

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (10):1273–1283; 4 October 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20150015

枯草芽孢杆菌 β -糖苷酶的克隆表达、体外定向进化及结构模拟

刘震¹, 陈倩¹, 陈荫楠¹, 王祖鑫¹, 朱秋享^{1,2}, 石贤爱^{1,2,3*}

¹ 福州大学生物科学与工程学院, 福建 福州 350108

² 福州大学药物生物技术与工程研究所, 福建 福州 350002

³ 福建省医疗器械和医药技术重点实验室, 福建 福州 350002

摘要: 【目的】从枯草芽孢杆菌基因组 DNA 中扩增出 *bglC* 基因并在大肠杆菌中表达, 分析表达产物的酶学性质并进行结构模拟, 为进一步研究其生理功能及结构解析奠定基础。【方法】将 *bglC* 基因克隆到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 中表达, 通过定向进化获取水解效率提高的突变株, 经 Ni-NTA 镍离子层析柱纯化后, 测定野生枯草芽孢杆菌 β -糖苷酶与突变酶的性质。利用 CD 光谱, 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及三维结构建模, 分析野生酶与突变酶的高级结构。【结果】野生酶的比活力为 9.7 U/mg, 最适催化温度为 60 °C, 最适 pH 值是 7.0。经过突变和筛选, 我们得到一个突变体 BS-GLY_M1 (A242T/T385A/S425L), 其比活力达到 17.1 U/mg, 最适温度为 55 °C, 最适 pH 值是 7.0, 在 55 °C 下的半衰期为 3.5 h, 比野生酶增加 2 h。突变酶对 4-硝基苯基- β -半乳糖苷、乳糖和熊果苷的催化效率 (K_m/K_{cat}) 有所提高。酶在天然条件下以二聚体、四聚体状态存在, 推测它以二聚体为基本功能单位。结构模拟结果表明突变后酶的三维结构有轻微地变化, 这可能是酶热稳定性和催化效率提高的原因。【结论】枯草芽孢杆菌 β -糖苷酶可以在大肠杆菌中高效表达并可以通过定向进化提高其水解效率。

关键词: 异源表达, 易错 PCR, 底物特异性, CD 光谱, 寡聚体, 结构建模

中图分类号: Q814 文章编号: 0001-6209 (2015) 10-1273-11

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 全基因组序列^[1] 中编码 6-磷酸- β -葡萄糖苷酶 (Pbgl, EC 3.2.1.86) 的基因有 5 个: *bglA*、*bglH*、*bglC* (旧称 *yckE*)、*bglD* (旧称 *ydhP*) 和 *licH*^[2-4]。6-磷酸- β -葡萄糖苷酶被归类于糖苷水解酶家族 1 和 4 中, 家族 1 的酶具有典型的 (α/β)₈ 结构域, 催化过程中不需要辅酶或辅因子的协助^[5], 家族 4 的酶需要在辅因子 Mn_2^+ 和 NAD^+ 的帮助下才能发挥作用^[6-7]。*bglA*、*bglH*、*bglC*、*bglD* 编码的酶都属于家族 1, *bglA*

和 *bglH* 编码的酶占枯草芽孢杆菌 6-磷酸- β -葡萄糖苷酶总活性的 95% 以上, 这 2 个基因都处在特定的操纵子控制之下, 受到 β -糖苷的诱导会增加表达量。*bglC* 编码的酶不受 β -糖苷的诱导, 水解活性远低于 *bglA* 和 *bglH* 编码的酶, 但仅表达该酶的突变株可以在 β -糖苷作为唯一碳源的培养基上正常生长, 此外该酶的热稳定性要优于其它酶。仅含有 *bglD* 的突变株不能在 β -糖苷作为唯一碳源的培养基上生长^[2,8-10]。*licH* 编码的酶基本没有活性, 它

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项子课题 (201205022-3), 福建省科技重大专项 (2013NZ0003)

* 通信作者。Tel: +86-591-22866379; E-mail: shixa@fzu.edu.cn

作者简介: 刘震 (1989-), 男, 河南驻马店人, 硕士研究生, 研究方向为蛋白质工程。E-mail: 504912491@qq.com

收稿日期: 2015-01-11; 修回日期: 2015-04-02

与来源于腾冲嗜热厌氧菌 (*Thermoanaerobacter tengcongensis*) 家族 4 的 6-磷酸- β -葡萄糖苷酶的氨基酸序列一致性为 62%^[11], 应为家族 4 的 6-磷酸- β -葡萄糖苷酶。

枯草芽孢杆菌为何要用 *bglA*、*bglH* 和 *bglC* 编码同一功能的糖苷水解酶, 这似乎不符合基因进化的原则, 虽然没有文献明确指出这 3 种酶的区别, 但不难推测它们必然有功能上的差异。本文发现, *bglC* 基因编码的酶有较宽的底物谱, 能够水解多种 β -糖苷, 经测定该酶对 4-硝基苯基-6-磷酸- β -半乳糖苷 (*pNP-6P-Gal*) 的催化效率 (K_{cat}/K_m) 为 18.1 (mmol/L)⁻¹/min, 而对 4-硝基苯基- β -半乳糖苷的 K_{cat}/K_m 为 25.3 (mmol/L)⁻¹/min, 因此本文的观点是将该酶定性为 β -糖苷酶, 即枯草芽孢杆菌 β -糖苷酶 (BS-GLY)。由于不易获取 6-磷酸- β -葡萄糖苷底物, 我们没有详细比较 BS-GLY 水解这两类糖苷的差异。

本文是首次从枯草芽孢杆菌 168 株总基因组中克隆出 BS-GLY 的基因并在大肠杆菌中表达, 表达产物经过镍柱纯化比活力达到 9.7 U/mg, 并以 β -半乳糖苷为底物研究了野生酶的基本性质。经过体外随机突变, 得到热稳定性和催化活性提高的突变体, 通过三维结构建模对突变体的立体构象变化进行了分析, 研究结果为枯草芽孢杆菌 β -糖苷酶的结构解析与功能机制研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: *Bacillus subtilis* strain 168, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α , *E. coli* BL21 (DE3), pUC19 质粒, pET28a (+) 质粒, 均由本实验保存。

1.1.2 培养基: 自动诱导 LB 培养基 (ALB): 改进自 Studier^[12] 的自动诱导型培养基, 以常用 LB 培养基为基础, 使用前加入无菌的乳糖 0.2%, 葡萄糖 0.05%, 用于自动诱导 *bglC* 基因的表达。

筛选培养基: 以常用 LB 培养基为基础, 使用前加入卡那霉素至终浓度 50 μ g/mL, IPTG 0.1 mmol/L, X-gal 0.1 mmol/L, 用于筛选表达 BS-GLY 的阳性克隆子

1.1.3 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Pfu* DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶均购自

