

# 脱氮硫杆菌 ATCC25259 SQR 蛋白及突变体的结构分析与活性研究

陈新, 孟志忠, 罗义, 荣向, 李杉

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 本文研究了通过 Discovery Studio 3.5 利用同源建模法构建了脱氮硫杆菌 ATCC25259 的硫化物:醌氧化还原酶 (Sulfide:quinone oxidoreductase, SQR) 野生型蛋白及突变体蛋白模型, 通过 GROMACS 5.1.2 对所有模型进行分子力学及分子动力学的优化, 使蛋白模型处于能量较低且结构稳定的状态。使用 PROCHECK, Verify 3D 和 ProSA 三种模型评价方法对模型进行评价, 表明蛋白模型具有较高的合理性。使用该蛋白模型计算蛋白相互作用、SAS 及能量值。将构建好的 SQR 及突变体的表达载体转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 诱导表达分子量约 65 ku 的蛋白。使用镍柱亲和层析纯化经大量表达含有 6×His 标签的野生型与突变体蛋白, 采用已经建立的 SQR 活性测定方法, 进行酶活性测定实验, 结果表明突变体酶活性较低。从模拟计算与实验验证两方面说明 SQR C 端  $\alpha$  螺旋结构对蛋白的结构稳定性具有重要影响, 蛋白结构稳定性降低, 从而酶活性降低。

**关键词:** 分子动力学; 脱氮硫杆菌; 硫化物:醌氧化还原酶; 诱导表达

文章编号: 1673-9078(2017)9-46-55

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.007

## Structure and Activity of Sulfide:Quinone Oxidoreductase and Its Mutants from *Thiobacillus denitrificans* ATCC25259

CHEN Xin, MENG Zhi-zhong, LUO Yi, RONG Xiang, LI Shan

(College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** The wild-type protein and mutant protein models of sulfide:quinone oxidoreductase (SQR) from *Thiobacillus denitrificans* ATCC25259 were generated by homology modeling using Discovery Studio 3.5. All models were optimized by molecular mechanics and molecular dynamics using GROMACS 5.1.2, yielding protein models in a stable state with a relatively low energy. Three methods, i.e., PROCHECK, Verify 3D, and ProSA, were used to evaluate the models, and the results indicated that the models were reasonable and reliable. The protein models were used to calculate the interactions between proteins and ligands, as well as the solvent accessible surface (SAS) and energy values. The expression vectors of SQR and mutants were constructed and transferred into *Escherichia coli* BL21 (DE3) to express the proteins with a molecular weight of about 65 ku. Several wild-type and mutant proteins containing the 6× His tag were purified by nickel-affinity chromatography. The SQR enzyme activity was determined using established methods, and the results showed that the activity of the mutants was lower than that of the wild-type SQR. Both simulation calculations and experimental verification suggested that the structural stability of the  $\alpha$  helix in the C-terminal of SQR had an important influence on the structural stability of the protein. If the structural stability of the protein decreased, the enzyme activity also decreased.

**Key words:** molecular dynamics; *Thiobacillus ferrooxidans*; sulfide:quinone oxidoreductase; induced expression

脱氮硫杆菌为硫杆菌属, 革兰氏阴性菌, 是重要的脱硫脱氮工程菌。脱氮硫杆菌菌种来源广泛, 生长条件温和<sup>[1]</sup>, 在硫杆菌属中的脱硫效率最高, 可在胞外聚集单质硫, 在厌氧条件下以硝酸盐作为电子受体

收稿日期: 2017-03-28

基金项目: 广州市产学研协同创新重大专项 (201508020110)

作者简介: 陈新 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物信息学

通讯作者: 李杉 (1972-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生物化学与分子生物学, 细胞生物学

进行生长, 将硝酸盐还原为  $N_2$ <sup>[2]</sup>。脱氮硫杆菌中存在两种硫氧化途径 Sox 和 SQR, SQR 氧化途径为主要通路<sup>[3]</sup>。硫化物:醌氧化还原酶 (Sulfide:quinone oxidoreductase, EC 1.8.5.4, 简称 SQR) 是低价硫化物进入 SQR 途径的第一个酶, 也是关键酶。SQR 蛋白通过辅基 FAD 将电子传递给醌, 使醌还原为氢醌<sup>[4]</sup>, 将低价硫化物 (如  $H_2S$ ) 氧化为零价的硫 (单质硫), 最终达到脱硫的目的。SQR 硫氧化途径是  $H_2S$  在 SQR 蛋白作用下, 氧化为单质硫, 继而在硫氰酸酶作用下

氧化为亚硫酸盐,最后在亚硫酸盐脱氢酶作用下氧化为硫酸盐或者在 APS 还原酶与 ATP 硫酸化酶联合作用下氧化为硫酸盐。当硝酸盐作为电子受体时,脱氮硫杆菌通过 SQR 途径实现硫的氧化,而 SQR 蛋白为 SQR 途径的唯一限速酶<sup>[3]</sup>,使得硫代谢速率降低。

为此对于 SQR 蛋白的研究是脱氮硫杆菌改造的重要依据。SQR 广泛分布在自然界中<sup>[5]</sup>,包括细菌,古生菌以及真核生物中。目前,有关 SQR 晶体结构的研究很少,在 RSCB PDB 数据库中仅有 3 个菌种的 SQR 结晶结构被解析出来,分别是嗜酸氧化亚铁硫杆菌<sup>[4]</sup> (*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、极端嗜热古生菌<sup>[6]</sup> (*Aquifex aeolicus*) 和耐热嗜酸古生菌<sup>[7]</sup> (*Acidianus ambivalens*)。前期研究结果表明 C 端  $\alpha$  螺旋结构可影响 SQR 蛋白与膜的结合,参与底物运输,是重要的功能区域<sup>[8]</sup>。

本文主要研究本实验室保存的脱氮硫杆菌 ATCC 25259 SQR 蛋白的 C 端结构对其生物活性的影响,选取了 C 端  $\alpha$  螺旋(387~422)上 2 个位点为突变点,通过同源建模法构建了脱氮硫杆菌 ATCC25259 SQR 蛋白及其突变体的蛋白模型,经过分子动力学优化和模型评价后获得稳定结构合理的蛋白模型,将野生型 SQR 蛋白及突变体在蛋白配体的相互作用、SAS 值、静电势分布及能量等方面进行分析,推测突变体的结构稳定性下降。以本实验室构建并保存的脱氮硫杆菌 ATCC25259 pET32a-SQR 表达载体为模板,设计引物构建 4 个突变体表达载体,将野生型 SQR 及突变体表达载体分别导入 *E. coli* BL21 (DE3),表达了分子量约为 65 ku 的 SQR 蛋白及突变体蛋白。经过酶活测定实验,与野生型 SQR 相比,突变体酶活性下降 19.39%~50.00%,表明 SQR 蛋白 C 端  $\alpha$  螺旋结构对酶的活性有重要影响。未来对 SQR 蛋白 C 端结构的深入研究,是脱氮硫杆菌进行菌种改造的重要基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 序列来源

脱氮硫杆菌 ATCC 25259 SQR 在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中序列号为 AAZ98178。

