

## 木薯 $\alpha$ -羟腈酶的克隆、表达及其初步应用

程树华 严共鸿 吴 襟 孙万儒\*

(中国科学院微生物研究所,微生物资源前期开发国家重点实验室,北京 100080)

**摘 要** 木薯  $\alpha$ -羟腈酶是一种催化羟腈化合物分解和合成的裂解酶,它在不对称合成手性羟腈化合物和手性药物等方面具有广泛的应用前景。通过 RT-PCR 从木薯叶组织总 RNA 中扩增出  $\alpha$ -羟腈酶基因的 cDNA 序列,并将其克隆于质粒 pPIC9K。序列分析表明,克隆的基因和文献报道的 3 个木薯羟腈酶的 cDNA 序列不完全一致,可能是木薯羟腈酶基因家族的新成员。通过一系列步骤,将获得的  $\alpha$ -羟腈酶基因 cDNA 序列插入表达载体 pET30a,在大肠杆菌获得高效表达。每升发酵液获得 2100 单位的羟腈酶,粗酶液的比活为 8.5 u/mg 蛋白质,并首次利用热变性法纯化重组羟腈酶。重组羟腈酶催化合成的(S)-扁桃腈的 ee 值达 95.2%,转化率为 98.2%。

**关键词** 木薯  $\alpha$ -羟腈酶 羟腈化合物 手性

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0078-06

药理学研究的深入发展和药物作用机理的不断阐明,使人们认识到药物分子结构中手性原子的空间构型,与其临床疗效存在密切的联系,往往某一构型的同手性(Homochirality)药物的药效更好、副作用更少。比如,巯甲丙脯氨酸(Captopril)是影响肾素-血管紧张素-醛固酮系统的抗高血压药物,S型巯甲丙脯氨酸的降压效果是其R型对映体的100倍以上<sup>[1]</sup>。因此,研究和发展新的手性技术,借此获得光学纯的药物,已成为许多实验室和医药公司追求的目标。在这个研究领域, $\alpha$ -羟腈酶(Hydroxynitrile lyases, HNLs, EC 4.1.1.10, EC 4.1.2.11, EC 4.1.2.37, EC 4.1.2.39)催化的羟腈化合物不对称合成具有巨大的应用潜力,日益受到广泛的关注。

$\alpha$ -羟腈酶是一种可逆催化羟腈化合物(Cyanohydrins)分解和合成的裂解酶,分解的产物或催化合成的底物为氢氰酸和相应的醛或酮(图1)。生理条件下,HNLs参与动植物的生氰或氨基酸的合成代谢<sup>[2]</sup>。该酶促反应具有高度的立体专一性和较低的底物专一性,合成反应生成的光活性羟腈化合物可转化成邻羟基胺、 $\alpha$ -羟基酸、 $\alpha$ -羟基醛、羟基酮和 $\alpha$ -氟代羧酸等多种重要的手性中间体<sup>[3]</sup>,后者可进一步转化成多种手性药物,如Taxol

的氨基酸侧链、沙丁胺醇、细胞第二信使神经酰胺、 $\beta$ -受体阻滞剂和抗焦虑药物。催化的分解反应用于消除木薯等含氰食品或饲料的毒性,因此HNL在精细化工、医药、食品、农业和畜牧业等方面具有广泛的应用前景<sup>[3,4]</sup>。

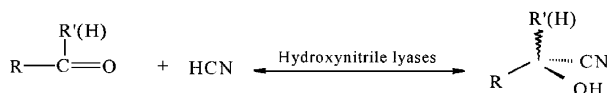


图1  $\alpha$ -羟腈酶催化光活性羟腈化合物的合成与分解

Fig. 1 Asymmetrical synthesis and resolution of chiral cyanohydrins by HNLs

迄今,人们已从7个科的动植物中纯化到12种HNL<sup>[3,5]</sup>,但在有机合成中具有应用前景者主要包括木薯HNL(*Manihot esculenta*, Me-HNL)、三叶胶HNL(*Hevea brasiliensis*, He-HNL)和来自蔷薇科的HNL<sup>[6]</sup>。后者为(R)型HNL,在蔷薇科果实的核仁中含量丰富,约占种子蛋白的5%~10%,容易纯化,已成为工业上生物合成R型羟腈化合物的主要酶源;Me-HNL、He-HNL为S型HNL,均能立体专一性催化脂肪族、芳香族和杂环族S型羟腈化合物的合成,但它们在相应的植物组织中丰度低,纯化较难,因此,通过基因工程大批量获得廉价的上述S型

