

傅江燕,徐 晟,夏 冰,等. 山桃醇腈酶基因 *PdHNL1* 的克隆、序列分析与原核表达[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):20-24.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.006

山桃醇腈酶基因 *PdHNL1* 的克隆、序列分析与原核表达

傅江燕,徐 晟,夏 冰,汪 仁

(江苏省中国科学院植物研究所,江苏南京 210014)

摘要:以山桃叶片为材料提取 RNA,反转录后得到 cDNA,通过 PCR 扩增得到 1 个山桃醇腈酶基因全长编码序列,并命名为 *PdHNL1*。*PdHNL1* 的开放阅读框为 1 737 bp,预测编码蛋白包含 539 个氨基酸。氨基酸序列比对结果表明,*PdHNL1* 编码的蛋白具有葡萄糖甲醇胆碱氧化还原酶的序列特征,与黑樱桃醇腈酶 PsHNL4 蛋白相似度为 92%,与桃假定的 HNL 蛋白相似度为 77%。通过将 *PdHNL1* 基因连接到原核表达载体 pET28(a) 上,并转化大肠杆菌 BL21(DE3)后,成功构建了原核表达重组菌株。SDS-PAGE 电泳结果显示,重组蛋白受 IPTG 诱导表达,分子量大小约为 62.4 ku,与已报道的其他蔷薇科植物的醇腈酶蛋白大小基本一致。

关键词:山桃;醇腈酶;基因克隆;原核表达

中图分类号:S662.101;Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)07-0020-05

利用酶作为催化剂用于合成单一对映体或直接分离特定手性异构体,被广泛应用于不对称合成领域。醇腈酶作为一种不对称催化手性反应的酶,自 20 世纪初在扁桃中发现以来,受到愈来愈多的关注^[1]。它可逆地催化 HCN 和醛/酮类

化合物反应生成手性氰醇^[2],进而转化成为羟基化合物等多种手性中间体,并用于合成多种手性药物,从而克服了为得到纯手性化合物而采用光学拆分所带来的生产工序复杂、成本高等一系列问题^[3-4]。此外,在植物体内,醇腈酶可催化氨基糖苷类化合物,反应生成碳基化合物和 HCN,而后者在植物防御草食类动物摄食或其他致病菌感染中起到作用,即植物的生氰作用^[5-6]。

HNL 在自然界中是广泛存在的。据统计,有 3 000 ~ 12 000 种植物内含有 HNL。HNL 主要分为两大类:R 构型和 S 构型。目前,已分离纯化并进行酶活分析的 R 型 HNL 多来自于蔷薇科植物^[7],如扁桃、黑樱桃、梅、枇杷、西番莲等^[8-13];而 S 型 HNL 多来自于木薯、橡胶树、海檀木与高

收稿日期:2015-01-31

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301798);江苏省中国科学院植物研究所青年基金(编号:201201)。

作者简介:傅江燕(1990—),女,江苏南京人,硕士研究生,主要从事植物功能基因克隆及功能验证方面研究。Tel:(025)84347034;E-mail:happydeduck@126.com。

通信作者:汪 仁,博士,副研究员,主要从事植物分子生物学方面研究。Tel:(025)84347111;E-mail:jswangren@aliyun.com。

[3] Xie C T, Chen C S, Xu Y, et al. Construction of a genetic linkage map for *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) based on sequence-related amplified polymorphism and simple sequence repeat markers[J]. Journal of Phycology, 2010, 46(4): 780-787.

[4] 贾 威, 黄林彬, 严兴洪. 条斑紫菜 6 个品系的 SRAP 分析[J]. 水产学报, 2013, 37(10): 495-1501.

[5] 孙 雪, 骆其君, 杨 锐, 等. 紫菜(*Porphyra*)遗传差异的 ISSR 分析[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(2): 141-145.

[6] Zietkiewicz E, Rafalske A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.

[7] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传, 2002, 24(5): 613-616.

[8] 崔灵英, 许 璞, 朱建一, 等. 四种紫菜叶状体的 ISSR 分子标记分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 371-377.

[9] 袁昭岚, 黄鹤忠, 沈颂东, 等. 条斑紫菜 5 个栽培品系的 ISSR 分析[J]. 海洋科学, 2006, 30(7): 9-14.

[10] 陈昌生, 谢潮添, 纪德华, 等. 野生坛紫菜种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 水产学报, 2008, 32(5): 717-723.

[11] Rohlf F J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1[M]. New York: Exeter Publications, 2000.

[12] 李文红, 姚建亭, 王继成, 等. 龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)选育品系及其野生型的 ISSR 指纹分析[J]. 海洋与湖沼, 2005, 36(3): 241-247.

