



## 应用易错PCR技术提高环糊精葡萄糖基转移酶的可溶性表达

郭永华<sup>1,2</sup>, 陈济琛<sup>1</sup>, 贾宪波<sup>1,2</sup>, 陈龙军<sup>1</sup>, 蔡海松<sup>1</sup>, 林新坚<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> 福建省农业科学院土壤肥料研究所, 福建 福州 350003

<sup>2</sup> 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002

**摘要:** 【目的】对嗜热脂肪芽孢杆菌CHB1的环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)基因进行定向进化, 筛选得到胞外酶活性和可溶性表达定量提高的突变酶。【方法】采用易错PCR技术向环糊精葡萄糖基转移酶基因中随机引入突变, 建立酶基因突变文库, 筛选获得胞外酶活性和可溶性表达定量提高的突变体, 并对突变酶进行诱导表达、纯化及部分酶学性质研究。【结果】通过筛选获得CGTase胞外酶活性和可溶性表达定量提高的突变菌株ds-6和ep-9, 其胞外 $\alpha$ -环化活力分别是原始酶的1.72倍和2.18倍, 可溶性表达量提高了1倍。序列分析表明, 突变体ep-9有3个碱基发生了变化: G2005A/A2037G/T2081G, 其中有2个碱基突变导致了氨基酸的改变。SWISS-MODEL数据库模拟CGTase的结构表明, 2个突变氨基酸分别位于无规卷曲和 $\beta$ -转角/折叠之间的转角中。酶学性质测定表明: 突变CGTase的 $\beta$ -环化比活力是原始酶的2.44倍, 总环化比活力提高了34%,  $K_m$ 值由4.3 g/L降低到3.74 g/L; 在pH稳定性方面较原始酶有所提高。单碱基定点突变证实突变体ep-9可溶性表达水平及胞外酶活性提高的关键突变是G2005A。【结论】本试验表明: 基于易错PCR技术获得嗜热脂肪芽孢杆菌CHB1的CGTase的胞外酶活和可溶性表达定向进化, G2005A突变对于提高CGTase的可溶性表达及胞外酶活起关键作用, 这对认识CGTase的构效关系以及进一步改造该酶分子、扩大酶的生产应用具有重要意义。

**关键词:** 嗜热环糊精葡萄糖基转移酶, 可溶性表达, 定向进化, 易错PCR

环糊精(Cyclodextrin, CDs)是由多个葡萄糖单元通过 $\alpha$ -1,4糖苷键连接而成的环状大分子多糖, 根据葡萄糖单元数目的不同, 分为 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -环糊精等。由于具有独特的疏水空腔结构, 能包含疏水性客体分子, 从而改变客体分子的溶解度

等物理化学性质, 因此环糊精在食品、医药和环境保护等诸多领域有着非常广泛的应用<sup>[1-2]</sup>。环糊精葡萄糖基转移酶(EC 2.4.1.19; Cyclodextrin glucosyltransferase, CGTase)是 $\alpha$ -淀粉酶家族的成员之一, 能催化环化、耦合、歧化和水解这4种反

基金项目: 国家公益性农业科研专项(201303094-05); 福建省自然科学基金项目(2014J01105); 福建省属公益类科研院所基本科研专项(2014R1022-3); 福建财政社会公益研究(2060302)

\*通信作者。Fax: +86-591-87862257; E-mail: xinjianlin@163.net

收稿日期: 2015-12-21; 修回日期: 2016-02-19; 网络出版日期: 2016-03-02

应, 环化反应是CGTase的特征反应, 能通过催化分子内的转糖基反应将淀粉和相关基质转化生成环糊精<sup>[3]</sup>。由于环糊精是高附加值产品, 生产环糊精所必需的CGTase已成为当今研究的热点。

研究表明, CGTase在重组大肠杆菌中的表达主要以包涵体形式存在<sup>[4]</sup>, 包涵体复性费时费力, 不适合工业化的生产应用。Wu等<sup>[5]</sup>构建了来源于*Paenibacillus macerans* JFB05-01的 $\alpha$ -CGTase基因的分泌型表达载体pET-20b(+)-*cgt*, 发酵90 h后胞外 $\beta$ -CGTase酶活可达22.5 U/ml, 是目前国内较高水平。Lo等<sup>[6]</sup>通过响应面法优化培养条件, 提高了胞外 $\beta$ -CGTase的可溶性表达, 但仍不能满足工业用酶的需求。因此提高CGTase的可溶性表达、发酵酶活和催化效率具有一定实践意义, 不仅可提高CGTase的工业应用效率, 而且可以此为基础研究CGTase结构与功能之间的关系。

酶的改造可以分为理性设计和非理性设计, 前者是根据蛋白质的结构、功能、催化机制等信息对氨基酸序列重要的突变位点进行精确设计, 产生新性状的蛋白质; 后者在不了解有关酶的结构与功能之间关系的情况下, 通过对酶基因的随机突变和基因片段重组来构建突变库, 再通过高通量筛选系统得到性能改善的突变体。易错PCR以其操作简单、有效等优点成为目前应用最为广泛的非理性设计方法之一<sup>[7]</sup>。

