

通过定点突变增强纳豆激酶的热稳定性

刘中美, 何孝天, 崔文璟, 周哲敏

(江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘要: 血栓导致的心脑血管疾病是当前危害人类健康、导致死亡率最高疾病之一, 因此近年来溶栓药物及具有溶栓功能保健食品的研发进展得十分迅速。纳豆激酶因其特有的高效溶血栓作用, 成为国内外科研热点之一。本研究针对目前纳豆激酶稳定性的问题, 以纳豆激酶的晶体结构和序列比对为基础, 通过定点突变构建组纳豆激酶突变体, 对可能影响纳豆激酶热稳定性的氨基酸进行研究。在构建的 5 个突变体中, P14L、N76D 两个突变体的热稳定性有明显提高, 在 65 °C 下的半衰期由 20 min 分别提高为 30 min 和 50 min。同源建模和分子动力学研究结果表明, 这两个氨基酸位点是通过不同机理对纳豆激酶催化活性以及热稳定性产生的重要作用。本研究可为纳豆激酶的基因工程改造以及其生产和应用提供理论基础和技术支持。

关键词: 纳豆激酶; 定点突变; 热稳定性; 枯草芽孢杆菌

文章编号: 1673-9078(2015)2-37-41

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.007

Enhancing Thermostability of Nattokinase by Site-directed Mutagenesis

LIU Zhong-mei, HE Xiao-tian, CUI Wen-jing, ZHOU Zhe-min

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Cardiovascular and cerebrovascular diseases caused by thrombi are often life-threatening, contributing to the highest mortality rate. This has fuelled rapid development of thrombolytic drugs and functional foods with thrombolytic activity in the past few years. Due to its strong thrombolytic effect, nattokinase (NK) has become the focus of international interest. The aim of this study was to enhance the thermostability of NK. Based on its sequence alignments and crystal structure, NK mutants were prepared by site-directed mutagenesis and the amino acids that might affect NK thermostability were studied. Among the five mutants generated in this study, P14L and N76D showed significantly increased thermostability and their half-life at 65 °C improved from 20 min (wild type) to 30 and 50 min, respectively. Homology modeling and molecular dynamics analysis showed that two amino acid sites influenced thermostability and catalytic activity of NK through different mechanisms. This study provides a theoretical and technical basis for the genetic reconstruction, production, and application of NK.

Key words: nattokinase; site-directed mutagenesis; thermostability; *Bacillus subtilis*

纳豆激酶是由日本传统发酵食品纳豆发酵而生成的。纳豆激酶以其特有的溶栓功效很快成为国内外保健食品的研究与开发的热点。1987年, 日本学者须见洋行等首次从纳豆中分离纯化得到一种具有高效溶血栓作用的蛋白酶, 因其与链激酶、尿激酶等溶血栓药物具有同样的功能, 故最初被命名为纳豆激酶(nattokinase, NK)^[1]。纳豆激酶以其特有的溶栓功效很快成为国内外的科研热点。自从1987年被发现以后, 其分子水平的研究取得了很大进展: 1992年 Nakamura 首次报道了其基因序列、转录调控区域^[2];

收稿日期: 2014-07-21

基金项目: 留学回国人员科研启动基金(第47批); 863科技计划项目(2014AA02130)

作者简介: 刘中美(1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生物酶学、蛋白质工程

通讯作者: 周哲敏(1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物酶学、发酵工程

随后, 其活性位点、底物结合位点、催化机制、重要酶学性质等都得到了深入解析与研究^[3]; 通过定点突变技术等对纳豆激酶进行分子改造, 使其酶活力、半衰期、热稳定性均得到了不同程度的提高^[4~5]。2010年 Yanagisawa 等人获得了纳豆激酶结晶, 使其三维晶体结构得到解析^[6]。

