

定点突变提高苯丙氨酸羟化酶的热稳定性

叶双双, 周丽, 周哲敏

江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

叶双双, 周丽, 周哲敏. 定点突变提高苯丙氨酸羟化酶的热稳定性. 生物工程学报, 2016, 32(9): 1243–1254.

Ye SS, Zhou L, Zhou ZM. Thermal stability improvement for phenylalanine hydroxylase by site-directed mutagenesis. Chin J Biotech, 2016, 32(9): 1243–1254.

摘要:嗜热菌中, 蛋白质存在 Ala 替换 Gly 以及 Arg 替换 Lys 的趋势。为了提高紫色色杆菌来源的苯丙氨酸羟化酶的热稳定性, 将该酶中所有 Gly 突变成 Ala, Lys 突变成 Arg, 筛选获得热稳定性提高的突变体, 并进行组合突变, 对突变酶的酶学性质进行研究。结果表明, 突变酶 K94R 和 G221A 在 50 °C 的半衰期分别为 26.2 min、16.8 min, 比原始酶 (9.0 min) 分别提高了 1.9 倍、0.9 倍, 同时组合突变酶 K94R/G221A 在 50 °C 处理 1 h 后仍保留 65.6% 的酶活, 比原始酶 (8.6%) 高出 6.6 倍。圆二色谱结果显示原始酶和突变酶 K94R、G221A 及 K94R/G221A 的 T_m 值分别为 51.5 °C、53.8 °C、53.1 °C 和 54.8 °C。蛋白三维结构模拟推测突变体热稳定性提高机理为: 突变体 K94R 中 Arg94 与 Ile95 之间形成额外氢键, 稳定其所在的柔性区域; 突变体 G221A 中 Ala221 与 Leu281 产生疏水作用, 稳定酶分子 C-端柔性区。该研究结果为蛋白质热稳定性改造提供了参考, 也为苯丙氨酸羟化酶在功能性食品领域的应用奠定了基础。

关键词: 苯丙氨酸羟化酶, 热稳定性, 定点突变, 丙氨酸突变, 精氨酸突变

Received: January 12, 2016; **Accepted:** May 30, 2016

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA021304), the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher-Education Institutions, the 111 Project, the Jiangsu Province “Collaborative Innovation Center for Advanced Industrial Fermentation” Industry Development Program (No. 111-2-06), The Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP51411B).

Corresponding author: Zhemin Zhou. Tel: +86-510-85325210; E-mail: zhmzhou@jiangnan.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA021304), 江苏高校优势学科建设工程自主项目, 111 引智计划 (No. 111-2-06), 江苏省现代发酵工业协同创新中心, 2014 年基本科研-重点项目子项目 (No. JUSRP51411B) 资助。

网络出版时间: 2016-06-13

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160613.0956.002.html>

Thermal stability improvement for phenylalanine hydroxylase by site-directed mutagenesis

Shuangshuang Ye, Li Zhou, and Zhemin Zhou

School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: In proteins of thermophilic bacteria, Gly is tend to be replaced by Ala and Lys is tend to be replaced by Arg to adapt the high temperature. In order to improve the thermal stability of phenylalanine hydroxylase (PAH) from *Chromobacterium violaceum*, all the Gly on PAH were mutated to Ala and Lys to Arg. Positive mutant enzymes with improved thermal stability were selected, followed by combined mutation and characterization. The results revealed that half-lives of K94R and G221A mutants at 50 °C were 26.2 min and 16.8 min, which were increased by 1.9-times and 0.9-times than the parent enzyme (9.0 min). The residual activity of K94R/G221A mutant was improved to 65.6% after keeping at 50 °C for 1 h, which was 6.6 time higher than the parent enzyme (8.6%). Circular dichroism (CD) spectroscopy revealed that T_m values of the parent enzyme, K94R, G221A and K94R/G221A were 51.5 °C, 53.8 °C, 53.1 °C and 54.8 °C, respectively. According to the protein structure simulation, the two mutations were located on flexible loop. In the K94R mutant, the mutated Arg94 on the surface of the enzyme formed an extra hydrogen bond with Ile95, which stabilized the located loop. In the G221A mutant, the mutated Ala221 formed hydrophobic interaction with Leu281, which could stabilize both the loop and flexible area of the C-terminus of G221A. The results not only provided a reference for protein modification on thermal stability, but also laid the foundation for application of phenylalanine hydroxylase in the field of functional foods.

Keywords: phenylalanine hydroxylase, thermal stability, site-directed mutagenesis, alanine mutation, arginine mutation

苯丙氨酸在人体中主要代谢途径是通过苯丙氨酸羟化酶 (Phenylalanine hydroxylase, PAH, EC 1.14.16.1) 的催化生成酪氨酸。若人体苯丙氨酸羟化酶存在缺陷, 将导致血液中苯丙氨酸含量升高, 最终形成苯丙酮尿症^[1] (Phenylketonuria, PKU)。目前, 国际上苯丙酮尿症的临床治疗方法都是摄入低苯丙氨酸食品或人工合成营养食品^[2]。这种治疗方式虽然能在一定程度上控制苯丙酮尿症, 但是也会导致患者其他营养素缺乏^[3-6]。如果能将苯丙氨酸羟化酶添加到食物中, 直接催化苯丙氨酸生成酪氨酸, 可有效控制血液中苯丙氨酸含量, 同时不影响其他营养物质的摄入。

