

研究报告

采用随机突变方法对 β -琼胶酶 YM01-3 活性位点的研究曲雯雯¹ 吴蕾蕾¹ 周顺¹ 史晓翀^{1,2*} 张晓华^{1,2}

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 山东 青岛 266003)

(2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室 山东 青岛 266071)

摘要:【背景】琼胶酶是一种多糖水解酶,在保健食品、医药、科研及化妆品等行业极具价值。本实验室发现来自嗜琼胶卵链菌(*Catenovulum agarivorans*)的 β -琼胶酶 YM01-3 具有较高的酶活性,在最适条件下的比酶活可达到 1.14×10^4 U/mg。【目的】探讨不同位点的突变对 β -琼胶酶 YM01-3 酶活力的作用,发现影响其酶活力的新位点。【方法】通过易错 PCR 在短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)表达系统中构建随机突变文库,从约 10 000 个克隆中筛选出 227 株有效突变体,从中选取 80 株进行测序。【结果】对突变体序列进行分析和定点突变验证发现,137 位和 237 位氨基酸发生突变后酶活力丧失 90% 以上。【结论】位于催化腔内的 137 位和 237 位氨基酸,对于维持 β -琼胶酶 YM01-3 酶活力具有重要作用。该研究结果为 β -琼胶酶的催化机理研究及分子改造提供了借鉴。

关键词: β -琼胶酶 YM01-3, 随机突变, 定点突变

Exploration on the active sites of β -agarase YM01-3 with random mutationQU Wen-Wen¹ WU Lei-Lei¹ ZHOU Shun¹ SHI Xiao-Chong^{1,2*} ZHANG Xiao-Hua^{1,2}

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

(2. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract: [Background] Agarases belong to glycoside hydrolases with broad application potentials in scientific research, health-food, pharmaceutical and cosmetic industries. Although a β -agarase YM01-3 from *Catenovulum agarivorans* YM01^T was obtained in previous studies with an activity up to 1.14×10^4 U/mg, its catalytic mechanism is still unclear. [Objective] In order to clarify the catalytic mechanism of YM01-3, the key sites affecting the activity should be identified. [Methods] A random mutation library in *Bacillus brevis* was constructed by error-prone PCR to select mutants that completely lost enzyme activity. In total 227 mutants showing lower activity

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2016YFA0601303, 2017YFA0603200); National Natural Science Foundation of China (41206117, 41476112)

*Corresponding author: Tel: 86-532-82032721; E-mail: shixiaochong@ouc.edu.cn

Received: June 06, 2018; Accepted: July 17, 2018; Published online (www.cnki.net): August 15, 2018

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFA0601303, 2017YFA0603200); 国家自然科学基金(41206117, 41476112)

*通信作者: Tel: 86-532-82032721; E-mail: shixiaochong@ouc.edu.cn

收稿日期: 2018-06-06; 接受日期: 2018-07-17; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-08-15

were selected from about 10 000 clones and 80 mutants were sequenced and analyzed. The putative key sites were confirmed by mutation construction. **[Results]** Compared to the original enzyme YM01-3, two mutants at 137 and 237 sites lost more than 90% catalytic activity. Y137 and D237, located in the catalytic cavity, were proved to be the novel key sites closely related to YM01-3 hydrolytic activity. **[Conclusion]** Our findings provide reference for further studying catalytic mechanism and molecular modification of β -agarase.

Keywords: β -agarase YM01-3, Random mutation, Site-directed mutation

琼胶酶是一类能够降解琼胶的糖苷水解酶, 根据降解底物方式及产生产物不同, 可分为 α -琼胶酶 (E.C.3.2.1.158) 和 β -琼胶酶 (E.C.3.2.1.81)^[1]。目前在糖苷水解酶数据库 (CAZy) 中, β -琼胶酶的数量远多于 α -琼胶酶。琼胶酶在制备琼胶寡糖^[2]、制备原生质体^[3]、回收琼脂糖凝胶中 DNA^[4] 等方面具有潜在的应用价值。

