

嗜热酯酶 APE1547 催化活性的定向进化研究

王秋岩 杨广宇 刘艳莉 王艳平 冯 雁*

(吉林大学 分子酶学工程教育部重点实验室 长春 130023)

摘 要 对来源于嗜热古菌 *Aeropyrum pernix* 的酯酶(APE1547)催化活性进行定向进化研究。利用 APE1547 特殊的稳定性,建立了准确的高通量高温酯酶筛选方法。对第一代随机突变库筛选获得了催化活性较野生型提高 1.5 倍的突变体 M010,序列分析表明其氨基酸突变为 R526S。从第二代突变库中筛选出的总活力提高 5.8 倍突变体 M020,突变位点为 R526S/E88G/A200T/I519L,其比活力与 M010 一致,但表达量比野生型提高约 4 倍。对 M020 酶学性质表征发现,其最适 pH 为 8.5,比野生型向碱性偏移 0.5,活性中心残基酸性基团的解离常数(pK_a)由野生型的 7.0 提高至 7.5。晶体结构分析表明,突变位点 R526 距离活性中心较近,将其突变为 Ser 降低了活性中心的极性,抑制了催化残基 His 的解离,使酸性基团的解离常数升高。

关键词 定向进化 嗜热酶 酯酶活力 解离常数

中图分类号:Q936.81 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2006)02-0259-04

酯酶可以催化酯合成、酯水解、酯交换等具有重要应用价值的反应。但自然界存在的酯酶在催化活性和稳定性方面与工业要求还有一定距离。为获得同时具有高催化活性和高稳定性的酶,通常从常温酶出发,利用分子改造提高其稳定性以获得理想的生物催化剂。随着极端环境微生物的发现,嗜热酯酶表现了较好的热稳定性,具有广阔的应用前景。对嗜热酯酶进行分子改造,在保证其稳定性的前提下提高催化活力成为获得理想酶的一种新途径。来源于嗜热古菌 *Aeropyrum pernix* 的嗜热酯酶(APE1547)具有良好的热稳定性^[1],在工业上有潜在的应用价值。利用分子改造的方法提高其酯酶活力对促进酶的工业应用具有重要的意义。

定向进化技术在上世纪 80 年代出现后,已经在蛋白质改造领域取得巨大的成功^[2-6]。它通过筛选大量的突变体搜索可能的序列空间,寻找针对特定生物过程更佳的解决方案。结合晶体结构,定向进化还可以对理解蛋白质结构和功能的关系起到良好的辅助作用^[7,8]。定向进化的成功与否取决于是否具备针对所需性质的灵敏高效的筛选方法^[9],尤其是要尽量降低空白菌体造成的背景噪音。本实验巧妙地利用嗜热酶的稳定性,建立了灵敏的高温酯酶活力高通量筛选方法,有效地提高了对突变库筛选的准确性及高效性。对筛选获得的阳性突变体进行

了序列及性质测定,结合晶体结构分析初步确定了对催化活性可能有重要影响的突变位点。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株及主要试剂

限制性内切酶 *Nde* I、*Bam* H I 以及 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; *Taq* DNA 聚合酶购自 Promega 公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21-CodonPlus-RIL (Novagen)用于克隆和表达,Plasmid pET15b (Novagen)用来构建随机突变库,凝胶回收及基因纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司;引物由大连宝生物公司合成酯酶底物对硝基苯酚辛酸酯(pNPC8)购自 Sigma 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 随机突变库的构建

应用高浓度 Mg^{2+} 和不均衡 dNTP 浓度来进行易错 PCR,针对 APE1547 全基因构建随机突变库^[10]。设计引物如下: ForAPH: 5'-CTTACGAGTATCTCATATGCGCATTATAATGCCTGT-3'; RevAPH: 5'-TTGGAGGCCCTCCCGCGGTGGATCCCTATCTCCT-3' (下划线为 *Nde* I 和 *Bam* H I 位点)。扩增体系(100 μ L):引物 40 pmol,质粒模板 10 ng,10 \times buffer (Mg^{2+} Free) 10 μ L, $MgCl_2$ 7 mmol/L, dCTP 1 mmol/L, dTTP 1 mmol/L, dATP 0.2 mmol/L, dGTP 0.2 mmol/L, *Taq* polymerase 5 U,补水至 100 μ L 混匀。PCR 反应条

