

蜂房哈夫尼菌植酸酶基因 *appA* 的克隆、表达及酶学性质研究 Gene Cloning, Expression and Characterization of a Novel Phytase from *Hafnia alvei*

谷维娜, 黄火清, 杨培龙, 罗会颖, 孟 昆, 王亚茹, 姚 斌*

GU Wei-Na, HUANG Huo-Qing, YANG Pei-Long, LUO Hui-Ying, MENG Kun, WANG Ya-Ru and YAO Bin*

中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081

Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

摘 要 从蜂房哈夫尼菌(*Hafnia alvei*)中克隆获得一个植酸酶编码基因 *appA*, 该基因全长 1335bp, 编码 444 个氨基酸, 其中前 33 个氨基酸为信号肽, 成熟蛋白的理论分子量为 45.2kD。将基因 *appA* 克隆到大肠杆菌 *E. coli* 表达载体 pET-221(+), 并在大肠杆菌中表达, 表达产物具有植酸酶活性。对表达的酶蛋白进行纯化, 并初步研究了该酶的酶学性质, 结果表明: 酶的作用最适 pH 值为 4.5, 在 pH 2.0~10.0 范围内, 酶活性保留 80% 以上, 酶的作用最适温度为 60℃, 酶的比活性为 356.7U/mg, 酶动力学分析表明其 K_m 为 0.49mmol/L, V_{max} 为 238U/mg, 该酶对胰蛋白酶和胃蛋白酶有一定的抗性。该研究为哈夫尼菌属来源植酸酶的首次报道。

关键词 植酸酶, 基因表达, 纯化, 酶学性质

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)06-1017-05

Abstract A gene *appA* encoding a novel phytase was firstly cloned from *Hafnia alvei* by PCR and sequenced. The gene was consisted of 1335 bp, encoding 444 amino acids. The calculated molecular weight of the mature APPA was about 45.2 kD. The gene *appA* was expressed in *E. coli* BL21(DE3). Recombinant APPA was purified and its enzymatic properties were determined. The optimum pH for the enzyme was 4.5 and the optimum temperature was 60°C. The pH stability of r-APPA is good, the relative phytase activity was above 80% after treated in buffers of pH2.0~10.0. The specific activity of r-APPA is 356.7 U/mg, and the K_m value was 0.49 mmol/L and V_{max} of 238 U/mg. The enzyme showed resistance to pepsin and trypsin treatment.

Key words phytase, overexpression, purification, characterization

植酸(肌醇六磷酸)是植物中磷的主要储存形式, 由于单胃动物缺乏相应的酶而不能水解利用植酸, 造成了磷源的浪费, 且不能被利用的植酸磷直接排出体外, 造成了磷污染。此外植酸还是一种抗营养因子, 它能与多种矿质元素及蛋白质螯合, 使这些

营养元素不能被有效利用, 导致了植物性饲料营养价值的降低。植酸酶是一种可以将植酸磷降解为肌醇和磷酸的酶, 应用在单胃动物饲料中可使植酸磷的利用率提高 60%, 粪便中磷排出量减少 40%, 并可减少植酸磷的抗营养作用, 因此已被广泛应用于

Received: March 16, 2007; Accepted: April 10, 2007.

This work was supported by the grant from the Hi-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA020101).

* Corresponding author. Tel: +86-10-68975126; Fax: +86-10-68975127; E-mail: yaobin@public3.bta.net.cn

国家高技术研究与发展计划(863计划)项目(No. 2006AA020101)资助。© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

动物饲料中^[1]。

植酸酶已经成为饲料添加剂和酶制剂研究的热点,在它的分子生物学和基因工程研究方面都取得了大量进展^[2-4]。目前研究主要集中在性质不同的植酸酶基因的获得,通过酶工程或基因工程进行酶学性质改良,通过重组微生物反应器高效表达酶蛋白这三方面。性质不同酶基因的获得是高效表达的基础,同时也可作为研究植酸酶的结构与功能提供材料。

本文首次从蜂房哈夫尼菌(*H. alvei*)克隆到植酸酶基因 *appA*,在原核表达系统中进行表达并对表达产物的酶学性质进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

蜂房哈夫尼菌(*H. alvei*)由本实验室保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 和 BL21(BE3)及大肠杆菌表达载体 pET-22b(+)均由本实验室保存。

