

红纹黄单胞菌 α -氨基酸酯水解酶的克隆、 序列分析及热稳定性提高

王轲^{1,2} 叶丽娟² 曹毅^{1*}

(1. 四川大学 生命科学院 四川 成都 610064)

(2. 中国医药集团总公司四川抗菌素工业研究所 四川 成都 610052)

摘 要: 【目的】克隆红纹黄单胞菌 α -氨基酸酯水解酶基因全序列, 对序列进行生物信息学分析, 并提高酶的热稳定性。【方法】利用多聚酶链式反应(PCR)克隆 α -氨基酸酯水解酶基因全序列; 应用生物信息学软件对获得的基因序列及编码的蛋白序列进行分析; 通过同源建模, 预测红纹黄单胞菌 α -氨基酸酯水解酶的三维结构; 通过定点突变替换氨基酸序列中高度柔性的位点, 提高该酶的热稳定性。【结果】从红纹黄单胞菌(*Xanthomonas rubrilineans*)中扩增得到 α -氨基酸酯水解酶基因 *aeH* (GenBank 登录号 JF744990), 核苷酸序列长度 1 917 bp, 编码 638 个氨基酸。序列比对和同源性分析显示, 该酶与白纹黄单胞菌 *Xanthomonas albilineans* str. GPE PC73 的肽酶及地毯草黄单胞菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. citri str. 306 的戊二酰-7-氨基头孢烷酸酰化酶氨基酸序列相似性最高, 分别为 91%和 83%, 系统进化分析表明, 该酶与白纹黄单胞菌 *Xanthomonas albilineans* str. GPE PC73 的肽酶亲缘性最高。基于预测的三维模型, 对高度柔性的位点进行饱和突变, 从 282 株突变体中筛选得到 3 株 T_{50} 较野生型高 5 °C 以上的突变体。【结论】对红纹黄单胞菌 AEH 的氨基酸序列分析有助于探索同源蛋白的进化过程。对高度柔性位点进行饱和突变的策略可以用于提高热稳定性。

关键词: α -氨基酸酯水解酶, 红纹黄单胞菌, 序列分析, 热稳定性, 定点饱和突变

基金项目: “十二五”重大新药创制科技重大专项(No. 2011ZX09401-403); 四川省国际科技合作与交流研究计划项目(No. 2010HH0036); 四川省国际合作计划项目(No. 2011HH0013); 成都市科技计划项目(No. 10GGYB297SW-182)

*通讯作者: Tel: 86-28-85412842; 信箱: caoyi_01@163.com

收稿日期: 2012-01-11; 接受日期: 2012-04-16

Cloning, bioinformatics analysis and improving thermostability of α -amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas rubrilineans*

WANG Lu^{1,2} YE Li-Juan² CAO Yi^{1*}

(1. College of Bioscience, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

(2. China National Pharmaceutical Group Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu, Sichuan 610052, China)

Abstract: [Objective] The study aimed to clone α -amino acid ester hydrolase gene from *Xanthomonas rubrilineans*, to perform bioinformatics analysis and increase the thermostability of the enzyme. [Methods] The full length of *aeh* was cloned by polymerase chain reaction (PCR). The gene sequence obtained and the putative amino acid sequence were analyzed by bioinformatics software, and the three-dimensional structure of *X. rubrilineans* AEH was predicted by homology modeling. In order to improve thermostability, sites displaying high degree of flexibility were replaced through site-directed mutagenesis. [Results] *Aeh* was obtained by PCR from *X. rubrilineans* (GenBank accession: JF744990). The nucleotide sequence is 1 917 bp length, encoding a polypeptide of 638 amino acids and shares 91% and 83% identity to peptidase from *X. albilineans* str. GPE PC73 and GL-7-ACA acylase from *X. axonopodis* pv. citri str. 306 respectively. Based on the predicted model, sites displaying high degree of flexibility were replaced through saturated mutagenesis and 3 variants with 5 °C higher T_{50} than wild type were distinguished from 282 variants by screening. [Conclusion] The sequence analysis of *X. rubrilineans* AEH was benefit for exploration of evolution history. The strategy of replacing highly flexible residues by saturated mutagenesis can be used for enhancing thermostability.

