

密级:

论文编号:

中国农业科学院

博士学位论文

来源于橄榄绿链霉菌 A1 的木聚糖酶 XYNB 的分
子改良

**Molecular Evolution of Xylanase XYNB from *Streptomyces*
olivaceoviridis A1**

博 士 研 究 生: 杨浩萌

指 导 教 师: 姚 斌 研究员

申 请 学 位 类 别: 理学博士

专 业: 生物化学与分子生物学

研 究 方 向: 酶的分子生物学

培 养 单 位: 研究生院

饲料研究所

提交日期 2006 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Ph.D Dissertation

**Molecular Evolution of Xylanase XYNB from *Streptomyces*
olivaceoviridis A1**

Ph.D Candidate: Yang Haomeng

Advisor: Yao Bin

Major: Biochemistry and Molecular Biology

Specialty: Molecular Biology of Enzyme

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June 2006

中 国 农 业 科 学 院

博士学位论文评阅人、答辩委员会名单表

论文题目		来源于橄榄绿链霉菌 A1 的木聚糖酶 XYNB 的分子改良				
论文作者		杨浩萌	专 业	生化与分子生物学	研究方向	酶的分子生物学
指导教师		姚 斌		培养单位(研究所、中心)		饲料所
姓名		职称	硕 (博)	单 位	专 业	签 名
评 阅 人	宋未	教授	硕导 ☐ 博导 ☐	首都师范大学生物学院	分子生物学	
	文华安	教授	硕导 ☐ 博导 ☐	中国科学院微生物研究所	微生物学	
	李 俊	研究员	硕导 ☐ 博导 ☐	中国农科院农业资源与农业区划研究所	微生物学	
答辩主席	范云六	研究员 院士	硕导 ☐ 博导 ☐	中国农科院生物技术研究 所	分子生物学	
答 辩 委 员	吴乃虎	研究员	硕导 ☐ 博导 ☐	中国科学院遗传与发育生物学研究所	分子生物学	
	钱世均	研究员	硕导 ☐ 博导 ☐	中国科学院微生物研究所	酶分子生物学	
	宋 未	教授	硕导 ☐ 博导 ☐	首都师范大学生物学院	分子生物学	
	莫湘筠	教授级高工	硕导 ☐ 博导 ☐	中国食品发酵工业研究院	酶工程	
	张志芳	研究员	硕导 ☐ 博导 ☐	中国农科院生物技术研究 所	分子生物学	
	伍宁丰	研究员	硕导 ☐ 博导 ☐	中国农科院生物技术研究 所	微生物学	
			硕导 ☐ 博导 ☐			
会议记录 (秘书)						
论文答辩时间地点		2006.6.13 农科院饲料所				

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

论文作者签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

摘 要

木聚糖酶可将木聚糖降解成低聚木糖和木糖,内切 β -1,4-木聚糖酶以内切方式水解木聚糖分子中的 β -1,4糖苷键,是一类重要的半纤维素酶。木聚糖酶在造纸、饲料、食品等行业和能源科学上都有着广泛的应用前景。来源于橄榄绿链霉菌(*Streptomyces olivaceoviridis*) A1 的木聚糖酶 XYNB 是一种性质优良的木聚糖酶,具有高比活性,抗胃蛋白酶和胰蛋白酶,已在饲料中作为添加剂应用。但该酶的热稳定性一般,在应用上存在不足。

本研究从提高该酶的热稳定性入手,通过定点突变和 DNA shuffling 的方法对木聚糖酶 XYNB 进行定向改良,将突变酶在毕赤酵母中表达纯化并对其酶学性质进行分析,以确定突变效果。同时,对该酶的催化残基、影响最适 pH 的因素也做了一定的分析。

通过定点突变的方法,获得了热稳定性有所提高的突变酶 N13D、S40E、T11Y、XS 和 TB。其中,突变酶 N13D 和 S40E 在 70℃处理 5 min,热稳定性分别比 XYNB 提高了 24.76%和 14.46%;T11Y 突变酶在 70℃处理 10 min,热稳定性是 XYNB 的 2.8 倍;增加二硫键的突变酶 XS 在 70℃的半衰期由 XYNB 的 3 min 提高到 9 min;氨基端替换获得的融合酶 TB,热稳定性较 XYNB 有很大的提高,在 70℃的半衰期由 XYNB 的 3 min 提高到 20 min。

再对以上突变位点进行优化组合,获得了突变酶 TS(氨基端替换结合二硫键的加入),最终比 XYNB 在 70℃处理 20 min 的热稳定性提高了 12.4 倍,半衰期由原来的 3 min 提高到 150 min。突变酶 TS 由于具有很好的热稳定性和 pH 稳定性,在工业上有较好的应用前景。

通过同源建模和定点突变,获得突变酶 E87F、E177F 和 N46D。突变酶 E87F、E177F 的酶活性几乎完全丧失,推断 E87、E177 是木聚糖酶 XYNB 的催化残基。突变酶 N46D 的最适 pH 值由 5.2 下降到 4.2, pH 稳定性也向酸性 pH 偏移,同时,最适温度和热稳定性也有一定的提高,结果证实木聚糖酶 XYNB 的第 46 位的氨基酸与其最适 pH 值相关,并对酶的酸碱催化反应起重要的作用。

通过 DNA shuffling 的方法构建木聚糖酶 XYNB 的突变体库,定向筛选热稳定性有所提高的突变酶,从 700 个表达菌株中筛选出 sh-94#突变酶,将突变酶基因在毕赤酵母中表达,研究发现,sh-94#在 70℃的热稳定性较野生型酶 XYNB 提高了 1 倍。又筛选到 sh-17#突变酶,它的最适温度由原酶的 60℃下降到 40℃,热稳定性有所下降。初步建立了应用 DNA shuffling 的方法对木聚糖酶 XYNB 进行热稳定性的定向改良的研究体系,为今后木聚糖酶的进一步改良奠定了基础。

本研究通过基因工程的手段,定向改良了木聚糖酶 XYNB 的热稳定性,推测出了木聚糖酶 XYNB 的催化残基并分析了在催化反应中起重要作用的氨基酸残基。研究中获得的一系列突变酶对研究木聚糖酶结构和功能的关系起到了重要的作用,对指导木聚糖酶的进一步改良提供了良好的研究材料。

关键词: 木聚糖酶, 热稳定性, 最适 pH, 酶学性质, DNA shuffling

Abstract

Xylanase (EC3.2.1.8) can hydrolyze xylan into xylo-oligosaccharides and D-xylose. Endo- β -D-1, 4-xylanase is one of the major hemicellulose hydrolases catalyzes the hydrolysis of internal β -1, 4 bonds of xylan. Xylanases are widely used in paper and pulp industry, feed industry, foodstuff industry and energy industry. Xylanase XYNB from *Streptomyces olivaceoviridis* A1 has been used as feed additive. XYNB has good properties such as high specific activity and resistance to pepsin and trypsin whereas its thermostability is not good enough.

This study aimed at the thermostability improvement. Methods of site-directed mutagenesis and DNA shuffling were used for the purpose. Different mutants were expressed in *Pichia pastoris* and purified, and then the enzymatic properties of these mutants were analyzed to test and verify the effects of mutations. Furthermore, the catalytic residues of XYNB and the factors influencing the optimal pH have also been analyzed.

The mutants T11Y、N13D、S40E、XS and TB were obtained by site-directed mutagenesis. The thermostability of these mutants increased with different degrees. The thermostability of N13D and S40E improved 24.76% and 14.46% respectively, at 70°C for 5 min, compared with XYNB; The thermostability of T11Y mutant is 1.8 times higher than that of XYNB; The half-life of XS (with a disulfide bridge mutation) was increased to 9 min instead of 3 min of XYNB, at 70°C and pH 6.0; TB (with the N-terminal replacement mutation) further increase the half-life at 70°C to 20 min.

We optimized and combined the mutations mentioned above to obtain a new mutant TS (with replacement of N-terminal and introduction of a disulfide bridge). The synergism of N-terminal and disulfide bridge made the thermostability of TS increased 12.4-fold compared with that of XYNB at 70°C, pH 6.0 for 20 min, and the half-life of TS increased to 150 min instead of 3 min of XYNB. The mutant TS with high stability is potentially useful in industrial applications.

A homology modeling of xylanase XYNB was made by Swiss-Model and BLAST. Then the E87F、E177F and N46D mutations were introduced into XYNB respectively by site-directed mutagenesis. The mutants E87F and E177F lost almost all of their activities, the E87 and the E177 were deduced to be the catalytic residues. The mutant N46D expressed in *Pichia pastoris* was purified and its enzymatic properties were determined. The result revealed that the optimal pH of N46D reduced from 5.2 to 4.2 and the pH stability of N46D changed to acid pH. The optimal temperature and thermostability of N46D also increased. A very good correlation is shown between N46 and the optimal pH. N46 is an important amino acid to catalysis.

Moreover, a mutant pool of XYNB was obtained by DNA shuffling method. A thermostable mutant sh-94# was screened from 700 recombinants, which thermostability was as twice as XYNB at 70°C. A system to screen the mutants of xylanase with better thermostability was founded, which will be helpful to further improvement of xylanase.

The thermostability of xylanase XYNB was improved and the important catalytic amino acids were found by protein engineering methods in this study. The mutants obtained in this study can be good materials for further research into the relationship between structure and function of xylanase.

Key words: Xylanase, thermostability, optimal pH, enzymatic properties, DNA shuffling

目 录

中文摘要-----	I
ABSTRACT-----	II
第一章 引言-----	1
第一节 木聚糖酶的结构与功能-----	1
1 木聚糖酶(Xylanase)的分类及结构区域-----	1
1.1 木聚糖酶的分类-----	1
1.2 木聚糖酶的结构区域 -----	2
2 木聚糖酶的催化机制-----	3
3 木聚糖酶分子结构与重要酶学性质关系的研究进展-----	4
3.1 木聚糖酶的催化残基-----	4
3.2 木聚糖酶的热稳定性-----	6
3.2.1 热稳定区(TSD) -----	6
3.2.2 盐桥(Salt bridge) -----	6
3.2.3 二硫键(Disulfide bridge) -----	7
3.2.4 芳香族氨基酸-----	7
3.2.5 蛋白质表面精氨酸和脯氨酸的含量-----	7
3.2.6 一些保守的氨基酸-----	8
3.3 木聚糖酶的最适 pH 和 pI-----	9
3.4 木聚糖酶的底物结合区-----	10

4 问题与展望-----	11
第二节 DNA 改组 (DNA shuffling) 技术简介-----	13
1 DNA 改组的原理-----	12
2 DNA 改组技术的发展-----	12
3 DNA 改组技术的成果-----	14
4 DNA 改组的应用前景-----	15
本研究的目的是和意义-----	17
第二章 木聚糖酶 XYNB 热稳定性的分子改良-----	18
1 实验材料-----	18
1.1 菌种和质粒-----	18
1.2 工具酶-----	18
1.3 试剂-----	18
1.4 培养基-----	19
1.5 主要仪器-----	20
2 研究方法-----	20
2.1 木聚糖酶 XYNB 的同源建模-----	20
2.2 突变位点的确定-----	20
2.3 突变方法-----	21
2.3.1 Over lapping PCR 程序-----	21
2.3.2 两步 PCR 程序-----	22
2.3.3 突变试剂盒程序-----	22

2.3.4 突变引物-----	22
2.4 重组表达载体的构建-----	23
2.4.1 pET22b(+)- <i>xynB'</i> 表达载体(<i>xynB'</i> 指任意突变酶基因)-----	23
2.4.2 pPIC9- <i>xynB'</i> 表达载体-----	23
2.5 重组木聚糖酶的表达及纯化-----	23
2.5.1 在大肠杆菌中的诱导表达-----	24
2.5.2 在毕赤酵母中的表达-----	24
2.5.2.1 酵母感受态的制备-----	24
2.5.2.2 酵母细胞的转化-----	24
2.5.2.3 转化子的筛选-----	24
2.5.2.4 目的基因在毕赤酵母中的表达检测-----	25
2.5.2.5 发酵罐水平重组酵母的高细胞密度发酵-----	25
2.5.3 重组酶的 Western Blot 分析-----	26
2.5.3.1 SDS-PAGE-----	26
2.5.3.2 Western Blot-----	26
2.5.4 重组木聚糖酶的纯化-----	27
2.6 木聚糖酶活性的测定-----	27
2.6.1 酶活单位定义-----	27
2.6.2 木糖(Xylose)标准曲线的绘制-----	27
2.6.3 木聚糖酶活性测定的方法-----	28
2.7 酶学性质的分析与比较-----	28
2.7.1 木聚糖酶最适 pH 和 pH 稳定性的测定-----	28

2.7.2 木聚糖酶最适反应温度和热稳定性的测定-----	28
2.7.3 金属离子和相关化学试剂对木聚糖酶活性的影响-----	29
2.7.4 木聚糖酶反应初速度的测定-----	29
2.7.5 木聚糖酶 k_m 和 V_{max} 值的测定-----	29
2.7.6 木聚糖酶比活性的测定-----	29
2.7.6.1 标准曲线的绘制-----	29
2.7.6.2 比活性测定-----	30
2.7.7 纤维素酶活性的测定-----	30
2.7.8 木聚糖酶抗胃蛋白酶及胰蛋白酶的能力-----	30
3 结果-----	30
3.1 T11Y 定点突变-----	30
3.1.1 同源建模及突变位点的确定-----	30
3.1.2 定点突变-----	31
3.1.3 重组表达质粒的构建-----	31
3.1.4 重组木聚糖酶 T11Y 的表达纯化-----	32
3.1.4.1 T11Y 在大肠杆菌中的表达-----	32
3.1.4.2 T11Y 在毕赤酵母中的表达-----	32
3.1.4.3 木聚糖酶 T11Y 的纯化-----	33
3.1.5 T11Y 酶学性质的分析与比较-----	33
3.2 N13D、S40E 定点突变-----	35
3.2.1 同源建模及突变位点的确定-----	35
3.2.2 定点突变-----	35

3.2.3 重组表达质粒的构建-----	35
3.2.4 重组木聚糖酶 N13D、S40E 的表达纯化-----	35
3.2.5 N13D、S40E 酶学性质的分析与比较-----	36
3.3 木聚糖酶 XYNB 氨基端的替换 -----	38
3.3.1 同源建模及突变位点的确定-----	38
3.3.2 木聚糖酶融合基因 <i>tb</i> 的构建-----	39
3.3.3 重组表达质粒的构建-----	40
3.3.4 重组木聚糖酶 TB 的表达纯化-----	40
3.3.4.1 TB 在大肠杆菌中的表达-----	40
3.3.4.2 TB 在毕赤酵母中的表达-----	41
3.3.5 木聚糖酶 TB 的纯化-----	41
3.3.6 TB 酶学性质的分析与比较-----	42
3.4 XYNB 及 TB 的二硫键突变-----	44
3.4.1 同源建模及突变位点的确定-----	44
3.4.2 突变位点的引入-----	44
3.4.3 重组表达质粒的构建-----	44
3.4.4 重组木聚糖酶 XS 和 TS 的表达纯化及二硫键的分析-----	45
3.4.4.1 重组木聚糖酶 XS 和 TS 的表达纯化-----	45
3.4.4.2 二硫键的分析-----	45
3.4.5 XS 和 TS 酶学性质的分析与比较-----	46
4 讨论-----	47
4.1 T11Y 定点突变-----	48

4.2 N13D、S40E 定点突变-----	48
4.3 木聚糖酶 XYNB 氨基端的替换-----	49
4.4 XYNB 及 TB 的二硫键突变-----	51
5 小结-----	52

第三章 木聚糖酶 XYNB 催化残基的研究及最适 pH 值的分子改良-----53

1 实验材料-----	53
2 研究方法 -----	53
2.1 突变位点的确定-----	53
2.2 定点突变方法-----	53
2.2.1 E87F 和 E177F 定点突变-----	53
2.2.2 N46D 定点突变-----	53
2.3 重组表达载体的构建-----	54
2.4 重组木聚糖酶的表达及纯化-----	54
2.5 酶学性质的分析与比较-----	54
3 结果-----	54
3.1 突变位点的确定-----	54
3.2 定点突变-----	56
3.3 重组表达质粒的构建-----	56
3.4 重组木聚糖酶的表达及纯化-----	56
3.4.4.1 在大肠杆菌中的表达-----	56
3.4.4.2 在毕赤酵母中的表达-----	57

3.4.3 木聚糖酶 N46D 的纯化-----	58
3.5 酶学性质的分析与比较-----	58
4 讨论-----	60
第四章 木聚糖酶 XYNB 的定向改良——DNA shuffling 方法-----	62
1 实验材料-----	62
1.1 菌种和质粒-----	62
1.2 工具酶、试剂、培养基及主要仪器-----	62
2 研究方法-----	62
2.1 实验设计-----	62
2.2 目的基因片段的扩增-----	62
2.3 DNase I 的酶切-----	63
2.4 酶切小片段的回收-----	63
2.5 无引物 PCR-----	63
2.6 有引物 PCR-----	64
2.7 构建突变体库-----	64
2.7.1 双酶切-----	64
2.7.2 连接-----	64
2.7.3 大肠杆菌感受态细胞的制备-----	65
2.7.4 大肠杆菌的转化-----	65
2.7.5 连接效率的鉴定-----	66
2.8 突变体重组子在木聚糖平板上的活性筛选-----	66

2.8.1 有木聚糖酶活性的菌落的筛选-----	66
2.8.2 热稳定性突变酶的筛选-----	66
2.9 突变酶基因在毕赤酵母中的表达纯化和酶学性质研究-----	66
3. 结果-----	67
3.1 目的基因片段的扩增-----	67
3.2 DNase I 的酶切-----	67
3.3 酶切小片段的回收-----	67
3.4 无引物 PCR-----	68
3.5 有引物 PCR-----	68
3.6 构建突变体库-----	69
3.7 突变体重组子在木聚糖平板上的活性筛选-----	69
3.7.1 有木聚糖酶活性的菌落的筛选-----	69
3.7.2 热稳定性突变酶的筛选-----	70
3.8 突变酶基因在毕赤酵母中的表达纯化-----	70
3.9 酶学性质研究-----	71
4 讨论-----	72
第五章 结论-----	75
参考文献-----	77
致谢-----	85
作者简历-----	86

第一章 引言

第一节 木聚糖酶的结构与功能

木聚糖是一种多聚五碳糖，是植物细胞中主要的半纤维素成分。木聚糖酶是可将木聚糖降解成低聚糖或木糖的一类酶的总称(Prade *et al.*, 1996)。一般指内切 β -1, 4 木聚糖酶(方洛云, 2002)。木聚糖酶在饲料、造纸、食品、能源工业和环境科学上有着广阔的应用前景(刘强等, 1999; 朱静等, 1996)。随着分子生物学、结构生物学的发展及蛋白质工程的应用, 对木聚糖酶结构和功能的研究不断深入。本文介绍了木聚糖酶的分类和结构区域以及催化机制, 并且重点阐述与酶的活性、热稳定性、最适 pH、等电点、底物结合区以及催化效率等重要性质相关的分子结构的研究进展。研究木聚糖酶结构与功能的关系, 对进一步研究木聚糖酶作用机制、指导木聚糖酶的分子改良有重要意义。

1. 木聚糖酶(Xylanase)的分类及结构区域

1.1 木聚糖酶的分类

由于自然界中存在着木聚糖的异质性和复杂性, 木聚糖酶也进化出多种多样的特异性酶来适应这种结构和组成上的差异。按照木聚糖酶的理化性质, 最初将木聚糖酶分成两类: 低分子量(小于 30 kD)具有碱性 pI 的木聚糖酶和高分子量(大于 30 kD)具有酸性 pI 的木聚糖酶(Wong *et al.*, 1988)。然而, 现在的研究表明, 已经有 30% 的木聚糖酶, 特别是来源于真菌的一些木聚糖酶不适用于这种分类方法(Sunna *et al.*, 1997; Matte *et al.*, 1992)。

根据糖基水解酶的催化机制、氨基酸组成及结构域的折叠方式的不同, 一种更完善的糖基水解酶的分类方法诞生了(Henrissat *et al.*, 1989; Henrissat *et al.*, 2001)。最初, 用这种分类方式, 将木聚糖酶和纤维素酶分成六个族(A-F), 随着新的糖基水解酶的发现, 到 1999 年, 糖基水解酶总共分为 77 个族; 到目前为止, 糖基水解酶已经分类到 106 个族(Coutinho *et al.*, 1999)。以这种分类方式分类, 木聚糖酶主要分成两类: 第 10 族和第 11 族(以前称为 F、G 族)木聚糖酶(Bergquist *et al.*, 2001; Torronen *et al.*, 1997; Jeffries *et al.*, 1996)。同一族的木聚糖酶有着相似的空间结构和作用机制(Gebler *et al.*, 1992; Claeysens *et al.*, 1992; Bourne *et al.*, 2001)。对 10、11 族木聚糖酶催化区晶体结构的分析表明, 第 10 族木聚糖酶催化区形成 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构, 而第 11 族木聚糖酶形成 β -折叠结构, 蛋白整体呈“右手”型。高分子量的木聚糖酶多属于第 10 族, 该族还包括对纤维素和木聚糖都有水解作用的非特异的葡聚糖酶; 低分子量的木聚糖酶多属于第 11 族。两组在催化特性上有差异(刘瑞田等, 1998; Henrissat *et al.*, 1993)。实验表明, 第 10 族木聚糖酶从葡萄糖醛酸中释放出的最短片段为丁醛酸, 从红藻聚糖产生的含 β -1, 3 糖苷键的最短片段为木三糖异构体, 而第 11 族木聚糖酶从前一底物中释放出的最短片段为戊醛酸, 从后一种底物中产生的含 β -1, 3 连接的最短片段为木四糖异构体。可见第 10 族比第 11 族木聚糖酶分解以上两种多糖更彻底。这些结果表明, 第

10 族木聚糖酶与底物结合需较少的位点, 有较低的特异性; 第 10 族比第 11 族的木聚糖酶对较短的 β -1, 4 寡聚糖有较高的亲合性。另外这两族酶在净电荷、碱性和酸性氨基酸的比例等方面也都有所不同。在糖基水解酶中, 有木聚糖水解作用的酶还包括第 5、7、8、16、26、43、52、62 族的一些酶。而严格意义上的木聚糖酶的只有第 5、7、8、10、11、43 族的糖基水解酶。第 16、52、62 族的酶严格的说是双功能酶, 它们有两个不同底物的催化结构域。而第 26 族的酶是内切 β -1, 3 木聚糖酶(Flint *et al.*, 1993)。不同族木聚糖酶的具体差异见 (表 1-1)。

表 1-1 木聚糖酶所在的糖基水解酶家族——折叠方式及催化机制

Table 1-1 Glycoside hydrolase families containing enzymes with a demonstrated activity on xylan. The fold and mechanism of action

糖基水解酶家族	木聚糖酶个数	折叠方式	催化机制
5	8	(β/α) 8	Retaining
7	1	β -Jelly roll	Retaining
8	4	(α/α) 6	Inverting
10	127	(β/α) 8	Retaining
11	173	β -Jelly roll	Inverting
43	1	5-Blade, β -propeller	Retaining

1.2 木聚糖酶的结构区域

不同微生物产生的木聚糖酶在结构和性质上有很大的差别。有的木聚糖酶只含有单一催化区, 也有的木聚糖酶同时具备催化区和多种非催化区。多区域木聚糖酶分子结构中一般含有催化区 (Catalytic Domain, CD)、纤维素结合区 (Cellulose-Binding Domain, CBD)、木聚糖结合区 (Xylan-binding Domain, XBD)、连接序列 (Linker Sequence)、重复序列 (Repeated Sequence)、热稳定区 (Thermostabilising Domain, TSD) 及其它未知功能的非催化区等。这些区域担负着不同的生理功能。不同木聚糖酶所包含的区域差别较大。有的仅具有其中的一种或几种, 有的则包含以上所有区域 (刘瑞田等, 1998; Gilkes *et al.*, 1991)。

木聚糖酶催化区承担着酶的水解特性, 可以作为该酶分类的依据。木聚糖酶的氨基酸数量变化很大, 但其催化区在大小上都趋向一致。在催化区特定位置的谷氨酸和天冬氨酸对催化特性是非常关键的。有些木聚糖酶分子中含有两个 CD 区域, 如来源于蝉琥珀酸纤维杆菌 (*Fibrobacter succingenes* S₈₅) 的分子量为 66.4 kD 的木聚糖酶中含 A、B 两个催化区域, 两区域有 56.5% 的同源性。B 区域属于第 10 族木聚糖酶的催化区, A 区域属于第 11 族木聚糖酶的催化区。到目前为止, 有 30 种左右的木聚糖酶的催化区取得了高分辨率的 X-Ray 结构 (Zui *et al.*, 2000; Zui *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 2005)。

木聚糖酶的底物结合区差异较大。根据氨基酸序列的同源性, 木聚糖酶及纤维素酶有 10 多种类型的纤维素结合区 (CBD), 一些木聚糖酶的底物结合区对木聚糖有特异性, 所以又称之为木聚糖结合区 (XBD) (Schmidt *et al.*, 1999)。一般这些底物结合区并不影响酶的催化活性, 但对不溶性底物有着特殊的作用。如 *Streptomyces Olivaceovividis* E-86 中的 FXYN 酶, 它包含有

催化区域及 XBD, 在天然状态下, 它既能分解可溶性木聚糖, 也能分解不溶性木聚糖, 而如果人工除去 XBD, 它就不能降解不溶性木聚糖, 但不会影响对可溶性木聚糖的降解效率。所以 XBD 对降解不溶性底物是必不可少的 (Zui *et al.*, 2000)。

木聚糖酶分子中的各功能区域是由连接序列相连, 此序列的长度变化很大, 一般为 6-59 个氨基酸 (Black *et al.*, 1994)。木聚糖酶的连接序列的组成和功能与某些免疫球蛋白、核糖体蛋白、丙酮酸脱氢酶复合物中的连接序列相似, 该序列中或含有较多的丝氨酸残基, 或含有较多的脯氨酸残基, 不同来源木聚糖酶的连接序列之间同源性一般不高。这些连接序列将不同的功能区域连接起来, 形成柔韧可伸展的绞链区。对木聚糖酶的稳定性可能有一定的影响。

在许多木聚糖分子中都含有重复序列, 其长度为 20-150 个氨基酸残基, 重复序列也不是酶发挥活性所必需的, 有人认为它是连接序列的一部分或担负有其它功能, 但具体作用尚不清楚 (刘瑞田等, 1998)。

另外, 在某些微生物 (如解糖高温厌氧杆菌和热纤梭菌) 所产的木聚糖酶中, 有某些氨基酸区段可增加酶的热稳定性, 可称为热稳定区 (Fontes *et al.*, 1995; Saul *et al.*, 1995)。这方面的报道将在下面作进一步的阐述。

2. 木聚糖酶的催化机制

木聚糖酶催化的水解反应都是由两个酸性氨基酸残基参与的广义的酸碱催化反应, 这两个酸性氨基酸一个作为质子供体, 一个作为亲核基团, 缺一不可 (Rye *et al.*, 2000; Zechel *et al.*, 2000; McCarter *et al.*, 1994)。木聚糖酶主要通过两种不同的机制对木聚糖进行水解。他们分别是 retaining 机制 (又称双交换机制) 和 inverting 机制 (又称单交换机制) (图 1-2)。无论是哪种作用机制, 作为质子供体的氨基酸是不变的。在 retaining 机制中, 当酶与底物作用时, 质子供体提供一个质子给 β -1,4-糖苷键上的氧原子, 使碳氧键断开, 同时, 亲核基团为了保持断开的糖苷键上的碳正离子的稳定性, 以共价键与碳正离子形成催化中间产物, 而后离子化的质子供体催化环境中的水分子解离, 使碳正离子与水分子形成的氢氧根离子结合, 而水中的氢离子与质子供体结合, 恢复其非离子化的羧基形式。这一过程结束后, 质子供体和亲核基团恢复原来的状态, 再进行下一步的催化反应, 水解产物糖苷的构型保持原来的 β 构型。这一机制与溶菌酶的催化机制相似。在 inverting 机制中, 质子供体提供一个质子给 β -1,4-糖苷键上的氧原子, 使碳氧键断开, 同时, 亲核基团攻击环境中的水分子使其解离, 解离产生的氢氧根离子攻击糖苷键上的碳正离子与之结合, 质子供体离子化, 而亲核基团得到水分子中的氢离子而成为非离子化状态, 水解产物糖苷的构型变为 α 构型。这一机制又与 β 淀粉酶的催化机制相似。木聚糖酶采取哪种催化机制取决于两个催化残基之间的距离 (Alzari *et al.*, 1996; Guerin *et al.*, 2002), 由于两个催化残基间的距离较大 (约 10Å) inverting 机制必须有水分子参与完成亲核攻击。当两个催化残基间的距离较小 (约 5.5 Å) 时, 催化反应采取 retaining 机制。

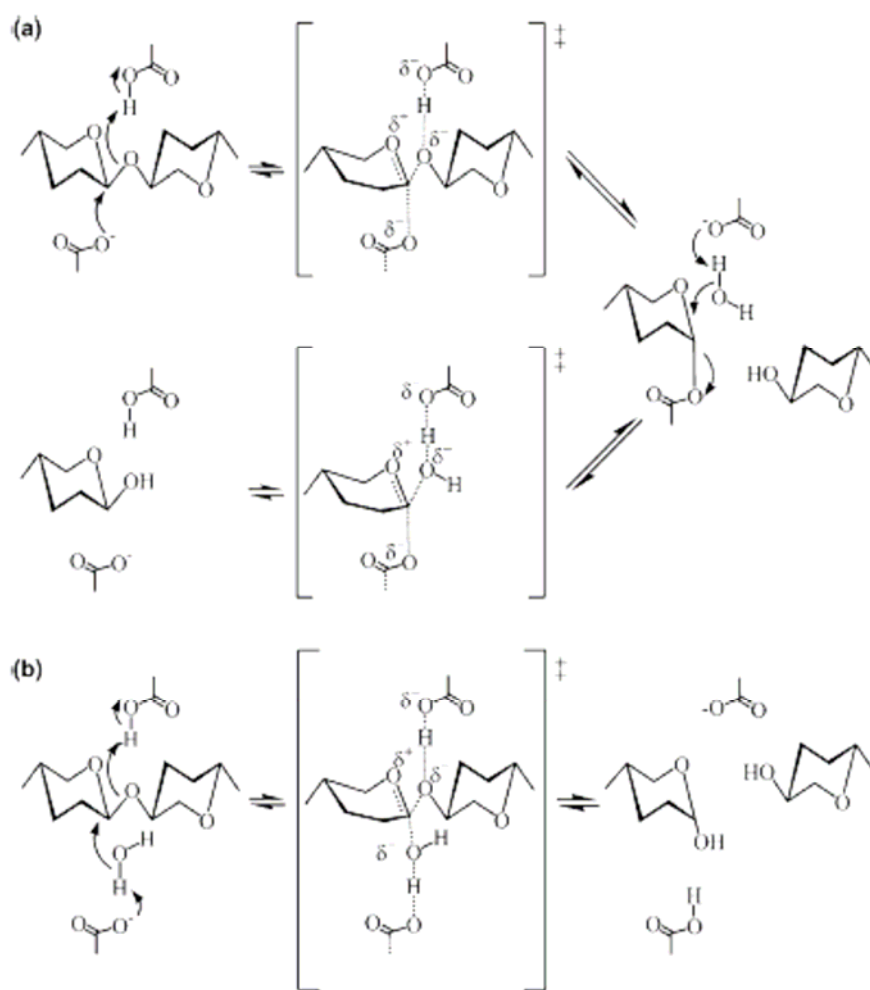


图 1-1 木聚糖酶的催化机制

Fig. 1-1 General mechanisms for (a) retaining and (b) inverting xylanase.

Adapted from (Collins *et al.*, 2005).