对于纳豆激酶基因工程方面的研究也有诸多报道。1999年, 刘北域等从纳豆芽孢杆菌基因组中扩增了纳豆激酶原基因和全长基因, 实现了纳豆激酶在大肠杆菌中的表达; 2002年该课题组又构建了穿梭表达质粒, 实现了枯草芽孢杆菌中的成功表达。2013年 Nguyen 等^[7]采用基因工程方法克隆了来源于 *Bacillus subtilis* VTCC-DVN-12-01 的纳豆激酶基因并在缺陷型菌株 WB800 中进行了高效表达。本课题组也已通过信号肽筛选构建了重组纳豆激酶的高效分泌表达质粒, 表达量达到 190 mg/L^[8]。

本研究旨在通过分子改造提高纳豆激酶的热稳定

性, 将有助于在工艺生产高温环节中保证酶活, 并延长其在机体内的作用时间, 促进纳豆激酶作为溶栓剂的开发与应用。Zhao 等^[9]通过 Staggered Extension process (交错延伸技术, StEP) 技术获得热稳定性有显著提高的枯草芽孢杆菌蛋白酶 E (subtilisin E), 并对 subtilisin E 的热稳定性具有促进作用的突变点进行了归纳总结。纳豆激酶同 subtilisin E 均有 276 个氨基酸, 同源性高达 99%。本研究参照 Zhao 等的实验结果, 对纳豆激酶进行定点突变以期提高热稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与质粒

枯草芽孢杆菌 WB600、*Escherichia coli* JM109、质粒载体 pMA0911 均由本实验室保存。

1.1.2 试剂与仪器

Pfu DNA 聚合酶购自日本宝生物工程(大连)有限公司, 质粒 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒均购自上海生物工程公司, 凝血酶、牛纤维蛋白原、巴比妥钠购自 Sigma 公司, 其它试剂均为国产或进口分析纯。

AKTAPRESS 蛋白纯化系统, 通用电气(中国)医疗器械集团; HiTrap SP HP (1mL), 通用电气(中国)医疗器械集团; UV1100 紫外-可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司。

1.1.3 枯草芽孢杆菌表达培养基

成分为: 12 g/L 蛋白胨、24 g/L 酵母粉、4 mL/L 甘油、2.3 g/L KH₂PO₄、16.4 g/L K₂HPO₄·3H₂O、0.2 g/L CaCl₂。

1.2 方法

1.2.1 定点突变

表 1 点突变引物序列

Table 1 Primer sequences for site-directed mutagenesis

Mutants	Sequence (5'-3')
S9F-F	GTTCCCTTATGGCATT <u>TTT</u> TCAAATTAAGC
S9F-R	GCGCTTAATTTGAAAAATGCCATAAGG
P14L-F	CTCAAATTAAGCGCTGGCTCTTCACTC
P14L-R	CCTTGAGAGTGAAGAGCCAGCGCTTAAATTTG
S37T-F	CGACAGCGGAATTGACACGTCTCATCC
S37T-R	CGTTTAAAGTCAGGATGAGACGTTGTCATTC
N76D-F	CGATTGCCGCTCTTGATAACTCAATCG
N76D-R	CAGAACACCGATTGAGTTATCAAGAGCGGC
S161C-F	CGAAGGTTTCATCCGGATGCACAAGCACAGTC
S161C-R	GTAGCCGACTGTGCTGTGCATCCGGATGAACC

注: 突变位点为下划线部分。

以质粒载体 pMA0911-wapA-pro-nk^[8]为模板设计引物(表 1)进行全质粒扩增, 将所获得 PCR 产物用 Dpn I 消化甲基化模版 pMA09-wapA-pro-nk 后, 转化入 *E. coli* JM109 中, 得到突变体 S9F、P14L、N76D、S37T、S161C, 以上所有质粒均经过测序验证。

