

海洋微生物 *Fulvimarina manganoxydans* 磷酸酶 FM2382 的克隆表达及酶学性质*

陈林材¹ 王丽² 董亮² 戴欣² 黄建忠^{1**} 董志扬^{2**}

¹福建师范大学生命科学学院, 工业微生物发酵技术国家地方联合工程研究中心, 工业微生物教育部工程研究中心 福州 350108

²中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100101

摘要 为促进海洋微生物及基因资源的开发应用, 将海洋微生物 *Fulvimarina manganoxydans* sp. nov. 8047 的磷酸酶基因 *fm2382* 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中异源表达、纯化, 并研究磷酸酶 FM2382 的酶学性质. 设计引物从 *F. manganoxydans* sp. nov. 8047 基因组 DNA 中扩增出磷酸酶 *fm2382* 基因, 克隆至 pET28(a) 表达载体中, 构建重组菌株, 表达纯化后对磷酸酶 FM2382 的酶学性质进行分析. 结果表明: 磷酸酶 FM2382 最适反应温度为 45 °C, 最适反应 pH 7.1, 70-80 °C 高温处理 1 h 后仍具 35% 左右的活力, 在 pH 7.1-9.0 范围内具有较好的稳定性; 金属离子对磷酸酶活力有不同程度的影响, 其中 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 具有强烈的激活作用; $K_m = 1.42 \times 10^{-3}$ mol/L, $V_m = 2.5 \times 10^{-7}$ mol/L. 本研究表明 *F. manganoxydans* sp. nov. 中获得的 *fm2382* 基因可以在大肠杆菌中高效表达且 FM2382 是一种新的磷酸酶. (图 9 表 1 参 20)

关键词 *Fulvimarina manganoxydans* sp. nov.; 磷酸酶; 克隆表达; 酶学性质
CLC Q939.9 : Q78

Gene cloning, expression and characterization of a novel phosphatase obtained from a marine bacterium *Fulvimarina manganoxydans**

CHEN Lincai¹, WANG Li², DONG Liang², DAI Xin², HUANG Jianzhong^{1**} & DONG Zhiyang^{2**}

¹National & Local United Engineering Research Center of Industry Microbiology and Fermentation Technology; Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education; College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China

²State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract To characterize phosphatase FM2382, we cloned the *fm2382* gene of *Fulvimarina manganoxydans* sp. nov. 8047 and expressed it in *Escherichia coli*. Based on the genomic DNA sequence of *F. manganoxydans* sp. nov. 8047, we designed a pair of primers and amplified phosphatase *fm2382* gene by PCR methods. Then *fm2382* was cloned into the vector of pET-28a and expressed in *E. coli*. The recombinant protein was purified to investigate enzymatic properties of phosphatase FM2382. The nucleotide sequencing result showed that the *fm2382* gene had 890 base pairs and encoded 289 amino acid residues. The purified FM2382 exhibited phosphatase activity with optimum temperature of 45 °C and optimum pH of 7.1. Moreover, the FM2382 was stable between pH 7.1 and pH 9.0 for 1 hour, and the relative activity held 40% after storing at 70–80 °C for 1 hour. Furthermore, FM2382 was activated by Mg^{2+} , Mn^{2+} , and inhibited by Zn^{2+} , EDTA. Lineweaver-Burk assay revealed that FM2382 had K_m of 1.42×10^{-3} mol/L and V_m of 2.5×10^{-7} mol/L. This research first reported that gene *fm2382* from *F. manganoxydans* sp. nov. 8047 could be highly expressed in *E. coli*, and the enzymatic characterization results suggested that FM2382 is a novel phosphatase.

Keywords *Fulvimarina manganoxydans* sp. nov. 8047; phosphatase; cloning and expression; enzymatic characterization

深海热液区是海洋中的一类极端生态系统, 一般在海洋 1 000 m 以下的深水区域. 其独特的极端环境蕴藏着丰富的微生物资源. 这些微生物进化出在这种严酷生境中的适应机

制, 有着很强的极端条件耐受性. 因此, 现在越来越多的生物学家开始关注海洋热液微生物资源的研究, 尤其对这些微生物基因资源的开发利用越来越重视.

