



南极菌产琼胶酶 $aga3311$ 的表达、性质及其降解特性

刘秀萌¹, 李江^{2*}, 侯旭光¹, 何培青²

¹ 山东大学(威海)海洋学院, 山东 威海 264200

² 国家海洋局第一海洋研究所, 海洋生物活性物质重点实验室, 山东 青岛 266061

摘要: 【目的】本文通过对具有琼胶降解能力的南极菌*Pseudoalteromonas* sp. NJ21全基因组进行生物信息学分析, 筛选获得琼胶酶疑似序列 $aga3311$, 采用基因工程手段对该基因的功能和性质进行了验证和分析。【方法】首先对 $aga3311$ 进行克隆和表达; 采用Ni-NTA对重组酶进行纯化; DNS-还原糖法测定重组酶的酶学性质; 用薄层层析(TLC)和质谱(MS)技术对Aga3311的酶解产物进行分析。【结果】构建的重组表达质粒pET-30(a)+ $aga3311$ 能够在工程菌*E. coli* BL21(DE3)中实现高效表达, 其中可溶性表达为30%左右; 纯化的重组酶Aga3311分子量为87 kDa, 其最适作用温度为35 °C, 30–45 °C的范围内稳定性较高, 50 °C则迅速失活, 具有热不稳定的特征; 最适pH为7.0, 在pH 4.0–10.0的范围内仍能保持50%以上的活性; 金属离子 Fe^{3+} 、 Be^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 均能显著提高Aga3311的活性, 特别是 Ca^{2+} 使其酶活提高1倍。该酶的酶解终产物经TLC和质谱分析主要为新琼二糖。【结论】重组酶Aga3311为Glyco_hydro_42家族的外切型 β -琼胶酶, 能够特异性降解琼脂糖生成新琼二糖。

关键词: 琼胶酶, 表达, 酶学性质, 新琼二糖

琼胶(agar)是一种亲水性多糖, 是红藻细胞壁的主要成分, 是由琼脂糖(agarose)和硫酸琼脂(agaropectin)组成的混合物^[1]。琼胶酶(agarase)是能够降解琼脂糖和琼胶的糖苷水解酶(glycoside hydrolases)。根据其作用方式不同, 可以把琼胶酶分为2类: α -琼胶酶和 β -琼胶酶。 α -琼胶酶(EC3.2.1)裂解琼脂糖的 α -1,3-糖苷键, 生成以 β -D-半乳糖为非还原性末端和以3,6-内醚- α -L-半乳糖为

还原性末端的琼胶寡糖(agar-oligosaccharides)系列; β -琼胶酶(EC3.2.1.81)裂解琼胶糖的 β -1,4-糖苷键, 生成以 β -D-半乳糖为还原性末端和以3,6-内醚- α -L-半乳糖为非还原性末端的新琼寡糖(neoagar-oligosaccharides)系列^[2-3]。

琼胶酶广泛应用于生化、临床、医药和食品等领域, 因为其降解琼胶产生的琼寡糖具有多种对人类健康有益的生理和生物活性, 如较强的抗

基金项目: 南北极环境综合考察与评估专项(CHINARE2014-01-05); 国家海洋局海洋生物活性物质与现代分析技术重点实验室开放基金(MBSMAT-2015-06); 青岛市应用基础研究计划项目(14-2-4-14-jch)

*通信作者。Tel/Fax: +86-532-88966520; E-mail: lijiaang@fio.org.cn

收稿日期: 2015-12-11; 修回日期: 2016-02-10; 网络出版日期: 2016-03-14

癌、抗氧化、抗炎、抗龋齿及抗淀粉老化等, 是一种极具开发潜力的低聚糖^[4]。由于酶解法降解制备低聚糖不仅反应条件温和、降解过程易于控制, 而且绿色环保, 因此利用琼胶酶降解琼胶制备低分子量活性寡糖, 成为海藻工业高值化利用的重要方向^[5]。

琼胶酶的来源比较广泛, 迄今已经有许多琼胶酶分离自海水、海洋沉积物、海藻、海洋软体动物、淡水和土壤。能够产生琼胶酶的微生物主要包括 *Alteromonas* sp.^[6]、*Pseudomonas* sp.^[7]、*Vibrio* sp.^[8]、*Cytophaga* sp.^[9]、*Agarivorans* sp.^[10]、*Thalassomonas* sp.^[11]、*Pseudoalteromonas* sp.^[12]、*Bacillus* sp.^[13]、*Acinetobacter* sp.^[14]。虽然目前已有几十种不同的琼胶酶得到了分离纯化, 并对一些琼胶酶基因进行了克隆表达, 但多数已报道的琼胶酶活力低、稳定性差, 无法满足工业化生产的需求, 也阻碍了琼胶寡糖的构效关系研究乃至应用开发的进一步开展^[15], 因此新型琼胶酶的筛选和发现, 特别是来源于特殊生境(南北极、大洋、热泉等)的新酶仍具有重要意义。南极具有独特的地理、气候及环境特征, 形成了一个高盐度、高辐射、酷寒、反复冻融及特殊的光照特征的自然环境^[16], 极地特殊生境造就了微生物在基因组、酶学特性以及代谢调控等方面独特的分子生物学机制与生理生化特性, 能够产生各种具有独特生理活性的酶系^[17]。本实验室在前期的工作中, 从南极沉积物中筛选获得1株琼胶酶高产菌株 *Pseudoalteromonas* sp. NJ-21, 并对琼胶酶疑似序列 *aga3311* 进行表达和性质研究, 以期获得活性高、稳定性好的新琼胶酶。

