

Myxococcus sp. V11 海藻糖合酶 TreS II 分子改造*

赵晓艳¹ 陈允妲¹ 章雅倩¹ 吴晓玉^{1,2} 王飞^{1,2} ** 陈金印²

(1 江西农业大学生物科学与工程学院 南昌 330045 2 江西省果蔬保鲜与质量安全创新中心 南昌 330045)

摘要 来源于黏细菌 *Myxococcus* sp. V11 的海藻糖合酶(trehalose synthase, EC 2.4.1.245) TreS II 可通过转糖苷作用将麦芽糖转化成为海藻糖,在酶法生产海藻糖上显示出一定的应用潜力,但 TreS II 对热敏感,在 60℃ 保温 3h,酶活性丧失,限制了其应用范围。目的:拟探索 TreS II 影响热稳定性的氨基酸残基构成,通过对可能的氨基酸位点进行定点突变,以期获得耐热性的突变子,扩大 TreS II 应用范围。方法:通过 PCR 介导的方法对 TreS II 可能影响到热稳定性的氨基酸 Q3、A283、W374、R449 和 Y537 进行定点突变,以野生型重组酶为对照,比较突变型与野生型的最适反应温度和最适反应 pH,通过测定不同温度下保存不同时间后的残留酶活,检测突变子的耐热效果。结果:研究表明突变子 Q3D、A283R、W374D、R449Q 和 Y537H 的比酶活与野生型无显著差异,且最适 pH 和最适反应温度也未发生改变;A283R、Y537H 在 60℃ 条件下,3h 后活性剩余 68%;Q3D、W374D、R449Q 在温度 60℃ 时,3h 后活性剩余 35%。结论:TreS II 分子结构中金属离子结合的氨基酸残基的改变对蛋白质分子的耐热性具有显著影响。

关键词 *Myxococcus* sp. V11 海藻糖合酶 定点突变 热稳定性

中图分类号 Q814

海藻糖是由两个葡萄糖分子以 1,1-糖苷键连接的一种非还原性双糖,广泛分布于分枝杆菌、链霉菌、肠道细菌、酵母、真菌、昆虫、黏菌、线虫和植物,在生物体中可能有多种功能^[1]。天然存在的海藻糖有三种构型(α , α -1,1- α , β -1,1-和 β , β -1,1-),目前已知的具有生物活性形式的海藻糖只有 α , α -1,1-葡萄糖-葡萄糖^[2]。在生物体内,海藻糖可以作为能源和碳源的储备^[3];也是分枝杆菌与棒状杆菌细胞壁糖脂的主要成分^[4],作为细胞壁的组成部分,它增加了不透水性,有助于保护细胞免受抗生素和有毒物质的侵害^[5];而在酵母和植物细胞内,海藻糖可能作为一种信号分子来调节与能量代谢有关的代谢通路^[6-7]。最令研究者关注的是海藻糖所具有的对生物大分子良好的保护性

能,当细胞处于饥饿、干燥、高渗透压、脱水等胁迫环境时,海藻糖能有效地保护蛋白质不变性,减少细胞膜的损伤和失活,从而提高这些生物的抗逆性^[8-10]。由于这一特点,海藻糖可以作为食品、化妆品、医药等工业的添加剂,具有诱人的应用前景^[11]。目前发现海藻糖在生物体内的合成途径有 5 条,其中海藻糖合酶(trehalose synthase, EC 2.4.1.245)途径仅通过一步的反应,就能够将麦芽糖转化为海藻糖^[12]。生产流程相对简单,转化率高,生产原料的成本比较低廉,稳定性能好,适合大规模的工业生产,受到广泛关注^[13]。

黏细菌是一类具有独特的子实体发育过程的革兰氏阴性菌,在营养物质被耗尽后,杆状细胞聚集形成子实体,在子实体内,细胞发育成代谢休眠的球形黏液孢子^[14]。研究表明,在子实体形成阶段,黏细菌通过细胞内海藻糖合成酶的作用,积累大量的海藻糖,以提高抗逆性^[15]。然而,来源于黏细菌的海藻糖合成酶鲜见报道。

收稿日期:2019-07-27 修回日期:2019-09-25

* 国家自然科学基金地区科学项目(31560031)、江西省自然科学基金(20161BAB204178)、江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ160387)资助项目

**通讯作者,电子邮箱:wangfei179@163.com

前期工作中,项目组从黏细菌 *Myxococcus* sp. V11 基因组中克隆到一个海藻糖合酶基因 TreS II, 进行异源表达和纯化, 对重组酶学特性进行了研究(数据未报道)。结果表明, TreS II 可逆转化麦芽糖为海藻糖的效率为 75%, 最适反应条件下, 单位酶活力单位为 28.43 U/mg。转化率和酶活均高于已报道的海藻糖合酶, 显示出良好的应用前景, 但该酶对热不稳定, 在温度为 60℃, 保温 3h 后, 酶活基本丧失。在基于蛋白质结构生物学的基础上, 本文对 TreS II 可能的与热稳定性有关的氨基酸残基进行定点突变, 并通过异源表达后对突变体的热稳定性进行了测定, 以期扩大其应用范围。

1 材料与方法

1.1 菌株

重组酶 TreS II 表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3)-pET29a-treS II 前期构建(重组酶 TreS II C 端含 6 × His tag), 保藏于江西农业大学江西省农业微生物资源开发与利用工程重点实验室; 克隆菌株 *E. coli* DH5 α , 表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3), 本实验室保藏。

