

鱼腥藻苯丙氨酸脱氨酶的基因克隆、表达及最适反应 pH 改造

黄楠 朱龙宝 周丽 周哲敏*

(江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】表达鱼腥藻苯丙氨酸脱氨酶(AvPAL), 并经分子改造降低其最适反应 pH。【方法】PCR 克隆 AvPAL 编码基因, 并在大肠杆菌中表达, 用 Ni^{2+} 亲和层析柱和凝胶柱纯化重组蛋白。利用 GETAREA 软件筛选与催化残基距离较近的暴露于酶分子表面的氨基酸位点, 将其突变为带电性质不同的氨基酸, 并对突变体进行酶学性质研究。【结果】在大肠杆菌中成功表达了 AvPAL, 纯化后得到电泳纯的重组酶。突变体 E75Q 和 E75R 的最适反应 pH 从 8.5 分别偏移到 7.5 和 7.0。E75Q 在 pH 7.5 时的比酶活较原酶提高了 25%, 在 pH 6.5–9.5 之间酶的稳定性良好, 其最适反应温度为 50 °C, 在此温度下保温 1 h 酶活无显著变化。在最适反应条件下, E75Q 的 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 值较原酶提高了 26.6%。【结论】改变 AvPAL 酶分子中起路易斯碱作用的关键氨基酸残基(质子受体)附近与之有相互作用的氨基酸的带电性质, 降低了 AvPAL 的最适反应 pH, 提升了其在医疗领域的应用前景。

关键词: 鱼腥藻, 苯丙氨酸脱氨酶, 酶学性质, 最适反应 pH

Gene cloning and expression of phenylalanine ammonia lyase from *Anabaena variabilis* and modification of the optimal reaction pH

HUANG Nan ZHU Long-Bao ZHOU Li ZHOU Zhe-Min*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] Phenylalanine ammonia lyase from *Anabaena variabilis* (AvPAL) was expressed and molecular modified to decrease its optimum reaction pH. [Methods] The full length AvPAL gene was cloned and expressed in *E. coli* BL21(DE3). The recombinant protein was purified through Ni^{2+} affinity chromatography and gel filtration chromatography. The mutation sites were decided by GETAREA software to choose the amino acid sites both closed to the catalytic group and exposed to the surface of the enzyme. After changing the electric properties of the target amino acid residues, enzymatic properties of the mutants were studied. [Results] The recombinant AvPAL was

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31300087); 江苏省自然科学基金项目(No. BK20130131, BK20130139)

*通讯作者: Tel: 86-510-85325210; 信箱: zhmzhou@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2014-10-10; 接受日期: 2014-11-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-27

successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3). SDS-PAGE analysis showed that the recombinant enzyme of electrophoresis pure was obtained. The optimal reaction pH of E75Q and E75R mutants were shifted to 7.5 and 7.0, respectively, in contrast to pH 8.5 of the wild type (WT). The E75Q had a 25% higher specific activity than AvPAL WT at pH 7.5, and there was a good stability between pH 6.5 and pH 9.5. The optimal reaction temperature of E75Q was 50 °C. At the same time, the E75Q had a good stability under 50 °C with no obvious reduction in enzymatic activity after incubation of 1 h. Under the optimal reaction conditions, the k_{cat}/K_m was increased by 26.6% compared to the AvPAL WT. [Conclusion] The optimal reaction pH of AvPAL was decreased by altering the charge of amino acid residues which were in a hypothetical position to interact with the general base catalyst. The resulting mutant would improve the application prospect of AvPAL in therapeutic.

Keywords: *Anabaena variabilis*, Phenylalanine ammonia lyase, Enzymatic properties, Optimal reaction pH

苯丙氨酸脱氨酶(PAL, EC:4.3.1.5)在低 pH 条件下,能催化 L-苯丙氨酸非氧化性脱氨生成反式肉桂酸和氨,而在浓铵离子条件下可以将反式肉桂酸反向合成 L-苯丙氨酸^[1]。因此, PAL 常被用于工业生产手性苯丙氨酸,杨顺楷实验室分离选育的粘红酵母所产 PAL 已用于肉桂酸生物转化生产 L-苯丙氨酸^[2];此外,黄建坡等用含 PAL 的固定化粘红酵母细胞催化 D,L-苯丙氨酸中的 L-苯丙氨酸转化为反式肉桂酸,利用反式肉桂酸在酸性条件下溶解度急剧下降的特点,实现 D-苯丙氨酸和反式肉桂酸的分离,得到高光学纯度的 D-苯丙氨酸^[3]。近年来,随着医药科技的发展, PAL 已成为苯丙酮尿症(PKU, 一种由于苯丙氨酸代谢途径中关键酶缺陷,使得苯丙氨酸不能转变成成为酪氨酸而导致的苯丙氨酸积累引起的疾病)的一种治疗药物,可以皮下注射和口服的聚乙二醇化 PAL 被人体吸收后能够降低血液中 L-苯丙氨酸的含量,从而减轻病情^[4]。这种药物治疗可以取代以前疗效甚微的食疗法来更好地控制 PKU 病情,因此越来越受到关注。

