

Thermococcus siculi HJ21 α -淀粉酶 Asp186 定点突变对酶活性的影响

吕明生¹, 杨帆^{1,2}, 胡建恩², 房耀维¹, 焦豫良¹, 王淑军^{1,*}, 刘姝¹

(1. 淮海工学院海洋学院, 江苏连云港 222005; 2. 大连海洋大学食品工程学院, 辽宁大连 116023)

摘要: 为确定嗜嗜热古菌 *Thermococcus siculi* HJ21 α -淀粉酶(TSA)中特定氨基酸及所在位点与酶活性间的关系, 以含 TSA 基因的 pEt-28a-His₆ 质粒为模板, 利用定点突变技术, 将第 186 位点的天冬氨酸(Asp)突变为天冬酰胺(Asn), 突变子转化至 *E. coli* BL21(DE3)并经 IPTG 诱导表达, 测定突变前后的酶活性, 定点突变后的 TSA 无酶活性; 采用 DNASTar 和 Deepview 蛋白分析软件, 预测突变前后 TSA 蛋白的二级结构和三级结构, 结果表明 *Thermococcus siculi* HJ21 α -淀粉酶的 186 位点对维持 TSA 的酶活性具有重要意义, 它的突变导致酶蛋白二级结构组件及氢键网络的变化。

关键词: α -淀粉酶; 定点突变; TSA 基因; 186 位点; 酶活性

Effect of Site-Directed Mutagenesis of Asp186 on Activity of *Thermococcus siculi* HJ21 α -Amylase

LÜ Ming-sheng¹, YANG Fan^{1,2}, HU Jian-en², FANG Yao-wei¹, JIAO Yu-liang¹, WANG Shu-jun^{1,*}, LIU Shu¹

(1. College of Marine Science, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. College of Food Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: In order to determine the relationship between amino acid residue at the special site and the activity of *Thermococcus siculi* HJ21 α -amylase, pEt-28a-His₆ plasmid with TSA gene was used as a template for the site mutagenesis from Asp186 to Asn186. The activity of α -amylase with and without mutation was measured. According to the difference between per-mutant and mutant cDNA sequences, the secondary structure and three-dimensional structure of TSA protein were also predicted using DNASTar and Deepview protein analysis software. The results showed that Asp186 was of critical significance for maintaining the activity of *T. siculi* HJ21 α -amylase. The site-directed mutagenesis of *T. siculi* HJ21 α -amylase at position 186 changed the properties of secondary structure as well as hydrogen-bonding networks, thus resulting in the loss of its activity.

Key words: α -amylase; site-directed mutagenesis; TSA gene; position 186; enzymatic activity

中图分类号: Q71

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0200-05

α -淀粉酶(EC3.2.1.1)是应用最广泛的酶制剂之一, 在动物、植物、微生物中均能产生, 但微生物发酵是 α -淀粉酶大量生产的主要方式^[1-2]。许多微生物中均能产生 α -淀粉酶, 主要有: *Bacillus* sp.、*Bacteroides* sp.、*Clostridium* sp.、*Thermophile* sp.、*Thermomonospora* sp.、*Acinetobacter* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Streptomyces* sp.、*Thmoactinomyces* sp.、*Aspergillus* sp.、*Mucor* sp.、

Neurospora sp.、*Penicillus* sp.等, 其中, 来自于嗜嗜热微生物的 α -淀粉酶因具有反应温度高、液化速度快、对 Ca²⁺ 依赖性小、pH 值稳定性高等特点而被作为一种理想的模型体系来探索极端环境条件下的酶催化和稳定机制。深海古菌 *Thermococcus siculi* HJ21 菌株分泌的 α -淀粉酶最适作用温度 95℃, 在 100℃有 60% 的酶活力, 且保温 2h 和 3h 后分别有 40% 和 30% 的残余酶

收稿日期: 2011-04-14

基金项目: 江苏省高校自然科学研究重大项目(09KJA170001); 江苏省科技支撑计划项目(BE2008340);

江苏省高校自然科学基金项目(08KJB550001)

作者简介: 吕明生(1963—), 男, 副教授, 学士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: mingshenglu@hotmail.com

