

转植酸酶基因玉米中植酸酶蛋白在模拟消化液中的稳定性研究

杨文竹¹, 蒲凌奎^{1,2}, 张琪¹, 陈平¹, 陈茹梅¹, 范云六¹

(1. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; 2. 兰州大学生命科学学院, 兰州 730000)

摘要:植酸酶作为应用最为广泛的重要饲料酶制剂之一,明确其在动物消化道环境中的稳定性对于其应用及作用方式的研究具有重要意义。本研究在体外建立了胃、肠两种模拟消化体系,取不同消化时间的样品进行 Western 杂交,结果显示在模拟胃液中植酸酶蛋白经 60 min 处理未被消化,而在模拟肠液中处理 15 min 内被全部消化,表明转植酸酶玉米种子中的植酸酶蛋白在模拟胃液中极难被消化,可稳定存在,在模拟肠液中可被消化。

关键词:植酸酶;转基因玉米;模拟胃液;肠液;稳定性

中图分类号: S188 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0864(2008)S1-0086-04

Stability of Phytase in Transgenic Corn in Simulated Gastric/Intestinal Fluid

YANG Wen-zhu¹, PU Ling-kui^{1,2}, ZHANG Qi¹, CHEN Ping¹, CHEN Ru-mei¹, FAN Yun-liu¹

(1. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

2. Life Science College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: As one of the most important feedstuff enzymes, phytase is applied extensively worldwide. It's very important to get knowledge on phytase stability in gastrointestinal tract environment for its application and function research. In vitro simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF) were established in this study. Samples treated by different time were carried on Western blotting analysis. Results showed that phytase was stable within 60 min in SGF and was stable within 15 min in SIF, indicating that phytase in transgenic com was digested with hard difficulty in SGF and digested easily in SIF.

Key words: phytase; transgenic com; simulated gastric/intestinal fluid; stability

微生物生产的植酸酶作为添加剂已经广泛的应用到饲料工业上^[1]。在过去的十多年中,人们对植酸酶的研究主要集中在从不同的生物中分离克隆植酸酶基因,现已分别从植物、细菌和真菌中分离和鉴定了多个植酸酶基因^[2~4]。但是植酸酶作用的底物——植酸磷存在于植物性饲料中,如玉米、大豆等作物的种子,如果在这些作物的种子中本身就含有足量的植酸酶,通过饲喂过程在动物的胃肠道中释放出来,降解饲料中植酸磷,这样就省去了植酸酶添加剂的生产以及在饲料中的添加,既降低成本又减少耗能,无疑是植酸酶应用的最佳方法。因此在饲料作物中表达植物酸酶的研究

受到关注,目前已成功地通过 DNA 重组技术在原核和真核生物等不同的表达系统中表达出植酸酶^[5~9]。

玉米是最佳的饲料原料,占饲料用量的 50% 以上。我国玉米种植面积和产量均居世界第二位。本实验室在玉米中进行了植酸酶转基因研究,构建了多个玉米表达载体,均成功转化玉米,都高效表达了植酸酶基因,表达的植酸酶水平为 1 000 ~ 120 000 U/kg^[10],经过选育,已经获得稳定遗传的转基因玉米纯合系,并且从表达植酸酶的玉米种子中纯化出该蛋白。从应用的角度考虑,表达植酸酶的转基因玉米无论直接作为饲料原料

收稿日期: 2008-02-25; 修回日期: 2008-04-30

基金项目: 国家 973 计划项目 (2005CB120905) 资助。

作者简介: 杨文竹, 硕士研究生, 研究方向为植物基因工程。通讯作者: 陈茹梅, 副研究员, 博士, 主要从事植物基因工程研究。 Tel: 010-62139832; Email: rumei.chen@163.com