苯丙氨酸羟化酶是一种非血红素铁单加氧

酶, 广泛存在于动物、植物和微生物中, 是苯丙氨酸代谢过程中的关键酶和限速酶。科研工作者对多种来源的苯丙氨酸羟化酶进行研究, 发现与其他来源的苯丙氨酸羟化酶相比, 紫色杆菌 *Chromobacterium violaceum* 来源的苯丙氨酸羟化酶 (CvPAH) 具有结构简单^[7]、与人类来源苯丙氨酸羟化酶催化区域几乎完全一致^[8]、能够在人体温度和 pH 条件下催化苯丙氨酸羟化反应^[7,9]、催化活性及稳定性高^[7]等特点。至 2013 年, Yew 等^[10]已通过红细胞封装的手段将 CvPAH 导入正常小鼠中, 并降低小鼠血液中苯丙氨酸的水平, 为其在功能食品领域的运用提供了参考。

本研究室在前期研究中, 从紫色色杆菌中

提取 *CvPAH* 基因, 实现了在大肠杆菌中高效表达, 并对其酶学性质进行了系统地研究^[9]。结果表明该酶在 37 °C、pH 7.5 时活性高于其他来源的苯丙氨酸羟化酶。然而该酶在高温条件下迅速失活, 增加了其医药应用的成本。因此, 提高 *CvPAH* 的热稳定性对其应用至关重要。

定向进化能够通过引入随机突变提高酶的热稳定性, 但是该方法需要构建足够大的突变体库, 因此往往消耗大量的人力、物力及财力^[11-12]; 计算机模拟设计也能提高蛋白热稳定性, 然而影响蛋白质稳定性的因素复杂, 大大降低计算机预测的准确性^[13]; 基于 B-factor 的进化策略能够降低酶局部的柔性达到降低酶的热稳定性的目的, 但是该方法需要建立在获得晶体结构的基础上^[12], 限制了该方法的应用。影响蛋白质热稳定性的因素众多^[14-20], 蛋白质的氨基酸组成与其热稳定性关系密切。如果能够以蛋白质的一级结构为基础, 建立提高酶热稳定性的方法, 不仅避免了高级结构的限制, 还能快速准确地获得突变体。

1979 年, Argos 等^[21]对嗜热蛋白和嗜中温蛋白氨基酸组成进行了统计分析, 发现相对于嗜中温蛋白, 嗜热蛋白中氨基酸序列中有如下替换趋势: 即甘氨酸 (Glycine, Gly) 替换为丙氨酸 (Alanine, Ala), 赖氨酸 (Lysine, Lys) 替换为精氨酸 (Arginine, Arg)。Zhang 等^[22]在 T4 溶菌酶中介入了单个或多个 Ala 突变, 有效提高该酶的热稳定性。此外, Mrabet 等^[23]利用将 Lys 突变成 Arg 的策略有效提高木聚糖异构酶的热稳定性。然而, 尚未见将 Ala 和 Arg 突变策略组合的研究, 以及应用上述策略提高 PAH 热稳定性的研究。

本实验选取 *CvPAH* 上所有的 Gly 及 Lys, 分别突变成 Ala 和 Arg, 构建突变体, 筛选热稳定性提高的突变酶, 进一步进行组合突变, 并研究突变体的酶学性质。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与培养基

菌种: 大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109、*E. coli* BL21 (DE3) 购自 Novangen 公司, *E. coli* BL21 (DE3)/pET24a-*pah* 由本实验室构建并保存^[9]。

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 10, 琼脂粉 20 (配制固体培养基)。

2YT 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 16, 酵母膏 10, NaCl 10, 琼脂粉 20 (配制固体培养基)。

1.1.2 工具酶和生化试剂

工具酶、DNA Marker 和 Protein Marker 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; 胶回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒购自东洋纺 (上海) 生物科技有限公司; 引物由上海生物工程公司合成; 酵母提取物、蛋白胨购自 Oxford 公司; IPTG、卡那霉素购自上海生物工程公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 突变位点选择及引物设计

根据嗜热蛋白对 Ala 的偏好性明显高于 Gly、对 Arg 的偏好性高于 Lys 的特点, 选取 *CvPAH* 上所有 Gly 和 Lys 分别突变成 Ala 和 Arg。根据 GenBank 提供的 *CvPAH* 基因序列 (Gene ID: AF146711), 以重组质粒 pET24a-*pah* 为模板, 用软件 Primer 5.0 设计引物 (表 1)。

