

研究报告

罗尼氏弧菌 *Vibrio shilonii* BY 新琼胶酶基因的克隆、 序列分析及表达

杨光¹ 叶秀云^{1,2} 林娟^{1,2} 李婧玘¹ 韩尧跃¹ 李仁宽^{1,2*}

(1. 福州大学 生物科学与工程学院 福建 福州 350116)

(2. 福建省海洋酶工程重点实验室 福建 福州 350116)

摘要:【目的】从海洋来源的罗尼氏弧菌菌株 BY 中克隆得到一个具有琼胶酶活性的新基因，并对其重组表达。【方法】对实验室保藏的产琼胶酶菌株 BY 进行 16S rRNA 基因序列分析，并构建系统发育树。根据已报道的琼胶酶基因序列的同源性，设计简并引物，利用降落 PCR (Touch-down PCR) 及染色体步移技术扩增琼胶酶基因序列全长，对基因序列进行生物信息学分析。将目的基因插入 pET22a(+) 载体，转化大肠杆菌 BL21(DE3)，对重组酶进行表达，利用 DNS 法测定了重组酶的酶活，对该重组琼胶酶学性质进行研究。【结果】克隆得到一条新的琼胶酶基因，命名为 *Vibrio* sp. BY (GenBank 登录号: AIW39921.1)，*Vibrio* sp. BY 基因序列全长 2 232 bp，编码 744 个氨基酸，理论分子量为 85 kD，*Vibrio* sp. BY 的氨基酸序列基因库中与已知的琼胶酶氨基酸序列 *Vibrio* sp. EJY3 的相似度为 86%。发酵液琼胶酶活力为 71.73 U/mL，证明表达的蛋白为琼胶酶。酶学性质研究表明重组琼胶酶的最适温度及 pH 分别为 50 °C 和 7.0，并且具有较好的稳定性。【结论】利用染色体步移技术克隆得到一条新的琼胶酶基因，并在大肠杆菌 BL21(DE3) 中实现了重组表达，为琼胶酶的应用奠定了基础。

关键词: 琼胶酶，罗尼氏弧菌，染色体步移技术，表达

Cloning, functional analysis and expression of a novel gene encoding agarase from *Vibrio shilonii* BY

YANG Guang¹ YE Xiu-Yun^{1,2} LIN Juan^{1,2} LI Jing-Hong¹ HAN Yao-Yue¹
LI Ren-Kuan^{1,2*}

(1. College of Biotechnology and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350116, China)

(2. Fujian Key Laboratory of Marine Enzyme Engineering, Fuzhou, Fujian 350116, China)

Abstract: [Objective] The novel gene encoding agarase in a strain of *Vibrio shilonii* screened from marine was cloned and expressed in *E. coli* BL21. [Methods] Isolate an agarase producing strain BY, 16S rRNA gene sequence analysis and construct phylogenetic tree. The degenerate primer was designed according to the known agarase gene sequence, touch-down PCR and chromosome walking techniques were used to obtain agarase full-length gene sequence. After being assembled, the

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项项目(No. 201305015)

*通讯作者: Tel: 86-591-22866376; 信箱: rkuanlee@163.com

收稿日期: 2015-01-09; 接受日期: 2015-03-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-04-08

full-length of agarase gene was inserted into expression plasmid pET22a(+), then transformed into *E. coli* BL21(DE3). Activity of recombinant enzyme was determined utilizing DNS method, study the enzymatic properties of the recombinant enzyme. **[Results]** A new gene *Vibrio* sp. BY was cloned from strain BY genomic. The full length of *Vibrio* sp. BY consists of a 2 232 bp, encoding 744 amino acids, with a putative molecular mass of 85 kD, the amino acids sequence of agarase *Vibrio* sp. BY shared 86% identity with the agarase of *Vibrio* sp. EJY3. The activity of agarase was 71.73 U/mL, which indicated that *Vibrio* sp. BY was an agarase gene. The optimum temperature and pH for the recombinant activity was at 50 °C and 7.0, have a high agarase stability. **[Conclusion]** A new agarase gene was cloned by chromosome walking techniques, realized recombinant in *E. coli* BL21(DE3), which lays a good foundation for the research on application of agarase.

Keywords: Agarase, *Vibrio shilonii*, Chromosome walking techniques, Expression

琼胶(Agar), 是从藻类生物细胞壁中提取出来的粘性多糖, 是一类应用广泛的海藻胶, 它主要包含琼脂糖和琼脂胶这两种组分^[1]。琼胶酶(Agarase)是一种糖苷水解酶(GH)类, 能够特异性降解琼胶, 其水解产物是琼胶寡糖^[2]。根据琼胶酶酶解方式的不同, 琼胶酶可以分为 α -琼胶酶(EC 3.2.1.158)和 β -琼胶酶(EC 3.2.1.81)^[3]。所有的琼胶酶都属于糖苷水解酶家族, 根据 Henrissat 等^[4]所提出的分类方法, α -琼胶酶被划分在 GH96 家族, 而 β -琼胶酶被划分在 GH16、GH42、GH50、GH86 家族。琼胶酶具有广泛的应用, 如制备琼胶寡糖^[5]、凝胶回收 DNA 和 RNA^[6]、作为海藻的工具酶等。

