

# Q20L 及 G247D 定点突变对葡萄糖异构酶酶活和最适 pH 的改善

朱国萍<sup>1</sup> 罗 丹<sup>1</sup> 蔡云飞<sup>1</sup> 朱学勇<sup>1,2</sup> 滕脉坤<sup>1,2</sup> 王玉珍<sup>1\*</sup>

( 中国科学技术大学生命科学学院分子生物和细胞生物学系 合肥 230026 )

( 中国科学院中国科学技术大学结构生物学重点实验室 合肥 230026 )

**摘 要** 用双引物法对 GI 基因进行体外定点突变, 构建了突变体 Q20L 和 G247D。含突变基因的重组表达质粒 pTKD-GIQ20L 及 pTKD-GIG247D 在 *E. coli* K38 菌株中表达。纯化的突变酶与野生型酶相比 (1) GIQ20L 的最适反应温度下降 5℃, 热稳定性为野生型酶的 78%, 对底物的亲和性增强 (2) GIG247D 的酶活提高约 33%, 最适 pH 下降 0.6 个单位, 但热稳定性降低。初步分析认为, Gln 20 位于  $\alpha 0 \sim \alpha 1$  螺旋之间, 其亲水侧链被 Leu 的疏水侧链取代后, 分子表面增强的疏水作用, 反而不利于蛋白质的稳定, 使 GIQ20L 的热稳定性降低。Gly247 是酶活性中心  $\beta$ -折叠 (242~247aa) 的最后一个残基。引入电负性极强的 Asp 后, 可能改变分子的静电场分布, 影响了活性部位的电荷传递过程, 使 GIG247D 酶活提高。引入的电荷, 可能改变活性中心可解离基团的  $pK_a$ , 使其最适 pH 下降。另外 Asp247 的侧链在周围空间结构中显得过于拥挤, 易与其他侧链产生排斥, 由此影响到  $\beta$ -折叠的稳定性, 接近亚基结合面的 Asp247, 可能进一步影响到亚基间相互作用的稳定性, 最终导致酶热稳定性的降低。GI 酶活和最适 pH 的改善更利于工业生产。

**关键词** 分子模拟, 蛋白质工程, 葡萄糖异构酶, 酶活, 最适反应 pH, 底物亲和性

**中图分类号** Q71 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)04-0469-05

葡萄糖异构酶又称木糖异构酶, 是工业上大规模以淀粉制备高果糖浆的关键酶, 也是国际上公认的研究酶催化机制及建立蛋白质工程技术最好的模型之一<sup>[1]</sup>。我国自行筛选的 7 号淀粉酶链霉菌 M1033 菌株所产 GF<sup>2</sup> (*Streptomyces diastaticus* No. 7 strain M1033 glucose isomerase, 简称 SM33GI) 其性质不理想。目前已完成 SM33GI 基因的克隆<sup>[3]</sup>、全序列测定<sup>[4]</sup>和在 *E. coli* 中的高效表达<sup>[5]</sup>, 并获得该酶 0.19nm 分辨率的晶体结构<sup>[6]</sup>。本文期望应用蛋白质工程方法改善 SM33GI 的性质, 以降低工业生产成本。本文报道了突变酶 GIQ20L 和 GIG247D 的构建和性质研究, 以及通过实验结果对该酶结构与功能关系的进一步认识。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和载体** :*E. coli* XL1-blue (*tet<sup>r</sup>*) *E. coli* CJ236 (*chl<sup>r</sup>*) *E. coli* K38 (*kan<sup>r</sup>*) 载体

M13mp19RF 及表达质粒 pTKD-GI 均为本实验室贮藏。

**1.1.2 试剂** :限制酶均为华美公司产品 ;T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、T4 多核苷酸激酶、DEAE-Sephrose FF、Sephacryl S-300 HR、Sephagals TM band prep kit 和 T7 DNA sequencing kit 为 Pharmacia 公司产品 [  $\alpha$ -<sup>32</sup>P ]dATP 为北京福瑞公司产品 ;寡核苷酸引物由中国科学院上海细胞生物研究所合成 ;其余为进口或国产分析纯试剂。

