

• 工业生物技术 •

利用分子环化技术提高瘤胃微生物木聚糖酶热稳定性

周可鑫¹, 王欢¹, 朱鑫涛¹, 郑安琪¹, 李锴¹, 孙小宝^{1,2}, 高德英¹, 安培培², 王佳堃², 钱国英¹, 王谦^{1,2}

1 浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波 315100

2 浙江大学 动物科学学院, 浙江 杭州 310012

周可鑫, 王欢, 朱鑫涛, 等. 利用分子环化技术提高瘤胃微生物木聚糖酶热稳定性. 生物工程学报, 2020, 36(5): 920–931.

Zhou KX, Wang H, Zhu XT, et al. Enhancing thermostability of xylanase from rumen microbiota by molecular cyclization. Chin J Biotech, 2020, 36(5): 920–931.

摘要: 在高温下保持催化活性是工业酶的重要性质。近年来, 采用基因工程、蛋白质工程技术提高野生酶进行催化活性或耐热等性质取得了重要进展。文中利用新近建立起来的异肽键介导的 SpyTag/SpyCatcher 系统对瘤胃微生物来源的木聚糖酶 XYN11-6 进行分子环化, 获得稳定的环化酶 C-XYN11-6。在 60 °C、70 °C 和 80 °C 下处理 10 min, C-XYN11-6 的残余活性为 81.53%、73.98% 和 64.41%, 分别是相同条件下线性蛋白 L-XYN11-6 残余活性的 1.48、2.92、3.98 倍。经 60–90 °C 热处理 10 min 后, C-XYN11-6 仍保持可溶状态, 而 L-XYN11-6 几乎完全聚沉。内源荧光和 8-苯胺-1-萘磺酸 (8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, ANS) 结合荧光光谱分析显示, 较之 L-XYN11-6, 热处理环境中 C-XYN11-6 更能够维持其构象稳定。值得注意的是, 分子环化提高了 C-XYN11-6 对 0.1–50 mmol/L Ca²⁺ 或 0.1 mmol/L Cu²⁺ 的耐受能力。综上所述, 文中利用 SpyTag/SpyCatcher 系统获得热稳定性和离子稳定性提高的环化酶, 为工业酶的分子改良及扩大其在工业领域的应用建立了良好基础。

关键词: 瘤胃, 木聚糖酶, 分子环化, 底物降解, 热稳定性

Enhancing thermostability of xylanase from rumen microbiota by molecular cyclization

Kexin Zhou¹, Huan Wang¹, Xintao Zhu¹, Anqi Zheng¹, Nuo Li¹, Xiaobao Sun^{1,2}, Deying Gao¹, Peipei An², Jiakun Wang², Guoying Qian¹, and Qian Wang^{1,2}

1 College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

2 College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, Zhejiang, China

Abstract: The capacity for thermal tolerance is critical for industrial enzyme. In the past decade, great efforts have been

Received: July 29, 2019; **Accepted:** October 11, 2019

Supported by: National Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program (No. 201810876022), Zhejiang Xinmiao Talents Program (No. 2018R420012), Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (No. LQ19C050001), Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Bioengineering Level A (No. ZS2017010).

Corresponding authors: Qian Wang. Tel: +86-574-88222391; E-mail: wangq@zww.edu.cn

国家级大学生创新创业训练计划 (No. 201810876022), 浙江省大学生新苗人才计划 (No. 2018R420012), 浙江省自然科学基金 (No. LQ19C050001), 浙江省生物工程一流学科自设课题 (No. ZS2017010) 资助。

made to endow wild-type enzymes with higher catalytic activity or thermostability using gene engineering and protein engineering strategies. In this study, a recently developed SpyTag/SpyCatcher system, mediated by isopeptide bond-ligation, was used to modify a rumen microbiota-derived xylanase XYN11-6 as cyclized and stable enzyme C-XYN11-6. After incubation at 60, 70 or 80 °C for 10 min, the residual activities of C-XYN11-6 were 81.53%, 73.98% or 64.41%, which were 1.48, 2.92 or 3.98-fold of linear enzyme L-XYN11-6, respectively. After exposure to 60–90°C for 10 min, the C-XYN11-6 remained as soluble in suspension, while L-XYN11-6 showed severely aggregation. Intrinsic and 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS)-binding fluorescence analysis revealed that C-XYN11-6 was more capable of maintaining its conformation during heat challenge, compared with L-XYN11-6. Interestingly, molecular cyclization also conferred C-XYN11-6 with improved resilience to 0.1–50 mmol/L Ca^{2+} or 0.1 mmol/L Cu^{2+} treatment. In summary, we generated a thermal- and ion-stable cyclized enzyme using SpyTag/SpyCatcher system, which will be of particular interest in engineering of enzymes for industrial application.

Keywords: rumen, xylanase, molecular cyclization, substrate degradation, thermostability

酶在高温、强酸/碱、金属离子、有机溶剂等工业环境下,易发生构象改变从而失去活性^[1],如何获取高活性和良好稳定性的工业酶成为研究者关注的焦点^[2]。理想的工业酶通常需兼具高催化活性与良好的分子稳定性,然而此类理想型糖苷水解酶很难从自然界直接获取。常规的菌种选育方法难以在短期内达到预期目标。通常,对于蛋白质的分子改良包括以下两个方面:以点突变为代表的理性设计和以定向进化为代表的非理性设计。前者需要充分掌握酶的结构、作用位点等信息,而后者从大量的突变体库中筛选优势突变体,需要高通量筛选技术作为支撑。因此,在不了解详细催化机制或缺乏有效筛选方式的情况下,难以对目标蛋白进行分子改良^[3]。

蛋白质的稳定性与其结构中的折叠状态息息相关,分子环化能够降低蛋白折叠域与非折叠域的构象熵,进而增加蛋白质稳定性,同时可增加蛋白质的受体亲和力,其功能和活性几乎不受影响^[4]。蛋白质环化是一种将线性肽的 C-端和 N-端通过酰胺键进行首尾环合形成环状分子的过程。目前,已建立起多种经生物法获得环状蛋白的方法,其中较为常用的方法包括蛋白质反式剪接 (Protein trans-splicing, PTS)^[5]、内含肽介导的蛋白表达连接 (Expressed protein ligation, EPL)^[6]、转肽酶 (Sortase) 介导的转肽作用 (Sortagging)^[7]等。然而,这些环化方式通常受光、温度、pH 或

