

褐藻胶裂解酶基因在大肠杆菌中的表达及其酶学性质

汪立平, 刘玉佩, 孙晓红, 赵勇

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 作者从蜡样芽孢杆菌 F1-5-10 中提取 DNA, 通过 PCR 克隆得到褐藻胶裂解酶基因后, 将其构建到 pET-30a(+) 上并在大肠杆菌 BL21 菌株中进行高效诱导表达, 继而对纯化得到的褐藻胶裂解酶蛋白进行活性检测和酶学特性研究。实验结果表明: PCR 扩增出 1035 bp 大小的褐藻胶裂解酶基因 *algI* (GenBank 登录号: GU585575), SDS-PAGE 电泳结果显示出相对分子质量约为 45 000 的特异性蛋白质条带。表达条件优化实验结果表明 0.4 mmol/L 浓度的 IPTG 32 °C 诱导 4 h 重组蛋白的表达量最高, 约占菌体总蛋白质质量的 36%。测定褐藻胶裂解酶酶活性, 酶活力为 11.7 U/mg。酶学性质研究表明: ALGL 的酶活最适温度为 35 °C, 热稳定性较差, 最适 pH 值为 6.6, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对酶活有激活作用, ALGL 催化褐藻胶的 K_m 值为 1.89 mg/mL, $V_{\max}$ 为 15.01 U/mL。

关键词: 褐藻胶裂解酶; 蜡样芽孢杆菌; 原核表达

中图分类号: Q 78 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2012)02-189-06

Expression of Alginate lyase Gene in *E. coli* and Characterization of the Enzyme

WANG Li-ping, LIU Yu-pei, SUN Xiao-hong, ZHAO Yong

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The *algI* gene (GenBank accession number: GU585575) encoding alginate lyase (ALGL) from *Bacillus cereus* F1-5-10 was cloned into the vector pET-30a and expressed in *Escherichia coli* BL21 in this study. The optimum expression conditions of *algI* in *E. coli* was study and listed as follows; the concentration of IPTG 0.4 mmol/L, expression time 4 h, and expression temperature 32 °C. Under the optimum conditions, the activity of recombinant enzyme achieved at 11.7 U/mg. Then, the recombinant enzyme was purified and the characteristics were determined. It was found that (1) the molecular weight was approximately 45 000; (2) the optimum pH and temperature were 6.6 and 35 °C, respectively; (3) the activity was stimulated by 1.0 mmol/L Ca^{2+} and Mg^{2+} ; (4) the K_m and $V_{\max}$ values for alginate were 1.89 mg/mL and 15.01 U/mL, respectively.

Key words: alginate lyase, *Bacillus cereus*, prokaryotic expression

收稿日期: 2011-05-23

基金项目: 上海市教育委员会重点学科建设项目(J50704); 上海市科学技术委员会基金项目(09320503600)。

作者简介: 汪立平(1968-), 女, 湖南衡山人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事功能性寡糖、酿酒科学与技术的研究。

E-mail: lpwang@shou.edu.cn

近年来,随着对褐藻胶寡糖的生理活性和功能性不断研究,发现褐藻胶寡糖除具有溶解性强、稳定性高及安全无毒等理化特性,还具有抗病毒和抑菌活性^[1]等生理活性,广泛用于医药和特定保健品等领域。制备褐藻胶寡糖的重要途径是化学降解或酶解天然多糖,其中褐藻胶的酶解法,因具有反应条件易控制、底物特异性高等特点而成为主要研究方向。

