

• 工业生物技术 •

醇脱氢酶金属离子绑定位点的可替换性

毕悦欣^{1,2}, 蒋迎迎^{2,3}, 覃宗敏^{2,3}, 曲戈^{2,4}, 孙周通^{2,4}

1 中国科学技术大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230026

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 中国科学院大学, 北京 100049

4 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308

毕悦欣, 蒋迎迎, 覃宗敏, 曲戈, 孙周通. 醇脱氢酶金属离子绑定位点的可替换性. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1518-1526.
BI YX, JIANG YY, QIN ZM, QU G, SUN ZT. Substitutability of metal-binding sites in an alcohol dehydrogenase. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1518-1526.

摘 要: 金属酶通过其极性氨基酸残基侧链所形成的共价键去锚定金属离子, 目前鲜有报道替换金属绑定位点本身是否影响原有酶催化性能。以来源于 *Thermoanaerobacter brockii* 的锌离子依赖型醇脱氢酶 TbSADH 为研究对象, 对其绑定锌离子的 3 个氨基酸残基位点 Cys37、His59 及 Asp150 进行序列保守性分析并构建突变体文库。经过建库筛选, 从 224 个克隆中获得 3 个能够不对称催化还原模式底物四氢呋喃-3-酮的突变体, 且转化率及 *ee* 值与野生型酶保持一致。结果揭示了虽然醇脱氢酶 TbSADH 的金属离子绑定位点高度保守, 但仍具有一定的可替换性, 且不以损耗活性及立体选择性为代价, 为后续金属离子置换及其介导的新反应设计奠定了研究基础。

关键词: 酶工程; 生物催化; 理性设计; 金属酶; 金属绑定位点

Received: August 10, 2021; **Accepted:** October 26, 2021; **Published online:** January 10, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905100); Tianjin Natural Science Foundation of China (19JCQNJC09100); Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capability Improvement Action Project (TSBICIP-CXRC-009)

Corresponding authors: QU Ge. Tel/Fax: +86-22-84866457. E-mail: qug@tib.cas.cn

SUN Zhoutong. Tel/Fax: +86-22-84861981. E-mail: sunzht@tib.cas.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0905100); 天津市自然科学基金 (19JCQNJC09100); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目 (TSBICIP-CXRC-009)

Substitutability of metal-binding sites in an alcohol dehydrogenase

BI Yuexin^{1,2}, JIANG Yingying^{2,3}, QIN Zongmin^{2,3}, QU Ge^{2,4}, SUN Zhoutong^{2,4}

1 School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4 National Technology Innovation Center of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

Abstract: Covalently anchoring of a ligand/metal via polar amino acid side chain(s) is often observed in metalloenzyme, while the substitutability of metal-binding sites remains elusive. In this study, we utilized a zinc-dependent alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter brockii* (TbSADH) as a model enzyme, analyzed the sequence conservation of the three residues Cys37, His59, and Asp150 that bind the zinc ion, and constructed the mutant library. After experimental validation, three out of 224 clones, which showed comparative conversion and *ee* values as the wild-type enzyme in the asymmetric reduction of the model substrate tetrahydrofuran-3-one, were screened out. The results reveal that the metal-binding sites in TbSADH are substitutable without tradeoff in activity and stereoselectivity, which lay a foundation for designing ADH-catalyzed new reactions via metal ion replacement.

Keywords: enzyme engineering; biocatalysis; rational design; metalloenzyme; metal-binding sites

作为生物体内重要的一类酶,金属酶使用金属离子(如铁、铜、锌、镁等)作为辅因子,广泛参与体内多种催化反应过程。在此类酶中,金属离子往往扮演催化活性中心的角色,在稳定“酶-金属-底物”复合体构象的同时,起到电子转移等重要作用^[1-2]。然而,天然金属酶并不能催化传统化学中过渡金属所介导的大多数反应类型^[3];同时还存在催化性能不足等缺点,难以满足人类生产及生活所需,往往需要利用酶工程等技术手段开展设计改造^[4-7]。

过去20年间,金属酶设计改造策略主要包括以下两种:(1)对金属酶进行定向进化,改变所使用的金属元素类型,同时赋予其催化非天

然反应的能力;(2)在天然酶结构中导入人工合成的金属复合物作为非天然催化中心,从而催化新反应^[8]。例如,天然细胞色素P450酶CYP119原本使用含铁卟啉作为辅因子,其铁原子通过该酶序列第317位的半胱氨酸(Cys317)固定。该酶可催化底物分子的氧化反应,但其催化效率远低于传统化学法。Hartwig团队把Cys317突变为甘氨酸,成功地将铁卟啉换成了铱卟啉,同时结合其他位点突变,极大提高了该酶催化卡宾插入反应的活力^[9]。第2种策略也有不少成功案例,比如王江云团队将荧光蛋白PSP2T的表面位点Glu59突变为半胱氨酸,通过二硫键锚定三联吡啶镍配合物,使其接受