**1.1.3 仪器** :Bio-Rad 公司的 DNA 测序系统 ;LKB 水平多功能电泳仪 ;LKB 常压层析系统 ;LKB 恒温水浴锅 ;Cole Parmer 公司的酸度计。

### 1.2 方法

**1.2.1 定点突变** :参见文献 [7]

**1.2.2 DNA 序列测定** :采用 Sanger 双脱氧链终止法 参照 T7 DNA sequencing kit 说明书进行。

**1.2.3 GI 分离纯化** :参见文献 [8]

**1.2.4 酶活力测定** :采用改进的乙醇-吡唑法<sup>[8]</sup>。

收稿日期 :1999-10-18, 修回日期 2000-04-20。

基金项目 :国家高技术研究发展计划项目资助 (863-130-13-02-04)。

\* 联系人 :Tel 0551-3601441, Fax 0551-3601441, E-mail yzwwang@ustc.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

**1.2.5 酶最适反应 pH 测定:**按 Smith 等人方法<sup>[9]</sup>,以 D-木糖为底物,甘氨酸-NaOH 作缓冲液,在 60℃ pH5.0~10.5 范围内测定。

**1.2.6 酶最适反应温度测定:**以 D-木糖为底物,加酶样品于 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,100 mmol/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH8.0) 缓冲液中。在 30~90℃ 范围内,每隔 5℃ 反应 10min,以相对活力为纵坐标,温度为横坐标作图,求出酶最适反应温度。

**1.2.7 酶热稳定性测定:**将酶加入 10mmol/L MgCl<sub>2</sub>,50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中(pH7.0),于 80℃ 水浴保温,每隔 30min 取样测活。以相对残余活力百分比的对数为纵坐标,以保温时间为横坐标作图,求出酶失活半衰期。

**1.2.8 酶动力学测定:**分别以 D-木糖和 D-葡萄糖为底物,在 10mmol/L MgCl<sub>2</sub>,50 mmol/L TEA (pH7.0) 缓冲液中,测试 40℃ 时的木酮糖和果糖生成量,按 Lineweaver-Burk 法作图,求出酶的表现  $K_m$   $V_{max}$ 。

## 2 实验结果

### 2.1 GI 基因的定点突变及鉴定

根据 SM33GI 的基因序列<sup>[4]</sup>,设计合成的突变引物为 (Q20L) 5'-CGGCTGG CAG GGACGGG-3' (G247D) 5'-ACCTCAACGACCAGTCCG-3'。采用双引物法,将含 GI 基因的 M13 mp19 单链掺 U 模板,分别在 37℃ 和 65℃ 条件下,与 Q20L、G247D 突变引物及非磷酸化通用引物退火,在体外进行定点突变反应,取  $\mu$ L 连接液转染 *E. coli* XL1-Blue,得到 50~100 个噬菌斑。挑取数十个分离较好的噬菌斑培养,抽提其单链 DNA,进行序列测定,确定 Q20L 和 G247D 突变体构建成功。

### 2.2 突变酶的分离纯化

用 *Eco*R I 和 *Sph* I 双酶解 M13 mp19 亚克隆,回收 0.9kb 含 GI 突变基因的片段,插入经 *Eco*R I 和 *Sph* I 双酶解的 pTKD-GI 中,构建成表达质粒 pTKD-GIQ20L 和 pTKD-GIG247D。将表达质粒转化 *E. coli* K38,在 LB 培养基中摇瓶生长至稳定期,42℃ 热诱导 25min,再在 37℃ 继续培养 2~2.5h,收获菌体,超声破碎后离心即得突变体和野生型的粗酶液。经 DEAE-Sepharose FF 和 Sephacryl S-300 HR 柱层析,SDS-PAGE 电泳表明已获得均一的酶蛋白(如图 1)。以木糖为底物,在 35℃ 条件下,测得突变酶 GIG247D 的比活比野生型酶提高约 33%,但 GIQ20L 的比活只有野生型酶的 27%。

