

耐热 β -糖苷酶的基因克隆、表达和耐热性研究

何向远 金城 张树政 杨寿钧*

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 从非解脲栖热菌 HG102 (*Thermus nonproteolyticus*) 染色体文库中, 筛选得到耐热 β -糖苷酶 (*Tn-gly*) 基因。该基因位于重组质粒 2.6kb *Hind* III 插入片段上; 并在 *E. coli* 中表达, 酶比活力提高 17 倍。经序列测定, 该基因 1311bp, 编码 436 个氨基酸, 前端与部分糖透性酶基因紧密相连, G + C 含量为 71%, 有明显的 RBS 序列, 启动子序列不明显。经序列同源性比较, 其氨基酸序列属糖苷水解酶家族 1, 有 -N-E-P- 和 -T-E-N- 保守序列, Glu164 和 Glu338 推测是催化活性中心。其氨基酸组成中, 疏水氨基酸含量较高 (Ala 12.8%、Leu 10.9%), Arg (9.6%), Glu (9.44%) 和 Pro (8.0%) 含量显著较高。理论预测二级结构中, α -螺旋占 41.4%, β -折叠占 16.2%, β -转角占 14.4%, 并有大量的 Pro 位于 β -转角的第二位。疏水作用、盐键、 α -螺旋和 Pro 对 *Tn-gly* 的突出热稳定性有重要贡献。经系统进化树分析发现, β -糖苷酶在物种进化中比较保守。

关键词 耐热 β -糖苷酶, 非解脲栖热菌 HG102, 耐热性研究

中图分类号 Q739 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0063-06

β -糖苷酶 (EC3.2.1.21) 可以催化水解多种 β -糖苷键, 具有底物广谱性, 广泛存在于各类生物体, 具有多种生物功能。 β -糖苷酶除水解作用外, 还有转糖苷作用, 可以合成寡糖^[1], 并可以水解纤维二糖获得葡萄糖, 这是纤维素降解中的重要步骤。耐热酶最适温度从 65 ~ 125 $^{\circ}$ C, 在应用上有更大优越性, 可以提高反应速度、减少污染、增强对化学试剂的耐受力。耐热酶已应用于分子生物学 (*Taq* 酶), 洗涤剂生产 (蛋白酶) 和淀粉加工 (淀粉酶) 等^[2]。

近年来, 耐热 β -糖苷酶研究活跃, 耐热 β -糖苷酶的报道有: *Suofolobus solfataricus*^[3], *Pyrococcus furiosus*^[4], *Pyrococcus kodakaraensis*^[5], *Thermotoga maritima*^[6], *Thermosphaera aggregans*^[7], *Thermus thermophilus*^[8]。

非解脲栖热菌 HG102 (*Thermus nonproteolyticus*) 是本实验室从广东温泉筛选得到的, 是栖热菌属的一个新种^[9], 可以产生胞内多种糖苷酶。本文报道了该菌 β -糖苷酶的基因克隆、表达和序列分析, 并对酶的耐热机制作了探讨和分析。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 非解脲栖热菌 HG102 (*Thermus*

nonproteolyticus) 为本实验室筛选获得。大肠杆菌 (*E. coli*) AS1.1739 [*K12r⁻Δ(lacIPOZY) × 74*] 为中科院微生物所保存。质粒 pUC18 为本实验室保存。

1.1.2 培养基及培养条件: LB 培养基为大肠杆菌完全培养基, 筛选时加入氨苄青霉素 (100 μ g/mL), 培养温度为 37 $^{\circ}$ C。非解脲栖热菌的培养基: 0.8% 蛋白胨, 0.5% 酵母膏, 0.2% NaCl, 0.5% 乳糖, 0.05% 葡萄糖, 固体培养基加 1.5% 琼脂粉, 培养温度为 65 $^{\circ}$ C。

