甘露聚糖酶 Man1602 中的色氨酸修饰及其突变体性质的研究

雍 婕， 高 晗， 吴永尧， 周海燕*
（湖南农业大学 生物科学技术学院，湖南 长沙 410128）

摘要： 为了揭示色氨酸残基与 Man1602 酶活力的关系，提高 Man1602 的表达量，笔者通过研究色氨酸专一化学修饰剂与甘露聚糖酶 Man1602 的反应，同时根据甘露聚糖酶 Man1602 的序列比对结果，推测色氨酸残基与酶活的关系，对保守位点的色氨酸进行定点突变，检测各突变体酶的活力变化。结果表明，色氨酸为甘露聚糖酶 Man1602 的活性必需氨基酸，其中 W196 和 W199 位点的突变导致酶活几乎完全丧失，可以推断 W196 和 W199 为活性中心的氨基酸，W198 也具有较高保守性，但对其突变并未造成酶的完全失活，推断 W198 是维持活性中心疏水性的重要氨基酸。

关键词： 甘露聚糖酶，色氨酸，化学修饰，定点突变
中图分类号：Q 6　**文章编号：**1673-1689(2019)04-0045-05　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.04.007

Studies on Modifying Tryptophan Residues of Man1602 and Researching Characteristics of Site-Directed mutant Man1602

YONG Jie， *GAO Han*， *WU Yongyao*， *ZHOU Haiyan**
（Hunan Agricultural University，College of Bioscience and Biotechnology，Changsha 410128，China）

Abstract： In order to reveal the relationship between the tryptophan residue and the activity of Man1602，the expression of Man1602 was increased，the authors studied the reaction of tryptophan-specific chemical modifier with mannanase Man1602，at the same time，according to the sequence alignment results of Man1602，the relationship between tryptophan residues and enzyme activity was deduced，the fixed position of tryptophan was fixed，and the activity of the mutant was detected. The results showed that tryptophan is the active essential amino acid of Man1602，in which the mutation of W196 and W199 sites leads to almost complete loss of enzyme activity. It can be inferred that W196 and W199 are the active centers of amino acids. W198 also has a high conservation，but its mutation did not cause the complete inactivation of the enzyme so it was concluded that W198 was an important residue to sustain the hydrophobic constant of the enzyme

收稿日期： 2016-08-22
基金项目： 国家自然科学基金青年科学基金项目(31401637)；湖南省教育厅科学基金项目(15K062)。
* **通信作者：** 周海燕(1974—)，女，博士，副教授，硕士研究生导师，研究方向为酶工程。E-mail：sws001@163.com
引用本文： 雍婕，高晗，吴永尧，等. 甘露聚糖酶 Man1602 中的色氨酸修饰及其突变体性质的研究 [J]. 食品与生物技术学报，2019，38(04)：45-49.

active site.
Keywords: mannanase, tryptophan, chemical modification, site-directed mutation

甘露聚糖酶是一种被广泛应用于医药、造纸、纺织印染、食品、饲料工业及石油开采等各个领域[1-6]的半纤维素酶。Man1602是本实验室自行筛选获得的高活力甘露聚糖酶,同时具有很强的纤维素降解能力,是具有良好应用价值的双功能酶。为了提高Man1602的表达量,进一步提高其活力和稳定性,笔者试图揭示与Man1602功能相关的结构特点,并从分子水平对Man1602进行改造。本研究拟分析色氨酸残基与Man1602酶活力的关系,探讨Man1602与底物结合的位点,旨在为寻找分子改造位点打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

甘露聚糖酶Man1602,由本实验室制备;二甲基(2-羟基-5-硝基苄基)溴化锍、甘油、溴酚蓝、甲醇、乙酸、氨水、柠檬酸、甲醛、NaOH和HCl,为国产分析纯试剂;$AgNO_3$、SDS、Tris、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸,为Sigma公司产品;DNA分子标样及DNA片段克隆试剂盒,购自天根生化科技有限公司;QuikChange® 定点突变试剂盒,购自MERCK公司;蛋白质marker、限制性内切酶和T4 DNA连接酶,均为TaKaRa公司产品;*B. subtilis* WB600,购自CICIM;引物合成通过上海生工完成;测序通过上海英骏生物技术有限公司完成。

