

## 枯草蛋白酶 E 的定点突变及其对酶性质的影响

杨永华 蒋 岚 杨胜利\*

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

吴宇杰 朱榴琴

(中国科学院生物物理研究所 北京 100101)

**摘 要** 用定点突变的方法研究 S221C/P225A, N118S/S221C/P225A, D60N/S221C/P225A 和 Q103R/S221C/P225A 突变对蛋白酶活性、酯酶活性与蛋白酶活性之比的影响。结果表明: S221C/P225A 突变使蛋白酶活性比枯草蛋白酶 E 低 73 000 多倍, 酯酶活性与蛋白酶活性之比是 Subtiligase 的 3 倍; N118S/S221C/P225A 突变使蛋白酶活性和酯酶活性分别比 S221C/P225A 突变下降 3.6 倍和 15 倍, 酯酶与蛋白酶活性之比下降 4 倍, 同时增加变体酶的热稳定性; D60N/N118S/S221C/P225A 突变使蛋白酶活性比 N118S/S221C/P225A 突变体下降 15 倍, 但对酯酶活性几乎没有影响, 酯酶与蛋白酶活性之比增加 14 倍, 分别是 S221C/P225A 突变体和 Subtiligase 的 3.3 倍和 10.3 倍; 但是, Q103R/N118S/S221C/P225A 突变使蛋白酶活性比 N118S/S221C/P225A 突变体增加 5 倍, 酯酶活性下降 55 倍, 酯酶与蛋白酶活性之比下降 1 000 倍。

**关键词** 枯草蛋白酶 E, 定点突变, 蛋白酶活性, 酯酶活性

中图分类号 Q591.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0341-04

枯草芽孢杆菌蛋白酶是重要的工业用酶, 对其结构功能的理解及催化机理的研究已比较透彻, 目前有关枯草杆菌蛋白酶以及变体酶的研究已超出水解性质的范畴, 而拓展到多肽合成的应用研究<sup>[1~3]</sup>, 但是枯草蛋白酶催化酰胺水解的效率高, 在催化多肽合成的过程中会引起底物及合成产物肽键的进一步水解, 因此必须对枯草蛋白酶进行改造, 降低酰胺键水解活性; 另一方面, 具有酯酶活性的蛋白酶可作多肽合成的催化剂, 这样的研究已有许多<sup>[5~7]</sup>, 尤其是枯草蛋白酶 BPN 经过 S221C/P225A( Subtiligase )改造后酰胺水解活性大幅度下降, 但仍保留较高的酯酶活性<sup>[8]</sup>, Subtiligase 变体酶已在 RNaseA 酶及环肽的合成中得到应用<sup>[9~11]</sup>。本文借鉴 Subtiligase 变体酶的研究经验, 用定点突变的方法考虑 S221C/P225A 突变对枯草蛋白酶 E 性质的影响, 为将枯草蛋白酶 E 进一步改造成非水介质中稳定的多肽连接酶打下基础。

## 1 材料

### 1.1 酶和试剂

除测序用 T7 Sequencing kit 为 Pharmacia 公司产品外, 实验所用酶及突变试剂盒 Altered Siter II *in vitro* Mutagenesis Systems 均为 Promega 公司产品。突变引物及测序引物用 Applied Biosystems ABI 380 合成仪合成。四肽底物 N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide( s-AAPF-pNA )及 N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-thiolbenzyl ester( s-AAPF-Sbz )为 Sigma 公司产品。

### 1.2 菌种及质粒

实验中所用蛋白酶缺陷型枯草芽孢杆菌 DB104<sup>[12]</sup>及枯草芽孢杆菌-大肠杆菌穿梭质粒 pBE-2<sup>[13]</sup>来源于中国科学院生物物理研究所朱榴琴实验室, JM109 及 ES1301 为突变试剂盒中的配套菌种, pBY, pBY1, pBY2, pBY3 及 pBY4 分别是含野生型

