

胃乙醇脱氢酶 $\delta\delta$ -ADH 的原核表达及酶学性质

常开霞^{1,2,3}, 孙军勇^{1,2,3}, 李晓敏^{1,2,3}, 吴殿辉^{1,2,3}, 朱德伟^{1,2,3}, 陆健^{*1,2,3}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为获得人胃乙醇脱氢酶 $\delta\delta$ -ADH, 根据 GeneBank 中 $\delta\delta$ -ADH 的基因序列合成目的基因 *ADH7*, 构建重组表达载体 pET-32a(+)-*ADH7*, 并转化大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)。获得的阳性转化子经异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达, SDS-PAGE 电泳结果显示, 目的蛋白质以包涵体的形式得到大量表达。用 1 mol/L 尿素溶解包涵体获得有活性的粗酶液, 经 HisTrapTM excel 亲和层析柱纯化获得目的蛋白质, 检测 $\delta\delta$ -ADH 酶活并对其基本酶学性质进行研究。结果显示, $\delta\delta$ -ADH 的活性为 2.085 U/mg, K_m 为 28.43 mmol/L, V_{max} 为 316.46 μ mol/(L $\cdot$ min)。 $\delta\delta$ -ADH 的最适反应温度为 40 $^{\circ}$ C, 在 30~50 $^{\circ}$ C 范围内温浴 60 min, 相对酶活在 47% 以上; 最适 pH 为 9.0, 将 $\delta\delta$ -ADH 在不同 pH (pH 3.0~11.0) 的广泛缓冲液中于 25 $^{\circ}$ C 保温 30 min, 在 pH 6.0~11.0 范围内酶活较稳定。pH 5.0 时, 相对酶活剩余 60%; 在 0、500、1 000、1 500 mmol/L 乙醇中 37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min, 相对酶活分别为 65.6%、51.1%、45.4% 和 44.4%。

关键词: 乙醇脱氢酶; $\delta\delta$ -ADH; 基因克隆; 酶学性质

中图分类号: Q 78 文章编号: 1673-1689(2019)07-0078-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.07.011

Expression and Enzymatic Properties of Stomach Alcohol Dehydrogenase $\delta\delta$ -ADH in *Escherichia coli*

CHANG Kaixia^{1,2,3}, SUN Junyong^{1,2,3}, LI Xiaomin^{1,2,3}, WU Dianhui^{1,2,3}, ZHU Dewei^{1,2,3}, LU Jian^{*1,2,3}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to gain the $\delta\delta$ -ADH from human stomach, the target gene was synthesized according to the sequence of human stomach alcohol dehydrogenase $\delta\delta$ -ADH gene *ADH7* in GeneBank, inserted into plasmid pET-32a(+) which was transformed into *E.coli* BL21 (DE3). IPTG was used to induce the expression of $\delta\delta$ -ADH in *E.coli* BL21 (DE3). $\delta\delta$ -ADH still existed in the form of inclusion body even after optimizing the expression conditions. Active crude enzyme solution was obtained after the inclusion body was solubilized with 1 mol/L urea and the target protein was purified by HisTrapTM excel affinity chromatography column. Then the specific activity

收稿日期: 2016-12-21

基金项目: 国家 863 计划项目(2013AA102109); 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

* 通信作者: 陆健(1968—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事啤酒酿造微生物与酶技术、黄酒酿造微生物与酶体系、新型生物制剂(大宗饲料原料的生物技术处理)等方面的研究。E-mail: jlu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 常开霞, 孙军勇, 李晓敏, 等. 胃乙醇脱氢酶 $\delta\delta$ -ADH 的原核表达及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(07): 78-85.

of the enzyme and its essential enzymatic properties were studied. The results showed that the specific activity of $\delta\delta$ -ADH was 2.085 U/mg, K_m was 28.43 mmol/L and V_{max} was 316.46 μ mol/ (L $\cdot$ min). The optimum reaction temperature of $\delta\delta$ -ADH was 40 $^{\circ}$ C, and its specific activity decreased to a value which was about half of the maximal activity after a water bath in 30~50 $^{\circ}$ C for 60 min. The optimum pH of $\delta\delta$ -ADH was 9.0, after a water bath in different pH buffer in 25 $^{\circ}$ C for 30 min, the enzyme activity of $\delta\delta$ -ADH kept almost consistent at pH 6.0~11.0, while the relative enzyme activity was only 60% remained at pH 5.0. After a water bath in different concentrations of alcohol (0, 500, 1 000, 1 500 mmol/L) in 37 $^{\circ}$ C, the relative enzyme activities of $\delta\delta$ -ADH were 65.6%, 51.1%, 45.4% and 44.4%, respectively.

