

海洋弧菌(*Vibrio* sp. QD-5)褐藻胶裂解酶基因的克隆和生物信息学分析

晁雅熙, 王淑艳, 吴谔琦, 陈 颢

(国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘 要:以海洋弧菌(*Vibrio* sp. QD-5)的基因组为模板,使用设计的褐藻胶裂解酶引物进行 PCR 扩增。将目的基因克隆至 pet-22b(+)载体后进行测序。测序结果显示,基因 *aly-II* 的大小为 2 170 bp,预测编码含有 723 个氨基酸的蛋白质。对该蛋白质进一步进行了生物信息学分析。利用 ProtParam 和 ProtScale 对蛋白质的理化性质进行分析,结果表明,蛋白质 Aly-II 的理论分子质量为 85.6 kDa,理论等电点为 5.1,并且是一种亲水性蛋白。利用软件 MEG 6.0 对蛋白质 Aly-II 进行系统发育分析,结果显示,蛋白质 Aly-II 很可能是 PL-17 家族的褐藻胶裂解酶。利用同源建模法构建蛋白质 Aly-II 的三维结构,Aly-II 含有 2 个结构域,分别为 $(\alpha/\alpha)_6$ toroid 结构域和 β -sheet 结构域。

关键词:*Vibrio* sp.;褐藻胶裂解酶;基因克隆;生物信息学分析

中图分类号:Q939.97

文献标识码:A

文章编号:1671-6647(2018)02-0290-11

doi: 10.3969/j.issn.1671-6647.2018.02.014

褐藻胶是一类主要存在于褐藻细胞壁中的水溶性酸性多糖,由 β -D-甘露糖醛酸和 α -L-古洛糖醛酸组成,2 个单体之间通过 α -1,4-糖苷键可组成 3 种不同的褐藻胶分子,分别为多聚甘露糖醛酸(polyM)、多聚古洛糖醛酸(polyG)和杂聚物(polyGM)^[1]。某些细菌也能合成褐藻胶,保护它们免受抗生素等有害因子的伤害^[2]。褐藻胶寡糖是褐藻胶降解而形成的产物,已经广泛应用于食品和医药行业^[3-5]。

褐藻胶裂解酶是一种降解褐藻胶的工具酶,能够以 β -消去方式作用于褐藻胶 2 个单体分子形成的糖苷键,将褐藻胶大分子降解成小分子的褐藻胶寡糖。褐藻胶裂解酶的来源十分广泛,包括细菌、海洋无脊椎动物、海洋藻类、真菌和病毒等,其中细菌是褐藻胶裂解酶的主要来源。目前,许多不同来源的褐藻胶裂解酶基因已经被克隆,并对褐藻胶裂解酶进行了表达、鉴定和性质表征。根据褐藻胶裂解酶底物特异性的不同,褐藻胶裂解酶主要被分为两种,一种是专一性降解 polyM 的 polyM 裂解酶(EC4.2.2.3),另一种是专一性降解 polyG 的 polyG 裂解酶(EC4.2.2.11)。另外,还有少数裂解酶对 polyM 和 polyG 同时具有活性,这类酶被称为双功能裂解酶。根据褐藻胶裂解酶作用方式的不同,褐藻胶裂解酶被分为内切型和外切型两种^[12]。内切型褐藻胶裂解酶作用于褐藻胶分子内部的糖苷键,主要产生不饱和寡糖;外切型褐藻胶裂解酶从褐藻胶分子的一端对褐藻胶进行降解,可以产生单体分子。目前,在已发现的褐藻胶裂解酶中,大部分都是内切型,外切型褐藻胶裂解酶只占很小一部分。在碳水化合物活性酶数据库(Carbohydrate-Active Enzymes, CAZy)中,褐藻胶裂解酶属于多糖裂解酶(Polysaccharide Lyase, PLs)中的一类。根据蛋白质分子一级结构的不同,多糖裂解酶被划分到 22 个不同的家族中,褐藻胶裂解酶分布在 7 个不同的家族中,分别为 PL-5, PL-6, PL-7, PL-14, PL-15, PL-17 和 PL-18。大部分内切型褐藻胶裂解酶属于 PL-5 和 PL-7 家族,而外切型褐藻胶裂解

收稿日期:2017-11-23

资助项目:国家重点基础研究计划——超深渊生物群落及其与关键环境要素的相互作用机制研究(2015CB755906);海洋公益性行业科研专业——基于海洋微生物发酵的新产品开发技术研究与应(201505032)

作者简介:晁雅熙(1990-),女,山东菏泽人,硕士,主要从事微生物功能酶方面研究。E-mail: yxchao@fio.org.cn

* **通讯作者:**陈 颢(1964-),男,江苏南京人,博士,主要从事深海微生物功能酶方面研究。E-mail: hchen@fio.org.cn

(王佳实 编辑)

酶多属于 PL-15 和 PL-17 家族^[6]。根据蛋白质三维结构的不同,褐藻胶裂解酶被分为 3 个家族,分别为 β -helix 家族、 β -jelly roll 家族和 $(\alpha/\alpha)_n$ 环形线圈家族^[7]。PL-6 家族的褐藻胶裂解酶属于 β -helix 家族,PL-7, PL-14 和 PL-18 家族的褐藻胶裂解酶属于 β -jelly roll 家族,PL-5, PL-15 和 PL-17 家族的褐藻胶裂解酶属于 $(\alpha/\alpha)_n$ 环形线圈家族。另外,根据褐藻胶裂解酶分子量的大小,褐藻胶裂解酶被分为小型裂解酶(25~30 kDa),中型裂解酶(大约 40 kDa)和大型裂解酶(>60 kDa)^[8]。

