

真菌嵌合体植酸酶的构建及其抗蛋白酶水解特性研究*

陈 庄^{1,2}, 贝锦龙², 廖 玲², 刘世贵¹

(1. 四川大学生命科学学院, 四川 成都 610064;

2. 广东省农业科学院畜牧研究所, 广东 广州 510640)

摘 要: 在烟曲霉植酸酶(Afp)的基因上, 通过PCR逐步将编码1-47、178-237及338-381多肽序列的DNA片段替换为黑曲霉NRRL 3135植酸酶(Anp)中的对应片段, 构建了3个嵌合体(嵌合体I、II和III)基因, 并在毕赤酵母中将其成功表达及纯化。所有的嵌合体和亲本植酸酶均能抵抗胃蛋白酶。在 m (胰蛋白酶)/ m (植酸酶)为0.1时, Anp完全失活; 但Afp与所有嵌合体的活性仅损失13%~23%。胰蛋白酶水解产物的SDS-PAGE结果显示嵌合体II与III也能被胰蛋白酶严重水解, 但非变性PAGE结果却表明它们在水解后仍能保持结构完整。嵌合体也具有一些与Anp及Afp相异的新pH曲线及耐热性。实验表明, 通过替换基因片段改良真菌植酸酶可行。

关键词: 植酸酶; 烟曲霉; 黑曲霉; 蛋白酶水解; 蛋白质工程

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2008) 04-0072-06

植酸盐(myo-inositol hexakisphosphate)是植物中磷的主要贮存形式, 植酸酶(phytase; EC 3.1.3.8)能够催化植酸盐水解, 释放磷酸。在缺乏内源性植酸酶的单胃动物(猪鸡)饲料中添加植酸酶已被证明具有环境和经济的双重益处^[1-2]。但研究表明大多数微生物植酸酶对单胃动物胃肠道蛋白酶水解敏感^[3-5], 这也是目前植酸酶添加量偏高的原因之一。此前有报道可通过点突变技术增加大肠杆菌植酸酶的蛋白酶耐受性^[6]。

黑曲霉(*Aspergillus niger*) NRRL 3135植酸酶(Anp)目前已广泛应用于饲料工业。它的比活力较高但热稳定性差, 且对胃蛋白酶敏感。烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*) ATCC 13073植酸酶(Afp)的比活力较低但具有良好的热回复性^[7], 但对胰蛋白酶敏感。本文作者继2001年在毕赤酵母中成功表达Anp基因^[8]后, 又使用组成型表达载体在毕赤酵母X-33中分别表达出有活性的r-Anp和r-Afp^[9]。

鉴于这两种植酸酶具有较高的序列相似性(66.7%)、高度重合的蛋白质三维结构及互补的酶学性质^[10-12], 本研究尝试通过置换两种酶对应区域的方法来进行遗传改良, 希望获得在酶活力、热稳定性和抗蛋白酶水解特性等方面表现更为“理想”的植酸酶。

1 材料与方法

1.1 材料

毕赤酵母X-33和质粒pGAPZαA购自(Carlsbad, CA)。PfuUltraTM高保真DNA聚合酶购自Stratagene (La Jolla, CA)。纯化试剂盒QIAEX II购自Qiagen (Hilden, Germany)。植酸钠、胃蛋白酶、胰蛋白酶和牛血清白蛋白(BSA)购自Sigma (St Louis, Mo)。超滤用Vivaspin 500μL、20mL和Vivaflow 200 (30 000, PES)购自Vivascience (Hannover, Germany)。HiTrapTM脱盐柱(5 mL)、HiTrapTM SP柱(5 mL)、Q柱(5 mL)和HiPrepTM 26/60 Sephacryl S-200 HR柱购自Pharmacia Biotech (Düßeldorf, Switzerland)。BCA蛋白质定量试剂盒购自Pierce Biotechnology (Rockford, IL)。所有限制性内切酶和蛋白质相对分子质量标记购自TaKaRa Biotechnology (中国大连)。其他试剂均为分析纯。