1 材料和方法

1.1 菌株和基因

产琼胶酶南极嗜冷菌株 *Pseudoalteromonas* sp. NJ-21, 保存于国家海洋局第一海洋研究所菌种

库(-80 °C); 琼胶酶疑似序列 *aga3311* 已提交至 GenBank (KU160630)。

1.2 试剂和材料

细菌基因组提取试剂盒、质粒小提试剂盒和胶回收试剂盒均购自 Tiangen (北京天根科技公司), 表达型感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3) 购自 Tiangen (北京天根科技公司), 表达载体 pET-30(a)(His•Tag) 购自 TaKaRa (大连宝生物工程有限公司), Ni Sepharose (GE Healthcare), 硅胶板(青岛胜海精细硅胶化工公司)。

1.3 琼胶酶 *aga3311* 的克隆

1.3.1 引物的设计: 根据已知的琼胶酶基因 *aga3311* 序列, 采用在线引物设计网站 <http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer> 设计引物, 在引物的5'端分别引入相应限制性内切酶位点, 并在酶切位点前面加6个保护碱基, 特异性引物由金斯瑞生物技术公司合成: 上游引物: 5'-GTCGTCGTCGACCTATTTCTTTAACCCCTTCACGAAACG-3', 下划线部分为添加 *Bam*H I 酶切位点; 下游引物: 5'-CATAAATCTAGAAATCAATCTTACAGGTACCAA-3', 下划线部分为添加 *Xba* I 酶切位点。

1.3.2 PCR扩增: 以南极菌 NJ21 基因组为模板进行 PCR 扩增。PCR 体系: 高保真的 2×MasterMix (TaKaRa) 25 μL; 模板 2 μL; 上下游引物各 1 μL; ddH₂O 21 μL; 总体积 50 μL。PCR 反应条件: 98 °C 4 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 2.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.4 琼胶酶 *Aga3311* 的表达

1.4.1 表达载体的构建: 用 *Bam*H I / *Xba* I 内切酶对上述 PCR 产物和表达载体 PET-30(a) 分别进行双酶切, 回收纯化; 利用 T4 DNA Ligase 进行连接, 并转化 TOP10 的感受态细胞。筛选阳性克隆, 提取重组质粒, 转化 *E. coli* BL21, 涂布于含卡那霉素 (50 mg/L) 的 LB 培养皿中, 于 37 °C 培养过夜。

1.4.2 重组质粒的鉴定:挑取阳性克隆,提取质粒,经BamH I /Xba I 双酶切鉴定;同时对阳性克隆进行测序鉴定,测序由北京六和华大基因股份有限公司完成。

1.5 重组琼胶酶Aga3311的纯化

按1%的接种量将重组菌接种入50 mL LB培养基中,37 °C、150 r/min摇床培养至 OD_{600} 为0.6–0.8时,加入0.8 mmol/L的IPTG分别于15 °C和37 °C条件下进行诱导。诱导后的菌液分别于4 °C、7500 r/min离心15 min弃上清;用pH 7.4的PBS缓冲液重悬菌体,高压细胞破碎仪破碎细胞,4 °C、10000 r/min离心10 min,收集上清备用。

采用Ni-NTA His Tag Kit对重组酶进行纯化,依次用含不同浓度咪唑(20、50、100、200、500 mmol/L)的洗脱液对Ni-NTA柱进行洗脱,收集、合并洗脱峰,SDS-PAGE检测蛋白纯度。

1.6 重组酶的酶学性质研究

1.6.1 酶活测定方法^[18]:反应体系为:粗酶液1 mL,底物(含0.2%琼脂的0.2 mol/L Tris-HCl缓冲液)1 mL,35 °C反应15 min,水解产生的还原糖采用DNS法测定其吸光值。酶活力单位定义为:在35 °C、pH 7.0条件下1 mL酶液每分钟产生1 μ g还原糖(以半乳糖计)所需的酶量。每组实验做3个平行,取平均值。

1.6.2 重组酶Aga3311的性质:分别以25、30、35、40、45、50 °C 6个温度梯度作为酶的反应温度,以确定其最适反应温度;分别在35、40、45、50 °C的条件下保温15、30、60 min,以测定该酶的热稳定性。分别以pH 4–6 (Na_2HPO_4 -柠檬酸),pH 6–9 (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4),pH 9–11 (甘氨酸-NaOH)作为底物反应缓冲液,以测定其最适pH。在底物中分别加入 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Be^{+} 、 Fe^{3+} ,以探究金属离子对酶活的影响。

1.7 降解产物分析

将重组酶1 mL与底物1 mL (0.2%的琼脂溶于pH 7的磷酸缓冲液)在35 °C条件下,分别反应15 min、30 min、1 h、6 h,沸水浴5 min终止反应,离心备用。

1.7.1 薄层层析法(TLC)^[19]:用毛细吸管吸取样品点于硅胶板上进行层析,展开剂为正丁醇:乙酸:水=2:1:1(体积比),显色剂为改进的苯胺,二苯胺。

1.7.2 质谱法(MS):酶解产物经Amicon的超滤管(Ultra15, 5 kDa)浓缩和纯化后,采用6320型离子阱质谱仪进行分析。分析条件:电喷雾(ESI)离子源(美国Agilent公司);雾化器压力(N_2)55 psi,干燥气(N_2)流速12 L/min,干燥气温度365 °C,毛细管电压,3500 V,质量扫描范围 m/z 150–500。

