

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (9) :1171 – 1176; 4 September 2015  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20140580

## 琼胶酶 AgaD 在大肠杆菌中的高效表达

刘欢, 张伟宾, 刘丹, 于文功, 路新枝\*

中国海洋大学医药学院, 海洋药物教育部重点实验室, 山东省糖科学与糖工程重点实验室, 山东 青岛 266003

**摘要:** 【目的】构建琼胶酶 AgaD 的高效表达体系, 优化发酵条件提高重组酶的表达量。【方法】首先根据大肠杆菌 (*E. coli*) 密码子偏好性, 优化并合成 AgaD 的基因, 使其适合 *E. coli* 表达系统; 考察了不同的 *E. coli* 表达宿主; 根据 N 端法则构建了突变体; 评价了培养基中添加  $\text{CaCl}_2$  和甘氨酸 (Gly) 对重组酶表达的影响。【结果】成功构建了琼胶酶 AgaD 的高效表达体系, 确定了 *E. coli* AD494 (DE3) 为最适表达宿主; 利用 N 端法则提高了重组酶的稳定性, 缩短了发酵时间; 通过在培养基中添加  $\text{CaCl}_2$  和甘氨酸 (Gly) 进一步提高了胞外酶产量。最终, 发酵上清中重组酶的活力由 20 U/L 提高至 11300 U/L, 比优化前提高了 500 余倍。【结论】构建了琼胶酶 AgaD 的高效表达体系, 为 GH96 家族琼胶酶的深入研究奠定了基础。

**关键词:** 琼胶酶, 密码子优化, N-端法则, 重组表达

中图分类号: Q936 文章编号: 0001-6209 (2015) 09-1171-06

琼胶是一种从江篱、石花菜等红藻中提取出来的多糖, 主要由琼脂糖和硫酸琼胶两部分组成, 琼脂糖是线性多聚物, 由 1,3 连结的  $\beta$ -D-呋喃半乳糖和 1,4 连结的 3,6-内醚- $\alpha$ -L-呋喃半乳糖交替连接而成<sup>[1]</sup> (图 1)。

琼脂糖的降解酶按照作用方式分为  $\alpha$ -和  $\beta$ -琼胶酶<sup>[2]</sup>, 分别降解琼脂糖的  $\alpha$ -1,3 糖苷键和  $\beta$ -1,4 糖苷键。迄今, 在已经发现的上千种琼胶酶中仅有 2 种属于  $\alpha$ -琼胶酶。根据氨基酸序列和三维结构的相似性, 琼胶酶被划分在糖苷水解酶 GH-46、GH-50、

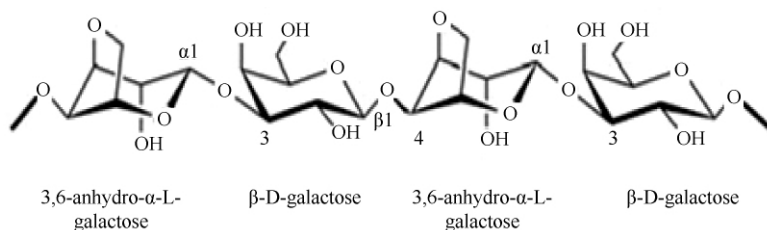


图 1. 琼脂糖的结构<sup>[1]</sup>

Figure 1. Structure of agarose<sup>[1]</sup>.

基金项目: 国家自然科学基金 (41376144); 国家科技支撑计划 (N2013BAB01B02); 海洋公益性行业科研专项 (201105027, 201005024)

