

LmAPX 基因在大肠杆菌和酵母菌中的表达研究*

高海伶¹ 季 静^{1**} 王 罡^{1**} 吴广霞² 荣 非¹ 关春峰¹ 金 超¹

(1 天津大学环境科学与工程学院 天津 300072 2 天津大学化工学院 天津 300072)

摘要 目的:研究枸杞抗坏血酸过氧化物酶基因(ascorbate peroxidase, *LmAPX*)在原核中的表达和酶学特性以及在酵母菌中的抗氧化能力,为进一步研究逆境诱导的抗氧化胁迫的作用机理奠定理论基础。方法:将*LmAPX*转入大肠杆菌BL21中进行异源表达,采用Ni²⁺亲和层析,纯化重组蛋白,并对不同温度和pH值下的酶活进行研究,Lineweaver-Burk双倒数作图法测定该酶的Km和Vmax值。将*LmAPX*转入酵母菌株W303中进行H₂O₂和NaCl氧化胁迫处理。结果:该酶的最适温度和最适pH值分别为40℃和6.5。当抗坏血酸(Ascorbic acid, AsA)浓度过量时,对H₂O₂的Km和Vmax分别是0.17 ± 0.02 mmol/L和11.78 ± 1.88 mmol/min · mg;当H₂O₂浓度过量时,对AsA的Km和Vmax分别是2.19 ± 0.40 mmol/L和58.82 ± 3.51 mmol/min · mg。含有*LmAPX*基因的酵母菌株,在半乳糖的诱导下在8 mmol/L H₂O₂和100 mmol/L NaCl的培养基上的生长都明显优于对照组。结论:*LmAPX*蛋白具有很好的抗氧化性和耐盐性。

关键词 中华枸杞 抗坏血酸过氧化物酶(APX) 酶学分析 氧化胁迫

中图分类号 Q78

枸杞是茄科枸杞属的多分枝落叶灌木,生长在中国以及亚洲其他地区。其果实又名枸杞子,是一种传统的中草药。枸杞对于旱、盐碱、低温具有很强的适应能力,被认为是解决我国西北土壤盐碱化的先锋植物^[1]。

盐碱干旱等非生物胁迫会使植物产生过多的活性氧(reactive oxygen species, ROS),使细胞膜和细胞器受到不同程度的损伤^[2],严重影响作物的生长和产量。ROS具有很强的氧化能力,当植物细胞中产生的活性氧大于被清除的活性氧时,活性氧在细胞内急剧积累,膜系统就会受到不同程度的损伤,尤其是线粒体和叶绿体的膜系统损伤较为严重,同时引发体内氧化胁迫,甚至引起细胞代谢紊乱,最终抑制植物生长和发育^[3]。其中H₂O₂是ROS中最稳定的成分,也是很多的细胞毒素活性氧衍生物的前体物质^[4]。

抗坏血酸过氧化物酶(APX, EC1.11.1.11),也叫维生素C过氧化物酶,存在于高等植物、真核藻类以及某些蓝细菌中,在某些昆虫中也能检测出APX的活性^[5],植物APX基因家族由4个亚家族组成,即*cAPX*, *pAPX*, *sAPX*, *tAPX*,分别位于细胞质、过氧化物酶体、叶绿体和线粒体中^[6]。抗坏血酸过氧化物酶是一种很好的活性氧清除剂,是清除H₂O₂的关键酶^[7-8]。它以还原型抗坏血酸为反应底物,催化H₂O₂产生单脱氢抗坏血酸和H₂O,而且APX对抗坏血酸具有很高的特异性和亲和性。单脱氢抗坏血酸可通过不同途径被还原成抗坏血酸^[9],能够有效地减轻植物体内活性氧积累造成的氧化胁迫。

豌豆^[10]、辣椒^[11]、葡萄^[12]等大多数APX蛋白的酶动力学特性和抗氧化性具有一致的酶学特性,与反应底物抗坏血酸具有更高的特异性,但缺乏底物时更容易失活^[13-14]。然而枸杞抗氧化系统中抗坏血酸过氧化物酶基因的酶学特性以及在酵母中的抗氧化胁迫能力还未见报道,本文首次将*LmAPX*基因在大肠杆菌和酵母菌中进行异源表达研究,揭示该酶的酶学特性以及在抗氧化胁迫中的重要作用。

