

半理性设计提高产碱杆菌 KS-85 来源的肌酸酶催化活性

卞佳豪, 郝俊尧, 杨广宇

上海交通大学 生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

卞佳豪, 郝俊尧, 杨广宇. 半理性设计提高产碱杆菌 KS-85 来源的肌酸酶催化活性. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4601-4614.
BIAN JH, HAO JY, YANG GY. Improving the activity of creatinase from *Alcaligenes* sp. KS-85 through semi-rational design.
Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4601-4614.

摘要: 肌酐水平是指示肾脏功能的重要临床指标。肌酸酶 (creatinase, CRE) 是肌酐的酶促检测体系中的关键酶之一, 也是整个体系的限速酶, 较差的活性限制了它在临床检测和工业上的应用。针对此问题, 采用半理性设计策略对产碱杆菌属 (*Alcaligenes* sp.) KS-85 来源肌酸酶 AI-CRE 的活性进行了改造, 通过对挑选出的突变热点进行饱和突变筛选和组合, 最终获得多个活性提升的突变酶, 活性最高的五点突变酶 I304L/F395V/K351V/Y63S/Q88A 比活力相较于野生型提升了 2.18 倍。同时对相关突变位点进行了结构分析, 为肌酸酶的实际应用及对其机理的进一步解析提供了基础。

关键词: 肌酐; 肌酸酶; 半理性设计; 饱和突变

Improving the activity of creatinase from *Alcaligenes* sp. KS-85 through semi-rational design

BIAN Jiahao, HAO Junyao, YANG Guang-Yu

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: Creatinine levels in biological fluids are important indicators for the clinical evaluation of renal function. Creatinase (CRE, EC3.5.3.3) is one of the key enzymes in the enzymatic measurement of creatinine concentration, and it is also the rate-limiting enzyme in the whole enzymatic cascade system. The poor catalytic activity of CRE severely limits its clinical and industrial applications. To address this

Received: March 21, 2022; Accepted: May 30, 2022; Published online: June 6, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32030063)

Corresponding author: YANG Guang-Yu. E-mail: yanggy@sjtu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (32030063)

issue, a semi-rational design is applied to increase the activity of a creatinase from *Alcaligenes* sp. KS-85 (Al-CRE). By high-throughput screen of saturation mutagenesis libraries on the selected hotspot mutations, multiple variant enzymes with increased activity are obtained. The five-point best variant enzyme (I304L/F395V/K351V/Y63S/Q88A) were further obtained by recombine the improved mutations sites that to showed a 2.18-fold increased specific activity. Additionally, structure analysis is conducted to understand the mechanism of the activity change. This study paves the way for a better practical application of creatinase and may help further understand its catalytic mechanism.

Keywords: creatinine; creatinase; semi-rational design; saturation mutagenesis

肌酐是哺乳动物肌酸的最终代谢产物^[1-3]。正常情况下,体内肌酐通过肾脏以相对恒定的速率排出体外^[2-4],从而维持在一个相对稳定的状态。因此血液和尿液肌酐水平是指示肾脏问题、甲状腺功能障碍和肌肉疾病的重要临床指标^[5-7]。测量血清和尿液中肌酐水平的主要方法分为两大类:基于 Jaffe 反应的化学方法和酶促反应方法^[8]。在 Jaffe 反应中,肌酐中的甲基或者亚甲基在碱性条件下与苦味酸反应并变成橙红色复合物,通过比色法进行测定^[9-10]。该方法

操作简单且成本较低,但是化学检测方法专一性不强,灵敏度较差^[11-12],因此在临床检测中基本停用^[13]。目前临床常用的肌酐检测体系是由肌酐酶 (creatininase, EC3.5.2.10)、肌酸酶 (creatinase, EC3.5.3.3) 和肌氨酸氧化酶 (sarcosine oxidase, EC1.5.3.1) 这 3 种关键酶组成的多级酶联检测体系^[12-14],其中肌酸酶催化肌酸水解生成肌氨酸和尿素(图 1, *标注)。肌酐在 3 种酶的催化下转化为过氧化氢 (H_2O_2),然后通过辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP)

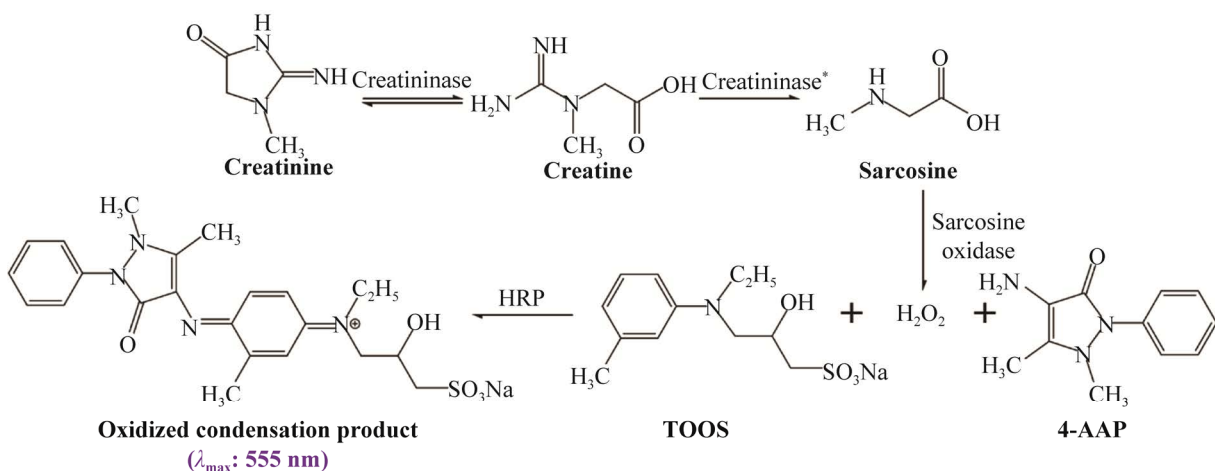


图 1 肌酐酶促检测方案

Figure 1 Scheme for enzymatic detection of creatinine. Firstly, creatininase catalyzes creatinine to generate creatine; secondly, creatinase (*) catalyzes the hydrolysis of creatine; third, sarcosine oxidase catalyzes sarcosine to generate hydrogen peroxide (H_2O_2); Finally, horseradish peroxidase (HRP) catalyzes H_2O_2 to generate a detectable purple color caused by a coupler reagent 4-AAP (4-Aminoantipyrine) and a color-generating substance TOOS (N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-3-methylaniline).

