

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (8) :897 -904; 4 August 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.08.007

原玻璃蝇节杆菌 D-氨基酸氧化酶及突变体的酶学特性

冯利伟^{1#}, 郭姣洁^{2#}, 李辉欣¹, 徐书景¹, 鞠建松^{1*}, 赵宝华^{1*}

¹河北师范大学生命科学院, 河北 石家庄 050024

²石家庄科技信息职业学院, 河北 石家庄 052165

摘要: 【目的】研究原玻璃蝇节杆菌(DSM 20168)中 D-氨基酸氧化酶的酶学特性。【方法】通过 PCR 从原玻璃蝇节杆菌(DSM 15035, 20168)中克隆获得 D-氨基酸氧化酶基因 *apdaao-1* 和 *apdaao-2*, 构建原核表达载体, 以表达质粒 pET-ApDAAO-2 为模板, 采用 QuickChange Site-Directed Mutagenesis 技术构建定点突变体, 经过原核表达及纯化获得重组型和突变体酶蛋白, 分析其酶学特性。【结果】通过原核表达及纯化成功获得了 2 个重组蛋白和 4 个突变体酶蛋白, SDS-PAGE 检测显示其分子量均约为 36 kDa; 酶学特性分析表明, ApDAAO-2 和突变体蛋白的最适反应温度为 30℃; ApDAAO-2 和 T286A 的最适反应 pH 范围为 7.0 - 11.0, 其它突变体为 8.0 - 11.0; ApDAAO-2 和突变体都具有较广泛的底物特异性, 除 T256K 的最适底物为 D-Phe 外, 其余均为 D-Met; 动力学参数测定结果显示, 以二级表观常数 k_{cat}/K_m 表示, 对于底物 D-Met 或 D-Phe, ApDAAO-2 和 4 个突变体的 k_{cat}/K_m 值均比 ApDAAO-1 和 pKDAAO 高数倍以上。【结论】ApDAAO-2 及突变体具有比 ApDAAO-1 和 pKDAAO 更广泛的底物特异性和较高的催化效率, 有一定的商业应用价值。

关键词: 原玻璃蝇节杆菌, D-氨基酸氧化酶, 定点突变, 二级表观常数

中图分类号: Q936 **文章编号:** 0001-6209(2014)08-0897-08

D-氨基酸氧化酶 (D-Amino acid oxidase : Oxidoreductase, DAAO, EC1.4.3.3) 是一种以黄素腺嘌呤 (FAD) 为辅基的典型黄素蛋白酶类, 可氧化 D-氨基酸生成相应的酮酸和氨。D-氨基酸氧化酶对催化反应底物有高度的立体异构选择性和广谱性, 可被广泛用于 D-氨基酸的定性定量分析、生物传感器、L-氨基酸和 α -酮酸的生产。20 世纪 90 年代, DAAO 在生物技术酶催化方面得以应用, 主要用于两步酶法转化头孢菌素 C (Cephalosporin C, CPC)

生产 7-氨基头孢烷酸 (7-aminocephalosporanic acid, 7-ACA) [1-2]。

自 1935 年 Krebs 等首次从猪肾脏中检测到 D-氨基酸氧化酶 (EC 1.4.3.3) 的活性以来, 研究人员陆续从哺乳动物、藻类、真菌等多种生物体内发现存在此酶, 如: 来自猪肾的 pKDAAO [3]、纤细红酵母的 RgDAAO [4] 和 人源 hDAAO [5-6]。pKDAAO 和 RgDAAO 都表现出广泛的底物特异性, 除了酸性氨基酸 D-谷氨酸和 D-天门冬氨酸外, DAAO 可以使其

基金项目: 河北省自然科学基金 (C2011205045); 河北省科技支撑项目 (10205521D); 河北省留学回国人员资助项目 (20100705); 河北省高等学校科学技术研究青年基金项目 (20111102); 河北师范大学重点基金项目 (L2012Z12, L2009B13)

* 通信作者。Tel: +86-311-80787573; Fax: +86-311-80789794; E-mail: jujiancong@126.com, zhaobaohua86178@sohu.com

作者简介: # 同等贡献者。冯利伟 (1987 -), 女, 河北邯郸人, 硕士研究生, 主要从事微生物酶学的研究, E-mail: 871559039@qq.com; 郭姣洁 (1984 -), 女, 河北石家庄人, 硕士, 主要从事微生物学的研究, E-mail: guojj_1126@126.com

收稿日期: 2013-10-20; 修回日期: 2013-12-13

它所有的 D-氨基酸发生不同程度的氧化脱氨作用。DAAO 对脂肪族和芳香族氨基酸作用效果较明显,对极性和碱性氨基酸作用效果不是很明显。哺乳动物的 DAAO 对 D-脯氨酸和 D-甲硫氨酸作用效果明显,人类的 hDAAO 对中性 D-氨基酸的活力最强,对碱性 D-氨基酸的活力较弱,而酸性 D-氨基酸的氧化主要由 D-天门冬氨酸氧化酶 (DASPO) 完成^[7]。有关原核生物 DAAO 的研究报道还很少,2007 年 Geueke 等人首次报道了原核生物原玻璃蝇节杆菌 (*Arthrobacter protophormiae*, DSM 15035) *apdaao-1* 基因的克隆和表达,酶蛋白 ApDAAO-1 具有较为广泛的底物特异性,其最适反应底物为 D-甲硫氨酸,此外对 D-赖氨酸、D-精氨酸、D-苯丙氨酸等具有较高活性^[8]。