氧化还原状态等外部因素调节。

自然界中存在天然环肽类物质具有首尾相连的环化结构。与线性蛋白相比,环化蛋白具有较高的热稳定性和结构稳定性^[8]。但大多数天然蛋白在生物体内均为线性蛋白,存在对热、金属离子、抑制剂等复杂环境中的稳定性不足,导致其活性快速丧失,制约了其在工业催化、食品制造、医药领域的应用。牛津大学的 Howarth 团队在革兰氏阳性菌酿脓链球菌 *Streptococcus pyogenes* 纤连蛋白 CnaB2 中分离了带有 Asp117 的 C-端肽段 (SpyTag) 和带有 Lys31 的 N-端肽段 (SpyCatcher)。其中, Lys31 能够和 Asp117 侧链自发地进行共价结合^[9-10]。该反应能够在短时间内完成,并且不需要任何特异性酶活离子进行催化。将 SpyTag 和 SpyCatcher 肽段分别置于目的蛋白 N-和 C-末端可自发形成异肽键从而实现分子环化,这种异肽键一经形成很难发生逆反应。与其他环化途径相比,经异肽键共价结合的蛋白分子的化学稳定性和热稳定性大幅度提高,为酶分子的稳定性改造提供了新思路^[11-12]。Wang 等^[13]发现,经 SpyTag/SpyCatcher 系统分子环化的地衣聚糖酶最适反应温度提升 5 °C,且在 100 °C 下处理 10 min 后仍能保持 80% 的残余活性。另有研究显示,β-内酰胺酶在 55 °C 条件下发生聚沉,可溶性蛋白显著减少且活性丧失。而相同条件下,经异肽键连接介导的环化 β-内酰胺酶活性则几乎不受影响,

且 T_m 值显著上升^[14]。此外, SpyTag/SpyCatcher 系统在生物材料、医学等方面也发挥了重要的作用, 如与蛋白质形成网状的生物材料, 可以包裹活性胚胎干细胞等, 防止其失活, 同时可增强癌细胞捕获, 作为药物缓释/输送材料、获得多种构型蛋白、蛋白质-RNA 互作等^[15-18]。由于其效果显著、使用便捷、适用范围广等优点, 异肽键介导的分子环化技术已成为国际上的研究热点^[19-20]。

本研究利用 SpyTag/SpyCatcher 系统对瘤胃未培养微生物来源的内切木聚糖酶 XYN11-6 进行分子环化^[21], 分析线性和环化酶蛋白的基本酶学性质, 重点关注分子环化提升酶蛋白热稳定性, 并探究了环化前后蛋白构象的变化, 为提升工业酶在加工及应用范围建立基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

克隆宿主大肠杆菌 *Escherichia coli* TOP10F' 和原核表达宿主 *E. coli* BL21(DE3) 本实验室保存。pET-30a(+) 购于 Novagen 公司, pET30a(+)/XYN11-6 和用于分子环化的 pETTC 质粒由本实验室前期构建^[21-23]。

1.1.2 主要试剂

T4 DNA 连接酶购自北京全式金生物技术有限公司, 限制性内切酶购自 Promega 公司。PCR 产物纯化试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司, DNA 割胶回收试剂盒购自 Axygen, 质粒小量抽提试剂盒购自 AidLab 公司。HisTrapTM FF 层析柱购自 GE 公司, 山毛榉木聚糖购自 Sigma 公司。酵母浸提物、蛋白胨、卡那霉素 (Kanamycin, Kan)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -D-Thiogalactoside, IPTG)、重组牛肠激酶 (Enterokinase, EK) 购自 BBI, 其余试剂为生工生物工程(上海)股份有限公司分子生物学级产品。

1.2 重组载体及宿主构建

以含瘤胃微生物木聚糖酶基因的 pET30a(+)/XYN11-6 质粒为模板, 利用 XYN11-BamH I (5'-C GGATCCGATTTTTGTCAAAGCTGCCGC-3') 和 XYN11-Hind III (5'-CAAGCTTCGCCCCCTCGAT ATAGACCT-3') 引物进行 PCR 扩增, 获得 699 bp 的目的片段。经 BamH I 和 Hind III 双酶切, 纯化回收目的产物后分别连接至 pET30a(+) 或 pETTC 载体, 连接产物热激转化 *E. coli* TOP10F' 感受态, 涂布含 100 μ g/mL Kan 的 Luria-Bertani (LB) 固体平板。采用菌落 PCR 法筛选阳性转化子, 并提取重组质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司测序进一步验证。测序正确的重组质粒命名为 pET30a/trXYN11-6 和 pETTC/trXYN11-6, 并热激转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 涂布含 100 μ g/mL Kan 的 LB 固体平板。

1.3 重组蛋白诱导表达

从平板上挑取重组宿主 BL21/pET30a/trXYN11-6 和 BL21/pETTC/trXYN11-6 至 3 mL 含 100 μ g/mL Kan 的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 16-20 h。将培养基以 1% 接种量接种 200 mL LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养至 $OD_{600}=0.6-1$ (约 3-5 h)。添加终浓度为 1 mmol/L IPTG, 在 16 $^{\circ}$ C、100 r/min 下诱导表达 12-16 h 后, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min 收集细胞。用 50 mL 1 \times PBS 缓冲液 (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4) 重新悬浮菌体, 流速 6 L/h, 压力 800 MPa, 6 $^{\circ}$ C, 在 FB-2010 均质机 (上海励途) 中破碎 5 min。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min 收集上清液即为粗酶液。

1.4 蛋白纯化与 SDS-PAGE

将上述粗酶液上样 HisTrapTM FF 层析柱, 利用 20 mmol/L 至 1 mol/L 咪唑, 流速 0.3 mL/min 在 BioLogic LP 层析系统上 (Bio-Rad) 进行梯度洗脱线性 (L-XYN11-6) 与环化 XYN11-6

(C-XYN11-6)。纯化的蛋白利用 10 kDa Amicon® Ultra 超滤管 (Millipore) 去除残余咪唑后, 用于电泳和后续性质分析。

纯化蛋白与 1×上样缓冲液混合, 煮沸 10 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 后, 收集上清液用于 SDS-PAGE (15%分离胶, 4%浓缩胶)。电泳结束后, 用考马斯亮蓝 R250 染色 1 h, 脱色, 拍照观察。

1.5 酶活力测定

采用 3,5 二硝基水杨酸 (DNS) 法测定木聚糖酶活性^[24], 采用 Bradford 法测定蛋白浓度^[25]。除特殊需求外, 本研究均采用 1.5 μg 纯化酶用于性质分析。

1.5.1 最适 pH

将纯化后的 15 μL 线性或环化 XYN11-6 酶液分别与 60 μL pH 3.0–10.0 缓冲液 (柠檬酸/磷酸缓冲液 pH 3.0–8.0; 甘氨酸/NaOH 缓冲液 pH 9.0–10.0) 配制的 0.5% 木聚糖底物在 50 °C 下反应 10 min。同时设置空白对照组, 空白管中加入 15 μL 预先煮沸灭活的酶液, 反应 10 min。在上述试验和对照体系加入 75 μL DNS 试剂, 100 °C 保温 15 min。待冷却至室温后, 使用 SpectraMax M3 酶标仪 (Molecular Devices) 于 540 nm 下测定 XYN11-6 反应活性, 设 4 组平行试验。以最高活性时的 pH 为 100%, 计算各 pH 条件下相对活性。

1.5.2 最适温度

将纯化后 15 μL 线性或环化 XYN11-6 酶液分别与 60 μL 0.5% 木聚糖底物 (pH 6.0) 混合, 于 30–80 °C 下反应 10 min。设置空白对照组, 测定方法同上。以最高活性时的反应温度为 100%, 计算各温度条件下的相对活性。

