

研究简讯

定点突变提高豆豉纤溶酶的酶活力和底物特异性的研究

崔堂兵^{1*} 郭勇¹ 罗文华¹ 舒薇²

1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510640; 2. 华南农业大学分析测试中心, 广州 510640

摘要 以 pBE-DFE 质粒为模板, 采用反向长距离 PCR 技术对豆豉纤溶酶(Douchi Fibrinolytic Enzyme, DFE)基因进行定点突变, 使位于酶的底物结合区第 156 位的谷氨酸和第 166 位的甘氨酸分别替换为丝氨酸和丙氨酸, 使临近酶的底物结合区的第 169 位甘氨酸残基替换为丙氨酸, 获得了三个突变体 E156S, G166A 和 G169A. 将含突变基因的表达载体转化枯草杆菌 WB800, 构建了豆豉纤溶酶基因突变体的表达菌株 WB800(E156S); WB800(G166A)和 WB800(G166A). 将 3 种表达菌株进行液体发酵培养, 结果发现发酵上清液中纤溶酶的纤溶活性为 460, 790 和 900 U/mL, 分别是未突变酶活性(660 U/mL)的 70%, 115%和 136%; 3 种突变酶对合成底物的 H-D-Val-Leu-Lys-pNA 的酰胺水解活性是未突变酶的 17%, 125%和 121%.

关键词 豆豉纤溶酶 定点突变 酶活力 特异性

人体内, 血纤溶酶能够直接作用于血栓中纤维蛋白, 将纤维蛋白降解成可溶性的纤维蛋白单体, 从而保持血流畅通. DFE 也具有和血纤溶酶类似的功能, 即水解纤维蛋白, 所以能用于预防和治疗栓塞引起的疾病. 但是 DFE 和血纤溶酶具有不同的底物特异性. 前期研究表明, DFE 最适的合成底物与枯草杆菌蛋白酶 BPN' 一样, 为 succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-NA^[1], 而血纤溶酶最适合成底物则是 H-D-Val-Leu-Lys-p-NA. 因此, 如果 DFE 对血纤溶酶的最适合成底物的特异性提高, 那么其在体内对血栓中纤维蛋白的特异性必然会提高, 从而提高其作为药物的应用价值.

DFE 属于枯草杆菌蛋白酶类, 本研究的 DFE 与枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的氨基酸同源性高达 97%. 枯草杆菌蛋白酶 BPN' 是开展定点突变研究最为详尽的一个蛋白酶, 关于枯草杆菌蛋白酶

BPN' 的底物特异性的研究已经有了报道. 因此, 枯草杆菌蛋白酶 BPN' 定点突变方面的知识与信息为 DFE 的改造提供了很好的借鉴作用.

枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的催化中心和底物结合区是被镶嵌在酶分子的各个结构域之中(图 1). “球心”形状分子的中心区域由 7 股平行的 β -折叠组成. 9 个 α -螺旋被 β 折叠以近乎反向平行的方式包裹, 其中 7 个 α -螺旋处于同一平面上并形成两个大的亚结构域. 两股反向平行的 β -折叠在肽链的 C-端附近形成另一个大的结构域. 蛋白酶的活性中心就在毗邻中心 β -折叠的亚结构域内^[2].

在枯草杆菌蛋白酶 BPN' 催化底物水解过程中, 底物结合在酶的“口袋区”, 这个口袋区由主链和主要的侧链组成, 底物肽链结合在酶的空间结构通道的表面, 这个通道表面可以接纳底物 P1, P2, P3, P4, P2', P1' 位置的 6 个氨基酸残基. 在容

2008-01-04 收稿, 2008-01-21 收修稿

* E-mail: fetheui@scut.edu.cn

易断裂键的 N 一端, 底物主链 P1 到 P4 位的残基总是插入在酶的两个 β -折叠链 Gly¹⁰⁰-Gly¹⁰² 和 Ser¹²⁵-Gly¹²⁷ 之间. 当枯草杆菌蛋白酶 BPN' 与其最适合底物 succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 结合时, 底物侧链伸入酶的折叠链之间, 底物 P1 位置的苯丙氨酸残基(Phe)的苯环嵌入蛋白酶底物结合区 S1 结构域的“指环区”, 与第 166 位的 Gly 残基结合形成酶与底物结合的过渡状态(图 1). 另外, P1 位置为 Lys 残基的合成底物也是枯草杆菌蛋白酶 BPN' 适合的底物, 因为 P1 位带正电荷的 Lys 残基能跨过疏水裂缝与酶的第 156 位带负电荷的谷氨酸残基形成盐桥, 这样形成较稳固的酶与底物结合复合物^[3]. 酶的第 166 位和第 156 位的氨基酸残基侧链均有与底物 P1 残基之间形成静电离子对的可能性, 它们是影响酶与底物结合的关键氨基酸残基^[4].

