

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54 (6) :663 - 669; 4 June 2014

ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.06.009

## 北京棒杆菌天冬氨酸激酶突变体 R169H 的构建及酶学性质表征

李慧颖, 朱运明, 闵伟红\*, 詹冬玲, 任军

吉林农业大学食品科学与工程学院, 小麦和玉米深加工国家工程实验室, 吉林 长春 130118

**摘要:**【目的】提高北京棒杆菌 (*Corynebacterium pекinense*) 中天冬氨酸激酶 (aspartokinase, AK) 活力。【方法】利用定点突变技术对 AK 基因进行突变, 并将突变体转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 中异源表达。重组菌经超声破碎后、利用镍柱对 AK 进行纯化, 并经 SDS-PAGE 和 Western blot 验证。通过检测酶活力比较突变体和野生型动力学变化并研究突变体和野生型的部分酶学性质。【结果】成功构建突变体 R169H。经验证知, AK 分子量为 48kDa。突变体 R169H 的  $V_{\max}$  为  $226.3 \text{ U/mg}\cdot\text{s}^{-1}$ , 较野生型提高 2.3 倍。最适反应温度为 26℃, 与野生型经验值相同; 最适反应 pH 为 9.0, 较野生型经验值 8.0 有所提高; 在最适温度和 pH 值下的半衰期为 5.5 h, 比野生型的 4h 稳定性要好; 代谢产物赖氨酸、苏氨酸和蛋氨酸在低浓度时对 AK 均具有激活作用。【结论】突变体中 R169 与 E92 间氢键消失, 能够影响亚基间聚合度, 降低酶对底物的亲和力, 减弱代谢产物对 AK 的反馈抑制作用, 从而使 R169H 中 AK 的  $V_{\max}$  提高 2.3 倍。

**关键词:** 北京棒杆菌, 天冬氨酸激酶, 突变, 酶学性质

**中图分类号:** Q816 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 06-0663-07

天冬氨酸族氨基酸 (赖氨酸、苏氨酸、蛋氨酸等) 是人和动物的必需氨基酸<sup>[1-2]</sup>, 由微生物利用前体物质——天冬氨酸, 经一系列代谢途径合成<sup>[3-4]</sup>。天冬氨酸激酶 (aspartokinase, AK) 是催化该途径的第一个关键酶, 它利用 ATP 将天冬氨酸磷酸化成天冬氨酰-P, 指导碳在代谢中的流通<sup>[5-6]</sup>。在不同的有机体中, AK 具有不同存在形式和抑制机制。在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中, 已知存在 3 种形式 AK, 分别是 AKI-HDI、AKII-HDII 和 AKIII<sup>[7]</sup>。其中 AKI-HDI 是一种双功能酶, 同时具有天冬氨酸激酶

活性和高丝氨酸脱氢酶活性, 并受到苏氨酸抑制; AKII-HDII 也是一种双功能酶, 但不受任何天冬氨酸族氨基酸抑制; AKIII 只有天冬氨酸激酶活性, 并受赖氨酸抑制<sup>[8]</sup>。在谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 中, 只存在一种形式 AK, 其活性受到 L-苏氨酸和 L-赖氨酸协同抑制<sup>[9]</sup>。

谷氨酸棒杆菌是一种革兰氏阳性菌, 常被用于赖氨酸等的工业生产<sup>[10]</sup>。该菌中 AK 是一种  $\alpha_2\beta_2$  型四聚体结构, 含有 2 个  $\alpha$  亚基和 2 个  $\beta$  亚基 (图 1)。其中  $\alpha$  亚基的 N-末端为催化区域, 其 C-末端

基金项目: 吉林省自然科学基金 (20130101139JC); 国家科技支撑项目 (2012BAD37B05)

\* 通信作者。Tel: +86-13944919697; E-mail: minwh2000@163.com

作者简介: 李慧颖 (1986 -), 女, 山东人, 硕士研究生, 研究方向为发酵微生物的选育与代谢调控。E-mail: gillian1314li@163.com

