

长双歧杆菌 α -唾液酸苷酶在大肠杆菌中的表达及酶学性质

李婷¹, 刘翊昊¹, 江正强², 马俊文¹, 闫巧娟^{*1}

1 中国农业大学工学院 中国轻工业食品生物工程重点实验室, 北京 100083

2 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

李婷, 刘翊昊, 江正强, 马俊文, 闫巧娟. 长双歧杆菌 α -唾液酸苷酶在大肠杆菌中的表达及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 492-504

Li Ting, Liu Yihao, Jiang Zhengqiang, Ma Junwen, Yan Qiaojuan. Enzymatic properties and expression of an α -sialidase from *Bifidobacterium longum* in *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 492-504

摘要:【背景】唾液酸苷酶是一类水解唾液酸糖复合物末端唾液酸残基的糖苷水解酶, 广泛存在于动物和微生物中, 具有重要的生物学功能。【目的】克隆一个长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)唾液酸苷酶基因(*blsia42*)并在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达, 探讨该重组酶的酶学性质。【方法】从长双歧杆菌中克隆唾液酸苷酶基因(*blsia42*), 构建重组表达质粒 pET-28a-*blsia42* 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中异源表达。BISia42 粗酶液经 Ni-NTA 亲和层析纯化后研究其酶学性质。【结果】BISia42 纯酶的比酶活为 164 935.2 U/mg。SDS-PAGE 法和凝胶过滤法测定 BISia42 的分子量分别为 42.8 kDa 和 41.5 kDa。该酶的最适 pH 和温度分别为 6.0 和 50 °C, 在 pH 3.5–9.0 和 45 °C 以下稳定。BISia42 底物特异性广泛, 对 α 2,3-、 α 2,6 和 α 2,8 糖苷键均显示出水解活性, 对 3'-唾液酸乳糖和多聚唾液酸的水解活性分别为 6'-唾液酸乳糖水解活性的 87.50%和 67.19%。BISia42 水解多聚唾液酸 12 h 后, 唾液酸浓度为 2.4 g/L, 水解率为 23.6%。【结论】唾液酸苷酶 BISia42 优良的酶学特性使其在唾液酸及其衍生物的制备中具有潜在的应用价值。

关键词: 长双歧杆菌; 唾液酸苷酶; 酶学性质; 唾液酸

基金项目: 国家自然科学基金(32172159)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32172159)

*Corresponding author: E-mail: yanqj@cau.edu.cn

Received: 2021-08-05; Accepted: 2021-10-14; Published online: 2021-12-05

Enzymatic properties and expression of an α -sialidase from *Bifidobacterium longum* in *Escherichia coli*

LI Ting¹, LIU Yihao¹, JIANG Zhengqiang², MA Junwen¹, YAN Qiaojuan^{*1}

1 Key Laboratory of Food Bioengineering (China National Light Industry), College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2 College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: [Background] Sialidases are a type of glycoside hydrolases that hydrolyze the terminal sialic acid residue from sialic acid-containing complex. Sialidases are ubiquitous in animals and microorganisms and have important biological functions. [Objective] To clone a novel sialidase gene *blsia42* from *Bifidobacterium longum* express it in *Escherichia coli* BL21(DE3), and characterize the enzymatic properties of the expressed protein. [Methods] A novel sialidase gene *blsia42* was cloned from *B. longum*, and the recombinant expression plasmid pET-28a-*blsia42* was constructed and expressed heterologously in *E. coli* BL21(DE3). After the crude enzyme was purified by Ni-NTA affinity chromatography, the enzymatic properties were studied. [Results] The specific activity of purified BLSia42 was determined to be 164 935.2 U/mg. The molecular weight of BLSia42 was determined as 42.8 kDa and 41.5 kDa by SDS-PAGE and gel filtration, respectively. The optimum conditions for BLSia42 were pH 6.0 and 50 °C, and this enzyme was stable within pH 3.5–9.0 and below 45 °C. BLSia42 showed a broad range of substrate specificity and had hydrolysis activity towards α 2,3, α 2,6, and α 2,8 glycosidic bonds. The activity of BLSia42 with 3'-SL and colominic acid as substrates was 87.50% and 67.19% of that with 6'-SL as the substrate. After colominic acid was hydrolyzed by BLSia42 for 12 h, the sialic acid concentration and hydrolysis rate was 2.4 g/L and 23.6%, respectively. [Conclusion] The excellent enzymatic properties make BLSia42 potentially suitable for the preparation of sialic acid and its derivatives.

Keywords: *Bifidobacterium longum*; sialidase; enzymatic properties; sialic acid

唾液酸是一种带负电的功能性单体, 其家族由 N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)、N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)、去氨基神经氨酸(KDN)及其衍生物等约 50 个组分组成^[1]。唾液酸广泛存在于细胞中糖蛋白、糖脂和多糖链的非还原末端, 通常以 α 2,3 或 α 2,6 糖苷键与半乳糖(Gal)、N-乙酰氨基半乳糖(GalNAc)或 N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)相连接, 也可以通过 α 2,8 或 α 2,9 糖苷键与唾液酸连接形成多聚唾液酸^[2]。研究表明, 唾液酸可以提高婴儿的记忆能力及促进骨骼的生长、维生素和矿物质的吸收、大脑的发育^[3]。多聚唾液酸作为新一代线性聚合物, 由于无毒、

可生物降解和免疫惰性而引起了人们的广泛关注, 研究发现其可以参与脑神经元细胞的发生、分化和发育^[4]。目前, 唾液酸、寡聚唾液酸和多聚唾液酸作为新型生物材料和食品原料广泛应用于医药和食品工业等^[5]。唾液酸在 2017 年被欧盟和中国食品药品监督管理局批准为新食品原料^[6]。从自然资源中分离唾液酸所需材料及过程复杂, 回收率低; 化学合成唾液酸需要烦琐的保护和去保护机制, 效率低, 不适合规模化生产; 而酶法制备唾液酸具有成本低、过程简单、产物纯度高^[6]等优点。