大部分产酶的微生物生长条件特殊,产酶量低,分离困难,限制了这一产业的发展。随着基因工程的发展,将褐藻胶裂解酶的基因克隆到适于工业化生产的宿主细胞,获得高产量的褐藻胶裂解酶已经迫在眉睫。目前为止大约有 20 个来源于细菌的褐藻胶裂解酶基因成功克隆并测序^[2-4],这些重组酶大都只能作用于古罗糖醛酸和甘露糖醛酸其中的一种,有研究报道^[5]来源于芽孢杆菌的褐藻胶裂解酶对这两种多糖都能降解,而这可能成为褐藻胶寡糖工业用酶生产的重要有利条件。目前尚未见来源于芽孢杆菌的褐藻胶裂解酶基因克隆表达的研究报道。作者用 pET30a(+) 系统在大肠杆菌中高效表达来自蜡芽孢杆菌中褐藻胶裂解酶 *algI* 基因片段,对重组蛋白进行酶活分析,并对表达体系进行初步优化,对重组酶进行酶学性质分析研究,从而为工业化生产褐藻胶裂解酶打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 菌株 *Bacillus cereus* 由作者所在实验室分离鉴定并保存;克隆载体 pBS T II, 大肠杆菌 *Escherichia coli* TOP10, BL21: 购自天根公司;表达载体 pET-30a(+) 为作者所在实验保存。

1.1.2 酶和试剂 高保真酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III、T4DNA 连接酶、蛋白质低相对分子质量标准品: 购自宝生生物工程有限公司;DNA 回收试剂盒,凝胶回收试剂盒、X Gal、IPTG、Taq PCR MasterMix、DNA 相对分子质量标准品: 购自天根公司;甲叉双丙稀酰胺、Tris base、丙稀酰胺、考马斯亮蓝 G 250 等: 购自上海生工公司;引物由上海生工公司合成。

1.1.3 主要仪器设备 基因扩增仪: 杭州博日科技产品;凝胶成像系统: Bio-Rad 产品;冷冻离心机:

Beckman 产品;稳压稳流电泳仪: 北京市六一仪器厂产品;电热恒温水浴槽,漩涡混合器,全温振荡培养箱,紫外可见分光光度计: 均为常用设备。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计与基因克隆 根据 Genbank 中褐藻胶裂解酶的同源序列(CM000725.1), 按需要加入适宜的内切酶(*Bam*H I 和 *Hind* III) 位点, 设计出一对 PCR 引物: 上游引物: 5'-CGG-GATCCATGGAGGGAATAGAAATGAAAG-3', 下游引物: 5'-GCGAAGCTTTTAAATTTCTC-TACAACG-3'。以芽孢杆菌 DNA 为模板, 25 μ L 体系扩增 *algI* 基因片段。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 51 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min^[6-7]。将 PCR 扩增产物(1034 bp) 经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳、试剂盒切胶回收后与 pBS T II 克隆载体连接并转化感受态细胞 *E. coli* TOP10。

1.2.2 高效表达载体的构建 克隆得到的序列经过测序分析确定无误后, 选择正确的重组质粒进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后于同样酶切的表达载体 pET-30a(+) 连接, 转化大肠杆菌 BL21 菌株, 对阳性克隆进行酶切验证后确定正确的重组子。

1.2.3 目的基因的诱导表达与纯化 挑取含有重组表达质粒的单菌落过夜培养后按体积分数 2% 比例接种到 50 mL 含 100 μ g/mL 卡那霉素青霉素(Kan)的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 培养至 $A_{600\text{ nm}}$ 约为 0.8, 取 1 mL 培养物做未诱导对照, 剩余培养液添加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 6~8 h, 取 1 mL 细菌培养液在 10 000 r/min 下离心 15 min, 弃上清, 加入 100 μ L 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 煮沸 5 min, 取 10 μ L 样品进行 SDS-PAGE 分析。

将剩余菌液离心 15 min(4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min), 用 1/10 培养液体积的 1 $\times$ PBS(pH 7.4) 缓冲液重悬沉淀, 冰上进行超声波细胞破碎(超声波工作条件: 工作 2 s, 间歇 1 s, 重复超声 200 次, 功率 150 W)。超声破碎后离心 15 min(4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min), 收集上清液为表达蛋白质粗提液。在所得蛋白质粗提液中加入体积分数 50% Ni-NTA Agarose 1mL, 轻柔摇动混匀, 4 $^{\circ}$ C 结合 60 min 后, 将混合液装入纯化柱中, 除去柱下端封闭盖子, 先用缓冲液 A(50 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 8.0, 300 mmol/L

