

拟南芥谷胱甘肽 *S*-转移酶 Zeta 类 进化酶的获得及其特性分析*

陶苏丹** 陈喜文** 刘 佳 贾向东 陈德富***

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要 拟南芥谷胱甘肽 *S*-转移酶 Zeta 类(*AtGSTZ*)是一种与细胞代谢和环境净化密切相关的多功能酶。应用易错 PCR 和多轮 DNA 洗牌技术构建了 *AtGSTZ* 随机突变文库, 再利用 pH 指示剂颜色改变法对突变文库进行筛选, 获得了 9 个二氯乙酸脱氯活性提高的突变子。其中, NN23 含 25 个氨基酸突变, 比活力提高 120%, NN20 含 24 个氨基酸突变, 比活力提高 102%, EC1 含 2 个氨基酸突变, 比活力提高 47%, 其他 6 个为单点突变, 比活力分别提高 9%~60%。酶学分析显示, 所有进化酶对底物二氯乙酸的催化效率和对谷胱甘肽的亲和力以及个别进化酶的复性能力都得到不同程度的提高, 但热稳定性均没有明显改善。同时, 对一系列与 *AtGSTZ* 空间折叠及催化活性相关位点进行了讨论。

关键词 进化子, 二氯乙酸脱氯(DCA-DC)活性, 热稳定性, 复性能力, 拟南芥谷胱甘肽 *S*-转移酶 Zeta 类

学科分类号 Q555, Q75

谷胱甘肽 *S*-转移酶(glutathione *S*-transferases, GSTs, EC 2.5.1.18)是一种具有解毒作用的超家族二聚体蛋白酶, 普遍存在于细菌、真菌、植物及动物细胞中^[1]。植物 GSTs 分为 4 大类: phi、tau、theta 及 zeta^[2]。Zeta 类(GSTZ)由于其性质独特, 自 1997 年被发现以来越来越受到关注。它能有效降解包括二氯乙酸(DCA)在内的多种卤代物, 而 DCA 是自来水氯处理过程中产生的对啮齿类动物具有强致癌毒性的副产物^[3], 因此该酶的二氯乙酸脱氯(DCA-DC)活性已成为人们关注的焦点。此外, GSTZ 还具有顺丁烯二酰乙酰乙酸异构酶活性, 在生物体内苯丙氨酸、酪氨酸等氨基酸代谢中起关键作用^[4]。

拟南芥来源的 GSTZ 简写为 *AtGSTZ*, 其单体由 221 个氨基酸残基组成, 编码基因的开放阅读框为 666 个碱基^[5]。*AtGSTZ* 单体的晶体结构已被测定, 由 2 个结构域组成, 即 N 端结构域和 C 端结构域。N 端结构域由 1~84 位氨基酸组成, 此区域非常保守, 是谷胱甘肽(GSH)的结合区域(G-site); C 端结构域由 93~221 位氨基酸组成, 此区域高度可变, 是疏水底物结合区(H-site)^[5]。虽然 *AtGSTZ* 的晶体结构已被测定, 但其相关研究的深度远不如

其他家族的 GSTs^[6~8], 如对结构的了解仅限于其活性中心, 功能位点还不很清楚, 催化性质仅限于酶动力学研究^[4, 9~11]。

酶的体外定向进化是近几年发展起来的蛋白质改造新技术, 不仅能获得有重要经济价值的进化子, 还适合于蛋白质结构-功能关系分析^[12]。本文应用易错 PCR(error-prone PCR, EP-PCR)^[13]和多轮 DNA 洗牌(DNA shuffling)^[14]技术, 构建了 *AtGSTZ* 随机突变文库。然后应用 pH 指示剂颜色改变法^[15], 从中筛选出 DCA-DC 活性提高的突变子, 并分析了其酶学特性。同时, 结合氨基酸比对结果和酶动力学数据, 对一系列与 *AtGSTZ* 正确折叠及催化活性相关位点进行了讨论, 为进一步阐明其功能位点及开展高效定向改造奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与试剂

大肠杆菌菌株 DH5 α -FT 和 BL21(DE3), 质粒

* 国家自然科学基金资助项目(30671183)。

** 同为第一作者。*** 通讯联系人。

Tel/Fax: 022-23500133, E-mail: chendefu@nankai.edu.cn

收稿日期: 2007-06-20, 接受日期: 2007-08-08

pET21b(+)和 pMID1-AtGSTZ^[10]均为本室保存. rTaq DNA 聚合酶、Ex Taq DNA 聚合酶、dNTPs、*Nde* I、*Not* I、T4 DNA 连接酶、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、氨苄青霉素(Amp)及各种引物等购自宝生物工程(大连)有限公司. GSH 购自 AMRESCO 公司. 酵母抽提物与蛋白胨购自 OXOID 公司. 乙醛酸购自日本和光纯药工业株式会社. 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 构建 AtGSTZ 突变文库

