

枯草杆菌碱性蛋白酶 Ki-2 基因的序列测定 及 M222A 定点突变

朱榴琴 赵玉凤

(中国科学院生物物理研究所蛋白质工程研究室 北京 100101)

摘要 含有枯草杆菌碱性蛋白酶 Ki-2 基因的 1.9kbDNA 片段用限制酶切成几个小片段,将这些片段分别插入 M13mp18 或 M13mp19 中,用通用测序引物测得全序列。所得全序列与蛋白酶 E 相比较,在结构基因部分仅有 8 个碱基不同,由此而导致两个氨基酸的差异。此 1.9kb 的片段插入枯草杆菌-大肠杆菌穿梭质粒 pBE-2,得到的重组质粒转化蛋白酶缺陷型的枯草芽孢杆菌 DB104,结果表明枯草杆菌碱性蛋白酶 Ki-2 基因在 DB104 中能利用自身的调控元件表达并分泌到胞外。将 Ki-2 蛋白酶的 222 位甲硫氨酸突变成丙氨酸,突变后的 Ki-2 蛋白酶具有抗氧化性,但比活性比野生型的约低 1 倍。

关键词 碱性蛋白酶 Ki-2, DNA 序列, 定点突变, 抗氧化性

枯草杆菌碱性蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶,用于洗涤剂添加剂和皮革、丝绸、食品加工工业。国外自 70 年代初就对它进行了大量的研究。80 年代初,多种来源的碱性蛋白酶基因陆续被克隆, DNA 序列也相继被测定^[1,2]从而为此酶的结构和功能的研究提供了有利的条件。在基因水平上进行定点突变和随机突变,得到多种突变种的酶具有新的性质如抗氧化性^[3],热稳定性^[4]和在极性有机溶剂中仍具有高比活性^[5]。由此可见枯草杆菌碱性蛋白酶不仅有应用价值,而且是研究酶的结构与功能关系很好的模型。枯草杆菌 Ki-2 碱性蛋白酶是丝氨酸蛋白酶大家族中的一员,对它的基因进行 DNA 序列测定是基因克隆的重要组成部分。比较 DNA 序列,从而知道它与其他蛋白酶的亲缘关系。通过定点突变或随机突变对 Ki-2 碱性蛋白酶进行蛋白质工程改造以便深入了解 Ki-2 蛋白酶的结构和功能关系,为设计具有优良性能的工业用酶提供依据。

1 材料和方法

1.1 酶和试剂

限制酶为 New England Bio-Labs 产品, T4 DNA Ligase, T7 DNA 聚合酶, ATP 和四种脱氧核糖核酸为 Pharmacia 产品。α-³⁵S-dATP 为 DuPont 公司产品。突变引物, M13/pUC 正向和反向测序引物由本所生物大分子国家开放实验室合成(ABI 公司 381-A 型 DNA 合成仪)。其他化学试剂为国产分析纯试剂。

1.2 菌株和质粒

本工作受 863-103 主题资助。

本文于 1995 年 5 月 5 日收到。

JM109 为本实验室保存, 枯草芽孢杆菌 DB104 为中性和碱性蛋白酶缺陷型 (*his nprR2 nprE18 aprA3*)^[6]。pUC-18, pUC-19, M₁₃mp18, M₁₃mp19 为本实验室保存。pSelect 为定点突变所用的 phagemid 载体, 来自 Promega 的定点突变试剂盒。pBE-2 是枯草芽孢杆菌-大肠杆菌穿梭质粒^[7]。pY 质粒为含有碱性蛋白酶 Ki-2 基因的 1.9kb 片段插入 pUC-19 构成的重组质粒, 由中国科学院遗传研究所 104 组提供。

1.3 培养基

芽孢杆菌和大肠杆菌在进行质粒重组和制备时采用 YT 培养基。固体培养基中含有 1.2% Agar。含有抗药性质粒时在培养基中抗菌素浓度为: 氨苄青霉素 50 μ g/ml, 卡那霉素 10 μ g/ml, 四环素 12.5 μ g/ml。牛奶平板中加入脱脂奶粉 1%。