\* 通信作者. Tel: +86-532-82032067; E-mail: luxinzhil@ouc.edu.cn

作者简介: 刘欢 (1988 -), 女, 山东济宁人, 硕士, 主要从事海洋多糖降解酶方向的研究. E-mail: toto\_lh@163.com

收稿日期: 2014-12-03; 修回日期: 2015-01-05

GH-86、GH-96 和 GH-118 家族,其中  $\alpha$ -琼胶酶属于 GH-96 家族。与  $\beta$ -琼胶酶的深入研究不同, $\alpha$ -琼胶酶由于数量少、活性低,因此其研究尚停留在酶的分离纯化、酶学基本性质研究阶段<sup>[3-4]</sup>。越来越多的研究显示,由  $\alpha$ -琼胶酶制备的琼寡糖在抗肿瘤、抗氧化及免疫调节等方面具有显著的生物活性<sup>[5-6]</sup>,因此对  $\alpha$ -琼胶酶的研究将促进琼胶的高值化利用,带动紫菜、角叉菜养殖等相关产业链的发展。课题组前期从青岛海域分离得到一株产琼胶酶的菌株 *Thalassomonas* sp. LD5,通过构建野生菌株的基因组文库,结合兼并 PCR 和 site-finding PCR 的方法获得了琼胶酶编码基因 *agaD*,其开放阅读框长 4401 bp,编码 1466 个氨基酸<sup>[7]</sup>。序列分析表明,AgaD 与 GH-96 家族的两个  $\alpha$ -琼胶酶氨基酸序列相似性分别为 77% 和 89%。与已经发现的  $\alpha$ -琼胶酶相似,AgaD 的野生酶和重组酶产量均很低,本实验从密码子偏好性、N 端法则及培养基条件等方面对 AgaD 的重组表达进行了优化。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种及质粒:**克隆宿主大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 $\alpha$ 、表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3)、表达宿主 *E. coli* AD494 (DE3)、表达宿主 *E. coli* Rosetta (DE3) 及表达载体 pET-22b (+) 为本实验室保藏;引物合成及 DNA 测序由 Invitrogen (中国北京) 生命技术公司完成。

**1.1.2 主要酶和试剂:**限制性内切酶、T4 DNA Ligase、La Taq DNA 聚合酶、Premix PrimeSTAR HS、克隆载体 pMD18-T Vector 及 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 回收、质粒提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。

### 1.2 AgaD 密码子分析和优化

使用 Genscript 软件在线分析 AgaD 的密码子并进行优化,优化后的基因序列由南京金斯瑞生物科技有限公司完成,为了后续的基因克隆,我们在目的基因序列 N 端和 C 端分别带有 *Nde* I 及 *Xho* I 限制性酶切位点,优化后的基因命名为 *optagaD*。

### 1.3 AgaD 在不同宿主的重组表达

将合成获得的 *optagaD* 基因连入 pET-22b (+) 载体,构建质粒 pET-22b (+) -*optagaD*,分别转化 *E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* Rosetta (DE3) 及 *E. coli* AD494 (DE3)。

### 1.4 N 端第 2 个氨基酸突变体构建

将 *optagaD* 基因的第 2 个氨基酸由苯丙氨酸 (Phe) 突变为丙氨酸 (Ala),设计上游引物 *optagaDxF*,下游引物 *optagaDxR* (Table 1)。PCR 扩增后得到基因片段 *optagaDx*,连接 pMD18-T Vector 载体,转化 DH5 $\alpha$ ,测序鉴定无误后,连接 pET-22b (+),构建质粒 pET-22b (+) -*optagaDx*,转化 *E. coli* AD494 (DE3)。

表 1. 突变 Phe 所需的引物序列

Table 1. Primer sequences of the mutation of Phe

Primer name	Sequence (5'→3')
<i>optagaDxF</i>	CATATGGCAAAGGCAAAGCGTTCACTGCTG
<i>optagaDxR</i>	CTCGAGGTGAGCCAGTTCAGGATACC

Forward primer: *optagaDxF*; Reverse primer: *optagaDxR*

### 1.5 培养方法及条件

挑取转化后的单克隆于液体 LB 培养基中(含 50 mg/L 氨苄青霉素),37 °C、170 r/min 培养过夜后用作种子培养液。

**1.5.1 在培养基中添加 CaCl<sub>2</sub>:**1 mol/L CaCl<sub>2</sub> 高压灭菌后,分别添加在 LB 培养基中,至终浓度为 0.001、0.002、0.005、0.010、0.020、0.050 mol/L。将种子液以 1% 的接种量接种到培养基(含 50 mg/L 氨苄青霉素)中,37 °C、170 r/min 培养至菌液 OD<sub>600</sub> 达到 0.8 时,加入 0.0001 mol/L IPTG,25 °C、170 r/min 诱导培养 24 h。