Afp (GenBank accession no. AY644455)基因由中山大学王珣章教授惠赠, Anp (GenBank accession no. AF295325)基因由实验室保存。重组质粒pGAPZαA-Afp和pGAPZαA-Anp及分泌表达Afp与Anp的重组毕赤酵母X-33均已经事先构建好^[9]。

1.2 嵌合体基因构建

根据Afp和Anp序列比对结果设计出5对引

* 收稿日期: 2007-11-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30200197); 广东省自然科学基金资助项目(990508)

作者简介: 陈庄(1963年生), 男, 副研究员; 通讯联系人: 刘世贵; E-mail: chenzh1963@vip.sina.com

物: f2 (5' ttagaatcactctcgttcagg3') 和 r2 (5' acctgaacgagagtattctaca3')、f3 (5' attctgtcattatctcgaaggc3') 和 r3 (5' gataatgacagaaatagctggtagca3')、f4 (5' atggacatgtgttttcgacact3') 和 r4 (5' agtgcgaagaacacatgtccat3')、f5 (5' ctactatgtacgttgacttctctcatga3') 和 r5 (5' tcatgagagaagtaacgtacatagtag3')、f6 (5' ttaatgatagagttgtccctctgca3') 和 r6 (5' tgcagagggacaact-ctatcat-taa3')。每对引物的 5' 末端彼此反向互补。当引物的若干位点在 Afp 和 Anp 之间不一致时, 采用编码 Afp 对应位置氨基酸残基的碱基序列。f1 (5' ccaacagcacaataacgggt3') 和 r1 (5' taaccgcggagttttgttctag3') 分别来自质粒 pGAPZαA 的 659-679 和 838-824 序列。

嵌合体基因 I、II 和 III 通过图 1 所示步骤构建: ①从相应的亲本基因中 PCR 扩增所需要的 DNA 片段; ②将各片段通过重叠 PCR 连接起来 (图 1 a-c)。相邻片段末端序列的高度一致性可保证正确的连接顺序与方向 (图 1 d)。

全部 PCR 反应均使用 PfuUltra™ 高保真 DNA 聚合酶。所有 PCR 产物在下一步应用前均经过 QI-AEX II Gel Extraction Kit 纯化。

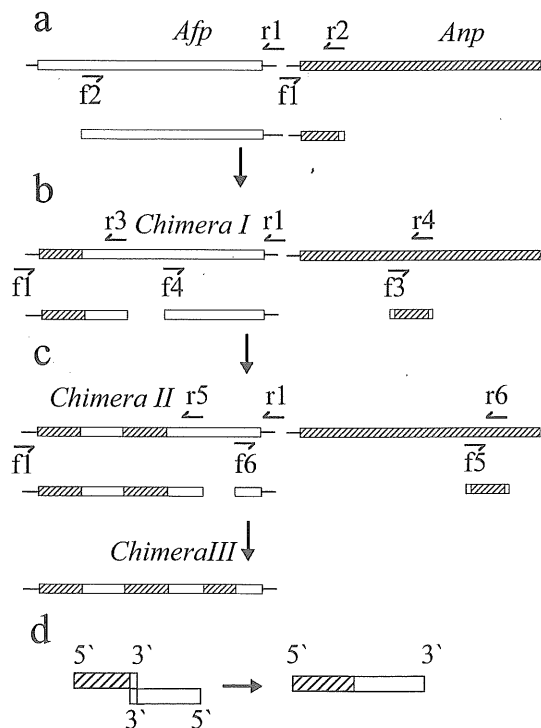


图1 嵌合体 I (a), II (b), III (c) 基因构建及重叠 PCR 法构建异源双链分子 (d) 示意图

Fig. 1 Construction of the genes of Chimera I (a), II (b), and III (c), and schematic drawing of formation of hetero-duplex molecule during overlapping PCR (d) 横向箭头示意有关引物; 阴影框示意 Anp 基因序列; 空白框示意 Afp 基因序列