对于CGTase的研究, 目前国内外研究主要集中在酶的热稳定性、产物专一性方面, 而对于提高该酶在大肠杆菌表达系统中可溶性表达和催化效率的研究较少, 尤其是在CGTase的结构与可溶性表达关系的定向进化研究方面, 尚未见相关报道。

本研究基于易错PCR随机突变方法对来自嗜热芽孢杆菌CHB1环糊精葡萄糖基转移酶基因*cgt*进行了分子改造, 通过建立的基于96孔板高通量筛选系统, 经过两轮定向进化与筛选, 共筛选得到2株胞外发酵酶活和可溶性表达明显得到提高

的CGTase突变体, 并初步分析了可溶性表达提高的机理, 为下一步的工业化生产应用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒:**嗜热芽孢杆菌CHB1、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、*Escherichia coli* BL21(DE3)、表达质粒pET-28a(+)-OmpA-*cgt*均由实验室保存或构建的; 表达载体pET-28a(+)-OmpA-*cgt*购自Novagen公司。

**1.1.2 酶和试剂:**限制性内切酶(*Bam*H I和*Xho* I)、T4 DNA连接酶、*Taq* DNA聚合酶购自TaKaRa公司; DNA marker购自天根生化科技有限公司; PCR纯化试剂盒及质粒纯化试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司; MnCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、dATP、dTTP、dCTP、dGTP购自TaKaRa公司; Protein Ladder购自Thermo公司; 其他试剂均为进口试剂或国产分析纯。

**1.1.3 培养基:**LB培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物5, 氯化钠10; 筛选培养基(LB培养基+3% (W/V)可溶性淀粉); 乳糖自诱导培养基<sup>[8]</sup>(/L): 胰蛋白胨10 g, 酵母浸粉5 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17.9 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.8 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.3 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, 甘油5 mL, Trace Metal 200  $\mu$ L。

### 1.2 易错PCR扩增与突变文库的构建

以实验室构建好的pET-28 a (+)-OmpA-*cgt* 质粒为模板, 用引物*cgt*-F和*cgt*-R进行易错PCR扩增基因, 在上下游引物中分别加入了*Bam*H I和*Xho* I限制性内切酶酶切位点, 分别用下划线标出。*cgt*-F: 5'-CGCGGGATCCAATAAGGTAATTT TACATCG-3'; *cgt*-R: 5'-CCGCTCGAGGTTTT GCCAATTCATAAT-3'。

易错PCR致突变条件优化: 普通PCR扩增体系(50  $\mu$ L) 为10 $\times$ TaKaRa *Taq* Buffer, dNTPs Mixture, 引物各0.2  $\mu$ mol/L, 模板 DNA 200 ng, *Taq* DNA 聚合酶2.5 U。PCR反应条件: 95  $^{\circ}$ C

5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35个循环; 72 °C 10 min。易错PCR致突变条件优化如下: (1)  $Mn^{2+}$  条件优化: 易错PCR体系其它条件不变,  $Mn^{2+}$  分别添加至0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 mmol/L; (2)  $Mg^{2+}$  条件优化: 易错PCR体系其它条件不变,  $Mg^{2+}$  分别选择6、7、8、9、10、11 mmol/L。根据以上条件得到不同突变率的结果, 其它易错PCR体系组分和反应条件不变, 选择适宜的突变率。

PCR扩增产物经质量分数为1%的琼脂糖凝胶电泳后, 切胶纯化回收目的条带。纯化后的产物和pET-28a(+)-OmpA载体都经BamH I和Xho I双酶切3 h后回收, 回收产物按基因片段: 载体=3:1比例混合后加入T4 DNA连接酶过夜, 转化大肠杆菌BL21(DE)感受态细胞, 涂布于固体LB平板(100  $\mu$ g/mL Kan), 抗性筛选阳性转化子, 所有转化子构成突变体文库。随机挑选10个阳性转化子送上海生工测序。计算在环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)基因中平均有多少碱基发生了突变, 计算突变率。

### 1.3 突变文库的高通量筛选

从LB平板上挑选单个克隆子菌落接种于含有300  $\mu$ L LB培养基(内含50  $\mu$ g/mL Kan)的96孔中, 每孔对应一特定转化子。每块96孔板同时接种野生型克隆, 作为阳性对照。37 °C、200 r/min振荡培养12 h。在无菌条件下, 从96孔板中取出20  $\mu$ L菌液, 对应接入含1000  $\mu$ L乳糖自诱导培养基的另一96深孔板中, 并进行37 °C、200 r/min振荡培养。4 °C临时冷藏种子96深孔板。25 °C、200 r/min振荡培养重组菌48 h后, 以每孔一一对应为原则, 移取10  $\mu$ L上清粗酶液至第2块已加入每孔90  $\mu$ L淀粉底物[5%(W/V)]的96孔PCR反应板中, 60 °C条件下反应10 min, 加入100  $\mu$ L 1 mol/L的盐酸, 加入100  $\mu$ L甲基橙显色液, 于酶标仪上测定 $OD_{505}$ 并保存数据。计算每个克隆子酶

