

工业生物技术

大肠杆菌磷酸甘油酸脱氢酶突变体的构建及抗反馈抑制效应

邓辉^{1,2}, 陈存武¹, 孙传伯¹, 韦传宝^{1,2}

1 皖西学院 生物与制药工程学院, 安徽 六安 237012

2 六安市蛋白质分离与纯化研究中心, 安徽 六安 237012

邓辉, 陈存武, 孙传伯, 等. 大肠杆菌磷酸甘油酸脱氢酶突变体的构建及抗反馈抑制效应. 生物工程学报, 2016, 32(4): 468-477.

Deng H, Chen CW, Sun CB, et al. Construction and characterization of *Escherichia coli* D-3-phosphoglycerate dehydrogenase mutants with feedback-inhibition relief. Chin J Biotech, 2016, 32(4): 468-477.

摘要: 磷酸甘油酸脱氢酶 (D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, PGDH, EC 1.1.1.95) 为 L-丝氨酸合成途径的关键酶, 其编码基因为 *serA*, 其活性受到合成产物 L-丝氨酸的反馈抑制调控。为解除丝氨酸的反馈抑制, 采用定点突变技术把编码 PGDH 酶 344 位组氨酸或 346 位天冬氨酸或 364 位天冬氨酸的密码子定点突变为丙氨酸密码子。改造后的 *serA*^{Fbr} 被连到表达载体 pT7-7 上, 并转入大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中进行表达, 破壁回收粗酶液, 通过 DEAE 阴离子柱纯化 PGDH 突变体, 并对其酶活性和 IC₅₀ 值进行了测定。结果, 野生型 PGDH 酶 IC₅₀ 值为 7 μmol/L, 而 PGDH 双突变体 N346A/H344A 催化活性与野生型相近, 在丝氨酸浓度为 160 mmol/L 时, 其酶活仍保持未添加丝氨酸时酶活的 96%, 基本解除反馈抑制。

关键词: 大肠杆菌磷酸甘油酸脱氢酶, 突变体的构建, 解除反馈抑制

Received: July 27, 2015; **Accepted:** October 29, 2015

Supported by: National High Technology Research and Development Program (863 Program) (No. 2012AA021500), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB720805), National Natural Science Foundation of China (Nos. 81274021, H2801).

Corresponding authors: Chuanbao Wei. Tel/Fax: +86-564-3305073

Hui Deng. Tel/Fax: +86-564-3305073; E-mail: dhup@qq.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2012AA021500), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB720805), 国家自然科学基金 (Nos. 81274021, H2801) 资助。

网络出版时间: 2015-12-29

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20151229.0934.001.html>

Construction and characterization of *Escherichia coli* D-3-phosphoglycerate dehydrogenase mutants with feedback-inhibition relief

Hui Deng^{1,2}, Cunwu Chen¹, Chuanbo Sun¹, and Chuanbao Wei^{1,2}

¹ College of Biology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Liu'an 237012, Anhui, China

² Research Center of Protein Separation and Purification, Liu'an 237012, Anhui, China

Abstract: 3-Phosphoglycerate dehydrogenase (PGDH, EC 1.1.1.95) is the key enzyme in L-serine biosynthesis and its coding gene is *serA*. PGDH is feedback inhibited by L-serine. In order to relieve the feedback-inhibition of PGDH by L-serine, H344 or D346 or D364 were chosen for site directed mutagenesis. The mutants were generated by the standard QuikChange mutagenesis, further subcloned into expression vector pT7-7 and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The recombinant cells were collected after cultured in LB media post induced by isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside. The enzymes were purified by anion exchange chromatography, and SDS-PAGE showed that the purified enzymes were homogenous. Enzyme characterization indicated that the mutant enzyme showed similar activity, optimal temperature, and optimal pH as that of the wild-type enzyme. Moreover, feedback inhibition study showed that the activity of the double mutant (N346A/H344A) could remain 96% in the presence of serine up to 160 mmol/L, whereas the activity of the wild-type enzyme remains only 50% in the presents of serine of 7 $\mu\text{mol/L}$, thus successfully relieving the feedback inhibition of PGDH with its activity remained.

Keywords: *Escherichia coli* phosphoglycerate dehydrogenase, construction of mutants, relief of feedback inhibition

L-丝氨酸处于氨基酸代谢的中间位置,参与许多生物物质的合成,具有许多重要的生理功能和作用,食品和医药产业对其需求日益增大^[1]。磷酸甘油酸脱氢酶(PGDH, d-3-phosphoglycerate dehydrogenase, EC 1.1.1.95)为L-丝氨酸合成途径的关键酶,催化L-丝氨酸生物合成的第一步,其编码基因为*serA*,其活性受到合成产物L-丝氨酸的反馈抑制调控^[2],它的克隆表达及反馈抑制的解除将有助于构建在生产上高产L-丝氨酸及其代谢衍生物的生产菌株。

