

## 凝乳酶 $\beta$ -转角突变体的构建、表达和性质分析

黎红晔 张渝英 董贻诚\* 杨开宇

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 为了阐明牛凝乳酶的第二个发夹结构中的 VI 型  $\beta$ -转角的功能,利用基因突变技术,将该转角的氨基酸残基 (Leu20-Gly21-The22-Pro23-Pro24-Gln25) 改为 (Leu20-Gly-Gly-Gln25)、(Leu20-Ser-Gly-Gln25)或 (Leu20-Gly-Ser-Gln25),得到 3 个突变牛凝乳酶原表达质粒 pMCGG, pMCSG 和 pMCGS。除 pMCGS 不能在大肠杆菌中表达外, pMCGG 和 pMCSG 均能以包含体的形式进行表达,且表达水平与野生型相当。像野生型凝乳酶原一样, pMCGG 和 pMCSG 的表达产物经过变性复性,均能自活化为假凝乳酶,而且复性后的酶原突变体在 DEAE-Sephrose CL-6B 上的柱行为与野生型相类似,但突变体假凝乳酶的凝乳及水解酪蛋白活性均明显低于野生型。说明突变对酶原的折叠影响较小,但对酶的催化效率影响较大。

**关键词** 牛凝乳酶(原),  $\beta$ -转角, 结构和功能

学科分类号 Q789

在球形蛋白质的非重复性结构中,  $\beta$ -转角是最常见的,构成这类结构的氨基酸平均占蛋白质中氨基酸残基总数的 25%<sup>[1]</sup>。它们在蛋白质的结构和功能中的作用尚未得到充分阐明。有人认为其功能仅仅是连接有序的二级结构<sup>[2,3]</sup>,也有人认为它们在决定蛋白质的折叠、结构、稳定性和功能中起重要的作用<sup>[4-7]</sup>。

本文利用已知晶体结构的凝乳酶<sup>[8,9]</sup>为模型蛋白,根据蛋白质结构统计学分析,计算机模拟以及同源蛋白比较,选择有可能形成 I' 型  $\beta$ -转角的 (Leu20-Gly-Gly-Gln25)、(Leu20-Ser-Gly-Gln25)和 II' 型  $\beta$ -转角的 (Leu20-Gly-Ser-Gln25)取代凝乳酶的第二个发夹结构中野生型的 VI 型  $\beta$ -转角 (Leu20-Gly21-The22-Pro23-Pro24-Gln25),以研究位于凝乳酶分子结构表面的该转角的功能,为深入地阐明凝乳酶以至天冬氨酸蛋白酶的结构与功能关系提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

*E. coli* DH5 $\alpha$  为进行亚克隆的受体菌, BL21(DE3)pLysS 为表达菌。含野生型凝乳酶原基因的质粒 pBC4<sup>[10]</sup>和 pTaAC5<sup>[11]</sup>为本实验室构建。pBV221 为含 P<sub>R</sub>PL 启动子质粒。

### 1.2 LB 培养基

组成见文献[12]。

\* 中国科学院生物物理研究所。

收稿日期:1997-04-14, 修回日期:1997-10-06。

### 1.3 主要试剂及酶

限制酶, T4 DNA 连接酶和 DNA Markers 均购自华美公司和 Promega 公司。T7 DNA Sequencing Kit 和 DEAE-Sepharose CL-6B 购自 Pharmacia 公司。 $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP 购自 Amersham 公司。突变寡核苷酸片段由本所技术室合成。其余试剂均为进口或者国产分析纯。

### 1.4 DNA 操作

细菌培养, 质粒提取, 内切酶酶解反应, 琼脂糖凝胶电泳, 突变寡核苷酸片段的纯化和回收, 连接反应, 质粒转化和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 均参照文献[12]。