Thermo 公司; 基因组 DNA 快速抽提试剂盒 (细菌)、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒均购自上海生工有限公司; DNA Marker、高分子量蛋白质标准购自于 TaKaRa 公司; Ni-NTA Agarose 购自 QIAGEN 公司; 葡萄糖测定试剂盒 (氧化酶法) 购自上海荣盛药业有限公司; 4-硝基苯基- β -葡萄糖苷 (*pNP-Glc*)、4-硝基苯基- β -半乳糖苷 (*pNP-Gal*)、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-gal) 及其他生化试剂购自于上海生工有限公司和 Sigma 公司。TC-96H 型 PCR 仪, 购于杭州博日科技有限公司; DYY-6C 型电泳仪, 购于北京六一仪器厂; ELx808 型酶标仪, 购于美国柏腾股份公司; MOS-450 型圆二色性光谱仪, 购于法国比奥罗杰公司。

1.1.4 引物合成及测序服务: 由上海生工有限公司完成。

1.2 野生型 *bglC* 基因的克隆

根据 GenBank 中登记的基因序列, 设计上游引物 *bglC*_F: 5'-CATGAAGCTTCCATGGCAATGATCC ACCAGCATCCAG-3' (含酶切位点 *Hind* III, 划线部分和 *Nco* I, 斜黑体部分), 下游引物: *bglC*_R: 5'-CGC GAATTCGATAAACTTTCTCCGTTTGTCTT-3' (含酶切位点 *Eco*R I, 划线部分), 以 *Pfu* DNA 聚合酶进行高保真 PCR 扩增。PCR 产物纯化回收后, 经 *Hind* III 和 *Eco*R I 消化后与 pUC19 质粒连接, 连接产物电转化 *E. coli* DH5 α , 电转产物涂布于筛选培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 出现蓝色斑的菌落即为阳性克隆, 提取阳性克隆子质粒 (命名为 pUC/*bglC*), 酶切验证并测定插入片段序列。

1.3 BS-GLY 的体外随机突变及高效筛选

以 pUC/*bglC* 质粒为模板, 参考 Kim 等^[13-14] 的方法, 通过易错 PCR 对野生型 *bglC* 基因进行随机突变。易错 PCR 产物经 *Hind* III 和 *Eco*R I 消化后与 pUC19 连接构建随机突变体库, 电转化 *E. coli* DH5 α 。挑取蓝色斑比较明显的单克隆子接种到含 200 μ L/孔自动诱导培养基的 96 微孔板中, 37 $^{\circ}$ C, 250 r/min 培养 10 h 左右, 使用酶标仪测定每孔的 *OD*₆₀₀ 值。随后, 每孔中加入溶菌酶至终浓度 1 mg/mL, 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 孵育 30 min, 室温静置 20 min 后取 20 μ L 上清, 加入到另一个含 180 μ L 的 *pNP-Gal* 底物的 96 孔板中, 55 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 酶标仪测定 *OD*₄₀₅ 值, *OD*₄₀₅/*OD*₆₀₀ 值最大的克隆子即为所

得突变体。

1.4 BS-GLY 的诱导表达及分离纯化

质粒 pUC/bglC 经 *Nco* I 和 *Eco*R I 消化后与 pET28a 连接, 转化 *E. coli* BL21 (DE3)。挑取阳性克隆子接种到 1.5 L 的 LB 液体培养基 (含终浓度 50 μ g/mL 的卡那霉素) 中, 37 $^{\circ}$ C, 220 r/min 条件下培养至 OD_{600} 值至 0.6 左右, 加入 IPTG 至终浓度 0.25 mmol/L 继续培养 10 h。离心收集菌体, 经 pH7.0 的 50 mmol/L 磷酸二氢钠缓冲液 (PB 缓冲液) 洗涤后, 重悬沉淀。加入溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL, 4 $^{\circ}$ C 放置 30 min, 然后 -80 $^{\circ}$ C 冷冻 30 min, 37 $^{\circ}$ C 水浴迅速解冻, 重复冻融 1-2 次彻底裂解菌体, 离心后上清即为粗酶液。用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化重组 BS-GLY, 目标洗脱液于 PB 缓冲液中透析除去咪唑, 经超滤离心管浓缩得纯酶液。纯化后的酶使用 SDS-PAGE 进行检测与鉴定, Bradford 法^[15] 对重组酶进行蛋白质定量。

1.5 野生酶和突变酶的基本酶学性质

1.5.1 水解活性的测定方法: 用 50 mmol/L 磷酸二氢钠缓冲液 (pH7.0) 配制各种 β -糖苷底物, 除 CMC 和 β -葡聚糖底物浓度为 2% 外, 其他 β -糖苷底物的浓度都是 10 mmol/L。取 0.1 mL 适当稀释的纯酶液, 加入到提前预热的 10 mmol/L *pNP-Gal* 的底物中, 55 $^{\circ}$ C 反应 10 min 后, 加入 2.9 mL 的 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应, 测定 405 nm 波长的吸光度值, 计算出 *pNP* 的生成量。葡萄糖生成量的测定, 按照葡萄糖测定试剂盒 (氧化酶法) 使用说明书的方法进行。定义: 在 55 $^{\circ}$ C, pH7.0 的条件下, 每分钟水解 1 μ mol β -半乳糖苷底物或者生成 1 μ mol 半乳糖所需酶量为 1 个活力单位。

1.5.2 温度对重组酶催化活性的影响: 以 *pNP-Gal* 为底物, 测定 20-80 $^{\circ}$ C 之间野生型重组酶的催化活力。

1.5.3 pH 对重组酶催化活性的影响: 以 *pNP-Gal* 为底物, 在 55 $^{\circ}$ C 条件下测定 pH 3-11 之间野生型重组酶的催化活力。

1.5.4 底物谱: 在 55 $^{\circ}$ C, pH7.0 条件下, 测定野生型酶与突变酶对各种 β -糖苷底物的相对催化活性。

1.5.5 催化动力学: 用 50 mmol/L 磷酸二氢钠缓冲液 (pH7.0) 将 *pNP-Gal*、乳糖、熊果苷分别稀释到 0.1-50.0 mmol/L 之间, 55 $^{\circ}$ C 反应 5 min 后, 测定 OD_{405} 值, 计算出反应初速度 V_0 。根据 M-M 方程模

型分析重组 BS-GLY 的动力学特征, L-B 双倒数作图法求出重组酶 K_{cat} 、 K_m 等参数。

1.5.6 抑制动力学: 以乳糖为底物, 将其浓度固定在 5 mmol/L, 改变抑制剂 *pNP-Gal* 的浓度, 研究其动力学特征。

1.6 Native-PAGE 分析

参考夏其昌等^[16] 的方法, 分析 BS-GLY 在天然状态下的寡聚状态和活性。考虑到 BS-GLY 的性质, 我们将配制分离胶和浓缩胶缓冲液的 pH 统一调成 7.5, 浓缩阶段的电流为 10 mA/胶, 分离阶段为 15 mA/胶, 电泳在室温下进行。电泳结束后, 立即将胶块侵入 55 $^{\circ}$ C 预热的 5 mmol/L 的 X-gal 溶液中染色 20 min, 观察染色情况, 胶块脱色后进行考马斯亮蓝 R250 复染分析。

