

# 金黄色葡萄球菌新型耐热核酸酶(Nuc2) 的定点突变与特性分析

陈丽敏,施春雷,王大鹏,张道锋,史贤明\*

(上海交通大学农业与生物学院 中美食品安全联合  
研究中心微生物代谢国家重点实验室,上海 200240)

**摘要:**本研究选取了 F60、A62、T102 和 Y135 这 4 个可能的关键位点,采用定点突变的方法成功构建了 5 个 Nuc2 的单点和多点突变体。体外表达并纯化这些核酸酶,对其活性、耐热性和二级结构进行测定。结果表明:经方差分析( $p < 0.05$ ),T102M 和 F60A/A62L/T102M/Y135V 的核酸酶活性与野生型相比较显著下降,并且 F60A/A62L/T102M/Y135V 的酶活性基本丧失;T102M 和 F60A/A62L 的耐热性明显弱于野生型;T102M 和 F60V/A62L 的二级结构中 $\alpha$ -螺旋结构的含量明显低于野生型,F60A/A62L/T102M/Y135V 的二级结构中包含有无规卷曲。因此,推断 T102 是维持 Nuc2 核酸酶活性、耐热性和二级结构稳定的一个关键位点;F60、A62、T102 和 Y135 及其与邻近氨基酸之间的相互作用对维持 Nuc2 的性质稳定起着重要作用。

**关键词:**金黄色葡萄球菌,新型耐热核酸酶,定点突变,二级结构

## Site-directed mutagenesis and characteristics analysis of new staphylococcal nuclease(Nuc2)

CHEN Li-min, SHI Chun-lei, WANG Da-peng, ZHANG Dao-feng, SHI Xian-ming\*

(MOST-USDA Joint Research Center for Food Safety, State Key Lab of Microbial Metabolism,  
School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** Four amino acid residues (F60, A62, T102 and Y135) were selected and five single and multiple mutants of Nuc2 were constructed. After *in vitro* expression and purification, enzyme activity, thermostability and secondary structure of these nucleases were determined. The results indicated that the enzyme activity of T102M and F60A/A62L/T102M/Y135V had significant differences with wild-type (WT) after variance analysis ( $p < 0.05$ ), and the nuclease activity of F60A/A62L/T102M/Y135V was totally disabled. The thermostability of T102M and F60A/A62L was much weaker than that of WT. Besides, the  $\alpha$ -helical content of T102M and F60V/A62L in their secondary structure was much lower than that of WT, and it was showed from the CD spectra that the secondary structure of F60A/A62L/T102M/Y135V was in a state of random coil. Therefore, T102 is a pivotal site to maintain the nuclease activity, thermostability and secondary structure of Nuc2. And the interaction among F60, A62, T102 and Y135 is also significant to maintain its stability of secondary structure.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; new staphylococcal nuclease; site-directed mutagenesis; secondary structure  
中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2015)17-0156-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.17.023

耐热核酸酶(staphylococcal nuclease, SNase),是金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)特有的重要毒力因子,属于非特异性核糖核酸酶<sup>[1-2]</sup>。编码该酶的 nuc 基因已被广泛用作食品和临床样品中金黄色

葡萄球菌检测的靶基因<sup>[3-5]</sup>。

2001年,Kuroda等<sup>[6]</sup>通过对金黄色葡萄球菌基因组中的22个胞外蛋白酶进行分析,预测了一个编码葡萄球菌核酸酶基因的新阅读框 SA1160(本课题

收稿日期:2014-11-26

作者简介:陈丽敏(1990-),女,硕士研究生,研究方向:食品安全与微生物,E-mail:limin\_chen1990@163.com。

\*通讯作者:史贤明(1961-),男,博士,教授,研究方向:食品安全、食源性细菌分子生态,E-mail:xmshi@sjtu.ech.cn。

基金项目:国家863项目(2012AA101601);教育部博士点基金(20120073110052)。

sliced pork bologna stored at 4 °C in vacuum packages [J].  
Lebenson Wiss Technol,2005,38:21-28.

[38] Hugas M, Monfort J M. Bacterial starter cultures for meat fermentation[J]. Food chemistry,1997,59(4):547-554.