3. 木聚糖酶分子结构与重要酶学性质关系的研究进展

对木聚糖酶的研究早在六十年代就已开始，已经从不同来源的微生物中分离到大量的不同类型不同性质的木聚糖酶（孙迅等，1998；杨瑞鹏等，1990）。木聚糖酶的酶学性质决定了其在应用上的潜力及应用领域，一般要求木聚糖酶有较高的催化效率、较好的抗逆性、较广的 pH 和温度适应范围等。近年来，大量有关木聚糖酶结构与功能的研究不断展开，一方面加深了对木聚糖酶作用的分子机理的了解，另一方面为通过基因工程和蛋白质工程改良木聚糖酶的性质、研制出符合不同应用领域要求的木聚糖酶产品提供了指导。

3.1 木聚糖酶的催化残基

为了阐明木聚糖酶的催化机制, 鉴定出其氨基酸组成中哪些氨基酸参与酶的催化作用是十分必要的。随着化学修饰诱变和 X-ray 等技术的广泛应用, 这方面的研究已取得了较大的进展。

Ko (Ko *et al.*, 1992) 等根据木聚糖酶的作用机制可能与同样水解多糖的蛋清溶菌酶的酸碱催化机制相似, 推测其催化过程可能涉及酸性氨基酸残基。他对来源于 *Bacillus pumilus* 的木聚糖酶晶体的三维结构进行分析, 发现该酶分子可分为两个结构域, 两域之间有一个长 3 nm 宽 1.5 nm 的裂缝, 裂缝的大小足以容纳直径 1.1 nm 的木聚糖纤维。因此, 木聚糖酶的活性位点很有可能是位于裂缝中的酸性氨基酸。对 *Bacillus pumilus* 的木聚糖酶的三维结构进行分析并与其他酶进行同源性比较后, 选出 D21、E93、E128 三个酸性氨基酸残基进行定点诱变, 证明 E93、E128 是酶的催化残基。同样发现, 来自 *alkalophilic Bacillus agaradhaerens* 的木聚糖酶 BadX 的 E94 和 E184 (Poon *et al.*, 2003), 来自 *Geobacillus stearothermophilus* 的木聚糖酶 XT6 的 E159 和 E265 (Teplitsky *et al.*, 2004), 来自 *Neocallimastix patriciarum* 的木聚糖酶 xyn-CD/WT 的 E117 和 E210 也是酶的催化残基 (Chen *et al.*, 2001)。这些研究进一步证实了木聚糖酶的催化机制是广义的酸碱催化。

另外 Lee (Lee *et al.*, 1993) 等用点突变的方法也证明了来自 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI 的木聚糖酶 XynA 的 D537N、D602N、E600Q 点突变使酶完全失活, 说明它们与酶的催化活性有关。对来自 *alkaliphilic Bacillus sp. Strain 41M-1* 的 xylanase J 的定点突变分析表明, E93、E183、W18、W86、Y84、Y95 对酶的催化活性也起重要作用 (Nakamura *et al.*, 1995)。

McCarthy (McCarthy *et al.*, 2000) 等人对来自 *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1 的木聚糖酶 XynB 进行高分辨率 (1.8 Å) X-ray 同晶置换法衍射实验, 证明了 XynB 是典型的第 11 族木聚糖酶, 由两个 β 折叠片形成底物与酶结合的裂缝, 催化残基 E90 和 E180 就位于该裂缝中。Larson (Larson *et al.*, 2003) 用同样的方法证明 E165 和 E253 是来自 *Erwinia chrysanthemi* 的木聚糖酶的催化残基, 分别位于 β 折叠股 4 和 7 上, 它属于第 5 族糖苷水解酶。Wouters (Wouters *et al.*, 2001) 用 X-ray 分子置换法证明了来自 *Streptomyces sp. S38* 的木聚糖酶 Xyl11 的 E87 和 E177 是酶的催化残基。

Moreau (Moreau *et al.*, 1994) 等人对来源于 *Streptomyces lividans* 的 Xylanase A 进行点突变。E128Q 和 E236Q 使酶完全失活, D124N 使酶的 $V_{\max}$ 值下降 14 倍, 这表明 E128、E236 是该酶的活性残基。D124 对酶的催化活性也起一定作用。同实验室的 Roberge 发现 N127D 突变酶虽然折叠方式没有发生变化, 但与野生型相比, 酶活性下降 70 倍。进一步研究发现, N127 对维持两个催化残基的离子状态及产物中间体的稳定起重要作用。

来源于 *Streptomyces lividans* 的木聚糖酶 XlnA 有 3 个组氨酸残基位于酶的活性区, 其中 H81 和 H207 又是第 10 组木聚糖酶超家族 4/7 (两个催化残基位于第 4 和第 7 β -折叠的碳端) 的保守氨基酸残基, 因此, 对 H81 和 H207 分别进行了三个点突变 H81R/S/Y; H207E/K/R, 结合对酶的三级结构的分析, Roberge (Roberge *et al.*, 1997) 指出, 六个突变酶的活性都至少下降 95%, 另外点突变 H207K 使酶的 K_m 值提高 3 倍, 其原因可能是 H81 和 H207 与催化残基 E236 以氢键结合, 形成电荷网, 以保持两个催化残基的离子状态, 从而有效的水解木聚糖的 β -1, 4-糖苷键。

总之, 通过木聚糖酶的三维结构的分析, 同源性的比较和对突变酶性质的分析表明, 木聚糖酶的作用机制是广义的酸碱催化机制, 谷氨酸和天冬氨酸等酸性氨基酸残基起催化残基的作用,

它们与空间位置相近的其他极性氨基酸残基互作,维持两个催化残基的离子状态及产物中间体的稳定性,保持酶的催化活性(Kulkarni *et al.*, 1999)。因此,在利用点突变或其他手段改善酶学性质时,要尽量避免涉及这些保守的氨基酸,以免影响酶的活性。

3.2 木聚糖酶的热稳定性

大多数木聚糖酶的最适温度在 50℃-60℃之间。迄今为止,只发现 20 余种细菌和不足 10 种真菌能产耐热木聚糖酶。嗜热真菌比嗜热细菌产生的木聚糖酶耐热性差,只有 *Gloephyllum trabeum* 产生的木聚糖酶最适温度为 80℃。而嗜热细菌产生的木聚糖酶的最适温度有的(栖热袍菌属)高达 100℃以上。值得注意的是现已发现的耐热木聚糖酶中只有 *Thermomonospora fussa* 的 XynA 属于 G/11 族糖苷水解酶,其它都属于 F/10 族(江正强等, 2003)。为了使木聚糖酶更好的应用于生产,对木聚糖酶耐热性的研究正不断进行。下面主要从结构上分析影响木聚糖酶热稳定性的可能因素。

3.2.1 热稳定区(thermostabilizing domain, TSD)

木聚糖酶的热稳定区往往是一个独立的结构域,由150个左右的氨基酸组成,含有重复序列,但各个TSD的相似性很差。现已发现有22种含有多功能区域的耐热木聚糖酶含有TSD,其中16种的TSD在氨基端,5种含有单一羧基端TSD,只有1种含有中间和氨基端TSD。值得注意的是含有氨基端TSD的16种木聚糖酶都属于第10族,而4种含有单一羧基端TSD的木聚糖酶为第11族中温木聚糖酶(Black *et al.*, 1995; Sunna *et al.*, 2000; 江正强等, 2003)。因而有人认为第11族木聚糖酶本质上更耐热,不象第10族木聚糖酶需要通过折叠方式而使它们相对容易进化为嗜热酶(胡沂淮等, 2002)。

有研究表明, TSD对木聚糖酶的热稳定性是非必需的。首先,对一些极端嗜热木聚糖酶的研究表明,它们只有单一的催化结构域而不存在TSD,例如,来源于 *Thermotoga maritima* 的两个木聚糖酶XynA和XynB,前者有TSD而后者只有催化结构域,但XynB的作用最适温度高达102℃,热稳定性也远高于XynA;其次, TSD也存在于中温木聚糖酶中,例如,来源于第11族的 *Ruminococcus flavefaciens* 和第10族的 *Cellulomonas fimi bacillus* sp. BP-23 的木聚糖酶,推测TSD的作用可能是保护木聚糖酶免受蛋白酶或极端酸碱环境的破坏;再次,在除木聚糖酶外的其它蛋白中没有找到与TSD相似的结构,将来源于 *Caldibacillus cellulosorans* 的木聚糖酶xynA的TSD删除,除热稳定性下降外,酶的底物特异性和催化效率也受到一定的影响,因此, TSD可能也是一种专一的木聚糖结合区。

来自 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI 的木聚糖酶 XynA 的氨基端是其热稳定区。对该基因的 5' 端的删除突变表明酶的活性不变,但热稳定性丧失。由此推测,氨基端缺失可能对该酶的三级结构有影响(Lee *et al.*, 1993)。

在对来源于 *Thermotoga maritima* 的 XynA 木聚糖酶进行研究时发现,该酶与 *T. saccharolyticum* B6A-RI 的木聚糖酶 XynA 的氨基端有相似的重复序列,氨基端的删除同样使酶的热稳定性急剧下降。因此有人认为这种氨基端的重复有利于蛋白抵抗热变性(Winterhalter

et al., 1995)。在对支链淀粉酶(*Clostridium thermoly drosulfuricum* 39E)的研究中也有相似的报道, 因此, 推测在氨基端引入适当的突变, 可以提高木聚糖酶的热稳定性。

3.2.2 盐桥(Salt bridge)

蛋白的酸性或碱性氨基酸侧链在生理环境中是带正电或负电的, 随着蛋白的卷曲折叠, 当正负基团相互接近时, 则通过静电吸引而形成盐桥。盐桥结构对木聚糖酶的热稳定性有一定的作用。

对来自*Caldocellum saccharolyticum* 的木聚糖酶的结构与功能进行研究, 在木聚糖酶基因的第 29 位氨基酸处插入Pro和Arg, 发现酶的最适温度由 70℃下降到 50℃, 而且在 50℃时的酶活性较原酶低, 同时, 在 75℃时的半衰期下降 75%。推测第 29 位插入的氨基酸可能破坏了盐桥结构, 使酶失去了正确的三级构象, 从而改变了最适温度及热稳定性(Luthil *et al.*, 1992)。将来源于*Caldocellum saccharolyticum* 的木聚糖酶基因与其他来源于嗜热菌的木聚糖基因相比较发现一些保守的带电荷的氨基酸与盐桥结构的形成有关。Tomazich和Klibanov对耐热的 α -淀粉酶的盐桥结构的分析表明盐桥结构可以使淀粉酶保持紧密和牢固的构象, 并且使淀粉酶具有耐热性, 证明了盐桥在提高酶的热稳定性方面的作用(Tomazic *et al.*, 1988)。但由于蛋白分子中带电荷基团少, 能接近者更少, 因此在维持蛋白稳定性中, 盐桥的作用是有限的(Wakarchuk¹ *et al.*, 1994)。

3.2.3 二硫键(Disulfide bridge)

在蛋白分子中, 两个在空间上邻近的半胱氨酸可形成二硫键(在肽链上至少间隔两个氨基酸残基)。二硫键一般出现在 α 螺旋与另一个伸展肽链或末端不规则的 α 螺旋之间, 另外在 β 转角上也常有二硫键, 但很少有二硫键出现在相邻的 β 折叠肽段间或两端都连在 α 螺旋上。二硫键对提高木聚糖酶的热稳定性也有一定的作用。

Wakarchuk(Wakarchuk² *et al.*, 1994)等在来源于*B. circulans*的木聚糖酶中引入不影响其活性的二硫键, 使其耐热性提高了 15℃。但有研究发现, 在分子内或分子间引入二硫键, 热稳定性虽提高了, 但酶的活性可能会下降。推测是分子间及分子内二硫键可能使酶分子形成二聚体或使酶的结构紧凑, 从而提高酶的热稳定性。但同时由于酶分子结构的改变, 也影响了酶的活性。二硫键对提高木聚糖酶热稳定性及对酶的活性的影响还有待进一步研究。

3.2.4 芳香族氨基酸

芳香族氨基酸的相互作用对提高酶的疏水性、增强酶和底物的相互作用, 从而提高酶的热稳定性, 有十分重要的作用。Georis(Georis *et al.*, 2000)等人为了研究蛋白的耐热性, 将来自*Streptomyces sp.* S38的嗜温木聚糖酶Xy11与来自*Thermomonospora fusca*的耐热木聚糖酶TfxA进行三级结构的相似性比较。一些存在于TfxA中的被认为与耐热性相关的氨基酸残基被用点突变的方法引入Xy11中, 用以提高Xy11的耐热性。T11Y点突变使Xy11获得了与TfxA中Y9-F14结构相似的Y11-Y16的芳香族氨基酸的相互作用机制, 这两个芳香族氨基酸分别位于Xy11突变酶

的第一和第二个 β 折叠上。突变酶的最适温度和 T_m 值都提高了 9°C ，在 57°C 时，突变酶的热稳定性是野生型酶的6倍。结构分析表明Y11和Y16的相互作用可以提高酶的氨基端的稳定性，Y11、Y16与5个其他残基组成的连续的芳香氨基酸区是木聚糖的结合部位，T11Y点突变使底物在较高的温度下与酶的结合力提高，从而提高酶的热稳定性。我们对来源于*Streptomyces olivaceoviridis*A1的木聚糖酶基因xynB的研究(Zhang *et al.*, 2003)，也取得了类似的结果，通过点突变获得芳香氨基酸的相互作用，突变酶经过酶学性质的分析，在 70°C 处理10 min，热稳定性比野生型提高了3倍。

3.2.5 蛋白质表面精氨酸和脯氨酸的含量

一些研究表明，某些木聚糖酶的稳定性与其表面的精氨酸含量有关。对于嗜热蛋白，一般来说，表面都有较高的精氨酸含量，而赖氨酸的含量却有所下降。同时，精氨酸与赖氨酸含量的比值的升高也使木聚糖酶在碱性条件下的酶活提高。其原因可能是精氨酸的胍基基团与其附近的极性基团有很强的相互作用。另外，耐热蛋白中大部分的精氨酸分布于蛋白的外周，形成离子键网络，是重要的稳定因子。

Turunen (Turunen *et al.*, 2002) 等人用 Swiss-pdbviewer (<http://www.expasy.ch/spdbv/>) 软件对来自 *Trichoderma reesei* 的第11族木聚糖酶 XYN II 的结构进行分析，并用 PCR 的方法引入突变。第一种突变是在蛋白表面的不同位置替换上了6个精氨酸，突变结果表明，对酶的热稳定性并无太大影响，但却使酶的最适 pH 范围变窄。当用5个精氨酸替换下酶表面的丝氨酸和苏氨酸时，酶在 65°C 的半衰期提高4到5倍。酶的最适 pH 也有所提高。因此可知，在富含丝、苏氨酸的木聚糖酶表面引入精氨酸，对改善酶学性质有一定的作用。

据统计，耐热性的蛋白中脯氨酸的含量比耐中温蛋白高40%-50%，而嗜冷蛋白中脯氨酸的含量明显低于耐中温蛋白。以脯氨酸代替耐中温蛋白中的某些氨基酸，其耐热性可能会有所提高。因为脯氨酸的N原子位于吡咯环上，使前一个氨基酸与它形成的肽键不能自由旋转，另外吡咯环还有疏水作用，这些性质使脯氨酸形成肽链时的构型熵小，从而提高蛋白的稳定性。

对来源于 *S. lividans* 的木聚糖酶 XlnA 的第49位氨基酸残基进行随机突变，并在大肠杆菌 XL1-BLUE 中进行表达，以0.15%的蓝色木聚糖平板筛选转化子，发现 I49P 突变酶的耐热性提高了4倍。这表明特定位点的脯氨酸对木聚糖酶的耐热性有很重要的作用 (Ebanks *et al.*, 2000)。

3.2.6 一些保守的氨基酸

从氨基酸序列相似性判断，产自 *Streptomyces liv.* 1326 的 xylanaseA 属于第10族木聚糖酶。通过点突变对其保守氨基酸进行研究时发现，R156E 突变酶的最适温度比未突变酶提高 5°C 。来自 *Clostridium thermocellum* (xynE) 和 *Cryptococcus albidus* 的木聚糖酶156位也是精氨酸，最适温度为 65°C 或稍低。而产自 *Bacillus sp.* C125 及 *Caldocellum saccharolyticum* 的木聚糖酶的156位是谷氨酸，最适温度是 70°C ，与 R156E 突变酶 xylanaseA 的最适温度相同。在 *Thermoascus aurantiacus* 中，木聚糖酶的156位是丙氨酸，最适温度也是 70°C (Moreau *et al.*, 1994)。因此，我们认为 R156E/A 可能会影响某些第10族木聚糖酶的热稳定性。

Lo leggìo (Lo Leggìo *et al.*, 1999) 等人总结了影响第 10 族木聚糖酶热稳定性的几种因素: ①酶的疏水中心的有效包埋。②酶的螺旋结构氨基端存在脯氨酸。③酶的带电侧链与螺旋偶极子的互作。④耐热酶没有太长的环状结构。⑤氢键和盐桥对第 10 族木聚糖酶的热稳定性并不起太大作用。以上结论对运用点突变技术提高第 10 族木聚糖酶的热稳定性有重要的参考价值。

在第 11 族木聚糖酶中, 盐桥相对于芳香族氨基酸的相互作用而言, 对提高酶的热稳定性影响较弱。同源性比较结果也显示, 二硫键的形成对提高第 11 族木聚糖酶的热稳定性没有太大影响 (Sapag *et al.*, 2002)。但特定位点的突变, 如: Gly→X; X→Pro 对提高第 11 族木聚糖酶的热稳定性却十分有效。在多种蛋白的保守区以缬氨酸代替亮氨酸或异亮氨酸, 在 α -螺旋区以丙氨酸代替亮氨酸或异亮氨酸对木聚糖酶的热稳定性也有影响 (Georis *et al.*, 2000; Matthews *et al.*, 1987; Hardy *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1994)。研究表明, 虽然第 10 族木聚糖酶的热稳定性要高一些, 但在造纸工业中, 由于酶的分子量较小, 第 11 族木聚糖酶更有应用前景。

总之, 精氨酸和脯氨酸的含量; 蛋白结构中二硫键的引入和盐桥的形成对木聚糖酶的热稳定性都有一定的影响; 木聚糖酶的热稳定性还与带电侧链和螺旋偶极子的疏水堆积及芳香族氨基酸有利的相互作用有关。但在具体的酶中, 可能只有一种或几种因素在起作用, 例如氢键和盐桥对第 10 族木聚糖酶的热稳定性并不起决定性作用 (Kumar *et al.*, 2000; Lehmann *et al.*, 2001)。另外, 一些多功能区域的耐热木聚糖酶含有热稳定区 (TSD)。

3.3. 木聚糖酶的最适 pH 和 pI

不同微生物来源的木聚糖酶所能耐受的 pH 值一般是 3-10, 最适 pH 值一般为 4-7。不同木聚糖酶的等电点变化范围在 pH 值 3-10 之间。工业上应用的木聚糖酶在 pH 值范围上有不同的要求。例如, 在饲料工业中, 木聚糖酶作为饲料添加剂要求在酸性和中性的 pH 值范围作用。而在造纸工业中, 又要求木聚糖酶在碱性的 pH 值范围作用。所以, 对木聚糖酶结构中影响最适 pH 值的因素进行研究有利于木聚糖酶在生产中的应用。

根据第 10 族木聚糖酶超家族 4/7 中序列的同源性, Roberge (Roberge *et al.*, 1997) 对来源于 *S. lividans* 的木聚糖酶 XlnA 进行 N127D 点突变, 对突变酶的性质研究发现, 突变酶的结构没发生任何变化, 酶的最适 pH 由 7.1 下降到 6.5。最有趣的是, 这个单一点突变使酶的等电点由 5.1 变到 5.5, 即改变了整个酶的带电性。进一步研究发现, N127 对催化中间体起稳定作用并参与氢键网的形成, 对两个催化残基维持离子状态起重要作用。

Chen (Chen *et al.*, 2001) 等人用随机突变的方法研究来自 *Neocallimastix patriciarum* 的木聚糖酶 xyn-CD/WT。先将 xyn-CD/WT 的基因克隆在 pGEX-4T-1 载体上, 用 PCR 的方法构建随机突变库, 并用含有木聚糖的高 pH 值的平板筛选出耐碱突变株 xyn-09D, 再对 xyn-09D 进行随机突变, 又筛选出 5 株比 xyn-09D 的耐碱性更好的, 再利用定点突变将各突变株的突变位点集中起来, 获得含 7 个突变位点 (I97S、K168N、G214V、N164D、S128F、E24V、V218A) 的突变株 xyn-CDBFV。实验证明 xyn-CDBFV 比任何一种随机突变酶的耐碱性都高。野生型酶 xyn-CD/WT 的最适 pH 为 6.0, 当 pH 为 7.5 时, 酶活只余 10%, 而在 pH 为 8.5/9.0 时酶活为 0。相比之下, 突变株 xyn-CDBFV 的酶活在 pH 为 7.5、8.5、9.0 时的酶活是 pH 为 6.0 时的 60%、45%、25%。进一步研究表明, G214V 及 S128F 和 E24V 提高了酶的疏水性, N164D 使酶的负电性提高了, 这些对提高酶的耐碱性都有帮

助。K168N 也通过对带正电的赖氨酸的替换,间接提高了酶的负电荷,使酶的耐碱性提高。同时, xyn-CDBFV 突变酶的耐热性也有所提高。

在对来源于 *Aureobasidium pullulans* (Tanaka *et al.*, 2004) 嗜酸性木聚糖酶的研究中发现,位于活性中心的 E208 和 E114 为催化残基,与它们空间位置邻近的 E157 和 D73 对该酸性木聚糖酶的嗜酸性有重要作用。同样,来源于 *Aspergillus niger* (Krengel *et al.*, 1996) 的木聚糖酶的最适 pH 为 3.0,这与 D37 与催化残基 E170 和 E79 的互相作用有关。

还有人通过对酸性和碱性纤维素酶的氨基酸序列进行比较分析,发现了在碱性纤维素酶中有 8 个保守性氨基酸,其中有丙氨酸,丝氨酸,色氨酸和脯氨酸等。通过基因的定点突变表明,碱性纤维素酶的耐碱性与其分子中的丙氨酸和丝氨酸有关,它们可与活性位点氨基酸形成氢键。由于纤维素酶和木聚糖酶都为聚糖酶,活性中心相似,因而推测其耐碱机理可能也有相似之处。

总之,木聚糖酶的疏水性和负电性的提高,对提高酶的耐碱性可能有一定的作用,还有人推测木聚糖酶耐碱性可能与其分子中的丙氨酸和丝氨酸有关。关于木聚糖酶的最适作用 pH 和 pI 与其结构的研究还有待深入。

3.4 木聚糖酶的底物结合位点

木聚糖酶以可溶或不可溶性木聚糖为底物。但不同的木聚糖酶对底物的要求略有不同。例如:第 10 族木聚糖酶与底物结合需要较少的位点,特异性较低。但 MU-X2 (4-Methylumbelliferyl- β -D-xylobioside) 是第 10 族木聚糖酶的特异性底物。又如第 11 族木聚糖酶对较短的 β -1,4 寡聚糖有较高的亲和性等。

Kuno (Kuno *et al.*, 1999) 等人对来源于 *Streptomyces olivaceoviridis* 的 Xylanase A 进行研究,用组氨酸代替保守的催化残基 E128,酶对底物——对硝基 β -D-木二糖苷 (PNP-X2) 的亲合性提高了 1000 倍。说明组氨酸对酶与底物的结合有促进作用。但该突变酶的活性却大大下降,可能是由于组氨酸不能作为质子供体来完成酶的催化作用。

Kaneko (Kaneko *et al.*, 1999) 等人提出,点突变只能研究某些氨基酸在蛋白中的作用,而对蛋白的较大区域的功能研究无能为力。他们用“基因移动”的方法来研究蛋白的结构与功能之间的关系。即用所谓的“多肽模块”,它们一般是由 15 个氨基酸组成,能形成紧密球形结构的多肽序列。木聚糖酶 FXYN (*Streptomyces olivaceoviridis* E-86) 的模块 10 被来自 *Cellulomonas fimi* 的木聚糖酶 Cex 的模块 10 取代后,突变酶的 K_m 值下降到野生型的 1/10。根据 FXYN 和 Cex 的模块 10 的同源性,对 FXYN 的几个氨基酸进行删除和插入突变,结果表明,当 D133 或 S135 被删除时,酶的动力学性质不变,而当 D133 和 S135 一起被删除时,酶对 PNP-X2 底物的 K_m 由 2.0 mM 下降到 0.6 mM。在此双突变基础上在 140 位插入天冬酰胺时, K_m 进一步下降到 0.3 mM,而此时突变酶的模块 10 更接近 Cex 的模块 10。进一步研究表明, E128 是 FXYN 的催化残基, N127 是底物的 -1 结合位点, D133 和 S135 的删除及 Q140 的插入影响了 D132 和 Y172 及 R139 的氢键相互作用,使 Y172 更易于识别 PNP-X2 的酚环而与底物结合。由此可知, FXYN 的模块 10 对酶与底物的相互作用有关,并可通过一些氨基酸的改变而改变酶与底物的亲和力。

来源于 *S. lividans* 的木聚糖酶 XlnA 是第 10 族木聚糖酶中研究较多的酶,其催化区的三级结构已知。经同源性比较,发现了几个保守的芳香族氨基酸,它们位于催化残基附近的底物结合

位点。对该酶进行了 W85A/H/F、W266A/H/F、W274A/H/F、Y172A/F/S 点突变研究,结果显示,W85 以氢键同催化残基 E128 及 N127 相连,对酶的催化效率起重要作用。W85 的三个突变型酶的活性都下降 70%,W85F 突变没有改变酶与底物的亲和性,而 W85A/H 与底物的亲和性下降,说明芳香族氨基酸对底物结合的重要作用。W85A/H/F 使酶在无底物时 60℃ 的半衰期下降,说明 W85 对酶的热稳定性起作用。用非芳香族氨基酸对 Y172 进行替换,酶与底物的亲和性下降,底物的结合又会影响酶的热稳定性,而使酶的热稳定性下降。总之,W85、Y172、W274、W266 是酶与底物结合相关的残基,并且影响酶的热稳定性。而 W266 对酶的催化效率也有影响(Roberge *et al.*, 1999)。

Moreau (Moreau *et al.*, 1994) 等证明用带负电的天冬氨酸代替 *S. lividans* 木聚糖酶中的 A173 可以显著改变木聚糖酶的转糖基作用。利用定点突变的方法,证明了酪氨酸和色氨酸残基位于该酶与底物的结合位点。

总之,多种研究表明,芳香族氨基酸和杂环族氨基酸在酶与底物结合中起重要的作用,是底物的结合位点。利用点突变的技术可以在一定程度上改善酶的底物特异性和催化效率,使酶更好地应用于生产。

4. 问题与展望

木聚糖酶可以广泛应用于饲料工业、食品工业、纸浆工业、能源工业等众多领域,充分显示出它在生产上的巨大潜力(张红莲等, 2003; 胡沂淮等, 2002; Subramaniyan *et al.*, 2002)。有望在生产实践中应用的木聚糖酶必须具备优良性质,如高比活性(何永志等, 2004)的酶可降低应用成本,抗逆性强的酶具有更好的贮存和应用稳定性等。而在不同领域中应用的木聚糖酶还需具备一些特殊的性质。例如,在饲料中添加的木聚糖酶必须同时具备在酸性到中性的条件下均能维持高活性以利于在动物的整个消化道内起作用;耐饲料加工的高温,同时在正常动物体温下具有高活性;抗动物消化道内的蛋白酶降解等综合特性(黄大肪等, 2001; 方洛云等, 2002)。又如在纸浆工业中应用的木聚糖酶,应具有在强碱条件下具有高活性、热稳定性、抗各种化合物和各种离子等特性(谢响明等, 2003)。由于在不同领域中应用的木聚糖酶需具有不同的综合性性质,而天然酶往往难以满足,因此,有必要利用现代基因工程技术,有目的地选育、改良木聚糖酶,以满足实际生产的需要,从而发挥其应用潜力。

虽然到目前为止已对木聚糖酶的结构与功能进行了大量的研究,在分子水平上对与各种酶学性质相关的结构有了一定的了解,也通过蛋白质工程创造出一些性质有所改良的工程酶,但还不能形成一套普遍适用的、完整的、确定的理论方法来指导特定木聚糖酶的定向改良。随着基因突变技术和蛋白质高级结构研究技术的发展,大量性质各异的木聚糖酶,尤其是在极端微生物中获得的具有极端性质的木聚糖酶被发现,有望使木聚糖酶的结构与功能研究取得突破性进展。

第二节 DNA 改组 (DNA shuffling) 技术简介

DNA 改组 (DNA shuffling) 是 90 年代中期发展起来的一种新技术。该技术在试管里模拟达尔文进化的过程, 在分子水平上创造分子的多样性, 结合灵敏的筛选技术, 迅速得到理想的变异。本文概述了有关 DNA 改组的基本原理和方法, 并简略介绍了当今该领域的研究成果和发展动态。

1. DNA 改组的原理

1994 年, 一种崭新的定向分子进化新技术——DNA shuffling (DNA 改组) 在美国 Affymax 研究所的 Stemmer 实验室悄然出现 (Stemmer, 1994)。“shuffling”一词是 1982 年 Leder 在 “moving genes” 一书中首次提出。DNA 改组是指 DNA 分子的体外重组, 是基因在分子水平上进行有性重组 (Sexual recombination)。通过改变单个基因 (或基因家族, Gene family) 原有的核苷酸序列, 创造新基因, 并赋予表达产物以新功能。实际上, 该技术是一种分子水平上的定向进化 (Directed evolution), 因此也称为分子育种 (Molecular breeding) (Chang *et al.*, 1999)。在创造新基因的过程中, 要设法产生各种变异。这主要通过有性 PCR (Sexual PCR) (Smith *et al.*, 1994)、交错延伸程序 (Stagger extension process, StEP) (Zhao *et al.*, 1998) 完成。要从大量的突变体库中获得理想的个体, 最首要的问题是筛选方法, 筛选方法越好, 成功的可能性越大。因此, DNA 改组技术把筛选方法放在首位。

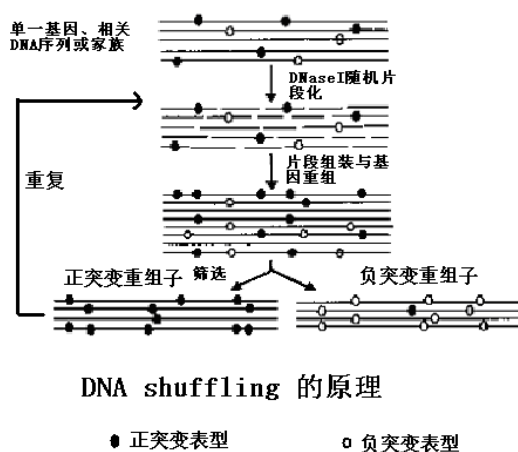


图 1-2 DNA shuffling 的原理

Fig. 1-2 The principle of DNA shuffling

2. DNA 改组技术的发展

在 DNA 改组技术发明之前, 定向诱变和随机诱变方法为基本的创造变异的途径(肖志壮等, 2001)。定向诱变适合于对基因及表达的蛋白产物的三维结构及功能等方面的信息了解得较为透彻的前提下所采用的方法(徐卉芳等, 2002)。以往的研究表明, 这种方法的成功率并不高。在大多数情况下, 对目标基因表达产物的高级结构知之甚少, 此时根本无法运用定向突变的方法。随机诱变方法是通过引进随机的碱基替换, 进而筛选理想的突变体。通常, 采用易错 PCR(Error-prone PCR) (Grame *et al.*, 1992) 的方法引入突变。本方法的关键点在于如何选择合适的突变频率(陈晓穗等, 2003)。一般有益突变的频率很低, 绝大多数突变是有害的。当突变频率太高时, 几乎无法筛选到有益突变; 但突变频率也不能太低, 否则未发生任何突变的野生型将占据突变群体的优势, 也很难筛选到理想的突变体。以往的研究表明, 目标基因内有 1.5-5 个碱基发生碱基替换时, 诱变结果是最理想的(Harayama *et al.*, 1998)。总体来看, 随机诱变的方法带有一定的盲目性, 在实际工作中成功率很低。

最初的 DNA 改组方法是在随机诱变的基础之上发展而来的。但 DNA 改组技术不象传统的定向进化方法, 在进化过程中不必了解具体造成这种改变的中间过程的细节, 只需要检测 DNA 改组带来的效果。如图 1-2, 首先对一组序列相关的 DNA 序列(经随机诱变得到的一组有益突变体, 或天然存在的基因家族), 经过 DNaseI 消化产生一系列随机切割的 DNA 片段, 然后, 在没有引物的情况下, 采用有性 PCR 方法进行合成。随着循环数的增加, PCR 产物将越来越接近切割前的目的基因的长度。最后, 用基因两侧的引物合成全长基因。该基因已经包含了不同突变体发生的突变。在 DNA 改组中, 包括基因重新组装的过程, 正是这一点, DNA 改组与以往的诱变技术有根本的不同。DNA 改组方法最初采用单个基因进行改造。如荧光蛋白基因、 β -半乳糖苷酶基因等。采用基因家族进行基因改组(Family shuffling)是富有成果的尝试, 并逐渐成为 DNA 改组的主要方法。基因家族里的基因可以来源于不同种属。但要求被改组的 DNA 基因之间要有一定程度的同源性。一般 DNA 序列间要有足够的相似性, 以保证信息的交流, 即基因间彼此的同源性足以支持有性 PCR 反应的进行, 具体体现在: 有性 PCR 过程中, 在不断地变性和复性反应中能在不同模板上随机互补结合并进一步延伸。

1997 年, France Arnold 研究组巧妙地设计了 PCR 程序, 将 DNA 改组技术进一步改进提高。他们创造性地提出了 StEP (Staggered extension process), 如图 1-3。在一个反应体系中以两个以上相关的 DNA 片段为模板, 进行 PCR 反应。引物先在一个模板链上延伸, 随之进行多轮变性和短暂的复性/延伸反应。在每个循环中, 延伸的片段在复性时与不同的模板配对。Zhao 等人的 StEP 实验方案为: 95°C 5 min; 80 个循环: 94°C 30 s, 55°C 5 s。由于模板的改变, 所合成的 DNA 片段中包含了不同模板 DNA 的信息。这种交错延伸过程继续进行, 直到获得全长的基因。由此可以看出, 交错延伸程序的核心点也是有性 PCR 技术。此方法较上述有性 PCR 法, 省去了用 DNaseI 切割成片段这一步, 因而简化了 DNA 改组的方法。