1.7 CD 色谱

纯化后的野生酶和突变酶经反复透析, 尽量除去其它离子, 然后调节 2 种酶的浓度为 0.5 mg/mL, 分为远紫外区域 (190-250 nm) 和近紫外区域 (250-320 nm) 对样品进行 CD 光谱扫描。远紫外区光谱使用 0.1 cm 光程石英比色皿, 近紫外区光谱使用 1 cm 光程石英比色皿。以 50 mmol/L 磷酸氢二钠空白缓冲液进行基线校准, 每个光谱数据取 3 次扫描的平均值, 扫描时间常量为 2 s, 扫描速度为 0.5 nm/s。远紫外区域的摩尔椭圆率 ($[\theta]$) 用平均残基摩尔椭圆率计算, 每个残基的分子量按 115 计算; 远紫外区域的 $[\theta]$ 用单体分子摩尔椭圆率计算, 每个单体分子的分子量按 57000 计算。酶的二级结构预测由 DICROPROT 软件的 K2D 神经网络算法程序进行。

1.8 BS-GLY 的三维结构建模与分析

将 BS-GLY 的蛋白质序列提交给 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>), 选用自动模式 (Automated Mode) 建立枯草芽孢杆菌 β -糖苷酶的三维结构模型。用 SPDBV4.0^[17] 软件对枯草芽孢杆菌 β -糖苷酶的三维结构进行编辑和分析。

2 结果和分析

2.1 bglC 基因的序列特征

测序结果表明, 成功从枯草芽孢杆菌 168 总 DNA 中扩增出 1434 bp 的 *bglC* 基因片段, 插入到 pUC19 载体上, 扩增出的目的基因序列与报道的序

列完全一致。经预测,该基因没有革兰氏阴性菌信号肽序列,在大肠杆菌中只能在胞内表达。BS-GLY 基因在其天然宿主中的表达量受到密码子偏性的影响,其密码子适应指数(CAI,一般用于预测内源基因的表达水平)^[18] 低于 *bglA* 和 *bglH*,表明 BS-GLY

的表达量低于 *bglA* 和 *bglH*,这与已报道的结果相符。当使用 *E. coli* 宿主时,BS-GLY 的密码子偏爱指数(CBI,反映外源基因在目的宿主中的表达水平)^[19] 升高,这说明使用 *E. coli* 宿主很有可能会提高 BS-GLY 的表达量(表 1)。

表 1. 枯草芽孢杆菌 β -糖苷酶基因的密码子偏性

Table 1. The codon bias of BS-GLY

| Gene | <i>B. subtilis</i> | | | <i>E. coli</i> | | | GC3s | GC |
|-------------|--------------------|--------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|
| | CAI | CBI | Fop | CAI | CBI | Fop | | |
| <i>bglA</i> | 0.432 | -0.034 | 0.374 | 0.300 | 0.107 | 0.492 | 0.477 | 0.452 |
| <i>bglH</i> | 0.440 | 0.007 | 0.386 | 0.291 | 0.085 | 0.482 | 0.469 | 0.460 |
| <i>bglC</i> | 0.424 | -0.015 | 0.373 | 0.247 | 0.017 | 0.441 | 0.385 | 0.432 |

2.2 随机突变体库的筛选

从约 5000 个蓝色阳性克隆中,挑取 192 个蓝色比较明显的克隆子到 96 微孔板进行定量分析,最后共选出 3 个 OD_{405}/OD_{600} 值最高的突变体。测序结果表明它们是相同的突变体,与野生酶相比共有 3 个氨基酸残基发生变化:A242T, T322A 和 S425L。

2.3 BS-GLY 的分离纯化及 SDS-PAGE 分析

通过单因素实验发现,0.25 mmol/L 的 IPTG 诱导浓度可以使可溶性重组酶的表达量达到最大。加入诱导物后,37 °C,200 r/min 条件下 8 h 重组酶表达量即可达到最大,8 - 14 h 之内表达量基本保持不变。粗酶液经镍离子亲和层析柱纯化,可回收 29.6% 的野生型重组酶,纯化倍数达到 15 倍。突变酶的酶活回收率和纯化倍数略低于野生酶,分别为 25.3% 和 13 倍,这可能是由于镍离子亲和层析柱重复使用后柱效下降导致。

纯化后的酶已达到较高的纯度,SDS-PAGE 结果只有一条带,大小在 57 - 58 kDa 之间(图 1),*bglC* 基因编码的枯草芽孢杆菌 β -糖苷酶的理论分子量为 55.1 kDa,加上 N 端融合的 Met-Gly 和 C 端增加的 20 个氨基酸,理论分子量为 57.5 kDa,与实验结果相符。

2.4 野生酶与突变酶的基本性质

结果表明(图 2),BS-GLY 是一种较耐热的 β -糖苷酶。野生酶在 45 - 65 °C 之间都有较高的活性,在 60 °C 左右催化效率最高,55 °C 条件下酶的半衰期约为 1.5 h。突变酶的最适催化温度略有下降,为 55 °C,此温度下的半衰期在 3.5 h 以上。突变后,酶的最适催化温度降低,热稳定性反而明显提高,因为

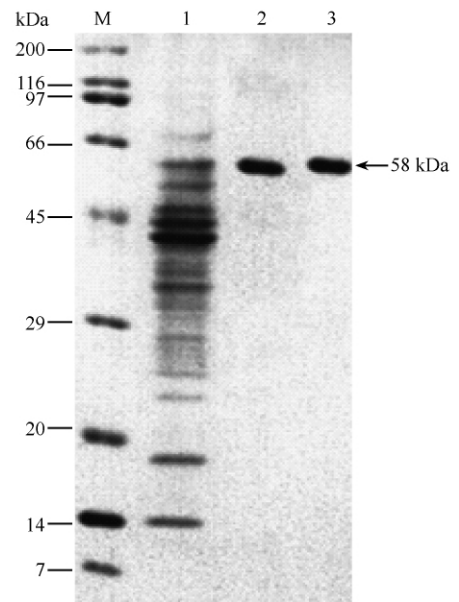


图 1. 重组枯草芽孢杆菌 β -糖苷酶的蛋白电泳分析

Figure 1. Protein electrophoresis of recombinant BS-GLY. M: protein marker; 1: Crude extract; 2: Purified wild-type enzyme; 3: Purified mutant enzyme.

酶的最适催化温度与活性中心的构象有关,BS-GLY 的活性中心位于分子内部,受到保护,热稳定性则与酶的整体构象有关,有时一个氨基酸残基的变化就可能导致整体构象发生极大的变化。我们克隆得到的 β -糖苷酶与 Kuo 等^[20] 从纳豆枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* natto NTU-18) 中克隆得到的不耐热 β -糖苷酶(YeckE) 和 Suzuki 等^[21] 从嗜热地芽孢杆菌 (*Geobacillus kaustophilus* HTA426) 中克隆得到的耐热性 β -糖苷酶(GK3214) 蛋白质序列一致性分别为 98% 和 71%,然而最适反应温度更加接近 GK3214。

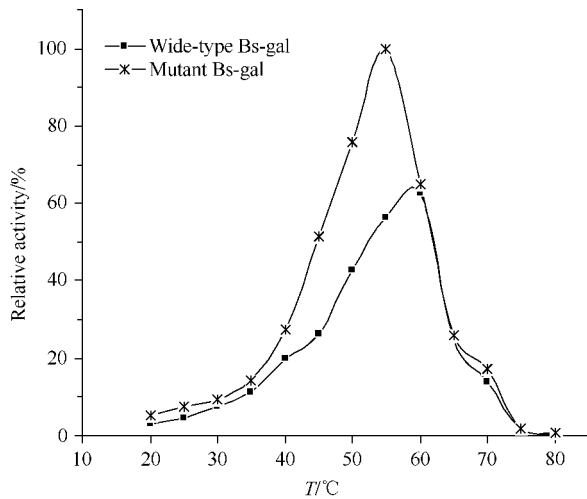


图 2. 温度对野生酶和突变酶的影响

Figure 2. Effect of temperature on the activity of wide-type and mutant BS-GLY. The optimal temperature for the enzyme activity was determined by assay at pH7.0, with 10 mmol/L *pNP-Gal* as a substrate.