收稿日期:2014-05-12 修回日期:2014-06-06

* 国家自然科学基金(31271793, 31271419),国家转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08003-002B),国家水体污染控制与治理科技重大专项(2014ZX07203-009)

**通讯作者,电子邮箱:jijingtjdx@163.com; wanggangtjdx@126.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体和菌株 携带有目的基因的质粒 pMD18T-*LmAPX* 由本实验室构建并保存。原核表达载体 pET28a、宿主菌 *E. coli* Top10、*E. coli* BL21 (DE3) 购自天根公司。酵母表达载体 pYES2 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 PCR 引物设计 根据 *LmAPX* (*APX*, EC1.11.1.11) 的 cDNA 序列, 分别设计上游引物 F: 5'-CGCGGATCCATGGGTAAGTGCTATCCTA-3' 和下游引物 R: 5'-ACGCGTCCGACACCCCTTCAGAATCACCAT-3', 标有下划线的序列分别为酶切位点 *Bam*H I 和 *Sal* I, 引物合成由华大公司完成。

1.1.3 主要试剂 琼脂糖凝胶、DNA 产物纯化和琼脂糖凝胶回收试剂盒、Pfu DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶和 DNA Marker III 均购自天根公司; 限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶均购自 Fermentas 公司; 大肠杆菌培养基 (LB 培养基) 和酵母培养基 (SD 培养基) 所需试剂以及氨苄青霉素和卡那霉素和磷酸缓冲液 (Phosphate Buffer Solution PBS), 乙二胺四乙酸 (EDTA), H_2O_2 和 AsA 等化学试剂均购自天津鼎国公司; 细菌蛋白抽提试剂盒 (Cat. No. CW0888) 和 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒 (Cat. No. CW0009), Ni 亲和层析柱和 G25 脱盐柱均购自北京康为世纪公司。

1.2 方法

1.2.1 原核表达载体的构建 分别以 F 和 R 为上下游引物, 以 pMD18T-*LmAPX* 为模版, 用高保真 Pfu 酶扩增 *LmAPX* 片段, 反应条件为 94 °C, 4 min; 94 °C, 30 s; 57 °C, 30 s; 72 °C, 1 min 50 s; 72 °C, 8 min, 32 个循环。经琼脂糖电泳验证片段大小, 将 PCR 产物与 pET28a 载体分别用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切并纯化回收, 回收产物用 T4 DNA 连接酶连接, 氯化钙法转化 *E. coli* BL21 感受态细胞中, 取 50 μ l 转化细菌涂布在 LB 平板上 (含卡那霉素 10 μ g/mL), 37 °C 过夜培养。

挑取阳性转化子并以 *LmAPX* 基因的 5' 端和 3' 端引物进行菌落 PCR 鉴定。PCR 鉴定正确的转化子进一步提取质粒, 用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切验证。最后选取阳性克隆送华大公司测序, 验证重组质粒读码框的正确性。

1.2.2 重组蛋白表达鉴定 将携带阳性质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株和空载体 pET28a 菌株分别接种于 2

ml LB 培养液 (含卡那霉素 10 μ g/mL), 37 °C 摇床培养过夜, 取上述菌液按 1:100 的比例接种到上述 LB 培养液, 37 °C 摇床培养至 OD_{600} 为 0.5。加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 后 28 °C 诱导 *LmAPX* 蛋白表达 12 h, 然后进行细菌蛋白抽提和目的蛋白纯化, 取 IPTG 诱导前后保存的菌液、抽提的细菌总蛋白和纯化后的 *LmAPX* 蛋白 (带有组氨酸标签) 进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.3 *LmAPX* 蛋白的酶学特性分析 3 mL 酶反应混合液 (50 mmol/L PBS (pH 6.0), 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L AsA) 中加入适量收集的上清 (纯化后带有组氨酸标签的 *LmAPX* 蛋白), 加入 0.1 mmol/L H_2O_2 启动反应, 测定 2 min 内 290 nm ($\epsilon_{290} = 2.8 \text{ mmol/L} \cdot \text{cm}$) 吸光值变化来初步测定抗坏血酸过氧化物酶的活性。用 Bradford 法测蛋白含量, 室温下每分钟氧化 1 mol AsA 的酶量作为一个“酶活性单位”。 H_2O_2 浓度过量 (0.16 mmol/L) 时取不同浓度的 AsA (0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.75, 1.0 mmol/L), 反应以加入 H_2O_2 为起始计算 K_m 和 V_{max} 值, AsA 浓度过量 (0.4 mmol/L) 时取不同浓度的 H_2O_2 (0.12, 0.2, 0.3, 0.4, 0.8 mmol/L), 反应以加入 AsA 为起始计算 K_m 和 V_{max} 值, 测三次取平均值。