David等^[3]在0.9 Å分辨率下解析了结合有丝氨酸的磷酸甘油酸脱氢酶晶体结构,晶体结构分析表明:磷酸甘油酸脱氢酶为四聚体,每个亚基由核苷酸结合域、底物结合域和调控域

组成。亚基之间的相互作用发生在调控区域,该区域形成一延伸的 β 折叠结构,产物L-丝氨酸的结合位点就位于这个表面。晶体结构给出了与抑制物丝氨酸成极性共价键的氨基酸残基,变构调控结合位点见图1。

为解除合成产物L-丝氨酸对磷酸甘油酸脱氢酶的反馈抑制调控,本研究直接阻断丝氨酸与酶的极性共价结合,即利用定点突变技术把磷酸甘油酸脱氢酶上与丝氨酸结合的344位组氨酸或346位天冬氨酸或364位天冬氨酸突变为丙氨酸,使丝氨酸不能与PDGH形成极性共价键,致使丝氨酸无法完成对PDGH的变构调控,从而获得基本解除丝氨酸对PDGH反馈抑制作用的突变体。

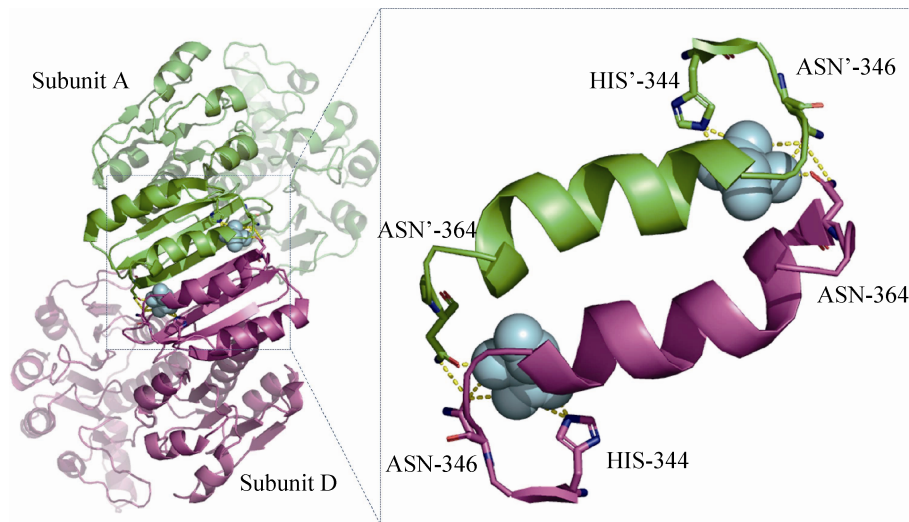


图 1 丝氨酸分子在 PGDH 酶上结合位点

Fig. 1 Serine bonding sites of PGDH. Subunit interface of PGDH consisting of two regulatory domains is shown in cartoon form. Banding subunit A is depicted in green, banding subunit D in purple. The two allosteric serine ligands are drawn in light blue, and side chains of residues which form important contacts (yellow dotted line) to the ligands are especially shown in molecular structural form. Using PyMOL 1.4 software to simulate the above picture.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、载体和质粒

菌株 BW25113、JM109 和 BL21 (DE3), 质粒 pMDTM18-T Simple 均购自 Sigma 公司。质粒 pT7-7 为本实验室保存。质粒 pMDTM18-T-*serA*、pMDTM18-T-*serA*^{Fbr}、pT7-7-*serA* 和 pT7-7-*serA*^{Fbr} 为本次试验构建, 其中 Fbr 为 feedback-inhibition resistance 缩写, 即抗反馈抑制。

1.1.2 培养基、工具酶和试剂

培养基配方见文献[4], *Nde* I、*Hind* III、*Dpn* I、CIAP 及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; pMDTM18-T Simple、基因组 DNA 及质粒小量提取试剂盒为 Promega 公司产品; 蛋白定量试剂盒与酶活性测定试剂为 Sigma 公司产品; 酵母提取物和胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品; 其他试剂为国产分析纯。

1.1.3 PCR 引物设计

根据 GenBank 中报道的 *E. coli* str.K-12 Substr. MG1655 的 *serA* 基因序列 (Accession No. 945258), 以构建 PGDH 双突变体 N346A/H344A 为例, 设计 4 条寡核苷酸引物, 并在两端加上合适的酶切位点 (*Nde* I, *Hind* III) (表 1), 引物合成及测序由上海生工生物技术有限公司完成。

表 1 本研究所用的引物名称与序列

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'-3')
Primers series 1	
<i>SerA</i> - <i>Nde</i> I-F	CATATGGCAAAGGTATC GCTGGAGAAAGACAAG
<i>SerA</i> - <i>Hind</i> III-R	AAGCTTTTAGTACAGCA GACGGGCGCGAATGGT
Primers series 2	
<i>SerA</i> (H344A, N346A)F	GATGCACATCGCCGAAG CCCGTCCGGGC
<i>SerA</i> (H344A, N346A)R	GCCCGGACGGGCTTCG GCGATGTGCATC

