

## 重组 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶键选择性的半理性改造

普鸿丽, 吕波, 赵东旭, 李春

北京理工大学生命学院, 北京 100081

普鸿丽, 吕波, 赵东旭, 等. 重组  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶键选择性的半理性改造. 生物工程学报, 2015, 31(7): 1119–1128.

Pu HL, Lü B, Zhao DX, et al. Semi-rational modification for improving bond selectivity of recombinant  $\beta$ -glucuronidase. Chin J Biotech, 2015, 31(7): 1119–1128.

**摘要:** 为了提高 *Escherichia coli* 重组表达的  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶 (PGUS-E) 的键选择性, 本研究以 PGUS-E 结构与功能关系的推测为指导, 选择了可能影响 PGUS-E 的键选择性的 R329、T369、N467 位点进行定点饱和突变, 利用薄层层析 (TLC) 和高效液相色谱 (HPLC) 对键选择进行筛选, 得到优势突变酶 R329K、T369V。结果显示: 与 PGUS-E 酶相比, 突变酶 R329K、T369V 键选择性分别提高 26.9%、34.3%。突变酶的酶学性质研究表明, 突变酶的最适 pH 和温度与 PGUS-E 一致, 但其酶催化效率下降。由此可见, R329、T369 对酶催化的键选择性和酶的活性有显著影响。综上结果, 本文应用饱和突变方法改善了 PGUS-E 的键选择性, 为酶的结构和功能关系理解提供了实验依据。

**关键词:**  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶, 单葡萄糖醛酸基甘草次酸, 键专一性, 定点饱和突变

## Semi-rational modification for improving bond selectivity of recombinant $\beta$ -glucuronidase

Hongli Pu, Bo Lü, Dongxu Zhao, and Chun Li

School of Life Sciences, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

**Abstract:** To improve bond selectivity of recombinant  $\beta$ -glucuronidase in *Escherichia coli* (PGUS-E), based on the PGUS-E structure guidance, three key points R329, T369 and N467 were identified to be responsible for the bond selectivity of PGUS-E, and further saturation mutagenesis was conducted. Two positive mutants R329K and T369V were

**Received:** December 2, 2014; **Accepted:** January 21, 2015

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 21176028, 21376028); National Science Fund for Distinguished Young Scholars of China (No. 21425624), Doctoral Fund of Ministry of Education of China (No. 20121101110050).

**Corresponding author:** Chun Li. Tel/Fax: +86-10-68913171; E-mail: lichun@bit.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 20976014, 21376028), 国家杰出青年科学基金 (No. 21425624), 高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20121101110050) 资助。

obtained by a combined selection technique of thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography. Compared to PGUS-E, the bond selectivity of mutants R329K and T369V increased by 26.9% and 34.3%, respectively; whereas the biochemical properties such as pH and temperature profile were unchanged. Nevertheless, the activity was decreased compared to PGUS-E. These results further confirmed that sites R329 and T369 played important roles for the bond selectivity and activity. In summary, this study significantly increased the bond selectivity of PGUS-E by structure guided saturation mutagenesis, providing experimental support for elucidating the relationship between the structure and function of PGUS-E.

**Keywords:**  $\beta$ -glucuronidase, glycyrrhetic acid monoglucuronide, bond selectivity, site-saturation mutagenesis

甘草酸 (Glycyrrhizin, GL) 又称甘草甜素<sup>[1]</sup>, 是一种三萜皂苷类化合物, 由五环三萜皂苷通过  $\beta$ -1,2 糖苷键和  $\beta$ -1,3 糖苷键与两个葡萄糖醛酸相连构成。它具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒等药理效应, 同时作为甜味剂、增香剂、稳定剂广泛应用于化妆品、食品等行业中<sup>[2-5]</sup>。但由于其极性较强, 溶解性不好, 不能有效地穿透细胞膜发挥药效, 使其应用受到了很大的限制。与 GL 的相比, GL 衍生物 (单葡萄糖醛酸基甘草次酸 (Glycyrrhetic acid monoglucuronide, GAMG) 是一种甜度高、热量低、安全性好的甜味剂, 甜度是甘草酸的 5 倍多, 蔗糖的 941 倍<sup>[6-7]</sup>, 而且 GAMG 具有极性适中、溶解性好、易为人体吸收等特性, 成为 GL 最理想的替代品。

$\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶 (EC 3.2.1.31) 是一类能水解含有  $\beta$ -葡萄糖醛酸基的糖苷类化合物, 同时释放出  $\beta$ -葡萄糖醛酸 (GlcA) 和相应的苷元的酶, 主要分布于糖苷酶水解酶家族 1 (GH1)、家族 2 (GH2) 和家族 79 (GH79), 同属于糖苷酶氏簇 A (GH-A)<sup>[8-9]</sup>, 目前报道过的不同微生物来源的  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶性质有所差异, 但普遍存在酶表达效率不高、酶活性偏低、稳定性差、存在副反应等特点<sup>[10-11]</sup>, 因此, 如何获得可以定向催化 GL 生成 GAMG 的  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶

成为甘草酸生物转化的瓶颈。本实验室前期在大肠杆菌原核系统中高效表达了来源于产紫青霉 *Penicillium purpurogenum* Li-3 的  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶 (PGUS)<sup>[12-13]</sup>, 但重组  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶 (PGUS-E) 的键选择性相对于 PGUS 发生了改变, 在水解 GL 的  $\beta$ -1,2 糖苷键生成产物 GAMG 的同时亦会水解 GAMG 的  $\beta$ -1,3 糖苷键生成副产物甘草次酸 (GA), 造成产物 GAMG 专一性降低 (图 1)。因此, 利用蛋白质改造技术研究并改造 PGUS-E 的键选择性及产物专一性使其更好地适应 GAMG 的工业化生产具有重要的应用价值。相比较非理性设计中突变文库大、筛选难度大等缺点<sup>[14-15]</sup>, 通过蛋白结构模拟和分析研究, 将随机突变限制在特定的区域上的半理性设计, 可在较小的突变库中获得性质改善的突变体<sup>[16]</sup>, 近年来被广泛的应用于蛋白的定向改造。

本文以利用 Pymol 软件对 PGUS-E 酶的模拟结构进行分析, 理性预测活性中心氨基酸位点对蛋白质的结构和功能的关系的影响, 最终选定 3 个突变位点 R329、T369 和 N467 进行饱和突变, 产生多样化突变酶, 通过薄层层析结合高效液相色谱筛选方法获得键选择性提高的突变酶 R329K 和 T369V。对结果进行分析讨论,

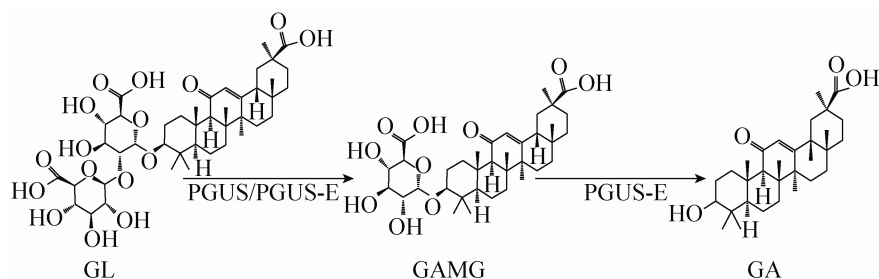


图 1  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶 (PGUS-E) 催化甘草酸示意图

Fig. 1 Biotransformation of GL catalyzed by  $\beta$ -glucuronidase (PGUS-E).

阐述了 PGUS-E 酶的结构和功能的关系, 为酶分子的蛋白质工程改造提供理论基础和试验依据, 也为后续酶分子修饰及相关研究提供性质更为优良的酶源。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1) 质粒和菌株: 克隆及表达宿主 *Escherichia coli* TOP10 由北京理工大学生命学院生物转化与微生物生态课题组保存。含有目标基因 *pgus* (GenBank 登录号: EU095019) 的组成型热诱导质粒 pHCE-*gus* 由本实验室构建。

2) 试剂: PCR 反应相关试剂 *Fastpfu* DNA

聚合酶、dNTPs 等购自购自 TaKaRa 公司; 质粒 DNA 小量提取试剂盒购自北京博迈德科技发展有限公司; *Dpn* I 内切酶购自 Fermentas 公司; DNA marker 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 本实验所用其他化学试剂均为分析纯; PCR 引物合成以及 DNA 测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

### 1.2 饱和突变法构建突变体文库

根据 Statagene 公司 Quit-Change Kit 原理, 针对 R329、T369、N467 三位点设计了 6 条简并引物 (表 1)。以质粒 pHCE-*gus* 为模板, 扩增出含有突变的质粒。其中 PCR 的反应体系组成为:  $10\times$ Fast *Pfu* PCR 缓冲液  $2.5\ \mu\text{L}$ , 4 种 dNTPs

表 1 定点突变引物表

Table 1 Primers used for site-saturation mutagenesis

Primer name	Primer sequence (5'-3')
329-F	GGGGGCAACTCCTTC <u><b>NNK</b></u> ACCTCACACTACCCATACG
329-R	GAAGGAGTTGGCCCCATCCAGTGCAGCAG
369-F	CGGAGCGGGAGC CCAG <u><b>NNK</b></u> TC AACCCGCCGGCTACATTC
369-R	CTGGGCTCCCGCTCCGATGGAGAATGCTAGACCG
467-F	GATGTGCTTTGCTT <u><b>NNK</b></u> CGGTATTTGGTTGGTACACGC
467-R	GAGCTCAGCCGTTTGC GTGTACCAACCAAAAATACCG

Underlined and bold sequences denote the coding sequence of the mutated amino acid (N=A/G/C/T; K=G/T).