1.1.3 酶及生化试剂: 各种 DNA 限制酶、T4DNA 连接酶购自 Promega 公司和宝灵曼公司; 小牛肠碱性磷酸酶 (CIAP)、X-Gal、Dig-prime Labeling Kit 购自宝灵曼公司; IPTG、ONPG、PNPG 和琼脂糖购自 Sigma 公司; 蛋白质分子量标准为 Pharmacia 产品; 其它均为分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 DNA 操作: 非解脲栖热菌染色体提取按 Marmur^[10] 方法。其它操作按《分子克隆》^[11], Southern 杂交按 Dig-prime Kit 说明书进行。

1.2.2 β -糖苷酶基因阳性克隆筛选: 重组质粒转化受体菌 *E. coli* AS1.1739, 菌落在涂有 IPTG 和 X-gal (方法按《分子克隆》^[11]) 的 Amp-LB 板上 37 $^{\circ}$ C 生长 16 ~ 20h, 然后在 50 ~ 55 $^{\circ}$ C 培养约 1 ~ 5h, 菌落变蓝

收稿日期: 2001-06-28, 修回日期: 2001-09-21。

* 通讯作者。 Tel: 86-10-62550184; Fax: 86-10-62560912; E-mail: yangsj@sun.im.ac.cn

色的即为阳性克隆。

1.2.3 序列测定:重组质粒在 ABI 377 自动测序仪上进行测定。

1.2.4 序列同源性比较及序列分析:测定的 DNA 序列用 DNASTAR Windows32 进行翻译并进行序列分析、二级结构预测和绘制系统进化树;序列同源性比较用 Gapped BLAST 程序^[12]。

1.2.5 重组 β -糖苷酶水解活力测定(用 ONPG 法):0.1mL 4mmol/L ONPG, 0.1mL pH5.8 磷酸缓冲液, 0.7mL H₂O, 混匀后于 85℃ 保温 5min, 加入 0.1mL 酶液, 反应 10min, 加入 4mL 0.4mol/L Na₂CO₃ 溶液终止反应, 420nm 测定吸光度。此条件下每分钟产生 1 μ mol 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

1.2.6 SDS-PAGE 电泳,按文献^[13]。

2 结果

2.1 重组 β -糖苷酶的基因克隆及表达

非解脲栖热菌 HG102 染色体 DNA 分别经 *Hind* III, *Bam* HI, *Pst* I 部分酶切后, 分别与相同酶切并且脱磷酸的质粒 pUC18 连接, 连接产物转化受体菌 *E. coli* AS 1.1739, 在涂有 IPTG 和 X-gal 的 Amp-LB 板上 37℃ 培养, 等菌落长到 0.5 ~ 1mm 转到 50 ~ 55℃ 培养 1 ~ 5h, 在约 5000 个 *Hind* III 酶切连接转化子中挑到 3 个蓝色阳性克隆。阳性克隆在 Amp-LB 培养基 37℃ 继续培养, 经进一步鉴定具有耐热 β -糖苷酶活性, 3 个重组质粒均含 2.6kb 的插入片段, 重组质粒命名为 pHY。重组质粒 pHY 经酶切鉴定, 具有 *Bam* HI、*Sac* I、*Sma* I、*Kpn* I 位点(见图 1)。经

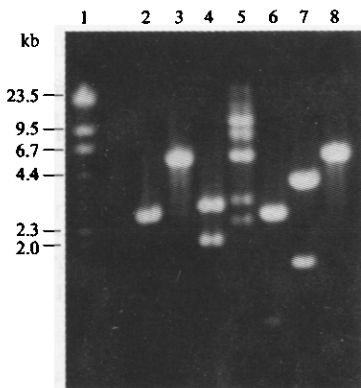


图 1 重组质粒 pHY 酶切图谱

Fig.1 Restriction enzyme map of the fragments cloned in plasmid pHY

1. Marker(λ DNA/*Hind* III); 2. pHY/*Hind* III; 3. pHY/*Eco*R I
4. pHY/*Bam* HI; 5. pHY/*Sac* I; 6. pHY/*Sma* I;
7. pHY/*Kpn* I; 8. pHY/*Pst* I