1.2.2 重组质粒在枯草杆菌表达系统中的表达及纯化

将测序正确的重组质粒转化枯草芽孢杆菌 WB600, 挑取平板单菌落, 接种于 5 mL 含 100 g/mL 卡那霉素的表达培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡过夜培养。将 1 mL 上述过夜培养物接种于 100 mL 含 100 g/mL 卡那霉素的表达培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养至 48 h 左右。8000 r/min 离心后留取上清进行硫酸铵盐析, 收集硫酸铵饱和度 40%~60% 下的蛋白沉淀于 Buffer A (20 mM 磷酸盐缓冲液, pH 6.0) 过夜透析, 经过阳离子交换层析柱 HiTrap SP HP 纯化目的蛋白, 采用 Buffer B (含有 1 M NaCl 的 20 mM 磷酸盐缓冲液, pH 6.0) 进行线性洗脱。按峰来收集样品, 将收集的样品进行 SDS-PAGE 及活性分析。蛋白质定量采用常规的 Bradford 法, 采用牛血清蛋白为标准蛋白。

1.2.3 热稳定性提高突变体的初步筛选

纤维蛋白平板的制备参照文献^[10], 于制作好的纤维蛋白平板上打孔。取各突变重组质粒及原始重组质粒在枯草芽孢杆菌 WB 600 中表达 48 h 后的发酵上清液 100 L, 于 65 °C 下热处理 30 min。于制作好的纤维蛋白平板上打孔, 每孔点样热处理后的样品各 20 L, 37 °C 下温育 5 h, 比较形成的透明圈的大小。

1.2.4 原始纳豆激酶及突变体在 65 °C 下热稳定性的测定

取适量纳豆激酶以及各突变体的纯酶液溶解于 Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中, 在 65 °C 下分别孵育 10、20、30、40、50、60 min, 采用紫外分光光度计法测定剩余的酶活。将最高的酶活力定义为 100%, 并以相对酶活的百分比对时间作图。

1.2.5 紫外分光光度计法测定酶活

紫外分光光度计法测定纳豆激酶活性参照日本纳豆激酶协会建立的方法(http://j-nattokinase.org/jnka_nk_english.html), 并稍作改进。取 1.4 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液与 0.4 mL 0.72% (m/V) 的纤维蛋白原溶液混匀后, 37 °C 放置 5 min。向上述溶液中加入 0.1 mL 凝血酶溶液 (20 U/mL) 充分混匀, 37 °C 放置 10 min。再向上述反应体系中加入 0.1 mL 稀释的酶液充分混匀, 于 37 °C 水浴中保温反应, 分

别在反应开始后的 20 min 和 40 min 时,分别混匀 10 s。在准确计时 60 min 后加入 2 mL 0.2 mol/L 的三氯乙酸终止反应,并在 37 °C 水浴中再保温 20 min。上述反应液于 15000 r/min 下离心 10 min,测定离心上清液在 275 nm 处的吸光值。一个酶活力单位 (FU) 定义为在 37 °C、pH 8.0 的条件下,每分钟在 275 nm 处吸光值变化 0.01 所需的酶量。比酶活定义:每 mg 蛋白所含的酶活力单位数,即比活力=活力 FU/mg 蛋白。

1.2.6 同源建模与分子动力学分析

以蛋白质数据库中纳豆激酶的晶体结构(PDB: 4DWW)为模板,采用 Discovery Studio 进行同源建模,建模之后用分子模拟手段对结果进行修正。

对模拟好的结构用 namd 软件进行分子动力学模拟分析。其步骤是先加大小合适的水盒子,再使体系呈电中性,然后进行体系能量最小化,最后是实际的计算机分子动力学运算。一般来讲体系运行得时间越长越可信,本实验中体系在平衡相中能量优化至少超过 5 ns,条件允许的话要重复进行分子动力学分析,以确保模拟结果的准确度。对动力学的结果,采用 vmd 软件分析,然后用 Pymol 作图。

