孙茜,廖丽,丁海涛,等. 北冰洋海单胞菌 β-D-半乳糖苷酶的异源表达及酶学特性研究[J]. 海洋学报,2015,37(11): 165－177, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2015.11.016

Sun Xi, Liao Li, Ding Haitao, et al. Heterologous expression and its enzymatic properties of β-galactosidase from a *Marinomonas* strain isolated from the Arctic Ocean[J]. Haiyang Xuebao, 2015, 37(11): 165－177, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2015.11.016

北冰洋海单胞菌 β-D-半乳糖苷酶的异源表达及酶学特性研究

孙茜[1,2],廖丽[2],丁海涛[2],刘双[1],陈波[1,2*]

(1. 华东理工大学 生物工程学院,上海 200237;2. 中国极地研究中心 国家海洋局极地科学重点实验室,上海 200136)

摘要: 初筛表明,一株分离自北极加拿大海盆海冰心芯样品的海单胞菌(*Marinomonas* sp. BSi20584)具有较高的 β-D-半乳糖苷酶活性,为了研究清楚其酶学性质,将经 hiTAIL-PCR 扩增得到的 β-D-半乳糖苷酶基因(*galt*)与 pET-28a(＋)原核表达载体结合,转入大肠杆菌 BL21(DE3)。经 IPTG 诱导后对重组 β-D-半乳糖苷酶(GALT)的表达条件进行了优化,采用金属螯合亲和层析技术制备纯酶,并对重组 GALT 的酶学性质进行了研究。结果显示,重组酶的最适诱导温度为 20℃,在 IPTG 浓度为 0.07 mmol/L 时诱导 22 h 后,酶活和产酶量达到最大值。GALT 单体分子量约为 6.6×10^4 g/mol,天然酶为同源三聚体。GALT 最适作用温度为 35℃,其热稳定性较好,在 60℃处理 5 h 后,仍可保持 50%以上的相对活性。GALT 的最适作用 pH 为 9.0,在 pH 为 6.0～11.0 范围内比较稳定。GALT 的最适 NaCl 浓度为 0.5 mol/L,对盐度具有较高的耐受性。Mg^{2+}、K^+、DTT 和 EDTA 对酶活不具有显著影响,而 Mn^{2+}、Fe^{2+} 对酶活有促进作用,Zn^{2+} 和 L-谷胱甘肽对酶活有抑制作用。GALT 对 Gal β1-4 GlcNAc 具有水解作用,而对 Gal β1-3 GalNAc 和 Gal β1-3 GlcNAc 糖苷键型没有水解能力。本研究实现了海单胞菌属菌株的 β-D-半乳糖苷酶基因在大肠杆菌系统中的高效表达,并系统研究了重组酶的酶学特性,为后续开展该酶的代谢适应性和潜在应用研究提供详细的酶学数据基础。

关键词: 北冰洋;海单胞菌;β-D-半乳糖苷酶;异源表达;酶学特性

中图分类号: TQ925 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-4193(2015)11-0165-13

1 引言

β-D-半乳糖苷酶(EC 3.2.1.23)能够催化水解半乳糖苷类物质,释放其末端的非还原性半乳糖分子,它存在于自然界很多微生物、动物和植物中,来源不同的 β-D-半乳糖苷酶其酶学性质也不尽相同[1]。迄今,已有 100 多种 β-D-半乳糖苷酶提交到各类数据库中,根据其功能的相似性可将其分为 4 个家族:GH1,GH2,GH35 和 GH42[2]。

多数 β-D-半乳糖苷酶是由微生物产生的,包括中温菌、嗜热菌和嗜冷菌等[3]。随着 β-D-半乳糖苷酶研究的不断深入,该酶的应用不再局限于乳糖水解,而是广泛应用于食品、医药、免疫、环境检测、基因诊断和基因治疗等多个领域,已取得了可观的经济和社会

收稿日期: 2015-04-10;**修订日期:** 2015-06-15。

基金项目: 国家"863"计划(2012AA092105);海洋公益性行业科研专项经费项目(201005032－4);上海市自然科学基金项目(13ZR1462700);南北极环境综合考察与评估专项(CHINARE04－03/04－05/01－06)。

作者简介: 孙茜(1989—),女,山东省淄博市人,主要从事极地微生物功能基因及其克隆表达研究。E-mail:545379435@qq.com

* **通信作者:** 陈波,研究员,主要从事极地微生物学研究。E-mail:chenbo@pric.org.cn

效益，具有广阔的市场前景[4]。

海单胞菌是一种海洋性细菌，目前已知有 7 个海单胞菌来源的 β-D-半乳糖苷酶基因，均是通过基因组测序得到，其中 *Marinomonas* sp. MWYL1 的基因组中含有两个 β-D-半乳糖苷酶基因(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/? term＝Marinomonas＋sp.＋MWYL1)，分别属于 GH42 家族和 GH2 家族；*Marinomonas* sp. MED121 和 *Marinomonas* sp. D104[5] 中各含有一个属于 GH42 家族的酶基因；*Marinomonas posidonica* IVIA-Po-181[6] 中含有两个 β-D-半乳糖苷酶基因，分别属于 GH42 家族和 GH1 家族；*Marinomonas mediterranea* MMB-1[7] 中含有一个属于 GH1 家族的酶基因。

本研究以北极加拿大海盆海冰冰心中分离的 *Marinomonas* sp. BSi20584 为研究菌株，通过 hiTAIL-PCR 技术获得该菌株产生的 β-D-半乳糖苷酶基因 *galt*，并将该基因克隆至大肠杆菌中进行原核表达，对重组酶的酶学特性进行了系统的研究，为该酶的代谢适应性和潜在应用研究提供详细酶学数据基础。

2 材料与方法

2.1 材料

海单胞菌 *Marinomonas* sp. BSi20584 分离自北极加拿大海盆海冰上层冰心，现保存于中国极地研究中心极地微生物菌种保藏管理中心(BSi20584)和中国海洋微生物菌种保藏管理中心(MCCC 1C00250)。原核表达载体 pET-28a(＋)由中国极地研究中心极地微生物学实验室提供；大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞购自 Biomed 公司；蛋白 Marker 购自 Thermo 公司；Bradford 蛋白定量试剂盒、DNA 回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、DNA marker、IPTG 和卡那霉素购自上海捷瑞生物工程有限公司；Ni-NTA 为 Bio-rad 公司产品；Taq 酶购自上海生工生物公司；氨基色谱柱购自 CNW；色谱纯试剂购自上海安谱科学仪器有限公司；PA-Sugar Chain 026(10 pmol/μL)、PA-Sugar Chain 028(10 pmol/μL)、PA-Sugar Chain 042(10 pmol/μL)、PA-Glc(1 pmol/μL)、Fastpfu 高保真酶、*BamH*I、*Xho*I 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司；引物由上海生工生物公司合成。

2.2 方法

2.2.1 基因的扩增与原核表达载体的构建

基于 hiTAIL-PCR 技术扩增得到的 β-D-半乳糖苷酶基因序列[8]，设计全长扩增引物，同时引入 *BamH*I、*Xho*I 两个酶切位点和保护碱基，F584：5′—CGCGGATCCATGAAATTAGGT GTGTGTTATT-3′，R584：5′-CCGCTCGAGTTATTGTTTTTTC-CAAATGG -3′。以野生型 BSi20584 全基因组 DNA 为模板，用 Fastpfu 高保真酶扩增 β-D-半乳糖苷酶基因。PCR 扩增程序：95℃ 5 min，1 个循环；95℃ 30 s，55℃ 1 min，72℃ 1 min，30 个循环；72℃ 10 min。将 PCR 产物通过 0.8%琼脂糖凝胶电泳验证后割胶回收。使用 *BamH*I、*Xho*I 分别对 pET-28a(＋)质粒和 PCR 扩增产物进行双酶切处理，酶切产物割胶回收后于 16℃过夜连接。将构建的原核表达载体命名为 pET-28/galt。