2 结果和分析

2.1 基因的序列分析

序列分析表明,aga3311包含1个完整开放阅读框,全序列长度为2349 bp,编码782个氨基酸,预测分子量为87 kDa。BLASTp比对结果显示,该序列编码的蛋白属于Glyco_hydro_42家族,经与Pseudoalteromonas属的琼胶酶:H9 AgaH91 (AJW83677.1)、PLSV agarase (WP_033186679.1)、P1-13-1a agarase (WP_055014356.1)和agarase (KDC51314.1)进行多序列比对表明,aga3311与PLSV agarase序列的相似性最高为96%,与AgaH91相似性最低为61%(图1)。由于序列分析并没有发现明显的琼胶酶家族保守区域,因此,我们仍需要结合酶学性质及降解特性对其进行归属。

2.2 重组酶Aga3311的表达与纯化

重组酶Aga3311在终浓度为0.8 mmol/L IPTG的诱导下表达量显著提高,在15 °C诱导16 h后,

| | | |
|-----------------|---|-----|
| AGA91 | MMKTHNN..VYISVLLLTGMLGGCTNNQLENTF.....ADDKTKKEHMLWDFEKPEYQFLLHHHATTKLIE...QQQDHKLQVMFAAKAHEHSDI | 88 |
| AGARASE_PLSV | MKPSFKSPGFILSAIALAVTADAGGNNQASNSVATSSDSGAKHAQKPLPWFAGMTDLQNVLTAAAGARVINTNIDGDECKLAIDLHSGEKSAGE | 100 |
| AGARASE_P1-131A | MMKTHNN..IYISVLLLTGMLGGCTNNQLENTF.....VVDTTKKEHMLWDFEKPEYQFLLQHNTTKLIE...QQQNHKLQVIFAAKHEHSDI | 88 |
| AGARASE | MNHIFKID..VRLTLMCLIGLAGGNNKISERKN...NTVVDFKKQLVIFDFEKNNYSDNINTINASTKLVE...QQSNHKLQVNIYSGEKSAGE | 90 |
| AGA3311 | MMPSFKSPGFILSAIALAVTADAGGNNQASNSVAPSSDSVAKHAQKPLPWFAGMTDLQNVLTAAADMRVY...DGGDECKLAIDLHSGEKSAGE | 96 |
| AGA91 | EYNSSTNNQALCFEFLADIDENSSASVHLVYSAPAECCOSHNRSFAVGNSSDVFMAINDPESIEGTIRSNENNMWTEFTTMMWVETGCLIDSQ | 188 |
| AGARASE_PLSV | SEIPDTPFQOECEFAFLADIDENSSASVHLVYSAPAECCOSHNRSFAVGNSSDVFMAINDPESIEGTIRSNENNMWTEFTTMMWVETGCLIDSQ | 200 |
| AGARASE_P1-131A | EYNSSTNNQALCFEFLADIDENSSASVHLVYSAPAECCOSHNRSFAVGNSSDVFMAINDPESIEGTIRSNENNMWTEFTTMMWVETGCLIDSQ | 188 |
| AGARASE | EYVNFQGNQALCFEFLADIDENSSASVHLVYSAPAECCOSHNRSFAVGNSSDVFMAINDPESIEGTIRSNENNMWTEFTTMMWVETGCLIDSQ | 190 |
| AGA3311 | SEIPDTPFQOECEFAFLADIDENSSASVHLVYSAPAECCOSHNRSFAVGNSSDVFMAINDPESIEGTIRSNENNMWTEFTTMMWVETGCLIDSQ | 196 |
| AGA91 | VTKVTEGKRLDLADKQLLDNRLIKPTNFTEVILGLVDFEGNQARRDSNRYSSSTRKOLLAISAQECRLIKSFEVDSRMSSEWQAFELKATGYFRTE | 288 |
| AGARASE_PLSV | VKSTIEDVRGVPEDRHILVDNRLIKPTNFTEVILGLVDFEGNQARRDSNRYSSSTRKOLLAISAQECRLIKSFEVDSRMSSEWQAFELKATGYFRTE | 300 |
| AGARASE_P1-131A | VTKVTEGKRLDLADKQLLDNRLIKPTNFTEVILGLVDFEGNQARRDSNRYSSSTRKOLLAISAQECRLIKSFEVDSRMSSEWQAFELKATGYFRTE | 288 |
| AGARASE | IVKYSIGVKGLLEDRFLIDNRLIKPTNFTEVILGLVDFEGNQARRDSNRYSSSTRKOLLAISAQECRLIKSFEVDSRMSSEWQAFELKATGYFRTE | 290 |
| AGA3311 | VKSIEDVRGVPEDRHILVDNRLIKPTNFTEVILGLVDFEGNQARRDSNRYSSSTRKOLLAISAQECRLIKSFEVDSRMSSEWQAFELKATGYFRTE | 296 |
| AGA91 | KYCGKSLVDPECYLSESGANVLANITITGYDFDSQFQKRAAGLTPEDSGCLNAPFAAWFSRYSSSELRAAMFWLSDDEHDLADNGYRREV | 388 |
| AGARASE_PLSV | KYCGKSLVDPECYLSESGANVLANITITGYDFDSQFQKRAAGLTPEDSGCLNAPFAAWFSRYSSSELRAAMFWLSDDEHDLADNGYRREV | 400 |
| AGARASE_P1-131A | KYCGKSLVDPECYLSESGANVLANITITGYDFDSQFQKRAAGLTPEDSGCLNAPFAAWFSRYSSSELRAAMFWLSDDEHDLADNGYRREV | 388 |
