

嗜酸热脂环酸杆菌中甘露聚糖酶活性位点的确立

徐书景¹, 张彩凤², 薛张伟², 何广正², 鞠建松^{2*}, 赵宝华^{2*}

河北师范大学,¹ 旅游学院,² 生命科学学院, 石家庄 050016

摘要:【目的】通过定点突变确定嗜酸热脂环酸杆菌中甘露聚糖酶的活性催化位点。【方法】根据序列比对和 GH53 家族的结构信息选择可能的催化活性位点, 利用重叠 PCR 法构建定点突变体, 采用薄层层析 (TLC) 法和 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法检测各酶蛋白活性。【结果】通过重叠 PCR 法成功构建了 7 个位点的突变体, 其中第 150 和 159 位的氨基酸突变对活性改变甚少或几乎没有, 而第 151 和 231 位谷氨酸的羧基基团的改变以及双位点突变体 E2Q 则导致其对各种底物催化活性的丧失, 说明位于 $\beta 4$ 和 $\beta 7$ 折叠的 C 末端的 E151 和 E231 的羧基基团作为功能基团参与了催化反应。【结论】E151 和 E231 分别是新型甘露聚糖酶 AaManA 的酸碱催化位点和亲核催化位点。

关键词: 甘露聚糖酶, 定点突变, 活性位点

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 01-0066-09

甘露聚糖是半纤维素的重要组分。Hetero-1,4- β -D 甘露聚糖通过内切甘露聚糖酶 (β -mannanase, endo- β -1,4-mannan mannanohydrolase, EC 3.2.1.78)、外切甘露糖苷酶 (β -D-mannopyranoside hydrolase, EC 3.2.1.2) 共同作用才能水解成甘露糖。 β -甘露聚糖酶具有降解半乳糖甘露聚糖、甘露聚糖、半乳糖甘露聚糖、葡甘露聚糖等多糖物质, 获得由不同单糖分子 (2-10 个单糖单位) 组成的甘露寡糖, 而甘露寡糖有很好的生物调节功能, 随着近年来对自然界半纤维素等多糖资源的开发利用和甘露寡糖药用价值的发现, β -甘露聚糖酶的研究受到了广泛关注, 微生物来源的 β -甘露聚糖酶则因具有活性高、成本低、提取方便以及比动植物更广的作用 pH、温度范围和底物专一性等显著特点而得到了更为广泛的研究和应用。

到目前为止, 已有多种微生物、动物和植物的 β -甘露聚糖酶基因先后被克隆和表达, 来自极端环境微生物的甘露聚糖酶也有报道, 如: 嗜热海栖热袍菌 (*Thermotoga maritime*) 的甘露聚糖酶最适温度达到 90°C^[1]; 嗜冷黄杆菌 (*Flavobacterium* sp.) 产生冷适应的甘露聚糖酶, 最适温度为 35°C, 而在 10°C 仍保留 35% 的酶活力^[2]; 嗜碱的 *Bacillus* sp. N16-5 甘露聚糖酶最适 pH 达到 9.5^[3]。由于极端微生物甘露聚糖酶研究的历史较短且菌株资源来源有限, 目前有关嗜酸热细菌产甘露聚糖酶的文献报道还很少。

中国科学院微生物研究所从云南腾冲热泉中分离发现一株具有甘露聚糖酶活性的嗜酸热细菌, 系统发育分析确定该菌株属于脂环酸杆菌属 (*Alicyclobacillus acidocaldarius*), 命名为 *A. acidocaldarius* Tc-12-31。张跃灵博士通过构建基因组文库

基金项目: 国家自然科学基金 (30970628); 河北省留学回国人员资助项目 (20100705); 河北师范大学博士启动基金项目 (L2009B13)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-311-86268473; E-mail: jujiancong@126.com, zhaobaohua86178@sohu.com

作者简介: 徐书景 (1974-), 女, 河北石家庄人, 讲师, 硕士, 主要从事食品生物技术的研究。Tel: +86-29-87091175; E-mail: shujingxu@163.com

收稿日期: 2010-07-15; **修回日期:** 2010-09-25

和活性筛选,从该菌中克隆获得了一个甘露聚糖酶基因(*AamanA*),长 963 bp,编码 320 个氨基酸,没有信号肽^[4]。序列比对分析发现甘露聚糖酶 AaManA 与所报道的甘露聚糖酶没有同源性,不属于已知的 112 个糖苷水解酶家族,是一个新型的糖苷水解酶,因此,明确该酶的催化活性中心,对于更好地了解酶蛋白的催化机制,弄清楚该酶蛋白的生物学地位,具有重要的生物学意义。本实验将根据基因序列比对信息,选择可能的突变位点,通过定点突变技术构建突变体,采用薄层层析(TLC)法和 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法检测酶蛋白催化活性,确定酶蛋白的活性位点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及试剂:大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH12S 用于基因克隆,菌株 *E. coli* BL21(DE3)用于蛋白表达;表达载体 pETMan963 由中科院微生物研究所张跃灵博士惠赠,该质粒含甘露聚糖酶基

