

大肠杆菌 β -D-半乳糖苷酶的定位突变 及突变酶的动力学性质^{*}

褚西宁 白玉明 袁静明

(山西大学生物系 太原 030006)

摘要 利用人工合成的寡核苷酸探针,将编码大肠杆菌 β -D-半乳糖苷酶(EC 3.2.1.23)的 Lac Z 基因中 537 位 Glu 密码子 GAA 分别用 GAC(Asp)、CAA(Gln)、GTC(Val)来替代,替代后的突变酶的催化活性显著降低。同天然 β -D-半乳糖苷酶相比,作用于 ONPG 底物时,突变酶的 k_{cat} 值分别为 0.13%(Asp-537)、0.0006%(Gln-537)、0.0035%(Val-537),但它们的 K_m 值并无明显改变。无论是天然酶还是突变酶,底物类似物 IPTG 是一个强有力的抑制剂,而过渡态类似物 2-脱氧-2-氨基-半乳糖和 L-核糖只对突变酶有微弱的抑制作用。活化剂叠氮钠的激活作用小于 β -D-半乳糖苷酶的 Glu-461 突变酶。催化甲醇成酯反应的能力小于天然酶。突变酶对热更不稳定。以上结果表明 Glu-537 残基是该酶催化反应的必需基团。

关键词 大肠杆菌, β -D-半乳糖苷酶, 定位突变, 动力学性质

蛋白质工程是研究酶活性中心残基功能的主要手段之一。用定位突变技术可定量的检验酶功能团同底物配位结合的机理^[1-3]。由 Lac Z 基因编码的大肠杆菌 β -D-半乳糖苷酶(EC 3.2.1.23)由 1023 氨基酸残基组成^[4,5]。该酶的完整 Lac Z 基因已被克隆到人工构建的 pIP101 质粒上, β -D-半乳糖苷酶基因可在转化细胞中表达^[6]。该酶的催化机制类似于溶菌酶,为酸碱协同催化。因此, β -D-半乳糖苷酶的定位突变是研究水解糖苷键的酶,尤其是双糖酶机理的一个理想模型。

β -D-半乳糖苷酶的定位突变研究已经表明,酶分子中 Tyr-503 残基起酸碱调节作用^[7,8]。而 Glu-461 可能具有稳定半乳糖中间酰化物的功能。Glu-461 或以半乳糖酰阳离子形式,或形成共价中间物,或二者兼而有之^[9]。最近 Gelber 等^[10]假设 Glu-537 残基同 Glu-461 都是酶的必需基团。为了定量地解释 Glu-537 的功能,我们用基因定位突变技术,将 Lac Z 基因中 GAA(Glu-537)用 GAC(Asp)、GAA(Gln)和 GTC(Val)替代。突变酶的 k_{cat} (ONPG)远低于天然酶,分别为天然酶的 0.13%(Asp-537)、0.0006%(Gln-537)和 0.0035%(Val-537)。实验结果还表明,Glu-537 的功能有别于 Glu-461 残基,前者起协调底物催化的作用,而后者可能同底物形成络合物。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

E. coli TG2、*E. coli* Y1091、*E. coli* RZ1032、*E. coli* XL1-Blue、Helper Phage P24 均由

^{*} 本文采用缩写符号:ONPG 邻硝基酚半乳糖,PNPG 对硝基酚半乳糖,IPTG 异丙基硫代 β -半乳糖苷,X-gal 5'-溴-4-氯-3-吲哚- β -半乳糖苷, k_{cat} 催化反应速度常数,BSA 牛血清白蛋白。

本文于 1992 年 9 月 19 日收到。

Calgary 大学 Dr. Huber 实验室提供。

培养基:LB 培养基^[11]。突变细胞培养:LB 培养基中加 100 μ g/ml Amp, 37 $^{\circ}$ C, 220r/min, 18—20 小时。

突变菌株筛选:固体 LB 培养基内加 100 μ g/ml Amp, 50 μ g/ml IPTG, 50 μ g/ml X-gal, 37 $^{\circ}$ C, 18—20 小时。