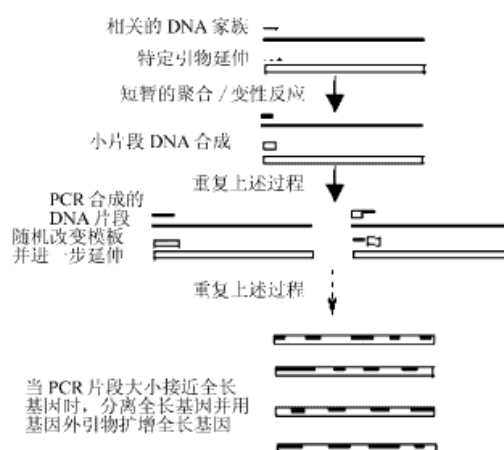


图 1-3 StEP 的原理

Fig. 1-3 The principle of StEP

随着研究的进一步深入,为了解决 DNA 改组过程中突变率给筛选造成的困难,研究者提出了对 DNA 改组技术的改进方案。①将亲本基因单链化,用 DNaseI 随机切割这些单链 DNA 后进行常规的 DNA 改组。②用限制性内切酶替代常规的 DNA 改组中的 DNaseI (Kikuchi *et al.*, 1999)。以此衍生出了很多简单高效的改组新方法,如 DOGS 法 (Degeneration oligonucleotide gene shuffling, Gibbs *et al.*, 2001; Bergquist *et al.*, 2005)。由于一些限制性内切酶,如: *Fok* I 和 *Bbv* I 的识别位点与切割位点不重叠,而产生不同的粘性末端,再当连接的时候,同源片段之间就可以混合起来组装成新的顺序正确的嵌合体分子,这种重组方法不需要 PCR 的过程 (王强等, 2004), 更加简单。

除了 DNA 改组技术,近几年发展出了一些新的定向进化技术,如随机引物体外重组 (RPR: Random-priming in vitro recombination, Shao *et al.*, 1998) 和临时模板随机嵌合生长 (RACHITT: Random chimera genesis on transient templates, Coco *et al.*, 2001), 以及增长截短法等 (ITCHY: incremental truncation for the creation of hybrid enzyme, Lutz *et al.*, 2001)。这些方法极大的丰富了定向进化的思路,完善了定向进化的步骤,使蛋白分子体外定向进化日臻完美。

美国宾夕法尼亚州立大学一个研究团体正在研发用电脑来预测 DNA 重组的数目和位置,希望改变只依据实验证实或经验法则来判断实验优劣的方法,改善实验预测和实验结果严重不符的现象。科学家在电脑上,利用热力学 (Thermodynamics) 和反应工程学 (Reaction engineering) 来评估和塑造这个复杂反应网络的模型,因此,我们有望预测不同亲本的基因是从哪些位置发生重组的。从而进一步指导实验设计。

3. DNA 改组技术的成果

随着该技术的推广应用,越来越多实验室加入 DNA 改组有关的研究中。在美国和欧洲有专门研究 DNA 改组的实验室;在亚洲主要研究集中在日本。在我国,有关 DNA 改组的成果不多,而且绝大多数属于初步的研究和探索阶段。有报道的如利用 DNA family shuffling 技术提高青霉素 G 酰

化酶合成活力（周政等，2003）；DNA改组技术在水蛭素进化中的应用（周育等，2001）；通过DNA改组技术获得高活性 β -葡萄糖苷酸酶（熊爱生等，2003）以及组织型纤溶酶原激活物基因的DNA改组等（黄庆生等，2003）。其中，利用DNA改组的方法获得优势突变体的一些成功范例见表1-2。

表 1-2 DNA shuffling 技术的一些成果

Table 1-2 Some results of DNA shuffling

类 型	示 例	特 性	活性增加倍数	潜在应用领域
蛋白	马心肌球蛋白	过氧化物酶活性	25 ¹	生物制药
	绿色荧光蛋白	荧光强度	45 ²	基础研究
	重组蛋白 RecA	重组率	100 ³	基础研究
抗体	鼠源抗体	表达水平	100 ⁴	生物制药
	人源抗体	亲和性	400 ⁴	生物制药
酶	谷胱甘肽转移酶	底物特异性	100 ⁵	生物制药
	天冬氨酸转氨酶	催化特异性	10000 ⁶	生物制药
	过氧化物酶	50℃热稳性、	110 ⁷	工业酶
	过氧化物酶	抗氧化性	2.8	
	枯草菌素 E	65℃半衰期	25~50 ⁸	工业酶
	β -内酰胺酶	抗生素的抗性	32000 ⁹	抗生素
	卡那霉素磷酸转移酶	抗生素的抗性	64 ¹⁰	抗生素
	人碱性转移酶	碱性基团的转移	10 ¹⁰	生物制药
	β -半乳糖苷酶	底物特异性	1 000 ¹¹	基础研究
	头孢菌素酶	特异活性	270~540 ¹²	生物制药
	HSV 胸腺嘧啶激酶	磷酸化活性	500 ¹³	基因治疗
细胞因子	肿瘤抑制因子 P53	37℃半衰期	12 ¹³	基因治疗
	人类干扰素	抗病毒	285000 ¹⁴	基因治疗
代谢途径	Antrazine 代谢途径	Antrazine 降解	80 ¹⁰	生物制药
	砷酸盐代谢途径	砷酸盐解毒	40 ¹⁵	生物制药
	汞代谢途径	汞解毒	12 ¹⁰	生物制药

注：参考文献 1. (Wan *et al.*, 1998); 2. (Crameri *et al.*, 1996); 3. (Buchholz *et al.*, 1998); 4. (Crameri *et al.*, 1996); 5. (Hansson *et al.*, 1999); 6. (Yano *et al.*, 1998); 7. (Cherry *et al.*, 1999); 8. (Zhao *et al.*, 1998); 9. (Stemmer *et al.*, 1994); 10. (<http://www.maxygen.com/>); 11. (Zhang *et al.*, 1997); 12. (Crameri *et al.*, 1998); 13. (Matsumura *et al.*, 1999); 14. (Changtal *et al.*, 1999); 15. (Crameri *et al.*, 1997)。

4. DNA 改组的应用前景

DNA 改组技术自诞生之日起就显示了其巨大的应用价值，在生物工程的各个领域均具有巨大的应用潜力。

首先，DNA 改组在基础理论研究中发挥了重要的作用，例如应用 DNA 改组技术使报告基因绿色荧光蛋白的荧光强度提高了 40 多倍；另外，DNA 改组技术也为特种工业酶的研究成功提供了有效的工具，Maxygen 公司的科学家从 26 种微生物中克隆了工业酶基因。运用 DNA 改组技术，他们创造了 600 个新的子基因，其中 77 个可以表达超级酶。通过筛选，发现这些超级酶在高、中、低三种 pH 的环境下，均比自然存在的酶有较好的功能；其他超级酶具有抗有机溶剂或抗热性，具有巨大的商业价值(刘国奇等，2000)。在医药研究方面，DNA 改组为生物制药、疫苗研制、基因治疗等注入了新的活力，为人类攻克疑难病症提供了希望。此外，DNA 改组技术在农业、石油化工、生物治疗、兽药研究、营养、人类基因治疗、生物武器的研究等重要领域也具有广阔的应用开发前景（表 1-3）。可以看出，DNA 改组几乎可以应用到与国计民生相关的各个领域。

表 1-3 DNA 改组技术的应用领域

Table 1-3 Application fields of DNA shuffling

分 类	用途
进化 DNA	转基因；疫苗载体；DNA 疫苗；表达载体；基因转移载体
进化蛋白	基因治疗用酶；细胞因子；生长因子；抗体；工业酶
进化生物体	植物；科研用生物体；化学及药物加工；疫苗有机体；石油加工；除污生物

本研究的目的是和意义

木聚糖酶的应用很广，但能够直接应用于工业生产的天然木聚糖酶却很少，工业用酶要求有较高的酶活性，良好的 pH 稳定性及热稳定性等性质。如在饲料制粒的过程中，有一个短暂的高温处理，大多数木聚糖酶在此过程中都会大幅度失活，因此耐高温的酶有更好的应用前景。同时，饲料用酶制剂必须在动物的体温下，在酸性的胃和中性的肠道中保持高活性，天然的酶很难同时满足以上的需要。在造纸工业中，酶还必须耐受高温和高碱性环境。因此，利用基因工程的方法对酶基因进行改造是一种有效的手段。这也是该研究的意义所在。

来源于橄榄绿链霉菌 (*Streptomyces olivaceoviridis*) A1 的木聚糖酶 XYNB 是一种性质优良的木聚糖酶，已经申请了专利，具有独立的知识产权。该酶具有高比活性，达到 2814.45 IU/mg；较好的 pH 稳定性，pH 4-9 保持 80% 的活性；抗胃蛋白酶和胰蛋白酶，保持 95% 以上的活性；无纤维素酶活性。XYNB 已在饲料中作为添加剂应用。但该酶的热稳定性一般，在应用上存在不足。本研究的目的是在保持 XYNB 上述优良性质的基础上，利用定点突变及 DNA shuffling 的方法对酶基因进行改良，重点在于提高酶的热稳定性，使其更适应工业生产的要求。

同时，对 XYNB 的催化残基和影响最适 pH 值的关键氨基酸进行推测和分析，根据突变酶的酶学性质，揭示木聚糖酶的结构与功能之间的关系，为分析木聚糖酶的催化机制及指导其分子改良奠定基础。

第二章 木聚糖酶 XYNB 热稳定性的分子改良

1. 实验材料

1.1 菌种和质粒

木聚糖酶基因 *xynB* (EMBL 收录号为: AJ292317) 由本实验室从 *Streptomyces olivaceoviridis* 中克隆 (张红莲等, 2003); 重组质粒 pUC19-*xynB* 由本实验室保存。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109、BL21 (DE3) 及巴斯德毕赤酵母 GS115、表达质粒 pET22b (+) 及表达载体 pPIC9 为 Invitrogen 公司产品。

1.2 工具酶

限制性内切酶 *Kpn* I、*Eco*R I、*Sma* I、*Nco* I、*Not* I、*Hind*III 和 *Bgl* II 及 DNA 回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; T₄ DNA 连接酶为 Promega 公司产品; *Taq* 酶为天为时代公司的普通 *Taq* 酶和 Pfu *Taq* 酶。

1.3 试剂

蛋白低分子量标准购自 Promega 公司; 1 kb 和 100 bp DNA 分子量标准购自鼎国公司; 丙烯酰胺、N, N'-甲叉双丙烯酰胺及无氨基酸酵母氮源 (YNB)、生物素 (Biotin)、琼脂糖、可溶性木聚糖 4-O-Me-D-glucurono-D-xylan (From Birchwood) 购自 Sigma 公司; 酵母提取物、蛋白胨购自 Oxford 公司; X-gal、IPTG 购自经科公司; 蛋白质分子量标准为 Phamacia 公司产品; 其余为国产分析纯试剂。

柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液: 以 0.1 mol/L 的柠檬酸或 0.2 mol/L 的 Na₂HPO₄ · 12H₂O 调节 pH, 配制不同 pH 的缓冲液。

1% (W/V) 的可溶性 4-O-Me-D-glucurono-D-xylan 溶液的制备:

0.5 g 4-O-Me-D-glucurono-D-xylan 溶于 50 mL 相应的 pH 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中, 100°C 煮沸 10 min, 在 10000 rpm 下离心 5 min, 取上清液。

Somogyi 试剂 (碱式铜试剂): 0.4% CuSO₄ · 5H₂O, 2.4% Na₂CO₃, 1.2% KNaC₄H₄O₆ · 4H₂O, 1.6% NaHCO₃, 18% Na₂SO₄。

将 24 g Na₂CO₃ 和 12 g KNaC₄H₄O₆ · 4H₂O 溶于 250 mL 蒸馏水中。将 4 g CuSO₄ · 5H₂O 溶解于 40 mL 蒸馏水中, 混合上述两种溶液, 再加入 16 g NaHCO₃; 将 180 g Na₂SO₄ 溶于 500 mL 煮过的蒸馏水

中，并加入到上述溶液中，用蒸馏水定容到 1000 mL，30℃下贮藏。

Nelson试剂(砷钼酸试剂): 5% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4.25% (v/v) 浓 H_2SO_4 , 0.6% $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。
25 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于 450 mL 蒸馏水中，加入 21 mL 浓 H_2SO_4 ，再加入 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于 25 mL 蒸馏水中所配成的溶液，用蒸馏水定容到 500 mL，室温下棕色瓶贮藏。使用前两天配置。

溶液 I: 50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 10 mmol/L EDTA。

溶液 II: 0.2 mol/L NaOH, 1% SDS (现配现用)。

溶液 III: 3 mol/L 醋酸钾, 5 mol/L 醋酸 (pH4.8)。

TAE (50×): 242 g Tris 碱, 57.1 mL 冰乙酸, 100 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0), 用无菌水定容至 1000 mL。

蛋白上样缓冲液 (2×): 100 mmol/L Tris-HCl (pH6.8)、200 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)、4% SDS、0.2% 溴酚蓝、10% 甘油。

30%丙烯酰胺溶液: 29 g 丙烯酰胺, 1 g N, N'-亚甲叉丙烯酰胺, 溶于 100 mL 水。

考马斯亮蓝染液: 0.24 g 考马斯亮蓝 R250 溶于 90 mL 甲醇:水 (1:1, v/v) 和 10 mL 冰乙酸中。

脱色液: 10% 冰乙酸。

考马斯亮蓝试剂: 考马斯亮蓝 G-250 100 mg 溶于 50 mL 95%乙醇中，加入 100 mL 磷酸(磷酸的初始浓度为 85%)，用蒸馏水稀释至 1000 mL，滤纸过滤。

标准蛋白质溶液: 结晶牛血清白蛋白，预先经微量凯氏定氮法测定蛋白氮含量，根据其纯度用 0.15 mol/L NaCl 配制成 1 mg/mL 蛋白溶液。

1.4. 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH7.0(固体培养基含 1.5%琼脂)。

完全培养基 YPD: 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L。

转化培养基RDB: YNB 13.4 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 生物素 4×10^{-4} g/L, 琼脂粉 20 g/L, 山梨醇 186 g/L。

选择培养基MD: YNB 13.4 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 生物素 4×10^{-4} g/L, 琼脂粉 20 g/L。

选择培养基MM: YNB 13.4 g/L, 甲醇 5 mL/L, 生物素 4×10^{-4} g/L, 琼脂粉 20 g/L。

诱导表达培养基BMGY: 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母氮源(YNB) 13.4 g/L, 生物素 4×10^{-4} g/L, 甘油 10 mL, pH6.0。

诱导表达培养基BMMY: 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母氮源(YNB) 13.4 g/L, 生物素 4×10^{-4} g/L, 甲醇 5 mL/L, pH6.0。

发酵培养基 10×Basal Salts: 磷酸 26.7 mL/L, 硫酸钙 0.93 g/L, 硫酸钾 18.2 g/L, 硫酸镁 14.9 g/L, 氢氧化钾 4.13 g/L, 葡萄糖 40 g/L。

发酵中所用的微量盐溶液 PTM1: 硫酸铜 6.0 g/L、碘化钠 0.08 g/L、硫酸锰 3.0 g/L、钼酸钠 0.2 g/L、硼酸 0.02 g 氯化钴 0.5 g/L、氯化锌 20 g/L、硫酸亚铁 65 g/L、Biotin 0.25

g/L、硫酸 5 mL/L。

上述培养基中除酵母氮源 (YNB)、甲醇、生物素、氨基酸、PTM1 需过滤除菌，葡萄糖需在 108℃ 灭菌 30 min 外，其余均在 121℃ 灭菌 20 min。

1.5 主要仪器

基因导入仪 (BioRAD 公司)、PCR 仪 (Techne 公司)、高速离心机 (Sorvall 公司)、3 升发酵罐 (Bioengineering 公司)、蛋白电泳仪 (Pharmacia 公司)、ÄKTA FPLC 蛋白质纯化系统 (Amersham Pharmacia Biotech 公司)。

2. 研究方法

2.1 木聚糖酶 XYNB 的同源建模

对 XYNB 的同源建模在 <http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html> 网站上完成 (Guex *et al.*, 1997)。

2.2 突变位点的确定

根据木聚糖酶 XYNB 的同源建模及氨基酸序列的相似性，设计了以下定点突变：

表 2-1 突变位点的设计

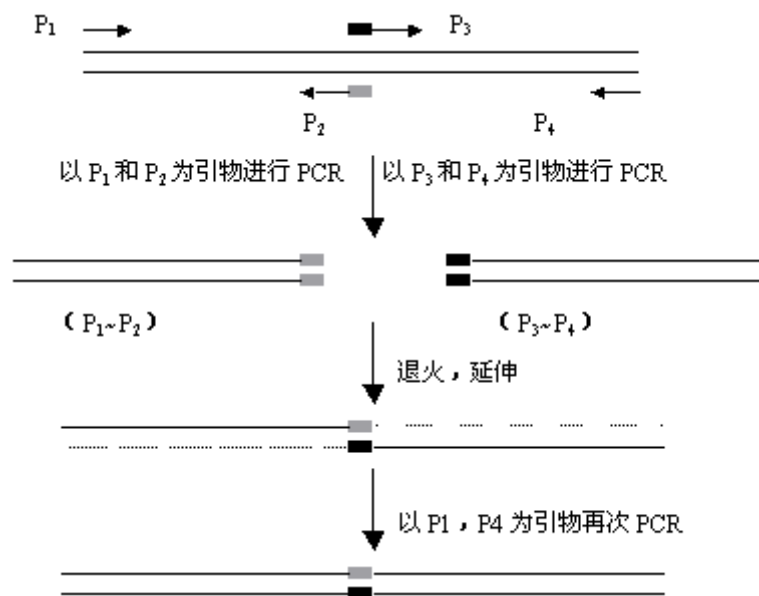
Table 2-1 Design of mutations

突变氨基酸	在蛋白二级结构中的位置	突变目的	方法	突变酶命名
T11Y	β -sheet B1, B2 之间	增加嗜热木聚糖酶表面芳香族氨基酸的相互作用来提高热稳定性	两步 PCR	T11Y
N13D	β -sheet B1, B2 之间	通过增加电荷来提高热稳定性	两步 PCR	N13D
S40E	β -sheet A3	通过增加蛋白表面的电荷来提高热稳定性	Over-lapping PCR	S40E
氨基端前 33 个氨基酸	包括 β -sheet B1, B2, A2	将氨基端替换为嗜热木聚糖酶的氨基端来提高热稳定性	Over-lapping PCR	TB
S109C/N153C	β -sheet B9/ α -helix N 端	通过分子内二硫键对 α 螺旋的稳定作用来提高热稳定性	定点突变试剂 盒	XS
氨基端端替换结合 S109C/N153C 端	包括 β -sheet B1, B2, A2 及 β -sheet B9/ α -helix 氨基端	综合以上因素，优化热稳定性	Over-lapping PCR	TS

2.3 突变方法

2.3.1 Over-lapping PCR 程序

Over-lapping PCR 用于片段拼接或定点突变，是简单高效的方法。共需要设计四条引物，包括扩增全长突变基因的上下游引物（分别为引物 P₁、P₄，引物两端带有酶切位点，便于连入载体）；位于拼接交界点或用于定点突变的上下游引物（分别为引物 P₃、P₂，引物一般较长，大于 20 nt，P₂、P₃ 反向互补）。原理如下：



具体扩增程序如下：

第一轮 PCR：

定点突变的的目的基因所在的质粒DNA稀释50倍后取1 μL作为PCR模板，分别利用P₁，P₂和引物P₃，P₄作为引物，Pfu *Taq*（注：必须使用）进行两个反应的扩增，扩增条件为：

变性：94℃ 5 min，1循环
 扩增：94℃ 30 sec
 55℃ 30 sec
 72℃ 2 min，30循环
 延伸：72℃ 10 min

第二轮 PCR：

取以上两种 PCR 产物等体积混合，稀释 10 倍后取 1 μL 作为 PCR 模板，P₁，P₄ 作为引物，Pfu *Taq*（注：非必须）进行第二轮 PCR 扩增，扩增条件为：

反应体系中先不加入引物，94℃ 2min，72℃ 1min，1 循环后加入引物；

变性：94℃ 5 min，1循环
 扩增：94℃ 30 sec
 55℃ 30 sec

72°C 1 min, 30循环

延伸: 72°C 10 min

取3 μ L以上各PCR产物在1%琼脂糖凝胶上电泳。在紫外灯下照相纪录结果。用回收试剂盒回收全长的突变基因, 用于酶切和连接。

2.3.2 两步 PCR 程序

由于突变位点接近目的基因的5'端, 所以设计三个引物, 分别是扩增全长突变基因的上下游引物(分别为引物 I, II)及包含突变位点的正向引物III, 引物 I 和III有大于10 nt的相同序列, 便于在第二步PCR中进行扩增。

第一步PCR:

定点突变的目的基因所在的质粒DNA稀释50倍后取1 μ L作为PCR模板, 用引物III和II, Pfu *Taq* (注: 必须使用Pfu *Taq*) 进行扩增, 扩增条件为:

变性: 94°C 5 min, 1循环

扩增: 94°C 30 sec

55°C 30 sec

72°C 2 min, 30循环

延伸: 72°C 10 min

第二步PCR:

取以上 PCR 产物, 稀释 50 倍后取 1 μ L 作为 PCR 模板, 引物 I 和 II, Pfu *Taq* 进行第二步 PCR 扩增, 扩增条件为:

变性: 94°C 5 min, 1循环

扩增: 94°C 30 sec

55°C 30 sec

72°C 1 min, 30循环

延伸: 72°C 10 min

取3 μ L以上各PCR产物在1%琼脂糖凝胶上电泳。在紫外灯下照相纪录结果。用回收试剂盒回收全长的突变基因, 用于酶切和连接。

2.3.3 定点突变试剂盒程序

见Promega公司Altered Sites II. In vitro Mutagenesis System (www.Promega.com) 产品说明。

2.3.4 突变引物

表 2-2 突变引物表

Table 2-2 Oligonucleotide primers for mutagenesis

突变酶	引物名称	引物序列(下划线标明突变碱基)	方法
T11Y	引物 I	5' gcgaattcgccacgggtcatcaccaccaaccagacc 3'	两步 PCR
	引物 II	5' taatgcggccgctcagccgctgaccgtgatgttga 3'	
	引物 III	5' tcatcaccaccaaccagaccggtc <u>t</u> acaacaacgggttc 3'	
N13D	引物 I	5' gcgaattcgccacgggtcatcaccaccaaccagacc 3'	两步 PCR
	引物 II	5' taatgcggccgctcagccgctgaccgtgatgttga 3'	
	引物 III	5' aaccagaccggcaccacacgacgggttctactac 3'	
S40E	引物 1	5' gcgaattcgccacgggtcatcaccaccaaccagacc 3'	Over-lapping PCR
	引物 2	5' gcagttcgtccact <u>c</u> ggtgctgtagtt 3'	
	引物 3	5' aactacagaccgagtggaactgc 3'	
	引物 4	5' taatgcggccgctcagccgctgaccgtgatgttga 3'	
TB/TS	引物 1	5' gcgaattcgccgtagctccaacgagaccggg 3'	Over-lapping PCR
	引物 2	5' ccacgaggtgctgtagttgccgccagggccagctcc 3'	
	引物 3	5' ggcggcaactacagcacctcgtgg 3'	
	引物 4	5' taatgcggccgctcagccgctgaccgtgatgttga 3'	
XS	引物 109	5' ggcacggtcacctgacgacggcgacg 3'	突变试剂盒
	引物 153	5' atcaccaccggctgccacttcgacgc 3'	

2.4 重组表达载体的构建

2.4.1 pET22b(+)-*xynB'* 表达载体(*xynB'* 指任意突变酶基因)

通过 *Nco* I 和 *Hind*III 双酶切位点将 PCR 获得的突变酶基因 *xynB'* 克隆进 pET22b(+) 载体, 电转化大肠杆菌 BL21。重组质粒进行酶切和测序鉴定。

2.4.2 pPIC9-*xynB'* 表达载体

PCR 产物通过 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切, 定向插入到 pPIC9 上的 *Eco*R I 和 *Not* I 位点之间, 形成重组质粒 pPIC9-*xynB'*, 与信号肽编码序列形成正确的阅读框架, 从而将目的基因克隆到 AOX1 启动子下游。

2.5 重组木聚糖酶的表达及纯化

2.5.1 在大肠杆菌中的诱导表达

将过夜培养活化的菌种以 1% 的接种量转接入 5 mL LB 培养基中（加 Amp 至终浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ ），37 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌 3 h，使 OD₆₀₀ 的值达到 0.6–0.7，加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L，28 $^{\circ}\text{C}$ ，150 rpm 诱导 3–4 h，取 500 μL 诱导表达的菌液，12000 rpm 离心 5 min，将菌体离心沉淀，并用 pH 5.2 的柠檬酸–磷酸氢二钠缓冲液洗涤，以 600 μL 该缓冲液悬浮菌体。在冰浴中以 100 Hz 频率超声波破碎细胞，每次 6 s，间隔 20 s，至菌液透明，离心，对细胞裂解上清液进行酶活性测定，并进行表达蛋白的 SDS–PAGE 分析。

2.5.2 在毕赤酵母中的表达

将重组质粒 pPIC9-*xynB'*（约 10–20 μg ）用 2–3 倍过量的 *Bgl* II 作线性化处理，电泳检测酶切是否完全。酚/氯仿（1: 1），氯仿各抽提一次，乙醇沉淀，70% 乙醇洗两次，无菌水溶解，–20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用，将以上线性化的质粒电击转化毕赤酵母。

2.5.2.1 酵母感受态的制备

- (1) 将毕赤酵母 GS115 接种到含 5 mL YPD 液体培养基的 100 mL 三角瓶中，28–30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜培养。
- (2) 将过夜培养物按 0.1%–0.5% 的接种量转接到含 200 mL YPD 液体培养基的 500 mL 三角瓶中培养至 OD₆₀₀ = 1.3–1.5。
- (3) 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5000 rpm 离心 5 min，收集菌体。
- (4) 用 200 mL 冰预冷的去离子水轻柔重悬沉淀，4 $^{\circ}\text{C}$ 、5000 rpm 离心 5 min，收集菌体。
- (5) 用 100 mL 冰预冷的去离子水轻柔重悬沉淀，4 $^{\circ}\text{C}$ 、5000 rpm 离心 5 min，收集菌体。
- (6) 用 20 mL 冰预冷的 1 mol/L 山梨醇轻柔重悬沉淀，4 $^{\circ}\text{C}$ 、5000 rpm 离心 5 min，收集菌体。
- (7) 用 0.4 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇轻柔重悬沉淀，按每管 80 μL 分装成备用的毕赤酵母感受态细胞，保存于 –70 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.5.2.2 酵母细胞的转化

- (1) 将 80 μL 已制备好的感受态细胞与 10 μL 已制备好的线性化待转化质粒 DNA 混合，并将其转至 0.2 cm 电转化杯中；
- (2) 将装有混合液的转化杯冰浴 5 min；
- (3) 调整好基因导入仪的参数（置于毕赤酵母档），电击一次，电压 2000 V，时间一般应约为 5 ms；
- (4) 立即往转化杯中加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇溶液，混匀，并将其转至灭过菌的离心管中；
- (5) 将混合液涂于 RDB 板上，每个 RDB 板上约涂 200–600 μL 的混合液；
- (6) 将 RDB 板置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 2–3 d，直到长出菌落为止。

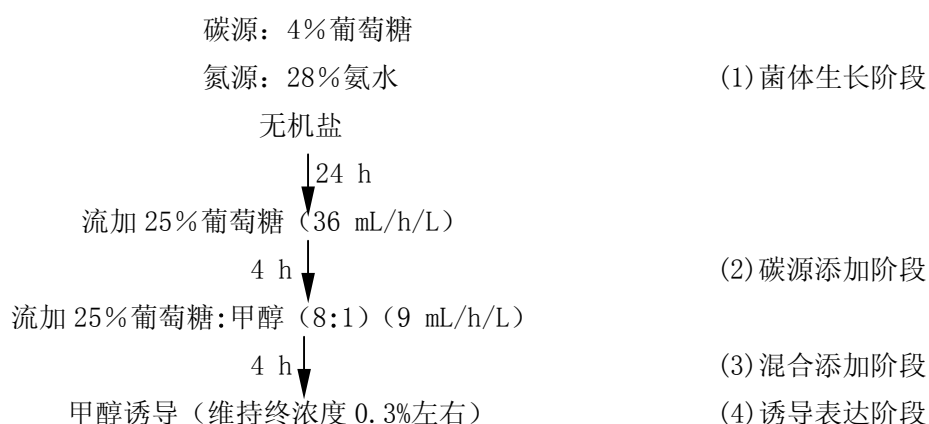
2.5.2.3 转化子的筛选

- (1) 用灭过菌的牙签从长有转化子的 RDB 板上挑取单菌落，按照编号接种到 MM 平板上，再点到相应编号的 MD 平板上，每个平板上一般接种 100 个单菌落；
- (2) 将点有转化子的 MM、MD 平板置于 30℃ 培养箱中培养 1-2 d，至菌落长出。阳性转化子应在 MM 平板上不生长或生长缓慢，而在 MD 平板上能正常生长。

2.5.2.4 目的基因在毕赤酵母中的表达检测

- (1) 按编号挑取 MD 平板上的单克隆接种于装有 2 mL BMGY 培养基的 10 mL 离心管中，30℃、250-280 rpm 摇床培养 2-3 d；
- (2) 将摇床培养 2-3 d 的培养液 5000 rpm 离心 15 min，取沉淀（尽量将上清除尽），再往沉淀中加入 1 mL 含有 0.5% 甲醇的 BMMY 培养基，重新在 30℃、250-280 rpm 诱导培养；
- (3) 诱导培养 48 h 后，每管取出 200 μ L 菌液，5000 rpm 离心 5 min，取上清，部分用于酶活性检测，部分用于 SDS-PAGE 凝胶电泳检测，对有酶活性的克隆，进一步的诱导表达；
- (4) 在筛选出有酶活性的菌液中加入 100 μ L 10 $\times$ 甲醇溶液，以补偿甲醇的挥发损失，使菌液中的甲醇浓度保持在 0.5%，以后每隔 12 h 取样一次，并补加甲醇，直至 96 h (4 d)，筛选出几株表达量高的准备上发酵罐。

2.5.2.5 发酵罐水平重组酵母的高细胞密度发酵



- (1) 菌株培养阶段。发酵培养基 10 $\times$ Basal Salts 接种前首先加入 28% 氨水使培养基的 pH 达到 5.0 (氨水同时也作为菌株生长的氮源)，再按每升培养基加 4.37 mL 的量加入 PTM1。5-10% 接种种子液，通气搅拌培养 18-24 h，在培养过程中随着菌株的生长，培养基中的溶氧量由 100% 逐渐降低。当碳源消耗完后溶氧量会再度升高，当溶氧升高至 80% 以上时，开始碳源添加阶段。
- (2) 碳源添加阶段。流加 25% 葡萄糖（每升中含 12 mL PTM1），流加量为 36 mL/h/L，培养 4 h。调整通气量使溶氧量始终大于 20%。
- (3) 碳源-甲醇混合添加阶段。流加 25% 葡萄糖:甲醇 (8:1) 培养 4 h，流加量为 9 mL/h/L，控

制溶氧量始终大于 20%。

(4) 诱导表达阶段。加入诱导剂甲醇（每升中含 12 mL PTM1），使甲醇终浓度维持在 0.3%，溶氧量始终大于 20%。在诱导过程中每 12 h 取样一次测定表达的木聚糖酶的积累量并进行表达蛋白的 SDS-PAGE。

2.5.3 大肠杆菌重组酶的 Western Blot 分析

2.5.3.1 SDS-PAGE

12%分离胶，依次混合如下成分：

水	6.6 mL
30% 丙烯酰胺凝胶	8.0 mL
1.5M Tris(pH8.8)	5.0 mL
10% SDS	0.1 mL
10% 过硫酸胺	0.1 mL
TEMED	10 μ L

加入 TEMED 后，凝聚开始，快速灌胶，留出齿梳及加样孔的位置，在上层覆盖一层水。聚合 30 min，制备 5% 浓缩胶：

水	3.4 mL
30% 丙烯酰胺凝胶	0.83 mL
1.0 M Tris(pH6.8)	0.63 mL
10% SDS	0.05 mL
10% 过硫酸胺	0.05 mL
TEMED	5 μ L

混匀，灌注在分离胶上，小心插入齿梳，垂直放置凝胶，使其聚合。

取 500 μ L 用 IPTG 诱导表达的大肠杆菌菌液，12000 rpm 离心 5 min，蒸馏水清洗一次菌体，离心去上清，加 30 μ L 蒸馏水，再加等体积的 2 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液混匀，在沸水中煮 3 min 变性，室温冷却，每个点样孔 15 μ L 上样。