目前,褐藻胶寡糖的活性受到了越来越多的关注,褐藻胶裂解酶,特别是内切型褐藻胶裂解酶可用于褐藻胶寡糖的生产^[9]。褐藻胶裂解酶也可用于测定褐藻胶分子的精细结构,精细结构的获得能够帮助理解褐藻胶的分子组成是如何影响它的物理性能的^[10-20]。红藻和褐藻的原生质体的获取,也需要有褐藻胶裂解酶的参与^[21-22]。此外,褐藻胶裂解酶在囊性纤维病的治疗方面也具有一定的潜力^[23-24]。

利用基因工程技术可以使褐藻胶裂解酶进行异源高效表达,从而提高褐藻胶裂解酶的产量。本研究通过基因工程的方法,对褐藻胶裂解酶基因进行克隆,并对其进行了生物信息学的分析,为褐藻胶裂解酶的酶学性质,结构与功能及开发应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和培养基

海洋弧菌(*Vibrio* sp. QD-5)由本实验室筛选分离,保存在中国微生物保藏中心(CGMCC NO.14172),*E. coli* DH5 α 为北京全式金生物技术有限公司产品, pET-22b(+) 由本实验室保存, 2 $\times$ Taq PCR Mastermix、DNA 分子量标准,核酸染料和琼脂糖凝胶回收试剂盒均为天根生化科技(北京)有限公司产品,限制性核酸内切酶和 T₄ DNA 连接酶为 NEB 公司产品,其余试剂均为分析纯产品。

海藻酸钠液体培养基:(NH₄)₂SO₄ 5 g, K₂HPO₄ 2 g, MgSO₄ 1 g, FeSO₄ 7H₂O 0.01 g, Alginate 5 g, 溶解于过滤后的 1 L 海水中,并与 121 $^{\circ}$ C 湿热灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 褐藻胶裂解酶活力的测定

将 *Vibrio* sp. QD-5 接种到海藻酸钠液体培养基中,26 $^{\circ}$ C, 120 r/min 培养 48 h 后,10 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,收集菌体,PBS 洗涤 3 次后,用高压细胞破碎仪将菌体破碎,然后在 10 000 rad/min 下离心 10 min,收集上清,即为粗酶提取液。向 100 μ L(5 g/L)海藻酸钠溶液中加入 20 μ L(10 mmol/L)MgCl₂溶液,震荡后加入 10 μ L 酶液,室温下反应 30 min,沸水中煮 5 min 终止反应,冷却至室温,向上述溶液中加入 0.025 mol/L NaIO₄溶液 100 μ L,混匀,室温下反应 20 min,后加入 120 μ L(20 g/L)Na₂S₂O₃溶液,震荡至黄棕色消失。静置 2 min 后,加入 200 μ L(6 g/L)2-巯代巴比妥酸(2-thiobarbituric acid, TBA)溶液,100 $^{\circ}$ C 下加热 10 min,迅速冷却。此时样品为红色,且红色越深酶活性越高。将得到的样品立刻移入比色皿中,测 548 nm 处吸光度。在实验室测定酶活的条件下,待测酶液中每毫克(mg)的蛋白质每分钟可以分解底物所产生的产物的微摩尔数(μ mol)就定义为该酶在该条件下的一个酶活力单位(1 U)。

1.2.2 褐藻胶裂解酶基因的克隆

根据 *Vibrio* sp. QD-5 的基因组序列(在 GenBank 中的序列登记号为:PRJNA382465),合成以下引物, P_{aly-II-1}: 5'-GGCAGGATCCGATAATAATGAGC-3', P_{aly-II-2}: 5'-TAACTCGAGAATTTGTGCGAATGC-3'。以 *Vibrio* sp. QD-5 的基因组为模板,扩增目的基因 *aly-II*。PCR 扩增的反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s;40 $^{\circ}$ C 退火 40 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 160 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,利用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的基因。目的基因经限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切,切出黏性末端,质粒 pET-22b(+)用同样的限制性内切酶切出相同的黏性末端。利用 T₄ DNA 连接酶将目的基

因与质粒连接,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 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单克隆,通过菌落 PCR 验证阳性克隆。阳性克隆委托南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.2.3 基因及其编码产物的生物信息学分析

利用 NCBI 中的 Nucleotide BLAST 和 Protein BLAST 工具对核酸序列及其所编码的蛋白质氨基酸序列进行同源性搜索;对利用 NCBI 的 ORF finder 开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)进行查找;利用分析蛋白质性质和结构的软件 ExPASy(Expert Protein Analysis System)的 Translate 和 Protparam 工具对 ORF 进行翻译和对应蛋白质的理化性质分析;由 ProtScale 程序对蛋白质的疏水性进行分析;由 MEG 6.0 软件完成核酸序列及氨基酸序列的系统发育分析;分别利用在线工具 SOPMA 和 SMART 完成蛋白质二级结构和结构域的预测;分别利用在线工具 Phyre2 和 3DLigandSite 完成蛋白质三级结构和底物结合位点的预测。

2 结 果

2.1 褐藻胶裂解酶的活力测定

采用 TBA 法测定海洋弧菌(*Vibrio* sp. QD-5)所产的胞内、外褐藻胶裂解酶的活性,结果显示,胞内粗酶的酶活力达到 54.6 U/mg,胞外样品的酶活力没有检测到。由此说明,海洋弧菌(*Vibrio* sp. QD-5)可以产生胞内褐藻胶裂解酶。

