

研究报告

褐藻胶裂解酶基因的克隆表达及重组酶酶学性质

韩伟 林娟* 谢勇 徐凡 叶秀云

(福建省海洋酶工程重点实验室 福州大学 福建 福州 350116)

摘要:【目的】克隆交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.) BYS-2 的褐藻胶裂解酶基因, 实现其在大肠杆菌细胞中异源表达, 对分离纯化的重组酶进行酶学性质研究。【方法】以交替假单胞菌 BYS-2 菌株基因组 DNA 为模板, 克隆得到褐藻胶裂解酶基因 *alg738*, 构建重组基因工程菌 BL21(DE3)/pET22b-*alg738*, 诱导表达, 表达产物通过 Ni-NTA 树脂纯化后进行酶学性质研究。【结果】重组酶的最适反应 pH 为 8.0, 在 pH 6.0–9.0 范围内 37 °C 保温 1 h 仍能保持 84% 以上的相对酶活力, 具有较好的 pH 稳定性; 最适反应温度为 45 °C, 热稳定性实验显示在 37 °C 下保温 60 min 其残余酶活力仍达 66.6%; 在 5 mmol/L 浓度下, Na⁺、Mg²⁺、Mn²⁺ 对该酶具有明显的促进作用, Ni²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Hg²⁺、Zn²⁺、EDTA、β-巯基乙醇、SDS 具有明显的抑制作用。动力学参数 K_m 、 V_{max} 分别为 1.11 g/L 和 0.011 g/(L·min), 底物特异性分析表明该重组酶为偏好聚甘露糖醛酸钠(Poly M)裂解作用的双功能酶。【结论】重组褐藻胶裂解酶具有良好的酶学特性, 为褐藻胶裂解酶的开发应用打下基础。

关键词: 褐藻胶裂解酶, 交替假单胞菌, 克隆表达, 重组酶, 酶学性质

Expression and characterization of a recombinant alginate lyase

HAN Wei LIN Juan* XIE Yong XU Fan YE Xiu-Yun

(Fujian Provincial Key Laboratory of Marine Enzyme Engineering, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350116, China)

Abstract: [Objective] The alginate lyase gene of *Pseudoalteromonas* sp. BYS-2 was cloned and expressed in *Escherichia coli*, and the properties of recombinase were characterized. [Methods] The alginate lyase gene *alg738* was cloned from the genomic DNA of *Pseudoalteromonas* sp. BYS-2 and the recombinant strain BL21(DE3)/pET22b-*alg738* was constructed. The recombinase was purified with Ni-NTA resin and the enzymatic properties were studied. [Results] The optimum pH of recombinase was 8.0. It was stable in the pH range of 6.0 to 9.0 and could maintain more than 84% of its relative enzyme activity after incubation at 37 °C for 1 hour. The optimum temperature of recombinase was 45 °C and 66.6% of enzyme activity was remained after incubation at 37 °C for

Foundation item: State Oceanic Administration of Marine Public Welfare Industry Research (No. 201305015); Enterprise Technology Innovation Project of Fujian Province; Fuzhou Science and Technology Project (No. 2016X0005)

*Corresponding author: E-mail: ljuan@fzu.edu.cn

Received: July 17, 2016; **Accepted:** September 22, 2016; **Published online** (www.cnki.net): September 28, 2016

基金项目: 国家海洋局海洋公益性行业科研专项项目(No. 201305015); 福建省企业技术创新项目; 福州市科技计划项目(No. 2016X0005)

*通讯作者: E-mail: ljuan@fzu.edu.cn

收稿日期: 2016-07-17; **接受日期:** 2016-09-22; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-09-28

60 minutes. At the concentration of 5 mmol/L, Na^+ , Mg^{2+} and Mn^{2+} had significant stimulation on the enzyme activity, while Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , EDTA, β -mercaptoethanol and SDS had inhibitory effects on the enzyme. The kinetic parameters K_m and V_{\max} of rAlg738 were 1.11 g/L and 0.011 g/(L·min), respectively. Moreover, this recombinase was a bifunctional enzyme which prefers sodium polymannuronate (Poly M). **[Conclusion]** The properties of the recombinase rAlg738 has laid a good foundation for its future development and application.