1.2 所用引物

所用引物由上海祥音生物技术有限公司 (Xiangyin Biotechnology Co., Ltd.) 合成, 引物序列见表 1。

表 1 TreS II 定点突变 PCR 扩增所用引物

Table 1 Oligonucleotides used for site-directed mutagenesis

TreS II gene allele	Mutagenic primer sets
Q3D-F	ACGGATTGAATGATTGATGACCTCT
Q3D-R	CTAAATCATTCAATCCGTGGCGGG
A283R-F	CTGGTGACGGAGGACCGTACGCCGCTCG
A283R-R	ACGGTCCTCCGTCACCAGCGACAGGAAG
W374D-F	GGGACGCCGTGCTCTATTACGGCGACG
W374D-R	ATAGAGCACCGCGTCCCGGCAGCGAC
R449Q-F	ATGGAGCGCATGGTGCAGATGGCAAGGA
R449Q-R	CTGCACCATGCGCTCCATCCAGTTGAGC
Y537H-F	TACGGTTACCGGTGGCACCGGATGGAGC
Y537H-R	GTGCCACCGGTAACCGTACCCCTCCAGC

Note: The underlined nucleotides encode the mutated amino acids

1.3 培养基与试剂

LB 培养基 (g/L): 酵母粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, pH 7.0 ~ 7.2。

定点突变试剂盒 Fast Mutagenesis System 购于北京金式金生物科技有限公司 (TransGen Biotech), 其余各化学试剂均为分析纯。凝胶回收试剂盒与质粒提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司 (BioTeke Corporation), 核酸测序委托上海祥音生物技术有限公司 (Xiangyin Biotechnology Co., Ltd.) 完成。

1.4 突变位点的选择

将 TreS II 氨基酸序列在蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB) 上进行比对, 下载相似度较高的参考蛋白质氨基酸序列, 以 Bioedit 7.0 软件进行比较, 分析活性中心位点和可能的与热稳定有关的位点。

1.5 PCR 介导的 treS II 基因的定点突变

以表达载体质粒 pET-29a(+) -treS II 为模板, 设计定点突变引物(表 1), 使用北京金式金生物科技有限公司的定点突变试剂盒 2 × TransStart® FastPfu Fly PCR SuperMix 进行 PCR 扩增。对推测的 TreS II 可能与热稳定性有关的 5 个氨基酸 Q3、A283、W374、R449、Y537 位点进行定点突变。

PCR 扩增体系为: pET-29a(+) -treS II 1 μ l, 正向引物 (10 μ mol/L) 1 μ l, 反向引物 (10 μ mol/L) 1 μ l, 2 × TransStart FastPfu PCR SuperMix 12.5 μ l, Nuclease-free Water 9.5 μ l。PCR 程序为 94℃ 2min, 94℃ 20s, 55℃ 20s, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 10min。PCR 产物经 DMT 酶(改良型的 *Dpn* I 限制性核酸内切酶)消化非突变型质粒模板后, 转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞^[16-17]。阳性克隆经电泳检测, 大小无误后, 送样品至祥音生物技术有限公司测序, 测序正确的质粒转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 构建突变表达菌株。

1.6 突变表达菌株诱导表达及突变重组酶的活性测定

将经 0.2 mmol/L IPTG 诱导培养后的突变表达菌株培养液以 6 000 r/min 离心 10min, 超声破碎后, 12 000 r/min 离心 10min, SDS-PAGE 后以考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色液脱色后观察结果^[18]。

1.7 酶活测定方法

将破碎、离心后的适量粗酶液加入至终浓度为 0.03% (m/m) 麦芽糖的 50 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 6.0) 中, 以灭活酶液为对照, 于 40℃ 条件下反应 6h 后, 加入 1 mol/L DNS 试剂 1 ml, 沸水浴 5min, 以蒸馏水稀释 2 倍测定 OD₅₄₀, 计算酶活^[19-20]。

酶活定义为 40℃、pH 为 6.0 反应条件下, 以 0.03% 麦芽糖为底物, 每分钟催化消耗 1 mmol 麦芽糖所

需的蛋白质量(mg)为一个活力单位(U)^[21]。

海藻糖合酶活性 = [葡萄糖差值毫克数(对照-酶反应) × 10⁶] / (360.32 × 360)

1.8 野生型和突变型重组酶的酶学特性比较

1.8.1 野生型和突变型重组酶的最适反应温度比较

将野生型和突变型 TreS II 破碎、离心后取适量粗酶液加入至终浓度为 0.03% (m/m) 麦芽糖的 50mmol/L PBS 缓冲液(pH 6.0)中,分别在 35℃、40℃、45℃、50℃ 温度下反应 6h 后,加入 1mol/L DNS 试剂 1ml,沸水浴 5min,以蒸馏水稀释 2 倍测定 OD₅₄₀,以野生型 TreS II 最适反应温度下的酶活力为 100% 进行比较。

1.8.2 野生型和突变型重组酶的比酶活的比较 将野生型和突变型 TreS II 破碎、离心后取适量粗酶液加入至终浓度为 0.03% (m/m) 麦芽糖的 50mmol/L PBS 缓冲液(pH 6.0)中,在 40℃ 温度下反应 6h 后,加入 1mol/L DNS 试剂 1ml,沸水浴 5min,以蒸馏水稀释 2 倍,测定 OD₅₄₀,分别计算野生型和突变型 TreS II 的比酶活。

1.8.3 野生型和突变型重组酶的最适反应 pH 比较 将野生型和突变型 TreS II 破碎、离心后取适量粗酶液加入至终浓度为 0.03% (m/m) 麦芽糖的反应体系,分别在 pH 为 5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0 的 PBS 缓冲液中,于 40℃ 条件下反应 6h 后,加入 1mol/L DNS 试剂 1ml,沸水浴 5min,以蒸馏水稀释 2 倍,测定 OD₅₄₀,以野生型 TreS II 最适反应 pH 下的酶活力为 100% 进行比较。

