研究论文

二硫键对提高木聚糖酶 AoXyn11A 热稳定性的作用

刘晓彤[1]，邬敏辰[*2]，殷 欣[3]，汪俊卿[3]

（1. 江南大学 药学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 无锡医学院，江苏 无锡 214122；3. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：为提高米曲霉 11 家族中温木聚糖酶 AoXyn11A 的热稳定性，将 AoXyn11A 与源于 *Thermomyces lanuginosus* 的耐热木聚糖酶 XynA 进行三维结构比对分析，发现 XynA 的 α-螺旋与 β9-折叠之间存在一个二硫键；基于分子动力学模拟预测结果，利用定点突变技术在 AoXyn11A 的相应位置引入二硫键（Cys^{108}-Cys^{152}），获得突变酶 $AoXyn11A^T$；分别将 AoXyn11A 及其突变酶基因在大肠杆菌 BL21（DE3）中表达，经纯化，获得重组 AoXyn11A 和 $AoXyn11A^T$，并分析比较温度对其酶活性的影响。结果显示，重组 $AoXyn11A^T$ 的最适温度为 60 ℃，比重组 AoXyn11A 提高了 5 ℃；其在 50 ℃下的半衰期 $t_{1/2}^{50}$ 为 71 min，较重组 AoXyn11A（$t_{1/2}^{50}$=25 min）提高了近 2 倍。研究表明二硫键对提高 AoXyn11A 的热稳定性有重要作用。

关键词：木聚糖酶；二硫键；定点突变；耐热性

中图分类号：Q 784　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)10—1038—06

Effect of Disulfide Bridge on Thermostability Iimprovement of the Xylanase AoXyn11A

LIU Xiaotong[1]，*WU Minchen*[*2]，*YIN Xin*[3]，*WANG Junqing*[3]

（1. School of Pharmaceutics，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. Wuxi Medical School，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；3. School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：To improve the thermostability of the family 11 xylanase AoXyn11A from *Aspergillus oryzae*，homology alignment and analysis of the three dimensional structures between thermostable xylanase XynA from *Thermomyces lanuginosus* and AoXyn11A were carried out. Resultantly，a disulfide bridge was located between the α-helix and β9 sheet of XynA while none in AoXyn11A. Based on the prediction by molecular dynamics simulation，a disulfide bridge（Cys^{108}-Cys^{152}）was introduced into the corresponding region（α-helix region）of *AoXyn11A* by site-directed mutagenesis. The mutant xylanase，$AoXyn11A^T$，was obtained. Then，the AoXyn11A- and $AoXyn11A^T$-encoding genes were separately expressed in *Escherichia coli* BL21（DE3）. After purification，the effects of temperature on xylanase activity of the recombinant AoXyn11A and $AoXyn11A^T$ were analyzed and compared. The temperature optimum（T_{opt}）of the recombinant

收稿日期：2014-03-23

基金项目：国家自然科学基金项目（31101229）。

* **通信作者**：邬敏辰（1962—），男，江苏无锡人，理学博士，教授，博士研究生导师，主要从事酶工程与基因工程研究。

E-mail：biowmc@126.com

AoXyn11A^T was 60 ℃, which was 5 ℃ higher than that of the recombinant AoXyn11A. The half-life of the recombinant AoXyn11A^T at 50 ℃ ($t_{1/2}^{50}$) was 71 min, which was about 3-fold than that (25 min) of the recombinant AoXyn11A. This study demonstrated that the disulfide bridge played an important role in thermostability improvement of the xylanase AoXyn11A.

