



Solitalea canadensis 源 β -N-乙酰氨基己糖苷酶的基因克隆、异源表达和酶学特性

王梦, 危双, 王婷, Josef Voglmeir, 刘丽*

南京农业大学食品科学技术学院, 江苏 南京 210095

摘要:【目的】对细菌 *Solitalea canadensis* 中编码 β -N-乙酰氨基己糖苷酶的基因进行克隆, 通过原核表达获得重组 β -N-乙酰氨基己糖苷酶, 并研究其酶学性质。【方法】以 *Solitalea canadensis* 基因组 DNA 为模板, 使用加尾 PCR 的方法克隆编码 β -N-乙酰氨基己糖苷酶的基因, 构建含有组氨酸标签的重组表达载体, 并将重组质粒导入大肠杆菌 BL21(DE3)中进行原核表达。重组蛋白经 Ni-NTA 纯化, 以对硝基苯酚- β -乙酰氨基葡萄糖(pNP- β -GlcNAc)为底物研究其酶学性质, 包括最适温度、最适 pH 以及金属离子和抑制剂的影响。【结果】从菌株 *Solitalea canadensis* 克隆得到了 β -N-乙酰氨基己糖苷酶基因片段(GeneBank: WP_014682183.1), 全长 2586 bp, 重组表达所得蛋白表观分子量约为 97 kDa, 最适 pH 6.0, 最适温度 42 °C, 但不稳定, 半衰期小于 5 min。该酶对十二烷基磺酸钠(SDS)敏感, 活性受 Triton X-100 和尿素的抑制。此外二糖分子也能不同程度地抑制该重组酶的活性, 特异性抑制剂 PugNAc (*O*-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylideneamino) *N*-phenylcarbamate)对该酶的 IC₅₀ 为 2 μ mol/L。该重组酶蛋白除能水解对硝基苯酚- β -乙酰氨基葡萄糖苷和对硝基苯酚- β -乙酰氨基半乳糖(pNP- β -GalNAc)外, 还能对 *O*-链聚糖核心结构 Core II 末端的乙酰氨基葡萄糖进行水解。【结论】本文首次从 *Solitalea canadensis* 中克隆得到能水解末端 β 1-6 连接的乙酰氨基葡萄糖而不能水解 β 1-4 连接键的 β -N-乙酰氨基己糖苷酶, 并对其进行了酶学性质研究和底物特异性分析, 为开发高效特异性强的糖链分析工具酶提供理论基础。

关键词: *Solitalea canadensis*, β -N-乙酰氨基己糖苷酶, 酶学特性

糖链的结构分析是糖组学研究的重要内容之一, 其主要任务是研究组成糖链的各种单糖的种类、数量、连接位点及键型等。糖链不像蛋白质一样是基因编码的产物, 有特定的排列规律。组

成糖链的单糖种类和数量多变, 单糖之间的连接方式(包括连接位点、连接键型)也异常复杂, 存在大量同分异构体, 导致糖链结构分析工作任务艰巨。长期以来, 科研工作者一直致力于糖链结构

基金项目: 国家自然科学基金(31371739, 31671854); 中央高校基本科研业务费(KYRC201209)

*通信作者。Tel: +86-25-84399553; Fax: +86-25-84399513; E-mail: lichen.liu@njau.edu.cn

收稿日期: 2017-03-11; 修回日期: 2017-05-27; 网络出版日期: 2017-07-03

分析技术和方法的开发和改良, 目前主要使用的技术方法包括: 高效液相色谱(HPLC)、质谱(MS)、核磁共振(NMR)、毛细管电泳和糖芯片技术等。其中外切糖苷酶技术结合高效液相色谱是最常用的对糖链进行初步结构解析的方法之一。外切糖苷酶能够特异性地将某种特定键型的末端单糖从糖链上解离下来, 反应条件温和, 催化效率高并具有很强的底物特异性。使用外切糖苷酶技术结合高效液相色谱, 能够明确糖链的单糖组成、连接位点和键型等详细信息, 被认为是一种绿色高效的糖链结构分析手段。乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)和乙酰氨基半乳糖(GalNAc)广泛存在于各种糖结构中, 使用 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶特异性水解末端不同键型连接的乙酰氨基葡萄糖和乙酰氨基半乳糖将为复杂的糖链分析工作带来巨大便利。

β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶(β -*N*-acetylhexosaminidase, EC 3.2.1.52)是一类能特异性水解糖链非还原末端乙酰氨基己糖的糖苷酶, 通常同时具有 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶和 β -*N*-乙酰氨基半乳糖苷酶活性, 而且对 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖的水解活性大于对 β -*N*-乙酰氨基半乳糖^[1]。 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶根据催化原理的不同分属于 GH20、GH3 或 GH84 三个蛋白家族^[2], 尤以 GH20 家族中的 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶数目最多。该酶广泛存在于人类、哺乳动物、昆虫、植物以及微生物中, 参与糖蛋白、糖脂、氨基聚糖等的代谢过程, 具有重要生物学功能^[3-8]。目前用于糖结构分析的 β -*N*-乙酰氨基己糖酶主要有两种, 分别来自刀豆和肺炎双球菌。这两种酶都是广谱性酶, 能够水解包括 1-2、1-3、1-4 和 1-6 在内的所有 β 连接乙酰氨基葡萄糖, 因此只能区分 α 和 β 连接键型, 不能区别连接位点, 且两种酶都不能水解 *N*-糖链中平分型的末端乙酰

氨基葡萄糖。此外, 来自肺炎双球菌的酶只对 GlcNAc 有活性, 不能水解末端 GalNAc。由此可见, 现有的 β -*N*-乙酰氨基己糖酶在糖链结构研究的应用中还存在不足之处, 尤其缺乏对不同键型的选择性, 因此开发一种特异性水解某单一键型、具有高度底物选择性的 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶十分必要。

Solitalea canadensis (*F. canadensis*)是一种从土壤中分离得到的革兰氏阴性菌^[9], 其全基因组信息已经公布, 但关于 *Solitalea canadensis* 源的 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶至今未见描述。本文针对 *Solitalea canadensis* 基因组中编码 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶的基因, 利用分子生物学手段进行了克隆, 构建了表达载体, 成功在大肠杆菌中进行了异源表达, 并对其酶学特性进行了研究, 测定了底物特异性, 以期开发用于糖链结构分析的新工具酶。

1 材料和方法

1.1 菌种和载体

菌株 *Solitalea canadensis* DSM3403, 购自德国菌种保藏中心; 敲除 β -半乳糖苷酶基因的大肠杆菌菌株 BL21(DE3)和 Top 10 购自天根(北京)生化科技有限公司, 其中 Top 10 经抗噬菌体改造命名为 BMMach1 T1, 保存于本实验室; pTG-19 载体购自上海捷瑞生物工程有限公司; pET-30a 载体购自 Novagen 公司。

1.2 主要试剂和生物信息学软件

DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自 Axygen 公司(北京); 改良型 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自生物工程(上海)股份有限公司; rTaq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司(大连); T4 连接酶、限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I 购自 Thermo Scientific