荧光蛋白发色团的电子,从而实现催化二氧化碳光还原反应^[10]。

无论上述哪种改造策略,均离不开对金属离子/配合物的绑定位点进行突变研究。尽管当前对金属酶的改造工作已有不少研究进展^[3,8,11-12],然而依赖锌离子醇脱氢酶的相关改造工作几无报道。在生物催化及合成生物学等领域,醇脱氢酶所介导的不对称催化还原合成手性醇反应具有重要的基础研究及应用价值^[13]。本研究以工业界感兴趣的嗜热菌 *Thermoanaerobacter brockii* 来源的中链醇脱氢酶 TbSADH^[14]为研究对象,以其催化潜手性酮化合物 (1) 为模式反应 (图 1),探究金属绑定位点是否具有可置换性,以及置换之后是否影响催化活力及立体选择性等催化性能。

1 材料与方 法

1.1 材料

重组载体 pRSFDuet-1-TbSADH 在之前的研究中已构建^[15]。KOD-Plus-Neo 高保真酶购自 TOYOBO, Dpn I 购自 TaKaRa, 四氢呋喃-3-酮及其他分析级试剂和溶剂均购自喀斯玛平台的生化试剂公司。

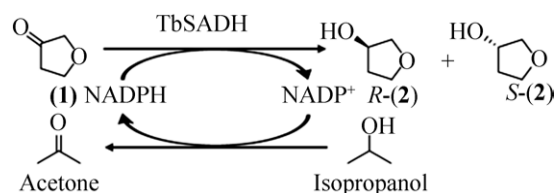


图 1 TbSADH 不对称催化还原模式底物四氢呋喃-3-酮 (1)

Figure 1 TbSADH catalyzes the asymmetric reduction of tetrahydrofuran-3-one (1).

基本培养基:去离子水 1 L、葡萄糖 0.5%、硝酸铵 1.0 g、磷酸二氢钾 0.5 g、磷酸氢二钠 1.5 g、氯化钠 1.0 g、七水硫酸镁 0.2 g。

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、氯化钠 10 g、蒸馏水 1 L。

TB 培养基:胰蛋白胨 12 g、酵母提取物 24 g、甘油 4 mL、蒸馏水 900 mL、100 mL 磷酸钾缓冲液 (0.17 mol/L KH_2PO_4 , 0.72 mol/L K_2HPO_4)。

1.2 方法

1.2.1 突变体库构建

以野生型 TbSADH 作为模板,同时对 C37、H59 和 D150 位点进行组合突变,突变构建模块为半胱氨酸、组氨酸、天冬氨酸和谷氨酸,采用简并密码子设计引物^[16]。引物列表如表 1 所示。

表 1 构建突变体文库所用引物列表

Table 1 Primers for constructing the mutagenesis library

Primers	Sequences (5'→3')
F1	ATGAAAGGTTTTCGAATGCTCAGTATC
R1-C37C	GCCAATGGCTCCTTCAAAAACGGTAT GAATGTCCGAAGTGCAAGGGGCCAC
R1-C37H	GCCAATGGCTCCTTCAAAAACGGTAT GAATGTCCGAAGTATGAGGGGCCAC
R1-C37D/ C37E	GCCAATGGCTCCTTCAAAAACGGTAT GAATGTCCGAAGT W TGAGGGGCCAC
F2-H59C	TTTGAAGGAGCCATTGGCGAAAGACA TAACATGATACTCGGT TG CGAAGCTG TAGGT
F2-H59H	TTTGAAGGAGCCATTGGCGAAAGACA TAACATGATACTCGGT CAT GGAAGCTG TAGGT
F2-H59D/ H59E	TTTGAAGGAGCCATTGGCGAAAGACA TAACATGATACTCGGT GA WGAAGCTG TAGGT
R2-D150C	ACCAGTGGTCATCAT GC AGGGAATCA TAACTGC
R2-D150H	ACCAGTGGTCATCAT TG GGGAATCA TAACTGC
R2-D150D/ D150E	ACCAGTGGTCATCAT WTC GGGAATCA TAACTGC

*The mutations are noted in bold; W represents A and T.

