

易错 PCR 技术提高源于 *Sulfolobus acidocaldarius* 麦芽寡糖基海藻糖合成酶活性

姚锴琳^{1,2,3,4}, 宿玲恰^{1,2,3,4}, 吴敬^{*1,2,3,4}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 4. 江南大学 教育部食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用易错 PCR 技术结合高通量筛选技术对源于 *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 的 MTSase 进行定向进化, 获得一个酶活提高的突变体酶 D-6。基因分析表明, 突变体酶发生了 2 个位点突变: G432D/G586D, 其中突变位点 G586D 位于 Aβ8 与 AEα14 的 loop 环上。将野生型 MTSase 和突变体酶 D-6 进行蛋白质纯化后, 测定其酶学性质, 结果表明: 突变体酶 D-6 的比活力为野生型 MTSase 的 1.22 倍; 野生型的 K_m 值为 4.74 mmol/L, 而突变体 D-6 为 2.77 mmol/L, 表明其对底物亲和性较野生型有所提高。

关键词: 麦芽寡糖基海藻糖合成酶; 嗜酸热硫化叶菌; 易错 PCR

中图分类号: Q 814 文章编号: 1673-1689(2020)03-0016-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.03.003

Improving the Activity of MTSase from *Sulfolobus acidocaldarius* by Error-Prone PCR

YAO Kailin^{1,2,3,4}, SU Lingqia^{1,2,3,4}, WU Jing^{*1,2,3,4}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. Joint Laboratory for International Cooperation in Food Safety by the Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A mutant D-6 of MTSase from *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 was obtained through directed evolution using error-prone PCR and high-throughput screening. Gene analysis showed that there were two mutations G432D/G586D with the G586D on the loop of Aβ8 and AEα14. The enzymatic properties of wild-type MTSase and mutant D-6 was determined. The results showed that the specific activity of mutant D-6 was 1.22 times that of wild-type MTSase. The K_m value of the mutant D-6 was 2.77 mmol/L while that of wild-type was 4.74 mmol/L. Thus, the substrate affinity of mutant increased compared to the wild-type.

Keywords: maltotrioligosyl trehalose synthase, *Sulfolobus acidocaldarius*, error-prone PCR

收稿日期: 2018-03-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771916); 国家杰出青年科学基金项目(31425020); 江苏高校优秀科技创新团队项目; 111 计划项目(111-2-06), 江苏省研究科研与实践创新计划项目(KYCX17-1466)。

* 通信作者: 吴敬(1969—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品与发酵方面的研究。E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn.

麦芽寡糖基海藻糖合成酶 (MTSase, EC 5.4.99.15) 作用麦芽寡糖还原性末端的 α -1,4 糖苷键使其变为 α , α -1,1 糖苷键,生成麦芽寡糖基海藻糖。麦芽寡糖基海藻糖水解酶 (MTHase, EC 3.2.1.141) 能水解麦芽寡糖基海藻糖中麦芽寡糖与海藻糖相连的 α , α -1,1 糖苷键,生成海藻糖^[1]和减少 2 个葡萄糖基的麦芽寡糖,是淀粉为底物制备海藻糖的关键酶。目前,已经从多种微生物中克隆表达出海藻糖合成酶系^[2],包括中低温酶系和高温酶系,如杆杆菌属 (*Arthrobacter*)^[3]、根瘤菌属 (*Rhizobium*)^[4]、嗜热硫磺硫化叶菌 (*Sulfolobus solfataricus* MT4)^[5]、嗜酸热硫化叶菌 (*Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909)^[6-7]等。海藻糖高温酶系通常具有较高的海藻糖转化率,并且具有良好的热稳定性,能在较高温度下转化淀粉生成海藻糖,不容易在生产过程中污染杂菌。但是,高温酶系相对于中低温酶系,具有蛋白表达量低的缺点。因此,提高高温酶系的蛋白表达量,为工业化生成海藻糖^[8-9]奠定基础显得愈发重要。

近年来,非理性设计已经成了酶分子改造的重要手段之一,这主要是由于现阶段人们尚未完全掌握对酶的空间构象预测、结构分析等技术。因此,通过非理性设计特别是易错 PCR 技术^[10-11]结合高通量筛选技术进行酶特性改造的策略依然是人们关注的焦点。源于 *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 的 MTSase 具有良好的热稳定性、耐酸的特点,但是表达量低成为该酶无法实现工业化生成的制约因素^[12]。而目前,国内外尚未有通过非理性设计对高温来源的 *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 的 MTSase 进行分子改造的研究报道。本研究中拟通过易错 PCR 技术结合高通量筛选技术对 MTSase 进行定向进化,以期获得酶活提高的突变体酶,为其工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 菌株 *E. coli* JM 109 和 *E. coli* BL21 (DE3): 为作者所在实验室前期保藏;质粒 pBackzero: 购自大连宝生物公司;质粒 pET-24(+) 和来源 *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 的麦芽寡糖基海藻糖合成酶基因 *treY*: 为作者所在实验室前期保藏。