将 H_2O_2 转化为可检测信号来确定肌酐的浓度。基于酶促反应的检测方法具有准确度更高、特异性更强以及不会交叉污染检测样品中的其他物质等优点^[15]。但是,在目前商业化的肌酐检测试剂盒中使用的肌酸酶的最大活性远低于体系中的其他商品酶,是检测体系中的限速酶^[16]。

已有多种种属来源的肌酸酶先后被发现^[17-23]。目前有关对肌酸酶进行改造的研究主要集中在热稳定性的改造^[24-28],如本研究团队的白雪等在 2020 年的相关研究工作中,通过利用一种无偏见的系统发育共识方法对粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*) 来源的肌酸酶 (Al-CRE, GenBank 登录号: BAA88830.1) 进行改造,构建并筛选得到了 11 个相较于亲本 (I304L/F395V) 表现出更高的热稳定性的单点突变酶,组合后得到的四点突变酶 D17V/T199S/L6P/T251C 在 57 °C 时半衰期延长约 1 700 倍,并且活性没有降低^[24]。但目前针对肌酸酶活性的改造研究相对较少,2005 年,Shao 等通过随机突变筛选对欧文氏菌属 (*Erwinia* sp.) 来源的肌酸酶进行改造时,发现双点突变 (I304L/F395V) 可以降低蛋白质的 K_m 值,五点突变 (F59W/N130D/M203V/I278T/F395L) 能够使蛋白质的 K_m 值由 4.3 mmol/L 降低为 2.0 mmol/L^[29]。但该项研究中并没有对野生型和突变酶的 k_{cat} 值进行探讨,无法有效证明其在实际应用中的潜力和价值。在白雪等的研究中发现,粪产碱杆菌来源的肌酸酶具有较高的 k_{cat} 值和较低的 K_m 值,并且引入双点突变 (I304L/F395V) 后可以维持 k_{cat} 值基本不变, K_m 值进一步降低,说明该酶具有较高的商业化应用潜力,是分子改造的良好对象^[24]。

目前已有很多研究利用半理性蛋白质工程策略对酶分子的活性进行改造^[30-33]。半理性蛋白质工程是一种通过计算机识别蛋白质重要区域的方法,可以根据蛋白质结构和序列提供的

信息来预先筛选出有希望的进化位点,产生更小的高质量文库,使得后续的筛选实验不再依赖高通量方法,显著提高酶工程的效率^[34-35]。在基于结构的半理性设计策略中,随着蛋白质结构解析技术、同源建模以及分子动力学模拟技术的发展,给研究者们提供了较为精细的蛋白质结构信息,从而帮助研究者们更有效地定位活性位点、结构域界面、铰链区等区域的重要位点。如 Reetz 团队提出的组合活性中心饱和突变策略^[36] (combinatorial active-site saturation test, CAST),其主要方法就是针对酶催化口袋区域的关键氨基酸位点进行单轮或者多轮饱和诱变,构建“小而精”的突变文库,提高筛选效率,从而实现酶的立体选择性、催化活性和底物选择性等特性的改造^[37]。在基于序列的半理性设计策略中,可以通过多重序列比对和系统发育分析等手段探索同源蛋白质序列间的氨基酸保守性和局部氨基酸可变性,从而识别关键氨基酸位点。如 3DM 数据库中的 3DM-MSA 工具可以实现蛋白质超家族的全面比对,预测蛋白质特异性、蛋白质活性和热稳定性的突变热点,将突变文库聚焦于特定位置使后续筛选更加高效^[38]。除此之外,针对蛋白质半理性设计的在线平台 HotSpot Wizard 已广泛应用于酶的改造中^[39],该平台内置了 BLAST、ConSurf、CAVER、FoldX 等一系列生物信息学分析模块,通过同源序列分析、进化速率分析和活性口袋分析等计算数据,对目标蛋白质位点的氨基酸频率、残基替换概率和结构中的位置等信息进行注释,对氨基酸的可变性进行打分,识别出位于活性口袋的高可变性位点,并给出突变建议。

为获取高水解活力的肌酸酶突变株,本研究采用半理性设计策略对产碱杆菌 *Alcaligenes* sp. KS-85 来源的肌酸酶 Al-CRE 进行活性改造。结合同源建模结构分析和 HotSpot Wizard 辅助

设计共挑选出 18 个突变热点,通过对上述热点进行饱和突变筛选及有序重组得到水解活力提高的突变株,为肌酸酶的进一步机理解析及实际应用提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

菌株与质粒:表达质粒 pET-28a 由本实验室保存,表达宿主大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 购自北京索莱宝科技有限公司。

LB 培养基 (g/L):酵母粉 5,蛋白胨 10,氯化钠 10。

酶、试剂与引物:肌酸酶购自于北京百灵威科技有限公司;2-羟基-3-间甲苯胺丙磺酸钠 (N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline, TOOS) 和 4-氨基安替比林 (4-Aminoantipyrine, 4-AAP) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;辣根过氧化物酶购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司 BBI 品牌;质粒小量提取试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司;PCR clean-up 试剂盒购自 Axygen 公司;PrimerSTAR Max DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;Dpn I 限制性内切酶购自 Thermo Scientific 公司。

1.2 突变热点预测

同源建模结构由本实验室构建,具体方法为:将产碱杆菌来源肌酸酶的氨基酸序列 (GenBank 登录号: BAA88830.1) 上传至 SWISS-MODEL^[40]网站上,搜索与其氨基酸序列匹配的蛋白结构,选择同源性较高的放线菌属 (*Actinobacillus* sp.) 来源的肌酸酶 (1KP0) 为模板进行 SWISS-MODEL 同源建模。随后将得到的 AI-CRE 同源建模的三维结构上传至 HotSpot Wizard 交互平台中 (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard/>),对突变残基进行预测,同源序列搜索数目限制在 200,序列同源性 (identity) 限制在 30%–90%, Probe

radius 设置为 2.7 Å, Essential residue 选择 His 233, Calculate Tunnels 中 Probe radius 范围为 1.7 Å 到 3.5 Å,将 H₂O 分子计算在内,其他条件设置为默认。预测任务完成后,在“FUNCTIONAL HOT SPOTS”模块查看 HotSpot Wizard 平台的计算结果。除了选取计算得到的“Hotspot”位点作为后续饱和突变实验的突变热点,平台会给出各个位点具体的可变性得分 (Mutability score)。为了扩大筛选范围,我们进一步分析了可变性得分在 4 分以上的氨基酸位点,并结合对该酶同源建模结构的分析,将部分在底物 10 Å 范围 (或位于活性口袋) 内且未参与酶催化和结合的氨基酸位点也合并至突变热点中。

1.3 单点饱和突变库构建

根据 HotSpot Wizard 平台计算预测的结果以及结构分析的结果,我们最终选择了 Glu15、Asp17、Tyr18、Asn54、Cys62、Tyr63、Tyr68、Gln88、His193、Ile197、Asn201、Ile204、Phe213、Val214、Asn234、Pro235、Phe256 和 Lys351 共 18 个突变热点,设计饱和突变引物,简并密码子为 NNK。本研究使用的引物见表 1。