收稿日期: 2013-10-08; 修回日期: 2013-12-25

和  $\beta$  亚基共同作为调节区域,而在  $\beta$  亚基中,C-末端具有一个额外的  $\beta$  串( $\beta 9$ )。当 AK 受到苏氨酸和赖氨酸同时作用时,其晶体结构形成一种封闭构象。在这种封闭构象中  $\beta 9$  变成一种无序组织,但其空余位置被来自  $\alpha$  亚基催化区域的另外  $\beta$  串( $\beta 5$ ,其 C-末端存在 Arg151、Gly152 和 Ser154)代

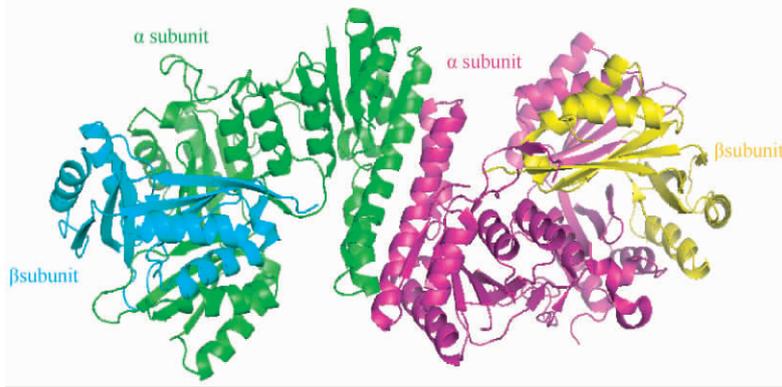


图 1. 谷氨酸棒杆菌中 AK 的  $\alpha_2\beta_2$  型晶体结构图(3aaw, PDB) [11]

Figure 1. The crystal structure of  $\alpha_2\beta_2$  AK in *Corynebacterium glutamicum* (3aaw, PDB) [11].

来源于北京棒杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) 的 AK 与谷氨酸棒杆菌 AK 的序列同源性高达 98% [12]。以 3aaw (谷氨酸棒杆菌 AK) 为模板对北京棒杆菌的 AK 进行同源建模,发现 151R 和 74E 在北京棒杆菌中分别对应于 169R 和 92E (图 2)。由图 2 知,169R 和 92E 位于  $\beta$  亚基和  $\alpha$  亚基的交界面上。因此,二者间的极性相互作用会在一定程度上影响亚基聚合度,进而可能会影响 AK 与底物和抑制剂的结合。综上所述,本研究对 169R 位点进

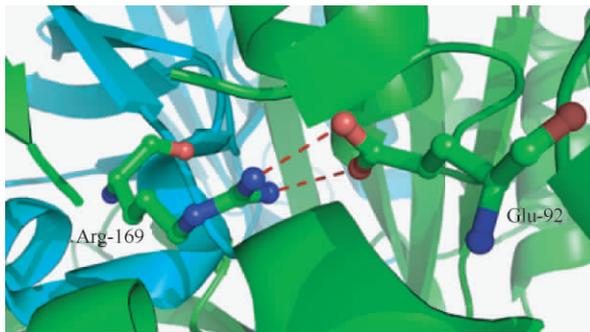


图 2. Arg169 和 Glu92 在亚基交界面上的极性相互作用

Figure 2. The polar contacts between Arg169 and Glu92 on the interface of  $\beta$  subunit and  $\alpha$  subunit. The red dotted lines stands for the polar contacts, the blue region stands for  $\beta$  subunit and the green region stands for  $\alpha$  subunit.