唾液酸苷酶(EC 3.2.1.18), 即神经氨酸酶,

可以特异性水解糖蛋白、糖脂和多糖末端以 α 2,3、 α 2,6 或 α 2,8 糖苷键连接的唾液酸残基^[1],广泛分布于细菌、病毒、真菌和动物中,但并未在植物中发现。根据氨基酸序列的同源性(<http://www.cazy.org/>),唾液酸苷酶主要分为糖苷水解酶(GH) 33、34 和 83 家族。GH33 家族唾液酸苷酶多数为细菌来源, GH34 和 83 家族的唾液酸苷酶均为病毒来源。细菌来源的唾液酸苷酶研究比较广泛,目前已发现 70 多种细菌唾液酸苷酶,其中多数来源于致病菌或共生菌^[7],如白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)^[8]、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)^[9]、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)^[10]、两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)^[11]和多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)^[12]等。目前约有 20 种微生物唾液酸苷酶的酶学性质被报道,多数细菌来源的唾液酸苷酶的最适 pH 为弱酸性(pH 5.0–7.0)^[9],最适温度较低(一般低于 40 °C),比酶活一般低于 1 000 U/mg^[7]。细菌唾液酸苷酶底物特异性广泛,可以水解 α 2,3、 α 2,6 和 α 2,8 糖苷键^[9]。由于野生型菌株产酶水平低,难以实现酶的大规模应用,采用异源表达手段提高产酶水平已成为酶研究的重点。Roggentin 等^[13]首次从产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)中成功克隆了唾液酸苷酶基因,为唾液酸苷酶的表达奠定了基础。近年来,研究者们已克隆了许多微生物唾液酸苷酶基因并在不同宿主中表达,但目前仅有锥虫属和病毒来源的唾液酸苷酶基因在毕赤酵母中表达^[14–16]。绿色小单孢菌(*Micromonospora viridifaciens*)^[17]来源的唾液酸苷酶在枯草芽孢杆菌中表达。大肠杆菌具有遗传清晰、成本低、繁殖快及表达量高等优点,是唾液酸苷酶最常用的异源表达宿主。肺炎链球菌^[9]、脆弱拟杆菌^[10]和双歧杆菌^[11]等来源的唾液酸苷酶已成功在大肠杆菌中表达。Wang

等^[18]将干酪短杆菌(*Brevibacterium casei*)来源的唾液酸苷酶在大肠杆菌中表达,比酶活达 520 000 U/mg。

长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)是肠道特有益生菌,主要通过消化唾液酸化或岩藻糖基化母乳低聚糖从而在母乳喂养婴儿的肠道中增殖^[19],具有调节人体肠道、改善健康的功效。目前关于长双歧杆菌唾液酸苷酶的研究报道较少。婴儿肠道内长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*) ATCC 15697 的基因组中含有编码唾液酸苷酶的基因(*blon_0646* 和 *blon_2348*)^[20]。Sela 等^[21]将 2 个基因在大肠杆菌中异源表达,发现长双歧杆菌 ATCC 15697 利用产生的唾液酸苷酶 NanH1 和 NanH2 来降解母乳低聚糖,从而促进自身的生长繁殖,2 种酶在酸性条件下具有较高的酶活(pH 4.5–6.0)且能水解 α 2,3 和 α 2,6 糖苷键。本文将长双歧杆菌来源的 α -唾液酸苷酶基因(*blsia42*)在大肠杆菌中表达并深入研究重组酶的酶学性质,以期为唾液酸及其衍生物的制备奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

载体 pET-28a(+), Invitrogen 生命技术公司;大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)感受态细胞,北京博迈德生物技术有限公司; TransStart *Fast Pfu* DNA Polymerase, 北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶, New England Biolabs 公司; AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒, 爱思进生物技术(杭州)有限公司; 4-甲基伞形酮-N-乙酰氨基- α -神经氨酸钠盐(4MU-Neu5Ac)、3'-唾液酸乳糖(Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc)和 6'-唾液酸乳糖(Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4Glc), 卡博森斯化学科技(苏州)有限公司; 多聚唾液酸和 4-甲基伞形酮(4MU), Sigma

公司; 其他试剂若无特殊说明均为分析纯。

PCR MyCycler 自动扩增仪, Bio-Rad 公司; ÄKTA 蛋白纯化系统和亲和层析柱(Ni-NTA), GE Healthcare 公司; 荧光分光光度计, 上海棱光技术有限公司; 高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC), Agilent 公司。

1.2 α -唾液酸苷酶 *blsia42* 基因的表达

唾液酸苷酶基因(*blsia42*)从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)上获得, 由南京金斯瑞生物科技公司合成。用 DNAMAN 软件对理论分子质量和等电点进行预测。在 NCBI 上进行 DNA 和蛋白质序列比对的 BLAST 分析。

以合成基因 pUC 质粒为模板进行目的基因扩增。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 90 s, 34 次循环; 72 °C 10 min。将胶回收的 PCR 产物和质粒 pET-28a(+)用相同的限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 于 37 °C 酶切处理 3 h, 纯化后的 PCR 产物与质粒用 T4 DNA 连接酶于 20 °C 连接过夜, 连接产物转化至 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞中, 37 °C 培养过夜, 挑菌验证并测序。将测序正确的阳性转化子提取质粒, 然后转化至 *E. coli* BL21(DE3), 挑取单菌落验证目的蛋白的表达情况。将单菌落接种至 15 mL LB 培养基(含 50 μ g/mL 卡那霉素)中, 37 °C、200 r/min 培养过夜, 种子液按 2% (体积分数)的接种量接种至 300 mL LB 培养基(含 50 μ g/mL 卡那霉素)中, 当培养液的光密度 (OD_{600})达到 0.6–0.8 后, 加入 1‰的 IPTG, 16 °C 下诱导 10 h。菌液于 10 000 r/min 离心 3 min 收集细胞, 用缓冲液 A (pH 8.0 的 20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑)将其重悬, 超声破碎细胞(功率 270 W, 工作时间 15 min, 工作 3 s, 停 4 s), 10 000 r/min 离心 10 min 去除细胞碎片, 收集上清液作为粗酶液。

1.3 BISia42 的纯化

利用 ÄKTA 蛋白纯化仪进行粗酶液的纯化。粗酶液以 0.5 mL/min 的速度上样到预先用缓冲液 A (pH 8.0 的 20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑)平衡的 Ni-NTA 柱上。用 5 倍柱体积的缓冲液 A 洗涤杂质后, 结合蛋白用缓冲液 A 和缓冲液 B (pH 8.0 的 20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑)以 1.0 mL/min 的流速线性洗脱。收集具有 α -唾液酸苷酶活性的组分, 并通过 SDS-PAGE 检验纯度。

1.4 α -唾液酸苷酶酶活和蛋白浓度测定

α -唾液酸苷酶的酶活以 4MU-Neu5Ac 为底物测定, 参照 Guo 等^[10]的方法。在 2.0 mL 离心管中加入 10 μ L 4MU-Neu5Ac 底物(1 mmol/L)、80 μ L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(50 mmol/L, pH 6.0)和 10 μ L 稀释到 1 mg/L 的酶液。50 °C 水浴反应 10 min, 添加 1.9 mL 含有 85 mmol/L 甘氨酸和 200 mmol/L 碳酸钠的缓冲液(pH 10.4)终止反应, 在激发波长 365 nm、发射波长 445 nm 处检测 4MU 的荧光强度, 以煮沸的样品作为对照。在上述反应条件下每分钟水解底物释放 1 μ mol 4MU 所需要的酶量定义为 1 个酶活单位(U)。

蛋白含量的测定参照 Lowry 法进行测定^[22], 以牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)作为标准蛋白。