电泳：浓缩胶电压为 8 V/cm，分离胶变为 15 V/cm，循环水浴保持低温。电泳至加样缓冲液染料距底部约 1 cm。

2.5.3.2 Western Blot

准备转移电泳槽及 6 张比凝胶略小的滤纸，1 张滤膜。配备转移缓冲液：(Glycine, 39 mM; Tris, 48 mM; SDS, 0.037%; 甲醇 20%)，卸下电泳凝胶，安装转移装置，在转移电泳板上依次放置滤纸、滤膜、凝胶等，注意避免产生气泡。电泳：滤膜朝向正极。100 mA 电转移 2 h，循环水浴降温。

封闭：转移完毕的滤膜移至 20 mL 含 2% BSA 的 PBS 中，室温下，封闭 2 h。

杂交：加 20 mL PBSTB 适当稀释的抗体，反应过夜。

洗涤：用 30 mL PBST (0.5% Tween20) 洗膜 4 次，每次 10 min。

加酶标抗体：加入用 PBSTB 1000×稀释的碱性磷酸酶标记的第二抗体 20 mL，温育 2 h。

洗涤：用 30 mL PBST (0.2% Tween20) 洗膜 4 次，每次 10 min。最后用 20 mL AP 缓冲液洗膜一次。

显色：在 20 mL AP 缓冲液中加入 50 μL NBT、25 μL BCIP 进行显色，条带显示出来后，用蒸馏水冲洗终止反应。

2.5.4 重组木聚糖酶的纯化

酵母发酵液经 5000 rpm 离心 15 min，取发酵上清液 2 mL，经过分子筛 Sephacryl-S200 column (Pharmacia)或 Superdex 75 HR 10/30 (Amersham pharmacia biotech 预装柱)纯化，使用柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH6.0)，1 mL/min 流速洗脱，分步收集洗脱峰中的样品，经过酶活性的测定，确定目的样品所在的收集管，以分子量为 5 kD 的超滤管 (Nanosep Centrifugal Devices，PALL Life Science, USA)浓缩酶液，得到电泳纯的目标蛋白。

2.6 木聚糖酶活性的测定

2.6.1 酶活单位定义

1 个木聚糖酶活性单位 (IU) 为以 1% 可溶性木聚糖为底物，每分钟在最适条件下分解木聚糖生成 1 μmol 木糖所需的酶量。

2.6.2 木糖 (xylose) 标准曲线的绘制

取 7 只试管，按下表分别加入不同量的木糖溶液及柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH6.0) (每管三个平行样，取平均值)，总体积为 500 μL，然后每管加入 500 μL Somogyi 试剂，沸水中煮 15 min，流动水中迅速冷却至室温，接着每管加入 500 μL Nelson 试剂，在搅拌器上剧烈搅拌，再在室温下放置 10 min，最后每管加入 1 mL 蒸馏水混匀，于 500 nm 处比色测定光吸收值。其线性回归方程为： $Y=b+aX$ ，其中 Y 为体系中木糖的量 (μmol)，X 为 OD₅₀₀ 值。

表 2-3 木糖 (xylose) 标准曲线的绘制

Table 2-3 Standard Curve of Xylose

管号 溶剂量	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
加木糖溶液量(μL) 1 μmol xylose/mL	0	50	100	200	300	400	500
加缓冲液量 (μL)	500	450	400	300	200	100	0
木糖绝对含量(μmol)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5

根据标准曲线绘制结果, 得出木聚糖酶活单位计算公式:

$$U (\mu\text{mol} / \text{mL}) = (a \times \Delta OD + b) \times n \times 20 \div 10$$

其中: ΔOD 为 500 nm 处光吸收差值

n 为酶液稀释倍数

10 为反应时间 10 min

20 为反应体系中酶液是 50 μL , 而公式中是每 mL 酶活单位即 1000 $\mu\text{L}/50 \mu\text{L}=20$

2.6.3 木聚糖酶活性测定的方法(采用国际通用的 Somogyi-Nelson 法)

酶反应温度及柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液的 pH 值由酶的最适温度和最适 pH 决定。

1. 将 0.25 mL 1%的可溶性 4-O-Me-D-glucurono-D-xylan (Sigma 公司, From birchwood) 溶液与 0.2 mL 0.1 mol/L 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液加入试管 (每个样品和其对照都用三个平行样, 试管选择带磨口塞的 20 mL 刻度试管), 放入酶的最适温度的水浴中预热 3 min。
2. 再将 0.05 mL 已经稀释好的酶液 (稀释倍数可先由梯度实验确定, 使最终结果 OD_{500} 在 0.2-0.8 之间) 加入到试管中, 继续在酶的最适温度的水浴中反应 10 min, 向试管中加入 0.5 mL Somogyi 试剂 (碱性铜试剂) 终止反应。(加酶液时注意: 每个试管加入酶液的时间间隔一定, 都是 10 s, 注意顺序, 以记时器记时, 加 Somogyi 试剂时注意: 每个试管的时间间隔一定, 也是 10 s, 顺序同上, 以记时器记时, 保证每管的反应时间均为 10 min)。
3. 将试管磨口塞盖好, 七个一捆绑好, 竖直放在沸水中加热 15 min, 立即用流动水冷却到室温, 向试管中加入 0.5 mL Nelson 试剂 (砷钼酸盐试剂) 显色, 在磁力搅拌器上剧烈搅拌, 室温下放置 10 min, 加入 1 mL 蒸馏水, 转入离心管, 10000 rpm 离心 5 min, 去除絮状物。500 nm 处测吸光值。
4. 对照为先将底物与缓冲液加入试管, 放入 55℃ 水浴中预热 3 min。再加入 0.5 mL Somogyi 试剂 (碱性铜试剂) 最后加入 0.05 mL 已经稀释好的酶液, 后同步步骤 3。

2.7 酶学性质的分析与比较

2.7.1 木聚糖酶最适 pH 和 pH 稳定性的测定

经纯化的木聚糖酶 XYNB 及其突变酶在不同的 pH 下进行酶促反应以测定其最适 pH。所用缓冲液为 pH 2.2-8.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠系列缓冲液及 pH 8.0-9.0 Tris-HCl 系列缓冲液, 60℃ 下测定酶活性。并绘制最适 pH 曲线。

将 XYNB 及其突变酶的浓缩液在不同 pH 值的缓冲液中于 37℃ 下保温 30 min, 处理后的酶液立刻用柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液适当稀释, 再在标准条件下测定酶活性以研究酶的 pH 稳定性。同时以未处理的稀释酶液为对照。

2.7.2 木聚糖酶最适反应温度和热稳定性的测定

测定木聚糖酶在柠檬酸-磷酸氢二钠（分别在其最适 pH 下）缓冲体系中不同温度下木聚糖酶的活力，绘制最适反应温度曲线，确定最适温度。

木聚糖酶在一定温度下分别保温不同时间后，立刻置于冰浴中，测定木聚糖酶的相对剩余酶活力，绘制酶在一定温度下的热稳定性曲线。

2.7.3 金属离子和相关化学试剂对木聚糖酶活性的影响

在酶促反应中加入不同的金属离子和相关化学试剂（终浓度为 1 mmol/L），研究其对木聚糖酶酶活性的影响，以未加金属离子和化学试剂的稀释酶液为对照。

2.7.4 木聚糖酶反应初速度的测定

取 9 支试管，每管都加好底物（浓度为 1%）、缓冲液（分别为该酶的最适 pH 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液），在最适温度下预热 3 min，用同一管已稀释好的酶液依次加样，计算好时间，依次在酶作用 1 min、3 min、5 min、7 min、10 min、15 min、20 min、30 min、60 min 时加入 500 μ L Somogyi 试剂终止反应，终止反应的试管立刻置于冰浴中，待全部反应完后，全部置于沸水中反应 15 min，再加入 500 μ L Nelson 试剂显色，测 OD₅₀₀，计算酶活性，然后算出酶活性与反应时间的比值，在一定时间内比值保持稳定，则在此时间内酶作用为一级反应，此时间即可确定为测 K_m 值和 V_{max} 的反应时间。

2.7.5 木聚糖酶 K_m 值及 V_{max} 的测定

根据以上所测的酶的反应初速度，分别确定测定 K_m 值及 V_{max} 的反应时间。用不同浓度的木聚糖底物（0.25-2%），在柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲体系中，各自最适温度最适 pH 下测定酶活性。按双倒数作图法（Lineweaver-Burk 法）将米氏方程改写为：

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

实验时选取不同的 [S] 测定相应的 v ，求出二者的倒数，以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图，绘出直线，横轴截距为 $1/K_m$ ， $K_m = -1/x$ 。

2.7.6 木聚糖酶比活性测定

2.7.6.1 标准曲线的绘制

取一系列不同体积的 1 mg/mL 标准蛋白溶液（用 0.15 mol/L NaCl 配制成 1 mg/mL BSA 蛋白溶液），与 0.15 mol/L NaCl 按总体积 0.1 mL 混合，加入 5 mL 考马斯亮蓝试剂，摇匀，37℃ 反应 15 min 后，在 595 nm 处测定光吸收值。以光吸收值为纵坐标，标准蛋白含量为横坐标，绘制标准曲线。

表 2-4 蛋白浓度标准曲线的绘制
Table 2-4 Standard curve for concentration of protein

管号 溶剂量	①	②	③	④	⑤	⑥
加 BSA 的量(μL) 1 mg/mL	0	10	20	30	40	50
加 0.15M 的 NaCl 的量(μL)	100	90	80	70	60	50
加入考马斯亮蓝试剂 (mL)	5	5	5	5	5	5
蛋白含量 (μg)	0	10	20	30	40	50

2.7.6.2 比活性测定

取合适体积的酶液，与 0.15 mol/L NaCl 按总体积 0.1 mL 混合，使其测定值在标准曲线的直线范围内。根据所测定的 OD₅₉₅ 的值，在标准曲线上查出其相当于标准蛋白的量，从而计算出酶蛋白的浓度 (mg/mL)。酶的比活性 (IU/mg) = 酶活性/蛋白浓度。

2.7.7 纤维素酶活性测定

用 0.5% 甲基纤维素 M20 作底物，按 Somogyi-Nelson 法测定纤维素酶活性。

2.7.8 木聚糖酶抗胃蛋白酶及胰蛋白酶能力

0.5 mL 木聚糖酶溶液，分别加入 0.5 mL 胃蛋白酶 (1: 10000) (0.1 mg/mL，用 pH 2.0、0.1 mg/L Gly-HCl 缓冲液配制) 和 0.5 mL 胰蛋白酶 (1: 250) (0.1 mg/mL，用 pH 7.0、0.1 mg/L Tris-HCl 缓冲液配制)，调节 pH 分别在 pH 2.0 和 pH 7.0 下，木聚糖酶与蛋白酶的比值为 10: 1 (w/w) 于 37℃ 处理 30 min，将木聚糖酶溶液在同样的 pH 缓冲液中，同样的稀释倍数于 37℃ 处理 30 min 作为对照，稀释后再用常规方法测木聚糖酶活性，计算相对剩余酶活力。

3. 结果

3.1 TIIY 定点突变

3.1.1 同源建模及突变位点的确定

对 XYNB 的同源建模在 <http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html> 网站上完成 (图 2-1)。推测木聚糖酶 XYNB 属于第 11 族木聚糖酶 (Liu *et al.*, 2004)，由两个反向的 β 折叠片和

一个短的 α 螺旋组成。整个酶分子成右手型结构。图 2-1 中标出 T11 和 Y16。它们分别位于该酶氨基端的 β 折叠股 B1 和 B2 上。从同为第 11 族的 4 种嗜热木聚糖酶的结构分析中发现, 在其氮端 β 折叠股 B1 和 B2 上存在芳香族氨基酸的疏水相互作用(表 2-5), 而这种相互作用可能对稳定酶的结构、提高酶的热稳定性起作用(Harris *et al.*, 1997)。在 XYNB 结构中的相似位点是 T11 和 Y16, 如将 T11 突变为 Y11, 则有可能形成相似的疏水相互作用。

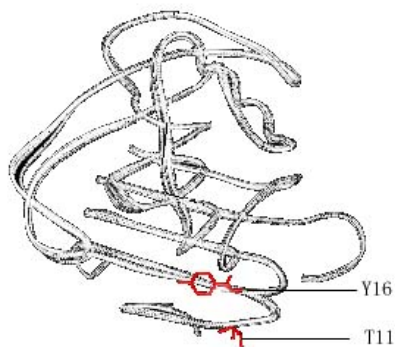


图 2-1 木聚糖酶 XYNB 的同源建模

Fig. 2-1 The molecular model of XYNB

表 2-5 四个嗜热木聚糖酶的最适温度和氨基端芳香族氨基酸的疏水相互作用的分析

Table 2-5 Optimum temperature and aromatic interaction of N-terminal in four thermophilic xylanase

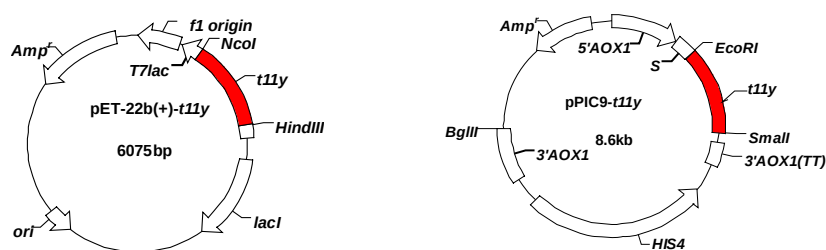
木聚糖酶	来源	最适温度	芳香族氨基酸 的相互作用	收录编号 (GeneBank)
Xylanase	<i>Caldicellulosiruptor</i> sp. Rt69B. 1	70°C	Y12-Y16	AF036925
Xylanase B	<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	85°C	F14-Y18	U76545
TfxA	<i>Thermomonospora fusca</i>	75°C	Y9-F14	U01242
XynA	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	70°C	W21-Y26	U35436

3.1.2 定点突变

以 *xynB* 为模板, 两步 PCR 扩增出突变基因 *t11y*, 其编码的氨基酸由原来的 T11 突变为 Y11。突变基因克隆到表达载体上, 通过测序分析, 确定突变位点与设计的目标位点一致。

3.1.3 重组表达质粒的构建

通过 *Nco* I 和 *Hind*III 双酶切位点将突变酶基因 *t11y* 克隆进 pET22b(+) 载体; 将突变酶基因 *t11y* 定向插入到 pPIC9 上的 *Eco*R I 和 *Not* I 位点之间, 形成重组质粒 pPIC9-*t11y*, 与信号肽编码序列形成正确的阅读框架, 从而将目的基因克隆到 AOX1 启动子下游(图 2-2)。

图 2-2 重组表达质粒 pET-22b(+)-*t11y* 及 pPIC9-*t11y* 的示意图Fig. 2-2 Physical map of recombinant expression plasmid pET-22b (+)-*t11y* and pPIC9-*t11y*

3.1.4 重组木聚糖酶 T11Y 的表达及纯化

3.1.4.1 T11Y 在大肠杆菌中的表达

实验表明, 突变酶在大肠杆菌中得到了表达(图 2-3), 表达的突变酶分子量为 21 kD, 与理论分子量一致。重组大肠杆菌细胞裂解液上清的酶活性为 5 IU/mL, 这说明突变酶有正常的木聚糖酶活性。

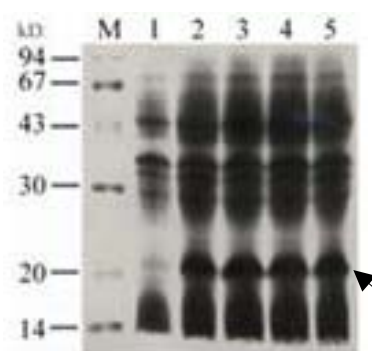


图 2-3 大肠杆菌表达的木聚糖酶 T11Y 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2-3 SDS-PAGE analysis of T11Y expressed in *E.coli* BL21 (DE3)1. CK; 2-5. T11Y expressed in *E.coli* BL21 (21 kD)

3.1.4.2 T11Y 在毕赤酵母中的表达

首先在摇床水平上对毕赤酵母重组子进行诱导表达, 诱导 72 h 后进行酶活性测定, 筛选出高表达菌株用于进一步的发酵罐扩大培养。在摇床水平上表达量最高的重组子其酶活性达到 30 IU/mL。在发酵罐上培养, 随着甲醇诱导时间的延长, 发酵上清液中木聚糖酶酶活力显著增加, 酶蛋白不断积累, 诱导 120 h 后木聚糖酶活性可达 400 IU/mL(图 2-4)。

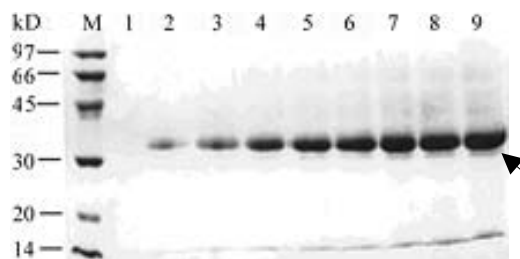


图 2-4 发酵罐中酵母表达的木聚糖酶 T11Y 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2-4 SDS-PAGE analysis of xylanase expressed in *Pichia pastoris*

1. CK; 2-9. Expressed T11Y after induction with methanol for every 12 h (31 kD)

3.1.4.3 木聚糖酶 T11Y 的纯化

经纯化后, 达到电泳纯的突变酶 T11Y(图 5), 与共同纯化的经毕赤酵母表达的原酶 XYNB(何永志等, 2004) 一起进行酶学性质的比较研究。



图 2-5 木聚糖酶 T11Y 纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2-5 SDS-PAGE analysis of purified T11Y

1. Crude T11Y, 2. Purified T11Y

3.1.5 T11Y 酶学性质的分析与比较

实验结果表明, T11Y 的热稳定性较 XYNB 有较大幅度的提高(图 2-6), 在 60℃ 和 70℃ 分别处理 60 min 和 10 min, T11Y 剩余酶活性在 50% 以上, 而 XYNB 剩余酶活性只有 10.28% 和 18.65%。在 80℃ 和 90℃ 分别处理 1 min, T11Y 剩余酶活性分别为 98.07% 和 34.39%; 而 XYNB 剩余酶活性只有 56.99% 和 6.91%。在热稳定性提高的同时, 其最适温度并未改变, 与原酶一样为 60℃。

T11Y 的最适 pH 为 5.6, 与原酶 XYNB 的 5.2 有所差异, pH 稳定性在酸性范围内有所提高。在酶的比活性方面, T11Y 为 1179.6 IU/mg, 较 XYNB 提高 33%。在酶的动力学方面, 突变酶 T11Y 在 K_m 值上比原酶低 43%, 这说明突变酶具有更高的催化效率。金属离子 Ni^{2+} 对原酶有轻微的激活作用, 而对突变酶表现为轻微的抑制作用, 别的金属离子和化学试剂对突变酶和原酶的影响基本一致。酶经突

变后, 依然维持了原酶独特的抗胃蛋白酶和胰蛋白酶的特性。

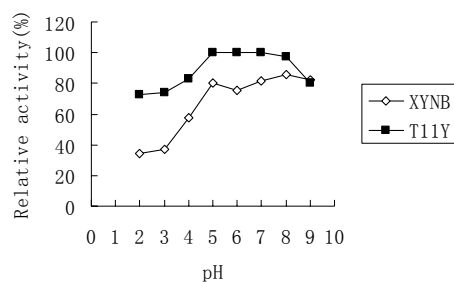


图 2-6 突变酶 T11Y 和原酶 XYNB 在 pH 稳定性上的比较

Fig. 2-6 Comparison of pH stability of XYNB and T11Y

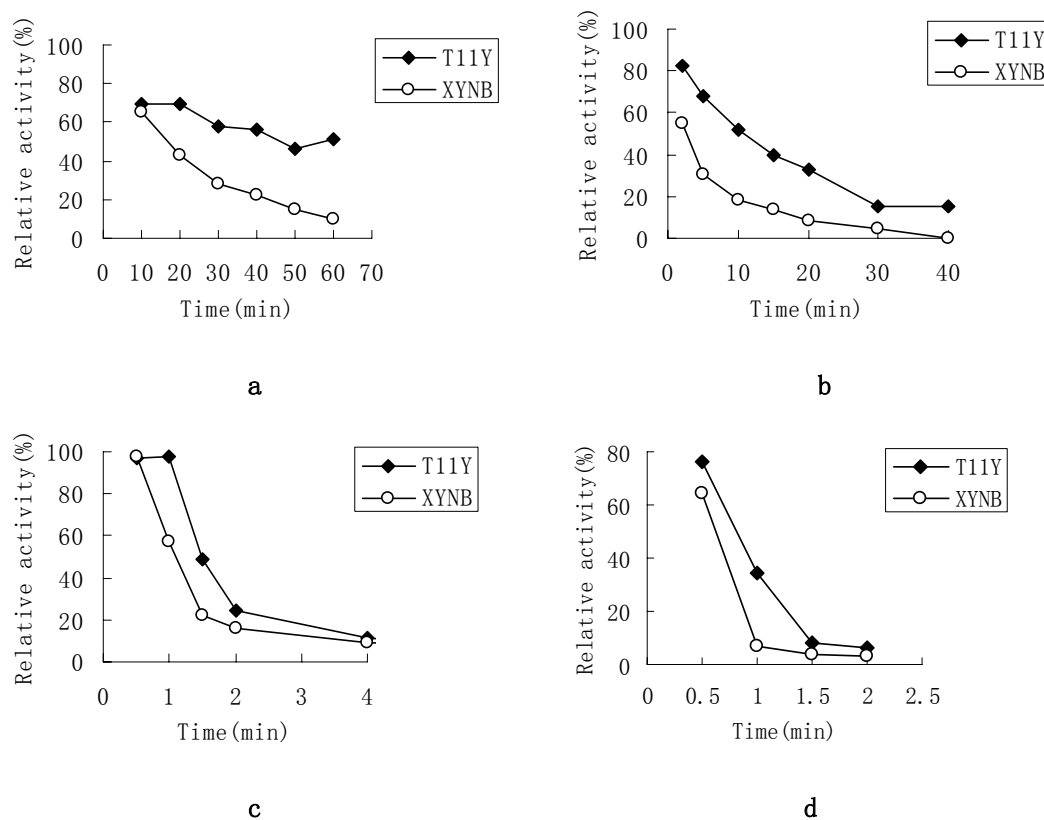


图 2-7 突变酶 T11Y 和原酶 XYNB 在不同温度下的热稳定性比较

Fig. 2-7 Comparison of thermostability of XYNB and T11Y

a. 60°C, b. 70°C, c. 80°C, d. 90°C

表 2-6 木聚糖酶 XYNB 和 T11Y 的酶学性质比较

Table 2-6 Comparison of enzyme properties of XYNB and T11Y

酶学性质	XYNB	T11Y
Optimum temperature/°C	60	60
Optimum pH	5.2	5.6
pH stability ¹	5-9	4-9
$K_m / (g/kg)^2$	20.87	11.89
$V_{max} / (\mu mol/mg \cdot min)$	4568	3045
Specific activity / (IU/mg)	886. 89	1179.6
Effect of metal ion and some reagents	EDTA, Cr ³⁺ , Ni ²⁺ activate slightly	EDTA, Cr ³⁺ , activate slightly
on enzymatic activity	Zn ²⁺ , Mn ²⁺ inhibit slightly	Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺ inhibit slightly
	SDS show no effect on activity	SDS show no effect on activity
Cellulase activity	No activity	No activity
Resistance to pepsin and trypsin	Retain about 95% of its activity	Retain about 99% of its activity

注 1：指相对剩余酶活性在 80% 以上的 pH 值范围。

注 2： K_m 用 g/kg 表示是因为无法计算木聚糖分子量而无法计算其摩尔浓度。

3.2 N13D、S40E 定点突变

3.2.1 同源建模及突变位点的确定

研究表明，蛋白表面的静电荷的增加有可能提高其热稳定性，因此我们需要选择一些特定的位点进行突变。在对四个嗜热木聚糖酶（表 2-5）的序列分析中发现，它们在氨基端第 13 个氨基酸残基的相应位点上都是带负电荷的 Asp。对 80 个第 11 族的木聚糖酶进行序列比较发现，在氨基端第 40 个氨基酸残基的相应位点上出现的都是极性氨基酸，如 Lys、Arg、Glu、Gln、Ser、Thr 等，推测第 40 位的氨基酸可能是蛋白表面氢键电离网的一部分。因此，通过同源建模和序列比较设计了 N13D、S40E 的定点突变，以期改善 XYNB 的热稳定性。

对突变酶的同源建模表明，突变酶的二级结构与原酶相比并没有发生改变，突变位点分别位于 β 折叠 B1 和 B2 及 β 折叠 A3 上。

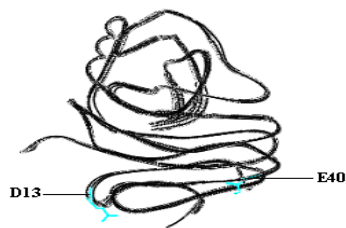


图 2-8 突变酶 N13D 和 S40E 的同源建模

Fig. 2-8 The molecular model of N13D and S40E

3.2.2 定点突变

以 *xynB* 为模板, 两步 PCR 法 (N13D) 及 over-lapping PCR 法 (S40E) 扩增出突变基因 *n13d* 和 *s40e*, 突变基因克隆到 pPIC9 上, 通过测序分析, 确定突变位点与设计的目标位点一致。

3.2.3 重组表达质粒的构建

将突变基因双酶切后直接连接到酵母表达载体 pPIC9 上。同 3.1.3

3.2.4 重组木聚糖酶 N13D 和 S40E 的表达及纯化

将 N13D 和 S40E 突变酶直接在毕赤酵母表达系统中进行表达, 各筛选出一株有活性的菌株, 在摇床水平的表达量分别为 92.63 IU/mL 和 90.95 IU/mL。对这两个突变酶进行纯化, 获得电泳纯的蛋白 (图 2-8)。

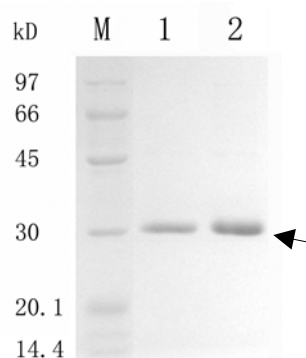


图 2-9 突变酶 N13D 和 S40E 纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2-9 SDS-PAGE analysis of purified N13D and S40E

1. Purified N13D, 2. Purified S40E

3.2.5 N13D 和 S40E 酶学性质的分析与比较

将纯化得到的 N13D 和 S40E 与原酶进行酶学性质的比较与分析。实验结果表明, N13D 和 S40E 的热稳定性较 XYNB 有一定的提高 (图 2-11), 但提高的幅度不大。在 70℃ 分别处理 2 min, N13D、S40E 和 XYNB 的剩余酶活性分别为 98.98%、85.99%、76.75%; 在 70℃ 分别处理 5 min, N13D、S40E 和 XYNB 的剩余酶活性分别为 37.88%、27.58%、13.12%; 在 70℃ 分别处理 10 min, N13D、S40E 和 XYNB 的剩余酶活性分别为 7.58%、4.95%、4.72%。突变酶的最适温度并未改变, 与原酶一样为 60℃。

在酸碱性质上, N13D 和 S40E 的最适 pH 均为 5.8, 与原酶 XYNB 的 5.2 有所差异。N13D 的 pH 稳定性在酸性范围内有所提高; 而 S40E 的 pH 稳定性与原酶基本一致 (图 2-10)。在酶的比活性方

面, N13D 的比活为 1081.05 IU/mg, 较 XYNB 提高了 22%。在酶的动力学方面, 突变酶比原酶有较大的差异, 其原因有待进一步研究。N13D 和 S40E 对金属离子和化学试剂普遍表现不敏感。N13D 和 S40E 依然维持了原酶独特的抗胃蛋白酶和胰蛋白酶的特性 (表 2-7)。

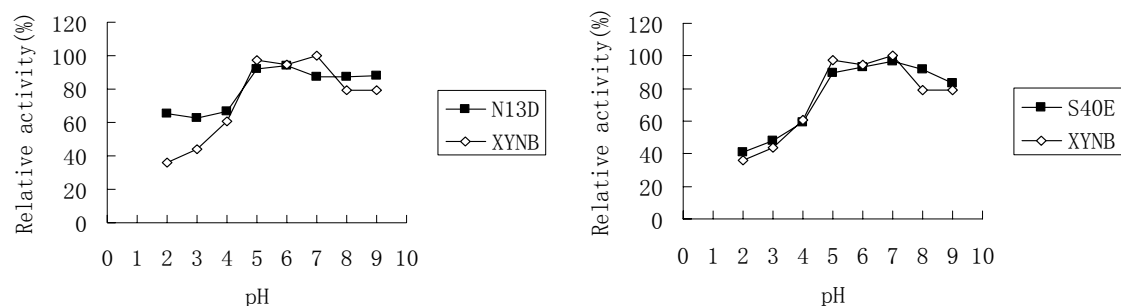


图 2-10 突变酶 N13D 和 S40E 及原酶 XYNB 在 pH 稳定性上的比较

Fig. 2-10 Comparison of pH stability of XYNB, N13D and S40E

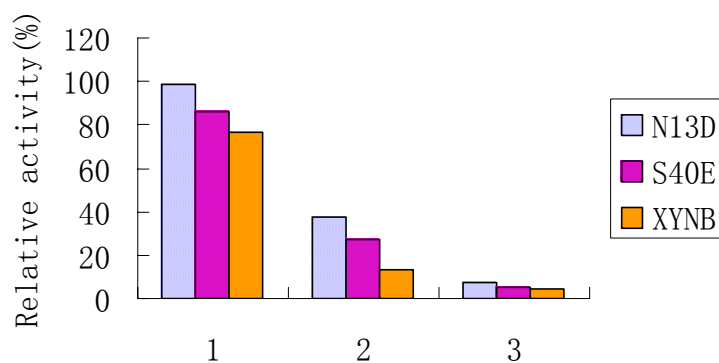


图 2-11 突变酶 N13D 和 S40E 及原酶 XYNB 在不同温度下的热稳定性比较

Fig. 2-11 Comparison of thermostability of XYNB, N13D and S40E

1. treated at 70°C for 2 min; 2. treated at 70°C for 5 min; 3. treated at 70°C for 10 min

表 2-7 木聚糖酶 XYNB 和突变酶 N13D 和 S40E 的酶学性质比较

Table 2-7 Comparison of enzyme properties of XYNB, N13D and S40E

酶学性质	XYNB	N13D	S40E
Optimum temperature /°C	60	60	60
Optimum pH	5.2	5.8	5.8
pH stability ¹	5-9	5-9	5-9
$K_m/(g/kg)^2$	20.87	75	18.18
$V_{max}/(\mu mol/mg \cdot min)$	4568	2500	909.09
Specific activity/(IU/mg)	886.89	1081.05	778.04

Effect of metal ion and some reagents on enzymatic activity	EDTA, Cr^{3+} , Ni^{2+} activate slightly Zn^{2+} , Mn^{2+} inhibit slightly	Co^{2+} , Mn^{2+} , Li^{2+} inhibit slightly	Ni^{2+} activate slightly SDS inhibit slightly
Cellulase activity	No activity	No activity	No activity
Resistance to pepsin and trypsin	Retain about 95% of its activity	Retain about 95% of its activity	Retain about 95% of its activity

注 1: 指相对剩余酶活性在 80% 以上的 pH 值范围。

注 2: K_m 用 g/kg 表示是因为无法计算木聚糖分子量而无法计算其摩尔浓度。

3.3 木聚糖酶 XYNB 氨基端的替换

3.3.1 同源建模及突变的确定

来源于 *Thermomonospora fusa* 的木聚糖酶 TfxA 的热稳定性在第 11 族木聚糖酶中十分突出, 该酶在 75℃ 处理 18 h, 仍能保持 96% 的活性 (Diana *et al.*, 1994)。而来源于 *Streptomyces olivaceoviridis* 的木聚糖酶 XYNB 的热稳定性相对较差, 在 70℃ 处理 1 h, XYNB 剩余酶活性只有 10.28%。木聚糖酶 TfxA 和 XYNB 都属于糖基水解酶第 11 家族。通过 BLAST 相似性比较, 它们有 81.9% 的相似性, 但 TfxA 的热稳定性比 XYNB 高很多。在对 XYNB 和 TfxA 的氨基端进行相似性比较时发现, 它们氨基端前 33 个氨基酸的相似性只有 48.5% (图 2-13), 而后面的氨基酸序列的相似性在 80% 以上, 这说明 TfxA 的氨基端可能对它的高热稳定性贡献很大。因此, 我们设计将 XYNB 的前 33 个氨基酸替换为 TfxA 的前 31 个氨基酸, 以期获得热稳定性有所提高的突变酶。

对融合突变酶 TB 的同源建模表明, TB 的二级结构与原酶相比并没有发生改变, 氨基酸骨架基本重叠 (图 2-12A), TB 的氨基端与原酶相比主要是一些氨基酸侧链的变化 (图 2-12B)。TB 的前 31 个氨基酸组成了氨基端的 β 折叠 B1、B2 及 A2。