目前国内普遍使用的酵母来源 PAL 存在稳定性不足的问题^[5],而合成工业中往往需要酶制剂满足耐热、耐有机溶剂、耐酸等苛刻的条件,酵母来源的 PAL 并不能很好地满足工业生产的要求。为此需要寻找稳定性更高的 PAL 来满足工业生产所需。2007 年 Moffitt 等在原核生物鱼腥藻中发现了 PAL^[6],并解析了其晶体结构,对其酶学性质的研究表明其热稳定性优于酵母来源的 PAL,具有较好

的工业应用前景。此外,由于具有优异的热稳定性,鱼腥藻 PAL 用于治疗 PKU 的研究越来越受到关注^[7]。然而,鱼腥藻 PAL 的最适反应 pH 为 8.5^[8],作为药物在血液环境中(pH 7.3–7.4)并不能发挥最大酶活,影响疗效,需要通过改造来提高低 pH 环境下(pH 7.3–7.4) PAL 的酶活来提升治疗 PKU 的效果。而目前尚无通过分子改造来降低 PAL 最适反应 pH 的先例。

植酸酶^[9]、淀粉酶^[10]、纤维素酶^[11]及枯草芽孢杆菌蛋白酶^[12]等工业用酶经分子改造,成功获得了最适反应 pH 降低的突变体。从这些成功的例子中可总结出一个共同的规律,即:替换酶分子中起路易斯碱作用的关键氨基酸残基附近与之有相互作用的氨基酸对酶的最适反应 pH 有显著的影响^[9]。另外,还有一些文献报道位于酶分子表面的带电氨基酸残基对酶的最适反应 pH 也有影响^[13]。但这两个改造的依据都具有局限性:替换关键氨基酸残基附近的氨基酸容易引起酶活的降低;而表面氨基酸由于是通过远距离静电作用力来施展影响,少数几个表面氨基酸的替换作用力有限,对 pH 影响较小。因此,将两种方法结合起来克服各自的缺陷,选择靠近关键氨基酸残基的表面氨基酸残基进行替换成为本文改造 PAL 最适反应 pH 的依据。

本研究克隆了来源于 *Anabaena variabilis* 的 PAL 基因,并实现了其在大肠杆菌中的高效表达。通过分子改造使其最适反应 pH 从 8.5 降为 7.5,且对 PAL 突变体的酶学性质研究表明,该酶具有比酵

母来源的 PAL 更优异的热稳定性。因此, 这种稳定性高且在低 pH 条件下(pH 7.3–7.4)具有较高酶活的 PAL 在医药领域和工业生产中有更广泛的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物: *Anabaena variabilis* FACHB-82 购自中国科学院水生生物研究所 (FACHB); *Escherichia coli* BL21、*Escherichia coli* JM109、质粒载体 pET-28a(+)购自 Novagen 公司; 引物均由上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。

1.1.2 主要试剂和仪器: *Bam*H I、*Not* I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Dpn* I 消化酶等均购自日本宝生物工程株式会社; 基因组 DNA 提取试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工生物工程有限公司; AKTA 蛋白纯化系统、His Trap FF crude, 1 mL 镍柱和 Superdex 75 10/300 GL 凝胶柱均为通用电气医疗器械集团产品。

1.2 方法

1.2.1 *Avp*al 基因的克隆: 以 *Anabaena variabilis* 的基因组 DNA 为模板, *Avp*al-1 和 *Avp*al-2 为引物扩增 *Avp*al 基因。*Avp*al 的 PCR 扩增反应体系(50 μ L): ddH₂O 36 μ L, 10 \times PCR buffer (Mg²⁺ plus) 5 μ L, dNTPs mixture (2 mmol/L) 5 μ L, *Avp*al-1 (10 μ mol/L)