1.5 BISia42 分子量的测定

BISia42 的分子量采用 SDS-PAGE 法和 Sephacryl S-100 HR 凝胶过滤法测定。

1.5.1 SDS-PAGE 法

采用 12.5%的分离胶进行 SDS-PAGE。分别计算溴酚蓝、标准蛋白中各条带以及纯酶的相对迁移率 R_f 值。再以相对分子质量的对数 \lg (MW)为纵坐标, 以 R_f 值为横坐标作图, 根

据目的蛋白的相对迁移率计算目的蛋白的相对分子质量。

1.5.2 Sephacryl S-100 HR 凝胶过滤法

将 0.5 mL 目的蛋白和标准蛋白(2 mg/mL) 分别以 0.3 mL/min 的流速上样到预先用 pH 8.0 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液平衡的 Sephacryl S-100 HR 凝胶柱上。用含 150 mmol/L NaCl 的 20 mmol/L PB 缓冲溶液(pH 7.0)以 0.3 mL/min 的流速洗脱,收集洗脱液并于 280 nm 波长下测定吸光值。计算目的蛋白及各标准蛋白洗脱体积 V_e , 然后以 V_e 为横坐标,以标准蛋白的相对分子质量的对数 $\lg(MW)$ 为纵坐标,计算出线性方程,根据目的蛋白的洗脱体积求出其相对分子质量。标准蛋白为牛血清蛋白(66.2 kDa)、卵清蛋白(44.3 kDa)、细胞色素(12.4 kDa)、磷酸酶 b (97.2 kDa)和 α -胰凝乳蛋白酶原 A (25.7 kDa)。

1.6 BISia42 酶学性质的测定

1.6.1 最适 pH 的测定

使用 pH 3.0–10.5 范围内的不同 pH 值的缓冲液体系(50 mmol/L)稀释唾液酸苷酶 BISia42, 不同缓冲液包括柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 3.0–6.0)、乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 4.0–6.0)、磷酸盐缓冲液(pH 6.0–8.0)、Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0–9.0)和甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 8.5–10.5)。在 35 °C 测定酶活,以最大酶活为 100%, 分别计算各 pH 条件下的相对酶活。

1.6.2 pH 稳定性的测定

分别用上述不同 pH 值的反应体系适当稀释纯酶液,在 35 °C 水浴锅中孵育 30 min,冰水浴中冷却 30 min,按照标准方法测定酶活。以未经处理的酶液作为对照,分别计算各 pH 处理后的残余酶活。以最大酶活为 100%, 分别计算各 pH 下的相对酶活。

1.6.3 最适温度的测定

用 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH

6.0)适当稀释 BISia42,在 20–60 °C 范围内测定酶活。以最大酶活为 100%, 分别计算各温度下的相对酶活。

1.6.4 温度稳定性的测定

用 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)适当稀释 BISia42,在不同温度(20–55 °C)的水浴锅中孵育 30 min,冰水浴中冷却 30 min,按照标准方法测定酶活。以未经处理的酶液作为对照,分别计算各温度下的残余酶活。以最大酶活为 100%, 分别计算各温度下的相对酶活。

1.6.5 金属离子及化合物对 BISia42 酶活力的影响

用 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)稀释 BISia42 后,加入终浓度为 1 mmol/L 的各种金属离子和化合物,在 35 °C 水浴锅中孵育 30 min,冰水浴中冷却 30 min,按照标准方法测定酶活。以未经处理的酶液作为对照,分别计算各金属离子和化合物处理后的残余酶活。以最大酶活为 100%, 分别计算各自的相对酶活。

1.6.6 BISia42 底物特异性的测定

采用 3'-唾液酸乳糖、6'-唾液酸乳糖和多聚唾液酸测定 BISia42 的底物特异性。用 50 mmol/L pH 6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液分别配制底物浓度为 1 mmol/L 的 3'-唾液酸乳糖、6'-唾液酸乳糖和 5 mg/mL 的多聚唾液酸。反应体系中加入 50 μ L 底物和 1 mg/mL 的酶液,50 °C 水浴反应 1 h,100 °C 煮沸 5 min 使酶灭活。用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法检测释放的唾液酸^[23]:灭酶后的反应体系中加入 125 μ L 高碘酸-硫酸混合液(25 mmol/L H_5IO_6 , 0.125 mol/L H_2SO_4)于 37 °C 水浴反应 30 min,加入 250 μ L 亚砷酸钠-盐酸混合液(2% $NaAsO_2$, 0.5 mol/L HCl)至释放出碘的黄色消失;再加入 1 mL

0.1 mol/L 2-硫代巴比妥酸(pH 9.0)于 100 °C 煮沸 10 min, 冷却至室温后, 测定 549 nm 处的吸光值并计算释放的唾液酸的量。

1.6.7 动力学参数的测定

用 50 mmol/L pH 6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液分别配制底物浓度为 4.0–16.0 mmol/L 的 4MU-Neu5Ac, 按照标准方法于 50 °C 反应 5 min 后测定其酶活力, 通过 GraFit 软件计算出米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 。

1.7 BISia42 水解特性

用 50 mmol/L pH 6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制 1% (质量体积分数) 的多聚唾液酸, 加入 1 mg/mL 的酶液, 50 °C 水解 36 h, 定时取样并煮沸 5 min 对酶进行灭活。样品经 10 000 r/min 离心 10 min 后取上清液进行薄层层析(thin-layer chromatography, TLC)分析和定量分析(硫代巴比妥酸法)^[23], TLC 展层剂为正丁醇:乙酸:水(体积比为 2:1:1), 显色剂为二苯胺-苯胺-磷酸试剂, 90 °C 显色 3 min。

1.8 数据处理

采用 Origin 8.5 进行数据统计和图片处理, 数据均为 3 次平行。

2 结果与分析

2.1 长双歧杆菌唾液酸苷酶基因(*blsia42*)的克隆与表达

长双歧杆菌来源的唾液酸苷酶基因(*blsia42*)全长 1 185 bp, 编码 394 个氨基酸, 不含有 N 端信号肽序列。经 DNAMAN 软件预测该蛋白的分子质量(MW)和等电点(pI)分别为 42 kDa 和 4.71。BLAST 序列分析表明(图 1), BISia42 与两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)唾液酸苷酶(PVV37185.1)的相似性最高为 63%^[24]; 与两歧双歧杆菌 BGN4 (AFL05382.1)^[25]

和 LMG 13195 (BBA47922.1)^[26]唾液酸苷酶的相似性为 62%; 与库姆异翅虫(*Isoptericola cucumis*)的唾液酸苷酶(GGI04540.1)的相似性为 59%^[27]。*blsia42* 经 *EcoR* I 及 *Not* I 双酶切, 与相同酶切的 pET-28a 载体连接后构建重组表达质粒(*blsia42*-pET-28a), 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达。

