

研究报告

枯草杆菌蛋白酶 E 的 156 和 165 位突变*

陈为东 马建华 朱榴琴
(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 应用定点突变方法, 在 M222A 突变的枯草杆菌蛋白酶 E 基因上进行 E156S 和 V165I 定点突变. 将突变基因插入大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pBE-2 中, 在碱性和中性蛋白酶缺陷型的枯草杆菌 DB104 中进行表达, 得到突变种 (M222A, E156S) 和 (M222A, E156S, V165I) 蛋白酶 E. 性质测定表明, E156S 突变使蛋白酶比活力增加 90%, 并不影响酶的热稳定性和抗氧化性. 而 V165I 突变使蛋白酶比活力降低.

关键词 枯草杆菌蛋白酶 E, 蛋白质工程, 比活力, 稳定性

枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin) 属于丝氨酸蛋白酶, 分为以下几类^[1]: subtilisin E、subtilisin BPN、subtilisin Carlsberg 和 subtilisin amylosacchariticus. 枯草杆菌蛋白酶是进行蛋白质工程研究良好的模型蛋白, 其结构功能已得到广泛研究^[2], 许多种枯草杆菌蛋白酶的基因已被克隆并表达, 同时它还是一种重要的工业用酶, 大量应用于洗涤剂、制革、丝绸和食品工业. 为了研究枯草杆菌蛋白酶结构功能关系和改进其催化性能, 应用基因工程的方法对它的基因进行定点突变或随机突变结合表型筛选, 已得到改良性能的突变种酶^[3], 包括: 在枯草杆菌蛋白酶 E 上引入 M222A 突变得到抗氧化但损失部分活性的突变种; 在 M222A 突变种基因片段上用随机突变的方法筛选到热稳定并且抗氧化的突变种 (M222A, N118S); Q103R 和 D60N 使酶比活增加但稳定性下降. 因此在不影响酶的抗氧化性和热稳定性的前提下, 提高比活力具有重要的理论意义和应用价值.

Wells 等^[4]应用定点突变对枯草杆菌蛋白酶 BPN 进行改造, 证明催化位点附近的 E156S 位突变使其比活力 K_{cat}/K_m 提高, 枯

草杆菌蛋白酶 E 与 BPN 具有高达 87% 的氨基酸序列同源性, 所以 E156S 突变很可能会提高蛋白酶 E 的比活力. 同时, 通过对枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg、BPN 和 E 氨基酸序列比较分析发现 Carlsberg 酶与 BPN 和 E 同源性分别达 70%, 而它的比活力较后者分别高近十倍和数百倍^[4], 比较氨基酸序列发现 165 位氨基酸 Carlsberg 为 Ile, BPN 和 E 是 Val, 将 E 酶的 165Val 突变为 Ile 可能会改变酶的比活性, 因此选定 165 位做 V165I 突变. 本文报道枯草杆菌蛋白酶 E 突变种 (M222A, 156S) 和 (M222A, E156S, V165I) 的性质.

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 JM109 为本实验室保存, 枯草芽孢杆菌 DB104 为碱性和中性蛋白酶缺陷型菌株 (his nprR 2 nprE 18 Δ aprA 3), pSelect 为定点突变所用的 phagemid 载体, 来自 Pharmacia 的定点突变试剂盒. pBE-2 是枯草芽孢杆菌-大肠杆菌穿梭质粒, 由中国科学院微生物研究所

* 国家 863-103 主题组资助.
收稿日期: 1996-06-04, 修回日期: 1996-11-28

郭兴华先生惠赠. pUC 质粒为本实验室保存. pBY/DB104、pBM/DB104、pBS/DB104、pBI/DB104 分别为野生型蛋白酶 E、(M222A)、(M222A, E156S)、和 (M222A, E156S, V165I) 突变种蛋白酶 E 基因片段在 pBE-2 质粒中的重组质粒转化 DB104 得到的转化菌株.