[13] 刘晨临, 王秀良, 刘胜浩, 等. 2008 年黄海浒苔绿潮 ISSR 标记溯源分析[J]. 海洋科学进展, 2011, 29(2): 235-240.

[14] 张 婷, 时 旭, 何建华, 等. 麒麟菜属和卡帕藻属海藻的 ISSR 初步分析[J]. 海洋学报, 2011, 33(3): 173-178.

[15] 陈淑沁, 吉红九, 丁亚平, 等. 吕四渔场三疣梭子蟹自然群体同工酶与 ISSR 遗传多样性分析[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(4): 406-410.

[16] 孙中响, 吉红九, 陈 葵, 等. 西施舌不同群体遗传多样性 ISSR 分析[J]. 江苏农业科学, 2010(8): 59-63.

[17] 陈淑沁, 徐士霞, 张志勇, 等. 大黄鱼野生群体与养殖群体遗传多样性研究[J]. 海洋科学, 2011, 35(12): 82-87.

[18] 陈淑沁, 陆勤勤, 张美如, 等. 条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*) 10 个选育系的 ISSR 分析[J]. 天津农业科学, 2012, 18(5): 19-23.

[19] 谢潮添, 陈昌生, 纪德华, 等. 坛紫菜种质材料 DNA 指纹图谱的构建[J]. 水产学报, 2010, 34(6): 734-740.

[20] 张肖娟, 孙振元. 植物新品种保护与 DUS 测试的发展现状[J]. 林业科学研究, 2011, 24(2): 247-252.

梁^[14-17]。笔者所在研究组根据前期公布的桃的基因组数据^[18],通过序列同源比对分析,发现其中有 3 条序列为编码推测的 HNL 蛋白。此外,山桃、桃与扁桃同属于蔷薇科桃属,目前有关山桃中 HNL 的研究并未报道。因此,本研究采用生物信息学结合 PCR 的方法,克隆得到 1 个山桃 *HNL* 基因,并对其进行了相关的生物信息学分析与原核表达研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

山桃[*Prunus davidiana* (Carr.) C.]叶片取自江苏省中国科学院植物研究所,采集后迅速放入液氮中冷冻,于 -80 ℃ 保存备用。

高纯总 RNA 快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,表达载体 pET28(a) 购自 Novagen 公司,rTaq DNA 聚合酶、克隆载体 pMD19-T、Oligo (dT)18、DNA Markers、限制性内切酶和反转录酶 M-MLV (RNase H-)等购自大连宝生物工程有限公;胰蛋白胨、酵母提取物购自 Oxoid 公司;其他化学试剂均为国产分析纯。大肠杆菌 DH5α、TOP10 和 BL21 (DE3) 菌株为笔者所在实验室保存,引物合成和测序工作分别委托北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司与上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 的合成 按照高纯总 RNA 快速提取试剂盒的操作说明,提取山桃叶片的 RNA,通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 纯度与完整性,并以此为模板,根据 TaKaRa 公司的反转录试剂盒说明书反转录得到山桃 cDNA。

1.2.2 *PdHNL1* 基因的克隆及生物信息学分析 根据桃基因组测序组公布的序列,通过比对搜索出编码假定醇脱氢酶的基因序列,并根据这些序列设计特异引物,上游引物为 F0:5'-ATGGTGAAATCAACAATGTC-3',下游引物为 R0:5'-AGTATCAAACGCAAAGGAT-3'。以反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增反应程序为:94 ℃ 预变性

5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 50 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收,纯化后的产物连接到 pMD19T 载体上,转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,挑取克隆进行 PCR 与质粒酶切检测,鉴定结果均为阳性的重组子送交公司测序。

测序结果通过 NCBI 的 ORF finder 在线软件查找该序列的开放阅读框,得到其编码的氨基酸序列,将该序列使用 BlastP 进行比对,选择与 *PdHNL* 同源的其他植物的醇脱氢酶蛋白序列,进一步利用 DNAMAN 软件进行多重序列比对并使用 MEGA5 构建系统进化树;使用 ExPASy 的 Compute pI/MW 计算蛋白的等电点与分子量;用 TMHMM 预测跨膜结构;用 SignalP 4.1 预测信号肽;用 PROSITE 数据库进行功能结构预测;用 SWISS-MODEL 预测三级结构并建模。

1.2.3 *PdHNL1* 基因的载体构建与原核表达 根据获得的 *PdHNL1* 基因与 pET28(a) 载体图谱,分析并设计带有酶切位点 *EcoR* I 和 *Not* I 的引物 *PdHNL1* -pETF 和 *PdHNL1* -pETR (表 1),使用 rTaq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。