1.5.3 pH 稳定性

在最适温度下, 将 7.5 μL 酶液置于 7.5 μL 不同 pH 缓冲液 (pH 3.0–10.0) 中 1 h 后, 各实验管中加入 60 μL 0.5% 木聚糖底物, 于 50 °C、pH 6.0 条件下反应 10 min。设置空白对照组, 测定方法

同上。以反应起始点为 100%, 计算各 pH 条件下的残余活性。

1.5.4 热稳定性

在 pH 6.0 中, 将 7.5 μL 酶液置于不同温度 (40–80 °C) 下保温 60 min, 分别于 0、2、5、10、20、40、60 min 取样, 分别加入 60 μL 0.5% 木聚糖底物, 于 50 °C、pH 6.0 条件下反应 10 min。设置空白对照组, 测定方法同上。以反应起始点为 100%, 计算各温度条件下的残余活性。

1.5.5 离子稳定性

将 7.5 μL 酶液与 7.5 μL 不同浓度 (0–50 mmol/L) 的金属离子溶液 (Ca^{2+} 或 Cu^{2+}) 混合, 4 °C 孵育 1 h 后, 各实验管中加入 60 μL 0.5% 木聚糖底物, 于 50 °C、pH 6.0 条件下反应 10 min。设置空白对照组, 测定方法同上。以不加离子溶液为 100%, 计算各离子条件下的残余活性。

1.5.6 动力学参数

分别配制不同浓度 (0.5–14 mg/mL) 山毛榉木聚糖底物, 在最适反应条件下进行酶促反应 5 min, 设 4 组平行试验。利用 GraphPad Prism 7 计算 K_m 及 V_{max} 。

1.6 蛋白聚沉分析

将溶于 1×PBS 缓冲液的纯化酶蛋白 (约 2.5 μg) 分别于 25 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 和 90 °C 中保温 10 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 上清液用于 SDS-PAGE 和活性分析。

1.7 荧光光谱分析

将溶于 1×PBS 缓冲液的纯化酶蛋白 (约 20 μg) 加入 0.1 cm 比色皿, 置于 RF-5301pc 荧光分光光度计 (SHIMADZU) 中。激发波长 280 nm, 发射波长 300–500 nm。以未处理的 L-XYN11-6 与 C-XYN11-6 为对照, 分别测定它们在 25 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 和 90 °C 条件下孵育 5 min 后的内源荧光光谱。

进一步利用 ANS 结合酶蛋白, 激发波长 390 nm, 发射波长 400–600 nm。以未处理的 L-XYN11-6

与 C-XYN11-6 为对照, 分别测定它们在 25 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 和 90 °C 条件下孵育 5 min 后的外源荧光光谱。

1.8 数据统计

数据与图片处理采用 GraphPad Prism 7.0, 数据以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) ($n=4$), 采用双尾学生 t -检验进行统计分析, * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 重组蛋白表达与分析

XYN11-6 (即 ORF6) 是经湖羊瘤胃微生物 Fosmid 文库筛选获取的木聚糖酶基因^[17]。BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和系统进化树分析显示, 该蛋白来源于未培养瘤胃微生物, 与已报道的木聚糖酶相似度较低 (图 1)。序列比

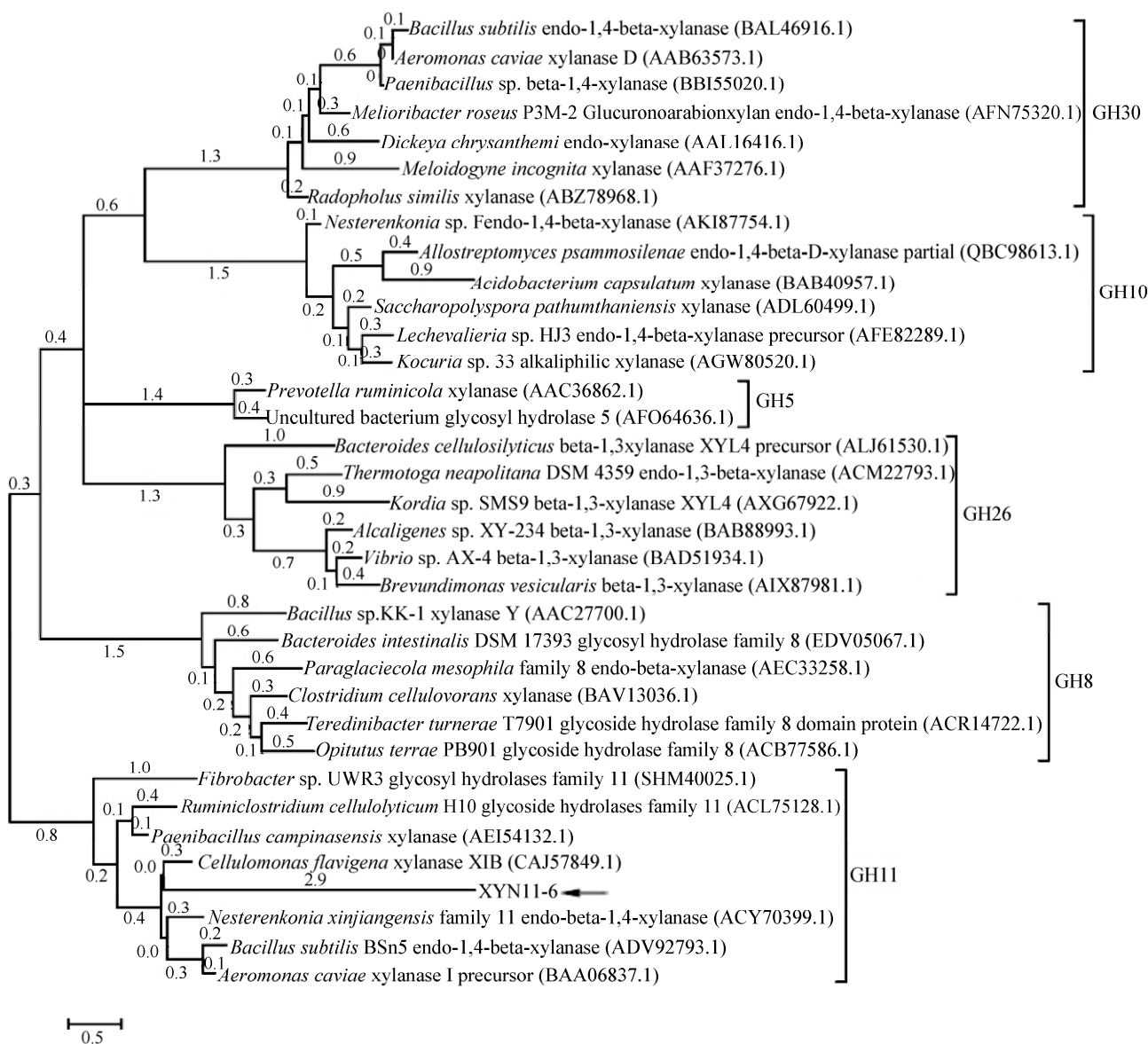


图 1 木聚糖酶系统发育树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis of xylanases. *XYN11-6* was labeled with arrow.