1.3 重组质粒构建和酵母嵌合体转化

连接好的基因经 *Xho* I 和 *Sac* II 消化后插入 pGAPZαA 中的对应窗口。每个基因的 N 端均融合有受 GAP 启动子控制的酿酒酵母 α-分泌信号因子。

所有重组质粒参照 Invitrogen 操作手册上所载方法转化入 X-33。

1.4 DNA 测序

应用两个设计自载体 pGAPZαA 的引物 (7f: 5' ctgtcatcggttactcagatt3'; 7r: 5' gcgctattcagatcctctctc3') 对插入质粒的嵌合体基因进行双向测序。

1.5 嵌合体植酸酶的表达与纯化

挑取重组毕赤酵母单菌落, 在 1 000 mL YPD 培养基中 30 °C 培养 3 d。表达产物 Afp 及嵌合体 I ~ III 用 HiTrap™ SP 柱 (pH 5.0, 10 mmol/L 乙酸钠) 进行离子交换纯化; Anp 则用 Q 柱 (pH 5.5, 10 mmol/L 乙酸钠) 进行离子交换纯化。收集蛋白峰后过 HiPrep™ 26/60 Sephacryl S-200 HR 柱 (pH 5.0, 150 mmol/L NaCl) 进行分子筛纯化。纯化后的蛋白质最终经过事先用 10 mmol/L 乙酸钠缓冲液 (pH 5.0) 平衡过的 HiTrap™ 脱盐柱的处理, 并经 Vivaspin 超滤浓缩。

1.6 植酸酶酶活力分析

酶活力测定方法参照文献 [8]。一个植酸酶酶活力单位 (U) 定义为: 在 37 °C 时, 每分钟催化释放 1 μmol 无机磷所需要的酶量。按照文献 [4] 的报道使用不同的缓冲液体系测定植酸酶在不同 pH 下的酶活力。所有测定设 3 个平行。

1.7 纯化产物的蛋白酶水解与电泳

胃蛋白酶 (824 units/mg) 和胰蛋白酶 (1 537 BAEE units/mg) 分别溶解于 10 mmol/L HCl, pH 2.0 (0.1 mg/mL) 和 80 mmol/L 碳酸氢铵, pH 7.5 (0.1 mg/mL) 溶液中。一个 BAEE 单位定义为在 pH 7.6, 25 °C, 以 BAEE 为底物的条件下, 每分钟在 253 nm 处吸光度产生 0.001 变化需要的酶量。纯植酸酶经 BCA 试剂盒测定蛋白质质量浓度后稀释至 2 mg/mL, 保存备用。1 mg 纯植酸酶分别与胃蛋白酶或者胰蛋白酶在 37 °C 孵育 2 h, 其中 $m(\text{胃蛋白酶})/m(\text{植酸酶})$ 设定为 0、0.02、0.2 和 1.0, $m(\text{胰蛋白酶})/m(\text{植酸酶})$ 设定为 0、0.002、0.02 和 0.1, 水解反应 pH 分别为 2.5 和 7.6, 反应体积为 10 mL。反应结束时立即置冰浴并迅速将溶液 pH 调节至 6.8。对水解产物直接进行植酸酶酶活力测定, 同时进行 SDS-PAGE 或者非变性 PAGE。凝胶用考马斯兰染色。

1.8 统计分析

全部数据用 SPSS 软件 (release 13.0 版, SPSS Science, Chicago, IL) 进行处理。使用 Student 非配对 t 检验检测数据。 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 嵌合体构建与表达

3 种重组毕赤酵母基因组的 PCR 产物测序结果表明嵌合体 I、II 和 III 基因已经分别转入毕赤酵母 X-33 细胞中, 且重组毕赤酵母均能分泌有活性的植酸酶。

2.2 嵌合体植酸酶纯化和酶学特性研究

纯化的 Afp、嵌合体 I、II、III 和 Anp 在 pH 5.0 时的比活力分别为 25.7 ± 2.1 、 24.7 ± 1.7 、 41.0 ± 2.3 、 43.7 ± 2.8 和 89.6 ± 3.8 U/mg。pH 特性测定结果显示, 嵌合体 II 和 III 的最适 pH 范围宽于 Afp 或者 Anp (图 2)。5 种植酸酶 90 °C 水浴 20 min 后置于 30 °C 水浴 60 min 复性, Afp、嵌合体 I 和 III 分别保留了 85%、90% 和 70% 的初始酶活; 而 Anp 和嵌合体 II 的残余酶活却不到 50%。

