

C-末端残基 Arg 缺失的 D-海因酶的分子形式与稳定性

钮利喜 张学尧 石亚伟 袁静明*

(山西大学生物技术研究所 教育部化学生物学与分子工程重点实验室 太原 030006)

摘要 报道 D-海因酶分子 C-末端 Arg 残基的缺失,导致酶的解聚与稳定性的显著改变。用基因克隆、表达与纯化的方法,制备了重组 D-海因酶(P479)及其 C-末端残基 Arg 缺失的 D-海因酶(P478)。SDS-PAGE 和 Native-PAGE 分析表明,在完全相同的条件下,两者单体的分子量相同,但天然 P479 为二聚体,而 P478 为单体并保持约 40% 催化底物海因的活性。突变酶 P478 的 pH 值稳定性显著增加,抗 SDS 能力亦有所提高,但热稳定性明显降低。结果预示 D-海因酶的 C-末端残基 Arg 显著影响酶的分子形式及热稳定性,虽也影响酶活性,但非酶活性所必需。

关键词: 重组 D-海因酶, 突变酶, 分子形式, 稳定性

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)06-1014-04

微生物海因酶(Hydantoinase, HDT)是酰胺水解酶超家族中的一个成员。根据催化底物的立体专一性,可分为 D-、L-、DL-3 种类型^[1]。其中 D-海因酶在工业应用上有鲜明的实际意义。该酶催化底物海因及其衍生物转化成相应的 N-氨甲酰-D-氨基酸,顺次在酶或化学试剂的作用下产生食品、药品等行业急需的 D-型氨基酸及其衍生物^[2]。半个多世纪以来,有关微生物 D-海因酶已有连篇累牍的报道,包括不同菌株的酶及其制备^[3,4]、基因克隆与表达^[5,6]、三维结构^[7]和酶性质等^[8,9]。Kim 等^[10]比较不同来源的 D-海因酶一级结构时发现,它们的 N-末端区保守性强,而 C-末端区几乎没有有什么同源性。因此,他们构建了 *Bacillus thermocatenuatus* GH2 和 *Bacillus stearothermophilus* SD1 中 D-海因酶 C-末段区缺失 11 个残基(LMADQDVVKMS)和 C-末段区缺失 12 个残基(STISKQEELTI)的突变酶 BT460 和 BS460。突变酶与完整酶相比,保留了 30%~40% 的酶活性,构象上有微细变化,并引起解聚。

我们在原有工作的基础上^[3,5]构建了 *P. putide* YZ-26 的 D-海因酶(P479)的 C-末端残基 Arg 缺失的突变酶(P478),该酶仍保留约 40% 的活性,但分子形式和稳定性发生了显著变化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)与 *Escherichia coli* DH5 α 质粒 pET-3a、重组质粒 pE-p479 为本实验室保存。

1.1.2 试剂和仪器: 卵清蛋白为 Sigma 公司产品,牛血清白蛋白为中国科学院生物物理所中生公司产品;Phenyl Sepharose、Sephacryl S-200 为瑞典 Amersham-Pharmacia 公司产

品;内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP 为大连 TaKaRa 公司产品,引物由奥科生物技术有限责任公司代为合成;质粒抽提、DNA 胶回收试剂盒为博大泰克生物技术公司产品。其它试剂为国产分析纯。MJ 公司 PTC-200 型基因扩增仪, LKB 公司蛋白纯化系统。

1.2 pE-p478 重组子的构建

根据酶 P479 基因序列^[5],分别设计了含酶切位点 *Nde* I 和 *Bam*HI 的引物 FW: 5'-CCCGAATTCATATGTCCTGTGATCCCGT-3' 和 RV: 5'-CGGGGATCCTCACTGAACITGGCAT-3'。然后以 pE-p479 为模板,在 MJ RESEARCH PTC-200 热循环仪上扩增 30 个循环,PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min; 72 $^{\circ}$ C 10min, 获得突变海因酶基因。经限制性内切酶酶切后,与相同酶切的 pET-3a 连接,构建重组质粒 pE-p478,转化 *E. coli* DH5 α ,再提取重组质粒经酶切分析和序列分析确认。所有操作均参照文献^[11]进行。

