

# 偶氮还原酶AZR的结构及其K<sup>109</sup>的定点突变研究

柳广飞\* 周集体 周 觅 李敬美

(大连理工大学环境与生命学院 大连 116023)

**摘要:** 利用同源建模构建了 *Rhodobacter sphaeroides* 的偶氮还原酶AZR的三级结构模型, AZR为一种 $\alpha/\beta$ 型结构的黄素氧化还原蛋白。两类依赖黄素的偶氮还原酶的三级结构对比表明它们具有高度的相似性。在序列和结构对齐分析的基础上, 选择保守位点K<sup>109</sup>进行K109A和K109H的定点突变研究。突变后K109H的最适pH=6, 而K109A的最适pH=9。突变未改变AZR的最适温度(30℃)。第109位正电荷残基对甲基红的结合有重要影响; 而K109H对NADPH的结合并非保守突变。K<sup>109</sup>可能只参与对NADPH的2'-磷酸基团的结合, 而对NADH的结合无影响。

**关键词:** 偶氮还原酶, 同源建模, 定点突变

## Structure Modeling of Azoreductase AZR and Site-directed Mutagenesis of Its K<sup>109</sup> Residue

LIU Guang-Fei\* ZHOU Ji-Ti ZHOU Mi LI Jing-Mei

(Institute of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116023)

**Abstract:** Three-dimensional structure model of azoreductase AZR of *Rhodobacter sphaeroides* was constructed using homology modeling method. It is a flavodoxin adopting  $\alpha/\beta$  structure. Structure alignment of two different types of flavin-dependent azoreductases revealed that they possessed high similarity. Based on sequence and structure analysis, site-directed mutagenesis of K109H and K109A were performed. The optimal pH values are pH 6 and pH 9 for K109H and K109A mutant protein, respectively. The optimal temperature (30 °C) is not affected by mutagenesis. Positively charged residues at position 109 is necessary for the binding of methyl red, while K109H is not a conserved mutagenesis for the binding of NADPH. K<sup>109</sup> may only be involved in the binding of the 2'-phosphate group of NADPH and have no effect on the binding of NADH.

**Keywords:** Azoreductase, Homology modeling, Site-directed mutagenesis

偶氮染料是分子中具有一个或多个偶氮基的芳香类化合物, 由于其易于合成且性质稳定, 被广泛应用于印染、纺织、食品和制药等行业中<sup>[1]</sup>。上述行业产生的染料废水的处理一直备受关注。相对于传统的物理、化学方法, 微生物对染料废水的处理

由于其成本低廉、环境友好而成为人们研究的热点。细菌细胞内或细胞膜上的偶氮还原酶将电子传递给偶氮染料实现其脱色降解, 发挥着重要的作用。近年来, 人们从废水、土壤、皮肤等不同来源的微生物中得到了多种偶氮还原酶。这其中除了源自

*Pigmentiphaga kullae*和*Xenophilus azovorans*的偶氮还原酶外,大都在分子中含有FMN辅基<sup>[2]</sup>。根据序列对齐分析,可将已发现的依赖黄素的偶氮还原酶分为两个家族<sup>[3,4]</sup>,分别以*Escherichia coli*和*Bacillus* sp. OY1-2的偶氮还原酶为代表。

许多报道都表明,依赖黄素的偶氮还原酶对偶氮染料的还原脱色遵循双底物乒乓动力学机理<sup>[5,6]</sup>。电子供体NAD(P)H先占据结合位点,将电子传递给偶氮还原酶,当氧化态的电子供体离开以后,电子受体(偶氮染料)才能进入活性位点并接受电子而被还原。对偶氮还原酶结构的研究为在分子水平上更好地阐释这一过程提供了帮助。有关研究表明,对于依赖黄素的偶氮还原酶,其FMN辅基的异咯嗪环附近的残基可能参与对底物的结合<sup>[4,7]</sup>。

本实验室前期工作中克隆得到了*Rhodobacter sphaeroides*的偶氮还原酶AZR的基因并在大肠杆菌中实现异源表达<sup>[6]</sup>。纯化后的AZR的亚基分子量为18.7 kD<sup>[6]</sup>,与*Bacillus* sp. OY1-2的偶氮还原酶具有97%的序列一致性<sup>[8]</sup>,属于同一偶氮还原酶家族。本文利用同源建模方法构建该偶氮还原酶的三级结构模型,探讨依赖黄素的偶氮还原酶的结构与分类,并利用定点突变方法对保守位点K<sup>109</sup>的功能进行研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