1.2 质粒

Bluescript(pBSK⁺)购于 Stratagene 公司,质粒 pIP101 由 Dr. Huber 实验室提供。质粒扩增用 *E. coli* TG2, 质粒提取按标准程序进行^[11]。质粒经限制性内切酶酶解后进行琼脂糖凝胶电泳,所需 DNA 片段用 GeneClean 试剂盒纯化。

1.3 酶与化学试剂

限制性内切酶 Cla I、Sac I 和 Pst I 等均购自 Pharmacia 或 Boehringer Mannheim 公司。突变试剂盒购自 Bio-Rad 实验室。DNA 顺序测定用 US Biochemical Corp 试剂盒,按标准操作进行。(S³⁵)-ATP 为 Du-Pout NEN 产品。寡核苷酸探针由 Calgary 大学 DNA 合成室合成。其它试剂均购自 Sigma、BRL 或相应试剂公司。

1.4 突变质粒的构建与转化

将含有完整 Lac Z 基因的 pIP101 质粒用限制性内切酶 Cla I 和 Sac I 酶解获得包含 Glu-537 密码子的 1.1kb 片段(pIP101 SC 1.1),同时将 Bluescript 质粒也用 Cla I 和 Sac I 内切酶酶解形成缺刻,经电泳分离纯化得到 pBSK⁺大片段与 pIP101 SC1.1 片段,再在 T₄ 连接酶作用下形成重组质粒 pBSK⁺SC 4.0,然后将重组质粒转化入 *E. coli* RZ1032 并加 Helper phage 和尿苷得到 ss-Uridyl-DNA。以含 537 残基密码的 23 聚体寡核苷酸 GATCCTTTGCCAA(GAC,GTC)TACGCCACG 为探针进行定位突变。突变后的质粒转化入生长在选择培养基平板上的 *E. coli* XL1-Blue 或 TG2 中。挑取蓝色的单菌落,继而进行液体培养,提取突变质粒并测定 DNA 顺序,确定突变位点。由于 pBSK⁺只有部分 Lac Z 序列且缺失启动子,故不能合成 β -D-半乳糖苷酶。因此,pBSK⁺SC1.1 需用 Cla I 和 Sac I 酶切将含点突变的 1.1kb 再回接到 pIP101 的大片段上,并转入 *E. coli* Y1091 菌株内。选取单菌落,于含有 Amp 的 LB 培养基中培养产酶。

1.5 突变酶的分离纯化

突变酶的分离纯化基本按 Cupples 等^[9]方法进行。细胞经高压破碎后离心,上清液经硫酸铵分部沉淀、DEAE-BioGel A 柱层析和 EPLC Superose 12。酶纯度经 Phast-Gel SDS-PAGE 鉴定,纯度可达 95%以上。蛋白质浓度测定按 280nm 的消光系数为 2.09cm⁻¹.mg⁻¹计算。

1.6 酶活力测定

反应体系为 0.2mol/L, pH 7.0 TES 缓冲液 100 μ l,底物 10mmol/L 的 ONPG 100 μ l 或 20mmol/L PNPG 100 μ l。一定量的酶液,加蒸馏水使终体积为 1ml。除酶液外的其它成分混合后于 25 $^{\circ}$ C 预保温 3—5 分钟,加入酶液混匀,立即测定 420nm 光吸收增加。不同底物在 420nm, pH7.0, 25 $^{\circ}$ C 时的消光值分别为 2.65(oNP)和 7.2(pNP)。一个酶活力单位(u)定义为在标准条件下(pH7.0, 25 $^{\circ}$ C),每分钟释放 1.0 μ mol oNP 或 1.0 μ mol pNP 所需酶量。酶的比活力为 u/mg 蛋白。

1.7 动力学参数及理化性质

用测定不同条件下酶活性的变化来得到突变酶的动力学参数及理化性质,测定低酶活性的 Gln-537 酶和 Val-537 酶时,向反应系统中补加 BSA(1.0 mg/ml)以免长时间保温(通常 1—6 小时)而引进酶失活。所有动力学参数按 Huber 和 Gant 法作图^[12]。

