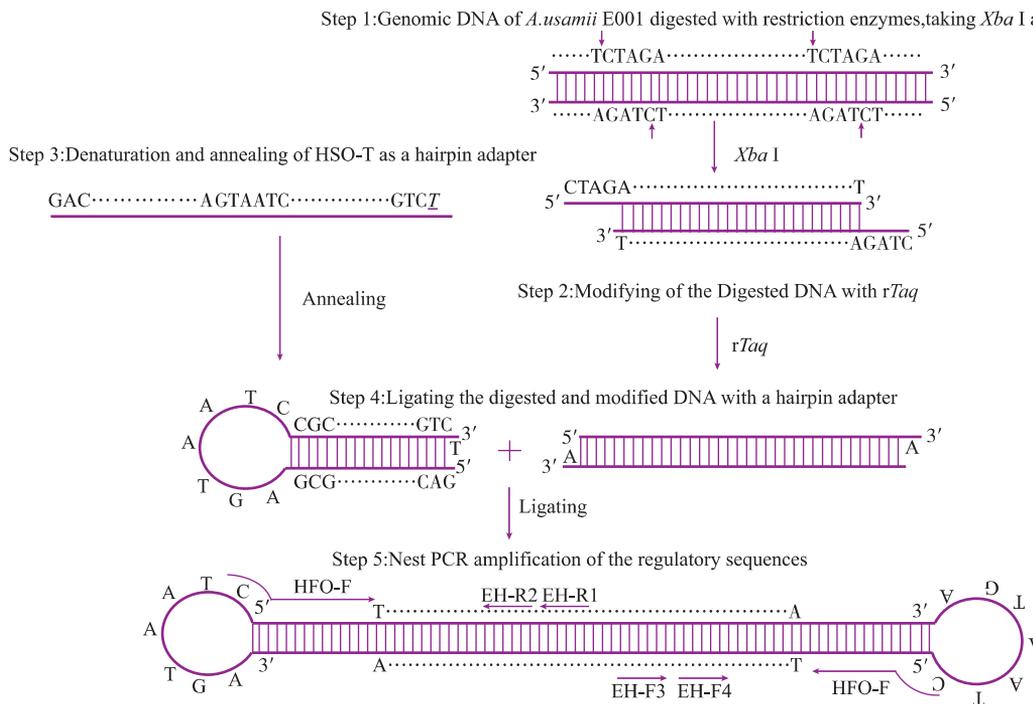


图1 THSO-PCR 扩增侧翼未知序列流程图

Fig. 1 Flowchart of the T-hairpin structure-mediated PCR amplification (THSO-PCR)

后出现5'黏性末端基因组或平末端的基因组 DNA 使用 *rTaq* 酶补齐末端,并在 3'端进行加 A 反应:酶切产物 20  $\mu$ L,10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L,dNTP 0.5  $\mu$ L,*rTaq* 酶 0.25  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 1.75  $\mu$ L;使用 PCR 仪在 72  $^{\circ}$ C反应 10 min。对酶切后出现 3'粘性末端的基因组用 *Ex Taq* 酶外切酶活性切除粘性末端,并在 3'端进行加 A 反应:酶切产物 20  $\mu$ L,10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L,dNTP 0.5  $\mu$ L,*Ex Taq* 酶 0.25  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 1.75  $\mu$ L,使用 PCR 基因扩增仪 72  $^{\circ}$ C反应 10 min,目的产物命名为 *Aueh2-DM*。

