

研究报告

利用定点突变法研究精氨酸脱亚胺酶活性的影响机制

李利锋^{1,2}, 倪晔^{1,2}, 孙志浩^{1,2}

江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

李利锋, 倪晔, 孙志浩, 等. 利用定点突变法研究精氨酸脱亚胺酶活性的影响机制. 生物工程学报, 2012, 28(4): 508-519.
Li LF, Ni Y, Sun ZH. Mechanism of arginine deiminase activity by site-directed mutagenesis. Chin J Biotech, 2012, 28(4): 508-519.

摘要: 精氨酸脱亚胺酶 (ADI) 是一种针对精氨酸缺陷型癌症 (如: 肝癌、黑色素瘤) 的新药, 目前处于临床三期试验。文中通过定点突变技术分析精氨酸脱亚胺酶的特定氨基酸位点对酶活力的影响机制。针对已报道的关键氨基酸残基 A128、H404、I410, 采用 QuikChange 法进行定点突变, 获得 ADI 突变株 M1 (A128T)、M2 (H404R)、M3 (I410L) 和 M4 (A128T/H404R)。将突变株在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行重组表达, 并对纯化获得的突变蛋白进行酶学性质研究。结果表明, 突变位点 A128T 和 H404R 对 ADI 最适 pH 的提高, 生理中性 (pH 7.4) 条件下的酶活力和稳定性的提高, 以及 K_m 值的降低均具有显著的作用。研究结果为阐明 ADI 的酶活力影响机制和蛋白质的理性改造提供了一定的依据。

关键词: 精氨酸脱亚胺酶, 定点突变, 蛋白质纯化, 酶活力, 最适 pH, 抗癌

Mechanism of arginine deiminase activity by site-directed mutagenesis

Lifeng Li^{1,2}, Ye Ni^{1,2}, and Zhihao Sun^{1,2}

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Arginine deiminase (ADI) has been studied as a potential anti-cancer agent for inhibiting arginine-auxotrophic tumors (such as melanomas and hepatocellular carcinomas) in phase III clinical trials. In this work, we studied the molecular mechanism of arginine deiminase activity by site-directed mutagenesis. Three mutation sites, A128, H404 and

Received: September 20, 2011; **Accepted:** December 29, 2011

Supported by: Natural Science Foundation of China (No. 30900030), National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2011CB710800), New Century Excellent Talents in University (No. NCET-11-0658).

Corresponding author: Ye Ni. Tel: +86-510-85329265; E-mail: yni@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30900030), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB710800), 教育部新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-11-0658) 资助。

I410, were introduced into wild-type ADI gene by QuikChange site-directed mutagenesis method, and four ADI mutants M1 (A128T), M2 (H404R), M3 (I410L), and M4 (A128T, H404R) were obtained. The ADI mutants were individually expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3), and the enzymatic properties of the purified mutant proteins were determined. The results show that both A128T and H404R had enhanced optimum pH, higher activity and stability of ADI under physiological condition (pH 7.4), as well as reduced K_m value. This study provides an insight into the molecular mechanism of the ADI activity, and also the experimental evidence for the rational protein evolution in the future.

Keywords: arginine deiminase, site-directed mutagenesis, protein purification, enzyme activity, optimal pH, anti-tumor

目前,肝癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 已经成为世界范围常见的恶性肿瘤之一。全球每年约有 600 000 名病人患有肝细胞癌。亚洲东部、东南部该病发病率为 18.3%~35.5% (每 10 万人),而在中美洲该病发病率仅有 2.1% (每 10 万人)。肝癌患者在确诊后没有经过治疗其生存期平均为 1~4 个月^[1]。通过手术治疗 HCC 效果不佳,且术后易复发,因此临床迫切需要一种治疗肝癌的新方法^[2-3]。研究中发现,ADI 在体内具有抑制精氨酸缺陷型肿瘤细胞的功效,且毒副作用较小^[4]。ADI 的抗癌机制是通过切断精氨酸对肿瘤细胞的供给,从而消灭或控制精氨酸营养缺陷型癌细胞 (如:肝癌细胞、黑素瘤细胞等) 的生长。精氨酸对于人类是一种非必需氨基酸,正常细胞可经尿素循环通过精氨酸-琥珀酸合成酶和精氨酸-琥珀酸裂解酶合成精氨酸^[5-6]。

近年来,ADI 作为新型抗癌药物的临床研究在国内外已经开展并引起了高度重视^[7-10],美国肯塔基大学和美国凤凰生物科技公司对开发 ADI 作为抗癌药物做了大量研究^[11-12]。经 PEG 修饰的支原体 *Mycoplasma* 来源的 ADI 重组蛋白 ADI-PEG-20,即 PEG 化重组支原体 ADI,于 1999 年和 2005 年分别被美国食品药品监督管理局 (FDA) 和欧洲药品审评署 (EMA) 批准作为罕见病药物用于治疗恶性黑素瘤和 HCC。目前美国凤凰生物科技公司的 ADI-PEG-20 在美国进行第 III

期临床实验。在前期研究中,本研究室刘咏梅等在自然界筛选到产 ADI 的变形假单胞菌 *Pseudomonas plecoglossicida*,该 ADI 为同源二聚体,其最适 pH 为 6.0,在人体生理 pH (7.35~7.45) 条件下的酶活力仅为最适条件下酶活力的 10% 左右^[13];刘咏梅等在改良的二乙酰-胍瓜氨酸测定方法的基础上,建立了高效灵敏的 96 孔板高通量筛选模型,采用易错 PCR 法构建 ADI 突变文库,由 600 多株突变株中筛选获得了在生理 pH 条件下酶活力提高 20.5 倍的 ADI 突变株 M314 (A128T/H404R/I410L)^[14]。ADI 突变株 M314 的最适 pH 为 6.5,较野生型 ADI 的最适 pH 提高了 0.5 个单位,在生理 pH 条件下残余酶活力为 40%。为了进一步探明 M314 中关键位点对精氨酸脱亚胺酶的影响,本研究采用定点突变法研究了精氨酸脱亚胺酶活性的影响机制。