对显示, XYN11-6 氨基酸序列与瘤胃梭状芽孢杆菌 *Ruminiclostridium cellulolyticum* (GenBank 登录号: ACL75128.1)、产黄纤维单胞菌 *Cellulomonas flavigena* (GenBank 登录号: CAJ57849.1)和豚鼠气单胞菌 *Aeromonas caviae* (登录号: BAA06837.1)来源的木聚糖酶相似度仅分别为 38.79%、38.03% 和 35.59%。

Pfam 分析 (<http://pfam.xfam.org/>) 显示, XYN11-6 蛋白包含一个 N 端的 GH11 家族木聚糖酶的催化结构域和一个 C 端未知结构域。为探究 SpyTag/SpyCatcher 系统对酶稳定性的作用,本研究将其催化结构域亚克隆至原核表达载体,在大肠杆菌中异源表达获得线性蛋白 L-XYN11-6,进一步在其 N 和 C 端分别加上来自 *S. pyogenes* 纤连蛋白 CnaB2 的 SpyTag 和 SpyCatcher 肽段,经 Asp117 和 Lys31 自发形成异肽键获得环化蛋白 C-XYN11-6(图 2A)^[22-23]。

SDS-PAGE 结果显示,经 6×His 亲和层析后 L-XYN11-6 的分子量约为 38 kDa,略大于其理论分子量 32.8 kDa,推测可能是由于其理论等电点 (pI=6.73)接近中性,影响其在凝胶中的泳动速度。C-XYN11-6 的分子量约为 45 kDa,与其理论分子量 45.8 kDa 相一致(图 2B)。为消除末端肽段对试验过程的影响,进一步利用 EK 酶切割 C-XYN11-6,

重新获得线性化的 C-XYN11-6 (RL-XYN11-6),用于热稳定性分析。

2.2 最适 pH 和 pH 稳定性

线性蛋白 L-XYN11-6 和环化蛋白 C-XYN11-6 的最适 pH 和 pH 稳定性呈现类似的规律。两种蛋白的最适 pH 均为 pH 5.0, pH 5.0–8.0 范围内活性较高(图 3A),在较广的 pH 范围内较为稳定,在 pH 4.0–9.0 下处理 1 h 残余活性达 70%以上(图 3B)。

2.3 最适温度和热稳定性

线性蛋白 L-XYN11-6 和环化蛋白 C-XYN11-6 的最适温度均为 50 °C(图 4A)。环化蛋白较之线性蛋白最适温度并没有提升,但 C-XYN11-6 在高温(60–90 °C)下的催化作用优于 L-XYN11-6。热稳定性试验表明,L-XYN11-6 在 50 °C 以下较为稳定,50 °C 处理 1 h,酶活性仍能保持 80.30%±3.33%。当温度继续升高,则活性迅速下降。在 60%、70% 和 80 °C 条件下分别处理 10 min, L-XYN11-6 的残余活性为 63.30%、39.72% 和 27.50%(图 4B)。与线性蛋白相比,环化蛋白的热稳定性显著提升。将 C-XYN11-6 分别在 60 °C、70 °C 和 80 °C 条件下处理 10 min, C-XYN11-6 的残余活性为 81.53%、73.98% 和 64.41%,分别是相同条件下 L-XYN11-6 残余活性的 1.48、2.92 和 3.98 倍(图 4C)。即使在 60 °C 和 70 °C 条件下处理 1 h, C-XYN11-6

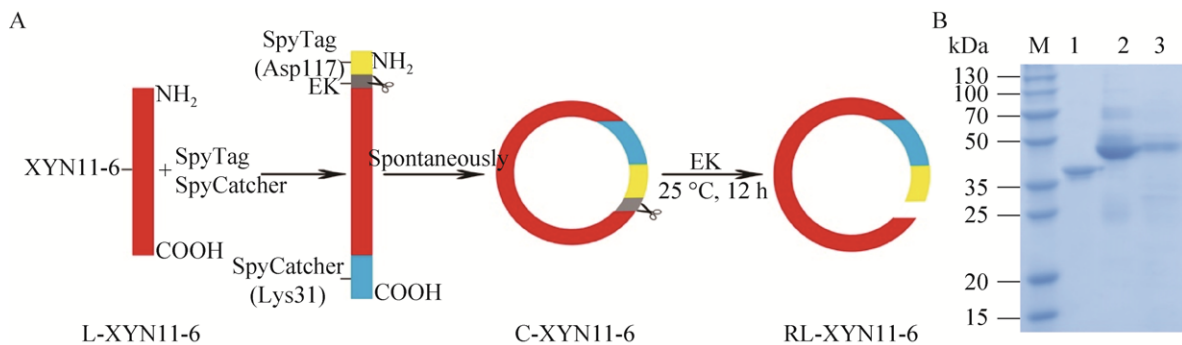


图 2 XYN11-6 的分子环化

Fig. 2 Molecular cyclization of XYN11-6. (A) Schematic diagram of cyclization. EK: Enterokinase. (B) SDS-PAGE analysis of linear and cyclized XYN11-6 proteins. 1: L-XYN11-6; 2: C-XYN11-6; 3: RL-XYN11-6.

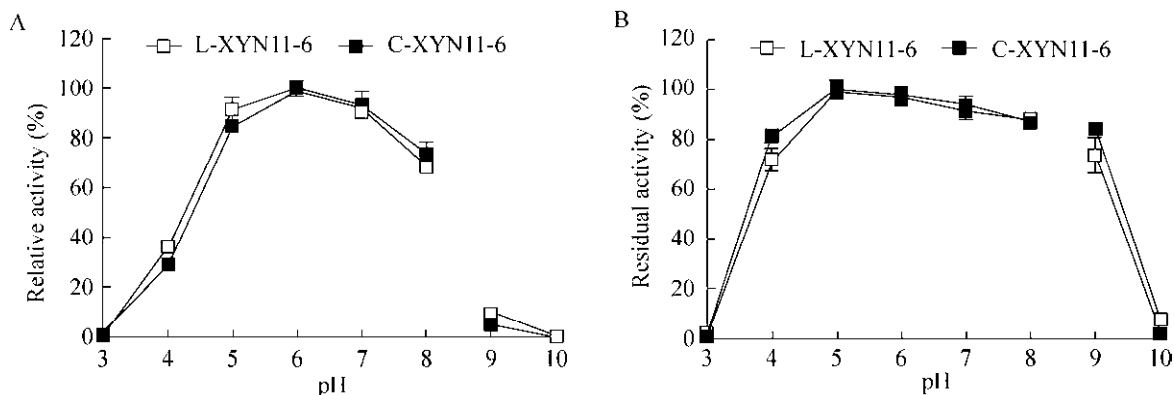


图3 XYN11-6 最适 pH 和 pH 耐受

Fig. 3 The optimum pH and pH stability of XYN11-6. (A) Optimum pH. (B) pH stability. Data represent the $\bar{x} \pm s$ ($n=4$).