目前关于琼胶酶的研究主要集中在菌种选育和构建基因工程菌两个方面, 通过菌种选育得到的琼胶酶菌株往往存在酶活比较低、稳定性较差、不能进行工业化生产等不足, 因而通过分子生物学的手段克隆表达重组琼胶酶蛋白, 已经成为一个趋势, 也便于进一步工业化生产。1987 年, Buttner 等^[7]首次报道了琼胶酶基因 *dagA* 的序列, 该基因来源于天蓝色链霉菌菌株。2004 年, Ohta 等^[8]克隆得到了来自于 *Microbulbifer* 菌株 JAMB-A7 的 β -琼胶酶基因 *AgaA7*。Jang 等^[9]于 2010 年从海洋细菌 (*Agarivorans* sp. LQ48)中克隆表达了一个新的 β -琼胶酶基因 *rAgaB*。由于对琼胶酶的分子生物学研究起步较晚, 克隆表达的琼胶酶基因较少, 仅仅局限于弧菌(*Vibrio* sp.)^[10-11]、假交替单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、产微球茎菌(*Microbulbifer* sp.)等少数几个种

属, 对新的琼胶酶基因的克隆表达就显得尤为重要了。本文针对实验室保藏的产琼胶酶菌株, 对该菌株进行分子生物学鉴定, 根据已报道的琼胶酶序列同源性利用 Touch down PCR 和染色体步移技术的方法, 克隆得到一个新的琼胶酶基因, 并对该基因进行生物信息学分析、诱导表达及重组酶的酶学性质研究, 为琼胶酶的进一步研究打下理论基础。

1 材料与方法

1.1 培养基

2216E 培养基^[12](g/L): 蛋白胨 5.00, 酵母膏 3.00, FeCl₃·6H₂O 0.02, 人工海水 1.00 L, pH 7.0。

液体发酵培养基(g/L): 琼脂 2, 其余组分与 2216E 培养基相同。

人工海水^[13](g/L): NaCl 26.5, MgCl₂·7H₂O 2.1, KCl 0.9, CaCl₂·2H₂O 1.2, MgSO₄·7H₂O 4.2, 蒸馏水 1.0 L。

大肠杆菌培养基为 LB 培养基(g/L), (蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, pH 7.0); 含重组质粒的大肠杆菌培养基添加氨卞青霉素。

1.2 主要试剂

柱式细菌基因组 DNA 试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒, 购自上海生工生物工程有限公司; DNA marker、*Taq* PCR mix、PCR 缓冲液、*EcoR* I、*Xho* I、*Bam*H I、*Hind* III、pMD18-T 载体、Genome Walking Kit 试剂盒等, 购自宝生物(大连)有限公司; *Pfu Taq* Polymerase、10×*Pfu* PCR buffer (含 MgCl₂) 等购自北京全式金公司; 引物由上海生

工生物工程有限公司合成; DNA 测序由 Invitrogen 生命技术有限公司完成。

DNS 试剂: 取 180 g 酒石酸钾钠于 500 mL 的蒸馏水中, 再添加 3,5-二硝基水杨酸 5 g, 接着依次添加 NaOH、苯酚和无水亚硫酸钠各 5 g, 待完全溶解后定容至 1 L。置于棕色瓶中放置一周后使用。

1.3 菌株与质粒

菌株 BY 由实验室分离保藏, *E. coli* DH5 α 、BL21、pET22a(+)由本实验室保藏。

1.4 菌株 BY 的分子鉴定

16S rRNA 基因序列分析: 提取基因组 DNA, 以其为模板进行扩增, 通用引物为 8F 和 1492R, 序列见表 1。PCR 反应体系 (20 μ L): ddH₂O 7.0 μ L, 2 \times Taq PCR mix 10 μ L, 正向引物 8F (10 μ mol/L) 1.0 μ L, 反向引物 1492R (10 μ mol/L) 1.0 μ L, 模板 1.0 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 胶回收 PCR 产物, TA 克隆, 连接到 pMD18-T 载体中, 转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆, 将所得到的重组质粒送 Invitrogen 公司测序。

1.5 Touch-down PCR 扩增保守片段

选择已报道的同种属、序列保守性较高的琼胶酶氨基酸序列为模板, 设计正向和反向简并引物各一条, 分别命名为 BY-F、BY-R (表 1)。以菌株 BY 基因组 DNA 为模板, 利用 Touch-down PCR 扩增目的片段, PCR 反应体系 (20 μ L): ddH₂O 7.0 μ L, 2 \times Taq PCR mix 10 μ L, 正向引物 BY-F (10 μ mol/L) 1.0 μ L, 反向引物 BY-R (10 μ mol/L) 1.0 μ L, 模板 1.0 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s (每循环一次温度减低 1 $^{\circ}$ C, 最后在 40 $^{\circ}$ C 循环 20 次, 共循环 40 次), 72 $^{\circ}$ C 90 s; 72 $^{\circ}$ C 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果, 用 DNA 胶回收试剂盒进行切胶纯化和克隆测序, 最后将重组质粒送 Invitrogen 公司测序。将测序结果在 NCBI 数据库中比对, 根据比对结果确定该序列为琼胶酶的保守片段序列。

1.6 利用染色体步移技术扩增琼胶酶 *Vibrio sp.* BY 基因的全长

根据 Touch-down PCR 扩增得到的基因序列, 分别设计 5' 和 3' 各 3 条引物, 编号为 5'-SP1、5'-SP2、5'-SP3、3'-SP1、3'-SP2、3'-SP3, 序列见表 1。4 段简并引物见于 Genome Walking Kit 试剂盒内, 分别编号为 AP1、AP2、AP3、AP4。

第 1 轮反应: 5' 端未知序列扩增 PCR 反应条件: 以基因组 DNA 为模板, PCR 反应体系 (25 μ L): ddH₂O 17.8 μ L, 10 \times *Pfu* PCR buffer (含 MgCl₂) 2.5 μ L, dNTPs mix (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, 正向引物 (10 μ mol/L) 1.0 μ L, 反向引物 (10 μ mol/L) 1.0 μ L, *Pfu* Taq Polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 模板 0.2 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min; 98 $^{\circ}$ C 1 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 25 $^{\circ}$ C 3 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 44 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 15 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。用 3'-SP1 引物取代 5'-SP1, 其他条件不变, 用于扩增 3' 端未知序列。

