

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2014.03.04

# 枯草杆菌蛋白酶嗜热性改造单突变效果评判方法研究

夏翹,马帅,王勤,李晓琴\*

(北京工业大学生命科学与生物工程学院,北京 100124)

**摘要:**对蛋白质进行嗜热性改造是蛋白质工程的主要问题之一,残基突变方法被广泛运用于其中。本文以枯草杆菌蛋白酶(SUBTILISIN BPN')为研究对象,旨在建立评判嗜热性改造效果的方法,选取了有可靠实验资料的9个突变点,运用分子动力学模拟方法,在四种不同模拟条件下,对其中的6个突变体和1个野生型蛋白进行了多种参量的对比分析,提取4个特征有效参量,建立了蛋白酶嗜热性改造单突变效果评判方法;利用该方法对其它3个突变效果进行评判,评判结果与实验资料完全吻合,证明该方法可用于枯草杆菌蛋白酶嗜热性改造单突变效果的评判。

**关键词:**枯草杆菌蛋白酶;热稳定性改造;残基突变;分子动力学模拟;评判方法

**中图分类号:**Q61 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2014)-03-171-08

## The evaluation of SUBTILISIN BPN's thermostability transformation effect on a single mutation

XIA Xuan, MA Shuai, WANG Qin, LI Xiaoqin\*

(School of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

**Abstract:** The modification of protein thermostability is one of the major topics of protein engineering, where the strategy of residue mutation is widely used. This article aims to establish a method of evaluating the effect of the mutation results. In this article, we chose Subtilisin BPN' as our research object and picked its 9 point mutations as our research samples. By using molecular dynamics simulation method in 4 different simulated conditions, we compared and analysed some parameters between the wild and 6 mutated proteins, collected 4 parameters of them as the effective parameters, and established the evaluation method of SUBTILISIN BPN's thermostability transformation effect on a single mutation. We used this method to evaluate the other three mutations' effects, and found the results were completely coincided with the existing data, suggesting that the method can be used to evaluate the SUBTILISIN BPN's thermostability transformation effect on a single mutation.

**Keywords:** SUBTILISIN BPN'; Thermostability modification; Residue mutation; Molecular dynamics simulation; Evaluation method

蛋白酶是一种天然的生物催化剂,具有较高的催化效率和底物特异性,被广泛应用于工业、食品业、医药业及人们的日常生活中<sup>[1-2]</sup>。蛋白酶发挥其高活性和高催化性是需要特定的条件作为保障的,如适当的PH值、温度、离子浓度等<sup>[3]</sup>。其中,温度这一因素尤为重要。蛋白酶只有在一定的温度范围内才能保持较高的活性,超出了这个温度范围,酶

的活性就会降低甚至消失,严重影响它们的实际应用。因此,了解蛋白酶的热稳定机制进而提高蛋白酶的热稳定性<sup>[4]</sup>,对扩大酶的应用范围与探究蛋白质结构和功能关系均具有非常重要的意义。

蛋白质的热稳定性是由多种作用共同参与的,不同的蛋白质可能有不同的耐热机制,在这些作用中比较重要的有:氨基酸组成、氢键、盐桥、疏水作

收稿日期:2014-04-04;修回日期:2014-04-23.

基金项目:北京自然科学基金(4112010)资助。

作者简介:夏翹,女,硕士,研究方向:生物信息学;E-mail:xiaxuan2015@sina.com.

\*通信作者:李晓琴,女,教授,研究方向:生物信息学;E-mail:lxq0811@bjut.edu.cn.

用、包埋效应、环和 N、C 端的稳定性等<sup>[5]</sup>。目前,提高枯草杆菌蛋白酶热稳定性的方法主要有两种,一种是改变酶的催化环境,如调节 PH 值、增加有机溶剂、底物保护等,这种方法不能从本质上改变枯草杆菌蛋白酶的耐热性,因此在工业应用上会受到很多的限制;另一种是对蛋白酶进行残基突变,在蛋白质的薄弱环节引入有利残基,加强局部或整体的彼此相互作用,从而增加蛋白的热稳定性。

残基突变是提高蛋白酶热稳定性的有效方法,如何评判残基突变对蛋白酶热稳定性的影响?目前,对蛋白酶嗜热性突变效果的判定主要有两种方法,一种是生物实验的方法<sup>[6]</sup>,即将突变成功的蛋白通过蛋白质合成技术制造出来,然后通过逐渐升温来验证其突变效果的优劣。该方法有较高准确性与可靠性,但是会耗费大量的时间和人力。另一种是生物信息学计算的方法<sup>[7-9]</sup>,即计算  $\Delta\Delta G_u$  值来评定嗜热性突变的效果。 $\Delta G_u$  (蛋白质解折叠自由能)是蛋白质热动力学参数中最重要的参数,也是反应蛋白质热稳定性的一个通用指标,因此多数方法都是利用生物信息学计算的方法来模拟突变前后  $\Delta G_u$  的变化,即  $\Delta\Delta G_u$  (式 1)。当  $\Delta\Delta G_u > 0$  时,表明该突变对蛋白质的热稳定性有正效应(即嗜热性突变效果好),反之有负效应(即嗜热性突变效果差)。

$$\Delta\Delta G_u = \Delta G(\text{mutant}) - \Delta G(\text{wild})。 \quad (1)$$