1.3 酶的表达和纯化

1.3.1 海因酶的表达: 将重组质粒 pE-p479(完整酶基因)和 pE-p478(C-末端残基 Arg 缺失的酶基因)各自转化至表达宿主 *E. coli* BL21(DE3)中,从 LB 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素平板挑取单菌落至 5mL 相同 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,按 2% 接种量转接至上述 LB 培养液, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 14h,收获菌体。

1.3.2 海因酶的分离和纯化: 离心收集菌体,洗涤后以 Tris-HCl pH 8.0 悬浮,超声(350W, 3min, 工作 2s, 间歇 10s)破碎细胞, 13000r/min 离心 30min, 上清液中加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 35% 饱和度, 4 $^{\circ}$ C 搅拌。13000r/min 离心 30min, 上清液上样于预先以 50mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 [含 1mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] 缓冲液平衡的 Phenyl-Sepharose Fast flow(16/10), 以相同缓冲液的 0.2mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 洗去杂蛋白,最后用

基金项目: 山西省自然科学基金资助(031042)

* 通讯作者。E-mail: jnyuan@sxu.edu.cn

作者简介: 钮利喜(1978-),男,山西阳高人,博士生,主要从事基因工程药物方面的研究。张学尧(1981-),男,山西霍州人,硕士研究生,主要从事基因工程药物方面的研究。两位作者对本文贡献相同。

收稿日期: 2006-01-17; 接受日期: 2006-02-28; 修回日期: 2006-06-08

50mmol/L Tris-HCl pH8.0 缓冲液洗脱目的蛋白,收集活性峰。根据实验需要,可再用 Sephacryl S-200 分子排阻层析,进一步纯化。

1.4 酶活性测定^[3]

取适量酶液,加入底物 1% 海因溶于 50mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 至 1.5mL,37℃ 反应 30 min。再加入 250μL 10% 三氯乙酸,250μL 10% 对二氨基苯甲醛和 1mL 蒸馏水混匀后,10000r/min 离心 5min,取上清,测定 430nm 光吸收值。酶活单位定义为在上述条件下,1min 内生成 1μmol N-氨甲酰-DL-丙氨酸所需酶量称为一个酶活单位(U)。酶比活力为 1mg 蛋白质的酶活力(U/mg)。

1.5 分子量和分子形式的测定

SDS-PAGE 与 Native-PAGE 按文献[11]进行。

1.6 蛋白质浓度测定

根据 Bradford 法^[12],以牛血清白蛋白绘制标准曲线。

2 结果

2.1 酶的纯化、活性与分子形式

表 1 表达酶的纯化汇总表

Table 1 Purification summary of expressed enzymes

Steps	Total protein(mg)		Total activity(U)		Activity recovery(%)		Specific activity(U/mg)		Purified factor	
	P479	P478	P479	P478	P479	P478	P479	P478	P479	P478
Extract	887	833	814	302	100	100	0.92	0.36	100	100
Phenyl-Sepharose	204	232	547	229	68	76	2.68	1.0	2.93	2.73
Gel filtration	110	117	341	138	42	46	3.10	1.2	3.37	3.26

Data were from 0.8 liter culture expressed by engineered strains. P479 and P478 are the recombinant enzyme and its mutant enzyme respectively. Other conditions are described as in "Materials and Methods".

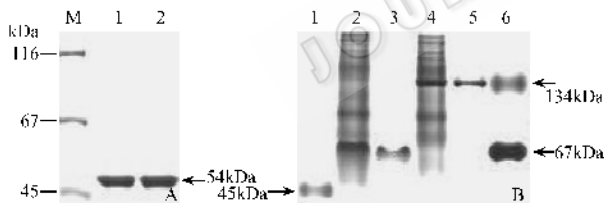


图 1 酶的电泳图谱

Fig.1 Electrophoretic patterns of purified D-hydantoinase. A: SDS-PAGE (10%). M. 116kDa β-galactosidase, 67kDa Bovine Serum Albumin, 45kDa Ovalbumin; 1. P479; 2. P478. B: Native-PAGE(10%). 1. Albumin Chicken Egg, 45kDa; 2. Extract of expressed cells from pE-p478; 3. Mutant enzyme P478 purified; 4. Extract of expressed cells from pE-p479; 5. Enzyme P479 purified; 6. Bovine Serum Albumin (monomer 67kDa, dimer 134kDa).