活, 以阳性对照为参考, 将结果高于阳性对照的克隆挑出并进行复筛。

### 1.4 突变体的生产与纯化

种子培养: 将高酶活突变体菌株接入装有50 mL LB培养基的250 mL三角瓶中, 摇床转速180 r/min, 培养温度为37 °C, 培养8 h。

发酵培养: 将培养好的种子培养液按2%(V/V)的接种量, 接种至装有50 mL乳糖自诱导培养基的250 mL三角瓶中进行培养, 发酵温度为25 °C, 摇床转速180 r/min, 诱导90 h。

各培养基使用前添加100  $\mu$ g/mL卡那霉素。

高酶活突变菌培养90 h后的发酵液在10000 r/min、4 °C下离心10 min, 除去菌体, 得上清即粗酶液。所有突变体粗酶液的纯化均采用Ni柱一步亲和层析法。

### 1.5 酶活性的测定

环糊精葡萄糖基转移酶 $\alpha$ -、 $\beta$ -和 $\gamma$ -环化活力, 参照Lejeune等<sup>[9-10]</sup>方法, 以3%(W/V)可溶性淀粉为底物进行环糊精葡萄糖基转移酶 $\alpha$ -、 $\beta$ -和 $\gamma$ -<sup>[11]</sup>环化活力测定。1个酶活力单位定义为在最适反应条件下每分钟生成1  $\mu$ mol环糊精所需的酶量。

### 1.6 突变体的SDS-PAGE电泳分析和蛋白质含量测定

野生型重组菌和突变体ep-9菌分别接种于发酵培养基中, 25 °C诱导90 h, 发酵液10000 r/min离心, 上清用于检测胞外酶活性, 菌体重悬于冰预冷的裂解缓冲液冰浴中超声破碎, 10000 r/min离心分离上清和沉淀, SDS-PAGE分析表达产物。以野生型重组菌作为对照, 分离胶浓度为15%的SDS-PAGE电泳检测目的蛋白可溶性表达情况。应用软件Bandscan 5.0分析SDS-PAGE电泳图谱中蛋白条件进行灰度扫描, 测定各泳道中目的蛋白表达比率和灰度值, 计算可溶性蛋白占总蛋白的比例。蛋白质的含量采用Bradford法进行测定。

## 1.7 环糊精葡萄糖基转移酶酶学性质的研究

突变株环糊精葡萄糖基转移酶的最适反应pH和pH稳定性：以0.9 mL不同pH配置的3% (W/V)可溶性淀粉溶液为底物，测定酶活，确定酶的最适反应pH。将酶液置于不同pH值的缓冲液于室温放置30 min, 在最适pH条件下测定残余酶活力，得到pH稳定性。

突变株环糊精葡萄糖基转移酶的最适反应温度和热稳定性：以最适pH配置的3% (W/V)可溶性淀粉溶液为底物，在不同温度梯度下测定酶活，确定酶的最适反应温度；将原酶置于相对稳定的pH缓冲液，分别在不同温度梯度下保温60 min, 在最适反应温度条件下测定残余酶活力。

## 1.8 突变基因序列分析及结构预测和突变位点分析

高酶活突变菌株PCR及质粒双酶切验证正确后送上海生工测序。测序结果进行序列比对，找出突变碱基位点和氨基酸位点。通过在线同源建模系统SWISS-MODEL (<http://www.swissmodel.expasy.org>)和the Yang Zhang Lab web

(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/>)<sup>[12]</sup>预测环糊精葡萄糖基转移酶的三维结构。根据预测的结构信息，运用Discovery Studio 4.0和MOE软件分析突变氨基酸位点的突变效应。

## 2 结果和分析

### 2.1 易错PCR条件的确定

由于 $Mg^{2+}$ 是保证扩增的互补链与模板的结合； $Mn^{2+}$ 能够降低 $Taq$  DNA聚合酶对模板的特异性，可导致目的基因碱基的参入频率改变或相应的氨基酸残基变异，因而调整2种离子的浓度，可以获得不同突变频率的多样性文库。本实验选择 $Mg^{2+}$ 浓度为6、7、8、9、10、11 mmol/L， $Mn^{2+}$ 浓度为0、0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 mmol/L作为梯度进行易错PCR实验。根据目的条带的扩增特异性，最终将PCR条件确定 $Mn^{2+}$ 浓度为0.5 mmol/L， $Mg^{2+}$ 浓度为7.0 mmol/L。扩增得到环糊精葡萄糖基转移酶基因片段为2100 bp左右的条带，PCR结果如图1所示。

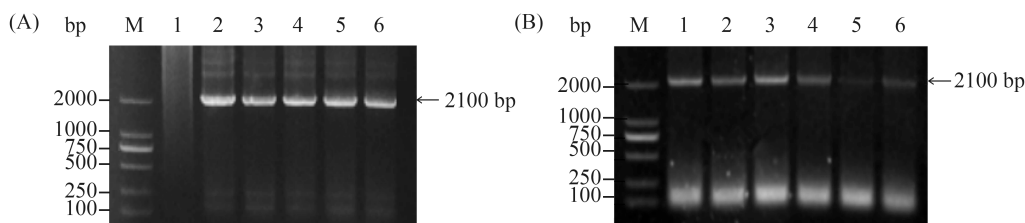


图 1. 不同离子浓度下的易错PCR

Figure 1. Error-prone PCR conducted with different ion concentration. (A) M: DNA marker; lane 1–6: 6, 7, 8, 9, 10, 11 mmol/L,  $Mg^{2+}$ , no  $Mn^{2+}$ . (B) M: DNA marker; lane 1–6: 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 mmol/L  $Mn^{2+}$ , 7 mmol/L  $Mg^{2+}$ .

