

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学号: 2220520102

阿卡波糖代谢途径中关键酶 Acb D 工程菌构建及分子改造

CONSTRUCTION AND MOLECULAR
MODIFICATION OF ACB D, A KEY ENZYME IN
ACARBOSE METABOLISM PATHWAY

论 文 作 者: 王雨晴

校 内 导 师: 薛正莲 李闯

校 外 导 师: 李为全

专 业 类 别: 生物与医药

研 究 方 向: 生物技术与工程

论文答辩日期: 2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：

王雨晴

日期：2025年5月15日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：王雨晴

指导教师签名：胡正莲

日期：2025年5月18日

日期：2025年5月18日

阿卡波糖代谢途径中关键酶 Acb D 工程菌构建及分子改造

摘 要

阿卡波糖 (Acarbose) 是一种 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 可有效防治 II 型糖尿病。随着人们生活方式的改变, II 型糖尿病的发病率逐步上升, 因此阿卡波糖的市场前景广阔。阿卡维基转移酶 (Acarviosyltransferase, ATase) 是由阿卡波糖生产菌株游动放线菌基因组内 *acb D* 基因编码的一种胞外酶, 是目前发现唯一能够以阿卡波糖为底物且不受底物本身抑制的糖基转移酶, 在阿卡波糖及其同系物代谢过程起着重要作用。本研究从 NCBI 数据库获得 *acb D* 的核酸和氨基酸序列, 借助生信手段对其进行分析, 构建重组菌株实现蛋白的可溶性表达, 测定重组酶的催化性质和底物偏好性, 基于计算机技术, 使用 PCR 介导的定点突变技术以提升酶的催化效率为导向对酶分子进行改造。本研究获得的主要成果如下:

(1) 从游动放线菌的 *acb* 基因簇中获得 *acb D* 的开放阅读框, 长度为 2175 bp, 编码 724 个氨基酸。生物信息学分析结果显示 Acb D 有信号肽, 切割位点位于 26 和 27 个氨基酸之间, 存在多个磷酸化位点; Acb D 的理论分子量为 75,351.20 Da, 是一个稳定的亲水蛋白, 亚细胞定位显示 Acb D 位于细胞外; Acb D 属于 α -淀粉酶 (Glycoside hydrolases 13, GH13) 超家族, 与该家族的 CGTase 同源性最高为 42%; 分子动力学模拟结果显示 Acb D 在 30 °C 时有较好的稳定性。随后, 成功克隆出 *acb D*, 并借助表达载体 pCold II 将其转化至 *E. coli*

BL21(DE3)。

(2) 优化诱导表达条件, 确定诱导剂最佳终浓度为 0.1 mM; 探究信号肽对异源蛋白可溶性表达含量的影响, 切除信号肽使蛋白的可溶性表达量提高了 23.4 倍; 探索了反应时间、温度和 pH 对酶活性的影响, 确定了最佳反应时间为 20 h, 最适反应温度为 30 °C, 当孵育温度设定为 40 °C 时, 酶的比活力仅是未处理酶液的 39.0%, 说明酶的热稳定性一般; 最适反应 pH 为 7.0, 磷酸盐缓冲液对该酶的缓冲能力最好; 探究 Acb D 的底物偏好性, 发现 Acb D 对 D-水杨苷的亲合力最高, 比活力达到 82.85 U/mL, 其次是 L-山梨糖, 比活力为 63.75 U/mL, 这是首次发现 L-山梨糖可以做 Acb D 的底物且催化活性较好, 另外发现糖的不同构型也会对 Acb D 的催化活力产生影响。

(3) 基于同源建模和底物结合口袋预测的基础, 通过同源序列比对和分子对接获得 Acb D-阿卡波糖复合物, 确定催化三联体为 Asp231-Glu259-Asp331; 分析阿卡 Acb D-阿卡波糖相互作用的氨基酸位点, 借助软件 Discovery Studio 2020 对这些氨基酸进行丙氨酸扫描后进行虚拟饱和突变, 根据虚拟饱和突变和同源序列比对分析的结果, 利用 PCR 介导的定点突变技术获得了突变体 Y106Q、W107Y、G146H、L196R、I199Q、A255F、Y261W、T296V、Q330H、T332M 和 F362Y, 随后检测突变体的酶活性, 其中 I199Q 酶活力为 WT 的 126.4%, F362Y 酶活力是 WT 的 127.2%。突变体分子对接结果和结构分析发现, I199Q 催化效率提升是因为突变导致“底物结合口袋”扩宽, 酶分子和底物更容易结合。F362Y 催化效率提升是因为突变使蛋白质的