Keywords: xylanase, disulfide bridge, thermostability, site-directed mutagenesis

内切 β-1,4-D-木聚糖酶（EC 3.2.1.8）简称木聚糖酶，以内切方式作用于木聚糖主链，将木聚糖水解为不同长度的木寡糖和少量的木糖，是木聚糖降解酶系中至关重要的酶[1]。根据酶蛋白一级结构同源性比对和疏水簇分析，绝大多数木聚糖酶属于糖苷水解酶 10 和 11 家族[2]。相对于 10 家族，11 家族木聚糖酶相对分子质量低（<30 000），多数为单一催化结构域，对木聚糖具有很高的特异性，空间结构主要由两个反向平行的 β-折叠片层和一个 α-螺旋构成，呈右手半握形状[3]。

木聚糖酶作为一种重要的生物酶，广泛应用于造纸、饲料、食品、能源及功能性寡聚木糖生产等诸多工业领域[4]。然而，天然木聚糖酶通常难以适应工业生产过程中的高温条件。因此，如何提高木聚糖酶的热稳定性已成为广泛关注的焦点，而通过构建分子内二硫键以改造木聚糖酶耐热性则成为该领域研究热点之一。Wakarchuk 等[5]在环状芽孢杆菌 *Bacillus circulans* 木聚糖酶中构建了一个连接 N 和 C 端且不影响其酶活性的二硫键，使该酶的热稳定性提高了约 15 ℃。Turunen 等[6]通过定点突变将二硫键引入木聚糖酶 XYNII（Cys^{110}-Cys^{154}），突变酶在 65 ℃下的半衰期较原酶延长了 13 min。Jeong 等[7]对来源于 *Bacillus stearothermophilus* 的木聚糖酶进行改造，引入二硫键（Cys^{100}-Cys^{150}），使 XynA 的热稳定性提高了 5 ℃。Yang 等[8]对 *Streptomyces olivaceoviridis* 木聚糖酶进行定点突变引入二硫键 Cys^{109}-Cys^{153}，突变酶的热稳定性较原酶提高 2.8 倍。

作者所在研究室前期克隆出一种来源于米曲霉（*Aspergillus oryzae*）的 11 家族中温木聚糖酶 *AoXyn11A*，该酶活性较高，但热稳定性较差。作者通过与 *Thermomyces lanuginosus* 耐热木聚糖酶 XynA（PDB:1YNA）的三维结构比对和分子动力学模拟，采用定点突变技术，在中温木聚糖酶 AoXyn11A 的 α-螺旋与 β9-折叠之间引入二硫键（Cys^{108}-Cys^{152}），获得耐热性提高的突变酶 AoXyn11A^T。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒和培养基

米曲霉 *Aspergillus oryzae*：购自中国工业微生物菌种保藏中心，编号为 CICC40186；大肠杆菌 *E. coli* JM109 和 *E. coli* BL21(DE3)：购于 Invitrogen 公司；克隆质粒 pUCm-T：购自上海 Sangon 公司；表达质粒 pET28a：购于 Invitrogen 公司；重组质粒 pUCm-T-Aoxyn11A：作者所在实验室构建和保存。LB 培养基（质量分数）：1% Tryptone、0.5% Yeast Extract、1% NaCl（固体培养基中添加质量分数 2%琼脂）。

1.2 工具酶、引物和试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 rTaq DNA 聚合酶、DNA Marker 和蛋白质 Marker：购于大连 TaKaRa 公司；DNA 回收试剂盒、酵母粉和蛋白胨等：上海 Sangon 公司产品；桦木木聚糖和考马斯亮蓝 R-250：Sigma 公司产品；其他化学试剂均为国产或进口分析纯；PCR 引物由上海 Sangon 公司合成（表 1），Xyn-F 和 Xyn-R 用于 AoXyn11A 成熟肽基因的克隆，1YNA-F1 和 1YNA-F2 用于 AoXyn11A^T 基因的突变。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 Primers for PCR amplification

名称	序列 (5'-3')	酶切位点
Xyn-F	GAATTCTCCACACCCAGTAGCACG	*Eco*R Ⅰ
Xyn-R	GCGGCCGCTCAATAAACAGTGATAGCAG	*Not* Ⅰ
1YNA-F1	CCTACAAGGGCCAGGTTACCTGTGACGGAGGC	
1YNA-F2	TCACTACGGGGTGTCATTTCAATGCGTGGGCT	