公司；细菌培养所用抗生素分别为氨苄青霉素(100 µg/mL)、卡那霉素(50 µg/mL)；液相色谱仪流动相均为色谱纯，购自默克公司；引物合成和基因测序由金斯瑞(南京)生物科技有限公司完成。序列比对使用 BLAST 工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)，多重序列比对使用 Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)，进化树使用软件 MEGA 6.0.6 绘制，二级结构预测使用在线软件 ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>)完成。

1.3 *Solitalea canadensis* β-N-乙酰氨基己糖苷酶基因扩增

根据 NCBI 数据库中 *Solitalea canadensis* 编码 β-N-乙酰氨基己糖苷酶的 DNA 序列，使用软件 Primer Premier 5 进行引物设计，并在前引物和后引物的 5'端分别添加 *Nde* I 和 *Xho* I 限制性内切酶酶切位点。前引物 F :5'-GGAATTCCATATGATGAAAATTCACACTTAGTTG-3' (*Nde* I)，后引物 R :5'-CCGCTCGAGGTTCTTGATCTCCTCAATCTG-3' (*Xho* I)。*Solitalea canadensis* 基因组 DNA 参照 Mahuku^[10]等报道的方法进行提取。以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，PCR 程序为：95 °C 5 min，95 °C 30 s，55 °C 30 s，72 °C 2 min，循环 35 次，72 °C 10 min。扩增产物使用 1%琼脂糖凝胶进行电泳分离，并按 Axygen DNA 回收试剂盒说明进行切胶回收。

1.4 表达载体的构建

回收得到的基因片段在 T4 连接酶作用下与 pTG-19 载体连接得到重组质粒，并热激转化至 BMMach1 T1 感受态细胞，使用蓝白斑筛选重组子，并挑取白色菌落以 M13 通用引物进行 PCR 鉴定。按 Axygen 质粒提取试剂盒说明对阳性克隆菌

落抽提质粒，所得质粒用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 进行双酶切，酶切后的目的基因片段与经相同酶切处理的 pET-30a 载体连接，并将连接产物转化至 BMMach1 T1 感受态细胞中，使用菌落 PCR 进行鉴定，将阳性克隆送样至测序公司测序，得到构建成功的重组质粒 pET30a-SoCaHexNAc。

1.5 β-N-乙酰氨基己糖苷酶的外源表达和纯化

提取重组质粒 pET30a-SoCaHexNAc，转化入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞。挑取单菌落于 5 mL 含卡那霉素(50 µg/mL)的 LB 培养基中过夜培养，然后接种至含有 400 mL LB 培养基的摇瓶中扩大培养，直至菌液浓度达到 OD_{600} 约为 0.5，加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L，18 °C 诱导表达 24 h。

4 °C、4000 r/min 离心收集菌体，将菌体沉淀重悬于 10 mL 裂解液(100 mmol/L NaCl，50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0，1% Triton X-100，1 mmol/L PMSF)，超声破碎细胞，12000 r/min、4 °C 离心 20 min，收集上清，使用 Ni-NTA 亲和层析进行纯化，镍柱使用 5 倍柱体积的平衡缓冲液(50 mmol/L Tris/HCl pH 8.0，50 mmol/L NaCl)进行平衡后上样，并使用 10 倍柱体积的结合缓冲液(50 mmol/L Tris/HCl pH 8.0，50 mmol/L NaCl，20 mmol/L 咪唑)冲洗去除非特异结合的蛋白，再用洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris/HCl pH 8.0，50 mmol/L NaCl，500 mmol/L 咪唑)洗脱重组蛋白，280 nm 波长检测柱下液，收集蛋白峰即纯化后的重组酶。

对诱导前后、上清和纯化蛋白进行 SDS-PAGE，分析重组蛋白的表达水平、纯化情况和分子量，分离胶电泳电压 100 V，浓缩胶电泳电压 80 V。蛋白含量的测定使用基于 Bradford 法的蛋白定量试剂盒，以牛血清蛋白(BSA)为标准绘制曲线，具体操作参照试剂盒说明进行。

1.6 酶活力的测定

以对硝基苯酚- β -乙酰氨基葡萄糖苷(*p*NP- β -GlcNAc)为底物,通过对硝基苯酚(*p*NP *p*-nitrophenol)的生成量计算重组 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶的活力。一个酶活力单位(1 U)定义为 37 °C 条件下,每分钟水解产生 1 μ mol 对硝基苯酚所需的酶量。配置一系列不同浓度的 *p*NP 标准溶液:0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00 mmol/L。取 25 μ L *p*NP 标准溶液与 50 μ L 1 mol/L Na₂CO₃ 溶液混匀,取 30 μ L 于酶标仪 405 nm 波长测定吸光值,绘制不同浓度 *p*NP 与吸光度标准曲线。25 μ L 酶活力测定的反应体系含 1 mmol/L *p*NP- β -GlcNAc, 50 mmol/L 缓冲液。向反应体系中加入酶溶液 10 μ L, 37 °C 孵育 10 min 后立即加入 50 μ L 1 mol/L Na₂CO₃ 溶液终止反应,取 30 μ L 于 384 孔板中,使用酶标仪检测 405 nm 波长下吸光度。每个反应设置 3 个重复,以不加酶的反应体系为空白对照。根据读取的吸光度和标准曲线换算出产物生成量,计算酶活力。

1.7 重组 *N*-乙酰氨基己糖苷酶的酶学特性研究

1.7.1 最适 pH 的测定:以 *p*NP- β -GlcNAc 为底物,分别检测不同 pH 值缓冲体系对酶活力的影响。所用缓冲体系分别为磷酸氢二钠-柠檬酸溶液(pH 3.0–8.0)、Tris-HCl (pH 8.0–9.0)、Na₂CO₃-NaHCO₃ (pH 9.0–10.0)为缓冲液,缓冲液 pH 梯度 0.5。反应体系同上述酶活力测定方法。

1.7.2 最适温度和不同温度下稳定性的测定:在最适 pH 下测定酶反应的最适温度,测定温度分别为 4、16、25、37、42、45、50、55、60、65 和 70 °C。反应体系和操作方法同最适 pH 的测定。温度稳定性试验分别将酶溶液(含 0.5% BSA)在 37 °C 和 42 °C 下孵育 1、2、5、10、15、30 min

和 1 h (以不加酶和未经温度孵育的酶为对照)分别测定酶活性。

1.7.3 金属离子和不同化学物质对酶活性影响的测定:在最适条件下,分别向上述反应体系中加入 Mg²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Fe³⁺、Ca²⁺ (金属离子终浓度为 2 mmol/L),按上述步骤测定金属离子对酶活性的影响,同时设置不含金属离子和含 2 mmol/L EDTA 的反应体系作为对照。以同样的方法分别测定不同化学物质对酶活性的影响,包括尿素(终浓度 0.1、0.5、1.0 mol/L), β -巯基乙醇(2-ME, 终浓度 1、10、50 mmol/L), Triton X-100 (终浓度 0.1%、0.5%、1.0%, V/V), SDS (终浓度 0.1%、0.5%、1.0%, M/V)。