2.2 酶的 pH 稳定性

将 P479 和 P478 两酶在相同浓度情况下,于不同 pH 缓冲液中 37℃ 放置 2h,然后各吸取 20μg 酶在标准酶活测定系统中测定酶活性。结果表明,在 pH6~11 的范围内,P478 的 pH 稳定性显著高于 P479,特别在碱性范围。然而在最适 pH(8~9)没有变化(图 2)。其可能的原因是:每个亚基的活性中心残基的构象没有发生变化,因此底物与酶分子的结合无论是二聚体或单体情况下都是一样的。但当酶处于酸性或

将已构建好的工程菌按方法 1.3 进行表达与纯化。培养细胞中的完整酶(P479)与突变酶(P478)催化底物海因的活性分别为 9.2U/ml(细胞浓度为 OD₆₀₀ = 10)和 3.7U/ml(细胞浓度为 OD₆₀₀ = 10)。突变酶仍保留约 40% 的活性。培养细胞经超声破壁,硫酸铵沉淀,疏水层析和分子排阻层析等步骤纯化 D-海因酶。经上述步骤(表 1)酶活力回收达 40%~45%,纯化了 3.3 倍。SDS-PAGE 分析表明,无论是 P479 还是 P478 其亚基 M_r 均约为 54kDa 且达到电泳纯(图 1-A)。而 Native-PAGE 则明显不同:P479 仍保持二聚体形式,而 P478 却成为单体(图 1-B),由于蛋白质在天然 PAGE 中迁移率与 SDS-PAGE 中状态不尽相同,它不但与分子大小有关,还与分子形状和构象密切相关,因此,图 1-B 中蛋白间的迁移速度只能相对比较,目的蛋白与标准蛋白之间有一定差异。从粗提物的电泳结果也说明,P478 的解聚并非因纯化过程而引起的,由于所有操作都在平行的条件下进行,可以认为 P479 C-末端 Arg 残基的缺失导致酶的解聚。我们曾将样品在 AKTA purifier 上经 Superose-1X 30/10 预装柱进行分子排阻分析,结果与天然 PAGE 一致(结果未列出)。

碱性侧 pH 值时,整个酶分子的表面电荷差异引起电荷基团解离度的不同,影响了底物与酶分子的结合。P479 处于二聚体状态,对 pH 的改变比较敏感,而作为单体的 P478 却不甚敏感,因而导致二者的显著差异。

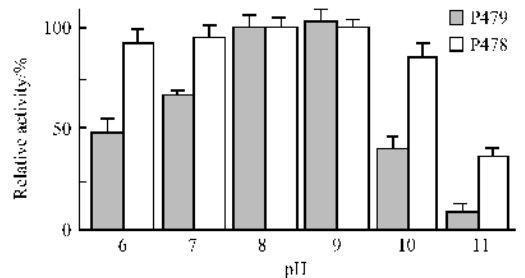


图 2 酶的 pH 稳定性比较

Fig.2 Comparison of pH stability between P479 and P478. Conditions are as follows: P479 and P478 (100μg/mL) were incubated in various buffers (0.05mol/L K₂HPO₄-KH₂PO₄ buffer pH6.0~7.0, 0.05mol/L Tris-HCl buffer pH8.0~9.0, 0.05mol/L NaHCO₃-NaOH Buffer pH10.0~11.0) at 37℃ for 2h, then taking 20μg each to 1.5mL reaction system for activity assay as described in "Materials and Methods".

