

[文章编号] 1007-7405(2015)03-0179-07

Pseudomonas syringae 褐藻胶裂解酶基因的克隆及 信息学分析

吴丽云¹, 刘 韩¹, 倪 辉^{1,2,3,4}, 肖安风^{1,2,3,4}, 蔡慧农^{1,2,3,4}, 朱艳冰^{1,2,3,4}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021; 3. 厦门市食品与生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021; 4. 厦门市南方海洋研究中心经济海藻资源化利用与深加工重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 以 *Pseudomonas syringae* 的基因组为模板, 使用褐藻胶裂解酶引物进行 PCR 扩增, 将目的基因克隆至 pMD18-T 载体后进行测序。结果显示, 克隆基因的大小为 1137 bp, 预测编码含有 378 个氨基酸残基的蛋白质。对该蛋白质进一步进行生物信息学分析, 结果表明, 该蛋白质序列与其他菌株来源的褐藻胶裂解酶具有高的相似性, 预测本研究克隆的基因编码褐藻胶裂解酶。该褐藻胶裂解酶的理论分子质量为 42.5 ku, 理论等电点为 8.15。采用同源建模法建立 *P. syringae* 褐藻胶裂解酶的三维结构, 富含螺旋结构。

[关键词] 假单胞菌; 褐藻胶裂解酶; 克隆; 生物信息学

[中图分类号] Q 939.97

[文献标志码] A

Cloning and Bioinformatics Analysis of an Alginate Lyase Gene from *Pseudomonas syringae*

WU Li-yun¹, LIU Han¹, NI Hui^{1,2,3,4}, XIAO An-feng^{1,2,3,4}, CAI Hui-nong^{1,2,3,4}, ZHU Yan-bing^{1,2,3,4}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering of Fujian Province, Xiamen 361021, China;

3. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China; 4. Key Laboratory of Systemic Utilization and In-depth Processing of Economic Seaweed, Xiamen Southern Ocean Technology Center of China, Xiamen 361021, China)

Abstract: The genomic DNA of *Pseudomonas syringae* was used as the template for amplification of alginate lyase gene by PCR using a pair of specific primers. The target gene was cloned into pMD18-T vector and then sequenced. The results showed that the cloned gene was 1137 bp, encoding 378 amino acid residues. This protein was further analyzed by bioinformatics. The results showed that the target protein sequence shared high identities with the alginate lyase sequences from other bacterial strains. So the cloned gene was predicted to be an alginate lyase. The theoretical molecular weight and pI of the alginate lyase were 42.5 ku and 8.15, respectively. The three-dimensional structure of *P. syringae* the alginate lyase was constructed by homology modeling and presented α -helix rich structure.

Key words: *Pseudomonas* sp.; alginate lyase; cloning; bioinformatics

[收稿日期] 2014-10-08

[修回日期] 2014-11-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31401632); 厦门南方海洋研究中心项目(13GZP004NF10); 福建省优良品种同生物与酶工程重点实验室开放基金项目(M20130905)

[作者简介] 吴丽云(1989—), 女, 硕士生, 从事微生物学方向研究。通信作者: 朱艳冰(1976—), 女, 副教授, 从事海洋分子生物学方向研究, E-mail: yanbingzhu@163.com.