野生酶与突变酶的最适 pH 都是 7.0, 其中野生酶对高 pH 的耐受性较强, 在 pH6-10 范围内仍保持较高活力 (图 3)。

GH 家族 1 的 β -糖苷酶一般具有较宽的底物谱, 本实验选取包括 α -葡萄糖苷、 β -葡萄糖苷、 β -半乳糖苷和 β -呋喃果糖苷的 10 种不同糖苷, 研究野

生型 BS-GLY 以及突变酶对它们的催化活性。结果发现, 突变后酶对 6-磷酸- β -葡萄糖苷底物的催化能力反而降低, 野生酶和突变酶对 β -半乳糖苷如 *pNP-Gal*、乳糖、X-gal (数据未列出) 有很高的活性, 对 α -葡萄糖苷、 β -呋喃果糖苷基本没有活性, 突变后的进化酶对 β -葡萄糖苷 (Arbutin) 表现出微弱的活性, 具体数据列于表 2。

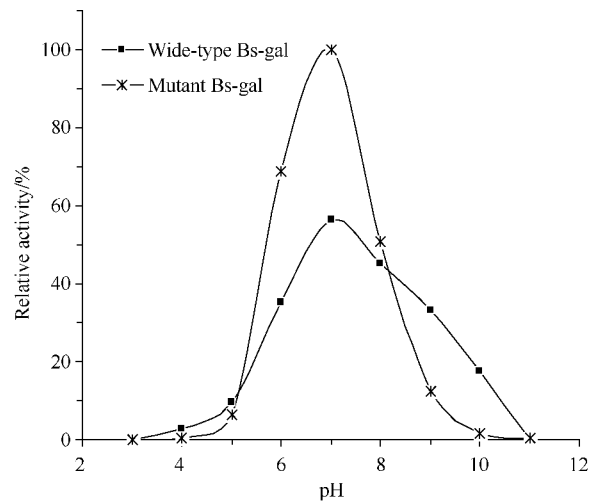


图 3. pH 对野生酶和突变酶的影响

Figure 3. Effect of pH on the activity of wide-type BS-GLY and mutant BS-GLY. The optimal pH for the enzyme activity was determined by assay at 55 °C, with 10 mmol/L *pNP-Gal* as a substrate.

表 2. 野生酶与突变酶对不同 β -糖苷底物的活性

Table 2. Enzymatic activity with different glycosides as substrates

| Substrates | Specific activity (U/mg) | | |
|---------------------------|--------------------------|---------------|--------|
| | Wild type enzyme | Mutant enzyme | |
| β -glucoside | <i>pNP-Glc</i> | 0.008 | 0.013 |
| | Cellobiose | 0.046 | 0.036 |
| | Salicin | 0.035 | 0.042 |
| | Arbutin | 0.054 | 0.220 |
| | β -glucan | 0.023 | 0.030 |
| | CMC | 0.030 | 0.023 |
| β -galactoside | <i>pNP-Gal</i> | 9.690 | 17.120 |
| | Lactose | 5.190 | 7.650 |
| β -fructofuranoside | Sucrose | 0.033 | 0.032 |
| α -glucoside | Maltose | 0.027 | 0.035 |

Abbreviations: *pNP-Gal*: p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside; *pNP-Glc*: p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside; CMC: carboxymethyl cellulose.

2.5 BS-GLY 的动力学特征

突变后的酶对 *pNP-Gal* 的 K_m 值明显降低, 对乳糖的 K_m 影响不大, 但对两者的 K_{cat} 都显著提高 (见表 3)。突变后的酶与野生酶相比对 *pNP-Gal*、乳糖、熊果苷的催化效率整体提高, 其中对熊果苷的催化效率提高 10 倍以上。由此推测, 突变残基的改变使

酶的活性中心构象发生变化, 对 β -糖苷的催化能力提高。野生酶和突变酶对 *pNP-Gal* 和乳糖都有很高的催化活性, 然而两者的动力学特征有明显的差异, 野生酶和突变酶对 *pNP-Gal* 的 K_{cat} 远高于乳糖, 而 K_m 却低于乳糖。根据家族 1 的 β -糖苷酶的催化机制, 我们推测, 虽然乳糖更适合与 BS-GLY 的活性中

心糖苷结合位点结合,但是 *pNP-Gal* 的半乳糖苷配基比乳糖更容易离去,形成的糖-酶复合物中间体更加稳定,反应能垒低,反应速率提高,最终酶对 *pNP-Gal* 的催化效率更高。在高底物浓度时,野生型

BS-GLY 对乳糖的动力学为底物抑制动力学,抑制系数为 24.3 mmol/L,突变后的 BS-GLY 则对 *pNP-Gal* 表现底物抑制现象,抑制系数为 14.3 mmol/L,熊果苷为饱和动力学。

表 3. 野生酶和突变酶的动力学参数比较

Table 3. Comparison of the kinetic parameters of wide-type and mutant BS-GLY^a

| Enzymes | Substrates | $K_{cat}/$ (min^{-1}) | $K_m/$ (mmol/L) | $K_{cat}/K_m/$ [(mmol/L) ⁻¹ /min] | Behavior (at high substrate concentration) |
|------------------------|----------------|-------------------------------------|-------------------------------|--|--|
| BS-GLY_WT ^b | <i>pNP-Gal</i> | 653.2 ± 10.0 | 0.431 ± 0.02 | 1515.5 | Saturation |
| | Lactose | 151.3 ± 12.0 | 0.150 ± 0.05 | 1008.7 | Substrate inhibition $K_i = 24.3 \text{ mmol/L}$ |
| | Arbutin | ND ^c | ND | 2.3 | Saturation |
| BS-GLY_M ^d | <i>pNP-Gal</i> | 803.8 ± 12.0 | 0.279 ± 0.02 | 2871.4 | Substrate inhibition $K_i = 14.3 \text{ mmol/L}$ |
| | Lactose | 201.2 ± 20.0 | 0.144 ± 0.05 | 1397.2 | Saturation |
| | Arbutin | 2.7 ± 0.2 | 0.267 ± 0.01 | 10.1 | Saturation |

^a: Values are the mean of three repeated trials with each substrate, and the error was below 10%; ^b: Wide-type BS-GLY; ^c: ND, not determined; ^d: Mutant BS-GLY.