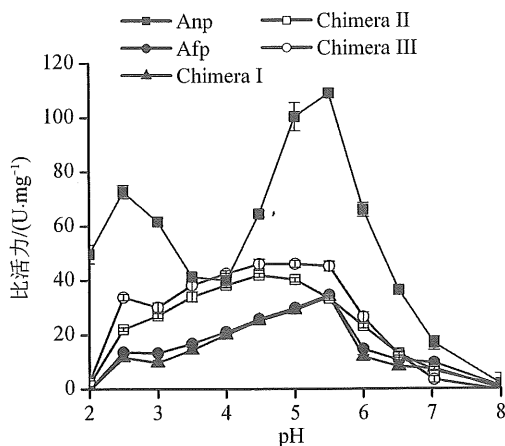


图 2 Anp, Afp 和嵌合体 I, II 与 III 的 pH 曲线

Fig. 2 pH profiles of Anp, Afp, Chimera I, II and III

2.3 胃蛋白酶对植酸酶活性的影响

未经蛋白酶消化处理的初始酶活与消化后剩余酶活之比被用来评估胃蛋白酶对酶活力的影响 (图 3a)。结果显示, 在所有 $m(\text{胃蛋白酶})/m(\text{植酸酶})$ 比率下, 毕赤酵母表达的 Anp 均保持了较高的酶活力。但是, Afp 在 $m(\text{胃蛋白酶})/m(\text{植酸酶})$ 为 0.02、0.2 和 1.0 时却损失了 15% ~ 17% 的酶活力, 与 Anp 差异显著 ($P < 0.05$)。嵌合体 I, II 和 III 经胃蛋白酶水解的结果与 Afp 类似。

2.4 胰蛋白酶对植酸酶活性的影响

当 $m(\text{胰蛋白酶})/m(\text{植酸酶})$ 为 0.002、

0.02 和 0.1 时, Afp 分别损失 13%、17% 和 23% 的酶活力 (图 3b)。Afp 和全部嵌合体在上述比率下的残余酶活力没有显著差异。但是, Anp 在 $m(\text{胰蛋白酶})/m(\text{植酸酶})$ 为 0.002 时只残留了 10% 的酶活力, 且在其它比率下完全失活 (图 3b), 与 Afp 差异显著 ($P < 0.05$)。

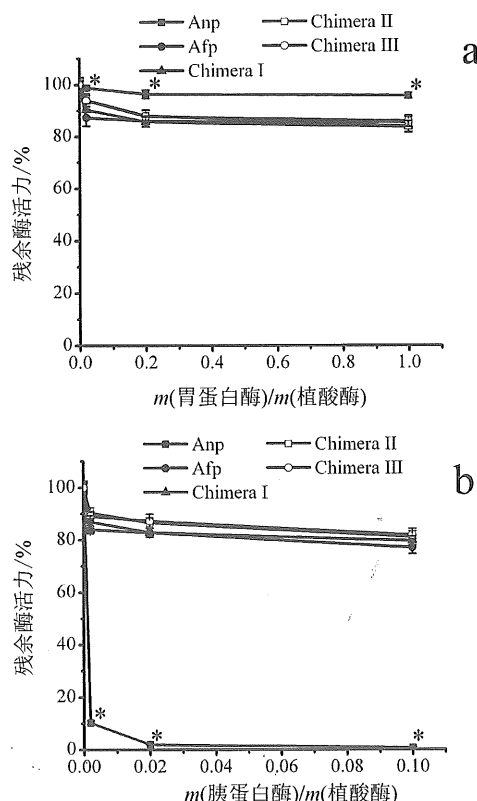


图 3 Anp, Afp 和嵌合体植酸酶经过不同 $m(\text{胃蛋白酶})$ (a) 或者 $m(\text{胰蛋白酶})$ (b) 水解后的残余酶活力

Fig. 3 Residual phytase activity of Anp, Afp and chimera phytases after (a) pepsin digestion or (b) trypsin digestion at different $m(\text{protease})/m(\text{phytase})$ ratios

