

研究报告

## 基于结构 B 因子分析指导的头孢菌素 C 酰化酶 动力学稳定性改造

刘新花<sup>1</sup> 杨广宇<sup>3</sup> 邓子新<sup>1,2</sup> 谢渊<sup>3\*</sup> 刘天罡<sup>1,2\*</sup>

(1. 武汉大学药学院 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室 湖北 武汉 430071)

(2. 湖北省合成微生物技术工程实验室 武汉生物技术研究院 湖北 武汉 430075)

(3. 武汉瀚海新酶生物科技有限公司 湖北 武汉 430075)

**摘要:**【目的】筛选 *Pseudomonas* sp. SE83 acyII 定点饱和突变库, 获得动力学稳定性提高的头孢菌素 C (CPC) 酰化酶突变体, 并对突变酶进行初步的结构-功能关系分析。【方法】靶标酶 *Pseudomonas* sp. SE83 acyII 与 *Pseudomonas diminuta* N176 具有较高的同源性, 通过分析 N176 的结构 B 因子, 构建 CPC 酰化酶 SE83 定点饱和突变库; 基于 pH 指示剂显色法, 采用 Biomek FX<sup>P</sup> 自动工作站建立 CPC 酰化酶高通量筛选方法, 获得优良突变酶, 对其活性、稳定性等酶学性质进行表征; 利用 SWISS-MODEL 对突变体进行同源建模, 探讨突变体结构与功能的关系。【结果】通过 B 因子分析和同源结构比对, 共找出 9 个靶标位点; 经过 3 轮筛选, 发现 R218 及 K226 位点突变显著提高酶的热稳定性, 其中最显著的 R218Q 和 K226V 在 40 °C 的半衰期分别为野生型的 3.77 和 2.77 倍, 催化效率  $k_{cat}/K_m$  分别为野生型的 1.8 和 3.1 倍。同源建模分析表明氢键作用和疏水相互作用的增加可能是突变体稳定性提高的原因。【结论】B 因子指导的酶分子改造是一种高效可靠的动力学稳定性改造策略, 突变体 R218Q 和 K226V 均可提高 CPC 酰化酶的稳定性和催化效率, 对进一步的 CPC 酰化酶分子改造具有一定的参考价值和指导意义。

**关键词:** 头孢菌素 C 酰化酶, 半衰期, 动力学稳定性, B 因子, Biomek FX<sup>P</sup> 高通量筛选

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31670090)

**\*Corresponding authors:** XIE Yuan: Tel: 86-27-65528952; E-mail: ytmito1986@163.com

LIU Tian-Gang: Tel: 86-27-68755086; E-mail: liutg@whu.edu.cn

**Received:** October 12, 2016; **Accepted:** February 09, 2017; **Published online** (www.cnki.net): February 28, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31670090)

**\*通讯作者:** 谢渊: Tel: 86-27-65528952; E-mail: ytmito1986@163.com

刘天罡: Tel: 86-27-68755086; E-mail: liutg@whu.edu.cn

收稿日期: 2016-10-12; 接受日期: 2017-02-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-02-28

## Enhancing enzyme activity and thermostability of cephalosporin C acylase based on B factor analysis

LIU Xin-Hua<sup>1</sup> YANG Guang-Yu<sup>3</sup> DENG Zi-Xin<sup>1,2</sup> XIE Yuan<sup>3\*</sup> LIU Tian-Gang<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, Wuhan University, School of Pharmaceutical Science, Wuhan, Hubei 430071, China)

(2. Hubei Engineering Laboratory for Synthetic Microbiology, Wuhan Institute of Biotechnology, Wuhan, Hubei 430075, China)

(3. Hzymes Biological Technology Co. Ltd, Wuhan, Hubei 430075, China)

**Abstract:** [Objective] The aim of this study was to obtain a more stable cephalosporin C (CPC) acylase by screening site-directed saturation mutation libraries of *Pseudomonas* sp. SE83 acyII and to characterize the structure and function of mutant enzyme. [Methods] We computed B factor based on the structure of *Pseudomonas diminuta* N176, a homologue of *Pseudomonas* sp. SE83 acyII, and constructed site-directed saturation mutation libraries of SE83 acyII. Combined with pH indicator assay, we used a Biomek FX<sup>P</sup> automation workstation high-throughput screening method to screen more stable CPC acylase. The enzyme properties were further defined by comparison with the wild type enzyme. The relationship between structure and function of the positive mutants was studied by homology modeling, using SWISS-MODEL software. [Results] We found 9 targeting sites by B factor homologous structure alignment and computation. After 3 rounds of screening, we found that the mutations occurring at residues R218 and K226 could enhance the thermostability of acylase, and the most stable mutants were identified as R218Q and K226V. Their half-lives at 40 °C were approximately 3.77- and 2.77-fold of the wild type enzyme, respectively. The catalytic efficiency  $k_{cat}/K_m$  was also approximately 1.8- and 3.1-fold of the wild type, respectively. The possible mechanism for the enhanced stability might be the increments of hydrogen bonds and hydrophobic interaction, which were analyzed by homology modeling. [Conclusion] It proved to be an efficient and reliable strategy for improving enzymatic stability based on B factor, and the positive mutant R218Q and K226V could enhance the stability and catalytic efficiency of CPC acylase. Thus, this study may serve as a useful reference for further improving enzyme properties.

**Keywords:** CPC acylase, Half-life, Kinetic stability, B factor, Biomek FX<sup>P</sup> high throughput screening

7-氨基头孢烷酸(7-ACA)是众多半合成头孢菌素类抗生素的关键中间体<sup>[1]</sup>。目前,7-ACA 主要由头孢菌素 C (Cephalosporin C, CPC)经化学法或酶法合成。其中,酶法生产主要分为两步酶法和一步酶法,两步酶法在国内外已经成功工业化,并在逐步取代化学法。虽然两步酶法避免了环境污染问题,但由于该方法采用 D-氨基酸氧化酶和戊二酰-7-氨基头孢烷酸(GL-7-ACA)酰化酶共同完成<sup>[2]</sup>,大量副产物的产生导致产率低、成本较高,无法满足高效生产的需求<sup>[3]</sup>。利用 CPC 酰化酶直接酰化 CPC 获得 7-ACA 的一步酶法<sup>[4]</sup>,既有化学法转化率高和纯度高的优势,又比两步酶法更具环保优势。据估计,一步酶法制备 7-ACA 每年市场价值

