

研究报告

重组鱼腥藻脂肪氧合酶基因的克隆表达、分离纯化及活性分析

张充, 周孝伟, 吕凤霞, 别小妹, 陶婷婷, 应琦, 陆兆新

南京农业大学食品科技学院 酶工程研究室, 江苏 南京 210095

张充, 周孝伟, 吕凤霞, 等. 重组鱼腥藻脂肪氧合酶基因克隆表达, 分离纯化及活性分析. 生物工程学报, 2012, 28(4): 440-456.

Zhang C, Zhou XW, Lü FX. Cloning and expression of lipoxygenase gene from *Anabaena* sp. PCC 7120 and purification, characterization of the recombinant enzyme. Chin J Biotech, 2012, 28(4): 440-456.

摘要: 克隆鱼腥藻 PCC7120 基因组中脂肪氧合酶 (ana-LOX) 基因, 对该功能基因进行了定点突变研究, 确定了 ana-LOX 的最短功能基因长度, 构建原核重组表达载体, 对重组 ana-LOX 进行了分离纯化和性质研究。从 GenBank 中搜索到鱼腥藻 PCC7120 基因组中含有 LOX 基因, 通过序列分析和比对, 发现 LOX 功能基因位于双功能酶 AOS (单加氧酶) -LOX 的 C 端, 通过定点突变研究, 证实了 ana-LOX 活性中心位点为 His¹⁹⁷、His²⁰²、His³⁶⁹、Asn³⁷³ 和 Ile⁴⁵⁵。通过逐步缩短基因长度的策略, 获得 ana-LOX 基因的最短功能基因长度为 1 254 bp。构建的表达载体 pET-32a/ana-LOX 转化入 BL21 (DE3) 宿主内, 在低温 16 °C 条件下的诱导表达, 重组脂肪氧合酶活力可达 6 750 U/mL。表达产物通过 Ni-NTA 亲和柱进行分离纯化, 比活达到 11.4×10⁴ U/mg 蛋白, 酶活回收率为 60.89%。重组 ana-LOX 最适反应温度 45 °C, 最适反应 pH 6.0, 在常温下具有较好的稳定性, 金属离子 Fe²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺ 对该酶存在明显的激活作用, 而 Fe³⁺ 和 Cu²⁺ 对该酶有强烈的抑制作用。重组 ana-LOX 能够改善面团的显微结构。该研究获得了高效表达重组 ana-LOX, 为实现其在食品加工中的应用提供了参考。

关键词: 重组脂肪氧合酶, 克隆表达, 定点突变, 分离纯化, 活性分析

Received: September 20, 2011; **Accepted:** January 10, 2012

Supported by: Youth Science and Technology Innovation Fund of Nanjing Agriculture University (No. Y201069), Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (No. KWZ200910), National Natural Science Foundation of China (No. 31071605).

Corresponding author: Zhaoxin Lu. Tel/Fax: +86-25-84396583; E-mail: fmb@njau.edu.cn

南京农业大学青年科技创新基金 (No. Y201069), 南京农业大学基本科研业务费专项基金 (No. KYZ200910), 国家自然科学基金 (No. 31071605)资助。

Cloning and expression of lipoxygenase gene from *Anabaena* sp. PCC 7120 and purification, characterization of the recombinant enzyme

Chong Zhang, Xiaowei Zhou, Fengxia Lü, Xiaomei Bie, Tingting Tao, Qi Ying, and Zhaoxin Lu

Laboratory of Enzyme Engineering, College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: We cloned the lipoxygenase gene (ana-LOX) from *Anabaena* sp. PCC 7120 and expressed it in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. We determined the active site of the recombinant ana-LOX through site-directed gene mutagenesis and obtained the shortest length of the functional gene. Meanwhile, we studied the properties of recombinant ana-LOX after purification. The C-terminal of the Aox (allene oxide synthase)-LOX fusion gene in *Anabaena* sp. PCC 7120 genome was found belonging to LOXs family by bioinformatics analysis. Further results of site-directed gene mutagenesis confirmed that the active sites of ana-LOX were His¹⁹⁷, His²⁰², His³⁶⁹, Asn³⁷³ and Ile⁴⁵⁵. The shortest length of functional gene was identified to be 1 254 bp based on the strategy of shortening the gene length gradually. The highest activity of recombinant ana-LOX of 6 750 U/mL could be achieved when constructed to pET-32a vector and expressed at low temperature 16 °C. We purified the enzyme by Ni-NTA chelating affinity chromatography, with 60.89% yield and specific activity of 11.4×10^4 U/mg. The optimum reaction temperature and pH for ana-LOX were 45 °C and 6.0, respectively. Furthermore, the obtained ana-LOX was stable at room temperature. The effect of metal ions on ana-LOX was determined also. Fe²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ could markedly promote the activity of this enzyme whereas Fe³⁺ and Cu²⁺ had a strong inhibitory effect on it. Finally, the ana-LOX could improve the microscopical structure of dough. The results of this study will provide a basis for future improvements and food industrial applications of ana-LOX.

Keywords: recombinant lipoxygenase, clone and expression, site directed, purification, characterization

脂肪氧合酶 (Lipoxygenase, LOX) 是一种含非血红素铁的蛋白, 催化具有顺, 顺-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸的双加氧反应, 如亚油酸、亚麻酸。脂肪氧合酶广泛存在于植物、动物^[1-2]中, 在微生物中鲜有发现。LOX 在食品加工中具有重要的应用价值。在面粉加工过程中可催化分子氧对面粉中的具有戊二烯 1,4 双键的油脂发生氧化, 形成的不稳定的氢过氧化物能诱导面筋蛋白质分子聚合, 从而起到增强面筋的作用, 可以减少或替代强筋剂溴酸钾的使用^[3]。欧美等国家在 90 年代就有添加大豆粉改善面粉品

质的专利出现^[4]; 同时, 近年来, 生物合成法外源催化合成风味物质成为一条经济可行的路线, 逐渐被重视, 而 LOX 可以催化生产天然清香味化合物, 可以满足人们对绿色风味物质的追求。

尽管人们早已认识到 LOX 在食品加工中的潜在应用价值, 且 LOX 在自然界中广泛存在, 但从自然界中直接获得不仅得率低而且纯化难, 获得 LOX 纯酶的成本很高; 而使用富含 LOX 酶的植物材料, 如大豆粉, 则存在成分复杂、反应不易控制的缺陷, 上述原因限制了脂肪氧合酶在食品、化工等领域中的广泛应用。