基金项目:国家 973 项目(2004CB719606)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-431-8987975; E-mail: yfeng@mail.jlu.edu.cn

作者简介:王秋岩(1975-)男,吉林省长春市人,博士研究生,主要从事嗜热酶的定向进化研究。E-mail: wangqiuyan@mail.jlu.edu.cn

收稿日期:2005-09-05;接受日期:2005-10-10;修回日期:2005-12-20

件 94℃ 3min 94℃ 1min 72℃ 2min 45℃ 3min 30 个循环 ;72℃ 10min。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.3 筛选方法的建立

将纯化的随机突变基因与载体 pET15b 连接 ,应用电转化方法转入大肠杆菌 BL21-CodonPlus-RIL (Novagen) 中构建随机突变库。将获得的单克隆挑入含 100μg/mL 氨苄青霉素的 200μL 2YT 培养基 96 孔板内 ,按照文献 [10] 的方法对突变体进行培养和诱导。收获菌体后 ,反复冻融 3 次破碎菌体 ,加入 200μL 磷酸缓冲液 (50mmol/L pH 8.0) 重悬 ,80℃ 保温 30min 以变性大肠杆菌本身的蛋白。3000r/min 离心 30min 除去杂蛋白 ,上清液即为粗酶。取适量加入到含有 0.2mmol/L pNPC8 的酶标板中 ,80℃ 反应 30min 酶标仪测定 OD_{405} 吸光度值。分别以含有 pET15b 空质粒和携带野生型基因的大肠杆菌 BL21-CodonPlus-RIL 作为阴性对照和阳性对照。

1.4 筛选方法的统计学分析

从野生型平板上挑取 300 个菌斑 ,在 96 孔板上进行培养和诱导表达 ,并进行活力测定 ,由于数值符合正态分布 ,利用公式 $rate = 1 - R((X_0 - \mu)/\sigma)$ 对筛选方法的准确性进行统计学分析 [11]。其中 μ 为野生型活力测定的平均值 ; σ 为野生型活力值的标准方差 ; X_0 为人为设定的预期值 ,用来表示由实验误差导致假阳性的活力数值 ,rate 为所求假阳性出现的概率。在确定单一基因库平板筛选中的活力平均值 (μ) 和标准方差 (σ) 后 ,就可以计算预期值 (X_0) 在 96 孔板中作为假阳性出现的概率 ,以此作为衡量筛选方法准确性的依据。

1.5 突变体的纯化和酶活力的测定

1.5.1 突变体的纯化 菌体经过诱导表达重组蛋白后 ,3000r/min 离心 20min 收集菌体 ,用 10 倍体积的 50mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 8.0) 重悬菌体。超声波破碎菌体后 ,80℃ 水浴保温 30min 以变性大肠杆菌本身的蛋白。12000r/min 离心 20min 除去杂蛋白 ,按照 pET 操作系统手册的方法 ,利用镍离子交换柱纯化目的蛋白 ,然后利用 Hitrap Sephacryl S-200 分子筛层析进行纯化即获得重组蛋白。以牛血清白蛋白为标准蛋白 ,用紫外吸收法测定蛋白浓度。

1.5.2 酶活力的测定 :按照文献 [1] 的方法 ,用 Cary 50 紫外分光光度计在 80℃ 测定 405nm 的光吸收值 ,来确定野生型和突变体的活力。实验数据为 3 次平行实验结果计算结果。

1.6 突变体的最适 pH 和活性基团解离常数的确定

利用混合缓冲液测定 pH 对重组酶催化活性的影响 ,缓冲液组分 :乙酸 25mmol/L ,MES 25mmol/L ,Tris 75mmol/L ,甘氨酸 25mmol/L ,EDTA 1mmol/L。利用上述的活力测定方法测定野生型和突变体重组酶在 pH5 ~ 11 范围内的催化活性。