2005 年, Korkegian 等直接从蛋白质结构入手预测蛋白质的  $\Delta G_u$ , 该方法主要是利用一些经验数据或方法来分析蛋白质突变前后其结构或能量变化,来推断其  $\Delta G_u$  的变化<sup>[10]</sup>。2006 年, Saraboji 等利用统计数据预测蛋白质的  $\Delta G_u$ , 即用一些统计学的手段对突变体数据进行分析,得到一些统计学的规律,以此来判定突变前后的  $\Delta\Delta G_u$ <sup>[11]</sup>。2008 年, Capriotti 等提出机器学习方法,即利用蛋白质的序列或结构特征直接从数据入手,建立计算模型来预测  $\Delta\Delta G_u$ <sup>[12]</sup>。该方法较生物实验方法节约了时间和人力,但是其仍具有计算复杂、计算量大的缺点。

分子动力学(MD)模拟是研究蛋白质动力学性质进而揭示其生物学功能的重要工具,利用 MD 模拟结果提取有效参数、建立蛋白酶嗜热性改造突变效果评判方法是本文研究的重点。本文以研究资料颇为丰富的枯草杆菌蛋白酶 BPN' 为研究对象,选取实验上已证明的能提高其热稳定性的突变体来进行研究,运用分子动力学模拟的方法,通过对突变前后蛋白质多种能量参数的对比分析,提取了多个有效参数,并进一步建立了枯草杆菌蛋白酶嗜热性改造单突变效果评判方法。

## 1 材料

### 1.1 枯草杆菌蛋白酶

枯草杆菌蛋白酶是芽孢杆菌属细菌所分泌的胞外碱性蛋白酶,属丝氨酸蛋白水解酶类<sup>[13-16]</sup>。它催化水解蛋白质为氨基酸,在有机溶剂中也能催化多肽的合成。常见的枯草杆菌蛋白酶有 BPN'、Carlsberg、E、Savinase、BL 等,它们的一级氨基酸序列非常类似,晶体结构也基本相似<sup>[17]</sup>。枯草杆菌蛋白酶 BPN' 与 E 的区别是 43 个氨基酸残基发生替换, Carlsberg 与 E 在序列上的区别是 89 个氨基酸残基替换再加上第 56 位残基缺失, BL 与 BPN' 的区别是在 275 个氨基酸残基上有 103 个残基替换再加上 4 个残基(160~163) 缺失。

枯草杆菌蛋白酶具有重要的应用价值,被广泛应用于洗涤剂、制革及丝绸等工业;此蛋白的结构与功能研究已有较长的历史,其蛋白结构、生化特性、催化机理等均有了较清晰的阐释。目前,在该酶的嗜热性改造方面有丰富的突变资料可供参考;另外,解析度为 1.8 Å 的该蛋白酶的晶体结构数据可以从 PDB 数据库中获取。基于以上原因,我们将枯草杆菌蛋白酶作为研究对象。

以枯草杆菌蛋白酶 BPN' 作为研究对象,它共有 275 个残基,空间结构如图 1 所示。

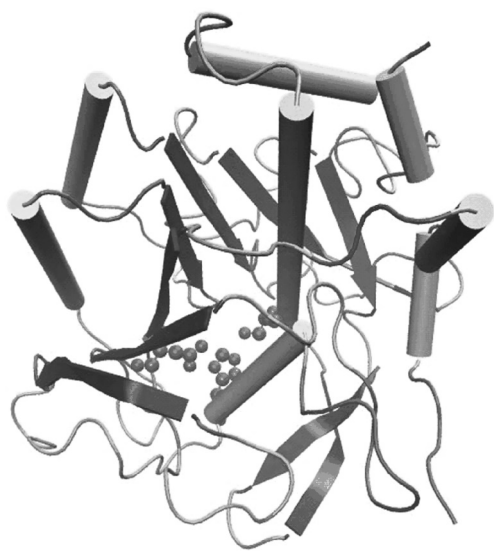


图 1 枯草杆菌蛋白酶空间结构

Fig.1 Spatial structure of Subtilisin BPN'

图中桶状结构代表  $\alpha$  螺旋, 固形箭头代表  $\beta$  折叠, 小球代表催化三联体( Asp<sub>32</sub>、His<sub>64</sub> 和 Ser<sub>221</sub> )。图中可见  $\beta$  折叠位于蛋白质内部形成疏水核心,  $\alpha$  螺

旋位于结构表面,围绕在  $\beta$  折叠周围,整个蛋白质呈一个球状。

## 1.2 枯草杆菌蛋白酶突变位点的选取

选取6个实验上已证明的能提高蛋白质热稳定性的突变点作为研究对象,它们分别为: S161C、G166R<sup>[18]</sup>、G169A<sup>[19]</sup>、S188P<sup>[20]</sup>、K213R<sup>[21]</sup> 以及 P239R<sup>[22]</sup>。表1为野生型枯草杆菌蛋白酶 BPN' 及其6个突变体的  $T_m$  值及 60 °C 下的半衰期时间,这两个值越大说明结构的热稳定性越强。由表中数据可以看出,六个突变体的热稳定性均强于野生型。表中 Wild 代表野生型枯草杆菌蛋白酶。