### 2.2 突变体文库的构建及突变株的筛选和鉴定

在优化确定易错PCR条件下扩增环糊精葡萄糖基转移酶基因，产物经纯化双酶切后连接到经同样酶切的表达载体pET-28 a (+)-OmpA上，转化 *E. coli* BL21 (DE3)细胞，涂布硫酸卡那霉素 (50 mg/L)抗性平板构建突变体文库。按照上述文库

构建及筛选方法对CGTase进行了3轮进化，共完成对约 $10^4$ 株突变体的初筛，得到活性比值提高的突变体100株。随后对这100株突变体进行了复筛，定量比较这些突变株和野生型CGTase的催化效率和可溶性表达情况。最终获得催化效率和可溶性表达提高的2个突变体：ds-6和ep-9。随后，

对突变体进行连续传代后, 质粒遗传稳定性为100%, 可溶性表达情况没有改变(图2), 其中突变株ep-9, 发酵90 h后其 $\alpha$ -环化活力为24.9 U/mL, 是野生型环糊精葡萄糖基转移酶的 $\alpha$ -环化活力(11.4 U/mL)的2.18倍。如表1所示, 突变株ep-9和原始菌株的CGT酶表达量占菌株总蛋白量的比例相比提高了5.8%, 总可溶性表达量是野生型CGT酶的2.1倍, 可溶性蛋白占总目标蛋白的比例提高了94.6%, 表明突变株ep-9提高了CGTase的可溶性表达。

### 2.3 突变基因的序列分析

突变基因的序列分析表明, ds-6和ep-9突变体基因都有3个碱基和2个氨基酸发生了突变, 碱基

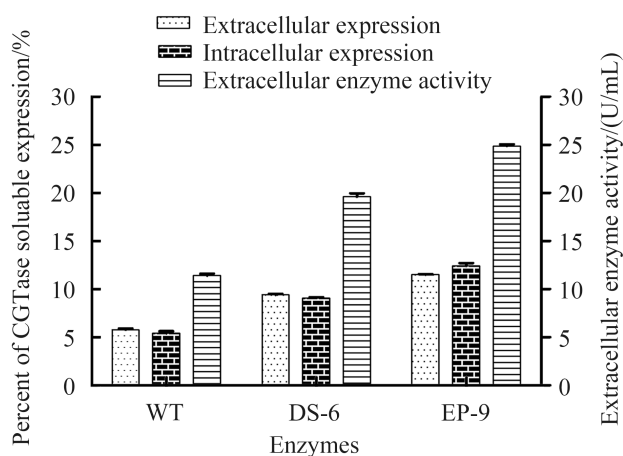


图2. 原始CGTase和突变体的胞内和胞外可溶性表达情况

Figure 2. Extracellular and intracellular soluble expression of the wild-type CGTase and mutants. The values are means $\pm$ standard errors of three independent experiments.

表1. 原始CGTase和突变体的可溶性表达情况

Table 1. Soluble expression of the wild-type CGTase and mutants

Enzymes	Soluble expression /%	Total expression /%	S/T ratio
Wild-type	11.2	60.5	18.5
ds-6	18.5	62.7	29.5
ep-9	23.9	66.3	36.0

的突变有1个是转换, 另外2个是颠换; ds-6和ep-9突变体的碱基突变都发生在A、G之间(表2)。

### 2.4 环糊精葡萄糖基转移酶的诱导表达和分离纯化

将筛选到的突变株和原始菌株分别诱导表达后, 收集菌体, 低温超声波破碎, 离心后取上清, 过Ni-IDA柱, 收集洗脱液, SDS-PAGE (图3)分析显示经镍柱纯化后的蛋白纯度达到95%以上, 重组CGTase的相对分子质量在75 kDa附近, 符合预期目的蛋白大小。从表3可见, 突变株的总环糊精形成比活力比原始酶提高了34%, 其中值得注意的是 $\beta$ -环糊精形成比活力是原始酶的2.44倍。

表2. 突变体的测序结果

Table 2. Sequencing results of the mutants

Mutants	Mutated nucleotide bases	Mutated amino acids
ds-6	G1741A/G1770A/A1752G	Gly581 Ser /Asp590 Asn/Same sense mutation
ep-9	G2005A/A2037G/T2081G	Gly669 Arg/Same sense mutation /Val694 Gly

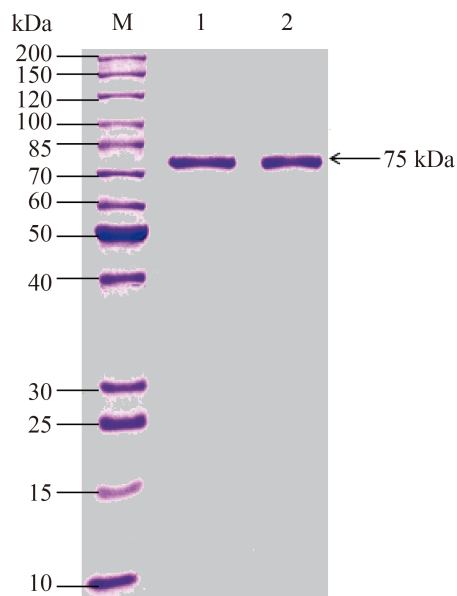


图3. 原始CGT酶和突变体的SDS-PAGE分析

Figure 3. SDS-PAGE analysis of the wild-type CGTase and mutants. M: protein Marker; lane 1: wild-type CGTase; lane 2: mutant ep-9.

