

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20180604.001

郭双双, 兰青, 何贺贺, 等. *Klebsiella* sp. GXK-1 的 α -L-鼠李糖苷酶的酶学性质[J]. 广西科学, 2018, 25(3): 290-298, 312.

GUO S S, LAN Q, HE H H, et al. Enzymatic characterization of α -L-rhamnosidase from *Klebsiella* sp. GXK-1[J]. Guangxi Sciences, 2018, 25(3): 290-298, 312.

Klebsiella sp. GXK-1 的 α -L-鼠李糖苷酶的酶学性质* Enzymatic Characterization of α -L-rhamnosidase from *Klebsiella* sp. GXK-1

郭双双^{1,2}, 兰青^{1,2}, 何贺贺^{1,2}, 郑芳芳^{1,2}, 王子龙^{1,2}, 韦宇拓^{1,2}, 黄日波^{1,2},
杜丽琴^{1,2**}

GUO Shuangshuang^{1,2}, LAN Qing^{1,2}, HE Hehe^{1,2}, ZHENG Fangfang^{1,2},
WANG Zilong^{1,2}, WEI Yutuo^{1,2}, HUANG Ribo^{1,2}, DU Liqin^{1,2}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005; 2. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530005)

(1. College of Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China;
2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning, Guangxi, 530005, China)

摘要:【目的】克隆、表达克雷伯氏菌 *Klebsiella* sp. GXK-1 菌株中的 α -L-鼠李糖苷酶基因, 并研究重组酶的酶学性质。【方法】比对分析 GenBank 数据库中克雷伯氏菌同属的 α -L-鼠李糖苷酶基因序列, 设计简并引物 PCR 扩增基因的保守区。扩增目的基因, 以 pSE380 为表达载体构建重组质粒 pSE-rha1, 并在大肠杆菌 *E. coli* XL-blue 进行诱导表达, 使用镍亲和层析纯化重组蛋白, 研究目的蛋白 RHA1 的酶学性质。【结果】以 pNPR 为底物, 进行重组酶酶学性质的研究。重组酶 RHA1 的最适 pH 值和最适温度分别为 5.0 和 45℃, K_m 值为 (0.223 ± 0.030) mmol/L, V_{max} 值为 (1.272 ± 0.121) μ mol/(min · mg)。在 pH 值为 6~10 的缓冲液内酶活力仍保持在 80% 以上; 在温度为 40℃ 以下时, 酶活较为稳定, 但在温度高于 40℃ 时酶活力迅速下降。RHA1 能水解 pNPR、橙皮苷和芦丁。【结论】RHA1 具有良好的 pH 稳定性, 不仅能够水解人工底物 pNPR, 还能够水解 α -1,6 键的天然底物橙皮苷和芦丁, 具有一定的医疗应用价值。

关键词: 克雷伯氏菌 α -L-鼠李糖苷酶 克隆表达 酶学性质

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2018)03-0290-09

Abstract:【Objective】The α -L-rhamnosidase gene in *Klebsiella* sp. GXK-1 strain was cloned and expressed, and the enzymatic properties of the recombinant enzyme were studied.【Methods】By searching GenBank database, the gene sequences coding α -L-rhamnosidase of *Klebsiella* were analyzed. The conservative sequence was amplified by degenerate primers. And a gene encoding α -

L-rhamnosidase was cloned by PCR. Then, the recombinant plasmid pSE-rha1 was constructed. And it was introduced and expressed in *E. coli* XL-blue. The recombinant protein RHA1 was purified with Ni-NTA. The enzymatic properties of the recombinant protein RHA1 were investigated in detail.【Results】Using pNPR as a substrate, the enzymatic properties of the recombinase were studied. The optimum pH and opti-

收稿日期: 2018-04-12

作者简介: 郭双双(1990—), 女, 硕士研究生, 主要从事分子酶学研究。

* 国家自然科学基金项目(31360369)和广西科学研究与技术开发计划项目首席科技资金项目(17290-03)资助。

** 通信作者: 杜丽琴(1975—), 女, 教授, 主要从事分子酶工程研究, E-mail: duliqin@gxu.edu.cn.

imum temperature of recombinase RHA1 were 5.0 and 45°C, respectively. Its K_m and V_{max} values were (0.223 ± 0.030) mmol/L and (1.272 ± 0.121) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, respectively. The enzyme activity remained above 80% in the buffer of pH 6–10; When the temperature was below 40°C, enzyme activity was relatively stable. But when the temperature was higher than 40°C, enzyme activity dropped rapidly. RHA1 could hydrolyze pNPR, hesperidin, rutin. **【Conclusion】**RHA1 has good pH stability, not only can hydrolyze artificial substrates but also can hydrolyze α -1 and 6 band natural substrates hesperidin and rutin, which has certain medical application value.

Key words: *Klebsiella* sp. GXK-1, α -L-rhamnosidase, cloning and expression, enzyme properties

0 引言

【研究意义】 α -L-鼠李糖苷酶是一种水解酶,可以作用于 α -1,2- α -1,3- α -1,4- α -1,6 以及 α -1 连接的糖苷键^[1],不同来源的鼠李糖苷酶其结构不同,催化特性也有所不同^[2]。 α -L-鼠李糖苷酶可分为 GH13、GH28、GH78、GH106 家族^[3]。 α -L-鼠李糖苷酶在很多工业中具有潜在的应用价值,主要表现在水解果汁饮品中的柚皮苷或橙皮苷,去除其苦味,改善果汁饮品的口味^[4];其次在医药领域,水解芦丁生成异槲皮苷,而异槲皮苷相较于芦丁具有更好的医药应用前景^[5]。**【前人研究进展】**目前关于动物组织和植物来源的 α -L-鼠李糖苷酶的报道相对较少,主要是通过细菌和真菌(如曲霉属、青霉属等)发酵来获取 α -L-鼠李糖苷酶。国外关于真菌 α -L-鼠李糖苷酶基因的克隆研究主要集中在来源于曲霉属的 α -L-鼠李糖苷酶。2008年,韩冰等^[5]从 *Absidia* sp. G3g 中筛选出可将人参皂苷 Re 水解成 Rg1^[6]的人参皂苷- α -鼠李糖苷酶以及将芦丁水解成异槲皮苷的芦丁- α -鼠李糖苷酶^[7];2016年, Li 等^[8]、Sarita 等^[9]分别从 *Aspergillus niger* JMU-TS528 和 *Penicillium griseoroseum* 中发现一株能够耐葡萄糖和乙醇的鼠李糖苷酶。2012年, Daniela 等^[10]从 *Aspergillus terreus* 中重组构建了一株能够高效转化芦丁生成异槲皮素的重组菌株。2015年 Sebastian 等^[11]从 *Aspergillus terreus* 菌株中构建了一个重组菌株,它能够与 β -葡萄糖苷酶共同作用于甜菊糖类物质。2016年 Federica 等^[12]从 *Novospongobium* sp. PP1Y 中得到一个对 α -1,2- α -1,6 鼠李糖糖苷键均有较好水解效果的鼠李糖苷酶。**【本研究切入点】**目前大多数鼠李糖苷酶是从真菌曲霉中分离得到的,从细菌中寻找鼠李糖苷酶,为研究鼠李糖苷酶提供了新的方向。**【拟解决的关键问题】**本研究从实验室保藏的克雷伯氏菌中克隆得到一个 α -L-鼠李糖苷酶基因,并构建重组质粒,对其进行诱导表达,进一步研究其酶学性质及其底物特异性,发掘其潜在的理论及应用广西科学 2018年6月 第25卷第3期