NaCl, 20 mmol/L 咪唑)洗去非特异性结合蛋白,然后用缓冲液 B(50 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑)洗脱特异性结合蛋白,对收集的溶液进行 SDS-PAGE 电泳检测以确定重组蛋白的最优纯化条件。

1.2.4 褐藻胶裂解酶基因的诱导表达条件优化

将重组菌接种于 LB 液体培养基,过夜培养后,按体积分数 2% 接种量转接入 50 mL LB 培养基中,当 $A_{600\text{ nm}}$ 约为 0.8 时,采用不同诱导物(IPTG)浓度(终浓度达 0.1~1.0 mmol/L)、不同诱导时间(0.5~10 h)、不同诱导温度进行表达(20~40 °C),分别收集重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.5 蛋白质含量的测定 用 Bradford 比色法测定蛋白质含量,试剂盒购于上海生工公司。

1.2.6 酶活性的初步鉴定 褐藻胶裂解酶酶活力测定参照 Preiss 方法^[6],取 0.9 mL 体积分数 1% 褐藻酸钠(pH=7.0, 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制),加入 0.1 mL 酶液,在 35 °C 下保温 30 min,用紫外分光光度计测量 235 nm 处的吸收值。在波长 235 nm 处光密度值,以每分钟光密度值增加 0.1 定义为一个酶活单位(U)。

1.2.7 酶学性质的研究

1) 重组蛋白最适催化 pH 值和 pH 稳定性测定 在 pH 缓冲体系中用褐藻胶为底物测定酶的最适反应 pH,将处于最适 pH 下的酶活力设为 100%,将酶液放置在不同 pH 的缓冲液中,冰上放置 2 h,取 100 μL 测定酶的残余活力,将剩余活力最高 pH 下的酶活力设为 100%。

2) 重组蛋白最适催化反应温度和温度稳定性测定:在 0~60 °C 范围内,以 1 g/dL 的褐藻胶为底物,测定酶在不同温度下酶活。将酶液分别在 0、10、15、20、25、30、35、40、50、60 °C 下保温 2 h,取出 100 μL 测定其剩余酶活力。将最高活力温度下的酶活力设为 100%。

3) EDTA、金属离子对酶活性的影响:在酶反应液中分别加入一定浓度的不同化合物,以加相同体积水作为对照组,测定酶活力,比较酶活力的变化规律。将对照组的酶活力设为 100%。

1.2.8 动力学分析 重组蛋白的米氏常数通过测定不同底物浓度[S]下的反应速度 V,可以确定酶催化的最大速度 V_{max} 和米氏常数 K_m 。在试管中加入 0.1 mL 酶液,再分别加入 0.9 mL 不同浓度的褐

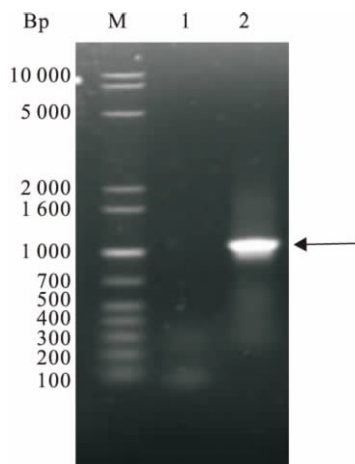
藻酸钠,使总体积为 1.0 mL。于 35 °C 反应 30 min,再分别测定反应前后的 A_{235} 。1/V 为纵坐标,1/[S]为横坐标作图。根据双倒数作图法(Lineweaver-Burk),通过横截距和纵截距求出米氏常数 K_m 和 V_{max} 。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆与序列测定重组表达载体的构建

从芽孢杆菌总 DNA 中 PCR 扩增后得到预期相对分子质量的特异产物,结果见图 1。将目标 DNA 片段回收后与 pBS T II 载体连接并转化 TOP10,挑选白斑进行 PCR 验证,将正确的转化子送上海生工公司进行序列测定。

测序结果表明,该片段全长 1 035 bp,编码 345 个氨基酸。通过 BioEdit 软件比对,与 GenBank 上的褐藻胶裂解酶序列(CM000725.1) 同源性为 100%。重组载体测序结果已递交到 GenBank,其登录号为:GU585575。