培养基配置:spA,0.4 g/dL硫酸铵,2.8 g/dL磷酸氢二钾,1.2 g/dL磷酸二氢钾,0.2 g/dL柠檬酸钠;spB,0.04 g/dL硫酸镁;100*CAYE,2 g/dL酪氨酸,10 g/dL酵母膏;sp1,9.8 mL spA,9.8 mL spB,200 μL葡萄糖(50%,质量体积比),200 μL 100*CAYE;sp2,5.88 mL sp1,60 μL氯化钙(250 mmol/L),60 μL氯化镁(250 mmol/L)。

1.2 方法

1.2.1 酶的荧光光谱分析 使用970CRT型荧光分光光度计,激发波长为280 nm,激发和发射光谱谱宽均为5 nm,发射波长扫描范围为250~400 nm,测定甘露聚糖酶与底物结合前后的荧光光谱变化。催化反应底物为0.1 g/dL的葡甘聚糖,反应温度30 ℃,反应时间10 min。

1.2.2 甘露聚糖酶Man1602的色氨酸修饰反应 参照文献[7]进行,用连四硫酸钠将甘露聚糖酶的巯基氧化保护起来,再用二甲基(2-羟基-5-硝基苄基)溴化锍特异修饰甘露聚糖酶上的吲哚基,在反应结束后分离去除未反应的试剂并还原SH,并测定残余活力。反应的缓冲系统为PBS pH 6.5,修饰剂最高浓度为2.5 mmol/L。

1.2.3 酶活力的测定 采用DNS法,参照文献[8]进行,一个活力单位相当于测定条件下每分钟释放出1 μmol甘露糖的酶量。

1.2.4 测定化学修饰反应的动力学参数,对色氨酸与酶功能的关系作初步判断 以终浓度为3.2、10、32、100、320、1 000 μmol/L的二甲基溴化锍在30 ℃下分别与甘露聚糖酶作用10、20、30、40 min后,以色氨酸终止反应,并测定残余酶活。然后以不加修饰剂的缓冲液作对照,计算相对酶活。相对酶活的对数对反应时间作图所得直线的斜率为一级反应常数,由一级反应常数的对数对修饰剂浓度的对数作图,所得直线的斜率为二级反应常数。

1.2.5 总DNA和质粒DNA的制备 具体方法参照文献[9]。

1.2.6 目的基因的克隆、回收与纯化以及与载体的连接和转化 按照相应的试剂盒说明书进行。

1.2.7 Man1602基因表达质粒的构建 如图1所示。用*Xba* I和*Sph* I分别双酶切目的基因,与表达载体pWB980形成粘性末端后将两者连接。

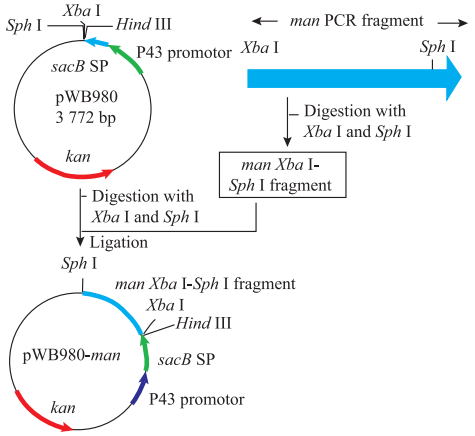


图1 pWB980-*man*表达质粒的构建图

Fig. 1 Construction spectrum of pWB980-*man*

1.2.8 枯草杆菌感受态细胞制备 参照文献[10]进行。适量单菌落过夜培养物转接于 5 mL 的 sp1 培养基中,37 ℃,200 r/min 培养 5 h,达到对数生长末期,取 200 μL 转接于 2 mL 的 sp2 培养基中,37 ℃,150 r/min 培养 1.5 h,加入 20 mL 的 EDTA(pH 8.0),37 ℃,100 r/min 培养 10 min,然后加入适量的重组质粒,37 ℃,200 r/min 培养 1.5 h,于筛选平板培养基上进行鉴定。

1.2.9 甘露聚糖酶的定点突变的测定 参照 QuikChange® 定点突变试剂盒说明书进行。设计的 6 对正反向引物序列分别为:

P1 5'-AATGAACGGCGAGCATTTCTGGTGGGGGC-3'

P2 5'-GCCCCCACCAGAAATGCTCGCCGTTCATT-3'