0 引言

褐藻胶为主要来源于褐藻类植物细胞壁的结构多糖,它是一种阴离子酸性直链多糖,由 β -D-甘露糖醛酸(M)和 α -L-古罗糖醛酸(G)通过共价键随机结合形成的线性无支链的高分子聚合物^[1].褐藻胶来源丰富,以其凝胶性、增稠性、稳定性和螯合金属离子等特点被广泛应用于食品、医疗、印染和化工等领域^[2-4].褐藻胶的降解产物褐藻胶寡糖因其具有特殊的化学结构而表现出多种生物活性,例如抗氧化、抗菌、抗炎、抗肿瘤、免疫调节、促进植物生长等^[5-9].研究表明,利用褐藻胶裂解酶催化裂解褐藻胶糖苷键,从而在非还原端形成具有双键的不饱和糖醛酸寡糖,这种不饱和双键对褐藻胶寡糖所具有的生理活性功能有重要的影响^[10].根据褐藻胶裂解酶的底物专一性,褐藻胶裂解酶分为多聚 β -D-1,4-甘露糖醛酸裂解酶(EC 4.2.2.3)和多聚 α -L-1,4-古罗糖醛酸裂解酶(EC 4.2.2.11).已经报道的褐藻胶裂解酶的来源主要包括海洋藻类、海洋软体动物、棘皮动物和微生物(包括海洋细菌、陆生真菌和极少数的病毒),其中细菌类是褐藻胶裂解酶研究最为广泛的来源^[11-14].利用基因工程技术将褐藻胶裂解酶基因在工业化生产的宿主细胞中高效表达,以获得高产量、高纯度、高活性、高稳定性的褐藻胶裂解酶制剂,具有高的产业潜力.本文进行 *Pseudomonas syringae* 褐藻胶裂解酶基因的克隆及其生物信息学分析,为该菌株褐藻胶裂解酶的酶学性质、酶的结构与功能研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

P. syringae 购自德国微生物菌种保藏中心(No. 21482), *E. coli* DH5 α 菌株由本实验室保存. pMD18-T 载体、Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和 DNA 标准均为 TaKaRa 公司产品, T₄ DNA 连接酶为 Fermentas 公司产品,细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,柱式质粒 DNA 提取试剂盒和柱式 DNA 胶回收试剂盒均为生工生物工程(上海)股份有限公司产品,寡核苷酸序列的合成及核酸序列的测定均委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成,其余试剂均为分析纯产品.

1.2 实验方法

1.2.1 褐藻胶裂解酶的活力测定

将 *P. syringae* 接种于培养基(0.25% D-葡萄糖,0.3% 大豆蛋白胨,1.7% 干酪素,0.5% NaCl,0.25% K₂HPO₄,均为质量分数),25℃培养36h后,取20mL培养液于4℃、10000 r/min离心10min,收集上清液,即为胞外液.用2mL 50 mmol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄缓冲液(pH=7.5)重悬菌体,在冰浴条件下超声破菌后,4℃、10000 r/min离心10min,获得上清液,即为胞内液.取0.25mL含0.5%(质量分数)褐藻胶的50 mmol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄缓冲液(pH=7.5),加入0.25mL粗酶液,30℃反应30min后,沸水终止反应.加入0.5mL DNS试剂,混匀后于540nm波长下测定反应液的吸光度值.通过制作葡萄糖标准曲线确定还原糖含量,根据还原糖的产生计算褐藻胶裂解酶的活力.褐藻胶裂解酶活力定义为:在上述条件下,每分钟水解底物产生1 μ g还原糖(以葡萄糖计)所需的酶量为1个酶活力单位(U).

1.2.2 褐藻胶裂解酶基因的克隆

根据 GenBank 中 *P. syringae* 的褐藻胶裂解酶基因序列,合成以下引物, P1: 5'-ATGCAGACTC-CTAAACTGAT-3', P2: 5'-TCACGAACCGTCGTTATCGC-3'. 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 *P. syringae* 的基因组 DNA,以此为模板进行 PCR 扩增,反应条件为: 95℃ 5 min 预变性; 94℃ 45 s, 50℃ 45 s, 72℃, 90 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物经 1.2% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳检测后,凝胶回收目的基因片段.将回收产物与 T 载体进行连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞.细胞涂布在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养平板上(平板上预先涂布 10 μ L 0.5 mol/L IPTG 和 50 μ L 20 mg/mL X-gal).从平板挑选白色单菌落进行菌落 PCR 鉴定重组子,并经测序鉴定

重组质粒中的插入序列.