M: DNA 相对分子质量标准;1:阴性对照;2:PCR 产物

图 1 PCR 产物

Fig. 1 PCR product of algI

2.2 pET-30a(+)-algI 表达载体的构建

对序列测定分析正确的重组子进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 与同样酶切的表达载体 pET-30a(+)连接,构建出 pET-30a(+)-algI 并转化大肠杆菌 BL21 菌株,表达用 pET30a-algI 质粒构建策略如图 2 所示。

挑取阳性克隆提取质粒 DNA,通过限制性内切酶的酶切验证(图 3),确定正确的重组子。

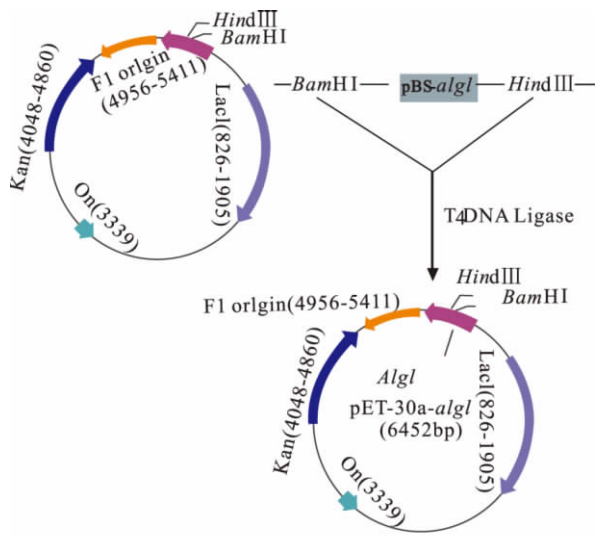
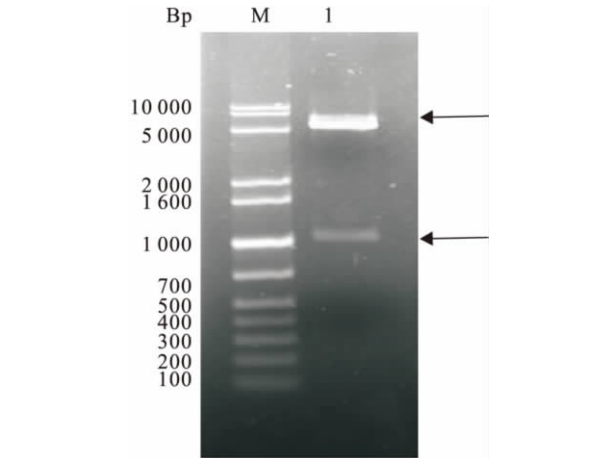


图 2 质粒 pET-30a(+)-algl 的构建
Fig. 2 Construction of plasmid pET-30a(+)-algl

2.3 不同来源微生物褐藻胶裂解酶氨基酸序列比对分析

图 4 显示了芽孢杆菌与其他微生物之间在褐藻胶裂解酶基因编码的氨基酸序列上的比对结果，可以发现，芽孢杆菌与其他微生物之间显示了低的褐藻胶裂解酶氨基酸序列同源性。由图 4 的黑色

阴影部分可以发现，绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*), 假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 中褐藻胶裂解酶的氨基酸序列在中间位置和羧基端分别显示了保守序列 NNHSYW 和 WVEPYCALY, 有研究发现 NNHSYW 是来源于 *P. syringae* pv. *Syringae* 褐藻胶裂解酶保持酶活所必须的^[7], 但是 ALGL 没有这个保守序列。



M: DNA 相对分子质量标准; 1: 重组质粒“pET algl”的双酶切产物
图 3 重组质粒双酶切鉴定
Fig. 3 Identification of recombinant plasmid by digesting with restriction enzymes

