

研究报告

玉米赤霉烯酮水解酶 ZHD101 胰蛋白酶抗性的理性分子设计

伍莲娜^{#1}, 牛芳园^{#1}, 谢春芳², 姚冬生^{*1,3,4}

1 暨南大学 生物医药研究院, 广东 广州 510632

2 暨南大学 生物科学与技术系, 广东 广州 510632

3 暨南大学 基因工程药物国家工程中心, 广东 广州 510632

4 暨南大学 广东省生物工程药物重点实验室, 广东 广州 510632

伍莲娜, 牛芳园, 谢春芳, 姚冬生. 玉米赤霉烯酮水解酶 ZHD101 胰蛋白酶抗性的理性分子设计[J]. 微生物学通报, 2025, 52(3): 965-979.

WU Lianna, NIU Fangyuan, XIE Chunfang, YAO Dongsheng. Rational design improves the resistance of zearalenone hydrolase ZHD101 to trypsin[J]. Microbiology China, 2025, 52(3): 965-979.

摘要: 【背景】玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是一种由镰刀菌属(*Fusarium*)真菌产生的毒素,可引起动物体生殖功能的紊乱,破坏其免疫系统,对人类的健康和动物的生产性能造成严重的危害。来源于粉红螺旋聚孢霉(*Clonostachys rosea*)的内酯水解酶 ZHD101, 又称玉米赤霉烯酮降解酶,能够通过水解反应高效地将玉米赤霉烯酮毒素降解为无毒产物,可作为饲用酶制剂减少霉菌毒素暴露对动物的危害。【目的】动物胃肠道消化酶的水解作用会显著降低饲用酶制剂的使用效率。因此,研究如何提高玉米赤霉烯酮水解酶的消化酶抗性,以提高酶制剂的使用效率是非常必要的。【方法】通过理性分子设计,突变位于与胰蛋白酶相互作用界面的关键氨基酸,减弱 ZHD101 与胰蛋白酶的结合,提高 ZHD101 对胰蛋白酶的耐受性,以达到提高 ZHD101 使用效率的目的。【结果】突变体 ZHD101^{K254Q}和 ZHD101^{K254Q/K262Q}在人工肠液中半衰期较野生型分别延长了 61.8%和 57.8%。突变体酶最适 pH 值均为 9.0-10.0, 最适反应温度约为 40 °C, 酶学性质与野生型无显著差异。【结论】本研究对 ZHD101 的胰酶抗性理性设计提升了其在饲料工业中的应用价值,也为其他饲用酶的分子改良提供了策略。**关键词:** 玉米赤霉烯酮水解酶; 胰蛋白酶抗性; 理性设计; 分子模拟

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2103003)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103003).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: tdsyao@jnu.edu.cn

Received: 2024-05-11; Accepted: 2024-06-05; Published online: 2024-06-28

Rational design improves the resistance of zearalenone hydrolase ZHD101 to trypsin

WU Lianna^{#1}, NIU Fangyuan^{#1}, XIE Chunfang², YAO Dongsheng^{*1,3,4}

1 Institute of Biomedicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

2 Department of Biological Sciences and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

3 National Engineering Research Center of Genetic Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

4 Guangdong Provincial Key Laboratory of Bioengineering Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

Abstract: [Background] Zearalenone (zearalenone, ZEN), a toxin produced by *Fusarium*, poses a serious risk to human health and animal production performance as it can disrupt the reproduction and damage the immune system of the body. The lactonase ZHD101 from *Clonostachys rosea*, also known as ZEN hydrolase, degrades ZEN into non-toxic products by hydrolysis and can be used as a feed enzyme additive to reduce the mycotoxin exposure in animals. [Objective] The digestive enzymes of animals significantly reduce the efficacy of feed enzyme additives, and it is therefore crucial to investigate the methods enhancing the trypsin resistance of feed enzymes to improve their utilization efficiency. [Methods] Rational design was employed to mutate the key amino acid residues of ZHD101 at the interaction interface with trypsin, thereby weakening the binding affinity of ZHD101 to trypsin and enhancing its trypsin resistance. [Results] Compared with that of the wild type, the half-life of ZHD101^{K254Q} and ZHD101^{K254Q/K262Q} in simulated intestinal fluid was prolonged by 61.8% and 57.8%, respectively. The mutated enzymes showcased the best performance at pH 9.0–10.0 and about 40 °C, with similar enzymatic properties to the wild type. [Conclusion] The rational design of ZHD101 for improving the trypsin resistance enhances the application of this enzyme in the feed industry and provides clues for molecular modification of other feed enzymes.

Keywords: zearalenone hydrolase; trypsin resistance; rational design; molecular simulation

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是一种由镰刀菌属(*Fusarium*)真菌产生的毒素。ZEN 的污染范围非常广泛, 欧洲、非洲、亚洲、北美洲、南美洲以及大洋洲等世界各地的霉变谷物(如玉米、燕麦、小麦等)中都可以检测到它的存在^[1]。该毒素可以通过污染谷物进入食物链, 并对动物体具有潜在的遗传毒性^[2]、肝肾毒性^[3-4]、致癌性^[5]和免疫毒性^[6]。ZEN 对人类健康和动物的生产性能造成严重威胁^[7], 同时也给农业带来巨大经济损失^[8]。

目前, 人们通过物理法、化学法和生物法去除 ZEN 的毒性。其中, 生物法通过微生物和生物酶去毒, 具有特异性高的优点, 不会破坏饲料和原料中的其他成分, 不会降低饲料的营养价值^[9]。研究表明, 来源于粉红螺旋聚孢霉(*Clonostachys rosea*)的内酯水解酶——玉米赤霉烯酮水解酶(ZHD101)可通过水解反应高效地将 ZEN 降解为无毒产物^[10]。近年来, 越来越多的 ZEN 降解酶被挖掘^[11-16], 由于 ZHD101 晶体结构的解析以及催化机制已被广泛研究^[17-19],

研究者们参考这些数据,通过在柔性结构区进行单点突变、引入二硫键、活性相关残基改造和内酯环附近残基改造^[20-22]等方法提高了 ZHD101 的热稳定性和催化活性,进一步提升了 ZHD101 的可应用性。

将 ZHD101 作为饲料酶添加剂可有效减少 ZEN 暴露对动物的危害,具有广阔的应用前景。然而, ZHD101 野生型的利用率受到多种因素影响,除了胃部极端 pH 和高温的影响,胃肠道高活性消化酶对其的水解作用更是不容忽视^[23]。

对饲用酶蛋白的胰蛋白酶抗性进行改造已经受到很多重视,如 Li 等^[24]分析了 β -甘露聚糖酶 MAN47 所有的 12 个精氨酸和赖氨酸,按照在溶剂中的暴露程度进行了排序,筛选出较野生型胰酶抗性提升了 85% 和 185% 的突变体 MAN47^{K280N} 和 MAN47^{K280N/K107H/R102N}。Qiu 等^[25]分析了黄曲霉毒素氧化酶(aflatoxin-oxidase, AFO)的 72 个精氨酸和赖氨酸残基,并结合了 AFO-胰蛋白酶的分子对接结果,筛选出了胰酶抗性提升的 AFO^{K244Q/K213C/K270T} 和 AFO^{R356E/K357T/R623C} 突变体,节省了大量湿实验筛选的时间。Wang 等^[26]分析了 β -葡萄糖苷酶 1 (beta-glucosidase 1, BGL1) 与胰蛋白酶的分子对接结果,从降低 BGL1-胰蛋白酶复合体结合能力的角度,通过虚拟突变计算了结合面关键氨基酸位点突变的突变能变化,结合分子动力学模拟结果筛选出了胰酶抗性提升的 BGL1^{Q627C/R543H/R646W} 突变体。Niu 等^[27]分析了 2 个同源植酸酶的消化酶切割位点,结合两者对胰蛋白酶耐受性的差异和氨基酸序列比对结果,筛选出胰蛋白酶抗性提升了 331% 的突变体 YeAPPA^{K226H}。Su 等^[28]利用 LC-MS/MS 分析了胰蛋白酶消化糖基水解酶 G (polysaccharide synthesis locus, PslG) 后的肽段,发现了 PslG 的 34 个潜在胰蛋白酶切割位点,通过选取位于表面灵活区域且远离催化活性位点的残基筛选到

