

鲍鱼褐藻胶裂解酶基因的原核表达及酶学性质

张 齐^{1,2}, 李云涛^{1,2}, 汪立平^{*1,2}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 褐藻胶寡糖因其内在的生物功能具有良好的应用前景, 褐藻胶裂解酶可将褐藻胶降解为褐藻胶寡糖, 基因工程技术为高效生产褐藻胶裂解酶提供了技术方法。从鲍鱼肝胰腺中提取 RNA, 通过 RT-PCR 得到 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增得到褐藻胶裂解酶基因 *algl*, 将其与 pET-28a(+) 载体连接, 并在大肠杆菌 BL21 菌株中进行高效诱导表达。将工程菌体超声波破碎后进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测, 利用 Ni-NTA 琼脂糖凝胶柱纯化重组蛋白 Algl, 继而对其进行酶学特性研究。细胞破碎物酶活检测及 SDS-PAGE 分析表明, 重组蛋白为包涵体, 相对分子量约为 32 000。包涵体纯化、复性后的酶活为 15.6 U/mL, 比酶活为 644.6 U/mg。纯化后的工程酶酶学性质研究表明: 该酶最适温度 35 ℃; 最适 pH 值为 8.0; 只能降解多聚甘露糖醛酸 (polyM) 而不能降解多聚古洛糖醛酸 (polyG); 催化褐藻胶的 K_m 值为 1.71 mg/mL, V_{max} 为 19.08 U/mL。重组酶 Algl 对多聚甘露糖醛酸的底物特异性和适冷性具有潜在的生物技术和工业应用。

关键词: 鲍鱼; 褐藻胶裂解酶; 基因克隆表达; 酶学性质

中图分类号: Q 78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)06-0632-07

Characterization of an Alginate Lyase, from Abalone and Its Expression in *Escherichia coli*

ZHANG Qi^{1,2}, LI Yuntao^{1,2}, WANG Liping^{*1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

Abstract: Alginate oligosaccharides have good prospects because of their useful and biologically important functions. Alginate lyase can degrade alginate to alginate oligosaccharides, genetic engineering technology provides technology for efficient production of alginate lyase. Extraction of RNA from the hepatopancreas of abalone cDNA obtained by RT-PCR, cDNA as template for PCR amplification to obtain alginate lyase gene *algl*, connection with pET-28a (+) vector. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21, induced and expressed. The new protein bands about 32 000 showed on polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the protein

收稿日期: 2015-11-11

基金项目: 上海市科委工程中心建设项目 (11DZ2280300)。

* 通信作者: 汪立平 (1968—), 女, 湖南衡阳人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物、食品酶学方面的研究。

E-mail: lpwang@shou.edu.cn

引用本文: 张齐, 李云涛, 汪立平. 鲍鱼褐藻胶裂解酶基因的原核表达及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(06): 632-638.

form of inclusion bodies. Inclusion body purification, refolding and determination of its activity 15.6 U/mL, specific activity 644.6 U/mL. The optimum temperature and pH were 35 °C and 8, respectively. Algl only degradation poly mannuronate (polyM) and not degradable poly guluronic acid (polyG). The K_m and V_{max} values for alginate were 1.71 mg/mL and 19.08 U/mL, respectively. Recombinase Algl poly mannuronic acid substrate specificity and cold adaptation has the potential for biotechnology and industrial applications.

Keywords: abalone, alginate lyase, gene cloning and expression, enzyme properties

褐藻胶 (Alginate) 是由 β -1,4-D-甘露糖醛酸 (M) 和 α -1,4-L-古罗糖醛酸 (G) 两种单体通过 1,4-糖苷键链接而成的线性多糖聚合物, 主要来自于海带、马尾藻、巨藻等褐藻类植物^[1]。近年来, 褐藻胶的酶解产物褐藻胶寡糖因其能促进双歧杆菌的生长^[2]、能促进植物根系生长^[3]、抗氧化活性^[4]、抗病原体^[5]等生理活性而受到越来越多的关注。

