

荧光光谱法定量测定纤维素酶活性架构中单个氨基酸突变对底物结合力的影响*

王培培 张丽丽 张 庆 王禄山 陈冠军**

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 纤维素酶活性架构是酶分子中多个氨基酸残基构成的可结合并催化底物的功能区, 其中色氨酸等芳香族残基在该区域中起着重要作用. 本研究利用荧光光谱法, 定量分析了纤维素酶 ChCel5A 活性架构中色氨酸与底物的结合动力学过程, 通过色氨酸荧光猝灭的定量分析, 确定了色氨酸特异性结合时的底物浓度范围, 并且测定了 ChCel5A 活性架构中单个氨基酸突变导致的底物结合常数的变化, 与催化动力学参数比较发现, 荧光光谱法可准确表征纤维素酶与底物的结合力及其单个残基突变引起动力学参数的变化. 此外, 由于 pNP 中含有强的吸电子基团, 因而以 pNPC 等为配体时会高估与色氨酸的结合常数约 20~100 倍. 荧光光谱法可以测定纤维素酶结合糖分子底物的动力学参数, 该方法具有灵敏和快速的特点, 这为蛋白质与底物之间相互作用的定量分析提供了新的视角.

关键词 荧光光谱法, 纤维素酶, 色氨酸, 活性架构, 结合力, 定量分析

学科分类号 Q81, Q93

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0205

木质纤维素是地球上分布最广、蕴藏量最丰富的可再生资源^[1-2]. 自然界中纤维素的降解主要是靠多种纤维素酶的协同作用完成的^[3-5]. 纤维素酶的活性中心架构包括结合残基和催化残基, 前者负责与纤维素等底物的结合, 后者负责催化底物断键^[6]. 酶分子与纤维素底物的高效结合是其催化断键的前提, 因此定量测定酶分子与底物的相互作用是探索其构效关系的基础^[7]. 酶分子活性架构中的氨基酸在底物识别过程中扮演着重要的角色^[8], 不同氨基酸结合底物残基的位置不同, 因而提供结合能力的贡献大小不同, 因此研究活性架构中不同氨基酸的功能可以指导酶分子的理性设计与改造过程^[9-10].

随着测序技术的快速发展, 人们发现纤维素酶家族活性架构中部分特定氨基酸残基, 特别是色氨酸残基, 出现频率具有明显的偏好性^[9-11]. 为了了解这些氨基酸残基在酶与底物结合过程中所起的作用, 需要定量分析其与底物结合力的相关性. 荧光光谱法的原理是芳香族氨基酸具有受激发后发射荧光的能力, 特别是色氨酸被 295 nm 的激发光激发后发射 353 nm 荧光, 当色氨酸与配体结合后会诱

导电子轨道变迁发生荧光猝灭现象, 其猝灭强度与配体分子的结合量之间具有剂量效应关系^[12-13]. 根据猝灭过程以及 Stern-Volmer 方程可以进一步计算出色氨酸与猝灭剂的结合常数, 从而计算结合力等相关参数^[14].

近几年, 荧光光谱法已被广泛应用于蛋白质与配体结合过程的研究^[15]. 例如, Bian 等^[16]利用色氨酸荧光猝灭的方法探究了染料木黄酮与人血清白蛋白之间的结合, 确定了两者的结合常数. 另外, Wang 等^[17]利用荧光光谱法对溶菌酶与头孢菌素类似物之间的结合行为进行研究, 发现不同的药物与溶菌酶具有不同的结合力. 因此, 荧光光谱法已经成为研究荧光体与配体结合力的有利工具^[18]. 值得注意的是, 荧光体与配体结合过程中存在单点

* 国家自然科学基金(31570051, 31370111)和山东省重点研发计划(2015GSR121019)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0531-88366202, E-mail: guanjun@sdu.edu.cn

收稿日期: 2016-06-22, 接受日期: 2016-11-03

特异性以及多点非特异性结合现象, 因此动力学分析过程需要明确荧光体与配体结合的单点特异性区间, 以便于特异性结合常数的计算与分析. 荧光光谱法具有灵敏、快速和操作简单的优点, 因此也适合于纤维素酶与底物之间相互作用的定量分析.

根据 CAZy 数据库(<http://www.cazy.org/>)对糖苷水解酶(GH)的分类, 哈氏噬纤维菌(*Cytophaga hutchinsonii*)产生的主要内切纤维素酶 *ChCel5A* 组属于糖苷水解酶 5 家族(GH5), 其催化结构域内一共有 8 个色氨酸(W)和 17 个酪氨酸(Y), 活性中心架构中 61 位 W 和 203 位的 Y 参与底物的识别与结合^[19-20]. 本研究中, 利用荧光光谱法定量测定内切纤维素酶 *ChCel5A* 野生型及其单个氨基酸突变体(-2 亚位点 W61Y 和+1 亚位点 Y203W)与底物 CMC、pNP 与 pNPC 之间的结合常数, 其次测定了 *TrCel5A*、*TrCel12A* 与 CMC 之间以及 *TrCel7A* 与 pNP 和 pNPC 等之间的结合常数, 分析了活性中心架构中单个氨基酸的突变对酶与底物结合力的影响以及不同底物结合酶分子的特定性与结合效率.