本研究从同种属的原玻璃蝇节杆菌 (DSM 20168) 中克隆获得 *apdaao-2* 基因,分析发现其氨基酸序列与文献所报道的 ApDAAO-1 的同源性为 98.5%,共有 5 个氨基酸位点存在差异。初步实验发现,与 ApDAAO-1 相比,ApDAAO-2 对部分底物的相对活性有较大幅度提高。本研究拟参照 *apdaao-1* 基因序列,采用定点突变技术逐一构建回复突变体,以分析各差异氨基酸位点对酶蛋白底物相对活性的影响。经过原核表达、蛋白纯化获得酶蛋白,酶学特性分析发现重组酶蛋白及突变体具有比 ApDAAO-1 和 pKDAAO 更广泛的底物特异性,催化活性也有不同程度的提高。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 用于基因克隆,*E. coli* BL21 (DE3) 用于蛋白表达。原玻璃蝇节杆菌 (*A. protophormiae*) DSM 20168 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC), *A. protophormiae* DSM 15035 购自美国标准生物物品收藏中心 (ATCC), 染色体 DNAs 参照 TIANamp Bacteria DNA Kit (TIANGEN, Beijing) 说明书提取。TA 克隆质粒载体 pMD18-T 购自大连宝生物公司,表达质粒载体 pET-22b (+) 购自 Novagen (Germany)。

*Ex Taq*TM DNA polymerase、T4 DNA Ligase、GC buffer 和限制内切酶等购自大连宝生物公司;猪肾来源的 D-氨基酸氧化酶 (D-Amino acid oxidase Type

X from Porcine Kidney, pKDAAO)、L-氨基酸和 D-氨基酸购自 Sigma 公司,Ni-NTA agarose 购自 Qiagen 公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 引物设计

参考 GenBank 公布的 *A. protophormiae* (DSM 15035) 中 *apdaao-1* 基因序列 (GenBank 登录号: AAP70489) 设计 PCR 扩增引物,表 1 中引物对 DAAO-F 和 DAAO-R 用于扩增 D-氨基酸氧化酶基因,下划线和粗体字母分别表示限制内切酶 *NdeI* 和 *XhoI* 的酶切位点。为了了解 ApDAAO-2 与 ApDAAO-1 的差异氨基酸位点对底物相对活性的影响,参照 *apdaao-1* 基因序列,设计各突变位点的定点突变引物。表中灰色背景的字母为待突变的核苷酸。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

表 1. 本实验所用引物

Table 1. Primers used in this research

primers	oligonucleotide sequence (5'→3')	description
DAAO-F	TCCCATATG <u>CCCACAGC</u> ACCGTTGAG	Gene cloning
DAAO-R	ATA CTCGAG GCTGGCCGGCTCGCCA	Gene cloning
E115A-F	CCTCCCGGG C GGATCTGC	GAG→CGC
E115A-R	GGCAGATCC C CCCGGGAG	CTC→CGC
N119D-F	TCTGCCG C ACGGCGCCAC	AAC→GAC
N119D-R	TGGGCGCCGT C CGGCAGAT	GTT→GTC
T256K-F	GCTGCCA A GCTGGTGCCGGA	ACG→AAG
T256K-R	CACCAGC T TGGCAGCGCGT	CGT→CTT
T286A-F	GAGCACGTC G CGGGCCAC	ACG→GCG
T286A-R	GTGGCCCG C GACGTGCTC	CGT→CGC

The underlined and bold sequences are *NdeI* and *XhoI* recognition sites, respectively. The mutated sites are grey background.

1.3 基因克隆和表达载体构建

以 *A. protophormiae* (DSM 15035) 基因组为模板,PCR 扩增 D-氨基酸氧化酶基因 *apdaao-1*,PCR 反应条件为:95℃ 预热 4 min;95℃ 变性 45 s,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,25 个循环;72℃ 保温 10 min。按照相同条件,以 *A. protophormiae* (DSM 20168) 基因组为模板,按照上述条件 PCR 扩增基因 *apdaao-2*。

PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离、纯化,与 TA 克隆载体 pMD18-T 连接,化转法转入大肠杆菌 DH5 α ,通过蓝白斑现象筛选获得质粒 pMD-ApDAAO-1 和 pMD-ApDAAO-2。将测序正确的质粒用限制内切酶 *NdeI* 和 *XhoI* 双酶切获得目的 DNA 片段,与经相同酶切处理的载体 pET-22b (+) 连接,构建表达质粒 pET-ApDAAO-1 和 pET-DAAO-2,