收稿日期 2000-06-27,修回日期 2000-10-15。

基金项目 国家自然科学基金支持的重大项目(29790128)。

\* 联系作者。Tel 86-10-62587206; Fax 86-10-62560912; E-mail: sunwr@sun.im.ac.cn

HNL 具有重要的经济意义,并有助于研究它们的结构和催化机制。

本文通过 RT-PCR 从木薯叶组织总 RNA 中扩增出一种 HNL 基因的 cDNA 序列。序列分析表明,与 DNA 数据库公布的已有 Me-HNL 编码序列不完全一致,可能是木薯 HNL 基因家族中一个新成员。将克隆基因插入 pET30a,在大肠杆菌获得高效表达。本实验建立的表达系统具有如下优势:a. 产酶量较高,是已报道表达水平的 4~5 倍;b. 重组酶非常稳定,分离纯化简单,粗酶液经一步热变性后,无需固定化或进一步处理,可直接用于手性合成,为工业化生产奠定了坚实基础;c. 成本低。重组 HNL 在不对称合成中的应用也进行了初步的探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

木薯种籽由华南植物所刘英勤教授惠赐;本所周永刚博士慷慨提供 pET30a, pPIC9K 购自 Invitrogen 公司,大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , BL-21( DE3 )分别作为质粒扩增和基因表达的宿主菌,由本室保藏;One-Tube<sup>TM</sup> RT-PCR Kit 购自罗氏公司,限制酶、Taq DNA 聚合酶、Taq plusI DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、dNTPs 等分别购自 Promega 公司、Biolabs 公司;(dl)-扁桃腈购自 Fluka 公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器

岛津 2201 型紫外-可见分光光度计;Sorvall 高速离心机;HP5890serial II 气相色谱仪,FID 检测器,带 3365 色谱工作站;CHIRALDEX<sup>TM</sup> 熔融石英手性毛细管柱:G-TA, 10m  $\times$  250  $\pm$  12  $\mu$ m ( I. D. )  $\times$  0.125  $\pm$  10%  $\mu$ m ( F. T. ),美国 Advanced Separation Technologies 公司产品。Shimadzu QP5000 气相-质谱仪,四极杆质谱检测器,Class-5000 工作站,配 DB-1 毛细色谱柱( 30m  $\times$  0.25mm  $\times$  0.25  $\mu$ m ),J & W Scientific 公司出品。

### 1.3 方法

**1.3.1 HNL 活力和蛋白质浓度的测定** 木薯 HNL 可催化 (dl)-扁桃腈裂解为氢氰酸和苯甲醛,后者在 280nm 有很高的吸收峰,而底物在此波长的吸收强度低,可忽略不计。反应体系由 3.95mL 0.05mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Citrate 缓冲溶液 (pH5.0)  $\lambda$  0.01~0.05mL 酶液和 0.004mL (dl)-扁桃腈组成,30 $^{\circ}$ C 反应 1min,在岛津 2201 型紫外-可见分光光度计检测 1min A<sub>280</sub> 的变化 ( $\Delta A$ ),减去底物自发化学分解的本底后

( $\Delta A'$ ),依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 1min 生成 1  $\mu$ mol 苯甲醛所需的酶量定义为 1 个酶活力单位 (u)。