因 *AamanA*, 该基因来自嗜酸热脂肪杆菌(*A. acidocaldarius*) Tc-12-31,长 963 bp, [G + C] % 为 65.2%,编码 320 个氨基酸,GenBank 登录号为 DQ838045,通过限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切与载体 pET28a 连接而成。

Taq DNA polymerase, dNTP (2.5 mmol/L) 和 DNA marker 购自天根公司;*Takara Ex Taq*TM DNA 聚合酶、T4 DNA ligase、GC buffer 和限制内切酶等购自大连宝生物公司;质粒提取和 DNA 纯化回收试剂盒购自 Omega 公司;槐豆胶、甘露糖、甘露二糖、甘露三糖、甘露四糖、甘露五糖和甘露六糖购于 Sigma 公司(美国),其他试剂均为分析纯。

1.2 实验所用引物

根据 *AamanA* 基因待突变位点周边序列设计特异性引物,如表 1 所示,表中带灰色背景的字母为欲突变的核苷酸。引物对 Ep4182 和 Ep6185 是根据质粒载体 pET28a 的序列设计的两个引物,分别在限制内切酶 *Nhe* I 和 *Hind* III 的外侧。引物由上海生物工程技术有限公司合成。

表 1 本实验所用引物

Table 1 Primers used in this research

| Primers | Oligonucleotide sequence (5'→3') | Description |
|---------|--|----------------|
| E151A-F | GCGTGGGCTGCG C GATGACGACTGCCG | GAG→GCG |
| E151A-R | CGGCAGTCGTCATC C CGCAGCCCACGC | CTC→CGC |
| E159A-F | GCCGAGCCACACG C AGCCATGTGGCGC | GAA→GCA |
| E159A-R | GCGCCACATGGCT C CGTGTGGCTCGGC | TTC→TGC |
| E231A-F | CCGCTCTTCTCATGG C AGTGGGGTGCCCG | GAA→GCA |
| E231A-R | CGGGCACCCTACT C CCATGAAGAAGAGCGG | TTC→TGC |
| E151Q-F | GCTGC C AGATGACGACTGCCGA | GAG→CAG |
| E151Q-R | TCATCT C GCAGCCCACGCAGAAC | CTC→CTG |
| E231Q-F | TTCTTCATG C AAGTGGGGTGCCCGA | GAA→CAA |
| E231Q-R | CCACTT C CATGAAGAAGAGCGGCT | TTC→TTG |
| C150A-F | CGTGGGC GC CGAGATGACGACTGCCGAG | TGC→GCC |
| C150A-R | TCATCTCG GC GCCACGCAGAACATCTC | GCA→GGC |
| Ep4812 | GCCTGCCACCATACCCACG | Primer pair on |
| Ep6185 | GCCAACTCAGCTTCCTTCGG | pET28a |

The forward primers are listed, and the mutated sites are grey background.

1.3 定点突变基因构建

1.3.1 PCR 扩增:以质粒 pETMan963 为 PCR 反应模版,以点突变正反向引物分别和 Ep4812 或 Ep6185 组成引物对,PCR 扩增 DNA 片段,反应条

件:95℃ 4 min;95℃ 45 s,58℃ 1 min,72℃ 2 min,25 个循环;72℃ 10min。

扩增所得 DNA 片段由 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离、纯化,作为后续重叠延伸 PCR 反应的模板^[5],

以 Ep4812 和 Ep6185 作为 PCR 反应引物对,扩增含突变位点的全长基因。适当加入 $2 \times \text{GC}$ buffer 以提高 PCR 扩增反应效率。

1.3.2 基因构建:将扩增获得的 DNA 片段经过限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Hind* III 酶切,与预先经相同酶切的载体 pET28a 连接构建表达质粒,转入大肠杆菌 DH12S,测序筛选序列正确的质粒用于后续蛋白表达、纯化和活性检测等研究。

以单点突变成功的质粒 DNA 为模板,通过重叠 PCR 法重复上述步骤引入第二点突变。

1.4 序列测定和分析

序列测定由北京诺赛测序公司采用 ABI 3730xl DNA 测序仪完成 (Applied Biosystems)。序列同源性分析使用 BLAST 程序进行 DNA 和氨基酸序列的同源搜索^[6]。使用 ClustalX 程序^[7]和在线软件 ESPript (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>) 进行序列比对分析。

1.5 AaManA 及突变体蛋白的表达和纯化

将质粒 pETMan963 和含突变位点的载体转入大肠杆菌 BL21 (DE3),经过预培养,加入 1 mmol/L IPTG 诱导培养 5 - 6h,收集菌体,并将菌体重新悬浮于细胞裂解液,利用超声破碎法裂解菌体,离心分离获得细胞上清液。

