

台湾家白蚁内切葡聚糖酶活性中心氨基酸的饱和突变

林丽华¹, 秦国梅¹, 韦宇拓¹, 杜丽琴¹, 庞宗文¹, 黄日波^{1,2}

1 广西大学生命科学与技术学院, 南宁 530004

2 广西科学院, 南宁 530007

摘要: 对内切葡聚糖酶的功能改进一直是纤维素酶研究领域的焦点。本研究对台湾家白蚁内切葡聚糖酶(CfEG)的活性位点做了饱和突变。首先, 以 PDB 数据库中高山象白蚁内切葡聚糖酶(NtEG)的三维结构(PDB id=1ks8)为模板, 对 CfEG 进行三维结构同源建模, 二者序列一致性高达 79%。位于 CfEG 活性中心的 D53、D56、E411, 分别与 NtEG 的催化残基 D54、D57、E412 重合。用简并引物对 CfEG 的假定活性位点 D53、D56、E411 进行定点饱和突变。在位点 D53、D56 各筛选到羧甲基纤维素酶活有一定提高的突变子 D53E、D56C, 其中 D56C 的 K_m 值减小为原始酶的三分之一。双突变子 D53L/D56I 的比活比原始酶提高了近 2 倍, 同时 K_m 值减小至原始酶的一半。而 E411 的饱和突变子库均没有活性, 进一步将其替换为近似氨基酸的 E411D、E411Q 定点突变子也丧失了酶活。由突变结果可推断, 位点 E411 为该酶行使功能的必需残基。

关键词: 台湾家白蚁, 内切葡聚糖酶, 定点饱和突变, 双突变, 定点突变

Saturation mutagenesis of three amino acid positions consisting of the active site of an endoglucanase from termite *Coptotermes formosanus*

Lihua Lin¹, Guomei Qin¹, Yutuo Wei¹, Liqin Du¹, Zongwen Pang¹, and Ribo Huang^{1,2}

1 College of life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China

2 Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China

Abstract: Functional improvement to one component of the cellulase, endo- β -1, 4-glucanase, has been a focus of the recent research in this area. We report here the saturation mutagenesis of the active site of an endoglucanase (CfEG) from termite *Coptotermes formosanus*. First, three dimensional structure of CfEG was built via homology modeling by using a close-related (79% homology in sequence) endo- β -1,4-glucanase (NtEG, PDB id=1ks8) from higher termite *Nasutitermes takasagoensis* as a template. Second, we identified three corresponding amino acid positions at the active site of CfEG by structural superposition onto NtEG. These three putative amino acids for the active site of CfEG, i.e., Asp53, Asp56 and Glu411, were subjected to saturation mutagenesis using degenerate primers. Among the mutants, Asp53Glu and Asp56Cys showed somehow higher activities than the wildtype, with the latter having more than 3-fold decrease in K_m . Double mutation Asp53Leu/Asp56Ile showed nearly 2-fold increase in specific activity and in the same time 2-fold decrease in K_m . Saturation mutagenesis to the position Glu411 produced no active mutant, even changing Glu411 explicitly into its similar amino acids such as Glu411Asp and Glu411Gln could not result in any active mutant.

Received: January 9, 2009; **Accepted:** April 14, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 20666002), Key Technologies R & D Program of Guangxi (No. 0728001).

Corresponding author: Ribo Huang. Tel: +86-771-3270336; E-mail: priboh@gxu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 20666002), 广西科技攻关项目(No. 0728001)资助。

These imply that position Glu411 could be extremely important and therefore indispensable for CfEG functionality.

Keywords: *Coptotermes formosanus*, endoglucanase, site-saturation mutagenesis, combined mutation, site-directed mutagenesis

随着对纤维素酶研究的深入,发现纤维素酶不仅广泛存在于微生物和植物中,在多种动物体内也分离得到内源性纤维素酶,这些动物性纤维素酶大都属于内切- β -1,4-葡聚糖酶^[1]。白蚁作为一种主要以木质纤维素为食的生物,这是因为在其体内存在着纤维素酶,目前国内外研究已陆续克隆到不同品种白蚁的内源性内切葡聚糖酶基因^[2],这些白蚁内源性内切葡聚糖酶均属于 GHF9,都只含有单一的催化结构域^[3]。

本研究在已克隆表达台湾家白蚁(*Coptotermes formosanus*)内切葡聚糖酶 CfEG 的基础上,对位于其活性中心的 D53、D56、E411(图 4)位点分别用简并引物进行饱和突变,在筛选到的单点突变子基础上进行组合突变。其中 E411 位点的饱和突变库均没有活性,进一步将其定点突变为近似氨基酸天冬氨酸和谷氨酰胺,还对 D53/D56 进行了联合饱和突变,并对所有突变酶的动力学特性进行了比较分析,为对纤维素酶的催化功能作进一步的改良和优化研究提供了一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