蛋白质测定按照 Bradford 方法<sup>[7]</sup>以 BSA 作标准曲线。

**1.3.2 光活性羟腈化合物对映体过量 (ee) 的检测和产物的质谱分析** 取 0.1~1mg 羟腈样品,加入 500  $\mu$ L 无水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶解后,再分别加入 50  $\mu$ L、10  $\mu$ L 乙酸酐和吡啶,以及少许无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。室温过夜,真空挥发掉多余试剂和溶剂,再加 200  $\mu$ L CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 复溶乙酰化羟腈,进样量 2  $\mu$ L。气相色谱的色谱条件为:纯氮气作载气,进样器、检测器的温度分别为 200 $^{\circ}$ C、250 $^{\circ}$ C,柱前压 70KPa,柱温 100 $^{\circ}$ C、平均线速度 55.9cm/s,分流进样,分流比  $\geq$  100:1。通过下列公式计算: ee = ( 主要对映体的摩尔数 - 次要对映体的摩尔数 ) / 两种对映体的摩尔数之和  $\times$  100。

产物的质谱分析方法:样品处理与检测 ee 值相同,羟基经过乙酰化。色谱条件:进样器温度 200 $^{\circ}$ C,检测器温度 230 $^{\circ}$ C,柱温 80~180 $^{\circ}$ C,5 $^{\circ}$ C/min 程序升温,质谱扫描范围 50~350 ( m/z )。

**1.3.3 木薯叶组织总 RNA 的提取和 RT-PCR 扩增 MeHNL 基因** 参照 Shujun Chang 法提取总 RNA<sup>[8]</sup>,One-Tube<sup>TM</sup> RT-PCR Kit 的方法指南进行 RT-PCR。

**1.3.4 DNA 分子克隆技术和分析表达水平的 SDS-PAGE** 参见文献 [9] 进行。

**1.3.5 DNA 序列的测定和分析** 利用荧光标记自动分析法,在本所技术室和上海 Gencore 公司进行 DNA 序列测定。序列分析利用 DNAsis v2.5 软件。

**1.3.6 工程菌的培养及诱导表达条件** 将构建的工程菌接种在含 50  $\mu$ g/mL Kanamycin 的 LB 培养基,220r/min、25 $^{\circ}$ C 培养 12h。获得的菌悬液再以 1% 的比例接种到含 300mL 上述 LB 培养基的 500mL 摇瓶,在上述条件培养到 A<sub>600</sub> = 0.7 时,加 IPTG 至终浓度 0.04mmol/L,25 $^{\circ}$ C 继续诱导培养 6h 后,离心收集菌体,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.3.7 重组 HNL 催化光活性羟腈化合物合成** 在 4 $^{\circ}$ C、4000r/min 离心 10min 收集菌体,生理盐水洗涤 1 次,用 pH5.4、0.05mol/L 的柠檬酸-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲溶液以 10mL/g 湿菌体的比例重悬菌体,超声破碎工程菌后,细胞裂解液经 25000g、4 $^{\circ}$ C 离心 20min,上清转移到另一离心管,70 $^{\circ}$ C 热变性 10min,25000g、4 $^{\circ}$ C 再离心获得的上清,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

将 0.5mL 含 40 个单位 HNL 的粗酶液 (溶于

0.05mol/L、pH5.4 的柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液)与 9.5mL 异丙醚混合,反应体系中分别加入 2mmol/L 醛或酮、通入足量的 HCN,并密封瓶口,室温搅拌反应 1~2h,分离有机相,取少许用气相色谱法检测 ee 和转化率,用 GC-MS 分析产物的结构。

2 结果

2.1 木薯 HNL 基因的克隆

基于 Hauges<sup>[10]</sup> 等报道的木薯 HNL 基因 *hnl10* 的 cDNA 序列和 pPIC9K 多克隆位点,设计了上游引物和下游引物,其中前者引入 *Eco*RI 酶切位点,3'端引物加上 *Not*I 位点,具体序列如下:

5' Primer: 5'-CGGCCGGAATTCATGTTAACTGCACATTTTGTTC-3'

3' Primer: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCAAGCATATGCATCAGCCAC-3'

扩增产物的电泳分析见图 2,片段大小约为 750bp,与文献报道的长度一致。经 *Eco*RI、*Not*I 双酶切的 RT-PCR 产物和质粒 pPIC9k,定向连接后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,通过 PCR(图 3)和酶切等方法筛选克隆,获得的阳性克隆命名为 *clonhnl*。

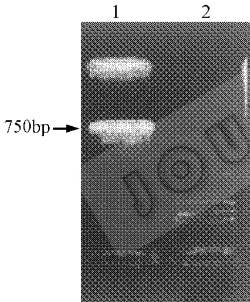


图 2 电泳分析 RT-PCR 产物

Fig. 2 Electrophoresis analysis of RT-PCR products

1. RT-PCR products; 2. DNA marker

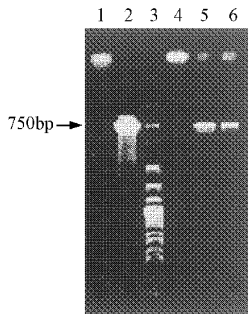


图 3 PCR 鉴定阳性克隆

Fig. 3 Identification of positive clones by PCR

1. Negative control; 2. Positive control 3. DNA marker;

4. Negative clone; 5 6. Positive clones( pPIC-HNL )

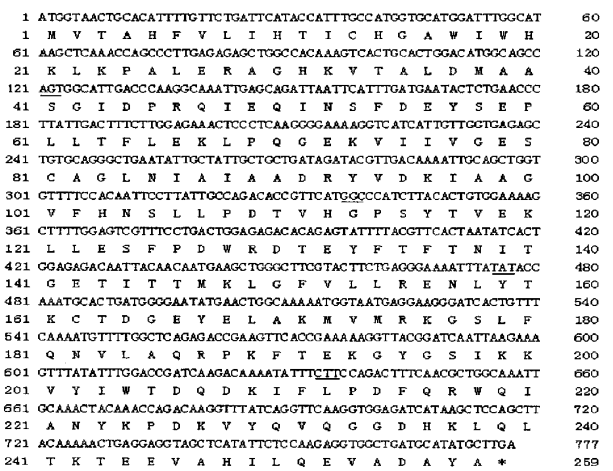


图 4 克隆的木薯羟腈酶 cDNA 序列和推测的氨基酸序列

Fig. 4 Full nucleotide and deduced amino acid sequences of a cDNA clone of  $\alpha$ -hydroxynitrile lyase from cassava

— Base pairs inconsistent with the sequence of Me-HNL 10 cDNA

2.2 克隆 Me-HNL 基因的序列测定和分析

利用荧光标记自动分析法,由本所技术室和上海 Genecore 公司对获得的阳性克隆各测序 1 次,结果一致(见图 4)。克隆基因的序列由 777 个 bp 组成,编码 258 个氨基酸。与 Me-HNL 10 基因的 cDNA 序列比较,其中 133 位、337 位、476 位、634 位、636 位的碱基 C、A、T、T、A 分别被 T、G、A、C、T 所取代,导致 113 位 Ser 变成 Gly,158 位 Phe 变成 Tyr。

2.3 大肠杆菌重组表达载体的构建

为了非融合表达木薯羟腈酶,根据克隆的木薯 HNL 基因和质粒 pET30a 限制酶的分布特点,设计如下引物:

5' Primer: 5'-GGGATGTCCATATGTTAACTGCACATTTT-3'

3' Primer: 5'-CGCGGATCCTCAAGCGTACGTCATCAGCCACCTCTTGG-3'

5'Primer 含 *Nde*I 位点,但克隆的 cDNA 3 末端附近也有一个 *Nde*I 位点,为此,在不改变氨基酸序列的前提下,3'Primer 引入 2 个点突变,以便去除基因内 *Nde*I 位点,并加上 *Bam*HI 识别的序列。重组表达载体的构建流程见图 6,命名为 pET30a-hnl。

得到的阳性重组子,双酶切分析(图 7)和序列测定,表明 pET30a-HNL 构建成功,可进行转化和诱导表达。

2.4 木薯羟腈酶的表达和热变性的初步纯化

将 pET30a-hnl 转化至宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3),诱导表达后,收集菌体超声破碎,进行 SDS-

