

## 嗜甲基菌 DM11 菌株二氯甲烷脱卤素 酶基因的定点诱变\*

蔡宝立 Vuilleumier S\*\* Wackett L P\*\*\*

(南开大学分子生物学研究所 天津 300071)

**摘要** 为了研究嗜甲基菌 (*Methylophilus*)DM11 菌株二氯甲烷脱卤素酶的不同氨基酸残基在底物结合、谷胱甘肽 (GSH) 亲和以及催化活力中的作用, 对编码该酶的基因进行了定点诱变研究。将保守的 103 位色氨酸 (W) 分别用苯丙氨酸 (F)、缬氨酸 (V) 或天冬酰胺 (N) 替换, 109 位精氨酸 (R) 用亮氨酸 (L) 替换, 117 位色氨酸用酪氨酸 (Y) 或苯丙氨酸替换, 得到 6 种突变酶。其中 3 种突变酶具有较低的活力, 另外 3 种突变酶没有活力。突变酶 W117Y 的性质与野生型酶明显不同。

**关键词** 嗜甲基菌, 二氯甲烷脱卤素酶, 定点诱变, 突变酶

**分类号** Q933

二氯甲烷 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 是一种主要的卤代烷污染物。由于它是一种致癌剂以及在水中具有高溶解度 (大于 1%, W/V), 故受到广泛重视。某些嗜甲基细菌能把二氯甲烷转化成可被细菌正常代谢途径代谢的甲醛和无机氯。催化这一反应的二氯甲烷脱卤素酶, 与哺乳动物的一类叫做谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 的解毒酶具有类似性, 它们的氨基酸序列同源性为 14%~29%, 催化反应都需要 GSH 作为辅因子参加。二氯甲烷脱卤素酶属于  $\theta$  类谷胱甘肽转移酶。关于  $\alpha$ 、 $\mu$  和  $\pi$  类 GST 的结构与功能研究已有大量报道, 而  $\theta$  类 GST 的这方面研究则刚刚开始。嗜甲基菌 (*Methylophilus*)DM11 菌株 (以前误称 *Pseudomonas*) 的二氯甲烷脱卤素酶基因 *dcmA* 已被克隆到 *E. coli* 中, 核苷酸序列也已测定, 这为该基因的分子生物学研究提供了方便<sup>[1,2]</sup>。为了阐明酶分子的不同氨基酸残基在底物结合、GSH 亲和以及催化活力中的作用, 我们进行了 DM11 菌株二氯甲烷脱卤素酶基因的定点诱变研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和培养条件

表 1 中菌株均在 28℃ 震荡培养, 当培养物  $OD_{600}$  达到 1.0 时加入 IPTG (0.1 mmol/L) 诱导基因表达, 然后继续培养 4.5h, 离心收集细胞, 用 50 mmol/L 的  $\text{Tris-H}_2\text{SO}_4$  (pH 7.5) 缓冲液洗一次。贮存于 -20℃ 备用。

\* 国家自然科学基金和天津市自然科学基金资助项目。

\*\* Mikrobiologisches Institut, ETH-Zentrum, CH-8092 Zürich, Switzerland

\*\*\* Department of biochemistry, University of Minnesota, MN 55108, USA

收稿日期: 1997-04-02

表1 菌株和培养基

Table 1 Strains and media

菌株 Strains	<i>dcmA</i> 基因 <i>dcmA</i>	培养基 Media	来源 Source
<i>E. coli</i> DH 5 $\alpha$ (pME1623)	Wild-type	LB <sup>[4]</sup>	[3]
<i>E. coli</i> DH 5 $\alpha$ (W103F)	Mutant	M9 <sup>[4]</sup>	This study
<i>E. coli</i> DH 5 $\alpha$ (W103V)	Mutant	M9	This study
<i>E. coli</i> DH 5 $\alpha$ (W103N)	Mutant	M9	This study
<i>E. coli</i> DH 5 $\alpha$ (R109L)	Mutant	M9	This study
<i>E. coli</i> DH 5 $\alpha$ (W117F)	Mutant	LB	This study
<i>E. coli</i> DH 5 $\alpha$ (W117Y)	Mutant	LB	This study