定点突变是研究蛋白质结构与功能之间复杂关系的有效手段^[15]。PCR 介导的定点突变是目前广为采用的方法之一^[16]。目前,QuikChange PCR 法 (快速定点突变法) 最为简便快速,其原理为以环状全质粒为模板,使用两条含突变位点的反向互补引物进行 PCR 扩增目的基因,其产物是含缺刻的环形质粒,由于来源于大肠杆菌的模板质粒几乎全为甲基化的质粒,因此,可以通过 *Dpn* I 限制性内切酶降解模板质粒,酶切后获得的为含突变的质粒,经转化大肠杆菌并修复环

形缺刻最终获得突变菌株^[17]。ADI 突变株 M314 较野生型 ADI 在生理 pH 条件下酶活力提高 20.5 倍, 最适 pH 提高了 0.5 个单位。为进一步了解 M314 中特定氨基酸位点对酶活力的影响机制, 本研究通过定点突变研究了 M314 的 3 个突变位点 A128T、H404R 和 I410L 对 ADI 酶活力和酶学性质的影响。并对 M314 突变位点进行结构模拟分析, A128T 有利于形成更多氢键, H404 位点紧临催化中心 C405, 两者均处于影响酶活力的重要位置; 而 I410 位点则处于 C 末端的 β 折叠上, 距酶催化中心较远, I410L 对 ADI 三维结构无明显的改变。本研究首先对 3 个氨基酸位点 A128、H404 和 I410 进行单点突变以阐明其对酶活力的影响, 为进一步双位点的突变研究提供依据。实验结果显示, A128T 和 H404R 对 ADI 的酶活力有显著影响, 而 I410L 对酶活力影响较小, 因此选择了 A128T 和 H404R 作为组合进行双位点突变。通过定点突变法获得了突变株 M1 (A128T)、M2 (H404R)、M3 (I410L) 和 M4 (A128T/H404R), 并对 WT-ADI 及其突变酶的酶学性质进行了研究, 探讨了上述位点对 ADI 酶活力的影响及其分子机制, 为阐明 ADI 的酶促反应的作用机制和蛋白质的理性改造提供了实验依据。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株、质粒和培养基

野生型 ADI (WT-ADI)、ADI 突变株 M314 (A128T/H404R/I410L) 及 *E. coli* JM109 和 BL21 (DE3) 均为本实验室保藏。

LB 培养基: 胰蛋白胨 1%, 酵母膏 0.5%, NaCl 1%, pH 7.0, 115 °C 灭菌 20 min。

1.2 主要试剂和设备

QuikChange 试剂盒 (210518) 购自 Stratagene 公司; DNA marker、质粒小量提取试剂盒、蛋白 marker、蛋白定量试剂盒、十二烷基硫酸钠 (SDS)、丙烯酰胺、双丙烯酰胺、 β -巯基乙醇、苯甲基磺酰氟 (PMSF) 等购自上海生工生物工程有限公司; PCR 引物合成及测序委托 Invitrogen 公司 (上海) 进行; 其他试剂均采用国产分析纯试剂。

超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司), 电子天平 (上海精天电子仪器有限公司), 超声波破碎仪 (宁波新芝生物科技有限公司), 3K15 台式高速冷冻离心机 (Sigma 公司), 蛋白电泳仪及凝胶成像仪 (Bio-Rad 公司), AKTA avant (GE healthcare 公司), 752 型紫外可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司) 等。

1.3 定点突变法制备 ADI 突变株

将携带有质粒 pET24a-ADI 的 *E. coli* BL21 (DE3) 基因工程菌接种于 LB/Kan (Kan 终浓度 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 液体培养基中, 过夜培养后提取质粒。具体操按照说明书进行。以变形假单胞菌 ADI 的编码序列 (GenBank Accession No. EU030267) 为模板, 设计引物 (表 1), 突变位点处由下划线标出。

PCR 扩增反应: 总体积为 50 μL , 其中 QuikChange[®] Lightning DNA 聚合酶 1 μL , 10 \times 反应缓冲液 5 μL , 待突变质粒模板 (20~50 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 1 μL , 正向引物 (125 ng) 1.25 μL , 反向引物 (125 ng) 1.25 μL , dNTPs 混合物 1 μL , QuikSolution 试剂 1.5 μL , 补 ddH₂O 至 50 μL 。PCR 反应程序: 95 °C 2 min; 95 °C 20 s, 60 °C 10 s, 68 °C 4 min, 进行 18 个循环; 68 °C 5 min。

表 1 定点突变引物

Table 1 Primers for site-directed mutagenesis

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
A128T-F	TGATCGGCGGCGTG <u>ACCGCC</u> AGGACCTG	29
A128T-R	CAGGTCCTGGCC <u>GGT</u> CACGCCCGGATCA'	29
H404R-F	GCCGTGGCGGCGG <u>CGT</u> TGCATGACCTGCCCG'	32
H404R-R	CGGGCAGGTCATGCA <u>ACG</u> GCCGCCACGGC	32
I410L-F	GCATGACCTGCCCG <u>CTC</u> GTGCGGACCCGAT	31
I410L-R	ATCGGGTCGCGCAC <u>GAG</u> CGGGCAGGTCATGC	31

The underlined sequences are the mutated sites.

