

定点突变提高过氧化氢酶热稳定性和催化效率

MUGISHA Samson^{1,2}, 杨套伟^{1,2}, 徐美娟^{1,2}, 张显^{1,2}, ULIHO Alphonse^{1,2},
钱海峰³, 王立³, 饶志明^{*1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 过氧化氢酶催化过氧化氢分解形成水和氧, 主要作用是保护细胞免受活性氧(ROS)的损伤, 尽管其在工业上被广泛使用, 但因热稳定的不足限制了它的使用前景。本研究以 *Bacillus pumilus* ML413 来源的血红素过氧化氢酶(KatX2)为研究对象, 采用定点突变技术提高其热稳定性及催化效率。利用 PoPMuSiC algorithm 软件计算并预测了其潜在突变位点的折叠自由能, 根据预测的结果, 选择了其中自由能最低的 3 个位点(K117V, K117I 和 K117M)进行突变。结果发现, 对 K117 位点进行突变, 可以有效提高 KatX2 的热稳定性, 突变体 K117V 在 60 °C 下半衰期比野生型 KatX2 提高 38 min, 催化效率较突变前提高 31.7%。根据结构分析发现, 该点突变并未改变 KatX2 的二级结构。突变体 K117V 具有良好的工业应用潜力。

关键词: 过氧化氢酶; 定点突变; 热稳定性; 催化效率

中图分类号: Q 789 文章编号: 1673-1689(2020)03-0104-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.03.014

Enhanced Thermo-Stability and Catalytic Efficiency of Catalase by Site-Directed Mutagenesis

MUGISHA Samson^{1,2}, YANG Taowei^{1,2}, XU Meijua^{1,2}, ZHANG Xian^{1,2}, ULIHO Alphonse^{1,2},
QIAN Haifen³, WANG Li³, RAO Zhiming^{*1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Catalase catalyzes the breakdown of hydrogen peroxide to form water and oxygen. The main role of this enzyme is to protect cell damage against reactive oxygen species (ROS). Although it is widely used industrially, it is sensitive to high temperature, which limits its use. In this work, a thermo-stable heme-catalase (KatX2) was constructed with high catalytic efficiency from *Bacillus pumilus* ML413 through site-directed mutagenesis and using PoPMuSiC algorithm to predict and calculate folding free energy of highly potential residues for mutation. Lys117 was selected and

收稿日期: 2018-03-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21778024); 江苏省杰出青年科学基金项目 (BK20150002); 江苏省自然科学基金项目 (BK20161292); 中国博士后科学基金项目 (2017M620189); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (JUSRP51708A); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 江苏省现代发酵工业协同创新中心项目。

* 通信作者: 饶志明 (1975—), 男, 博士, 教授, 主要从事发酵工程方面研究。E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

genetically engineered to enhance KatX2 thermostability. From the set of mutants, the K117V recombinant mutant showed significant improvement in thermo-stability with the increase of half-life at 60 °C by 38 minutes compared to the wild-type. Furthermore, the catalytic efficiency of K117V mutant was increased by 31.7% compared to that of the wild-type. Interestingly, no change of secondary structure was observed after structural analysis. Therefore, this highly stable KatX2 could be used as a potential industrial biocatalyst.

Keywords: catalase, site-directed mutagenesis, thermo-stability, catalytic efficiency

过氧化氢酶(过氧化氢氧化还原酶, EC1.11.1.6)广泛存在于好氧生物中,在动植物、细菌、真菌、古生菌中。它通过歧化作用直接分解由活性氧 ROS 产生的过氧化氢形成水和氧气。其中,ROS 是由细胞正常生长过程中线粒体电子传递所形成的。然而,过多的 ROS 和自由基会导致细胞氧化性损伤甚至死亡^[1-3]。因此,在氧化还原不平衡时,过氧化氢酶通过催化过氧化氢分解起到了解毒作用^[4]。此外,过氧化氢酶广泛应用于食品加工、纺织和临床检测中^[5-7]。