褐藻胶裂解酶能通过 β 消去机制催化褐藻胶的降解成寡糖和不饱和的糖醛酸, 其作用位点是 1,4 糖苷键^[6]。褐藻胶裂解酶主要来源于海洋藻类、海洋软体动物和海洋微生物^[7]。

褐藻胶裂解酶可直接将弹性的褐藻藻体转变为浆状, 同时释放出降解的褐藻胶寡糖, 而这种将褐藻变成高附加值原料的技术关键在于褐藻胶裂解酶。为了大规模的应用褐藻胶裂解酶来降解褐藻, 需要提供大量低成本的酶。目前, 相对于细菌来源的褐藻胶裂解酶, 软体动物来源的褐藻胶裂解酶的研究较少; 目前已经从角螺螺 *Turbo cornutus*^[8]、滨螺 *Littorina* sp.^[9]、黑斑海兔 *Littorina brevicula*^[10]、皱纹盘鲍 *Haliotis discus hannai*^[11-12] 等软体动物分离出褐藻胶裂解酶。虽然人们已经反复研究了软体动物来源的褐藻胶裂解酶的常规生化特性, 但目前仅成功克隆了皱纹盘鲍 *Haliotis discus hannai*^[11]、短滨螺 *Aplysia kurodai*^[13]、黑斑海兔 *Littorina brevicula*^[14] 少数种类软体动物褐藻胶裂解酶的基因。皱纹盘鲍重组蛋白为包涵体, 复性后没有活性, 短滨螺、黑斑海兔重组酶的比酶活分别为 1 147.2 U/mg 和 2 100 U/mg; 均具有多聚甘露糖醛酸底物特异性。

本研究中, 以鲍鱼来源的一种适冷性和多聚甘露糖醛酸底物特异性的褐藻胶裂解酶为研究对象, 参考皱纹盘鲍褐藻胶裂解酶的 cDNA 序列, 通过 RT-PCR 克隆到编码鲍鱼褐藻胶裂解酶成熟肽的 cDNA 片段, 将其连接至 pET-28a(+) 原核表达质粒

在大肠杆菌中进行表达; 纯化了重组蛋白, 并对其酶学性质进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种 大肠杆菌 TOP10 和 BL21 (DE3): 购自北京天根生物科技公司; 克隆载体 pEASY-T3: 购自全式金生物技术有限公司; 表达载体 pET-28a(+): 作者所在实验室保存。

1.1.2 试剂 Total RNA Extractor (Trizol) 试剂盒、氨苄青霉素、硫酸卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-gal)、甲叉双丙烯酰胺、Tris base、丙烯酰胺、考马斯亮蓝 G250、还原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽、DNA 相对分子质量标准品、蛋白质相对分子质量标准品: 购自上海生工生物工程有限公司; 限制性内切酶 *Bam* HI 和 *Nde* I, T4 DNA 连接酶: 购自 New England Biolabs; 质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、Taq PCR MasterMix: 购自北京天根生化科技有限公司; TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒: 购自全式金生物有限公司; 蛋白质纯化 Ni-NTA Agarose: 购自 QIAGEN。引物合成由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 algl 基因克隆 取适量新鲜肝胰腺组织, 使用 Total RNA Extractor 试剂盒提取总 RNA。提取的总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳和 OD_{260/280} 鉴定, 紫外分光光度计法检测其浓度后贮于 -80 °C 冰箱备用。用 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒合成第一链 cDNA。参考皱纹盘鲍褐藻胶裂解酶的核苷酸序列 (GenBank: AB110094.1), 用 Primer premier 5.0 软件设计正向引物 AlgF (5'-GCTGCGGCA GAAAGTCGACCAG-3') 和反向引物