1.8.4 野生型和突变型重组酶的热稳定性比较 将野生型和突变型 TreS II 破碎、离心后取适量粗酶液在 40℃、50℃、60℃ 条件下保温后,分别于 0h、3h、6h、9h、12h 取适量粗酶液加入至终浓度为 0.03% (m/m) 麦芽糖的 50mmol/L PBS 缓冲液(pH 6.0)中,在 40℃ 温度下反应 6h 后,加入 1mol/L DNS 试剂 1ml,沸水浴 5min,以蒸馏水稀释 2 倍测定 OD₅₄₀,以野生型重组酶 TreS II 在 0℃ 条件下处理 0h 的酶活力为 100%,比较突变型的热稳定性。

1.9 蛋白质含量的测定

按 Bradford 方法进行,以牛血清蛋白作为标准蛋白,具体操作见参考文献[22]。

2 结果与分析

2.1 TreS II 氨基酸序列分析

将 TreS II 氨基酸序列在 NCBI 上进行比对,TreS II

与来源于 *Picrophilus torridus* 的海藻糖合酶 PtTs^[23]、*Deinococcus radiodurans* 的海藻糖合酶 DrTs^[24]、*Thermobaculum terrenum* 的海藻糖合酶 TtTs^[25]、*Mycobacterium smegmatis* 的海藻糖合酶 MsTs^[21] 具有较高的相似性。三个活性中心残基 D202-E244-E310 分别位于 GFRVDXVPFL、LLAE、FLRNHDEL 的保守序列内。TtTs 有 4 个金属离子结合位点(图 1),可能与热稳定性有关,TreS II 与之对应的 A283 和 Y537 两个氨基酸残基与 TtTs 存在差异^[25]。此外,TreS II 序列中与 TtTs 结构上几个转角处的氨基酸残基 Q3、W374、R449 也存在差异,而这几个氨基酸可能也影响到热稳定性^[25]。因此,本研究选取这几个位点进行突变。

2.2 tres II 基因的定点突变

以表达载体 pET-29a-tresII 为模板,分别扩增 Q3D、A283R、Y537H、W374D、R449Q,PCR 产物凝胶回收后与 DMT 酶在 37℃ 下孵育 1h,热激转化至 *E. coli* DH5α,阳性克隆培养后提取质粒,0.75% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 2)。

将测序正确的突变质粒热激转化至 *E. coli* BL21(DE3),表达菌株经 0.2mmol/L IPTG 在 16℃ 条件下诱导表达后,6 000r/min 离心 10min,收集菌体,以 50mmol/L PBS 缓冲液(pH 6.0)重悬,超声破碎,12 000r/min 离心 10min,取 5μl 上清液(约 20μg 蛋白质)进行 SDS-PAGE(图 3)。图 3 显示经诱导后,突变重组酶 TreS II(MT)和野生型重组酶 TreS II(WT)都以可溶蛋白的形式大量表达。作者尝试通过 Ni²⁺-NTA 亲和层析对重组酶 TreS II 进行纯化,但未能成功。

2.3 突变型 TreS II 最适反应温度比较

以野生型重组酶 TreS II(WT)粗酶液为对照,分别测定突变型 TreS II(MT)在 35℃、40℃、温度下的酶活力,以野生型 TreS II 最适反应温度下的酶活力为 100% 进行比较,结果如图 4 所示。与野生型 TreS II 相比,各突变型的最适反应温度与野生型无明显差异,均为 40℃。

2.4 突变型 TreS II 最适反应 pH 的比较

以野生型重组酶 TreS II(WT)粗酶液为对照,分别测定突变型 TreS II(MT)在不同 pH 下的酶活力,以野生型 TreS II 最适反应 pH 下的酶活力为 100% 进行比较,结果如图 5 所示。与野生型 TreS II 相比,各突变型的最适反应 pH 与野生型无明显差异,均为 pH 6.0。