1.2.3 基因及其编码产物的生物学信息分析

利用 NCBI 的 BLAST 程序在 GenBank 数据库中进行蛋白质序列的同源性搜索, 利用 MEGA 6.0^[15] 的邻接法 (Neighbor – Joining, NJ) 构建系统发育树, 利用 ExPASy 的 Protparam 工具进行蛋白质的理化性质预测. 蛋白质二级结构预测采用 SOPMA 程序^[16] 进行, 蛋白质的结构域及信号肽分析利用 SMART^[17] 进行. 利用 SWISS – MODEL^[18] 进行蛋白质结构的三维建模, 采用 VMD 软件显示蛋白质的空间结构.

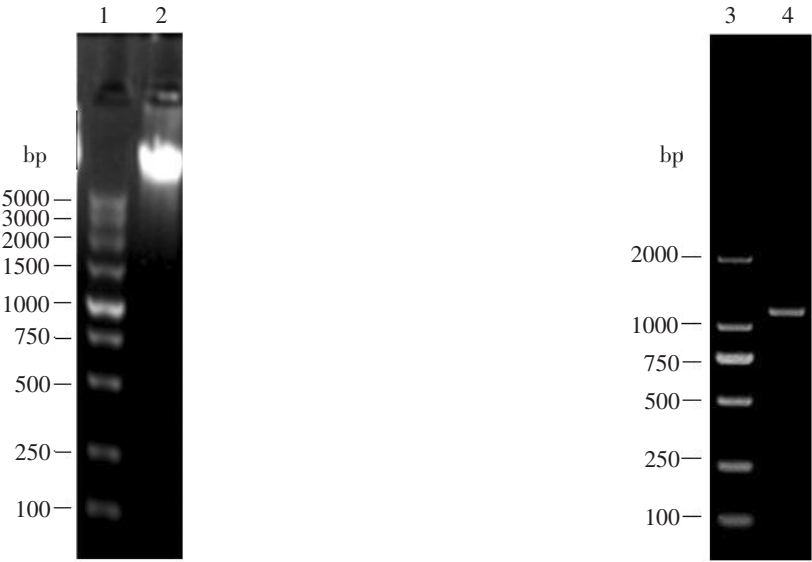
2 结果

2.1 褐藻胶裂解酶的活力

采用 DNS 法测定菌株 *P. syringae* 所产的细胞内外褐藻胶裂解酶的活性, 结果显示, 胞内粗酶液的活力达 7 U/mL, 未检测到胞外样品的酶活力. 由此可见, 菌株 *P. syringae* 以胞内形式产褐藻胶裂解酶.

2.2 褐藻胶裂解酶基因的克隆

以 *P. syringae* 的基因组 DNA (见图 1a) 为模板, 利用褐藻胶裂解酶引物进行 PCR 扩增. 琼脂糖凝胶电泳显示, 扩增产物为大约 1100 bp 的 DNA 片段 (见图 1b). 将该基因克隆入 T 载体后进行测序分析, 结果显示目的基因的大小为 1137 bp.



a. *P. syringae* 基因组 DNA
Genomic DNA of *P. syringae*

b. *P. syringae* 褐藻胶裂解酶基因的 PCR 产物
PCR product of alginate lyase gene from *P. syringae*

说明: 1—DL5000 DNA 标准; 2—基因组 DNA; 3—DL2000 DNA 标准; 4—褐藻胶裂解酶基因的 PCR 产物.
Notes: 1—DL5000 DNA maker; 2—Genomic DNA of *P. syringae*; 3—DL2000 DNA maker; 4—PCR product of alginate lyase gene from *P. syringae*.