AlgR (5'-GATGTGGCGTGTACATG-3'),用以扩增鲍鱼褐藻胶裂解酶的全长 cDNA。采用 T-A 克隆法,将扩增得到的 cDNA 连接到 pEASY-T3 载体,将连接物转化感受态大肠杆菌 TOP10 后,涂布于含氨苄青霉素和 IPTG 的抗性平板,37 °C 静置培养 16~20 h。通过蓝白斑筛选阳性转化子,对其进行 DNA 测序,测序正确的重组质粒命名为 pEASY-T3-*algI*。

1.2.2 pET-28a-*algI* 表达载体构建 提取 pEASY-T3-*algI* 质粒,以其为模板,设计分别添加 *Nde* I 和 *Bam* HI 酶切位点的正向引物 ExF (5'-CGAACAATGTATTGTGACACATAAAG-3') 和反向引物 ExR (5'-GATGTTGGATCCTACATG TGTACA-3') 对编码 *algI* 成熟肽的 cDNA 片段进行 PCR 扩增。扩增的片段进行 *Nde* I、*Bam* HI 双酶切,经琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,将其与用同样酶处理过的表达载体 pET-28a 按 15:1 连接,在 T4 DNA 连接酶作用下,16 °C 保温 16 h,转化感受态细胞大肠杆菌 TOP10,通过菌落 PCR、双酶切和 DNA 测序对重组表达载体 pET-28a-*algI* 进行筛选。

1.2.3 *algI* 基因的诱导表达 重组质粒 pET-28a-*algI* 提纯后转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,将转化细胞接种于 10 mL 含 50 µg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 过夜培养后,取 1 mL 转接入 100 mL 含 50 µg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 培养基中,37 °C、180 r/min 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.8 时,取 1 mL 菌液做未诱导对照,剩余培养液加入 IPTG 至 1 mmol/L,28 °C、180 r/min 诱导表达 6 h,菌液 10 000 r/min 离心 10 min,4 °C 离心收集菌体,菌体重悬于 10 mL 裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L NaCl, 20% 甘油, 1% Triton X-100),用超声波破碎菌体,破碎条件:破碎功率 150 W,工作/间隙时间为 4 s/8 s,时间 15 min,冰浴。破碎液 10 000 r/min、4 °C 离心 10 min,分别收集上清液、沉淀进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 包涵体蛋白纯化、复性 包涵体重悬于 2 mL 溶解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 8 mol/L 尿素, 12 mmol/L 2-巯基乙醇),室温下不停搅拌 1 h。13 000 r/min、离心 15 min,4 °C 离心收集上清液,去除沉淀。

先用 4 mL 平衡 Ni-NTA resin,缓慢倒入 2 mL 包涵体溶解液,使蛋白质与 Ni-NTA 树脂充分结合

(4 °C, 150 r/min, 1 h),随后用 5 mL 漂洗缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 8 mol/L 尿素, 10 mmol/L 咪唑)漂洗两次来洗掉未结合成分,最后用 1 mL 洗脱缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 8 mol/L 尿素, 250 mmol/L 咪唑)将重组蛋白 AlgI 洗脱下来。

通过 Ni-NTA 纯化得到的重组蛋白 AlgI 逐滴滴加到 10 mL 复性缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 5 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽) 中至蛋白质终质量浓度 20 µg/mL, 4 °C 下不停的搅拌 24 h。将蛋白质溶液放入处理好的透析袋中,两端用细线系好,将透析袋放入装有 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 的烧杯, 4 °C 搅拌透析 24 h。透析后的蛋白质溶液即为复性的重组蛋白 AlgI 溶液,用于酶活测定及酶学性质研究。

1.2.5 酶活力测定 褐藻胶裂解酶酶活力测定参照 Preiss 方法^[15],将 0.1 mL 酶液加入 2.9 mL 体积分数 0.1% 褐藻酸钠 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 中混合,在 35 °C 下保温 20 min 后测量反应前后在 235 nm 处的吸光度值。在 235 nm 处反应液吸光度值每分钟增加 0.01 定义为一个酶活单位 (U)。