约 4 亿美元<sup>[5]</sup>。

Matsuda 等<sup>[6]</sup>从土壤中筛选得到的 *Pseudomonas* sp. SE83 菌株能产生两种头孢菌素酰化酶,分别为 acyI 和 acyII,其中仅 *Pseudomonas* sp. SE83 acyII 对 CPC 有活性。*Pseudomonas* sp. SE83 acyII 基因编码 83 kD 的多肽前体,前体经自剪切得到 25 kD  $\alpha$  亚基和 58 kD  $\beta$  亚基组成的成熟蛋白。Shin 等通过多轮突变获得的突变体 V122 $\alpha$ A/G140 $\alpha$ S/F58 $\beta$ N/I75 $\beta$ T/I176 $\beta$ V/S471 $\beta$ C (也被命名为 S12)相比于野生型酶活提高了 8.5 倍,并且产物抑制也显著降低<sup>[7]</sup>。然而,CPC 酰化酶在应用中仍存在对热敏感、稳定性不佳等问题<sup>[8-9]</sup>,SE83 acyII 野生型和 S12 最适温度仅为 40 °C<sup>[7]</sup>,温度高时极易失

活, 因此, 提高其热稳定性, 使其更好地适应运输、工业生产等条件是推动其进一步工业应用的关键。

B 因子, 又称为温度因子, 通过软件 Discovery studio 计算每个氨基酸残基的 B 因子, 从而衡量各个残基的刚性或柔性, 对柔性较大的氨基酸进行突变, 可有效提升酶的稳定性<sup>[10]</sup>。目前, *Pseudomonas* sp. SE83 acyII 晶体结构尚未被解析, 但其蛋白序列与 *Pseudomonas diminuta* N176 同源性达 90% 以上<sup>[11-12]</sup>。本文以 N176<sup>[13]</sup>(PDB ID: 4HSR) 晶体结构为模板, 通过 Discovery studio 计算出各残基 B 因子值, SWISS-MODEL 同源建模得到 SE83 acyII S12 结构信息, 通过结构比对选择 N176 高 B 因子值所对应的残基, 应用分子生物学技术构建定点饱和突变库, 基于 pH 指示剂法<sup>[14]</sup>, 利用 Biomek FX<sup>P</sup> 实验室自动工作站建立高效的筛选程序, 快速筛选出稳定性提高的突变体, 并对突变体进行催化动力学分析, 进一步推进头孢菌素 C 酰化酶的优良改造, 为工业化生产奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒: 宿主 *Escherichia coli* DH10B 和 BL21(DE3) 及载体 pET28a 均为本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器: Phusion DNA Polymerase 和 *Dpn* I 购于 New England Biolabs 公司; PCR 产物纯化、胶回收产物纯化和质粒小量提取试剂盒购于 Axygen Scientific 公司; DNA 限制性内切酶、T4 DNA Ligase 和 Prestained Protein Ladder 购于 Fermentas 公司; PrimeSTAR Max DNA Polymerase 购于 TaKaRa 公司; DNA Marker、Millipore Amicon Ultrafiltration Centrifuge Tubes 和 BCA Protein Assay Kit 购于 Thermo Fisher Scientific 公司; Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 购于 AMRESCO 公司。

微生物菌落挑选系统 Molecular Devices Qpix 460、Thermo 连续分液仪、Biomek FX<sup>P</sup> 自动化工作站和 PerkinElmer 微孔板酶标仪由武汉生物技术研

究院高通量平台提供。

1.1.3 培养基: LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0; 固体培养基另外加入 15.0 g/L 琼脂粉。

### 1.2 实验方法

1.2.1 目的基因 SE83 的克隆: 研究中所需要的头孢菌素酰化酶 SE83 基因根据 *Pseudomonas* sp. SE83 acyII S12 (V122 $\alpha$ A/G140 $\alpha$ S/F58 $\beta$ N/I75 $\beta$ T/I176 $\beta$ V/S471 $\beta$ C) 蛋白序列(GenBank 登录号为 AAA25690.1) 经整体密码子优化, 交由南京金斯瑞科技有限公司合成。设计引物: F (5'-ATATCATATGACGATGGCGGCCAAGACCGATCGCGAGGCCCTGCAGGCGGC GCTGCCCGCCTTCCGGCAGCCTCTCCATTCCGGGTTAAGCGCCCCTG-3') 和 R (5'-ATATCTCGAGTTAGGCCGGAACCAGCTCCTGGCTG-3'), 其中下划线分别为 *Nde* I 和 *Xho* I 的酶切位点。以金斯瑞公司提供的 pUC57-SE83 S12 质粒为模板, PCR 扩增 SE83 S12 基因。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 5 $\times$ PrimeSTAR GXL Buffer 10.0  $\mu$ L, 引物(10  $\mu$ mol/L) 各 2.5  $\mu$ L, 模板(50 mg/L) 1.0  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4.0  $\mu$ L, PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 1.0  $\mu$ L, 双蒸水 29.0  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 30 s; 98  $^{\circ}$ C 15 s, 55  $^{\circ}$ C 15 s, 68  $^{\circ}$ C 2 min, 32 个循环; 68  $^{\circ}$ C 10 min。将 SE83 S12 基因克隆至载体 pET28a 上, 即为 pET28a-SE83 S12 质粒。

1.2.2 N176 的 B 因子分析及靶标位点的确定: 在 Protein Data Bank (PDB 数据库) 中搜索 SE83 同源性最高的酶 N176 的结构进行分析。将 N176 包含的氨基酸根据  $\alpha$ 、 $\beta$  链分为两组, 使用 Discovery studio 软件对两个研究组中每一个氨基酸按照 B 因子大小进行排序, 选取每组中 B 因子较大的残基作为突变靶标位点。

1.2.3 SWISS-MODEL 同源建模<sup>[15]</sup>: 在线软件输入目的蛋白序列, 搜索同源性最高的序列 4HSR 作为模板进行比对, 得到目的蛋白结构模型。

1.2.4 定点饱和突变库的构建: 根据头孢菌素酰化酶基因序列设计饱和突变上下游引物(表 1), 以

表1 定点饱和突变库引物设计  
Table 1 Primers for site-directed saturation mutation libraries construction

