

高活性 β -内酰胺酶的分离、表达和性质

赖飞^{1,2} 田宇鑫^{1,2} 赵峰^{1,2} 王震^{1,2} 吕建新^{1,2*}¹温州医学院检验医学院, 细胞与分子医学研究所; ²浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

摘要 应用 DNA 家族改组方法制备 TEM 型 β -内酰胺酶基因突变文库, 利用平皿初筛和琼脂稀释法复筛获得一株酶活力增高的突变体 bla_{TEM}^m 。带有该突变基因的大肠杆菌, 其最低抑菌浓度(MIC)比带有野生型 bla_{TEM} 的大肠杆菌高 2~4 倍(氨苄青霉素)、4~8 倍(头孢唑啉)、4~8 倍(头孢呋辛)、16~32 倍(头孢他啶)、8 倍以上(头孢曲松)和 4~8 倍(头孢噻肟)。在 *E. coli* BL21(DE3) 高效表达 bla_{TEM} 和 bla_{TEM}^m , 利用离子交换柱层析和凝胶过滤层析对包涵体进行柱上复性和纯化, 获得纯度达 90% 的重组蛋白质。酶动力学分析显示, 与野生型蛋白相比, 突变蛋白酶促反应的 k_{cat}/K_m 值分别增加 1.5 倍(青霉素 G)、4.4 倍(氨苄青霉素)、3.1 倍(头孢唑啉)、2.8 倍(头孢他啶), 但是对头孢噻肟的 k_{cat}/K_m 下降了 2.5 倍。DNA 序列分析显示 bla_{TEM}^m 发生 7 处碱基置换, 造成 4 个氨基酸改变, 即 S59G、R164S、A237T 和 E240K。应用 Swiss-Pdb Viewer3.7 软件预测蛋白质的三维结构, 显示这些突变不影响酶的活性中心, 但是变异造成的蛋白质空间结构的细微变异增加了酶和底物的亲和性。

关键词 β -内酰胺酶; DNA 家族改组; 最低抑菌浓度; 耐药

β -内酰胺类抗生素由于抗菌作用强、抗菌谱广、毒性低, 是目前临床抗感染治疗最普遍应用的一类抗生素, 随着这类药物的广泛使用(特别是滥用和误用)以及致病菌的变迁, 产生了病原菌对药物的耐药性问题, 而且耐药发生率相当高。细菌对 β -内酰胺类抗生素耐药的机制^[1]有 4 种: (1) 产生使 β -内酰胺类抗生素水解失活的酶(β -内酰胺酶); (2) 青霉素结合蛋白改变(被修饰或获得新的细胞壁合成酶); (3) 经过特殊的药物泵排出; (4) 进入细菌细胞的量减少(允许抗生素进入的膜蛋白通道丢失)。其中细菌产生 β -内酰胺酶是细菌对 β -内酰胺类抗生素产生耐药的最重要的机制, TEM 型是较常见的 β -内酰胺酶, 而由质粒介导的 TEM 型超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum β -lactamase, ESBL)通过结构基因上单点或多点突变衍生大量的新型 ESBL。

DNA 改组(DNA shuffling)技术是 Stemmer 等^[2]建立的改变基因的一个新方法, 模拟通过 DNA 改组可以将含不同突变位点的基因或具有同源序列的基因整合在一起, 快速积累有益突变, 从而快速实现蛋白质性质的改善。研究表明, 采用基因家族改组(DNA family shuffling)的效果明显高于单个基因的改组效果, 逐渐成为 DNA 改组的主要方法^[3]。本研究应用 DNA 家族改组技术对几个 TEM 型的 ESBL 基因进行改组, 运用该技术提高了原有 β -内酰胺酶基因的活性,

为研制新一代 β -内酰胺类抗生素提供理论依据, 也为把 β -内酰胺酶开发成为抗生素清除剂打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和载体 重组质粒 pET28a- bla_{TEM-1} 、pET28a- bla_{TEM-2} 和 pET28a- bla_{TEM-3} 由本室构建并保存, 质粒 pET28a(+), 工程菌 *E. coli* BL21 (DE3) [F^+ , *ompT*, *hsdS_B*($r_B^-m_B^-$), *gal* (λ c I 857, *ind1*, *Sam7*, *nin5*, *lacUV5-T7gene1*), *dcm* (DE3)] 和标准菌株 ATCC25922 为本室保存。