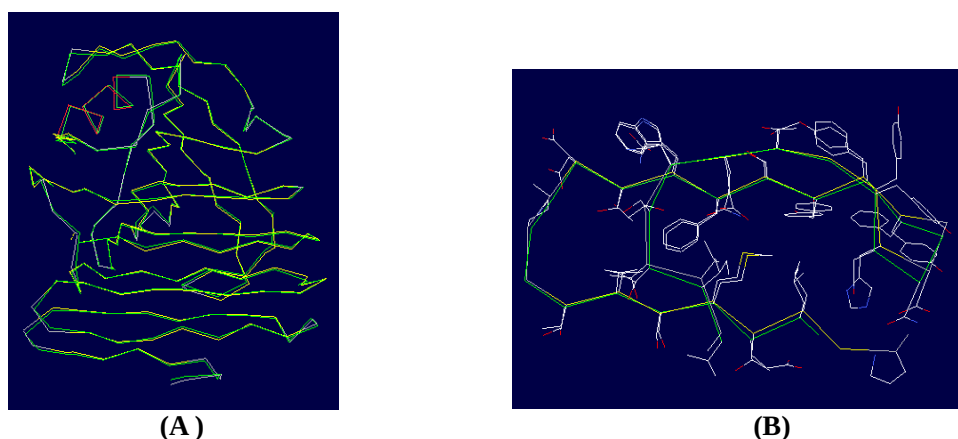


图 2-12 TB 和 XYNB 的同源建模比较

Fig. 2-12 The comparison of molecular model of TB and XYNB

(A) overlapped framework of TB and XYNB, (B) partial overlapped N-terminal of TB and XYNB



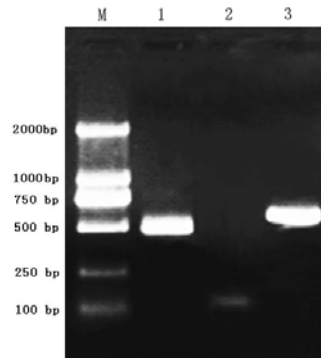
图 2-13 TfxA 和 XYNB 的氨基端氨基酸的序列比较

Fig. 2-13 Comparison of N-terminal of TfxA and XYNB

3.3.2 木聚糖酶基因 *tb* 的构建

分别以 *tb* 和 *xynB* 为模板, 经 over-lapping PCR 法扩增获得目的基因片段 A、B, 其长度分别为 0.13 kb 和 0.5 kb, 经过进一步的 PCR 扩增得到的基因为 0.6 kb。将全长基因克隆进表达载体, 阳性克隆子经测序得到正确预计的基因 *tb*。PCR 扩增获得目的基因片段 A、B 其长度分别为 129 bp 和 481 bp, PCR 扩增到的基因长度为 586 bp, 与电泳结果一致 (图 2-14)。

突变基因克隆到 pPIC9 上, 通过测序分析, 确定突变位点与设计的目标位点一致。由此推导出其编码的氨基酸序列 (图 2-15)。

图 2-14 基因 *tb* 片段 A、B 及全长 *tb* 基因的 PCR 扩增电泳图Fig. 2-14 PCR amplification of *tb* gene fragments (A and B) and full length gene of *tb*

M: DNA Marker; 1: PCR product of fragment A; 2: PCR product of fragment B; 3: PCR product of hybrid gene *tb*

A	V	T	S	N	E	T	G	Y	H	D	G	Y	F	Y	S	F	W	T	D
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

GCC GTG ACC TCC AAC GAG ACC GGG TAC CAC GAC GGG TAC TTC TAC TCG TTC TGG ACC GAC

A	P	G	T	V	S	M	E	L	G	P	G	G	N	Y	S	T	S	W	T	N
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

GCG CCT GGA ACG GTC TCT ATG GAG CTG GGC CCT GGC GGC AAC TAC AGC ACC TCG TGG ACG AAC
C G N F V A G K G W S N G G R R N V Q Y S
TGC GGG AAC TTC GTC GCC GGC AAG GGC TGG AGC AAC GGC GGA CGC AGG AAC GTG CAG TAC TCG
G S F Y P S G N G V L A L Y G W T S N P L
GGC AGC TTC TAC CCG TCC GGC AAC GGC TAC CTG GCG CTG TAC GGG TGG ACC TCG AAC CCG CTC
V E Y Y I V D N W G N Y R P T G T Y K G
GTC GAG TAC TAC ATC GTC GAC AAC TGG GGC AAC TAC CGG CCC ACC GGA ACG TAC AAG GGC
T V T S D G G T Y D V Y Q T T R Y N A P

```

ACG GTC ACC AGC GAC GGC GGC ACG TAC GAC GTC TAC CAG ACG ACG CGG TAC AAC GCC CCC
S   V   E   G   T   K   T   F   N   Q   Y   W   S   V   R   Q   S   R   R   T
TCC GTG GAA GGC ACC AAG ACC TTC AAC CAG TAC TGG AGC GTC CGG CAG TCC AAG CGG ACC
G   G   T   I   T   T   G   N   H   F   D   A   W   A   R   Y   G   M   Q   L
GGC GGC ACC ATC ACC ACC GGC AAC CAC TTC GAC   GCC TGG GCC CGC TAC GGC ATG CAA CTG
G   S   F   S   Y   Y   M   I   L   A   T   E   G   Y   Q   S   S   G   S   S
GGC AGC TTC AGC TAC TAC ATG ATC CTC GCC ACC GAG GGC TAC CAG AGC AGC GGC TCC TCC
N   I   T   V   S   G
AAC ATC ACG GTC AGC GGC TGA

```

图 2-15 TB 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

带边框的氨基酸序列为 XYNB 被 TfxA 的 N 端所替换上的 31 个氨基酸

Fig. 2-15 Nucleotide sequence of *tb* and deduced amino sequence

Amino acids framed were from TfxA

3.3.3 重组表达质粒的构建

同 3.1.3

3.3.4 重组木聚糖酶 TB 的表达及纯化

3.3.4.1 TB 在大肠杆菌中的表达

将重组质粒 pET22b(+)-*tb* 电击转化大肠杆菌 BL21, 挑取几个阳性转化子进行诱导表达。TB 在大肠杆菌中得到了表达(图 2-16), 由于外源蛋白的过量表达, 一部分表达的蛋白未来得及切掉信号肽, 所以有两种分子量不同的表达条带 (21 kD 和 23 kD), 该结论由 Western Blot 的结果验证, 在对应的位置上获得两条杂交条带。大肠杆菌细胞裂解液的酶活性的平均值为 5.2 IU/mL, 这说明 TB 有正常的木聚糖酶活性。

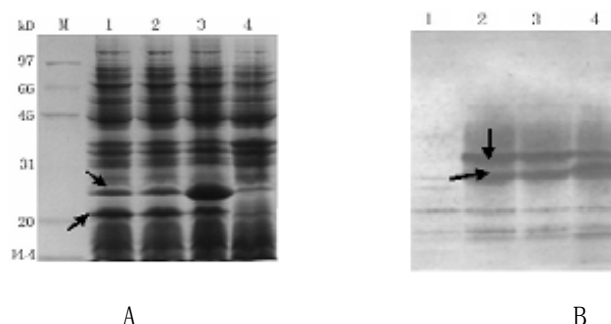


图 2-16 大肠杆菌表达的 TB 的 SDS-PAGE 分析及 Western Blot 分析

Fig. 2-16 SDS-PAGE and Western Blot analysis of TB expressed in *E. coli* BL21.

A: SDS-PAGE, M: protein marker of Low molecular weight; 1-3: the different *E. coli* BL21 recombinants pET22b(+)-*tb*; 4: *E. coli* BL21 with plasmid pET22b(+)

B: Western Blot, 1: *E. coli* BL21 with plasmid pET22b(+); 2-4: the different *E. coli* BL21 recombinants pET22b(+)-*tb*

3.3.4.2 TB 在毕赤酵母中的表达

首先在摇床水平上对毕赤酵母重组子进行诱导表达, 30℃, 0.5%甲醇诱导 48 h 后进行酶活性测定, 筛选出高表达菌株用于进一步的发酵罐扩大培养。在摇床水平上表达量最高的重组子酶活性达到 42 IU/mL。将表达量最高的重组子在发酵罐上培养, 随着甲醇诱导时间的延长, 发酵上清液中木聚糖酶活力显著增加, 酶蛋白不断积累, 分别取甲醇诱导 12 h、24 h、36 h、48 h、72 h、96 h、120 h 的发酵液进行 SDS-PAGE 分析 (图 2-17)。诱导 120h 后木聚糖酶活性可达 400 IU/mL。由于 TB 序列中含有三个潜在的糖基化位点 (顾园等, 2004) (Asn-X-Ser/Thr, X 为任意氨基酸), 使酵母表达的木聚糖酶产物的分子量由 21 kD 提高到 31 kD, 这与原酶 XYNB 在酵母中表达的情况一致 (何永志等, 2004)。

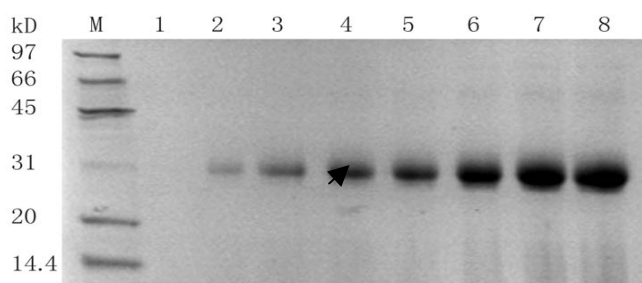


图 2-17 发酵罐中酵母表达的木聚糖酶 TB 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2-17 SDS-PAGE analysis of TB expressed in *Pichia pastoris* with different induction time

M: Low molecular protein marker, 1: The culture supernatant before induction (ck)

2-8: Expressed TB after induction of 12 h、24 h、36 h、48 h、72 h、96 h、120 h (31 kD)

3.3.5 木聚糖酶 TB 的纯化

发酵液经过两倍体积乙醇沉淀, 10000 rpm 离心 15 min, 将沉淀冷冻干燥, 磨成粉末, 取 1 g 粉末以 2 mL 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液回溶, 上清液的酶活性为 705.5 IU/mL, 上清液再经透析袋脱盐后, 酶活性为 298.39 IU/mL, 再经过分子筛纯化, 得到电泳纯的目标蛋白, 酶活性为 151.36 IU/mL。最终回收率 21.45%。经纯化后, 获得电泳纯的 TB (图 2-18), 与同样纯化的经毕赤酵母表达的原酶 XYNB 一起进行酶学性质的比较研究。

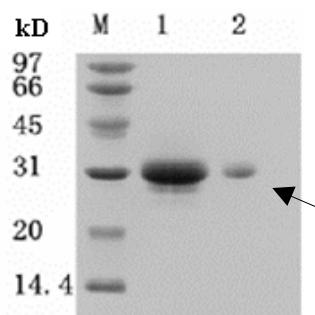


图 2-18 木聚糖酶 TB 纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2-18 SDS-PAGE analysis of purified TB

1. Crude TB; 2. Purified TB

3.3.6 TB 酶学性质的分析与比较

经过对酶学性质的分析与比较, TB 的最适 pH 值由 XYNB 的 5.2 变为 6.0。55℃处理 30min 后, 相对剩余活力在 80%以上的 pH 范围不变, 但 TB 的耐酸性比 XYNB 差 (图 2-19)。TB 的热稳定性较 XYNB 有很大的提高 (图 2-20), 80℃分别处理 3 min 和 10 min, TB 剩余酶活性分别是 72.12%和 36.73%, 而 XYNB 剩余酶活性分别为 12.84%和 4.32%。在 90℃分别处理 1 min 和 3 min, TB 剩余酶活性为 79.25%和 33.44%, 而 XYNB 剩余酶活性分别为 18.69%和 5.13%。TB 的最适温度由 XYNB 的 60℃变为 70℃ (表 2-8)。

在酶的动力学方面, TB的 K_m 值由 XYNB的 20.87 变成 28.75。 V_{max} 较 XYNB提高了一倍; 金属离子对 TB均无明显影响; 而 SDS对 TB有轻微的抑制作用。TB维持了 XYNB独特的抗胰蛋白酶的特性, 而 TB 抗胃蛋白酶的能力则由原来的 95%下降到 76.45%。TB的比活性与 XYNB基本一致。

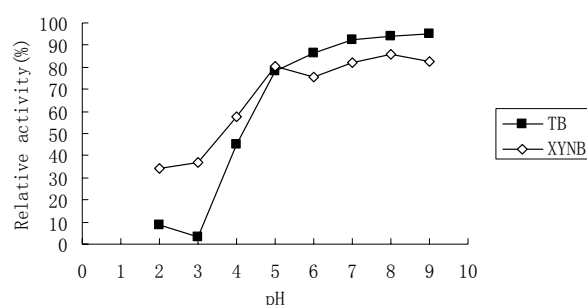


图 2-19 TB 及原酶 XYNB 在 pH 稳定性上的比较

Fig. 2-19 Comparison of pH stability of XYNB and TB

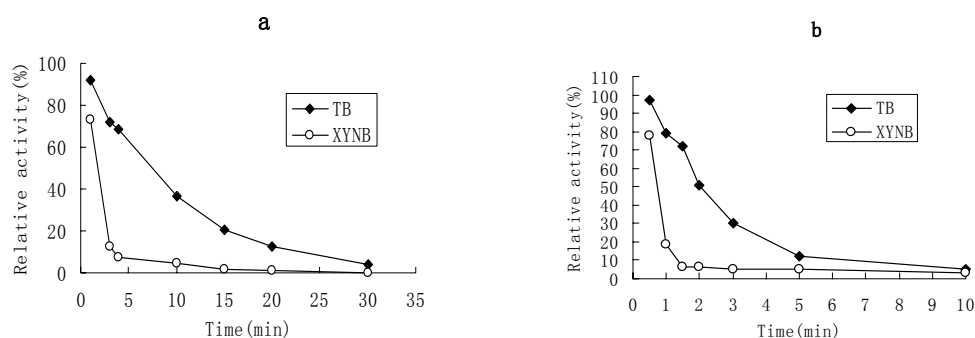


图 2-20 TB 及原酶 XYNB 在不同温度下的热稳定性比较

Fig. 2-20 Comparison of thermostability of XYNB and TB

a: thermostability detection after different time of incubation at 80°C

b: after different time of incubation at 90°C

表 2-8 木聚糖酶 XYNB 和 TB 的酶学性质比较

Table 2-8 Comparison of enzyme properties of XYNB and TB

酶学性质	XYNB	TB
Optimum temperature/°C	60	70
Optimum pH	5.2	6.0
pH stability ¹	5-9	5-9
$k_m/(\text{g/kg})^2$	20.87	28.75
$V_{\max}/(\mu\text{mol/mg} \cdot \text{min})$	4568	9897
Specific activity/(IU/mg)	886.89	883.36
Effect of metal ion and some reagents on enzymatic activity	EDTA, Cr^{3+} , Ni^{2+} activate slightly Zn^{2+} , Mn^{2+} inhibit slightly	SDS inhibit slightly
Cellulase activity	No activity	No activity
Resistance to pepsion and trypsin	Retain about 95% of its activity	Retain about 76.45% of its activity after treated with pepsion; retain about 95% of its activity after treated with trypsin.

注 1: 指相对剩余酶活性在 80% 以上的 pH 值范围。

注 2: K_m 用 g/kg 表示是因为无法计算木聚糖分子量而无法计算其摩尔浓度。

3.4 XYNB 及 TB 的二硫键突变

3.4.1 同源建模及突变的确定

研究表明,蛋白质分子内的二硫键对提高酶的热稳定性有很重要的作用。一些嗜热木聚糖酶,如来源于 *Thermomyces lanuginosus* 和 *Paecilomyces varioti* Bainier 的木聚糖酶,在酶分子的 β -折叠 B9 和 α -螺旋之间也存在着天然的二硫键。最近对来源于 *Bacillus circulans* 和来源于 *Trichoderma reesei* 的木聚糖酶也进行了二硫键的突变,结果发现,二硫键的引入使突变酶的热稳定性有很大的提高(Wakarchuk *et al.*, 1994; Turunen *et al.*, 2001; Fenel *et al.*, 2004; Hairong *et al.*, 2004)。因此,我们通过对 XYNB 的同源建模及第 11 族木聚糖酶的氨基酸相似性比较,设计了 S109C-N153C 的双突变,推测这一双突变可能在 XYNB 的 β -折叠 B9 和 α -螺旋之间形成一个分子内二硫键(图 2-21),以期提高 XYNB 的热稳定性,新的突变酶定名为 XS。

由前面的实验获得的突变酶TB,在热稳定性上较原酶XYNB有了很大的提高,在80℃和90℃下热处理3 min, TB比XYNB的热稳定性提高了6倍左右,是前面实验中得到的热稳定性最好的突变酶。为了进一步的提高融合酶TB的热稳定性,我们同时以TB为母本,同样引入双突变S109C-N153C,期望通过二硫键进一步提高TB的热稳定性,新的突变酶定名为TS。

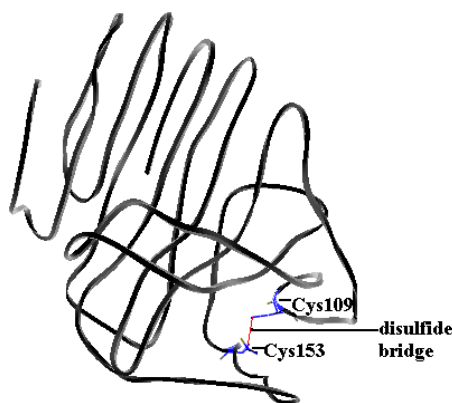


图 2-21 突变酶 XS 和 TS 中的二硫键

Fig.2-21 Structure of mutant xylanase with disulfide bridge

3.4.2 突变位点的引入

分别以原酶基因 *xynB* 和融合酶基因 *tb* 为模板,通过定点突变试剂盒(Promega公司)的方法,通过突变引物将突变位点引入目的基因,经过测序,证明了突变位点的正确性。

3.4.3 重组表达质粒的构建

将突变基因双酶切后直接连接到酵母表达载体 pPIC9 上。同 3.1.3

3.4.4 重组木聚糖酶 XS 和 TS 的表达、纯化及二硫键的分析

3.4.4.1 重组木聚糖酶 XS 和 TS 的表达、纯化

将突变酶 XS 和 TS 直接在毕赤酵母表达系统中进行表达,各筛选出一株有活性的菌株,分别在发酵罐水平和摇床水平进行表达,表达量分别为 300 IU/mL 和 59.99 IU/mL。对这两个突变酶进行纯化,两个突变酶的分子量均为约 31 kD,与其突变母本有大致相同的分子量(图 2-22)。

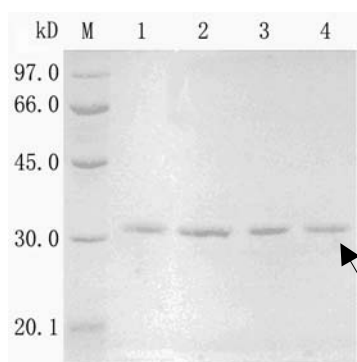


图 2-22 突变酶 XS 和 TS 与其母本 XYNB 和 TB 纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2-22 SDS-PAGE analysis of purified xylanases

1. Purified XYNB; 2. Purified XS; 3. Purified TB; 4. Purified TS

3.4.4.2 二硫键的分析

突变酶中是否存在二硫键是我们在研究酶学性质之前必须要确定的。我们使用的检测方法与 Wakarchuk 等人使用的方法(Wakarchuk *et al.*, 1994)相同。在对纯化的木聚糖酶进行 SDS-PAGE 电泳之前,用不同浓度的二硫苏糖醇(DTT, 1-5 mM)对酶进行处理。由于一定浓度的 DTT 能破坏二硫键,没有二硫键或二硫键被破坏的蛋白,能结合更多的 SDS;而有二硫键的蛋白由于空间位阻和疏水氨基酸的包埋使 SDS 与蛋白的结合量减少,表现为分子量相对小于没有二硫键的蛋白。并且,由于有二硫键的蛋白结构更加紧凑,因此,在电泳过程中泳动距离大于没有二硫键的蛋白。

由图 2-23 我们可以看出,由于 DTT 浓度的不同,XS 的第 7、8 泳道上的蛋白条带比第 5 泳道上的蛋白条带的泳动距离小,这说明二硫键在 DTT 浓度为 2 mM 时已经遭到破坏,DTT 的浓度继续增加后没有变化,第 6 泳道上出现两条蛋白条带,可能是突变酶在 DTT 浓度为 1 mM 时,有部分二硫键被破坏。突变酶 TS 的结果与 XS 基本相同,而原酶 XYNB 在有无 DTT 的条件下蛋白条带的泳动距离并没有变化。因此,我们根据这一实验证明,在突变酶 XS 和 TS 中确实存在由于点突变 S109C-N153C 而形成的二硫键。

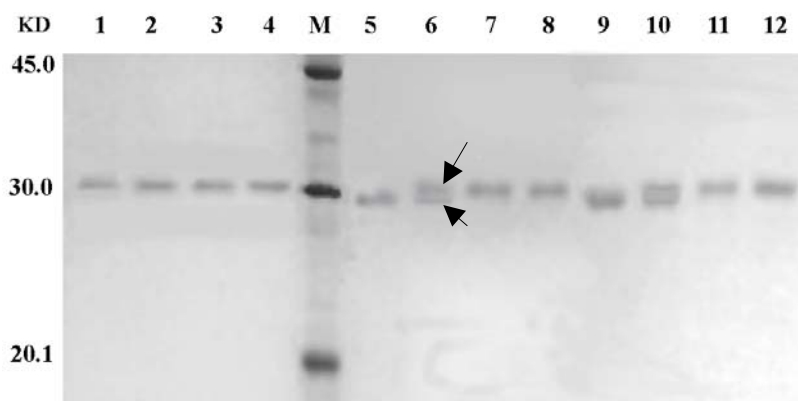


图 2-23 突变酶 XS 和 TS 的二硫键分析

Fig. 2-23 Different mobility of wild type and mutants treated with reducing agent in SDS-PAGE.

SDS-PAGE was done on a 12% (w/v) polyacrylamide gel. Protein was stained by Coomassie Brilliant Blue R-250. The samples were treated with increasing concentrations of DTT in the presence of 1% SDS at 70°C for 5 min prior to electrophoresis. 1. Purified XYNB had not been treated with DTT; 2. XYNB treated with 1 mM DTT; 3. XYNB treated with 2 mM DTT; 4. XYNB treated with 5 mM DTT; M. protein marker of Low molecular weight; 5. Purified XS had not been treated with DTT; 6. XS treated with 1 mM DTT; 7. XS treated with 2 mM DTT; 8. XS treated with 5 mM DTT; 9. Purified TS had not been treated with DTT; 10. TS treated with 1 mM DTT; 11. TS treated with 2 mM DTT; 12. TS treated with 5 mM DTT.

3.4.5 XS 和 TS 酶学性质的比较与分析

突变酶XS、TS的最适pH为6.0。对XYNB、XS、TB、TS的pH稳定性进行比较发现，在pH为2-3的缓冲液处理30 min后，TS、XS和XYNB的相对剩余活性都在35%以上，而TB的相对剩余活性不到10%；在pH为5时，XS能保持100%的酶活性，而TB只有44.84%的活性；在pH为6-8时，突变酶与原酶的活性相差不大，而且结果显示，各个酶在碱性pH条件下的稳定性都很好，普遍高于酸性pH（图2-24）。

XS、TB和TS的最适温度分别为65°C、70°C和70°C，高于原酶XYNB的60°C。在70°C，pH 6.0处理20 min，TS保持100%的活性，TB保持50%的活性，而XS和XYNB的剩余活性分别只有22.64%和8.22%。在70°C，pH 6.0处理150 min后，突变酶TS仍然保持53.4%的活性，而TB只剩余3.15%的活性。XYNB和XS在70°C处理40 min后就完全失活了（图2-25）。TS、TB、XS和XYNB的在70°C的半衰期分别为150 min、20 min、9 min和3 min（表2-9）。

在金属离子方面， Ni^+ 、 Co^+ 对XS有轻微的激活作用，SDS对XS有轻微的抑制作用；EDTA、 Ca^{2+} 对TS有轻微的激活作用， Zn^{2+} 对TS有轻微的抑制作用。突变酶与原酶在动力学的 K_m 值和 $V_{\max}$ 值上也都有一定的变化（表2-9）。突变酶XS和TS保持了原酶的抗胃蛋白酶和胰蛋白酶的优良性质。

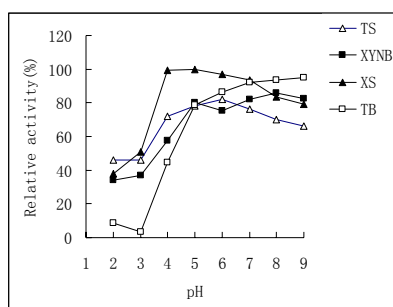


图 2-24 突变酶 XS、TS 及其母本 XYNB、TB 的 pH 稳定性比较

Fig. 2-24 Comparison of pH stability of XYNB, XS, TB and TS

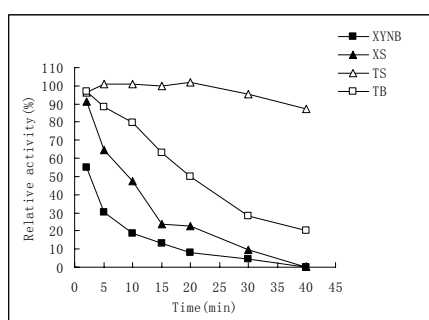


图 2-25 突变酶 XS、TS 及其母本 XYNB、TB 在 70°C 时的热稳定性比较

Fig. 2-25 Comparison of thermostability of XYNB, XS, TB and TS at 70°C

Thermostability of XYNB, XS, TB and TS incubated for different time at 70°C followed by rapid cooling and measurement of residual activity.

表2-9 XYNB、XS、TB和TS的酶学性质比较

Table 2-9 Comparison of enzyme property of XYNB, XS, TB, and TS

酶学性质	XYNB	XS	TB	TS
Optimum temperature/°C	60	65	70	70
Optimum pH	6.0	6.0	6.0	6.0
pH stability ¹	4-9	3-9	5-9	4-9
K_m /(g/kg) ²	20.87	29.90	28.75	33.6
V_{max} /(μmol / mg· min)	4568	3333.3	9397	4200
Specific activity /(IU/mg)	886.89	773.46	883.36	523.33
Half-life 70°C/(min)	3	9	20	150

注 1：指相对剩余酶活性在 50%以上的 pH 值范围。

注 2： K_m 用g/kg表示是因为无法计算木聚糖分子量而无法计算其摩尔浓度。

4. 讨论

4.1 T11Y 定点突变

目前,在 GeneBank 上已发表的第 11 族木聚糖酶的三维结构有 10 多个,并且他们的氨基酸序列和三级结构有较高的相似性(Sapag *et al.*, 2002)。XYNB 与第 11 族木聚糖酶有同源性,XYNB 的基因 *xynB*(EMBL 收录号为: AJ292317)由本实验室从 *Streptomyces olivaceoviridis* 中克隆,同源性最高的达到 86%(张红莲等, 2003),因此我们可以建立 XYNB 的分子模型。

我们通过对四个嗜热木聚糖酶氨基端的分析发现(表 2-5),嗜热木聚糖酶氨基端存在多个芳香族氨基酸,研究表明它们组成酶与底物的结合位点,并且它们之间的疏水相互作用对酶的热稳定性有一定影响(Roberge *et al.*, 1999)。推测在氨基端引入适当的突变,使木聚糖酶氨基端稳定性提高,从而提高酶的热稳定性。因此,我们在 XYNB 中引入 T11Y 的定点突变,使 XYNB 氨基端的 β 折叠股 B1 和 B2 上存在与嗜热木聚糖酶氨基端相似的 Y11-Y16 疏水相互作用。结果表明, T11Y 突变酶的热稳定性有明显的提高。T11Y 在 60℃ 和 70℃ 分别处理 60 min, 10 min。剩余酶活性在 50% 以上,而 XYNB 剩余酶活性只有 10.28% 和 18.65%。T11Y 在 80℃ 和 90℃ 分别处理 1 min, 剩余酶活性分别为 98.07% 和 34.39%; 而 XYNB 剩余酶活性只有 56.99% 和 6.91%。与 XYNB 进行氨基端芳香族氨基酸的疏水相互作用比较的四个嗜热木聚糖酶的最适温度都在 70℃ 以上,而突变酶 T11Y 的最适温度保持不变为 60℃,并没有提高,说明 T11Y 突变对最适温度没有影响,推测酶的最适温度和热稳定性不是由单一一位点决定的,可能是多种因素共同作用的结果。突变的 Y11 与邻近的其它芳香族氨基酸组成底物的结合域,提高了酶与底物的亲和性,使突变酶的 K_m 值由 20.87 g/Kg 下降为 11.89 g/Kg。同时影响酶的作用效率,表现为 V_{max} 的下降和比活性的提高。另外 T11Y 突变使 XYNB 的最适 pH 由 5.0 增加到 5.6。T11Y 的 pH 稳定性有所提高,其原因有待进一步研究。

由于 *t11y* 序列中含有三个潜在的糖基化位点,使酵母表达的木聚糖酶产物的分子量由 21 kD 提高到 31 kD 这与原酶 XYNB 在酵母中表达的情况一致(何永志等, 2004)。由于我们的目的是研究酶的结构与酶学性质之间的关系,在做酵母表达时并没有筛选表达量最高的,因此 T11Y 与 XYNB 相比表达量有所不同。

来自 *Streptomyces olivaceoviridis* 的木聚糖酶 XYNB 具有较优良的酶学性质(何永志等, 2004; 张红莲等, 2003)。它具有抗胃蛋白酶和胰蛋白酶的能力,而且金属离子和表面活性剂对 XYNB 的酶促反应均无明显影响,也有较好的 pH 稳定性,比活性也较高,但其耐热性一般。在 XYNB 中引入 T11Y 的定点突变,在保持了 XYNB 优良性质的基础上,进一步提高了酶的热稳定性,同时也提高了酶的催化效率,使此酶具有更好的应用价值。

本实验结果说明,第 11 族木聚糖酶氨基端芳香族氨基酸之间的疏水相互作用对提高木聚糖酶的热稳定性有很重要的作用。突变酶 T11Y 与原酶 XYNB 仅有一个氨基酸的差异,在性质上除了热稳定性有显著变化外,在别的性质上如酶的动力学性质、酶的比活性、最适 pH 等方面均有所变化,为进一步的木聚糖酶结构与功能的研究提供了优良的材料。

4.2 N13D、S40E 定点突变

本实验选择 N13 和 S40 两个不同位置上的氨基酸残基,经过定点突变使该位点的氨基酸突变

为酸性氨基酸。在对突变酶的热稳定性研究中发现, N13D 突变酶在 70℃ 处理 5 min, 热稳定性比 XYNB 提高了 24.76%, 比活性比 XYNB 提高了 22%; S40E 突变酶在 70℃ 处理 5 min, 热稳定性比 XYNB 提高了 14.46%, 在其他性质方面基本与 XYNB 相似。但在热稳定性的提高幅度上, N13D 和 S40E 没有芳香族氨基酸突变酶 T11Y 大。

在对来源于 *Trichoderma reesei* 的木聚糖酶 TRX II 的突变酶的研究中也发现, N11D 和 N38E 的定点突变使 TRXII 的热稳定性在 Q162H/Q162Y 突变的基础上有进一步的提高, 也说明了蛋白表面的带电荷的氨基酸对蛋白的热稳定性有一定的贡献。N13D 和 S40E 的突变表明, 离子键和电荷对蛋白质热稳定性的影响很大程度上取决于它们所处的空间位置。一般亲水的极性氨基酸分布在蛋白表面, 疏水的非极性氨基酸被包埋在蛋白的内部, 即所谓的包装效应, 这种效应的结果使蛋白在特定环境中更加稳定。突变酶的最适 pH 变化较大, 由 XYNB 的 5.2 变为 N13 和 S40 的 5.8, 这可能与酸性氨基酸产生的氢键及突变酶整体电离网的形成有关, 具体的原因有待进一步研究。

4.3 木聚糖酶 XYNB 氨基端的替换

通过 Western Blot 检测证明, 融合木聚糖酶 TB 在大肠杆菌 BL21 中的表达产物在 SDS-PAGE 电泳中有两条不同的表达条带, 分子量分别是 21 kD 和 23 kD。pET-22b (+) 表达系统自带 22 个氨基酸的信号肽序列, 使表达的蛋白分泌到胞外, 由于目的蛋白的过量表达, 一部分蛋白来不及切掉信号肽而且会形成包涵体, 所以有两种大小不同的表达条带。从电泳图中看到目的蛋白的表达量较高, 而酶活性测定的结果只有 5.2 IU/mL, 这也是由于目的蛋白过量表达而产生包涵体的原因。

由于 TB 序列中含有三个潜在的糖基化位点 (Asn-X-Ser/Thr), 使酵母表达的木聚糖酶产物的分子量由 21 kD 提高到 31 kD 这与原酶 XYNB 在酵母中表达的情况一致。