仍保留 64.59% 和 34.50% 的残余活性, 而 L-XYN11-6 则完全失活, 表明环化后蛋白的热稳定性得到提升。

为验证异肽键介导的分子环化与酶蛋白热稳定性的相关性, 我们进一步利用 EK 酶对 C-XYN11-6 进行重新线性化 (图 2), 并分析其热稳定性。试验结果显示, 重新线性化的 C-XYN11-6

蛋白 (RL-XYN11-6) 的热稳定性迅速下降, 将其在 60 °C 和 70 °C 条件下分别处理 1 h, RL-XYN11-6 残余活性为 5.93% 和 1.62% (图 4D), 与 L-XYN11-6 的残余活性相接近, 表明异肽键介导的分子环化而非蛋白末端的 SpyTag 或 SpyCatcher 肽段提升了酶的热稳定性。

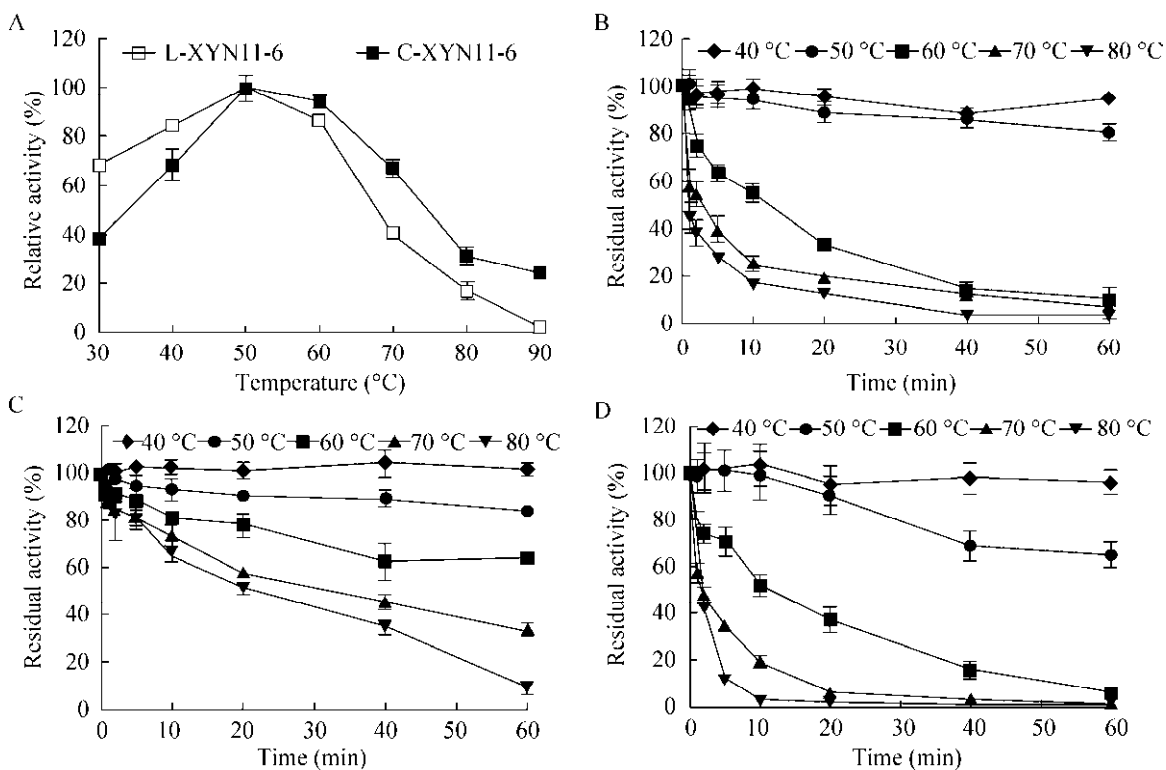


图4 XYN11-6 最适温度和温度耐受

Fig. 4 The optimum temperature and thermostability of XYN11-6. (A) Optimum temperature. (B–D) Thermostability of L-XYN11-6 (B), C-XYN11-6 (C) and RL-XYN11-6 (D). Data represent the $\bar{x} \pm s$ ($n=4$).

2.4 离子稳定性

进一步研究分子环化对金属离子的耐受能力,发现 C-XYN11-6 对 Ca^{2+} 和 Cu^{2+} 的耐受能力优于 L-XYN11-6。经 0.1 mmol/L Ca^{2+} 和 Cu^{2+} 处理 1 h 后, C-XYN11-6 的残余活性分别为 $84.53\% \pm 5.20\%$ 和 $66.31\% \pm 12.17\%$, 分别是相同条件下 L-XYN11-6 残余活性的 2.22 倍和 3.00 倍 ($P < 0.01$) (图 5)。同时,离子耐受能力呈现明显的剂量效应。当离子浓度提高至 0.5 mmol/L 以上时,分子环化对离子的能力减弱(图 5A),甚至消失(图 5B)。

2.5 动力学参数

以山毛榉木聚糖为底物,线性蛋白 L-XYN11-6

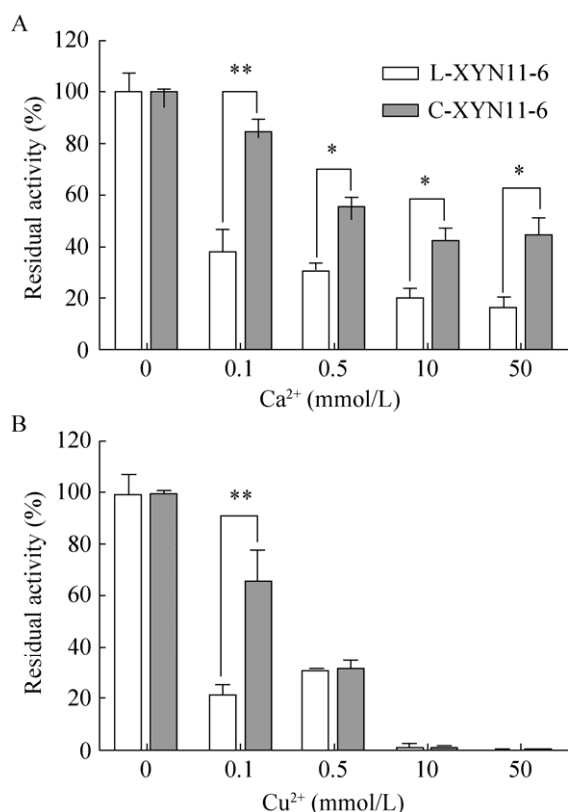


图 5 金属离子对木聚糖酶活性的影响

Fig. 5 Effects of metal ions on xylanase activities. (A) Ca^{2+} . (B) Cu^{2+} . Data represent the $\bar{x} \pm s$ ($n=4$). Statistical significance was analyzed using a two-tailed Student's *t*-test by GraphPad Prism 7.0 and indicated by asterisks: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