#### 1.1.2 平台、数据库及在线分析程序

Discovery Studio 3.5 in Windows 7, GROMACS 5.1.2 in CentOS 6.7 platform, 蛋白质结构数据库 RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)。

#### 1.1.3 实验材料

脱氮硫杆菌 ATCC 25259 为本实验室保存,

pET32a-SQR 表达载体由本实验室构建并保存,大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3) 感受态细胞、质粒小提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; Prime Star 高保真 DNA 聚合酶、DNA 分子质量标准 (DL10000) 和 Taq DNA 聚合酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; Kpn I、Hind III 和 Dpn I 购自 ThermoFisher Scientific 公司; DUQ、葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶购自 Sigma 公司; Ni<sup>+</sup>亲和柱购自 GE 公司; Na<sub>2</sub>S、IPTG 和 PEG 20000 均为分析纯。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 同源建模

Discovery Studio 3.5 包含 BLAST 搜索程序和 modeller 同源建模程序。在 DS 中,导入序列 AAZ98178,使用 BLAST Search(NCBI Server) BLOSUM 62 矩阵在 PDB 数据库中搜索蛋白质结构作为模板。使用 Build Homology Models 构建 SQR 的三维模型,Optimization Level 设置为 High,产生 20 个模型。根据与目标序列高同源性及模板间相似度不能过高的原则,选择 3T2Z\_A、3SY4\_A、3HYV\_A 和 3HYW\_A 为建模的模板,与目标序列的同源性依次为 58%, 58%, 42% 和 42%。选区 PDF Total Energy 和 DOPE Score 最低的模型为初始模型。利用 DS 中 Build Mutants 可以构建 SQR 蛋白的突变体模型。表 1 中列出了确定的突变体及编号。

表 1 突变体编号

Table 1 Numbering of mutants

编号	突变体
1	Val412Lys
2	Val412Ala
3	Leu415Ala
4	Leu415Gly

### 1.2.2 分子力学与分子动力学优化

使用 GROMACS 5.1,添加 OPLS-AA 全原子力场。处理蛋白 pdb 文件,忽略 H 原子,使用 SPC/E 水分子模型,建立分子边缘距离盒子边缘长度为 1 nm 的溶剂盒子,向盒子中加入溶剂分子。加入溶剂分子之后,整个体系带有 3 个负电荷,为了平衡电荷,使蛋白在分子动力学的时候保持电中性,向体系中加入 Na<sup>+</sup> 替换溶剂分子使体系平衡。随后进行能量优化,设置 restraint 限制碳骨架,使蛋白在一定范围内运动,而非彻底固定。先后使用最速下降法和共轭梯度法来处理,能量阈值分别设置为 1000 kJ/mol 和 500 kJ/mol。去除限制,继续使用最速下降法和共轭梯度法来处理,能量阈值分别设置为 100 kJ/mol 和 10 kJ/mol。经过分

子力学能量优化再进行分子动力学模拟。经过 100 ps 升温、100 ps 平衡和 3 ns 收集三个阶段，蛋白达到稳定状态，完成动力学模拟<sup>[9]</sup>。

### 1.2.3 蛋白模型的评价

构建好的模型使用 PROCHECK, Verify 3D 和 ProSA 对模型进行评价。PROCHECK 评价模型中残基与残基之间的立体化学性质，用拉式图表示。Verify 3D 是比较模型与一级序列之间的关系。ProSA 评价残基间的相互作用是否在合理范围内，是有关能量的评价<sup>[10,11]</sup>。

### 1.2.4 SQR 蛋白与底物的拟合及相互作用分析

通过 DS 平台中的 Superimpose 将蛋白模型与 FAD 叠合，以模板蛋白为参考分子，通过序列比对将 C<sub>α</sub> 分子进行叠合，删去模板蛋白，最终得到蛋白-FAD 模型。通过 Analyze Protein Interface 进行界面分析，surface area probe radius 设置为 0.6 Å，最大氢键键长（电子供体与电子受体间的距离）为 2.5 Å，最大盐键键长为 5.0 Å。通过 Calculate Solvent Accessibility 计算蛋白的溶剂可及表面积，Grid points per atom 设置为

240, Probe Radius 为 1.4 Å。通过 Calculate Electrostatics 计算蛋白的静电势分布，Parameter Type 设置为 Delphi Default, Solvent Probe Radius 为 1.4 Å，其余所有设置均为默认。

### 1.2.5 载体的构建及表达纯化

以 pET32a-SQR 为模板，加入定点突变引物扩增整个突变体质粒<sup>[4]</sup>，重组载体 pET32a-SQR 及突变体载体分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞，涂布平板，37 °C 过夜培养。挑取单菌落至 Amp<sup>+</sup> LB 液体培养基，37 °C 过夜培养，收集菌体制备质粒并将突变体质粒送至广州擎科生物技术有限公司测序，以确定正确的突变。取 1 mM IPTG 诱导表达的菌液，收集菌体，重悬后经高压细胞破碎仪破碎，经过 0.22 μm 滤膜过滤，使用 HisTrap<sup>FF</sup> 纯化蛋白，25 mM~300 mM 梯度咪唑浓度洗脱蛋白，50 mM 咪唑浓度为蛋白洗脱浓度<sup>[12]</sup>。将洗脱下来的蛋白装入截留量为 8~14 ku 的透析袋中，放入含 10% 甘油的 1×PBS (pH=6.8) 的透析液中 12 h，透析后使用 PEG 20000 进行蛋白浓缩。使用 BCA 法测定蛋白浓度，并标记。

表 2 SQR 定点突变引物序列

Table 2 Sequences of the primers for site-directed mutagenesis

引物名称	引物序列	长度	Tm	G+C%
Val412Lys-F	AGCCGCTGTACGAGAAGTACAAGCTCGGCCCTCATGGGCATCAA	43	73.83	55
Val412Lys-R	TTGATGCCCATGAGGCCGAGCTTGTACTTCTCGTACAGCGGCT	43	73.83	55
Val412Ala-F	AGCCGCTGTACGAGAAGTACGCGCTCGGCCCTCATGGGCATCAA	43	75.74	60
Val412Ala-R	TTGATGCCCATGAGGCCGAGCGCTACTTCTCGTACAGCGGCT	43	75.74	60
Leu415Ala-F	TACGAGAAGTACGTGCTCGGCGCGATGGGCATCAAGAACTCAAG	45	73.43	53
Leu415Ala-R	CTTGAGTTTCTTGATGCCCATGCGCGCCGAGCACGACTTCTCGTA	45	73.43	53
Leu415Gly-F	TACGAGAAGTACGTGCTCGGCGGCATGGGCATCAAGAACTCAAG	45	73.43	53
Leu415Gly-R	CTTGAGTTTCTTGATGCCCATGCGCGCCGAGCACGACTTCTCGTA	45	73.43	53