1.2 主要试剂

植酸钠(肌醇六磷酸十二钠)、IPTG、X-gal 购自 Sigma 公司;限制性内切酶、连接酶、Taq 酶购自 TaKaRa 公司;蛋白质分子量标准为上海生化研究所产品;层析介质购自 Amersham Pharmacia 公司;pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司;引物由上海生工合成;其他试剂为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 植酸酶基因的克隆 根据植酸酶蛋白的内部保守序列 RHGX RXP 和 HDTN 设计简并引物 FI 和 RI (见表 1)。提取 *H. alvei* 的总 DNA^[5],用 FI 和 RI 引物扩增植酸酶基因片段,PCR 程序如下:94 °C 预变性 5min,94 °C 30s,48 °C 30s,72 °C 1min,30 个循环,最后 72 °C 延伸 10min。所得片段纯化后与 pGEM-T 载体连接,电击转化,挑选白斑培养,提取质粒酶切鉴定重组子。阳性克隆测序获得植酸酶基因序列片段。所得序列与 GenBank 中数据库比较,根据与该基因同源性最高的变形肥杆菌(*Obesumbacterium proteus*)的植酸酶基因 *phyA*^[6]设计简并引物 OPS-F 和 OP-R (分别位于基因的两端),再根据前述扩增出的基因片段设计 QSP 和 HSP 引物,由 OPS-F 和 QSP 扩增出基因的上游序列,由 OP-R 和 HSP 扩增出下游序列。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 30s,45 °C 30s,72 °C 1min,30 个循环,最后 72 °C 延伸 10min。

表 1 实验中所用引物

Table 1 Primers used in experiment

Prime name	Prime sequence
FI	5'-GTKSTKAWWKTGAGYCGCCA-3'
RI	5'-TWKGCMAKRTRTGTATCATG-3'
OPS-F	5'-ATGACAATTTCWCRTTTCYACVCA-3'
OP-R	5'-TTATTGGCACTCNACYAGYTCRIT-3'
QSP	5'-GTTTGGCTCATTTTGGTAGGCG-3'
HSP	5'-CAAACCATCGTCAGCGCAATCAA-3'
pNdeI	5'-CCCATATGACAATTTCTCTGTTTACACACAGTCCAAC-3'
HaH	5'-ATAAGCTTTTATGGCACTCCACCAGTCTGTTTGTTCGCC-3'

1.3.2 基因序列分析 采用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 进行信号肽预测;应用 DNASTar 软件进行分子量计算及等电点预测;蛋白的序列比对采用 CLUSTALX 软件进行。

1.3.3 大肠杆菌表达载体的构建及植酸酶基因的诱导表达 设计引物 pNdeI 和 HaH,扩增出全长基因片段,利用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切后,将基因克隆到表达载体 pET-22b(+)上,筛选出阳性克隆子 pET-22b(+)-*appA*。挑选含重组质粒 pET-22b(+)-*appA* 的大肠杆菌单菌落接种至含氨苄青霉素(终浓度为 100 μg/mL)的 LB 培养基中,37 °C 振荡培养过夜,次日按 1% 接种量转接 37 °C 培养至 OD_{600} 约 0.6 ~ 0.8,用 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 3h,收集上清并进行酶活测定。

1.3.4 重组植酸酶的纯化 诱导培养上清液经 60% ~ 80% 的硫酸铵沉淀,收集沉淀物用醋酸钠-醋酸缓冲液溶解,透析后利用 pH8.0 的 HiTrap Q XL 柱子纯化,平衡缓冲液为 20 mmol/L 的 Tris-HCl (pH8.0),洗脱液为含 0.6 mol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris-HCl (pH8.0),上样量 0.5 mL,0 ~ 100% 洗脱 10CV,流速 2 mL/min,分部收集洗脱峰,得到电泳纯的目标蛋白。

1.3.5 重组植酸酶的酶学性质研究:

(1) 最适 pH 及 pH 稳定性:纯化后的酶在不同的 pH (2.0 ~ 8.5) 条件下进行酶促反应测定其最适 pH 值,所用缓冲液为 pH2.0 ~ 3.5 的 0.1 mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液;pH4.0 ~ 5.5 的 0.1 mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲液;pH6.0 ~ 6.5 的 0.1 mol/L Tris-醋酸缓冲液;pH7.0 ~ 8.5 的 0.1 mol/L Tris-盐酸缓冲液,37 °C 测定酶活性。将酶液在不同 pH 缓冲液中于 37 °C 处理 1h,在 37 °C,pH4.5 的醋酸钠-醋酸缓冲液中测定酶活性研究酶的 pH 稳定性。每一 pH 值下的测定重复 3 次,取平均值。