1 μ L, *Avp*al-2 (10 μ mol/L) 1 μ L, *Anabaena variabilis* 基因组 DNA (10 mg/L) 1 μ L, 5 U/ μ L *Pfu* DNA 聚合酶 1 μ L。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 25 个循环; 10 $^{\circ}$ C 保温。扩增完成后用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.2.2 表达载体的构建: 将 PCR 扩增得到的 *Avp*al 基因产物用 *Bam*H I 和 *Not* I 限制性内切酶双酶切后连接到用同样限制性内切酶酶切的质粒载体 pET-28a(+)上, 转化到 *Escherichia coli* JM109 中, 在含有卡那霉素抗性的 LB 固体培养基平板上挑选阳性重组子, 提取重组质粒并进行 PCR 和双酶切验证, 阳性克隆即 pET-28a(+)-*Avp*al。

1.2.3 突变体的构建: 以 pET-28a(+)-*Avp*al 重组质粒为模板, 用 E75Q-1、E75Q-2 和 E75R-1、E75R-2 引物(表 1)进行 PCR 扩增, PCR 条件同方法 1.2.1。PCR 产物经 *Dpn* I 消化酶处理后转化 *Escherichia coli* JM109, 在含有卡那霉素抗性的 LB 固体培养基平板上挑选阳性重组子进行 DNA 测序, 获得 E75Q 和 E75R 突变体重组菌株。

1.2.4 鱼腥藻苯丙氨酸脱氨酶及其突变体的诱导表达: 将重组质粒 pET-28a(+)-*Avp*al 及其突变质粒转化到 *Escherichia coli* BL21 中, 挑选单菌落至 5 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 10 h 后, 取 1 mL 培养物至 100 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、

表 1 引物序列
Table 1 Sequences of primers

引物名称 Name of primer	序列 Sequences (5'→3')
<i>Avp</i> al-1	GGCGGATCCATGAAGACACTATCTCAAG
<i>Avp</i> al-2	GTGCGGCCGCTTAATGCAAGCAGGGTAAG
E75Q-1	AATAATGCTGTTGAATCTGGGCAGCCAATTTATGGA
E75Q-2	AGATGTCACTCCATAAATTGGCTGCCAGATTCAAC
E75R-1	AATAATGCTGTTGAATCTGGGCGCCCAATTTATGGA
E75R-2	AGATGTCACTCCATAAATTGGGCGCCAGATTCAAC

注: 划线部分分别为 *Bam*H I 和 *Not* I 限制性内切酶酶切位点。

Note: The underline words represent the restriction sites of *Bam*H I and *Not* I.

200 r/min 培养至菌体的 OD_{600} 为 1 时加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 20 °C 诱导 12 h 后离心收集菌体。

1.2.5 鱼腥藻苯丙氨酸脱氨酶的纯化: 取离心收集到的菌体, 加入适量裂解缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 10%甘油)悬浮细胞, 于冰水浴中进行超声波细胞破碎(工作 1 s, 间隔 3 s, 工作时间 30 min)。破碎后用高速冷冻离心机以 12 000 r/min 离心 10 min 除去不溶性杂质获得粗酶液。进一步过滤除杂后用 His Trap FF crude, 1 mL 镍柱对粗酶液进行纯化。先用含 100 mmol/L 咪唑的裂解缓冲液洗脱 10 mL, 去除杂蛋白, 后用含 300 mmol/L 咪唑的裂解缓冲液洗脱目的蛋白, 并经无咪唑透析液 3 次透析操作(每次 6 h)除去咪唑。将透析后的酶液加入到预先用 25 mmol/L Tris-HCl pH 8.5 缓冲液平衡好的 Superdex 75 10/300 GL 层析柱中, 用含 0.5 mol/L 氯化钠的 25 mmol/L Tris-HCl 缓冲液进行洗脱, 流速为 0.4 mL/min, 收集有活性的部分进行 SDS-PAGE 鉴定。纯酶液超滤脱盐后用于酶学性质研究。

1.2.6 酶活的测定: 参照文献[6]方法测定鱼腥藻苯丙氨酸脱氨酶的酶活, 酶活定义: 50 °C 下每分钟转化 L-Phe 生成 1 μ mol 反式肉桂酸所需的酶量为 1 U。

1.2.7 蛋白浓度的测定: 采用 Bradford 法^[14]测定。

1.2.8 酶学性质研究: 在 pH 7.5 的条件下将反应缓冲液和底物混合后置于 30–65 °C 保温 30 min 后加入稀释的酶液, 按照 1.2.6 的方法测定酶活, 从而确定酶的最适反应温度。为了研究温度对酶稳定性的影响, 将酶液分别置于 50 °C 和 55 °C 下保温 1 h 后, 测定残留酶活力, 于 4 °C 下保温 1 h 作为对照。