一个胰蛋白酶抗性显著提升的突变体 PslG^{K286A/K433S}。这些胰酶抗性理性设计均针对单体酶。ZHD101 发挥酶功能的结构是多聚体,相较于单体酶,多聚体酶在进行理性设计时有以下差异:(1) 胰酶与酶蛋白的对接更为复杂,存在更多的可能构象,胰酶可能和多个亚基存在相互作用;(2) 需要考虑亚基间的相互作用对蛋白自身结构稳定性的影响。因此,在本研究中,依据 ZHD101 的结构和催化机制^[29],使用 ZHD101 晶体结构单体与胰蛋白酶进行了分子对接模拟,在对接时封闭单体结构参与二聚体相互作用的残基,以模拟实际情况下二聚体在溶液中与胰蛋白酶的结合。本研究突变位点的筛选是基于削弱 ZHD101 与胰蛋白酶结合能力的策略进行的,通过对结合面氨基酸的分析筛选出了结合面上具有关键相互作用的残基位点,结合虚拟饱和突变的结果,拟筛选出使 ZHD101-胰蛋白酶复合物稳定性下降而不影响 ZHD101 自身稳定性的突变体。ZHD101 胰蛋白酶抗性的提升对饲料酶在饲料工业具有重要的理论价值和应用价值。

1 材料与方 法

1.1 样品

毕赤酵母(*Komagataella pastoris*) GS115, 本实验室保存;大肠杆菌 DH5 α , 鼎国昌盛生物技术公司(北京);培养大肠杆菌时添加 100 μ g/mL 氨苄青霉素(ampicillin, Amp)。zhd101 基因由上海捷瑞生物工程有限公司进行密码子优化并全序列化学合成,序列在合成时 N 端添加 EcoR I 和 Xba I 这 2 个酶切位点序列, C 端添加 Spe I 和 Pst I 这 2 个酶切位点,两端含 6 个组氨酸标签,克隆至载体 pGH (GenBank 登录号: EF591492.1);表达载体 pBAN (GenBank 登录号 KF806603),本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

EcoR I、*Xba* I、*Spe* I、*Pst* I和 T4 DNA 连接酶，纽英伦生物技术(北京)有限公司；PrimeSTAR 高保真 DNA 聚合酶、DNA marker，宝日医生物技术(北京)有限公司；蛋白 marker 和 SDS-Loading Buffer，伯乐生命医学产品(上海)有限公司；SDS-PAGE 试剂盒，生工生物工程(上海)股份有限公司；胰蛋白酶，西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司；质粒抽提试剂盒及琼脂糖凝胶回收试剂盒，天根生化科技(北京)有限公司；其他化学品均为国产分析纯。恒温振荡培养箱，上海智诚分析仪器制造有限公司；高速冷冻离心机，Beckman Coulter 公司；AKTA pure 蛋白纯化仪及 Ni-NTA 亲和层析柱，GE Healthcare 公司；核酸电泳仪和蛋白电泳仪，伯乐生命医学产品(上海)有限公司；超声波细胞粉碎机，宁波新芝生物科技有限公司；高效液相色谱仪，赛默飞世尔科技公司。

1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 细菌学蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0; 基础葡萄糖培养基(minimal dextrose medium, MD): 甘油 10.0 mL/L, 酵母基本氮源 13.4 g/L, 生物素 0.4 mg/L; 酵母蛋白胨甘油培养基(yeast peptone glycerol medium, YPG): 酵母提取物 10.0 g/L, 大豆蛋白胨 2.0 g/L, 甘油 10.0 mL/L。

1.4 ZHD101 结构模型的获取和预处理

从 NCBI 网站获得 *zhd101* (GenBank 登录号 AB076037.1) 的核酸序列，在蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB) (<http://www.rcsb.org/>) 中获得 ZHD101 的三聚体结构 (PDB ID: 3WZM, 包括 A、B、C 这 3 条链)。下载得到的 PDB 文件导入 Discovery Studio 4.5^[30] 软件中，删除晶体中多余的配体结构和水分子后，将 A 链作为研究对象，使用 prepare 程序补充 loop 区并

质子化，赋予 CHARMm 力场。得到的模型使用 Ramachandran plot 和 Profiles3D 方法进行质量评估。

1.5 ZHD101 和胰蛋白酶的分子对接

使用 Discovery Studio 4.5 中的 ZDOCK^[31] 刚性对接进行 ZHD101 与胰蛋白酶的分子对接，定义 ZHD101 为受体，胰蛋白酶为配体，设置欧拉角度 6°，封闭 ZHD101 参与亚基相互作用的区域，选取 ZDOCK 结果中 ZDOCK SCORE 得分最高的 100 个构象进行 RDOCK^[32] 能量优化，以模拟胰蛋白酶和 ZHD101 的结合构象。

1.6 影响胰蛋白酶和 ZHD101 复合物形成的关键氨基酸的预测

胰蛋白酶 ZHD101 复合物相互作用表面的关键氨基酸是影响基态复合物形成的关键因素，这些氨基酸的突变可以抑制基态复合物的形成。在残基选择过程中，优先考虑选择胰蛋白酶潜在水解位点(精氨酸和赖氨酸)，同时考虑位点与活性中心的距离以及位点的相对可溶性 (relative solvent accessibility, RSA) 值。因此，在结合面上选取 RSA>25% 且暴露于溶剂环境中的赖氨酸和精氨酸作为突变候选位点。随后，对突变候选位点进行丙氨酸扫描以预测该位点对复合物稳定性的影响，将替换前后能量变化超过 2.0 kcal/mol 的氨基酸即热点氨基酸进行虚拟饱和和突变^[33]。分别使用 calculate mutation energy (binding) 和 calculate mutation energy (stability) 程序对复合物和突变体的突变能进行统计，评估突变对基态复合物和 ZHD101 自身稳定性的影响。评估标准为：-0.5 kcal/mol ≤ 突变能 ≤ 0.5 kcal/mol 的突变为中性，对突变体无影响；突变能 > 0.5 kcal/mol 的突变体不稳定；突变能 < -0.5 kcal/mol，则代表突变体稳定性上升。最终选择既能使复合物结构不稳定又不会对 ZHD101 自身的结构稳定性造成不良影响的突变体。

1.7 分子动力学模拟

为了评价突变体合理性,使用软件 GROMACS 4.5^[34]进行分子动力学模拟。分子动力学在模拟时采集的构象越充分,计算得到的各个能量项值就越精确^[35]。先进行初始结构的能量最小化,使目标分子尽量处于能量最低的状态,再给定溶剂环境进行模拟,模拟后可计算出均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)值作分子稳态分析。

1.8 表达载体的构建

由上海捷瑞生物工程有限公司全基因合成的 pGH-*zhd101* 质粒使用 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切鉴定。质粒经过 *EcoR* I 和 *Spe* I 双酶切,表达载体 pBAN (GenBank 登录号 KF806603)经过 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切,*Xba* I 和 *Spe* I 是一对同尾酶,使用 T4 DNA 连接酶连接 *zhd101* 片段和表达载体 pBAN,采用热激法将重组质粒转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,通过含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 的 LB 平板筛选阳性单克隆,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证,提取重组表达质粒载体 pBAN-*zhd101*。

1.9 酶的表达和纯化

使用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Spe* I 线性化表达载体,电转化法转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞,然后将转化菌株在 MD 培养基中 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48–72 h。随后转接于 YPG 液体培养基中,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下培养至最终 $OD_{600}=1-4$ 以表达分泌蛋白 ZHD101。接着在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 $\times g$ 离心 10 min 去除菌体,上清液中逐渐加入硫酸铵至饱和度达到 80%后,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜沉淀浓缩。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 $\times g$ 条件下离心 10 min,收集沉淀蛋白。随后于 20 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl 中溶解沉淀,4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 $\times g$ 条件下离心 10 min 去除不溶物,制备粗酶液。采用镍离子亲和层析法纯化野生型和突变型的 ZHD101

蛋白,使用 20 mmol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(0.5 mmol/L NaCl)作为平衡缓冲液,洗脱缓冲液为平衡缓冲液添加终浓度为 0.5 mmol/L 的咪唑。用线性梯度浓度的咪唑缓冲液洗脱蛋白质,收集洗脱峰,并用 SDS-PAGE 检测。使用 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.10 蛋白酶消化试验