1.2 重组表达质粒的构建

用基因组提取试剂盒提取 *E. coli* K-12 BW25113 基因组 DNA, 用引物系列 1 PCR 扩增得到的野生型 *serA* 基因, 将其与克隆载体 pMDTM18-T Simple 连接后, 转入 JM109 进行扩增, 借助重组克隆质粒 pMDTM18-T-*serA*, 用引物系列 2 对 *serA* 进行 H344A、N346A 定点突变, 获得重组克隆质粒 pMDTM18-*serA*^{Fbr}, 然后把野生型 *serA* 基因、突变型 *serA*^{Fbr} 基因和 pT7-7 载体用 *Nde* I、*Hind* III 双酶切后分别切胶回收, 用 T4 DNA 连接酶进行连接, 获得重组表达质粒 pT7-7-*serA* 和 pT7-7-*serA*^{Fbr}。

1.3 野生型及突变型酶基因的表达和产物的纯化

把重组表达质粒 pT7-7-*serA* 和 pT7-7-*serA*^{Fbr} 电转入 BL21 (DE3), 取活化后菌体 100 μ L 菌液至 50 mL TB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600} 约为 1.3 时, 转入 25 $^{\circ}$ C 摇床继续培养 0.5 h, 添加 IPTG 至终浓度 50 mmol/L^[5], 继续培养 10–16 h。

取 100 mL 培养后的菌体 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心, 去尽上清, 加入 10 mL PBS 缓冲液 (20 mmol/L 磷酸钾缓冲液, 1 mmol/L DTT, pH 7.5), 充分混匀, ON 10 s, OFF 1 min 超声破碎, 使浑浊液澄清。4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 30 min, 上清和沉淀分别–20 $^{\circ}$ C 保藏。

用 AKTA 蛋白纯化系统, 采用 Sepharose Fast Flow 层析柱, DEAE 为其阴离子交换介质基团, 洗脱液为: A 液 (20 mmol/L 磷酸钾缓冲液, 1 mmol/L DTT), B 液 (20 mmol/L 磷酸钾缓冲液, 1 mmol/L DTT, 1 mol/L NaCl)。对出峰蛋白进行酶活测定, 选取合适的洗脱液比例洗脱目的蛋白。用 30 kDa 的纤维柱浓缩蛋白样液。

用 SDS-PAGE 蛋白电泳分析纯化产物和粗酶液, 比较纯化效果。

1.4 酶活性测定

PGDH 酶活性的测定见文献[6]。2 mL 反应体系中含有: 40 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.5), 1.0 mmol/L DTT, 0.25 mmol/L NADH, 5 mmol/L α -KG, 10–20 μ L 的已纯化蛋白。测定方法: 把 0 $^{\circ}$ C 酶液加入 37 $^{\circ}$ C 的反应体系, 测定样品在 340 nm 条件下的 NADH 的吸光值减少量, 计算酶的活性。1 U 酶活定义等于反应体系中每分钟减少 1 nmol/L NADH。蛋白浓度测定采用 Bradford 法^[7], 绘出蛋白浓度标准曲线, 根据酶活和蛋白含量计算比酶活。

1.5 野生型及突变型 PGDH 稳态动力学性质比较及抗反馈抑制效果

测定不同浓度 α -KG (α -酮戊二酸) 下的反应速度, 作 $1/[s]$ 和 $1/[v]$ 的双倒数曲线图, 求出 K_m^{app} 、 k_{cat}^{app} 、 V_{max}^{app} 、 k_{cat}^{app}/K_m^{app} 。反应体系为: 40 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.5), 1.0 mmol/L DTT, 0.25 mmol/L NADH, 不同浓度 α -KG, 10–20 μ L 的已纯化蛋白。按 1.4 酶活性测定方法测定酶活。

IC_{50} 表示在底物浓度饱和的情况下, 抑制原酶活性 50% 时丝氨酸的浓度。在 PGDH 酶活 (μ mol/L) 分别为 0、4、8、9、15、20、30、40、50、60、80、20 000、40 000、60 000、80 000、160 000, 加入纯化后的野生型及突变型酶蛋白 10 μ g, 以未加入丝氨酸时的酶活性为 100%, 计算酶活比。

1.6 野生型及突变型 PGDH 理化性质比较

测定不同反应温度下 (30–70 $^{\circ}$ C) 酶液的酶活来确定最适温度。反应体系见 1.4 酶活性测

定,酶液在待测温度下先预热 1 min 后加入同样温度下预热 2 min 的反应液中,待测温度下测定样品在 340 nm 条件下的 NADH 的吸光值减少量,计算酶的活性。

