

# Shewanella haliotis BP-1 海藻酸裂解酶基因的克隆表达\*

## Gene Cloning and Expression of Alginate Lyase from Shewanella haliotis BP-1

黄桂媛<sup>1</sup>,温顺华<sup>2</sup>,李 锋<sup>3</sup>,卢明倩<sup>1</sup>,王巧贞<sup>1</sup>,廖 威<sup>4</sup>,黄庶识<sup>1\*\*</sup>

HUANG Guiyuan<sup>1</sup>, WEN Shunhua<sup>2</sup>, LI Feng<sup>3</sup>, LU Mingqian<sup>1</sup>, WANG Qiaozhen<sup>1</sup>, LIAO Wei<sup>4</sup>, HUANG Shushi<sup>1</sup>

(1. 广西科学院生物物理实验室,广西南宁 530007;2. 厦门万泰凯瑞生物技术有限公司,福建厦门 361003;3. 黔南州民族师范学院化学化工学院,贵州都匀 558000;4. 广西职业技术学院,广西南宁 530226)

(1. Lab of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Xiamen Innodx Biotech Co. Ltd., Xiamen, Fujian, 361003, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Qiannan Normal College for Nationalities, Duyun, Guizhou, 558000, China; 4. Guangxi Vocational and Technical College, Nanning, Guangxi, 530226, China)

**摘要:**【目的】了解海洋细菌 *Shewanella haliotis* BP-1 中海藻酸裂解酶降解海藻酸钠的生物活性。【方法】应用基因克隆和大肠杆菌异源表达技术,过量表达海藻酸裂解酶,将粗酶液通过 DEAE Sepharose FF 柱分离纯化后检测其酶活性。【结果】从 *S. haliotis* BP-1 菌株的基因组 DNA 中克隆得到一个大小为 2 157 bp 的海藻酸裂解酶基因 *Alg17S*,该基因编码的海藻酸裂解酶 Alg17S 属于 PL17 家族的蛋白,大小为 79 726 Da,其中包括 N 端 26 个氨基酸的信号肽,与 *Saccharophagus degradans* 2-40 菌株产生的海藻酸裂解酶 Alg17C 具有高度同源性,相似性为 52%。经纯化后获得的重组酶 Alg17S 和  $\Delta$ snAlg17S(N 端不含 26 个氨基酸的信号肽)均具有降解海藻酸钠的活性,但  $\Delta$ snAlg17S 对海藻酸钠的催化活性比 Alg17S 高,其酶比活力高达 9 635 U/mg。【结论】重组海藻酸裂解酶  $\Delta$ snAlg17S 兼具高表达水平及高酶活性,是进一步研究海藻酸盐糖化和生物燃料生产的潜在的优势酶。

**关键词:**海藻酸裂解酶 克隆表达 酶活性测定 *Shewanella haliotis* BP-1

**中图分类号:**Q74 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2016)03-0228-06

**Abstract:**【Objective】Alginate lyase in *Shewanella haliotis* BP-1 strains was studied illustrate its biological activity of degrading alginate. 【Methods】The gene cloning technology and the *Escherichia coli* heterologous expression technology were applied to overexpress the alginate

lyase; And the enzyme activity was analyzed after the crude enzyme was separated and purified by DEAE Sepharose FF chromatography. 【Results】The alginate lyase gene *Alg17S*, with a size of 2 157 bp, was cloned from *S. haliotis* BP-1 strain genomic DNA and encoded an alginate lyase Alg17S, which belonged to polysaccharide lyase(PL)17 family and had a size of 79 726 Da protein(including an N-terminal signal peptide of 26 amino acid signal peptide). Alg17S showed high sequence identity of 52% with PL-

收稿日期:2016-04-28

修回日期:2016-06-17

作者简介:黄桂媛(1986—),女,研究实习员,主要从事分子生物学技术研究。

\* 国家自然科学基金项目(31560017),广西自然科学基金项目(2014GXNSFDA118012)和贵州省教育厅自然科学研究重点项目(黔教合 KY[2014]286)资助。

\*\* 通讯作者:黄庶识(1964—),男,研究员,主要从事应用微生物学分子光谱研究,E-mail:hshushi@gxas.cn.

17 protein sequence Alg17C from *Saccharophagus degradans* 2-40. Both the purified recombinase Alg17S and the  $\Delta$ snAlg17S(without the N-terminal signal peptide of 26 amino acids) can degrade alginate, but the enzymatic activity of  $\Delta$ snAlg17S revealed a specific activity of 9 635 U/mg, which was more efficient than Alg17S. **【Conclusion】**The recombinant alginate lyase  $\Delta$ snAlg17S that has both high-level expression and high enzymatic activity could be a potential enzyme for further researching on the alginate saccharification and the biofuels production.

