

Salinivibrio sp. YH4 胞外丝氨酸蛋白酶 EYHS 耐盐性及生物信息学分析

武翠玲, 宋英达, 高慧芳, 张廉芸, 任晨霞
(长治医学院, 山西 长治 046000)

摘要:为探讨菌株 *Salinivibrio* sp. YH4 分泌的丝氨酸蛋白酶 EYHS 的耐盐性及结构特征, 采用明胶底物酶谱法分析 EYHS 的耐盐性, 并应用生物信息学手段对 EYHS 及 6 种耐盐的 S8 家族丝氨酸蛋白酶结构特征进行分析。结果表明 EYHS 在 4 mol/L 的 NaCl 溶液中仍具有活性, 属于耐盐蛋白酶。EYHS 及 6 种 S8 家族丝氨酸蛋白酶分子表面的 loop 区等无规则卷曲所占比例较高, α -螺旋与 β -片层则主要位于酶分子内部。EYHS 分子表面酸性氨基酸含量较高, 且具有弱疏水内核。多序列比对发现蛋白酶的催化三联体两侧存在高度保守的基序和保守的极性氨基酸及芳香族氨基酸, 并存在多个保守的 Gly 与 Ala。同源建模和表面电荷分布显示, α -螺旋和 β -片层围成了蛋白酶的催化腔, EYHS 活性中心包含由 Asp32、His65 与 Ser215 组成的催化三联体, 且催化位点区域表面静电势为负。上述结构特征可能有助于耐盐丝氨酸蛋白酶 EYHS 在高盐环境下维持其稳定性和适度柔性, 并有助于其催化功能的发挥, 为深入研究耐盐丝氨酸蛋白酶的高盐环境适应性提供了一定的理论依据。

关键词: *Salinivibrio* sp. YH4; 丝氨酸蛋白酶; 耐盐蛋白酶; 生物信息学

中图分类号: S154.3

文献标识码: A

文章编号: 1008-858X(2021)01-0105-06

嗜盐菌是一种广泛分布于海洋、盐湖、盐田、盐土环境、腌制食物等高盐环境中的微生物^[1], 主要类群包括嗜盐细菌、嗜盐古菌和嗜盐真菌。相较嗜盐古菌和嗜盐真菌, 嗜盐细菌分布范围更为广泛, 因此近年来受到越来越多的重视^[2]。由于长期生活在高盐环境中, 嗜盐细菌在进化过程中形成了独特的生理结构与代谢机制, 能够产生许多具有特殊性质的生物活性物质。比如, 嗜盐细菌通过分泌耐盐蛋白酶来降解环境中的有机氮源, 维持自体的新陈代谢。这些耐盐蛋白酶往往在高盐环境中仍然具有很好的稳定性和催化活性, 因而在食品、化工及生物技术领域具有良好的应用前景^[3-5]。

菌株 *Salinivibrio* sp. YH4 为中度嗜盐细菌, 可分泌胞外丝氨酸蛋白酶 EYHS (QAB01366.1), 明胶底物浸泡酶谱结果显示 EYHS 对高盐具有很好的耐受性。丝氨酸蛋白酶是分布最为广泛的蛋白酶之一, 目前市售的丝氨酸蛋白酶在高盐条件下

很难维持其高活性和稳定性, 限制了其在一些领域的应用。因此, 研究开发耐盐丝氨酸蛋白酶并探索其结构与耐盐性之间的关系, 对于扩大其应用范围具有重要意义。目前, 对耐盐蛋白酶结构的解析多来自于实验, 可用数据有限。本文利用生物信息学软件对耐盐丝氨酸蛋白酶 EYHS 的氨基酸组成特点、二级结构、亲疏水性、表面可及性、保守结构域、三级结构、催化位点的关键氨基酸等进行了预测, 以期深入探究丝氨酸蛋白酶 EYHS 的耐盐机制提供理论依据。