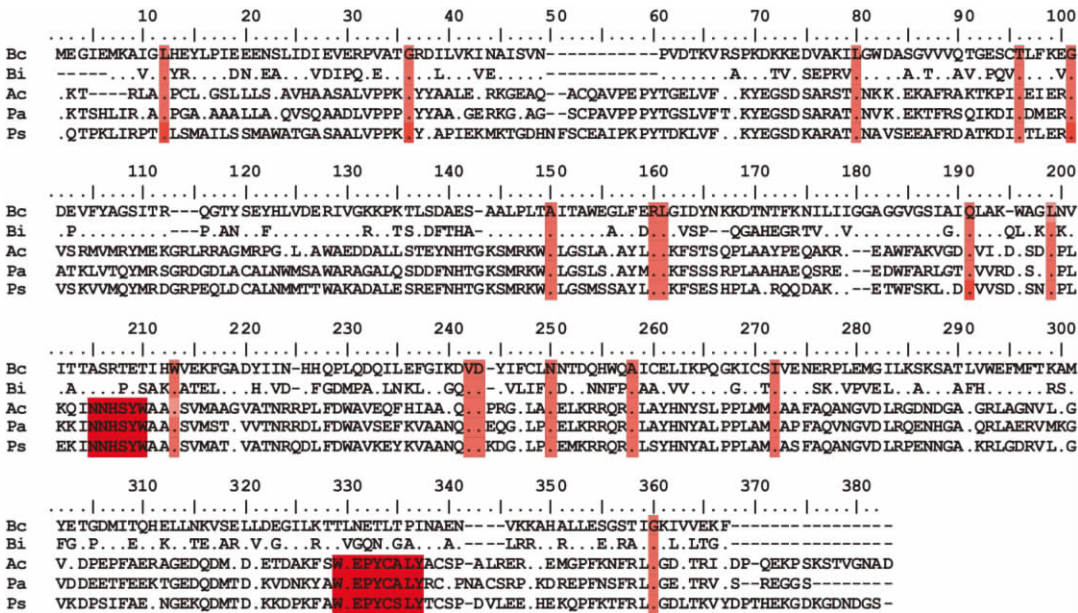
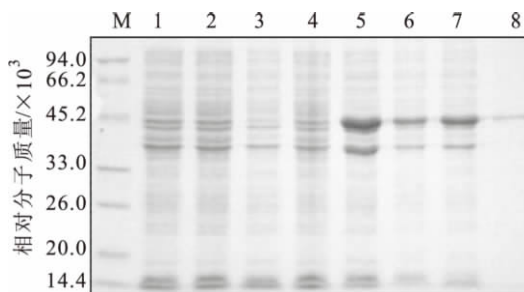


图 4 来源于芽孢杆菌和其他几种微生物的褐藻胶裂解酶蛋白序列对比
Fig. 4 Sequence alignment of alginate lyase of *Bacillus cereus* with other known alginate lyases from various microorganisms

2.4 褐藻胶裂解酶基因的诱导表达

含重组表达质粒的大肠杆菌 BL21 培养至 $A_{600\text{ nm}}$ 为 0.6~0.8 时,经 1 mmol/L IPTG, 37 °C 诱导培养 6 h 后,收集湿菌体,超声破碎后检测蛋白可溶性表达情况。超声波破碎后离心得到的上清经 Ni-NTA 亲和柱纯化后,洗脱得到纯的 ALGL 融合蛋白。图 5 可以看出,含“pET alg1”的诱导菌与各个对照相比,在大约 45 000 处有明显的蛋白条带,与预期的融合蛋白的相对分子质量一致,表明融合蛋白得到了高效表达。此外,菌体经超声波破碎后离心得到的上清液的电泳结果表表明,产生了一定比例的可溶性融合蛋白。表 1 是各步纯化分离收率和酶活力变化情况,收率为 30.4%。



M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: BL21 总蛋白; 2: 未经诱导、含空质粒的 BL21 总蛋白; 3: 经诱导、含空质粒的 BL21 总蛋白; 4: 未经诱导、含重组质粒的 BL21 总蛋白; 5: 经诱导、含重组质粒的 BL21 总蛋白; 6: 经诱导、含重组质粒的 BL21 经超声波破碎后上清; 7: 经诱导、含重组质粒的 BL21 经超声波破碎后沉淀; 8: 纯化后的融合蛋白