**Key words:** alginate lyase, cloning and expression, enzyme activity determination, *Shewanella haliotis* BP-1

## 0 引言

**【研究意义】**海藻酸具有在水介质中形成粘性溶液和凝胶的能力以及对生物无毒性的特点,在医药、化妆品、食品和生物技术等行业得到广泛应用<sup>[1]</sup>。同时海藻酸的降解产物褐藻寡糖具有广泛的生物活性,如促进植物生长、缓解植物非生物胁迫、抗肿瘤、抑菌、抗凝血、降血糖血脂、抗自由基氧化、抗炎症、免疫调节活性等作用,在绿色农业、医药保健、食品、日用化工等领域具有广阔的前景<sup>[2]</sup>。**【前人研究进展】**目前已有许多关于产海藻酸裂解酶细菌的报道,例如 *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp., *Alteromonas* sp., *Vibrio* sp., *Sphingomonas* sp., *Flavobacterium* sp. 等<sup>[3]</sup>。大多数细菌海藻酸裂解酶通常是分泌到细胞周质间隙或培养基即细胞外降解海藻酸的,但也有部分如 *Sphingomonas* sp. A1 菌株对海藻酸的降解作用发生在细胞质中,菌株 A1 在 ABC 转运蛋白的协作下将高分子海藻酸摄入细胞质中,然后进一步分解<sup>[3-7]</sup>。另外,在 Carbohydrate-Active enZymes(CAZY)数据库中登记的细菌海藻酸裂解酶基因已经超过 500 个<sup>[8]</sup>。1993 年,Boyd 等<sup>[9]</sup>首次克隆了假单胞菌(*Pseudomonas alginovora*)海藻酸裂解酶编码基因 *algL*,并在大肠杆菌中成功表达,粗酶比活力为 146 U/mg,是原始野生菌株的 2.5 倍;Uchimura 等<sup>[10]</sup>从 *Vibrio* sp. JAM-Aam 菌株中克隆得到海藻酸裂解酶编码基因 *A9mT*,并使其在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中分泌表达,从发酵液中分离纯化得到 A9mT 蛋白酶的生物活性高达 1 401 U/mg;Li 等<sup>[11]</sup>从 *Agarivorans* sp. L11 菌株中克隆到一个新的编码海藻酸裂解酶基因 *AlyL1*,该基因在大肠杆菌中的重组表达蛋白 AlyL1 具有高的生物催化活性,比活力为 1 370 U/mg。目前,已经有 20 多种海藻酸分解菌的海藻酸裂解酶基因被克隆,其中大部分基因已成功地进行了异源表达<sup>[12]</sup>。**【本研究切入点】**本实验室从北部湾海域分离筛选出一株 *Shewanella haliotis* BP-1 菌株(菌株 BP-1),在该菌株的发酵液中分离纯化得到 1 种酶,该酶经基本的酶学性质分

析,确定是外分泌的海藻酸裂解酶,分子量约为 70 kDa,同时具有降解 poly(M)和 poly(G)的活性,酶的比活力高达 40 420 U/mg(文献[13])。本研究在菌株 BP-1 的基因组注释结果中找出一个可能编码海藻酸裂解酶的基因 *Alg17S*,并对其进行克隆表达以及重组酶的活性检测。**【拟解决的关键问题】**验证重组酶 Alg17S 具有降解海藻酸的生物活性,为阐明 BP-1 菌株利用海藻酸钠的代谢途径提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

海洋细菌菌株 *Shewanella haliotis* BP-1 从广西北海涠州岛采集到的腐烂马尾藻中筛选获得;实验所使用的细菌表达载体 pET-11d、pET-27b 购自上海捷瑞生物工程有限公司;pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 Trans5 $\alpha$ 、BL21(DE3)购自北京全式金生物技术有限公司。

### 1.2 酶与试剂

DNA 聚合酶、DNA 连接试剂盒购自 TaKaRa 公司;限制性内切酶购自 NEB 公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒均购自博日科技(Bioflux)公司;海藻酸钠为阿拉丁<sup>®</sup>(Aladdin<sup>®</sup>)品牌试剂,其它试剂均为国产或进口分析纯试剂;所得样品送往 TaKaRa 公司测序。

### 1.3 培养基和抗生素

LB 液体培养基(W/V):1% Tryptone、0.5% Yeast Extract 和 1% NaCl。抗生素氨苄青霉素(Ampicillin, Amp),贮液浓度 100 mg/mL,终浓度 50  $\mu$ g/mL;抗生素卡那霉素(Kanamycin, Ka),贮液浓度 50 mg/mL,终浓度 25  $\mu$ g/mL;异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)贮液浓度 100 mmol/L,终浓度 0.4 mmol/L。配制 LB 固体培养基时加入 1.5% (W/V)的琼脂,抗生素则为液体培养基使用浓度的两倍。