1.4 枯草芽孢杆菌的转化

枯草芽孢杆菌的转化采用感受态细胞转化方法^[8]。

1.5 DNA 序列的测定

以噬菌体 M13mp18 或 M13mp19 单链 DNA 或双链质粒 DNA 为模板, 用双脱氧末端终止法测定 DNA 序列^[9]。

1.6 蛋白酶活力和抗氧化性的测定

采用 Folin-Phenol 法测定蛋白酶的活力^[10]。在 pH10~11, 40 $^{\circ}$ C 每分钟水解酪蛋白产生 1 微克酪氨酸的酶量为一个酶活力单位。用四肽底物 N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanalide 测定酶与 H₂O₂ 保温前后的活性。

1.7 定点突变

按 promega 公司的 phagemid 突变 Kit 的方法进行定点突变。222 位定点突变引物为: 5' AACGGAACGTCCGCGGCGACTCCTC 3'

2 结果与讨论

2.1 枯草芽孢杆菌 Ki-2 碱性蛋白酶基因的全序列分析

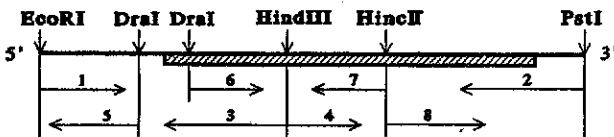


图 1 含枯草杆菌蛋白酶 Ki-2 基因的 DNA 片段的酶切图谱和 DNA 序列分析方案

Fig.1 The partial restriction map of 1.9 kb DNA fragment containing subtilisin Ki-2 gene and the strategy of DNA sequencing

The numbers are subclones, Arrow shows the direction of sequencing, shadow area shows the structure region of subtilisin Ki-2

枯草芽孢杆菌 Ki-2 碱性蛋白酶基因位于 1.9kb 的片段中, 克隆在 pUC-19 的 EcoR I 和 Pst I 切点间, 酶切图谱分析确定了在此片段中有几个酶切点如图 1 所示。利用这些酶切点将片段切成几个小片段, 并将这些小片段分别克隆在 M13 载体中。用 HindIII 酶解将 1.9kb 片段切成两段插入 M13 的相应切点处, 得到亚克隆 3 和 4; 用 Dra I 酶解得亚克隆 5 和 6; 用 Hinc II 酶解 Hind III - Pst I 片段得到亚克隆 7 和 8。pY 质粒用于测定 1.9kb 片段两端的序列即图上所标的 1 和 2。

2.2 枯草杆菌碱性蛋白酶 Ki-2 基因的 DNA 序列

枯草杆菌碱性蛋白酶 Ki-2 基因的 DNA 序列如图 2 所示。在 1.9kb 的片段中基因的编码链方向是从 EcoR I 到 Pst I。结构基因起始于上游第一个 Dra I 切点以下 18bp 处的 GTG。自起始密码到第一个终止密码之间有 1143bp 的编码区,这正好编码 381 个氨基酸,与枯草杆菌 168 碱性蛋白酶基因的氨基酸编码数相同。自第一个翻译终止码以后紧接着还有两个终止码,同时还有一段构成发夹结构的序列,茎有 15bp,环为 8 个核苷酸,这是典型的转录终止信号。在起始密码上游 8bp 处有很典型的 SD 区域 AAAGGAG。此外,在上游序列中有类似 σ^{37} 的 -35 区和 -10 区的启动子序列。

枯草杆菌碱性蛋白酶 Ki-2 基因的 DNA 序列与枯草杆菌 168 碱性蛋白酶 E 的 DNA 序列比较,在编码链部分有 8 个核苷酸的差异,从而导致两个氨基酸的不同。由此可见,这两种基因的同源性很大,它们的性质也必定相似。碱性蛋白酶 E 的研究国内外已有不少报道,这为我们对 Ki-2 基因进行改造提供了借鉴。

