

文章编号: 1000-0615(2019)12-2468-08

DOI: 10.11964/jfc.20181011496

龙须菜卤代烷烃脱卤酶基因的转录及原核表达

孙鹏¹, 杜宇², 吕燕¹, 孙雪^{1*}, 徐年军¹

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211;

2. 绍兴市环保科技服务中心, 浙江绍兴 312000)

摘要: 卤代烷烃脱卤酶(HLD)是一类能降解卤代脂肪化合物的酶, 为今后将藻类HLD用于环境中卤素化合物的降解提供资料, 本实验利用生物信息学、荧光定量PCR和pET28a表达系统对大型红藻龙须菜中HLD的酶学特性、转录表达和原核表达进行了研究。生物信息学分析结果显示, 龙须菜中HLD基因(记为GIHLD)开放阅读框长969 bp, 理论分子量约为36.33 ku, 等电点约为5.53; 该GIHLD序列与绳状龙须菜的一条HLD序列(PXF45553.1)完全一致, 与绳状龙须菜和皱波角叉菜等红藻优先聚类。荧光定量PCR结果表明, 高温下底物1,2-二氯乙烷和植物激素水杨酸可促进GIHLD基因的表达, 其表达量分别为常温组的3.64、2.64和2.43倍。GIHLD与pET28a质粒构建的重组载体在大肠杆菌BL21(DE3)中成功表达出具有脱卤酶活性的蛋白; 该蛋白的最佳诱导条件为16 °C、0.1 mmol/L IPTG诱导12 h, 最后用镍柱对GIHLD蛋白进行了初步纯化。本研究为进一步了解藻类HLD家族及获得高纯度HLD酶奠定了基础。

关键词: 龙须菜; 卤代烷烃脱卤酶; 转录; 原核表达

中图分类号: Q 78; X 51

文献标志码: A

卤代烷烃脱卤酶(haloalkane dehalogenase, HLD)是一类能降解卤代脂肪族化合物的酶, 它们在环境污染治理修复等方面有着潜在的应用价值。如美国Enantis公司研制出一种包含脱卤酶及其突变酶的产品“Yperzyme Kit”, 该产品用于降解芥子气^[1]。HLD属于a/b水解酶家族, 它的活性部位位于a/b水解酶折叠结构域和较小的螺旋帽结构域之间的封闭腔; 其中折叠结构域在a/b水解酶家族中高度保守^[2-3], 而螺旋帽结构域参与酶活性位点的形成, 其结构和组成决定着活性位点的空腔大小、底物特异性、手性选择性等^[4-6]。HLD还是一种特异性广泛的酶, 不仅能够水解常见卤代烷烃为醇和卤素, 而且对烯烃、醚、酯等化合物也有催化作用^[7-8]。

关于微生物中的HLD研究较多, 目前在微生物中已鉴定出的HLD酶有DhaA、DhmA、DmbA、DmbB和DmbC等^[9]。早在1997年,

Kulakova等^[10]在玫瑰红红球菌(*Rhodococcus rhodochrous*)中克隆出DhaA酶的基因, 并在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中成功表达。后来, 研究者在鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*) N85中发现了DhmA; 在根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) C58中鉴定出了DatA^[11-12]。在海洋细菌中也存在着各种HLD, 如波罗的海红假单胞菌(*Rhodospirillum baltica*) SH1中的DrbA^[13]、太平洋邻囊菌(*Plesiocystis pacifica*) SIR-1中的DppA^[14]。某些海洋动物和藻类自身也能合成大量含卤有机物, 因此体内也存在该酶。如大型红藻皱波角叉菜(*Chondrus crispus*)基因组中发现了6条HLD基因序列^[15]; 在绳状龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)基因组中筛选到7条HLD序列^[16]; 在紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)中鉴定了1条DspA^[17]。

龙须菜(*G. lemaneiformis*)是一种具有重要经济价值的大型海洋红藻, 富含陆地植物没有的

收稿日期: 2018-10-19 修回日期: 2019-01-02

资助项目: 国家自然科学基金(31672674); 宁波市科技局国际合作项目(2017D10019)