Keywords: alcohol dehydrogenase, $\delta\delta$ -ADH, gene cloning, enzymatic properties

乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenases, ADH, EC1.1.1.1) 是一类以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 为辅酶、以锌原子为辅基的二聚体酶, 是乙醇代谢的关键酶^[1]。人体中, 乙醇脱氢酶可催化乙醇转化为乙醛, 乙醛由乙醛脱氢酶继续催化转化为乙酸, 乙酸经过三羧酸循环途径转化为二氧化碳和水排出体外^[2]。目前, 人体内的乙醇脱氢酶有 5 大类: ADH I、ADH II、ADH III、ADH IV 和 ADH V, 其中 ADH IV 类由 $\delta\delta$ -ADH 组成, 其亚基为 δ (或者 μ)^[3-4]。 $\delta\delta$ -ADH 是惟一不存在于肝脏的乙醇脱氢酶, 它主要分布于胃粘膜细胞中^[5]。

随着社交需要和生活压力的增大, 一方面酒精饮品的消耗量不断增加, 另一方面人们对解酒保肝类物质的需求日益迫切, 因而用乙醇脱氢酶来研制解酒药将成为一项重要的应用和发展趋势^[6]。目前国内关于人乙醇脱氢酶的研究主要集中在肝脏中的 ADH I 类^[7-8], 其中 ADH1B*2、ADH1C*1 是 I 类乙醇脱氢酶中活性最高的两种形式^[9], 它们也存在于胃粘膜或者胃肌肉细胞中^[5]。实验证明^[9], 当乙醇浓度小于 10 mmol/L 时, ADH1B*2 是各类人乙醇脱氢酶中活性最高的酶; 但当乙醇浓度大于 10 mmol/L 时, $\delta\delta$ -ADH 的活性最高。饮酒后, 胃中乙醇浓度可达摩尔级水平。研究指出^[10], 当每千克体重饮入 0.8 g 纯乙醇时, 胃腔中乙醇浓度可以达到 1.5 mol/L。在饮酒后乙醇浓度较高的胃环境中, 由于乙醇的底物抑制作用, ADH1B*2、ADH1C*1 氧化乙醇的作用小于 $\delta\delta$ -ADH, $\delta\delta$ -ADH 很可能是人体内氧化高浓度乙醇作用最大的一种酶^[5,11]。

由于大肠杆菌表达系统与其他表达系统相比具有培养简单、培养周期短、成本低, 且目的基因有

表达水平高、抗污染能力强等优点^[12], 因此, 作者利用大肠杆菌表达载体对 $\delta\delta$ -ADH 进行外源表达并对该酶的最适作用温度、最适 pH、温度稳定性、pH 稳定性及乙醇耐受性进行研究, 以期对 $\delta\delta$ -ADH 的进一步研究奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 $\delta\delta$ -ADH 的基因来源 通过 NCBI 获得 $\delta\delta$ -ADH 编码基因 *ADH7* 的序列 (GenBank 登录号: L47166.1), 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 5'端和 3'端分别预设计酶切位点 *Bam*H I 和 *Sal* I。

1.1.2 质粒及其他试剂 质粒 pMD19T-simple、pET-32a(+), *E.coli* JM109、*E.coli* BL21 (DE3): 均由作者所在实验室保藏。细菌质粒提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒, 限制性内切酶、DNA 聚合酶、T4 连接酶、异丙基硫化- β -D-半乳糖苷 (IPTG), DNA Marker、标准蛋白质 Marker: 均购自大连宝生物技术有限公司; 其他化学试剂: 均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体的构建 为了提高酶切效率, 首先将 *ADH7* 与克隆载体 pMD19T-simple 连接, 获得重组质粒 pMD19T-*ADH7*。利用 *Bam*H I 和 *Sal* I 将 pMD19T-*ADH7* 和 pET-32a(+) 分别进行双酶切后, 回收目的片段 *ADH7* 和 pET-32a(+) 质粒片段, 经 T4 连接酶连接构建重组表达载体 pET-32a(+)-*ADH7*, 并通过化学方法转化大肠杆菌 *E.coli* BL21 (DE3), 将转化液涂布在含氨苄青霉素 (100 μ g/L)

的 LB 固体培养基上,经 37 ℃过夜培养后,挑选转化子进行菌落 PCR 验证。

菌落 PCR 反应时,首先经 95 ℃预变性 5 min,之后于 94 ℃变性 30 s,52 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min 20 s,循环 30 次,然后在 72 ℃延伸 10 min。最后 PCR 产物用 1 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 大肠杆菌的诱导表达^[2] 挑取含重组表达质粒(pET-32a(+)-ADH7)及空质粒(pET-32a(+))的阳性转化子,分别接种于 3 mL 含 100 μ g/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养过夜,然后按 1%的接种体积分数进行扩大培养,当菌液浓度达到 OD₆₀₀ 值为 0.6 时加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L),并于 37 ℃继续培养 6 h。