| AGARASE | KYCGKSLVDPECYLSESGANVLANITITGYDFDSQFQKRAAGLTPEDSGCLNAPFAAWFSRYSSSELRAAMFWLSDDEHDLADNGYRREV | 390 |
| AGA3311 | KYCGKSLVDPECYLSESGANVLANITITGYDFDSQFQKRAAGLTPEDSGCLNAPFAAWFSRYSSSELRAAMFWLSDDEHDLADNGYRREV | 396 |
| AGA91 | HSGAVRKGETSFYBANLARKYASNDPKVFETPRDRTTVDRMLWGFSTFGNWLDDDYQCNRLPYFANAWIIGDKTVSSGNDYWSPLDPDFDFEIKR | 488 |
| AGARASE_PLSV | HSGAVRKGETSFYBANLARKYASNDPKVFETPRDRTTVDRMLWGFSTFGNWLDDDYQCNRLPYFANAWIIGDKTVSSGNDYWSPLDPDFDFEIKR | 500 |
| AGARASE_P1-131A | HSGAVRKGETSFYBANLARKYQTRDEQTLMKWRRTTIVDRMLWGFSTFGNWLDDDYQCNRLPYFANAWIIGDKTVSSGNDYWSPLDPDFDFEIKR | 488 |
| AGARASE | HSGAVRKGETSFYBANLARKYQTHNNELMKWQRTTVDRMLWGFSTFGNWLDDDYQCNRLPYFANAWIIGDKTVSSGNDYWSPLDPDFDFEIKR | 490 |
| AGA3311 | HSGAVRKGETSFYBANLARKYASNDPKVFETPRDRTTVDRMLWGFSTFGNWLDDDYQCNRLPYFANAWIIGDKTVSSGNDYWSPLDPDFDFEIKR | 496 |
| AGA91 | ADITLATAQVQVNSPWCVGVIDNEKSWGMMSVNSCYGLVINTSVDETCSPTKAEVTLNKKRYQDIALNASMNSNTASHEFSSEHGVKNINQV | 588 |
| AGARASE_PLSV | ADITLATAQVQVNSPWCVGVIDNEKSWGMMSVNSCYGLVINTSVDETCSPTKAEVTLNKKRYQDIALNASMNSNTASHEFSSEHGVKNINQV | 600 |
| AGARASE_P1-131A | ADITLATAQVQVNSPWCVGVIDNEKSWGMMSVNSCYGLVINTSVDETCSPTKAEVTLNKKRYQDIALNASMNSNTASHEFSSEHGVKNINQV | 588 |
| AGARASE | ADITLATAQVQVNSPWCVGVIDNEKSWGMMSVNSCYGLVINTSVDETCSPTKAEVTLNKKRYQDIALNASMNSNTASHEFSSEHGVKNINQV | 590 |
| AGA3311 | ADITLATAQVQVNSPWCVGVIDNEKSWGMMSVNSCYGLVINTSVDETCSPTKAEVTLNKKRYQDIALNASMNSNTASHEFSSEHGVKNINQV | 596 |
| AGA91 | EAFSTNMLHNTANGYFAVVEQTAKHILNHLNGARFADWGMTETIRNAAAHADYVSNYYDEGLNDORHFLADIDRPSIIGEHNALDGLNLPGL | 688 |
| AGARASE_PLSV | IEPDSAMLSLAEKRYFAVVEQTAKHILNHLNGARFADWGMTETIRNAAAHADYVSNYYDEGLNDORHFLADIDRPSIIGEHNALDGLNLPGL | 700 |
| AGARASE_P1-131A | EAFSTNMLHNTANGYFAVVEQTAKHILNHLNGARFADWGMTETIRNAAAHADYVSNYYDEGLNDORHFLADIDRPSIIGEHNALDGLNLPGL | 688 |
| AGARASE | NTDESAMLSLAEKRYFAVVEQTAKHILNHLNGARFADWGMTETIRNAAAHADYVSNYYDEGLNDORHFLADIDRPSIIGEHNALDGLNLPGL | 690 |
| AGA3311 | IEPDSAMLSLAEKRYFAVVEQTAKHILNHLNGARFADWGMTETIRNAAAHADYVSNYYDEGLNDORHFLADIDRPSIIGEHNALDGLNLPGL | 696 |
| AGA91 | IEFASCHGRGKRYQVNNVVIDNPYFVGAHWFQYIDSPLTGGRAYDGENYVGVFNVADEPVPDLVNAARVNNQQLYGRRYTNVNV | 788 |
| AGARASE_PLSV | IEFASCHGRGKRYQVNNVVIDNPYFVGAHWFQYIDSPLTGGRAYDGENYVGVFNVADEPVPDLVNAARVNNQQLYGRRYTNVNV | 785 |
| AGARASE_P1-131A | IEFASCHGRGKRYQVNNVVIDNPYFVGAHWFQYIDSPLTGGRAYDGENYVGVFNVADEPVPDLVNAARVNNQQLYGRRYTNVNV | 773 |
| AGARASE | IEFASCHGRGKRYQVNNVVIDNPYFVGAHWFQYIDSPLTGGRAYDGENYVGVFNVADEPVPDLVNAARVNNQQLYGRRYTNVNV | 776 |
| AGA3311 | IEFASCHGRGKRYQVNNVVIDNPYFVGAHWFQYIDSPLTGGRAYDGENYVGVFNVADEPVPDLVNAARVNNQQLYGRRYTNVNV | 781 |

图 1. 琼胶酶基因3311编码的氨基酸多序列比对

Figure 1. Multiple alignment of *aga3311* amino acid sequences with known agarases.