(2) 最适温度及热稳定性:在 pH4.5 的 0.1 mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲液及不同温度(30 °C ~ 70 °C)条件下测定酶活性以确定最适温度。热稳定性测定为在

不同温度(50℃、60℃、70℃)条件下将酶液分别处理 5,10,15,20,30min,再进行酶活性测定。每一温度下的测定重复 3 次,取平均值。

(3)不同金属离子及相关化学试剂对酶活性的影响 酶促反应体系中加入终浓度为 1mmol/L 的不同的金属离子及化学试剂,在 37℃、pH4.5 条件下测定酶活性,重复测定 3 次取平均值,研究其对酶活性的影响。

(4)植酸酶 K_m 值和 V_{max} 的测定:参见文献 [7]。

(5)植酸酶抗胃蛋白酶和胰蛋白酶的能力 酶液分别与胃蛋白酶和胰蛋白(蛋白酶/植酸酶 = 0.1, W/W)混合,37℃处理 60 min,分别于 5,10,20,30,60min 取样测定酶活性,重复测定 3 次取平均值。

1.3.6 植酸酶活性的测定:测定方法见参考文献 [8] 酶活性单位定义为:在一定条件下,每分钟释放出 1 μ mol 无机磷所需的酶量为一个酶活性单位(U)。

2 结果与分析

2.1 植酸酶基因的克隆及分析

提取 *H. alvei* 的总 DNA,用 FI 和 RI 引物进行扩增,得到长度为 891bp 的基因内部片段,通过与 GenBank 数据库中序列比对,发现它与 *O. proteus* 的植酸酶基因 *phyA* 核苷酸序列相似性达到 94%,氨基酸序列相似性达到 95%。根据 *phyA* 基因序列设计引物 OPS-F 和 OP-R (见表 1),根据得到的 891 bp 片段序列设计 QSP、HSP 引物,利用 OPS-F 和 QSP 扩增出上游序列,用 OP-R 和 HSP 扩增出下游序列。克隆得到的植酸酶基因 *appA* 全长 1335 bp,编码 444 个氨基酸,用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 进行分析表明前 33 个氨基酸为信号肽。该基因所编码成熟蛋白的理论分子量为 45.2kD,预测等电点为 7.0。成熟蛋白有两个潜在的糖基化位点(N-X-S/T),*appA* 基因与 *O. proteus* 的植酸酶基因 *phyA* 核苷酸序列^[6]相似性为 94.5%,氨基酸序列相似性为 95.9%,二者具有 17 个氨基酸的差异(图 1)。

2.2 *appA* 基因在 *E. coli* 中表达与重组蛋白的纯化

appA 基因插入到表达载体 pET-22k(+)上得到重组载体 pET-22k(+)-*appA*,转化大肠杆菌后得到重组子,诱导重组子,诱导后的菌液经 SDS-PAGE 分析,检测到一条分子量约为 45 kD 的特异性条带(图 2),与此酶的理论分子量相当。上清液中测定

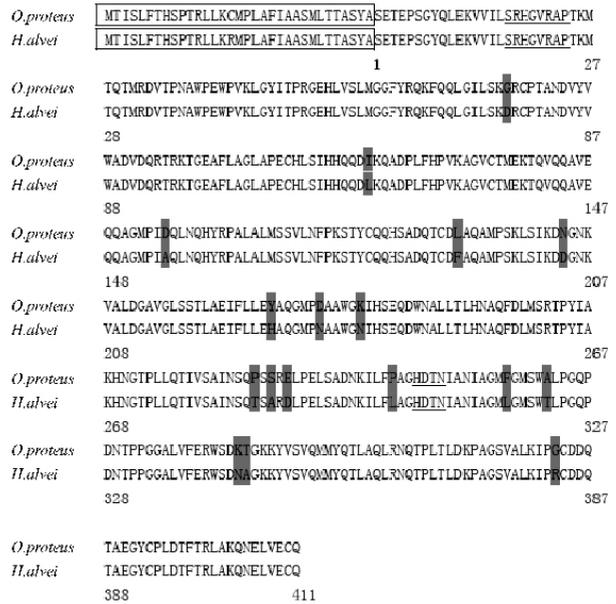


图 1 蜂房哈夫尼菌来源植酸酶与变形杆菌来源植酸酶氨基酸序列对比

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of APPA from *H. alvei* and PHYA from *O. proteus*

The deduced signal peptide sequences were boxed. The conserved motif relating with the catalytic center were underlined, which were the basis of primer design. The different amino acid residues between the two enzymes showed in gray background. The number indicated the amino acids of mature protein.