## 1.2 二氯甲烷脱卤素酶基因的定点诱变

*dcmA* 基因来自 *E. coli* DH 5 $\alpha$  (pME1623) 菌株, 定点诱变方法见文献 [4]。

## 1.3 二氯甲烷脱卤素酶的纯化

见文献 [5] 和 [6]。

## 1.4 蛋白质浓度测定

用 100 mmol / L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH8.2) 溶液将纯化的酶稀释 10 倍, 然后用离心超滤法浓缩到原来体积。重复操作一次。目的是最大限度地减少酶溶液中甘油和 DTT 对测定的干扰。用美国 Pierce 公司的试剂 (BCA<sup>\*</sup> Protein Assay Reagent) 和方法测定蛋白质浓度。标准蛋白为清蛋白 (2 mg / ml)。

## 1.5 酶动力学常数的测定

测定方法见文献 [7], 野生型二氯甲烷脱卤素酶每个反应 (500  $\mu\text{l}$ ) 用 4  $\mu\text{g}$ , 突变型酶用 80  $\mu\text{g}$ 。

## 1.6 抗血清的制备

从 *E. coli* DH 5 $\alpha$  (pME1623) 菌株中纯化二氯甲烷脱卤素酶, 免疫雄性白兔, 按文献 [8] 的方法制备抗血清。

## 1.7 二氯甲烷脱卤素酶的免疫吸印 (Western blotting)

先将酶的电泳带从聚丙烯酰胺凝胶中转移到硝酸纤维素膜上, 然后与第一抗体 (DM11 菌株二氯甲烷脱卤素酶的抗血清) 和第二抗体 (羊抗兔 IgG 碱性磷酸结合体) 反应, 经显影后含有野生型和突变型二氯甲烷脱卤素酶的位置出现黑色谱带。

# 2 结果与讨论

## 2.1 二氯甲烷脱卤素酶基因的定点诱变

经过定点诱变, 共得到 6 个发生一个氨基酸替换的突变菌株 (表 1)。从突变株 W103F、W103V、W103N、R109L 和 W117Y 中都能分离并纯化出突变的二氯甲烷脱卤素酶, 这些酶蛋白都能与野生型酶的抗血清发生免疫学反应 (图 1, W117Y 未进行此项实验)。但是, 只有 W103F 和 W117Y 具有活力, 前者的比活力是野生型酶的 1.2%, 后者的比活力是野生型酶的 2.4% (表 2)。突变酶 W103V、W103N 和 R109L 没有活力。R109L 的分子量变小, 大约是 13 kD, 这是由于 109 位点的突变导致转录或翻译在此位点中断, 因而产生缩短的肽链。突变菌株 W117F 的蛋白粗提物具有低水平的二氯甲烷脱卤素酶活力, 但

突变酶不能被 Mono Q 柱吸附,所以没有得到纯化酶。突变菌株 W103F、W103V、W103N 和 R109L 必须用 M9 培养基培养才能得到突变酶,而突变菌株 W117Y 和 W117F 用 LB 培养基培养也能得到突变酶。这些结果说明,保守的 W103、R109 和 W117 位点对酶的功能具有非常重要的作用。如果这些位点发生改变,将使酶的性质发生重要变化。而且,同一位点用不同的氨基酸替换,会产生不同的效应。