突变体文库构建采用了重叠延伸 PCR, 总共 3 轮。第一轮 PCR 体系为 50 μL , 包括如下组分: 模板 (50 ng/ μL) 1 μL , Neo 1 μL , dNTPs (2 mmol/L) 5 μL , 10 \times Buffer 5 μL , ddH₂O 31 μL , MgSO₄ 3 μL , 上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL , 下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL 。第一轮 PCR 程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 循环数 30 次; 终延伸 68 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。

其中第一轮所用引物 F1 和 R1, F2 和 R2 单独 PCR, 所得产物等比例混合作为第二轮的模板。第二轮 PCR 体系及程序和第一轮相同, 引物为 F1 和 R2。第三轮引物为第二轮产物, 以 WT-TbSADH 为模板, 可得到目标 PCR 产物, 需要注意第三轮改变 MgSO₄ 添加量为 4 μL , PCR 程序延伸时间改为 2.5 min。

3 轮 PCR 产物用 1 μL Dpn I 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min 后, 将消化产物电转至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 并将其涂于含 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 琼脂板上, 挑取单菌落测序成功后可进行突变体文库的筛选。

1.2.2 突变体库筛选

挑取单菌落于含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素、600 μL LB 培养基的 48 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 8–10 h, 100 μL 移入甘油原板–80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存, 然后将 1 mL 含 0.2 mmol/L IPTG 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 TB 培养基加入 48 孔板, 20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜振荡培养。菌体收集后, 用 500 μL 含有 6 U DNase I 和 1 mg/mL 溶菌酶的 50 mmol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液重悬, 30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 2 h^[17]。4 000 r/min 离心 15 min, 取 400 μL 上清液用于初筛检测。反应体系 500 μL 包含: 底物(1) 10 mmol/L、异丙醇 10% V/V 、1 mmol/L NADP⁺ 和上清液 400 μL , 反应在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min 下进行 24 h。

用等体积的乙酸乙酯振荡萃取产物和底

物, 离心后取上清液过 0.22 μm 有机系滤膜, 用气相色谱检测底物与产物^[18]。检测所用色谱柱为 Hydrodex- β -TBDAC (25 m \times 0.25 mm), 升温程序为: 125 $^{\circ}\text{C}$; 3 $^{\circ}\text{C/min}$, 135 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 5 $^{\circ}\text{C/min}$, 155 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 50 $^{\circ}\text{C/min}$, 220 $^{\circ}\text{C}$, 1 min。出峰时间为: 底物 (1): 4.4 min; (S)-2: 8.1 min; (R)-2: 8.3 min。

1.2.3 酶活性测定

对突变体库初筛得到的突变体进行诱导表达, 收集菌体后用磷酸钾缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.4) 重悬至 0.1 g/mL。

复筛的酶活性测定体系 500 μL 包含: 底物 10 mmol/L、湿细胞 0.1 g/mL、异丙醇 10% V/V 、磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.4) 450 μL , 反应在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 下反应 24 h。样品处理和检测方法见 1.2.2。

1.2.4 计算分析

以 TbSADH 蛋白质序列为模板, 导入 ENDscript2.0 在线程序^[19], 设置 E 值为 1e^{-12} , 检索数据库选为 PDBAA95, 进行同源序列保守性分析。以 TbSADH 蛋白质晶体结构 1YKF 为模板, 导入 DynaMut 在线程序^[20], 并输入相应突变位点信息, 进行突变体稳定性及 RMSF 预测分析。熵值及自由能变化采用的预测模型分别为 ENCoM 及 DynaMut。使用 Autodock vina 程序^[21]将底物四氢呋喃-3-酮分别对接至野生型和最优突变中, 观察突变体对稳定锌离子的影响。

1.2.5 Zn²⁺对醇脱氢酶 TbSADH 催化活性的影响

将包含突变体的重组菌划线培养于基本培养基平板上, 48 h 后挑取单菌落于 5 mL 基本培养基中, 24 h 后以 5% (V/V) 接种量转接到 100 mL 基本培养基中, 培养约 6–8 h 加入 0.1 mmol/L IPTG 诱导。随后实验组加入

1 mmol/L ZnCl_2 , 对照组不添加。继续培养 12 h 后以 4 000 r/min 离心 10 min 收菌, 用含 1 mmol/L EDTA 的缓冲液清洗对照组以螯合去除可能存在的锌离子。两组实验分别用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 稀释细胞浓度至 0.1 g/mL。500 μL 反应体系中加入 450 μL 细胞悬液, 50 μL 异丙醇溶解的四氢呋喃-3-酮 (10 mmol/L), 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 下反应 24 h 后检测产物。处理样品和气相检测条件见 1.2.2。