通信作者: 孙雪, E-mail: sunxue@nbu.edu.cn

藻胶、多糖及微量元素, 具有很高的食用和药用价值。龙须菜还可以降低海水中的氮、磷含量, 从而抑制赤潮藻的生长, 因此在赤潮的防治方面也备受人们的关注^[18-19]。本课题组前期在龙须菜基因组中发现了6条HLD基因序列^[20], 并在水杨酸(SA)等激素处理的转录组分析中发现1条HLD基因表达上调^[21]。在此基础上, 本实验以该HLD(记为GIHLD)基因序列为研究对象, 对其进行了生物信息学、转录表达和原核表达分析, 从而为藻类HLD的酶性质研究以及今后可能用于环境卤素化合物的降解提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

龙须菜采自福建霞浦海藻养殖基地。在实验室中使用Provasoli培养基, 在光照强度为2 000 lx, 温度为23 °C的光照培养箱中培养。选取生长状态良好的材料用于实验。

1.2 GIHLD生物信息学分析

使用BLAST程序对GIHLD基因进行同源性比较; 利用ExPaSy(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测编码蛋白的理化性质; 分别使用PSORT(<http://psort1.hgc.jp/form.html>)和TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)进行亚细胞定位和蛋白跨膜结构预测; 利用MEGA 5.2软件中的Neighbor-Joining方法构建系统进化树, 其中Bootstrap值为1 000。

1.3 总RNA提取及cDNA合成

使用RNeasy Plant Mini Kit试剂盒(Qiagen, Germany)提取龙须菜总RNA后进行电泳检测, 利用Nanodrop1000蛋白核酸检测仪(Thermo Scientific, USA)检测RNA浓度和纯度。按照Transcript all-in-one first strand cDNA synthesis supermix for qPCR (one-step gDNA removal)(北京全式金生物技术有限公司)试剂盒说明书进行cDNA制备。

1.4 GIHLD基因的转录表达分析

将龙须菜分别在常温(23 °C)、高温(33 °C)、常温添加1.25 mmol/L 1,2-二氯乙烷和常温添加100 μmol/L水杨酸中培养6 h, 然后进行藻体总RNA提取和反转录反应。根据龙须菜转录组数据库中筛选到的GIHLD基因序列信息^[21], 利用

Primer Premier 5.0设计荧光定量PCR引物(表1), 以actin基因为内参。利用TransStart Tip Green qPCR SuperMix试剂(北京全式金生物技术有限公司)进行荧光定量PCR反应, 反应程序为95 °C 3 min; 95 °C 10 s, 58 °C 20 s, 72 °C 20 s, 40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算GIHLD基因的相对表达量^[22]。

表 1 引物信息列表

Tab. 1 Information of used primers

引物 primers	引物序列(5'-3') 5'-3' sequence	用途 usage
qHLD-F	AACGGCGTGGTCGGCTAAT	荧光定量PCR
qHLD-R	GGGATTTCGCGGTTGTG	荧光定量PCR
actin-F	CTGAGGAGTTGAAAGGGAGA	荧光定量PCR
actin-R	AATGTCGCGGTCTTGATAG	荧光定量PCR
HLD-F	<u>CGCGGATCC</u> ATGTCGTCGGTGCT TTTTGC	全序列扩增
HLD-R	GGCAAGCTTTCATAACCTCATAAC <u>CAGTTTGCAATGGCC</u>	全序列扩增

注: 下划线碱基分别为BamH I和Hind III酶切位点

Notes: underlined bases are BamH I and Hind III restriction enzyme cutting site, respectively

1.5 GIHLD全基因序列的克隆

根据龙须菜GIHLD基因序列信息, 利用Primer Premier 5.0设计引物并在两端分别加入BamH I和Hind III酶切位点及保护碱基(表1)。以龙须菜cDNA为模板进行PCR扩增。反应程序为94 °C变性5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C终延伸10 min。将扩增产物回收、纯化、连接到pMD18T载体后转化至大肠杆菌DH5α。最后将阳性的重组菌送往上海桑尼生物科技有限公司测序。

1.6 重组表达载体的构建

将经测序验证序列正确的重组pMD18-T和pET28a分别进行BamH I和Hind III双酶切。回收酶切后的HLD片段与pET28a进行连接, 然后转化至大肠杆菌BL21(DE3)中。通过PCR和双酶切检测插入片段大小, 将正确的重组菌落送至上海桑尼生物科技有限公司测序, 并命名为pET28a-GIHLD。