2.6 乳糖与 *pNP-Gal* 的竞争性抑制

BS-GLY 具有家族 1 糖苷水解酶的典型特征,可以被葡萄糖酸- δ -内酯抑制,当 10 mmol/L 乳糖存在时,*pNP-Gal* 的动力学表现出竞争性抑制特征。重

排竞争性抑制动力学方程得: $\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{\max} [S]} \frac{[I]}{K_i} +$

$\frac{K_m}{v_{\max} [S]} + \frac{1}{v_{\max}}$, 当酶的活性部位与一个抑制剂分子

结合时, $1/v_0$ 与 $[I]$ 的关系为一条直线,称为线形竞争性抑制;如果酶的活性部位与 2 个以上的抑制剂分子相结合,则 $1/v_0$ 与 $[I]$ 的关系为一条抛物线称为抛物线形竞争性抑制。然而乳糖与 *pNP-Gal* 相互竞争结果是 $1/v_0$ 与 $[I]$ 的关系为一条反抛物线(图 4),只有当 2 个或 2 个以上的活性部位与一个抑制剂分子结合时才会出现这样的现象。唯一的合理解释就是:BS-GLY 以 2 个或 2 个以上相同亚基作为活性功能单位。许多家族 1 的糖苷水解酶都是以二聚体作为功能单位。

2.7 Native-PAGE

从不同染色方法得到的结果可见,BS-GLY 在天然非变性条件下,以二、四聚体形式存在,并以二聚体状态为主。BS-GLY 的二聚体和四聚体都有催化活性(图 5),这佐证了前面竞争性抑制结果的推论,因此我们进一步推测 BS-GLY 的基本功能单位是二聚体。据 Jeng 等^[22]报道,来源于 *Clostridium cellulovorans* 的 β -葡萄糖苷酶 BglA (PDB:3ahx, 结构已知的与 BS-GLY 相似性最高的糖苷水解酶)在晶体状态下是四聚体,至于 BS-GLY 晶体条件下是否

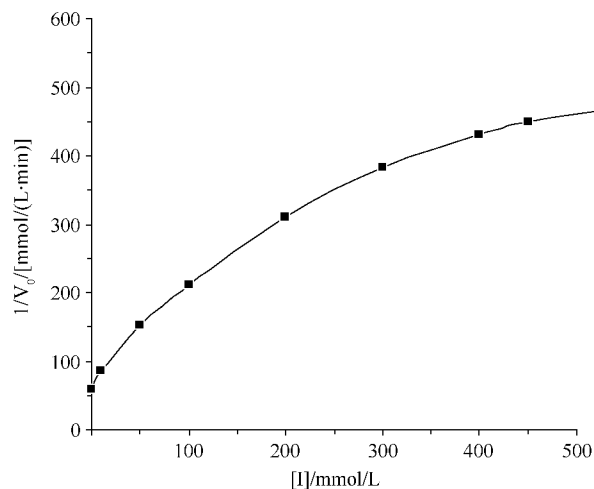


图 4. *pNP-Gal* 对乳糖的竞争性抑制

Figure 4. The competitive inhibition of *pNP-Gal* on lactose.

也为四聚体,在溶液状态时又多数解离为二聚体,尚不确定。

2.8 CD 光谱

远紫外区的 CD 色谱可以反映酶的二级结构构成,通过 K2D 算法得出的野生酶与突变酶的 α -helix, β -sheet 和 aperiodic 结构见表 4,结果显示组成规则的 α -helix/ β -sheet 二级结构的氨基酸占全部残基的一半左右,它们的 α -helix 含量远高于 β -sheet,但是野生酶与突变酶的二级结构构成没有明显差异,这或许因为突变的 3 个氨基酸都不在酶结构的敏感位置上。在近紫外区域,野生酶与突变酶的酪氨酸特征区 (275 nm 左右) 谱线基本一致,突变酶略有起伏波形,两者在 278 nm 处达到负椭圆率极大

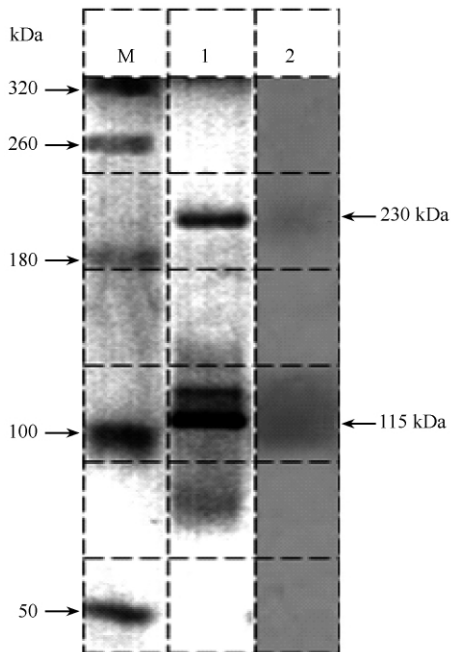


图 5. 枯草芽孢杆菌 β -糖苷酶的非变性聚丙烯酰胺电泳分析

Figure 5. Native-PAGE of BS-GLY. M: protein marker; 1: purified BS-GLY, dyed by coomassie brilliant blue R250; 2: purified BS-GLY, dyed by X-gal.

值。看起来似乎 A242T 和 T322A 突变对酶的构象没有带来任何影响,实际上还有一种可能:这两个完

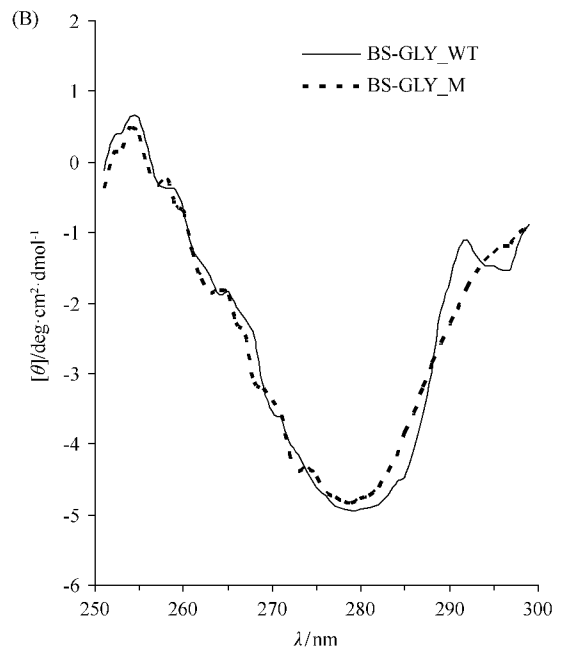
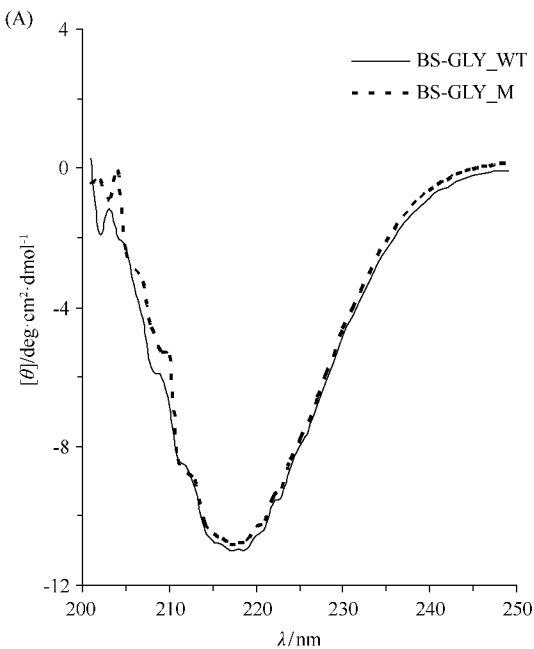


图 6. 野生型和突变型重组酶的 CD 色谱

Figure 6. The CD spectra in the far-UV and near-UV regions of BS-GLY_WT and BS-GLY_M. CD spectra for BS-GLY_WT and BS-GLY_M recorded in the far-UV (A) and near-UV (B) regions.