1.7.4 二糖分子对酶活性影响的测定:在最适条件下,向反应体系分别加入终浓度 5、25 和 50 mmol/L 不同二糖,包括蔗糖、乳糖、麦芽糖、松二糖、密二糖和纤维二糖,测定不同二糖分子对酶活性的影响,操作步骤如上所述。

1.7.5 特异性抑制剂(PugNAc)对酶活性影响的测定:以 *p*NP- β -GlcNAc 为底物,使用酶标仪测定 PugNAc [*O*-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylideneamino) *N*-phenylcarbamate]对酶活性的抑制作用。PugNAc 的终浓度设置如下:1、2、5、10、20、50 pmol/L, 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 nmol/L, 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μ mol/L 和 0.1 mmol/L。操作步骤如上所述。

1.8 重组 *N*-乙酰氨基己糖苷酶底物特异性鉴定

重组酶对于不同 *p*NP-单糖活性的测定:使用酶标仪分别以对硝基苯酚- β -葡萄糖苷(*p*NP- β -glucose)、对硝基苯酚- β -半乳糖苷(*p*NP- β -galactose)、对硝基苯酚- β -乙酰葡萄糖苷(*p*NP- β -GlcNAc)、对硝基苯酚- β -乙酰半乳糖苷(*p*NP- β -GalNAc)、对硝基苯酚

- α -葡萄糖苷(*p*NP- α -glucose)、对硝基苯酚- α -半乳糖苷(*p*NP- α -galactose)、对硝基苯酚- α -乙酰氨基葡萄糖苷(*p*NP- α -GlcNAc)和对硝基苯酚- α -岩藻糖苷(*p*NP- α -Fucose)为底物实时测定 OD_{405} 。反应体系中底物终浓度 2 mmol/L, 缓冲体系为 50 mmol/L pH 6.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液, 反应温度 37 °C, 反应时间 1 h。

重组酶对于 *p*NP-Core II 活性的测定: 以 *p*NP-Core II 为底物(终浓度 0.1 mmol/L), 缓冲体系为 50 mmol/L pH 6.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液, 37 °C 分别反应 1、2、5 h, 95 °C 加热 5 min 终止反应。反应产物使用高效液相色谱(HPLC)方法进行测定。色谱条件: 流动相 A 为含 0.1% 三氟乙酸(TFA)的水, 流动相 B 为含 0.1% TFA 的乙腈; 流速 0.8 mL/min, 紫外检测器检测波长 330 nm, 色谱柱选用 HyperClone™ 5 μ m ODS (C₁₈) 120Å 250 mm×4.6 mm, 进样体积 20 μ L。洗脱程序: 0–6.0 min 流动相 B 比例线性提高至 90%, 6.0–8.0 min 流动相 B 比例保持不变, 8.0–9.0 min 流动相 B 比例降至 20%。

重组酶对于 2AB-NGA2 活性的测定: 以 2AB 标记的 NGA2 为底物(终浓度 1 μ mol/L), 缓冲体系为 20 mmol/L pH 6.0 MES 缓冲液, 37 °C 反应 12 h, 加入乙腈至终浓度 80% 终止反应, 离心取上清, 使用超高压液相色谱(UPLC)检测酶反应产物。色谱条件: 流动相 A 为 50 mmol/L NH₄COOH (pH 4.5), 流动相 B 为乙腈; 流速 0.5 mL/min; 柱温 60 °C, 荧光检测器激发波长 330 nm 和发射波长 420 nm, 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC® BEH Glycan Column 1.7 μ m×2.1 mm×150 mm, 进样体积 45 μ L。洗脱程序: 流动相 B 比例 0–6 min 由 95% 降至 78%, 6.0–20 min 由 78% 降至 70%, 20–21 min 升至 100%, 23–25 min 降至 95%。

2 结果和分析

2.1 基因克隆、载体构建与序列分析

以 *Solitalea canadensis* 基因组 DNA 为模板使用所设计引物进行基因扩增, 琼脂糖凝胶电泳显示成功得到一全长约 2500 bp 的 DNA 片段, 命名为 SoCaHexNAc (图 1-A)。扩增所得 DNA 片段经酶切和连接 构建得到重组质粒 pET30a-SoCaHexNAc。测序结果表明克隆得到的重组 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶基因与 *Solitalea canadensis* 基因序列匹配, 完整开放阅读框全长 2586 bp, 共编码 861 个氨基酸残基, 带有 C-端组氨酸标签。BLAST 数据库信息显示该蛋白属 GH20 家族。系统发育进化树显示该基因所编码蛋白序列与目前已知的来自玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (ABI81756.1)、人类乙酰氨基己糖苷酶的 β 亚基(NP_000512.1)、*Paenivaccillus* sp. *Ts12* (3GH4)、*Treptomyces plicatus* (1HP4)、*Streptococcus pneumonia* (5A69 & WP_000679939.1)、*Talaromyces flavus* (AEQ33603.1)、*Serratia marcescens* (ETX49365.1)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (1YHT)、*Serratia marcescens* (WP_016928753.1) 的 GH20 家族 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶有不同程度的相似性(图 1-B)。氨基酸序列多重比对结果显示, 尽管在分子进化树上进化关系远近不同, 但来自真核和原核生物的 11 个不同 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶在氨基酸序列 Val₃₁₃-Lys₃₇₃、Tyr₄₀₈-Lys₄₅₁、His₅₁₈-Glu₅₂₃、Lys₆₀₂-Trp₆₀₅、Ile₇₀₁-Trp₇₃₅ 之间都具有保守性。二级结构预测也显示这几段序列内所含 α 螺旋和 β 折叠, 数量和位置极为类似, 可能与形成(β/α)₈ 桶状催化结构域密切相关(图 2)。第 522 位的天冬氨酸(Asp, D)和第 523 位的谷氨酸(Glu, E)的 2 个酸性氨基酸在所有酶中都高度保守, 可能与催化活性中心有关。

2.2 重组蛋白的表达和纯化

重组大肠杆菌 IPTG 诱导前后菌体、裂解所得上清液和镍亲和层析纯化组分的 SDS-PAGE 分析结果如图 3 所示。通过比较诱导前后菌体的蛋白组成, 可以发现 IPTG 诱导后菌体在分子量 100 kDa 左右具有一明显增强条带, 同时上清液和纯化组分都在相同位置具有信号, 应为所表达重组蛋白 SoCaHexNAc, 其表观分子量与理论分子量 (97.5 kDa) 相吻合, 表明经 Ni-NTA 纯化得到重组蛋白。Bradford 法测定的重组蛋白浓度为 1.4 mg/mL, 比活力为 33.8 U/mg。

2.3 酶学性质研究

2.3.1 最适 pH: 不同 pH 缓冲体系对重组 SoCaHexNAc 的活性影响如图 4-A 所示。重组 SoCaHexNAc 最适 pH 为 6.0, 在 pH 5.0–7.5 范围内酶活力可保持 60% 以上, 当 pH 低于 5.0 时酶的活性迅速下降。