混合溶液 2  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , pHCE-gus 模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ , 5 U/ $\mu\text{L}$  的 *FastPfu* DNA 聚合酶及无菌水适量, 反应总体积为 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 65  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 3 min 50 s, 25 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  下延伸 10 min。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应产物, 目标条带为 7 269 bp。PCR 产物中加入 *Dpn* I 限制性内切酶, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  酶解 3 h 以彻底消化甲基化原始模板, 酶解产物采用热击法转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 转化液涂布于 LB 平板上 (含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素), 得到饱和突变文库。

### 1.3 酶的组成型表达及突变文库筛选

将 LB 固体培养板上的单菌落逐个挑到每孔含有 1 mL LB 液体培养基 (含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素; 0.5 g/L 底物 GL) 的 Ep 管中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 转速的摇床中培养表达 24 h 后迅速转至 40  $^{\circ}\text{C}$ , 热诱导裂解细胞释放 PGUS-E 到培养基中, 与培养基中底物 GL 反应 24 h 后, 加 10  $\mu\text{L}$  的 NaOH (1 mol/L) 终止反应。反应液中的底物 GL 和产物 GAMG, GA 通过 TLC 法进行定性初筛, 判断标准如下: 在 GL 转化率相同的条件下 ( $\geq 90\%$ ), GAMG 的积累量越高, 则酶的键选择性越高, 对 GAMG 积累量高于 PGUS-E 酶的优势突变酶, 用 HPLC 进一步进行定量复筛。

### 1.4 PGUS-E 酶液制备及活性分析

将获得的突变株接种于新鲜的 LB 培养基 (含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素) 中 30  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜, 1% 接种量转接于 200 mL LB 培养基, 220 r/min 培养 16 h 后, 将发酵液冷冻离心 (4  $^{\circ}\text{C}$ , 5 000 r/min) 10 min, 用醋酸缓冲液洗涤, 重悬细胞, 在冰浴中超声破碎细胞 (300 W, 工作 2 s,

间歇 2 s, 全程工作时间 20 min)。破碎液于 12 000 r/min 离心 20 min 收集上清, 即为粗酶液。采用镍亲和层析对所得的粗酶液进行分离纯化。首先用 pH 8.0 的 Tris-HCl 的缓冲液平衡镍柱, 通过上样将粗酶液装载到镍柱上, 然后清洗杂蛋白将基线  $A_{280}$  降至最低并冲平。最后分别用 50 和 200 mmol/L 的咪唑溶液梯度洗脱目的蛋白, 最后将洗脱液透析除盐即得到纯酶。

取 100  $\mu\text{L}$  酶液加 200  $\mu\text{L}$  含有 1 g/L 甘草酸 (pH=5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液), 40  $^{\circ}\text{C}$  反应 60 min 后, 添加 10  $\mu\text{L}$  NaOH (1 mol/L) 终止反应。取 100  $\mu\text{L}$  反应液添加 900  $\mu\text{L}$  甲醇, 混合均匀, 用 HPLC 检测 GL、GAMG 及 GA 的含量。 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶的活力定义为: 在上述条件下每分钟消耗 1 nmol 甘草酸所需要的  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶量为一个活力单位 (U)。

### 1.5 最适温度和 pH 的测定

按上述方法测定突变酶在不同 pH (3.0–8.0) 和温度 (25–60  $^{\circ}\text{C}$ ) 下的酶活力, 原始酶与突变酶分别设定最高酶活为 100%, 以相对酶活力和 pH, 温度关系作图, 确定酶的最适 pH 和温度。

### 1.6 PGUS-E 突变酶的键选择分析

采用高效液相色谱 (HPLC) 对反应混合物中底物 GL 及产物 GAMG、GA 进行定量分析。仪器主要参数: 岛津 LC-10A, 色谱柱: Shim-pack, VP-ODS (150 mm, 4.6 mm), 检测器: SPD, 检测波长: 254 nm, 流动相: 甲醇: 0.6% 醋酸 = 81: 19, 进样量: 10  $\mu\text{L}$ , 流速: 1 mL/min, 柱温箱: 40  $^{\circ}\text{C}$ , 工作站: LC solution。GL、GAMG、GA 的保留时间分别为 5.2 min、11.7 min、21.3 min。

数据处理计算公式如下:

转化率 ( $C_{GL}$ ) =  $(S_0 - S_T) / S_0 \times 100\%$ ;

化学键选择性 ( $S_{cb}$ ) =  $P_{GAMG} / (P_{GAMG} + P_{GA}) \times 100\%$ 。

$S_0$ 、 $S_T$  分别代表底物 GL 的初始浓度和终浓度； $P_{GAMG}$ 、 $P_{GA}$  分别代表产物 GAMG 和 GA 的终浓度。