价值。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株:克雷伯氏菌 *Klebsiella* sp. GXK-1、大肠杆菌 *E. coli* XL-blue 由本实验室保藏。

试剂:限制性内切酶 *Nco* I、*Sac* I 等,PrimeSTAR™ HS DNA 聚合酶、dNTP、 T_4 DNA 连接酶、 λ /*Hind* III DNA Marker 等均购买自 TaKaRa 公司;质粒 DNA 小量提取试剂盒、PCR 纯化试剂盒、胶回收试剂盒均购自 BioFlux 公司;Ni-NTA 填料购自 Qiagen 公司;对硝基苯基- α -L-吡喃鼠李糖苷(*p*NPR)等对硝基苯基底物均购自 Sigma 公司;各种糖类及其他试剂均为国产分析纯;柚皮苷、新橙皮苷购自阿拉丁生化科技股份有限公司;橙皮苷、芦丁购自生工生物工程(上海)股份有限公司;槲皮苷、杨梅苷、柴胡皂苷 C 购买自源叶生物。

仪器:PCR 仪(Biometra),离心机(Eppendorf Centrifuge 5415D),高效液相色谱仪(Agilent G1314F 1260VWD、Agilent G1314F 1260RID),恒温培养箱(Binder),恒温摇床(ZHWY-211B),超声波细胞破碎机(新芝 JY92-2D)。

1.2 方法

1.2.1 α -L-鼠李糖苷酶基因保守序列的克隆

在 GenBank 数据库中查找与克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp. GXK-1)同属的鼠李糖苷酶基因序列,利用 SMART 软件对这些同属的基因所编码的蛋白质进行结构组件分析,然后根据这些蛋白质结构组件的不同进行分类,用生物软件 Vector NTI Advance 11.5 对这些基因进行比对分析,查找其同源区并最终设计出二对简并引物。

第一类简并引物:

K1-1:5'-ACCTTCGCGAR ACGCTGAGCG-AAG-3'

K1-2:5'-TTAAAGTCCGTACTGGCGAATA-AACC-3'

第二类简并引物:

K2-1:5'-ATGTTAAGTATY AATTACCAA-ACG-3'

K2-2:5'-TTACAATAGTACTTTTATRTC-ACC-3'

PCR 反应程序:95℃ 3 min;95℃ 30 s,56.5℃ 30 s,72℃ 2 min,进行 30 个循环;72℃ 10 min。PCR 扩增出的 DNA 片段连接至 pMD19-T,转化到 *E. coli* XL1-Blue,进行测序。根据测序结果,在 NCBI 上 BLAST 进行比对分析。

1.2.2 α -L-鼠李糖苷酶基因 *rha 1* 的克隆

根据保守区的比对分析结果,以 pSE380 为表达载体,设计含有 6×His 标签的引物,以 *Klebsiella* sp. GXK-1 的总 DNA 为模板,PCR 扩增 rhamnase 完整基因 *rha 1*。*rha 1-1*:5'-ACGCCATGGAA CATCATCATCATCATTCACAAGCA-ATTCAATACAATTCC-3'(引入酶切位点 *Nco* I 和组氨酸标签);*rha 1-2*:5'-GGCGAGCTCTTA-AAGTCCGTACTGGCGAATAAAC-3'(引入酶切位点 *Sac* I)。PCR 反应程序:98℃ 3 min;98℃ 15 s,56.5℃ 10 s,72℃ 2 min,进行 30 个循环;72℃ 10 min。将 PCR 扩增所得的目的片段及提取的 pSE380 质粒分别经 *Nco* I 和 *Sac* I 酶切处理后,进行连接,转化到 *E. coli* XL1-Blue,进行测序。将成功构建的重组质粒命名为 pSE-*rha 1*。

1.2.3 蛋白质 RHA1 的生物信息学分析

(1)RHA1 的结构域预测及信号肽分析

在网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对 α -L-鼠李糖苷酶基因 *rha 1* 编码的氨基酸序列进行 SMART Main page 分析。在网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对 RHA1 进行 SignalP4.1 信号肽分析。

(2)RHA1 的疏水性预测

使用 ExPASy 的 ProtScale 工具对重组酶 RHA1 进行疏水性分析。分析结果对每个氨基酸位点均有亲疏水性的评分。以 0 为分界线,亲水性的氨基酸评分为负值,疏水性氨基酸评分为正值。

(3)RHA1 的二级结构预测

将 RHA1 的蛋白质序列提交到 PSIPRED 网站进行蛋白质二级结构预测。

(4)RHA1 的三级结构的预测

利用 SWISS-MODEL 网站对 RHA1 进行建模分析,以 4xhc.1.A(PDB-ID)为模板,它与 RHA1 序列相似性达到 76.82%,达到同源建模的要求。

1.2.4 重组酶 RHA1 的诱导表达及纯化

将菌种 37℃ 培养使菌液 OD_{600} 至 0.4~0.6,再加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,于 20℃、180 r/min 诱导 20 h,离心收集菌体。超声波破胞后镍亲和层析纯化重组酶 RHA1。并对纯化后的重组酶进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。

1.2.5 重组酶 RHA1 酶学性质研究

鼠李糖苷酶酶活力单位(U)的定义:在最适反应条件下,每分钟内催化 1 μ mol 底物(*p*NPR)转化为产物(*p*NP)所需要的酶量。

酶活力测定方法:酶标准反应体系是由缓冲液、底物、酶液组成 200 μ L 体系(除特别说明外)。取 170 μ L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液和 20 μ L 10 mmol/L 的 *p*NPR 先在最适温度下预热 2 min,加入 10 μ L 适当稀释倍数的酶液,准确反应 20 min 后,加入 50 μ L 2 mol/L Na_2CO_3 终止酶反应,混匀,以不加酶的反应管为空白对照。取 200 μ L 反应液至酶标板中,在 405 nm 波长下读取吸光值。

