

田菁根瘤菌嗜盐 α -淀粉酶的基因克隆表达与分子改造* *Rhizobium sesbania* Halophilic Alpha - Amylase Gene Cloning and Enzymology Characteristics Research

杨媛^{1,2},姚甜甜^{1,2},熊海涛^{1,2},杜丽琴^{1,2},韦宇拓^{1,2**}

YANG Yuan^{1,2},YAO Tiantian^{1,2},XIONG Haitao^{1,2},DU Liqin^{1,2},WEI Yutuo^{1,2}

(1. 广西大学生命科学与技术学院,广西南宁 530005;2. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室,广西南宁 530005)

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China;2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-biore-sources, Nanning, Guangxi, 530005, China)

摘要:【目的】克隆表达田菁根瘤菌嗜盐 α -淀粉酶基因,并对其进行基因改造,为探索与嗜盐性相关的氨基酸位点提供参考。【方法】从田菁根瘤菌及周围土壤的宏基因组中克隆到一个命名为 RSA 的极端嗜盐淀粉酶。通过与同源性的 75.33% 的嗜盐 α -淀粉酶 K6 的序列比对发现,RSA-D205 位点与已报道的 K6-N204(嗜盐相关的氨基酸位点)相似,从而对其进行定点饱和突变以研究相关酶学性质。【结果】共获得 17 个突变子,其最适 NaCl 浓度较 RSA 均有不同程度的降低。RSA-D205R、RSA-D205C 酶反应温度高达 80℃,拓宽了其应用范围。【结论】RSA-D205 氨基酸残基位点与 Na⁺ 结合位点有一定的联系;另外,精氨酸(R)、半胱氨酸(C)对淀粉酶的高温改造具有参考价值。

关键词:克隆表达 嗜盐机理 α -淀粉酶 定点突变 离子结合位点

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2017)02-0201-05

Abstract:【Objective】The study was to provide the reference for exploring the amino acid sites related to halophilic characteristics by cloning,expressing and genetically modifying the gene of *Rhizobium sesbania*. 【Methods】An extreme halophilic amylase named RSA was cloned from the metagenome of *Rhizobium sesbania* and surrounding soil. RSA-D205 site was found to have a similarity to the reported K6-N204 (amino acid site related to halophilic characteristics) at sequence homology level about 75.33% with halophilic amylase K6. In order to study the relevant enzymatic properties,a site directed saturation mutagenesis was performed. 【Results】A total of 17 mutants were obtained,and the optimum NaCl concentration was lower than that of RSA in various degree. However,the reaction temperature of RSA-D205R and RSA-D205C were both up to 80℃,which broadened their application. 【Conclusion】There is a certain relationship between the amino acid residues of RSA-D205 and Na⁺ binding sites,and the arginine (R) and cysteine (C) have the reference value for the modification of amylase.

Key words:cloning and expression,halophilic mechanism,alpha-amylase,site-saturation mutagenesis,ion binding site

收稿日期:2016-12-20

作者简介:杨媛(1989—),女,硕士研究生,主要从事微生物方面研究。

* 国家自然科学基金项目(31460437)资助。

** 通信作者:韦宇拓(1971—),男,教授,主要从事发酵与酶工程研究,E-mail:weiyutuo@gxu.edu.cn.

0 引言

【研究意义】嗜盐淀粉酶在许多行业中都具有潜在的应用价值,如医药、纺织、制糖、酿造、食品及洗涤行业^[1-4]。了解嗜盐 α -淀粉酶的嗜盐机制,不仅对解决蛋白质的折叠、稳定性的保持、溶解性的提高有重

要意义,而且能为生物技术应用工程稳定蛋白质或酶提供指导方针和范本。【前人研究进展】目前有一些文献指出,蛋白质表面富含负电荷氨基酸残基是这类来自于嗜盐微生物蛋白质的最突出特征之一^[5-7]。为研究嗜盐淀粉酶的嗜盐机理,Zorgani等^[8]对大量的嗜盐及非嗜盐淀粉酶的氨基酸组成进行了序列比对,并着重研究嗜盐酶的结构特征。与非嗜盐酶相比,嗜盐酶呈现出不一样的三维结构以保证其在高盐浓度的环境下能维持稳定性和活力^[8]。【本研究切入点】为了解嗜盐 α -淀粉酶的嗜盐性与氨基酸序列及离子结合位点的关系,采用定点突变技术对RSA离子结合位点上的氨基酸进行改造研究。【拟解决的关键问题】通过改变嗜盐 α -淀粉酶的蛋白质序列来研究是否离子结合位点本身的变化影响了酶与盐之间的相互作用,从而表现出不同的稳定性与嗜盐性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 本 的 采 集

