

N13D、S40E 点突变提高木聚糖酶 XYNB 的热稳定性*

杨浩萌¹ 王亚茹¹ 伍宁丰² 姚斌^{1**}

(中国农业科学院饲料所 北京 100081) (中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

摘要 对来源于 *Streptomyces olivaceoviridis* 的高比活木聚糖酶 XYNB 进行同源建模和序列比较,设计了 N13D、S40E 的定点突变,以期改善中温酶 XYNB 的热稳定性。突变酶 N13D、S40E 分别在毕赤酵母中表达,经纯化后与野生型酶 XYNB(同样经毕赤酵母表达后纯化)进行酶学性质比较,结果表明,突变酶 N13D 和 S40E 在 70℃ 处理 5min,热稳定性比 XYNB 分别提高了 24.76% 和 14.46%,突变酶 N13D 的比活性比 XYNB 提高了 22%。在其他性质方面突变酶 N13D、S40E 与野生型酶 XYNB 基本相似。通过对木聚糖酶 XYNB 的定点突变,提高了该酶的热稳定性,并为结构与功能的进一步研究提供了材料。

关键词 木聚糖酶, N13D, S40E, 热稳定性, 定点突变

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)03-0533-04

Site-directed Mutagenesis of N13D、S40E Improved the Thermostability of Xylanase XYNB*

YANG Hao-Meng¹ WANG Ya-Ru¹ WU Ning-Feng² YAO Bin^{1**}

(Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

(Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: The predicted structure of *Streptomyces olivaceoviridis* xylanase XYNB was made by homology modeling and BLAST. Then N13D and S40E mutations were introduced into wide-type XYNB separately by site-directed mutagenesis to improve the enzyme thermostability. XYNB and the mutants (N13D, S40E) were expressed in *Pichia pastoris* and purified. Their enzymatic properties were determined. The result revealed that the thermostability of N13D and S40E were improved by 24.76% and 14.46% respectively compared with XYNB at 70℃ for 5 min. The specific activity of N13D was increased by 22% compared with XYNB. The other enzymatic properties of mutants were similar to XYNB. The mutants N13D and S40E are good materials for further research in the relationship between structure and function of xylanase XYNB.

Key words: Xylanase, N13D, S40E, Thermostability, Site-directed mutagenesis

木聚糖酶是可将木聚糖降解成低聚木糖和木糖的复合酶系,应用较多的是内切 β -1,4-木聚糖酶^[1]。木聚糖酶在造纸、食品、能源、饲料以及环境等领域的应用价值已经得到了肯定,但由于纸浆处理通常是在高温下进行,在饲料制粒加工中也需要短暂的高温处理,很多天然的木聚糖酶热稳定性较差,成为它们在饲料、造纸行业中应用的瓶颈,因此,对工业用木聚糖酶热稳定性的改良十分必要。

影响木聚糖酶热稳定性的因素十分复杂,主要有疏水作用、氢键、离子键、二硫键、包装效应、Pro

理论、螺旋结构的稳定作用、氨基酸的组成等多种因素^[2]。没有一种因素能够单独决定酶的热稳定性,往往是各种因素共同作用的结果,因此,对木聚糖酶热稳定性的改良也存在一定的难度。但随着大量木聚糖酶的发现和晶体结构的解析,通过同源建模和序列比较,我们可以推测出一些对木聚糖酶的热稳定性有重要作用的氨基酸残基,通过基因工程的手段对酶基因进行改良,以达到提高热稳定性的目的。例如,2004 年对来源于 *Trichoderma reesei* 的木聚糖酶进行分子改良,二硫键的引入使该酶的

* 国家高技术研究与发展计划“863 计划”项目(No.2003AA214030)
国际科技合作重点项目计划(No.2004DFA06800)

** 通讯作者 Tel: 86-10-68975126, Fax: 86-10-68975127, E-mail: yaobin@public3.bta.net.cn

收稿日期: 2006-09-18, 修回日期: 2006-12-11

半衰期由原来的 1min 提高到 14min,而新的 Q162H 或 Q162Y, N11D 和 N38E 点突变的加入使半衰期最终提高到 100min^[3]。2005 年杨浩萌等通过氨基端替换,对来自 *Streptomyces olivaceoviridis* 的木聚糖酶基因 *xynB* 进行改良,突变后的融合木聚糖酶在 70℃, pH 6.0 热处理 20min 的条件下热稳定性提高了 6 倍,半衰期提高到 20min^[4]。