2.3 枯草杆菌碱性蛋白酶 Ki-2 基因在枯草芽孢杆菌 DB104 中的表达

由于 1.9kb 的 DNA 片段中包括基因编码链,约 110bp 的下游序列,其中含有转录终止信号,以及约 600bp 的上游序列,在这中间又有很典型的 SD 区域和类似 σ^{37} 的 -35 区和 -10 区的启动子序列,所以碱性蛋白酶 Ki-2 基因可以依靠自身的调控元件在枯草杆菌中得到表达。将此 1.9kb 的 DNA 片段插入大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pBE-2 的相应酶切点得到重组质粒 pBY。

将 pBY 转化蛋白酶缺陷型的枯草杆菌 DB104。含有 pBY 质粒的 DB104 菌在牛奶平板上产生透明圈,在 YT 液体培养基中 37℃ 摇瓶培养 24h,培养液中的酶活可以达到 80~100u/ml。在工业培养基中摇瓶培养 48h,酶活可以达到 1000~2000u/ml 而且酶活力不受 EDTA 影响,而 PMSF 对酶活起不可逆的抑制作用,说明枯草杆菌 Ki-2 基因在 DB104 中表达得到了能分泌到胞外的碱性蛋白酶。与同样带自身启动子的地衣芽孢杆菌 2709 碱性蛋白酶(属 Carlsberg 类)基因在 DB104 中的表达相比,Ki-2 基因的表达水平高得多,这可能是 2709 碱性蛋白酶的启动子不能被 DB104 菌的调控因子识别造成的。碱性蛋白酶 Ki-2 是进行蛋白质工程研究的很好的模型。改造后的基因的表达是最终了解蛋白酶的结构和功能关系,提供合乎使用要求的优良酶制剂的重要环节。

2.4 枯草杆菌碱性蛋白酶 Ki-2 基因的定点突变

蛋白质不稳定的根源之一是由于氧化而导致失活或变性,在活性中心附近含有甲硫氨酸、半胱氨酸或色氨酸的蛋白质尤其如此。根据 Ki-2 酶基因的 DNA 序列证明 Ki-2 酶同属丝氨酸蛋白酶,与 221 位活性中心相邻的 222 位是甲硫氨酸,根据同类酶 BPN 和 E 的 222 位甲硫氨酸被丙氨酸取代后使它们具有了抗氧化性^[3,11],将 Ki-2 酶的 222 位甲硫氨酸用丙氨酸取代也会使它具有抗氧化性。