HSO-T 接头制备:吸取 2  $\mu$ L 100 mmol/L 的 HSO-T 和 8  $\mu$ L 的 ddH<sub>2</sub>O 于 250  $\mu$ L EP 管中混合均匀,使用 PCR 基因扩增仪在 94  $^{\circ}$ C变性 3 min,缓慢降温(1  $^{\circ}$ C/s)至 25  $^{\circ}$ C,恒温退火 30 min,从而形成稳定的 HSO-T 接头。将 HSO-T 接头与 *Aueh2-DM* 连接,连接体系为:*Aueh2-DM* 5  $\mu$ L,HSO-T 接头 3  $\mu$ L,10 $\times$ Ligase buffer 1  $\mu$ L,T<sub>4</sub> DNA Ligase 1  $\mu$ L,在 16  $^{\circ}$ C反应 4 h。连接液即可作为扩增 *Aueh2* 侧翼未知 DNA 序列的 PCR 模板,命名为 *Aueh2-DML*,不同的限制性内切酶酶切基因组构建不同的 *Aueh2-DML*。

### 1.7 *Aueh2* 基因 DNA 序列的克隆

分别以 1.6 所述 *Aueh2-DML* 为模板,HSO-F 为上游引物,EH-R1 为下游引物,进行第一轮 PCR

扩增;然后以第一轮 PCR 产物为模板,HSO-F 为上游引物、EH-R2 为下游引物,进行第二轮 PCR 扩增,获得 *Aueh2* 基因 5'端 DNA 序列。分别以 *Aueh2-DML* 为模板,以 EH-F3 为上游引物,HSO-F 为下游引物,进行第一轮 PCR 扩增;然后以第一轮 PCR 产物为模板,EH-F4 为上游引物、HSO-F 为下游引物,进行第二轮 PCR 扩增,获得 *Aueh2* 基因 3'端 DNA 序列。PCR 产物参照 1.5 回收、克隆并测序。

### 1.8 *Aueh2* 基因编码区 cDNA 克隆

以 1.5 方法中获得的 cDNA 第 1 条链为模板,使用引物 EH-F 和 M13PrimerM4 进行第一轮 PCR 扩增,其后以第一轮 PCR 产物为模板,使用引物 EH-F 和 EH-R 扩增 *Aueh2* 基因编码序列,PCR 产物参照 1.5 方法回收、克隆并测序。

### 1.9 生物信息学分析

参照张慧敏<sup>[8]</sup>等人和薛飞等人<sup>[9]</sup>所述的方法对 *Aueh2* 基因及其编码氨基酸序列进行相关的生物信息学分析。

## 2 结果

### 2.1 *Aueh2* 基因 3'端 cDNA 的克隆

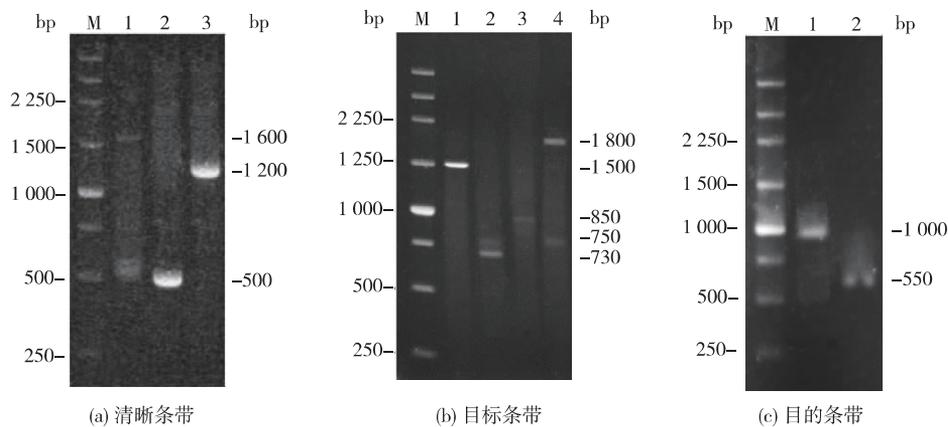
利用简便引物 EH-F1、引物 M13PrimerM4 扩增的 PCR 产物在约 550 bp、1 600 bp 处有两条较清晰

