

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (12) :1584 - 1592; 4 December 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150225

定点突变对酰胺水解酶 DamH 可溶性表达和酶活的影响

王飞^{1,2}, 李周坤², 周杰², 崔中利^{2*}

¹江西省农业微生物资源开发与利用工程实验室, 江西农业大学生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045

²南京农业大学生命科学院, 农业部农业环境微生物工程重点实验室, 江苏 南京 210095

摘要: 【目的】DamH 是一种具有酯酶活性的酰胺水解酶, 其非活性中心氨基酸残基的突变对重组酶可溶性表达和比酶活产生一定的影响。拟探索 DamH 的活性中心氨基酸残基构成, 并对其非活性中心氨基酸残基突变对可溶性表达和比酶活的影响进行研究。【方法】通过重叠延伸的方法对 DamH 可能的活性中心氨基酸 S149、E244 和 H274 以及非活性中心氨基酸 D165 及 N192 进行定点突变, 通过静息细胞测活验证了 S149、E244 和 H274 在催化 2-氯-N-(2'-甲基-6'-乙基苯基) 乙酰胺 (CMEPA) 水解反应中的作用, 通过 Ni²⁺-NTA 亲和层析对 D165 及 N192 突变子进行纯化, 对突变株和野生型比酶活进行比较。【结果】研究表明 S149A 使 DamH 的 CMEPA 水解酶活性下降为野生型的 5%, E244A 和 H274A 突变导致其失去活性; D165P 和 N192P 突变影响到 DamH 的可溶性表达, 表达量分别为野生型的 28.2% 和 20.8%, 突变子 N192P、D165P 比酶活分别为野生型比酶活的 55.5% 和 49.7%。【结论】DamH 催化酯类底物和芳基酰胺类底物可能共用同一活性中心 S149、E244 和 H274, 其两个 α 螺旋的转角处氨基酸侧链极性和刚性结构的改变对可溶性表达以及活性有很大的影响。

关键词: DamH, 定点突变, 催化三联体, 可溶性表达, 比酶活

中图分类号: Q814 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 12-1584-09

氯代乙酰胺类除草剂因分子结构中具有酰胺基团 (CONH-) 而得名, 因其高效、高选择性而在全球范围内广泛使用^[1]。乙草胺 [2'-乙基-6'-甲基-N-(乙氧基甲基)-2-氯代-N-乙酰胺苯胺] 是氯代乙酰胺类除草剂的重要代表, 主要用于一年生禾本科杂草和部分阔叶杂草的防除^[2]。大量使用氯代乙酰胺类除草剂导致的环境残留对水环境和农业生态系统构成不利影响^[3], 可导致小鼠形成肿瘤^[4], 造成对两栖动物的细胞毒性, 染色体和 DNA 损伤^[5], 1994 年被美国环保局 (USEPA) 列为 B-2 类致癌物^[6-7]。乙

草胺的主要生物降解产物为 CMEPA 和 2-甲基-6-乙基苯胺 (MEA)^[8]。侯颖等以小旱稗 [*Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. var. *austrorjaponensis* Ohwi] 和 马唐 [*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.] 两种杂草为试验靶标, 对乙草胺及其代谢中间产物 CMEPA 和 MEA 的除草活性进行了测定, 结果表明三种化合物对试验材料的抑制活性强弱程度依次为 CMEPA > 乙草胺 > MEA, 且低浓度的 MEA (< 20 mg/L) 对两种杂草的生长似乎有刺激作用^[9]。因此, CMEPA 水解是消除环境中乙草胺残留毒性的重要步骤之一。

基金项目: 国家自然科学基金地区科学项目 (31560031); 国家自然科学基金面上项目 (31570059)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-84396753; E-mail: czl@njau.edu.cn

作者简介: 王飞 (1976-), 男, 湖北天门人, 讲师, 博士, 研究方向为环境微生物学。E-mail: wangfei179@163.com

收稿日期: 2015-05-19; **修回日期:** 2015-06-28

近年来, 国内外研究者从不同的菌株中已克隆到一些催化 CMEPA 水解酶基因。Weiliang Shen 等通过鸟枪法从 *Paracoccus* sp. M-1 中克隆到 CMEPA 水解酶 PamH, 该酶分子量大小为 50 kDa, 酶活在 pH6.0-9.0 之间稳定, 最适反应温度为 45 °C^[10]。Jun Zhang 等从 *Paracoccus* sp. FLN-7 中克隆到一个新的 CMEPA 水解酶 AmpA, 该酶分子量 49.6 kDa, 最适反应温度 40 °C, 最适反应 pH7.5-8.0^[11]。氨基酸序列分析表明这些酶都归属于酰胺酶 (EC 3.4.11.2.), 具有典型的酰胺酶保守序列 GGSS 和催化活性中心 Lys-Ser-Ser。