替。该变化引起了 Arg151 与 Glu74 (与底物天冬氨酸结合有关) 的相互作用,结果是形成了一种双配位基极性键。而在不受苏氨酸和赖氨酸同时作用的 AK 结构中未发现 Arg151-Glu74 相互作用 [11]。由此可推测,Arg151 的存在使苏氨酸和赖氨酸对  $\alpha_2\beta_2$  型 AK 的协同抑制作用成为现实。

行定点突变,探讨其对酶活力和别构作用的影响,为今后 AK 的结构研究及工业化应用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 重组质粒 pET-28a-AK 由本实验室提供 [12], 表达宿主大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 购自于 Novagen (USA)。

**1.1.2 培养基:** LB 培养基 [13], 本研究中除特殊说明外,所用 LB 培养基均含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 核酸、蛋白电泳 Maker、Taq 聚合酶及定点突变试剂盒,购于大连 TaKaRa 公司; Dpn I 酶,购于 Fermentas 中国公司; 异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG)、卡那霉素,购于 Genview 公司; 质粒抽提试剂盒,购于北京天泽恩公司; 非变性镍柱,购于 GEHealthcare Bio-Sciences AB 公司。PVDF 膜,购于 BIO-RAD 公司; HRP Mouse Anti-6xHis,购于 BD Biosciences 公司。DAB 显色试剂,购于 MAIXIN\_BIO 公司。UV1700 紫外-可见分光光度仪,日本岛津公司; Scientz-II D 超声波破碎仪,宁波新芝生物科技有限公司; Z36HK 高速冷冻离心,德国 HERMLE 公司; SE260 蛋白电泳仪,GE Healthcare Bio-Sciences AB 公司; DYY-6C 核酸电泳

仪,北京市六一仪器厂;AG PCR 仪, eppendorf 中国有限公司;CL-32L 高压蒸汽灭菌器,日本 ALP 公司;infinityM200 酶标仪,TECAN 公司;Trans-Blot SDCell 蛋白印迹转膜仪,BIO-RAD 公司。

## 1.2 突变

**1.2.1 引物:**用软件 Primer Premier 5 设计突变引物,并送上海生工生物工程有限公司合成。引物如下(下划线部分为突变位点):上游引物 5'-CAGAACCACCGTGACCCAACGTGGTGACATC-';下游引物 5'-CACGTTGGGTCACGTTGTTCTGACACCACTG-3'。

**1.2.2 全质粒 PCR 反应:**利用合成引物,以 pET-28a-AK 为模板,进行全质粒 PCR 反应。反应条件:94℃ 4 min;94℃ 1 min,56℃ 1 min,72℃ 10 min,循环 18 次;72℃ 20 min。PCR 产物用 *Dpn* I 酶消化除去模板,消化产物直接用于转化。

**1.2.3 构建突变体重组质粒 pET-28a-R169H:**取上述消化产物 2  $\mu$ L 加入 100  $\mu$ L 大肠杆菌 BL21 感受态细胞中,冰浴 20 min,42℃ 热击 90 s,冰浴 2 min 后加入 900  $\mu$ L LB 培养基(不含卡那霉素),37℃、165r/min 培养 1h。10012  $\times$  g 离心 1 min,弃上清 800  $\mu$ L,剩余 200  $\mu$ L 重悬菌体涂布于 LB 平板上,37℃ 培养过夜。将所得单菌落接种至 LB 液体培养基中活化并送上海生工生物工程有限公司测序。

## 1.3 AK 基因验证、诱导及粗酶液制备

**1.3.1 AK 基因验证、诱导:**以活化的菌液为模板,在克隆引物作用下进行 PCR 扩增。反应条件:94℃ 4 min;94℃ 40 s,58℃ 60 s,72℃ 90 s,循环 30 次;72℃ 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证。克隆引物如下(下划线部分为限制性酶切位点):上游引物 5'-GGAATTCATATGCCCCTGGTCGTACAGAA-3' (*Eco*RI 酶切位点);下游引物 5'-GGAATTCTTAGCGTCCGGTGCCTGCAT-3' (*Nde*I 酶切位点)。

**1.3.2 粗酶液制备:**突变成功后,再次活化菌液,并将活化后种子菌液按照 2% 接种量转移到 500 mL (含 250 mL 培养基)摇瓶中,IPTG (终浓度为 1 mmol/L) 诱导方法参考文献 [14]。诱导发酵 8 h 后,10020  $\times$  g、4℃、10 min 离心去上清液,收集菌体。AK 蛋白粗酶液制备方法参考文献 [14]。