### 1.4 引物设计

根据菌株 BP-1 全基因组注释结果中可能编码海藻酸裂解酶基因的核酸序列,利用 PrimerPremier

5.0 软件设计两对 PCR 引物, *Alg17S*-F 和 *Alg17S*-R 用于扩增海藻酸裂解酶完整的基因编码序列,  $\Delta snAlg17S$ -F 和  $\Delta snAlg17S$ -R 用于扩增不含信号肽的海藻酸裂解酶的基因编码序列。设计引物时分别在上游引物的 5' 端添加 *Bsp*HI 酶切位点, 下游引物的 5' 端添加 *Bam*HI 酶切位点, 引物序列如下, 酶切位点用下划线标出。

*Alg17S*-F: 5'-GCGAC TCATGAAAATACGATC-CT-3'

*Alg17S*-R: 5'-CG GGATCCGAATGTTTCAGTCTT-3'

$\Delta snAlg17S$ -F: 5'-GTTCA TCATGAGCCCGTCA-CTG-3'

$\Delta snAlg17S$ -R: 5'-CG GGATCCGAATGTTTCAGT-CTT-3'

### 1.5 基因组 DNA 的制备

菌株 BP-1 全基因组 DNA 的提取参照 BioSpin Bacteria Genomic DNA Extraction Kit 说明书。用 0.8% (W/V) 的琼脂糖凝胶检测基因组 DNA 的大小。基因组 DNA 的浓度和纯度用 Nanodrop 法检测。

### 1.6 海藻酸裂解酶基因的克隆与分析

以菌株 BP-1 基因组 DNA 为模板, 利用 Ex Taq DNA 聚合酶 PCR 扩增获得目的基因片段。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 54℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。海藻酸裂解酶基因的 PCR 产物经琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化后与 TA 克隆质粒 pMD18-T 连接, 转化大肠杆菌 Trans 5 $\alpha$  感受态细胞, 提取阳性克隆的质粒送测序。利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 数据库在线分析基因的开放阅读框; 使用软件 DNASIS MAX Trial V3.0 推导海藻酸裂解酶基因编码蛋白的氨基酸序列; 通过 SignalP-4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测分析海藻酸裂解酶的信号肽; 使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 工具计算蛋白质的理论分子质量和理论等电点; 依据蛋白质多序列比对的结果, 采用 MEGA 5.1 构建 *Alg17S* 蛋白的系统进化树。

### 1.7 海藻酸裂解酶基因的表达与纯化

将测序正确的重组质粒 pMD18-T-*Alg17S*, pMD18-T- $\Delta snAlg17S$  和细菌表达载体 pET-11d, pET-27b 分别进行 *Bsp*HI 和 *Bam*HI 酶切, 酶切产物回收、连接构建得到相应的重组质粒 pET-11d-*Alg17S*, pET-27b- $\Delta snAlg17S$ 。阳性克隆子

送 TaKaRa 公司测序。

将测序正确的重组质粒 pET-11d-*Alg17S*, pET-27b- $\Delta snAlg17S$  转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 挑取阳性转化子接种至 10 mL 含相应抗生素的 LB 液体培养基中, 37℃、200 r/min 摇床震荡培养至  $OD_{600}$  为 0.6~0.8。按接种量为 1% (V/V) 将菌液接种至 100 mL 加有相应抗生素的 LB 液体培养基中, 37℃、200 r/min 摇床震荡培养至  $OD_{600}$  为 0.8, 向菌液中加入 0.4 mL 100 mmol/L 的 IPTG 使其终浓度为 0.4 mmol/L, 并将菌液转入 20℃、200 r/min 摇床诱导培养 24 h。

蛋白分离纯化实验均在 4℃ 下进行。将 100 mL 诱导菌液 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 使用 20 mmol/L, pH 值 7.5 的磷酸缓冲液重悬后超声波细胞粉碎机裂解菌体; 裂解的菌液经 8 000 r/min, 离心 30 min 后收集的上清液, 即海藻酶裂解酶的粗酶液。蛋白粗酶液依次经过 DEAE Sepharose FF 柱 (上海楷洋) 和蛋白质截留分子量为 10 kDa 的超滤离心管 (Millipore) 进行分离纯化与浓缩。12% SDS-PAGE 电泳分析蛋白纯化结果, Bradford 方法<sup>[14]</sup> 检测纯化的蛋白质浓度。