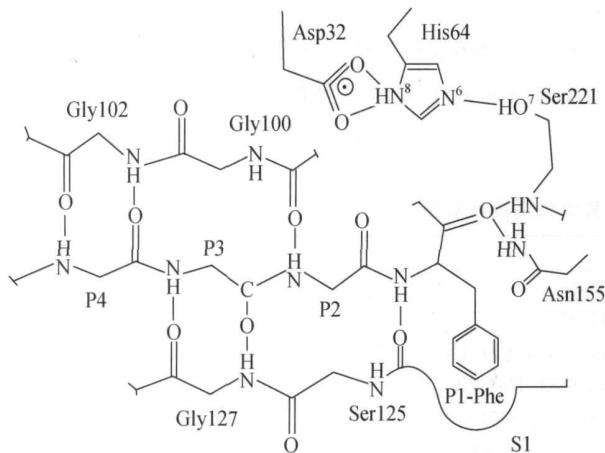


图 1 枯草杆菌蛋白酶 BPN' 催化的化学和动力学机制示意图

改变枯草杆菌蛋白酶对底物的选择性, 可以通过替换与底物 P1 氨基酸直接接触的氨基酸残基来实现^[5,6]. Well 等对枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的第 156 位 Glu 残基和第 166 位的 Gly 残基进行盒式突变, 研究突变体对合成底物 succinyl-Ala-Ala-Pro-(Xaa)-pNA (其中底物 P1(Xaa)位置的氨基酸残基分别为 Glu, Gln, Met 和 Lys)的 K_m 和 K_{cat}/K_m 值的影响. 结果发现底物 P1 位氨基酸与酶的第 156 位和第 166 位氨基酸残基之间的静电作用对酶的底物特异性产生显著影响^[3]. 另有研究表明, 将枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的第 169 位甘氨酸替换为丙氨酸

后, 突变酶对合成底物 succinyl-Ala-Ala-Pro-Lys-pNA 的 K_m 出现下降, 底物特异性提高^[7].

尽管关于枯草杆菌蛋白酶的定点突变研究报道较多, 但是研究多以合成底物 succinyl-Ala-Ala-Pro-(Xaa)-pNA 为对象, 尚未见到以 H-D-Val-Leu-Lys-pNA 为底物研究其特异性的报道. 因而拟通过对 DFE 底物结合区 S1 结构域内的第 156 位, 第 166 位氨基酸残基以及酶的非底物结合区的第 169 位氨基酸进行定点突变, 以探讨突变 DFE 对其纤溶活力和对 H-D-Val-Leu-Lys-pNA 特异性的影响.

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

产纤溶酶的枯草芽孢杆菌 DC-12^[1] 为实验室从广东省阳江豆豉中分离并保存, 作为克隆 DFE 基因的供体菌. 克隆宿主菌 *E. coli* DH5 α (*supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *relA1*) 为本室保存; 枯草杆菌 168(*trpC2*)由上海生命科学院植物生理与生态研究所杨晟惠赠; 缺陷 8 种蛋白酶的枯草杆菌 WB800(*nprE aprE epr bpr mpr nprB Δ vpr wprA*)为 DFE 基因的表达宿主菌, 由加拿大 Calgary 大学 Wong Sui-Lam 惠赠^[8]. TA 克隆载体 pMD18-T simple(Amp^r), 载体上无酶切位点, 购自 TaKaRa 公司(大连). 大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pBE₃ (Amp^r, Kan^r), 插入了 Subtilisin E 突变体基因, 由加州理工学院 Arnold F H 惠赠, 载体不带表达所必须的启动子元件, 物理图谱如下:

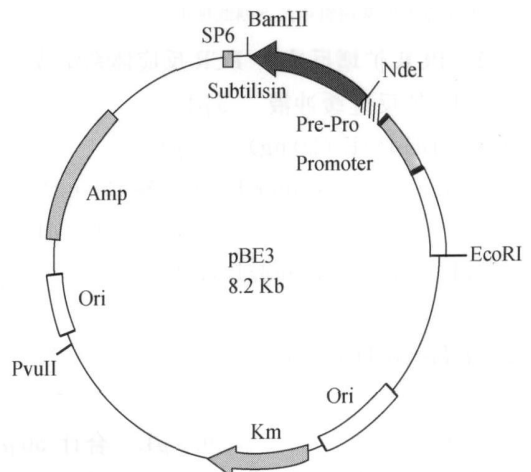


图 2 质粒 pBE₃ 物理图谱

1.2 主要试剂和培养基

QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit 购自 Stratagene 公司(包括有 *pfu Turbo polymerase*, dNTP, 限制性内切酶 *Dpn I*, *E. coli* XL10-Gold 超级感受态细胞); 合成底物 H-D-Val-L-Leu-L-Lys-p-NA 购自 Sigma 公司。

大肠杆菌转化和培养采用 LB/Amp 培养基, 枯草杆菌转化和发酵培养采用 LB/Kan 培养基。SOC 培养基用于 PCR 产物转化 *E. coli* XL10-Gold 过程中, SPII 培养基用于重组表达质粒 pBE-DFE 转化 *Bacillus subtilis* WB800 的过程中。

1.3 突变方法

1.3.1 DFE 基因突变位点的确定

根据 Well 等研究枯草杆菌蛋白酶 BPN' 对底物 succinyl-Ala-Ala-Pro-(Xaa)-p-NA 的研究, 以及 DFE 的氨基酸序列与枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的同源性高达 97%, 对 DFE 的在底物结合区的第 156 位谷氨酸和第 166 位甘氨酸残基以及临近底物结合区的第 169 位甘氨酸残基行定点突变, 考察突变对纤溶酶活力和酶对

底物 H-D-Val-Leu-Lys-p-NA 特异性的影响。设计突变如下表:

表 1 突变位点的设计

突变氨基酸 ^{a)}	在蛋白质结构中的位置	突变体命名
156 th Glu Ser	底物 S1 结合区, 与底物 P1 位置残基相结合	E156S
166 th Gly Ala	底物 S1 结合区, 与底物 P1 位置残基相结合	G166A
169 th Gly Ala	非底物结合区	G169A

a) 前面的氨基酸是指突变前氨基酸, 后面是指突变后氨基酸

1.3.2 突变方法

根据 pBE-DFE 序列和拟突变位点的密码子设计了三对完全互补的引物序列, 以 pBE-DFE 质粒为模板, 按照 Stratagene 突变试剂盒的使用说明书, 采用长距离 PCR 反应进行定点突变。

1.3.2.1 突变引物的设计

根据 Protocol of QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) 的引物设计要求, 突变引物是环状质粒 DNA 上需突变位点上完全互补的序列, 突变位于引物位于的中间位置, 且引物 5' 和 3' 末端为 G 或 C。

表 2 突变引物的序列及其退火温度计算值

突变位点	引物序列(5' → 3') ^{a)}	T _m /°C
156 th Glu Ser	F: 5' GCA GCC GGT AAC <u>ICA</u> GGC ACT TCC GG3' R: 5' CC GGA AGT GCC <u>TGA</u> GTT ACC GGC TGC3'	80.2
Gly166Ala	F: 5' GC TCA AGC ACA GTG <u>GCC</u> TAT CCT GGT AAA TAC C3' R: 5' G GTA TTT ACC AGG ATA <u>GCC</u> CAC TGT GCT TGA GC3'	81.2
Gly169Ala	F: 5' GC ACA GTG GGC TAT CCT <u>GCT</u> AAA TAC CCT TCT GTC ATT GC3'; R: 5' GC AAT GAC AGA AGG GTA TTT <u>AGC</u> AGG ATA GCC CAC TGT GC3'	82.0

a) 突变位点的碱基用斜体及下划线标出

1.3.2.2 PCR 扩增反应

PCR 反应体系组成如下:

10× PCR 反应缓冲液 5 μL

质粒 pBE-DFE (20 ng) 1.0 μL

oligonucleotide primer F, R (各 125 ng)

1.0 μL + 1.0 μL

dNTP mix (2.5 mmol/L each)

1.0 μL

Pfu Turbo DNA polymerase (2.5 U/μL)

1.0 μL

ddH₂O 39.5 μL 合计 50 μL

PCR 反应程序: Step1, 95 °C 30 s; Step2, 95 °C

30 s, 55 °C 30 s, 68 °C 11 min (12—16 cycles, 一个

碱基突变 12 个循环, 2 碱基突变 15 循环); Step3, 4 °C 保存。

1.4 PCR 产物反应体系 *Dpn I* 酶切与转化 *E. coli* XL10-Gold

直接在 50 μL PCR 产物中加入 1.0 μL 限制性内切酶 *Dpn I* (识别序列为 5' G^mA TC3') 消化模板质粒 DNA, 混匀后置 37 °C 消化 1 h。

取 2.0 μL 的经过 *Dpn I* 酶切过的 PCR 产物与 50 μL *E. coli* XL10-Gold 感受态细胞混合, 冰浴 30 min, 42 °C 热激 45 s, 迅速冰浴 2 min, 加入 500 μL SOC 培养基, 于 37 °C, 150 rpm 培养 45 min 后, 转化液涂布于 LB/Amp 平板, 37 °C 培养箱中培养 20 h。

1.5 DFE 基因及突变基因的序列分析

突变重组子由上海英骏生物技术有限公司用通用引物 M13-47 和 RV-M 进行测序, 序列分析用 BLAST 完成.

1.6 DFE 基因突变体的质粒转化枯草杆菌 WB800

重组表达质粒 pBE-DFE 转化枯草杆菌 168 及 WB800 的方法参照 Harwood^[9]. 挑取宿主菌接种于 3 mL 液体培养基中, 37 °C 摇床培养 12 h; 取 100 μ L 菌液, 接种至用 50 mL 离心管配好的 5 mL SPI 培养基中, 37 °C 摇床培养, 3 h 后开始测 OD_{600} , 当培养物生长到对数末期时 (OD_{600} 为 1.0—1.5), 快速取 200 μ L 接种到 2 mL SPII Medium 中, 于 37 °C 150 rpm 摇床培养 1.5 h; 加 20 μ L 100 \times EGTA 溶液, 于 37 °C 100 rpm 培养 10 min, 用 1.5 mL 离心管分装 500 μ L; 向管中加入适量质粒, 轻轻混匀于 37 °C 100 rpm 摇床培养 30 min; 将离心管转移到 250 rpm 摇床, 37 °C 培养 1.5 h; 4000 rpm 离心 2 min 后, 弃部分上清, 将剩余部分涂布于 LB/kan 平板, 37 °C 过夜培养.

1.7 DFE 基因突变体的筛选与表达

从 LB/Kan 平板上分别挑取 DFE 突变基因重组菌的单菌落接种到 5 mL LB/kan 液体培养基中, 37 °C 培养 12 h, 作为种子液, 按 5% 接种量转接至 50 mL LB/kan 液体培养基, 37 °C, 220 r/min 培养 24 h. 发酵液于 4 °C, 10000 g 离心 15 min, 获得的上清液为粗酶液.

1.8 纤溶酶活性的测定方法

1.8.1 纤维蛋白—琼脂双层平板的制作 将灭菌的 2.0% 琼脂倒入平板, 吹干, 即为下层: 琼脂层; 取 8.0 mL 保温于 55 °C 的 1.2% 琼脂糖 (需灭菌) 于小三角瓶中, 加入 8.0 mL 0.3% 的纤维蛋白原 (用 40 mmol/L, pH 7.8 的巴比妥钠溶液配制) 于小三角瓶中, 摇匀, 再加入 0.65 mL 凝血酶 (1 BP/mL), 迅速混匀后倒入培养皿 (直径为 8.8—9.0 cm), 静止冷却 0.5 h, 即为上层: 纤维蛋白层. 在纤维蛋白层上打直径为 2 mm 的孔 (注意不要打破琼脂层), 备用.