### 1.2.6 SQR 及突变体的酶活性测定

氧化型 DUQ 在 275 nm 处有特有的吸收峰。酶活性的测定使用 Shimadzu UV-2545 测定 DUQ 在 275 nm 波长条件下吸光值的减少<sup>[13]</sup>，反应混合液 50 mM 磷酸缓冲液 (pH=7)，40 mM 葡萄糖，50 μM DUQ，2 unit/mL 葡萄糖氧化酶，20 unit/mL 过氧化氢酶及纯化之后的蛋白 (10 μg/mL)。加入 100 μM Na<sub>2</sub>S 使反应开始。葡萄糖、葡萄糖氧化酶及过氧化氢酶的作用是提供无氧环境，防止 DUQ 被氧气氧化<sup>[14]</sup>。单位酶活定义为每分钟还原 1 μmol DUQ 所需的 SQR 的量<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SQR 蛋白结构分析

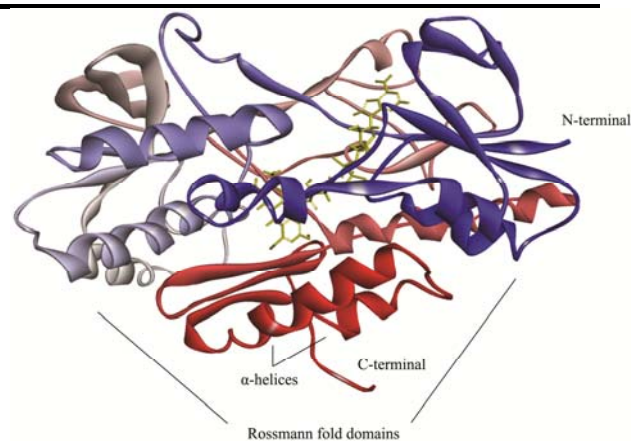


图 1 SQR 蛋白模型图

Fig.1 Structure of SQR protein

通过 Superimpose 模块将蛋白模型与 FAD 叠合，



得到蛋白-FAD 模型。脱氮硫杆菌 ATCC 25259 的 SQR 具有二硫键氧化还原酶的结构特征，具有两个罗斯曼折叠，每个罗斯曼折叠结构由两个重复的部分组成，每个部分包括 6 个平行的  $\beta$  折叠与两对  $\alpha$  螺旋形成  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  的拓扑结构，FAD 结合于第一个罗斯曼折叠