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')
E113-F	GAAGCCCTGGGCGCANN <b>K</b> GCAAAGGATATGCTGC
E113-R	TATCCTTTGCMNNTGCGCCAGGGCTTCAAATCG
R218-F	TAGCAGCCCTGNN <b>K</b> CCGCGCGTTGATGCATTACTGAAAGC
R218-R	ATCAACGGCCGGMN <b>N</b> CAGGGCTGCTAAATCGGCTTCCAGG
K226-F	GATGCATTACTGNN <b>K</b> GCCATGGGTGGTGACGCCAGT
K226-R	CCACCCATGGCMN <b>N</b> CAGTAATGCATCAACGGCCGGAC
E334-F	CACGCTTTGGCAATNN <b>K</b> TTCGAACCTGTGGCCTGG
E334-R	ACAGGTTCGAAMN <b>N</b> ATTGCCAAAGCGTGCGGTGCG
E454-F	GGTTGGAGTGGTNN <b>K</b> CACGAATGGCGCGGTTGGATTCTCT
E454-R	AACCGCGCCATTCGTGMN <b>N</b> ACCACTCCAACCCGGAACC
G547-F	CCTGGGTATTCAGNN <b>K</b> AGCCTGCCGGCAGAAGAAGT
G547-R	CCGGCAGGCTMN <b>N</b> CTGAATACCCAGGGCTTCTAAG
S548-F	GGTATTCAGGGTNN <b>K</b> CTGCCGGCAGAAGAAGTGCGCCAGACC
S548-R	CTGCCGGCAGM <b>N</b> NACCCTGAATACCCAGGGCTTCTAAG
W632-F	GGCATGTAAAAAGC <b>N</b> KAGCTGGGATGAGGCCCTGAGCGAAG
W632-R	CTCATCCAGCTMN <b>N</b> GCCTTTTAACATGCCTGCGTCG
E764-F	CGTATCGCAGCCNN <b>K</b> GCCGTGACCAGCCAGGAGC
E764-R	GCTGGTCACGGCMN <b>N</b> GGCTGCGATACGATCCAGCTATACAGC

注：F：正向引物；R：反向引物。突变位点密码子以粗体显示；引物中的字母代表不同的核苷酸；N：A/T/C/G；K：G/T；M：A/C。  
Note: F: Forward primer; R: Reverse primer. Modified codons are shown in bold. Letters in primers represent different nucleotide; N: A/T/C/G; K: G/T; M: A/C.

pET28a-SE83 S12 重组质粒为模板，利用全质粒 PCR 方法构建饱和突变库。PCR 反应体系(50  $\mu$ L)：2 $\times$ PrimeSTAR Max 25.0  $\mu$ L，引物(10  $\mu$ mol/L)各 1.0  $\mu$ L，模板(50 mg/L) 1.0  $\mu$ L，双蒸水 22.0  $\mu$ L。PCR 反应条件：98  $^{\circ}$ C 2 min；98  $^{\circ}$ C 15 s，55  $^{\circ}$ C 15 s，72  $^{\circ}$ C 90 s，32 个循环；72  $^{\circ}$ C 10 min。将 PCR 产物经过 *Dpn* I 酶切消化，Axygen PCR Clean Up 试剂盒纯化回收后转化进入大肠杆菌 BL21(DE3)中构建了饱和突变库。

1.2.5 饱和突变库的筛选：如图 1 所示，利用 Qpix 460 将单菌落接入 200  $\mu$ L LB 的 96 孔板培养，37  $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养过夜，定义为母板；使用 Biomek FX<sup>P</sup> 工作站转接新孔板，定义为子板，37  $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养 2 h，连续分液仪向子板中加入 0.5 mmol/L IPTG，25  $^{\circ}$ C、220 r/min 培养过夜。酶标仪在 600 nm 处测定子板的菌密度值，扣除生长状况不佳的点。

低温离心收菌，弃上清，放入 -80  $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次。连续分液仪加入 200  $\mu$ L 5 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液重悬菌体，4  $^{\circ}$ C、3 600 r/min 离心 30 min，将上清液等分至两块新的 96 孔板中，标记为 A 板和 B 板：

1) 将 A 板于 55  $^{\circ}$ C 水浴保温 10 min，B 板室温放置 10 min，然后两板均放置冰上 15 min，再室温放置 10 min；

2) 工作站从 A 板和 B 板中吸取一定量的上清液，转移至含 0.002 5% 苯酚红(质量体积比)、68.6 mmol/L CPC 和 5 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液中，总体积 200  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C 反应 10 min，酶标仪在 556 nm 处测定 A 板和 B 板的吸光值；

3) 计算 A 板  $OD_{556}$ /B 板  $OD_{556}$  的比值，选取比值高的孔，在母板上找到对应的克隆，挑取富集至新的 96 孔板，重复上面的步骤进行复筛。

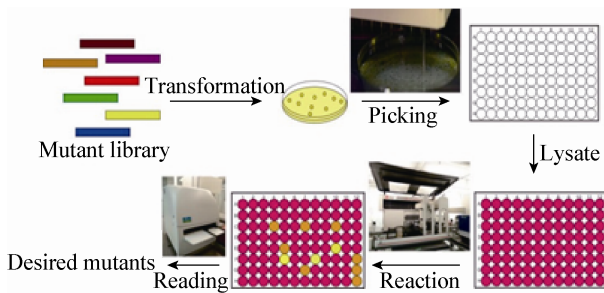


图 1 高通量工作站筛选示意图

Figure 1 The screening process of high throughput automation workstation

注: 突变库转化感受态 BL21(DE3); Qpix 460 挑菌至 96 孔板培养; 工作站完成接种; 连续分液仪加入 IPTG 诱导; 收集菌体破碎; 温度处理; 工作站吸取酶液反应; 酶标仪进行读数。

Note: The general screening process was from transformation, picking, inoculating, induction, disintegration and temperature treatment to enzymatic reaction and data reading.

**1.2.6 CPC 酰化酶的大量表达及纯化:** 将野生型和突变体 CPC 酰化酶重组菌接种于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 中, 37 °C 培养 2 h 加入 0.5 mmol/L IPTG, 25 °C 诱导过夜, 收集菌体。菌体沉淀用 Buffer A (50 mmol/L Tris-HCl, 4 mmol/L β-巯基乙醇, 300 mmol/L NaCl, pH 7.6) 缓冲液重悬, 冰浴中进行超声破碎(15 min, 每个循环运行 5 s 后暂停 8 s)。4 °C、18 000 r/min 离心 30 min 后将上清上样至 Ni<sup>2+</sup> 螯合的层析柱(GE Healthcare)中, Buffer B (50 mmol/L Tris-HCl, 4 mmol/L β-巯基乙醇, 300 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.6) 梯度洗脱得到目的蛋白, 采用 10 K Amicon<sup>®</sup> 超滤浓缩管(Millipore, Billerica, MA)将蛋白保存缓冲液更换成 5 mmol/L Tris-HCl (含 10%甘油, pH 8.0)。目的蛋白采用 SDS-PAGE 进行纯度分析。