来源于 *Streptomyces olivaceoviridis* 的木聚糖酶 XYNB 是一种具有优良性质的高比活木聚糖酶,比活性达到 2868.78 IU/mg^[5],在毕赤酵母中表达的重组蛋白,比活性达 886.89 IU/mg^[6]。热稳定性较差是它在应用中的不足。我们希望通过基因工程手段对该酶的基因进行定向改良,以提高它的热稳定性,从而满足生产应用上的需要。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

木聚糖酶基因 *xynB* (EMBL 收录号为: AJ292317) 由本实验室从 *Streptomyces olivaceoviridis* 中克隆并构建在质粒 pUC19-*xynB* 上。大肠杆菌 JM109 由本实验室保存。巴斯德毕赤氏酵母 GS115、载体 pPIC9 为 Invitrogen 公司产品。

1.2 培养基

大肠杆菌培养基 LB, 毕赤酵母培养基 YPD、MM、MD、BMGY 和 BMMY 的配制方法见文献 [7]。

1.3 工具酶和生化试剂

限制性内切酶及 DNA 回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; T₄ DNA 连接酶为 Promega 公司产品; 蛋白质分子量标准为 Pharmacia 公司产品; 可溶性木聚糖 4-O-Me-D-glucurono-D-xylan (From Birchwood) 购自 Sigma 公司; 其它化学试剂为国产分析纯。

1.4 同源建模和序列比较

XYNB 的同源建模在 <http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html> 网站上完成。序列比较见文献 [8]。

1.5 定点突变及 pPIC9-n13d/s40e 表达载体构建

以 pUC19-*xynB* 为模板, 两步 PCR 法^[9] (获得 N13D 突变酶基因) 及 over-lapping PCR 法^[4] (获得 S40E 突变酶基因) 扩增出突变基因 *n13d* 和 *s40e*, 所用引物见表 1。将两个 PCR 产物分别进行 *EcoR* I 和 *Not* I 的双酶切并定向连接到 pPIC9 上的

EcoR I 和 *Not* I 位点之间。电转化大肠杆菌 JM109, 筛选出重组菌落, 提取重组质粒 pPIC9-*n13d* 和 pPIC9-*s40e* 进行序列测定。

表 1 定点突变所用引物

突变位点	引物名称	引物序列
N13D	引物 I	5' gcaattcgccacggatcatcaccaccaaccagacc 3'
	引物 II	5' taatgcccgcctcagccgctgaccgtgatgttga 3'
	引物 III	5' aaccagaccggcaccacagcaggggttactact 3'
S40E	引物 1	5' gcaattcgccacggatcatcaccaccaaccagacc 3'
	引物 2	5' taatgcccgcctcagccgctgaccgtgatgttga 3'
	引物 3	5' aactacagaccgagtgagcagaactgc 3'
	引物 4	5' gcagttcgtccactcgggtgctgtagtt 3'

注: 下划线处表示突变位点

1.6 重组木聚糖酶的表达

将重组质粒 pPIC9-*n13d* 和 pPIC9-*s40e* 用 *Bgl* II 单酶切使之线性化, 电击转化毕赤酵母, 挑取阳性转化子。电转化及筛选方法参见 Invitrogen 公司操作手册。重组酵母的发酵为高细胞密度补料发酵, 发酵过程分为菌株培养阶段、碳源饲喂阶段和诱导表达阶段, 具体方法见文献 [6] 和 Invitrogen 操作手册。

1.7 重组木聚糖酶的纯化

酵母发酵液经 5000r/min 离心 15min, 取发酵上清液 2mL, 经过分子筛 Sephacryl-S200 column 或 Superdex 75 HR 10/30 (Amersham pharmacia biotech) 纯化, 使用柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液 (pH 6.0), 流速 1mL/min 洗脱, 分步收集洗脱峰中的样品, 经过酶活性的测定, 确定目的样品所在的收集管, 以分子量为 5kD 的超滤管 (PALL Life Science, USA) 浓缩酶液, 得到电泳纯的目标蛋白。

1.8 木聚糖酶活性的测定

采用国际通用的 Somogyi-Nelson 法^[10]。

酶活单位定义: 1 个木聚糖酶活性单位 (IU) 为以 1% 可溶性木聚糖 (4-O-Me-D-glucurono-D-xylan, Sigma From Birchwood) 为底物, 每分钟在 pH 5.2、55℃ 条件下分解木聚糖生成 1 μmol 木糖所需的酶量。