按 Promega 的 Altered Sites™ 体外突变系统的方法进行定点突变(图 3)。

```

1      G ATA TAC CTA AAT AGA GAT AAA ATC ATC TCA AAA AAA TGG GTC TAC TAA AAT ATT ATT
59     CCA TCT ATT ACA ATA AAT TCA CAG AAT AGT CTT TTA AGT AAG TCT ACT CTG AAT TTT TTT

119   AAA AGG AGA GGG TAA AGA GTG AGA AGC AAA AAA TTG TGG ATC AGC TTG TTG TTT GCG TTA
1      fMet Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu

179   ACG TTA ATC TTT ACG ATG GCG TTC AGC AAC ATG TCT GCG CAG GCT GCC GGA AAA AGC AGT
15     Thr Leu Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala Ala Gly Lys Ser Ser
      C
239   ACA GAA AAG AAA TAC ATT GTT GGA TTT AAA CAG ACA ATG AGT GCC ATG AGT TCC GCC AAG
35     Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met Ser Ala Met Ser Ser Ala Lys

299   AAA AAG GAT GTT ATT TCT GAA AAA GGC GGA AAG GTT CAA AAG CAA TTT AAG TAT GTT AAC
55     Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly Gly Lys Val Gln Lys Gln Phe Lys Tyr Val Asn

359   GCG GCC GCA GCA ACA TTG GAT GAA AAA GCT GTA AAA GAA TTG AAA AAA GAT CCG AGC GTT
75     Ala Ala Ala Ala Thr Leu Asp Glu Lys Ala Val Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val

419   GCA TAT GTG GAA GAA GAT CAT ATT GCA CAT GAA TAT GCG CAA TCT GTT CCT TAT GGC ATT
95     Ala Tyr Val Glu Glu Asp His Ile Ala His Glu Tyr Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Ile
      C
479   TCT CAA ATT AAA GCG CCG GCT CTT CAC TCT CAA GGT TAC ACA GGC TCT AAC GTA AAA GTA
115    Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val
      GC
539   GCT GTT ATC GAC AGC GGA ATT GAC TCT TCT CAT CCT GAC TTA AAC GTC AGA GGC GGA CGA
135    Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Asn Val Arg Gly Gly Arg

599   AGC TTC GTA CCT TCT GAA ACA AAC CCA TAC CAG GAC GGC AGT TCT CAC GGT ACG CAT GTA
155    Ser Phe Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Tyr Gln Asp Gly Ser Ser His Gly Thr His Val
      T A C
659   GCC GGT ACG ATT GCC GCT CTT AAT AAC TCA ATC GGT GTT CTG GGC GTA CGG CCA AGC GCA
175    Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Arg Pro Ser Ala
      A
719   TCG TTA TAT GCA GTA AAA GTG CTT GAT TCA ACA GGA AGC GGC CAA TAT AGC TGG ATT ATT
195    Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asp Ser Thr Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile

779   AAC GGC ATT GAT TGG GCC ATT TCC AAC AAT ATG GAT GTT ATC AAC ATG AGC CTT GGC GGA
215    Asn Gly Ile Asp Trp Ala Ile Ser Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly

839   CCT ACT GGT TCT ACA GCG CTG AAA ACA GTC GTT GAC AAA GCC GTT TCC AGC GGT ATC GTC
235    Pro Thr Ser Thr Ala Leu Lys Thr Val Val Asp Lys Ala Val Ser Ser Gly Ile Val

899   GTT GCT GCC GCA GCC GGA AAC GAA GGT TCA TCC GGA AGC ACA AGC ACA GTC GGC TAC CCT
255    Val Ala Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Ser Ser Gly Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro

959   GCA AAA TAT CCT TCT ACT ATT GCA GTA GGT GCG GTA AAC AGC AGC AAC CAA AGA GCT TCA
275    Ala Lys Tyr Pro Ser Thr Ile Ala Val Gly Ala Val Asn Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser

1019  TTC TCC AGC GCA GGT TCT GAG CTT GAT GTG ATG GCT CCT GGC GTG TCC ATC CAA AGC ACA
295    Phe Ser Ser Ala Gly Ser Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr

1079  CTT CCT GGA GGC ACT TAC GGC GCT TAT AAC GGA ACG TCC ATG GCG ACT CCT CAC GTT GCC
315    Leu Pro Gly Gly Thr Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala

1139  GGA GCA GCA GCG TTA ATT CTT TCT AAG CAC CCG ACT TGG ACA AAC GCG CAA GTC CGT GAT
335    Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Thr Trp Thr Asn Ala Gln Val Arg Asp

1199  CGT TTA GAA AGC ACT GCA ACA TAT CTT GGA AAC TCT TTC TAC TAT GGA AAA GGG TTA ATC
355    Arg Leu Glu Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile

1259  AAC GTA CAA GCA GCT GCA CAA TAA TAG TAA AAA GAA GCA GGT TCC TCC ATA CCT GCT TCT
375    Asn Val Gln Ala Ala Ala Gln *** *** ***

1319  TTT TAT TTG TCA GCA TCC TGA TGT TCC GGC GCA TTC TCT TCT TTC TCC GCA TGT TGA ATC
1379  CGT TCC ATG ATC CGT CGA CCT GCA GGC ATG CAA GCT TGG. 1417