有研究表明, 将氨基端替换成嗜热酶的相应序列有利于提高其热稳定性 (Sun *et al.*, 2005; Shibuya *et al.*, 2000)。实验结果表明, 融合酶 TB 的热稳定性较原酶 XYNB 有很大幅度的提高。进一步的研究发现, TfxA 的氨基端比 XYNB 的氨基端少了两个氨基酸, 与 XYNB 相比, TB 的氨基端共有 15 个氨基酸残基发生了改变。其中, V3A、I4V、T6S、F15Y、Y16F、G23A、S26T、N32G 的氨基酸改变属于结构与性质 (极性 & 疏水性) 相似的氨基酸之间的改变, 可能对酶的影响不大。而 Q8E、T11Y、N12H、N13D、G24P、T30E、S33P 的氨基酸改变仅从氨基酸的性质上分析, 变化是很显著的。下面分别进行分析, 从空间三维结构看 (图 2-26), H12、D13 位于 TB 的 β 折叠股 B1 和 B2 之间; P24 位于 TB 的 β 折叠股 B2 和 A2 之间; P33 位于 TB 的 β 折叠股 A2 和 A3 之间。其中, H12、D13 分别为带正电荷和带负电荷的氨基酸, 并且空间位置邻近。我们知道, 蛋白的酸性或碱性氨基酸侧链在生理环境中是带正电或负电的, 随着蛋白的卷曲折叠, 当正负基团相互接近时, 则通过静电吸引而形成离子键, 也就是盐桥。盐桥结构对提高蛋白质的热稳定性有一定的作用。因此, H12、D13 形成的离子键可以提高折叠股 B1 和 B2 的稳定性, 从而提高融合酶 TB 的氨基端的热稳定性。在前面的 N13D 定点突变中, 我们也获得了热稳定性提高的结果, 也证明了 D13 对热稳定性的贡献。同样, P24 和 P33 也位于 β 折叠股的连接处, 由于脯氨酸的 N 原子位于吡咯环上, 使前一个氨基酸与它形成肽键时 ($C^{\alpha}-N$) 不能自由转动, 吡咯环还具有疏水性, 脯氨酸的这些特性导致它比其它氨基酸的构型熵小, 从而降低非折叠区的熵值 (Matthews *et al.*, 1987; Hardy *et al.*, 1993;

Watanabe *et al.*, 1994), 提高它所连接的 β 折叠股的稳定性。

即与 XYNB 相比, 除了包含了 T11Y 的突变外, N12H、N13D、G24P、S33P 的变化对提高融合酶的热稳定性有重要的作用。而且 Q8E、T30E 的变化增加了融合酶 TB 的带电荷氨基酸的数量, 使氨基酸相互作用的氢键发生改变, 有可能对 TB 的最适 pH 和 pH 稳定性及热稳定性都有一定的影响。总之, 以 TfxA 的氨基端取代 XYNB 的氨基端使融合酶 TB 的疏水性和电负性提高, 影响了 TB 的酶学性质, 至于具体的原因, 由于蛋白质氨基酸空间位置和相互作用的复杂性, 还需要进一步的研究。

TB 保持了木聚糖酶 XYNB 的比活性, 达到 883.36 IU/mg, 最适温度 70°C, 热稳定性很好, 稀释好的酶液在 80°C 和 90°C 下热处理 3 min, TB 比 XYNB 的热稳定性提高了 6 倍左右, 能适应饲料和造纸加工过程的高温, 有很大的应用潜力。

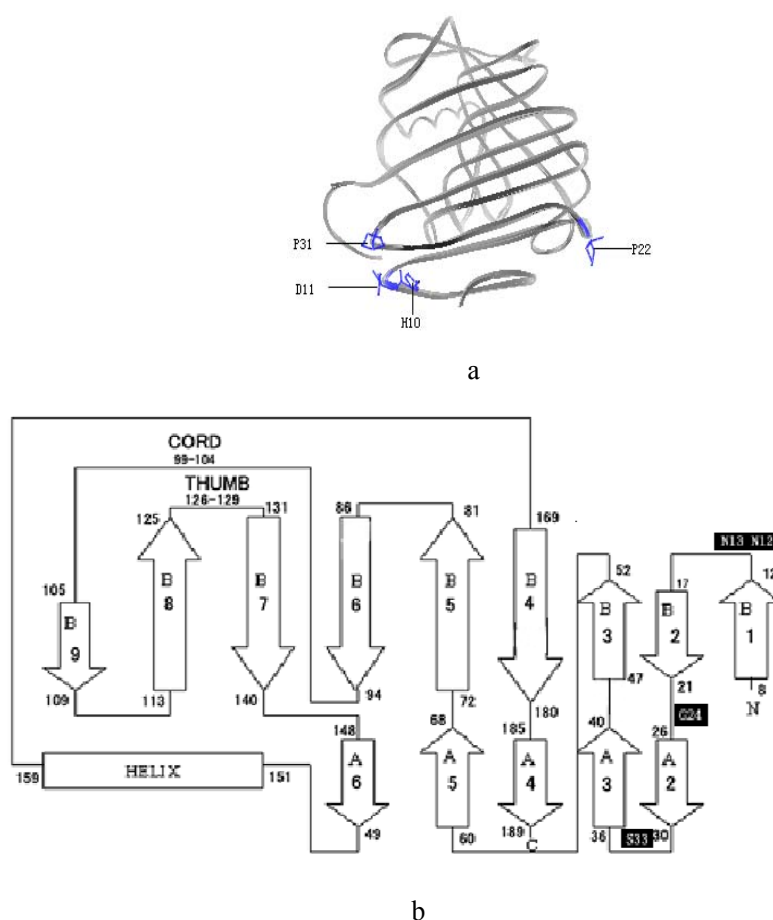


图 2-26 TB 的分子模型及二级结构

Fig. 2-26 a: The molecular model of TB

b: The secondary structure trend of TB

A2–A6 and B1–B9: β -strands; Helix: α -helix; Cord: cord structure; Thumb: thumb structure; B1, B2 and A2 is the substituted N-terminal from TfxA; N12, N13, P24, P33 are located between β -strand (shaded).

4.4 XYNB 及 TB 的二硫键突变

在热变性过程中, 首先展开的很可能是环状转角结构(loop)和蛋白质的氨基、羧基末端。我们可以通过定点突变的方法对这些区域进行改造, 通过缩短蛋白末端或锚定的方式增加蛋白结构的稳定性。其中, 对这些结构的锚定是通过增加蛋白质分子中氨基酸之间的相互作用力来实现的(Vogt *et al.*, 1997; Georis *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2000; Lehmann *et al.*, 2001; Hakulinen *et al.*, 2003)。这些作用力分别是: 离子键(盐桥)、氢键、二硫键、疏水力、范德华作用力。在前面的实验中, 我们尝试通过对结构较为松散和不稳定的蛋白质氨基端进行改造, 使突变酶中增加了盐桥、氢键和疏水相互作用, 突变酶的热稳定性也有了不同程度的提高。对第11族的木聚糖酶的结构研究表明, 它们的 α 螺旋区也是热不稳定的区域, 我们通过定点突变将 α 螺旋区和 β 折叠B9通过二硫键进行锚定, 期望获得热稳定性更好的突变酶。为了获得热稳定性进一步提高的突变酶并便于比较突变效果, 我们在XYNB和前面实验获得的热稳定性最好的TB中共同引入二硫键。

实验结果表明, 突变酶TS(包含有氨基端替换和二硫键突变)的热稳定性比单一的二硫键突变酶XS或单一的氨基端替换突变酶TB的热稳定性高很多。如同“1+1>2”的情况, 也就是说, TS分子内的二硫键和氨基端存在着协同作用, 共同影响木聚糖酶的热稳定性。对来源于*T. reesei*的木聚糖酶的定点突变研究表明, 二硫键的引入使该酶的半衰期由原来的1 min提高到14 min, 而新的Q162H或Q162Y, N11D和N38E点突变的加入使半衰期最终提高到100 min(Turunen *et al.*, 2001; Fenel *et al.*, 2004; Hairong *et al.*, 2004)。本实验的研究结果显示, 二硫键突变使XYNB在70℃, pH 6.0 热处理20min的条件下, 热稳定性提高了3倍, 半衰期由原来的3 min提高到9 min; 氨基端突变酶TB在以上条件下的热稳定性提高了6倍, 半衰期提高到20 min; 综合以上两种突变, 我们获得TS, 将热稳定性提高了12.4倍, 半衰期最终提高到150 min。对突变酶TS来说, 它综合了TB中的点突变对热稳定性的影响: Q8E和T30E对蛋白质带电荷量的提高; N12H和N13D形成盐桥对热稳定性的提高; G24P和S33P对蛋白质疏水性和折叠熵的改善; T11Y对蛋白质氨基端芳香族氨基酸相互作用的疏水力的提高; 结合二硫键的作用, TS获得了更好的热稳定性, 实验结果也证明了这一结论。

原酶XYNB在二硫键的位置上天然存在着一个由Ser和Asn形成的氢键(Diana *et al.*, 1994)。将氢键替换为更加牢固的共价二硫键之后, 突变酶的热稳定性有所提高, 其原因可能是由于二硫键可以使酶分子的结构更加紧密, 降低了蛋白质的折叠熵。同时, 二硫键又使蛋白的结构刚性增加, 使酶在与底物发生作用时出现僵化, 在酶学性质上表现为比活性的下降和酶反应动力学的改变(Sapag *et al.*, 2002)。氢键的产生受环境pH的影响较大, 而二硫键对此并不敏感, 因此, 突变酶有更好的pH稳定性。

对二硫键在高温下的稳定性研究表明, 一般情况下温度高于80℃时, Cys很容易被氧化而使二硫键发生断裂。但也有特例, Van den Burg 等人在蛋白中引入二硫键使蛋白在100℃时仍保持稳定。二硫键的作用关键在于它在蛋白质分子中所处的位置。我们将突变酶在80℃和90℃下处理不同的时间, 然后测定相对剩余活性, 结果发现, 在80℃和90℃下, XS和XYNB由于热稳定性相对较差, 几分钟之内就完全失活了, 所以在不同时间热处理的相对剩余活性相差不大; 而TB的剩余活性反而比TS高, 表现出更好的热稳定性。通过进一步分析, 我们认为, 在高于80℃的时候, 处

于 α 螺旋区和 β 折叠B9之间的二硫键由于高温逐渐断裂,发生一种不可逆的变性反应。由于热处理后,被处理的样品会被立即置于冰上,在TB中二硫键的相应位置是一个氢键,高温下,氢键断裂,但由于是一种可逆变性,在低温时,氢键又会重新形成,在其最适温度下测定酶活时,TB的结构相对于失去二硫键的TS更加稳定,所以表现出更好的热稳定性。这也只是一种推测,具体的原因有待进一步研究。

5. 小结

影响蛋白热稳定性的因素十分复杂,主要有:疏水作用、氢键、离子键、二硫键、包装效应、Pro 理论、 α 螺旋的稳定作用、氨基酸的组成等多种因素。没有一种因素能够单独决定蛋白的热稳定性,往往是各种因素共同作用的结果。

本研究通过定点突变的方法对木聚糖酶 XYNB 的热稳定性进行改良。获得了突变酶 T11Y、N13D、S40E、XS 和 TB,这些突变酶的热稳定性较野生型酶 XYNB 的热稳定性都有不同程度的提高。

我们优化组合了以上的定点突变,获得了突变酶 TS(氨基端替换结合二硫键突变体),最终使 XYNB 在 70℃处理 20 min 的热稳定性提高了 12.4 倍,半衰期由原来的 3 min 提高到 150 min。突变效果 TS>TB>T11Y>XS>N13D>S40E。各突变酶的热稳定性见表 2-9。

突变酶 TS 由于具有很好的热稳定性和 pH 稳定性,在工业上有较好的应用前景。

表 2-10 各突变酶的突变依据与效果

Table 2-10 The design of mutants and the results

突变酶	突变依据	突变效果
S40E	增加蛋白表面带电荷氨基酸的含量	S40E 突变酶在 70℃处理 5 min, 热稳定性比 XYNB 提高了 14.46%
N13D	与嗜热木聚糖酶的氨基酸序列相似性比较	N13D 突变酶在 70℃处理 5 min, 热稳定性比 XYNB 提高了 24.76%
XS	二硫键提高 α 螺旋区的稳定性	二硫键突变使 XYNB 在 70℃, pH 6.0 热处理 20 min 的条件下, 热稳定性提高了 3 倍, 半衰期由 XYNB 的 3 min 提高到 9 min;
T11Y	提高木聚糖酶氨基端的疏水作用	T11Y 在 60℃和 70℃分别处理 60 min, 10 min。剩余酶活性是 XYNB 剩余酶活性的 4.7 和 2.6 倍。70℃的半衰期由 XYNB 的 3 min 提高到 10 min。
TB	氨基端的替换包括: 离子键, 疏水作用, Pro 理论, 氨基酸组成等多种因素	氨基端突变酶 TB 在 70℃, pH 6.0 热处理 20 min 的条件下, 热稳定性提高了 6 倍, 半衰期提高到 20 min;
TS	以上突变的综合	在 70℃下, TS 将热稳定性提高了 12.4 倍, 半衰期最终提高到 150 min。

第三章 木聚糖酶催化残基的研究及最适 pH 值的分子改良

1. 实验材料

同第二章

2. 研究方法

2.1 突变位点的确定

突变氨基酸	在蛋白二级结构中的位置	突变目的	方法	突变酶命名
E87F	β -sheet B6	通过对第 11 族木聚糖酶催化机制及分子建模的研究初步确定催化残基	定点突变试剂盒	E87F
E177F	β -sheet B4	通过对第 11 族木聚糖酶催化机制及分子建模的研究初步确定催化残基	定点突变试剂盒	E177F
N46D	β -sheet A3,B3 之间	通过对第 11 族木聚糖酶同源基因比较及最适 pH 比较来改变最适 pH 值	利用基因内部的酶切位点	N46D

2.2 定点突变方法

2.2.1 E87F 和 E177F 定点突变

使用定点突变试剂盒，程序见promega公司Altered Sites II. In vitro Mutagenesis System (www.Promega.com) 产品说明。

所用的突变引物如下：E87F primer: 5' tcgaacccgctcgtcttctactacatcgctcgac 3'

E177F primer: 5' atgatcctcgccaccttcggtaccagagcagc 3' (下划线为突变位点)。

2.2.2 N46D 定点突变

拟突变的木聚糖酶 XYNB 基因中的 Asn46 位点之后有一个 *Nae* I 单酶切位点(下划线为 Asn46 位点)

Asn46

Nae I

ACG AAC TGC GGG AAC TTC GTC GCC GGC AAG GGC

据此设计 PCR 引物，完成 N46D 点突变，引物如下：

上游引物：Z9-xyn4: 5' -TAGAATTGCCATGGCCACGGTCATCACCACCAACCAG-3' (含 *Eco*R I 及 *Nco* I 的酶切位点)

下游引物: xyn7: 5' -GCCCTTGCCGGCGACGAAGTCCCCGCAGTT -3' (含 *Nae* I 的酶切位点, 带有下划线的部分为突变的核苷酸)

通过 PCR 扩增出了突变的 100 bp 左右的片段, 用 *Nae* I 和 *Eco*R I 双酶切位点将 *N46D* 突变片段取代 pUC19-*xynB* 上的相应片段, 电转化大肠杆菌 JM109 筛选出重组菌落, 提取重组质粒 pUC19-*N46D* 进行序列测定。

2.3 重组表达载体的构建

同第二章 2.4

2.4 重组木聚糖酶的表达及纯化

同第二章 2.5

2.5 酶学性质的分析与比较

同第二章 2.7

3. 结果

3.1 突变位点的确定

对XYNB的同源建模在 <http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html> 网站上完成。木聚糖酶XYNB属于第11族木聚糖酶, 由两个反向的 β 折叠片和一个短的 α 螺旋组成, 整个酶分子成右手型结构(Liu *et al.*, 2004)。第11族木聚糖酶的催化机制是经典的酸碱催化机制(Withers *et al.*, 2001)。分析XYNB中所有的可能作为催化残基的酸性氨基酸, 只有E87和E177位于酶与底物作用的活性中心(见图3-1a), 它们分别位于 β 折叠股B6和B4上(图3-1b, 3-1c)。推断E87和E177为XYNB的催化残基。为了进一步证明我们的推测, 我们设计将E87和E177突变为中性的苯丙氨酸(将-COOH突变为惰性的苯基), 根据突变酶的性质, 证明我们的推测。

木聚糖酶的pH特性与空间上邻近酸碱催化残基的氨基酸有很大关系, 特别是与催化残基天冬氨酸和谷氨酸形成所谓的“电荷网”的氨基酸, 它们往往带有电荷并与催化残基形成氢键(Poon *et al.*, 2003)。在多种第11族木聚糖酶中, 其 β 折叠股A3和B3之间的一个保守的氨基酸Asn或Asp可能就是这样的一个氨基酸(表3-1), Asn46正好位于 β 折叠股A3和B3之间(图3-1b, 3-1c)。当木聚糖酶的最适pH在5.0以上时为Asn, pH在5.0以下时为Asp。XYNB的最适pH为5.2, 相对应的氨基酸为Asn46(图3-1b), 如果将此位点的Asn46突变成Asp46, 可能会改变它与催化残基E87和E177的相互作用, 从而降低XYNB的最适pH。

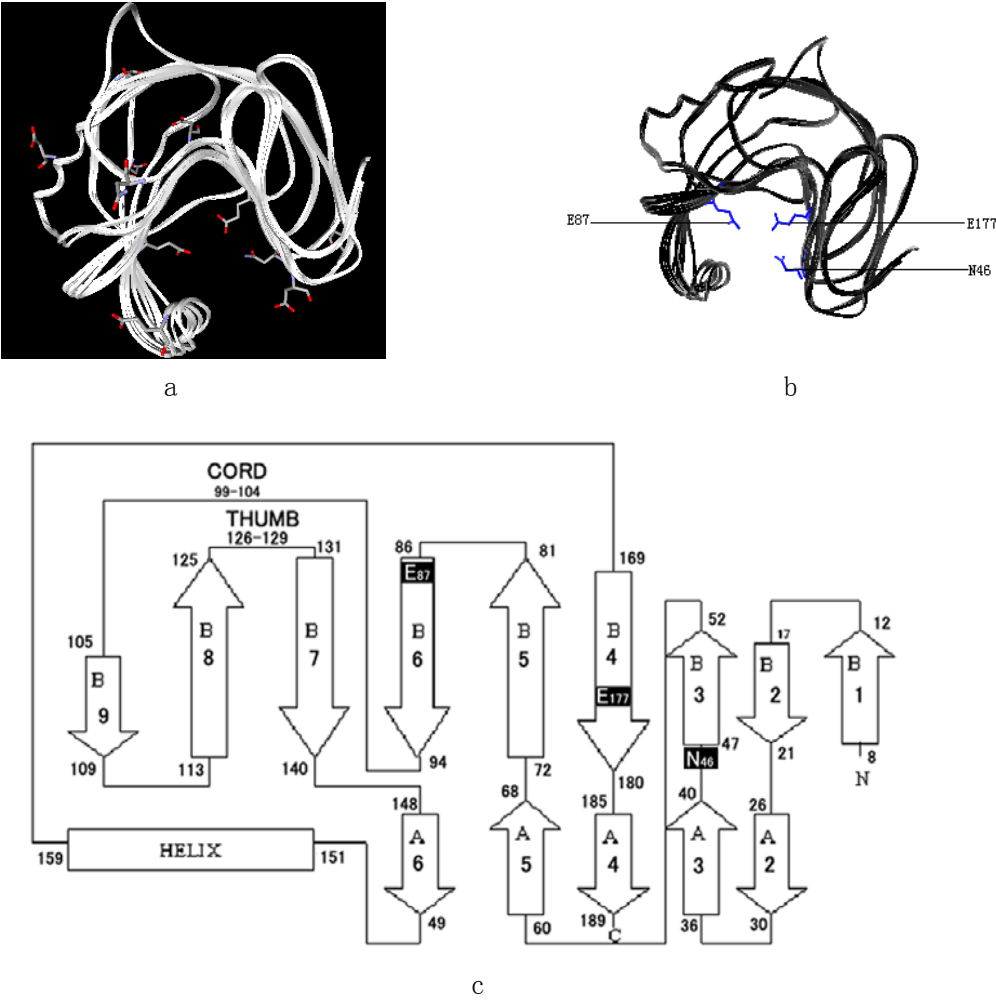


图 3-1 XYNB 的分子模型

Fig. 3-1 The molecular model of XYNB

表 3-1 第 11 族木聚糖酶最适 pH 值和相应氨基酸序列的比较
Table 3-1 Optimum pH and BLAST of family 11 xylanase

来源	酶	相应氨基酸序列	最适 pH	收录号 (GenBank)
<i>Bacillus</i> sp.41M1	Xylanase J	AQWSNVN N LLFRKGK	9.0	AB029319
<i>Thermomonospora fusca</i>	TfxA	TSWRNTG N FVAGKG	7.0	U01242
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	STX-II	TQWSNTG N FVAGKG	7.0	D85897
<i>Dictroglomus thermophilum</i>	Xylanase B	CQWSNIN N ALFRTGK	6.5	U76545
<i>Streptomyces lividans</i>	XlnB	TSWRNTG N FVAGKG	6.5	M64552
Reference(Harris <i>et al.</i> , 1997)				
<i>Bacillus</i> sp.D3	Xylanase	VSWNSNG N FVIGKG	6.0	<i>al.</i> , 1997)
<i>Streptomyces lividans</i>	XlnC	TQWTNCG N FVAGKG	6.0	M64553
<i>Caldicellulosiruptor</i> sp.Rt69B	Xylanase	CQWSNIN N ALFRTGK	5.5	AF036925

<i>Aspergillus niger</i>	XynNB	VEWSNVG N FVGGKG	5.0	D38071
<i>Trichoderma harzianum</i> E58	Xylanase	VNWSNSG N FVAGKG	5.0	P48793
<i>Trichoderma viride</i>	XylanaseIIA	VNWSNS G N FVGGKG	5.0	A44594
<i>Aureobasidium pullulan</i>	XynA	MYWNGVNG D FVVGG	4.8	U10298
<i>Trichoderma reesei</i>	XynI	VNWNQD D FVVGVG	3.5-4.0	X69574
<i>Penicillium purpurogenum</i>	XynB	MYWQQGVSN D FVVGG	3.5	Z50050
<i>Aspergillus niger</i>	Xylanase A	MYWEDGVSS D FVVGLG	3.0	A19535
<i>Aspergillus kawachii</i>	XynC	MYWEDGVSS D FVVGLG	2.0	D14848
<i>Cryptococcus</i> sp.S-2	Xyn-CS2	VNWNQNT D FVCGLG	2.0	D63382
<i>Penicillium</i> sp.40	XynA	KGWSTGSAR D ITFEGTFN	2.0	AB035540

3.2 定点突变

用定点突变试剂盒完成 E87F, E177F 的定点突变, 通过测序分析, 确定突变位点与设计的目标位点一致。

以 *xynB* 为模板, 通过 PCR 扩增, 双酶切插入突变片段, 完成 N46D 点突变, 其编码的氨基酸由原来的 Asn46 突变为 Asp46。突变基因克隆到表达载体上, 通过测序分析, 确定突变位点与设计的目标位点一致。

3.3 重组表达质粒的构建

突变基因分别克隆在 pET-22b (+) 和 pPIC9 上, 构建的大肠杆菌表达载体和毕赤酵母表达载体的示意图 (图 3-2)。

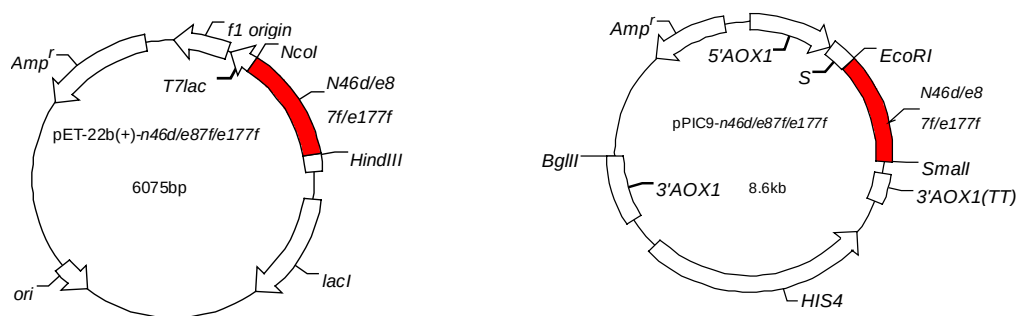


图 3-2 重组表达质粒 pET-22b (+) -n46d/e87f/e177f 和 pPIC9-n46d/e87f/e177f 构建的物理图谱

Fig. 3-2 Physical map of recombinant expression plasmid pET-22b (+)-n46d/e87f/e177f and pPIC9-n46d/e87f/e177f

3.4 重组木聚糖酶的表达及纯化

3.4.1 在大肠杆菌中的表达

实验表明, 突变酶在大肠杆菌中都得到了表达 (图 3-3), 表达的突变酶分子量为 21 kD, 与理

论分子量一致。N46D 突变酶表达的大肠杆菌细胞裂解液上清的酶活性约为 5 IU/mL; E87F 和 E177F 突变酶表达的大肠杆菌细胞裂解液上清基本检测不到酶活性。

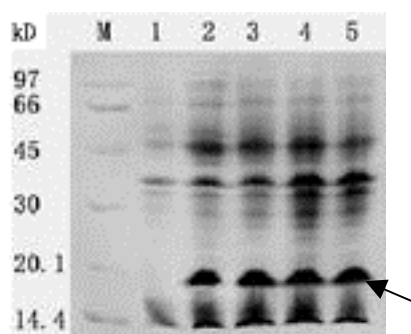


图 3-3 N46D 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3-3 SDS-PAGE analysis of N46D expressed in *E. coli* BL21 (DE3).

1. Empty pET22b(+) expressed in *E. coli* BL21(DE3)
- 2-5. N46D expressed in *E. coli* BL21 (DE3) (21 kD)

3.4.2 毕赤酵母中的表达

首先在摇床水平上对毕赤酵母重组子进行诱导表达, 诱导 72 h 后进行酶活性测定, 筛选出高表达菌株用于进一步的发酵罐扩大培养。N46D 在摇床水平上表达量最高的重组子其酶活性达到 35 IU/mL。在发酵罐上培养, 随着甲醇诱导时间的延长, 发酵上清液中木聚糖酶酶活力显著增加, 酶蛋白不断积累, 诱导 120 h 后木聚糖酶活性可达 300 IU/mL(图 3-4)。E87F 和 E177F 两个突变酶在酵母中都有表达(图 3-5)。但这两个突变酶的催化活性基本全部丧失。用 somogyi-nelson 法检测不到酶活性。

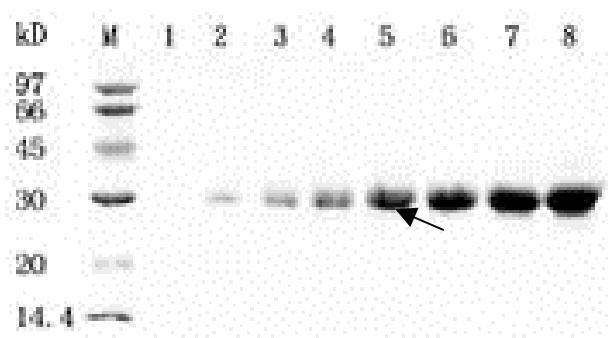


图 3-4 N46D 在毕赤酵母中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3-4 SDS-PAGE analysis of N46D expressed in *Pichia pastoris*

1. Before induced

2-8: Expressed TB after induction of 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h (31 kD)

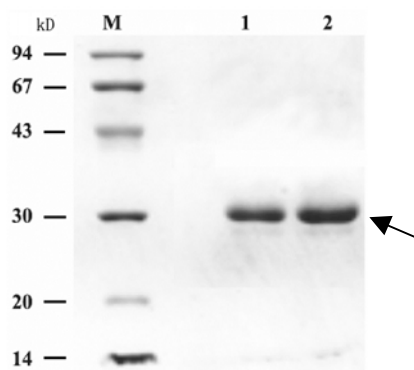


图 3-5 E87F 和 E177F 突变酶摇床水平表达

Fig. 3-5 SDS-PAGE analysis of E87F and E177F expressed in *Pichia pastoris*1. E87F expressed in *Pichia pastoris*2. E177F expressed in *Pichia pastoris*

3.4.3 木聚糖酶 N46D 的纯化

发酵上清液的酶活性 689.79 IU/mL, 酵母发酵上清液经透析袋脱盐后, 酶活性 307.59 IU/mL, 经过 PEG8000 浓缩后, 酶活性再经过分子筛 Superdex 75 HR 10/30 (Amersham pharmacia biotech 预装柱) 纯化, 得到电泳纯的目标蛋白, 酶活性 152.36 IU/mL. 最终回收率 22%。

经纯化后, 达到电泳纯的突变酶 N46D (Fig. 3-6), 与以前纯化的经毕赤酵母表达的原酶 XYNB 一起进行酶学性质的比较研究。

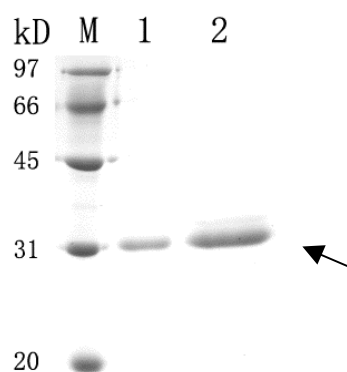


图 3-6 N46D 的纯化

Fig. 3-6 SDS-PAGE analysis of purified N46D

1. Purified N46D; 2. Crude N46D

3.5 酶学性质的分析与比较

结果表明, N46D 的最适 pH 值由 5.2 下降到 4.2, pH 稳定性也向酸性 pH 偏移, 由原来的 5-9 变为 3-8 (指相对剩余酶活性在 50% 以上的 pH 值范围)。同时, 热稳定性和最适温度也有一定的变化。实验结果表明, N46D 的热稳定性较 XYNB 有一定的提高 (Fig. 3-7), 70℃ 分别处理 6 min 和 4 min, N46D 剩余酶活性分别是 58.5% 和 80.26%, 而 XYNB 剩余酶活性为 56.77% 和 76.30%。在 80℃ 分别处理 1 min, N46D 剩余酶活性为 51.78%; 而 XYNB 剩余酶活性为 42.78%。在热稳定性提高的同时, N46D 最适温度由原酶的 60℃ 变为 65℃。

在酶的比活性方面, N46D 为 132.56 IU/mg, 是 XYNB 比活的 14.95%。在酶的动力学方面, 突变酶 N46D 在 K_m 值和 V_{max} 上与原酶基本一致。金属离子 Mg^{2+} , K^+ 对 N46D 有轻微的激活作用, SDS 对 N46D 有轻微的抑制作用。突变酶 N46D 依然维持了原酶抗胃蛋白酶和胰蛋白酶的特性。

表 3-2 木聚糖酶 XYNB 和 N46D 的酶学性质的比较

Table. 3-2 Comparison of enzyme properties of XYNB and N46D

酶学性质	XYNB	N46D
Optimum temperature/℃	60	65
Optimum pH	5.2	4.2
pH stability ¹	5-9	3-8
$K_m/(g/kg)^2$	20.87	21.0
$V_{max}/(\mu mol/mg \cdot min)$	4568	4500
Specific activity/(IU/mg)	886.89	132.56
Effect of metal ion and some reagents on enzymatic activity	EDTA, Cr^{3+} , Ni^{2+} activate slightly Zn^{2+} , Mn^{2+} inhibit slightly	Mg^{2+} , K^{2+} , EDTA activate slightly SDS inhibit slightly
Cellulase activity	No activity	No activity
Resistance to pepsin and trypsin	Retain about 95% of its activity	Retain about 95% of its activity

注 1: 指相对剩余酶活性在 80% 以上的 pH 值范围。

注 2: K_m 用 g/kg 表示是因为无法计算木聚糖分子量而无法计算其摩尔浓度。

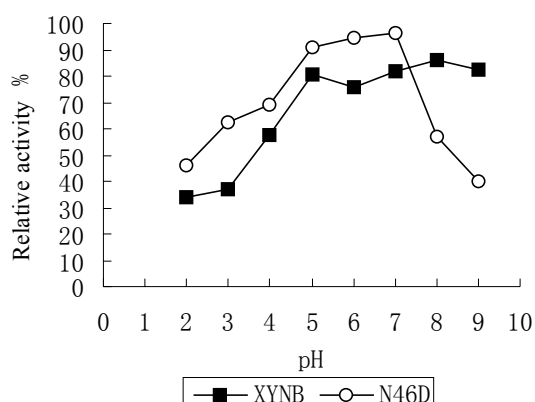


图 3-7 XYNB 和 N46D pH 稳定性的比较

Fig. 3-7 Comparison of pH stability of XYNB and N46D

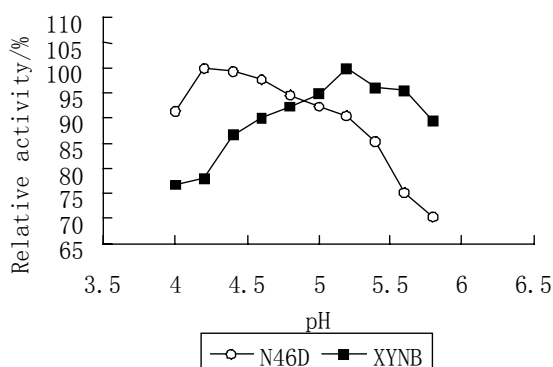


图 3-8 XYNB 和 N46D 最适 pH 的比较

Fig. 3-8 Comparison of pH optimum of XYNB and N46D

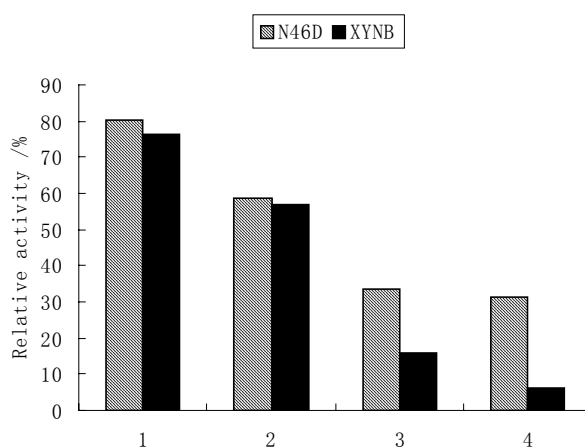


图 3-9 XYNB 和 N46D 热稳定性的比较

Fig. 3-9 Comparison of thermostability of XYNB and N46D

1. the relative activity after 4 min incubation at 70°C
2. the relative activity after 6 min incubation at 70°C
3. the relative activity after 2 min incubation at 80°C
4. the relative activity after 4 min incubation at 80°C