1.3 序列比对、同源建模和分子动力学模拟

利用 DNAMAN 6.0 软件对木聚糖酶 AoXyn11A（GenBank:AFA51067）和耐热酶 XynA（PDB:1YNA）的氨基酸序列进行比对，寻找两个酶分子在一级结构上的差异。

在 PDB 数据库(http://www.pdb.org/pdb/home/home.do)中寻找与 AoXyn11A 结构同源性较高的 11 家族木聚糖酶晶体结构,作为三维结构同源建模的模板。利用同源建模软件 MODELLER 9.9(http://salilab.org/modeller/)对 AoXyn11A 及其突变酶 *AoXyn11A*^{T} 分别进行三维结构建模。

利用 GROMACS 4.0 程序包(http://www.gromacs.org/)[9],参照 Yin 等[10]的方法分别对 AoXyn11A 和 AoXyn11A^{T} 的三维结构进行分子动力学(Molecular dynamics,MD)模拟,依据根均方偏差(Root Mean Square Deviation,RMSD)值预测二硫键(Cys^{108}–Cys^{152})存在与否对木聚糖酶耐热性的影响。

1.4 定点突变

以作者所在实验室保存的 pUCm-T-Aoxyn11A 为模板,以 1YNA-F2,Xyn-R 为引物进行第一轮 PCR,反应条件为:94 ℃ 4 min,30 个循环(94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s),72 ℃ 10 min,获得基因片段 P1;以 pUCm-T-Aoxyn11A 为模板,以 Xyn-F 和 P1 为引物进行第二轮大引物 PCR[11],反应条件为:94 ℃ 4 min,2 个循环(94 ℃ 30 s,45 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s),28 个循环(94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s),72 ℃ 10 min,获得含有一个突变位点的基因 Aoxyn11A^{1}。同上,以 Aoxyn11A^{1} 为模板,以 1YNA-F1 和 Xyn-R 为引物进行第三轮 PCR,反应条件为:94 ℃ 4 min,30 个循环(94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s),72 ℃ 10 min,获得基因片段 P2;以 Aoxyn11A^{1} 为模板,以 Xyn-F 和 P2 为引物进行第四轮 PCR,反应条件为:94 ℃ 4 min,2 个循环(94 ℃ 30 s,45 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s),28 个循环(94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s),72 ℃ 10 min,获得含有两个突变位点的基因 Aoxyn11A^{T}。将得到的 Aoxyn11A^{T} 经琼脂糖凝胶电泳分析、胶回收、与 pUCm-T 连接,转化 *E. coli* JM109,蓝白斑筛选阳性转化子,送上海 Sangon 公司测序,测序正确的重组质粒命名为 pUCm-T-Aoxyn11A^{T}。

1.5 重组表达质粒的构建

用 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ分别双酶切重组质粒 pUCm-T-Aoxyn11A 和 pUCm-T-Aoxyn11A^{T},胶回收目的基因条带,与经同样双酶切的表达质粒 pET28a 连接,分别转化 *E. coli* BL21(DE3),卡那霉素筛选阳性转化子,送上海 Sangon 公司测序。测序正确的重组表达质粒分别命名为 pET28a-Aoxyn11A 和 pET28a-Aoxyn11A^{T},阳性转化子分别命名为 BL21-pET28a-Aoxyn11A 和 BL21-pET28a-Aoxyn11A^{T}。空质粒 pET28a 转化 *E. coli* BL21(DE3)作对照。

1.6 木聚糖酶基因在 *E. coli* BL21(DE3)中的表达和纯化

将 BL21-pET28a-Aoxyn11A 和 BL21-pET28a-Aoxyn11A^{T} 分别接种于含 100 μg/mL 卡那霉素(Kan)的 LB 培养基中,于 37 ℃,220 r/min 振荡培养 12 h,再以 2 g/dL 的接种量转接于 30 mL 含 Kan 的新鲜 LB 培养基中,220 r/min,待 $A_{600\ nm}$ 达 0.8 时,加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L,25 ℃诱导培养 6 h。