TreS II	1	-----M	IQDLWKNAV	IYCLDVETFM	21
DrTs	1	-----MVPTQ	AHPEWYKSAV	FYELSVRTFQ	25
PTTS	1	-----MLD	NNGLWYRDAV	FYEVVPKSFY	23
TtTS	1	-----MDPLWKDAV	IYQLHVRSSF		20
MsTs	1	MEEHTQGSHV	EAGIVEHPNA	EDFGHARTLP	50
TreS II	22	DGNGDGVGDF	GGLQRRLDYL	AGLGVTCWL	71
DrTs	26	DGNGDGKGF	PGLTSRLDYL	KNLGVDCWL	75
PTTS	24	DSNNDGIGDF	NGLTMKLDYL	KKLGVDCWL	73
TtTS	21	DANNNGYGF	EGLRRKLPYL	EELGVNLTWL	70
MsTs	51	DSNADGIGDL	RGLTEKLDYI	KWLGVDCLWL	100
TreS II	72	VDPRLGSLGD	FVEFTHQAKQ	RGLRVIIDL	121
DrTs	76	IHPDLGTLDD	FKVFLREAH	RGLWVIGDL	125
PTTS	74	ILPEYGTIDD	FKNFIDTAHS	MNIRVIADLV	123
TtTS	71	ILPVHGTLED	FT--VDEAHG	RGMKVIELV	117
MsTs	101	VLPEFGTVDD	FVTLLDAHR	RGIRIITDL	150
TreS II	122	R-----FHD	FYVWSDKKPK	DAHKGMPFPG	165
DrTs	126	PDGSPNEYHD	YYVWSDGKKE	YADTRIIFTD	175
PTTS	124	P-----KRD	WFIWSDTPEK	FKEARIIFID	167
TtTS	118	P-----MRD	WYVWSDTPEK	YKGVVIFDK	161
MsTs	151	P-----YGD	FYVWSDTSDR	YPDARIIFVD	194
TreS II	166	FPFQPENIT	HPAVREELK	VMGYWLQGV	215
DrTs	176	FASQPDLNYD	NPKVVEELHG	AARFWDLDGL	225
PTTS	168	YSSQPDLNYD	NPVVRNEVKK	VIRYWLDLGL	217
TtTS	162	YWHQPDLNWD	SPEVEKAIHQ	VMFFWADLV	211
MsTs	195	FSHQPDLNWD	NPAVQEAMLD	VLRFWLDLGI	244
TreS II	216	GIEDPYALLD	RMREFLSWRS	-GDAILLAE	261
DrTs	226	NLPETHEILK	GFRAMVDREY	-PGRILLAE	272
PTTS	218	NLPETHNFFK	EIRKMMDEDY	-PGTILLAE	262
TtTS	212	NLPETIEAVK	RLRKALEERY	GPGKILLAEV	257
MsTs	245	NLPETHAFLK	RCRKAIDDEY	-PGRVLLAE	293
TreS II	262	MQMVFNFAAN	QSYFLSLVTE	DATPLVESLR	311
DrTs	273	FHMCNFPVM	PRLYMSLKRE	DTSSIREIMG	322
PTTS	263	FHMAFNPLM	PRIFIALARS	DYYPIMDIK	312
TtTS	258	VHMAYNFPLM	PRIFMALRRE	DRGPIETMLK	307
MsTs	294	CHMAFHPLM	PRIFMAVRRE	SRFPISEILA	343
TreS II	312	LDLGRLPKA	RKRVAELGP	EPRMQLYERG	361
DrTs	323	LTLEMVTDEE	RAFMYAAYAP	DARMKIN-VG	371
PTTS	313	LTLEMVTDEE	RDIMYREYAK	IPKMRLN-LG	361
TtTS	308	LTLEKVTEEE	REFMYEAYAP	DPKFRIN-LG	356
MsTs	344	LTLEMVTDEE	RDYMYAAYAK	DPRMKAN-VG	392
TreS II	362	SLMLSPLGTP	VLWYGDELGM	GEDLSLHERQ	411
DrTs	372	TVLLALPGSP	VLWYGDEIGM	GDDLGLPDRN	421
PTTS	362	ALIFSLPGTP	IIWYGDEIGM	GDN IYLGDRN	411
TtTS	357	ALLLTLKGT	IVWYGDEIGM	GDN PFLGDRN	406
MsTs	393	ALLLSLPGSP	VLWYGDEIGM	GDI IWLGRD	442
TreS II	412	EP--FRPVVE	RAPHGYRQVN	VEHQRRDPGS	458
DrTs	422	PSDCFFPPIQ	DPVYGFGRVN	VQS QLDQPS	470
PTTS	412	SEQLYSPVIT	NPNYHYESVN	VEAELRLSS	461
TtTS	407	YHALFLPPVS	EGPYSYHFVN	VEAQRENPHS	456
MsTs	443	PGRLYLPPNQ	DAVYGYHSVN	VEAQDSSSS	491
TreS II	459	WGAWRLSVR	NKNVLALRYD	WKGET-----	499
DrTs	471	HGDLTFIETG	NPAILAFTRQ	YDGET-----	511
PTTS	462	RGSIKFIEQG	NKRVLSYIRE	YENQR-----	502
TtTS	457	RGSLTLLPVE	NRRVLAYLRE	HEGER-----	497
MsTs	492	VGTFRELGG	NPSVLAYIRE	VTRQQGDGGA	541
TreS II	500	SPGGPPARLV	HLLSEHSSP	GKTG--RHRV	540
DrTs	512	DLAPFVGRAP	VTLSGASPLP	VVTGNGQYPV	556
PTTS	503	NLSYIGLKP	IEAITKAAFP	RIKDD-RYFI	544
TtTS	498	PLEAYQGLVP	VELFSQQPFP	PVEG--RYRL	545
MsTs	542	NLQQWAGYIP	VEMTGYVEFP	SIGQL-PYLL	583

图1 TreS II 和已知海藻糖合酶氨基酸序列的比较

Fig.1 Sequence alignment of known trehalose synthases

Three regions of highly conserved sequence that are shaded in gray boxes. Catalytic residues D202, E244 and E310 are indicated by (*). The metal-binding sites are indicated by (:). Coordinated amino acids with thermal stability are indicated by (.)

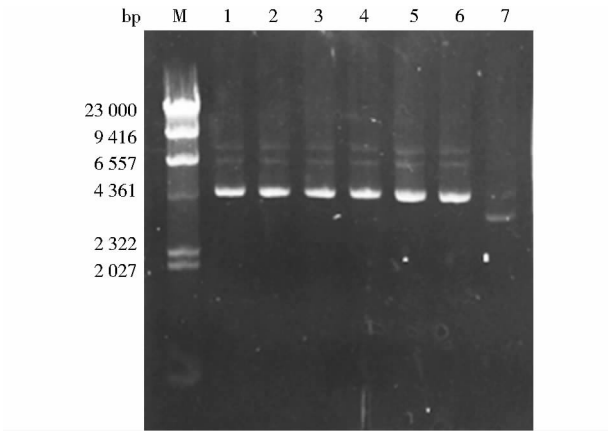


图2 PCR 介导定点突变 *treSII*

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of site-directed mutagenesis *treSII* by overlapping PCR