测定不同温度 (0–60 °C) 下保存 3 min 后的酶液的酶活来确定热稳定性。按 1.4 酶活性测定方法确定酶活比值。

测定不同 pH 值下 (pH 6–9) 酶液的酶活来确定最适 pH。反应体系为: 40 mmol/L 磷酸钾-钠缓冲液 (pH 6–9) (由 Na_2HPO_4 和 KH_2PO_4 混合), 1.0 mmol/L DTT, 0.25 mmol/L NADH, 5 mmol/L α -KG, 10–20 μL 的已纯化蛋白。酶液调整到待测 pH 值下加入同样 pH 值反应液中,按 1.4 酶活性测定方法确定酶活比值。

测定在磷酸钾-钠缓冲液不同 pH 值 (pH 6–9) 下 4 °C 保存 24 h 后酶液的酶活来确定酸碱稳定性。按 1.4 酶活性测定方法确定酶活比值。

2 结果与分析

2.1 野生型和突变型重组表达质粒的构建

对比 L-丝氨酸结合前后的 PDGH 的晶体结构,可知当一个 L-丝氨酸分子与 PDGH 一个亚基结合域的两个氨基酸残基 344H、346N 和相邻亚基结合域的 364'N 形成 3 个极性共价键时,就会引起两亚基间的空间构像改变,进而引起整个晶体的空间结构变化,为最大限度维持原蛋白晶体的构像,又尽量解除丝氨酸对 PDGH 两相邻亚基的作用,实验选择突变 H344A 或 N346A 或 N364A 来解除 L-丝氨酸的反馈抑制。

以双突变体 PDGH (N346A/H344A) 为例,用引物系列 1 从基因组扩增出 *serA*, 构建重组克隆质粒 pMDTM18-T-*serA*, 用引物系列 2 对 *serA* 进行 H344A、N346A 定点突变,获得

pMDTM18-T-*serA*^{Fbr}, 再把 pMDTM18-T-*serA*、pMDTM18-T-*serA*^{Fbr} 和 pT7-7^[8]载体酶切后连接,获得重组表达质粒 pT7-7-*serA* 和 pT7-7-*serA*^{Fbr}。图 2 为重组表达质粒 pT7-7-*serA* 及 pT7-7-*serA*^{Fbr} 的双酶切鉴定结果。

测序结果表明: 所构建成重组质粒 pMD18-T-*serA* 中 *serA* 的核苷酸序列与 GenBank 中报道的 *E. coli* K-12 的 *serA* 基因序列一致; 所构建的重组质粒 pMD18-T-*serA*^{Fbr} 的 H344A、N346A 定点突变成功。

2.2 PGDH 酶液的分离和纯化

由于该酶作为 α -酮戊二酸 (α -ketoglutarate, α -KG) 还原酶和作为 3-磷酸甘油酸 (3-phosphoglycerate, 3PG) 脱氢酶的稳态动力学特性一致,且二者对终产物 L-丝氨酸反馈抑制特性也几乎完全一致^[9],以 α -KG 作为底物测该

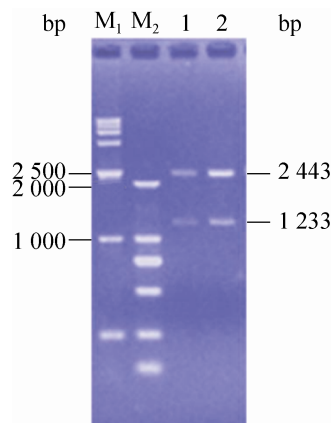


图 2 重组质粒 pT7-7-*serA* 及 pT7-7-*serA*^{Fbr} 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification by restriction digestion on recombinant plasmids of pT7-7-*serA* and pT7-7-*serA*^{Fbr}. M₁: DS 15 000 marker; M₂: DL 2 000 DNA marker; 1: recombinant plasmids of pT7-7-*serA* after enzyme digestion; 2: recombinant plasmids of pT7-7-*serA*^{Fbr} after enzyme digestion.

酶 3PG 脱氢酶活性的方法近年来也得到研究者的普遍应用^[10-15], 所以我们采用测定 α -酮戊二酸 (α -ketoglutarate, α -KG) 还原酶特性代替测定 3PG (3-phosphoglycerate, 3PG) 脱氢酶的特性。

高速离心菌液收集诱导表达 PDGH 后的菌体, 加入适量缓冲液混匀后超声破碎至澄清, 再高速离心取上清 (即粗酶液) 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保藏。用 DEAE 阴离子柱洗脱目的蛋白, 用 30 kDa 的纤维柱浓缩蛋白样液, 用 SDS-PAGE 蛋白电泳对纯化产物和粗酶液进行电泳, 比较纯化效果。PDGH 酶及其突变体的蛋白分离纯化步骤参数见表 2。