1.1.2 试剂 头孢他啶(ceftriaxime, CAZ), 头孢曲松(ceftriaxone, CRO), 头孢唑啉(cefazolin, CEZ), 头孢噻肟(cefotaxime, CTX), 氨苄青霉素(ampicillin, AMP), 青霉素 G(penicillin G, PG) 和头孢呋辛(cefuroxime, CXM) 购自华北制药有限公司。Nitrocefin 购自英国 Oxoid 公司。DNase I (RNase Free)、T4 DNA 连接酶、*rTaq*、*Pyrobest*[®]、*Ex Taq*[®] DNA 聚合酶、*NcoI* 和 *XhoI* 限制性核酸内切酶、DNA 胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自大连宝生物公司。小分子量 DNA 片段高效快速回收试剂盒购自北京博大泰克生

收稿日期: 2008-03-26 接受日期: 2008-05-30

浙江省科技厅重点项目(No.2004C23018)

* 通讯作者。Tel: 0577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com

物公司。MH 琼脂购自杭州天和微生物试剂公司。寡核苷酸片段由为大连宝生物公司合成。DEAE Sepharose F.F. 阴离子交换柱填料为通用医疗集团 Amersham Biosciences 公司产品。其他化学试剂为国产的分析纯。

1.2 方法

1.2.1 DNA 家族改组 参照文献^[4]进行 DNA 家族改组。有引物 P1(5'-GGCCATGGGGATGAGTATTCAACAT-3')和 P2(5'-CCTCGAGTTACCAATGCTTAATCAGTG-3')的 PCR 反应程序是 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 55 s, 58 °C 30 s, 72 °C 50 s, 15~25 个循环, 72 °C 延伸 10 min。没有引物 P1 和 P2 的 PCR 反应程序是 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 45 s, 54 °C 45 s, 72 °C 45 s + 5 s/ 循环, 40 个循环; 94 °C 45 s, 54 °C 45 s, 72 °C 7 min。PCR 反应和 DNaseI 酶切反应的产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 按照公司提供的方法用 DNA 胶回收试剂盒或小分子量 DNA 片段高效快速回收试剂盒回收 DNA 片段。

首先 PCR 反应扩增 *bla* 基因。50 μ l 反应溶液含有 1 \times Ex Taq 缓冲液, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 mmol/L P1 和 P2, 2.5 U Ex Taq, 2.5 μ l 模板。PCR 产物用 DNaseI 酶切。100 μ l 反应溶液含有 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 10 mmol/L MgCl₂, 各约 1 μ g *bla*_{TEM} PCR 产物。于 25 °C 保温 20 min, 加入 EDTA 至终浓度为 20 mmol/L 终止反应。DNaseI 酶切产物作为模板, 进行没有引物 P1 和 P2 的 PCR 反应。10 μ l 反应溶液含有 1 \times Taq 缓冲液, 2.2 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, *pyrobest* : *rTaq* = 1 : 1 各 1 U, 70 ng 的 50~200 bp DNA 片段。最后用含有引物 P1 和 P2 的 PCR 反应制备 *bla* 基因突变库。

1.2.2 突变文库的构建和筛选 用限制性内切酶 *Nco*I、*Xho*I 双酶切改组后目的基因和质粒 pET28a, 胶回收后在 T4 DNA 连接酶的作用下连接, 转化入 *E. coli* BL21 (DE3) 中构建突变文库。先用含有 0.125 μ g/ml 头孢他啶的卡那霉素抗性平皿初步筛选, 然后采用美国临床实验室标准化研究所 (CLSI) 推荐的琼脂二倍稀释法进一步筛选耐药水平高的细菌株, 以大肠杆菌 ATCC25922 为对照菌。