通过 LOX 基因的克隆与表达, 经简单的纯化过程, 获得高纯度的 LOX 酶是解决上述问题的极好策略。Casey 等^[5]提出, 重组脂肪氧合酶将成为食品加工领域研究中的前沿。然而, 至今为止, 还未曾有高效表达脂肪氧合酶的报道^[6]。究其原因, 一是脂肪氧合酶基因多数来源于真核生物, 在原核生物中极少发现, 这些基因在原核中 (如大肠杆菌) 表达存在稀有密码子问题, 在真核中 (如酵母) 表达存在糖基化问题; 二是 LOX 基因过长 (2 500~3 000 bp), 也是制约高效表达的一个重要因素。为此, 本研究在数据库中搜索到原核生物鱼腥藻 PCC 7120 基因组中 LOX 基因以双功能酶形式存在, 利用逐步缩短策略克隆得到其最短的功能基因, 进行了定点突变研究, 在大肠杆菌中实现高表达, 并对重组酶进行了分离纯化和性质研究, 为该酶在食品加工中的应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Anabaena sp. PCC 7120 菌株购自中国科学院水生生物研究所, *Escherichia coli* DH5 α (Δ Lac U169 (Φ 80 Lac Z Δ M15) 克隆宿主、*E. coli* BL21 (DE3) pLysS (F-ompT hsdSB(rB -mB-) gal dcm (DE3) pLysS Camr) 为本实验室保藏。*Escherichia coli* 表达载体 pET-23a、pET-32a 购自 Novagen 公司, pGS21a 购自南京金斯特公司。

限制性内切酶 *Xho* I、*Sac* I、氨苄青霉素、DNA 凝胶回收试剂盒、基因组提取试剂盒、DNA marker、琼脂糖、IPTG 购自上海生工生物工程

公司。*pfu* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自大连宝生物公司; 亚油酸购自 Sigma 公司; 其他试剂为国产分析纯。

LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g。加水溶解后, 用 5 mol/L NaOH 将 pH 调到 7.0。加水定容到 1 000 mL。配制固体培养基时, 按每 100 mL 加入琼脂粉 1.5 g。

重组大肠杆菌的表达培养基: 配制 20% 葡萄糖, 0.075 MPa 灭菌 20 min, 添加至上述 LB 中, 终浓度为 0.2%。

1.2 方法

1.2.1 *Anabaena* sp. PCC 7120 脂肪氧合酶基因的搜索

NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中输入“lipoxygenase”对数据库内的所有基因组信息进行检索; 使用 Clustalx 软件进行序列比对分析; 使用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> 和 <http://pfam.sanger.ac.uk> 网站进行功能预测。

1.2.2 ana-LOX 基因的定点突变

运用重叠延伸 PCR (over-lap extension PCR, SOE-PCR) 技术^[7], 设计 2 个 PCR 反应以产生 2 个含突变位点的 DNA 片段, 分别用引物 L-F、L-R 和 R-F、R-R 扩增含有突变位点的上游片段 L 和下游片段 R, 随后将上述两个 PCR 产物混合, 二者通过末端互补区结合并在适宜的温度下互为引物延伸得到完整的含突变的基因。突变位点选择是根据序列分析预测出活性位点, 分别为 His¹⁹⁷、His²⁰²、His³⁶⁹、Asn³⁷³ 和 Ile⁴⁵⁵, 并且随机选择了 His³⁶⁴、Asn⁴¹⁹ 和 Ile³²⁶ 作为活性中心位点的佐证。表 1 为 ana-LOX 基因定点突变引物及突变方向。

表 1 定点突变用引物

Table 1 Synthetic primers for site-direct mutation

Name	Sequence (5-3')	Results
Ana-LOX-L-L	<u>GGATTC</u> GGAGTGTCTGGTGCCTTAGTTC	
Ana-LOX-R-R	<u>GGATTC</u> CCTAAATGTTGATACTCATCATGAG	His197Ala
L1-R	ACGGGCTAAGGCAAGTTTCAGCTC	
R1-F	GAGCTGAAACTTGCCTTAGCCCGT	
L2-R	ACGGGCTAATAAAAAGTTTCAGCTC	His197Lys
R2-F	GAGCTGAAACTTTTATTAGCCCGT	
L3-R	ACGGGCTAACCGAAGTTTCAGCTC	His197Arg
R3-F	GAGCTGAAACTTCGGTTAGCCCGT	
L4-R	CATATTGTTCAATGTTGAAGGCACA	His202 Ala
R4-F	TGTGCCTTCAACATTGAACAATATG	
L5-R	CATATTGTTCAATGTTGAAGAGACA	His202 Lys
R5-F	TGTCTCTTCAACATTGAACAATATG	
L6-R	CATATTGTTCAATGTTGAAACGACA	His202 Arg
R6-F	TGTCGTTTCAACATTGAACAATATG	
L7-R	GTTTAAAGTTAGCCCATGATGCCAG	His369 Ala
R7-F	CTGGCATCATGGGCTAACTTTAAAC	
L8-R	GTTTAAAGTTAGCCCATGATAACAG	His369 Lys
R8-F	CTGTTATCATGGGCTAACTTTAAAC	
L9-R	GTTTAAAGTTAGCCCATGAACGCAG	His369 Arg
R9-F	CTGCGTTCATGGGCTAACTTTAAAC	
L10-R	CATGAGTGCAGGAAACTTGAGGCGTA	His364 Ala
R10-F	TACGCCTCAAGTTTCCTGCACTCATG	
L11-R	CATGAGTGCAGGAAACTTGACAAGTA	His364 Lys
R11-F	TACTTGTCAAGTTTCCTGCACTCATG	
L12-R	CATGAGTGCAGGAAACTTGACCGGTA	His364 Arg
R12-F	TACCGGTCAAGTTTCCTGCACTCATG	
L13-R	CATCATCATATTGTTTAAAGGCAGC	Asn373Ala
R13-F	GCTGCCTTTAAACAATATGATGATG	
L14-R	CATCATCATATTGTTTAAATTGAGC	Asn373Gln
R14-F	GCTCAATTTAAACAATATGATGATG	
L15-R	CATCATCATATTGTTTAAAGTGAGC	Asn373His
R15-F	GCTCACTTTAAACAATATGATGATG	

		续表 1
L16-R	TGAGGCGTATCGAATTGATGAAAGTACCCAT	Asn419Ala
R16-F	ATGGGTACTTTCATCAATTCGATACGCCTCA	
L17-R	TGATTGGTATCGAATTGATGAAAGTACCCAT	Asn419Gln
R17-F	ATGGGTACTTTCATCAATTCGATACCAATCA	
L18-R	TGAGTGGTATCGAATTGATGAAAGTACCCAT	Asn419His
R18-F	ATGGGTACTTTCATCAATTCGATACCACTCA	
R19	<u>GGATTC</u> CTAGTTGATACTCATCATGAGATCCTCTAATG	Ile455deletion
R20	<u>GGATTC</u> CTAAGCGTTGATACTCATCATGAGATCCTCTAATG	Ile455Ala
R21	<u>GGATTC</u> CTAATGGTTGATACTCATCATGAGATCCTCTAATG	Ile455His
R22	<u>GGATTC</u> CTAATTGTTGATACTCATCATGAGATCCTCTAATG	Ile455Asn
L23-R	CAAAAAGTTCGTCAACCTGGGCCGC	Ile326Ala
R23-F	GCGGCCCAGGTTGACGAACCTTTTTG	
L24-R	CAAAAAGTTCGTCAACCTGATGCGC	Ile326His
R24-F	GCGCATCAGGTTGACGAACCTTTTTG	
L25-R	CAAAAAGTTCGTCAACCTGATTCGC	Ile326Asn
R25-F	GCGAATCAGGTTGACGAACCTTTTTG	