取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 的扩增情况,然后在剩余的 PCR 产物中加入 2 μ L 的 *Dpn* I 限制性内切酶 (专一性消化甲基化质粒序列 GATC), 于 37 $^{\circ}$ C 条件下反应 5 min 将原始模板序列彻底降解。

将酶切后的 PCR 产物转化大肠杆菌 JM109, 对转化子进行菌落 PCR 验证, 并提取质粒进行序列测定, 最后将测序正确的质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 并保藏待用。

1.4 ADI 的蛋白质纯化

将突变株 M1 (A128T)、M2 (H404R)、M3 (I410L)、WT-ADI 及 M314 (A128T/H404R/I410L) 分别接入 LB/Kan 液体培养基, 待 OD_{600} 为 1.0 左右, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 30 $^{\circ}$ C 诱导 5 h 后, 8 000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 用磷酸钠缓冲液 (20 mmol/L, pH 7.0) 洗涤 2 次, 并按菌体湿重/缓冲液 1 : 6 将菌体悬浮, 冰浴条件下进行超声破碎 (400 W, 10~15 min, 超声 1 s, 停止 3 s)。将破碎液于 12 000 r/min 离心 20 min, 上清即为粗酶液。

用溶液 A (20 mmol/L, pH 7.0, 磷酸钠缓冲液) 平衡 HiPrep DEAE FF 离子交换层析柱, 上样后用溶液 A 洗脱未吸附蛋白, 再用溶液 B

(20 mmol/L, pH 7.0, 磷酸钠缓冲液, 1 mol/L NaCl) 进行线性洗脱。并将活性部分超滤浓缩脱盐后进行凝胶过滤层析。

用溶液 C (20 mmol/L, pH 7.0, 磷酸钠缓冲液, 0.15 mol/L NaCl) 平衡 SuperdexTM 200 凝胶过滤层析柱, 将上步浓缩后的蛋白上样后以进行洗脱。将活性部分收集后于 0~4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 并进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 ADI 突变株的酶学性质研究

1.5.1 ADI 的酶活力及比活力测定

ADI 酶活力的测定方法同本研究室的文献报道^[18], 简述如下:

酶活力单位定义: 37 $^{\circ}$ C 时, 每分钟转化 1 μ mol 精氨酸盐酸盐生成瓜氨酸的酶量定义为 1 U。

瓜氨酸含量测定: 于 10 mL 的比色管中依次加入 0.5 mL 二乙酰一肟-硫胺脲溶液, 3 mL 混酸溶液 (含 Fe^{3+}), 2 mL 不同浓度瓜氨酸标准液 (0~50 mg/L), 空白以 2 mL 的去离子水代替。将混匀好的溶液沸水浴 10 min 后, 冷却至室温。按文献^[19]方法测定吸光值, 并绘制标准曲线。

ADI 酶活力测定: 取 50 μ L 适当稀释浓度的酶液并加入 950 μ L 底物 (10 mmol/L L-精氨

酸, 0.5 mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.0), 终体积为 1 mL, 于 37 °C 条件下反应 30 min 后, 100 °C 沸水浴 5 min, 使酶失活, 终止反应。适当稀

释后按文献^[19]方法测定吸光值, 根据标准曲线计算其中瓜氨酸含量, 并计算酶活。计算公式如下:

$$\text{酶活力(U/mL发酵液)} = \frac{\text{瓜氨酸浓度}(\mu\text{g/mL}) \times \text{稀释倍数} \times \text{反应体积(mL)}}{\text{瓜氨酸分子量} \times \text{转化时间(min)} \times \text{发酵液体积(mL)}}$$

蛋白质含量的测定: 根据上海生工生物工程有限公司的 Bradford 法蛋白定量试剂盒说明书进行操作。

1.5.2 最适反应温度和热稳定性的测定

取适量纯化后的 WT-ADI 及其突变酶分别加入到两种不同 pH 的磷酸钠缓冲液 (0.5 mol/L, pH 6.0/pH 7.4) 中, 并在不同的温度 (20 °C~65 °C, 间隔 5 °C) 条件下进行酶促反应测定其最适反应温度, 所使用的底物浓度为 10 mmol/L L-精氨酸, 参照 1.5.1 部分测定其酶活力, 重复测定 3 次。以 WT-ADI 及其突变酶在不同温度条件下所测得的最高酶活力为 100%, 其他值与之比较得到的相对值作图。

取适量纯化后的 WT-ADI 及其突变酶于不同的温度 (25 °C~65 °C, 间隔 5 °C) 条件下处理 1 h 后, 分别在 pH 6.0 和 pH 7.4 磷酸钠缓冲液中测定其酶活力, 所使用的缓冲液及底物的浓度均参照酶活力标准测定方法, 重复测定 3 次。以所测得的最高酶活力为 100%, 其他值与之比较得到的相对值作图。

1.5.3 最适 pH 和 pH 稳定性的测定

将纯化后的 WT-ADI 及其突变酶在不同的 pH (3.5~9.0) 条件下进行酶促反应测定其最适 pH 值, 所使用的缓冲液为 0.5 mol/L 醋酸盐缓冲液, pH 3.5~5.5; 0.5 mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.5~8.0; 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液,

pH 8.5~9.0。并参照 1.5.1 部分测定其酶活力, 重复测定 3 次。以所测得的最高酶活力为 100%, 其他值与之比较得到的相对值作图。

取纯化后的 WT-ADI 及其突变酶在上述中不同 pH 缓冲液中按相同的体积混匀后, 于 37 °C 处理 1 h, 在 0.5 mol/L, pH 7.4 磷酸钠缓冲液中参照 1.5.1 部分测定其酶活力, 重复测定 3 次。以所测得的最高酶活力为 100%, 其他值与之比较得到的相对值作图。

1.5.4 不同突变株精氨酸脱亚胺酶动力学参数对比

按文献[14]的方法, 以 L-精氨酸为底物, 分别在 pH 6.0 和 pH 7.4, 0.5 mol/L 磷酸钠缓冲液中, 于 37 °C 条件下, 按照 1.5.1 部分的酶活力测定方法, 测定 WT-ADI 及其突变酶在 2~10 mmol/L 底物浓度下产物瓜氨酸的生成量, 重复测定 3 次。并按 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求得 K_m 和 V_{max} 。

2 结果与分析

2.1 ADI 的定点突变

为研究 ADI 关键氨基酸残基的作用, 采用定点突变技术首先对 ADI 突变株 M314 中氨基酸位点 A128、H404、I410 进行单点突变以阐明这 3 个位点对精氨酸脱亚胺酶活性的影响, 为进一步双位点的突变研究提供依据。以携带有 WT-ADI