1.2.3 包涵体的制备与目的蛋白质的纯化

1)包涵体的制备^[13-14]:菌液离心后去上清液,用破胞液(50 mmol/L Tris-HCl,150 mmol/L NaCl,10 mmol/L EDTA,pH 8.0)重悬菌体并将其冰浴超声破碎 14 min(超声 3 s,间隔 6 s,功率 350 W),8 000 r/min、4 ℃下离心 15 min,收获粗包涵体沉淀。沉淀经包涵体洗涤液(50 mmol/L Tris-HCl,150 mmol/L NaCl,2 mol/L 尿素,0.5% Triton X-100,1 mmol/L EDTA,pH 8.0)冲洗一次,再经水洗一次后于 8 000 r/min、4 ℃下离心 15 min,收获的沉淀即为纯化的 $\delta\delta$ -ADH 包涵体,并利用含低浓度尿素的溶解液溶解包涵体,离心取上清液获得含有重组目的蛋白质的粗酶液。

2)目的蛋白质的纯化:载体 pET-32a(+)中含有 S tag,His tag 以及 Trx tag 三种标签(共 18 000)。作者以 His tag 为纯化标签,选用 1 mL HisTrap™ excel 亲和色谱柱对目的蛋白质进行分离纯化。上样前首先用结合液(500 mmol/L NaCl,10 mmol/L 咪唑,20 mmol/L 磷酸钠缓冲液,pH 7.4)平衡镍柱,上样量 10 mL,上样流速为 0.5 mL/min。再用 5 倍柱体积的结合液冲洗,最后用 15 倍柱体积的洗脱缓冲液(500 mmol/L NaCl,500 mmol/L 咪唑,20 mmol/L 磷酸钠缓冲液,pH 7.4)线性梯度洗脱结合蛋白质,洗脱流速为 1 mL/min。上样后开始收集流出液(每管收集 1 mL),并通过 SDS-PAGE 电泳检验分离效果。

1.2.4 乙醇脱氢酶活性检测 ADH 催化乙醇脱氢生成乙醛的同时,NAD⁺被还原成 NADH,鉴于 NAD⁺和 NADH 分别在 260 nm 及 340 nm 处有各自的最大吸收峰,因此测定 340 nm 处吸光度的增加值可

反映 ADH 的活性^[2]。

乙醇脱氢酶 $\delta\delta$ -ADH 的酶活测定参照文献[11]中的方法并稍作修改,酶活测定前,先将一定体积的 0.1 mol/L 甘氨酸/NaOH(pH10.0)缓冲液、NAD⁺及乙醇溶液于 25 ℃温浴 5 min,以确保反应开始时混合液即达到所需温度。然后向混合液中加入酶液,于 25 ℃反应 5 min,沸水浴终止反应并用分光光度计在 340 nm 测定吸光值,见表 1。酶活定义:一个乙醇脱氢酶酶活相当于 25 ℃、1 min 氧化 NAD⁺生成 1 μ mol NADH 所需的酶量。

表 1 乙醇脱氢酶酶活测定体系

Table 1 Alcohol dehydrogenase enzyme activity assay system

试剂	终浓度/(mmol/L)	体积/ μ L
甘氨酸/NaOH(pH 10.0)		3 000
NAD ⁺	2.4	100
乙醇	100	400
酶		100

采用考马斯亮蓝法^[6]测定蛋白质质量浓度,根据以下公式^[15]计算酶比活力:

$$\text{比活力} = \frac{E_{340} \times 3.6}{6.2 \times E_w} \text{ (U/mg)}$$

式中, E_{340} :340 nm 处每分钟吸光值的增大值; E_w :100 μ L 酶液中酶的质量(mg);6.2:NADH 在 340 nm 下的毫摩尔吸光系数($\text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);3.6:试液的总体积(mL)。

1.2.5 乙醇脱氢酶酶学性质研究 对重组酶的 K_m 、最适反应温度、最适反应 pH、温度稳定性^[16](温度范围 30~50 ℃)、pH 稳定性(广泛缓冲液 pH 范围 3.0~11.0)、乙醇耐受性(0、500、1 000、1 500 mmol/L)进行研究,并计算相对酶活。