Fulvimarina manganoxydans sp. nov. 8047 是从西南印度洋 (37°47'S 49°39'E) 水下 2 800 m 深海热液羽流区筛选获得的一株新种^[1], 该菌是需氧、 Mn^{2+} 氧化、革兰氏阴性菌, 是目前 *Fulvimarina* 属已有报道^[2] 中发现的第 2 个菌种. 对其基因组进行分析, 从中选取一个注释为脱卤酶的基因 *fm2382* (专利申请号: 201610128149.7) 进行研究. 将 *fm2382* 基因序列与

收稿日期 Received: 2016-02-18 接受日期 Accepted: 2016-03-03

*国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2012AA092103, 2013AA10280) 资助 Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2012AA092103, 2013AA10280)

**通讯作者 Corresponding authors (E-mail: hjz@fjnu.edu.cn; dongzy@im.ac.cn)

氨基酸序列分别在NCBI数据库与PDB数据库中进行比对分析,结果表明该基因为HAD超家族(Haloacid Dehalogenase Superfamily)中的卤酸脱卤酶^[3-7]。将其克隆至大肠杆菌中异源表达,研究其脱卤性质,先后尝试13种卤酸类和卤代烷烃类底物,研究结果并没有明显的脱卤现象。进一步对该基因进行分析研究,推测该基因可能是HAD超家族中的磷酸酶基因,编码的蛋白质具有磷酸酶功能^[8]。

关于HAD超家族磷酸酶的研究,目前已有报道。HAD超家族是普遍存在于生物体中的一大类酶^[9],家族成员中目前已有超过19 000条单一序列被鉴定出^[10]。该家族主要包括磷酸酶(约占全家族的79%)和ATP酶(约占全家族的20%)^[11-12]。

在此基础上,我们课题组开始探究 $fm2382$ 基因的磷酸酶功能,从*F. manganoxydans* sp. nov.基因组中克隆出磷酸酶基因 $fm2382$,并在大肠杆菌中重组表达。通过对其表达产物FM2382最适温度、最适pH、金属离子影响,以及温度稳定性和酸碱稳定性的研究,来确定该基因的生物学功能,为海洋微生物资源的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌(*Escherichia coli*) BMBL21(DE3)购于博迈德生物技术有限公司,*E. coli* Transl-T1购于北京金式金生物技术有限公司;载体pEASY-Blunt Simple购于北京金式金生物技术有限公司,pET-28a为本实验室保存。

1.1.2 培养基 LB培养基(0.5%酵母提取物,1%蛋白胨,1% NaCl),37℃培养,需要时添加终浓度为50 μg/mL的卡那霉素。

1.1.3 主要试剂 高分子量蛋白质标准购于Thermo公司,硫酸卡那霉素、IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactoside,异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)购于江晨生物,改良型Bradford蛋白质浓度测定试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司,pNPP(p-nitrophenyl phosphate,对硝基苯磷酸二钠)、pNP(p-nitrophenol,对硝基苯酚)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司,其它化学试剂均为分析纯。

1.2 磷酸酶基因 $fm2382$ 的克隆

以*F. manganoxydans* sp. nov. 8047菌株基因组DNA为模板,用引物FM2382-F和FM2382-R进行PCR扩增 $fm2382$ 全长序列。PCR扩增程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸45 s,30个循环;72℃ 10 min,4℃ 1 h。PCR产物经电泳纯化回收后,克隆到pEASY-Blunt Simple质粒中,转化到*E. coli* Transl-T1。经转化子验证后,送交北京擎科新业生物技术有限公司测序。

表1 PCR引物序列

Table 1 Oligonucleotides used as primers

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')
FM2382-F	GGAATTCATATGATGCGGAAAGCGACACCGGAG
FM2382-R	CCCAAGCTTCAACGCGAGTCGGGATGAAG

1.3 表达载体的构建

将含有目的基因 $fm2382$ 的pEASY-Blunt Simple- $fm2382$ 质

粒与载体pET-28a质粒分别经*Nde* I和*Hind* III消化,经电泳验证,纯化回收目的基因 $fm2382$,连接到pET-28a,转化*E. coli* Transl-T1。对阳性克隆子提取质粒,转化到*E. coli* BMBL21(DE3)。获得阳性克隆子保种备用。