Keywords: Alpha-amino acid ester hydrolase, *Xanthomonas rubrilineans*, Sequence analysis, Thermostability, Site-directed saturated mutagenesis

β -内酰胺类抗生素, 是全球医药领域销售额最大的品种之一, 在抗感染药品中占据重要地位^[1]。为满足全球对抗菌谱广、药理性质优的抗生素的需求, 人们从未停止过探索新 β -内酰胺抗生素的脚步。自从发现侧链的变化能够改变 β -内酰胺抗生素的性质, 半合成 β -内酰胺抗生素的序幕由此拉开^[2]。化学法合成 β -内酰胺抗生素在经历了几十年的辉煌之后, 由于酶法合成无可比拟

的选择性^[3]及温和的反应条件^[4], 使得人们的眼光逐渐从化学合成法转向酶法。

虽然大肠埃希菌的青霉素酰化酶(Penicillin Acylase, 简称 PA, EC 3.5.1.11)最应早用于酶法生产 β -内酰胺抗生素^[5], 但 α -氨基酸酯水解酶(α -Amino acid ester hydrolase, 简称 AEH, EC 3.1.1.43)具备一系列优点^[6]: 与酰胺的亲合力低导致底物水解少; 不受水解产物苯甘氨酸的抑

制; 对 D-苯甘氨酸甲酯有构象选择性, 工业上可以直接使用消旋混合物, 而不必先进行拆分; 其最适反应 pH 比 PA 低, 也使反应体系中的底物和产物更稳定, 尤其适合用于催化合成带 α -氨基的 β -内酰胺类抗生素, 因而成为非常有前景的 PA 替代品。

虽然 1972 年 Takahashi 等就发现并分离到 AEH, 但直到 10 年前才出现有关 AEH 的基因序列、酶活性中心以及三维晶体结构的报道^[7-9]。AEH 通常为二聚体或四聚体, 能够催化 3 个反应: α -氨基酸酯的水解; β -内酰胺类抗生素的合成; β -内酰胺类抗生素的水解(图 1)。AEH 每个亚基有一个非常保守的活性中心, 是 3 个氨基酸残基 Asp-Ser-His 构成的三元复合体。目前已知三维结构的 AEH 有 2 个, 分别来自柑橘黄单胞菌

Xanthomonas citri 和混浊醋杆菌 *Acetobacter turbidans*, 为酶的改良铺平了道路。

本研究从红纹黄单胞菌(*Xanthomonas rubrilineans* CPCC 140817)中克隆到 AEH 的基因, 对其进行了序列比对和同源性分析; 为了提高该酶对突变的包容性(Robustness to mutations)^[10], 为后续定向进化提供一个稳定的起始模板^[11-12], 定点突变了氨基酸序列中的高度柔性位点。本研究不仅有助于绕开国外专利, 定向进化 AEH 以适应产业化需求, 同时也为本土酶法合成 β -内酰胺类抗生素创造了条件。