### 1.5 DNA 序列测定

参照 T7 DNA Sequencing Kit 说明书。

### 1.6 基因表达

挑取新转化的单菌落接种于 2 ml LB 培养基(含氨苄青霉素 75  $\mu$ g/ml)中 30 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。次日取 1% 的接种量转接 25 ml LB 培养基(氨苄青霉素 75  $\mu$ g/ml), 30 $^{\circ}$ C 培养至 OD<sub>600</sub> = 0.4~0.6, 升温至 42 $^{\circ}$ C, 诱导 3.5~4 h, 收获菌体, SDS-PAGE 进行表达水平定量。

### 1.7 表达产物的复性和活性

突变和野生型牛凝乳酶原基因在 *E. coli* 中表达形成包含体, 可通过超声裂解菌体, 离心获得。包含体的溶解与复性方法为: 将包含体溶于 8 mol/L 尿素, pH11 PBS(50 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA), 30 $^{\circ}$ C 放置 2 h, 用 pH11 PBS 稀释 10 倍, 15~20 $^{\circ}$ C 过夜。再用 0.1 mol/L HCl 调 pH 至 8, 15~20 $^{\circ}$ C, 1 h 后, 置 4 $^{\circ}$ C 对 50 mmol/L NaCl-Tris 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0)透析, 得到复性的凝乳酶原。复性液再用 0.1 mol/L HCl 调至 pH2, 15~20 $^{\circ}$ C 活化 2 h 获得假凝乳酶。

### 1.8 凝乳活性测定

参照 Emtage<sup>[13]</sup>的方法, 但反应 pH 为 6.0。即一定稀释度的酸化后酶液与底物(20% 牛奶和 20 mmol/L CaCl<sub>2</sub>)混合, 37 $^{\circ}$ C 保温 20min。一个活力单位相当于 20ng 的天然凝乳酶的凝乳活力。

### 1.9 酶原的纯化

复性液上样到 DEAE-Sepharose CL-6B(25cm $\times$ 2.5cm)柱上。先用 0.1 mol/L NaCl-Tris 缓冲液洗脱, 后换上 0.1~0.6 mol/L NaCl-Tris 缓冲液进行梯度洗脱。样品经 SDS-PAGE 电泳检查纯度, 经透析后储于 4 $^{\circ}$ C 或冻干储于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

### 1.10 假凝乳酶水解酪蛋白的动力学参数测定

基本参照 Aoyagi<sup>[14]</sup>等方法。以 0.6% 酪蛋白(含 0.7% 乳酸)配制不同浓度的底物, 在 pH 2 的条件下, 加入一定体积的假凝乳酶, 37 $^{\circ}$ C 保温 10 min, 测定 A<sub>280nm</sub>。以每分钟的  $\Delta A_{280nm}$  表示假凝乳酶的蛋白水解活力。

### 1.11 蛋白质含量测定

参照 Lowry<sup>[15]</sup>的方法。

## 2 结果和讨论

### 2.1 突变牛凝乳酶原表达质粒 pMCGG、pMCSG 和 pMCGS 的构建

为产生突变体, 合成互补的寡核苷酸经退火形成以下 DNA 片段。

pMCGG: 5' GATCTACCTCGGTGGCC 3'  
 3' ATGGAGCCACCGG 5'  
 pMCSG: 5' GATCTACCTCTCCGGCC 3'  
 3' ATGGAGAGGCCGG5'  
 pMCGS: 5' GATCTACCTCGGTTCTC 3'  
 3' ATGGAGCCAAGAG5'

用突变的 DNA 片段取代野生型表达质粒(pBC4)中的 VI 型  $\beta$ -转角处的 Bgl II 至 BstN I (Klenow 填平 BstN I 末端)的片段:

pBC4: 5' GATCTACCTCGGGACCCCGCC 3'  
 3' ATGGAGCCCTGGGGCGGG 5'

这样就使野生型凝乳酶原第二个发夹结构中 VI 型  $\beta$ -转角处的 cDNA 和氨基酸序列。

|    |        |     |     |     |        |     |     |     |     |     |    |
|----|--------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|-----|-----|----|
|    | K      | I   | Y   | L   | G      | T   | P   | P   | Q   | E   |    |
| 5' | AAG    | ATC | TAC | CTC | GGG    | ACC | CCG | CCC | CAG | GAG | 3' |
|    | Bgl II |     |     |     | BstN I |     |     |     |     |     |    |