的 pET24a-ADI 质粒为模板, 通过全质粒 PCR 扩增, 获得了长度约为 6.5 kb 的特异性条带, 其中 pET24a 质粒的长度约为 5 300 bp, ADI 基因片段大小约为 1 250 bp (图 1)。经菌落 PCR 验证后, 挑取单克隆过夜培养后提取质粒进行测序鉴定。

经序列比对, 突变株序列正确。其中 M1 (A128T)、M2 (H404R)、M3 (I410L) 和 M4 (A128T/H404R) 分别对应 DNA 序列 382 位 (G→A)、1 211 至 1 212 位 (AC→GT)、1 228 位 (A→C)、382 位 (G→A) 和 1 211 至 1 212 位 (AC→GT)。说明通过快速定点突变法获得了正确的突变株。

2.2 WT-ADI 和 ADI 突变株的纯化

WT-ADI 及突变株 M314、M1、M2、M3 和 M4 经 HiPrep DEAE FF 离子交换层析和

Superdex™ 200 凝胶过滤层析后均获得单一条带, 纯化后的野生型及突变型 ADI 的分子量均为 46 kDa。SDS-PAGE 电泳 (图 2) 显示了通过离子交换层析和凝胶过滤层析可以获得电泳纯级别的精氨酸脱亚胺酶。

2.3 ADI 野生酶和突变株的酶学性质研究

2.3.1 酶活力比较

结果如表 2 所示, 当 pH 由 6.0 升高至 7.4 时, WT-ADI 的比活力从 20.20 U/mg 降至 0.86 U/mg, 剩余酶活力仅为 4.25%; 突变株 M1 和 M2 在 pH 7.4 时比活力分别为 3.78 U/mg 和 8.19 U/mg, 与 pH 6.0 时相比剩余酶活力分别为 41.17% 和 76.82%; 尽管 M3 在 pH 6.0 时有较高比活力 15.65 U/mg, 但在 pH 7.4 时, 剩余酶活力仅为 5.05%。鉴于突变位点 A128T 和 H404R 对酶活力的显著影响, 因此选择了 A128T 和 H404R 作

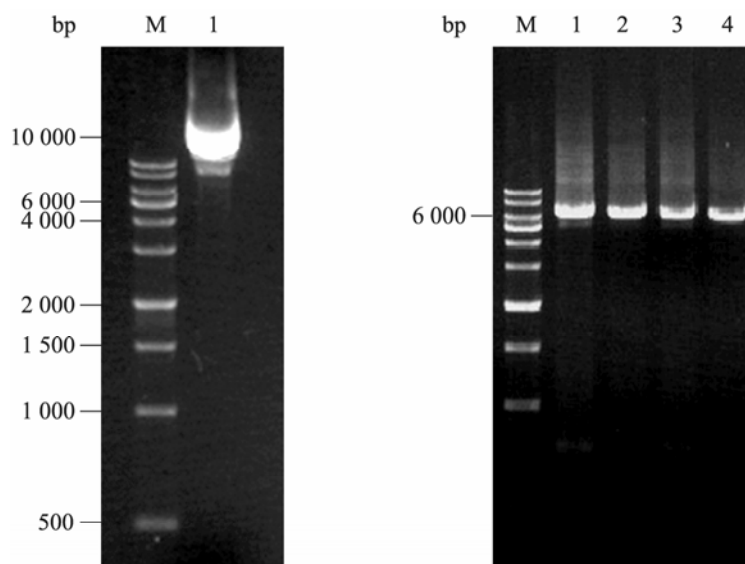


图 1 WT-ADI 质粒模板和 QuikChange 定点突变 PCR 扩增产物

Fig. 1 Plasmid template and QuikChange PCR product. M: 1 kb DNA marker; 1: plasmid of WT-ADI; 2: PCR products of the A128T site-directed mutagenesis; 3: PCR products of the H404R site-directed mutagenesis; 4: PCR products of the I410L site-directed mutagenesis; 5: PCR products of the A128T/H404R site-directed mutagenesis.

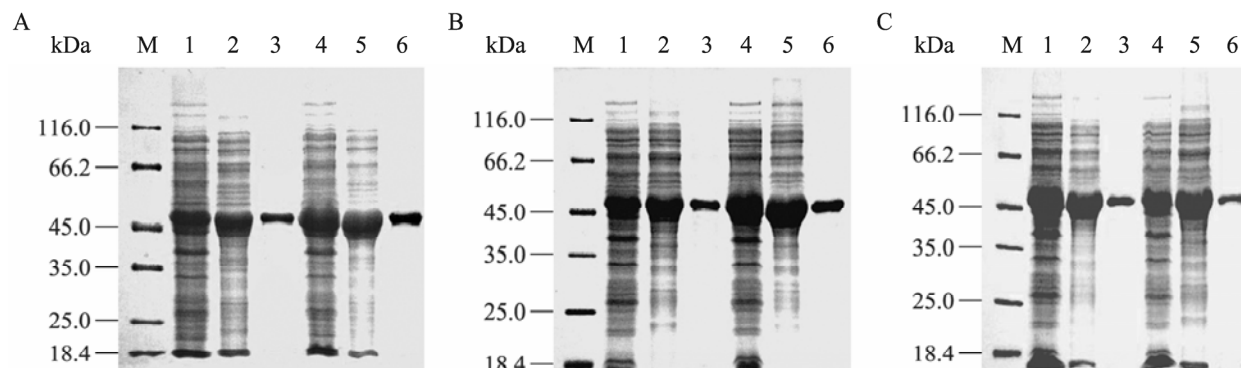


图 2 WT-ADI 和 ADI 突变株 M314、M1、M2、M3、M4 蛋白质纯化 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purified WT-ADI, and ADI mutants M314, M1, M2, M3, M4. (A) 1–3: crude enzyme of WT-ADI, HiPrep 16/10 DEAE column of WT-ADI, SuperdexG-200 gelfiltration of WT-ADI; 4–6: crude enzyme of M314, HiPrep 16/10 DEAE column of M314, SuperdexG-200 gelfiltration of M314. (B) 1–3: crude enzyme of M1, HiPrep 16/10 DEAE column of M1, SuperdexG-200 gelfiltration of M1; 4–6: crude enzyme of M2, HiPrep 16/10 DEAE column of M2, SuperdexG-200 gelfiltration of M2. (C) 1–3: crude enzyme of M3, HiPrep 16/10 DEAE column of M3, SuperdexG-200 gelfiltration of M3; 4–6: crude enzyme of M4, HiPrep 16/10 DEAE column of M4, SuperdexG-200 gelfiltration of M4. M: protein marker.