Keywords: Alginate lyase, *Pseudoalteromonas* sp., Cloning and expression, Recombinant enzyme, Characterization

褐藻胶(Alginate)是存在于褐藻细胞壁及细胞间质中的一种水溶性酸性多糖, 广义上褐藻胶是褐藻酸、褐藻酸盐及褐藻酸有机衍生物的统称, 市场上商品一般指的是褐藻酸钠盐。褐藻胶是世界上用途最广的三大海藻胶之一, 广泛应用于工业、农业、医药等领域^[1-5]。褐藻胶在藻体中含量丰富, 工业上应用的褐藻胶大部分来源于 3 个属: 巨藻(*Macrocystis*)、海带(*Laminaria*)和泡叶藻(*Ascophyllum*), 欧美国国家生产的褐藻胶主要源自巨藻, 我国生产的褐藻胶则主要来源于海带。褐藻胶分子由两种互为 C5 差向异构体的单体[β -D-甘露糖醛酸(M)和 α -L-古罗糖醛酸(G)]聚合而成^[6], 其组成方式有 3 种: 同聚物 G 段、同聚物 M 段和异聚物 G/M 段。同一种褐藻胶中可同时包含一种及多种结构。

由于褐藻胶凝胶性强、黏度大、不易被机体吸收等缺点, 使其在应用方面受到限制。随着海洋科学和寡糖生理活性研究的不断深入, 褐藻胶寡糖的价值逐渐被揭示。研究表明, 褐藻胶寡糖有抗肿瘤、抗凝血、抗自由基氧化、抗菌、预防龋齿、增强免疫、促进植物生长和诱导抗逆性等生物活性^[7-8]。褐藻胶裂解酶作为一种海藻工具酶^[9], 因其反应条件温和, 专一性强, 且在制备过程中不改变寡糖结构, 得到的寡糖也较酸解寡糖生物活性更强等优点, 将逐步取代传统酸碱制备方法。因此对褐藻胶裂解酶的开发引起了国内外学者的关注。

褐藻胶裂解酶来源广泛, 可从土壤微生物、海洋软体动物和微生物、海藻、海水甚至一些噬菌体、病毒中分离获得, 但主要来自海洋微生物^[10]。不同来源的褐藻胶裂解酶, 其酶学性质差异较大, 在

分子量、底物特异性、最适 pH 和温度等方面也各不相同。本文采用基因工程方法, 克隆褐藻胶裂解酶基因, 构建重组表达载体, 转化大肠杆菌进行异源表达, 并对重组酶进行分离纯化和酶学性质研究, 为褐藻胶裂解酶的开发应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 交替假单胞菌 BYS-2 菌株: 从福建南日岛鲍鱼养殖场水样中筛选获得, 宿主大肠杆菌 Top10 为本实验保存菌株; 宿主大肠杆菌 BL21(DE3) 购于北京 TransGen 公司; 质粒 pET-22b(+) 为本实验室保存质粒。

1.1.2 主要试剂和仪器: *Pfu* DNA Polymerase 购自北京 TransGen 公司; 质粒提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、蛋白 Marker 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; IPTG 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。梯度热循环 PCR 仪 Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler, 美国 Applied Biosystems 公司; 凝胶成像仪 JS-680, 上海培清科技有限公司; DYY-8C 型电泳仪、DYCP-31DY 型电泳槽, 北京六一仪器厂; YXQ-LS-100SII 型高压蒸汽灭菌锅、SW-CJ-2FI 类 B 型超净工作台, 上海博迅实业有限公司; SHP-250 型隔水式恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; 752N 型可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; CF16RX II 型高速冷冻离心机, 日本 HITACHI 公司; ZWY-2101C 型恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计与基因克隆: 引物设计: alg738-F: 5'-AACTGAATTCAGCGCATCCAAATTTGGTAATA ACC-3', alg738-R: 5'-AAGTCTCGAGCTCCTGATTATTCTTCATCGCATAAAC-3'。以交替假单胞菌 BYS-2 菌株 DNA 为模板, 50 μ L 体系扩增 alg738 基因。扩增体系: 2 \times Pfu PCR master 25 μ L, 20 pmol/L alg738-F 1.5 μ L, 20 pmol/L alg738-R 1.5 μ L, 基因组 DNA 3 μ L, ddH₂O 19 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 10 $^{\circ}$ C 保存^[11]。将扩增 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳验证, 回收目的片段。