1.8.2 尿激酶标准曲线的绘制 将尿激酶标准品 (6.25, 12.5, 25, 50, 100 U/mL) 各取 10 μ L 点样于新配制的纤维蛋白平板的孔内, 放置 10 min, 37 °C 培养箱保温 18 h 后取出, 量取透明水解圈直径, 以水解圈的面积的自然对数为纵坐标, 以标准酶活力的自然对数为横坐标, 绘制标准曲线.

1.8.3 纤溶酶活性的测定 将表达菌株培养物的上清液稀释适当倍数 (使测定值在尿激酶标准曲线范围内), 点样于纤维蛋白平板的孔内, 以尿激酶作参照, 量取水解圈的直径计算酶活性. 酶的活力单位用尿激酶单位 U 表示.

1.9 酶对合成底物 H-D-Val-L-Leu-L-Lys-p-NA 的酰胺水解活性

1.9.1 对硝基苯胺 (p-nitroanilide, pNA) 的标准曲线的测定 用双蒸水将 pNA 溶解至终浓度为 0.1 mmol/L. 然后以 0.1 mmol/L pNA 为母液, 将 pNA 分别配制成浓度为 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 和 0.1 mmol/L 的 pNA 溶液, 以双蒸水为空白对照, 在波长 405 nm 下测定吸光度, 绘制 pNA 的标准曲线.

1.9.2 合成底物水解活性测定 收集在相同发酵条件下的发酵液用于底物水解活性测定. 酶的酰胺水解活性测定按文献 Kim 等的方法进行^[10]. 将合成底物溶于 0.1 mol/L Tris HCl (pH 7.4, 含 0.1 mol/L NaCl) 的缓冲液, 使底物终浓度为 5×10^{-4} mol/L. 待测酶溶液 20 μ L 与底物溶液 2 mL 混合, 于 37 °C 反应 5 min, 加入三氯乙酸终止反应, 在波长 405 nm 处连续检测被释放的对硝基苯胺. 酶的酰胺水解活性单位定义为: 1 min/mL 发酵上清液水解底物生成 1 μ mol 的产物的为 1 个酶活力单位 (AU).

酰胺水解活性计算公式: 酰胺水解活性 (AU) = pNA 的摩尔浓度 $\times 10^5$ / min \cdot mL

2 结果与分析

2.1 DFE 基因的定点突变

研究以含 DFE 基因的穿梭质粒 pBE-DFE 为模板, 采用高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增环状质粒. 由于模板质粒经过大肠杆菌复制时会产生

5'-Gm⁶ATC-3' 位点, 因此扩增反应体系中的模板质粒 DNA 被内切酶 *Dpn* I 所识别且消化, 而 PCR 扩增的与模板互补的链不含甲基化位点不被内切酶所识别, 消化后为 PCR 扩增的单链环状 DNA, 经过转化大肠杆菌后获得含突变的阳性转化子. 对突变的转化子序列测定证实, 在拟突变位点的碱基发

生了改变, 与预期相符(如图 3). DFE 成熟肽的第 156 位氨基酸的密码子经 GAA→TCA 突变, 谷氨酸被替换为丝氨酸(E156S); 第 166 位氨基酸的密码子 GGC→GCC 突变, 将甘氨酸替换为丙氨酸(G166A); 第 169 位氨基酸的密码子 GGT→GCT 突变, 将甘氨酸替换为丙氨酸(G169A).