2 结果与讨论

2.1 热稳性改造突变点设计

本研究参照 Huimin Zhao 等的实验结果,将纳豆激酶与 subtilisin E 进行氨基酸序列比对(图 1),在其中选取了 5 个氨基酸位点进行突变。

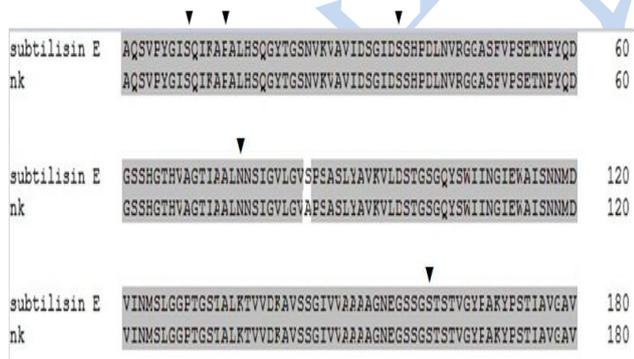


图 1 氨基酸序列比对

Fig.1 Sequence alignment of nattokinase and subtilisin E

注: ▼表示突变位点。

2.2 突变体初步筛选

突变体及原始酶在 65 °C 热处理 30 min 后酶活情况如图 2 所示。由结果可见,突变体 P14L、N76D 热处理后其活性与原始酶及其它三个突变体相比较,于是选择这两个突变体作为进一步研究对象。

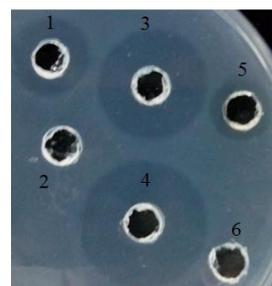


图 2 重组纳豆激酶的纤溶活性分析

Fig.2 Fibrinolytic activity of wild-type nattokinase and mutants

注: 1-原始纳豆激酶(对照); 2-S9F; 3-P14L; 4-N76D; 5-S37T; 6-S161C。

2.3 突变体 P14L、N76D 的纯化与热稳定性测定

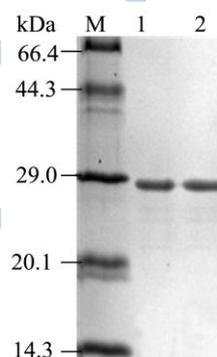


图 3 纳豆激酶突变体纯化 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE results for purified nattokinase mutants

注: M-蛋白分子量标准; 1-P14L; 2-N76D。

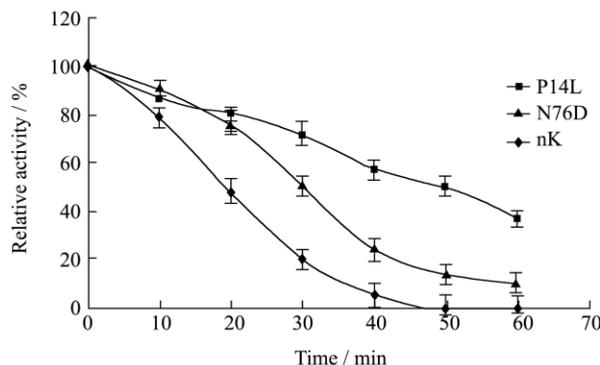


图 4 野生型及各突变体在 65 °C 下的热稳定性

Fig.4 Thermostability of wild-type and mutant nattokinases

将突变体 P14L、N76D 进行分离纯化,利用 Hitrap SP HP 阳离子交换柱经过一步纯化即可得到较纯的目的蛋白(图 3)。原始纳豆激酶及突变体 P14L 和 N76D 在 65 °C 下孵育不同时间后,其酶活变化如图 3 所示。由实验结果可以看出,原始酶在 65 °C 下的半衰期约为 20 min (半衰期是以 10 min 为单位测定),N76D 突变体在 65 °C 下的半衰期延长至 30 min 以上, P14L

突变体半衰期约为 50 min, 为原始酶的 2.5 倍。两个突变体的热稳定性有了显著提高。

2.4 突变体 P14L、N76D 比酶活测定

表 2 突变体酶活测定

Table 2 Specific activity of mutant nattokinases		
纳豆激酶	比酶活 [FU/mg]	相对酶活/%
P14L	684±41	65
N76D	736±52	70
Wild-type	1052±53	100