**1.2.7 考马斯亮蓝法测定酶蛋白浓度:** 使用 Pierce#BCA Protein Assay Kit 测定蛋白浓度, 以 BSA (牛血清蛋白)为标准蛋白, 同时测定不同浓度 BSA 和目的蛋白在 562 nm 处的吸光值, 以 BSA 蛋白浓度为横坐标, OD<sub>562</sub> 为纵坐标, 绘制蛋白浓度标准曲线, 计算出目的蛋白的表达量。

**1.2.8 温度对酶活力的影响:** 通过测定 31–46 °C 范围内酶对 CPC 的活力以确定 CPC 酰化酶 SE83 及

其突变体最适反应温度。设定酶活最高点的活力为 100%, 以相对酶活绘制温度-酶活曲线。

**1.2.9 pH 指示剂法测 CPC 酰化酶活力和产物抑制:** 以 CPC 为底物, 按照 Xiao 等<sup>[14]</sup>提供的方法测定 CPC 酰化酶活力。反应总体积 200 μL, 反应液包含: 5 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl, 0.002 5%苯酚红, 68.6 mmol/L CPC, 5 μL 酶液。37 °C 下, 酶标仪连续监测 4 min 内 556 nm 处吸光值的变化。通过在相同反应体系中加入 HCl 代替酶液, 设置 HCl 浓度梯度(0–0.9 mmol/L), 37 °C 下酶标仪读取 556 nm 处吸光值, 质子浓度与苯酚红吸光值线性关系通过 Origin 9.0 进行拟合, 建立质子浓度换算的标准曲线。CPC 酰化酶酶活单位的定义: 每分钟释放 1 μmol 质子所需的酶量定义为一个酶活单位 U。测定产物抑制时, 反应体系分别加入 0–25 mmol/L 的 7-ACA。酶活计算公式:

$$\text{酶活力(U/L)} = \frac{D \times (\Delta A_1 - \Delta A_2) \times 10^3 \times V_t}{k \times t \times V_E}$$

公式中,  $D$  为稀释倍数,  $\Delta A_1$  为样品在  $t$  时间内吸光度变化值,  $\Delta A_2$  为空白对照在  $t$  时间内吸光度变化值,  $V_t$  为反应总体积(mL),  $V_E$  为酶液体积(mL),  $k$  为以不同浓度 HCl 建立的标准曲线斜率。

**1.2.10 动力学常数的测定:** 以 CPC 为底物, 设置底物浓度梯度(0.5–80.0 mmol/L), 根据测酶活法测定野生型和突变体的酶反应速度。将不同底物浓度  $[S]$  下对应的酶反应速度  $V$  代入米氏方程:  $V = V_{\max} \times [S] / (K_m + [S])$ , 使用 Origin 9.0 软件进行非线性拟合, 获得酶动力学参数  $K_m$  和  $V_{\max}$ , 再由公式  $k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E]$  计算  $k_{\text{cat}}$ , 其中  $[E]$  为酶的摩尔浓度。

**1.2.11 热失活动力学研究:** 将 0.5 g/L 酶液在 40 °C 保温不同时间, 然后置于冰上冷却 10 min, 测定酶的残余活性。以  $\ln(\text{残余活性})$  对时间作图, 并进行线性拟合, 所得斜率即为酶在该温度下的一级失活常数( $k_d$ )。酶在一定温度下的半衰期( $t_{1/2}$ )由以下公式求得:  $t_{1/2} = \ln 2 / k_d$ 。

$\Delta G$  表示从蛋白质中间过渡态到解折叠态的吉布斯自由能,  $\Delta\Delta G$  代表突变体与野生型之间的吉布

斯自由能差值<sup>[16]</sup>, 可通过一级失活常数求得,  $\Delta\Delta G = -RT \ln(k_d \text{ mutant} / k_d \text{ wild type})$ ,  $k_d \text{ mutant}$  和  $k_d \text{ wild type}$  分别为突变体和野生型的一级热失活常数。

1.2.12 蛋白质分子表面静电势计算: 静电势采用 APBS 软件计算, Pymol 软件进行结构显示。

## 2 结果与分析

### 2.1 靶标位点的选择

在 Protein Data Bank 中搜索 Cephalosporin acylase, 因 *Pseudomonas diminuta* N176 和 *Pseudomonas* sp. SE83 acyII 相似性最高, 以 N176 的晶体结构(PDB: 4HSR)为指导, 利用 Discovery studio 软件计算  $\alpha$ 、 $\beta$  链氨基酸残基的 B 因子, 并分别将它们从大到小进行排序(表 2), 选择 B 因子较大的残基作为饱和突变的靶标位点(Arg218, Lys226, Glu113, Asp547, Trp632, Asp548, Glu454, Glu764, Asp334), 在 SE83 对应的位点(Arg218, Lys226, Glu113, Gly547, Trp632, Ser548, Glu454, Glu764, Glu334)设计突变, 各靶标位点在蛋白结构上的位置如图 2 所示。

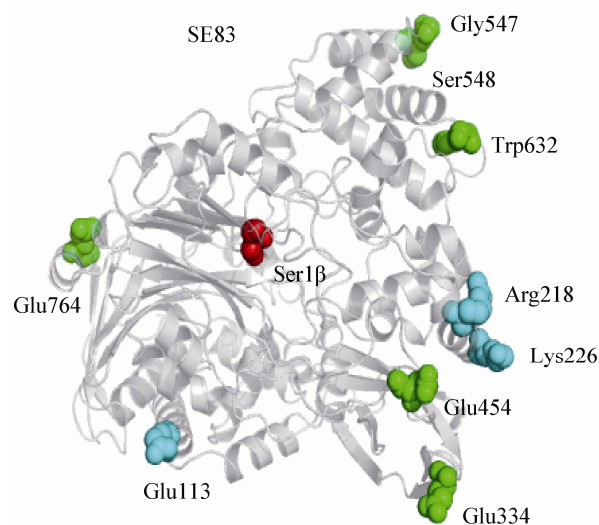


图 2 SE83 构建饱和突变库位点的选择

Figure 2 SE83 sites chosen for saturation mutagenesis

注: 以 N176 晶体结构 4HSR 建立的 SE83 蛋白模型。α 链上选择的靶标残基标为蓝色; β 链上的靶标残基标为绿色; Ser1β 为酶催化中心。

Note: The diagram shows a structural model based on the crystallographic structure of N176(4HSR). Mutation sites on the chain  $\alpha$  are shown in cyan; mutation sites on the chain  $\beta$  are shown in green; Catalytic Ser1 $\beta$  is shown in red.