2.2.2 β-D-半乳糖苷酶基因序列分析

将扩增得到的基因序列提交至 NCBI 进行 BLAST(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)同源性比对，选取同源性大于 70%的序列构建系统发育树，从而观察其进化上的相关关系。用 Protean 5.01 进行蛋白二级结构的分析[9]，同时用 Swiss-model(http://swissmodel.expasy.org/)进行三维结构的预测，用 Swiss-pdbviewer 4.10 对催化位点进行预测。

2.2.3 *galt* 酶基因在大肠杆菌中的表达与纯化

将 pET-28/galt 重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞，用 50 μg/μL 的卡那霉素抗性筛选，挑取阳性单克隆送测。将验证成功的重组菌于含 50 μg/μl 卡那霉素的 LB 培养基中培养至 OD_{600} 为 0.6～0.8，然后加入不同浓度 IPTG 进行诱导，对不同诱导条件下的样品取样，8 000 rpm 离心 10 min 收集菌体，用 PBS 重悬，在 400 W 功率下超声破碎(超声 2 s，停 3 s)30 min 后，于 12 000 rpm 下离心 20 min，收集上清得到粗酶液，沉淀用 PBS 重悬，用以分析酶的可溶性表达情况。由于重组菌含有 6×His-tag 标签，因此对重组酶采用镍柱亲和层析纯化[10]，用不同浓度的咪唑洗脱，将洗脱液中有酶活的部分收集，SDS-PAGE 分析重组酶纯度。

2.2.4 酶活力测定

采用 ONPG(邻硝基苯 β-D-半乳吡喃糖苷)法测定酶活：将 10 倍稀释过的酶液 10 μL 与 90 μL ONPG 混合，于 37℃下反应 10 min 后加入 100 μL 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应 5 min，测定 OD_{420}，与 ONP 标准曲线对照得到酶活。酶活力定义：在 37℃条件下，每催化产生 1 μmol ONP 所需要的酶量为 1 U[10]。

2.2.5　蛋白质定量分析

用蛋白定量试剂盒进行蛋白量的测定,具体操作为:取 20 μL 酶液与 200 μL Bradford 试剂混合,室温下放置 5 min 后测定 OD_{595},然后与 BSA(牛血清白蛋白)标准曲线对照得到蛋白量。

2.2.6　酶学性质测定

(1)温度对酶的影响:将酶液与反应液混合后分别放置在 0℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃下进行,ONPG 法测定酶活以检测酶的最适作用温度;先将等量酶液分别放置在 40℃、50℃、60℃中处理相应的时间(1 h、2 h、3 h、4 h、5 h)后再与底物 ONPG 反应,检测酶的热稳定性。

(2)pH 对酶的影响:用 Britton-Robinson 缓冲液(磷酸、乙酸、硼酸、氢氧化钠混合液)将酶反应体系分别调成 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,然后与 ONPG 反应,测定酶反应的最适 pH;将等量酶液分别放在 pH 为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 的 Britton-Robinson 缓冲液中处理 1 h 后 ONPG 法测定酶活,测定不同条件下酶的 pH 稳定性。

(3)NaCl 对酶的影响:分别配制含 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5 mol/L NaCl 的酶反应体系,将酶反应放置在上述盐浓度梯度中进行,以检测酶的最适 NaCl 浓度;将等量酶液单独放置在上述盐浓度梯度中处理 1 h 后再与底物反应,检测酶的耐盐性。

(4)金属离子和化学物质对酶活的影响:在酶与底物 ONPG 的反应体系中分别加入浓度为 0.1 mmol/L 到 5 mmol/L 的 Fe^{2+}、Zn^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+},分析不同浓度金属离子对酶活的影响;在酶与底物 ONPG 的反应体系中分别加入 10、20、30、40、50 mmol/L 的 DTT、EDTA 和 L-谷胱甘肽,分析上述化学物质对酶活的影响。

(5)动力学参数:用 PBS 配制不同浓度的 ONPG 溶液,取等量酶液与不同浓度的 ONPG 底物反应,测定酶活,用 OriginPro 8 非线性拟合分析法作图,求出 K_m 和 V_{max}。

2.2.7　SDS-PAGE 和 Native-PAGE

SDS-PAGE 条件:12%的分离胶和 5%的浓缩胶,Marker 范围为 $14.4\times10^3\sim116\times10^3$ g/mol(Thermo);Native-PAGE:8%的分离胶和 5%的浓缩胶,Marker 范围为 $5\times10^3\sim250\times10^3$ g/mol(Thermo),预电泳 30 min,电泳在冷库中(4℃)进行,以防止蛋白质变性。用考马斯亮蓝 G250 进行凝胶染色。

2.2.8　水解底物键型分析

用具有 PA(吡啶氨基)荧光修饰的多糖(Sugar Chain,Takara)对重组酶的水解底物键型进行分析。反应体系为:50 pmol 底物,5×10^{-3} U 酶,10 mol/L DTT,10 mmol/L $MgCl_2$,缓冲液为 0.01 mol/L 的 PBS(pH=7.4)。反应 20 h 后将反应液短暂离心后煮沸 5 min,14 000 r/min 离心 10 min 去除酶蛋白,取上清作为检测样品。色谱条件:检测器:Waters 2475 荧光检测器;流动相:200 mmol/L 醋酸三乙胺(pH=7.3):乙腈=35∶65;流速:1 mL/min;上样量:30 μL;检测波长:E_x=310,E_m=380[11]。

表 1　糖标准品结构

Tab.1　Structure of sugar standards

标准品	结构
PA-sugar chain 026	Gal β1-4 Glc-PA
PA-sugar chain 028	Gla β1-3 GalNAcβ1-4Gal β1-4 Glc-PA
PA-sugar chain 042	Gla β1-3 GlcNAcβ1-3Gal β1-4 Glc-PA

3　结果

3.1　*galt* 基因原核表达载体的构建

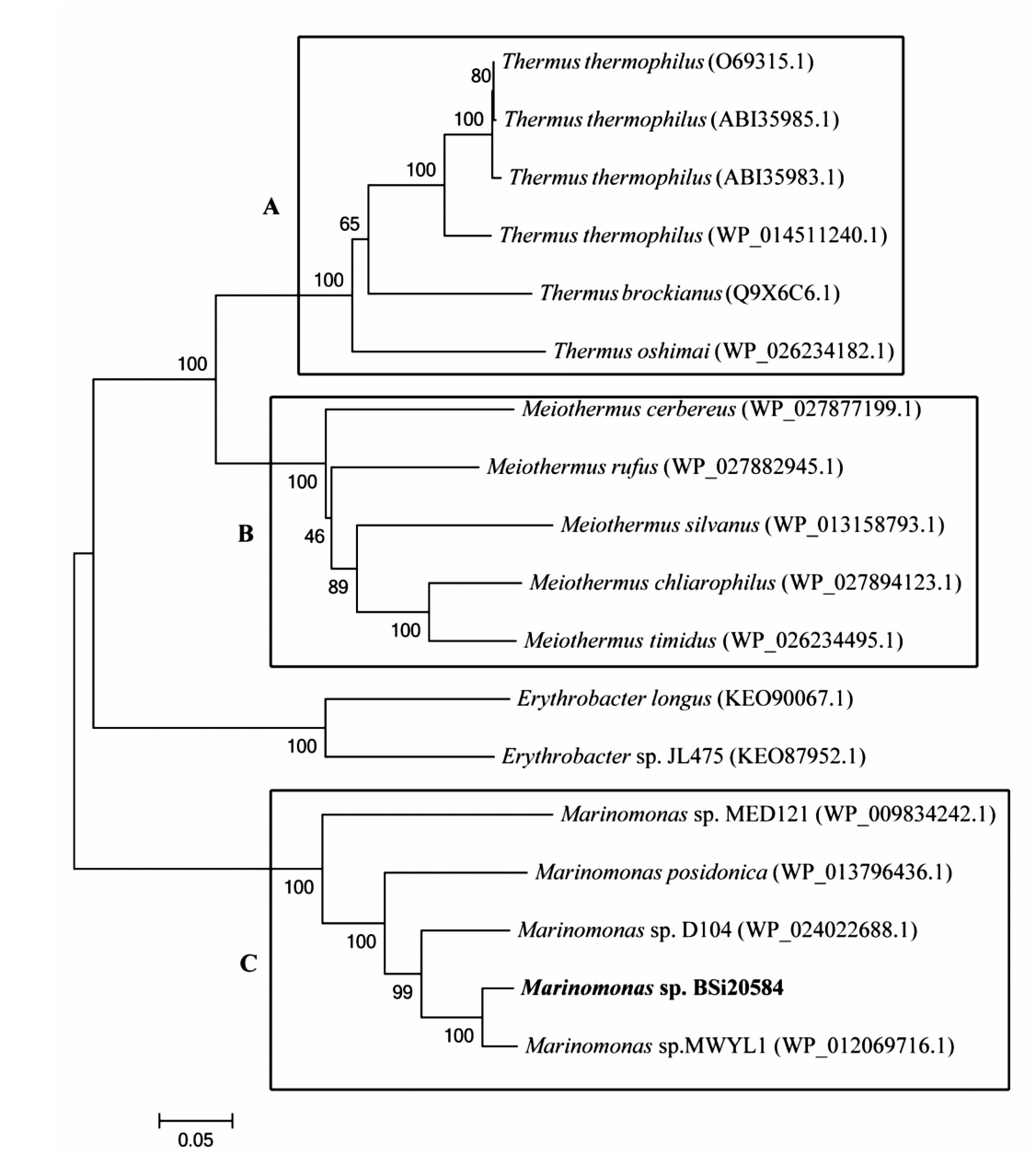
以野生型海单胞菌 BSi20584 的全基因组为模板,F584 和 R584 为引物,扩增得到约 2 000 bp 的条带。将目的片段割胶回收后用 *BamH*I、*Xho*I 双酶切,同时对 pET-28a(+)质粒进行双酶切处理,然后将酶切后的目的片段与 pET-28a(+)载体用 T4 DNA 连接酶于 16℃过夜连接。对重组质粒进行双酶切验证,以检测是否正确插入目的基因片段。将阳性克隆送测结果显示,*galt* 基因全长 1 971 bp,共编码 656 个氨基酸,预测蛋白分子量大小约 66×10^3 g/mol。