2 结果与分析

2.1 TbSADH 金属结合位点的保守性分析

基于 TbSADH 已公开报道的晶体结构 (PDB ID: 1YKF)^[14], 该酶催化区域包括大口袋及小口袋, 其中锌离子通过 3 个氨基酸残基位点 Cys37、His59 及 Asp150 固定于催化口袋中心 (图 2A)。同源序列比对分析表明, 这 3 个金属离子结合位点具有相对不一致的序列保守性, 其中 Cys37 及 His59 位点的保守性较好, 而 Asp150 位点的保守性较差 (图 2B)。

2.2 TbSADH 金属结合位点的突变体文库构建及筛选

为探究金属结合位点可置换性, 采用同源序列比对结果中出现频率最高的 4 种氨基酸, 即组氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸及谷氨酸, 作为构建单元, 对上述 3 个位点构建组合饱和突变体文库。引物设计如图 3A 所示, 经 3 轮 PCR 扩增获得目标条带 (图 3B)。随后, 将 PCR 产物转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态。为验证突变体文库质量, 从琼脂糖凝胶平板上随机挑选 10 个克隆进行测序验证, 测序结果表明相应位点均已引入正确突变 (图 3C)。

为达到 95% 以上的突变体文库覆盖率, 随机挑选 224 个克隆^[22-23]进行 500 μL 反应体系验

证。通过气相色谱 (GC) 对 5 块 48 深孔板 (L1-L5) 进行模式反应 (图 1) 检测, 结果表明这些克隆中有 175 个未检测到活性, 另外有 49 个表现出一定的催化活力及立体选择性 (表 2)。接下来对这 49 个克隆进行测序验证, 发现其中 3 个为突变体, 即三突变体 Cys37Asp/His59Asp/Asp150Glu (L3-D1)、单突变体 Asp150His (L5-D4) 及双突变体 Cys37His/His59Glu (L2-C3)(表 2), 其他克隆则为野生型或同义突变。

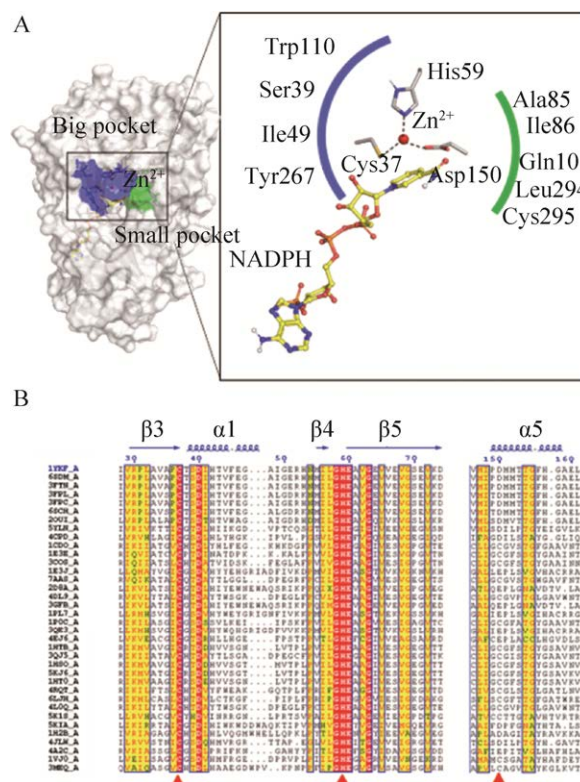


图 2 醇脱氢酶 TbSADH 三维结构 (PDB ID: 1YKF) A: 催化活性中心示意图; B: 3 个金属离子结合位点保守性分析

Figure 2 Three-dimensional structure of TbSADH (PDB ID: 1YKF). (A) The active-site residues and zinc ion. (B) Conservation analysis of the three metal-binding sites Cys37, His59 and Asp150, depicted by red triangles.