(1)重组酶最适 pH 值测定

在 37℃ 条件下,测定一系列不同 pH 值(4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0)的 0.1 mol/L 柠檬酸-0.2 mol/L 磷酸氢二钠缓冲液对重组酶酶活力的影响,并以最高酶活力为 100%,计算在各个 pH 值下重组酶的相对酶活力,相对活力最高对应的 pH 值即为该酶的最适反应 pH 值。

(2)重组酶最适温度测定

在酶的最适 pH 值条件下,测定重组酶在一系列不同温度(25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃)下的酶活力,并以最高活力为 100%,计算重组酶在各个温度下的相对酶活力,相对酶活力最高对应的温度即为该酶的最适反应温度。

(3)酶 pH 稳定性的测定

将重组酶保存在一系列不同 pH 值(3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸、8.0, 8.5, 9.0 的硼酸-硼砂、9.0, 9.5, 10.0, 10.5 的甘氨酸-氢氧化钠)的缓冲液中,于 4℃ 保存 12 h。然后在最适反应条件下测定其残存酶活力,以保存在 pH 值 7.0 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中的纯酶的酶活力为 100%,来计算各个 pH 值下的重组酶的相对酶活力。

(4)酶热稳定性的测定

将重组酶保存在一系列不同温度(25~65℃,每个间隔为 5℃)下 1 h,立即取出放于冰上,然后在最适反应条件下测定其残存酶活力,以保存在冰箱 4℃ 的纯酶的酶活力为 100%,来计算各个温度下的重组

酶的相对酶活力。

(5) 重组酶的动力学常数测定

在最适反应条件下,测定酶在以一系列不同终浓度(0.1 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.5 mmol/L, 0.6 mmol/L, 0.8 mmol/L, 1.0 mmol/L, 2.0 mmol/L)的 p NPR 为底物时的比活力,使用软件 GraphPad Prism 5 通过非线性回归分析拟合出重组酶的 K_m 、 V_{max} 值。

(6) 鼠李糖和葡萄糖对酶的影响

按照酶活力测定方法,测定重组酶分别在添加 0~20 mmol/L 不同浓度的鼠李糖以及 0~200 mmol/L 不同浓度葡萄糖时的酶活力,以不添加鼠李糖和葡萄糖的反应管为对照,其酶活力为 100%,计算一系列不同浓度鼠李糖和葡萄糖下重组酶的相对活力。

(7) 金属离子对酶活力的影响

在最适反应条件下,在反应体系中添加终浓度为 5 mmol/L 的各种金属离子溶液,测定重组酶的残存酶活力。以不添加金属离子溶液的反应管的酶活力为 100%,计算各种金属离子下重组酶的相对酶活力。实验测定的金属离子包括 LiCl、KCl、RbCl、NaCl、CsCl、AgNO₃、BaCl₂、CaCl₂、MnCl₂、MgCl₂、NiCl₂、CoCl₂、HgCl₂、ZnSO₄、CuSO₄、FeSO₄、Pb(NO₃)₂、FeCl₃、CrCl₃、AlCl₃。

(8) 化学试剂对酶活力的影响

在最适反应条件下,在反应体系中分别添加终浓度为 0.05% SDS(M/V)、1% TritonX-100(V/V)、4 mol/L 脲、0.01 mol/L Imidazole、1% 巯基乙醇(V/V)、5% Tween-80(V/V),测定重组酶的残存酶活力。以不添加化学试剂的反应管的酶活力为 100%,计算各种化学试剂下重组酶的相对酶活力。

(9) 有机试剂对重组酶酶活力的影响

在最适反应条件下,在反应体系中分别添加 5%、10%、15%、20%、25%、30%(V/V)的一元醇、二元醇及有机溶剂(一元醇类:甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇;二元醇类:乙二醇、1,3-丙二醇;有机溶剂:DMSO、DMF、吡啶、四氢呋喃、乙腈),测定重组酶的残存酶活力。以不添加有机试剂的反应管的酶活力为 100%,计算各个有机试剂下重组酶的相对酶活力。

(10) 酶底物特异性的测定

人工底物:取合适的底物浓度,以及适当稀释的酶液,在最适反应条件下进行酶活力的测定。以 p NP 或 o NP 的生成量来计算酶活力,以 p NPR 作为底物时的酶活力为 100%。测定的底物包括对硝基

苯基- α -L-吡喃鼠李糖苷(p NPR)、对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(p NPG)、对硝基苯基- β -D-吡喃木糖苷(p NPX)、4-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(p NPGal)、4-硝基苯基-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖苷(p NPAG)、4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖苷酸(MU-Glc)、邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(o NPG)、4-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(p NPGal)、4-硝基苯基- β -D-阿拉伯糖苷(p NPA)、4-硝基苯基- β -D-纤维二糖苷(p NPC)、4-硝基苯基- α -D-葡萄糖苷(α - p NPC)。

二糖及糖苷类:以终浓度为 1%(W/V)的麦芽糖、异麦芽糖、海藻糖、乳糖、纤维二糖、蔗糖、苦杏仁苷、水杨苷分别作为底物,于纯酶在最适酶反应条件下测定酶活力。反应 20 min 后,煮沸终止 5 min,利用葡萄糖氧化试剂盒测定反应管中葡萄糖的生成量,具体操作步骤按照试剂盒的说明书进行,依次计算酶活力。

多糖类物质:以终浓度为 1%(W/V)的羧甲基纤维素钠、淀粉、山毛榉木聚糖分别作为底物,于纯酶在最适酶反应条件下测定酶活力。反应 6 h 后,加入 400 μ L DNS 终止酶反应,再将反应管煮沸显色 5 min。取 200 μ L 反应液至酶标板中,在 540 nm 波长下读取吸光值。根据还原糖的生成量来计算酶活力。

天然类底物:以终浓度为 0.1%(W/V)的橙皮苷、芦丁、槲皮苷分别作为底物,与纯酶在最适酶反应条件反应 12 h 后,煮沸终止 5 min。用 50%乙腈稀释 10 倍,12 000 r/min 离心 30 min,取上清利用 HPLC 分析酶与这 3 种底物的反应产物。HPLC 检测条件:仪器设备为安捷伦 1260 系列液相色谱仪,色谱柱为 C18 柱,进样量 10 μ L,柱温 35 $^{\circ}$ C,流速 1 mL/min,检测波长 280 nm。流动相:water(A)、methanol(B)、acetonitrile(C)。梯度洗脱:A : B : C=62 : 12 : 26(0~7 min)、A : B : C=15 : 35 : 50(7~9 min)、A : B : C=15 : 35 : 50(9~15 min)、A : B : C=62 : 12 : 26(15~17 min)、A : B : C=62 : 12 : 26(17~20 min)^[8]以终浓度为 0.1%(M/V)的杨梅苷作为底物,于纯酶在最适酶反应条件下反应 12 h 后,煮沸终止 5 min。用 50%乙腈稀释 3 倍,12 000 r/min 离心 30 min,取上清用 HPLC 分析反应产物。HPLC 检测条件:仪器设备为安捷伦 1260 系列液相色谱仪,色谱柱为 C18 柱,进样量 10 μ L,柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 1 mL/min,检测波长 358 nm。流动相:acetonitrile(A)、0.1%磷酸水溶液(B)。梯度洗脱:A : B=20 : 80(0 min)、A : B=30 : 70(0~10 min)、A : B=50 : 50(10~15 min)、A : B=80 : 20(15~20 min)、A : B=80 : 20(20~25 min)、A : B=20 :