*通信作者: 王淑军(1965—), 女, 教授, 博士, 研究方向为海洋微生物及其活性物质。E-mail: shujunwang86@163.com

活, 酶的最适作用 pH 5.0, 在 pH4.5 有 80% 的酶活力, 同时, 热稳定性不依赖 Ca^{2+} , 实用性好于其他已报道的超嗜热 α -淀粉酶^[3-9]。目前已对该酶进行了基因克隆、原核表达和定向进化, 构建了基因工程菌, 优化了菌株的发酵条件, 纯化了重组酶和突变酶并研究了酶学性质, 然而, 酶分子结构与功能之间的关系仍有待探索^[10-12]。

本实验通过 Blast 搜索获得 *P. woesei* 分泌的蛋白相似水平达 87.3% α -淀粉酶基因序列, 并在蛋白质数据库中(protein data bank, PDB)得到它的晶体结构(PDB: 1MWO), 经比对分析, 推测处于超嗜热古菌 *T. siculi* HJ21 α -淀粉酶 Domain A 的无规则卷曲上的第 186 位点氨基酸(Asp)可能对维持酶的活性起到一定的作用^[13], 结合 Takase 等^[14]对 *B. subtilis* α -淀粉酶的氨基酸残基上的一 NH_2 末端的相关分析, 设计了 Asp186(天冬氨酸)→Asn(天冬酰胺)的定点突变, 密码子由 GAC 变为 AAC, 测定了突变前后的酶活性, 分析了酶的二级结构和三级结构, 在此基础上, 初步探讨超嗜热古菌 *T. siculi* HJ21 α -淀粉酶的活性机制, 为高温耐酸 α -淀粉酶的分子设计和改造提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 菌种与宿主菌

深海古菌 *T. siculi* HJ21 α -淀粉酶基因由本课题组克隆, 保存在 pEt-28a 质粒上, 保藏于 *E. coli* DH5 α 中。克隆宿主 *E. coli* DH5 α , 表达宿主 *E. coli* BL21(DE3)。

1.1.2 试剂与培养基

酵母提取物、胰蛋白胨 英国 Oxoid 公司; *pfu* DNA 聚合酶、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-乳糖苷(X-gal)、异丙基- β -D-乳糖苷(IPTG) Promega 公司; 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I、卡那霉素(Kan)和质粒提取试剂盒上海生工生物工程技术有限公司; 其他试剂为国产分析纯。

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5、胰蛋白胨 10、NaCl 10, 用 NaOH 调 pH 值至 7.0。LB/Kan 培养基: 含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基。LB/Kan/IPTG/X-Gal 培养基: 含有 10 μL 20% IPTG、40 μL 2% X-Gal 的 LB/Kan 培养基。

1.1.3 仪器与设备

170-6701PCR 仪 美国伯乐公司; 全自动多功能酶标仪 美国 Bio Tek 公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计

利用软件 Primer 5.0, 根据已克隆的超嗜热 α -淀粉

酶基因序列设计引物。

突变子: Asp186-Asn GAC-AAC; 引物 P_1 : 5'-GCGCGAATTCATGAACAGGGGTATAT-3'; 引物 P_2 : 5'-CTTTGGCGGCTATCCGAACATATGCCACGACAA-3'; 引物 P_3 : 5'-TTGTCGTGGCATATGTTTCGGATAGC CGCCAAAG-3'; 引物 P_4 : 5'-TAGTCGACTCAGCC CACCCCACAG-3'; 引物 P_1 与 *T. siculi* HJ21 α -淀粉酶的成熟肽结构基因 5' 端互补, 其自身含有起始密码子 ATG。且引物 P_1 的 5' 增加了 *EcoR* I 酶切位点。引物 P_4 为下游引物, 与 TSA 的结构基因下游序列互补, 并含 *Sal* I 酶切位点。 P_2 和 P_4 为不完全互补的两条核苷酸单链。

1.2.2 质粒的提取

将含质粒 pEt-28a-His₆-TSA 的 *E. coli* DH5 α 按照 1% 接种量接种于 LB/Kan 培养基中培养至 OD_{600nm} 值在 0.6~0.8 之间, 按照说明书提取质粒。

1.2.3 定点突变-Over-lap 法

第一轮 PCR: 反应体系: 10 \times PCR Buffer(含 MgCl_2) 5 μL , dNTP 1 μL 、质粒 pEt-28a-His₆-TSA 1 μL , 引物 P_1 & P_3 或 P_2 & P_4 各 1 μL , 加入双蒸水 40 μL 。轻轻混匀, 最后加入 *pfu* DNA 聚合酶 1 μL (2.5U), 使 PCR 反应体系为 50 μL 。有引物对 P_1 & P_3 或 P_2 & P_4 扩增出的片段分别为 C1 和 C2。