表3. 来源于嗜热脂肪芽孢杆菌CHB1的野生和突变体CGT酶的环糊精形成比活力

Table 3. Cyclodextrin forming specific activities of the wild-type and mutant CGTases from *Geobacillus* sp.B1

Enzyme	Wild-type	ep-9	G2005A	T2081G
$\alpha$ -cyclodextrin forming specific activity/(U/mg)	166.80±1.70	167.70±1.54	166.90±1.50	165.90±1.48
$\beta$ -cyclodextrin forming specific activity/(U/mg)	72.90±0.29	178.50±1.20	177.30±1.35	83.50±0.22
$\gamma$ -cyclodextrin forming specific activity/(U/mg)	26.600±0.005	10.800±0.001	15.300±0.003	20.000±0.002
Total/(U/mg)	266.3	357	359.5	269.4

Each value represents the mean of three independent measurements, and the deviation from the mean was below 5%.

## 2.5 酶学性质分析

**2.5.1 最适温度和温度稳定性:** 如图4-A所示, 突变酶ep-9的最适温度为50 °C, 与原始酶相比, 突变酶的最适温度降低了10 °C。图4-B可见, 原始酶和突变酶的温度稳定性都较好, 在55 °C处理60 min后, 酶活仍然能够保持在50%左右, 温度稳定性变化趋势一致。

**2.5.2 最适pH及pH稳定性:** 在pH 3.0–10.0范围内

测定酶活力, 结果如图5-A所示, 突变前后2个酶的最适反应pH发生较大变化, 突变体ep-9的最适反应pH为7.0, 是中性环境, 原始酶的反应环境偏向于酸性, 且突变后的CGT酶在pH 5.0–9.0范围内均具有较高的酶活力, pH范围有所增大。原始酶和突变酶的pH稳定性基本一致, 在pH 5.0–10.0之间, 处理60 min后均保持在80%以上(图5-B), 在中性及酸性条件下, 突变酶与原始酶相比, 稳定性略有提高。

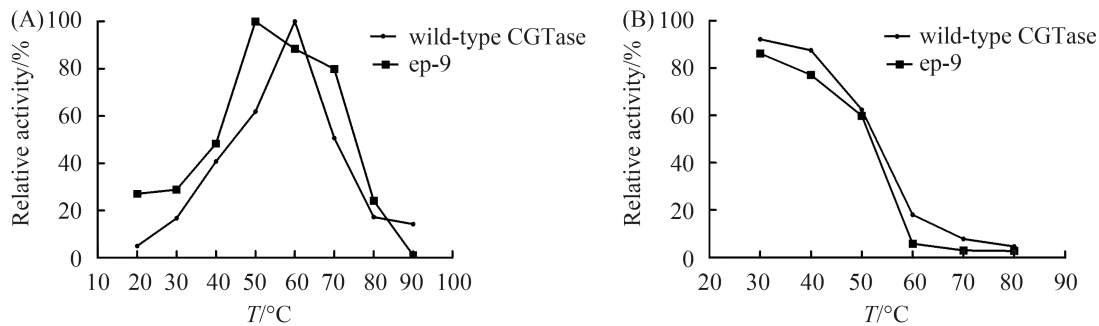


图4. 原始CGTase和ep-9的最适温度(A)和温度稳定性(B)

Figure 4. Analysis of optimum temperature (A) and stability (B) of the wild-type CGTase and ep-9.

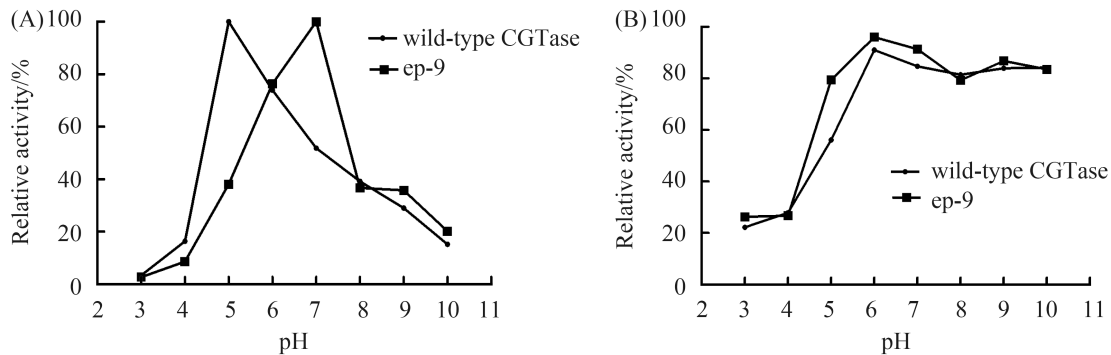


图5. 原始CGTase和ep-9的最适pH(A)和pH稳定性(B)

Figure 5. Analysis of optimum pH (A) and stability (B) of the wild-type CGTase and ep-9.

