

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(5):611-619; 4 May 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

黑颈鹤粪便分离菌 *Arthrobacter* sp. GN14 的 α -半乳糖苷酶基因克隆、表达与酶学特性

周峻沛, 潘璐, 李俊俊, 唐湘华, 黄遵锡*

生物能源持续开发利用教育部工程中心, 云南师范大学生命科学学院, 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 云南师范大学酶工程重点实验室, 昆明 650500

摘要: 【目的】克隆高原唯一珍稀鹤类——黑颈鹤粪便分离菌 *Arthrobacter* sp. GN14 的 α -半乳糖苷酶基因 *agaAGN14*, 并对该酶进行序列分析、系统发育分析和重组酶的酶学特性分析。【方法】利用简并 PCR 和 GC TAIL-PCR 方法获得 *agaAGN14* 全长, 并对其氨基酸序列 (AgaAGN14) 进行比对和 neighbor-joining 系统发育树的构建。将 *agaAGN14* 重组到载体 pET-28a(+) 中并转化到 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中异源表达。利用组氨酸标签纯化重组 α -半乳糖苷酶 rAgaAGN14 并进行酶学性质分析。【结果】*agaAGN14* 全长 2109 bp, GC 含量 66.8%, 编码 702 个氨基酸 (77.5 kDa)。AgaAGN14 与数据库中序列的最高一致性为 53.7%, 与其余胃肠道环境 α -半乳糖苷酶的一致性 < 43%。系统发育分析将 AgaAGN14 聚于具有催化域 KWD 和 SDXXDXXXR 的 α -半乳糖苷酶分支, 与土壤微生物来源 α -半乳糖苷酶距离相对较近, 而与其余胃肠道环境 α -半乳糖苷酶距离相对较远。rAgaAGN14 可水解 pNPG、棉籽糖、密二糖、水苏糖、菜粕和棉籽粕, 表观最适 pH 为 6.5, 在 pH 6.0 - pH 9.0 的范围内稳定并维持 50% 以上的酶活性。rAgaAGN14 的表观最适温度为 45°C, 在 10°C、20°C 和 37°C 内稳定并分别具有约 28%、30% 和 80% 的酶活。在 45°C pH 6.5 条件下, rAgaAGN14 对 pNPG 的 K_m 、 V_{max} 和 k_{cat} 分别为 0.41 mmol/L、18.28 μ mol/min/mg 和 25.36 s^{-1} 。rAgaAGN14 受 Ag^+ 、 Hg^{2+} 及 SDS 抑制, 受 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 和 β -mercaptoethanol 部分抑制, 受 Co^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 和 EDTA 的影响较小。【结论】首次报道从黑颈鹤粪便中分离到 *Arthrobacter* 菌, 并对该属细菌 α -半乳糖苷酶进行序列分析、系统发育分析、异源表达和重组酶的酶学特性分析。rAgaAGN14 序列较新颖, 其酶学特性可能是同时适应黑颈鹤肠道环境和高原淡水湿地环境的结果。

关键词: 黑颈鹤, 粪便, 高原, *Arthrobacter*, α -半乳糖苷酶, 异源表达, 系统发育, 酶学特性

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 05-0611-09

黑颈鹤 (*Grus nigricollis*) 是世界 15 种鹤类中唯一生存在高原的鹤类, 主要生活于青藏高原和云贵高原, 被列为我国 I 级重点保护野生动物和世界自

然保护联盟 (ICUN) 易危物种^[1]。胃肠道微生物种类与动物的种属、食性、营养需求、生存环境及胃肠道的结构等有着密切的关系^[2], 许多动物和昆虫的

基金项目: 国家“863 计划”(2008AA02Z202); 国家自然科学基金(31160229); 云南省应用基础研究计划(2011FB048); 云南师范大学青年基金(11ZQ07)

* 通信作者。Tel: +86-871-5920830; Fax: +86-871-5920952; E-mail: huangzunxi@163.com

作者简介: 周峻沛(1982-), 男, 博士, 讲师, 主要从事特殊环境微生物基因工程方面的研究。E-mail: junpeizhou@126.com

收稿日期: 2011-12-07; 修回日期: 2012-03-14

胃肠道微生物及新颖水解酶已得到了揭示^[3-6]。黑颈鹤生存于低温的高原淡水湿地环境,可取食高原特有绿色植物(如青稞)的根、芽及种子,兼食软体动物、昆虫、蛙类、鱼类等,因而极有可能进化出特有的胃肠道微生物及新颖的消化酶。但到目前为止,还未见黑颈鹤胃肠道微生物来源相关酶基因的报道。

半乳糖(如密二糖和棉籽糖)及半乳糖聚糖(如角豆胶)广泛存在于食品和饲料原料中,特别是豆科类植物种子中,可导致消化道胀气和饲料消化率的降低^[7]。 α -半乳糖苷酶(α -galactosidase, EC 3.2.1.22)又叫密二糖酶(melibiose),能特异性水解这些低聚糖和多聚糖等底物中的 α -半乳糖苷键^[6],消除或减少食品及饲料组成中半乳糖及半乳糖聚糖对营养物质消化的副作用^[7]。除此之外, α -半乳糖苷酶还可应用于造纸、制糖和医药业中^[8-10]。

根据氨基酸序列一致性, α -半乳糖苷酶主要分为糖苷水解酶第27和36家族^[11]。 α -半乳糖苷酶的来源包括动物、植物和微生物,动物胃肠道细菌来源的 α -半乳糖苷酶也有为数不多的报道^[6]。本研究首次报道从黑颈鹤粪便中分离到 *Arthrobacter* 菌,并对其 α -半乳糖苷酶进行序列分析、系统发育分析、异源表达和重组酶的酶学特性分析

