

枯草杆菌蛋白酶_E的蛋白质工程

朱榴琴 季永梅

(中国科学院生物物理研究所蛋白质工程室 北京 100101)

摘要 用定点突变和随机突变的方法,对枯草杆菌碱性蛋白酶 E 基因进行改造。突变后的基因插入大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pBE-2 中,在碱性和中性蛋白酶缺陷型的枯草杆菌 DB104 中进行表达,得到突变种的碱性蛋白酶,它们的突变位点分别是(M222A)、(M222A、N118S)、(M222A、N118S、Q103R)、(M222A、N118S、Q103R、D60N)。各突变种酶的性质测定结果表明,M222A 突变使酶抗氧化,N118S 突变使酶增加热稳定性,Q103R 和 D60N 突变虽然能增加酶的比活,但使酶的热稳定性大大下降,尤其是 D60N 突变使酶变得极不稳定。野生型碱性蛋白酶与(M222A)突变种的等电点均为 8.92,而(M222A, N118S)、(M222A, N118S, Q103R)和(M222A, N118S, Q103R, D60N)突变酶分别为 8.88, 9.10 和 9.17。用 N-suc-AAPF-pNA 作为底物时酶反应最适 pH 值为 7.5~9.5,而用酪蛋白作底物时最适 pH 值为 10~12。

关键词 枯草杆菌碱性蛋白酶 E, 蛋白质工程, 稳定性

枯草杆菌碱性蛋白酶是重要的工业用酶,为了适应应用的需要,用基因工程的方法对它的基因进行定点突变或随机突变结合表型筛选,可以得到合乎要求的突变种酶。如:在碱性蛋白酶 BPN' 的 222 位,用盒式突变方法得到了抗氧化并保留较高活性的突变种^[1],在碱性蛋白酶 E 上引入 M222A 突变也得到了相似的结果;在(M222A)突变种基因片段上用随机突变的方法筛选到热稳定并且抗氧化的突变种(M222A, N118S)^[2];Chen. K 等人用随机突变方法筛选到(Q103R, D60N)突变的碱性蛋白酶 E,发现此突变使酶的 Kcat/Km 值增加^[3]。本文报道碱性蛋白酶 E 的四种突变种(M222A)、(M222A, N118S)、(M222A, N118S, Q103R)、(M222A, N118S, Q103R, D60N)的性质。

1 材料与方法

1.1 酶和试剂

苯甲基磺酰氟(PMSF),四肽底物 N-Succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-Nitroanilide (N-Suc-AAPF-pNA)为 Sigma 产品。限制酶是 New England Biolabs 产品。T4DNA 连接酶、T7DNA 聚合酶(Sequencing Grade)和电泳用标准蛋白为 Pharmacia 产品。干酪素是国产化学纯试剂,其它均为国产分析纯试剂。

1.2 菌种和质粒

本项目由 863-03 主题资助。

本文于 1995 年 9 月 13 日收到。

大肠杆菌为本实验室保存,枯草芽孢杆菌-大肠杆菌穿梭质粒由中国科学院微生物研究所郭兴华先生惠赠。pBY/DB104、pBM/DB104、pBH/DB104、pBT/DB104 和 pBF/DB104 分别是含有野生型蛋白酶 E、(M222A)、(M222A, N118S)、(M222A, N118S, Q103R)和(M222A, N118S, Q103R, D60N)突变种蛋白酶 E 基因片段与 pBE-2 质粒组成的重组质粒的 DB104 转化菌株,它们能分泌相应的蛋白酶。

1.3 培养基

大肠杆菌的培养基为 YT 培养基,抗生素浓度为:氨苄青霉素(50mg/L)、卡那霉素(10mg/L)。枯草杆菌在进行质粒重组、菌种保存时均用 YT 培养基,在进行酶制备时用工业培养基,每升培养基中含玉米粉 60g,豆饼粉 40g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4g, KH_2PO_4 0.3g, Na_2CO_3 1g。

1.4 蛋白酶活力测定

用酪蛋白作底物时,测活条件参考文献[4]。酶在 40℃、pH11 时每分钟水解产生 1μg 酪氨酸的酶量为一个活力单位(u)。用四肽底物测活时,底物溶解在 100mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 5mmol/L $CaCl_2$ 溶液中,浓度为 0.1mmol/L。将 1.5ml 底物溶液在 37℃ 保温,加入一定量酶液(30~50μl),混匀,在分光光度计上测定不同时间释放出的对硝基苯胺的量(410nm 处的 OD 值),以反应初速度计算酶活。酶浓度以纯酶溶液的消光系数 $\epsilon_{410, 1\%} = 8.6$, 根据 280nm 处的 OD 值计算。