表 1 本文所用引物及序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
G19A up	CACCCGCAAGAATGTG <u>CCCT</u> GAGCCACGAC	31
G19A down	TGGCGTCGTGGCTCAG <u>GGC</u> GACATTCTTGCG	31
G57A up	ATGCAAGCTGCTGCC <u>CCG</u> CGCCTGCGAC	31
G57A down	ACTCGTCGCAGGCG <u>GGC</u> GGGCAGCAGCTT	31
G66A up	CGACGAGTTTCTGGA <u>GCCT</u> GGAGCGCCTG	31
G66A down	CTTCCAGGCGCTCCAG <u>GGC</u> TTCAGAACTC	31
G92A up	GCTGATGGCCGCCAC <u>CCG</u> CTGGAAGATCGTC	31
G92A down	CCGCGACGATCTTCAG <u>GGC</u> GGTGGCGGCCATC	32
G100A up	GATCGTCGCGGTGCC <u>GGC</u> CTGATTCCCGAC	31
G100A down	CGTCGTCGGGAATCAG <u>GGC</u> CGGCACCGCGAC	31
G142A up	GTTCCACGACCTGTT <u>CGCC</u> CACGTGCCGCTG	31
G142A down	TCAGCAGCGGCACGT <u>GGC</u> GAACAGGTCGTG	31
G160A up	TTACCTGGAGGCCTAC <u>GCC</u> AAGGGCGGGGTG	31
G160A down	CCTTCA <u>CCCG</u> CCCTTGGCGTAGGCCTCCAG	31
G162A up	GGAGGCCTACGGCAAG <u>GCC</u> GGGGTGAAGGCG	31
G162A down	CCTTCGCCTTCA <u>CCCG</u> CCCTTGCCGTAGGC	31
G163A up	AGGCCTACGGCAAGGGC <u>GCC</u> GTGAAGGCGAAG	32
G163A down	GCGCCTTCGCCTTCA <u>GGC</u> GCCCTTGCCGTAG	32
G170A up	GAAGGCGAAGGCGCT <u>GCC</u> CGCGCTGCCGATG	31
G170A down	CCAGCATCGGCAGCG <u>GGC</u> CAGCGCCTTCGC	31
G186A up	GTACACGGTGGAATTC <u>GCC</u> CTGATCAATACTC	32
G186A down	CCGGAGTATTGATCAG <u>GGC</u> GAATTCCACCGTG	32
G193A up	GATCAATACTCCGGCC <u>GCC</u> ATGCGCATCTAC	31
G193A down	CGCCGTAGATGCGCAT <u>GGC</u> GCCGGAGTATTG	32
G198A up	CGGCATGCGCATCTAC <u>GCC</u> GCCGGCATCTTG	31
G198A down	TGGACAAGATGCCGG <u>GGC</u> GTAGATGCGCATG	32
G200A up	GCGCATCTACGGCGCC <u>GCC</u> ATCTTGTCAGC	31
G200A down	ACTTGCTGGACAAGAT <u>GGC</u> GGCGCCGTAGATG	32
G221A up	CAGCCCCAACC GCGTC <u>GCC</u> TTCGACCTGAT	30
G221A down	TGCGCATCAGGTCGA <u>GGC</u> GACGCGGTTGGG	31
G272A up	CGACGCGCAACCGTGG <u>GCC</u> GCCGGCGACATC	31
G272A down	GCGCGATGTCGCCGG <u>GCC</u> CCACGGTTGCGC	31
G274A up	GCAACCGTGGGGCGCC <u>GCC</u> GACATCGCGCCG	31
G274A down	CGTCCGGCGCGATGTC <u>GGC</u> GGCGCCCCACGG	31
G286A up	CCTGGTGCTGAATGCC <u>GCC</u> GACCGCCAAGG	31
G286A down	CCCATCCTTGGCGGT <u>GCC</u> GGCATTGACAC	31

续表 1

G290A up	TGCCGGCGACCGCCAAGCCTGGGCGGATAACC	31
G290A down	CTTCGGTATCCGCCAGGCTTGGCGGTCGC C	31
K16R up	CCGACATCACCACCCGCGCAATGTCGGACTG	32
K16R down	GGCTCAGTCCGACATTGCGGCGGGTGGTGTATG	32
K53R up	GTACCAGCGCCAATGCCGCCTGCTGCCCGGC	31
K53R down	CGCGGCCGGGCAGCAGGCGGCATTGGCGCTG	31
K82R up	GGTCCCGGACTTCAATCGCCTCAACGAGAAG	31
K82R down	TCAGCTTCTCGTTGAGGCGATTGAAGTCCGG	31
K86R up	CAATAAGCTCAACGAGCGCCTGATGGCCGCC	31
K86R down	CGGTGGCGGCCATCAGGCGCTCGTTGAGCTT	31
K94R up	GGCCGCCACCGGCTGGAGGATCGTCGCGGTG	31
K94R down	CCGGCACCGCGACGATCCTCCAGCCGGTGGC	31
K161R up	CCTGGAGGCCTACGGCCGCGGCGGGGTGAAG	31
K161R down	TCGCCTTACCCCGCCGCGGCCGTAGGCCTC	31
K165R up	CGGCAAGGGCGGGGTGCGCGCAAGGCGCTG	31
K165R down	CGCCCAGCGCCTTCGCGCGCACCCCGCCCTTG	32
K167R up	GGGCGGGGTGAAGGCGCGCGCTGGGCGCG	31
K205R up	CGGCATCTGTCCAGCCGCTCGGAATCCATC	31
K205R down	AGTAGATGGATTCCGAGCGGCTGGACAAGATG	32
K239R up	GATCGACACCTTCCAGCGCACCTACTTCGTC	31
K239R down	CGATGACGAAGTAGGTGCGCTGGAAGGTGTC	31
K248R up	CGTCATCGACAGCTTCCGCGCAGCTGTTGAC	31
K248R down	TGGCGTCGAACAGCTGCCGAAGCTGTGATG	32

The mutation sites are underlined.

1.2.2 突变体的构建

PCR 反应体系：10 μL 5 \times PrimeSATAR Buffer (5 mmol/L Mg^{2+} plus) 4 μL 浓度的 dNTPs (2.5 mmol/L each), 1 μL 上游引物 (10 mmol/L), 1 μL 下游引物 (10 mmol/L), 1 μL 模板 pET24a-*pah*, 0.5 μL PrimeSTAR HS DNA Polymerase, 超纯水补至 50 μL 。

PCR 扩增条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min , 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6.5 min , 25 个循环 ; 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min。

用 *Dpn* I 消化 PCR 模板 (在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h), 再进行纯化, 获得带有突变基因的质粒。

将构建的质粒转化感受态细胞 *E. coli* JM109, 涂布含有卡那霉素 (50 mg/L) 的抗性平板, 筛选获得阳性克隆, 提取质粒转化感受态细胞 *E. coli* BL21 (DE3)。

1.2.3 突变酶的表达与纯化

从平板上挑取突变菌种的单菌落, 分别接种至 5 mL 含有卡那霉素 (50 mg/L) 的 LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 过夜培养。取 1 mL 培养液接种至 100 mL 含有卡那霉素 (50 mg/L) 的 2YT 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至菌浓度达到 $OD_{600} = 0.6$, 加入终浓度 0.6 mmol/L 的 IPTG, 诱导表达 24 h。