配制不同 pH 值(pH 6.0–9.5)的缓冲液, 测定纯酶在不同缓冲液中的酶活力以考察酶的最适反应 pH。所需不同 pH 缓冲液如下: 0.1 mol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0–6.5); 0.1 mol/L 的磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液(pH 6.5–8.0); 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0–9.5)。将酶分别放置在不

同 pH 值的缓冲液中于 4 °C 保存 12 h, 测定残留酶活力, 从而判断酶在不同 pH 值下的稳定性。

1.2.9 鱼腥藻苯丙氨酸脱氨酶动力学参数的测定: 为了测定 AvPAL 及突变体的动力学参数, 向 600 μ L 含有 3 μ g 纯酶的磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液中(0.1 mol/L, pH 7.5)分别加入 200 μ L 不同浓度的 L-苯丙氨酸(20–200 μ mol/L), 50 °C 反应 5 min, 在 290 nm 下测定生成的反式肉桂酸浓度, 从而计算不同底物浓度时的初速度值。采用 Line weaver-Burk 双倒数法作图, 得出该酶在上述底物浓度时的动力学参数值。

2 结果与分析

2.1 鱼腥藻苯丙氨酸脱氨酶基因的克隆

以鱼腥藻基因组为模板, 通过 PCR 扩增获得 *Avpal* 基因, 大小为 1 701 bp, 将该基因连接到载体 pET-28a(+)上, 获得重组质粒 pET-28a(+)-*Avpal*。该基因经测序验证, 与 GenBank 报道序列完全一致, 确定为鱼腥藻苯丙氨酸脱氨酶基因。

2.2 鱼腥藻苯丙氨酸脱氨酶的诱导表达及纯化

Escherichia coli BL21/pET-28a(+)-*Avpal* 重组菌株经终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 在 20 °C 诱导培养 12 h 后, 全细胞的 SDS-PAGE 结果如图 1 所示, 获得了较高的 AvPAL 表达量, 重组酶分子量大小约为 62.5 kD。重组菌诱导培养液经超声破碎, 高速离心后获得粗酶液, 再经 His Trap FF Crude, 1 mL 镍柱和 Superdex 75 10/300 GL 凝胶柱两步纯化。图 2 的 SDS-PAGE 结果显示获得了单一条带, 表明经过两步纯化, 可获得电泳纯的苯丙氨酸脱氨酶蛋白。

2.3 最适反应 pH 改造

AvPAL 的最适反应 pH 为 8.5^[7], 而人体血液 pH 值为 7.3–7.4, AvPAL 在该条件下酶活性相对较低, 在治疗 PKU 时不能发挥最好的效果。因此需要对 AvPAL 进行分子改造, 使其最适反应 pH 降低。一些研究^[12,15]表明, 改变酶分子活性中心起路易斯碱作用的关键氨基酸残基附近与之有相互作用的氨基酸的带电性质, 可成功降低酶的最适反应 pH。

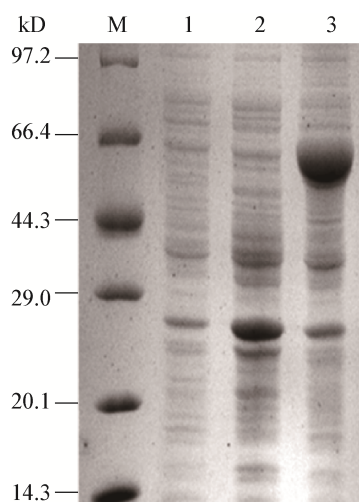


图1 重组菌全细胞 SDS-PAGE 电泳图

Figure 1 SDS-PAGE of the cell extracts of BL21(DE3) harboring pET-28a(+)-Avpal

注: M: 蛋白标准; 1: *E. coli* BL21; 2: 未诱导的重组菌; 3: 诱导的重组菌。

Note: M: Marker; 1: *E. coli* BL21; 2: *E. coli* BL21 harboring pET-28a(+)-Avpal without IPTG; 3: *E. coli* BL21 harboring pET-28a(+)-Avpal with IPTG.

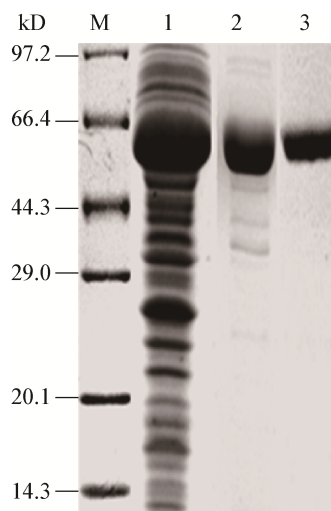


图2 蛋白表达纯化结果

Figure 2 The results of expression and purification of the protein

注: M: 蛋白标准; 1: 粗酶液; 2: Ni^{2+} 亲和层析纯化; 3: 凝胶过滤层析纯化。

Note: M: Marker; 1: Crude enzyme extract; 2: Purified enzyme with Ni^{2+} affinity chromatography; 3: Purified enzyme with gel filtration chromatography.