重组酶的可溶性表达约占30 %左右, 而当诱导温度提高到37 °C时, 重组酶则主要以包涵体的形式存在(图 2-A), 其原因可能是在高温条件下, 大量的重组酶积累在细胞质中不能进行正确折叠, 从而形成不溶的包涵体。

重组酶经镍柱纯化, 当洗脱液中咪唑浓度为200 mmol/L时可得到单一的蛋白条带, SDS-PAGE显示其分子量约为87 kDa, 与Aga3311的预测值相一致(图 2-B), 纯化后重组酶Aga3311的比活力可达19.801 U/mg。

2.3 重组酶Aga3311的性质

如图 3-A和3-B所示, 重组酶Aga3311在温度为35 °C时酶活最高, 在35–45 °C的范围内仍能保持80%以上的酶活, 但当温度升高为50 °C时酶活

迅速丧失, 表明其具有热不稳定的特性, 可能与该酶来源于南极微生物具有密切的关系。温度稳定性结果显示, 当作用温度为35、40、45 °C, 保温30 min的条件下, 该酶的热稳定性很好, 酶活几乎没有下降; 但当温度提高到50 °C, 保温30 min的条件下, 酶活迅速下降, 当保温60 min后酶活几乎丧失。

如图 3-C所示, 该酶的最适pH为7.0 (磷酸缓冲液), 但在pH 4–10的范围内, 该酶仍保持50%以上的活性, 说明该酶具有较广泛的酸碱适应性。

多种金属离子能够影响重组酶的活性, 如图 3-D所示, Fe^{3+} , Be^{2+} , Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 均能显著提高Aga3311的活性, 特别是 Ca^{2+} 使其酶活提高1倍; 而金属离子 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Co^{2+} 则对该酶具有一定的抑制作用。

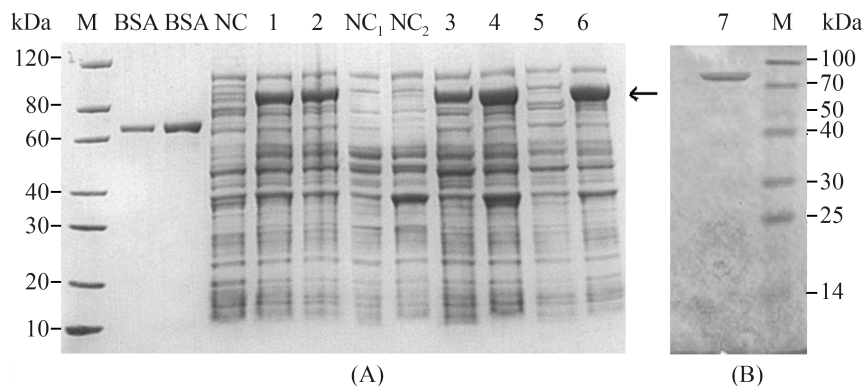


图 2. Aga3311蛋白表达的SDS-PAGE分析

Figure 2. SDS-PAGE of Aga3311. M: molecular mass of the marker; lane NC: total proteins of the recombinant *E. coli* BL21(DE3) before induce; lane 1: total proteins of the recombinant *E. coli* BL21(DE3) after induce 16 hours at 15 °C; lane 2: total proteins of the recombinant *E. coli* BL21(DE3) after induce 4 hours at 37 °C; lane NC₁: supernatant of the recombinant *E. coli* BL21(DE3) before induce; lane NC₂: the pellet fraction of the recombinant *E. coli* BL21(DE3) before induce; lane 3: supernatant of the recombinant *E. coli* BL21(DE3) after induce 16 hours at 15 °C; lane 4: the pellet fraction of the recombinant *E. coli* BL21(DE3) after induce 16 hours at 15 °C; lane 5: supernatant of the recombinant *E. coli* BL21(DE3) after induce 4 hours at 37 °C; lane 6: the pellet fraction of the recombinant *E. coli* BL21(DE3) after induce 4 hours at 37 °C; lane 7: purified Aga3311.