先对 AtGSTZ 基因进行 EP-PCR, 再对其产物进行多轮 DNA 洗牌. EP-PCR 的引物设计依据 AtGSTZ 序列及 pET21b(+)多克隆位点序列, 上游引物为 GSTZ-1 (5' ctacttctgcatatggcggaattccggc 3', 下划线为 *Nde* I 位点), 下游引物为 GSTZ-rev (5' gatgatgatgggcccgcgcatggtgga 3', 下划线为 *Not* I 位点). EP-PCR 体系包括: 0.2 mmol/L dATP、0.2 mmol/L dGTP、1.0 mmol/L dCTP、1.0 mmol/L dTTP、0.3 μ mol/L 2 种引物、7.5 mmol/L Mg^{2+} 、0.5 mmol/L Mn^{2+} 、0.01% Triton X-100、0.05 U/ μ l rTaq DNA 聚合酶及 0.2 mg/L pMID1-AtGSTZ. 扩增条件为: 94℃ 5 min, 94℃ 40 s、58℃ 32 s、72℃ 90 s 35 个循环, 72℃ 7 min. 扩增产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶回收目的片段用于 DNA 洗牌.

回收的 DNA 在 15℃ 下用 0.1 U/ μ l DNase I 消化数分钟后, 85℃ 保温 20 min, 再添加 5%(v/v)含 50 mmol/L EDTA 和 30%(v/v)甘油的预冷缓冲液 A 终止反应. 电泳回收 40~100 bp DNA 片段用于无引物重排反应. 重排反应条件同 EP-PCR, 但不加引物、模板 DNA 浓度改为 10~20 mg/L、循环数降至 20.

回收重排产物, 再重复上述步骤 (DNase I 消化和无引物重排) 2 次, 最后得到的重排产物进行有引物 PCR. 反应体系为: 0.2 mmol/L dNTP、0.3 μ mol/L 每种引物、0.05 U/ μ l Ex Taq DNA 聚合酶及适量重排 DNA. PCR 条件同无引物重排. 产物回收后用 *Not* I 和 *Nde* I 消化, 并与经同种限制性内切酶消化的 pET21b(+)载体连接, 然后电转化进大肠杆菌 DH5 α -FT, 得突变文库, 并计算库容.

1.3 筛选 AtGSTZ 进化子

利用 pH 指示剂颜色改变法^[15]筛选 AtGSTZ 进化子. 回收突变文库的全部菌落, 提取质粒 DNA,

转化进 BL21(DE3), 接种到铺有一层硝酸纤维素滤膜的 LA(含 50 mg/L Amp 的 LB)平板上, 37℃ 倒置培养 10 h, 得表达文库. 然后将滤膜转移至含 0.5 mmol/L IPTG 的 LA 平板上, 37℃ 过夜诱导, 再将滤膜转移至浸有 13 mg/L 酚红、13 mg/L 溴酚蓝、0.3 g/L 溶菌酶、0.5 mmol/L IPTG 及 5 倍稀释 LA 培养液 (pH 8.2, 蓝色)的双层滤纸上. 待全部菌落转蓝后 (需 0.5~1 h), 反转滤膜并置于含 13 mg/L 酚红、13 mg/L 溴酚蓝、10 mmol/L DCA、1 mmol/L GSH、0.5 mmol/L IPTG 及 12 g/L 琼脂的 5 倍稀释 LA 培养基 (pH 8.2, 蓝色)上, 37℃ 倒置培养. 具 DCA-DC 活性的菌落, 其所在位置 (培养基或滤膜) 将变黄, 黄色深浅反映菌落 DCA-DC 活性的强弱. 挑选菌落所在位置明显变黄的单菌落 (需 1~2 h) 进行诱导表达及序列测定.

1.4 AtGSTZ 进化酶的表达及 DCA-DC 比活力测定

将挑选的单菌落接种至 10 ml 含 50 mg/L Amp 的 2 $\times$ TY 培养液中, 37℃ 培养至 $A_{600} \approx 0.8$, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 继续培养 10 h, 离心收集菌体. 菌体悬浮于含 0.3 g/L 溶菌酶、0.01% Triton X-100 的 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中, 室温保温 30 min, -70℃/4℃ 冻融处理和超声波破碎, 再 15 000 r/min 4℃ 离心 15 min, 上清即为酶液. 12.5% SDS-PAGE 检测蛋白质带型及含量. 测定 DCA-DC 活性, 方法参照 Tong 等^[9]做如下修改, 反应体系中加入 2 mmol/L DCA 和 4 mmol/L GSH, 37℃ 保温 7 min. 以每分钟产生 1 nmol 乙醛酸的量为 1 个 DCA-DC 活力单位 (U), 取 3 次重复实验的 $\bar{x} \pm s$ 为其比活力值.