Lane M: λ Hind III marker; Lane 1: pET-29a-*treSII* (Q3D); Lane 2: pET-29a-*treSII* (A283R); Lane 3: pET-29a-*treSII* (W374D); Lane 4: pET-29a-*treSII* (R449Q); Lane 5: pET-29a-*treSII* (Y537H); Lane 6: pET-29a-*treSII*; Lane 7: pET-29a (+)

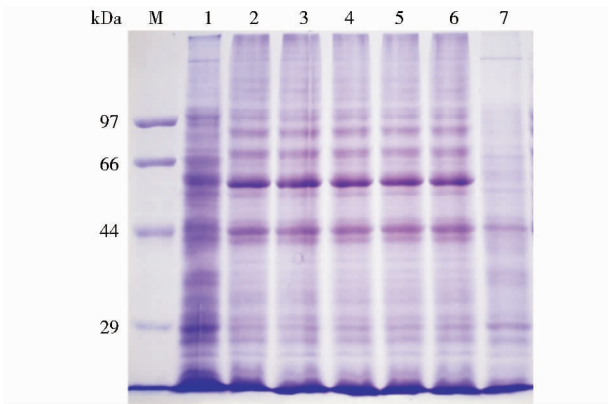


图3 突变重组酶 TreS II SDS-PAGE 图谱

Fig.3 Analysis of the expression of the mutant enzymes on SDS-PAGE

Lane M: Low molecular protein marker; Lane 1: Total protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+) - *treS II* (WT); Lane 2: Total protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+) - *treS II* (Q3D); Lane 3: Total protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+) - *treS II* (A283R); Lane 4: Total protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+) - *treS II* (Y537H); Lane 5: Total protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+) - *treS II* (W374D); Lane 6: Total protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+) - *treS II* (R449Q); Lane 7: Total protein of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-29a(+)

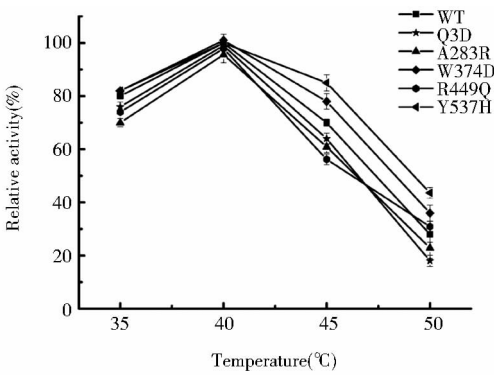


图4 突变型 TreS II 最适反应温度

Fig.4 Compared with optimum temperature of mutant and wild-type

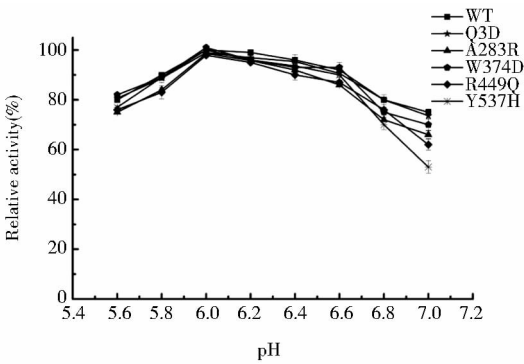


图5 突变型 TreS II 最适反应 pH

Fig.5 Compared with optimum pH of recombinant mutant TreS II and wild-type

2.5 突变型 TreS II 比酶活的比较

在最适反应温度和最适反应 pH 下测定突变型 TreS II (MT) 和野生型重组酶 TreS II (WT) 的单位酶活, 以野生型 TreS II 比酶活为 100% 进行比较。结果如图 6 所示。在最适反应条件下, 野生型 TreS II 的比酶活为 28.43U/mg。与野生型 TreS II 相比, 突变重组酶 Q3D、A283、W374D、Y537H 的单位酶活与野生型无明显差异, 而 R449Q 的单位酶活为野生型的 92%。

2.6 突变子热稳定性的比较

将突变重组酶在 40 °C、50 °C、60 °C 条件下保温后, 于 0h、3h、6h、9h、12h 取样测定酶活, 以野生型重组酶 TreS II 在 0 °C 条件下处理 0h 的酶活力为 100%, 比较突变型的热稳定性 (图 7)。

40 °C 条件下 (图 7 a), 野生型海藻糖合酶 TreS II 经过 6h, 其相对酶活为 50% 左右, 而突变体 Q3D、A283R、Y537H、R449Q、W374D 经过 6h, 其相对酶活依然有

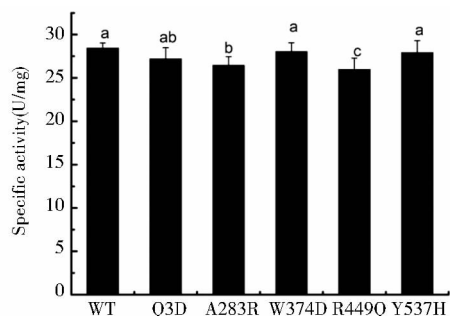


图6 突变型 TreS II 与野生型比酶活的比较

Fig. 6 Compared with specific activity of mutant recombinant enzyme and wild-type

85%左右;12h之后野生型残留酶活约为20%,而突变体 A283R、Y537H 位点突变的酶的相对酶活为60%左右。

50℃条件下(图7b),野生型海藻糖合酶 TreS II 经过6h,其相对酶活为30%左右,而突变体 Q3D、A283R、W374D、R449Q、Y537H 经过6h,其相对酶活依然有75%左右;12h之后野生型残留酶活约为10%,而突变体 A283R、Y537H 位点突变的相对酶活仍在40%左右。