结构域中<sup>[15]</sup>。C 端具有两个  $\alpha$  螺旋，主要功能与蛋白和膜的结合有关。

## 2.2 分子力学及分子动力学优化

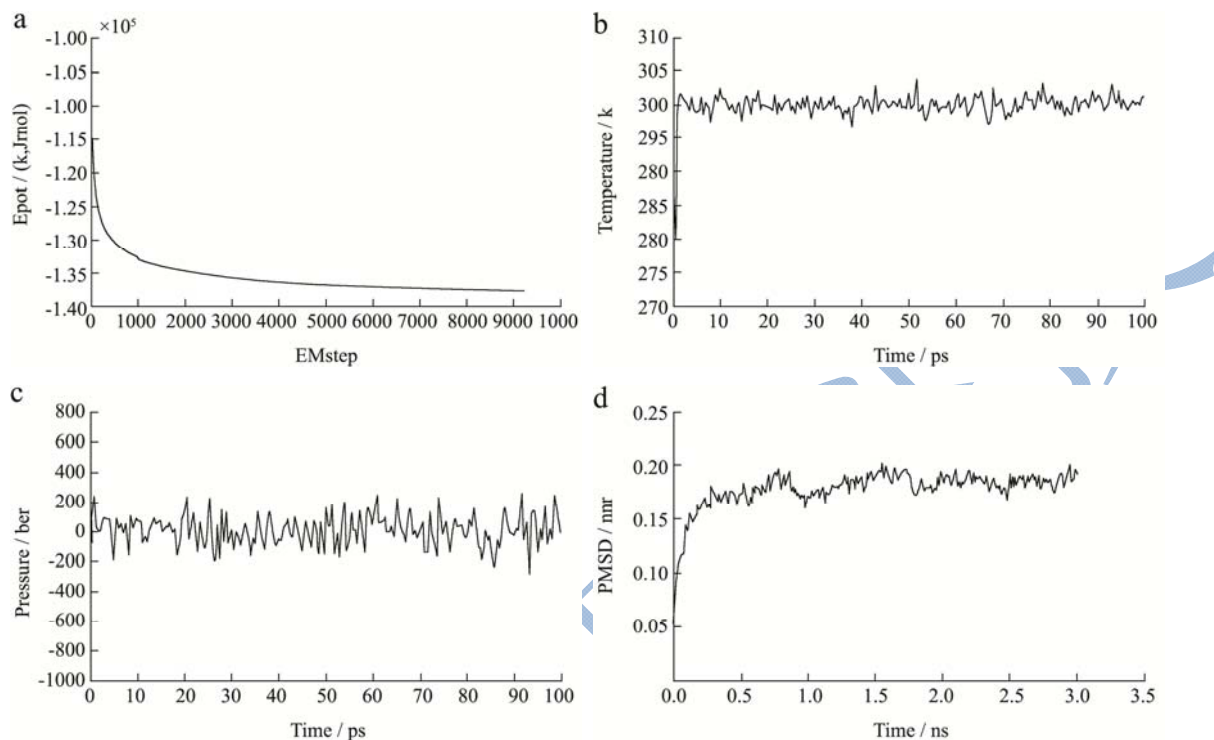


图2 野生型 SQR 蛋白的分子动力学结果图

Fig.2 Results of MD simulation of WT SQR

注：a，分子力学优化能量图；b，NVT 过程中温度变化图；c，NPT 过程中压力变化图；d，RMSD 统计值。

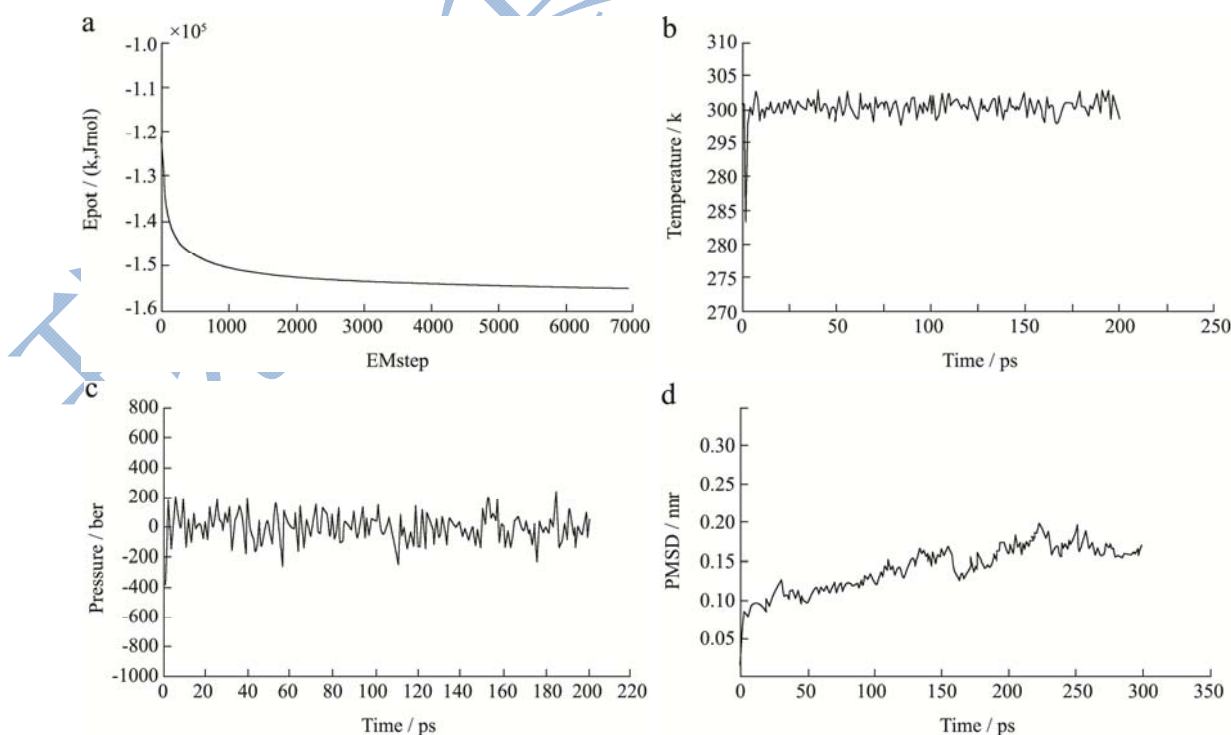


图3 Val412Lys 蛋白的分子动力学结果图

Fig.3 Results of MD simulation of Val412Lys

注: a, 分子力学优化能量图; b, NVT 过程中温度变化图; c, NPT 过程中压力变化图; d, RMSD 统计值。

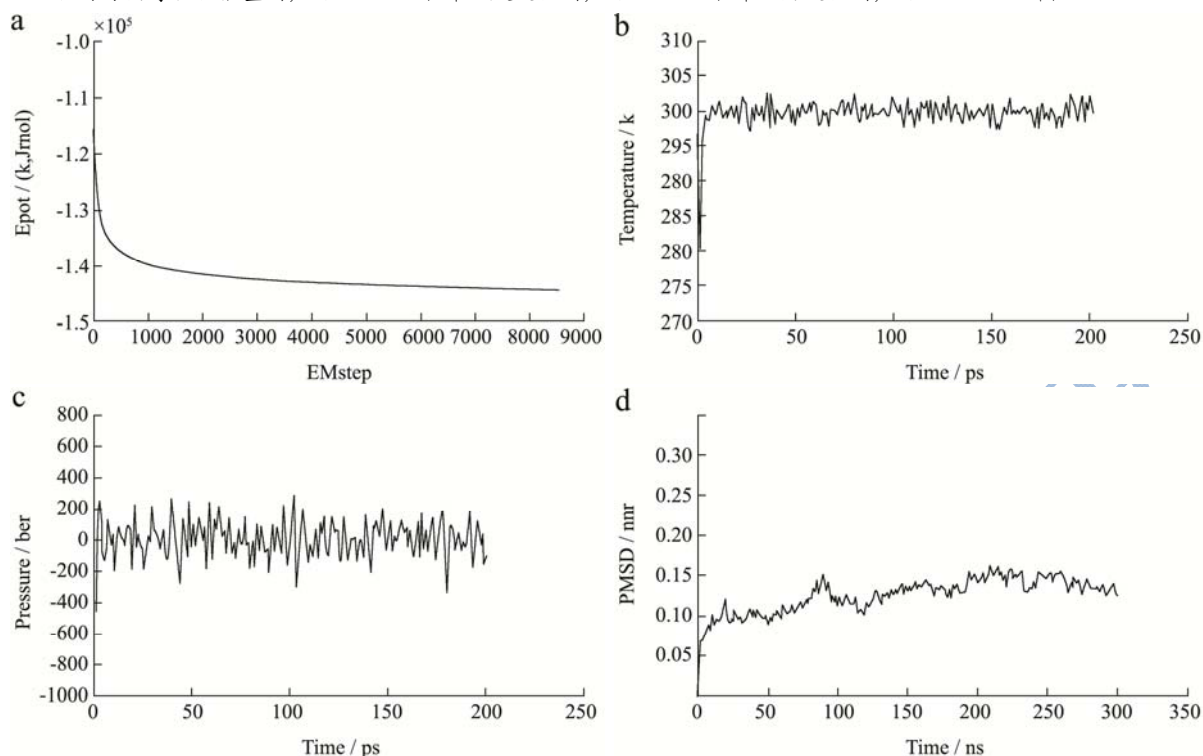


图 4 Val412Ala 蛋白的分子动力学结果图

Fig.4 Results of MD simulation of Val412Ala

注: a, 分子力学优化能量图; b, NVT 过程中温度变化图; c, NPT 过程中压力变化图; d, RMSD 统计值。

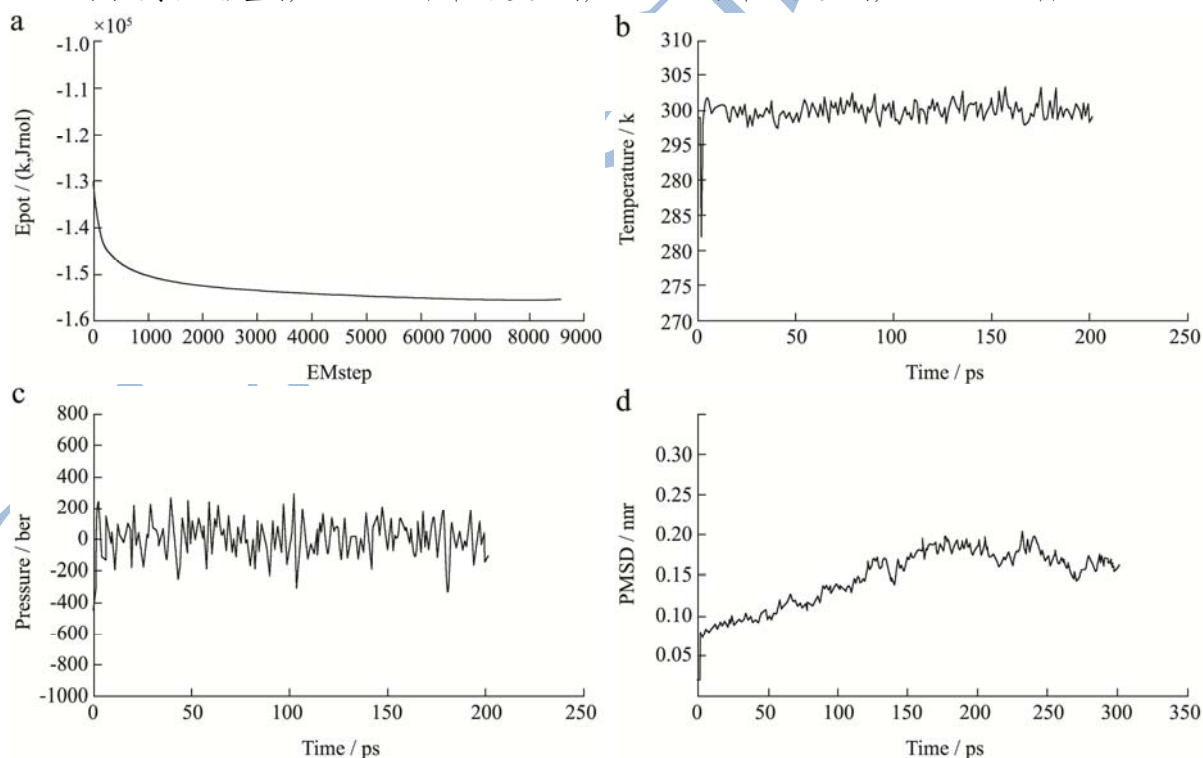


图 5 Leu415Ala 蛋白的分子动力学结果图

Fig.5 Results of MD simulation of Leu415Ala

注: a, 分子力学优化能量图; b, NVT 过程中温度变化图; c, NPT 过程中压力变化图; d, RMSD 统计值。

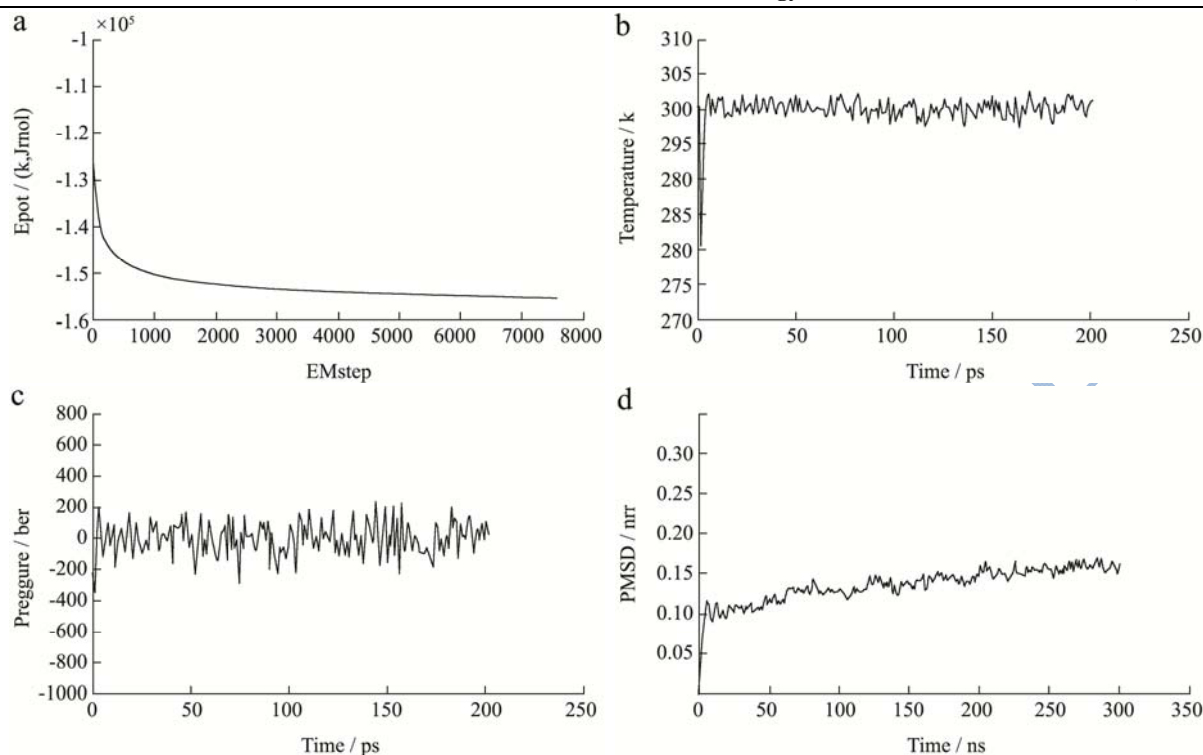


图6 Leu415Gly 蛋白的分子动力学结果图

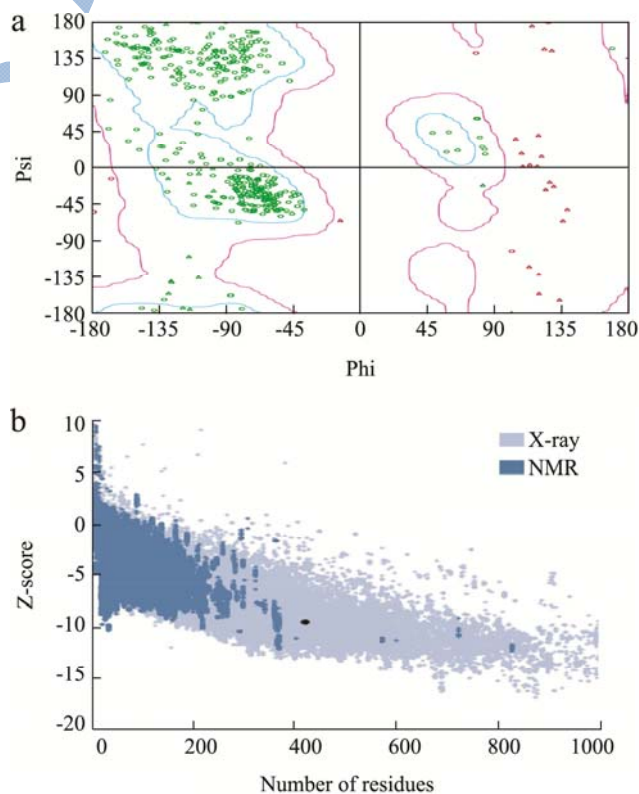