1 材料和方法

Salinivibrio sp. YH4 分离自山西运城盐湖; EYHS (实验室自主制备); I 型胶原蛋白酶 (上海生物工程有限公司); 明胶 (索莱宝)。

将菌株 *Salinivibrio* sp. YH4 活化后接种于发酵培养基, 37 °C, 200 r/min, 培养 96 h, 9000 × g 离心 20 min, 上清即为粗酶液^[6]。粗酶液经离子

收稿日期: 2020-03-30; 修回日期: 2020-05-26

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助 (31900038); 山西省青年科学基金资助 (201801D221284)

作者简介: 武翠玲 (1979-), 女, 硕士, 副教授, 主要从事微生物蛋白酶结构与功能的研究。Email: clw928@163.com。

通信作者: 任晨霞 (1987-), 女, 硕士, 主要研究方向蛋白质结构与功能。Email: rcx2010@126.com。

交换层析、PAGE 电泳纯化后得到蛋白酶 EYHS, 对 EYHS 进行质谱鉴定, 结果显示 EYHS 为 S8 家族丝氨酸蛋白酶。

利用不同浓度的 NaCl 溶液 (0 ~ 4 mol/L) 配制浓度为 2% 的明胶底物, 调节 pH 至 7.5, 采用

明胶底物浸泡酶谱法^[6]分析 EYHS 在不同浓度 NaCl 溶液中的活性。以 I 型胶原蛋白酶(非耐盐酶)作为对照。同时, 在 NCBI 数据库中检索到了具有一定耐盐性的 6 种 S8 家族丝氨酸蛋白酶, 利用生物信息学工具对其进行比对分析(表 1)。

表 1 生物信息学分析工具

Table 1 Bioinformatics tools

分析项目	分析工具
序列查询	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein
结构查询	http://www.rcsb.org/
理化性质	ExPASy:ProtParam(https://web.expasy.org/protparam/)
亲疏水性	ExPASy:ProtScale(https://web.expasy.org/protscale/)
多序列比对	EMBI Clustal Omega(https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)
多序列比对编辑	Jalview
二级结构预测	PredictProtein(https://www.predictprotein.org/)
三级结构预测	Swiss - Model(https://swissmodel.expasy.org/)
可视化处理	Discovery Studio 2016 软件
表面电荷分布	Visual Molecular Dynamics(VMD)软件 APBS 插件

2 结 果

2.1 EYHS 的耐盐性分析

由图 1 可见, 在 4 mol/L 的 NaCl 溶液中 EYHS 仍可以保持较高的催化活性, 而在 2 mol/L 的 NaCl 溶液中 I 型胶原蛋白酶几乎完全丧失活性。由此可见 EYHS 属于耐盐蛋白酶。

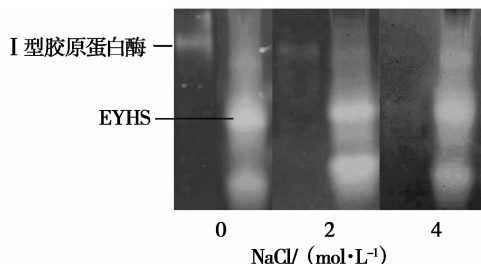


图 1 EYHS 的耐盐性分析

Fig. 1 The salt tolerance analysis of EYHS

2.2 蛋白酶理化性质分析

对 EYHS 及检索到的 6 种耐盐丝氨酸蛋白酶的氨基酸组成及理化性质进行分析发现, 虽然不同来源蛋白酶的氨基酸组成差异较大, 但是都具有如下共同点: Gly、Ala、Val 与 Ser 含量相对较

高; Trp 与 Cys 含量较低; 酸性氨基酸含量高于碱性氨基酸含量; 等电点大多位于 5.0 左右; 蛋白酶不稳定系数小于 40; 脂肪指数高于 65; 均为稳定蛋白质。由 ProtScale 的 K - D 预测算法对 EYHS 及检索到的耐盐丝氨酸蛋白酶的疏水性进行分析, 结果显示均为亲水性蛋白质。