2.2 BISia42 的纯化及分子量

唾液酸苷酶基因(*blsia42*)成功在大肠杆菌中可溶性表达, 粗酶液通过 Ni-NTA 亲和层析一步纯化得到电泳级纯酶(图 2), 纯化后酶的比酶活由 141 421.5 U/mg 提高至 164 935.2 U/mg, 纯化倍数为 1.2 倍, 回收率为 41%。SDS-PAGE 法测定纯酶的分子量为 42.8 kDa (图 3A), 凝胶过滤法测定其分子量为 41.5 kDa (图 3B), 表明该酶为单亚基蛋白。

2.3 BISia42 的酶学性质

BISia42 的最适 pH 值为 6.0, 在 pH 4.5–7.5 之间的酶活力能保持 50%以上(图 4A)。在 pH 3.5–9.0 范围内处理 30 min 后保留 80%以上的酶活力(图 4B)。该酶的最适温度为 50 °C, 在 30–50 °C 之间 BISia42 的酶活力在 50%以上(图 4C)。该酶在 45 °C 以下处理 30 min 后能保持 80%以上的残余酶活力(图 4D)。金属离子及化合物对 BISia42 酶活力的影响如表 1 所示, 多数金属离子对 BISia42 都有一定程度的抑制作用, Cu^{2+} 和 SDS 对该酶酶活力抑制作用强, 酶活力分别降低了 58.59%和 46.75%。BISia42 经 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Na^{+} 、 Cr^{2+} 和 Zn^{2+} 处理后的残余酶活力分别为 60.94%、67.45%、73.96%、60.94% 和 73.96%, Ca^{2+} 对 BISia42 有一定的激活作用, 酶活力提高了 13%, 其他金属离子和化合物对 BISia42 无显著影响。

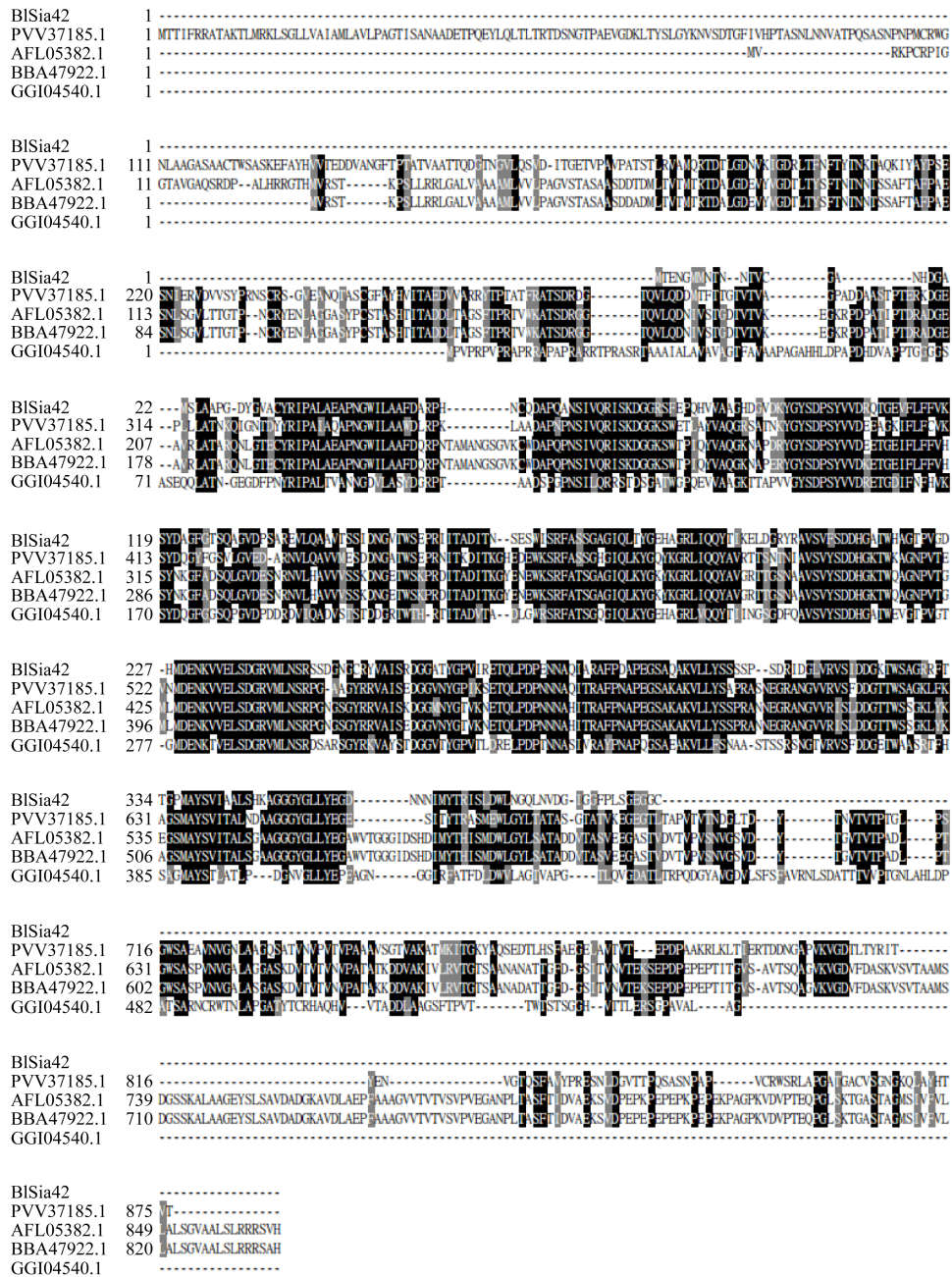


图 1 长双歧杆菌唾液酸苷酶 BISia42 与其他唾液酸苷酶的多重序列比对 图左边的数字是每行第一个氨基酸残基的序号。黑色阴影为相同残基，灰色阴影为保守残基。多重序列比对的序列为：BISia42 及两歧双歧杆菌(PVV37185.1)、两歧双歧杆菌 BGN4 (AFL05382.1)、两歧双歧杆菌 LMG 13195 (BBA47922.1) 和库姆异翅虫(GGI04540.1)来源的唾液酸苷酶的氨基酸序列

Figure 1 Multiple sequence alignment of BISia42 with other sialidases. The numbers on the left are the residue numbers of the first amino acid in each line. Identical residues are shaded in black, and conserved residues are shaded in gray. The sequences of multiple sequence alignment are as follows: the amino acid sequence of BISia42 and sialidase from *Bifidobacterium bifidum* (PVV37185.1), *Bifidobacterium bifidum* BGN4 (AFL05382.1), *Bifidobacterium bifidum* LMG 13195 (BBA47922.1) and *Isoptericola cucumis* (GGI04540.1).