通过多个来源的 PAL 晶体结构及突变分析,可以确认 Tyr78 为 AvPAL 活性中心的关键催化基团,起到路易斯碱的作用^[8]。因此,在改造过程中主要围绕 Tyr78 展开,对其周围与之有静电相互作用的残基进行选择并替换。

2.3.1 突变点的选择:根据 Russell 等^[12]和 Cockburn 等^[15]的报道,设立了 2 条标准来选择突变点:(1) 要替换的氨基酸残基与催化基团的距离较近以保证两者之间有静电相互作用;(2) 被替换的氨基酸位于酶分子表面,能与溶剂接触,这样能尽量降低替换后对酶活的影响。鱼腥藻 PAL 晶体结构的成功获得^[6,8]为 PAL 的分子改造提供了依据。利用 GETAREA 软件^[16],结合晶体结构可计算出每个氨基酸在结构中的表面暴露程度,当表面暴露程度大于 0.3,即认为该氨基酸属于表面与溶剂可接触的氨基酸。从中选出位于 Tyr78 附近的表面氨基酸: Asn68、Asn69、Glu72 和 Glu75。在此基础上再结合 AvPAL 的活性中心晶体结构(图 3),选择了距离 Tyr78 最近的带负电荷氨基酸 Glu75 作为替换目标,将其分别突变为带正电荷的精氨酸及不带电荷的谷氨酰胺。

2.3.2 突变体的最适反应 pH: E75Q 和 E75R 突变体的 pH-活力曲线如图 4 所示,两个突变体的最适反应 pH 都向低 pH 范围产生了偏移, E75Q 的最适

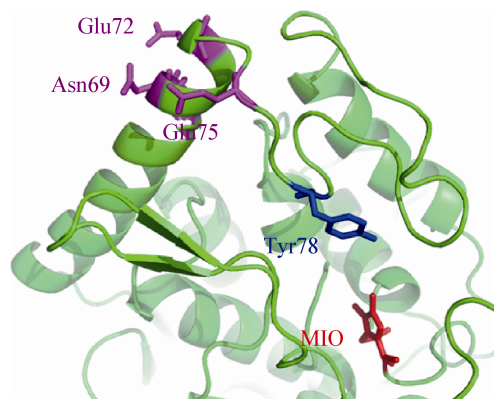


图3 AvPAL 活性中心示意图

Figure 3 Schematic representation of the AvPAL active site

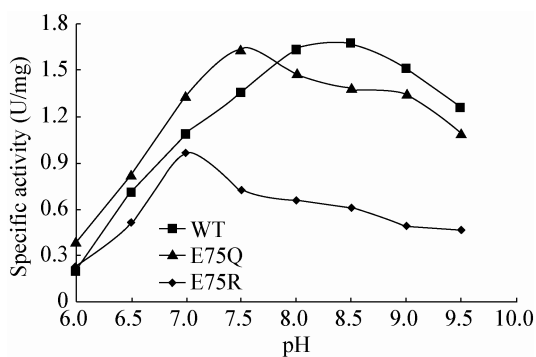


图4 AvPAL 及其突变体的 pH-活力曲线

Figure 4 pH-activity profiles of AvPAL and its mutations

反应 pH 为 7.5, 比野生型 AvPAL 的最适反应 pH 降低了 1 个单位, 且在 pH 7.5 时的比酶活比野生型提高了 0.3 U/mg; 而 E75R 的最适反应 pH 偏移更多, 变为 7.0, 该 pH 下其比酶活略低于原始酶, 为野生型的 85%。综合考虑突变体的最适反应 pH 和比酶活, 采用 E75Q 突变体进行后续研究。

AvPAL 比酶活的高低与 Tyr78 有密切的关系, 作为脱氨反应中的质子受体, Tyr78 只有在其酚羟基处于去质子化状态时才能接受底物 L-苯丙氨酸解离出的质子^[8](图 5)。在 pH 较低时, Tyr78 由于 pK_a 值较高, 酚羟基不能将质子解离, 底物 L-苯丙氨酸解离出的质子无法被 Tyr78 接收, 从而造成底物的解离受到抑制, 因此酶反应速率降低。而将

