

## 凝乳酶原(凝乳酶)二硫键 Cys206-Cys210 的定位突变

陈红杰 潘学峰 张国宝 刘年娟 张渝英 杨开宇\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 在对凝乳酶原二硫键 Cys206-Cys210 进行定位突变过程中发现,在相应的模板序列中有自身形成自由能为  $-16.1 \text{ kcal/mol}$  的茎环结构倾向,妨碍与引物结合,从而难以合成突变的 DNA,采用快退火可解决此矛盾。5 个突变基因均能在大肠杆菌中高效表达,除 C206A 外,约占细胞总蛋白的 50% 左右。突变体的复性结果表明,Cys206-Cys210 对凝乳酶原正确折叠不是绝对必需的,但相应位置的氨基酸取代对复性效率有显著影响,在 5 个突变体中,C206A/C210A 的复性率分别为 C206S/C210S、C210A、C210S 的 4.5 倍、20 倍和 30 倍,而 C206A 完全不能复性。C206A/C210A 与 C206S/C210S 的远紫外 CD 光谱与野生型基本相同,其荧光发射光谱与野生型相比最大发射峰不变,而荧光强度有显著增加。由于上述 3 个蛋白具有相同比活,说明突变分子能形成具有生物活性的空间构象,而只是某些色氨酸残基微环境受到微扰。

**关键词** 定位突变,二硫键,凝乳酶原,凝乳酶

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0007-04

一般而言,二硫键在蛋白质折叠与稳定蛋白质构象中起重要作用,有时还决定某些蛋白质的生物功能。凝乳酶原(凝乳酶)含有 3 对二硫键,本实验室已证明在凝乳酶原的正确折叠过程中 Cys250-Cys283 是绝对必需的<sup>[1]</sup>,而 Cys45-Cys50 则是可取代的<sup>[2]</sup>。为了全面了解凝乳酶(原)的二硫键的功能,对另一对二硫键 Cys206-Cys210 进行了定位突变并分析了突变体的复性效率及其空间构象。

### 1 材料与方法

#### 1.1 定位突变

用 EcoRI 酶切凝乳酶原表达质粒 pTaAC<sup>[3]</sup> 获得含有编码 C206 与 C210 的 800bp 片段,亚克隆至 M13mp19 中,按 Kunkel 法<sup>[4]</sup>制备含 U 单链模板,突变引物序列见表 1。模板与引物退火后按 Yukenberg 方法<sup>[5]</sup>或 PCR 方法<sup>[6]</sup>得到突变 DNA,用 Sanger 双脱氧核苷酸链终止法<sup>[7]</sup>进行测序鉴定。

#### 1.2 突变基因的表达

用确证突变的 DNA 片段置换相应野生型片段并构建含 P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 启动子的表达质粒<sup>[8]</sup>,转化 E. coli BL21(DE3)pLysS,通过提高培养温度诱导表达。

#### 1.3 凝乳酶原突变体的复性

表达后的菌体经超声破碎获得包含体蛋白,将包含体蛋白按文献<sup>[9]</sup>所述的方法进行溶解、复性,再经 pH2 处理<sup>[10]</sup>使正确折叠的凝乳酶原分子转变为假凝乳酶,测定产物的凝乳活性<sup>[10]</sup>。

表 1 凝乳酶原基因定位突变引物

Table 1 Primers for site-directed mutagenesis at disulfide bond Cys206-Cys210 of prochymosin gene

Mutation	Primer No.	Sequence(5'→3')
C206A	1	ACAGCCACCCTC <u>AG</u> CTGCCACAACC
C210A	2	GGATGGCCTG <u>GCC</u> GCCACCCTCAG
C206A/C210A*	3	GATGGCCTG <u>GCG</u> CCACC <u>TCG</u> GCGGCCACAAC
	4	GTTGTGGCC <u>GCC</u> AGGGTGGC <u>GCC</u> CAGGCCATC
C210S	5	ATGGCCTG <u>AG</u> GCCACC
C206S/C210S	6	TC <u>AG</u> AGGCCACAACCACAC + Primer 5

Note: the mutation sites were underlined.

\* The terminal primers for PCR amplification are not shown.