以重组质粒 pET-28a-AI-CRE 为模板,采用全质粒聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 方法进行定点突变。其中 PCR 的反应体系 (50 μL) 组成为: PrimeSTAR Max Premix 溶液 (2×) 2.5 μL, 质粒模板 (50 ng/μL) 1 μL, 上下游引物各 2 μL, 去离子水 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s; 55 °C 30 s; 72 °C 3.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经纯化、Dpn I 消化、二次纯化后,电转入 *E. coli* BL21(DE3) 感受态中。将复苏后的电转感受态稀释 10 倍,涂布于含 Kana 抗性 (100 mg/L) 的 LB 固体培养基上,每个突变库涂布 2 块培养板。过夜培养后每个平板挑取 5 个单克隆送测序,验证突变库的质量。

表 1 定点饱和突变文库

Table 1 Primers used for site-saturation mutagenesis

Primer name	Primer sequence (5'→3')
E15X-F	GGCATAATGGTNNKAAAGATTACAGTCCGTTTAGTG
E15X-R	GGACTGTAATCTTTMNNACCATTATGCCATTTTC
D17X-F	TGGTGAAAAANNKTACAGTCCGTTTAGTGATGC
D17X-R	AACGGACTGTAMNNTTTTTCACCATTATGCCATTTTC
Y18X-F	TGAAAAAGATNNKAGTCCGTTTAGTGATGCCG
Y18X-R	ACTAAACGGACTMNNATCTTTTTCACCATTATGC
N54X-F	TATCATTGTATTNNKTACTACAGTGGTTGGCTGTATTGTTA
N54X-R	AACCACTGTAGTAMNNAATACAATGATAGCTGGTAAACAG
C62X-F	TTGGCTGTATNNKTATTTTGGTCGCAAATATGG
C62X-R	GACCAAAATAMNNATACAGCCAACCACTGTAGTA
Y63X-F	GGCTGTATTGTNNKTTTGGTCGCAAATATGG
Y63X-R	TGCGACCAAAMNNACAATACAGCCAACC
Y68X-F	TGGTCGCAAANNKGGTATGGTTATTGATCATAATAACGCC
Y68X-R	ATAACCATAACMNNTTGGCGACCAAATAACAATACAG
Q88X-F	ATGGTGGTNNKCCGTGGAGACGTAGTTTTGGC
Q88X-R	GTCTCCACGGMNNACCACCATCAATGCCGGCAC
H193X-F	TGTTCCGGAANNKGAAGTTGCAATTGCCACCAC
H193X-R	TTGCAACTTCMNNTTCCGGAACACCGGCCTTA
I197X-F	ATGAAGTTGCANNKGCCACCACCAATGCAATGATTCG
I197X-R	CATTGGTGGTGGCMNNTGCAACTTCATGTTCCGGAACACCT
N201X-F	TTGCCACCACNNKGAATGATTTCGTGAAATTGCAAAAAG
N201X-R	TTCACGAATCATTGCMNNGTGGTGGCAATTGCAAC
I204X-F	ATGAAGTTGCANNKGCCACCACCAATGCAATGATTC
I204X-R	GCAATTCACGMNNCATTGCATTGGTGGTGGCAATTGC
N213X-F	AAGTTTTCCGNNKGTGGAAGTATGGATACTGG
N213X-R	ATCAGTCCACMNCCGAAAACCTTTTTCGCAATTTTC
V214X-F	TTTTCCGTTTNNKGAAGTATGGATACTGG
V214X-R	CATCAGTTCMNNAACCGAAAACCTTTTTCG
N234X-F	GATGGTGCACATNNKCCGGTGACCAATCGCATTGTGCAGAG
N234X-R	GGTCACCGGMNATGTGCACCATCGGTATTAATGC
P235X-F	GTGCACATAATNNKGTGACCAATCGCATTGTGCAGAG
P235X-R	CGATTGGTCCACMNNTATGTGCACCATCGGTATTAATG
D256X-F	CTTTCCGATGATTNNKGGCTATTATACCGCCCTGGAACGTACC
D256X-R	CGGTATAATAGCCMNNAATCATCGGAAAGGTATTCAGGCTCAG
K351X-F	ATACCGAACTGNNKCCGGGTATGGTTGTTAGTATGG
K351X-R	AACCATACCGGMNNCAGTTCGGTATCAATATCTTC

1.4 肌酸酶的 96 孔板筛选方法

1.4.1 肌酸酶的 96 孔板培养方法

挑取平板上的单克隆于 96 孔深孔板中，

每孔 500 μ L 含 Kana 抗性 (100 mg/L) 的 LB 培养基，于 37 $^{\circ}$ C 过夜振荡培养。挑取单克隆多于 $N=32 \ln(1-P)$ 为 147 个，以达到 99% 的文

库覆盖率。

转接 50 μL 过夜培养的菌液至含有 450 μL 自诱导培养基的深孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 3 h, 随后调整至 20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜诱导。

转移 200 μL 过夜诱导的菌体至标准 96 孔板中, 4 000 r/min 离心 10 min, 倒掉上清; 随后每孔加入 50 μL 的 BugBuster 细胞裂解液, 于微孔板振荡器上 500 r/min 振荡 30 min, 加入 100 μL 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) (pH 7.4) 重悬 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用于酶活力检测。

1.4.2 肌酸酶的微孔板酶活力检测方法

190 μL PBS (pH 7.4) 缓冲体系包含 TOOS (终浓度为 0.5 mmol/L), 4-AAP (终浓度为 0.45 mmol/L), 肌酸 (终浓度为 0.5 mmol/L), HRP (900 U/L), 肌氨酸氧化酶 (8 U/mL), 在该反应体系中加入 10 μL 粗酶液, 放入酶标仪中振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 检测 20 min 内 555 nm 波长下吸光度的变化值。

根据吸光度的变化值, 选取活力高于对照 120% 的孔, 从中吸取 50 μL 菌液, 接种到 450 μL 含 Kana 抗性 (100 mg/L) 的 LB 培养基的深孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养 8–12 h, 按照上述的方法进行复筛。复筛后将活力提高的菌液接种于试管中, 表达纯化蛋白。

1.5 野生型肌酸酶与突变体的表达纯化和酶活力测定

1.5.1 肌酸酶的表达纯化方法

取 3 mL 新鲜的菌液转接到 300 mL (100 mg/L Kana) LB 培养基的摇瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养至 $OD_{600}=0.8$, 加入终浓度为 100 mg/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG), 20 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 14–16 h。发酵结束后, 6 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 使用高压均质仪破碎菌体, 随后用镍柱纯化