LmAPX 最适温度和最适 pH 值的测定: 将纯化后的 *LmAPX* 酶蛋白 (带有组氨酸标签) 在不同温度 (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 °C) 和不同 pH 值 (3, 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 8, 9) 下测定酶活, 将最高酶活计为 100%, 计算相对酶活。

1.2.4 酵母表达载体 pYES2-*LmAPX* 的构建及酵母抗逆性分析 pET28a-*LmAPX* 重组质粒经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切, 1% Agarose 电泳分离, 切胶回收目的基因片段 *LmAPX*。同时用相同的酶双酶切质粒 pYES2-GFP (本实验室构建, 含有 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切位点), 1% Agarose 电泳分离, 切胶回收载体片段 pYES2。用 T4 DNA 连接酶连接载体大片段和目的基因, 经氯化钙法转化至感受态细胞 *E. coli* Top10 中, 提取阳性转化子的质粒, 进行 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切验证。

将构建好的质粒 pYES2-*LmAPX* 和空载体 pYES2 经乙酸锂转化法^[18], 导入酵母野生型菌株 W303 中。挑取在尿嘧啶缺省的 SD 培养基 (SD-Ura⁻) 上长出的转化子通过 PCR 检测鉴定。挑取阳性转化子接种至 SD 液体培养基中于 30 °C 进行振荡培养过夜。各菌液统一调至 OD_{600} 为 1 时, 经梯度稀释后 (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 和 10^{-4} 倍), 分别点种在含浓度为 0, 2, 4, 8 mmol/L 的

H₂O₂ 和 0, 50, 75, 100 mmol/L NaCl 的 SD-Ura^r 固体培养基上 30 ℃ 培养 4 d, 观察菌落生长状态。

2 结果

2.1 原核表达载体的鉴定

菌落 PCR 结果表明, PCR 产物约为 750 bp 左右,

与目的基因的产物条带大小一致(图 1a)。对 PCR 鉴定正确的克隆提取质粒进行双酶切鉴定, 酶切产物经电泳分离, 目的片段约 750 bp, pET28a 载体片段大小约为 5 369 bp(图 1b), 与预期结果相符, 初步推断重组质粒构建成功。目的基因序列和读码框经测序后都正确, 表明原核表达载体 pET28a-*LmAPX* 构建成功。

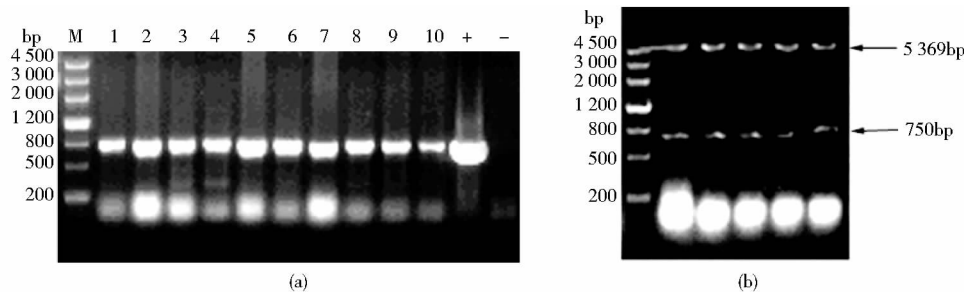


图 1 *LmAPX* 基因的 PCR 鉴定和双酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pET28a-*LmAPX* by PCR and digested by *Bam*H I and *Sal* I

(a) Identification of pET28a-*LmAPX* by PCR (b) Identification of pET28a-*LmAPX* by *Bam*H I and *Sal* I

2.2 *LmAPX* 基因的诱导表达及纯化

将质粒 pET28a-*LmAPX* 转化到大肠杆菌 BL21 中, 经 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 12 h, SDS-PAGE 电泳结果显示, 诱导的空载体没有目的条带, 未诱导的重组蛋白的目的蛋白表达量比较低, 为本底水平的表达, 诱导后的重组蛋白的目的条带表达量最高, 且纯化后的目的蛋白(带有组氨酸标签)条带单一。(图 2)。