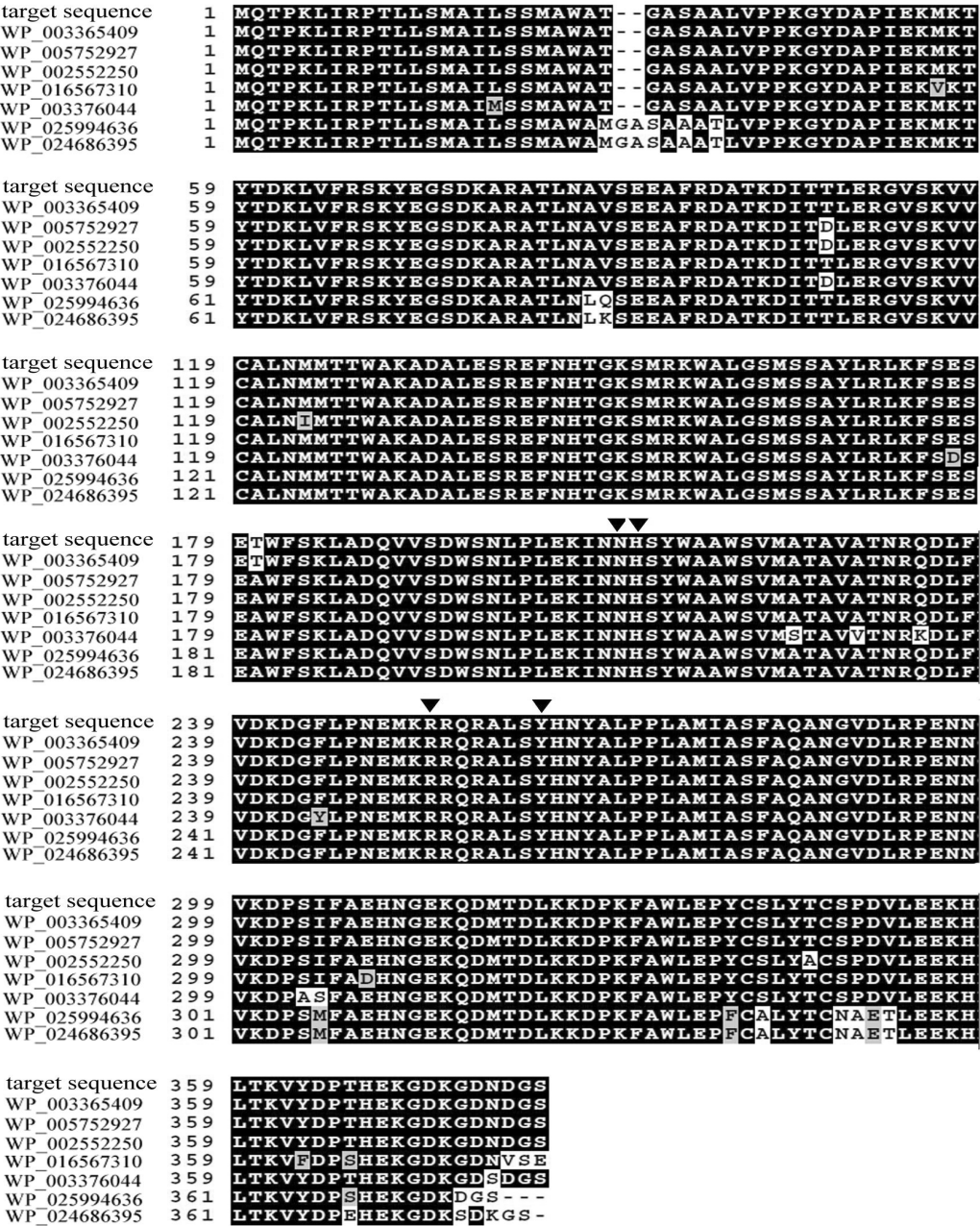
图 1 *P. syringae* 的基因组 DNA 及褐藻胶裂解酶基因的 PCR 产物

