

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (8) :905 -912; 4 August 2014  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.08.008

## 定点突变提高 *N*-酰基高丝氨酸内酯酶酶活和温度稳定性

杨梅, 谢盼盼, 简思美, 林丽玉, 杨彩云

福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350108

**摘要:**【目的】提高 *N*-酰基高丝氨酸内酯酶 (*N*-acylhomoserine lactonase, AiiA) 酶活及温度稳定性。【方法】本研究基于 AiiA 同源蛋白的三维结构对 AiiA 进行定点突变, 分析野生型 AiiA 及其突变蛋白酶活和温度稳定性。【结果】野生型 AiiA 较不稳定, 在 45℃ 下温浴 30 min, 或 4℃ 储存 5 d 后均失去降解 *N*-酰基高丝氨酸内酯 (*N*-acylhomoserine lactone, AHL) 的活性。但是突变 AiiA 蛋白 (N65K, T195R 和 A206E) 的酶活力较野生型 AiiA 均提高了 20% 以上, 且 4℃ 储存时间延长到 7 d。此外, 突变株 N65K 比野生型 AiiA 对高温具有更强的耐受性, 在 45℃ 温浴后剩余酶活力达到 45% 以上, 55℃ 温浴 30 min 后仍保留 5.0% 的酶活力。【结论】通过定点突变改造 AiiA 蛋白结构, 提升了 AiiA 蛋白的酶活和温度稳定性。

**关键词:** *N*-酰基高丝氨酸内酯, *N*-酰基高丝氨酸内酯酶, 酶学特性, 定点突变

**中图分类号:** Q814      **文章编号:** 0001-6209 (2014) 08-0905-08

细菌能自发产生、释放一些特定的信号分子, 感知其浓度变化, 调节微生物的群体行为, 这一调控系统称为群体感应 (quorum sensing, QS)<sup>[1]</sup>。许多细菌利用 QS 系统调控特定的功能, 如铜绿假单胞杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 生物膜的生物合成<sup>[2-3]</sup>; 费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*)<sup>[4-5]</sup> 和哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 的生物发光<sup>[6-7]</sup>; 土壤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 质粒的结合转移<sup>[8-9]</sup>; 一些动、植物的致病菌, 如胡萝卜软腐欧文氏菌 (*Erwinia carotovora*) 毒力因子的表达等<sup>[10-11]</sup>。

植物致病菌大部分是革兰氏阴性细菌<sup>[12]</sup>, 它们的 QS 系统主要利用 *N*-酰基高丝氨酸内酯 (*N*-acylhomoserine lactone, AHL) 作为信号分子。当病原菌释放到环境中 AHL 的浓度达到一定阈值时, 能够诱导致病菌毒力基因的表达, 产生致病性并出现

各种相关的病症<sup>[10-11]</sup>。因此 QS 系统成为该类病原菌防治的重要靶位点。2002 年 Dong 和 Lee 等相继报道了在苏云金芽孢杆菌中广泛存在着 *aiiA* 基因, 其表达的 *N*-酰基高丝氨酸内酯酶 (*N*-acylhomoserine lactonase, AiiA) 能够水解 AHL 的内酯键, 降低 AHL 浓度, 干扰 QS 系统的发生<sup>[13-14]</sup>。利用 AiiA 蛋白干扰细菌 QS 系统有望成为当前该类病害生物防治的一个重要手段<sup>[15]</sup>。

前期对 AiiA 蛋白的研究主要集中在从不同的细菌中克隆 *aiiA* 基因, 并对其表达的 AiiA 蛋白的酶学性质进行研究<sup>[16-20]</sup>, 但是很少研究涉及 AiiA 蛋白的分子改造, 以提高酶活和稳定性, 使其更加适应生产实践的需要。我们在前期从苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) LLB15 中克隆 *aiiA* 基因 (GenBank accession number: DQ440581) 的基础

基金项目: 国家“863 计划”(2011AA10A203); 福建省自然科学基金(2012J01123); 福建省教育厅项目 (JK2012009)

作者简介: 杨梅 (1963 -), 博士, 教授, 主要从事微生物生物化学与分子生物学方面的研究。Tel/Fax: +86-591-2286-8212; E-mail:

myang@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2014-01-05; 修回日期: 2014-01-23

上<sup>[21]</sup>,针对 AiiA 蛋白酶活力低、对热不稳定等特点,通过定点突变,改造和提高 AiiA 蛋白的生物学特性,为促进 AiiA 蛋白在植物细菌病害生物防治中的应用提供技术手段,为深入研究 AiiA 蛋白的结构与功能提供有利的参考数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** AiiA 蛋白大肠杆菌转基因工程菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) -pET29a-*aiaA* 由本实验室构建<sup>[21]</sup>。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** *rTaq* 酶、dNTPs 购自 TaKaRa 公司;KOD plus 聚合酶购自 TOYOBO 公司;限制性内切酶 *Xho* I、*Kpn* I、*Dpn* I 和 DNA ladder Marker 均购自 Promega 公司;其余试剂均为国产分析纯。所用仪器:Waters ACQUITY™ UPLC 超高效液相色谱仪,Amersham Biosciences ABI 2720 PCR 仪。