1 材料与方法

1.1 菌株

Xanthomonas rubrilineans CPCC 140817 由

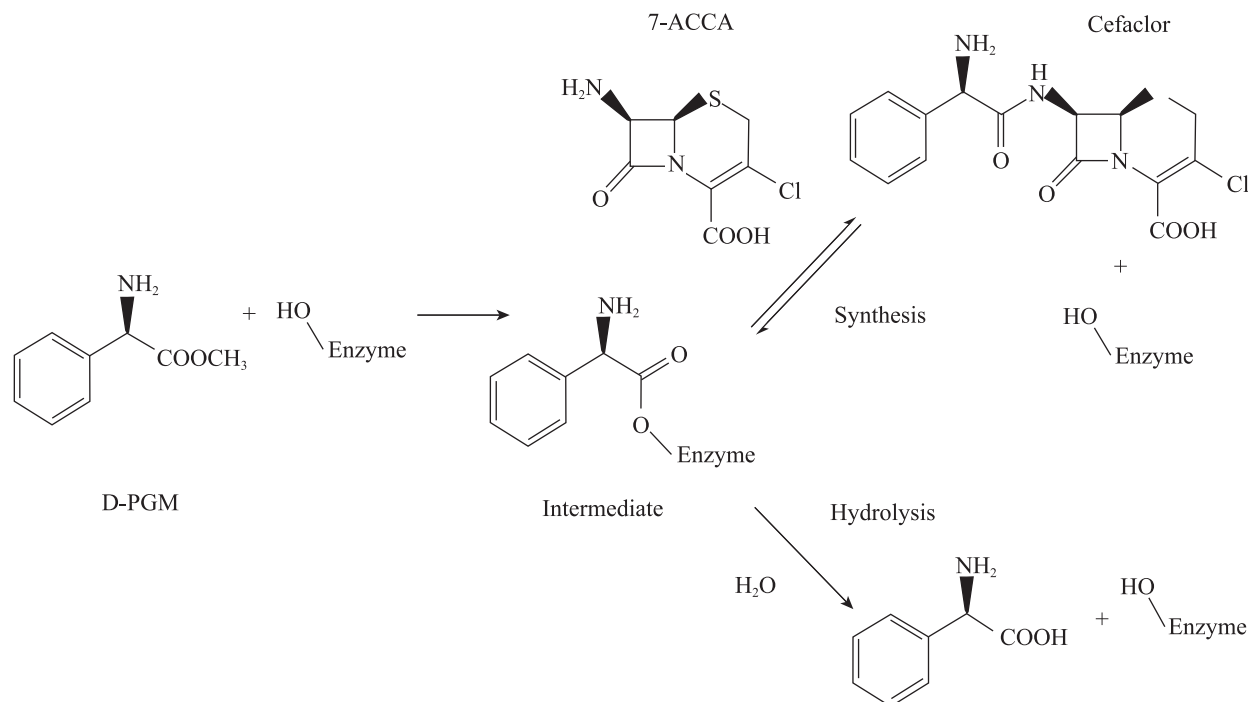


图 1 AEH 催化的头孢克洛合成及苯甘氨酸甲酯水解反应

Fig. 1 Cefaclor synthesis and D-PGM hydrolysis reactions performed by AEH

注: D-PGM: 苯甘氨酸甲酯; 7-ACCA: 3-氯-7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸。

Note: D-PGM: D-phenylglycine methyl ester; 7-ACCA: 7-Amino-3-chloro-desacetoxycephalosporanic acid.

中国医药集团四川抗菌素工业研究所保藏; *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞购自北京天根生化公司。

1.2 引物和试剂

用于克隆的聚合酶为上海生工生物工程公司 *Pfu* 聚合酶, 定点突变采用 TOYOBO 的 KOD plus 定点突变试剂盒, 内切酶 *Dpn* I 及 T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司, 质粒小量提取采用 Bio-Tek 公司的 OMEGA 试剂盒。其它试剂为进口或国产分析纯, 引物合成与测序由上海 Invitrogen 公司完成。

1.3 实验方法

1.3.1 PCR 法扩增 AEH 基因: PCR 反应体系: 基因组 DNA 约 100 ng, 引物 10 pmol/L, dNTPs 200 pmol/L, 1×PCR buffer, *Taq* 酶 1.5 U, ddH₂O 补足总体积至 25 μL。引物序列为表 1 中的 CF 及 CR。梯度 PCR 反应程序如下: 94 °C 3 min; 98 °C 30 s, 50 °C–58 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 共 20 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物切胶回收, 克隆到 pGEM-T 载体中, 测序验证。

1.3.2 AEH 的氨基酸序列分析及三维结构预测:

将所获得的基因序列经 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi>)与 GenBank 中的非冗余蛋白数据库进行同源性比对。利用 Swiss-Model 软件^[13]预测 AEH 的三维结构, 采用 PyMOL^[14]对其三维结构进行进一步分析。

1.3.3 AEH 氨基酸序列分析及定点饱和突变: 运行 B-FITTER^[15]分析 1.3.2 中得到的三维结构的 PDB 格式文件。B 值最高的 10 个氨基酸残基及对应的位置见表 2。首先选择 Gln410、Gly435、Phe459 三个位点进行定点饱和突变。定点突变采用 KOD 酶进行反向 PCR。野生型 pET28-*aeH* 质粒为模板, 引物序列见表 1, 具体操作参见试剂盒说明书。反向 PCR 得到的线性质粒由 T4 DNA 连接酶连接后, 转化感受态 *E. coli* BL21(DE3), 获得 AEH 突变体库。

1.3.4 野生型及突变 AEH 的表达及提取: (1) 野生型 AEH。将测序验证的 pGEM-T-*aeH* 和 pET28 载体分别经 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切后回收, 由 T4 DNA 连接酶连接并转化感受态 *E. coli* BL21 (DE3)。表达及提取条件同突变体。

表 1 用于 AEH 克隆和定点突变的引物
Table 1 Primers used for cloning and site-directed mutagenesis in this work

引物名称 Name of primers	序列 Sequence (5'→3')	内切酶/突变位点 Restriction sites/ Mutation sites
CF	CGGAATTCATGCGCCGCATCGCTCCCTGCCTGC	<i>Eco</i> R I
CR	CCGCTCGAGTCAATGTACCGGCAGACTGATGAAAC	<i>Xho</i> I
410F	GNNKGGCTGCCCCGGCGCAGAGCAAGCC	Q410
410R	GCGCAGCTCAGCGCCAGCGCTGCAG	
435F	CNNKAGGGCGAGTACACCGAGTACGT	G435
435R	GCCTTGGGCGCCTCGAACGAGACG	
459F	GNNKGGCGACCGCGACATGTGGACCAC	F459
459R	ACCACGGGCGCGGCACGAACGG	

注: 带下划线的序列为内切酶位点, 黑体为突变位点。
Note: The underlined sequences are the restriction sites, and the mutation sites are in bold.