条带 (图 2 (a) Lane 1)。利用引物 EH-F2 和 M13PrimerM4 扩增有一条约 500 bp 明显条带,测序结果显示获得 479 bp (包含 11 bp polyA) 核苷酸序列。经 NCBI 数据库 BLAST 对比,发现此序列与数据库中 EH 均有较高的同源性,因此确定该片段为一种 EH 基因。

### 2.2 *Aueh2* 基因 DNA 的克隆

用 4 种限制性内切酶酶切基因组构建了 4 个 PCR 模板。利用引物 EH-R1 和 EH-R2 与 HSO-F 进行巢式 PCR 扩增,4 个模板均扩增出目标条带

(图 2(b)),分别约 730 bp、850 bp、1 500 bp、1 800 bp 和 750 bp。测序结果表明,除约 750 bp 处条带外其余 4 个片段均为 *Aueh2* 基因 5' 端 DNA 序列,约 1 800 bp 序列包含其他 3 条序列。利用引物 EH-F3 和 EH-F4,结合 HSO-F 进行巢式 PCR 扩增。经 *Xba*、*Hind* 酶切基因组 DNA 构建 PCR 模板,获得大小分别为约 1 000 bp、550 bp 条带,而经 *Pst*、*EcoR* 酶切基因组 DNA 构建 PCR 模板则未扩增出目的条带(图 2(c))。测序获得长为 1 006 bp 的 *Aueh2* 基因的 3' 端 DNA 序列。



M:250 bp DNA Ladder Marker;(a)1:3' 端 cDNA 第一轮 PCR 产物;2:3' 端 cDNA 第二轮 PCR 产物;3: 编码区 cDNA 的 PCR 产物;(b)1-4:分别为用 *Xba*、*Hind*、*Pst* 和 *EcoR* 酶切基因组 DNA 构建的 *Aueh2*-DML 为模板扩增 5' 端 DNA 的 PCR 产物;(c)1-2:分别为用 *Xba*、*Hind* 酶切基因组 DNA 构建的 *Aueh2*-DML 为模板扩增 3' 端 DNA 第二轮 PCR 扩增产物

图 2 *Aueh2* 部分 cDNA 及 DNA 的 PCR 产物  
Fig. 2 PCR products of the partial cDNA and the DNA of *Aueh2* the gene

### 2.3 *Aueh2* 基因编码区 cDNA 的克隆

用 DNAMAM 和 NCBI 中 BLAST 工具分析 3' 端 cDNA 序列的阅读框,确定终止子(TGA)的位置,在该位置设计特异性下游引物 EH-R,用在线分析软件 BestORF (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bestorf&group=programs&subgroup=gfind>)根据 DNA 序列预测蛋白编码框,结果显示其起始密码子 ATG 位于 455 bp 处。采用 RT-PCR 和巢式 PCR 技术,通过引物 EH-F 和 EH-R 扩增获得长约 1 200 bp 条带(图 2A, Lane 2),测序获得长度为 1 188 bp 编码区 cDNA 序列。

### 2.4 *Aueh2* 基因的生物信息学分析

用 DNAMAN 拼接 5' 端和 3' 端 DNA 序列获得的 DNA 序列长为 2 481 bp(图 3)。获得 *Aueh2* 基因部分 cDNA 序列为 1 279 bp,其中包含 3'-非编码

区、PolyA 尾核苷酸序列、1 188 bp 开放阅读框(ORF),编码 395 个氨基酸。*Aueh2* 基因序列在 GenBank 登陆号为 KF061095。用 BDGP 提供的在线启动子分析工具 Promoter 预测 *Aueh2* 基因转录起始位点为腺嘌呤(A),位于起始密码子上游位 336 bp 处。用 PLACE 预测在转录起始位点上游-30 处发现 TATAAA 序列,为真核生物典型的 TATA-Box。用 TFSEARCH 预测 5' 端序列的转录因子结合位点,结果显示:分值在 90 分以上的有 20 个转录因子结合位点。其包含 8 个 HSF,主要集中在转录起始位点上游和起始密码子上游区域,HSF 的存在表明该基因可能在热胁迫或大量化学胁迫的环境下表达;3 个 ADR1;3 个 NIT2;2 个 CdxA 可增强基因转录活性;2 个 cap 分布在启动子附近,可调节转录的起始;1 个 GATA-1 可提高启动子的强度和活性。