蛋白, 并通过超滤管和 PBS 缓冲液除去残留的咪唑。

1.5.2 肌酸酶的酶活力测定

酶活力单位定义: 在下述条件下肌酸酶通过酶联反应每分钟释放 1 μmol H_2O_2 所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

酶活测定方法: 检测体系为含有肌酸 0.5 mmol/L; TOOS 0.5 mmol/L; 4-AAP 0.45 mmol/L; HRP 900 U/L; 肌氨酸氧化酶 400 U/L 的 PBS 缓冲液 (pH 7.4), 反应体系在 37 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育。向 1 mL 的石英比色皿中加入 950 μL 的反应液, 50 μL 待测酶液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应, 生成的紫色络合物在波长 555 nm 有最大吸收值, 通过检测混合后 30–60 s 内体系吸光度的变化, 计算酶活。

1.6 酶学性质和动力学的测定

1.6.1 温度对反应的影响

测定纯化后的野生型 (Wild type, WT) 及突变酶 (1 mg/mL) 在 20–55 $^{\circ}\text{C}$ (20 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 和 55 $^{\circ}\text{C}$) 下的比活力, 活力测定方法同 1.5.2 所示, 分析 WT 及其突变酶的最适反应温度。

1.6.2 pH 对反应的影响

测定纯化后的野生型及突变酶 (1 mg/mL) 在不同 pH 值 (pH 5.5–10) 下的缓冲液中的比活力, 酶活测定方法同 1.5.2 所示, 反应温度统一为 30 $^{\circ}\text{C}$, 分析 WT 及其突变酶的最适反应 pH。其中缓冲液分别为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 5.0、5.5)、PBS 缓冲液 (pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 8.5、9.0、9.5、10.0)。

1.6.3 金属离子对反应的影响

测定纯化后的 WT 及突变酶 (1 mg/mL) 在添加了不同金属离子 (K^+ 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+}) 及乙二胺四乙酸四钠盐合物 (ethylenediaminetetraacetic acid

tetrasodium salt hydrate, EDTA) 缓冲液中的比活力, 将纯化后的酶用 1×PBS 缓冲液稀释至 1 mg/mL, 向待测样品中分别加入 1 mmol/L 的不同金属离子或 1 mmol/L EDTA, 孵育 10 min, 测活方法同 1.5.2 所示, 反应温度统一为 30 °C。同时以不含任何离子的反应体系 (control) 作为对照试验, 含有不同离子的反应体系分别做 3 组平行实验。

1.6.4 动力学参数的测定

设置底物肌酸的终浓度为 0.5、1、2、5、10、20、50、80、100 mmol/L 的浓度梯度, 酶活测定方法同 1.5.2 所示, 在 37 °C PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中测定酶的反应速率, 使用米氏方程 (Michaelis-Menten equation) 进行非线性回归分析, 计算突变体的 K_m 及 k_{cat} 。

2 结果与分析

2.1 肌酸酶突变热点的选取

在 HotSpot Wizard 平台中, 将肌酸酶野生型序列与 200 条同源序列进行多序列比对, 根据氨基酸频率和突变的影响来计算各个位点的可变性得分, 其中高可变性位点的得分在 6–9 分, 中可变性位点的得分在 4–5 分 (表 2)。高可变性位点的氨基酸频率相对较低, 并且有可能容忍多种类型的突变, 体现非保守性, 因此以此作为突变热点很大概率可以得到高催化活性的阳性突变体。

此外, 由于位于活性位点附近的残基是对于酶的催化活性、对映选择性和底物特异性等功能具有重要影响的关键残基, 所以通过限制必需氨基酸为 His233 和探针半径为 2.7 Å 来预测参与构建肌酸酶活性口袋的氨基酸位点。结合可变性得分和位置信息这两种评价指标, 最终获得了 11 个高可变性且位于活性口袋的“热点”残基 (hotspot)。同时为了扩大筛选范

围, 对可变性得分在 4 分以上的氨基酸位点进行进一步分析, 结合实验室早期以同源建模、分子对接、丙氨酸扫描等技术对该酶活性中心关键氨基酸的分析结果^[41], 将在底物 10 Å 范围内 (或位于活性口袋) 且未参与酶催化和结合的氨基酸位点也合并至突变热点中。受限于突变文库的大小, 我们最终只选择了符合上述条件的 Cys62、Tyr63、Tyr68、Gln88、Asn234、Pro235、Lys351 共 7 个氨基酸位点。

最终选择了 Glu15、Asp17、Tyr18、Asn54、Cys62、Tyr63、Tyr68、Gln88、His193、Ile197、Asn201、Ile204、Phe213、Val214、Asn234、Pro235、Phe256、Lys351 共 18 个突变热点。其相关参数及在蛋白质结构中的具体位置信息如表 2 和图 2 中所示。

2.2 单点饱和突变的筛选及组合结果

利用 96 孔深孔板的筛选体系对 18 个 Hotspot 位点的饱和突变库进行筛选, 对每孔的酶活数据进行统计及阳性突变体复筛, 部分纯化蛋白的 SDS-PAGE 结果见图 3, 蛋白分子量在 46 kDa 左右, 与预测蛋白分子量大小基本一致, 目标条带单一, 蛋白纯度达到 90% 以上, 可以用于后续测定实验。阳性突变集中在 Asp17、Asp18、Tyr63、Gln88、His193、Phe213 和 Lys351, 其余位点均未得到阳性突变。经酶的纯化表征, 得到 10 个水解活力提高的突变体 D17P、D17T、D18T、Y63S、Q88A、H193S、F213Q、K351R、K351T、K351V 活性分别为野生型的 1.41 倍、1.1 倍、1.19 倍、1.35 倍、1.20 倍、1.13 倍、1.18 倍、1.32 倍、1.37 倍、1.64 倍 (图 4); 其中 Lys351 位点含有 3 种阳性突变体, Asp17 含有 2 种阳性突变, 并且活力提升最高两个突变体分别为 K351V 和 D17P, 说明 Lys351 和 Asp17 这 2 个位点可能对酶水解活性有极为重要的作用。