## 1.4 纯化、SDS-PAGE 和 Western blot

用非变性镍柱对粗酶液进行纯化。纯化方法、

SDS-PAGE 以及 Western blot 实施方法及步骤参考文献 [14]。

## 1.5 活力测定及动力学分析

**1.5.1 活力测定:**利用纯化 AK 酶液进行活力测定,反应体系及活力测定方法参考文献 [14]。反应速率  $V$  定义为单位时间 (1 s) 内单位质量 (1 mg) 酶的催化能力,单位表示为  $U/mg \cdot s^{-1}$ 。其中,纯化后 AK 蛋白含量用考马斯亮蓝法测定。

**1.5.2 动力学分析:**分析方法是在其它试剂和条件不变的前提下,将底物 L-天冬氨酸的浓度从 1 mmol/L 依次增加到 10 mmol/L (间隔为 1),并分别测定活力 (每个浓度均做 3 个平行) 后用软件 Origin75 作图。

## 1.6 酶学性质研究

**1.6.1 最适反应温度:**试验中,分别将酶活力检测的混合反应体系置于不同温度 (15℃、20℃、25℃、26℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃) 下反应,其它条件不变。每组样品检测 3 个平行。

**1.6.2 最适反应 pH:**试验中,分别将反应体系中 Tris-HCl 缓冲液调节至不同 pH (6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0) 值,其它条件不变。每组样品检测 3 个平行。

**1.6.3 稳定性:**AK 在最适温度和 pH 下的稳定性试验是将 AK 纯化后酶液与最适 pH 值的 Tris-HCl 缓冲液按活力检测反应体系中的比例混合,置于最适温度下 10 h,每 1 小时检测酶活力,每组样品检测 3 个平行。

**1.6.4 抑制剂:**底物抑制剂对 AK 的影响试验中,选择常见 AK 抑制剂赖氨酸、苏氨酸和蛋氨酸做检测对象,同时还研究了这 3 种抑制剂两两组合和 3 种组合对 AK 的影响。每组检测都是在 0.2、1.5、10 mmol/L 这 4 种浓度下进行,每组样品检测 3 个平行。

## 2 结果和讨论

### 2.1 重组菌株的构建

测序结果显示,AK 氨基酸序列中 169 位点由野生型 Arg 突变成 His,即表明突变体 R169H 构建成功。将突变体重组质粒 pET-28a-R169H 转化到大肠杆菌中,挑单克隆培养,提质粒,对其进行双酶切和核酸电泳检测。结果显示,在分子量为 1000 bp

和 2000 bp 间存在目的单带,这与 AK 基因分子量 1453 bp 相符,表明突变菌株构建成功。

## 2.2 AK 纯化及验证

纯化后 AK 酶液经 SDS-PAGE 及 Western blot 验证结果如图 3 所示。野生型粗酶液、野生型纯化液以及突变体纯化液在分子量为 48kDa 左右均存在目的带,表明 AK 基因在诱导剂作用下得到大量表达。但由 2、3 中可看出,2 中目的条带明显比 3 中目的条带粗,表明突变后 AK 基因的表达量较野生型低。原因可能是突变使正常的 AK 基因表达机制受到一定干扰,从而降低了 AK 合成量。

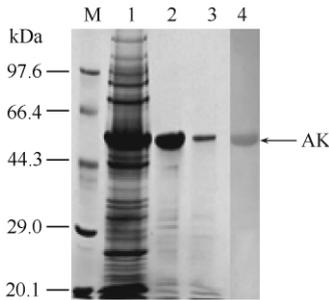


图 3. SDS-PAGE 验证结果

Figure 3. The result of SDS-PAGE. M stands for Marker; lane 1, the supernatant of WT; lane 2, the purified AK of WT; lane 3, the purified AK of R169H; lane 4, the result of Western blot.