本课题组前期从生产乙草胺农药厂活性污泥中分离到一株 CMEPA 高效水解菌株 *Delfia* sp. T3-6^[1], 并成功克隆到催化该水解反应的酰胺水解酶 DamH^[12]。DamH 分子量大小为 32 kDa, 最适底物为 CMEPA, 其 K_m 和 k_{cat} 值分别为 0.197 mmol/L 和 2804.32 s⁻¹。最适酶反应 pH 为 6.5, 最适酶反应温度为 35 °C。显示出与已报道的 CMEPA 水解酶不同的特性以及较高的催化活性, 具有潜在的应用价值。氨基酸序列分析表明 DamH 具有与酯酶类似的保守序列¹⁴⁷GXSXG¹⁵¹和⁷⁹HGG⁸¹, 也存在与酯酶活性中心类似的氨基酸残基 S149, E244 和 H274, 底物谱实验证实 DamH 也具有催化对硝基苯酯和三酰甘油酯水解活性^[12]。

重组蛋白异源表达的技术瓶颈之一是所表达的蛋白常常以非正确折叠、无活性的包涵体形式存在^[13], 其解决策略包括包涵体复性, 构建新的表达系统, 与分子伴侣共表达, 引入可溶性分子标签融合表达等^[14-15]。近年来研究者发现氨基酸的突变对蛋白可溶性表达有较大的影响^[16-17], 对非活性中心氨基酸残基进行定点突变, 逐渐成为提高重组蛋白可溶性表达的策略之一^[18]。前期研究中课题组在对 DamH 进行异源表达时, 发现两个非活性位点氨基酸突变 (D165G, N192Q) 对重组酶可溶性表达和活性都有一定影响 (数据未报道)。本研究对其可能的活性中心氨基酸位点 (S149, E244 和 H274) 进行定点突变, 探索其活性中心氨基酸残基构成。对 D165 和 N192 两个氨基酸位点进行定点突变, 研究非活性中心氨基酸对重组酶活性及可溶性表达的影响。

1 材料和方法

1.1 菌株

重组酶 DamH 表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3)-pET29a-damH, 前期构建, 保藏于南京农业大学农业部环境微生物与环境工程重点实验室; 克隆菌株 *E. coli* DH5 α , 表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3), 本实验室保藏。

1.2 所用引物

本研究所用引物由上海英潍捷基生物技术有限公司 (Invitrogen Co., Ltd.) 合成, 引物序列见表 1。

表 1. damH 定点突变 PCR 扩增所用引物

Table 1. Oligonucleotides used for site-directed mutagenesis	
DamH gene allele	Mutagenic primer sets
Dam-F	CATATCGGGCACGTCGCCGACGCTCTGAT
Dam-R	GTCCGACTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCGCCCTT GAACCACTGGG
S149A-F	GCCCGC CGC GTCGCCGCTGGTG
S149A-R	CACCAGCGCGGAC CGC GCGGGCC
E244A-F	GCAGGTC CGC GCGCACTGCCG
E244A-R	CGGCACTGCC CGC ACCCCTGC
H274A-F	GAAGAC GGC TGCATGCCGT
H274A-R	ACGGCATGCAG GCC GTCTTC
D165K-F	CTGCCCCAG AAA GGCGTGGCGCT
D165K-R	AGCGCCACGCC TTT TCTGGCGCAG
D165L-F	CTGCCCCAG TTA GGCGTGGCGCT
D165L-R	AGCGCCACGCC TAA TCTGGCGCAG
D165E-F	CTGCCCCAG GAA GGCGTGGCGCT
D165E-R	AGCGCCACGCC TTT CCTGGCGCAG
D165P-F	CTGCCCCAG CCT GGCGTGGCGCT
D165P-R	AGCGCCACGCC AGG TCTGGCGCAG
D165Y-F	CTGCCCCAG TAT GGCGTGGCGCT
D165Y-R	AGCGCCACGCC ATA TCTGGCGCAG
D165Q-F	CTGCCCCAG CAA GGCGTGGCGCT
D165Q-R	AGCGCCACGCC TTG TCTGGCGCAG
N192Q-F	ACGCTGCAGACC CAA GCGGCCAC
N192Q-R	GTGGCCGCT TTG GGTCTGCAGCGT
N192K-F	ACGCTGCAGACC AAA GCGGCCAC
N192K-R	GTGGCCGCT TTT GGTCTGCAGCGT
N192L-F	ACGCTGCAGACC TTA GCGGCCAC
N192L-R	GTGGCCGCT TAA GGTCTGCAGCGT
N192E-F	ACGCTGCAGACC GAA GCGGCCAC
N192E-R	GTGGCCGCT TTT GGTCTGCAGCGT
N192P-F	ACGCTGCAGACC CCT TGGCGGCCAC
N192P-R	GTGGCCGCT AGG GGTCTGCAGCGT
N192Y-F	ACGCTGCAGACC TAT TGGCGGCCAC
N192Y-R	GTGGCCGCT ATA GGTCTGCAGCGT

Nucleotide codons in boldface type encode the mutated amino acids.