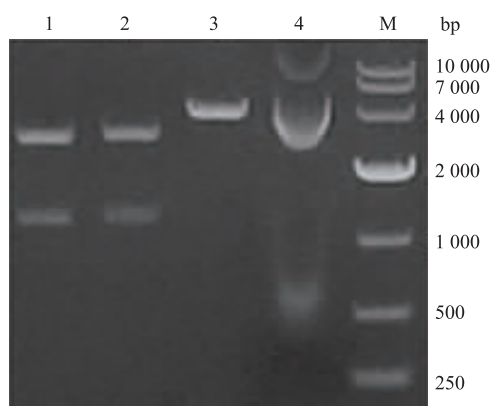
乙醇耐受性实验是将 200 μ L 酶液分别与 100 μ L 不同浓度的乙醇混合,使混合液中的乙醇终浓度分别为 0、500、1 000、1 500 mmol/L,将混合液置于 37 ℃水浴一定时间后取 100 μ L 混合液测定剩余酶活。酶活测定时,加入反应体系中的乙醇浓度分别做相应调整,以确保参与反应的乙醇浓度一致且为 100 mmol/L。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体的构建及鉴定

将 $\delta\delta$ -ADH 的编码基因 ADH7 与 pMD19T-

simple 载体连接,转化 *E.coli* JM109,选择阳性克隆进行酶切验证,结果见图 1。得到一条 1 100 bp 大小的目的条带,与预期大小一致,测序结果证实重组质粒构建正确。

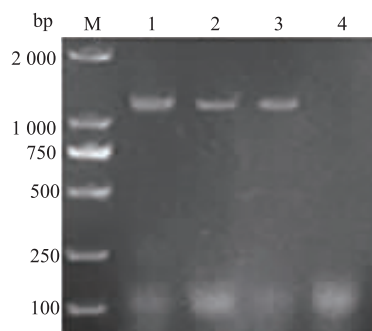


M: 相对分子质量标准 DL10000 ;1-2: 双酶切 pMD19T-ADH7;3: 单酶切的 pMD19T-ADH7;4: 未酶切的 pMD19T-ADH7。

图 1 pMD19T-ADH7 双酶切电泳图

Fig. 1 Plasmid pMD19T-ADH7 digested by double enzymes

将重组质粒 pMD19T-ADH7 转化 *E.coli* BL21 (DE3), 涂布菌液于含有 100 μ g/L 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,挑选转化子进行菌落 PCR 验证。由图 2 可知,转化子克隆出 1 100 bp 大小的条带,说明重组质粒转化成功。



M: 相对分子质量标准 DL2000;1-3: 含 pET-32(+)-ADH7 工程菌菌落 PCR 结果;4: 含 pET-32a(+)-工程菌菌落 PCR 结果。

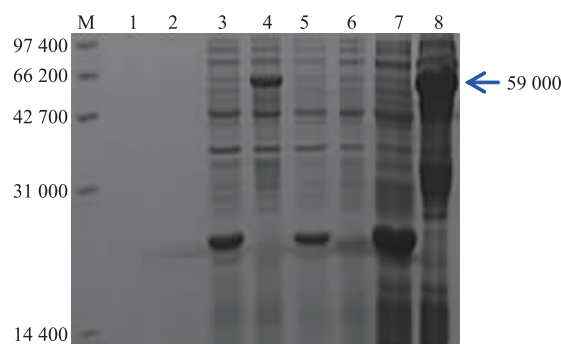
图 2 工程菌菌落 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 2 PCR product of engineering bacteria colony

2.2 大肠杆菌的诱导表达及诱导条件优化

阳性菌 (pET-32a(+)-ADH7) 于 37 $^{\circ}$ C 经 IPTG (终浓度 1 mmol/L) 诱导 6 h, 对发酵液上清液、全细胞、细胞破碎上清液及包涵体进行 SDS-PAGE 电泳分析,见图 3。结果显示,与对照菌株 (pET-32a(+))

相比,阳性菌在 59 000 附近出现一条新带,且表达产物存在于阳性菌的包涵体中。经分析可知,产物大小符合目的蛋白质单亚基 (41 000) 与融合标签 (18 000) 之和,与文献[17]报道相符,因此初步判定阳性菌的表达产物为目标蛋白质。



M: 蛋白质 Marker;1、3、5、7: 对照菌株 (pET-32a(+)) 发酵液上清液、全细胞、细胞破碎液上清液、包涵体;2、4、6、8: 阳性菌 (pET-32a(+)-ADH7) 发酵液上清液、全细胞、细胞破碎液上清液、包涵体。

图 3 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 3 SDS-PAGE of $\delta\delta$ -ADH in different conditions

大肠杆菌可以在短时间里大量表达重组蛋白质,但同时表达的蛋白质常常形成非活性的包涵体。包涵体形成与强的表达系统、高的诱导剂浓度以及相对较高的培养温度有关^[18]。为探索增加细胞中可溶性目的蛋白质含量的诱导条件,将种子液接种于发酵培养基中摇床培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 后,对诱导剂浓度 (IPTG 浓度分别为 0.05、0.1、0.5、1 mmol/L)、诱导温度 (诱导温度分别为 15、20、25、30 $^{\circ}$ C) 及诱导时间 (诱导时间分别为 2、4、6、8、10 h) 进行了优化,结果显示降低 IPTG 浓度、降低诱导温度并不能增加细胞中可溶性目的蛋白质的含量。综合诱导剂成本及蛋白表达量,选择的诱导条件是 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L、诱导温度 30 $^{\circ}$ C、诱导时间为 4 h。