1.5 测定 AtGSTZ 进化酶动力学参数

测定底物 DCA 动力学参数时, 固定 GSH 浓度为 4 mmol/L, 设置 DCA 浓度范围为 0.2~1.6 mmol/L. 测定底物 GSH 动力学参数时, 固定 DCA 浓度为 2 mmol/L, 设置 GSH 浓度范围为 0.5~8 mmol/L. DCA-DC 活性测定同本文 1.4, 但 37℃ 保温时间减至 5 min. 依 A_{535} 值计算各进化酶的 K_m 和 K_{cat} , 取 3 次重复实验的 $\bar{x} \pm s$ 为其动力学参数值.

1.6 AtGSTZ 进化酶的热稳定性和复性能力分析

热稳定性分析时, 设 6 个处理温度 (37℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃), 各进化酶分别保温 15 min 后再于冰上静置 10 min, 再测其 DCA-DC 比活力. 以各处理温度酶活与 37℃ 标准温度酶活百分比表示其热稳定性.

复性能力分析时,各进化酶在变性液(100 mmol/L 磷酸缓冲液、4 mol/L 尿素、1 mmol/L EDTA, pH 7.4)中变性 30 min 后,再用复性液(100 mmol/L 磷酸缓冲液、1 mmol/L EDTA, pH 7.4)稀释 5 倍,室温下再静置 10 min,再测其 DCA-DC 比活力.以复性后酶活与未经变性处理酶活百分比表示其复性能力.

热稳定性和复性分析中的 DCA-DC 比活力测定同本文 1.4.

2 结果与分析

2.1 *AtGSTZ* 突变文库的构建与筛选

以 pMID1-*AtGSTZ* 为模板, GSTZ-1 和 GSTZ-rev 为引物,进行 EP-PCR,其电泳图谱见图 1.结果显示,扩增带集中在 0.7 kb 附近,与预期相符.回收目的片段用于 DNase I 消化.不同消化时间的电泳图谱见图 2.结果显示,消化片段的长度随消化时间的延长而变短.20 min 时,消化片段长 40~160 bp,大多集中在 80 bp 附近,是进行 DNA 重排反应的理想长度.

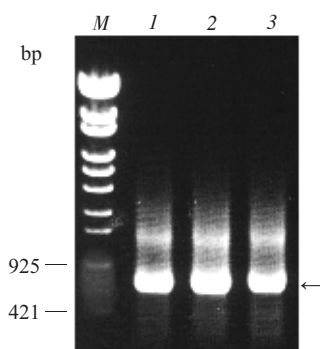


Fig. 1 The amplified pattern of *AtGSTZ* by EP-PCR

M: λ /EcoT14 I digest DNA marker; 1~3: The EP-PCR products.

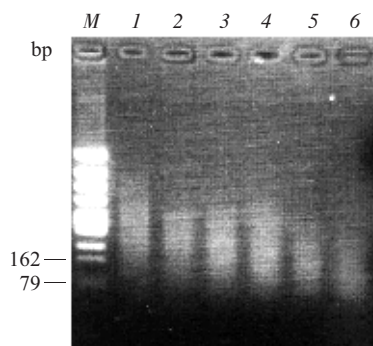


Fig. 2 The profile of *AtGSTZ* digested with DNase I

M: Φ X174/Hinc II digest DNA marker; 1~6: The treated time was 1, 2, 4, 8, 12 and 20 minutes, respectively.

回收 40~80 bp 的消化片段用于无引物重排,图 3 为其重排产物电泳图谱.结果显示,重排产物集中在 0.7 kb,表明多数已组装成全长 *AtGSTZ*.回收重排产物,再重复 DNase I 消化和无引物重排,最后获得 0.7 kb 片段用于有引物 PCR.图 4 为不同模板量下有引物 PCR 的扩增结果.显示,当 PCR 循环数为 20 时,22.5~37.5 mg/L 重排模板量能有效地扩增出全长 *AtGSTZ*.

回收有引物 PCR 产物, *Nde* I 和 *Not* I 双酶切后与 pET21b(+)连接,再电转化进 DH5 α -FT,得库容为 5×10^5 的突变文库.收集全部转化子,提取重组质粒,转化 BL21(DE3),得相同大小的表达文库.利用硝酸纤维素滤膜介导的 pH 指示剂颜色改变法,从中筛选出 50 余个颜色变黄的单菌落.