为了评价野生型和突变体蛋白对于胰蛋白酶的耐受性,将纯化后的 ZHD101 蛋白液(0.25 mg/mL)和胰蛋白酶(0.05 mg/mL)于 40 $^{\circ}\text{C}$ 反应,分别于反应的 0、10、20、30、40、50、60 min 时取样。每次取样后立即与 SDS-loading buffer 混合,煮沸 5 min 终止反应,每组设置 3 个平行。样品经 SDS-PAGE 后进行灰度密度扫描。按公式(1)–(4)计算野生型及突变体的半衰期。0 min 为未经蛋白酶处理的样液。

$$A = \frac{C_t}{C_0} \quad (1)$$

式(1)中: C_t 为 t 时刻 ZHD101 的灰度扫描值; C_0 为 0 min 时 ZHD101 的灰度扫描值。

$$b = \frac{\log_{10} A_1 - \log_{10} A_2}{t_1 - t_2} \quad (2)$$

式(2)中: b 为斜率常数, h^{-1} ; t 为消化时间, h。

$$k = -2.303b \quad (3)$$

式(3)中: k 为消除速率常数。

$$\text{半衰期 } t_{1/2} = \frac{0.693}{k} \quad (4)$$

1.11 酶活性测定

测活体系包括 5 μL 0.3 mg/mL 的纯化酶(终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5 μL 底物 ZEN (终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 200 μL 150 mmol/L NaCl 溶液和 90 μL 25 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5), 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 10 min, 随后加入 300 μL 甲醇终止反应。用配备有 BETASIL C18 (150 mm \times 4.6 mm, 3 μm) 的高效液相色谱系统定量 ZEN, 以无底物

的灭活酶溶液作为对照, 每次测量重复 3 次。用 HPLC (233 nm 检测波长, 60%乙腈 0.6 mL/min 洗脱)检测酶活性, 以反应前后 ZEN 的峰面积的变化来表示底物减少量。酶活单位(U)定义为每分钟降解 1 μg ZEN 所需的酶量。

1.12 酶学性质表征

设置温度梯度为 10、20、30、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$, 使用 1.11 测活体系测定 ZHD101 及突变体在不同温度下的酶活, 以最高活性的酶活值为 100% 相对酶活, 计算各温度下 ZHD101 及突变体的相对活性。酶在 10、20、30、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$ 预处理 15 min 后测活以测定热稳定性, 以未进行温度预处理的 ZHD101 及突变体的酶活作为 100%酶活, 计算预处理后的残余活性。设置 pH 梯度为 pH 4.0、5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0、11.0, 使用 1.11 测活体系测定了 ZHD101 及突变体在不同 pH 下的酶活, 以最高活性的酶活值为 100%相对酶活, 计算各 pH 下 ZHD101 及突变体的相对活性。酶在 pH 4.0、5.0、6.0、7.5、9.0、10.0、11.0 预处理 30 min 后测活以测定 pH 稳定性, 以未进行 pH 预处理的 ZHD101 及突变体的酶活作为 100%酶活, 计算预处理后的残余活性。所有实验组和对照组均设置 3 组平行。

2 结果与分析

2.1 ZHD101 单体的建模

从 PDB 蛋白质数据库(<http://www.rcsb.org/>)中获得 ZHD101 的结构(PDB ID: 3WZM), 删除晶体中多余的配体结构和水分子, 将 A 链作为研究对象, 使用 prepare 程序补充 loop 区并质子化, 赋予 CHARMM 力场后成功构建了 ZHD101 单体结构模型(图 1A)。对模型进行拉氏图和 Profiles3D 评估。Verify score 为 122.82, Verify expected high score 为 120.000 8, Verify expected

low score 为 54.003 5, Verify score 高于 Verify expected high score, 表明模型具有较高质量; 拉氏图(图 1B)显示最适区域的氨基酸占 97.3%, 在允许区域的氨基酸占 2.0%, 不允许区域占 0.7%, 同样表明模型具有较高质量, 适合下一步分析。

2.2 突变位点的筛选

使用 ZDOCK 程序进行 ZHD101 与胰蛋白酶的分子对接分析, 并通过 ZDOCK Score 评价构象的合理性, 选择分数最高的前 100 个 pose 进行 RDOCK 能量优化。优化后得分最优的 5 个构象如图 2 所示。选择 pose124 来代表 ZHD101 和胰蛋白酶的结合构象。由于只有暴露在溶剂环境中的胰蛋白酶潜在水解位点(即 RSA 值 $\geq 25\%$)才有被水解的可能性, 所以, 统计 ZHD101 中赖氨酸和精氨酸的 RSA 值, 如表 1 所示, 其中符合胰蛋白酶潜在水解位点条件的精氨酸/赖氨酸共 17 个。对这些位点进行丙氨酸扫描, 选择使复合物结构稳定性下降的位点(Arg63, Lys230, Lys254, Lys262)进行下一步分析。

2.3 突变体的筛选

为了确定各种突变对复合物和 ZHD101 自身稳定性的影响, 对筛选出来的候选突变位点进行虚拟饱和突变, 突变前后对 ZHD101-胰蛋白酶复合物稳定性的影响使用 Calculate Mutation Energy (Binding)评估, 对 ZHD101 自身结构稳定性的影响使用 Calculate Mutation Energy (Stability)评估。根据分析结果进一步缩小突变范围, 并通过 RMSD 综合评估, 选择 ZHD101^{K254Q}、ZHD101^{K262I}、ZHD101^{K254Q/K262Q} 这 3 个突变体进行后续的生物实验验证(表 2, 图 3)。

2.4 构建基因表达盒

从 NCBI 网站获得 *zhd101* (GenBank 登录号 AB076037.1)的核酸序列, 将上海捷瑞生物工程有限公司合成的 *zhd101*^{WT}、*zhd101*^{K254Q}、*zhd101*^{K262I}、

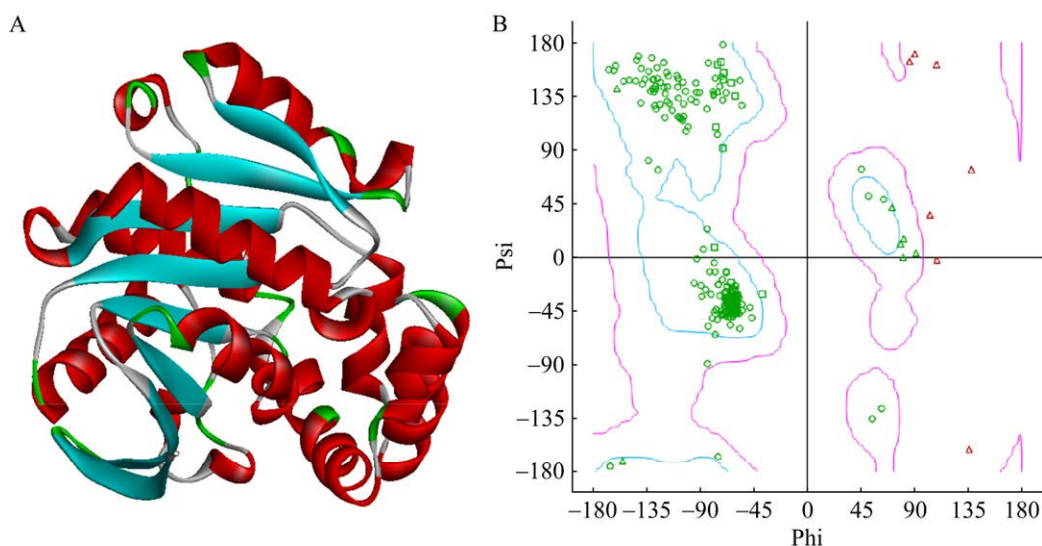


图 1 ZHD101 单体模型(A)和拉氏图(B) 浅蓝色线内为残基核心区域, 该区域是蛋白质残基偏好区域, 残基构象稳定; 粉红色线内为残基允许区域, 残基构象较稳定; 非线内区域为不允许区域, 该区域内残基构象不稳定; 绿色点代表稳定残基, 红色点代表不稳定残基。

Figure 1 ZHD101 monomer model (A) and Ramachandran plot (B). The light blue lines enclose the core regions of the residues, which are the preferred regions for protein residues with stable conformations. The pink lines enclose the allowed regions of the residues, where the conformations are relatively stable. Regions outside the lines are disallowed regions, where the conformations of residues are unstable. Green dots represent stable residues, while red dots represent unstable residues.