80(20~30 min)^[13]。

以终浓度为 0.1%(W/V)的柚皮苷、新橙皮苷分别作为底物,于纯酶在最适酶反应条件下反应 12 h 后,煮沸终止 5 min。用 50%乙腈稀释 10 倍,12 000 r/min 离心 30 min,取上清用 HPLC 分析反应产物。HPLC 检测条件:仪器设备为安捷伦 1260 系列液相色谱仪,色谱柱为 C18 柱,进样量 10 μ L,柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 1 mL/min,检测波长 285 nm。流动相:0.1%磷酸水溶液(A)、acetonitrile(B)。梯度洗脱:A : B=77 : 23(0~5 min)、A : B=45 : 55(5~10 min)、A : B=45 : 55(10~25 min)、A : B=77 : 23(25~30 min)。

以终浓度为 0.1%(W/V)的柴胡皂苷 C 作为底物,于纯酶在最适酶反应条件下反应 12 h 后,煮沸终止 5 min。用 50%乙腈稀释 3 倍,12 000 r/min 离心 30 min,取上清用 HPLC 分析反应产物。HPLC 检测条件:仪器设备为安捷伦 1260 系列液相色谱仪,色谱柱为 C18 柱,进样量 10 μ L,柱温 25 $^{\circ}$ C,流速 1 mL/min,检测波长 210 nm。流动相:acetonitrile(A)、0.1%磷酸水溶液(B)。梯度洗脱:A : B=30 : 70(0 min)、A : B=60 : 40(0~22 min)、A : B=60 : 40(22~27 min)、A : B=30 : 70(0~5 min)。

2 结果与分析

2.1 基因保守区的扩增及 *rha1* 的克隆

以提取的克雷伯氏菌的总 DNA 为模板,利用引物 K2-1 和 K2-2 能够扩增出基因的保守区,大小约为 1.3 Kb。将测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 分析,相似性高达 99%的结果有 40 多个,对这些结果进行分析,发现测序结果及这些序列的开始和结尾是一样的、高度保守的。*rha1* 的基因大小为 1 569 bp, G+C 百分含量为 61.12%,可编码由 522 个氨基酸组成的蛋白质。该蛋白质的预计分子量为 59 707.84 Da,等电点 pI 为 5.85。

2.2 蛋白质 RHA1 的生物信息学分析

2.2.1 RHA1 的结构域预测及信号肽分析

对 RHA1 进行蛋白质结构组件 SMART 分析,发现 RHA1 只含有一个 Bac_rhamnosid 功能域(图 1a)。结合 SignalP4.1 分析,结果表明蛋白质 RHA1 是不含信号肽序列的(图 1b)。

2.2.2 RHA1 的疏水性预测

使用 ExPASy 的 ProtScale 工具对重组酶 RHA1 进行疏水性分析,根据分析结果显示,RHA1 蛋白质具有较为明显的亲水性(图 2)。

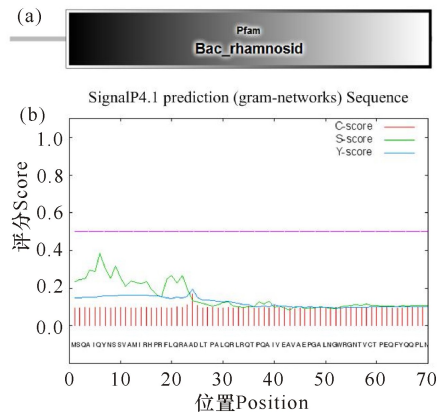


图 1 RHA1 的结构组件及信号肽分析

Fig. 1 Structural components and signal peptide analysis of RHA1

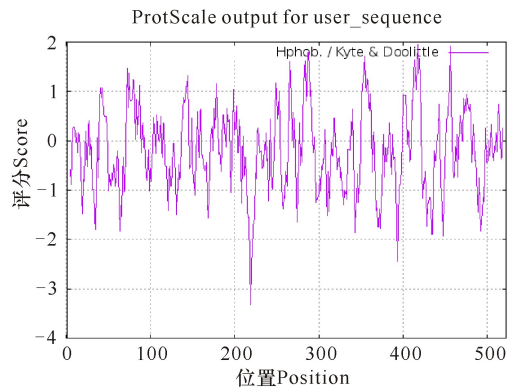


图 2 RHA1 的疏水性分析

Fig. 2 Hydrophobic analysis of RHA1

2.2.3 RHA1 的二级结构预测

将 RHA1 的蛋白质序列提交到 PSIPRED 网站进行蛋白质二级结构预测,结果如图 3 所示。结果中显示了 RHA1 二级结构中可能出现 α 螺旋区、 β 折叠区以及无规卷曲的分布,其中 α 螺旋区占 36.78%, β 折叠区占 15.33%,无规卷曲占 47.89%。

2.2.4 RHA1 的三级结构的预测

利用 SWISS-MODEL 网站对 RHA1 进行建模分析,结果是以 4xhc. 1. A (PDB-ID) 为模板,它与 RHA1 序列相似性达到 76.82%,达到同源建模的要求。根据建模分析的结果(图 4)预测,RHA1 具有 α 螺旋、 β 折叠以及无规卷曲等二级结构。活性中心涉及的氨基酸残基可能为 221 位的 Asp 和 485 位的 Glu^[14]。

2.2.5 RHA1 的诱导表达和纯化

重组质粒转化到 *E. coli* XL1-Blue 进行诱导表达,镍亲和层析纯化目的蛋白 RHA1。纯化产物进行 SDS-PAGE。在约 60 kDa 位置处出现特征条带,与理论分子量一致。且纯化条带明显,可以进行下一步的鉴定(图 5)。

