

α -淀粉酶 AmyP 中淀粉结合结构域的鉴定

汪颖 刘源涛 郑昫昫 彭惠*

(安徽大学 生命科学学院 安徽省微生物与生物催化工程技术中心 安徽 合肥 230039)

摘要: 【目的】检测具有生淀粉降解活性的新型 α -淀粉酶 AmyP 是否具有淀粉结合结构域 (SBD)。【方法】通过结构域预测和序列分析, 推测 AmyP 的 C 端是一个 SBD。将这段序列克隆、表达和重组蛋白纯化后, 采用亲和电泳和生淀粉吸附两种方法对重组表达的蛋白进行研究。【结果】AmyP 的 C 端序列是一个新型的 SBD, 根据序列特征可以将其划分在碳水化合物结合结构域(CBM) 20 家族。该 SBD 与生大米淀粉的吸附能力最强, 生玉米淀粉次之, 不能与生小麦淀粉、生马铃薯淀粉和生绿豆淀粉吸附。【结论】 α -淀粉酶 AmyP 在蛋白 C 端具有一个 SBD, 有助于理解 AmyP 快速偏好性降解生淀粉的能力。

关键词: 淀粉结合结构域 SBD, α -淀粉酶, 生淀粉, 碳水化合物结合结构域 CBM20 家族

Identification of starch-binding domain in α -amylase AmyP

WANG Ying LIU Yuan-Tao ZHENG Yun-Yun PENG Hui*

(School of Life Science, Anhui University, Engineering Technology Research Center of Microorganisms and Biocatalysis, Hefei, Anhui 230039, China)

Abstract: [Objective] To explore whether a starch-binding domain (SBD) locates in the newly identified α -amylase (AmyP) that can degrade raw starches. [Methods] Based on sequence alignment and protein domain prediction, a putative SBD was found in the C-terminal sequence of AmyP. The sequence was cloned, expressed and purified, and the recombinant protein was identified by affinity gel electrophoresis and adsorption on raw starch. [Results] The sequence was defined as an SBD that belongs to the carbohydrate-binding module family 20 (CBM20) based on

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(No. 11040606M65); 安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目(No. KJ2012A017)

*通讯作者: Tel: 86-510-5107224; 信箱: pph0259@126.com

收稿日期: 2013-01-04; 接受日期: 2013-02-20

sequenced similarity. SBD binds with higher affinity to raw rice starch compared to raw corn starch, and is unable to adsorb to raw wheat starch, raw potato starch or raw mungbean starch.

[Conclusion] The C-terminal region of AmyP was identified as a novel SBD, which may contribute to the specific raw starch-degrading ability of AmyP.

Keywords: Starch-binding domain (SBD), α -Amylase, Raw starch, Carbohydrate-binding module family 20 (CBM20)

具有生淀粉降解活性的 α -淀粉酶 (α -Amylases, E.C 3.2.1.1)能在低温条件下降解生淀粉,节省了淀粉高温糊化所需的能源,具有巨大的应用价值^[1]。这种 α -淀粉酶往往是多结构域的蛋白,除了催化结构域,还包含一个非催化功能的淀粉结合结构域(Starch-binding domain, SBD)。SBD 的主要功能是和生淀粉颗粒结合,使酶吸附在生淀粉颗粒的表面,帮助降解^[2]。对 SBD 的研究将有助于理解和改造生淀粉降解酶。

α -淀粉酶 AmyP 是我们从海洋宏基因组文库中筛选获得的一个新型的生淀粉降解酶,其氨基酸序列与已知的其它 α -淀粉酶相似性极低 (<20%),代表了一个新建立的糖苷水解酶亚家族 GH13_37^[3]。AmyP 蛋白它不仅广泛地降解多种生淀粉^[4],而且能以一种罕见的快速的偏好方式降解生大米淀粉^[5]。为深入理解 AmyP 降解生淀粉的机制,我们对 AmyP 蛋白 C 端的一段序列进行了研究。本文报道 AmyP 中一个新型 SBD 的发现与鉴定。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

大肠杆菌 BL21(DE3)中的重组表达载体 pET32a-AmyP 由本实验室构建^[3]。限制性内切酶、Pyrobest DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和牛血清白蛋白(BSA)等为宝生物公司产品。生淀粉购自河北赵州利民淀粉企业集团总公司和安徽燕之坊食品有限公司。

1.2 序列分析

采用 NCBI 的在线软件 PSI-BLASTP 和 CDD search 对蛋白序列进行相似性分析和结构域预测。碳水化合物结合结构域(Carbohydrate-binding module, CBM)家族的序列比对采用 ClustalX 2.0.8 软件。

