

文章编号: 1000-5013(2008)04-0559-04

# 新型 G/11 家族木聚糖酶的设计及生物学分析

石敢当, 张光亚, 方柏山

(华侨大学 工业生物技术重点实验室, 福建 泉州 362021)

**摘要:** 运用 Bioedit 软件,从已知耐热性能较好的 G/11 木聚糖酶蛋白序列出发,构建调和序列,获得新型木聚糖酶.首先运用 InterProScan 得出该序列为 G/11 家族,再运用 MotifScan 确定其活性部位,对比 G/11 木聚糖酶的特征序列确定该酶为木聚糖酶.通过 SWISS-MODEL 对其三级结构进行预测,了解信号肽长度为 27 个.运用 ProtParam Tool 对其部分理化性质进行预测,得出其理论等电点为 6.82,最适温度为 81.72,高于调和前的任何一条序列.最后,通过选择宿主菌最优密码子获得其基因序列.

**关键词:** 木聚糖酶;调和序列;三级结构;理化性质;合成生物学

**中图分类号:** Q 811.4; Q 556

**文献标识码:** A

木聚糖酶能水解木聚糖主干链内部的  $\alpha$ -1,4 糖苷键,产生低聚木糖或带有侧枝的寡聚糖.用于纸浆漂白的木聚糖酶最好应该是耐热和耐碱的,但目前工业上多数用于纸浆漂白的木聚糖酶最适温度在 45 以下.这就引起了国内外学者对木聚糖酶及其基因的关注<sup>[1-3]</sup>.目前有两种解决方法:一种方法是从极端环境中筛选木聚糖酶产生菌株<sup>[4]</sup>.迄今为止,已发现能产耐热木聚糖酶的细菌只有 20 余种和不足 10 种的真菌,其中只有 *Thermomonospora fussa* 的 XynA 属于 G/11 族<sup>[5]</sup>;另一种方法是对木聚糖酶进行蛋白质改造,这是一个更好的选择<sup>[6]</sup>.对现有木聚糖酶进行遗传改造的方法,主要有定向进化法、定点突变法和计算机辅助法<sup>[7]</sup>.前者属于非理性的蛋白设计范畴,采用随机的方法.因此,存在筛选容量太大,筛选过程较复杂且费用较昂贵等缺点<sup>[8]</sup>.后两者属于理性和半理性蛋白设计范畴,它们利用了蛋白质分子空间结构的数据,尽管能取得一定的成功<sup>[9]</sup>,但很大程度上依赖于经验<sup>[10]</sup>.随着生物信息学的迅猛发展,研究者开始注意到将生物信息学的手段引入到蛋白质工程领域,如 Lehmann 等<sup>[11]</sup>运用 PRETTY 软件对已知的植酸酶的氨基酸序列进行调和,取得了很好的效果.本文采用类似文[11]的方法,通过生物信息学手段设计一种新型木聚糖酶,并探讨其热稳定性的分子机制.

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

G/11 家族木聚糖酶序列来源于 Swiss-Prot Release 44.4 和 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb/>),前者是非冗余的专家库.木聚糖酶最适温度的数据来源于文[12].6 个木聚糖酶的 ID 号及最适温度,如表 1 所示,其中 ID 为 Swiss-Prot 登陆号.然后运用 Bioedit 软件对 6 个木聚糖酶的序列进行调

表 1 G/11 家族木聚糖酶  
Tab.1 The G/11 xylanases

ID	P55329	P55332	P55334	P35809	P33558	O43097
opt/	53.90	56.01	60.15	67.46	72.26	79.08