将 pMD19T-*PdHNL1* 重组质粒与 pET28(a) 载体质粒同时进行 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,回收并纯化目的片段,并使用 T₄ DNA 连接酶 16 ℃ 连接过夜,随后转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,重组质粒经卡那霉素筛选,PCR 扩增并进行质粒双酶切验证后,最后挑去阳性克隆子进行测序。将测序正确的重组质粒 pET28(a)-*PdHNL1* 和空载体 pET28(a) 分别转入表达宿主菌 BL21 (DE3) 中,挑取克隆并使用 T₇ 通用引物进行 PCR,筛选阳性菌株。

1.2.4 原核表达及 SDS-PAGE 电泳检测 将 PCR 验证正确的重组菌株与对照菌株分别接种于 50 mL 的 LB 培养基中,37 ℃ 振荡培养至 D_{600nm} 约为 0.8,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 于 16 ℃ 进行低温诱导;分别在诱导后的 0、3、6、18、24 h 时取菌液 1 mL,10 000 r/min 离心 1 min 收集菌体,制备 SDS-PAGE 电泳样品;按照《蛋白质技术手册》配制蛋白胶,并进行 SDS-PAGE 电泳分析。

表 1 山桃 *PdHNL1* 基因克隆和表达分析引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
F0	ATGCTGAAATCAACAATGTC	基因克隆
R0	AGTATCAAACGCAAAGGAT	
<i>PdHNL1</i> -pETF	TAGAGAATTCGTCAATACTTCTTCTGAG	原核表达载体构建
<i>PdHNL1</i> -pETR	CTAAGCGGCCGCAGTATCAAACGCAAAGGAT	

2 结果与分析

2.1 提取的 RNA 质量

取提取的山桃叶片总 RNA 2.5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示,其 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰可见,5S rRNA 呈现一条较弱的条带(图 1),表明提取的 RNA 浓度较高且完整性较好,可以用于进一步的基因克隆试验。

2.2 *PdHNL1* 基因的克隆与生物信息学分析

通过 PCR 方法扩增 *PdHNL1* 目标基因的全长 cDNA 的 ORF 序列,将其命名为 *PdHNL1*,软件分析发现该基因编码区(CDS)长度为 1 737 bp,编码 579 个氨基酸,理论分子量为 62.4 ku,理论等电点为 4.98,预测的半衰期为 30 h,不稳定系

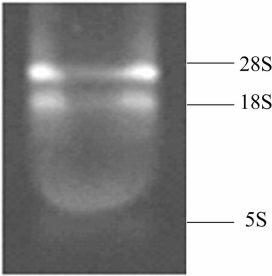


图1 山桃叶片总RNA的提取结果

数为 29.36,属于稳定蛋白,不含跨膜区。疏水性分析结果显示 *PdHNL1* 属于亲水性蛋白(图 2);信号肽预测分析结果显

示,该蛋白 N 端有一段信号肽序列。PdHNL1 蛋白序列的二级结构预测结果显示,无规则卷曲是山桃 PdHNL1 的主要结构元件;统计结果表明,PdHNL1 蛋白的二级结构包含 16.72% α -螺旋、17.55% β -折叠和 65.73% 无规则卷曲。此外,结构功能分析结果还表明,PdHNL1 蛋白有类似葡萄糖甲醇胆碱氧化还原酶的序列特征(图 3)。氨基酸多重序列比对结果显示 PdHNL1 与黑樱桃 PsHNL4 同源性较高(图 4)。

从 GenBank 上获得多个植物 HNL 同源基因编码蛋白的氨基酸序列。利用进化分析 MEGA 5.0,采用中邻位相算法构建系统进化树(图 5)。分析结果显示,山桃 PdHNL1 与同为蔷薇科的黑樱桃 PsHNL4 进化关系最近;与其他蔷薇科