2 结果

2.1 定位突变的战略

采用寡核苷酸探针同单股尿苷-DNA 粘合的方法进行定位突变。其方案参照 Stratagene 和 Bio-Rad 两公司试剂盒推荐的方法。步骤见材料与与方法(1.4)。总体方案如图 1。

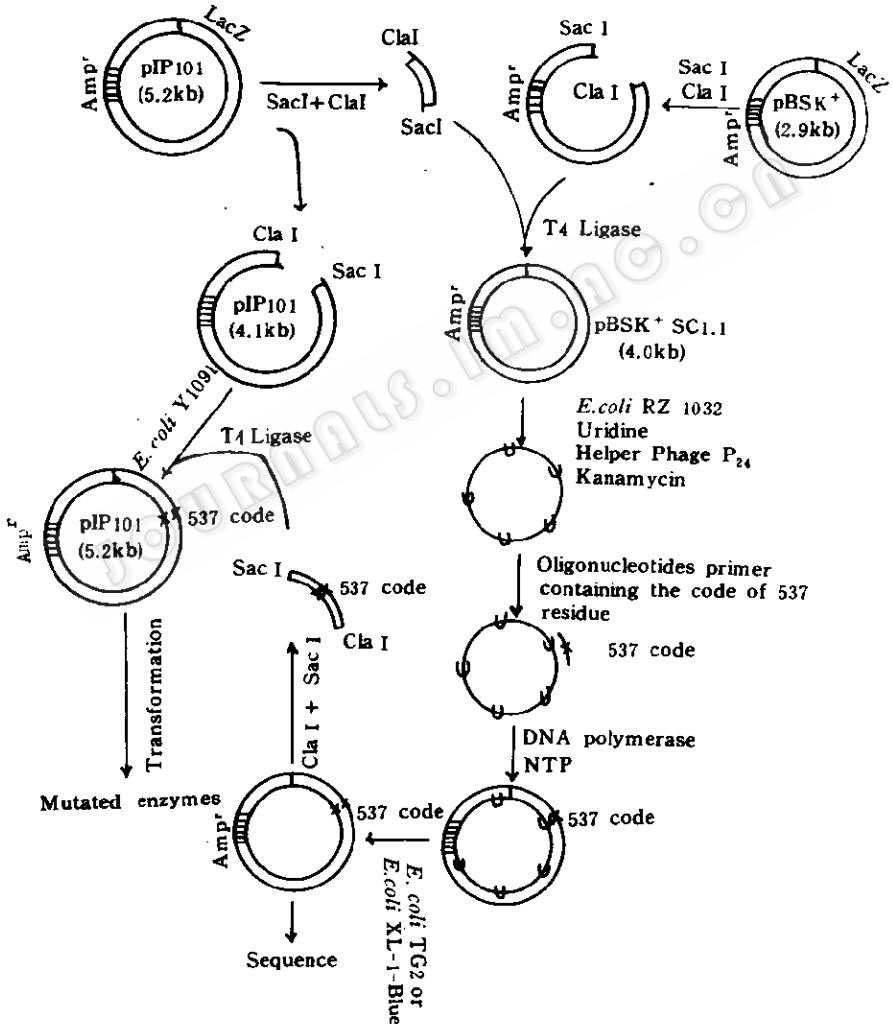


图 1 大肠杆菌 β -D-半乳糖苷酶基因定位突变战略

Fig. 1 The strategy of site-directed mutagenesis on Lac Z gene coding β -D-galactosidase in *E. coli*

2.2 酶的纯度及分子量

大肠杆菌 β -D-半乳糖苷酶是一种胞内酶,破壁后按方法(1.5)分离纯化,纯度达 95% 以上。

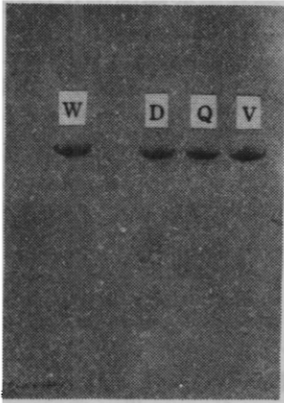


图 2 突变酶的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoresis of purified mutated β -D-galactosidase

实验条件均按 Pharmacia 公司 Phastsystem 电泳说明书。

The experimental conditions were used according to the instruction of Phastsystem electrophoresis supplied by Pharmacia LKB Biotechnology Corp.