细胞上清液中的酶蛋白先后由亲和层析法 (Ni-NTA agarose, Qiagen)、分子筛层析法 (Superdex 200 10/30 GL column, GE; 缓冲液: 20 mmol/L Tris-Cl pH 7.9, 150 mmol/L NaCl) 和 DEAE 阴离子交换法 (GE; A 液: 20 mmol/L Tris-Cl pH 7.9, B 液: 20 mmol/L Tris-Cl pH 7.9, 1 mol/L NaCl) 分离纯化,蛋白浓度由 Bio-Rad 蛋白测定试剂盒 II (Bio-Rad Protein Assay) 测定, BSA (2.0 mg/mL) 为蛋白标准品。

收集所得的蛋白样品采用 Amicon Ultra-15 离心浓缩管 (30 K MWCO, Millipore) 浓缩、脱盐,并将蛋白分装保存于 -80°C 冰箱待用,缓冲液为 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.9)。

1.6 甘露聚糖酶活性分析

采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定酶蛋白活性:以 50 mmol/L 磷酸 - 柠檬酸缓冲液 (pH 5.5) 配制 0.5% 的槐豆胶 (Locust bean gum) 作为底物溶液。取 0.9 mL 底物溶液,在 65°C 预热 5 min,加入

0.1 mL 酶液,继续保温 10 min,随后加入 1 mL DNS 溶液,沸水浴 10 min 显色。加入 4 mL 水,测定 540 nm 吸光值。空白对照样中的酶液在沸水浴之前加入,其余反应条件同上。一个酶活力单位定义为 1 min 内产生相当于 1 μmol 还原糖所需要的酶量。

1.7 蛋白纯度和浓度测定

采用 SDS-PAGE 法检测酶蛋白的纯度,以 Bio-Rad 蛋白测定试剂盒 (Bio-Rad, USA) 测定细胞裂解液中的蛋白浓度,以 BCA 蛋白分析试剂盒 (Pierce) 测定纯化后的蛋白浓度,以小牛血清球蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 为标准品做标准曲线。

1.8 寡糖水解产物的检测

以 50 mmol/L 磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液 (pH 5.5) 配制浓度为 2% 的寡糖底物溶液 (分别为甘露二糖,甘露三糖,甘露四糖,甘露五糖,甘露六糖), 60°C 保温 5 min 后,加入酶液 (终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$), 反应分别进行 5 min, 10 min, 20 min, 40 min, 80 min 和 180 min 后取出,沸水浴 5 min 终止反应,采用薄层层析 (Thin layer chromatography, TLC) 法检测不同反应时间的产物组成。硅胶板采用青岛海洋化工分厂“海洋”牌 GF254 硅胶板 100X200 mm,展层剂为正丁醇:水:乙酸 (V:V:V) = 2:1:1,显色剂为丙酮:二苯胺:苯胺:磷酸 = 100 mL:2 g:2 mL:10 mL, TLC 操作方法详见文献^[8]。

1.9 突变蛋白晶体的制备和 X-Ray 衍射分析

参考蛋白 AaManA 的结晶条件筛选双活性位点突变体蛋白 (E2Q) 晶体生长条件^[4],以悬滴气相扩散法静置培养晶体 (18°C),用缓冲溶液 Tris-HCl (5 mmol, pH 7.9) 调整蛋白浓度,蛋白浓度范围 5 - 30 mg/mL,池液为磷酸二氢铵和柠檬酸三钠缓冲溶液 (0.1 - 1 mol/L, pH 4.6 - 8.5)。获得的蛋白晶体浸泡于甘露二糖、甘露三糖、甘露四糖、甘露五糖和甘露六糖等一系列寡糖底物溶液中 5 - 30 min,底物浓度范围为 5 - 100 mmol/L,挑取晶体进行 X-Ray 衍射分析,晶体衍射分析由中国科学院微生物研究所衍射室完成。

2 结果和分析

2.1 甘露聚糖酶突变位点选择、突变体的构建

利用 BLAST 工具 (NCBI) 检索发现,基因 *AamanA* 与若干预测蛋白有较高的序列相似性,最高

达 38%,但与已知的甘露聚糖酶没有相似性。采用点特异循环同源序列搜索工具(Position-Specific Iterated BLAST, PSI-BLAST)^[9],在第二轮比对中发现两个来自糖苷水解酶家族 GH53 的半乳聚糖酶与 AamanA 的序列相似性为 17%,这两个半乳聚糖酶分别是来自 *Enterococcus faecium* 的 EfaGAL (accession no. EAN09439) 和来自 *Frankia* sp. 的 FraGAL (Accession No. EAN12989)。这表明 AaManA 不属于现有的 112 个糖苷水解酶家族【<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>】,它可能是一个新型的甘露聚糖酶。

通过 ClustalX 工具和 ESPript 在线序列比对分析发现(图 1),GH53 半乳聚糖酶的酸碱催化位点 E136(实心菱形表示)和亲核催化位点 E246(实心三角形表示)在 AaManA 中保守,分别对应于 E151 和 E231,而这两个催化位点是 GH-A 超家族酶的共同特征^[13]。这预示着 AaManA 可能也属于糖苷水解酶超家族 GH-A。