根据田菁的植物特征,从广西南宁市石埠码头靠河流附近采集到一株田菁,取其根部及根瘤周围土壤。

1.1.2 主 要 试 剂

由Beyotime公司生产的小剂量质粒提取试剂盒(Biospin Plasmid DNA Extraction Kit)、PCR产物纯化试剂盒(PCR Purification Kit)以及DNA凝胶回收试剂盒(DNA Gel Extraction Kit)。IPTG、SDS为CALBIOCHEM公司产品。Yeast extract、Tryptone为OXIOD公司产品。dNTP、TEMED、Tris碱、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、NaCl、丙烯酰胺、苯酚、RNase A、四水亚硫酸钠、溴酚蓝、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等均为上海生工生产。

1.1.3 菌 种 和 质 粒

Escherichia coli JM109、表达载体pSE380(色氨酸启动子、复制子PBR322、Amp抗性)均为本实验组保藏菌种。

1.2 方 法

1.2.1 引 物 设 计

通过PCR从田菁根瘤菌根瘤及根瘤周围土壤的宏基因组中克隆到一个注释为 α -淀粉酶的ORF rsa,测序结果表明这个ORF来自于*Rhizobium* sp. IR-BG74。利用NCBI网站上BLAST对获得的 α -淀粉酶的氨基酸进行序列比对,得到相似性最高的氨基酸信息,找到其中相对应的核苷酸序列进行引物设计。设计的引物序列如下:

P1:5'-CCGGAATTCATGCATCATCATCATCATCATCATATGGCCGGACGCACCTTGCTT-3',

P2:5'-CCCAAGCTTTCACCCGGATTCGGC-TGGCAC-3'。

1.2.2 PCR 扩 增 目 的 片 段

以田菁根瘤周围土壤菌种中获得的宏基因组DNA为模板,设计的P1、P2为引物进行PCR扩增。PCR反应体系25 μ L,扩增条件:94 $^{\circ}$ C预变性2 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,45 $^{\circ}$ C退火45 s,72 $^{\circ}$ C延伸2 min,循环29次;最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。

1.2.3 重 组 表 达 载 体 的 构 建 及 目 的 蛋 白 的 纯 化

利用限制性内切酶EcoR I及Hind III对胶回收获得的PCR产物和表达载体pSE380分别进行双酶切处理后,利用热激法转入大肠杆菌JM109中并进行测序验证。挑测序正确的重组菌接种于LB培养基(Amp浓度为100 μ g/mL)中,于37 $^{\circ}$ C、220 r/min摇床中恒温培养。待OD₆₀₀值达到0.6时加入终浓度为0.6 mmol/L的IPTG,于30 $^{\circ}$ C、220 r/min摇床中诱导表达6 h。最后,收集菌体用裂解缓冲液(10 mmol/L咪唑,50 mmol/L NaH₂PO₄)充分重悬菌体后进行超声波破胞。对破胞液进行离心取上清,用镍柱亲和层析纯化蛋白,采用SDS-PAGE检测纯化蛋白的分子量大小和纯度。

1.2.4 突 变 位 点 的 选 择

本课题组已研究的来自大肠杆菌的K6 α -淀粉酶的突变子中,K6-N204D的嗜盐性相较原始的K6得到提高。RSA与K6的氨基酸序列同源性较高,该位点对应到RSA为D205位点,而且经过预测分析,这两个位点在各自蛋白质三维空间结构上的位置都处于离子结合位点上,这个位点的氨基酸可能与离子直接接触,所以选择该位点进行突变研究。