1.4 磷酸酶FM2382同源性分析

利用MEGA、Clustal W等软件对蛋白FM2382与典型的HAD超家族保守区序列进行同源比对。

1.5 磷酸酶FM2382表达

将获得的*E. coli* BMBL21(DE3)-pET-28a- $fm2382$ 工程菌接种到含有终浓度50 μg/mL卡那霉素的LB液体培养基中,37℃,200 r/min条件下培养至OD_{600 nm}值0.6-0.8,加入终浓度为1 mmol/L的IPTG,换至20℃,200 r/min条件下,诱导外源基因 $fm2382$ 的表达。诱导16 h后,6 000 r/min离心10 min,收集*E. coli*菌体。用Buffer A(0.1 mol/L Tris-HCl,0.1 mol/L NaCl,0.01 mol/L咪唑,0.5 mmol/L EDTA,pH 8.0)重悬菌体,在冰水浴上超声处理,破碎细胞,至重悬液清澈透明。在4℃,12 000 r/min条件下离心10 min,收集上清液。上清液上机流经Buffer A平衡的HisTrap HP(1 mL),再用洗脱缓冲液Buffer B(0.1 mol/L Tris-HCl,0.1 mol/L NaCl,0.5 mol/L咪唑,0.5 mmol/L EDTA,pH 8.0)洗脱层析柱,收集目标蛋白。收集的蛋白溶液再流经Buffer C(0.1 mol/L Tris-HCl,0.1 mol/L NaCl,0.5 mmol/L EDTA,pH 8.0)平衡的HisTrap Desalting色谱柱脱盐除镍和Superdex 200-10/300GL分子排阻色谱柱鉴定FM2382的聚合状态。经SDS-PAGE检测和鉴定后,用超滤离心管(10×10³)浓缩得到纯酶液,采用Bradford方法^[13],对蛋白质浓度进行测定。

1.6 磷酸酶FM2382酶学性质分析

1.6.1 磷酸酶活性的测定 磷酸酶活性的测定参照文献^[14],并进行了改进。1 mL反应体系中含20 mmol/L的pNPP(p-nitrophenyl phosphate,对硝基苯磷酸二钠),2 mmol/L MgCl₂,200 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.1),10 μg/mL磷酸酶FM2382。45℃水浴孵育10 min,加入100 μL 1 mol/L NaOH混匀。在405 nm波长条件下测定吸光度值,计算水解产物pNP(4-nitrophenol,对硝基酚)的含量。磷酸酶活力定义:在45℃,pH 7.1条件下,每毫克磷酸酶每分钟水解产生pNP的量。

1.6.2 最适温度与最适pH 设置温度梯度30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃,在其它条件一致的情况下分别测定磷酸酶FM2382活性,确定其最适温度。确定最适温度后,在该温度下,在pH 3.0-9.0范围内(缓冲液体系由pH 3.0-6.6的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液和pH 7.1-9.0的Tris-HCl缓冲溶液组成)分别测定磷酸酶FM2382活性,确定其最适pH。每个反应进行3次重复。

1.6.3 热稳定性与pH稳定性 将酶液分别置于70℃、80℃、90℃、100℃水浴中保温,每隔20 min取100 μL酶液,置于冰上5 min,12 000 r/min离心10 min,取上清液,在最适条件下检测剩余酶活。将酶液分别置于pH 3.0、pH 5.0、pH 7.1、pH 9.0、pH 11缓冲溶液中,处理1 h,12 000 r/min离心10 min,取上清液,在最适条件下检测剩余酶活。每个反应进行3次重复。

1.6.4 金属离子对磷酸酶FM2382活性的影响 在纯化后

的酶液中分别加入终浓度为 1 mmol/L 的金属离子化合物 $MgCl_2$ 、 $MgSO_4$ 、 $MnCl_2$ 、 $NiCl_2$ 、 $CoCl_2$ 、 $FeCl_2$ 、 $ZnCl_2$ 、 $CuCl_2$ 、EDTA、None (未添加金属离子), 在最适条件下检测它们的相对酶活力, 以添加 $MgCl_2$ 的酶活力为 100%。每个反应进行 3 次重复。