Fig.6 Results of MD simulation of Leu415Gly

注: a, 分子力学优化能量图; b, NVT 过程中温度变化图; c, NPT 过程中压力变化图; d, RMSD 统计值。

体系的能量不断下降, 最后趋于平稳, 优化后能量降至 $-1.38 \times 10^6$  kJ/(mol·nm)。从图 2b 中可以看出, 体系的温度迅速上升, 达到 300 k 目标温度, 并保持稳定, 完成 100 ps NVT equilibration。在 100 ps NPT equilibration 过程中, 压强的平均值为 12.86 bar, 压强大小在平均值附近上下波动。图 2d 为 3-ns production MD 过程中采集的蛋白碳骨架的 RMSD 值, RMSD 值上升后趋于稳定, 在 0.19 nm 处上下波动。经过分子动力学优化之后, 蛋白的能量与 RMSD 值达到稳定, 表明蛋白模型已经达到稳定状态。图 3、4、5 和 6 分别是四个突变体蛋白模型的分子动力学结果, 突变体 1、2、3 和 4 的能量分别降至 $-1.55 \times 10^6$  kJ/(mol·nm)、 $-1.44 \times 10^6$  kJ/(mol·nm)、 $-1.56 \times 10^6$  kJ/(mol·nm) 和  $-1.55 \times 10^6$  kJ/(mol·nm), 体系能量趋于平稳。突变体 1、2、3 和 4 的 RMSD 值在 2 ns~3 ns 间趋于稳定, 分别在 0.16 nm、0.13 nm、0.15 nm 和 0.15 nm 处上下波动, 均低于野生型 SQR 的 RMSD 值。突变体在 NVT equilibration 过程中, 体系温度均迅速升至 300 K, 并在其附近波动, 在 NPT equilibration 过程中, 压强均在其平均值附近上下波动。突变体模型的能量与 RMSD 值达到稳定, 并且两者数值均低于野生型 SQR 的数值, 表明突变体模型已经达到稳定状态, 稳定程