1.2.2 表达载体构建: 将 alg738 基因和质粒 pET-22b(+)用 EcoR I 和 Xho I 双酶切, 回收的基因片段和酶切质粒用 T4 DNA 连接酶连接, 构建重组表达质粒 pET-22b-alg738, 转化至感受态细胞大肠杆菌 Top10, 挑选阳性转化子送至 Invitrogen 公司测序, 提取序列正确的重组质粒转化至感受态细胞大肠杆菌 BL21(DE3)。

1.2.3 序列分析: 采用 ExPASy 中 ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 预测褐藻胶裂解酶 alg738 基因的蛋白质分子量以及等电点等; 采用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测蛋白质信号肽以及剪切位点, 为目的蛋白表达提供一定基础条件; 利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) 在线对褐藻胶裂解酶 Alg738 进行三维建模。

1.2.4 重组酶 rAlg738 诱导表达: 将构建的大肠杆菌工程菌接种到 LB 液体培养基^[12]中(含 Amp 终浓度为 100 mg/L), 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养。菌液 OD₆₀₀ 达到 0.5–0.8 时, 加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L) 进行诱导, 以未添加 IPTG 诱导作为对照组。收集菌液, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液并测定褐藻胶裂解酶活力。

1.2.5 重组酶 rAlg738 活力检测: 采用 DNS (3,5-二硝基水杨酸)法测定还原糖含量^[13]。取 0.1 mL 酶液与 0.9 mL 的 0.3% 褐藻酸钠底物于 40 $^{\circ}$ C 水浴中反应 15 min, 加入 1 mL DNS 并煮沸 5 min 显色, 然后立即冷水冷却至室温并定容至 5 mL, 同时以

灭活酶液组作为空白对照, 在 540 nm 下测定吸光值, 根据上述葡萄糖标准曲线计算还原糖含量。

酶活力单位定义: 在该反应条件下, 每分钟催化底物产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量作为一个酶活力单位(U)。

1.2.6 重组酶 rAlg738 分离纯化: 利用中空纤维柱对诱导上清液进行初步浓缩, 将浓缩液进行硫酸铵分级沉淀, 检测酶活力并收集^[14]; 将收集的重组酶溶液置于 2 L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)中进行透析; 通过 Ni-NTA 亲和层析对重组酶 rAlg738 进行分离纯化, SDS-PAGE 检测纯度。

1.2.7 重组酶 rAlg738 比活力测定: 以考马斯亮蓝染色(Bradford)法测定纯化酶液的蛋白含量^[15-16]; 在最适反应条件下测定重组酶活力, 计算比活力(酶活力/蛋白含量)。

1.2.8 重组酶 rAlg738 纯酶性质研究: (1) 最适反应 pH 和 pH 稳定性研究。在 40 $^{\circ}$ C 条件下, 分别测定在不同 pH 缓冲溶液配制的褐藻胶底物中的酶活力, 以测得的最高酶活力值为 100%, 计算相对酶活力, 确定最适反应 pH。将其置于不同 pH 缓冲液中 37 $^{\circ}$ C 条件下保温 1 h, 在最适 pH 和温度下测定酶活力, 以测得的最高酶活力为 100%, 计算各 pH 下褐藻胶裂解酶的残余酶活百分比。(2) 最适反应温度和温度稳定性研究。在最适 pH 条件下, 分别测定在不同温度(20、30、40、50、60、70 $^{\circ}$ C)下的褐藻胶裂解酶活力, 以测得的最高酶活力为 100%, 计算相对酶活力, 确定最适反应温度。将其分别置于不同温度水浴中保温, 在不同时间点(2、5、8、15、30、45、60 min)分别取样并在最适 pH 和温度下测定酶活力, 以未处理组的酶活力定义为 100%, 计算各温度条件下褐藻胶裂解酶的残余酶活百分比。(3) 不同金属离子及化学试剂对酶活力的影响。在最适反应条件下, 比较浓度为 1 mmol/L 和 5 mmol/L 的 14 种金属离子(Na⁺、Ca²⁺、K⁺、Co²⁺、Cr³⁺、Li⁺、Cu²⁺、Mg²⁺、Ni²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Mn²⁺、Hg²⁺、Zn²⁺)和 2 种化学试剂(EDTA、SDS)对酶活性的影响, 以相同条件下未加金属离子和化学试剂的酶促反应为对照。(4) 酶 K_m 值和 V_{max} 值测定。配制不同浓度(0.8–6.0 g/L)的反应底物, 在