表 2 不同处理步骤对 PDGH 纯化的影响

Table 2 The influence of different processing steps on PDGH purification

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (U)	specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Soluble cellular fraction of BL21(DE3) (<i>serA</i>)	744.00	2.70×10^6	3.63×10^3	100.00	1.00
DEAE anion exchange chromatography	8.34	8.506×10^4	1.02×10^4	3.59	3.21
Soluble cellular fraction of BL21(DE3) (<i>serA</i> ^{Fbr})	756.00	2.75×10^6	3.64×10^3	100.00	1.00
DEAE anion exchange chromatography	8.37	8.45×10^4	1.01×10^4	3.45	3.23

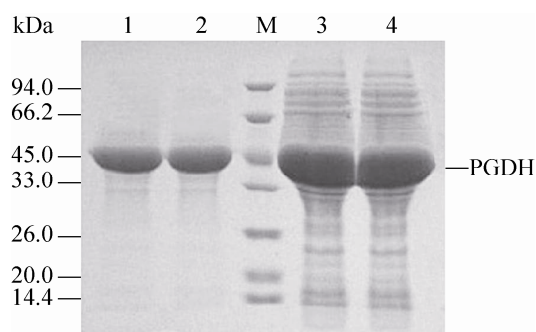


图 3 野生酶与突变酶 SDS-PAGE 蛋白电泳

Fig. 3 SDS-PAGE protein electrophoresis of wild type enzyme and its mutation. 1, 2: wild type enzyme and its mutation after purification; 3, 4: soluble cellular fraction of BL21(DE3) (*serA*) and its mutation; M: protein marker (14.4 kDa–94.0 kDa).

由表 2 知纯化后的 PDGH 比酶活约为 1.0×10^4 U/mg, 比纯化前的比酶活提高了约 3.2 倍。SDS-PAGE 电泳比较纯化后酶液和粗酶液, 结果见下图 3。

由图知纯化后的 PDGH 亚基蛋白分子量约在 45 kDa, 纯化后的目的条带清晰, 达到电泳纯。

2.3 野生型及突变型 PDGH 稳态动力学性质比较及抗反馈抑制效果

在 NADH 浓度饱和下, 测定不同浓度 α -KG 下的反应速度, 作 $1/[s]$ 和 $1/[v]$ 的双倒数曲线图, 得出 PDGH 的 α -KG 还原酶动力学参数, 结果见表 3。

表 3 野生型 PDGH 酶及其突变体的动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of Wild type PDGH and Mutant

Kinetic parameters	Wild type	Mutant(N346A/H344A.)
K_m^{app} ($\mu\text{mol/L}$) ^a	86 ± 3	85 ± 3
$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ (s^{-1}) ^a	33 ± 3	33 ± 3
$k_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_m^{\text{app}}$ ($\text{L/mol}\cdot\text{s}$)	3.837×10^5	3.882×10^5

a: K_m^{app} , apparent K_m . $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$, apparent k_{cat} .

由表中数据知, 野生型 PDGH 酶及其突变体的 K_m^{app} 和 $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ 都相当, 即催化效率近似。

L-丝氨酸对突变体和野生型 PDGH 的 α -KG 还原酶活性为非竞争性抑制, 在 PDGH 酶活性测定反应体系中加入一系列不同浓度的 L-丝氨酸

酸,测定丝氨酸对野生型及突变型 PGDH 的活性影响。不同丝氨酸浓度下野生酶和突变体 (N346A/H344A) 真实酶活和酶活比的变化见图 4。

由曲线数据显示,未添加 L-丝氨酸时,野生酶和突变酶的比酶活相近,都约为 1.01×10^4 U/mg;当添加不同浓度的丝氨酸后,野生酶的 IC_{50} 值为 $7 \mu\text{mol/L}$,即野生酶在丝氨酸浓度达到 $7 \mu\text{mol/L}$ 时,酶活就被抑制为原来的 50%,而突变酶 (N346A/H344A) 在丝氨酸浓度达到 160 mmol/L 时酶活仍保持 96%。与野生型相比,本实验所构建突变体在解除了终产物 L-丝氨酸对 PGDH 酶反馈抑制的同时,基本保持了原有野生型酶活性。

2.4 野生型及突变型 PGDH 理化性质比较

酶液在待测温度下先预热 1 min 后加入同样

温度下预热 2 min 的反应液中,测定不同反应温度下酶液的酶活。由曲线数据显示,野生型 PDGH 的最适温度为 50°C ,突变体的最适温度为 55°C ,高于野生型 PDGH (图 5A)。

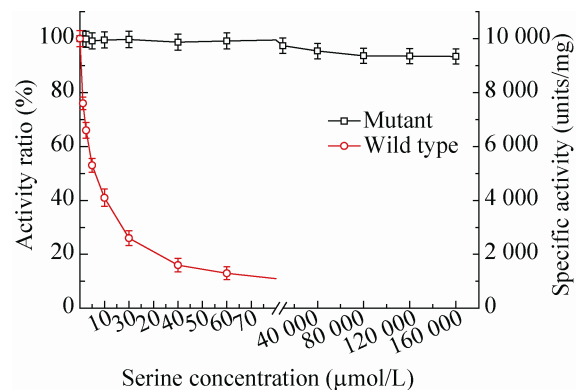


图 4 野生型 PGDH 酶及其突变体 (N346A/H344A) 的抗反馈抑制曲线

Fig. 4 Feedback inhibition of wild-type PGDH and its mutant (N346A/H344A).