1.1.2 培养基 LB 液体培养基^[13], LB 固体培养基,

SOB 培养基^[12], TB 培养基。

1.1.3 酶和试剂 限制性内切酶 (*Nde*I、*Hind*III)、T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶 Primer STAR HS、rTaq DNA 聚合酶、DL 5000 和 DL 10000 DNA Marker 等: 购自大连宝生物公司;细菌蛋白抽提试剂盒: 购自康为世纪公司;质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒: 购自天根生化科技有限公司;蛋白凝胶电泳试剂盒、蛋白质 Marker 标准品: 购自碧云天生物科技有限公司;麦芽六糖、麦芽糊精 (DE 值 9~13): 购自 Sigma 公司;其他常规试剂: 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 MTSase 基因的易错 PCR 以实验室早期保藏的源于 *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 的麦芽寡糖基海藻糖合成酶基因 *treY* 作为易错 PCR 的模板,并设计引物 YC-PCR-F: 5'-TTTAACATATGATTAGCGCGACCTATCG-3', YC-PCR-R: 5'-TTTAAAAGCTTACATACGCACCAGGATAC-3'。PCR 体系 (50 μ L): ddH₂O (27.0 μ L), Mg²⁺ (25 mmol/L, 10.0 μ L), Mn²⁺ (10 mmol/L, 2.0 μ L), 10 $\times$ rTaq buffer (5 μ L), 质粒 DNA 模板 (0.5 μ L), 引物 YC-PCR-F (10 μ mol/L, 0.5 μ L), 引物 YC-PCR-R (10 μ mol/L, 0.5 μ L), dNTP Mix (2.5 mM, 4 μ L), rTaq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L, 0.5 μ L)。PCR 过程: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 5 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min 20 s, 31 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。

1.2.2 突变文库的构建 将 PCR 所得的基因片段用 1 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳分离,使用胶回收试剂盒回收。将回收后的基因片段与克隆载体 pBackzero 相连接,转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,涂布于 LB 固体培养基 (含 100 μ g/mL Amp), 37 $^{\circ}$ C 培养 8 h, 用无菌水将固体平板上的所有阳性克隆洗脱,转至 LB 液体培养基 (含 100 μ g/mL Amp), 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h, 用质粒抽提试剂盒提取混合质粒,用限制性内切酶 *Nde*I 和 *Hind*III 进行双酶切,与表达载体 pET-24a 相连接。将连接产物转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,涂布于 LB 固体培养基 (含 100 μ g/mL kanamycin), 37 $^{\circ}$ C 过夜培养,挑取阳性克隆,构建突变文库。

1.2.3 突变文库的筛选 采用前期研究所得筛选方法: 以 200 μ L 0.2 g/dL 的麦芽糊精溶液作为底物,于 60 $^{\circ}$ C 水浴锅中预热 10 min,加入 50 μ L 稀释后的粗酶液,精确反应 10 min,加入 DNS 试剂终止

反应。于沸水中煮沸 7 min, 冷却, 加入去离子水稀释, 混匀, 取 200 μL 于酶标板中, 在 540 nm 处检测吸光值。根据吸光值的大小, 筛选出酶活提高的突变体酶。将酶活提高的突变体送至无锡天霖生物科技有限公司进行基因测序。

1.2.4 MTSase 的表达及纯化 将能够表达野生型 MTSase 和突变型酶的 *E. coli* BL21 (DE3) 接种于 10 mL LB 液体培养基 (含 100 $\mu\text{g/mL}$ kanamycin), 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 按体积分数 5% 的接种量转接至 TB 培养基 (含 100 $\mu\text{g/mL}$ kanamycin), 25 $^{\circ}\text{C}$, 培养 24 h。取一定体积的发酵液, 12 000 r/min、离心 5 min、弃上清液, 用 pH 8.0 的缓冲液重悬浮, 后用超声破壁仪破壁, 离心后收集上清液, 即为发酵粗酶液。

将发酵粗酶液经过 75 $^{\circ}\text{C}$ 热处理 1 h, 50 g/dL 硫酸铵沉淀, 透析, 经过阴离子交换柱 MonoQ 进行蛋白质纯化^[12]。蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法。纯化后的 MTSase 及其突变体用于酶学性质及动力学参数的测定。