1.2 酶和试剂

限制性内切酶为 New England Bio-Labs 产品, 四肽底物 N-succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilide (N-Suc-AAPF-pNA), 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 为 Sigma 产品. T4DNA 连接酶、T7DNA 聚合酶 (Sequencing Grade)、ATP 和四种脱氧核糖核酸为 Pharmacia 产品. α - 35 S-dATP 为 DuPont 公司产品. 突变引物由上海细胞所合成. 其他化学试剂为国产分析纯试剂.

1.3 培养基

大肠杆菌采用 YT 培养基. 抗菌素浓度为: 氨苄青霉素 50 mg/L, 卡那霉素 10 mg/L, 四环素 12.5 mg/L. 枯草杆菌在进行质粒重组、菌种保存时均用 YT 培养基, 在进行发酵制备酶时用工业培养基, 每升发酵液中含玉米粉 60 g, 豆饼粉 40 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4 g, KH_2PO_4 0.3 g, Na_2CO_3 1 g.

1.4 枯草芽孢杆菌的转化

枯草芽孢杆菌的转化采用感受态细胞转化方法^[5].

1.5 定点突变

采用 Promega 公司的 phagemid 突变试剂盒的方法进行体外定点突变. 156 位定点突变引物为: 5' GCCGGAAGCTCAGGTTTCATCC 3', 165 位定点突变引物为: 5' CACAAGCA-CAATCGGCTAC 3'.

1.6 DNA 序列的测定

以碱变性双链质粒 DNA 或 phagemid 单链 DNA 为模板, 103 位引物为测序引物, 用双脱氧末端终止法测定 DNA 序列^[6].

1.7 蛋白酶活力测定

用酪蛋白作底物时, 测活条件参考文献

[7]. 酶在 40℃、pH11 时每分钟水解产生 1 μ g 酪氨酸的酶量为一个活力单位. 用四肽底物 (N-Suc-AAPF-pNA) 测活时参考文献 [3].

1.8 酶的热稳定性测定

纯酶溶解在 0.1 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 10 mmol/L $CaCl_2$, 0.5 mol/L NaCl 中, 65℃保温, 不同时间取 30~50 μ l 溶液, 用四肽底物测定酶活. 以保温时间为零时的酶活为 100, 计算相对剩余活性.

1.9 酶的动力学性质测定

用四肽底物, 在 37℃测定酶活性及底物浓度与酶活的关系, 计算 K_m 和 K_{cat} 的值.

1.10 酶的抗氧化性测定

纯酶溶解在 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 5 mmol/L $CaCl_2$ 中, 加入 H_2O_2 终浓度 1 mmol/L, 在 37℃保温一定时间后, 取一定量的酶加到 1.5 ml 0.1 mmol/L 四肽底物, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L $CaCl_2$ 溶液中, 在 37℃测定反应起始活性, 与未经 H_2O_2 处理的酶的起始活性比较, 计算相对剩余活性.

2 结果与讨论

2.1 定点突变的确定

在已具有 M222A 突变的基因上再进行

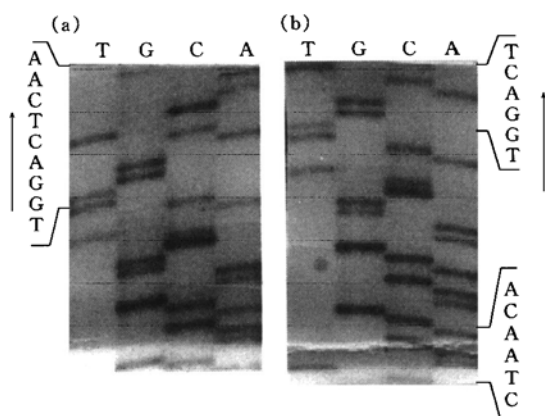


图 1 突变部位的序列测定图谱

(a) 156 位定点突变序列图; (b) 156 位 165 位双突变序列图. 图上箭头方向为测序的方向, 旁边为碱基序列.