不同 pH 下的相对活力对 pH 作图 ,数据经过非线性拟和 ,计算两个解离基团的解离常数 ,计算公式为 $k = k(\text{limit}) / (1 + 10^{pK_1 - pH} + 10^{pH - pK_2})$ 。k (limit) 指不依赖于 pH 值的最大活力 , K_1 、 K_2 指参与反应的酸碱基团解离常数。

2 结果

2.1 随机突变库的构建与筛选方法的评价

经过易错 PCR ,获得的目的基因如图 1 所示。将其与 pET15b 载体连接后 ,电转化进入大肠杆菌获得约 10000 个单克隆 ,突变库构建成功。

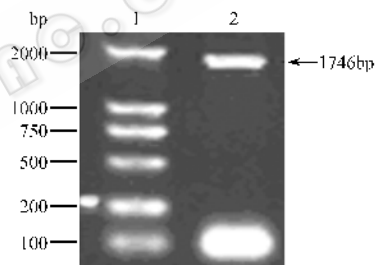


图 1 APE1547 基因易错 PCR 产物电泳图

Fig.1 Error prone PCR to amplify the 1.7kb APE 1547 fragment of plasmid pET15b/APE1457. 1. DL2000 Maker ; 2. Error prone PCR product with 7mmol/L Mg^{2+} .

准确灵敏的高通量筛选方法是酶定向进化获得成功的关键。本实验利用嗜热酯酶的热稳定特性 ,对破碎后的菌体溶液热处理 ,离心除去大肠杆菌的热变性蛋白 ,提高了比色法测定酶活性的灵敏性及准确性。为检验该方法在高通量筛选中的稳定性和准确性 ,从平板上挑取 300 株野生型克隆到 96 孔板中 ,经过培养和诱导 ,对其酶活力进行了测定。结果表明 ,代表活力的吸光度值的均数 μ 为 $\Delta OD_{405} = 0.35$,其数据组标准差为 $\pm 0.042 (0.12\mu)$,按照材料和方法 (1.4) 中公式进行统计学分析 ,结果表明 ,活力预期值为 1.25 倍野生型总体均数的假阳性克隆的概率为 1.8×10^{-2} ,表现为 1.5 倍均数的假阳性克隆出现概率为 1.55×10^{-5} 。表明此方法的假阳性背景极低 ,可以有效地检测到活力提高的突变菌株。

2.2 野生型和突变体的纯化及酶活力测定

经过两轮共 5000 株克隆的筛选 ,获得两株活力

提高突变体 M-010 和 M-020 ,表 1 为突变位点及活力。在第一代随机突变库中筛选得到突变体 M-010 ,测序表明其氨基酸突变为 R526S。经过加热除杂蛋白,镍离子亲和柱纯化和分子筛层析纯化,获得纯度高于 90% 的目标蛋白(图 2)。活力测定表明 M-010 催化活性较野生型提高约 1.5 倍。在突变体 M-010 基础上继续进行随机突变,筛选第二代随机突变库得到突变体 M-020 ,测序表明其在第一轮的突变基础上又引入了 3 个新的突变位点。其比活力与突变体 M-010 相比基本无变化,但总活力比野生型提高约 6 倍(表 1),这主要是因为突变体的表达量比野生型提高了约 4 倍。

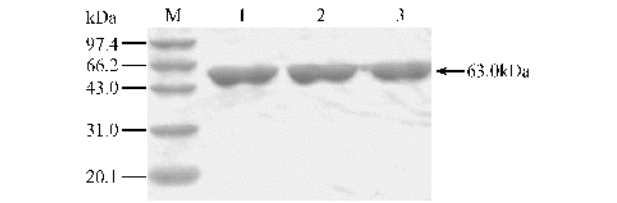


图 2 野生型及突变体纯化后电泳图

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the purified WT and Mutants. M. Marker ;1. M-020 ;2. M-010 ;3. WT.