**2.5.3 酶动力学分析:**以可溶性淀粉为底物,测定野生型环糊精葡萄糖基转移酶和突变体ep-9酶动力学参数。野生型CGTase和突变体ep-9的 $K_m$ 值分别为4.3和3.74,突变体的 $K_m$ 降低了13%,而 $V_{max}$ 增大了183.4%(表4)。结果表明突变体CGTase对底物的亲和力增强,催化效率比原始酶提高了16%。

## 2.6 嗜热脂肪芽孢杆菌环糊精葡萄糖基转移酶的结构预测和突变位点分析

选择与CGTase同源率为97%的嗜热脂肪芽孢杆菌CGTase作为同源模板(pdb: 1 CYG),经同源序列比对,采用swiss-model repository对突变酶

ep-9进行结构预测生成三级结构模型(图6)。由图可知,G669R和V694G 2个突变位点都分布于CGTase蛋白分子的表面,而且都远离酶的催化中心(Asp 229和Glu 257)。从一级结构看,2个位点都位于氨基酸序列的C-端。这些位点的突变在提高蛋白可溶性表达的同时不会直接影响CGTase的重要催化功能,这与前面对酶的一些性质测定结果是一致的。从二级结构分析,G669R突变位点位于 $\beta$ -转角和无规卷曲之间的一个转角中,而V694G则位于无规卷曲和 $\beta$ -折叠之间的一个转角中。

如图7所示,突变体G2005A(G669R)发酵90 h的胞外酶活性为22.9 U/mL,比较接近于突变

表4. 来源于嗜热脂肪芽孢杆菌CHB1的野生和突变CGT酶的动力学参数  
Table 4. Kinetic parameters of wild-type and mutated enzymes

Enzyme	Wild-type	ep-9	G2005A	T2081G
$V_{max}/[\text{mmol}/(\text{mL}\cdot\text{min})]$	0.0130±0.005	0.0369±0.011	0.0362±0.009	0.0190±0.002
$K_m/(\text{g}/\text{L})$	4.30±0.15	3.74±0.16	3.80±0.10	4.01±0.11
$k_{cat}/\text{min}^{-1}$	8.21	9.48	9.62	8.86
$k_{cat}/k_m/[\text{g}/(\text{min}\cdot\text{L})]$	131.5	152.0	151.9	132.6

The values are means±standard errors of three independent experiments.

体ep-9的24.9 U/mL,而突变体T2081G(V694G)的胞外酶活性只有12.7 U/mL,并且从表3和表4可知,突变体G2005A的 $\beta$ -环化比活提高以及相应的 $K_m$ 值降低程度和突变体ep-9相似,结果表明第2005位碱基的突变是起主导作用,氨基酸Gly突变成Arg对可溶性表达有一定的作用,说明该酶第669位氨基酸对提高可溶性表达有较大的影响。

如图8-A, B依次为野生型CGT酶和第669位甘氨酸被精氨酸取代的突变体(G669R),可以看出突变体G669R的侧链结构发生了改变,进而引发了附近的氨基酸残基及整个空间结构的变化,这可能在一定程度上减少了包涵体的形成,提高可溶性表达量。

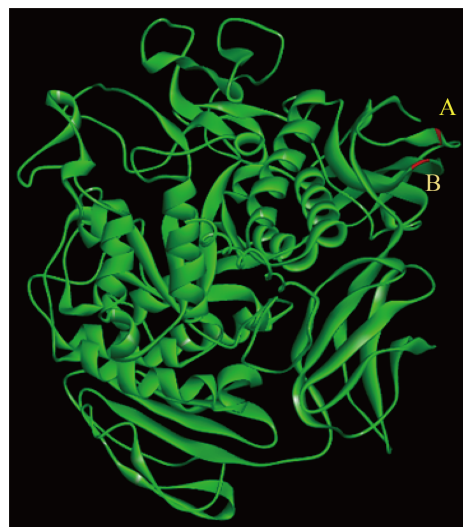


图6. 突变体ep-9环糊精葡萄糖基转移酶的模拟三级结构  
Figure 6. 3D structure of simulated mutant ep-9 CGTase. A: V694G; B: G669R.

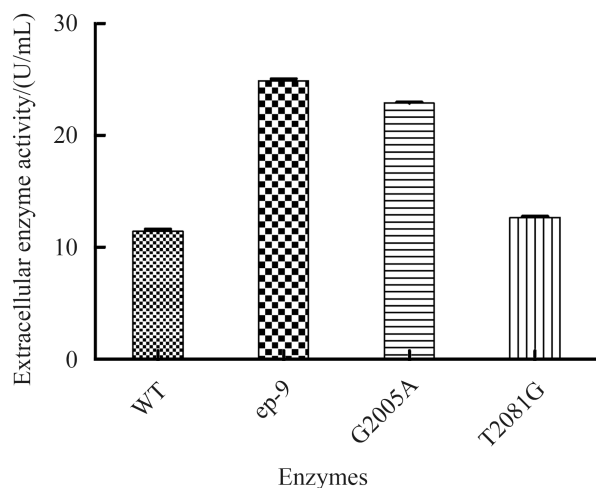


图 7. 原始CGTase和突变体的胞外酶活性情况

Figure 7. Extracellular enzyme activity of wild-type CGTase and mutants. The values are means±standard errors of three independent experiments.