### 1.8 海藻酸裂解酶活力定性测定

将获得的海藻酸裂解酶粗酶液点种于含 0.2% (W/V) 海藻酸钠的 LB 固体培养基上, 37℃ 放置 30 min, 最后使用 10% (W/V) 氯代十六烷吡啶染色, 观察重组酶 *Alg17S*,  $\Delta snAlg17S$  水解海藻酸钠透明圈产生的情况, 同时以含有空载体的 pET-11d/BL21 (DE3) 和 pET-27b/BL21 (DE3) 重组菌作为阴性对照。

### 1.9 海藻酸裂解酶活力定量测定

酶活性的测定参照 Preiss 方法<sup>[15]</sup>。取 0.1% (W/V) 的海藻酸钠溶液 (0.1 g 海藻酸钠溶于 100 mL, pH 值 7.5, 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液) 2 mL, 加入 0.5 mL 酶液, 37℃ 水浴 30 min 后, 沸水浴 5 min 终止反应, 冷却至室温后测定反应体系在 235 nm 处的光吸收值。在此条件下, 每分钟光吸收值增加 0.001 定义为一个酶活力单位 (U)。

## 2 结果与分析

### 2.1 编码海藻酸裂解酶基因序列分析与克隆

菌株 BP-1 全基因组中仅存在一个可能编码海藻酸裂解酶的基因 *Alg17S*, 核酸序列见图 1。分析结果显示, 该基因包含一个大小为 2 157 bp 的开放阅读框, 编码含 718 个氨基酸残基的蛋白质海藻酸裂解酶 *Alg17S*, 其理论分子量和理论等电点 (pI) 分别