1.3 SBD 的克隆、表达与纯化

根据 AmyP 蛋白的基因序列设计引物。扩增假定的 SBD 引物为 SBD-n (5'-CCCCATATGTTGATAGGTGAGGGTTTCA-3')和 SBD-c (5'-CCCCCTCGAGCGGAGACTTAGAGACCAT-3'),下划线为 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点。PCR 产物酶切后分别与用 *Nde* I/*Xho* I 酶切好的 pET28a 连接,产生质粒 pET28a-SBD。质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)后,37 °C 培养至 OD_{600} 为 0.6-0.8 时,加入 1 mmol/L IPTG,然后转入 16 °C 低温摇床,诱导表达 12 h。收集菌体,超声破壁后离心取上清,通过 Ni^{2+} 亲和层析(Invitrogen)一步纯化重组蛋白。

1.4 SBD 的亲电泳

亲和电泳是指蛋白在含有底物的活性聚丙烯酰胺梯度凝胶(PAGE)进行电泳。蛋白与底物的结合将导致蛋白条带的迁移率或弥散度发生变化,常用来鉴定蛋白与底物的结合情况^[4-5]。亲和电泳采用 10%的 PAGE,配制时加入终浓度为 1%的生大米淀粉悬浊液;堆积胶浓度为 3%。采用与生淀粉无吸附作用的 BSA 作为对样品。电泳后,蛋白胶用考马斯亮蓝 G-250 染色。

1.5 SBD 与生淀粉的吸附能力测定

使用 100 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.5)分别配置 5% (W/V)的生大米淀粉、生小麦淀粉、生玉米淀粉、生马铃薯淀粉、生绿豆淀粉。在振荡条件下吸取 450 μ L 生淀粉溶液, 加入 50 μ L SBD 蛋白(蛋白量 30 μ g), 在冰水混合的水浴锅中 220 r/min 孵育 1 h。然后 4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g 离心 10 min, 取 100 μ L 上清用 Bradford 法测定蛋白含量。空白对照组用等体积缓冲液替代 SBD 蛋白。采用牛血清白蛋白(BSA)作为绘制蛋白含量标准曲线的标准。吸附率(%)=(总蛋白-上清中残留的蛋白)/总蛋白 \times 100。

2 结果与讨论

2.1 序列分析

AmyP 有 639 个氨基酸(NCBI 序列号 ADK21254), CDD search 结果显示, 该蛋白的 C 端有一段 131 个氨基酸的“普鲁兰糖酶类似蛋白的催化结构域(Early set domain associated with the catalytic domain of pullulanase-like proteins)”。因为 AmyP 的 N 端已经证明具有一个催化结构域^[3], 所以认为 C 端的这段序列不可能是软件展示的结构域。另一方面, 由于 AmyP 与其它 α -淀

粉酶的序列相似性极低, PSI-BLAST 分析 AmyP C 端序列的结果仅显示该序列与一些假定的糖苷水解酶中的部分序列具有一定相似性, 没有获得有价值的功能预测信息。

考虑到 AmyP 是生淀粉降解酶^[6-7], 而绝大多数这类蛋白具有一个 SBD, 因此, 推测 AmyP 蛋白的这段 C 端序列是 SBD。目前已知的 SBD 分布在 10 个不同的 CBM 家族(CBM20、21、25、26、34、41、45、48、53 和 58)^[8]。将 AmyP 的 C 端序列与这些 CBM 家族的典型代表逐一进行序列分析(数据略), 发现符合 CBM20 家族的序列特征要求(图 1)。CBM20 家族中极为保守的 3 个色氨酸残基(W, 图 1 中黑色标出)在 AmyP 的 C 端序列中均保守。一个在淀粉结合过程中发挥重要功能的赖氨酸(K, 图 1 中灰色标出)在该序列中也保守。这表明 AmyP 的 C 端序列具有 2 个淀粉结合位点(SBS1 和 SBS2), 而这是 CBM20 家族的典型特征^[8-9]。此外, CBM20 家族中保守性较高的苯丙氨酸(F, 图 1 中深灰色标出)在该序列中也保守。由此可见, 尽管 AmyP 的 C 端序列与已知的 SBD 整体上均无同源性, 但是, 这段序列极有可能是一个新的 SBD, 而且隶属于 CBM20 家族。此外, 目前已知的隶属于 CBM20 家族的 SBD 均处于全酶