1.2.5 MTSase 的酶活测定

1) 用 20 mmol/L pH 6.0 的柠檬酸缓冲液, 将麦芽六糖配成 1 g/dL 的溶液, 取 190 μL 的麦芽六糖溶液置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中预热, 加入 10 μL 稀释后的酶液, 精确反应 10 min, 加入 200 μL 1 mol/L NaOH 溶液终止反应, 取 200 μL 反应液于具塞试管中, 加入 800 μL 水和 1 mL DNS, 沸水煮沸 7 min, 冷却, 加入 8 mL 去离子水, 混匀。于 540 nm 测定吸光值。MTSase 的酶活定义为: 每分钟消化 1 μmol 的麦芽六糖所有酶量^[14]。酶活的计算公式为:

$$\text{酶活} = \frac{1.0375 \times \Delta A \times 2 \times 10^4}{990.86} \times N \quad (1)$$

其中 $\Delta A = A_{540}(\text{空白对照}) - A_{540}(\text{样品})$; 990.86 为麦芽六糖的相对分子质量; 1.0375 为 DNS 测定麦芽六糖质量浓度标准曲线的斜率; N 为稀释倍数。

2) 以麦芽糊精作为筛选底物时, MTSase 的酶活定义为: 每分钟相当于转化 1 μmol 葡萄糖变为非还原性糖所需要的酶量。酶活的计算公式为:

$$\text{酶活} = \frac{0.2116 \times \Delta A \times 2 \times 10^5}{180} \times N \quad (2)$$

其中 $\Delta A = A_{540}(\text{空白对照}) - A_{540}(\text{样品})$; 180 为葡萄糖的相对分子质量; 0.2116 为 DNS 测定葡萄糖含量标准曲线的斜率; N 为稀释倍数。

1.2.6 酶学性质探究

1) 最适温度。用 20 mmol/L pH 6.0 的柠檬酸缓冲液, 将麦芽六糖配成 1 g/dL 的溶液, 将 190 μL 底物置于 45~90 $^{\circ}\text{C}$ (梯度为 5 $^{\circ}\text{C}$) 水浴锅中预热, 加入 10 μL 稀释后的酶液, 精确反应 10 min, 加入 200 μL 1 mol/L NaOH 溶液终止反应, 取 200 μL 反应液于具塞试管中, 加入 800 μL 水和 1 mL DNS, 沸水煮沸 7 min, 冷却, 加入 8 mL 去离子水, 混匀。于 540 nm 测定吸光值。定义最高酶活为 100%。

2) 温度稳定性。将酶液用 pH 6.0 的缓冲液稀释后, 置于 70 $^{\circ}\text{C}$ 中保温, 定期取样, 按照方法 1.2.5 所述的方法测定残余酶活, 设定 0 h 酶活为 100%。

3) 最适 pH。用 20 mmol/L pH 4.0~8.0 (梯度为 0.5) 的缓冲液溶解底物, 配成 1 g/dL 的麦芽六糖溶液, 将 190 μL 底物置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中预热, 加入 10 μL 稀释后的酶液, 精确反应 10 min, 加入 200 μL 1 mol/L NaOH 溶液终止反应, 取 200 μL 反应液于具塞试管中, 加入 800 μL 水和 1 mL DNS, 沸水煮沸 7 min, 冷却, 加入 8 mL 去离子水, 混匀。于 540 nm 测定吸光值。定义最高酶活为 100%。

4) pH 稳定性。将酶分别置于 20 mmol/L pH 4.0~10.5 (梯度为 0.5) 的缓冲液中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h, 按照 1.2.5 的方法测定酶活, 定义 0 h 酶活为 100%。

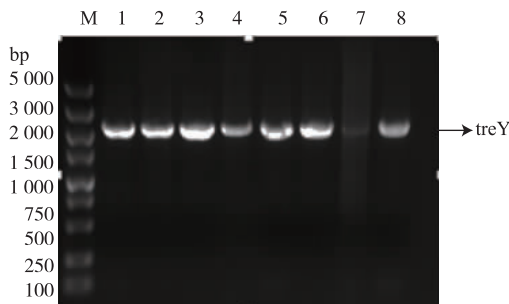
5) K_m 值的测定。用 20 mmol/L pH 6.0 缓冲液溶解底物, 配成 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5 g/dL 的麦芽六糖, 将 190 μL 底物置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中预热, 加入 10 μL 稀释后的酶液, 精确反应 10 min, 加入 200 μL 1 mol/L NaOH 溶液终止反应, 取 200 μL 反应液于具塞试管中, 加入 800 μL 水和 1 mL DNS, 沸水煮沸 7 min, 冷却, 加入 8 mL 去离子水, 混匀。于 540 nm 测定吸光值。使用 GraphPad Prism 5 软件进行拟合分析, 计算得出 K_m 值。