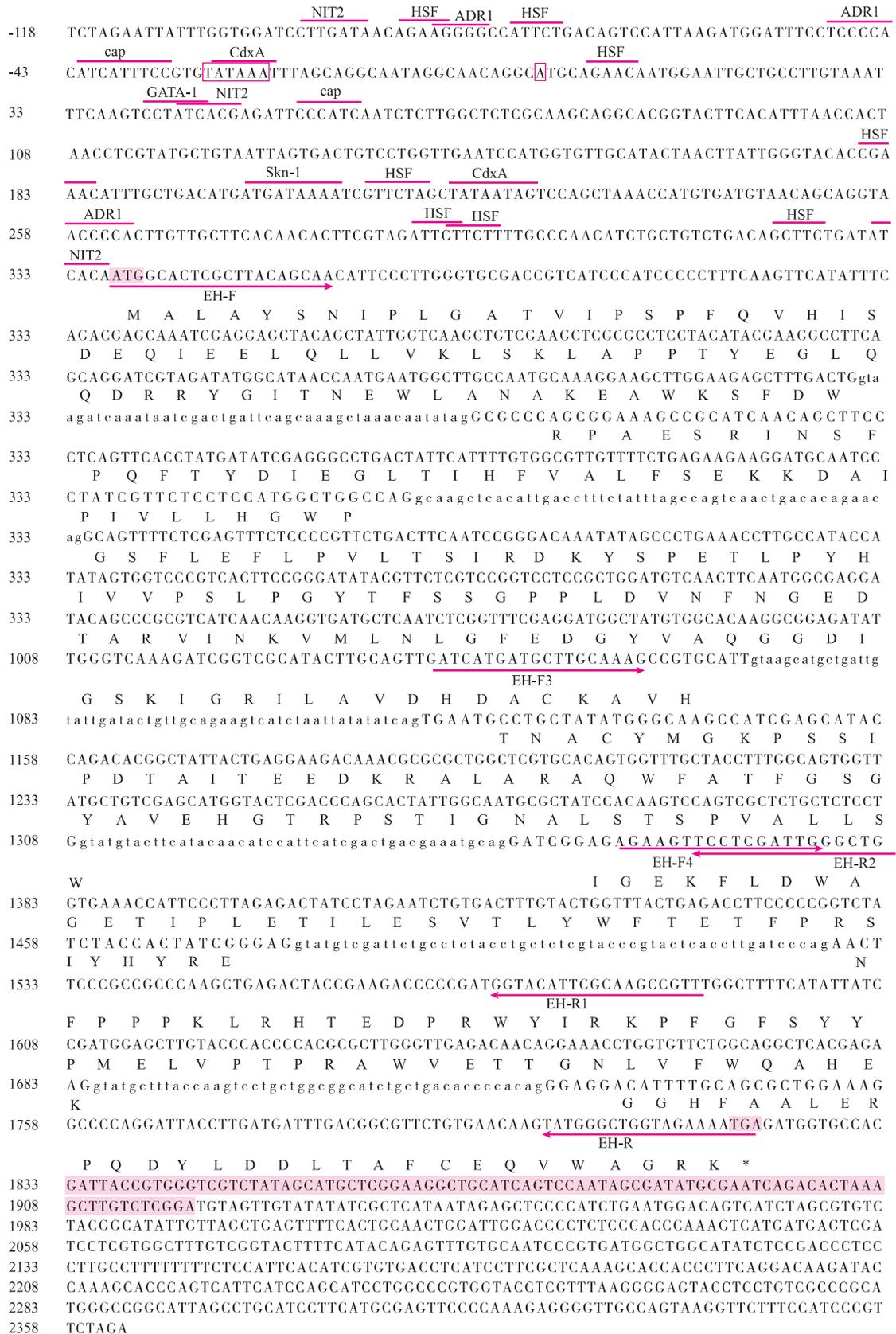


图3 *Aueh2* 部分 cDNA、DNA 序列和氨基酸序列

Fig. 3 Partial cDNA and DNA sequences of the gene *Aueh2*, and the amino acid sequence of the AuEH2 deduced from the *Aueh2*