转化 *E. coli* BL21 (DE3) 进行蛋白表达。

1.4 定点突变体构建

参照 QuikChange® Site-directed mutagenesis kit (Stratagene, USA) 技术^[9-10], 以质粒 pET-DAAO-2 为 PCR 反应模板, PCR 扩增反应条件为: 95℃ 2 min; 95℃ 35 s, 55℃ 1 min, 68℃ 7 min, 16 个循环; 68℃ 10 min。

PCR 产物经限制性内切酶 *Dpn* I 酶切处理后, 化学转化法转入 *E. coli* DH5 α , 涂布培养于含 Amp 抗性的 LB 琼脂固体培养基上; 随机挑取菌落, 培养于含 Amp 抗性的 LB 液体培养基中, 收集菌体, 提取质粒, 经限制内切酶 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切验证后测序。

1.5 D-氨基酸氧化酶及突变体蛋白的表达和纯化

将质粒 pET-ApDAAO-1、pET-ApDAAO-2 及突变后的表达载体分别转入大肠杆菌 BL21 (DE3), 在含 Amp 抗性的 LB 液体培养基中培养至 OD_{600} 约为 0.5, 加入 0.5 mmol/L IPTG, 30℃ 诱导培养 10 h, 收集菌体。

将菌体重悬于细胞裂解液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 8.0; 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L imidazole), 超声破碎数次至溶液清亮, 高速离心分离除去细胞碎片, 上清液通过 Ni-NTA 亲和层析法纯化蛋白。蛋白样品采用 Amicon Ultra-15 离心浓缩管 (30K MWCO, Millipore) 脱盐、浓缩, 分装保存于 -80℃。蛋白纯度由 SDS-PAGE 电泳法检测, 浓度采用 Bio-Rad 蛋白测定试剂盒 II (Bio-Rad Protein Assay II) 测定。

1.6 酶学特性分析

1.6.1 酶蛋白活性测定: 反应体系为 200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mg/mL 4-氨基安替比林, 0.1 mg/mL *N*-乙基-*N*-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲基苯胺钠盐 (TOOS), 2 units 过氧化物酶, 0.1 unit D-氨基酸氧化酶和 50 mmol/L D-氨基酸, 反应总体积为 200 μL 。在 30℃ 下反应 20 min 后, 用微孔板分光光度计 (BioTek, USA) 测定 550 nm 吸光值^[11]。空白对照以小牛血清球蛋白 (BSA) 替代酶液, 其余反应条件同上。一个酶活力单位定义为 1 min 内降解 1 μmol D-氨基酸所需要的酶量。

1.6.2 最适反应温度和最适反应 pH 值的测定: 以 D-Met (50 mmol/L) 为底物, 30℃ 于 Britton-Robinson 缓冲溶液 (pH4.0-12.0) 中测定酶蛋白的最适反应

pH 值^[12]。以 D-Met 为反应底物, 200 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0) 中, 反应温度梯度为 4、10、20、30、40、50 和 60℃, 测定酶蛋白的最适反应温度。

1.6.3 底物特异性: 以各种 D-氨基酸为底物, 30℃ 下, 200 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0) 的缓冲溶液中反应 20 min, 测定 550 nm 吸光值, 分析酶蛋白底物特异性。

1.7 动力学参数测定

在不同底物浓度 D-Met (0.5-50 mmol/L) 或 D-Phe (1.0-50 mmol/L), 200 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0), 30℃ 恒温反应 20 min, 测定 550 nm 吸光值, 根据标准曲线计算反应中 H_2O_2 的生成量, 采用 GraphPad Prism 软件进行非线性回归分析计算酶蛋白的反应速率常数 K_m 及酶的比活力 (specific activity)。

1.8 序列测定和分析

核酸序列由华大基因科技公司 (北京) 测定。序列比对采用 Clustal X 软件处理^[13], 氨基酸及核苷酸同源分析比对采用在线程序 BLAST (NCBI)^[14]。基因 *apdaao-1* 和 *apdaao-2* 的核苷酸序列在 GenBank 中的登录号分别为 AY306197 和 JX855922。

2 结果

2.1 目的基因克隆、序列分析及定点突变体构建

以 *A. protophormiae* DSM 15035 和 DSM 20168 的基因组为模板, PCR 扩增获得了目的基因 *apdaao-1* 和 *apdaao-2*, 并构建获得了重组质粒 pMD-ApDAAO-1 和 pMD-ApDAAO-2, 重组质粒经限制内切酶酶切、连接, 成功构建了表达载体 pET-ApDAAO-1 和 pET-ApDAAO-2。序列测定发现克隆所得基因 *apdaao-2* 长 978 bp, GC 含量高达 70.1%, 编码 326 个氨基酸残基, 理论分子量为 35.8 kDa; 克隆所得基因 *apdaao-1* 序列与 NCBI 公布的基因序列完全一致, 与基因 *apdaao-2* 的核苷酸同源性为 98.7%, 氨基酸同源性为 98.5%, 存在 5 个不同的氨基酸位点 (ApDAAO-1: P114, A115, D119, K256, A286; ApDAAO-2: R114, E115, N119, T256, T286); 基因 *apdaao-2* 与来自 *Arthrobacter arilaitensis* Re117 的 D-氨基酸氧化酶的氨基酸同源性最高达 65% (GenBank accession no. YP_003917084), 与