Fig.1 Genomic DNA and PCR product of an alginate lyase gene from *P. syringae*

2.3 褐藻胶裂解酶基因及其编码产物的序列分析

P. syringae 褐藻胶裂解酶基因 (1137 bp) 预测编码 378 个氨基酸. 该蛋白质的前 28 个氨基酸残基预测为信号肽, 预测的切割位点位于 A28 和 A29 之间. 将该蛋白质序列在 Genbank Reference proteins 数据库中进行同源性搜索, 结果显示, 目的基因编码的蛋白质序列与来自 *P. syringae* (WP_003365409)、*P. amygdale* (WP_005752927)、*P. savastanoi* (WP_002552250)、*P. syringae* (WP_016567310)、*P. syringae* (WP_003376044)、*P. viridiflava* (WP_025994636) 和 *P. syringae* (WP_024686395) 的多聚

β -D-甘露糖醛酸裂解酶或褐藻胶裂解酶的序列分别具有 100%、99%、99%、99%、96%、94% 和 94% 的相似性，所以预测该基因编码褐藻胶裂解酶。将本研究的 *P. syringae* 褐藻胶裂解酶序列与其他菌株来源的褐藻胶裂解酶序列进行比对，结果如图 2 所示。N203、H204、R251 和 Y258 构成可能的 *P. syringae* 褐藻胶裂解酶催化活性位点。其中 H204 位于 NNHSYW 保守结构中。将本研究的 *P. syringae* 褐藻胶裂解酶序列与相似性较高的其他菌株来源的酶序列进行系统发育分析，结果（见图 3）显示，本研究的褐藻胶裂解酶与来自 *P. syringae* 的多聚 β -D-甘露糖醛酸裂解酶（WP_003365409）聚在一个分支。



说明:箭头所示为 *P. syringae* 褐藻胶裂解酶可能的催化活性位点。
Notes:Arrowheads indicate amino acids constituting the putative catalytic active sites of *P.syringae* alginate lyase.

图 2 *P. syringae* 褐藻胶裂解酶的氨基酸序列与其他菌株来源的褐藻胶裂解酶序列的比对
Fig.2 Alignment of the alginate lyase protein sequence from *P. syringae* with alginate lyase sequences from other bacterial strains