表 2 红纹黄单胞菌 AEH 中 B 值最高的 10 个氨基酸残基
Table 2 The 10 amino acids of *X. rubrilineans* AEH with the highest B-value

残基 Residue	B 值 B-value	排名 Rank
Gln436	50.33	1
Gly435	46.4	2
Ala434	44.9	3
Phe459	41.78	4
Ala460	41.59	5
Lys34	40.86	6
Gln410	40.24	7
Arg462	39.57	8
Gln627	38.36	9
Lys433	37.75	10

(2) 突变 AEH。用牙签挑取平皿上的转化菌落, 接入含有 500 μ L 培养基的 2 mL 96 孔深孔板中, 培养基组成: 0.1%乳糖, 1%胰蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1% NaCl, 30 mg/L 卡那霉素。深孔板置 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 24 h 后收获菌体。5 000 \times g 离心 15 min, 弃去培养液。参考 Sambrook 的方法^[16]在 96 孔板中制备无细胞提取物: 菌体沉淀加入 400 μ L 裂解缓冲液, 裂解缓冲液组成: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100, 50 mmol/L NaCl 及 1 g/L 溶菌酶, 37 $^{\circ}$ C 下保温 30 min。裂解完毕, 96 孔板 5 000 \times g 离心 20 min。上清转移到新 96 孔板中作为母板, 4 $^{\circ}$ C 保存以备筛选。

1.3.5 热稳定性的初步筛选: (1) 热处理。从母板中吸取无细胞提取物置于 96 孔 PCR 板, 在 PCR 仪中 50 $^{\circ}$ C 保温 30 min。4 $^{\circ}$ C 冷却 10 min 并在室温平衡 15 min 后备用。

(2) 酶活测定。按照如下条件分别测定酶的无细胞提取物热处理前后的活性。反应底物为 30 mmol/L 7-ADCA、15 mmol/L D-PGM 溶于

50 mmol/L pH 6.2 的磷酸钠缓冲液, 酶的加量为 50 μ L 无细胞提取物每 mL 反应混和物, 30 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 间歇振荡。上述条件下, 1 min 生成 1 μ mol 头孢氨苄所需的酶量定义为 1 个活力单位(1 U)。HPLC 法测定反应生成头孢氨苄的量。HPLC 分析方法如下: 分析柱: 菲罗门 C₁₈, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m; 流动相: A: 甲醇, B: pH 2.1 磷酸铵缓冲液, A:B=30:70; 流速: 1 mL/min; 柱温箱: 35 $^{\circ}$ C; 检测波长: 254 nm; 头孢氨苄保留时间: 6.24 min。计算每个突变体热处理前后的活性比值。

1.3.6 阳性突变株酶活性测定及热稳定性参数 T_{50} 的计算: 同时满足如下两个条件的突变体进入酶的纯化步骤: ①相对野生型保留 80%的活性; ②热处理前后酶活比值高于 50%。

(1) 阳性突变体的纯化。采用 1.3.4 项下相同的培养基, 在 250 mL 摇瓶中 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 24 h。采用 1.3.5 项下相同的方法制备无细胞提取物。用 Hi-Trap (GE 公司医疗部) 纯化无细胞提取物(pET28-*aeh* 编码的重组蛋白带有 N-端 6 \times His 标签), 含 20 mmol/L 咪唑的 pH 6.2、20 mmol/L 磷酸钠, 50 mmol/L NaCl 缓冲液洗脱目的蛋白。超滤离心管(MWCO 50000, Millipore)浓缩含有目的蛋白的洗脱液, 最后用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(10%丙烯酰胺)验证酶溶液的纯度。

(2) 酶比活力测定。按照 1.3.5 项下方法测定纯酶溶液的活性。Pierce BCA 蛋白含量测定试剂盒测定蛋白含量, 具体操作参见试剂盒说明书。根据酶活和蛋白含量计算比活力。

(3) 计算热稳定性参数 T_{50} 。参照文献[17]计算 T_{50} 。吸取纯酶溶液置于 96 孔 PCR 板。PCR 仪设定 35 $^{\circ}$ C–65 $^{\circ}$ C 的温度梯度, 每列为一个温度梯度, 依次升高。每个突变体酶溶液的 3 个平

行样放置在3行中。不同温度梯度下保温30 min。将装有酶溶液的PCR板于4 °C冷却10 min并在室温平衡15 min后,分别测定残留酶活。将残留酶活对温度作图,残留酶活为初始酶活50%的温度为 T_{50} 。