表1 定点突变的引物序列  
Table 1 Primers for site-directed mutagenesis

引物名称	引物序列(5'-3')	突变位点
F60V-F	GTTGTGGATGGTGATACA <u>GTTATTGCAAATCAA</u> ATG	F(TTT)→V(GTT)
F60V-R	CCATTTTGATTTGCAAT <u>AACTGTATCACC</u> ATCCACAAC	
A62L-F	GGATGGTGATACATTTATT <u>TTAAATCAA</u> ATGGTAAAG	A(GCA)→L(TTA)
A62L-R	CTTTACCATTTTGATT <u>TAAAATAAA</u> TGTATCACCATCC	
T102M-F	GAAGCATCAAATTATAGTAAGAAG <u>ATGTTAACA</u> AAATCAAGATG	T(ACA)→M(ATG)
T102M-R	CATCTTGATTTGTTAA <u>CATCTTCT</u> TACTATAATTTGATGCTTC	
Y135V-F	GGATAAGTAAAGATCGTATG <u>GTAATAAGGA</u> ATTAGTGGAAAAGG	Y(TAC)→V(GTA)
Y135V-R	CCTTTTCCACTAATTCCTTATT <u>TACCATACGATCTT</u> ACTTATCC	

组命名为 nuc2 基因),不同于之前大多数文献中报道的 nuc 基因(SA0746,本课题组命名为 nuc1)。本课题组的前期研究已经证实 Nuc1 和 Nuc2 同时存在于金黄色葡萄球菌中<sup>[7]</sup>;氨基酸序列和蛋白质结构比对分析表明,Nuc2 位于活性中心的氨基酸残基相对保守,并且与 Nuc1 的三维结构在叠加后并没有较大的差别<sup>[8]</sup>。虽然 Nuc1 是蛋白折叠和酶功能研究的模式蛋白<sup>[9-10]</sup>,关于其结构与功能之间关系已经研究得较为透彻,但是 Nuc2 作为一个新型的耐热核酸酶,其结构与功能之间的关系尚未得到阐明。

本研究在新型耐热核酸酶 Nuc2 与 Nuc1 氨基酸序列同源性比对的基础上,结合 PROSITE 数据库的序列模式和功能位点分析,选择了 Nuc2 中 F60、A62、T102 和 Y135 这 4 个位点,采用定点突变的方法构建了 T102M、Y135V、F60V/A62L、T102M/Y135V 和 F60V/A62L/T102M/Y135V 这 5 个 Nuc2 的单点和多点突变体。通过对重组蛋白进行诱导表达和纯化,比较突变体和野生型 Nuc2 的核酸酶活性以及二级结构的差异,以期找到对 Nuc2 性质稳定起着重要作用的关键位点,为今后进一步研究金黄色葡萄球菌新型耐热核酸酶(Nuc2)结构与功能的关系奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3) 本实验室保存;金黄色葡萄球菌 RN4220 国际食品保护学会(International Association for Food Protection, IAFP) Karen Battista 博士惠赠;克隆载体 pMD19-T 和表达载体 pET-28a 分别购自 TaKaRa 和 Novagen;限制性内切酶 Nhe I 和 EcoR I、Taq DNA 聚合酶和 T<sub>4</sub> DNA 连接酶 购自 TaKaRa 生物公司;质粒抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒 购于美国 Axygen 公司;QuickChange 定点突变试剂盒 购于 Agilent 科技公司;蛋白纯化试剂盒和脱盐柱 分别购于 Thermo Scientific 公司和 TaKaRa。

### 1.2 实验方法

1.2.1 突变位点的选择 通过在 GenBank 中搜索金黄色葡萄球菌 N315 的基因组序列,下载得到 nuc1(SA0746)和 nuc2(SA1160)的氨基酸序列,使用 Vector NTI Advance<sup>®</sup> 11.5 软件中的 AlignX 进行比对。Nuc2 蛋白的结构域组成、序列模式和功能位点

分析采用 InterPro 数据库(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>)和 PROSITE 数据库(<http://prosite.expasy.org/>)。根据上述分析结果并结合差异位点的理化性质最终确定需要突变的氨基酸位点。

1.2.2 nuc2 基因的克隆和定点突变 根据 GenBank 中 nuc2(SA1160)的序列,利用 Primer Premier 5.0 设计得到去除信号肽的 nuc2 特异性引物并引入相应酶切位点, nuc2 - F (Nhe I): CGTACGGCTAGCAATCATACGGGTCCTTTCAAAA; nuc2 - R (EcoR I): CGCTAGGAATTCTACGCTCGATACGCACTATG。因引物设计的需要,该引物扩增出来的 nuc2 基因包含有终止子 TAA 后的 120 个碱基。以金黄色葡萄球菌 RN4220 的基因组 DNA 为模板,PCR 扩增参数设置如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。按照 TA 克隆的操作说明,取回收后的 PCR 产物 4.5  $\mu$ L、Solution I 5.0  $\mu$ L、pMD19-T 0.5  $\mu$ L,于 16 $^{\circ}$ C 连接 1 h 后转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂布在含有 Amp(氨苄青霉素,100  $\mu$ g/mL)抗性的 LB(Luria-Bertani)平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。转化子经 PCR 验证后,送往上海美吉生物科技有限公司进行 DNA 测序。