1.2.3 *Anabaena* sp. PCC 7120 脂肪氧合酶功能基因的克隆

参考 GenBank 中 *Anabaena* sp. PCC 7120 基因组序列^[8] (Accession No. NC_003267), 利用 DNAMAN 软件设计只编码脂肪氧合酶功能序列的引物。

Ana-LOX 含有 5 个保守活性位点, 只有 5 个活性位点均存在才具有活性。因此, 将当 N 端边缘氨基酸为保守残基时的基因长度设定为最短基因长度, 将已经证明具有活性的 ana-LOX 基因长度设定为最长基因长度。采用分别截取, 逐步测定基因活性, 最终精确到一个三联体长度的差别, 方案如图 1 所示。表 2 为鉴定 ana-LOX 基因功能基因长度的引物。

1.2.4 大肠杆菌 ana-LOX 基因重组表达载体的构建

凝胶回收的 PCR 产物以及表达载体

pET-23a、pET-32a 和 pGS21a-ana-LOX 分别用 *Bam*H I 酶切处理, 再分别凝胶回收纯化, 用 T4 DNA 连接酶置于 16 °C 连接过夜后, 全部转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。涂布于含有氨苄青霉素的 LB 平板, 倒置, 37 °C 培养过夜。挑取单菌落于 10 mL LB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 振荡 10 h, 小量提取质粒。电泳鉴定重组子。送上海生工生物工程有限公司测序。获得重组表达载体 pET-23a-ana-LOX、pET-32a-ana-LOX、pGS21a-ana-LOX。

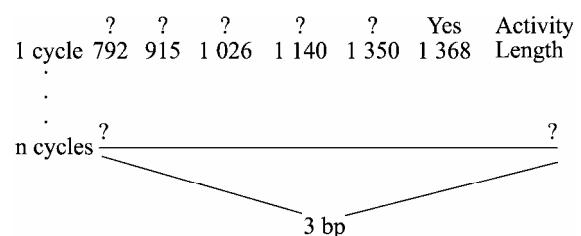


图 1 逐步缩短基因长度策略
Fig. 1 Strategy for shortening the ana-LOX gene.

表 2 Ana-LOX 基因缩短用引物

Table 2 Synthetic primers for shortening ana-LOX gene

Name	Sequence (5'-3')	Restriction enzyme site
Ana-LOX-R	<u>GGATTC</u> CCTAAATGTTGATACTCATCATGAG	<i>Bam</i> H I
1368-F	<u>GGATTC</u> GGAGTGTCTGGTGCCTTAGTTC	<i>Bam</i> H I
1350-F	<u>GGATTC</u> GTTCATTATTTGGCTCCATTGTTC	<i>Bam</i> H I
1332-F	<u>GGATTC</u> ATTGTTCGTGCTGAACGCACTC	<i>Bam</i> H I
1314-F	<u>GGATTC</u> ACTCAGTATTTGTATGGAAGTAAGG	<i>Bam</i> H I
1296-F	<u>GGATTC</u> AGTAAGGATGATTTGCCTGGAAAACCAG	<i>Bam</i> H I
1278-F	<u>GGATTC</u> CGAAAACCAGTTTATTTCCCTCTCCC	<i>Bam</i> H I
1260-F	<u>GGATTC</u> CCCTCTCCCAGTGACTGAAATTCC	<i>Bam</i> H I
1254-F	<u>GGATTC</u> CCAGTGACTGAAATTCCTTCTAAAAG	<i>Bam</i> H I
1251-F	<u>GGATTC</u> GTGACTGAAATTCCTTCTAAAAG	<i>Bam</i> H I
1248-F	<u>GGATTC</u> ACTGAAATTCCTTCTAAAAGATTC	<i>Bam</i> H I
1245-F	<u>GGATTC</u> GAAATTCCTTCTAAAAGATTCCTTTTTTC	<i>Bam</i> H I
1242-F	<u>GGATTC</u> ATTCCCTTCTAAAAGATTCCTTTTTTC	<i>Bam</i> H I
1239-F	<u>GGATTC</u> CCCTTCTAAAAGATTCCTTTTTTC	<i>Bam</i> H I
1236-F	<u>GGATTC</u> TCTAAAAGATTCCTTTTTTCTATTAGAG	<i>Bam</i> H I
1233-F	<u>GGATTC</u> AAAAGATTCCTTTTTTCTATTAGAG	<i>Bam</i> H I
1230-F	<u>GGATTC</u> CAGATTCCTTTTTTCTATTAGAGAAATATAAT	<i>Bam</i> H I
1224-F	<u>GGATTC</u> CCTTTTTTCTATTAGAGAAATATAATTTTCTTAC	<i>Bam</i> H I
1182-F	<u>GGATTC</u> GGATCCTACCCTTCAGACGGTGAACACG	<i>Bam</i> H I
1140-F	<u>GGATTC</u> TCAGCCATGCCTACTACAGCTTTGG	<i>Bam</i> H I
1026-F	<u>GGATTC</u> CGCGGATCCCGCAATCTTCTGGTCAAGAAGGCTG	<i>Bam</i> H I
912-F	<u>GGATTC</u> CGCGGATCCGATAAACAAAATGGTGTCAAGCTGCATTCA	<i>Bam</i> H I
795-F	<u>GGATTC</u> CGCGGATCCCAAGAGCTGAAACTTCATTTAGCCC	<i>Bam</i> H I

1.2.5 目的基因在大肠杆菌中的诱导表达

分别挑取含有重组表达载体 pET-23a-ana-LOX、pET-32a-ana-LOX、pGS21a-ana-LOX 的重组菌和对照菌 *E. coli* BL-21 (DE3) 以及含空载体的对照菌体, 接种于含有 100 mg/L 氨苄青霉素的液体 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 14 h。再分别取 8 mL 种子液到 500 mL 三

角瓶中, 加入 100 mL 上述 LB 培养基液体培养基, 37 °C、180 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6 左右, 加 IPTG 至 100 mg/L, 37 °C、180 r/min 诱导 5 h 或者低温 16 °C 诱导 15 h, 4 °C、10 000×g 离心 5 min, 收集菌体。

1.2.6 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 电泳参照 Lorenzi 等^[1]报道的方

法进行, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 10%, 胶厚 1.0 mm。电泳完毕后, 取出凝胶, 固定、考马斯亮蓝 R-250 染色、脱色后观察并拍照。

1.2.7 重组脂肪氧合酶的分纯化

将诱导表达收集到的菌体, 用磷酸缓冲液 (50 mmol/L PBS+0.3 mol/L NaCl+0.5% Triton X-100) 重悬菌体, 超声波破碎菌体 (400 W, 超声 5 s, 间歇 10 s, 共超声 15 min), 4 °C、10 000×g 离心 10 min, 收集上清液作为粗酶液。