另外,clan GH-A 家族中活性位点分别位于 TIM 桶的 $\beta 4$ 和 $\beta 7$ 折叠的 C 末端^[13-14],对 AaManA 的二级结构模拟可以发现(图 1),氨基酸残基 E151、E159 和 E231 位于 $\beta 4$ 和 $\beta 7$ 折叠的 C 末端,因此,它们可能是酶蛋白的催化位点,此外氨基酸位点 Cys150 也有影响活性口袋的可能性,因此将此四个氨基酸位点作为突变位点,设计了一系列引物(表 1),分别将谷氨酸(E,侧链为带负电的亲水羧基基团)突变为丙氨酸(A,侧链为 α -甲基基团)或谷氨酰胺(Q,侧链为不带电荷的氨基基团)和将半胱氨酸(C,带有巯基基团)突变为没有-SH 基团的丙氨酸(A)。

通过 PCR 扩增获得 DNA 小片段,由重叠延伸 PCR 法拼接获得突变体 DNA,经过限制性内切酶酶切验证和序列测定等实验,我们顺利构建了如下 7 个定点突变体: E151A、E159A、E231A、C150A、E151Q、E231Q 和双位点突变体 E2Q (E151Q & E231Q)。采用限制性内切酶酶切获得目的 DNA 片段,并与经相同酶切的质粒载体 pET28a 连接,最终构建获得表达载体 pETE151A, pETE159A, pETE231A, pETC150A, pETE151Q, pETE231Q 和 pETE2Q。

2.2 蛋白表达和纯化

上述 7 个表达载体和 pETMan963 分别转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,通过预培养及诱导剂 IPTG 诱导 5-6 h,所收集的菌体经过超声破碎、离心分离,细胞裂解液上清分别通过亲和层析法和分子筛层析法纯化蛋白,从图 2 可以看出所有蛋白均获得了很好的表达,分子量约为 36 kDa,蛋白纯度均一。为了制备蛋白晶体,蛋白 E2Q 还通过离子交换层析法作了进一步的纯化。

2.3 TLC 法检测酶蛋白及突变体的水解活性

在 AaManA 对魔芋粉和槐豆胶的水解试验中发现,AaManA 能够很好地作用于这些聚糖,短时间内就能降低溶液的粘度,这种现象是内切酶活力的一种表现。蛋白 AaManA 对寡聚糖的水解实验中发现,AaManA 对二糖没有作用,对三糖以上的寡糖和聚糖水解释作用较强,产物以聚合度大于 2 的寡糖为主,其中以二糖和三糖居多(图 3)。这些结果都说明 AaManA 是以内切的方式作用于底物的。

突变体蛋白 E159A 表现出与 AaManA 相同的水解作用,而 E151A 和 E231A 则对这些寡糖几乎没有作用(图 3)。蛋白 E151Q、E231Q 以及 E2Q 表现出与 E151A 和 E231A 相同的实验结果,均对甘露寡糖没有作用(结果未显示)。这说明氨基酸位点 151 和 231 可能与酶蛋白活性位点有关,而 E159 则可以排除其参与酶活性中心的可能性。

2.4 突变体酶蛋白催化活性检测

经过初步活性检测发现,突变体 E159A 的活性和母体没有太大差别(见表 2),这个结果和 TLC 检测结果基本一致,说明氨基酸残基 E159 与酶蛋白催化活性位点无关。突变体 C150A 的活性约为野生型活性的 1/3,而 Hogg 等人认为在这个位置的组氨酸或天冬酰胺的作用是与亲核催化谷氨酸形成氢键,在固定亲核催化位点的位置中起重要作用^[13,15],该位点的突变常引起酶活损失较大(大于 100 倍)。这说明在 AaManA 中,氨基酸残基 C150 的作用与 GH-A 超家族中其它酶的共同位置氨基酸的作用存在差异。