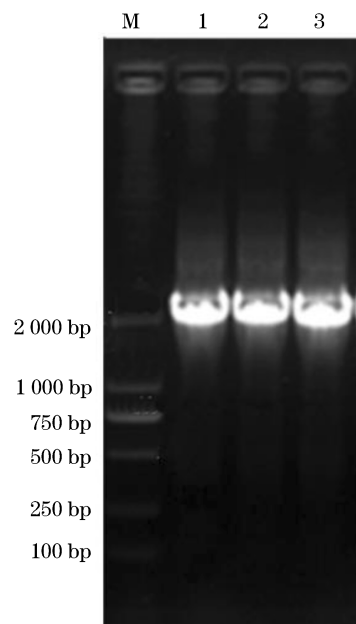
2.2 褐藻胶裂解酶基因的克隆

以海洋弧菌(*Vibrio* sp. QD-5)的基因组为模板,利用设计的褐藻胶裂解酶引物进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳显示基因 *aly-II* 的大小约为 2 000 bp(图 1)。将扩增的基因片段克隆进入质粒 pET-22b(+)后进行测序,测序分析结果显示基因 *aly-II* 的大小为 2 170 bp。

2.3 褐藻胶裂解酶基因及其编码产物的生物信息学分析

对基因 *aly-II* 的分析结果显示,该基因编码一个含有 723 个氨基酸的蛋白质 Aly-II。在 Genbank 中对该蛋白质进行同源性检索,结果显示蛋白质 Aly-II 与褐藻胶裂解酶 WP_085568977.1 (*Vibrio alginolyticus*), ADW41661.1 (*Vibrio midae*), WP_095759892.1 (*Vibrio* sp. V1B), AKH41065.1 (*Vibrio* sp. W13), WP_009703185.1 (*Vibrio harveyi*) 和软骨素裂解酶 WP_045424109.1 (*Vibrio jasicida*), WP_045465198.1 (*Vibrio hyugaensis*), WP_075706108.1 (*Vibrio panuliri*), WP_065677161.1 (*Vibrio celticus*), WP_076678843.1 (*Vibrio splendidus*) 分别具有 99%, 99%, 98%, 99%, 98%, 96%, 96%, 95%, 87% 和 87% 的相似性(图 2)。在 CAZy 数据库中褐藻胶裂解酶和软骨素裂解酶同属于多糖裂解酶家族。预测 *aly-II* 编码多糖裂解酶基因。

将本研究中蛋白质 Aly-II 的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树分析。结果(图 2)表明,蛋白质 Aly-II 与来自 *Vibrio alginolyticus* 的褐藻胶裂解酶 WP_085568977.1 具有较近的亲缘关系。



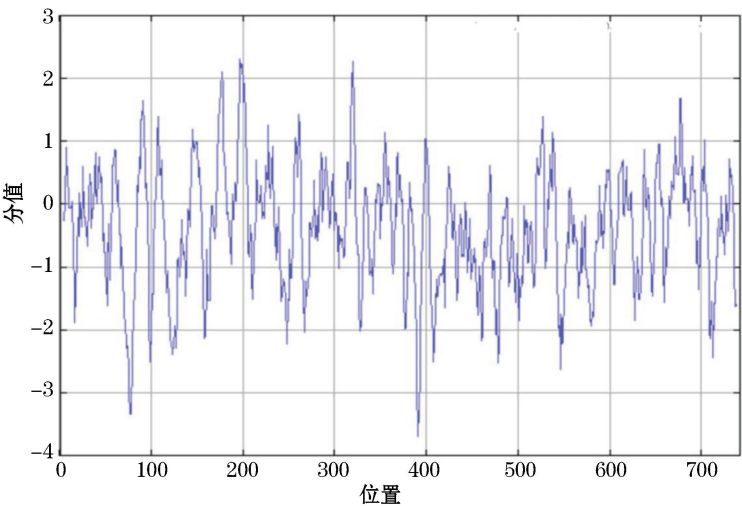
注:M 代表 DL2000 DNA Marker;

1,2,3 均为基因 *aly-II*

图 1 褐藻胶裂解酶基因的 PCR 产物
Fig.1 The PCR product of alginate lyase gene

表 1 蛋白质的基本特性
Table 1 The basic characteristics of the Aly-II protein

基本特性	编码氨基酸的个数	等电点	分子量	分子式	负电荷残基数 (Asp,Glu)	正电荷残基数 (Arg,Lys)	不稳定系数	平均亲水性	脂肪系数	半衰期 (大肠杆菌)
预测结果	764	5.1	85 624.48 Da	C ₃₈₂₈ H ₅₇₇₁ N ₁₀₂₅ O ₁₁₇₁ S ₂₃	102	55	35.66	-0.365	79.41	>10 h



注：“-”表亲水性；“+”表疏水性

图 4 蛋白质 Aly-II 的氨基酸疏水性分析

Fig.4 Hydrophobicity analysis of amino acids from Aly-II protein

2.5 蛋白质的二级结构和结构域分析

对蛋白质 Aly-II 的二级结构分析(图 5)发现,在该蛋白分子中含有 α -螺旋、延伸链、 β -折叠和无规则卷曲四种结构,其中无规则卷曲在蛋白质分子二级结构中的比例最高(34.29%), α -螺旋、延伸链和 β -折叠所占比例分别为 29.71%,25.26%,10.73%。