表 2 WT-ADI 及其突变酶的酶活力比较

Table 2 Specific activity of ADI mutants and WT-ADI

Source	pH 6.0	pH 7.4	pH 7.4/pH 6.0
	Specific activity (U/mg)	Specific activity (U/mg)	Percentage (%)
WT-ADI	20.20±1.01	0.86±0.05	4.25
M314 (A128T/H404R/I410L)	12.27±0.57	10.80±0.61	88.02
M1 (A128T)	9.18±0.45	3.78±0.15	41.17
M2 (H404R)	10.66±0.52	8.19±0.38	76.82
M3 (I410L)	15.65±0.79	0.79±0.03	5.05
M4 (A128T/H404R)	13.62±0.66	9.81±0.41	72.03

为组合进行双位点突变研究；同时，结果显示，M4 突变株在 pH 6.0 时比活力为 13.62 U/mg，在 pH 7.4 时剩余酶活力仍保留 72.03%。因此推测，A128T 与 H404R 对 ADI 在生理中性条件 (pH 7.4) 下的酶活力均有显著的促进作用，而 I410L 对 WT-ADI 在 pH 7.4 条件下对酶活力提高无明显作用。

表 3 显示，在 pH 7.4 条件下，ADI 突变株 M1, M2 和 M4 的 K_m 值较野生酶均有显著降低，在 pH 7.4 时 WT-ADI 的 K_m 值由 4.41 mmol/L 分别降至 1.07 mmol/L, 1.02 mmol/L 和 0.83 mmol/L。同时，突变株 M1, M2 和 M4 的 k_{cat}/K_m 较野生酶均有大幅度的提高，其中 M4 在 pH 7.4 时的 k_{cat}/K_m 由 2 937 L/(mol·s) 升至 25 060 L/(mol·s)。

从表中可以得出, 突变株 M1, M2 和 M4 在酶与底物的亲和力以及对底物的催化效率方面均有较大提高。

2.3.2 最适反应温度与热稳定性

本实验分别考察了 WT-ADI 及其突变酶在 pH 6.0 和 pH 7.4 条件下的最适反应温度和热稳定性, 结果见图 3A 和 3B。图 3A 表明, 在 pH 6.0 条件下 WT-ADI 及其突变株 M314、M1、M2、M3 和 M4 酶的最适反应温度均为 40 °C; 在 pH 7.4 条件下 WT-ADI 及其突变酶的最适反应温度均为 35 °C (图 3B)。值得注意的是, 作为治疗精氨酸缺陷型癌症的药物, ADI 突变株 M1、M2

和 M4 在人体生理温度范围 (35 °C~42 °C) 及生理中性条件下 (pH 7.4) 的酶活力较 WT-ADI 均有不同程度提高 (图 3B)。

图 4A 表明, 在 pH 6.0 时 WT-ADI 及其突变酶在低于 40 °C 的条件下保温 1 h 后, ADI 各突变酶相对剩余酶活力变化不明显, 在 40 °C~60 °C 条件下, WT-ADI 及其突变酶相对剩余酶活力下降显著。图 4B 表明, 在 pH 7.4 时, 在 20 °C~40 °C 条件下, WT-ADI 及其 ADI 突变株的相对剩余活力下降幅度较小。在 55 °C~60 °C 条件下保温 1 h 后, 野生型 ADI 和突变株 M314、M1、M2、M3 和 M4 的相对剩余酶活力迅速下降至最低点。因

表 3 pH 7.4 条件下 WT-ADI 及其突变株的动力学参数

Table 3 Kinetics parameters of ADI mutants and WT-ADI at pH 7.4

Source	V_{\max} ($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{L})$)	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$)
WT-ADI	0.092±0.01	4.41±0.23	12.95±0.26	2 937±164
M314	0.122±0.02	0.67±0.02	17.66±0.24	26 358±865
M1	0.125±0.03	1.07±0.05	17.45±0.23	16 308±792
M2	0.126±0.04	1.02±0.05	20.30±0.28	19 902±1 013
M3	0.079±0.02	3.87±0.22	13.05±0.19	3 372±198
M4	0.129±0.05	0.83±0.03	20.80±0.27	25 060±962

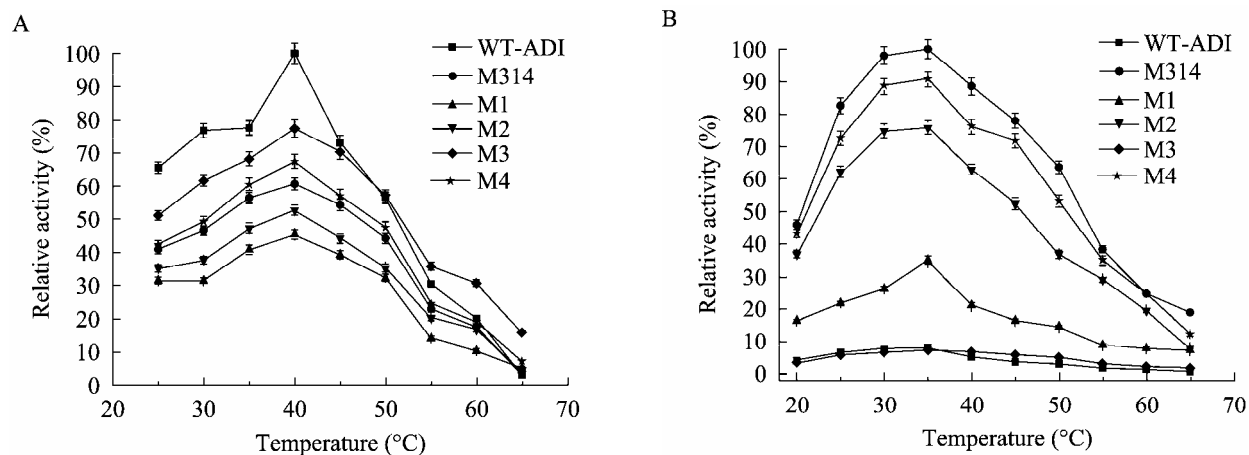


图 3 pH 6.0 (A) 和 pH 7.4 (B) 条件下温度对 WT-ADI 和 ADI 突变株酶活力的影响

Fig. 3 Effect of temperature on activity of ADI mutants and WT-ADI at pH 6.0 (A) and pH 7.4 (B).