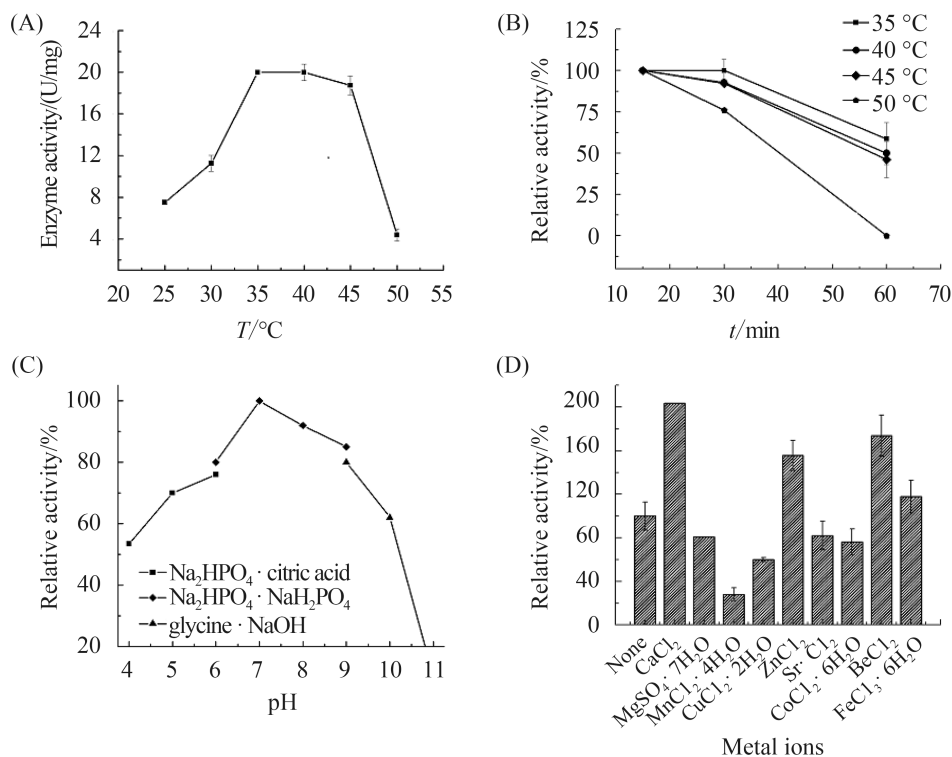


图 3. 重组酶Aga3311的理化性质

Figure 3. Characterization of purified Aga3311. A: The effect of temperature on the activity of Aga3311; B: The effect of thermostability on Aga3311 at different temperatures and time points; C: The effect of pH on the activity of Aga3311; D: The effects of metal ions and metal salts on the activity of Aga3311.

2.4 降解产物的分析

TLC分析结果显示, 重组酶Aga3311和底物反应15 min、30 min、1 h、6 h后的降解产物与新琼二糖的迁移率相同(图 4-A)。为了进一步对酶解产物进行验证, 我们对重组酶Aga3311的酶解产物进行了MS分析, 如图 4-B所示, 测得的离子峰(m/z)分别为: $325.2[M+H]^+$ 、 $342.3[M+NH_4]^+$ 、 $347.3[M+Na]^+$ 和 $363.2[M+K]^+$, 该分析结果与新琼二糖标准品的质谱结果(图 4-C)相符。

综上, 我们确定重组酶Aga3311降解琼胶的终产物主要为新琼二糖, 因此也可以推测出Aga3311是一种外切型的 β -琼胶酶。

3 讨论

极端生境孕育着独特的微生物类群, 生存在恶劣南极环境下的细菌, 形成了一系列独特生理特性以获取竞争优势。这也使得南极地区成为产

酶、抗生素、多糖、脂类等先导化合物菌株的潜在种源地^[20]。本研究的琼胶酶基因*aga3311*来自于南极嗜冷菌(*Pseudoalteromonas* sp. NJ-21), 而有关南极微生物产琼胶酶的研究尚不多见, 琼胶酶Aga3311的酶学性质研究表明, 该酶可溶性表达高、活性强、pH适应性广, 因而具有潜在的应用价值。

Aga3311的最适作用温度为35 °C, 且在50 °C迅速失活, 该性质符合南极微生物来源的低温酶的基本特征; 但该酶在40–45 °C的范围内具有与35 °C时几乎相同的酶活, 该特征则非常有利于酶与底物的充分作用, 因为琼胶的凝固温度为40 °C, 低于40 °C琼胶就会迅速凝固, 从而大大降低底物与酶的接触面积和作用效率。Aga3311的最适pH为7, 但在pH在4–10的范围之内仍保持着较高的酶活, 该特性与已报到的(AgaD、AgaA)的pH适应性相一致^[21–22], 由于该酶具有广泛的pH适

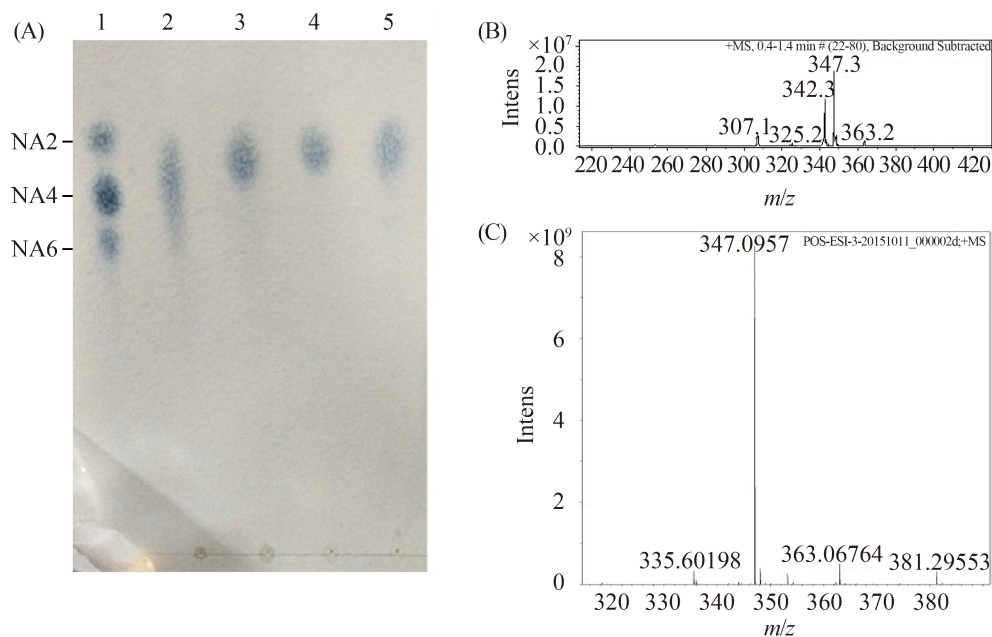


图 4. 重组酶Aga3311的降解产物分析

Figure 4. Analysis of hydrolysis products of purified Aga3311. A: TLC of the hydrolysis products of purified Aga3311. NA2: neoagarobiose; NA4: neoagarotetraose; NA6: neoagarohexaose; lane 1: standard mixture; lane 2: reaction products of the agarose with Aga3311 for 15 min; lane 3: reaction products of the agarose with Aga3311 for 30 min; lane 4: reaction products of the agarose with Aga3311 for 60 min; lane 5: reaction products of the agarose with Aga3311 for 6 hours. B: MS of the hydrolysis products of purified Aga3311. C: MS of standard neoagarobiose.