## 2 方法

### 2.1 枯草杆菌蛋白酶突变体的同源建模

从 PDB 数据库中下载解析度为 1.8 Å 的枯草杆菌蛋白酶 BPN' 晶体结构 (PDB: 2SIC), 将此结构的 E 链作为野生型样本。利用 SWISS-MODEL 进行同源建模, 得到表 1 所列的 6 个突变体的结构。

表 1 枯草杆菌蛋白酶及其突变体的信息统计

Table 1 Information statistics of subtilisin BPN' and its mutants

	Wild	S161C	G166R	G169A	S188P	K213R	P239R
$T_m/^\circ\text{C}$	58.5	/	62.1	59.6	60.5	/	/
Half life/min <sup>60°C</sup>	18	21.5	/	/	/	30	26.5

利用野生型及 6 个突变体的结构信息, 分别计算主链结构的二面角, 绘制图 2 所示的拉氏构象图。图 A 为野生型蛋白的拉氏构象图, 图 B、图 C、图 D、图 E、图 F、图 G 分别为 S161C、G166R、G169A、S188P、K213R、P239R 突变体的拉氏构象图。图中黑色区域表示构象允许区域, 在该区域内的任何成对二面角所规定的构象都是立体化学所允许的。灰色区域表示不完全允许区, 表示在这个区域内的二面角所规定的主链构象虽然是立体化学可允许的, 但是不够稳定, 白色区域是不允许区域。在图中可以看到, 构象角绝大部分都处于构象允许区域内, 说明这些突变体的构象均处于合理的状态。

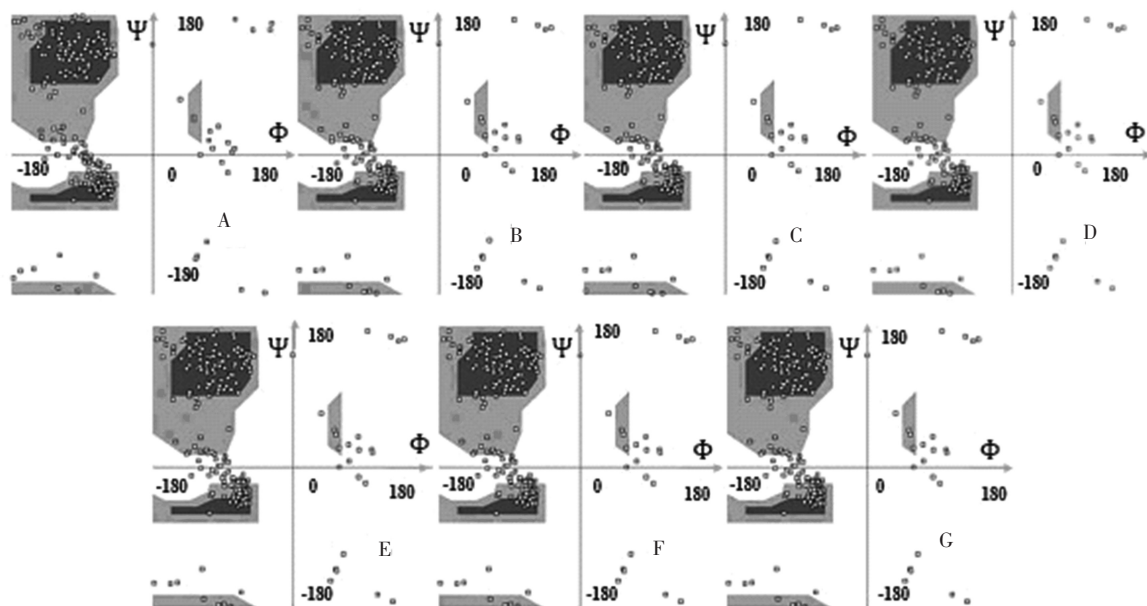


图 2 枯草杆菌蛋白酶及其突变体所对应的拉氏构象图

Fig.2 The ramachandran figure of subtilisin BPN' and its mutants

### 2.2 分子动力学模拟实验的设计

使用 NAMD 软件对野生型和 6 个突变体蛋白进行分子动力学模拟, 选用 CHARMM27 全原子力场。预处理过程中, 首先删掉晶体中的氢原子, 再使用 VMD 软件自带的 psfgen 程序包补足氢原子, 测得该晶体结构的净电荷为零; 然后给该结构添加一个厚度为 10 Å 的 TIP3P 型水分子层, 最终得到的水盒子的尺寸是 65 Å × 66 Å × 68 Å。

预平衡过程中, 选用 NPT 系综。在 1 个标准大气压下, 使用 SHAKE 算法约束氢键键长, 截断半径为 12 Å, 非键相互作用在 14 Å 处截断。对 1 个野生型及 6 个突变体共进行了以下 4 次分子动力学模拟过程:

(1) 温度恒定为 370 K, 步长为 2 fs/step, 运行 100 000 步, 分子动力学模拟时间为 0.2 ns, 此过程命名为 370 K\_0.2 ns;