根据其功能特点,过氧化氢酶被分为 3 类:含血红素过氧化氢酶、过氧化氢-过氧化物双功能酶以及含锰离子的过氧化氢酶^[8-9]。其中单功能的过氧化氢酶由于其商业价值而受到更多的关注。目前,许多研究者致力于筛选不同微生物来源的过氧化氢酶,并进行同源或异源表达,以适用于不同的用途^[10-13]。蛋白质工程策略已被广泛应用于提高靶蛋白的性能,其中基于结构模拟和计算等理性设计的定点突变来改造蛋白的方法已被广泛使用^[14-18]。研究报道了不同种类的酶通过定点突变成功的提高了其催化能力及热稳定性^[18-19],但是对过氧化氢酶进行热稳定性改造的报道却较少^[20-21]。

短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)由于具有多种抗氧化酶,从而比其他微生物具有更好的抗氧化能力^[22-23]。本研究中,选择 *B. pumilus* ML413 来源的过氧化氢酶作为研究对象。另外,菌株枯草芽孢杆菌 168 由于具有良好的分泌表达能力而被广泛作为工业表达宿主^[24-25],同时也被用来作为过氧化氢酶的异源表达的宿主菌。本研究采用枯草芽孢杆菌 168 作为过氧化氢酶表达宿主菌,利用 PoPMuSiC algorithm 软件计算并预测了 *B. pumilus* ML413 血红素过氧化氢酶(KatX2)的活性中心潜在突变位点

的折叠自由能,对该位点附近的氨基酸进行一系列定点突变来提高该区域的疏水性,从而提高过氧化氢酶的热稳定性。

1 材料与方法

1.1 菌株,质粒和材料

B. pumilus ML413 为本研究室保藏。*E. coli* JM109 和 *B. subtilis* 168 分别作为克隆和表达菌株。质粒 pMA5 和 pMD18-T 分别作为表达和克隆载体。PrimeSTAR[®] e 扩增酶、ExTaq DNA 扩增酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Mlu*I,购自宝生物(大连)有限公司;DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 回收试剂盒,购自生工生物工程(上海)有限公司;HisTrap[™]HP 纯化柱,购自美国通用医疗集团;其他试剂均为商业化商品。

1.2 定点突变及重组菌株的构建

以 *B. pumilus* ML 413 的 DNA 为模板,用引物 KatX2 F 和 KatX2 R(表 1)进行 PCR 扩增得到过氧化氢酶基因。扩增产物经纯化后与克隆载体 pMD18-T 连接获得重组质粒 pMD18T-KatX2。用 *Bam*HI 和 *Mlu*I 对 pMD18T-KatX2 和 pMA5 分别进行双酶切,纯化后,将得到的 KatX2 和线性化的 pMA5 进行连接获得重组质粒 pMA5-KatX2,随后将该重组质粒利用 Spizizen 描述的方法转化到枯草芽孢杆菌 168 中^[26]。以重组质粒 pMA5-KatX2 为模板,用表 1 所示的引物进行重叠延伸 PCR 的方法进行定点突变^[27]。含突变基因的质粒转入到大肠杆菌 JM109 中并验证,并送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序正确的重组质粒转入到枯草芽孢杆菌 168 中进行表达,以菌株 *B. subtilis* 168/pMA5-KatX2 作为对照。

后的模型结构并分析二级结构的改变。用 PoPMuSiC-2.1 algorithm 工具来找寻可能提高热稳定性的突变位点,并计算其吉布斯自由能^[30]。

2 结果与讨论

2.1 突变位点的选择

在本实验中,以短小芽孢杆菌 MTCCB6033 过氧化氢酶蛋白质 (PDB id: 4qol. PubMed id: 25663126) 结构为模板,构建了野生型和突变株的 3D 结构。Swiss model 选择的模板与同源建模得到的结构有 99.39% 的相似性。

KatX2 由 4 个相同的亚基组成,每个亚基有 3 个对催化起关键作用的氨基酸残基(His57、位于血红素腔的 Asn130 以及在保守区域的 Asn130)^[31]。利用 PoPMuSiC-2.1 algorithm 工具预测了各个残基突变后自由能的改变,根据预测的结果,我们选择了其中自由能最低的 3 个突变株(K117V、K117I 和 K117M 的折叠自由能分别为-2.23, -2.58 kcal/mol 和-1.84 kcal/mol)进行突变。同时考虑到位于活性中心附近 α -螺旋的氨基酸残基对酶的热温度性起到关键作用,并且苯丙氨酸对蛋白的稳定性有关键作用^[32],因此我们将 M177 突变成苯丙氨酸。构建 4 个过氧化氢酶突变体,并在枯草芽孢杆菌 168 中进行表达。