3.2　*galt* 基因序列分析

3.2.1　*galt* 基因序列同源性分析

将 *galt* 基因序列提交至 NCBI 进行 BLAST 比对,结果显示,*galt* 属于 GH42 家族,与海单胞菌 *Marinomonas* sp. MWYL1 中 GH42 家族的 β-D-半乳糖苷酶基因相似性最高,两者的基因序列一致性为 93%,氨基酸序列一致性为 95%。选取 GenBank 中与 *galt* 相似性高于 70%的序列构建系统发育树(图 1)。进化树主要分为 3 个大的分支 A、B、C,分属于嗜热菌、亚栖热菌和海单胞菌属,*galt* 与 *Marinomonas* sp. MWYL1 中 GH42 家族的 β-D-半乳糖苷酶亲缘关系最接近,与另外 4 个同是海单胞菌来源的 β-D-半乳

糖苷酶也具有极高的亲缘性，可推知海单胞菌 GH42 家族的 β-D-半乳糖苷酶在进化上非常保守。



注：分支上的数值是采用 N—J 建树时经过 1 000 次 bootstrap 之后得出的置信度值，黑体代表本次实验的目的基因 *galt* 的产生菌株，A、B、C 代表不同 β-半乳糖苷酶产生菌株形成的分支（A 为嗜热菌属，B 为亚栖热菌属，C 为海单胞菌属）

图 1 *galt* 产生菌 *Marinomonas* sp. BSi20584 系统发育树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree of *galt* from *Marinomonas* sp. BSi20584

3.2.2 GALT 蛋白二级结构预测分析

分别用 Garnier-Robson 法和 Chou-Fasman 法对 GALT 酶蛋白二级结构组成和分布进行预测分析（图 2）。用 Garnier-Robson 法得出特定氨基酸残基在特定结构内部的可能性结果为：有 32 个 α 螺旋区域，其中 370～420 之间有一个明显的 α 螺旋聚集区；有 17 个 β 折叠区域，与 α 螺旋相比，排列稀疏且数量较少；44 个转角区域，45 个无规则卷曲；用 Chou-Fasman 法预测酶蛋白的二级结构结果为：α 螺旋区域有 26 个，β 折叠区域有 24 个，比用 Garnier-Robson 法预测的数

量要多,分布相对广泛,转角区域有 42 个。丰富的二级结构导致了空间结构的丰富性。

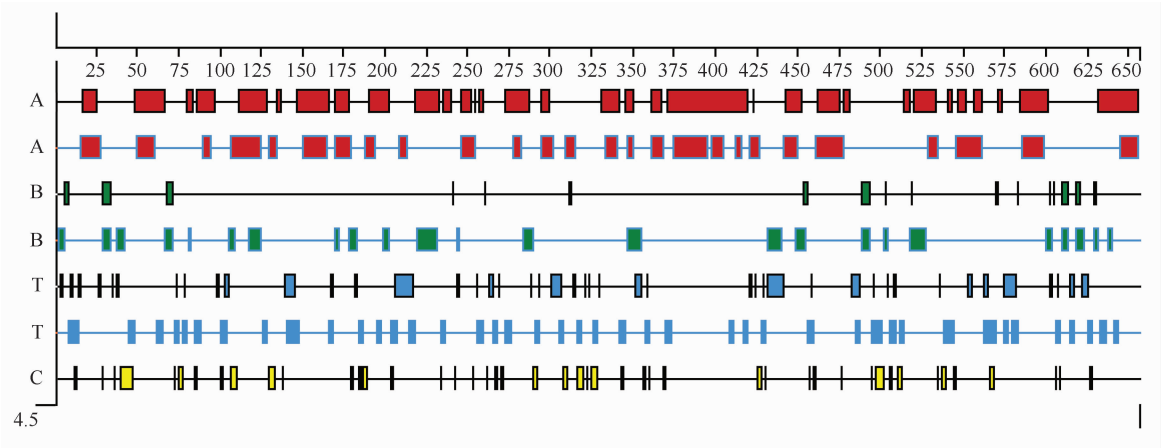


图 2　*Marinomonas* sp. BSi20584 GALT 酶蛋白二级结构预测

Fig. 2　*Marinomonas* sp. BSi20584 GALT secondary structure prediction

用 Kyte-Doolittle 法对 GALT 蛋白的亲水性进行分析,如图 3 所示,GALT 蛋白亲水性氨基酸分布于整个序列中,与不亲水的区域穿插分布,N 端的亲水性氨基酸含量比较高,疏水性片段很少,而 C 端的疏水性区域相对较多,在 375～425 处有一个明显的疏水区,在蛋白质中,肽键上的酰胺氢和羰基氧既能形成内部 α 螺旋内的氢键,也能与水分子形成氢键,但疏水环境不利于氢键的形成,反而会促进形成 α 螺旋,所以在 375～425 处由于疏水区的存在,会极大提高 α 螺旋形成的概率,与用 Garnier-Robson 法和 Chou-Fasman 法对 BGAL584-2 酶蛋白二级结构组成和分布进行预测分析结果一致。

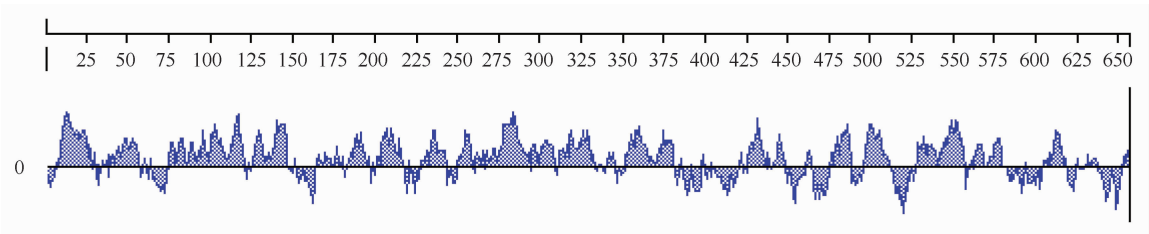


图 3　*Marinomonas* sp. BSi20584 GALT 蛋白亲水性分析

Fig. 3　Hyrophilicity plot prediction of GALT from *Marinomonas* sp. BSi20584

用 Emini 法对 GALT 蛋白的表面可能性进行分析,如图 4 所示,发现该蛋白有相当一部分氨基酸位点位于蛋白表面的可能性非常高,例如 106 位的 Tyr、140 位的 Asp、282 位的 Glu、503 位的 Thr 等氨基酸位点。