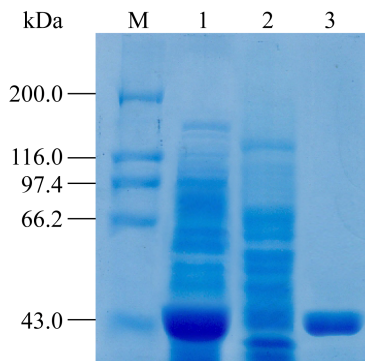


图 2 唾液酸苷酶(B1Sia42)电泳图 M: 高分子量标准蛋白; 1: 上清液; 2: 沉淀; 3: 纯酶液
Figure 2 SDS-PAGE analysis of sialidase B1Sia42. M: High Molecular Weight Standard Protein; 1: Supernatant; 2: Precipitation; 3: Purified B1Sia42.

B1Sia42 水解 3'-唾液酸乳糖、6'-唾液酸乳糖和多聚唾液酸的底物特异性如表 2 所示, 可以看出 B1Sia42 底物特异性广泛, 对以 α -2,3、 α -2,6 和 α -2,8 糖苷键连接的唾液酸残基均显示出水解活性; B1Sia42 对 6'-唾液酸乳糖的水解

活性最高(100%), 对 3'-唾液酸乳糖和多聚唾液酸的水解活性分别为 6'-唾液酸乳糖水解活性的 87.50%和 67.19%。B1Sia42 水解多聚唾液酸的水解特性如图 5 所示。TLC 分析表明, 水解初期(0-4 h)唾液酸的浓度迅速增加, 随着水解时间的延长(4-12 h)唾液酸的浓度持续增加, 水解至 12 h 时唾液酸的浓度达到最高。硫代巴比妥酸法测定唾液酸的浓度为 2.4 g/L, 水解率为 23.6% (图 6), 此时水解反应达到平衡。B1Sia42 对 4MU-Neu5Ac 的 K_m 和 V_{max} 值分别为 8.24 mmol/L 和 1 702 655 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。

3 讨论

唾液酸苷酶是一类存在于多种微生物及高等动物体内的糖苷水解酶, 可以水解糖复合物末端的唾液酸残基, 水解多聚唾液酸产生的唾液酸及其衍生物作为新型生物材料, 可以用来治疗多种疾病并且广泛应用于食品等行业, 受

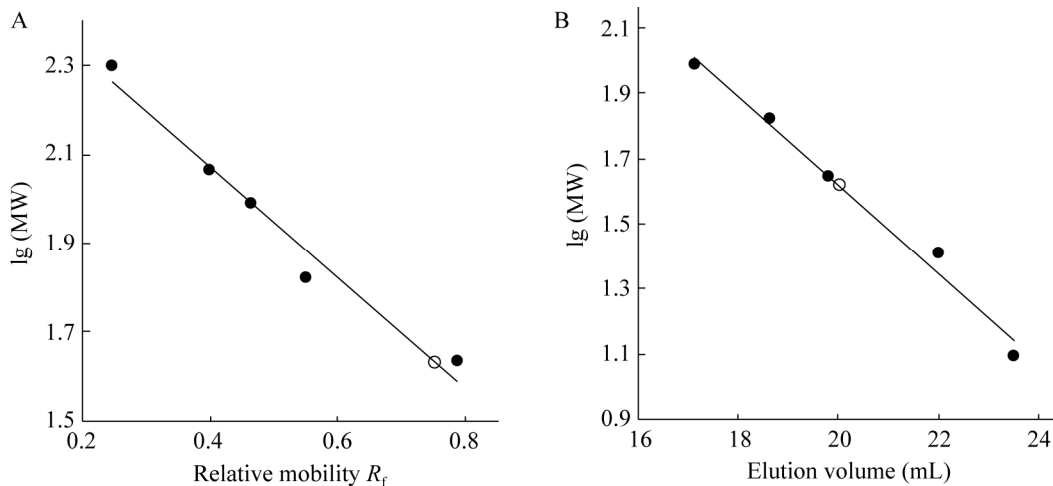


图 3 SDS-PAGE 法(A)及 S-100 凝胶过滤法(B)测定 B1Sia42 的分子量 ●: 标准蛋白; ○: 重组唾液酸苷酶 B1Sia42; A: $y=-1.246 4x+2.570 1$, $R^2=0.977 6$; B: $y=-0.135 6x+4.330 3$, $R^2=0.985 4$
Figure 3 Molecular mass determination of B1Sia42 by SDS-PAGE method (A) and S-100 gel filtration chromatography method (B). ●: Standard protein; ○: Recombinant sialidase B1Sia42; A: $y=-1.246 4x+2.570 1$, $R^2=0.977 6$; B: $y=-0.135 6x+4.330 3$, $R^2=0.985 4$.

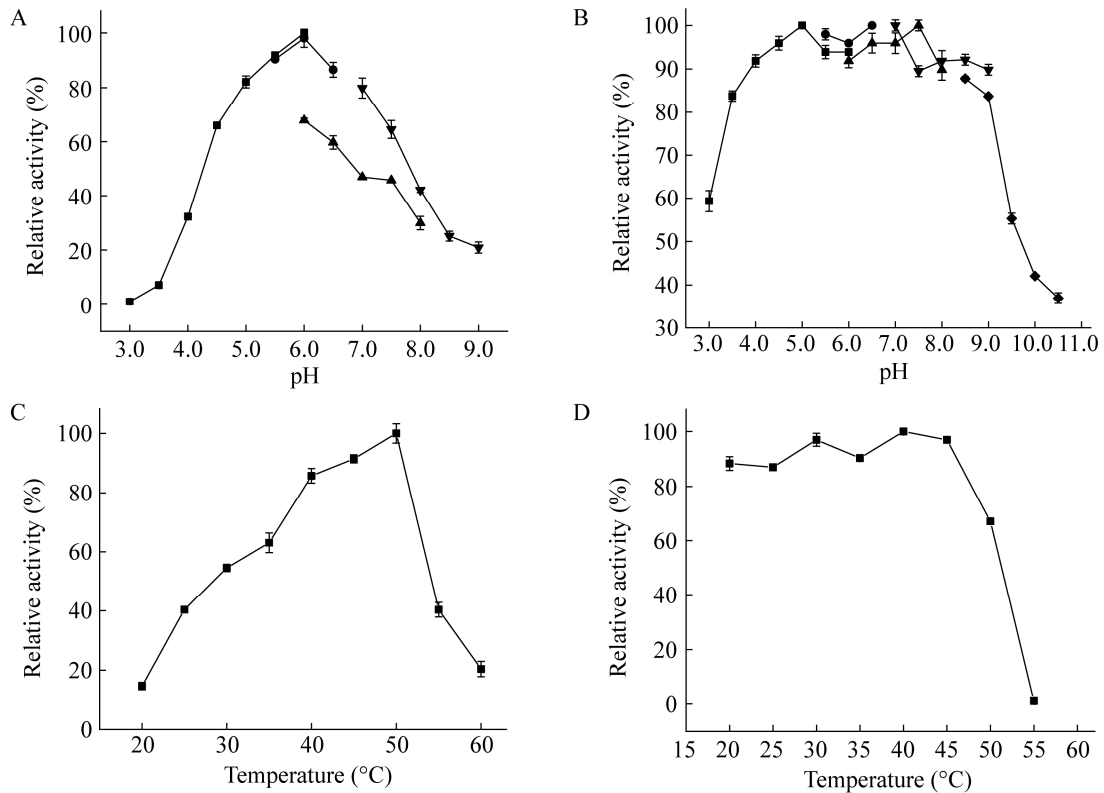


图4 唾液酸苷酶 BISia42 的最适 pH (A)、pH 稳定性(B)、最适温度(C)和温度稳定性(D) ■: 柠檬酸缓冲液; ●: MES 缓冲液; ▲: 磷酸盐缓冲液; ▼: Tris-HCl 缓冲液; ◆: 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液