1.7 GIHLD蛋白的诱导及条件优化

将pET28a-GIHLD在37 °C培养至OD₆₀₀为0.6~0.8, 加入诱导剂IPTG, 在16 °C、200 r/min条件下培养。不同诱导剂浓度实验: IPTG浓度分别为0、0.1、0.5和1.0 mmol/L, 诱导24 h; 不同诱

导时间实验：0.5 mmol/L IPTG分别诱导0、6、12和24 h。收集菌体，加入磷酸盐缓冲液(PBS)后在低温下超声破碎(360 W功率持续30 min，超声2 s间隔3 s)，离心后取上清液测定GIHLD粗酶活性。

1.8 GIHLD活性测定

以1,2-二氯乙烷为底物，参考Kulakova等^[10]的方法并稍做改动。测定GIHLD活性的反应体系包含10 mmol/L 1,2-二氯乙烷、3 mL PBS缓冲液和2 mL粗酶液；于37 °C反应4 h后加入甲醇溶液(色谱级)终止反应。然后使用GC-MS 7890B-5977A HP-5毛细管柱(安捷伦)，顶空自动进样进行检测。顶空条件：50 °C 30 min；进样量800 μL，分流比20 : 1；程序升温：30 °C保持5 min，15 °C/min升温至150 °C，保温1 min。根据1,2-二氯乙烷标准曲线计算其含量。蛋白含量测定按BCA蛋白定量试剂盒说明书进行。

1.9 GIHLD蛋白的检测与纯化

在“GIHLD蛋白的诱导及条件优化”部分超声破碎后的沉淀中加入5 mL 2 mol/L尿素+0.1% TritonX-100混合液，12 000 r/min离心5 min后弃上清液，再加入20 mL 8 mol/L尿素后，于4 °C冰箱放置过夜，12 000 r/min离心20 min后收集上清液。按照His-Tagged Protein纯化试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)的操作说明进行蛋白纯化。

1.10 数据分析

使用Excel 2013对转录表达和酶活性数据进

行处理和统计分析。实验数据均以平均值±标准差表示，并采用SPSS 20.0软件进行单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异显著性水平。

2 结果

2.1 GIHLD基因序列分析

GIHLD基因开放阅读框长969 bp (GenBank登录号为MK450460)，共编码322个氨基酸，推测其蛋白分子量约为36.33 ku，等电点pI约为5.53，为酸性蛋白。亚细胞定位和跨膜结构域预测结果显示，GIHLD蛋白有86.5%的概率在溶酶体中，为胞外蛋白。将龙须菜和绳状龙须菜、皱波角叉菜、南极颗粒性球菌(*Granulosicoccus antarcticus*)、毛癣菌(*Antriccoccus suffuscus*)、海洋单核杆菌(*Monaibacterium marinum*)等9个物种共13条HLD氨基酸序列一起进行同源性和系统发生树构建(图1)。同源分析结果显示，龙须菜HLD序列与绳状龙须菜HLD氨基酸序列(PXF45553.1)的相似性为100%，而与其他3条绳状龙须菜HLD序列相似性为84%~86%；与2条角叉菜HLD氨基酸序列相似性分别为62%和63%；与其他微生物如结节链霉菌(*Streptomyces nodosus*)的相似性为55%。在构建的系统树中，7条红藻HLD序列首先聚在一起成为一群，而放线菌和变形杆菌等微生物则在外群，该系统进化结果与物种的亲缘性远近一致。