Rhodospiridium gracilis 的 RgDAAO (PDB code 1COK) 氨基酸同源率为 31% [15]。

以质粒 pET-ApDAAO-2 为模板, 通过定点突变技术成功构建了 4 个突变体质粒, 分别为 pET-E115A、pET-N119D、pET-T256K 及 pET-T286A, 而 114 位点, 尽管对该位点经过了多轮次的突变尝试, 最终未能筛选获得正确的突变体。

2.2 酶蛋白表达的检测

酶蛋白 ApDAAO-1、ApDAAO-2 和 4 个突变体蛋白 (E115A, N119D, T256K 和 T286A) 经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化、脱盐后, SDS-PAGE 检测发现蛋白分子量均在 36 kDa 左右 (图 1), 与理论分子量 (35.8 kDa) 基本一致。

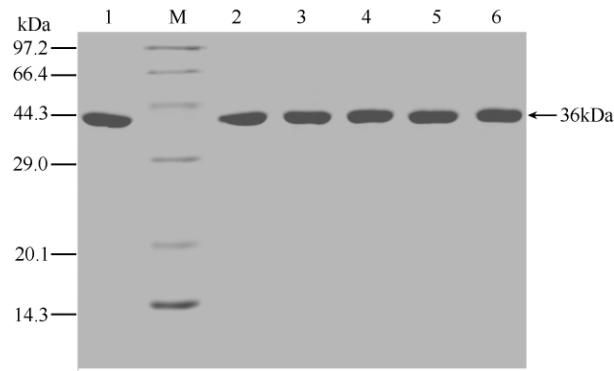


图 1. D-氨基酸氧化酶及其突变体纯化 SDS-PAGE 检测图

Figure 1. SDS-PAGE analysis of protein DAAO and mutants. Lane 1, 2, 3, 4, 5 and 6 stand for purified protein ApDAAO-1, ApDAAO-2, E115A, N119D, T256K, and T286A, respectively; M, protein marker.

2.3 酶学特性分析

2.3.1 最适反应温度: 在不同温度 (4 - 60°C) 条件下测定 D-氨基酸氧化酶的相对活性, 重组 ApDAAO-2 和各突变体的最适温度如图 2 所示, 重组 ApDAAO-2 和突变体酶蛋白在各温度下相对活性的趋势基本一致, 在 20 - 40°C 范围内相对活性较高 (>70%), 30°C 时酶活达到最高 (图 2-A); 随着温度的继续升高 (>30°C), 突变体酶蛋白相对活性的降幅稍大于 ApDAAO-2; 当温度达 60°C 时, 所有酶蛋白活性均低于 40%, 其中 ApDAAO-2 的相对活性最高, 约为 33%, 而突变体 N119D 的活性最低, 仅为 10%。

2.3.2 最适反应 pH: 经过检测, 重组酶蛋白 ApDAAO-2 在 pH 7.0 - 11.0 之间相对活性较高 (大于 90%), 而低于 pH 7.0 或高于 11.0 时, 酶蛋白活

性急剧下降; 突变体 T256K 和 T286A 表现出与重组酶蛋白 ApDAAO-2 相似的趋势, 而 E115A 和 N119D 的最适 pH 范围为 pH 8.0 - 11.0 (图 2-B)。

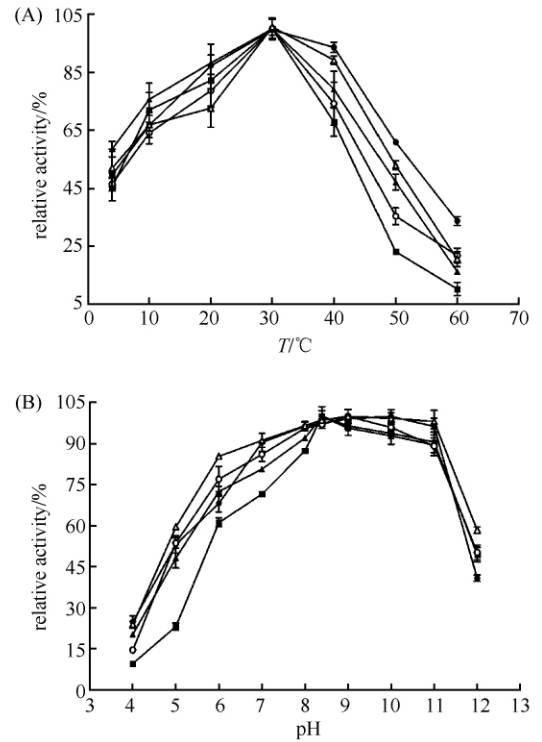


图 2. 重组蛋白 ApDAAO-2 及其突变体的最适反应温度和最适反应 pH

Figure 2. The optimal temperature and pH for recombinant ApDAAO-2 and mutants. A: Optimal temperature; B: Optimal pH. ●—●: ApDAAO-2, ▲—▲: E115A, ■—■: N119D, ○—○: T256K, △—△: T286A.