表 2 HotSpot Wizard 平台的计算结果

Table 2 Calculation results from the HotSpot Wizard

Position	Residue	Mutability&score	In catalytic pocket	Amino acid frequencies (%)	Deleterious mutations
15	Glu	High,8	√	37.50	Pro
17	Asp	High,6	√	1.00	Pro, Tyr, Trp
18	Tyr	High,8	√	0.50	–
54	Asn	High,6	√	20.00	Pro, Trp
62	Cys	Moderate,4	√	83.00	Gly, Ile, Tyr, Met, Leu, Gln, Asp, Ala, Lys, Glu, Trp, Arg, Pro
63	Tyr	High,6	×	04.00	Ile
68	Tyr	Moderate,4	√	81.50	Ile, Arg, Ala, Glu, Gly, Pro
88	Gln	Moderate,4	√	85.00	Ile, Trp, Gly, Pro
193	His	High,6	√	12.50	Gly, Pro
197	Ile	High,6	√	3.00	His, Tyr, Asn, Thr, Cys, Trp, Gly, Pro
201	Asn	High,7	√	8.00	Pro, Trp
204	Ile	High,6	√	6.00	Trp, Pro
213	Phe	High,6	√	1.00	Trp, Pro
214	Val	High,8	√	2.50	Lys, Pro, Tyr, Trp
234	Asn	Moderate,4	√	86.50	Glu, His, Gln, Ile, Thr, Arg, Lys, Pro, Tyr, Trp
235	Pro	Moderate,4	√	84.50	Asn, Arg, Trp, Ile
256	Phe	High,6	√	2.00	Ile, Pro
351	Lys	Moderate,5	×	3.00	His, Trp, Tyr, Cys, Asn, Thr, Gly, Pro

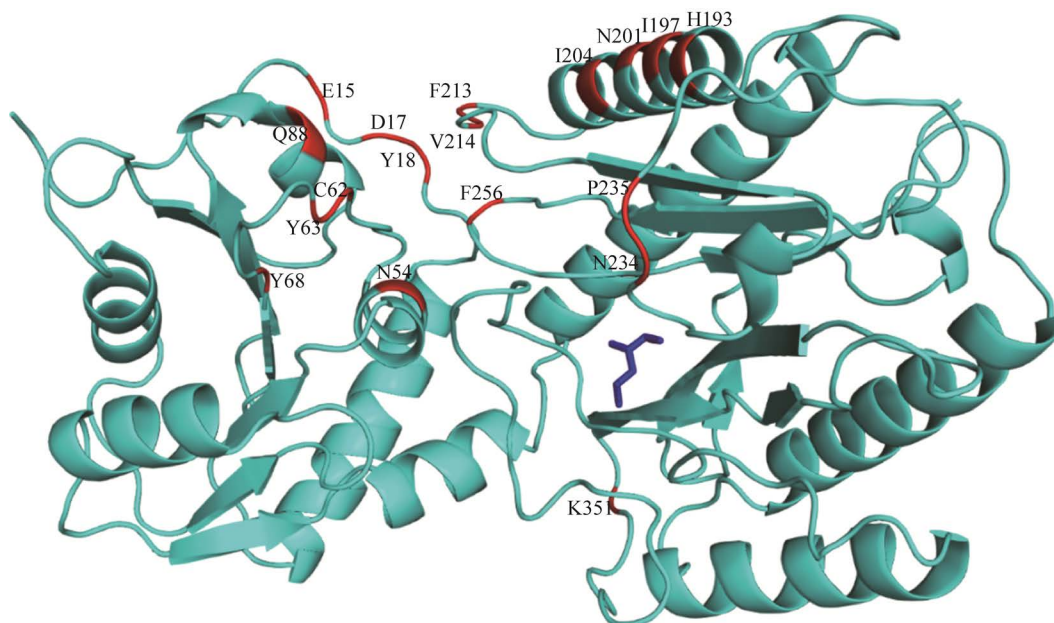


图 2 基于 AI-CRE 结构及 HotSpot Wizard 软件选取突变热点

Figure 2 Selection of hot spots based on AI-CRE structure and HotSpot Wizard software.

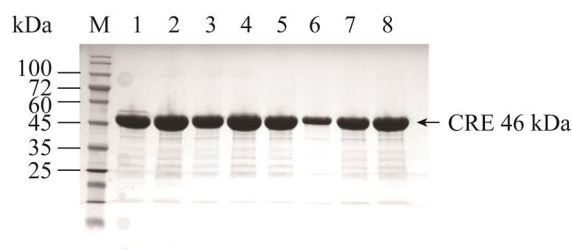


图3 Al-CRE 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析
Figure 3 SDS-PAGE analysis of Al-CRE.

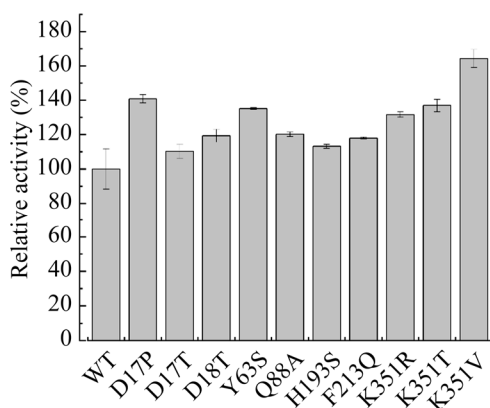


图4 Al-CRE 野生型及单点突变体的相对活性
Figure 4 Relative enzyme activity of the wild-type Al-CRE and its single-point mutations.

根据文献报道, I304L 及 F395V 的组合突变可以降低肌酸酶的 K_m 值, 提高其催化活力^[29], 我们将筛选得到的阳性单点突变与上述的双点进行组合突变, 从结构分析来看, 突变

位点之间距离较远, 在空间结构上不存在协同效应, 因此直接将阳性突变与该位点进行了组合 (表 3)。

最终得到五点突变酶为 I304L/F395V/K351V/Y63S/Q88A, 其比活力为 15.11 U/mg, 比野生型肌酸酶 Al-CRE (7.00 U/mg) 提高 2.18 倍, 比已知的双点突变 I304L/F395V (9.92 U/mg) 提高 1.55 倍。

2.3 野生型及重要突变体的酶学性质表征

我们对于野生型酶及重要突变体 I304L/F395V、四点突变酶 I304L/F395V/K351V/Y63S 和五点突变酶 I304L/F395V/K351V/Y63S/Q88A 的酶学性质进行了系统表征 (图 5)。如图 5A 所示, WT 与突变酶的最适反应 pH 均为 8.0, pH 值在 5.5–8.0 范围内时, WT 与突变酶比活力随着反应 pH 的增高而上升; 当缓冲液 pH 值在 8.0–10.0 范围内, 比活力随着反应 pH 的增高而下降。当 pH 值在 7.5–8.0 范围内时, WT 与突变酶比活力波动不大, 均维持在 80% 以上。在此范围之外, 酶活力受 pH 影响较大。

反应温度对 WT 与突变酶影响如图 5B 所示。除了突变酶 I304L/F395V 的最适温度为 37 °C 外, WT 和其余两个突变酶的最适反应温度为 30 °C。