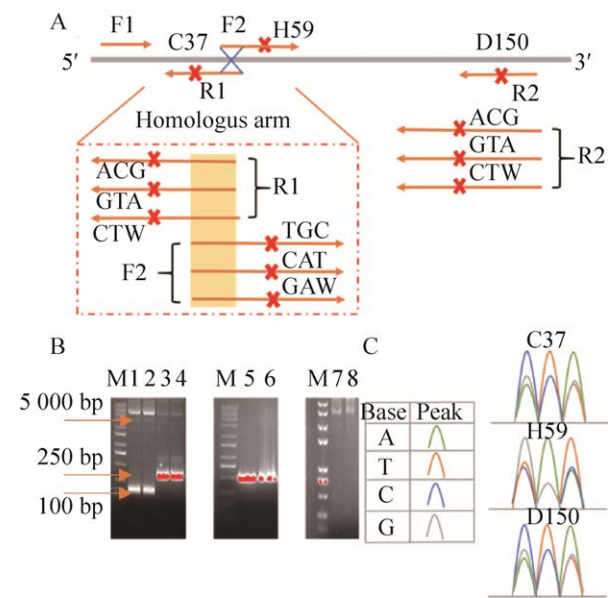


图 3 突变体文库构建引物设计 (A)、PCR 琼脂糖凝胶电泳图 (B) 和刮板测序结果 (C)

Figure 3 Primer design (A), agarose gel electrophoretogram of PCR product (B), and quality assessment by sequencing of clones on a plate (C). M: marker, lanes 1–2: product F1R1 in the first round of PCR; lanes 3–4: product F2R2 in the first round of PCR; lanes 5–6: product F1R2 in the second round of PCR; lanes 7–8: overall PCR product in the third round of PCR.

2.3 活性克隆复筛

为确保初筛结果的可靠性，对上步获得的 3 个功能活性突变体进行复筛。复筛结果如表 3 所示，分别以野生型酶 WT 作为阳性对照，以空载体 pRSFDuet-1 作为阴性对照，3 个突变体对模式底物的转化率均在 97%以上，且产物手性均保持与阳性对照一致，但 ee 值有略微下降，原因可能由金属离子相对位置发生微小变动，进而影响到催化底物局部构象所致。

2.4 突变体稳定性计算分析

针对 TbSADH 3 个金属离子绑定位点的建库筛选及复筛结果显示，仅有 1% (即 3/224) 的克隆具有阳性结果 (图 4A)，且建库使用的 4 种构建单元 (His、Asp、Cys 及 Glu) 均为醇脱氢

表 2 气相色谱检测结果

Table 2 Mutants detected by GC		
Code	Conversion (%)	ee (%)
wt	97.7	24.0 (R)
pRSFDuet-1	2.3	9.9 (R)
L3-B5	97.9	16.7 (R)
L1-E4	98.2	17.3 (R)
L2-G1	97.8	16.2 (R)
L3-A4	95.9	17.0 (R)
L3-D1*	97.7	17.6 (R)
L2-D3	97.7	16.5 (R)
L1-B1	97.3	15.8 (R)
L1-H6	52.3	6.7 (R)
L1-H5	39.4	9.1 (R)
L1-E3	97.0	15.2 (R)
L4-G1	97.3	15.4 (R)
L3-H5	97.1	16.7 (R)
L2-F2	97.0	15.0 (R)
L3-H6	96.6	15.3 (R)
L1-E2	97.0	15.2 (R)
L1-A5	96.7	24.5 (R)
L3-C6	98.6	19.4 (R)
L5-H4	99.0	25.2 (R)
L5-E2	99.9	18.4 (R)
L5-A5	99.8	20.5 (R)
L5-A6	99.6	22.3 (R)
L5-D4*	98.9	17.3 (R)
L5-D1	99.1	20.4 (R)
L5-D6	98.6	16.1 (R)
L5-F5	98.8	22.1 (R)
L4-A4	98.7	17.4 (R)
L3-E2	97.5	16.0 (R)
L3-G6	96.8	15.5 (R)
L2-D4	97.7	16.1 (R)
L2-H3	98.4	17.8 (R)
L4-B6	93.5	9.4 (R)
L1-E6	97.4	20.4 (R)
L5-A1	80.4	14.0 (R)
L4-H1	96.2	17.9 (R)
L2-C3*	97.3	14.6 (R)
L2-B5	97.2	13.9 (R)
L3-A2	85.5	5.6 (R)
L3-G3	96.8	14.4 (R)
L4-A2	59.5	10.5 (R)
L5-C4	99.8	16.5 (R)
L3-F4	99.5	10.4 (R)
L4-G3	99.6	16.0 (R)
L4-F6	96.9	17.5 (R)
L2-F3	95.6	13.6 (R)
L5-A4	96.4	16.0 (R)
L2-G4	97.7	13.4 (R)
L4-A1	96.9	12.2 (R)
L1-B3	98.0	11.5 (R)
L3-G5	99.4	13.4 (R)

*Sequencing results showed that the L3-D1 for three mutant Cys37Asp/His59Asp/Asp150Glu, L5-D4 for single mutant Asp150His, L2-C3 for double mutant Cys37His/His59Glu.