Southern 杂交鉴定, 插入片段与非解脲栖热菌 HG102 DNA 有同源性(见图 2)。重组质粒 pHY 在 *E. coli* AS 1.1739 中, 表达了耐热 β -糖苷酶活性, 酶比活力提高 17 倍(见图 3 和表 1)。

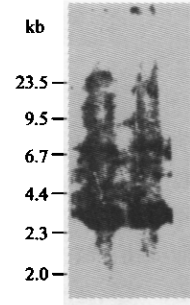


图 2 Southern 杂交照片

Fig.2 Southern hybridization analysis using the cloned plasmids as probes against *T. nonproteolyticus* HG102 genomic DNA

The two lanes are both genomic DNA digested by *Hind* III, the numbers on the left indicate kilobase scale (λ DNA fragments digested by *Hind* III)

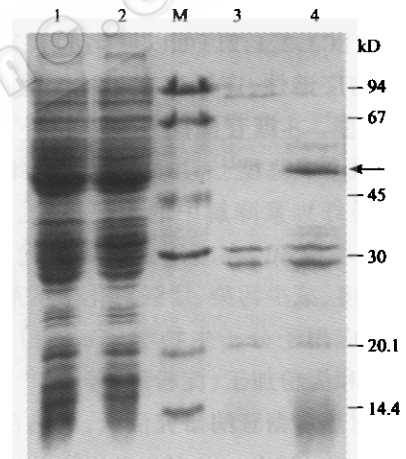


图 3 *Tn-gly* 在 *E. coli* 中表达

Fig.3 SDS-PAGE of *Tn-gly* expression in *E. coli* AS1.1739

1. *E. coli* AS1.1739 (pUC18) cell-free extract;
2. *E. coli* AS1.1739 (pHY) cell-free extract;
3. *E. coli* AS1.1739 (pUC18) cell-free extract heated at 80℃ for 15min;
4. *E. coli* AS1.1739 (pHY) cell-free extract heated at 80℃ for 15min;
M. Standard marker proteins

表 1 耐热 β -糖苷酶活力比较
(以 ONPGal 为底物, 85℃ 测定酶活)

Table 1 Activity comparison between recombinant and wild β -glycosidase

	T/℃	Activity/(u/mg)	Folds
AS1.1739	37	-	-
<i>T. n</i> HG102	65	6.7	1
AS1.1739(pHY)	37	114.9	17

2.2 耐热 β -糖苷酶的基因序列测定

经序列测定插入片段含 2623bp, 序列中有 1 个 *Kpn* I 位点, 1 个 *Sac* I 位点, 2 个 *Bam*HI 位点, 9 个 *Sma* I 位点。用 BLAST 程序与 GenBank 中的已有序列比较, 确定了编码框: 从 189 位起始密码子 ATG 到 1499 位终止子 TGA, 共 1311bp, 编码 436 个氨基酸, 该基因(命名为 *Tn-gly*)序列已被 GenBank 收入, Accession No. AF225213。ATG 前面有典型的 RBS 序列, 但无明显启动子, G + C 含量为 71%, 基因前端有部分糖透性酶编码框。估计 *Tn-gly* 基因和其前端的糖透性酶基因共同位于一个调协子中, 使用共同的启动子序列。

2.3 耐热 β -糖苷酶氨基酸序列分析

Tn-gly 的理论分子量为 48997.5D, 与纯化酶测定的分子量一致, 理论等电点为 5.8。氨基酸组成中: 含强碱氨基酸 46 个 [Strongly Basic (+) aa (K, R)], 强酸氨基酸 56 个 [Strongly Acidic (-) aa (D, E)], 疏水氨基酸 172 个 [Hydrophobic aa (A, I, L, F, W, V)], 极性氨基酸 71 个 [Polar aa (N, C, Q, S, T, Y)]。亲水氨基酸(H): Asx, Glx, Lys, Arg, Ser, Thr, His 与疏水氨基酸(A): Val, Ile, Leu, Phe, Met 的比值为