此, 各突变位点对 ADI 的热稳定性无明显影响, WT-ADI 及其 ADI 突变株均在 20 °C~40 °C 条件下表现出较好的热稳定性。

2.3.3 最适反应 pH 与 pH 稳定性

本实验考察了 WT-ADI 及其突变酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性, 结果如图 5A 和 5B。图 5A 显示, WT-ADI 和 M3 的最适 pH 为 6.0, M314、M1、M2 和 M4 的最适 pH 均为 6.5, 并且 M314、M1、M2 和 M4 突变酶的活力较野生

酶 WT-ADI 和突变酶 M3 有不同程度的提高。结果表明, A128T 和 H404R 对 ADI 的最适 pH 的提高可能有一定的促进作用。

图 5B 表明, WT-ADI 及其突变株在 pH 低于 6.0 时稳定性明显下降, 相对剩余酶活力均在 pH 5.0~5.5 时降至最低点。与 WT-ADI 和其他突变株相比, M314 在 pH 5.5~8.5 范围内表现出较好的 pH 稳定性, 在 pH 5.5 时的相对剩余酶活力为 90%。

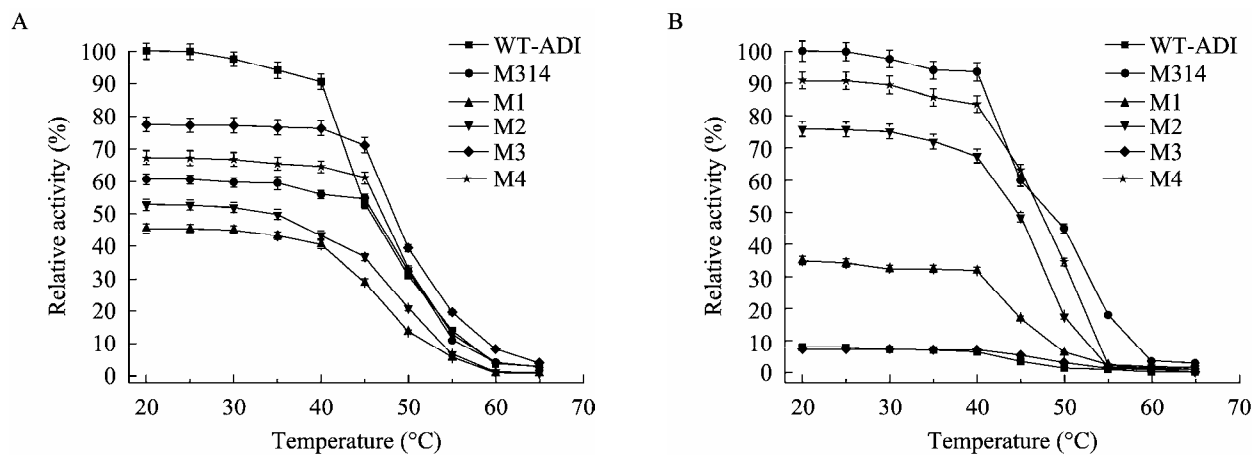


图 4 pH 6.0 (A) 和 pH 7.4 (B) 条件下 WT-ADI 和 ADI 突变株的热稳定性
Fig. 4 Thermostability of ADI mutants and WT-ADI at pH 6.0 (A) and pH 7.4 (B).

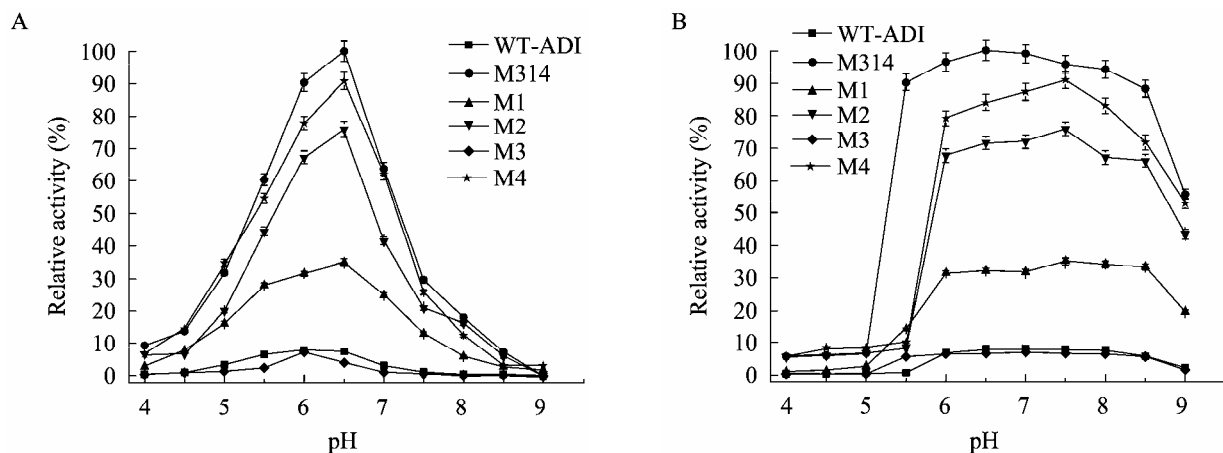


图 5 (A) pH 对 WT-ADI 和 ADI 突变株酶活力的影响; (B) WT-ADI 和 ADI 突变株在不同 pH 条件下的稳定性
Fig. 5 (A) The optimum pH of ADI mutants and WT-ADI; (B) Stability of ADI mutants and WT-ADI at different pHs.