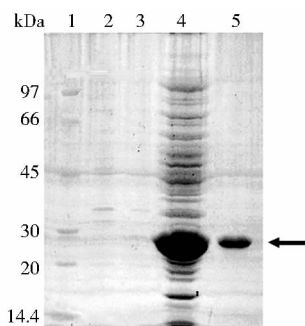


图 2 *LmAPX* 的原核表达及重组蛋白纯化

Fig. 2 Prokaryotic expression and purification of recombinant *LmAPX*

1: Mid-range protein Marker; 2: pET-28a (+ IPTG); 3: pET-28a-*LmAPX* (-IPTG); 4: pET-28a-*LmAPX* (+ IPTG); 5: Purified pET-28a-*LmAPX* (+ IPTG)

2.3 *LmAPX* 蛋白酶学特性分析

LmAPX 蛋白的最适反应温度呈典型的钟形曲线, 在 40 ℃ 时其活性最大, 在 25 ~ 45 ℃ 之间, 均达最高酶

活的 70% 以上, 表明该酶有更为广泛的温度适应范围。低于 20 ℃ 或者高于 50 ℃ 其活力不足最大活力的 60%, 在高于 45 ℃ 以后, *LmAPX* 蛋白的活力随着温度的升高呈现明显降低趋势, 当温度达到 60 ℃ 时, 酶活力仅为最高值的 15%。

当 pH 值为 3 时, 酶活力几乎为 0, 随着 pH 值升高, 酶活力急剧上升, 当 pH 值处于 4 ~ 7 之间时, 酶活力均达最大活力的 80% 以上, 这表明该酶有一个相对广泛的最适 pH 值范围, *LmAPX* 蛋白的最适 pH 值为 6.5, 当 pH 值升至 9 时, 酶活力仅达最大活力的 34%, 由此可知, 该酶更适宜在偏酸性的条件下发挥更大的抗氧化作用。

利用 Lineweaver-Burk 双倒数法分别对两个底物 AsA 和 H₂O₂ 作图, AsA 浓度过量时, 对 H₂O₂ 的 K_m 和 V_{max} 分别是 0.17 ± 0.02 mmol/L 和 11.78 ± 1.88 mmol/min · mg, H₂O₂ 浓度过量时, 对 AsA 的 K_m 和 V_{max} 分别是 2.19 ± 0.40 mmol/L 和 58.82 ± 3.51 mmol/min · mg。

2.4 酵母表达载体的鉴定及其转化酵母的抗逆性分析

2.4.1 酵母表达载体的鉴定 表达载体 pYES2 是大肠杆菌和酵母菌穿梭型表达载体, 它既可以作为克隆载体在大肠杆菌中表达, 也可以在 GAL1 启动子(半乳糖诱导型启动子)的作用下在酵母菌中进行诱导表达。为验证表达载体 pYES2-*LmAPX* 构建的正确性, 提取大

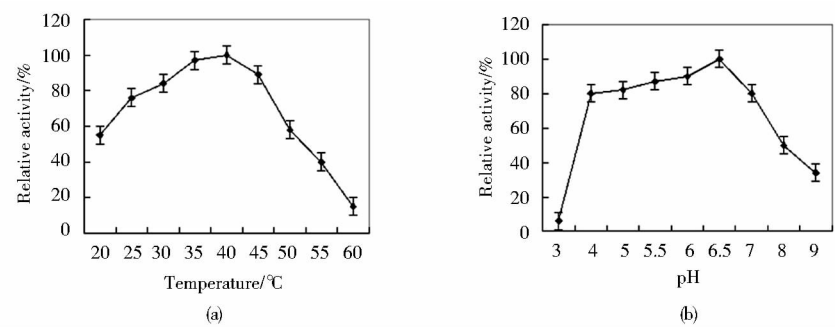


图 3 温度和 pH 值对 *LmAPX* 酶活性的影响

Fig. 3 Effect of temperature (a) and pH (b) on *LmAPX* activity

肠杆菌阳性转化子的质粒,经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切后,得到约 750 bp 目的条带和 5 856 bp 的载体大片段 pYES2(图 4a)。为验证酵母表达载体 pYES2-*LmAPX* 是否已经成功转入酵母菌中,以 SD-Ura^r 固体培养基上生长的酵母单菌落为模板,以目的基因的上下游引物进行菌落 PCR 验证,结果表明 PCR 产物条带与目的基因大小一致,证明已导入了目的条带(图 4b)。