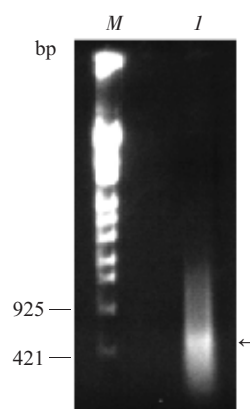


Fig. 3 The reassembly of digested *AtGSTZ* fragments

M: λ /EcoT14 I digest DNA marker; 1: The reassembly products.

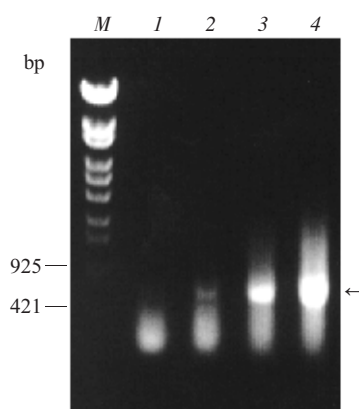


Fig. 4 Amplification profile with primers when using different amount of reassembled *AtGSTZ*

M: λ /EcoT14 I digest DNA marker; 1~4: The amount of the reassembly fragments were 3, 9, 22.5 and 37.5 mg/L, respectively.

2.2 *AtGSTZ* 进化子的氨基酸序列比对

对筛选出的 50 余个单菌落在 IPTG 诱导下表

2.3 *At*GSTZ 进化子的比活力分析

9 个 *At*GSTZ 进化子的 DCA-DC 比活力结果见表 1. 可以看出, 多点突变进化子的比活力提高较大(NN23 提高了 120%, NN20 提高了 102%, EC1 提高了 47%), 单点突变进化子的比活力提高较小(除 NN1-67 提高了 60%外, 其余均未超过 35%), 暗示多点突变对酶活性的改善优于单点突变.

在单点突变进化子中, EA6、NN1-67 和 NN2-54 的突变位点位于 N 端, 活性的提高可能与

“G-site” 的改变有关; EA1、EA3 和 EA4 的突变位点位于 C 端, 活性的提高可能与 “H-site” 的改变有关. EA1 和 EA4 均为 Gln115 突变, 但变成 Pro 的 EA1 比变成 Leu 的 EA4 活力高, 暗示此位点的 Pro 比 Leu 更有利于形成较高活性的结构. EC1 比 EA1 多一个 Ile111L 突变位点, 其比活力高于 EA1, 暗示 Leu111 能单独或协同 Pro115 提高 *At*GSTZ 的 DCA-DC 活性.

Table 1 The difference of DCA-DC activity among the evolved *At*GSTZ mutants

Enzymes	Mutated amino acids	Specific activity/(U·mg ⁻¹)	Relative activity with WT/%
Native	–	204.57 ± 12.13	–
EA1	Q115P	267.57 ± 3.13	131
EA3	P113R	223.13 ± 8.25	109
EA4	Q115L	238.66 ± 12.22	117
EA6	D67H	276.21 ± 14.27	135
EC1	I111L/Q115P	300.11 ± 11.58	147
NN1-67	N55Y	327.38 ± 2.72	160
NN2-54	Y79F	235.49 ± 32.87	115
NN20	A28S, D33E, K43R, D45E, F47S, S49P, N71S, F74L, R92P, Y101F, M104A, A118G, R121K, Y122F, V129S, N137T, N153S, I164V, H176Y, M186L, K194T, N200K, E201D, L209A	414.13 ± 30.29	202
NN23	AS28S, D33E, E35D, K43R, D45E, F47S, S49P, N71S, F74L, R92P, Y101V, M104A, A118G, R121K, Y122F, V129S, N137T, N153S, I164V, H176Y, M186L, K194T, N200K, E201D, L209A	449.79 ± 22.81	220

Data are shown as $\bar{x} \pm s$, $n = 3$.

2.4 *At*GSTZ 进化酶的动力学参数

表 2 列出了各进化酶的动力学参数. 从中可以看出, 各进化酶的 K_m^{DCA} 介于 0.5~0.65 之间, 与野生酶相比差异不明显, 但 K_{cat}^{DCA} 和 K_{cat}^{DCA}/K_m^{DCA} 值明显升高, 其中进化酶 NN20、NN23 和 NN1-67 提高最大, 这与它们较高的比活力相吻合.