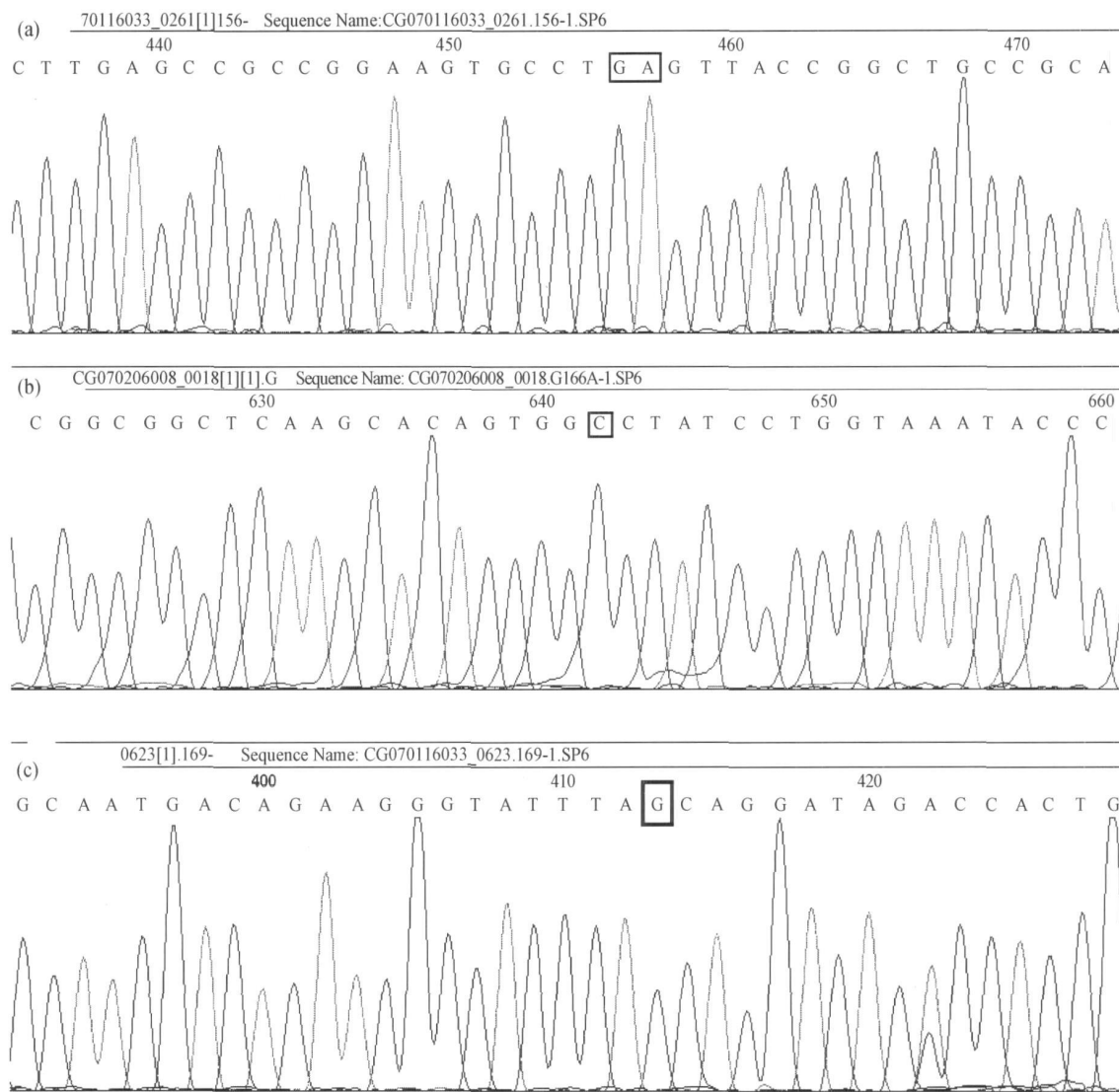


图 3 DFE 基因突变体测序验证

2.2 突变体表达菌株的构建和表达

将测序验证的 DFE 基因突变体质粒转化枯草芽孢杆菌 WB800, 阳性转化菌为 DFE 突变体表达菌株, 分别命名为 WB800 (E156S); WB800 (G166A) 和 WB800 (G169A). DFE 突变体表达菌和未突变 DFE 的表达菌 WB800/pBE-DFE 在相同

条件下发酵培养 24 h 后, 上清液在纤维蛋白平板的水解活性具有明显差异, 如图 4.

测定的纤溶酶活性的结果见表 3. 可以看出 E156S 突变后, DFE 的纤溶酶活性明显下降; 而 G166A 和 G169A 突变后, DFE 的纤溶酶活性分别增加了 15% 和 36%.