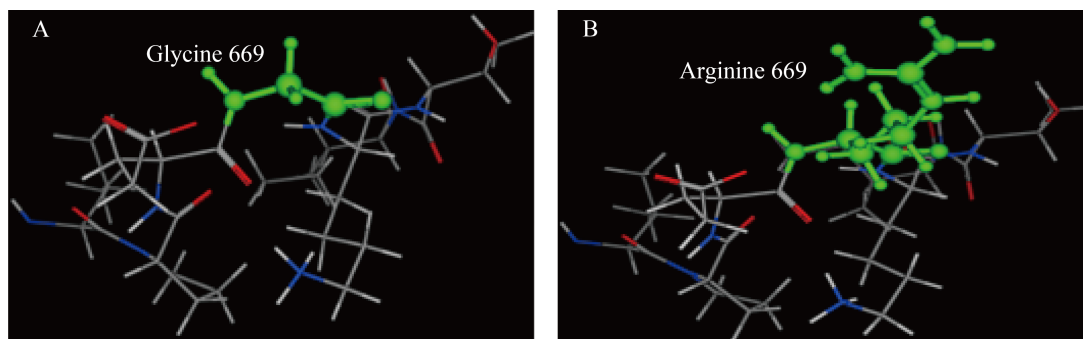


图 8. 野生型与突变型CGT酶在669位点上的结构图

Figure 8. Structure map of the wild-type and mutant CGTases in 669 sites. A: wild-type CGTase; B: G669R.

### 3 讨论

大肠杆菌表达系统中表达的重组蛋白多数由于新生肽链不能在正确位置形成次级键，从而错误折叠形成包涵体。提高蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达，通常采用：(1) 选择合适的载体与宿主菌<sup>[13]</sup>；(2) 培养条件与诱导方法的选择<sup>[14]</sup>；(3) 分子伴侣、融合蛋白和折叠酶的共表达<sup>[15]</sup>；(4) 蛋白质工程方法改变蛋白结构增加可溶性<sup>[16]</sup>。在实际生产应用中，需要对上述方法进行综合考虑以达到最佳的效果。目前，利用基因工程和蛋白质工

程方法对工业生产中的关键酶进行改造已经成为优化酶的性质常用方法。将这一方法应用于提高目的蛋白的可溶性表达，可以简化表达条件的优化，从蛋白质自身的结构入手提高其异源表达的可溶性。

环糊精葡萄糖基转移酶作为生产环糊精的主要酶，由于异源表达形成大量包涵体、发酵酶活偏低，影响了其在工业生产中的应用。蛋白质由氨基酸组成，其表达形成包涵体的部分原因与氨基酸的组成、氨基酸的疏水性/亲水性、蛋白表面的电荷分布有密切的关系<sup>[16-17]</sup>。本实验结果也支持了以上这一点，同时还表明易错PCR技术应用于提高异源可溶性表达具有一定的效果。从氨基酸的疏水性/亲水性的变化分析，669位的G突变为为

R和694位的V突变为G，都导致氨基酸的亲水性增加。通常在蛋白分子的一些关键部位，使用亲水性的氨基酸残基取代疏水性的氨基酸残基将可能增加蛋白的可溶性<sup>[18-19]</sup>。研究发现，CGTase中2个位点与其可溶性表达密切相关，其中G669和V694 2个位点氨基酸残基的亲水性的增加有助于提高该酶的可溶性表达。通常情况下，当各突变位点相距较远或不存在相互作用时，各位点的突变效应会在叠加突变时存在叠加效果。为此，我们将选出CGTase 每个位点提高可溶性效果最优的突变体，进行叠加突变以期得到符合工业化生产



应用的酶。同时, 为了提高酶的可溶性表达也可以考虑同源表达的方法, 在原始菌株中转入构建好的表达载体, 让原始菌株过量表达生产所需要的酶。

本研究通过易错PCR技术和96孔板筛选系统得到2株可溶性表达和胞外酶活性明显提高的CGTase突变体, 其中ep-9突变体胞外酶活是原本的2.18倍, 可溶性表达量提高了一倍。研究还发现G669和V694两个位点与CGTase的可溶性表达有密切关系, 这些结果为研究目的蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达和正确折叠奠定了基础, 同时也为通过合理设计提高同类型蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达提供了理论依据。要进一步提高发酵菌胞外酶活性, 还需要继续开展与CGTase可溶性表达相关位点优化等工作。