W:天然酶 Native enzyme; D: Asp-537(E-Asp-537)

Q: Gln-537(E-Gln-537); V: Val-537(E-Val-537).

图 2 是 FPLC 纯化后的酶。Phast-Gel SDS-PAGE 表明,突变酶和天然酶的迁移率相同,即分子量和分子形式相同,是由四聚体组成的活性酶分子。

2.3 基本动力学参数

表 1 列出了天然酶和三个突变酶的基本动力学参数。突变酶的 k_{cat} 值明显小于天然酶。若以 oNPG 为底物,相应为 0.13% (Asp-537)、0.0006% (Gln-537) 和 0.0035% (Val-537)。以 pNPG 为底物,相应为 0.12%、0.004% 和 0.002%。但它们的 K_m 值变化不大。除 Asp-537 酶的 K_m 较大外,其它突变酶无论以 oNPG 还是 pNPG 为底物,均相差无几。

2.4 抑制剂的影响

从表 1 和图 3 还可以看出,底物类似物 IPTG 是天然酶和突变酶的强烈抑制剂,而过

表 1 天然和突变 β -D-半乳糖苷酶的动力学性质

Table 1 The kinetic properties of native and mutated-D-galactosidase

动力学参数 Kinetic parameters	天然酶 Native enzyme	突变酶 Mutated enzymes		
		Asp-537	Gln-537	Val-537
k_{cat} (ONPG, s^{-1})	480.000	0.630	0.003	0.017
K_m (ONPG, mmol/L)	0.120	0.420	0.142	0.120
k_{cat}/K_m (mol/L, s^{-1})	4000.00	1.500	0.021	0.140
k_{cat} (PNPG, s^{-1})	120.000	0.120	0.0004	0.0019
K_m (PNPG, mmol/L)	0.039	0.370	0.050	0.076
k_{cat}/K_m (mol/L, s^{-1})	3080.00	0.320	0.008	0.025
K_i (IPTG, mmol/L)	0.110	0.304	0.120	0.056
K_i (NH ₂ -Gal, mmol/L)	1.350	0.610	0.412	0.674
K_i (L-Ribose, mmol/L)	0.210	0.502	0.510	0.436

渡态中间物 2-脱氧-2-氨基-半乳糖(具有一个正电荷)和 L-核糖(具有五元环平面结构),对突变酶抑制效率大致相同。

2.5 活化剂的影响

叠氮钠是一个亲核试剂,可提供一个负电荷,因此可提高突变酶的催化活性。在叠氮钠浓度相同时,其激活程度相应为 Asp-537>Gln-537>Val-537。使突变酶活力提高一倍所需叠氮钠浓度分别为 Asp-537 100mmol/L、Gln-537 200mmol/L 和 Val-537 400mmol/L。

2.6 甲醇成酯反应

在甲醇存在下, β -D-半乳糖苷酶可催化半乳糖甲酯化。其产物类似于过渡态中间物,因此甲醇可提高酶的活性。表 2 说明,甲醇对突变酶的活化作用小于对天然酶的活化作用。在相同甲醇浓度时,Asp-537 酶的活化程度最小,这可能同酯化作用距离有关。

表 2 甲醇对天然和突变 β -D-半乳糖苷酶活性的影响

Table 2 The effect of methanol on the enzymatic activity of the native and mutated β -D-galactosidase

甲 醇 Methanol(mmol/L)	β -D-galactosidase*			
	Native	Asp-537	Gln-537	Val-537
0	100	100	100	100
200	132	104	126	120
400	168	110	138	137
600	178	123	148	143

* 测定系统中用酶量如下:

The amounts of enzymes in the reaction systems(1.0 ml)are as follows: Native 0.03 μ g; Asp-537 70 μ g; Gln-537 150 μ g; Val-537 150 μ g.