1.3.7 阳性突变体突变氨基酸的确定: T_{50} 提高5 °C以上的突变体采用OMEGA (Bio-Tek)小量质粒提取试剂盒提取质粒,并测序。

2 结果

2.1 *aeH* 全序列的同源性分析

根据同源序列设计引物,PCR扩增得到与预期大小一致的条带。经回收测序分析,确定为 α -氨基酸酯水解酶基因,提交GenBank获得登录号JF744990。

将*aeH*序列在NCBI数据库中进行核苷酸和氨基酸水平的同源性分析。结果如下:在核苷酸水平上,与白纹黄单胞菌*Xanthomonas albilineans* str. GPE PC73及野油菜黄单胞菌*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913基因组中某一段相似性最高,分别为88%和86%,两者都来自基因组测序,没有明确的功能描述;在氨基酸水平上,与*X. albilineans* GPE PC73的肽酶及地毯草黄单胞菌*X. axonopodis* pv. *citri* str. 306的戊二酰-7-氨基头孢烷酸酰化酶(简称戊二酰-7-ACA酰化酶)的氨基酸序列相似性最高,分别达91%和83%。与两个三维结构已知的AEH的氨基酸同源性分别为82%和62%。红纹黄单胞菌AEH与以上4个同源蛋白质的比对结果见图2。可见红纹黄单胞菌AEH的活性中心氨基酸非常保守。

与其它蛋白质的进化树分析结果如图3所示,AEH与*X. albilineans* GPE PC73的肽酶亲缘关系最近。

2.2 AEH 的三级结构预测

应用Swiss-Model软件对*X. rubrilineans* AEH的三维结构进行同源建模。系统以*X. citri*的AEH晶体结构(PDB ID: 1MPX_A)为模板,经同源比对等分析,生成了*X. rubrilineans*的AEH的三维结构模型(图4A)。

2.3 突变位点的确定及突变体库的建立

B-FITTER分析*X. rubrilineans* AEH的三维结构模型后发现,高度柔性位点主要集中在以下5个区域:433-436, 459-462, 34, 410及627(表1)。34位和627位残基分别接近蛋白的N-端和C-端,相应的氨基酸突变对整体蛋白稳定性产生影响的机率较小,而462位处于底物进入活性口袋的通道入口(图4B,红色箭头为底物进入活性位点的通道),是下一步提高特定底物特异性的目标位点,故而优先考虑433-436, 459-460及410三个区域。首先进行410、435和459三个位点的突变,三维结构中的位置见图4B。

由于采用饱和突变,根据95%覆盖率的统计学规则^[18],每个突变位点挑取94个转化子,共282株。

2.4 野生型及突变AEH的热稳定性及比活力

经初步筛选,282株突变体中有47株突变体保留了相对野生型80%的活性。其中,有9株突变体热处理前后酶活比值高于50%。9株突变体分离纯化后,经电泳鉴定为单一条带。按照1.3.6所述测定比活力并作残留活性-温度图计算 T_{50} 。 T_{50} 较野生型提高5 °C以上的突变体,其氨基酸突变及合成头孢氨苄的比活力见表3。可以看出,与野生型相比,G435L催化合成头孢氨苄的比活力降低27%,另外两株突变体比活力没有损失。其中F459N热稳定性最高,其与野生型热稳定性的比较见图5。