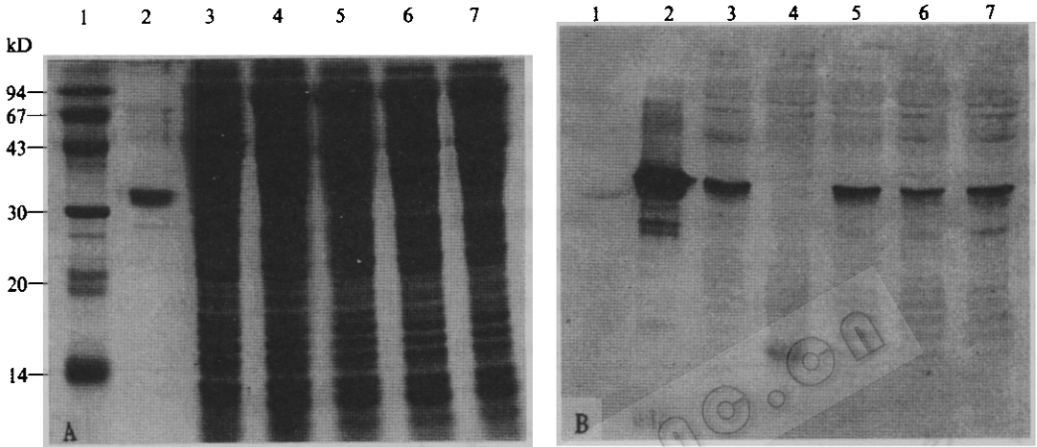


图1 二氯甲烷脱卤素酶突变菌株蛋白粗提物的 SDS-PAGE 电泳(A)和免疫吸印(B)

1. 分子量标准; 2. 纯化的野生型酶; 3. 野生型酶粗提物; 4. R109L粗提物;  
5. W103F粗提物; 6. W103V粗提物; 7. W103N粗提物。

Fig.1 SDS-PAGE(A) and the corresponding immunoblot (B) of crude extract of the dichloromethane dehalogenase mutant strains

1. MW standard; 2. Purified wild-type enzyme; 3. Crude extract of wild-type enzyme; 4. Crude extract of R109L; 5. Crude extract of W103F; 6. Crude extract of W103V; 7. Crude extract of W103N.

## 2.2 突变酶 W103F、W117Y 和野生型酶的性质比较

2.2.1 酶动力学性质的比较 DM11 菌株的二氯甲烷脱卤素酶和它的突变酶 W103F 和 W117Y, 都能催化二卤甲烷进行脱卤素反应, 其动力学性质见表 2。从表 2 可以看出, 突变酶 W103F 和 W117Y 的比活力大大低于野生型酶, 但是 W117Y 的动力学性质发生很大改

表2 野生型和突变型二氯甲烷脱卤素酶的动力学性质比较

Table 2 Comparison of kinetic properties between wild-type and mutant dichloromethane dehalogenases

底物	$K_m$ ( $\mu\text{mol/L}$ )			比活力 ( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )		
				Specific activity		
Substrate	DM11*	W103F	W117Y	DM11*	W103F	W117Y
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	67	34	400	4668	56	112
$\text{CH}_2\text{Br}_2$	20	ND	338	7398	85	980
$\text{CH}_2\text{I}_2$	55	ND	521	4728	54	436
$\text{CH}_2\text{ClBr}$	7	ND	430	3366	57	914
$\text{CH}_2\text{ClI}$	9	ND	180	3618	55	804

\* Wild-type enzyme, previously published data<sup>[7]</sup>

ND: Not determined

变,一是  $K_m$  值明显增高,二是对 5 种底物的比活力之比明显不同于野生型酶。野生型酶以表 2 所列 5 种底物(按自上而下的顺序)进行催化反应时,其比活力比值是 1.0:1.6:1.0:0.7:0.8,突变酶 W117Y 是 1.0:6.0:2.5:6.6:5.7。突变酶 W103F 与野生型酶基本相同,比值为 1.0:1.5:1.0:1.0:1.0。这一结果表明,W117 位点很可能位于酶的活性中心,与底物  $CH_2Cl_2$  的结合有关,因此通过定点诱变技术改变酶的底物范围和提高对某些底物的降解能力是完全可能的。

**2.2.2 热稳定性的比较:**从图 2 可见,突变酶 W103F 在 45℃ 的稳定性明显低于野生型酶。突变酶 W117Y 的热稳定性比野生型酶好,在 45℃ 保温 5min,野生型酶剩余活力为 38%,W117Y 剩余活力为 54%,这表明用定点诱变技术增加二氯甲烷脱卤素酶的热稳定性是可能的。

**2.2.3 最适 pH 的比较:**从图 3 可见,突变酶 W103F 的 pH 适应范围比野生型酶窄,而 W117Y 的 pH 适应范围比野生型酶宽。野生型酶、W103F 和 W117Y 的最低失活 pH 都是 6.5,而它们的最高失活 pH 分别是 11.0、10.5 和 11.5,最适 pH 值分别是 10.0、8.7 和 11.0。