1.2.6 温度、pH 对褐藻胶裂解酶活性及稳定性的影响 重组蛋白最适催化温度和温度稳定性测定,将 0.1 mL 酶液添加到 2.9 mL 体积分数 0.1% 海藻酸钠溶液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 中,在 20~70 °C 水浴条件下反应 20 min 后测定酶活,将最高酶活力设为 100%;将酶液放置在不同的温度下保温 1 h 后按 1.2.5 测定残余酶活力,将初始酶活力设为 100%。

重组蛋白最适催化 pH 值和 pH 稳定性测定,将 0.1 mL 酶液添加到 2.9 mL 不同 pH 的 0.1% 海藻酸钠溶液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 3.0~10.6) 中,在 35 °C 保温 20 min 后测定酶活,将最高酶活力设为 100%;将酶液添加到不同 pH 的缓冲液中冰浴 1 h 后按 1.2.5 测定酶的残余活力,将初始的酶活力设为 100%。

1.2.7 EDTA、金属离子对酶活的影响 将金属离子化合物 KCl、NaCl、CaCl₂、MnCl₂、MgCl₂、CuCl₂、FeCl₃、ZnCl₂ 和 EDTA, SDS 分别加入 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.0) 中配制成 1 mmol/L 的溶液,以添加相同体积水作为对照组,调节 pH 至 8.0,测定不同反应体系下的酶活力。

1.2.8 褐藻胶裂解酶底物特异性以及动力学测定 多聚古洛糖醛酸 (polyG)、多聚甘露糖醛酸 (polyM)、

不规则杂合片段(pMG)的制备参照 Gacesa^[16]的方法。将海藻酸钠、多聚古洛糖醛酸(polyG)、多聚甘露糖醛酸(polyM)、不规则杂合片段(pMG)四种底物加入 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.0) 配成 0.1% 的反应液,按 1.2.4 方法测定不同时间的吸光度值。

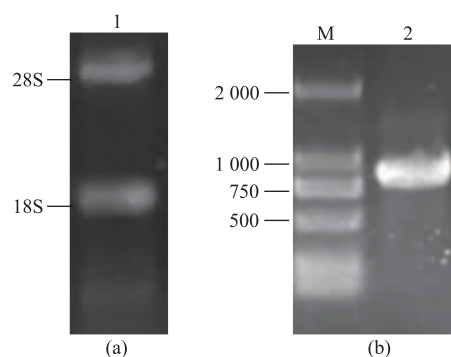
重组酶动力学分析,通过测定酶在 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中不同底物质量浓度 $[S]$ (0.625~5.0 mg/mL) 下的反应速度 V 来确定酶催化的最大速度 $V_{\max}$ 和米氏参数 K_m 。取 2.9 mL 不同浓度的海藻酸钠溶液加入 0.1 mL 酶液,总反应体系 3 mL,于 35 ℃ 保温 20 min,再测定反应液在 235 nm 处的吸光度值。根据双倒数作图法 (Lineweaver-Burk),将反应速度的倒数 $1/V$ 对底物浓度的倒数 $1/[S]$ 作图,通过计算横截距和纵截距求出米氏常数 K_m 和 $V_{\max}$ 。

2 结果与分析

2.1 *algI* 基因的克隆

以鲍鱼肝胰腺第一链 cDN 为模板,用一对根据皱纹盘鲍褐藻胶裂解酶基因的核苷酸序列设计的特异性引物 AlgF、AlgR,通过 PCR 扩增得到 *algI* 的 cDNA,见图 1。将其与 pEASY-T3 载体连接,转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,对蓝白斑筛选得到的阳性克隆子 pEASY-T3-*algI* 进行 DNA 测序。