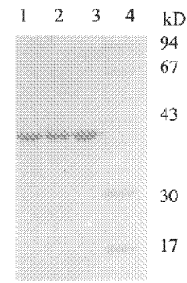


图 1 野生型 GI 及突变体酶的 SDS-PAGE 电泳  
Fig.1 SDS-PAGE of wild-type GI and its mutants  
1. Wild-type GI; 2. GIQ20L;  
3. GIG247D; 4. Standard MW marker

### 2.3 突变酶的酶学性质研究

**2.3.1 最适反应 pH:**在 60℃ 时,以 0.03mol/L D-木糖为底物,在 10mmol/L MgCl<sub>2</sub>,100mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液中,在 pH5.0~10.5 范围内测得 GIG247D 的最适反应 pH 为 7.6(如图 2)。GIG247D 的最适 pH 由野生型 GI 的 8.2 下降了约 0.6 个单位。GIQ20L 的最适 pH 约为 9.0,比野生型 GI 上浮了 0.8 个单位。

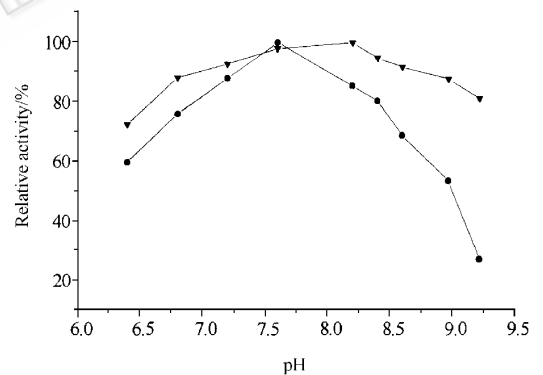


图 2 野生型 GI 及 GIG247D 的最适反应 pH 曲线  
Fig.2 The curve of optimum pH for catalytic reaction of wild-type GI and GIG247D  
▼ Wild-type GI; ● GIG247D

**2.3.2 最适反应温度:**以 0.5mg/mL 酶液在 30~90℃ 范围内,每隔 5℃ 取样测活,绘制出最适反应温度曲线(如图 3)。由该曲线求得野生型酶和 GIG247D 的最适反应温度分别约为 70℃ 和 65℃。GIQ20L 的最适反应温度也约为 65℃(数据未给出)。因此两个突变体酶的最适反应温度比野生型酶下降约 5℃。

**2.3.3 热稳定性:**将 1mg 酶溶解于 2mL 反应缓冲液中,置 80℃ 水浴中,每 30min 取样测活,绘制酶的热失活曲线(如图 4)。由图可见,野生型 GI 在

80℃下的热失活半衰期约为 100min,GIQ20L 和 GIG247D 分别约为 78min 和 61min,因此突变酶 GIQ20L 的热稳定性约为野生型酶的 78%,G247D 的热稳定性只有野生型酶的 61%。

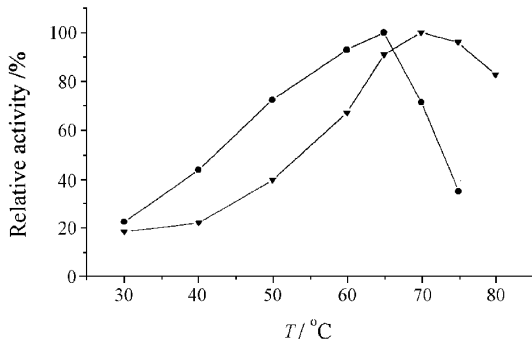


图3 野生型 GI 及 GIG247D 的最适反应温度曲线

Fig.3 The curve of optimum temperature for catalytic reaction of wild-type GI and its mutants