1.2.7 MTSase 的结构预测及突变位点分析 野生型的 MTSase 的蛋白质结构通过数据库 protein data bank 中获得 (PDB ID 1IV8), 突变体的结构则是通过 SWISS-MODEL 进行同源建模获得的, 应用 Pymol 进行酶分子拟合。

2 结果与分析

2.1 易错 PCR 条件的探究

在易错 PCR 过程中,需要加入 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} , Mg^{2+} 能与核酸骨架相互作用,起到稳定作用。同时, Mg^{2+} 还能影响到 DNA 聚合酶的活性。 Mg^{2+} 浓度过低,会降低 PCR 的扩增效率,甚至导致扩增失败。但是, Mg^{2+} 浓度过高,则会产生非特异性扩增。 Mn^{2+} 能降低 DNA 聚合酶对模板的特异性,增加 PCR 过程中碱基互补的出错率。因此,在易错 PCR 过程中需要调整 2 种离子的浓度,以期获得不同突变频率的突变文库。本研究中,以常规 PCR 中 5 mmol/L Mg^{2+} 浓度作为初始浓度,通过调整体系中 Mn^{2+} 的浓度,来探索易错 PCR 条件。PCR 结果如图 1 所示。



M:DNA marker; lane1:0.1 mmol/L; lane2:0.2 mmol/L; lane3:0.3 mmol/L; lane4:0.4 mmol/L; lane5:0.5 mmol/L; lane6:0.6 mmol/L; lane7:0.7 mmol/L; lane8:0.8 mmol/L

图 1 不同 Mn^{2+} 浓度下的 PCR

Fig. 1 Error-prone PCR with different Mn^{2+} ion concentrations

从图 1 中可知, Mg^{2+} 浓度为 5 mmol/L 时, 结合不同浓度的 Mn^{2+} 浓度, 均能使得目的基因有效扩增。因此, Mg^{2+} 浓度选择为 5 mmol/L。在选定的 Mg^{2+} 条件下, 不同浓度的 Mn^{2+} 浓度均能使得目的有效扩增, 但是, 考虑到 Mn^{2+} 浓度过高会产生较高的出错率, 使得后续表达的 MTSase 失活; 而 Mn^{2+} 浓度过低则会出错率太低, 甚至不发突变。较为合适的出错率为 MTSase 氨基酸序列中有 2~5 个氨基酸突变。通过对不同浓度 Mn^{2+} PCR 产物测序, 根据测序结果和 2~5 个氨基酸突变为宜的突变原则, 选择了 Mn^{2+} 浓度 0.4 mmol/L。

2.2 突变文库的构建及筛选

经过初步的易错 PCR 条件探究后, 在确定的 PCR 条件下扩增 MTSase 的基因 *treY*, 经 PCR 产物纯化后, 连接到克隆载体 pBackzero 上, 转化 *E. coli*

JM 109 感受态细胞, 涂布平板, 将平板上所有菌落用无菌水洗脱至 LB 液体培养基, 过夜培养后, 提取混合质粒 pBackzero-*treY*, 将混合质粒 pBackzero-*treY* 和表达载体 pET-24a 分别经 *Nde*I 和 *Hind*III 双酶切后, 16 °C 过夜连接, 转入 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中。本研究突变获得到转化子约 5 000 株, 所有转化子构成突变文库。

2.2.1 初筛 由于麦芽六糖价格昂贵, 不适合用作筛选的底物。因此, 以价格低廉的麦芽糊精作为筛选的底物。对构建好的突变文库, 采用前期设计的筛选方法, 进行初筛: 将突变体与底物反应后的反应液同 DNS 试剂进行显色反应, 置于酶标板中于 540 nm 处测定吸光值, 计算酶活。初步筛选出酶活有较大幅度提高的突变株, (图中所示数值是以麦芽糊精为底物所计算的酶活 (U/mL), 红色框表示酶活有较大幅度提高的突变体, 黑色表示野生型 MTSase, 橙色框表示空白对照, 即用缓冲液替代酶液)。初筛结果见图 2 所示。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	112.85	206.90	154.00	122.26	129.31	134.01	130.49	114.03	126.96	85.82	47.02	121.08
B	171.63	148.12	184.56	173.98	130.49	119.91	105.80	161.05	156.35	154.00	134.01	110.50
C	179.86	189.26	190.44	129.31	179.86	175.16	183.39	198.67	67.01	151.65	163.40	108.15
D	170.46	154.00	141.07	123.43	124.61	230.41	86.99	193.97	165.75	125.78	203.37	122.26
E	179.86	175.16	141.07	201.02	121.08	173.98	178.68	158.70	137.54	172.81	88.17	115.20
F	112.85	123.43	98.75	130.49	125.78	161.05	185.74	146.94	69.36	170.46	137.54	114.03
G	125.78	186.91	149.30	99.92	152.82	172.81	165.75	118.73	163.40	158.70	0.00	0.00
H	101.10	92.87	102.27	61.13	121.08	65.83	86.99	138.72	129.31	104.62	0.00	0.00