第 2 轮反应: 5' 未知序列扩增 PCR 反应条件: 以第 1 轮 PCR 结果为模板, PCR 反应体系同第 1 轮反应。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 44 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 15 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 3'-SP2 引物取代 5'-SP2, 其他条件不变, 用于扩增 3' 端未知序列。

第 3 轮反应: PCR 反应条件: 以第 2 轮 PCR 结果为模板, PCR 反应体系同第 1 轮反应。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。用 3'-SP 引物取代 5'-SP, 其他条件不变, 用于扩增 3' 端未知序列。保证其他条件不变将引物 AP1 变为 AP2、AP3、AP4, 进行 3 轮 PCR 过程。1% 琼脂糖凝胶电泳检测第 3 轮 PCR 结果, 用 DNA 胶回收试剂盒进行切胶纯化和克隆测序, 最后将重组质粒送到 Invitrogen 公司测序。

表 1 实验中所用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	长度 Size (bp)	引物来源 Primers source
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20	Used in this study
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	19	Used in this study
BY-F	TGGARKCYTACGGCAGYGACCG	22	Used in this study
BY-R	GGYTTRTARAABCGHACCCAGTC	23	Used in this study
5'-SP1	GGCGACTCTTGTGCATCACGGCTAAGG	27	Used in this study
5'-SP2	GATTTCTGCGCAACTTGTTGACCGTCG	29	Used in this study
5'-SP3	TTTGAATACTGGGTCAAATGG	21	Used in this study
5'-SP4	CACTTGTGTAGAGCGAGAGCGTAG	24	Used in this study
5'-SP5	GAAGCATCAATATTGTTGAAG	21	Used in this study
5'-SP6	CACCACATCGTGAATAGTTGGCGT	24	Used in this study
3'-SP1	CTATATTTAGGCTGCCGATTCGCAGACTG	29	Used in this study
3'-SP2	AAGGTTTACATCCTCAGCCATGGAG	25	Used in this study
3'-SP3	CGGTGAGTTCATATCGGCTCG	22	Used in this study
BY-Q-F	ATGACGCCAACTATTCACGATG	22	Used in this study
BY-Q-R	TTGGTATCGTCGCTTGACATAG	23	Used in this study
BY-Q-F-E	<u>GAATTC</u> GATGACGCCAACTATTCACGATG	29	Used in this study
BY-Q-R-X	<u>CTCGAG</u> TTGGTATCGTCGCTTGACATAG	29	Used in this study

注：酶切位点以下划线表示。BY-Q-F-E: *EcoR* I 酶切位点；BY-Q-R-X: *Xho* I 酶切位点。

Note: Restriction sites were underlined. BY-Q-F-E: *EcoR* I restriction sites; BY-Q-R-X: *Xho* I restriction sites.

测序结果显示 5'未获得序列全长，则需要通过染色体步移技术进行 2 次 PCR 扩增(保证其他条件不变，分别用引物 5'-SP4、5'-SP5、5'-SP6 代替引物 5'-SP1、5'-SP2、5'-SP3)，直到扩增出序列 5'全长为止。

将 5'测序结果与 3'测序结果在 NCBI 数据库中比对，并与保守片段拼接，拼接完后，根据两端测序结果，设计琼胶酶 BY 基因的序列全长引物，分别编号为 BY-Q-F，BY-Q-R，序列见表 1。利用常规 PCR 过程得到琼胶酶 BY 基因的全长，1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果，用 DNA 胶回收试剂盒进行切胶纯化和克隆测序，最后将重组质粒送到 Invitrogen 公司测序。

1.7 利用生物信息学软件对琼胶酶 *Vibrio* sp. BY 基因进行分析

利用 NCBI BLAST 检索系统中的数据库进行

比对，分析该琼胶酶基因与其他琼胶酶基因的相似性；用 ProtParam (<http://cn.expasy.org/tools/protparam.html>)分析理论分子量和等电点；用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)和 SignalP V2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析该琼胶酶的开放阅读框和可能的信号肽序列；利用 NCBI 网站的结构域数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行结构域分析；利用 Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>)分析琼胶酶 *Vibrio* sp. BY 基因所编码蛋白质的三级结构。

1.8 *Vibrio* sp. BY 基因的重组表达

分别设计上下游 *Vibrio* sp. BY 基因序列全长引物，命名为 BY-Q-F-E (含 *EcoR* I 酶切位点)和 BY-Q-R-X (含 *Xho* I 酶切位点)(表 1)，进行 PCR 扩增，1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果，用 DNA 胶

回收试剂盒进行切胶纯化和克隆测序, 最后将重组质粒送 Invitrogen 公司测序。利用 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性内切酶酶切重组质粒, DNA 胶回收试剂盒进行切胶回收, 回收产物连接用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切的 pET22a(+)载体, 构建重组质粒 pET22a(+)-BY, 并转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株中, 诱导表达。

采用 DNS 法测定琼胶酶的酶活力。将发酵液 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为粗酶液。适当稀释后取 20 μ L 酶液, 加入含 0.3%琼胶的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 7.0, 0.2 mol/L) 180 μ L, 50 $^{\circ}$ C 恒温水浴 15 min 后, 加入 300 μ L DNS 试剂, 煮沸 5 min 后立即冷却并定容至 2 mL, 混匀, 在 520 nm 处测定 OD 值, 空白组先加 DNS 再加酶液, 其他步骤相同, 对比半乳糖标准曲线计算酶活力。酶活单位定义为在上述条件下, 每分钟生成 1 μ g 半乳糖的还原糖所需的酶量为 1 个酶活单位。