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

Nickel-NTA 树脂购于美国 Qiagen 公司,基因组提取和纯化试剂盒及质粒提取试剂盒购于北京 Tiangen 公司,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶和 dNTPs 购于日本 TaKaRa 公司,*p*-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside (*p*NPG) 和密二糖(melibiose) 购于美国 Sigma 公司;半乳糖(*d*-galactose)、棉籽糖(raffinose) 和 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 购于美国 Amresco 公司;水苏糖(stachyose) 购自日本东京化成工业株式会社(TCI);葡萄糖氧化酶试剂盒购于上海荣盛生物药业有限公司,其余试剂为国产分析纯。细胞超声破碎仪购于宁波新芝生物科技股份有限公司,离心机购于德国 Eppendorf 公司,PCR 仪、核酸电泳仪、蛋白电泳仪及核酸蛋白分析仪购于美国 BIO-RAD 公司。

1.2 样品、菌株和载体

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Trans1-T1 和 BL21 (DE3) 购于北京 TransGen 公司,载体 pET-28a(+) 和 pMD 18-T 载体分别购于美国 Novagen 公司和日本 TaKaRa 公司。

粪便微生物(胃肠道的下段)是胃肠道微生物的一个重要组成部分。由于黑颈鹤是濒危物种,不能采用传统方法进行猎杀并采集整个胃肠道,因而只能采集粪便作为样品。大山包位于云南省昭通市,是云贵高原上最大的黑颈鹤越冬栖息地^[1]。黑颈鹤粪便样品于2010年11月在大山包黑颈鹤国家级自然保护区采集。

取2g黑颈鹤粪便样品,利用稀释涂布法及划线分离法在20℃下筛选得到菌株GN14。筛选培养基为(w/v):0.5%豆粕(或青稞),0.5%蛋白胨、0.3%酵母粉和2.0%琼脂。

1.3 基因克隆

利用基因组提取试剂盒提取菌株GN14的基因组(方法参照试剂盒说明书)。菌株的鉴定以16S rDNA 作为指标。以GN14基因组为模板,选用细菌通用引物27F和1492R(表1)进行16S rDNA 扩增,扩增条件为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,52℃ 30 s,72℃ 2 min,30个循环;72℃ 10 min。菌株GN14 α -半乳糖苷酶保守区核苷酸序列的克隆参照文献进行^[6]。获得序列片段后,设计嵌套引物(usp1-usp2及dsp1-dsp4;表1),利用文献报道的GC TAIL-PCR方法扩增侧翼序列^[12-13]。将PCR产物连接进入pMD 18-T载体,转化大肠杆菌Trans1-T1后(方法参照试剂盒说明书),将阳性克隆子送到华大基因组测序中心测序。

表1 引物

Table 1 Primers used in this study		
Primer name	Primer sequence (5'→3')	T _m (°C) ^b
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	52
1492R	GGTTACCTTGTACGACTT	
usp1	AGGCCGAATTCATGCCCA	59
usp2	ACGTGGCTGATCAGCGGATCAA	
dsp1	GGGGCTTGATCCGCTGATCA	59
dsp2	GGGCATGGAATTCGGCCCTTTG	
dsp3	AATTGGTGGGCCAGCACATCG	63
dsp4	GCTCTTTGGGCACTTCGGGATG	
agaAGN14F	CCCAAGCTTGCATGAGCAGCGTAATACTCGAAAG	60
agaAGN14R	CCGCTCGAGTGCACCCCTCCGTTCCGGCGGCA	

^a IUPAC/IUB symbols are used; restriction sites are underlined. ^b T_m: annealing temperature.

1.4 序列分析和系统发育分析

GC TAIL-PCR 得到的片段经测序后,使用 Vector NTI 10.3 软件将其与已知的片段进行拼接,获得全长并翻译为蛋白序列。开放性阅读框(ORF)的预测使用 GeneMark. hmm (Version 2.4; http://exon.gatech.edu/GeneMark/gmhmm2_prok.cgi) 并且用 BLASTx 进一步地判定 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。DNA 之间和蛋白之间的比对分别使用 BLASTn 和 BLASTp 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。信号肽的预测使用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。糖苷水解酶的分类使用 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)。

多序列的比对采用软件 Clustal X^[14]; 系统发育树的构建使用 MEGA 4.0^[15] 软件包中的 neighbor-joining 算法和 poisson correction 矩阵, 设定 bootstrap 为 1000。

1.5 α -半乳糖苷酶基因的异源表达

以 *agaAGN14F* 和 *agaAGN14R* 为引物对 (表 1), GN14 基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应参数为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 2 min 30 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。PCR 结果得到 α -半乳糖苷酶基因 *agaAGN14*, 并在该基因 5' 和 3' 端分别引入了 *Hind*III 和 *Xho*I 酶切位点。将 *agaAGN14* 进行双酶切 (*Hind*III 和 *Xho*I), 同时将表达载体 pET-28a(+) 进行双酶切 (*Hind*III 和 *Xho*I)。将上述酶切的 *agaAGN14* 与表达载体 pET-28a(+) 相连接, 获得含有 *agaAGN14* 的重组质粒 pET-*agaAGN14*。将该质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 获得重组大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) / *agaAGN14*, 并送华大基因组测序中心测序以进行验证。