将处理得到的粗酶液按照 Ni-NTA His Tag Kit 说明书依次用含不同浓度咪唑 (50 mmol/L、100 mmol/L、150 mmol/L、200 mmol/L) 的洗脱液洗脱 Ni-NTA 柱, 收集洗脱峰, 测定脂肪氧合酶活性。

1.2.8 酶活力测定

脂肪氧合酶活性分析用亚油酸钠作为底物。酶反应体系中含有: pH 6.0 的磷酸缓冲液 2.79 mL, 酶液 10 μ L, 亚油酸钠 200 μ L, 混匀后放入 35 °C 水浴中并开始计时, 反应 3 min 后测定吸光度^[9]。酶活单位定义: 在上述条件下以 1 min 内 3 mL 反应体系在 234 nm 的吸光度增加 0.001 作为一个酶活力单位 U^[10]。

1.2.9 重组脂肪氧合酶酶学性质的研究

重组脂肪氧合酶的最适反应温度: 将缓冲液分别在 20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C 水浴中保温 10 min, 加入 10 μ L 待测酶液, 在不同温度下反应 3 min, 在 234 nm 下测定吸光值, 以不加酶的溶液作对照。以温度为横坐标, 酶活力为纵坐标作图, 得到该酶的最适反应温度。

重组脂肪氧合酶的热稳定性: 将待测酶液

(溶在 0.2 mol/L pH 6.0 PBS 缓冲液中) 分别在 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C 水浴中保温 1 h, 每隔 10 min 取出一组样品, 迅速置于冰水中, 待保温结束后统一进行酶活力测定, 以未处理酶液作为对照。以温度为横坐标, 酶活力为纵坐标, 得到温度对酶活力的影响曲线。

重组脂肪氧合酶的最适 pH 值: 以亚油酸钠为底物, 在 pH 分别为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的缓冲液中, 按酶活力测定方法中所述, 进行酶活测定。

重组脂肪氧合酶的 pH 稳定性: 将重组脂肪氧合酶在不同 pH 值的缓冲液中, 30 °C 保温 1 h, 测定剩余的酶活力。

重组金属离子对酶活性影响: 将各种金属离子与酶液混合, 使其最终浓度达到 10 mmol/L, 然后在 30 °C 下测定酶活, 均以不加金属离子的酶液为空白对照组, 以未处理的酶液的酶活为 100%。

2 结果与分析

2.1 *Anabaena* sp. PCC 7120 脂肪氧合酶基因的序列分析

在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中搜索到了 *Anabaena* sp. PCC 7120 脂肪氧合酶基因与丙二烯氧合酶以双功能酶 (AOS-LOX, NC_003267) 形式存在, LOX 活性中心位于双功能酶 C 端。将 AOS-LOX 的 C 端覆盖 LOX 活性位点的 455 氨基酸输入 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> 网站, 发现该段序列属于脂肪氧合酶家族。将该段 455 氨基酸序列输入 <http://pfam.sanger.ac.uk> 网站, 分析该段序列的二级结构的保守模块, 发现该段序列中含有

脂肪氧合酶保守功能模块。将该段序列与其他来源的 LOX 进行氨基酸序列比对^[11-14],找到了 LOX 活性中心定位铁离子的 5 个保守氨基酸残基位点分别为 His¹⁹⁷、His²⁰²、His³⁶⁹、Asn³⁷³ 和 Ile⁴⁵⁵。

2.2 Ana-LOX 基因的克隆及其在大肠杆菌中的诱导表达

参考 GenBank 中 *Anabaena* sp. PCC 7120 基因组序列 (Accession No. NC_003267), 利用 DNAMAN 软件设计了扩增双功能酶 C 端 455 氨基酸残基基因序列 (1 368 bp) 的引物: 上游引物: 5'-CGCGA GCTCGGAGTGTCTGGTGCC-3'; 下游引物: 5'-CCGCTCGAGCTAAATGTTGATA CTCATCAT-3'。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可见 1 368 bp 处的片段。以构建的重组质粒 pET-23a- ana-LOX、pET-32a-ana-LOX、pGS21a-ana-LOX 进行 *Bam*H I 酶切后琼脂糖凝

胶电泳鉴定, 结果得到长约 1 368 bp 的片段, 酶切结果与预期目标一致。测序结果与 GenBank 公布的序列一致, 证实重组质粒构建成功。

将 3 个重组表达载体转化 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 表达宿主菌, 筛选获得的重组子通过 IPTG 的诱导作用, 均获得了 ana-LOX 的活性表达, 酶活测定结果如图 2 所示。其中 pET-32a-ana-LOX 的活性表达最高, 并且 16 °C 低温条件下诱导表达获得的酶活性均高于 30 °C 条件下的表达结果。

因此, 选取了带有分子伴侣 Trx 的 pET-32a-ana-LOX 的重组表达载体进行下一步研究。当 IPTG 浓度为 1 g/L, 诱导时间 16 h, 诱导时机 OD_{600} 为 0.8, 诱导温度为 16 °C 的培养条件下, 重组脂肪氧合酶活力可达 $(6\ 750\pm 40)$ U/mL。

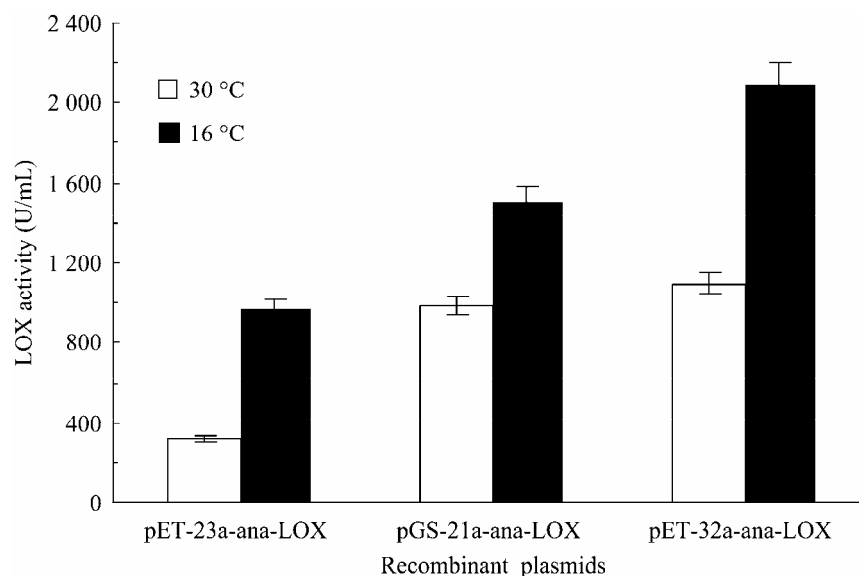


图 2 Ana-LOX *E. coli* 工程菌在 16 °C 和 30 °C 条件下诱导表达酶活测定

Fig. 2 Production of active recombinant ana-LOX in recombinant *E. coli* at 16 °C and 30 °C condition.