156 位单突变, 突变过程中加入 156 位突变引物即可, 而做 156 位 165 位双突变, 在突变时, 同时加入 156 位和 165 位突变引物. 定点突变得到的 pSelect 质粒经碱变性后, 以 103 位引物为测序引物, 测定其在预定突变部位的序列, 结果如图 1 所示.

如图 1a 所示, 156 位谷氨酸的编码 GAA 变为丝氨酸的编码 TCA, 而图 1b 所示, 156 位谷氨酸的编码 GAA 变为丝氨酸的编码 TCA, 165 位缬氨酸的编码 GTC 变为 ATC.

2.2 酶的催化性质

野生型和各种突变种碱性蛋白酶的动力学性质如表 1 所示.

表 1 野生型与突变型枯草蛋白酶 E 水解底物 N-Suc-AAPF-pNA 的反应动力学常数

酶	K_m / $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	K_{cat} / s^{-1}	K_{cat}/K_m / $\text{s}^{-1}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{L}$
野生型	0.43	29.6	68.8
M222A	0.56	14.8	26.4
M222A, E156S	1.19	59.4	50.2
M222A, E156S, V165I	0.91	10.7	11.8

注: 反应条件为: 0.1 mol/L Tris-HCl, 10 mmol/L CaCl_2 , pH 8.0, 37℃.

分泌的酶经过提取纯化, 经 SDS-PAGE 检测为单一条带, 纯度在 95% 以上. 从表 1 可见, M222A 突变使酶的比活下降 62%. E156S 突变使酶 K_m 增大一倍, K_{cat} 增大 300%, 导致酶的比活增加 90%, 这证明 E156S 突变能使枯草杆菌蛋白酶 E 的比活大幅度增加, 大大提高了该酶的应用前景. 165 位突变后, 酶的 K_{cat} 降到原来的 20% 以下, 致使比活随之降低.

2.3 酶的稳定性

2.3.1 热稳定性: 碱性蛋白酶 E 和它的各突变种的热稳定性测定结果如图 2 所示.

野生型枯草杆菌蛋白酶的半失活时间是 18 min, M222A 突变酶 13 min, (M222A, E156S) 双突变酶 12 min, (M222A, E156S,

V165I) 三突变酶 13 min, 可见进行 156 位突变和 165 位突变没有使酶的热稳定性能降低, 这对于酶的保存应用有重要意义.

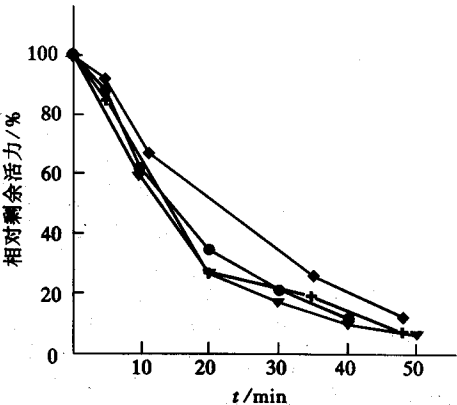


图 2 枯草杆菌蛋白酶 E 及其突变体的热稳定性
▲—▲: M222A, E156S; ●—●: M222A, E156S, V165I; ◆—◆: 野生型; +——+: M222A.

2.3.2 抗氧化性: 枯草杆菌蛋白酶 E 和三突变种的抗氧化性测定结果如图 3 所示. 从图 3 可见, 三个突变种都具有抗氧化的能力, 在 37℃ 与 1 mol/L H_2O_2 保温 50 min, 活性仍保留 90% 以上. 说明 156 位突变和 165 位突变均不影响酶的抗氧化能力.