1.9 SDS-PAGE 蛋白电泳

将重组转化子诱导培养 20 h, 将菌液离心, 取上清, 进行分离胶浓度为 12.5% SDS-PAGE 蛋白电泳, 考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色后检测目的蛋白条带。

1.10 重组琼胶酶的酶学性质研究

1.10.1 重组琼胶酶的最适温度及温度稳定性: 在不同温度(30、40、50、60、70 $^{\circ}$ C)下测定琼胶酶的酶活力, 以酶活力最高者为 100%对照, 确定最适反应温度。将酶液分别置于不同温度(30、40、50、60、70 $^{\circ}$ C)的水浴中分别保温 0.5、1、2、4 h, 然后迅速冷却, 在最适温度下反应, 测定琼胶酶的剩余酶活力, 以活力最高者为 100%对照, 探究温度对琼胶酶稳定性的影响。

1.10.2 重组琼胶酶的最适 pH 及 pH 稳定性: 将酶液分别与 pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的 0.3%琼胶底物在 50 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 测定琼胶酶的酶活力, 以酶活力最高者为 100%对照, 确定最适 pH 值。将酶液置于 pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的缓冲液中室温保持 4 h 后, 于最适 pH 下测定剩余酶活力, 以

最适条件下未保温琼胶酶的酶活力为 100%对照, 探究 pH 对琼胶酶稳定性的影响。

2 结果与分析

2.1 菌株 BY 的 16S rRNA 基因分子鉴定及进化树

利用通用的 16S rRNA 基因引物对基因组 DNA 进行 PCR, 将 PCR 结果测序, 测序结果在 NCBI 数据库中比对, 比对结果显示菌株 BY 的 16S rRNA 基因序列与弧菌 *Vibrio shilonii* HJ7 的 16S rRNA 基因序列具有高达 99%的相似性, 将菌株 BY 命名为 *Vibrio* sp. BY, 根据比对结果构建出菌株 BY 的系统发育树(图 1), 形态学观察表明细胞为短小杆状, 且部分呈现圆点状, 结合形态学观察及分子生物学鉴定结果, 鉴定菌株 BY 为一株罗尼氏弧菌(*Vibrio shilonii*)。

2.2 保守片段 PCR 结果

简并引物的 PCR 结果如图 2 箭头所示, 测序结果在 NCBI 数据库中比对显示, 基因序列与已报道的琼胶酶基因无相似性, 但该基因片段的氨基酸序列与弧菌 *Vibrio* sp. EJY3 (GenBank 登录号: AEX22367.1)琼胶酶的相似性为 89%。因此, 我们推断该序列为琼胶酶 *Vibrio* sp. BY 的部分基因片段。

2.3 染色体步移技术得到 BY 菌株琼胶酶基因的全长

由于利用简并 PCR 扩增获得的序列仅为部分序列, 因此我们利用染色体步移技术扩增获得琼胶酶 *Vibrio* sp. BY 基因序列的全长。

保守片段上游序列的获得: 利用 5'端的特异性引物和简并引物, 经过染色体步移技术的 3 轮循环, 第 3 轮 PCR 结果电泳如图 3 所示, 得到长度为 700 bp 的片段(图 3 泳道 3 箭头所指方向), 将 PCR 结果测序, 测序结果与保守片段 5'端能拼接起来, 将拼接结果在 NCBI 数据库中比对, 比对结果显示, 上游序列还差 750 bp, 因此再设计 3 对特异性引物 5'-SP4、5'-SP4、5'-SP6 利用二次染色体步移技术, 最终扩增得到保守片段长度为 1 200 bp, 比对结果