表3 气相色谱复筛检测结果

Table 3 Second screening results by GC

Code	Conversion (%)	ee (%)
WT	97.2	24.5 (R)
pRSFDuet-1	2.8	9.2 (R)
Asp150His	98.3	18.2 (R)
Cys37His/His59Glu	98.6	16.4 (R)
Cys37Asp/His59Asp/Asp150Glu	97.8	15.2 (R)

酶绑定金属离子使用频率较高的极性氨基酸,说明突变引起的局部构象调整可能影响锌离子结合及活性功能。人工金属酶整体结构及金属离子绑定区域的稳定性是影响其功能的重要因素^[24]。基于此,以三突变体 Cys37Asp/His59Asp/Asp150Glu 为例,研究突变前后是否对酶的稳定性及口袋构型有影响。预测结果表明, Cys37 突变为 Asp, 以及 His59 突变为 Asp 均导致突变体的熵值 ($\Delta\Delta S$) 较野生型有小幅增加,对结构稳定性 ($\Delta\Delta G$) 有负面影响;然而, Asp150 突变为 Glu, 所对应的 $\Delta\Delta G$ 降低了 0.93 kcal/mol (图 4B), 一定程度上弥补了前两个突变所造成的不稳定性。综合考量 3 个点突变, 组合突变后相较野生型所增加的熵值及自由能仅为 0.845 kcal/(mol·K) 以及 0.382 kcal/mol (图 4B), 对蛋白质结构稳定性影响较小。同时对氨基酸位点的平均位置变动情况进行分析, 发现 37、59 及 150 位点对应的 RMSF 值 (root mean square fluctuation) 在突变前后无明显变化 (图 4C), 意味着突变并未造成局部结构或金属离子绑定位点发生较大偏移, 而这可能是三突变体 Cys37Asp/His59Asp/Asp150Glu 在金属离子绑定位点发生置换的同时, 仍能维持原有催化性能的重要原因。此外, 我们基于 TbSADH 野生型酶晶体结构 (PDB ID: 1YKF) 模建了三突变体 Cys37Asp/His59Asp/Asp150Glu 的三维结构, 并将底物分子分别对接至野生型及三突变体的催化口袋 (图 4D, 4E)。对接结果显示, 两者

无明显区别, 锌离子与周围氨基酸形成配位键, 且底物分子的羰基氧原子正确朝向锌离子, 表明金属离子绑定位点发生置换并未明显影响底物分子的空间定位, 这与突变体实验结果相符合 (表 3)。

2.5 Zn^{2+} 对醇脱氢酶 TbSADH 催化活性的影响

为探究突变位点是否对锌离子绑定有影响, 设置实验组 (加 Zn^{2+}) 和对照组 (不加 Zn^{2+}) 两组反应体系 (具体方法见 1.2.5)。为尽可能排

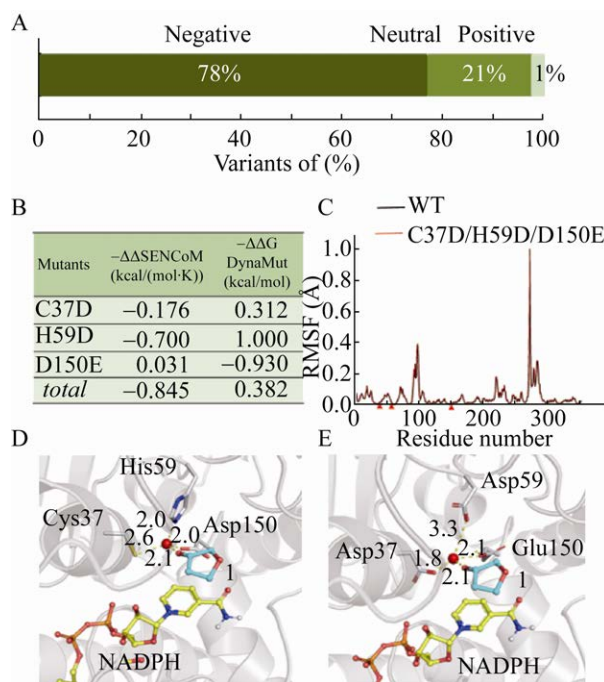


图4 突变株稳定性分析 A: 筛选结果统计分析; B: 突变体相较野生型的熵值及自由能变化情况; C: 突变体及野生型氨基酸位点的 RMSF 分析; 野生型酶 (D) 及三突变体 Cys37Asp/His59Glu/Asp150Glu (E) 的底物分子对接分析

Figure 4 Stability analysis of the engineered mutants. (A) Statistical analysis of the screening results. (B) Predicted vibrational entropy energy and potential energy between the wild type and mutant. (C) RMSF analysis of the wild type and mutant. The three mutants are indicated by red triangles. (D) Docking analysis of substrate 1 in the wild type (D) and the triple mutant Cys37Asp/His59Asp/Asp150Glu (E).