2.3.3 底物特异性: 重组酶蛋白 ApDAAO-2 和 4 个突变体都具有较广泛的底物特异性 (表 2), 除了突变体蛋白 T256K 的最适底物为 D-Phe (108%), 其余均为 D-Met (100%), 与文献所报道的 ApDAAO-1 一致。与 ApDAAO-1 相比, ApDAAO-2 和突变体除了对底物 D-Arg 和 D-Lys 的相对活性有所下降外, 对其他底物的相对活性均有所上升, 尤其是对底物 D-Ala、D-Val、D-Pro、D-His 及 D-Leu, ApDAAO-1 对这些底物的相对活性较低 (分别为 0.26%、0.35%、0.25%、5.9% 和 12%), ApDAAO-2 和突变体则均有较大幅度提高 (表 2)。将突变体与 ApDAAO-2 相比, 各突变体在不同程度上导致了对一些底物的相对活性的上升和下降, 如: E115A 导致了其对底物 D-Ala、D-Lys 和 D-Val 的相对活性有一定程度下降, 而对其他底物则略有上升; 突变体 N119D 则导致其

对底物 D-Phe、D-Ala 和 D-Lys 的相对活性有所下降,而对其他底物有所上升,值得一提的是,该突变体对 D-Ser 具有微弱的活性,这是 ApDAAO-1、ApDAAO-2 及其他突变体所没有的。或许这些位点突变后对于酶蛋白活性中心的离子化状态产生了一定的影响,导致其底物选择性有所改变^[16]。从表 2 还可以看出,pKDAAO 和 ApDAAO-1 对某些底物的相对活性较高,但各自都存在一定数量的相对活

性较低的底物,有的甚至低于 10%,如: D-Val (pKDAAO, 6.8%; ApDAAO-1, 0.35%) 和 D-His (pKDAAO, 4.7%; ApDAAO-1, 5.9%),这些底物在实际检测中往往因为检测灵敏度低而影响检测效果,重组酶蛋白 ApDAAO-2 和各突变体对大部分底物的相对活性均超过 20% (D-Ser 和 D-Pro 除外),显然,ApDAAO-2 和各突变体具有比 ApDAAO-1 及 pKDAAO 底物特异性更广泛且灵敏的优点。

表 2. 重组蛋白 ApDAAO-2 及其突变体的底物特异性

Table 2. Substrate preferences of ApDAAO-2 and mutants

substrate	relative activities / %						
	ApDAAO-2	E115A	N119D	T256K	T286A	ApDAAO-1 ^[8]	pKDAAO ^[17]
D-Met	100	100	100	100	100	100	100
D-Phe	87	91	77	108	99	54	64
D-Ala	24	15	18	3.2	16	0.26	66
D-Arg	44	51	56	75	51	80	8.6
D-Ser	-	-	0.02	-	-	-	14
D-Val	23	20	25	11	20	0.35	6.8
D-Orn	32	41	46	25	36	15	1.2
D-Lys	84	61	55	74	65	99	36
D-Pro	7.3	7.9	10	7.8	7.7	0.25	146
D-His	19	18	22	20	17	5.9	4.7
D-Leu	63	79	85	69	79	12	36

“-”, no activity was detected.

2. 4 动力学常数测定

以不同浓度的 D-Met 及 D-Phe 为底物,在 30℃ pH 9.0 下测定了重组蛋白 ApDAAO-1、ApDAAO-2 及 4 个突变体的动力学参数(表 3)。从表 3 可以看出,重组蛋白 ApDAAO-2 和突变体蛋白对底物 D-Met 的亲合常数 K_m 基本一致,其中突变体 E115A、N119D 及 T256K 的比活力、转换数 k_{cat} 及二级表观常数 k_{cat}/K_m 与 ApDAAO-2 相当,而突变体 T286A 的比活力和转换数 k_{cat} 均为 ApDAAO-2 的 1.51 倍,二级表观常数 k_{cat}/K_m 比 ApDAAO-2 提高约 1.23 倍。对于底物 D-Phe 来说,4 个突变体蛋白的转换数 k_{cat} 均比重组蛋白 ApDAAO-2 有所提高,然而由于突变体 N119D、N256K 和 T286A 对 D-Phe 的亲合常数 K_m 升高,导致突变体 N119D 的二级表观常数 k_{cat}/K_m 与 ApDAAO-2 基本一致,这可能是由于天冬氨酸和天冬酰胺的结构相似^[18],氨基酸残基 N 替换为 D 对酶蛋白的催化活性影响甚微;其他 3 个突变体对底物 D-Phe 的二级表观常数 k_{cat}/K_m 均比 ApDAAO-2 有所提高,其中突变体 T256K 的 k_{cat}/K_m 值最高(约为 ApDAAO-2 的 1.66 倍),且其对底物 D-Phe 的转

换数高于底物 D-Met(约 1.29 倍),这与表 2 中突变体蛋白 T256K 的第一底物改变为 D-Phe 相符。从表 3 可以看出,与其他蛋白相比,突变体 T286A 的比活力、转换数 k_{cat} 均为最高值,但由于其对二底物的亲和常数 K_m 有不同程度的升高,导致了 T286A 虽然对底物 D-Met 具有最高的二级表观常数,然而其对底物 D-Phe 的二级表观常数则相对较低,这个结果也与表 2 的结果基本一致。