1 ATGAAAATAGATCTTATATAGCTCAGGCTTTGGTTGTTATTGTTCTTCTGCTGGTGGTGGT  
 M K I R S Y T A Q A F G V F V L L L G G  
 61 TTGAGTGCCTGCGGAGCGGCCCTCAGCTGGTCTGCTCAGTGGCGATGATAGCGGCTGCTG  
 L S A A A E R P S L V L S G D D I A V L  
 121 GCGCAGGCGCAGTGGCGGACTGCTTGGCTGGTGGCGGAAACCGCAACTGGCTGAT  
 R Q A S G G L L E Q S L R A N R Q L A D  
 181 GAGGCTTTGGCTGAAGGTTATGTTGCTTCCGCGCCGAAAGATGCGGGGCGGCTTATTAAC  
 E A L A E G I V P P W P K D A G G Y T  
 241 CAOGAGCAACATAGGCGAATTATAAGCCATGATGTCGGCCGCGTGGCAATATCAGTGTG  
 H E Q H K R N Y K A M Y A A A L Q Y Y Q L  
 301 AGCGGCGATACCGCTATAGCGATTATGTTGGTCAAGCACTTGAAGCTTATGCGGATATG  
 S G D T R Y S D Y V V K T L E A Y A D M  
 361 TATCTCAGCTTGGTTTGCATCGGAAAAAAGAGCAACCCCGGGCAAGTATTCTGG  
 Y P Q L G L H P E K K E Q T P G K L F W  
 421 CAAGGCTGAATGAAGCGCTTGGCTGGTGTACACCGAGCGAGGCTTACGATATGGTGGG  
 Q S L N E A V W L V Y T S Q A Y D M V G  
 481 GAAGCGTTAAGCAGAAGCGCAAAACCGAATATACAAAACAACCTTTTATTTCCGGTAGCG  
 E I L T E A Q N R N I Q N N L L F P V A  
 541 GACTAOCCTGTGAAAGGCGAGCGAGACTTGTGATAGAGTTTCAACACCGAGTACTGCG  
 D Y L S K G Q P Q T F D K I H N H G T W  
 601 GCGGTGGCGCGGCTGGAAAGTGGTGGTTATGCGCACAGAGCGTAAAGATTATGTTGGAGCAG  
 A V A A V G M V G Y A T E R K D Y V E Q  
 661 GCITTACTCGCTGCGATTGAGTGGAAACTCGCGTTTITATAGCAGCTGATATGCTG  
 A L L G L D L S G N S T F Y F Y K Q L D M L  
 721 TTCTCTCCGAGCGTTATTAACAAGGAAAGGCGCTTATACAGCGCTATGCACTTATGCGC  
 F S P D G Y Y T E G P Y Y Q R Y A L M P  
 781 TTGTGTTGGTGGCGAAGGCGATTCAGCAATGATGCGGCAAGGCTATTTTGAATAT  
 F V W F A K A I Q T I N D P D K A I F E Y  
 841 GGTGATGGCATTITATTAAGGCGATCAAAAACAGCGGTAGAGCTCAGCTATAAGCGACTC  
 R D G I L L K A I K T I V E L S Y N G L  
 901 TTTTGGCTTATTAATGACCGCATTAAGATAAAGCATTAAGAAACGCAAGAGCTGGTTCAG  
 F L P I N D A I K D K G I K T E E L V Q  
 961 GCGCTGGCGATTGCGTATGAAATGACATCGATAAAGCCTTAAGCGATATAGCCCGCA  
 A L A I A Y E M T S D K S L S D I A R Q  
 1021 CAGGGAAAGGTTAGTCTGAGCTCTGGTGGTGTGGCTTGTGCGATCTGATGCGCAGCAAT  
 Q G R V S L S S G G V A L S D L I A S N  
 1081 TCTGTGGAGGCCATCCCTTATAGCTCAGACTTATATGCGATGTCGGAGGGGTGCTCAG  
 S V E P Y P Y S S R L Y R D G A R G G Q  
 1141 GCGCAGCTGCGTTGATCGTTCGGCGGATAAAGCAACAGCAACTCTGCTGCGTAAAG  
 G A L A L M R S G D N E T G T L V V A K  
 1201 AACACCGACCGAGGGATGGCGCATGCTACTATGATGCTTTAAGCTGCTGTTTATGAC  
 N T S Q G M G H G H Y D R L S W L F Y D  
 1261 AATGGCAATGAGTTGTCAGCGATTATGCGCGGCAAGTACCTTAATGTAGAACCAAA  
 N G N E V V T D Y G A A R Y L N V E A K  
 1321 TATGGCGCCACTACTTACCGGAAAACAAAGCTGGGCAAAACAACGTAGCCCAACAT  
 Y G G H Y L P E N N S W A K Q T V A H N  
 1381 ACOCTGGTAGTGGATCAGAAAAGTCAGTTTCAGGGCGACTTAAACTGGCGAATGATGTT  
 T L V V D Q K S Q F K L L A N D R  
 1441 CCAGCGAAGCAGGTGGCTTTTCTCAGCAATGCTGTCGCGGATATATGATTTGGCAGGATC  
 P A E Q V A F L Q N A L A D I S I G R I  
 1501 GACAAGCGCTTACAGCAGAGTTGACTATAGTGGCTTGGCTGGCTTGGTAAACACAGAGTGG  
 D N A Y D G V D Y S R V L A L V K P E S  
 1561 GTTGGCCTTTTGGTATGATGATGTTGTAATGTTAAGTCGCGTGAACACATCAGTACGAT  
 V E P F V I D V V I V K S G D E H Q Y D  
 1621 TTGCGCTGCACTTTAAAGGCGAGGTCATAGATCAACAACCTTGTATGCTTCAAGGCTTT  
 L P L H F N G Q V I D H N L S S F K A F  
 1681 AATACTGGCATGCAATGGTAAAGGAGTGGCTATCAGCATATGCTATTGCGAAGTCAG  
 N T W H A M G K G S Q Y Q H M L L R S Q  
 1741 GAAAATAATGACCGCCCAATAGCGCTTAACTGGCTGGTGGTAAATGCTTTTATTCI  
 G N N A P A N N R L T W L L G N R F Y S  
 1801 TATACTATGTTATCAGGCGAGATCTGACGATTAGCACAGGACTATTTTCCAGTTG  
 Y T Y G Y Q A D T D D L A Q T L F F Q L  
 1861 GGGGCAATGATCCAAATCATAACTTTCGCGGTGATAGGGTGTAAATAGTGGCTGGTGGC  
 G A N D P N H N L R R D Q G V I R R L R  
 1921 GCGCGCAATGCGGTTATGATTCCTGAGTGGAGCCCATGAGAGTACAGCGGACCGCT  
 A R N A V M Y S V V E P H G E Y N G T A  
 1981 GAATATGTAAGAAATGCTACAGTGGGTTAAGTCACTGGATTAACGCGGCGCAAGTATC  
 E Y V K N A Y S R V K S L D Y R A K N S  
 2041 GGTGCTGAAAGTACCGTAAATATGGAGAGTGGGATTTATTCGCGTACTGCTGACCGCT  
 G A E V T V N M G D A G I Y R L I L T A  
 2101 GAGGAAATGAGAAACCTCGCGAGCGCAAGGTTAATAAGTCAATAAAGACTGA 2157  
 E E D G E T P A T A K V I K V N K D \*\*\*

Y为Alg17S假定的催化位点;H、D为假定的底物相互作用位点  
 Y indicates the proposed catalytic sites; H and D substrate interacting sites for Alg17S

图1 S. haliotis BP-1 海藻酸裂解酶基因的核酸序列和推导的氨基酸序列  
 Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the alginate lyase gene from S. haliotis BP-1