将菌体沉淀,用 4 mL 柠檬酸-Na_2HPO_4 缓冲液(pH 4.6)悬浮,冰浴并超声破碎细胞,离心得上清为粗酶液。在 4 ℃下,用 2 mL 镍金属螯合层析柱纯化目的蛋白。采用 Broadford 法[12]测定蛋白质质量分数。利用 BandScan 5.0 软件预测蛋白质质量分数。

1.7 木聚糖酶活性的测定

采用改进的 DNS 法[13]:2.4 mL 质量分数 0.5% 木聚糖溶液(pH 4.6 的柠檬酸-Na_2HPO_4 缓冲液配制)加入 0.1 mL 适当稀释的酶液,50 ℃下反应 10 min,加入 2.5 mL DNS 试剂,沸水浴显色 7 min,测定 $A_{540\ nm}$。在上述反应条件下,一个酶活性单位(U)定义为每分钟产生 1 μmol 还原糖所需的酶量。

1.8 温度对木聚糖酶活性的影响

将适当稀释的酶液分别于 40~75 ℃(以 5 ℃为间隔)下测定它们的酶活性,以最高酶活性为 100%,作温度-相对酶活性曲线;T_{opt} 表示最适温度。将酶液分别于 50 ℃下放置不同时间,测定其残余酶活性,绘制温度-残留酶活性曲线。$t_{1/2}^{50}$ 表示在 50 ℃下酶的半衰期,即残留酶活性为 50%时的保温时间。

1.9 动力学参数的测定

分别以不同质量浓度(1.0~10.0 mg/mL)的木聚糖溶液(pH 4.6)为底物,在两种酶的最适温度下测定酶活性,按 Lineweaver-Burk 法作图,计算重组酶的 K_m 和 V_{max} 值。

2 结果与分析

2.1 AoXyn11A 和 XynA 的结构比对分析

将 11 家族耐热木聚糖酶 XynA 与AoXyn11A 的氨基酸序列进行同源比对,结果显示它们的同源性为 58.25%。经三维结构分析,耐热酶XynA 含有一个二硫键,对应于 AoXyn11A 的 S^{108} 和 N^{152}(图 1)。



▲:S108 和 N152

图 1　AoXyn11A 和 XynA 的一级结构比对

Fig. 1　Homology alignment of primary structures between AoXyn11A and XynA

2.2　同源建模及分子动力学模拟

从 PDB 数据库中选择来源于绳状青霉菌(*Penicillium funiculosum*)、大肠杆菌(*E. coli*)和红褐肉座菌（*Hypocrea jecorina*）的木聚糖酶晶体结构(PDB:1TE1、2VUL、1ENX）为模板，对 AoXyn11A 及其突变酶进行三维结构同源建模，结果显示 AoXyn11A^{T} 除了在 α-螺旋区增加了一个二硫键外，整体结构和活性中心 Glu^{84} 和 Glu^{175} 几乎未受影响(图 2)。

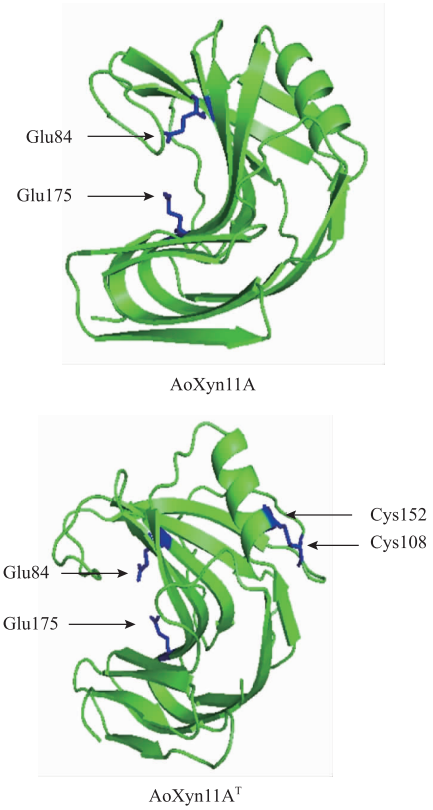


图 2　AoXyn11A 和 AoXyn11A^{T} 的三维结构

Fig. 2　Modeled structures of AoXyn11A and AoXyn11A^{T}

分子动力学模拟结果显示，AoXyn11A^{T} 的 RMSD 值几乎在各个时间点都低于 AoXyn11A。因为 RMSD 值越低代表分子越稳定 [14]，因此与 AoXyn11A 相比，突变酶的热稳定性可能会有一定程度的提高(图 3)。

