应用与环境生物学报 2010, **16**(1): 096~099
Chin J Appl Environ Biol=ISSN 1006-687X
2010-02-25
DOI: 10.3724/SP.J.1145.2010.00096

短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因的随机突变*

杨 锦 冯 红 万民远 焦惠科 张晓露 张义正**
（四川大学生命科学学院四川省分子生物学及生物技术重点实验室 成都 610064）

摘 要 碱性蛋白酶（DHAP）属于丝氨酸蛋白酶家族（S8A），是由275个氨基酸残基组成的单链多肽，没有二硫键，以Asp32、His64、Ser221作为活性中心. 采用易错PCR方法，对短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因（GenBank登录号：AY458140）进行随机突变. 在大肠杆菌中建立随机突变文库，然后转化枯草芽孢杆菌WB600，构建枯草芽孢杆菌突变文库，筛选出酶活性提高或最适反应温度和pH值有所降低的突变体. 通过3轮的随机突变和筛选，获得2个阳性突变体pP43AP-M166和pP43AP-M375. 其中pP43AP-M166在不同的温度和pH条件下，与出发菌株相比，酶活都有不同程度提高，特别是当反应温度为50 ℃、pH 为10时，突变蛋白酶酶活性提高1.23倍，表现出很好的热稳定性. 测序结果表明，该突变体含有一个氨基酸置换，位于碱性蛋白酶催化三联体活性中心His64旁，与其只有一个氨基酸残基相隔. 图4 表3 参21

关键词 碱性蛋白酶；短小芽孢杆菌；定向进化；易错PCR；序列分析；基因表达
CLC Q939.106 : X172

Random Mutation of Alkaline Protease Gene in *Bacillus pumilus**

YANG Jin, FENG Hong, WAN Mingyuan, JIAO Huike, ZHANG Xiaolu & ZHANG Yizheng**
(*Sichuan Key Laboratory of Molecular Biology & Biotechnology, College of Life Sciences, Sichuan University,* Chengdu 610064, China)

Abstract De-hair alkaline protease (DHAP), belonging to serine protease family (S8A), is composed of 275 amino acid residues with Asp32, His64 and Ser221 as activity centers, and has no disulfide bond. Random mutation of DHAP gene (NCBI No: AY458140) from *Bacillus pumilus* was carried out with modified prone-error PCR. A random mutation library was constructed in *Escherichia coli* DH5α and then in *B. subtilis* WB600. The capacity of the random mutation library is 4×10^5. After three sequential error-prone PCR followed by screening, pP43AP-M166, the expected mutant with improved properties was obtained. Compared with the wild type, pP43AP-M166 has improved its activity and stability under different pH and temperatures. Moreover, its activity was determined, and it was 1.23 fold higher than that of wild type under optimal reaction temperature at 50 ℃ and pH 10, while it showed excellent thermal stability. The gene sequence analysis indicated that the mutant enzyme had F62C. The position of mutant AA has only one AA separated from His64, which is the most significant composition of catalytic activity center. Fig 4, Tab 3, Ref 21

Keywords alkaline protease; *Bacillus subtilis*; directed evolution; prone-PCR; sequence analysis; gene expression
CLC Q939.106 : X172

皮革工业在创造巨大经济价值的同时，也给环境带来了严重的危害. 制革污染主要来自于灰碱法脱毛的过程，采用蛋白酶法脱毛是从根本上解决制革工业严重污染的有效途径[1~3]. 本实验室从多个富含蛋白质的土样中，筛选到一株碱性蛋白酶产生菌——短小芽孢杆菌（*Bacillus pumilus*）BA（06），经反复诱变后得到一株碱性蛋白酶高产菌株*B. pumilus* UN-31-C-42，该菌株的发酵液有较好的生皮脱毛效果，脱毛后毛皮胶原蛋白保持完整[4~5]. 研究发现该菌株只分泌一种胞外蛋白酶，属于丝氨酸蛋白酶系，相对分子质量（M_r）约为30×10^3，纯化后，发现最适反应温度是58 ℃，最适pH为10，pI为9，Ca^{2+}能提高酶稳定性[6]. 黄庆等利用PCR从该短小芽孢杆菌中扩增出碱性蛋白酶基因[7~8]，利用不同的启动子实现了该基因在枯草芽孢杆菌中的异源表达[9].