**1.5.2 在培养基中添加甘氨酸:**在 LB 培养基中加入 Gly 至终浓度为(0.01、0.05、0.10、0.15、0.20 mol/L)。培养方法参照 1.5.1。

### 1.6 酶活测定

将发酵液于 4 °C、13000 × g 离心 20 min 后收集上清,酶活力测定方法为 DNS 法<sup>[8]</sup>,根据前期研究结果,在底物 0.1% 琼脂糖溶液中添加 0.002 mol/L CaCl<sub>2</sub> 以促进酶活,反应温度为 40 °C。酶活力单位的定义:在上述条件下,以每分钟催化产生 1 μmol 还原糖的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

## 2 结果和分析

### 2.1 密码子优化

蛋白质的异源重组表达受多种因素影响, 密码子偏好性是重要原因之一<sup>[9]</sup>, 密码子偏好性是指在蛋白质合成过程中, 同义密码子的使用概率在不同的宿主中具有一定的偏好性。尽管少量稀有密码子的出现通常不会给目的蛋白的合成造成太大影响, 但如果一个基因中含有成串或多个稀有密码子, 外源蛋白的表达量将大大降低。密码子适用指数 (CAI) 是评价目的基因密码子是否适合宿主菌的主要指标, CAI 值等于 1.0 被认为在所选用的表达宿主中是最适合的, 而低于 0.8 时表达水平可能会受到影响。对 *agaD* 的密码子分析显示 CAI 值为 0.7, 而且该基因有 18% 的密码子使用率低于大肠杆菌正常使用率 (FOP) 的 50%; 另外 *agaD* 的 GC 含量仅为 42.74%, 同样有可能影响 *agaD* 的重组表达。本文首先对 *agaD* 的密码子进行了优化, 优化后 CAI 值为 0.88, GC 含量为 53.05%, 低于 FOP 50% 的密码子使用率为 0 (表 2)。优化后的基因命名为 *optagaD*, 由南京金瑞斯生物科技有限公司进行全基因合成。

表 2. 酶基因 *agaD* 密码子优化

Table 2. Codon usage optimization of agarase gene *agaD*

Item	Before optimized	After optimized
CAI	0.70	0.88
Under 50% FOP	18%	0
(G + C) %	42.47	53.05

CAI: Codon index; FOP: Codon usage frequency; G + C: Occupancy of G and C.

### 2.2 不同表达宿主对重组酶表达的影响

将优化后的琼胶酶基因 *optagaD* 分别转入 *E. coli* BL21 (DE3) 和 *E. coli* AD494 (DE3) 和 *E. coli* Rosetta (DE3) 宿主菌。结果表明, *optagaD* 基因在 3 种不同的宿主中均表达出了琼胶酶活力, 其中 *E. coli* AD494 (DE3) 表达的单位酶活力为 460 U/L, *E. coli* Rosetta (DE3) 为 24 U/L, 而 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株为 21 U/L (图 2)。

*E. coli* Rosetta (DE3) 宿主常被用来表达含有较多稀有密码子的目的蛋白, 在本实验中, 该宿主表达的酶活力与 *E. coli* BL21 (DE3) 没有太大差别。

二硫键是由两个半胱氨酸残基的巯基基团发生

反应形成的共价键, 是维持蛋白质结构的重要作用力。但是重组蛋白在折叠过程中经常会形成分子间二硫键或分子内错误的二硫键配对, 从而引起蛋白质的聚集或不正确折叠, 因此二硫键的正确配对是蛋白质正确折叠的关键<sup>[10-11]</sup>。菌株 Origami TM、Origami B、AD494 (DE3) 或 BL21[12]。经过分析, 本文的研究对象 AgaD 一级序列中含有多个半胱氨酸, 推测在其成熟过程中可能有二硫键形成, 采用 *E. coli* AD494 (DE3) 作为宿主菌, 胞外的酶产量明显提高, 进一步证明了这种可能性。