1 材料与方法

1.1 试剂和设备

羧甲基纤维素钠(CMC)、4-硝基苯基- β -D-纤维二糖苷(pNPC)、对硝基苯酚(pNP)购自 Sigma-Aldrich; 葡萄糖、纤维二糖、色氨酸购自上海生工生物工程(上海)股份有限公司. 实验用仪器为日本 SHIMADZU 公司的荧光分光光度计, 型号为 RF-5301PC.

1.2 荧光体和无定型纤维素 (RAC) 的制备

选定的荧光体为色氨酸和 4 种纤维素酶, 其中纤维素酶主要包括 *ChCel5A* 的野生型及其突变体(W61Y、和 Y203W)、由里氏木霉(*Trichoderma reesei*)产生的两种内切纤维素酶 *TrCel5A* 和 *TrCel12A* 以及一种外切纤维素酶 *TrCel7A*. *ChCel5A* 的野生型及其突变体和 *TrCel5A* 使用大肠杆菌异源表达, 具体方法参照文献[20]; *TrCel7A* 是对从上海生工购买的纤维素酶运用 DEAE 阴离子交换层析进行纯化得到的, 具体方法参照文献[21]. *TrCel12A* 是使用毕赤酵母进行异源表达和纯化, 具体方法参照文献[22]. RAC 是用 85% 的磷酸对 PH105 进行洗涤膨胀得到的, 制备流程参考文献[23].

1.3 酶活和动力学参数的测定

利用 3, 5-二硝基水杨酸(DNS)法测定野生型

ChCel5A 及其突变体的 CMC 酶活^[24]. 使用浓度为 0.1%~1.4% 的 CMC 测定野生型 *ChCel5A* 及其突变体的米氏常数, 具体方法参照文献[9].

1.4 荧光体自发荧光光谱的测定

测定未结合状态下各荧光体的荧光光谱, 发射光谱的检测范围为 305~505 nm. 色氨酸采用的浓度梯度为 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μ mol/L; *ChCel5A* 和 *TrCel7A* 采用的浓度梯度均为 15、30、45、60、75、100、150 mg/L.

1.5 荧光体与底物 pNP、pNPC 和 CMC 结合的荧光光谱测定

将荧光体(色氨酸、*ChCel5A* 野生型及其突变体和 *TrCel7A*)与系列浓度的底物(pNP 和 pNPC 的系列浓度为 5、10、20、50、100、200、300、500、700、1000 μ mol/L)结合后, 测定 295 nm 处的激发光谱, 发射光谱的检测范围为 305~505 nm, 其中酶分子与底物的结合温度为 4 $^{\circ}$ C. 其次, 取 5 种酶分子, 包括 *ChCel5A* 野生型、突变体 W61Y 和 Y203W、*TrCel5A* 和 *TrCel12A* 与系列浓度的 CMC(质量分数为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.5%、2.0%)结合 30 min, 在同样条件下测定其荧光光谱.

2 结果与讨论

2.1 色氨酸、酶分子荧光强度与其浓度的剂量关系

为了确定色氨酸和纤维素酶等荧光强度与荧光体浓度之间的剂量关系, 我们测定了以色氨酸为对照以及内切纤维素酶 *ChCel5A* 和外切纤维素酶 *TrCel7A* 3 种荧光体在没有猝灭剂(底物)存在情况下的荧光光谱(图 1a 和附件图 S1). 结果发现色氨酸在没有底物存在的情况下, 荧光光谱的最高峰在 353 nm 处. *ChCel5A* 和 *TrCel7A* 的最高峰分别为 338 nm 和 341 nm, 两者最大峰峰值与色氨酸明显不同, 发生了显著的蓝移现象, 这是由于 *ChCel5A* 和 *TrCel7A* 活性架构内色氨酸所处的疏水环境不同而导致^[25-26].

为了对数据进行准确分析, 将各个荧光体的总荧光强度(曲线下面积 $AUC_{305-505\text{ nm}}$)与荧光体的浓度进行了线性拟合分析^[27], 测定结果如图 1 所示, Trp、*ChCel5A* 以及 *TrCel7A* 浓度与荧光总强度的拟合系数分别为 0.99、0.99 和 0.97, 这说明未结合底物的 Trp、*ChCel5A* 和 *TrCel7A* 的总荧光强度与荧光体浓度呈线性相关, 表明该方法具有良好的可重现性和稳定性.