将 ApDAAO-2 及 4 个突变体与重组蛋白 ApDAAO-1 和猪肾来源的 pKDAAO 相比较,从 k_{cat}/K_m 的比值来看,D-Met 为反应底物,ApDAAO-2 和 4 个突变体的二级表观常数分别是 ApDAAO-1 的 2.68、2.47、2.59、2.76 和 3.31 倍,是 pKDAAO 的 11.17、10.28、10.81、11.50、和 13.81 倍;以 D-Phe 为底物,ApDAAO-2 和 4 个突变体的二级表观常数分别是 ApDAAO-1 的 1.56、2.41、1.45、2.61 和 1.90 倍,是 pKDAAO 的 6.83、10.44、6.28、11.33、8.24 倍,这说明了 ApDAAO-2 和 4 个突变体具有比 ApDAAO-1 和 pKDAAO 更强的催化效率。

表 3. 重组蛋白及突变体的动力学参数

Table 3. The kinetic parameter measurement of ApDAAO and mutants

protein	D-Met					D-Phe				
	$K_m /$ (mmol/L)	specific activity / (U/mg)	$k_{cat} /$ (s^{-1})	$k_{cat} / K_m /$ (s^{-1} mol^{-1})	ratio of k_{cat} / K_m	$K_m /$ (mmol/L)	specific activity / (U/mg)	$k_{cat} /$ (s^{-1})	$k_{cat} / K_m /$ (s^{-1} mol^{-1})	ratio of k_{cat} / K_m
ApDAAO-2	0.84	38.91	23.31	2.76×10^4	2.68	1.69	21.83	13.04	7.72×10^3	1.56
E115A	0.77	32.79	19.58	2.54×10^4	2.47	1.61	31.75	18.95	1.18×10^4	2.41
N119D	0.88	39.22	23.41	2.67×10^4	2.59	3.26	38.76	23.14	7.10×10^3	1.45
T256K	0.89	42.37	25.30	2.84×10^4	2.76	2.56	54.65	32.63	1.28×10^4	2.61
T286A	1.03	58.82	35.12	3.41×10^4	3.31	3.91	60.98	36.41	9.31×10^3	1.90
ApDAAO-1	1.74	30.12	17.98	1.03×10^4	1.00	4.98	40.85	24.39	4.90×10^3	1.00
pKDAAO	1.15	4.76	2.84	2.47×10^3	0.24	9.11	17.20	10.27	1.13×10^3	0.23

3 讨论

D-氨基酸氧化酶(DAAO)广泛应用于D-氨基酸的定性、定量分析、生物传感器、L-氨基酸和 α -酮酸的生产,在生物制药方面DAAO也得到较好的应用,主要用于两步酶法转化头孢菌素C生产7-氨基头孢烷酸(7-amino cephalosporanic acid, 7-ACA)。目前科研人员已从哺乳动物、藻类及真菌等多种生物体内发现D-氨基酸氧化酶,如来自猪肾的pKDAAO^[3]、人源hDAAO^[5]、纤细红酵母的RgDAAO^[4]和三角酵母的TvDAAO^[19],这些酶无论从理论研究还是生产应用方面都受到了较为广泛的关注。

然而,有关原核生物D-氨基酸氧化酶的研究报道还很少,迄今为止仅有Geueke等对原玻璃蝇节杆菌(DSM 15035)中的 $apdaao-1$ 基因进行了研究报道,该基因长978bp,编码326个氨基酸残基,酶学特性分析显示酶蛋白ApDAAO-1最适反应温度为30℃,最适pH范围为6.5-8.5,添加辅酶FAD与否不影响酶蛋白ApDAAO-1的催化活性;酶蛋白具有广泛的底物特异性,最适底物为D-Met,其次分别为D-Lys, 4-Fluoro-DL-phenylalanine, D-Arg及D-Phe等,对D-Val, D-Ala, D-Pro及D-Ser的催化活性较低甚至无活性,动力学常数分析表明对第一底物D-Met的 K_m 为1.0 mmol/L,比活力为180 U/mg蛋白^[8]。

本研究从原玻璃蝇节杆菌中克隆获得了D-氨基酸氧化酶基因 $apdaao-1$ 和 $apdaao-2$,二者的核苷酸同源率为98.7%,氨基酸同源率为98.5%,存在着5个不同的氨基酸残基。实验通过定点突变技术成功构建了4个定点突变体的表达载体,通过分析野生型蛋白ApDAAO-2及4个突变体蛋白的酶学特性发现,它们的最适反应温度均为30℃,与

ApDAAO-1一致;外源辅酶FAD的添加与否对蛋白ApDAAO-2的催化活性也没有影响(结果未显示)。与ApDAAO-1的最适pH范围相比,ApDAAO-2和突变体的最适pH范围更大,且相对偏碱一些;此外,相比于ApDAAO-1,ApDAAO-2和突变体对诸如D-Ala, D-Val和D-Pro等底物的相对活性均有大幅提升,表现出比ApDAAO-1及pKDAAO更广泛的底物特异性。所有这些差异可能是由5个不一致的氨基酸位点引起的。