最适反应条件下测定酶活力, 重复 3 次, 计算酶促反应速度, 利用双倒数法求得 K_m 值和 V_{max} 值^[17]。(5) 酶底物特异性研究。分别配制 0.3% (质量体积比) 的褐藻酸钠、聚古罗糖醛酸钠、聚甘露糖醛酸钠底物, 在最适条件下测定酶活力, 确定该重组酶对不同底物的作用特异性。

2 结果与分析

2.1 褐藻胶裂解酶全长基因调取及序列分析

以交替假单胞菌 BYS-2 菌株基因组 DNA 为模板, 设计全长特异性引物 alg738-F/R 进行 PCR 扩增; 扩增得到一条约 2 200 bp 大小的片段(图 1), 送测序。将测序获得的序列利用 Vector 软件进行开放阅读框分析, 在 NCBI 数据库中进行蛋白序列比对, 确认该序列为完整的褐藻胶裂解酶基因全长, 记为 *alg738*。

褐藻胶裂解酶基因 *alg738* 全长 2 217 bp, 利用 ProtParam 预测该蛋白的氨基酸组成和理化性质, 发现其可以编码 738 个氨基酸, 分子量约为 79.512 kD, 理论等电点为 6.42。带负电的氨基酸 Asp 和 Glu 共有 79 个, 而带正电的氨基酸 Arg 和 Lys 有 72 个, 由此推断该蛋白为一个酸性蛋白。SignalP 4.1 预测结构表明蛋白 N 端含 28 个氨基酸的信号肽序列, 通过 NCBI 中 BLASTp 对预测蛋白序列分析, 该蛋白含 Alginate lyase 和 Hepar_II_III 两个保守结构域。利用 SWISS-MODEL 在线对褐藻胶裂解酶 Alg738 进行同源建模, 以 4nei.1.A 为模板, 对 Alg738 中第 28–734 个氨基酸进行结构模拟, 得到一个低同源性的蛋白结构(图 2), 一致性仅为 50.07%, 该结构中螺旋区和折叠区分明显, N 端约 370 个氨基酸部分富含 α -螺旋, 剩余部分富含 β -折叠结构。

2.2 重组酶 rAlg738 的表达与纯化

重组工程菌 BL21(DE3)/pET22b-*alg738* 经 IPTG 诱导分泌重组酶 rAlg738。诱导结束后, 离心收集上清液测定褐藻胶裂解酶活力并进行 SDS-PAGE 检测(图 3)。发现经过 IPTG 诱导的发酵上清液在 80 kD 处出现一条很明显的蛋白条带, 与预测的理论分子

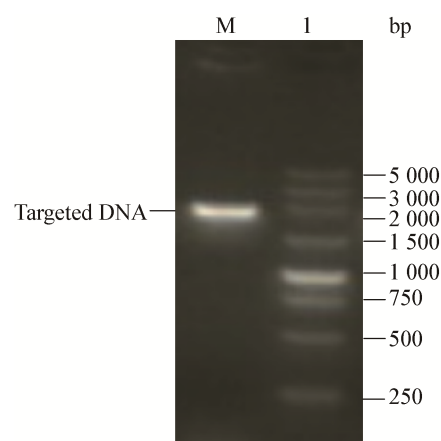


图 1 褐藻胶裂解酶基因 *alg738* 的 PCR 扩增电泳图

Figure 1 PCR product of alginate lyase gene *alg738*

Note: M: 5 000 bp DNA marker; I: PCR product.