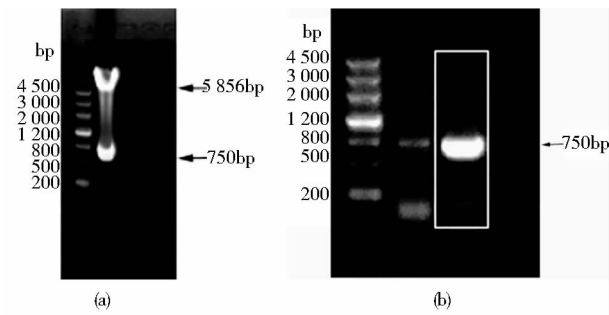


图 4 酵母表达载体 pYES2-*LmAPX* 双酶切验证及导入酵母菌株 W303 的菌落 PCR 验证

Fig. 4 Identification of pYES2-*LmAPX* by *Bam*H I and *Sal* I (a) and identification of transformants by PCR of colony (b)

2.4.2 *LmAPX* 基因在酵母菌中氧化胁迫(H_2O_2)下的表达分析 转化后的酵母菌株,在含不同浓度 H_2O_2 的 SD-Ura^r 培养基下进行抗氧化胁迫处理,结果表明,在含有 0,2,4 mmol/L H_2O_2 的 SD 培养基上生长表现差异不明显(数据未列出),过量表达 *LmAPX* 基因的酵母菌落在含 8 mmol/L H_2O_2 胁迫下生长表现出抗氧化逆境生长差异(图 5),随着稀释倍数增加表现出过量表达 *LmAPX* 基因的酵母菌长势明显优于空载体对照,稀释 10^{-4} 时对照菌几乎不能生长,而过量表达 *LmAPX* 的酵母菌株生长良好。

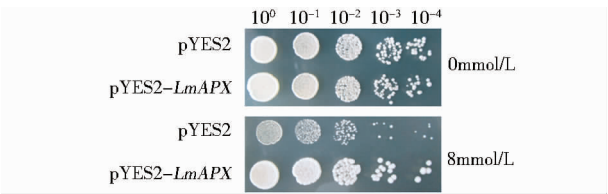


图 5 过量表达 *LmAPX* 基因的酵母菌抗 H_2O_2 (8 mmol/L) 胁迫分析

Fig. 5 Growth of yeast overexpressing of *LmAPX* with 8 mmol/L H_2O_2

2.4.3 *LmAPX* 基因在酵母中盐胁迫(NaCl)下的表达分析 转化后的酵母菌株,在含不同浓度 NaCl 的 SD 固体培养基上进行盐胁迫处理,结果表明,过量表达 *LmAPX* 基因的酵母菌在不同浓度 NaCl 的 SD 固体培养基上均比对照菌株表现出明显的耐盐性,而且随着盐浓度的增加,对照菌株在稀释 10^{-3} 倍后几乎不能生长(如图 6)。

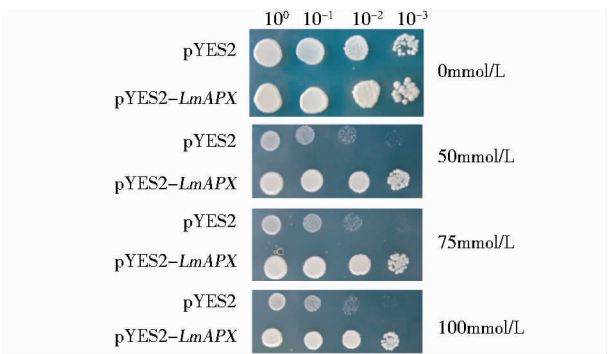


图 6 过量表达 *LmAPX* 基因的酵母抗 NaCl 胁迫分析

Fig. 6 Growth of yeast overexpressing of *LmAPX* with different concentration of NaCl