图 5 在 *E. coli* BL21 中表达的融合蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig. 5 SDS-PAGE analysis for fusion proteins expressed in *E. coli* BL21

表 1 ALGL 分离纯化步骤

Tab. 1 The procedure for ALGL purification

步骤	体积/ mL	蛋白质 质量浓度/ (mg/mL)	总蛋白质 质量浓度/ (mg/mL)	活力/ (U/mL)	总活力/ U	比活力/ (U/mg)	纯化 倍数	产量/%
破壁上清	5	3.61	18.05	16.03	80.15	4.44	1.00	100
Ni-column	2	1.04	2.08	12.20	24.40	11.73	2.64	30.4

进一步对褐藻胶裂解酶基因的诱导表达条件进行优化,确定了产重组蛋白最佳条件为: IPTG 的终浓度为 0.4 mmol/L, 培养温度为 32 °C, 添加 IPTG 后培养 4 h。

2.5 ALGL 的酶学性质研究

2.5.1 pH 值对 ALGL 酶活力和稳定性的影响

ALGL 酶的活性和稳定性与 pH 值的关系曲线如图 6 所示。在酸性或碱性条件下酶的活力和稳定性都不高, ALGL 最适酶反应 pH 条件为 6.6, ALGL 在中性条件十分稳定, 其中在 pH 6.5~7.0 能稳定保持 2 h。表明该酶是中性酶。

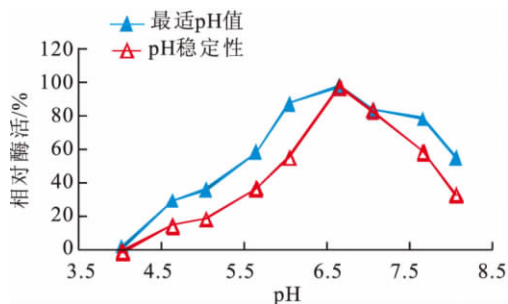


图 6 pH 值对 ALGL 催化特性的影响

Fig. 6 Effect of pH on activity and stability of the recombi-

nant alginate lyase

2.5.2 ALGL 酶的最适温度和热稳定性

将酶与褐藻胶在不同温度下反应以测定酶的最适温度。结果如图 7 所示: 酶的最适反应温度 35 °C, 在 30~35 °C 范围内有较高的酶活力; 当温度升高到 40 °C 时, 酶活力迅速下降, 只有峰值的 52.4%。酶的热稳定性实验结果如图, 由图可知该酶在 30 °C 保温 2 h 后, 剩余酶活力为 83.5%; 在 40 °C 保温 2 h 后, 剩余酶活力为 38.4%; 而在 50 °C 时剩余酶活力仅有 16.3%, 说明褐藻胶裂解酶的热稳定性比较差。

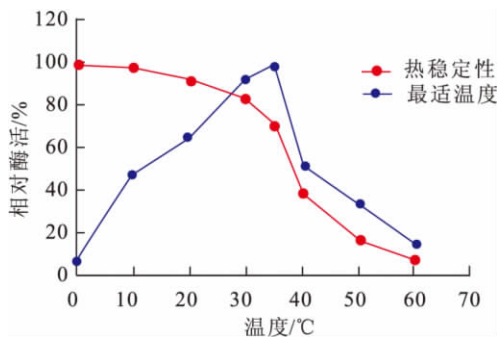


图 7 温度对 ALGL 催化特性的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the activity and stability of the recombinant alginate lyase

2.5.3 EDTA、金属离子对酶活力的影响 在酶与底物反应时,向体系内加入不同的离子,以不加任何离子的酶活为 100%,测定其相对酶活。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对酶活有激活作用;而 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 对酶活有抑制作用,EDTA 对酶活的抑制作用更明显。

2.6 重组酶催化动力学

$1/V$ 为各测得的酶活力的倒数。以 $1/V$ 为纵坐标, $1/[S]$ 为横坐标作图,结果见图 8。根据双倒数作图法,求出最大反应速度 $V_{\max} = 15.01 \text{ U/mL}$, 米氏常数 $K_m = 1.89 \text{ mg/mL}$ 。