对碱性蛋白酶的前期研究表明，其蛋白酶的产量、酶活性，以及酶的最适反应温度和pH值都应进一步改善，以便在制革工业上应用，酶的产量已经通过更换高效率的启动子得到一定提高. 分子定向进化是改变酶性质的有效途径，通过对蛋白酶编码基因进行随机突变和重组，定向选择出所需性质的蛋白酶. 本研究主要是通过对碱性蛋白酶基因进行分子定向进化，筛选到酶活性有所提高或是反应最适温度降低的突变基因. 利用易错PCR方法对碱性蛋白酶基因进行多轮突变，结合三重筛选方法，成功获得两个突变体，分别称为pP43AP-M166、pP43AP-M375；对其表达的蛋白酶进行了纯化，测定了突变蛋白酶最适反应温度和pH值，同时进行了热稳定性分析.

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 **菌种与质粒** *Escherichia coli* DH5α: F^- *φ80 lacZΔM15 Δ*(*lacZYA-argF*) *U169 endA1 recA1 hsdR17* (rK^-, mK^+) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1 phoA*，本室保存.

B. subtilis WB600 : *trpC2 nprA arp epr bpf mpr nprB, Cm*^{r},

收稿日期：2009-02-12 接受日期：2009-04-03
*国家高技术研究发展计划（No. 2006AA02Z221）资助 Supported by the National High-tech R & D Program of China (No. 2006AA02Z221)
**通讯作者 Corresponding author (E-mail: yizzhang@scu.edu.cn)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用于DHAP基因的表达, 由加拿大Calgary大学Dr. Wong惠赠.

短小芽孢杆菌(*B. pumilus*) UN-31-C-42: 自成都市生活垃圾分离、诱变所得, 其分泌的蛋白酶有良好的脱毛效果, 且胶原水解活性极低[4].

1.1.2 **质 粒**　pSUGV4: 6.4 kb, *Kan*^{r} *Ap*^{r}, *E. coli-B. subtilis*穿梭载体, 由本实验室构建, 其多克隆位点区与pUC18的多克隆位点区相同[10].

pP43AP: 7.6 kb, P43启动子, DHAP连接到质粒pSUGV4中的表达质粒, 本实验室构建, 主要用作突变蛋白酶基因文库的构建和突变基因的表达.

1.1.3 **主要试剂**　Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司(Takara), DNA限制性内切酶购自Fermentas公司产品, PCR产物快速胶回收试剂盒和小量质粒抽提试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术公司, AAPF (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA)购自Sigma公司, 其他试剂均为国产分析纯试剂. DNA序列测定及引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成.

1.2 方 法

1.2.1 **易错PCR(Error-prone PCR)扩增AP基因**　根据本实验室已扩增的DHAP基因[7](GenBank登录号: AY458140)序列设计引物, 以pP43AP为模板, 用改良后的易错PCR方法扩增碱性蛋白酶基因, 得到的产物用胶回收试剂盒纯化.

1.2.2 **随机突变文库构建**　由于枯草芽孢杆菌的转化方法和转化效率远远低于大肠杆菌, 要在枯草芽孢杆菌中建立基因的随机突变库以进行目的基因的筛选通常有较大难度, 因此本研究先在大肠杆菌中建库, 再将重组子转入枯草芽孢杆菌中建库.

纯化后的易错PCR产物与双酶切(*Hin*d Ⅲ/*Pst*Ⅰ)的pP43AP大片段相连, 转化*E. coli* DH5α [11, 19], 建立了大肠杆菌随机突变文库, 再将所有的突变子转化枯草芽孢杆菌WB600 [12], 构建枯草芽孢杆菌随机突变文库.

1.2.3 **筛 选**　突变文库菌液适当稀释, 均匀涂布含有卡那霉素的牛奶平板, 37 ℃恒温培养12~16 h, 对突变文库进行初筛.