米氏常数 (K_m) 和最大反应速率 (V_{max}) 分别为 (9.15 ± 1.28) mg/mL 和 ($1\,594 \pm 144.2$) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg protein})$, 环化蛋白 C-XYN11-6 的 K_m 和 V_{max} 分别为 (9.39 ± 0.61) mg/mL 和 ($1\,426 \pm 49.40$) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg protein})$ 。以 0.5% 山毛榉木聚糖为底物时, C-XYN11-6 的比活性为 (484 ± 12.1) U/mg, 与 L-XYN11-6 的 (542 ± 50.0) U/mg 无显著差异 ($P = 0.062$), 提示分子环化提升酶热稳定性的同时并没有降低酶的催化效率。

2.6 抗聚沉能力分析

抗热聚沉能力分析结果显示, L-XYN11-6 在 50 °C 以下较为稳定, 温度继续升高至 60 °C 以上, 则蛋白迅速变性, 进而发生聚沉(图 6A)。较之 L-XYN11-6, C-XYN11-6 的抗聚沉能力显著提升, 在 60–90 °C 下处理 10 min 后, 大部分蛋白仍能处于上清液中(图 6B)。经 60 °C 条件下处理 10 min 后, C-XYN11-6 的残余活性为 $63.70\% \pm 4.44\%$, 是 L-XYN11-6 的 3.91 倍 ($P < 0.05$)。随着温度继续升高, C-XYN11-6 的残余活性仍显著高于 L-XYN11-6 ($P < 0.001$) (图 6C), 这与热稳定性的试验结果相符合(图 4B 和 4C)。

2.7 荧光光谱分析

为分析线性与环化 XYN11-6 在热激过程中构象的变化, 我们进一步开展内源荧光分析。在 25 °C、40 °C 和 50 °C 条件下处理 5 min 后, 线性蛋白 L-XYN11-6 的荧光值逐渐上升; 当温度高于 60 °C 时, L-XYN11-6 的荧光值又迅速下降, 同时伴随着最大发射波长从 336 nm 红移至 338 nm; 当温度上升至到 90 °C 时, 红移值达 3 nm (图 7A), 提示其构象发生剧烈改变^[22]。而环化蛋白 C-XYN11-6 经 25–90 °C 下处理 5 min 后, 其荧光值略有上升, 最大吸收波长也仅从 337 nm 红移至 338 nm (图 7B), 提示其构象基本维持稳定。利用 ANS 对疏水区域进行标记, 其外源荧光光谱呈现与内源荧光光谱类似的规律(图 7C 和 7D), 表明经分子环化的酶分子更能够维持其蛋白构象稳定。

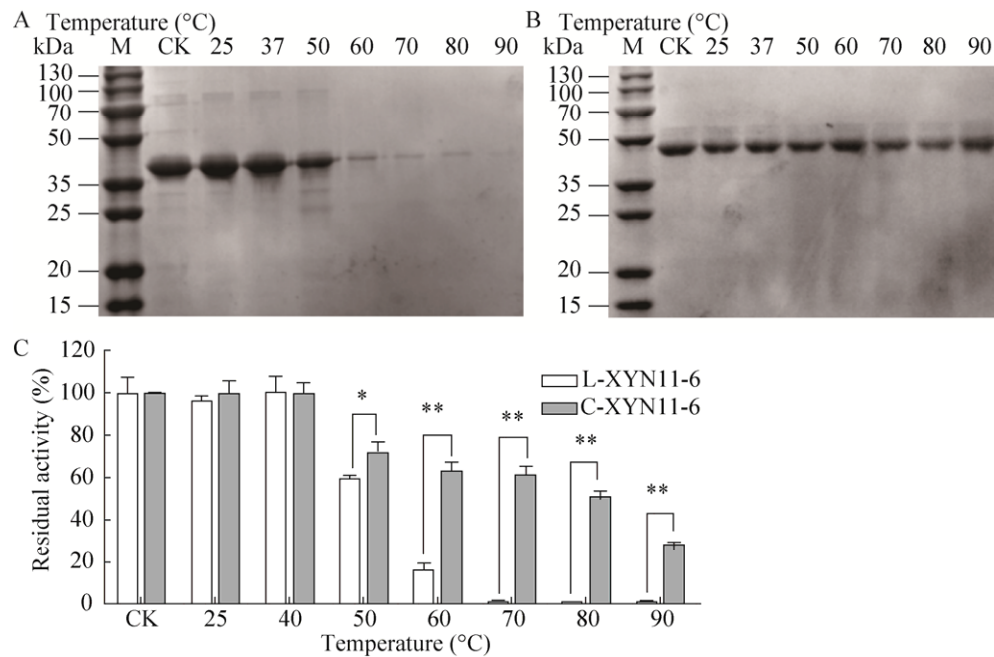


图 6 抗热聚沉能力分析

Fig. 6 Resistance to heat aggregation. (A–B) Protein aggregation of L-XYN11-6 (A) and C-XYN11-6 (B). (C) Residual activities of supernatant enzymes after heat challenge. M: standard protein marker; CK: control. Data represent the $\bar{x} \pm s$ ($n=4$). Statistical significance was analyzed using a two-tailed Student's *t*-test by GraphPad Prism 7.0 and indicated by asterisks: *, $P<0.05$; **, $P<0.01$.