▼ Wild-type GI ; ● GIG247D

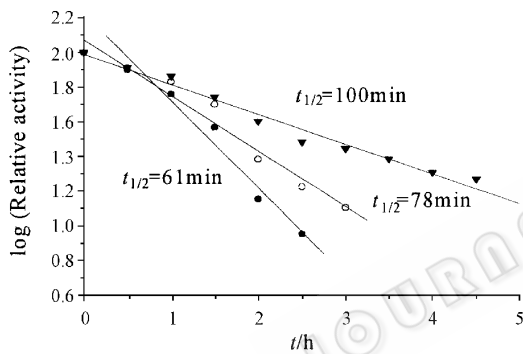


图4 野生型 GI 及突变体酶的热稳定性曲线

Fig.4 The curve of thermostability of wild-type GI and its mutants

▼ Wild-type GI ; ○ GIQ20L ; ● GIG247D

**2.3.4 稳态动力学参数:**在 40℃ 条件下,突变酶和野生型 GI 的动力学参数列于表 1。从表中可见,以葡萄糖为底物时,GIQ20L 和 GIG247D 的  $K_m$  及  $V_{max}$  分别为野生型 GI 的 96%、77% 和 51%、77%;以木糖为底物时,GIQ20L 和 GIG247D 的  $K_m$  及  $V_{max}$  分别是野生型酶的 37%、84% 和 73%、78%。

## 3 讨论

### 3.1 GIQ20L

热稳定性是蛋白质分子所有共价和非共价结合力的复杂综合效应,包括疏水作用、盐键及氢键、共价键的稳定、降低去折叠熵以及  $\alpha$ -螺旋、环等二级结构的稳定等<sup>[1,2]</sup>。由于目前仍不清楚究竟是哪种关键残基控制着温度敏感性的蛋白质,因此通过蛋

白质工程获得性质改善的酶,至今没有百发百中的分子设计手段。

表 1 GI 的稳态动力学参数

Table 1 Steady-state kinetic parameters				
Enzyme	Substrate	$K_m$ / (mmol/L)	$V_{max}$ / ( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ )	$K_{cat}$ / ( $\text{min}^{-1}$ )
W. T.	Glucose	556	117.6	1099
	Xylose	20.8	106.4	994
Q20L	Glucose	534	91.1	852
	Xylose	7.6	89.4	835
G247D	Glucose	286	90.9	826
	Xylose	15.1	83.3	758

我们在 SM33GI 高分辨率晶体结构的基础上,通过 SGI Indigo 2 图形工作站,用 Insight II 软件包对 GI 20 位的残基进行了替换,发现 Gln20 与周围残基没有氢键联系,替换成大小相仿的 Leu 在空间结构上是合理的。对替换的模型,用 GROMOS 分子动力学模拟软件包进行结构优化处理,图 5(a) 为 Gln20 附近氨基酸空间分布的立体对图,图 5(b)

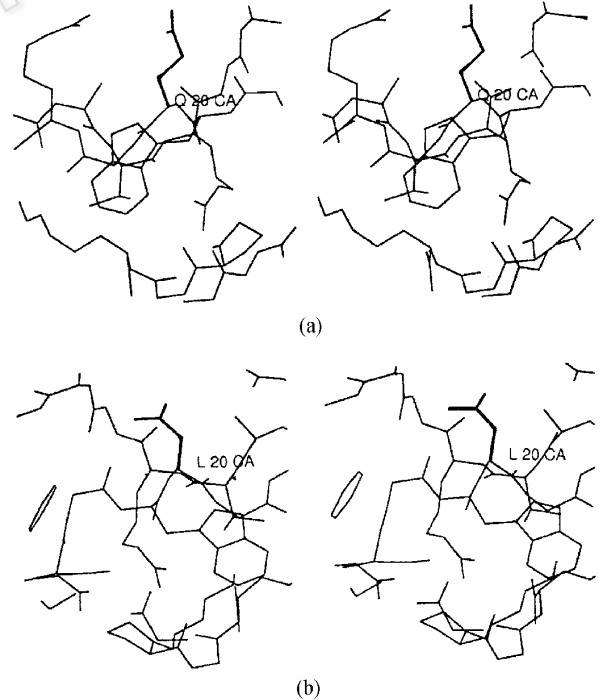


图5 野生型 GI 和突变体酶 GIQ20L 的立体结构

Fig.5 Stereo view of wild-type GI and GIQ20L

(a)The structure of wild-type GI in the vicinity of Gln-20 ;

(b)The structure of GIG138P in the vicinity of Leu-20

为模拟 Leu 取代 Gln20 之后的情况。SM33GI 的 N 端结构域(1-320)为 8 段  $\alpha$ -螺旋和 8 段  $\beta$ -折叠构