构象发生了变化，底物和酶分子产生了更多的氢键，这些氢键提升了 F362Y 的底物亲和力，因此酶活性得到提高。

关键词：阿卡波糖，阿卡维基转移酶，异源表达，转糖基作用，定点突变

CONSTRUCTION AND MOLECULAR MODIFICATION OF Acb D, A KEY ENZYME IN ACARBOSE METABOLISM PATHWAY

ABSTRACT

Acarbose is an alpha-glucosidase inhibitor, which can effectively prevent and treat type II diabetes. With the change of People's Daily lifestyles, the incidence of type II diabetes is gradually increasing, so the market prospect of acarbose is broad. Acarviosyltransferase (ATase) is an extracellular enzyme encoded by the *acb D* gene in the genome of acarbose producing strain *Actinoplanes*. It is currently the only glycosyltransferase discovered that can use acarbose as a substrate and is not inhibited by the substrate itself. It plays an important role in the metabolic process of acarbose and its homologues. In this study, the nucleic acid and amino acid sequences of *acb D* were obtained from the NCBI database. They were analyzed by bioinformatics means, recombinant strains were constructed to achieve soluble protein expression, the catalytic properties and substrate preferences of the recombinant enzymes were determined, and based on

computer technology, PCR-mediated site-directed mutagenization technology was used to modify the enzyme molecules with the aim of improving the catalytic efficiency of the enzymes. The main achievements obtained in this study are as follows:

(1) An open reading frame of *acb D* was obtained from the *acb* gene cluster of *Actinoplanes* sp., with a length of 2175 bp and encoding 724 amino acids. The results of bioinformatics analysis showed that Acb D had a signal peptide, the cleavage site was located between amino acids 26 and 27, and there were multiple phosphorylation sites. The theoretical molecular weight of Acb D is 75,351.20 Da. It is a stable hydrophilic protein. Subcellular localization shows that Acb D is located outside the cell. Acb D belongs to the α -amylase (Glycoside hydrolases 13, GH13) superfamily, and the homology with CGTase of this family is the highest at 42%. The results of molecular dynamics simulation show that Acb D has good stability at 30 °C. Subsequently, *acb D* was successfully cloned and transformed into *E. coli* BL21(DE3) with the aid of the expression vector pColld II.

(2) Optimize the induction expression conditions and determine that the optimal final concentration of the inducer is 0.1 mM; To explore the effect of signal peptides on the soluble expression content of heterologous proteins, the removal of signal peptides increased the soluble expression level of proteins by 23.4 times. The effects of reaction time, temperature

and pH on enzyme activity were explored. It was determined that the optimal reaction time was 20 h and the optimal catalytic temperature was 30 °C. When the incubation temperature was set at 40 °C, the specific activity of the enzyme was only 39.0% of that of the untreated enzyme solution, indicating that the thermal stability of the enzyme was average. The optimal catalytic pH is 7.0, and the phosphate buffer solution has the best buffering capacity for this enzyme. The substrate preference of Acb D was explored. It was found that Acb D had the highest affinity for D-salicin, with a specific activity of 82.85 U/mL, followed by L-sorbitol, with a specific activity of 63.75 U/mL. This was the first discovery that L-sorbitol could be used as the substrate of Acb D and had good catalytic activity. In addition, it was found that different configurations of sugars also have an impact on the catalytic activity of Acb D.