(2) 温度恒定为 370 K, 步长为 2 fs/step, 运行 1 000 000 步, 分子动力学模拟时间为 2 ns, 此过程命名为 370 K\_2 ns;

(3) 温度恒定为 370 K, 步长为 1 fs/step, 运行 100 000 步, 分子动力学模拟时间为 0.1 ns, 此过程命名为 370 K\_0.1 ns;

(4) 初始温度为 300 K, 步长为 2 fs/step, 运行 100 000 步, 每 2 000 步升高 1 K, 终止温度为 350 K, 分子动力学模拟时间为 0.2 ns, 此过程命名为 300 K\_0.2 ns。

其中 370K\_0.2ns 作为标准组, 其他 3 组作为对照组。

### 2.3 基于模拟结果的参数计算

每个野生型及其突变体分子动力学模拟完成后均输出一个“.log”日志文件, 包含了模拟过程中的压力、温度以及本实验中需要用到能量等信息。配置文件中设置每 1 000 步(即 2 ps)输出一次能量信息, 而我们需要计算的是在模拟的整个过程中或者某一特定时间段内的平均能量, 因此具体方法如下: 利用 VMD 软件的能量计算脚本 namdstats.tcl, 结

合输出的.log 日志文件, 提取蛋白体系的以下平均能量信息: BOND(键能)、ANGLE(键角能)、DIHED(二面角能)、ELECT(静电能)、VDW(范德华力能)、KINETIC(动能)。

## 3 结果与分析

### 3.1 模拟结果

依照上述方法, 我们共得到 4 组动力学模拟后的能量结果(见表 2~表 5)。每组表格中上半部分为提取的能量值, 下半部分为每个突变体与野生型能量的差值以及能量的变化趋势。

首先, 以温度为 1 个标准大气压下温度为 370 K、时间为 0.2 ns 的模拟作为标准组。表 2 是该组的模拟能量结果, 我们提取的是每个结构从模拟第一步到最后一步的能量平均值。由表中数据可以看出, 6 个突变体与野生型酶相比, 每种平均能量值均出现了相同的变化趋势, 即 BOND 增大、ANGLE 增大、DIHED 减小、ELECT 减小、VDW 增大、KINETIC 增大。

表 2 370 K\_0.2 ns 模拟平均能量(kcal/mol)

Table 2 Average energy data simulated-370 K\_0.2 ns (kcal/mol)

	Wild	S161C	G166R	G169A	S188P	K213R	P239R
BOND	3 631.02	3 657.82	3 651.54	3 642.59	3 645.81	3 672.87	3 644.56
ANGLE	2 933.49	2 949.9	2 951.81	2 946.09	2 954.84	2 965.67	2 963.89
DIHED	725.97	704.65	720.19	714.47	709.15	710.07	701.69
ELECT	-117 436.17	-118 094.58	-118 138.68	-117 743.47	-117 795.77	-118 766.8	-118 328.82
VDW	490 288.28	571 651.11	576 507.12	573 173.32	573 218.7	577 288.55	3 270 080.17
KINETIC	400.14	400.85	401.19	400.91	401.26	403.03	404.67
$\Delta$ BOND	大于 0	26.8	20.52	11.57	14.79	41.85	13.54
$\Delta$ ANGLE	大于 0	16.41	18.32	12.6	21.35	32.18	30.4
$\Delta$ DIHED	小于 0	-19.52	-5.78	-11.5	-16.82	-15.9	-24.28
$\Delta$ ELECT	小于 0	-658.41	-702.51	-307.3	-359.6	-1 330.63	-892.65
$\Delta$ VDW	大于 0	81 362.83	86 218.84	82 855.04	82 930.42	87 000.27	2 779 791.89
$\Delta$ KINETIC	大于 0	0.71	1.05	0.77	1.12	2.89	4.53

标准组的模拟温度为 370 K, 模拟时间为 0.2 ns, 这样高温、短时间的模拟并没有使野生型及突变体动力学模拟达到平衡, 为了检验非平衡态的能量统计结果的可靠性, 我们在标准组 370 K\_0.2 ns 模拟的基础上进行了较长时间的模拟, 温度不变, 模拟时间增加为标准组的 10 倍, 即 2 ns。图 3 为该模拟下野生型及其突变体的 RMSD 曲线图。

可以看到, 在 1.0 ns~1.5 ns 的时间段, 7 个结构的 RMSD 曲线均呈现平稳状态, 说明在此时间段内达到了平衡状态。因此我们提取了这段时间内的能量平均值, 并计算突变体与野生型的能量差值(见表 3)。可以看到, 表中突变体的 6 种平均能量值有着与标准组相同的变化趋势。