3.2.3　GALT 蛋白三维结构预测分析

用 Swiss-model 预测 GALT 酶蛋白的三维结构,序列比对显示该酶与同是 GH42 家族的 *Thermus thermophilus* A4[12] 的 β-D-半乳糖苷酶氨基酸一致性最高(55.63%),因此选择 *Thermus thermophilus* A4 的 β-D-半乳糖苷酶作为模板进行三维结构同源建模,建模结果显示 GALT 天然蛋白为同源三聚体结构。根据 *Thermus thermophilus* A4 的 β-D-半乳糖苷酶的结构域分布特征,对 GALT 蛋白进行结构域的划分,结果显示在 GALT 单体中存在 3 个结构域,如图 5 所示,其中,domain A 是由 $(\beta/\alpha)_8$ 形成的 TIM 桶装结构,为催化结构域;domain B 为 α/β 折叠结构域;domain C 为 β 折叠构成的结构域。*Thermus thermophilus* A4 的 β-D-半乳糖苷酶催化位点为 Glu141 和 Glu312,利用 Swiss-pdbviwer[13] 进行分析,发现在 GALT 蛋白结构中与其对应的是 Glu142 和 Glu314。此外,*Thermus thermophilus* A4 β-D-半乳糖苷酶的第

182 位 Trp 是酶维持活性所必须的，它可以与其他亚基一起构成活性区域的一部分，而在 GALT 中与之对应的是 Trp183，所以推测 GALT 的催化位点为 Trp183、Glu142 和 Glu314(图 6)。

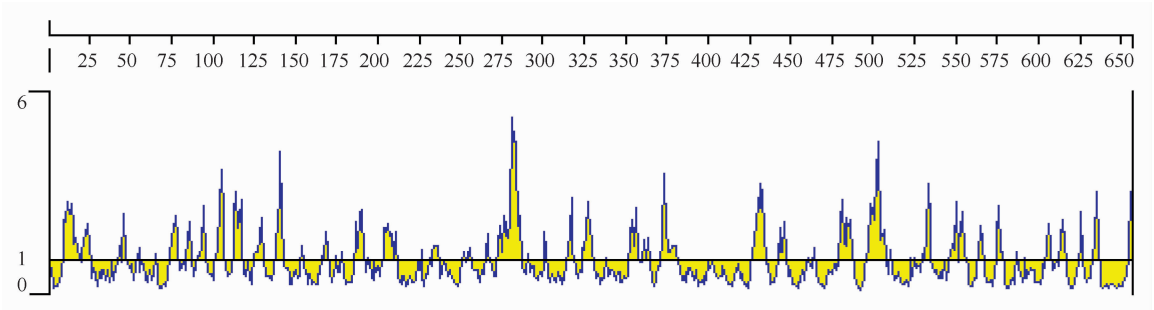


图 4 *Marinomonas* sp. BSi20584 GALT 蛋白表面可及性分析

Fig. 4 Surface probability prediction of GALT from *Marinomonas* sp. BSi20584

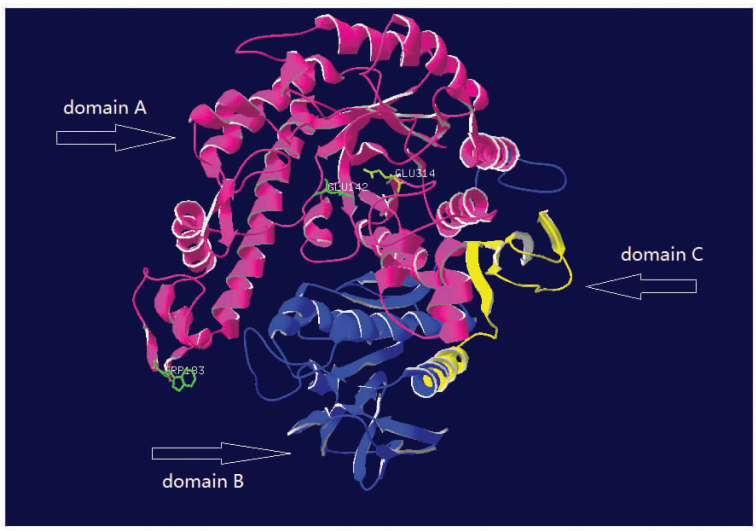


图 5 *Marinomonas* sp. BSi20584 GALT 三维结构的同源建模

Fig. 5 Homology modeling of GALT from *Marinomonas* sp. BSi20584

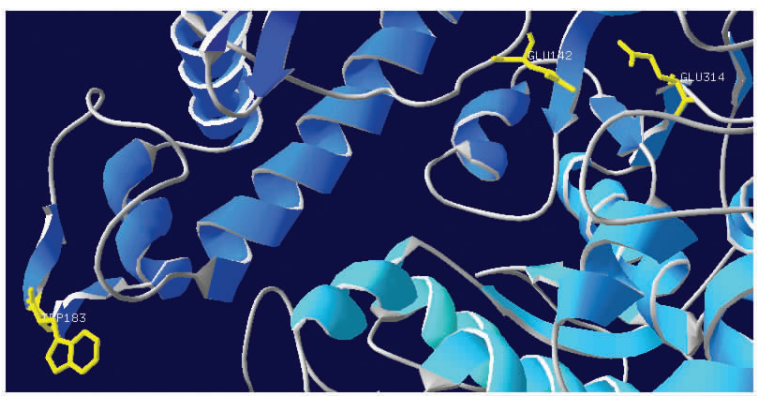


图 6 *Marinomonas* sp. BSi20584 GALT 催化位点预测

Fig. 6 Catalytic residues prediction of GALT from *Marinomonas* sp. BSi20584

3.3　重组蛋白的表达

将构建成功的重组载体 pET-28/galt 转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,经 LB 培养基后,用含 50 μg/μL 卡那霉素的 LB 培养基培养到 OD_{600} 为 0.6～0.8,然后加入不同浓度 IPTG 诱导一定的时间。经过优化,发现重组菌在 20℃,IPTG 为 0.07 mmol/L 下诱导 22 h 时表达效果最好。如图 7 所示,重组菌可以正确表达重组蛋白,蛋白分子量约为 66×10^3 g/mol。

3.4　重组蛋白纯化

在最适诱导条件下(20℃,IPTG 为 0.07 mmol/L 下诱导 22 h)培养 200 mL 菌液,离心收集菌体,用 150 mL PBS 重置,超声破碎 40 min 得到粗酶,经镍柱一步纯化即可达到电泳纯,用 Millipore 的超滤浓缩管(15 mL,10×10^3 g/mol)浓缩除盐,纯化前后酶活力结果如表 2 所示。

表 2　重组酶 GALT 镍柱纯化前后酶活力比较

Tab. 2　Enzyme activity contrast of recombinant GALT after the Ni column purification

	酶活力/U	蛋白量/mg	比活力/U·mg^{-1}	纯化倍数
粗酶	1 767.00	51.632	34.22	1
Ni 柱纯化后	810.90	5.075	159.79	4.7

3.5　GALT 蛋白酶学性质研究

3.5.1　最适作用温度与热稳定性

如图 8A_1 所示,GALT 最适作用温度为 35℃,在 30～40℃范围内相对酶活可保持在 80%以上,高于 40℃酶活水平急剧下降,为中温酶;如图 8A_2 所示,在 60℃以下呈现较好的稳定性,低于 50℃时处理 5 h 后,能保持 95%以上的相对酶活,60℃处理 5 h 后仍可保持近 60%的相对酶活;70℃处理 15 min 后,酶完全失活。

3.5.2　最适 pH 与 pH 稳定性

在 25℃条件下,测定不同 pH 环境中酶活的变化,结果如图 8B_1 所示,在 pH 为 9.0 时,GALT 具有最高酶活,pH 在 6.0～9.0 的范围内可保持 60%以上的酶活。GALT 的 pH 稳定性较好,如图 8B_2 所示,pH 在 6.0～11.0 范围内比较稳定,pH＞11.0 时酶活急剧下降。

