

## $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶及其进化酶的 FT-IR 研究

李正强<sup>1</sup>, 黄品伟<sup>2</sup>, 陶艳春<sup>2</sup>, 刘 崑<sup>1</sup>, 吕 明<sup>1</sup>, 张 今<sup>1</sup>

(吉林大学 1. 分子酶学工程教育部重点实验室; 2. 超分子结构与材料教育部重点实验室, 吉林 长春 130021)

摘要: 用分子定向进化技术, 在酶活力和热稳定性双重选择压力下, 筛选到了一株  $K_{cat}/K_M$  是天然酶 47 倍的进化酶。用 FT-IR 方法, 测定了  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶及其进化酶的酰胺 I 带图谱, 定量估算了天然酶和进化酶的各种二级结构含量。天然酶中  $\beta$  折叠结构含量为 28.5%,  $\alpha$  螺旋结构含量为 33%, 这与圆二色谱测量  $\alpha$  螺旋结构为 33% 的结果有很好的统一, 剩余的残基形成不同类型的转角和无规结构, 其总含量为 38.5%。在进化酶中,  $\beta$  折叠结构含量为 26.8%,  $\alpha$  螺旋结构含量为 31%, 其它结构为不同类型的转角和无规结构, 含量为 42.2%。

关键词:  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶; 进化酶; FT-IR; 二级结构

中图分类号: Q617 文献标识码: A 文章编号: 1000-6737(2002)02-0193-04

$\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶 ( $\alpha$ -aspartyl dipeptidase) 能够专一地水解 N 端为 L-天门冬氨酸的  $\alpha$ -二肽<sup>[1]</sup>。利用其逆向催化反应, 该酶可用于专一催化合成二肽甜味剂的前体, 在酶法合成三种二肽甜味剂的前体中有重要的应用价值<sup>[2]</sup>。利用天门冬氨酰二肽酶合成二肽甜味剂, 不但可以避免化学合成带来的污染, 而且可以避免使用保护氨基酸, 大大提高了合成效率, 降低了成本。然而, 天然  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶存在酶活性低、稳定性差等缺点, 不利于工业生产的应用。因此, 获得高活性、高稳定性的  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶是我们所追求的目标。定向进化是一种新的蛋白质工程策略<sup>[3]</sup>, 是通过人工模拟自然进化的机制来实现“在试管中的进化”, 并在人为创造的选择压力下, 筛选出所需性质的进化酶。而对进化酶的结构分析更有助于我们深入了解该酶结构与功能的关系。我们利用分子定向进化技术, 在酶活力和热稳定性双重选择压力下, 筛选了一株酶活性和热稳定性都有较大提高的进化酶, 利用 FT-IR 方法, 通过去卷积和曲线拟合, 研究了天然酶和进化酶的结构差异, 进而解释了酶的结构与功能的关系。

### 1 材料和方法

#### 1.1 $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶及进化酶的分纯化

按文献 [4] 的方法进行, 得到了电泳纯的酶蛋白, 可用于结构研究。

#### 1.2 红外光谱的测定

在德国 Bruker 公司 IFS-66V 红外光谱仪上

进行。取天然酶和进化酶水溶液的冻干粉, 用无离子水和重水分别配制成浓度为 1.2 g/L 的待测液, 无离子水配制的样品立刻进行红外光谱的测定, 而用重水配制的样品则在 1 h 后进行红外吸收光谱的测定。另取天然酶和进化酶重水溶液的冻干粉, 用重水分别配制成浓度为 1.2 g/L 的待测液, 立刻进行红外吸收光谱的测定。通过差减各自的溶液得到了  $H_2O$  和  $D_2O$  中天然酶和进化酶的 FT-IR 光谱。所得到的图谱用仪器自带软件进行基线校正、二阶导数、去卷积和高斯曲线拟合处理, 计算出各种二级结构的含量。

### 2 结果与讨论

蛋白质的 FT-IR 光谱, 其酰胺 I 带主要位于 1600-1700  $cm^{-1}$  范围内。我们首先分析了天然酶和进化酶水溶液的冻干粉在  $D_2O$  中 D 与 H 的交换情况。通过设定  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶野生型和进化型酶在  $H_2O$  中的交换率为 0, 在  $D_2O$  中交换完全时的交换率为 100%, 我们以 1552  $cm^{-1}$  处的峰强与酰胺 I 带最大值相比, 可计算出酶溶于  $D_2O$  中 1 h, 天然酶大约还有 30% 的氢质子没有交换, 突变酶大约还有 20% 的氢质子没有交换。

$\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶野生型和进化型酶在

收稿日期: 2001-08-21

作者简介: 李正强, 1960 年生, 副教授, 博士,

电话: (0431) 8923189-2261,

E-mail: Lizhengqiang608@yahoo.com.cn.