1.2.3 测序及 Swiss-Pdb Viewer 3.7 软件预测分析

DNA 序列测定由大连宝生物公司完成。用 Swiss-Pdb Viewer3.7 软件预测蛋白质三级结构。

1.2.4 野生酶与突变体酶在 *E. coli* BL21 (DE3) 的诱导表达和 SDS-PAGE 分析 鉴于 TEM-3 型 ESBL

的活性要高于 TEM-1、TEM-2 型 β -内酰胺酶, 故在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达重组 TEM-3ESBL (野生酶) 和突变体酶 (TEM^m ESBL), 参照文献^[5]的方法进行。

1.2.5 包涵体的柱上复性和纯化 参照文献^[6]介绍的方法分离包涵体。超声破碎细菌后, 10 000 r/min, 20 min, 离心获取包涵体。用含 2 mol/L 尿素和 1% Triton X-100 缓冲液洗涤包涵体。然后用含 2 mol/L 尿素缓冲液溶解包涵体, 制备蛋白质溶液。用 Bradford 法测定蛋白质浓度^[7]。将浓度为 20 mg/ml 的蛋白质溶液 (9 ml) 上样到已经为 8 mol/L 尿素和 50 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0 平衡的 (150 ml) DEAE Sepharose F.F. 柱, 流速是 1 ml/min。用 5 倍柱床体积溶于 50 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L PMSF、1.0 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0 的线性梯度尿素溶液 (8 mol/L 至 2 mol/L) 进行柱上复性, 流速为 0.6 ml/min。最后用溶于 20 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0 的线性梯度 NaCl 溶液 (50 mmol/L 至 1 mol/L) 洗脱已复性的蛋白质, 流速为 1 ml/min, 再经分子筛进一步纯化。用 nitrocefin 检测活性, 合并有活性的蛋白质组分。用 PBS 彻底透析, 冷冻干燥浓缩后, 于 -70 °C 分装冻存储用。

1.2.6 β -内酰胺酶活性测定与动力学分析 用 PBS 溶解重组野生酶和突变体酶。用 DU800 分光光度计确定各种底物反应前的最佳测定波长后。测定不同底物浓度稳态下的初速度, 利用 Sigmaplot 7.0 软件中的 Enzyme kinetics analysis 模块以米氏方程进行拟合, 求出重组 TEM-3 和 TEM^m β -内酰胺酶的米氏常数 (K_m) 和最大反应速度 (V_{max}) 并计算催化效率常数 (k_{cat}) 值。

2 结果

2.1 DNA 改组

将 *bla*_{TEM-1}、*bla*_{TEM-2} 和 *bla*_{TEM-3} 基因的纯化后 PCR 产物等量混合后, 在 DNaseI 作用下消化成 50~200 bp 小片段, 经无引物 PCR 和有引物 PCR 两步反应得到与目的基因大小一致的改组后 *bla*_{TEM}, 进行 β -内酰胺酶基因进行改组 (图 1)。

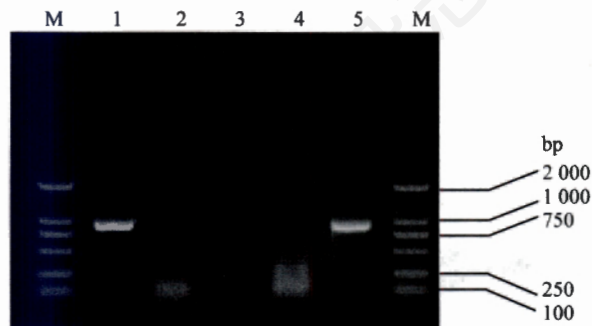
2.2 重组质粒的构建及筛选

经琼脂二倍稀释法筛选到一株菌株对青霉素类与头孢菌素类抗生素的最低抑菌浓度 (MIC) 均有不同程度的增高, 改组前后菌株对不同 β -内酰胺类抗生素的 MIC 的结果见表 1。与改组前菌株相比, 改组

表 1 不同 β -内酰胺类抗生素对改组前后菌株的 MIC 比较(单位: $\mu\text{g/ml}$)