本实验室前期从一株海洋新属新种嗜琼胶卵链菌 YM01 中克隆表达出 β -琼胶酶 YM01-3 (GenBank 登录号: KF413621)^[5], 该酶是一种耐高温琼胶酶, 最适反应温度达到 60 °C; 在最适反应条件下, β -琼胶酶 YM01-3 的酶活力为 1.14×10^4 U/mg, 是目前报道活性较高的琼胶酶, 由于其较高的酶活力及温度稳定性, 使其具有良好的应用前景。

随机突变 (Random mutation) 是在实验室环境下模拟蛋白质自然进化的过程, 诱导蛋白质的核酸序列在扩增时产生错配。该过程不需要了解蛋白质三维结构、活性位点等信息, 是开发新型酶的常见手段。常见方法有易错 PCR、化学诱变等^[6]。定点突变 (Site-directed mutation) 是在特定位点处对氨基酸进行突变、缺失或插入, 进而分析该处氨基酸突变对蛋白质结构、活性、底物结合能力等的影响^[7]。

本研究利用随机突变和定点突变的方法, 确定了 2 个影响 β -琼胶酶 YM01-3 的新位点, 为研究 β -琼胶酶 YM01-3 构效关系及其开发利用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料、主要试剂和仪器

pNCMO2 载体、短芽孢杆菌感受态细胞,

TaKaRa 公司; *E. coli* JM109 感受态细胞、质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 博迈德公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I, Thermo 公司。

PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 酶标仪, 太康公司; 蛋白电泳仪, 伯乐公司。

1.1.2 培养基

MTNm 培养基 (g/L): 葡萄糖 10.0, 多聚蛋白胨 10.0, 牛肉粉 5.0, 酵母膏 2.0, FeSO₄ 0.01, MnSO₄ 0.01, ZnSO₄ 0.001, pH 7.0。固体培养基添加琼脂粉 15.0 g。

TM 培养基 (g/L): 葡萄糖 10.0, 多聚蛋白胨 10.0, 牛肉粉 5.0, 酵母膏 2.0, FeSO₄ 0.01, MnSO₄ 0.01, ZnSO₄ 0.001, MgCl₂ 4.1, pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 β -琼胶酶基因 YM01-3 的随机突变

根据 GenBank 中 β -琼胶酶 YM01-3 的序列设计引物, 引物由上海铂尚有限公司合成。YM01-3 上游引物 5'-CACGGATCCATGTATGCAGCAGA-3' (划线部分为 *Bam*H I 的酶切位点); YM01-3 下游引物 5'-CAGGAATTCGTGGTGGTGGTGGT-3' (划线部分为 *Eco*R I 的酶切位点)。以重组 β -琼胶酶 YM01-3 质粒为模板, 进行易错 PCR 扩增。PCR 反应体系: Mn²⁺ 1.6 mmol/L, Mg²⁺ 5 mmol/L, dNTPs 组分是 dATP、dGTP 2.5 mmol/L, dCTP、dTTP 20 mmol/L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 98 °C 10 s, 56 °C 15 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保温。PCR 产物与载体 pNCMO2 连接, 并将连接产物转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞。从 *E. coli* JM109 感受态细胞中提取重组质粒, 参照宝生物 NTP 转化方法 (www.takarabiomed.com)。

cn/DownLoad/HB200.pdf), 将质粒转入短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*) 感受态细胞中, 将感受态细胞稀释至合适的浓度涂布于 MTNm 平板上构建突变体文库。

1.2.2 β -琼胶酶 YM01-3 突变体的初步筛选及鉴定

短芽孢杆菌可将 β -琼胶酶 YM01-3 突变酶分泌到胞外, 通过观察宿主菌在琼脂平板上透明圈的大小对突变体酶活进行初步高通量筛选^[8]。筛选在琼脂平板上没有活性的克隆, 用菌液 PCR 方法对突变体基因与质粒连接情况进行再次验证, 排除质粒与片段连接不正确的克隆。10 μ L 菌液 PCR 体系:

2 \times Taq PCR Mix 5 μ L, 引物 T7、T7-Ter (10 mmol/L) 各 0.1 μ L, 菌液 0.5 μ L, ddH₂O 补充体积到 10 μ L。

1.2.3 β -琼胶酶 YM01-3 突变体的复筛

将筛选出的阳性突变体转接至 5 mL TM 液体培养基培养 8 h, 超纯水将突变体稀释, 酶标仪检测至 $OD_{600}=0.3$, 取突变体粗酶液利用 DNS 法测定其酶活力^[9]。根据酶活力测定结果, 从中挑选低酶活的突变体 80 株, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.4 酶活关键位点的分析及验证

将突变菌株的氨基酸序列与原始氨基酸序列进行比对, 发现 Y137、D237 是在大多突变体中高频出现的突变位点; 参照 β -琼胶酶 YM01-3 的三维结构发现 Y137、D237 均位于催化腔内, 因此推测 Y137、D237 氨基酸可能是影响酶活变化的关键位点。对 Y137、D237 两个氨基酸位点进行定点突变验证, 突变氨基酸选择为性质完全相反原则, 方法为 PCR 介导的定点突变^[10]。Y137A 上游引物: 5'-ATGGAAGCTGCNCGGTAGTGATAGGC-3', Y137A 下游引物: 5'-TGCATCTAATTCTTGAGTTGAATCA-3'; D237K 上游引物: 5'-ATTATTATTA~~A~~ATGGAACATCAAG-3', D237K 下游引物: 5'-ATGTAATGGTTTGTGATACCTGTG-3', 下划线为突变氨基酸位点。

1.2.5 突变蛋白酶活测定

采用 DNS 法^[9]检测定点突变酶 Y137A、D237K 的酶活力。

2 结果与分析

2.1 建立随机突变文库

通过易错 PCR 获得的 PCR 产物与载体 pNCMO2 连接, 转入 *E. coli* JM109 感受态细胞。为降低突变体的损失, 易错 PCR 产物质粒在 *E. coli* JM109 扩增时选用液体培养基培养。从 *E. coli* JM109 中提取易错 PCR 产物质粒, 将易错 PCR 产物质粒转入短芽孢杆菌中构建随机突变文库。

2.2 突变体的初筛

通过宿主短芽孢杆菌产生透明圈的大小, 利用平板法对随机突变文库中的突变体进行快速筛选。本实验共获得约 200 个转化平板, 构建包含约 10 000 株突变体的随机突变文库。含突变体的转化平板如图 1 所示, 菌落 1 与菌落 2 完全没有透明圈, 推测菌落 1 与菌落 2 完全丧失琼胶酶活性; 菌落 3 透明圈直径较小, 推测菌落 3 琼胶酶活性降低。将初筛突变体进行菌液 PCR 验证其阳性情况, 选择菌液 PCR 结果为阳性的菌株留作下一步筛选, 2 次筛选得到 227 株酶活力丧失明显的突变体。

2.3 突变体的复筛

利用 DNS 法对获得的 227 株突变体的琼胶酶酶活进行复筛, 从复筛结果中选取酶活最低的 80 株突变体进行测序。

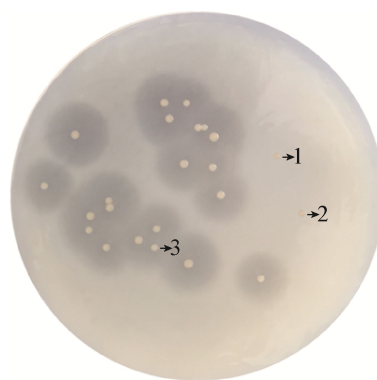


图 1 易错 PCR 转化结果

Figure 1 The results of error prone PCR transformation

注: 1、2: 无透明圈菌落; 3: 透明圈较小菌落。

Note: 1, 2: Colony without transparent circle; 3: Colony with small transparent circle.