H<sub>2</sub>O(图1和图2)的傅立叶去卷积谱可以清楚的看到六个谱带。而部分H/D交换 $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶野生型酶(图3)进化型酶(图4)和完全H/D交换的 $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶野生型酶(图5)进化型酶(图6)都多了一个带。对这六个谱图进行最小二乘法拟合,得到定量的结构信息。各个不同的酰胺I带的峰位和相对整体强度如表1。

根据文献的蛋白质FT-IR数据<sup>[5,6]</sup>,我们对 $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶野生型酶和进化型酶在D<sub>2</sub>O中的结构成分进行了归属,如表2所示。

许多蛋白质的红外谱图中,可以观测到多个低波数 $\beta$ 折叠成分谱。在D<sub>2</sub>O中 $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶的1623(1624)和1633 cm<sup>-1</sup>处的峰可以归属为两种不同反平行 $\beta$ 折叠结构的低波数成分。在水中的 $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶的酰胺I带谱图中的1626(1625)和1638(1637)cm<sup>-1</sup>和部分H/D交换的 $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶在1626(1627)和1640 cm<sup>-1</sup>处的峰也归属为 $\beta$ 结构。

1670-1690 cm<sup>-1</sup>之间也是蛋白质的红外活性区,1686 cm<sup>-1</sup>为转角结构;1676 cm<sup>-1</sup>可能为引起

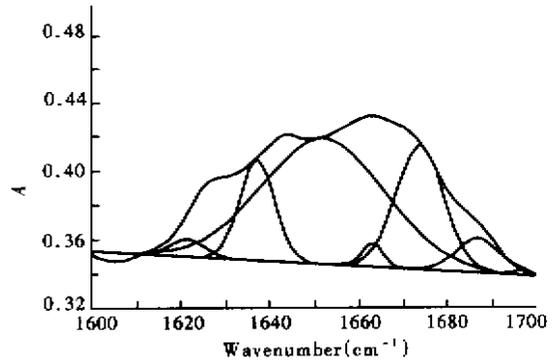
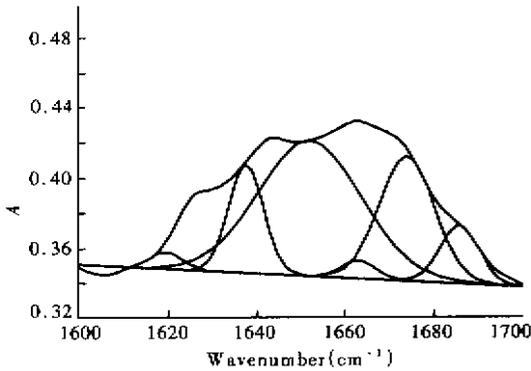


Fig.1 FT-IR spectra of native enzyme in H<sub>2</sub>O

Fig.2 FT-IR spectra of evolutionary enzyme in H<sub>2</sub>O

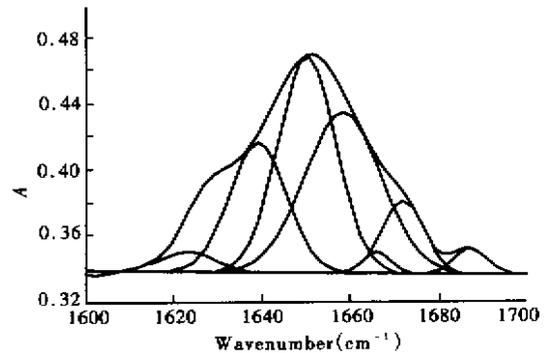
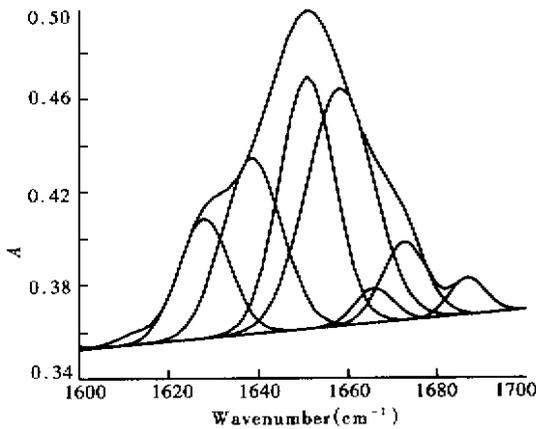


Fig.4 FT-IR spectra of evolutionary enzyme H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O exchanging 1 h