全相反的突变引起的变化相互抵消,无法在 CD 光谱上表现出来。在色氨酸特征区(290 nm 左右),突变酶的椭圆率低于野生酶(图 6-B),这说明在突变酶构象中色氨酸侧链的不对称性更为明显,但具体有如何的变化无法单从 CD 光谱上得知。单从 CD 光谱的结果,我们无法从二、三级结构上解释突变体性质的变化,因此我们只能推测,酶的热稳定性变化可能是突变后分子内氢键或其它相互作用变化导致的,催化效率的提高,可能是活性中心关键氨基酸侧链构象的微小变化引起的。

表 4. 野生酶和突变酶的二级结构

| Enzymes | Secondary structure / % | | Aperiodic structure / % |
|-----------|-------------------------|----------------|-------------------------|
| | α -helix | β -sheet | |
| BS-GLY_WT | 0.30 | 0.17 | 0.53 |
| BS-GLY_M | 0.32 | 0.14 | 0.54 |

2.9 BS-GLY 的三维结构建模

经序列比对,BS-GLY 与来源于嗜纤维杆菌 (*Clostridium cellulovorans*) 的 β -葡萄糖苷酶 A (BglA, PDB:3AHX) 的序列一致性最高,为 43.4%,以 3AHX 为模板建立 BS-GLY 的三维结构(图 7-A)。BS-GLY 的三维结构中 共有 20 个 α 螺旋(Helix)和 15 个 β 片层(Sheet)结构,含有典型 $(\alpha/\beta)_8$ 桶状结

构域,我们推测两个谷氨酸残基 E170 和 E378 分别担任质子供体和亲核试剂的功能。BS-GLY 与 CcbglA 的三级结构十分相似,除少数无规则卷曲结构外, α 螺旋和 β 折叠等二级结构基本一致,然而 BS-GLY 的稳定性和催化特性却与 CcbglA 有明显差异,这除了计算机模拟建模的误差,还说明蛋白质酶功能与结构关系十分复杂。突变残基 A242T 位于

BS-GLY 第 12 个 α 螺旋靠近中间的位置,处于分子表面,这与我们 CD 光谱得到的结果相悖;T322A 位于第 4 个 β 片层末端的无规则卷曲上,处于蛋白质内部;S425L 则位于第 19 和第 20 个 α 螺旋之间的无规则卷曲上,位于酶的活性口袋区。A242T 和 T322A 离活性中心很远,S425L 比较接近活性中心(图 7-B)。

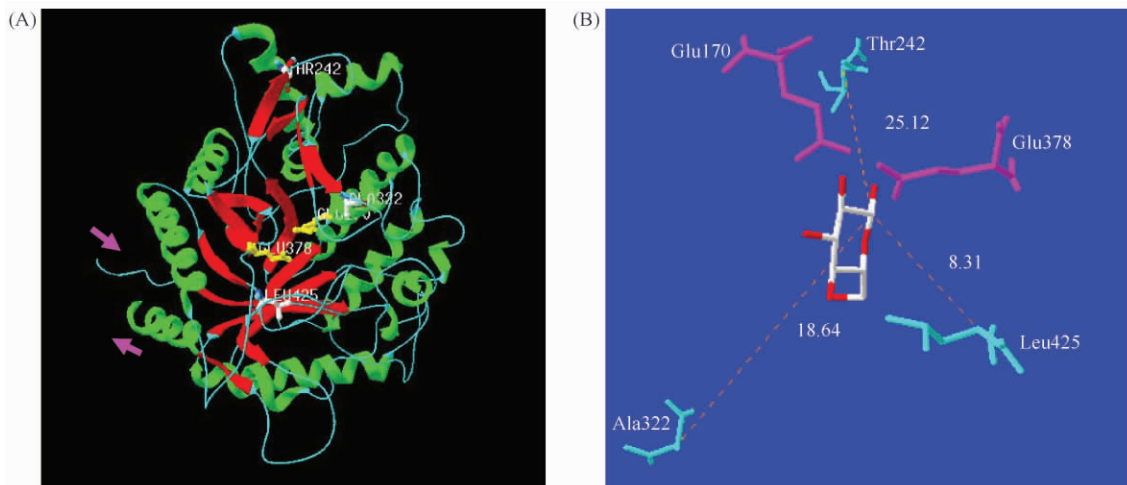


图 7. 枯草芽孢杆菌 β -糖苷酶的模建结构和突变残基位置

Figure 7. Model structure of the BS-GLY and the positions of mutations. A: Shown is the secondary structure elements of BS-GLY. β -sheets are represented as orange arrows, α -helices as blue spirals. The catalytic amino acids are represented in yellow, three positive mutations are depicted in CPK coloring with carbon atoms in white, nitrogen atoms in blue, and oxygen atoms in red. B: Glucose of substrate is colored in green, the catalytic amino acids in magenta, and the mutations in cyan. Distance between two atoms shown by yellow short dash line.

3 讨论

突变体中 3 个氨基酸的替换都会导致分子内氢键的变化, A242T 形成两个新的氢键(图 8-B), Gly326 和 Pro334 分别位于分子表面的第 11 和第 12 个 β -strand 上,它们临近 Thr242 所处的 α -helix,这样增强了 3 个二级元件之间的相互作用,很可能会提高酶的热稳定性。T322A 和 S425L 分别导致一个氢键的丢失,虽然如此,但他们都处于无规则卷曲上,并且丢失的氢键没有在 α -helix 和 β -sheet 上,不会对热稳性有明显影响。

突变体酶的底物专一性变化可能是由于突变氨基酸残基对底物进入隧道空间构象的影响导致的。我们推测,距离活性中心最近的突变点 S425L,在突变后原本带有羟基极性氨基酸变成侧链较大的非极性亮氨酸,这很有可能导致活性中

心的构象发生变化,使酶的底物专一性改变。从突变前后酶活性中心的构象拟合(图 9-A)可以看出,丝氨酸突变成亮氨酸之后,Trp424 和 Glu378 的构象有微弱的变化。局部放大图(图 9-B)表明,突变前 Glu378 侧链羟基氧与葡萄糖底物配体 C1 之间的距离是 1.69 Å,突变后变为 1.62 Å;Trp424 侧链 7 号碳与葡萄糖底物配体碳 4 之间的距离是 3.47 Å,突变后变为 3.65 Å,这微小的变化很可能就是导致突变酶底物专一性改变的原因。我们进一步推测,Trp424 的构象变化导致突变酶对 *pNP-Gal*、乳糖等的底物亲和性(K_m)变化, Glu378 极其微弱的构象变化导致酶对 *pNP-Gal*、乳糖等的催化活性(K_{cat})的改变。然而,也可能是位置较远的 T322A 和 A242T 对酶构象产生影响,要确定是哪一残基的影响以及使构象发生何种变化,还需要进行定点突变以及晶体衍射分析研究,我们会在以后的报道中讨论。