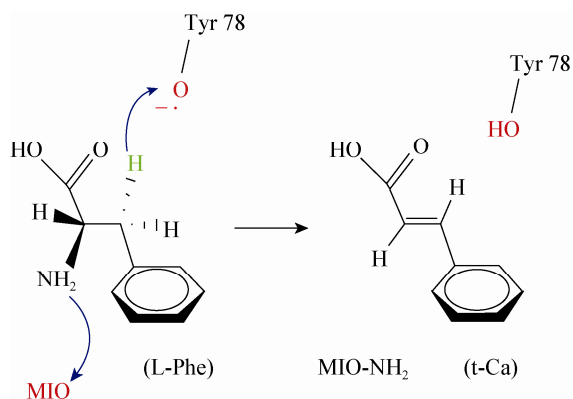


图5 AvPAL 催化原理示意图

Figure 5 Schematic representation of the catalysis principles of AvPAL

Tyr78 附近的 Glu75 替换为碱性和中性氨基酸之后, Tyr78 所处微环境的碱性增强, 可能会中和部分缓冲液中的氢离子, 使得 Tyr78 能顺利解离出酚羟基上的质子, 消除底物解离时所受到的抑制作用。因此, AvPAL 的突变体 E75Q 在 pH 7.5 时酶活升高, 而 E75R 酶活降低可能是由于突变后氨基酸侧链结构变化过大, 影响了活性中心关键氨基酸的相互作用。

2.3.3 E75Q 的 pH 稳定性: 用不同 pH 值的缓冲液 (6.5–9.5) 分别处理 E75Q 12 h 后测定其酶活, 以未处理的酶液为 100%, 计算相对酶活力。结果显示, 酶在 pH 6.5–9.5 条件下处理 12 h 后, 活性都维持在 90% 以上(图 6), 表明该酶在较广的 pH 范围内具有良好的稳定性。

2.3.4 E75Q 的最适反应温度及热稳定性: 为测定 E75Q 的最适反应温度, 在 pH 7.5 的条件下, 分别测定其在不同温度下 (30–65 °C) 的酶活(图 7), 可见在 50–55 °C 时 E75Q 的酶活最高, 温度高于 55 °C 时, 酶活开始下降。将酶分别在 50、55 °C 保温 1 h, 每隔 10 min 取样测定残余酶活力, 以未处理的酶活力为 100%, 计算相对酶活力。结果显示, 50 °C 保温 1 h 后酶活没有损失(图 8), 而在 55 °C 保持 1 h, 相对酶活只能保持 80%, 热稳定性与野生型 AvPAL 相当^[17]。因此, 在综合考虑酶的活力和稳定性后, 确定 E75Q 的最适反应温度为 50 °C。在最适反应温度和 pH 7.5 下, E75Q 突变体比酶活比原始酶提高了 25%, 具有一定的应用前景。