度比野生型更高。

### 2.3 蛋白模型的评价结果



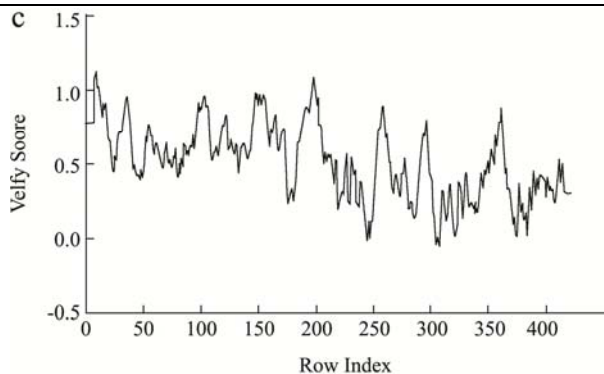


图7 野生型 SQR 蛋白模型的评价结果图

Fig.7 Evaluation results of the WT SQR protein model

注: a, SQR 蛋白的拉式图; b, SQR 蛋白的 PROSA 图; c, SQR 蛋白的 VERIFY\_3D 图。

在图 7a 拉式图中,蓝色区域为最适宜区,红色区域为允许区,红色区域以外的为非允许区。绿色的点表示处于最适宜区和允许区的氨基酸残基,红色的点表示处于非允许区的氨基酸残基。正方形代表脯氨酸残基,三角形代表甘氨酸残基,圆形代表其他氨基酸残基。99.1%的氨基酸位于允许区内,高于 90%,仅有 4 个氨基酸残基处于非允许区域,分别是 25 Arg (77.70:141.15)、Asp 92(-178.99:-54.62)、Ser 205 (-167.05:-13.85) 和 Glu 405(101.78:-102.43)。这表明了氨基酸间二面角是合理的。ProSA-web 蛋白结构分析结果 Z-Score: -9.44,位于已知 X-ray 结构的蛋白结构的范围内,能量合理。模型的 Verify Score 198.55 高于并且很接近 Verify Expected High Score 192.552,表明模型的质量较高。以上评价结果表明经过分子动力学之后的蛋白模型结构稳定并合理。

## 2.4 相互作用分析

使用 Analyze Protein Interface 进行界面分析,通过界面分析可知,SQR 与配体是通过氢键相互作用,没有共价键结合,也没有形成 Pi 键与盐键。野生型 SQR 蛋白与 FAD 之间形成了 13 个氢键,大部分是氨基酸的酰胺氢与 FAD 氧原子形成的,配体接触面积为 366.07 Å<sup>2</sup>,受体接触面积为 351.96 Å<sup>2</sup>,疏水率为 41.79%。突变体蛋白与 FAD 均形成 14 个氢键,配体接触面积为 366.86 Å<sup>2</sup>,受体接触面积为 352.12 Å<sup>2</sup>,疏水率为 41.80%。突变体蛋白与野生型蛋白相比,野生型 SQR 形成的 13 个氢键键长均小于 2.7Å,属于强氢键,虽然突变体蛋白形成的氢键数目为 14,但键长均增长,且蛋白与配体的接触面积及蛋白-FAD 的疏水率均没有明显差异,突变位点在结构上距离蛋白配体的结合位点较远,说明经过突变之后蛋白与配体间的氢键及疏水作用并未发生明显变化。

Calculate Solvent Accessibility 运算得出蛋白 SAS (Solvent Accessible Surface) 值,SAS 为溶剂可及表面积,指的是蛋白分子暴露在溶剂中的表面积。设定氨基酸 SAS 值大于 25% SAS<sub>max</sub> 的为暴露态,小于 10% SAS<sub>max</sub> 的氨基酸残基为掩埋态,介于 10%~25% SAS<sub>max</sub> 之间的为过渡态。野生型 SQR 的 SAS 值为 20235.40 Å<sup>2</sup>,突变体 SAS 值分别为 20163.10 Å<sup>2</sup>、20187.10 Å<sup>2</sup> 和 20202.10 Å<sup>2</sup> 和 20179.70 Å<sup>2</sup>,变化范围为 33.30 Å<sup>2</sup>~72.30 Å<sup>2</sup>。野生型 SQR 蛋白-FAD SAS 值为 19815.80 Å<sup>2</sup>,突变体蛋白-FAD SAS 值分别为 19750.80 Å<sup>2</sup>、19792.20 Å<sup>2</sup>、19087.20 Å<sup>2</sup> 和 19767.40 Å<sup>2</sup>,

表 3 野生型 SQR 及各突变体蛋白-FAD 界面处的接触面积值

Table 3 Polar and nonpolar contact surface area of the interface in the protein-FAD complex of WT SQR and mutants

	Total Hydrogen Bonds	Ligand Contact Surface Area (Å <sup>2</sup> )	Ligand Polar Contact Surface Area (Å <sup>2</sup> )	Ligand Nonpolar Contact Surface Area (Å <sup>2</sup> )
SQR	13	366.07	249.36	116.71
1	14	366.86	249.87	116.99
2	14	366.86	249.87	116.99
3	14	366.86	249.87	116.99
4	14	366.86	249.87	116.99
	Receptor Contact Surface Area (Å <sup>2</sup> )	Receptor Polar Contact Surface Area (Å <sup>2</sup> )	Receptor Nonpolar Contact Surface Area (Å <sup>2</sup> )	Hydrophobicity/%
SQR	351.96	168.62	183.34	41.79
1	352.12	169.06	183.06	41.80
2	352.12	169.06	183.06	41.80
3	352.12	169.06	183.06	41.80
4	352.12	169.06	183.06	41.80



SAS 值都下降,表明蛋白暴露在溶剂中的表面积减小,其包埋在内部的疏水基团或过渡态的基团有所增加,产生的疏水性会影响蛋白的疏水性质、蛋白质折叠和三维结构。与野生型 SQR 相比,3 号突变体 (Leu415Ala) 蛋白 SAS 值仅下降 0.16%,表明蛋白三维结构并未发生明显改变,而蛋白-配体 SAS 值下降高达 3.68%,说明突变体与 FAD 结合后,结构发生了明显改变。

### 2.5 静电势分布

SQR 蛋白表面的正负电势是互补的。底物通道连

接的是强负电势区,而在另一侧中距离通道较远的结构中出现了大面积的强正电势区,C 端的  $\alpha$  螺旋及其他区域处于正电势区内,这些区域和磷脂双分子层的负电区域相互作用,从而结合在膜上。表 4 列出了各个蛋白的势能场能量值,野生型 SQR 的能量值为 -4075.75 KT,突变体的能量值分别为 -4023.38 KT、-4022.80 KT、-4023.02 KT 和 -4009.53 KT,突变体与野生型相比,能量增加了 1.28%、1.30%、1.29%和 1.63%,蛋白结构的稳定性下降,4 号突变体 (Leu415Gly) 在能量方面为最不稳定结构。