离心收集菌体,用适当体积 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 重悬后用超声破碎仪破碎(工作 3 s,停 7 s),离心(12 000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 30 min)取上清液, 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,使用 HiTrapTM 1 mL DEAE FF 于 AKATA pure 层析系统中纯化蛋白,纯化方法参见文献[9]。采用 Bradford 法测定蛋白质浓度^[10]。

1.2.4 CvPAH 酶活测定

CvPAH 酶液稀释至 0.5 mg/mL,取 50 μ L 加到 250 μ L 100 mmol/L HEPES (pH 7.5) 缓冲液中,然后在该体系中加入 50 μ L 浓度为 10 mmol/L 的 L-苯丙氨酸 (L-phe)、50 μ L 浓度为 50 mmol/L 的 DTT、50 μ L 浓度为 50 μ mol/L FeSO₄、50 μ L 浓度为 2 mmol/L 的 DMPH₄ 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min,加入 500 μ L 甲醇终止反应。15 000 \times g 离心 30 min,取上清,用 0.22 μ m 微孔有机滤膜过滤,利用 HPLC 检测产物生成量,计算酶活^[9]。CvPAH 活性测定反应体系见表 2。

1.2.5 突变酶最适反应温度及热稳定性测定

最适反应温度:根据表 2 的反应体系,将突变酶分别置于 20 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C 条件反应 10 min,测定残余酶活。

温度稳定性:突变酶在 50 $^{\circ}$ C 水浴中热处理 15 min、30 min、45 min、60 min,立刻冰浴 30 min。

表 2 CvPAH 酶活测定反应体系

Table 2 Reaction system for activity determination of CvPAH

Composition	Volume (μ L)	Final concentration
HEPES	250.0	50.0 mmol/L
FeSO ₄	50.0	5.0 μ mol/L
DTT	50.0	5.0 mmol/L
L-phe	50.0	1.0 mmol/L
CvPAH	50.0	0.05 mg/mL
DMPH ₄	50.0	0.2 mmol/L

根据表 2 配制反应体系,迅速振荡混匀,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中反应 10 min,测定残余酶活。

1.2.6 突变酶 T_m 值测定

用圆二色谱仪测定原始酶及突变酶 T_m 。温度范围为 35–70 $^{\circ}$ C, 0.1 mg/L 蛋白样溶于 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5),在 222 nm 的波长条件下测定。用软件 Origin 8.0 进行平滑处理。

1.2.7 突变酶动力学参数测定

以不同浓度 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L) L-phe 为底物,在 37 $^{\circ}$ C、pH 7.5 的条件下反应 3 min,测定突变酶的初始反应速率。利用软件 GraphPad Prism 5 进行非线性拟合,计算动力学参数 (V_{max} 、 K_m 、 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m)。

1.2.8 突变酶的结构分析

取 0.2 mg/mL 蛋白溶解于 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 中,使用圆二色谱分析仪,扫描波长从 190–250 nm,检测蛋白质的二级结构。

以 CvPAH (PDB ID: 1LTZ) 为模板,利用 SWISS-MODEL 对突变酶进行同源建模。利用 Pymol 软件对蛋白质的三级结构进行分析。

2 结果与分析

2.1 突变位点保守性分析

为了比较 CvPAH 中 Gly 和 Lys 的保守性,从动物和植物中分别选取人苯丙氨酸羟化酶 (hPAH) 和绿藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 苯丙氨酸羟化酶 (CrPAH),与 CvPAH 进行序列比对(图 1)。结果表明,CvPAH 氨基酸序列中有 19 个 Gly,其中有 7 个保守位点,分别是 92、100、142、160、186、198 和 200 位;有 11 个 Lys,并且都不保守。

```

CvPAH: MNDRADFVVPDITTRKN-VGLSHDANDFTLPQPLDRYSAEDHATWATLYQRQCKLLPGRACDEFLEGLERLE----VDAD
hPAH:  DADHPGFKDPVYRARRKQFADIAYNYRHGQPIPRVEYMEEKKTWGTVFKTLKSLYKTHACYEYNHIFPFLLEKYCGFHED
CrPAH:  AEDHPGFHDPAYKQRRRAWLAEMAKTHRIGTPIPDVEYSPAEVATWDAVLEELSGLLPQHACREYLRCLTLFD----FRKG

          V
CvPAH:  RVPDFNKLNEKLMAATGKIVAVPGLIPDDVFFEHANRRFPVTWWLREPHQLDYLQEPDVFHDLFGHVPLLINPVFADY
hPAH:  NIPQLEDVSQLQCTCTGFRLRPVAGLLSSRDFLGGLAFRVFHCTQYIRHGSKPMYTPEPDICHELIQHVPLFSDRSFAQF
CrPAH:  RVPQLEEMNTVLRSTTQWTVRPVAGLMHPRHFLAGLAFKHFHSTQYMRHPSKPSYTPEDVVHELIGHVPLLADPAYARL

          V V
CvPAH:  LEAYGKGGVKAKALGALPMLARLYWYTVVEFGLINTPAGMRIYGAGILSSKSESIYCLDSASPNRVGFDLMRIMNTRYRID
hPAH:  SQEIGLASLGAPDE-YIEKLATIYWFTVEFELCKQGDSIKAYGAGLLSSFGELQYCLSEK-PKLLPLELEKTAIQNYTVT
CrPAH:  IQTIGLASLAADDK-QIWHLTKVYWHHTVEFQVVRREGQVKAFSGAGILSSYGELAHMASGA-AALERLDPFRPQPRMAYKD

CvPAH:  TFQKTYFVIDSFKQLFDATAPDFAPLYLQLADAQPWGAGDIAPDDLVLNAGDHQGWADTEDV-----
hPAH:  EFQPLYVVAESFNDAKEKVRNFAATIPRPFVRYDPYTQRIEVLNNTQQLKILADSINSEIGILCSALQKIK
CrPAH:  GFQKRYFVLDSFAEGSELLSSYAASLGLPESLRGDASVA-----

```

图 1 紫色色杆菌 PAH 与人和绿藻 PAH 氨基酸序列比对

Fig. 1 Alignment of amino acid sequences for the PAH from *C. violaceum*, human and *Chlamydomonas reinhardtii*. Red boxes indicated conserved amino acids. Triangles indicated amino acids around the active center.