除培养菌体过程中 Zn^{2+} 的引入, 两组均采用基本培养基, 且所有试剂均采用去离子水配制。反应 24 h 后, 使用气相色谱检测两组实验中突变体 Cys37Asp/His59Asp/Asp150Glu 对模式底物 **1** 的催化活性, 发现实验组底物的转化率大于 99%; 而对照组底物的转化率仅为 38% (图 5)。结果表明, 锌离子的去除导致了突变体活性显著下降, 间接说明突变后的位点仍然参与了锌离子的结合, 后者对于酶催化活性有重要作用。

3 结论

本研究以醇脱氢酶 TbSADH 不对称催化还原潜手性酮 **1** 为模式反应 (图 1), 尽管采用同

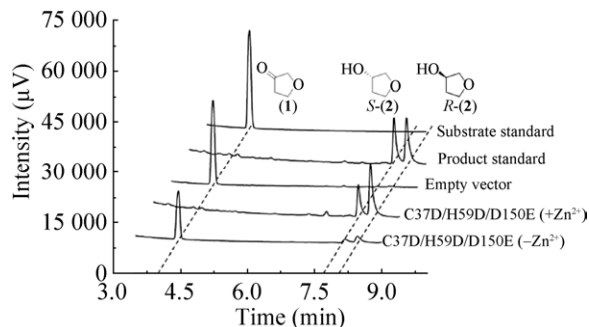


图 5 TbSADH 突变体 Cys37Asp/His59Asp/Asp150Glu 的 GC 检测结果 Substrate standard 和 Product standard 分别表示底物和产物标品; Empty vector 为反应体系使用空载体 pRSFDuet-1 作为阴性对照; C37D/H59D/D150E 表示 TbSADH 三突变体 Cys37Asp/His59Asp/Asp150Glu; $+\text{Zn}^{2+}$ 表示反应体系中加入锌离子, $-\text{Zn}^{2+}$ 则表示反应体系中去掉锌离子

Figure 5 GC profiles of TbSADH mutant Cys37Asp/His59Asp/Asp150Glu in the transformation of tetrahydrofuran-3-one (**1**). The substrate and product standards are indicated by the dashed lines. The empty vector pRSFDuet-1 is adopted as negative control. $+\text{Zn}^{2+}$ represents the reaction system contains the zinc ion, while $-\text{Zn}^{2+}$ indicates the zinc ion is eliminated in the reaction system.

源序列高度保守的氨基酸 (图 2B) 作为突变体文库构建单元, 失活克隆占比仍高达 78% (表 2、图 4A), 意味着金属离子结合位在进化过程中已高度固化。即便如此, 本研究通过突变体文库设计及筛选获得了金属离子结合位点发生突变且保留原有催化性能的突变体 (表 3)。结果表明, 醇脱氢酶高度进化的金属离子结合位点仍具备一定的可替换性, 为将来替换锌离子为其他金属离子/配合物, 提高立体选择性以及为开展机器学习指导的人工金属酶催化新反应设计^[25]奠定基础。