收稿日期: 1999-03-15, 修回日期: 1999-12-03。

基金项目: 国家高技术研究与发展计划项目资助( 103-12-02-02 )。

\* 通讯联系人: Tel: 8621-64700892 ext. 371; Fax: 8621-64700244; E-mail: yonghuayang@hotmail.com

蛋白酶 E, S221C/P225A 突变, N118S/S221C/P225A 突变, D60N/N118S/S221C/P225A 突变和 Q103R/N118S/S221C/P225A 突变的蛋白酶 E 基因片段与 pBE-2 所组成的重组质粒。

## 2 方法

### 2.1 突变及质粒构建

将野生型枯草蛋白酶 E 的基因(由 Masayori Inouye 教授提供)<sup>[14]</sup>插入突变载体 pAlter-I 的 *Hind*III/*Bam*HI 位点,得到的质粒 pSY,用下列引物分别引入所需的突变:

S221C/P225A:

5'-AAC GGA ACG TGC ATG-GCG ACT GCT CAC GTT GCC3;

N118S:

5'-ATT TCC AAC TCT ATG GAT GTT3;

D60N:

5'-CCA TAC CAG AAC GGC AGT TCT3;

Q103R:

5'-ACA GGA AGC GGC CGA TAT AGC TGG ATT3

黑体画线部分表示突变碱基,突变后的质粒分别命名为 pSY1, pSY2, pSY3 和 pSY4,所有突变都经双脱氧链终止法测序证实。用 *Hind*III/*Bam*HI 切出突变后的片段,分别插入 pBE-2 中得到表达质粒 pBY1, pBY2, pBY3 和 pBY4。变体酶 BY1, BY2, BY3 及 BY4 都在 DB104 中得到表达。

### 2.2 表达及纯化

突变菌种在 2YT 中(含卡那霉素 50mg/L)于 37°C, 200r/min 发酵 30~36h。2L 发酵上清用 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀(30%~60% 饱和度)后,溶于 15 mL 10mmol/L 磷酸缓冲液(1mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH7.4),直接上 DEAE-Dextran A-25 柱,用磷酸缓冲液(pH7.4)缓慢淋洗(20mL/h),SDS-PAGE 鉴定所需蛋白,超滤浓缩后上 Acrylex P-150 柱,用磷酸缓冲液(pH7.4)缓慢淋洗,得到电泳纯(95%)的变体酶。变体酶的浓度根据 280nm 处的 OD 值,以消光系数  $e_{1\text{cm}, 1\%} = 11.7$  计算。

### 2.3 动力学性质测定<sup>[8]</sup>

测定蛋白酶活性时,用四肽底物 s-AAPF-pNA(溶于 10 mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.4, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液), 37°C, 410nm 处测定蛋白酶活性及底物浓度与酶活的关系,计算不同底物浓度时的初速度。算出  $K_m, K_{cat}$ (表 1)。

测定酯酶活性时,用四肽底物 s-AAPF-Sbz(溶

表 1 枯草蛋白酶 E 突变体水解 s-AAPF-pNA 的反应动力学常数

Table 1 Kinetic constants for hydrolysis of s-AAPF-pNA by wild-type and variants of subtilisin E

Variant	s-Ala-ala-Pro-Phe-pNA		
	$K_{cat}/s^{-1}$	$K_m$ (mmol/L)	$K_{cat}/K_m$ (mol·L <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup>
Wild-type	27.83	0.61	$4.57 \times 10^{-4}$
Subtiligase	$4.53 \times 10^{-5}$	0.274	0.1653
S221C, P225A	$7.60 \times 10^{-5}$	0.1223	0.622
N118S, S221C, P225A	$5.92 \times 10^{-4}$	3.45	$1.72 \times 10^{-1}$
D60N, S221C, P225A	$2.45 \times 10^{-4}$	22.23	$1.10 \times 10^{-2}$
Q103R, S221C, P225A	$4.44 \times 10^{-3}$	1.00	4.42

