

文章编号:1673-1689(2007)06-0095-04

木薯醇腈酶部分酶学性质研究

王丹, 李亚, 张涛, 何浪

(成都医学院 基础医学院, 四川 成都 610081)

摘要: 对利用基因重组技术获得的木薯醇腈酶(HNL)的酶学特异性进行研究, 确定了其部分酶学性质。重组木薯 HNL 的最适温度为 50 ℃, 最适 pH 值为 5.5。重组木薯 HNL 在 60 ℃ 条件下, 保温 30 min 后仍具有 90% 的酶活力, 说明温度稳定性较好; 在 pH 4.0~6.0 的条件下, 获得的相对酶活仍大于 80%。

关键词: 木薯; 醇腈酶; 酶学性质

中图分类号: S 533

文献标识码: A

Studies on the Enzyme Property of Hydroxynitrile Lyas from Cassava

WANG Dan, LI Ya, ZHANG Tao, HE Lang

(School of Basic Medical Sciences, Chengdu Medical College, Chengdu 610081, China)

Abstract: The enzyme property of hydroxynitrile lyas which was obtained by gene engineering technology were studied in this manuscript. The part of enzyme properties were determined. The optimal condition of the enzyme was pH 5.5 and 50 ℃. Under 60 ℃, after 30min the relative activity of recombinant hydroxynitrile lyase from cassava remained 90%. This indicated the enzyme had a high stability to temperature. The relative activity was over 80% between pH 4.0 and pH 6.0.

Key words: cassava; hydroxynitrile lyase; enzyme property

木薯又叫树薯、木番薯, 属多年生灌木, 是世界三大薯类(马铃薯、甘薯、木薯)之一, 起源于热带美洲, 十分耐旱耐瘠, 基本不用浇水或施肥, 在山坡或平地都可种植, 不需要田间管理, 因此木薯是非洲主要的粮食作物。在我国, 木薯的种植主要分布在广西、海南、云南、贵州等地。目前将木薯叶粉添加在家禽、牲畜等饲料中, 可以提高饲料的蛋白质含量, 同时木薯叶也是矿物质和叶黄素的来源。但大量的事实表明^[1], 过量或不恰当的食用木薯等含氰

植物, 可引起人畜食物中毒, 甚至危害其生命。HNL 作为一种生物催化剂能可逆地催化由 HCN 和醛(或酮)生成光学活性氰醇的反应。催化的分解反应可应用于消除木薯等含氰食品或饲料的毒性^[2]。目前, 该酶主要应用于生物转化。利用 HNL 催化的合成反应可生成光学活性氰醇, 该酶促反应具有高度的立体专一性, 产物手性氰醇可转化成羟基化合物、胺化合物、羧基化合物等多种重要中间体, 进而转化成多种手性药物^[3], 在不对

收稿日期: 2006-11-09.

基金项目: 四川省青年基金项目(2006B112).

作者简介: 王丹(1977-), 女, 辽宁辽阳人, 理学硕士, 讲师, 主要从事生物化学与分子生物学研究.

Email: wangdan770815@yahoo.com.cn

通讯作者: 何浪(1979-), 女, 四川攀枝花人, 理学硕士, 讲师, 主要从事生物化学与分子生物学研究.

Email: helang79@sohu.com

称合成领域中, HNL 也成为人们研究的热点。尽管 HNL 在自然界中广泛存在, 但从自然界直接获得不仅得率低而且纯化难, 这就限制了 HNL 在食品、医药、精细化工等领域的广泛应用。对此, 作者利用基因工程技术, 将编码木薯 HNLcDNA 克隆到原核表达载体 pBV220 上, 构建了大肠杆菌 (*Esch-Erichia coli*) 中表达质粒 pBV220-HNL, 并通过温度诱导, 在 *Escherichia coli* DH5 α 实现了木薯 HNL 的初步表达, 并对其酶学性质进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

限制酶、DNA 相对分子质量标准, 中等相对分子质量蛋白质标准及各类抗生素等, 分别购自华美生物工程公司、Promega 等公司; (dl) 扁桃腈购自 Fluka 公司; 其余化学试剂均为国产分析纯和进口分析纯。培养基为 LA 培养基, 参照“分子克隆”第二版配制^[4]。