2.7 突变酶的热稳定性

图 4 表明了突变酶的热稳定性。Glu-537 位残基的改变使酶更趋于不稳定。其热稳定性为天然酶>E-Asp-537>E-Gln-537>E-Val-537。说明酶经突变后,局部构象可能发生了改变,从而导致不稳定。特别是 Val 代替 Gln 后,引入了一个庞大的疏水基,构象变形较大,因而最不稳定。

3 讨论

Gebler 等最近报道^[10],当 2,4-二硝基酚-2-脱氧-2-氟- β -D-半乳糖作为 β -D-半乳糖苷酶底物时,2-脱氧-2-氟- β -D-半乳糖可共价结合于 Glu-537 残基。因此,他们认为 Glu-537 的 γ -COOH 在 β -D-半乳糖苷酶催化过程中起亲核剂的作用。我们用 DNA 定位突变技术,用 Asp、Gln 和 Val 替代 β -D-半乳糖苷酶的 Glu-537 残基的结果表明:同天然酶相比,突变酶的催化活性显著降低,但 K_m 值或多或少处于同一水平。说明 Glu-537 残基并不严重影响底物的结合且同 Glu-461 突变酶性质略有差异^[9]。因此可以认为 Glu-461 残基可能

同底物结合有关,而 Glu-537 残基只协调酶与底物中间络合物的形成。也就是 Glu-537 残基是该酶的必需基团,但并不是底物结合位点。

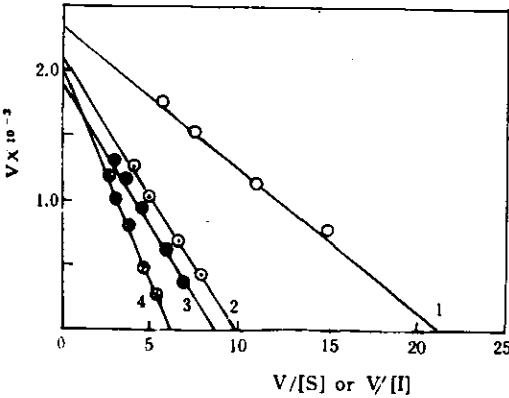


图3 Val-537 突变酶的抑制作用

Fig. 3 Hofstee plots of the inhibition of Val-537 β -D-galactosidase
各抑制剂浓度如下:

The concentration of inhibitors is as follows:

1. No any inhibitors; 2. 0.85 mmol/L
- 2-NH₂-galactose; 3. 0.63 mmol/L
- L-Ribose; 4. 0.13 mmol/L IPTG.

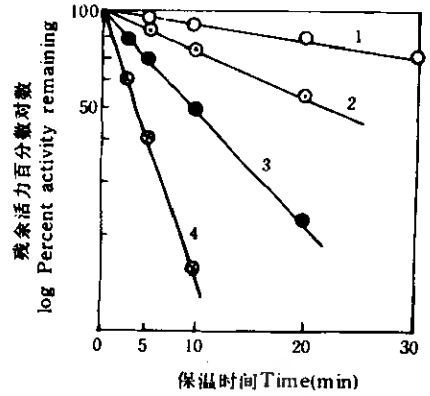


图4 突变酶的热稳定性

Fig. 4 The thermal stability of mutated β -D-galactosidase 酶在 0.02mmol/L, pH7.0 缓冲液中, 52 $^{\circ}$ C 保温不同时间, 取定量酶于常规反应系统中测定酶活力。

The enzymes were incubated at 52 $^{\circ}$ C in 0.02 mmol/L, pH7.0 TES Buffer. Then an amount of enzyme was taken to measure its activity at different time.