1.6 蛋白表达与纯化

取重组大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) / *agaAGN14*, 以 0.1% 的接种量接种于 LB (含 50 μ g/mL Kan) 培养液中, 37℃ 快速振荡 16 h。然后将此活化的菌液以 1% 接种量接种到新鲜的 LB (含 50 μ g/mL Kan) 培养液中, 快速振荡培养约 2-3 h (OD_{600} 达到 0.6-1.0) 后, 加入终浓度 0.7 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 于 20℃ 继续振荡培养约 20 h。10000 \times g 离心 5 min, 收集菌体。用适量的 pH 7.0 Tris-HCl 缓冲液悬浮菌体后, 于低温水浴下超声波破碎菌体。以上

胞内浓缩的初酶液经 10000 \times g 离心 10 min, 吸取上清并用 Nickel-NTA 树脂纯化目的蛋白。纯化的蛋白进行 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析和 Bradford 法蛋白定量。

1.7 酶学特性分析

重组 α -半乳糖苷酶 AgaAGN14 (rAgaAGN14) 的活性测定方法采用 pNPG 法: 将 pNPG 溶于缓冲液中, 使其终浓度为 2 mmol/L; 反应体系含 100 μ L 适量酶液, 900 μ L 的底物; 底物在反应温度下预热 5 min 后, 加入酶液再反应 10 min, 然后加 1.5 mL 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应, 冷却至室温后在 405 nm 波长下测定释放出的 pNP; 1 个酶活单位 (U) 定义为每分钟分解 pNPG 产生 1 μ mol pNP 所需的酶量。对底物棉籽糖、水苏糖、棉籽粕和菜粕的活性测定方法采用 DNS 法: 将底物溶于缓冲液中, 使其终浓度为 0.5% 或 1.0% (w/v); 反应体系含 100 μ L 适量酶液, 900 μ L 底物; 底物在反应温度下预热 5 min 后, 加入酶液后再反应 120 min, 然后加 1.5 mL DNS 终止反应, 沸水煮 5 min, 冷却至室温后在 540 nm 波长下测定 OD 值; 1 个酶活单位 (U) 定义为在给定的条件下每分钟分解底物产生 1 μ mol 半乳糖所需的酶量。对底物密二糖的活性测定方法采用葡萄糖氧化酶法: 将底物溶于缓冲液中, 使其终浓度为 0.5% (w/v); 反应体系含 100 μ L 适量酶液, 900 μ L 底物; 底物在反应温度下预热 5 min 后, 加入酶液后再反应 10 min, 然后根据葡萄糖氧化酶试剂盒说明书测定酶活性; 1 个酶活单位 (U) 定义为在给定的条件下每分钟分解底物产生 1 μ mol 葡萄糖所需的酶量。缓冲液为: McIlvaine buffer (pH 4.0-8.0)、0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0-9.0) 和 0.1 mol/L glycine-NaOH (pH 9.0-11.0)。

酶的最适 pH 测定: 将纯化的 rAgaAGN14 在 37℃ 下和 pH 5.0-11.0 的缓冲液中进行酶促反应。酶的 pH 稳定性测定: 将纯化的酶液置于 pH 4.0-11.0 的缓冲液中, 在 37℃ 下处理 1 h, 然后在 pH 6.5 及 37℃ 下进行酶促反应, 以未处理的酶液作为对照。酶的最适温度测定: 在 pH 6.5 的缓冲液中, 于 0-60℃ 下进行酶促反应。酶的热稳定性测定: 将同样酶量的酶液置于 37℃ 和 50℃ 中, 处理 0-60 min 后, 在 pH 6.5 及 37℃ 下进行酶促反应, 以未处理的酶液作为对照。酶的动力学参数测定: 用 0.1-4.0 mmol/L pNPG 为底物, 在 pH 6.5 和 45℃ 下, 根

据 Lineweaver-Burk 方法测定 K_m 、 V_{max} 和 k_{cat} 。酶的金属离子和化学试剂抗性测定:在酶促反应体系中加入 10 mmol/L 的金属离子及化学试剂,在 37℃ 及 pH 6.5 条件下测定酶活性。金属离子及化学试剂包括: KCl、CaCl₂、CoCl₂、NiSO₄、CuSO₄、MgSO₄、FeSO₄、FeCl₃、MnSO₄、ZnSO₄、Pb(CH₃COO)₂、AgCl、HgCl₂、EDTA、 β -mercaptoethanol、SDS。

1.8 菌株保藏号和序列号

菌株 GN14 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心,保藏号 CGMCC 1.10974。菌株 GN14 的 16S rDNA 和 α -半乳糖苷酶基因收录于 GenBank 数据库,序列号分别为 JF745871 和 JF745876。

2 结果和分析

2.1 菌株鉴定

基于 BLASTn 分析,菌株 GN14 的部分 16S

rDNA (722 bp) 与 *Arthrobacter gandavensis* (序列号: AM237357)、*Arthrobacter luteolus* (DQ486130) 和 *Arthrobacter koreensis* CA15-9 (AY116497) 的 16S rDNA 一致性分别为 99.9%、98.8% 和 98.8%,表明菌株 GN14 属于 *Arthrobacter*。因此,将 GN14 定名为 *Arthrobacter* sp. GN14。

2.2 基因克隆和序列分析

通过简并 PCR,菌株 GN14 α -半乳糖苷酶保守区核苷酸共 172 bp。依此结果进行 GC TAIL-PCR 并拼接后,获得 GN14 α -半乳糖苷酶基因全长 (*agaAGN14*) 共 2109 bp。*agaAGN14* 起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA,GC 含量 66.8%,编码 702 个氨基酸组成的多肽 (AgaAGN14)。AgaAGN14 不含信号肽,理论分子量为 77.5 kDa,理论等电点为 6.4。简并引物保守区 [F/L/V]-[L/V]-[L/M/V]-D-D-G-W-F 和 E-P-E-M-[V/I]-[N/S]-[P/E] 及催化域 KWD 和 SDXXDXXXR 见图 1^[6],催化氨基酸