### 1.2 AiiA 蛋白三维结构模拟

AiiA 蛋白的氨基酸序列与 PDB 数据库中酰基高丝氨酸内酯酶 (PDB ID: 3DHA) 的一致性为 96.4%<sup>[22]</sup>,利用在线三维结构模拟程序 Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/>) 构建 AiiA 蛋白的三维结构,利用 Rasmol v2.7 软件进行蛋白质空间结构的可视化<sup>[23-24]</sup>。

### 1.3 *aiaA* 基因定点突变

采用环状诱变法对 *aiaA* 基因进行定点突变,突变体的筛选及突变引物设计方法参见《分子克隆》<sup>[25]</sup>。定点突变引物见表 1,用 KOD Plus 聚合酶

表 1. 点突变引物

Table 1. Primers for the site-directed mutagenesis

primer	sequence (5'→3')
57U	atgccagaaagt <b>C</b> CAGTTAATAATG
57L	actttctgcatACCTGTATCTAC
62U	ttaataaagaag <b>C</b> GCTTTTTAACGG
62L	cttcattattaaCTGCACTTTCTG
65U	agggcttttaa <b>A</b> GGTACATTTGTG
65L	ttaaaaagccctTCATTATTAACG
195U	atgcatgtaca <b>G</b> GAAAGAGAATTTT
195L	tgtacgatgcatCAATTGTTAATAAAAC
206U	gaagatgaagtgccgttcg <b>A</b> AGGATTTGATCCAG
206L	cgaacggcacttcatttcAAAATTCTCTTT

\* Lower case letters represent complementary sequence of the primers and shadow letters represent mutated sites of *aiaA*.

进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为:94℃ 2 min;94℃ 15 s,59℃ 30 s,68℃ 6 min,25 个循环;68℃ 10 min。PCR 产物加入 1 μL *Dpn* I 酶消化去除模板。将 *Dpn* I 酶处理过的 PCR 产物转化 *E. coli* BL21 (DE3),筛选阳性转化子,质粒 PCR 经酶切鉴定后,送上海生物工程技术有限公司测序。

### 1.4 重组工程菌的培养及诱导

将大肠杆菌重组工程菌一级菌种按 1% 接种量接种于牛肉膏蛋白胨发酵培养基 (3 g 牛肉膏,10 g 蛋白胨,5 g 氯化钠,溶于 1 L 水中,pH 7.0),于 37℃、230 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 0.5,向其加入 IPTG 至终浓度为 0.6 mmol/L,20℃、180 r/min 诱导 20 h。

### 1.5 蛋白质纯化

取 30 mL 经过上述培养和诱导的重组工程菌菌液,7700 × g、5 min 收集菌体,3 mL 高纯水重悬菌体后进行超声波破碎 (工作 5 s,间歇 10 s,工作 60 个循环)。取破壁上清与 1/10 体积的 Ni Sepharose High Performance 混合,4℃ 下轻微震荡 1.5 h 后取沉淀加入淋洗缓冲液 (含 20 mmol/L  $Na_3PO_4$ ,0.5 mol/L NaCl,30 mmol/L 咪唑,pH 7.4) 洗涤两次;4℃、500 × g 离心 3 min 收集沉淀,加入 2 mL 预冷的洗脱缓冲液 (含 20 mmol/L  $Na_3PO_4$ ,0.5 mol/L NaCl,500 mmol/L 咪唑,pH 7.4),4℃ 轻微震荡 20 min 后收集上清即为纯化的目的蛋白。目的蛋白采用 Bradford 法检测蛋白质浓度<sup>[26]</sup>。

### 1.6 AiiA 蛋白活力测定

在 pH 6.5, AHL 为 2.0 mmol/L 的 1 mL 反应体系中,加入适量 AiiA 蛋白,28℃、180 r/min 反应 15 min,沸水浴 10 min 终止反应,采用 UPLC 测 AHL 的消耗量,检测参数为:流动相甲醇:水 = 70% : 30% (V/V),流速 0.3 mL/min,上样量 3 μL,柱温 28℃,检测波长 254 nm。根据 AHL 减少量计算酶活力,酶活力单位 (U) 定义为该反应条件下 1 min 降解 1 μmol AHL 所需的酶量为 1 个酶活力单位 (μmol/min)。

### 1.7 AiiA 蛋白酶学性质测定

**1.7.1 AiiA 蛋白最适作用温度测定:** 在酶活力测定体系中,分别在 20、28、37、45℃ 的条件下,测定酶活力,分析 AiiA 蛋白的最适作用温度。

**1.7.2 pH 对 AiiA 蛋白酶活力的影响:** 在酶活力测

定体系中, 测定 pH 值分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 时的酶活力, 观察 pH 对酶活力的影响。