还是作为添加剂使用,都在动物体内的消化道中分解植酸磷,因此植酸酶是否为致敏原以及其在消化道环境中的稳定性是值得关注的问题。通过致敏原数据库比对分析说明植酸酶为非致敏原。为了进一步明确植酸酶在消化道中的稳定性并探讨其时空分布上对分解植酸磷的作用,本实验根据动物体内胃、肠消化液的主要成分及消化环境,在体外建立模拟胃、肠消化体系,将转基因玉米中外源植酸酶基因表达的蛋白在该体系中进行消化,对不同消化时间的样品进行 Western 杂交,以确定该蛋白在模拟胃液和模拟肠液中被消化的时间,从而推断转植酸酶玉米中的植酸酶在模拟胃/肠消化过程中的稳定性。

1 材料与amp;方法

1.1 试样蛋白溶液

1.1.1 纯化的蛋白样品 从转植酸酶玉米中纯化得到植酸酶蛋白,经冷冻干燥后,溶于重蒸馏水中,采用 Bradford 方法定量,使样品浓度达到 2 mg/mL,备用。

1.1.2 转植酸酶玉米种子 随机选取 5 粒高植酸酶活性的玉米种子(酶活性为 120 000 U/kg 种子,酶蛋白占种子重量的 0.12%),磨碎,称取 460 mg,加 1 mL 重蒸馏水,振荡,10 000 rpm 离心 10 min,取上清备用,酶蛋白浓度约为 0.5 mg/mL。

1.2 对照蛋白溶液^[11]

1.2.1 酪蛋白(-casein) 称取 5 mg 酪蛋白,溶于 1 mL 重蒸馏水中,混匀,作为模拟胃液消化不稳定对照。称取 2 mg 酪蛋白,溶于 1 mL 重蒸馏水中,混匀,作为模拟肠液消化不稳定对照。

1.2.2 大豆胰蛋白酶抑制剂(soybean trypsin inhibitor, STI) 称取 5 mg 大豆胰蛋白酶抑制剂,溶于 1 mL 重蒸馏水中,混匀,作为模拟胃液消化稳定对照。称取 2 mg 大豆胰蛋白酶抑制剂,溶于 1 mL 重蒸馏水中,混匀,作为模拟肠液消化稳定对照。

1.3 模拟胃液(simulated gastric fluid, SGF)^[11]

称取 0.02 g NaCl 和 0.012 g 胃蛋白酶(pepsin, Sigma),再加入 7 mL 重蒸馏水,加入 73 μ L HCl,用 HCl 调至 pH 1.2,加水定容至 10 mL。

1.4 模拟肠液(simulated intestinal fluid, SIF)^[11]

称取 0.07 g KH_2PO_4 ,溶于 2.5 mL 重蒸馏水中,振荡使之完全溶解,加入 1.9 mL 0.2 mol/L NaOH 溶液和 4 mL 重蒸馏水,加入 0.1 g 胰蛋白酶(pancreatin, Sigma),用 0.2 mol/L NaOH 溶液调至 pH 7.5,加重蒸馏水定容至 10 mL。

1.5 模拟胃液消化试验

1.5.1 反应时间为 0 s 的模拟胃液消化试验 在 0.2 mL 离心管中加入 19 μ L 模拟胃消化液,37 恒温水浴 5 min。加入 1 μ L 试样蛋白溶液或对照蛋白溶液,同时加入 7 μ L 0.2 mol/L NaHCO_3 ,漩涡振荡后,冰浴,加入 10 μ L 蛋白样品上样缓冲液,沸水浴 5 min,取出后冷却至室温备用。

1.5.2 反应时间为 15 s、2 min、8 min、15 min、30 min、60 min 的模拟胃液消化试验 在 1.5 mL 离心管中加入 190 μ L 模拟胃消化液,37 恒温水浴 5 min。加入 10 μ L 试样蛋白溶液或对照蛋白溶液,迅速漩涡振荡并快速置于 37 水浴,准确记录时间,在每个反应时间点,迅速吸取反应液 20 μ L,加入 0.2 mL 离心管中(含有 7 μ L 0.2 mol/L NaHCO_3),冰浴,加入 10 μ L 蛋白样品上样缓冲液,沸水浴 5 min,取出后冷却至室温备用。