各进化酶的 $K_{0.5}^{GSH}$ 均比野生酶低 1~2 mmol/L,

暗示各进化酶与电子传递物 GSH 的亲合力增加, 其中 EA3、EC1、NN1-67 和 NN2-54 增加最明显. 野生 *At*GSTZ 对 GSH 的 Hill 常数为 1.13, 不符合经典的米氏方程, 有微弱的正协同效应, 这与前人研究结果^[6]相一致; 9 个进化酶的 Hill 常数与野生酶的差异不明显, 暗示各突变位点对 *At*GSTZ 亚基间的正协同效应影响不大.

Table 2 The difference of kinetic parameters among the evolved AtGSTZ mutants

Enzymes	K_m^{DCA} /(mmol·L ⁻¹)	K_{cat}^{DCA} /min ⁻¹	K_{cat}^{DCA}/K_m^{DCA} /(mmol ⁻¹ ·L·min ⁻¹)	$K_{0.5}^{GSH}$ /(mmol·L ⁻¹)	Hill coefficient
Native	0.56 ± 0.02	15.4 ± 0.4	27.75 ± 1.46	5.37 ± 0.58	1.13 ± 0.02
EA1	0.61 ± 0.03	19.8 ± 2.7	32.41 ± 3.15	4.47 ± 0.66	1.08 ± 0.04
EA3	0.64 ± 0.03	17.6 ± 2.2	27.61 ± 4.47	4.03 ± 0.33	1.18 ± 0.03
EA4	0.64 ± 0.08	18.0 ± 2.1	28.10 ± 1.53	4.27 ± 0.46	1.14 ± 0.03
EA6	0.65 ± 0.08	19.6 ± 3.7	30.11 ± 3.53	4.42 ± 0.37	1.10 ± 0.03
EC1	0.58 ± 0.04	21.9 ± 0.4	37.75 ± 2.20	4.00 ± 0.26	1.08 ± 0.02
NN1-67	0.65 ± 0.06	24.8 ± 0.4	38.09 ± 2.78	4.10 ± 0.24	1.13 ± 0.05
NN2-54	0.50 ± 0.01	16.1 ± 0.2	32.37 ± 0.92	3.95 ± 0.41	1.10 ± 0.06
NN20	0.53 ± 0.08	21.6 ± 0.7	41.49 ± 4.79	4.29 ± 0.46	1.11 ± 0.01
NN23	0.59 ± 0.01	24.0 ± 0.1	40.41 ± 0.79	4.23 ± 0.89	1.12 ± 0.03

Data are shown as $\bar{x} \pm s$, $n=3$.

2.5 AtGSTZ 进化酶的热稳定性和复性能力

图 6 为 AtGSTZ 进化酶的热稳定性结果. 45℃、50℃、55℃处理后各进化酶的相对活性均没有明显改变; 60℃处理时, 各进化酶的相对活性明

显降低, 仅保留 50%~60%; 65℃时, 仅保留 10% 活性. 进化酶热处理后保留活性与野生酶间没有显著差异, 暗示突变位点对 AtGSTZ 热稳定性没有明显影响.

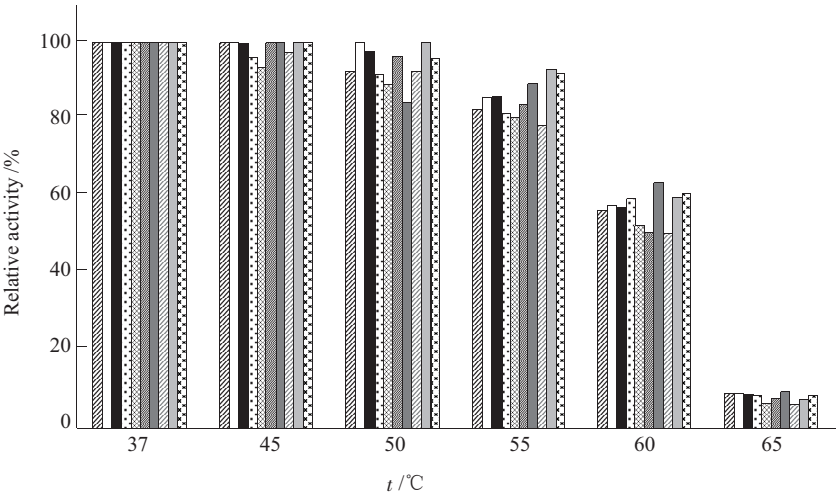


Fig. 6 The difference of thermostability among the evolved AtGSTZ mutants

■: WT; □: EA1; ■: EA3; ▨: EA4; ▩: EA6; ▤: EC1; ▥: NN1-67; ▦: NN2-54; ▧: NN20; ▨: NN23.