**1.7.3 AiiA 蛋白的热稳定性测定:** 将纯化后的 AiiA 蛋白 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 分别在 20 $^{\circ}\text{C}$ 、28 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$  温度下保温 30 min 后, 取 1  $\mu\text{g}$  AiiA 蛋白在酶活力测定体系中测定 AiiA 蛋白的剩余酶活力, 观察酶的热稳定性。

**1.7.4 AiiA 蛋白 4 $^{\circ}\text{C}$  储存稳定性:** 将纯化后的 AiiA 蛋白 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 放置于 4 $^{\circ}\text{C}$  中, 每隔 1 d 取样, 测定 AiiA 蛋白的剩余酶活力。

**1.7.5 AiiA 蛋白动力学参数测定:** 在 AHL 浓度分别为 0.6 mmol/L, 1.0 mmol/L, 2.0 mmol/L, 4.0 mmol/L, 6.0 mmol/L 和 8.0 mmol/L, pH 值为 6.5, 28 $^{\circ}\text{C}$  条件下, 测定野生型 AiiA 的酶促反应的初速度  $v$ , 以底物浓度和初速度做双倒数曲线, 计算 AiiA 蛋白酶促反应的米氏常数  $K_m$  值和最大反应速度  $V_{\max}$  值。

## 2 结果和分析

### 2.1 野生型 AiiA 蛋白酶学性质

**2.1.1 野生型 AiiA 蛋白最适作用温度及最适 pH:** 利用 Ni 柱亲和层析获得电泳纯的可溶性 AiiA 蛋白 (图 1)。最适作用温度 (图 2-A) 及最适 pH 分析 (图 2-B) 表明, AiiA 降解 AHL 的最适作用温度为

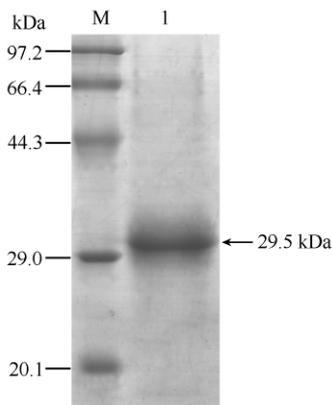


图 1. AiiA 蛋白的镍离子亲和层析纯化

Figure 1. AiiA protein purified with  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA affinity chromatography. M, protein marker; lane 1, purified AiiA protein.

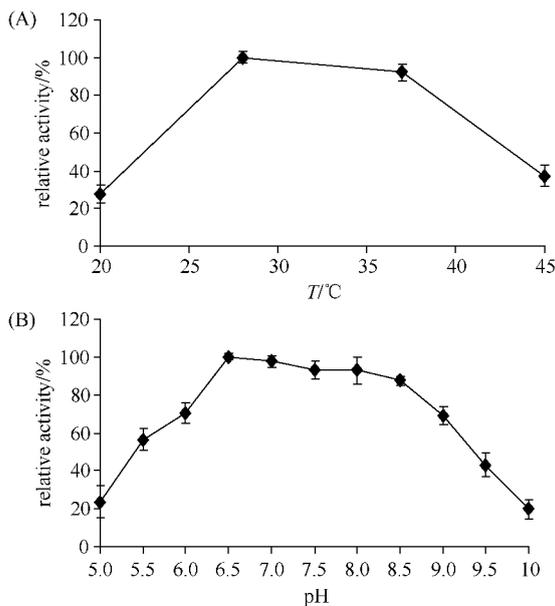


图 2. AiiA 蛋白最适作用温度 (A) 及最适 pH (B)

Figure 2. The optimal temperature (A), optimal pH (B) for AHL-degrading activity.

28 $^{\circ}\text{C}$ , 在 28–37 $^{\circ}\text{C}$  酶活力保持在 90% 以上, 20 $^{\circ}\text{C}$  和 45 $^{\circ}\text{C}$  酶活均在 40% 以下。AiiA 蛋白在温度为 28 $^{\circ}\text{C}$  时的最适 pH 为 6.5, pH 6.5–8.5 时, AiiA 蛋白的酶活力保持在 85% 以上, 且在 pH 5.0–10.0 之间, AiiA 蛋白均具有活力, 表现出较好的 pH 耐受性。

**2.1.2 野生型 AiiA 热稳定性及 4 $^{\circ}\text{C}$  储存稳定性:** AiiA 蛋白热稳定性研究表明 (3-A), 28 $^{\circ}\text{C}$  保温 30 min 后剩余酶活力超过 80%, 但是 37 $^{\circ}\text{C}$  保温 30 min 后, 酶活迅速降低至 19.4%, 45 $^{\circ}\text{C}$  保温 30 min 后即丧失酶活。结果表明 AiiA 蛋白对温度非常敏感。低温 4 $^{\circ}\text{C}$  储存稳定性表明 (3-B), 4 $^{\circ}\text{C}$  环境下储存 1 d, 剩余酶活超过 80%, 1–3 d 之间, 酶活下降较为缓慢, 3 d 后, 酶活迅速降低, 4 d 时酶活只剩余 20.0%, 5 d 后丧失酶活。