重组表达质粒 pSE380-CfEG, *Escherichia coli* BL21(DE3)和 JM109 为本实验室保存。

1.1.2 试剂

限制性核酸内切酶 *Nae* I、Prime STAR HS DNA 聚合酶;快速定点突变试剂盒 Quickchange 购自 Stratagene 公司; *Dpn* I 为 Promega 产品;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自 Calbiochem 公司;Yeast extract 和 Tryptone 购自 OXOID 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

LB 培养基[1% (W/V) tryptone, 0.5% (W/V) yeast extract, 1% (W/V) NaCl]。

1.2 方法

1.2.1 突变酶的获得

利用一步反向 PCR 介导的定点突变,使用分别

在饱和突变位点 D53、D56、E411 含简并碱基 NNN 的引物来随机突变成任意氨基酸,定点突变引物中分别引入突变的碱基, D53/D56 联合突变引物则在 D53 和 D56 位点同时为简并碱基 NNN。转化子采用刚果红平板染色法进行筛选^[4]。

1.2.2 重组酶的表达和纯化

将重组酶在 LB 培养基培养至 $OD_{600}=0.6$ 左右,加入 IPTG 使其终浓度为 1 mmol/L 进行诱导表达,继续培养 24 h 后离心收集菌体。超声波破胞,离心弃沉淀,上清即为粗酶液。粗酶液用镍亲和层析柱纯化,镍柱用 5 mmol/L 咪唑缓冲液平衡,粗酶液上柱后依次用 5 mmol/L、20 mmol/L 咪唑缓冲液洗涤杂蛋白,最后用 90 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱收集酶蛋白峰。蛋白峰收集液取样后进行 SDS-PAGE 电泳分析和酶活力测定。

1.2.3 酶活检测

取 0.5 mL 纯酶液,与 0.5 mL 的 1%(W/V)CMC-Na 柠檬酸钠溶液(pH6.5)在 42°C 反应 30 min,加 0.5 mL DNS 终止反应,沸水浴 5 min 后,在 540 nm 处测定吸光值,以此计算还原糖的生成量。在最适温度及最适 pH 条件下,按上述反应,每分钟生成 1 μ mol 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活单位(1 U)^[5]。检测内切纤维素酶纯酶的比酶活时,反应体系同上。CMCase 的比活力(U/mg)=CMCase 活力/蛋白含量。

1.2.4 K_m 值和热稳定性的测定

K_m 测定参照文献^[6],除选用一系列不同的底物浓度外,其余反应条件同上;热稳定性测定的具体方法:将纯酶液在不同的温度(20°C~55°C)下保温 30 min 后冷却,再在最适温度下测定其残存活性,然后作温度活性曲线。

1.2.5 蛋白质浓度测定

蛋白质的测定使用 Bradford 法^[7],以牛血清白蛋白(BSA)为标准。

2 结果

2.1 突变结果

D53 和 D56 饱和突变子库分别筛选到突变体 D53E、D53C 和 D56C,组合突变子 D53C/D56C、

D53E/D56C 则失去酶活。D53/D56 联合饱和突变子库筛选到突变体 D53E/D56S、D53L/D56I。E411 饱和突变子库均没有活性, 进一步定点突变为近似氨基酸的突变子 E411D、E411Q 也都丧失了酶活。

2.2 突变酶的酶学性质分析

2.2.1 酶的比活力和 K_m 值

用作酶学性质研究的酶均为经镍亲和层析柱纯化后达到电泳纯的纯酶, 即 SDS-PAGE 电泳显示为单一条带(图 1, 以野生酶与一个突变酶为例)。纯化后野生型 CfEG 的比活力为 13.54 U/mg。D53、D56 位点的突变体 D53C、D53E、D56C 的比活较之野生酶没有太大变化, 将其组合的定点突变子 D53C/D56C、D53C/D56C 则失去酶活, 但是筛选到的 2 个位点联合饱和突变的突变子 D53E/D56S、D53L/D56I 的比活分别提高到野生酶的 1.45 倍和 1.84 倍, K_m 值则分别降低至野生酶的 70% 和 50%。而 E411 位点的谷氨酸替换为近似氨基酸天冬氨酸和谷氨酰胺后也丧失了活力(表 1)。