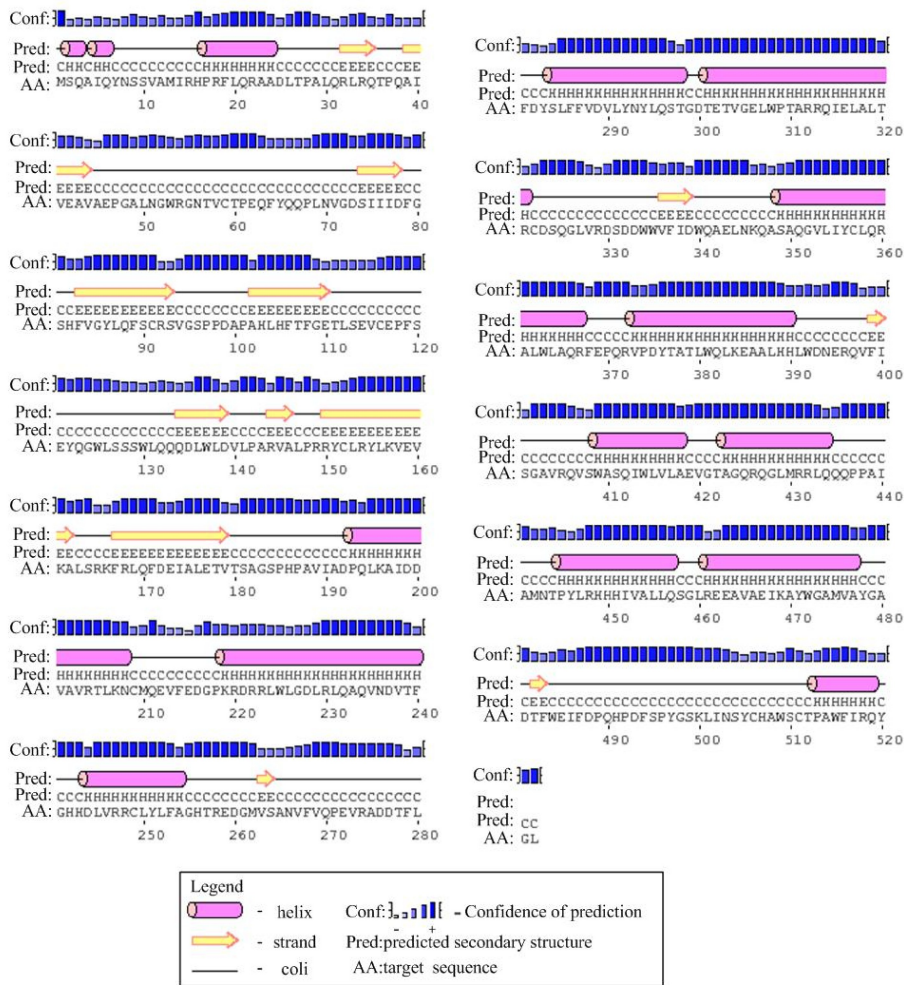


图3 RHA1 的二级结构分析

Fig. 3 Secondary structure analysis of RHA1

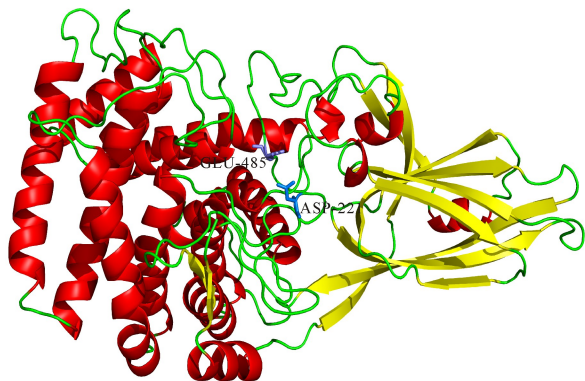


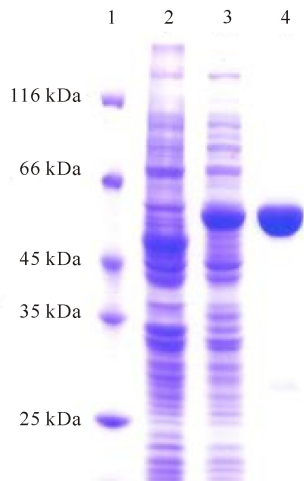
图4 RHA1 三级结构的预测

Fig. 4 The prediction tertiary structure of RHA1

2.3 重组酶 RHA1 的酶学性质

2.3.1 RHA1 的最适 pH 值及温度测定

RHA1 的最适 pH 值为 5.0, 在 pH 值为 4.5~6.0 时能保持 80% 以上的酶活力(图 6a)。RHA1 的最适温度为 45℃, 在 40~50℃ 时能保持 80% 以上的酶活力(图 6b)。



1: Standard protein marker; 2: *E. coli*/pSE380 诱导菌体的裂解物; 3: *E. coli*/pSE-*rha1* 诱导菌体的裂解物; 4: 纯化的 RHA1

1: Standard protein marker; 2: Included cell lysate of *E. coli*/pSE380; 3: Included cell lysate of *E. coli*/pSE-*rha1*; 4: Purified protein RHA1

图5 纯化产物 RHA1 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified product RHA1

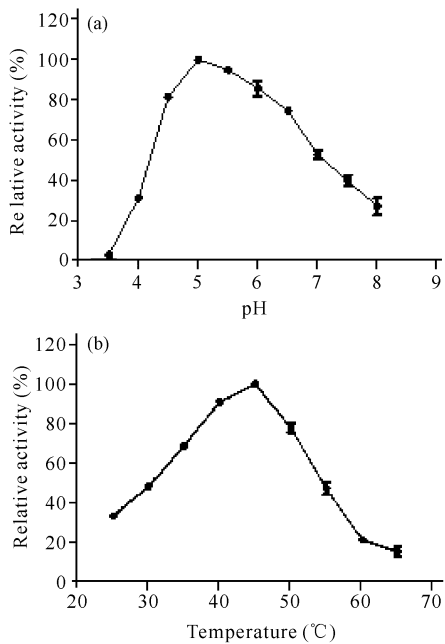


图6 pH值和温度对RHA1酶活性的影响

Fig. 6 The effects of pH and temperature on the RHA1 enzyme activity

2.3.2 温度稳定性和pH稳定性的测定

pH稳定性测定:在pH值6~10的缓冲液内4℃放置12h后,酶活力仍保持在80%以上(图7a),说明在此范围内该酶具有较好的pH稳定性,在高pH值缓冲液环境中仍能保持较高的活力。