纵坐标数据 (百分数) 代表消化样品与未消化样品比率的平均数 $\pm$ 标准误 ($n = 6$); 星号表示与 Afp 差异显著 ($P < 0.05$)

2.5 植酸酶水解产物的变性凝胶电泳

各种植酸酶经胃蛋白酶水解后的变性凝胶电泳结果与残余酶活测定结果吻合 (图 4a)。除 Afp 以外, 其他植酸酶没有发现明显的降解; 消化与未消化的 Afp 相比, 主带出现轻微模糊 ($M_r = 76\ 200$)。Afp、Anp 和嵌合体 I 的胰蛋白酶水解产物电泳结果也与它们的残余酶活测定结果一致 (图 4b)。Afp 和嵌合体 I 轻微降解 (消化产物中出现微弱的 28 000 条带, 且主带轻微模糊); Anp 主带则完全消失。但嵌合体 II 和 III 胰蛋白酶消化产物的 SDS-PAGE 结果却与残余酶活测定结果相左 (图 4b)。

嵌合体 II 整齐清晰的主带消化后变得十分模糊并拖尾, 嵌合体 III 的情形也是如此。它们均出现了微弱的 28 000 电泳带。

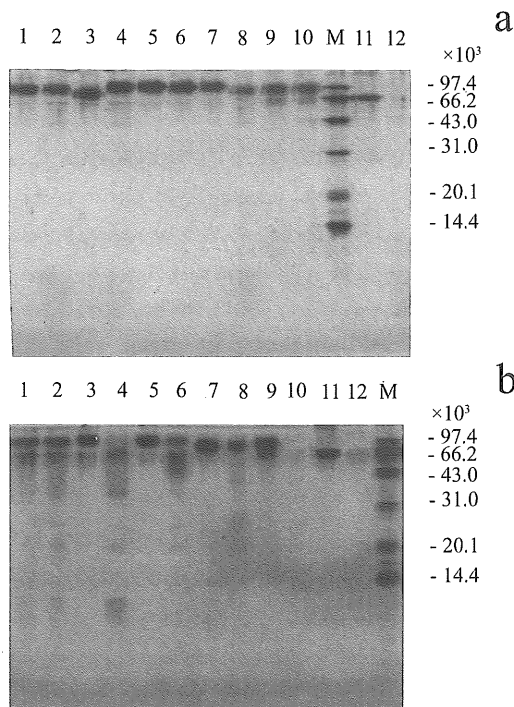


图4 Anp, Afp 和嵌合体植酸酶在 $m(\text{蛋白酶})/m(\text{植酸酶})$ 为 0.1 的胃蛋白酶消化 (a) 或者胰蛋白酶消化 (b) 后 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-polyacrylamide gel (15%) electrophoresis of Anp, Afp and chimera phytases after (a) pepsin digestion or (b) trypsin digestion at $m(\text{protease})/m(\text{phytase})$ ratio of 0.1

a: 1: 未消化的嵌合体 I; 2: 消化的嵌合体 I; 3: 未消化的 Afp; 4: 未消化的嵌合体 II; 5: 消化的嵌合体 II; 6: 未消化的嵌合体 III; 7: 消化的嵌合体 III; 8: 消化的 Afp; 9: 未消化的 Anp; 10: 消化的 Anp; M: 蛋白质相对分子质量标记; 11: 未消化的 BSA; 12: 消化的 BSA (b): 1: 未消化的嵌合体 I; 2: 消化的嵌合体 I; 3: 未消化的嵌合体 II; 4: 消化的嵌合体 II; 5: 未消化的嵌合体 III; 6: 消化的嵌合体 III; 7: 未消化的 Afp; 8: 消化的 Afp; 9: 未消化的 Anp; 10: 消化的 Anp; 11: 未消化的 BSA; 12: 消化的 BSA; M: 蛋白质相对分子质量标记