2.3 酶的热稳定性

将酶 P479 和 P478 置于 50℃、55℃、60℃ 分别保温不同时间,然后取 20μg 酶置于标准反应系统中进行酶活性测定。

结果如图 3, P479 的热稳定性明显高于 P478。可能作为二聚体完整酶结构比较紧密, 导致其热失活速度缓慢; 而突变酶是单体, 易引起热变性而失活。

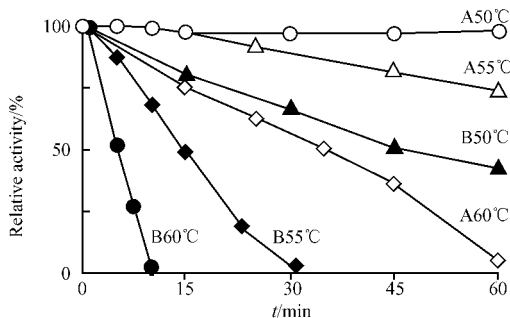


图 3 酶热稳定性比较

Fig. 3 Comparison of thermo-stability between P479 (A) and P478 (B). P479 and P478 (100 μg/mL) were incubated at 50°C, 55°C, 60°C for different times and then the enzymatic activity of each sample was determined as described in "Materials and Methods".

2.4 酶的抗 SDS 能力

众所周知, SDS 是一种表面活性剂, 可导致蛋白质因结构松散而伸展。在不同 SDS 浓度时, 将酶于 37°C 保温 30 min, 然后分别进行活性测定。结果如图 4, 在较高 SDS 浓度时 (0.2%) P479 和 P478 的活性明显下降但区别不大, 因为高浓度 SDS 导致酶分子解聚与亚基结构松散同时发生, 剩余不到 20% 活性, 很难体现两者差异。而在较低浓度时 (0.01%), 两酶活性变化也不很显著。只有在适当浓度 (0.1%) 时, P478 比 P479 有明显抗 SDS 的能力, 在此环境下, 可能酶分子解聚先于结构的改变, 因而两者有显著差异。

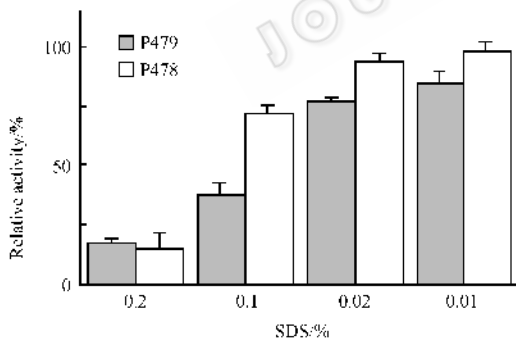


图 4 酶抗 SDS 的能力

Fig. 4 The ability of anti-SDS between P479 and P478. The determination of the enzymatic activity was described in "Materials and Methods" at various concentrations of SDS.

3 讨论

众所周知, 无论是酶的多聚形式还是酶的氨基酸序列都是酶分子长期进化的结果。任何形式的改变, 如酶的解聚或氨基酸残基的替代和缺失都将导致其结构与活性的改变。微生物 D-海因酶常以同源二聚体或四聚体作为功能单位^[7], 而且不同种属的 D-海因酶的氨基酸序列同源性一般在 40%~90%, 且保守性主要在 N-末端区的大部分序列, C-