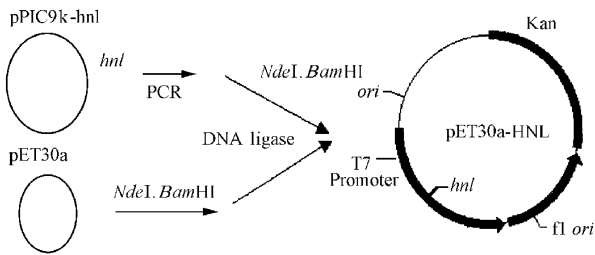


图 5 大肠杆菌表达质粒的构建

Fig. 5 Construction of recombinant expression vector (pET30a-hnl)

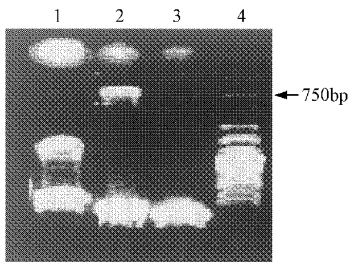


图 6 限制性酶切分析重组质粒 pET30a-hnl

Fig. 6 Restriction analysis of pET30a-hnl  
1. pET30a-hnl ; 2. pET30a-hnl/*NdeI* + *BamHI*  
3. pET30a-hnl/*NdeI* ; 4. DNA marker

PAGE 分析和酶活力的测定。SDS-PAGE 凝胶上，在 29kD 处清楚可见表达的特异蛋白条带(图 7)。酶活力为 2.1u/mL，粗酶液比活达到 8.50u/mg 蛋白质，是木薯叶组织粗酶液比活的 61 倍。将破碎液离心获得的上清 70℃ 保温 10min，离心后上清保留了 85%~95% 的酶活力，纯化 2.57 倍(图 7)，可直

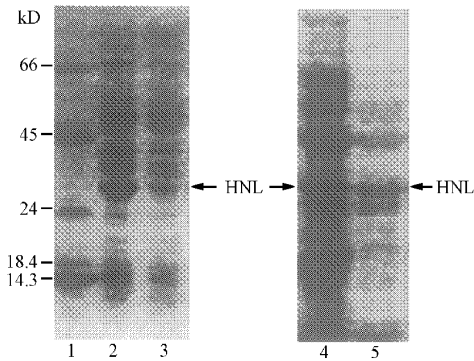


图 7 SDS-PAGE 分析重组表达的木薯羟腈酶及热变性的纯化效率

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of recombinant ClonHNL and the result of partial purification by heat denaturation  
1. Protein molecular weight Marker ; 2. pET30a-hnl/BL21(DE3) induced ; 3. pET30a-hnl/BL21(DE3) uninduced ; 4. The supernatant of the lysate of pET30a-hnl/BL21(DE3) induced ; 5. Partially purified ClonHNL by heat denaturation

接用于手性合成。

### 2.5 重组 HNL 催化 (S)-扁桃腈的手性合成

选择扁桃腈作为检测重组 ClonHNL 立体专一性和催化效率的模式化合物。根据上述方法，反应完成后，利用手性气相色谱检测底物的转化率和产物的光学纯度，通过 GC-MS 鉴定产物的结构。结果显示(图 8)，转化率为 98.2% (S)-扁桃腈的 ee 值达到 95.2%，产物质谱的谱图与其结构完全吻合，表明重组 ClonHNL 能够高效、立体专一性地催化 S 型羟腈化合物的合成。