2.3.2 最适温度及温度稳定性: 重组 SoCaHexNAc 的表观最适温度为 42 °C (图 4-B)。当反应温度高于 42 °C 时, 酶活性迅速降低, 50 °C 时酶活性仅为 12%。温度稳定性试验显示, 42 °C 环境下该酶不稳定, 但在温度 37 °C 孵育 30 min 仍可以保持原有酶活力的 80% 以上 (图 4-C)。尽管重组 SoCaHexNAc 表观最适温度为 42 °C, 但该温度下酶并不稳定, 由于 37 °C 下该酶的稳定性相对较好, 因此在后续的实验中, 我们选用了 37 °C 为反应温度而不是最适温度 42 °C。

2.3.3 金属离子和化学添加剂对酶活性的影响: 金属离子影响的测定结果显示不同金属离子对酶活性均无显著影响 (图 4-D)。不同浓度的 2-ME 和 Triton X-100 对酶的活性无显著影响。尿素对重组 SoCaHexNAc 的抑制作用具有剂量效应, 1 mol/L 尿素能够抑制约 80% 的酶活性。SDS 对酶活性的抑制作用明显, 0.1% SDS 即可抑制 90% 以上的酶活性 (图 4-E)。

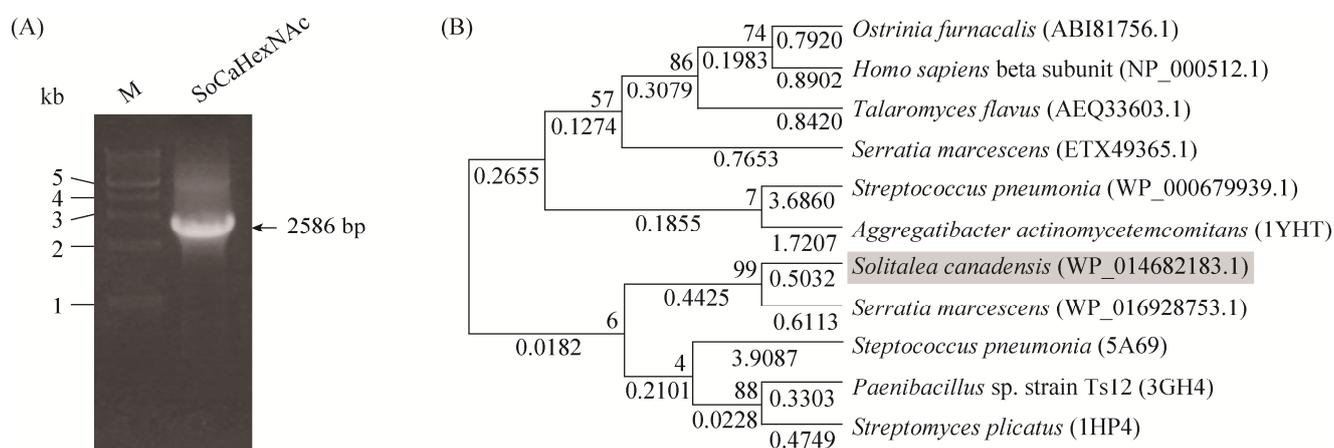


图 1. PCR 扩增产物电泳结果及与不同来源 GH20 家族 β -N-乙酰氨基己糖苷酶进化树分析

Figure 1. Agarose gel electrophoresis and phylogenetic analysis of β -N-acetylhexosaminidase from *Solitalea canadensis*. A: M: DNA marker; SoCaHexNAc: PCR product of SoCaHexNAc. B: phylogenetic tree constructed using Maximum Likelihood method by the software Mega 6 based on the amino acid sequences of β -N-acetylhexosaminidase from different sources, accession numbers were given in brackets and the enzyme identified in this study was with gray shade. Bootstrap values ($n=500$ replicates) were reported above branches as percentages, the length of branches were shown under branches.