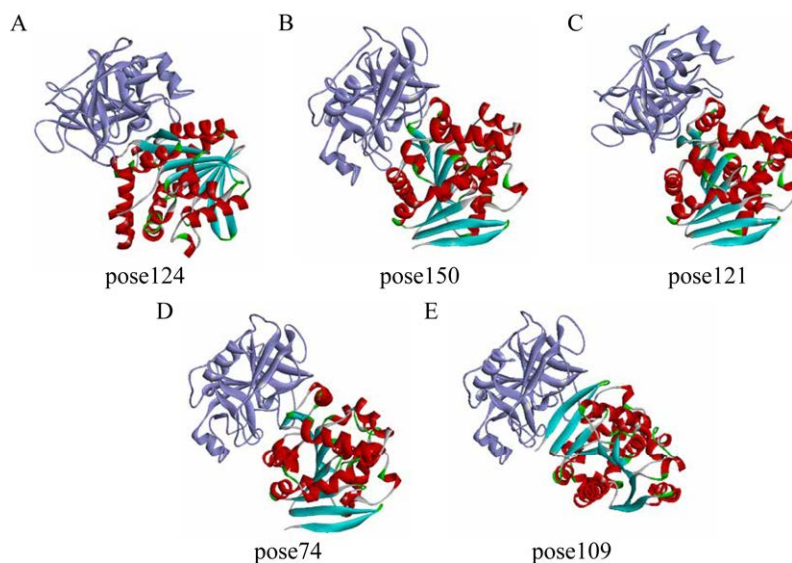


图 2 ZHD101 与胰蛋白酶对接后 E-ROCK 最优的 5 个构象 胰蛋白酶用紫色显示, ZHD101 用红色和绿色显示。

Figure 2 Five conformations of the optimal E-ROCK after docking of ZHD101 with trypsin. Trypsin in purple, ZHD101 in red and green.

表1 胰蛋白酶潜在水解位点的相对可溶性统计
Table 1 Relative solvent accessibility statistics for potential hydrolysis sites of trypsin

Item	Accessible surface area (Å ²)	Relative solvent accessibility (%)
Arg2	26.344	11.485
Arg4	135.461	59.054
Arg52	69.516	30.306
Arg63	78.215	34.098
Lys66	150.448	77.365
Lys79	54.467	28.008
Lys94	121.104	62.275
Arg118	37.177	16.207
Arg120	56.208	24.504
Lys130	117.820	60.586
Lys148	147.447	75.821
Arg175	45.657	19.904
Lys178	138.783	71.366
Arg185	96.851	42.222
Arg189	119.351	52.031
Lys198	175.253	90.120
Arg204	108.225	47.181
Lys206	77.659	39.934
Lys230	124.955	64.255
Lys254	116.540	59.928
Lys262	113.583	58.407

表2 Discovery Studio 中突变位点和突变能量统计

Table 2 Statistics of mutation sites and mutation energies in Discovery Studio

Item	Mutation energy of trypsin complex (kcal/mol)	Mutation energy of ZHD101 (kcal/mol)
Lys254>Gln	0.47	1.33
Lys262>Gln	-0.03	-0.13
Lys262>Ile	-0.03	0.05

zhd101^{K254Q K262Q} 基因使用 *EcoR* I 和 *Pst* I 进行双酶切鉴定, 通过琼脂糖凝胶电泳得到的条带为 870 bp 的 *zhd101* 和 2 907 bp 的 pGH 载体(图 4A), 结果符合预期。质粒 pGH-*zhd101* 和表达载体 pBAN

经相应限制性内切酶双酶切并切胶回收, 连接转化感受态大肠杆菌 DH5 α 。大肠杆菌 DH5 α 阳性重组子抽提的质粒使用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切后, 通过琼脂糖凝胶电泳得到的条带为 6 335 bp 的 *zhd101* 和 3 780 bp 的 pBAN 载体(图 4B), 双酶切鉴定表达载体构建成功, 测序结果同样表明表达载体构建成功。

2.5 ZHD101 及突变体的表达和纯化

将双酶切线性化后的 DNA 片段通过电击转化到感受态毕赤酵母 GS115 中, 使野生型和突变体 ZHD101 蛋白在毕赤酵母 GS115 表达, 并以未电转的 GS115 为空白对照。各组样本的 SDS-PAGE 结果显示, 野生型和突变体 ZHD101 蛋白成功表达和分泌, 分子量符合预期大小(29 kDa), 野生型和突变体蛋白的纯化结果如图 5 所示。

2.6 ZHD101 及突变体的胰蛋白酶消化试验

ZHD101 及突变体的胰蛋白酶消化试验结果如图 6 所示。相较于 ZHD101^{WT}, ZHD101^{K254Q} 和 ZHD101^{K254Q/K262Q} 突变体展现出了胰酶耐受性的提升。ZHD101^{WT}、突变体 ZHD101^{K262I}、ZHD101^{K254Q} 及 ZHD101^{K254Q/K262Q} 消化 10 min 的蛋白残余量分别是: 93.1%、88.1%、95.2% 和 94.1%; 60 min 后 4 个蛋白的残余量分别为 74.2%、68.7%、82.7% 和 81.5% (图 6E)。根据公式计算的半衰期分别为 152、139、246 和 240 min, ZHD101^{K254Q} 的半衰期比野生型延长了 61.8%, ZHD101^{K254Q/K262Q} 比野生型延长了 57.8%。这表明了 2 个 ZHD101 突变体的胰蛋白酶抗性提升了。

2.7 酶学性质表征

如图 7A、7B 所示, 突变体 ZHD101^{K254Q}、ZHD101^{K262I} 和 ZHD101^{K254Q/K262Q} 与野生型酶学性质相似, 在 pH 9.0–10.0 具有最高活性, 并且在碱性条件下活性较高, 稳定性更强。各突变体

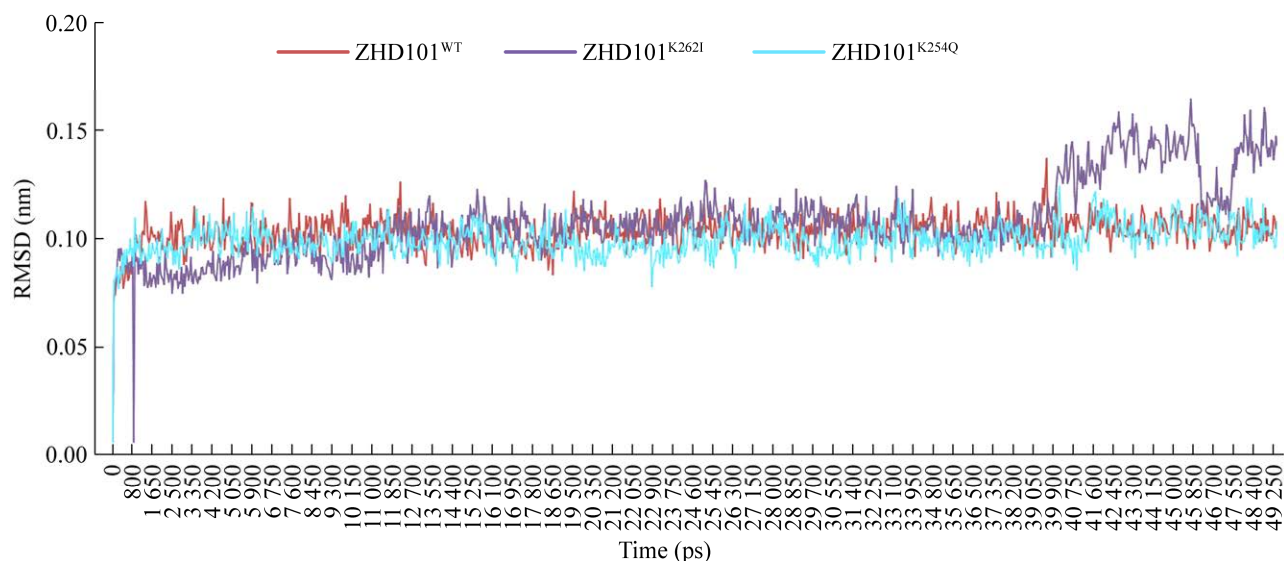


图 3 ZHD101 及突变体的主干均方根偏差(RMSD)

Figure 3 Root mean square deviation (RMSD) of trunks for ZHD101 and mutants.