图 2 深孔板初筛结果

Fig. 2 Screening result of MTSase in the 96-well plate

2.2.2 复筛 将初筛获得的阳性转化子, 5% 接种体积分数接种于 TB 液体培养基 (含 100 μ g/mL kanamycin), 于 25 °C 培养 24 h, 取一定发酵液, 离心弃上清液, 用 pH 8.0 的缓冲液重新悬浮后, 用超声破碎菌体, 离心收集上清液, 以麦芽六糖作为底物, 测定酶活。对突变文库筛选后, 获得酶活提高较为显著的突变体 D-6, 其粗酶液酶活为 41.2 U/mL, 而野生型 MTSase 酶活为 26.65 U/mL。突变体粗酶液酶活为野生型的 1.54 倍。

2.3 突变体的基因测序

对酶活提高的突变体 D-6 进行测序, 发现 D-6 的基因在 1 295 和 1 757 位点发生突变, 其氨基酸序列均产生突变。其序列分析结果如表 1。

2.4 MTSase 及其突变体的分离纯化

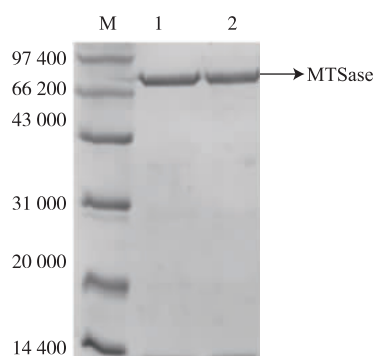
离心收集发酵液中的菌体, 使用高压匀浆机进行细胞破碎, 8 000 r/min, 离心 15 min, 收集上清液,

表 1 突变体测序结果

Table 1 Sequencing results of the mutant

突变体	突变的碱基	突变的氨基酸
D-6	G1295A/G1757A	G432D/G586D

经过 75 °C 热处理 1 h, 50 g/dL 的硫酸铵沉淀, 透析, MonoQ 阴离子交换层析柱这 3 步纯化后, 获得电泳纯的野生型 MTSase 和突变体 D-6, 其 SDS-PAGE 分析结果如图 3 所示。对纯化后的野生型 MTSase 和突变体 D-6 进行比活力测定, 分别为 75.1 U/mg 和 92.2 U/mg, 突变体酶的比活力为野生型 MTSase 的 1.22 倍。同时, 经计算可知突变体 D-6 的粗酶液目的蛋白可溶性表达量为 0.447 mg/mL, 而野生型 MTSase 为 0.356 mg/mL, 表明突变体 D-6 可溶性蛋白表达量提高。



M: protein marker; 1: WT-MTSase; 2: D-6

图 3 纯化后的野生型 MTSase 和突变体酶 D-6 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE of purified WT-MTSase and mutant MTSase D-6

2.5 MTSase 及突变体的酶学性质分析

2.5.1 最适温度及温度稳定性分析 酶催化过程中, 酶活力与温度密切相关。当温度低于最适温度时, 随着温度升高, 酶促反应速率加快; 当温度高于最适温度时, 随着温度升高, 酶促反应速率反而呈现下降趋势。因此, 需要探究突变体酶 D-6 同野生型 MTSase 在最适温度和温度稳定性上的差异。突变体酶 D-6 和野生型 MTSase 的最适反应温度和温度稳定性结果如图 4 和图 5 所示。

从图 4 可知, 野生型 MTSase 的最适反应温度为 70 °C, 而突变体酶 D-6 的最适反应温度为 60 °C, 较野生型 MTSase 的最适温度略有下降。从图 5 可知, 70 °C 下保温, D-6 的半衰期为 5 d, 在相同条件

下, 而野生型 MTSase 的相对酶活在 5 d 时能保持在 75.2% 以上, 突变体酶 D-6 的温度稳定性同野生型 MTSase 相比略有下降。根据吴世雄等人报道^[12], 双酶法制备海藻糖最适反应温度为 60 °C, 反应时间 48 h, 便能达到最大产率。考虑到 D-6 的热稳定性有所下降, 同时考察了突变体 D-6 和野生型 MTSase 在 60 °C 保温 48 h 后的残余酶活。结果如图 6 所示, 保温 48 h 后, 突变体 D-6 的残余酶活仍保持在 80% 以上。因此即便温度稳定性略有下降, 也不会影响该突变体应用于海藻糖的制备。