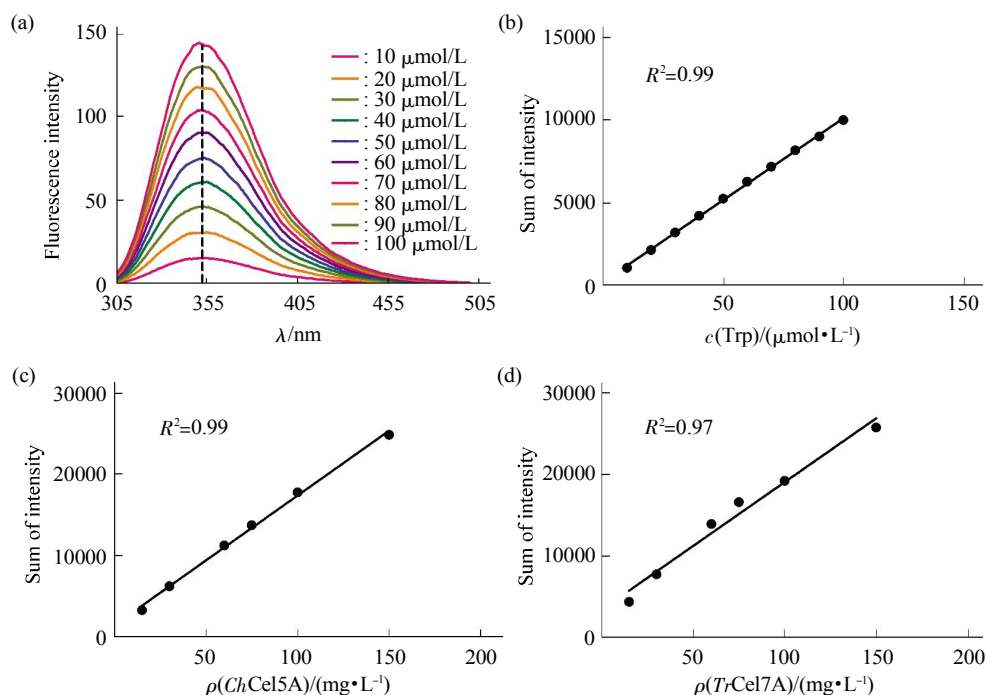


Fig. 1 Quantitative relationship between fluorescence intensity and fluorophor concentration

(a) Fluorescence spectrum of different concentrations of tryptophan. (b), (c), (d) The linear relationship between concentration and intensity of tryptophan, ChCel5A and TrCel7A, respectively.

2.2 结合动力学过程的分析与单点结合区间的确定

由于配体与供体的结合动力学过程中可能发生单位点特异性结合,也可能发生多位点的非特异性结合,因此动力学过程分析时需要确定配体与供体的单点特异性结合区间. pNP 是对硝基苯酚,具有硝基强吸电子基团,因而可以与色氨酸结合并使其荧光发生明显的猝灭现象. 我们的实验结果中也观察到了这一现象:当色氨酸结合底物 pNP 后,荧光光谱显示发生了荧光猝灭现象(图 2a). 随着 pNP 浓度的增加,猝灭程度进一步提高,光谱最高峰的位置由开始的 353 nm 移动至结合过程中的 365 nm 处,发生了 12 nm 的红移现象,这是由于高浓度的 pNP 使得色氨酸所处的微环境发生变化所致^[26].

通过计算色氨酸与 pNP 结合后荧光强度的曲线下面积并与 pNP 的浓度进行指数衰减拟合分析后,发现两者具有非常好的拟合效果($R^2=0.9999$),表明荧光光谱猝灭程度与猝灭剂的浓度之间存在明确的函数关系,这有利于下一步结合位点的确定与动力学分析(图 2b). 利用双对数方程(1)可以判断结合过程中结合位点数的变化^[28]:

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (1)$$

在这个公式中, F_0 和 F 分别是有无猝灭剂存

在情况下的荧光强度, K_a 是结合常数, Q 是猝灭剂的浓度, n 是结合位点^[29]. 由图 2c 可以看出,结合位点的数值不是一个常数,发生了由单点结合向多点结合的变化过程:当 $\lg Q \leq -1$ 时,对应的底物 pNP 浓度为 0~0.1 mmol/L,色氨酸与底物 pNP 之间是单点特异性结合;当 $\lg Q > -1$ 时,色氨酸与底物 pNP 之间发生了多点非特异性结合.

在色氨酸与底物 pNP 之间单点特异性结合时,可使用 Stern-Volmer 方程即方程(2)计算结合常数^[14,30]:

$$F_0/F = 1 + K_a Q \quad (2)$$

因此,以 F_0/F 对猝灭剂 Q 的浓度作图,斜率即为单点结合常数 K_a . 根据方程(2)可计算出色氨酸与底物 pNP 的结合常数为 $1.69 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. 利用荧光光谱法测定了色氨酸与系列浓度的葡萄糖以及纤维二糖的荧光光谱,结果发现 5 mol/L 的葡萄糖和 1 mol/L 的纤维二糖并不能使色氨酸发生明显的荧光猝灭现象,而 pNP 在 1 mol/L 时能够使色氨酸荧光发生全部猝灭现象,这说明色氨酸与 pNP 结合力大,而色氨酸与葡萄糖和纤维二糖的结合力小. 因此,如果利用 pNP 做配体分析单糖和寡糖分子与蛋白质的结合力时获得结果将会被高估.