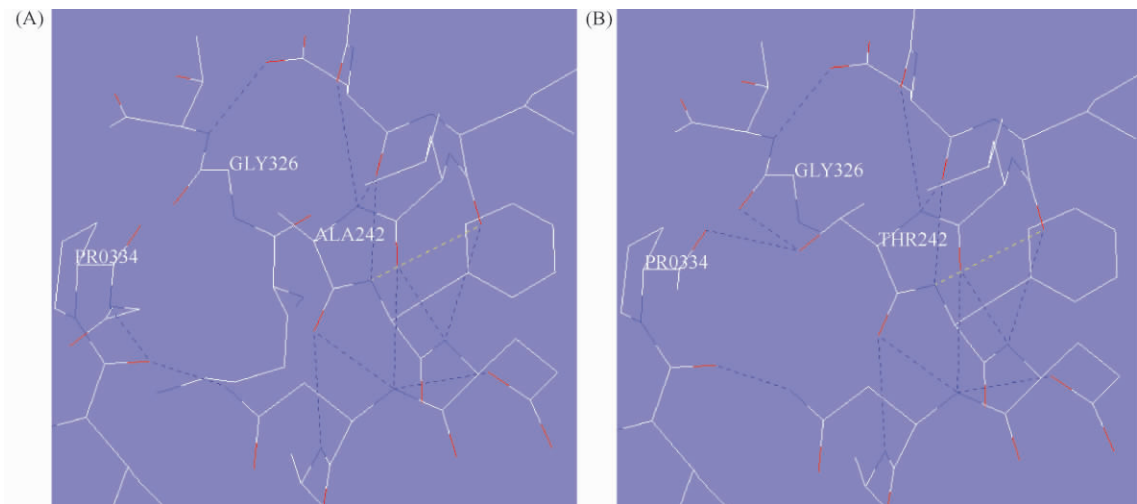


图 8. 突变前后枯草芽孢杆菌 β -糖苷酶的分子内氢键变化

Figure 8. The change of hydrogen bond in BS-GLY around mutation. A: The hydrogen bonds of Ala242 before mutation. B: The hydrogen bonds of Thr242 after mutation.

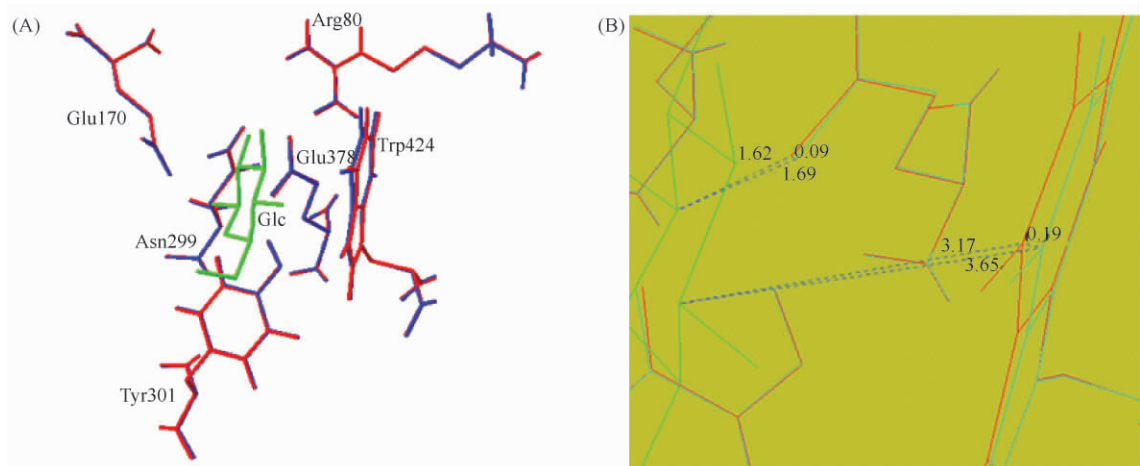


图 9. 活性中心的构象变化

Figure 9. Conformational changes of active site. A: The amino acids of mutant enzyme shown by blue ball and stick, and the amino acids of wide-type enzyme shown by red ball and stick. Glucose of substrate is colored in green; B: The amino acids of mutant enzyme shown by cyan line, and the amino acids of wide-type enzyme shown by red line. Yellow short dash line represents distance between two atoms.

参考文献

[1] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessières P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Cordani JJ, Connerton IF, Cummings NJ, Daniel RA, Denzlot F, Devine KM, Düsterhöft A, Ehrlich SD, Emmerson PT, Entian KD, Errington J, Fabret C, Ferrari E, Foulger D, Fritz C, Fujita M, Fujita Y, Fuma S, Galizzi A, Galleron

N, Ghim SY, Glaser P, Goffeau A, Golightly EJ, Grandi G, Guiseppe G, Guy BJ, Haga K, Haiech J, Harwood CR, Hènaut A, Hilbert H, Holsappel S, Hosono S, Hullo MF, Itaya M, Jones L, Joris B, Karamata D, Kasahara Y, Klaerr-Blanchard M, Klein C, Kobayashi Y, Koetter P, Koningstein G, Krogh S, Kumano M, Kurita K, Lapidus A, Lardinois S, Lauber J, Lazarevic V, Lee SM, Levine A, Liu H, Masuda S, Mauël C, Médigue C, Medina N, Mellado RP, Mizuno M, Moestl D, Nakai S, Noback M, Noone D, O'Reilly M, Ogawa K, Ogiwara A, Oudega B, Park SH, Parro V, Pohl TM,