60℃条件下(图7c),野生型海藻糖合酶 TreS II 经过3h,其相对酶活下降到20%左右,而突变体 A283R、Y537H 残留酶活仍有68%左右,Q3D、R449Q、W374D 相对残留酶活为35%;6h之后野生型仅保留小于10%的酶活,而突变体 A283R、Y537H 残留酶活仍有30%左右。

3 讨论

热稳定高的海藻糖合酶在工业化酶法生产海藻糖上具有很强的应用潜力。*Pimelobacter* sp. R48 的海藻糖合酶在30℃条件下处理1h,相对酶活保持在80%,在50℃处理1h,残留酶活不足10%,单位酶活力为17U/mg^[26]; *Pseudomonas stutzeri* CJ38 的海藻糖合酶在55℃条件下处理1h,相对酶活保持在40%,单位酶活力为79.2U/mg^[27];来源于 *Picrophilus torridus* 的海藻糖合酶 PtTs 具有较强的热稳定性,在60℃条件下处理1h,酶活无损失,其单位酶活力为80U/mg^[28];来源于 *Thermus quaticus* ATCC33923 的海藻糖合酶在80℃下稳定,单位酶活力为134U/mg^[29]。王宇凡等^[30]对菌株 *Meiothermus ruber* strain CBS-01 所产海藻糖合酶 MrTs 上与热稳定性有关的关键位点 R392 进行突变,结果表明 R392A 在50℃条件下活力基本丧失,TreS II 与之对应的位点为 R394,本文未对其进行突变。有意思的是

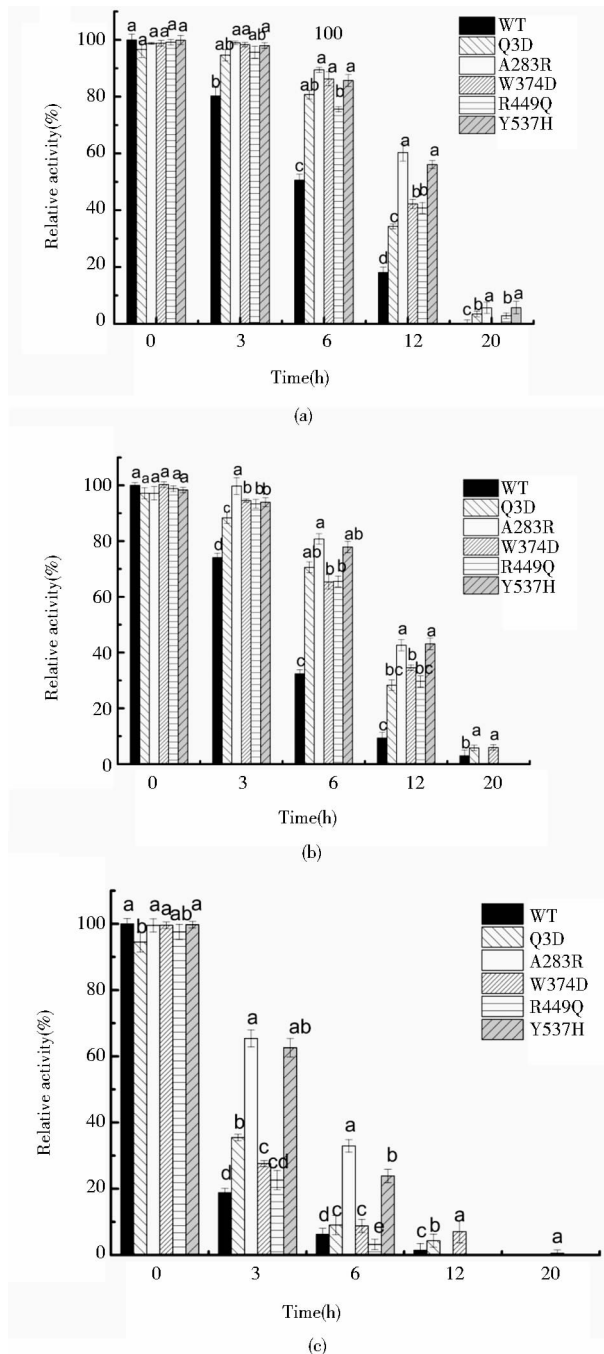


图7 突变型 TreS II 与野生型热稳定性比较

Fig.7 Comparison of thermal stability of WT and thermal stability of mutant enzymes

(a) The thermal stability of WT and mutant enzymes on 40℃ (b) The thermal stability of WT and mutant enzymes on 50℃ (c) The thermal stability of WT and mutant enzymes on 60℃

MrTs 具有一个比 TtTs、DrTs 及 TreS II 多出427个氨基酸的C端结构域,Wang等^[31]推测C端可能与维持蛋白质的热稳定性有关。但缺失该结构域的DrTs和经突

变后的 TreS II also 具有良好的热稳定性,表明 TreS II 可以通过其他的氨基酸残基之间的作用来维持自身结构。

脯氨酸对高温条件下蛋白质构象的稳定有非常关键的作用^[32],通过提高脯氨酸的含量来改变蛋白质的柔韧性以维持结构是常见的增强蛋白质热稳定性的策略之一^[33]。Chou 等^[23]通过定点突变对 PtTs 的几个位点进行了突变,但仅发现 N503P 提高了热稳定性。耐热性良好的 DrTs 与 PtTs 序列内 N503 位点对应的氨基酸残基是 D512,且 TtTs 和 TreS II 对应的位点分别是 D501 和 S498,这一位点在 DrTs、TtTs 和 TreS II 中对蛋白结构的维持机制尚值得探讨。