1.3 培养基与试剂

LB 培养基 (g/L): 酵母粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, pH7.0 - 7.2。

LA-*Taq* 酶, *Taq* 酶, PrimeSTAR HS DNA 聚合酶, T4DNA Ligase, pMD19-T Vector 均购于大连宝生物公司 (TaKaRa), IPTG, X-gal 氨苄青霉素 (Amp), 卡那霉素 (Km) 购于上海生工, 其余各化学试剂均为分析纯。

凝胶回收试剂盒与质粒提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司 (BioTeke Corporation), 核酸测序委托南京金斯瑞生物科技有限公司 (Genscript BioTechnologies Co., Ltd.)。

1.4 重叠延伸 PCR 定点突变 DamH

采用重叠延伸的方法, 以表达载体质粒 pET-29a (+) *-damH* 为模板, 设计定点突变引物, 对推测的 DamH 3 个酯酶活性中心位点 S149、E244、H274 以及 D165 和 N192 两个影响重组酶表达和活性的氨基酸位点进行定点突变。

重叠延伸 PCR 具体操作方法见参考文献 [19 - 20], 以表达载体质粒 pET-29a (+) *-damH* 为模板, 先分别以全长引物 Dam-F (正向引物, 含 *Nde* I 酶切位点) 和突变位点反向引物扩增出上游序列, 然后分别以全长引物 Dam-R (反向引物, 含 *Sal* I 酶切位点) 和突变位点正向引物扩增出下游序列。PCR 产物凝胶电泳, DNA 凝胶试剂盒回收后, 以两轮扩增的上、下游 PCR 产物为模板, 以全长引物 (Dam-F 和 Dam-R) 扩增全长。PCR 程序为 98 °C 10 s, 55 °C 10 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

PCR 产物凝胶电泳, DNA 凝胶试剂盒回收后加 A 尾, T/A 克隆至 pMD19-T 克隆载体, *Nde* I/*Sal* I 双酶切后与 pET-29a (+) 构建突变基因表达载体 [21], 将表达载体转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 构建突变表达菌株 [22]。

1.5 突变表达菌株诱导表达及突变重组酶的活性测定

突变表达菌株静息细胞活性检测: 将经 0.2 mmol/L IPTG 诱导培养后的突变表达菌株培养液 6000 r/min, 10 min 离心, 以灭菌的 MSM 液体培养基重悬洗涤 1 次, 6000 r/min, 10 min 离心, 以灭菌的 MSM 液体培养基调整 OD_{600} 至 1.0, 准确吸取 0.1 mL 菌悬液至 2 mL 含 2 mmol/L CMEPA 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH6.5) 中, 35 °C 反应 2 h,

测活。

1.6 突变重组酶纯化

Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱预先以两倍柱体积的 20 mmol/L Tris-HCl (pH7.0) 平衡, 将含有重组酶 DamH 的破碎液离心上清上样至 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱, 4 °C 孵育 1 h, 以 5 倍柱体积的 20 mmol/L Tris-HCl (pH7.0, 50 mmol/L 咪唑) 洗去杂蛋白, 然后以 20 mmol/L Tris-HCl (pH7.5, 300 mmol/L) 洗脱, SDS-PAGE 电泳 [23] 检验纯度, 收集合并纯度最高的洗脱液, 4 °C, 以截留分子量 10 kDa 的透析袋在 20 mmol/L Tris-HCl (pH7.0) 缓冲液中透析过夜去除咪唑。

1.7 酶活测定方法

取适量纯化的突变重组酶加至 3 mL 含 2 mmol/L CMEPA 的 20 mmol/L Tris-HCl (pH7.0) 中, 于 30 °C 反应 10 min 后, 加入 0.1 mol/L 4-氨基安替比林和 0.2 mol/L 铁氰化钾各 30 μ L, 以未突变的重组酶 (WT) 为对照, 稀释 10 倍后测定 OD_{535} , 根据标准曲线计算 MEA 含量 [12]。

酶活定义为 30 °C 下每分钟催化产生 1 μ mol MEA 所需的蛋白量 (mg)。

1.8 蛋白含量的测定

按 Bradford 方法进行, 以牛血清蛋白作为标准蛋白, 具体操作见参考文献 [24]。

2 结果和分析

2.1 重叠延伸 PCR 定点突变 DamH

以表达载体质粒 pET-29a (+) *-damH* 为模板, 重叠延伸 PCR 扩增 S149、E244、H274、D165 和 N192 突变基因, 结果见图 1。

2.2 活性中心氨基酸残基突变表达菌株静息细胞活性检测

对可能的活性中心氨基酸进行突变后发现, 氨基酸的突变影响了酶的稳定性, 突变后的表达菌株超声波破碎后检测不到 DamH 水解活性。以经诱导表达的重组菌株静息细胞进行定性测酶活, 结果见图 2。显色反应依据 MEA 在铁氰化钾催化下与 4-氨基安替比林形成紫红色物质的原理 [12]。

将显色后的反应体系 12000 r/min 离心 1 min, 上清液于 535 nm 波长下测定吸光值, 对各菌株的酶活进行比较。与野生型相比, 突变株 E244A 和