1.6 模拟肠液消化试验

1.6.1 反应时间为 0 s 的模拟肠液消化试验 在 0.2 mL 离心管中加入 19 μ L 模拟肠消化液,37 恒温水浴 5 min。加入 1 μ L 试样蛋白溶液或对照蛋白溶液,漩涡振荡后,立即加入 10 μ L 蛋白样品上样缓冲液,沸水浴 5 min,取出后冷却至室温备用。

1.6.2 反应时间为 15 s、2 min、8 min、15 min、30 min、60 min 的模拟肠液消化试验 在 1.5 mL 离心管中加入 190 μ L 模拟肠消化液,37 恒温水浴 5 min。加入 10 μ L 试样蛋白溶液或对照蛋白溶液,迅速漩涡振荡并快速置于 37 水浴中,准确记录时间,在每个反应时间点,迅速吸取反应液 20 μ L,加入 0.2 mL 离心管中,立即加入 10 μ L 蛋白样品上样缓冲液,沸水浴 5 min,取出后冷却至室温备用。

1.7 SDS-PAGE 及 Western 杂交检测

消化试验结束后,取 15 μ L 蛋白样品进行

SDS-PAGE,分离胶的浓度为 12%,电泳结束后,考马斯亮蓝染色,脱色液脱色。

使用电转仪将样品蛋白转移到 PVDF膜上,使用该蛋白免疫兔子获得的抗血清作为一抗,采用 AP标记的山羊抗兔 IgG为二抗,进行 Western 杂交反应及显色 (NBT/BCIP系统)。

2 结果与分析

2.1 模拟消化液消化对照蛋白

用不稳定对照蛋白和稳定对照蛋白检测模拟消化液是否工作正常,如图 1和图 2所示:酪蛋白在 15 s时就被模拟胃 肠液完全消化,而大豆胰蛋白酶抑制剂 60 min内在模拟胃 肠液中是稳定的,不能被消化,表明模拟胃 肠消化试验体系工作正常。

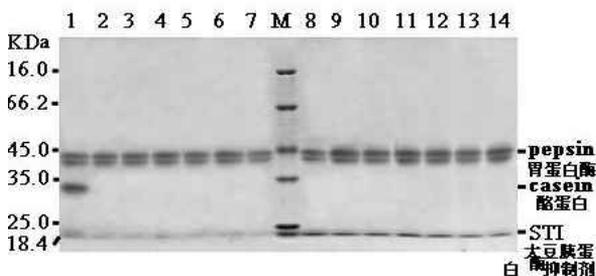


图 1 模拟胃液消化酪蛋白和 大豆胰蛋白酶抑制剂

Fig 1 Digestion of α -casein and STI by SGF.

1~7:用模拟胃液处理酪蛋白 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min; 8~14:用模拟肠液处理大豆胰蛋白酶抑制剂 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min; M:蛋白质标准分子量

1~7: Digestion of casein by SGF within 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min; 8~14: Digestion of STI by SGF within 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min; M: Protein standard molecular weight marker

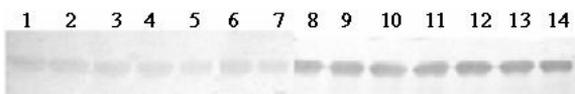


图 3 模拟胃液消化转植酸酶玉米中的植酸酶蛋白

Fig 3 Digestion of phytase in transgenic corn by SGF

1~7:模拟胃液处理种子粉末中的植酸酶 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min; 8~14:用模拟胃液处理纯化的植酸酶 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min

1~7: Digestion of phytase in corn meal by SGF within 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min; 8~14: Digestion of purified phytase by SGF within 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min.