3 讨 论

干旱、盐碱、低温、高温等逆境环境使植物体内活性氧累积,从而对细胞造成损伤。抗坏血酸过氧化物酶能够有效地清除植物体内的 H_2O_2 ,使植物免受氧化损伤^[15]。中华枸杞是一种重要的耐盐植物,是解决我国西北土壤盐渍化的先锋植物,具有极强的抗寒,耐旱,抗盐碱等特性,本研究将枸杞 *LmAPX* 基因成功转入 *E. coli* 中,对 *LmAPX* 蛋白进行最适温度和最适 pH 值测定后发现,*LmAPX* 表现出与前人报道的 *APX* 蛋白同工酶相似的最适温度特性^[16]。枸杞 *LmAPX* 蛋白的最适温度曲线也呈典型的钟形曲线,在 40 °C 时其活性最大,在 25 ~ 45 °C 之间,均达最高酶活的 70% 以上,说明该酶有更为广泛的温度适应范围,使作物更加适应恶劣的气候环境。低于 20 °C 或者高于 50 °C 其活力不足最大活力的 60%,在高于 45 °C 以后,*LmAPX* 蛋白的活力随着温度的升高呈现明显降低趋势,当温度达到 60 °C 时,酶活力仅为最高值的 15%。据前人报道显示,细胞质和叶绿体中 *APX* 同工酶最适 pH 值变化范围在 6.0 ~ 8.0 之间^[17]。本研究测定得知,当 pH 值为 3 时,酶活力几乎为 0,随着 pH 值升高,酶活力急剧上升,当 pH 值处于 4 ~ 7 之间时,酶活力均达最大活力的 80% 以上,这表明该酶有一个相对广泛的最适 pH 值范围,*LmAPX* 蛋白的最适 pH 值为 6.5,当 pH 值升至 9 时,酶活力仅达最大活力的 34%,由此可知,该酶更适宜在偏酸性的土壤中发挥更大的抗氧化作用。

对 *LmAPX* 进行酶动力学分析表明 *LmAPX* 具有不同的底物特异性,*LmAPX* 对 H_2O_2 和 AsA 的 K_m 值表明 *LmAPX* 对这些底物都具有相对较高的亲和力,这与毛白杨中所报道的内容一致^[17],而且,相对于 AsA, *LmAPX* 对 H_2O_2 具有更高的底物亲和力。

在半乳糖诱导下,过表达 *LmAPX* 基因的酵母菌落在 8 mmol/L H_2O_2 和不同梯度的盐浓度胁迫下表现出明显的抗氧化能力,说明其表达的酶催化 H_2O_2 还原为 H_2O ,从而使转基因酵母在含 H_2O_2 的培养基上生长良好,对组织和细胞起到了保护作用,这与朝鲜碱茅中所报道的内容相似^[18],体现了在氧化胁迫状态下抗坏血酸过氧化物酶作用。为进一步研究逆境诱导下抗坏血酸过氧化物酶的抗氧化胁迫机理奠定了基础。如用于培育具有抗盐碱性的大田粮食作物新品系,在开发盐碱地上得以应用,将具有重大的科学意义和经济价值。

参考文献

- [1] Zhao C Y, Wang Y C, Song Y D, et al. Biological drainage characteristics of alkalized desert soils in north-western China. *Journal of Arid environments*, 2004, 56(1): 1-9.
- [2] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, et al. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science*, 2004, 9(10): 490-498.
- [3] Wu G X, Wang G, Ji J, et al. Cloning of a cytosolic ascorbate peroxidase gene from *Lycium chinense* Mill. and enhanced salt tolerance by overexpressing in tobacco. *Gene*, 2014, 543(1): 85-92.
- [4] Ashraf M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(1): 84-93.
- [5] Marcia C P, Mariana B O, Pedro L. Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Physiology*, 2001, 48(2): 63-71.
- [6] Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(372): 1305-1319.
- [7] 孙卫红,王伟青,孟庆伟. 植物抗坏血酸过氧化物酶的作用机制、酶学及分子特性. *植物生理学报*, 2005, 41(2): 143-147.
Sun W H, Wang W Q, Meng Q W. Functional mechanism and enzymatic and molecular characteristic of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Physiology Journal*, 2005, 41(2): 143-147.
- [8] 张维静,陆海,杜希华. 抗坏血酸过氧化物酶在植物抵抗氧化胁迫中的作用. *山东师范大学学报(自然科学版)*, 2008, 23(4): 113-115.
Zhang W J, Lu H, Du X H. The function of ascorbate peroxidases in plant resistance to oxidative stress. *Journal of ShanDong Normal University (Natural Science)*, 2008, 23(4): 113-115.
- [9] 杜秀敏,殷文璇,赵彦修,等. 植物中活性氧的产生及清除机制. *生物工程学报*, 2001, 17(2): 121-125.
Du X M, Yin W X, Zhao Y X, et al. The production and Scavenging of reactive oxygen species in plants. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, 17(2): 121-125.
- [10] Mittler R, Zilinskas B A. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase, *FEBS Lett.*, 1991, 289(2): 257-259.
- [11] Yoo T H, Park C J, Lee G L, et al. A hot pepper cDNA encoding ascorbate peroxidase is induced during the incompatible interaction with virus and bacteria. *Molecular Cell*, 2002, 14(1): 75-84.