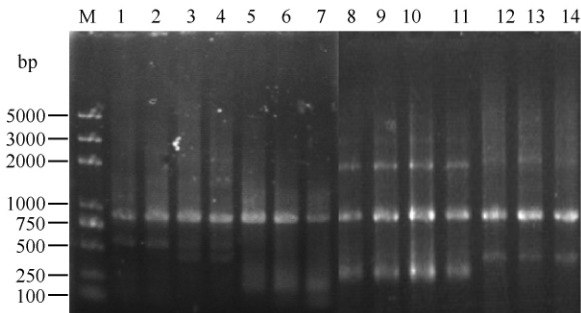


图 1. 重叠延伸 PCR 定点突变 *damH*

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of site-directed mutagenesis *damH* by overlapping PCR. M: DL5000 marker; lane 1: *damH* (WT); lane 2: S149A; lane 3: E149A; lane 4: H149A; lane 5: D165K; lane 6: D165L; lane 7: D165E; lane 8: D165P; lane 9: D165Y; lane 10: N192K; lane 11: N192L; lane 12: N192E; lane 13: N192P; lane 14: N192Y.

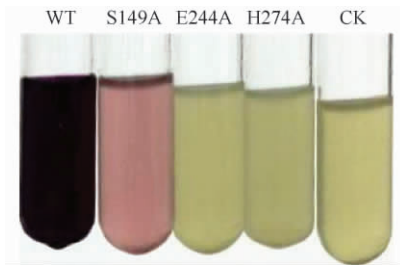


图 2. 突变菌株静息细胞测活

Figure 2. CMEPA hydrolysis activity detection of mutant strains.

H274A 彻底失活, 突变株 S149A 残留活性为野生型 DamH 的 5% (图 2)。洗涤菌体, 重悬后超声破碎, 12000 r/min 离心 10 min, 取 5 μ L 上清液 (约 20 μ g 蛋白), 沉淀以少许 Tris-甘氨酸缓冲液溶解, 取 2 μ L 样品 (约 4 μ g 蛋白) 进行 SDS-PAGE 电泳。SDS-PAGE 电泳结果显示突变重组蛋白都有一定量的表达, H274A 形成较多的包涵体, 重组蛋白大量存在于沉淀中 (图 3)。

2.3 DamH 结构推测

将 DamH 氨基酸序列提交至 NCBI 蛋白结构数据库 (PDB) 进行比对, DamH 与酯酶 3FAK 相似性达 30%。以 3FAK 为参照, 将氨基酸序列提交至 <http://swissmodel.expasy.org/> 进行结构模拟。将模拟得到的 pdb 文件以 pymol 1.4.2 软件绘图, 获得 DamH 蛋白飘带结构和表面形态结构示意图 (图 4)。与 3FAK 一致, DamH 可能的活性中心 3 个氨基酸残基 S149, E244 和 H274 构成的三联体结构位

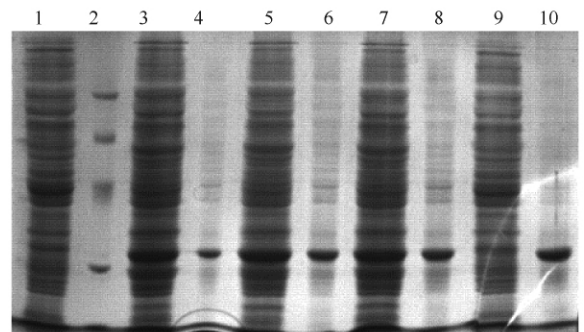


图 3. 突变表达菌株粗酶液 SDS-PAGE 电泳图谱

Figure 3. Analysis of the expression of the mutant enzymes on SDS-PAGE. lane 1: total protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+); lane 2: low molecular protein marker; lane 3: total protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+)-*damH*(WT); lane 4: precipitate protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+)-*damH*(WT); lane 5: total protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+)-*damH*(S149A); lane 6: precipitate protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+)-*damH*(S149A); lane 7: total protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+)-*damH*(E244A); lane 8: precipitate protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+)-*damH*(E244A); lane 9: total protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+)-*damH*(H274A); lane 10: precipitate protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+)-*damH*(H274A).

于由 α 螺旋和 β 转角构成的口袋内, N 端氨基酸序列构成的 α 螺旋位于口袋入口处。这一特征与典型的 α/β 水解酶家族相符。

3FAK 中与活性相关氨基酸残基 (图 5-A) 中, 亲核基团 Ser157 侧链位置由 Trp174 稳定, Ser157, Glu251 和 His281 构成电荷中继网, 对底物进行共价催化以及酸碱催化。与之类似, DamH 可能的活性中心 Ser149-His274-Glu244 之间也存在类似的结构 (图 5-B), 且与之通过氢键相连的氨基酸残基也与 3FAK 相似。

2.4 D165 和 N192 突变子纯化

将 D165 和 N192 两个氨基酸位点定点突变的重组酶 DamH 以 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱进行纯化, 破碎上清液取 5 μ L (约 20 μ g 蛋白), 洗脱液取 2 μ L 上样进行 SDS-PAGE 电泳检测表达情况, 结果见图 6。

SDS-PAGE 电泳结果显示 DamH 的 2 个氨基酸位点突变为脯氨酸后, 重组酶表达受到较大的影响, N192P 几乎不表达, 经 Ni^{2+} -NTA 亲和层析的洗脱液