2.2 模拟消化液消化试样蛋白

转植酸酶玉米的样品被消化液消化的结果如图 3和图 4所示。不论是种子粉末中的蛋白还是纯化后的蛋白在 60 min内均完全不被模拟胃液消化,而种子粉末中的蛋白在模拟肠液中处理 2 min时绝大部分被降解,8 min内完全降解,纯化得到的蛋白在模拟肠液中处理 8 min时绝大部分被降解,15 min内完全降解。

综合以上实验结果,可以清楚地看到,在试验体系工作正常的情况下,根据 Western 杂交的结果中植酸酶蛋白条带消失的时间来判断蛋白的可消化性:在模拟胃液中,植酸酶蛋白经 60 min处理未被消化,表明该蛋白极难消化。在模拟肠液中,植酸酶蛋白处理在 8~15 min全部被消化,表明该蛋白可消化。

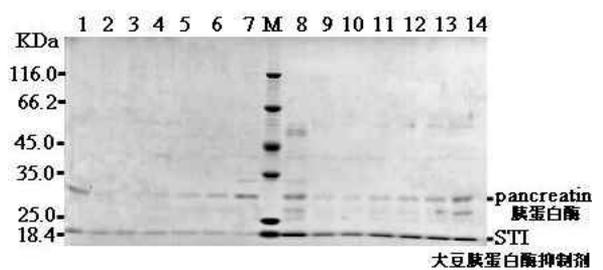


图 2 模拟肠液消化酪蛋白和 大豆胰蛋白酶抑制剂

Fig 2 Digestion of α -casein and STI by SIF

1~7:模拟肠液处理酪蛋白 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min; 8~14:用模拟肠液处理大豆胰蛋白酶抑制剂 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min; M:蛋白质标准分子量

1~7: Digestion of casein by SIF within 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min; 8~14: Digestion of STI by SIF within 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min; M: Protein standard molecular weight marker

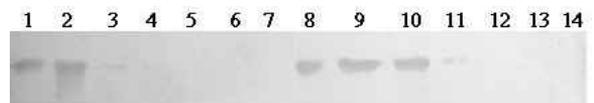


图 4 模拟肠液消化转植酸酶玉米中的植酸酶蛋白

Fig 4 Digestion of phytase in transgenic corn by SIF

1~7:模拟肠液处理种子粉末中的植酸酶 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min; 8~14:用模拟肠液处理纯化的植酸酶 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min

1~7: Digestion of phytase in corn meal by SIF within 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min; 8~14: Digestion of purified phytase by SIF within 0 s, 15 s, 2 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min

3 讨论

通过与食物和花粉过敏原数据库比对分析,发现植酸酶与数据库中的已知过敏原没有同源性。植酸酶在自然界中大量存在,在多种微生物、植物中都有不同含量的植酸酶,特别在农作物中,例如在人类已经有 2 000 多年食用历史的小麦中就含有活性较高的植酸酶,酶活性约为 300 ~ 1 000 U/kg^[12],至今未见到有过敏性反应的报道。

根据《转基因生物及其食品食用安全检测模拟胃肠液外源蛋白质消化稳定性试验方法》^[11],在试验体系工作正常的情况下,根据 SDS-PAGE 电泳图谱和蛋白印迹图谱中试样蛋白条带消失的时间可判断蛋白质的可消化性,可分别表述为:该蛋白在模拟胃 肠液中极易消化、易消化、可消化、难消化或极难消化。所以对植酸酶的研究结果可表述为转植酸酶玉米中的植酸酶蛋白在模拟胃液中极难消化,在模拟肠液中可消化,表明其在模拟动物消化道环境可以被消化。这一点也表明植酸酶可以正常发挥其功能,植酸酶蛋白在动物胃中可以 与植酸磷充分接触,进行分解反应;而其在模拟肠液中可短时间的存留,并不影响该蛋白分解植酸磷的作用,因为植酸酶的主要作用部位在动物的胃中。