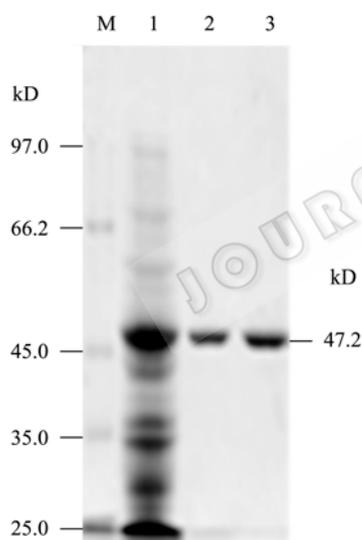


图 1 镍柱纯化后野生型与突变型 CfEG 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of wild CfEG and mutant CfEG purified on Ni-nitrotriacetate column. M: protein marker; 1: recombinant strain *E. coli* BL21 (DE3) containing pSE380-CfEG; 2: wild enzyme purified on nickel column; 3: mutant enzyme purified on nickel column.

2.2.2 最适温度和最适 pH

在 50 mmol/L (pH 6.5) 柠檬酸钠缓冲液和不同温度(4°C~70°C, 8 个梯度)的条件下, 以及在 42°C 不同

pH (pH 4~10, 8 个梯度)的 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液的条件下, 将突变酶分别与 1% 的 CMC-Na 反应, 通过 DNS 显色反应测定酶活力大小。

与野生酶相比, 突变酶 D53E 的最适温度(图 2)降低了 5°C, 为 37°C; D56C 的最适 pH(图 3)提高了 1.5 个单位, 在 pH 8.0 左右; D53L/D56I 的最适 pH 变为 7.0。其他突变酶的最适温度和最适 pH 没有变化, 分别为 42°C 和 pH 6.5。

表 1 野生型与突变型 CfEG 的性质比较

Table 1 Comparison of the properties of CfEG between wild type and mutants

| Strain | Characteristics of enzyme | |
|-----------|---------------------------|---------------------|
| | Specific activity (U/mg) | K_m value (mg/mL) |
| WT | 13.54 | 80.27 |
| D53C | 9.91 | 37.68 |
| D53E | 16.42 | 93.82 |
| D56C | 16.47 | 26.81 |
| D53E/D56S | 19.64 | 57.45 |
| D53L/D56I | 24.89 | 43.14 |
| D53C/D56C | - | - |
| D53E/D56C | - | - |
| E411Q | - | - |
| E411D | - | - |

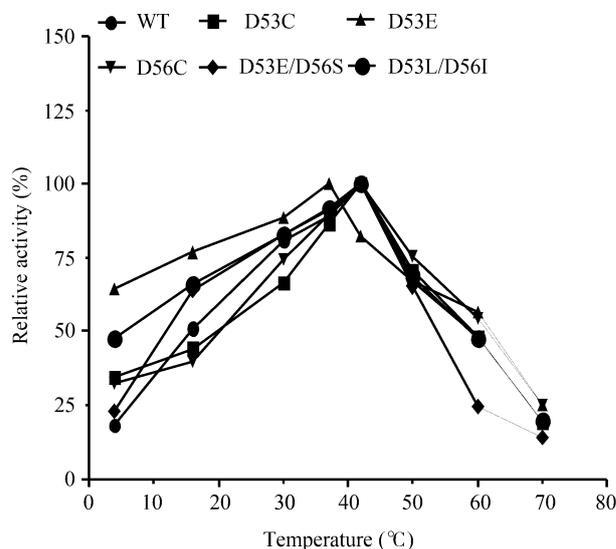


图 2 温度对野生型和突变型 CfEG 活力的影响

Fig. 2 Effect of temperature on activities of wild CfEG and mutant CfEG.

2.2.3 野生酶和突变酶的热稳定性

将野生酶和突变酶置于不同的温度(20°C~55°C)下保温 30 min, 冷却后于最适反应条件下测定残余

酶活力。结果表明:突变酶 D53C、D56C 的 T_m 值升高至 50°C , 其他突变酶的热稳定性与野生酶基本相同, T_m 值均为 46°C (图 4)。

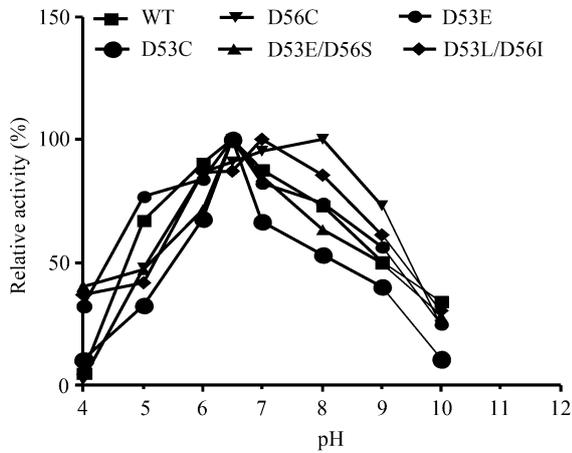


图 3 pH 对野生型和突变型 CfEG 活力的影响

Fig. 3 Effect of pH on activities of wild and mutant CfEG.