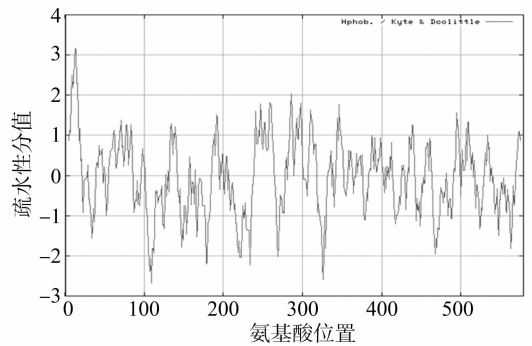


图2 山桃 PdHNL1 蛋白的疏水性分析

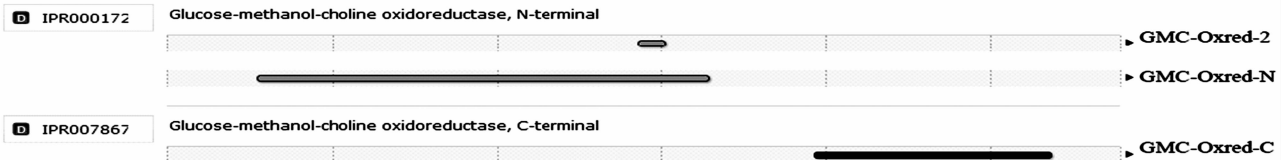


图3 山桃 PdHNL1 蛋白的功能结构分析

PdHNL1	MKSTMSAVV...LVNLIVHILQSEVHSLVNTSSEHDSYLFKVVNVAVLELGGSYDYIIVGGGTGCPLAATLSANYSVLVLRGCTIATVYPNLTIVTC	99
PsHNL4	MKSTMSAVV...LVNLIVHILQSEVHSLVNTSSEHDSYLFKVVNVAVLELGGSYDYIIVGGGTGCPLAATLSANYSVLVLRGCTIATVYPNLTIVTC	99
PmHNL2	MKSTMSAILL...LVNLIVHILQSEVHSLVNTSSEHDSYLFKVVNVAVLELGGSYDYIIVGGGTGCPLAATLSANYSVLVLRGCTIATVYPNLTIVTC	99
PaHNL2	MKSTMSAILL...LVNLIVHILQSEVHSLVNTSSEHDSYLFKVVNVAVLELGGSYDYIIVGGGTGCPLAATLSANYSVLVLRGCTIATVYPNLTIVTC	98
EjHNL	MKSTMSVTHVL...LVNLIVHILQSEVHSLVNTSSEHDSYLFKVVNVAVLELGGSYDYIIVGGGTGCPLAATLSANYSVLVLRGCTIATVYPNLTIVTC	96
PdHNL1	PAVNLCCDDGKTPVPRVSPDGIINVSRLGGSTIINAGVVRANESFYNDSSVAVMDIVNRAVAVLELGGSYDYIIVGGGTGCPLAATLSANYSVLVLRGCTIATVYPNLTIVTC	199
PsHNL4	PAVNLCCDDGKTPVPRVSPDGIINVSRLGGSTIINAGVVRANESFYNDSSVAVMDIVNRAVAVLELGGSYDYIIVGGGTGCPLAATLSANYSVLVLRGCTIATVYPNLTIVTC	199
PmHNL2	PAVNLCCDDGKTPVPRVSPDGIINVSRLGGSTIINAGVVRANESFYNDSSVAVMDIVNRAVAVLELGGSYDYIIVGGGTGCPLAATLSANYSVLVLRGCTIATVYPNLTIVTC	199
PaHNL2	PAVNLCCDDGKTPVPRVSPDGIINVSRLGGSTIINAGVVRANESFYNDSSVAVMDIVNRAVAVLELGGSYDYIIVGGGTGCPLAATLSANYSVLVLRGCTIATVYPNLTIVTC	198
EjHNL	PAVNLCCDDGKTPVPRVSPDGIINVSRLGGSTIINAGVVRANESFYNDSSVAVMDIVNRAVAVLELGGSYDYIIVGGGTGCPLAATLSANYSVLVLRGCTIATVYPNLTIVTC	196
PdHNL1	GSIVVECASTLGTSTFDNNGTRHASELLNKGDPNTNKAFAVAVKILFTL.EASGVIAVGVYITDSNGTSFRAVRNGKEVILSAGLCAEQLLLLS	298
PsHNL4	GSIVVEEESTLGTSTFDNNGTRHASELLNKGDPNTNKAFAVAVKILFTL.ESSGLTAVGVYITDSNGTSFRAVRNGKEVILSAGLCAEQLLLLS	298
PmHNL2	GSIVVEESTLGTSTFDNNGTRHASELLNKGDPNTNKAFAVAVKILFTL.ESSGLTAVGVYITDSNGTSFRAVRNGKEVILSAGLCAEQLLLLS	298
PaHNL2	GSIVVEESTLGTSTFDNNGTRHASELLNKGDPNTNKAFAVAVKILFTL.ESSGLTAVGVYITDSNGTSFRAVRNGKEVILSAGLCAEQLLLLS	296
EjHNL	GSIVVEESTLGTSTFDNNGTRHASELLNKGDPNTNKAFAVAVKILFTL.ESSGLTAVGVYITDSNGTSFRAVRNGKEVILSAGLCAEQLLLLS	296
PdHNL1	GVGPESYLSINISVAVSHPYVCGYINPNRNFINTLLPNHIEPSTVTVLGTSTSEVCCSLSISLFTFTFSLLETTSPYPLNCTHFAIVSKVEGPLSG	398
PsHNL4	GVGPESYLSINISVAVSHPYVCGYINPNRNFINTLLPNHIEPSTVTVLGTSTSEVCCSLSISLFTFTFSLLETTSPYPLNCTHFAIVSKVEGPLSG	398
PmHNL2	GVGPESYLSINISVAVSHPYVCGYINPNRNFINTLLPNHIEPSTVTVLGTSTSEVCCSLSISLFTFTFSLLETTSPYPLNCTHFAIVSKVEGPLSG	398
PaHNL2	GVGPESYLSINISVAVSHPYVCGYINPNRNFINTLLPNHIEPSTVTVLGTSTSEVCCSLSISLFTFTFSGFTESASYPLNSTHFAIVSKVEGPLSG	396
EjHNL	GVGPESYLSISIGVAVIHPYVGHLYINPNRNFINTLLPNHIEPSTVTVLGTSTSEVCCSLSISLFTFTFSGFTESASYPLNSTHFAIVSKVEGPLSG	396
PdHNL1	YILTLSSSNMSPNPNVFNHNSDPLDLHCVGMKKGIBELSTDLKPYKVEDLPGVILGHENILGHLEEMOTIDPAREFCRDTVASYWHYHGGCLVGV	498
PsHNL4	YILTLSSSNMSPNPNVFNHNSDPLDLHCVGMKKGIBELSTDLKPYKVEDLPGVILGHENILGHLEEMOTIDPAREFCRDTVASYWHYHGGCLVGV	498
PmHNL2	YILTLSSSNMSPNPNVFNHNSDPLDLHCVGMKKGIBELSTDLKPYKVEDLPGVILGHENILGHLEEMOTIDPAREFCRDTVASYWHYHGGCLVGV	498
PaHNL2	YILTLSSSNMSPNPNVFNHNSDPLDLHCVGMKKGIBELSTDLKPYKVEDLPGVILGHENILGHLEEMOTIDPAREFCRDTVASYWHYHGGCLVGV	496
EjHNL	YILTLSSSNMSPNPNVFNHNSDPLDLHCVGMKKGIBELSTDLKPYKVEDLPGVILGHENILGHLEEMOTIDPAREFCRDTVASYWHYHGGCLVGV	495
PdHNL1	IDGNRVGIDALRVVDSSTFFTPASHEGFGYLMGLGRVCTKIICERSASGEAICTSTFKPKIMDSRKALSFAFDTA	578
PsHNL4	IDGNRVGIDALRVVDSSTFFTPASHEGFGYLMGLGRVCTKIICERSASGEAIAHTSTFKPKIMDSRKALSFAFDTA	574
PmHNL2	LDGDRVIGIDALRVVDSSTFFTPASHEGFGYLMGLGRVCTKIICERSASEEALHSTFKPKILELLESALSFAFDT...	576
PaHNL2	LDGDRVIGIDALRVVDSSTFFTPASHEGFGYLMGLGRVCTKIICERSAS.....DLKILDSLKSASFLVL...	563
EjHNL	VDGGIRVIGIDALRVVDSSTFFTPASHEGFGYLMGLGRVCTKIICERSPWAG.....ISSA.....	552