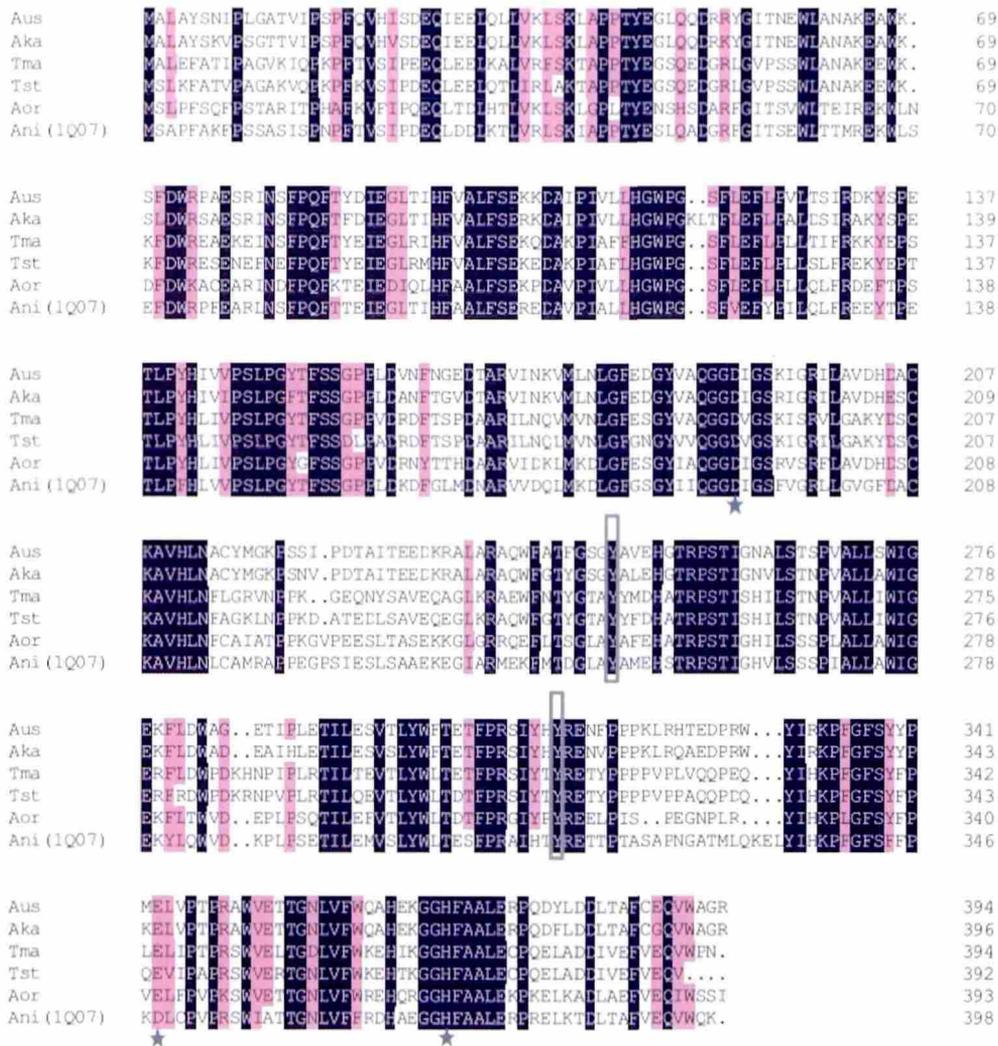
2.5 AuEH2 蛋白质一级结构和二级结构分析

利用 ProtParam 工具分析 AuEH2 蛋白质理化性质,结果显示,其分子量为 44.62 kDa;理论 pI 为 5.43;不稳定系数 47.17,是物理性质不稳定的蛋白质;疏水性分析的 GRAVY 值为-0.225,表明该蛋白质为亲水蛋白质。预测结果显示,AuEH2 没有信号肽和跨膜区域,为非跨膜蛋白质。利用 PredictProtein 分析蛋白质二级结构,显示 AuEH2 含有 39.2%的  $\alpha$ -螺旋(Helix)、13.7%的  $\beta$ -折叠(Strand)和 47.1%的无规则卷曲(Loop)。

2.6 AuEH2 氨基酸的同源性分析

利用 NCBI 数据库的 BLAST 软件,以 *Aueh2* 基

因的氨基酸序列为模板,进行同源性序列比对。结果表明,AuEH2 与大多数真菌的 EH 具有较高的相似性,其中与 *A. kawachii*(GAA87738.1)、*T. marneffeii*(XP\_002144609)、*T. stipitatus*(XP\_002340 19.1)、*A. oryzae*(XP\_001818311.2)、*A. niger* LCP521(CAB59812.1,PDB:1QO7) 来源的 EH 相似性分别为 89%、63%、61%、59%、58%(图 4)。来源于 *A. niger* LCP521 的 Ani(1QO7)的晶体结构已被测定,其催化机制也已被阐明<sup>[10]</sup>。如图 4 所示,Ani(1QO7)的活性中心氨基酸残基 Asp<sup>192</sup>、His<sup>374</sup> 及质子供体酪氨酸残基 Tyr<sup>251</sup>、Tyr<sup>314</sup> 位置非常保守,但其活性中心氨基酸残基为 Asp<sup>348</sup>,与其他曲霉的 Glu 有所不同。



Aus:*Aspergillus usamii*;Aka:*Aspergillus kawachii* (GAA87738.1);Tma:*Talaromyces marneffeii* (XP\_002144609);Tst:*Talaromyces stipitatus* (XP\_00234019.1);Aor:*Aspergillus oryzae* (XP\_001818311.2);Ani(1QO7):*Aspergillus niger* LCP521 (CAB59812.1)