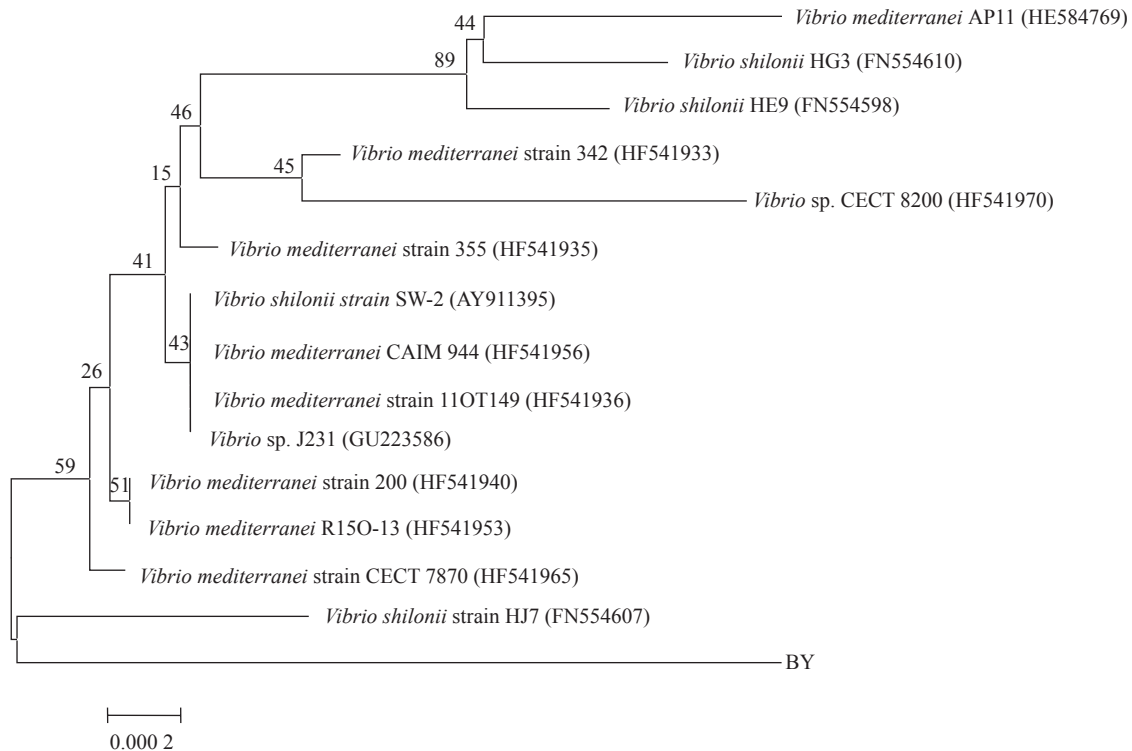


图 1 菌株 BY 16S rRNA 基因序列同源性的系统发育树

Figure 1 The phylogenetic tree based on the homology of 16S rRNA gene sequences of strain BY

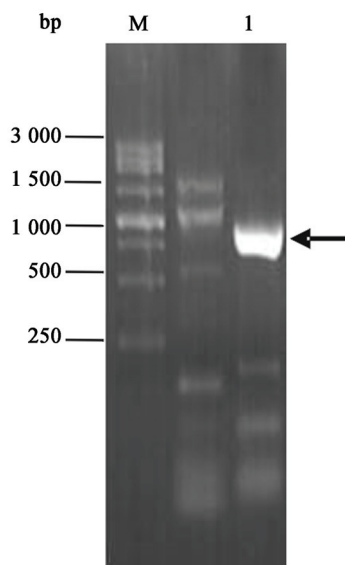


图 2 简并 PCR 结果

Figure 2 The result of degenerate PCR

Note: M: 250 bp marker; 1: Products of degenerate PCR.

显示包含了完整的上游 5'端剩余的序列(图 4 泳道 3 箭头所示)。

保守片段下游序列的获得: 利用 3'端的特异性引物和简并引物, 经过染色体步移技术的 3 轮循环, 第 3 轮 PCR 结果如图 3 所示, 得到了长度为 500 bp 的片段(图 3 泳道 8 箭头所示), 大小与理论估算值相一致, 将 PCR 结果测序, 测序结果与保守片段 3'端能拼接起来, 因此我们认为获得了保守片段的下游序列。

利用 DNAMAN 软件将保守片段和上游、下游序列拼接在一起, 放入 NCBI 数据库进行比对, 比对结果显示基因序列与已报道的琼胶酶基因无相似性, 但该基因片段的蛋白序列与报道的弧菌琼胶酶的相似性为 89%, 且大小与推测的理论值(2 232 bp)完全一致。

根据拼接结果设计 BY-Q-F、BY-Q-R 一对引物, 利用常规 PCR 进行扩增, 电泳结果如图 5 所示, 大

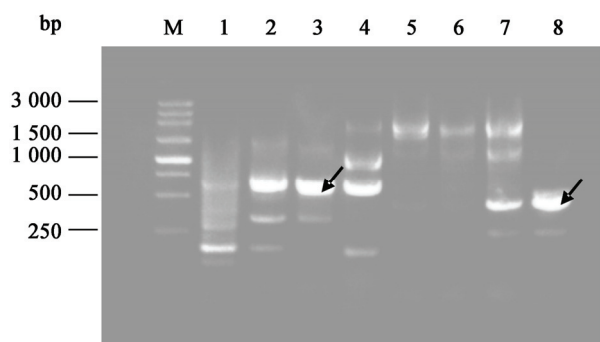


图3 染色体步移方法获得 *Vibrio sp. BY* 基因序列电泳图
Figure 3 Chromosome walking method to get the *Vibrio sp. BY* gene sequence

注: M: 250 bp marker; 1、2、3、4 分别表示 4 个简并引物 AD1、AD2、AD3、AD 与 5'端上游序列的特异性引物 5'SP1、5'SP2、5'SP3 第 3 轮 PCR 结果; 5、6、7、8 分别表示 3 个简并引物 AD1、AD2、AD3、AD4 与 3'端下游序列的特异性引物第 3 轮 PCR 结果.

Note: M: 250 bp marker; 1, 2, 3, 4 respectively represent specific primers of the third round of the PCR results of four degenerate primers AD1, AD2, AD3, AD4 and 5' end of upstream sequence; 5, 6, 7, 8 respectively four degenerate primers AD1, AD2, AD3, AD4 and the 3' end of downstream sequence specific primers of the third round of the PCR result.

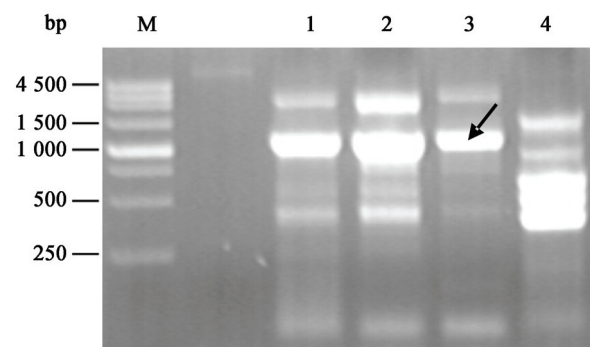


图 4 染色体步移方法获得 *Vibrio sp. BY* 5'端未知序列第 2 次扩增电泳图

Figure 4 Second chromosome walking method to get the unknown *Vibrio sp. BY* gene 5' sequence

注: M: 250 bp marker; 1、2、3、4 分别表示 4 个简并引物 AD1、AD2、AD3、AD 与 5'端上游序列的特异性引物 5'SP4、5'SP5、5'SP6 第 3 轮 PCR 结果.