2.3 二级结构预测

通过 PredictProtein 网站可以获得蛋白质的许多结构信息, 如二级结构、基序、结构域等^[7]。预测结果显示 EYHS 中 α - 螺旋、 β - 片层和 loop 环等无规则卷曲的含量分别为 17.1%、23.0% 和 60.0%。其中 α - 螺旋与 β - 片层总的占比较低, 且多分布于酶分子的内部, loop 环等无规则结构占比较大, 多处于酶分子表面。其它 6 种耐盐丝氨酸蛋白酶也具有相同的趋势, loop 环等无规则卷曲占比介于 55.8% ~ 65.7% 之间(表 2)。Jamir 等在研究 RNaseT1 热变性过程中发现 α - 螺旋和 β - 片层等有序二级结构形式对于维持蛋白结构的稳定性具有重要意义^[8]。Ahmad 等发现 loop 环等无规则卷曲在空间结构上更为灵活, 更容易去折叠而产生构象的改变^[9]。因此推测, EYHS 等耐盐丝氨酸蛋白酶的这种适度柔性构象

使其在维持内部空间结构稳定的基础上,又具有一定的柔性,以利于在高盐环境下发挥催化活性。

2.4 表面酸性氨基酸及内部疏水性氨基酸预测

利用 PredictProtein 网站对蛋白质的溶剂可及性进行预测。结果表明,6种耐盐丝氨酸蛋白酶表面酸性氨基酸比例较高(表2),介于1.4~3.2之间,其中EYHS的表面酸性氨基酸与碱性氨基酸比值可以达到1.9。酸性氨基酸使蛋白表面带有大量负电荷,使蛋白酶在高盐环境中可以维持一定的柔韧性,以保证酶的催化活性^[10];另一方面,酸性侧链能够结合水和盐离子,为蛋白质适应

高盐环境并维持稳定提供了可能,同时也增加了蛋白质在高盐环境下的溶解性^[11]。

Gromiha等观察到,蛋白内部氨基酸残基的疏水性与其内部结构的稳定性密切相关^[12]。疏水性的内核在高盐环境下易刚化,导致酶的结构自由能降低,降低了催化活性所需的蛋白质结构弹性^[10]。据蛋白溶剂可及性状态分析可知,耐盐丝氨酸蛋白酶均含有弱疏水性内核结构,EYHS的内部疏水性氨基酸占比约为31.5%,弱的疏水性内核使其在高盐环境下具有一定灵活性,能够有效结合底物和辅因子,促进底物酶解。

表2 丝氨酸蛋白酶二级结构形式、疏水性氨基酸及表面酸/碱性氨基酸分析

Table 2 Analysis of secondary structure, hydrophobic amino acid and the ratio of the surface acidic amino acids to basic amino acids of serine protease

不同来源丝氨酸蛋白酶	α螺旋	β片层	无规则卷曲	内部疏水氨基酸	Asp + Glu/ArgLys + His
Salinivibrio sp. YH4(QAB01366.1)	17.1	23.0	60.0	31.5	1.9
Bacillus sp. (PRO65824.1)	9.0	25.3	65.7	36.5	3.2
Halobacillus sp. (TGB01716.1)	20.0	19.6	62.4	31.2	1.7
Halobacillus sp. (TGB01706.1)	19.9	18.1	62.0	29.2	1.6
Paludifilum sp. (OYD06754.1)	25.2	19.0	55.8	40.3	1.6
Oceanobacillus sp. (AVR00957.1)	24	19.5	56.5	39.3	1.4
Pontibacillus sp. Y32(KGP74215.1)	23.1	19.1	57.8	39.5	2.5