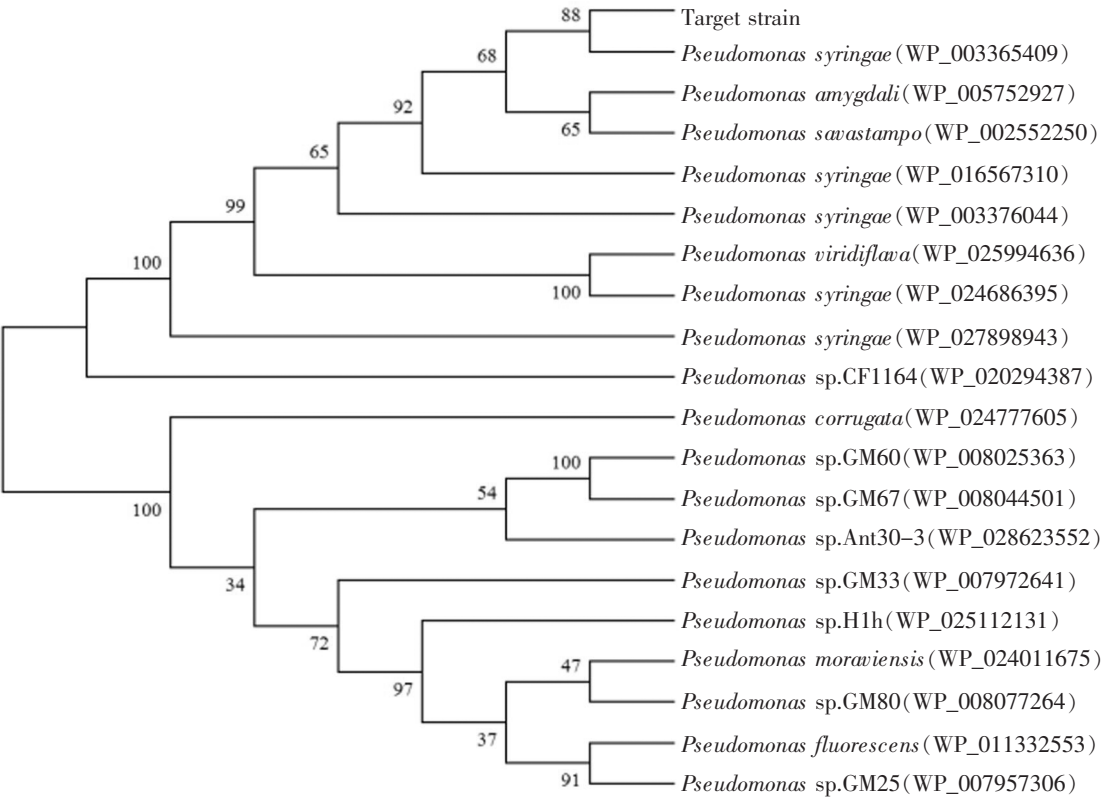


图 3 *P. syringae* 褐藻胶裂解酶的系统发育进化树

Fig.3 Unrooted neighbor-joining phylogenetic tree of alginate lyase from *P. syringae*

2.4 褐藻胶裂解酶基因编码蛋白质的理化性质

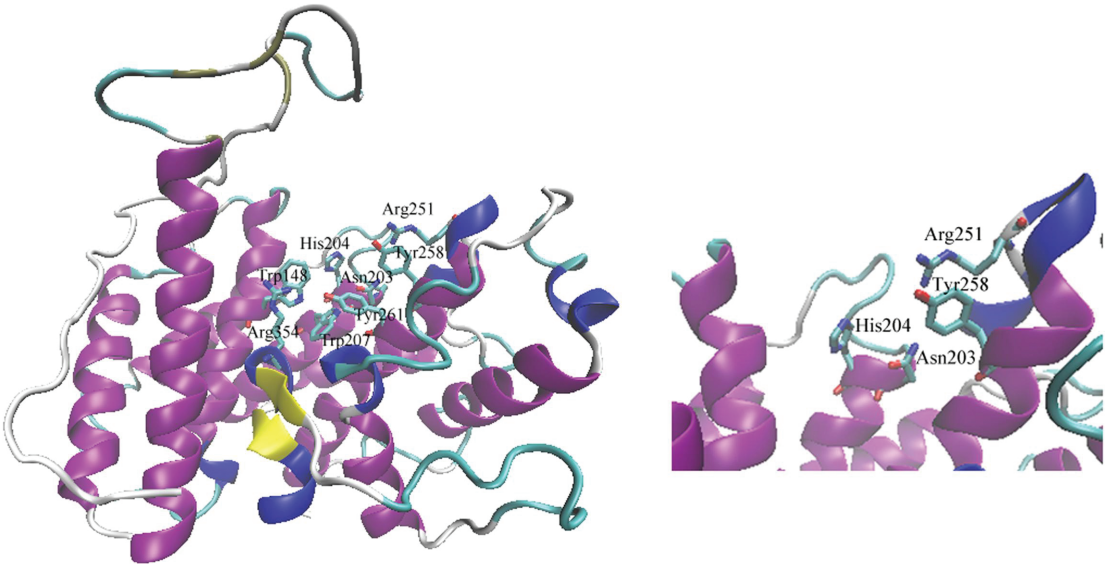
利用 ExPASy 的 ProtParam 工具分析目的基因所编码蛋白质的序列, 结果如下: 氨基酸个数为 378, 理论分子质量大小为 42.5 ku; 理论等电点为 8.15, 负电荷残基总数为 50 (D + E), 正电荷残基总数为 52 (R + K); 分子式为 C₁₈₈₃H₂₉₄₂N₅₂₂O₅₆₇S₁₈, 原子总数为 5932; 预测在大肠杆菌细胞内半衰期大于 10 h, 不稳定指数为 31.78, 该蛋白质分类为稳定蛋白; 脂溶指数为 68.76, 亲水性平均指数 (Grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.593.