2.3 Ana-LOX 基因的定点突变

定点突变酶基因的克隆采用 SOE-PCR 的方法, 各个突变基因与表达载体连接酶切验证并测序正确后, 采用热激法将重组表达载体转化入 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, 酶活测定结果见表 3。

His¹⁹⁷、His²⁰²、His³⁶⁹、Asn³⁷³、Ile⁴⁵⁵ 位点的所有突变基因均无活性, 而随机选择 His³⁶⁴、Asn⁴¹⁹、Asn³²⁶ 位点的所有突变基因均维持原有活性, 证明 His¹⁹⁷、His²⁰²、His³⁶⁹、Asn³⁷³、Ile⁴⁵⁵ 5 个氨基酸残基位点为 ana-LOX 活性中心的保守位点。

表 3 定点突变基因活性测定

Table 3 Activity of site-directed mutation

Site	Direction	Activity (U/mL)
His ¹⁹⁷	Ala	—
	Glu	—
	Arg	—
His ²⁰²	Ala	—
	Glu	—
	Arg	—
His ³⁶⁹	Ala	—
	Glu	—
	Arg	—
His ³⁶⁴	Ala	6 675±40
	Glu	6 741±40
	Arg	6 650±40
Asn ³⁷³	Ala	—
	Gln	—
	His	—
Asn ⁴¹⁹	Ala	6 700±40
	Gln	6 750±40
	His	6 740±40
Ile ⁴⁵⁵	Deletion	—
	Ala	—
	His	—
	Asn	—
Ile ³²⁶	Ala	6 730±40
	His	6 680±40
	Asn	6 750±40

2.4 Ana-LOX 功能基因的长度

不同长度的 ana-LOX 基因与表达载体 pET-32a 连接, 获得工程菌诱导发酵后, 酶活结果见表 4。1 368~1 254 bp 长度的 ana-LOX 基因酶活基本一致, 1 254~1 233 bp 长度的 ana-LOX 基因酶活逐步开始降低, 当 ana-LOX 基因长度缩短为 1 230 bp 时, 酶活完全丧失。因此, ana-LOX 的最适基因片段长度为 1 254 bp, 重组脂肪氧合酶的分离纯化及性质研究选择均选择 1 254 bp 进行研究。

2.5 重组 ana-LOX 蛋白表达形式鉴定

分别取适量 pET-32a-ana-LOX 工程菌及含

空载体的对照菌体, 诱导发酵超声波破碎菌并离心后, 上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。结果如图 3 所示, 重组蛋白全部以可溶性形式存在于细胞裂解物的上清中。

2.6 重组 ana-LOX 分离纯化

按照 Ni-NTA His Tag Kit 说明书, 依次用含不同浓度咪唑 (50 mmol/L、100 mmol/L、150 mmol/L、200 mmol/L) 的洗脱液洗脱 Ni-NTA 柱, 收集洗脱峰, 测定脂肪氧合酶活性。结果如表 5 所示, 当咪唑为 150 mmol/L 时, 通过 Ni-NTA 层析一步纯化, 比活达到 11.4×10^4 U/mg 蛋白, 纯化倍数达到 23 倍, 酶活

表 4 不同基因长度的 ana-LOX 活性测定

Table 4 Activity of ana-LOX with different gene length

Length of the fragment (bp)	LOX activity (U/mL)	Protein molecular weight (kDa)
1 368	6 750±40	51.84
1 350	6 616±40	51.35
1 332	6 750±40	50.66
1 314	6 550±40	49.94
1 296	6 583±40	49.21
1 278	6 500±39	48.56
1 260	6 516±37	47.87
*1 254	6 640±39	47.66
1 251	5 016±30	47.56
1 248	3 260±20	47.46
1 245	3 233±20	47.36
1 242	3 100±18	47.23
1 239	2 800±16	47.12
1 236	2 375±14	47.02
1 233	1 750±10	46.93
1 230	0	46.81

* the optimal length of ana-LOX.

表 5 Ni-NTA 层析柱纯化重组蛋白

Table 5 Purification of recombinant His₆-ana-LOX

Purification step	Protein (mg)	Activity ($\times 10^4$ U)	Specific activity ($\times 10^4$ U/mg)	Yield (%)
Crude extract	134.50	67.0	0.498	100.00
Ni-NTA column	3.57	40.8	11.400	60.89

回收率为 60.89%。如图 4 所示, 对纯化重组酶进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示纯化效果较好。

纯化后的融合蛋白在 SDS-PAGE 中显示为一条带 (图 5)。泳道 1 为重组的融合蛋白 Trx-ana-LOX, 用 Bio-Rad Quantity One 4.6.2 凝胶分析软件计算其分子量约为 70 kDa 左右, 与理论值基本一致。

2.7 重组 ana-LOX 的性质研究

2.7.1 重组酶反应的最适 pH

将纯化的重组酶在不同的 pH 条件下与底物反应后, 测定各条件下的活力。不同 pH 值对重组脂肪氧合酶活力的影响。如图 5 所示, 重组脂肪氧合酶反应的最适 pH 值为 6.0。

2.7.2 重组酶反应的最适温度

将纯化的重组酶在不同的温度条件下与底物反应后, 测定各条件下的活力。结果表明重组酶的最佳反应温度为 45 °C (图 6)。

2.7.3 重组酶的热稳定性

对重组 ana-LOX 的热稳定性进行了研究。如图 7 所示, 在 20 °C 条件下保温 1 h, 酶活降低到对照组的 83%, 30 °C 条件保温 25 min, 酶活降低为对照组的 50%, 40 °C 和 50 °C 条件下酶的较易失活, 保温 10 min 后酶活分别降低为对照组的 50% 和 40%。

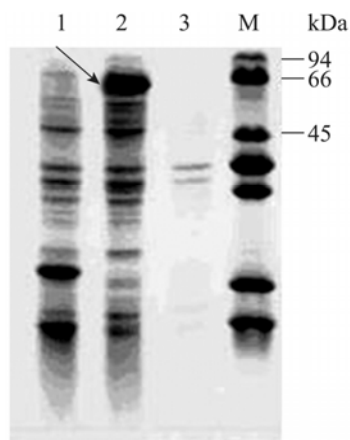


图 3 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白的表达形式

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the solubility of expressed protein. 1: the crude extracts from cells carrying pET-32a (control); 2: the supernatant of the disrupted cells carrying pET-32a-ana-LOX, recombinant Trx-ana-LOX is indicated by arrowhead; 3: inclusion bodies of cells carrying pET-32a-ana-LOX; M: protein marker.

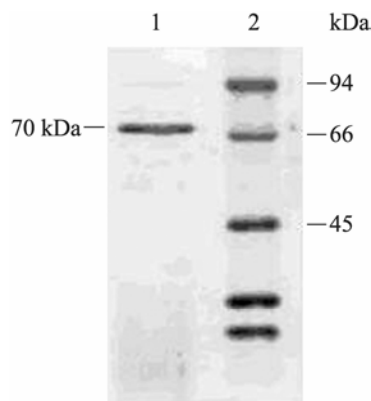


图 4 纯化后重组 ana-LOX SDS-PAGE 电泳

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified recombinant ana-LOX.