2.2 GIHLD基因的转录表达分析

GIHLD基因表达受高温、底物1,2-二氯乙烷

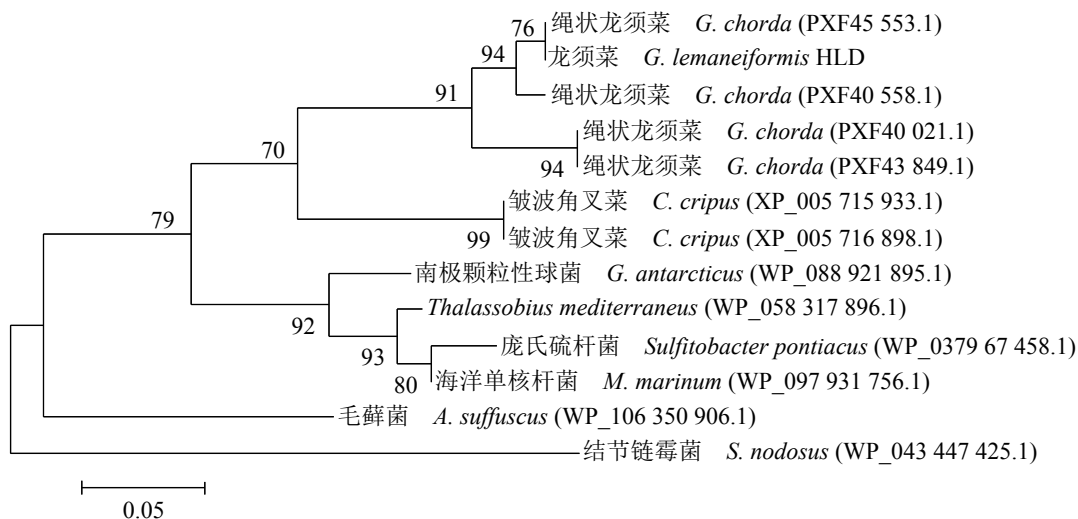


图1 基于几种藻类和微生物HLD序列的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of some algae and microorganisms based on HLD proteins

和植物激素水杨酸的影响(图2)。将常温组 *GIHLD* 基因表达量记为1, 高温组、1,2-二氯乙烷和水杨酸添加组的 *GIHLD* 基因表达量分别为常温组的3.64、2.64和2.43倍。以上结果表明, 高温、1,2-二氯乙烷和外源水杨酸均可促进 *GIHLD* mRNA 的积累, 其中高温对 *GIHLD* 基因表达量的影响最为显著。

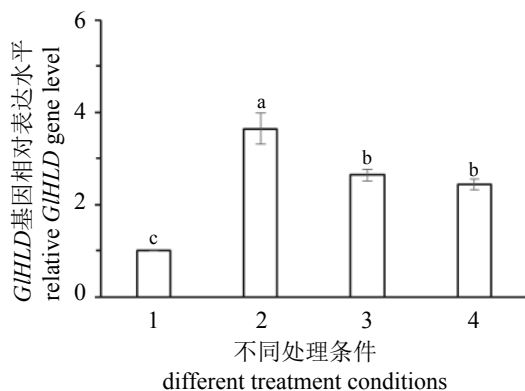


图2 不同处理条件下的 *GIHLD* 基因表达

1. 常温组, 2. 高温组, 3. 1,2-二氯乙烷组, 4. 水杨酸组; 图中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 2 Effects of the different treatments on the expression of *GIHLD* gene

1. normal temperature group, 2. high temperature group, 3. 1,2-dichloroethane group, 4. salicylic acid group; different letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

2.3 重组载体的构建及检测

龙须菜 *GIHLD* 基因大小约1 000 bp, 与预期大小一致(图3-a)。测序结果表明, pMD18-T中插入的 *GIHLD* 片段与已知序列完全一致。将该 *GIHLD* 与T载体连接产物进行双酶切, 结果在

1 000 bp左右出现 *GIHLD* 片段(图3-b)。电泳结果显示, pET28a空载体在5 000 bp左右有一条片段, 而重组的pET28a-*GIHLD*载体在6 100 bp附近出现片段(图3-c)。将重组pET28a-*GIHLD*菌测序验证, 显示插入片段序列正确。以上结果表明重组载体pET28a-*GIHLD*构建成功, 可以用于后续原核表达实验。

2.4 目的蛋白诱导条件的优化

SDS-PAGE结果显示, *GIHLD*条带在35 ku位置附近出现, 与预期蛋白大小相符。对目的蛋白进行不同IPTG诱导浓度和诱导时间优化, 结果显示, 重组蛋白在6、12和24h诱导后均能表达, 并且无论在上清液或包涵体中, 均在诱导12 h的表达量最高(图4-a); IPTG浓度为0.1、0.5和1.0 mmol/L时, 0.1 mmol/L浓度表达量较高(图4-b)。因此, 最终选择的诱导条件为16 °C, 0.1 mmol/L IPTG浓度, 诱导12 h。诱导蛋白在上清液中较少, 大多数在沉淀中, 说明该蛋白多以包涵体的形式存在。

2.5 *GIHLD*活性测定

重组pET28a-*GIHLD*载体诱导表达上清液中粗酶活性测定结果显示, 空质粒与重组质粒上清液中的 *GIHLD* 粗酶活性分别为19.86和76.02 U ($P < 0.05$), 二者的比活性分别为2.62和11.87 U/mg ($P < 0.05$) (表2)。重组质粒中的酶活性与比活性分别为对照组的3.83和4.53倍。可见尽管上清液中表达蛋白浓度较低, 但表达的目的蛋白具有催化1,2-二氯乙烷底物的脱卤酶活性。