1.5 酶的稳定性测定

纯酶溶解在 0.1mol/L Tris-HCl, pH8.0, 40mmol/L $CaCl_2$, 0.5mol/L NaCl 中,浓度为 0.5~1mg/ml, 在 65℃ 保温,不同时间取 30~50μl 溶液,用酪蛋白作底物测定酶活。以保温时间为 0 时的酶活为 100, 计算相对剩余活性。

1.6 酶的动力学性质测定

用四肽底物 N-Suc-AAPF-pNA, 在 37℃ 测定酶活性及底物浓度与酶活的关系, 计算 K_m 和 K_{cat} 的值。

1.7 酶的 SDS 和等电聚焦电泳

纯酶用 LKB2117 多用电泳仪进行等电聚焦电泳,两性电解质的 pH 范围为 3.5~10, 丙酰胺浓度为 5%, 交联度为 1.3%, 电泳温度为 5℃。酶液浓度为 0.5~2mg/ml, 点样量 5~30μl。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的凝胶浓度为 15%。

1.8 酶的抗氧化性测定

纯酶溶解在 100mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 5mmol/L $CaCl_2$ 中,酶液中加入 H_2O_2 使其浓度达到 1mol/L, 在 37℃ 保温一定时间后,取一定量的酶液加到 1.5ml, 0.1mmol/L 四肽底物 N-Suc-AAPF-pNA, 50mmol/L Tris-HCl pH8.0, 5mmol/L $CaCl_2$ 溶液中, 在 37℃ 测定反应起始活性, 与未经 H_2O_2 处理的酶的起始活性比较, 计算相对剩余活性。

2 结果与讨论

2.1 碱性蛋白酶的基本性质

2.1.1 分子量:纯酶样品中加入酶的抑制剂 PMSF(苯甲基磺酰氟), 均得到单一的酶蛋白带, 分子量为 27.5kDa, 与文献报道值相同。如不加抑制剂, 四突变酶(M222A, N118S,

Q103R, D60N) 出现两条酶带, 其中一条是未降解的酶蛋白带, 另一条为降解产物 (图版 I - A, B)。降解产物的分子量为 24.5kDa, 约被降解掉 27 个氨基酸残基。

2.1.1 等电点: 如图版 I - C 所示, 根据标准蛋白的等电点, 测得野生型和 (M222A) 突变型碱性蛋白酶 E 的等电点为 8.92, 而 (M222A, N118S) 突变型为 8.88, 略低于单突变酶。

有可能 118 位突变引起酶的空间结构发生变化, 导致分子表面正电荷相对增多。三突变酶 (M222A, N118S, Q103R) 的 pI 值为 9.10, 因为 103 位氨基酸由不带电荷的 Gln 变为带负电荷的 Arg, 所以它的等电点高于双突变酶。四突变酶 (M222A, N118S, Q103R, D60N) 在等电聚焦电泳中出现两条带, 与蛋白酶样品不加抑制剂 PMSF 的 SDS - PAGE 结果相似。其中一条带的 pI 为 9.17, 比三突变种的略高一些; 而另一条带的 pI 为 9.03, 比三突变种的略低。与三突变种相比, 由于第四个突变使一个酸性氨基酸 Asp 突变为中性氨基酸 Asn, 所以四突变种的 pI 值应该比三种变种的高, 即 pI 为 9.17 的为未降解的酶带, 而 pI 为 9.03 的为降解产物带。此降解产物带与 SDS-PAGE 中的降解带相对应, 说明第 60 位突变导致某一位点容易被切开, 引起蛋白酶一端缺失 27 个氨基酸残基, 缺失后的产物正电性较强。这个推测需要通过降解产物的氨基酸序列分析和分子结构研究进一步证实。

2.2 酶的催化性质

2.2.1 反应动力学性质: 野生型和各种突变种碱性蛋白酶的动力学性质如表 1 所示:

表 1 野生型和各种突变种碱性蛋白酶 E 水解四肽底物的反应动力学常数

Table 1 Kinetic constants for hydrolysis of N-Suc-AAPF-pNA by wild type and Variant subtilisin E