表 3 为 AtGSTZ 进化酶复性能力的结果. 可以看出, NN1-67 最高, 为 54.28%, NN23 次之, 为 50.1%, 其余与野生酶间没有显著差异, 均为 42% 左右. 由于复性能力在一定程度上反映了酶的折叠

能力, 因此 NN1-67 的突变位点(N55Y)可能与 AtGSTZ 的空间折叠有关. NN23 比 NN20 仅多一个氨基酸突变(E35D), 但 NN23 的复性能力却比 NN20 高 12%, 暗示 AtGSTZ 上第 35 位残基与酶

的空间折叠有关.

Table 3 The difference of renaturability among the evolved *AtGSTZ* mutants

Enzymes	Renaturability /%
Native	42.06 ± 7.37
EA1	45.23 ± 5.08
EA3	46.20 ± 3.58
EA4	37.89 ± 2.13
EA6	45.85 ± 5.88
EC1	43.03 ± 3.34
NN1-67	54.28 ± 6.23
NN2-54	47.02 ± 5.51
NN20	38.12 ± 8.10
NN23	50.10 ± 7.82

Data are shown as $\bar{x} \pm s$, $n=3$.

3 讨 论

本文利用 EP-PCR 和多轮 DNA 洗牌技术构建了 *AtGSTZ* 随机突变文库, 然后利用 *AtGSTZ* 催化二氯乙酸脱氯生成盐酸而改变介质 pH 进而使 pH 指示剂颜色改变的方法, 从 5×10^5 的突变文库中筛选出 9 个 DCA-DC 比活力提高的进化子. 进化子筛选效率明显低于其他酶, 如 Lee 等^[17]从 5 000 的突变库中筛选出 12 个法尼基焦磷酸合成酶进化子. 本文中进化子筛选效率较低可能与多轮 DNA 洗牌有关. DNA 洗牌将产生大量的致死或活性下降的移码、缺失、重复、多点替换等突变类型^[18], 较高的致死或活性下降突变的产生将直接影响高活性突变子的筛选效率. 同时, 多点突变可导致酶的三维结构发生重大改变进而导致其功能丧失, 所以 9 个进化子中, 6 个为单点突变, 仅 3 个为多点突变, 显示多点突变获取活性提高的进化子的几率比较低.

进化酶与野生酶的氨基酸序列比对发现, 突变氨基酸并未发生在 *AtGSTZ* 的活性中心, 而是发生在间接影响酶催化活性的区域, 即酶活性中心周围区域. 该发现与 Guo 等^[19]在 3-甲基腺苷酸 DNA 糖基化酶(AAG)上的研究相吻合. 他们认为, 活性中心氨基酸残基耐受突变的能力明显低于各二级结构单元间的无规则卷曲. 因此, 通过定点诱变或点饱

和突变技术改造活性中心周围氨基酸残基来提高酶的活性, 是进一步改造 *AtGSTZ* 的新方向.

获得的 9 个 DCA-DC 活性提高进化酶的 K_m^{DCA} 在 0.5~0.65 之间, 与野生酶差异不显著, 说明这些氨基酸残基的突变对酶与底物 DCA 的亲和力没有影响, 不能增加酶-DCA 复合物的稳定性, 但其 K_{cat}^{DCA}/K_m^{DCA} 和 K_{cat}^{DCA} 明显高于野生酶, 即酶-DCA 复合物分解成乙醛酸的能力得到了提高. 对 GSH 的 Hill 常数和 $K_{0.5}^{GSH}$ 分析发现, 9 个进化酶亚基间的协同效应虽不明显, 但与 GSH 的亲和力, 即酶-GSH 复合物的稳定性得到了明显改善. 因此, 本文所得进化酶活性提高的主要原因, 是改变了 DCA 的催化能力及酶-GSH 复合物的稳定性.

进化子 NN23 和 NN20 的活性较高, 分别是野生型的 2.2 和 2.02 倍, 这与其多点突变可能有一定的联系. 近年研究表明, 多点突变可造成酶活性中心三维构象的重大改变, 能引入额外的协同作用, 产生出结构更优、功能更强的进化子^[20]. 在野生型 *AtGSTZ* 中, Phe74、Tyr101、Met104 等位点参与结构域及亚基间的相互作用, 形成疏水核心^[9]. NN20 与 NN23 虽在 74、101 和 104 位均产生了突变, 但由于是突变成疏水氨基酸, 并未影响到疏水核心的形成, 这也是 NN20 和 NN23 仍维持正确空间构象而具有活性的重要前提. 进化子 NN20 和 NN23 在许多特性上差异不大, 但 NN20 的复能力比 NN23 低 12%, 二者在序列上只有一个氨基酸差异, 35 位氨基酸残基分别是 Asp 和 Glu, 说明 35 位残基可能与 *AtGSTZ* 的正确折叠有密切关系. Asp 和 Glu 都是酸性氨基酸, Asp35 优于 Glu35 的原因可能是 Asp 的侧链小, 从一级结构折叠成高级结构的空位阻将相应变小.