2.5 关键氨基酸位点预测

将EYHS及检索到的6个耐盐丝氨酸蛋白酶的催化结构域进行序列比对,分析其保守位点,这些位点可能在维持高盐环境下酶的结构和功能方面发挥重要作用。多序列比对(图2)发现,各蛋白酶均含有S8家族丝氨酸蛋白酶的保守结构特征:EYHS含有催化三联体氨基酸(Asp32、His65和Ser215);Ser215存在于Ser-Gly-Thr-Ser-Met-Xaa-Xaa-Pro基序中;还发现在Asp32处有一个Xaa-Xaa-Asp-Xbb-Gly-Xaa基序;在His65处存在His-Gly-Xaa-His-Xaa-Ala-Gly基序(其中Xaa代表脂肪族氨基酸,Xbb代表极性氨基酸)。此外,还含有一些高度保守的极性氨基酸和芳香族氨基酸,如:His39、Ser123、Asn152、Tyr208。同时,Gly(34、66、71、79、143、151、172、187、196、213、223)和Ala(70、81、139、194)在EYHS催化结构域中高度保守,且含量较

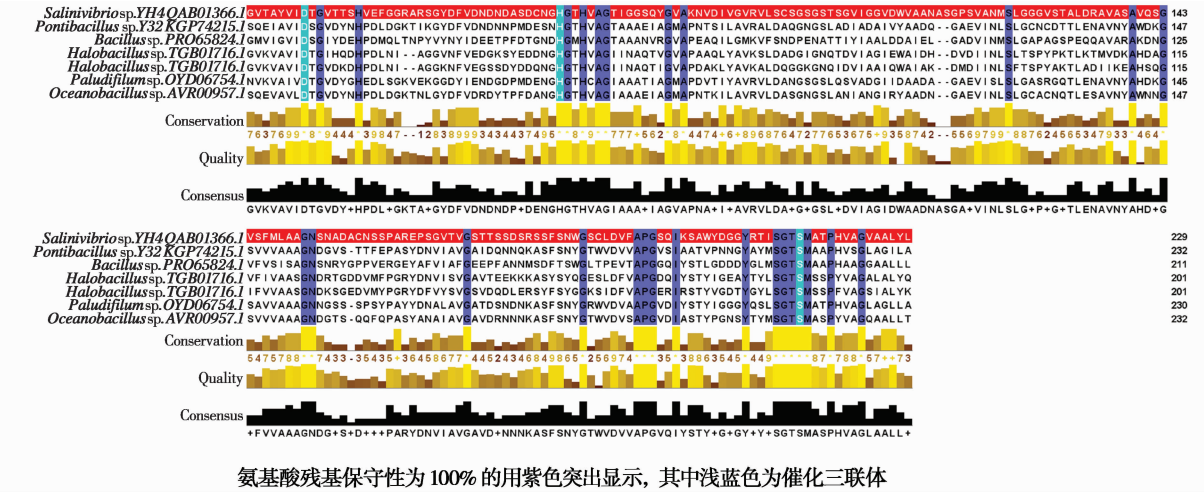
高。

2.6 同源模建及表面静电势分析

通过 Swiss-Model 网站对上述蛋白酶的催化结构域进行建模。通常,目标序列与参考蛋白序列之间的相似性在50%以上时,构建的目标蛋白三维模型才具有很高的准确性^[13]。在对上述蛋白酶模型预测过程中发现,Salinivibrio sp. YH4(QAB01366.1)/EYHS和耐盐丝氨酸蛋白酶 Pontibacillus sp. Y32(KGP74215.1)与参考蛋白序列之间的相似度在75%以上,属于同源性高的模型^[14]。对两者分别进行模拟得到了以PDB ID 1DBI和PDB ID 1S2N为模板的高质量预测模型,相似度分别为79.23%和85.20%,全局模型质量评估得分(GMQE)分别为0.88和0.96。如图3A1所示,EYHS蛋白酶的催化结构域由七个螺旋,一个由七条平行链组成的β片层以及两个由两条反平行链组成的β片层组成。图3A1、

3B1 中黄色残基显示了酸性氨基酸残基的分布,酸性氨基酸残基大多分布于催化结构域表面,球棍模型显示了催化三联体的分布,催化三联体位于催化结构域内部。通过 Discovery Studio 软件进行可视化分析,VMD 联合 APBS 插件进行表面