### 1.7 PGUS-E 酶和突变酶的空间结构模拟

PGUS-E 酶的三维结构通过 SWISS-MODEL 蛋白模拟在线服务器 (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) 进行同源模拟获得, 模板为 *E. coli* 来源的  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶 (EGUS) 晶体结构 (PDB 登录号: 3K46), 氨基酸序列比对结果显示相似度达到 54.34%。采用 Pymol 软件理性分析和预测了活性中心氨基酸对 PGUS-E 键选择性的影响, 选取了突变位点。并且应用该软件虚拟氨基酸突变, 通过分析突变前后氨基酸极性、疏水作用、氢键等的变化, 分析结构-键选择性关系。阐述了 PGUS-E 的结构和功能的关系, 为进一步的酶特性改造提供理论基础。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PGUS-E 酶键选择性特异位点分析

PGUS-E 酶同源模拟获得的理论结构说明

它包含一个  $(\alpha/\beta)_8$  桶状催化结构域, 属于  $(\alpha/\beta)_8$  水解酶亚组。 $(\alpha/\beta)_8$  类酶的活性部位均处于一个非常相似的位置, 即位于连接  $\beta$  折叠链 C 端与  $\alpha$  螺旋 N 端的环构成的漏斗形口袋底部, 参与底物结合和催化作用氨基酸在这个口袋中<sup>[17-18]</sup>。PGUS-E 的糖苷底物分子 GL 和 GAMG 的糖基部分均为葡萄糖醛酸, 配基则不同 (图 2), 说明 PGUS-E 对 GL 和 GAMG 的末端糖苷键的糖基识别较强, 对配基结构识别性较低, 可能导致键选择性低。由此做出以下假设: 糖苷键两端结构识别决定酶的键选择性, 通过与 GL 末端糖苷键的配基结构识别相关的氨基酸突变可以提高 PGUS-E 酶键选择性, 最终使 GAMG 的产量提高。

大肠杆菌的  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶 (EGUS-E) 与 PGUS-E 同属于 GH2, 其结构与功能关系为 PGUS-E 的研究提供了有利参考。利用 Pymol 软件对 PGUS-E 的模拟结构与 EGUS-E 及葡萄糖醛酸复合物的晶体结构 (PDB 登录号: 3K4D) 进行比对, 分析发现 PGUS-E 酶三维结构中 Arg329、His332、Thr369、Asp414、Asn467、Asp505、Trp550、Arg563、Lys567、Asn569 (图 3) 位于底物结合口袋中, 说明这些氨基酸与底物分子的糖基或者配基识别结合相关。依据文

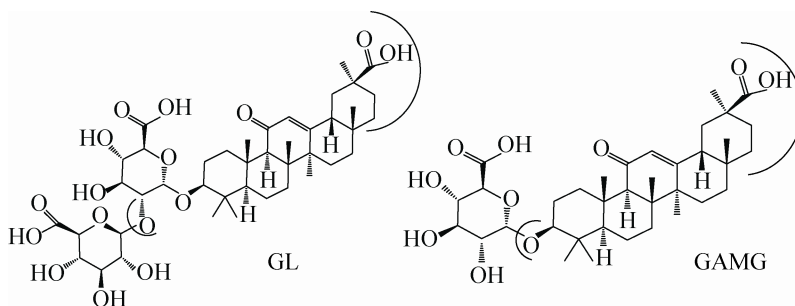


图 2 PGUS-E 酶底物分子的结构示意图

Fig. 2 Substrate schematic representation of PGUS-E. GL (left) GAMG (right).

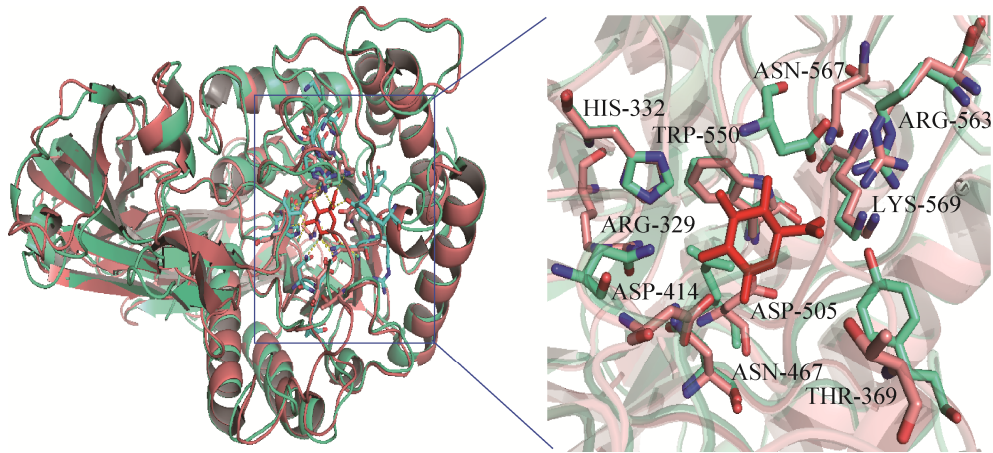


图3 PGUS-E (绿) 与 EGUS 复合物 (3K4D 粉橙色) 的结构比对示意图

Fig. 3 Stereo view of the superimposition of the PGUS-E (green) and EGUS (3K4D, salmon). Substrate binding residues are depicted as stick.