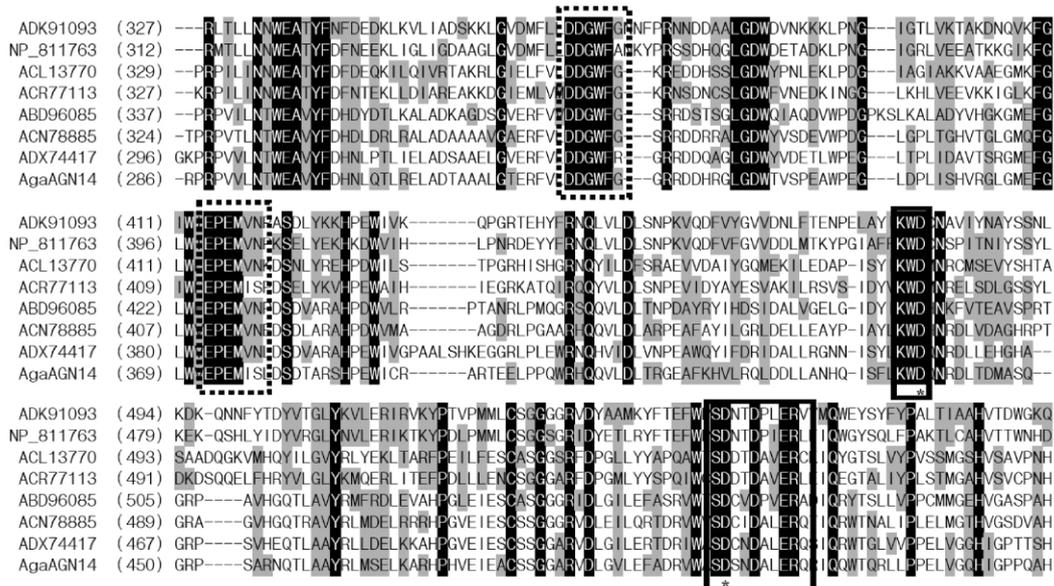


图 1 AgaAGN14 与糖苷水解酶第 36 家族 α -半乳糖苷酶序列的部分比对分析 (对应图 2)

Fig. 1 Partial amino acid sequence alignment of AgaAGN14 with glycosyl hydrolase family 36 α -galactosidases (corresponding to Fig. 2). Sequence names are shown with accession numbers except AgaAGN14, as follows: ADK91093, *Flavobacterium* sp. TN17 α -galactosidase from *Batocera horsfieldi* gut^[6]; NP_811763, *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 α -galactosidase from Human gut; ACL13770, *Ruminococcus gnavus* E1 α -galactosidase from Human feces; ACR77113, *Eubacterium rectale* ATCC 33656 α -galactosidase from Human gut; ABD96085, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171 α -galactosidase from Human feces; ACN78885, identified *Streptomyces* sp. S27 α -galactosidase most identical to AgaAGN14; ADX74417, putative *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 α -galactosidase most identical to AgaAGN14. Identical residues are shaded in black and conserved residues are shaded in gray. The solid-line frames and dotted-line frames indicate blocks of catalytic regions and degenerate primers-designing regions reported by Zhou et al. ^[6]. The asterisks show the putative catalytic residues.

预测为 D438 和 D502。BLASTp 结果表明: AgaAGN14 与 *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 来源的潜在 α -半乳糖苷酶 (ADX74417) 具有最高的一致性, 为 53.7%; 与确证活性的 *Streptomyces* sp. S27 来源 α -半乳糖苷酶 (ACN78885) 的一致性为 50.1%; 与其余胃肠道环境 α -半乳糖苷酶的一致性 < 43% (图 1)。

2.3 系统发育分析

Neighbor-joining 系统发育树的构建基于

AgaAGN14 及 GenBank 数据库中的 Actinobacteria 和胃肠道微生物来源 α -半乳糖苷酶 (图 2)。在较高的节点支持率 ($\geq 97\%$) 支持下, 这些 α -半乳糖苷酶被分成了 3 个 clusters: Actinobacteria cluster、Firmicutes cluster 和 Bacteroidetes cluster。其中, Actinobacteria cluster 至少可分为 *Arthrobacter* subcluster 和 *Bifidobacterium* subcluster。AgaAGN14 聚于 *Arthrobacter* subcluster。