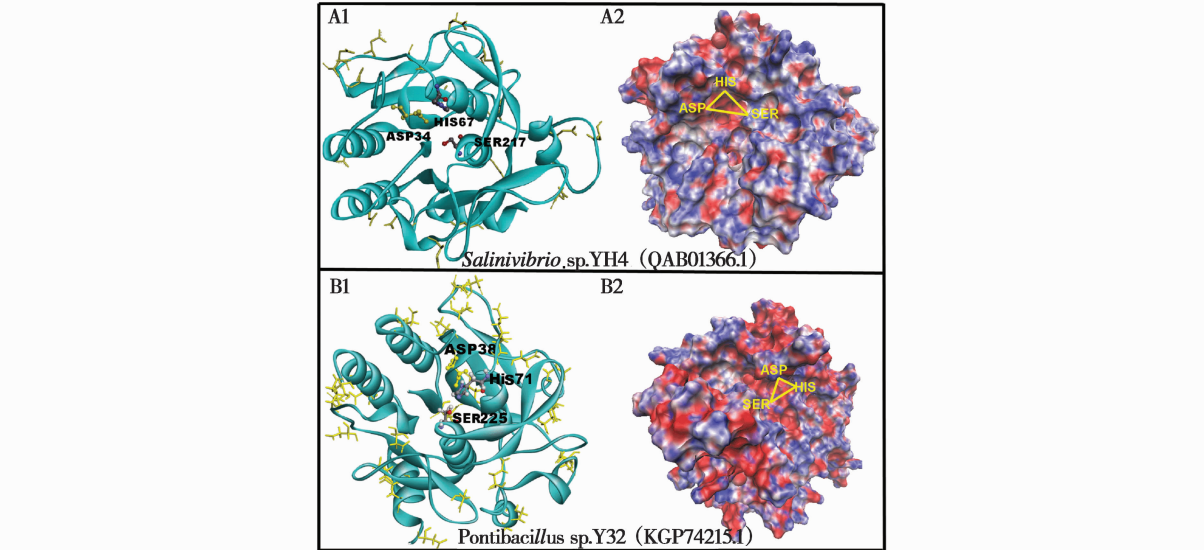
电荷分布处理。如图 3A2、3B2 所示,蓝色表示蛋白酶带正电荷的区域,红色表示带负电荷的区域,灰色表示不带电荷的区域,两者催化三联体所处空穴区域表面静电势都为负,其它区域静电势分布并无规律。



氨基酸残基保守性为 100% 的用紫色突出显示, 其中浅蓝色为催化三联体

图 2 丝氨酸蛋白酶催化结构域多序列比对

Fig. 2 Multiple amino acid sequence alignment of serine proteases catalytic domain



带状模型显示了 α 螺旋、 β 片层、转角/环、催化三联体及酸性氨基酸(黄色标记)(图 A1、B1);
表面静电势模型(蓝色, 正电荷区域; 红色, 负电荷区域; 灰色, 不带电荷)(图 A2、B2)

图 3 丝氨酸蛋白酶催化结构域同源模建图

Fig. 3 Modeled catalytic domain of serine proteases

3 讨论

本项研究发现 *Salinivibrio* sp. YH4 的丝氨酸

蛋白酶 EYHS 具有较强的耐盐性。通过与 NCBI 数据库中细菌来源的 6 个 S8 家族的耐盐丝氨酸蛋白酶比对可知, EYHS 能够在高盐环境中维持其稳定性和催化活性可能与其表面分布的大量的