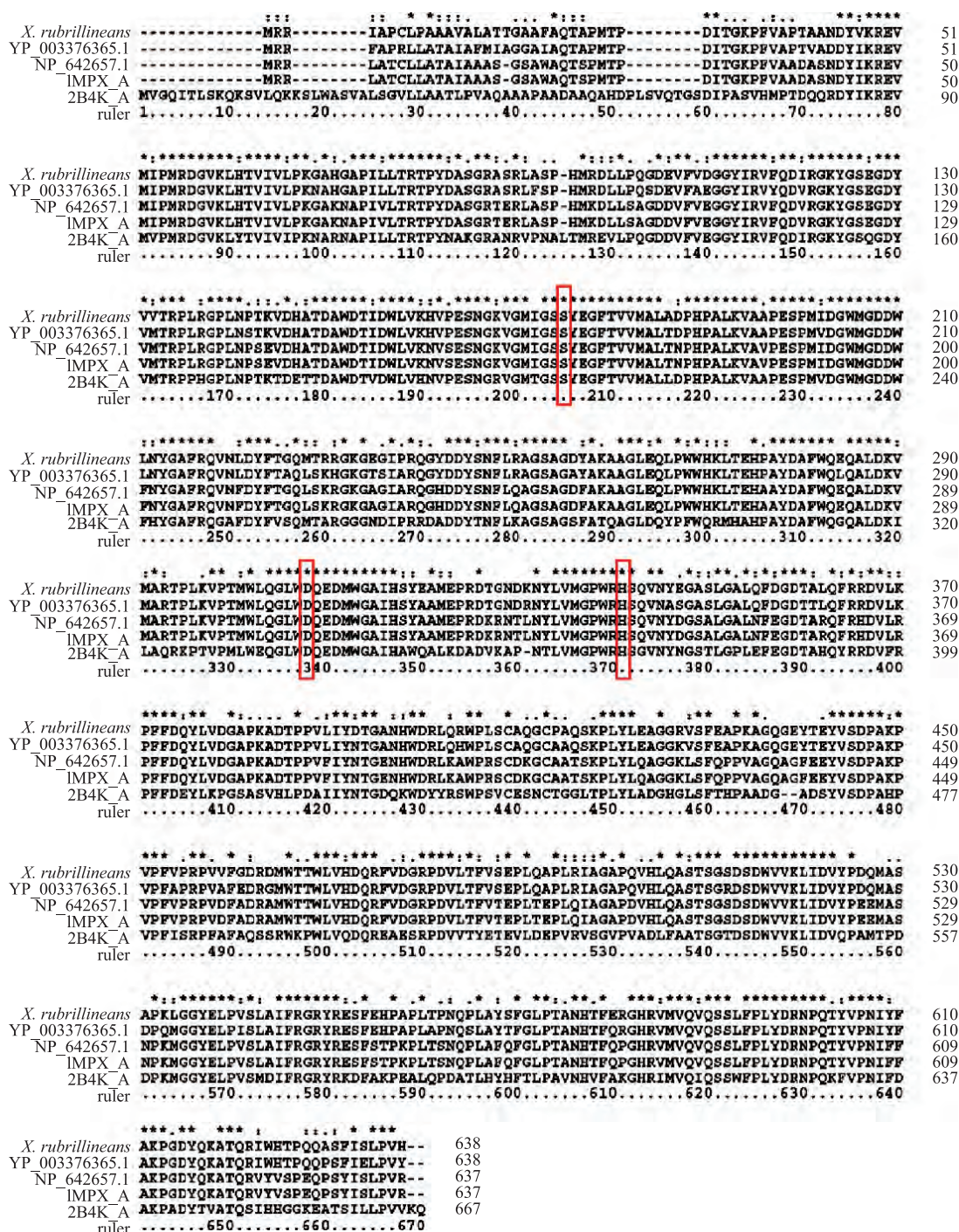


图2 AEH氨基酸序列比对分析

Fig. 2 Alignment and analysis of amino acid sequences of AEH

注: YP_003376365: 肽酶(白纹黄单胞菌); NP_642657: GL-7-ACA 酰化酶(地毡草黄单胞菌); IMPX: AEH(柑橘黄单胞菌); 2B4K: AEH(混浊醋杆菌)。星号代表保守氨基酸残基, 红框表示活性中心。

Notes: YP_003376365: Peptidase, s15 family protein (*Xanthomonas albilineans* str. GPE PC73); NP_642657: GL-7-ACA acylase (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306); IMPX: Alpha-amino acid ester hydrolase (*Xanthomonas citri*); 2B4K: Alpha-amino acid ester hydrolase (*Acetobacter turbidans*). Asterisks indicate conserved amino acids. Red boxes indicate active center.

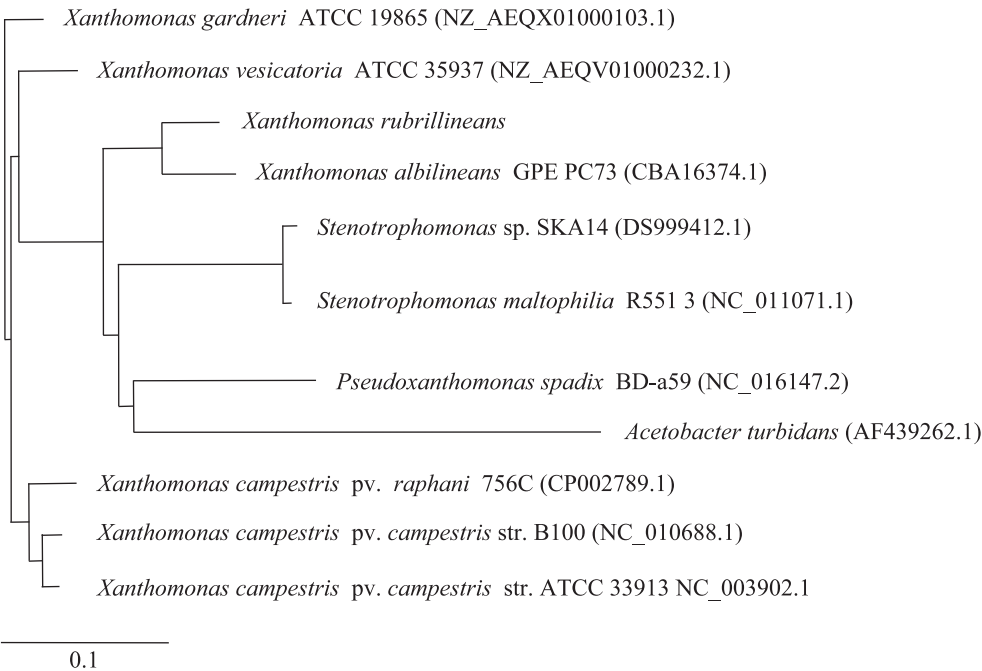


图 3 利用 ClustalX 构建的 AEH 与同源蛋白的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of AEH based on the homology proteins by ClustalX

注: 括号中数字为 GenBank 登录号. 标尺代表 10% 的序列差异.