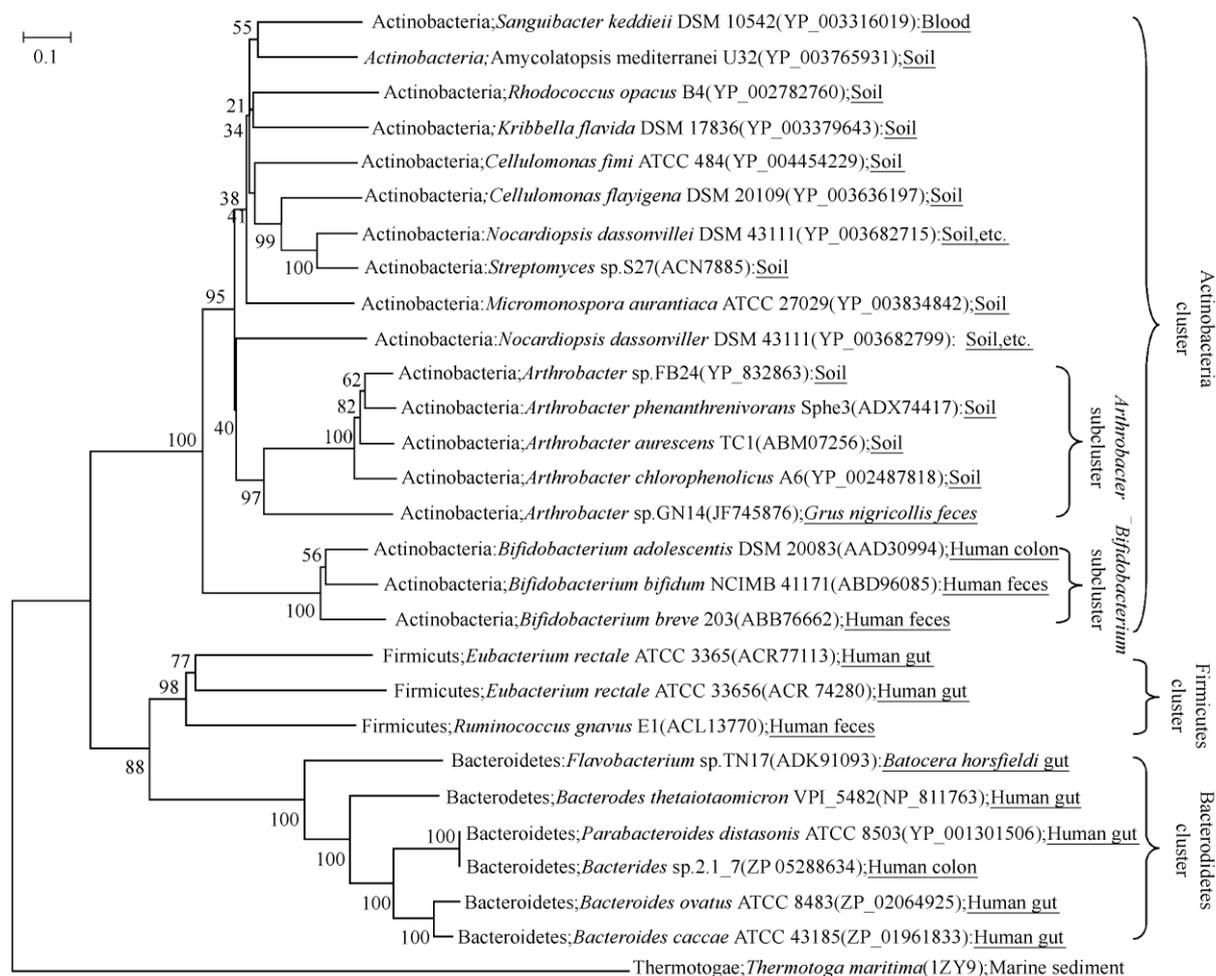


图 2 AgaAGN14 与 Actinobacteria 和胃肠道微生物来源 α -半乳糖苷酶的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed using the neighbor-joining method based on the amino acid sequences of α -galactosidases from Actinobacteria and symbiotic microorganisms from gastrointestinal habitats. Accession numbers are given in brackets. Based on annotation of the sequences in public databases, the sources from which the strains were isolated are underlined. The enzyme identified in this study is shown in bold type. Bootstrap values ($n = 1000$ replicates) are reported as percentages. The scale bar represents the number of changes per amino acid position.

2.4 agaAGN14 的异源表达与纯化

PCR 扩增得到 5' 和 3' 端分别引入 *Hind*III 和

*Xho*I 酶切位点的 *agaAGN14*。经酶切和连接后, 获得了含有 α -半乳糖苷酶基因 *agaAGN14* 的重组质粒

pET-*agaAGN14* 重组蛋白理论分子量 82.8 kDa、等电点为 6.8。pET-*agaAGN14* 成功转化大肠杆菌 BL21 (DE3)。阳性克隆子经测序验证正确并在超声波破碎细胞液中测到 α -半乳糖苷酶酶活。经 Nickel-NTA 树脂纯化后,纯化的重组蛋白 (rAgaAGN14) 达到 SDS-PAGE 电泳纯并具有 α -半乳糖苷酶酶活(图 3),表观分子量约 82 kDa,蛋白浓度为 0.04 mg/mL。

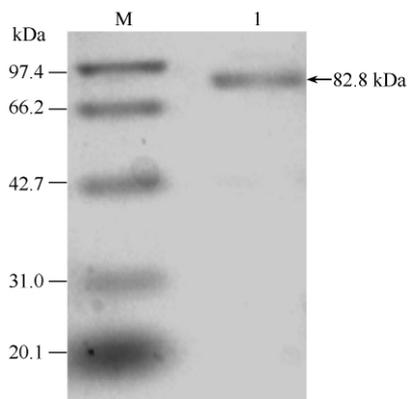


图 3 已纯化 rAgaAGN14 的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analyses of rAgaAGN14. Lanes: M, low-molecular weight markers; 1, rAgaAGN14 purified by Ni^{2+} -NTA chelating affinity chromatography.