### 2.2 饱和突变库的构建和筛选

在选定的靶标位点处设计带有覆盖 20 种氨基酸的简并密码子(NNK)的引物, 以优化后的 SE83 S12 基因为模板, 利用全质粒 PCR 对各靶标位点进行饱和突变。为保证 32 种密码子编码的 20 种氨基酸在库中被筛选到的机率大于 95%, 各突变库中挑选至少 200 个克隆进行筛选。

经过 3 轮筛选后,  $\alpha$  链得到稳定性明显提高的突变体, 经测序分析分别为 K226V、R218Q 和 R218T。β 链所有饱和突变库筛选后未获得稳定性明显提高的突变体, 筛选结果数据如图 3 所示。

### 2.3 酶学性质表征

2.3.1 CPC 酰化酶蛋白纯化和最适温度测定: 如图 4 所示, 野生型(WT)和突变体表达均得到 3 条带: 前体蛋白 83 kD 及自解切为  $\alpha$  链 25 kD 和  $\beta$  链 58 kD, 镍柱纯化后 SDS-PAGE 分析纯度都超过 90%。

表 2  $\alpha$ 、 $\beta$  链氨基酸残基 B 因子排序

Table 2 Ranking from highest to lowest B factor of the chain  $\alpha$ ,  $\beta$  residues

Chain $\alpha$			Chain $\beta$		
Amino acid	Site	B factor	Amino acid	Site	B factor
Ala	14	53.95	Asp	547	62.47
Ala	15	52.53	Glu	541	55.47
Arg	218	51.48	Trp	632	54.59
Gly	229	46.99	Asp	548	54.13
Lys	226	41.99	Glu	454	50.47
Thr	216	41.01	Glu	764	46.46
Leu	214	40.51	Glu	354	46.06
Glu	113	39.71	Lys	630	45.91
Asp	213	39.12	Arg	371	45.22
Ala	215	38.50	Arg	344	44.81
			Asp	334	44.70
			Ser	549	44.28

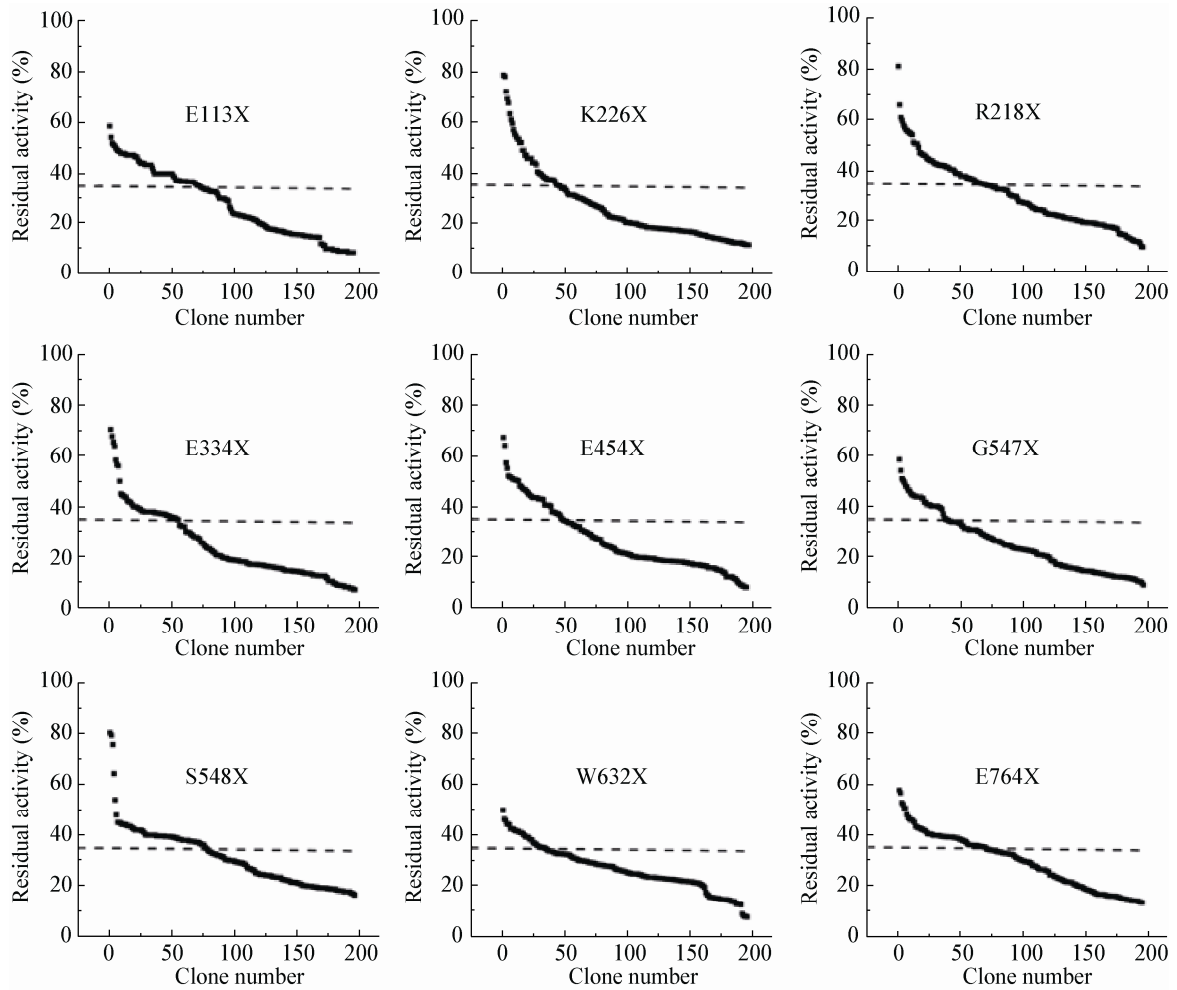


图 3  $\alpha$ 、 $\beta$  链靶标位点饱和突变库筛选结果

Figure 3 Results of screening saturation mutagenesis libraries of chain  $\alpha$  and chain  $\beta$  residues

注：以 96 孔板中野生型 CPC 酰化酶经 55 °C 处理后对底物 CPC 残余活性作为比活力参照，采用虚线表示。

Note: The residual activity of wild type enzyme after 55 °C heating treatment was taken as a reference of specific activity, which was represented by a dashed line.