挑选水解圈出现时间早和水解圈大的突变子, 接种到每孔含1 mL优化发酵培养基[4](麸皮2.5%, 黄豆粉2%, 酵母膏0.3%, K_2HPO_4 0.4%, NaH_2PO_4 0.04%, $CaCO_3$ 3%)的96孔板中, 37 ℃摇床培养48~60 h, 发酵液与AAPF反应, 在酶标仪(MQX 200)上测定410 nm处OD值. 挑选出具有较高OD值的突变株, 进行试管发酵, 发酵上清液测定酶活.

1.2.4 **蛋白酶活性测定**　以酪素为底物, 采用福林酚法[6]测定酶活.

1.2.5 **突变株蛋白酶纯化以及Bradford法测定蛋白含量**　酶的纯化方法参照文献[6], 蛋白质含量测定采用Bradford法[13], 用BSA做标准曲线.

1.2.6 **pH值对蛋白酶活性的影响**　纯化后的蛋白酶分别溶解在pH为7.0、8.0、9.0、10.0、11.0的缓冲液中, 按照福林酚法测酶活. 以相对酶活对反应pH值作图, 确定突变蛋白酶的最适反应pH值, 以及与对照相比, 酶活性提高程度.

1.2.7 **温度对蛋白酶活性的影响**　蛋白酶在25 ℃、37 ℃、50 ℃反应10 min, 按照福林酚法测酶活. 以相对酶活对反应温度作图, 确定突变蛋白酶的最适反应温度, 以及酶活提高比例.

1.2.8 **酶的热稳定性分析**　将酶分别在60 ℃、65 ℃、70 ℃、75 ℃、80 ℃放置30 min, 冰浴10 min, 按照福林酚法测酶活. 未经过热处理的酶在最适条件下测定的酶活设为100%, 将经过热处理后的酶活折合成相对剩余酶活, 对温度作图, 用于确定酶的热稳定性.

1.2.9 **阳性突变株碱性蛋白酶基因序列测定、结构预测和位点突变分析**　蛋白酶的基因测序由华大公司完成. 在SWISS-MODEL数据库输入突变蛋白的氨基酸序列, 预测蛋白的三级结构, 分析位点突变效应.

2 结果与分析

2.1 易错PCR突变文库的构建及突变基因筛选

按照上述的方法和建库过程, 在枯草芽孢杆菌中成功构建了短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因突变文库, 文库含有40 000个转化子. 随机挑取24个转化子提取质粒, 电泳结果显示, 它们的大小与质粒pP43AP一致; 对重组质粒进行双酶切(*Hin*d Ⅲ/*Pst*Ⅰ), 也能得到预期大小的片段, 表明它们都是重组子, 因此, 构建的突变体文库的重组率为100%.

将文库进行适当稀释后均匀涂布在牛奶平板上进行初筛. 培养12 h后, 平板上开始出现水解圈, 挑选水解圈出现时间早和水解圈大的突变子, 共挑取了2 534个重组子, 挑选的频率约为6%.

在低温酶活和热稳定性2个筛选指标下, 经酶标仪复筛后, 挑出36个潜在阳性突变子. 对它们进行发酵筛选, 发酵液在紫外分光光度计下进行酶动力学分析, 再结合福林酚法测定酶的活性数据, 成功挑选到2个阳性突变子, 分别命名为pP43AP-M166、pP43AP-M375, 其蛋白酶分别命名为DHAP-M166、DHAP-M375.

2.2 蛋白酶基因测序和突变位点分析

对pP43AP-M166、pP43AP-M375进行序列测定, 结果表明, 两个突变蛋白酶都发生了氨基酸突变, 并且都是由于单碱基的替换造成的. pP43AP-M166的置换氨基酸是F62C, 位于成熟肽N端, 在活性位点His64旁边; pP43AP-M375的置换氨基酸是I271T, 位于成熟肽C端.

根据两个突变子的基因序列, 在SWISS-MODEL数据库中预测蛋白酶三级结构. 预测结果表明, 两个突变子的三级结构基本与DHAP一致, 没有变化.

2.3 突变蛋白酶的酶学性质

2.3.1 **碱性蛋白酶纯化及鉴定**　分别培养1.5 L 的pP43AP、pP43AP-M166、pP43AP-M375, 发酵液离心后的上清液经过60%硫酸铵沉淀, 凝胶层析(Sephacry S-200), 磷酸缓冲液透析, 冻干, 然后进行SDS-PAGE电泳(图1), 得到了较纯的蛋白酶.