应性,因此在以后的生产和应用中具有广阔的适用范围。金属离子 Ca^{2+} 、 Be^{+} 、 Zn^{2+} 能够显著的提高该酶的酶活,其中尤以 Ca^{2+} 的作用最明显,该结果与很多海洋微生物来源的琼胶酶在 Ca^{2+} 的作用下酶活最高的报道相一致^[22-23],也符合该酶产生菌的生境特征。而 Mn^{2+} 对该酶的酶活具有较大的抑制作用,可能是 Mn^{2+} 与 Ca^{2+} 竞争活性中心的结合位点所致,而根据此特性可以进一步探究该酶的催化区域和空间构象,以阐明其催化机理。

琼寡糖具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等多种生物活性,并且与寡糖的聚合度(DP)密切相关。DP在2-4的寡糖可以抑制前列腺素 E_2 (PGE_2)和肿瘤坏死因子(TNF- α)的产生,从而抑制癌细胞的发生;可以通过阻止可诱导性NO合成酶(iNOS)的表达来抑制过量NO自由基的产生,从而消除NO过量造成的损伤;日本Kobayashi等发现低分子量的新琼二糖具有良好的吸湿和美白双重功效。本研究中,Aga3311降解琼胶的主要产物和终产物都为新琼二糖,而之前报道的琼胶酶的主要产物多为新琼四糖^[7, 24-26],还有一些琼胶酶的主要产物是新琼六糖和新琼四糖,但终产物是新琼二糖^[27]。由于Aga3311能够高效制备新琼二糖,因而在海藻的高值化利用领域具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Wang CN, Shi J, Ge SS, Liu YY, Liu PH. Progress of extraction of the carrageenan and agar. *Marine Sciences*, 2012, (6): 122-126. (in Chinese)
汪春牛, 时杰, 葛思思, 刘洋洋, 刘平怀. 卡拉胶与琼胶提取工艺的研究进展. *海洋科学*, 2012, (6): 122-126.
- [2] Ma RP, Zhu YB, Ni H, Luo HD, Xiao AF, Cai HN. Isolation, identification and characterization of an agarase-producing marine bacterial strain *Stenotrophomonas* sp. NTa. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(5): 543-551. (in Chinese)
马芮萍, 朱艳冰, 倪辉, 骆河东, 肖安凤, 蔡慧农. 一株产琼胶酶细菌的分离、鉴定及其琼胶酶基本性质. *微生物学报*, 2014, 54(5): 543-551.
- [3] Wang JX, Mou HJ, Jiang XL, Guan HS. Characterization of a novel β -agarase from marine *Alteromonas* sp. SY37-12 and its degrading products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 71(6): 833-839.
- [4] Wang JX, Jiang XL, Hu XK. Research advance on agar degradation by bacteria. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(3): 94-96, 93. (in Chinese)
王静雪, 江晓路, 胡晓珂. 细菌降解琼胶的研究进展. *中国水产科学*, 2001, 8(3): 94-96, 93.
- [5] Fu XT, Kim SM. Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. *Marine Drugs*, 2010, 8(1): 200-218.
- [6] Leon O, Quintana L, Peruzzo G, Slebe JC. Purification and properties of an extracellular agarase from *Alteromonas* sp. Strain C-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(12): 4060-4063.
- [7] Ha JC, Kim GT, Kim SK, Oh TK, Yu JH, Kong IS. β -Agarase from *Pseudomonas* sp. W7: purification of the recombinant enzyme from *Escherichia coli* and the effects of salt on its activity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1997, 26(1): 1-6.
- [8] Sugano Y, Terada I, Arita M, Noma M, Matsumoto T. Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(5): 1549-1554.
- [9] Duckworth M, Turvey JR. An extracellular agarase from a *Cytophaga* species. *The Biochemical Journal*, 1969, 113(1): 139-142.
- [10] Ohta Y, Hatada Y, Ito S, Horikoshi K. High-level expression of a neoagarobiose-producing β -agarase gene from *Agarivorans* sp. JAMB-A11 in *Bacillus subtilis* and enzymic properties of the recombinant enzyme. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2005, 41(2): 183-191.
- [11] Hatada Y, Ohta Y, Horikoshi K. Hyperproduction and application of α -agarase to enzymatic enhancement of antioxidant activity of porphyrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(26): 9895-9900.
- [12] Ma CP, Lu XZ, Shi C, Li JB, Gu YC, Ma YM, Chu Y, Han F, Gong QH, Yu WG. Molecular cloning and characterization of a novel β -agarase, AgaB, from marine *Pseudoalteromonas* sp. CY24. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(6): 3747-3754.
- [13] Suzuki H, Sawai Y, Suzuki T, Kawai K. Purification and