表 4 野生型 SQR 及突变体的总 SAS 值及能量值

Tbale 4 Total SAS and energy values of WT SQR and mutants

	蛋白 SAS 值( $\text{\AA}^2$ )	FAD SAS 值( $\text{\AA}^2$ )	蛋白-FAD SAS 值( $\text{\AA}^2$ )	势能场能量值/KT
SQR	20235.40	1030.88	19815.80	-4075.75
1	20163.10	1030.88	19750.80	-4023.38
2	20187.10	1030.88	19792.20	-4022.80
3	20202.10	1030.88	19087.20	-4023.02
4	20179.70	1030.88	19767.40	-4009.53

### 2.6 SQR 及突变体的表达纯化及酶活性测定

经 IPTG 诱导,表达了分子量为 65 ku 左右的蛋白,分子量大小与预估一致,在上清与沉淀中均有表达,未诱导菌液中无表达。经 IPTG 诱导,突变体菌株也表达了分子量为 65 ku 左右的蛋白,只在上清中表达,诱导沉淀与未诱导菌液中均无表达。在大肠杆菌中大量表达蛋白,纯化浓缩后经 SDS-PAGE 分析。使用 BCA 法测定蛋白浓度,野生型 SQR 与突变体 1、2、

3、4 的蛋白浓度分别为 165.09 mg/mL、193.18 mg/mL、96.07 mg/mL、103.18 mg/mL 和 125.16 mg/mL。根据单位酶活定义,野生型 SQR 与突变体 1、2、3、4 的酶活分别为 152.29 U/g、122.77 U/g、91.67 U/g、83.92 U/g 和 76.15 U/g。酶活性的测定结果表明突变体 1、2、3、4 与野生型 SQR 蛋白相比,酶活分别下降 19.39%、39.80%、44.90%和 50.00%。表明 Val412 和 Leu415 两个位点在维持 C 端螺旋结构方面有重要作用。

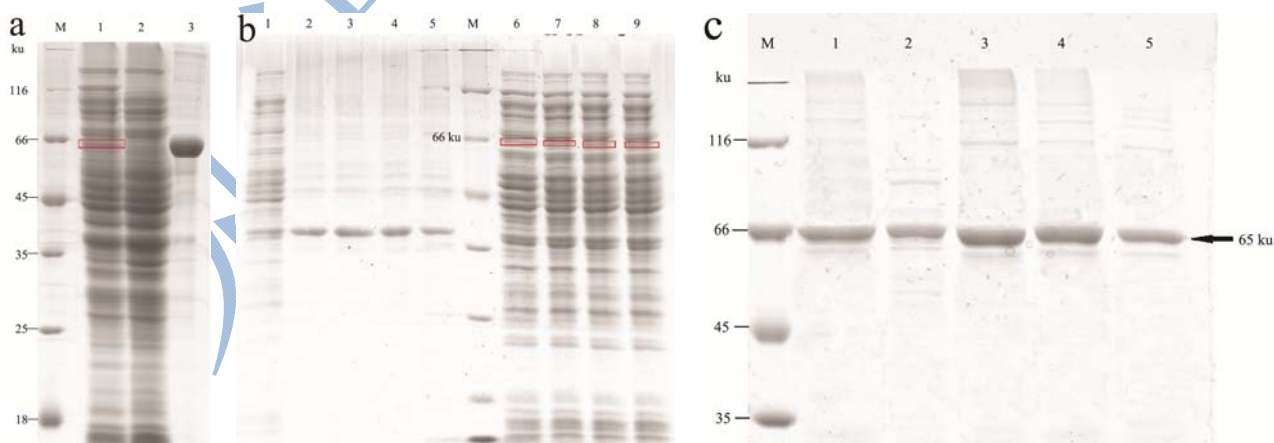


图 8 SDS-PAGE 检测图

Fig.8 SDS-PAGE images

注: a, 野生型 SQR 蛋白小量表达 (M, Marker; 1, 诱导后上清; 2, 未诱导对照; 3, 诱导后沉淀)。b, 突变体蛋白小量表达, (1, 未诱导对照; 2, Leu415Gly 诱导后沉淀; 3, Leu415Gly 诱导后沉淀; 4, Val412Ala 诱导后沉淀; 5, Val412Lys 诱导后沉淀; M, Marker; 6, Leu415Gly 诱导后上清; 7, Leu415Ala 诱导后上清; 8, Val412Ala 诱导后上清; 9, Val412Lys 诱导后上清)。c, 蛋白纯化浓缩的 SDS-PAGE 检测 (M, Marker; 1, Leu415Gly; 2, Leu415Ala; 3, Val412Ala; 4, Val412Lys; 5, 野生型 SQR)。



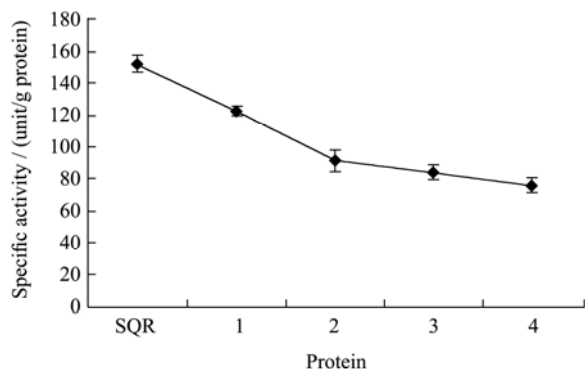


图9 野生型 SQR 及突变体酶活性测定

Fig.9 Enzyme activity of WT SQR and mutants

### 3 结论

3.1 解析蛋白结构的主要方法为 X 射线衍射法和核磁共振法。PDB 数据库<sup>[16]</sup>目前有 127823 个结晶结构,通过 X 射线晶体衍射解析的数量是 114424 个,比例高达 89.52%,表明 X 射线晶体衍射仍然是获得结晶结构最主要的方法。由于蛋白分子量大且蛋白结晶条件缺乏普遍适用性,难以获得适合衍射的高质量单晶,所以蛋白解析进展缓慢。通过实验测定的蛋白质的三维结构技术要求高、费用高且耗时长,而蛋白序列的测定速度远高于三级结构的解析速度。同源建模基于目标蛋白序列与已经解析出结构的蛋白进行结构预测,序列同源性超过 30%,蛋白被认为具有相似的结构,蛋白模型具有较高的准确性。对模型结构的了解可以分析与催化活性、结合或结构稳定性相关的氨基酸残基。本研究基于四个同源性较高的模板,应用同源建模的方法,构建了脱氮硫杆菌 ATCC25259 SQR 蛋白及其突变体的三维模型。模型经过分子力学及分子动力学优化,能量降低趋于平稳,蛋白结构达到稳定状态。使用 PROCHECK, Verify 3D, 和 ProSA 等程序评估所有蛋白模型,评估结果表明蛋白模型有良好的合理性与较高的准确性。

3.2 与野生型 SQR 相比,蛋白与配体的接触面积蛋白-FAD 的界面无明显差异,表明总氢键及疏水作用无明显变化。Andrea M. Lencina 等证实 *C. maquilingensis* SQR 的 C 端与膜结合,并且 C 端的  $\alpha$  螺旋结构构象会影响蛋白与膜的结合,C 端也参与形成底物到达活性位点的通道。研究同时表明 *C. maquilingensis* SQR 的 Tyr383Gln, Phe384Lys 双突变体使部分蛋白转化为水溶形式,减弱与膜的结合<sup>[8]</sup>。突变体的蛋白 SAS 值与蛋白-配体 SAS 值与野生型相比都有所下降,突变体的内部疏水基团的增加对蛋白的二级结构产生影响,同时蛋白暴露在溶剂中的表面积减小,突变体蛋白的势能场能量升高表明蛋白的结