酶活为 9.65U/mL,表明基因在大肠杆菌中得到表达,且表达酶蛋白具有生物学活性。

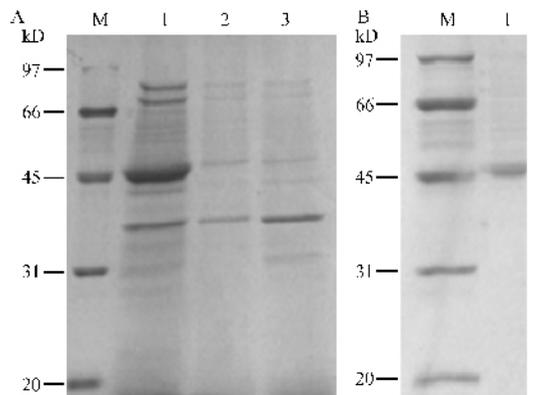


图 2 *appA* 基因在 *E. coli* 中表达 (A) 及重组酶蛋白的纯化 (B)

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expression and purified sample of r-APPa

A. 1: supernatant of *E. coli* BL21 with recombinant plasmid pET-22b(+)-*appA*; 2: supernatant of *E. coli* BL21 with plasmid pET-22k(+); 3: supernatant of *E. coli* BL21 with recombinant plasmid pET-22k(+)-*appA* without IPTG. B. 1: purified r-APPa.

诱导培养的上清通过硫酸铵沉淀并透析后,利用 HiTrap Q XL 阴离子层析柱 (pH8.0) 纯化,最终得到电泳纯的目的蛋白(图 2)。酶的比活性由粗酶液的 241.3U/mg 提高到 356.7U/mg,纯化倍数为 1.48 倍,纯化过程及结果见表 2。

表2 *E. coli* 表达重组酶的纯化结果Table 2 The result of purification of r-APPA expressed in *E. coli*

Step	Total activity/U	Total protein/mg	Specific activity/(U/mg)	Purification (fold)
Crude extract	3282	13.6	241.3	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	905	2.81	322.1	1.33
HiTrap Q XL	535	1.5	356.7	1.48

2.3 重组植酸酶的酶学性质分析

2.3.1 最适 pH 及 pH 稳定性 重组酶的最适 pH 值为 4.5, 在 pH3.0 ~ 5.0 条件下, 酶活性维持在 80% 以上, 而在 pH6.5 以上和 1.5 以下酶活性难以检测。pH 稳定性方面, 将酶在不同 pH 条件下处理 1h 后测定酶活性, 结果表明: 从 pH2.0 到 10.0 剩余酶活均在 80% 以上, 说明该酶的稳定性很好(图 3)。

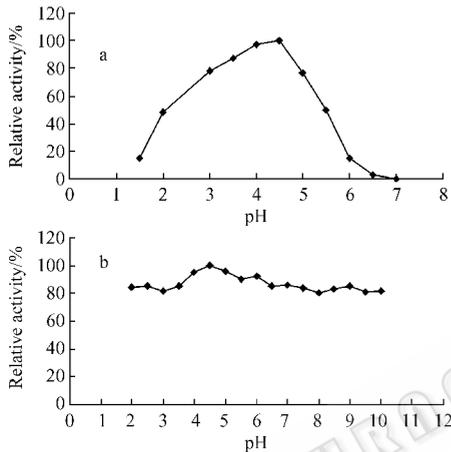


图3 r-APPA 的最适 pH (a) 和 pH 稳定性 (b)

Fig.3 The optimal pH (a) and pH stability (b) of r-APPA

2.3.2 最适温度及热稳定性 酶促反应最适温度测定结果表明, 酶的最适温度为 60℃。热稳定性试验表明, 50℃ 处理 30min, 剩余酶活为 90%, 60℃ 处理 30min, 剩余酶活为 30%, 70℃ 处理 5min 剩余酶活为 38%, 处理 30min 剩余酶活为 25%(图 4)。