**2.1.3 野生型 AiiA 蛋白酶动力学参数:** 测定不同浓度 AHL 下 AiiA 蛋白酶促反应初速度, 以底物浓度和初速度根据双倒数作图法进行 AiiA 蛋白酶动力学分析, 得到 AiiA 蛋白酶促反应的米氏常数  $K_m$  和最大反应速率  $V_{\max}$  分别为 1.25 mmol/L 和 24.51  $\mu\text{mol}/\text{L}/\text{min}$  (图 4)。

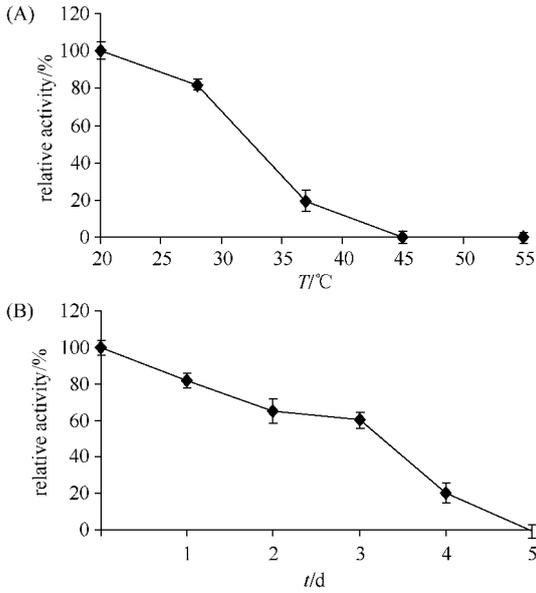


图 3. AiiA 蛋白热稳定性 (A) 及 4°C 储存稳定性 (B)

Figure 3. Thermostability (A) and the stability of AiiA at 4°C storage (B).

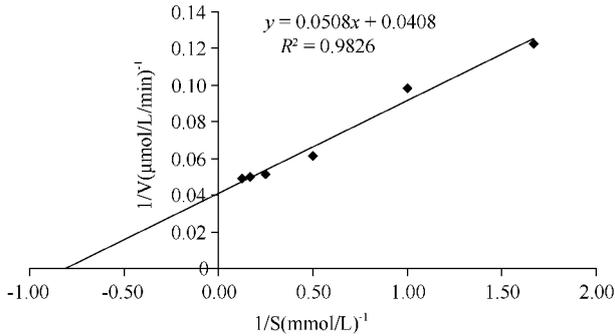


图 4. AiiA 蛋白降解 AHL 酶促反应双倒数曲线

Figure 4. The Lineweaver-Burk double reciprocal plot of AiiA during AHL degradation. V: reaction velocity, S: substrate concentration.

## 2.2 突变 AiiA 蛋白酶学性质

**2.2.1 AiiA 蛋白定点突变:** 定点突变技术是改造和提升酶学特性, 研究目的蛋白结构与功能关系的有效手段。前期研究表明, 通过定点突变在蛋白质分子中引入新的盐桥<sup>[27-28]</sup>, 在蛋白质无规则卷曲处或转角处引入 Pro 增加蛋白质的刚性<sup>[29]</sup>, 以 Ala 替换 Gly, 降低区域柔顺性<sup>[27]</sup> 等均是提高蛋白质稳定性的策略。此外, 通过定点突变改变活性中心与催化反应所需金属离子的结合强度, 也可能在一定程度上提高酶活力及稳定性<sup>[30-33]</sup>。

对模拟的 AiiA 蛋白的空间结构和活性中心位点 (图 5) 进行分析, 结合上述定点突变策略, 利用环

状诱变法对 AiiA 蛋白进行定点突变, 成功获得了 5 株突变株: A57P (Ala57→Pro57), G62A (Gly62→Ala62), N65K (Asn65→Lys65), T195R (Thr195→Arg195), 以及 A206E (Ala206→Glu206)。

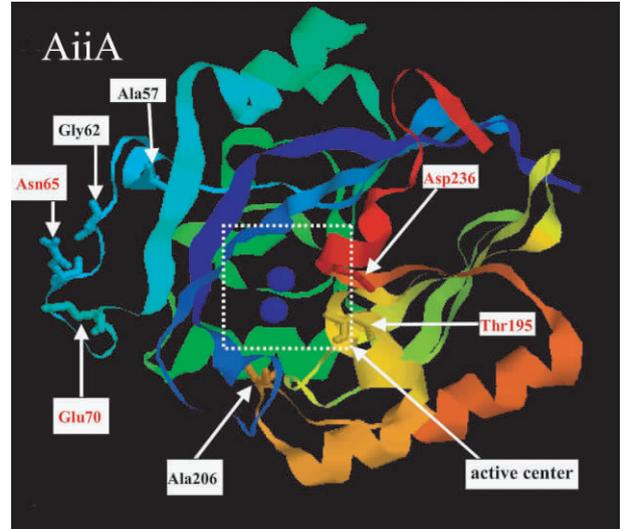


图 5. AiiA 蛋白空间三维结构

Figure 5. The 3-D structures of AiiA. The active center is shown by white rectangular box. The amino acids signed with rubric are amino acids which close to each other.