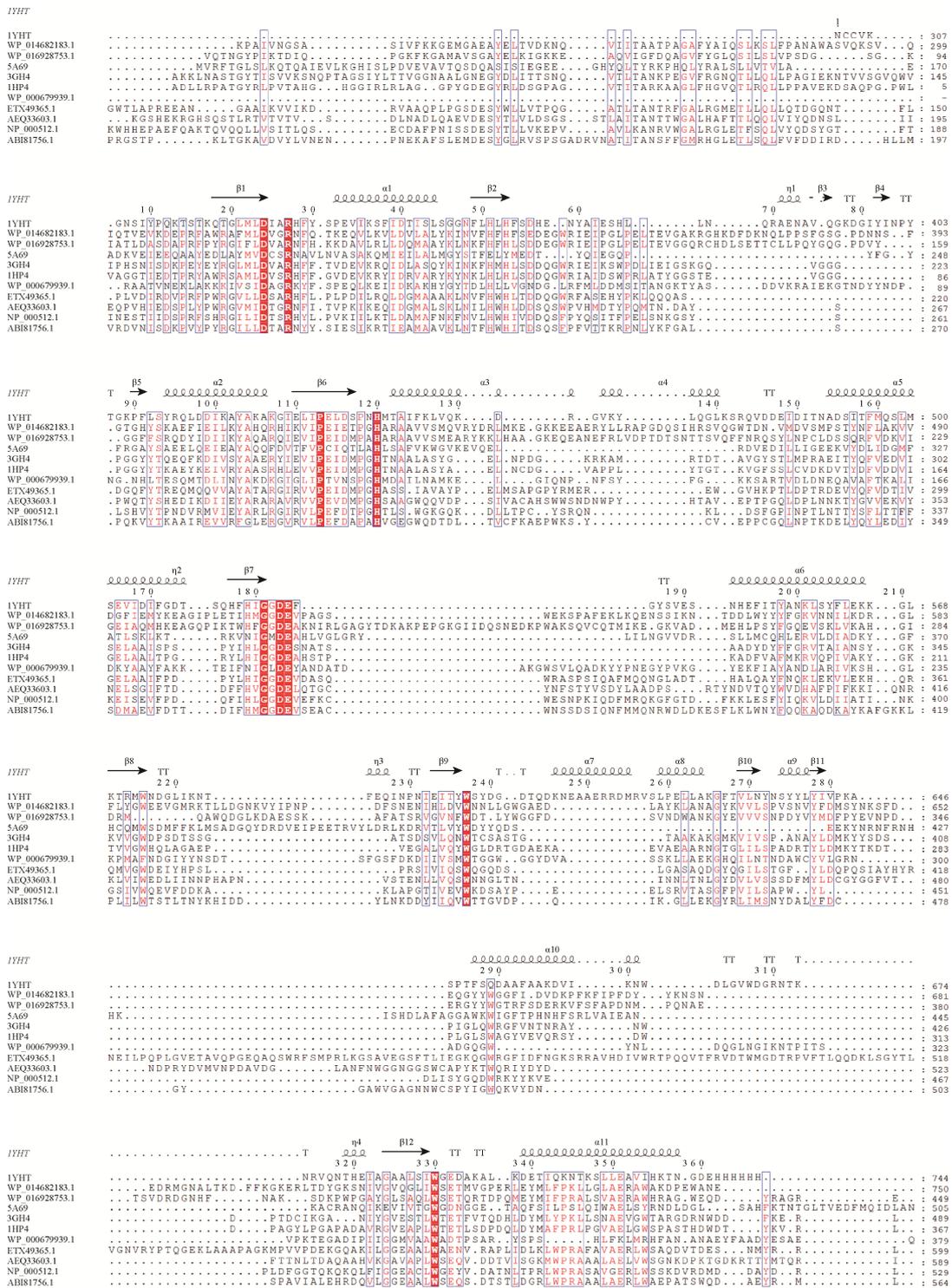


图 2. SoCaHexNac 与其他来源的 GH20 家族 β -N-乙酰氨基己糖苷酶的序列多重对比图

Figure 2. Multiple sequence alignment of β -N-acetylhexosaminidases from *Solitalea canadensis* and other sources. The multiple sequence alignment was performed by Clustal Omega, and secondary structure indicated along the top of alignment (α -helix; β -sheet) was constructed using ESPrift 3.0 based on the structure of 1YHT. Identical residues are in red, highly conserved residues are shaded in red.

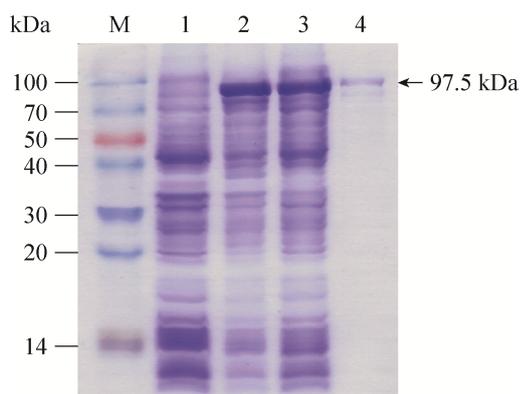


图 3. 重组蛋白 SDS-PAGE

Figure 3. SDS-PAGE of recombinant protein from *Solitalea canadensis*. M: marker; 1: cell pallet before induction; 2: cell pallet after induction with IPTG; 3: supernatant after cell lysis; 4: protein after purification on Ni-NTA agarose column.

2.3.4 二糖对酶活性的影响：密二糖、纤维二糖、麦芽糖和乳糖对重组 SoCaHexNAc 酶活性具有抑制作用，其中乳糖的抑制作用最为明显，50 mmol/L 的乳糖可以完全抑制酶活性。松二糖和蔗糖也具有一定抑制作用，但抑制剂浓度与抑制作用没有明显的线性关系(图 4-F)。

2.3.5 特异性酶抑制剂 PugNAc 对酶活性的抑制作用：0–2 nmol/L PugNAc 不影响酶的活性，PugNAc 浓度大于 2 nmol/L 时，PugNAc 对重组酶 SoCaHexNAc 产生抑制作用并具有量效关系，其 IC_{50} 为 2 μ mol/L。

2.4 底物特异性

2.4.1 重组 SoCaHexNAc 对 pNP-单糖的底物特异性研究：在 384 孔板中依次加入 8 μ L 酶反应液(含 50 mmol/L pH 6.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液和 1 mmol/L 不同的 pNP-单糖)，向各个孔中同时加入 2 μ L 酶液，立即测定 405 nm 下实时吸光度，设置不加酶的对照组。结果显示 SoCaHexNAc 可以特异性水解 pNP- β -GlcNAc 和 pNP- β -GalNAc，其

中 pNP- β -GlcNAc 的水解速率高于 pNP- β -GalNAc，对其他底物无作用(图 5-A)。

2.4.2 重组 SoCaHexNAc 对 O-链寡糖及 N-链寡糖标准品末端乙酰氨基葡萄糖水解活性的研究：在 37 °C 以及最适 pH 条件下，分别以 O-链寡糖 pNP-Core II 和 N-链寡糖 2AB-NGA2 为底物，使用 HPLC 分别测定底物的生成量。重组 SoCaHexNAc 能够水解 pNP-Core II 末端 β 1-6 连接的乙酰氨基葡萄糖，随反应时间增加，底物峰(保留时间 4.2 min)不断降低，而保留时间为 5.4 min 的产物峰逐渐升高，当反应 5 h 时，pNP-Core II 基本完全反应(图 5-B)。而重组 SoCaHexNAc 对 2AB-NGA2 中 β 1-4 连接的乙酰氨基葡萄糖无作用，反应 12 h 后仍无产物峰生成(图 5-C)。

3 讨论

本研究首次从细菌 *Solitalea canadensis* 克隆得到一种新的 β -N-乙酰氨基己糖苷酶基因，并通过原核表达体系对其进行了重组表达，得到有活性的重组 β -N-乙酰氨基己糖苷酶 SoCaHexNAc。系统发育进化树显示，来源于真核和原核的 11 个 GH20 家族 β -N-乙酰氨基己糖苷酶可以分为 2 个亚类，SoCaHexNAc 与 *Serratia marcescens* 来源的 β -N-乙酰氨基己糖苷酶同属一个亚类，进化关系最近，而与另一亚类的昆虫和人体来源的 β -N-乙酰氨基己糖苷酶距离较远。尽管如此，SoCaHexNAc 与同一亚类和不同亚类之间的 β -N-乙酰氨基己糖苷酶之间的氨基酸序列多重比对仍显示存在某些氨基酸残基高度保守，如 SoCaHexNAc 第 327 位和 522 位的天冬氨酸、第 330 位精氨酸、第 429 位的脯氨酸、第 438 位的组氨酸、第 520 位甘氨酸、第 523 位的谷氨酸、第 605 位和 709 位的色氨酸，