测序结果表明,该片段全长 822 bp,编码 273 个氨基酸 *algI* 基因 GenBank 登录号为:KP406582。



M: DNA marker; 1: 总 RNA; 2: PCR 产物

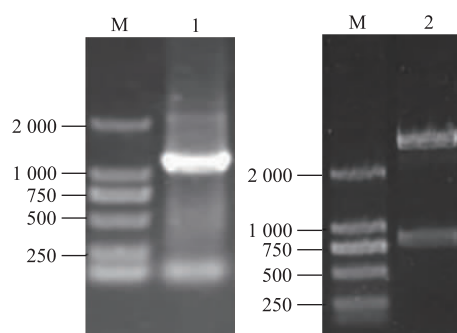
图 1 鲍鱼肝胰腺总 RNA 和 *algI* 基因 PCR 扩增

Fig. 1 Total RNA of abalone hepatopancreas and PCR amplification of *algI* gene

2.2 重组表达质粒的构建

以重组质粒 pEASY-T3-*algI* 为模板,以 ExF、ExR 为引物,通过 PCR 扩增得到编码 AlgI 成熟肽片段,将 AlgI 成熟肽片段和 pET-28a 经 *Nde* I 和

Bam HI 双酶切及纯化回收后,通过 T4 DNA 连接酶连接后得到重组表达载体 pET-28a-*algI*。通过菌落 PCR 琼脂糖凝胶电泳检测发现,在约 1 060 bp 处有清晰条带,见图 2(a),与理论相符;进一步对该载体采用 *Nde* I 和 *Bam* HI 双酶切处理,经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测,该载体经双酶切后存在两条谱带,其中一条约为 780 bp 的谱带属于目的片段,见图 2(b);最后通过 DNA 测序,结果显示目的基因没有突变并且读码框正确。



M: DNA marker; 1: 菌落 PCR 产物; 2: 重组质粒 pET-28a-*algI* 双酶切产物

图 2 重组表达载体 pET-28a-*algI* 的菌落 PCR 双酶切鉴定
Fig. 2 Identification of the recombinant expression vector pET-28a-*algI* by PCR and restriction enzyme digestion

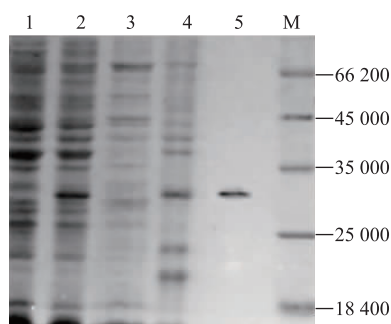
2.3 重组蛋白的诱导表达、鉴定及包涵体的纯化

含重组表达质粒 pET-28a-*algI* 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 在 28 ℃、1 mmol/L IPTG 诱导培养 6 h 后,成功表达了重组蛋白 AlgI (图 3,泳道 2)。细胞经超声波破碎后,通过 SDS-PAGE 发现,该蛋白质以包涵体形式存在 (图 3,泳道 4)。包涵体蛋白质溶解,变性条件下经 Ni-NTA 琼脂糖凝胶柱亲和层析纯化后,复性、透析得到重组褐藻胶裂解酶 (图 3,泳道 5)。由图 3 可以看出,重组蛋白 AlgI 相对分子质量大约 32 000,与预期的融合蛋白的相对分子质量一致。纯化后的重组蛋白 AlgI 测定酶活为 15.6 U/mL,比酶活为 644.6 U/mg。

2.4 最适反应温度及温度稳定性

酶最适的反应温度通过测定其在不同温度下酶活力确定。由图 4 知,酶的最适反应温度 35 ℃,其酶活为 15.6 U/mL。在 30~40 ℃ 范围内有较高的催化活性,当温度降低到 20 ℃ 或升高到 50 ℃ 时,酶活力都迅速下降。酶的温度稳定性见图 4。酶在 40

℃及以下较稳定,40℃处理1h后残留酶活力为初始值的59.7%;而当温度高于40℃时,残留酶活力下降很快,在60℃下处理1h,酶几乎失活;表明该褐藻胶裂解酶 Algl 的温度稳定性有待进一步提高。