酸性氨基酸和弱疏水性的内核有关。同时,高盐环境下 EYHS 能够维持其催化活性可能也得益于蛋白质内部有序的二级结构和表面大量的柔性 loop 环等无规则结构。通过对催化结构域的多序列进行比对发现,耐盐丝氨酸蛋白酶在催化三联体两侧的序列上存在高度保守的基序和一些保守的极性氨基酸及芳香族氨基酸。许多研究表明,极性氨基酸和芳香族氨基酸在底物结合中起着关键作用^[15]。这些氨基酸残基容易形成离子键或氢键,其中盐桥可以清除盐离子的屏蔽效应,增加耐盐酶的可溶性,而氢键则有利于蛋白酶三级结构的稳定,使其耐受高盐环境^[16]。同时,EYHS 催化结构域中 Gly 和 Ala 高度保守,且含量较高,可能是由于这些侧链小的 Gly 及 Ala 位于空间上转角位置,使得蛋白具有较大的自由度,更有利于蛋白酶在高盐环境下维持适度的柔性构象,发挥其催化功能。因此猜测,耐盐丝氨酸蛋白酶的这些高度保守的基序和位点对于维持高盐环境下酶的催化功能具有重要意义。对催化结构域进行同源建模和表面静电势分析,发现在催化位点区域具有高度表面负电势,这可能与维持高盐环境下酶的稳定性有关。Laska 指出不同蛋白酶同源物的环境适应性和功能多样性会导致不同的表面静电势分布^[17]。Dym 指出,催化位点周围带大量负电荷的残基能提供稳定作用,从而有助于酶在高盐环境下行使催化功能^[18]。尽管三维结构预测对蛋白功能研究有一定的指导作用,但不能一概而论,还有待进一步的实验来验证。

本研究结果为深入研究 *Salinivibrio* sp. YH4 胞外丝氨酸蛋白酶 EYHS 的高盐环境适应性提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Russell H. Advances in understanding the biology of halophilic microorganisms[M]. Heidelberg: Springer Science + Business Media Dordrecht, 2012: 59–60.
- [2] 任培根,周培瑾. 中度嗜盐菌的研究进展[J]. 微生物学报, 2003, 43(3): 427–431.
- [3] Narendra M, Bhushan C, Ulhas P. Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 117: 493–522.
- [4] Sinha R, Khare S K. Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: Differential role of metal ions in stability and activity[J]. Bioresource Technology, 2013, 145: 357–361.
- [5] Akolkar A V, Durai D, Desai A J. *Halobacterium* sp. SPI(1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(1): 44–53.
- [6] 武翠玲, 刘丹, 杨兴昊, 等. *Salinivibrio* sp. YH4 胞外蛋白酶 EYH I 的分离纯化、酶学性质及基因克隆[J]. 山东大学学报(理学版), 2016, 51(5): 36–42.
- [7] Rost B, Sander C. Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure[J]. Proteins, 1994, 19(1): 55–72.
- [8] Jamir K, Seshagirao K. Fluorescence quenching, structural and unfolding studies of a purified cysteine protease, ZCPG from *Zingiber montanum* rhizome[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 277–283.
- [9] Ahmad S, Kumar V, Ramanand K B, et al. Probing protein stability and proteolytic resistance by loop scanning: A comprehensive mutational analysis[J]. Protein Science, 2012, 21(3): 433–446.
- [10] Mevarech M, Frolow F, Gloss L M. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt[J]. Biophysical Chemistry, 2000, 86(2–3): 155–164.
- [11] Stéphane B. Richard, Madern D, Garcin E, et al. Halophilic adaptation: novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 Å resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*[J]. Biochemistry, 2000, 39(5): 992–1000.
- [12] Gromiha M M, Oobatake M, Kono H, et al. Role of structural and sequence information in the prediction of protein stability changes: comparison between buried and partially buried mutations[J]. Protein Engineering Design & Selection, 1999, 12(7): 549–555.
- [13] 湛容, 陈敏, 杨春贤, 等. 基于 SWISS-MODEL 的蛋白质三维结构建模[J]. 生命的化学, 2006(01): 54–56.
- [14] Rodriguez R, China G, Lopez N, et al. Homology modeling, model and software evaluation: three related resources[J]. Bioinformatics (Oxford, England), 1998, 14(6): 523–528.
- [15] He H L, Guo J, Chen X L, et al. Structural and functional characterization of mature forms of metalloprotease E495 from Arctic sea-ice bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM495[J]. PLoS ONE, 2018, 7(4): e35442.
- [16] 石云云, 李信志, 张桂敏. 微生物嗜盐酶的研究进展[J]. 微生物学报, 2017, 57(08): 1180–1188.
- [17] Laskar A, Rodger E J, Chatterjee A, et al. Modeling and structural analysis of evolutionarily diverse S8 family serine proteases[J]. Bioinformation, 2011, 7(5): 239–245.
- [18] Dym O, Mevarech M, Sussman J L. Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an archaeobacterium[J]. Science (New York), 1995, 267(5202): 1344–1346.

