

文章编号: 1000-5013(2011)03-0296-04

短小芽孢杆菌木聚糖酶的同源建模 及分子动力学模拟

葛慧华, 李红春, 张光亚

(华侨大学 化工学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 克隆并测序来源于短小芽孢杆菌的木聚糖酶基因,测定其编码产物的理化性质并鉴定其表达产物为常温酶蛋白.利用同源建模构建出具有较高精度的三级结构模型,并进行优化和评估.利用分子动力学模拟木聚糖酶基因对热不稳定的分子机制,了解影响该酶热稳定性的因素,寻找对热不稳定性的区域.通过与嗜热木聚糖酶比较发现,两者在 3 个区域的分子动力学行为存在较明显的差异.

关键词: 木聚糖酶;短小芽孢杆菌;同源建模;热稳定性;分子动力学模拟

中图分类号: Q 71; Q 55

文献标志码: A

木聚糖酶(EC3.2.1.8)是一种重要工业用酶,属于 F/10 和 G/11 家族.由于 G/11 家族的木聚糖酶分子更小,且其结构较为简单,更适合作为理论研究分子的模型^[1],用于极端条件下木聚糖酶催化模式系统及蛋白质分子折叠机理等的研究.分子动力学模拟能提供在不同温度下,极短时间内蛋白分子构象的变化,是研究蛋白质去折叠或者变性机理的重要手段,它有着实验无法比拟的优势^[2-3].然而,国内大多数分子动力学研究主要集中于小分子物质,而对生物大分子的研究相对较少^[2,4-5].本文获取了来源于短小芽孢杆菌木聚糖酶基因,测定其编码产物的理化性质,构建出具有较高精度的三级结构模型,并进行了分子动力学模拟.

1 材料与方法

1.1 材料

短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*,中国普通微生物菌种保藏管理中心);*E. coli* DH5 α (中国科学院遗传与发育生物学研究所吴乃虎教授惠赠);质粒 pMD18-T,DNA 回收试剂盒 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit Ver. 2.0,限制性内切酶及其缓冲液(大连 TaKaRa 公司).

1.2 方法

1.2.1 引物 参考其他来源于芽孢杆菌属的木聚糖酶序列,使用 DNA club 辅助设计引物,并在 5'端分别加上 *Bam*H I 和 *Xho* I 的限制性内切酶位点.设计的上游引物 L1:5/GCGCGGATCCAT-GAATTTGAGAAAATTAAG3';下游引物 L2:5/GATGCTCGAT GTTGCCAATAAACAGCT-GATTG3'.L1 和 L2 中的划线部分分别是 *Bam*H I 和 *Xho* I 的酶切位点.引物委托北京奥科公司合成,基因测序由北京华诺公司完成.

1.2.2 同源建模及模型评估 将返回的测序结果翻译成蛋白质,并在 SWISS-MODEL 上完成同源建模^[6];利用 MetaMQAP^[7]对模型进行评估及优化.

1.2.3 分子动力学模拟 分子动力学模拟软件为 NAMD,视图、建模和数据处理软件为其辅助软件 VMD^[8].使用的力场为经验力场 CHARMM 力场.其基本过程分为如下几步:(1)能量最小化;(2)溶

收稿日期: 2010-01-19

通信作者: 张光亚(1975-),男,副教授,主要从事生物信息与生物化工的研究. E-mail:zhgyghh@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2009J01030);华侨大学科研基金资助项目(07HZR20)

解蛋白;(3) 加入离子;(4) 体系升温(此处温度为 400 K);(5) 最终的分子动力学模拟。

2 木聚糖酶的基因及其编码产物的理化性质

以短小芽孢杆菌 *Bacillus pumillus* 基因组 DNA 为模板,利用 P1 和 P2 为引物聚合酶链反应(PCR),扩增得到编码木聚糖酶的 *xynA* 基因。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析,结果如图 1 所示。由图 1 可见,扩增片段大小约为 700 bp,与实际大小的 680 bp 吻合。

根据 Taq DNA 聚合酶在 PCR 产物的 3' 末端加 1 个“A”碱基的特性,将 PCR 产物切胶回收后,与 T 载体 pMD18-T 连接,连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 。利用氨苄青霉素进行初步筛选,挑取 5~6 个转化子扩培,抽提质粒,进行单、双酶切鉴定。

