

快速展示糖苷水解酶活性架构单点突变导致结合力变化的电泳技术*

吴秀芸 刘淑萍 赵 越 陈冠军 王禄山**

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 酶分子在长期进化过程中形成一系列氨基酸残基组成的活性架构, 参与底物的识别、结合与催化过程, 而活性架构中相应氨基酸残基是如何影响酶分子结合底物的能力, 进而影响酶分子的催化效率, 一直是酶分子理性改造研究的热点. 利用亲和电泳技术, 可以快速展示内切纤维素酶 *Ti-Cel12A* 和木聚糖酶 *TiXynA* 活性架构中不同突变体的催化活性及其迁移率的变化, 进而通过在不同底物浓度凝胶中蛋白质相对迁移率变化程度的定量回归分析, 发现由氨基酸单点突变导致蛋白质迁移率的相对变化, 可以定量表征酶分子突变前后结合底物能力的变化. 亲和电泳测定的有效阻滞常数 K_b 值与等温滴定量热法和荧光光谱法测定的相关参数比较具有明显相关性. 由于亲和电泳技术在测定酶分子与底物的结合能力时具有简便、快速、灵敏的特点, 因而可作为常规生化实验室常规普筛技术来检测突变文库中系列突变体导致结合力的变化.

关键词 亲和电泳, 结合力, 定量测定, 等温滴定量热法, 荧光光谱法

学科分类号 Q81, Q93

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0342

酶分子是自然界中高效的催化剂, 其高效催化的结构基础是酶分子可与底物结合形成酶-底物(ES)复合体, 因此定量测定酶分子活性架构氨基酸与底物的结合力是探索其构效关系的基础^[1]. 酶分子特异性识别和结合底物是一物理学过程, 未涉及化学键的断裂. 酶分子是通过其活性架构中不同位点氨基酸残基结合底物对应功能基团, 从而完成对底物的识别、结合和催化, 因此对活性架构中不同氨基酸残基与特定底物结合能力进行定量研究可以用于指导酶分子的理性设计与改造^[2-3].

纤维素酶活性架构中含有较多的芳香族氨基酸残基, 因而 π -H 作用在底物识别和结合过程中扮演着重要的角色^[4]. 荧光光谱法是根据色氨酸与配体结合后会诱导电子轨道变迁发生荧光猝灭现象, 通过荧光光谱的方法可以定量表征纤维素酶分子与底物分子的结合力^[5-6]. 然而, 部分酶分子中没有相关的 π -H 相互作用, 或者底物中存在含有苯环的小分子干扰, 就需要利用等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)等测定, ITC

方法是定量生物大分子相互作用的精确方式, 可以直接测得结合常数(K_b)及 ΔH 、 ΔS 等参数的变化, 这有助于分析酶分子与可溶性多糖、寡糖链以及单糖之间相互作用及其识别结合机制^[7]. 由于催化过程常常伴随放热或吸热现象, 为了消除催化过程的影响, 在利用 ITC 测定结合力的变化时常常需要将催化残基进行定点突变, 因而会影响酶分子与底物的结合能力.

早在 1960 年, 人们即利用电泳技术来研究血清白蛋白(serum albumin)与 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 的相互作用^[8]. 到 1973 年, 亲和电泳技术被提出^[9], 可以表征分子特性及其结合配体的相互作用. 1984 年 Takeo^[10] 系统总结亲和电泳的应用及其限制, 并且指出聚丙烯

* 国家自然科学基金(31570051, 31370111)和山东省重点研发计划(2015GSR121019)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0531-88366202, E-mail: lswang@sdu.edu.cn

收稿日期: 2017-12-30, 接受日期: 2018-03-02

烯凝胶亲和电泳技术可以用于分析酶分子与其可溶性配体的相互作用. 聚丙烯酰胺凝胶亲和电泳是通过将可溶性底物(如多糖)包埋在活性的聚丙烯酰胺凝胶中, 电泳时酶分子与多糖等底物不断地结合和分离, 导致其在凝胶中的迁移率降低. 例如, Takeo^[11]在 1987 年利用亲和电泳研究凝集素与可溶性底物的相互作用. 2000 年 Tomme 等^[12]利用亲和电泳技术探究了碳水化合物结合模块(carbohydrate binding modules, CBM)与可溶性多糖的亲合力并量化这种相互作用的强度. 随后该方法被广泛应用到其他 CBM 等结合力研究中^[13-15]. 另外, Kormos 等^[16]利用亲和电泳研究点突变对 *Cellulomonas fimi* 产生的内切葡聚糖酶(endoglucanase C)纤维素结合域(cellulose binding domain, CBD)的结合行为的变化, 发现相关电泳技术可以展示不同位点氨基酸突变导致 CBD 结合力的变化. 因此, 亲和电泳技术具有快速、灵敏的优点, 已经成为研究蛋白质与配体结合力的有利工具.

GH11 家族和 GH12 家族的糖苷水解酶分子, 其分子质量很小, 酶学性质变化范围大, 所以是研究酶分子与底物结合催化能力的良好素材^[17]. 本研究中利用内切纤维素酶 *TrCel12A*-E200Q 及其单一氨基酸突变体(W22Y、W22F、W22H 和 W22A)和 *TrXynA*-E86Q 及其突变体(Y96A、Y96W), 快速展示酶活性架构单点突变导致结合力变化的亲和电泳技术, 定量分析了相关酶分子与底物之间的结合力变化, 并与等温滴定量热法和荧光光谱法测定的相关参数比较, 讨论了常规生化实验室建立相关技术平台的可行性与方法优势.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂: Tris、甘氨酸、丙烯酰胺(acrylamide, Acr)、过硫酸铵(ammonium persulfate, APS)、四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)、考马斯亮蓝 R-250 均购自上海生工生物技术有限公司; 分子质量标准蛋白为购自 Fermentas 公司的 unstained protein marker(SM 0431). 羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)和木糖苷酶(xylosidase, X-3504)购自 Sigma 公司. 木聚糖(xylan)购自 Megazyme 公司.