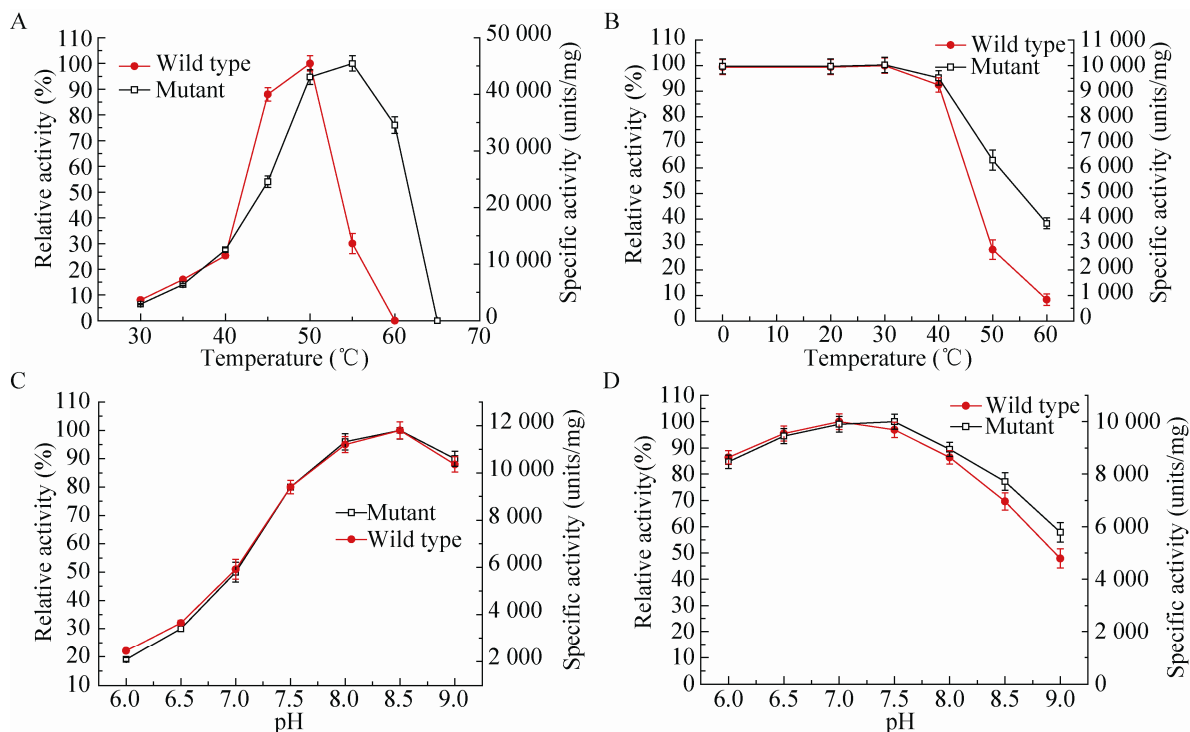


图 5 野生型 PGDH 及突变体 (N346A/H344A) 理化性质比较

Fig. 5 Compare of physicochemical property of wld type PGDH and its mutant (N346A/H344A). (A) Optimum temperature. (B) Thermostability. (C) Optimal pH. (D) pH-stability.

酶液在设定温度下保存 3 min 后置于冰上, 测定在 37 °C 反应温度下酶液的酶活。由曲线数据显示 (图 5B), 突变体和野生型 PDGH 的在 0–30 °C 保存 3 min 后, 酶活一直很稳定, 但野生型 PDGH 在 60 °C 保存 3 min 后迅速失活到原活性的 7%, 而突变体在 60 °C 保存 3 min 后, 仍保持原酶活的 38%。由此得出突变体的最适温度和热稳定性都略高于野生型 PDGH。

酶液被调节到不同的待测 pH 值后加入同 pH 值的反应液中, 测定不同 pH 值下酶液的酶活。曲线数据显示 (图 5C), 突变体和野生型 PDGH 的最适 pH 值相当, 都为 pH 8.5, 但在磷酸钾-钠缓冲液中酶活较同样 pH 值下 (pH 7.5) 的磷酸钾缓冲液要小约 1 000 U, 即在后者中更适合酶的活性表达; 在酸碱稳定性测定中, 可观测到突变体 (N346A/H344A) 和野生型 PDGH 的酸碱稳定性基本一致 (图 5D)。