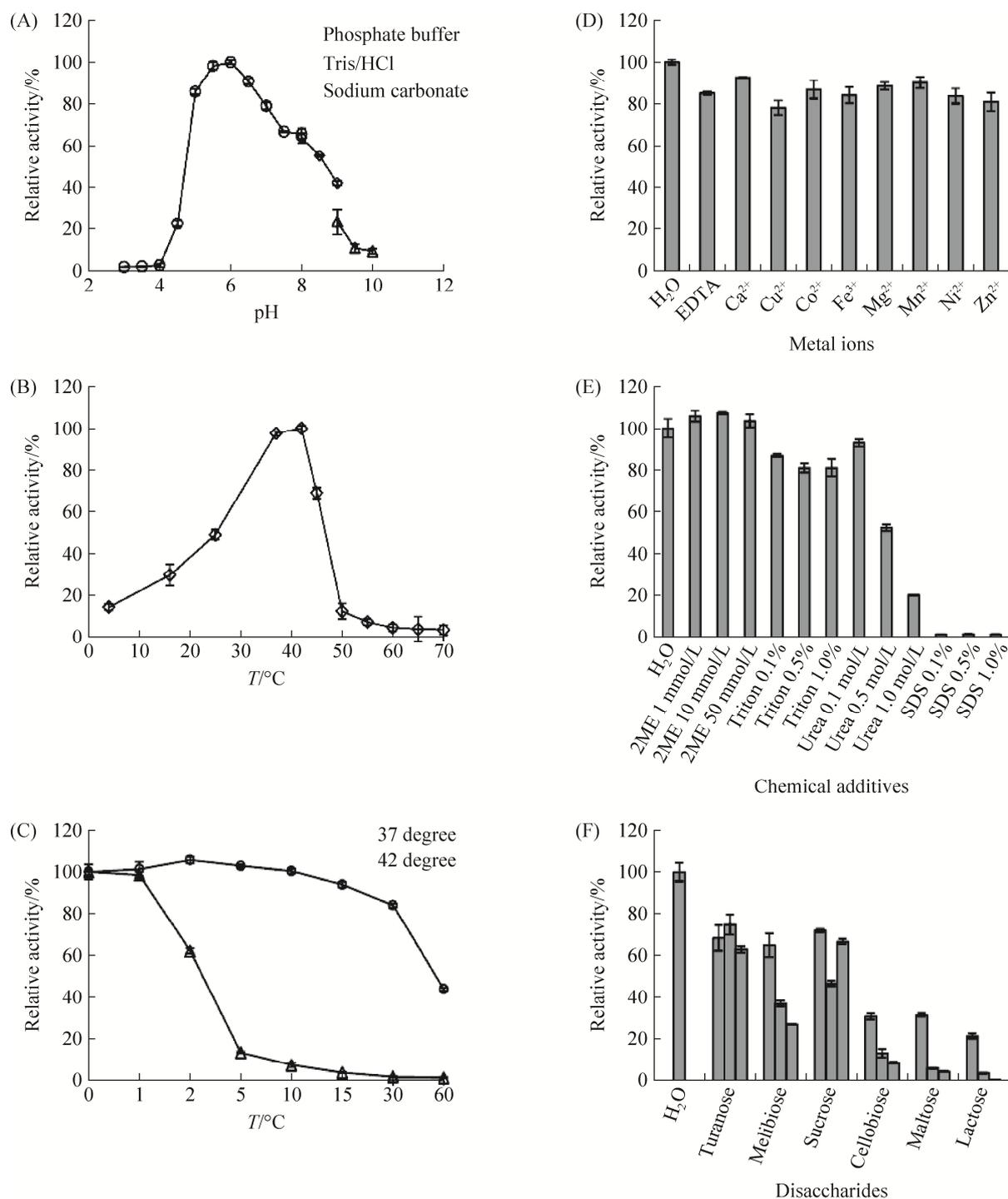


图 4. SoCaHexNAc 酶学性质研究

Figure 4. Characterization of the recombinant β -*N*-acetylhexosaminidase, SoCaHexNAc. A: pH optima assayed at 37 °C in buffers ranging from pH 3.0–10.0. B: temperature optima assayed at the optimum pH from 4 °C to 70 °C. C: thermostability of SoCaHexNAc done with enzymes incubated at 37 °C and 42 °C for different time intervals. D: effect of metal ions measured by adding different metal ions with a final concentration of 2 mmol/L. E: effect of different chemical additives. F: effect of different disaccharides with concentrations of 5, 25 and 50 mmol/L.

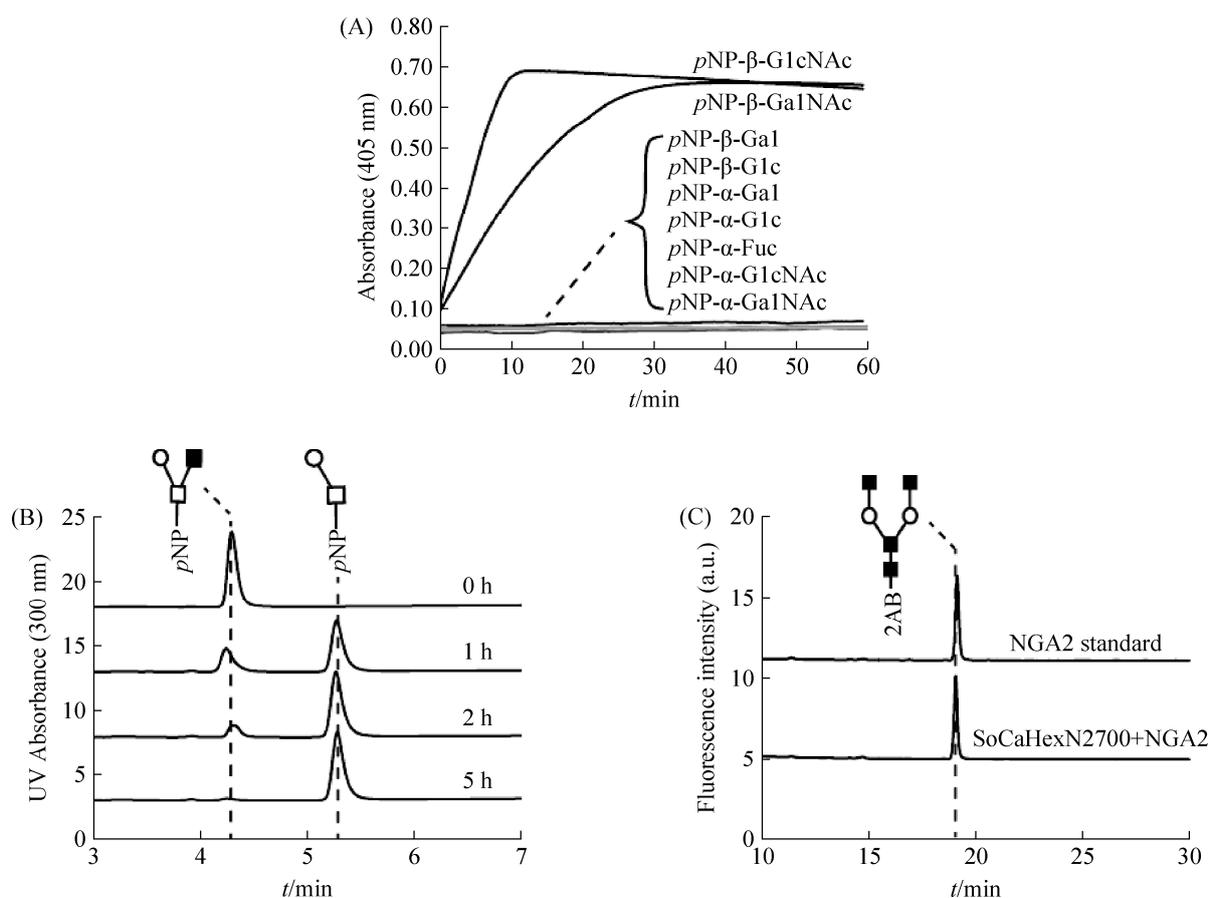


图 5. SoCaHexNAc 底物特异性

Figure 5. Activity detection of recombinant SoCaHexNAc. A: substrate specificity assays of SoCaHexNAc to *pNP*-monosaccharides base on micro-plate reader; B: determination of hydrolyze activity to *pNP*-Core II based on HPLC; C: activity of SoCaHexNAc to 2AB-NGA2.