Note: Numbers in parentheses are GenBank accession numbers. Bar: 10% sequence divergence.

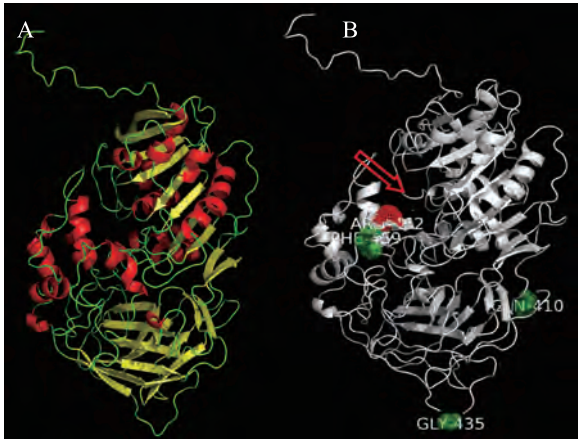


图 4 *X. rubrilineans* AEH 三维结构图

Fig. 4 The three-dimensional structure of *X. rubrilineans* AEH

注: A: 基于柑橘黄单胞菌 AEH (PDB ID: 1MPX_A) 的红纹黄单胞菌 AEH 蛋白的晶体结构图; B: 3 个高度柔性位点的位置及底物通道.

Notes: A: The predicted three-dimensional structure of *X. rubrilineans* AEH based on *X. citri* AEH (PDB ID: 1MPX_A); B: The location of three highly flexible residues and the substrate tunnel of *X. rubrilineans* AEH.

表 3 突变体酶热稳定性及活性 Table 3 Thermal stability and specific activity of variants		
突变株名称 Name of variants	热处理前比活力* Specific activity before heat treatment (U/mg)	半失活温度* T_{50} (°C)
WT	576±17	43±0.5
G435L	418±9	49±0.8
F459N	602±11	54±0.7
F459C	583±23	53±0.7

注: *: 表中比活力及半失活温度为 3 个平行样的平均值.

Note: *: The specific activity and T_{50} values are averages of three parallel samples.

3 讨论

在氨基酸水平上, 与红纹黄单胞菌 AEH 相似性最高的 *X. albilineans* GPE PC73 的肽酶. 属于 Pfam 数据库所定义的 S15 家族^[19], 这种蛋白家族的特征是含有 $\alpha\beta$ -水解酶折叠结构域, AEH

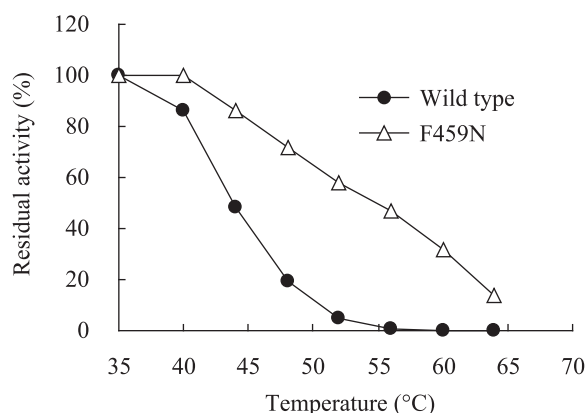


图5 *X. rubrilineans* AEH 野生型及突变体 F459N 纯化后的热稳定性曲线图

Fig. 5 Thermostability curve of purified wild-type and variant F459N of *X. rubrilineans* AEH

注: 分别测定酶溶液在不同温度下(35 °C–65 °C)处理 30 min 后的头孢氨苄合成活性。野生型和突变体 F459N 35 °C 下的比活力数值标准化至 100%。

Notes: Activity in the synthesis of cephalixin was measured after the enzyme solutions were treated at various temperatures (35 °C –65 °C) for 0.5 h. The specific activities of wide-type and variant F459N at 35 °C were normalized to 100%.