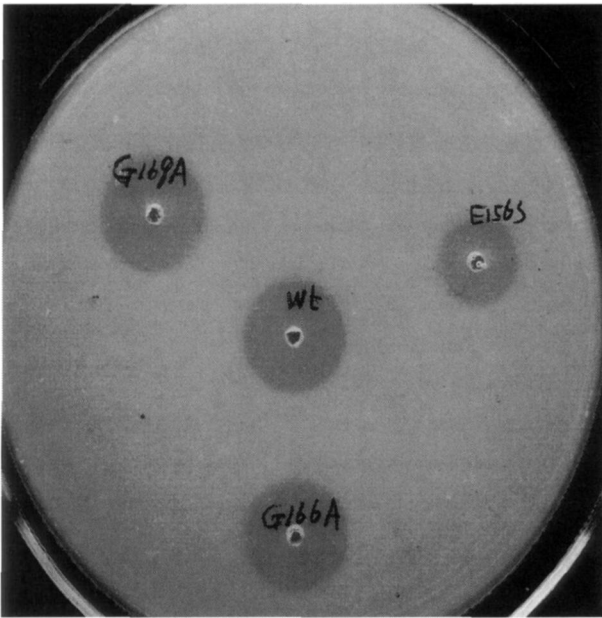


图 4 野生型的 DFE 与突变体在纤维蛋白平板上的水解活性

表 3 野生型与突变型 DFE 的纤溶活性

酶	纤溶酶活性/ $U \cdot mL^{-1}$	相对活性/%
野生型(wt)	660	100
E156S	460	70
G166A	790	115
G169A	900	136

2.3 DFE 突变体对合成底物的水解活性

2.3.1 对硝基苯胺 p-nitroanilide(pNA)的标准曲线

检测不同浓度对硝基苯胺 (*p*-Nitroanilide), pNA 在波长为 405 nm 下的吸光值, 绘制成标准曲线. 据此求得的标准曲线方程为: $Y = 2.4314 X, R^2 = 0.9917$.

2.3.2 DFE 及其突变体对合成底物 H-D-Val-Leu-Lys-p-NA 的特异性

DFE 基因及其突变体基因的重组表达菌株的发酵上清液对合成底物 H-Val-Leu-Lys-p-NA 的水解活性测定结果如表 4. 可以看出, E156S 突变后, 酶对合成底物的酰胺水解活性大幅度下降, 仅为未突变型的 17%; 而 G166A 突变使酶的酰胺水解活性提高了 25%; G169A 突变使酶的酰胺水解活性提高了 21%.

表 4 野生型与突变型 DFE 对合成底物 H-Val-Leu-Lys-p-NA 的水解活性

酶	底物水解活性/AU	相对活性/%
野生型(wt)	2.36	100
E156S	0.40	17
G166A	2.95	125
G169A	2.86	121

3 讨论

通过将第 156 位的 Glu 突变为 Ser 后, 突变体 E156S 比野生型的豆豉纤溶酶的纤维蛋白水解活性有了明显下降, 对合成底物 H-D-Val-Leu-Lys-p-NA 的活性也显著下降. 原因在于未突变酶第 156 位带负电荷的谷氨酸残基与 P1-Lys 之间能形成了强的静电吸引力, 而突变后因带正电荷丝氨酸残基与底物 P1 的带正电荷赖氨酸残基之间不能形成静电引力, 因此造成突变体酶与底物结合困难, 降低了与底物的亲和力. 豆豉纤溶酶底物结合区的第 166 位的 Gly 突变为 Ala 后, 突变体酶对纤维蛋白的水解活性和对血纤溶酶合成底物的水解活性都有提高, 突变体酶活力的提高可能主要是由于酰胺水解活性提高的缘故. 根据对枯草杆菌蛋白酶 BPN' 第 156 位和第 166 位氨基酸残基饱和突变后对系列合成底物 succinyl-Ala-Ala-Pro-(Xaa)-p-NA 的动力学常数的研究结果, 两个位置氨基酸残基的静电荷之和与底物 P1 氨基酸残基的带电荷性对酶与底物的作用产生显著影响, 如两个位置氨基酸残基静电荷之和为正值时, 酶对 P1 位置为负电荷如苯丙氨酸的底物选择性更高, 但是这种情况仅限于两个氨基酸残基中只能一个氨基酸带电荷^[7]. 对豆豉纤溶酶这两个位点的突变后, Ser/Gly 和 Glu/Ala 两对氨基酸残基中均只有一个带电荷 (Ser 带正电荷, Glu 带负电荷), 突变后对底物的影响结果与 Wells 对 succinyl-Ala-Ala-Pro-(Xaa)-p-NA 的研究结论是一致的. 因此, 推测这一类型蛋白酶可能对这两种合成底物中间 P2-P3 位置的氨基酸残基的变化不敏感.