重组质粒 pMD-*xynA* 用 *Bam*H I 单酶切,得到一条大小约 3.4 kb 的片段,如图 2(a) 所示。这是空载体与目的基因大小之和。用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,得到两条大小分别为 2.7 kb 和 700 bp 的片段,如图 2(b) 所示。它们分别是空载体和目的基因的大小。这表明目的基因已成功插入表达载体 pMD 18-T 中。测序结果表明,其开放阅读框(ORF)的长度为 687 bp。经 BLAST 比对证实,该基因为编码木聚糖酶基因,在 NCBI 的登录号为 EF090270。

该酶经表达并测定,其最适温度为 50 $^{\circ}$ C^[9]。进一步测定酶在不同温度下保温 30 min 后残留的酶活力,结果如图 3 所示。由图 3 可知,在 70 $^{\circ}$ C 时保温 30 min 残留的酶活力仅有 25% 左右,而在 80 $^{\circ}$ C 以上则几乎完全失活,这说明其高温耐受性较差。与大多数来源于芽孢杆菌的木聚糖酶相比^[10],其理化性质较为接近。从其最适温度及热稳定性可以判断,该木聚糖酶属于常温酶蛋白。

3 木聚糖酶的同源建模

木聚糖酶基因(编号:EF090270)编码的木聚糖酶蛋白序列总长度为 228 个氨基酸。通过在 PDB 数据库进行 BLAST 比对,发现它与编号为 1IGO 的(来源于枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*)木聚糖酶同一性最高,可达 84.58%,以其为模板进行三级机构的同源建模。

由于所获得的木聚糖酶存在一个长度为 27 个氨基酸的信号肽,因此在同源建模过程中去掉了这一段序列。为了保证后续分子动力学研究的准确性,需要充分评估建模获得的三级结构的可靠性。

4 木聚糖酶的结构评估及优化

利用 Swiss-model 进行同源建模后,使用了目前较好的评估方法 MetaMQAP 对其进行评估和结构优化。评估结果表明,该模型准确率得分值为 84.701,均方根误差为 1.299,说明模型可靠性很高。

针对每个氨基酸残基中原子-原子相互作用,二级结构类型、水分子可及性,以及与其他氨基酸残基的相互作用等因素得到的分值(*P*)和 MetaMQAP 的全局得分值(*M*),如图 4 所示。由图 4 可见,大多数氨基酸残基都位于得分较高的区域。

经优化后的木聚糖酶三级结构,如图 5(a)所示;然后,在 VADAR 上构建其结构的拉氏图,如图 5(b)所示。由图 5(b)可见,绝大多数氨基酸残基都落在允许的区域,它对应于可接受的侧链环境。综上所述,优化后的三级结构是可靠的。

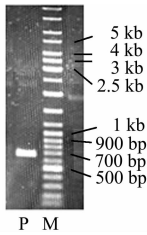
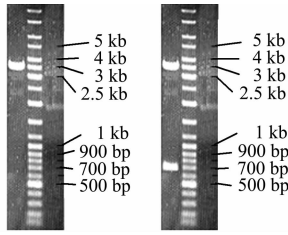


图 1 *xynA* 基因的 PCR 扩增
Fig. 1 Electrophoresis of PCR products of *xynA*



(a) 单酶切 (b) 双酶切
图 2 重组克隆载体 pMD-*xynA* 的限制酶酶切鉴定
Fig. 2 Identification of recombinant cloning vector pMD-*xynA* digested by restriction enzyme