2.3.2 **温度对突变碱性蛋白酶活性的影响**　按照Bradford法测定的蛋白质含量, 在pH 9.6的硼酸–NaOH缓冲液中, 取适量的纯化酶液, 分别在25 ℃、37 ℃、50 ℃反应10 min测定酶活(表1). 温度对突变碱性蛋白酶活性影响的方差分析表明, 温度对蛋白酶活性的影响极其显著, 同一温度下碱性蛋白酶之间的差异也是显著的.

如图2所示, 碱性蛋白酶低温(25 ℃、37 ℃)的酶活性不

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

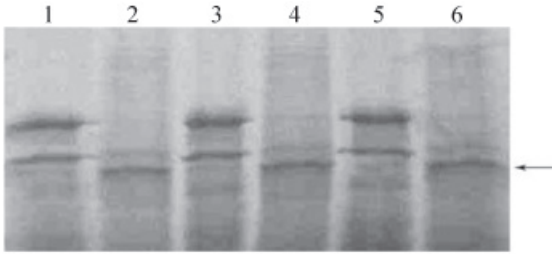

图1 突变碱性蛋白酶的SDS-PAGE分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of mutated alkaline proteases

Lanes 1, 3 and 5: DHAP, DHAP-M166 and DHAP-M375 without purification; Lanes 2, 4 and 6: Purified products (arrow) of DHAP, DHAP-M166 and DHAP-M375

表1 温度对突变碱性蛋白酶活性的影响

Table 1 Effect of temperature on the activity of mutated alkaline proteases

Protease activity (A/u mL^{-1})	θ/℃					
	25		37		50	
DHAP	354	0.29*	542	0.45	1215	1
DHAP-M166	482	0.30	716	0.45	1590	1
DHAP-M375	403	0.29	594	0.43	1384	1

*The ratio of enzyme activity at 25 ℃ to that at 50 ℃. The other ratios are the same

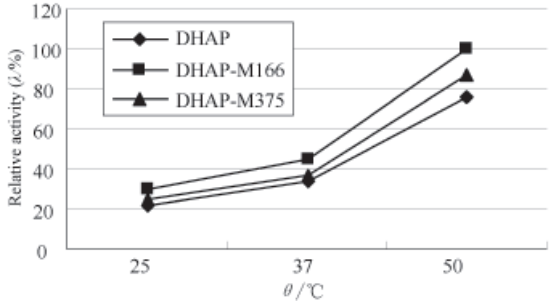

图2 温度对碱性蛋白酶相对活性的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the relative activity of alkaline protease

表2 pH值对突变碱性蛋白酶活性的影响

Table 2 Effect of pH on the activity of mutated alkaline proteases

Proteases activity (A/u mL^{-1})	pH				
	7	8	9	10	11
DHAP	285	880	1119	1227	926
DHAP-M166	289	995	1296	1578	944
DHAP-M375	260	898	1117	1376	937

及最适反应温度（50 ℃）酶活性的50%，尤其在25 ℃，酶活仅为最高酶活的30%左右. 突变株pP43AP-M166的酶活性普遍比对照高，在低温（25 ℃）时，酶活性提高1.1倍；最适温度（50 ℃）酶活性提高1.22倍.

2.3.3 **pH值对突变碱性蛋白酶活性的影响** 按照Bradford法测定的蛋白质含量，取适量的纯酶液，分别在pH值为7.0、8.0、9.0、10.0、11.0的缓冲液中，50 ℃反应10 min后测定酶活（表3）. 由图3可知，3种碱性蛋白酶的反应最适pH值为10；但在pH 7时，蛋白酶的活性仅为最高酶活的20%左右；在最适pH值条件下，突变株pP43AP-M166的相对酶活比对照高1.23倍.