菌株	AMP	CEZ	CXM	CAZ	CRO	CTX
<i>E. coli</i> BL21 (pET28a- <i>bla</i> _{TEM-1})	32	1	0.5	0.03	0.0037	< 0.0075
<i>E. coli</i> BL21 (pET28a- <i>bla</i> _{TEM-2})	64	1	1	0.03	0.0075	< 0.0075
<i>E. coli</i> BL21 (pET28a- <i>bla</i> _{TEM-3})	32	2	1	0.06	0.015	0.03
<i>E. coli</i> BL21 (pET28a- <i>bla</i> _{TEM^m})	128	8	4	1	0.125	0.125
<i>E. coli</i> BL21 (pET28a)	0.5	1	0.5	0.03	< 0.0018	< 0.0075
<i>E. coli</i> BL21	0.5	1	0.5	0.03	< 0.0018	< 0.0075
ATCC25922	2	1	2	0.06	0.03	0.03

E. coli BL21 (pET28a)和 *E. coli* BL21 作为阴性对照, ATCC25922 作为质控菌株, 各种抗生素的 MIC 均在质控允许范围内。

图 1 *bla*_{TEM} 基因 DNA 家族改组的流程图

1: *bla*_{TEM-3} PCR 扩增和纯化产物; 2: β -内酰胺酶基因被 DNase I 酶切成随机片段; 3: 50~200 bp DNA 片段胶回收纯化; 4: 无引物 PCR; 5: 有引物 PCR; M: DNA marker DL2000。

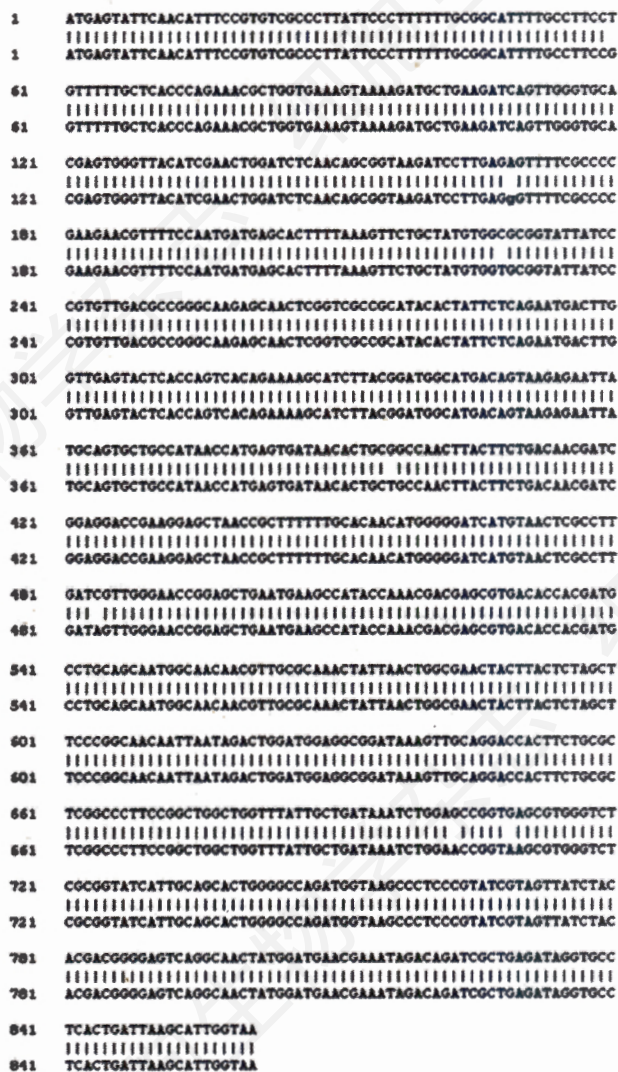
后已产生突变的菌株 *E. coli* BL21 (pET28a-*bla*_{TEM^m}) 耐药性增加, 主要表现为 MIC 值增高 2~4 倍(AMP)、4~8 倍(CEZ)、4~8 倍(CXM)、16~32 倍(CAZ)、8 倍以上(CRO)和 4~8 倍(CTX)。