4. 讨论

利用生物信息学手段,应用 SWISS-MODEL 和 SCANVIEW 软件对 XYNB 进行分析,XYNB 具有第 11 族木聚糖酶的分类特性和三级结构。第 11 族木聚糖酶的催化机制是经典的酸碱催化机制,根据同源序列的比较分析,推测 E87 和 E177 是 XYNB 的催化残基。为了证明 E87 和 E177 的作用,我们设计了 E87F 和 E177F 的定点突变。研究发现,突变酶的活性基本丧失。证明了我们的推测。

通过酶学性质的分析与比较, N46D 的最适 pH 值由 5.2 下降到 4.2。这与 Table.1 中“第 11 族木聚糖酶相应蛋白序列的比较与木聚糖酶的最适 pH 值的分析”的结果相符。大多数第 11 族木聚糖酶最适 pH 为 5 以上时, 相应的氨基酸位点为 Asn; 最适 pH 为 5 以下时, 该氨基酸位点为 Asp。只有个别报道如: 来源于 *F. succinogenes* 的 Xyn (Zhu *et al.*, 1994) 和来源于 *Schizophyllum commune* 的 xylanase (Bray *et al.*, 1995) 与该结论相反。

木聚糖酶的催化机制是酸碱催化机制, 在酶的活性中心附近加入了酸性氨基酸, 必然影响酶的催化反应。通过 SWISS-MODEL 对 XYNB 空间结构的分析表明, Asn46 的 OE2 氧原子与 Glu177 的 OE2 氧原子之间的距离为 3.97Å, 没有形成氢键的能力(两氧原子之间的距离在 2.8–3.0 Å 之间可形成 O–H–O 氢键), 对催化残基的影响较小。突变酶 N46D 中, Asn46 变成了 Asp46, Asp46 的 OE2 氧原子与 Glu177 的 OE2 氧原子之间的距离小于 3.0 Å, 可以形成氢键, 而 Glu177 是质子供体, Asp46 的存在就会使 Glu177 质子供体的作用减弱, 使酶的催化能力下降, 这可能就是 N46D 的比活性下降的原因。但在偏酸性的环境下, 影响 Asp46 与 Glu177 形成氢键, 而降低 Asp46 对催化残基的影响, 因此, 突变酶与原酶相比在酸性 pH 下的活性更高, 这就解释了突变酶的最适 pH 下降和 pH 稳定性也向酸性 pH 偏移的现象。但在酸性条件下, 催化残基的作用也会受到影响, 因此在最适 pH 下的比活较原酶也会下降。

影响木聚糖酶热稳定性的因素很多, 特别是第 11 族木聚糖酶, 热稳定性与 Arg 和 Pro 的含量; 蛋白结构中二硫键的引入和盐桥的形成; 带电侧链和螺旋偶极子的疏水堆积及芳香族氨基酸有利的相互作用有关。有研究者利用 SAS 生物信息学统计软件对 25 个第 11 族木聚糖酶的序列进行分析(刘亮伟等, 2005), 得到第 11 族木聚糖酶最适温度的经验公式: $T_{\text{opt}} = -37.3 + 5.3(D) + 5.5(L) + 5.8(P) + 5.6(Y) - 6.2(H)$ 。从公式中可以看出, 第 11 族木聚糖酶最适温度与 Asp 的含量成正相关。而且 Asp 是酸性氨基酸, 可以稳定螺旋 N 端的偶极子和氢键, 这可能是突变酶 N46D 最适温度和热稳定性提高的原因。

由于 N46D 序列中含有三个潜在的糖基化位点 (Asn–X–Ser/Thr), 使酵母表达的木聚糖酶产物的分子量由 21 kD 提高到 31 kD, 这与原酶 XYNB 在酵母中表达的情况一致。由于我们的目的是研究酶的结构与酶学性质之间的关系, 在做酵母表达时并没有筛选表达量最高的转化子, 因此 N46D 与 XYNB 相比在酵母中表达量较低。

N46D 单点突变使 XYNB 的最适 pH 从 5.2 下降到 4.2, 耐酸性及热稳定性也有提高, 使其更适于在动物酸性的胃中发挥作用, 因此, 更适合在饲料工业中的应用。

第四章 木聚糖酶XYNB的定向改良

——DNA shuffling方法

应用定点突变的方法对酶进行改良有一定的局限性,它依赖于对酶的三级结构以及酶学性质的了解,或者对亲缘关系相近的其它酶的结构与功能有较为广泛深入的认识。而用DNA shuffling 的方法对酶进行定向改良并不受以上因素的限制,获得的突变体库包含更丰富的信息,对酶在工业应用中的性质改良以及对酶的结构与功能的分析有更加广泛的研究前景。

1. 实验材料

1.1 菌种和质粒

橄榄绿链霉菌*Streptomyces olivaceoviridis* A1所产木聚糖酶基因 $xynB$ 及褐色嗜热单胞菌*Thermomonospora fusca*所产的木聚糖酶基因 $tfxA$ 由本实验室保存。pET22b(+)- $xynB$, pET22b(+)- $tfxA$ 质粒由本实验室保存。大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109、BL21(DE3)、表达质粒pET22b(+)均由本实验室保存。巴斯德毕赤酵母GS115、载体pPIC9为Invitrogen公司产品。

1.2 工具酶、试剂、培养基及主要仪器

同第二章

2. 研究方法

2.1 实验设计

来源于褐色嗜热单胞菌*Thermomonospora fusca*的木聚糖酶TfXA的热稳定性很高,75℃处理18 h仍然保持96%的相对酶活性。而来源于橄榄绿链霉菌*Streptomyces olivaceoviridis* A1所产木聚糖酶XYNB的热稳定性相对较差。经Blast分析, $tfxA$ 与 $xynB$ 基因有80%的相似性,经SWISS-PROT结构分析,二者为同属于第11家族的木聚糖酶。因此,我们希望运用DNA shuffling技术对木聚糖酶XYNB进行改良,从而获得一些性质有所改善的重组酶,特别是热稳定性好的突变酶,以适应工业生产上的要求。

2.2 目的基因片段的扩增

以pET22b(+)-*xynB*, pET22b(+)-*tfxA*质粒为模板, 以多克隆位点中*Nco* I 和*Hind*III的酶切位点两侧的序列为引物, 使用天为时代公司生产的普通*Taq*酶, 扩增全长的*xynB*和*tfxA*基因。扩增产物经回收试剂盒回收, 最终回收产物的浓度应达到50 ng/ μ L。

引物如下: pv-f: 5' gccatatgaaatacctgctgccgaccgctg 3'

pv-r: 5' gtggtgctcgagtgcggccgc 3'

变性: 94°C 5 min, 1个循环

扩增: 94°C 30 sec

55°C 30 sec

72°C 30 sec, 32个循环

延伸: 72°C 10 min

2.3 DNase I 的酶切

预实验: 0.025 IU DNaseI 酶切相同体积的DNA回收产物(浓度50 ng/ μ L) 5、10、15、20、25 min, 电泳检测酶切效果, 目的条带是50-100 bp的小片段DNA。确定以下条件进行小片段DNA的获取:

20 μ L体系: 0.025 IU DNaseI ; 约800 ng回收DNA (*xynB*和*tfxA*各400 ng); 25°C酶切10 min, 70°C处理10 min灭活DNaseI。酶切后的小片段以低熔点胶法进行回收。

2.4 酶切小片段的回收

①配置2%的琼脂糖凝胶, 在点样孔后大约3-4 cm处切割出一块大约1 cm长, 比点样孔稍宽的孔, 以吸管吸取融化好的低熔点胶滴入孔内至与胶面平行。待低熔点胶凝固后, 以较低的电压(约50 V)对DNaseI 的酶切的小片段进行电泳, 直至小片段泳动完全进入低熔点胶孔。

②将小片段DNA切割下来, 以5倍体积TE缓冲液70°C溶解。

③加等体积的Tris饱和酚, 混匀后14000 rpm离心15 min, 快速吸出上清。

④加等体积的氯仿, 混匀后14000 rpm离心8 min, 快速吸出上清。

⑤加1/10体积NaAc及3倍体积无水乙醇, -70°C沉淀1 h。

⑥12000 rpm离心1 h, 去上清, 干燥并以一定体积的超纯水溶解。

⑦回收产物经电泳检测, 最终浓度要求在10-30 ng/ μ L。

2.5 无引物PCR

10 μ L PCR 反应体系:

回收小片段DNA 约10 ng/ μ L; 2.5 mM MgCl₂; 0.4 mM dNTP; 1 $\times$ PCR buffer.

94 °C 5 min; 加入 *Taq* DNA polymerase 1.5 IU

94 °C 1 min; 45 °C 1 min; 72 °C 1 min; 25个循环

End

10 μ L PCR 反应体系:

8 μL 以上的PCR产物; 2.5 mM MgCl_2 ; 0.4 mM dNTP; 1 $\times$ PCR buffer.

94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 加入 *Taq* DNA polymerase 0.5 IU

94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 45 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 25个循环

72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min

End

2.6 有引物PCR

以无引物PCR产物为模板, 稀释不同的倍数(10、20、40、80倍)后, 以pv-f和pv-r为上下游引物, 用普通 *Taq*酶, 进行PCR扩增。程序如下:

变性: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 1个循环

扩增: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec

55 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec

72 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec, 30个循环

延伸: 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min

将600 bp左右的PCR产物以回收试剂盒回收, 终体积约25 μL 。

2.7 构建突变体库

2.7.1 双酶切

第一次酶切:

无菌水	16 μL
回收PCR产物/ pET22b (+)	10 μL
10 $\times$ buffer K	3 μL
<i>Nco</i> I (Takara)	1 μL
总体积	30 μL

37 $^{\circ}\text{C}$ 保温1.5 h后, 加3 μL 3M 乙酸钠 (pH5.2) 及90 μL 无水乙醇, -70 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀20 min。

13000 rpm离心10 min, 用70%乙醇洗次, 13000 rpm离心5 min。真空干燥10 min后, 用17 μL 无菌水溶解进行第二次酶切:

DNA	17 μL
10 $\times$ buffer M	2 μL
<i>Hind</i> III (Takara)	1 μL
总体积	20 μL

37 $^{\circ}\text{C}$ 保温1.5 h。电泳回收目的条带及质粒载体。

2.7.2 连接

pET22b (+) 质粒:	1 μ L
突变基因片段:	6 μ L
5 $\times$ T4 DNA连接酶缓冲液:	2 μ L
T4 DNA连接酶:	1 μ L
总体积	10 μ L
16 $^{\circ}$ C 保温12–16 h。	

2.7.3 大肠杆菌感受态细胞的制备

- (1) 挑取大肠杆菌单菌落，接种于10 mL LB培养基中，37 $^{\circ}$ C振荡培养过夜。
- (2) 取1/100体积的新鲜的过夜培养物，接种于500 mL LB培养至OD₆₀₀ 0.3–0.4。
- (3) 将培养液冰浴20 min，以后的步骤尽可能保持在0 $^{\circ}$ C，所有的容器在加细胞之前都预冷。3500 rpm，4 $^{\circ}$ C离心15 min。
- (4) 用500 mL预冷的10%甘油重悬细胞，动作要轻。3500 rpm，4 $^{\circ}$ C离心15 min，弃上清。
- (5) 用250 mL预冷的10%甘油重悬细胞，3500 rpm，4 $^{\circ}$ C离心15 min，弃上清。
- (6) 用20 mL预冷的10%甘油重悬细胞，转移到30 mL无菌离心管中，3500 rpm，4 $^{\circ}$ C离心15 min，弃上清。
- (7) 用1–2 mL预冷的10%甘油重悬细胞，将细胞以每管40 μ L分装，–70 $^{\circ}$ C保存，备用。

2.7.4 大肠杆菌的转化

取连接后的10 μ L溶液，加1 μ L乙酸钠（1/10体积）和30 μ L无水乙醇（3倍体积），–20 $^{\circ}$ C沉淀20 min，14000 rpm离心10 min。再用70%乙醇洗，14000 rpm离心5 min。沉淀真空干燥10 min后用5 μ L无菌水溶解。

- ①于冰上冻融–70 $^{\circ}$ C保存的感受态细胞，把Eppendorf管和电转化杯预冷备用；
- ②将纯化后的5 μ L DNA加入到40 μ L的感受态细胞中混匀，冰浴1 min；
- ③将细胞和DNA混和液转到电转化杯中，并将液体敲至杯底。把小杯放入小盒中，电击；
- ④迅速取出小杯，加入1 mL LB培养基，重悬细胞。把细胞转至一灭菌的离心管中，37 $^{\circ}$ C轻柔振荡1 h；
- ⑤取电击转化培养液，混匀涂于LB（含Amp 100 μ g/mL）平板，每板200 μ L，37 $^{\circ}$ C倒置培养过夜。

2.7.5 连接效率的鉴定

任意选取10个菌落，分别以牙签挑取于10个PCR反应管中，以pv-f和pv-r为上下游引物，用普通 *Taq* 酶，进行PCR扩增。程序如下：

变性：94℃ 5 min, 1循环
扩增：94℃ 30 sec
55℃ 30 sec
72℃ 30 sec, 30循环
延伸：72℃ 5 min

取5 μ L PCR产物电泳检测连接效率。

2.8 突变体重组子在木聚糖平板上的活性筛选

2.8.1 有木聚糖酶活性的菌落的筛选

将以上转化长出的大肠杆菌菌落用牙签分别点在背面贴有标签纸的LB（含Amp 100 μ g/mL）平板（每板100个菌落）和木聚糖平板上（0.1% xylan, 0.1%琼脂，表面涂有20 μ L 200 mM的IPTG，每板20个左右菌落）。LB平板37℃倒置培养16 h，木聚糖平板37℃倒置培养12 h。木聚糖平板培养12 h后，将其上的菌落用自来水冲下，注意不要使其上的培养基发生转动。以0.1%的刚果红溶液染色30 min，以自来水冲洗平板，再以1M NaCl溶液脱色30 min，观察是否有消解圈出现。记录有消解圈的菌落编号，找到对应的LB平板上的相应菌落。

2.8.2 热稳定性突变酶的筛选

将以上初步筛选到的有木聚糖酶活性的菌株用牙签点在两块背面贴有标签纸的LB（含Amp 100 μ g/mL）平板上，37℃倒置培养16 h，一块存种，一块用于取菌。用牙签从LB平板上将菌依次点在70℃预热的RBB木聚糖平板上，注意用牙签挑菌时，只是在菌落的边缘轻点一下，尽量保证每次挑菌的量相同。在RBB木聚糖平板上同样点上含有原酶XYNB基因的对照菌株作为对照。RBB木聚糖平板在70℃培养30 min，记录与对照的消解圈大小不同的菌落的编号，找到对应的LB平板上的相应菌落。再次实验验证被选菌株的消解圈的大小。以原酶XYNB作为对照，初步检测在大肠杆菌表达系统中表达的突变酶的热稳定性，选择差异较大的突变酶作下一步在毕赤酵母中的表达。

2.9 突变酶基因在毕赤酵母中的表达纯化和酶学性质研究

同第二章

3. 结果

3.1 目的基因片段的扩增

获得 $xynB$ (573 bp)和 $tfxA$ (570 bp)PCR扩增产物,与预计大小相近。结果如图4-1。

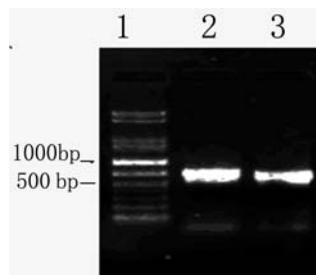


图 4-1 $xynB$ 和 $tfxA$ 扩增产物的电泳分析

Fig. 4-1 PCR amplification of $xynB$ and $tfxA$ gene

1. DNA marker; 2. $xynB$ gene; 3. $tfxA$ gene

3.2 DNase I 的酶切

经预实验,确定0.025 IU DNaseI; 约800 ng回收DNA ($xynB$ 和 $tfxA$ 各400 ng); 25℃酶切10 min, 进行小片段DNA的获取。结果如图4-2。

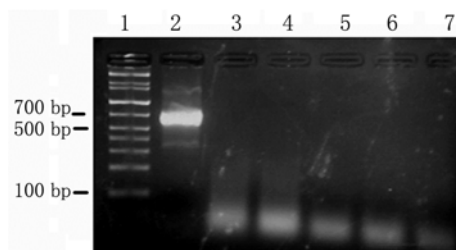


图 4-2 DNaseI 酶切不同时间的DNA产物的电泳分析

Fig. 4-2 Gel analysis of DNA products digested by DnaseI for different time

1. DNA marker; 2. PCR product undigested; 3. PCR product digested for 5 min; 4. digested for 10 min; 5. digested for 15 min; 6. digested for 20 min; 7. digested for 25 min

3.3 酶切小片段的回收

将酶切后的小于50 bp的小片段以低熔点胶法进行回收,结果如图4-3。回收产物经电泳检

测，最终浓度达到10–30 ng/μL。

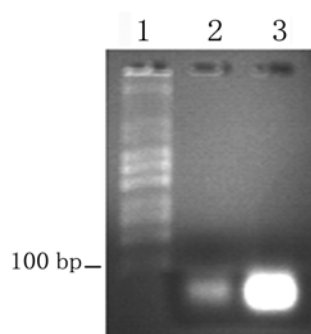


图 4-3 低熔点胶法回收小片段DNA的电泳分析

Fig. 4-3 Small DNA fragment recovered by low melting-point gel

1. DNA marker; 2-3. small DNA fragment

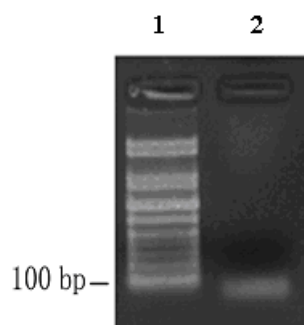


图 4-4 小片段回收率的电泳分析

Fig. 4-4 Gel analysis of recovery efficiency

1. DNA marker; 2. recovered DNA fragment

3.4 无引物PCR

回收的小片段DNA互为引物和模板进行两轮的PCR扩增，结果如图4-5。获得了100–2000 bp的弥散的DNA产物。

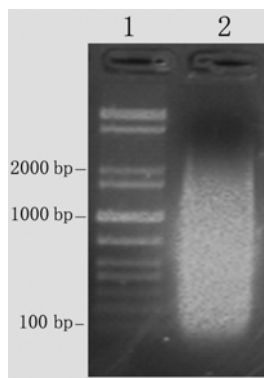


图 4-5 无引物PCR结果的电泳分析

Fig. 4-5 Gel analysis of PCR without primer

1. DNA marker; 2. 100–2000 bp smear

3.5 有引物PCR

将无引物PCR的产物稀释不同的倍数，以pv-f和pv-r为上下游引物进行有引物PCR反应，结果如图4-6。回收600 bp左右的明亮条带，用于与载体的连接反应和突变体库的构建。

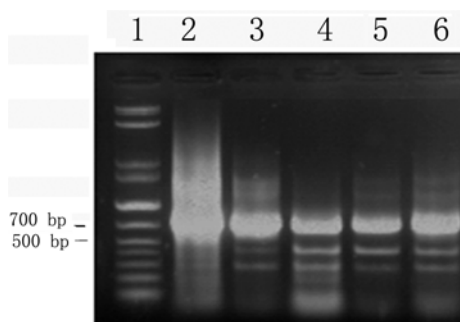


图 4-6 有引物PCR结果的电泳分析

Fig. 4-6 Gel analysis of PCR with primer

1. DNA marker; 2. PCR product with template undiluted; 3. template diluted for 10×; 4. template diluted for 20×; 5. template diluted for 40×; 6. template diluted for 80×

3.6 构建突变体库

将有引物PCR产物以 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切位点连接表达载体 pET22b(+), 转化大肠杆菌 BL21, 转化效率达到 10^6 , 随机挑选10个菌落, 做菌落PCR检测连接效率。结果如图4-7。连接效率达到90%, 说明此突变库可用于突变酶的筛选。

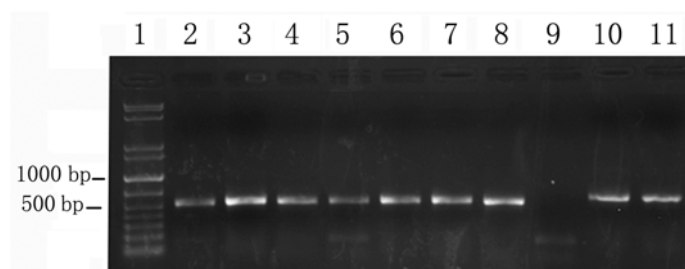


图 4-7 转化子连接效率的检测

Fig. 4-7 Detect of ligation efficiency

1. DNA marker; 2-11. PCR product of random transformants

3.7 突变体重组子在木聚糖平板上的活性筛选

3.7.1 有木聚糖酶活性的菌落的筛选

将700个转化子点在木聚糖平板上, 在IPTG的诱导下, 重组木聚糖酶表达并降解木聚糖, 在刚果红染色以及脱色后, 平板上出现清晰的消解圈, 如图4-8, 记录有消解圈的菌落编号, 共有170个转化子。菌株的木聚糖酶活性率为24.3%。

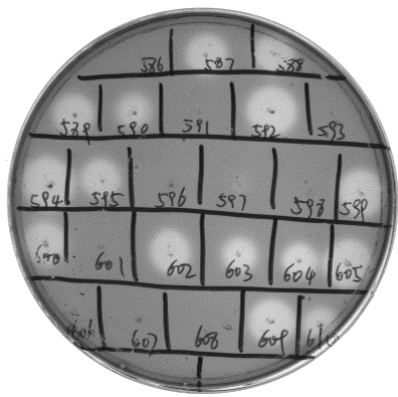


图 4-8 木聚糖酶平板法筛选有活性的突变菌株

Fig. 4-8 Screening of xylanase active transformants by xylan plate

3.7.2 热稳定性突变酶的筛选

以原酶XYNB的表达菌株作为对照,观察消解圈的大小,选择消解圈比XYNB大的10个突变酶,在大肠杆菌中进行表达,初步检测热稳定性,进一步确定选择94#(图4-9)进行测序并将其基因在毕赤酵母中表达,研究其酶学性质。又选择了消解圈比XYNB小的17#也进行测序并将其基因在毕赤酵母中表达,看是否热稳定性较XYNB差。

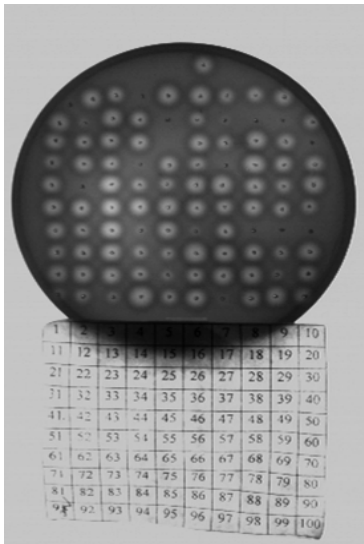


图 4-9 RBB木聚糖平板法筛选热稳定性好的突变酶

Fig. 4-9 Screening of xylanase with higher thermostability by RBB-xylan plate

3.8 突变酶基因在毕赤酵母中的表达纯化

将初步筛选的突变酶sh-17# 和 sh-94# 的基因在毕赤酵母中表达,并将表达产物进行纯

化，表达产物的分子量分别是约29 kD和31 kD（图4-11），它们都有正常的木聚糖酶活性。

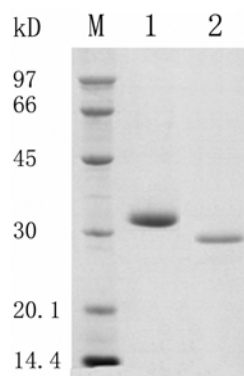


图 4-10 sh-17# 和 sh-94# 突变酶的纯化

Fig. 4-10 Purification of sh-17# and sh-94#

M: Low molecular weight protein marker; 1: purified sh-94#; 2: purified sh-17#

3.9 酶学性质的研究

sh-17#的最适温度为40℃，而XYNB的最适温度为60℃。sh-17#的热稳定性较差，在50℃下处理60 min，剩余31.03%的活性；在60℃下处理10 min后，基本完全失活，而XYNB在60℃下处理10 min后，还剩余64.88%的活性。因此，它的消解圈小于XYNB的消解圈。

sh-94#的最适温度为65℃，sh-94#突变酶在70℃下的热稳定性较原酶XYNB提高了1倍，在对XYNB的热稳定性改造方面与T11Y定点突变的效果相似。

在pH稳定性方面，sh-17#在酸性或碱性pH范围的稳定性均高于XYNB。sh-94#在酸性pH条件下的稳定性好于XYNB，但在pH高于6时，稳定性急剧下降，表现为耐酸不耐碱。在对胃蛋白酶和胰蛋白酶的抗性上，突变酶sh-17# 和sh-94#与原酶相比有一定程度的下降，其它性质也有改变（表4-1）。

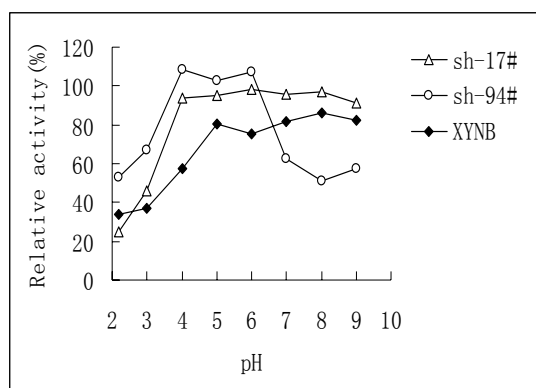


图 4-11 突变酶与原酶的 pH 稳定性的比较

Fig. 4-11 Comparison of pH stability of XYNB, sh-25# and sh-94#

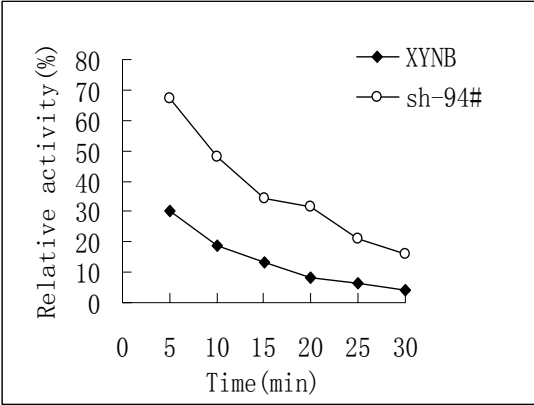


图 4-12 sh-94#与 XYNB 的热稳定性比较

Fig. 4-12 Comparison of thermostability of XYNB and sh-94#

表 4-1 木聚糖酶 XYNB 和 sh-17#、sh-94#的酶学性质的比较

Table 4-1 Comparison of enzyme properties of XYNB、sh-17# and sh-94#

酶学性质	XYNB	sh-94#	sh-17#
Optimum temperature/℃	60	65	40
Optimum pH	5.2	5.8	5.8
pH stability ¹	5-9	4-6	4-9
K _m /(g/kg) ²	20.87	13.86	23.46
V _{max} /(μmol/mg • min)	4568	5000	1111
Specific activity/(IU/mg)	886.89	868.41	660.00
Effect of metal ion and some reagents on enzymatic activity	EDTA,Cr ³⁺ ,Ni ²⁺ activate slightly Zn ²⁺ ,Mn ²⁺ inhibit slightly	Hg ²⁺ activate slightly; Zn ²⁺ ,Mn ²⁺ ,SDS inhibit slightly ;	K ⁺ ,Ca ²⁺ ,Li ⁺ activate slightly; Cu ²⁺ inhibit slightly
Cellulase activity	No activity	No activity	No activity
Resistance to pepsion and trypsin	Retain about 95% of its activity	Retain about 95% of its activity after the treatment of trypsin; 60.30% after the treatment of pepsion.	Retain about 74.55% of its activity after the treatment of trypsin; 40.12% after treatment of pepsion.

注 1：指相对剩余酶活性在 80%以上的 pH 值范围。

注 2：K_m用g/kg表示是因为无法计算木聚糖分子量而无法计算其摩尔浓度。

4. 讨论

sh-94#的测序结果表明（图 4-13a），sh-94#的前 93 个氨基酸来自 TfxA，其中包括酶的催化残基的亲核基团 Glu87，后 94-191 个氨基酸来自 XYNB 如图 4-13。突变酶保持了良好的

木聚糖酶活性,比活性与 XYNB 相似。从 sh-94# 的热稳定性来看,sh-94# 突变酶在 70℃ 下的热稳定性较原酶 XYNB 提高了 1 倍,在对 XYNB 的热稳定性改造方面与 T11Y 定点突变的效果相似,但不如前面获得的 TB 突变酶(氨基端替换 31 个氨基酸的突变酶),进一步说明了影响热稳定性因素的复杂性。sh-94# pH 稳定性上表现为耐酸不耐碱,在高于 7 的 pH 范围下稳定性较差,具体原因有待进一步研究。

sh-17# 的测序结果表明(图 4-14),与 XYNB 相比,sh-17# 的氨基端发生了较大的变化,如图 4-14,氨基端少了一个氨基酸并且发生了连续的几个点突变,使氨基端的一个糖基化位点“NQT”消失。由于 XYNB 序列中含有三个糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr),使酵母表达的木聚糖酶产物的分子量由未糖基化的 21 kD 提高到 31 kD。sh-17# 失去一个糖基化位点,因此分子量下降到 29 kD 左右(图 4-10)。有研究者通过统计学辅助计算机技术的方法总结出第 11 族木聚糖酶最适温度的经验公式: $T_{opt} = -37.3 + 5.3(D) + 5.5(L) + 5.8(P) + 5.6(Y) - 6.2(H)$ 。从公式中可以看出,第 11 族木聚糖酶最适温度与 His 的含量成负相关,这可能是突变酶 sh-17# 的最适温度由 60℃ 下降到 40℃ 的原因之一。我们在对糖基化的研究中发现,XYNB 在酵母表达中的糖基化使其热稳定性有一定的提高。sh-17# 突变酶其中一个糖基化位点“NQT”的消失可能是其热稳定性下降的原因之一。sh-17# 突变酶的 pH 稳定性非常好,而且在近似动物体温的温度下有很高的活性,有利于它在饲料工业中的应用。对 sh-17# 和 sh-94# 突变酶的性质研究表明,通过比较消解圈的大小,可以筛选出热稳定性有所差异的突变酶,我们初步建立了一种利用 DNA shuffling 方法定向改良木聚糖酶性质的研究体系。

DNA 改组的效果必须由改组后的基因表达产物的功能来验证。因此,灵敏可靠的筛选方法是 DNA 改组技术成功与否的关键。从以上的实验结果可以看出,在较高温度下消解圈的大小在一定程度上反映了突变酶热稳定性的高低。可以应用这种平板筛选的方法定向的获得一些在某些性质有所改善的突变酶。但在实验的过程中发现,这种筛选方法也存在着很大的局限性。首先是对筛选温度的限制,消解圈法的筛选温度不能超过 100℃;其次是由于菌株自身表达效率和生长状态的不同会影响突变酶产生的消解圈的大小;还有突变酶的其他性质,如比活、最适温度和最适 pH 等的变化,也会影响消解圈的大小,使筛选的灵敏性下降。也就是说,消解圈法对热稳定性突变酶的筛选灵敏性较差。作者也采用了尼龙膜影印菌落后原位裂解细菌,将尼龙膜在高温下处理,再将尼龙膜覆盖在 RBB 木聚糖平板上看消解圈的大小,其效果也不理想。总之,对突变酶热稳定性的筛选不象底物特异性、最适 pH 的突变在平板上筛选那么灵敏,其筛选方法还有待进一步改善。

由于 DNA shuffling 技术针对不同的基因、表达产物和筛选方向,有不同的实验步骤和筛选方法,因此预实验对方法的摸索和条件的优化必不可少。本文只是初步建立了一种体外突变的体系,具体的很多方法,如无引物 PCR 条件的优化、突变效率的控制、筛选方法的优化等等还需要进一步的摸索。作者认为,应用 DNA shuffling 的方法时应注意以下几点:① PCR 产物片段化之前,其中的引物必须去除。② 被切割后的 DNA 片段的大小取决于要获得的重组率和亲本基因的大小。③ 无引物 PCR 中小片段的浓度过低难以重聚,浓度应在 10 ng/μL 以上。④ 亲本基因之间的相似性在 70% 左右时,应用 DNA shuffling 的方法获得突变酶的效果较好,亲本基因的相似性太高或太低都会影响突变率,需要在实验步骤,如无 PCR 的退火温度和延伸条件方面加以改善。⑤ 多个母本的 DNA shuffling(又称 Family shuffling)的改组效率

高于单基因的 DNA shuffling。⑥某些方面性质相差较大的母本作为改组的材料对突变体的获得较为有利。⑦灵敏可靠的筛选方法是 DNA 改组技术成功与否的关键。

总之，本研究初步建立了通过 DNA shuffling 的方法对木聚糖酶 XYNB 进行定向改良并获得热稳定性有所改变的突变酶的研究体系和方法。为木聚糖酶 XYNB 的进一步改良和研究奠定了基础。

```

sh-94  ---AVTSNETGYHDSFYFSWTDAPGTVSMELGPGGNYSTSWRNTGNFVA
tfxA   ---AVTSNETGYHDSFYFSWTDAPGTVSMELGPGGNYSTSWRNTGNFVA
sh-17  ATAHHQQTGTNNGFYFSWTDGGGSVSMTLNSGGNYSTSWTNCGNFVA
XYNB   ATVITTNQTGTNNGFYFSWTDGGGSVSMTLNSGGNYSTSWTNCGNFVA

GKGWATGGRRTVTYSASFYPSGNAYLTLYGWTRNPLVEYYIVESWGNYP
GKGWATGGRRTVTYSASFNPSPGNAYLTLYGWTRNPLVEYYIVESWGTYP
    GKGWSNGGRRNVQYSGSFYPSGNGYLALYGWTSNPLVEYYIVDNWGNYP
    GKGWSNGGRRNVQYSGSFYPSGNGYLALYGWTSNPLVEYYIVDNWGNYP

    TGTYKGTVTSDGGTYDVYQTTRYNAPSVEGKTENQYWSVRQSKRTGGTI
    TGTYMGTVTTDGGTYDIYKTTRYNAPSIEGTRTFDQYWSVRQSKRTSGTI
    TGTYKGTVTSDGGTYDVYQTTRYNAPSVEGKTENQYWSVRQSKRTGGTI
    TGTYKGTVTSDGGTYDVYQTTRYNAPSVEGKTENQYWSVRQSKRTGGTI

    TTGNHFD AWARYGMQLGSFRYYMILATEGYQSSGSSNITVSG--
    TAGNHFD AWA RHGMHLG-THDYMIMATEGYQSSGSSNVTLTGTS
    TTGNHFD AWARYGMQLGSFSYYMILATEGYQSSGSSNITVSG--
    TTGNHFD AWARYGMQLGSFSYYMILATEGYQSSGSSNITVSG--
  
```

图 4-13 Sh-94#、sh-17#、XYNB、TfxA 的序列比较

Fig. 4-13 Sequence comparison of sh-94#, sh-17#, XYNB and TfxA

The amino acid sequence of sh-94# was under lined. The 93 residuals of N-terminal come from TfxA, and the others belong to XYNB. The amino acid sequence of sh-17# framed is different from XYNB, and the others belong to XYNB.