Jonbied等^[13]研究表明,黑曲霉植酸酶水解植酸磷发生在猪胃和十二指肠中,所释放的无机磷在小肠中被吸收。Yi和 Komegay等^[14]在研究植酸酶在仔猪胃肠道内作用部位时发现,植酸酶活性最高的地方是仔猪胃部,主要是由于仔猪胃部具有适宜 pH 和较低的蛋白酶水平。Liebert等^[15]与史凯来等^[16]均指出嗦囊、肌胃和腺胃是植酸酶在鸡消化道内的主要作用部位。这些文献报道的结果与本文中转植酸酶基因玉米中植酸酶的试验结果完全吻合。

了解植酸酶在消化道中的稳定性及主要作用部位,对转植酸酶玉米籽粒用作饲料原料或替代微生物发酵生产的植酸酶添加剂,以及玉米种子生物反应器生产的第二代植酸酶产品的推广应用具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Pen J, Verwoerd TC, van Paridon PA, et al. Phytase containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization [J]. *Bio/Technology*, 1993, 11: 811 - 814.
- [2] Wyss M, Pasamonis L, Friedlein A, et al. Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(2): 359 - 366.
- [3] Hong C Y, Cheng K J, Tseng T H, et al. Production of two highly active bacterial phytases with broad pH optima in germinated transgenic rice seeds [J]. *Transgenic Res*, 2004, 13(1): 29 - 39.
- [4] 姚斌,张春义,王建华,等.产植酸酶的黑曲霉菌株筛选及其植酸酶基因克隆 [J]. *农业生物技术学报*, 1998, 6(1): 1 - 6.
- [5] Li J, Hegeman C E, Hanlon R W, et al. Secretion of active recombinant phytase from soybean cell-suspension cultures [J]. *Plant Physiol*, 1997, 114(3): 1103 - 1111.
- [6] 姚斌,张春义,王建华,等.高效表达具有生物学活性的植酸酶的毕赤酵母 [J]. *中国科学 (C辑)*, 1998, 28(3): 237 - 243.
- [7] Lei X G, Stahl C H. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57(4): 474 - 481.
- [8] Vohra A, Satyanarayana T. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2003, 23(1): 29 - 60.
- [9] 姚斌,范云六.植酸酶的分子生物学与基因工程 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16(1): 1 - 5.
- [10] Chen R M, Xue G X, Chen P, et al. Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gene [J/OL]. *Transgenic Res*, 2007, DOI 10.1007/s11248-007-9138-3.
- [11] 农业部 869 号公告 - 2 - 2007. 转基因生物及其食品食用安全检测模拟胃肠液外源蛋白质消化稳定性试验方法 [EB/OL]. http://www.agri.gov.cn/bllgg/t20070619_837364.htm, 2007 - 06 - 17.
- [12] Brinch-Pedersen H, Sorensen L D, et al. Engineering crop plants: getting a handle on phosphate [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(3): 118 - 125.
- [13] Jonbied A W, Muz Z, Kemme P A. The effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of dry matter, total phosphorus, and phytic acid in different sections of the alimentary tract [J]. *J. Anim. Sci*, 1992, 70: 1159 - 1168.
- [14] Yi Z, Komegay E T. Site of phytase activity in the gastrointestinal tract of young pigs [J]. *Anim Feed Sci Technol*, 1996, 61: 362 - 368.
- [15] Liebert F, Wecke C, Schoner F J. Phytase activities in different gut contents of chickens as dependent on levels of phosphorus and phytase supplementations [M]. Switzerland: Karthaus-Ittingen, 1993, 13 - 16, 202 - 205.
- [16] 史凯来,王秀坤,刘伟,等. pH 值对植酸酶活性的影响及其在猪、鸡消化道中的分析 [J]. *饲料研究*, 2000, 2: 8 - 9.