## 2.3 突变体 R169H 动力学分析

对 AK 进行动力学分析,结果如图 4 所示,突变体 AK 的  $V_{max}$  为  $226.3 \text{ U/mg} \cdot \text{s}^{-1}$ ,这比野生型  $V_{max}$  ( $99.1 \text{ U/mg} \cdot \text{s}^{-1}$ ) 提高 2.3 倍;  $n$  值为 1.0,明显低于野生型,表明经突变后 AK 的正协同性降低;  $K_m$  值与野生型相比明显提高,表明突变体 AK 与底物亲和力降低。上述结果表明,169R 的改变打破了其与

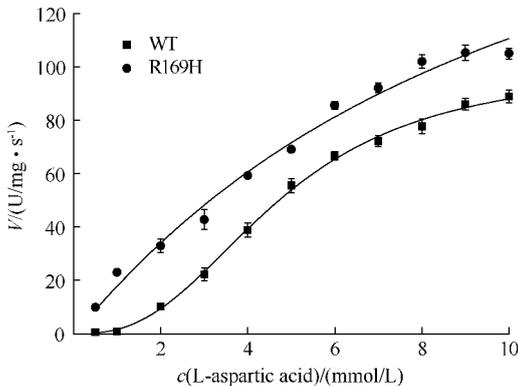


图 4. WT 和 R169H 动力学结果

Figure 4. Dynamics of WT and R169H.

92E 间的极性相互作用,进而使亚基间聚合度降低,使亚基结合更加松散。从而进一步影响了突变体 AK 的底物结合口袋,使底物亲和力降低,更有利于酶的催化。同时,也使抑制剂结合位点由致密组织变得松散,更加不利于抑制剂的结合。综合上述两种因素,突变体由别构酶变成米氏酶,并且  $V_{max}$  有所提高。

## 2.4 温度和 pH 对突变体 R169H AK 活力的影响

由图 5-A 可知,R169H 中 AK 最适反应温度为  $26^\circ\text{C}$ ,这与野生型经验值相比没有发生改变。当温度在  $15-26^\circ\text{C}$  范围内升高时,酶活力呈现较大升高趋势,当反应温度高于  $26^\circ\text{C}$  时,酶活力显著下降,温度升高至  $50^\circ\text{C}$  时,酶活力降低 90%。这表明 AK 耐高温能力较弱。图 5-B 表明,R169H 中 AK 最适反应 pH 为 9,与野生型相比更趋于碱性环境。当 pH 值在 6-9 间变化时,随 pH 值升高,AK 活力呈现增大趋势;当 pH 值大于 9 时,AK 活力急剧下降。

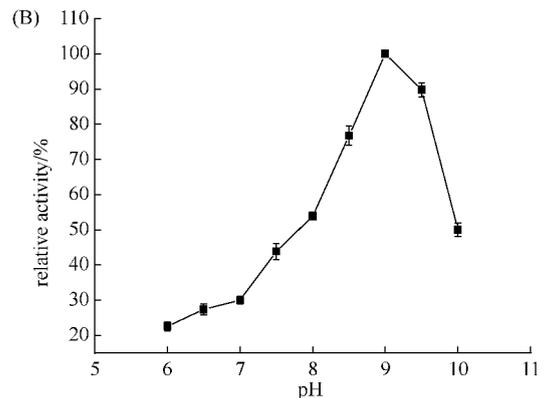
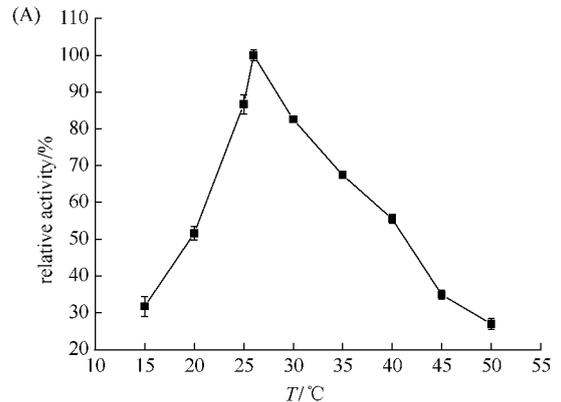


图 5. 不同温度 (A) 和 pH (B) 对 R169H AK 活力的影响

Figure 5. The effect of different temperature (A) and pH (B) on the activity of AK from R169H. A stands for the effect of different temperature; B stands for the effect of different pH.