REFERENCES

- [1] Beaufils C, Man HM, Poulpique AD, et al. From enzyme stability to enzymatic bioelectrode stabilization processes. *Catalysts*, 2021, 11(4): 497.
- [2] Markel U, Sauer DF, Schiffels J, et al. Towards the evolution of artificial metalloenzymes—a protein engineer's perspective. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58(14): 4454-4464.
- [3] Reetz MT. Directed evolution of artificial metalloenzymes: a universal means to tune the selectivity of transition metal catalysts? *Acc Chem Res*, 2019, 52(2): 336-344.
- [4] 曲戈, 赵晶, 郑平, 等. 定向进化技术的最新进展. *生物工程学报*, 2018, 34(1): 1-11.
Qu G, Zhao J, Zheng P, et al. Recent advances in directed evolution. *Chin J Biotech*, 2018, 34(1): 1-11 (in Chinese).
- [5] 曲戈, 张锐, 蒋迎迎, 等. 2018 诺贝尔化学奖: 酶定向进化与噬菌体展示技术. *生物学杂志*, 2019, 36(1): 1-6.
Qu G, Zhang K, Jiang YY, et al. The Nobel Prize in chemistry 2018: the directed evolution of enzymes and the phage display technologies. *J Biol*, 2019, 36(1): 1-6 (in Chinese).
- [6] 曲戈, 朱彤, 蒋迎迎, 等. 蛋白质工程: 从定向进化到计算设计. *生物工程学报*, 2019, 35(10): 1843-1856.
Qu G, Zhu T, Jiang YY, et al. Protein engineering: from directed evolution to computational design. *Chin J Biotech*, 2019, 35(10): 1843-1856 (in Chinese).
- [7] Qu G, Li A, Acevedo-Rocha CG, et al. The crucial role of methodology development in directed evolution of selective enzymes. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020,

- 59(32): 13204-13231.
- [8] Jarvis AG. Designer metalloenzymes for synthetic biology: enzyme hybrids for catalysis. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, 58: 63-71.
- [9] Dydio P, Key HM, Nazarenko A, et al. An artificial metalloenzyme with the kinetics of native enzymes. *Science*, 2016, 354(6308): 102-106.
- [10] Liu XH, Kang FY, Hu C, et al. A genetically encoded photosensitizer protein facilitates the rational design of a miniature photocatalytic CO₂-reducing enzyme. *Nat Chem*, 2018, 10(12): 1201-1206.
- [11] Chen K, Arnold FH. Engineering new catalytic activities in enzymes. *Nat Catal*, 2020, 3(3): 203-213.
- [12] Naowarojna N, Cheng R, Lopez J, et al. Chemical modifications of proteins and their applications in metalloenzyme studies. *Synth Syst Biotechnol*, 2021, 6(1): 32-49.
- [13] Zhou JY, Xu GC, Ni Y. Stereochemistry in asymmetric reduction of bulky-bulky ketones by alcohol dehydrogenases. *ACS Catal*, 2020, 10(19): 10954-10966.
- [14] Korkhin Y, Kalb(Gilboa) AJ, Peretz M, et al. NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*. *J Mol Biol*, 1998, 278(5): 967-981.
- [15] Liu BB, Qu G, Li JK, et al. Conformational dynamics - guided loop engineering of an alcohol dehydrogenase: capture, turnover and enantioselective transformation of difficult - to - reduce ketones. *Adv Synth Catal*, 2019, 361(13): 3182-3190.
- [16] Kille S, Acevedo-Rocha CG, Parra LP, et al. Reducing codon redundancy and screening effort of combinatorial protein libraries created by saturation mutagenesis. *ACS Synth Biol*, 2013, 2(2): 83-92.
- [17] Qu G, Liu BB, Jiang YY, et al. Laboratory evolution of an alcohol dehydrogenase towards enantioselective reduction of difficult-to-reduce ketones. *Bioresour Bioprocess*, 2019, 6(1): 18.
- [18] Sun ZT, Lonsdale R, Ilie A, et al. Catalytic asymmetric reduction of difficult-to-reduce ketones: triple-code saturation mutagenesis of an alcohol dehydrogenase. *ACS Catal*, 2016, 6(3): 1598-1605.
- [19] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(W1): W320-W324.
- [20] Rodrigues CH, Pires DE, Ascher DB. DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(w1): W350-W355.
- [21] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [22] Tang L, Gao H, Zhu X, et al. Construction of "small-intelligent" focused mutagenesis libraries using well-designed combinatorial degenerate primers. *Biotechniques*, 2012, 52(3): 149-158.
- [23] Sun Z, Lonsdale R, Kong XD, et al. Reshaping an enzyme binding pocket for enhanced and inverted stereoselectivity: use of smallest amino acid alphabets in directed evolution. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(42): 12410-12415.
- [24] Hernandez KE, Renata H, Lewis RD, et al. Highly stereoselective biocatalytic synthesis of key cyclopropane intermediate to ticagrelor. *ACS Catal*, 2016, 6(11): 7810-7813.
- [25] 蒋迎迎, 曲戈, 孙周通. 机器学习助力酶定向进化. *生物学杂志*, 2020, 37(4): 1.
Jiang Y, Qu G, Sun Z. Machine learning-assisted enzyme directed evolution. *Journal of biology*, 2020, 37(4): 1 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)