为 79 726 Da 和 5. 72, 其中 N 端信号肽大小为 26 个氨基酸(图 1 下划线标出)。在 CAZY 数据库中,海藻酸裂解酶被归入多糖裂解酶 (polysaccharide lyase, PL) 蛋白家族<sup>[16]</sup>。NCBI 在线分析蛋白质保守结构域发现, Alg17S 蛋白与其他 PL-17 家族的蛋白一样存在两个保守的蛋白结构域: 一个是蛋白质 N 端的海藻酸裂解酶超级家族结构域; 一个是蛋白质 C 端的肝素酶 (heparinas) II / III 家族蛋白域<sup>[17]</sup>。同时, 蛋白质多序列比对分析表明 Alg17S 蛋白存在 PL17 家族蛋白保守的 2 个可能的催化位点 Y235 和 Y445 (络氨酸 Try, Y) 和 3 个底物相互作用位点 D420 (天冬氨酸 Asp, D)、H410 和 H459 (组氨酸 His, H)<sup>[17]</sup>。如图 2 所示, Alg17S 与 S. degradans 2-40 的海藻酸裂解酶 Alg17C 的进化距离最近, 氨基酸序列的相似性为 52%。

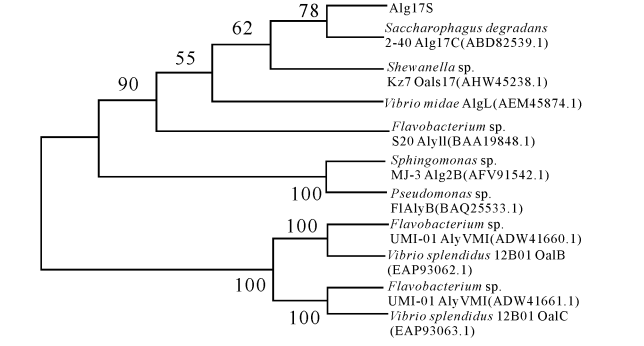


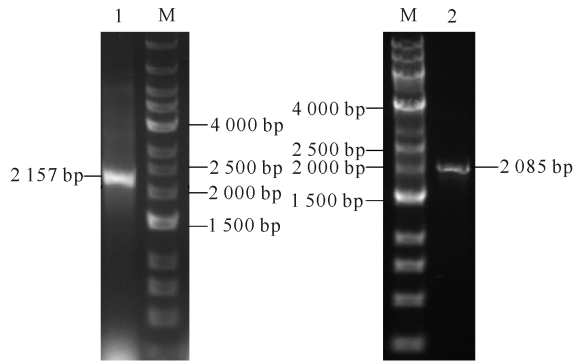
图2 Alg17S 与其它 PL17 家族蛋白的系统进化树  
 Fig. 2 Phylogenetic tree of Alg17S and other PL17 family

以菌株 BP-1 的基因组 DNA 为模板, 使用引物 Alg17S - F/Alg17S - R 和  $\Delta snAlg17S$  - F/ $\Delta snAlg17S$  - R 进行 PCR 扩增, 分别得到大小为 2 157 bp 和 2 085 bp 的 DNA 片段 (图 3)。TA 克隆、测序结果表明, Alg17S 核酸序列和  $\Delta snAlg17S$  核酸序列分别与全基因组中可能编码海藻酸裂解酶的核酸序列和去掉信号肽的海藻酸裂解酶的序列相似性均为 100%。

## 2.2 海藻酸裂解酶基因表达及酶活性的定性测定

成功构建的重组质粒 pET-11d - Alg17S 和 pET-27b -  $\Delta snAlg17S$  在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达并获得海藻酸裂解酶粗酶液, 该酶的大小约为 70 kDa, 与温顺华<sup>[13]</sup>从原始菌株 BP-1 中分离纯化得到的海藻酸裂解酶的大小相近。如图 4a~b 所示, 重组菌 pET-11d - Alg17S/BL21 (DE3) 和 pET-27b -  $\Delta snAlg17S$ /BL21 (DE3) 的粗酶液在含海藻酸钠的 LB 固体平板上都可以产生透明圈, 说明 BP-1 菌株的海藻酸裂解酶无论有无信号肽都可以成功表达具有活性的蛋白酶; 但是  $\Delta snAlg17S$  蛋白水解海藻酸钠形成的透明圈亮度明显要比 Alg17S 的亮, 这可能是前

者重组酶的比活力要比后者高得多。同时 pET-11d/BL21(DE3)(图 4c)和 pET-27b/BL21(DE3)(图 4d)阴性对照组均没有透明圈生成。