*E. coli* JM109感受态细胞购自大连 TaKaRa 公司。质粒 pGEX 4T-1 (Amersham Pharmacia)作为克隆偶氮还原酶基因的表达载体。

### 1.2 工具酶及主要试剂

限制性内切酶、连接酶及 DNA 回收试剂盒等购自 TaKaRa 公司;蛋白分子量标准为 Pharmacia 公司产品;NAD(P)H、BSA、IPTG 等购自 Sigma 公司;Glutathione Sepharose 4B 购自 Amersham;偶氮染料甲基红、酸性红 14 由大连理工大学染料合成实验室提供。

### 1.3 同源建模

利用 Swiss PdbViewer 软件,选择 Project Mode,以基于 SWISS-MODEL 服务器的同源建模方法构建偶氮还原酶 AZR 的三级结构模型。利用 PyMol 软件完成对模型的相关分析。

### 1.4 定点突变

以此前构建的质粒 pGEX-AZR<sup>[6]</sup>为模板,利用大引物法经过 3 次 PCR,实现 K109A 和 K109H 突变。突变所用引物如下(下划线标记引入突变位置),pGEX5': 5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'; pGEX3': 5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'; K109H F: 5'-TGGTGGCGGTCACGGTGAATAAA TG-3'; K109H R: 5'-TTCCACCGTGACCGCCACCA GCAAC-3'; K109A F: 5'-TGGTGGCGGTGCAGG TGAATAAATG-3'; K109A R: 5'-TTCCACCTGCA CCGCCACCAGCAAC-3'。

产物回收后送 TaKaRa 公司测序验证,而后经 *EcoR* /*Xho* 双酶切引入表达载体中,转化至 *E. coli* JM109 中进行表达。

### 1.5 偶氮还原酶的表达和纯化

将表达野生型与突变型 AZR 的 *E. coli* JM109 菌株于 37 在 LB 培养基(氨苄青霉素 1 mmol/L)中培养至  $OD_{660}=0.7$ ,加入 1 mmol/L IPTG 诱导 6 h 后离心收集菌体,超声破碎细胞并利用 Glutathione Sepharose 4B 进行纯化<sup>[6]</sup>。非融合蛋白由凝血酶水解得到<sup>[8]</sup>。蛋白浓度由 Bradford 法分析,以 BSA 为标准蛋白<sup>[9]</sup>。取纯化后的非融合蛋白进行 SDS-PAGE (10%)。

### 1.6 酶活检测

标准反应体系(2 mL)为 20 mmol/L, pH 7 的磷酸缓冲溶液,其中含 0.3 mmol/L 的 NAD(P)H, 0.1 mmol/L 的甲基红,一定量的 AZR,反应在 30 进行。以加入 NAD(P)H 引发反应。酶活力单位(U)定义为在反应条件下每分钟还原 1  $\mu$ mol 甲基红所需的酶量。

以 Jasco V-560 分光光度计 Time-Course 监测甲基红在最大吸收波长下(430 nm)吸光度随时间的变化,测量酶反应速率。以酸性红 14 为底物,在 30 分别于 20 mmol/L 的醋酸缓冲溶液(pH 4~6)、磷酸缓冲溶液(pH 5~7)和 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7~10)考察 pH 对酶活的影响;在 20 ~70 于 20 mmol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲溶液中考察温度对酶活的影响。由 Lineweaver-Burk 双倒数图求解  $K_m$ 、 $V_{max}$  等动力学参数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 AZR 的结构模型与依赖黄素偶氮还原酶的本质

利用 Swiss PdbViewer 软件和 SWISS-MODEL

服务器开展模型构建工作。通过搜索,在蛋白质数据库(PDB)中发现一个与 AZR 具有 51% 的序列一致性的已知结构的蛋白质,编号为 1NNI,为源自 *Bacillus subtilis* 的蛋白 YhdA。采用 1NNI 作为模板序列,得到 AZR 的三级结构模型。Ramachandran 图分析表明模型中所有氨基酸残基均分布在允许的范围,模型中蛋白质主链残基的二面角构象合理;Procheck 和 WhatCheck 评价表明模型的结构和均方根 Z 值大多在允许范围内,模型较为合理。