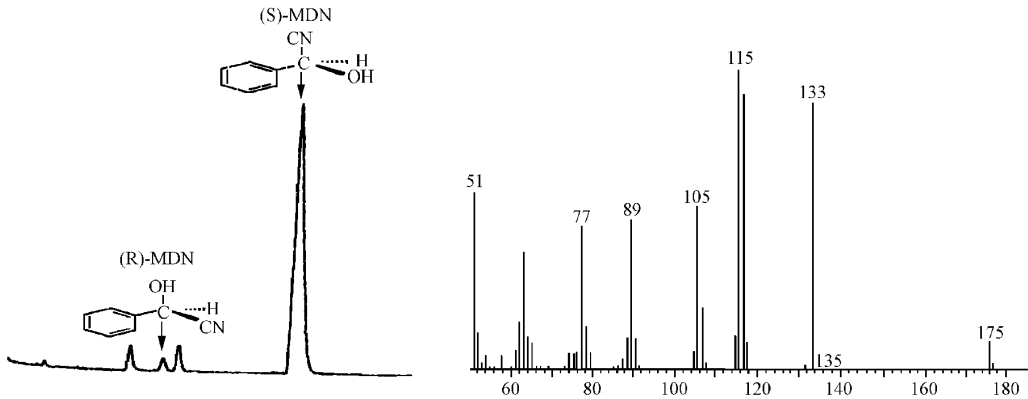


图 8 手性气相色谱和 GC-MS 分析重组 HNL 催化合成的 (S)-扁桃腈

Fig. 8 Chiral-GC and MS analysis of (S)-Mandelonitrile obtained from benzaldehyde and HCN under the catalysis of recombinant ClonHNL

(R)-MDN (R)-mandelonitrile ; (S)-MDN (S)-mandelonitrile ;  $M/z$  (relative intensity) : 175 (10,  $M^+$ ), 133 (90,  $M^+$ - $CH_2CO$ ), 116 (93,  $M^+$ - $CH_2CO-OH$ ), 115 (100), 105 (65), 89 (56), 77 (50), etc.

3 讨 论

根据同源性比较和酶学性质的初步研究结果 , 我们认为所克隆基因 *clonhnl* 很可能是 Me-HNL 家族的新成员。它的依据如下 :1. 木薯为大戟科植物 雌雄同株 ,基因组为四倍体 ,Southern blot 的结果显示 ,木薯基因组中存在多个 HNL 基因 ,最近的研究初步确定 ,可能共存 7 个 Me-HNL 基因 ,其中有一个假基因 ,但目前只获得 3 个成员的全序列 ( *me-hnl10*、*me-hnl4*、*me-hnl24* ) ,另外 4 个成员的基因及 cDNA 序列尚未见发表。 *clonhnl* 与 *mehnl4*、*mehnl24*、*mehnl10* 的同源性分别是 75.2%、79.8%和 99.2% ,四者之间 DNA 序列的一级结构存在一定的差异 ,因此 ,*clonhnl* 有可能是其中的新成员 2. 已报道的 3 个基因结构中 ,均有 1~2 个内含子和 2~3 个外含子 ,内含子的同源性很低 ,大小差别显著 ,提示存在等位基因的变异。同时 ,3 个已知基因的第二个外含子 ,编码的氨基酸序列组成 Me-HNL3D 结构的“帽子”( *cap* )结构域 ,序列保守性低 ,而 ClonHNL 一级序列中与 Me-HNL10 不同的 2 个氨基酸 ,正好位于此结构域 ,符合该区域易变异的特点<sup>[10]</sup> ,因此 ,*clonhnl* 有可能作为等位基

因之一 ;3. 酶学性质的初步研究表明 ,大肠杆菌表达的 Me-HNL10 ,最适反应温度为 40℃ ,60℃ 保温 30min 仅保留较少的酶活性 ,中性条件为同源四聚体<sup>[11]</sup> ;而重组 ClonHNL 最适反应温度为 46℃ ,70℃ 保温 10min 仍有 85%~90% 的酶活性 ,中性条件下四级结构为同源六聚体( 结果未显示 ) ,二者存在明显差异 4. 在 RT-PCR 操作时 ,为保证 PCR 产物的正确性 ,采用了高保真的 DNA 聚合酶 ,较高的退火温度( 60℃ )和较少的循环次数( 25 次 )。此外 ,TTA( Leu )→CTT( Leu )是无法用 PCR 反应错误掺入碱基来解释的。由以上分析可知 ,ClonHNL 所对应的基因组序列很可能是木薯 HNL 基因家族的新成员 ,而不是 ME-HNL10。此外 ,这 4 个木薯 HNL 基因可能由同一祖先基因通过发散型( Divergent )进化而来。