分别转变成以下相应序列:

①突变型凝乳酶原 pMCGG。

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
|    | K   | I   | Y   | L   | G   | G   | Q   | E   |    |
| 5' | AAG | ATC | TAC | CTC | GGT | GGC | CAG | GAG | 3' |

②突变型凝乳酶原 pMCSG。

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
|    | K   | I   | Y   | L   | S   | G   | Q   | E   |    |
| 5' | AAG | ATC | TAC | CTC | TCC | GGC | CAG | GAG | 3' |

③突变型凝乳酶原 pMCGS。

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
|    | K   | I   | Y   | L   | G   | S   | Q   | E   |    |
| 5' | AAG | ATC | TAC | CTC | GGT | TCT | CAG | GAG | 3' |

pMCGG 的具体的构建步骤如图 1。PMCSG 和 pMCGS 的构建除了插入突变的寡核苷酸不同外,其余步骤相同。DNA 序列测定结果见图 2,表明获得了预期的突变。此方法适用于基因缺失,插入和多碱基置换,具有简便、准确等优点,关键是要选择适当的酶切位点,使置换的 DNA 片段尽可能的短,以利于 DNA 合成。本实验选择  $\beta$ -转角附近的 Bgl II 和 BstN I,全长仅 22 个碱基。因此合成的寡核苷酸只有 17 个和 14 个碱基。但工作中遇到两个困难,一是在亚克隆的 0.4kb 中还有其它 BstN I 位点,不利于基因操作,故在亚克隆后,用不含有此位点的异源 H 片段取代,再进行突变片段的置换(图 1)。二是实验初期曾使用含 BstN I 粘性末端的突变片段,但测序结果表明连接处与预期的结果不符,这与 BstN I 粘性末端连接后不能再被 BstN I 酶切的报道相类似,后改用平端连接解决了此问题。

## 2.2 突变对基因表达的影响

凝乳酶原质粒在 BL21(DE3)plysS 菌中的表达结果见图 3。在构建的三个突变基因中,pMCGG 与 pMCSG 都能在大肠杆菌中正常表达,其表达水平与野生型相当,约为细胞总蛋白的 30%~35%,而 pMCGS 则不能表达。说明 6 个碱基的区别就足以对表达产生完全不同的影响。PMCGS 不能表达,以下实验均以 pMCGG 和 pMCSG 为对象。