突变体 P14L、N76D 的酶活性有不同程度的损失。比酶活测定结果如表 2 所示, P14L、N76D 突变体比酶活分别为原始酶的 65% 和 70%, 表明这两个氨基酸位点对于纳豆激酶的催化活性也具有一定的影响。

2.5 热稳定性提高的突变酶的耐热机理分析

根据纳豆激酶的晶体结构, 如图 5a 所示, Pro14 为刚性氨基酸, 与周围氨基酸之间不存在相互作用。将 14 位的 Pro 突变为 Leu, 通过同源建模 (图 5b) 发现, 14 位的 Leu 与 17 位的 His 之间存在氢键相互作用, 使得 14 位的 Leu 参与形成 α 螺旋。同时 14 位的 Pro 突变为 Leu 之后, Pro 所在区域由转角结构 (Turn) 转变为 loop 结构, 稳定了原来 Turn 区两侧的 α 螺旋, 从而其热稳定性有一定程度的提高。

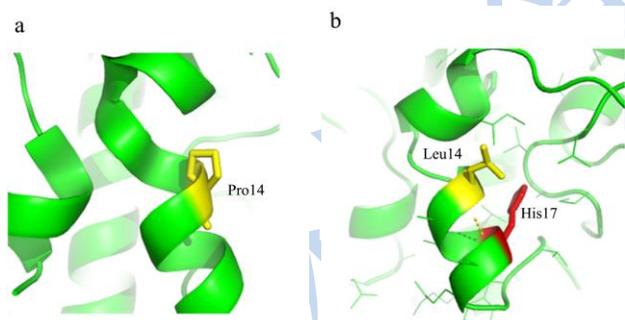


图 5 原始酶及 P14L 突变体三维结构

Fig.5 Three-dimensional crystal structures of wild-type and the mutant nattokinase, P14L

注: a: 原始酶; b: P14L。

枯草芽孢杆菌蛋白酶一个共有特征即是含有一或两个 Ca^{2+} 结合位点, 与 Ca^{2+} 结合可影响热失活速度。根据纳豆激酶的晶体结构, 可知在原始纳豆激酶当中 76 位 Asn 的 $\text{O}^{\delta 1}$ 和 2 位 Gln 的 $\text{N}^{\epsilon 2}$ 之间形成氢键, 同时 2 位的 Gln 与 Ca^{2+} 之间也存在一定的相互作用 (图 6a)。通过同源建模发现, 76 位 Asn 突变为 Asp 导致与 2 位的 Gln 之间氢键缺失 (图 6b)。一方面, 这可能赋予了 2 位 Gln 更大的柔性, 更有利于 2 位 Gln 与 Ca^{2+} 之间相互作用, 从而使突变体 N76D 的热稳定性得到

增强。另一方面, 76 位的 Asn 突变为带有负电荷的 Asp, 可能增强了 Ca^{2+} 与结合位点的静电吸引, 从而提高了热稳定性。

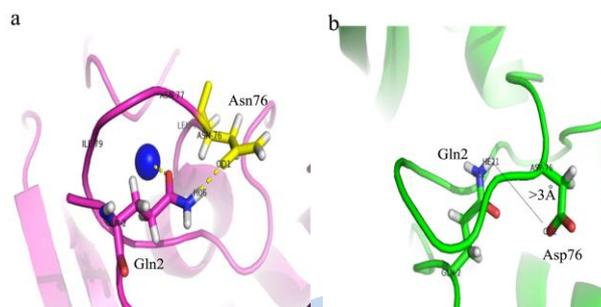


图 6 原始酶及 N76D 突变体的三维结构

Fig.6 Three-dimensional crystal structures of wild-type and the mutant nattokinase, N76D