- characterization of an extracellular β -agarase from *Bacillus* sp. MK03. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 95(4): 328–334.
- [14] Lakshmikanth M, Manohar S, Lalitha J. Purification and characterization of β -agarase from agar-liquefying soil bacterium, *Acinetobacter* sp., AG LSL-1. *Process Biochemistry*, 2009, 44(9): 999–1003.
- [15] Han WJ, Zhao S, Liu HH, Wu ZH, Gu QQ, Li YZ. Isolation, identification and agarose degradation of a polysaccharide-degrading marine bacterium *Persicobacter* sp. JZB09. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(6): 776–783. (in Chinese)
韩文君, 赵帅, 刘会会, 吴志红, 顾谦群, 李越中. 一株多糖降解菌的分离、鉴定与琼脂糖降解能力. *微生物学报*, 2012, 52(6): 776–783.
- [16] Vincent WF. *Microbial Ecosystems of Antarctica*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988: 17–19.
- [17] Sinha RP, Häder DP. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2002, 1(4): 225–236.
- [18] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426–428.
- [19] Oh C, Nikapitiya C, Lee Y, Whang I, Kang DH, Heo SJ, Choi YU, Lee J. Molecular cloning, characterization and enzymatic properties of a novel beta-agarase from a marine isolate *Pseudoalteromonas* sp. AG52. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2010, 41(4): 876–889.
- [20] Lo Giudice A, Bruni V, Michaud L. Characterization of Antarctic psychrotrophic bacteria with antibacterial activities against terrestrial microorganisms. *Journal of Basic Microbiology*, 2007, 47(6): 496–505.
- [21] Ohta Y, Hatada Y, Nogi Y, Miyazaki M, Li Z, Akita M, Hidaka Y, Goda S, Ito S, Horikoshi K. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable β -agarase from a novel species of deep-sea *Microbulbifer*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(4): 505–514.
- [22] Dong JH, Tamaru Y, Araki T. Molecular cloning, expression, and characterization of a β -agarase gene, *agaD*, from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain PO-303. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(1): 38–46.
- [23] Dong JH, Tamaru Y, Araki T. A unique β -agarase, AgaA, from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain PO-303. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(6): 1248–1255.
- [24] Lee DG, Park GT, Kim NY, Lee EJ, Jang MK, Shin YG, Park GS, Kim TM, Lee JH, Lee JH, Kim SJ, Lee SH. Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 50 β -agarase from a marine *Agarivorans* isolate. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(23): 1925–1932.
- [25] Ohta Y, Nogi Y, Miyazaki M, Li ZJ, Hatada Y, Ito S, Horikoshi K. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable β -agarase from the novel marine isolate, JAMB-A94. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004, 68(5): 1073–1081.
- [26] Fu XT, Pan CH, Lin H, Kim SM. Gene cloning, expression, and characterization of a β -agarase, AgaB34, from *Agarivorans albus* YKW-34. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(3): 257–264.
- [27] Leuenberger-Fisher MR. Health care business method patents: prior art, secrecy, and secondary indicia of obviousness. *Biotechnology Law Report*, 2005, 24(2): 149–167.

Expression and characterization of the agarase gene *aga3311* from an Antarctic bacterium

Xiumeng Liu¹, Jiang Li^{2*}, Xuguang Hou¹, Peiqing He²

¹ Marie College, Shandong University, Weihai 264200, Shandong Province, China

² Key Laboratory of Marine Bioactive Substances, the First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] The complete genome of the agarolytic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. NJ21 from Antarctic sample was analyzed by bioinformatics methods and putative agarase *aga3311* was screened. Expression and characterization of the putative agarase *aga3311* were studied. [Methods] Gene *aga3311* was cloned and expressed by genetic engineering method firstly; then, the recombinant enzyme was purified by Ni-NTA chromatography and the characterization of recombinant enzyme was determined by dinitrosalicylic acid method; the hydrolysis product of recombinant enzyme Aga3311 was analyzed by thin-layer chromatography (TLC) and mass spectrometry (MS). [Results] The recombinant expression vectors (pET-30(a)+ *aga3311*) was overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) and 30% of the recombinant protein was soluble. The purified agarase (Aga3311) revealed a single band on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, with an apparent molecular weight of 87 kDa. The optimum temperature of the recombinant agarase was 35 °C, and it maintained higher activity between 30 and 45 °C, but the activity declined rapidly above 50 °C, typical of thermal instability enzyme. The optimum pH was 7.0, and it maintained 50% of its maximum activity between pH 4 and 10. Aga3311 was significantly activated by Fe³⁺, Be²⁺, Zn²⁺ and Ca²⁺, especially Ca²⁺ doubled the enzyme activity. The pattern of agar hydrolysis of Aga3311 is an exo-β-agarase, producing neoagarobiose (NA2) as the final main product. [Conclusion] Aga3311 is an exo-β-agarase of Glyco_hydro_42 family, producing neoagarobiose (NA2) as the final main product.

Keywords: agarase, expression enzymatic characterization, neoagarobiose

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Chinese Polar Environment Comprehensive Investigation & Assessment Programs (CHINARE2014-01-05), by the Key Laboratory of Marine Bioactive Substance and Modern Analytical Technique, SOA (MBSMAT-2015-06) and by the Qingdao Fundamental and Applied Research Project (14-2-4-14-jch)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-532-88966520; E-mail: lijiaang@fio.org.cn

Received: 11 December 2015; Revised: 10 February 2016; Published online: 14 March 2016