Figure 4 Optimal pH (A), pH stability (B), optimal temperature (C) and thermostability (D) of the sialidase BISia42. ■: Citrate; ●: MES; ▲: PB; ▼: Tris-HCl; ◆: Gly-NaOH.

表1 金属离子及化合物对重组唾液酸苷酶 BISia42 酶活力的影响

Table 1 Effect of metal ions and chemical reagents on the enzyme activity of BISia42

试剂 Reagent (1 mmol/L)	相对酶活力 Relativity activity (%)
Control	100.00
Ni ²⁺	80.47
Mg ²⁺	60.94
Mn ²⁺	85.80
Ba ²⁺	67.45
Na ⁺	73.96
Cu ²⁺	41.41
Cr ²⁺	60.94
Zn ²⁺	73.96
Co ²⁺	95.57
K ⁺	86.98
Ca ²⁺	113.02
SDS	53.25
EDTA	92.31

到了广泛关注^[4]。发掘酶学性质优良且可以降解多聚唾液酸的唾液酸苷酶至关重要。本文研究了长双歧杆菌唾液酸苷酶(BISia42)的基因克隆表达、酶学性质及水解特性。

从长双歧杆菌中获得一个唾液酸苷酶基因(*bsia42*)并在大肠杆菌中成功可溶性表达。唾液酸苷酶 BISia42 经亲和层析纯化得到电泳级纯酶,其比酶活为 164 935.2 U/mg,远高于其他微生物来源的唾液酸苷酶,如烟草节杆菌(*Arthrobacter nicotianae*)的 1 250 U/mg^[28]和噬菌体 63D (*Bacteriophage 63D*)的 5 583.3 U/mg^[29],但低于干酪短杆菌来源的唾液酸苷酶(520 000 U/mg)^[18]。目前已报道的细菌唾液酸苷酶多数为单亚基蛋白,分子量在 40–150 kDa

表2 重组 BISia42 对3种唾液化底物的水解活性
Table 2 Hydrolysis activity of recombinant BISia42 towards three sialylated substrates

底物 Substrate	结构 Structure	相对活性 Relative activity ^a (%)
3'-唾液酸乳糖 3'-sialyllactose	Neu5Aca2,3Gal β 1,4Glc	87.50
6'-唾液酸乳糖 6'-sialyllactose	Neu5Aca2,6Gal β 1,4Glc	100.00
多聚唾液酸 Colominic acid	(Neu5Aca2,8) ₉ Neu5Ac ^b	67.19

注: ^a: 以 BISia42 对 3'-唾液酸乳糖的水解活性为 100%;
^b: 聚合度的平均值

Note: ^a: The hydrolytic activity of BISia42 on 3'-SL was defined as 100%; ^b: Mean value of aggregation.

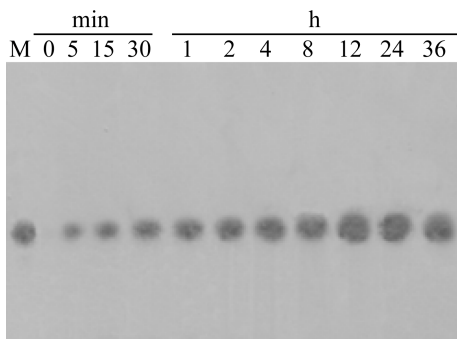


图5 BISia42 水解多聚唾液酸的 TLC M: 唾液酸; 0-36: 反应分别进行至 0-36 h

Figure 5 TLC analysis of products from colominic acid hydrolysed by BISia42. M: Sialic acid; 0-36: The reactions were carried out to 0-36 h respectively.

之间。SDS-PAGE 法和凝胶过滤法测得 BISia42 的分子量分别为 42.8 kDa 和 41.5 kDa (图 3), 与产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) A99 (43 kDa)^[30]和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) (42 kDa)^[31]来源的唾液酸苷酶的分子量接近, 同属于低分子量唾液酸苷酶, 低于多数细菌唾液酸苷酶, 如来源于产气荚膜梭菌(77 kDa)^[32]和脆弱拟杆菌(113.6 kDa)^[10]的唾液酸苷酶。目前大多数唾液酸苷酶的最

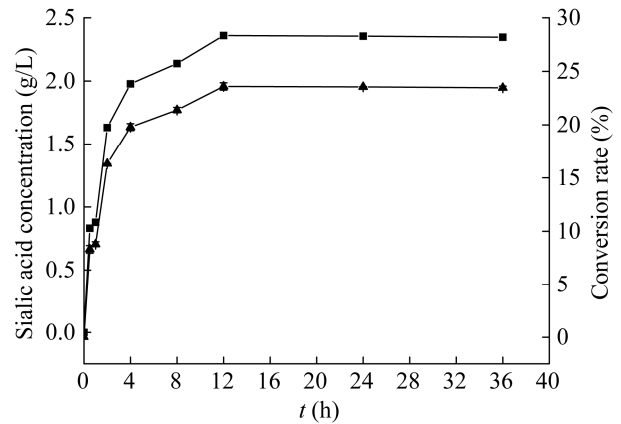


图6 唾液酸苷酶 BISia42 水解多聚唾液酸的时间进程曲线 ■: 唾液酸浓度; ▲: 底物转化率
Figure 6 Effect of time on colominic acid hydrolyzed by BISia42. ■: Sialic acid concentration; ▲: Substrate conversion rate.