构稳定性下降。计算结果表明了蛋白经过突变之后 C 端结构发生改变,蛋白的稳定性下降。

3.3 脱氮硫杆菌为严格自养菌,生长缓慢,菌体浓度低,无法大量制备 SQR 蛋白。大肠杆菌是最早也是研究最为成熟应用最广泛的原核表达系统,拥有繁殖快且表达量高、添加 IPTG 即可诱导表达,表达产物易纯化等优点。已有四个菌株的 SQR 蛋白成功在大肠杆菌系统中表达,本研究采用 pET-32a 表达载体,在大肠杆菌中异源表达 C 端与 N 端分别含有一个 6×His 标签的重组蛋白,利用镍柱亲和和层析系统纯化 SQR 蛋白及突变体蛋白。

3.4 张燕飞<sup>[4]</sup>研究嗜酸氧化亚铁硫杆菌 SQR 结晶结构时将 SQR-DUQ 结构与 SQR 结构进行拟合,发现在没有结合底物 DUQ 的 SQR 蛋白结构中,C 端第二个  $\alpha$  螺旋上的 Met418 的支链占据了 DUQ 的位置,Leu415 也非常接近 DUQ 尾部癸基硫链<sup>[15,17]</sup>,表明了 C 端  $\alpha$  螺旋结构对底物与活性位点的结合有重要的影响。经过酶活性测定,突变体的酶活性都下降,表明 C 端螺旋的结构对酶活性有重要影响。Val 为疏水性氨基酸,Lys 与 Ala 分别是亲水性氨基酸与疏水性氨基酸,突变后酶活性分别下降 19.39%和 39.80%,说明氨基酸的亲疏水性对位点影响不大,Val 对维持蛋白结构有重要影响。Val412Lys 突变体酶活性比 Val412Ala 高 20.41%,可能是由于 Lys 为碱性氨基酸,带正点荷,与 Val412Ala 相比,增强了与膜的负电区域的相互作用。Leu 为疏水性氨基酸,Ala 和 Gly 分别为疏水性氨基酸与亲水性氨基酸,突变之后酶活性都大幅降低,两个突变体酶活性仅相差 5.10%,Leu 与 Ala 和 Gly 相比,具有较长脂肪链,在维持蛋白结构方面有重要作用。经模拟计算与实验测定表明脱氮硫杆菌 ATCC 25259 的 SQR C 端结构在保持蛋白结构稳定性中有重要作用。当前对脱氮硫杆菌研究多集中于其应用方面,主要为污水处理、防腐以及天然气脱硫<sup>[2]</sup>,但有关其代谢途径、脱硫机制以及结构学方面却少有研究。在此基础上,要继续探索研究如何改变 C 端结构以增强蛋白的结构稳定性,提高 SQR 的活性,为菌种改造提供依据。

### 参考文献

- [1] 赵会军,刘凯,李俊玲.生物法应用于脱除硫化氢的实验研究[J].西南石油大学学报(自然科学版),2010,32(1):125-129  
ZHAO Hui-jun, LIU Kai, LI Jun-ling. The experimental study on the thiobacillus desulfurization applied to removing hydrogen sulfide [J]. Journal of Southwest Petroleum University (Science & Technology Edition), 2010, 32(1):

- 125-129
- [2] 张忠智,鲁莽,魏小芳,等.脱氮硫杆菌的生态特性及其应用[J].化学与生物工程,2005,22(2):52-54  
ZHANG Zhong-zhi, LU Mang, WEI Xiao-fang, et al. Ecological characters and application of *Thiobacillus Denitrificans* [J]. Chemistry & Bioengineering, 2005, 22(2): 52-54
- [3] Poser A, Vogt C, Knöller K, et al. Stable sulfur and oxygen isotope fractionation of anoxic sulfide oxidation by two different enzymatic pathways [J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(16): 9094-102
- [4] 张燕飞.源自嗜酸氧化亚铁硫杆菌的硫化物: 醌氧化还原酶的特征、结构和机理研究[D].长沙:中南大学,2013  
ZHANG Yan-fei. Characterization, structure and mechanism of Sulfide: quinone oxidoreductase from *Acidithiobacillus ferrooxidans* [D]. Changsha: Central South University, 2013
- [5] Theissen U, Hoffmeister M, Grieshaber M, et al. Single eubacterial origin of eukaryotic sulfide: quinone oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times [J]. Molecular Biology & Evolution, 2003, 20(9): 1564-1574
- [6] Marcia M, Ermler U, Peng G, et al. The structure of *Aquifex aeolicus* sulfide: quinone oxidoreductase, a basis to understand sulfide detoxification and respiration [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(24): 9625-9630
- [7] Brito J A, Sousa F L, Stelter M, et al. Structural and functional insights into sulfide: quinone oxidoreductase [J]. Biochemistry, 2009, 48(24): 5613-5622
- [8] Lencina A M, Ding Z, Schurigbriccio L A, et al. Characterization of the Type III sulfide: quinone oxidoreductase from *Caldivirga maquilingensis* and its membrane binding [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2013, 1827(3): 266-275
- [9] Hemchandra D, Rajeev S, Ankita S, et al. Modelling and characterization of glial fibrillary acidic protein [J]. Bioinformation, 2015, 11(8): 393-400
- [10] Wiederstein M, Sippl M J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins [J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(Web Server issue): 407-410
- [11] Sippl M J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins [J]. Proteins-structure Function & Bioinformatics, 1993, 17(4): 355-362
- [12] 马玉彬,谭志,张志峰.单环刺螈硫醌氧化还原酶的表达、纯化和复性[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2010, 40(6):81-86  
MA Yu-bin, TAN Zhi, ZHANG Zhi-feng. Expression, purification and renaturation of sulfide: quinone oxidoreductase from *Urechis unicinctus* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(6): 81-86
- [13] Griesbeck C, Al E. Mechanism of sulfide-quinone reductase investigated using site-directed mutagenesis and sulfur analysis [J]. Biochemistry, 2002, 41(39): 11552-11565
- [14] 贺艳芬,徐源,吴海娥,等.荚膜红细菌DSM1710中硫化物醌还原酶基因的克隆、表达及活性分析[J].中国畜牧兽医,2012,39(2):6-10  
HE Yan-fen, XU Yuan, WU Hai-e, et al. Cloning, prokaryotic expression and activity analysis of sulfide-quinone reductase (SQR) from *Rhodobacter capsulatus* DSM1710 [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 39(2): 6-10
- [15] Cherney M M, Zhang Y, Solomonson M, et al. Crystal structure of sulfide: quinone oxidoreductase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*: insights into sulfidotrophic respiration and detoxification [J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 398(2): 292-305
- [16] Berman H M, Battistuz T, Bhat T N, et al. The protein data bank [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 235-242
- [17] Cherney M M, Zhang Y, James M N, et al. Structure-activity characterization of sulfide: quinone oxidoreductase variants [J]. Journal of Structural Biology, 2012, 178(3): 319-328