(3) Based on homologous modeling and substrate binding pocket prediction, the Acb D-acarbose complex was obtained through homologous sequence alignment and molecular docking, and the catalytic triad was determined to be Asp231-Glu259-Asp331. The amino acid sites of the Acb D-acarbose interaction were analyzed. After alanine scanning of these amino acids with the help of the software Discovery Studio 2020, virtual saturation mutations were performed. Based on the results of virtual saturation mutation and homologous sequence alignment analysis, The mutants Y106Q, W107Y, G146H, L196R, I199Q, A255F, Y261W, T296V,

Q330H, T332M and F362Y were obtained by PCR-mediated site-directed mutagenesis technology. Subsequently, the enzyme activities of the mutants were detected. Among them, the enzyme activity of I199Q was 126.4% of WT. The enzyme activity of F362Y was 127.2% of that of WT. The results of mutant molecule docking and structural analysis revealed that the enhanced catalytic efficiency of I199Q was due to the expansion of the "substrate binding pocket" caused by the mutation, making it easier for the enzyme molecule and the substrate to bind. The improvement in the catalytic efficiency of F362Y is due to the fact that the mutation has changed the conformation of the protein, generating more hydrogen bonds between the substrate and the enzyme molecule. These hydrogen bonds enhance the substrate affinity of F362Y, thereby increasing the enzyme activity.

KEY WORDS: acarbose, acarviosyltransferase, heterologous expression, transglycosylation, site-directed mutagenesis

目录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	IV
第 1 章 绪论.....	1
1.1 糖尿病的概述及发展现状.....	1
1.2 糖尿病的治疗药物.....	1
1.3 阿卡波糖的概述.....	2
1.3.1 阿卡波糖的理化性质.....	2
1.3.2 阿卡波糖的药理作用.....	3
1.4 阿卡波糖代谢途径的研究进展.....	3
1.4.1 阿卡波糖代谢途径的相关基因.....	3
1.4.2 阿卡波糖的代谢途径.....	3
1.4.3 阿卡波糖代谢途径改造的研究进展.....	6
1.4.4 阿卡波糖代谢途径的酶系.....	7
1.4.5 阿卡维基转移酶.....	9
1.5 环糊精糖基转移酶定向改造的研究进展.....	9
1.6 生物信息学.....	11
1.6.1 生物信息学概念及发展史.....	11
1.6.2 生物信息学的研究方法.....	11
1.6.3 蛋白空间结构的构建方式.....	12
1.6.4 分子对接概述及其应用.....	13
1.6.5 定点突变概述及其应用.....	13
1.7 研究意义及内容.....	14
1.7.1 研究意义.....	14
1.7.2 研究内容.....	14
1.7.3 技术路线.....	15
第 2 章 阿卡维基转移酶 Acb D 生物信息学分析及异源表达.....	16
2.1 引言.....	16
2.2 实验材料.....	16
2.2.1 菌株及培养基.....	16
2.2.2 实验试剂.....	17
2.2.3 实验仪器.....	17
2.3 实验方法.....	18
2.3.1 目的基因的确定.....	18
2.3.2 Acb D 生物信息学分析.....	18
2.3.3 放线菌全基因组提取.....	18
2.3.4 目的基因的克隆.....	19
2.3.5 克隆载体的构建.....	20
2.3.6 表达载体的构建.....	21
2.3.7 重组菌株的诱导表达.....	22

2.4 结果与讨论.....	23
2.4.1 基本理化性质分析.....	23
2.4.2 一级序列分析.....	25
2.4.3 同源建模及模型结构评估.....	26
2.4.4 分子动力学模拟.....	27
2.4.5 目的基因的扩增.....	27
2.4.6 重组菌株的构建.....	28
2.4.7 重组菌株的诱导表达结果.....	29
2.5 本章小结.....	29
第3章 重组 Acb D 酶学性质测定及转糖基活性分析	31
3.1 引言.....	31
3.2 实验材料.....	31
3.2.1 菌株及培养基.....	31
3.2.2 实验试剂.....	32
3.2.3 实验仪器.....	33
3.3 实验方法.....	33
3.3.1 诱导条件的优化.....	33
3.3.2 酶活检测的条件的建立.....	33
3.3.3 反应进程的考察.....	34
3.3.4 重组 Acb D 最适温度和温度稳定性考察	34
3.3.5 重组 Acb D 最适 pH 的考察	34
3.3.6 重组 Acb D 催化不同糖基供体的活性测定	34
3.4 实验结果.....	35
3.4.1 密码子的优化.....	35
3.4.2 诱导剂浓度的优化.....	36
3.4.3 信号肽对重组蛋白可溶性表达的影响.....	37
3.4.4 时间对重组 Acb D 催化活性的影响	38
3.4.5 重组 Acb D 的温度特性	39
3.4.6 重组 Acb D 的最适 pH.....	40
3.4.7 重组 Acb D 的底物谱分析	41
3.5 本章小结.....	42
第4章 Acb D 酶分子的定向改造	43
4.1 引言.....	43
4.2 实验材料.....	43
4.2.1 菌株及培养基.....	43
4.2.2 实验试剂.....	44
4.2.3 所用软件及网站.....	44
4.2.4 实验所用引物.....	44
4.2.5 实验仪器.....	45
4.3 实验方法.....	45
4.3.1 分子对接.....	45
4.3.2 丙氨酸扫描.....	46
4.3.3 虚拟饱和突变.....	46
4.3.4 序列比对.....	46