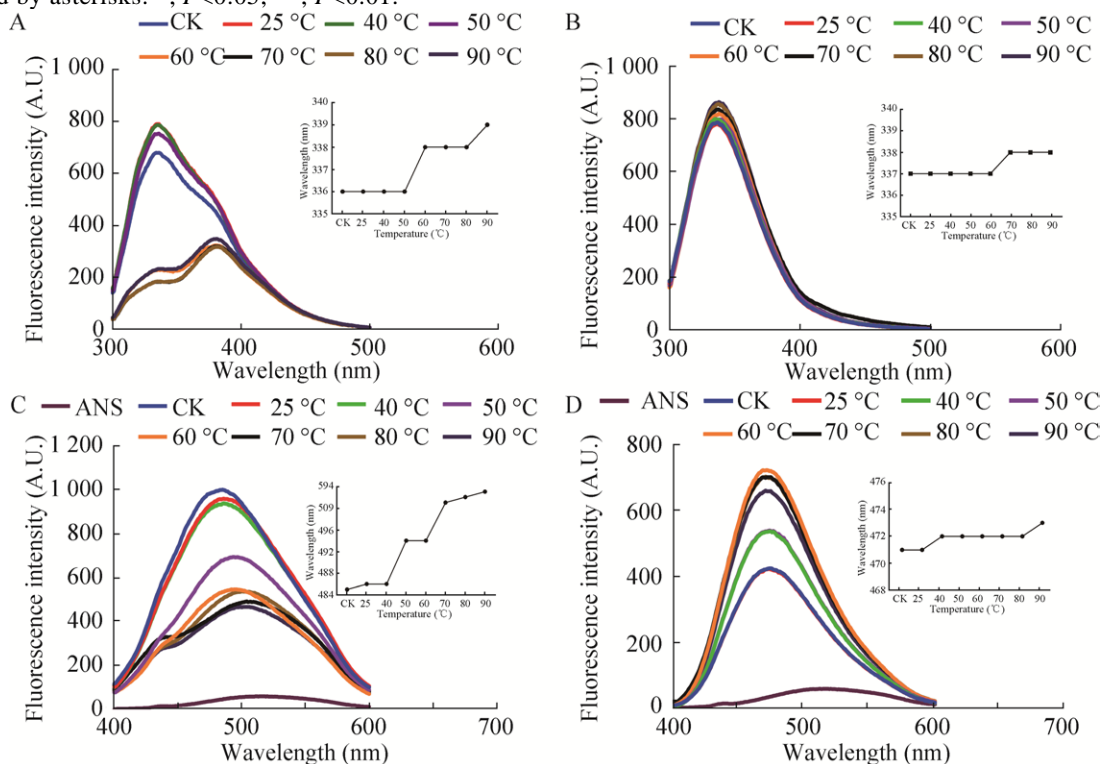


图 7 荧光光谱分析

Fig. 7 Fluorescence spectra analysis. (A) Intrinsic fluorescence of L-XYN11-6. (B) Intrinsic fluorescence of C-XYN11-6. (C) ANS-binding fluorescence of L-XYN11-6. (D) ANS-binding fluorescence of C-XYN11-6. The inset plots show the maximum peak wavelengths.

3 讨论

近年来,采用基因工程、蛋白质工程等手段提升野生木聚糖酶的酶学性质受到广泛关注。通过在分子水平对野生木聚糖酶进行改造,使其拥有优良的温度耐受性,利于酶制剂大范围应用于工业化生产。Hegazy 等^[26]采用易错 PCR (Error-prone PCR) 构建突变文库和微孔板筛选相结合的方法对嗜热脂肪土芽孢杆菌 *Geobacillus stearothermophilus* 木聚糖酶 XT6 进行改造,获得转化数 (k_{cat}) 提高 4.5 倍的突变体。He 等^[27]对里氏木霉 *Trichoderma reesei* 木聚糖酶 Xyn2 进行点突变,获得 60 °C 下半衰期分别提高 2.5 倍的 XM1 (F14C/Q52C) 和 1.8 倍的 XM2 (V59C/S149C) 突变体。Nakatani 等^[28]采用序列饱和突变技术 (Site saturation mutagenesis) 对来自芽孢杆菌 TAR-1 的木聚糖酶 XynR 进行改造,其突变体在 80 °C 条件下处理 15 min 后仍保留 80% 的残余活性。此外,有研究报道通过 N 端序列置换^[29]或在靶蛋白 C 端添加一个额外的 α 螺旋结构^[30],也能提高木聚糖酶的热稳定性。

上述的分子改良技术的确能有效改善木聚糖酶的热稳定性。然而,定向进化需要有效且高通量的筛选技术,通常筛选容量达 10^4 – 10^7 的突变体文库才能获得理想的优势突变体^[31];点突变技术则需要掌握酶蛋白的催化位点、催化机制等具体信息,才能选择靶向氨基酸残基作为突变位点,一定程度上限制了它们作为分子改良手段的使用范围^[32]。相比之下,异肽键介导的分子环化技术反应迅速、无需特殊催化剂,能更简便、快速地提升蛋白稳定性,且适用的范围更广^[22]。

反刍动物瘤胃中的微生物能有效降解植物性饲料中的木质纤维素类物质,生成挥发性脂肪酸供机体生长所需^[33]。前期研究中,我们采用宏基因组与宏转录组相结合的方法从湖羊瘤胃中筛选获得一系列高活性的木聚糖酶、纤维素酶等糖苷水解酶^[21,34]。然而,这类具备木质纤维素底物高

效降解能力的酶热稳定性相对不足,如木聚糖酶 XYN-LXY 于 50 °C 处理 10 min 后,活性损失达 50% 以上,推测可能是瘤胃微生物来源的酶蛋白适应在动物机体温度 (38–41 °C) 下催化的结果^[35]。

针对瘤胃微生物来源糖苷水解酶热稳定性的不足,本研究将 XYN11-6 进行分子环化,分析线性与环化蛋白的酶学性质。结果显示,线性蛋白 L-XYN11-6 和环化蛋白 C-XYN11-6 呈现类似的最适 pH 与 pH 稳定性 (图 3)。然而,环化蛋白的热稳定性显著提升。在 60 °C、70 °C 和 80 °C 下分别处理 10 min 后,C-XYN11-6 的残余活性为 81.53%、73.98% 和 64.41%,分别是相同条件下 L-XYN11-6 残余活性的 1.48、2.92、3.98 倍 (图 4C)。我们进一步利用 EK 将 C-XYN11-6 重新切割为线性构象 (图 2),发现 RL-XYN11-6 的热稳定性明显低于 C-XYN11-6 (图 3D),提示异肽键介导的分子环化而不是酶蛋白两侧的 SpyTag 或 SpyCatcher 肽段提升了酶的稳定性^[25]。值得注意的是,RL-XYN11-6 甚至比 L-XYN11-6 更不稳定,推测是由于 EK 切割时间较长,导致酶蛋白发生部分失活。之后的聚沉试验和荧光光谱分析进一步证实了环化提升了酶蛋白的耐热能力。在较高温度 (60–90 °C) 环境中,L-XYN11-6 迅速发生构象改变,芳香族氨基酸残基和蛋白疏水区的暴露,伴随着最大吸收波长红移的现象 (图 7A 和 7C),造成蛋白变性失活,进一步发生聚集进而聚沉析出 (图 6A)。然而,C-XYN11-6 在相同条件下仍能维持其蛋白基本构象稳定,仅发生微弱红移 (图 7B 和 7D),仅表现出部分蛋白失活,即使在 90 °C 下处理 10 min 几乎不发生聚沉 (图 6B),有力地证明异肽键介导的分子环化有助于提升蛋白的热稳定性。值得注意的是,有研究报道 SpyTag/SpyCatcher 分子环化可以提升 L-苯丙氨酸醛缩酶在乙醇、丙酮等有机溶剂中的稳定性^[36]。本研究中,我们还发现分子环化有助于提升对部分金属离子的耐受能力 (图 5),其作用机制需要进一步展开研究。

综上所述,本研究采用异肽键介导的 SpyTag/SpyCatcher 系统对瘤胃未培养微生物来源的木聚糖酶进行分子环化,提升酶的热稳定性和抗聚沉能力。较之传统的分子改良策略,分子环化技术具有反应速率快、反应过程无需特定催化酶、适用对象广等优势,为提升工业酶的分子稳定性建立了良好基础。