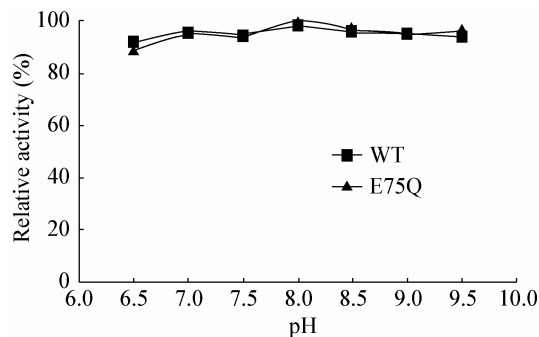


图6 E75Q 的 pH 稳定性

Figure 6 The pH stability of the E75Q

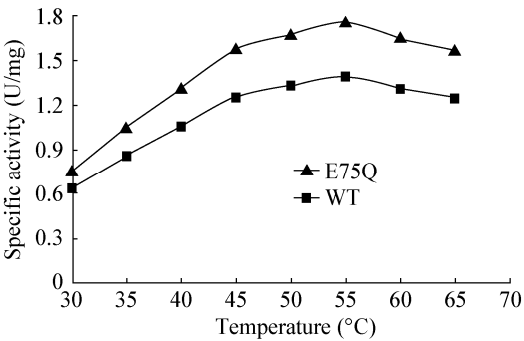


图 7 温度对酶活的影响
Figure 7 Effect of temperature on the activity of enzyme

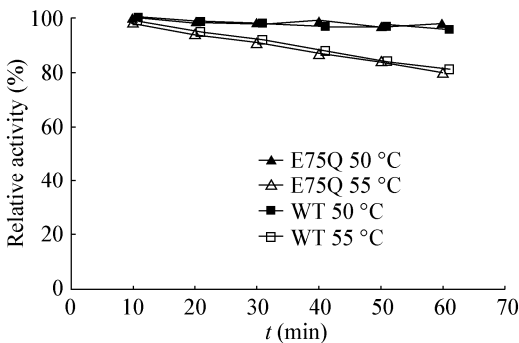


图 8 AvPAL 及 E75Q 的热稳定性
Figure 8 Thermo stability of AvPAL and E75Q

2.3.5 AvPAL 及 E75Q 的反应动力学研究：在 50 °C、pH 7.5 的条件下，分别测定了 AvPAL 和突变体 E75Q 在不同底物浓度下的反应初速度，根据双倒数法计算出各项动力学参数,结果如表 2 所示。突变体 E75Q 与原酶 AvPAL 相比， K_m 值增大了 31.5%，表明突变后底物与酶的亲和性降低；而 k_{cat} 却比突变前提高了 67%，在一定程度上抵消了底物与酶的亲和性降低对催化效率的影响，最终 E75Q 的 k_{cat}/K_m 值较原酶增大了 26.6%。

3 讨论

本文报道的鱼腥藻来源 AvPAL (50 °C 保温 1 h 酶活没有损失)相比于酵母来源的 RgPAL (50 °C 下保温 1 h 酶活只能保留 80%^[18]), 具有更好的热稳定性，造成这种稳定性差异的原因与酶的结构有关。鱼腥藻苯丙氨酸脱氨酶和目前已大量报道的植物^[19]及酵母^[20]等真核生物来源的苯丙氨酸脱氨酶在活性中心的结构上高度保守，催化部位都是由 Ala-Ser-Gly 经环化脱水形成的 MIO 基团和一个含有 Tyr 的高度柔性的 Loop 区组成。但原核生物来源的鱼腥藻苯丙氨酸脱氨酶(567 个氨基酸)与真核生物来源的苯丙氨酸脱氨酶(约 700 个氨基酸)相比在结构上缺少了一段位于 C 端的多螺旋区域^[21](约 150 个氨基酸，与 Loop 区的稳定性有关)。拥有该螺旋区域的真核生物来源的苯丙氨酸脱氨酶在极端环境下，Loop 区容易折叠成低活性的构象，从而稳定性低于鱼腥藻来源的苯丙氨酸脱氨酶。另外，该多螺旋区域的存在还会使酶蛋白对降解更敏感^[21]，所以鱼腥藻苯丙氨酸脱氨酶的抗降解能力也优于真核来源的苯丙氨酸脱氨酶。

优异的稳定性及抗降解能力使得 AvPAL 在医药领域作为 PKU 的辅助治疗药物越来越受到重视^[6-7]。但由于其最适反应 pH 为 8.5，进入血液 (pH 7.3-7.4)后，仅能发挥最高酶活的 75%左右。本研究经过氨基酸替换后得到的突变体 E75Q 和 E75R 的最适反应 pH 分别变为 7.5 和 7.0。E75Q 在其最适反应 pH 7.5 时，比酶活为 1.65 U/mg，比 AvPAL 原菌在 pH 7.5 时的比酶活提高了 25%，热稳定性和 pH 稳定性与野生酶相当，在治疗 PKU 时可能会发挥更好的效果。同时，本实验还为酶的最

表 2 AvPAL 及 E75Q 的动力学研究 Table 2 Kinetic analysis of AvPAL wild type and E75Q mutant			
Enzyme	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (L/($s \cdot mmol$))
AvPAL	0.057	1.73	30.4
E75Q	0.075	2.89	38.5

适反应 pH 改造提供了一条思路, 即: 改变酶分子中起路易斯碱作用的关键氨基酸(质子受体)附近与之有静电相互作用的表面氨基酸的带电性质, 对酶的最适反应 pH 有显著的影响。本研究构建的 2 个突变体 E75Q 和 E75R 都是将活性中心质子受体 Tyr78 附近的表面氨基酸 Glu75 替换为带电性质不同的氨基酸残基。E75Q 是将带负电荷(酸性)的 Glu75 替换为不带电荷(中性)的 Gln, 由于该突变点靠近 Tyr78, 突变后 Tyr78 所处的微环境的酸性减弱, 可能更利于 Tyr78 酚羟基上质子的解离, 转变为活性状态的 Tyr-O⁻, 使得 E75Q 在酸性环境下的活性增强。E75R 则是将带负电荷的 Glu75 替换为带正电荷(碱性)的 Arg, 因为带电性质的变化比 E75Q 更大, 所以 E75R 的最适反应 pH 变化更大, 可惜的是可能由于替换后氨基酸侧链结构差异过大, 导致了比酶活的降低。