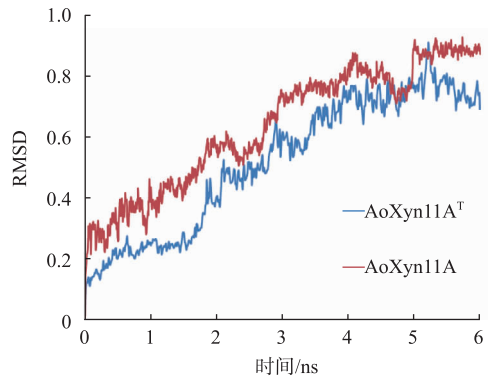


图 3　AoXyn11A 和 AoXyn11A^{T} 的 RMSD 值

Fig. 3　RMSD values of AoXyn11A and AoXyn11A^{T}

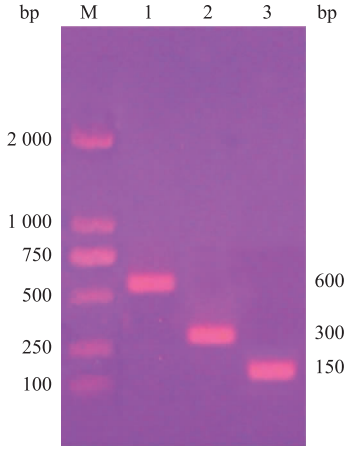
2.3　重组表达质粒的构建

将 AoXyn11A 序列中编码 Ser^{108} 的密码子 TCC 和编码 Asn^{152} 的 AAT 分别突变为编码 Cys 的密码子 TGT，引入二硫键 Cys^{108}-Cys^{152}。以 pUCm-T-*Aoxyn11A* 为模板，经过第一轮 PCR 扩增，获得长度约为 150 bp 的基因片段 P1(图 4 泳道 3)；经过第三轮 PCR 扩增，获得长度约为 300 bp 的基因片段 P2(图 4 泳道 2)；经过第四轮 PCR 扩增，获得长度约为 600 bp 的突变基因 Aoxyn11A^{T}（图 4 泳道 1)。基因测序结果显示突变基因 Aoxyn11A^{T} 长度为 581 bp(含 *Eco*R Ⅰ、*Not* Ⅰ 酶切位点)，与预期一致。

2.4　重组木聚糖酶的表达与纯化

IPTG 诱导 6 h 后离心收集重组大肠杆菌菌体，经细胞破碎和纯化后，测得重组 AoXyn11A 和

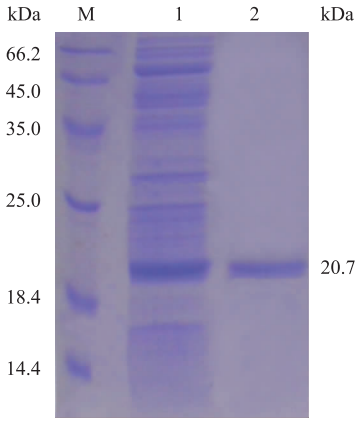
AoXyn11A^T 的比酶活性分别为 3 336 U/mg 和 3 511 U/mg。SDS-PAGE 分析表明，重组 AoXyn11A 和 AoXyn11A^T 的表观相对分子质量约为 20 700（图 5）。重组木聚糖酶末端含有 His6 标签，可用 His-Ni 亲和层析法快速纯化。经 BandScan 5.0 软件预测纯化后酶的纯度可达 95%以上。