1.9 酶学性质的分析与比较

将纯化后的突变酶与野生型酶 (同样经毕赤酵母表达并纯化)^[6] 进行酶学性质的比较研究。包括酶的最适温度和热稳定性、最适 pH 和 pH 稳定性、

比活性、金属离子和相关化学试剂对木聚糖酶活性的影响、酶动力学性质、酶抗胃蛋白酶及胰蛋白酶能力等性质。测定方法见参考文献 [5]。

2 结果

2.1 同源建模、序列比较及突变位点的确定

木聚糖酶 XYNB 由两个反向的 β 折叠片和一个短的 α 螺旋组成, 整个酶分子呈右手型结构, 具有第 11 族木聚糖酶的典型结构特征。对第 11 族木聚糖酶进行氨基酸的序列比较发现, 在一些嗜热的 11 族木聚糖酶中与 XYNB 第 13 位的氨基酸残基相对应的位点上都是带负电荷的 Asp(选择的嗜热木聚糖酶的 GenBank 收录号为 AF036925 ;U76545 ;U01242 ;U35436); 在氨基端第 40 个氨基酸残基的相应位点上出现的多为带电荷的氨基酸。我们推测在嗜热木聚糖酶中第 13 位和第 40 位的带电荷的氨基酸可能是蛋白表面氢键电离网的一部分, 对提高木聚糖酶的热稳定性有一定的作用。因此确定了 N13D、S40E 的定点突变, 以期改善 XYNB 的热稳定性。对 XYNB 的同源建模如图 1, 突变位点分别位于 β 折叠 B1 和 B2 之间 (N13D) 及 β 折叠 A3 上 (S40E)。

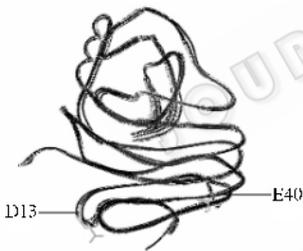


图 1 木聚糖酶 XYNB 的同源建模

2.2 定点突变及重组表达载体的构建

通过 PCR 方法扩增出突变基因 *n13d* 和 *s40e*, 测序正确后连接到酵母表达载体 pPIC9 上。构建出重组表达载体 pPIC9-*n13d* 和 pPIC9-*s40e*。

2.3 重组木聚糖酶的表达及纯化

将 N13D 和 S40E 突变酶在毕赤酵母表达系统中进行表达, 各筛选出一株有活性的菌株, 在摇床水平的表达量分别为 92.63IU/mL 和 90.95IU/mL。对这两个突变酶进行纯化, 获得电泳纯的蛋白(图 2)。

2.4 酶学性质的分析与比较

将纯化得到的 N13D 和 S40E 与野生型酶进行

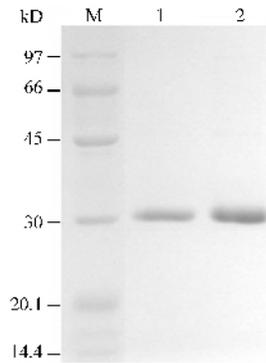


图 2 突变酶 N13D 和 S40E 纯化的 SDS-PAGE 分析
M 低分子量蛋白标准, 1 N13D 突变酶, 2 S40E 突变酶

酶学性质的比较与分析。实验结果表明, N13D 和 S40E 的热稳定性较 XYNB 有一定的提高(图 3)。在 70°C 分别处理 2min, N13D、S40E 和 XYNB 的剩余酶活性分别为 98.98%、85.99%、76.75%; 在 70°C 分别处理 5 min, N13D、S40E 和 XYNB 的剩余酶活性分别为 37.88%、27.58%、13.12%; 在 70°C 分别处理 10 min, N13D、S40E 和 XYNB 的剩余酶活性分别为 7.58%、4.95%、4.72%。突变酶的最适温度并未改变, 与野生型酶一样为 60°C。

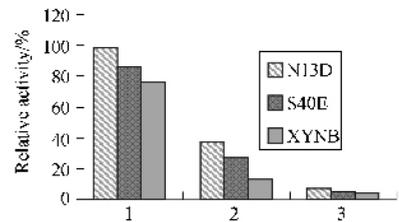


图 3 突变酶 N13D 和 S40E 及野生型酶 XYNB 在不同温度下的热稳定性比较

1 70°C 分别处理 2 min 2 70°C 分别处理 5 min,
3 70°C 分别处理 10 min

在酸碱性能上, N13D 和 S40E 的最适 pH 均为 5.8 与野生型酶 XYNB 的 5.2 有所差异。N13D 的 pH 稳定性在酸性范围内有所提高, 而 S40E 的 pH 稳定性与野生型酶基本一致(图 4, 图 5)。在酶的比较