Enzyme	$K_m/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	K_{cat}/s^{-1}	$K_{cat}/K_m\text{ /mmol}\cdot(\text{L}\cdot\text{s})^{-1}$
Wild type	0.43	29.6	68.8
M222A	0.56	14.8	26.4
M222A, N118S	0.91	31.2	34.3
M222A, N118S, Q103R	0.29	20.7	71.4
M222A, N118S, Q103R, D60N	0.56	64.6	115.4

从表 1 可见, M222A 突变使酶的 K_{cat} 值下降 1 倍, K_{cat}/K_m 值下降 1.5 倍, 所以 222 位突变后酶的比活下降 1 倍多。118 位突变使由于 222 位突变而降低的 K_{cat} 和 K_{cat}/K_m 值有所升高, 所以 118 位突变不仅增加热稳定性, 而且改变了酶的反应动力学性质。三突变种的 K_{cat}/K_m 与野生型相似, 四突变种的超过近一倍。这些结果与文献报道的相一致^[3], 说明 Q103R 和 D60N 突变都能增加酶的比活性。

2.2.2 最适 pH: 用不同 pH 的 50mmol/L 的缓冲液 (pH6~8 为磷酸缓冲液, pH8 以上为甘氨酸缓冲液) 1.5ml 与 75 μ l 2mmol/L 的 N-Suc-AAPF-pNA 混合, 于 37℃ 保温 2min 后, 加入适量酶液, 在分光光度计上测 410nm 处的光密度, 计算反应初速度。发现野生型蛋白酶 E 和它的突变种的最适 pH 均在 7.5~9.5 之间。而用酪蛋白作底物时, (将 pH7 的 2.5% 酪蛋白溶液以 1:4 的体积比与不同 pH 值的缓冲液混合, 在 40℃ 保温后, 加入一定量的酶液), 最适 pH 在 10~12 之间 (图 1)。

2.3 酶的稳定性

2.3.1 热稳定性:碱性蛋白酶 E 和它的各突变种的热稳定性测定结果如图 2 所示。

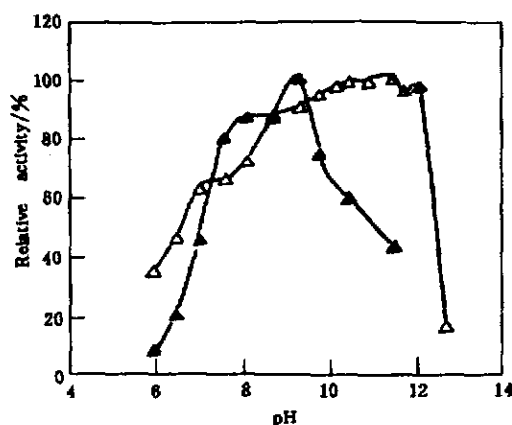


图 1 枯草杆菌蛋白酶 E 及其突变种的最适 pH

Fig. 1 The optimum pH of subtilisin E and its mutants

▲ Substrate: N-Suc-AAPF-pNA △ Substrate: casein

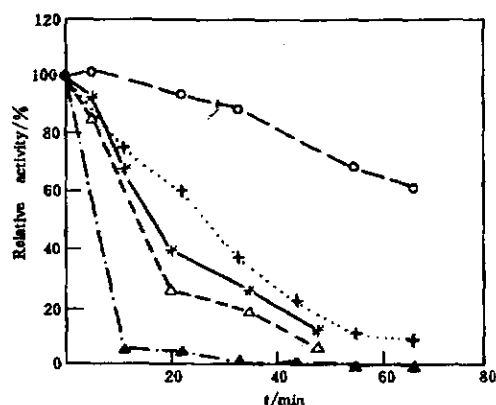


图 2 枯草杆菌蛋白酶 E 及其突变种的热稳定性

Fig. 2 hermostability of subtilisin E and its mutants

The enzymes were dissolved in the solution of 0.1mol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.5mol/L NaCl, 5mmol/L CaCl₂ at 65°C for the time indicated. the residual amidase activities were measured on the substrate casein 1% at 40°C in 25mmol/L borate buffer, pH11.