适 pH 在酸性范围内, BISia42 的最适 pH (pH 6.0) 与多数唾液酸苷酶相近(图 4A), 高于产气荚膜梭菌(pH 5.5)^[32]和肺炎链球菌 TIGR4 (pH 4.5)^[9]来源的唾液酸苷酶, 而白喉棒状杆菌(pH 7.5)^[8]和荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) JK-0412 (pH 8.0)^[5]来源的唾液酸苷酶在弱碱性下具有最高的催化活性。BISia42 在 pH 3.5-9.0 范围内处理 30 min 酶活力残留 80%以上, 在 pH 9.5 时残余酶活力仍在 50%以上, pH 稳定性好(图 4B), 优于烟草节杆菌(pH 3.5-6.0)^[28]和脆弱拟杆菌 NCTC9343 (pH 4.5-7.5)^[10]的唾液酸苷酶, 良好的 pH 稳定性有利于 BISia42 工业化应用。BISia42 的最适温度为 50 °C (图 4C), 在 45 °C 以下保持稳定(图 4D), BISia42 比大部分已报道的唾液酸苷酶的最适温度(37 °C 左右)高, 如拟杆菌(40 °C)^[12]和干酪短杆菌(37 °C)^[18]来源的唾液酸苷酶, 但是稍低于来源于产气荚膜梭菌产生的 2 种同工酶(DSM: 51 °C, A99: 55 °C)^[33]的最适温度。多数唾液酸苷酶在中温下稳定, 如干酪短杆菌(40 °C 以下)^[18]唾液酸苷

酶, 而两歧双歧杆菌 JCM1254^[19]唾液酸苷酶的温度稳定性较好, 在 80 °C 以下保持稳定。Ca²⁺对 BISia42 有一定的激活作用, 酶活力提高了 13%, 而 Cu²⁺对该酶的抑制作用最强(表 2), BISia42 经 EDTA 处理后的酶活力无显著变化, 表明该酶不具有金属离子依赖性。

大多数细菌唾液酸苷酶对唾液酸的水解键型是非特异性的, 但不同来源的唾液酸苷酶对于键型的偏好性也不同^[7], 如脆弱拟杆菌唾液酸苷酶 RNanH1 对 α 2,8 糖苷键的水解活性几乎是 α 2,3 和 α 2,6 糖苷键的 2 倍^[34]。两歧双歧杆菌 JCM1254^[19]唾液酸苷酶对 α 2,3 糖苷键的水解活性远高于 α 2,6 和 α 2,8 糖苷键, 而微小单孢菌 (*Micromonospora viridifaciens*)^[35]的唾液酸苷酶对 α 2,6 糖苷键的水解活性高于 α 2,8 和 α 2,3 糖苷键。少数唾液酸苷酶对唾液酸的水解键型具有特异性。如肺炎链球菌 G5^[36]唾液酸苷酶对 α 2,3 糖苷键具有特异性, 不能水解 α 2,6 和 α 2,8 糖苷键, 而 BISia42 底物特异性广泛, 对 α 2,3、 α 2,6 和 α 2,8 糖苷键均有水解能力, 对 3'-唾液酸乳糖和多聚唾液酸的水解活性分别为 6'-唾液酸乳糖水解活性的 87.50%和 67.19% (表 3)。BISia42 对 4MU-Neu5Ac 的 K_m 和 V_{max} 值分别为 8.24 mmol/L 和 1 702 655 μ mol/(min·mg), K_m 值与白喉棒状杆菌来源的唾液酸苷酶(7.9 mmol/L)^[37]相近, 高于大部分已报道唾液酸苷酶的 K_m , 如脆弱拟杆菌 NCTC9343 (0.06 mmol/L)^[10]和多形拟杆菌 (0.16 mmol/L)^[12]来源的唾液酸苷酶。BISia42 水解 10 g/L 的多聚唾液酸 12 h 后唾液酸浓度为 2.4 g/L、水解率为 23.6% (图 6), 处于较高水平。鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium*) 来源的唾液酸苷酶 30 °C 水解 0.1 g/L 多聚唾液酸的水解率为 10%^[3], 唾液酸浓度为 0.01 g/L。链球菌属 (*Streptococcus*) 来源的唾液酸苷酶水解 10 g/L 多聚唾液酸的水解率仅为 3.25%^[38]。本文的

BISia42 水解相同浓度多聚唾液酸的水解率为 23.6%。BISia42 广泛的底物特异性及优良的水解特性使其在唾液酸的制备上具有潜在应用。

4 结论

本文实现了长双歧杆菌唾液酸苷酶基因 (*blsia42*) 在大肠杆菌中的可溶性表达。重组唾液酸苷酶(BISia42)比酶活为 164 935.2 U/mg, 最适 pH 值和最适温度分别为 6.0 和 50 °C, 在 pH 3.5–9.0 和 45 °C 以下保持稳定, 该酶可以水解 α 2,3、 α 2,6 和 α 2,8 糖苷键, BISia42 对多聚唾液酸的水解率高于已报道的唾液酸苷酶。因此, 该酶良好的酶学特性使其在医药和食品工业中具有潜在的应用价值。

REFERENCES

- [1] Juge N, Tailford L, Owen CD. Sialidases from gut bacteria: a mini-review[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2016, 44(1): 166-175
- [2] 郭龙成, 马忠轩, 卢丽丽, 肖敏. 唾液酸苷酶的催化机理及水解与合成寡糖进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2019, 46(2): 181-192
Guo LC, Ma ZX, Lu LL, Xiao M. Progress in catalytic mechanism of sialidases and their functions in oligosaccharide hydrolysis and synthesis[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2019, 46(2): 181-192 (in Chinese)
- [3] Iwaki Y, Matsunaga E, Takegawa K, Sato C, Kitajima K. Identification and characterization of a novel, versatile sialidase from a *Sphingobacterium* that can hydrolyze the glycosides of any sialic acid species at neutral pH[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 523(2): 487-492
- [4] Gregoriadis G, Jain S, Papaioannou I, Laing P. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: a role for polysialic acids[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 300(1-2): 125-130
- [5] Park JK, Choi DJ, Kim SM, Choi HN, Park JW, Jang SJ, Choo YK, Lee CG, Park YI. Purification and characterization of a polysialic acid-specific sialidase from *Pseudomonas fluorescens* JK-0412[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012, 17(3):