1.6.5 酶促动力学参数测定 配制浓度范围为 0.1-10 mmol/L 的 pNPP, 在最适反应条件下分别测定 405 nm 波长下的吸光度值, 计算不同浓度底物对应的磷酸酶活力。利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算出磷酸酶 FM2382 的 K_m 、 V_m 参数。

2 结果和分析

2.1 磷酸酶 FM2382 同源性分析

将 FM2382 蛋白与已知的典型 HAD 超家族保守序列进行同源性比较, 结果如图 1 所示。典型的 HAD 超家族有 3 个非常保守的 Motif: Motif I 由 DXDX (T/V) (X 代表任意氨基酸残基) 组成, Motif II 仅含 (T/S)G—2 个氨基酸残基, Motif III 则由 K-(X)₁₈₋₃₀(G/S)(D/S)XXX(D/N) 组成。从图中可以看出, FM2382 氨基酸序列与 HAD 超家族保守序列的匹配度并不高, Motif I 中的第 2 个天冬氨酸被色氨酸 (W) 取代, Motif II 中的甘氨酸被天冬酰胺 (N) 取代, Motif III 中的赖氨酸和第 1 个天冬氨酸分别被亮氨酸 (L) 和丙氨酸 (A) 所取代, 且不难发现, 这些取代的氨基酸之间物理化学性质也截然不同。因此, 我们初步推测, FM2382 可能是 HAD 超家族中的新型磷酸酶。

	Motif I	Motif II	Motif III
PH1421	K A I S T I I G I I T . Y P N	L V T G . . N	W I N K G S I E K A S E F L G I R P R E V A H V G G E N I L D
TM0651	R V E V F G L I G L L . N D N	F A S G . . R	N V D R G K A L R F L R E R M N W K K E I V V S G N E N D L F
YidA	K L I A D M I G L L . L P D	L T T G . . R	R V N K G T S V K S L A D V L G I R P E E I M A I G G Q E N D I A
Yb1V	K V I V D M I G L F L N D A K	V A S G . . N	G L H K A N G I S R L L K R W D L S P Q N V V A I G S G N D A E
BT4131	K A L F S D I I G L V S F E T	I A T G . . R	G D T K Q K G I D E I I R H F G I R L E E T M S G G G N D I S
FM2382	G A V F C D V K E V V . . H N G	L L T N S P R	A E S L G E I G I P I L A I G D G M M T D I R G A C A F G I L A L

图 1 FM2382 与 HAD 超家族保守序列同源比较。

Fig. 1 Alignment of sequence conserved between FM2382 and HAD superfamily.

2.1 磷酸酶基因 *fm2382* 的克隆表达

以 *F. arina manganoxydans* sp. nov. 8047 菌株基因组 DNA 为模板, PCR 扩增出一条大小约为 870 bp 的条带, 连接到载体中, 进行测序验证。测序结果表明基因全长 870 bp, 编码 289 个氨基酸, 与磷酸酶 *fm2382* 基因序列完全一致, 说明载体构建成功。重组质粒 pET-28-a-*fm2382* 转化到 *E. coli* BMBL21 (DE3) 中, 经过 IPTG 诱导表达、HisTrap HP 亲和层析和 HisTrap Desalting 脱盐纯化后, 对样品进行 SDS-PAGE 电泳分析结果见图 2。发现除了有一条分子量 (M_r) 约为 30×10^3 的条带与我们基因预测所得的分子量一致外, 还有两条分子量约为 60×10^3 和 110×10^3 的细的条带。将这 3 条条带分别进行 LC-MALDI 质谱分析, 结果显示都为磷酸酶 FM2382。为了探究 FM2382 在自然条件下的聚合状态, 进行了分子筛层析实验, 如图 3 所示。图中可以看出 FM2382 主峰的 $V_e = 15.6$, 根据蛋白质分子量校正曲线计算出 FM2382 的相对分子质量为 43×10^3 , 介于理论上单体 (31×10^3) 和二聚体 (62×10^3) 分子量之间。考虑到分子排阻层析洗脱顺序除了与相对分子质量有关, 还与分子的形状密切相关, 如分子结构紧密的利血平 (一种药物) 实际相对分子质量为 608, 而在校正曲