针对 F60、A62、T102 和 Y135 这 4 个氨基酸位点设计了 4 对突变引物,如表 1 所示。

按照 QuickChange 试剂盒的操作说明对质粒模板(pMD19-T-nuc2)上的 nuc2 基因进行定点突变,并将产物转化到 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中。经 PCR 检测的转化子送往上海美吉生物科技有限公司进行测序验证。

利用试剂盒进行定点突变每次只突变一个氨基酸密码子,突变产物转化大肠杆菌(DH5 $\alpha$ )后提取甲基化的质粒,以完成了单点突变的质粒为模板再进行其它碱基的突变。即,在完成单点突变、测序验证突变正确之后,以突变子为模板,利用相同的 PCR 条件进行第二个、第三个和第四个位点的碱基突变。

1.2.3 原核表达载体的构建、诱导表达和蛋白纯化 用限制性内切酶 Nhe I 和 EcoR I 对 6 个重组克隆载体以及表达载体 pET-28a 进行双酶切。在 T<sub>4</sub> DNA 连接酶的作用下,将野生型 nuc2 和 5 个突变型 nuc2 基因与 pET-28a 进行连接,连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  后涂布含有 Kana(卡那霉素,50  $\mu$ g/mL)抗性

的 LB 平板,挑取单菌落进行重组子的验证。

以终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG (异丙基硫代半乳糖苷)对野生型和突变型 Nuc2 的重组表达载体分别进行 37 °C, 6 h 和 16 °C, 24 h 的诱导。以 1 × PBS (磷酸盐缓冲液, pH = 7.4) 重悬菌体后,在冰浴条件下进行超声破碎(200 W,持续 4 s,间隔 6 s,共 50 个循环);10000 × g 离心 10 min 后收集上清用于重组蛋白的纯化。

参照蛋白纯化试剂盒的操作说明,纯化 6 个外源表达蛋白并以 15% SDS-PAGE 对纯化蛋白进行分析。

**1.2.4 酶活的测定** 参照 Lachica 等<sup>[11]</sup>的方法,用甲苯胺蓝核酸琼脂平板进行耐热核酸酶活性的测定。将配制好的甲苯胺蓝核酸琼脂融化后倒入平皿中,制备约 0.5 cm 厚度的平板。待琼脂凝固后,用打孔器制作直径为 3 mm 的小孔;孔中加入 20 μL 纯化后的蛋白酶液(200 μg/mL)。将酶活测定平板置于 37 °C 孵育 6 h (保持适当的湿度),核酸酶阳性反应会在孔的周围出现明显的粉红降解圈,以游标卡尺测量粉红圈的直径并记录结果。

**1.2.5 耐热性研究** 将稀释后的纯化蛋白酶液(浓度 200 μg/mL)于 100 °C 下进行加热处理,时间分别设定为 0、20、40、60、80、100、120 min。按照 1.2.4 所述的方法测定热处理后纯化酶液的核酸酶活性,将每个蛋白酶液在 0 min 时的活性定义为 100%,作时间-相对酶活性曲线。

**1.2.6 二级结构的测定** 以 PBS 将纯化的蛋白液稀释至 50 μg/mL,选用光程为 1 mm 的石英比色皿进行测量,上样量为 400 μL。用圆二色谱仪 J-815 (日本 JASCO 公司)进行样品扫描,参数设置如下:扫描波长范围,200~250 nm;扫描速率,100 nm/min;扫描平行次数,3 次。

**1.2.7 数据统计分析** 利用绘图软件 Origin 8.0 进行数据的整理、制图;利用 SAS 9.3 软件的方差分析对数据进行邓肯多重差异分析( $p < 0.05$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 突变位点的选择