**2.2.2 突变 AiiA 蛋白酶最适温度分析:** 重组突变株经培养、IPTG 诱导和蛋白质纯化 (图 6) 后进行酶学性质分析。突变 AiiA 蛋白最适温度 (图 7) 分析表明, 与野生型 AiiA 蛋白相比, 在 28 °C 下, 5 株突变蛋白除了 A57P 酶活降低外, G62A、N65K、T195R 和 A206E 蛋白酶活分别提高了 29.8%、23.1%、41.9% 和 34.4%。突变蛋白 A57P、G62A、N65K 和 T195R 的最适作用温度没有发生改变, 均为 28 °C, 但是 A206E 的最适温度提高到 37 °C, 比野生型增加了 9 °C。AiiA 蛋白是金属离子结合蛋白, 其活性中心 (His104、His106、Asp108、His109、His169、Asp191、Tyr194 和 His235) 与  $Zn^{2+}$  结合后发挥底物结合的能力<sup>[22]</sup>。将活性中心位点附近的 Ala206 突变成带负电荷的 Glu, 可能使 AiiA 蛋白与  $Zn^{2+}$  的结合力提高, 从而提高 AiiA 蛋白酶与底物的结合能力, 有利于其在温度较高的情况下与底物结合。

**2.2.3 突变 AiiA 蛋白酶热稳定性测定:** 蛋白酶热稳定性 (图 8) 分析表明, 37 °C 温浴 30 min 后 5 株突变蛋白剩余蛋白酶活均超过 65%, 较野生型 AiiA 蛋白有了明显提高, 45 °C 保温 30 min 后, 突变蛋白除了 A57P 外, 其余 4 株突变蛋白 G62A、N65K、

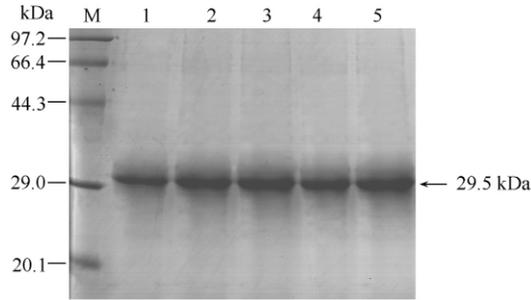


图 6. 突变 AiiA 蛋白的镍离子亲和层析纯化

Figure 6. AiiA mutants purified with  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA affinity chromatography. M, protein marker; lane 1 to 5, purified AiiA mutants (1: A57P; 2: G62A; 3: N65K; 4: T195R; 5: A206E).

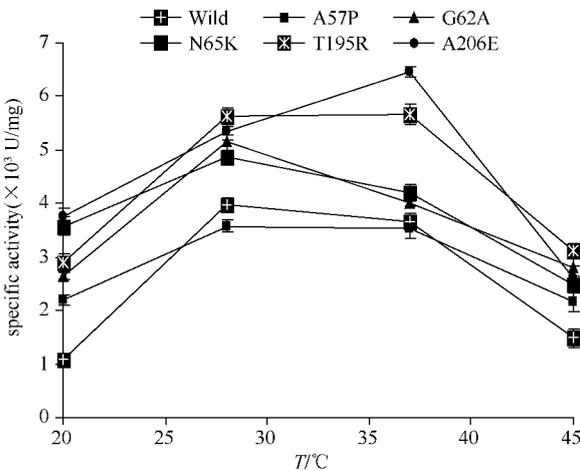


图 7. 突变 AiiA 蛋白最适作用温度

Figure 7. Optimal temperatures for the AiiA mutants.

T195R 和 A206E 仍保留 15% 以上的酶活力。非常有意思的是, 突变蛋白 N65K 和 A206E 有更高的热稳定性, A206E 在 45°C 保温 30 min 后, 剩余酶活力超过 65%, 而只有 N65K 在 55°C 温浴 30 min 后仍具有 5.0% 的剩余酶活力。AiiA 三维结构中, Asn65 与 Glu70 相邻, 处于活性中心外围, Glu 拥有一个带负电荷的羧基。将 Asn 突变成带正电荷的 Lys, 使两者之间可能形成盐桥, 增加蛋白质结构的稳定性。实验结果表明, 增加 AiiA 蛋白分子内盐桥, 对提高该酶的热稳定性有显著效果。

**2.2.4 突变 AiiA 蛋白酶 4°C 储存稳定性:** 4°C 储存稳定性 (图 9) 表明, 储存 4 d 后, 5 株突变蛋白的剩余酶活力均仍有 40% 以上, 4°C 储存 5 d 后, 突变蛋白 A57P、N65K、T195R 和 A206E 均具有 25% 以上的剩余酶活力。表明定点突变后, 5 株突变蛋白的

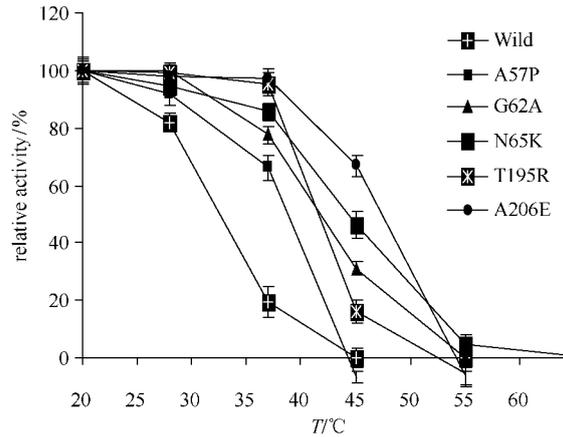


图 8. 突变蛋白热稳定性

Figure 8. Thermostability of the AiiA mutants.