已解析的海藻糖合酶 MsTS 由 A、B 和 C 三个 domain 组成。其中 domain B 包含 1 个 α 螺旋、3 个 β 折叠和 1 个 Ca^{2+} 结合位点, Ca^{2+} 结合对维持保持 domain A 结构的稳定具有重要作用^[34]。而另一个已解析结构的海藻糖合酶 DrTs 具有较高的热稳定性^[24]。TtTS 具有 1 个由 Asp202-Glu244-Asp310 组成的催化中心,2 个与 Mg^{2+} 结合的氨基酸位点 (R283G/Y287R/R291G,H534Y) 的突变显著提高了酶的热稳定性,且在结构上由两段氨基酸构成的序列 Asp4-Val129 和 Tyr373-Gln450 之间的相互作用与热稳定性密切相关^[25]。本研究中的海藻糖合酶 TreS II 与 TtTs 的相似性为 61%,经序列比对,TreS II 存在着类似的氨基酸结合位点 A283/R287/V291 和 Y537。通过对 A283 和 H537 位点的突变,60℃ 条件下 A283R、Y537H 保温 3h,其残留酶活仍有 68% 左右,证实了与金属离子结合的氨基酸残基对 TreS II 的热稳定性具有显著作用。此外,对 TreS II 与 TtTs 上相似的两个维持蛋白质结构的结构域上的几个位点 Q3D、W374D、R449Q 进行突变后,其热稳定性也有不同程度的提高。所获得的具良好热稳定性的突变重组酶扩大了海藻糖合酶 TreS II 的应用范围。

参考文献

- [1] Nwaka S, Holzer H. Molecular Biology of Trehalose and the Trehalases in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Progress in Nucleic Acid Research, 1997, 58: 197-237.
- [2] Elbein A D, Pan Y T, Irena P, et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology, 2003, 13(4): 17R.
- [3] Elbein A D. The metabolism of α , α -trehalose. Adv Carbohydr Chem Biochem, 1974, 30(8): 227-256.
- [4] Shimakata T, Minatogawa Y. Essential role of trehalose in the synthesis and subsequent metabolism of corynomycolic acid in *Corynebacterium matruchotii*. Archives of Biochemistry Biophysics, 2000, 380(2): 331-338.
- [5] Liu J, Nikaido H. A mutant of *Mycobacterium smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acids accumulates meromycolates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(7): 4011-4016.
- [6] Brodmann D, Schuller A, Ludwigmüller J, et al. Induction of trehalase in Arabidopsis plants infected with the trehalose-producing pathogen *Plasmodiophora brassicae*. Mol Plant Microbe Interact, 2002, 15(7): 693-700.
- [7] Rolland F, Baena Gonzalez E. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annual Review of Plant Biology, 2006, 57(1): 675-709.
- [8] Hottiger T, Virgilio C D, Hall M N, et al. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. Febs Journal, 2005, 219(1 - 2): 187-193.
- [9] Hounsai C G, Brandt E V, Thevelein J, et al. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. Microbiology, 1998, 144 (3): 671-680.
- [10] 刘俊梅, 聂海彦, 郑微微, 等. 水生栖热菌 FL-03 海藻糖合酶基因的克隆及真核表达. 食品科学, 2010, 31(23): 267-270.
- [10] Liu J M, Nie H Y, Zheng W W, et al. Cloning and eukaryotic expression of trehalose synthase gene from *Thermus aquaticus* FL-03. Food Science, 2010, 31(23): 267-270.
- [11] Richards A B, Krakowka S, Dexter L B, et al. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. Food Chemical Toxicology, 2002, 40(7): 871-898.
- [12] 李忠奎. 海藻糖合酶基因在毕赤酵母中的克隆和表达. 济南: 齐鲁工业大学, 2014.
- [12] Li Z K. Cloning and expression of trehalose synthase gene in *Pichia pastoris*. Jinan: Qilu University of Technology, 2014.
- [13] Cai X, Seil I, Mu W, et al. Biotechnical production of trehalose through the trehalose synthase pathway: current status and future prospects. Applied Microbiology Biotechnology, 2018, 102 (12): 1-12.
- [14] Jelsbak L, Sogaard-Andersen L. Cell behavior and cell-cell communication during fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. Journal of Microbiological Methods, 2003, 55 (3): 829-839.
- [15] McBride M J, Zusman D R. Trehalose accumulation in vegetative cells and spores of *Myxococcus xanthus*. Journal of Bacteriology, 1989, 171(11): 6383-6386.
- [16] Shi C, Lu X, Ma C, et al. Enhancing the thermostability of a novel β -agarase AgaB through directed evolution. Applied