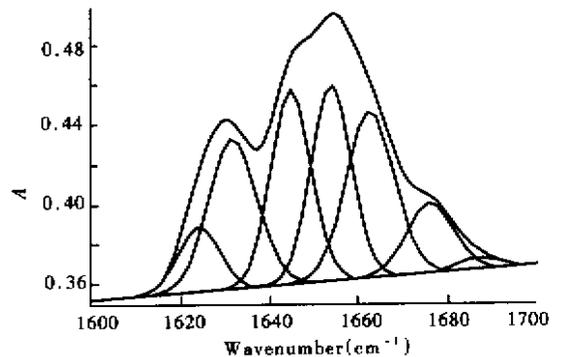
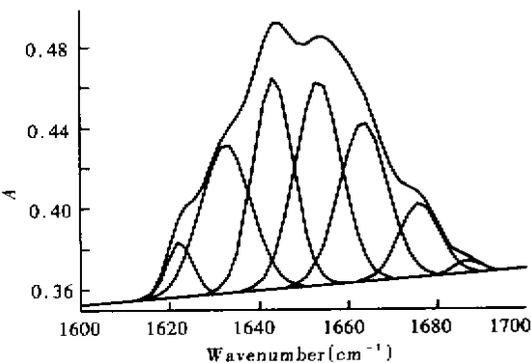


Fig.5 FT-IR spectra of native enzyme in D<sub>2</sub>O

Fig.6 FT-IR spectra of evolutionary enzyme in D<sub>2</sub>O

**Table 1** Peak position and relative intensity of  $\alpha$ -aspartyl dipeptidase (native and evolutionary types) in  $H_2O$ 、 $H_2O/D_2O$  exchanging for 1h and  $D_2O$ 

Native enzyme						Evolutional enzyme					
$H_2O$		$D_2O$ 1h		$D_2O$		$H_2O$		$D_2O$ 1h		$D_2O$	
Peak $cm^{-1}$	Area %	Peak $cm^{-1}$	Area %	Peak $cm^{-1}$	Area %	Peak $cm^{-1}$	Area %	Peak $cm^{-1}$	Area %	Peak $cm^{-1}$	Area %
1696	1.0			1687	1.0	1697	1.0			1687	1.0
1686	4.8	1687	4.0	1676	8.0	1687	5.0	1687	5.5	1676	9.0
1674	21	1673	15.0	1664	12.5	1674	20.0	1673	15.0	1663	13.2
1663	2.0	1666	2.0			1663	2.0	1666	2.5		
1652	55.0	1658	30.0	1654	33.0	1652	58.0	1659	31.0	1655	31.0
		1650	21.5	1644	25.0			1650	23.0	1645	28.0
1638	13.5	1640	24.0	1633	18.0	1637	10.0	1640	18.0	1632	14.0
1626	2.7	1628	3.5	1623	2.5	1625	4.0	1627	5.0	1624	3.8

**Table 2** Peak position and relative intensity and secondary structure of  $\alpha$ -aspartyl dipeptidase (native and evolved types) in  $D_2O$ 

Native enzyme		Evolutional enzyme		Peak types
Peak ( $cm^{-1}$ )	Area (%)	Peak ( $cm^{-1}$ )	Area (%)	
1687	1	1687	1	turn
1676	8	1676	9	$\beta$ -sheet
1664	12.5	1663	13.2	turn
1654	33	1655	31	$\alpha$ -helix
1644	25	1645	28	random coil
1633	18	1632	14	$\beta$ -sheet
1623	2.5	1624	3.8	$\beta$ -sheet

偶极变化的反平行  $\beta$  折叠结构。由表 1 可见, 在部分 H/D 交换谱图中,  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶  $1686\text{ cm}^{-1}$  处的相对强度为 4.0%, 在  $H_2O$  中  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶  $1686\text{ cm}^{-1}$  处的相对强度为 4.0%, 而  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶在  $D_2O$  中完全氘代后  $1687\text{ cm}^{-1}$  的强度仅为 1.0%, 这表明  $1687\text{ cm}^{-1}$  所代表的转角成分处在  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶的表面, 易于发生变化。为了计算整个  $\beta$  折叠成分, 我们把在氘代谱中  $1676\text{ cm}^{-1}$  的峰, 认为与  $1624$  和  $1633\text{ cm}^{-1}$  一样是  $\beta$  折叠成分, 所以由表 2, 我们计算得到野生型和进化型  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶中  $\beta$ -折叠结构含量分别为 28.5% 和 26.8%。

我们对酰胺 I 带在  $1664-1640\text{ cm}^{-1}$  之间的峰进行了指认。在  $H_2O$  中的酶蛋白,  $\alpha$  螺旋结构和无规结构相互交叠, 不能进行详细的结构类型指认, 但我们可知酰胺 I 带在  $1652\text{ cm}^{-1}$  处的峰是  $\alpha$  螺旋结构和无规卷曲结构的总和。而在  $D_2O$  中的酶,  $1654(1655)\text{ cm}^{-1}$  处的峰被认为是  $\alpha$  螺旋结构, 在  $1644(1645)\text{ cm}^{-1}$  的峰认为是无规结构。比较野生型和进化型的  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶在  $1654(1655)$  和