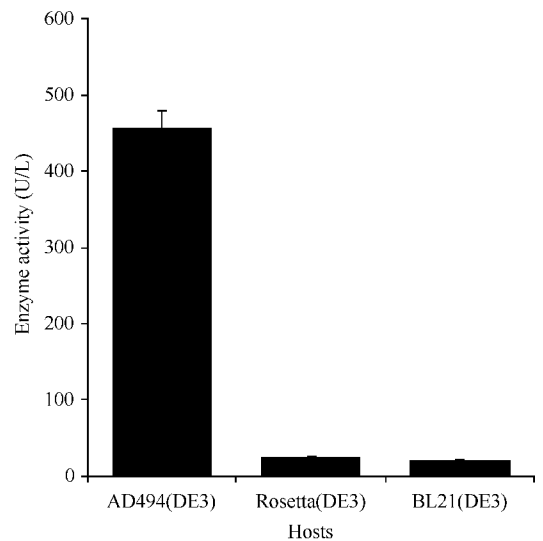


图 2. 利用不同宿主诱导表达琼胶酶 AgaD

Figure 2. Expression of AgaD with different hosts.

### 2.3 N 端第二个氨基酸突变

*optagaD* 翻译后第二个氨基酸为苯丙氨酸 (Phe), 我们将其突变为丙氨酸 (Ala) 获得 *optagaD* 的突变基因 *optagaDx*, 连入 pET-22b (+) 质粒后转化 *E. coli* AD494 (DE3), 检测诱导后的发酵上清琼胶酶活力。结果表明, 突变后的重组菌株在 6 h 就有酶活出现, 并且在 12 h 酶活力达到 2300 U/L, 而突变前的重组菌在 12 h 后才能检测到琼胶酶活性, 24 h 时酶活力达到最高, 但仅有 400 U/L (图 3)。

在原核生物中, 蛋白质的合成通常是从甲酰甲硫氨酸 (fMet) 开始的, 合成后的蛋白质的 fMet 会被氨基肽酶催化切除, 造成蛋白质稳定性下降。N 端第二个氨基酸对蛋白质稳定性影响非常大, 当第二个氨基酸拥有大的侧链时蛋白质稳定性明显降低<sup>[13-14]</sup>。研究表明第二个氨基酸为下列氨基酸: 精氨酸 (Arg)、赖氨酸 (Lys)、苯丙氨酸 (Phe)、亮氨酸

(Leu)、色氨酸(Trp)或酪氨酸(Tyr)时,蛋白的半衰期为 2 min;当其余的氨基酸出现在氨基端,蛋白的半衰期可以超过 10 h<sup>[15]</sup>。本实验结果表明,将 AgaD N 端第二个氨基酸由苯丙氨酸(Phe)突变为丙氨酸(Ala)后,胞外酶产量大大提高,而且酶活达到最高所用时间缩短了近一半,说明 N 端第二个氨基酸突变后 AgaD 稳定性提高,符合 N 端法则。

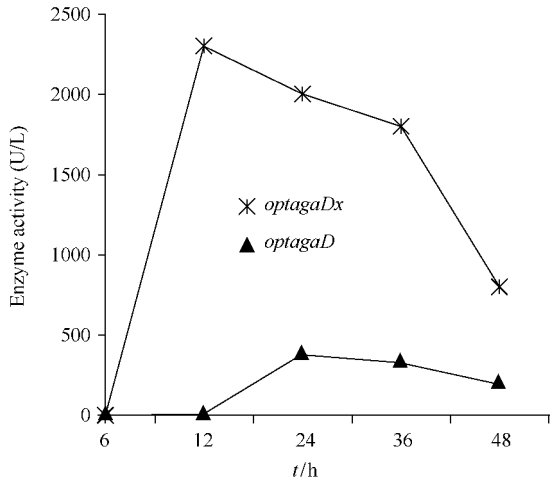


图 3. N 端第二个氨基酸对琼胶酶 AgaD 表达的影响

Figure 3. The effect of the second amino acid from N end to the agarase activity.