3 讨论

以上结果表明：在酶活力方面，A128T 和 H404R 对 ADI 在生理中性 (pH 7.4) 条件下的酶活力有显著促进作用，WT-ADI 的比活力由 0.86 U/mg 提高至 3.78 U/mg (M1, A128T), 8.19 U/mg (M2, H404R) 和 9.81 U/mg (M4, A128T/H404R)。在动力学方面，A128T 和 H404R 对 ADI 在 pH 7.4 条件下与底物的亲和力以及催化效率均有较大提高，M4 的 K_m 值由 4.41 mmol/L (野生酶) 降至 0.83 mmol/L, k_{cat}/K_m 由 2 937 L/(mol·s) 升至 25 060 L/(mol·s)。在最适 pH 方面，A128T 和 H404R 对 ADI 的最适 pH 的提高具有促进作用。

由于两者蛋白序列同源性约为 84%，以来源于铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的 ADI 蛋白质结构 (PDB: 1RXXX) 为模型，采用 Swiss-Model 对来源于变形假单胞菌 *P. plecoglossicida* 的 ADI 突变株 M314 进行同源结构建模，并对 M314 各突变位点 A128T, H404R 和 I410L 的立体结构进行分析 (图 6)。

突变株 M1 (A128T) 的酶活力和酶学性质显示，M1 在最适反应 pH 及其稳定性方面，与 M314 表现一致。在三维模拟结构中 (图 6B)，Ala128 位于 α -螺旋区中的 loop 上，将其替换成 Thr 后，一方面，由于 Thr 较 Ala 更具亲水性， α -螺旋结构内局部基团间作用力加强，也可能通过盐桥稳定 α -螺旋， β -折叠以及 $\alpha\beta$ 结构链接的区域，使酶

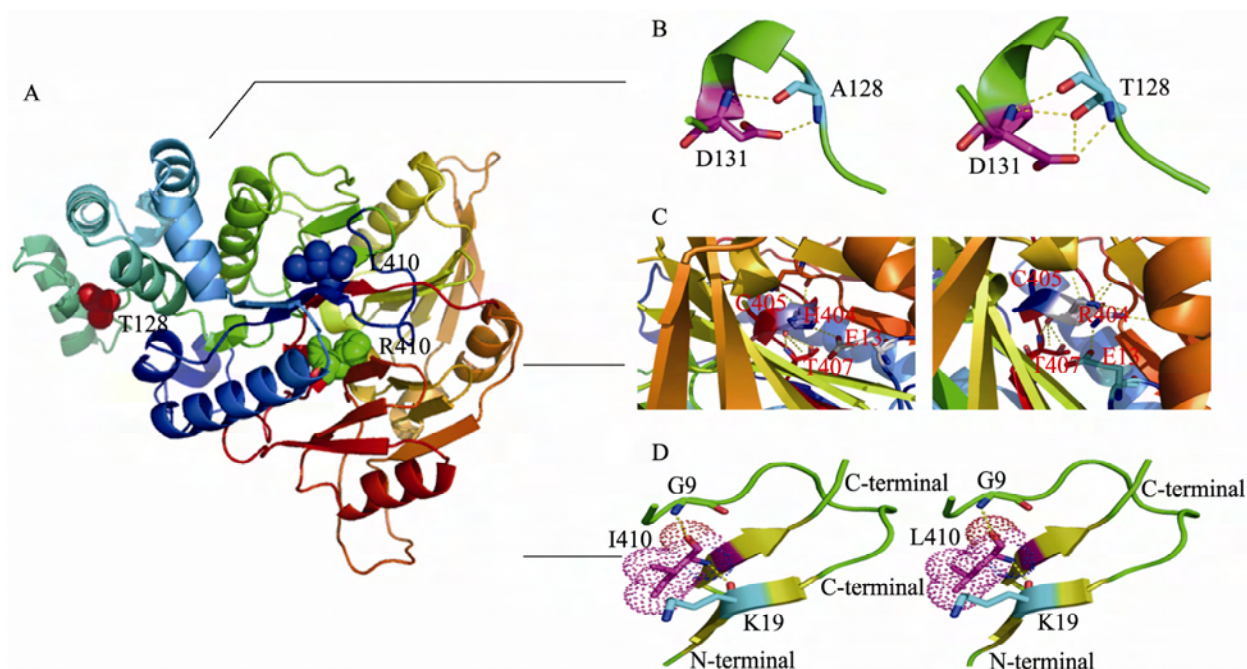


图 6 M314-ADI 的立体结构模型 (A) 及其突变位点 A128T (B)、H404R (C) 和 I410L (D) 的局部立体图

Fig. 6 Simulated three-dimensional structure of M314 and the stereoscopic view of mutations A128T, H404R, and I410L.

对底物结合能力增强。另一方面, Thr 的 R 基团含有一个羟基, 加强了与相邻氨基酸残基 Asp131 之间的氢键, 使酶的空间结构更加稳定。

对于 M2 (H404R) 位点的酶活力和酶学性质的研究显示, 其对 ADI 的最适 pH 的提高有一定的促进作用, 使该 ADI 的最适 pH 由 6.0 迁移到 6.5。Galkin 等研究显示, 在铜绿假单胞菌中紧邻催化中心的 H405 (相当于本研究的 H404 位点) 有时会被 Arg 所取代, 其推测 H405R 是支原体来源的 ADI 最适 pH (6.5) 高于铜绿假单胞菌来源的 ADI 最适 pH (5.6) 可能的原因之一^[20], 本研究结果也验证了这一推测。本研究中变形假单胞菌来源的 ADI 催化中心与铜绿假单胞菌来源的 ADI 的催化中心一致, 从 ADI 三维模拟结构 (图 6C) 上看, H404 同样紧邻催化中心 (His278-Cys406-Glu224)。由于 His 和 Arg 均属于碱性氨基酸, pI 值分别为 7.59 和 10.76, R 基 pKa 分别为 6.0 和 12.48, 精氨酸的胍基较组氨酸的咪唑基更易质子化, 因此在与底物结合催化的过程中更易形成氢键。此外, 精氨酸的胍基基团与其附近的极性基团有很强的相互作用, H404R 有可能起到对催化中间体起到稳定作用, 并参与氢键网的形成, 对 2 个催化的残基维持离子状态起重要作用。因此, H404R 有利于提高 ADI 酶的最适 pH 值, 及其在中性偏碱条件下的活性和稳定性。