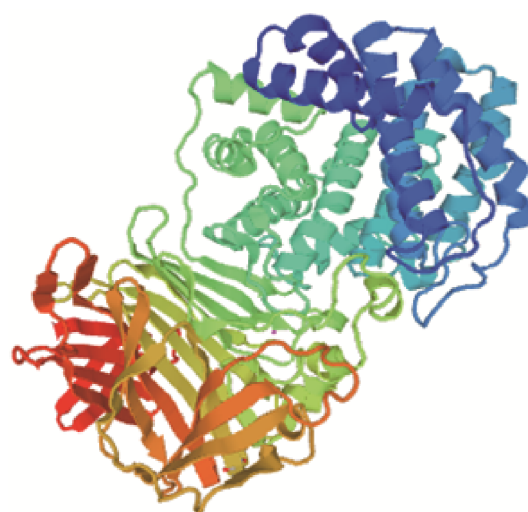


图 2 三维结构模拟示意图

Figure 2 Three-dimensional simulated structure of Alg738

量大小(79.512 kD)一致, 说明重组褐藻胶裂解酶基因 *alg738* 在大肠杆菌中诱导表达成功。

将诱导和未经诱导的发酵上清液经过中空纤维柱初步浓缩、硫酸铵分级沉淀和镍柱纯化后得到单一条带(图 3), 表明重组酶 rAlg738 已获得纯化。在最适条件下测定重组酶活力为 560 U/L, 比活力为 0.34 U/mg。

后续进一步对经过分离纯化的重组酶 rAlg738 进行酶学性质研究。

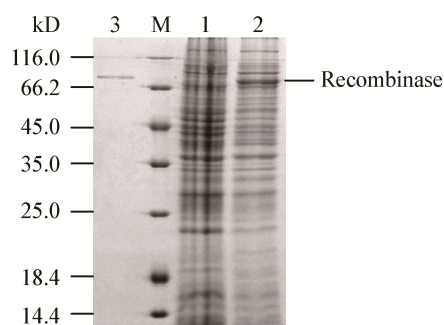


图3 重组酶 rAlg738 的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of rAlg738

注: M: Protein marker; 1: 未经 IPTG 诱导的发酵上清液; 2: 经 IPTG 诱导的发酵上清液; 3: 纯化后的重组酶。

Note: M: Protein marker; 1: Fermentation without IPTG; 2: Fermentation with IPTG; 3: The purified recombinant enzyme.

2.3 重组酶 rAlg738 性质分析

2.3.1 最适反应 pH 和 pH 稳定性: 将 rAlg738 置于不同 pH 缓冲液中测定酶活力, 结果表明该重组酶的最适反应 pH 为 8.0, 当 pH 小于 5.0 或大于 10.0 时酶活力降为 0 (图 4A)。将重组酶置于不同 pH 缓冲液中 37 °C 保温 1 h 并测定酶活力, 结果表明该酶在 pH 6.0–9.0 范围内稳定性较好, 能保持 84% 以上的相对酶活力; 在 pH 低于 4.0 或高于 11.0 条件下该酶完全失活(图 4B)。

2.3.2 最适反应温度和热稳定性: 将 rAlg738 置于不同温度条件下测定酶活力, 结果表明该重组酶的最适反应温度为 45 °C (图 5A)。热稳定性试验结果

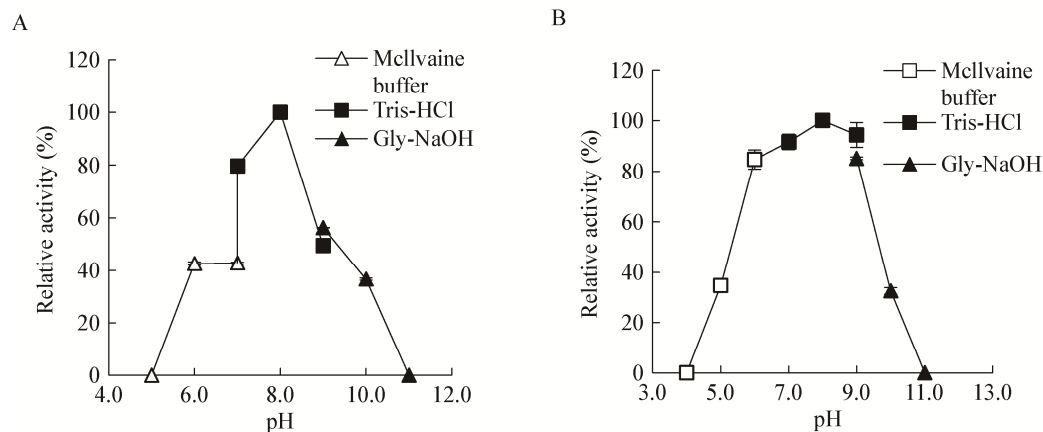


图4 重组酶 rAlg738 最适反应 pH (A)和 pH 稳定性(B)
Figure 4 Effect of pH on activity (A) and stability (B) of rAlg738