<i>Thermus n. HG102</i>	β -gly: SRETPFFATL	NEP	MCSAFLGHWTGEHAP	----	REVPWPLYI	TEN	GAAYPDLW
<i>Thermus thermophilu</i>	β -gly: ADRVPPFATL	NEP	MCSAFLGHWTGEHAP	----	REVPWPLYV	TEN	GAAYPDLW
<i>Streptomyces sp.</i>	β -glu: GDRVKTWTTL	NEP	MCSAFLGYGSGVHAP	----	DFPALPLVI	TEN	GAAFHDYA
<i>Bacillus polymyxa</i>	β -glu: GKIQHLLTF	NEP	MCI AFLSNMLGVHAP	----	KYGNIDIVI	TEN	GACIND-EVV
<i>Thermotoga maritima</i>	β -glu: GDRVKNWITL	NEP	MVVAIVGHLYGVHAP	----	EYNPPEVYI	TEN	GAAFDDVVS
<i>Sulfolobus s.</i>	β -gly: DDLVDEYSTM	NEP	MVVGGLGYVGKSGF	----	NRYHLYMYV	TEN	GIADDADYQ
<i>Thermoanaerobacter b.</i>	β -gly: DAIPLWITL	NEP	MWSSILSYGIGEH	-----	ATKLPMYI	TEN	GAAKDEGV

图 4 非解脲柄热菌 HG102 β -糖苷酶与部分糖苷水解酶族 I 成员保守序列比较

Fig. 4 Alignments of some β -glycosidases in glycosyl hydrolase family I

The two framed sequences indicated the reserved motif in glycosyl hydrolase family I

2.5 重组 β -糖苷酶的二级结构预测

用 DNASTAR 软件中 Protean 程序预测 *Tn-gly* 的二级结构, 根据 Chou-Fasman^[24] 模式, 该蛋白含 41.4% α -螺旋, 16.2% β -折叠, 14.4% β -转角。特别在 35 个 Pro 中有 14 个 (30、40、85、93、165、180、255、291、303、316、331、344、356、409) 位于 β -转角的第二位。Kyte-Doolittle 模式分析其亲水性, 发现其 N-端较 C-端的亲水性强, 亲水片段与疏水片段相间排列。

2.6 重组 β -糖苷酶的系统进化树分析

我们选取糖苷酶家族 I 中已有三维结构的序列和栖热菌属的已有序列, 用 DNASTAR 软件进行同源性和系统树绘制。这些序列有来源于古细菌

(*Sulfolobus solfataricus*, *Thermosphaera aggregans*)、常温细菌 (*Bacillus circulans*, *Bacillus polymyxa*, *Lactococcus lactis*)、栖热菌 (*Thermus thermophilus*, *Thermus thermophilus* TH25, *Thermus nonproteolyticus* HG102) 和高等植物 (*Trifolium repens*, *Sinapis alba*)。它们的生物功能各不相同, 有 β -葡萄糖硫苷酶 (Myrosinase)、产氰 β -葡萄糖苷酶 (Cyanogenesis β -glucosidase), β -葡萄糖苷酶和 6-磷酸-半乳糖苷酶, 但它们均有相似的 (β/α)_s 结构和底物广谱性, 同属糖苷酶族 I。

值得注意的是, 该酶中某些氨基酸含量: Ala 为 12.8%, Leu 为 10.09%, Gly 为 9.17%, Glu 为 9.44%, Pro 为 8.0%, Arg 为 9.6% (Arg/Lys 比值为 10.5); 而 Cys 和 Met 含量较低, 分别只有 2 个 (0.45%) 和 4 个 (0.91%)。

2.4 耐热 β -糖苷酶的氨基酸序列同源性比较

Tn-gly 氨基酸序列与数据库中已有序列进行比较, 确定其为糖水解酶族 I 的一员, 同源性高于 40% 的 β -葡萄糖苷酶序列有: *Streptomyces sp.* (46%)^[15], *Thermoanaerobacter brockii* (46%)^[16], *Thermotoga maritima* (44%)^[17], *Caldocellum ascchanolyticum* (43%)^[18], *Bacillus circulans* (44%)^[19], *Microbispora bispora* (46%)^[20], *Bacillus polymyxa* (42%)^[21] 和 *Thermotoga neapolitana* (43%)^[22]。而与古细菌 β -糖苷酶^[3,4] 的同源性较低 (28%)。与 *Thermus thermophilus*^[8] 的同源性为 85%, 差异集中于 N 端和 C 端。糖苷水解酶族 I 序列中有两保守序列-N-E-P-和-T-E-N-^[23], 在 *Tn-gly* 序列中非常保守 (见图 4)。