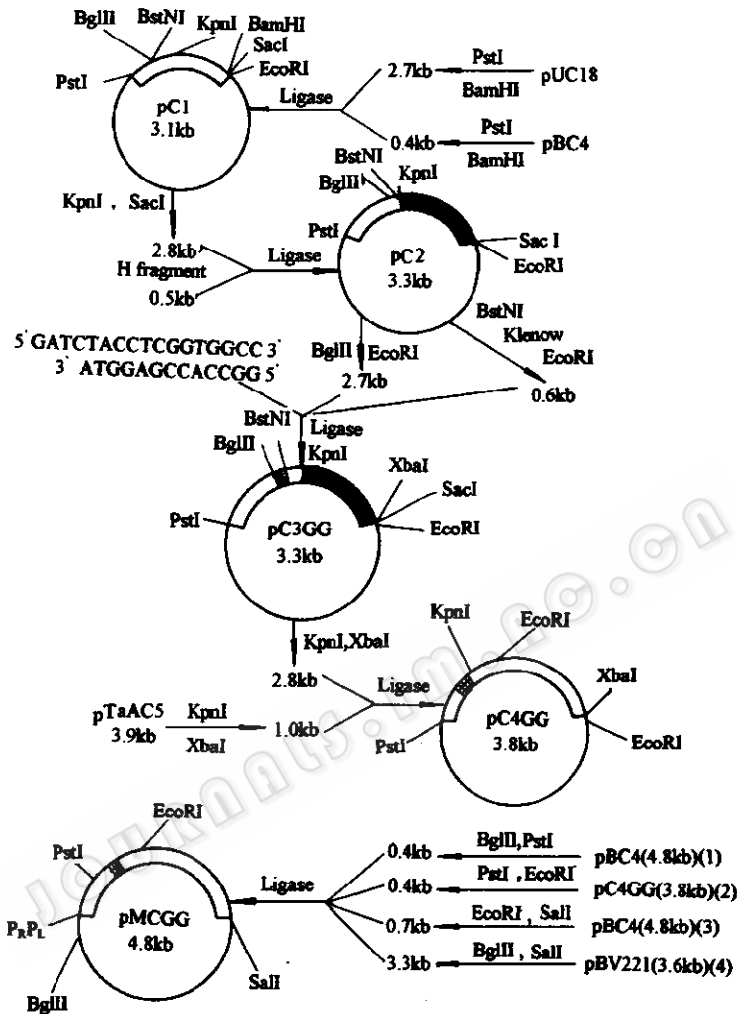




图 1 质粒 pMCGG 的构建

Fig. 1 Construction of pMCGG plasmid

□ Prochymosin gene.  Mutant part.  Heterogeneous DNA fragment, containing no BstNI and EcoRI sites

### 2.3 突变对凝乳酶原折叠的影响

**2.3.1 野生型和突变凝乳酶原折叠效率的比较:** 凝乳酶原在 pH 2 可以切去 N-末端的 27 个氨基酸残基产生有凝乳活性的假凝乳酶, 这一活化过程是凝乳酶原自身催化的结果。只有正确折叠的酶原分子才有可能自活化, 利用这一原理, 我们以折叠后酶原的可活化程度作为判断折叠效率的指标。即经过折叠后的酶原分子在 pH 2 活化, 利用 SDS-PAGE 和扫描对活化产物进行定量分析, 以求出酶原转化为酶的百分率。由图 4 可见

pMCGG 和 pMCSG 与野生型凝乳酶原一样, 包含体经过变性, 复性, 活化后均能产生假凝乳酶。

折叠效率分别为 86.0% 和 80.4%, 分别比野生型低 8.4% 和 14.0%。

**2.3.2 野生型和突变凝乳酶原的柱层析行为比较:** DEAE-Sephrose CL-6B 兼有离子交换和分子筛的双重作用。复性后的野生型和突变体凝乳酶原经过柱层析, 不仅可以达到纯化的目的,

而且可以通过它们在柱上的行为初步了解折叠分子的形状与所带的净电荷状况。图 5 表明野生型和突变体通过此柱后均可得到两个蛋白峰。前者为穿柱峰, 含杂蛋白及不能活化(非正确折叠)的酶原。后者为能够活化的凝乳酶原, 其纯度为 90% 以上, 均被同一盐浓度(0.3mol/L NaCl)洗脱。说明两种突变体具有野生类类似的净电荷和分子形状。

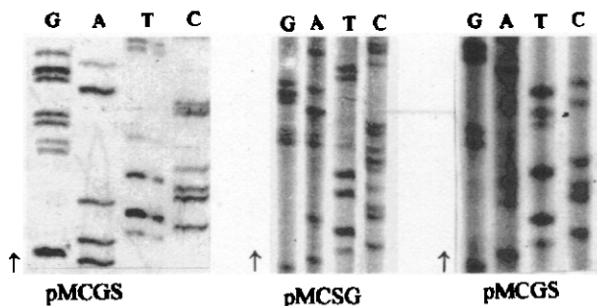


图 2 pMCGG, pMCSG 和 pMCGS 突变部分的序列分析  
Fig.2 Sequence analysis of the mutant fraction in pMCGG, pMCSG and pMCGS

pMCGG: 5' AGATCTACCTCGGTGGCCAG 3'

pMCSG: 5' GATCTACCTCTCCGGCCAG 3'

pMCGS: 5' GATCTACCTCGGTTCTCAG 3'

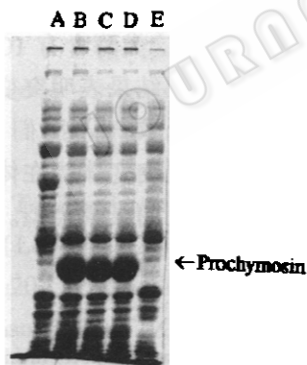


图 3 野生型和突变凝乳酶原基因表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression products of the wild-type and mutant prochymosin genes in *E. coli* BL21 (DE3) plyS.