注: a: 原始酶, 蓝色球表示 Ca^{2+} ; b: N76D。

3 结论

本研究通过定点突变构建重组纳豆激酶突变体, 阐述了两个氨基酸位点对于纳豆激酶催化活性以及热稳定性具有重要作用。经过初步筛选得到两株热稳定性显著提高的突变体 P14L 和 N76D, 但是两者的比酶活有不同程度的下降。虽有研究报道, 通过定点突变, 酶的热稳定性和催化活性同时得到改善, 但以热稳定性提高伴随催化活性降低居多^[11]。因为酶的催化活性建立在空间构象的柔性的基础上的, 而热稳定性则需要构象具有刚性, 以抵御外力 (高温钝化作用) 的破坏^[12]。因此在很多情况下, 一个酶的活性和其热稳定性是一种此消彼长的关系, 本研究的结果也与之符合。

参考文献

- [1] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, et al. A novel fibrinolytic enzyme in the vegetable cheese natto: a typical land popular soybean food in the Japanese diet [J]. *Experientia*, 1987, 43(20): 1110-1117
- [2] Nakamura T, Yamagata Y, Ichishima E. Nucleotide sequence of the Subtilisin NAT gene, aprN, of *Bacillus subtilis* (natto) [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, 56(11): 1869-1871
- [3] 须见洋行, 马场健史, 岸丁明. 纳豆中のブロウキナゼ活性化酵素と血栓溶解能 [J]. *日本食品科学工学会志*, 1996, 43(10): 46-49
- [4] Sumi H, Banba T, Kishitei A. Pro-urokinase activation enzyme and thrombolysis ability in natto beans [J]. *Journal of Japanese Food Science*, 1996, 43(10): 46-49
- [4] Zheng ZL, Ye MQ, Zuo ZY, et al. Probing the importance of hydrogen bonds in the active site of the subtilisin nattokinase

- by site-directed mutagenesis and molecular dynamics simulation [J]. *Biochem. J.*, 2006, 395(3): 509-515
- [5] Yongjun C, Wei B, Shujun J, et al. Directed evolution improves the fibrinolytic activity of nattokinase from *Bacillus natto* [J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2011, 325(2): 155-161
- [6] Yanagisawa Y, Chatake T, Chiba-Kamoshida K, et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction experiment of nattokinase from *Bacillus subtilis natto* [J]. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 2010, 66(12):1670-1673
- [7] Nguyen TT, Quyen TD, Le HT. Cloning and enhancing production of a detergent- and organic-solvent-resistant nattokinase from *Bacillus subtilis* VTCC-DVN-12-01 by using an eight-protease-gene-deficient *Bacillus subtilis* WB800 [J]. *Microb. Cell Fact*, 2013, 12: 79
- [8] 何孝天,刘中美,崔文璟,周哲敏.介导纳豆激酶分泌表达的信号肽比较[J].现代食品科技,2014,30(5):62-68
HE Xiao-Tian, LIU Zhong-Mei, CUI Wen-Jin, et al. Comparison of signal peptides for nattokinase secretory expression [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(5): 62-68
- [9] Zhao H, Arnold F H. Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase [J]. *Protein Eng.*, 1999, 12(1): 47-53
- [10] Weng M, Zheng Z, Bao W, et al. Enhancement of oxidative stability of the subtilisin nattokinase by site-directed mutagenesis expressed in *Escherichia coli* [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, 1794(11): 1566-1572
- [11] Martin A R, DiSanto R, Plotnikov I, et al. Improved activity and thermostability of (S)-aminotransferase by error-prone polymerase chain reaction for the production of a chiral amine [J]. *Biochem. Eng. J.*, 2007, 37(3): 246-255
- [12] 秦久福.通过体外分子进化技术提高淀粉液化芽孢杆菌 BS5582 β -1,3-1,4-葡聚糖酶热稳定性的研究[D].无锡:江南大学,2010
QIN Jiu-Fu. Study on improving thermostability of β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus amyloliquefaciens* BS5582 by molecular directed evolution [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010