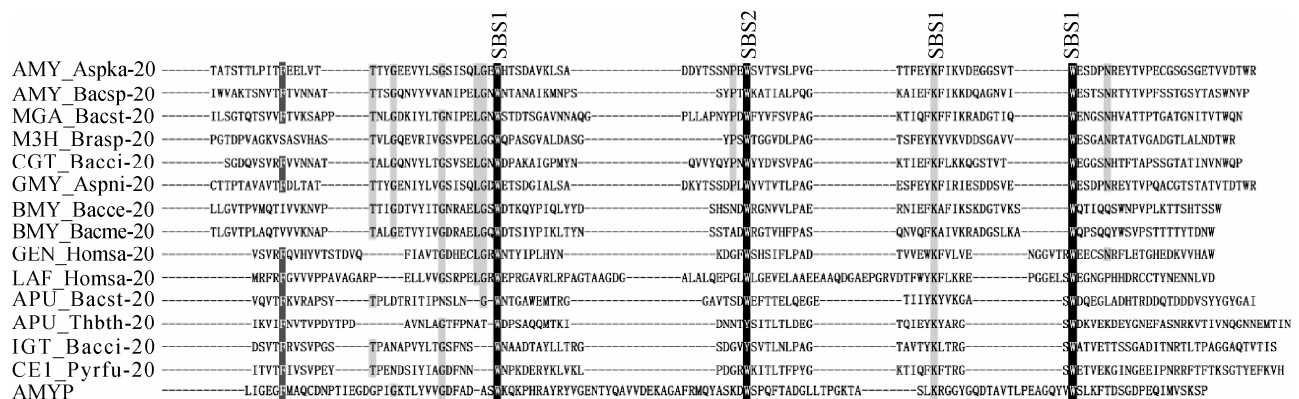


图 1 AmyP 的 C 端序列与 CBM20 家族代表的序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of the C-terminal sequence of AmyP and the SBD representatives from CBM20 family

Note: The SBD representative members were referred to published data^[9-10].

蛋白的 C 端^[9], 这个特点也与 AmyP C 端序列吻合。

2.2 假定 SBD 的克隆、表达与纯化

运用常规的分子克隆技术, 成功构建了假定 SBD 的重组表达质粒 pET28a-SBD。质粒转化大肠杆菌后, 低温 16 °C 诱导表达可以获得较好的可溶性表达。重组表达的 SBD 蛋白已经融合了载体上的 His-tag 标签, 直接采用 Ni²⁺亲和层析获得纯品(图 2)。假定 SBD 蛋白有 131 个氨基酸, 理论分子量为 15.8 kD, 从图 2 中可见重组表达的假定 SBD 的分子量与理论分子量吻合。

2.3 假定 SBD 蛋白与大米生淀粉的结合

SBD 是指具有结合生淀粉能力的结构域, 只要测定重组表达的假定 SBD 能否与生淀粉结合, 即能核实其身份。由于 AmyP 对大米生淀粉的降解具有强烈的偏好性^[7], 因此采用在活性电泳的条件下, 测定假定 SBD 与大米生淀粉的结合情况。如果该蛋白与胶内添加的大米生淀粉发生结合, 蛋白迁移将显著减慢。比对 BSA 的电泳情况, 由假定 SBD 在无添加的胶(图 3A)和添加生大米淀粉的胶(图 3B)的迁移结果可见, 该蛋白在添加了大米淀粉的胶中迁移率明显变缓。同时,

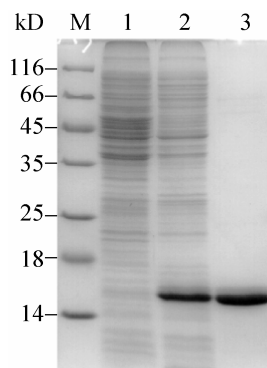


图 2 SDS-PAGE 分析假定 SBD 的表达

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant the putative SBD

Note: M: Marker proteins; 1: Cell extract of *E. coli* harboring pET28a; 2: The supernatant of cell extract of *E. coli* harboring pET28a-SBD; 3: The purified putative SBD.

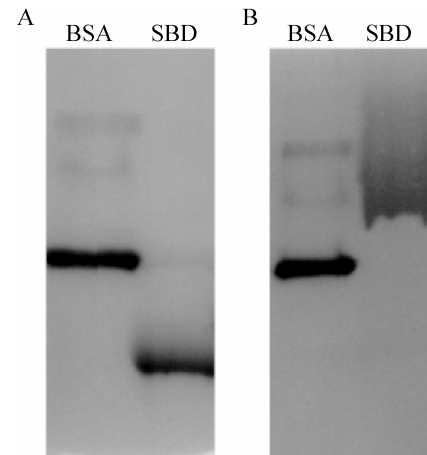


图 3 SBD 与生大米淀粉的亲和电泳定性分析

Fig. 3 Qualitative affinity gel electrophoresis analysis of the interaction of SBD with raw rice starch

Note: SBD and BSA were electrophoresed on non-denaturing polyacrylamide gels containing no starch (A) and 1% raw rice starch (B).

