

枯草蛋白酶 E 的突变体

杨永华¹ 吴宇杰² 蒋 岚¹ 朱榴琴² 杨胜利^{1*}

¹(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

²(中国科学院生物物理研究所 北京 100101)

摘 要 Ser236 位于横贯枯草蛋白酶 E 的 α -螺旋末端, 远离催化活性中心, Ser236 的突变不会对酶的活性产生大的影响。用定点突变的方法对枯草蛋白酶 E 的基因进行改造引入 Ser236Cys, 可能会形成分子间二硫键, 有利于提高酶的稳定性。Ser236Cys 变体酶(BP-1)活性是野生型蛋白酶 E 的 1.5 倍, 热稳定性提高 3 倍; 进一步在其他位点引入突变的变体酶 BU-1(Ala15Asp/Gly20His/Ser236Cys)和 BW-1(Ser24His/Lys27Asp/Ser236Cys)活性都比野生型蛋白酶 E 低, 但 BW-1 的稳定性稍高于野生型蛋白酶 E。

关键词 枯草杆菌蛋白酶 E, 蛋白质工程, 稳定性

中图分类号 Q503 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0147-03

蛋白质工程是提高蛋白质稳定性及活性的重要手段, 国内外围绕多种不同来源的蛋白酶用蛋白质工程手段进行了大量的研究。其中, 对枯草蛋白酶 BPN' 的研究最为透彻, 已得到了抗氧化^[1], 耐热^[2]及非水介质中稳定的变体酶^[3]。枯草蛋白酶 E 是枯草杆菌分泌的一种丝氨酸蛋白酶, 与枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的同源性高达 86%, 一些有关枯草蛋白酶 BPN' 的研究结果对蛋白酶 E 也适用并已取得了较好的结果^[4,5]。另外, 用随机突变的方法也筛选到活性提高或稳定性提高的枯草蛋白酶 E 变体^[6,7]。本文报道三个全新的枯草蛋白酶 E 变体酶, 其中 BP-1 的 Ser236Cys 突变可提高枯草蛋白酶 E 的热稳定性, 为枯草蛋白酶 E 的蛋白质工程研究提供有益的经验。

1 材料与方 法

1.1 酶和试剂

除测序用 T7 Sequencing kit 为 Pharmacia 公司产品外, 实验所用的酶及突变试剂盒 Altered Sites[®] II *in vitro* Mutagenesis Systems 均为 Promega 公司产品。突变引物及测序引物用 Applied Biosystems ABI 380B 合成仪合成。四肽底物 N-Succinyl-Ala-Prp-Phe-p-nitroanilide(sAAPF-pNA)为 Sigma 产品。

1.2 菌种及质粒

实验中所用蛋白酶缺陷型枯草杆菌 DB104 及枯草杆菌-大肠穿梭质粒 pBE-2 来源于中国科学院生物物理所朱榴琴实验室, JM109 及 ES1301 为突变试剂盒中的配套菌种。pBY, pBP-1, pBW-1 和 pBU-1 分别是含野生型蛋白酶 E, Ser236Cys, Ser24His/Lys27Asp/Ser236Cys 和 Ala15Asp/Gly20His/Ser236Cys 突变的基因片段与 pBE-2 组成的重组质粒。

1.3 方 法

1.3.1 突变及质粒构建: 将枯草蛋白酶 E 基因(包括信号肽和导肽部分的基因, 1.9kb), 插入突变载体 pAlter-I 的 *EcoRI/SalI* 位点得质粒 pSY, 分别用下列引物引入相应的突变: 5-GCG TTA ATT CTT TGC AAG CAC CCG(Ser236Cys), 5-G CCG G AT CTT CAC TCT CAA CAC TAC ACA GG (Ala15Asp/Gly20His), 5-C ACA GGC CAT AAC GTA GAC GTA GCT GT(Ser24His/Lys27Asp), 黑体划线部分表示突变碱基; 突变后的质粒分别命名为 pSP-1, pSU-1 及 pSW-1; 所有突变都经双脱氧链终止法测序证实。用 *EcoRI/SalI* 切出突变后的 1.9kb 片段, 分别插入 pBE-2 穿梭质粒中^[8], 得到表达质粒 pBP-1, pBU-1 及 pBW-1。pBP-1, pBU-1, pBW-1 及 pBY 都在 DB104 中得到表达。