InterPro 和 PROSITE 数据库的比对结果表明, Nuc2 具有和 Nuc1 类似的蛋白质结构域组成,都包含有一个 SNase 结构域(45-177),三个保守的酶反应活性中心位点(72R, 80E 和 122R)和三个金属结合位点(58D, 77D 和 78T)。然而, Nuc2 序列中的 F60 和 A62 这两个氨基酸不符合耐热核酸酶家族 TNase\_1 的活性结构模式 PS01123。另外,结合氨基酸序列的同源比对结果(如图 1 所示)可以看出,在相对保守的区段内, Nuc2 中的 102 位苏氨酸(Thr)和 135 位酪氨酸(Tyr)与 Nuc1 中的 144 位甲硫氨酸(Met)和 178 位缬氨酸(Val)的疏水性差别较大,可能会对 Nuc2 的性质稳定起着重要作用。因此,本研究选择了 F60、A62、T102 和 Y135 这四个位点(在图 1 中以黑色方框标注)对 Nuc2 进行定点突变,研究这四个位点对 Nuc2 性质稳定性的影响。

### 2.2 nuc2 基因的定点突变

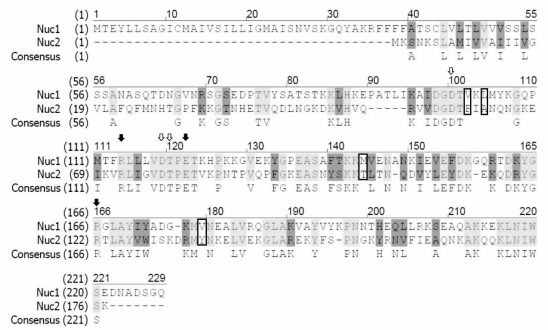


图 1 金黄色葡萄球菌 Nuc1 和 Nuc2 的氨基酸序列比对  
Fig.1 Amino acid sequence alignment of Nuc1 and Nuc2 in *S.aureus*

注:图中浅灰色背景标注的是保守位点,深灰色背景标注的是较保守位点;实心箭头标注处为三个保守的活性中心位点 72R、80E 和 122R,空心箭头标注处为三个金属结合位点 58D、77D 和 78T。

以测序验证正确的重组克隆载体 pMD19-T-nuc2 为模板,利用定点突变试剂盒进行 nuc2 基因定点突变,测序后进行 BLASTn 比对分析,结果显示:已获得预期的突变基因。野生型和突变型 Nuc2 的碱基序列比对结果如图 2 所示(黑色箭头标示处为发生突变的碱基位点)。

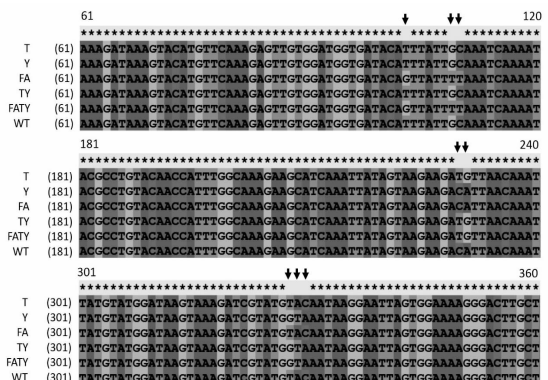


图 2 突变型和野生型 Nuc2 的碱基序列比对  
Fig.2 Alignment of base sequences between mutant and wild-type Nuc2

注:WT.野生型 Nuc2, T. T102M, Y. Y135V, FA. F60A/A62L, TY. T102M/Y135V, FATY. F60A/A62L/T102M/Y135V;因重组蛋白 Nuc2 的目的基因片段不包含有信号肽,文中 F60、A62、T102 和 Y135 这四个氨基酸残基位点的碱基序列分别对应为此处第 103-105、109-111、229-231 和 328-330 位的碱基序列。

### 2.3 原核表达载体的构建和重组蛋白的纯化

用限制性内切酶 Nhe I 和 EcoR I 对 PCR 扩增验证为阳性的质粒重组子进行双酶切验证(如图 3 所示),条带大小与理论值相符。测序结果表明,野生型 nuc2 和 5 个突变型 nuc2 基因已经成功连接到原核表达载体 pET-28a 上。

对纯化后的重组蛋白进行 15% SDS-PAGE 电泳分析,获得了一条大小为 20 ku 左右的蛋白条带,与预计的亚基表现分子量(19.6 ku)大小相符(图



4), 且无杂带。

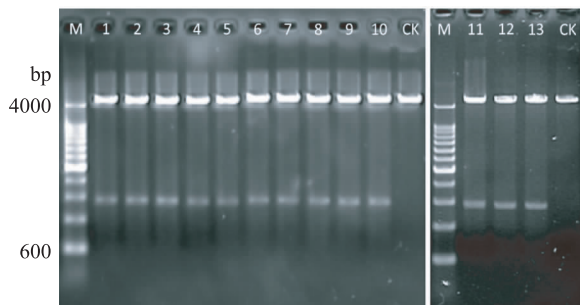


图3 原核表达载体的双酶切验证

Fig.3 Digestion confirmation of Nhe I and EcoR I of prokaryotic expression vectors