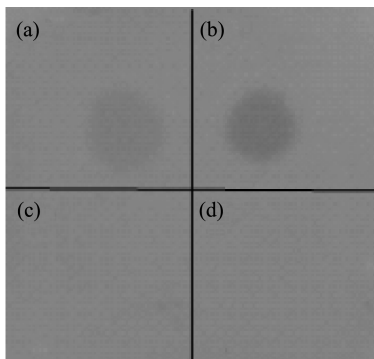


1: 含信号肽的海藻酸裂解酶基因的 PCR 产物; 2: 不含信号肽的海藻酸裂解酶基因的 PCR 产物; M: 1 kb DNA ladder

1: The PCR products of alginate lyase gene containing signal peptide; 2: Alginate lyase gene PCR products without the signal peptide; M: 1 kb DNA ladder

图 3 菌株 BP-1 海藻酸裂解酶基因 PCR 产物

Fig. 3 The alginate lyase gene PCR products from BP-1 strain



(a) pET-11d-*Alg17S*/BL21(DE3); (b) pET-27b- $\Delta$ *snAlg17S*/BL21(DE3); (c) pET-11d/BL21(DE3); (d) pET-27b/BL21(DE3)

图 4 重组菌产海藻酸裂解酶活性的定性测定

Fig. 4 Detection of alginate lyase activities of recombinant strain

### 2.3 海藻酸裂解酶的纯化及酶活力的定量测定

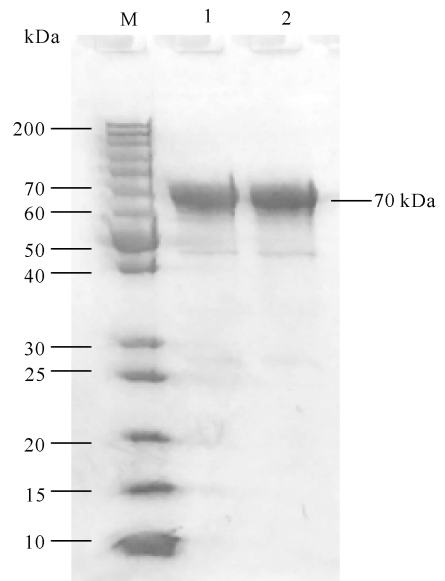
如图 5 所示, 纯化的蛋白酶分子量与从 *S.*

表 1 纯化的重组酶 *Alg17S* 和  $\Delta$ *snAlg17S* 的活性定量测定

Table 1 The activity quantitative determination of purified recombinant enzyme *Alg17S* and  $\Delta$  *snAlg17S*

项目 Item	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total activity (U)	比活力 Specific activity (U/mg)	产量 Yield (%)	纯化倍数 Purification (Fold)
<i>Alg17S</i> 粗酶液 Crude enzymes of <i>Alg17S</i>	36.9	10 670	289	100.0	1.0
纯化的 <i>Alg17S</i> Purification of <i>Alg17S</i>	0.2	412	2 060	3.9	7.1
$\Delta$ <i>snAlg17S</i> 粗酶液 Crude enzymes of $\Delta$ <i>snAlg17S</i>	57.7	18 331	318	100.0	1.0
纯化的 $\Delta$ <i>snAlg17S</i> Purification of $\Delta$ <i>snAlg17S</i>	0.2	1 921	9 635	10.5	30.3

*haliotis* BP-1 菌株中分离纯化得到的酶蛋白一样约为 70 kDa。由表 1 可见, 不含信号肽的海藻酸裂解酶  $\Delta$ *snAlg17S* 活性要比含信号肽的 *Alg17S* 高, 或许信号肽的存在影响了蛋白酶的高级结构从而影响了酶对底物的结合催化活性。  $\Delta$ *snAlg17S* 纯蛋白比初始粗酶液纯化了 30.3 倍, 酶的比活力高达 9 635 U/mg, 约为 *Alg17S* 的 4.7 倍, 但是无论是  $\Delta$ *snAlg17S* 还是 *Alg17S*, 它们对海藻酸钠降解的最大酶比活力都远远高于 *Agrobacterium tumefaciens* C58 的 AtU3025 (20.5 U/mg)、 *Sphingomonas* sp. A1 的 A1-IV (17.2 U/mg) 和 *Pseudomonas* sp. QD3 的海藻酸裂解酶 (173.4 U/mg)<sup>[18-19]</sup>, 这些结果表明菌株 BP-1 的海藻酸裂解酶对海藻酸钠具有更高的亲和力与更有效的水解能力。



M: molecular weight markers; 1: purified *Alg17S*; 2: purified  $\Delta$ *snAlg17S*

图 5 重组酶 *Alg17S*、 $\Delta$ *snAlg17S* 的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 5 SDS-PAGE of *Alg17S* and  $\Delta$ *snAlg17S*