线上对应的却是相对分子质量 410 的洗脱峰^[15]。同理, 推测 FM2382 在自然状态下是以紧密的球状二聚体形式存在的。试验还表明 FM2382 表达量较高, 纯化效果好, 获得了纯的蛋白质, 同时也说明磷酸酶 FM2382 的结构比较稳定, 普通变性方法不能完全将其解聚成单体。确定纯化得到的蛋白质是磷酸酶 FM2382 后, 用超滤离心管 (10×10^3) 浓缩纯化后的蛋白, 并用改良型 Bradford 蛋白质浓度测定试剂盒测得磷酸酶 FM2382 的浓度为 17 mg/mL。

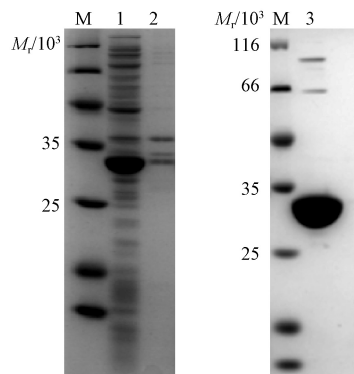


图 2 磷酸酶 FM2382 蛋白 SDS-PAGE 电泳图。1: 上清液, 2: 包涵体, 3: 纯化蛋白。

Fig. 2 SDS-PAGE of phosphatase FM2382. M: protein marker; Lane 1: supernate protein; Lane 2: inclusion-body protein; Lane 3: purified protein.

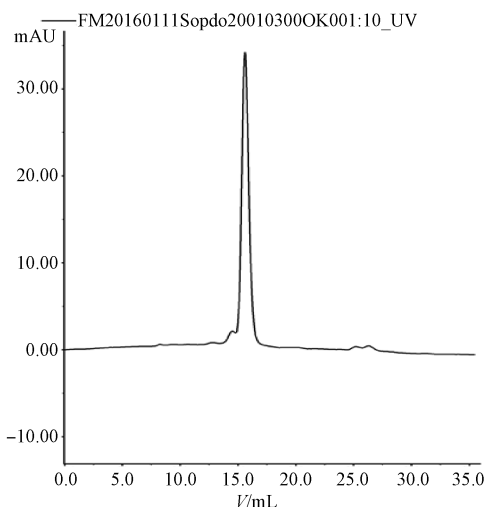


图 3 FM2382 分子排阻层析分析。

Fig. 3 Size-exclusion chromatography analysis of FM2382.

2.2 磷酸酶 FM2382 酶学性质分析

2.2.1 温度对磷酸酶 FM2382 酶活力的影响 在 30-45 °C 范围内, 随着温度的上升, 磷酸酶 FM2382 的活力逐渐提高; 当温度进一步升高时 (50-55 °C), 其活力开始下降。因此, 最适温度为 45 °C 左右, 结果见图 4。对其热稳定性进行分析, FM2382 在 4 °C 处理 2 h, 酶活力保持稳定, 这与一般的酶性质类似。70-80 °C 高温处理 30 min 仍能保持 50%-60% 的活力, 且 1 h 后还具 35% 左右的活力, 表明 FM2382 具有一定的耐高温性, 结果见图 5。

2.2.2 pH 对磷酸酶 FM2382 酶活力的影响 在强酸性条件 (pH 3.0- 5.0) 下, 磷酸酶 FM2382 几乎没有活力, 且在 pH 5.0

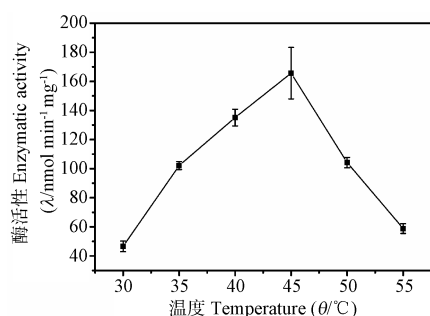


图4 磷酸酶FM2382最适反应温度。

Fig. 4 Optimum temperature of phosphatase FM2382.