注: M. DNA 标准分子量 (200 bp); CK. pET-28a 的双酶切; 1、2. pET-28a-nuc2 的双酶切; 3、4. pET-28a-T102M 的双酶切; 5、6. pET-28a-Y135V 的双酶切; 7、8. pET-28a-F60V/A62L 的双酶切; 9、10. pET-28a-T102M/Y135V 的双酶切; 11-13. pET-28a-F60V/A62L/T102M/Y135V 的双酶切。

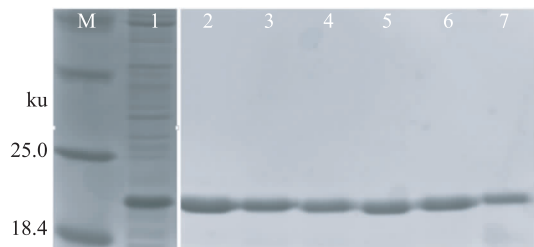


图4 SDS-PAGE 检测蛋白纯化效果

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified protein

注: M. 蛋白标准分子量; 1. 未纯化的 Nuc2; 2. Nuc2; 3. T102M; 4. Y135V; 5. F60V/A62L; 6. T102M/Y135V; 7. F60V/A62L/T102M/Y135V。

## 2.4 核酸酶活性的测定

甲苯胺蓝琼脂平板法测定耐热核酸酶活性的结果如图5所示。从图中可以看出,在 Nuc2 的突变型蛋白中, Y135V 的酶活性与野生型的最为接近,而 F60A/A62L 和 T102M/Y135V 的活性与野生型相比较均有所下降;经方差分析( $p < 0.05$ ), T102M 和 F60A/A62L/T102M/Y135V 与野生型的活性差异显著。其中, F60A/A62L/T102M/Y135V 的核酸酶活性基本丧失。

## 2.5 耐热性

由图6可知,突变型 Nuc2 的相对酶活力与野生型相比都较低,其中, T102M 和 F60A/A62L 的核酸酶活性随着热处理时间的延长而急剧下降。在 100 °C 下加热 40 min, 野生型 Nuc2、Y135V 和 T102M/Y135V 仍然保留有 80% 以上的核酸酶活性, 其中, 野生型 Nuc2 的剩余酶活力高达 90%, 而 T102M 和 F60A/A62L 的剩余酶活力为 50% 以上; 加热 80 min, 野生型 Nuc2、Y135V 和 T102M/Y135V 仍然保有 50% 以上酶活, 而 T102M 和 F60A/A62L 的剩余酶活力仅为 20%; 加热 120 min 后, 突变体 Nuc2 的核酸酶活性均已基本丧失, 而野生型 Nuc2 仍然保有 40% 的酶活性。

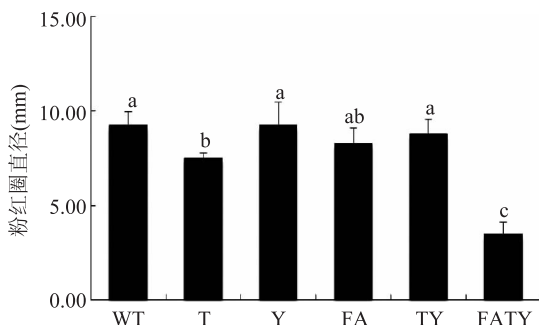


图5 甲苯胺蓝琼脂平板测定野生型和突变型 Nuc2 的酶活

Fig.5 Toluidine blue-DNA assays

for thermonuclease activity of purified recombinant protein

注: WT. 野生型 Nuc2, T. T102M, Y. Y135V, FA. F60A/A62L, TY. T102M/Y135V, FATY. F60A/A62L/T102M/Y135V; 柱状图上的不同小写字母表示利用 SAS 软件进行邓肯多重比较 ( $P < 0.05$ ) 后差异显著。

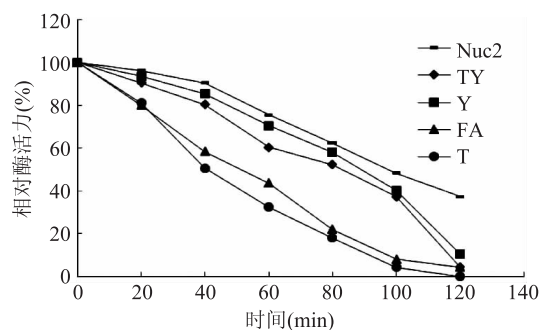


图6 野生型和突变型 Nuc2 的耐热性

Fig.6 Thermostability of wild-type and mutant Nuc2

注: WT. 野生型 Nuc2, T. T102M, Y. Y135V, FA. F60A/A62L, TY. T102M/Y135V; 由于 F60A/A62L/T102M/Y135V 的核酸酶活性已基本丧失, 因此未对该酶进行热稳定性研究。