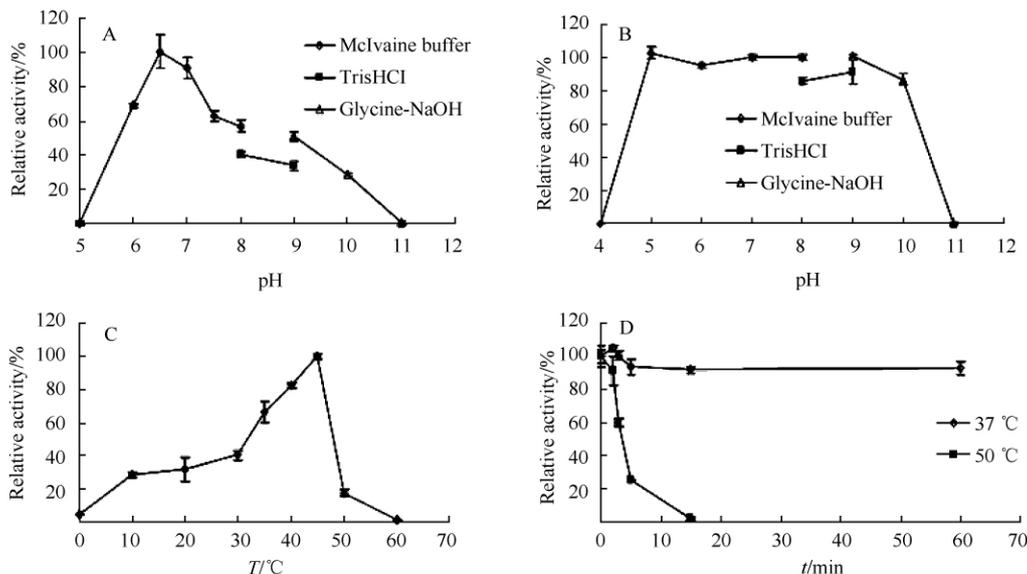


图 4 已纯化 rAgaAGN14 的酶学特性

Fig.4 Characterization of the purified rAgaAGN14. A: Effect of pH on rAgaAGN14; B: pH stability of rAgaAGN14; C: Effect of temperature on rAgaAGN14; D: Thermostability of rAgaAGN14. See Materials and methods, Enzyme characterization for details.

2.5 rAgaAGN14 的酶学特性

在 pH 6.5 及 37°C 下, rAgaAGN14 对 2 mmol/L *p*NPG 的比活为 39.28 ± 0.68 U/mg,对 0.5% (w/v) 棉籽糖和水苏糖的比活分别为 0.69 ± 0.01 和 0.41 ± 0.01 U/mg,对 1% 的密二糖、菜粕和棉籽粕的比活分别为 34.45 ± 2.15 , 2.94 ± 0.27 和 2.65 ± 0.22 U/mg。

rAgaAGN14 的表观最适 pH 为 6.5,在 pH 6.0 - 9.0 的范围内维持 50% 以上的酶活性(图 4-A);经 pH 5.0 - 10.0 的缓冲液处理 1 h,仍能保持约 85% 的活性(图 4-B)。rAgaAGN14 的表观最适温度为 45°C,在 10°C 和 20°C 分别具有约 28% 和 30% 的酶活(图 4-C);在 37°C 下稳定,在 50°C 下半衰期 < 5 min(图 4-D)。

在 45°C pH 6.5 条件下, rAgaAGN14 对 *p*NPG 的 K_m 、 V_{max} 和 k_{cat} 分别为 0.41 mmol/L、18.28 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 和 25.36 s^{-1} 。

10 mmol/L 的 Ag^+ 、 Hg^{2+} 及 SDS 可完全或几乎完全抑制 rAgaAGN14; K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 和 β -mercaptoethanol 对 rAgaAGN14 具一定的抑制作用(剩余酶活 50% - 60%);其余金属离子和化学试剂对 rAgaAGN14 的影响较小(表 2)。

表 2 金属离子及化学试剂对 rAgaAGN14 活力的影响
Table 2 Effect of 10 mM metal ions and chemical reagents on the α -galactosidase activity of purified rAgaAGN14

Reagent	Relative activity (%) ^a
CK	100.0 \pm 3.9
Co ²⁺	94.7 \pm 2.8
Pb ²⁺	87.2 \pm 8.7
Zn ²⁺	76.5 \pm 1.7
Mg ²⁺	74.3 \pm 0.9
Na ⁺	68.1 \pm 3.4
K ⁺	58.7 \pm 0.8
Ca ²⁺	57.7 \pm 1.5
Mn ²⁺	57.5 \pm 5.9
Fe ³⁺	56.8 \pm 4.1
Ni ²⁺	55.0 \pm 2.2
Cu ²⁺	52.2 \pm 4.2
Ag ⁺	0
Hg ²⁺	0
EDTA	83.0 \pm 4.1
β -Mercaptoethanol	58.7 \pm 1.6
SDS	0.4 \pm 0.2

^a Values represent the means \pm SD (n = 3) relative to the untreated control samples.

3 讨论

Arthrobacter 菌主要来源于土壤(图 2), 大部分的报道主要关注于该菌对污染物的生物降解能力, 如对氯苯酚的降解^[16]。近年来基因组的测序结果发现该类菌具有多种糖类物质降解能力, 除了 *Arthrobacter arilaitensis* 外, *Arthrobacter aurescens* TC1、*Arthrobacter chlorophenolicus* A6、*Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 及 *Arthrobacter* sp. FB24 都含潜在的糖苷水解酶第 36 家族 α -半乳糖苷酶基因, 但目前的报道主要局限于对 β -半乳糖苷酶性质的研究^[17], 该类菌的 α -半乳糖苷酶活性及其基因一直未得到确证。本研究首次报道从黑颈鹤粪便中分离到 *Arthrobacter* 菌, 并对该属细菌 α -半乳糖苷酶进行序列分析、系统发育分析、异源表达和重组酶的酶学特性分析。

AgaAGN14 序列较新颖, 与数据库中序列的最高一致性只有 53.7%, 与其余胃肠道环境 α -半乳糖苷酶的一致性 < 43%。系统发育分析将 AgaAGN14 聚于具有催化域 KWD 和 SDXXDXXXR 的 α -半乳糖苷酶分支^[6], 目前所报道的胃肠道微生物来源 α -半乳糖苷酶全部是细菌来源并且全部聚于该分支。AgaAGN14 在系统发育树上与土壤微生物来源 α -半