末端区的同源性十分低, 即使在同类微生物也是如此^[9]。Kim 等曾将两种杆菌 *Bacillus thermocatenulatus* 和 *Bacillus stearothermophilus* 的 D-海因酶的 C-端区的 11 个残基和 12 个残基分别缺失导致酶的解聚与酶活性的改变^[10]。我们将来源于一株 *P. putida* YZ-26 的重组 D-海因酶 (P479) C 末端一个 Arg 残基剔除, 得到突变酶 P478。这一个残基的缺失导致酶分子形式由二聚体解聚成单体, 但酶活性仍保留约 40%。这一结果表明, C-末端带正电荷的 Arg 可能是 P479 通过离子键维系其二聚结构的一个关键残基, 而对酶活性是非必需的。也说明该残基不处于酶的活性中心区且与催化作用无关。CD 和荧光光谱的结果也显示两者在构象上没有显著差异 (结果未列出)。我们曾用酸性氨基酸和中性氨基酸替代该 Arg, 初步结果表明 C-末端残基电荷对酶的解聚有决定性的作用, 进一步研究正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Syltatk C, May O, Altenbuchner J, et al. Microbial hydantoinase-industrial enzymes of from the origin of life? *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**: 293-309.
- [2] Grifantini R, Galli G, Garpani G, et al. Efficient conversion of 5-substituted hydantoins to D-alpha-amino acids using recombinant *Escherichia coli* strains. *Microbiology*, 1998, **144**: 947-954.
- [3] 石亚伟, 李汉卿, 袁黎明, 等. 假单胞杆菌 D-海因酶的纯化及酶学性质. *微生物学报*, 2001, **41**(5): 605-610.
- [4] Park JH, Kim GJ, Lee SG, et al. Purification and characterization of thermostable D-hydantoinase from *Bacillus thermocatenulatus* GH-2. *Appl Biochem Biotechnol*, 1999, **81**(1): 53-65.
- [5] Shi YW, Zhao LX, Niu LX, et al. Gene sequence, soluble expression and homologous comparison of a D-hydantoinase from *Pseudomonas putida* YZ-26. *Chem Res Chinese U*, 2005, **21**(5): 552-557.
- [6] Chien HR, Jih YL, Yang WY, et al. Identification of the open reading frame for the *Pseudomonas putida* D-hydantoinase gene and expression of the gene in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1395**(1): 68-77.
- [7] Cheon YH, Kim HS, Han KH, et al. Crystal structure of D-hydantoinase from *Bacillus stearothermophilus*: insight into the stereochemistry of enantioselectivity. *Biochemistry*, 2002, **41**(30): 9410-9417.
- [8] Lapointe G, Viau S, Leblanc D, et al. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the D-hydantoinase gene from *Pseudomonas putida* and distribution of homologous genes in other microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 888-895.
- [9] Shi YW, Niu LX, Feng X, et al. Purification, enzymatic properties of a recombinant D-hydantoinase and its dissociation by Zinc ion. *World J Microbiol Biotechnol*, 2006, **22**(6): 350-357.
- [10] Kim GJ, Kim HS. C-terminal regions of D-Hydantoinases are nonessential for catalysis, but affect the oligomeric structure. *Biochem Biophys Res Comm*, 1998, **243**(1): 96-100.
- [11] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

- [12] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* ,1976 ,**72** : 248 – 254.

Molecular form and stability of D-hydantoinase deleted at C-terminal residue Arg

NIU Li-xi ,ZHANG Xue-yao ,SHI Ya-wei ,YUAN Jing-ming*

(*Institute of Biotechnology , Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of National Ministry of Education , Shanxi University , Taiyuan 030006 , China*)

Abstract :This report is about only deleting one C-terminal residue of D-hydantoinase to result in obvious changes on its molecular form and stability. A recombinant D-hydantoinase (P479) and its mutant enzyme deleted at C-terminal residue Arg (P478) were prepared by methods of gene cloning , expression and purification. Results show that the subunit molecular weight of P479 and P478 is the same (54kDa) as determined by SDS-PAGE , whilst the molecular form of native P479 and P478 is a dimer and a monomer respectively in the completely operative conditions. Compared with P479 , the enzymatic activity of P478 for substrate hydantoin maintained about 40% and pH stability was obviously increased , at the alkaline side in particular , as well as the anti-SDS ability was also raised. However , the thermal stability for P478 was clearly lowed as compared to P479. It implies from above data that the C-terminal residue Arg of the D-hydantoinase is a crucial one for subunit dissociation , but non-essential for catalysis.

Keywords : D-hydantoinase ; Mutant D-hydantoinase ; Molecular form ; Stability

Foundation item : Natural Science Fund of Shanxi Province (031042)

* Corresponding author. E-mail : jmyuan@sxu.edu.cn

Received : 17 January 2006 / Accepted : 28 February 2006 / Revised : 8 June 2006