仪器: 电泳仪(Bio-Rad, 164-5050), 电泳槽(Bio-Rad, 165-8005), 扫描仪(BenQ, 7550R).

图像处理软件: Quantity One(Bio-Rad technical service department, Version 4.6.2), OriginPro 8.0 (Origin lab, USA), Photoshop.

1.2 纤维素酶和木聚糖酶的准备

纤维素酶是里氏木霉(*Trichoderma reesei*)产生的内切纤维素酶 *TrCel12A* 野生型及其突变体 N20D、E200Q、W22YE200Q、W22FE200Q、W22HE200Q 和 W22AE200Q, 蛋白质是使用毕赤酵母进行异源表达和纯化^[2,18].

木聚糖酶是梳棉状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)产生的 *TrXynA* 突变体 E86Q、E86QY96A 和 E86QY96W, 蛋白质是使用大肠杆菌进行异源表达和纯化.

蛋白质浓度请见附件表 S1.

1.3 亲和电泳检测酶分子与底物的结合力

亲和电泳通常采用非变性的系列聚丙烯酰胺凝胶, 在分离胶中加入系列浓度梯度的多糖底物, 然后进行电泳. 聚丙烯酰胺凝胶的制备: 分离胶中包含 10% 聚丙烯酰胺、375 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8)、0.1% APS、0.02% TEMED 和 0%~0.9% 梯度变化的底物; 浓缩胶包括 4% 聚丙烯酰胺、62.5 mmol/L Tris-HCl(pH 6.8)、0.1% APS 和 0.02% TEMED. 以 xylosidase (Sigma X3504)作为阴性对照, 与 BSA 蛋白按 1:1 混合, 作为分子质量标准. 通常将包含 5~20 μ g 蛋白样品上样在每个孔道, 电泳条件是电压 80 V 和时间 30 min, 然后调成 180 V 电泳, 电泳时间视聚丙烯酰胺凝胶的浓度和蛋白质分子质量的大小而定. 电泳后用考马斯亮蓝或者其他通用的凝胶染色方法进行染色监测蛋白质条带.

1.4 亲和电泳条带迁移率的定量分析

电泳条带迁移率的定量提取是通过 Quantity One 软件完成. 将灰度图用 Quantity One 软件打开, 选择需要分析的条带, 通过 Band Attributes-Relative Front 显示每条条带的相对迁移率^[19].

Takeo 和 Nakamura^[20]假定了配体浓度与蛋白质的迁移率之间有明显的线性关系. 用 Origin 8.0 软件以相对迁移率对底物浓度按照 $Y=a+bX$ 方程进行回归分析作图, 求出参数 a 值和 b 值, 其中 a 值代表酶本身的荷质比对相对迁移率的影响, b 值代表底物的加入对相对迁移率的影响, 酶分子与底物结合力越大, b 值(一般为负)的绝对值就会越大. 在此, 我们定义有效阻滞常数(effective retarding constant) K_b 为 b 的绝对值, 以此来表征酶对底物结

合力的大小.

1.5 荧光光谱法测定酶分子与底物的结合力

将酶分子(E200Q、W22YE200Q、W22FE200Q、W22HE200Q 和 W22AE200Q)与系列浓度的 CMC (0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.5%、2.0%) 混合, 冰上放置 30 min, 使酶与底物充分结合. 将木聚糖酶分子(E86Q、E86QY96A 和 E86QY96W)与系列浓度的 xylan(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.75%、1.0%)混合, 冰上放置 10 min. 然后测定 295 nm 处的激发光谱, 发射光谱的检测范围为 305~505 nm. 数据处理具体的方法参照文献[6].

2 结果与讨论

2.1 可展示内切纤维素酶分子结合、催化能力的亲和电泳技术

本文利用亲和电泳技术研究酶分子与底物之间的相互作用, 选用 *Tr*-Cel12A 及它的 2 个突变体 N20D、E200Q 进行梯度浓度 CMC 的亲和电泳展示与分析. 异源表达的 *Tr*-Cel12A 由于糖基化程度不同在凝胶中有 3 条条带, 中间条带含量最大, 因而是分析迁移率的重点条带(图 1a). E200Q 突变体相对野生型仅有一个氨基酸的差别, 即由 200 位酸性谷氨酸残基(E)变为中性谷氨酰胺残基(Q), 在没有底物的非变性电泳过程中该蛋白质与野生型 *Tr*-Cel12A 迁移程度就可明显区分开, 即具有不同

的迁移率. 而将野生型突变增加一个负电荷(N20D), 相关蛋白的迁移率会明显向正极移动, 因而电泳条带显示其迁移速率更大, 并且相关条带具有良好的重现性(图 1a). 一个电荷的变化能够通过活性电泳相关条带迁移率的明显变化, 这说明非变性电泳技术的灵敏性较高.