2.2 突变体筛选

用粗酶液初步测定突变酶相对酶活和热稳定性。相对酶活 (图 2 中 A、B) 表明, Lys 突变为 Arg 对酶活影响较小, 除了 K86R 酶活降至原始酶的 45.5%, 其余酶的相对酶活均保持在 50% 以上。Gly 突变成 Ala 对 CvPAH 活性影响较大, 其中 G100A、G198A 和 G200A 的酶活分别降至原始酶的 10.4%、24.4% 和 28.1%。根据晶体结构 (数据未显示) 分析可知 G198 和 G200 均处于活性中心周围, 对酶的活性部位的微环境有较大的影响, 而 G100 直接参与辅酶 (6,7-dimethyltetrahydropterin, DMPH₄) 的结合, 突变后直接影响辅酶结合, 降低酶活。

选取 Gly 突变成 Ala 后相对酶活保持在 50% 以上的突变酶和所有由 Lys 突变成 Arg 的突变酶初步测定热稳定性 (在 50 °C 保温, 测定

15 min、30 min 时的酶活保留率)。图 3 表明, 大部分突变酶的热稳定性下降或影响较小, 只有 G221A、K94R 热稳定性明显提高。因此, 后续对 G221A、K94R 和组合突变酶 K94R/G221A 展开研究。

对各突变位点在晶体结构中所处的位置进行比较分析, Gly 分布为: 19、57、92、100、170、186、193、198、221、272、274、286、290 均位于该酶的柔性区, 66、142、160、162、163、200 均位于 α -螺旋中, 且 19、92、170、193、221、272、274、286、290 均位于酶分子表面。Lys 分布为: 所有点均分布在酶分子表面, 且 94、167、239 位于柔性区, 其余位点位于 α -螺旋中。可见, 蛋白表面氨基酸性质对酶的热稳定性影响较大, 对分子表面的柔性区进行改造能有效提高突变位点选择的效率, 大大降低工作量。

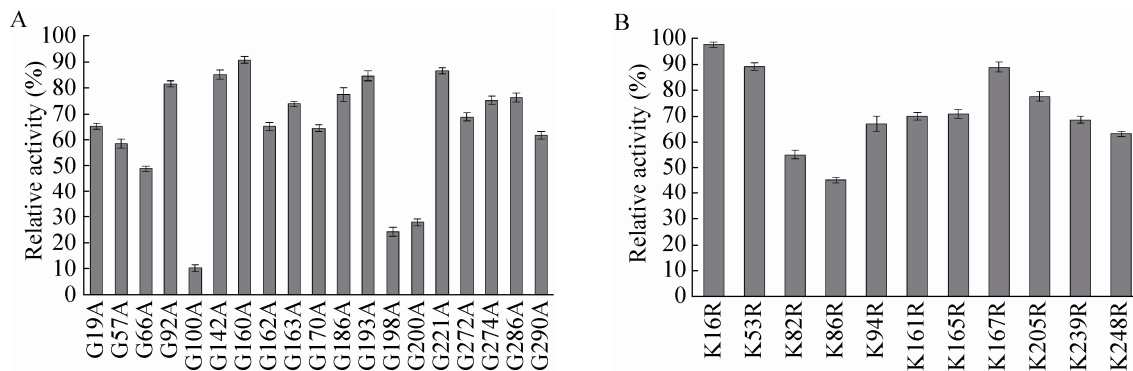


图 2 突变酶相对酶活

Fig. 2 Relative activity of mutant enzymes. Relative activity of mutant enzymes that mutated from Gly to Ala is shown in figure A. Relative activity of mutant enzymes that mutated from Lys to Arg is shown in figure B. The error bars show standard deviations calculated for three replicate experiments.

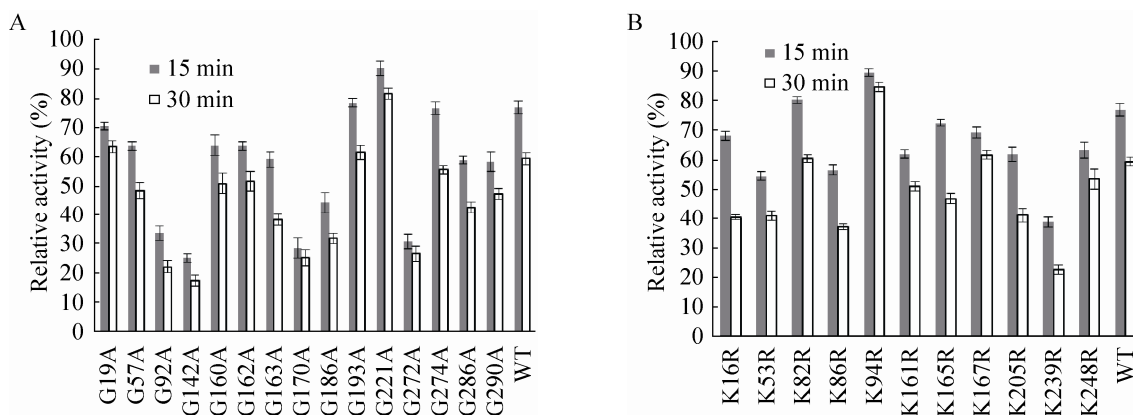


图 3 突变酶热稳定性

Fig. 3 Thermal stability of mutant enzymes. Thermal stability of mutant enzymes that mutated from Gly to Ala is shown in figure A. Thermal stability of mutant enzymes that mutated from Lys to Arg is shown in figure B. The error bars show standard deviations calculated for three replicate experiments.