反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min, 进行 PCR 反应(94 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60s), 经过 30 个热循环。热循环后, 置冰上 2min。

第二轮 PCR: 将第一轮 PCR 产物等体积混合, 取 1 μL 混合物作为模板, 以 P_1 & P_4 为引物, 使用 *pfu* DNA 聚合酶进行第二轮扩增。PCR 反应条件如上。胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

1.2.4 重组表达质粒的构建与鉴定

将 PCR 产物和非突变型的 pEt-28a-His₆-TSA 质粒用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切后在 T4DNA 酶作用下进行连接, 取 5 μL 连接物加入至 100 μL *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 轻轻混匀, 冰浴 30min 后; 42 $^{\circ}\text{C}$ 热休克 90s, 迅速转移至冰浴中, 继续冰浴 2min; 加入 LB 液体培养基 400 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 、120r/min 孵育 45min; 将培养物 100 μL 涂布到 LB/Kan/IPTG/X-Gal 琼脂平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱正放培养 30min 后, 倒置培养 14h, 长出转化子。采用蓝白斑筛选法筛选阳性克隆子。扩大培养白色克隆子, 提取质粒, 双酶切鉴定和测序。将测序含突变子的质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3)。

1.2.5 超嗜热古菌 *T. siculi* HJ21 α -淀粉酶的制备

将 *E. coli* BL21、含 pEt-28a-His₆ 质粒的 *E. coli* BL21(DE3)、含突变型或非突变型 TSA 基因的重组菌单个菌落分别接种于 5mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 取新

鲜种子液4mL于100mL LB/Kan培养基中, 37℃、180r/d, 培养至OD₆₀₀值在0.6~0.8之间。加入IPTG, 使其终浓度为4mmol/L, 诱导表达5h。然后8000 × g离心5min, 收集菌体。将诱导表达收集的菌体, 用50mmol/L pH7.0磷酸缓冲液洗涤两次。再用50mmol/L、pH7.0磷酸缓冲液重悬菌体, 超声波破碎菌体(400W, 超声3s, 停7s, 共超声15min), 4℃、12000 × g离心20min, 收集上清液作为粗酶液。粗酶液的纯化参见文献[10-11]。

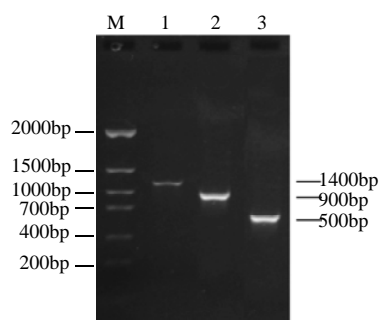
1.2.6 嗜嗜热古菌 *T. siculi* HJ21 α -淀粉酶的酶活力测定

取10 μ L酶液于10mL试管中, 加入190 μ L 1g/100mL的可溶性淀粉乙酸钠缓冲液(50mmol/L, pH 5.0), 在95℃水浴中反应30min, 冷却, 加入200 μ L DNS终止反应, 沸水中显色10min。最后加入3mL蒸馏水稀释, 混匀, 在520nm波长处测吸光度^[10-11]。

酶活单位定义: 在相应条件下, 1min催化产1 μ mol麦芽糖的酶量, 即为1个酶活力单位, 以1U表示。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增结果



M. DL2000 DNA Marker; 1. 突变 TSA 基因扩增产物; 2. 片段 C2 扩增产物; 3. 片段 C1 扩增产物。

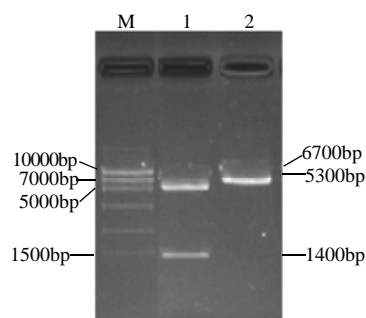
图1 PCR产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Argarose gel electrophoresis analysis of PCR products

由图1可知, 以pEt-28a-His₆-TSA为模板, 直接用引物P₁和P₄扩增得到了长度约为1400bp大小的片段, 以引物P₁和P₃扩增所得的片段C1在500bp左右, 以引物P₂和P₄为引物扩增所获得片段C2为900bp左右, 以C1和C2作为重叠模板进行重叠PCR的扩增产物大小亦为1400bp左右, 符合实验预期结果。