2.3 测序结果分析

通过 BLAST 比对分析, 重组质粒 pET28a-*bla*_{TEM^m} (GenBank 登录号 EU597799) 与 *bla*_{TEM} (GenBank 登录号 NC003486) 相比较有 7 处碱基发生置换(图 2), 分别为 60 位 T \rightarrow G, 169 位 A \rightarrow G, 228 位 C \rightarrow T, 396 位 G \rightarrow T, 484 位 C \rightarrow A, 703 位 G \rightarrow A, 709 位 G \rightarrow A, 其中 169 位 A \rightarrow G、484 位 C \rightarrow A、703 位 G \rightarrow A、709 位 G \rightarrow A 引起氨基酸的改变, 即 59 位的氨基酸由丝氨酸变为甘氨酸, 164 位由精氨酸变为丝氨酸, 237 位由丙氨酸变为苏氨酸和 240 位由谷氨酸变为赖氨酸。

2.4 野生酶和突变体酶的柱上复性和纯化

野生酶(重组 TEM-3)的等电点为 6.3, 突变体酶(TEM^m)的预测等电点为 5.84, 故考虑利用阴离子交换柱 DEAE Sepharose F.F. 进行柱上复性同时分离纯化目的蛋白。在变性条件下, 目的蛋白能与阴离子交换柱有效结合, 通过逐渐降低尿素浓度实现对目的蛋白的柱上复性, 复性过程出现蛋白质洗脱峰 I (图 3A), SDS-PAGE 鉴定为杂蛋白。用 50 mmol/L 至 1 mol/L

图 2 *bla*_{TEM} 与 *bla*_{TEM^m} 序列比对分析

上行: *bla*_{TEM} 核苷酸序列; 下行: *bla*_{TEM^m} 核苷酸序列。

NaCl 线性梯度(5 个柱床体积)洗脱获得已复性的可溶性目的蛋白, nitrocefin 鉴定和 SDS-PAGE 均证实第 II 峰为可溶性的目的蛋白(图 3B), 纯度在 70% 以上, 这表明离子交换柱上复性一步法就能得到较高纯度的可溶性目的蛋白, 得率一般在 70% 左右。复性后的目的蛋白经分子筛 Sephadex G-75 进一步纯化去除杂