从分析结果可以看出 (见图 5), 糖苷酶族 I 的成员的氨基酸序列进化与物种进化基本保持一致。与 *Tn-gly* 序列同源性最高的是同为栖热菌属的

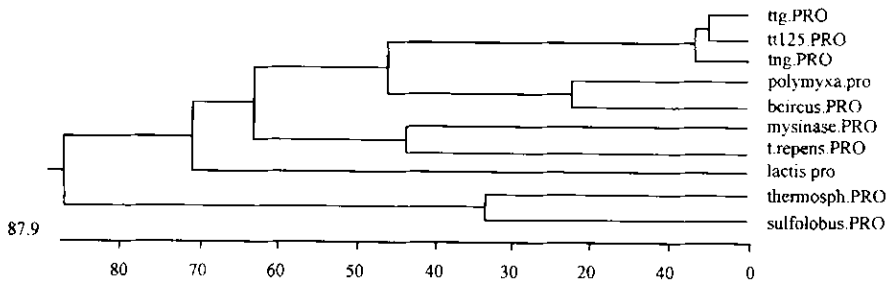


图5 糖苷酶族1的部分成员的系统树

Fig.5 Phylogenetic tree constructed by DNASTar

(ttg: *Thermus thermophilus*; tt125: *Thermus thermophilus* TH25; tng: *Thermus nonproteolyticus* HG102;
 ploymyxa: *Bacillus polymyxa*; beircus: *Bacillus circulans*; mysinase: *Sinapis albat*; repens: *Trifolium repens*;
 lactis: *Lactococcus lactis*; thermosph: *Thermosphaera aggregans*; sulfolobus: *Sulfolobus solfataricus*)

T. thermophilus 的两个不同种的序列;而非解脛栖热菌 HG102 作为同属的一个新种,序列差异反映了物种的差异。其次, *Tn-gly* 序列与常温细菌 (*B. circulans*, *B. polymyxa*) 的亲缘较近,再次是与植物的两个序列。值得注意的是 *Tn-gly* 与嗜热的古细菌 (*S. solfataricus*, *T. aggregans*) β -糖苷酶序列亲缘性最远,这与古细菌的独立进化地位是一致的。*Tn-gly* 在一级序列上的特点,反映出它在耐热机制上可能不同于嗜热古细菌 β -糖苷酶。

3 讨论

根据氨基酸序列同源性和结构的类似性(而不是底物的选择性),糖苷水解酶被分为60多个家族。糖苷水解酶族1包括 β -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖硫苷酶、6-磷酸- β -半乳糖苷酶、6-磷酸- β -葡萄糖苷酶等^[25],它们往往可以作用于多种底物。糖苷水解酶族1的水解作用需要两个重要基团,一个质子供体和一个亲核集团,它们分别位于两保守的序列-N-E-P-和-T-E-N-中^[23],已有实验^[26]证明-N-E-P-和-T-E-N-中两个Glu即为其催化活性中心,前面是质子供体,后面是亲核集团。*Tn-gly* 与糖苷水解酶族1中的许多成员有高度同源性,通过保守序列比较发现与常温菌 (*Streptomyces* sp., *B. polymyxa*) 及耐热古细菌 *S. solfataricus*, *T. aggregans* 的保守序列一致,所以推测Glu164和Glu338是*Tn-gly*的催化活性中心,Glu164是质子供体,Glu338是亲核集团。

从分析*Tn-gly*的氨基酸组成和预测二级结构,可以发现*Tn-gly*具有突出耐热性的部分原因:

1. 带电氨基酸的电荷作用。这种作用一般位于蛋白质的表面。*Tn-gly*具有高Arg(9.6%)含量及高Arg/Lys比值。而Arg被认为通过离子键对蛋白结构起稳定作用。Aguilar^[3]统计了15种糖苷水解

酶族1成员氨基酸平均含量,Arg为4.7%、Pro为4.1%。Folcarelli等^[27]通过Lys \rightarrow Arg点突变提高了蛋白热稳定性。Shibuya等^[28]报道认为:Lys和Arg一般位于蛋白分子表面,具有亲水性,Lys较Arg多一个CH₂而减弱了亲水性;而Arg比Lys少一个CH₂,多一个胍基,从而形成更强的电荷作用,增强了稳定性。另外,高Glu(9.4%)的作用可能与Arg相似,Arg和Glu之间非常易于形成盐键,这对蛋白稳定很重要。

2. *Tn-gly*的Pro(8.0%)含量明显高于平均含量,并且有大量的Pro位于 β -转角第二位。Suzuki等^[29]报道:蛋白质氨基酸组成中的高Pro含量与热稳定有关,特别位于 β -转角第二位的Pro;Pro随机分布于蛋白的表面,具有积累效应。Guo^[30]报道了Pro对蛋白热稳定性的贡献,认为:由于Pro的吡咯嗪环的刚性限制了肽键N-C旋转,Pro构象自由度比其它氨基酸小,减小了Pro前氨基酸的构象空间;并且使肽链沿Pro弯曲,使其易于和 β -转角其它部位形成氢键;另外Pro的疏水侧链与附近疏水区域的相互作用,加强了高级结构的稳定性。

3. *Tn-gly*的预测二级结构中,有41.4%的 α -螺旋。Vieille^[31]报道, α -螺旋对蛋白质稳定有重要作用。许多点突变实验证明,通过引入易于形成 α -螺旋的氨基酸(如Ala),增强了酶的热稳定性。*Tn-gly*序列中有高的Ala(12%)含量,这与二级结构预测的 α -螺旋(41.4%)含量高一致。

4. 疏水氨基酸作用。疏水作用是在溶液中维持蛋白质折叠紧密结构的主要力,一般疏水氨基酸位于蛋白质内部,氨基酸中含有较多的芳香氨基酸是增加热稳定性的重要原因。*Tn-gly*有172个疏水氨基酸(39.4%),特别是Leu(10.09%)。卢柏松等

收集 110 对分别来自嗜热和常温微生物的同源蛋白质序列,分析两组蛋白质各种氨基酸含量以及疏水性氨基酸组成,疏水指数和带电氨基酸组成的差别。嗜热蛋白质比常温蛋白质具有较高的平均疏水性和带电氨基酸组成。对两组蛋白质的“脂肪族氨基酸指数”进行分析,证明嗜热蛋白质之所以具有较高的脂肪族氨基酸指数是由于其亮氨酸含量较高^[32]。

5. Cys, Thr, Asn, Gln 等氨基酸在高温下不稳定,容易引起蛋白质变性或断裂^[33]。Tn-gly 序列中 Cys 和 Met 含量较低,并且 Asn 和 Gln 的含量也不高,结构中并没有发现有二硫键形成。这样高温下,可以保持稳定的结构。