1.2.5 重 组 酶 和 突 变 酶 活 的 测 定

酶活力测定的方法参考3,5-二硝基水杨酸比色法(Bernfeld法)^[9]对还原糖的含量进行测定,并结合之前测定的葡萄糖标准曲线对测定结果进行计算。将190 μ L、含有1%(W/V)的可溶性淀粉为底物的反应缓冲液加入至1.5 mL的Ep管中,使用移液枪每隔10 s加入10 μ L的稀释一定倍数的纯酶液。将10 μ L经煮沸灭活的纯酶加入到相同的缓冲液中作为空白对照组。在最适条件下反应10 min后,各管加入400 μ L DNS终止反应,移至沸水浴中加热5 min显色,然后各取200 μ L混合液加至96孔板中,测定混合液的吸光值OD₅₄₀,再结合葡萄糖标准曲线计算出葡萄糖的产量。 α -淀粉酶的酶活力单位定义:处于最适条件时,每分钟生成1 μ mol葡萄糖所需的

酶量为一个酶活力单位(U)。α-淀粉酶活力的计算：
α-淀粉酶活力单位(U/mL) = (葡萄糖含量 × 103 × 稀释倍数) / (198.17 × 10 × 0.01)，比活力 = 最高酶活力(U) / 纯化后蛋白质的含量(mg)。

1.2.6 重组酶和突变酶酶学性质的测定

(1) pH 值对酶活力的影响

使用不同 pH 值的磷酸-柠檬酸缓冲液与可溶性淀粉进行底物的配制，取 10 μL 稀释的纯酶液与 190 μL 底物在 37℃ 恒温水浴锅中反应 10 min。根据公式计算酶活力，以最高相对酶活力为 100%，绘制 pH 值对酶活力的影响曲线。

(2) 温度对酶活力的影响

使用最适 pH 值的磷酸-柠檬酸缓冲液与可溶性淀粉进行底物的配制，取 10 μL 稀释的纯酶液与 190 μL 底物分别在不同温度下反应 10 min。根据公式计算酶活力，以最高相对酶活力为 100%，绘制温度对酶活力的影响曲线。

(3) 最适 NaCl 浓度

使用最适 pH 值的磷酸-柠檬酸缓冲液与可溶性淀粉进行底物的配制，并加入不同浓度的 NaCl 溶液。取 10 μL 稀释的纯酶液与 190 μL 含不同浓度 NaCl 的底物在最适温度下反应 10 min。根据公式计算酶活力，以最高相对酶活力为 100%，绘制 pH 值对酶活力的影响曲线。

(4) Ca²⁺ 对酶活力的影响

使用最适 pH 值的磷酸-柠檬酸缓冲液稀释酶液，使稀释后的酶液中含有不同终浓度的 Ca²⁺。将稀释后的酶液于 4℃ 处理 12 h。取 10 μL 经处理的酶液与 190 μL 底物在最适温度下反应 10 min。以最高相对酶活力为 100%，绘制不同浓度的 Ca²⁺ 对酶活力影响曲线。

(5) EDTA 对酶活力的影响

使用最适 pH 值的磷酸-柠檬酸缓冲液稀释酶液，使稀释后的酶液中含有不同终浓度的 EDTA。将稀释后的酶液于 4℃ 处理 12 h。取 10 μL 经处理的酶液与 190 μL 底物在最适温度下反应 10 min(未经处理的酶液为空白对照)。以空白对照的相对酶活力为 100%，绘制不同浓度的 EDTA 对酶活力影响曲线。

(6) 金属离子对酶活力的影响

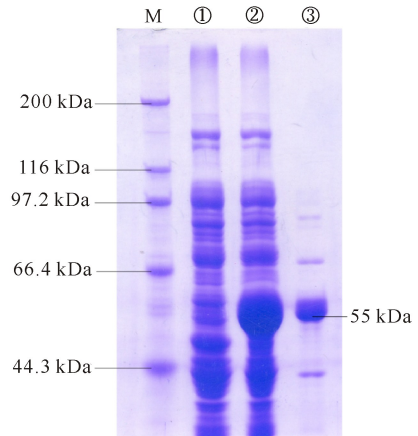
使用最适 pH 值的磷酸-柠檬酸缓冲液与可溶性淀粉进行底物配置，使得底物中的 NiCl₂、MgCl₂、CuCl₂、FeCl₃、CoCl₂、CaCl₂、ZnSO₄、PbAc、MnCl₂、BaCl₂ 的终浓度为 10 mmol/L。取 10 μL 稀释的纯酶液与 190 μL 含不同金属的底物在最适温度下反应