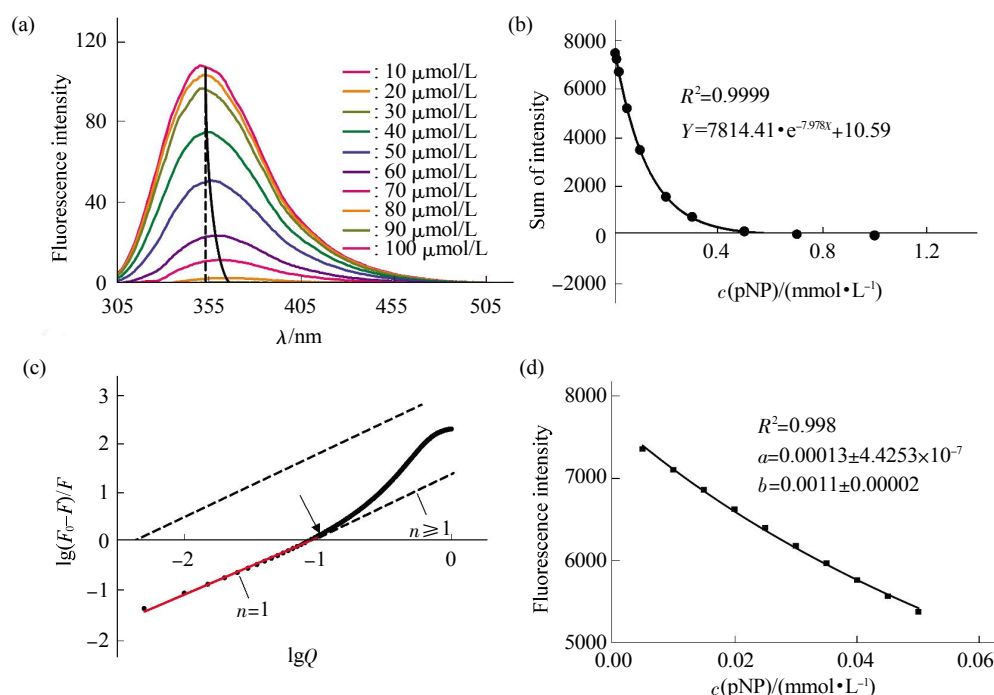


Fig. 2 Determination of the single point specific binding range and nonlinear fitting analysis

(a) The fluorescence spectrum of tryptophan and pNP. (b) One phase decay fitting of pNP and area under the curve (AUC). (c) The range of single-point specific binding. When $\lg Q$ is less than -1, the binding between tryptophan and pNP is a single point specific adsorption. (d) Nonlinear fitting analysis of the single point specific binding.

2.3 pNP 类物质不适宜作为配体表征纤维素酶与底物的结合力

色氨酸与 pNP 之间存在着多点非特异性结合过程, 并且作为配体测定的结合力会被高估, 然而 pNP 类物质如 pNPG(4- 硝基苯基 - β -D- 吡喃葡萄糖苷)、pNPC(4- 硝基苯基 - β -D- 纤维二糖苷)以及 pNPX(对硝基苯酚 - 木糖苷)却大量被用做糖苷水解酶的底物来表征酶分子的活力, 因此猜测 pNP 类物质与酶分子的相互作用是否会被高估? 进而影响酶分子对底物的催化效率? 因此我们测定了纤维素酶 ChCel5A 与葡萄糖、CMC、pNP 和 pNPC 结合时荧光光谱的变化(图 3). 利用系列浓度的葡萄糖作为底物测定纤维素酶 ChCel5A 的荧光光谱, 发现葡萄糖并未诱导 ChCel5A 中的色氨酸发生明显的荧光猝灭现象, 这说明酶分子并不能有效地结合葡萄糖分子(图 3a). 当利用不同浓度的 CMC 做底物时纤维素酶 ChCel5A 的荧光发生了部分猝灭现象(图 3b), 这说明纤维素酶 ChCel5A 可以结合底物 CMC, 其活性架构中的色氨酸与 CMC 的糖单元残基发生明显相互作用, 使得酶分子活性架构中

色氨酸发生荧光猝灭. 另外, 对比葡萄糖的结合过程参数发现酶分子可以识别结合多个葡萄糖单元, 但不能有效结合单个游离葡萄糖分子. 由于 CMC 中的葡萄糖残基只结合活性架构中的色氨酸分子, 而不能进入纤维素酶 ChCel5A 蛋白质内部, 因而其内部的色氨酸残基仍然发出荧光, 所以 CMC 并不能使得纤维素酶 ChCel5A 的荧光光谱发生完全猝灭现象, 由方程(2)计算出纤维素酶 ChCel5A 与 CMC 的结合常数为 $7.79 \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (表 1).