2.3 突变酶的酶学性质

2.3.1 突变酶纯化

突变酶经过 DEAE 阴离子柱纯化, 进行 SDS-PAGE 电泳检测 (图 4), 突变酶的分子量大小与原始酶一致, 均在 35 kDa 左右。

2.3.2 突变酶的最适反应温度及热稳定性

突变酶的活性研究结果表明, K94R、G221A 和 K94R/G221A 的比酶活分别为 473.8、413.6

和 294.3 U/mg, 与原始酶 (562.7 U/mg) 相比, 分别下降了 15.8%、26.5%和 47.7%。最适反应温度结果 (图 5) 表明, 突变酶和原始酶均在 40 °C 左右达到最高酶活, 随着温度升高或降低, 酶活均会降低, 其中 K94R/G221A 在温度降低过程中酶活降低速度最慢。

热稳定性对比分析 (图 6) 显示, 在 50 °C 处理时, 原始酶的酶活下降速度明显比突变酶

快, 尤其在前 15 min, 原始酶活性迅速丧失, 最终只剩 25.1%, 而突变酶 K94R、G221A 和 K94R/G221A 酶活保留率分别达到 65.5%、53.4% 和 80.2%。K94R 和 G221A 在 50 °C 的半衰期分别为 26.2 min、16.8 min, 比原始酶 (9.0 min) 分别提高了 1.9 倍、0.9 倍, 同时 K94R/G221A 在 50 °C 处理 1 h 后仍保留 65.6% 的酶活, 比原始酶 (8.6%) 高出 6.6 倍。

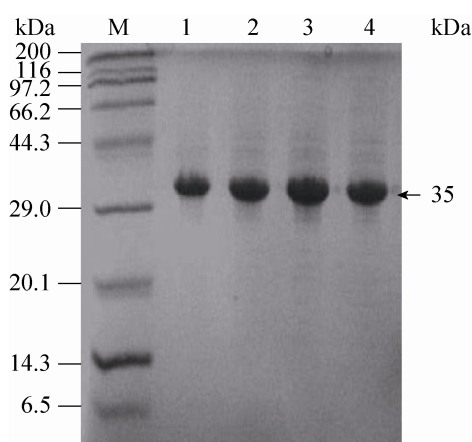


图 4 突变酶纯化结果

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified mutant enzymes. M: protein marker; 1: parent enzyme; 2: K94R; 3: G221A; 4: K94R/G221A.

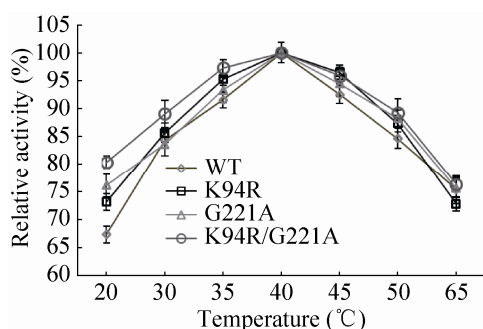


图 5 突变酶最适反应温度

Fig. 5 Optimum temperature of the mutant enzymes. Enzymes reacted at different temperatures (20 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 60 °C), and residual activities were determined. The error bars show standard deviations calculated for three replicate experiments.

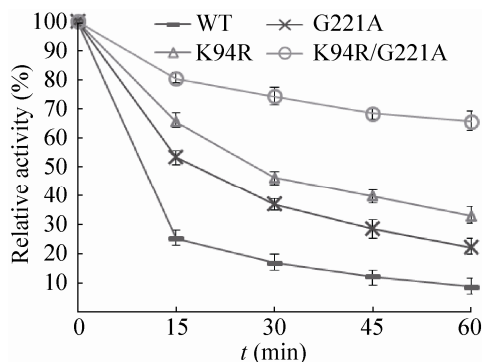


图 6 突变酶热稳定性比较

Fig. 6 Comparison of thermostability of the mutant enzymes. Enzymes were heated at 50 °C for increasing times. Then residual activities were determined taking L-phe as substrate. The error bars show standard deviations calculated for three replicate experiments.

2.3.3 突变酶的 T_m 值

通过圆二色谱仪对突变酶 K94R、G221A、K94R/G221A 及原始酶进行 T_m 测定, 结果如图 7 所示, 原始酶的 T_m 值约 51.5 °C, 而突变酶 K94R、G221A 及 K94R/G221A 分别达到 53.8 °C、53.1 °C、54.8 °C。因此, 相比较原始酶, 突变酶具有更高的耐热性。

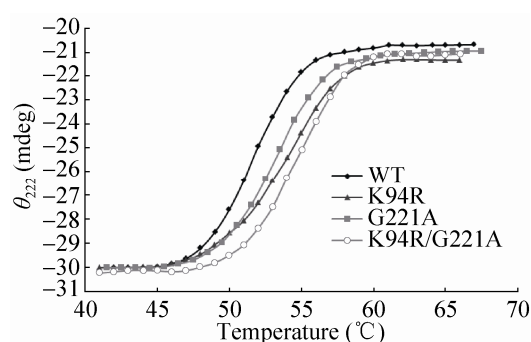


图 7 圆二色谱测定突变酶 T_m 值

Fig. 7 The melting temperature of the mutant enzymes measured by CD spectroscopy. Temperature-induced unfolding profile of parent enzyme and mutant enzymes derived from data monitored by changes in ellipticity at 222 nm.