黑色背景表示序列一致性为100%,黑色方框标记表示HNL保守氨基酸序列;PsHNL4—黑樱桃(*P. serotina*, O82784.1); PmHNL2—梅(*P. mume*, O50048.1); PaHNL2—扁桃(*P. dulcis*, Q945K2.1); EjHNL—枇杷(*Eriobotrya japonica*, ACY69987.1)

图4 PdHNL1 与其他植物 HNL 蛋白序列的多重比对

植物的 HNL 蛋白遗传距离也比较接近,同在一个进化分支上。

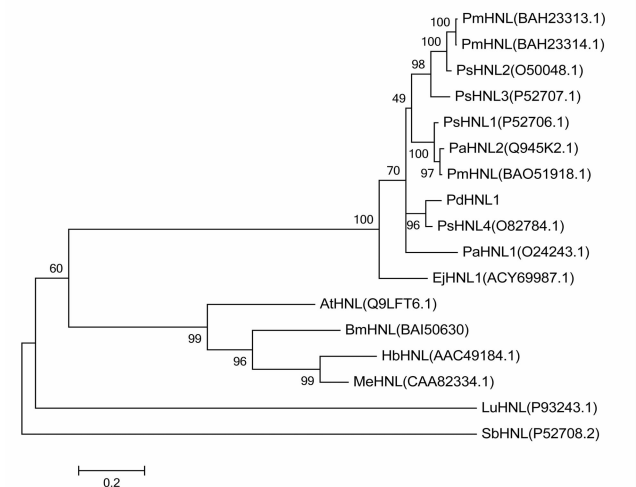
使用 SWISS - MODEL 对 PdHNL1 蛋白的三级结构进行预测,软件自动选择 PDB 数据库中的梅的 PmHNL isozyme - 1 蛋白为模板(同源率为 77.65%),对 PdHNL1 蛋白进行建模(图 6)。结果表明,PdHNL1 结构主要为无规则卷曲,这与二级结构预测结果相符。