利用 pNP、pNPC 做配体时, 纤维素酶 ChCel5A 的荧光发生了明显的猝灭现象, 并且两种底物的浓度在 1 mmol/L 的时候能够使纤维素酶 ChCel5A 的荧光发生完全猝灭(图 3c, d), 这说明 pNP、pNPC 作为底物时不仅结合纤维素酶 ChCel5A 活性架构中的色氨酸, 而且可以进入纤维素酶 ChCel5A 的内部, 将纤维素酶 ChCel5A 中所有色氨酸发出的荧光全部猝灭. pNP 与酶分子结合行为与 pNP 结合色氨酸的行为基本一致, 都会导致荧光光谱红移并发生多点结合, 并且 pNP 与纤维素酶 ChCel5A 之间的结合常数为 $1.98 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$

(表 1), 而其与色氨酸的结合常数为 $1.69 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 两者在同一数量级, 相对于色氨酸 pNP 更易与酶分子结合. pNPC 也有类似的情况(图 3d), 当以 pNPC 为配体时, 可以与 *ChCel5A* 发生结合, 并可以进入蛋白质内部, 引起内部色氨酸的荧光猝灭.

因此, pNP 类物质作为配体来表征纤维素酶与糖分子的结合力时, 高估配体与受体的结合力, 并且还会发生 pNP 结合蛋白质内部色氨酸等非特异性结合现象, 从而给测定带来系统性偏差.

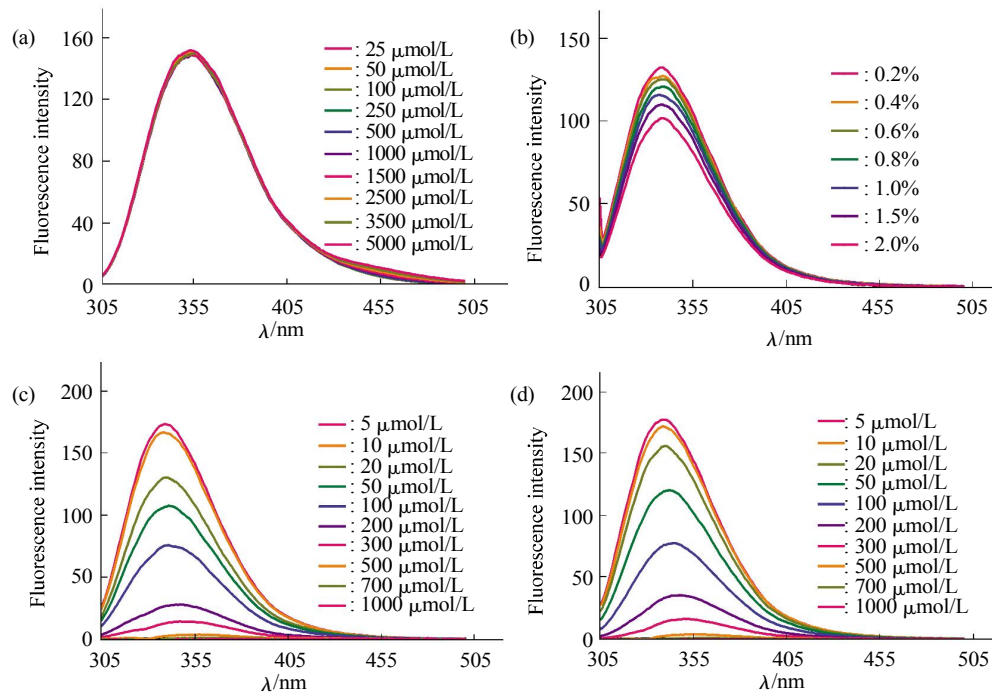


Fig. 3 The fluorescence spectra of ChCel5A with four kinds of substrates
(a), (b), (c), (d) The fluorescence spectrum of *ChCel5A* with glucose, CMC, pNP and pNPC, respectively.

Table 1 Kinetic parameter and relative activity between different fluorophors and substrates

Fluorophors	$K_a/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$			$K_m/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	Relative activity	
	CMC	pNP	pNPC	CMC	CMC	RAC
<i>ChCel5A</i> -WT	7.79×10^2	1.98×10^4	2.18×10^4	3.47	1.00 ± 0.15	1.00
<i>ChCel5A</i> -W61Y	5.94×10^2	1.99×10^4	1.97×10^4	31.09	0.28 ± 0.09	0.71
<i>ChCel5A</i> -Y203W	6.39×10^2	2.15×10^4	6.91×10^4	13.80	0.31 ± 0.07	0.80
<i>TrCel7A</i> -WT	NA	1.96×10^4	3.71×10^4	NA	NA	NA
<i>TrCel5A</i> -WT	4.55×10^2	NA	NA	11.74	NA	NA
<i>TrCel12A</i> -WT	3.54×10^2	NA	NA	22.74	NA	NA

NA: At present, we don't test the parameters.