2.3.4 突变酶的动力学参数

以不同浓度的 L-phe 为底物,测定突变酶的动力学参数。如表 3 所示,与原始酶相比,突变后最大反应速率 V_{\max} 有所降低,其中 K94R/G221A 的 V_{\max} 最低,降到 $5.8 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{s})$ 。突变酶对底物的米氏常数 K_m 均有不同程度下降,其中 K94R 对 L-phe 的 K_m 最低,为 $119.3 \mu\text{mol}/\text{L}$,可见突变酶对底物的结合能力均有所提高,同时 k_{cat} 也有不同程度的下降。最终,催化效率 (k_{cat}/K_m) 仅略低于原始酶,即该突变对酶活的影响较小。结合稳定性研究结果可知,相比原酶,突变酶更具有应用价值。

2.4 突变酶的结构分析

二级结构分析结果如图 8。突变酶与原始酶 α -螺旋特征波长 208 nm 和 222 nm 以及 β -折叠

特征波长 195 nm 和 216 nm 处的椭圆率没有显著差别。可见 K94R、G221A 两个位点突变对酶的二级结构几乎没有影响。

同源建模发现,突变酶与原始酶的三级结构没有显著差别,因此对氨基酸之间成键情况进行分析。如图 9 所示,94 位氨基酸位于 α -螺旋与 β -折叠之间的柔性环上,由 Lys 突变成带有更大侧链基团的 Arg,与 Ile95 形成额外的氢键,有助于稳定该环的结构,从而提高酶的稳定性的;此外,该位点位于蛋白质表面区域,突变成 Arg 后胍基能够与水分子之间形成偶极-电荷作用,使蛋白表面形成水化膜,从而提高蛋白质热稳定性^[24]。

如图 10 所示,Gly221 处于柔性区并且与酶分子的 C-端柔性区接近,Gly 没有侧链基团,

表 3 突变酶动力学参数

Table 3 Kinetics parameters of the mutant enzymes

Enzymes	V_{\max} ($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{s})$)	K_m ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{L}/(\text{s}\cdot\text{mmol})$)
WT	10.2 ± 0.2	163.1 ± 1.5	5.2 ± 0.1	319.6 ± 3.2
K94R	6.4 ± 0.1	119.3 ± 1.2	2.8 ± 0.1	230.5 ± 2.7
G221A	7.6 ± 0.3	130.4 ± 1.3	3.2 ± 0.2	247.7 ± 4.3
K94R/G221A	5.8 ± 0.1	128.9 ± 1.3	2.7 ± 0.1	211.8 ± 3.5

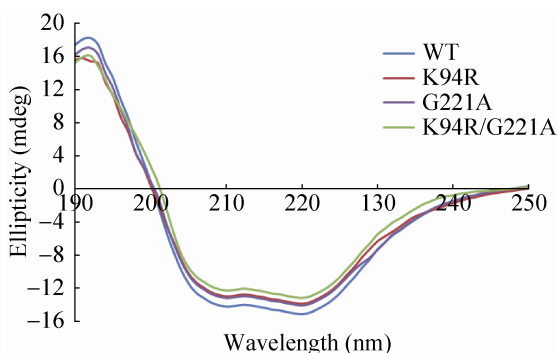


图 8 突变酶二级结构

Fig. 8 Secondary structure of the mutant enzymes. The circular dichroism spectrum of the mutant enzymes was not dramatically different from that of parent enzyme.

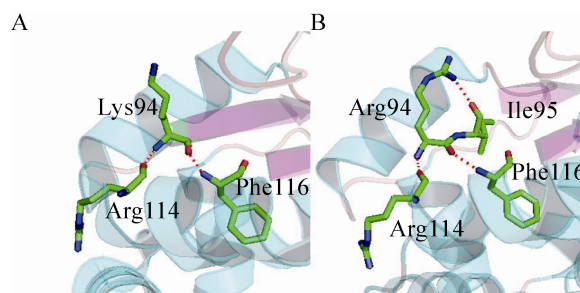


图 9 位点 94 突变前 (A) 后 (B) 三维结构模拟

Fig. 9 Simulated three-dimensional structure prior (A) and after (B) residue 94 mutation. The red dotted line is hydrogen bond. In the parent enzyme, Lys94 (A) forms hydrogen bonds with Arg114 and Phe116, respectively. Arg94 (B) forms an extract hydrogen bond with Ile95 in K94R.

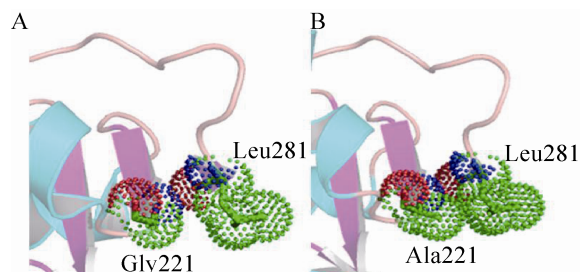


图 10 位点 22 突变前 (A) 后 (B) 三维结构模拟
Fig. 10 Simulated three-dimensional structure prior (A) and after (B) residue 221 mutation. The green dashed ball is hydrophobic group. The Ala221 (B) has a bigger hydrophobic group, forming hydrophobic interaction with Leu281.