也具有相同的结构域。其次是地毯草黄单胞菌 *X. axonopodis* pv. *citri* str. 306 的戊二酰-7-ACA 酰化酶, 催化戊二酰-7-ACA 水解为 7-ACA 的反应。戊二酰-7-ACA 酰化酶的底物与 AEH 的底物具有一定的结构相似性, 与功能上的相似性一致。从构建的进化树(图3)中可以看出, AEH 在黄单胞菌中分布非常广泛, 与 AEH 亲缘关系最近的肽酶也来自黄单胞菌, 不排除两种酶来自共同的祖先蛋白的可能性。

克隆及异源表达 AEH 的目的是将其应用于工业化生产 β -内酰胺抗生素。其中热稳定性这一指标无论对于蛋白质工程(稳定性高的模板可以避免突变体酶由于不稳定而无法显示其优越性)^[20], 还是后续工业化生产中酶的操作稳定性^[21]都具有重大意义。因此将提高 AEH 的热稳定性作为酶改造的第一步。通过纯粹理性设计仅突变少量氨基酸残基就能提高酶稳定性的普遍

规律尚未发现。所以本研究在提高红纹黄单胞菌 AEH 热稳定性的过程采用了半理性的策略, 在结构信息已知的情况下减少筛选量增加获得阳性克隆的成功率。

筛选方法的可靠性对于提高热稳定性至关重要。本文通过三方面避免假阳性: ①热处理快速升温, 快速降温, 保证处理温度的准确性; ②严格控制初筛过程中无细胞提取物活性测定的一系列条件; ③初筛获得的阳性克隆纯化后评价比活力, 排除可能因点突变引起的表达量差异造成酶活性的变化。最终获得 3 株 T_{50} 较野生型提高 5 °C 以上的突变体, 说明该热稳定筛选方法的可行性。

热稳定性的提高不能以牺牲酶活为代价。因此在初筛步骤设置了两个标准: 活性和热稳定性。3 株 T_{50} 较野生型提高 5 °C 以上的突变体中, G435L 催化合成头孢氨苄的比活力降低 27%, 而在初筛步骤 G435L 活性降低小于 20%, 说明无细胞提取物形式和纯酶形式在测定活性方面有一定偏差, 应以更精确的纯酶形式的比活力为准。获得 F459N 及 F459C 的 T_{50} 较野生型分别提高 10 °C 和 9 °C, 且比活力没有损失, 可以作为 AEH 定向进化的起始模板。

致谢: 衷心感谢德国马克斯-普朗克学会煤炭研究所 Manfred T Reetz 教授赠送 B-FITTER 软件。

参考文献

- [1] Elander RP. Industrial production of β -lactam antibiotics[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61(5/6): 385–392.
- [2] Abraham EP. The β -lactam antibiotics[J]. Scientific American, 1981, 244: 64–74.
- [3] Pollard DJ, Woodley JM. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now[J]. Trends in Biotechnology, 2007, 25(2): 66–73.
- [4] Woodley JM. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener[J].

- Trends Biotechnology, 2008, 26(6): 321–327.
- [5] Tao JH, Xu JH. Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2009, 13(1): 43–50.
- [6] Hewitt L, Kasche V, Lummer K, et al. Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the active-site cleft[J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 302(4): 887–898.
- [7] Barends TRM, Polderman-Tijmes JJ, Jekel PA, et al. The sequence and crystal structure of the α -amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas citri* define a new family of β -lactam antibiotic acylases[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(25): 23076–23084.
- [8] Polderman-Tijmes JJ, Jekel PA, Jeronimus-Stratingh CM, et al. Identification of the catalytic residues of α -amino acid ester hydrolase from *Acetobacter turbidans* by labeling and site-directed mutagenesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(32): 28474–28482.
- [9] Barends TRM, Polderman-Tijmes JJ, Jekel PA, et al. *Acetobacter turbidans* α -amino acid ester hydrolase: how a single mutation improves an antibiotic-producing enzyme[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(9): 5804–5810.
- [10] Bloom JD, Labthavikul ST, Otey CR, et al. Protein stability promotes evolvability[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(15): 5869–5874.
- [11] D'Amico S, Marx JC, Gerday C, et al. Activity-stability relationships in extremophilic enzymes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(10): 7891–7896.
- [12] Bommarius AS, Blum JK, Abrahamson MJ. Status of protein engineering for biocatalysts: how to design an industrially useful biocatalyst[J]. Current Opinion in Chemical Biology 2010, 15(2): 194–200.
- [13] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195–201.
- [14] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.
- [15] Reetz MT, Carballeira JD. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes[J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 891–903.
- [16] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南 [M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 1252.
- [17] Li YG, Drummond DA, Sawayama AM, et al. A diverse family of thermostable cytochrome P450s created by recombination of stabilizing fragments[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(9): 1051–1056.
- [18] Firth AE, Patrick WM. Statistics of protein library construction[J]. Bioinformatics, 2005, 21(15): 3314–3315.
- [19] Punta M, Coghill PC, Eberhardt RY, et al. The Pfam protein families database[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(D1): D290–D301.
- [20] Eijssink VGH, Gåseidnes S, Borchert TV, et al. Directed evolution of enzyme stability[J]. Biomolecular Engineering, 2005, 22(1/3): 21–30.
- [21] Synowiecki J. Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(42): 7020–7025.