成的  $\alpha/\beta$  型桶状结构。Gln20 位于  $\alpha_0 \sim \alpha_1$  螺旋之间,其侧链易破坏  $\beta$ -折叠结构,而非极性氨基酸 Leu 很适合  $\alpha$ -螺旋结构且疏水性较强,可以增强  $\alpha$ -螺旋二级结构之间的疏水作用。但由于 Gln20 位于四聚体分子表面,其亲水性侧链被 Leu 的疏水性侧链取代后,分子表面疏水作用的增强反而不利于蛋白质的稳定,因此降低了 GI 的热稳定性。

### 3.2 GIG247D

实验结果表明,GIG247D 的酶活比野生型酶提高约 33%,最适反应 pH 下降 0.6 个 pH 单位,但热稳定性明显下降。根据野生型 GI 的 0.19nm 分辨率的晶体结构发现,Gly247 位于酶活性中心,是 242~247 位氨基酸构成的  $\beta$ -折叠的最后一个残基<sup>[10]</sup>。在 247 位引入 Asp 后,因其电负性极强,可能改变了分子的静电场分布,影响了活性部位的电荷传递过程,而使酶活性提高<sup>[11]</sup>。另外可能引入的电荷,导致活性中心可解离基团的  $pK_a$  发生变化,从而使 GIG247D 的最适 pH 下降了 0.6 个 pH 单位。

分子模拟显示,如图 6,Gly247 突变为 Asp 后,会导致 GI 空间结构发生局部性调整。Gly 的柔性较大,且没有侧链基团。而 Asp 含一个极性侧链,其空间自由度相对较小。突变后,Asp247 附近的活性残基 N216、R219、N246、D254 及 D256 的侧链均伸向活性中心,而 Asp247 的侧链却向外伸展。尽管 Asp247 可能与 R258 及 G260 形成弱的氢键,但其侧链在周围空间结构中显得过于拥挤,易于其他氨基酸的侧链产生排斥作用,可能并非能量最优构象,由此影响到  $\beta$ -折叠的稳定性。加之 Asp247 接近亚基之间的结合面,因而可能进一步影响到亚基间相互作用的稳定性,最终导致酶热稳定性的降低。

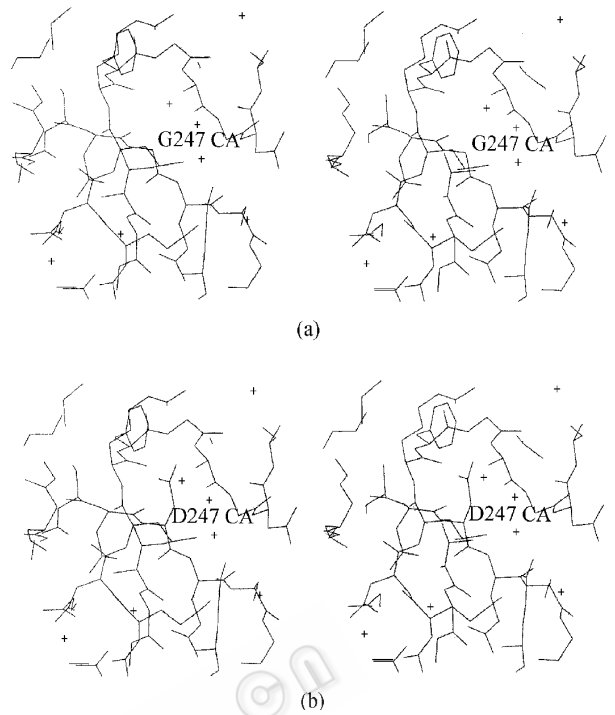


图 6 野生型 GI 和突变体酶 GIG247D 的立体结构

Fig.6 Stereo view of wild-type GI and GIG247D

(a)The structure of wild-type GI in the vicinity of Gly-247;

(b)The structure of GIG138P in the vicinity of Asp-247

动力学研究表明,突变酶对 D-葡萄糖和 D-木糖的亲性和都有所增强,但其表观  $V_{max}$  和  $K_{cat}$  值并未得到提高,反映了酶与底物的结合不是异构化反应的限速步骤。由于 SM33GI 的最适 pH 偏碱性,在高温碱性条件下,果糖的稳定性较差,同时还伴有羟甲基糠醛等毒副产物的生成,因此突变酶催化效率及最适 pH 的改善,将更有利于 GI 的工业化生产。目前突变酶的晶体学研究工作正在进行中。