**收稿日期:** 2008-02-13

**作者简介:** 石敢当(1983-),男;通信作者:方柏山(1957-),男,教授,主要从事微生物生化研究. E-mail:fangbs@hqu.edu.cn.

**基金项目:** 国家重点基础研究发展(973)计划项目(2007CB707804);国家高技术研究发展(863)计划项目(2006AA020103);国家自然科学基金资助项目(20676048)

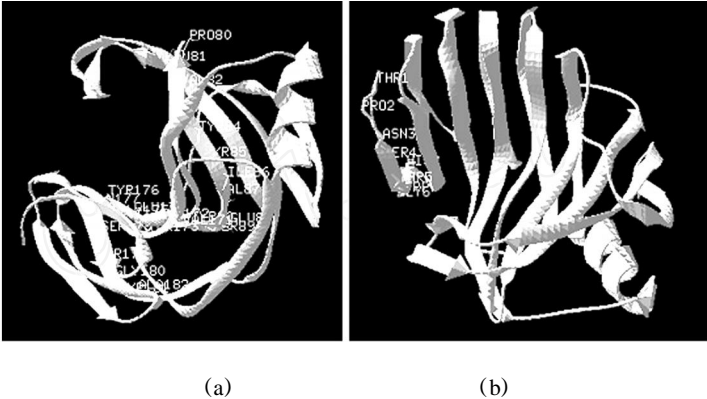


$0.342I - 0.425K + 0.23L + 0.055M - 0.111N + 0.194P +$   
 $0.364Q + 0.203R + 0.047S - 0.008T - 0.152V - 0.082W - 0.288Y,$   
 $PC_2 = -0.267A + 0.282C + 0.179D - 0.235E + 0.109F - 0.209G + 0.158H +$   
 $0.172I + 0.056K - 0.047L + 0.041M + 0.399N - 0.066P + 0.156Q -$   
 $0.326R + 0.338S + 0.349T - 0.338V + 0.001W + 0.011Y,$

代入数值计算得出  $PC_1 = -1.18, PC_2 = 3.82$ . 符合文献所说的  $PC_2 < -1.5 PC_1 + 6$ , 进而说明该酶为嗜热蛋白.

2.3 三级结构图的构建及其特征位点观察

通过 SWISS-MODEL 对该新酶三级结构进行预测,如图 2 所示. 从图 2 (a)可以看出新木聚糖酶氨基酸链的活性部位的具体位置,以及新酶的活性位点集中在凹巢中. 从图 2(b)可以看出,该新酶的 N 端裸露在结构的外面,便于连上相应的 His 末端,为以后酶的纯化提供方便.



(a) (b)  
图 2 酶的三级结构  
Fig. 2 3D structure of xylanase

2.4 密码子的优化

考虑到后续研究过程中所使用的表达宿主为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*),为了避免由于密码子偏好带来的基因表达效率的影响. 因此,在逆翻译上述获得的酶蛋白序列对应的基因序列时,在存在同义密码子的情况下,优先使用枯草芽孢杆菌的最优密码子. 从 Codon Usage 数据库获得的枯草芽孢杆菌的最优密码子,如表 2 所示. 表 2 中,采用出现频率(*f*)较高的对应密码子即为枯草芽孢杆菌的最优密码子.

表 2 枯草芽孢杆菌最优密码子

Tab.2 Superior codon of *Bacillus subtilis*

氨基酸	密码子	f/ %	氨基酸	密码子	f/ %	氨基酸	密码子	f/ %	氨基酸	密码子	f/ %
Ala(A)	GCA	2.11	Gln(Q)	CAA	2.04	Leu(L)	CUG	2.30	Ser(S)	UCA	1.46
Arg(R)	AGA	1.05	Glu(E)	GAA	0.81	Lys(K)	AAA	4.84	Thr(T)	ACA	2.11
Asn(N)	AAU	2.29	Gly(G)	GGC	2.33	Met(M)	AUG	2.63	Trp(W)	UGG	1.07
Asp(D)	GAU	3.32	His(H)	CAU	1.57	Phe(F)	UUU	3.00	Tyr(Y)	UAU	2.33
Cys(C)	UGC	0.43	Ile(I)	AUU	3.62	Pro(P)	CCG	1.63	Val(V)	GUU	1.86

由最优密码子得到的编码该新型木聚糖酶的基因序列(图 3),它可用于指导其基因序列的合成.

3 结束语

通过 Bioedit 软件对已知序列的木聚糖酶氨基酸序列进行调和,不但能够省时省力,而且不需要对结构太多的了解. 利用 Bioedit 软件时,发现所考察的氨基酸序列中

```
1 ACACCGAATAGCACAGGCTGGCATGGCGGCTATTACTATAGCTGGTGGTCAGATGGCGGT
61 GGCCAGGCAACGTATACAAATCTGGAAGGCGGCACATATAGCGTTTCAGTGGGGCAATGGA
121 GGCAATTTTGTGGCGGCAAGGCTGGAATCCGGGCAGCAGCAGCGATCAACTACGGC
181 GGCGTGATAACCGAATGGCAATAGCTACCTGGCAGTATACGGCTGGACGCGCAACCCG
241 CTGGTTGAGTACTATATCGTAGAGAGCTACGGCACGTACAACCCGAGCAGCGAGCGACA
301 CATAAAGGCACAGTTTATTGCGATGGCGCAACATACGACATCTACACAACGACGCGCTAC
361 AATGCACCGAGCATTGACGGCACACAAACGTTCCAGCAGTATTGGAGCGTTAGACAGAGC
421 AAACGCACAAGCGGCACGGTGACAGTGCAAAATCACTTCAACGCATGGGCAAGACTGGGA
481 ATGAATCTGGGCGATCACTACTATCAAATCGTCGCAACAGAGGGCTACCAAAGCTCAGGC
541 TATGCAAGCATTACGGTAGCA
```