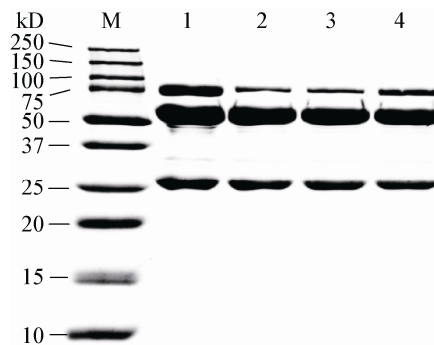


图 4 镍柱纯化后 CPC 酰化酶蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis of CPC acylase purified by Ni<sup>2+</sup> affinity column

注：M：蛋白标准；1-4：纯化后的 CPC 酰化酶蛋白；1：野生型；2：突变体 R218T；3：突变体 R218Q；4：突变体 K226V。

Note: M: Marker; 1-4: Purified CPC acylase; 1: Wildtype; 2: Mutant R218T; 3: Mutant R218Q; 4: Mutant K226V.

以反应温度对相对活力作图,得到温度-活力曲线(图 5),从图 5 中可以看出,野生型和突变体 R218T 和 K226V 的最适温度均为 40 °C,突变体 R218Q 最适温度为 43 °C 左右 较野生型提高 3 °C。

**2.3.2 CPC 酰化酶活力测定:** Origin 9.0 对不同浓度 HCl 与苯酚红吸光值的线性关系进行拟合,绘制质子浓度换算的标准曲线,如图 6 所示。为了研究突变对酶表达量及催化活性的影响,测定野生型(WT)和突变体每升发酵液的湿菌体量和蛋白表达量;根据 1.2.9 中测酶活法测定野生型和突变体酶活性,并利用 1.2.9 中公式计算每升发酵液的总活力(表 3)。表 3 中数据显示突变体湿菌体量、蛋白表达量、总活力及比活力均与野生型相当,结果表明,突变主要影响酶的热稳定性,对酶的表达和催化活力影响较小,蛋白的产量与热稳定性并无明显关联。

**2.3.3 CPC 酰化酶产物抑制性评估:** 当反应体系中加入终浓度为 0–25 mmol/L 的 7-ACA 时,3 个突变体与野生型(WT)相比,产物抑制趋势一致,其中突变体 K226V 在低浓度 7-ACA 环境时,产物抑制较野生型略微减弱(图 7)。

**2.3.4 动力学常数的测定:** 以 CPC 为底物,测定了野生型和 3 个突变体在不同底物浓度下(0.5–80.0 mmol/L)的动力学常数  $K_m$  和  $k_{cat}$ 。R218T 较野生型的  $k_{cat}$  值虽有所下降,但突变体 R218Q 和 K226V 的  $k_{cat}$  有所提升;相对野生型,突变体  $K_m$  值均有所降低,催化效率  $k_{cat}/K_m$  也都高于野生型(表 4)。

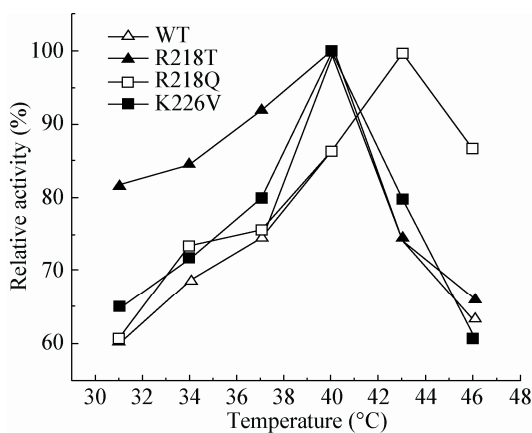


图 5 温度对 CPC 酰化酶活性的影响  
Figure 5 Effects of temperature of CPC acylase activity

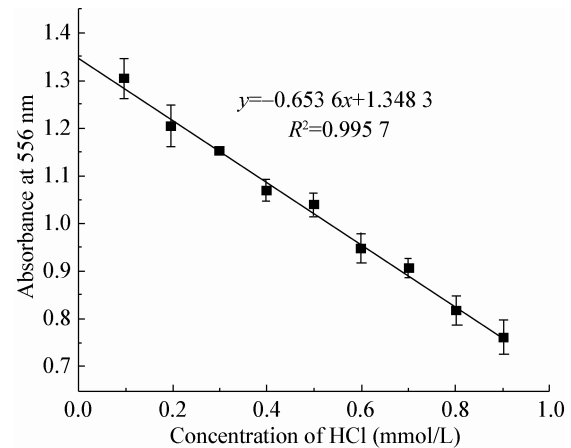


图 6 不同浓度 HCl 与苯酚红吸光值变化标准曲线  
Figure 6 The standard curve for the absorbance change of phenol red, plotted against the concentration of HCl

表 3 pH 指示剂法测定 CPC 酰化酶活力  
Table 3 Enzymatic activities measured by the pH indicator assay

菌株 Strain	湿菌体量 Weight of wet cell (g/L)	蛋白表达量 Amount of protein (mg/L)	总活力 Total Activity (U/L)	酶活力 Specific activity (U/mg)
WT	4.220±0.062	61.0±3.2	4 304±4.3	4.30±0.004 3
R218T	4.463±0.055	75.0±3.4	4 473±2.8	4.47±0.002 8
R218Q	4.905±0.058	93.0±5.0	4 733±2.7	4.73±0.002 7
K226V	4.375±0.080	82.0±4.1	4 824±4.5	4.82±0.004 5

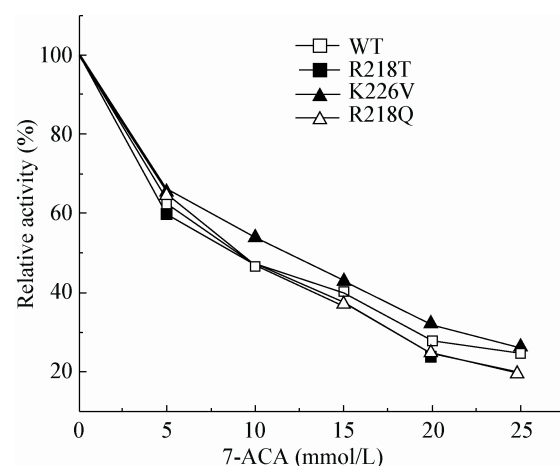


图 7 不同浓度 7-ACA 时 CPC 酰化酶产物抑制性评估  
Figure 7 Product inhibition measurement of CPC acylase in the presence of various concentrations 7-ACA