### 参 考 文 献

- [1] Bhosale S H, Rao M B, Deshpande V V. *Microbiol Rev*, 1996, **60**: 280~300
- [2] 崔涛,刘咸安,王玉珍等. *微生物学报*, 1991, **31**(4): 329~331.
- [3] 朱学良,王玉珍,黄震等. *生物工程学报*, 1992, **8**(3): 232~236
- [4] 王玉珍,黄震,戴新华等. *生物工程学报*, 1994, **10**(2): 118~123.
- [5] 崔虹,刘咸安,李澄清等. *高技术通讯*, 1993, **3**(7): 9~12
- [6] Zhu X Y, Gong W M, Niu L W *et al.* *Science in China (Series C)*, 1996, **39**(6): 636~644
- [7] 朱国萍,滕脉坤,伍传金等. *生物化学与生物物理学报*, 1998, **30**(6): 607~610
- [8] 黄婉治,王淳,刘兢等. *中国科学技术大学学报*, 1992, **22**(3): 283~288
- [9] Smith C A, Rangarajan M, Hartley B S. *Biochem J*, 1991, **277**: 255~261
- [10] Zhu G P, Xu C, Teng M K *et al.* *Pro Engng*, 1999, **12**(8): 635~638
- [11] 王玉珍,徐冲,朱国萍等. *中国专利发明公报*, 公开号: CN1213003A. 1999, Vol. 15, No. 14

## Mutations of Q20L and G247D Improved the Specific - activity and Optimum pH of Glucose Isomerase

ZHU Guo-Ping<sup>1</sup> LUO Dan<sup>1</sup> CAI Yun-Fei<sup>1</sup> ZHU Xue-Yong<sup>1 2</sup>

TENG Mai-KUN<sup>1 2</sup> WANG Yu-Zhen<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Molecular Biology and Cell Biology and <sup>2</sup> The Key Lab of Structural Biology ,USTC ,CAS , School of Life Science ,University of Science and Technology of China ,Hefei 230026 )

**Abstract** The mutants of Q20L and G247D of glucose isomerase (GI) were constructed by *in vitro* site-directed mutagenesis of GI gene with double-primers method. The recombinant plasmids pTKD-GIQ20L and pTKD-GIG247D were expressed in *E. coli* K38 strain. The comparison experiments of mutant enzymes with wild-type GI showed that : ( 1 ) the optimum temperature of GIQ20L was decreased by 5°C . Its thermostability was only 78% half-time of the wild type. But its substrate affinity was enhanced. ( 2 ) The specific-activity of GIG247D was increased by 33% , and the optimum pH was lowered by 0.6 unit. However , the thermostability of GIG247D was decreased. We supposed , based on the above facts and 0.19nm resolution crystal structure of SM33GI , that Gln20 locates between  $\alpha 0$ -helix and  $\alpha 1$ -helix , the substitution of hydrophobic side chain of Leu for hydrophilic side chain of Gln may enhance the hydrophobic interaction of the molecular surface , leading to the decrease of the stability and thermostability of GIQ20L. Gly247 which is the last amino acid of a  $\beta$ -sheet from 242 to 247 residues locates in the active core of GI. After replacement , Asp247 which has strong negative electricity may change the electrostatic distribution and influence the charge transfer processes of the active core. So the specific-activity of GIG247D was increased. The introduced charge could alter the *pKa* of dissociable groups and make the optimum pH lower. In addition , the side chain of Asp247 seems to be very crowded in the surrounding space conformation and is easy to exclude with the other side chains , therefore influences the stability of  $\beta$ -sheet. Furthermore , Asp247 is in the vicinity of the interface of subunits , so it could interfere with the stability of the interaction between subunits. Thus , the GIG247D decreased the thermostability of SM33GI. The higher enzyme activity and the lower optimum pH will be very useful for industrial production of GI.

**Key words** Molecular modeling , protein engineering , glucose isomerase , enzyme activity , optimum pH , substrate affinity