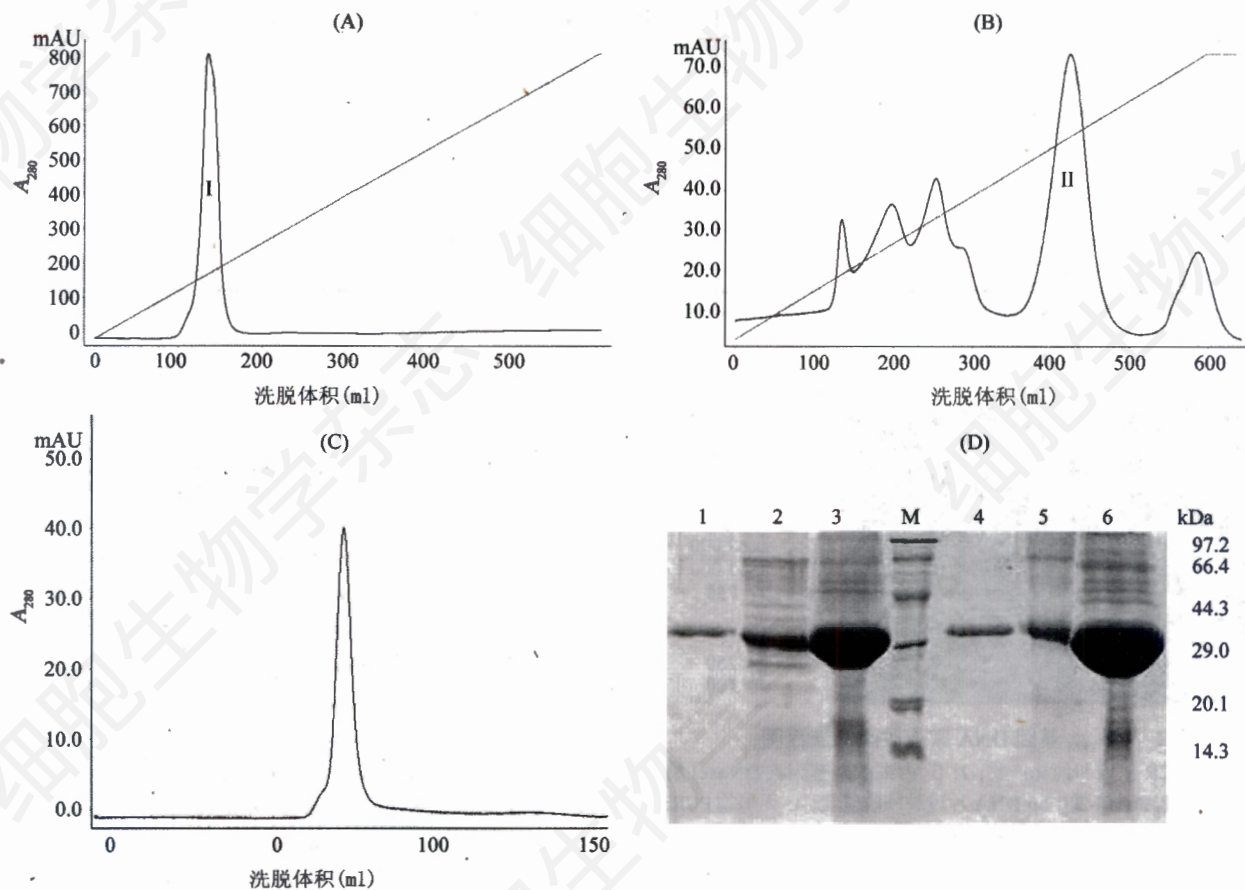


图3 野生酶与突变体酶的层析图和 SDS-PAGE 分析

A: DEAE Sepharose F.F.柱上复性目的蛋白图, I 峰为复性过程中洗出的蛋白质; B: DEAE Sepharose F.F.分离纯化目的蛋白图, II 峰经 nitrocefin 鉴定为目的蛋白峰; C: Sephadex G-75 纯化目的蛋白图; D: 野生酶与突变体酶的 SDS-PAGE 分析, M: marker, 1 和 4: 经分子筛 Sephadex G-75 纯化的突变体酶和野生酶, 2 和 5: 以阴离子交换柱 DEAE Sepharose F.F.柱上复性和纯化的突变体酶和野生酶, 3 和 6: IPTG 诱导的经 8 mol/L 尿素溶解的包涵体。

表2 改组前后 β -内酰胺酶的酶动力学参数

底物	TEM-3			TEM ^m		
	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$)	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$)
PG	9.5	34	3.58	3.2	17	5.31
AMP	41	23.6	0.58	4.9	12.5	2.55
CXM	/	/	/	/	/	/
CEZ	195.2	22.8	0.11	137.1	49.6	0.36
CTX	78.9	44.2	0.56	28.9	6.5	0.22
CAZ	91	5.12	0.056	64.8	10.1	0.16

这两种 β -内酰胺酶都不能有效水解 CXM。

蛋白, 纯度达到 90% (图 3C)。SDS-PAGE 分析纯化过程的各个步骤所获得的蛋白质组分(图 3D)指出纯度逐步增加。

2.5 酶动力学分析

从表 2 中可以看出经 DNA 改组后的 TEM 型 β -内酰胺酶对 β -内酰胺类抗生素的催化效率有不同程

度的改变, 对于 PG 和 AMP 的 k_{cat}/K_m 较改组前(TEM-3)分别增高 1.5 倍和 4.4 倍, 对于 CEZ 和 CAZ 的 k_{cat}/K_m 较改组前(TEM-3)分别增高 3.1 倍和 2.8 倍, 而对 CTX 的 k_{cat}/K_m 较改组前却明显降低 2.5 倍, 这表明经第一轮 DNA 改组后富集有益突变, 产生活性增高的突变酶, 其催化效率有一定程度的增高。