表 2 中 E151A 和 E231A 的突变导致其对各种底物的活性均降低了 5000 倍以上,说明谷氨酸(E)突变为丙氨酸(A)后羧基基团的缺失导致酶活大幅

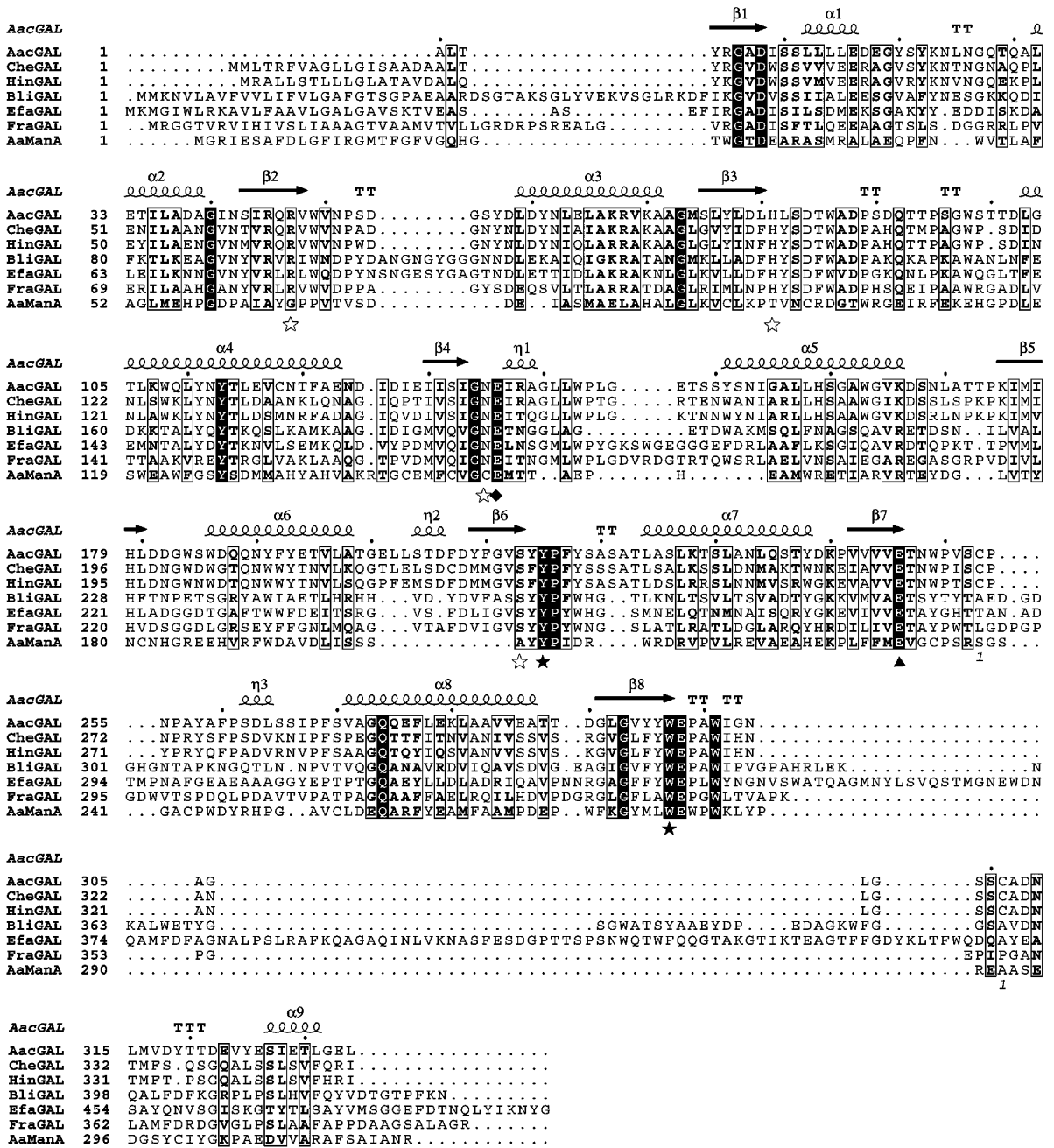


图1 基于二级结构的 AaManA 与 GH53 家族的半乳聚糖酶的序列比对图 (ClustalX)

Fig.1 Structure-based sequence alignment of AaManA with the GH53 galactanases by ClustalX^[7]. Strictly conserved residues are highlighted in black, and the conservatively substituted residues are boxed. Secondary structure elements for AacGAL are shown above the alignment. Helices (α), strands (β), and 3_{10} helices (η) are labeled. The residue equivalent to the acid/base catalyst of GH53 enzymes is indicated by solid diamond, and to the nucleophile catalyst by a triangle. The other six GH53 conserved residues are indicated by solid stars (conserved in AaManA) or hollow stars (unconserved in AaManA). The sequences shown include the galactanases from *Aspergillus aculeatus* (AacGAL), *Corynascus heterothallicus* (CheGAL), *Humicola insolens* (HinGAL), *Bacillus licheniformis* (BliGAL), *E. faecium* DO (EfaGAL) and *Frankia* sp. EAN1pec (FraGAL). The structures of the first four enzymes have been obtained, with PDB codes of 1FHL^[10], 1HJS, 1HJQ^[11] and 1R8L^[12], respectively. The figure was produced using ESPrict.

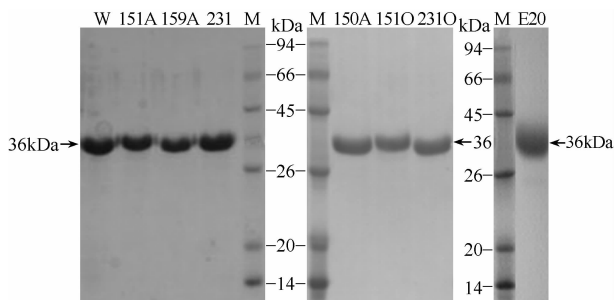


图2 突变体蛋白和野生型蛋白纯化 SDS-PAGE 检测

Fig. 2 Profile of SDS-PAGE for mannase and mutated mannases. M, The low molecular weight protein marker; L, cell lysis; W, protein AaManA; 151A, protein E151A; 159A, protein E159A; C150A, protein C150A; E151Q, protein E151Q; E231Q, protein E231Q; E2Q, double mutated protein E2Q.