利用非变性电泳结合 CMC 反浸凝胶技术^[18]就可进一步看出 *Tr*-Cel12A 具有 4 条明显的活性条带(图 1b), 这说明酶活性的展示要比考马斯亮蓝染色法的灵敏度要高. 如果活性架构中催化残基 E 突变为 Q, 酶分子将失去催化活性, 在凝胶活性展示中无明显的条带显示, 这与酶活的测定结果一致. N20D 保守氨基酸的突变也会明显影响酶活, 活性条带的灰度值很弱(图 1c, d). 将底物(0.5% CMC)注入凝胶中进行电泳, 可以看到相应蛋白质与底物发生了明显的相互作用, 条带发生了明显的拖尾现象(图 1c), 加大凝胶中 CMC 的浓度, *Tr*-Cel12A 的电泳迁移率发生了明显的影响, N20D 的迁移率也明显的滞后(图 1d), 因此在凝胶中加入不同浓度的底物, 可结合底物的相关蛋白质会有明显的迁移率变化. 由于催化残基被突变而失去催化活性, 因此 E200Q 在活性电泳(图 1b~d)中未被展示出来, 但可以推测其迁移率会发生明显变化. 因此, 下文利用考马斯亮蓝染色法分析无催化活性但具有结合活性的相关突变体结合能力的变化.

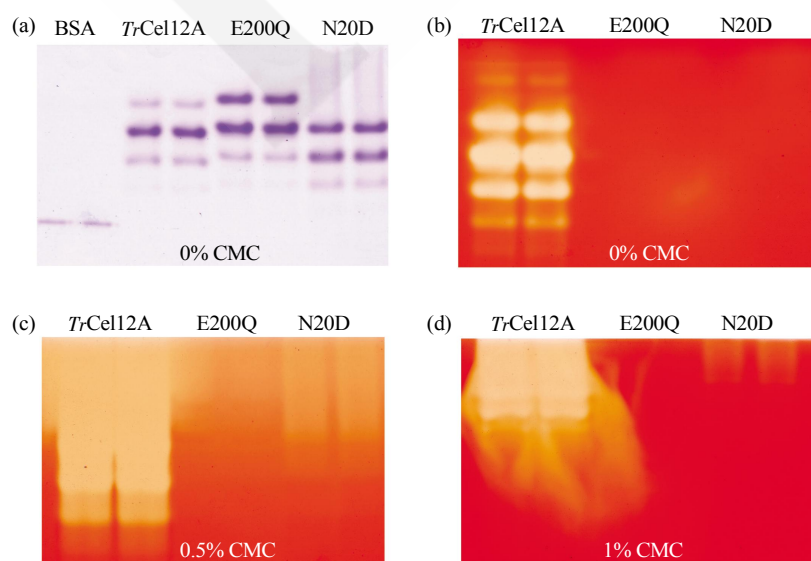


Fig. 1 Native-PAGE of *Tr*-Cel12A and its mutants (E200Q and N20D)

(a) The bands were showed by Coomassie Blue staining. (b), (c), (d) The bands were showed by Congo Red Staining corresponding to 0%、0.5%、1% CMC.

2.2 亲和电泳检测 TrCel12A-E200Q 及其突变体与 CMC 的结合力变化

为了定量分析酶分子突变前后亲和力变化, 将 TrCel12A-E200Q 加入不同浓度底物(CMC 浓度为 0%~0.9%)的凝胶进行亲和电泳, 由于 TrCel12A-E200Q 突变体是将 200 位 E 催化残基突变成了 Q 残基, 因而酶分子失去了活性, 但是仍具有结合底物的能力. 由图 2 可以看出, 相较于无 CMC 结合能力的牛血清白蛋白(BSA)和 xylosidase, E200Q 蛋白质条带发生了明显的位移, 并且随着底物浓度的提高, TrCel12A-E200Q 与 BSA 的相对迁移率差距就越大, 并与 CMC 浓度呈现明显的负相关($R^2=0.95$)(图 2e).

在 E200Q 的基础上对 TrCel12A 活性架构的关键氨基酸进行系列突变, 利用亲和电泳技术检测活

性架构中单点氨基酸突变对酶分子与底物结合力的变化. 由图 2a 可以看出, W22Y、W22F、W22H 和 W22A 这些突变由于没有引入或去除带电的氨基酸残基, 因此双突变体相对于 E200Q 没有明显的迁移率变化. 然而将相应突变体在不同 CMC 浓度进行亲和电泳实验, 可以发现单一氨基酸突变会导致其结合力的差异, 这在亲和电泳过程能够展示出来(图 2b~d 和附件图 S1). 利用 Quantity One 处理定量分析数据详见附件表 S2~S6. 参照 TrCel12A-E200Q 的分析, 分别以突变体的相对迁移率对 CMC 的浓度进行线性相关性分析, 发现相关系数都在 0.9 以上(表 1). 根据线性回归的参数 a 值可以估计质荷比的相关变化, 而线性回归参数斜率 b 值是有效阻滞常数 K_b , 其绝对值可以表示相对迁移率的变化. 从表 1 数据可看出 K_b 值的大小