* Wild type △ M222A ○ M222A, N118S

+ M222A, N118S, Q103R ▲ M222A, N118S, Q103R, D60N

野生型碱性蛋白酶的半失活时间是 18min, M222A 突变酶为 13min, 而增加了 N118S 突变后热稳定性大大提高, 65°C 保温 1h 活力仍保留 65%。增加 Q103R 突变使热稳定性遭到破坏, 但仍比野生型稳定, 半失活时间为 27min。四突变种由于 D60N 突变, 酶的热稳定性大大降低, 65°C 保温 10min, 酶几乎全部失活。由此可见, Q103R 和 D60N 突变虽然能提高酶的比活性, 但随之而来的是热稳定性大大降低, 给酶的保存带来困难。

2.3.2 抗氧化性:碱性蛋白酶 E 和它的四种突变种的抗氧化性测定结果如图 3 所示。

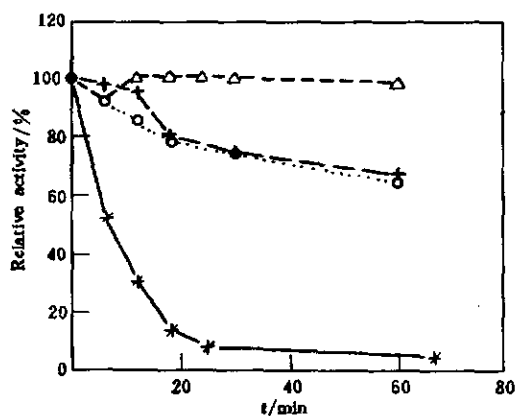


图 3 过氧化氢对枯草杆菌碱性蛋白酶 E 及其突变种的影响

Fig. 3 Effects of hydrogen peroxide on the activity of subtilisin E and its mutants

The enzymes were dissolved in the solution of 0.1 mol/L Tris-HCl, pH8.0, 5mmol/L CaCl₂, 1mol/L H₂O₂ at the concentration of 1mg/ml, and incubated at 37°C for the time indicated. The residual initial activities were measured over time by mixing not more than 50 μl of the enzyme solution into 1.5ml substrate solution at 37°C

* wild type △ M222A and M222A, N118S + M222A, N118S, Q103R ○ M222A, N118S, Q103R, D60N

它表明:(M222A)和(M222A, N118S)突变种都具有抗氧化的能力,在 37℃ 与 1mol/L H_2O_2 保温小时,活性仍保留 90% 以上,三突变种(M222A, N118S, Q103R)和四突变种(M222A, N118S, Q103R, D60N)活性保留 60%~70%。这些结果表明,M222A 突变使碱性蛋白酶 E 抗氧化,222 位 Met 被氧化是酶失活的原因^[5],N118S 没有改变酶的抗氧化能力。而 Q103R 和 D60N 突变使酶的抗氧化性受到一定程度的影响,但仍保留了相当强的抗氧化能力。Q103R 和 D60N 两位点的突变虽然增加了酶的比活性,但热稳定性和抗氧化性都有所下降。

参 考 文 献

- [1] Wells J A, Estell D A, Graycar T P, J Biol Chem, 1985, 260: 6518.
- [2] 朱榴琴,赵玉凤,季永梅,热稳定性和抗氧化的碱性蛋白酶(待发表).
- [3] Chen K, Arnold F H, Bio/Technology, 1991, 9: 1073.
- [4] 北京大学生物系编,细菌蛋白酶的活力和比活力测定,生物化学实验指导,第一版,北京:高等教育出版社,1979, pp. 151.
- [5] Stauffer C E, Etson D, J Biol Chem, 1969, 244: 5333~5338.