1.2 方法

1.2.1 重组基因工程菌的诱导表达 挑取重组子的单菌落接种于 2 mL 的 LA 液体培养基中, 37 °C 振荡培养至 A₆₀₀ 值为 0.4~0.6, 再以体积分数 2% 的接种量转接到 10 mL LA 液体培养基中, 32 °C 振荡培养 5 h 后, 取出 1 mL 发酵液作为诱导 0 h 的样品, 再迅速升温到 42 °C, 连续振荡培养 6 h, 并每隔 1 h 分别取样 1 mL, 用于表达产物的鉴定和酶活的测定。

1.2.2 酶活测定 获得的复性蛋白根据 HNL 可催化 (dl)-扁桃腈裂解为氢氰酸和苯甲醛, 且后者在 280 nm 有很高的吸收峰, 而底物在此波长的吸光度低, 可忽略不计^[5]。测定 HNL 酶活, 反应体系: 3.95 mL 0.05 mol/mL Na₂HPO₄-Citrate 缓冲液 (pH 5.0), 0.04 mL 酶液, 0.004 mL (dl)-扁桃腈, 0.04 mL 无水乙醇。30 °C 反应 1 min, 在 755B 型紫外-可见分光光度计下检测 1 min A_{280 nm} 的变化 (ΔA), 减去底物自发化学分解的本底后 ($\Delta A'$), 依照如下公式计算酶活力: 酶活力 (U/mL) = $\Delta A' \times 4/1.3$ 。在上述条件下 1 min 生成 1 μ mol 苯甲醛所需的酶量定义为 1 个酶活力单位 (U)^[6]。

1.2.3 表达产物的分离纯化 用 8 mol/L 尿素和 10 mmol/L DTT 的裂解液, 按体积比 1:10 的比例溶解包涵体, 并在 4 °C 条件下搅拌 3 h, 所获得的包涵体溶解液再经 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 并加入 3 倍体积的复性液 (20 mmol/L Tris-His, pH 8.5; 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽;

1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽) 室温复性 1 h, 再加复性液稀释 30 倍后于 4 °C 复性过夜, 待用。

1.2.4 相对分子质量测定 发酵培养物在 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 所得沉淀悬浮于一定体积的 TE 中, 并加至 1 mg/mL 溶菌酶, 超声波破壁 (6 $\times$ 30 s) 后于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀并用 20 μ L 上样 buffer 重新悬浮, 再加热变性后, 上样, 进行 12 g/dL SDS-PAGE, 检测目的蛋白质表达水平和相对分子质量。

1.2.5 最适温度及酶的热稳定性测定 在不同温度下: 10、20、30、40、50、60、70 °C, 测定重组酶活力, 计算其在不同温度下的相对酶活力; 并将重组木薯 HNL 在不同温度下保温 30 min, 检测剩余的酶活。

1.2.6 最适 pH 值及其稳定性的测定 以 dl-扁桃腈为底物, 在 pH 分别为 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 的缓冲溶液中, 按酶活测定方法中所述, 进行酶活测定, 计算其在各 pH 值下的相对酶活力; 并将重组木薯 HNL 在不同 pH 值的缓冲液中, 50 °C 保温 30 min, 检测剩余的酶活力。

2 结果

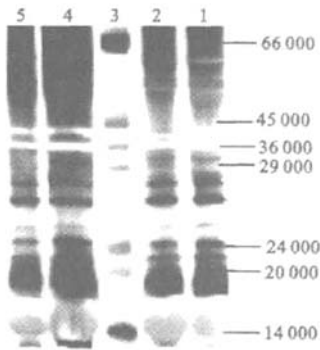
2.1 木薯 HNL 基因的诱导表达及相对分子质量的测定

重组工程菌按方法中所述, 通过迅速升温诱导 HNL 基因的表达, 并将每小时所取的 1 mL 发酵液样品进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳检测。结果如图 1 所示: 在第 1、2、4 道分别是诱导 1、2、3 h 的表达产物, 在 29 000 左右均清晰可见表达的特异蛋白条带, 相对分子质量均为 30 000 左右, 这与理论值相符。随着诱导时间的增加, 特异蛋白条带颜色逐渐加深, 即蛋白质表达量逐渐增多, 最终可占菌体总蛋白质的 35% 左右。而第 5 道是诱导 0 h 的样品, 在此处无明显条带, 说明 HNL 基因在大肠杆菌中成功表达。经多次电泳实验, 发酵液上清液和细胞裂解上清液中没有发现基因表达产物, 但在裂解沉淀中大量存在, 证明重组蛋白是以包涵体形式在 *E. coli* DH5 α 中表达的。