2.6 植酸酶水解产物的非变性凝胶电泳

应用非变性凝胶电泳分别察看了上述几种植酸酶在 $m(\text{胰蛋白酶})/m(\text{植酸酶})$ 为 0.1 条件下水解后的蛋白质自然状态 (图 5)。由于非变性凝胶的分辨效果低于 SDS-PAGE, 所有电泳带变宽。嵌合体 II 和 III 的结果与它们的 SDS-PAGE 结果不同 (Figure 4b): 它们经胰蛋白酶消化后, 在非变性凝胶电泳时均只出现一条主带, 与它们未消化对

照类似。Afp 和 Anp 的非变性凝胶电泳结果与它们的变性凝胶电泳结果相符, Anp 主带完全消失而 Afp 则部分被水解。

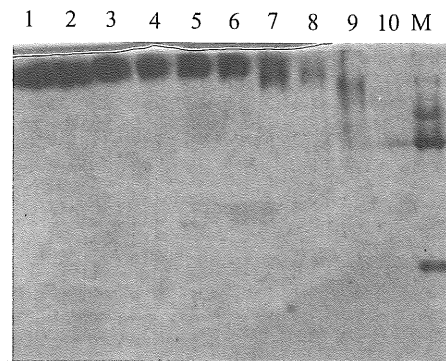


图5 Anp, Afp 和嵌合体在经 $m(\text{蛋白酶})/m(\text{植酸酶})$ 为 0.1 的胰蛋白酶处理后的非变性 PAGE

Fig. 5 Nondenaturing - polyacrylamide gel (15%) electrophoresis of Anp, Afp and chimera phytases after trypsin digestion at $m(\text{protease})/m(\text{phytase})$ ratio of 0.1

1: 未消化嵌合体 I; 2: 消化的嵌合体 I; 3: 未消化嵌合体 II; 4: 消化的嵌合体 II; 5: 未消化嵌合体 III; 6: 消化的嵌合体 III; 7: 未消化 Afp; 8: 消化的 Afp; 9: 未消化 Anp; 10: 消化的 Anp; M: 蛋白质相对分子质量标记

3 讨论

Rodriguez 的研究证实, 黑曲霉表达的 Anp 在 $m(\text{胰蛋白酶})/m(\text{植酸酶})$ 为 0.025 时保留 80% 的酶活力, 在 $m(\text{胃蛋白酶})/m(\text{植酸酶})$ 为 0.01 时保留 23% 的酶活力^[5]。在本研究中, 毕赤酵母表达的 Anp 能抵抗胃蛋白酶水解, 却对胰蛋白酶十分敏感。Afp 在 $m(\text{胰蛋白酶})/m(\text{植酸酶})$ 为 0.1 时的结果也不同于早前的有关研究: 本研究发现 SDS-PAGE 结果中经胰蛋白酶消化后的 Afp 蛋白主带变小但并未消失, 但在 Rodriguez 的研究中该带已经完全消失; 本研究中 Afp 经过胰蛋白酶水解以后仍然保留 80% 的酶活力, 而 Rodriguez 却报道完全失活^[4]。上述差异产生的原因还需要通过进一步研究去发现。

嵌合体植酸酶 (尤其是嵌合体 III) 组合了 Anp 和 Afp 的某些优良酶学特性: 较好的热稳定性, 较宽的最适 pH 范围 (图 2) 以及较高的比活力。所有嵌合体植酸酶经过胃蛋白酶或者胰蛋白酶水解以后的酶活力都与其亲本 Afp 相同, 它们之间酶活力的差异不显著。但是 SDS-PAGE 结果表明用 Anp 的 178~237 区置换 Afp 的对应区域后可赋予后者部分对胰蛋白酶的敏感性。在 $m(\text{胰蛋白$