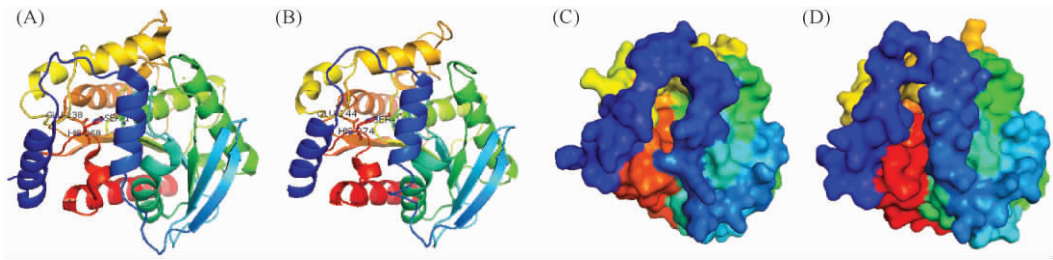


图 4. 3FAK 和 DamH 晶体结构飘带示意图和表面示意图比较

Figure 4. Compared with monomer and surface structure of 3FAK and DamH. A: monomer structure of 3FAK; B: monomer structure of DamH; C: surface structure of 3FAK; D: surface structure of DamH.

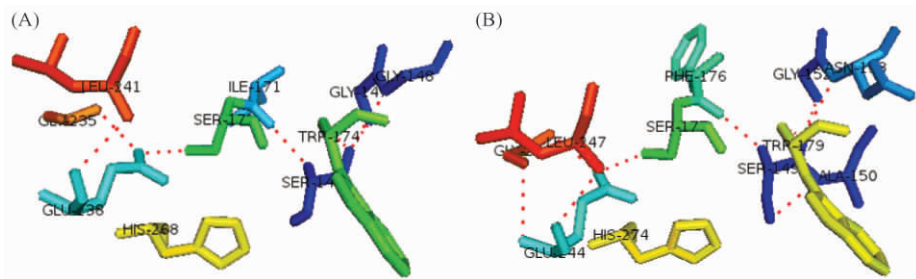


图 5. DamH 和 3FAK 活性相关氨基酸残基之间的比较

Figure 5. Reaction related residues of DamH and 3FAK. A: 3FAK; B: DamH structure. H-bond interactions are outlined by the dashed lines.

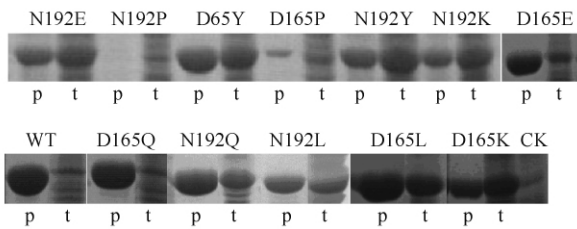


图 6. 突变重组酶纯化 SDS-PAGE 电泳

Figure 6. Analysis of the purification of the mutant enzymes on SDS-PAGE (I). p: purified recombinant DamH; t: total protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+)-*damH*; CK: total protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+)-control.

中未见明显条带; D165P 突变株粗酶液中目标蛋白量较少, 经 Ni^{2+} -NTA 亲和层析的洗脱液中有单一条带, 但与野生型及其它突变型相比, 表达量明显偏低。

2.5 D165 和 N192 位点突变对重组酶酶活的影响

将适量经纯化的突变重组酶加入至测活体系, 测定 CMEPA 水解酶活性。同时测定蛋白含量, 计算比酶活, 以野生型 (WT) 为对照, 结果见表 2。由表 2 可知, 非活性氨基酸位点定点突变对 DamH 可溶性表达有较大影响, 突变子 N192P 和 D165P 可溶

性蛋白表达量分别为野生型表达量的 20.8% 和 28.2%, 突变子 N192Q、N192K、D165Y、D165E 可溶性蛋白表达量分别为野生型表达量的 65.6%, 64.8%, 72.2% 和 79.5%; 突变子 N192P、D165P 比酶活分别为野生型比酶活的 55.5% 和 49.7%, N192Y 和 D165Q 比酶活分别为野生型的 85.5% 和 82.5%, 其余突变株对比酶活无显著影响。

3 讨论

酯酶 (EC3.1.1.1) 是一类催化酯键水解和形成的酶类, 按照氨基酸序列来划分, 来源于微生物的酯酶可分为 8 个家族^[25]。家族 VII 的酯酶和 C 族的 β -内酰胺酶具有很高的相似性, 它们通常具有 Gly-X-Ser-X-Gly 保守序列及 Ser-X-X-Lys 序列。三维结构显示酯酶为 α/β 水解酶折叠模式, 具有一个 Ser-Glu (Asp)-His 的三联体催化中心, 并且活性中心 Ser 位于 Gly-X-Ser-X-Gly 序列中^[26]。水解蛋白质大分子肽键的丝氨酸蛋白酶家族也具有类似的 Ser-His-Asp 催化三联体, 在催化机制上也与酯酶类似^[27]。