2.2 诱导表达产物的酶活检测

将细胞裂解后所得到的包涵体经溶解和复性处理后, 按照方法中所述, 进行酶活测定。将所获的酶活测定结果以诱导时间为横坐标, 以相对吸光度值 $\Delta A'$ (1 min A_{280 nm} 的变化, 减去底物自发化学分解的本底) 为纵坐标, 做酶活曲线图 (见图 2, 3)。由图可见: 随着诱导时间的延长, 酶活逐渐增加, 当诱导时间达到 3 h 时, 所测酶活最高; 超过 3 h, 重

组 HNL 的酶活有所下降,此结果具有重复性。所测最高酶活力为 5 460 U/L。



1. 阳性转化子诱导 1 h; 2. 阳性转化子诱导 2 h; 3. 中等分子量蛋白质标准; 4. 阳性转化子诱导 3 h; 5. 阳性转化子诱导 0 h

图 1 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 1 The result of SDS-PAGE

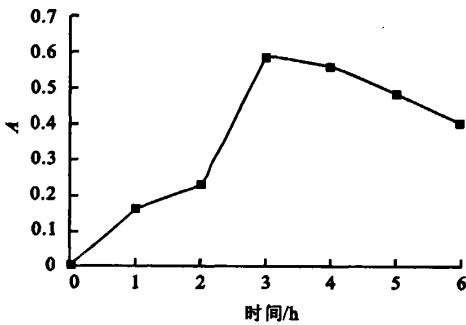


图 2 酶活测定曲线

Fig. 2 The curve of enzyme activity measurement

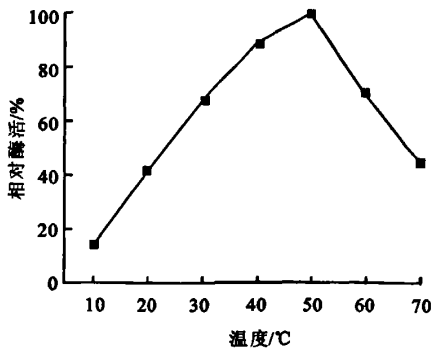


图 3 温度对重组木薯 HNL 酶活的影响

Fig. 3 Effect of temperature on HNL activity

2.3 重组木薯 HNL 最适温度及温度稳定性

不同温度下对重组酶活进行测定,以最高酶活为 100%计,其相对酶活曲线如图 3 所示,在较低温度下,升高温度可加快酶的水解速度,但高温会使酶蛋白质变性。温度对酶促反应速度的影响由这两方面因素综合决定。酶促反应速度达最大值时的速度即为该酶的最适温度。由图 4 所知,该重组

酶的最适作用温度为 50 ℃,与文献[3]报道的 46 ℃相接近,与文献[7]报道的最适温度 40 ℃相比,获得的重组木薯 HNL 的耐热性更强。将重组木薯 HNL 的酶液分别在不同温度下保温 30 min,检测剩余的酶活力,结果如图 4 所示,重组木薯 HNL 在 60 ℃下保温 30 min 后仍具有 90%的酶活力,说明该酶的温度性较好。在 70 ℃条件下,保温 30 min,酶活力下降 40%。

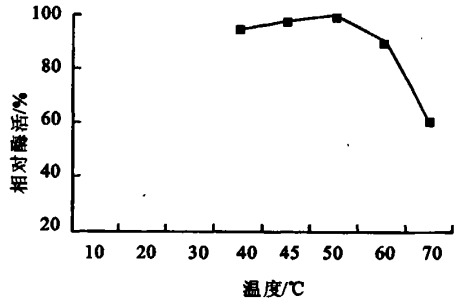


图 4 重组表达木薯 HNL 的温度稳定性

Fig. 4 Effect of temperature on HNL stability

2.4 重组木薯 HNL 反应最适 pH 及 pH 稳定性

如图 5 所示,重组木薯 HNL 的最适 pH 是 5.5,与文献报道的相符。将重组木薯 HNL 在不同的缓冲液中 50 ℃保温 30 min,检测剩余的酶活力,结果如图 6 所示,该酶在 pH 4.0~6.0 的条件下保温 30 min 后仍具有 80%以上的酶活力。