### 3 结论

从海洋细菌菌株 *S. haliotis* BP-1 中成功克隆的目的基因 *Alg17S*、 $\Delta snAlg17S$  的核酸序列和从其全基因组注释结果中找出的可能编码海藻酸裂解酶的核酸序列相似性为 100%。海藻酸裂解酶归属于多糖裂解酶家族的 PL17 家族, 分子量为 79 726 Da。表达的海藻酸裂解酶重组蛋白 *Alg17S* 和  $\Delta snAlg17S$  可以有效的水解海藻酸钠, 且后者的水解能力明显高于前者。 $\Delta snAlg17S$  具有较高的海藻酸降解酶活性, 酶的比活力高达 9 635 U/mg, 约为 *Alg17S* 的 4.7 倍, 为进一步研究海藻酸盐糖化和生物燃料的生产奠定了基础。

#### 参考文献:

[1] HERNANDEZ-CARMONA G, MCHUGH D J, LOPEZ-GUTIERREZ F. Pilot plant scale extraction of laminates from *Macrocystis pyrifera* [J]. *Appl Phycol*, 2000, 11: 493-502.

[2] 刘航, 尹恒, 张运红, 等. 褐藻胶寡糖生物活性研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2012(S1): 201-204.

LIU H, YIN H, ZHANG Y H, et al. Research progress on biological activities of alginate oligosaccharides [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2012(S1): 201-204.

[3] WONG T Y, PRESTON L A, SCHILLER N L. Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 289-340.

[4] MURATA K, INOSE T, HISANO T, et al. Bacterial alginate lyase: Enzymology, genetics and application [J]. *Journal of Fermentation & Bioengineering*, 1993, 76 (93): 427-437.

[5] TOMOO S, MIWA O, YOSHIO E. Novel alginate lyases from marine bacterium *Alteromonas* sp. strain H-4 [J]. *Carbohydrate Research*, 1997, 304(1): 69-76.

[6] ZHEN Q Z, GUANG L Y, HUA S G, et al. Preparation and structure elucidation of alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase from *Vibrio* sp. 510 [J]. *Carbohydrate Research*, 2004, 339(8): 1475-1481.

[7] HUANG L, ZHOU J, XIAO L, et al. Characterization of a new alginate lyase from newly isolated *Flavobacterium* sp. S20 [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2013, 40(1): 113-122.

[8] HENRISSAT B, COUTINHO P M, LEVASSEUR A, et al. CAZY Carbohydrate-Active Enzymes Database [EB/OL]. [2014-04-15]. <http://www.cazy.org>.

[9] SCHILLER N L, MONDAY S R, BOYD C M, et al. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* algi-

nate lyase gene (*algL*): Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(15): 4780-4789.

[10] UCHIMURA K, MIYAZAKI M, NOGI Y, et al. Cloning and sequencing of alginate lyase genes from deep-sea strains of *Vibrio* and *Agarivorans* and characterization of a new *Vibrio* enzyme [J]. *Marine Biotechnology*, 2010, 12(5): 526-533.

[11] LI S, YANG X, ZHANG L, et al. Cloning, expression, and characterization of a cold-adapted and surfactant-stable alginate lyase from marine bacterium *Agarivorans* sp. L11 [J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2015, 25(5): 681-686.

[12] 李锋, 温顺华, 黄庶冰, 等. 响应面法优化海带酸水解预处理工艺 [J]. *可再生能源*, 2012, 30(11): 93-103.

LI F, WEN S H, HUANG S B, et al. Optimized pretreatment process of acid hydrolysis *Laminaria japonica* by response surface methodology [J]. *Renewable Energy Resources*, 2012, 30(11): 93-103.

[13] 温顺华. 褐藻糖化预处理过程中褐藻胶裂解酶的作用研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2013.

WEN S H. Study on Saccharification of Brown Algae by Alginate Lyase [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2013.

[14] BRADFORD M M. A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(S1/S2): 248-254.

[15] PREISS J, ASHWELL G. Alginic acid metabolism in bacteria. I. Enzymatic formation of unsaturated oligosaccharides and 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237 (2): 309-316.

[16] CANTAREL B L, COUTINHO P M, RANCUREE C, et al. The carbohydrate - active enzymes database (CAZY): An expert resource for glycogenomics [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(suppl 1): 233-238.

[17] WANG L, LI S, YU W, et al. Cloning, overexpression and characterization of a new oligoalginate lyase from a marine bacterium, *Shewanella* sp. [J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 37(3): 665-671.

[18] PARK H H, KAM N, LEE E Y, et al. Cloning and characterization of a novel oligoalginate lyase from a newly isolated bacterium *Sphingomonas* sp. MJ-3 [J]. *Marine Biotechnology*, 2012, 14(2): 189-202.

[19] SAKATOKU A, TANAKA D, NAKAMURA S. Purification and characterization of an alkaliphilic alginate lyase *AlgMytC* from *Saccharophagus* sp. *Myt-1* [J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2013, 23(6): 872-877.

(责任编辑: 竺利波)