2.2 过氧化氢酶的过表达和纯化

通过 SDS-PAGE 分析表明, *B. subtilis* 168/pMA5-KatX2 以及分别含有 KatX2 突变体 K117V、K117I、K117M 和 M177P 的重组菌均构建成功。纯化后,SDS-PAGE 分析表明纯化效果较好无杂质蛋白条带,过氧化氢酶相对分子质量大小为 5.8×10^4 (图 1)。野生酶和突变株 K117V、K117I、K117M、M177P 的比酶活分别为 27 559、36 297、33 582、29 896 U/mg 和 31 024 U/mg。

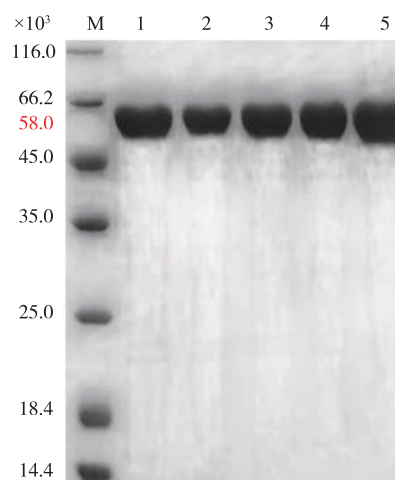
2.3 过氧化氢酶突变体酶学特性分析

过氧化氢酶突变前后的酶学特性如表 2 所示。

表 2 突变前后酶反应动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of the purified wild-type catalase (KatX2) and its mutants

酶	比酶活/(U/mg)	K_m /(mmol/L)	K_{cat} /($\times 10^4$ s ⁻¹)	K_{cat}/K_m /($\times 10^3$ (mmol/L) ⁻¹ s ⁻¹)
Wild-type (KatX2)	27 559	59.9 \pm 1.2	31.028	5.179
K117V	36 297	48.7 \pm 0.9	31.942	6.559
K117I	33 582	54.3 \pm 1.5	31.718	5.841
K117M	29 896	56.2 \pm 2.7	31.171	5.546
M177P	31 024	55.4 \pm 1.3	31.296	5.649



M. 蛋白质标准;1. 野生型过氧化氢酶 KatX2; 2. K117V;3. K117I;4. K117M;5. M177P。

图 1 野生型过氧化氢酶 KatX2 及其突变株 K117V、K117I、K117M 和 M177P 纯化后的 SDS-PAGE 分析
Fig.1 SDS-PAGE analysis of the purified wild-type KatX2 and its mutants K117V, K117I, K117M and M177P

将 K117 分别突变为疏水性的残基 (Val、Ile 和 Met) 比酶活分别提高了 31.7%、21.8% 和 8.48%, 60 °C 的半衰期分别提高了 38、23 min 和 9 min。K117V 和 K117I 的 k_{cat} 分别为 $319\ 427\ s^{-1}$ 和 $317\ 185\ s^{-1}$, 比野生型展现出更高的催化效率。根据结构分析可知, 117 位的赖氨酸突变为疏水的缬氨酸后, 会与 92 位的苯丙氨酸形成 2 个氢键的连接, 并且与疏水性的 93 位缬氨酸和 119 位酪氨酸共同形成一个疏水性的孔道 (图 2(b))。疏水性的孔道与位于血红素附近主孔道的催化残基 Asp110 和 Asn130 相连接。之前的研究报道表明, 活性位点附近的疏水性对酶的稳定起关键作用^[33], 疏水区域由于能增强稳定性, 这可能是因为它增强了 α -螺旋和 β -折叠结构域之间的联系, 而这一点与作为底物结合位点的配体有关^[31]。因此 117 位亲水性的赖氨酸突变为疏水性的