乳糖苷酶距离相对较近, 而与其余胃肠道环境 α -半乳糖苷酶距离相对较远, 推测 *Arthrobacter* sp. GN14 并不是专一的黑颈鹤胃肠道微生物, 其 α -半乳糖苷酶也不仅仅在黑颈鹤胃肠道中发挥作用。rAgaAGN14 在 37°C (黑颈鹤体温) 活性较高(约 80%)、在 10°C (高原淡水湿地环境温度) 具有活性、在中性 pH (肠道 pH) 活性最高及在 pH 6.0 - pH 10.0 (大部分土壤 pH) 都具有活性, 这些性质特征也进一步表明了 *Arthrobacter* sp. GN14 及其 α -半乳糖苷酶很可能需要同时适应黑颈鹤胃肠道环境和高原淡水湿地环境, 并且以适应黑颈鹤胃肠道环境为主。

低温酶和嗜冷酶可用于低温到中温的生境和加工过程, 如水产生境常常为 10°C - 25°C、食品行业中的醒面和杆面过程需要在 35°C 以下进行等; 将中温或者高温加工的过程转为低温加工过程还可起到降低能耗的作用; 同时, 对低温酶的研究也具有理论意义(如指导酶的分子改性等)^[18-20]。目前, 还尚未报道典型的低温 α -半乳糖苷酶或嗜冷 α -半乳糖苷酶。少数已报道具有低温活性的 α -半乳糖苷酶也属于中温酶, 如 GalA17^[6]、Aga-F75^[21] 和 AgII^[22], 而这些酶在 pH 9.0 时酶活很低或几乎没有酶活。造纸过程主要在碱性条件下进行, 需要碱性水解酶^[8]。此外, 大豆糖蜜呈中性, 其可作为辅助饲料, 但具有约 10% 的棉籽糖^[23]。rAgaAGN14 是具有低温活性的中温酶, 可降解棉籽糖等, 在 pH 9.0 时具有 40% - 50% 的活性, 并具有良好的 pH 稳定性和大部分的金属离子抗性。因而, rAgaAGN14 可作为良好的出发材料, 通过进一步的突变等研究以提高低温活性等, 最终使其在低温到中温的生境和加工过程中具一定的应用潜力。

参考文献

- [1] Kong DJ, Yang XJ, Liu Q, Zhong XY, Yang JX. Winter habitat selection by the vulnerable black-necked crane *Grus nigricollis* in Yunnan, China: implications for determining effective conservation actions. *Oryx*, 2011, 45 (2): 258 - 264.
- [2] Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JL. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6 (10): 776-788.
- [3] Brulc JM, Antonopoulos DA, Miller MEB, Wilson MK, Yannarell AC, Dinsdale EA, Edwards RE, Frank ED, Emerson JB, Wacklin P, Coutinho PM, Henrissat B, Nelson KE, White BA. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals

- forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106 (6): 1948 – 1953.
- [4] Ley RE , Lozupone CA , Hamady M , Knight R , Gordon JL. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6 (10): 776 – 788.
- [5] Warnecke F , Luginbuhl P , Ivanova N , Ghassemian M , Richardson TH , Stege JT , Cayouette M , McHardy AC , Djordjevic G , Aboushadi N , Sorek R , Tringe SG , Podar M , Martin HG , Kunin V , Dalevi D , Madejska J , Kirton E , Platt D , Szeto E , Salamov A , Barry K , Mikhailova N , Kyrpides NC , Matson EG , Ottesen EA , Zhang XN , Hernandez M , Murillo C , Acosta LG , Rigoutsos I , Tamayo G , Green BD , Chang C , Rubin EM , Mathur EJ , Robertson DE , Hugenholtz P , Leadbetter JR. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature*, 2007, 450 (7169): 560 – 565.
- [6] Zhou JP , Shi PJ , Huang HQ , Cao YN , Meng K , Yang PL , Zhang R , Chen XY , Yao B. A new α -galactosidase from symbiotic *Flavobacterium* sp. TN17 reveals four residues essential for α -galactosidase activity of gastrointestinal bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88 (6): 1297 – 1309.
- [7] Graham KK , Kerley MS , Firman JD , Allee GL. The effect of enzyme treatment of soybean meal on oligosaccharide disappearance and chick growth performance. *Poultry Science*, 2002, 81 (7): 1014 – 1019.
- [8] Clarke JH , Davidson K , Rixon JE , Halstead JR , Fransen MP , Gilbert HJ , Hazlewood GP. A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase , mannanase and α -galactosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53 (6): 661 – 667.
- [9] Linden JC. Immobilized α -D-galactosidase in the sugar-beet industry. *Enzyme and Microbial Technology*, 1982, 4 (3): 130 – 136.
- [10] Buja LM. Evaluation of recombinant α -galactosidase A therapy for amelioration of the cardiovascular manifestations of Fabry disease: an important role for endomyocardial biopsy. *Circulation*, 2009, 119 (19): 2539 – 2541.
- [11] Cantarel BL , Coutinho PM , Rancurel C , Bernard T , Lombard V , Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37 (Database issue): D233 – D238.
- [12] Zhou JP , Huang HQ , Meng K , Shi PJ , Wang YR , Luo HY , Yang PL , Bai YG , Yao B. Cloning of a new xylanase gene from *Streptomyces* sp. TN119 using a modified thermal asymmetric interlaced-PCR specific for GC-rich genes and biochemical characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(5): 1277 – 1292.
- [13] Zhou JP , Shi PJ , Zhang R , Huang HQ , Meng K , Yang PL , Yao B. Symbiotic *Streptomyces* sp. TN119 GH 11 xylanase: a new pH-stable , protease- and SDS-resistant xylanase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38 (4): 523 – 530.
- [14] Thompson JD , Gibson TJ , Plewniak F , Jeanmougin F , Higgins DG. The CLUSTAL _ X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (24): 4876 – 4882.
- [15] Tamura K , Dudley J , Nei M , Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24 (8): 1596 – 1599.
- [16] Sahoo NK , Pakshirajan K , Ghosh PK , Ghosh A. Biodegradation of 4-chlorophenol by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6: effect of culture conditions and degradation kinetics. *Biodegradation*, 2011, 22 (2): 275 – 286.
- [17] Xu K , Tang XA , Cai YB , Mehmood MA , Xiao XA , Wang FP. Molecular characterization of cold-inducible β -galactosidase from *Arthrobacter* sp. ON14 isolated from Antarctica. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 21 (3): 236 – 242.
- [18] Beg QK , Kapoor M , Mahajan L , Hoondal GS. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56 (3): 326 – 338.
- [19] Zhou JP , Huang HQ , Meng K , Shi PJ , Wang YR , Luo HY , Yang PL , Bai YG , Zhou ZG , Yao B. Molecular and biochemical characterization of a novel xylanase from the symbiotic *Sphingobacterium* sp. TN19. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 85 (2): 323 – 333.
- [20] Siddiqui KS , Cavicchioli R. Cold-adapted enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 2006, 75 (1): 403 – 433.
- [21] Cao Y , Wang Y , Meng K , Bai Y , Shi P , Luo H , Yang P , Zhou Z , Zhang Z , Yao B. A novel protease-resistant α -galactosidase with high hydrolytic activity from *Gibberella* sp. F75: gene cloning , expression , and enzymatic characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 83 (5): 875 – 884.
- [22] Mi S , Meng K , Wang Y , Bai Y , Yuan T , Luo H , Yao B. Molecular cloning and characterization of a novel α -galactosidase gene from *Penicillium* sp . F63 CGMCC 1669 and expression in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40 (5): 1373 – 1380.
- [23] Siqueira PF , Karp SG , Carvalho JC , Sturm W , Rodriguez-Leon JA , Tholozan JL , Singhania RR , Pandey A , Soccol CR. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory , pilot and industrial scales. *Bioresource Technology*, 2008, 99 (17): 8156 – 8163.