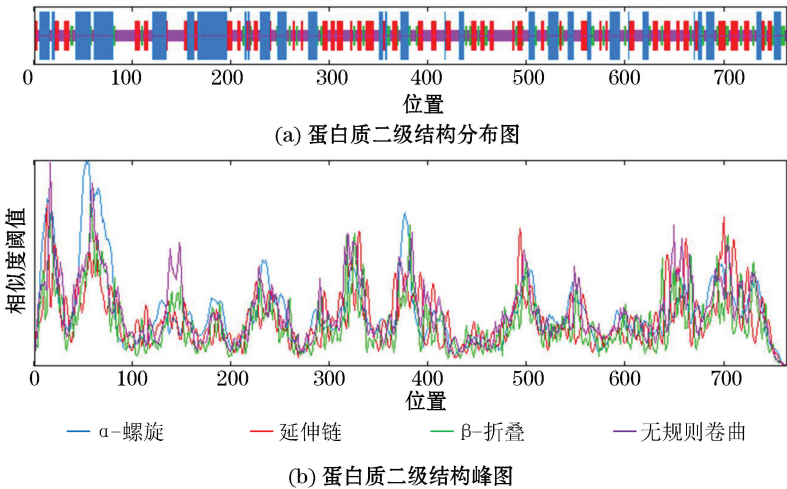


图 5 蛋白质 Aly-II 的二级结构分析

Fig.5 Analysis of secondary structure of Aly-II protein

对蛋白质 Aly-II 的结构域的分析结果(图 6)显示,该蛋白质含有 Alginate_lyase 和 Hepar_II_III 两个结构域:Alginate_lyase 位于蛋白质 Aly-II 的第 66~313 位氨基酸残基之间,是一种全部由 α -螺旋组成的结构;Hepar_II_III 位于蛋白质 Aly-II 的第 394~712 位氨基酸残基之间,是一种主要由 β -折叠片组成的结构。

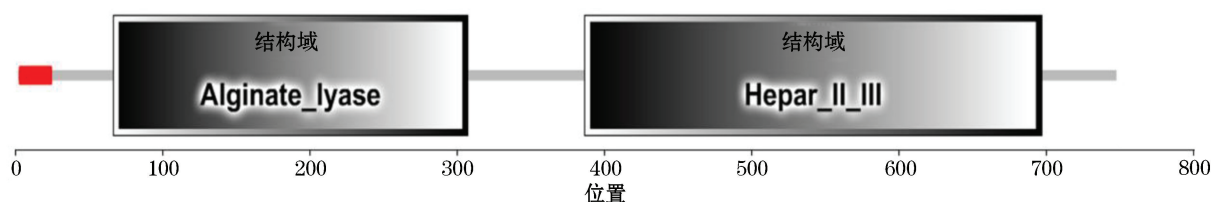


图 6 蛋白质 Aly-II 的保守结构域分析

Fig.6 Analysis of the conserved domains of Aly-II protein

对蛋白质 Aly-II 的序列分析的同时也发现,有 295 个蛋白质与 Aly-II 具有相同的结构域组成,在这 295 个蛋白质中有 294 个来自细菌,1 个来自不明的超界生物。来自细菌的 294 个蛋白质中有 2 个来自酸杆菌门、15 个来自放线菌门、62 个来自拟杆菌门、1 个来自绿弯菌门、2 个来自梭杆菌门、167 个来自变形菌门、1 个来自螺旋体门、10 个来自疣微菌门、1 个来自 Ignavibacteriae。295 个蛋白中有 9 个乙酰肝素酶(heparinase)、37 个肝素酶 II/III 样蛋白(heparinase II/III-like protein)、43 个肝素酶 II/III 家族蛋白(heparinase II/III family protein)、11 个聚 β -D 甘露糖醛酸裂解酶(poly(β -D-mannuronate) lyase)、57 个还未表征的蛋白(uncharacterized protein)、38 个假定蛋白(hypothetical protein)、26 个软骨素 AC 裂解酶(chondroitin AC lyase)、5 个假定褐藻胶裂解酶(putative alginate lyase)、16 个软骨素 AC/褐藻胶裂解酶(chondroitin AC/alginate lyase)、31 个褐藻胶裂解酶(alginate lyase)、20 个假定未表征蛋白(putative uncharacterized protein)、2 个寡褐藻胶裂解酶(oligoalginate lyase)。将蛋白质 Aly-II 与这 295 个蛋白进行系统发育分析(与蛋白质 Aly-II 具有相同结构域的蛋白质序列数量太多,所以系统进化树没有列出),发现蛋白质 Aly-II 可以与褐藻胶裂解酶 G4WFC5 和 U3AJQ3,褐藻胶裂解酶家族蛋白 K5TYW9、K5TZG2 和 K5UVR5,软骨素 AC 裂解酶(UPI00037A78C4)聚到一起,说明它们之间具有较近的亲缘关系。

2.6 蛋白三级结构预测

对蛋白质 Aly-II 的三级结构进行预测,模板为 *Saccharophagus degradans* 2-40 的褐藻胶裂解酶 Alg17c,PDB 登录号为 4ok2A。蛋白质 Aly-II 与模板的相似性为 43%。预测的三级结构见图 7,参与建模的氨基酸残基从 42 位到 754 位,包含了 693 个氨基酸。就蛋白质 Aly-II 的总体结构来说,该蛋白质包含了 N 端的 $(\alpha/\alpha)_6$ 环形线圈结构和 C 端 β -折叠片结构。由图 8 看见, α -螺旋主要集中在 N 端, β -折叠主要集中在 C 端。在已知的多糖裂解酶中,PL-15 和 PL-17 家族的褐藻胶裂解酶含有 $(\alpha/\alpha)_6$ 环形线圈和 β -折叠片组合结构,另外,PL-15 家族的褐藻胶裂解酶在 N-端含有一个由 7 个 β -折叠组成的结构,而 PL-17 家族 N-端无 β -折叠组成的结构,所以蛋白质 Aly-II 是一种 PL-17 家族的褐藻胶裂解酶。