由于酶活检测所用的缓冲溶液成分和pH有所不同(Geueke等采用TEA-HCl buffer, pH 7.6检测酶活),而且本研究仅采用了一步纯化法(镍柱亲和层析)纯化蛋白,所得蛋白纯度相对稍低,这些因素或许导致了本研究所测重组蛋白ApDAAO-1的 K_m 值上升及酶的比活力下降。不过,在相同的缓冲溶液、pH及温度等条件下分析ApDAAO-1、ApDAAO-2及4个突变体的动力学常数可以看出,尽管突变体蛋白的比活力、转换数 k_{cat} 及二级表现常数 k_{cat}/K_m 与重组蛋白ApDAAO-2相比并没有显著变化,但是ApDAAO-2和突变体的 k_{cat}/K_m 值与ApDAAO-1及pKDAAO相比均有显著提高,以底物D-Met来说,ApDAAO-2和4个突变体的 k_{cat}/K_m 值分别是ApDAAO-1的2.68、2.47、2.59、2.76和3.31倍,是商品化的pKDAAO的11.19、10.29、10.79、11.51和13.81倍(表3);另外,ApDAAO-2和各突变体具有比ApDAAO-1及pKDAAO更广泛的底物特异性及较为可信的检测能力,这些都说明了ApDAAO-2和4个突变体具有更高的催化效率和工业应用价值。

从氨基酸残基替换情况可以看出,119位点是将极性的天冬酰胺(N)突变为带负电的天冬氨酸(D),天冬酰胺(N)中侧链-CONH₂既是氢的供体又是受体,而天冬氨酸(D)的侧链基团-COOH仅是氢

的受体;115 位点是将酸性的谷氨酸(E)突变为非极性的丙氨酸(A)并失去一个羧基,Ullah 等认为带电荷氨基酸 E 替代脂肪族氨基酸 A 可能促使活性中心区域形成新的氢键,从而改变酶蛋白的最适反应 pH 或最适温度^[20];256 位点是将极性的苏氨酸(T,氢的受体)突变为带正电的碱性赖氨酸(K,氢的供体);286 位点是将极性的苏氨酸(T)突变为非极性的丙氨酸(A)并失去一个羟基。陈晓曦等认为氨基酸残基的带电性质和离子化状态改变后有可能会影响酶蛋白的活性和耐碱性^[16],或许是这些因素导致了 ApDAAO-2 和突变体的耐碱性及催化效率均比 ApDAAO-1 增强,底物特异性亦有所改变。此外,Turunen 等研究发现,突变引起酶蛋白表面离子对网络变化会导致酶蛋白的热稳定性和耐碱性发生改变^[21],通过同源建模分析发现,ApDAAO-1 与 ApDAAO-2 中 5 个不一致的氨基酸位点均处于酶蛋白的表面(结果未显示),或许这些位点的突变导致了 ApDAAO-2 和突变体的最适 pH 范围变宽和耐碱性增强,有关这些位点的作用机理的研究还需要作进一步的研究。

参考文献

[1] Conlon HD, Baqai J, Baker K, Shen YQ, Wong BL, Noiles R, Rausch CW. Two-step immobilized enzyme conversion of cephalosporin C to 7-aminoccephalosporanic acid. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, 46 (6) : 510-513.

[2] Khoronenkova SV, Tishkov VI. D-amino acid oxidase: physiological role and applications. *Biochemistry (Mosc)*, 2008, 73 (13) : 1511-1518.

[3] Bakke M, Setoyama C, Miura R, Kajiyama N. Thermostabilization of porcine kidney D-amino acid oxidase by a single amino acid substitution. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 93 (5) : 1023-1027.

[4] Alonso J, Barredo JL, Diez B, Mellado E, Salto F, Garcia JL, Cortes E. D-amino-acid oxidase gene from *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospiridium toruloides*) ATCC 26217. *Microbiology*, 1998, 144 (Pt 4) : 1095-1101.

[5] Molla G, Sacchi S, Bernasconi M, Pilone MS, Fukui K, Polegioni L. Characterization of human D-amino acid oxidase. *FEBS Letters*, 2006, 580 (9) : 2358-2364.

[6] Momoi K, Fukui K, Watanabe F, Miyake Y. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human kidney D-amino acid oxidase. *FEBS Letters*, 1988, 238 (1) : 180-184.

[7] Romano D, Molla G, Pollegioni L, Marinelli F. Optimization of human D-amino acid oxidase expression in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2009, 68 (1) : 72-78.

[8] Geueke B, Weckbecker A, Hummel W. Overproduction and characterization of a recombinant D-amino acid oxidase from *Arthrobacter protophormiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74 (6) : 1240-1247.

[9] Qi D, Scholthof KB. A one-step PCR-based method for rapid and efficient site-directed fragment deletion, insertion, and substitution mutagenesis. *Journal of Virological Methods*, 2008, 149 (1) : 85-90.