P3 5'-AATGAACGGCGAGGCCTTCTGGTGGGGGC-3'

P4 5'-GCCCCCACCAGAAGGCCTCGCCGTTCATT-3'

P5 5'-CGGCGAGTGGTTCCATTGGGGGCTGACAG-3'

P6 5'-CTGTCAGCCCCCAATGGAACCACTCGCCG-3'

P7 5'-CGGCGAGTGGTTCGCCTGGGGGCTGACAG-3'

P8 5'-CTGTCAGCCCCCAGGCGAACCACTCGCCG-3'

P9 5'-CGAGTGGTTCTGGCATGGGCTGACAGGCT-3'

P10 5'-AGCCTGTCAGCCCATGCCAGAACCACTCG-3'

P11 5'-CGAGTGGTTCTGGGCCGGGCTGACAGGCT-3'

P12 5'-AGCCTGTCAGCCCGGCCCAGAACCACTCG-3'

—:突变位点

克隆得到的突变质粒分别为 Man(W196H)、Man (W196A)、Man (W198H)、Man(W198A)、Man(W199H)和 Man(W199A)。

1.2.10 表达产物的 SDS 电泳检测 参照文献[11]进行,浓缩胶 3 g/dL,分离胶 7.5 g/dL,银染法染色。

2 结果与讨论

2.1 甘露聚糖酶 Man1602 的荧光光谱

天然状态 Man1602 的发射光谱图显示最大峰值位于 336 nm 处,光谱特征表现为色氨酸的特征,当与底物结合后,光谱峰蓝移至 330 nm 处,且荧光强度略增强(图 2),说明色氨酸是活性必需氨基酸,且位于酶蛋白分子内部的疏水区域。

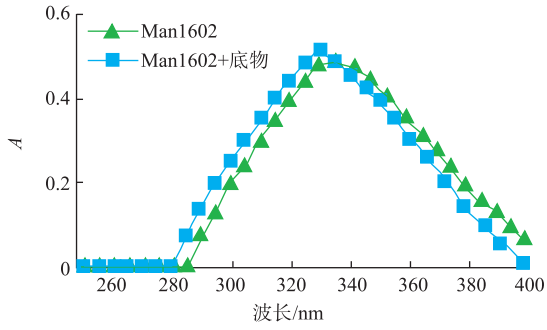


图 2 Man1602 的荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence spectrogram of Man1602

2.2 色氨酸残基的修饰反应及其动力学

在二甲基溴化锍的修饰反应中,当修饰剂浓度达到最高时,酶的活力降低了近 90%,可见二甲基溴化锍对该酶活性具强烈的抑制作用(图 3)。与底物保护组结果对比显示加入底物对酶有良好的保护效果,酶活仅降低了不到 10%。

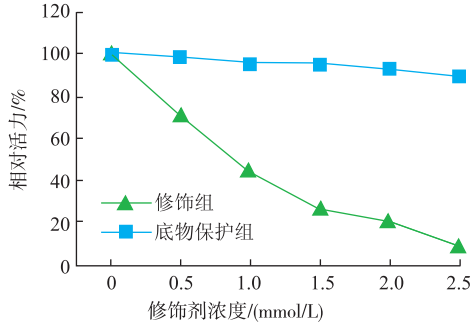


图 3 二甲基溴化锍修饰对酶活的影响

Fig. 3 Effect of Dimethyl-sulfonium bromide on Man1602 activity

用不同浓度的二甲基溴化锍修饰甘露聚糖酶,一定时间后测定相对酶活,做酶反应的动力学分析,以相对酶活的对数对时间作图并计算一级反应常数(图 4(a)),一级反应常数对二甲基溴化锍浓度双对数作图并计算二级反应常数(图 4(b))。

色氨酸残基在 0~20 min 内的修饰反应过程为一级反应阶段,此阶段曲线的斜率对二甲基溴化锍浓度的双对数图中的曲线斜率为 1.98,表明该酶中有 2 个色氨酸为活性必需基团。