图 4 AuEH2 与其他 5 种霉菌环氧化物水解酶氨基酸同源序列比对

Fig. 4 Multiple homology alignment of the AuEH2 with other five epoxide hydrolases from the fungi.

### 2.7 AuEH2 蛋白三级结构模拟及分析

利用 Swiss-Model 数据库对 AuEH2 进行三维结构预测(图 5),AuEH2 与模板 AnEH(3g02A)三级结构相似性为 59.49%。结果显示,AuEH2 主要由  $\alpha$ -螺旋(Helix)、 $\beta$ -折叠(Strand)和无规则卷曲(Loop)3 部分组成,其含量和分布与二级结构预测结果一致。AuEH2 蛋白质由  $\alpha$ -螺旋和 8 个交叉平行  $\beta$ -折叠组成  $\alpha/\beta$  水解酶折叠( $\alpha/\beta$  Hydrolase fold)核心结构域、 $\alpha$ -螺旋组成的“帽子”(Lip)结构域和包裹“帽子”结构的 N 末端卷曲(N-terminal meander)结构域组成,是典型的微粒体环氧化物结构特征。目前,来自放线菌<sup>[11]</sup>、黑曲霉<sup>[10]</sup>、肺结核双歧杆菌<sup>[12]</sup>环氧化物水解酶的晶体结构已被测定,并对 EH 的催化机制和活性中心的功能性氨基酸残基进行了深入研究。研究者证实了 EH 具有一个三位一体的催化基团:一个亲核性的 Asp 残基,一个水分子活化 His 残基和一个传递电荷的 Asp/Glu 残基<sup>[13]</sup>。Rink 等<sup>[14]</sup>报道了 EH 活性中心附近的两个 Tyr 残基在环氧乙烷的活化与开环中发挥了相当重要的作用。根据氨基酸同源性比对结果(图 4)和 AuEH2 三维结构分析,推测其活性位点位于  $\alpha/\beta$  折叠型水解酶核心结构域中 Asp<sup>191</sup>、His<sup>349</sup> 和 Glu<sup>343</sup> 催化三联体,两个作为质子供体的酪氨酸残基 Try<sup>249</sup> 和 Try<sup>312</sup> 位于 Lip 结构域(图 5)。