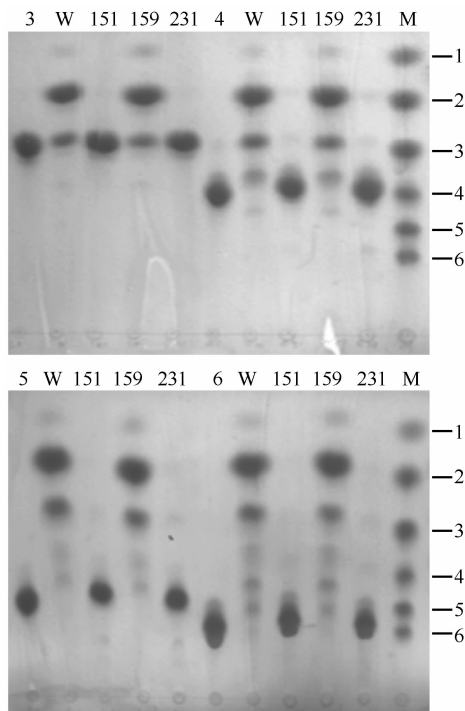


图3 TLC 法检测 AaManA 和突变体蛋白水解甘露寡糖产物

Fig. 3 TLC detection of the products from manno-oligosaccharides by AaManA and mutations. 1, mannose; 2, mannobiose; 3, mannotriose; 4, mannotetraose; 5, mannopentose; 6, mannohexose; W, protein AaManA; 151, 159 and 231 indicates the mutated protein E151A, E159A and E231A. M stands for the mixture of manno-oligosaccharides.

下降;而 E151Q 和 E231Q 以及双位点突变体 E2Q (E151Q&E231Q) 的酶蛋白活性的完全丧失,说明 E151 和 E231 的羧基基团作为功能基团参与催化反应,这符合 E151 和 E231 的羧基基团提供和接收质

表2 野生和突变的甘露聚糖酶对槐豆胶(底物)的催化活性

Table 2 Specificity activities of AaManA and its mutant on Locust bean gum.

| Enzyme | Locust bean gum / (U/mg) | Ratio / % |
|--------|--------------------------|-----------|
| AaManA | 456.2 ± 6.7 | 100.0 |
| E159A | 457.0 ± 7.3 | 100.2 |
| E151A | 0.076 ± 0.009 | 0.017 |
| E151Q | 0.022 ± 0.005 | 0.005 |
| E231A | 0.058 ± 0.032 | 0.013 |
| E231Q | 0.015 ± 0.008 | 0.003 |
| C150A | 142.6 ± 5.3 | 31.3 |
| E2Q | 0.003 ± 0.001 | 0.000 |

子以及亲核攻击的功能推测,因此,基本可以确定 E151 和 E231 分别是 AaManA 的酸碱催化位点和亲核催化位点。

2.5 双活性位点突变蛋白晶体制备

为了更进一步明确上述活性位点在底物结合中的机理,制备双点突变 E2Q 的蛋白晶体并与底物浸泡,以便更直观地了解酶蛋白的催化机理。经过筛选,在含有 0.1 mol/L 柠檬酸三钠 pH 4.6, 0.2 mol/L 磷酸二氢铵的缓冲液中培养 24 h 即可获得双点突变体 E2Q 的蛋白晶体(18℃),大小为约 0.1 mm × 0.15 mm × 0.3 mm 的砖形晶体(图 4)。

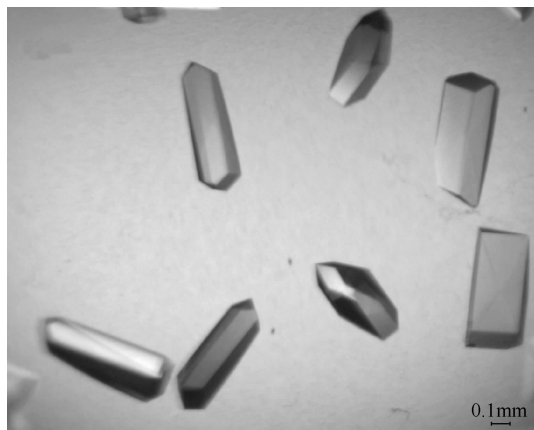


图4 双突变体 E2Q 的蛋白晶体

Fig. 4 Crystals of double-mutation E2Q

将双突变体蛋白晶体浸泡于含系列底物浓度(5 - 100 mmol/L)的结晶池液中 5 - 30 min,挑取晶体进行 X-Ray 衍射实验,结果发现蛋白与底物结合不明显,而且晶体衍射效果差。此实验尚需进一步探索研究底物浸泡条件以提高衍射效果。