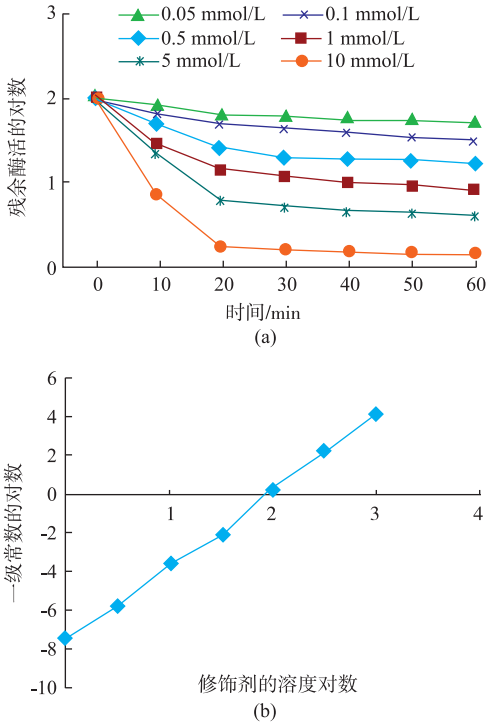


图 4 二甲基溴化锍修饰反应动力参数关系

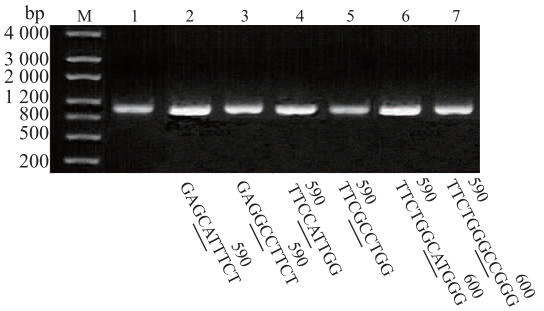
Fig. 4 Parameters of modified reaction of Dimethyl-sulfonium bromide

2.3 甘露聚糖酶 Man1602 的定点突变及突变酶特性

根据 Man1602 氨基酸序列的比对情况来看,有 3 个位点的色氨酸具有较高的保守性,它们是 W196、W198 和 W199。为了确定哪个是酶活性的必需氨基酸,对这 3 个位点进行了定点突变,因前者和色氨酸疏水常数相近,而侧链结构相差很大,其中同一位点分别突变为丙氨酸和组氨酸;后者则为带电性的氨基酸,可以通过比较这 2 种突变体,发现色氨酸的疏水性和侧链结构哪个是酶活性的主导因素。

在重组质粒 pWB980-*man* 中引入突变后,用 *Xba* I 和 *Sph* I 进行双酶切,电泳检测后送出测序,结果显示点突变被成功引入(图 5)。

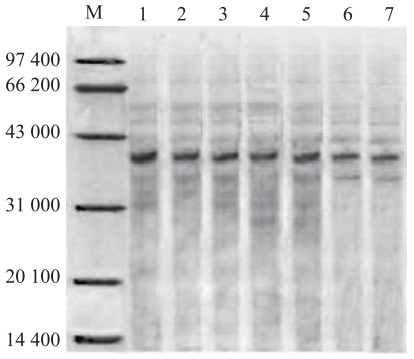
各种突变体都能表达分子量约 40×10^3 的目的蛋白(图 6),对表达产物进行活力测定,与未引入突变的重组酶相比,196 和 199 位的色氨酸被其他残基取代后酶的活力几乎丧失,而 198 位的色氨酸则对酶活力影响不太明显,但是残基疏水常数的改变可以导致酶活的明显差异(图 7)。



M:标准;1:Man(未引入突变);2:Man(W196H);3:Man(W196A);4:Man(W198H);5:Man(W198A);6:Man(W199H);7:Man(W199A)

图 5 突变体质粒的酶切片段电泳图及突变位点基因序列

Fig. 5 Electrophoretogram of mutant plasma digested and genic sequence of mutation site



M:标准;1:pWB980-*man*;2:pWB980-*man*(W196H);3:pWB980-*man*(W196A);4:pWB980-*man*(W198H);5:pWB980-*man*(W198A);6:pWB980-*man*(W199H);7:pWB980-*man*(W199A)

图 6 甘露聚糖酶 Man1602 点突变体的 SDS-PAGE

Fig. 6 SDS-PAGE of site-directed mutant enzyme Man1602

W196 和 W199 的突变造成 Man1602 活力几乎丧失,可以推断两者为 Man1602 的活性中心氨基酸,W198 虽然不会使酶完全失活,但它是保持活性中心疏水环境的重要残基,将 W198 突变为 A 和突变为 H 所导致的酶活下降程度不同,丙氨酸的疏水常数与色氨酸接近,而组氨酸则为极性氨基酸,会使活性中心附近的结构发生微小变化,造成酶活力的损失。