## 2.5 最适温度和 pH 下的稳定性

由图 6 所示, 突变体 AK 在最适反应温度 26℃、最适反应 pH 9.0 条件下具有较好的稳定性, 其半衰期为 5.5 h; 上述结果表明, 突变并未对 AK 稳定性造成不良影响, 其性质依然较稳定, 并且较野生型经验值 4 h 相比还稍有提高。

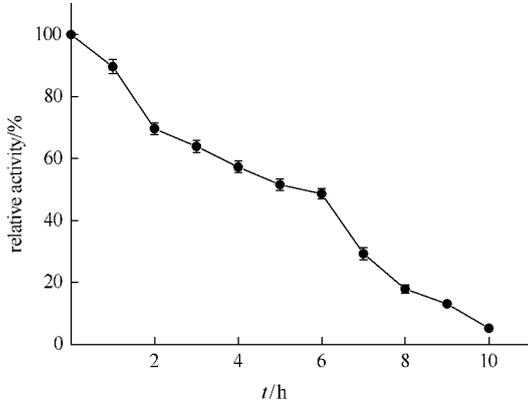


图 6. R169H 中 AK 在 26℃ 和 pH 为 9 时的稳定性

Figure 6. Stability of the activity of AK from R169H under 26℃ and pH9.

## 2.6 底物抑制剂对 R169H 中 AK 的影响

根据对  $\alpha_2\beta_2$  型 AK 晶体结构报道<sup>[15]</sup> 可知, 苏氨酸和赖氨酸对 AK 产生的协同抑制机制呈现两步式反应。第一步, 由苏氨酸结合引起的  $\alpha$  亚基调节区域和  $\beta$  亚基相互作用; 第二步, 由赖氨酸结合引起的与  $\beta 1$  作用的转变, 即由  $\beta 9$  ( $\beta$ ) 转变为  $\beta 5$  ( $\alpha$ )。进而诱导了 Arg169-Glu92 间的极性相互作用, 使得苏氨酸和赖氨酸的抑制作用得以实现。

由于蛋氨酸也是天冬氨酸族氨基酸代谢途径的产物, 因此本研究探讨了苏氨酸、赖氨酸以及蛋氨酸在单独存在和组合存在情况下对北京棒杆菌中 AK 的作用, 结果如表 1 所示。单独作用于突变体 AK 时, 低浓度 (0.2 mmol/L) 条件下均表现出对 AK 活力的激活作用, 其最大促进作用下的相对活力分别为  $142.9 \pm 1.1\%$ 、 $134.9 \pm 1.5\%$ 、 $180.9 \pm 1.8\%$ 。随着浓度的升高, 这种积极作用转变为抑制作用。而对于上述 3 种抑制剂两两组合试验, 低浓度下对 AK 激活作用依然存在, 在浓度为 0.2 mmol/L 时, 苏氨酸 + 赖氨酸、苏氨酸 + 蛋氨酸、蛋氨酸 + 赖氨酸的最大促进作用下的相对活力分别为  $123.8 \pm 1.3\%$ 、 $114.3 \pm 1.1\%$ 、 $166.7 \pm 1.2\%$ 。同样的, 这种积极作用随浓度升高转变成抑制 AK 活力的效应。但在苏氨酸 + 赖氨酸 + 蛋氨酸组合试验中, 尽管在低浓度