M: 蛋白质相对分子质量标准;1: 未经诱导的菌体总蛋白质;2: 经诱导的菌体总蛋白质;3: 诱导后的菌体经超声波破碎后上清液;4: 诱导后的菌体经超声波破碎后沉淀;5: 纯化后的重组蛋白 Algl。

图3 Algl 的 SDS-PAGE
Fig. 3 SDS-PAGE of Algl

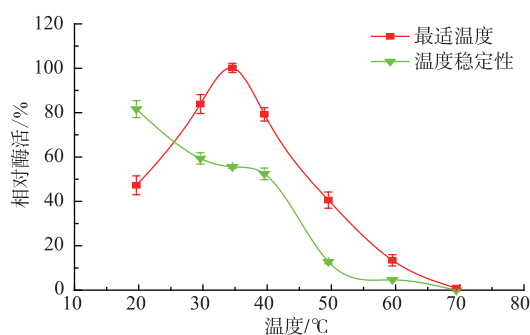


图4 Algl 最适反应温度及温度稳定性

Fig. 4 Optimal temperature and thermostability of Algl

2.5 最适反应 pH 及 pH 稳定性

酶最适反应的 pH 通过测定其在不同 pH 下酶活力确定,结果见图 5。最适酶反应 pH 条件为 8.0,其酶活为 15.6 U/mL。当 pH 为 7.0 时,酶活力为峰值的 61.9%,而当 pH 升高到 9.0 时,酶活力仅为峰值的 32.1%。当褐藻胶裂解酶在 pH 6.0~9.0 的范围内处理 1 h 后,残留酶活力能达到 60% 以上,pH 值再降低或升高时残余酶活力较低,当 pH 降到 4.0 或升高到 10.0 时,残留酶活力几乎为零。此酶是一个嗜碱酶。

2.6 EDTA、金属离子对酶活力影响

在酶的反应底物中加入 1 mmol/L 的 EDTA、SDS 和不同的金属离子化合物,测定其酶活;以不加

任何离子时的酶活力 15.6 U/mL 为 100%。根据表 1, K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 对酶活有激活作用, K^+ 对酶活的刺激作用最大,可使酶活提高 19%;而 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 对酶活有抑制作用, Zn^{2+} 的抑制作用在金属离子中最强。EDTA、SDS 对酶活的抑制相对于金属离子的作用更明显。

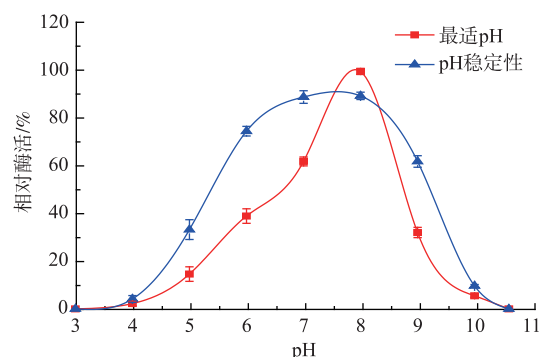


图5 Algl 的最适反应 pH 及 pH 稳定性

Fig. 5 Optimal pH and atability of Algl

表1 金属离子对酶活的影响

Table 1 Effect of metal cations on AlgL activity

离子	浓度/(mmol/L)	相对酶活/%
Non	1	100±1
K^+	1	119±3
Na^+	1	118±2
Ca^{2+}	1	111±3
Mn^{2+}	1	106±3
Mg^{2+}	1	90±5
Cu^{2+}	1	70±4
Fe^{3+}	1	21±2
Zn^{2+}	1	74±2
SDS	1	75±3
EDTA	1	62±3

2.7 底物特异性

四种底物用来研究褐藻胶裂解酶的底物特异性,结果见图 6。发现酶与多聚甘露糖醛酸的反应液在波长 235 nm 处的吸光度变化值最高,海藻酸钠、不规则杂合片段吸光度值变化依次减小,而在多聚古洛糖醛酸中吸光度没有发生变化。表明褐藻胶裂解酶 Algl 具有多聚甘露糖醛酸底物特异性,不能降解多聚古洛糖醛酸。