表3 肌酸酶 Al-CRE 突变体的酶活力
Table 3 Specific activity of Al-CRE mutants

Mutants	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)
WT	6.93	100.00
I304L/F395V	9.74	140.57
I304L/F395V/K351V	10.34	149.28
I304L/F395V/K351V/Q88A	13.22	190.79
I304L/F395V/K351V/Y63S	13.33	192.31
I304L/F395V/K351V/H193S	13.12	189.38
I304L/F395V/K351V/D17P	12.13	175.02
I304L/F395V/K351V/Y63S/Q88A	15.11	218.10
I304L/F395V/K351V/Y63S/H193S	12.30	177.51

金属离子对 WT 与突变酶影响如图 5C 所示, 在不同的金属离子的影响下肌酸酶活力受到不同程度的影响, 但同种金属离子对 WT 与突变酶的影响基本一致。与不加金属离子的反应体系进行对比, Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{3+} 不同程度上抑制了肌酸酶的活性, 其中 Cu^{2+} 的存在会导致酶活性完全被抑制, 这与之前的研究结果相符^[42]。在金属离子与待测蛋白的孵育中, 未见有蛋白质沉淀现象, 排除金属离子导致蛋白质变性从而表现为活性抑制的可能性。而在 EDTA、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 存在的反应体系中, WT 与突变酶活性并无明显变化。

2.4 野生型及重要突变体的动力学表征

将纯化后的 WT, 两点突变酶 I304L/F395V 和五点突变酶 I304L/F395V/K351V/Y63S/Q88A 进行酶反应动力学参数分析 (表 4), 与 WT 相比, 双点突变酶 I304L/F395V 的 K_m 值由野生型的 2.12 mmol/L 降低 1.75 mmol/L, k_{cat} 并无明显变化, 说明这两个远端氨基酸的突变主要起到的作用是使酶与底物的亲和力提高, 从而提高酶活性; 而五点突变体相比双点突变的 K_m 由 1.76 mmol/L 提高为 2.75 mmol/L, 酶对底物亲和力略有降低, k_{cat} 由 388.96 min^{-1} 增大为 712.99 min^{-1} , 酶对底物的转化效率大幅度提高。

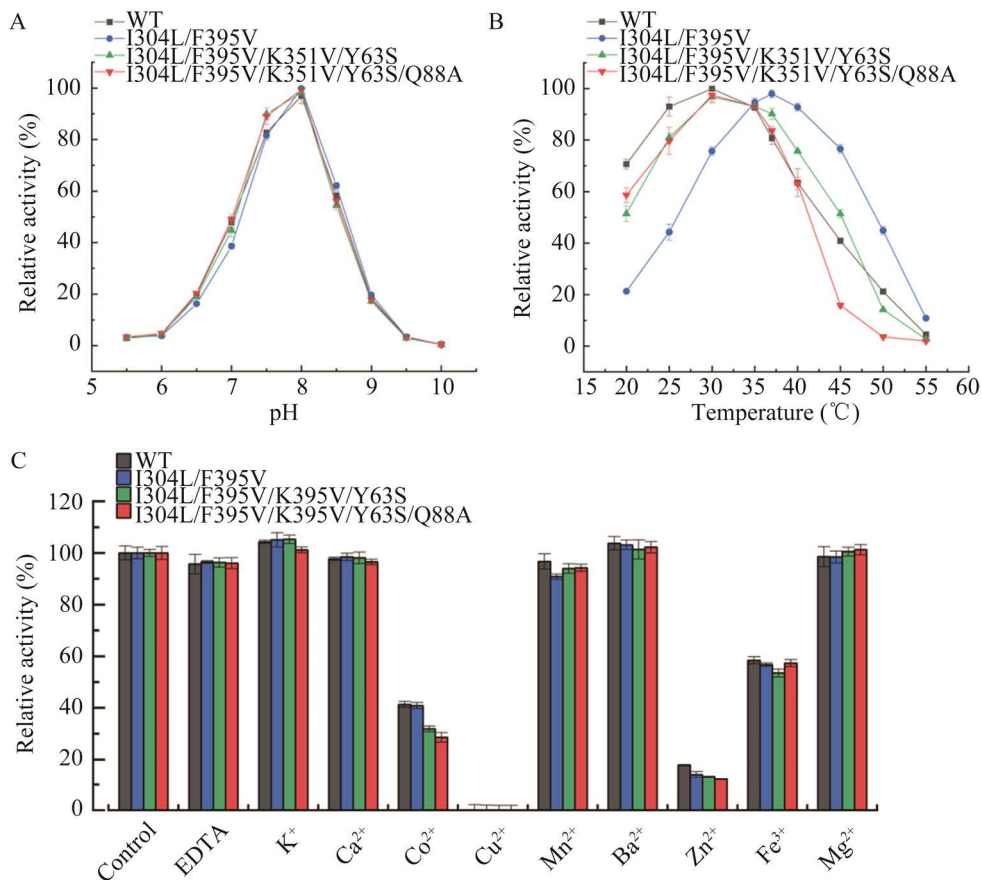


图 5 AI-CRE 野生型及其突变体的酶学性质研究

Figure 5 Enzymatic properties of the wild-type AI-CRE and its mutants. (A) The optimal pH. (B) The optimal temperature. (C) Effects of several metal ions on the activity of wild-type AI-CRE and its mutants.

表 4 肌酸酶 AI-CRE 突变体的酶动力学

Table 4 Kinetic characterization AI-CRE mutants

Mutants	k_{cat} (min^{-1})	K_{m} (mmol/L)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (L/(mmol·min))
WT	382.99±4.79	2.12±0.33	180.66
I304L/F395V	388.96±5.43	1.76±0.09	221.63
I304L/F395V/K351V/Y63S/Q88A	712.99±19.71	2.75±0.24	260.65

2.5 突变体的结构分析

五点突变体 I304L/F395V/K351V/Y63S/Q88A 中, 3 个突变位点 Ile304、Phe395 和 Lys351 均位于肌酸酶表面 (图 6), 距离活性中心距离较远。研究表明, 许多导致高活性的突变都分散在远离活性位点的地方^[43]。这是因为远离酶活性位点的残基可以通过远程相互作用 (long-range indirect interactions) 直接或间接影响酶的底物结合或其他构象状态, 从而影响催化功能^[44]。如在辛伐他汀合酶 (simvastatin synthase) LovD 的改造中, 先后 9 轮进化中共引入了 29 个突变, 其中大多数突变位点都远离活性位点, 但最终突变体 LovD9 的 K_{m} 值由 0.56 mmol/L 降低为 0.28 mmol/L, 比活力提升 1 000 倍。同时作者通过晶体结构和分子动力学模拟分析, 证明了远程突变可以通过影响构象变化来调节活性位点的催化活性^[43]。因此, I304L/F395V/K351V 这 3 个突变位点可能是通过上述方式来提高肌酸酶的催化活性。其余 2 个突变位点 Tyr63、Gln88 均位于同源二聚体界面的交界处 (图 7), 这 2 个位点的突变均引入了更短的侧链, 其中 Tyr 63 位于底物进出的隧道, Y63S 进一步拓宽了隧道, 有利于底物的进入和产物的释放。Gln88 位于同源二聚体界面的 $\alpha 3$ 螺旋 (图 2), 突变可能使该螺旋的柔性变大, 有利于二聚体中单体的构象变化, 使位于二聚体界面的活性中心柔性更强。但同源建模结构的精准度可能不足, 以更准确的晶体结构以及基于晶体结构