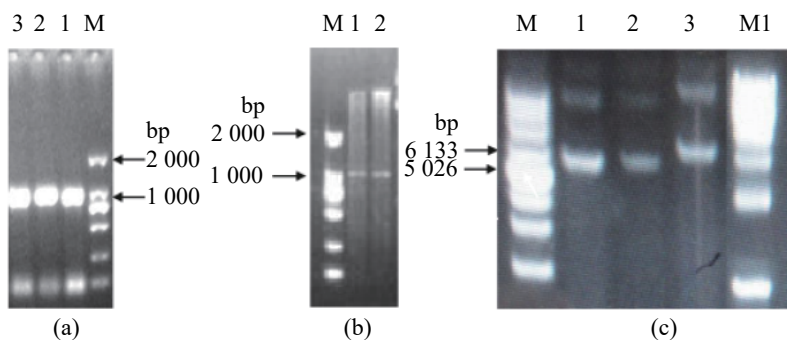


图3 *GIHLD* 基因扩增、酶切及载体检测

(a) *GIHLD* 基因扩增, M. DL 2 000 Marker; 1-3. PCR产物; (b) T载体中 *GIHLD* 基因双酶切, M. DL 2 000 Marker, 1-2. 双酶切片段; (c) 载体检测, M. 超螺旋Marker, 1-2. pET28a空载体, 3. pET28a-*GIHLD*重组载体, M1. DL 10 000 Marker

Fig. 3 *GIHLD* amplification, enzyme digestion and recombinant pET28a detection

(a) *GIHLD* gene amplification, M. DL 2 000 Marker, 1-3. PCR products; (b) digested *GIHLD* in pMD18-T, M. DL 2 000 Marker, 1-2. digested fragment; (c) vector detection, M. supercoiled Marker, 1-2. pET28a plasmid, 3. pET28a-*GIHLD* plasmid, M1. DL 10 000 Marker

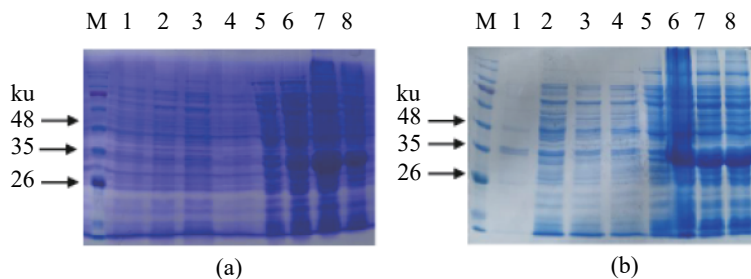


图4 诱导时间(a)和诱导剂浓度(b)对GIHL D蛋白表达的影响

(a)不同诱导时间, M. 蛋白质分子量Marker, 1~4. 分别诱导0、6、12和24 h的上清液, 5~8. 分别诱导0、6、12和24 h的沉淀; (b)不同诱导剂浓度结果, M. 蛋白质分子量Marker, 1~4. IPTG浓度分别为0、0.1、0.5和1.0 mmol/L的上清液, 5~8. IPTG浓度分别为0、0.1、0.5和1.0 mmol/L的沉淀

Fig. 4 Effects of induction time (a) and inducer concentration (b) on protein expression

(a) different induction time, M. protein Marker, 1-4. supernatant fluid after induction of 0, 6, 12 and 24 h, respectively, 5-8. precipitation after induction of 0, 6, 12 and 24 h, respectively; (b) different inducer concentrations, M. protein Marker, 1-4. supernatant after induction by 0, 0.1, 0.5 and 1.0 mmol/L IPTG, respectively, 5-8. precipitation after induction by 0, 0.1, 0.5 and 1.0 mmol/L IPTG, respectively

表2 诱导上清液中的GIHL D活性和比活性

Tab. 2 Enzyme activity and specific activity of GIHL D in the induced supernatant

样品 sample	酶活性/U enzyme activity	比活性/(U/mg) specific activity
空质粒上清液 pET28a supernatant	19.86±4.25 ^a	2.62±0.56 ^a
重组质粒上清液 pET28a-GIHL D supernatant	76.02±3.33 ^b	11.87±0.52 ^b