10 min(无金属离子的底物为空白对照)。根据公式计算酶活力，以空白对照的相对酶活为 100%，绘制不同盐溶液对酶活性影响的柱状图。

2 结果与分析

2.1 重组酶的表达与纯化

如图 1 所示，利用 SDS-PAGE 凝胶电泳对获得的重组蛋白 RSA 进行纯化，重组酶的蛋白质大小为 55 kDa。结果表明 RSA 在大肠杆菌 JM109 中成功表达，且经过 IPTG 诱导表达所产生的目的蛋白条带较为单一，可以进行下一步研究。



M: 蛋白质 Marker; ① 诱导空载体 pSE380/JM109 可溶性蛋白; ② 诱导转化子可溶性蛋白质; ③ 纯化目的蛋白 RSA

M: Protein marker; ① Proteins from soluble fractions of pSE380/JM109 with induction; ② Proteins from soluble fractions of pSE380-RSA/JM109 with induction; ③ Purified RSA from soluble fractions of pSE380-RSA/JM109

图 1 重组蛋白 RSA 的 SDS-PAGE 凝胶电泳
Fig. 1 SDS-PAGE gel of RSA purification steps

2.2 重组酶酶学性质

2.2.1 最适 pH 值

如图 2 所示，RSA 的最适 pH 值为 7.5，在 pH 值 7.0 以下及 pH 值 8 以上的溶液中 RSA 的酶活下降很明显，当 pH 值下降到 6 时 RSA 基本失去酶活力，表明 RSA 的 pH 耐受范围较小。

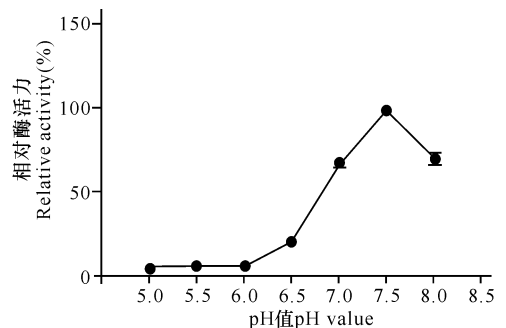


图 2 RSA 的最适 pH 值

Fig. 2 Optimal pH value of RSA

2.2.2 最适温度

如图3所示,RSA的最适温度是45℃,在35~50℃时酶的活性较高,相对活力维持在60%以上。温度超过50℃后的酶活力有较大的降低,表明RSA不能耐高温,低温下稳定性较好。

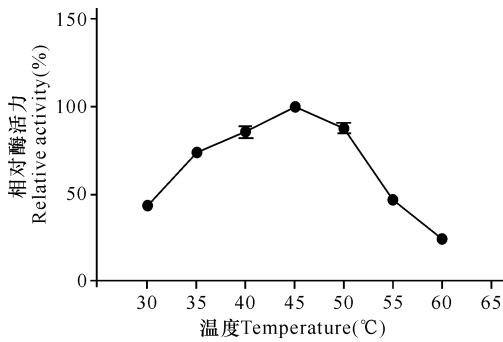


图3 RSA的最适温度

Fig. 3 Optimal temperature of RSA

2.2.3 最适 NaCl 浓度

由图4可见,RSA的最适NaCl浓度为5 mol/L,在2~5 mol/L NaCl环境中酶活力不断升高,到6 mol/L时开始下降。说明RSA的嗜盐性较高,属于极端嗜盐酶。

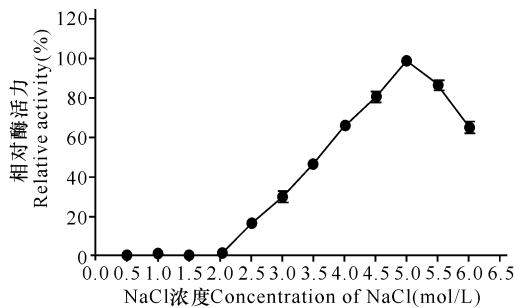


图4 RSA的最适NaCl浓度

Fig. 4 Optimal NaCl of RSA

2.2.4 Ca²⁺对酶活力的影响

如图5所示,在0~5 mmol/L Ca²⁺溶液中,随着Ca²⁺浓度增加,酶活力不断地升高,说明Ca²⁺对RSA具有激活作用。在Ca²⁺达到5 mmol/L以上时出现酶活抑制现象,说明Ca²⁺浓度在5 mmol/L的时候激活作用最强。