实验同时也进行了该调控结合域的 3 个结合位点的单点突变, 即单突变 H344A、N346A 和 N364'A 和其他两个双点突变, 即双突变 H344A 和 N364'A, N346A 和 N364'A 并采用相同方法构建了相应的突变体, 结果单点突变体和双点突变 H344A-N364'A、N346A-N364'A 的突变体的酶活与野生型相比无明显差异, 而对单突变体对丝氨酸的 IC_{50} 最大值为 52 $\mu\text{mol/L}$, 尚未解除丝氨酸反馈抑制, 而双点突变 H344A-N364'A、N346A-N364'A 的突变体对丝氨酸的反馈抑制效果与双点突变 H344A-N346A 的突变体效果相当, 且催化活力基本一致, 具体数据见表 4。

3 小结

国内外报道中, 去除 *SerA* 的反馈抑制的方

表 4 丝氨酸对野生型 PDGH 及其突变体的抑制效果
Table 4 Inhibition of L-Serine on wild-type PDGH and its mutants

	IC_{50} (mmol/L)	Retaining rate ^a (%)	$K_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_{\text{m}}^{\text{app}}$ (L/(mol·s))
Wild-type	0.007	NA	3.84×10^5
H344A	8	NA	3.85×10^5
N346A	10	NA	3.81×10^5
N364'A	52	NA	3.82×10^5
N346A/H344A	ND	96	3.89×10^5
N346A/N364'A	ND	93	3.92×10^5
H344A/N364'A	ND	95	3.95×10^5

a: the ratio of enzyme activity of PDGH in serine concentration is 160 mmol/L and in serine concentration is 0 mmol/L; ND: not determined; NA: not applicable.

法, 多采用尝试性的删除部分结构域, 以降低反馈抑制效应, 如 Wendisch 报道研究发现在谷氨酸棒状杆菌中 3-磷酸甘油酸脱氢酶 C 端 197 个氨基酸缺失后能有效地解除反馈抑制, 但比酶活从 2.1 U/mg 下降到 1.3 U/mg, 研究者同时发现该酶野生型为同源四聚体, 而突变体为同源二倍体^[16]。张绪梅通过对大肠杆菌 *SerA* 碱基序列和蛋白质结构分析, 用 PCR 突变法构建 C 端缺失不同序列的突变酶, 获得了具有抗反馈抑制性质的大肠杆菌磷酸甘油酸脱氢酶, 酶活性测定结果表明, M1、M2 蛋白酶均保持了原有的野生型磷酸甘油酸脱氢酶活性, 且部分解除了终产物 L-丝氨酸的反馈抑制作用; M3 蛋白酶完全解除了终产物的反馈抑制作用, 但酶活为野生型的 83%, 且在实验过程中研究者发现去除部分结构域的菌株比野生型更易形成包涵体^[17]。蒋琼等构建了甲基营养菌 *serA* 基因的缺失 C 末端 ACT 功能域的突变基因和重组体表达菌 MB200/pCM80*serA*Δ77。分析发现野生型基因重组表达菌的 PGDH 酶活受 L-丝氨酸浓度

影响较大,当反应体系中的 L-丝氨酸浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时,酶活减少了约 1/3;而缺失了 ACT 功能域的基因表达菌的 PGDH 酶活基本不变,不受 L-丝氨酸浓度的影响^[18]。除蒋琼的结果较为理想外,其他研究者通过非理性尝试删除部分调控域以达到解除反馈抑制并能保持酶活力不降的效果均不是很理想。值得注意的是,Al-Rabiee 等也曾对来源于大肠杆菌 *Escherichia coli* 的 PGDH 酶的同位点进行过定点突变和动力学研究^[6,19-21],其采用的表达载体为 pTrc 99A,表达宿主菌为 JM105,结果显示单突变体的丝氨酸 IC_{50} 值与本实验接近,而双突变体的丝氨酸 IC_{50} 的值均大于 250 mmol/L,但实际活细胞中并不会在胞内出现浓度高达 250 mmol/L 的丝氨酸浓度,其突变体在丝氨酸浓度较低情况下的酶活保留率是未知的。相比而言,本实验明确给出双突变体 (N346A/H344A) 在丝氨酸浓度为 160 mmol/L 之前的抑制曲线图及突变体的酶学性质,同时本实验也明确给出不同突变体的动力学参数值,这对丝氨酸及其衍生物的代谢调控和生产实践将有更多的参考价值。

本研究在分析大肠杆菌 *SerA* 蛋白晶体结构的基础上,通过理性设计突变替换丝氨酸分子与酶分子调控域上直接结合的氨基酸残基分子为丙氨酸,阻断丝氨酸分子与酶分子的极性共价结合,希望获得解除丝氨酸对 PDGH 反馈抑制作用且酶活基本保持不变的突变体,实验研究结果表明上述目的达到,并且通过进一步的酶学特性和动力学实验表明,突变体和野生型在理化性质和催化活性上均无显著差别,而且实验中野生型和突变体的过量表达均没有产生明显的包涵体或聚集体,即选择的表达载体和