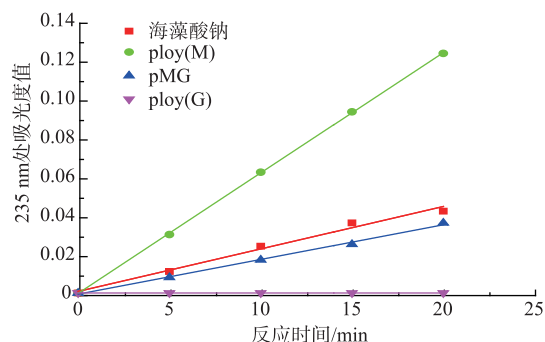


图 6 酶的底物特异性

Fig. 6 Substrate specificity of AlgL

2.8 酶催化动力学

以不同质量浓度的海藻酸钠为底物,测定重组酶的酶活。根据双倒数作图法,将酶活力的倒数 $1/V$ 对底物浓度的倒数 $1/[S]$ 作图,得到一条直线,结果见图 7。通过计算直线与纵轴的截距得到最大反应速度 $V_{\max}=19.08$ U/mL,直线与横轴的截距得到米氏常数 $K_m=1.71$ mg/mL。

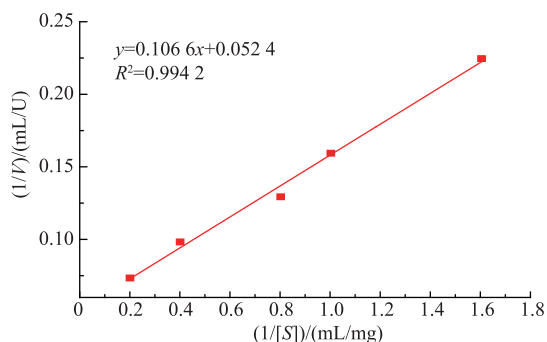


图 7 AlgI 水解褐藻胶的 Lineweaver-Burke 双倒数图

Fig. 7 Lineweaver-Burke plots of the alginate degradation by the AlgI

3 结 语

从鲍鱼肝胰腺中提取 RNA,通过 RT-PCR 得到褐藻胶裂解酶(algl)的 cDNA,将其构建到 pET-28a(+) 上并在大肠杆菌 BL21 菌株中进行高效诱导表达,将菌体超声波破碎后进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测,该蛋白质以包涵体的形式表达。包涵体的形成主要是蛋白质合成速度过快,没有足够的时间进行折叠;对含二硫键较多的重组蛋白质而言,细胞质内的还原环境抑制二硫键的形成;重组蛋白质在大肠杆菌中表达时,缺乏一些蛋白质折叠过程中所需要的酶和辅助因子,如折叠酶和分子伴侣等,是包涵体形成的又一原因^[17]。

包涵体在变性条件下用 Ni-NTA 琼脂糖凝胶柱亲和层析纯化,将纯化后的重组蛋白质复性,继而对其进行活性检测和酶学特性研究。纯化后的 AlgI 测定其酶活为 15.6 U/mL,比酶活为 644.6 U/mg,低于报道中短滨螺(1 147.2 U/mg)、黑斑海兔(2 100 U/mg)比酶活。在 pH 8.0 时酶活力达到最大值,属于嗜碱性酶;底物特异性分析表明,褐藻胶裂解酶 AlgI 具有多聚甘露糖醛酸底物特异性,不能降解多聚古洛糖醛酸;据报道,短滨螺和黑斑海兔来源的褐藻胶裂解酶同样只具有多聚甘露糖醛酸底物特异性^[12-13],所以 AlgI 与其他软体动物来源的褐藻胶裂解酶同属于多糖裂解酶家族 14(PL14)。AlgI 最适温度 35 ℃,且在 20~30 ℃处有 60%以上的酶活性保留,则该酶具有适冷性,热不稳定性;而报道中短滨螺和黑斑海兔来源的褐藻胶裂解酶最适温度分别为 55 ℃和 50 ℃^[12-13]。重组酶 AlgI 的这种适冷性和热不稳定性可以很好的用于工业生产,低温反应的酶可以降低因加热而产生的生产成本,热不稳定性对于工业生产是很有利的,只需要适当的提高温度就可以很容易和选择性的灭活。