Note: M: 250 bp marker; 1, 2, 3, 4 respectively represent specific primers of the third round of the PCR results of four degenerate primers AD1, AD2, AD3, AD4 and 5' end of pstream sequence.

小约为 2 200 bp, 对 PCR 结果进行测序, 测序结果利用 NCBI 数据库进行比对, 比对结果显示该基因编码的氨基酸序列与报道的弧菌琼胶酶的相似度为 89%, 且大小与拼接之后推测的理论值(2 232 bp)完全一致, 因而我们认为获得了琼胶酶 *Vibrio sp. BY* 序列的全长, 且该基因为新的琼胶酶基因, 将全长序列提交 NCBI 数据库, 得到登录号为 AIW39921.1。

2.4 琼胶酶 BY 基因的生物信息学分析

对琼胶酶 *Vibrio sp. BY* 基因序列生物信息学分析可知: *Vibrio sp. BY* 基因全长 2 232 bp, 编码 744 个氨基酸, 理论分子量为 85.4 kD, 理论等电点 pI 值为 5.02; 该基因所编码的蛋白序列中无信号肽; 结构域分析表明, 该琼胶酶属于糖苷水解类 42 家族(GH42); BLAST 分析表明, 琼胶酶 *Vibrio sp. BY* 的氨基酸序列与 NCBI 数据库中已知琼胶酶序列 *Vibrio sp. EJY3* 的相似性为 86%, 与琼胶酶序列 *Agarivorans albus* 的相似性为 67%, 为一种新型琼胶酶; 通过 Swiss-Model 分析得到该基因编码蛋白的三级结构(图 6), 有一个 Ca²⁺结合位点, 与已报道的 β-琼胶酶 4bq4.1.A 的三级结构有 52%的相似性。

2.5 琼胶酶 *Vibrio sp. BY* 基因的重组表达

根据 *Vibrio sp. BY* 基因的 BY-Q-F、BY-Q-R 引

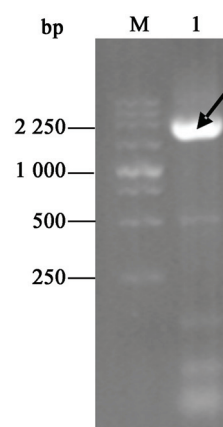


图 5 PCR 扩增 *Vibrio sp. BY* 基因序列全长

Figure 5 PCR result of *Vibrio sp. BY* gene

注: M: 250 bp marker; 1: *Vibrio sp. BY* 基因序列全长.

Note: M: 250 bp marker; 1: Full-length of *Vibrio sp. BY* gene.

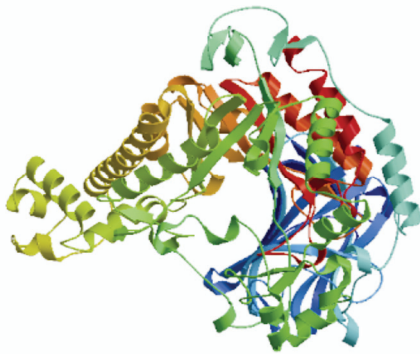


图6 *Vibrio* sp. BY 基因编码蛋白的三级结构

Figure 6 The third level structure of the protein encoded by *Vibrio* sp. BY gene

物PCR扩增得到琼胶酶 *Vibrio* sp. BY 基因序列的全长(图7), 构建重组表达载体 pET22a(+)-BY, 提取质粒, 再用 *Eco*R I 和 *Xho* I 限制性内切酶酶切质粒, 双酶切结果如图7所示, 箭头所示的为目的基因, 大小约 2 250 bp, 与理论分子量相同, 则表明成功构建了重组表达载体 pET22a(+)-BY。

重组表达载体 pET22a(+)-BY 在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达, SDS-PAGE 电泳结果如图

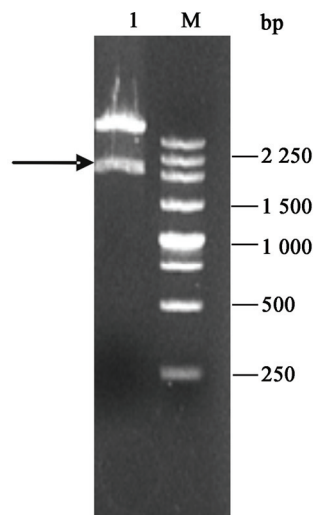


图7 重组表达载体 pET22a(+)-BY 双酶切结果

Figure 7 Double digestion results of recombinant expression vector pET22a(+)-BY

注: M: 250 bp marker; 1: 重组表达载体 pET22a(+)-BY 双酶切产物。

Note: M: 250 bp marker; 1: Products of double digestion of recombinant expression vector pET22a(+)-BY.

8 所示, 经 IPTG 诱导后的重组表达载体有明显的目的蛋白表达, 且表达蛋白(图8箭头所示)的蛋白分子量为 85 kD, 与理论分子量相同; 利用 DNS 测得表达后上清液琼胶酶酶活力为 71.73 U/mL, 以上结果表明基因 *Vibrio* sp. BY 编码产生的蛋白为琼胶酶。

2.6 重组琼胶酶的酶学性质研究

重组琼胶酶最适的反应温度实验(图9A)表明, 重组琼胶酶与对琼胶的最适作用温度为 50 °C, 温度高于 50 °C 或低于 50 °C 时琼胶酶酶活力都下降。温度稳定性实验表明, 在温度低于 50 °C 时该重组琼胶酶很稳定, 放置 4 h 后仍保持着 80% 以上的酶活力。而在 70 °C 保温 4 h 后, 酶活力仅剩原活力的 20% 左右, 结果显示该重组琼胶酶在温度低于 50 °C 时稳定性较好, 有较宽的温度承受范围(图9B)。在重组琼胶酶最适反应 pH 实验中(图9C), 底物的 pH 为 7.0 时, 琼胶酶酶活力最高, 说明该重组琼胶酶最适反应 pH 为 7.0。重组琼胶酶 pH 稳定