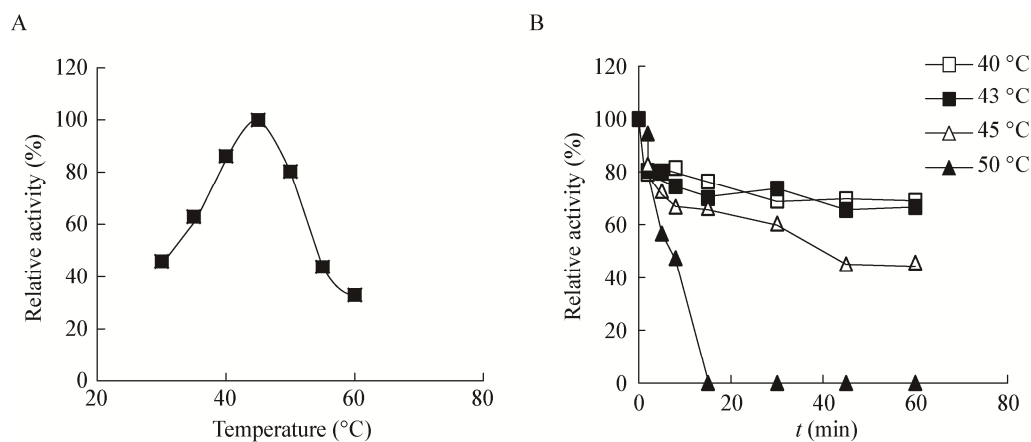


图5 重组酶 rAlg738 最适反应温度(A)和热稳定性(B)
Figure 5 Effect of temperature on activity (A) and stability (B) of rAlg738

显示,该酶在 43 °C 以下较稳定,37 °C 保温 60 min 其残余酶活力仍达 66.6%;当温度超过 50 °C,酶快速失活,保温 15 min,相对酶活降为 0 (图 5B)。

2.3.3 金属离子及化学试剂对酶活性影响: 14 种金属离子及 2 种化学试剂对重组酶活性的影响见表 1。当浓度相对较低(1 mmol/L)时,Na⁺、K⁺、Ca²⁺对该酶有一定促进作用,Co²⁺、Hg²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺、EDTA 对该酶具有明显的抑制作用,Cu²⁺和 SDS 可完全抑制酶活性;当浓度为 5 mmol/L

时,Na⁺、Mg²⁺、Mn²⁺对该酶具有明显的促进作用,其中 Mn²⁺促进作用最明显,酶活力提高了 50.7%,K⁺、Ca²⁺和 Fe²⁺有一定促进作用,而 Ni²⁺、Co²⁺、EDTA、β-巯基乙醇具有明显的抑制作用,Cu²⁺、Hg²⁺、Zn²⁺、SDS 可完全抑制该重组酶活性。

2.3.4 酶促反应动力学参数测定: 采用 Lineweaver-Burk 作图法,测得重组酶 rAlg738 的 V_{max} 为 0.011 g/(L·min),K_m 为 1.11 g/L (图 6)。

表 1 不同添加剂对重组酶 rAlg738 活力的影响
Table 1 Effects of different factors on rAlg738 activity