表 1 定向进化嗜热酯酶获得的进化突变体

Name	Base substitutions	Mutations	Total activity (U/mL culture)	Specific activity(U/mg)
WT	—	—	14.28 ± 0.36	714.25 ± 18.14
M010	T99G/A1577G	R526S	21.73 ± 0.65	1086.74 ± 32.53
M020	T99G/A1577G/ A262G/G598A/ A1554T	R526S/E88G/ A200T/I519L	82.82 ± 3.33	1062.31 ± 42.68

2.3 野生型酶与突变体最适 pH 与催化基团解离常数测定

突变体与野生型不同 pH 条件下的活力测定表现为典型的钟型曲线(图 3),说明 pH 对突变体和野生型的影响源于活性中心两个酸碱基团的解离。突变体 M-020 最适 pH 值较野生型向碱性偏移了约

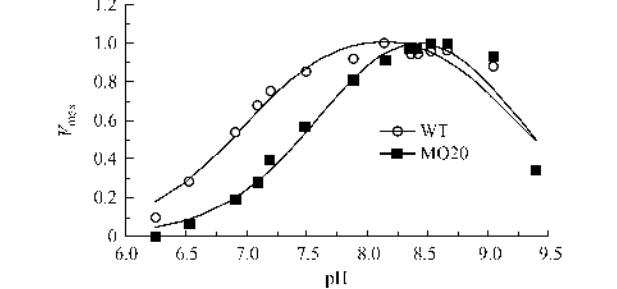


图 3 野生型和突变体水解 pNPC8 的 pH-活力曲线

Fig.3 pH dependent maximum rate constant (V_{max}) for the hydrolysis of pNPC8.

0.5 个单位。在两者的 pH-活力图谱中,突变体酸性段较野生型酶变陡(图 3),其解离常数(pK_1)从 7.0 上升至 7.5,相对的 pK_2 与野生型相比变化不明显(表 2)。

表 2 野生型酶与突变体 M-020 的解离常数

Table 2 Ionization constants for the pH-rate profiles of wild-type enzyme and mutant		
Strain	pK1	pK2
WT	6.95	9.28
M020	7.47	9.25

3 讨论

本实验利用嗜热酯酶 APE1547 极好的热稳定性,建立了灵敏、准确的高通量高温酯酶筛选方法,并且成功地获得了酯酶活力提高的突变体。突变体 M010 有两个碱基变异,但只有一个氨基酸 R526 发生有效突变,说明突变位点 R526S 是 M010 催化活性提高的原因。结合晶体结构分析^[12],突变位点 R526 距离活性中心位置较近(图 4),R526S 消除了精氨酸带正电的侧链对活性中心的影响,可能使酶-底物复合物的构象更有利于反应进行,从而使催化活性提高。

利用定向进化提高异源蛋白在大肠杆菌中的表达量在国外已有报道^[13,14]。通常外源蛋白的表达量跟外源基因的密码子编码,mRNA 二级结构稳定性和蛋白折叠等均有关系。通过定向进化可以在全部的 3 种水平上对外源基因的表达进行调节,促进外源蛋白在大肠杆菌中的表达。突变体 M020 表达量与野生型相比有较为明显的提高,这再次证明了这种观点。

酶的 pH-活力图谱通常是由其活性中心关键残基的解离状态所决定的,只有关键的残基处于正确的解离状态时,酶才能有效地发挥催化活性。对于酯酶来说,只有其催化三联体中的组氨酸 ϵN 原子去质子化,才能发挥催化活性。这个去质子化的过程就对应着 pH-活力图谱中的酸性基团解离(pK_1)。突变体与野生型相比 pK_1 显著升高,说明活性中心组氨酸的解离状态受到了影响。通常氨基酸解离常数的升高是由于环境疏水性增加导致的。晶体结构分析表明,526 位点临近活性中心,由带正电的 Arg 突变为不带电荷的 Ser 使活性中心的介电常数下降,有可能影响催化三联体中的 His556 解离效果(图 4)。

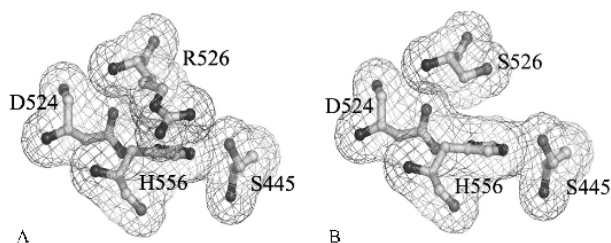


图4 R526S在野生型和突变体中与催化三联体的相对位置

Fig.4 The relative position between 526 site and the catalytic triad (Ser-His-Asp) of APE1547. A: R526 in wild-type enzyme; B: S526 in the mutant.