3.5.3　NaCl 耐受性

如图 8C 所示,GALT 的最适 NaCl 浓度为 0.5 mol/L,重组酶对盐度具有较高的耐受性,当 NaCl 浓度为 3 mol/L 时,仍有 60%酶活。

3.5.4　化学物质对酶活的影响与金属离子对酶活的影响

如图 8D 所示,DTT 和 EDTA 对酶活影响不大,而 L-谷胱甘肽对酶活有明显的抑制作用,GALT 在 10 mmol/L 的 L-谷胱甘肽作用下仅能保持 67%的相对酶活,而随着 L-谷胱甘肽浓度升高,酶活水平急剧下降;金属离子对酶活的影响如图 8E 所示,一定浓度的 Fe^{2+}、Mn^{2+} 对重组酶的酶活有促进作用,其中 Fe^{2+} 的促进效果最明显,最高可使相对酶活达到 223%,而 Mg^{2+} 离子对酶活的影响不大,Zn^{2+} 对酶活有抑制作用,相对酶活水平始终抑制在 80%以下。

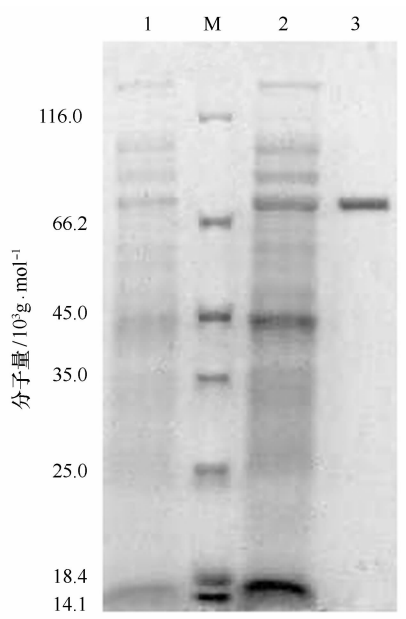


图 7　*Marinomonas* sp. BSi20584 GALT 重组蛋白 SDS-PAGE 分析(M 为蛋白 Marker,1 为重组菌未诱导样品,2 为重组菌诱导后粗酶液,3 为 GALT 纯酶)

Fig. 7　SDS-PAGE analysis of recombinant GALT from *Marinomonas* sp. BSi20584 (Lane M: Protein Molecular Weight Marker, Lane 1: non-induced recombinant sample, Lane 2: recombinant enzyme after induction; Lane 3: purified GALT)

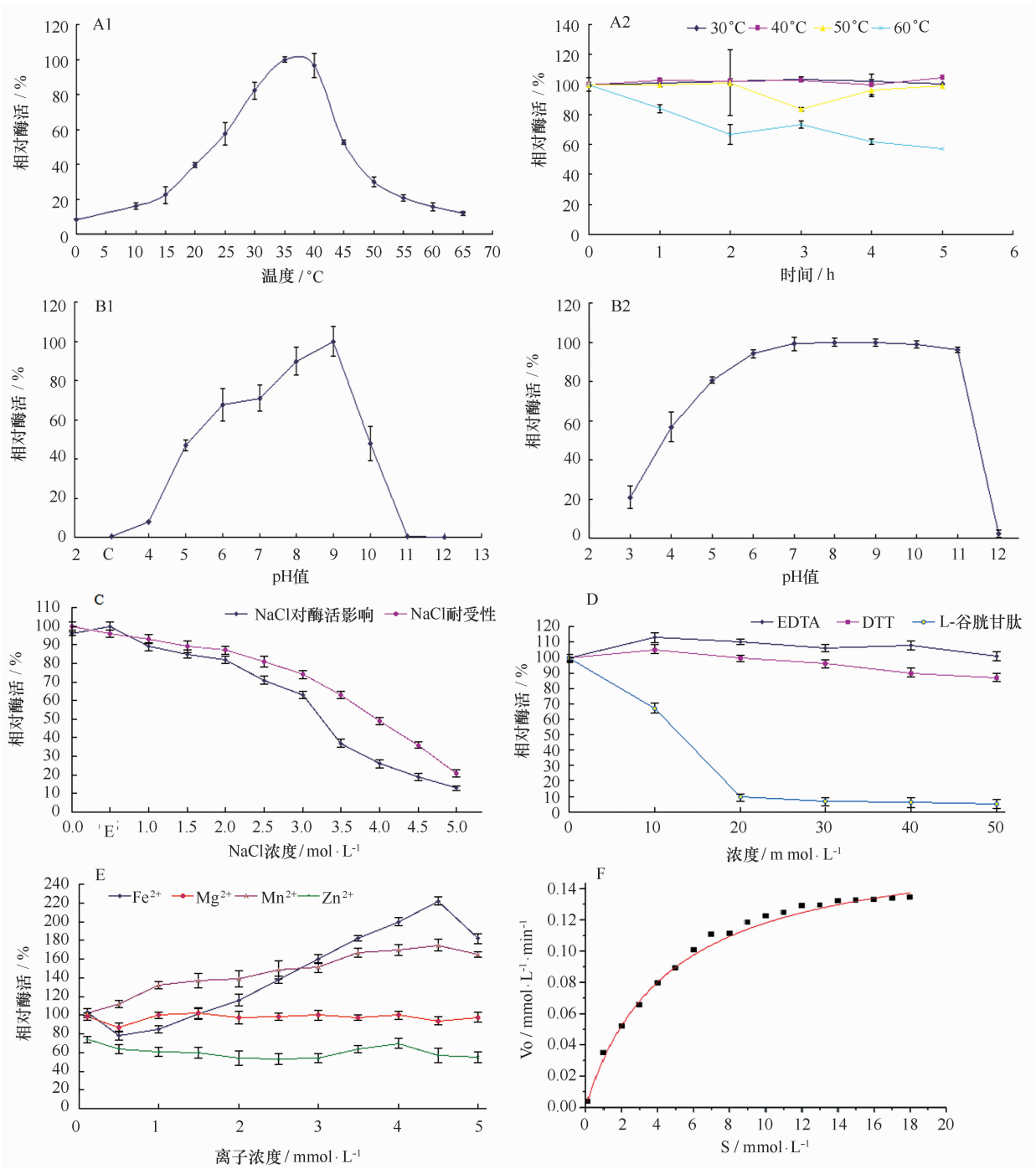


图 8 GALT 酶学性质研究

Fig. 8 GALT characterization analysis

A_1 和 A_2 分别表示 GALT 最适作用温度和热稳定性；B_1 和 B_2 分别表示 GALT 最适 pH 值和 pH 稳定性；C 表示 NaCl 浓度对酶活影响；D 表示化学物质 GALT 对酶活影响；E 代表金属离子对酶活的影响；F 表示 GALT 对 ONPG 的动力学参数

A_1: the optimal temperature of GALT, A_2: thermal stability of GALT; B_1: the optimum pH of GALT, B_2: pH stability of GALT; C: effects of different NaCl concentration on enzyme activity; D: effects of different chemicals on enzyme activity; E: effects of different metal irons on enzyme activity; F: kinetics parameters of GALT towards ONPG

3.5.5 稳态动力学参数

配置不同浓度 ONPG，按酶活测定程序测定酶液在 50℃时的 OD 值，然后用非线性拟合法求出 GALT 的动力学参数，如图 8F 所示，GALT 对 ONPG 的动

力学参数为 V_{max} = 0.172 27 mmol/(L · min),K_m = 4.586 4 mmol/L。

3.6　重组酶非变性电泳(Native-PAGE)分析

非变性电泳结果显示,该天然酶的分子量约为 200×10³ g/mol(图 9),而 SDS-PAGE 结果显示该酶分子量在 66×10³ g/mol,推测其天然酶为三聚体结构,即该酶在三聚化的状态下起作用,这一结果与 Swiss-model 的预测结果相符合。