## 2.4 培养条件优化

**2.4.1 CaCl<sub>2</sub> 对琼胶酶 AgaD 表达的影响:**前期研究表明钙离子存在的条件下野生酶活力可以提高 1.5 – 1.6 倍,为了验证 CaCl<sub>2</sub> 是否也能影响重组蛋白的表达,我们在发酵培养基中分别加入了不同浓度的 CaCl<sub>2</sub>。结果表明,胞外酶产量对 CaCl<sub>2</sub> 具有浓度依赖性,在一定范围内,随 CaCl<sub>2</sub> 浓度增加而增加,当超过 0.020 mol/L 后则开始下降,在 CaCl<sub>2</sub> 浓度为 0.005 – 0.020 mol/L 时,酶活力达到最高,为 4000 U/L (图 4)。

BLAST 序列分析表明 AgaD 中存在钙离子结合位点,而我们在前期也证明了钙离子可以明显促进野生酶的活力。在本研究中我们发现发酵培养基中加入适量 CaCl<sub>2</sub> 后胞外酶的活力可以提高接近 2.5 倍,说明 CaCl<sub>2</sub> 也能提高重组 AgaD 的表达量。然而 CaCl<sub>2</sub> 究竟是促进了蛋白的正确折叠,还是提高了酶的稳定性,仍需要更多的实验来证明。

**2.4.2 甘氨酸对琼胶酶 AgaD 表达的影响:**在 pET22b-optagaD5x-AD494 (DE3) 的发酵培养基中分别加入不同浓度的甘氨酸(Gly),检测发酵上清酶

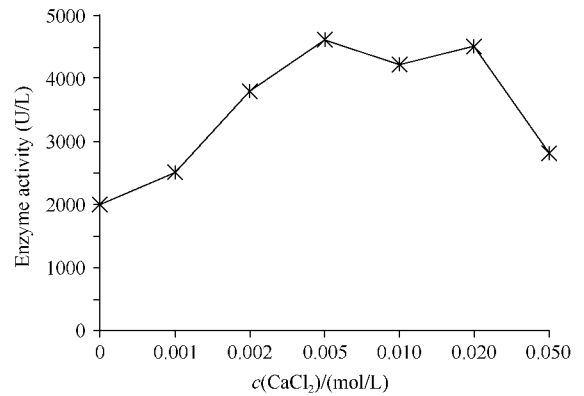


图 4. CaCl<sub>2</sub> 对琼胶酶 AgaD 表达的影响

Figure 4. The effect of CaCl<sub>2</sub> on agarase expression.

活力。结果表明,当甘氨酸(Gly)浓度为 0.1 mol/L 时,发酵液中酶活力最高达到了 11300 U/L。但随着甘氨酸(Gly)浓度提高 OD<sub>600</sub> 降低,表明菌体生长受到影响,进而酶活力下降(图 5)。

大肠杆菌表达的带有信号肽的重组蛋白分泌到胞外需要经过两层膜,文献表明甘氨酸能够参与核苷酸所激活的肽聚糖前体的形成,使肽聚糖结构改变,从而改变细胞膜通透性,提高分泌到胞外的重组蛋白量<sup>[16]</sup>。本文中加入了浓度的甘氨酸(Gly)后,虽然菌体生长受到了抑制,但是在 0.1 mol/L 时,胞外琼胶酶产量可以提高 2.5 倍。

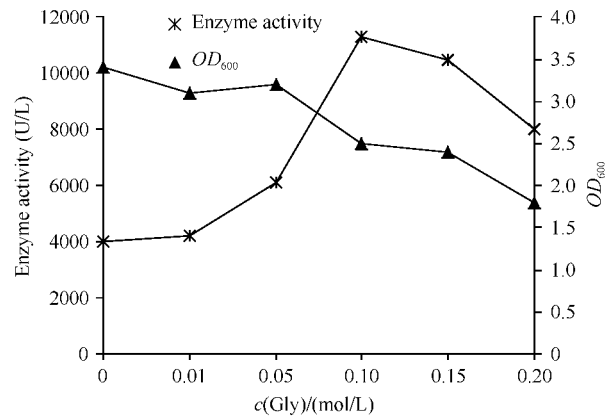


图 5. Gly 对琼胶酶 AgaD 表达的影响

Figure 5. The effect of Gly on agarase activity.