尤其是第 523 位的精氨酸和第 524 位的谷氨酸在所有 11 个样本中完全一致。此外, SoCaHexNAc 氨基酸序列中还存在一些相对保守的区段, 而根据这些区段推测出的 α -螺旋和 β -折叠等二级结构类型与已知晶体结构的 1YHT 相比, 在数目和位置上都高度一致。根据已报道的 GH20 家族中 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶晶体结构的研究^[11-13]和二级结构的分析, 我们推断 SoCaHexNAc 氨基酸序列中这些保守片段所形成的 α 螺旋和 β 折叠可能位于酶催化口袋区域, 参与形成 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构, 并将 Asp-Glu 这 2 个与催化相关的氨基酸残基包围在内

部, 构成催化活性中心。根据系统发育进化树、氨基酸序列多重比对分析以及二级结构分析结果综合判断 SoCaHexNAc 酶具有明显的 GH20 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶家族特征, 应分属于 GH20 家族。

重组 SoCaHexNAc 酶学性质研究表明该酶最适 pH 值为 6.0, 与之前报道的 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶类似, 都处于弱酸性至中性范围内, 如细菌 *Aeromonas hydrophila* 来源的 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶 rNAG-B 最适 pH 值为 6.0^[14], *Bacillus stearothermophilus* 来源的 β -HexNAcase 最适 pH 处于 6.5 左右^[15], *Vibrio furnissii* 来源的 pXE18 和

pXE28 最适 pH 值 7.0^[16], 灰翅夜蛾来源的 Sfhex 最适 pH 值 5.5^[17], 玉米螟的 OfHex1 最适 pH 值为 7.0^[18]。本文所述重组酶来源于土壤细菌 *Solitalea canadensis*, 表观最适温度为 42 °C, 而该细菌培养温度为 18–30 °C^[9], 显然, 该酶的最适温度与细菌 *Solitalea canadensis* 生长的环境温度并不一致。来源于细菌 *Solitalea canadensis* 的其他酶也有类似发现, 如有研究指出来源于该菌种的甘露糖苷酶最适反应温度为 37 °C 也并非其最适生长温度^[19]。类似现象在其他土壤细菌中也有发现, 如关于内切葡聚糖酶的报道^[20]指出自淡水沼泽森林土壤中分离的芽孢杆菌 *Paenibacillus* sp. M33 中内切葡聚糖酶的最适温度为 50 °C, 高于其菌体存在的环境温度。分离自我国无锡某地羊圈土壤中的细菌 *Brevibacillus parabravis* CGMCC 10798 最适培养温度为 37 °C, 该菌来源的丝氨酸蛋白酶最适温度却是 60 °C^[21], 由此发现重组酶的最适温度与来源菌株的生长温度并没有严格的必然关系。此外, 在酶的稳定性试验中, 我们发现虽然 SoCaHexNAc 表观最适温度为 42 °C, 但其在该温度下并不稳定, 37 °C 下酶的稳定性明显增强。酶的热稳定性也是制约其应用价值的重要因素, 在酶的实际应用中不仅需要酶具有较高催化速率迅速催化化学反应, 也希望其具有良好的稳定性可以长期保存, 因此在后续的研究中我们将尝试对酶进行改造, 以提高其温度的稳定性。

研究中还发现该酶会受二糖分子不同程度的影响, 尤以乳糖对其的影响突出, 而类似的特性在其他关于该酶的研究中未见报道。生物信息学表明 GH20 家族 β -N-乙酰氨基己糖苷酶催化活性中心含有高度保守序列 His/Asn-Xaa-Gly-Ala/Cys/Gly/Met-Asp-Glu-Ala/Ile/Leu/Val^[22], 其中谷氨酸和天冬酰胺作为 2 个重要的催化位点, 参与催化

的过程。有文献指出该酶的催化机制为底物辅助催化^[23], 即底物 2 位碳原子上的乙酰氨基基团中的羰基氧作为分子内亲核试剂使之形成一个环状离子中间体, 谷氨酸和天冬酰胺上的羧基作为一般酸/碱提供质子, 促使糖苷键的断裂和糖基的水解。由于乳糖等二糖分子中不存在乙酰氨基, 无法形成离子中间体, 导致酶催化反应不能进行, 但二糖分子的结构和酶的天然底物结构相似, 能与底物竞争酶的催化中心, 导致表观酶活性被抑制, 这也与二糖分子对酶活性抑制作用的研究结果相吻合。