如图 1, AZR 为  $\alpha/\beta$  型结构的黄素氧化还原蛋白,分子中含有 5 个  $\alpha$  螺旋,5 个  $\beta$  折叠,螺旋与折叠交替出现。5 个  $\beta$  折叠相互平行,形成一个平面,位于分子的中间; $\alpha$  螺旋分列于平面的两侧,一侧 2 个,另一侧 3 个;在  $\beta$  折叠的 C 端非共价结合 1 个黄素单核苷酸(FMN)分子。

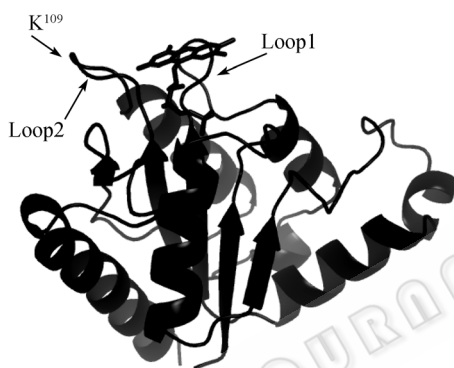


图 1 AZR 的三级结构模型  
Fig. 1 3D model of azoreductase AZR

与另一类依赖黄素偶氮还原酶家族的代表——*E. coli* AzoR 的三级结构<sup>[7]</sup>对比表明,尽管两类偶氮还原酶在氨基酸序列上无同源性可言,但它们的三级结构非常相似,FMN 在分子中的结合位置和方式也很相似(图 2);两类序列上无同源性却具有相同功能的偶氮还原酶在本质上是同样呈  $\alpha/\beta$  型结构的黄素氧化还原蛋白。

## 2.2 AZR 活性区域的分析

如图 3,对 AZR 所属的偶氮还原酶家族的成员进行的序列对齐分析显示,Pro<sup>72</sup>-Gly<sup>111</sup> 之间的氨基酸残基具有较高的相似性。其中包括 1 个新的黄素氧化还原蛋白家族的特征序列(P-X-Y-H/N-6X-L-K-N-S/A-L/I-D)<sup>[8]</sup>和 1 个甘氨酸富集区(G-G-G-K/H-G-G)。



图 2 AZR(黑色)与 AzoR(灰色)的结构对比  
Fig. 2 Comparison of structures of AZR (black) and AzoR (gray)

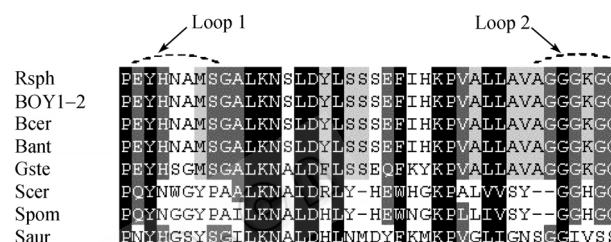


图 3 AZR 与其它依赖黄素的偶氮还原酶氨基酸序列的对齐分析  
Fig. 3 Multiple sequence alignment of amino acid sequences of AZR and other flavin-dependent azoreductases

对应 AZR 的三级结构分析发现,这两处保守区域分别对应着 FMN 附近的两个环状结构(图 1)。有报道认为 Loop 1 可能参与对 FMN 的结合;而位于嘧啶环附近的 Loop 2 可能含有参与 NAD(P)H 结合的位点<sup>[3,10]</sup>。特别地,在另一类依赖黄素的偶氮还原酶中也发现了类似的环状结构<sup>[4,7]</sup>。K109 为甘氨酸富集区(Loop 2)中连续 6 个氨基酸里唯一一个非甘氨酸氨基酸,且带正电荷,推测可能与底物结合及酶的活性有密切关系,故选择作为突变对象。