献报道,  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶中, Asp414、Asp505 为催化残基<sup>[19]</sup>, 参与糖苷键的断裂, His332、Arg563、Lys567、Asn569 位于糖基结合位点, 与糖基识别相关<sup>[20-21]</sup>。在 PGUS-E 酶结构中显示, Trp550 位于底物结合口袋的底部, 是强疏水性氨基酸, 保证催化反应的疏水环境, Arg329、Thr369、Asn467 位于糖基结合位点的对立面, 可能与底物分子配基部分的识别相关。综上分析, 为了确保选择位点的准确性, 最终选定与配基识别相关的 3 个位点 (Arg329、Thr369、Asn467) 进行饱和突变研究, 以提高 PGUS-E 酶键的选择性。

## 2.2 突变文库的构建及筛选

利用带有简并密码子的引物, 以 pHCE-gus 质粒为模板, 通过 PCR 扩增对 R329、T369、N467 进行饱和突变, PCR 扩增质粒结果如图 4 所示。将 PCR 产物经过 *Dpn* I 酶切消化转化 *E. coli* TOP10 中, 构建了 R329、T369、N467 的饱和突变文库。通过 TLC 定性初筛和 HPLC

定量复筛相结合的方法对突变文库筛选, 通过基因测序及序列分析获得了优势突变酶 R329K 和 T369V (图 5)。HPLC 检测结果计算获得, 原始的 PGUS-E 的转化率达到 90.1% 时, 键选择性达到 8.5%, T369V 的转化率达到 90.3% 时, 键选择性达到 42.8%, 与 PGUS-E 比较提升了

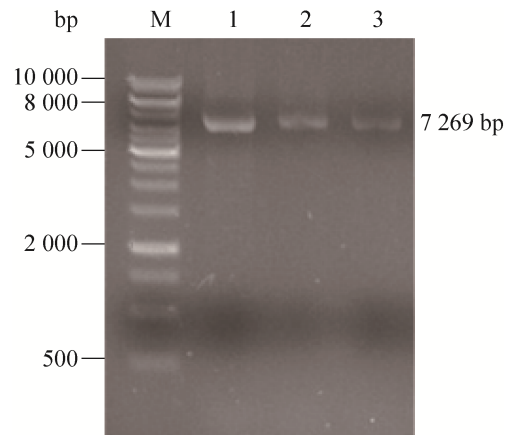


图4 饱和突变 PCR 扩增 DNA 电泳图

Fig. 4 DNA electrophoresis of saturation mutagenesis reactions. M: DNA marker; 1-3: PCR products corresponding to R329, T369 and N467.



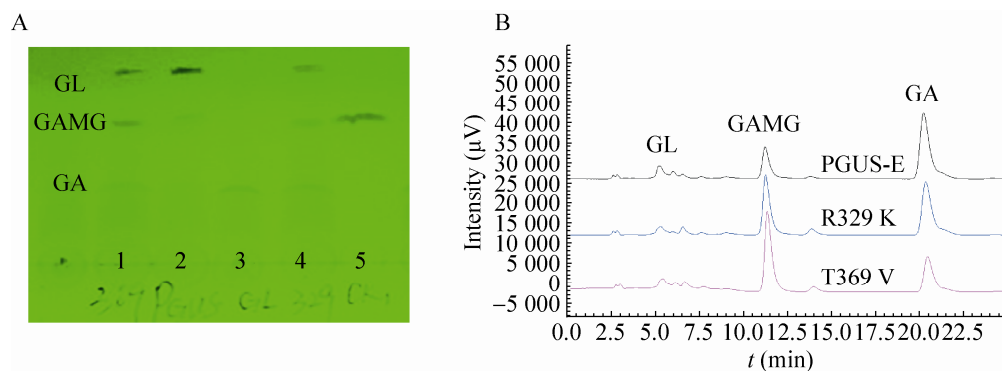


图 5 PGUS-E 突变酶筛选结果

Fig. 5 Screening results of mutant PGUS-E. (A) The primary screening of TLC. 1–5: corresponding to T369V, PGUS-E, GL, R329K, GAMG. (B) The re-screening of HPLC.