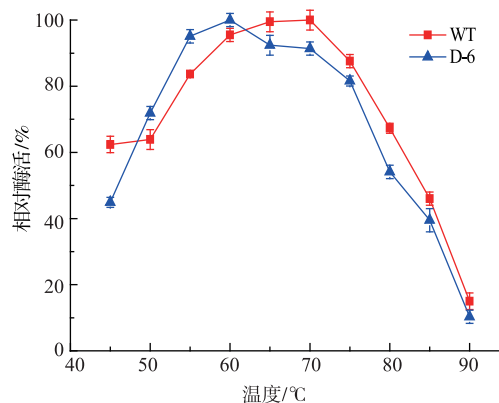


图 4 野生型 MTSase 和突变体酶 D-6 的最适温度

Fig. 4 Optimum temperature of WT-MTSase and D-6

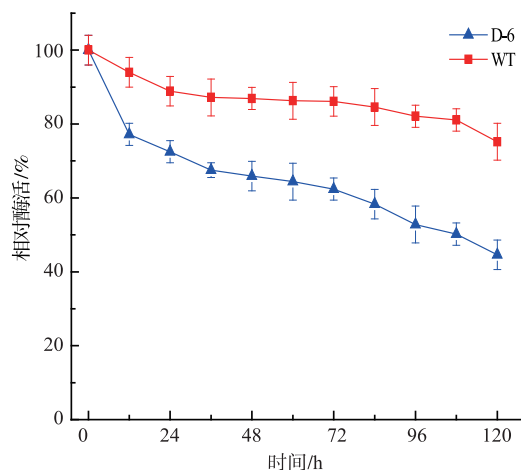


图 5 野生型 MTSase 和突变体酶 D-6 的 70 °C 温度稳定性

Fig. 5 Thermal stability of WT-MTSase and D-6 at 70 °C

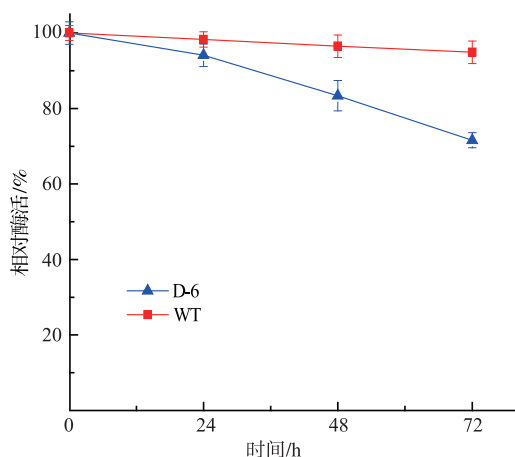


图 6 野生型 MTSase 和突变体酶 D-6 60 °C 温度稳定性

Fig. 6 Thermal stability of WT-MTSase and D-6 at 60 °C

2.5.2 最适 pH 及 pH 稳定性分析 酶催化过程中, pH 即可以影响酶同底物的亲和力, 也能影响酶的稳定性。因此, 本研究需要探究突变体酶 D-6 同野生型 MTSase 在最适 pH 和 pH 稳定性上的差异。在其他条件不变的情况下, 用方法 1.2.6 测定突变体酶 D-6 和野生型 MTSase 的酶活。结果如图 7 和图 8 所示。突变体酶 D-6 和野生型 MTSase 的最适 pH 均为 6.0。野生型 MTSase 在 pH 4.0~10.5 相对酶活维持在 89% 以上, 而突变体酶 D-6 在同等情况下, 相对酶活维持在 91.7% 以上。当大于 pH 7.0 时, 突变体酶 D-6 的 pH 稳定性优于野生型 MTSase。

2.5.3 酶促反应动力学分析 用纯化后的野生型 MTSase 和突变体酶 D-6, 以不同浓度的麦芽六糖作为底物测定其动力学参数 K_m 。其结果用 GraphPad