的分子动力学模拟来对肌酸酶构象动力学做进一步分析, 可以更有效地分析突变影响肌酸酶活性的具体机制。

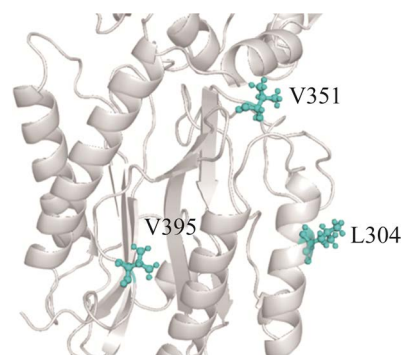


图 6 突变位点 I304L/F395V/K351V 结构信息

Figure 6 Structural information of I304L/F395V/K351V.

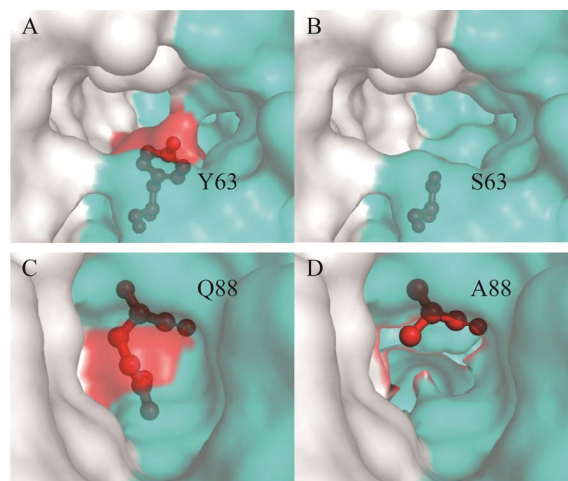


图 7 突变位点 Y63S (A-B)和 Q88A (C-D)结构信息

Figure 7 Structural information of Y63S (A-B) and Q88A (C-D).

3 讨论

本研究通过 SWISS-MODEL 软件模拟了产碱杆菌 (*Alcaligenes* sp.) KS-85 来源肌酸酶 Al-CRE 的三维结构, 通过 HotSpot Wizard 平台计算分析和蛋白质三维结构分析, 共挑选出了 18 个突变热点。通过对上述热点进行饱和突变筛选及有序重组得到多个水解活力提高的突变株, 其中五点突变酶 I304L/F395V/K351V/Y63S/Q88A 提升最为明显, 与 WT 相比, 其相应的比活力提升 2.18 倍, 催化效率 k_{cat}/K_m 提高了 1.44 倍。 k_{cat} 由 382.99 min^{-1} 增大为 712.99 min^{-1} , 更高活性的肌酸酶可以缩短肌酐检测体系测定的时间, 提高临床检测肌酐水平的效率, 具有较高的应用潜力。结果证明, 以半理性设计策略来改造酶活性是有效的, 可以减少整体实验的复杂程度、数量和时间。即使缺少目标酶分子的晶体结构, 也可以通过计算手段进行辅助^[39], 如同源建模方法^[40]和人工智能预测方法^[45-46]。为了对酶分子进行更加深入地研究, 精准的三维结构是必需的。后续还需要对野生型及重要突变体的晶体结构进行解析, 对肌酸酶分子水解活性的机理进行更加深入地解析, 同时对突变所带来的影响进行更加具体地分析, 从而将半理性设计策略更有效地应用到对肌酸酶或者其他重要酶的功能改造之中。

REFERENCES

- [1] Pundir CS, Kumar P, Jaiwal R. Biosensing methods for determination of creatinine: a review. *Biosens Bioelectron*, 2019, 126: 707-724.
- [2] Gao BJ, Li YB, Zhang ZG. Preparation and recognition performance of creatinine-imprinted material prepared with novel surface-imprinting technique. *J Chromatogr B*, 2010, 878(23): 2077-2086.
- [3] Barcelos RP, Stefanello ST, Mauriz JL, et al. Creatine and the liver: metabolism and possible interactions. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16(1): 12-18.
- [4] Serafin V, Hernández P, Agüí L, et al. Electrochemical biosensor for creatinine based on the immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase onto a ferrocene/horseradish peroxidase/gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/Teflon composite electrode. *Electrochimica Acta*, 2013, 97: 175-183.
- [5] Duong HD, Rhee JI. Development of ratiometric fluorescent biosensors for the determination of creatine and creatinine in urine. *Sensors (Basel)*, 2017, 17(11): 2570.
- [6] Zhybak M, Beni V, Vagin MY, et al. Creatinine and urea biosensors based on a novel ammonium ion-selective copper-polyaniline nano-composite. *Biosens Bioelectron*, 2016, 77: 505-511.
- [7] Zinchenko OA, Marchenko SV, Sergeeva TA, et al. Application of creatinine-sensitive biosensor for hemodialysis control. *Biosens Bioelectron*, 2012, 35(1): 466-469.
- [8] 陶政宇. 在枯草芽孢杆菌中高效异源表达肌酸酶[D]. 天津: 天津大学, 2019.
Tao ZY. High-level expression of A heterologous creatinase in *Bacillus subtilis*[D]. Tianjin: Tianjin University, 2019 (in Chinese).
- [9] Bonsnes RW, Taussky HH. On the colorimetric determination of creatinine by the jaffe reaction. *J Biol Chem*, 1945, 158(3): 581-591.
- [10] Junge W, Wilke B, Halabi A, et al. Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffé method. *Clin Chim Acta*, 2004, 344(1/2): 137-148.
- [11] Tao ZY, Fu G, Wang SJ, et al. Hyper-secretion mechanism exploration of a heterologous creatinase in *Bacillus subtilis*. *Biochem Eng J*, 2020, 153: 107419.
- [12] Afshari E, Amini-Bayat Z, Hosseinkhani S, et al. Cloning, expression and purification of *Pseudomonas putida* ATCC12633 creatinase. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2017, 9(4): 169-175.
- [13] Weykamp C, Kuypers A, Bakkeren D, et al. Creatinine, Jaffe, and glucose: another inconvenient truth. *Clin Chem Lab Med*, 2015, 53(12): e347-e349.
- [14] Kumar P, Jaiwal R, Pundir CS. An improved amperometric creatinine biosensor based on nanoparticles of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase. *Anal Biochem*, 2017, 537: 41-49.
- [15] 王正印, 尹元, 王伟灵. 肌酐检测方法及其常见药物对肌酐检测干扰的研究进展. *检验医学*, 2018, 33(4): 370-373.