于 10 mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.4, 1mmol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液,含 4% 二甲基亚砷), 37°C, 250nm 处测定变体酶酯酶活性与底物浓度的关系,计算不同底物浓度时的初速度,算出  $K_m, K_{cat}$ (见表 2)。

表 2 枯草蛋白酶 E 突变体水解 s-AAPF-Sbz 的反应动力学常数

Table 2 Kinetic constants for hydrolysis of s-AAPF-Sbz by wild-type and variants of subtilisin E

Variant	s-Ala-Ala-Pro-Phe-Sbz			
	$K_{cat}/s^{-1}$	$K_m$ (mol·L <sup>-1</sup> )	$K_{cat}/K_m$ (mol·L <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup>	Esterase/ Amidase
Subtiligase	$4.1 \times 10^1$	$1.9 \times 10^1$	$2.1 \times 10^5$	$1.27 \times 10^6$
S221C, P225A	$3.22 \times 10^3$	1.31	$2.45 \times 10^6$	$3.94 \times 10^6$
N118S, S221C, P225A	$2.22 \times 10^2$	1.39	$1.59 \times 10^5$	$9.25 \times 10^5$
D60N, S221C, P225A	$1.98 \times 10^3$	13.74	$1.44 \times 10^5$	$1.31 \times 10^7$
Q103R, S221C, P225A	2.03	0.706	$2.87 \times 10^3$	$6.50 \times 10^2$

变体酶的稳定性:将变体酶置于 30°C, 40°C, 50°C, 60°C 保温 0.5h,测样品的剩余酯酶活性。最后置于 60°C 每隔 0.5h 取样测样品的剩余酯酶活性(图 1, 2)。

## 3 结果与讨论

### 3.1 表达纯化

一般认为蛋白酶的活性中心经 S221C 突变后的变体酶在分泌表达时不能成熟,发酵过程中必须加入野生型的菌种共表达,以帮助变体酶的成熟<sup>[8]</sup>。这样对纯化工作极其不利,野生型酶与变体酶之间的性质差异很小,难以分离。但是,在大肠杆

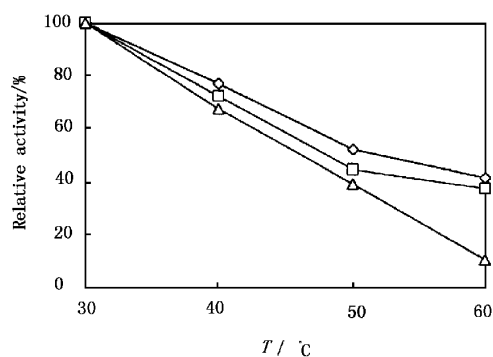


图 1 温度对枯草蛋白酶 E 突变体活性的影响

Fig. 1 Effect of temperature on esterase activity of variants of subtilisin E

◇ N118S/S221C/P225A ; □ S221C/P225A ;  
△ D60N/N118S/S221C/P225A

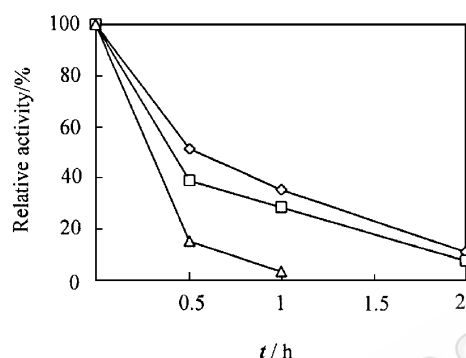


图 2 枯草蛋白酶 E 突变体的热稳定性

Fig. 2 Thermal stability of variants of subtilisin E

◇ N118S/S221C/P225A ; □ S221C/P225A ;  
△ D60N/N118S/S221C/P225A

菌中表达的 Prothiolsubtilisin E 包含体在体外可以自行成熟,仅仅是成熟的过程较慢而已<sup>[15]</sup>。我们在研究过程中发现所有变体酶都可以自行成熟,无需野生型酶的帮助。因此直接用突变菌种在 2YT 中, 37°C 发酵 36h,发酵上清用 30%~60% 硫酸铵沉淀后,溶于 pH7.4 的磷酸缓冲液,经 DEAE-Dextran A-25 柱和 Acrylex P-150 柱可得目的蛋白(纯度可达电泳纯 95% 以上)。