$1644(1645)\text{ cm}^{-1}$  处的二个峰, 我们可知野生酶的  $\alpha$  螺旋结构含量 (33%) 比进化酶的  $\alpha$  螺旋结构含量 (31%) 高 2%, 而进化酶无规卷曲含量 (28%) 比野生酶的无规卷曲含量 (25%) 高 3%。

我们对  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶的进化酶的 DNA 序列进行了分析, 与野生型酶相比, Val110 变成了 Gly, Glu224 变成了 Asp。在蛋白质的二级结构中, 天冬氨酸和甘氨酸易出现在各种转角和无规结构中。从我们在  $D_2O$  中所测定的进化酶和野生酶的各种二级结构相对含量的变化 (野生型酶转角和无规结构含量占 38.5%; 进化酶转角和无规结构含量占 42.2%), 我们有理由推测 Val110 变成 Gly, Glu224 变成 Asp 后, 使得野生酶的部分  $\alpha$  螺旋结构和  $\beta$  折叠结构变成了进化酶中的转角和无规结构, 这使得进化酶的结构更具有柔性, 更容易接近底物。野生型的  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶主要是靠空间结构而不是靠电荷相互作用选择底物, 因此空间结构对底物与活性中心的匹配有相当重要的意义。我们认为这两个位点的突变发生在活性中心附近, 从而使酶活性中心具有更大的柔性, 对底物的催化作用更好。因而  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶的进化酶比野

生酶应有更高活性。酶动力学研究表明进化酶的  $K_{cat}/K_M$  是天然酶的 47 倍,从而证明了结构变化引起酶活性的提高。

综合以上分析,我们可得出结论:野生型  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶的二级结构中, $\beta$  折叠结构含量为 28.5%, $\alpha$  螺旋结构含量为 33%,各种转角和无规结构含量为 38.5%;进化型酶的  $\alpha$  螺旋结构含量为 31%, $\beta$  折叠结构含量为 26.8%,不同类型的转角和无规结构含量为 42.2%;进化型酶中转角结构和无规结构增加,酶分子的柔性变大,活性明显提高。

#### 参考文献:

[1] Carter TH, Miller CG. Aspartate-specific peptidases in

Salmonella typhimurium: mutants deficient in peptidase E[J]. *J Bacteriol*, 1984, 159: 453-459.

[2] Zhang H, Zhang J, Wang X. Biochemical characterization of alpha-aspartyl dipeptidase. cloning and expression of its gene[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 864: 621-625.

[3] 张红缨, 孔祥铎, 张今. 蛋白质工程的新策略—酶的体外定向进化[J]. *科学通报*, 1999, 44: 1121-1127.

[4] 黄品伟.  $\alpha$ -天门冬氨酰二肽酶的定向进化及谱学研究[D]. 硕士学位论文, 吉林大学, 2001.

[5] Dong AC, Huang P, Canghey WS. Protein secondary structure in water from second-derivative amide I infrared spectra[J]. *Biochemistry*, 1990, 29: 3303-3308.

[6] Surewicz WK, Mantsch HH. New-insight into protein secondary structure from resolution-enhance infrared spectra[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1988, 952: 115-130.

## FT-IR STUDIES OF $\alpha$ -ASPARTYL DIPEPTIDASE AND ITS EVOLUTIONAL ENZYME

LI Zheng-qiang<sup>1</sup>, HUANG Pin-wei<sup>2</sup>, TAO Yan-chun<sup>2</sup>, LIU Wei<sup>1</sup>, LU Ming<sup>1</sup>, ZHANG Jin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering, Jilin University, Changchun 130021, China;

2. Key Laboratory for Supermolecular Structure and Materials, Jilin University, Changchun 130021, China)

**Abstract:** Under double screen pressure of specific activity and thermo stability, an evolved  $\alpha$ -aspartyl dipeptidase, with 47 folds higher activity than its wild type ancestor, was obtained. By using FT-IR, the secondary structure of  $\alpha$ -aspartyl dipeptidase and its evolutionary enzyme were studied. It is found that  $\alpha$ -helix structure is 31%,  $\beta$ -sheet content is 26.8% while turn and random coil component are 42.2% in the evolutionary type of  $\alpha$ -aspartyl dipeptidase. In the wild type enzyme,  $\alpha$ -helix structure is 33%,  $\beta$ -sheet content is 28.5% and turn and random coil are 38.5%. These structure changes lead to arise the flexibility of evolutionary type and adaptability to substrate.

**Key Words:**  $\alpha$ -aspartyl dipeptidase; Evolutional enzyme; FT-IR; Secondary structure