添加剂 Additives	1 mmol/L 相对酶活 1 mmol/L Relative activity (%)	5 mmol/L 相对酶活 5 mmol/L Relative activity (%)
Blank	100	100
Li ⁺	87.35±5.71	94.82±1.00
Na ⁺	103.04±2.54	122.81±6.43
K ⁺	102.38±3.28	114.54±4.04
Ca ²⁺	110.18±1.43	107.41±2.42
Mg ²⁺	93.44±6.57	130.50±4.98
Ni ²⁺	70.42±1.55	56.00±1.36
Co ²⁺	47.96±2.58	38.96±0.63
Cu ²⁺	0	0
Fe ²⁺	98.30±2.46	117.01±2.46
Fe ³⁺	83.00±6.70	80.45±3.87
Mn ²⁺	89.16±1.08	150.70±7.86
Hg ²⁺	47.42±1.10	0
Gr ³⁺	83.56±1.08	89.53±1.32
Zn ²⁺	38.99±1.97	0
SDS	0	0
EDTA	67.91±1.28	56.93±2.34
β-巯基乙醇 β-Mercaptoethanol	89.45±3.77	77.89±2.79

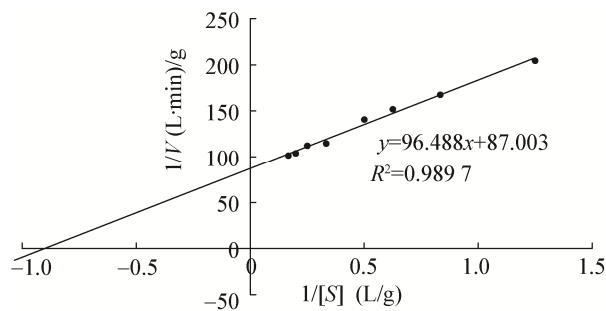


图 6 重组酶 rAlg738 的 Lineweaver-Burk 作图
Figure 6 Lineweaver-Burk plot of rAlg738

2.3.5 重组酶 rAlg738 的底物特异性: 褐藻胶分子由β-D-甘露糖醛酸(M)和α-L-古罗糖醛酸(G)两种单体聚合而成。褐藻胶裂解酶根据作用底物不同可分为三类:特异性裂解 1,4-β-D-甘露糖醛酸片段酶、特异性裂解 1,4-α-L-古罗糖醛酸片段酶或者可同时裂解两种片段的双功能裂解酶。分别以褐藻酸钠、聚甘露糖醛酸钠(Poly M)、聚古罗糖醛酸钠(Poly G)为底物测定重组酶活力,结果发现该重组酶为 Poly M 偏好型的双功能酶,作用于聚甘露糖醛酸片段效果远大于作用于聚古罗糖醛酸片段(表 2)。

表 2 重组酶 rAlg738 的底物特异性
Table 2 Substrate specificity of rAlg738

底物 Substrate	相对酶活力 Relative activity (%)
褐藻酸钠 Sodium alginate	100.00±1.55
Poly M	225.57±1.86
Poly G	44.54±5.10

3 结论

以交替假单胞菌 BYS-2 基因组 DNA 为模板, 克隆目的基因 *alg738* 全长, 构建工程菌大肠杆菌 BL21(DE3)/pET22b(+)-*alg738*, 诱导表达, 对重组酶 rAlg738 进行分离纯化和酶学性质研究。

重组酶的最适反应 pH 为 8.0, 最适反应温度为 45 °C, 在 pH 6.0–9.0、43 °C 以下稳定性较好; 低浓度(1 mmol/L)下 Na⁺、K⁺、Ca²⁺对该酶有一定促进作用, 而高浓度(5 mmol/L)下 Na⁺、Mg²⁺、Mn²⁺则具有明显的促进作用; 在 1 mmol/L 和 5 mmol/L 下, Cu²⁺、Co²⁺、Hg²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺、EDTA 和 SDS 对该酶都具有显著的抑制作用。酶促反应参数 K_m 值、 V_{max} 值分别为 1.11 g/L 和 0.011 g/(L·min); 底物特异性分析表明该重组酶为偏好聚甘露糖醛酸钠(Poly M)裂解作用的双功能酶。