2.3.4 **突变碱性蛋白酶的热稳定性分析** 按照Bradford法测定的蛋白质含量，取适量的酶液，将酶溶解在pH 9.6的硼酸

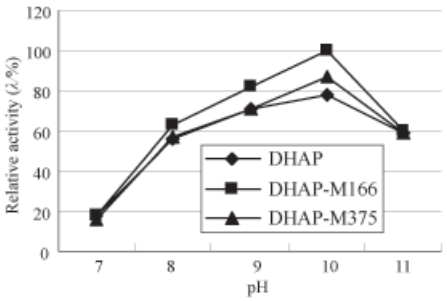

图3 pH值对碱性蛋白酶相对活性的影响

Fig. 3 Effect of pH on the relative activity of alkaline protease

表3 突变碱性蛋白酶热稳定性分析

Table 3 Analysis of the thermal stability of mutated alkaline proteases

Protease activity (A/u mL^{-1})	θ/℃				
	60	65	70	75	80
DHAP	1042	1038	650	187	0
DHAP-M166	1263	1243	927	236	0
DHAP-M375	1147	1089	757	204	0

缓冲液中，在60 ℃、65 ℃、70 ℃、75 ℃、80 ℃放置30 min，冰浴10 min，在50 ℃反应10 min，测定剩余酶活（表4），绘制热失活曲线（图4）. 如图4所示，突变碱性蛋白酶在65 ℃放置30 min，活性仍可达到最适条件下酶活性的90%以上，由此可见突变蛋白酶在酶活性提高的同时，其热稳定性并没有降低.

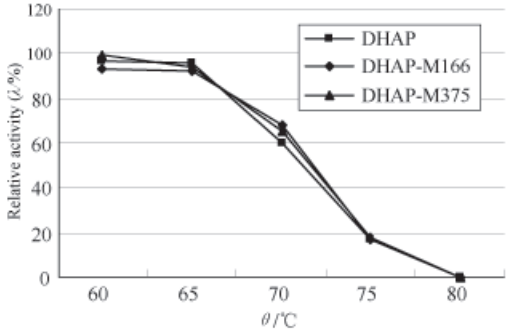

图4 突变碱性蛋白酶的热稳定性分析

Fig. 4 Analysis of the thermal stability of mutanted alkaline proteases

3 讨 论

3.1 突变文库筛选

随机突变文库构建后，一个高灵敏度、高效率的筛选方法是至关重要的，决定着实验的成败[14~17]. 常用的筛选方法有：利用底物显色反应，改变培养条件（如逐步提高培养温度，或改变培养基的pH值等），利用蛋白质的固有性质，如产生绿色荧光，或高通量筛选（HTS）. 在本研究中，突变株分泌的碱性蛋白酶能够水解脱脂牛奶，能够在牛奶平板上形成大小不等的水解圈，并且水解圈的大小和酶的活性有一定的线性关系. 因此，选择这种半定量的方法对突变文库进行初筛，大大增加了突变库的筛选容量，降低了筛选强度. AAPF能够与碱性蛋白酶反应，产物在410 nm处有最大吸收峰，与碱性蛋白酶活性呈线性关系，结合酶标仪的高通量筛选和紫外分光光度计的高准确度筛选，大大提高了筛选的效率和准确度；再用福林酚显色法进行第3轮的筛选，确保能够筛选

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

到所需要的目的突变基因. 因此, 这种3重筛选方法, 扩大了筛选容量, 提高了筛选效率.

3.2 影响蛋白酶活性的突变位点

碱性蛋白酶(DHAP)由一条肽链折叠而成, 无二硫键, 属α/β型蛋白质, 其三级结构只有1个域, 由4个α螺旋环绕5个β链组成. 在分子表面, 除了有许多水分子的结合位点外, 还有几个钙离子的结合部位[18]. 由残基Ser221、His64和Asp32构成丝氨酸蛋白酶的催化三联体, 也处于分子表面一浅沟槽里, 形成一个Oxyanion Hole, Ser是亲核体, His是质子受体, 而Asp起固定质子受体的作用[20]. 本研究所获得的突变体DHAP-M166碱性蛋白酶62位上的氨基酸残基由Cys取代Phe, 与催化三联体的活性中心His64只有1个氨基酸残基相隔, 影响活性中心周围的电极性, 有利于His64与质子的结合和过渡态复合物的稳定, 同时又大大减小了质子与His64结合的空间位阻, 更加有利于活性中心与质子的结合.