2.3 重组 $\delta\delta$ -ADH 的纯化

前期实验采用传统的方法^[13-14]制备粗酶液,即先用含 2 mol/L 尿素的包涵体洗涤液清洗杂蛋白质,再用含 8 mol/L 尿素的缓冲液溶解包涵体,然而溶解液经稀释复性后得到的粗酶液无活性。由于高浓度的变性剂会严重破坏重组蛋白质的二级结构,产生不可逆变性从而导致包涵体无法复性^[19],因此改用低浓度的尿素溶解包涵体,得到了有活性的包涵体溶解液。

用 1 mol/L 的尿素溶解包涵体, 将该包涵体溶解于 8 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液得到有活性的粗酶液, 酶比活力为 0.202 U/mg。这说明包涵体中本身存在着近似天然的蛋白质二级结构, 它以介于变性和复性状态之间的中间体形式存在^[20], 而用低浓度尿素在溶解蛋白质聚集体的同时使蛋白质天然的二级结构得以保留, 从而使粗酶液表现出了酶活性。粗酶液经镍柱亲和层析纯化, 上样后开始收集流出液得到两个峰, 见图 4, 穿透峰(第 4~14 管)和洗脱峰(第 21~24 管)。分别收集两个峰的流出液进行 SDS-PAGE 电泳检测, 见图 5。结果显示洗脱峰中含有目标蛋白质。

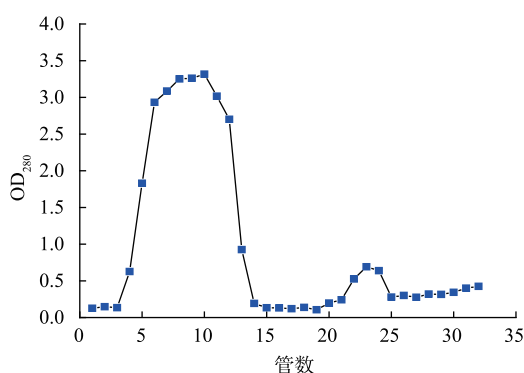
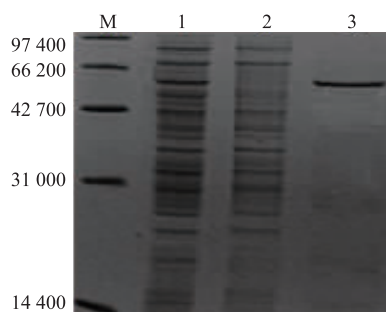


图 4 HisTrap™ excel 色谱柱色谱图谱

Fig. 4 Profiles of HisTrap™ excel chromatography of proteins extracted from recombinant strain



M: 蛋白质 Marker; 1: 粗酶液; 2: 穿透峰; 3: 洗脱峰

图 5 乙醇脱氢酶 $\delta\delta$ -ADH 纯化后的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 5 SDS-PAGE of $\delta\delta$ -ADH after purification

2.4 乙醇脱氢酶活性检测及酶学性质

对 $\delta\delta$ -ADH 的活性进行检测并对其酶学性质进行研究。结果表明, 纯化后酶活为 2.085 U/mg。利用不同浓度的乙醇(1、3、5、7、9、10 mmol/L)为底物, 采用双倒数作图法(图 6)所得方程为 $y=0.003\ 16+0.089\ 84x$ ($r=0.997\ 0$), 求得 $\delta\delta$ -ADH 的米氏常数 K_m

为 28.43 mmol/L, V_{max} 为 316.46 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 。

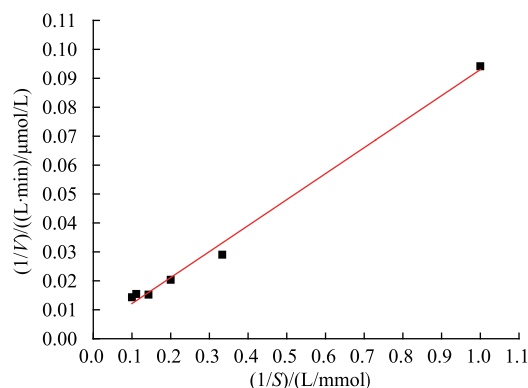


图 6 米氏常数的双倒数作图法

Fig. 6 Lineweaver-Burk plot for K_m

温度对 $\delta\delta$ -ADH 活性的影响见图 7。在 25~40 $^{\circ}\text{C}$ 范围内, $\delta\delta$ -ADH 的活性随着温度的升高而增高, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 时活性达到最大, 超过 40 $^{\circ}\text{C}$ 酶活不断下降。