参 考 文 献

- [1] Raybaudi-Massilia RM, Mosqueda-Melgar J, Martín-Belloso O. Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 121(3): 313-327
- [2] Li CX, Sun Y, Guan HS. Progress of marine drug propylene glycol alginate sodium sulfate (PSS) and inspiration[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2012, 24(9): 1019-1025 (in Chinese)
李春霞, 孙杨, 管华诗. 海洋药物藻酸钠双酯钠研究进展及启示[J]. 生命科学, 2012, 24(9): 1019-1025
- [3] Suzuki Y, Tanihara M, Ohinishi K, et al. Cat peripheral nerve regeneration across 50 mm gap repaired with a novel nerve guide composed of freeze-dried alginate gel[J]. Neuroscience Letters, 1999, 259(2): 75-78
- [4] Wang Q, Zhang N, Hu XW, et al. Alginate/polyethylene glycol blend fibers and their properties for drug controlled release[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007, 82(1): 122-128
- [5] Ashton RS, Banerjee A, Punyani S, et al. Scaffolds based on degradable alginate hydrogels and poly(lactide-co-glycolide) microspheres for stem cell culture[J]. Biomaterials, 2007, 28(36): 5518-5525
- [6] Ji MH. Seaweed Chemistry[M]. Beijing: Science Press, 1997: 231-235 (in Chinese)
纪明侯. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 231-235
- [7] Zhang YJ, Luo FW, Yao ZA, et al. Research progress about biological activity of sodium alginate oligosaccharides[J]. China Brewing, 2014, 33(1): 5-8 (in Chinese)
张玉娟, 罗福文, 姚子昂, 等. 海藻酸钠寡糖生物活性的研究进展[J]. 中国酿造, 2014, 33(1): 5-8
- [8] Zhu L, Cheng L, Cai JP. Progress in algin oligosaccharide potential medicinal value[J]. Chinese Herbal Medicine, 2006, 29(9): 993-996 (in Chinese)
祝玲, 程璐, 蔡俊鹏. 褐藻胶寡糖潜在药用价值的研究进展[J]. 中药材, 2006, 29(9): 993-996
- [9] Li LY, Guan HS, Jiang XL, et al. Advances in algae toolenzymes: alginate lyases[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(6): 838-845 (in Chinese)
李丽妍, 管华诗, 江晓路, 等. 海藻工具酶——褐藻胶裂解酶研究进展[J]. 生物工程学报, 2011, 27(6): 838-845
- [10] Liu Y, Jiang XL, Guan HS. Research advances on alginate lyases[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2001, 7(4): 99-103 (in Chinese)
刘岩, 江晓路, 管华诗. 褐藻胶裂解酶研究进展[J]. 中国水产科学, 2001, 7(4): 99-103
- [11] Wang LP, Liu YP, Sun XH, et al. Expression of alginate lyase gene in *E. coli* and characterization of the enzyme[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2012, 31(2): 189-194 (in Chinese)
汪立平, 刘玉佩, 孙晓红, 等. 褐藻胶裂解酶基因在大肠杆菌中的表达及其酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(2): 189-194
- [12] Shen P, Chen XD. Experiment of Microbiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2010: 246-247 (in Chinese)
沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 246-247
- [13] Hou BB, Liu SL, Zhang JY, et al. Optimization of alginate-degrading bacterial fermentation process for alginate lyase production[J]. Fisheries Science, 2009, 28(11): 667-670 (in Chinese)
侯保兵, 刘书来, 张建友, 等. 褐藻胶裂解酶产生菌的发酵优化研究[J]. 水产科学, 2009, 28(11): 667-670
- [14] Dou WF, Wei D, Li H, et al. Purification and characterisation of a bifunctional alginate lyase from novel *Isotripterocola halotolerans* CGMCC 5336[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(2): 1476-1482
- [15] Wang XP, Xing SL. Determination of protein quantitation using the method of coomassie brilliant blue[J]. Tianjin: Chemical Industry, 2009, 23(3): 40-42 (in Chinese)
王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J]. 天津化工, 2009, 23(3): 40-42
- [16] Li J, Zhang YT, Zeng W, et al. Determination of total protein content applications Coomassie brilliant blue[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2000, 13(2): 118-120 (in Chinese)
李娟, 张耀庭, 曾伟, 等. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量[J]. 中国生物制品学杂志, 2000, 13(2): 118-120
- [17] Li JW. Study on the alginate lyases secreted by the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM0524[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2011 (in Chinese)
李建伟. 海洋细菌 *Pseudoalteromonas* sp. SM0524 分泌的褐藻胶裂解酶的研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2011