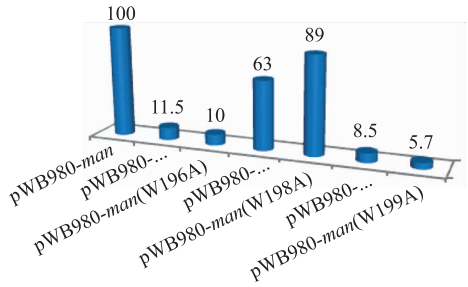


图 7　甘露聚糖酶 Man1602 突变体的活力比较

Fig. 7　Comparison of mutant Man1602 activity

3 结　语

色氨酸是在酶活性中心出现频率较高的残基之一，经常作为活性中心的底物结合位点，在不少多糖水解酶的研究中都发现色氨酸与酶活密切相关[12-14]。

Man1602 的荧光光谱特征表现为色氨酸，属于 B 型蛋白，本研究中利用定点突变法确定 W196 和 W199 是酶活性中心的残基，均位于分子内部的疏水区，从改变 W198 位点的极性会使酶活力大幅度下降这一现象来看，活性中心周围的疏水基团对酶的稳定性具有重要作用，如果将活性中心附近的极性基团突变为疏水基团可能有利于 Man1602 的稳定。

Man1602 中的 W196 和 W199 与 E191 在空间结构上相互靠近，形成酶的活性中心，此中心区域的附近还有一个绝对保守的残基 G194，与活性部位的柔性密切相关，此研究结果将另文报道。

参考文献：

[1] YANG Wenbo，TONG Shumin，SHEN Qing，et al. β-mannanase form NK27 strain degradate plant gum and products promote growth of bifidobacterium[J]. **Microbiology**，1995，22(4)：204-207.(in Chinese)

[2] MA Yanhe，ZHOU Peijin. Discussion on the development and application of oligosaccharide[J]. **Food and Fermentation Industries**，1992，(1)：80-82.(in Chinese)

[3] YOU Xin. Rapid development of China's funct ional fruct ooligosaccharide[J]. **Food and Machinery**，1999(4)：4-6.(in Chinese)

[4] LI Yuncheng，LIN Juan，LIANG Yanhui，et al. Screening of mannanase-producing marine microorganisms and characterization of the enzyme[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**，2015，15(12)：66-73.(in Chinese)

[5] LI Hua，GAO Li. Research advance on methods of determining β-glucosidase activity [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2007，26(2)：107-114.(in Chinese)

[6] CHEN Jian，LIU Long，DU Guocheng. Current status and prospects of enzyme preparation industry in China[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2012，31(1)：7-13.(in Chinese)

[7] 周海梦，王洪睿. 蛋白质化学修饰[M]. 北京：清华大学出版社，1998.

[8] ZHOU Haiyan，YANG Sandong，ZHOU Dazhai，et al. Fermentation condition of producing konjac glucomannanase[J]. **China Biotechnology**，2005，25(3)：65-68.(in Chinese)

[9] F. M. 奥斯伯，R. E. 金斯顿，J. G. 塞德曼，等. 精编分子生物学实验指南[M]. 4 版. 北京：科学出版社，2005.

[10] ANAGNOSTOPOULUS C，SPIZIZEN J. Requirements for transformation in Bacillus subtilis[J]. **J Bacteriol**，1961，81：741-746.

[11] 郭尧军. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京：科学出版社，1999.

[12] WU Jin，HE Bingwang. The study on chemical modification and active site of β-D-mannanase from nocardioform actinomycetes [J]. **Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology**，2000，16(2)：227-230.(in Chinese)

[13] YU Hong ying，WANG Weijun，SUN Yuanming，et al. Chemical modification of active side of β-mannanase from bacillus subtilis[J]. **Industrial Microbiology**，2005，35(1)：21-23.(in Chinese)

[14] YANG Xiuqing，SHEN Chong，GAO Chong. Tryptophan 266 is required for the C-C hydrolase activity [J]. **Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology**，2012，28(6)：538-545.(in Chinese)