温度稳定性测定:在温度为25~40℃时,酶活力较为稳定,保温1h后仍保持80%以上的活力(图7b),但在温度高于40℃时酶活力迅速下降。

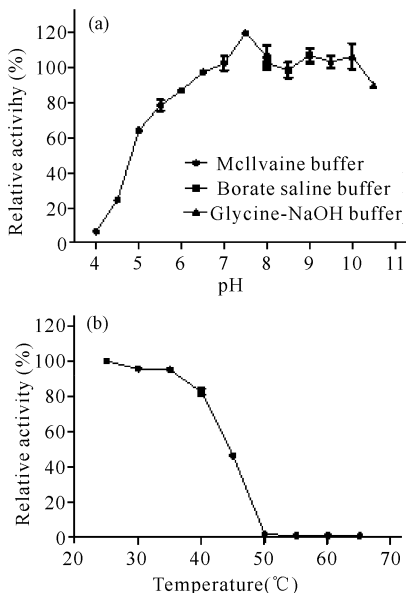


图7 pH稳定性及温度稳定性的测定

Fig. 7 The pH stability and temperature stability of RHA1

2.3.3 RHA1的动力学常数测定

如图8所示,以一系列不同终浓度的pNPR为

底物,利用软件GraphPad Prism 5通过非线性回归拟合出RHA1的 K_m 值为 (0.223 ± 0.030) mmol/L, V_{max} 值为 (1.272 ± 0.121) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。

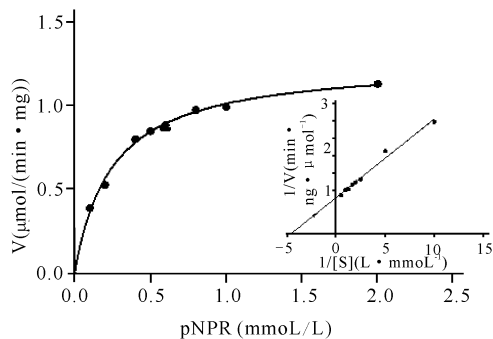


图8 RHA1的 K_m 和 V_{max} 值

Fig. 8 The determination of K_m and V_{max}

2.3.4 RHA1的鼠李糖及葡萄糖耐受性

RHA1对鼠李糖较为敏感(图9a),在鼠李糖浓度为20 mmol/L时RHA1的活力仅为不添加鼠李糖时的40%左右。RHA1对葡萄糖不是很敏感(图9b),在葡萄糖浓度为100 mmol/L时RHA1的活力为不添加葡萄糖时的40%左右。

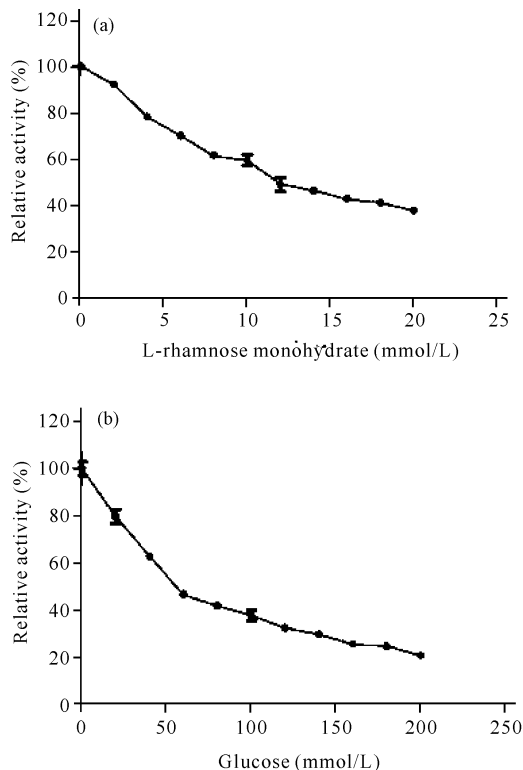


图9 鼠李糖和葡萄糖对RHA1酶活力的影响

Fig. 9 The effects of rhamnose and glucose on the RHA1 enzyme activity

2.3.5 金属离子对RHA1酶活力的影响

从表1可以看出: Ag^+ 和 Hg^{2+} 完全抑制重组酶活性, Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 对重组酶有较强的激活作用, Rb^+ 、 K^+ 、 Fe^{2+} 、 Li^+ 对重组酶略有激活作用,其他所测的

金属离子对重组酶有不同程度的抑制作用。

表 1 金属离子对 RHA1 酶活的影响

Table 1 The effects of metal ions on the RHA1 enzyme activity

金属离子 Metal ions	相对活力 Relative activity(%)
CK	100.00±1.53
Na ⁺	91.61±0.32
Cs ⁺	96.52±0.89
K ⁺	101.76±2.15
Li ⁺	101.69±0.10
Rb ⁺	102.10±1.63
Ag ⁺	2.23±0.29
Ni ²⁺	85.12±1.15
Co ²⁺	88.47±1.25
Ba ²⁺	94.07±1.68
Hg ²⁺	1.49±0.19
Pb ²⁺	172.90±2.08
Mn ²⁺	96.48±0.76
Mg ²⁺	96.24±0.68
Ca ²⁺	98.92±0.57
Zn ²⁺	94.72±0.00
Cu ²⁺	89.38±1.24
Fe ²⁺	101.71±1.97
Al ³⁺	51.47±1.60
Cr ³⁺	78.72±2.57
Fe ³⁺	143.32±0.11

2.3.6 化学试剂对 RHA1 酶活力的影响

从图 10 可以看出,0.05% SDS 和 4 mol/L 脲能够使酶失活,0.01 mol/L Imidazole 对酶活力影响不大,1% TritonX-100、5% Tween-80 和 1% 巯基乙醇对酶活略有抑制作用。

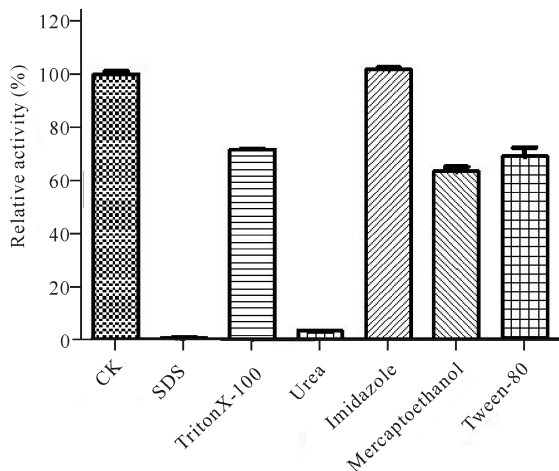


图 10 化学试剂对 RHA1 酶活的影响

Fig. 10 The effects of chemical reagents on the RHA1 enzyme activity

2.3.7 有机试剂对 RHA1 酶活力的影响

由图 11 可知,乙二醇和 1,3-丙二醇在 5% 浓度时对酶活力有一定的促进作用,在浓度为 30% (V/V) 时,对 RHA1 酶活的抑制没有那么强烈,仍保持有一半的酶活力,而其他几种有机试剂对 RHA1 酶活的抑制较为明显,且抑制程度与浓度相关,浓度越高,对 RHA1 的抑制作用越强。

随着有机溶剂的浓度增大,其对 RHA1 的抑制作用越强。其中 RHA1 对 DMSO 表现出较高的耐受性,在 10% 的 DMSO 下仍能保持 40% 以上的活力。其余几种有机溶剂对 RHA1 有强烈的抑制作用。