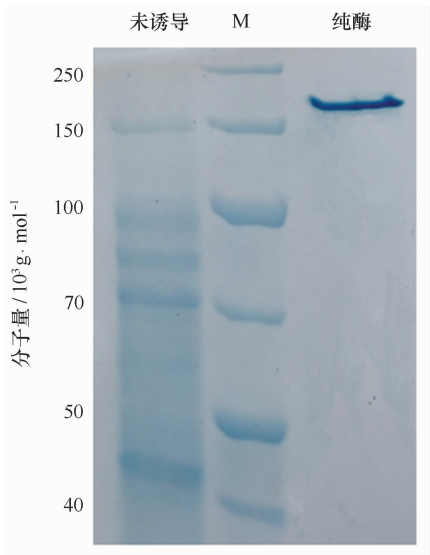


图 9　*Marinomonas* sp. BSi20584 重组酶 GALT Native-PAGE 电泳

Fig. 9　Native-PAGE result of GALT from *Marinomonas* sp. BSi20584

3.7　水解底物键型分析

将纯酶与不同键型的底物反应得到的产物进行 HPLC 分析。结果显示,PA Sugar Chain 026 样品反应后在 4 min 出现了 Glc-PA 的峰,说明 026 样品被降解生成了 Glc 分子,表明该重组酶对 β-1,4 半乳糖苷键具有水解作用,而 PA Sugar Chain 028 和 PA Sugar Chain 042 样品反应后均没有新物质峰的产生,说明 GALT 对 Gal β1-3 GalNAc 和 Gal β1-3 GalNAc 糖苷键型则没有水解能力(图 10)。

4　结论

galt 基因全长 1 971 bp,共编码 656 个氨基酸,将 *galt* 基因与 pET-28a(+)载体连接后导入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,用 IPTG 进行原核诱导表达。对该酶的三维结构预测显示,推测 GALT 含有 3 个结构域,domain A 是由(β/α)8 形成的 TIM 桶装结构,为催化结构域;domain B 为 α/β 折叠结构域;domain C 为 β 折叠构成的结构域,预测 GALT 的催化位点为 Trp183、Glu142 和 Glu314。

酶学性质研究表明,该酶单体分子量约为 66×10³ g/mol,天然酶分子量约为 200×10³ g/mol,其天然酶为同源三聚体。GALT 最适作用温度为 35℃,在 30～40℃范围内相对酶活可保持在 80%以上,高于 40℃酶活水平急剧下降,属于中温酶,该 β-D-半乳糖苷酶的热稳定性较好,在 60℃环境中处理 5 h 后,仍可保持近 60%的相对酶活。GALT 的最适作用 pH 为 9.0,pH 在 6.0～9.0 的范围内可保持 60%以上的酶活,pH 在 6.0～11.0 范围内比较稳定,在 pH >11.0 时酶活急剧下降。GALT 的最适 NaCl 浓度为 0.5 mol/L,对盐度具有较高的耐受性,当 NaCl 浓度为 3 mol/L 时,仍有 60%酶活。DTT 和 EDTA 对 GALT 活性影响不大,而 L-谷胱甘肽对酶活有明显的抑制作用。一定浓度的 Fe^{2+}、Mn^{2+} 对 GALT 的活性有促进作用,其中 Fe^{2+} 的促进效果最明显,最高可使相对酶活达到 223%,而 Mg^{2+} 离子对酶活的影响不大,Zn^{2+} 对酶活有抑制作用,相对酶活水平始终抑制在 80%以下。GALT 对 ONPG 的 V_{max} 和 K_m 分别为 0.172 27 nmol/min 和 4.586 4 mmol/L。GALT 对 β-1,4 半乳糖苷键具有水解作用(PA Sugar Chain 026),对 Gal β1-3 GalNAc(PA Sugar Chain 028)和 Gal β1-3 GlcNAc(PA Sugar Chain 042)糖苷键型没有水解能力。

5　讨论

蛋白质的结构与其功能具有密不可分的关系,因此,分析 GALT 的三维结构有利于进一步揭示其功能。三维结构预测发现,Glu142 和 Glu314 为重组酶的催化位点,与 *Thermus thermophilus* A4 的 β-D-半乳糖苷酶的催化位点 Glu141 和 Glu312 相对应[12]。Glu 的催化位点在 β-D-半乳糖苷酶中极为常见,例如,大肠杆菌 β-D-半乳糖苷酶的 Glu461 和 Glu537 位点[13]、*Bacillus circμlans* ATCC 31382 中 Glu447 和 Glu532[14] 位点均为催化位点。对 *Thermus thermophilus* A4 β-D-半乳糖苷酶的研究表明[12],Trp182 是维持其天然活性所必须的,它可以与其他亚基一起构成活性区域的一部分,这也说明 β-D-半乳糖苷酶并不是以单体状态起作用,必须与其他亚基一起才能形成有活性的酶蛋白,在本研究中通过建模预测和活性电泳确定了天然 GALT 全酶是以三聚体的形式发挥

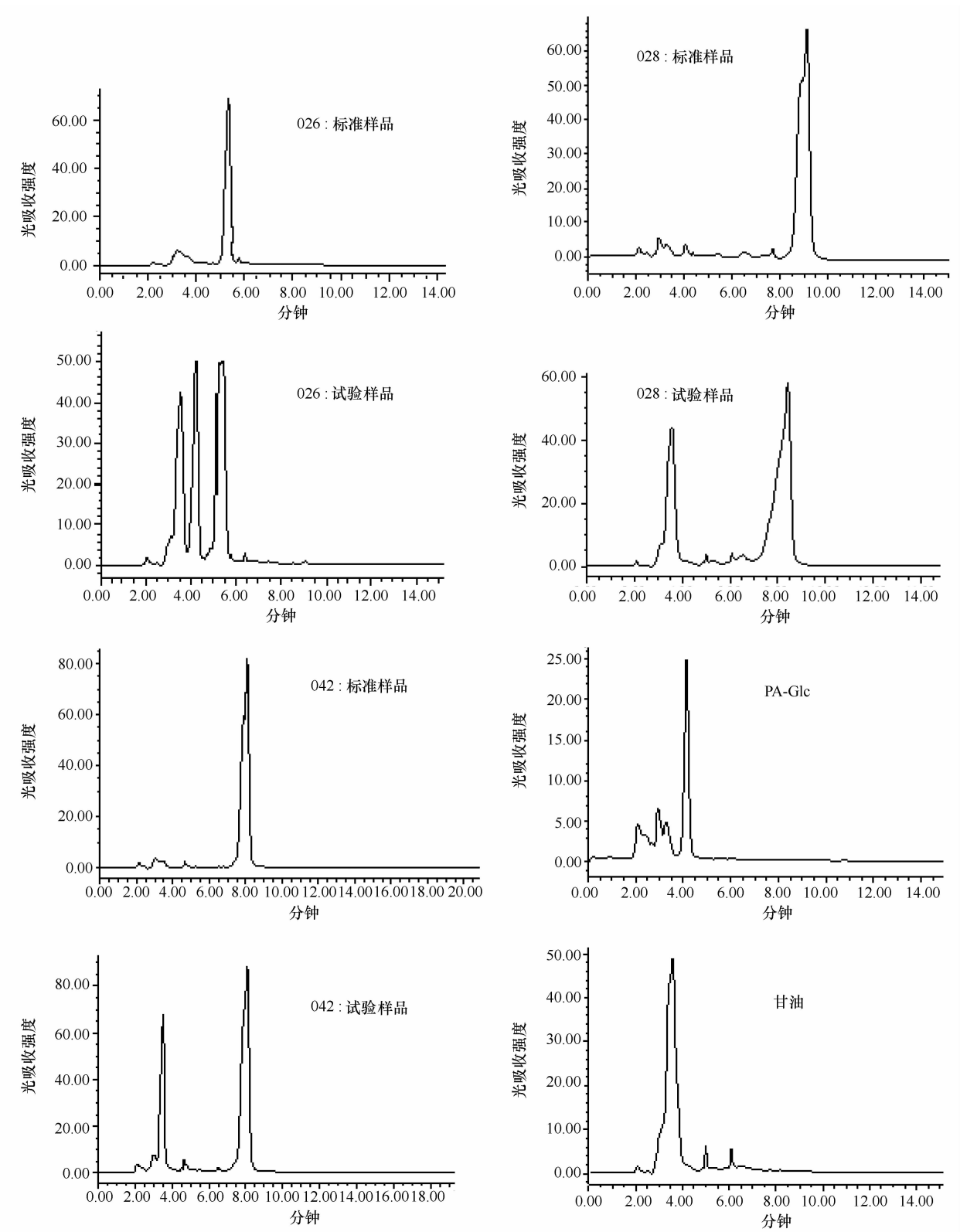


图 10 *Marinomonas* sp. BSi20584 GALT 重组酶的键型水解特异性

Fig. 10 The hydrolysis specificity of the recombinant enzyme GALT from *Marinomonas* sp. BSi20584