34.3%; R329K 的转化率达到 90.8%，键选择性达到 35.5%，与 PGUS-E 比较提升了 26.9%。但 N467 位点饱和突变获得的 20 种突变酶键选择性并没有提高，且催化 GL 的酶活力基本丧失。另外，对得到的 R329K、T369V 优势突变进行组合，发现突变酶 M3 (R329L/T369V) 的键选择性并没有进一步与提高。

### 2.3 PGUS-E 突变酶活性分析

对 PGUS-E 突变酶的比酶活进行分析，发现与 PGUS-E 比较，突变酶 R329K、T369V 催化 GL 水解能力下降。如图 6 所示，突变酶 T369V (3273 U/mg) 的比酶活为 PGUS-E (4726 U/mg) 的 69.3%，突变酶 R329K (1492 U/mg) 比酶活仅为 PGUS-E 的 31.6%。

### 2.4 突变酶的最适 pH 合温度的测定

为了确定酶反应的最佳条件，考察了突变酶催化 GL 的最适 pH 和温度，结果如图 7、8 所示，突变酶 T369V、R329K 与 PGUS-E 的最适 pH 为 5.0，最适温度为 40 °C，说明突变氨基酸的引入并没有影响酶的最适 pH 和最适温度。

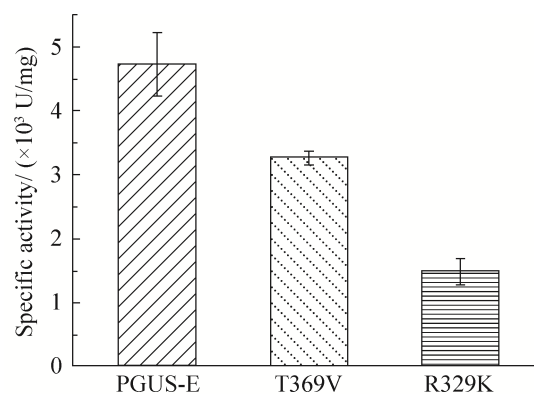


图 6 PGUS-E 酶及突变酶的比酶活

Fig. 6 Specific activity of PGUS-E and variants.

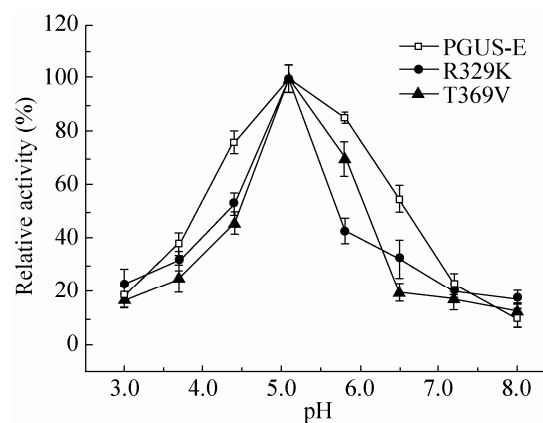


图 7 pH 对 PGUS-E 及突变酶活力的影响

Fig. 7 Effect of pH on the PGUS-E and variants.

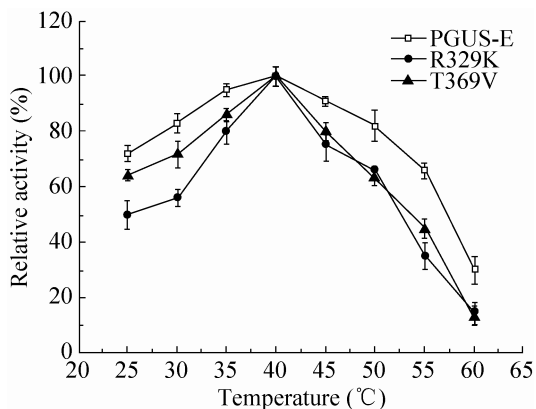


图 8 温度对 PGUS-E 及突变酶活力的影响  
Fig. 8 Effect of temperature on the PGUS-E and variants.

## 2.5 突变酶的分析

为了进一步确定突变酶的作用机制, 采用 Autodock 软件对酶与底物 GL 进行对接模拟。图 9A-D 依此为 PGUS-E 和 T369V、R329K、N467D 突变酶。

图 9A 和图 9B 比对显示, 突变酶 T369V 的第 369 位氨基酸由亲水性苏氨酸突变为疏水性缬氨酸, 极性变化影响 369 位氨基酸所在的整个 Loop 环构象朝向疏水中心移动, 增加了酶与 GL 的契合度, 进而增强了酶的键选择性。但是酶与底物 GL 之间的范德华力的增强, 使得催化