4°C 储存稳定性有了明显提高, 尤其是突变株 T195R, 4°C 储存 7 d 后其剩余酶活力仍有 21.2%。Thr195 和 Asp236 在空间结构上也相互靠近, 且位于活性中心附近, 将 Thr195 突变成 Arg, 从而在这两个氨基酸间建立盐桥。实验结果表明, 在 AiiA 蛋白分子内引入盐桥, 有助于 AiiA 4°C 储存稳定性的提高, 然而降低 AiiA 分子区域柔顺性 (Gly62 → Ala62) 并不能很好地改善 AiiA 的低温稳定性。

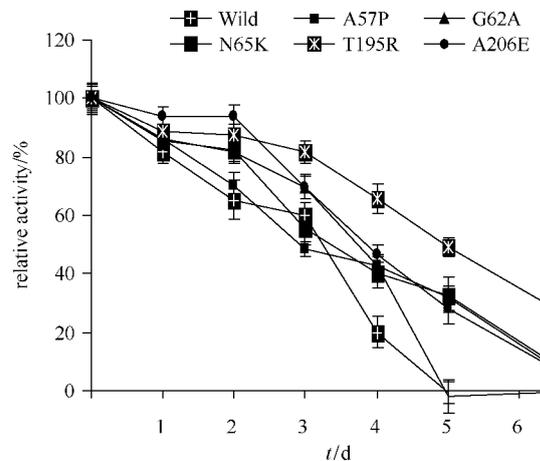


图 9. 突变蛋白 4°C 储存稳定性

Figure 9. The stabilities at 4°C of the AiiA mutants.

### 3 讨论

本研究结果表明野生型 AiiA 蛋白最适温度为 28°C, 最适 pH 为 6.5, AiiA 蛋白能够耐受较大的 pH 范围。早期研究<sup>[19-20]</sup> 也表明酰基高丝氨酸内酯酶 AidC 和 AiiM 均具有较广的 pH 耐受性。但是, 野生

型 AiiA 蛋白于 37℃ 作用 30 min 后活性降低 80.6%, 45℃ 作用 30 min 后丧失活性。此外, 野生型 AiiA 于 4℃ 储存 3 d 后活性迅速降低, 5 d 后丧失降解底物的活性, 表明野生型 AiiA 蛋白对温度敏感、稳定性差, 与邱健等<sup>[34]</sup>的研究结果相一致。而 AiiA 蛋白酶的酶活和温度稳定性是其是否能够应用于农业生产中的关键。

前期研究<sup>[27]</sup>表明利用定点突变技术进行分子改造可以提高目的蛋白的温度稳定性和酶活力。Watanabe 等<sup>[35]</sup>认为 Pro 对嗜热菌酶的热稳定性有至关重要的作用; Mabrouk 等<sup>[27]</sup>通过在淀粉酶结构中引入盐桥, 有效提高了淀粉酶的热稳定性; Bunting 等<sup>[30]</sup>通过定点突变对超氧化物歧化酶活性中心位点进行突变, 有效改善了酶与底物的结合, 提高酶活力。为了提高 AiiA 蛋白酶的酶活和温度稳定性, 本文利用定点突变技术对 AiiA 蛋白进行分子改造。实验结果表明, 对 AiiA 蛋白进行分子改造有效提高了其酶活和温度稳定性。突变蛋白 N65K, T195R 和 A206E 降解底物 AHL 的活力均显著提高, 28℃ 下酶活均比野生型 AiiA 提高了 23% 以上。4℃ 储存稳定性延长, 特别 N65K 同时获得了高的热稳定性。另外, 研究结果表明突变蛋白 A206E 不仅提高了温度稳定性, 同时提高了 AiiA 蛋白的酶活, 提示活性中心位点附近的氨基酸可以作为分子改造蛋白酶的有效突变位点。然而本研究发现, 将 AiiA 蛋白 Ala57 突变成 Pro, 并不能如预期显著提高其热稳定性, 突变体蛋白 A57P 在 45℃ 时同野生型 AiiA 一样丧失酶活, 而将 Gly62 突变成 Ala 也没有延长其 4℃ 储存稳定性, 提示在 AiiA 蛋白中引入 Pro 和 Ala 以提高蛋白质的刚性可能并不是提高其酶活和温度稳定性的有效手段。

本研究表明定点突变技术是改造 AiiA 蛋白酶的分子结构, 提高酶学性质, 使其更加适合农业生产应用的有效手段。同时本研究建立了基于蛋白质三维空间结构, 选取有效突变位点的方法。虽然我们还没有足够的证据来说明某一位点突变引起酶学性质改变的确切机制, 但是我们的研究为 AiiA 蛋白酶学性质的提高提供了新的思路, 为酰基高丝氨酸内酯酶的分子改造提供了新的技术手段。

## 参考文献

[1] Yeon KM, Cheong WS, Oh HS, Lee WN, Hwang BK,

Lee CH, Beyenal H, Lewandowski Z. Quorum sensing: a new biofouling control paradigm in a membrane bioreactor for advanced wastewater treatment. *Environmental Science & Technology*, 2008, 43 (2): 380-385.