收稿日期: 1999-02-08, 修回日期: 1999-12-03。

基金项目: 国家高技术研究发展与计划项目资助(103-13-02-02)。

* 通讯联系人。E-mail: slyang@srecb.ac.cn

1.3.2 表达及纯化: 纯化方法参照文献[5]并经改进。菌种在 2XYT 于 37℃, 200r/min, 24h, 上清经 30%~60% 硫酸铵沉淀后, 溶于 4℃ 的 10mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.2, 1mmol/L CaCl₂ 溶液中, 直接上 DEAE-A50 柱, 收集含所需蛋白的流出液, 经超滤浓缩后上 CM Sepharose 柱, 用 0~0.4mol/L NaCl 的 10mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.2, 1mmol/L CaCl₂ 溶液梯度洗脱。超滤脱盐。SDS-PAGE 电泳显示分离产物为一条带。酶浓度根据 280nm 处的 OD 值, 以消光系数 $e_{1\text{cm}, 1\%} = 11.7$ 计算。

1.3.3 酶的动力学性质测定: 用四肽底物 s-AAPF-pNA (溶于 10mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.2, 1mmol/L CaCl₂ 溶液), 在 37℃ 测定酶活性及底物浓度与酶活的关系, 计算不同底物浓度时的初速度。算出 K_m , K_{cat} , 同样方法测出 DMF-磷酸缓冲液混合体系的 K_m , K_{cat} (见表)。

1.3.4 稳定性测定: 四肽底物 s-AAPF-pNA 溶于 10mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.2, 1mmol/L CaCl₂ 溶液中, 浓度为 0.1mol/L。将酶在 60℃ 保温, 每隔一定时间取一定量酶置于冰上保存, 在 37℃ 测定酶的剩余活性 (以反应初速度计算酶活), 与未经热处理的蛋白酶 E 活性相比, 计算热处理后酶的相对剩余活性。

2 结果与讨论

以枯草蛋白酶 E 的 PMSF 复合物晶体结构为基础^[9], 通过图形分析发现, Ser236 位于蛋白酶的表面, 与活性位点 Ser221 处于同一 α -螺旋上。由于 Ser236 与 Ser221 相距较远, Ser236 的突变不会对活性产生大的影响, Ser236Cys 突变后的变体酶可能会在 236 位形成分子间二硫键, 有利于提高蛋白酶的稳定性。

表 1 为 BP-1、BW-1、BU-1 及 WT 在不同 DMF 体系中的动力学常数; 图 2 为 DMF 含量的升高对 BP-1、BW-1、BU-1 及 WT 动力学性质的影响。可见, BP-1、BW-1、BU-1 及 WT 的活性都随 DMF 溶度的升高而降低。其中 BP-1 的活性及稳定性最高, Ser236Cys 突变使蛋白酶的 K_{cat} 值稍有增加, K_{cat}/K_m 值是野生型蛋白酶的 1.5 倍; BW-1 稳定性与 WT 相似, 而 BU-1 的活性及稳定性最低, Ser24His/Lys27Asp/Ser236Cys 和 Ala15Asp/Gly20His/Ser236Cys 突变使蛋白酶的 K_{cat} 值和 K_{cat}/K_m 大大降低。在 5%~20% DMF-缓冲溶液的混合介质中, 变体酶的稳定性次

序为: BP-1>BW-1³ WT>BU-1; 变体酶及野生型蛋白酶在 40% DMF 中的稳定性都较差, 活性几乎全部丧失, 因此这些酶在极性有机溶剂 DMF 中没有应用前景。

表 1 BP-1、BW-1、BU-1 及 WT 在不同 DMF 体系中的动力学常数

Table 1 Kinetic parameters of mutants and wild-type subtilisin E in DMF-phosphate buffer, pH7.4, 1mmol/L CaCl₂

Enzyme	DMF /%	K_{cat} /s ⁻¹	K_m / (mmol/L)	K_{cat}/K_m / (mol ⁻¹ ·L·s ⁻¹)
WT	0	27.83	0.61	4.57×10^4
	5	26.76	1.16	2.31×10^4
	10	24.85	2.56	9.71×10^3
	20	22.36	9.32	2.40×10^3
	40	3.73	17.76	2.10×10^2
BP-1	0	31.02	0.40	7.72×10^4
	5	53.81	0.93	5.80×10^4
	10	29.11	0.96	3.02×10^4
	20	16.98	2.61	6.51×10^3
	40	0.74	5.46	1.35×10^2
BW-1	0	5.74	0.15	3.73×10^4
	5	8.35	0.44	1.89×10^4
	10	11.34	1.30	8.73×10^3
	20	21.87	12.27	1.78×10^3
	40	0.1245	0.20	6.20×10^2
BU-1	0	12.76	0.44	2.92×10^4
	5	23.93	4.28	5.58×10^3
	10	3.64	1.31	2.78×10^3
	20	0.66	0.96	6.87×10^2