条件下依然表现出对 AK 的抑制作用。上述结果表明, 突变能在一定程度上解除抑制剂对 AK 的抑制作用, 并在低浓度时促进 AK 活力。

表 1. 底物抑制剂对 R169H AK 活力的影响

Table 1. The effect of inhibitors on the activity of AK from R169H

inhibitor	relative activity/%			
	0.2 mmol/L	1 mmol/L	5 mmol/L	10 mmol/L
control	100	100	100	100
thr	$142.9 \pm 1.1$	$109.5 \pm 0.8$	$95.2 \pm 1.0$	$90.5 \pm 1.1$
lys	$134.9 \pm 1.5$	$114.3 \pm 1.1$	$95.2 \pm 0.7$	$42.9 \pm 0.5$
met	$180.9 \pm 1.8$	$169.0 \pm 1.6$	$138.1 \pm 1.1$	ND
thr + lys	$123.8 \pm 1.3$	$61.9 \pm 0.6$	$28.6 \pm 0.5$	ND
thr + met	$114.3 \pm 1.1$	$76.2 \pm 0.5$	$61.9 \pm 0.3$	$14.3 \pm 0.2$
met + lys	$166.7 \pm 1.2$	$95.2 \pm 0.9$	$28.6 \pm 0.2$	ND
thr + lys + met	$90.5 \pm 0.9$	$66.7 \pm 0.7$	$33.3 \pm 0.4$	$14.3 \pm 0.4$

ND, the activity could not be determined.

## 3 讨论

本研究对北京棒杆菌中 AK 基因 169R 位点进行定点突变, 以达到解除与 92Glu 间的极性相互作用并提高酶活力的目的。运用软件 Primer Premier 5 设计突变引物, 以连接了北京棒杆菌中 AK 基因的重组质粒 pET-28a-AK 为模板进行突变, 并成功构建了突变体 R169H。对 R169H 中 AK 进行纯化和 10% SDS-PAGE 验证。结果表明, 突变体和野生型 AK 分子量均为 48kDa, 动力学结果显示, 突变体 AK  $V_{max}$  较野生型提高了 2.3 倍, 这表明突变确能使 AK 活力得到改善, 并且较正协同性降低, 更趋于米氏酶, 但与底物亲和力较野生型有所降低。

对 R169H 中 AK 的酶学性质研究表明, 突变体 AK 的最适反应温度和 pH 分别为 26℃ 和 9。在最适温度和 pH 下具有较好的稳定性, 半衰期为 5.5h。通过研究底物抑制剂对突变体 AK 活力的影响表明, 抑制剂苏氨酸、赖氨酸、蛋氨酸在低浓度时表现出对 AK 的激活效应, 这种积极作用在两两组合试验中的低浓度条件下依然存在。但在 3 种组合试验中各浓度下均表现出了抑制作用。这表明, 对 169R 突变能在一定程度上解除抑制剂对 AK 的抑制作用。

综上所述, 北京棒杆菌中 AK 基因能在大肠杆菌 BL21 宿主中得到较好表达, 对其重要位点 169R 的突变能够在不明显改变其性质的情况下改善酶活

力,并在一定程度上解除了苏氨酸、赖氨酸和蛋氨酸的抑制作用。因此,本研究为今后进一步探讨该基因在北京棒杆菌中的表达、活力及性质提供了重要的参考价值。同时,也为解除 AK 在北京棒杆菌中的反馈抑制作用,进而为优化天冬氨酸族氨基酸在棒杆菌中的代谢途径并达到高产目的提供了一定的理论依据。