表 4 CPC 酰化酶野生型和突变体的动力学常数  
Table 4 The kinetic parameters of wild type and mutant CPC acylase toward CPC

菌株 Strain	$K_m$ (mmol/L)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ (L/(mmol·s))
WT	0.60±0.06	0.226±0.009	0.374
R218T	0.29±0.05	0.192±0.008	0.656
R218Q	0.33±0.11	0.230±0.033	0.697
K226V	0.22±0.02	0.258±0.006	1.166

2.3.5 热失活动力学研究: 根据 1.2.11 中方法和公式可以得出野生型和 3 个突变体在 40 °C 下的半衰期。

表 5 数据表明突变体 R218T、R218Q 和 K226V 在 40 °C 下半衰期分别为野生型的 2.63、3.77 和 2.77 倍。

与野生型相比,  $\Delta\Delta G$  越大, 表示突变体解折叠有着更高的能垒, 也就意味着突变体稳定性更佳。突变体 R218Q 的  $\Delta\Delta G$  为 3.20 kJ/mol, 表明该突变体稳定性较好。

### 3 讨论

CPC 酰化酶 SE83 acyII 由 774 个氨基酸组成, 若采用随机突变, 每一个残基都有 20 种突变的可能性, 需要巨大的库容量才能保证较高的覆盖率。相比而言, 基于 B 因子指导快速判定柔性较大的氨基酸, 再对其进行突变的半理性设计显得更为可取。通过建立 Biomek FX<sup>P</sup> 高通量筛选体系快速完成筛选, Biomek FX<sup>P</sup> 自动化的操作过程减少了人为操作误差, 平均每天可筛选 50 块 96 孔板, 缩短了筛选时间。突变体活性、稳定性等酶学性质的表征结果也确证了突变体酶稳定性有所提升。

为了探讨突变后酶稳定性提高的可能原因, 分析突变对于蛋白质结构的影响<sup>[17]</sup>, 结果显示 3 个突变体分别与野生型通过整体比对(Superimposition)

表 5 CPC 酰化酶野生型和突变体的稳定性参数  
Table 5 The stability parameters of wild type and mutant CPC acylase toward CPC

菌株 Strain	$k_d$ ( $min^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$\Delta\Delta G$ (kJ/mol)
WT	0.011 3	61.34	
R218T	0.004 3	161.20	2.335
R218Q	0.003 0	231.05	3.206
K226V	0.004 1	169.06	2.450

得到 RMSD 均为 0.001Å; 再以 218 位点和 226 位点 5 Å 范围内的氨基酸残基单独作为研究对象, 对野生型和突变体进行局部比对, 发现 K226V 与野生型比对后的 RMSD 为 0.001Å, R218T 与野生型比对后的 RMSD 为 0.002Å, R218Q 与野生型比对后的 RMSD 为 0.004Å。突变没有给突变位点周围带来明显的结构变化, 除了突变位点本身外, 其他氨基酸都采取几乎一样的构象, 酶稳定性的提高并不是由于突变位点周围氨基酸构象明显改变所引起的。

另一方面, 单点突变 K226V 较野生型多形成了一个氢键(图 8), 位于 V226 主链 O 原子与 G229 主链 N 原子之间。根据图 8 分析, 226 位 5 Å 范围内大多为疏水氨基酸(A223, L224, L225, V226, A227, M228), 因此推测, 226 位由亲水氨基酸 K 突变为疏水氨基酸 V 增加了周围的疏水相互作用, 从而增加蛋白质的疏水堆叠, 有利于提高蛋白质的稳定性。

218 位残基处在  $\alpha 11$  螺旋与 Loop 结构连接处附近(图 9), R218T 与其他氨基酸残基形成了 5 个氢键(表 6), 在  $\alpha 11$  螺旋与 Loop 环交界处残基(L214 和 A215)多形成 2 个氢键; 极大可能提升了 Loop 环和  $\alpha 11$  螺旋的刚性, 从而更好地提升酶的稳定性。

野生型中 218 位 R 为带正电氨基酸, R218 周围静电势为正值(图 10), 产生互相排斥的静电作用; 当 218 位突变为 Q 或 T 时, 两者均为不带电氨基酸, Q218 和 T218 周围静电势都为负值, 消除了静电排

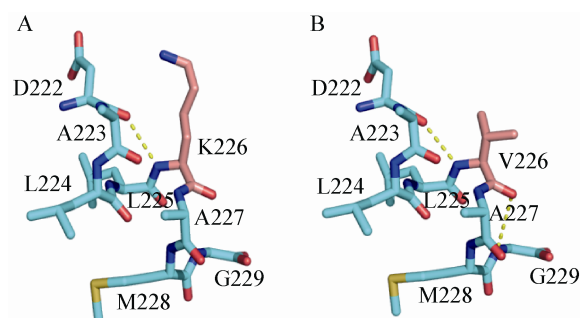


图 8 野生型和突变体 CPC 酰化酶局部结构比对

Figure 8 The structural alignment of wildtype and mutants of CPC acylase

注: K226 位 5 Å 范围内的氨基酸残基。A: WT; B: K226V.

Note: Residues within 5 Å of Lys 226. A: WT; B: K226V.

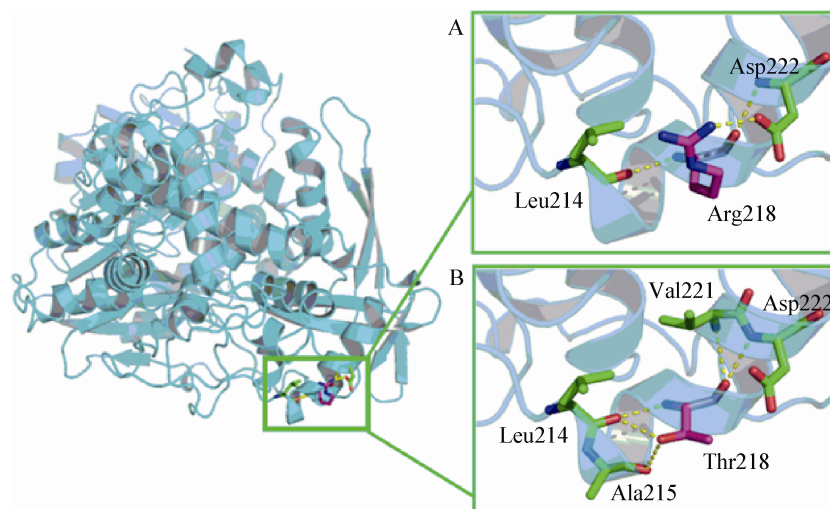


图9 野生型和突变体 R218T 在 218 位氢键网络比较

Figure 9 The network of hydrogen bonds comparison between wildtype and mutant R218T

注：A：野生型；B：突变体 R218T。218 位残基：紫红；与 218 位形成氢键的残基：绿色；氢键：黄色线形。

Note: A: Wildtype; B: Mutant R218T. Residue 218: Magenta; Form hydrogen bonds with residue 218: Green; Hydrogen bonds are shown in yellow dashed lines.