催化作用的，Trp 作为重要的催化位点这种现象在其他 β-D-半乳糖苷酶中同样存在，如大肠杆菌 β-D-半乳

糖苷酶中的 Trp999[13]。

BSi20584 产生的 β-D-半乳糖苷酶的最适温度为 35℃,属于中温酶的范畴,与一般中温微生物来源的酶相比具有较高的热稳定性,却低于一些嗜热菌来源的 β-D-半乳糖苷酶,例如,*Pyrococcus furiosus*[15] 的最适温度能够达到 90℃,*Sulfolobus solfataricus*[16] 的最适温度为 85℃。但是,南极地区也发现过不属于嗜热菌却有较高最适温度的酶,如发现于南极的嗜盐菌 *Halorubrum lacusprofundi*[17] 的 β-D-半乳糖苷酶,其最适温度为 50℃。

此外,我们在研究金属离子对酶活影响时发现,Fe^{2+} 对酶活有促进作用,推测原因可能为 Fe^{2+} 对酶的催化作用位点起作用,而 Zn^{2+} 对酶活有一定的抑制作用,并且随着浓度的增加,抑制作用增大,在其他 β-D-半乳糖苷酶中也发现了类似的情况,在 *Lactobacillus delbrueckii*[18] 和 *Arthrobacter* sp. ON14[19] 中同样发现 Zn^{2+} 会抑制酶活,推测原因可能是 Zn^{2+} 的存在改变了半乳糖苷酶的构象,从而使酶活受到抑制。DTT 和 EDTA 对 GALT 活性影响不大,而 L-谷胱甘肽对酶活有明显的抑制作用,推测原因为 L-谷胱甘肽破坏了酶蛋白的二硫键,从而影响其酶活。重组酶基因来源于北极海单胞菌,对 NaCl 具有一定的耐受性,但远远低于嗜盐菌的耐受性,例如分离自南极的 *Halorubrum lacusprofundi*[17],在 NaCl 浓度为 4.0 mmol/L 时具有最高酶活。表 3 为不同来源的 β-D-半乳糖苷酶性质比较。

生存于海洋低温环境中的微生物,往往是通过调节代谢来适应环境,适应性机制包括:能量传导和胞内环境新陈代谢调节的特殊机制;细胞膜、细胞壁结构成分和功能成分的稳定性;反应动力学和蛋白质构象及酶系的功能[31]。*Marinomonas* sp. BSi20584 来源于北冰洋海冰冰心,生长在低温环境,其产生的 β-D-半乳糖苷酶为中温酶,这种现象可能与其进化和环境适应性有关,相关的机制尚不清楚。本研究中的 *Marinomonas* sp. BSi20584 和嗜盐菌 *Halorubrum lacusprofundi*[17] 都是从极地寒冷环境中所分离,它们体内的酶若要在低温下发挥作用,需要具有足够的构象稳定性,因而进化出较高的构象稳定性,一般而言,构象稳定性高的酶也具有较高的热稳定性和最适反应温度。同理,酶若要在冰心内的低温环境下维持较高活性,就难以进化出高的构象稳定性,因为低温下过高的构象稳定性会导致酶活性中心柔性的降低,不利于实现活性中心与低温环境下底物结合和产物释放这两种构象的快速切换。因此,本研究中海单胞菌 β-D-半乳糖苷酶的热稳定性和最适反应温度符合中温酶的特性,是细菌自身适应其生存环境的结果。

表 3　不同来源 β-D-半乳糖苷酶性质对比[14—29]

Tab.3　Characterization contrast among different β-galactosidase

酶源	分子量/10^3 g·mol^{-1}	家族	最适温度/℃	最适 pH	比活/U·mg^{-1}
Marinomonas sp. BSi20584	66	42	50	7.0	159.79
Bifidobacterium longum	130	42	37	6.0	200
Pyrococcus furiosus	58	42	90	7.0	130.0
Bacillus cirulans ATCC 31382	156	2	30	7.0	157
Kluyveromyces lactis	78	2	40～70	6.8	18
Halorubrum lacusprofundi	76	42	50	6.5	110.83
Paracoccus sp. 32d.	160	2	40	7.5	40.98
Arthrobacter sp. ON14	116	2	15	8.0	25.4
Succinici producens MBEL55E	110	1	45	7.8～8.0	30
Bifidobacterium breve B24	150	42	45	7.0	142
Deinococcus Geothermalis	158	42	60	6.5	42
Bacillus licheniformis DSM 13	130	42	50	6.5	88
soil metagenomic gene *zd*410	78.6	42	38	7.0	243
Arthrobacter	77.5	2	45	6.0	1 176
streptococcus suis	69	35	42	5.5	1 076
Lactobacillus crispatus	88	42	50	7.0	221

本文通过 *Marinomonas* sp. BSi20584 重组表达所产生的 β-D-半乳糖苷酶在基因序列、蛋白结构及酶学性质等方面进行了深入的研究，为进一步揭示基因序列与蛋白功能的关系，及酶蛋白结晶及结构解析奠定了基础。

参考文献：

[1] Khalid A A, Rahim, Byong H L, et al. Specifieity, inhibitory, studies and oligoaseeharide fomartoin by β-Galacotsidaes form psychrotorphie *Bacillus subtilis* KL88[J]. J Dairy Sci, 1991, 74: 1773－1778.

[2] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C. The carbohydrate-active enzymes database(CAZy): an expert resource for glycogenomics[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37: 233－238.

[3] 张莉，李庆章，田雷. β-半乳糖苷酶研究进展[J]. 东北农业大学学报，2009，40(7)：128－131.
Zhang Li, Li Qingzhang, Tian Lei. Research advancement of β-Galacotsidaes[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2009, 40(7): 128－131.

[4] 林金资，卢蓉蓉，李强军，等. 中性乳糖酶高产菌的选育[J]. 中国乳品工业，1995(3)：113－116.
Lin Jinzi, Lu Rongrong, Li Qiangjun. Screening of high-yielding strains for neutral lactose[J]. China Dairy Industry, 1995(3): 113－116.

[5] Dong C M, Bai X H, Lai Q L, et al. Draft genome sequence of *Marinomonas* sp. strain D104, a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from the deep-sea sediment of the Arctic Ocean[J]. Genome Announcements, 2014, 2(1): 1211－1213.

[6] Lucas-Elio P, Goodwin L, Woyke T, et al. Complete genome sequence of *Marinomonas posidonica* type strain (IVIA-Po-181(T))[J]. Standards in Genomic Sciences, 2012, 7: 31－43.

[7] Lucas-Elio P, Goodwin L, Woyke T, et al. Complete genome sequence of the melanogenic marine bacterium *Marinomonas mediterranea* type strain (MMB-1T)[J]. Standards in Genomic Sciences, 2012, 5: 63－73.

[8] 周莉莉，陈瑞琴，陈秀兰，等. 应用 hiTAIL-PCR 技术克隆 *Marinomonas* sp. BSI20584 菌株 β-半乳糖苷酶基因[J]. 极地研究，2013，25(3)：250－256.
Zhou Lili, Chen Ruiqin, Chen Xiulan, et al. Cloning of beta-galactosidase genes from *Marinomonas* sp. BSI20584 by hiTAIL-PCR[J]. Polar Research, 2013, 25(3): 250－256.