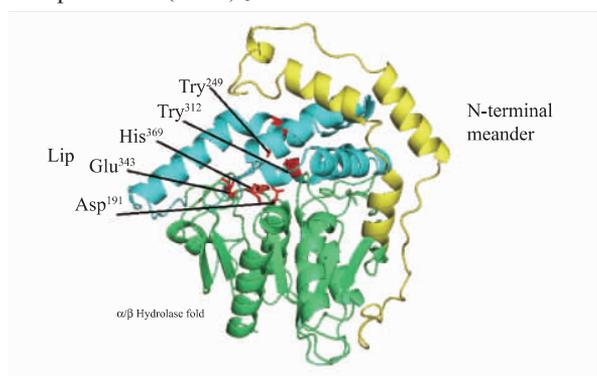


图 5 通过 Swiss-model 预测的 AuEH2 三维结构图

Fig. 5 Modeled three-dimensional structure of AuEH2 predicted by using Swiss-model

### 参考文献:

- [1] Archelas A, Furstoss R. Synthetic applications of epoxide hydrolases[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5(2): 112-119.
- [2] Zhu X J, Venkatasubbaiah K, Weck M, et al. Kinetic evaluation of cooperative Co(salen) catalysts in the hydrolytic kinetic resolution of rac-epichlorohydrin[J]. *Chemcatchem*, 2010, 2(10): 1252-1259.

## 3 结语

基于 PCR 的染色体步移技术主要用于分离已知序列侧翼的未知序列,为分离未知基因、步移获得调控区域及填补基因组测序空隙提供了极大便利,在现代分子生物学研究中发挥着不可替代的作用<sup>[15]</sup>。本课题研究中试图利用 5'-RACE 方法克隆 AuEH2 的 5'端 cDNA 序列,但经过多次试验均未获得目的基因,可能是该方法操作过程繁杂,易受 mRNA 丰度、稳定性和高级结构的影响,导致效果不理想。作者通过 RT-PCR 和 THSO-PCR 侧翼未知 DNA 序列扩增方法克隆 DNA 序列,并结合生物信息学分析方法克隆基因编码区 cDNA 序列,为基因克隆提供新思路。作者基于 pUCm-T 载体及原核生物终止子原理设计了一个 T-HSO 接头,构建了一种利用限制性内切酶酶切、HSO-T 和巢式 PCR 技术的 THSO-PCR 扩增侧翼未知序列技术。设计的 HSO-T 结构稳定,回文结构的设计大幅度提高 PCR 扩增的特异性和效率,并且在 HSO 3'端设计的碱基“T”使接头在连接过程中不受限制性内切酶的限制。该技术操作简便、应用范围广、成本低廉、高效准确,具有广阔的应用前景。由作者所在研究室分离得到的宇佐美曲霉为一株新型 EH 产生菌,作者通过 RT-PCR 和新构建的 THSO-PCR 技术成功克隆了一种宇佐美曲霉 EH 基因,用生物信息学方法对该蛋白质的理化性质、跨膜结构、疏水性、信号肽、二级结构和三维结构进行预测,明确了该环氧化物水解酶无信号肽是亲水蛋白质。同源性分析其与 *A. kawachii*、*T. marneffeii*、*T. stipitatus*、*A. oryzae*、*A. niger* 来源的 EH 相似性分别为 89%、63%、61%、59%、58%。三维结构显示,由核心结构域、“帽子”结构域和 N 末端卷曲结构域组成,属于微粒体环氧化物水解酶,并推测 AuEH 的催化活性中心氨基酸残基为 Asp<sup>191</sup>、His<sup>349</sup> 和 Glu<sup>343</sup>。这些参数的获得为进一步研究其功能及催化机制提供了科学依据。