- Wang ZY, Yin Y, Wang WL. Research progress in the methods for creatinine determination and the interference of common drugs on creatinine determination. *Lab Med*, 2018, 33(4): 370-373 (in Chinese).
- [16] Zhi Q, Kong PY, Zang JT, et al. Biochemical and molecular characterization of a novel high activity creatine amidinohydrolase from *Arthrobacter nicotianae* strain 02181. *Process Biochem*, 2009, 44(4): 460-465.
- [17] Kaplan A, Szabo LL. Creatinine hydrolase and creatine amidinohydrolase: II. partial purification and properties. *Mol Cell Biochem*, 1974, 3(1): 17-25.
- [18] Koyama Y, Kitao S, Yamamoto-Otake H, et al. Cloning and expression of the creatinase gene from *Flavobacterium* sp. U-188 in *Escherichia coli*. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(6): 1453-1457.
- [19] Suzuki K, Sagai H, Sugiyama M, et al. Molecular cloning and high expression of the *Bacillus* creatinase gene in *Escherichia coli*. *J Ferment Bioeng*, 1993, 76(2): 77-81.
- [20] Hoeffken HW, Knof SH, Bartlett PA, et al. Crystal structure determination, refinement and molecular model of creatine amidinohydrolase from *Pseudomonas putida*. *J Mol Biol*, 1988, 204(2): 417-433.
- [21] Inouye Y, Matsuda Y, Naid T, et al. Purification and characterization of creatinine amidohydrolase of *Alcaligenes* origin. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(1): 269-274.
- [22] Wang YY, Ma XH, Zhao WF, et al. Study on the creatinase from *Paracoccus* sp. strain WB₁. *Process Biochem*, 2006, 41(9): 2072-2077.
- [23] Hermann M, Knerr HJ, Mai N, et al. Creatinine and N-methylhydantoin degradation in two newly isolated *Clostridium* species. *Arch Microbiol*, 1992, 157(5): 395-401.
- [24] Bai X, Li DX, Ma FQ, et al. Improved thermostability of creatinase from *Alcaligenes faecalis* through non-biased phylogenetic consensus-guided mutagenesis. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 194.
- [25] Schumann J, Böhm G, Schumacher G, et al. Stabilization of creatinase from *Pseudomonas putida* by random mutagenesis. *Protein Sci*, 1993, 2(10): 1612-1620.
- [26] 高亚楠, 辛瑜, 张玲, 等. 多聚赖氨酸对双亚基肌酸酶表面的修饰. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(7): 134-140.
- Gao YN, Xin Y, Zhang L, et al. Surface modification on homodimeric creatinase by poly-lysine binding. *J Food Sci Biotechnol*, 2019, 38(7): 134-140 (in Chinese).
- [27] 张玲, 杨海麟, 高亚楠, 等. 一种提高肌酸酶热稳定性的方法: CN106399283B. 2019-09-17.
- Zhang L, Yang HL, Gao YN, et al. A method for improving the heat stability of creatinase: CN106399283B. 2019-09-17 (in Chinese).
- [28] 阮洁, 刘松, 李江华, 等. 饱和突变提高肌酸酶热稳定性. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(10): 8-14.
- Ruan J, Liu S, Li JH, et al. Improvement of creatinase thermal stability through saturation mutagenesis. *J Food Sci Biotechnol*, 2019, 38(10): 8-14 (in Chinese).
- [29] Shao Zhixin, Rainer Schmuck, Peter Kratzsch, et al. Variants of Erwinia-type creatinase: US, 6958231 B2. 2005-10-25.
- [30] Xu P, Ni ZF, Zong MH, et al. Improving the thermostability and activity of *Paenibacillus pasadenensis* chitinase through semi-rational design. *Int J Biol Macromol*, 2020, 150: 9-15.
- [31] Jung E, Park BG, Yoo HW, et al. Semi-rational engineering of CYP153A35 to enhance ω -hydroxylation activity toward palmitic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(1): 269-277.
- [32] Li PW, Li K, Li X, et al. Improving enzyme activity of glucosamine-6-phosphate synthase by semi-rational design strategy and computer analysis. *Biotechnol Lett*, 2020, 42(11): 2319-2332.
- [33] Szymczyk P, Szymańska G, Lipert A, et al. Computer-aided saturation mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* ent-copalyl diphosphate synthase. *Interdiscip Sci*, 2020, 12(1): 32-43.
- [34] Xiong W, Liu B, Shen YJ, et al. Protein engineering design from directed evolution to *de novo* synthesis. *Biochem Eng J*, 2021, 174: 108096.
- [35] Sinha R, Shukla P. Current trends in protein engineering: updates and progress. *Curr Protein Pept Sci*, 2019, 20(5): 398-407.
- [36] Reetz MT, Wang LW, Bocola M. Directed evolution of enantioselective enzymes: iterative cycles of CASTing for probing protein-sequence space. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45(16): 2494.
- [37] 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).
- [38] Kuipers RK, Joosten HJ, van Berkel WJH, et al. 3DM:

- systematic analysis of heterogeneous superfamily data to discover protein functionalities. *Proteins*, 2010, 78(9): 2101-2113.
- [39] Sumbalova L, Stourac J, Martinek T, et al. HotSpot Wizard 3.0: web server for automated design of mutations and smart libraries based on sequence input information. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(W1): W356-W362.
- [40] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [41] 郝俊尧, 马富强, 杨广宇. 产碱杆菌 *Alcaligenes* sp. KS-85 来源肌酸酶活性中心的关键氨基酸功能研究. *生物技术通报*, 2021, 37(3): 75-83.
Hao JY, Ma FQ, Yang GY. Functional analysis of key residues in the active center of creatinase from *Alcaligenes* sp. KS-85. *Biotechnol Bull*, 2021, 37(3): 75-83 (in Chinese).
- [42] Dai J, Zhang L, Kang Z, et al. High-level production of creatine amidinohydrolase from *Arthrobacter nicotianae* 23710 in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 175(5): 2564-73.
- [43] Jiménez-Osés G, Osuna S, Gao X, et al. The role of distant mutations and allosteric regulation on LovD active site dynamics. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(6): 431-436.
- [44] Acevedo-Rocha CG, Li A, D'Amore L, et al. Pervasive cooperative mutational effects on multiple catalytic enzyme traits emerge via long-range conformational dynamics. *Nat Commun*, 2021, 12: 1621.
- [45] Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 2021, 596(7873): 583-589.
- [46] Baek M, DiMaio F, Anishchenko I, et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*, 2021, 373(6557): 871-876.

(本文责编 陈宏宇)