表 2. 重组酶 DamH 野生型与突变型表达量与比酶活比较

Table 2. Comparison of the specific activity and yield of DamH (WT) with DamH (MT)

Mutation	Total protein /mg	Total activity /U	Specific activity / (U/mg)	Purification fold	Yield /%
N192Q	66.28	233306	3520	3.05	85.6
N192L	98.78	338519	3427	3.56	86.9
N192K	65.47	218408	3336	3.01	86.3
N192Y	97.70	288117	2949	3.02	84.3
N192P	21.01	40234	1915	3.12	82.5
N192E	99.93	376436	3767	3.19	88.2
D165Q	98.92	281526	2846	3.14	87.4
D165L	106.96	368477	3445	3.15	87.8
D165K	98.07	326965	3334	3.20	84.1
D165Y	72.95	252407	3460	3.04	86.9
D165P	28.49	48860	1715	3.15	83.1
D165E	80.32	282325	3515	3.06	85.3
WT	101.04	348588	3450	3.13	87.7

来源于 *Rhodococcus* sp. N-771 的酰胺酶 RhAmidase 的催化中心由 S195-S171-K96 构成^[28], 定点突变结果显示来源于 *Paracoccus* sp. M-1 的酰胺酶 PamH 具有与之类似的活性中心氨基酸残基 (K84, S159, S183)^[10]。通过氨基酸序列比较, DamH 并不存在与 PamH 类似的三联体结构。对 DamH 可能的 3 个活性中心氨基酸进行定点突变后, 获得的 S149A 的芳基酰胺酶活性只有野生型的 5%, 而突变型 E244A 和 H274A 的活性则完全丧失, 表明这 3 个氨基酸与催化作用密切相关。Nam、Palm、Zhu 等通过 X-ray 衍射分别解析了酯酶 EstE5、PestE、EstE7、HerE 的晶体结构, 底物共结晶试验结果表明这些酯酶的活性中心都由 Ser-Glu (Asp)-His 三联体结构组成^[29-32]。本研究中定点突变的结果揭示 DamH 的活性中心由 Ser-Glu-His 构成, 与酯酶类似。其组成形式与已报道的 CMEPA 水解酶 PamH、AmpA 及 RhAmidase 完全不同。

蛋白质理性设计通常用于优化酶的稳定性、

活性及底物对映体选择性等^[33], 大量的实验证据显示定向进化可有效提高靶蛋白的可溶性表达^[17-18,34]。影响重组蛋白可溶性表达的因素包括亲水性残基的构成、等电点等。突变对 DamH 可溶性表达的影响可以通过同源结构建模获得部分解释。DamH 的 D165 残基和 N192 残基均位于 DamH 球状蛋白的表面 (图 7-A), 且位于两个 α 螺旋的转角处, 这一位置氨基酸残基的改变可能对构象的维持有重要作用。与 D165 相互作用的氨基酸为 Lys161 和 Leu162 (图 7-C), 与 N192 作用的氨基酸为 Thr188, Thr195, Asp196 及 Ser242 (图 7-B)。本研究结果显示两个极性氨基酸 D165、N192 突变为非极性氨基酸 Pro, 以及第 192 位不带电的 Asp 突变为碱性氨基酸 Lys 后, 重组酶可溶性表达受到影响最大。可能是因为脯氨酸的芳香环侧链这种刚性结构对蛋白的正确折叠及维持构象的稳定性产生一定的影响, 从而导致蛋白的可溶性表达和比酶活的差异。

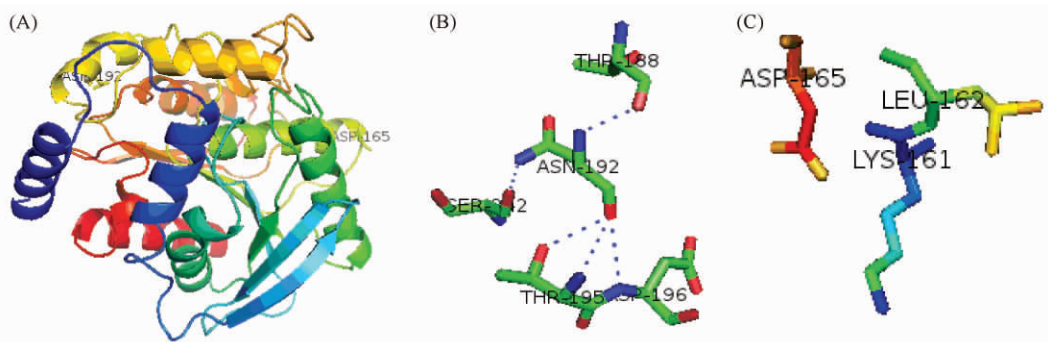


图 7. N192 和 D165 在 DamH 上所处位置及相关氨基酸残基

Figure 7. The N192 reaction related residues and location on the DamH.