此外底物特异性初步研究还发现, 重组 SoCaHexNAc 可以水解 O-链寡糖核心结构 Core II 末端乙酰氨基葡萄糖, 而不能水解 N-链糖核心结构 NGA2 的末端乙酰氨基葡萄糖, 这可能是由于重组酶对底物有一定的选择性和专一性, CoreII 末端乙酰氨基葡萄糖是以 β -1,6 键连接而 NGA2 末端乙酰氨基葡萄糖是以 β -1,4 键与其他单糖连接的, 该重组酶对 β -1,6 键表现活性, 而不能水解 β -1,4 键连接的末端乙酰氨基葡萄糖。未来我们还将进一步探索重组 SoCaHexNAc 的底物特异性, 检测更多不同的底物, 比较重组 SoCaHexNAc 对不同连结位点的糖链以及对 O-糖链和 N-糖链的活性差异。目前为止, 虽有多个不同来源的 β -N-乙酰氨基己糖苷酶被克隆表达, 但表现出的酶学性质和底物特异性各不相同, 如有的酶能水解线性壳聚寡糖却不能水解 N-链寡糖, 有的只能特异性水解 1 种或 2 种连接位点, 这导致不同酶的应用价值和范围不尽相同。因此, 以重组 SoCaHexNAc 为模板, 通过重组突变, 对活性中心进行改造, 以期发掘出针对特定结构的寡糖外切糖苷工具酶, 对糖链结构分析技术的开发和改良具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Cabezas JA. Some comments on the type references of the official nomenclature (IUB) for β -*N*-acetylglucosaminidase, β -*N*-acetylhexosaminidase and β -*N*-acetylgalactosaminidase. *The Biochemical Journal*, 1989, 261(3): 1059-1060.
- [2] Slámová K, Bojarová P, Petrásková L, Křen V. β -*N*-Acetylhexosaminidase: what's in a name...? *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 682-693.
- [3] Landels EC, Green PM, Ellis IH, Fensom AH, Bobrow M. Beta-hexosaminidase splice site mutation has a high frequency among non-Jewish Tay-Sachs disease carriers from the British Isles. *Journal of Medical Genetics*, 1992, 29(8): 563-567.
- [4] Katta S, Ankati S, Podile AR. Chitooligosaccharides are converted to *N*-acetylglucosamine by *N*-acetyl- β -hexosaminidase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 348(1): 19-25.
- [5] Yang Q, Liu T, Liu FY, Qu MB, Qian XH. A novel β -*N*-acetyl-D-hexosaminidase from the insect *Ostrinia furnacalis* (Guenée). *The FEBS Journal*, 2008, 275(22): 5690-5702.
- [6] Jin YL, Jo YY, Kim KY, Shim JH, Kim YW, Park RD. Purification and characterization of β -*N*-acetylhexosaminidase from rice seeds. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 35(3): 313-319.
- [7] Oikawa A, Itoh E, Ishihara A, Iwamura H. Purification and characterization of β -*N*-acetylhexosaminidase from maize seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 2003, 160(9): 991-999.
- [8] Slámová K, Kulik N, Fiala M, Krejzová-Hofmeisterová J, Ettrich R, Křen V. Expression, characterization and homology modeling of a novel eukaryotic GH84 β -*N*-acetylglucosaminidase from *Penicillium chrysogenum*. *Protein Expression and Purification*, 2014, 95: 204-210.
- [9] Christensen P. *Flexibacter canadensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1980, 30(2): 429-432.
- [10] Mahuku GS. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004, 22(1): 71-81.
- [11] Ramasubbu N, Thomas LM, Ragnath C, Kaplan JB. Structural analysis of Dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the Periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 349(3): 475-486.
- [12] Mark BL, Vocadlo DJ, Knapp S, Triggs-Raine BL, Withers SG, James MNG. Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial β -hexosaminidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(13): 10330-10337.
- [13] Langley DB, Harty DWS, Jacques NA, Hunter N, Guss JM, Collyer CA. Structure of *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (GcnA) from the endocarditis pathogen *Streptococcus gordonii* and its complex with the mechanism-based inhibitor NAG-thiazoline. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 377(1): 104-116.
- [14] Lan XQ, Zhang X, Kodaira R, Zhou ZY, Shimosaka M. Gene cloning, expression, and characterization of a second β -*N*-Acetylglucosaminidase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* Strain SUWA-9. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008, 72(2): 492-498.
- [15] Sakai K, Narihara M, Kasama Y, Wakayama M, Moriguchi M. Purification and characterization of thermostable β -*N*-acetylhexosaminidase of *Bacillus steareothermophilus* CH-4 isolated from Chitin-containing compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(8): 2911-2915.
- [16] Chitlaru E, Roseman S. Molecular cloning and characterization of a novel β -*N*-acetyl-D-glucosaminidase from *Vibrio furnissii*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(52): 33433-33439.
- [17] Tomiya N, Narang S, Park J, Abdul-Tahman B, Choi O, Singh S, Hiratake J, Sakata K, Betenbaugh MJ, Palter KB, Lee YC. Purification, characterization, and cloning of a *Spodoptera frugiperda* Sf9 β -*N*-acetylhexosaminidase that hydrolyzes terminal *N*-acetylglucosamine on the *N*-glycan core. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(28): 19545-19560.
- [18] Liu T, Liu FY, Yang Q, Yang J. Expression, purification and characterization of the chitinolytic β -*N*-acetyl-D-hexosaminidase from the insect *Ostrinia furnacalis*. *Protein Expression and Purification*, 2009, 68(1): 99-103.
- [19] Liu FF, Kulnich A, Du YM, Liu L, Voglmeir J. Sequential processing of mannose-containing glycans by two α -mannosidases from *Solitalea canadensis*. *Glycoconjugate Journal*, 2016, 33(2): 159-168.
- [20] Kanchanadumkerng P, Sakka M, Sakka K, Wiwat C. Characterization of endoglucanase from *Paenibacillus* sp. M33, a novel isolate from a freshwater swamp forest. *Journal of Basic Microbiology*, 2017, 57(2): 121-131.
- [21] Zhang RX, Gong JS, Su C, Zhang DD, Tian H, Dou WF, Li H, Shi JS, Xu ZH. Biochemical characterization of a novel surfactant-stable serine keratinase with no collagenase activity from *Brevibacillus parabrevis* CGMCC 10798. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 93: 843-851.
- [22] Gutternigg M, Kretschmer-Lubich D, Paschinger K, Rendić D, Hader J, Geier P, Ranftl R, Jantsch V, Lochnit G, Wilson IBH. Biosynthesis of Truncated *N*-linked oligosaccharides results from non-orthologous hexosaminidase-mediated mechanisms in nematodes, plants, and insects. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(38): 27825-27840.
- [23] Mark BL, James MNG. Anchimeric assistance in hexosaminidases. *Canadian Journal of Chemistry*, 2002, 80(8): 1064-1074.

Gene cloning, expression, purification and characterization of a beta-*N*-acetylhexosaminidase from *Solitalea canadensis*

Meng Wang, Shuang Wei, Ting Wang, Josef Voglmeir, Li Liu*

College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] We intended to discover and characterize a novel beta-*N*-acetylhexosaminidase from *Solitalea canadensis*. [Methods] Genomic DNA extracted from *Solitalea canadensis* was used as the template for gene cloning of the beta-*N*-acetylhexosaminidase using PCR reaction. The PCR product was digested with restriction endonucleases *Nde* I and *Xho* I, then ligated to pET-30a vector. After plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells, the recombinant enzyme was expressed by IPTG induction and purified with nickel affinity chromatography. Characterization of recombinant SoCaHexNAc including optimal pH and temperature, metal ions dependency and inhibitor was done using *p*NP- β -GlcNAc as the substrate. Effect of different chemical compounds and disaccharides on the enzyme activity was also measured. [Results] A beta-*N*-acetylhexosaminidase gene with an open reading fragment of 2586 bp was successfully obtained, which encodes 856 amino acids with a putative molecular size of 97 kDa. The results of SDS-PAGE revealed that the recombinant SoCaHexNAc (GeneBank accession number: WP_014682183.1) was expressed and purified successfully. Characterization of the enzyme showed that the optimum pH of SoCaHexNAc is 6.0, and the optimum temperature is 42 °C with a half-life being less than 5 minutes. The recombinant SoCaHexNAc was sensitive to SDS and could be partly inhibited by Triton X-100 and urea. Different concentrations of lactose, maltose and cellobiose could also inhibit the activity of SoCaHexNAc to different extends. The IC₅₀ of a specific β -*N*-acetylhexosaminidase inhibitor, PugNAc, was 2 μ mol/L. The substrate specificity result showed that the recombinant SoCaHexNAc was active to *p*NP-GlcNAc and *p*NP-GalNAc. When being used for the hydrolysis of GlcNAc from natural glycans, the recombinant SoCaHexNAc exhibited linkage specificity evidenced by the fact that only β 1,6-linked GlcNAc in Core II structure, but not the β 1,4-linked GlcNAc in NGA2 structure, was removed, although the terminal GlcNAc was the exceptional terminal sugar in both substrates. [Conclusion] A beta-*N*-actylhexosamindase with activity specifically towards β 1,6-linked but not β 1,4-linked GlcNAc was discovered and characterized from *Solitalea canadensis* for the first time. The results of characterization and substrate specificity showed it might be a potential novel tool enzyme which could be used in structure analysis of glycans.

Keywords: *Solitalea canadensis*, beta-*N*-acetylhexosaminidase, enzymatic characterization

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31371739, 31671854) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (KYRC201209)

*Corresponding author. Tel: +86-25-84399553; Fax: +86-25-84399513; E-mail: lichen.liu@njau.edu.cn

Received: 11 March 2017; Revised: 27 May 2017; Published online: 3 July 2017