- 526-537
- [6] Yang HQ, Lu LP, Chen XZ. An overview and future prospects of sialic acids[J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 46: 107678
- [7] Kim S, Oh DB, Kang HA, Kwon O. Features and applications of bacterial sialidases[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(1): 1-15
- [8] Kim S, Oh DB, Kwon O, Kang HA. Construction of an *in vitro* trans-sialylation system: surface display of *Corynebacterium diphtheriae* sialidase on *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(4): 893-903
- [9] Gut H, King SJ, Walsh MA. Structural and functional studies of *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase B: an intramolecular trans-sialidase[J]. *FEBS Letters*, 2008, 582(23-24): 3348-3352
- [10] Guo LC, Chen XD, Xu L, Xiao M, Lu LL. Enzymatic synthesis of 6'-sialyllactose, a dominant sialylated human milk oligosaccharide, by a novel exo- α -sialidase from *Bacteroides fragilis* NCTC9343[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018. DOI: 10.1128/AEM.00071-18
- [11] Ashida H, Tanigawa K, Kiyohara M, Katoh T, Katayama T, Yamamoto K. Bifunctional properties and characterization of a novel sialidase with esterase activity from *Bifidobacterium bifidum*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2018, 82(11): 2030-2039
- [12] Park KH, Kim MG, Ahn HJ, Lee DH, Kim JH, Kim YW, Woo EJ. Structural and biochemical characterization of the broad substrate specificity of *Bacteroides thetaiotaomicron* commensal sialidase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2013, 1834(8): 1510-1519
- [13] Roggentin P, Rothe B, Lottspeich F, Schauer R. Cloning and sequencing of a *Clostridium perfringens* sialidase gene[J]. *FEBS Letters*, 1988, 238(1): 31-34
- [14] Fontanella GH, De Vusser K, Laroy W, Daurelio L, Nocito AL, Revelli S, Contreras R. Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly protects mice from experimental *Trypanosoma cruzi* infection: a vaccine candidate[J]. *Vaccine*, 2008, 26(19): 2322-2334
- [15] Li HY, Rasmussen MI, Larsen MR, Guo Y, Jers C, Palmisano G, Mikkelsen JD, Kirpekar F. Automated N-glycan profiling of a mutant *Trypanosoma rangeli* sialidase expressed in *Pichia pastoris*, using tandem mass spectrometry and bioinformatics[J]. *Glycobiology*, 2015, 25(12): 1350-1361
- [16] Subathra M, Santhakumar P, Narasu ML, Beevi SS, Lal SK. Evaluation of antibody response in mice against avian influenza A (H5N1) strain neuraminidase expressed in yeast *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Biosciences*, 2014, 39(3): 443-451
- [17] Jers C, Guo Y, Kepp KP, Mikkelsen JD. Mutants of *Micromonospora viridifaciens* sialidase have highly variable activities on natural and non-natural substrates[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2015, 28(2): 37-44
- [18] Wang XD, Long H, Shen DH, Liu L. Cloning, expression, and characterization of a novel sialidase from *Brevibacterium casei*[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2017, 64(2): 195-200
- [19] Kiyohara M, Tanigawa K, Chaiwangsri T, Katayama T, Ashida H, Yamamoto K. An exo- α -sialidase from bifidobacteria involved in the degradation of sialyloligosaccharides in human milk and intestinal glycoconjugates[J]. *Glycobiology*, 2011, 21(4): 437-447
- [20] Sela DA, Chapman J, Adeuya A, Kim JH, Chen F, Whitehead TR, Lapidus A, Rokhsar DS, Lebrilla CB, German JB, et al. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome[J]. *PNAS*, 2008, 105(48): 18964-18969
- [21] Sela DA, Li YH, Lerno L, Wu S, Marcobal AM, German JB, Chen X, Lebrilla CB, Mills DA. An infant-associated bacterial commensal utilizes breast milk sialyloligosaccharides[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(14): 11909-11918
- [22] Lowry O, Rosebrough N, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265-275
- [23] Cassidy JT, Jourdian GW, Roseman S. Sialic acid. VI. Purification and properties of sialidase from *Clostridium perfringens*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1965, 240(9): 3501-3506
- [24] Barnaba TJ, Gangiredla J, Mammel MK, Lacher DW, Elkins CA, Lampel KA, Whitehouse CA, Tartera C. Draft genome sequences of *Bifidobacterium* strains isolated from dietary supplements and cultured food products[J]. *Genome Announcements*, 2018. DOI: 10.1128/genomeA.00610-18
- [25] Yu DS, Jeong H, Lee DH, Kwon SK, Song JY, Kim BK, Park MS, Ji GE, Oh TK, Kim JF. Complete genome sequence of the probiotic bacterium *Bifidobacterium bifidum* strain BGN4[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(17): 4757-4758

- [26] Katoh T, Maeshibu T, Kikkawa KI, Gotoh A, Tomabechi Y, Nakamura M, Liao WH, Yamaguchi M, Ashida H, Yamamoto K, et al. Identification and characterization of a sulfoglycosidase from *Bifidobacterium bifidum* implicated in mucin glycan utilization[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2017, 81(10): 2018-2027
- [27] Wu LH, Ma JC. The Global Catalogue of Microorganisms (GCM) 10K type strain sequencing project: providing services to taxonomists for standard genome sequencing and annotation[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(4): 895-898
- [28] Abrashev I, Dulguerova G, Dolashka-Angelova P, Voelter W. Purification and characterization of a novel sialidase from a strain of *Arthrobacter nicotianae*[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2005, 137(3): 365-371
- [29] Machida Y, Hattori K, Miyake K, Kawase Y, Kawase M, Iijima S. Molecular cloning and characterization of a novel bacteriophage-associated sialidase[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 90(1): 62-68
- [30] Kruse S, Kleineidam RG, Roggentin P, Schauer R. Expression and purification of a recombinant "small" sialidase from *Clostridium perfringens* A99[J]. *Protein Expression and Purification*, 1996, 7(4): 415-422
- [31] Crennell SJ, Garman EF, Laver WG, Vimr ER, Taylor GL. Crystal structure of a bacterial sialidase (from *Salmonella typhimurium* LT2) shows the same fold as an influenza virus neuraminidase[J]. *PNAS*, 1993, 90(21): 9852-9856
- [32] Newstead SL, Potter JA, Wilson JC, Xu GG, Chien CH, Watts AG, Withers SG, Taylor GL. The structure of *Clostridium perfringens* NanI sialidase and its catalytic intermediates[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(14): 9080-9088
- [33] Roggentin P, Kleineidam RG, Schauer R. Diversity in the properties of two sialidase isoenzymes produced by *Clostridium perfringens* spp.[J]. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 1995, 376(9): 569-575
- [34] Yamamoto T, Ugai H, Nakayama-Imaohji H, Tada A, Elahi M, Houchi H, Kuwahara T. Characterization of a recombinant *Bacteroides fragilis* sialidase expressed in *Escherichia coli*[J]. *Anaerobe*, 2018, 50: 69-75
- [35] Aisaka K, Uwajima T. Production of neuraminidase by *Micromonospora viridifaciens*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1987, 44(2): 289-291
- [36] Owen CD, Lukacik P, Potter JA, Sleator O, Taylor GL, Walsh MA. *Streptococcus pneumoniae* NanC: structural insights into the specificity and mechanism of a sialidase that produces a sialidase inhibitor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(46): 27736-27748
- [37] Kim S, Oh DB, Kwon O, Kang HA. Identification and functional characterization of the NanH extracellular sialidase from *Corynebacterium diphtheriae*[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2010, 147(4): 523-533
- [38] Inouye K, Izawa S, Saito A, Tonomura B. Effects of alcohols on the hydrolysis of colominic acid catalyzed by *Streptococcus* neuraminidase[J]. *The Journal of Biochemistry*, 1995, 117(3): 629-634