参考文献

- [1] Hou Y, Dong W, Wang F, Li J, Shen W, Li Y, Cui Z. Degradation of acetochlor by a bacterial consortium of *Rhodococcus* sp. T3-1, *Delftia* sp. T3-6 and *Sphingobium* sp. MEA3-1. *Letters in Applied Microbiology*, 2014, 59 (1) : 35-42.
- [2] Hou Y, Wang F, Dong WL, Cui ZL. Degradation characteristics of all acetochlor-degrading bacterium *Rhodococcus* sp. T3-1. *China Environmental Science*, 2013, 33 (10) : 1785-1790. (in Chinese)
侯颖, 王飞, 董维亮, 崔中利. *Rhodococcus* sp. T3-1 菌株降解乙草胺的特性. *中国环境科学*, 2013, 33 (10) : 1785-1790.
- [3] Xiao NW, Jing BB, Ge F, Liu XH. The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. *Chemosphere*, 2006, 62 (8) : 1366-1373.
- [4] Coleman S, Linderman R, Hodgson E, Rose RL. Comparative metabolism of chloroacetamide herbicides and selected metabolites in human and rat liver microsomes. *Environmental Health Perspectives*, 2000, 108 (12) : 1151-1157.
- [5] Muthukaruppan G, Janardhanan S, Vijayalakshmi G. Sublethal toxicity of the herbicide butachlor on the earthworm *Perionyx sansibaricus* and its histological changes (5 pp). *Journal of Soils and Sediments*, 2005, 5 (2) : 82-86.
- [6] Geng BR, Yao D, Xue QQ. Acute toxicity of the pesticide dichlorvos and the herbicide butachlor to tadpoles of four anuran species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2005, 75 (2) : 343-349.
- [7] Panneerselvam N, Sinha S, Shanmugam G. Butachlor is cytotoxic and clastogenic and induces apoptosis in mammalian cells. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1999, 37 (9) : 888-892.
- [8] Li Y, Chen Q, Wang CH, Cai S, He J, Huang X, Li SP. Degradation of acetochlor by consortium of two bacterial strains and cloning of a novel amidase gene involved in acetochlor-degrading pathway. *Bioresource Technology*, 2013, 148 : 628-631.
- [9] 侯颖. 芳氧苯氧丙酸类和氯乙酰胺类除草剂降解菌的分离鉴定、降解基因克隆表达及其代谢途径研究. 南京农业大学博士学位论文, 2011.
- [10] Shen WL, Chen HH, Jia KZ, Ni J, Yan X, Li SP. Cloning and characterization of a novel amidase from *Paracoccus* sp. M-1, showing aryl acylamidase and acyl transferase activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94 (4) : 1007-1018.
- [11] Zhang J, Yin JG, Hang BJ, Cai S, He J, Zhou SG, Li SP. Cloning of a novel arylamidase gene from *Paracoccus* sp. strain FLN-7 that hydrolyzes amide pesticides. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (14) : 4848-4855.
- [12] Wang F, Hou Y, Zhou J, Li ZK, Huang Y, Cui ZL. Purification of an amide hydrolase DamH from *Delftia* sp. T3-6 and its gene cloning, expression, and biochemical characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98 (17) : 7491-7499.
- [13] Wetzel R. For protein misassembly, it's the "1" decade. *Cell*, 1996, 86 (5) : 699-702.
- [14] Zhang YB, Howitt J, McCorkle S, Lawrence P, Springer K, Freimuth P. Protein aggregation during overexpression limited by peptide extensions with large net negative charge. *Protein Expression and Purification*, 2004, 36 (2) : 207-216.
- [15] Liu S, Hu BC. Strategy of protein soluble expression in *Escherichia coli*. *Letters in Biotechnology*, 2005, 16 (2) : 172-175. (in Chinese)
刘爽, 胡宝成. 原核系统可溶性表达策略. *生物技术通讯*, 2005, 16 (2) : 172-175.
- [16] Dale GE, Broger C, Langen H, D'Arcy A, Stüber D. Improving protein solubility through rationally designed amino acid replacements: solubilization of the trimethoprim-resistant type S1 dihydrofolate reductase. *Protein Engineering*, 1994, 7 (7) : 933-939.
- [17] Yang JK, Park MS, Waldo GS, Suh SW. Directed evolution approach to a structural genomics project: Rv2002 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100 (2) : 455-460.
- [18] Jiang SM, Li CH, Zhang WW, Cai YH, Yang YL, Yang S, Jiang WH. Directed evolution and structural analysis of N-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase provide insights into recombinant protein solubility in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 2007, 402 (3) : 429-437.
- [19] Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR.

- Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1989, 77 (1) : 51-59.
- [20] Landt O, Grunert HP, Hahn U. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1990, 96 (1) : 125-128.
- [21] Sambrook J, Russell D. Molecular cloning, a laboratory manual. Vol. 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [22] Hou Y, Tao J, Shen WJ, Liu J, Li JQ, Li YF, Cao H, Cui ZL. Isolation of the fenoxaprop-ethyl (FE)-degrading bacterium *Rhodococcus* sp. T1, and cloning of FE hydrolase gene *feh*. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 323 (2) : 196-203.
- [23] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227 (5259) : 680-685.
- [24] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72 (1) : 248-254.
- [25] Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64 (6) : 763-781.
- [26] Petersen EI, Valinger G, Sölkner B, Stubenrauch G, Schwab H. A novel esterase from *Burkholderia gladioli* which shows high deacetylation activity on cephalosporins is related to β -lactamases and dd-peptidases. *Journal of Biotechnology*, 2001, 89 (1) : 11-25.
- [27] Sun ZR, Wang Y, Hu SM, Guo Q, He FC. Study on the molecule structural evolution of serine proteinase superfamily. *Acta Biophysica Sinica*, 1999, 15 (3) : 530-535. (in Chinese)
孙之荣, 王钰, 胡胜民, 郭青, 贺福初. 丝氨酸蛋白酶超家族分子结构进化研究. 生物物理学报, 1999, 15 (3) : 530-535.
- [28] Ohtaki A, Murata K, Sato Y, Noguchi K, Miyatake H, Dohmae N, Yamada K, Yohda M, Odaka M. Structure and characterization of amidase from *Rhodococcus* sp. N-771: Insight into the molecular mechanism of substrate recognition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2010, 1804 (1) : 184-192.
- [29] Nam KH, Kim MY, Kim SJ, Priyadarshi A, Lee WH, Hwang KY. Structural and functional analysis of a novel EstE5 belonging to the subfamily of hormone-sensitive lipase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 379 (2) : 553-556.
- [30] Nam KH, Kim MY, Kim SJ, Priyadarshi A, Kwon ST, Koo BS, Yoon SH, Hwang KY. Structural and functional analysis of a novel hormone-sensitive lipase from a metagenome library. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2009, 74 (4) : 1036-1040.
- [31] Palm GJ, Fernández-Álvaro E, Bogdanović X, Bartsch S, Sczodrok J, Singh RK, Böttcher D, Atomi H, Bornscheuer UT, Hinrichs W. The crystal structure of an esterase from the hyperthermophilic microorganism *Pyrobaculum calidifontis* VA1 explains its enantioselectivity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91 (4) : 1061-1072.
- [32] Zhu XY, Larsen NA, Basran A, Bruce NC, Wilson IA. Observation of an arsenic adduct in an acetyl esterase crystal structure. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (3) : 2008-2014.
- [33] Zhu L, Zhou Q, Zhan BJ, Chi LY, Zhang JL. Progress and applications of site-directed mutagenesis of lipases and esterases. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2012, 24 (2) : 10-13. (in Chinese)
祝玲, 周琼, 詹冰津, 池丽影, 张军玲. 脂肪酶及酯酶定点突变研究进展及其应用. 海峡药学, 2012, 24 (2) : 10-13.
- [34] Wigley WC, Stidham RD, Smith NM, Hunt JF, Thomas PJ. Protein solubility and folding monitored *in vivo* by structural complementation of a genetic marker protein. *Nature Biotechnology*, 2001, 19 (2) : 131-136.

Effect of site-directed mutagenesis on soluble expression and specific activity of amide hydrolase DamH

Fei Wang^{1,2}, Zhoukun Li², Jie Zhou², Zhongli Cui^{2*}

¹Jiangxi Engineering Laboratory for the Development and Utilization of Agriculture Microbial Resources, College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, Jiangxi Province, China

²Key Laboratory of Agricultural Environmental Microbiology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] DamH is a bifunctional hydrolase that hydrolyzes the amide and ester bonds. Previous studies demonstrated that mutagenesis of non-catalytic residues shows a negative impact on the soluble expression and specific activity of DamH. Therefore, we studied the catalytic triad of DamH and the effect of non-catalytic mutagenesis on the soluble expression and specific activity of DamH. [Methods] We performed site-directed mutation experiment of the 3 possible catalytic sites: S149, E244 and H274 and the non-active sites by using overlapping PCR. In the whole cell catalytic experiments, 2'-methyl-6'-ethyl-2-chloroacetanilide (CMEPA) hydrolase activities of the three mutants (S149A, E244A and H274A) were assayed. Mutants of D165 and N192 were purified by affinity chromatography of Ni²⁺-NTA. At the same time the hydrolase activities of mutants were compared with that of the wild-type strain. [Results] S149-E244-H274 was the catalytic triad of DamH. Kinetics shows that the CMEPA hydrolase activity of mutant S149A declined to 5% of the wild-type strain and none of E244A and H274A mutants showed any CMEPA hydrolase activity. Mutations of D165 and N192 would affect the soluble expression of recombinant enzyme. The soluble expression levels of D165P and N192P were 28.2% and 20.8% of the wild-type strain, respectively. Furthermore, hydrolase activities of N192P and D165P were only 55.5% and 49.7% of the wild-type enzyme, respectively. [Conclusion] DamH uses the same active site to hydrolyze esters and amides.

Keywords: DamH, site-directed mutagenesis, catalytic triad, soluble expression, specific activity

(本文责编:李磊)

Supported by the Natural Science Foundation of China (31560031, 31570059)

Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84396753; E-mail: czl@njau.edu.cn

Received: 19 May 2015/Revised: 28 June 2015