**2.4.3 培养条件对琼胶酶 AgaD 表达的影响:**根据上述的研究结果我们进一步研究了其他培养条件对 AgaD 表达的影响,包括诱导温度、诱导后发酵时间及 IPTG 浓度等,并与之前的表达体系做了对比(表 3)。结果表明,优化后的表达体系在诱导温度、诱导剂浓度、起始诱导 OD<sub>600</sub> 值等方面与优化前的表达体系没

有差别,但是在发酵时间方面缩短了一倍。最终确定高效表达体系构建之后的培养条件为:重组菌株接入含有 0.005 mol/L CaCl<sub>2</sub>、0.1 mol/L 甘氨酸 (Gly) 的 LB 培养基中,37 °C、170 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.8,加入 0.0004 mol/L IPTG 于 25 °C,170 r/min 诱导 12 h,最终酶活力可达 11300 U/L 左右。

表 3. 培养条件对比

Table 3. Comparison of the culture condition

Subject	Before optimization	After optimization
Gene	<i>agaD</i>	<i>optagaDx</i>
Vector	pET24a (+)	pET22b (+)
Host	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> AD494 (DE3)
Culture temperature/°C	25	25
The initial induction of OD <sub>600</sub>	0.8	0.8
IPTG concentration/(mol/L)	0.0004	0.0004
Fermentation time/h	24	12
CaCl <sub>2</sub> /(mol/L)	0	0.005
Gly/(mol/L)	0	0.1
Agarase activity/(U/L)	21 ± 6	11300 ± 1000

### 3 结论

目前关于 α-琼胶酶的报道非常少,已经发现的 α-琼胶酶产量较低,例如 *Altermonas agarlyticus* GJ1B 产琼胶酶只有 900 U/L,2012 年 Ji-Hwan Seok 等尝试用酵母表达 *Thalassomonas* sp. JAMB A33 产的 α-琼胶酶<sup>[17]</sup>,结果表明发酵上清中的酶产量也只有 300 - 1600 U/L。酶的低产量造成 α-琼胶酶的研究远远滞后于 β-琼胶酶,本文研究了密码子偏好性、表达宿主、N 端法则、培养条件等对同属于 GH-96 家族的琼胶酶 AgaD 表达的影响,最终发酵上清液中的酶活由未优化之前的 20 U/L 提高至 11300 U/L,提高了 500 余倍,比已经报道的 α-琼胶酶产量提高了 10 倍以上,为该家族酶的深入研究奠定了基础。但是,与其他重组蛋白相比,重组琼胶酶 AgaD 的产量仍然较低,体现在发酵液经过高倍浓缩后仍然无法在 SDS-PAGE 上看到明显的条带,而且经过凝胶复性显示重组酶 AgaD 被剪切成了大小不一的活性片段,因此对于上述因素引起的胞外酶活力大幅增加的机制有待于进一步分析。

### 参考文献

[1] MA Cui-Ping, SHI Chao. Advance in research of agarase. *Microbiology China*, 2008, 15 (1): 107-111. (in

Chinese)

马翠萍, 石超. 琼胶酶研究进展. *微生物学通报*, 2008, 15 (1): 107-111.

- [2] Flament D, Barbeyron T, Jam M, Potin P, Czjzek M, Kloreg B, Michel G. Alpha-agarases define a new family of glycoside hydrolases, distinct from beta-agarase families. *Applied & Environmental Microbiology*, 2007, 73 (14): 4691-4694.
- [3] Ohta Y, Hatada Y, Miyazaki M, Nogi Y, Ito S, Horikoshi K. Purification and characterization of a novel alpha-agarase from a *Thalassomonas* sp.. *Current Microbiology*, 2005, 50 (4): 212-216.
- [4] Sugano Y, Terada I, Arita M, Noma M, Matsumoto T. Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain Jt 0107. *Applied & Environmental Microbiology*, 1993, 59 (5): 1549-1554.
- [5] Eun Ju Yun SL, Ji KH. Enzymatic production of 3,6-anhydro-L-galactose from agarose and its purification and in vitro skin whitening and anti-inflammatory activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97 (3): 2961-2970.
- [6] Kazlowski B, Pan CL, Ko YT. Separation and quantification of neoagaro- and agaro-oligosaccharide products generated from agarose digestion by beta-agarase and HCl in liquid chromatography systems. *Carbohydrate Research*, 2008, 343 (14): 2443-2450.
- [7] liu D, Xing PC, Yu WG, Lu XZ. Cloning of a new agarase gene using site-finding PCR. *Progress in Modern Biomedicine*, 2013, 13 (1): 5-10. (in Chinese)
- 刘丹, 邢培川, 于文功, 路新枝. 利用 Site-Finding PCR 克隆琼胶酶基因. *现代生物医学进展*, 2013, 13 (1): 5-10.
- [8] Gupta V, Trivedi N, Kumar M, Reddy CRK, Jha B. Purification and characterization of exo-beta-agarase from an endophytic marine bacterium and its catalytic potential in bioconversion of red algal cell wall polysaccharides into galactans. *Biomass & Bioenergy*, 2013, 49 (3): 290-298.
- [9] Hu H, Gao J, He J, Yu B, Zheng P, Huang Z, Mao X, Yu J, Han G, Chen D. Codon optimization significantly improves the expression level of a keratinase gene in *Pichia pastoris*. *PLoS One*, 2013, 8 (3): e58393.
- [10] Aslund F, Zheng M, Beckwith J, Storz G. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