1. Native enzyme 0.50mg/ml; 2. Asp-537 enzyme 0.45mg/L; 3. Gln-537 enzyme 0.48mg/L; 4. Val-537 enzyme 0.43mg/L.

Glu-537 残基的替代导致酶活力降低,表明 Glu-537 的 γ -COOH 是一个可解离基团,它提供一个对酶催化必需的负电荷。被 Asp 替代之后, β -COOH 的解离虽也能提供一个负电荷环境,但协调作用的有效距离缩短了。Gln 虽类同 Glu,但酰胺基可能不解离,而 Val 由于庞大的疏水侧链造成一定空间位阻,因此后二者残余活力远小于 Asp 替代酶。三个突变酶的 k_{cat}/K_m 是 Asp-537 > Val-537 > Gln-537,这可能表明,Val 的疏水侧链同底物 ONPG 具有某种疏水作用力。而热稳定性表明突变酶的局部构象可能有较大变化,因此更趋于不稳定。

抑制作用与活化作用同样表明,底物类似物是酶的强烈抑制剂,而过渡态中间物或产物类似物的抑制效率较低。EDTA 失活表明 Glu-537 的 γ -COOH 可能同 Mg^{2+} 配位有关。活化剂叠氮钠虽能活化突变酶,但活化效率低于 Glu-461 突变酶。甲醇的成酯反应也因不同替代基而异。

综上所述,Glu-537 残基是 β -D-半乳糖苷酶的必需基团之一,在催化过程中提供一个游离羧基,起协调底物络合的作用。

致谢 本文部分工作在加拿大 Calgary 大学生化系 Dr. Huber 实验室进行,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Willian V S. *Biochem J*, 1987, **246**:1—17.
 [2] Wagner C R, Benkovic S J. *TIBTech*, 1990, **8**: 263—270.
 [3] Gewely E L *et al.* *Protein Eng Pro Int Symp*, 1990, **4**: 214.
 [4] Fowler A *et al.* *J Biol Chem*, 1978, **253**: 5521.
 [5] Kalnins A *et al.* *EMBO*, 1983, **2**: 593—597.
 [6] Bader D E *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, **153**: 301—306.
 [7] 许根俊. 酶作用原理, 北京: 科学出版社, 1983, 108.
 [8] Huber R E *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1990, **283**: 342—350.
 [9] Cupples C G, Huber R E. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 5512—5518.
 [10] Gebler J C *et al.* *J Biol Chem*, 1992, **267**: 11126—11130.
 [11] Sambrook J *et al.* *Mol Cloning, A Lab Manual*, Cold Spring Harbor lab Press, 1990. 1: 25.
 [12] Huber R E *et al.* *Can J Biochem*, 1982, **60**: 608—612.

SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF LAC Z GENE IN ESCHERICHIA COLI AND THE KINETIC PROPERTIES OF THE MUTATED ENZYMES

Chu Xining Bai Yuming Yuan Jingming

(Department of Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract Glutamic acid at position of 537 of β -D-galactosidase coded by Lac Z gene was substituted with Aspartic acid, Glutamine and Valine using synthetic oligonucleotide probes. Compared to native enzyme, the k_{cat} values for substrate ONPG were 0.13%, 0.0006% and 0.0035% for Asp-537, Gln-537 and Val-537 mutated enzymes respectively. The K_m values were of the same order of magnitude, either native or mutated enzymes. The substrate analog, IPTG was a strong inhibitor of each of the substituted enzymes, as in the case of native enzyme. The transition state analogs, 2-NH₂-galactose and L-ribose were almost the same effects for the mutated enzymes as for the normal enzyme. The nucleophili, Azide, did not activate the mutated enzymes as in the case of Glu-461 substituted in β -D-galactosidase. The effect of methanol on the mutated enzymes was less than on native enzyme. The order of the thermal stability was native enzyme > Asp-537 > Gln-537 > Val-537 enzymes. Overall, the evidence strongly supports the suggestion that Glu-537 is an essential residue of β -D-galactosidase.

Key words *Escherichia coli*, β -D-galactosidase, Site-directed mutagenesis, Kinetic properties