图 1 为野生型枯草蛋白酶 E, Ser236Cys 突变后的变体酶 BP-1 和 Ser24His/Lys27Asp/Ser236Cys 突变后的变体酶 BW-1 在 50℃ 条件下的相对活性

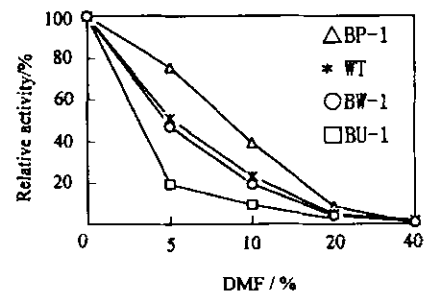


图 1 枯草蛋白酶在 DMF 中的稳定性
Fig. 1 Stability of mutants and wild-type subtilisin E at 37°C in DMF-phosphate buffer pH7.4, 1mmol/L CaCl₂ mixture system

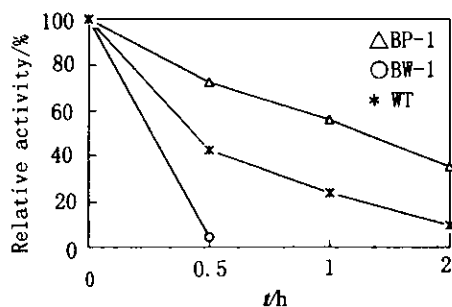


图2 枯草蛋白酶E突变体的热稳定性

Fig. 2 Thermal stability of Mutants and wild-type subtilisin E at 50°C in phosphate buffer pH7.4, 1mmol/L CaCl₂

比较图。由图1可见, BP-1的半寿期超过1h, BW-1的半寿期约为0.5h, 而枯草蛋白酶E的半寿期不超过20min, BP-1的耐热性比天然酶高约3倍。由此可见, 引入Ser236Cys突变可提高枯草蛋白酶E的耐热性, 而Ser24His/Lys27Asp和Ala15Asp/Gly20His突变对枯草蛋白酶E的活性及稳定性都不利。

以上结果说明, Ser236Cys突变可提高蛋白酶E的热稳定性。但是经非变性SDS-PAGE电泳并没有发现能证明形成分子间二硫键的55kD条带, 有关Ser236Cys突变体稳定性的原因有待进一步探明。

参 考 文 献

- [1] Wells J A, Estell D A, Grayear T P. *J Biol Chem*. 1985, **260**: 6518~6521
- [2] Bryan P N, Rollence M L, Pantoliano M W, Gilliland G L, Howard et al. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1986, **1**: 326~334
- [3] 朱檀琴, 季永梅. 生物工程学报, 1997, **13**: 13~17
- [4] Chen K Q, Robinson A C, Van Dam M E et al. *Biotechnol Prog*. 1991, **7**: 125~129
- [5] Chen K Q, Arnold F H. *Bio/Technology*, 1991, **9**: 1073~1077
- [6] 朱檀琴. 中国专利 CN1113953A
- [7] Zhong Z Y, Liu J L, Dinterman L M et al. *J Am Chem Soc*. 1991, **113**: 683~684
- [8] 郭兴华. 生物工程学报, 1991, **7**: 224~229
- [9] Chu N M, Cao Y, Bi R C. *Protein Engineering*. 1995, **8**: 211~215

Mutants of Subtilisin E

YANG Yong-Hua¹ WU Yu-Jie² JIANG Lan¹ ZHU Liu-Qin² YANG Sheng-Li¹

¹ (Shanghai Research Center of Biotechnology, Shanghai 200233)

² (Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Science, Beijing 100101)

Abstract Ser 236, located in the surface of subtilisin E and at the end of α -helix with Ser221, is far from the active center (Asp32, His64, Ser221). The replacement of Ser236 with Cys via directed-mutagenesis should effect protease activity insignificantly and may be able to improve the stability of enzyme due to the potency to form disulfide across two molecules. The results indicated that BP-1 (Ser236Cys) was found to gain 150% activity (K_{cat}/K_m value) of the wild-type subtilisin E and 3-fold increase in stability in aqueous solution at pH7.4 and 50°C, compared to the wild-type enzyme. However, further mutations on BP-1 to introduce Ala15Asp/Gly20His (BU-1) or Ser24His/Lys27Asp (BW-1) was found negative effects on the activity and stability of subtilisin E.

Key words Subtilisin E, protein engineering, stability