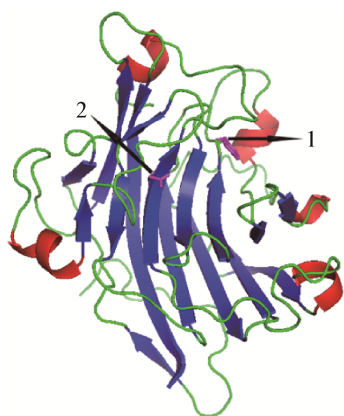


图3 β -琼胶酶 YM01-3 结构中突变位点的位置

Figure 3 The sites of mutants in the β -agarase YM01-3 structure

注: 1: 氨基酸位点 Y137; 2: 氨基酸位点 D237.

Note: 1: Amino acid site of Y137; 2: Amino acid site of D237.

利用 DNS 法对突变体酶活检测, 如图 5 所示, 突变体 Y137A 与突变体 D237K 纯蛋白的酶活力分别为 β -琼胶酶 YM01-3 酶活力的 7.38% 与 7.98%, 这 2 个位点的突变均使原始酶活力显著下降, 说明这 2 个位点是影响 β -琼胶酶 YM01-3 酶活的关键位点。

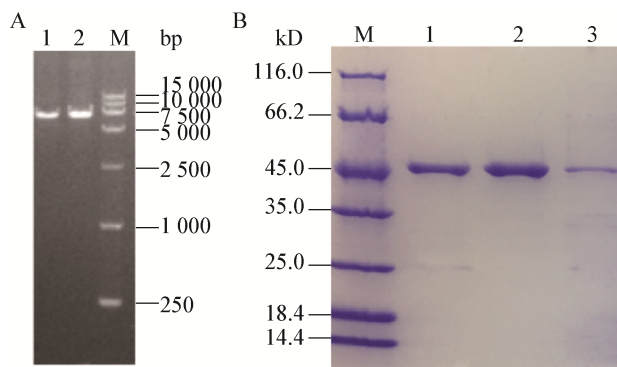


图4 β -琼胶酶基因 YM01-3 突变体的 PCR 扩增及纯化蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳

Figure 4 PCR amplification of mutants β -agarase YM01-3 gene and SDS-PAGE analysis of purified protein

注: A: M: 15 000 bp DNA marker; 1: Y137A 突变体基因扩增产物; 2: D237K 突变体基因扩增产物. B: M: 蛋白 Marker; 1: YM01-3 蛋白; 2: Y137A 突变蛋白; 3: D237K 突变蛋白.

Note: A: M: 15 000 bp DNA marker; 1: PCR production of Y137A mutant gene; 2: PCR production of D237K mutant gene. B: M: Protein marker; 1: Protein of YM01-3; 2: Y137A mutant protein; 3: D237K mutant protein.

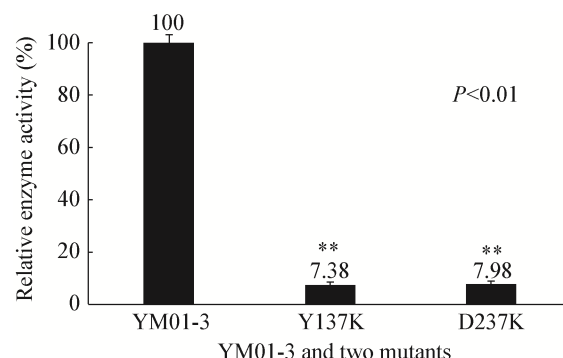


图5 β -琼胶酶 YM01-3 与突变蛋白活性比较

Figure 5 The comparison of the enzyme activity between β -agarase YM01-3 and mutants

3 讨论与结论

目前, 绝大多数的研究者都是通过随机诱变的方式来改变酶性能, 如 Yang 等^[12]通过随机突变和组合密码子诱变(Combinatorial codon mutagenesis)对人工金属酶(Artificial metalloenzymes)酶活进行提升。本研究是通过随机突变构建突变文库并从中筛选影响酶活力的新位点, 这是与目前大多数研究不同的新思路。本研究通过外泌型宿主短芽孢杆菌建立对随机突变文库中突变体的高通量筛选, 最终确定 2 个影响酶活力变化的氨基酸新位点 Y137、D237。