表 6 R218T 与野生型氢键相互作用的比较  
Table 6 Hydrogen bond interactions in mutant R218T compared to wild type

项目 Item	野生型 Wild type	突变体 Mutant R218T
氢键 Hydrogen bonds	R218N <sub>atom</sub> /L214O <sub>atom</sub> (Dd-a=2.9Å)	T218N <sub>atom</sub> /L214O <sub>atom</sub> (Dd-a=2.8Å)
	R218O <sub>atom</sub> /L222N <sub>atom</sub> (Dd-a=2.9Å)	T218O <sub>atom</sub> /L222N <sub>atom</sub> (Dd-a=2.9Å)
	R218N <sub>atom</sub> /L222O <sub>atom</sub> (Dd-a=2.6Å)	T218O <sub>atom</sub> /L214O <sub>atom</sub> (Dd-a=3.0Å)
		T218O <sub>atom</sub> /L221N <sub>atom</sub> (Dd-a=3.3Å)
		T218O <sub>atom</sub> /L215O <sub>atom</sub> (Dd-a=3.5Å)

斥作用，从静电势上也进一步解释了 218 位突变体稳定性的提高。

此次在实验室成功将贝克曼自动化平台运用到酶稳定性改造中突变株的筛选，R218T 活力与 R218Q 相近，半衰期较野生型也提高了 2.63 倍，这不仅验证了筛选的准确性和有效性，也进一步表明以 B 因子为指导策略进行酶稳定性改造是可行的，期待后续对 218 位和 226 位进行深入的组合突变，以期得到稳定性和酶活力共进化的更好突变体，为 7-ACA 工业化生产提供更好的 CPC 酰化酶酶源。

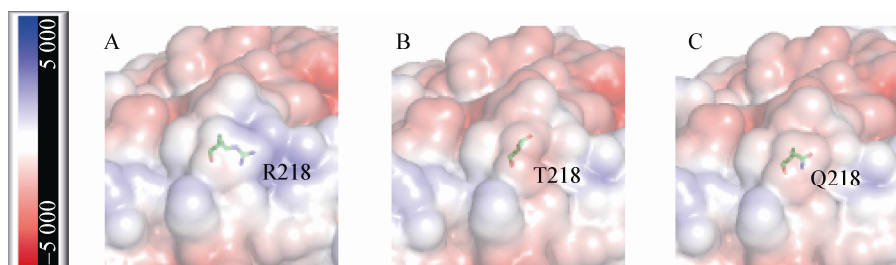


图 10 CPC 酰化酶 SE83 蛋白分子局部表面静电势

Figure 10 Protein molecular part surface electrostatic potential of CPC acylase SE83

注：A：野生型 R218 位附近；B：突变体 T218 位附近；C：野生型 Q218 位附近。蓝色部分表示静电势为正值；红色部分表示静电势为负值。

Note: A: Nearby of R218; B: Nearby of T218; C: Nearby of Q218. Positive electrostatic potential is in blue; Negative electrostatic potential is in red.

## 参 考 文 献

- [1] Ren Y, Lei YL, Zhu YS. Site-directed mutagenesis of cephalosporin C acylase and enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid[J]. *Türk Biyokimya Dergisi*, 2014, 39(1): 51-56
- [2] Parmar A, Kumar H, Marwaha SS, et al. Recent trends in enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA)[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1998, 18(1): 1-12
- [3] Pollegioni L, Rosini E, Molla G. Cephalosporin C acylase: dream and (or) reality[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(6): 2341-2355
- [4] Zhu SC, Yang YL, Zhao GP, et al. A rapid and specific method to screen environmental microorganisms for cephalosporin acylase activity[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 54(1): 131-135
- [5] Pollegioni L, Lorenzi S, Rosini E, et al. Evolution of an acylase active on cephalosporin C[J]. *Protein Science*, 2005, 14(12): 3064-3076
- [6] Matsuda A, Matsuyama K, Yamamoto K, et al. Cloning and characterization of the genes for two distinct cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain[J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5815-5820
- [7] Shin YC, Jeon JY, Jung KH, et al. Cephalosporin C acylase mutant and method for preparing 7-ACA using same: US 7592168[P]. 2009-09-22
- [8] Saito Y, Fujimura T, Ishii Y, et al. Oxidative modification of a cephalosporin C acylase from *Pseudomonas* strain N176 and site-directed mutagenesis of the gene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(8): 2919-2925
- [9] Zhu XW, Luo H, Chang YL, et al. Characteristic of immobilized cephalosporin C acylase and its application in one-step enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27(4): 823-829
- [10] Zhang JH, Lin Y, Sun YF, et al. High-throughput screening of B factor saturation mutated *Rhizomucor miehei* lipase thermostability based on synthetic reaction[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 50(6/7): 325-330
- [11] Li Y, Chen JF, Jiang WH, et al. *In vivo* post-translational processing and subunit reconstitution of cephalosporin acylase from *Pseudomonas* sp. 130[J]. *The FEBS Journal* 1999, 262(3): 713-719
- [12] Oh B, Kim M, Yoon J, et al. Deacylation activity of cephalosporin acylase to cephalosporin C is improved by changing the side-chain conformations of active-site residues[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 310(1): 19-27
- [13] Golden E, Paterson R, Tie WJ, et al. Structure of a class III engineered cephalosporin acylase: comparisons with class I acylase and implications for differences in substrate specificity and catalytic activity[J]. *Biochemical Journal*, 2013, 451(2): 217-226
- [14] Xiao YZ, Huo XD, Qian Y, et al. Engineering of a CPC acylase using a facile pH indicator assay[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(11): 1617-1625
- [15] Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(15): 2714-2723
- [16] Kim SJ, Lee JA, Joo JC, et al. The development of a thermostable CiP (*Coprinus cinereus* peroxidase) through *in silico* design[J]. *Biotechnology Progress*, 2010, 26(4): 1038-1046
- [17] Xie Y, An J, Yang GY, et al. Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(11): 7994-8006