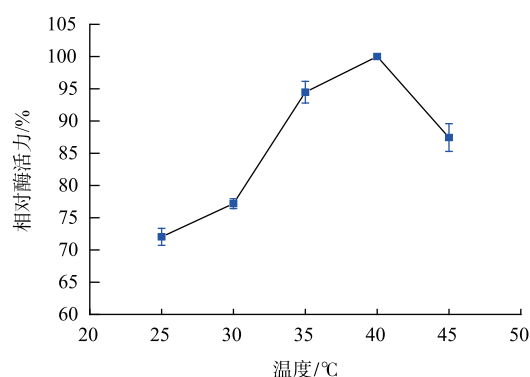


图 7 乙醇脱氢酶 $\delta\delta$ -ADH 最适温度范围

Fig. 7 Optimal temperature of $\delta\delta$ -ADH

pH 对 $\delta\delta$ -ADH 酶活力的影响见图 8。在 pH 3~5 范围内, 酶活仅为最高活性的 10% 左右, 之后随着 pH 的升高, 酶活也不断上升, pH 9.0 时酶活达到最大值, 当 pH>9.0 时酶活不断下降。Alberto Moreno^[11] 从人胃粘膜中分离到的 $\delta\delta$ -ADH 最适 pH 为 9.9, 随着 pH 的不断降低酶活不断下降, 与本研究结果相近。

取相同体积的酶液(pH 9.0)在 30、40、50 $^{\circ}\text{C}$ 温浴, 并分别于 15、30、60、90 min 时取样并检测酶活, 以未温浴的酶活为 100% 作图。如图 9 所示, $\delta\delta$ -ADH 的酶活变化趋势基本一致, 在温浴 15~30 min 时, 酶活下降较快; 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 60 min 后, 相对酶活约为 47%, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 60 min 相对酶活为 55%。

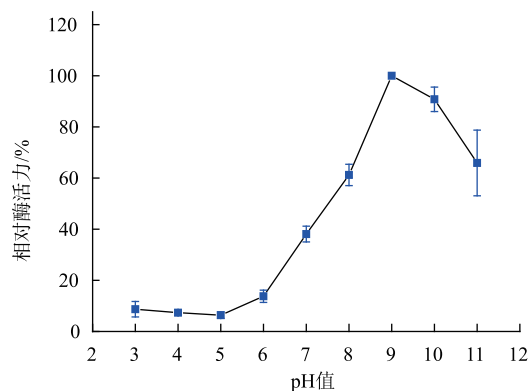


图 8 乙醇脱氢酶 $\delta\delta$ -ADH 最适 pH 范围
Fig. 8 Optimal pH of $\delta\delta$ -ADH

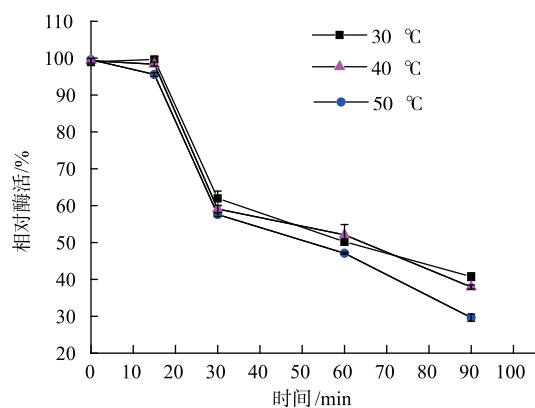


图 9 乙醇脱氢酶 $\delta\delta$ -ADH 温度稳定性
Fig. 9 Effect of temperature on the stability of $\delta\delta$ -ADH

正常情况下,人体胃液的 pH 值范围是 1.0~4.0,饮水或进食后可上升到 3.0~5.0^[21]。 $\delta\delta$ -ADH 对胃生理环境,尤其是对酸性环境的耐受性将影响其活性的发挥^[2]。如图 10 所示,将 $\delta\delta$ -ADH 在不同 pH (pH 3~11) 的广泛缓冲液中于 25 °C 保温 30 min,在 pH 6.0~11.0 范围内酶活较稳定;pH 10.0 时酶活力最高;pH 5.0 条件下,相对酶活为 60%;在 pH 4.0 以下,检测不到酶活。

取相同体积的酶液在 0、500、1 000、1 500 mmol/L 乙醇中 37 °C 温浴,于 10、20、30 min 时取样检测酶活。如图 11 所示,在 0 mmol/L 乙醇中 37 °C 温浴 30 min 的 $\delta\delta$ -ADH 的相对酶活为 65.6%。在 500 mmol/L 乙醇中温浴 10 min 后, $\delta\delta$ -ADH 的相对酶活下降至 95% 左右,温浴 30 min 后相对酶活为 51.1%。在 1 000、1 500 mmol/L 乙醇中温浴 10 min 后, $\delta\delta$ -ADH 酶活下降至 60% 左右,随着温浴时间的延长,酶活下降速率减慢,温浴 30 min 后相对酶活