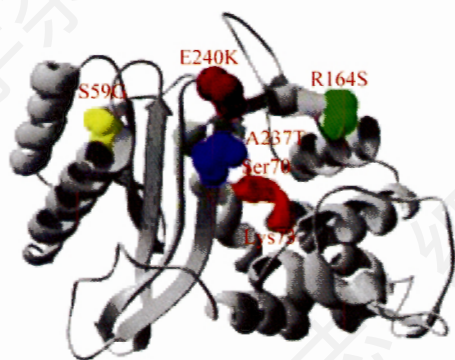


图4 突变体酶的三级结构预测分析

红色表示活性中心 70SXXK73, 黄色为 S59G, 绿色为 R164S, 蓝色为 A237T, 褐色为 E240K。

3 讨论

DNA改组是模拟自然进化进程的体外定向进化技术,它能产生点突变或多个突变组合,而且能富集有益突变。通过对几个 TEM 型 β -内酰胺酶进行一轮 DNA 改组,我们得到一株 β -内酰胺酶活性增高的菌株, β -内酰胺类抗生素(包括青霉素类和头孢菌素类)对其的 MIC 与对改组前菌株有不同程度的增高(表 1)。而且比较改组前后 TEM 型 ESBL 的催化效率即 k_{cat}/K_m ,可见突变酶 TEM^m较 TEM-3 对除了 CTX 以外其他 β -内酰胺类抗生素水解活性增高,这与 MIC 的检测结果是基本一致的(表 2)。通过与 TEM-1 型 β -内酰胺酶氨基酸序列比对并用 Swiss-Pdb Viewer 3.7 软件预测其三级结构显示如下氨基酸改变: S59G、R164S、A237T 和 E240K(图 4),这可能是其对 β -内酰胺类抗生素耐药性增加的原因。

Ghuysen 等^[8]报道指出 TEM 型 β -内酰胺酶的活性中心为由 70~73 位的 SXXK 的 4 个氨基酸组成的四联体组成,它位于催化腔底部,其中 Ser 为活性位点,故又称为活性位点丝氨酸酶。第 2 个序列为三联体 Ser130-Asp-Asn132 (SDN)形成催化腔的一个侧面。第 3 个序列为 Lys234-Thy-Gly236 (KTG)形成催化腔的另一个侧面,其位于 β 折叠上,KTG 和 SDN 之间通过氢键连接起稳定的作用,这几个序列在 A 类 β -内酰胺酶中为高度保守序列。另外 166~170 位点上数个氨基酸残基组成 Ω 环,环上氨基酸序列在 TEM 型酶中高度保守, Ω 环可将亲核水解反应所需的水分子准确定位。SXXK、KTG、SDN 和 Ω 环这几个结构域单元之间的空间相对位置所形成的腔即为 β -内酰胺底物与酶作用的“键合腔(binding cavity)”, α 螺旋结构正好使丝氨酸活性位点 Ser70 定位于键合腔的中央,Arg164 与 Asp179 之间通过静

电引力和氢键作用共同维护 Ω 环的结构^[9]。Ser70 的 -OH、-NH- 和 Ala237 的 -NH- 共同形成 oxyanion 盒(酰化反应点), β -内酰胺环上的羰基在此与 -OH、-NH- 形成酰化酶复合物。

研究认为 TEM 型 β -内酰胺酶中 164 位氨基酸替代是最常见的,若发生 Arg164 \rightarrow Ser 或 His 取代,后者较弱的氢键作用和静电引力使得 164 与 179 位点之间的结构松弛,从而增加了 Ω 环的柔韧性,这样更利于具有较大空间位阻的底物进入活性中心,同时, Ω 环的改变有可能使环上的 Glu166 与水分子之间的连接发生改变^[10,11]。Sowek 等^[12]通过对 TEM-1 基因 Arg164 \rightarrow Ser 点突变获得的 TEM-21 基因表达的酶对 CTX、CAZ 和氨曲南的 k_{cat}/K_m 值有显著增加^[12]。Blazquez 等^[13]的研究表明在 TEM 型酶中,如果单独发生 A237T 不能使菌株的耐药表型发生变化,而当 A237T 与 TEM-10 的两个突变(R146S 和 E240K)同时发生时,则使 TEM-10 的耐药表型发生很大改变,因此,Blazquez 认为 237 位点的突变是调节性突变,它能影响酶的底物优先性并为细菌适应将来可能出现的环境变化提供了进化潜能。Kurokawa 等^[14]报道位于键合腔附近的 240 位氨基酸由 Glu \rightarrow Lys 时能够减少与 CAZ 的空间位阻,所以突变酶发生 Arg164 \rightarrow Ser、Ala237 \rightarrow Thr 和 Glu240 \rightarrow Lys 突变可能是引起其增强水解 CAZ,而减弱水解 CTX 的原因。至于 CTX 的耐药性增加而催化效率却降低,还可能与细菌其他的耐药机制如细菌细胞膜的通透性增加,以及与抗生素本身结构的不同有关,其中机制还未明了,有待进一步研究。