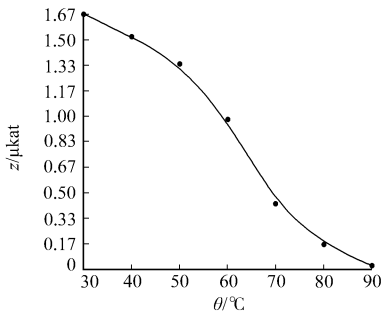


图 3 木聚糖酶的热稳定性
Fig. 3 Thermostability of xylanase

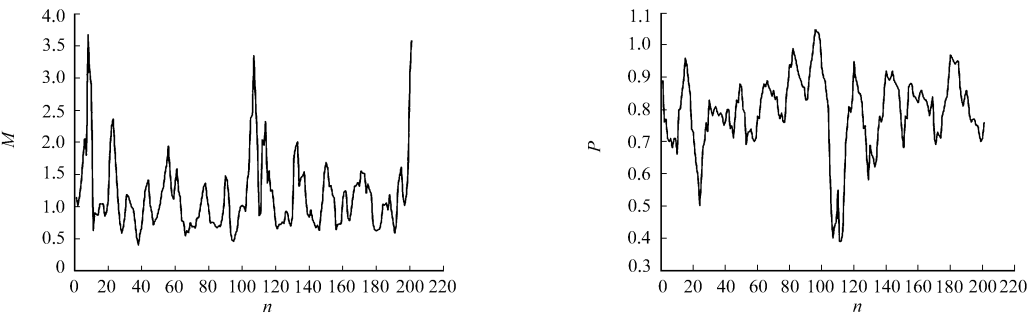
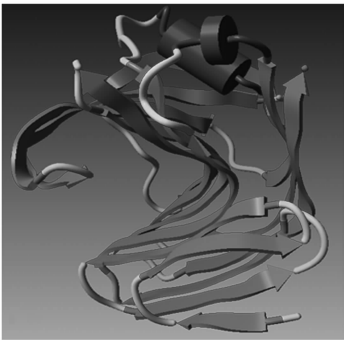
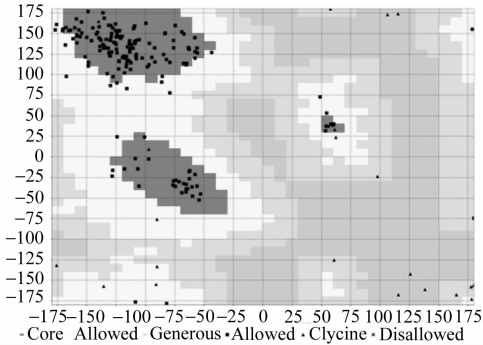


图 4 木聚糖酶三级结构模型的评估

Fig. 4 Evaluation of the 3D structure of xylanase



(a) 优化后结构



(b) 优化结构的拉氏图

图 5 木聚糖酶三级结构及其拉氏图

Fig. 5 3D structure of xylanase and its Ramachandran plot

5 木聚糖酶分子动力学模拟

为了对比并了解该常温木聚糖酶的分子动力学行为,选取了编号为 1F5J(来源于嗜热菌 *Dictyoglomus thermophilum*)的木聚糖酶. 该酶长度为 199 个氨基酸,和获取木聚糖酶模型(201 个氨基酸)长度相近,其最适温度为 75 ℃,具有较好的热稳定性,为嗜热酶蛋白^[11]. 在 400 K 温度下,两种木聚糖酶各残基 RMSD(差异均方根)值^[2]的分布,如图 6 所示. 由图 6 可知,在整个模拟的过程中,各位点 RMSD 的变化趋势类似,这可能和它们相似的结构有关.

然而,嗜热木聚糖酶 1F5J 在整个模拟过程中 RMSD 普遍高于常温木聚糖酶,说明其嗜热木聚糖酶分子的柔性更强,尤其在其 N 端,第 30 位至 42 位、第 122 位到 134 位之间. 研究表明,N 端对于木聚糖酶的热稳定性非常重要. 一般情况下,常温木聚糖酶 N 端较短,且在其 N 端有一段不规则 loop 结构;而嗜热蛋白则往往是一段 β -折叠. 已有实验证实,将黑曲霉中木聚糖酶 A 的 N 端用嗜热菌 *Thermomonospora fusca* 中木聚糖酶的 N 端替换后,其热稳定性和催化活性均有提高^[12].

从所获得木聚糖酶 xynA 的三级结构可以看出,在其 N 端也有一段长约 10 个左右的氨基酸形成了一段 loop 结构,连接着两段很短的 β -折叠,这印证该酶为常温酶蛋白. 中间的 30~42 位区间主要是 β -折叠和 loop 连接的区域,它们是形成木聚糖酶疏水核(hydrophobic core)的部分;而第 122 位到 134 位间则主要是两段短的 β -折叠通过 loop 连接而成,也是一段柔性较强的区域. 在 159 位到 168 位是该分子中所具有最长的一段(也是唯一一段) α -螺旋区域,这是一段相对刚性的区域. 因此,在整个模拟过程中变化不大,与之前报道吻合^[13]. 在第 100 位和第 180 位附近的区域,两种酶的差异较小. 经比较发现,这两个区域是木聚糖酶活性位点所在的区域. 有趣的是,该酶活性位点都分布在这些区域.