2.3 PdHNL1 基因的原核表达

对 PdHNL1 进行信号肽预测分析发现,该蛋白 N 端具有 1 段信号肽序列。因此,设计去除该信号肽的引物,对 PdHNL1 的成熟蛋白进行原核表达。将 *pMD19T - PdHNL1* 与 *pET28*

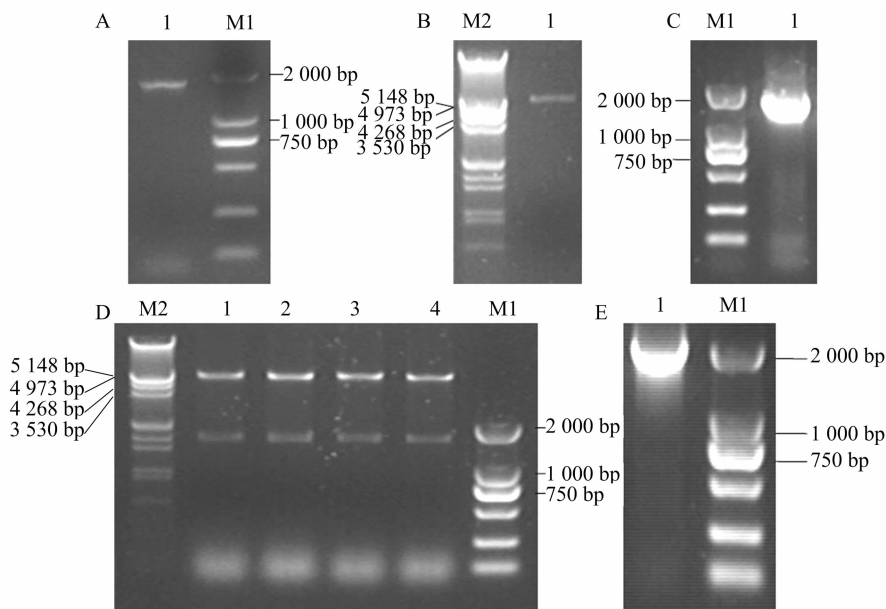
(a)质粒使用 *EcoR* I 与 *Not* I 双酶切(图 7 - A、图 7 - B),分别纯化回收后,使用 *T*₄ DNA 连接酶进行连接,并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。菌液 PCR 和质粒双酶切试验结果显示,*PdHNL1* 成功连接到原核表达载体 *pET28* (a) (图 7 - C、图 7 - D)。提取重组质粒 *pET28* (a) - *PdHNL1* 并转入大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3),菌液 PCR 检测结果表明获得了用于原核标的重组菌(图 7 - E)。

将含有重组质粒 *pET28* (a) - *PdHNL1* 的阳性菌株和含空载体 *pET28* (a) 的对照菌株培养至 *D*_{600 nm} 为 0.5,随后加入终浓度为 0.8 mmol/L IPTG 进行诱导表达;分别于 IPTG 诱导后的 0、3、6、18、24 h 取样,并制备 SDS - PAGE 检测样品。



R型HNL: PsHNL4—黑樱桃(O82784.1); EjHNL—枇杷(ACY69987.1); PaHNL1—扁桃(O24243.1); PsHNL3—黑樱桃(52707.1); PsHNL2—黑樱桃(O50048.1); PmHNL—梅(BAH23313.1); PmHNL—梅(BAH23314.1); PmHNL—梅(BAO51918.1); PaHNL2—扁桃(Q945K2.1); PsHNL1—黑樱桃(52706.1); AtHNL—拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, Q9LFT6.1); LuHNL—亚麻(*Linum usitatissimum*, P93243.1); S型HNL: BmHNL—斑籽(*Baliospermum montanum*, BAI50630); MeHNL—木薯(*Manihot esculenta*, CAA82334.1); HbHNL—橡胶树(*Hevea brasiliensis*, AAC49184.1); bHNL—高粱(*Sorghum bicolor*, P52708.2)。