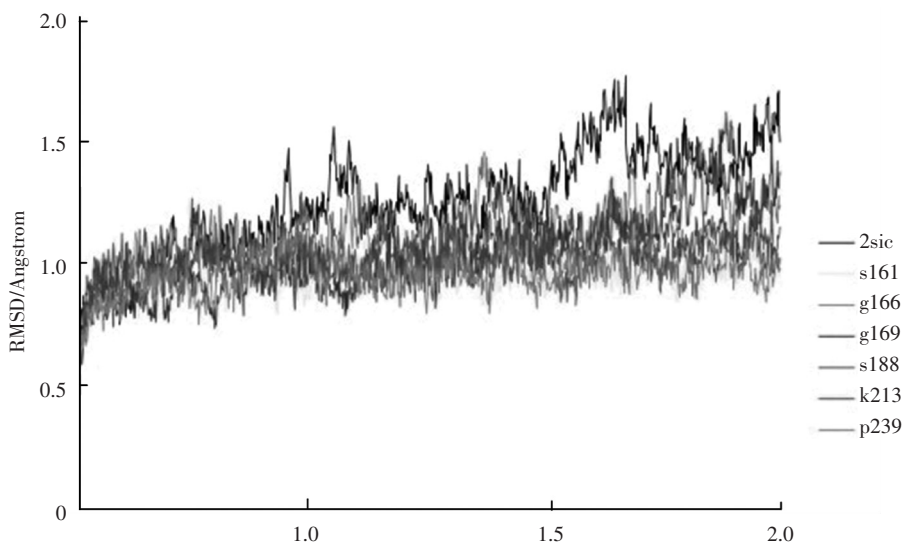


图3 枯草杆菌蛋白及其突变体 2ns 分子动力学模拟过程中的 RMSD 曲线

Fig.3 The RMSD curves of Subtilisin BPN' and its mutants in 2ns in the molecular dynamic simulation

表3 370 K\_2 ns 模拟平均能量差值 (kcal/mol)

Table 3 D-value of average energy data simulated-370 K\_2 ns (kcal/mol)

		S161C	G166R	G169A	S188P	K213R	P239R
$\Delta$ BOND	大于0	1.29	6.40	1.64	3.46	1.77	2.61
$\Delta$ ANGLE	大于0	0.69	9.56	0.57	23.14	7.14	10.42
$\Delta$ DIHED	小于0	-16.28	-18.01	-11.33	-19.00	-6.31	-17.47
$\Delta$ ELECT	小于0	-174.54	-442.08	-179.24	-211.91	-886.69	-1 631.37
$\Delta$ VDW	大于0	17.67	33.01	19.61	34.84	70.02	151.19
$\Delta$ KINETIC	大于0	29.51	39.27	28.69	31.16	124.09	239.71

从表2、表3的结果看,模拟时间的长短以及体系是否平衡对能量变化趋势并没有影响,为进一步检验模拟时间对结果的影响,我们在温度不变的情

况下,进行了更短时间的模拟,模拟时间缩减为标准组的一半,即0.1 ns,其能量差值见表4。表4中所有能量的变化都较标准组呈现相同的趋势。

表4 370 K\_0.1 ns 模拟平均能量差值 (kcal/mol)

Table 4 D-value of average energy data simulated-370 K\_0.1 ns (kcal/mol)

		S161C	G166R	G169A	S188P	K213R	P239R
$\Delta$ BOND	大于0	28.24	22.54	12.99	9.92	42.66	35.94
$\Delta$ ANGLE	大于0	16.83	17.88	12.6	16.95	30.76	32.34
$\Delta$ DIHED	小于0	-20.71	-5.23	-10.84	-16.16	-15.68	-22.89
$\Delta$ ELECT	小于0	-709.11	-761.07	-357.57	-286.86	-1 375.41	-1 398.69
$\Delta$ VDW	大于0	81 380.1	86 241.45	82 899.86	82 898.0	87 023.74	<b>2 780 035.63</b>
$\Delta$ KINETIC	大于0	1.14	1.4	0.28	0.26	1.77	4.34

最后,我们检验了温度对模拟结果的影响。在标准组的基础上我们做了一组温度均匀变化的模拟 300 K\_0.2 ns,时间同标准组设置一样,模拟过程中将温度从 300 K 均匀升高到 350 K。能量差值结果

见表5。由表中数据可以看出,在温度变化的模拟条件下突变体的平均能量还是出现了与标准组一样的变化趋势。

表 5 300 K\_0.2 ns 模拟平均能量差值 (kcal/mol)

Table 5 D-value of average energy data simulated-300 K\_0.2 ns (kcal/mol)

		S161C	G166R	G169A	S188P	K213R	P239R
ΔBOND	大于 0	26.50	22.53	11.96	15.07	40.72	<u>-18.33</u>
ΔANGLE	大于 0	12.99	16.37	9.58	17.27	27.75	16.70
ΔDIHED	小于 0	-21.62	-6.17	-12.20	-9.34	-16.68	-24.37
ΔELECT	小于 0	-645.23	-754.77	-314.13	-369.21	-1 308.89	-141.11
ΔVDW	大于 0	81 373.66	86 255.29	82 898.83	82 924.26	86 962.73	<u>2 779 595.18</u>
ΔKINETIC	大于 0	0.48	0.34	1.05	1.35	1.91	3.81