A: lysate of cells harboring pBV221 (containing no prochymosin gene)

B: lysate of cells harboring wild-type prochymosin gene

C: lysate of cells harboring mutant gene pMCGG

D: lysate of cells harboring mutant gene pMCSG

E: lysate of cells harboring mutant gene pMCGS

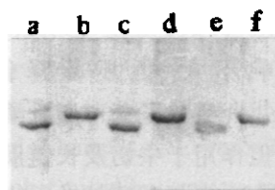


图 4 野生型和突变凝乳酶原复性后活化产物的电泳分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of activation product after renaturation of wild-type and mutant prochymosins

a. pMCGG mutant prochymosin after activation

b. pMCGG mutant prochymosin before activation

c. pMCSG mutant prochymosin after activation

d. pMCSG mutant prochymosin before activation

e. Wild-type prochymosin after activation

f. Wild-type prochymosin before activation

综合以上两个方面的结果可以看出,两种突变体 pMCGG 和 pMCSG 均可折叠成与野生型构象类似的分子。

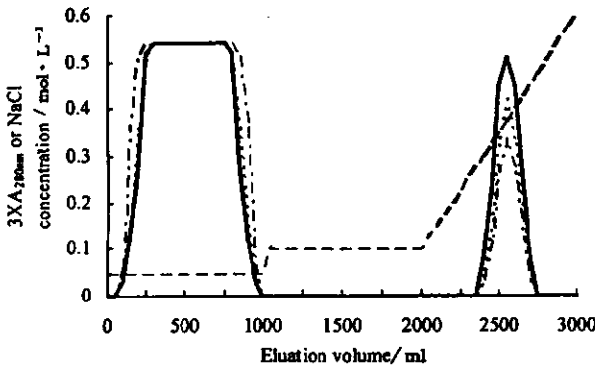


图5 野生型和突变凝乳酶原的 DEAE Sepharose CL-6B 柱层析图谱

Fig. 5 Chromatography of wild-type and pMCGG, pMCSG mutant prochymosins on DEAE Sepharose CL-6B column

---[NaCl] ——— WT ..... pMCGG  
- · - · - pMCSG

## 2.4 突变对假凝乳酶催化特性的影响

假凝乳酶具有两种催化活性,一是特异性地切割  $\kappa$ -酪蛋白中的 Phe105-Met106 的肽键,这是导致凝乳的分子基础,另一种是非特异性地切割肽键即水解蛋白作用。凝乳是酶促与非酶促两种作用的综合反映,不可能以牛奶为底物进行动力学参数的测定,但它是极重要的实用性能指标,是探讨突变对酶的催化特性影响所必须考虑的一个方面。因此,我们分别以牛奶,酪蛋白为底物测定了纯化后的假凝乳酶突变体的比活性及水解酪蛋白的动力学参数。由表 1 和表 2 可见,突

变体和野生型相比凝乳比活性明显下降,对酪蛋白的亲合力不变,但水解效率显著降低。

凝乳酶属于天冬氨酸蛋白酶家族,根据已知的三维空间结构,这类酶含有 10 个  $\beta$ -转角(或称  $\beta$ -发夹,环区)。本文所研究的对象为第二个  $\beta$ -转角。以上结果表明突变对酶原的折叠影响不大,但显著降低酶的催化效率。撰写此论文时,我们注意到 T.L.Blundell<sup>[16]</sup>实验室曾对凝乳酶的第 5 个  $\beta$ -转角进行突变,发现突变体能在体内正确折叠,外泌,但作用于牛奶及长链肽底物的活力下降,与我们所得到的结果类似。说明这两个  $\beta$ -转角在决定凝乳酶的功能方面起重要作用。