2.4 荧光光谱法定量测定单个氨基酸突变对结合纤维素能力的影响程度

纤维素酶 *ChCel5A* 活性架构中具有 2 个芳香族氨基酸, 分别为 61 位的 W 和 203 位的 Y(图 4), 这 2 个关键亚位点应对于维持其酶活力具有重要作用. 因此测定了 *ChCel5A* 及其突变体的 CMC 和

RAC 酶活(表 1), 发现两者之间具有较高的相关性, 简单相关系数为 0.9635, 说明利用 CMC 作底物表征酶活性时具有较小的局限性. 在低浓度配体条件下, *ChCel5A* 可以与底物 pNP 和 pNPC 特异性结合, 分析结合常数 K_a 发现相比于 pNP, 多含有一个纤维二糖的 pNPC, 其与 *ChCel5A* 的结合常

数稍微提高 $2.0 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 这说明 *ChCel5A* 与 pNP 类底物的相互作用主要结合力还是来自 pNP 基团与色氨酸的相互作用. 增加活性中心色氨酸可以提高 pNP 类物质与纤维素酶的结合力, 由表 1 可以看出 Y203W 与 pNP 和 pNPC 的结合常数相比野生型增大, 而 W61Y 与 pNP 的结合常数相比于野生型相差不大, 由 pNP 类物质测出的结合常数与酶活力之间并不具有相关性. 另外, *TrCel7A* 可以与 pNPC 结合, 其结合常数明显大于 pNP 的,

但 pNPC 底物却也可以与 *TrCel7A* 发生非特异性结合, 使得分子内的色氨酸荧光也发生完全猝灭, 因此 pNPC 类物质做为配体表征纤维素酶与底物的相互作用会导致系统性偏差. 比较 *ChCel5A* 野生型及其突变体 W61Y 和 Y203W 与 pNP、pNPC 和 CMC 的结合常数, pNP 类物质作为配体表征纤维素酶与底物之间的结合常数时约高 20~100 倍, 并且结合常数受到色氨酸残基数量的明显影响.

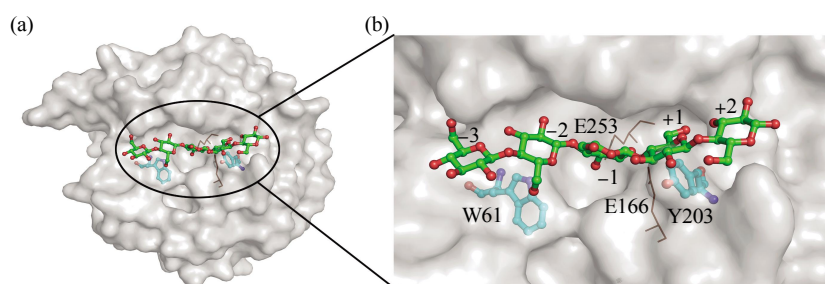


Fig. 4 The structure display of subsites in *ChCel5A* tunnel

(a) Surface representation of *ChCel5A*. (b) A detailed view of the two subsite amino acids. Functional residues are shown in cyan. The catalytic residues are shown in brown. Carbohydrate chain is shown in green.

利用荧光光谱法分别定量测定纤维素酶 *ChCel5A* 野生型及其突变体 W61Y 和 Y203W 与底物 CMC 之间的结合动力学常数 K_a (表 1), 突变体 W61Y 和 Y203W 的 K_a 值较野生型分别减小 $1.85 \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $1.4 \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 这说明荧光光谱法可以检测单个氨基酸突变导致的结合常数的变化. 由于配体与受体结合力常数 K_a 和酶分子与底物米氏常数 K_m 之间具有负相关性, 所以纤维素酶 *ChCel5A* 及其突变体与底物 CMC 的 K_m 也列在表 1 中. 比较纤维素酶 *ChCel5A* 及其突变体的 K_a 和 K_m , 发现 2 种突变体 Y203W、W61Y 与底物 CMC 的 K_a 都小于野生型的 K_a , 而 K_m 都大于野生型蛋白质的 K_m , 即 2 种突变体与底物的结合力都减弱, 并且 K_a 和 K_m 的简单相关系数为 -0.9166, 说明利用荧光光谱法测定的结合常数 K_a 与 K_m 具有较高的一致性.

里氏木霉的纤维素酶系统中含有 *TrCel5A* 和 *TrCel12A* 等内切纤维素酶^[31]. 根据 CAZy 数据库, *TrCel5A* 属于糖苷水解酶 5(GH5)家族, *TrCel12A* 属于糖苷水解酶 12(GH12)家族. 对来自里氏木霉的 *TrCel5A* 和 *TrCel12A* 与底物 CMC 之间的结合力也进行了定量测定. *TrCel5A* 与 CMC 的 K_a 为

$4.55 \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, *TrCel12A* 与 CMC 的 K_a 为 $3.54 \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 因此荧光光谱法也可以表征 GH5 和 GH12 家族酶分子与底物的结合力, 并且测定的结合常数与酶分子的 K_m 具有明确的相关性^[32]. 荧光光谱法可以在催化残基的不突变情况下, 定量测定单一氨基酸残基突变对酶分子结合力的影响, 并可以与酶反应米氏常数测定的 K_m 值变化基本一致, 这说明荧光光谱法的优势. 当然, 荧光光谱法受限于酶分子活性中心必须存在参与结合的芳香族氨基酸, 这是该方法的限制所在.