```

图 2 枯草杆菌碱性蛋白酶 Ki-2 基因的 DNA 序列和相应的氨基酸序列

Fig.2 The DNA sequence of subtilisin Ki-2 gene and the deduced amino acids sequence

Those sites that are different from subtilisin E were indicated on top

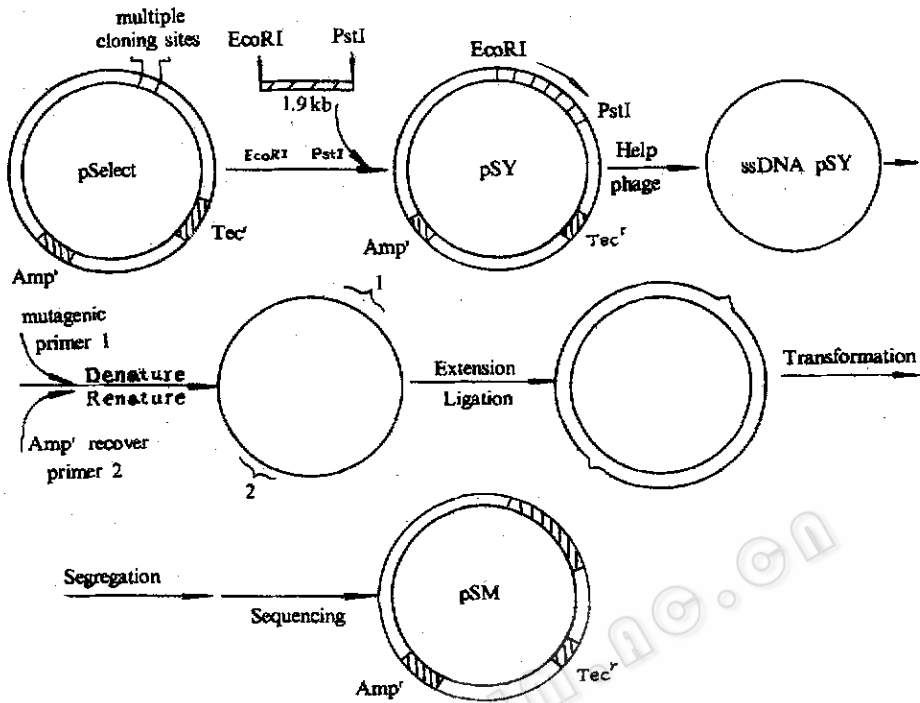


图 3 用 Phagemid 载体在体外进行定点突变的程序。

Fig. 3 The procedure of *in vitro* site-directed mutagenesis by Phagemid vector.

含 Ki-2 酶基因的 1.9kb 片段插入突变载体 Phagemid pselect 的多克隆位点, 得到重组的 Phagemid pSY 单链 pSY DNA 与氨苄抗性恢复引物和 222 位突变引物退火, 用 T4DNA 聚合酶和 T4DNA 连接酶在体外制备双链复制型, 并转化大肠杆菌, 在氨苄抗性平板上筛选 Amp^r 的转化子。DNA 序列测定证明突变正确的转化子为 pSM。

2.5 M222A 突变的 Ki-2 蛋白酶的抗氧化性

将含 M222A 突变的 Ki-2 蛋白酶基因的 1.9kb 片段从 pSM 重组到 pBE-2 中得到重组穿梭质粒 pBM。pBM 上的 M222A Ki-2 蛋白酶基因在 DB104 中表达得到突变种的酶。