缬氨酸并在活性中心形成疏水区域是提高酶热稳定性的原因。将 Lys117 突变为其他疏水氨基酸(异亮氨酸和蛋氨酸)加强了与周围 Phe114、Ala115、Val116、Phe118 和 Tyr119 的相互作用,使疏水区域更加稳定,从而提高了酶的催化效率和热稳定性。另外,将 Met177 突变成脯氨酸,脯氨酸起着维持蛋白质形状和折叠的重要作用,从而提高蛋白质构象稳定性和催化效率^[32]。如图 2(c)和 2(d)所示, Met177 和突变株 P177M 通过同样的氢键与 Trp180、Leu181 和 Ser174 形成极性连接,但是热稳定性和催化活性却有所差异,这可能是由于脯氨酸残基能提高构象的稳定性所导致的。

2.4 温度、pH 和金属离子对突变体的影响

突变后,最适催化温度未发生改变,均为 40 °C (表 3),这与 *B. pumilus* B4W 来源的过氧化氢酶相同^[22]。该结果与此前报道的常温微生物来源的过氧化氢酶在 15~55 °C 相一致^[34]。所有的突变株在 40 °C 下均保持良好的热稳定性,在 20 °C 下储藏 20 h,酶活能保留 90% 以上。在 60 °C,酶活下降速度显著加快,野生型在 60 °C 下的半衰期为 220 min (见图 3),

表 3 突变前后过氧化氢酶学特性

Table 3 Characterization and thermostability of the wild-type catalase (KatX2) and its mutants

酶	$t_{1/2,60} / \text{min}$	最适温度/°C	最适 pH
Wild-type (KatX2)	220±1.8	40±0.8	7.0±0.4
K117V	258±1.1	40±1.2	7.0±0.7
K117I	243±2.4	40±0.6	7.0±0.5
K117M	229±1.9	40±0.9	7.0±0.3
M177P	233±1.5	40±0.7	7.0±0.4

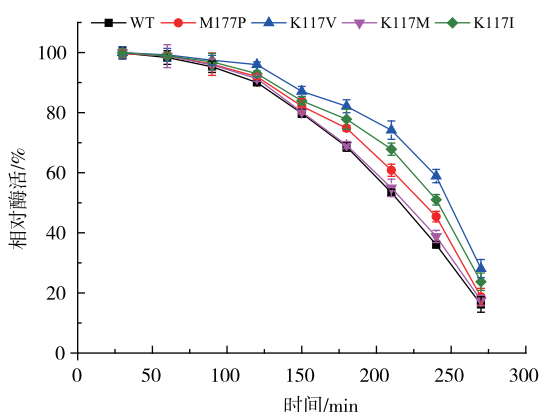
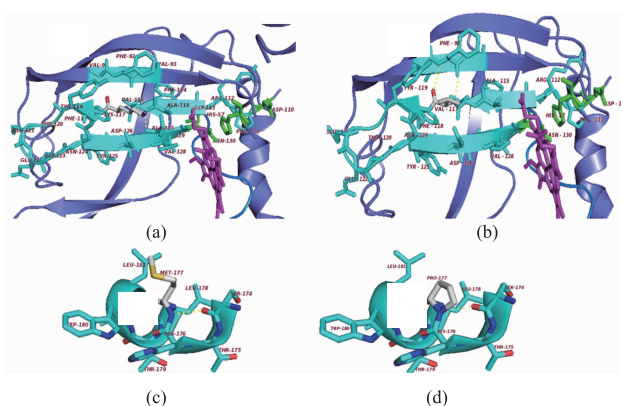


图 3 60 °C 下野生型过氧化氢酶及其突变株热稳定性

Fig.3 Thermo-stability of the wild-type KatX2 and its mutants at 60 °C.