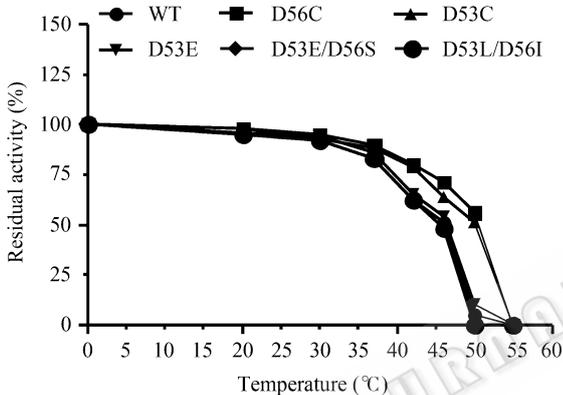


图 4 野生型与突变型 CfEG 的热稳定性比较

Fig. 4 Comparison of thermal stability between wild CfEG and mutant CfEG.

3 讨论

CfEG 和 NtEG 氨基酸的同源性为 79%, 因此可以以 PDB 数据库中 NtEG (PDB id= 1Ks8) 的三维结构为模板^[8], 对 CfEG 进行三维结构同源建模, 分析 CfEG 的三级结构和预测其活性中心。通过同源建模分析它们的三维结构发现, 其中位于 CfEG 活性中心的 D53、D56、E411 (图 5), 分别与 NtEG 的 D54、D57、E412 重合, 而这 3 个位点正是 NtEG 的催化残基。CfEG 的 E411 对应 NtEG 的酸催化剂 E412, CfEG 的 D53、D56 分别对应于 NtEG 的 D54、D57, 而 D54、D57 其中之一为碱催化剂^[8], E411、D53、D56 也刚好处于 CfEG 活性中心的凹沟中。当用羧甲基纤维素钠作为底物, 突变位点 E411 的 CMCase 完全丧失,

由此可以进一步断定 E411 为 CfEG 的酸催化剂, 其羧基提供一个质子给糖苷氧, 即 E411 的羧基 C 质子化后作为催化酸 (图 6)。突变酶的内切活性被保留在碱催化剂 D53 或 D56 上, 这与对 *Clostridium stercorarium* 纤维素酶 CelZ 的催化碱基突变结果一致^[9], 即用基因定点突变 CelZ 的可能催化残基 E447 和 D84 发现, 突变体酶的羧甲基纤维素内切活性被保留在碱催化剂 D84 上。



图 5 CfEG 同源建模三维结构图

Fig. 5 3D structural homology modeling of CfEG

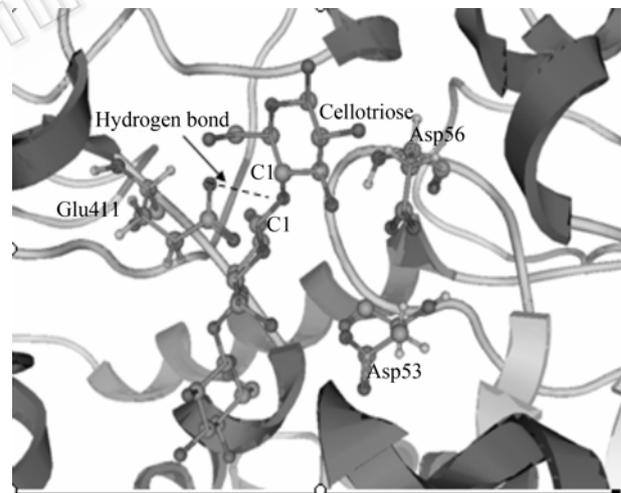


图 6 CfEG: 底物复合物的模拟图

Fig. 6 Simulation diagram of CfEG: Substrate complex.