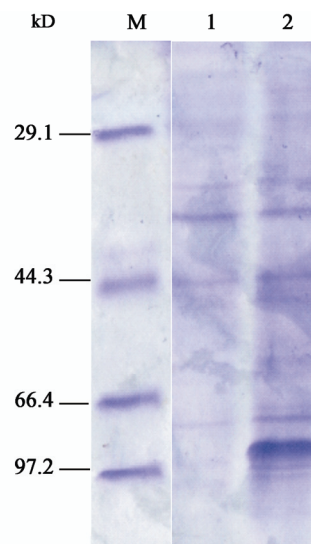


图8 重组表达载体 pET22a(+)-BY SDS-PAGE 电泳图

Figure 8 SDS-PAGE of recombinant expression vector pET22a(+)-BY

注: M: 蛋白 Marker; 1: IPTG 诱导的 pET22a(+)载体表达菌液; 2: IPTG 诱导的 pET22a(+)-BY 重组表达菌液。

Note: M: Protein marker; 1: IPTG induction of pET22a(+) expression bacteria; 2: IPTG induction of pET22a(+)-BY recombinant expression bacteria.

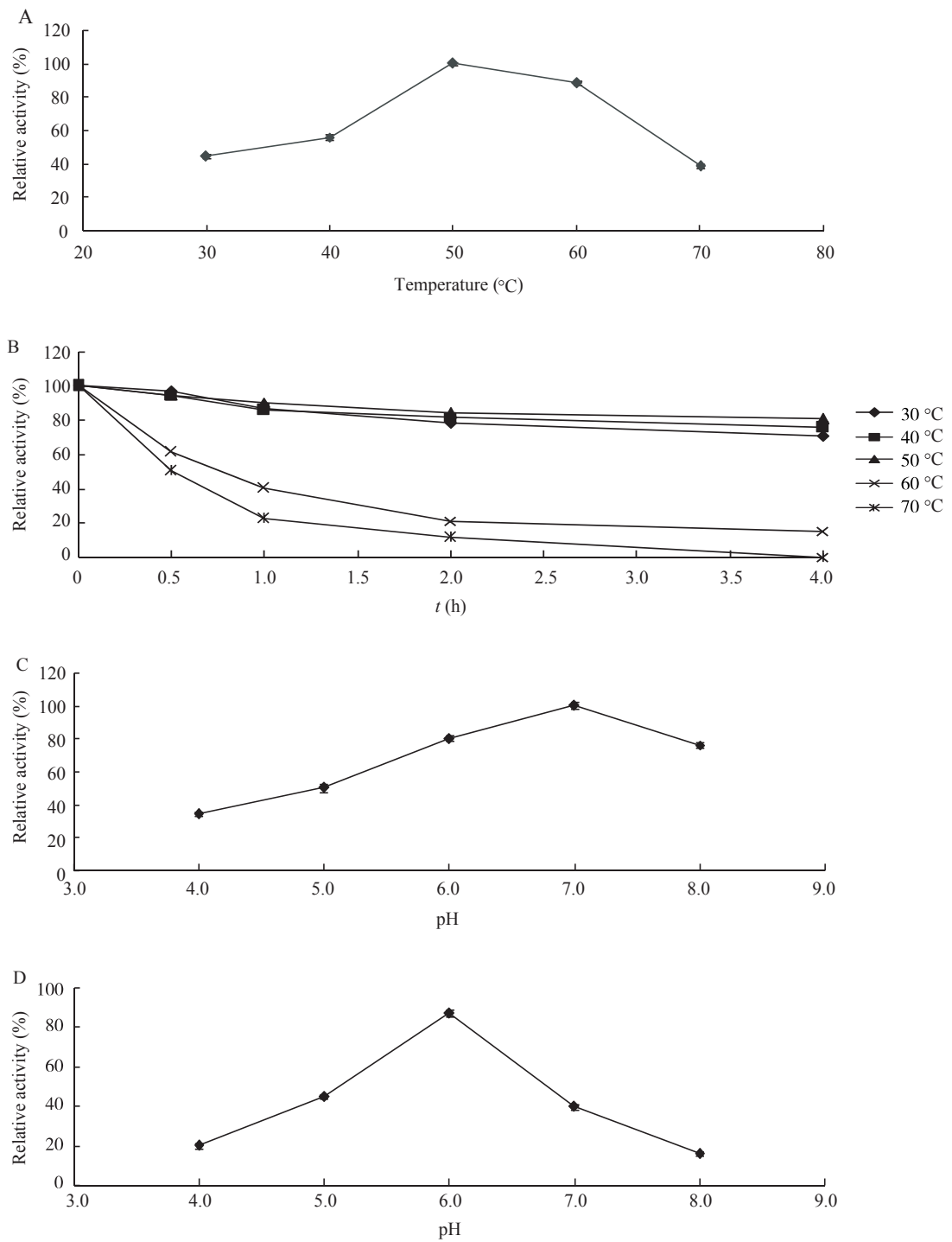


图 9 重组琼胶酶酶学性质分析

Figure 9 Effect of temperature and pH on activity and stability of the recombinant agarase

注: A: 酶反应最适作用温度; B: 酶的温度稳定性; C: 酶的最适作用 pH; D: 酶的 pH 稳定性.

Note: A: Effects of temperature on enzyme activity; B: Effects of temperature on enzyme stability; C: Effects of pH on enzyme activity; D: Effects of pH on enzyme stability.