M:DNA Ladder Marker;1:Aoxyn11A^T;2:基因片段 P2;3:基因片段 P1

图 4　突变基因Aoxyn11A^T 的 PCR 扩增

Fig. 4　PCR amplification for a mutant gene Aoxyn11A^T



M：低相对分子质量蛋白质 Marker;1:BL21-pET28a-Aoxyn11A^T 的表达产物;2:纯化后的重组 AoXyn11A^T

图 5　表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5　SDS-PAGE analysis of expressed products

2.5　温度对重组木聚糖酶活性的影响

分别测定重组 AoXyn11A 和 AoXyn11A^T 的最适温度(T_{opt})，结果如图 6 所示，重组 AoXyn11A^T 的最适温度为 60 ℃，比重组 AoXyn11A 的 55 ℃提高了 5 ℃。

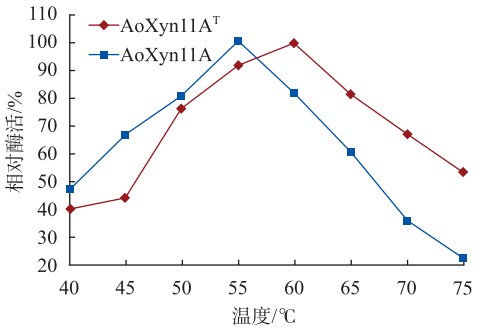


图 6　温度对重组 AoXyn11A 和 AoXyn11A^T 活性的影响

Fig. 6　Effects of temperature on xylanase activity of recombinant AoXyn11A 和 AoXyn11A^T

两种重组木聚糖酶热稳定性的测定结果如图 7 所示，重组 AoXyn11A 的热稳定性较差，50 ℃下保温 30 min 残留酶活性降为 47%，保温 60 min 时的残留酶活性仅为 18%，半衰期 $t_{1/2}^{50}$ 为 25 min；重组 AoXyn11A^T 在 50 ℃下较稳定，该温度下保温 30 min 的残留酶活性高达 82%，保温 60 min 的残留酶活性为 64%，半衰期 $t_{1/2}^{50}$ 为 71 min，热稳定性($t_{1/2}^{50}$)较重组 AoXyn11A 提高了近 2 倍。由此得出结论：二硫键的引入显著提高了木聚糖酶AoXyn11A 的热稳定性，与预测结果相符。

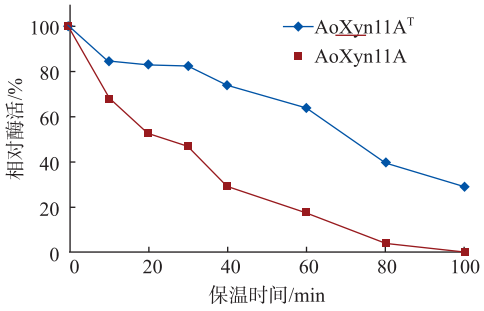


图 7　重组 AoXyn11A 和 AoXyn11A^T 的热稳定性

Fig. 7　Effects of temperature on thermostability of recombinant AoXyn11A 和 AoXyn11A^T

2.6　动力学参数的测定

重组 AoXyn11A 的 V_{max} 和 K_m 值分别为 4812 U/mg 和 2.33 mg/mL；重组 AoXyn11A^T 的 V_{max} 值为 5377 U/mg，与重组 AoXyn11A 相比有所提高，K_m 值为 2.67 mg/mL，变化不大。

3　结　语

木聚糖酶在造纸、饲料、能源等领域具有较大的价值，但由于工业化酶制剂生产和应用的恶劣环境，如纸浆处理通常是在较高温度条件下进行，在

饲料制粒加工中也需要短暂的高温处理[14]。很多天然的木聚糖酶热稳定性较差，在工业应用中受到严重的限制。为提高木聚糖酶对高温环境的耐受能力，使木聚糖酶具有更高的工业应用价值，可利用现代生物技术如基因工程等改造木聚糖酶的耐热性。在合理的位置引入二硫键，能够有效地提高木聚糖酶的热稳定性。而引人不合理的二硫键有时不仅不会提高热稳定性，反而会导致热稳定性降低，如在杨木质体蓝素中引入二硫键（Cys^{21}–Cys^{25}）后，其最适温度与热稳定性均降低。