## 参考文献

- [1] Kumar D, Gomes J. Methionine production by fermentation. *Biotechnology Advances*, 2005, 23 (1) : 41-61.
- [2] Yang Q, Yu K, Yan L, Li Y, Chen C, Li X. Structural view of the regulatory subunit of aspartate kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein & Cell*, 2011, 2 (9) : 745-754.
- [3] Mas-Droux C, Curien G, Robert-Genthon M, Laurencin M, Ferrer JL, Dumas R. A novel organization of ACT domains in allosteric enzymes revealed by the crystal structure of *Arabidopsis* aspartate kinase. *The Plant Cell Online*, 2006, 18 (7) : 1681-1692.
- [4] Nærdal I, Netzer R, Ellingsen TE, Brautaset T. Analysis and manipulation of aspartate pathway genes for L-lysine overproduction from methanol by *Bacillus methanolicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (17) : 6020-6026.
- [5] Wang X, Lopez-Valenzuela JA, Gibbon BC, Gakiere B, Galili G, Larkins BA. Characterization of monofunctional aspartate kinase genes in maize and their relationship with free amino acid content in the endosperm. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58 (10) : 2653-2660.
- [6] Yoshioka Y, Kurei S, Machida Y. Identification of a monofunctional aspartate kinase gene of *Arabidopsis thaliana* with spatially and temporally regulated expression. *Genes & Genetic Systems*, 2001, 76 (3) : 189-198.
- [7] Chen Z, Rappert S, Sun J, Zeng AP. Integrating molecular dynamics and co-evolutionary analysis for reliable target prediction and deregulation of the allosteric inhibition of aspartokinase for amino acid production. *Journal of Biotechnology*, 2011, 154 (4) : 248-254.
- [8] Dong X, Quinn PJ, Wang X. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of l-threonine. *Biotechnology Advances*, 2011, 29 (1) : 11-23.
- [9] Yoshida A, Tomita T, Kurihara T, Fushinobu S, Kuzuyama T, Nishiyama M. Structural Insight into Concerted Inhibition of  $\alpha 2\beta 2$ -Type Aspartate Kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 368 (2) : 521-536.
- [10] Becker J, Zelder O, Häfner S, Schröder H, Wittmann C. From zero to hero—Design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for l-lysine production. *Metabolic Engineering*, 2011, 13 (2) : 159-168.
- [11] Yoshida A, Tomita T, Kuzuyama T, Nishiyama M. Mechanism of concerted inhibition of  $\alpha 2\beta 2$ -type hetero-oligomeric aspartate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285 (35) : 27477-27486.
- [12] 汪一名. 北京棒杆菌突变株 E31 天冬氨酸激酶基因的克隆与表达分析. 吉林农业大学学位论文, 2011.
- [13] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999: 908.
- [14] 任军. 天冬氨酸激酶定点突变及酶学性质研究. 吉林农业大学学位论文, 2013
- [15] Dumas R, Cobessi D, Robin AY, Ferrer JL, Curien G. The many faces of aspartate kinases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012, 519 (2) : 186-193.

# Construction and characterization of R169H mutant of aspartokinase from *Corynebacterium pekinense*

Huiying Li, Yunming Zhu, Weihong Min<sup>\*</sup>, Dongling Zhan, Jun Ren

College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University; National Engineering Laboratory on Wheat and Corn Further Processing, Changchun 130118, Jilin Province, China

**Abstract:** [Objective] Increasing the activity of aspartokinase (AK) from *Corynebacterium pekinense*. [Methods] The gene of AK was constructed and mutated by site-specific mutagenesis. The mutational recombinant plasmid was heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21. The mutational AK was purified by Ni<sup>2+</sup>-NTA column after ultrasonication of the recombinant bacteria, and then identified by SDS-PAGE and Western blot. We compared the kinetic difference between R169H AK and WT AK by determining the enzymatic activities. Some other characteristics of R169H AK and WTAK were also studied. [Results] The mutant R169H was successfully constructed. The molecular weight of AK was 48kDa.  $V_{\max}$  of R169H AK was 226.3 U/mg·s<sup>-1</sup>, which was 2.3 times higher than that of WT AK. The optimum reaction temperature of R169H AK was 26°C, the same as that of WT AK. The optimum reaction pH of R169H AK was 9.0, slightly higher than that of WT AK. The half-life period of R169H AK under optimum temperature and pH were 5.5h, much higher than that of WT AK. Lysine, threonine and methionine had an active effect on the activity of R169H AK when they were in low concentration. [Conclusion] The hydrogen bond between R169 and E92 was broken down in R169H AK, which could affect the degree of polymerization and further lowered the affinity of mutant AK with substrates and then decreased the inhibition inducing by the metabolites. Thus, the  $V_{\max}$  of mutant AK from R169H had increased by 2.3 times compared with that of WT AK.

**Keywords:** *Corynebacterium pekinense*, aspartokinase, mutate, characterization

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Jilin Province (20130101139JC) and by the National Key Program for Technology Research and Development of China Plan Grant (2012BAD37B05)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel: +86-43944919697; E-mail: minwh2000@163.com

Received: 8 October 2013 / Revised: 25 December 2013