注: 不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Notes: different letters indicate significant difference ($P<0.05$)

2.6 目的蛋白的纯化

将纯化的GIHL D蛋白进行梯度洗脱, 结果发现, 10、50或100 mmol/L咪唑均能洗脱下目的蛋白(图5), 其中10 mmol/L咪唑洗脱的蛋白质中杂蛋白比较多, 而100 mmol/L以上浓度咪唑洗脱的蛋白浓度比较低, 50 mmol/L咪唑洗脱的非特

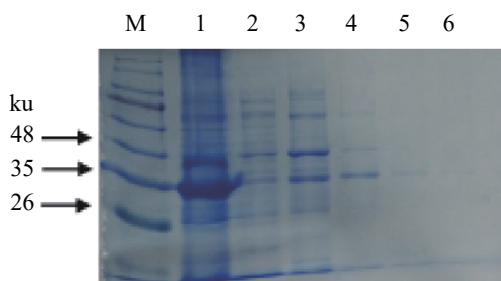


图5 目的蛋白的纯化结果

M. 蛋白质分子量Marker; 1. 包涵体蛋白; 2. binding buffer冲洗液; 3~6. 分别为10、50、100和250 mmol/L咪唑洗脱液

Fig. 5 Purified results of GIHL D protein

M. protein Marker; 1. inclusion body protein; 2. binding buffer flushing fluid; 3-6. the purified protein after affinity chromatography with 10, 50, 100 and 250 mmol/L imidazole, respectively

异性蛋白较少。

3 讨论

自然界中存在的有机卤素化合物已有5 000多种, 主要是氯或溴化合物, 均是在生物体或自然的非生物过程中形成^[23]。由于多种原因, 现代化工业产生的卤代化合物也被释放到环境中成为持久性污染物。因此, 卤代化合物的降解成为现代环境治理中的一个问题。卤代烷烃脱卤酶结构稳定、反应简单, 能够催化多种卤代烷底物的降解, 引起人们极大的兴趣^[7, 9]。

目前, 关于HLD的研究多在微生物中进行, 鲜有针对藻类的研究, 其中GIHL D及其基因的研究尚属空白。本研究从水杨酸等激素处理的龙须菜转录组数据中筛选到1条HLD基因序列, 采用生物信息学方法对GIHL D进行了分析, 为揭示藻类HLD的特性提供了资料。基于HLD序列进行的系统发生树分析表明, 龙须菜与大型红藻绳状龙须菜、皱波角叉菜亲缘关系较近, 而与微生物关系较远。

微生物中HLD的研究多集中在酶活性检测、催化功能、酶结构和作用特性等方面^[24-26]。如Dh1A的帽结构域具有高度灵活性, 在HLD家族中催化位点最小, 但却能催化大分子底物如4-(溴甲基)-6,7-二甲氧基香豆素的降解^[27]。而HLD基因水平的报道较少。本研究探讨了高温、1,2-二氯乙烷和水杨酸对GIHL D基因表达的影响, 发现三者均能促进GIHL D基因的表达。因此, GIHL D的表达不仅受底物的影响, 推测GIHL D也

参与了龙须菜抗高温逆境的应答过程。

影响外源基因原核表达的因素很多, 主要包括诱导温度、IPTG浓度、大肠杆菌种类及诱导表达时间等^[28]。如诱导温度高时菌体生长速率快, 但易造成副产物的增加; 较低的诱导温度有利于产物的表达^[29]。本实验中GIHLD大部分以包涵体蛋白的形式出现, 这是一种不溶、无活性的蛋白。外源基因的表达过快可能是包涵体蛋白产生的一个因素^[30]。另外, 表达蛋白不可溶可能与原核表达系统无法对蛋白进行翻译后修饰有关。

综上所述, 本研究在获得龙须菜GIHLD基因cDNA全长的基础上, 对其进行了生物信息学和转录表达分析, 构建了pET28a重组表达载体, 并成功表达出具有脱卤酶活性的目的蛋白, 并对包涵体蛋白进行了初步纯化。该研究为下一步制备高纯度酶及酶功能探索奠定了基础。

参考文献:

- [1] 习海玲, 刘昌财, 问县芳, 等. 卤代烷烃脱卤酶及其对芥子气的降解研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(5): 842-847.
Xi H L, Liu C C, Wen X F, *et al.* Advances in research on haloalkane dehalogenases and its sulfur mustard degradation function[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2015, 21(5): 842-847(in Chinese).
- [2] Chovancová E, Kosinski J, Bujnicki J M, *et al.* Phylogenetic analysis of haloalkane dehalogenases[J]. Proteins-Structure Function & Bioinformatics, 2010, 67(2): 305-316.
- [3] Oakley A J, Klvana M, Otyepka M, *et al.* Crystal structure of haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 at 0.95 Å resolution: dynamics of catalytic residues[J]. Biochemistry, 2004, 43(4): 870-878.
- [4] Gehret J J, Gu L C, Geders T W, *et al.* Structure and activity of DmmA, a marine haloalkane dehalogenase[J]. Protein Science, 2012, 21(2): 239-248.
- [5] Chan W Y, Wong M, Guthrie J, *et al.* Sequence- and activity-based screening of microbial genomes for novel dehalogenases[J]. Microbial Biotechnology, 2010, 3(1): 107-120.
- [6] Marek J, Vévodová J I, Smatanová I K, *et al.* Crystal structure of the haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26[J]. Biochemistry, 2000, 39(46): 14082-14086.
- [7] Janssen D B. Evolving haloalkane dehalogenases[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2004, 8(2): 150-159.
- [8] Prokop Z, Sato Y, Brezovsky J, *et al.* Enantioselectivity of haloalkane dehalogenases and its modulation by surface loop engineering[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2010, 49(35): 6111-6115.
- [9] 李安章, 邵宗泽. 微生物卤代烷烃脱卤酶研究进展[J]. 微生物学报, 2015, 55(4): 381-388.
Li A Z, Shao Z Z. Research progress of microbial haloalkane dehalogenase-a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(4): 381-388(in Chinese).
- [10] Kulakova A N, Larkin M J, Kulakov L A. The plasmid-located haloalkane dehalogenase gene from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064[J]. Microbiology, 1997, 143(1): 109-115.
- [11] Jesenská A, Bartoš M, Czerneková V, *et al.* Cloning and expression of the haloalkane dehalogenase gene dhmA from *Mycobacterium avium* N85 and preliminary characterization of DhmA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3724-3730.
- [12] Hasan K, Fortova A, Koudelakova T, *et al.* Biochemical characteristics of the novel haloalkane dehalogenase DatA, isolated from the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* C58[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(5): 1881-1884.
- [13] Jesenská A, Monincová M, Koudeláková T, *et al.* Biochemical characterization of haloalkane dehalogenases DrbA and DmbC, representatives of a novel subfamily[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(15): 5157-5160.
- [14] Bogdanović X, Hesseler M, Palm G J, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the putative haloalkane dehalogenase DppA from *Plesiocystis pacifica* SIR-I[J]. Acta Crystallographica, 2010, 66(7): 828-830.
- [15] Collén J, Porcel B, Carré W, *et al.* Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(13): 5247-5252.