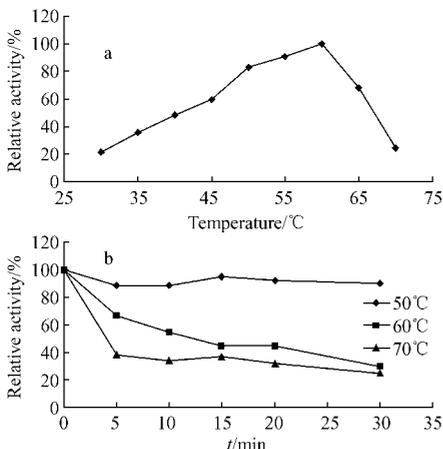


图4 r-APPA 的最适反应温度 (a) 和热稳定性 (b)

Fig.4 The optimal temperature (a) and thermal stability (b) of r-APPA

2.3.3 不同金属离子及相关化学试剂对酶活性的影响 在酶促反应体系中加入不同的化学试剂, 然后分别测定酶活性, 结果表明 Fe³⁺、SDS 和 Zn²⁺ 对酶具有明显抑制作用, 其中 SDS 完全抑制了其酶活性。其余化学试剂对酶促反应无明显影响(表 3)。

表3 各种金属离子和化学试剂对 r-APPA 活性的影响

Table 3 Effect of various chemicals and metal ions on the activity of r-APPA

Various chemicals and metal ions(1mmol/L)	Relative phytase activity/%
K ⁺	94.8
Mg ²⁺	98.3
Ca ²⁺	99.9
Zn ²⁺	39.8
Cr ³⁺	75.2
Cu ²⁺	76.5
Mn ²⁺	94.8
Fe ³⁺	5
EDTA	100
SDS	0

2.3.4 酶的比活性、K_m 值和 V_{max} 纯化的重组酶比活性为 356.7U/mg, 酶动力学分析结果表明其 K_m 为 0.49mmol/L, V_{max} 为 238U/mg。

2.3.5 酶抗胃蛋白酶和胰蛋白酶的能力 胰蛋白酶和胃蛋白酶处理重组酶液 60min 后, 剩余酶活分别为 72% 和 43%, 说明酶对胰蛋白酶和胃蛋白酶有一定的抗性(图 5), 且胰蛋白酶抗性强于胃蛋白酶。

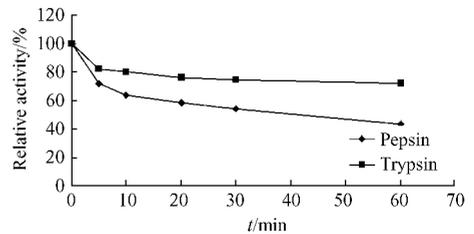


图5 胰蛋白酶和胃蛋白酶处理对 r-APPA 的影响

Fig.5 Effect of trypsin and pepsin treatment on activity of r-APPA

The residue phytase activities were determined after trypsin and pepsin treatment for 60 min at 37°C.

3 讨论

H. alvei 属于肠杆菌科哈夫尼菌属, 目前尚无在该属中发现植酸酶基因的报道, 本文为首次报道。本研究克隆到的植酸酶基因 *appA* 与 *O. proteus* 来源的植酸酶基因 *phyA* 核苷酸序列相似性为 94.5%, 氨基酸序列相似性为 95.9%, 二者间只有 17 个氨基酸的差异。虽然二者的同源性较高, 但两种蛋白的酶学性质却有所差异, 且 APPA 的某些性质要优于 PHYA。我们曾将 *O. proteus* 来源的 *phyA* 基因在大

肠杆菌中表达并进行了性质研究,与 Nickolay^[6]报道的基本一致。表达的 r-PHYA 最适温度为 50℃,r-APPA 最适温度为 60℃,比前者高出 10℃。在热稳定方面,r-AAPA 也比 r-PHYA 优异,r-PHYA 在 60℃ 条件下处理 30min,剩余酶活不到 20%,而 r-AAPA 为 30%,70℃ 处理 r-PHYA 30min,剩余酶活不到 5%,而 r-AAPA 为 25%。r-PHYA 的比活性为 310 U/mg,r-AAPA 的比活性为 356.7U/mg,二者较为接近。