木薯 HNL 为非糖基化蛋白 ,空间结构是同源三聚体或四聚体 ,无需翻译后复杂的修饰 ,是原核表达系统较为理想的靶基因<sup>[10]</sup>。由于 ME-HNL 在手性合成和其他领域所具有的应用前景 ,国外 Hughes 小组和 Effenberger 实验室均对 HNL10 基因在大肠杆菌的高效表达进行了研究<sup>[11,12]</sup>。表 1 将本实验的结果和他们发表的数据进行了比较。

表 1 大肠杆菌表达木薯羟腈酶的结果比较  
Table 1 Comparison of various systems to express Me-HNL

No.	Plasmids	Host cells	Concentration of IPTG	Mode of Expression	Process of Purification	Yield( u/L )	Reference
1	pMal-c2	JM105	0.1mmol/L	Fusion	Affinity chromatograph Cleaved site-directionally by Xa	-	[ 12 ]
2	pQE4	M15( pREP4 )	1mmol/L	Non-fusion	Q-Sepharose FF	500	[ 13 ]
3	pET30a	BL21( DE3 )	0.05mmol/L	Non-fusion	Incubated for 10 min at 70℃	2100	

由表 1 可以看出 :1. 利用 pMal-c2 系统表达的是融合蛋白 ,需要昂贵的亲和层析柱和凝血因子 Xa ,切割效率不稳定 ,难以适应工业化生产的要求 ;2. pQE4 系统是非融合性表达 ,但产酶量不高 ,明显制约了它的应用前景。比较而言 ,本实验建立的方法具有如下优势 :产酶量较高 ;分离纯化简单 ,粗酶液经一步热变性后 ,无需固定化或进一步处理 ,可直接用于手性合成 ;成本低 ,容易实现工业化生产。

对上述结果的差异 ,我们认为主要存在 3 个方面的原因。第一 ,T7 启动子( pET30a )的转录效率较 Tac 启动子( pMal-c2、pQE4 )高 ,在调集和控制宿主菌株资源方面 ,能力可能更强。比如 ,本法所需 IPTG 的浓度分别只是后二者的 1/2 和 1/20。第