## 2.6 二级结构

蛋白质的圆二色光谱中,  $\alpha$ -螺旋结构在 208 和 222 nm 处表现出两个负的特征肩峰谱带, 并且负峰强度越大, 表明  $\alpha$ -螺旋结构的含量越高; 无规卷曲在 200 nm 附近存在负吸收<sup>[12]</sup>。图7显示了野生型和 5 个突变型 Nuc2 在远紫外区段 (190~250 nm) 的圆二色光谱。从中可以看出, 在 Nuc2 的突变型蛋白中, Y135V 和 T102M/Y135V 在 208 nm 和 222 nm 两处的负峰 CD 谱带与野生型的基本吻合。然而, T102M 和 F60V/A62L 于 208 nm 和 222 nm 这两处 CD 光谱与野生型的差异较大, 负峰强度明显弱于野生型, 表明这两个蛋白中  $\alpha$ -螺旋结构的含量要低于野生型; 对于 F60V/A62L/T102M/Y135V, 其 CD 光谱与其它蛋白的显著差异表明该蛋白的二级结构受到了严重的破坏, 呈现出一种无规卷曲的状态。

定点突变技术因其可以有目的地改变 DNA 序列中的碱基而被广泛应用于多种目的基因的改造中<sup>[13-14]</sup>。本研究克隆了金黄色葡萄球菌的新型耐热核酸酶基因 nuc2, 利用 QuikChange 试剂盒对 nuc2 进行定点突变。每次只突变单个氨基酸, 转化大肠杆

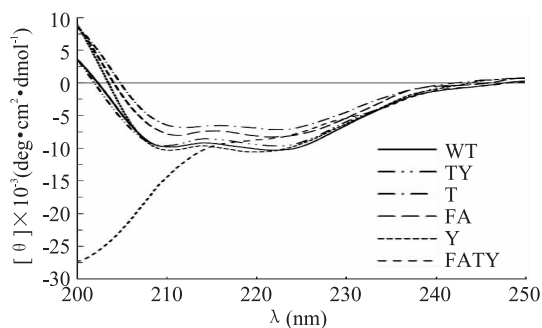


图7 野生型和突变型 Nuc2 的圆二色谱图

Fig.7 CD spectrums of wild-type and mutant Nuc2

注:WT.野生型 Nuc2, T.T102M, Y.Y135V, FA.F60A/A62L, TY. T102M/Y135V, FATY. F60A/A62L/T102M/Y135V。

菌后再提取含有预期突变的甲基化质粒,进行其它位点的碱基突变,从而实现 F60、A62、T102、Y135 这四个位点的单点突变、双点突变和四点突变。

Nuc2 单点突变体 T102M 的核酸酶活性、耐热性以及二级结构稳定性与野生型相比较都显著下降 ( $p < 0.05$ ),表明 T102 是维持 Nuc2 核酸酶活性、耐热性和二级结构的一个关键位点。对于 Y135V,可能是极性氨基酸替换成非极性氨基酸后,蛋白质的疏水作用增强,在一定程度上代偿了位点突变对蛋白构象造成的影响,从而该突变体的活性和二级结构稳定性与野生型相较并未减弱,并且使得 T102M/Y135V 的酶活性、耐热性和二级结构也都优于 T102M。双位点突变体 F60V/A62L 的核酸酶活性、耐热性和二级结构稳定性较野生型差,而本课题组的前期研究也证实了 Nuc2 对金黄色葡萄球菌耐热核酸酶活性表型的贡献较小<sup>[15]</sup>。因此,Nuc2 可能并不遵循耐热核酸酶家族的活性结构模式,作为一种新型的耐热核酸酶,Nuc2 的其它功能有待发掘。F60V/A62L/T102M/Y135V 的二级结构受到了严重的破坏、核酸酶活性也基本丧失,应该是多个位点的改变造成这 4 个位点周围的氨基酸结构网络被打乱,从而破坏了 Nuc2 蛋白的天然构象,导致其活性的丧失。因此,F60、A62、T102 和 Y135 这 4 个位点与其邻近氨基酸残基之间的相互作用对维持 Nuc2 的性质稳定起着重要作用。