参 考 文 献

- [1] MacDonald MJ, D'Cunha GB. A modern view of phenylalanine ammonia lyase[J]. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 2007, 85(3): 273-282
- [2] Miao YY, Liu CJ, Yang SK, et al. Core cDNA cloning and structural analysis of phenylalanine ammonia-lyase of *Rhodotorula glutinis* CIBAS A1401[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2005(6): 694-698 (in Chinese)
缪元颖, 刘成君, 杨顺楷, 等. 粘红酵母(*Rhodotorula glutinis* CIBAS A1401)苯丙氨酸脱氨酶 cDNA 核心序列的克隆与分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2005(6): 694-698
- [3] Huang JP, Yin RC, Zhang PP, et al. A method of producing D-phenylalanine by asymmetry biotransformation: China, CN101671716[P]. 2010-03-17 (in Chinese)
黄建坡, 尹若春, 张萍萍, 等. 生物酶不对称转化生产 D-苯丙氨酸的方法: 中国, CN101671716[P]. 2010-03-17
- [4] Nicola L, Cary OH, Barbara KB, et al. Single-dose, subcutaneous recombinant phenylalanine ammonia lyase conjugated with polyethylene glycol in adult patients with phenylketonuria: an open-label, multicentre, phase 1 dose-escalation trial[J]. *Lancet*, 2014, 384(9937): 37-44
- [5] Li LL, Cui JD. Preparation and properties of cross-linked enzyme aggregates of phenylalanine ammonia lyase in the aminated macroporous silica gel[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014(11): 160-165 (in Chinese)
李连连, 崔建东. 以大孔硅胶为载体的苯丙氨酸脱氨酶交联酶聚体的制备及性质研究[J]. *食品工业科技*, 2014(11): 160-165
- [6] Moffitt MC, Louie GV, Bowman ME, et al. Discovery of two cyanobacterial phenylalanine ammonia lyases: Kinetic and structural characterization[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(4): 1004-1012
- [7] Sarkissian CN, Alejandra G, Wang L, et al. Preclinical evaluation of multiple species of PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(52): 20894-20899
- [8] Wang L, Alejandra G, Archer H, et al. Structural and biochemical characterization of the therapeutic *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 380(4): 623-635
- [9] Kim T, Mullaney EJ, Porres JM, et al. Shifting the pH profile of *Aspergillus niger* PhyA phytase to match the stomach pH enhances its effectiveness as an animal feed additive[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 4397-4403
- [10] Hirata A, Adachi M, Utsumi S, et al. Engineering of the pH optimum of *Bacillus cereus* beta-amylase: conversion of the pH optimum from a bacterial type to a higher-plant type[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(39): 12523-12531
- [11] Cockburn DW, Vandenende C, Clarke AJ. Modulating the pH-activity profile of cellulase by substitution: Replacing the general base catalyst aspartate with cysteinesulfinate in cellulase A from *Cellulomonas fimi*[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(9): 2042-2050
- [12] Russell AJ, Fersht AR. Rational modification of enzyme catalysis by engineering surface charge[J]. *Nature*, 1987, 328(6130): 496-500
- [13] Siddiqui KS, Loviny AT, Rangarajan M, et al. *Arthrobacter* D-xylose isomerase: chemical modification of carboxy groups and protein engineering of pH optimum[J]. *Biochemical Journal*, 1993, 296(3): 685-691
- [14] Wang JZ, Fan M. Handbook of Protein Technology[M]. Beijing: Science Press, 2000: 38-55 (in Chinese)
汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 38-55
- [15] Cockburn DW, Clarke AJ. Modulating the pH-activity profile of cellulase A from *Cellulomonas fimi* by replacement of surface residues[J]. *Protein Engineering Design and Selection*, 2011, 24(5): 429-437
- [16] Fraczekiewicz R, Braun W. Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 1998, 19(3): 319-333
- [17] Jaliani HZ, Farajnia S, Mohammadi SA, et al. Engineering and kinetic stabilization of the therapeutic enzyme *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 171(7): 1805-1818
- [18] Zhu LB, Cui WJ, Fang YQ, et al. Cloning, expression and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(5): 751-756
- [19] Ritter H, Schulz GE. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(12): 3426-3436
- [20] Calabrese JC, Jordan DB, Boodhoo A, et al. Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(36): 11403-11416
- [21] Pilbak S, Tomin A, Retey J, et al. The essential tyrosine-containing loop conformation and the role of the C-terminal multi-helix region in eukaryotic phenylalanine ammonia-lyases[J]. *FEBS Journal*, 2006, 273(5): 1004-1019