二 ,BL21( DE3 )为 *lon* 和 *ompT* 基因缺陷型 ,细胞内蛋白酶活性显著降低 ,而宿主菌 *E. coli* JM105 和 M15( pREP4 )没有这一表型优势。其次 ,结构基因编码的酶蛋白一级结构的微小差异 ,可能导致表达产物稳定性不同。与 ME-HNL10 比较 ,ClonHNL 的 113 位氨基酸由 Ser 变成 Gly ,导致帽子结构域的疏水矩下降( 0.43→0.42 ) ,疏水性增强( -0.12→-0.13 ) ,酶蛋白分子的空间结构可能变得更紧凑 ,稳定性增高。Hughes<sup>[12]</sup>报道 ,重组 HNL10 60℃ 变性 30min 后只保留了较少的酶活 ,而我们的结果显示 ,ClonHNL 70℃ 变性 10min 后保留了 85%~95% 以上的活性 ,这一结果与上述预测是一致的。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Cushman D W, Cheung M S, Sabo E F, Ondetti M A. Design of Potent Competitive Inhibitors of Angiotensin-converting Enzyme. Carboxyalkanoyl and Mercaptoalkanoyl Amino Acids. *Biochem.* ,1977 ,**16** :5484~5491
- [ 2 ] Hickel A, Hasslacher M, Griengl H. Hydroxynitrile Lyases : Functions and Properties , *Physiol Plant.* ,1996 ,**98** :891~898
- [ 3 ] Efferberger F. Synthesis and Reaction of Optically Active Cyanohydrins , *Angew. Chem Int Ed Engl* ,1994 ,**33** :1555~1564
- [ 4 ] White W LB, Arias-Garzon DI, McMahon J M, Sayre R. Cyanogenesis in cassava. The Role of Hydroxynitrile Lyase in Root Cyanide Production , *Plant Physiol* ,1998 ,**116** :1219~1225
- [ 5 ] Gregory R JH. Cyanohydrins in Nature and the Laboratory : Biology, Preparation, and Synthetic Applications , *Chem Rev* , 1999 ,**99** :3649~3682
- [ 6 ] Johnson D V, Zabelinskaja-Mackova A A, Griengl H. Oxynitrilases for Asymmetric C-C Bond Formation , *Curr Opin Chem. Biol* 2000 ,**4** :103~109
- [ 7 ] Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal Biochem* ,1976 ,**72** :248~254
- [ 8 ] Shujun Chang, Puryear J, Cairney J. A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees , *Plant Mol Bio Rep* , 1993 ,**11**( 2 ) :113~116
- [ 9 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning : a Laboratory Manual( 2nd ed ). Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [ 10 ] Hughes J, Carvalho FJPD, Hughes M A. Purification, Characterization, and Cloning of  $\alpha$ -hydroxynitrile Lyase from Cassava ( *Manihot esculenta* Crantz ) , *Arch Biochem Biophys* ,1994 ,**311** ( 2 ) :496~502
- [ 11 ] Hughes J, Keresztessy Z, Broun K. Genomic Organization and Structure of  $\alpha$ -hydroxynitrile Lyase in Cassava( *Manihot esculenta* Crantz ) , *Arch Biochem Biophys* ,1998 ,**356**( 2 ) :107~116
- [ 12 ] Hughes J, Lakey J H, Hughes M A. Production and Characterization of a Plant  $\alpha$ -hydroxynitrile Lyase in *Escherichia coli* . , *Biotech Bioengin* ,1997 ,**53**( 3 ) :332~338
- [ 13 ] Forster S, Roos J, Efferberger F , *et al.* The First Recombinant Hydroxynitrile Lyase and its Application in the Synthesis of ( S )-Cyanohydrin , *Angew Chem Int Ed Engl* ,1996 ,**35** :437~439

Cloning , Expression and Preliminary Application of A  $\alpha$ -hydroxynitrile Lyase from Cassava

CHENG Shu-Hua YAN Gong-Hong Wu Jin SUN Wan-Ru\*

( State Key Laboratory of Microbial Resources , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

**Abstract**  $\alpha$ -Hydroxynitrile lyase ( ME-HNLs , E. C. 4. 1. 2. 3. 37 ) from the cyanogenic crop cassava ( *Manihot esculenta* Crantz ) catalyze the condensation of hydrocyanic acid and aldehydes or ketone into ( s )-cyanohydrins , which are valuable starting material for various optically active compounds , such as pharmaceuticals and agrochemicals. The cDNA of a ME-HNL were obtained by RT-PCR and cloned. The sequencing result for the cDNA showed that the sequence encoded for the ME-HNL was inconsistent with all those which are published , such as *hnl10* , *hnl24* , *hnl4*. The full sequence analysis demonstrated that the cloned cDNA was about 75.2% , 79.8% , 99.2% homologous to other three reported HNL genes from cassava , respectively , among which the last was the same to the cloned gene except the five base substitution at the site 142 , 337 , 476 , 634 and 636 , respectively. The two base substitutions lead to change the amino acid sequence , *i. e.* , Ser113→Gly113 , Phe158→Tyr158. To construct the recombinant plasmid pET30a-hnl , the cDNA was inserted into an expression vector pET30a. After transformation of pET30a-hnl and induction with IPTG , the ME-HNL was efficiently expressed in *E. coli* . BL21( DE3 ) and reached over 2100units/L of culture with the specific activity 8.5u/mg protein. By one simple treatment , incubating 10 minutes at 70℃ , the recombinant ME-HNL may be used as an catalyst for production of ( S )-mandelonitrile with enantiomeric excess of 95.2% and 98.2% yield.

**Key words**  $\alpha$ -Hydroxynitrile lyase , cyanohydrin , cassava , chiral