## 参考文献

- [ 1 ] Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 329(1/2): 1–11.
- [ 2 ] Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 2004, 39(9): 1033–1046.
- [ 3 ] Leemhuis H, Kelly RM, Dijkhuizen L. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(4): 823–835.
- [ 4 ] Han RZ, Li JH, Shin HD, Chen RR, Du GC, Liu L, Chen J. Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(2): 415–428.
- [ 5 ] Wu J, Li ZF, Li B, Cheng C, Chen J. A new strategy for efficient secretory expression of extracellular proteins into culture medium of *E. coli*. *Journal of Biotechnology*, 2008, 136(S1): S719–S720.
- [ 6 ] Lo PK, Hassan O, Ahmad A, Mahadi NM, Illias RM. Excretory over-expression of *Bacillus sp.* G1 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) in *Escherichia coli*: optimization of the cultivation conditions by response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(5): 1256–1263.
- [ 7 ] Moore JC, Jin HM, Kuchner O, Arnold FH. Strategies for the *in vitro* evolution of protein function: enzyme evolution by random recombination of improved sequences. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 272(3): 336–347.
- [ 8 ] Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression & Purification*, 2005, 41(1): 207–234.
- [ 9 ] Lejeune A, Sakaguchi K, Imanaka T. A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose ( $\alpha$ -cyclodextrin) glucanotransferase. *Analytical Biochemistry*, 1989, 181(1): 6–11.
- [ 10 ] Mäkelä M, Korpela T, Laakso S. Colorimetric determination of  $\beta$ -cyclodextrin: two assay modifications based on molecular complexation of phenolphthalein. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1987, 14(2): 85–92.
- [ 11 ] Kato T, Horikoshi K. Colorimetric determination of  $\gamma$ -cyclodextrin. *Analytical Chemistry*, 1984, 56(9): 1738–1740.
- [ 12 ] Kelley LA, Sternberg MJ. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols*, 2009, 4(3): 363–371.
- [ 13 ] Ignatova Z, Mahsunah A, Georgieva M, Kasche V. Improvement of posttranslational bottlenecks in the production of penicillin amidase in recombinant *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2): 1237–1245.
- [ 14 ] Wang L, Wu D, Chen J, Wu J. Enhanced production of  $\gamma$ -cyclodextrin by optimization of reaction of  $\gamma$ -cyclodextrin glycosyltransferase as well as synchronous use of isoamylase. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 3072–3076.
- [ 15 ] Kim SG, Kweon DH, Lee DH, Park YC, Seo JH. Coexpression of folding accessory proteins for production of active cyclodextrin glycosyltransferase of *Bacillus macerans* in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2005, 41(2): 426–432.
- [ 16 ] 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.
- [ 17 ] Roodveldt C, Tawfik DS. Directed evolution of phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* for heterologous expression in *Escherichia coli* results in stabilization of the metal-free state. *Protein Engineering Design*

*and Selection*, 2005, 18(1): 51–58.

- [18] Mosavi LK, Peng ZY. Structure-based substitutions for increased solubility of a designed protein. *Protein Engineering Design and Selection*, 2003, 16(10): 739–745.

- [19] Wurth C, Guimard NK, Hecht MH. Mutations that reduce aggregation of the Alzheimer's A $\beta$ 42 peptide: an unbiased search for the sequence determinants of A $\beta$  amyloidogenesis. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 319(5): 1279–1290.

## Improving soluble expression of *Geobacillus* sp. B1 CGTase by errorprone PCR

Yonghua Guo<sup>1,2</sup>, Jichen Chen<sup>1</sup>, Xianbo Jia<sup>1,2</sup>, Longjun Chen<sup>1</sup>, Haisong Cai<sup>1</sup>, Xinjian Lin<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Soil and Fertilizer Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

<sup>2</sup> College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

**Abstract:** [Objective] This study was aimed to enhance the extracellular enzymes activities and soluble expression of CGTase from *Geobacillus* sp. B1 by directed evolution. [Methods] A library of CGTase mutants was constructed by introducing random mutagenesis using error-prone PCR to screen mutant enzymes with improved extracellular enzyme activities and soluble expression. After induction, expression and purification, the mutant enzyme was characterized. [Results] After screening, two optimum mutants ds-6 and ep-9 with extracellular alpha - cyclization activity are respectively 1.72 times and 2.18 times of the original enzyme. The sequence of ep-9 *cgt* gene showed that three nucleotides substitution, G2005A, A2037G and T2081G were observed, and two of them caused amino acid changes. According to the 3D structure of *Geobacillus* sp. B1 cyclodextrin glucosyltransferase mimicked by SWISS-MODEL Repository, two amino acid mutations were in rotating angle between beta angle and the random coil. The wild-type CGTase or ep-9 genes was ligated with pET-28 (a)-OmpA vector, and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). After induced by lactose, CGTases were purified and characterized. The results showed that the specific  $\beta$ -cyclization activity of the evolved CGTase was 1.31-fold than that of the wild-type CGTase, and the  $K_m$  decreased from 4.3 to 3.74 g/L. The pH stability of the evolved CGTase was better than wild-type CGTase. Site-directed mutagenesis demonstrated the key to improve the soluble expression level and extracellular enzyme activity was G2005A. [Conclusion] Directed evolution by error-prone PCR of *Geobacillus* sp. B1 CGTase gene is effective to improve extracellular enzyme activities and soluble expression, in particular mutation occurred in the G2005A.

**Keywords:** thermophilic cyclodextrin glucosyltransferase, soluble expression, directed evolution, errorprone PCR

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest of China (201303094-05), by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2014J01105), by the Fujian Provincial Public Research Institute of Basic Scientific Research(2014R1022-3) and by the Social Research in the Public Interest of Fujian Finance (2060302)

\*Corresponding author. Fax: +86-591-87862257; E-mail: xinjianlin@163.net

Received: 21 December 2015; Revised: 19 February 2016; Published online: 2 March 2016