2.5 褐藻胶裂解酶的二级结构和结构域

预测 *P. syringae* 褐藻胶裂解酶的二级结构, α-螺旋、β-折叠、β-转角和不规则卷曲所占比例分别为 51.59%、7.94%、7.14% 和 33.33%. 该蛋白质包含褐藻胶裂解酶结构域, 位于 64 ~ 305 位氨基酸残基.

2.6 褐藻胶裂解酶的三级结构

将 *P. syringae* 褐藻胶裂解酶进行三维模建, 模板来自 *Sphingomonas* sp. A1 的褐藻胶裂解酶 (PDB 登录号为 1QAZ). 模建的残基范围为目的序列中的 47 ~ 363 位氨基酸残基, 在此范围内, 目的序列与模板序列的相似性为 28%. *P. syringae* 褐藻胶裂解酶富含螺旋结构, 由螺旋构成的栅状结构中有一个类似隧道的深裂隙 (见图 4a). 通过与模板序列进行比对, N203、H204、R251 和 Y258 组成可能的 *P. syringae* 褐藻胶裂解酶催化活性位点^[19] (见图 4b). 一些保守的具有芳香基侧链的残基 (W148, W207, Y261 和 Y258) 位于裂隙中, 两个保守的精氨酸残基 (R251 和 R354) 存在于裂隙入口的两侧 (见图 4a).



a. *P. syringae* 褐藻胶裂解酶的结构
Overall structure of *P. syringae* alginate lyase.

b. *P. syringae* 褐藻胶裂解酶的活性位点. Zoom of the
active sites of *P. syringae* alginate lyase.

图 4 *P. syringae* 褐藻胶裂解酶的三维模建

Fig.4 3-D structure modeling of *P. syringae* alginate lyase

3 讨论

本研究中，利用 Genbank 数据库中已有的 *P. syringae* 褐藻胶裂解酶基因序列设计引物，从目的菌株的基因组中成功扩增了 1137 bp 的基因片段。通过 NCBI 的蛋白质 BLAST 分析，发现该基因编码的蛋白质与 *Pseudomonas* 属中其他菌株来源的褐藻胶裂解酶具有很高的相似性。所以，本研究克隆的基因预测编码褐藻胶裂解酶。

褐藻胶裂解酶是多糖裂解酶家族 (PLs, EC 4.2.2.X) 的成员，根据酶的初级结构可将 PLs 分为 22 个家族，褐藻胶裂解酶属于 7 个家族，分别为 PL-5, PL-6, PL-7, PL-14, PL-15, PL-17 和 PL-18，大多数细菌来源的内切褐藻胶裂解酶属于 PL-5 和 PL-7，而前者多具有降解多聚 β -D-甘露糖醛酸底物的特异性，后者多具有降解多聚 α -L-古罗糖醛酸底物的特异性^[20]。研究表明，PL-5 和 PL-7 家族之间的褐藻胶裂解酶序列相似性比较低，然而对催化活性起重要作用的氨基酸，如精氨酸、天冬酰胺（或谷氨酰胺）、组氨酸和酪氨酸都在活性位点的功能区域^[21]。本研究中，以 *Sphingomonas* sp. A1 的褐藻胶裂解酶为模板，将本研究的 *P. syringae* 褐藻胶裂解酶进行同源模建，它们的三维结构呈现相似的空间结构。*P. syringae* 褐藻胶裂解酶主要结构为由螺旋构成的栅状结构，类似的结构常见于葡萄糖淀粉酶和纤维素酶^[21]。这两个酶的活性中心包括 Asn、His、Arg 和 Tyr，组氨酸位于 NNHSYW 保守结构中。与 *Sphingomonas* sp. A1 褐藻胶裂解酶^[19] 类似，本研究的 *P. syringae* 褐藻胶裂解酶结构中也包含一个很深的隧道缝隙，预测该结构有利于褐藻胶底物分子的渗入，并与酶催化位点相互作用。