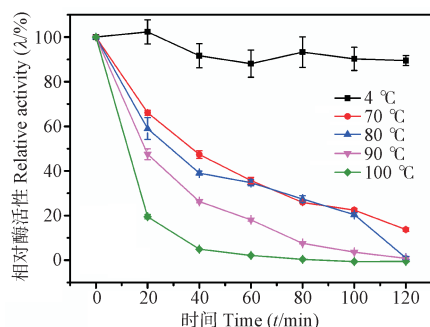


图5 磷酸酶FM2382温度稳定性。

Fig. 5 Thermal stability of phosphatase FM2382.

时有部分絮状物产生。根据基因预测得到FM2382的理论pI为4.72, 推测在pH 5.0环境下, FM2382的净电荷趋近于零, 导致蛋白质分子之间的静电力减小, 从而形成聚集沉淀, 表现出来即为剩余酶活力的降低。在pH 6.0- 7.1时, FM2382活力迅速升高; 在中性偏碱性条件 (pH 7.1-9.0) 下, FM2382活力开始下降。因此磷酸酶FM2382最适pH为7.1左右, 结果见图6。酶活的pH稳定性试验表明, 磷酸酶FM2382在pH 7.1-9.0之间比较稳定, 处理1 h后酶活保持在较高的水平几乎不变。在pH 5.0条件下处理1 h, FM2382几乎没有表现出活力, 进一步证明了由等电点沉降引起的剩余酶活力的降低, 结果见图7。

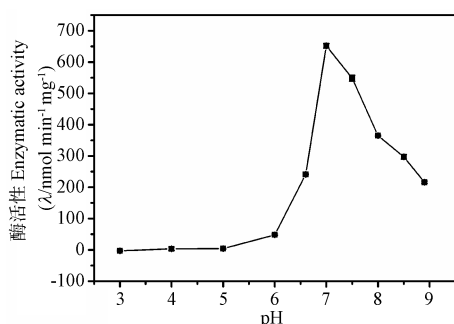


图6 磷酸酶FM2382最适pH。

Fig. 6 Optimum pH of phosphatase FM2382.

2.2.3 金属离子对磷酸酶FM2382活性的影响 磷酸酶FM2382活力会受到不同金属离子的影响。Mg²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Ni²⁺对FM2382有不同程度的激活作用, 其中Mn²⁺对FM2382具有强烈的激活作用, 约为Mg²⁺的4.5倍。这可能与fm2382基因来源于*F. manganoxydans*有关, 该菌为锰氧化菌, 在其生理代谢过程中多有锰元素的参加, 而该基因编码的FM2382在执行生物学功能过程中对Mn²⁺有更强的适应性,

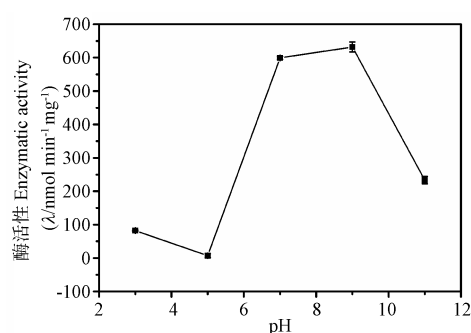


图7 磷酸酶FM2382 pH稳定性。

Fig. 7 The pH stability of phosphatase FM2382.

因此表现出较高的酶活力。Zn²⁺、EDTA对酶活力有抑制作用, 使得酶活力几乎为零。而Cl⁻、SO₄²⁻等阴离子对FM2382的活力没有明显影响。结果见图8。

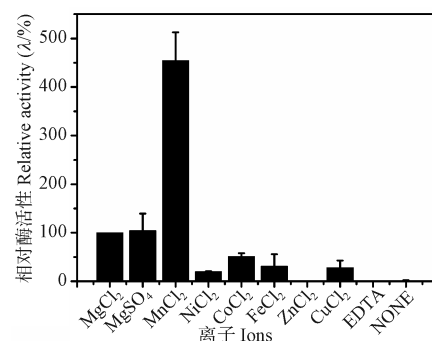


图8 金属离子对磷酸酶FM2382活力的影响。

Fig. 8 Effect of metal ions on phosphatase activity of FM2382.