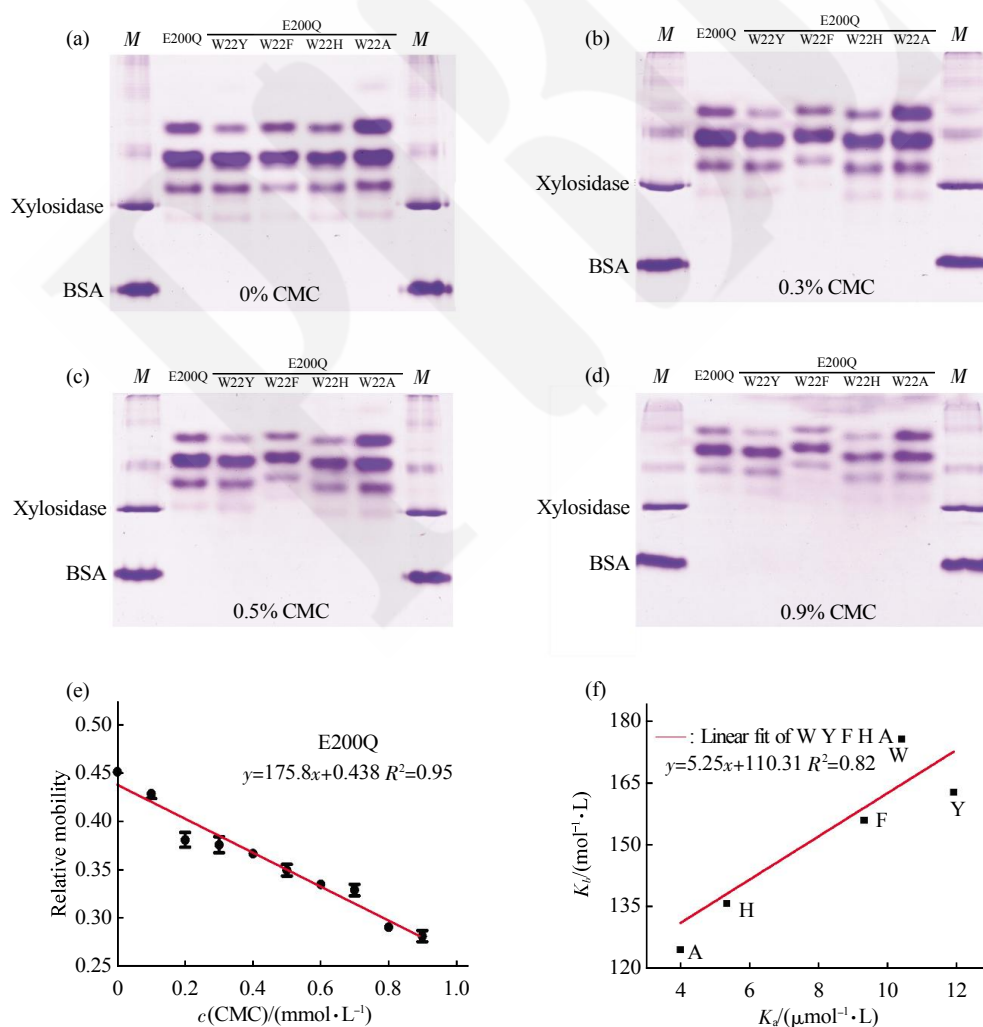


Fig. 2 Affinity electrophoresis of TrCel12A-E200Q and its four mutants in different CMC concentrations

(a), (b), (c), (d) Corresponding to 0%, 0.3%, 0.5% and 0.9%. (e) Linear regression analysis of the relative mobility and CMC concentration. (f) Correlation analysis of effective retardation constant K_b and binding constant K_a .

依次为 $T\text{rCel12A-E200Q} > \text{W22YE200Q} > \text{W22FE200Q} > \text{W22HE200Q} > \text{W22AE200Q}$. 将亲和电泳的测定 K_b 参数与之前 ITC 测定的 K_a 结果(附件表 S7)和荧光光谱法测定的 K_A 结果(附件表 S8)相比较, 有效阻滞常数(K_b)分别与结合常数(K_a)和有效猝灭常数 K_A 存在高度相关性, Pearson 相关系数^[21] R^2 分别为 0.82(图 2f)和 0.83, 这说明利用亲和电泳得到的有效阻滞常数 K_b 值可以表征内切纤维素酶活性架构中单个氨基酸突变导致的结合力的变化. 当然利用亲和电泳不能很好地区分电荷差异明显的突变体.

Table 1 Linear fitting of relative mobility of TrCel12A-E200Q and its mutants in affinity electrophoresis

$y=a+bx$	$a(q/m)$	$K_b(\text{substrate})/(\text{mol}^{-1} \cdot \text{L})$	R^2
$T\text{rCel12A-E200Q}$	0.438 ± 0.0031	175.8 ± 5.8	0.950
W22Y E200Q	0.449 ± 0.0034	162.9 ± 6.3	0.933
W22F E200Q	0.438 ± 0.0027	156.0 ± 5.1	0.952
W22H E200Q	0.448 ± 0.0033	135.9 ± 6.2	0.909
W22A E200Q	0.451 ± 0.0024	124.6 ± 4.5	0.941

2.3 亲和电泳检测 TlXynA-E86Q 及其突变体与木聚糖的结合力变化

类似 $T\text{rCel12A-E200Q}$ 及其突变体相关方法,

利用亲和电泳技术, 对 GH11 家族酶分子活性架构关键氨基酸单点突变对结合力的影响进行了分析. 将相应突变体在不同木聚糖浓度进行亲和电泳实验, 可以发现单一氨基酸突变会导致其结合力的差异, 可在亲和电泳过程直观地展示出来(图 3). 以突变体的相对迁移率对木聚糖浓度进行相关性分析, 发现线性相关系数都在 0.85 以上(表 2). 根据线性回归的参数 a 值可以估计质荷比的相关变化, 而线性回归参数斜率 b 值为有效阻滞常数 K_b , 其值表示相对迁移率的变化. 从表 2 数据可看出 K_b 值的大小依次为 $\text{TlXynA-E86Q} < \text{E86QY96W} < \text{E86QY96A}$. 将亲和电泳测定的 K_b 参数与荧光光谱法测定的 K_A 结果(附件表 S9)相比较, 有效阻滞常数(K_b)与有效猝灭常数 K_A 具有明显的线性相关性($R^2 = 0.84$), 这说明利用亲和电泳技术可以表征 GH11 木聚糖酶活性架构中单点突变导致结合力的变化, 并且该变化与利用荧光技术测定结合力的变化具有较好的一致性^[6].