Asn55 位于 N 端结构域 $\alpha 2$ 螺旋的末端, 并不与 GSH 和 DCA 直接作用, 但进化子 NN1-67 在 55 位由 Asn 突变成 Tyr, DCA-DC 比活力提高了 60%, K_{cat}^{DCA}/K_m^{DCA} 也明显提高. 其活性提高可能与 *AtGSTZ* 的 $\alpha 2$ 螺旋及其邻近的 $\beta 3$ 折叠有关, 这 2 个区域是酶与 GSH 结合的重要特征区域^[9], N55Y 突变可能导致酶空间构象改变, 影响酶与 GSH 的结合从而间接影响酶的催化活力. 本文发现, NN1-67 具有较高的热稳定性和复能力, 在一定程度上支持该构象变化影响酶催化活力的推测.

N 端结构域 $\alpha 1$ 螺旋和 $\alpha 3$ 螺旋的氨基酸残基与 C 端结构域 $\alpha 4$ 螺旋和 $\alpha 6$ 螺旋的氨基酸残基之间形成疏水区, 该疏水区是 N 端和 C 端结构域间

的主要作用力^[5], 二聚体亚基间的 $\alpha 3$ 螺旋与 $\alpha 4$ 螺旋的疏水作用是 *AtGSTZ* 两亚基间的主要作用力^[5]. 本研究发现 Tyr79 突变为 Phe 后, 活性提高了 15%. 由于 79 位残基位于 $\alpha 3$ 螺旋中, 疏水的 Phe 也可能参与 N 端疏水表面的形成, 进一步促进了 N 端与 C 端结构域及二聚体亚基之间的相互作用, 从而提高 DCA-DC 活性.

保守基元 IQP (111~113) 位于 C 端结构域 $\alpha 4$ 螺旋的末端, 被认为与底物结合和催化活性有关^[5]. 但这些保守位点的突变却没有使酶失活, 酶活反而微弱提高(EA3、EC1), 说明保守位点也具有耐受突变的能力. 这与 Matsumura 等^[21]的结果相一致, 他们对 β - 葡萄糖苷酸酶进行定向进化, 获得的高酶活突变体的突变位点也位于高保守区.

在全部进化子中, EA6 活性提高的原因比较特殊, 67 位酸性 Asp 突变成碱性 His 后, 不但没有失去活性, 反而显示出更高的 DCA-DC 比活力. *AtGSTZ* 晶体结构显示, Asp67 位于 $\beta 3$ 和 $\beta 4$ 连接处, 远离活性中心, 这种远离活性中心且性质相反氨基酸的突变, 是很难用理性设计预测的. 当然, D67H 突变使酶活性提高的原因尚需进一步探讨.

通过对获得的 9 个进化子的分析, 本文鉴定出了一系列与 *AtGSTZ* 催化活性和折叠相关位点, 如 Glu35、Asn55 和 Tyr79 等位点, 但一些位点的作用机制还需深入研究. 鉴于 *AtGSTZ* 在细胞内代谢及污染物处理等方面的重要作用, 通过定向进化获得高活性进化子具有良好的应用前景, 也为 *AtGSTZ* 结构 - 功能关系的研究及进一步了解它的作用机理奠定了基础.

致谢 感谢南开大学生命科学学院 2003 级明铭同学在本工作上给予的协助.