[10] Zhu D, Zhou Q, Wang Y, Che G, Tang X, Zhu W, Chen X, Sun Z. One-step and cost-effective site-directed mutagenesis of large plasmids using Pyrobest DNA Polymerase. *Letters in Biotechnology*, 2007, 18 (4) : 590-593. (in Chinese)
朱大兴,周清华,王艳萍,车国卫,唐小军,朱文,陈小禾,张芝琳. 利用 Pyrobest DNA 聚合酶一步法进行大片段基因的定点突变. *生物技术通讯*, 2007, 18 (4) : 590-593

[11] Ju J, Misono H, Ohnishi K. Directed evolution of bacterial alanine racemases with higher expression level. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100 (3) : 246-254.

[12] Fotouhi L, Ganjavi M, Nematollahi D. Electrochemical study of iodide in the presence of phenol and o-cresol: application to the catalytic determination of phenol and o-cresol. *Sensors*, 2004, 4 (11) : 170-180.

[13] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL _ X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (24) : 4876-4882.

[14] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215 (3) : 403-410.

[15] Umhau S, Pollegioni L, Molla G, Diederichs K, Welte W, Pilone MS, Ghisla S. The x-ray structure of D-amino acid oxidase at very high resolution identifies the chemical mechanism of flavin-dependent substrate dehydrogenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97 (23) : 12463-12468.

[16] Chen X, Cao Y, Du Z, Zeng B. The application of homology in the cellulase molecule evolution. *Acta Biophysica Sinica*, 2008, 24 (2) : 85-91. (in Chinese)
陈晓曦,曹以诚,杜正平,曾炳佳. 同源建模在纤维素

酶分子改造中的应用. 生物物理学报, 2008, 24 (2) : 85-91.

- [17] Tishkov VI, Khoronenkova SV. D-Amino acid oxidase: structure, catalytic mechanism, and practical application. *Biochemistry*, 2005, 70 (1) : 40-54.
- [18] Matthew JB, Robert BR. Amino acid properties and consequences of substitutions // Betts MJ, Russell RB. *Bioinformatics for Geneticists*. John Wiley & Sons, Ltd, 2003.
- [19] Mueller M, Kratzer R, Schiller M, Slavica A, Rechberger G, Kollroser M, Nidetzky B. The role of Cys108 in *Trigonopsis variabilis* d-amino acid oxidase examined through chemical oxidation studies and point

mutations C108S and C108D. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, 1804 (7) : 1483-1491.

- [20] Ullah AHJ, Sethumadhavan K, Boone S, Mullaney EJ. A single mutation in the hepta-peptide active site of aspergillus niger PhyA phytase leads to myriad biochemical changes. *Advances in Microbiology*, 2012, 2 (3) : 388-394.
- [21] Turunen O, Vuorio M, Fenel F, Leisola M. Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1,4- β -xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH. *Protein Engineering*, 2002, 15 (2) : 141-145.

Characterization of D-amino acid oxidase and its mutants from *Arthrobacter protophormiae*

Liwei Feng^{1#}, Jiaojie Guo^{2#}, Huixin Li¹, Shujing Xu¹, Jiansong Ju^{1*}, Baohua Zhao^{1*}

¹College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, Hebei Province, China

²Shijiazhuang Vocational College of Technology & Information, Shijiazhuang 052165, Hebei Province, China

Abstract: [Objective] To characterize D-amino acid oxidase from *Arthrobacter protophormiae* (DSM 20168). [Methods] Genes *apdaao-1* and *apdaao-2* from *A. protophormiae* (DSM 15035 & 20168) were cloned by PCR; expression vectors were constructed and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The mutant was constructed by site-directed mutagenesis using plasmid pET-ApDAAO-2 as the template. After Ni-NTA column chromatography purification, the protein was characterized. [Results] Protein ApDAAO-1, ApDAAO-2 and 4 mutants were expressed and purified successfully. The apparent molecular masses of all purified proteins were about 36 kDa by SDS-PAGE. The optimum temperature of ApDAAO-2 and 4 mutants was 30°C similar to ApDAAO-1. ApDAAO-2 and its mutants exhibited much broader optimal pH than ApDAAO-1, and they revealed broad substrate specificity and high specificity to D-Met (100%) except T256K, which showed the substrate preference for D-Phe (108%). For substrates D-Met and D-Phe, the second-order rate constants k_{cat}/K_m of ApDAAO-2 and 4 mutants were several-fold higher than ApDAAO-1 and pKDAAO, respectively. [Conclusion] Comparing with ApDAAO-1 and pKDAAO, ApDAAO-2 and its mutants had much broader substrate specificity and higher catalytic efficiency, which suggested that they might have much higher commercial value.

Keywords: *Arthrobacter protophormiae*, D-amino acid oxidase, site-directed mutagenesis, k_{cat}/K_m

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2011205045), by the Hebei Science and Technology Development Foundation (10205521D), by the Hebei Foundation for Returnees (20100705), by the Youth Foundation of Hebei Educational Committee (2011102) and by the Science Foundation of Hebei Normal University (L2012Z12, L2009B13)

* Corresponding author. Tel: +86-311-80787573; Fax: +86-311-80789794; E-mail: jujiansong@126.com, zhaobaohua86178@sohu.com

#These authors contributed equally to this study.

Received: 20 October 2013/Revised:13 December 2013