综上, 亲和电泳技术不仅可定性分析酶分子与底物结合力差异^[22-24], 还可通过蛋白质在不同底物浓度上有效阻滞常数 K_b 的差异分析, 可以较好地定量表征酶分子活性架构单点突变引起底物结合能力的差异.

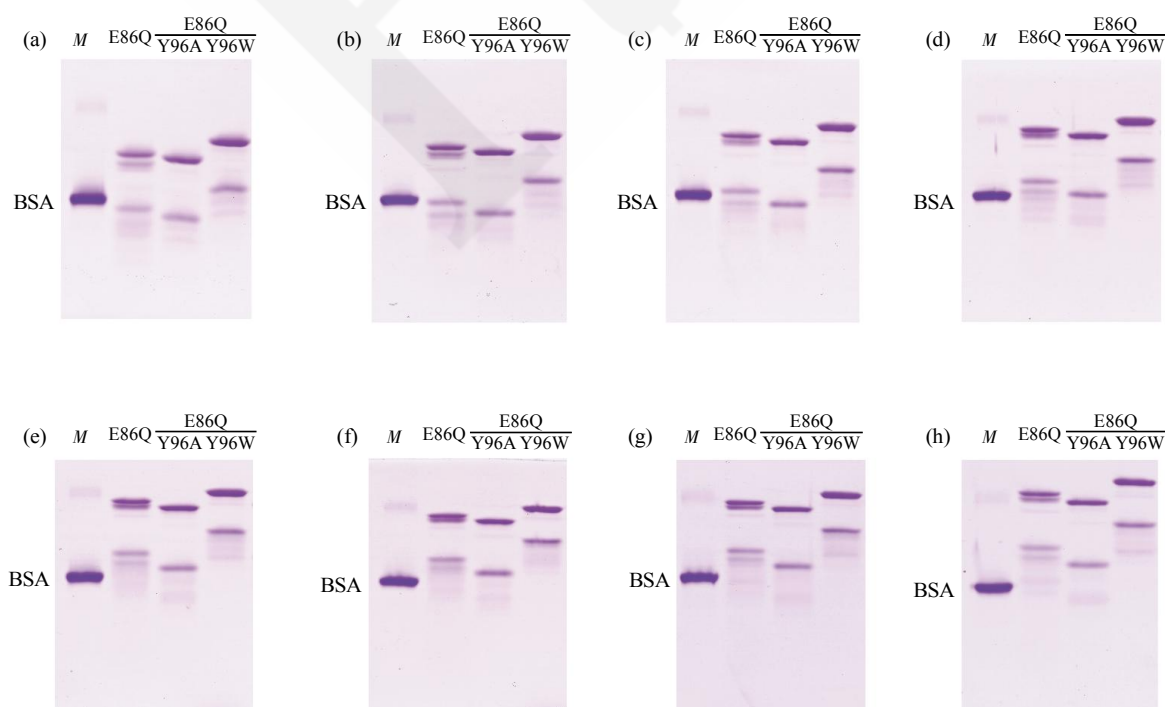


Fig. 3 Affinity electrophoresis of TlXynA-E86Q and its mutants in different xylan concentrations

(a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) Corresponding to xylan concentration of 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7% and 0.8%.

Table 2 Linear fitting of relative mobility of TlXynA-E86Q and its mutants in affinity electrophoresis

$y=ax+bx$	$a(q/m)$	$K_b(\text{substrate})/(\text{mol}^{-1} \cdot \text{L})$	R^2
E86Q-TlXynA	0.500	481.0	0.890
E86Q Y96A	0.533	497.3	0.918
E86Q Y96W	0.445	487.0	0.888

3 结 论

亲和电泳技术具有良好的稳定性和可重现性, 本文通过对突变体迁移率变化的定量分析, 发现不同突变体的有效阻滞常数 K_b 值可以灵敏反映单一氨基酸引起结合力的变化. 荧光光谱技术也是一种快速灵敏分析单一氨基酸突变引起活性架构结合力变化的技术, 但是当所选底物含有 pNP、阿魏酸这类芳香环类结构时, 测定结果会发生明显偏差. ITC 方法是测定分子间相互作用力最准确的方法, 但是由于设备及其效率的限制, 该方法并不能用于高通量的筛选过程.

综上所述, 亲和电泳、荧光光谱及 ITC 三种测定方法都可检测酶分子单点突变引起的结合力变化, 可以应用于酶分子改造的快速筛选过程, 不同的实验室可以根据设备与实验设计要求进行相应的选择. 由于电泳方法具有灵敏、快速的特点, 并且是多数实验室的常规设备, 因而不受 ITC、荧光专业设备的限制, 所以本方法可以适用于多数的生物化学实验室.

附件 图 S1, 表 S1~S9 见网络版附录(<http://www.pibb.ac.cn>).