### 3.2 突变对酶性质的影响

枯草蛋白酶的活性中心由 Asp32, His64 及 Ser221 构成,活性中心任何残基的突变都会导致蛋白酶活性的丧失。基于蛋白酶活性缺失但仍有酯酶活性的蛋白酶可以用作多肽合成的催化剂, Kaiser 等用化学的方法将枯草蛋白酶 BPN' 活性中心的 Ser221 转变成 Cys<sup>[6,8]</sup>,得到的变体酶 thiolsubtilisin 蛋白酶活性比野生型酶下降 104 倍,而酯酶活性比蛋白酶活性高约 104 倍,大幅度降低了底物及产物

的水解。由于硫原子半径比氧原子半径大得多,相应的巯基对羰基的亲合力比羟基大, S221C 变体酶形成羰基-酶过渡态的活化能比 BPN' 低 8.4KJ/mol,同时 thiolsubtilisin 酶-羰基中间体对亲核试剂胺的亲合作用及反应活性强,因而易于胺解,所以仅表现为酯酶活性的 S221C 变体酶可以催化片段偶合的多肽合成,从而使枯草蛋白酶由水解酶变成多肽连接酶。鉴于经 S221C/P225A 双突变后的 Subtiligase 变体酶,酯酶活性比蛋白酶活性高 106 倍,并成功地在 RNase A 酶及环肽的合成中得到应用,也可以将枯草蛋白酶 E 改造成蛋白酶活性低而酯酶活性高的变体酶,为进一步改造成非水介质中稳定的多肽连接酶打下基础。

结果表明(表 1, 2): S221C/P225A 突变使枯草蛋白酶 E 的蛋白酶活性降低 73 000 多倍,酯酶活性与蛋白酶活性之比为  $3.9 \times 10^6$ ,是 Subtiligase 的 3 倍, N118S 突变有利于提高枯草蛋白酶 E 的热稳定性,对活性没有负面影响,但是 N118S/S221C/P225A 突变不但影响蛋白酶活性,而且影响酯酶活性,其蛋白酶活性和酯酶活性分别比 S221C/P225A 突变体下降 3.6 倍和 15 倍,酯酶与蛋白酶活性之比下降 4 倍; D60N/N118S/S221C/P225A 突变使蛋白酶活性进一步下降 15 倍,但对酯酶活性几乎没有影响,从而导致酯酶与蛋白酶活性之比比 N118S/S221C/P225A 突变体高 14 倍,分别是 S221C/P225A 突变体和 Subtiligase 的 3.3 倍和 10.3 倍,但是, Q103R/N118S/S221C/P225A 突变使 N118S/S221C/P225A 突变体的蛋白酶活性增加 5 倍,同时使酯酶活性下降 55 倍,酯酶与蛋白酶活性之比比 N118S/S221C/P225A 突变体下降 1 000 倍,比 Subtiligase 低约 2 000 倍,可见 Q103R/N118S/S221C/P225A 突变体没有进一步改造的意义。

由图 1 和图 2 可见, S221C/P225A, N118S/S221C/P225A 和 D60N/N118S/S221C/P225A 突变体的稳定性都随温度的升高而降低,其中温度对 D60N/N118S/S221C/P225A 突变体的影响最大,在 60°C 保温 0.5h,有近 90% 的活性丧失, 1h 后活性几乎全部丧失,而 S221C/P225A 突变体的热稳定性与野生型枯草蛋白酶 E 相似; N118S/S221C/P225A 突变体的热稳定性高于 S221C/P225A,即 S221C/P225A 突变对枯草蛋白酶 E 的热稳定性没有影响, N118S 突变却可增加 S221C/P225A 突变体的热稳定性。