图 3 优化的密码子  
Fig. 3 Optimized codon

第 181 位的氨基酸对木聚糖酶的最适温度影响很大,该位置氨基酸的变化会直接导致高达 20 左右的温差,其中调和序列温度最高的两种木聚糖酶在 181 位的氨基酸都是 Tyr(Y). 因此,研究该位氨基酸很有意义. 据此,借助合成生物学的理念,直接合成该新型木聚糖酶蛋白的基因序列并进行表达和纯化相应的酶,然后对其性质进行进一步验证,有关结果将作后续报道.

## 参考文献:

- [1] XUE Yi-ming, MAO Gui-zhong, SHAO Wei-lan, et al. Eaxpression of xlyanase B gene of *Thermotoga maritime* in *Escherichia coli*[J]. Food and Fermentation Industries, 2003, 29(11):20-25.
- [2] BADJAM A K, CHADHA B S. Functionally diverse multiple xylanases of thermophilic fungus *Myceliophthora sp.* IMI 38709[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35(5):460-466.
- [3] KUL KARNI N, SHENDYE A. Molecular and biotechnological aspects of xylanases[J]. FEMS Microbiol Rev, 1999, 23:411-456.
- [4] KHASIN A, ALCHANATI I, SHOHAM Y. Purification, and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59:1725-1730.
- [5] 江正强,李里特,李颖.耐热木聚糖酶研究进展[J].中国生物工程杂志,2003,23(8):47-51.
- [6] 张光亚,方柏山.木聚糖酶氨基酸组成与其最适 pH 的神经网络模型[J].生物工程学报,2005,21(4):658-661.
- [7] VIELLE C, ZEIKUS GJ. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2001, 65(1):1-43.
- [8] LEHMANN M, KOSTREWA D, WYSS M, et al. From DNA sequence to improved functionality: Using protein sequence comparision to rapidly design a thermostable consensus phytase[J]. Protein Engineering, 2000, 13(1):49-57.
- [9] OSSO T, KIRSIKKA E. A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the helix region of *Trichoderma reesei* endo-1,4-xylanase increases the thermal stability through synergism[J]. Journal of Biotechnology, 2001, 88(1):37-46.
- [10] 张光亚,方柏山.木聚糖酶氨基酸组成与最适温度的模型[J].华侨大学学报:自然科学版,2005,26(2):191-194.
- [11] ROBERTO A C, NICOLAS D, JOELLE N P. Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: Combining the benefits of directed evolution and rational design[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2005, 16:378-384.
- [12] 王飞飞,张光亚,方柏山,等. G/11 家族木聚糖酶特征序列与其最适温度定量关系的研究[J]. 计算机与应用化学, 2007(12):1638-1642.
- [13] ZHANG G Y, FANG B S. Discrimination of thermophilic and mesophilic proteins via pattern recognition methods [J]. Process Biochemistry, 2006, 41:552-556.

## Design and Bioinformatical Analysis of a Novel G/11 Xylanase

SHI Gan-dang, ZHANG Guang-ya, FANG Bai-shan

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province University, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

**Abstract:** A novel xylanase sequence was obtained by using Bioedit to compare six G/11 thermostable xylanase protein sequences. The calculated optimal temperature of the new sequence was 81.72 °C, which was higher than any of the six ancestral sequences. Firstly, we knew this new sequence belonged to G/11 through using InterProScan, and got its active site by using MotifScan. The signal peptide of the new xylanase could know by using the SWISS-MODEL which predicted the tertiary structure of the protein. The length of the signal peptide was 27. By using protparam tool, we got some physical and chemical properties of the new xylanase, from which we knew the theoretical isoelectric point of it was 6.28. The gene encoding of the xylanase was generated through the optimal codon used by the host strain. The current study paved the way for the synthetic biology of xylanase.

**Keywords:** xylanase; consensus sequence; tertiary structure; physical and chemical properties; synthetic biology

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 陈国华)