以上论述的这些是与 Tn-gly 突出热稳定性有关的特点。要进一步了解 Tn-gly 的耐热机制,只有通过三维结构解析和定点突变技术,才可以知道是什么因素导致 Tn-gly 具有突出的耐热性。Tn-gly 晶体学研究在进行中。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Ichikawa Y, Look G C, Wong C-H. Enzyme-Catalyzed Oligosaccharide Synthesis *Anal Biochem*. 1992, **202**: 215 ~ 218
- [2] Thomas K NG, William R Kenealy. *Thermophiles*, Edited by Thomas D. Brock. A Wiley-Interscience Publication, 1986, pp. 197 ~ 216
- [3] Aguilar C F, Sanderson I, Moracci M C *et al.* Crystal structure of the β -Glucosidase from the hyperthermophilic Archeon *Sulfolobus solfataricus*: resilience as a key factor in thermostability. *J Mol Biol*. 1997, **271**: 789 ~ 802
- [4] Kengen S W M, Luesink E J, Stams A J M *et al.* Purification and characterization of an extremely thermostable β -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Eur J Biochem*. 1993, **213**: 305 ~ 312
- [5] Ezaki S, Miyaoku K, Nishi K J *et al.* Gene Analysis and Enzymatic Properties of Thermostable β -Glucosidase from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *J of Bioscience and Bioengineering*, 1999, **88**: 130 ~ 135
- [6] Gabelsberger J, Liebl W, Schleifer K H. Cloning and characterization of β -galactoside and β -glucoside hydrolyzing enzymes of *Thermotoga maritima*. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, **109**: 131 ~ 138
- [7] Chi Y I, Martinez-Cruz L A, Jancarik *et al.* Crystal structure of the β -glucosidase from the hyperthermophile *Thermosphaera aggregans*: insights into its activity and thermostability. *FEBS letters*, 1999, **445**: 375 ~ 383
- [8] Dion M, Fourage L, Jean-Noel *et al.* Cloning and expression of a β -glucosidase gene from *Thermus thermophilus*. Sequence and biochemical characterization of the encoded enzyme. *Glycoconjugate J*. 1999, **16**: 27 ~ 37
- [9] CAI M Y (蔡妙英), YANG S J (杨寿钧), LIU J F (刘俊风) *et al.* *Thermus nonproteolyticus* sp. nov., A new species of thermophilic nonsporeformer producing LDH. *ACTA Microbiologica sinica* (微生物学报), 1992, **32**: 233 ~ 237
- [10] Marmur J. A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Micro-organisms. *J Mol Biol*. 1961, **3**: 208 ~ 218
- [11] Sambrook J *et al.* *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [12] Altschul S F, Makken T L, Schaffer A A *et al.* Gapped BLAST and PLS-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997, **25**: 3389 ~ 3402
- [13] LI J W (李建武), XIAO N G (肖能赓), YU R Y (余瑞元) *et al.* Principle and Methods of Biochemical Experiments. (生物化学实验原理和方法), Beijing: Beijing University Publication, 1994, pp. 207 ~ 233
- [14] Hatch F T, Bruce A L. Amino-acid Composition of Soluble and Membranous Lipoproteins. *Nature*, 1968, **218**: 1166 ~ 1168
- [15] Perez-Pons J A, Cayetano A, Rebordosa X *et al.* A β -glucosidase gene (bg13) from *Streptomyces* sp. strain QM-B814 Molecular cloning nucleotide sequence, purification and characterization of the encoded enzyme, a new member of family I glycosyl hydrolases. *Eur J Biochem*, 1994, **223**: 557 ~ 565
- [16] Breves R, Bronnenmeier K, Wild N *et al.* Genes Encoding two different β -glucosidases of *Thermoanaerobacter brochii* are clustered in a common operon. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 3902 ~ 3910
- [17] Lieb W, Gabelsberger J, Schleifer K-H. Comparative amino acid sequence analysis of *Thermotoga maritima* β -glucosidase (Bel A) deduced from the nucleotide sequence of the gene indicates distant relationship between β -glucosidase to the BGA family and other family of β -1,4-glycosyl hydrolases. *Mol Gen Genet*, 1994, **242**: 111 ~ 115
- [18] Love D R, Fisher R, Bergquist P L. Sequence structure and expression of a cloned β -glucosidase gene from an extreme thermophile. *Mol Gen Genet*, 1988, **213**: 84 ~ 92
- [19] Paavilainen S, Hellman J, Korpela T. Purification Characterization Gene Cloning and Sequencing of a New β -Glucosidase from *Bacillus circulans* subsp. *alkalophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 927 ~ 932
- [20] Wright R M, Yablonsky M D, Shalita Z P *et al.* Cloning, characterization and nucleotide sequence of a gene encoding *Microbispora bispora* Bgl B, a thermostable β -glucosidase expressed in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 3455 ~ 3465
- [21] Gonzalez-Candelas L, Ramon D, Polaina J. Sequences and homology analysis of two genes encoding β -glucosidase from *Bacillus polymyxa*. *Gene*, 1990, **95**: 31 ~ 38
- [22] Dakhova O, Kurepina N, Zverlov V *et al.* Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Thermotoga neapolitana* genes coding for enzymes of carbohydrate Substrate degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **194**: 1359 ~ 1364
- [23] Davies G, Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 1995, **3**: 853 ~ 859
- [24] Chou P Y, Fasman J. Prediction of the secondary Structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymology*, 1978, **47**: 45 ~ 49
- [25] Henrissat B, Barrach. Updating the sequence-based Classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J*, 1996, **316**: 695 ~ 696
- [26] Moracci M, Capalbo L, Ciaramella M *et al.* Identification of two glutamic acid residues essential for catalysis in the β -glucosidase from the thermoacidophilic archaeon: *Sulfolobus solfataricus* *Prot Eng*, 1996, **9**: 1191 ~ 1195
- [27] Folcarelli S, Battistoni A, Carri M T *et al.* Effect of Lys \rightarrow Arg mutation on the thermal stability of Cu, Zn superoxide dismutase: influence on the monomer-dimer equilibrium. *Protein Engineering*, 1996, **9**: 232 ~ 235