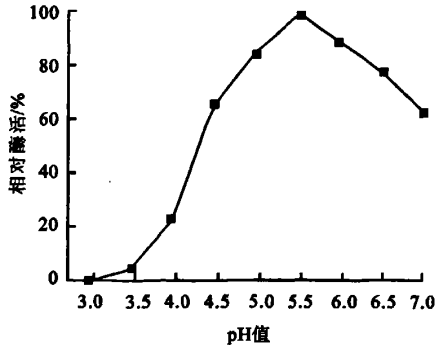


图 5 pH 值对重组木薯 HNL 酶活的影响

Fig. 5 Effect of pH on HNL activity

3 结 语

目前,国内外已有许多关于木薯 HNL 克隆与表达的报道:例如,国外 Hughes^[7]等人在大肠杆菌中成功表达了克隆到的木薯 ME-HNL 基因,而 Hasslacher 等人^[8]也分别利用大肠杆菌、酿酒酵母、甲醇酵母表达三叶胶 HNLcDNA,但其研究结果仍处于实验阶段,表达水平不高。国内仅有一家报道了利用大肠杆菌表达可溶性木薯 HNL,酶活

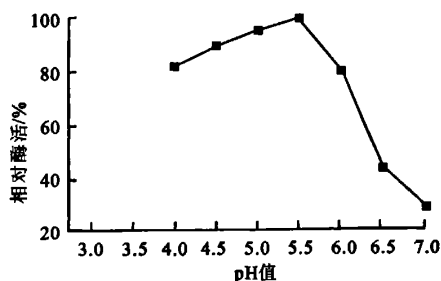


图6 重组表达木薯 HNL 酶活的 pH 值稳定性

Fig. 6 Effect of pH on HNL stability

力达到 2 100 U/L(以发酵液计)^[4],研究获得的最
高酶活力为 5 460 U/L。

研究该重组酶学性质的结果是:获得的重组木
薯 HNL 的最适温度为 50 ℃,重组木薯 HNL 在
60 ℃下保温 30 min 后仍具有 90% 的酶活力,说明
该酶的温度稳定性较好;最适 pH 值为 5.5,对于
pH 变化的适应性较强,在 pH 4.0~6.0 范围内较
为稳定,相对酶活力大于 80%。

参考文献(References):

- [1] 何培表,柳春燕,郝林华. 植物挥发性物质与植物抗病防御反应[J]. 植物生理学通讯, 2005,41(1):105-111.
HE Pei-qing, LIU Chun-yan, HAO Lin-hua. Volatile Organic Compounds and Plant Defence Against Pathogenic Diseases [J]. *Plant Physiology Communications*, 2005,41(1):105-111. (in Chinese)
- [2] 程树华,严洪鸣,孙万儒. 木薯 α -羟腈酶的克隆、表达及初步应用 [J]. 生物工程学报, 2001,17(1):78-83.
CHENG Shu-hua, YANG Hong-ming, SHUN Wang-ru. Cloning, expression and preliminary application of a hydroxynitrile lyase from cassava[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001,17(1):78-83. (in Chinese)
- [3] White W LB, Arias-Garzon D I. Cyanogenesis in cassava. The role of Hydroxynitrile Lyase in Root Cyanide Production [J]. *Plant physiol*, 1998,116:1219-1225.
- [4] (美)J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯等著. 分子克隆实验指南[M](第二版), 金冬雁, 黎孟枫译, 北京: 科学出版社, 1989.
- [5] Colette Bovef, Erice, Conn. Metabolism of aromatic compounds in higher plants[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1961, 236(1): 207-211.
- [6] Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72:24-254.
- [7] Hughes J, Lakey J H, Hughes M A. Production and characterization of a plant α -hydroxynitrile lyase in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997, 53(3): 332-338.
- [8] Meinhard Hasslacher, Michael Schall, Marianne Hayn, et al. Molecular cloning of the full-length cDNA of (S)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* functional expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* and identification of an active site residue[J]. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc*, 1996, 271 (10): 5884-5899.
- [9] Albers H, Bamann E, Myrback K, et al. Methoden der fermentfor schung[J]. *George Thim Lie pzig*, 1941,8:2137-2141.
- [10] 尚宏丽, 陈红漫. 一株产海藻糖合成酶嗜中温芽孢杆菌的鉴定及其酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2006,25(6):34-36.
SHANG Hong-li, CHEN Hong-man. Studies on Screening of Trehalose Synthase-Producing Strain and Its Enzymology Properties[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006,25(6):34-36. (in Chinese)
- [11] 肖怀秋, 林亲录, 李玉珍. 中性蛋白酶芽孢杆菌 BX-4 产酶条件及部分酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2005,24 (4):42-46,56.
XIAO Huai-qiu, LIN Qin-lu, LI Yu-zhen. Studies on Protease Production Conditions and Enzyme Characterizations of Neutral Protease-Producing Strain *Bacillus* BX-4 [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005,24(4):42-46,56. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)