### 3.2 结果分析

从上面 4 个表可以看出,突变体与野生型酶相比,均出现了 BOND 增大、ANGLE 增大、DIHED 减小、ELECT 减小、VDW 增大、KINETIC 增大的趋势。研究表明,分子柔性的降低会带来嗜热性的增强<sup>[23]</sup>,因此突变体的分子柔性均低于野生型,正是由于柔性降低、刚性增强,所以会使得 BOND(键能)增大、ANGLE(键角能)增大以及 DIHED(二面角能)减小;而所有突变体的 ELECT(静电能)都比野生型小,这与以前的实验中所说引入带电残基增强蛋白质热稳定性是相一致的,静电能越小稳定性越强<sup>[24]</sup>;而 VDW(范德华能)增大说明分子的极性也增大了,表明蛋白质的嗜热性与分子极性也密切相关;突变体的 KINETIC(动能)虽然比野生型都有所增大,但变化范围很小,说明这个能量可能与热稳定性的关系并不大,但我们仍暂时保留这一项,等待后续实验进行进一步验证。

另外可以看到表中有一些数据与其他数据相差较大,我们将这些数据称为极端数据,并用特殊格式将这些极端数据标记出来。除去这些极端数据,我们得到以下突变体与野生型相比的能量变化范围(单位: kcal/mol): ΔBOND 为 [ 2. 66, 8. 57 ], ΔANGLE 为 [ 3. 32, 32. 18 ], ΔDIHED 为 [ -16. 68, -2.66 ], ΔELECT 为 [ -1 375.41, -286.86 ], ΔVDW 为 [ 81 362. 83, 87 027. 74 ], ΔKINETIC 为 [ 0. 26, 2.89 ]。

为进一步分析能量变化与蛋白嗜热性的关系,我们利用 SPSS 分析软件分别对以上 4 组模拟中每个突变体的 6 种能量差值与其对应的 T<sub>m</sub> 或半衰期进行了斯皮尔曼(Spearman)相关性分析,99%置信度下的双侧检验的计算结果见表 6,其中表的上半部分是 G166R、G169A、S188P 的 T<sub>m</sub> 值与各个能量差值的绝对值之间的相关系数,下表下半部分是 S161C、K213R、P239R 的 Half life 与各个能量差值之间的相关系数。相关系数越大表示相关性越显

著,正数表示正相关,负数表示负相关。

表 6 能量差值与 T<sub>m</sub>\Half life 的相关系数Table 6 The correlation coefficient between the energy difference and T<sub>m</sub>\Half life

	ΔBOND	ΔANGLE	ΔDIHED	ΔELECT	ΔVDW	ΔKINETIC
370 K_0.2 ns	1.0	0.5	-0.5	1.0	1.0	0.5
370 K_2 ns	1.0	0.5	0.5	1.0	0.5	1.0
370 K_0.1 ns	0.5	1.0	-0.5	0.5	0.5	0.5
300 K_0.2 ns	1.0	0.5	-1.0	1.0	1.0	-0.5
370 K_0.2 ns	0.5	1.0	-0.5	1.0	0.5	0.5
370 K_2 ns	0.5	0.5	-0.5	0.5	0.5	0.5
370 K_0.1 ns	1.0	0.5	-0.5	0.5	0.5	0.5
300 K_0.2 ns	0.5	1.0	-0.5	0.5	0.5	0.5

从表 6 可以看出:ΔBOND、ΔELECT 与突变体的 T<sub>m</sub> 相关性最强,3 组模拟时间大于 0.1 ns 的相关系数均为 1,同时与突变体的半衰期也分别有一组相关系数为 1,总体平均值为 0.75。说明 ΔBOND、ΔELECT 对 T<sub>m</sub> 及半衰期的变化最为敏感;ΔANGLE 略低于 ΔBOND、ΔELECT 与突变体的 T<sub>m</sub> 及半衰期的相关性,相关系数为 1 的共有 3 组,平均为 0.687 5;ΔVDW 与突变体的 T<sub>m</sub> 及半衰期的相关系数均为正值,有两组模拟时间大于 0.1 ns 的相关系数为 1,总体均值为 0.5,相关性一般;而 ΔDIHED 和 ΔKINETIC 与突变体的 T<sub>m</sub> 及半衰期的相关性不稳定,说明 ΔDIHED 和 ΔKINETIC 对 T<sub>m</sub> 及半衰期的变化趋势不敏感。

### 3.3 判定方法

从以上分析可以看出,在 4 组不同条件的模拟过程中,突变体的 6 个平均能量值与野生型相比均出现了相同的变化趋势,结合相关性的计算结果,ΔBOND、ΔELECT、ΔVDW、ΔANGLE、ΔDIHED、ΔKINETIC 可以作为评判枯草杆菌蛋白酶嗜热性改造单突变效果评判的 6 个有效参数,其中 ΔBOND、ΔELECT、ΔANGLE、ΔVDW 为特征有效参数,并采用 370 K\_0.2 ns 模拟结果来提取上述参数。

枯草杆菌蛋白酶嗜热性改造单突变效果评判方法为:以标准组 370 K\_0.2 ns 的模拟条件参数为准,分别对需要判定嗜热改造效果的突变体及野生型进行分子动力学模拟,利用模拟结果计算上述 4 个特征有效参数,如果  $\Delta\text{BOND}$ 、 $\Delta\text{VDW}$ 、 $\Delta\text{ANGLE}$  大于 0,同时  $\Delta\text{ELECT}$  小于 0,则可以判断该枯草杆菌蛋白酶突变体嗜热性提高,为有效突变,否则为无效突变。