- [16] Lee J, Yang E C, Graf L, *et al.* Analysis of the draft genome of the red seaweed *Gracilariopsis chorda* provides insights into genome size evolution in Rhodophyta[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 20(8): 1869-1886.
- [17] Fortova A, Sebestova E, Stepankova V, *et al.* DspA from *Strongylocentrotus purpuratus*: the first biochemically characterized haloalkane dehalogenase of non-microbial origin[J]. *Biochimie*, 2013, 95(11): 2091-2096.
- [18] 刘婷婷, 杨宇峰, 叶长鹏, 等. 大型海藻龙须菜对两种海洋赤潮藻的生长抑制效应[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2006, 27(5): 754-759.
- Liu T T, Yang Y F, Ye C P, *et al.* Inhibitory effects of seaweed *Gracilaria lemaneiformis* on the growth of two red tide microalgal species[J]. *Journal of Jinan University (Natural Science Edition)*, 2006, 27(5): 754-759(in Chinese).
- [19] Wang Y, Zhou B, Tang X X. Effects of two species of macroalgae-*Ulva pertusa* and *Gracilaria lemaneiformis* on growth of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2009, 21(4): 375-385.
- [20] Sun X, Wu J, Wang G C, *et al.* Genomic analyses of unique carbohydrate and phytohormone metabolism in the macroalga *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta)[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 94-104.
- [21] Wang F J, Wang C B, Zou T L, *et al.* Comparative transcriptional profiling of *Gracilariopsis lemaneiformis* in response to salicylic acid- and methyl jasmonate-mediated heat resistance[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0176531.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta C_T}$ the method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] Gribble G W. Occurrence of halogenated alkaloids[J]. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 2012, 71(1): 1-165.
- [24] Kumar A, Pillay B, Olaniran A O. Enzyme activity and gene expression profiles of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 during aerobic biodegradation of 1, 2-dichloroethane[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 31(8): 1211-1216.
- [25] Godinho L M, de Sá-Nogueira I. Characterization and regulation of a bacterial sugar phosphatase of the haloalkanoate dehalogenase superfamily, AraL, from *Bacillus subtilis*[J]. *The FEBS Journal*, 2011, 278(14): 2511-2524.
- [26] Nakamura T, Zámocký M, Zdráhal Z, *et al.* Expression of glycosylated haloalkane dehalogenase LinB in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2006, 46(1): 85-91.
- [27] Kokkonen P, Bednar D, Dockalova V, *et al.* Conformational Changes allow processing of bulky substrates by a haloalkane dehalogenase with a small and buried active site[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(29): 11505-11512.
- [28] 倪志勇, 李波, 范玲. 棉花肉桂醇脱氢酶基因 *GhCAD3* 的克隆及原核表达[J]. 核农学报, 2010, 24(5): 910-916, 921.
- Ni Z Y, Li B, Fan L. Cloning and prokaryotic expression of *GhCAD3* gene from *Gossypium hirsutum* L.[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2010, 24(5): 910-916, 921(in Chinese).
- [29] 张军杰, 周会, 胡育峰, 等. 玉米基因 *sbe1* cDNA 的克隆与原核表达[J]. 核农学报, 2009, 23(1): 70-74.
- Zhang J J, Zhou H, Hu Y F, *et al.* Clone and expression of *sbe1* cDNA from maize in *E. coli*[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2009, 23(1): 70-74(in Chinese).
- [30] 吕添, 曹正茂, 武海涛, 等. 单核细胞增多性李斯特菌 p60 蛋白表达条件的优化[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 160-163.
- Lü T, Cao Z M, Wu H T, *et al.* Optimization of expression conditions for *Listeria monocytogenes* p60 protein[J]. *Food Science*, 2010, 31(23): 160-163(in Chinese).

Transcriptional expression and prokaryotic expression analysis of haloalkane dehalogenase gene from *Gracilariopsis lemaneiformis*

SUN Peng¹, DU Yu², LÜ Yan¹, SUN Xue^{1*}, XU Nianjun¹

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Environmental Technology Service Center of Shaoxing, Shaoxing 312000, China)

Abstract: Haloalkane dehalogenase (HLD) is a kind of enzyme that can degrade halogenated aliphatic compounds. In order to provide information on the possible use of the algal HLD for the degradation of halogen compounds in the environment, we used bioinformatics, quantitative real-time PCR and pET28a system to study the characteristics and prokaryotic expression of HLD in the macroalga *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta). The open reading frame of HLD in *G. lemaneiformis* (recorded as *GIHLD*) was 969 bp, and its theoretical molecular weight and isoelectric point was approximately 36.33 ku and 5.53, respectively. The *GIHLD* amino acid sequence was identical with an HLD sequence of *G. chorda* (PXF45553.1), and was close to *G. chorda* and *Chondrus crispus* in the phylogenetic tree. The high temperature, substrate 1,2-dichloroethane and phytohormone salicylic acid all promoted the expression of *GIHLD* gene with an increment fold of 3.64, 2.64 and 2.43 times, respectively. Finally, the recombinant vector of pET28a-*GIHLD* was transformed into *E. coli* BL21 (DE3), and the recombinant protein displayed a dehalogenase activity. The optimal induction conditions were 16 °C and 0.1 mmol/L IPTG treatment for 12 h. And then, the HLD protein was preliminarily purified by nickel column. This study will lay the foundation for further understanding of the algal HLD family and the acquisition of high purity HLD enzyme.

Key words: *Gracilariopsis lemaneiformis*; haloalkane dehalogenase; transcription; prokaryotic expression

Corresponding author: SUN Xue. E-mail: sunxue@nbu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31672674); Ningbo Science and Technology Bureau International Cooperation Project (2017D10019)