酶)/ m (植酸酶)为0.1时,嵌合体Ⅱ和Ⅲ的主带被部分水解,变宽并模糊,但并未像Anp那样被完全水解,这种带型的弥散通常表示形成了不完全的水解片段。因此,178~237区可能与胰蛋白酶的敏感性有关。嵌合体Ⅱ和Ⅲ的非变性凝胶电泳结果显示它们均有一条清晰的主带,这说明两种嵌合体植酸酶在胰蛋白酶水解以后还能够维持其天然高级结构。推测两种电泳结果互相矛盾的可能原因是:某些位于嵌合体Ⅱ和Ⅲ分子表面的胰蛋白酶水解位点(R-X和K-X, X=P则不会发生水解)可接受胰蛋白酶的 attack;因此水解产物在变性条件下出现片段化现象(见SDS-PAGE结果);但這些水解形成的分子表面的“裂纹”(共价键断裂)在自然非变性条件下,并不足以破坏由非共价键作用维持的蛋白质2D或3D结构(见非变性凝胶结果)。可能起作用的非共价键包括范德瓦耳氏力、氢键、亲水力和离子键等。嵌合体Ⅱ和Ⅲ获得对胰蛋白酶敏感性的原因可能有:①Anp178-237区的胰蛋白酶水解位点(R217-Q218和R219-L220)比Afp对应区域位点(R217-A218和R219-A220)对胰蛋白酶更加敏感;②嵌合体Ⅱ和Ⅲ分子中Anp的178-237区形成了结构上的某些变化,从而暴露出一些胰蛋白酶水解位点。作者更倾向后一种可能,因为胰蛋白酶消化的嵌合体Ⅱ或者Ⅲ在SDS-PAGE时均未出现清晰的锐带,如果出现则可能说明在该区域发生了蛋白酶水解,因此有必要进行更深入的研究,如对该区域进行定向突变等。

参考文献:

- [1] MULLANEY E J, DALY C B, ULLAH A H. Advances in phytase research[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2000, 47: 157-199.
- [2] SELLE PH, RAVINDRAN V. Microbial phytase in poultry nutrition[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 135(1-2): 1-41.
- [3] RODRIGUEZ E, PORRES J M, HAN Yan, et al. Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* phytase (r-PhyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase (r-AppA) to trypsin and pepsin *in vitro*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, 365(2): 262-267.
- [4] RODRIGUEZ E, MULLANEY E J, LEI Xingen. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 268(2): 373-378.
- [5] IGBASAN F A, MANNER K, MIKSCH G, et al. Comparative studies on the *in vitro* properties of phytases from various microbial origins[J]. *Archiv fur Tierernahrung*, 2000, 53(4): 353-373.
- [6] GARRETT J B, KRETZ K A, O'DONOGHUE E, et al. Enhancing the thermal tolerance and gastric performance of a microbial phytase for use as a phosphate-mobilizing monogastric-feed supplement[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 3041-3046.
- [7] PASAMONTES L, HAIKER M, WYSS M, et al. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(5): 1696-1700.
- [8] 贝锦龙,陈庄,杨林,等.人工合成的黑曲霉NRRL3135菌株植酸酶基因在毕赤酵母系统中的高效表达[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(3): 254-258.
BEI Jinlong, CHEN Zhuang, YANG Lin, et al. Overexpression of artificial synthetic gene of *Aspergillus niger* NRRL3135 phytase in *Pichia pastoris*[J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2001, 17, 254-258.
- [9] 陈庄,付捷,贝锦龙,等.两种重组真菌植酸酶的纯化及其酶学性质比较[J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2007, 44(5): 1141-1146.
CHEN Zhuang, FU Jie, BEI Jinlong, et al. Purification and comparison of enzymatic properties of two recombinant fungal phytases[J]. *Journal of Sichuan University: Natural Science Edition*, 2007, 44(5): 1141-1146.
- [10] KOSTREWA D, GRUNINGER-LEITCH F, D'ARCY A, et al. Crystal structure of phytase from *Aspergillus ficuum* at 2.5 Å resolution[J]. *Nature Structural Biology*, 1997, 4(3): 185-190.
- [11] LIU Qun, HUANG Qingqiu, LEI Xingen, et al. Crystallographic snapshots of *Aspergillus fumigatus* phytase, revealing its enzymatic dynamics on the design of substrate analogs or site-directed mutagenesis[J]. *Structure*, 2004, 12(9): 1575-1583.
- [12] XIANG Tao, LIU Qun, DEACON AM, et al. Crystal structure of a heat-resilient phytase from *Aspergillus fumigatus*, carrying a phosphorylated histidine[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 339(2): 437-445.