参考文献:

- [1] ZHOU Xuxia, XU Jun, DING Yuting. Alginate-derived oligosaccharides product by alginate lyase and detection of the antioxidant activity[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2014, 2(2): 116-120. (in Chinese)
- [2] WANG Y, HAN F, HU B, et al. In vivo prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate[J]. *Nutrition Research*, 2006, 26(11): 597-603.

- [3] IWASAKI K,MATSUBARA Y. Purification of alginate oligosaccharides with root growth-promoting activity toward lettuce[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**,2000,64(5):1067-1070.
- [4] FALKEBORG M,CHEONG L Z,GIANFICO C,et al. Alginate oligosaccharides:enzymatic preparation and antioxidant property evaluation[J]. **Food Chemistry**,2014,164:185-94.
- [5] AN Q D,ZHANG G L,WU H T,et al. Alginate-deriving oligosaccharide production by alginase from newly isolated *Flavobacterium sp.* LXA and its potential application in protection against pathogens[J]. **J Appl Microbiol**,2009,106(1):161-170.
- [6] HAUG A,LARSEN B,SMIDSROD O. Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid[J]. **Acta Chem Scand**,1967,21:691-704.
- [7] KIM H S,LEE C G,LEE E Y. Alginate lyase: Structure, property, and application[J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**,2011,16(5):843-851.
- [8] MURAMATSU T,HIROSE S,KATAYOSE M. Isolation and properties of alginate lyase from the mid-gut gland of wreath shell *Turbo cornutus*[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**,1977,41(10):1939-1946.
- [9] ELYAKOVA L A,FAVOROV V V. Isolation and certain properties of alginate lyase VI from the mollusk *Littorina sp* [J]. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA)–Enzymology**,1974,358(2):341-354.
- [10] RAHMAN M M,INOUE A,TANAKA H,et al. Isolation and characterization of two alginate lyase isozymes, AkAly28 and AkAly33, from the common sea hare *Aplysia kurodai*[J]. **Comparative biochemistry and physiology Part B,Biochemistry & Molecular Biology**,2010,157(4):317-325.
- [11] SHIMIZU E,OJIMA T,NISHITA K. cDNA cloning of an alginate lyase from abalone,*Haliotis discus hannai*[J]. **Carbohydrate Research**,2003,338(24):2841-2852.
- [12] SUZUKI H,SUZUKI K,INOUE A,et al. A novel oligoalginate lyase from abalone,*Haliotis discus hannai*,that releases disaccharide from alginate polymer in an exolytic manner[J]. **Carbohydrate Research**,2006,341(11):1809-1819.
- [13] RAHMAN M M,INOUE A,TANAKA H,et al. cDNA cloning of an alginate lyase from a marine gastropod *Aplysia kurodai* and assessment of catalytically important residues of this enzyme[J]. **Biochimie**,2011,93(10):1720-1730.
- [14] RAHMAN M M,WANG L,INOUE A,et al. cDNA cloning and bacterial expression of a PL-14 alginate lyase from a herbivorous marine snail *Littorina brevicula*[J]. **Carbohydrate Research**,2012,360:69-77.
- [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] GACESA P,WUSTEMAN F S. Plate assay for simultaneous detection of alginate lyases and determination of substrate specificity [J]. **Applied and Environmental Microbiology**,1990,56(7):2265-2267.
- [17] LEI Rongyue,QIAO Yuhuan,YAN Jidong,et al. Soluble expression of recombinant human BMP6 in *Escherichia coli* and its purification and bioassay in vitro[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,2008,3(3):452-459.(in Chinese)