3 讨论

甘露聚糖酶基因 (*AamanA*) 是张跃灵博士通过构建基因组文库和活性筛选, 从 *A. acidocaldarius* 菌中筛选获得的一个具有甘露聚糖酶活性的新型甘露聚糖酶^[4], 为了确定这个新型甘露聚糖酶的催化活性位点, 更好地研究其催化机制, 本文通过 AaManA 与 Gh53 家族半乳聚糖酶的序列比对和二级结构模拟, 最终选择了位于 $\beta 4$ 和 $\beta 7$ 折叠的 C 末端的氨基酸残基 E151、E159 和 E231, 以及可能影响活性口袋的 C150 作为突变位点进行分析研究, 构建了 7 个点突变体 E151A、E159A、E231A、C150A、E151Q、E231Q 和 E2Q (E151Q & E231Q) 并顺利表达和纯化。

经过寡糖水解产物 TLC 检测和蛋白活性检测, 第 150 和 159 位的氨基酸突变则对活性改变甚少或几乎没有, 而 151 和 231 位的谷氨酸突变失去羧基基团后导致其对各种底物的活性显著下降甚至完全丧失, 说明这两个氨基酸的羧基基团可能具有提供和接收质子以及亲核攻击的功能, 它们可能是 AaManA 的酸碱催化位点和亲核催化位点。

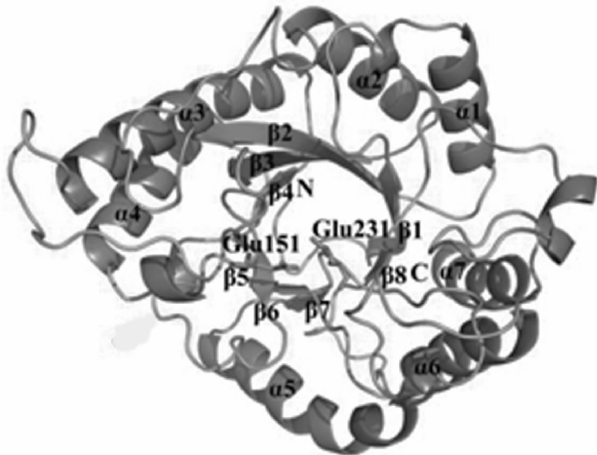


图 5 AaManA 的三维结构图

Fig. 5 Overall structure of mannanase AaManA^[16]. The overall structure of AaManA viewed from above the $(\beta/\alpha)_8$ -barrel. The α -helices and β -strands belonging to the $(\beta/\alpha)_8$ -barrel motif are numbered. The catalytic residues Glu151 and Glu231 are shown as stick model in orange.

通过后续蛋白 AaManA 的晶体结构解析发现 (PDB ID: 3CIV), E151 位于 AaManA $(\beta/\alpha)_8$ -TIM 桶状结构的 $\beta 4$ 的 C 端, E231 位于 $\beta 7$ 的 C 端 (图 5), 这与 GH-A 超家族的酸碱催化位点氨基酸和亲核催化位点氨基酸位置相符, 且这两个催化谷氨酸 (E151 和 E231) 之间的距离为 4.75 \AA ^[16], 符合糖苷水解酶的催化反应机制之一——保留反应机制的要求: 两个催化位点谷氨酸之间的距离约为 5.5 \AA ^[17], 这个结果更为直观地支持了通过同源序列分析和定点突变技术所得的结果。因此, 可以确定酶蛋白 AaManA 的催化活性位点是 E151 和 E231。

为了更进一步明确上述活性位点在底物结合中的机理, 本研究制备获得了双点突变 E2Q 的蛋白晶体, 但是由于晶体浸泡底物的时间不易掌握, 最终导致晶体衍射效果差。因此还需进一步探索研究底物浸泡条件以提高衍射效果, 最终获得理想数据以便明确活性位点在底物结合中的机理。

致谢 感谢中国科学院微生物研究所张跃灵博士惠赠质粒, 以及对本研究的热心指导和帮助。

参考文献

- [1] Chhabra S, Parker KN, Lam D, Callen W, Snead MA, Mathur EJ, Short JM, Kelly RM. Beta-mannanases from *Thermotoga* species. *Methods in Enzymology*, 2001, 330: 224-238.
- [2] Zakaria MM, Ashiuchi M, Yamamoto S, Yagi T. Optimization for beta-mannanase production of a psychrophilic bacterium, *Flavobacterium* sp. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1998, 62 (4): 655-660.
- [3] Ma Y, Xue Y, Dou Y, Xu Z, Tao W, Zhou P. Characterization and gene cloning of a novel beta-mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. *Extremophiles*, 2004, 8(6): 447-454.
- [4] Zhang YL, Gao F, Xue Y F, Zeng Y, Peng H, Qi JX, Ma YH. Crystallization and preliminary X-ray study of native and selenomethionyl beta-1,4-mannanase AaManA from *Alicyclobacillus acidocaldarius* Tc-12-31. *Acta Crystallographica Section F*, 2008, 64: 209-212.