3 结 论

荧光光谱法具有高度灵敏性, 可以广泛应用于酶与底物的结合力测定中. 在本文中, 通过色氨酸、*ChCel5A* 和 *TrCel7A* 等荧光强度对荧光体浓度进行定量分析, 说明荧光强度与荧光体浓度之间具有线性相关趋势, 根据拟合系数证明荧光光谱法结果稳定并且具有可重现性. 利用荧光光谱法测定了 *ChCel5A* 及其突变体 W61Y 和 Y203W 与底物 CMC 的结合常数, 发现突变体结合常数变低, 说明利用荧光光谱法可以灵敏定量地表征出纤维素酶单位点突变体与底物之间的结合常数. 通过检测

T-Cel5A 和 T-Cel12A 与底物 CMC 的结合常数, 发现该方法也可以表征 GH5 和 GH12 家族中相关组分结合底物的能力. 此外, 发现 pNP 和 pNPC 做配体会高估结合力约 20~100 倍, 表明 pNP 类物质作为配体表征酶结合力时具有明显的偏差. 以上研究结果表明荧光光谱法能够检测单点氨基酸突变对底物结合力的影响, 从而为研究纤维素酶与底物之间的结合力提供一个更加稳定、快速、简单的方法.

附件 图 S1 见本文网络版附录(<http://www.pibb.ac.cn>)

参 考 文 献

- [1] Zhang Y H P, Himmel M E, Mielenz J R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 2006, **24**(5): 452–481
- [2] 顾方媛, 陈朝银, 石家骥, 等. 纤维素酶的研究进展与发展趋势. *微生物学杂志*, 2008, **28**(1): 83–87
Gu F Y, Chen Z Y, Shi J J, *et al.* *J Microbiol*, 2008, **28**(1): 83–87
- [3] Ghose T K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, 2009, **59**(2): 257–268
- [4] Kumar D, Murthy G S. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, **6**(2): 420–431
- [5] Zhang Q, Zhang X, Wang P, *et al.* Determination of the action modes of cellulases from hydrolytic profiles over a time course using fluorescence-assisted carbohydrate electrophoresis. *Electrophoresis*, 2014, **36**(6): 910–917
- [6] Himmel M E. Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy, 2009
- [7] Dwivedi U N, Singh P, Pandey V P, *et al.* Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2011, **68**(2): 117–128
- [8] Nakamura A, Tsukada T, Auer S, *et al.* Tryptophan residue at active-site tunnel entrance of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A is important to initiate degradation of crystalline cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**(19): 13503–13510
- [9] Zhang X, Wang S, Wu X, *et al.* Subsite-specific contributions of different aromatic residues in the active site architecture of glycoside hydrolase family 12. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 18357
- [10] Payne C M, Bomble Y J, Taylor C B, *et al.* Multiple functions of aromatic-carbohydrate interactions in a processive cellulase examined with molecular simulation. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, **286**(47): 41028–41035
- [11] Tian L, Liu S, Wang S, *et al.* Ligand-binding specificity and promiscuity of the main lignocellulolytic enzyme families as revealed by active-site architecture analysis. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 23605
- [12] Lakowicz J R. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer Berlin, 2006, **13**(2): 029901
- [13] 陈国珍. 荧光分析法. 北京: 科学出版社, 1990
Chen G Z. The Method of Fluorescence Analysis. Beijing: Science Press, 1990
- [14] Uttam A, Chandrima J, Ravi Kiran B, *et al.* Exploring the mechanism of fluorescence quenching in proteins induced by tetracycline. *Journal of Physical Chemistry B*, 2011, **115** (19): 6312–6320
- [15] Van De Weert M. Fluorescence quenching to study protein-ligand binding: common errors. *Journal of Fluorescence*, 2010, **20** (2): 625–629
- [16] Bian Q, Liu J, Tian J, *et al.* Binding of genistein to human serum albumin demonstrated using tryptophan fluorescence quenching. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2004, **34** (5): 275–279
- [17] Wang Z, Tan X, Chen D, *et al.* Study on the binding behavior of lysozyme with cephalosporin analogues by fluorescence spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, 2009, **19**(5): 801–808
- [18] Van De Weert M, Stella L. Fluorescence quenching and ligand binding: a critical discussion of a popular methodology. *Journal of Molecular Structure*, 2011, **998**(1): 144–150
- [19] Lombard V, Ramulu H G, Drula E, *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**(D1): D490–D495
- [20] Zhu Y, Zhou H, Bi Y, *et al.* Characterization of a family 5 glycoside hydrolase isolated from the outer membrane of cellulolytic *Cytophaga hutchinsonii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, **97**(9): 3925–3937
- [21] Medve J, Lee D, Tjerneld F. Ion-exchange chromatographic purification and quantitative analysis of *Trichoderma reesei* cellulases cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II by fast protein liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1998, **808**(1–2): 153–165
- [22] Zhang X, Liu N, Yang F, *et al.* *In situ* demonstration and quantitative analysis of the intrinsic properties of glycoside hydrolases. *Electrophoresis*, 2012, **33**(2): 280–287
- [23] Zhang Y H P, Cui J, Lynd L R, *et al.* A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. *Biomacromolecules*, 2006, **7**(2): 644–648
- [24] Zhang L, Ma H X, Zhang H Q, *et al.* *Thermomyces lanuginosus* is the dominant fungus in maize straw composts. *Bioresource Technology*, 2015, **197**(266–275)
- [25] Huang J, Xu Y, Qian X. A red-shift colorimetric and fluorescent sensor for Cu²⁺ in aqueous solution: unsymmetrical 4, 5-diaminonaphthalimide with N-H deprotonation induced by metal ions. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2009, **7** (7): 1299–1303.
- [26] Burstein E A, Vedenkina N S, Ivkova M N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochemistry & Photobiology*, 1973, **18**(4): 263–279
- [27] Pruessner J C, Kirschbaum C, Meinschmid G, *et al.* Two formulas