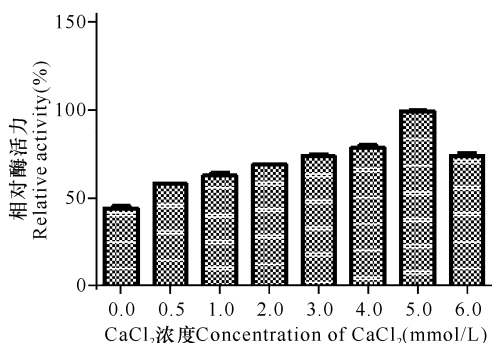


图5 Ca²⁺对重组酶活性的影响

Fig. 5 Effect of Ca²⁺ on recombinant enzyme activity

2.2.5 EDTA对酶活力的影响

如图6所示,从实验结果可知EDTA对重组酶RSA的酶活性影响很大,相对酶活力均在10%以下,说明重组酶RSA是一种金属酶。

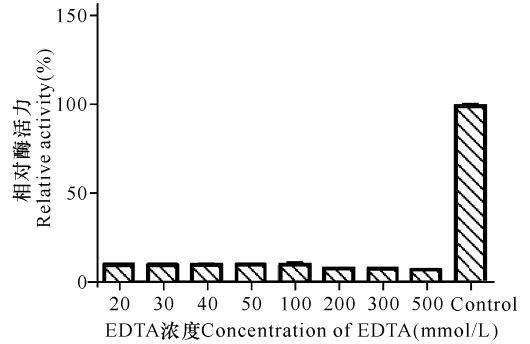


图6 EDTA对重组酶活性的影响

Fig. 6 Effect of EDTA on recombinant enzyme activity

2.2.6 金属离子对酶活力的影响

如图7所示,Cu²⁺、Fe³⁺、Zn²⁺、Pb²⁺均对RSA有抑制作用,其中Zn²⁺对于RSA的抑制作用不明显。Ni²⁺、Mg²⁺、Co²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Ba²⁺均对RSA有激活作用,其中Co²⁺、Ca²⁺对RSA的激活效果显著,而Ba²⁺对于RSA的激活效果不明显。

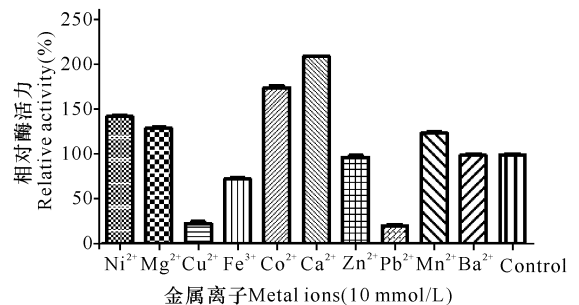


图7 金属离子对RSA活力的影响

Fig. 7 Effect of metal ions on RSA activity

2.3 突变酶的酶学性质及其与重组酶的比较

在17个突变子中(表1),RSA的D205K、D205I、D205M、D205L、D205S、D205N、D205T、D205F、D205H、D205E突变子为嗜盐酶,但是嗜盐性较RSA均有所下降。另外,RSA-D205R、RSA-D205C突变子的最适温度均为80℃,相比野生重组酶上升35℃成为嗜热酶。

3 讨论

通过分析PDB数据库中一些酶的三维结构后发现,大多数氨基酸是用来维持酶分子结构上的稳定,少部分氨基酸作为构成活性中心的关键氨基酸,这些关键氨基酸对酶分子的催化活性影响巨大,对这类氨基酸进行替换可能会引起酶学性质的改善。RSA