参 考 文 献

- [1] Dwivedi U N, Singh P, Pandey V P, *et al.* Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011, **68**(2): 117-128
- [2] Zhang X, Wang, S, Wu, X, *et al.* Subsite-specific contributions of different aromatic residues in the active site architecture of glycoside hydrolase family 12. *Scientific Reports*, 2015, **5**(18357): 1-12
- [3] Payne C M, Bomble Y J, Taylor C B, *et al.* Multiple functions of aromatic-carbohydrate interactions in a processive cellulase examined with molecular simulation. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, **286**(47): 41028-41035
- [4] Nakamura A, Tsukada T, Auer S, *et al.* The tryptophan residue at the active site tunnel entrance of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A is important for initiation of degradation of crystalline cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**(19): 13503-13510
- [5] Wang Z, Tan X, Chen D, *et al.* Study on the binding behavior of lysozyme with cephalosporin analogues by fluorescence spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, 2009, **19**(5): 801-808
- [6] 王培培, 张丽丽, 张庆, 等. 荧光光谱法定量测定纤维素酶活性架构中单个氨基酸突变对底物结合力的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2016, **43**(11): 1086-1093
Wang P P, Zhang L L, Zhang Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2016, **43**(11): 1086-1093
- [7] Dam T K, Brewer C F. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chemical Reviews*, 2002, **102**(2): 387-430
- [8] Waldmann-Meyer H. Thermodynamic proton-, cadmium-, and zinc-binding constants of serum albumin determined by zone electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 1960, **235**(11): 3337-3345
- [9] Bøg-Hansen T. Crossed immuno-affinoelectrophoresis: an analytical method to predict the result of affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, 1973, **56**(2): 480-488
- [10] Takeo K. Affinity electrophoresis: principles and applications. *Electrophoresis*, 1984, **5**(4): 187-195
- [11] Takeo K. Affinity electrophoresis. *Advances in Electrophoresis*. New York: VCH Publishers, 1987, **1**: 229-279
- [12] Tomme P, Boraston A, Kormos J M, *et al.* Affinity electrophoresis for the identification and characterization of soluble sugar binding by carbohydrate-binding modules. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, **27**(7): 453-458
- [13] Boraston A B, Chiu P, Warren R A J, *et al.* Specificity and affinity of substrate binding by a family 17 carbohydrate-binding module from *Clostridium cellulovorans* cellulase 5A. *Biochemistry*, 2000, **39**(36): 11129-11136
- [14] Abbott D W, Hrynuik S, Boraston A B. Identification and characterization of a novel periplasmic polygalacturonic acid binding protein from *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Molecular Biology*, 2007, **367**(4): 1023-1033
- [15] 汪颖, 刘源涛, 郑昀昀, 等. α -淀粉酶 AmyP 中淀粉结合结构域的鉴定. *微生物学通报*, 2013, **40**(12): 2254-2258
Wang Y, Liu Y T, Zheng Y Y, *et al.* *Microbiology China*, 2013, **40**(12): 2254-2258
- [16] Kormos J, Johnson P E, Brun E, *et al.* Binding site analysis of cellulose binding domain CBDN1 from endoglucanase C of *Cellulomonas fimi* by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 2000, **39**(30): 8844-8852
- [17] Lombard V R, Drula E, *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**(Database issue): D490-495
- [18] Zhang X, Liu N, Yang F, *et al.* *In situ* demonstration and quantitative analysis of the intrinsic properties of glycoside hydrolases. *Electrophoresis*, 2012, **33**(2): 280-287
- [19] Gong W, Zhang, H, Tian, L, *et al.* Determination of the modes of action and synergies of xylanases by analysis of xylooligosaccharide profiles over time using fluorescence-assisted carbohydrate electrophoresis. *Electrophoresis*, 2016, **37**(12): 1640-1650
- [20] Takeo K, Nakamura S. Dissociation constants of glucan phosphorylases of rabbit tissues studied by polyacrylamide gel disc electrophoresis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1972,

- 153(1): 1–7
- [21] Lawrence I, Lin K. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*, 1989, 255–268
- [22] Cockburn D, Nielsen M M, Christiansen C, *et al.* Surface binding sites in amylase have distinct roles in recognition of starch structure motifs and degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 75(4): 338–345
- [23] Ludwiczek M L, Heller M, Kantner T, *et al.* A secondary xylan-binding site enhances the catalytic activity of a single-domain family 11 glycoside hydrolase. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 373(2): 337–354
- [24] Wilkens C, Andersenauthor S, Petersenauthor B O, *et al.* An efficient arabinoxylan-debranching-L-arabinofuranosidase of family GH62 from *Aspergillus nidulans* contains a secondary carbohydrate binding site. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(14): 6265–6277

Affinity Electrophoresis for The Rapid Identification and Characterization of Substrate Binding Ability Influenced by Amino Acid Single-Point Mutation in Active-Site Architecture of Glucoside Hydrolase*

WU Xiu-Yun, LIU Shu-Ping, ZHAO Yue, CHEN Guan-Jun, WANG Lu-Shan**

(The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract The enzyme molecule is natural effective biological catalyst. The enzyme - substrate (ES) complex forming in the first step imparts the catalytic efficiency of enzyme. Specifically, multiple amino acid residues composed the active site of enzyme, which created a precisely organized architecture for substrate recognition, binding and catalytic process. Therefore, the function of amino acid residues in active-site architecture has always been the research hotspot in protein engineering. The enzymes in GH11 and GH12 families have small molecular mass and large range of enzymology properties, which are good candidates to study the binding affinity of enzymes. In this study, the catalytic activity and band mobility of different mutants in the active-site architecture of *T_r*-Cel12A and *T_r*XynA could be rapidly demonstrated by affinity electrophoresis. The substrate binding affinity can be quantitatively characterized by quantitative regression analysis of the relative mobility of proteins at different substrate concentrations. At the same time, isothermal titration calorimetry and fluorescence spectroscopy were also used to determine the binding affinity of different mutants. For the mutants of *T_r*-Cel12A, the parameters K_b measured by affinity electrophoresis were significantly related with those determined by isothermal titration calorimetry ($R^2 = 0.82$) and fluorescence spectroscopy ($R^2 = 0.83$). Therefore, the magnitude of their affinities was *T_r*-Cel12A-E200Q>W22YE200Q>W22FE200Q>W22HE200Q>W22AE200Q, respectively. Furthermore, the substrate binding affinities of the variants in *T_r*XynA were also characterized using affinity electrophoresis. The results showed that there was a good correlation with that measured by fluorescence spectrometry ($R^2 = 0.84$). These results indicate that the parameters K_b measured by affinity electrophoresis can characterize the binding ability influenced by amino acid single-point mutation in active-site architecture of glucoside hydrolase. Therefore, affinity electrophoresis was effective and can be used as routine screening technology in biochemical laboratory to detect the change of series mutants binding affinity in mutant library.