2.7.4 金属离子对重组酶活性的影响

金属离子对酶活的影响见表 6。其中 Fe^{2+} 对重组 ana-LOX 具有强烈的激活作用, 与对照组相比, 能提高到 181.91%, Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 对重组

ana-LOX 有强烈的抑制作用, 能完全抑制 ana-LOX 活性。 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 对重组 ana-LOX 具有一定激活作用; Na^+ 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 对重组 ana-LOX 具有一定的抑制作用。

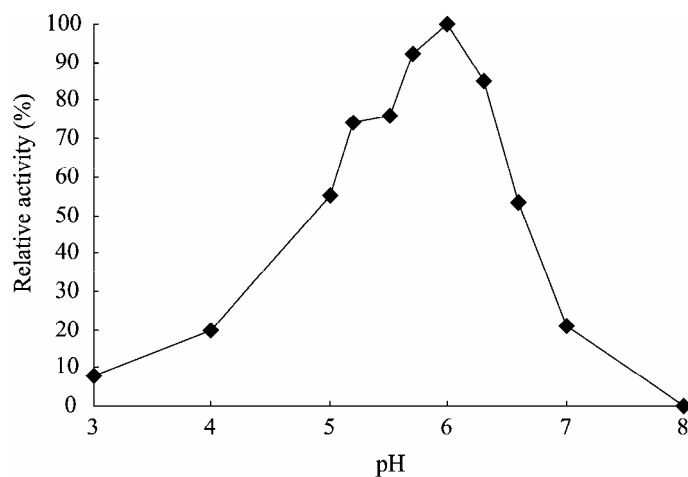


图 5 pH 对重组酶的活力的影响

Fig. 5 Effect of pH on recombinant ana-LOX activity.

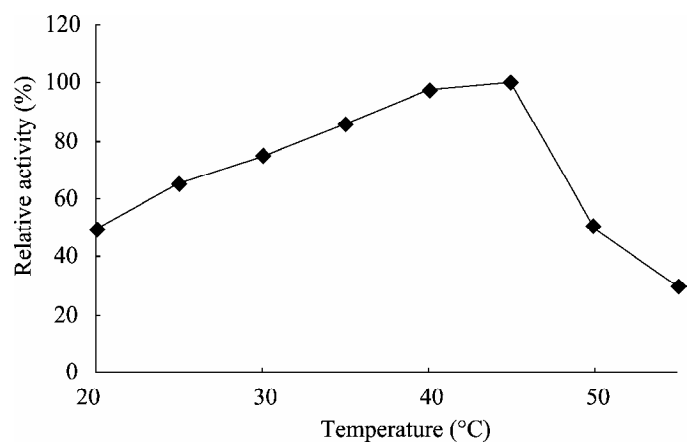


图 6 温度对重组酶活力的影响

Fig. 6 Effect of temperature on recombinant ana-LOX activity.

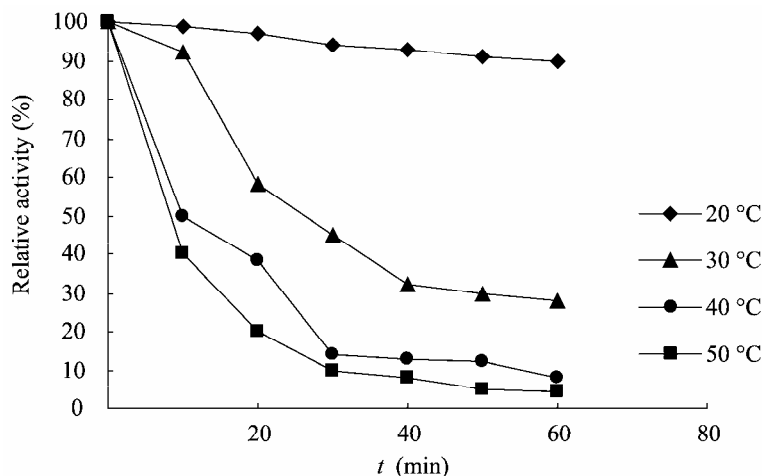


图 7 Ana-LOX 热稳定性

Fig. 7 Thermal stability of recombinant ana-LOX.

表 6 金属离子对重组 ana-LOX 活性的影响

Table 6 Effect of metal ions (10 mmol/L) on recombinant ana-LOX

Metal ions	Relative activity (%)
Control	100.00
Fe ²⁺	181.91±24.00
Mg ²⁺	108.87±14.00
Ca ²⁺	105.99±12.00
Na ⁺	97.83±8.00
Zn ²⁺	88.66±10.00
Mn ²⁺	82.20±11.00
Fe ³⁺	0.00
Cu ²⁺	0.00

2.8 重组 Ana-LOX 对面团微观结构的影响

图 8 分别为对照面团 (A)、每克面粉添加 80 U (80 U/g) 重组 Ana-LOX 处理的面团 (B) 和每克面粉添加添加 50 μg KBrO₃ (50 μg/g) (C) 处理的面团在 500 倍放大倍数下的 SEM 显微结构图片。结果表明, 与对照组比较 (A), 经重组

Ana-LOX 处理后的面团结构的变化明显, 可以清晰地看到少量丝状结构变成完整的网状结构, 而淀粉颗粒则存在于交错的面筋网络之间 (B), 与 KBrO₃ 处理所得结果基本相似 (C)。重组 Ana-LOX 在改善面团结构方面表现出了良好的效果, 有待进一步研究。