图 7 蛋白质 Aly-II 的三级结构预测

Fig.7 Tertiary structure prediction of Aly-II protein

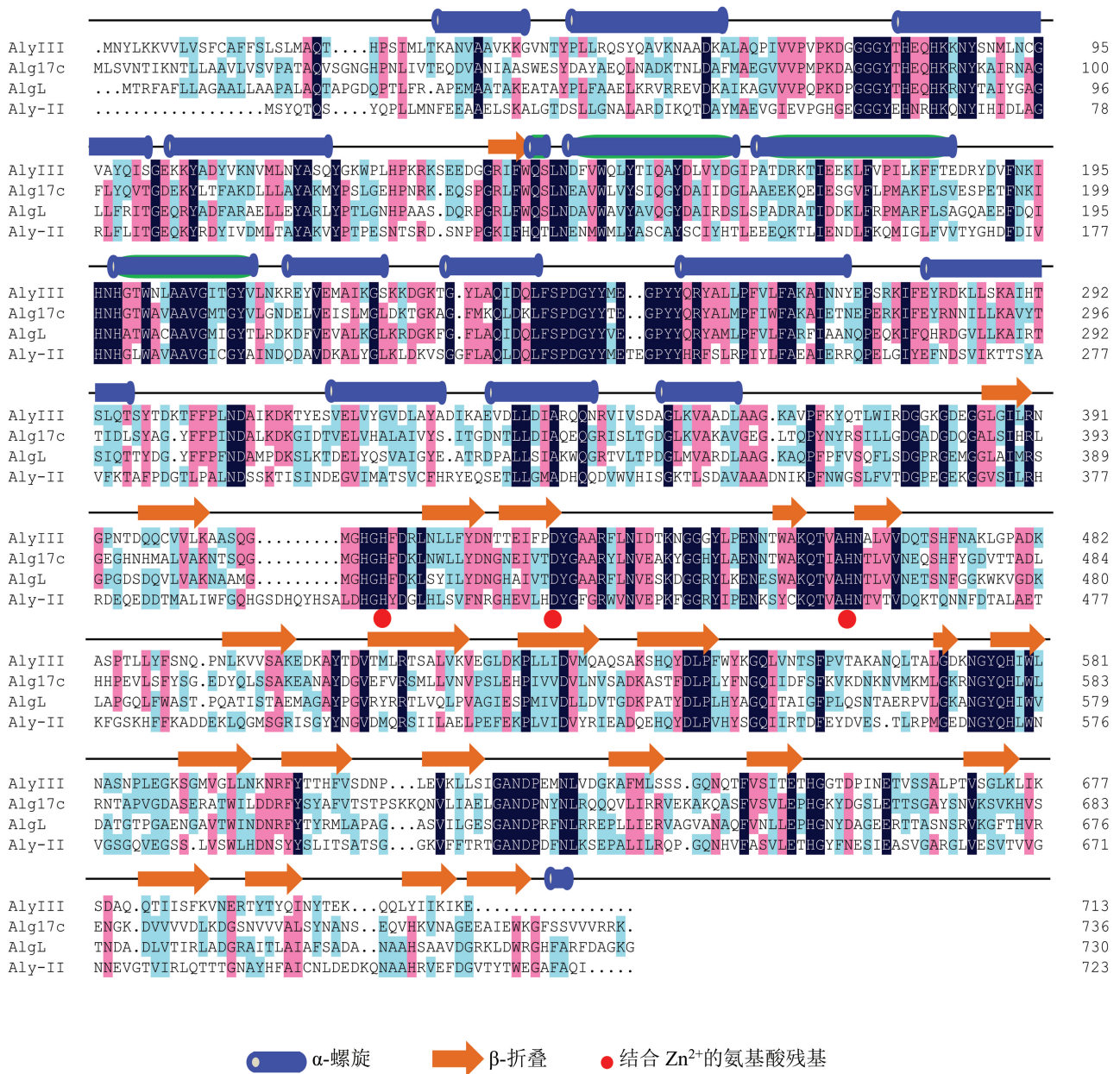


图 8 蛋白质 Aly-II 和 PL17 家族的褐藻胶裂解酶的氨基酸序列对比

Fig.8 Amino acid sequence alignment of proteins Aly-II and alginate lyases from PL17 family

利用 MEG6.0 软件对 PL-17 家族的褐藻胶裂解酶进行系统发育分析(图 9),可见与 *Sphingomonas* sp. MJ-3, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Saccharophagus degradans* 2-40, *Shewanella* sp. Kz7 来源的褐藻胶裂解酶的进化距离都小于 0.1,相对于其他菌株来源的褐藻胶裂解酶亲缘关系更近。而 *Vibrio* sp. 来源的褐藻胶裂解酶与其他菌株来源的褐藻胶裂解酶的亲缘关系相对较远。

蛋白质与配体预测的结合位点为 Gln¹⁵⁷, Leu¹⁵⁹, Met¹⁶³, Asn²¹¹, His²¹³, Trp²¹⁶, Tyr²⁷², Phe²⁷⁵, Ser²⁷⁶, 蛋白质与配体结合的空间结构模拟如图 10 所示,配体位于由 α -螺旋组成的腔内。

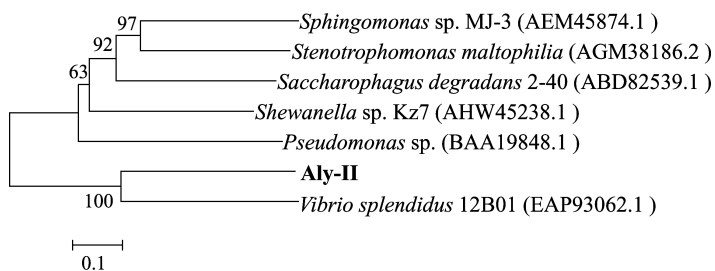


图 9 PL-17 家族的褐藻胶裂解酶基因的系统发育分析
Fig.9 Phylogenetic analysis of alginate lyase genes in PL-17 family