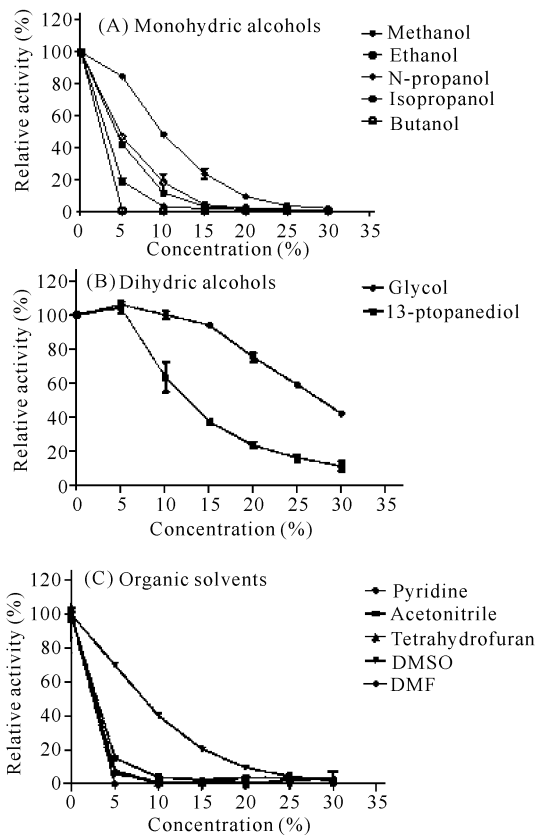


图 11 有机试剂对 RHA1 酶活的影响

Fig. 11 The effects of organic reagents on the RHA1 enzyme activity

2.3.8 RHA1 的底物特异性

RHA1 仅能水解 pNPR,对其他人工底物没有水解能力;对蔗糖有较弱的水解能力,对其他二糖及糖苷类没有水解能力;对于天然类底物 RHA1 仅能够水解 α-1,6 糖苷键的橙皮苷及芦丁(表 2)。

表 2 天然底物特异性

Table 2 The natural substrates specificity

底物 Substrate	糖苷键 Glycosidic bond	水解结果 The hydrolysis results
柚皮苷 Naringin	α -1,2 连接 α -1,2 connection	-
芦丁 Rutin	α -1,6 连接 α -1,6 connection	+
橙皮苷 Hesperidin	α -1,6 连接 α -1,6 connection	+
柴胡皂苷 C Radix stellariae C	α -1,4 连接 α -1,4 connection	-
槲皮苷 Quercitrin	L-鼠李糖直接连接到糖苷配基 Rha directly connected to aglycon	-
新橙皮苷 Neohesperidin	α -1,2 连接 α -1,2 connection	-
杨梅苷 Myricetin	L-鼠李糖直接连接到糖苷配基 Rha directly connected to aglycon	-

注：“-”表示不能够水解，“+”表示能够水解

Note:“-”means can not hydrolyze;“+”means can hydrolyze

3 讨论

鼠李糖苷酶一般以 L-鼠李糖苷酶为主, L-鼠李糖苷酶可分为 α -L-鼠李糖苷酶(EC 3. 2. 1. 40) 和 β -L-鼠李糖苷酶(EC 3. 2. 1. 43), 这两种酶催化水解非还原性末端 L-鼠李糖残基。本文研究的 RHA1 是属于 GH78 家族的 α -L-鼠李糖苷酶。重组酶 RHA1 的最适反应 pH 值和最适反应温度为 5. 0 和 45℃。大多数鼠李糖苷酶的最适反应 pH 值为 4~7, 少数 pH 值大于 7; 最适酶反应温度差异较大, 多数在 40~60℃, 少数在 70℃ 或以上^[2,15]。Mai 等^[15] 从 *Aspergillus oryzae* 中克隆得到的 α -L-鼠李糖苷酶最适酶反应温度为 70℃, 来源于 *Aspergillus terreus* 的 α -L-鼠李糖苷酶在温度为 70℃ 时仍具有较好的耐受性^[10]。

本研究中, RHA1 对橙皮苷和芦丁均具有一定的水解效果。橙皮苷在水中的溶解度极低, 鼠李糖苷酶水解橙皮苷生成橙皮素葡萄糖苷和鼠李糖, 而橙皮素葡萄糖苷是生产甜味剂的前体物质。芦丁在自然界中的含量非常丰富, 而异槲皮素作为芦丁水解掉一个鼠李糖基后的产物, 在自然界中的含量是十分低的^[7]。但异槲皮素相较于芦丁具有更好的药理活性, 更容易被人体吸收。因此, 水解橙皮苷和芦丁具有一定的实际应用价值。

4 结论

本研究通过设计简并引物 PCR 扩增获得 α -L-鼠李糖苷酶基因 *rha1*, 其基因大小为 1 569 bp, 编码 522 个氨基酸。以 pSE380 为表达载体, 并在大肠杆菌 *E. coli* XL-blue 表达, 使用镍亲和层析纯化重组蛋

白, 研究目的蛋白 RHA1 的酶学性质。以 pNPR 为底物, 测得重组酶 RHA1 的最适反应 pH 值和最适反应温度为 5. 0 和 45℃。 K_m 值为 (0. 223 ± 0. 030) mmol/L, V_{max} 值为 (1. 272 ± 0. 121) μ mol/(min · mg); 重组酶 RHA1 对高 pH 值缓冲液有较好的耐受性; 对于天然类底物 RHA1 能够水解 α -1-6 糖苷键的橙皮苷及芦丁, 水解芦丁生成的异槲皮苷具有较好的医药功能。

参考文献:

- [1] YADAV V, YADAV P K, YADAV S, et al. α -L-Rhamnosidase: A review[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(8): 1226-1235.
- [2] 王艳君, 刘同军, 曹涛, 等. α -L 鼠李糖苷酶的研究进展[J]. 中国酿造, 2010, 233(10): 11-15.
WANG Y G, LIU T J, CAO T, et al. Research progress of α -L-rhamnosidase[J]. China Brewing, 2010, 233(10): 11-15.
- [3] 张霞, 李利君, 倪辉, 等. 微生物来源 α -L-鼠李糖苷酶的分子和结构生物学研究进展[J]. 生命科学研究, 2015, 19(1): 68-74.
ZHANG X, LI L J, NI H, et al. Progress on molecular biology and structural biology of α -L-rhamnosidase from microbial source[J]. Life Science Research, 2015, 19(1): 68-74.
- [4] LI L J, WU Z Y, YU Y, et al. Development and characterization of an α -L-rhamnosidase mutant with improved thermostability and a higher efficiency for debittering orange juice[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 1070-1078.
- [5] 韩冰, 付绍平, 金凤燮, 等. 两种菌产两种不同天然苷类 α -鼠李糖苷酶的研究[J]. 大连工业大学学报, 2008, 27(2): 105-109.
HAN B, FU S P, JIN F X, et al. Characterization of glycoside- α -rhamnosidase from *Absidia* sp. [J]. Journal of Dalian polytechnic University, 2008, 27(2): 105-109.
- [6] 金赞敏, 鱼红闪, 金凤燮. 人参皂甙- α -鼠李糖苷酶分离提纯及其酶性质[J]. 大连轻工业学院学报, 2003, 22(2): 103-106.
JIN Z M, YU H S, JIN F X. Purification and characterization of ginsenoside- α -rhamnosidase [J]. Journal of Dalian Institute of Light Industry, 2003, 22(2): 103-106.
- [7] 王侃, 鱼红闪, 金凤燮. 芦丁- α -鼠李糖苷酶分离提纯及其酶性质[J]. 大连轻工业学院学报, 2004, 23(1): 30-33.
WANG K, YU H S, JIN F X. Purification and characterization of rutin- α -rhamnosidase[J]. Journal of Dalian Institute of Light Industry, 2004, 23(1): 30-33.
- [8] LI L J, YU Y, ZHANG X, et al. Expression and biochemical characterization of recombinant α -L-rhamnosidase r-Rha1 from *Aspergillus niger* JMU-TS528[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 85: 391-399.
- [9] YADAV S, YADAVA S, YADAV K D S. α -L-rhamnosidase selective for rutin to isoquercitrin transformation from *Penicillium griseoroseum* MTCC-9224[J]. Bioorganic Chemistry, 2017, 70: 222-228.

(下转第 312 页 Continue on page 312)

References

- [1] MEMISH Z A, BALKHY H H. Brucellosis and international travel[J]. *J Travel Med*, 2004, 11:49-55.
- [2] PAPPAS G, PAPANITRIOU P, AKRITIDIS N, et al. The new global map of human brucellosis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2006, 6:91-99.
- [3] CORBEL M J. Brucellosis: An overview[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 1997, 3(2):213-221.
- [4] BOSCHIROLI M L, FOULONGNE V, O'CALLAGHAN D. Brucellosis: A worldwide zoonosis [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2001, 4:58-64.
- [5] KISS I Z, GREEN D M, KAO R R. The network of sheep movements within Great Britain: Network properties and their implications for infectious disease spread [J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2006, 3:669-677.
- [6] MARTNEZ-LÓPEZ B, PEREZ A M, SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J M. Social network analysis. Review of general concepts and use in preventive veterinary medicine[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2009, 56:109-120.
- [7] DUBÉ C, RIBBLE C, KELTON D, et al. A review of network analysis terminology and its application to foot-and-mouth disease modelling and policy development [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2009, 56:73-85.
- [8] MEYERS L A, POURBOHLOUL B, NEWMAN M E J, et al. Network theory and SARS: Predicting outbreak diversity[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2005, 232:71-81.
- [9] CHRISTLEY R M, PINCHBECK, G L, BOWERS, R G, et al. Infection in social networks: Using network analysis to identify high-risk individuals[J]. *American Journal of Epidemiology*, 2005, 162:1024-1031.
- [10] DE R, WYLIE J L, CAMERON D W, et al. Combining social network analysis and cluster analysis to identify sexual network types[J]. *Int J STD AIDS*, 2007, 18:754-759.
- [11] COOK V J, SUN S J, TAPIA J, et al. Transmission network analysis in tuberculosis contact investigations [J]. *J Infect Dis*, 2007, 196:1517-1527.
- [12] BIGRAS-POULIN M, THOMPSON R A, CHRIEL M, et al. Network analysis of Danish cattle industry trade patterns as an evaluation of risk potential for disease spread[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2006, 76:11-39.
- [13] BIGRAS-POULIN, M, BARFOD K, MORTENSEN S, et al. Relationship of trade patterns of the Danish swine industry animal movements network to potential disease spread[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2007, 80:143-165.
- [14] NATALE F, GIOVANNINI A, SAVINI L, et al. Network analysis of Italian cattle trade patterns and evaluation of risks for potential disease spread[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 92:341-350.
- [15] RAUTUREAU S, DUFOUR B, DURAND B. Vulnerability of animal trade networks to the spread of infectious diseases: A methodological approach applied to evaluation and emergency control strategies in Cattle, France, 2005 [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2011, 58:110-120.
- [16] ORTIZ-PELAEZA, PFEIFFER D U, SOARES-MAGALHÃES R J, et al. Use of social network analysis to characterize the pattern of animal movements in the initial phases of the 2001 foot and mouth disease (FMD) epidemic in the UK [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2006, 76:40-55.
- [17] KISS I Z, GREEN D M, KAO R R. The network of sheep movements within Great Britain: network properties and their implications for infectious disease spread [J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2006, 3(10):669-677.
- [18] FIRESTONE S M, CHRISTLEY R M, WARDA M P, et al. Adding the spatial dimension to the social network analysis of an epidemic: Investigation of the 2007 outbreak of equine influenza in Australia [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2012, 106(2):123-235.
- [19] SMITH R P, COOK A J C, CHRISTLEY R M. Descriptive and social network analysis of pig transport data recorded by quality assured pig farms in the UK [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 108(2/3):167-177.

(责任编辑:陆雁)

(上接第 298 页 Continue from page 298)

- [10] GERSTORFEROVÁ D, FLIEDROVÁ B, HALADA P, et al. Recombinant α -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in selective trimming of rutin[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(5):828-835.
- [11] SPOHNERS C, ZAHN D, SCHAUM V, et al. Recombinant α -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in selective trimming of α -L-rhamnose from steviol glycosides[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 122:248-254.
- [12] FEDERICA D L, FRANCESCA M, VINCENZO T, et al. RHA-P: Isolation, expression and characterization of a bacterial α -L-rhamnosidase from *Novosphingobium* sp. PP1Y [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 134:136-147.
- [13] 齐洁, 万竹青, 李墨影, 等. HPLC 法测定杨梅叶中杨梅苷的含量 [J]. *中国野生植物资源*, 2012, 31(1):35-37.
- QI J, WAN Z Q, LI M Y, et al. Determination of myricitrin in leaves of *Myrica rubra* Sieb. et Zuce. by HPLC [J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2012, 31(1):35-37.
- [14] O'NEILL E C, STEVENSON C E, PATERSON M J, et al. Crystal structure of a novel two domain GH78 family α -rhamnosidase from *Klebsiella oxytoca* with rhamnose bound [J]. *Proteins*, 2015, 83(9):1742-1749.
- [15] ISHIKAWA M, SHIONO Y, KOSEKI T. Biochemical characterization of *Aspergillus oryzae* recombinant α -L-rhamnosidase expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 124(6):630-634.

(责任编辑:陆雁)