[9] 郑海学，刘湘涛，尚佑军，等. 猪水泡病病毒结构蛋白基因的克隆及其蛋白二级结构和淋巴细胞表位的预测[J]. 中国兽医科学，2005，35(11)：843－850.
Zheng Haixue, Liu Xiangtao, Shang Youjun, et al. Cloning of SVDV structural protein gene and predictions of secondary structure and lymphocyte epitopes of structural protein[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2005, 35(11): 843－850.

[10] 周莉莉. 北极海单胞菌 β-半乳糖苷酶的原核表达及其转糖基活性检测[D]. 上海：华东理工大学，2012.
Zhou Lili. Expression, purification and transgalactosylation of β-galactosidase from the *Marinomonas* strain isolated from Arctic Ocean[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2012.

[11] Vanessa S, Terra K A, Homer S G, et al. Characterization of novel beta-galactosidase activity that contributes to glycoprotein degradation and virulence in *Streptococcus pneumoniae*[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(1): 348－357.

[12] Hidaka M, Fushinobu S, Ohtsu N, et al. Trimeric crystal structure of the glycoside hydrolase family 42 beta-galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the structure of its complex with galactose[J]. Journal of Biochemistry and Molecμlar Biology, 2002, 322(1): 79－91.

[13] Matthews B W. The structure of *E. coli* β-galactosidase[J]. Comptes Renndus Biologies, 2005, 328(6): 549－556.

[14] Bultema J B, Kuipers B J H, Dijkhuizen L. Biochemical characterization of mutants in the active site residues of the beta-galactosidase enzyme of *Bacillus circμlans* ATCC 31382[J]. FebS Open Bio, 2014, 11(4): 354－361.

[15] 段文娟，杨娇艳，李卓夫，等. 来源于嗜热古细菌 *Pyrococcus furiosus* 乳糖酶基因的原核表达及酶学性质分析[J]. 中国农业科技导报，2008，10(2)：76－81.
Duan Wenjuan, Yang Yanyan, Li Zhuofu, et al. Expression of beta-galactosidase from *Pyrococcus furiosus* in *E. coli* and Analysis of Lactose properities[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2008, 10(2): 76－81.

[16] Sun X J, Duan X G, Wu D, et al. Characterization of *Sulfolobus solfataricus* beta-galactosidase mutant F441Y expressed in *Pichia pastoris*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 94(7): 94－97.

[17] DasSarma S, Capes M D, Karan R, et al. Amino acid substitutions in cold-adapted proteins from *Halorubrum lacusprofundi*, an extremely halophilic microbe from Antarctica[J]. PLOS ONE, 2013, 8: 82－90.

[18] Wang C, Zhang C W, Yu Q, et al. Beta-galactosidase gene from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* gets non-fusion expression in *Escherichia coli*[J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2008, 39: 544－546.

[19] Xu K, Tang X A; Gai Y B, et al. Molecular characterization of cold-inducible beta-galactosidase from *Arthrobacter* sp. ON14 isolated from Antarctica[J]. Journal of Microbilogy and Biotechnology, 2011, 21: 236－238.

[20] Dabrowski S, Sobiewska G, Maciunska J, et al. Cloning, expression, and purification of the His6-Tagged thermostable β-galactosidase from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and some properties of the isolated enzyme[J]. Protein Expression and Purification, 2000, 19(1): 107－112.

[21] Hildebrandt P, Wanarska M, Kur J. A new cold-adapted beta-D-galactosidase from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32c-gene cloning, overexpres-

sion,purification and properties[J]. BMC Microbiology,2009,9(1): 151－152.

[22] Halbmayr E,Mathiesen G,Nguyen T,et al. High-level expression of recombinant beta-galactosidases in *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei* using a sakacin P-based expression system[J]. Agricultural and Food Chemistry,2008,56(12): 4710－4719.

[23] Maischberger T,Mierau I,Peterbauer C K,et al. High-level expression of *Lactobacillus* β-galactosidases in *Lactococcus lactis* using the food-grade. nisin-controlled expression system NICE[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2010,58 (4): 2279－2287.

[24] Kim C S,Ji E S,Oh D K. Characterization of a thermostable recombinant β-galactosidase from *Thermotoga maritima*[J]. Journal of Applied Microbiology,2004,97 (5): 1006－1014.

[25] Li L,Zhang M,Jiang Z,et al. Characterisation of a thermostable family 42 β-galactosidase from *Thermotoga maritima*[J]. Food Chemistry,2009,112 (4): 844－850.

[26] Kang S K,Cho K K,Ahn J K,et al. Three forms of thermostable lactose-hydrolase from *Thermus* sp. IB－21; cloning,expression,and enzyme characterization[J]. Journal of biotechnology,2005,116 (4): 337－346.

[27] Pessela B C C,Vian A,Mateo C,et al. Overproduction of *Thermus* sp. Strain T2 β-galactosidase in *Escherichia coli* and preparation by using tailor-made metal chelate supports[J]. Applied and Environmental Microbiology,2003,69(4): 1967－1972.

[28] 张凤玉,胡丹,龚秀芳,等. 2 型猪链球菌 β-D-半乳糖苷酶基因的克隆表达及酶活性测定[J]. 中国生物工程杂志,2014,34(2): 39－44.
Zhang Fengyu,Hu Dan,Gong Xiufang,et al. Cloning,expression and identification of gene encoding the β－Galactosidases of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. China Biotechnology,2014,34(2): 39－44.

[29] 聂春明. 乳酸杆菌 β-D-半乳糖苷酶重叠基因的克隆、表达及酶学性质分析[D].呼和浩特市:内蒙古农业大学,2012.
Nie Chunming. The overlapping gene cloning,expression and characterization of a β-galactosidases from *Lactobacillus crispatus*[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University,2012.

[30] Hung M N,Xia Z,Hu N T,et al. Molecular and biochemical analysis of two β-galactosidases from *Bifidobacterium infantis* HL96[J]. Applied and Environmental Microbiology,2001,67 (9): 4256－4263.

[31] Cummings S P,Black G W. Polymer hydrolysis a cold climate[J]. Extremophiled,1999,3(2): 81－87.

Heterologous expression and its enzymatic properties of β-galactosidase from a *Marinomonas* strain isolated from the Arctic Ocean

Sun Xi[1,2],Liao Li[2],Ding Haitao[2],Liu Shuang[1],Chen Bo[1,2]

(1. *College of Bioengineering,East China University of Science and Technology,Shanghai* 200237,*China*; 2. *Key Laboratory for Polar Science,State Oceanic Administration,Polar Research Institute of China,Shanghai* 200136,*China*)

Abstract: A *Marinomonas* strain isolated from an ice core sample collected from Canada Basin,Arctic Ocean,displayed high β-galactosidase activity in the preliminary screening process. To get its overall understanding towards its enzymatic properties,the *galt* gene obtained by hiTAIL-PCR amplification was inserted into plasmid pET-28a (＋),then transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant enzyme was purified to electrophoretic homogeneity by one step Ni^{2+} affinity chromatography. The highest yield was achieved with 0.07mM IPTG when cultivated in 20℃ for 22 h. The molecular weight of the monomeric GALT was estimated as about 6.6×10^4 g/mol and the native GALT was confirmed as homologous trimer through native-PAGE. The optimum temperature of GALT was 35℃ and showed good thermal stability at the temperature of 60℃ below. The optimum pH of GALT was 9.0 and was stable between pH 6.0 and 11.0. GALT showed high tolerance to salinity and the optimum NaCl concentration was 0.5 mol/L. Mineral ions Fe^{2+} and Mn^{2+} were identified as enzyme activators,Mg^{2+},K^+,DTT and EDTA showed no significant influence towards the enzyme activity,while Zn^{2+} and L-glutathione inhibited the activity strongly. GALT was able to hydrolyse Gal β1-4 GlcNAc but unable to hydrolyze Gal β1-3 GalNAc and Gal β1-3 GlcNAc. In this study,the β-galactosidase gene from *Marinomonas* sp. BSi20584 was successfully expressed in *E. coli* system,and a systematic understanding of the enzymatic properties of the recombinant GALT was acquired,which will provide the detailed enzymatic data for further studies on its metabolic adaptation and potential applications.

Key words: the Arctic Ocean; β-galactosidase; *Marinomonas*; heterologous expression; enzymatic properties