## 2.3 野生型与突变型 AZR 活性的考察

如图 4,经纯化后获得野生型与突变型 AZR 的纯酶,用于后续性质考察。如图 5,野生型 AZR 的活性最高,突变后酶活下降。野生型 AZR 的最适 pH 为 8 左右,在 pH=7~8 具有较高活性;突变后 K109H 的最适 pH=6,而 K109A 的最适 pH=9。二者在各自最适 pH 值下的酶活较野生型 AZR 最适 pH 下的酶活分别下降了 30% 和 90% 左右。K<sup>109</sup> 位于 AZR 活性中心附近的分子表面,突变的引入可能改变了酶表面的电荷情况,从而改变了其最适 pH。由图 6 可见,几种

突变操作未改变该还原酶的最适温度, 30 时酶的活性最高。

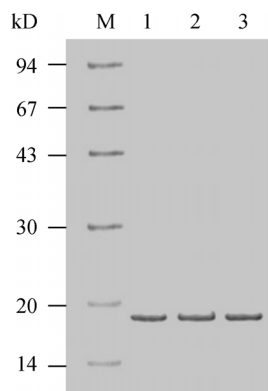


图 4 野生型与突变型 AZR(18.7 kD)的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 4 SDS-PAGE of wild-type and mutant AZR (18.7 kD)  
M: Protein molecular weight marker; 1: Wild-type AZR; 2: K109A; 3: K109H

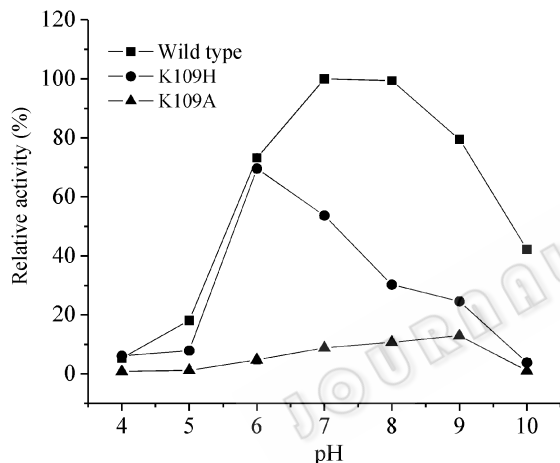


图 5 pH 值对酶活的影响  
Fig. 5 Effects of pH on enzymatic activity

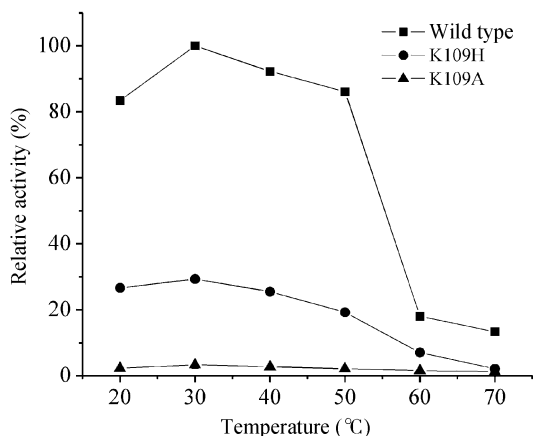


图 6 温度对酶活的影响  
Fig. 6 Effects of temperature on enzymatic activity

以甲基红和NADPH为底物, 考察野生型与突变型AZR的偶氮还原酶活性。突变型AZR的双倒数图呈一组平行线, 表明还原过程仍符合乒乓动力学。如表 1 可见, K109H突变后,  $V_{max}$  下降为野生型的 1/5 左右, 而当K109A突变后, 其活性几乎完全丧失。分析两种底物的 $K_m$ 可知, 第 109 位氨基酸残基荷正电对甲基红的结合影响很大, 而对NADPH的结合, K109H并非保守替换, 空间结构在结合过程中也发挥影响, 尽管都荷正电, 杂环的His不能替代直链的Lys。

表 1 以 NADPH 为辅酶的偶氮还原酶动力学常数  
Table 1 Kinetic parameters of azoreductase investigated using NADPH

Enzyme	$V_{max}$ (U/mg)	$K_m$ (methyl red) (mmol/L)	$K_m$ (NADPH) (mmol/L)
Wild-type	68.38	0.27	0.09
K109H	14.55	0.27	0.68
K109A	1.13	0.66	0.31