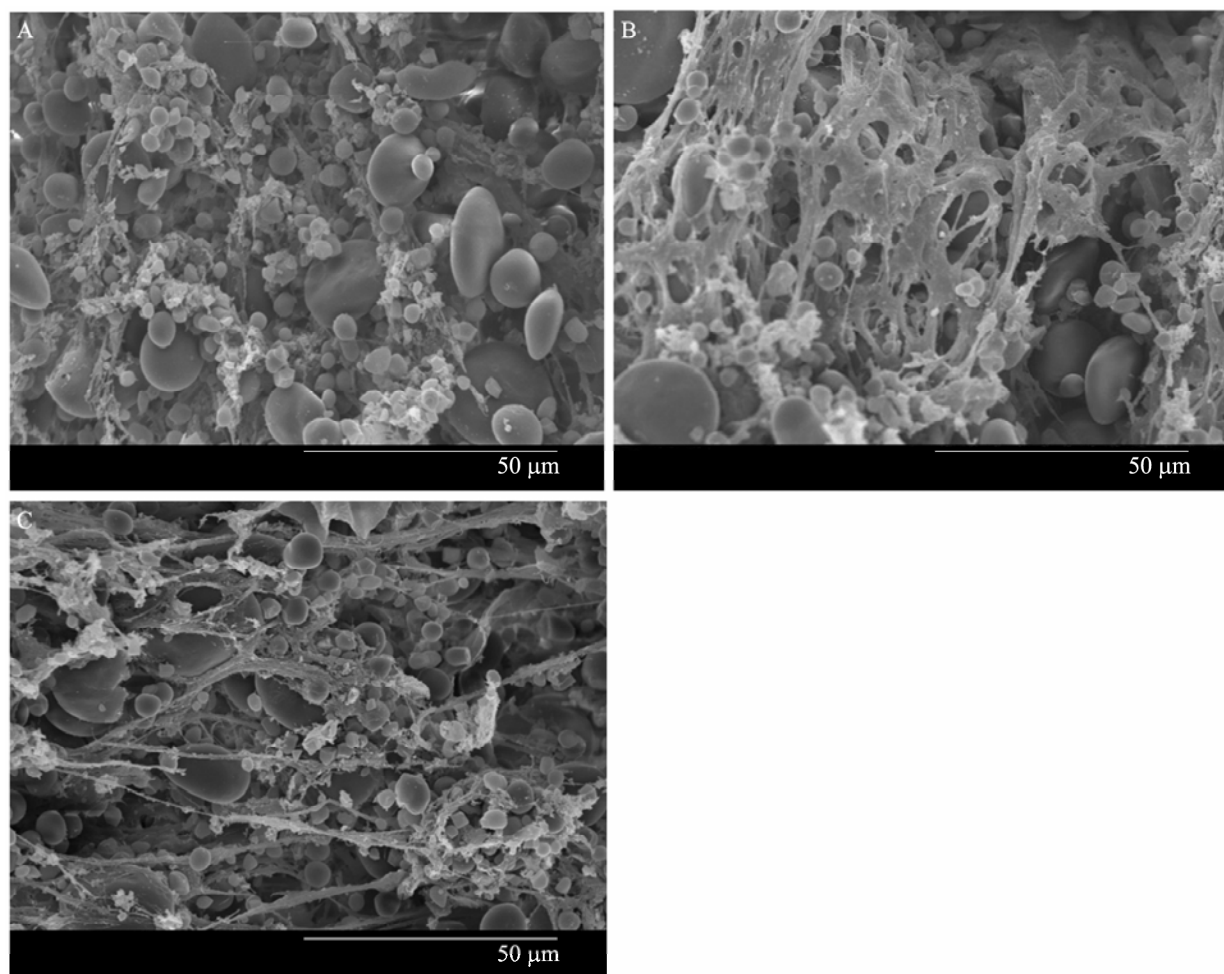


图 8 面团的 SEM 显微结构图

Fig.8 SEM results of the dough with no enzyme treatment. (A) Control. (B) With 80 U/g dough ana-LOX treated. (C) With 50 µg/g dough KBrO₃ treated.

3 讨论

关于脂肪氧合酶的异源表达早有学者开始研究。分别对氰细菌、水稻、大豆等多种^[6,12-15]来源的 LOX 基因在大肠杆菌中进行了异源表达研究,但活性表达量都很低。LOX 基因至今表达量不高主要由于多数来源于真核生物,异源表达过程中存在基因长度过长、稀有密码子以及翻译后加工修饰等问题。因此,寻找新型原核来源

的 LOX 基因,对于开发 LOX 成为新型食品添加剂具有重要的意义。

本研究通过在 NCBI 数据库中搜索,发现 *Anabaena* sp. PCC 7120 基因组中含有 LOX 基因,以双功能酶形式存在。通过氨基酸序列比对和活性位点的推测发现 LOX 活性中心为双功能酶的 C 端,并从 C 端扩增了一段只包含脂肪氧合酶活性中心的基因 (ana-LOX)。虽然与其他来源的

LOX 同源性很低 (表 7), 但是, 保守区、二级结构域以及三维结构预测均发现扩增得到的 ana-LOX 基因属于 LOX 家族。由于 ana-LOX 基因具有原核来源、基因长度 (1 368 bp) 比其他来源的基因小许多, 因此, 具有实现 LOX 高效异源表达的潜力。

本研究结果表明, 扩增的 ana-LOX 在 *E. coli* 中获得了活性表达, 酶活达到 6 750 U/mL。Ana-LOX 基因在不同的表达载体表现出不同的酶活产量, 表明分子伴侣能够影响重组 ana-LOX 的活性表达量, 分子伴侣 Trx 优于 GST。低温发酵能够避免包涵体的形成^[16], 在 16 °C 条件下, 重组 ana-LOX 全部以可溶性形式出现, 该结果属首次报道。通过 Ni 柱一步纯化过程, 获得了电泳纯的重组蛋白条带, 对重组 ana-LOX 酶学性质进行了研究的。金属离子能够影响酶活性, Fe²⁺ 能够显著提高重组 ana-LOX 酶活, 而 Cu²⁺ 和 Fe³⁺ 能够完全抑制重组 ana-LOX 酶活。我们分析金属离子的氧化性质影响到重组 ana-LOX Fe 原子的价态变化从而影响到酶活。

大豆 LOX-1 的空间结构已被解析, 活性保守位点即 Fe³⁺ 定位残基为 His⁴⁹⁹、His⁵⁰⁴、His⁶⁹⁰、Asn⁶⁹⁴ 和 Ile⁸³⁹^[13]。通过序列比对和空间结构模拟, 我们预测到 ana-LOX 的保守位点为 His¹⁹⁷、His²⁰²、His³⁶⁹、Asn³⁷³ 和 Ile⁴⁵⁵。LOX 的氧化活性是通过的 Fe³⁺ 价态的变换实现的^[15], 因此定位 Fe³⁺ 的氨基酸残基会通过电子间的竞争影响 LOX 的活性。为了提高 LOX 的活性, 采用定点突变技术进行了定向进化研究。然而通过将保守位点分别突变为中性、碱性、酸性氨基酸, 获得的突变基因在 *E. coli* 均为无活性表达。Mirela 等在研究 Mn 脂肪氧合酶过程中, 定点突变后发现突变基因表达出的重组酶丧失了活性, 进一步研究发现突变重组酶检测不到 Mn 离子^[17]。因此, 推测 ana-LOX 保守位点的突变也同样导致了 Fe³⁺ 无法定位。通过大量的定点突变, 没有得到活性提高的突变基因, 但是, 该结果证明了 ana-LOX 保守氨基酸位点确实与预测的一致。为了对该结论加以佐证, 我们随机选择了其他位点的相同氨基酸进行突变, 突变基因表达出的重组