- Portelle D, Porwollik S, Prescott AM, Presecan E, Pujic P, Purnelle B, Rapoport G, Rey M, Reynolds S, Rieger M, Rivolta C, Rocha E, Roche B, Rose M, Sadaie Y, Sato T, Scanlan E, Schleich S, Schroeter R, Scoffone F, Sekiguchi J, Sekowska A, Seror SJ, Serron P, Shin BS, Soldo B, Sorokin A, Tacconi E, Takagi T, Takahashi H, Takemaru K, Takeuchi M, Tamakoshi A, Tanaka T, Terpstra P, Togoni A, Tosato V, Uchiyama S, Vandebol M, Vannier F, Vassarotti A, Viari A, Wambutt R, Wedler H, Weitzenegger T, Winters P, Wipat A, Yamamoto H, Yamane K, Yasumoto K, Yata K, Yoshida K, Yoshikawa HF, Zumstein E, Yoshikawa H, Danchin A. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 1997, 390 (6657) : 249-256.
- [2] Setlow B, Cabrera-Hernandez A, Cabrera-Martinez RM, Setlow P. Identification of aryl-phospho- β -D-glucosidases in *Bacillus subtilis*. *Archives of Microbiology*, 2004, 181 (1) : 60-67.
- [3] Setlow B, Cabrera-Martinez RM, Setlow P. Mechanism of the hydrolysis of 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside by germinating and outgrowing spores of *Bacillus species*. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96 (6) : 1245-1255.
- [4] Tobisch S, Glaser P, Kruger S, Hecker M. Identification and characterization of a new beta-glucoside utilization system in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology*, 1997, 179 (2) : 496-506.
- [5] Michalska K, Tan K, Li H, Hatzos-Skintges C, Bearden J, Babnigg G, Joachimiak A. GH1-family 6-P- β -glucosidases from human microbiome lactic acid bacteria. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 2013, 69 (3) : 451-463.
- [6] Yip VLY, Varrot A, Davies GJ, Rajan SS, Yang XJ, Thompson J, Anderson WF, Withers SG. An unusual mechanism of glycoside hydrolysis involving redox and elimination steps by a family 4 β -glucosidase from *Thermotoga maritima*. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126 (27) : 8354-8355.
- [7] Varrot A, Yip VLY, Li YS, Rajan SS, Yang XJ, Anderson WF, Thompson J, Withers SG, Davies GJ. NAD⁺ and metal-ion dependent hydrolysis by family 4 glycosidases: structural insight into specificity for phospho- β -D-glucosides. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 346 (2) : 423-435.
- [8] Zhang JK, Arthur A. A *Bacillus subtilis* *bglA* gene encoding phospho- β -glucosidase is inducible and closely linked to a NADH dehydrogenase-encoding gene. *Gene*, 1994, 140 (1) : 85-90.
- [9] Krüger S, Hecker M. Regulation of the putative *bglPH* operon for aryl- β -glucoside utilization in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177 (19) : 5590-5597.
- [10] Krüger S, Gertz S, Hecker M. Transcriptional analysis of *bglPH* expression in *Bacillus subtilis*: evidence for two distinct pathways mediating carbon catabolite repression. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178 (9) : 2637-2644.
- [11] Yin J, Liu YW, Li J, Ma YH, Xiang H, Yan JH, Gao F. Cloning, expression, crystallization and characterization of a novel 6-phospho- β -glucosidase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Chinese Journal Biochemistry Molecular Biology*, 2008, 24 (10) : 916-924. (in Chinese)
尹捷, 刘一苇, 李洁, 马延和, 向华, 严景华, 高福. 腾冲嗜热厌氧杆菌 6-磷酸- β -葡萄糖苷酶的表达与结晶及其功能鉴定. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008, 24 (10) : 916-924.
- [12] Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 2005, 41 (1) : 207-234.
- [13] Kim YW, Lee SS, Warren RAJ, Withers SG. Directed evolution of a glycosynthase from *Agrobacterium* sp. increases its catalytic activity dramatically and expands its substrate repertoire. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (41) : 42787-42793.
- [14] Liu WJ, Hong J, Bevan DR, Zhang YHP. Fast identification of thermostable beta-glucosidase mutants on cellobiose by a novel combinatorial selection/screening approach. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 103 (6) : 1087-1094.
- [15] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72 (1/2) : 248-254.
- [16] Xia QC, Zhang XM, Zhou ZJ, Ruan HQ. Technical guide of protein electrophoresis. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 19-23. (in Chinese)
夏其昌, 张祥民, 周仲驹, 阮宏强. 蛋白质电泳技术指南. 北京: 化学工业出版社, 2007: 19-23.
- [17] Guex N, Peitsch MC, Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis*, 2009, 30 (S1) : S162-S173.
- [18] Sharp PM, Li WH. The codon adaptation index—a measure

of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15 (3): 1281-1295.

- [19] Morton BR. Chloroplast DNA codon use: evidence for selection at the psb A locus based on tRNA availability. *Journal of Molecular Evolution*, 1993, 37 (3): 273-280.
- [20] Kuo LC, Lee KT. Cloning, expression, and characterization of two β -glucosidases from isoflavone glycoside-hydrolyzing *Bacillus subtilis* natto. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56 (1): 119-125.
- [21] Suzuki H, Okazaki F, Kondo A, Yoshida KI. Genome

mining and motif modifications of glycoside hydrolase family 1 members encoded by *Geobacillus kaustophilus* HTA426 provide thermostable 6-phospho- β -glycosidase and β -fucosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97 (7): 2929-2938.

- [22] Jeng WY, Wang NC, Lin MH, Lin CT, Liaw YC, Chang WJ, Liu CI, Liang PH, Wang AHJ. Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *Journal of Structural Biology*, 2011, 173 (1): 46-56.

Cloning, expression, directed evolution *in vitro* and structural simulation of β -glycosidase from *Bacillus subtilis*

Zhen Liu¹, Qian Chen¹, Yinnan Chen¹, Zuxin Wang¹, Qiuxiang Zhu^{1,2}, Xian'ai Shi^{1,2,3*}

¹ College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350108, Fujian Province, China

² Institute of Pharmaceutical Biotechnology and Engineering of Fuzhou University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

³ Fujian Key Laboratory of Medical Instrument and Pharmaceutical Technology, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

Abstract: [Objective] To further study physiological functions and structure of β -glycosidase, we cloned the *bgIC* gene of *Bacillus subtilis* and expressed it in *E. coli* BL21 (DE3), followed by the characterization and structural simulation of the enzyme. [Methods] We amplified the *bgIC* gene and transferred it into *E. coli* BL21 (DE3), then we obtained a mutant with higher hydrolytic activity by directed evolution. After purifying the enzymes through a nickel-nitrilotriacetic acid agarose column, we characterized the wild-type and mutant enzymes. By means of CD spectrum, Native-PAGE and protein 3-D structure modeling, we analyzed the higher structure of the β -glycosidase. [Results] We got one mutant enzyme BS-GLY_M1 (A242T/T385A/S425L) with improved hydrolytic activity by directed evolution and screening. The specific activity of wild-type enzyme was 9.7 U/mg, with optimum temperature at 60 °C and optimum pH at 7.0. The specific activity of BS-GLY_M1 was 17.1 U/mg, with optimum temperature at 55 °C and optimum pH at 7.0. Moreover, the half-life time of the mutant enzyme at 55 °C was 3.5 h, 2 h longer than that of wild-type enzyme. Furthermore, the catalytic efficiency (K_m/K_{cat}) of BS-GLY_M1 on the substrates 4-nitrophenyl- β -galactoside, lactose, and arbutin improved obviously. The polymer forms of the enzyme under the native conditions were of dimer and tetramer, but the dimer was the most probable functional unit. Result of structural simulation also showed slight changes occurred in the tertiary structure of the mutant enzyme, which may be the main reason for the enhanced thermal stability and catalytic efficiency of BS-GLY_M1. [Conclusion] β -glycosidase from *Bacillus subtilis* could be expressed in *E. coli* BL21 (DE3), meanwhile its hydrolysis efficiency could be further improved by directed evolution.

Keywords: heterologous expression, error-prone PCR, substrate specificity, CD spectrum, oligomer, structure modeling
(本文责编:李磊,王晋芳)

Supported by the National Public Science and Technology Research Sub-Projects of Ocean (201205022-3); by the Major Science and Technology Projects in Fujian Province (2013NZ0003)

* Corresponding author. Tel: +86-591-22866379; E-mail: shixa@fzu.edu.cn

Received: 11 January 2015/Revised: 2 April 2015