性实验(图 9D)表明,在 pH 5.0–7.0 范围内该琼胶酶酶活力保持在 60%左右,而在 pH 在 4.0 或 pH 为 8.0 时相对酶活力只有 20%–30% (图 9D),说明该琼胶酶在偏中性条件下较稳定。

3 结论

琼胶酶具有广泛的应用前景,如在制备琼胶寡糖、凝胶回收 DNA 和 RNA、作为海藻的工具酶等方面。近年来关于琼胶酶的研究越来越多,新的琼胶酶基因也不断被克隆得到。Sugano 等^[10-11]对弧菌 JT0107 产生的琼胶酶进行了系统的研究,随后,他们克隆到琼胶酶的基因 *agaA* 及 *agaB*,并且在大肠杆菌中进行了表达。其他弧菌, *Vibrio* sp. V134^[14]和 *Vibrio* sp. EJY3 近年来也得到了系统的研究。本文首先利用透明圈的方法筛选得到一株产琼胶酶菌株 BY,通过复筛得知产琼胶酶菌株 BY 最适温度为 50 °C,最适 pH 为 6.0,并且具有一定的温度和 pH 稳定性。对该菌株进行分子生物学鉴定,确定菌株 BY 为弧菌属(*Vibrio* sp.)。根据已报道的琼胶酶的基因序列设计了简并引物,利用 Touch-down PCR 及染色体步移技术扩增得到琼胶酶基因 *Vibrio* sp. BY 的全长序列, *Vibrio* sp. BY (NCBI 登录号: AIW39921.1)基因序列的全长为 2 232 bp,编码 744 个氨基酸,分子量为 85 kD,等电点 pI=5.02,比对结果显示该基因编码的氨基酸序列与 *Vibrio* sp. EJY3 (NCBI 登录号: AEX22367.1)的氨基酸序列相似性为 86%,而 *Vibrio* sp. BY 基因序列与 NCBI 数据库中的基因序列都不相同,则表明 *Vibrio* sp. BY 基因为一条新的琼胶酶基因。

本实验利用染色体步移技术,扩增得到了保守片段的 5'和 3'未知片段,设计了 4 对简并引物和 3 对特异性引物,进行热不对称 PCR 反应,相对于其他传统方法^[15],该方法具有高效、简便、特异性高、灵敏度高、一次性获得的未知序列较长等特点。由于 *Vibrio* sp. BY 基因的全长序列在 NCBI 数据库与其他基因序列比对无相似性, *Vibrio* sp. BY 基因编码的氨基酸序列与 *Vibrio* sp. EJY3 的氨基酸序列相似性为 86%,因而我们就认为克隆得到的是新的

琼胶酶基因,在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达进一步证实了该基因为琼胶酶基因,编码产生琼胶酶蛋白,该重组琼胶酶有较好的稳定性。对琼胶酶的应用及工业化生产奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] Araki C. Acetylation of agar like substance of *Gelidium amansii*[J]. Journal of the Chemical Society, 1937, 58(12): 1338-1350
- [2] Flament D, Barbeyron T, Jam M, et al. Alpha-agarases define a new family of glycoside hydrolases, distinct from beta-agarase families[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(14): 4691-4694
- [3] Leon O, Quintana L, Peruzzo G, et al. Purification and properties of an extracellular agarase from *Alteromonas* sp. strain C-1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(12): 4060-4063
- [4] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. The Biochemical Journal, 1991, 280(2): 309-316
- [5] Wang XJ, Mou HJ, Jiang XL, et al. Biological activities of a neutral water-soluble agar polysaccharide prepared by agarase degradation[J]. High-tech Communications, 2005, 11(4): 6-10
- [6] Kang NY, Choi YL, Cho YS, et al. Cloning, expression and characterization of a β -agarase gene from a marine bacterium, *Pseudomonas* sp. SK38[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(14): 1165-1170
- [7] Buttner MJ, Fearnley YIM, Bibb MJ. The agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): nucleotide sequence and transcriptional analysis[J]. Molecular and General Genetics MG, 1987, 209(1): 101-109
- [8] Ohta Y, Hatada Y, Nogi Y, et al. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable β -agarase from a novel species of deep-sea *Microbulbifer*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(4): 505-514
- [9] Jang MK, Lee SW, Lee DG, et al. Enhancement of the thermostability of a recombinant β -agarase, *AgaB*, from *Zobellia galactanivorans* by random mutagenesis[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(7): 943-949
- [10] Sugano Y, Matsumoto T, Kodama H, et al. Cloning and sequencing of *agaA*, a unique agarase 0107 gene from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(11): 3750-3756
- [11] Sugano Y, Terada I, Arita M, et al. Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(5): 1549-1554
- [12] Ballester M, Ballester J, Belaich J. Isolation and characterization of a high molecular weight antibiotic produced by a marine bacterium[J]. Microbial Ecology, 1977, 3(4): 289-303
- [13] Nascimento FC, Carneiro CE, de Santana H, et al. The effect of artificial seawater on SERS spectra of amino acids-Ag colloids: an experiment of prebiotic chemistry[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014, 118(2): 251-259
- [14] Zhang WW, Sun L. Cloning, characterization, and molecular application of a beta-agarase gene from *Vibrio* sp. strain V134[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(9): 2825-2831
- [15] Liu D, Xing PC, Yu WG, et al. Cloning of a new agarase gene using site-finding PCR[J]. Progress in modern Biomedicine, 2013, 13(1): 5-10 (in Chinese)
刘丹, 邢培川, 于文功, 等. 利用 Site-Finding PCR 克隆琼胶酶基因[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(1): 5-10