2.2 重组质粒的酶切鉴定及DNA测序鉴定结果

1%琼脂糖凝胶电泳筛选到的重组质粒用限制性内切酶EcoR I和Sal I双酶切切下约1400bp的插入片段, 初步表明重组质粒构建成功(图2)。DNA测序重组质粒成功地插入了TSA片段, 同时重组质粒插入的TSA片段在186位点的密码子由GAC变为AAC。



M. DNA Marker; 1. 重组质粒 pEt-28a-His₆-TSA 的 EcoRI 和 Sal I 酶切生物; 2. 重组质粒 pEt-28a-His₆-TSA。

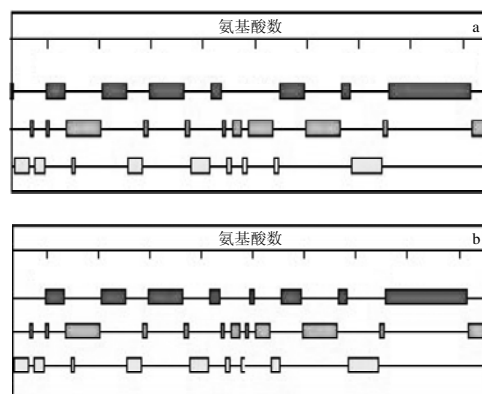
图2 重组质粒 pEt-28a-His₆-TSA 双酶切产物电泳图

Fig.2 Argarose gel electrophoresis analysis of plasmid pEt-28a-His₆-TSA digested by EcoR I and Sal I

2.3 嗜嗜热古菌 *T. siculi* HJ21 所产 α -淀粉酶的活性测定

E. coli BL21(DE3)和含pEt-28a-His₆质粒的*E. coli* BL21(DE3)菌株均未检测到 α -淀粉酶的产生; 含非突变型TSA基因的pEt-28a-His₆质粒的*E. coli* BL21(DE3)重组菌能有效地表达 α -淀粉酶, 其酶活力为89.68U; 含突变型TSA基因的pEt-28a-His₆质粒的*E. coli* BL21(DE3)重组菌表达的 α -淀粉酶未测到酶活性。

2.4 突变前后TSA二级结构的比较



■ β -折叠; □ β -转角; □ β -无规则卷曲;
a. 突变前 *T. siculi* HJ21 α -淀粉酶二级结构;
b. 突变后 *T. siculi* HJ21 α -淀粉酶二级结构。

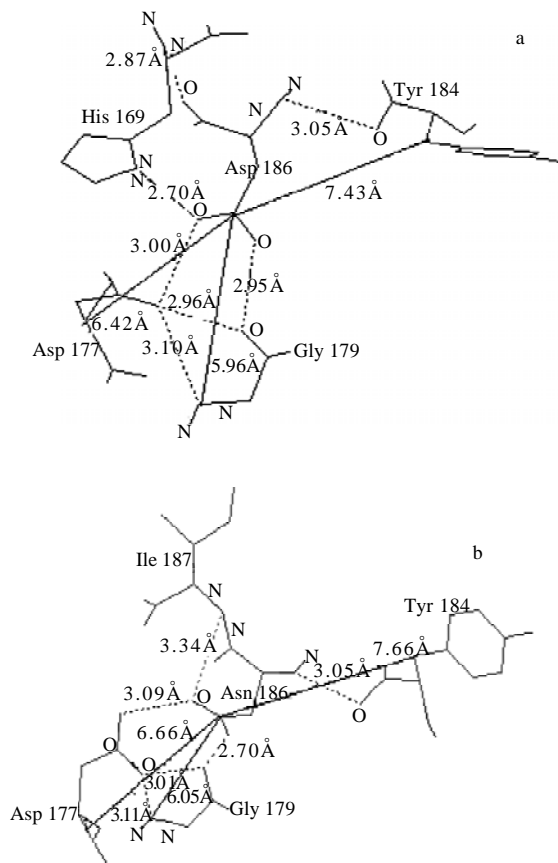
图3 *T. siculi* HJ21 α -淀粉酶二级结构的预测

Fig.3 Prediction of secondary structure of *T. siculi* HJ21 α -amylase

利用DNASar软件, 通过准确率较高的Garnier-Robson法计算特定氨基酸在特定结构内部的可能性来预测蛋白质分子中的卷曲螺旋(coiled coil)、螺旋、 β -折叠、 β -转角以及无规则卷曲等二级结构区域^[15]。如图