参 考 文 献

- 1 Armstrong R N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol*, 1997, **10**(1): 2~18
- 2 Dixon D P, Lapthorn A, Edwards R. Plant glutathione transferases. *Genome Biol*, 2002, **3**(3): 1~10
- 3 Edwards R. Characterisation of glutathione transferases and glutathione peroxidases in pea (*Pisum sativum*). *Physiol Plant*, 1996, **98**(3): 594~604
- 4 Dixon D P, Cole D J, Edwards R. Characterisation of a zeta class glutathione transferase from *Arabidopsis thaliana* with a putative role in tyrosine catabolism. *Arch Biochem Biophys*, 2000, **384**(2): 407~412
- 5 Thom R, Dixon D P, Edwards R. The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism. *J Mol Biol*, 2001, **308**(5): 949~962
- 6 Zeng Q Y, Wang X R. Catalytic properties of glutathione-binding residues in a tau class glutathione transferase (*PtGSTU1*) from *Pinus tabulaeformis*. *FEBS Lett*, 2005, **579**(12): 2657~2662
- 7 Winayanuwattikun P, Ketterman A J. Catalytic and structural contributions for glutathione-binding residues in a delta class glutathione S-transferase. *Biochem J*, 2004, **382**(Pt 2): 751~757
- 8 Wongsantichon J, Ketterman A J. An intersubunit lock-and-key 'clasp' motif in the dimer interface of delta class glutathione transferase. *Biochem J*, 2006, **394**(Pt 1): 135~144
- 9 Tong Z, Board P G, Anders M W. Glutathione transferase zeta catalyses the oxygenation of the carcinogen dichloroacetic acid to glyoxylic acid. *Biochem J*, 1998, **331**(pt2): 371~374
- 10 Ricci G, Turella P, De Maria F, *et al.* Binding and kinetic mechanisms of the zeta class glutathione transferase. *J Biol Chem*, 2004, **279**(32): 33336~33342
- 11 Anderson W B, Board P G, Anders M W. Glutathione transferase zeta-catalyzed bioactivation of dichloroacetic acid: reaction of glyoxylate with amino acid nucleophiles. *Chem Res Toxicol*, 2004, **17**(5): 650~662
- 12 You L, Arnold F H. Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Eng*, 1996, **9**(1): 77~83
- 13 Cirino P C, Mayer K M, Umeno D. Generating mutant libraries using error-prone PCR. In: Arnold F H, Georgiou G, eds. *Methods in Molecular Biology 231-Directed Evolution Library Creation*. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2003. 3~10
- 14 Joern J M. DNA shuffling. In: Arnold F H, Georgiou G, eds. *Methods in Molecular Biology, 231-Directed Evolution Library Creation*. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2003. 85~90
- 15 Holloway P, Trevors J T, Lee H. A colorimetric assay for detecting haloalkane dehalogenase activity. *J Microbiol Methods*, 1998, **32**(1): 31~36
- 16 Chen D, Kawarasaki Y, Nakano H, *et al.* Cloning and *in vitro* and *in vivo* expression of plant glutathione S-transferase zeta class genes. *J Biosci Bioeng*, 2003, **95**(6): 594~600
- 17 Lee P C, Petri R, Mijts B N, *et al.* Directed evolution of *Escherichia coli* farnesyl diphosphate synthase (IspA) reveals novel structural determinants of chain length specificity. *Metab Eng*, 2005, **7**(1): 18~26
- 18 Scimmenti C R, Thyagarajan B, Calos M P. Directed evolution of a recombinase for improved genomic integration at a native human sequence. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(24): 5044~5051
- 19 Guo H H, Choe J, Loeb L A. Protein tolerance to random amino acid change. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(25): 9205~9210
- 20 Bloom J D, Meyer M M, Meinhold P, *et al.* Evolving strategies for enzyme engineering. *Curr Opin Struct Biol*, 2005, **15**(4): 447~452
- 21 Matsumura I, Ellington A D. *In vitro* evolution of beta-glucuronidase into a beta-galactosidase proceeds through non-specific intermediates. *J Mol Biol*, 2001, **305**(2): 331~339

Obtainment and Characterization of The Evolved Enzymes From *Arabidopsis thaliana* Glutathione S-Transferase Zeta Class*

TAO Su-Dan**, CHEN Xi-Wen**, LIU Jia, JIA Xiang-Dong, CHEN De-Fu***

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract The *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferases zeta class (*AtGSTZ*) is a multi-functional enzyme, which plays important role in cellular metabolism and environmental purification. Error-prone PCR and cycles of DNA shuffling were used to construct a mutagenesis library of *AtGSTZ*. The screening of the resultant libraries was carried out by a pH indicator dye-based colorimetric assay. Nine mutants which enhanced the dichloroacetic acid dechlorination activity were obtained. Among them, NN23 contained 25 amino acid substitutions with the activity improving 120%, whereas NN20 contained 24 amino acid substitutions with the activity improving 102%. EC1 contained 2 amino acid substitutions with the activity improving 47%. The rest 6 mutants contained one amino acid substitution with their activity increasing from 9% to 60%. The enzymatic characterization showed that all the evolved enzymes increased their catalytic efficiencies towards dichloroacetic acid and binding affinity towards glutathione whereas some of them increased the renaturability. However there is no obvious change in their thermostability. Based on these data, functional residues related to catalysis and refolding of *AtGSTZ* were discussed.

Key words evolved mutants, dichloroacetic acid dechlorination (DCA-DC) activity, thermostability, renaturability, *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferases zeta class (*AtGSTZ*)

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30671183).

** TAO Su-Dan and Chen Xi-Wen contributed equally to this work.

*** Corresponding author. Tel/Fax: 86-22-23500133, E-mail: chendefu@nankai.edu.cn

Received: June 20, 2007 Accepted: August 8, 2007