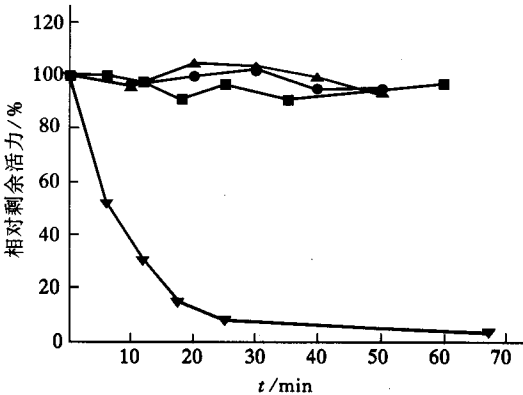


图 3 枯草杆菌蛋白酶 E 及其突变体的抗氧化性
▲—▲: M222A, E156S; ●—●: M222A, E156S, V165I; ▼—▼: 野生型; ■—■: M222A.

E156S 突变影响枯草杆菌蛋白酶 E 比活力的原因可通过对其晶体结构的分析得以解

释, 以增加对蛋白酶 E 结构功能的理解, 提高对蛋白质工程应用的认识.

参 考 文 献

- 1 Markland F S, Smith E L. Subtilisins: primary structure, chemical and physical properties. In: Boyer P D ed. The Enzymes. 3rd. New York: Academic Press, 1971. 561~608
- 2 Wells J A, Estell D A. Subtilisin: an enzyme designed to be engineered. TIBS, 1988, **13**: 291~ 297
- 3 朱榴琴, 季永梅. 枯草杆菌蛋白酶 E 的蛋白质工程. 生物工程学报, 1997, **13**: 15~ 20
- 4 Wells J A, Cunningham B C, Graycar T P *et al.* Recruitment of substrate specificity properties from one enzyme into a related one by protein engineering. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, **84**: 5167~ 5171
- 5 郭兴华, 贾士芳, 陈乃用等. 芽孢杆菌原生质体作为质粒 DNA 转化的受体. 微生物学报, 1992, **22** (3): 263 ~ 268
- 6 Sanger F, Nickelen S, Coulson A R. DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, **74**: 5463~ 5467
- 7 北京大学生物系编. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1979. 151~ 154

Site 156 and 165 Mutation of Subtilisin E.
CHEN Weidong, MA Jianhua, ZHU Liuqin
(*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract E156S and V165I mutation were introduced into subtilisin E gene by site-directed mutagenesis. The mutated gene fragments were recombined with pBE-2 which is a shuttle vector between *E. coli* and *Bacillus subtilis*. The recombinant plasmids were used to transform *B. subtilis* DB104, a mutant strain deficient in alkaline and neutral protease, then they were expressed. They were (M222A, E156S) and (M222A, E156S, V165I). The property analysis of these enzymes revealed that the Subtilisin E E156S substitution enhanced the hydrolysis K_{cat}/K_m by 90% while keeping thermal stability and oxidation-resistance unchanged, however the V165I mutation reduced the K_{cat}/K_m value.

Key words subtilisin E, protein engineering, specific activity, stability

北京鸭血清 HDL 及 apo A I 在胆固醇代谢中的作用*

尹银亮 王克勤¹⁾ 陈保生

(中国医学科学院基础医学研究所 北京 100005)
(中国协和医科大学基础医学部 , 北京 100005)

摘要 对纯化的北京鸭脂蛋白进行了电镜观察、梯度凝胶电泳、总胆固醇及卵磷脂胆固醇脂酰转移酶 (LCAT) 活力分布测定等研究, 对鸭 apo A I 的氨基酸组成、序列、亲-疏水性同人及其他动物进行了比较并初步进行了二级结构预测. 实验结果进一步证实北京鸭血清胆固醇是由高密度脂蛋白 (HDL) 携带运输, 鸭 apo A I 在胆固醇代谢中起着重要作用.

关键词 北京鸭, 高密度脂蛋白 (HDL), apo A I , α 螺旋, 结构, 功能

* 国家自然科学基金资助项目 (39270764). ¹⁾ 通讯联系人, 本研究导师.

收稿日期: 1996-06-12, 修回日期: 1996-12-24