Key words affinity electrophoresis, binding affinity, quantitative determination, isothermal titration calorimetry, fluorescent spectrometry

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0342

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31570051, 31370111) and The Key Technologies R&D Program of Shandong Province (2015GSF121019).

**Corresponding author.

Tel: 86-531-88366202, E-mail: lswang@sdu.edu.cn

Received: December 30, 2017 Accepted: March 2, 2018

附录

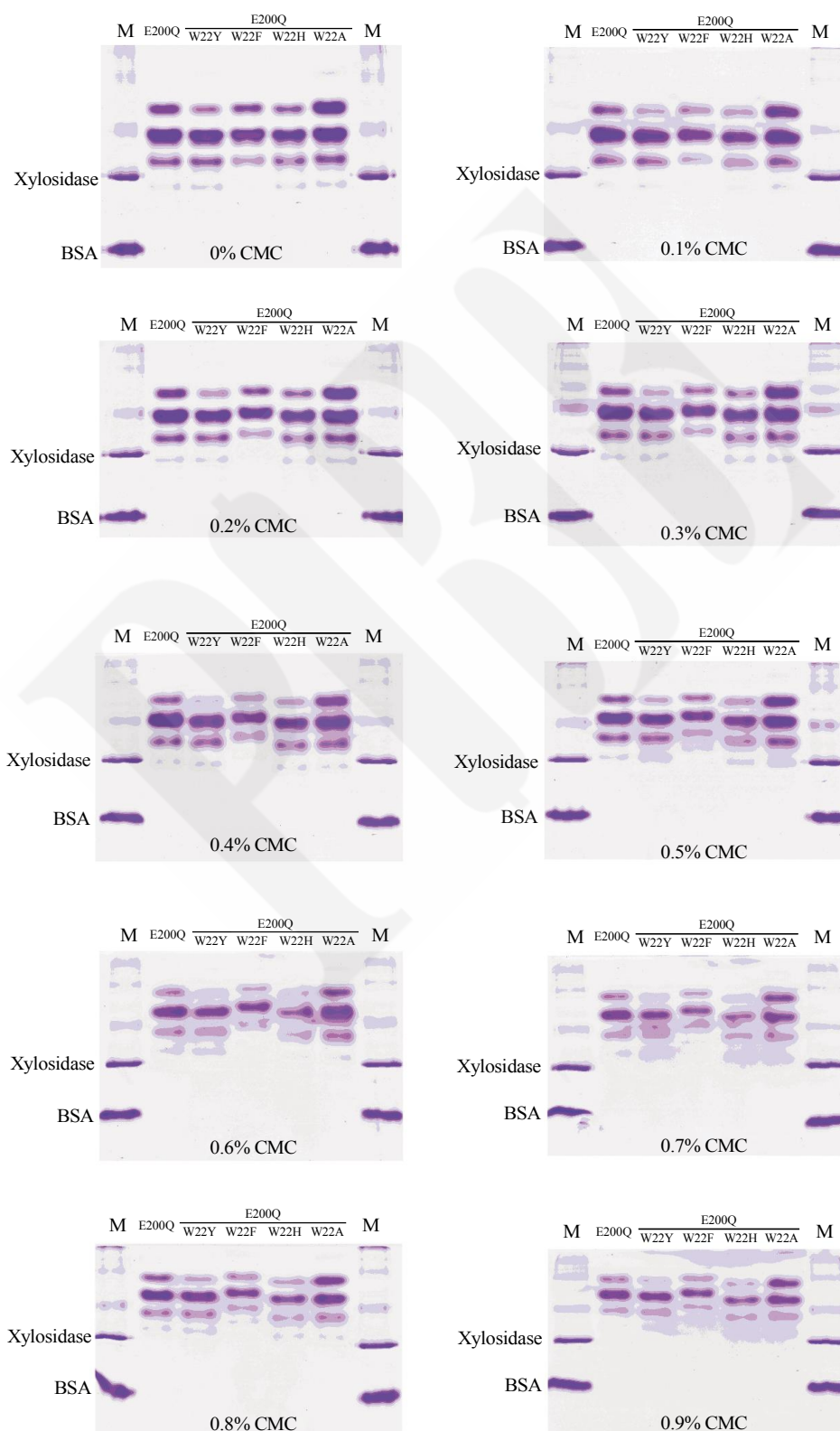


Fig. S1 Affinity electrophoresis of TrCel12A-E200Q and its four mutants in different CMC concentrations (0%~0.9%)

Table S1 The protein concentrations obtained in this study

Enzymes	$\rho/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$
<i>Tr</i> Cel12A	0.258
N20D	0.266
<i>Tr</i> Cel12A-E200Q	0.340
W22Y E200Q	0.399
W22F E200Q	0.240
W22H E200Q	0.218
W22A E200Q	0.300
<i>Tl</i> XynA-E86Q	0.200
E86Q Y96A	0.200
E86Q Y96W	0.200