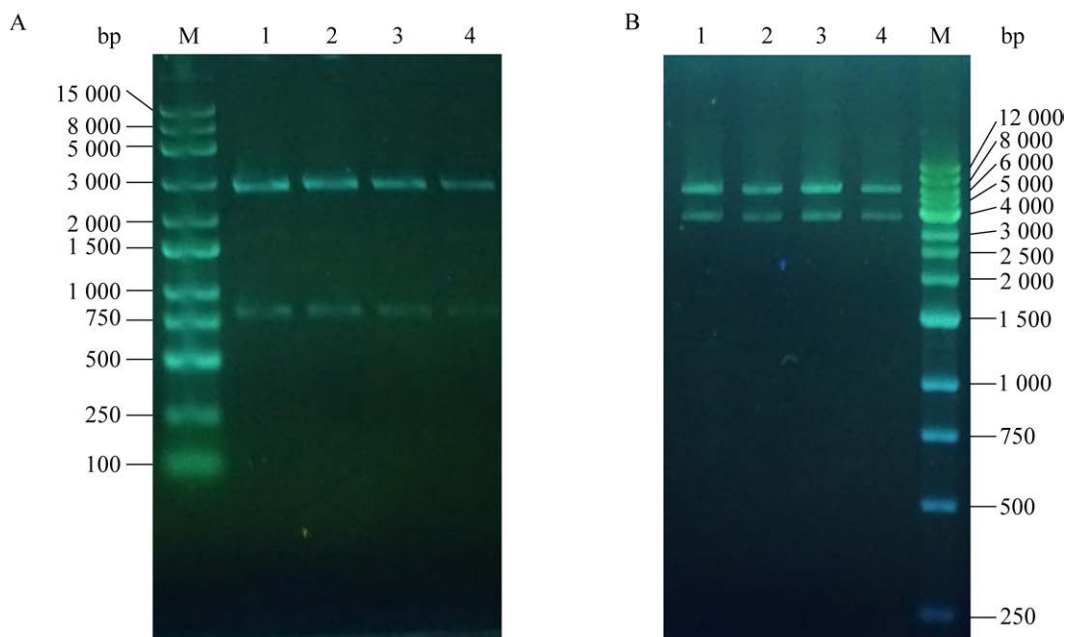


图 4 pGH-*zhd101* 和表达盒双酶切电泳图 A: pGH-*zhd101* 双酶切鉴定(M: DL2504 DNA marker; 1-4: pGH 和 *zhd101* 野生型及突变体基因)。B: pBAN-*zhd101* 双酶切鉴定(M: DL10004 DNA marker; 1-4: pBAN 和 *zhd101* 野生型及突变体基因)。

Figure 4 Dual enzyme digestion electropherogram of pGH-*zhd101* and expression cassette. A: pGH-*zhd101* double digest identification (M: DL2504 DNA marker; 1-4: pGH and *zhd101* wild type and mutant genes). B: pBAN-*zhd101* double digest identification (M: DL10004 DNA marker; 1-4: pBAN and *zhd101* wild type and mutant genes).

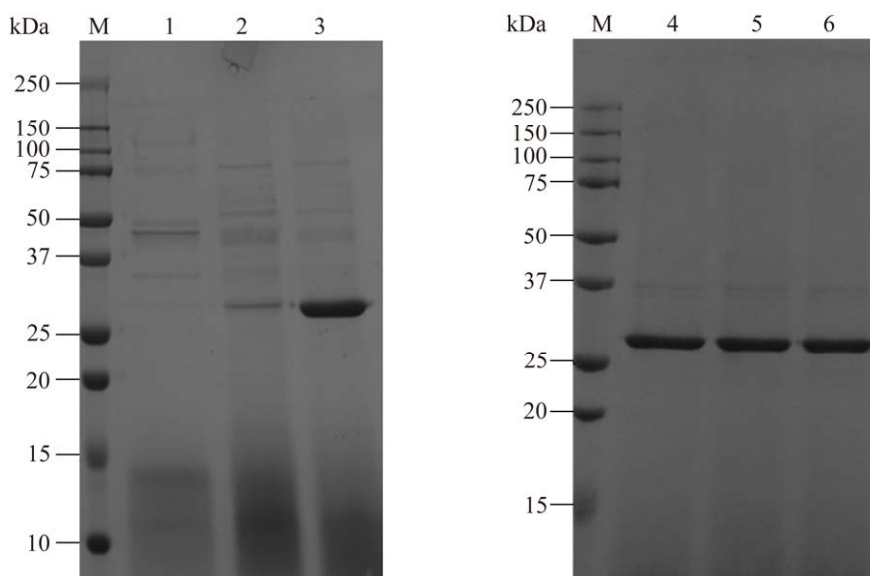


图5 ZHD101及突变体的表达和纯化 M:蛋白 marker;1:上样峰;2:洗脱杂质峰;3:纯化的ZHD101^{WT};4:纯化的ZHD101^{K254Q};5:纯化的ZHD101^{K262I};6:纯化的ZHD101^{K254Q/K262Q}。

Figure 5 Expression and purification of ZHD101 and mutants. M: Protein marker, 1: Upper sample peak; 2: Elution impurity peak; 3: Purified ZHD101^{WT}; 4: Purified ZHD101^{K254Q}; 5: Purified ZHD101^{K262I}; 6: Purified ZHD101^{K254Q/K262Q}.

及野生型 ZHD101 的最适温度均为 40 °C, 同时 在高温下活性和稳定性会迅速降低(图 7C、7D)。除突变体 ZHD101^{K254Q} 外的催化活性都受到负面影响, ZHD101^{K254Q} 的 k_{cat}/K_m 值比野生型高 0.29 倍, 而 ZHD101^{K254Q/K262Q} 的 k_{cat}/K_m 值比野生型低 45%, ZHD101^{K262I} 的 k_{cat}/K_m 值比野生型低 75% (表 3)。以上结果表明突变体 ZHD101^{K254Q} 和 ZHD101^{K254Q/K262Q} 的胰蛋白酶抗性优于野生型, 并且突变体 ZHD101^{K254Q} 相较于野生型催化效率有所提高, 而突变体的温度耐受性及 pH 耐受性未改变。

3 讨论

ZEN 是一种由镰刀菌属真菌产生的毒素^[36], 可对人类的健康和动物的生产性能造成严重的危害。可以通过微生物和生物酶的作用实现对 ZEN 转化, 从而去除污染谷物中带有毒性的

ZEN^[9]。然而, 酶在应用过程中容易受到温度、pH 及胃蛋白酶等因素的影响, 导致其在实际应用中的使用效率降低。因此, 人们通过非理性设计、理性设计和半理性设计的蛋白质工程手段来优化酶等各种蛋白质分子的结构, 提高分子的反应效率及对不良因素的抗性。

目前, 玉米赤霉烯酮水解酶 ZHD101 的基因序列已知, 对蛋白晶体结构和催化机制也有着广泛的研究, 为理性设计分子的模拟计算提供了准确和可靠的依据^[17-19]。在本研究中, 我们选择来源于 *Clonostachys rosea* 的具有高效降解玉米赤霉烯酮生物活性的酶 ZHD101, 通过对其单体模型与胰蛋白酶进行分子对接, 在对接时封闭单体结构参与二聚体相互作用的残基并基于复合物结合的稳定性和胰酶水解的特异性。同时, 避开了位于活性中心的突变位点以及承担稳定结构和对接底物的关键位点。