由于电泳过程中蛋白反复和淀粉颗粒发生吸附与解吸附作用, 蛋白条带呈现典型的弥散形式。这表明 AmyP 的 C 端序列确实是一个 SBD。

2.4 SBD 与各种生淀粉的结合能力比较

AmyP 是一个生淀粉降解酶, 可以不同程度地降解生大米淀粉、生小麦淀粉、生玉米淀粉、生马铃薯淀粉、生绿豆淀粉等多种生淀粉^[6-7]。SBD 能帮助生淀粉降解酶吸附在生淀粉颗粒的表面, 因此 SBD 与生淀粉的结合能力往往会极大影响酶的降解能力^[11-12]。为了了解 AmyP 的 SBD 对生淀粉降解过程的贡献, 分别测定了该 SBD 与这些生淀粉的吸附率(表 1)。该 SBD 对大米生淀粉的吸附率最高, 这与 AmyP 偏好性降解生大米淀粉的催化特征吻合。AmyP 对生玉米淀粉的降解能力是生大米淀粉的 33.5%, 但是 SBD 的吸附率却显著降低为 5.7%, 仅为生大米淀粉吸附率的 13% (5.7/44.4)。以生小麦淀粉、生马铃薯淀粉和生绿豆淀粉为底物时, 均检测不到 SBD 的吸附。该结果说明, 虽然该 SBD 的吸附能力对生淀粉的降解有贡献, 但是该 SBD 不是 AmyP 降解生淀粉的必要条件。因此, AmyP 中 SBD 的功能还有待于进一步探索。

表 1 不同生淀粉为底物时的 AmyP 酶活和 SBD 吸附率

Table 1 Relative activity of AmyP and binding of SBD to different raw starch substrates

生淀粉种类 Raw starch source	AmyP 的相对酶活 ^a Relative activity of AmyP ^a (%)	SBD 的吸附率 Binding of SBD (%)
Rice	100	44.4
Wheat	6.1	0
Corn	33.5	5.7
Potato	10.4	0
Mung	15.1	0

Note: ^a: Data were referred to published paper^[4-5].

3 结论

通过氨基酸序列分析,发现 α -淀粉酶 AmyP 的 C 端序列极可能是一个隶属于 CBM20 家族的 SBD。将这段序列重组表达纯化后,采用亲和电泳技术明确无误的鉴定为一个新型的 SBD。该 SBD 的吸附能力对 AmyP 降解生淀粉有一定贡献,但不是降解的必要条件。

参 考 文 献

- [1] Robertson GH, Wong DWS, Lee CC, et al. Native or raw starch digestion: a key step in energy efficient biorefining of grain[J]. Journal Agriculture Food Chemistry, 2006, 54(2): 353–365.
- [2] Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N, Sanchez S. Microbial starch-binding domain[J]. Current Opinion in Microbiology, 2005(8): 260–267.
- [3] Liu Y, Lei Y, Zhang XC, et al. Identification and phylogenetic characterization of a new subfamily of α -amylase enzymes from marine microorganisms[J]. Marine Biotechnology, 2012, 14(3): 253–260.

- [4] Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N, Escalante L, et al. A single residue mutation abolishes attachment of the CBM26 starch-binding domain from *Lactobacillus amylovorus* α -amylase[J]. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 2009, 36(3): 341–346.
- [5] Duan CJ, Liu JL, Wu X, et al. Novel carbohydrate-binding module identified in a ruminal metagenomic endoglucanase[J]. Applied and Environment Microbiology, 2010, 76(14): 4867–4870.
- [6] 彭惠, 雷寅, 刘源涛, 等. 海洋环境来源的淀粉酶 AmyP 对生玉米淀粉的降解特性[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(7): 79–83.
- [7] Lei Y, Peng H, Wang Y, et al. Preferential and rapid degradation of raw rice starch by an α -amylase of glycoside hydrolase subfamily GH13_37[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2012, 94(6): 1577–1584.
- [8] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(1): D233–238.
- [9] Christiansen C, Abou Hachem M, Janecek S, et al. The carbohydrate-binding module family 20—diversity, structure and function[J]. FEBS Journal, 2009, 276(18): 5006–5029.
- [10] Janeček Š, Svensson B, MacGregor EA. Structural and evolutionary aspects of two families of non-catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 49(5): 429–440.
- [11] Juge N, Le Gal-Coeffet MF, Furniss CSM, et al. The starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*: overview of its structure, function, and role in raw-starch hydrolysis[J]. Biologia (Bratislava), 2002, 57(11): 239–246.
- [12] Southall SM, Simpson PJ, Gilbert HJ, et al. The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch[J]. FEBS Letters, 1999, 447(1): 58–60.