1999, 96 (11) : 6161-6165.

- [11] Bessette PH, Aslund F, Beckwith J, Georgiou G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96 (24) : 13703-13708.
- [12] Prinz WA, Aslund F, Holmgren A, Beckwith J. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (25) : 15661-15667.
- [13] Hirel PH, Schmitter MJ, Dessen P, Fayat G, Blanquet S. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86 (21) : 8247-8251.
- [14] Lathrop BK, Burack WR, Biltonen RL, Rule GS. Expression of a group II phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus* in *Escherichia coli*: recovery and renaturation from bacterial inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 1992, 3 (6) : 512-517.
- [15] Tobias JW, Shrader TE, Rocap G, Varshavsky A. The N-end rule in bacteria. *Science*, 1991, 254 (5036) : 1374-1377.
- [16] Li ZFL, Liu B, Wang ZG, Gu M, Du ZB, Wu GC, Chen JJ. Calcium leads to further increase in glycine-enhanced extracellular secretion of recombinant alpha-cyclodextrin glycosyltransferase in *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57 (14) : 6231-6237.
- [17] Seok JHK, Hatada YHS, Nam S, Kim YH. Construction of an expression system for the secretory production of recombinant alpha-agarase in yeast. *Biotechnology Letters*, 2012, 34 (6) : 1041-1049.

## High expression of agarase AgaD in *Escherichia coli*

Huan Liu, Weibin Zhang, Dan Liu, Wengong Yu, Xinzhi Lu\*

Key Laboratory of Marine Drugs, Chinese Ministry of Education, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China

**Abstract:** [Objective] We constructed highly efficient expression systems for agarase AgaD and optimized its culture conditions. [Methods] First, the codon usage of AgaD was optimized to make it suitable for expression in *E. coli*. Then, the gene expression vector was transformed into different *E. coli* hosts. According to the "N-end rule" that is related to the *in vivo* half-life of a protein, a mutant was constructed. Finally, the effects of CaCl<sub>2</sub> and glycine on enzyme production were evaluated. [Results] A highly efficient expression system of agarase AgaD was constructed, named pET-22b(+)-optagaDx-AD494 (DE3). Replacing N-terminal second amino acid phenylalanine with alanine significantly improved agarase production and shortened the fermentation period. The extracellular enzyme activity was further up-regulated by CaCl<sub>2</sub> and glycine. After optimization, the extracellular enzyme production raised from 20 U/L to 11300 U/L, more than 500 folds. [Conclusion] The high expression system of AgaD provides good basis for further studying agarases.

**Keywords:** agarase, codon usage optimization, N-terminal rule, recombinant and expression

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41376144), by the National Key Technology R&D Program of the Ministry of Science and Technology (N2013BAB01B02) and by the Special Fund for Marine Scientific Research in the Public Interest (201105027, 2011005024)

\* Corresponding author. Tel: +86-532-82032067; E-mail: luxinzhi@ouc.edu.cn

Received: 3 December 2014 / Revised: 5 January 2015