3所示,突变后二级结构在约175~190氨基酸处的含量升高,具体表现为 β -折叠和 β -转角较突变前各增加一个,而无规则卷曲较突变前发生了松弛,loop环平均长度增加。

2.5 突变前后三级结构的比较



a. 186位点突变前的三级结构; b. 186位点突变后的三级结构。

图4 超嗜热 α -淀粉酶186位点三级结构突变前后放大图

Fig. 4 Three-dimensional structures of *T. siculi* HJ21 α -amylase with and without mutation

通过Swiss-model构建*T. siculi* HJ21 α -淀粉酶突变前后的立体结构,突变前后 α -淀粉酶的整体三维结构基本一致,186突变位点位于酶分子的表面,在结构域A的无规则卷曲上。由图4可知,利用Deepview软件分析186位点突变前后氢键的变化,由于186位点的Asp变为Asn,氢键由5个变为4个,且与之形成氢键的氨基酸种类及氢键距离均发生了改变。突变前,Asp186与Tyr184(键间距离为3.05Å)、His169(2.87Å和2.70Å)、Asp177(3.00Å)、Gly179(2.95Å)形成氢键;突变后,186Asn分别与Tyr184(键间距离为3.05Å)、Asp177(3.09Å)、Gly179(2.70Å)、Ile187(3.34Å)形成氢键,与His169形成的两个氢键被完全断开。同时,186位点和周围氨基酸残基的距离也发生了改变,突变前,

Asp186与Asp177、Gly179和Tyr184残基之间的距离分别是6.42Å、5.96Å和7.43Å,突变后,Asn186上述氨基酸残基之间的距离改变为6.66Å、6.05Å和7.66Å。

3 讨论

由实验得到*T. siculi* HJ21 α -淀粉酶的蛋白质结构还未见报道,突变效应的分析在一定程度上受到了制约,通过模型模拟的方法预测该酶分子结构将有助于对该酶分子结构与功能关系的理解,认为*T. siculi* HJ21 α -淀粉酶经186Asp定点突变丧失生物活性的主要原因在于酶蛋白的非折叠态构象,熵的增加破坏了该酶原有的嗜热机制^[16]。

3.1 酶蛋白一级结构的影响

Asp186突变成Asn后,与His169的两个带电荷-带电荷型氢键被断开,而与Ile187形成一个非电荷-非电荷型氢键。Ile存在 C_{β} 支链且不带电荷,当一级结构通过氢键折叠成对活力发挥关键作用的螺旋结构时易产生较大的构象张力^[17],此外,高温下Asn脱氨作用导致的非酶促不可逆反应也可能产生一定的影响^[18]。

3.2 酶蛋白天然构象的影响

T. siculi HJ21与*P. woesei*的同源性达87.3%,而*P. woesei*与BLA的同源性却只有29%^[19],但它们的三级结构极其相似,是由常见的二级结构元件,如 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角等,排列堆积而成,同时,还都含有典型的 $(\alpha/\beta)_8$ 桶状结构(亦称之TIM-桶),简言之,TIM-桶也是*T. siculi* HJ21 α -淀粉酶具有催化活性的关键因素^[9,20]。然而,Asp186变为Asn的定点突变发生在TIM-桶结构的非保守区,对酶蛋白催化活性中心的影响应归结为酶蛋白高级结构中非共价力的变化,由于突变位点附近loop环的平均长度、二级结构组件的总含量、氢键间的平均距离以及氨基酸残基间的平均距离均有所增加,故突变后多肽链折叠时的构象熵也得到了相应地提高^[21]。有趣的是,非电荷-非电荷型氢键的数量增加了,而带电荷-带电荷型氢键的数量却减少了,这与氢键和蛋白耐热性间关系的统计结果相吻合^[22]。

4 结论

通过生物信息学同源建模,比较了超嗜热古菌*T. siculi* HJ21所产 α -淀粉酶突变前后的分子结构,发现氨基酸的种类、氨基酸残基之间的距离、残基之间形成的氢键网络、二级结构组件的含量与长度等多个因素都会对酶折叠构象所对应的自由能产生影响,即便蛋白结构的变化极其微小,也能显著改变酶的生物活性。