两种酶性质的差异可能与 17 个不同氨基酸相关。对 17 个氨基酸进行分析,发现其中 9 个属于性质相近的氨基酸,可能对酶学性质无影响,而另外 8 个氨基酸存在分子间作用力和结构的差异,可能对性质有一定影响。APPA 中位于分子表面的 4 个氨基酸 D77,H228,T322,R383 与 PHYA 中 G77,Y228,A322,G383 相比(图 1),氨基酸亲水性增加,增大蛋白质分子表面的亲水性,从而稳定蛋白质结构。其中 D77 和 H228 还可能和邻近的氨基酸形成氢键,也可以起到稳定蛋白结构的作用。APPA 中 L303 相对于 PHYA 中脯氨酸(P)能提供较强的疏水作用,而处于分子内部可以使蛋白质结构更加稳定。以上这些因素可能是 APPA 比 PHYA 具有较高的最适温度和较好的热稳定性的原因^[9]。另外 APPA 中 3 个位于分子表面的氨基酸 A155,A288,A345 与 PHYA 中 D155,S288,T345 相比,可以使氨基酸疏水性增加,减弱了蛋白表面的亲水性,可能会对蛋白质结构的稳定有影响。但是植酸酶结构复杂,酶学性质的改变可能是由单一氨基酸决定,但更可能是多个氨基酸共同作用的结果。氨基酸序列对蛋白结构和酶学性质的影响还有待进一步的实验证明^[10]。

与已发表的来源于 *E. coli*、*Citrobacter freundii* 和 *C. braakii* 植酸酶的性质相比,本文中来源于 *H. alvei* 的植酸酶的性质具有以下特点:(1)热稳定性相对较好,70℃ 处理 30min 剩余酶活性为 25%,而 *E. coli* 来源植酸酶 70℃ 处理 30min 剩余酶活性为 15%,*C. braakii* 来源植酸酶 70℃ 处理 10min 剩余酶活性为 7.5%,*C. freundii* 来源的植酸酶 70℃ 处理 4min 酶活性完全丧失。(2)抗胃蛋白酶的能力虽不如 *E. coli* 植酸酶,但优于 *C. freundii* 和 *C. braakii* 来源植酸酶。胃蛋白酶处理 *C. braakii* 植酸酶 5min 剩余酶活性仅为 50%,*C. freundii* 来源植酸酶活性为 0,而 *H. alvei* 植酸酶处理 60min 后剩余酶活性为 43%。抗胰蛋白酶能力与 *C. freundii* 和 *C. braakii* 来

源植酸酶基本一致,但优于 *E. coli* 植酸酶,胰蛋白酶处理 *E. coli* 植酸酶 60min 后剩余酶活性为 40%,而 *H. alvei* 植酸酶剩余酶活性为 72%^[11,12]。上述这些优点使 *H. alvei* 来源植酸酶具有一定的应用潜力,此外也可以作为备选实验材料用于植酸酶蛋白质工程的研究。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Pallauf J, Rimbach G. Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Arch Tierernähr*, 1997, **50**(4):301-319.
- [2] Lei XG, Porres JM. Phytase enzymology, application, and biotechnology. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**(21):1787-1794.
- [3] Vohra A, Satyanarayana T. Phytase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2003, **23**(1):29-60.
- [4] Yao B(姚斌), Fan YL(范云六). Molecular biology and gene engineering of phytase. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 2000, **16**(1):1-5.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] Nickolay VZ, Anna VS, Mikhail SG, et al. Gene cloning, expression and characterization of novel phytase from *Obesumbacterium proteus*. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, **236**:283-290.
- [7] Huang H, Luo H, Yang P, et al. A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, **350**:884-889.
- [8] Yao B(姚斌), Zhang CY(张春义), Wang JH(王建华), et al. High level expression of bioactive phytase in *Pichia pastoris* yeast. *Science in China (Series C)* (中国科学 C 辑), 1998, **28**(3):237-243.
- [9] Feng XL(冯小黎), Jin YT(金业涛), Su ZG(苏志国), et al. Instability of proteins during bioseparation and the strategy for anti-denaturation. *Progress in Biotechnology* (生物工程进展) 2000, **20**(3):67-71.
- [10] Edward M, Catherine D, Taiwan K, et al. Site-directed mutagenesis of *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase at residue 300 to enhance catalysis at pH 4.0. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, **297**:1016-1020.
- [11] Luo HY(罗会颖), Yao B(姚斌), Yuan TZ(袁铁铮), et al. Overexpression of *Escherichia coli* phytase with high specific activity. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2004, **20**(1):78-84.
- [12] Huang HQ(黄火清), Luo HY(罗会颖), Bai YQ(柏映国), et al. Overexpression of *Citrobacter braakii* phytase with high specific activity in *Pichia pastoris*. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报) 2006, **46**(6):945-950.