- for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. *Psychoneuroendocrinology*, 2003, **28**(7): 916–931
- [28] 张 勇, 张贵珠, 王月梅, 等. 光谱法研究丝裂霉素、血清白蛋白以及金属离子间的相互作用. *分析科学学报*, 2000, **16**(6): 445–449
- Zhang Y, Zhang G Z, Wang Y M, et al. *Journal of Analytical Science*, 2000, **16**(6): 445–449
- [29] Skrt M, Benedik E, Podlipnik C, et al. Interactions of different polyphenols with bovine serum albumin using fluorescence quenching and molecular docking. *Food Chemistry*, 2012, **135**(4): 2418–2424
- [30] 边平凤. 生物大分子与小分子相互作用研究. 杭州: 浙江大学, 2008
- Bian P F. Study on The Interaction Between Bio-macromolecules and Small Molecules. Hangzhou: Zhejiang University, 2008
- [31] Palonen H, Tjerneld F, Zacchi G, et al. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *Journal of Biotechnology*, 2004, **107**(1): 65–72
- [32] Lynd L R, Weimer P J, Van Zyl W H, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 2002, **66**(3): 739

Quantitative Determination of Substrate Binding Affinity Influenced by a Single Amino Acid Mutation in Cellulase Active-site Architecture Using Fluorescent Spectrometry*

WANG Pei-Pei, ZHANG Li-Li, ZHANG Qing, WANG Lu-Shan, CHEN Guan-Jun**

(The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract The active-site architecture of cellulase is a functional area composed of multiple amino acid residues which can bind and catalyze substrates. Aromatic residues, such as tryptophan, play important roles in the function of this region. In this study, the dynamic of binding process between tryptophan in active-site architecture of cellulase *ChCel5A* and substrate was quantitatively analyzed using fluorescence spectrum. The substrate concentration range when tryptophan can specifically bind the substrate was determined and the change of binding constant caused by a single amino acid mutation in active-site architecture of *ChCel5A* was measured through quantitative analysis of tryptophan fluorescence quenching. Compared with the measurement of kinetic parameters, fluorescence spectroscopy could accurately characterize the binding affinity between cellulase and substrate, as well as the change of kinetic parameter caused by a single residue mutation. Besides, when using pNPC as the ligand, the binding constant could be overestimated for 20–100 times due to the increase of strong electrophilic groups. Fluorescent spectrometry can measure the kinetic parameter of cellulase-substrate binding process in a sensitive and rapid way, providing a new perspective for the quantitatively analyzing the interaction between proteins and substrates.

Key words fluorescent spectrometry, cellulase, tryptophan, active-site architecture, binding affinity, quantitative analysis

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0205

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31570051, 31370111) and The Key Technologies R&D Program of Shandong Province (2015GSF121019).

**Corresponding author.

Tel: 86-531-88366202, E-mail: guanjun@sdu.edu.cn

Received: June 22, 2016 Accepted: November 3, 2016

附录

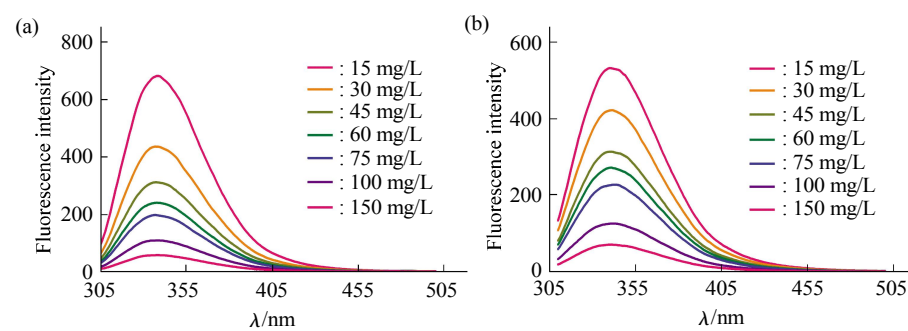


Fig. S1 Fluorescence spectrum of different concentrations of chCel5A (a) and TrCel7A (b)