## 4 检验与讨论

### 4.1 枯草杆菌蛋白酶其他突变点检验

我们从 Protherm 数据库中选定了 2 个实验上已经获取的枯草杆菌蛋白酶嗜热突变体作为检测样本,它们分别是 Q206C 和 N218S。野生型及 2 个突变体在 ProTherm 数据库的记载见表 7。表中 2 个突变体的  $T_m$  值都大于野生型,说明突变体的嗜热性要强于野生型。另外我们还选取了一个稳定性小于野生型的突变体 P239G,实验测得此突变体在 60 °C 时的半衰期比野生型减少了 8.5 min。

表 7 枯草杆菌蛋白酶及其嗜热突变体在 Protherm 数据库中的记录

Table 7 Records of subtilisin BPN' and its mutants in protherm

Entry	Protein	Mutation	$T_m$	pH	Measure	Mesthod
2525	Subtilisin BPN'	WILD	58.50	8	DSC	Thermal
2525	Subtilisin BPN'	Q206C	63.20	8	DSC	Thermal
2530	Subtilisin BPN'	N218S	62.50	8	DSC	Thermal

注:Entry 是该蛋白在 ProTherm 数据库中的标识,DSC 表示测定的方法是示差扫描量热法。

Notes: Entry is the protein identified in the ProTherm Database, DSC is short for differential scanning calorimetry.

根据 3.3 节提出的判定原则,我们对以上选取的两个有效突变体、一个无效突变体以及野生型进行分子动力学模拟,野生型命名为 Wild。模拟结果见表 8 所示。

表 8 检验样本模拟的平均能量

Table 8 Average energy data simulated-test samples

	Wild	Q206C	N218S	P239G
BOND	3 630.29	3 643.25	3 644.41	3 629.31
ANGLE	2 934.32	2 935.15	2 935.03	2 841.47
ELECT	-117 407.45	-117 678.21	-117 795.68	-117 399.86
VDW	573 104.33	576 431.71	576 458.31	490 270.61
$\Delta\text{BOND}$	大于 0 小于 0	12.96	14.12	-0.98
$\Delta\text{ANGLE}$	大于 0 小于 0	0.83	0.71	-92.85
$\Delta\text{ELECT}$	小于 0 大于 0	-270.76	-388.23	7.59
$\Delta\text{VDW}$	大于 0 小于 0	3 327.38	3 353.98	-82 833.72

表 8 下半部分第一列变化趋势为有效突变体 Q206C 及 N218S 的能量变化结果,第二列为无效突变体 P239G 的结果。从数据可以看出,Q206C 和 N218S 这两个突变体的特征有效参数的取值满足有效突变条件,并且能量变化的数值也处于上文中所提到的范围之内,可以判断 Q206C 和 N218S 为有效突变;而 P239G 的能量变化趋势正好与之相反,为无效突变。

### 4.2 讨论

本文以枯草杆菌蛋白酶 BPN' 为研究对象,利用 4 组不同条件分子动力学模拟结果,对其及其嗜热突变体的能量变化趋势进行对比分析,计算并提取了 6 个有效参数,并结合相关性分析结果,确定了 4 个特征有效参数,建立了判定枯草杆菌蛋白酶 BPN' 嗜热性突变效果的理论方法。研究发现,不同的模拟温度与时间对突变前后各个能量的变化趋势并没有影响。而且在较短的模拟时间条件下,即模拟没有达到平衡的状态下,有效参数及特征有效参数具有相同的变化趋势。本文提出的对枯草杆菌蛋白酶嗜热效果改造的判定方法非常简单有效,这将为以后筛选有效的突变体提供捷径。

利用短时间(时间小于等于 0.2 ns)分子动力学模拟结果提取有效参数,在 P239 位点对应的两个突变体 P239R 和 P239G 上均出现了  $\Delta\text{VDW}$  取值不同于正常  $\Delta\text{VDW}$  取值范围的离群值,具体结果见表 2、4、5、及表 8。其中 P239R 为有效突变,对应  $\Delta\text{VDW}$  为正值;P239G 为无效突变,对应  $\Delta\text{VDW}$  为负值,尽管  $\Delta\text{VDW}$  的变化趋势是对的,但 P239R 和 P239G 对应的  $\Delta\text{VDW}$  明显超出  $\Delta\text{VDW}$  的取值范围。这可能与脯氨酸(Pro)特殊的性质有关。由于脯氨酸是非极性氨基酸,而精氨酸(Arg)是极性带正电的氨基酸,因而引入带正电的 Arg 可以在增加蛋白的稳定性的同时使得分子极性大大增强,导致 P239R 的范德华能较其他几个能量呈现出更大的增长,造成极端数据的出现。而甘氨酸(Gly)是非极性不带电荷氨基酸,在 P239G 处为何也会出现极端数据,需要更多的实验来进行统计与验证。

此外,本文选取的试验样本仅为枯草杆菌蛋白酶,对其他蛋白酶是否具有普适性还需进一步研究与探讨。

## 参考文献(References)

- [1] NASCIMENTO W C A, MARTINS M L L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2004, 35(1-2):91-96.