突变株 M3 (I410L) 的酶活力和酶学性质显示, M3 突变酶与 WT-ADI 在 pH 和温度实验中, 均与野生酶表现相似。如图 6D 所示, Ile 和 leu 两者结构相似且均为疏水性氨基酸, 且分子大小、等电点也十分相似, 在这种情况下的氨基

酸替代一般对 ADI 的最适 pH 的迁移没有显著影响。

定点突变是研究蛋白质及其功能的一种重要的手段^[21], 本研究通过快速定点突变, 获得了 ADI 突变株 M1 (A128T)、M2 (H404R)、M3 (I410L)、M4 (A128T/H404R), 研究了不同突变位点对酶活力和酶学性质的影响, 为阐明 ADI 的酶活力机制及蛋白质的理性改造提供了实验依据。

REFERENCES

- [1] Whang-Peng J, Cheng AL, Hsu C, et al. Clinical development and future direction for the treatment of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Med*, 2010, 2(3): 93-103.
- [2] Verhoef C, Visser O, de Man RA, et al. Hepatocellular carcinoma in the Netherlands incidence, treatment and survival patterns. *Eur J Cancer*, 2004, 40(10): 1530-1538.
- [3] Curley SA Jr, Cusack JC Jr, Tanabe KK, et al. Advances in the treatment of liver tumors. *Curr Probl Surg*, 2002, 39(5): 449-572.
- [4] Joshi M. The importance of L-arginine metabolism in melanoma: an hypothesis for the role of nitric oxide and polyamines in tumor angiogenesis. *Free Radic Biol Med*, 1997, 22(3): 573-578.
- [5] Takaku H, Takase M, Abe SI, et al. *In vivo* anti-tumor activity of arginine deiminase purified from *Mycoplasma arginini*. *Int J Canc*, 1992, 51(2): 244-249.
- [6] Zhu LL, Verma R, Roccatano D, et al. A potential antitumor drug (Arginine Deiminase) reengineered for efficient operation under physiological conditions. *ChemBioChem*, 2010, 11(16): 2294-2301.
- [7] Feun L, Savaraj N. Pegylated arginine deiminase: a novel anticancer enzyme agent. *Expert Opin Investig Drugs*, 2006, 15(7): 815-822.

- [8] Park IS, Kang SW, Shin YJ, et al. Arginine deiminase: a potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *Br J Cancer*, 2003, 89(5): 907–914.
- [9] Izzo F, Marra P, Beneduce G, et al. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. *J Clin Oncol*, 2004, 22(10): 1815–1822.
- [10] Ascierto PA, Scala S, Castello G, et al. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: results from phase I and II studies. *J Clin Oncol*, 2005, 23(30): 7660–7668.
- [11] Ensor CM, Holtsberg FW, Bomalaski JS, et al. Pegylated arginine deiminase (ADI-SS PEG_{20,000}) inhibits human melanomas and hepatocellular carcinomas *in vitro* and *in vivo*. *Cancer res*, 2002, 62(19): 5443–5450.
- [12] Dillon BJ, Prieto VG, Curley SA, et al. Incidence and distribution of argininosuccinate synthetase deficiency in human cancers. *Cancer*, 2004, 100(4): 826–833.
- [13] Ni Y, Li ZW, Sun ZH, et al. Expression of arginine deiminase from *Pseudomonas plecoglossicida* CGMCC2039 in *Escherichia coli* and its anti-tumor activity. *Curr Microbiol*, 2009, 58(6): 593–598.
- [14] Ni Y, Liu YM, Schwaneberg U, et al. Rapid evolution of arginine deiminase for improved anti-tumor activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(1): 193–201.
- [15] Ling MM, Robinson BH. Approaches to DNA mutagenesis: an overview. *Anal Biochem*, 1997, 254(2): 157–178.
- [16] Kammann M, Laufs J, Schell J, et al. Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). *Nucl Acids Res*, 1989, 17(13): 5404.
- [17] Hogrefe HH, Cline J, Youngblood GL, et al. Creating randomized amino acid libraries with the QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit: Drug discovery and genomic technologies. *Biotechniques*, 2002, 33(5): 1158–1160, 1162, 1164–1165.
- [18] Liu YM, Sun ZH, Ni Y, et al. Isolation and identification of an arginine deiminase producing strain *Pseudomonas plecoglossicida* CGMCC2039. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24(10): 2213–2219.
- [19] Qian JN, Sun ZH, Liu YP, et al. Determination of L-citrulline in enzymatic conversion solution by diacetylmonoxime-thiosemicarbazide colorimetry. *Chin J Pharm*, 2007, 38(7): 519–522.
钱嘉南, 孙志浩, 刘宇鹏, 等. 二乙酰-一脒-氨基硫脲比色法测定酶转化液中的L-瓜氨酸. *中国医药工业杂志*, 2007, 38(7): 519–522.
- [20] Galkin A, Lu XF, Dunaway-Mariano D, et al. Crystal structures representing the Michaelis complex and the thiuronium reaction intermediate of *Pseudomonas aeruginosa* arginine deiminase. *J Biol Chem*, 2005, 280(40): 34080–34087.
- [21] Leemhuis H, Kelly RM, Dijkhuizen L. Directed evolution of enzymes: library screening strategies. *IUBMB Life*, 2009, 61(3): 222–228.