图5 PdHNL1与其他物种植物HNL蛋白的系统进化树



M1—DL2000 marker; M2—lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III marker; A: 经*EcoR* I 与 *Not* I 双酶切的基因片段; B: 经*EcoR* I 与 *Not* I 双酶切的载体pET28(a); C—重组质粒pET28(a)-*PdHNL1*转入大肠杆菌DH5α的菌液PCR; D—pET28(a)-*PdHNL1*的双酶切鉴定; E—重组质粒pET28(a)-*PdHNL1*转入大肠杆菌BL21(DE3)的菌液PCR

图7 pET28(a)-*PdHNL1* 重组表达载体的构建

了 163 种产氰植物的 HNL 活性及其催化产生手性醇氰的能力,发现桃 HNL 具有 R 型 HNL 活性^[5]。桃与山桃同属于蔷薇科李亚科桃属,亲缘关系相近。本研究通过筛选桃基因组数据库,PCR 扩增得到山桃中克隆得到醇腈酶 cDNA 序列,生物信息学与分析发现其核苷酸长度、编码蛋白的分子量等与已报道的蔷薇科 HNL 蛋白相似;进一步的二级结构预测也发现,该蛋白含有大量无规则卷曲和少量 α -螺旋与 β -折叠,除 N 端信号肽外,无明显跨膜螺旋区域,表明同科的 HNL 具



图6 PdHNL1 的同源建模三级结构

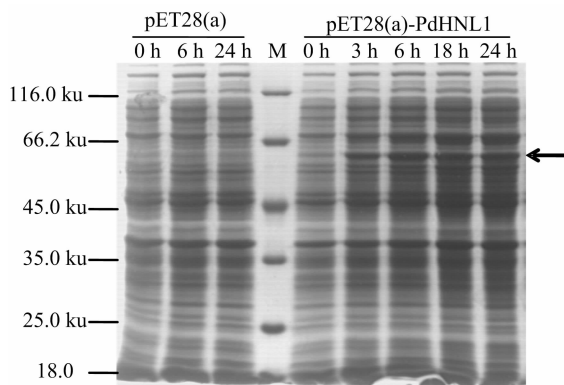
SDS - PAGE 电泳结果显示,含 pET28(a) - *PdHNL1* 的宿主菌经 IPTG 诱导后,在 62 ku 左右有 1 条清晰的目的条带,且随着时间的延长,该目的条带表达量增加(图 8)。这与 *PdHNL1* 预测的分子量相一致,表明山桃 pET28(a) - *PdHNL1* 重组质粒在大肠杆菌中成功表达。

3 结论与讨论

HNLs 是合成纯光学氰醇类化合物的重要的酶催化剂,其在植物体内催化分解氰基糖苷类化合物生成氰化物,从而起到保护植物的作用^[19]。自 1997 年就已经有研究者在植物体内筛选可能的 HNL^[20];此后,Asano 等采用 HPLC 方法检测

有较高的保守性。

先前的研究表明,R 型 HNL 主要具有氧化还原酶活性,而 S 型 HNL 具有 α/β 水解酶活性。拟南芥 HNL 则是第 1 个从非产氰植物中发现的具有 α/β 水解酶活性的 R 型 HNL^[21]。另一方面,HNL 蛋白依据是否含有 FAD 辅基分为 FAD - HNLs 与非 FAD - HNLs。本研究中对包括 PdHNL1 在内的 11 种植物的 17 个 HNL 蛋白进行聚类分析,发现蔷薇科 R 型 HNL 在一个进化分支,且均为 FAD - HNLs,推测蔷薇科



M—蛋白 marker; 黑色箭头表示目的融合蛋白

图8 pET28(a)-*PdHNL1* 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析结果

HNL 在进化过程中具有高度的保守性。山桃同属蔷薇科且 *PdHNL1* 与蔷薇科其他物种的 HNL 在同一个进化分支上,暗示其可能属于 R 型 HNL。蛋白比对分析结果同样显示, *PdHNL1* 与同属于蔷薇科的梅、黑樱桃、扁桃的 HNL 蛋白序列相似度较高,均达 75% 以上。结构功能分析结果显示, *PdHNL1* 属于葡萄糖甲醇胆碱氧化还原酶家族,且 *PdHNL1* 氨基酸序列中具有蔷薇科植物 HNL 推测的保守氨基酸序列 YWHYHGG。此外,拟南芥和亚麻 HNL 虽属于 R 型 HNL,但与 S 型醇腈酶亲缘关系较近,归为一个进化分支。

本研究还将 *PdHNL1* 基因连接到原核表达载体 pET28(a) 上,通过转化大肠杆菌 BL21(DE3) 进行融合蛋白的诱导表达,成功获得了重组菌种。上述结果为进一步纯化目标蛋白,并进行 *PdHNL1* 催化活性研究奠定了基础。另外,本研究对山桃醇腈酶 *PdHNL1* 基因进行的序列分析与原核表达,还丰富了植物 HNL 基因的来源,并为推进手性醇腈的酶法制备奠定了基础。