因此,我们认为 DNA 改组产生的 S59G、R164S、A237T 和 E240K 位点突变导致 TEM^m 水解第三代头孢菌素的能力增加,从而导致细菌对该类抗生素的 MIC 提高。提示多轮 DNA 改组有可能获得活性不断增高的突变株,有助于研究细菌耐药酶的进化及其新型抗生素的研制。另一方面,活性更强的 β -内酰胺酶也可以开发成未来的抗生素清除剂。

参考文献(References)

- [1] 向 倩等. 中国医学科学院学报, 2006, 28: 298
- [2] Stemmer WPC. Nature, 1994, 370: 389
- [3] Graddis TJ et al. Curr Pharm Biotechnol, 2002, 3: 285
- [4] Zhang XY et al. J Zhejiang Univ SCIENCE A, 2006, 7: 1948
- [5] 朱卫民等. 中国抗生素杂志, 2001, 26: 460
- [6] 潘建华等. 细胞生物学杂志, 2006, 28: 711
- [7] Bradford MM et al. Anal Biochem, 1976, 72: 248
- [8] Ghuysen JM. Trends Microbiol, 1994, 2: 372

- [9] Knox JR *et al. J Mol Biol*, 1991, **220**: 435
[10] Escobar WA *et al. Biochemistry*, 1994, **33**: 7619
[11] Palzkill T *et al. Mol Microbiol*, 1994, **12**: 217
[12] Soweck JA *et al. Biochemistry*, 1991, **30**: 3179
[13] Blazquez J *et al. Antimicrob Agents Chemother*, 1998, **42**: 1042
[14] Kurokawa H *et al. Antimicrob Agents Chemother*, 2003, **47**: 2981

Isolation, Expression and Characterization of Enhanced Activity β -Lactamase

Fei Lai^{1,2}, Yu-Xin Tian^{1,2}, Feng Zhao^{1,2}, Zhen Wang^{1,2}, Jian-Xin Lu^{1,2}

(¹Institute of Cellular and Molecular Medicine, Laboratory Medicine College; ²Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics; Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract We constructed *bla*_{TEM} mutant library with DNA family shuffling. A mutant (*bla*_{TEM}^m-pET28a/BL21) with improved activity was obtained with the elementary plate screening and secondary agar dilution. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of *E. coli* BL21 (pET28a-*bla*_{TEM}^m) were two to four times (ampicillin), four to eight times (cephazoline), four to eight times (cefuroxime), sixteen to thirty-two times (ceftazidime), more eight times (ceftriaxone) and four to eight times (cefotaxime) higher than the wide type. Both TEM^m and TEM were expressed efficiently in *E. coli* BL21 (DE3) but mainly present in inclusion bodies. The proteins could be refolded by ion-exchange chromatography using the urea linear gradient strategy, and were further purified with size-exclusion chromatography. The recovered proteins could reach 90% homogeneity. The enzymatic dynamics were determined, indicating that k_{cat}/K_m of β -lactam hydrolysis was all increased respectively, except cefotaxime. Gene analysis of *bla*_{TEM}^m indicated that there were several site mutations in TEM^m causing four amino acid substitutions, i.e. S59G, R164S, A237T and E240K. Tertiary structure of the mutant enzyme was predicated with swiss-Pdb Viewer 3.7, suggesting that all the substitutions did not influence the active centre of enzyme, but the subtle variation of the enzyme's spatial structure may enhance the affinity between enzyme and substrate.

Key words β -lactamase; DNA family shuffling; minimum inhibitory concentration; drug resistance

Received: March 26, 2008 Accepted: May 30, 2008

This work was supported by Key Program of the Science and Technology Department of Zhejiang Province (No.2004C23018)

*Corresponding author. Tel: 86-577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com