- [5] Hechman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 924-932.
- [6] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215: 403-410.
- [7] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [8] 王秀吉,秦淑媛,高天慧. 基础生物化学实验(*Basic Biochemistry Experiments*). 第二版. 北京:高等教育出版社. 2006. 38-40.
- [9] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [10] Ryttersgaard C, Lo Leggio L, Coutinho PM, Henrissat B, Larsen S. *Aspergillus aculeatus* beta-1,4-galactanase: substrate recognition and relations to other glycoside hydrolases in clan GH-A. *Biochemistry*, 2002, 41(51): 15135-15143.
- [11] Le Nours J, Ryttersgaard C, Lo Leggio L, østergaard PR, Borchert TV, Christensen LL, Larsen S. Structure of two fungal beta-1,4-galactanases: searching for the basis for temperature and pH optimum. *Protein Science*, 2003, 12(6): 1195-1204.
- [12] Ryttersgaard C, Le Nours J, Lo Leggio L, Jørgensen CT, Christensen LL, Bjørnvad M, Larsen S. The structure of endo-beta-1,4-galactanase from *Bacillus licheniformis* in complex with two oligosaccharide products. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 341(1):107-117.
- [13] Hogg D, Woo EJ, Bolam DN, McKie VA, Gilbert HJ, Pickersgill RW. Crystal structure of mannanase 26A from *Pseudomonas cellulosa* and analysis of residues involved in substrate binding. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 276(33): 31186-31192.
- [14] Bolam DN, Hughes N, Virden R, Lakey JH, Hazlewood GP, Henrissat B, Braithwaite KL, Gilbert HJ. Mannanase A from *Pseudomonas fluorescens* ssp. *cellulosa* is a retaining glycosyl hydrolase in which E212 and E320 are the putative catalytic residues. *Biochemistry*, 1996, 35(50): 16195-16204.
- [15] Sakon J, Adney WS, Himmel ME, Thomas SR, Karplus PA. Crystal structure of thermostable family 5 endocellulase E1 from *Acidothermus cellulolyticus* in complex with cellotetraose. *Biochemistry*, 1996, 35(33): 10648-10660.
- [16] Zhang Y, Ju J, Peng H, Gao F, Zhou C, Zeng Y, Xue Y, Li Y, Ma Y. Biochemical and structural characterization of the intracellular mannanase AaManA of *Alicyclobacillus acidocaldarius* reveals a novel glycoside hydrolase family belonging to GH-A superfamily. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(46): 31551-31558.
- [17] Vasella A, Davies GJ, Böhm M. Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, 6(5): 619-629.

Identification of the catalytic residues of mannanase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*

Shujing Xu¹, Caifeng Zhang², Zhangwei Xue², Guangzheng He², Jiansong Ju^{2*},
Baohua Zhao^{2*}

¹College of Tourism, ²Life College of Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

Abstract: [**Objective**] To identify the catalytic residues of mannanase AaManA from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. [**Methods**] Based on the sequence alignment by ClustalX and ESPript and the structure information of GH – 53 family, the possible catalytic residues were selected and mutated by overlap extension PCR. The protein of wild type and mutant were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and ordinal purified by Ni – NTA affinity chromatography, gel – filtrate chromatography and ion – exchange chromatography. The purified protein was analyzed by thin layer chromatography (TLC) and the dinitrosalicylic acid (DNS) methods for enzyme assay. [**Results**] Seven mutants, E151A, E159A, E231A, C150A, E151Q, E231Q and double mutation E151Q&E231Q were successful constructed. Mutant E159A showed similar activities with wild type, and C150A mutation resulted in only a 3 – fold reduction in the activities, but mutations E151A, E231A, E151Q, E231Q and E151Q&E231Q resulted in sharp decreases or loss in the activities, indicating that Glu151 and Glu231 play critical roles in AaManA activity. Furthermore, the presence of Glu151 at the C terminus of β 4 and Glu231 at the C terminus of β 7 was entirely consistent with the positions of the acid/base catalyst and the nucleophile catalyst of a GH – A enzyme, respectively. [**Conclusion**] By combining the results of TLC and enzyme assay of those mutants and the structural comparisons, it was confirmed that Glu151 and Glu231 fulfilled the roles of an acid/base catalyst and nucleophile catalyst in AaManA, respectively.

Keywords: mannanase, site-directed mutagenesis, active site

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30970628), by the Hebei Province Foundation for Returned Scholars (20100705) and by the Scientific Research Foundation of Hebei Normal University (L2009B13)

* Corresponding author. Tel: +86-311-86268473; E-mail: jujiansong@126.com, zhaobaohua86178@sohu.com

Received: 15 July 2010 /Revised: 25 September 2010