综上所述,最终获得的突变体 M020 与野生型相比具有较高的催化活力和偏碱的最适 pH,更适合在偏碱的环境中应用。Arg526 不仅影响催化活性,还对催化集团的解离有着重要的调节作用。本实验有助于深入理解 APE1547 发挥活力的机理,并为继续对其进行分子改造奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Gao RJ, Feng Y, Ishikawa K, *et al.* Cloning, purification and properties of a hyperthermophilic esterase from archaon *Aeropyrum pernix* K1. *J Mol Catal, B Enzym*, 2003, **24-25**: 1-8.
- [2] Turner NJ. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends Biotechnol*, 2003, **21**: 474-478.
- [3] Arnold FH, Volkov AA. Directed evolution of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol*, 1999, **3**: 54-59.
- [4] Hao H, Chockalingam K, Chen Z. Directed evolution of enzymes

and pathways for industrial biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, **13**: 104-110.

- [5] Schmidt-Dannert C, Arnold FH. Directed evolution of industrial enzymes. *Trends Biotechnol*, 1999, **17**: 135-136.
- [6] Arnold FH. Directed Evolution: Creating Biocatalysts for the Future. *Chem Eng Sci*, 1996, **51**: 5091-5102.
- [7] Lingens B, Grotzinger J, Kolter D, *et al.* Improving the carboxylase activity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* by a combination of directed evolution and site-directed mutagenesis. *Protein Eng*, 2002, **15**: 585-593.
- [8] Spiller B, Gershenson A, Arnold FH, *et al.* A structural view of evolutionary divergence. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, **22**: 12305-12310.
- [9] Kuchner O, Arnold FH. Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol*, 1997, **15**: 523-530.
- [10] Giver L, Gershenson A, Freskgard PO, *et al.* Directed evolution of a thermostable esterase. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, **95**: 12809-12813.
- [11] Arnold FH, Georgiou G. Directed Enzyme Evolution. ed. New Jersey: Humana Press, 2003, 85-97.
- [12] Bartlam M, Wang G, Yang H. Crystal structure of an acylpeptide hydrolase/esterase from *Aeropyrum pernix* K1. *Structure*, 2004, **12**: 1481-1488.
- [13] McLoughlin SY, Jackson C, Liu JW, *et al.* Increased expression of a bacterial phosphotriesterase in *Escherichia coli* through directed evolution. *Protein Expr Purif*, 2005, **41**: 433-440.
- [14] Sun L, Petrounia IP, Yagasaki M, *et al.* Expression and stabilization of galactose oxidase in *Escherichia coli* by directed evolution. *Protein Eng*, 2001, **14**: 699-704.

Directed evolution of thermophilic esterase from the archaeon *Aeropyrum pernix* K1

WANG Qiu-yan, YANG Guang-yu, LIU Yan-li, WANG Yan-ping, FENG Yan*

(Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering of Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130023, China)

Abstract: Thermophilic esterase (APE1547) from *Aeropyrum pernix* K1 was subjected to error-prone PCR (epPCR) to enhance activity. For the screening of mutants, an efficient and reliable assay suitable for high throughput screening was developed based on the enzyme thermostability. Two successive rounds of random mutagenesis by epPCR resulted in a four amino acid substitution variant M020 with significantly increased activity (six-fold under the screening condition). Further assay for the purified enzymes showed that the mutant possess 1.5-fold higher specific activity and nearly 4-fold higher expressed level than the wild-type. The mutant has an optimal activity at pH 8.5, corresponding to an alkaline shift of 0.5 pH unit compared to the wild type. The structure analysis suggests that R526S may contribute to the enhanced activity and the shift of pK_1 .

Keywords: Directed evolution; Thermophilic enzyme; Esterase

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719606)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-431-8987975; E-mail: yfeng@mail.jlu.edu.cn

Received: 5 September 2005/Accepted: 10 October 2005/Revised: 20 December 2005