将 β -琼胶酶 YM01-3 的氨基酸序列与测序成功的丧失酶活突变体的氨基酸序列进行比对, 可了解到多条序列在 Y137、D237 位氨基酸处发生突变, 且这 2 个位点在 β -琼胶酶 YM01-3 的催化腔内, 推测这 2 个位点是影响 β -琼胶酶 YM01-3 酶活力变化的新位点。Takagi 等^[11]研究 β -琼胶酶 MtAgaA (*Microbulbifer* sp.)发现, 色氨酸与底物结合有关。137 位酪氨酸, 其侧链为对羟基丙酸, 与色氨酸侧链苯环相比极性更强, 可与底物形成更为稳定的结构。将其突变成丙氨酸, 丙氨酸极性低, 与底物结合能力差, 因此酶活力降低。Allouch 等^[13]研究 β -AgaA_CM (*Zobellia* sp.)和 β -AgaB (*Zobellia* sp.)的三维结构发现 β -AgaA_CM 的 Glu254 和 β -AgaB 的 Glu256 突变会使酶活力显著下降, 并认为其通过影响蛋白质结构使酶活力降低。237 位天冬氨酸

侧链与 Glu254 和 Glu256 相似也具有羧基, 当其由酸性带负电荷的天冬氨酸突变为带正电荷的赖氨酸后, 由于电荷的排斥, 导致蛋白质结构改变, 酶活降低。以上推论还需要通过蛋白质结晶等进一步验证。

REFERENCES

- [1] Araki T, Hayakawa M, Lu Z, et al. Purification and characterization of agarases from a marine bacterium, *Vibrio* sp. PO-303[J]. *Journal of Marine Biotechnology*, 1998, 6(4): 260-265
- [2] Wu SC, Pan CL. Preparation of algal-oligosaccharide mixtures by bacterial agarases and their antioxidative properties[J]. *Fisheries Science*, 2004, 70(6): 1164-1173
- [3] Ramos KRM, Valdehuesa KNG, Nisola GM, et al. Identification and characterization of a thermostable endolytic β -agarase Aga2 from a newly isolated marine agarolytic bacteria *Cellulophaga omnivescoria* W5C[J]. *New Biotechnology*, 2018, 40: 261-267
- [4] Chen XL, Hou YP, Jin M, et al. Expression and characterization of a novel thermostable and pH-stable β -agarase from deep-sea bacterium *Flammeovirga* sp. OC4[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(38): 7251-7258
- [5] Cui FY, Dong SJ, Shi XC, et al. Overexpression and characterization of a novel thermostable β -Agarase YM01-3, from marine bacterium *Catenovulum agarivorans* YM01^T[J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(5): 2731-2747
- [6] Hida K, Hanes J, Ostermeier M. Directed evolution for drug and nucleic acid delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59(15): 1562-1578
- [7] Irfan M, Gonzalez CF, Raza S, et al. Improvement in thermostability of xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* C5 by site directed mutagenesis[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2018, 111: 38-47
- [8] Ohta Y, Hatada Y, Nogi Y, et al. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable β -agarase from a novel species of deep-sea *Microbulbifer*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(4): 505-514
- [9] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428
- [10] Ke SH, Madison EL. Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(16): 3371-3372
- [11] Takagi E, Hatada Y, Akita M, et al. Crystal structure of the catalytic domain of a GH16 β -agarase from a deep-sea bacterium, *Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2015, 79(4): 625-632
- [12] Yang H, Swartz AM, Park HJ, et al. Evolving artificial metalloenzymes via random mutagenesis[J]. *Nature Chemistry*, 2018, 10(3): 318-324
- [13] Allouch J, Jam M, Helbert W, et al. The three-dimensional structures of two β -agarase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(47): 47171-47180