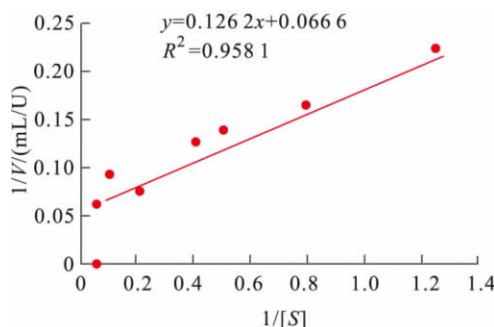


图 8 水解褐藻胶的 Lineweaver-Burke 双倒数图

Fig. 8 Lineweaver-Burke plots for the degradation of alginate by the alginate lyase

3 结 语

作者以提高褐藻胶裂解酶表达量为目的,采用基因工程手段,从蜡样芽孢杆菌上扩增得到褐藻

胶裂解酶基因 *algI*, 构建了表达载体 pET *algI*, 并转化大肠杆菌 BL21(DE3)。这是首次关于从芽孢杆菌中克隆褐藻胶裂解酶的报道。通过条件优化试验,重组菌经 32°C , 0.4 mmol/L IPTG 诱导 4 h, 能最大量的表达褐藻胶裂解酶,表达量约占菌体总蛋白的 36%, 并且以部分可溶性形式存在。经紫外线法测定,酶活性为 11.7 U/mg 。

ALGL 氨基酸序列显示了同其他微生物来源的褐藻胶裂解酶低同源性。在来源于不同物种的相对分子质量大小为 40 000 的褐藻胶裂解酶中,发现大都存在保守序列"NNHSYW",并认为此保守序列对酶的活性至关重要。重组酶 ALGL 中并无此保守序列,该酶活性中心有待进一步研究,以作为深入研究芽孢杆菌 ALGL 最小活性单位的重要基础。

在酶学性质方面,纯化后的 ALGL 属于中性酶且只能在较窄 pH 范围内保持较高的酶活力,在 pH 6.6 时酶活力达到最大值。酶的最适反应温度 35°C , 在酶的热稳定性实验中发现褐藻胶裂解酶的热稳定性比较差。ALGL 受金属离子影响较大, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对酶活有激活作用,金属离子是褐藻胶裂解酶获得最大活性所必须的,但是由于酶的性质差异,不同来源的褐藻胶裂解酶,其受金属离子的影响是不同的。ALGL 催化褐藻胶的 K_m 值为 1.89 mg/mL , $V_{\max}$ 为 15.01 U/mL 。

参考文献(References):

- [1] HU X K, JIANG X L, WANG H M, et al. Antitumour activities of alginate-derived oligosaccharides and their substitution derivatives[J]. *Europe Journal of Phycology*, 2004, 39:67-71.
- [2] Dong Eun Kim, Eun Yeol Lee, Hee Sook Kim. Cloning and characterization of alginate lyase from a marine bacterium *Streptomyces* sp. ALG-5[J]. *Mar Biotechnol*, 2009, 11:10-16.
- [3] Hitoshi Kawamoto, Akio Horibe, Yasunari Miki, et al. Cloning and sequencing analysis of alginate lyase genes from the marine bacterium *Vibrio* sp. O2[J]. *Marine Biotechnology*, 2006, 8:481-490.
- [4] Ma L Y, Chi Z M, Li J. Overexpression of alginate lyase of *Pseudoalteromonas elyakovii* in *Escherichia coli*, purification, and characterization of the recombinant alginate lyase[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24: 89-96.
- [5] Nakagawa A, Ozaki T, Chubachi K, et al. An effective method for isolating alginate lyase-producing *Bacillus* sp. ATB-1015 strain and purification and characterization of the lyase[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 84: 328-335.
- [6] Preiss J, Ashwell G. Alginic acid metabolism in bacteria I. Enzymatic formation of unsaturated oligosaccharides and 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseuronic acid[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237 (2): 309-316.
- [7] AP Loria, TY Wong, B Carroll. Characterization of alginate lyase from *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182: 6268-6271.