REFERENCES

- [1] Wang XZ, Zhang GY. Advances in protein cyclization. *Chin J Biotech*, 2016, 32(4): 430–439 (in Chinese).
王心哲, 张光亚. 蛋白质环化的研究进展. *生物工程学报*, 2016, 32(4): 430–439.
- [2] An J. Structural bases for the regulation of stability and substrate specificity of both glycoside hydrolases and ester hydrolases[D]. Changchun: Jilin University, 2015 (in Chinese).
安娇. 糖苷水解酶与酯水解酶稳定性和底物选择性调控的结构基础[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [3] Larue K, Melgar M, Martin VJJ. Directed evolution of a fungal β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 52.
- [4] Volkmann G, Murphy PW, Rowland EE, et al. Intein-mediated cyclization of bacterial acyl carrier protein stabilizes its folded conformation but does not abolish function. *J Biol Chem*, 2010, 285(12): 8605–8614.
- [5] Minato Y, Ueda T, Machiyama A, et al. Segmental isotopic labeling of a 140 kDa dimeric multi-domain protein CheA from *Escherichia coli* by expressed protein ligation and protein *trans*-splicing. *J Biomol NMR*, 2012, 53(3): 191–207.
- [6] Clerico EM, Zhuravleva A, Smock RG, et al. Segmental isotopic labeling of the Hsp70 molecular chaperone DnaK using expressed protein ligation. *Biopolymers*, 2010, 94(6): 742–752.
- [7] Kimura RH, Tran AT, Camarero JA. Biosynthesis of the cyclotide kalata B1 by using protein splicing. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006, 45(6): 973–976.
- [8] Reddington SC, Howarth M. Secrets of a covalent interaction for biomaterials and biotechnology: SpyTag and SpyCatcher. *Curr Opin Chem Biol*, 2015, 29: 94–99.
- [9] Zakeri B, Fierer JO, Celik E, et al. Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(12): E690–E697.
- [10] Gilbert C, Howarth M, Harwood CR, et al. Extracellular self-assembly of functional and tunable protein conjugates from *Bacillus subtilis*. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(6): 957–967.
- [11] Li L, Fierer JO, Rapoport TA, et al. Structural analysis and optimization of the covalent association between SpyCatcher and a peptide tag. *J Mol Biol*, 2014, 426(2): 309–317.
- [12] Min D, Arbing MA, Jefferson RE, et al. A simple DNA handle attachment method for single molecule mechanical manipulation experiments. *Protein Sci*, 2016, 25(8): 1535–1544.
- [13] Wang JD, Wang YL, Wang XZ, et al. Enhanced thermal stability of lichenase from *Bacillus subtilis* 168 by SpyTag/SpyCatcher-mediated spontaneous cyclization. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 79.
- [14] Schoene C, Fierer JO, Bennett SP, et al. SpyTag/SpyCatcher cyclization confers resilience to boiling on a mesophilic enzyme. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(24): 6101–6104.
- [15] Gao XY, Fang J, Xue B, et al. Engineering protein hydrogels using SpyCatcher-SpyTag chemistry. *Biomacromolecules*, 2016, 17(9): 2812–2819.
- [16] Fang J, Zhang WB. Genetically encoded peptide-protein reactive pairs. *Acta Polym Sin*, 2018, (4): 429–444 (in Chinese).
方晶, 张文彬. 可基因编码的多肽-蛋白质化学应对. *高分子学报*, 2018, (4): 429–444.
- [17] Brizendine RK, Anuganti M, Cremo CR. Using the SpyTag SpyCatcher system to label smooth muscle myosin II filaments with a quantum dot on the regulatory light chain. *Cytoskeleton*, 2019, 76(2): 192–199.
- [18] Zhao Y, Zhang Y, Teng YL, et al. SpyCLIP: an easy-to-use and high-throughput compatible CLIP platform for the characterization of protein-RNA interactions with high accuracy. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(6): e33.
- [19] Röder J, Fischer R, Commandeur U. Engineering potato virus X particles for a covalent protein based

- attachment of enzymes. *Small*, 2017, 13(48): 1702151.
- [20] Kim TY, Seo HD, Lee JJ, et al. A dimeric form of a small-sized protein binder exhibits enhanced anti-tumor activity through prolonged blood circulation. *J Control Release*, 2018, 279: 282–291.
- [21] Wang JK, Sun ZY, Zhou Y, et al. Screening of a xylanase clone from a fosmid library of rumen microbiota in Hu sheep. *Anim Biotechnol*, 2012, 23(3): 156–173.
- [22] Sun XB, Cao JW, Wang JK, et al. SpyTag/SpyCatcher molecular cyclization confers protein stability and resilience to aggregation. *New Biotechnol*, 2019, 49: 28–36.
- [23] Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol*, 1992, 23(3): 257–270.
- [24] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [25] Kim DY, Shin WS. Characterisation of bovine serum albumin-fucoidan conjugates prepared via the Maillard reaction. *Food Chem*, 2015, 173: 1–6.
- [26] Hegazy UM, El-Khoneyzy MI, Shokeer A, et al. Revealing of a novel xylose-binding site of *Geobacillus stearothermophilus* xylanase by directed evolution. *J Biochem*, 2019, 165(2): 177–184.
- [27] He J, Tang F, Chen DW, et al. Design, expression and functional characterization of a thermostable xylanase from *Trichoderma reesei*. *PLoS ONE*, 2019, 14(1): e0210548.
- [28] Nakatani K, Katano Y, Kojima K, et al. Increase in the thermostability of *Bacillus* sp. strain TAR-1 xylanase using a site saturation mutagenesis library. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018, 82(10): 1715–1723.
- [29] He Y. Enhancement in the thermotolerance of xylanase (AoXyn11A) by N-terminus replacement and site-directed mutagenesis[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016 (in Chinese).
何瑶. 通过 N-端置换及定点突变提高木聚糖酶 AoXyn11A 耐热性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [30] Li GQ, Chen XJ, Zhou X, et al. Improvement of GH10 family xylanase thermostability by introducing of an extra α -helix at the C-terminal. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 515(3): 417–422.
- [31] Porter JL, Rusli RA, Ollis DL. Directed evolution of enzymes for industrial biocatalysis. *ChemBioChem*, 2016, 17(3): 197–203.
- [32] Yang XL, Feng YR, Chong HM, et al. High-throughput estimation of specific activities of enzyme/mutants in cell lysates through immunoturbidimetric assay of proteins. *Anal Biochem*, 2017, 534: 91–98.
- [33] Tian LP, Zhang C, Wang JC, et al. Study on the relationship between physiological metabolism and rumen microorganisms in ruminants. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2016, 15(8): 49–51, 56 (in Chinese).
田丽萍, 张才, 汪纪仓, 等. 反刍动物生理代谢与瘤胃微生物关系的研究. *黑龙江畜牧兽医*, 2016, 15(8): 49–51, 56.
- [34] He B, Jin SW, Cao JW, et al. Metatranscriptomics of the Hu sheep rumen microbiome reveals novel cellulases. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12(1): 153.
- [35] Wang Q, Luo Y, He B, et al. Characterization of a novel xylanase gene from rumen content of Hu sheep. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 177(7): 1424–1436.
- [36] Wang YD, Tian JW, Xiao Y, et al. SpyTag/SpyCatcher cyclization enhances the thermostability and organic solvent tolerance of L-phenylalanine aldolase. *Biotechnol Lett*, 2019, 41(8/9): 987–994.

(本文责编 陈宏宇)