- [3] 彭华松,宗敏华,聂凌鸿. 环氧化合物水解酶的研究进展[J]. 分子催化,2003,17(1):75.  
PENG Hua-song,ZONG Min-hua,NIE Ling-hong. Progress in the research on epoxide hydrolase[J]. **Journal of Molecular Catalysis**,2003,17(1):75.(in Chinese)
- [4] Choi W J. Biotechnological production of enantiopure epoxides by enzymatic kinetic resolution[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2009,84(2):239-47.
- [5] Bala N,Chimni S S. Recent developments in the asymmetric hydrolytic ring opening of epoxides catalysed by microbial epoxide hydrolase[J]. **Tetrahedron Asymmetry**,2010,21(24):2879-2898.
- [6] Shi H L,Yin X,Wu M C,et al. Cloning and bioinformatics analysis of an endoglucanase gene (*Auce112A*) from *Aspergillus usamii* and its functional expression in *Pichia pastoris*[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**,2012,39(2):347-357.
- [7] 张晓祥,王玲,寿路路. 一种快速提取小麦基因组 DNA 的改良 CTAB 方法[J]. 中国农学通报,2012,28(36):46.  
ZHANG Xiao-xiang,WANG Ling,SHOU Lu-lu. A rapid modified CTAB method of extracting genomic DNA from wheat leaf[J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin**,2012,28(36):46.(in Chinese)
- [8] 张慧敏,李剑芳,邬敏辰. 圆弧青霉脂肪酶基因序列的生物信息学分析[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(4):602.  
ZHANG Hui-min,LI Jian-fang,WU Min-cheng. Bioinformatics analysis on the sequence of lipase gene from *Penicillium cyclopium*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2010,29(4):602.(in Chinese)
- [9] 薛飞,柴晓杰,余祝君. 盐藻新基因 *DsSTPK* 的克隆及生物信息学分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2012,28(3):289.  
XUE Fei,CHAI Xiao-jie,YU Zhu-jun,et al. Cloning and bioinformatics analysis of a novel gene *DsSTPK* from *Dunaliella salina* [J]. **Chin J Biochem Mol Biol**,2012,28(3):289.(in Chinese)
- [10] Zou J,Hallberg B M,Bergfors T,et al. Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution:implications for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases[J]. **Structure**,2000,8(2):111-22.
- [11] Nardini M,Ridder I S,Rozeboom H J,et al. The x-ray structure of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. An enzyme to detoxify harmful epoxides[J]. **J Biol Chem**,1999,274(21):14579-14586.
- [12] Biswal B K,Garen G,Cherney M M,et al. Cloning,expression,purification,crystallization and preliminary X-ray studies of epoxide hydrolases A and B from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**,2006,62(2):136-138.
- [13] Widersten M,Gurell A,Lindberg D. Structure-function relationships of epoxide hydrolases and their potential use in biocatalysis [J]. **Biochim Biophys Acta**,2010,1800(3):316-326.
- [14] Rink R,Spelberg J H L,Pieters R J,et al. Mutation of tyrosine residues involved in the alkylation half reaction of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 results in improved enantioselectivity[J]. **J Am Chem Soc**,1999,121(32):7417-7418.
- [15] 李付鹏,伍宝朵,马朝芝. 基于 PCR 的染色体步移技术研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2010,30(12):87.  
LI Fu-feng,WU Bao-duo,MA Chao-zhi. Progress of chromosome walking[J]. **China Biotechnology**,2010,30(12):87.(in Chinese)