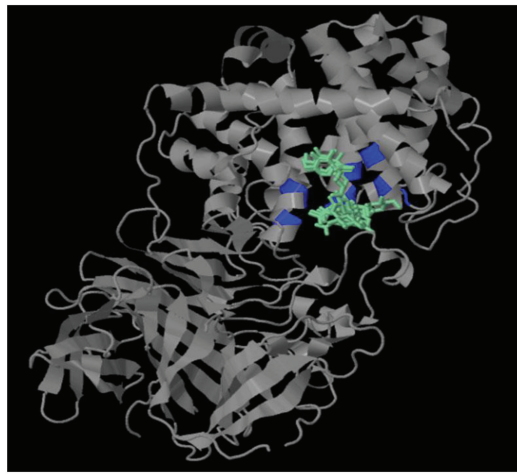


图 10 蛋白质与配体相互结合的空间结构预测图
Fig.10 Predicted structural view of Aly-II protein and its ligand

2.7 蛋白质跨膜结构分析

对蛋白质 Aly-II 的跨膜结构进行分析(图 11),结果显示蛋白质 Aly-II 是一种跨膜蛋白,在整个蛋白质分子中存在 S1,S2,S3 三段跨膜序列,分别为第 158 位到 173 位氨基酸(S1),第 229 位到 214 位氨基酸(S2),第 273 位到 288 位氨基酸(S3),3 段跨膜结构都包含了 16 个氨基酸残基。

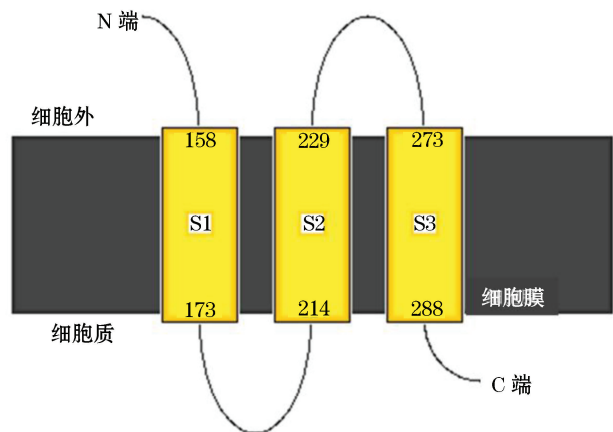


图 11 蛋白质 Aly-II 中跨膜螺旋及其拓扑学结构
Fig.11 The prediction of transmembrane helices of Aly-II protein

3 讨 论

多糖是由碳水化合物重复单元通过糖苷键形成的聚合物。主要以线型聚合物的形式存在,也有一些多糖会含有不同程度的分支^[7]。多糖是生命有机体中重要的细胞组成成分,在生命过程中具有复杂的生物学作用^[25-26]。在细胞信号传递^[26-27]、免疫应答^[28-29]、细菌发病机理^[30]和癌症发生^[31-32]等细胞相互作用的过程

中都会有多糖的参与。许多具有重要生物学功能的多糖在它们的重复单元中含有糖醛酸^[7]。褐藻胶是一种线型的多糖,由 α -L-古洛糖醛酸和 β -D-甘露糖醛酸两种单体组成,可以有假单胞杆菌属和固氮菌属的细菌产生^[33],也可以由褐藻产生。许多细菌和植物将多糖作为碳源,所以这些生命有机体内含有用于多糖合成、修饰和裂解的酶并不奇怪^[34]。在 CAZy 数据库中,根据酶的性质不同,将裂解酶分成了 22 个不同的家族,其中有 7 个家族是褐藻胶裂解酶。polyM 特异性的裂解酶大多属于 PL-5 家族,大多数 polyG 特异性的裂解酶属于 PL-7 家族^[8],而能同时作用于 polyM 和 polyG 的裂解酶多属于 PL-18 家族^[6]。目前,已发现的外切型褐藻胶裂解酶都属于 PL-15 和 PL-17 家族^[35]。对 PL-17 家族中的褐藻胶裂解酶 Alg17c 研究发现,Alg17c 分子中与底物结合的区域螯合了一个 Zn^{2+} , Zn^{2+} 与该区域的 His⁴¹⁵, Asp⁴³³ 和 His⁴⁶⁴ 形成配位键,固定了 3 个氨基酸残基的取向,从而促进了酶与底物的结合^[36]。通过序列对比发现(图 9),在 PL-17 家族的其他褐藻胶裂解酶中也发现了相同的金属配位残基,所以,结合金属离子可能是 PL-17 家族的褐藻胶裂解酶的一个显著特征。