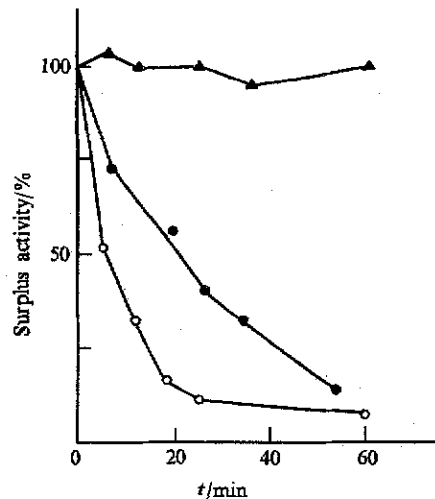


图 4 碱性蛋白酶 Ki-2 的抗氧化性。

Fig. 4 Oxidation resistance of subtilisin Ki-2

○ wild type subtilisin Ki-2, ▲ M222A mutant Ki-2, ● 2709 subtilisin

野生型 Ki-2 和突变种酶经纯化得到 SDS 电泳纯的酶制品比活性分别为 800u/mg 蛋白和 400u/mg 蛋白。纯化的酶与 1mol/L H₂O₂ 在 37℃ 保温,测定它们的抗氧化性,结果如图 4 所示,M222A 突变种酶的抗氧能力比野生型的大大提高,保温 1h 后活性仍保留 90% 以上,而野生型的酶保温不到 20min 活性就丧失 90% 以上。2709 Carlsberg 类酶的抗氧化能力比野生型的 Ki-2 酶好,但远远不如 M222A Ki-2 酶。M222A 突变使 Ki-2 蛋白酶提高了抗氧化能力,为该酶的使用提供了广阔的前景,但因此而使比活性下降了一半,又为酶的改造提出了新的任务。旨在提高比活性和改良其他性质的工作正在进行之中。

参 考 文 献

- [1]Wells J A, Ferrari E, Henner D J *et al.* Nucl Acids Res. 1983, 11: 7911~7925.
- [2]Stahl, M L, Ferrari E, J Bacteriology, 1984, 158: 411~418.
- [3]Estell D A, Graycar T P, Wells J A, J Biol. Chem, 1985, 260: 6518~6521.
- [4]Takagi H, Takahashi T, Momose H *et al.* J Biol Chem. 1990, 265: 6874~6878.
- [5]Chen K, Arnold F H, Proc Natl Acad Sci, USA 1993, 90: 5618~5622.
- [6]Kawamura F, Doi R H, J Bacteriology, 1984, 160: 442~444.
- [7]郭兴华, 熊占, 周民等, 生物工程学报, 1991, 7: 224~229.
- [8]郭兴华, 贾士芳, 陈乃用等, 生物工程学报, 1992, 8: 263~268.
- [9]Sanger, F, Nicklen, S, Coulson, A. R. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1977, 74: 5463~5467.
- [10]北京大学编, 细菌蛋白酶的活力和比活力测定, 生物化学实验指导, 北京: 高等教育出版社, 1979, p151.
- [11]赵云德, 尹路明, 王贤舜等, 生物化学与生物物理学报, 1993, 25: 263~269.

Sequencing and M222A Site-directed Mutagenesis of *Bacillus subtilis* in Ki-2 Gene

Zhu Liuqin Zhao Yufeng

(Department of Protein Engineering, Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101)

Abstract The 1.9kb DNA fragment containing subtilisin Ki-2 gene was digested by restriction enzymes into several small fragments. These fragments were inserted into M13mp18 or M13mp19 and sequenced by using universal sequencing primers. Comparing the sequence of subtilisin Ki-2 with subtilisin E, in the structure gene region, only 8 nucleotides difference which deduced two amino acids varying was found. The 1.9kb DNA fragment was recombined with pBE-2 which is a shuttle vector between *E. coli* and *Bacillus Subtilis*. The recombined plasmid was used to transform *B. subtilis* DB104 that is a double mutant strain deficient in both alkaline and neutral proteases. The results shew that subtilisin Ki-2 gene could be expressed in DB104 under its own expression elements and secreted into culture medium. The Met 222 of subtilisin Ki-2 was mutated into Ala 222. The mutant subtilisin Ki-2 was oxidation resistant but with lower specific activity.

Key words Subtilisin Ki-2, DNA sequence, site-directed mutagenesis, oxidation resistant