P. syringae 褐藻胶裂解酶的克隆及生物信息学分析为该酶的进一步研究打下良好的基础。在未来的研究中，可以进行 *P. syringae* 褐藻胶裂解酶的表达及酶学性质研究，或进一步利用定向进化技术提高该褐藻胶裂解酶的催化活性或热稳定性，为该褐藻胶裂解酶的工业化生产和应用打下良好的基础。

[参考文献]

[1] VERA J, CASTRO J, GONZALEZ A, et al. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants [J]. Mar Drugs, 2011, 9(12): 2514-2525.
[2] LEE K Y, MOONEY D J. Alginate: properties and biomedical applications [J]. Prog Polym Sci, 2012, 37(1): 106-

126.

- [3] PAWAR S N, EDGAR K J. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(11): 3279-3305.
- [4] TSENG C K. Algal biotechnology industries and research activities in China [J]. *J Appl Phycol*, 2001, 13(4): 375-380.
- [5] 孙丽萍, 薛长湖, 许家超, 等. 褐藻胶寡糖体外清除自由基活性的研究 [J]. *中国海洋大学学报*, 2005, 35(5): 811-814.
- [6] LASKY L A. Selection-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response [J]. *Annu Rev Biochem*, 1995, 64: 113-139.
- [7] HU X K, JIANG X L, WANG H M, et al. Antitumour activities of alginate-derived oligosaccharides and their substitution derivatives [J]. *Eur J Phycol*, 2004, 39: 67-71.
- [8] OTTERLEI M, OSTGAARD K, SKJAK BRAEK G, et al. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate [J]. *J Immunother*, 1991, 10(4): 286-291.
- [9] YOKOSE T, NISHIKAWA T, YAMAMOTO Y, et al. Growth-promoting effect of alginate oligosaccharides on a unicellular marine microalga, *Nannochloropsis oculata* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(2): 450-453.
- [10] 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]. *Annu Rev of Microbiol*, 2000, 54: 289-340.
- [11] LIN Y T, HASSID W Z. Pathway of alginic acid synthesis in the marine brown alga, *Fucus gardneri* Silva [J]. *J Biol Chem*, 1966, 241(22): 5284-5297.
- [12] WANG L, RAHMAN M M, INOUE A, et al. Heat-stability and primary structure of the major alginate lyase isozyme LbAly35 from *Littorina brevicula* [J]. *Fish Sci*, 2012, 78(4): 889-896.
- [13] WANG Y, GUO E W, YU W G, et al. Purification and characterization of a new alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. [J]. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(5): 703-708.
- [14] CAO L X, XIE L J, XUE X L, et al. Purification and characterization of alginate lyase from *Streptomyces* species strain A5 isolated from banana rhizosphere [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(13): 5113-5117.
- [15] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [16] GEORJON C, DELEAGE G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [J]. *Comput Appl Biosci*, 1995, 11(6): 681-684.
- [17] LETUNIC I, DOERKS T, BORK P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 302-305.
- [18] AMOLD K, BORDOLI L, KOPP J, et al. The SWISS - MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195-201.
- [19] YOON H J, MIKAMI B, HASHIMOTO W, et al. Crystal structure of alginate lyase A1-III from *Sphingomonas* species A1 at 1.78 Å resolution [J]. *J Mol Biol*, 1999, 290(2): 505-514.
- [20] MIYAKE O, OCHIAI A, HASHIMOTO W, et al. Origin and diversity of alginate lyases of families PL-5 and-7 in *Sphingomonas* sp. strain A1 [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(9): 2891-2896.
- [21] KIM H S, LEE C, LEE E Y. Alginate lyase: structure, property, and application [J]. *Biotechnol Bioproc E*, 2011, 16: 843-851.

(责任编辑 马建华 英文审校 曹敏杰)