在 Nuc1 中,V102、L104、V145、I151、I171 和 V178 这六个氨基酸残基在三维结构中相互靠近,能够联合邻近的氨基酸残基依靠彼此之间的范德华力从而生成稳定的空间构型<sup>[16]</sup>。逾 150 个突变体的氨基酸定点突变体库的构建和结构稳定性实验已经证明了这六个位点对该蛋白的重折叠及结构稳定性起着重要作用<sup>[17-19]</sup>。根据氨基酸序列的比对结果发现,Nuc1 中这六个位于疏水核心的氨基酸残基在 Nuc2 中分别对应为 F60、A62、L103、V108、V127、Y135,而本课题组前期的蛋白质结构比对分析也表明,Nuc2 和 Nuc1 的三维结构在叠加后并没有较大的差别<sup>[15]</sup>。因此,Nuc2 中很有可能也存在由 F60、A62、L103、V108、V127 和 Y135 这六个位点与其邻近氨基酸残基之间依靠相互作用形成的稳定的空间构型,需要

更多的定点突变和空间结构稳定性实验对此加以证明。

### 3 结论

金黄色葡萄球菌新型耐热核酸酶 Nuc2 中的 T102 是维持其核酸酶活性、耐热性和二级结构稳定性的关键位点;F60、A62、T102 和 Y135 这 4 个位点与其邻近氨基酸残基之间的相互作用对维持 Nuc2 的性质稳定起着重要作用。本研究为今后研究新型耐热核酸酶(Nuc2)结构和功能的关系提供了有用的数据和信息,也为进一步研究该新基因的功能和应用奠定了良好的基础。

### 参考文献

- [1] Tucker PW, Hazen Jr EE, Cotton FA. Staphylococcal nuclease reviewed: a prototypic study in contemporary enzymology. I. Isolation; physical and enzymatic properties [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1978, 22(2-3): 67-77.
- [2] Rangarajan ES, Shankar V. Sugar non-specific endonucleases [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2001, 25(5): 583-613.
- [3] Wilson IG, Cooper JE, Gilmour A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes entB and entC1 and the thermonuclease gene nuc [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57: 1793-1798.
- [4] Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, 30: 1654-1660.
- [5] Alarcon B, Vicedo B, Aznar R. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 100: 352-364.
- [6] Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *The Lancet*, 2001, 357: 1225-1240.
- [7] Tang JN, Zhou R, Shi XM, et al. Two thermostable nucleases coexisted in *Staphylococcus aureus*: evidence from mutagenesis and *in vitro* expression [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 284: 176-183.
- [8] Hu Y, Xie YP, Tang JN, et al. Comparative expression analysis of two thermostable nuclease genes in *Staphylococcus aureus* [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2012, 9(3): 265-271.
- [9] Chen HM, Chan SC, Leung KW, et al. Local stability identification and the role of key acidic amino acid residues in staphylococcal nuclease unfolding [J]. *FEBS Journal*, 2005, 272: 3967-3974.
- [10] Wang CC, Tsong TY, Hsu YH, et al. Inhibitor binding increases the mechanical stability of staphylococcal nuclease [J]. *Biophysical Journal*, 2011, 100: 1094-1099.
- [11] Lachica RVF, Genigeorgis C, Hoerich PD. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease

(下转第 169 页)

Bacteriology, 1990, 68: 157-162.  
 [15] 谢爱英, 张富新, 陈颖. 发酵香肠的 pH、水分含量与水分活度(Aw)的关系及其对制品贮藏性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(11): 143-146.  
 [16] Hammes WP, Hertel C. New developments in meat starter cultures[J]. Meat Science, 1998, 49: 125-138.  
 [17] Ilona S, Tatiana K, Eduardo P. Effects of water activity in model systems on high-pressure inactivation of Escherichia coli[J]. Food Bioprocess Technology, 2009, 2: 213-221.  
 [18] Fontana J. Water activity's role in food safety and quality[J]. Food safety magazine, 2001, 2: 19-20.  
 [20] 王卫. 肉制品加工中的防腐保鲜技术[J]. 肉类研究, 2001, 3: 30-33.  
 [21] 王敏. 肉制品中亚硝酸盐的作用、安全性及替代物的讨

(上接第 149 页)

Journal, 2010, 44(5): 912-923.  
 [19] Ohtsubo K, Suzuki K, Yasui Y, et al. Bio-functional components in the processed pre-germinated brown rice by a twin-screw extruder[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2005, 18(4): 303-316.  
 [20] 虞华芳, 汪志君, 方维明. 锌在麦芽中富集研究及对麦芽生理生化特性的影响[J]. 现代食品科技, 2005, 01: 1-5.