参考文献:

- [1] Andexer J N, Langermann J V, Kragl U, et al. How to overcome limitations in biotechnological processes – examples from hydroxynitrile lyase applications[J]. Trends Biotechnol, 2009, 27 (10): 599 – 607.
- [2] Andexer J N, Staunig N, Eggert T, et al. Hydroxynitrile lyases with α/β – hydrolase fold: two enzymes with almost identical 3D structures but opposite enantioselectivities and different reaction mechanisms[J]. ChemBiochem, 2012, 13 (13): 1932 – 1939.
- [3] 邢晓夏, 李伟伟, 刘均洪. 醇腈酶: 生物与化学的结合点[J]. 化工科技, 2006, 14 (2): 46 – 50.
- [4] 徐军伟, 刘均洪. 脂肪酶和醇腈酶在有机合成中的应用[J]. 化工生产与技术, 2003, 10 (4): 15 – 19.
- [5] Asano Y, Tamura K, Doi N, et al. Screening for new hydroxynitrilases from plants[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, 69 (12): 2349 – 2357.
- [6] Krammer B, Rumbold K, Tschemmerneegg M, et al. A novel screening assay for hydroxynitrile lyases suitable for high – throughput screening[J]. J Biotechnol, 2007, 129 (1): 151 – 161.
- [7] 赵冠杰, 白锴凯, 郑允权, 等. 枇杷醇腈酶基因的克隆及结构分析[J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2011, 39 (6): 960 – 964.
- [8] Suelves M, Puigdomènech P. Molecular cloning of the cDNA coding for the (R) – (+) – mandelonitrile lyase of *Prunus amygdalus*: temporal and spatial expression patterns in flowers and mature seeds[J]. Planta, 1998, 206 (3): 388 – 393.
- [9] Weis R, Poehlauer P, Bona R, et al. Biocatalytic conversion of unnatural substrates by recombinant almond R – HNL isoenzyme 5[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 29 (1/2/3/4/5/6): 211 – 218.
- [10] Hu Z, Poulton J E. Molecular analysis of (R) – (+) – mandelonitrile lyase microheterogeneity in black cherry[J]. Plant Physiol, 1999, 119 (4): 1535 – 1546.
- [11] Nanda S, Kato Y, Asano Y. A new (R) – hydroxynitrile lyase from *Prunus mume*: asymmetric synthesis of cyanohydrins[J]. Tetrahedron, 2005, 61 (46): 10908 – 10916.
- [12] Zhao G J, Yang Z Q, Guo Y H. Cloning and expression of hydroxynitrile lyase gene from *Eriobotrya japonica* in *Pichia pastoris*[J]. J Biosci Bioeng, 2011, 112 (4): 321 – 325.
- [13] Ueatrongchit T, Tamura K, Ohmiya T, et al. Hydroxynitrile lyase from *passiflora edulis*: Purification, characteristics and application in asymmetric synthesis of (R) – mandelonitrile[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46 (6): 456 – 465.
- [14] Narayanan N N, Ihemere U, Ellery C, et al. Overexpression of hydroxynitrile lyase in cassava roots elevates protein and free amino acids while reducing residual cyanogen levels[J]. PLoS One, 2011, 6 (7): e21996.
- [15] Hasslacher M, Schall M, Hayn M, 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]. J Biol Chem, 1996, 271 (10): 5884 – 5891.
- [16] Kuroki G W, Conn E E. Mandelonitrile lyase from *Ximenia americana* L.: stereospecificity and lack of flavin prosthetic group[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86 (18): 6978 – 6981.
- [17] Wajant H, Mundry K W, Pfizenmaier K. Molecular cloning of hydroxynitrile lyase from *Sorghum bicolor* (L.) homologues to serine carboxypeptidases[J]. Plant Mol Biol, 1994, 26 (2): 735 – 746.
- [18] International Peach Genome Initiative, Verde I, Abbott A G, et al. The high – quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution[J]. Nat Genet, 2013, 45 (5): 487 – 494.
- [19] Krammer B, Rumbold K, Tschemmerneegg M, et al. A novel screening assay for hydroxynitrile lyases suitable for high – throughput screening[J]. J Biotechnol, 2007, 129 (1): 151 – 161.
- [20] Hickel A, Heinrich G, Schwab H, et al. Screening for hydroxynitrile lyase in plants[J]. Biotechnology Techniques, 1997, 11 (1): 55 – 58.
- [21] Andexer J, von Langermann J, Mell A, et al. An R – selective hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* with an α/β – hydrolase fold[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2007, 46 (45): 8679 – 8681.