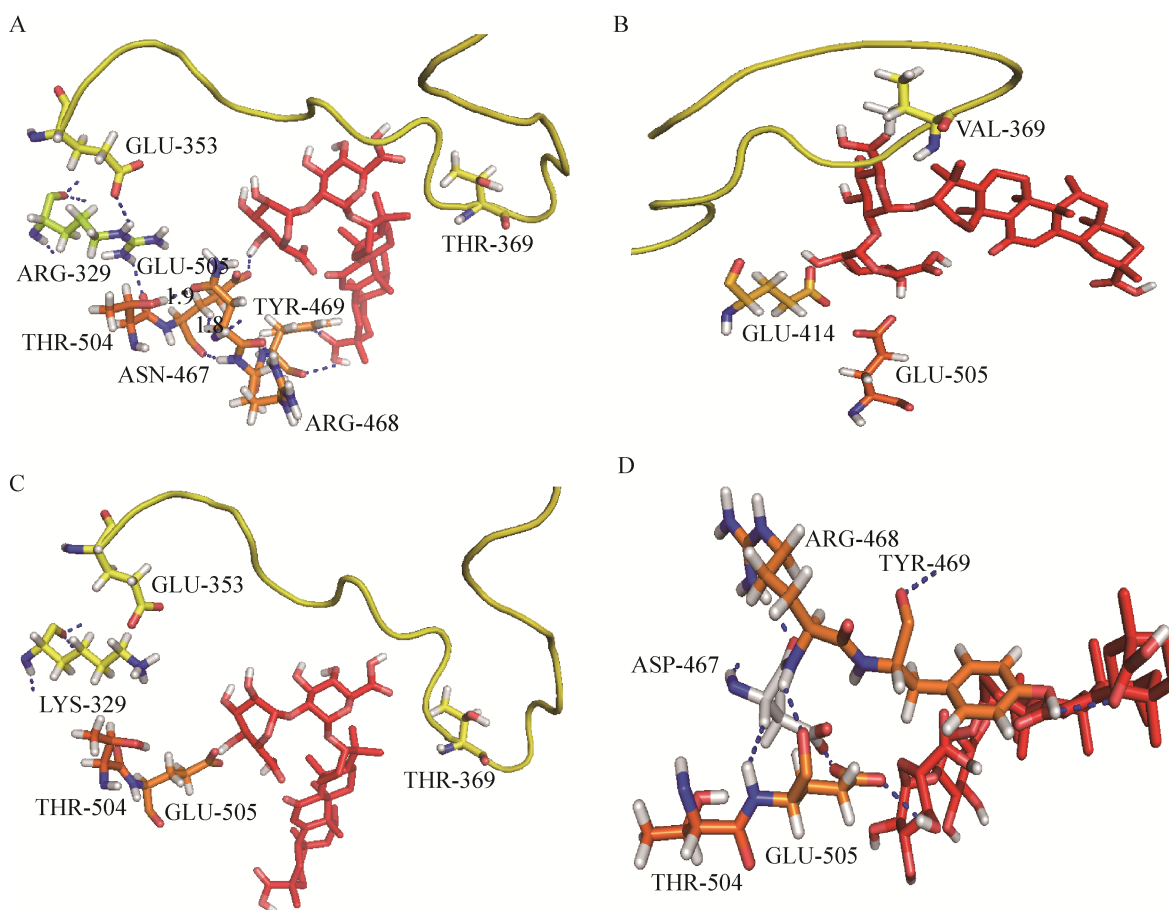


图 9 PGUS-E 和突变酶与 GL 作用的模拟结构图  
Fig. 9 The model structure of PGUS-E and mutants with a GL substrate. (A) PGUS-E; (B) T369V; (C) R329K; (D) N467D.



反应中结构重排的自由能垒变大,影响了酶活性残基的释放,减缓了新一轮底物进入活性中心速率,最终降低了酶催化效率。

图 9A 和图 9C 比对显示, R329 与 E353 和 T504 之间各存在一个氢键的相互作用。突变酶 R329K 的第 329 位氨基酸由精氨酸变为赖氨酸,两者具有相似的极性及电荷性质,但侧链变短,破坏了与 E353 和 T504 之间的氢键,引起 E505 位谷氨酸的位移,从而提高了酶的键选择性。但是突变增加了催化位点与 GL 之间的距离,最终影响其催化效率。

图 9A 和图 9D 比对显示,突变前 N467 分别与 E505 (催化残基) 及 T504 之间形成一个氢键,且与两者之间的距离很近,分别为 1.3 Å 和 2.1 Å。故微小的变化影响催化残基 E505。这里以 Asn 长度和性质变化最小的 Asp 进行突变模拟,PGUS-E 酶第 467 位天冬酰胺突变后,破坏了 N467 与 E505 之间的氢键,催化残基 E505 与糖苷键结合构象发生变化,严重影响 PGUS-E 的催化效率。结果分析表明 N467 对维持酶功能有重要作用。

### 3 结论

本实验通过 SWISS-MODEL 软件模拟了 PGUS-E 酶的三维结构,通结构比对,利用 Pymol 软件分析了底物分子与酶之间的相互作用,初步确定影响其键选择性的部分位点。通过构建饱和突变文库的研究,发现 R329K 和 T369V 突变使 PGUS-E 酶的键选择性分别提高了 26.9%, 34.3%, 突变酶催化 GL 生成的 GAMG 的产率和底物特异性增加。通过突变酶与底物 GL 作用的结构模拟,进一步分析了 R329K 和 T369V 键选择性提高的机理,为进一步键选择性改善提