(下转第87页)

- [28] CRONQUIST A C. Basic botany [M]. 2nd ed. New York: Harper & Row Publishers, 1982.
- [29] LI Yanghan. Botany: First Vol [M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 1986.
- [30] NIEVES F G, CARVAJAL M, OLMOS E. Graft union formation in tomato plants: Peroxidase and catalase involvement [J]. Ann Bot, 2004, 93: 53-60.
- [31] SPERRY J S. Evolution of water transport and xylem structure [J]. Int J Plant, 2003, 64: 115-127.
- [30] NIEVES F G, CARVAJAL M, OLMOS E. Graft union

苏铁类植物4个属的导管与被子植物导管结构特征的比较研究

黄玉源^{1,2}, 廖文波³, 张宏达³, 王佳卓², 伍映辉⁴

(1. 仲恺农业工程学院生命科学院, 广东 广州 510225; 2. 广西大学农学院, 广西 南宁 530005; 3. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275; 4. 海口市农业科学研究所, 海南海口 570311)

摘要: 对苏铁属的台湾苏铁 (*Cycas taiwaniana*)、波温铁属的细齿波温铁 (*Bowenia serrulata*)、双子铁属的双子铁 (*Dioon edule*) 叶的羽片, 大泽米铁属长刺大泽米铁 (*Macrozamia longispina*) 的根, 以及被子植物的白兰 (*Michelia alba*) 和桃 (*Amygdalus persica*) 的叶组织进行了电子扫描显微镜的观察研究, 结果表明, 2个科4个属苏铁植物的导管类型是丰富的, 导管的结构组成方式、发育过程与被子植物是一致的; 例如导管端壁倾斜度等结构特征显示, 一些被子植物导管的构造比苏铁类植物的要原始。在被子植物的导管中有许多为端部呈扁平的带状, 而且还带有扭曲状, 没有端壁, 只有两面的侧壁及另两侧的很窄的边, 在带状的侧壁上具有许多的穿孔。这在过去未见有报道。对苏铁类植物导管的认识, 对于我们进一步了解现存最原始的种子植物对严酷环境的适应机制和进化状况, 对于采取有效措施保护这些珍稀的植物类群, 以及对于结构植物学、植物进化和生态学等研究方面均具有重要的意义。

关键词: 苏铁类植物; 导管; 被子植物; 演化; 结构特征; 适应性

中图分类号: Q941; Q944.6

(上接第76页)

Construction of Chimerical Fungal Phytase and its Resistance to Proteolysis

CHEN Zhuang^{1,2}, BEI Jin-long², LIAO Ling², LIU Shi-gui¹

(1. School of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Chimera I, II and III were created by stepwise substitutions of DNA fragments encoding region 1-47, 178-237 and 338-381 from *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase (Anp) gene for their counterparts in *Aspergillus fumigatus* phytase (Afp) gene, expressed in *Pichia pastoris*, and then purified. All chimera and parent phytases resisted to pepsin. Afp and all chimeras lost 13%~23% phytase activities at $m(\text{trypsin})/m(\text{phytase})$ ratio of 0.1, while Anp was thoroughly inactivated. However, SDS-PAGE of trypsin digestion results suggested serious proteolysis of Chimera II and III. But nondenaturing PAGE analysis showed they still kept structural intact in nature state after trypsin treatment. Chimera phytases also possessed novel pH profiles and thermo stability different from Anp and Afp. These results demonstrated the feasibility of improving fungal phytase via gene fragment replacement.

Key words: phytase; *Aspergillus fumigatus*; *Aspergillus niger*; proteolysis; protein engineering