Salt-tolerance and Bioinformatics Analysis on the Serine Protease EYHS Secreted by *Salinivibrio* sp. YH4

WU Cui-ling, SONG Ying-da, GAO Hui-fang, ZHANG Lian-yun, REN Chen-xia
(Changzhi Medical College, Changzhi, 046000, China)

Abstract: To investigate the structural properties and salt tolerance of serine protease EYHS secreted by *Salinivibrio* sp. YH4, the gelatin immersing zymography was employed to analyze salt tolerance of EYHS. Bioinformatics tools were used to analyze structural properties of EYHS and six S8 family salt-tolerant serine proteases. The results showed that EYHS had high proteolytic activity at 4 mol/L NaCl. The proportion of irregular curls was high on the surface of EYHS and six kinds of S8 serine proteases, while α -helix and β -sheet were mainly located inside the enzyme. Furthermore, the content of acidic amino acids was high on the surface of serine protease and it has a weak hydrophobic core. Multiple sequence alignment showed that there were highly conserved motifs, polar amino acids and aromatic amino acids on both sides of the catalytic triad, in addition to high contents of Gly and Ala. Homologous modeling and surface charge distribution showed that α -helix and β -sheet formed the catalytic cavity of protease, the EYHS active center contained a catalytic triad composed of Asp32, His65 and Ser215, with the surface electrostatic potential being negative in the catalytic center area. The above structural characteristics of salt-tolerant serine protease may help maintain its stability and moderate flexibility in high salt environment, which was helpful for its catalytic function. This study provided a theoretical basis for studying the adaptability of salt tolerant serine protease to high salt environment.

Key words: *Salinivibrio* sp. YH4; Serine protease; Salt-tolerant protease; Bioinformatics

(上接第 104 页)

Microecological Analysis on Seaweed Leaf Surface for High-salt Wastewater Treatment by Using *Ulva lactuca*

LU Wen-juan¹, LV Jian^{1,2}, WU Jun³, ZHANG Yu-xuan², CUI De-jie¹

(1. Resources and Environment College of Qingdao Agricultural University, Qingdao, 266109, China;

2. Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, 264003, China;

3. Key Laboratory of Comprehensive and Highly Efficient Utilization of Salt Lake resources, Qinghai Institute of Salt Lakes, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810008, China)

Abstract: *Ulva lactuca*, a large intertidal green alga, has played a significant role in removing nitrogen and phosphorus nutrients in waters. However, no detailed information is available on microecology of leaf surface for high-salt wastewater treatment by using *Ulva lactuca*. Therefore, this study investigated the microbial community feature of seaweed surface and wastewater through high-throughput sequencing technology for high-salt wastewater treatment by using *Ulva lactuca*. The results showed that the microbial diversity and abundance of algal surface were higher than those of wastewater. The dominant bacteria on algal surface included *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Fictibacillus* and *Brevibacterium*. *Bacillus* accounted for more than 70% of the total microorganisms on algal surface, serving as the main dominant bacterium. *Bacillus* genus and *Exiguobacterium* genus were the main species in the wastewater, accounting for over 99% of the total microorganisms. The algal surface was more conducive to the growth and distribution of microorganisms than the water with the fluidity.

Key words: *Ulva lactuca*; High-salt wastewater; Microecology