在对 CfEG 的饱和突变研究中, D53E 的最适温度降低了 5°C , D56C 的最适 pH 值由野生酶的 6.5 提高至 8.0, 是蛋白质一级结构上的改变导致后代性状上的差异; 突变为半胱氨酸的 D53C 和 D56C 的 T_m 值均比野生酶提高, 可能是因为形成分子间二硫键, 有利于提高酶的稳定性^[10]。突变酶的失活可能是氨基酸替换以及其所引起的高级结构的变化, 直接或

间接的影响到活性中心的氨基酸残基的高级结构的布局。一般来说, 酶分子能量的降低也有助于酶的稳定性的提高, D53L/D56I 的能量要比野生酶的低(图 7), 这也可能是其酶活有所提高的原因。

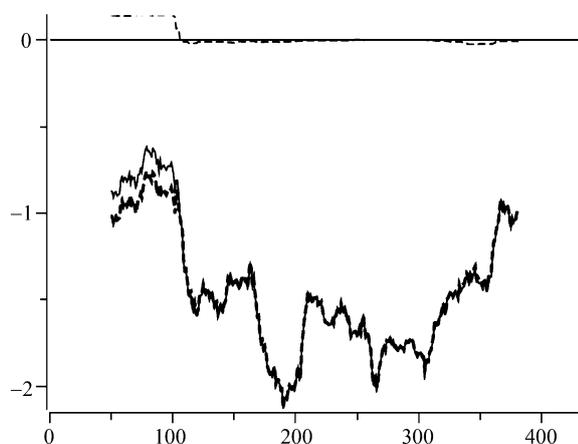


图 7 通过 ProSa2003 计算获得的 CfEG 野生酶及突变酶 D53L/D56I 的能量分析结果

Fig. 7 Potential energy analysis of CfEG and mutant enzyme D53L/D56I by software of ProSa2003. CfEG(wt):solid line; mutant enzymes D53L/D56I: dashed line; zwt-zmut: broken line(on the top). Note: the z-scores zmut of the mutant enzyme is calculated and compared to the wild type z-scores zwt. The mutation is regarded as stabilising as zwt-zmut >0.

突变型 CfEG 的酶学性质变化表现各异, 仅通过同源建模的方法比较难以分析出其中的原因, 需要得到更准确的结晶结构, 再通过三维结构做进一步的结构和功能上的分析研究。对活性中心进行饱和突变, 是一种快速的改造酶的有效方法。本研究首次对台湾家白蚁内切葡聚糖酶进行了理性设计, 为定位催化关键点及深入了解其性质与结构之间的关系奠定了基础。

REFERENCES

[1] Li YH, Zhao FK. Advances in cellulase research. *Chin*

Bull Life Sci, 2005, **17**(5): 392–397.

李燕红, 赵辅昆. 纤维素酶的研究进展. *生命科学*, 2005, **17**(5): 392–397.

[2] Yang TC, Mo JC, Cheng JA. Advances in the study on the digestive mechanism of cellulose in termites. *Sci Silvae Sin*, 2006, **42**(1): 110–115.

杨天赐, 莫建初, 程家安. 白蚁消化纤维素机理研究进展. *林业科学*, 2006, **42**(1): 110–115.

[3] Tokuda G, Lo N, Watanabe H, et al. Metazoon cellulase genes from termites: Intron/exon structures and sites of expression. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1447**(2/3): 146–159.

[4] Teather RM, Wood PJ. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine ruminant. *Appl Environ Microbiol*, 1982, **43**(4): 777–800.

[5] Liu DH, Yang YH, An LM, et al. Assay method on the activity of feed cellulose. *China Feed*, 2002, **17**: 88–91.

刘德海, 杨玉华, 安明理, 等. 纤维素酶酶活的测定方法. *中国饲料*, 2002, **17**: 88–91.

[6] Yan SX, Cai HY. Principle and Method of Catalytic Kinetic. Xiamen: Xiamen University Press, 1987.

颜思旭, 蔡红玉. 酶催化动力学原理与方法. 厦门: 厦门大学出版社, 1987.

[7] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248–254.

[8] Khademi S, Guarino LA, Watanabe H, et al. Structure of an endoglucanase from termite, *Nasutitermes takasagoensis*. *Biol Crystallogr*, 2002, **58D**: 653–659.

[9] Riedel K, Bronnenmeier K. Active-site mutations which change the substrate specificity of the *Clostridium stercorarium* cellulase CelZ implications for synergism. *Eur J Biochem*, 1999, **262**: 218–223.

[10] Yang YH, Wu YJ, Jiang L. Mutants of subtilisin E. *Chin J Biotech*, 2000, **16**(2): 147–149.

杨永华, 吴宇杰, 蒋岚. 枯草蛋白酶 E 的突变体. *生物工程学报*, 2000, **16**(2): 147–149.