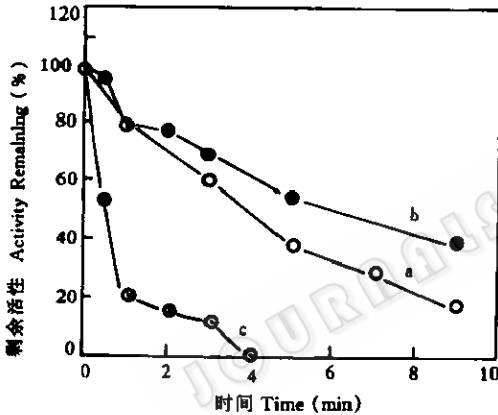


图 2 野生型和突变型二氯甲烷脱卤素酶在 45℃ 的失活

a. 野生型酶; b. W117Y; c. W103F.

Fig.2 Inactivation of wild-type and mutant dichloromethane dehalogenases at 45°C

a. Wild-type enzyme; b. W117Y; c. W103F.

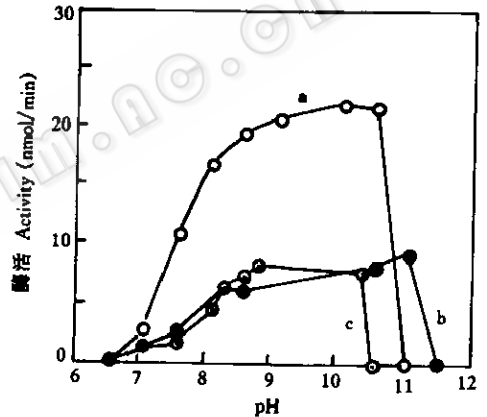


图 3 野生型和突变型二氯甲烷脱卤素酶的最适 pH

a. 野生型酶; b. W117Y; c. W103F.

Fig.3 pH optimum of wild-type and mutant dichloromethane dehalogenases

a. Wild-type enzyme; b. W117Y; c. W103F.

## 参 考 文 献

- [1] Leisinger T, Bader R, Herman R *et al.* *Biodegradation*, 1994, 5: 237~248.
- [2] Dirr H, Reinemer P, Huber R. *Eur J Biochem*, 1994, 220: 645~661.
- [3] Bader R, Leisinger T. *J Bacteriol*, 1994, 176: 3466~3473.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] Scholtz R, Wackett L P, Egli C *et al.* *J Bacteriol*, 1988, 170: 5698~5704.
- [6] 蔡宝立, Wackett L P. *微生物学报*, 1991, 31: 321~324.

- [7] 王淑芳, 蔡宝立. 南开大学学报(自然科学), 1994, 27: 56~61.
- [8] Harlow E, Lane D. *Antibodies, A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

## SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF THE DICHLOROMETHANE DEHALOGENASE GENE FROM *METHYLOPHILUS* SP. STRAIN DM11

Cai Baoli

(*Institute of Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071*)

Vuilleumier S

(*Mikrobiologisches Institut, ETH-Zentrum, CH-8092 Zürich, Switzerland*)

Wackett L P

(*Department of Biochemistry, University of Minnesota, MN 55108, USA*)

**Abstract** In order to investigate the role of different residues of *Methylophilus* sp. strain DM11 dichloromethane dehalogenase for substrate binding, glutathione affinity, and catalytic activity, site-directed mutagenesis studies of the gene encoding the enzyme were carried out. The conserved tryptophane residue at 103 region was respectively substituted by phenylalanine, valine or asparagine. The conserved arginine residue at 109 region was substituted by leucine. The conserved tryptophane residue at 117 region was respectively substituted by tyrosine or phenylalanine. Six mutant enzymes were produced. Among them three possess lower activities, other three do not possess activity. The properties of the mutant enzyme W117Y are very different from wild-type enzyme.

**Key words** *Methylophilus* sp., Dichloromethane dehalogenase, Site-directed mutagenesis, Mutant enzyme