#### 1.4 凝乳酶突变体的光谱分析

折叠后的凝乳酶原经过 pH2 与 pH5.5 两阶段处理<sup>[10]</sup>转变为凝乳酶,经 DEAE-Sepharose FF 柱层

析纯化后进行光谱分析。在 J-720 型圆二色谱仪上进行远紫外区 CD 光谱分析,光径 0.1cm,扫描速度 50nm/min,灵敏度 2mdeg。在 HITACHI 850 型荧光分光光度计上进行荧光发射光谱扫描,激发波长 281nm,狭缝 5.0nm,光径 1cm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 定位突变

虽然定位突变目前已成为常规操作,但我们在工作中注意到 DNA 模板的结构对于突变 DNA 的合成仍有重要影响,不容忽视。在合成 Cys206→Ala206 和 Cys210→Ala210 的突变 DNA 时,采用 25mer 或 26mer 引物(引物 1、2)未出现任何问题,但在进行 Cys210→Ser210 突变时,采用 18mer 引物 5,在同样的合成条件下,合成产物极少,此 18mer 引物设计是符合一般原理的,其中仅有一个碱基错配两侧分别有 8、9 个碱基互补。在用 DNASIS 分析模板 DNA 序列时发现,在 206 与 210 位附近有可能出现一个茎环结构(图 1),其自由能为 -16.1 kcal/mol。据此推测,在退火时有可能模板自身形成二级

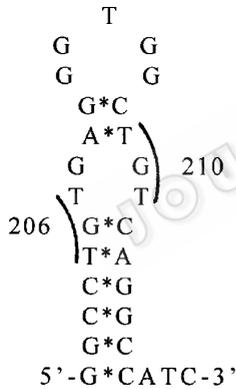


图 1 凝乳酶原 Cys206 与 Cys210 位点附近基因序列可能形成的茎环结构

Fig. 1 The possible loop-stem structures at Cys206 and Cys210 of prochymosin gene

结构,妨碍了与引物结合。为了验证这一推论,将由 70℃ 降至 22℃ 经历 40 min 的慢退火缩短至经历 1~2 min 的快退火,结果合成效率明显提高。为了避免模板形成茎环结构并同时获得单、双位点的突变,将引物 5、6 与模板同时退火,然后加入 T4 DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶进行体外合成,结果确实同时获得了 C210S 与 C206S/C210S 的突变 DNA,而在进行 C206A/C210A 突变时则采取 PCR 方法,突变引物为互补的 33mer(引物 3、4)。经 DNA 重组及序列测定证实共得到 5 个表达质粒:C206A、

C210A、C206A/C210A、C210S、C206S/C210S。图 2 给出了 C206A/C210A 在突变位点附近的序列。

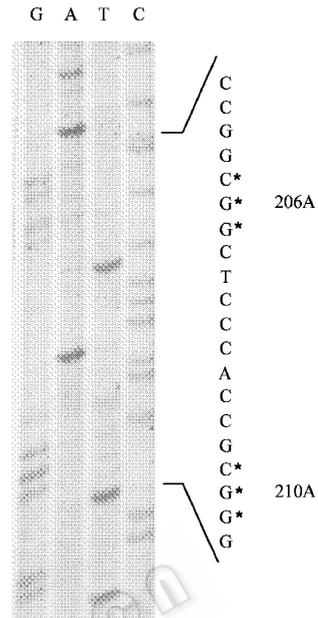


图 2 突变位点及其旁侧序列

Fig. 2 Mutated sites and their flanking sequences of mutant prochymosin C206A/C210A.

### 2.2 凝乳酶原突变体的表达

上述 5 个突变凝乳酶原表达质粒在 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 中的表达情况见图 3,表明除了

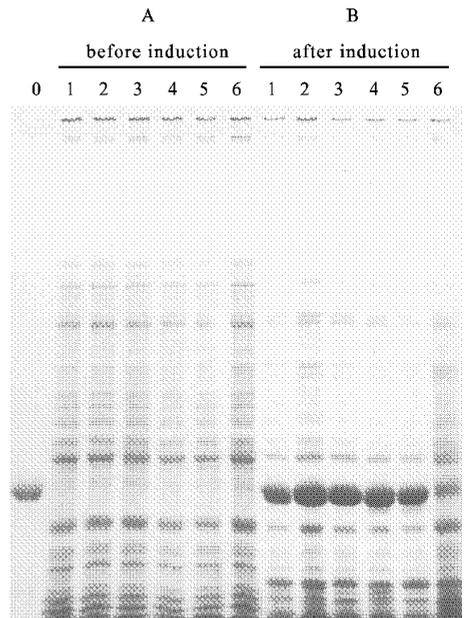


图 3 诱导前后野生型及其突变体凝乳酶原的表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression of wild-type (WT) and mutant prochymosins before (A) and after induction (B).