4 个配基分别用绿、黄、红、蓝表示。每个配基都包含一个亚铁血红素,并用品红色表示。虚线框表示突变的位点。(a) K117 相关区域结构。K117 附近结构用青色表示,催化氨基酸残基用绿色表示,血红素用红色表示,极性相互作用黄色表示。(b) K117V 相关区域结构。K117V 附近结构用青色表示,催化氨基酸残基用绿色表示,血红素用红色表示,极性相互作用黄色表示。(c)和(d)分别表示 M177 和 M177P 与附近残基的极性连接作用。

图 2 过氧化氢酶及其突变的结构分析

Fig.2 Structural model analysis of the wild-type KatX2 and its mutants

突变体 K117V 在 60 °C 下的半衰期提高了 38 min。

此外,作者研究了野生型和突变株的 pH 稳定性。结果如图 4 所示,突变前后在 pH 7 的条件下均较稳定,能保留 95% 的酶活。突变株 K117V 在 pH 12 的条件下保留了 67% 的酶活,展现出比野生型更好的 pH 稳定性。其他突变株在 pH 4.0~13.0 的条件下,pH 稳定性与野生型相似。作者同样研究了金属离子对突变后酶活的影响。如图 5 所示,金属离子对过氧化氢酶突变前后的影响基本一致。 Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶活有促进作用。 Co^{2+} 对酶活有一定的抑制作用, Cu^{2+} 对过氧化氢酶有较强的抑制作用,但与较野生型相比较, Cu^{2+} 突变株 K117V 抑制性有所降低。

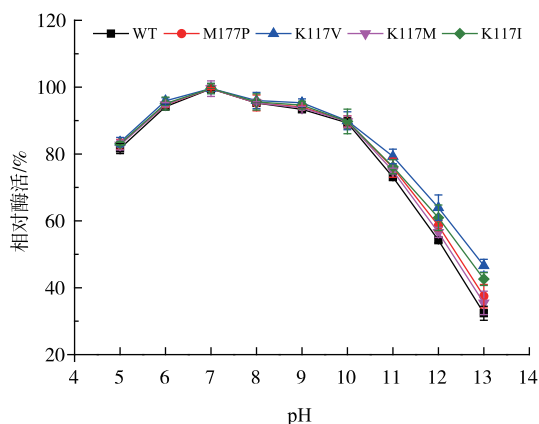


图4 pH对过氧化氢酶稳定性的影响

Fig.4 Effect of pH on enzyme stability of the wild-type KatX2 and its mutants

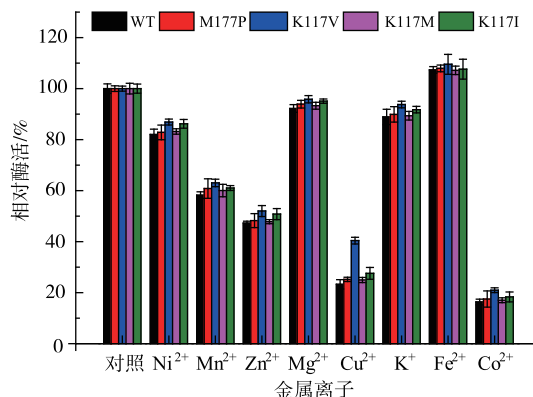


图5 金属离子对过氧化氢酶酶活的影响

Fig.5 Effect of metal ions on the activities of wild-type KatX2 and its mutants

3 结语

通过对 *B. pumilus* ML413 血红素过氧化氢酶 K117 进行定点改造,提高了过氧化氢酶的热稳定性和催化活力。突变株 K117V 在 60 °C 的半衰期提高了 38 min, 并且比酶活提高了 31.7%, 其他的突变

株在热稳定性和催化能力上也有所提高。我们从酶分子结构上对造成热稳定性和酶学特性提高的原因进行了分析,疏水性氨基酸以及脯氨酸的引入是造成该变化的原因。突变后的过氧化氢酶显示出更好的适用范围,具有工业化应用的潜力。

参考文献:

- [1] HALLIWELL B. Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life[J]. *Plant Physiol*, 2006, 141:312-322.
- [2] MOLS M, ABEE T. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13:1387-1394.
- [3] ZHOU Liping, LIU Long, LI Jianghua, et al. Production of catalase based on controlling of key factors[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, (11):1156-1162. (in Chinese)
- [4] TARHAN EAAL. Characterization of immobilized catalases and their application in pasteurization of milk with H₂O₂ [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1995, 50:291-303.
- [5] VUILLEMARD S C. Food bioconversions and metabolite production using immobilized cell technology[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1994, 14:193-224
- [6] ADELAIDA D P, IGNACIO F, XAVI C. Thirty years of heme catalases structural biology[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012, 525:102-110.
- [7] DUAN Xuguo, SHEN Wei, LI Yanli, et al. Construction of recombinant thermo—stable catalase engineering strain and optimization of its fermentation condition[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, (2):74-78. (in Chinese)
- [8] LI J, ZHANG Y, CHEN H, et al. Purification and characterization of recombinant *Bacillus subtilis* 168 catalase using a basic polypeptide from ribosomal protein L2[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 72:83-89.
- [9] CHELIKANIAP. Diversity of structures and properties among catalases[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, 61:192-208.
- [10] NAKAYAMA M, NAKAJIMA-KAMBE T, KATAYAMA H, et al. High catalase production by *Rhizobium radiobacter* strain 2-1 [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106:554-558.
- [11] ZENG H W, CAI Y J, LIAO X R, et al. Production, characterization, cloning and sequence analysis of a monofunctional catalase from *Serratia marcescens* SYBC08[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2011, 51:205-214.

- [12] ROCHAT T, GRATADOUX J J, GRUSS A, et al. Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H₂O₂ and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006, 72: 5143-5149.
- [13] WANG W, SUN M, LIU W, et al. Purification and characterization of a psychrophilic catalase from *Antarctic Bacillus* [J]. **Canadian Journal of Microbiology**, 2008, 54: 823-828.
- [14] SILVA I R, LARSEN D M, JERS C, et al. Enhancing RGI lyase thermostability by targeted single point mutations [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97: 9727-9735.
- [15] IRFAN M, GONZALEZ C F, RAZA S, et al. Improvement in thermostability of xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* C5 by site directed mutagenesis [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2018, 111: 38-47.
- [16] LUO Q, CHEN Y, XIA J, et al. Functional expression enhancement of *Bacillus pumilus* CotA-laccase mutant WLF through site-directed mutagenesis [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2018, 109: 11-19.
- [17] ZHANG X, SITASUWAN P, HORVATH G, et al. Increased activity of β -glucuronidase variants produced by site-directed mutagenesis [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2018, 109: 20-24.
- [18] LIU B, ZHANG J, FANG Z, et al. Enhanced thermostability of keratinase by computational design and empirical mutation [J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2013, 40: 697-704.
- [19] JAOUADI B, AGHAJARI N, HASER R, et al. Enhancement of the thermostability and the catalytic efficiency of *Bacillus pumilus* CBS protease by site-directed mutagenesis [J]. **Biochimie**, 2010, 92: 360-369.
- [20] CHRISTA JAKOPITSCH G R, PAUL G F, FLORIAN R, et al. Engineering the proximal heme cavity of catalase-peroxidase [J]. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2002, 91: 78-86.
- [21] CAO W, LIU S, LIU L, et al. Improved catalytic efficiency of catalase from *Bacillus subtilis* by rational mutation of Lys114 [J]. **Process Biochemistry**, 2014, 49: 1497-1502.
- [22] SHEFALI SANGAR MP, LOMARY S M, RAVINDER S J. A catalase-peroxidase for oxidation of b-lactams to their (R)-sulfoxides [J]. **Bioresource Technology**, 2012, 115: 102-110.
- [23] HANDTKE S, SCHROETER R, JURGEN B, et al. *Bacillus pumilus* reveals a remarkably high resistance to hydrogen peroxide provoked oxidative stress [J]. **PLoS One**. 2014, 9: 1-14.
- [24] SHI X F, ZHAO M, GUO Y, et al. Overexpression, purification and characterization of a recombinant secretory catalase from *Bacillus subtilis* [J]. **Biotechnology Letter**, 2008, 30: 181-186.
- [25] WENZEL M, MULLER A, SIEMANN-HERZBERG M, et al. Self-inducible *Bacillus subtilis* expression system for reliable and inexpensive protein production by high-cell-density fermentation [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2011, 77: 6419-6425.
- [26] SPIZIZEN C. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* [J]. **Journal of Bacteriology**, 1960, 81: 741-746.
- [27] XIAO Y H, YIN M H, HOU L, et al. Asymmetric overlap extension PCR method bypassing intermediate purification and the amplification of wild-type template in site-directed mutagenesis [J]. **Biotechnology Letter**. 2007, 29: 925-930.
- [28] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72: 248-254.
- [29] OLAND f, BEERS J, IRWIN W. Sizer a spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1951, 195: 133-140.
- [30] YVES DEHOUCK J M K, DIMITRI G, MARIANNE R. PoPMuSiC 2.1 a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality [J]. **BMC Bioinformatics**, 2011, 12: 151.
- [31] LOEWEN P C, VILLANUEVA J, SWITALA J, et al. Unprecedented access of phenolic substrates to the heme active site of a catalase: substrate binding and peroxidase-like reactivity of *Bacillus pumilus* catalase monitored by X-ray crystallography and EPR spectroscopy [J]. **Proteins**, 2015, 83: 853-866.