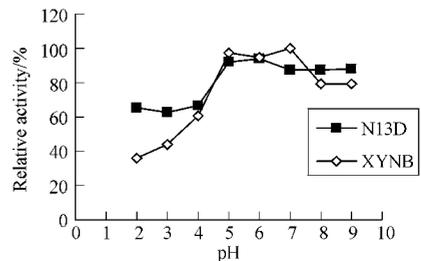


图 4 N13D 和 XYNB 的 pH 稳定性比较

表2 突变酶 N13D 和 S40E 与野生型酶 XYNB 的酶学性质比较

酶学性质	XYNB	N13D	S40E
Optimum temperature/°C	60	60	60
Optimum pH	5.2	5.8	5.8
pH stability ¹	5-9	5-9	5-9
k_m (g/kg) ²	20.87	75	18.18
V_{max} (μ mol/mg·min)	4568	2500	909.09
Specific activity(IU/mg)	886.89	1081.05	778.04
Effect of metal ion and some reagents on enzymatic activity	EDTA, Cr ³⁺ , Ni ²⁺ activate slightly Zn ²⁺ , Mn ²⁺ inhibit slightly	Co ²⁺ , Mn ²⁺ , Li ²⁺ inhibit slightly	Ni ²⁺ activate slightly SDS inhibit slightly
Cellulase activity	No activity	No activity	No activity
Resistance to pepsin and trypsin	Retain about 95% of its activity	Retain about 95% of its activity	Retain about 95% of its activity

注: 1 相对剩余酶活性在 80% 以上的 pH 值范围 2 k_m 的单位为 g/kg 是因为无法计算木聚糖分子量而无法计算其摩尔浓度

活性方面, N13D 的比活为 1081.05IU/mg, 较 XYNB 提高了 22%。N13D 和 S40E 对金属离子和化学试剂普遍表现不敏感。酶经突变后, 依然维持了野生型酶独特的抗胃蛋白酶和胰蛋白酶的特性(表 3)。

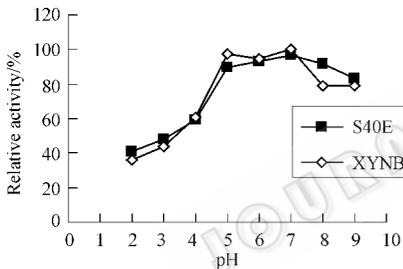


图5 S40E 和 XYNB 的 pH 稳定性比较

3 讨论

本研究中获得两个突变酶在热稳定性上比野生型酶都有不同程度的提高。说明酸性氨基酸在酶的热稳定性中起到一定的作用。在对来源于 *Trichoderma reesei* 的木聚糖酶 TRX II 的研究中也发现, N11D 和 N38E 的定点突变使 TRX II 的热稳定性有进一步的提高, 也说明了蛋白表面的带电荷的氨基酸对蛋白的热稳定性有一定的贡献。N13D 和 S40E 的突变表明, 离子键和电荷对酶的热稳定性的影响很大程度上取决于它们所处的空间位置。一般亲水的极性氨基酸分布在蛋白表面, 疏水的非极性氨基酸被包埋在蛋白的内部, 即所谓的包装效

应, 这种效应的结果使蛋白在特定环境中更加稳定。突变酶的最适 pH 变化较大, 由 XYNB 的 5.2 变为 5.8, 这可能与酸性氨基酸产生的氢键及突变酶整体电离网的形成有关。在酶的动力学方面, 突变酶比野生型酶有较大的差异, 其原因有待进一步研究。

参考文献

- [1] Subramaniyan S, Prema P. Crit Rev Biotechnol, 2002, 22(1): 33 ~ 64.
- [2] Kumar S, Tsai C J, Nussinov R. Protein Eng, 2000, 13(3): 179 ~ 191.
- [3] Hairong X, Fenel F, Matti L, et al. Extremophiles, 2004, 8: 393 ~ 400.
- [4] Yang H M, Yao B, Meng K, et al. Chin J Biotech, 2006, 22(1): 15 ~ 21.
- [5] Zhang H L, Yao B, Wang Y R, et al. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(8): 761 ~ 765.
- [6] 何永志, 姚斌, 王亚茹, 等. 微生物学报, 2004, 44(3): 340 ~ 344.
- [7] 张红莲, 姚斌, 王亚茹, 等. 生物工程学报, 2003, 19(1): 76 ~ 80.
- [8] Sapag A, Wonters J, Lambert C, et al. J Biotechnol, 2002, 95(2): 109 ~ 131.
- [9] 杨浩萌, 柏映国, 姚斌, 等. 生化与分子生物学报, 2006, 22(3): 204 ~ 211.
- [10] Wilkerson H L, Cohen A S, Kantor N, et al. Diabets, 1962, 11: 204 ~ 208.