- [12] Lin L, Wang X P, Wang Y J. cDNA clone, fusion expression and purification of the novel gene related to ascorbate peroxidase from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* in *E. coli*. *Molecular Biology Rep.* 2006, 33(3): 197-206.
- [13] Yoshimura K, Ishikawa T, Nakamura Y, et al. Comparative study on recombinant chloroplastic and cytosolic ascorbate peroxidase isozymes of spinach. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998, 353(1): 55-63.
- [14] Nishikawa F, Kata M, Wang R, et al. Two ascorbate peroxidases from broccoli: identification, expression and characterization of their recombinant proteins *Postharv. Biol. Technol.* 2003, 27(2): 147-156.
- [15] Li H B, Qin Y M, Pang Y, et al. A cotton ascorbate peroxidase is involved in hydrogen peroxide homeostasis during fibre cell development. *New Phytologist*, 2007, 175(3): 462-471.
- [16] Kazuyoshi O, Satoshi M, Hidenori Tanaka, et al. Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulan* var. *melanigenum* and sequence analysis of the encoding gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 92(3): 262-270.
- [17] Lu H, Han R L, Jiang X N. Heterologous expression and characterization of a proxidomal ascorbate peroxidase from *Populus tomentosa*. *Molecular biology reports*, 2009, 36(1): 21-27.
- [18] 管清杰, 李琳, 高野哲夫, 等. 朝鲜碱茅抗坏血酸过氧化物酶的基因克隆和表达. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(4): 631-629.
- Guan Q J, Li L, Tetsuo T, et al. Cloning of an ascorbate peroxidase gene from *puccinellia tenuiflora* and its expression analysis. *Genomics and Applied Biology*, 2009, 28(4): 631-639.

Expression Studies of Ascorbate Peroxidase from *Lycium chinense* Mill. in *E. coli* and Yeast

GAO Hai-ling¹ JI Jing¹ WANG Gang¹ WU Guang-xia² RONG Fei¹ GUAN Chun-feng¹ JIN Chao¹

(1 School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

(2 School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract Objective: The aim of the study is to investigate the expression and enzymatic properties in *E. coli* and oxidation resistance in yeast of ascorbate peroxidase (*LmAPX*) cloned from *Lycium chinense* Mill., which will provide the theory foundation of antioxidant stress for future studying. Method: *LmAPX* was transformed into heterologous expression system *E. coli* BL21 and wild type yeast strain W303. The recombinant protein was purified by Ni^{2+} affinity chromatography and the enzyme activities at different temperature and pH were detected. The enzyme kinetics constant K_m and V_{max} were calculated by double-reciprocal plot. Results: The results showed that the optimal pH and temperature for this enzyme were 6.5 and 40 °C, respectively. At fixed concentration of AsA, the K_m and V_{max} values of the enzyme for H_2O_2 were 0.17 ± 0.02 mmol/L and 11.78 ± 1.88 mmol/min · mg. And at fixed concentration of H_2O_2 , the K_m and V_{max} values for AsA were 2.19 ± 0.40 mmol/L and 58.82 ± 3.51 mmol/min · mg. Transgenic yeast strain transformed with *LmAPX* gene showed higher stress resistance than the control in the medium containing 8 mmol/L H_2O_2 or 100 mmol/L NaCl under the inducement of β -galactose. Conclusion: *LmAPX* enhanced the tolerance to oxidative stresses.

Key words *Lycium chinense* Mill. Ascorbate peroxidase Enzymatic analysis Oxidative stress