0. Prochymosin marker; 1. WT; 2. C206A/C210A; 3. C206S/C210S;

C206A 突变凝乳酶原与野生型的表达量相当,均达到 50% 的高水平。

### 2.3 凝乳酶原突变体的氧化重折叠

凝乳酶原及其突变体的表达产物以包含体形式存在,为了进行复性首先将包含体用 8 mol/L 脲-pH 11 磷酸盐缓冲液溶解,再经过 pH11 和 pH8 两阶段氧化重折叠,根据复性产物酸化后的凝乳活性计算复性率。由表 2 和以往对其它两对二硫键突变的结果可得出如下结论 (1)将 Cys206-Cys210 消除,用两个 Ala 取代,所得到的突变体有较高的复性率,约为野生型凝乳酶原的 50%,说明这对二硫键不同于 Cys250-Cys283,而类似于 Cys45-Cys50,不是凝乳酶原正确折叠所绝对必需的。(2)双位点突变优于单位点突变,Ala 取代优于 Ser 取代,而 C206A 则完全不能正确折叠,说明 206 与 210 位的氨基酸残基对于凝乳酶原的有效折叠起重要作用。这与 Cys45-Cys50 有明显区别,前文报道<sup>[2]</sup>,C45A、C50A、C45A/C50A、C45D、C50S、C45D/C50S、C45A/C50S 7 个突变体均能正确折叠,复性率相差较小。

表 2 凝乳酶原突变体及其野生型复性率的比较

Table 2 Refolding efficiency of mutant and wild-type (WT) prochymosins

Protein	Renaturation efficiency ( $\bar{X} \pm SD$ %)
WT	26.9 ± 1.5
C206A/C210A	14.5 ± 1.0
C206S/C210S	3.26 ± 0.50
C210A	0.72 ± 0.42
C210S	0.45 ± 0.39
C206A	0

Note: After renaturation at 1st stage for 24 h and at 2nd stage for 240 h the refolded products were activated at pH2 for 10 h followed by analysis for milk-clotting activity to evaluate renaturation efficiency.

### 2.4 凝乳酶及其突变体的光谱分析

光谱分析是探测突变对蛋白质构象影响的有效手段之一,为了深入了解突变体凝乳酶与其野生型结构上的异同,对其进行了 CD 和荧光光谱分析。在上述 5 种突变体中,由于只有双位点突变体有较高的复性率,才有可能获得一定量的纯凝乳酶进行光谱分析,因此对 C206A/C210A 和 C206S/C210S 的复性产物进行酸化处理及 DEAE-Sepharose FF 柱层析获得了纯度大于 95% 的凝乳酶突变体。图 4 表明,突变体凝乳酶与野生型的远紫外区 CD 光谱

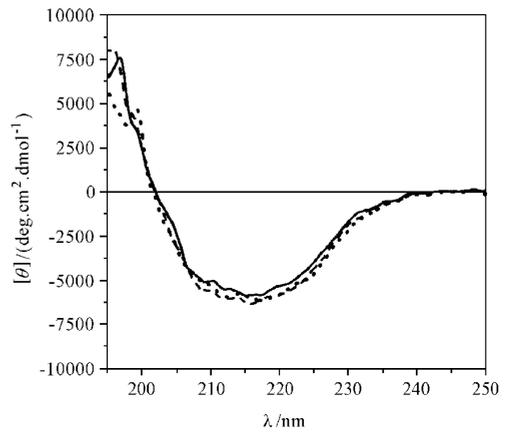


图 4 凝乳酶突变体及其野生型的远紫外区 CD 光谱

Fig. 4 CD spectra of mutant and wild-type chymosins in the far UV region

(---) C206A/C210A (···) C206S/C210S;  
(—) Wild-type chymosin

无明显差别,最小摩尔椭圆度均在 215nm 左右,表明野生型及突变体凝乳酶以  $\beta$ -片层结构为主,仅有少量的  $\alpha$ -螺旋结构,从而证明它们有相同的二级结构。从图 5 荧光发射光谱分析可见,与野生型相