表 7 ana-LOX 与其他来源 LOX 序列同源性

Table 7 Identity of ana-LOX to other resource of LOX

Resource	GenBank Accession No.	Name	Identity (%)	Length (bp)	Reference
Soybean	EU28320.1	LOX-1	12.02	839	[12]
Soybean	EU28322.1	LOX-3	11.54	857	[13]
Rice seeds	X64396.1	LOX-2	11.65	865	[11]
<i>Plexaura homomalla</i>	2FNQA	8R-LOX	14.82	894	[10]
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC73102	YP_00186751.1	NpLOX1	15.66	630	[5]
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC73102	YP_001864265.1	NpLOX2	14.86	547	[5]

ana-LOX 均具有活性。今后的工作可以在此基础上,对活性中心位点周边的残基进行突变,以期获得性能改良的突变酶。

通过信息学分析,以及定点突变研究,位于 ana-LOX C 末端的 Ile 是活性中心不可缺少的氨基酸残基。同理,我们考虑 ana-LOX N 端也应该存在一个过渡区域,决定了 ana-LOX 基因的最短长度。通过从 ana-LOX 基因 5'端逐步缩短基因长度,首次发现 ana-LOX 基因长度存在一个过渡区域,即当基因长度长于 1 254 bp 时,表达的重组 LOX 活性处于同一水平,当基因长度缩短为 1 254 bp 时,重组酶活逐步降低,至 1 230 bp 时,酶活消失。我们分析 C 端的氨基酸在维持重组 ana-LOX 空间结构的稳定性发挥一定作用。当维持空间结构起主要作用的残基消失,活性结构处于不稳定状态,或者无法形成活性结构。

对不同来源的脂肪氧合酶的性质,国内外学者也有不少报道。Daniel 等^[18]以酪梨为材料分离纯化 LOX,发现其最适反应 pH 为 6.5,最适反应温度为 40 °C; Jin 等^[19]的研究结果表明,豌豆种子的最适反应 pH 为 9.0,最适反应温度为 39 °C;陈书婷等^[20]对大豆 LOX 进行了研究,发现其最适反应 pH 为 9.0,在低温下(低于 40 °C)保持较高酶活性。本研究中表达的重组 ana-LOX 最适反应 pH 为 6.0,表明为一种偏酸性酶;最适反应温度为 45 °C,高于其他来源的 LOX,有利于在实际生产加工过程中的应用。

本研究实现了 ana-LOX 的高效表达,显示出 ana-LOX 基因在食品酶制剂中的巨大应用潜力。但是作为宿主的 *E. coli* 属于致病菌,属于胞内表达,获得重组蛋白必须经过破壁,且需要严格的

纯化过程以除去致病物质才能应用于人体。而对于附加值较低的食品添加剂用酶,高额的纯化成本必然会限制其应用。因此,需要寻找安全的表达系统,实现胞外分泌表达。有关 ana-LOX 食品级表达系统的构建是我们进一步研究的重点方向。

REFERENCES

- [1] Lorenzi V, Maury J, Casanova J, et al. Purification, product characterization and kinetic properties of lipoxygenase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiol Biochem*, 2006, 44(7/9): 450–454.
- [2] Kuo JM, Hwang A, Yeh DB, et al. Lipoxygenase from banana leaf: purification and characterization of an enzyme that catalyzes linoleic acid oxygenation at the 9-position. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(8): 3151–3156.
- [3] Zhang SW, Li D. Improve wheat flour quality by biological technology. *J Chin Cereals Oils Assoc*, 2002, 17(1): 16–21.
张守文, 李丹. 应用混合酶制剂进行面粉品质改良的基础研究. *中国粮油学报*, 2002, 17(1): 16–21.
- [4] Addo K, Burton D, Stuart MR, et al. Soybean flour lipoxygenase isozyme mutant effects on bread dough volatiles. *J Food Sci*, 2006, 3(58): 583–585.
- [5] Casey R, West SI, Hardy D, Robinson DS, et al. New frontiers in food enzymology: recombinant lipoxygenases. *Trends Food Sci Tech*, 1999, 10(9): 297–302.
- [6] Koeduka T, Kajiwara T, Matsui K. Cloning of lipoxygenase genes from a cyanobacterium, *Nostoc punctiforme*, and its expression in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, 2007, 54(4): 315–319.
- [7] Nakamura A, Takakura Y, Kobayashi H, et al. *In vivo* directed evolution for thermostabilization of *Escherichia coli* hygromycin B phosphotransferase and the use of the gene as a selection marker in the host-vector system of *Thermus thermophilus*. *J Biosci Bioeng*, 2005, 100(2): 158–163.

- [8] Kaneko T, Nakamura Y, Wolk CP, et al. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res*, 2001, 8(5): 205–213.
- [9] Hou ML, Miao HR, Chen J, et al. Measurement of peanut seeds lipoxygenase activity. *J Anhui Agric Sci*, 2008, 36(32): 14033–14035.
侯美玲, 苗华荣, 陈静, 等. 花生种子脂肪氧化酶的活性测定研究. *安徽农业科学*, 2008, 36(32): 14033–14035.
- [10] Szymanowska U, Jakubczyk A, Baraniak B, et al. Characterisation of lipoxygenase from pea seeds (*Pisum sativum* var. *Telephone* L.). *Food Chem*, 2009, 116(4): 906–910.
- [11] Oldham ML, Brash AR, Newcomer ME. Insights from the X-ray crystal structure of coral 8R-lipoxygenase. *J Biol Chem*, 2005, 280(47): 39545–39552.
- [12] Wang R, Shen WB, Liu LL, et al. A novel lipoxygenase gene from developing rice seeds confers dual position specificity and responds to wounding and insect attack. *Plant Mol Bio*, 2008, 66(4): 401–414.
- [13] Meyer MP, Tomchick DR, Klinman JP. Enzyme structure and dynamics affect hydrogen tunneling: The impact of a remote side chain (I553) in soybean lipoxygenase-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(4): 1146–1151.
- [14] Shin JH, Van K, Kim DH, et al. The lipoxygenase gene family: a genomic fossil of shared polyploidy between *Glycine max* and *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol*, 2008, 8(1): 133.
- [15] Sellhorn GE, Youn B, Webb B, et al. Biochemical characterization, kinetic analysis and molecular modeling of recombinant vegetative lipoxygenases from soybean. *Int J Bio*, 2011, 3(1): 44–62.
- [16] Fang JJ, Ewald D. Expression cloned cDNA for 10-deacetylbaecatin III-10-*O*-acetyltransferase in *Escherichia coli*: a comparative study of three fusion systems. *Protein Expr Purif*, 2004, 35(1): 17–24.
- [17] Cristea M, Engström Å, Su C, et al. Expression of manganese lipoxygenase in *Pichia pastoris* and site-directed mutagenesis of putative metal ligands. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 434(1): 201–211.
- [18] Jacobo-Velázquez DA, Hernández-Brenes C, Cisneros-Zevallos L, et al. Partial purification and enzymatic characterization of avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass) lipoxygenase. *Food Res Int*, 2010, 43(4): 1079–1085.
- [19] Jin GF, Zhang JH, Yu X, et al. Crude lipoxygenase from pig muscle: partial characterization and interactions of temperature, NaCl and pH on its activity. *Meat Sci*, 2011, 87(3): 257–263.
- [20] Chen ST, Kong XZ, Hua YF, et al. Study on purification and some properties of soybean lipoxygenase. *Sci Technol Food Ind*, 2011(5): 176–182.
陈书婷, 孔祥珍, 华欲飞, 等. 大豆脂肪氧合酶的分离纯化及其性质研究. *食品工业科技*, 2011(5): 176–182.