本研究利用设计的引物,从目标菌株的基因组中克隆出了一段基因,并将它命名为 *aly-II*。对基因及其编码的蛋白质进行生物信息学分析,发现该基因编码的蛋白质与 PL-17 家族的褐藻胶裂解酶具有很高的相似性。到目前为止,对 PL-17 家族的褐藻胶裂解酶的研究还很少,只有一个来自 *Saccharophagus degradans* 的褐藻胶裂解酶 Alg17c 的结构得到了表征^[36]。本研究中,以 Alg17c 为模板,对蛋白质 Aly-II 进行同源建模。蛋白质 Aly-II 由位于氨基端的 $(\alpha/\alpha)_6$ 环形线圈结构和羧基端的 β -折叠片结构组成,类似的结构也常见于 PL-15 家族的褐藻胶裂解酶。Alg17c 的活性中心包含 Asn, His, Tyr 和 Arg 四种氨基酸。但蛋白质 Aly-II 的活性中心包括了 Gln, Leu, Met, Asn, His, Trp, Tyr, Phe, Ser。序列对比结果显示(图 9),在蛋白质 Aly-II 的氨基酸序列中,也含有 His⁴⁰⁸, Asp⁴²⁶ 和 His⁴⁵⁷ 三个与 Zn^{2+} 结合的保守氨基酸残基,同时, Aly-II 在氨基端的 $(\alpha/\alpha)_6$ 环形线圈结构上也有一个凹陷腔,预测该结构有助于酶与底物的结合。

本研究克隆了 *Vibrio* sp. QD-5 基因组中的褐藻胶裂解酶基因并对其编码的蛋白质进行了生物信息学的分析,为酶的表达及酶学性质研究打下了良好的基础。在未来的研究中,可以利用定点突变技术对酶的催化位点进行研究,也可以进一步利用定向进化技术提高酶的催化活性或稳定性,为酶的工业化生产和应用打下基础。

4 结 论

根据海洋细菌 *Vibrio* sp. QD-5 的基因组草图,通过设计特异的引物对基因 *aly-II* 进行了克隆。利用 ExPASy 的 Translate 和 Protparam 工具对 ORF 进行翻译和对应蛋白质的理化性质分析;由 ProtScale 程序对蛋白质的疏水性进行分析;利用 NCBI 中的 blastp 对蛋白质的氨基酸序列进行同源性分析;蛋白质二级结构和结构域的预测分别利用在线工具 SOPMA 和 SMART 完成;利用在线工具 Phyre2 和 3DLigandSite 对蛋白质三级结构和底物结合位点进行了预测。得出以下结论:

1) 通过克隆得到基因 *aly-II*, 并对其序列进行分析,基因全长为 2 170 bp,编码 764 个氨基酸。系统发育分析表明,与蛋白质 Aly-II 相似度最高的为海洋弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的褐藻胶裂解酶(WP_085568977.1),相似度为 99%。

2) 对蛋白质 Aly-II 的二级结构及结构域分析发现,蛋白质 Aly-II 中含有 α 螺旋、延伸链、 β -转角和无规则卷曲四种二级结构,其中无规则卷曲在分子中的含量最高,占了 34.29%,说明蛋白质 Aly-II 的分子结构比较松散。对蛋白质的结构域分析发现, Aly-II 中含有 Alginate_lyase 和 Hepar_II_III 两个结构域。

3) 通过同源建模分析发现, Aly-II 含有 2 个保守的基序,分别为 N 端的 $(\alpha/\alpha)_6$ 环形线圈结构和 C 端的 β -折叠片结构。同时发现,蛋白质 Aly-II 的氨基酸序列中含有 PL17 家族的褐藻胶裂解酶所特有的与 Zn^{2+} 离子结合的氨基酸位点 His⁴⁰⁸, Asp⁴²⁶ 和 His⁴⁵⁷。

参考文献(References):

- [1] VERA J, CASTRO J, GONZALEZ A, et al. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants[J]. *Marine Drugs*, 2011, 12: 2514-2525.
- [2] GIMMESTAD M, ERTESVAG H, HEGGESET T M, et al. Characterization of three new *Azotobacter vinelandii* alginate lyases, one of which is involved in cyst germination[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(15): 4845-4853.
- [3] FREMOND B, MALANDAIN C, GUYOMARD C, et al. Correction of bilirubin conjugation in the Gunn rat using hepatocytes immobilized in alginate gel beads as an extracorporeal bioartificial liver[J]. *Cell Transplantation*, 1993, 2(6): 453-460.
- [4] STEINLECHNER-MARAN R, EBERL T, KUNC M, et al. Oxygen dependence of respiration in coupled and uncoupled endothelial cells[J]. *American Journal of Physiology*, 1996, 271: C2053-C2061.
- [5] ATALA A, KIM W, PAIGE K T, et al. Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocyte-alginate suspension[J]. *Journal of Urology*, 1994, 152: 641-644.
- [6] 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]. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54(1): 289-340.
- [7] GARRON M L, CYGLER M. Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases[J]. *Glycobiology*, 2010, 20(12): 1547-1573.
- [8] SUN Y, CHEN H, JIANG G L. Research progress of alginate lyase[J]. *China Brewing*, 2017, 36(3): 14-18. 孙艳宾, 陈洪基, 姜国良. 褐藻胶裂解酶的研究进展[J]. *中国酿造*, 2017, 36(3): 14-18.
- [9] LI L, JIANG X, GUAN H, et al. Preparation, purification and characterization of alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase from *Pseudomonas* sp. HZJ 216[J]. *Carbohydrate Research*, 2011, 346(6): 794-800.
- [10] JONATHAN B, JAMES R T. Structural studies of Alginic acid, using a bacterial poly- α -L-gulonate lyase[J]. *Carbohydrate Research*, 1978, 66(1): 187-194.
- [11] CHITNIS C E, OHMAN D E. Cloning of *Pseudomonas aeruginosa* algG, which controls alginate structure[J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(6): 2894-900.
- [12] DAVIDSON I W, SUTHERLAND I W, LAWSON C J. Purification and properties of an alginate lyase from a marine bacterium[J]. *Biochemical Journal*, 1976, 159(3): 707.
- [13] FAVOROV V V, VOZHOVA E I, DENISENKO V A, et al. A study of the reaction catalyzed by alginate lyase VI from the sea mollusc, *Littorina* sp.[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Enzymology*, 1979, 569(2): 259-266.
- [14] FUJIBAYASHI S, HABE H, NISIZAWA K. Heterogeneity of alginate in special reference to the enzymatic degradation[J]. *Journal of Biochemistry*, 1970, 67(1): 37-45.
- [15] HEYRAUD A, COLIN-MOREL P, GIROND S, et al. HPLC analysis of saturated or unsaturated oligogulonates and oligomannuronates-application to the determination of the action pattern of *haliotis tuberculata* alginate lyase[J]. *Carbohydrate Research*, 1996, 291(38): 115-126.
- [16] MIN K H, SASAKI S F, KASHIWABARA Y, et al. Fine structure of SMG alginate fragment in the light of its degradation by alginate lyases of *Pseudomonas* sp.[J]. *Journal of Biochemistry*, 2008, 81(3): 555.
- [17] NAKADA H I, SWEENEY P C. Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1967, 242(5): 845.
- [18] ØSTGAARD K. Enzymatic microassay for the determination and characterization of alginates[J]. *Carbohydrate Polymers*, 1992, 19(1): 51-59.
- [19] ØSTGAARD K. Determination of alginate composition by a simple enzymatic assay[J]. *Hydrobiologia*, 1993, 260-261(1): 513-520.
- [20] ROMEO T, PRESTON III J F. Depolymerization of alginate by an extracellular alginate lyase from a marine bacterium; substrate specificity and accumulation of reaction products[J]. *Biochemistry*, 1986, 25(26): 8391-8396.
- [21] INOUE A, MASHINO C, KODAMA T, et al. Protoplast preparation from *Laminaria japonica* with recombinant alginate lyase and cellulase[J]. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(2): 256-263.
- [22] HU X, JIANG X, GUAN H. Isolation of protoplasts from *undaria pinnatifida*, by alginate lyase digestion[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2003, 2(1): 58-61.
- [23] ISLAN G A, BOSIO V E, CASTRO G R. Alginate lyase and ciprofloxacin co-immobilization on biopolymeric microspheres for cystic fibrosis treatment[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2013, 13(9): 1238-1248.
- [24] ISLAN G A, MARTINEZ Y N, ILLANES A, et al. Development of novel alginate lyase cross-linked aggregates for the oral treatment