- [28] Shibuya H, M Abe *et al*. Effect of Guanidination on subunit interactions in hybrid isozymes from pig lactate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*, 1982, **708**:300 ~ 304
- [29] Watanabe K, Kitamura K, Suzuki Y. Analysis of the critical sites for protein thermostabilization by proline substitution in oligo-1,6-Glucosidase from *Bacillus coagulans* ATCC 7050 and the evolutionary consideration of proline residues. *Appl and Envir Microbiol*. 1996, **62**: 2066 ~ 2073
- [30] Guo Ping Zhu, Chong Xu *et al*. Increasing the thermostability of D-xylase isomerase by introduction of a proline into the turn of a random coil. *Protein Engineering*, 1999, **12**:635 ~ 638
- [31] Vieille C, Zeikus U G. Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *Trends in Biotech*, 1996, **14**:183 ~ 190
- [32] LU B S (卢柏松), WANG G L (王国力), HUANG P T (黄培堂). A comparison of amino acid composition of proteins from thermophiles and mesophiles. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 1998, **38** (1):20 ~ 25.
- [33] Chen H M, Ford C, Reilly P J. Identification and elimination by site-directed mutagenesis of thermolabile aspartyl bonds in *Aspergillus awamori* glucoamylase. *Protein Engineering*, 1995, **8**:575 ~ 582

Cloning and Expression of a Thermostable β -glycosidase Gene from *Thermus nonproteolyticus* HG102

HE Xiang-Yuan JIN Cheng ZHANG Shu-Zheng YANG Shou-Jun *

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

Abstract The gene coding for β -glycosidase (EC3.2.1.21) from *Thermus nonproteolyticus* HG102 has been cloned and expressed in *E. coli*. The gene open reading frame was 1311bp and it codes for 436 amino acids. The deduced amino acid sequence of the enzyme showed identity with members of glycosyl hydrolase family I. The enzyme had high content of hydrophobic amino acid (Ala 12.8%、Leu 10.9%), Arg(9.6%), Glu(9.4%) and Pro(8.0%), but low content Cys(0.45%) and Met (0.9%). From the alignment of enzyme amino acid sequence with other glycosyl hydrolase family I members, Glu164 and Glu338 were predicted as the proton donor and nucleophile group. The DNASTAR program was used to predict the secondary structure. According to the Chou-Fasman model, the enzyme has 41.4% of α -helices, 16.2% β -strands, 14.4% β -turns. 14 of the 35 Pro were located at the second sites of β -turns. Hydrophobic interaction, ion bond, α -helices and Pro had important contribution to *Tn*-gly thermostability.

Key words *Thermus nonproteolyticus* HG102, thermostable β -glycosidase