参考文献:

- [1] van der MAAREL M J, van der VEEN B, UITDEHAAG J C, et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family[J]. Journal of Biotechnology, 2002, 94: 137-155.
- [2] VIOLET M, MEUNIER J C. Kinetic study of the irreversible thermal denaturation of *Bacillus licheniformis* α -amylase[J]. Journal of Biochemistry, 1989, 263: 665-670.
- [3] VIEILLE C, ZEIKUS G J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability[J]. Microbiol. Mol Biol Rev, 2001, 65: 1-43.
- [4] BERTOLDO C, ANTRANIKIAN G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria[J]. Curr Opin in Chemical Biology, 2002, 6: 151-160.
- [5] 熊鹏钧, 文建军. 嗜热菌 *Thermus* sp. YBJ-1 的分离和淀粉酶基因的克隆[J]. 生物工程学报, 2004, 20(3): 434-436.
- [6] 蒋专, 杨慧芬, 邱并生, 等. 硫磺矿硫化叶菌耐酸 α -淀粉酶基因的克隆及其在枯草芽孢杆菌中的表达[J]. 中国科技信息, 2006(6): 317-318.
- [7] 郭建强, 李运敏, 岳丽丽, 等. 超耐热酸性 α -淀粉酶基因的克隆及其在酵母细胞中的表达[J]. 生物工程学报, 2006, 22(2): 237-242.
- [8] LÉVEQUE E, HAYE B, BELARBI A. Cloning and expression of an α -amylase encoding gene from the hyperthermophilic archaeobacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterization of the recombinant enzyme[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 186: 67-71.
- [9] WANG Shujun, LÜ Zhaoxin, LÜ Mingsheng, et al. Identification of archaeon producing hyperthermophilic α -amylase and characterization of the α -amylase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(4): 1432-0614.
- [10] 王淑军. 超嗜热古菌 *Thermococcus sicuti* HJ21 高温酸性 α -淀粉酶及其基因克隆的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [11] 姚婷, 李华钟, 房耀维, 等. 定点突变提高 *Thermococcus sicuti* HJ21 高温酸性 α -淀粉酶催化活性的研究[J]. 食品科学, 2011, 32(15): 148-152.
- [12] 胡建恩, 曹茜, 扬帆, 等. 高温 α -淀粉酶高密度高表达发酵条件的研究[J]. 食品科学, 2012, 33(1): 219-225.
- [13] LINDEN A, MAYANS O, MEYER-KLAUCKE W, et al. Differential regulation of a hyperthermophilic α -amylase with a novel(Ca, Zn) two-metal center by zinc[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278: 9875-9884.
- [14] TAKASE K, MIZUNO H, YAMANE K. NH₂-terminal processing of *Bacillus subtilis* α -amylase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1988, 263: 11548-11553.
- [15] GARNIER J, OSGUTHORPE D J, ROBSON B. Analysis of the accuracy and implications of simple method for predicting the secondary structure of globular proteins[J]. J Mol Biol, 1978, 120: 97-120.
- [16] MALAKAUSKAS S M, MAYO S L. Design, structure and stability of a hyperthermophilic protein variant[J]. Nat Struct Biol, 1998, 5: 470-475.
- [17] FACCHIANO A M, COLONNA G, RAGONE R. Helix stabilizing factors and stabilization of thermophilic proteins: an X-ray based study [J]. Protein Eng, 1998, 11(9): 753-760.
- [18] ICHIKAWA J K, CLARKE S. A highly active protein repair enzyme from an extreme thermophile: the *L*-isoaspartyl methyltransferase from *Thermotoga maritima*[J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 358(2): 222-231.
- [19] LINDEN A, MAYANS O, MEYER-KLAUCKE W. Differential regulation of a hyperthermophilic α -amylase with a novel(Ca, Zn) two-metal center by zinc[J]. Biol Chem, 2003, 278(11): 9875-9884.
- [20] MACGREGOR E A, JANECEK S, SVENSSON B, et al. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1546(1): 1-20.
- [21] THOMPSON M J, EISENBERG D. Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability[J]. J Mol Biol, 1999, 290(2): 595-604.
- [22] 丁彦蕊, 蔡宇杰, 须文波. 氢键与蛋白质耐热性关系的研究[J]. 计算机与应用化学, 2007, 24(5): 641-644.