- [2] ARGOS P, ROSSMAN M. G, GRAU U. M, ZUBER H. Thermal stability and protein structure [J]. *Biochemistry*, 1979, 18(25):5698-5703.
- [3] ARNOLD F H, GIVER L, GERSHENSON A, ZHAO H. Directed evolution of mesophilic enzymes into their thermophilic counterparts [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 870:400-403.
- [4] LEHMANN M, LOCH C, MIDDENDORF A, et al. The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept [J]. *Protein Engineering*, 2002, 15(5):403-411.
- [5] SEELIGER D, GROOT B L. Protein thermostability calculations using alchemical free energy simulations [J]. *Biophysical Journal*, 2010, 98(10):2309-2316.
- [6] 田健, 王平. 理性设计提高蛋白质热稳定性的研究进展 [J]. *生物技术进展*, 2012, 4(2):233-239.  
TIAN Jian, WANG Ping. Recent advances in the rational design to improve the protein thermostability [J]. *Current Biotechnology*, 2012, 4(2):233-239.
- [7] GROMIHA M M, UEDAIRA H, AN J. ProTherm: Thermodynamic Database for Proteins and Mutants: developments in version 3.0 [J]. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30(1):301-302.
- [8] GRIBENKO A V, PATEL M M, LIU J, et al. Rational stabilization of enzymes by computational redesign of surface charge-charge interactions [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2009, 106(8):2601-2606.
- [9] JOO J C, PACK S P, KIM Y H, et al. Thermostabilization of *Bacillus circulans* xylanase: Computational optimization of unstable residues based on thermal fluctuation analysis [J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 151(1):56-65.
- [10] KORKEGIAN A, BLACK M. E, BAKER D. Computational thermostabilization of an enzyme [J]. *Science*, 2005, 308(5723):857-860.
- [11] SARABOJI K, GROMIHA M. Average assignment method for predicting the stability of protein mutants [J]. *Biopolymers*, 2006, 82(1):80-92.
- [12] CAPRIOTTI E, FARISELLI P. A neural-network-based method for predicting protein stability changes upon single point mutations [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(Suppl 1):i63-68.
- [13] 毕汝昌, 储乃明. 枯草杆菌蛋白酶与蛋白质工程 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1991, 18(5):329-334.  
BI Ruchang, CHU Naiming. Subtilisin and protein engineering [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1991, 18(5):329-334.
- [14] 王凡强, 马美荣, 王正祥, 等. 枯草杆菌蛋白酶基因工程的研究进展 [J]. *生物工程进展*, 2000, 20(2):41-44.  
WANG Fanqiang, MA Meirong, WANG Zhengxiang, et al. The research progress of Subtilisin gene engineering [J]. *Progress in Biotechnology*, 2000, 20(2):41-44.
- [15] MCKENNEY J M, KOREN M J, KEREIAKES D J. Safety and efficacy of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease, SAR236553/REGN727, in patients with primary hypercholesterolemia receiving ongoing stable atorvastatin therapy [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2012, 59(25):2344-2353.
- [16] GUMBINER B, CHANDRASEKHAR U, JOH T. The effects of multiple dose administration of RN316 (PF-04950615), a humanized IgG2a monoclonal antibody binding proprotein convertase subtilisin kexin Type 9, in hypercholesterolemic subjects [J]. *Circulation*, 2012, 126(suppl):A13524-A13524.
- [17] KIMBER I, BASKETTER D A. Categorisation of protein respiratory allergens: The case of Subtilisin [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2014, 68(3):488-492.
- [18] ZHAO H M, ARNOLD F H. Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase [J]. *Protein Engineering*, 1999, 12(1):47-53.
- [19] PANTOLIANO M W, WHITLOW M, WOOD J F, et al. Large increases in general stability for subtilisin BPN' through incremental changes in the free energy of unfolding [J]. *Biochemistry*, 1989, 28(18):7205-213.
- [20] SÄTTLER A, KANKA S, MAURER K, et al. Thermostable variants of subtilisin selected by temperature-gradient gel electrophoresis [J]. *ELECTROPHORESIS*, 1996, 17(4):784-92.
- [21] CUNNINGHAM B C, WELLS J A. Improvement in the alkaline stability of subtilisin using an efficient random mutagenesis and screening procedure [J]. *Protein Engineering*, 1987, 1(4):319-325.
- [22] TAKAGI H, MORINAGA Y, IKEMURA H, et al. The Role of Pro-239 in the Catalysis and Heat Stability of Subtilisin E [J]. *Journal of Biochemistry*, 1989, 105(6):953-956.
- [23] RADESTOCK S, GOHLKE H. Protein rigidity and thermophilic adaptation [J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2011, 79(4):1089-1108.
- [24] CHAN C H, WILBANKS C C, MAKHATADZE G I, et al. Electrostatic contribution of surface charge residues to the stability of a thermophilic protein: Benchmarking experimental and predicted pKa values [J]. *PloS One*, 2012, 7(1):e30296.