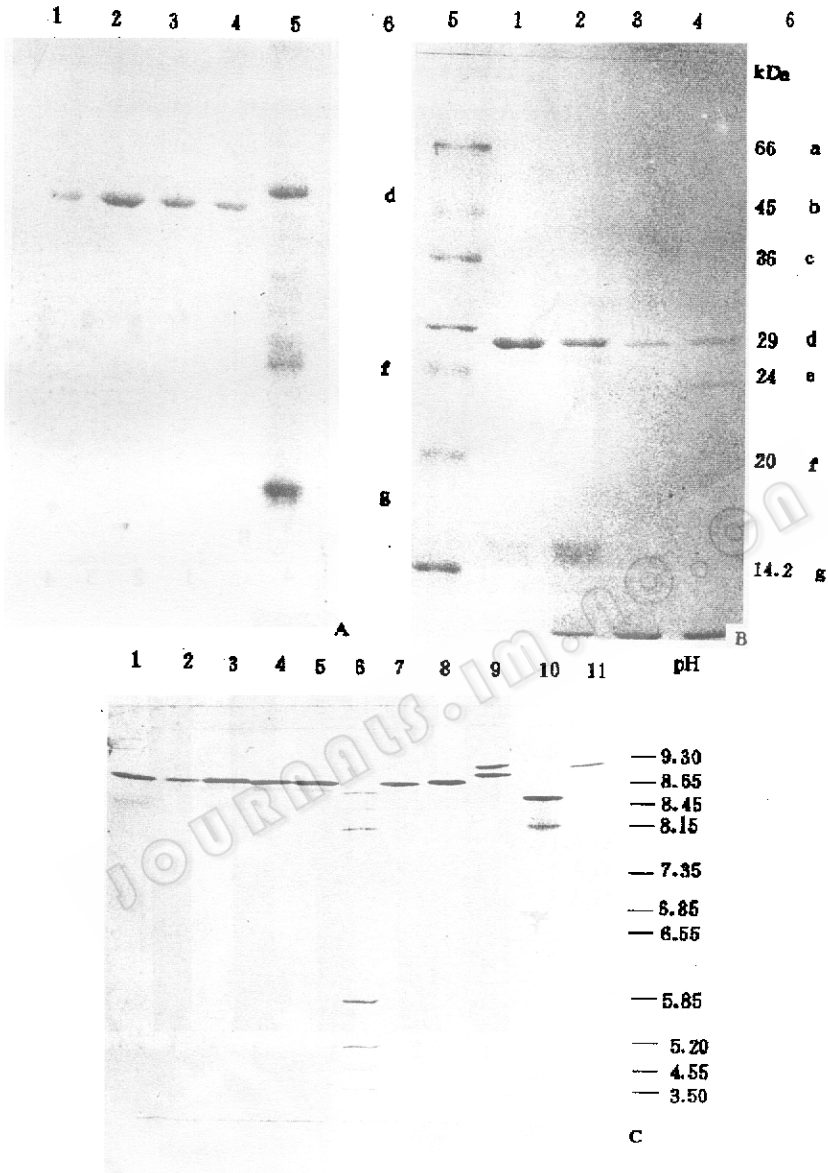
Protein Engineering on Subtilisin E

Zhu Liuqin Ji Yongmei

(Department of protein engineering, Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101)

Abstract Protein engineering was carried out by site-directed and random mutagenesis on subtilisin E gene. Four mutants were obtained. They are M222A; M222A, N118S; M222A, N118S, Q103R and M222A, N118S, Q103R, D60N. The mutant genes were recombined in pBE-2 and *E. coli*-*B. subtilis* shuttle vector, and transformed into *B. subtilis* DB104, an alkline and neutral proteinase deficient strain. The mutant subtilisin E obtained from their gene expression were purified. The properties of those mutants showed that the M222A mutation led the enzyme become oxidation-resistant, N118S mutation increased the heat stability, while Q103R and D60N mutations enhanced specific activity of the enzyme but decreased the heat stability, especially D60N mutation caused the enzyme quite unstable. The IEF-PAGE showed that the wild-type and M222A mutant had the same pI of 8.92, while those of double mutant, triple mutant and tetra-mutant were 8.88, 9.10 and 9.17 respectively. The optimum pH range was 7.5~9.5 for substrate suc-AAPF-pNA and was 10~12 for substrate casein

Key words Subtilisin E, protein engineering, heat stability



The SDS-PAGE of Subtilisin E and its mutants A. Add PMSF, B. No PMSF

1. M222A, 2. M222A, N118S, 3. M222A, N118S, Q103R, 4. M222A, N118S, Q103R, D60N, 5. Protein standard, 6. Molecular weight marker,

a. Albumin bovine, b. albumin egg, c. Glyceral dehyde-3'-p-Dehydrogenase, d. Carbonic anhydrase, bovine, e. Trypsinogen, bovine pancreas f. Trypsin Inhibitor, soybean, g. α -Lactalbumin, Bovine milk

C. The IEF-PAGE of Subtilisin E and its mutants

1. Subtilisin E (sigma) 2. Wild type 3. Double mutant (M222A, N118S) 4. Single mutant (M222A) 5. Tetramutant (M222A, N118S, Q103R, D60N) 6. protein standard 7. Lentil lectin (acidic band) 8. Myoglobin (basic band) 9. Bovine carbonic anhydrase 10. Subtilisin carlsberg (2709) 11. Triple mutant (M222A, N118S, Q103R)

6. protein standard	pI	Lentil lectin (acidic band)	8.15	Bovine carbonic anhydrase	5.85
Trypsinogen	9.30	Myoglobin (basic band)	7.35	β -lactoglobulin A	5.20
Lentil lectin (basic band)	8.65	Myoglobin (acidic band)	6.85	Soybean trypsin inhibitor	4.55
Lentil lectin (middle band)	8.45	Human carbonic anhydrase	6.55	Amyloglucosidase	3.50