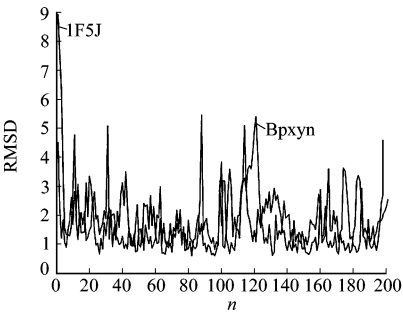


图 6 木聚糖酶各残基的 RMSD 值

Fig. 6 RMSD values of the xylanase residues

6 结束语

研究木聚糖酶的分子动力学特性,能提供另一种研究该酶热稳定性的机制,同时也能寻找出较早发生热变性的区域(或者是对热不稳定性区域)。这就是后续突变需要改造的区域。可见,分子动力学模拟可为酶的定向改造提供有价值信息。

参考文献:

- [1] SAPAG A, WOUTERS J, LAMBERT C, et al. The endoxylanases from family 11: Computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships[J]. J Biotechnol, 2002, 95(2): 109-131.
- [2] 张慧丽, 刘元, 于媛媛, 等. 用分子动力学方法对 Cystatin 蛋白的研究[J]. 辽宁工程技术大学学报: 自然科学版, 2008, 27(3): 472-474.
- [3] MIKKO P, JARKKO V, KRISTIINA T, et al. Molecular dynamics studies on the thermostability of family 11 xylanases[J]. Protein Engineering, Design & Selection, 2007, 20(11): 551-559.
- [4] 孙浩, 蒋勇军, 俞庆森, 等. 分子动力学模拟方法研究结构水在糖原合成酶激酶-3 β 中的作用[J]. 物理化学学报, 2009, 25(4): 635-639.
- [5] 赵熹, 黄旭日, 孙家锺. 分子动力学研究亚铁血红素激活蛋白转录激活机理[J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(4): 819-823.
- [6] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, et al. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195-201.
- [7] LEIGH W, ANUJ R, ZHANG H Y, et al. VADAR: A web server for quantitative evaluation of protein structure quality[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(7): 3316-3319.
- [8] HUMPHREY W, DALKE A, SCHULTEN K. VMD: Visual molecular dynamics[J]. Journal of Molecular Graphics, 1996, 14(1): 33-38.
- [9] 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, 24(2): 1638-1642.
- [10] SUBRAMANIYAN S, PREMA P. Cellulase-free xylanase from *Bacillus* and other microorganisms[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 183(1): 1-7.
- [11] MCCARTHY A A, MORRIS D D, BERGQUIST P L, et al. Structure of XynB, a highly thermostable β -1,4-xylanase from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, at 1.8 Å resolution[J]. Acta Crystallogr (D): Biol Crystallogr, 2000, 56(11): 1367-1375.
- [12] SUN Jian-yi, LIU Ming-qi, XU Ying-lei, et al. Improvement of the thermostability and catalytic activity of a mesophilic family 11 xylanase by N-terminus replacement[J]. Protein Expr Purif, 2005, 42(1): 122-130.

Homology Modeling and Molecular Dynamic Simulation of Xylanase from *Bacillus pumilus*

GE Hui-hua, LI Hong-chun, ZHANG Guang-ya

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: The gene of xylanase from *Bacillus pumilus* was cloned and sequenced. This xylanase was identified as a mesophilic enzyme. The tertiary structure of the xylanase originated from homology modeling was evaluated and optimized. Based on the optimal structure, molecular dynamic simulation of the mesophilic xylanase and a thermophilic one was performed using NAMD. The results showed that there were three regions which showed differences between the mesophilic and thermophilic xylanase. The molecular dynamic analysis suggested regions in the protein structure which were more unstable and thus potential targets for mutation to improve its thermostability.

Keywords: xylanase; *Bacillus pumilus*; homology modeling; thermostability; molecular dynamic simulation