表 1 定点突变子的酶学性质汇总

Table 1 Summarize the enzyme properties of site-saturation mutants

RSA 突变子 RSA Mutants	最适温度 Optimum temperature(°C)	最适 pH 值 Optimum pH	最适 NaCl 浓度 Optimum NaCl concentration (mol/L)
RSA	45	7.5	5
D205L	45	6.5	2
D205Q	60	5.0	0
D205R	80	5.5	0
D205S	55	5.5	2
D205K	55	6.5	3
D205N	65	7.0	2
D205T	50	6.5	2
D205Y	60	5.5	0
D205A	55	6.0	0
D205C	80	6.5	0
D205G	35	6.0	0
D205W	60	5.5	0
D205V	75	5.5	0
D205I	55	7.0	3
D205M	35	6.5	4
D205F	45	6.5	1.5
D205P	75	8.0	0
D205H	45	6.0	2
D205E	60	5.0	2

最适 NaCl 浓度为 5 mol/L,为极端嗜盐酶。本实验通过对 RSA-D205 位点进行突变,突变子的嗜盐性均有所降低。另外,RSA-D205R、RSA-D205C 这两个突变子的最适反应温度达到 80℃,相较原始的 RSA 提高 35℃。精氨酸(R)、半胱氨酸(C)也许对淀粉酶的高温改造具有参考价值。这些改变可能是因为离子结合位点本身的变化影响酶与盐之间的相互作用,从而表现出不同的性能。同时 RSA 嗜盐淀粉酶是从非嗜盐菌田菁根瘤菌中获得的,打破了嗜盐酶从嗜盐菌中获得的传统。由于 RSA 的晶体结构尚未被完全理解,突变位点的选择存在较大的不可预见性和盲目性。仅从这些定点突变结果还不能完全说明该离子结合位点是如何影响酶的性能,但是这些结果可以为嗜盐淀粉酶的分子改造积累经验。目前嗜盐酶在生物技术应用方面的潜力还没有被广泛地开发利用^[10],但是相比在极端环境下比如高温、宽范围的 pH 值或者在物理化学都不适合的普通酶^[11]来说,这些属性使得嗜盐水解酶在工业生产上得到更广泛的应用。

参考文献:

[1] RASIAH I A, REHM B H A. One-step production of

immobilized α -amylase in recombinant *Escherichia coli* [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2009, 75 (7):2012-2016.

[2] GHOLLASI M, KHAJEH K, NADERI-MANESH H, et al. Engineering of a *Bacillus* α -amylase with the improved rmostability and calcium independency[J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2010, 162(2): 444-459.

[3] DELGADO-GARCÍA M, VALDIVIA-URDIALES B, AGUILAR-GONZÁLEZ C N, et al. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92 (13):2575-2580.

[4] VAN DER MAAREL M J E C, VAN DER VEEN B, UITDEHAAG J C M, et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family [J]. Journal of Biotechnology, 2002, 94(2):137-155.

[5] MEVARECH M, FROLOW F, GLOSS L M. Halophilic enzymes: Proteins with a grain of salt [J]. Biophysical Chemistry, 2000, 86(2/3):155-164.

[6] EISENBERG H. Life in unusual environments: Progress in understanding the structure and function of enzymes from extreme halophilic bacteria [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995, 318(1):1-5.

[7] ELCOCK A H, MCCAMMON J A. Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins[J]. Journal of Molecular Biology, 1998, 280(4):731-748.

[8] ZORGANI M A, PATRON K, DESVAUX M. New insight in the structural features of haloadaptation in α -amylases from halophilic *Archaea* following homology modeling strategy: Folded and stable conformation maintained through low hydrophobicity and highly negative charged surface[J]. Journal of Computer-aided Molecular Design, 2014, 28(7):721-734.

[9] DOUGLAS T L, CLONCE A J, JONES G C. 3,5-dinitrosalicylic acid[M]. US:1983.

[10] GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ J C, PEÑA A. Strategies of adaptation of halophilic microorganisms and *Debaryomyces hansenii* (halophilic yeast) [J]. Revista Latinoamericana de Microbiología, 2002, 44(3/4):137-156.

[11] COJOC R, NEAGU S, POPESCU G T, et al. Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal [J]. Romanian Biotechnological Letters, 2009, 14(5):4658-4664.

(责任编辑:米慧芝)