表达宿主适合过量表达目的蛋白。此研究提高了 L-丝氨酸中关键酶基因的表达量,并解除了产物的反馈抑制作用,为应用代谢工程方法研究 L-丝氨酸的合成及其衍生物的合成提供了重要参考。

REFERENCES

- [1] Snell K, Natsumeda Y, Weber G. The modulation of serine metabolism in hepatoma 3924A during different phases of cellular proliferation in culture. *Biochem J*, 1987, 245(2): 609–612.
- [2] Grant GA, Hu Z, Xu XL. Specific interactions at the regulatory domain-substrate binding domain interface influence the cooperativity of inhibition and effector binding in *Escherichia coli* D-3-phosphoglycerate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 2001, 276(2): 1078–1083.
- [3] Schuller DJ, Grant GA, Banaszak LJ. The allosteric ligand site in the V_{max} -type cooperative enzyme phosphoglycerate dehydrogenase. *Nat Struct Biol*, 1995, 2(1): 69–76.
- [4] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 908.
- [5] Liu S, Hu BC. Strategy of protein soluble expression in *Escherichia coli*. *Lett Biotech*, 2005, 16(2): 172–175 (in Chinese).
刘爽, 胡宝成. 原核系统可溶性表达策略. *生物技术通讯*, 2005, 16(2): 172–175.
- [6] Zhao G, Winkler ME. A novel alpha-ketoglutarate reductase activity of the serA-encoded 3-phosphoglycerate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12 and its possible implications for human 2-hydroxyglutaric aciduria. *J Bacteriol*, 1996, 178(1): 232–239.
- [7] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [8] Tabor S, Richardson CC. A bacteriophage T7 RNA

- polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(4): 1074–1078.
- [9] McKittrick JC, Pizer LI. Regulation of phosphoglycerate dehydrogenase levels and effect on serine synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1980, 141(1): 235–245.
- [10] Blomberg A, Adler L. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1989, 171(2): 1087–1092.
- [11] Chen XZ, Fang HY, Rao ZM, et al. Cloning and characterization of a NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene from *Candida glycerinogenes*, an industrial glycerol producer. *FEMS Yeast Res*, 2008, 8(5): 725–734.
- [12] Albertyn J, Van Tonder A, Prior BA. Prior purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 1992, 308(2): 130–132.
- [13] Grant GA, Xu XL, Hu ZQ. Quantitative relationships of site to site interaction in *Escherichia coli* D-3-phosphoglycerate dehydrogenase revealed by asymmetric hybrid tetramers. *J Biol Chem*, 2004, 279(14): 13452–13460.
- [14] Grant GA, Hu ZQ, Xu XL. Cofactor binding to *Escherichia coli* D-3-phosphoglycerate dehydrogenase induces multiple conformations which alter effector binding. *J Biol Chem*, 2002, 277(42): 39548–39553.
- [15] Thompson JR, Bell JK, Bratt J, et al. V_{\max} regulation through domain and subunit changes. The active form of phosphoglycerate dehydrogenase. *Biochemistry*, 2005, 44(15): 5763–5773.
- [16] Peters-Wendisch P, Netzer R, Eggeling L, et al. 3-Phosphoglycerate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: the C-terminal domain is not essential for activity but is required for inhibition by L-serine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 60(4): 437–441.
- [17] Zhang XM, Guo CJ, Liu Y, et al. Construction and characterization of *E. coli* PGDH mutants with feedback-inhibition resistance. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2006, 22(10): 806–810 (in Chinese).
张绪梅, 郭长江, 刘云, 等. 大肠杆菌 PGDH 末端缺失突变体的构建及抗反馈抑制效应分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22(10): 806–810.
- [18] Jiang Q, Ma S, Zhou K, et al. Function of serA gene in *M. sp.* MB200. *Genomic Appl Biol*, 2014, 33(3): 551–555 (in Chinese).
蒋琼, 马晟, 周侃, 等. 甲基营养菌 *M. sp.* MB200 中 serA 基因功能初探. *基因组学与应用生物学*, 2014, 33(3): 551–555.
- [19] Al-Rabee R, Lee EJ, Grant GA. The mechanism of velocity modulated allosteric regulation in D-3-phosphoglycerate dehydrogenase cross-linking adjacent regulatory domains with engineered disulfides mimics effector binding. *J Biol Chem*, 1996, 271(22): 13013–13017.
- [20] Grant GA, Schuller DJ, Banaszak LJ. A model for the regulation of D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, a V_{\max} -type allosteric enzyme. *Protein Sci*, 1996, 5(1): 34–41.
- [21] Schuller DJ, Fetter CH, Banaszak LJ, et al. Enhanced expression of the *Escherichia coli* serA gene in a plasmid vector. Purification, crystallization, and preliminary X-ray data of D-3 phosphoglycerate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 1989, 264(5): 2645–2648.

(本文责编 陈宏宇)