以甲基红和NADH为底物, 考察野生型与突变型AZR的偶氮还原酶活性。突变型AZR的双倒数图呈一组平行线, 表明还原过程仍符合乒乓动力学。如表 2 可见, K109H突变后,  $V_{max}$  几乎未有变化, 而当K109A突变后, 其 $V_{max}$  几乎下降为野生型的 1/7。分析两种底物的 $K_m$ 可知, 与前述利用NADPH为辅酶的情况类似, 甲基红的结合依赖于该处存在荷正电的氨基酸, K109H突变对其结合没有影响, 而K109A突变则使其 $K_m$ 增大了 2.5 倍; 而与利用NADPH为辅酶的情况不同, K<sup>109</sup>突变对NADH的结合几乎没有影响, 因此, K109 可能参与对NADPH的 2'-磷酸基团的结合。

表 2 以 NADH 为辅酶的偶氮还原酶动力学常数  
Table 2 Kinetic parameters of azoreductase investigated using NADH

Enzyme	$V_{max}$ (U/mg)	$K_m$ (methyl red) (mmol/L)	$K_m$ (NADH) (mmol/L)
Wild-type	0.91	0.06	0.38
K109H	0.87	0.05	0.34
K109A	0.13	0.15	0.36

### 3 结论

利用同源建模法, 构建了 *R. sphaeroides* 的偶氮还原酶 AZR 的三级结构模型, AZR 为一 $\alpha/\beta$ 型的黄

素氧化还原蛋白, 蛋白分子呈三明治结构。

尽管两类依赖黄素的偶氮还原酶在序列上无相似性可言, 但它们的三级结构非常接近, 都是 $\alpha/\beta$ 型的黄素氧化还原蛋白, FMN 辅基的结合位置与方式也很相似。蛋白质的三级结构比其氨基酸序列的保守性更高。这一认识为发现新的偶氮还原酶及其编码基因和深入研究 AZR 的功能奠定了基础。

第 109 位氨基酸荷正电对甲基红的结合有重要影响; 而 K109H 对 NADPH 的结合并非保守突变, 其结合不仅需要该处荷正电, 还与空间结构有关。K<sup>109</sup> 可能只参与 NADPH 的磷酸基团的结合, 而对 NADH 的结合无影响。

## 参 考 文 献

- [1] Raffi F, Hall JD, Cerniglia CE. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. *Food Chem Toxicol*, 1997, **35**(9): 897-901.
- [2] Chen H. Recent advances in azo dye degrading enzyme research. *Curr Protein Pept Sci*, 2006, **7**(2): 101-111.
- [3] Chen H, Hopper SL, Cerniglia CE. Biochemical and molecular characterization of an azoreductase from *Staphylococcus aureus*, a tetrameric NADPH-dependent flavo-protein. *Microbiology*, 2005, **151**(5): 1433-1441.
- [4] Liu ZJ, Chen H, Shaw N, *et al.* Crystal structure of an aerobic FMN-dependent azoreductase (AzoA) from *Enterococcus faecalis*. *Arch Biochem Biophys*, 2007, **463**(1): 68-77.
- [5] Nakanishi M, Yatome C, Ishida N, *et al.* Putative ACP phosphodiesterase gene (*acpD*) encodes an azoreductase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(49): 46394-46399.
- [6] Yan B, Zhou J, Wang J, *et al.* Expression and characteristics of the gene encoding azoreductase from *Rhodobacter sphaeroides* AS1.1737. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **236**(1): 129-136.
- [7] Ito K, Nakanishi M, Lee WC, *et al.* Three-dimensional structure of AzoR from *Escherichia coli*: An oxidoreductase conserved in microorganisms. *J Biol Chem*, 2006, **281**(29): 20567-20576.
- [8] Liu G, Zhou J, Lv H, *et al.* Azoreductase from *Rhodobacter sphaeroides* AS1.1737 is a flavodoxin that also functions as nitroreductase and flavin mononucleotide reductase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**(6): 1271-1279.
- [9] 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.
- [10] Liger D, Graille M, Zhou CZ, *et al.* Crystal structure and functional characterization of yeast YLR011wp, an enzyme with NAD(P)H-FMN and ferric iron reductase activities. *J Biol Chem*, 2004, **279**(33): 34890-34897.

稿件书写规范

## 论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前三个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*HI, *Eco*RI, *Msp*I, *Sau*3AI 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。