- [2] Abbas A, Adams C, Scully N, Glennon J, O'Gara F. A role for TonB1 in biofilm formation and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 274 (2): 269-278.
- [3] Vikström E, Tafazolli F, Magnusson KE. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells. *FEBS Letters*, 2006, 580 (30): 6921-6928.
- [4] Antunes LCM, Schaefer AL, Ferreira RB, Qin N, Stevens AM, Ruby EG, Greenberg EP. Transcriptome analysis of the *Vibrio fischeri* LuxR-LuxI regulon. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189 (22): 8387-8391.
- [5] Stevens AM, Greenberg E. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179 (2): 557-562.
- [6] Nackerdien ZE, Keynan A, Bassler BL, Lederberg J, Thaler DS. Quorum sensing influences *Vibrio harveyi* growth rates in a manner not fully accounted for by the marker effect of bioluminescence. *PLoS One*, 2008, 3 (2): e1671.
- [7] Pompeani AJ, Irgon JJ, Berger MF, Bulyk ML, Wingreen NS, Bassler BL. The *Vibrio harveyi* master quorum-sensing regulator, LuxR, a TetR-type protein is both an activator and a repressor: DNA recognition and binding specificity at target promoters. *Molecular Microbiology*, 2008, 70 (1): 76-88.
- [8] Cho H, Winans SC. TraA, TraC and TraD autorepress two divergent quorum-regulated promoters near the transfer origin of the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Microbiology*, 2007, 63 (6): 1769-1782.
- [9] Lowe N, Gan HM, Chakravarty V, Scott R, Szegedi E, Burr TJ, Savka MA. Quorum-sensing signal production by *Agrobacterium vitis* strains and their tumor-inducing and tartrate-catabolic plasmids. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 296 (1): 102-109.
- [10] Barnard AM, Bowden SD, Burr T, Coulthurst SJ, Monson RE, Salmond GP. Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2007, 362 (1483): 1165-1183.

- [11] Zhao C, Zeng H, Yu Z, Sun M. *N*-Acyl homoserine lactonase promotes prevention of *Erwinia* virulence with Zwittermicin A-producing strain *Bacillus cereus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 100 (3) : 599-603.
- [12] De Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity*, 2000, 68 (9) : 4839-4849.
- [13] Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL, Zhang LH. Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (4) : 1754-1759.
- [14] Lee SJ, Park SY, Lee JJ, Yum DY, Koo BT, Lee JK. Genes encoding the *N*-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (8) : 3919-3924.
- [15] Van Kessel JC, Ulrich LE, Zhulin IB, Bassler BL. Analysis of activator and repressor functions reveals the requirements for transcriptional control by LuxR, the master regulator of quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *mBio*, 2013, 4 (4) : e00378-13.
- [16] Da Silva Araújo FD, Esper LMR, Kuaye AY, Sircili MP, Marsaioli AJ. *N*-Acyl-homoserine Lactones from *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and Their Degradation by *Bacillus cereus* Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60 (2) : 585-592.
- [17] Mahmoudi E, Naderi D, Venturi V. AiiA lactonase disrupts *N*-acylhomoserine lactone and attenuates quorum-sensing-related virulence in *Pectobacterium carotovorum* EMPCC. *Annals of Microbiology*, 2013, 63 : 691-697.
- [18] Park SY, Lee SJ, Oh TK, Oh JW, Koo BT, Yum DY, Lee JK. AhlD, an *N*-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology*, 2003, 149 (6) : 1541-1550.
- [19] Wang WZ, Morohoshi T, Ikenoya M, Someya N, Ikeda T. AiiM, a novel class of *N*-acylhomoserine lactonase from the leaf-associated bacterium *Microbacterium testaceum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (8) : 2524-2530.
- [20] Wang WZ, Morohoshi T, Someya N, Ikeda T. AidC, a novel *N*-acylhomoserine lactonase from the potato root-associated *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* (CFB) group bacterium *Chryseobacterium* sp. strain StRB126. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (22) : 7985-7992.
- [21] Yang M, Zhang F, Lin B, Su X, Guo L, Huang Z, Guan X. Soluble expression of AiiA protein and analysis of its antimicrobial activity. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2008, 41 (6) : 465-472. (in Chinese)  
杨梅, 张锋, 林彬辉, 苏新华, 郭丽清, 黄志鹏, 关雄. AiiA 蛋白的可溶性表达及其抗菌活性研究. 分子细胞生物学报, 2008, 41 (6) : 465-472.
- [22] Liu D, Momb J, Thomas PW, Moulin A, Petsko GA, Fast W, Ringe D. Mechanism of the Quorum-Quenching Lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 1. Product-Bound Structures. *Biochemistry*, 2008, 47 (29) : 7706-7714.
- [23] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 2006, 22 (2) : 195-201.
- [24] Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31 (13) : 3381-3385.
- [25] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manua*. 3<sup>rd</sup> eds. NewYork: Cold Spring Laboratory Press, 2001.
- [26] Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry*, 1996, 236 (2) : 302-308.
- [27] Mabrouk SB, Aghajari N, Ali MB, Messaoud EB, Juy M, Haser R, Bejar S. Enhancement of the thermostability of the maltogenic amylase MAUS149 by Gly312Ala and Lys436Arg substitutions. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (2) : 1740-1746.
- [28] Zhang SB, Wu ZL. Identification of amino acid residues responsible for increased thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* using the PoPMuSiC algorithm. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (2) : 2093-2096.
- [29] Wang Z, Chen T, Ma X, Shen Z, Zhao X. Enhancement of riboflavin production with *Bacillus subtilis* by expression and site-directed mutagenesis of *zuf* and *gnd* gene from *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (4) : 3934-3940.
- [30] Bunting K, Cooper J, Badasso MO, Tickle IJ, Newton M, Wood SP, Zhang Y, Young D. Engineering a change in metal-ion specificity of the iron-dependent superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*. *European*