第五章 结论

1. 本研究对来源于橄榄绿链霉菌 A1 的木聚糖酶 XYNB 进行了同源建模和结构预测。XYNB 是由两个反向的 β 折叠片和一个短的 α 螺旋组成, 整个酶分子成右手型结构, 属于糖基水解酶第 11 家族。

2. 通过定点突变的方法获得了一系列热稳定性有所提高的突变酶。

① T11Y 突变酶在 60℃ 处理 60 min 时的相对剩余酶活性是 XYNB 的 5 倍; 在 70℃ 处理 10 min, 相对剩余酶活性是 XYNB 的 2.8 倍。在 80℃ 和 90℃ 分别处理 1 min, 相对剩余酶活性分别是 XYNB 的 1.7 倍和 5 倍。

② 突变酶 N13D 和 S40E 的热稳定性较 XYNB 有一定的提高, 但提高的幅度不大。在 70℃ 分别处理 5 min, N13D、S40E 和 XYNB 的相对剩余酶活性分别为 37.88%、27.58%、13.12%; 在 70℃ 分别处理 10 min, N13D、S40E 和 XYNB 的剩余酶活性分别为 7.58%、4.95%、4.72%。

③ 将 XYNB 的氨基端前 33 个氨基酸替换为嗜热木聚糖 TfxA 的前 31 个氨基酸, 获得了融合酶 TB, TB 的热稳定性较 XYNB 有很大的提高, 80℃ 分别处理 3 min 和 10 min, TB 剩余酶活性分别是 XYNB 的 5.6 倍和 8.5 倍; 在 90℃ 分别处理 1 min 和 3 min, TB 剩余酶活性分别为 XYNB 的 4.3 和 6.5 倍。TB 在 70℃ 的半衰期由 XYNB 的 3 min 提高到 20 min。

④ 将二硫键引入 XYNB 和 TB 的 α 螺旋氨基端和 β 折叠 B9 之间, 两个突变酶 XS 和 TS 的热稳定性有明显的提高。XS 在 70℃ 的半衰期由 XYNB 的 3 min 提高到 9 min, TS 突变酶在 70℃ 的半衰期提高到 150 min。

对于 XYNB 的热稳定性提高, 突变效果由高到低的顺序是: TS, TB, T11Y, XS, N13D, S40E。其中, 突变酶 TS 综合了 T11Y 和 N13D 的定点突变以及氨基端替换和二硫键的引入, 是以上热稳定性突变酶的优化组合, 最终使 XYNB 的热稳定性有了显著的提高, 将 70℃ 的半衰期提高到 150 min。

3. 通过 E87F 和 E177F 的定点突变, 发现突变酶的活性基本丧失, 说明 E87 和 E177 对 XYNB 的催化反应至关重要。根据亲缘关系相近的木聚糖酶氨基酸相似性比较以及结构预测, 认为 E87 和 E177 是 XYNB 的催化残基, XYNB 的催化机制是经典的酸碱催化机制。

4. N46D 定点突变使 XYNB 的最适 pH 值由 5.2 下降到 4.2。说明第 46 位的氨基酸对酶的最适 pH 值有很重要的影响。第 46 位的氨基酸影响质子供体 E177 的催化效率, 从而影响酶的催化活性。

5. 初步建立了应用 DNA shuffling 的方法对木聚糖酶 XYNB 进行热稳定性的定向改良的研究体系, 获得了热稳定性有所提高的 sh-94#突变酶, 它在 70℃ 下的热稳定性较原酶 XYNB 提高了 1 倍。sh-17#突变酶的最适温度由原酶的 60℃ 下降到 40℃。

参考文献

1. 陈晓穗, 汪保安, 王琰. 错配PCR致突变的实验条件研究. 第二军医大学学报, 2003, 24 (3): 307-310.
2. 方洛云, 邹晓庭, 许梓荣. 木聚糖酶的分子生物学与基因工程. 中国饲料, 2002, (7): 11-13.
3. 顾园, 诸欣平, 王少华. 酵母表达蛋白的糖基化. 生命的化学, 2004(4): 353-355.
4. 何永志, 姚斌, 王亚茹等. 来源于 *Strepomyces olivaceoviridis* A1 的高比活木聚糖酶的高效表达及其酶学性质的研究. 微生物学报, 2004, 44(3): 340-344.
5. 胡沂淮, 邵蔚蓝. 木聚糖酶. 生命的化学, 2002, 12(3): 281-285.
6. 黄大肪, 林敏. 农业微生物基因工程, 北京, 科学出版社, 2001.
7. 黄庆生, 徐静, 徐俊杰, 童贻刚, 王海涛. 组织型纤溶酶原激活物基因的DNA改组. 细胞与分子免疫学杂志, 2003. 1.
8. 江正强, 李里特, 李颖. 耐热木聚糖酶研究进展. 中国生物工程杂志, 2003, (8): 47-51.
9. 刘国奇, 王海涛. DNA 改组——定向进化的技术革命. 军事医学科学院院刊, 2000, 24(2).
10. 刘亮伟, 张革新, 贺铁明, 李炜疆. F/10 和 G/11 木聚糖酶家族的不同热稳定性机制. 无锡轻工大学学报. 2005, 24(1): 52-58.
11. 刘强, 冯学琴. 非淀粉多糖酶制剂的研究与应用进展. 动物营养学报, 1999, 11(2): 6-11.
12. 刘瑞田, 曲音波. 木聚糖酶分子的结构区域. 生物工程进展, 1998, 18 (6): 26-28.
13. 卢建军. 寡聚糖在饲料工业上的应用. 饲料与畜牧, 1999, 1: 21-22.
14. 孙迅, 马远忠, 孙宝聚等. 产胞外木聚糖酶链霉菌发酵条件的正交试验. 微生物学杂志, 1999, 19(4): 22-24.
15. 王强, 刘秋云, 李刚, 李宝健. 一种方便、无PCR过程的DNA shuffling方法. 科学通报, 2004, 49 (5): 448-450.
16. 肖志壮, 刘梦海, 汪天虹, 曲音波. 蛋白质定向进化的研究进展. 生物工程进展, 2001, 21 (6): 31-56.
17. 谢响明, 何晓青. 微生物产木聚糖酶的研究进展及其在造纸工业中的应用. 北京林业大学学报, 2003, 25(3): 111-116.
18. 熊爱生, 姚泉洪, 彭日荷, 陈建民, 李贤, 范惠琴. 通过DNA改组技术获得高活性 β -葡萄糖苷酸酶. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19 (2): 162-167.
19. 徐卉芳, 张先恩, 张用梅. 体外分子定向进化研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29 (4): 518-522.
20. 杨瑞鹏, 胡慰望, 赵学慧. 黑曲霉 A34 菌株的木聚糖酶分离纯化及其性质研究. 华中农业大学学报, 1991, 10(1): 117-123.
21. 张红莲, 姚斌等. 橄榄绿链霉菌 A1 所产 43kD 木聚糖酶 XYNA 的纯化及其酶学性质. 农业生物技术学报, 2002, 10 (1): 10-14.
22. 张红莲, 姚斌等. 具有高比活性的新木聚糖酶 XYNB 的酶学性质研究及其编码基因的克隆和表达. 科学通报, 2003, 48 (4): 364-368.

23. 张红莲, 姚斌等. 链霉菌 *Streptomyces olivaceoviridis* A1 木聚糖酶基因 *xynA* 在大肠杆菌及毕赤酵母中的高效表达. 生物工程学报, 2003, 19 (1): 41-45.
24. 周育, 刘晖, 谭涛超, 黄仪秀, 朱圣庚. DNA改组技术在水蛭素实验进化中的应用. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17 (2): 271-274.
25. 周政, 张爱晖, 王晶茹等. 利用 DNA 家族重排提高青霉素 G 酰化酶合成活力. 生物化学与生物物理学报, 2003, 35 (6) :573.
26. 朱静, 严自正. 微生物产生的木聚糖酶的功能和应用. 生物工程学报, 1996, 12 (4) : 375-378.
27. Alzari PM, Souchon H, Dominguez R. The crystal structure of endoglucanase CelA, a family 8 glycosyl hydrolase from *Clostridium thermocellum*. Structure, 1996, (4): 265-275.
28. Bergquist PL, Reeves RA, Gibbs MD. Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS) and random drift mutagenesis (RNDM): two complementary techniques for enzyme evolution. Biomol Eng, 2005, 22(1-3): 63-72.
29. Bergquist PL, Gibbs MD, Morris DD *et al.* Hyperthermophilic xylanases. Methods Enzymol, 2001, 330: 301-319.
30. Black GW, Hazlewood GP, Millward SJ, Laurie JI, Gilbert HJ. A modular xylanase containing a novel non-catalytic xylan-specific binding domain. Biochem J, 1995, 307: 191-195.
31. Bourne Y, Henrissat B. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. Curr. Opin. Struct. Biol, 2001, 11: 593-600.
32. Bray MR, Clarke AJ. Identification of an essential tyrosyl residue in the binding site of *Schizophyllum commune* xylanase A. Biochemistry, 1995, 34(6): 2006-2014.
33. Buchholz F, Angrand PO, Stewart AF. Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. Nat Biotechnol, 1998, 16(7): 657-662.
34. Chang CC, Chen TT, Cox BW *et al.* Evolution of a cytokine using DNA family shuffling. Nat Biotechnol, 1999, 17(8): 793-797.
35. Chen YL, Tang TY, Cheng KJ. Directed evolution to produce an alkalophilic variant from a *Neocallimastix patriciarum* xylanase. Can J Microbiol, 2001, 47: 1088-1094.
36. Cherry JR, Lamsa MH, Schneider P *et al.* Directed evolution of a fungal peroxidase. Nat Biotechnol, 1999, 17(4): 379-384.
37. Christians FC, Scapozza L, Crameri A *et al.* Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling. Nat biotechnol. 1999, 17(3): 259-264.
38. Claeyssens M, Henrissat B. Specificity mapping of cellulolytic enzymes: classification into families of structurally related proteins confirmed by biochemical analysis. Protein Sci, 1992, 1, 1293-1297.
39. Coco WM, Levinson WE, Crist MJ *et al.* DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. Nat Biotechnol, 2001, 19(4): 354-359.
40. Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiol Rev, 2005, 29(1): 3-23.
41. Coutinho PM, Henrissat, B. Carbohydrate-active enzyme server (CAZY) at URL: <http://afmb>.

- cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/, 1999.
42. Cramer A, Cwirla S, Stemmer WP. Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nat Med*, 1996, 2(1): 100-102.
 43. Cramer A, Dawes G, Rodriguez EJ *et al*. Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling. *Nat biotechnol*, 1997, 15(5): 436-438.
 44. Cramer A, Raillard SA, Bermudez E *et al*. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature*, 1998, 391(6664): 288-291.
 45. Cramer A, Whitehorn EA, Tate E *et al*. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(3): 315-319.
 46. Creighton TE. Protein folding pathways determined using disulphide bonds. *Bioessays*, 1992, 14: 195-199.
 47. Diana I, Elyse DJ, David B *et al*. Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(3): 763-770.
 48. Ebanks R, Dupont M, Shareck F *et al*. Development of an *Escherichia coli* expression system and thermostability screening assay for libraries of mutant xylanase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2000, 25: 310-314.
 49. Fenel F, Leisola M, J  nis J, Turunen O. A de novo designed N-terminal disulphide bridge stabilizes the *Trichoderma reesei* endo-1, 4-xylanase II. *J Biotechnol*, 2004, 108: 137-143.
 50. Flint HJ, Martin J, McPherson CA, Daniel AS, Zhang JX. A bifunctional enzyme, with separate xylanase and beta (1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the xynD gene of *Ruminococcus .avefaciens*. *J. Bacteriol.* 1993, 175: 2943-2951.
 51. Gebler J, Gilkes NR, Claeysens M *et al*. Stereoselective hydrolysis catalyzed by related beta-1, 4-glucanases and beta-1, 4-xylanases. *J. Biol. Chem*, 1992, 267, 12559-12561.
 52. Georis J, De Lemos, Estteres F *et al*. An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study. *Protein Science*, 2000, 9: 466-475.
 53. Gibbs MD, Nevalainen KM, Bergquist PL. Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling. *Gene*, 2001, 271(1): 13-20.
 54. Gram H, Marconi L, Barbas CF *et al*. In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library. *Proc natl Acad Sci USA*, 1992, 89(8): 3576-3580.
 55. Gu Y, Zhu XP, Wang SH. Glycosylation of proteins expressed in *Pichia pastoris*. *Chemistry of life*, 2004, 4: 353-355.
 56. Guerin DM, Lascombe MB, Costabel M *et al*. Atomic (0.94 Å) resolution structure of an inverting glycosidase in complex with substrate. *J. Mol. Biol*, 2002, 316: 1061-1069.
 57. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 1997, 18: 2714-2723.
 58. Hairong X, Fenel F, Matti L, Ossi T. Engineering the thermostability of *Trichoderma reesei* endo-1,

- 4-xylanase II by combination of disulphide bridges. *Extremophiles*, 2004, 8: 393-400.
59. Hakulinen N, Turunen O, Jãnis J, Leisola M, Rouvinen J. Three-dimensional structures of thermophilic α -1, 4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa*: Comparison of twelve xylanases in relation to their thermal stability. *Eur J Biochem*, 2003, 270: 1399-1412.
60. Hansson LO, Bolton-Grob R, Massoud T *et al.* Evolution of differential substrate specificities in Mu class glutathione transferases probed by DNA shuffling. *J Mol Biol*, 1999, 287(2): 265-76.
61. Harayama S. Artificial evolution by DNA shuffling. *Trends biotechnol*, 1998, 16(2): 76-82.
62. Hardy F, Vriend G, Veltman OR *et al.* Stabilization of *Bacillus stearothermophilus* neutral protease by introduction of prolines. *FEBS Lett*, 1993, 317:89-92.
63. Harris GW, Pickersgill RW, Connerton I *et al.* Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase. *Proteins*, 1997, 29(1): 77-86.
64. Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 1993, 293 (Pt 3): 781-788.
65. Henrissat B, Claeyssens M, Tomme P, Lemesle L, Mornon JP. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene*, 1989, 81: 83-95.
66. Henrissat B, Coutinho PM. Classification of glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophiles. *Methods Enzymol*, 2001, 330: 183-201.
67. http://www.maxygen.com/nf_research.html. Maxygen Inc. Pioneering techniques in molecular evolution.1999-07-07.
68. Jeffries TW. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. *Curr. Opin. Biotechnol*, 1996, 7: 337-342.
69. Kaneko S, Kuno A, Fujimoto Z *et al.* An investigation of the nature and function of module 10 in a family F/10 xylanase FXYN of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 by module shuffling with the Cex of *Cellulomonas fimi* and by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett*, 1999, 460(1): 61-66.
70. Kikuchi M, Ohnishi K, Harayama S. Novel family shuffling methods for the in vitro evolution of enzymes. *Gene*, 1999, 236(1): 159-167.
71. Ko EP, Akatsuka H, Moriyama H *et al.* Site-directed mutagenesis at aspartate and glutamate residues of xylanase from *Bacillus pumilus*. *Biochem J*, 1992, 288: 117-121.
72. Kregel U, Dijkstra BW. Three-dimensional structure of Endo-1, 4-beta-xylanase I from *Aspergillus niger*: molecular basis for its low pH optimum. *J Mol Biol*, 1996, 263(1): 70-78.
73. Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol Rev*, 1999, 23(4): 411-456.
74. Kumar PR, Eswaramoorthy S, Vithayathil PJ, Viswamitra MA. The Tertiary Structure at 1.59Å Resolution and the Proposed Amino Acid Sequence of a Family-11 Xylanase from the Thermophilic Fungus *Paecilomyces varioti bainier*. *J Mol Biol*, 2000, 295: 581-593.
75. Kumar S, Tsai CJ, Nussinov R. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng*, 2000, 13(3): 179-191.

76. Kuno A, Shimizu D, Kaneko S *et al.* Significant enhancement in the binding of p- nitrophenyl-beta- D- xylobioside by the E128H mutant F/10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. FEBS Lett, 1999, 450(3): 299-305.
77. Larson SB, Day J, Barba de la Rosa AP *et al.* First crystallographic structure of a xylanase from glycoside hydrolase family 5: implications for catalysis. Biochemistry, 2003, 42(28): 8411-8422.
78. Lee YE, Lowe SE, Henrissat B *et al.* Characterization of the active site and thermostability regions of endoxylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. J Bacteriol, 1993, 175(18): 5890-5898.
79. Lehmann M, Wyss M. Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. Curr Opin Biotechnol, 2001, 12: 371-375.
80. Liu L, Zhang J, Chen B, Shao W. Principle component analysis in F/10 and G/11 xylanase. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 322(1): 277-280.
81. Lo Leggio L, Kalogiannis S, Bhat MK *et al.* High resolution structure and sequence of *T. aurantiacus* xylanase I: implications for the evolution of thermostability in family 10 xylanases and enzymes with (beta) alpha -barrel architecture. PROTEINS: Structure, Function, and Genetics, 1999, 36: 295-306.
82. Luthi E, Reif K, Jasmat NB *et al.* In vitro mutagenesis of a xylanase from the extreme thermophile *Caldocellum saccharolyticum*. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 36: 503-506.
83. Lutz S, Ostermeier M, Benkovic SJ. Rapid Generation of Incremental Truncation Libraries for Protein Engineering Using a-Phosphothioate Nucleotides. Nucleic Acids Res., 2001, 29: 1-7.
84. Matsumura I, Ellington AD. In vitro evolution of thermostable p53 variants. Protein sci, 1999, 8(4): 731-740.
85. Matte A, Forsberg CW. Purification, characterization, and mode of action of endoxylanases 1 and 2 from *Fibrobacter succinogenes* S85. Appl. Environ. Microbiol, 1992, 58: 157-168.
86. Matthews BW, Nicholson H, Becktel WJ. Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfold. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 6663-6667.
87. McCarter JD, Withers SG. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. Curr. Opin. Struct. Biol, 1994, 4: 885-892.
88. McCarthy AA, Morris DD, Bergquist PL *et al.* Structure of XynB, a highly thermostable beta-1,4-xylanase from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, at 1.8 Å resolution. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2000, 56 (Pt 11): 1367-1375.
89. Moreau A, Roberge M, Manin C *et al.* Identification of two acidic residues involved in the catalysis of xylanase A from *Streptomyces lividans*. Biochem J, 1994, 302: 291-295.
90. Moreau A, Shareck F, Kluepfel D *et al.* Increase in catalytic activity and thermostability of the xylanase A of *Streptomyces lividans* 1326 by site-specific mutagenesis. Enzyme Microb Technol, 1994, 16(5): 420-424.
91. Nakamura S, Nakai R, Namba K *et al.* Structure-function relationship of the xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. Nucleic Acids Symp Ser, 1995, (34): 99-100.

92. Poon DK, Webster P, Withers SG, McIntosh LP. Characterizing the pH-dependent stability and catalytic mechanism of the family 11 xylanase from the alkalophilic *Bacillus agaradhaerens*. Carbohydr Res, 2003, 338(5): 415-421.
93. Prade RA. Xylanases: from biology to biotechnology. Biotechnol Genet Eng Rev, 1996, 13: 101-131.
94. Roberge M, Dupont C, Morosoli R *et al*. Asparagine-127 of xylanase A from *Streptomyces lividans*, a key residue in glycosyl hydrolases of superfamily 4/7: kinetic evidence for its involvement in stabilization of the catalytic intermediate. Protein Engineering, 1997, 10(4): 399-403.
95. Roberge M, Shareck F, Morosoli R *et al*. Characterization of active-site aromatic residues in xylanase A from *Streptomyces lividans*. Protein Eng, 1999, 12(3): 251-257.
96. Roberge M, Shareck F, Morosoli R *et al*. Characterization of two important histidine residues in the active site of xylanase A from *Streptomyces lividans*, a family 10 glycanase. Biochemistry, 1997, 36(25): 7769-7775.
97. Rye CS, Withers SG. Glycosidase mechanisms. Curr. Opin. Chem. Biol, 2000, 4: 573-580.
98. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York, Cold Spring Laboratory Press, 1989.
99. Sapag A, Wouters J, Lambert C, de Ioannes P, Eyzaguirre J, Depiereux E. The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. J Biotechnol, 2002, 95: 109-131.
100. Saul D J, Williams L C, Reeves R A *et al*. Sequence and Expression of a Xylanase Gene from the *Hyperthermophile Thermotoga* sp. Strain FjSS3-B.1 and Characterization of the Recombinant Enzyme and Its activity on Kraft Pulp. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(11):4110-4113.
101. Schmidt-Dannert C, Arnold FH. Directed evolution of industrial enzymes. Trends biotechnol, 1999, 17(4): 135-136.
102. Shao Z, Zhao H, Giver L, Arnold FH. Random-priming in vitro recombination: an effective tool for directed evolution. Nucleic Acids Res, 1998, 26(2): 681-683.
103. Shibuya H, Kaneko S, Hayashi K. Enhancement of the thermostability and hydrolytic activity of xylanase by random gene shuffling. Biochem J, 2000, 349: 651-656.
104. Smith GP. Applied evolution. The progeny of sexual PCR. Nature, 1994, 370(6488): 324.
105. Stemmer WPC. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. Nature, 1994, 370(6488): 389-391.
106. Subramaniyan S, Prema P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. Crit Rev Biotechnol, 2002, 22(1): 33-64.
107. Sun JY, Liu MQ, Xu YL, Xu ZR, Pan L, Gao H. Improvement of the thermostability and catalytic activity of a mesophilic family 11 xylanase by N-terminus replacement. Protein Expr Purif, 2005, 42: 122-130.
108. Sunna A, Gibbs MD, Bergquist PL. The thermostabilizing domain, XynA, of *Caldibacillus*

- cellulovorans* xylanase is a xylan binding domain. *Biochem J*, 2000, 346: 583-586.
109. Sunna A, Antranikian G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Rev Biotechnol*, 1997, 17: 39-67.
110. Tanaka H, Tomoko O, Satoshi M *et al.* Acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans*: efficient expression and secretion in *Pichia pastoris* and mutational analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, 98(5): 338-343.
111. Teplitsky A, Mechaly A, Stojanoff V *et al.* Structure determination of the extracellular xylanase from *Geobacillus stearothermophilus* by selenomethionyl MAD phasing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, 60(5): 836-848.
112. Tomazic SJ, Klibanov AM. Why is one *Bacillus* alpha-amylase more resistant against irreversible thermoinactivation than another. *J Biol Chem*, 1988, 263(7): 3092-3096.
113. Torronen A, Rouvinen J. Structural and functional properties of low molecular weight endo-1, 4-beta-xylanases. *J. Biotechnol*, 1997, 57: 137-149.
114. Turunen O, Etuaho K, Fenel F, Vehmaanpera J, Wu X, Rouvinen J, Leisola M. A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the R-helix region of *Trichoderma reesei* endo-1, 4-xylanase II increases the thermal stability through synergism. *J Biotechnol*, 2001, 88: 37-46.
115. Turunen O, Vuorio M, Fenel F *et al.* Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1, 4-beta-xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH. *Protein Engineering*, 2002, 15(2): 141-145.
116. Vieille C, Zeikus GJ. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, 65(1): 1-43.
117. Vogt G, Woell G, Argos P. Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J. Mol Biol*, 1997, 269: 631-643.
118. Wakarchuk² W, Sung W, Campbell R *et al.* Thermostabilization of the *Bacillus circulans* xylanase by the introduction of disulfide bonds. *Protein Eng*, 1994, 7: 1379-1386.
119. Wakarchuk¹ WW, Campbell RL, Sung WL *et al.* Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Sci*, 1994, 3(3): 467-475.
120. Wan L, Twitchett MB, Eltis LD *et al.* In vitro evolution of horse heart myoglobin to increase peroxidase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(22): 12825-12831.
121. Watanabe K, Masuda T, Ohashi H *et al.* Multiple proline substitution cumulatively thermostabilize *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1, 6-glucosidase. Irrefragable proof supporting the praline. *Eur J Biochem*, 1994, 226(2): 277-283.
122. Weng XY, Sun JY. Construction, expression, and characterization of a thermostable xylanase. *Curr Microbiol*, 2005, 51: 188-192.
123. Winterhalter C, Hinrich P, Candussio A *et al.* Identification of a novel cellulose-binding domain within the multidomain 120 kDa xylanase XynA of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Mol Microbiol*, 1995, 15(3): 431-444.

124. Withers SG. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydrate Polymers*, 2001, 44: 325-337.
125. Wong KKY, Tan LUL, Saddler JN. Multiplicity of beta-1, 4-xylanases in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev*, 1988, 52: 305-317.
126. Wouters J, Georis J, Engher D *et al.* Crystallographic analysis of family 11 endo-beta-1, 4-xylanase Xyl11 from *Streptomyces* sp. S38. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2001, 57(Pt 12): 1813-1819.
127. Yano T, Oue S, Kagamiyama H. Directed evolution of an aspartate aminotransferase with new substrate specificities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(10): 5511-5515.
128. Zechel DL, Withers SG. Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res*, 2000, 33: 11-18.
129. Zhang HL, Yao B, Wang YR *et al.* Characterization, gene cloning and expression of new xylanase XYNB with high specific activity. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(8): 761-765.
130. Zhang JH, Dawes G, Stemmer WP. Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(9): 4504-4509.
131. Zhao H, Giver L, Shao Z *et al.* Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(3): 258-261.
132. Zhou Z, Zhang AH, Wang JR, Chen ML, Li RB, Yang S, Yuan ZY. Improving the specific synthetic activity of a penicillin gacylase using DNA family shuffling. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, 2003, 35(6): 573-579.
133. Zhu H, Paradis FW, Krell PJ, Phillips JP, Forsberg CW. Enzymatic specificities and modes of action of the two catalytic domains of the XynC xylanase from *Fibrobacter succinogenes* S85. *J Bacteriol*, 1994, 176(13): 3885-3894.
134. Zui Fujimoto, Atsushi Kuno, Satoshi Kaneko *et al.* Crystal Structure of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 β -Xylanase Containing Xylan-binding Domain. *J. Mol. Biol*, 2000, 300:575-585.

致 谢

五月的微风轻轻吹拂着我的思绪，文章的结尾并不意味着终止，而代表着新的开始。五年的硕博连读即将结束，这是我人生中最值得珍惜和回忆的岁月。这五年记录了我的成长，承载着我的友谊和亲情，我将带着这五年的收获走向新的生活！

回想这几年的学习和生活，首先要感谢的是我的导师姚斌研究员。姚老师给人的第一感觉是严肃而不苟言笑。他孜孜不倦的工作热情，严谨的治学态度，敏锐的洞察力，都是我学习的榜样。对我影响更深的是姚老师的亲切善良，对我生活和工作的关心使我感动万分。我的每一点工作进展都凝结着他的心血，在老师的悉心指导下，我的论文顺利完成。一日为师，终身为师，虽然感谢的话语不能完全表达我的心情，但我还是由衷的说声谢谢！

能在这样一个温暖和谐的实验室工作，我是幸运的。从什么都不懂到能够独立思考和完成实验操作，我的进步也离不开实验室的老师 and 同学们的帮助。我要特别感谢史秀云老师，及时纠正我的错误，教给我严谨的工作态度；感谢王亚茹、袁铁铮、罗会颖、柏映国和李江老师在实验操作上给予我的帮助和教导；特别感谢孟昆和杨培龙老师对我论文写作上的悉心指导。同时，还要感谢生物中心的伍宁丰老师，张志芳老师，张伟老师和陈汝梅老师对我的帮助和教导。

实验室的同学密士军、李雅楠、石鹏君、谷维娜、黄火青、李宁、付大伟、张宇宏、曹雅男、初晓雨等人给了我很大的帮助；还有已经毕业的张红莲、何永志、徐锋、张会图同学，我在这里一并说声谢谢！与你们的友谊将陪伴我一生。

衷心感谢饲料研究所和研究生院各处室的老师们给予我的帮助！

这五年的工作和学习是短暂的，充满激情和挑战的，同时对我也是一种历练。在此，由衷的感谢支持和帮助我的人，谢谢！

最后感谢我的父母，多年来他们默默的给予我支持和关爱；感谢我的丈夫张执金，在工作和生活中对我的帮助。

本论文由国家高技术研究与发展计划(863 计划)项目和国际科技合作重点计划项目资助，特此表示感谢。

作者简历

姓 名：杨浩萌

性 别：女

出生日期：1978 年 4 月 22 日

籍 贯：黑龙江省齐齐哈尔市

教育经历：

2001.9-至今：中国农业科学院研究生院，生物化学与分子生物学专业，硕博连读，攻读博士学位

1997.9-2001.7: 东北农业大学生命科学学院，生物技术专业，获理学学士学位

发表文章：

- 1) 杨浩萌, 姚斌等. 木聚糖酶分子结构与重要酶学性质关系的研究进展. 生物工程学报, 2005, 21(1): 6-11.
- 2) 杨浩萌, 姚斌等. 木聚糖酶 XYNB 分子中折叠股 B1 和 B2 间的疏水作用对酶热稳定性的影响. 生物工程学报, 2005, 21(3): 414-419.
- 3) 杨浩萌, 柏映国等. 木聚糖酶 XYNB 的 N46D 突变设计、表达与酶学性质变化. 生化与分子生物学报, 2006, 22(3): 204-211.
- 4) Yang HM, Yao B, Meng K *et al.* Improvement of the thermostability of xylanase by N-terminal replacement. Chin J Biotech, 2006, 22(1): 15-21.

待发表的文章：

- 1) Yang HM, Yao B, Meng K *et al.* To further enhance the thermostability of xylanase by introduction of disulfide bridge to a mutant of xylanase XYNB.
- 2) 杨浩萌, 姚斌等. N13D、S40E 点突变提高木聚糖酶 XYNB 的热稳定性.
- 3) Yang HM, Yao B *et al.* A thermostable mutant of xylanase XYNB obtained by DNA shuffling.