表 1 野生型和突变假凝乳酶的比活性

Table 1 Specific activity using milk substrate of the wild-type and variant pseudo-chymosins

|                                      | WT    | pMCSG | pMCGG |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|
| Specific activity/ $u \cdot mg^{-1}$ | 41.66 | 0.57  | 2.29  |

表 2 野生型和突变假凝乳酶水解酪蛋白的反应动力学参数

Table 2 Kinetic parameters for hydrolysis of casein by wild-type and variant pseudo-chymosins

|                     | WT    | pMCSG | pMCGG |
|---------------------|-------|-------|-------|
| $Km/g \cdot L^{-1}$ | 8.33  | 8.33  | 8.33  |
| $\mu cat/min^{-1}$  | 49.38 | 8.16  | 15.11 |
| $\mu cat/Km$        | 5.93  | 0.98  | 1.83  |

## 参 考 文 献

- 1 Kabsch W, Sander C. *Biopolymers*, 1983, **22**:2257~2637
- 2 Castagnoli L, Vetriani C, Cesareni G. *J Mol Biol*, 1994, **237**:378~387
- 3 Predki P F, Regan L. *Biochemistry*, 1995, **34**:9834~9839
- 4 Knappik A, Pluckthun A. *Protein Eng*, 1995, **8**:81~89
- 5 Sibanda B L, Thornton J M. *Nature*, 1985, **316**:170~174
- 6 Sibanda B L, Thornton J M. *Methods Enzymol*, 1991, **202**:59~82
- 7 Predki P F, Agrawal V, Brungel A T et al. *Natural Structural Biol*, 1996, **3**:54~58
- 8 Gilliland G L, Whinborne E L, Nachman J et al. *Proteins:Struct Funct Genet*, 1990, **8**:82~101
- 9 Newman M, Safro M, Frazao C et al. *J Mol Biol*, 1991, **221**:1295~1309
- 10 Wang G, Liu N J, Yang K Y. *Protein Expression and Purification*, 1995, **6**:284~290
- 11 张渝英, 周 炜, 刘年娟等. *生物工程学报*, 1991, **7**:195~200
- 12 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- 13 Emtage J S, Angal S, Doel M T et al. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1983, **80**:3671~3675
- 14 Aoyagi T, Kunimoto S, Morishima H et al. *J Antibiotics*, 1971, **24**:687~694
- 15 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L et al. *J Biol Chem*, 1951, **193**:265~269
- 16 Nugent P G, Albert A, Orprayoon P et al. *Protein Eng*, 1996, **9**:885~893

Construction, Expression and Characterization of Calf Chymosin  $\beta$ -Turn Mutants

Li Hongye Zhang Yuying Dong Yicheng\* Yang Kaiyu

(Department of Enzymology, Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

(Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)\*

**Abstract** To elucidate the function of  $\beta$ -turn at the second  $\beta$ -hairpin of chymosin, the type VI  $\beta$ -turn (Leu20-Gly21-Thr22-Pro23-Pro24-Gln25) was substituted by cassette mutagenesis with (Leu20-Gly-Gly-Gln25), (Leu20-Ser-Gly-Gln25) or (Leu20-Gly-Ser-Gln25), three mutant plasmids pMCGG, pMCSG and pMCGS were thus obtained. Except pMCGS, pMCGG and pMCSG were expressed in *E. coli* at the levels comparable to that of the wild-type prochymosin. Like the wild-type prochymosin, mutant prochymosins could be activated into pseudochymosins by autocatalysis, and exhibited a similar behavior on DEAE-Sephrose CL-6B column. However, milk-clotting and casein-hydrolysis activities of mutant pseudochymosins were lower than that of the wild-type one. These results indicate that mutation had little effect on prochymosin refolding and great effect on catalytic activity of pseudochymosins.

**Key words** Prochymosin(chymosin),  $\beta$ -turn, structure and function