- [32] DHARMARAJ SAMUEL G G, YANG P, CHANG M, et al. Proline inhibits aggregation during protein refolding[J]. **Protein Science**, 2000, 9: 344-352.
- [33] SARABOJI K, GROMIHA M M, PONNUSWAMY M N. Relative importance of secondary structure and solvent accessibility to the stability of protein mutants. case study with amino acid properties and energetics on T4 and human lysozymes[J]. **Computational Biology and Chemistry**, 2005, 29(1): 25-35.
- [34] SOOCH B S, KAULDHAR B S, PURI M. Recent insights into microbial catalases: isolation, production and purification[J]. **Biotechnology Advance**, 2014, 32: 1429-1447.

科技信息

北京大学报道单氨基酸精度绘制蛋白质功能图谱新方法

2019年12月16日,北京大学生命科学学院魏文胜课题组在 *Genome Biology* 杂志在线发表题为“PASTMUS:mapping functional elements at single amino acid resolution in human cells”的研究论文。

精准绘制蛋白质功能图谱对于研究蛋白质的作用机制十分重要。传统方法通常需要构建蛋白质的截短突变,工作量巨大且效率低下。近年来一些高通量手段比如利用错义突变进行文库筛选、利用 CRISPR-Cas 系统产生覆瓦式 (tiling) 突变并结合 sgRNA 富集分析等被用于相关研究,但这些方法受限于覆盖程度及位点精度,而且均不适用于隐性遗传突变类型。

魏文胜课题组开发了名为 PASTMUS (PARsing fragmented DNA Sequences from CRISPR Tiling MUtagenesis Screening) 的新方法。通过 CRISPR-Cas 介导的覆瓦式突变首先对目标基因产生覆盖度高、种类丰富的突变体文库,结合功能性筛选和对目标基因碎片化后深度测序,再利用全新的生物信息学分析方法对数据进行多重过滤,最终实现了对蛋白质功能相关位点的精确定位。该论文分别对 3 种毒素受体蛋白和 3 种抗癌药物靶标蛋白进行了功能性扫描,实现了单氨基酸精度的蛋白功能图谱绘制。除此以外,PASTMUS 方法还可以广泛应用于非编码 RNA、启动子、增强子等调控性元件的研究,也可以演变为蛋白进化的高效手段。

[信息来源]北京大学生命科学学院. 魏文胜课题组报道单氨基酸精度绘制蛋白质功能图谱新方法 [EB/OL]. (2019-12-16). <http://news.foodmate.net/2020/01/547823.html>

欧盟评估一种 L-色氨酸作为添加剂的安全性和有效性

2020年2月24日,据欧盟食品安全局(EFSA)消息,应欧盟委员会要求,欧盟动物饲料添加剂和产品(FEEDAP)研究小组就一种 L-色氨酸(L-tryptophan)作为所有动物品种的饲料和饮用水的营养添加剂发表科学意见。据了解,这种 L-色氨酸是由转基因大肠杆菌菌株 CGMCC 7.267 发酵产生。经过评估,小组认为,这种添加剂对消费者和环境是安全的。由于缺乏数据,专家小组无法得出添加剂对皮肤和眼睛有刺激性或对皮肤有致敏性的结论。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟评估一种 L-色氨酸作为添加剂的安全性和有效性 [EB/OL]. (2020-2-25). <http://news.foodmate.net/2020/02/551149.html>