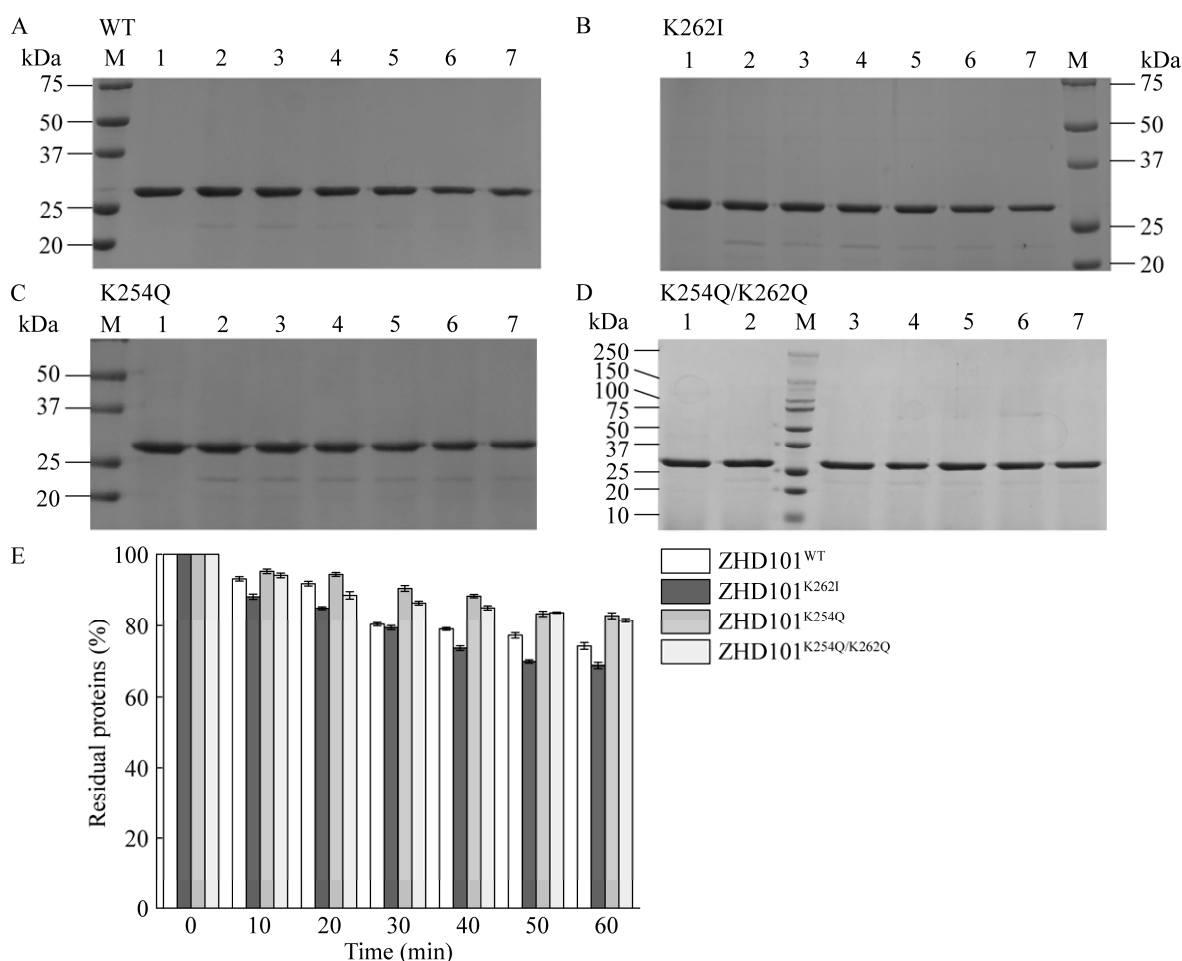


图 6 ZHD10 及突变体胰蛋白酶消化试验 M: 蛋白 marker; 1-7: 经胰蛋白酶消化 0、10、20、30、40、50、60 min 后剩余的 ZHD10^{WT} (A)、ZHD10^{K262I} (B)、ZHD10^{K254Q} (C) 和 ZHD10^{K254Q/K262Q} (D) 蛋白量。E: ZHD10^{WT}、ZHD10^{K262I}、ZHD10^{K254Q} 和 ZHD10^{K254Q/K262Q} 胰蛋白酶耐受性灰度扫描结果。

Figure 6 Trypsin digestion assay of ZHD10 and mutants. M: Protein marker; 1-7: Amounts of ZHD10^{WT} (A), ZHD10^{K262I} (B), ZHD10^{K254Q} (C), and ZHD10^{K254Q/K262Q} (D) proteins remaining after 0, 10, 20, 30, 40, 50, and 60 min of trypsin digestion; E: ZHD10^{WT}, ZHD10^{K262I}, ZHD10^{K254Q}, ZHD10^{K254Q/K262Q} trypsin tolerance grey scale scan results.

相较于 Su 等^[28]通过鉴定胰酶消化肽段再进一步筛选的策略,本研究策略可节省大量实验时间,快速筛选突变位点。而 Niu 等^[27]通过同源蛋白序列比对的策略适用范围小,具有胰蛋白酶抗性的同源序列是该策略实现的前提,相比之下,本研究的理性设计具有更高的普适性。本研究设计的突变体实验结果表明,3 个突变体中有 2 个突变体表现出了显著提升的胰蛋白

酶抗性,ZHD10^{K254Q}的半衰期比野生型延长了 61.8%,ZHD10^{K254Q/K262Q}比野生型延长了 57.8%,体现了该突变策略的可行性。借助虚拟突变、分子动力学计算等计算机手段进行筛选,确定符合要求的有益突变方案和组合,能够减少生物学实验的庞大工作量。

对 ZHD101 突变前后与胰蛋白酶的结合构象(图 8)进行分子分析发现,结合面上的 K254

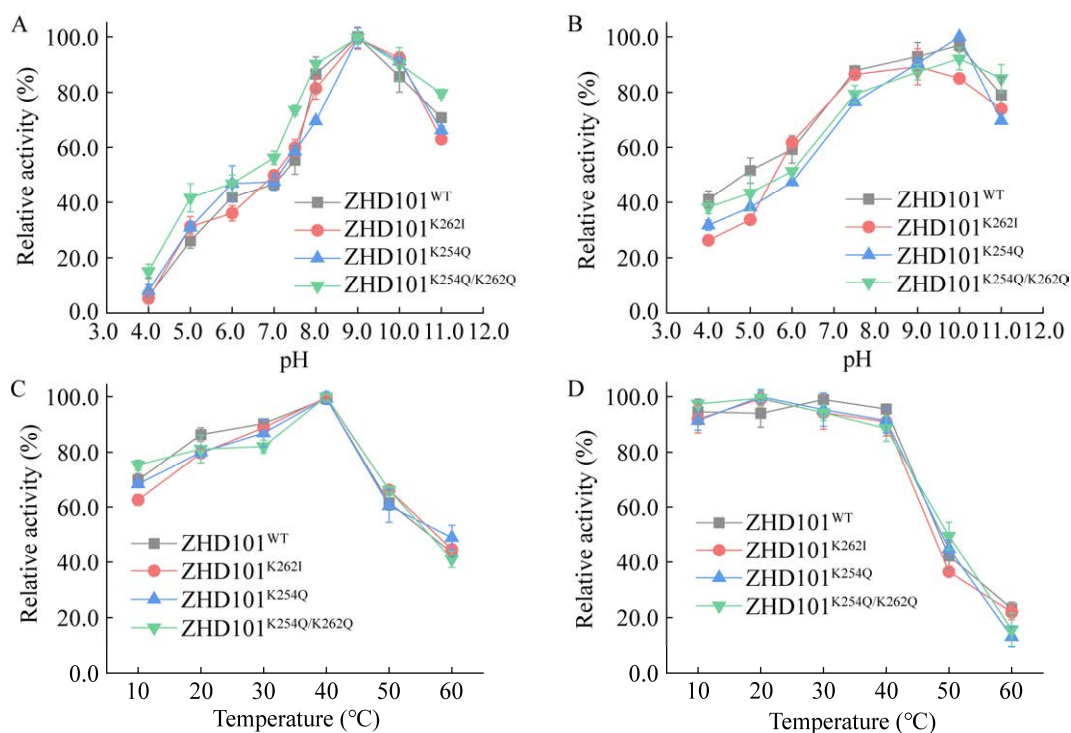


图 7 野生型及胰蛋白酶突变体的最适 pH (A)、pH 稳定性(B)、最适温度(C)和温度稳定性(D)

Figure 7 Optimum pH (A), pH stability (B), optimum temperature (C) and temperature stability (D) of wild-type and trypsin mutants.