供了理论依据。

本研究对于 PGUS-E 酶的结构和功能关系的分析和预测进行了验证和完善,为进一步阐明 PGUS-E 酶的键选择性与结构关系奠定了基础,同时为构建具有理想键选择性和产物特异性的 PGUS-E 酶突变体提供了新的出发点。

### REFERENCES

- [1] Hennell JR, Lee S, Khoo CS, et al. The determination of glycyrrhizic acid in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC. (Zhi Gan Cao) root and the dried aqueous extract by LC-DAD. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47(3): 494–500.
- [2] Liu Y, Huangfu J, Qi F, et al. Effects of a non-conservative sequence on the properties of  $\beta$ -glucuronidase from *Aspergillus terreus* Li-20. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): 309–318.
- [3] Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, et al. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet*, 2003, 361(9374): 2045–2046.
- [4] Lu L, Zhao Y, Yu H, et al. Preparation of glycyrrhetic acid monoglucuronide by selective hydrolysis of glycyrrhizic acid via biotransformation. *Chin Herbal Med*, 2012, 4(4): 324–328.
- [5] Chen GL, Zhao QY, Duan RZ. Study selective hydrolysis of glycyrrhizin and the molecular complex of glycyrrhiin and sialic acid. *J Lanzhou Univ*, 2012, 38(1): 29–34 (in Chinese).  
陈桂玲, 赵全义, 段瑞哲. 甘草酸的选择水解及其与唾液酸形成分子复合物的初步研究. *兰州大学学报*, 2012, 38(1): 29–34.
- [6] Mizutani K, Kambara T, Masuda H, et al. Glycyrrhetic acid monoglucuronide (MGGR): biological activities. *Int Congr Ser*, 1998, 43(2): 225–235.
- [7] Mizutani K, Kuramoto T, Tamura Y, et al. Sweetness of glycyrrhetic acid 3-O-beta

- D-monoglucuronide and the related glycosides. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58(3): 554–555.
- [8] Henrissat B, Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J*, 1996, 316(Pt 2): 695–696.
- [9] Geddie ML, Matsumura I. Rapid evolution of  $\beta$ -glucuronidase specificity by saturation mutagenesis of an active site loop. *J Biol Chem*, 2004, 279(25): 26462–26468.
- [10] Akao T, Hattori M, Kobashi K, et al. Hydrolysis of glycyrrhizin to glycyrrhetyl monoglucuronide by lysosomal  $\beta$ -D-glucuronidase of animal livers. *Biochem Pharmacol*, 1991, 41(6): 1025–1029.
- [11] Akao T. Hasty effect on the metabolism of glycyrrhizin by *Eubacterium* sp. GLH with *Ruminococcus* sp. PO1-3 and *Clostridium innocuum* ES24-06 of human intestinal bacteria. *Bio Pharm Bull*, 2000, 23(1): 6–11.
- [12] Feng S, Li C, Xu X, et al. Screening strains for directed biosynthesis of  $\beta$ -D-mono-glucuronide-glycyrrhizin and kinetics of enzyme production. *J Mol Catal B Enzym*, 2006, 43(1): 63–67.
- [13] Song ZK, Wang XY, Li C, et al. Cloning and prokaryotic expression of  $\beta$ -glucuronidase from *Penicillium purpurogenum* Li-3. *J Chem Ind Eng*, 2008, 59(12): 3101–3106.
- [14] Xiao ZZ, Qu YB, Wang TH, et al. Advance in study on directed evolution of proteins. *Prog Biotech*, 2001, 21(6): 31–33 (in Chinese).  
肖志壮, 曲音波, 汪天虹, 等. 蛋白质定向进化的研究进展. *生物工程进展*, 2001, 21(6): 31–33.
- [15] Chen K, Arnold FH. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(12): 5618–5622.
- [16] Reetz MT, Carballeira JD. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat Protoc*, 2007, 2(4): 891–903.
- [17] Gerlt JA, Raushel FM. Evolution of function in  $(\alpha/\beta)_8$ -barrel enzymes. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7(2): 252–264.
- [18] Bourne Y, Henrissat B. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional module. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11(5): 593–600.
- [19] Arul L, Benita G, Balasubramanian P. Functional insight for  $\beta$ -glucuronidase in *Escherichia coli* and *Staphylococcus* sp. RLH1. *Bioinformatics*, 2008, 2(8): 339–343.
- [20] Michikawa M, Ichinose H, Momma M, et al. Structural and biochemical characterization of glycoside hydrolase family 79-glucuronidase from *Acidobacterium capsulatum*. *J Biol Chem*, 2012, 287(17): 14069–14077.
- [21] Geddie ML, Matsumura I. Rapid evolution of  $\beta$ -glucuronidase specificity by saturation mutagenesis of an active site loop. *J Biol Chem*, 2004, 279(25): 26462–26468.

(本文责编 陈宏宇)