2.2.4 酶促动力学参数测定 磷酸酶FM2382与一系列不同浓度的pNPP反应, 根据Lineweaver-Burk双倒数作图法计算出磷酸酶FM2382的 $K_m = 1.42 \times 10^{-3}$ mol/L, $V_m = 2.5 \times 10^{-7}$ mol/L, 结果见图9。

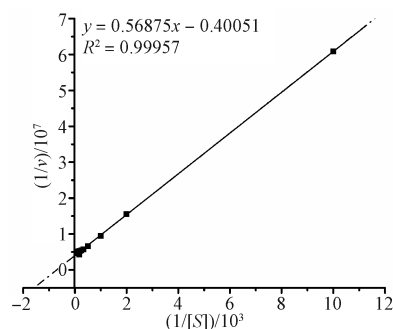


图9 磷酸酶FM2382双倒数曲线图。

Fig. 9 Double reciprocal diagram of phosphatase FM2382.

3 讨论

本研究成功地从新种*F. manganoxydans* sp. nov基因组中获取了目的基因fm2382, 并在大肠杆菌中大量重组表达。对其生物学功能进行研究, 发现该基因编码的蛋白质FM2382具有磷酸酶功能, 与NCBI和PDB数据库序列比对给出的注释具有脱卤酶功能的结果不完全相符, 这也证实了现有数据库中大量不准确基因功能注释的现象^[8]。虽然fm2382

预测为HAD超家族的成员,且试验结果表明编码的蛋白FM2382有磷酸酶功能,但没有HAD超家族磷酸酶核心区典型的Motif I [DXDX(T/V)]、Motif II [(S/T)G]和Motif III [K-(X)₁₈₋₃₀-(G/S)(D/S)XXX(D/N)]这3个保守区^[14, 16-17]。因此,结合功能性试验结果和生物信息学分析,我们推测该酶为HAD超家族中的另一类新型磷酸酶。

为了在酶学性质上探讨大肠杆菌重组表达的磷酸酶FM2382,我们以pNPP为底物,对纯化后的FM2382磷酸酶活性进行了详细研究。结果表明,FM2382的最适温度约为45℃,热稳定性试验表明FM2382具有一定的耐热性。此外,FM2382最适pH在7.1左右,说明FM2382为中性磷酸酶^[18];在pH 7.1-9.0之间比较稳定,处理1 h后酶活仍能保持在较高的水平。金属离子试验表明,FM2382是一种金属离子依赖型磷酸酶,其中对Mn²⁺的依赖型最强;而Zn²⁺和EDTA对FM2382磷酸酶活性存在抑制作用,几乎检测不到磷酸酶的活性。从动力学参数可以看出,本研究中FM2382的 $K_m = 1.42 \times 10^{-3}$ mol/L, $V_m = 2.5 \times 10^{-7}$ mol/L,与其他文献报道的 K_m 值^[19-20]相比较,FM2382与底物pNPP的亲合力处于较高水平。

本研究首次在*F. manganoxydans* sp. nov.中发现了一个具有良好温度稳定性的中性磷酸酶基因 $fm2382$,并在大肠杆菌中重组表达。对其编码的FM2382蛋白进行了初步研究,发现其为HAD超家族中的新型磷酸酶。在此基础上,课题组后期将着手开发磷酸酶FM2382潜在的应用价值,即进一步研究FM2382对有机磷农药的降解和检测情况,使该酶能够在环境生物修复和农药残留检测方面发挥作用。此外,本研究还可丰富磷酸酶的种类和来源以及后续的应用研究奠定基础,为*F. manganoxydans* sp. nov.基因资源的开发创造条件。

参考文献 [References]