(上接第 160 页)

activity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1971, 21(4): 585.  
 [12] 闫隆飞, 孙之荣. 蛋白质分子结构[M]. 北京: 清华大学出版社, 1999: 168-171.  
 [13] 任志强, 郑玉玲, 甘淑珍, 等. 猪溶血素突变体的构建及活性评价[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(6): 580-582.  
 [14] 朱运明, 王晓飞, 闵伟红, 等. 北京棒杆菌天冬氨酸激酶 G377 定点突变及酶学性质表征[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 192-197.  
 [15] Hu Y, Meng JH, Shi CL, et al. Characterization and comparative analysis of a second thermonuclease from Staphylococcus aureus[J]. Microbiological Research, 2013, 168: 174-182.

(上接第 164 页)

2001, 75(2): 255-259.  
 [9] 王凤芹, 刘芳, 孟勇. TLC 和 HPLC 法相结合分析盐水鸭中的生物胺[J]. 食品科学, 2011, 32(14): 273-276.  
 [10] 卢士玲, 李开雄, 徐幸莲, 等. 传统香肠中产生物胺肠细菌和乳酸菌分离方法的研究[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(8): 47-51.  
 [11] Suzzi G, Gardini F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 88(1): 41-54.  
 [12] 郝小倩, 唐善虎, 李雪, 等. 肉制品中生物胺的控制技术及其检测方法的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(9): 148-151.

论[J]. 食品卫生, 2001, 9: 24-25.  
 [22] 杨艳, 王淑琴, 赵春燕. 降低肉制品中亚硝酸盐残留量的研究进展[J]. 食品科技, 2007, 6: 260-264.  
 [23] 赵亚娟, 郝延军, 孙冬梅, 等. 木糖葡萄糖菌和肉糖葡萄糖菌的生理特性及其转化硝酸盐影响因素的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(5): 63-66.  
 [24] 夏秀芳, 张金铎, 孔保华. 木糖葡萄糖菌添加量对发酵牛肉串品质特性的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 47-50.  
 [25] 许慧卿, 汪志君, 蒋云升, 等. 木糖葡萄糖菌对风鸡蛋白质降解的影响[J]. 食品工业科技, 2008, 29(11): 153-155.  
 [26] 杨晶, 田雨, 姜瞻梅. 果蔬汁与蛋白酶联合作用对原料牛肉的质构特性和色泽影响[J]. 食品工业科技, 2012, 33(23): 140-143.

[21] 虞华芳, 汪志君, 方维明. 不同锌处理对麦芽富锌的影响[J]. 食品与发酵工业, 2005, 04: 69-73.  
 [22] 于立梅, 钟惠曾, 于新, 等. 大豆发芽过程中营养成分变化规律的研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 08: 19-22.  
 [23] Prom-u-thai C, Rerkasem B, Cakmak I, et al. Zinc fortification of whole rice grain through parboiling process[J]. Food Chemistry, 2010, 120(3): 858-863.

[16] Chen JM, Lu ZQ, Sakon J, et al. Proteins with simplified hydrophobic cores compared to other packing mutants[J]. Biophysical Chemistry, 2004, 110(3): 239-248.  
 [17] Chen JM, Stites WE. Higher-order packing interactions in triple and quadruple mutants of staphylococcal nuclease[J]. Biochemistry, 2001, 40(46): 14012-14019.  
 [18] Chen JM, Stites WE. Packing is a key selection factor in the evolution of protein hydrophobic cores[J]. Biochemistry, 2001, 40(50): 15280-15289.  
 [19] Holder JB, Bennett AF, Chen J, et al. Energetics of side chain packing in staphylococcal nuclease assessed by exchange of valines, isoleucines, and leucines[J]. Biochemistry, 2001, 40(46): 13998-14003.

[13] Lu S, Xu X, Shu R, et al. Characterization of biogenic amines and factors influencing their formation in traditional chinese sausages[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(6): 366-272.  
 [14] Boner-cid S, Izpuierdo-polido M, Vidal-carou M C. Influence of hygienic quality of raw material on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausages[J]. Journal of Food Protection, 2000, 63(11): 1544-1550.  
 [15] Durlu-ozkayaf, Ayhan K, Vural N. Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products[J]. Meat Science, 2001, 58(27): 163-166.  
 [16] 李志军. 食品中生物胺及其产生菌株检测方法研究[D]. 青岛: 中国海洋大学.