表 3 野生型及胰蛋白酶抗性突变体动力学参数比较

Table 3 Comparison of kinetic parameters in wild-type and trypsin-resistant mutants

Item	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (mmol/(L·s))
ZHD101 ^{WT}	2.027 0±0.252 6	3.612 8±0.335 9	1.782 3±0.380 4
ZHD101 ^{K262I}	4.718 2±0.371 2	2.102 6±0.265 4	0.445 6±0.520 0
ZHD101 ^{K254Q}	2.086 8±0.134 5	4.795 0±0.261 9	2.297 8±1.350 0
ZHD101 ^{K254Q/K262Q}	12.029 6±1.581 7	11.773 8±1.242 3	0.978 7±2.345 0

突变改变了蛋白与胰蛋白酶的结合模式。突变体 ZHD101^{K254Q} 和 ZHD101^{K254Q/K262Q} 与胰蛋白酶之间的主要相互作用力氢键的数目均由 16 个减少到 11 个(图 8B、8C), 氢键减弱表示与胰酶的结合减弱, 表明 K254 残基的变化减弱了 ZHD101 与胰蛋白酶的结合。ZHD101^{K262I} 与胰蛋白酶相互作用的氢键数目增加到 17 个(图 8D), 增强了 ZHD101 与胰酶的相互作用, 计算机模拟与生物学实验中 ZHD101^{K262I} 胰酶耐受性降低的现象展现出了一致性。在测定酶动力学参

数的过程中, 发现 K254 和 K262 的双点突变带来了催化活性的负面影响, 这可能是由于 2 个位点相距较近, 在 α 螺旋的同侧, 并且 Q 残基侧链较长, 同时突变可能会导致分子内相互作用发生变化使得二聚体构象的 ZHD101 受到影响, 在溶液中与底物的亲和力变低。分析该突变前后 K254 和 K262 及其附近残基之间的相互作用, 发现 E258 位点与两者均产生相互作用, 并且突变使 E258 与后者的氢键由 4 个增加到 5 个, 这表明分子内相互作用确实发生了变化(图 9)。

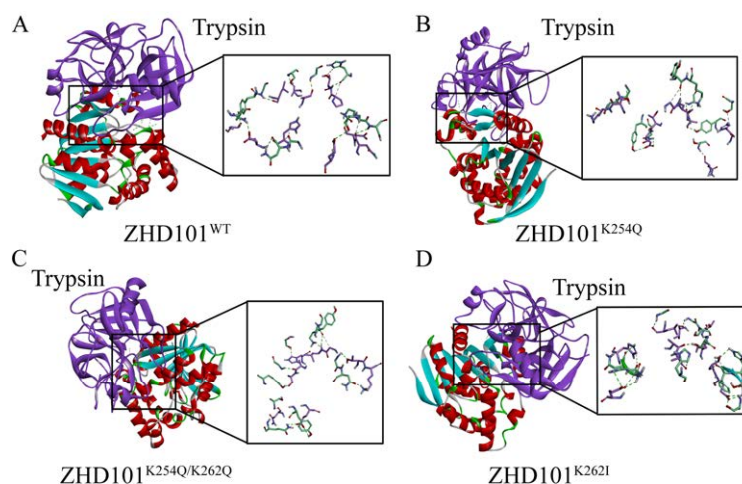


图 8 ZHD101^{WT} (A)、ZHD101^{K254Q} (B)、ZHD101^{K254Q/K262Q} (C)和 ZHD101^{K262I} (D)与胰蛋白酶的主要相互作用氢键 ZHD101 用红绿色标记；胰蛋白酶用紫色标记；绿色虚线表示氢键。

Figure 8 Hydrogen bonding of ZHD101^{WT} (A), ZHD101^{K254Q} (B), ZHD101^{K254Q/K262Q} (C), and ZHD101^{K262I} (D) to trypsin as the primary interaction with trypsin. ZHD101 is labelled in red and green and trypsin is labelled in purple, green dashed lines indicate hydrogen bonds.

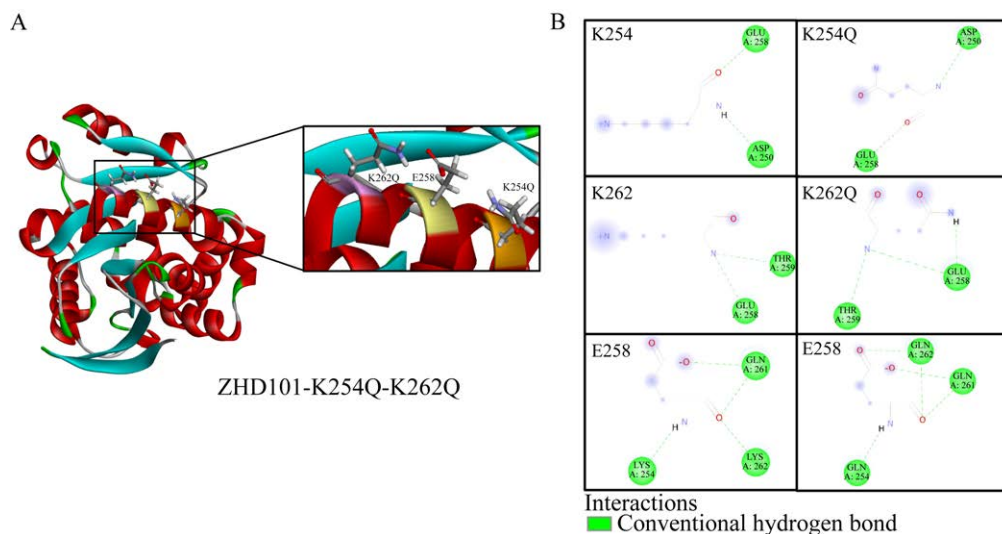


图 9 ZHD101 单体结构中 K254Q 和 K262Q 在模型中的位置(A)和相互作用分析(B) A: K254Q 以橙色部分显示, E258 以黄色部分显示, K262Q 以粉色部分显示, 3 个残基均显示其棍棒模型。B: K254、E258、K262 这 3 个位点突变前后与其他残基相互作用的 2D 图, 左为突变前, 右为突变后, A 表示 ZHD101 的单链。

Figure 9 Location of K254Q and K262Q in the ZHD101 monolithic structure in the model (A) and interaction analysis (B). A: K254Q is shown in the orange part, E258 in the yellow part, and K262Q in the pink part, all three residues are shown in their stick models; B: 2D plots of the interactions with other residues before and after the mutation of the three loci K254, E258, and K262, with the left being the pre-mutation and the right being the post-mutagenesis, and A denoting a single stranded ZHD101.

4 结论

本研究通过理性设计开发了可以提高玉米赤霉酮水解酶 ZHD101 抗胰蛋白酶性能的突变体, 有助于提高其在实际应用中的使用率。此外, 本研究对 ZHD101 蛋白质分子的改造策略, 可拓展到其他性质如底物选择性、提高蛋白质酶活性等方面的理性分子设计。