A novel α -galactosidase from *Arthrobacter* sp. GN14 isolated from *Grus nigricollis* feces: gene cloning, heterologous expression and characterization

Junpei Zhou, Lu Pan, Junjun Li, Xianghua Tang, Zunxi Huang*

Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Yunnan Normal University, College of Life Sciences, Yunnan Normal University, Key Laboratory of Yunnan for Biomass Energy and Biotechnology of Environment, Key Laboratory of Enzyme Engineering, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China

Abstract: [Objective] Cloning and heterologously expressing the α -galactosidase gene (*agaAGN14*) from *Arthrobacter* sp. GN14 isolated from feces of black-neck crane (*Grus nigricollis*). [Methods] The full-length *agaAGN14* was cloned based on degenerate PCR and GC TAIL-PCR (thermal asymmetric interlaced PCR), ligated into pET-28a(+) vector and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The recombinant α -galactosidase (rAgaAGN14) was purified to electrophoretic homogeneity by Ni^{2+} -NTA metal chelating affinity chromatography, and then the enzyme characterizations were determined. Amino acids sequences of *agaAGN14* (AgaAGN14) and α -galactosidases from Actinobacteria and gastrointestinal microorganisms were aligned and used for constructing a neighbor-joining phylogenetic tree. [Results] The 2109-bp full-length *agaAGN14* (66.8% GC content) encodes a 702-residue polypeptide (AgaAGN14; 77.5 kDa). AgaAGN14 showed the highest identity of 53.7% with α -galactosidases in public databases, and <43% identities with α -galactosidases from gastrointestinal microorganisms. AgaAGN14 was put in a phylogenetic branch sharing the catalytic motifs KWD and SDXXDXXXR, and close to α -galactosidases from soil microorganisms and far from α -galactosidases from gastrointestinal microorganisms. The purified rAgaAGN14 efficiently hydrolyzed pNPG, raffinose, melibiose, stachyose, rapeseed meal and cottonseed meal; showed apparent optimal at pH 6.0 and 45°C, stability and activity (>50%) at pH 6.0–9.0, and activities of 28%, 30% and 80% at 10°C, 20°C and 37°C, respectively; exhibited K_m , V_{max} and k_{cat} values of 0.41 mmol/L, 18.28 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ and 25.36 s^{-1} , respectively, using pNPG as the substrate at 45°C and pH 6.5; strongly inhibited by Ag^+ , Hg^{2+} and SDS, partial inhibited by K^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} and β -mercaptoethanol, and little influenced by Co^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ and EDTA. [Conclusion] The *Arthrobacter* strain isolated from feces of *Grus nigricollis*, and the sequence analysis, phylogenetic analysis, heterologous expression and recombinant enzyme's biochemical characterizations of an α -galactosidase from *Arthrobacter* strain were first reported. rAgaAGN14 was a novel α -galactosidase.

Keywords: *Grus nigricollis*, feces, plateau, *Arthrobacter*, α -galactosidase, heterologous expression, phylogenetic analysis, enzyme characterizations

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2008AA02Z202), by the National Natural Science Foundation of China (31160229), by the Applied and Basic Research Foundation of Yunnan Province (2011FB048), and by the Foundation of Yunnan Normal University (11ZQ07)

* Corresponding author. Tel: +86-871-5920830; Fax: +86-871-5920952; E-mail: huangzunxi@163.com

Received: 7 December 2011 / Revised: 14 March 2012