Thermitase和蛋白酶K对热有一定的抵抗能力, 都在活性中心位点附近有一个自由巯基[21]. 由此可以推测突变体DHAP-M166蛋白酶Cys取代Phe, 在活性中心His64旁添加一个自由巯基, 增强了碱性蛋白酶的热稳定性. 同时巯基有利于形成分子间二硫键, 实现蛋白酶分子间的相互协作, 共同催化底物.

References

1 Jonczyk W, Studniarski K. Enzyme dehairing of pigskins. *Soc Leather Technol Chemists*, 1986, **72**: 83~88

2 Puvanakrishnan, Dhar. Recent advances in the enzymatic depilation of hides and skins. *Leather Sci*, 1986, **33**: 177~191

3 Paul RG, Davighi D, Addy VL, Covington AD. The use of neutral protease in enzymatic unhairing. *Am Leather Chem Ass*, 2001, **96**: 180~185

4 Wang HY, Liu DM, Liu Y, Cheng CF, Ma QY, Huang Q, Zhang YZ. Screening and mutagenesis of a novel *Bacillus pumilus* strain producing alkaline protease for dehairing. *Lett Appl Microbiol*, 2007, **44**: 1~6

5 张义正, 刘德明, 李珉, 刘彦, 程昌凤, 黄庆. 脱毛蛋白酶、其制造方法、使用方法和生产此蛋白酶的微生物. 中国, ZL00120641.9. 2007

6 Huang Q, Peng Y, Zhang YZ. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Curr Microbiol*, 2003, **46**: 169~173

7 Huang Q (黄庆), Pan J (潘皎), Peng Y (彭勇), Li X (李昕), Zhang YZ (张义正). 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)脱毛蛋白酶基因的克隆与序列分析. 高技术通讯, 2004, **14** (158): 31~35

8 张义正, 黄庆, 李珉, 潘皎, 王海燕. 脱毛蛋白酶和编码这种脱毛蛋白酶的多核苷酸. 中国, ZL03135279.0. 2008

9 Pan J, Huang Q, Zhang YZ. Gene cloning and expression of an alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Curr Microbiol*, 2004, **49**: 165~169

10 Liu CJ, Zhang YZ. Construction of a *Escherichia coli-Bacillus subtilis* shuttle vector pSUGV4. *J Sichuan Univ Nat Sci Ed*, 2001, **38** (2): 243~245

11 Hiroaki I, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene,* 1996, **96**: 23~28

12 Dubnau D, Davidoff-Abelson R. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis* formation and properties of the donor recipient complex. *Mol Biol,* 1971, **56**: 209~221

13 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**: 248~250

14 Sun B (孙博), Wang J (王捷). 蛋白质分子体外定向进化研究进展. *J Practical Med* (实用医学杂志), 2006, **22** (11): 1335~1336

15 Amstutz P, Forrer P, Zahnd C, Pluckthun A. *In vitro* display technologies: novel developments and applications. *Curr Opin Biotech*, 2001, **12**: 400~405

16 Soumillion P, Fsstrez J. Novel concepts for selection of catalytic activity. *Curr Opin Biotech*, 2001, **12**: 387~394

17 Heruberg RP, Pope AJ. High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Curr Opin Chem*, 2000, **4**: 445~451

18 Bi RC (毕汝昌), Chu NM (储乃明). 枯草杆菌蛋白酶与蛋白质工程. *Progr Biochem & Biophys* (生物化学与生物物理进展), 1991, **18** (5): 329~335

19 Tang XM (唐雪明), Shao WL (邵蔚蓝), Shen W (沈微), Wang ZX (王正祥), Fang HY (方惠英), Zhuge J (诸葛健). Cloning, expression and sequence analysis of the gene encoding alkaline protease from *Bacillus licheniformis* 2709 and 6816 in *E. coli*. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2002, **2**: 209~214

20 Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 5th ed. New York, USA: Freeman Publishers, 2002

21 Betzel C, Teplyakov AV, Harutyunyan EH, Saenger W, Wilson KS. Thermitase and proteinase K: A comparison of the refined three-dimensional structures of the native enzymes. *Protein Eng*, 1990, **3** (3): 161~172

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net