REFERENCES

- [1] ROPEJKO K, TWARUZEK M. Zearalenone and its metabolites-general overview, occurrence, and toxicity[J]. *Toxins*, 2021, 13(1): 35.
- [2] ÜLGER TG, UÇAR A, ÇAKIROĞLU FP, YILMAZ S. Genotoxic effects of mycotoxins[J]. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 2020, 185: 104-113.
- [3] LIANG Z, REN ZH, GAO S, CHEN Y, YANG YY, YANG D, DENG JL, ZUO ZC, WANG Y, SHEN LH. Individual and combined effects of deoxynivalenol and zearalenone on mouse kidney[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2015, 40(3): 686-691.
- [4] ZHANG CQ, LI C, LIU KC, ZHANG Y. Characterization of zearalenone-induced hepatotoxicity and its mechanisms by transcriptomics in zebrafish model[J]. *Chemosphere*, 2022, 309(Pt 1): 136637.
- [5] ROGOWSKA A, POMASTOWSKI P, SAGANDYKOVA G, BUSZEWSKI B. Zearalenone and its metabolites: effect on human health, metabolism and neutralisation methods[J]. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 2019, 162: 46-56.
- [6] BULGARU CV, MARIN DE, PISTOL GC, TARANU I. Zearalenone and the immune response[J]. *Toxins*, 2021, 13(4): 248.
- [7] 许玲涵. 饲料中常见霉菌毒素及防控措施[J]. *畜牧业环境*, 2020(3): 73.
XU LH. Common mycotoxins in feed and their prevention and control measures[J]. *Animal Industry and Environment*, 2020(3): 73 (in Chinese).
- [8] LI WF, ZHOU XX, LU P. Structural features of thermozymes[J]. *Biotechnology Advances*, 2005, 23(4): 271-281.
- [9] MURTAZA B, LI XY, DONG LM, JAVED MT, XU L, SALEEMI MK, LI G, JIN BW, CUI HJ, ALI A, WANG LL, XU YP. Microbial and enzymatic battle with food contaminant zearalenone (ZEN)[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(12): 4353-4365.
- [10] TAKAHASHI-ANDO N, KIMURA M, KAKEYA H, OSADA H, YAMAGUCHI I. A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning[J]. *The Biochemical Journal*, 2002, 365(Pt 1): 1-6.
- [11] HENG YY, LIU WT, CHEN CC, HU XY, LIU WD, KO TP, TANG XK, WEI HL, HUANG JW, GUO RT. Crystal structure of a mycoestrogen-detoxifying lactonase from *Rhinocladiella mackenziei*: molecular insight into ZHD substrate selectivity[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(5): 4294-4298.
- [12] 赵程程, 孙长坡, 孙晶, 王峻, 刘虎军. 1株新型降解玉米赤霉烯酮的沙福芽孢杆菌及其关键酶分析[J]. *食品科学*, 2023, 44(22): 165-172.
ZHAO CC, SUN CP, SUN J, WANG J, LIU HJ. Identification and characterization of a novel strain of *Bacillus safensis* M7L4 capable of degrading zearalenone and analysis of related key enzymes[J]. *Food Science*, 2023, 44(22): 165-172 (in Chinese).
- [13] HU JQ, WANG G, HOU MX, DU SL, HAN J, YU YG, GAO HX, HE D, SHI JR, LEE YW, MOHAMED SR, DAWOOD DH, HONG Q, LIU X, XU JH. New hydrolase from *Aeromicrobium* sp. HA for the biodegradation of zearalenone: identification, mechanism, and application[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(5): 2411-2420.
- [14] FANG YY, ZHANG ZX, XU W, ZHANG WL, GUANG CE, MU WM. Zearalenone lactonase: characteristics, modification, and application[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(21): 6877-6886.
- [15] OUYANG BB, ZHANG WL, GUANG CE, XU W, MU WM. Identification and modification of enzymatic substrate specificity through residue alteration in the cap domain: a thermostable zearalenone lactonase[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(48): 18943-18952.
- [16] SUN ZP, FANG YT, ZHU YH, TIAN W, YU JJ, TANG J. Biotransformation of zearalenone to non-estrogenic compounds with two novel recombinant lactonases from *Gliocladium*[J]. *BMC Microbiology*, 2024, 24(1): 75.
- [17] PENG W, KO TP, YANG YY, ZHENG YY, CHEN CC, ZHU Z, HUANG CH, ZENG YF, HUANG JW, WANG AHJ, LIU JR, GUO, RT. Crystal structure and substrate-binding mode of the mycoestrogen-detoxifying lactonase ZHD from *Clonostachys rosea*[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(107): 62321-62325.
- [18] 柴成梁, 常晓娇, 王楠希, 孙晶, 孙长坡. 玉米赤霉烯酮降解酶 ZHD795 编码基因克隆及降解活性研究[J]. *食品科学技术学报*, 2018, 36(6): 28-32.
CHAI CL, CHANG XJ, WANG NX, SUN J, SUN CP. Cloning of ZEN-degrading enzyme ZHD795 and study on degradation activity[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2018, 36(6): 28-32 (in Chinese).
- [19] LEE HL, CHANG CK, JENG WY, WANG AHJ, LIANG PH. Mutations in the substrate entrance region of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* improve enzyme activity and thermostability[J]. *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS*, 2012, 25(11): 733-740.
- [20] 官媛林, 张萌, 许菲. 结构指导的玉米赤霉烯酮水解酶的热稳定性改造[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(8): 3336-3350.
GUAN AL, ZHANG M, XU F. Structure-guided engineering for improving the thermal stability of zearalenone hydrolase[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(8): 3336-3350 (in Chinese).
- [21] 许中霞, 刘桂智, 刘卫东, 郭瑞庭, 李华钟, 郑迎迎. 玉米赤霉烯酮水解酶耐热性的分子改造[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(7): 71-77.

- XU ZX, LIU GZ, LIU WD, GUO RT, LI HZ, ZHENG YY. Molecular engineering of mycoestrogen-detoxifying lactonase ZHD101 to improve enzyme thermostability[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2019, 38(7): 71-77 (in Chinese).
- [22] WANG YX, CHEN Y, JIANG L, HUANG H. Improvement of the enzymatic detoxification activity towards mycotoxins through structure-based engineering[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 56: 107927.
- [23] GRUBER-DORNINGER C, KILLINGER M, HÖBARTNER-GUßL A, ROSEN R, DOUPOVEC B, ALESCHKO M, SCHWARTZ-ZIMMERMANN H, GREITBAUER O, MARKOVIĆ Z, STANKOVIĆ M, SCHÖNDORFER K, VUKMIROVIC D, WEIN S, SCHATZMAYR D. Enzymatic degradation of zearalenone in the gastrointestinal tract of pigs, chickens, and rainbow trout[J]. *Toxins*, 2023, 15(1): 48.
- [24] LI YF, HU FJ, WANG XM, CAO H, LIU DL, YAO DS. A rational design for trypsin-resistant improvement of *Armillariella tabescens* β -mannanase MAN47 based on molecular structure evaluation[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 163(4): 401-407.
- [25] QIU YX, WU XY, XIE CF, HU YD, LIU DL, MA Y, YAO DS. A rational design for improving the trypsin resistance of aflatoxin-detoxifzyme (ADTZ) based on molecular structure evaluation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 86: 84-92.
- [26] WANG H, LIN XN, LI S, LIN JL, XIE CF, LIU DL, YAO DS. Rational molecular design for improving digestive enzyme resistance of beta-glucosidase from *Trichoderma viride* based on inhibition of bound state formation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 133: 109465.
- [27] NIU CF, YANG PL, LUO HY, HUANG HQ, WANG YR, YAO B. Engineering of *Yersinia* phytases to improve pepsin and trypsin resistance and thermostability and application potential in the food and feed industry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(34): 7337-7344.
- [28] SU TT, HE J, LI NN, LIU SH, XU SJ, GU LC. A rational designed PslG with normal biofilm hydrolysis and enhanced resistance to trypsin-like protease digestion[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 760.
- [29] HUI RJ, HU XY, LIU WT, LIU WD, ZHENG YY, CHEN Y, GUO RT, JIN J, CHEN CC. Characterization and crystal structure of a novel zearalenone hydrolase from *Cladophialophora bantiana*[J]. *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology Communications*, 2017, 73(Pt 9): 515-519.
- [30] SALI A, POTTERTON L, YUAN F, van VLIJMEN H, KARPLUS M. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER[J]. *Proteins*, 1995, 23(3): 318-326.
- [31] CHEN R, LI L, WENG ZP. ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2003, 52(1): 80-87.
- [32] LI L, CHEN R, WENG ZP. RDOCK: refinement of rigid-body protein docking predictions[J]. *Proteins*, 2003, 53(3): 693-707.
- [33] CASE DA, CHEATHAM TE 3rd, DARDEN T, GOHLKE H, LUO R, MERZ KM Jr, ONUFRIEV A, SIMMERLING C, WANG B, WOODS RJ. The Amber biomolecular simulation programs[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2005, 26(16): 1668-1688.
- [34] PRONK S, PÁLL S, SCHULZ R, LARSSON P, BJELKMAR P, APOSTOLOV R, SHIRTS MR, SMITH JC, KASSON PM, van der SPOEL D, HESS B, LINDAHL E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit[J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(7): 845-854.
- [35] WIEHE K, PIERCE B, MINTSERIS J, TONG WW, ANDERSON R, CHEN R, WENG ZP. ZDOCK and RDOCK performance in CAPRI rounds 3, 4, and 5[J]. *Proteins*, 2005, 60(2): 207-213.
- [36] STOB M, BALDWIN RS, TUIITE J, ANDREWS FN, GILLETTE KG. Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*[J]. *Nature*, 1962, 196: 1318.