- Biochemistry Biotechnology, 2008, 151(1): 51.
- [17] Zhang Y J, Xie M, Zhang X L, et al. Establishment of polyethylene-glycol-mediated protoplast transformation for *Lecanicillium lecanii* and development of virulence-enhanced strains against *Aphis gossypii*. Pest Management Science, 2016, 72(10): 1951-1958.
- [18] 王飞, 李周坤, 周杰, 崔中利. 定点突变对酰胺水解酶 DamH 可溶性表达和酶活的影响. 微生物学报, 2015, 55(12): 1584-1592.
- Wang F, Li Z K, Zhou J, et al. Effect of site-directed mutagenesis on the soluble expression and specific activity of amide hydrolase DamH. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(12): 1584-1592.
- [19] Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. Journal of Biological Chemistry, 1944, 153(2): 471-473.
- [20] Wei Y T, Zhu Q X, Luo Z F, et al. Cloning, Expression and identification of a new trehalose synthase gene from *Thermobifida fusca* Genome. Acta Biochimica Et Biophysica Sinica, 2004, 36(7): 477-484.
- [21] Yuan T, Pan, Vineetha KE, et al. Trehalose synthase of *Mycobacterium smegmatis*: purification, cloning, expression, and properties of the enzyme. Febs Journal, 2010, 271(21): 4259-4269.
- [22] Bradford M M. 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.
- [23] Chou H H, Chang S W, Lee G C, et al, Shaw JF. Site-directed mutagenesis improves the thermostability of a recombinant *Picrophilus torridus* trehalose synthase and efficiency for the production of trehalose from sweet potato starch. Food Chemistry, 2010, 119(3): 1017-1022.
- [24] Wang Y L, Sih-Yao C, Lin Y T, et al. Structures of trehalose synthase from *Deinococcus radiodurans* reveal that a closed conformation is involved in catalysis of the intramolecular isomerization. Acta Crystallographica, 2015, 70(12): 3144-3154.
- [25] Wang J, Ren X, Wang R, et al. Structural characteristics and function of a new kind of thermostable trehalose synthase from *Thermobaculum terrenum*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2017, 65(35): 7726-7735.
- [26] Nishimoto T, Nakano M, Nakada T, et al. Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48. Bioscience, Biotechnology, Biochemistry, 1996, 60(4): 640-644.
- [27] Lee J H, Lee K H, Kim C G, et al. Cloning and expression of a trehalose synthase from *Pseudomonas stutzeri* CJ38 in *Escherichia coli* for the production of trehalose. Applied Microbiology Biotechnology, 2005, 68(2): 213-219.
- [28] Chen Y S, Lee G C, Shaw J F. Gene cloning, expression, and biochemical characterization of a recombinant trehalose synthase from *Picrophilus torridus* in *Escherichia coli*. Journal Of Agricultural Food Chemistry, 2006, 54(19): 7098-7104.
- [29] Tsusaki K, Nishimoto T, Nakada T, et al. Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Thermus aquaticus* ATCC33923. Biochimica et Biophysica Acta -General Subjects, 1997, 1334(1): 28-32.
- [30] 王宇凡, 朱碣明, 魏东盛, 等. 利用定点突变分析海藻糖合酶的功能. 微生物学通报, 2009, 36(5): 658-665.
- Wang Y F, Zhu Y M, Wei D S, et al. Functional analysis of trehalose synthase in *Meiothermus ruber* CBS-01 by site-directed mutation. Microbiology China, 2009, 36(5): 658-665.
- [31] Wang Y, Zhang J, Wang W, et al. Effects of the N-terminal and C-terminal domains of *Meiothermus ruber* CBS-01 trehalose synthase on thermostability and activity. Extremophiles Life Under Extreme Conditions, 2012, 16(3): 377-385.
- [32] Goihberg E, Dym O, Telor S, et al. A single proline substitution is critical for the thermostabilization of *Clostridium beijerinckii* alcohol dehydrogenase. Proteins Structure Function Bioinformatics, 2010, 66(1): 196-204.
- [33] Masayoshi S, Mika M, Keisuke N, et al. Role of proline residues in conferring thermostability on aqualysin I. Journal of Biochemistry, 2007, 141(2): 213-220.
- [34] Caner S, Nguyen N, Aguda A, et al. The structure of the *Mycobacterium smegmatis* trehalose synthase reveals an unusual active site configuration and acarbose-binding mode. Glycobiology, 2013, 23(9): 1075-1083.

Site-directed Mutagenesis Improves the Thermostability of Trehalose Synthase TreS II from *Myxococcus* sp. V11

ZHAO Xiao-yan¹ CHEN Yun-da¹ ZHANG Ya-qian¹ WU Xiao-yu^{1,2} WANG Fei^{1,2} CHEN Jin-yin²

(1 College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China)

(2 Collaborative Innovation Center of Postharvest Key Technology and Quality Safety of Fruits and Vegetables in Jiangxi Province, Nanchang 330045, China)

Abstract The trehalose synthase (EC 2.4.1.245) from *Myxococcus* sp. V11 (TreS II) catalyzes the reversible interconversion of maltose and trehalose. The high catalytic activity and high conversion rate of maltose into trehalose of TreS II indicate that it has potential application in industrial production of trehalose. However, the thermal instability of TreS II limits its wide application in trehalose production. Objective: The effects of amino acid residues mutations on the thermal stability, optima of pH and temperature, and specific activity of TreS II were studied by site-directed mutagenesis. Methods: Site-directed mutation experiment of the two possible metal ion-binding sites (A283 and Y537) and the three sites (Q3, W374 and R449) in two regions which may correlate with thermostability by using overlapping PCR were performed. Mutants of A283R, Y537H, Q3D, W374D and R449Q were heterogeneously expressed in *E. coli* BL21 (DE3). At the same time the specific activity, the optimum reaction temperature, the optimum pH and the thermal stability of mutants were compared with wild-type strain. Results: Mutation of Q3D, W374D, R449Q, A283R and Y537H enhanced the thermal stability, but did not affect the pH and temperature optima. Only the mutant R449Q reduced the specific activity. The modified enzymes A283R and Y537H showed 68% and the mutants Q3D, R449Q, W374D showed 35% of maximal activity after incubating in maltose substrate for 3h at 60°C compared to only 20% activity for wild-type enzyme. Conclusion: These factors may render TreS II relatively more thermostable among mesophilic trehalose synthases. The thermophilic amino acid residues provided herein may provide guidance for further protein engineering in the design of stabilized enzymes.

Key words *Myxococcus* sp. V11 Trehalose synthase Site-directed mutagenesis Thermostability