综上所述, S221C/P225A 突变可改变枯草蛋白

酶 E 的酶性质,使之由蛋白酶活性变为酯酶活性,进一步引入 N118S 突变对酶的活性有不良影响,但是可以提高酶的热稳定性。值得一提的是,在

N118S/S221C/P225A 突变体的基础上进一步突变,已得到了可用于非水介质中的热稳定突变体,并已用于多肽的合成(另文发表)。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Wang C H, Chen S T, Hennen J *et al.* *J Am Chem Soc* ,1990 ,**112** :945~953
- [ 2 ] Margolin A L, Tai D F, Klivanov A M. *J Am Chem Soc* ,1987 ,**109** :7885~78870
- [ 3 ] Kazutaka Tanizawa ,Akihiro sugimura ,Yuichi Kanaoka. *FEBS* ,1992 ,**296** :163~165
- [ 4 ] Chen K Q , Arnold F H. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1993 ,**90** :5618~5622
- [ 5 ] West J B, Scholten J, Stolicwifh N J *et al.* *J Am Chem Soc* ,1988 ,**110** :3709~3710
- [ 6 ] Nakatsuka T, Sasak T, Kaiser E T. *J Am Chem Soc* ,1987 ,**109** :3808~3810
- [ 7 ] Wu Z P, Hilvert D. *J Am Chem Soc* ,1989 ,**111** :4513~4514
- [ 8 ] Abrahmsen L, Tom J, Burnier J *et al.* *Biochemistry* ,1991 ,**30** :4151~4159
- [ 9 ] Jackson D Y, Burnier J, Quan C *et al.* *Science* ,1994 ,**266** :243~247
- [ 10 ] Jackson D Y, Burnier J, Wells J A. *J Am Chem Soc* ,1995 ,**117** :819~820
- [ 11 ] Chang T K, Jackson D K, Burnier J P *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* ,1994 ,**91** :12544~12548
- [ 12 ] Kawamura F, Doi R H. *J Bacteriol* ,1984 ,**160** :442~444
- [ 13 ] 郭兴华 熊占周 民等. 生物工程学报, 1991, **7** :224~229
- [ 14 ] Masai Y, Coleman J, Inouye M. Expression Cloning Vehicles in *Escherichia coli* in Experimental Manipulation of Gene Expression; Inouye M. Ed, ;Academia Press :New York, 1983, pp. 15~33
- [ 15 ] Li Y, Inouye M. *J Biol Chem* ,1994 ,**269** :4169~4174

## Site-directed Mutagenesis and Effects on the Enzymatic Properties of Subtilisin E

YANG Yong-Hua JIANG Lan YANG Sheng-Li

( Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233 )

WU Yu-Jie ZHU Liu-Qin

( Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101 )

**Abstract** Site-directed mutagenesis was used to investigate the effects of S221C/P225A, N118S/S221C/P225A, D60N/N118S/S221C/P225A and Q103R/N118S/S221C/P225A mutations on the properties of Subtilisin E. It was found that S221C/P225A mutant is 73 000-fold decreased in amidase activity than subtilisin E and 3-fold increased than subtiligase in the ratio of esterase/amidase; N118S/S221C/P225A mutant has 3.6-fold and 15-fold decreased in amidase and esterase activity respectively and as a result it has a 4-fold lower in the ratio of amidase/esterase than S221C/P225A mutant; Although it has no effect on the esterase activity, D60N/N118S/S221C/P225A mutant enhanced its ratio of amidase/esterase by 15 fold, 3.3-fold and 10.3 fold compared to N118S/S221C/P225A mutant, S221C/P225A mutant and subtiligase respectively; Q103R/N118S/S221C/P225A mutant, however, has a 5-fold enhanced in the amidase activity and 55-fold and 1000-fold decrease in the esterase activity and the ratio of esterase/amidase compared to N118S/S221C/P225A.

**Key words** Subtilisin E, site-directed mutagenesis, amidase activity, esterase activity