与上述两个氨基酸残基位于蛋白酶 S1 结构域内不同的是, 豆豉纤溶酶的第 169 位的 Gly 残基是位于在底物结合区之外, 并不与底物的氨基酸直接接触, 但是通过该位置的 Gly 突变后, 突变体的纤

溶酶活性和对合成底物 H-D-Val-Leu-Lys-p-NA 的水解活性都有了提高,说明第 169 位的 Gly 突变对酶的底物结合性质产生了实质性的影响. Estell 等认为尽管枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的第 169 位 Gly 残基不与合成底物的氨基酸残基直接接触(不在 Van der Waals 力的距离范围之内),但却在第 152 位氨基酸残基的碳氧键结合的距离范围之内. 他们推测甘氨酸被替换为丙氨酸后, α -碳原子发生空间位移,正是这种突变后的空间位移使此 α -碳原子能够与第 152 位的丙氨酸残基形成碳氧键,从而改变酶与底物的结合的空间构象,突变后提高了底物 P1 位为 Lys 的结合能力,也可能是由于突变后改变了底物 P1 结合位点的疏水性所导致的^[6]. 这也说明设计底物选择性的复杂性,一些突变效应可能无法通过预测得到.

据报道枯草杆菌蛋白酶 E 的第 127 位与底物 P1, P2 和 P4 位氨基酸残基接触,也是影响酶的底物专一性的位点^[11]; 还有报道认为第 217 位氨基酸也影响该酶对多种合成底物的结合^[7]; 这些位点是否能够提高 DFE 对血纤溶酶底物的特异性和酶活力,需要进一步研究. 此外,两个或两个以上突变位点之间是否存在叠加效应也值得进一步研究.

定点突变方法存在一个明显的缺陷,那就是:每次突变仅限于一两个氨基酸残基变化,多个位点同时变化难以实现. 而可能正是多个位点同时变化会产生一些意想不到的突变效应,某些单个氨基酸突变不能产生效应或产生效应不明显,但是多个氨基酸突变的组合却可能产生显著的协同效应,这种情况可能无法通过预测得到的. 近年来,定向进化在蛋白质改造中应用越来越多,它可以通过随机突变产生海量的突变体,通过合适的筛选或选择手段将有益的突变体鉴别出来. 利用定向进化来改造

DFE 可能是一种更好和更加有效的方法.

参 考 文 献

- 1 范晓丹. 新型纤溶酶得产生菌选育发酵优化及酶学性质研究. 华南理工大学博士论文, 广州, 2006
- 2 Penno JJ, Craik CS. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci*, 1995, 4: 337-360
- 3 Wells JA, Powers DB, Bott RR, et al. Designing substrate specificity by protein engineering of electrostatic interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 1219-1223
- 4 Wright CS, Alden RA, Kraut J. Structure of subtilisin BPN' at 2.5 Å resolution. *Nature*, 1969, 221: 235-242
- 5 Carter P, Nilsson B, Bumier JP, et al. Engineering subtilisin BPN' for site-specific proteolysis. *Proteins Struct Funct Genet*, 1989, 6: 240-245
- 6 Estell DA, Graycar TP, Miller JV, et al. Probing steric and hydrophobic effects on enzyme-substrate interactions by protein engineering. *Science*, 1986, 233: 659-663
- 7 Wells JA, Cunningham BC, Graycar TP, et al. Recruitment of substrate-specificity properties from one enzyme into a related one by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 5167-5171
- 8 Wu SC, Yeung JC, Wong SL. Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*; Effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 3261-3269
- 9 任乐民, 张云升, 孟雅娟. 溶栓药物的研究进展. *实用中西医结合临床*, 2006, 6(3): 91-92
- 10 Kim W, Choi K, Kim Y, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook Jang. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 2482-248
- 11 Takagi H, Maeda T, Ohtsu I, et al. Restriction of substrate specificity of subtilisin E by introduction of a side chain into a conserved glycine residue. *FEBS Letters*, 1996, 395: 127-132