分别为 45.4% 和 44.4%,说明 $\delta\delta$ -ADH 可在高浓度乙醇中保持一定活力。

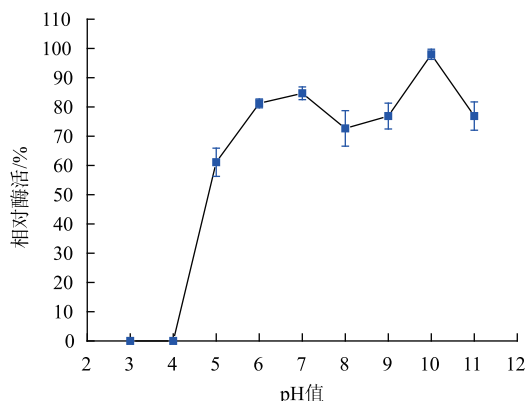


图 10 乙醇脱氢酶 $\delta\delta$ -ADH pH 稳定性
Fig. 10 Effect of pH on the stability of $\delta\delta$ -ADH

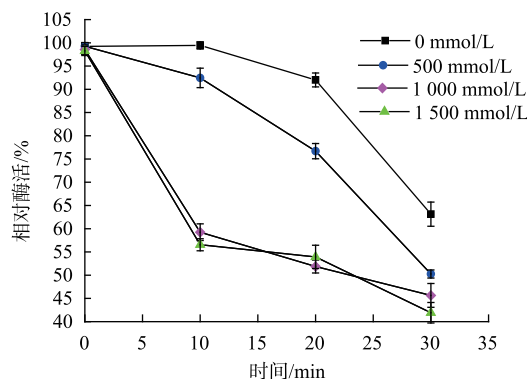


图 11 乙醇脱氢酶 $\delta\delta$ -ADH 的乙醇耐受性
Fig. 11 Effect of alcohol on the stability of $\delta\delta$ -ADH

3 结 语

作者通过构建 pET-32a (+)-ADH7 表达载体,将人胃来源的乙醇脱氢酶 $\delta\delta$ -ADH 在 *E.coli* BL21 (DE3) 中进行外源表达。SDS-PAGE 电泳结果显示,目的产物以包涵体形式存在,且其大小符合目的蛋白质单亚基(41 000)与融合标签(18 000)之和,即 59 000。

包涵体用 1 mol/L 的尿素作初步的溶解处理,将此包涵体溶解液离心取上清液,得到有活性的 $\delta\delta$ -ADH 粗酶液,酶比活力为 0.202 U/mg。粗酶液进一步经镍柱亲和层析纯化,纯化后酶的比活力为 2.085 U/mg。在制备有活性的粗酶液的过程中,在用含低浓度尿素的缓冲液溶解包涵体前省略了传统

方法中洗涤包涵体的步骤,因此粗酶液中含有较多杂蛋白质,由于尿素浓度较低,溶解液中目的蛋白质并不占主体地位。通过对工程菌进行高密度培养及优化包涵体溶解条件等途径以提高酶的得率,将是本研究继续努力的方向。

对 $\delta\delta$ -ADH 的酶学性质进行研究,结果表明,该酶的 K_m 为 28.43 mmol/L, V_{max} 为 316.46 μ mol/(L·min),最适温度为 40 $^{\circ}$ C,最适 pH 为 9.0,在 30~50 $^{\circ}$ C 范围内较稳定,温浴 60 min 后相对酶活在 47% 以上;在 pH 5.0~10.0 较稳定,温育 30 min 后相对酶活在 60% 以上。此外,该酶能耐受一定浓度的乙醇,在

500~1 500 mmol/L 乙醇中保持 30 min,相对酶活在 45% 以上。

然而, $\delta\delta$ -ADH 在酸性环境下活性不高且稳定性差,其原因可能是 $\delta\delta$ -ADH 存在于胃粘膜细胞的细胞质中^[1,5],正常的胃粘膜具有胃屏障功能,其中的一个重要作用是防止胃腔里的盐酸从胃腔回渗到胃粘膜细胞里^[2],从而使 $\delta\delta$ -ADH 避免了直接暴露在酸性环境下。鉴于 $\delta\delta$ -ADH 的这一缺点,今后将通过酶的固定化、化学修饰或分子生物学等手段提高该酶在酸性条件下的稳定性,以扩大该酶的应用范围。

参考文献:

- [1] HOOG J O, HEDBERG J J, STROMBERG P, et al. Mammalian alcohol dehydrogenase-functional and structural implications[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2001, 8: 71-76.
- [2] 汤甜甜. 人乙醇脱氢酶 ADH1B2 的基因表达和活性分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [3] FARRES J, MORENO A, CROSAS B, et al. Alcohol dehydrogenase of class IV ($\delta\delta$ -ADH) from human stomach cDNA sequence and structure/function relationships[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 224: 549-557.
- [4] XIE P G, PARSONS S H, SPECKHARD D C, et al. X-ray structure of human class IV $\delta\delta$ alcohol dehydrogenase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(30): 18558-18563.
- [5] BIRLEY A J, JAMAMES M R, DICKSON P A, et al. Association of the gastric alcohol dehydrogenase gene ADH7 with variation in alcohol metabolism[J]. *Human Molecular Genetics*, 2008, 17(2): 179-189.
- [6] 鲍文娜. 乙醇脱氢酶的克隆表达及生物活性分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [7] ZENG Fancai, CHEN Qin, LI Ailing, et al. Cloning and identity of the human class I alcohol dehydrogenase gene[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2007, 34(15): 2822-2825. (in Chinese)
- [8] ZHOU Wenting, CUI Yu, WANG Xiaoyan, et al. Cloning and expression of the full-length cDNAs encoding human class I alcohol dehydrogenases[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2007, 38(5): 624-627. (in Chinese)
- [9] HAN C L, LIAO C S, WU C W, et al. Contribution to first-pass metabolism of ethanol and inhibition by ethanol for retinol oxidation in human alcohol dehydrogenase family Implications for etiology of fetal alcohol syndrome and alcohol-related diseases [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 254: 25-31.
- [10] HALSTED C H, ROBLES E A, MEZEY E, et al. Distribution of ethanol in the human gastrointestinal tract[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1973, 26: 831-834.
- [11] MORENO A, PARES X. Purification and characterization of a new alcohol dehydrogenase from human stomach[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(2): 1128-1133.
- [12] YUAN Ye, ZHANG Ling, SHAO Weilan, et al. Expressioin of cholesterol oxidase with temperature induced vector pHsh[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2016, 35(3): 272-277. (in Chinese)
- [13] WANG Junxiong, GUAN Yixin, YAO Shanjing. Preparation of recombinant reteplase inclusion bodies in E.coli and its refolding in vitro[J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2015, 66(2): 709-716. (in Chinese)
- [14] ZHANG Yanmin, LI Cheng, WU Yao, et al. Refolding of recombinant Fenneropenaeus chinensis lysozyme inclusion body[J]. *Journal of Dalian Polytechnic University*, 2014, 33(4): 239-242. (in Chinese)
- [15] B·施特尔马赫著, 钱嘉渊译. 酶的测定方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991: 17-19.
- [16] LI Tongbiao, ZHOU Chenyan, ZHU Xinshu, et al. Effect of sited-directed mutagenesis of VIC on thermostability of Xylanase

- XynZF-2[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2015, 41(4):39-43. (in Chinese)
- [17] STONE C L, THOMASSON H R, BOSRON W F, et al. Purification and partial amino acid sequence of a high-activity human stomach alcohol dehydrogenase[J]. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 1993, 17(4):911-918.
- [18] 华子春. 蛋白质高效表达技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2011:6-23.
- [19] GAO Yonggui, GUAN Yixin, YAO Shanjing. Refolding of genetic engineering protein expressed as inclusion bodies[J]. **Bulletin of Science and Technology**, 2003, 19(1):10-15. (in Chinese)
- [20] PANDA A K. Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*[J]. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 2003, 85:43-93.
- [21] HUANG Caishun, LI Baocai, XIANG Cheng. A review on artificial gastrointestinal fluid model applied in drug-stability evaluation[J]. **Natural Product Research and Development**, 2015, 27(10):1836-1841. (in Chinese)
- [22] CHEN Guozhen. New progress in etiology, pathogenesis and treatment of peptic ulcer disease[J]. **Guangdong Medical Journal**, 1977(Z1):41-47.

科技信息

欧盟批准丁香油酚制剂作为鸡育肥饲料添加剂

据欧盟官方公报消息, 2019年6月3日, 欧盟发布条例(EU) 2019/898, 批准活性物质丁香油酚(eugenol)制剂作为鸡育肥饲料添加剂。

根据附件中规定的条件, 此种添加剂被授权作为动物营养添加剂。所属添加剂类别为“动物技术添加剂”, 功能组别为“其他动物技术添加剂”。授权日期至2029年6月23日。本法规在欧盟官方公报公布后20天生效。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟批准丁香油酚制剂作为鸡育肥饲料添加剂[EB/OL]. (2019-6-6). <http://news.foodmate.net/2019/06/521389.html>