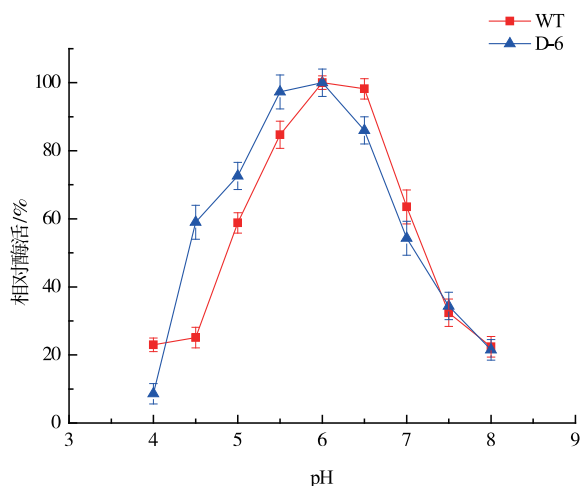


图 7 野生型 MTSase 和突变体酶 D-6 的最适 pH

Fig. 7 Optimum pH of WT-MTSase and D-6

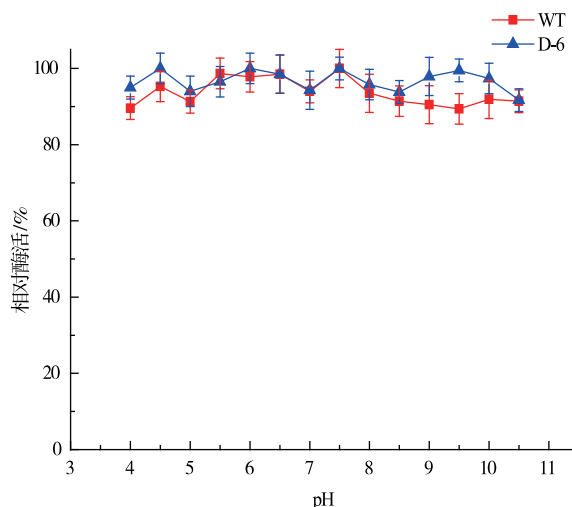


图 8 野生型 MTSase 和突变体酶 D-6 的 pH 稳定性

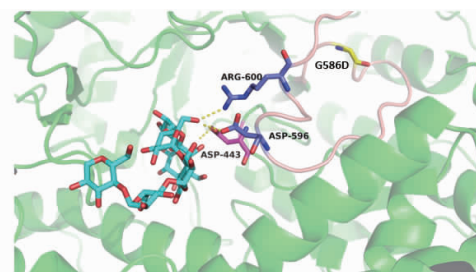
Fig. 8 Effect of pH on the stability of WT-MTSase and D-6

Prism 5 软件进行计算, 野生型 MTSase 的 K_m 值为 (4.74 ± 0.33) mmol/L, 突变体酶 D-6 的 K_m 值为 (2.77 ± 0.22) mmol/L, 表明突变体酶对底物的亲和性提高。

2.6 突变位点分析

在 protein data bank 数据库中获取野生型 MTSase 的蛋白质三维结构(PDB ID: 1IV8)。通过氨基酸序列比对, 突变体同野生型 MTSase 的同源性为 99%。因此, 突变体酶 D-6 的蛋白质三维结构以野生型 MTSase 蛋白质结构作为同源模板, 应用 SWISS-MODEL 进行同源建模。

G432 位点位于 MTSase 的表面亲水区域, 当 G432 变成 D432 后, 侧链结构变大, 亲水性变强, 使得酶分子之间的疏水相互作用变弱, 不容易聚集, 这可能在一定程度上减少包涵体的形成, 提高



蓝色的为底物麦芽六糖, 而紫色的分别为 D596 和 R600, 黄色的为突变位点 G586D, 粉色的为 loop 环。

图 9 MTSase 的活性中心与底物对接

Fig. 9 Docking of the active center of MTSase with the substrate

MTSase 的可溶性表达量。

突变位点 G586D 位于 A β 8 与 AE α 14 的 loop 环上^[15],与氨基酸 D596 和 R600 位于同一 loop 环上,而根据 Wen-Chi Tseng 等^[16]报道,D596 和 R600 能与-2 及-3 位点的葡萄糖残基结合,当 G586 变成 D586,loop 环的刚性变强^[17],从而使得 D596 和 R600 与底物结合更加稳定。推测是由于这个原因使得酶与底物的亲和性提高。

3 结 语

高温酶系的 MTSase 的酶活普遍偏低,如源于 *Sulfolobus solfataricus* ATCC 35092^[18]MTSase 在 *E. coli* BL21 (DE3) 表达的酶活仅有 0.222 U/mL,而

Sulfolobus acidocaldarius ATCC 33909 的 MTSase 在 *E. coli* BL21 (DE3)、*Brevibacillus brevis*、*B. subtilis* 表达的酶活分别为 26.65、16.3、17.5 U/mL^[12]。本研究对源于 *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 的 MTSase 进行定向进化,结合高通量筛选技术,获得了一株酶活提高的突变体酶 D-6,其酶活为 41.2 U/mL。测定了突变体酶 D-6 的酶学性质,突变体酶 D-6 在 60 °C 保温 48 h 后,残余酶活仍保持在 80% 以上。因此,虽然突变体酶温度稳定性较野生型略有下降,但是不影响其应用。此外,希望以突变体酶 D-6 最为出发菌,继续进行高通筛选,以期获得酶活提高更加显著的突变体,为工业化生产奠定基础。

参考文献:

- [1] CHENG Chi. Natural biological preservatives—characteristics and applications of trehalose[J]. **Food and Fermentation Industries**, 1996(1):59-64. (in Chinese)
- [2] MA Ying, LIU Qiaohong. Biosynthesis of trehalose and its relative enzymes [J]. **China Beet and SUGAR**, 2008 (1):24-28. (in Chinese)
- [3] MARUTA K, HATTORI K, NAKADA T, et al. Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Arthrobacter* sp. Q36[J]. **Biochimica Et Biophysica Acta General Subjects**, 1996, 1289(1):10-13.
- [4] MARUTA K, HATTORI K, NAKADA T, et al. Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Rhizobium* sp. M-II [J]. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, 1996, 60(4):717-720.
- [5] PASCALE D D, SASSO M P, LERNIA I D, et al. Recombinant thermophilic enzymes for trehalose and trehalosyl dextrins production[J]. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, 2001, 11(4-6):777-786.
- [6] MARUTA K, MITSUZUMI H, NAKADA T, et al. Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*[J]. **Biochimica Et Biophysica Acta General Subjects**, 1996, 1291(3):177-181.
- [7] 陈晓斌. 重组 MTSase 和 MTHase 双酶法转化淀粉生产海藻糖[D]. 杭州:浙江大学, 2006:1-53.
- [8] REN Xiaoqing, ZHUANG Gui, LIAO Jinsong, et al. Production, research situation and development of *Trehalose* and its application[J]. **Journal of Henan University of Technology**, 2001, 22(1):82-85. (in Chinese)
- [9] HU Zongli, XIA Yuxian, CHEN Guoping, et al. Manufacture and applications of trehalose [J]. **China Biotechnology**, 2004, 24(4):44-48. (in Chinese)
- [10] HUANG Ying, CAI Yong, YANG Jiangke, et al. Directed evolution of lipase of *Bacillus pumilus* YZ02 by error-prone PCR[J]. **Chin J Biotech**, 2008, 24(3):445-451. (in Chinese)
- [11] WU Huawei, ZHANG Zhan, LI Xiangqian, et al. Directed evolution for significantly increasing high temperature resistant β -glucanase activity by error-prone PCR[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2010(5):1-4. (in Chinese)
- [12] 吴世雄. 嗜酸热硫化叶菌 MTSase 和 MTHase 的异源表达及应用[D]. 无锡:江南大学, 2016:1-52.
- [13] HU Shubing, DUAN Xuguo, WU Jing. Studies on preparation of β -galactosidase and optimization of reaction conditions for the galactooligosaccharides production[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2017(12):1241-1245. (in Chinese)
- [14] WANG Kui, SU Linqia, WU Jing, et al. Enzymatic properties of recombinant *Arthrobacter ramosus* S34 MTSase and MTHase and optimization of application conditions for production of trehalose[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2017, 43 (7):1-6. (in Chinese)
- [15] KOBAYASHI M, KUBOTA M, MATSUURA Y. Refined structure and functional implications of trehalose synthase from

- Sulfolobus acidocaldarius*[J]. **Journal of Applied Glycoscience**, 2003, 50(1): 1-8.
- [16] TSENG W C, LIN C R, HUNG X G, et al. Identification of substrate-binding and selectivity-related residues of maltooligosyltrehalose synthase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* ATCC 35092[J]. **Enzyme & Microbial Technology**, 2014, 56(14): 5628-5633.
- [17] 丁国伟. 米曲霉脯氨酰基团克隆及其异源表达[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 1-48.
- [18] FANG T Y, HUNG X G, SHIH T Y, et al. Characterization of the trehalosyl dextrin-forming enzyme from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* ATCC 35092[J]. **Extremophiles**, 2004, 8(4): 335-343.

会 议 消 息

会议名称: 中国化学会 2020(第三届)分子筛产业技术协同创新论坛

会议时间: 2020 年 8 月

会议地点: 上海市

主 办 方: 中国化学会分子筛专业委员会

共同主办: 上海化工研究院

承 办 方: 全国分子筛标委会; 上海化工研究院有限公司

会议主题: 科技驱动、产业升级转型

大会主席: 于吉红

预计规模: 800

联 系 人: 石 冰

电子邮箱: China_fzs@163.com

电 话: 13585670485

会议内容: 1. 国内外分子筛材料的发展趋势与市场需求; 2. 分子筛多孔材料在能源化工、节能环保等领域引领的技术突破; 3. 分子筛科研与产业融合发展; 4. 有序多孔材料的合成与修饰技术; 5. 分子筛领域的国内外公开专利分析; 6. 国内分子筛标准化进程解读与标准制定宣贯; 7. 分子筛技术研究成果转化与业务技术洽谈