- Ren F, Zhang L, Song L, Xu S, Xi L, Huang L, Huang Y, Dai X. *Fulvimarina manganoxydans* sp. nov., isolated from a deep-sea hydrothermal plume in the south-west Indian Ocean [J]. *Intern J Syst Evol Microbiol*, 2014, **64**: 2920-2925
- Cho JC, Giovannoni SJ. *Fulvimarina pelagi* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium that forms a deep evolutionary lineage of descent in the order "Rhizobiales" [J]. *Intern J Syst Evol Microbiol*, 2003, **53**: 1853-1859
- Huang J, Xin Y, Zhang W. Isolation, characterization and identification of a *Paracoccus* sp. 2-haloacid-degrading bacterium from the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* [J]. *J Basic Microbiol*, 2011, **51** (3): 318-324
- Koudelakova T, Chovancova E, Brezovsky J, Monincova M, Fortova A, Jarkovsky J, Damborsky J. Substrate specificity of haloalkane dehalogenases [J]. *Biochem J*, 2011, **435** (2): 345-354
- Novak HR, Sayer C, Isupov MN, Paszkiewicz K, Gotz D, Spragg AM, Littlechild JA. Marine Rhodobacteraceae L-haloacid dehalogenase contains a novel His/Glu dyad that could activate the catalytic water [J]. *FEBSJ*, 2013, **280** (7): 1664-1680
- Novak HR, Sayer C, Panning J, Littlechild JA. Characterisation of an L-haloacid dehalogenase from the marine psychrophile *Psychromonas ingrahamii* with potential industrial application [J]. *Mar Biotechnol*, 2013, **15** (6): 695-705
- Schmidberger JW, Wilce JA, Tsang JS, Wilce MC. Crystal structures of the substrate free-enzyme, and reaction intermediate of the HAD superfamily member, haloacid dehalogenase DehIVa from *Burkholderia cepacia* MBA4 [J]. *J Mol Biol*, 2007, **368** (3): 706-717
- Kuznetsova E, Nocek B, Brown G, Makarova KS, Flick R, Wolf YI, Khusnutdinova A, Evdokimova E, Jin K, Tan K, Hanson AD, Hasnain G, Zallot R, de Crecy-Lagard V, Babu M, Savchenko A, Joachimiak A, Edwards AM, Koonin EV, Yakunin AF. Functional diversity of haloacid dehalogenase superfamily phosphatases from *Saccharomyces cerevisiae*: biochemical, structural, and evolutionary insights [J]. *J Biol Chem*, 2015, **290** (30): 18678-18698
- Koonin EV, Tatusov RL. Computer-analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity - application of an iterative approach to database search [J]. *J Mol Biol*, 1994, **244** (1): 125-132
- Allen KN, Dunaway-Mariano D. Markers of fitness in a successful enzyme superfamily [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2009, **19** (6): 658-665
- Aravind L, Galperin MY, Koonin EV. The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold [J]. *Trends Biochem Sci*, 1998, **23** (4): 127-129
- Seifried A, Schultz J, Gohla A. Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease [J]. *FEBSJ*, 2013, **280** (2): 549-571
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248-254
- Yamamoto H, Takio K, Sugahara M, Kunishima N. Structure of a haloacid dehalogenase superfamily phosphatase PH1421 from *Pyrococcus horikoshii* OT3: oligomeric state and thermoadaptation mechanism [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2008, **64**: 1068-1077
- 朱明华, 胡坪. 仪器分析[M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2008: 75
- Allen KN, Dunaway-Mariano D. Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold [M]. *Trends Biochem Sci*, 2004, **29** (9): 495-503
- Roberts A, Lee SY, McCullagh E, Silversmith RE, Wemmer DE. YbiV from *Escherichia coli* K12 is a HAD phosphatase [J]. *Proteins*, 2005, **58** (4): 790-801
- Dick WA, Juma NG, Tabatabai MA. Effects of soils on acid-phosphatase and inorganic pyrophosphatase of corn roots [J]. *Soil Sci*, 1983, **136** (1): 19-25
- Keppetipola N, Shuman S. Mechanism of the phosphatase component of *Clostridium thermocellum* polynucleotide kinase-phosphatase [J]. *RNA*, 2006, **12** (1): 73-82
- Zhang ZY, Clemens JC, Schubert HL, Stuckey JA, Fischer MW, Hume DM, Saper MA, Dixon JE. Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant *Yersinia* protein tyrosine phosphatase [J]. *J Biol Chem*, 1992, **267** (33): 23759-23766