- of cystic fibrosis[J]. RSC Advances, 2014, 4(23): 11758-11765.
- [25] GAGNEUX P, VARKI A. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function[J]. Glycobiology, 1999, 9(8): 747-755.
- [26] SCHAEFER L, SCHAEFER R M. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules[J]. Cell and Tissue Research, 2010, 339(1): 237-246.
- [27] MYTHREYE K, BLOBE G C. Proteoglycan signaling co-receptors: roles in cell adhesion, migration and invasion[J]. Cellular Signaling, 2009, 21(11): 1548-1558.
- [28] CHEN D, WU X Z, WEN Z Y. Sulfated polysaccharides and immune response: promoter or inhibitor? [J]. Panminerva Medica, 2008, 50(2): 177-183.
- [29] MARTH J D, GREWAL P K. Mammalian glycosylation in immunity[J]. Nature Reviews Immunology, 2008, 8(11): 874-887.
- [30] BONECA I. The role of peptidoglycan in pathogenesis[J]. Current Opinion in Microbiology, 2005, 8(1): 46-53.
- [31] VLODAVSKY I, ILAN N, NADIR Y, et al. Heparanase, heparin and the coagulation system in cancer progression[J]. Thrombosis Research, 2007, 120(S2): S112-S120.
- [32] IOZZO R V, ZOELLER J J, NYSTRÖM A. Basement membrane proteoglycans: Modulators *Par Excellence* of cancer growth and angiogenesis[J]. Molecules and Cells, 2009, 27(5): 503-513.
- [33] REHM B H, VALLA S. Bacterial alginates: biosynthesis and applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 48(3): 281-288.
- [34] LAIRSON L L, HENRISSAT B, DAVIES G J, et al. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms[J]. Annual Review of Biochemistry, 2008(77): 521-555.
- [35] LOMBARD V, BERNARD T, RANCUREL C, et al. A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics[J]. Biochemical Journal, 2010, 432(3): 437-444.
- [36] PARK D, JAGTAP S, NAIR S K. Structure of a PL17 family alginate lyase demonstrates functional similarities among exotype depolymerases[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(12): 8645-8655.

Cloning and Bioinformatics Analysis of Alginate Lyase Genes From Marine Bacteria *Vibrio* sp. QD-5

CHAO Ya-xi, Wang Shu-yan, WU Su-qi, CHEN Hao
(The First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China)

Abstract: Using designed specific primers, the target *aly-II* gene was amplified by PCR from the genomic DNA of *Vibrio* sp. QD-5, cloned into pet-22b(+) vector and then sequenced. The result showed that the cloned gene was 2 170 bp, encoding 723 amino acid residues. The bioinformatics analysis of Aly-II protein was further conducted using ProtParam and ProtScale to analyze the physical and chemical properties of the protein. The theoretical molecular weight and pI of Aly-II were 85.6 kDa and 5.1, respectively. The protein had hydrophilic property. The phylogenetic trees were constructed by MEG 6.0 and phylogenetic analysis showed that, Aly-II was most likely an alginate lyase of PL-17 family. The three-dimensional structure of Aly-II was constructed using homology modeling method. The structure of Aly-II displayed that it contained two domains, i.e., $(\alpha/\alpha)_6$ toriod domain and β -sheet domain.

Key words: *Vibrio* sp.; alginate lyase; gene cloning; bioinformatics analysis

Received: November 23, 2017