Table S2 The relative mobility of *Tr*Cel12A-E200Q in different CMC concentrations (0%~0.9%)

CMC/%	<i>Tr</i> Cel12A-E200Q				
0	0.449	0.449	0.456	0.449	0.458
0.1	0.425	0.425	0.435	0.428	0.434
0.2	0.389	0.376	0.372	0.382	0.389
0.3	0.385	0.378	0.363	0.376	0.381
0.4	0.368	0.361	0.370	0.372	0.366
0.5	0.349	0.348	0.348	0.345	0.361
0.6	0.330	0.334	0.336	0.336	0.342
0.7	0.329	0.338	0.330	0.321	0.330
0.8	0.296	0.288	0.289	0.295	0.288
0.9	0.285	0.284	0.273	0.279	0.288

Table S3 The relative mobility of *Tr*Cel12A-W22YE200Q in different CMC concentrations (0%~0.9%)

CMC/%	W22Y E200Q				
0	0.463	0.447	0.449	0.446	0.446
0.1	0.432	0.431	0.442	0.424	0.445
0.2	0.425	0.425	0.421	0.395	0.405
0.3	0.411	0.396	0.393	0.399	0.396
0.4	0.411	0.394	0.388	0.388	0.385
0.5	0.373	0.336	0.354	0.353	0.358
0.6	0.345	0.340	0.344	0.340	0.354
0.7	0.354	0.365	0.368	0.332	0.349
0.8	0.318	0.308	0.319	0.308	0.318
0.9	0.284	0.309	0.315	0.287	0.312

Table S4 The relative mobility of TrCel12A-W22FE200Q in different CMC concentrations (0%~0.9%)

CMC/%	W22F E200Q				
0	0.454	0.456	0.437	0.432	0.442
0.1	0.429	0.428	0.405	0.419	0.428
0.2	0.412	0.399	0.393	0.414	0.402
0.3	0.395	0.381	0.396	0.384	0.385
0.4	0.388	0.371	0.354	0.372	0.380
0.5	0.354	0.352	0.382	0.352	0.372
0.6	0.336	0.342	0.334	0.346	0.366
0.7	0.326	0.331	0.336	0.336	0.354
0.8	0.313	0.325	0.324	0.309	0.308
0.9	0.301	0.288	0.304	0.288	0.288

Table S5 The relative mobility of TrCel12A-W22HE200Q in different CMC concentrations (0%~0.9%)

CMC/%	W22H E200Q				
0	0.452	0.439	0.426	0.455	0.449
0.1	0.437	0.428	0.412	0.438	0.437
0.2	0.429	0.419	0.399	0.426	0.424
0.3	0.427	0.413	0.395	0.412	0.426
0.4	0.422	0.389	0.389	0.400	0.396
0.5	0.390	0.373	0.365	0.389	0.388
0.6	0.373	0.355	0.338	0.377	0.376
0.7	0.331	0.357	0.325	0.366	0.360
0.8	0.355	0.332	0.330	0.339	0.340
0.9	0.331	0.323	0.309	0.331	0.330

Table S6 The relative mobility of TrCel12A-W22AE200Q in different CMC concentrations (0%~0.9%)

CMC/%	W22A E200Q				
0	0.452	0.446	0.441	0.455	0.443
0.1	0.437	0.432	0.426	0.440	0.429
0.2	0.432	0.425	0.417	0.435	0.423
0.3	0.423	0.419	0.412	0.428	0.412
0.4	0.420	0.419	0.393	0.423	0.408
0.5	0.398	0.389	0.385	0.399	0.388
0.6	0.376	0.371	0.356	0.376	0.359
0.7	0.375	0.363	0.369	0.379	0.366
0.8	0.352	0.353	0.339	0.355	0.348
0.9	0.339	0.336	0.328	0.339	0.330

Table S7 Thermodynamic constants determined for the binding of mutants to CMC

	$K_A/(\text{mol}^{-1} \cdot \text{L})$	$\Delta H/(\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{deg}^{-1})$
<i>Tr</i> Cel12A-E200Q	$1.04\text{E}7 \pm 6.22\text{E}6$	$-4.61\text{E}4 \pm 1.43\text{E}3$	-154
W22Y E200Q	$1.19\text{E}7 \pm 5.20\text{E}6$	$-4.55\text{E}4 \pm 1.02\text{E}3$	-152
W22F E200Q	$9.31\text{E}6 \pm 3.28\text{E}5$	$-4.01\text{E}4 \pm 7.85\text{E}3$	-134
W22H E200Q	$5.32\text{E}6 \pm 2.42\text{E}5$	$-3.37\text{E}4 \pm 1.27\text{E}3$	-113
W22A E200Q	$3.98\text{E}6 \pm 3.03\text{E}5$	$-3.08\text{E}4 \pm 5.50\text{E}3$	-103

Table S8 K_A of E200Q and its double mutants obtained from fluorescence spectrum

$Y=1/(a+bX)$	$K_A/(\text{mol}^{-1} \cdot \text{L})$	R^2
<i>Tr</i> Cel12A-E200Q	154	0.992
W22Y E200Q	177	0.991
W22F E200Q	147	0.992
W22H E200Q	119	0.998
W22A E200Q	114	0.989

Table S9 K_A of E86Q and its double mutants obtained from fluorescence spectrum

$Y=1/(a+bX)$	$K_A/(\text{mol}^{-1} \cdot \text{L})$	R^2
E86Q- <i>Tr</i> XynA	220	0.996
E86Q Y96A	318	0.999
E86Q Y96W	292	0.999