一般来说，大多数二硫键在蛋白质折叠和稳定性方面都起着关键的作用，且部分二硫键与蛋白质的热稳定性密切相关，二硫键的作用主要是通过降低蛋白去折叠状态的熵值来提高蛋白结构的稳定性。作者通过分子动力学模拟的方法成功预测出二硫键的引人对酶热稳定性的影响，并且引入二硫键（Cys^{108}–Cys^{152}）的位置远离活性位点，活性位点的三维结构几乎没有变化，对酶活性影响较小。重组 $AoXyn11A^{T}$ 在 50 ℃下较原酶的热稳定性提高了近 2 倍，且酶活性也有一定的提高，为其它中温木聚糖酶的耐热性改造提供了思路和方法，也为拓宽木聚糖酶的应用领域奠定基础。

参考文献：

[1] Wu M C，Wang J Q，Zhang H M，et al. Cloning and sequence analysis of an acidophilic xylanase（Xyn）gene from *Aspergillus usamii* E001[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**，2011，27(4)：831–839.

[2] Collins T，Gerday C，Feller G. Xylanases，xylanase families and extremephilic xylanases [J]. **FEMS Microbiology Reviews**，2005，29(1)：3–23.

[3] Pastor F I J，Gallardo Ó，Sanz–Aparicio J，Díaz P. Xylanases：molecular properties and applications [M]. Heidelberg：Springer–Verlag Press，2007，65–82.

[4] 张慧敏，李剑芳，邬敏辰，等. 耐热木聚糖酶基因在毕赤酵母中的表达及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报，2013，32(2)：124–128.
ZHANG Huimin，LI Jianfang，WU Minchen，et al. Expression of a thermostable xylanase gene in *Pichia pastoris* and its enzymatic characterization[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2013，32(2)：124–128.(in Chinese)

[5] Wakarchuk W W，Sung W L，Campbell R L，et al. Thermostabilization of the *Bacillus circulans* xylanase by the introduction of disulfide bonds[J]. **Protein Engineering**，1994，7(11)：1379–1386.

[6] Turunen O，Etuaho K，Fenel F，et al. A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the α–helix region of Trichoderma reesei endo–1，4–β–xylanase Ⅱ increases the thermal stability through synergism[J]. **Journal of Biotechnology**，2001，88(1)：37–46.

[7] Jeong M Y，Kim S，Yun C W，et al. Engineering a de novo internal disulfide bridge to improve the thermal stability of xylanase from *Bacillus stearothermophilus* No.236[J]. **Journal of Biotechnology**，2007，127(2)：300–309.

[8] Yang H M，Yao B，Meng K，et al. Introduction of a disulfide bridge enhances the thermostability of a *Streptomyces olivaceoviridis* xylanase mutant[J]. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**，2007，34(3)：213–218.

[9] Berendsen H J C，van der Spoel D，van Drunen R. GROMACS：A message–passing parallel molecular dynamics implementation [J]. **Computer Physics Communications**，1995，91(2)：43–56.

[10] Yin X，Li J F，Wang J Q，et al. Enhanced thermostability of a mesophilic xylanases by N–terminal replacement designed by molecular dynamics simulation[J]. **Journal of Science Food and Agriculture**，2013，93(12)，3016–3023.

[11] 朱玉贤，李毅. 现代分子生物学(第二版)[M]. 北京：高等教育出版社，2006，178.

[12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**，1976，72(1/2)：248–254.

[13] Wang J Q，Zhang H M，Wu M C，et al. Cloning and sequence analysis of a novel xylanase gene，Auxyn10A，from *Aspergillus usamii*[J]. **Biotechnology Letters**，2011，33(5)：1029–1038.

[14] 高淑娟. N 端结构对米曲霉木聚糖酶热稳定性的研究[D]. 无锡：江南大学，2013.