*Journal of Biochemistry*, 1998, 251 (3) : 795-803.

- [31] Chen Y, Chou W, Chang G. Characterization of the interactions between Asp141 and Phe236 in the  $Mn^{2+}$ -L-malate binding of pigeon liver malic enzyme. *Journal of Biochemistry*, 2003, 374 : 633-637.
- [32] Obradors N, Cabisco E, Aguilar J, Ros J. Site-directed mutagenesis studies of the metal-binding center of the iron-dependent propanediol oxidoreductase from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 258 (1) : 207-213.
- [33] Yin J, Shan L, Song D, Zhong J. Site-directed mutagenesis of the zinc-binding domain of *Trichoplusia ni* granulovirus enhancin. *Acta Entomologica Sinica*, 2007, 50 (11) : 1111-1115. (in Chinese)  
尹隽, 单梁, 宋大新, 钟江. 粉纹夜蛾颗粒体病毒增强蛋白锌离子结合域定点突变. 昆虫学报, 2007, 50 (11) : 1111-1115.
- [34] Qiu J, Li C, Jia Z, Zhang X, Ma H, Song S. Enzymatic characterization and function of *N*-acylhomoserine lactonase SS10. *Acta Phytopathol Sinica*, 2007, 37 (6) : 629-636. (in Chinese)  
邱健, 李承光, 贾振华, 张霞, 马宏, 宋水山. 酰基高丝氨酸内酯酶 SS10 的酶学特性及其抗软腐病功能的初探. 植物病理学报, 2007, 37 (6) : 629-636.
- [35] Watanabe K, Chishiro K, Kitamura K, Suzuki Y. Proline residues responsible for thermostability occur with high frequency in the loop regions of an extremely thermostable oligo-1, 6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidarius* KP1006. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266 (36) : 24287-24294.

## Enhancement of enzyme activity and thermostability of *N*-acylhomoserine lactonase by site-directed mutagenesis

Mei Yang<sup>\*</sup>, Panpan Xie, Simei Jian, Liyu Lin, Caiyun Yang

College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, Fujian Province, China

**Abstract:** [Objective] To enhance enzymatic activity and thermostability of *N*-acylhomoserine lactonase (AiiA). [Methods] We performed site-directed mutagenesis based on AiiA homologous 3-D protein structure, and analyzed enzymatic activity and thermostability of both wild type and mutated AiiA. [Results] The wild type AiiA lost its *N*-acylhomoserine lactone (AHL) degrading activity after being incubated at 45°C for 30 min or after being stored at 4°C for 5 days. By comparison, the AHL-degrading activities of three types of mutated AiiA (N65K, T195R, and A206E) were enhanced, and their storage periods at 4°C were extended to 7 days. In addition, the N65K mutant acquired higher temperature tolerance with remain of more than 45% of its enzymatic activity after being incubated at 45°C and 5.0% enzymatic activity after being incubated at 55°C as compared to the wild type. [Conclusion] Molecular modulation by site-directed mutagenesis could significantly improve enzymatic activity and thermostability of AiiA.

**Keywords:** *N*-acylhomoserine lactone, *N*-acylhomoserine lactonase, enzymatic characterization, site-directed mutagenesis

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2011AA10A203), by the Projects from the Scientific Foundation of Fujian Province (2012J01123) and by the Education Department of Fujian (JK2012009)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel/Fax: +86-591-2286-8212; E-mail: myang@fjnu.edu.cn

Received: 5 January 2014/ Revised: 23 January 2014