构象熵大。突变成 Ala 后，增加了一个疏水性基团（甲基），拉近了与酶 C-端 Leu281 的距离，与 Leu281 疏水侧链出现重叠区域（图 10），推测形成疏水作用^[25-26]，不仅增加了柔性环的稳定性，同时起到锚定 C-端柔性区的作用，提高了突变酶的热稳定性。

3 结论

通过 Gly 替换成 Ala 以及 Lys 替换成 Arg 的策略得到 2 个突变酶 K94R 和 G221A，其热稳定性较原始酶分别提高了 0.9 倍和 1.9 倍。进一步对两个位点进行组合突变，获得 K94R/G221A，其热稳定性较原始酶提高了 6.6 倍。圆二色谱数据进一步证明突变酶的具有更高的耐热性。动力学分析结果表明，突变酶对底物的亲和力提高了，同时催化效率仅略低于原始酶。最后，通过蛋白三级结构模拟发现，K94R 和 G221A 分别通过形成氢键和增强局部疏水作用提高了酶的热稳定性。

REFERENCES

- [1] Flydal MI, Martinez A. Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation. *IUBMB Life*, 2013, 65(4): 341–349.
- [2] Williams RA, Mamotte CDS, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin Biochem Rev*, 2008, 29(1): 31–41.
- [3] Przyrembel H, Bremer HJ. Nutrition, physical growth, and bone density in treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr*, 2000, 159(2 Supl): S129–S135.
- [4] Chanoine JP. Selenium and thyroid function in infants, children and adolescents. *Biofactors*, 2003, 19(3/4): 137–143.
- [5] Beblo S, Reinhardt H, Demmelmair H, et al. Effect of fish oil supplementation on fatty acid status, coordination, and fine motor skills in children with phenylketonuria. *J Pediatr*, 2007, 150(5): 479–484.
- [6] Colomé C, Artuch R, Vilaseca MA, et al. Ubiquinone-10 content in lymphocytes of phenylketonuric patients. *Clin Biochem*, 2002, 35(1): 81–84.
- [7] Nakata H, Yamauchi T, Fujisawa H. Phenylalanine hydroxylase from *Chromobacterium violaceum* purification and characterization. *J Biol Chem*, 1979, 254(6): 1829–1833.
- [8] Onishi A, Liotta LJ, Benkovic SJ. Cloning and expression of *Chromobacterium violaceum* phenylalanine hydroxylase in *Escherichia coli* and comparison of amino acid sequence with mammalian aromatic amino acid hydroxylases. *J Biol Chem*, 1991, 266(28): 18454–18459.
- [9] Cao SH, Zhou L, Cui WJ, et al. Heterologous expression and characterization of phenylalanine hydroxylase from *Chromobacterium violaceum*. *Biotechnol Bull*, 2014, (8): 152–158 (in Chinese). 曹淑慧, 周丽, 崔文璟, 等. 紫色色杆菌苯丙氨酸羟化酶的异源表达及重组酶学性质研究. *生物技术通报*, 2014, (8): 152–158.

- [10] Yew NS, Dufour E, Przybylska M, et al. Erythrocytes encapsulated with phenylalanine hydroxylase exhibit improved pharmacokinetics and lowered plasma phenylalanine levels in normal mice. *Mol Genet Metab*, 2013, 109(4): 339–344.
- [11] Turner NJ. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(8): 56–573.
- [12] Reetz MT, Carballeira JD, Vogel A. Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006, 45(46): 7745–7751.
- [13] Polizzi KM, Bommarius AS, Broering JM, et al. Stability of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol*, 2007, 11(2): 220–225.
- [14] Martin A, Kather I, Schmid FX. Origins of the high stability of an *in vitro*-selected cold-shock protein. *J Mol Biol*, 2002, 318(5): 1341–1349.
- [15] Bagautdinov B, Yutani K. Structure of indole-3-glycerol phosphate synthase from *Thermus thermophilus* HB8: implication for thermal stability. *Acta Crystallogr D*, 2011, 67(12): 1054–1064.
- [16] Chakravarty S, Varadarajan R. Elucidation of factors responsible for enhanced thermal stability of proteins: a structural genomics based study. *Biochemistry*, 2002, 41(25): 8152–8161.
- [17] Delboni LF, Mande SC, Rentier-Delrue F, et al. Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*: an analysis of potential thermostability factors in 6 isomerases with known 3-dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Sci*, 1995, 4(12): 2594–2604.
- [18] Vogt G, Woell S, Argos P. Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J Mol Biol*, 1997, 269(4): 631–643.
- [19] Ma YF, Eglinton JK, Evans DE, et al. Removal of the four C-terminal glycine-rich repeats enhances the thermostability and substrate binding affinity of barley β -amylase. *Biochemistry*, 2000, 39(44): 13350–13355.
- [20] Mahanta P, Bhardwaj A, Kumar K, et al. Structural insights into N-terminal to C-terminal interactions and implications for thermostability of a $(\beta/\alpha)_8$ -triosephosphate isomerase barrel enzyme. *FEBS J*, 2015, 282(18): 3543–3555.
- [21] Argos P, Rossman MG, Grau UM, et al. Thermal stability and protein structure. *Biochemistry*, 1979, 18(25): 5698–5703.
- [22] Zhang XJ, Baase WA, Matthews BW. Multiple alanine replacements within α -helix 126–134 of T4 lysozyme have independent, additive effects on both structure and stability. *Protein Sci*, 1992, 1(6): 761–776.
- [23] Mrabet NT, Van den Broeck A, Van den Brande I, et al. Arginine residues as stabilizing elements in proteins. *Biochemistry*, 1992, 31(8): 2239–2253.
- [24] Rahman RNZA, Fujiwara S, Nakamura H, et al. Ion pairs involved in maintaining a thermostable structure of glutamate dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon. *Biochem Bioph Res Co*, 1998, 248(3): 920–926.
- [25] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [26] Martin A, Sieber V, Schmid FX. *In-vitro* selection of highly stabilized protein variants with optimized surface. *J Mol Biol*, 2001, 309(3): 717–726.

(本文责编 郝丽芳)