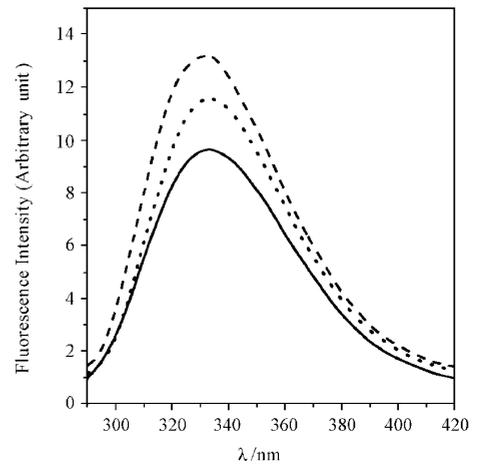


图 5 凝乳酶原突变体及其野生型的荧光发射光谱

Fig. 5 Fluorescence emission spectra of mutant and wild-type chymosins

(---) C206A/C210A (···) C206S/C210S;  
(—) Wild-type chymosin

比,突变体凝乳酶的最大发射峰无改变,三者均在 333nm,而荧光强度有明显增加,其中 C206A/C210A 提高更多。又据活性测定 3 种蛋白具有相似的比活,说明突变分子能形成具有生物活性的空间构象,而只是某些色氨酸残基微环境受到微扰。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Huang K ,Zhang Z Z ,Liu N J *et al.* Functional implication of disulfide bond ,Cys250 – Cys283 ,in bovine chymosin. *Biochem Biophys Res Commun* ,1992 ,**187** :692–696
- [ 2 ] Zhang Y Y ,Li H S ,Wu H *et al.* Functional implications of disulfide bond ,Cys45 – Cys50 ,in recombinant prochymosin. *Biochim Biophys Acta* ,1997 ,**1343** :278–286
- [ 3 ] Zhang Y Y ,Zhou W ,Liu N J *et al.* Expression of calf prochymosin gene in *Escherichia coli* . *Chinese J Biotechnol*( *生物工程学报* ) ,1991 ,**7** :169–175
- [ 4 ] Kunkel T A ,Roberts J D ,Zakour R A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Meth Enzymol* ,1987 ,**154** :367–382
- [ 5 ] Yukenberg P D ,Witney F ,Geisselsoder J *et al.* In *Directed Mutagenesis* ,Edited by McPerson , M J ,IRL Press ,New York , 1991 ,pp.27–48
- [ 6 ] Sambrook J ,Fritsch F E ,Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual ,Second Edition* ,Cold Spring Harbor Press , New York ,1989
- [ 7 ] Sanger F. Determination of nucleotide sequence in DNA. *Science* ,1981 ,**214** :1205–1210
- [ 8 ] Wang G ,Liu N J ,Yang K Y. High-Level expression of prochymosin in *Escherichia coli* :Effect of the secondary. *Protein Expression and Purification* ,1995 ,**6** :284–290
- [ 9 ] Zhang Z ,Zhang Y ,Yang K. Structure of the ribosome binding site. *Science in China( Serives C )* ,1997 ,**40** :169–175
- [ 10 ] Pederson V B ,Christensen K A ,Foltmann B. Mechanism of enhancement of prochymosin. *Eur J Biochem* . 1979 ,**94** :573–580
- [ 11 ] Emtage J S ,Angal S ,Doel M T *et al.* Investigations on the activation of bovine prochymosin synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli* . *Proc Natl Acad-Sci USA* , 1983 ,**80** :3671–3675

### Site-directed Mutagenesis at Disulfide Bond Cys206-Cys210 of Prochymosin ( Chymosin )

CHENG Hong-Jie PAN Xue-Feng ZHANG Guo-Bao LIU Nian-Juan  
ZHANG Yu-Ying YANG Kai-Yu\*

( *Institute of Microbiology ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 ,China* )

**Abstract** During the work of site-directed mutagenesis at disulfide bond Cys206-Cys210 of prochymosin ,it was found that the corresponding template sequence had the potential to form a loop-stem structure with free energy of  $-16.1$  kcal/mol ,which prevent the template from pairing with primer and in turn ,the synthesis of the mutated DNA strand. Rapid annealing can overcome this difficulty. Five expression plasmids of prochymosin muants with deletion of Cys206-Cys210 ( C206A ,C210A ,C206A/C210A ,C210S and C206S/C210S ) were constructed. Except for C206A they were expressed at high level in *E. coli* amounting to 50% of the total cellular proteins. Renaturation of the mutant prochymosin indicated that Cys206-Cys210 is dispensable for correct refolding of prochymosin. However ,the amino acid residues at Cys206 and/or Cys 210 play a critical role in determining the renaturation. Among the five mutants the reactivation efficiency of C206A/C210A were about 4.5-fold ,20-fold and 30-fold higher than that of C206S/C210S ,C210A and C210S respectively. C206A can not correctly refold at all. CD spectra in the far UV region indicate that C206A/C210A and C206S/C210S chymosin analogs have a secondary structure almost identical to that of the wild-type chymosin. Fluorescence spectroscopic analysis revealed that mutant chymosins have the same emission maximum at 333 nm as the wild-type chymosin but their fluorescence intensities at 333 nm are much higher than that of the wild-type chymosin. Considering that the mutants and the wild-type chymosin exhibit almost the same specific activity ,it is reasonable to conclude that the mutant proteins assume a native active information with a perturbation around some tryptophan residues.

**Key words** site-directed mutagenesis , disulfide bond , prochymosin , chymosin

Received May 16 2000

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China ( 39870173 ).

\* Corresponding author. Tel 86-10-62566527 ; Fax 86-10-62560912 ; E-mail: yangky@sun.jim.ac.cn

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