4.3.5 突变体的构建.....	47
4.3.6 突变体的酶活力的检测.....	48
4.3.7 突变体分子对接和结构分析.....	48
4.4 实验结果.....	48
4.4.1 分子对接结果.....	48
4.4.2 丙氨酸扫描结果.....	49
4.4.3 虚拟饱和突变结果.....	50
4.4.4 多序列比对结果.....	51
4.4.5 突变体的构建.....	52
4.4.6 突变体酶活力检测结果.....	53
4.4.7 突变体的分子对接及结构分析.....	53
4.5 本章小节.....	54
第 5 章 结论与展望.....	56
5.1 结论.....	56
5.2 展望.....	57
参考文献.....	59
攻读硕士期间成果.....	72
致谢.....	73

第 1 章 绪论

1.1 糖尿病的概念及发展现状

糖尿病(Diabetes mellitus)是一种多发性内分泌疾病,主要包括 I 型糖尿病、II 型糖尿病、妊娠糖尿病及其他类型的糖尿病,其中 II 型糖尿病的发病人数占临床占总发病人数的 90%^[1]。糖尿病的发病机制复杂多样,但主要归为两种,一种是机体细胞对自身分泌的胰岛素产生抵抗,从而造成机体自身的糖代谢紊乱,另外一种则是胰腺自身 β 细胞的损坏导致胰岛素分泌不足从而使机体的血糖升高^[2]。高血糖对肝脏、肾脏、视网膜、神经元以及心血管系统等器官带来的并发症不仅严重危害着民众的生命健康,还带来了巨大的医疗负担,可见糖尿病的防治具有重要的社会与经济意义^[3]。

近年来,由于人们生活习惯的改变,肥胖和超重人口的数量增加,糖尿病的发病趋势也愈发迅猛,且一旦确诊几乎不可逆。国际糖尿病联盟(International diabetes federation)发布的数据显示,全球至 2022 年约有 5.37 亿糖尿病患者,其中我国糖尿病的患者数量已逾 1.4 亿,约占全球患者数量的 1/4,居于世界首位^[4]。在我国,糖尿病俨然成了继肿瘤和心脑血管疾病之后又一严重威胁我国民众生命健康的非传染性的慢性疾病^[5]。因此,糖尿病的防治道路任重而道远。

1.2 糖尿病的治疗药物

治疗糖尿病常用的口服药物主要有四类,分别为促胰岛素分泌剂、 α -糖苷酶抑制剂、双胍类和噻唑烷二酮类。促胰岛素分泌剂包括磺胺类和进餐时的血糖调节剂,磺胺类药物的作用机制是刺激胰腺 β 细胞产生更多的胰岛素来降低血糖水平,这类药物的代表有格列齐特、格列喹酮、格列本脲和格列美脲等。餐时血糖调节剂的作用机制也是通过刺激胰腺 β 细胞产生更多的胰岛素来降低患者的餐后血糖水平,为了有更好的药理效果,该药需要在进餐前或进餐时服用。这类药物的代表主要有那格列奈(格列奈类药物)、利拉鲁肽(GLP-1 受体激动剂)和

沙格列汀（4-二肽基肽酶抑制剂）^[6]。 α -糖苷酶抑制剂类药物的作用机制是通过抑制 α -糖苷酶的活性来调节患者的血糖水平，该类药物的代表药为伏格列波糖、米格列醇和阿卡波糖等。双胍类降糖药物的代表是二甲双胍，该药不仅可以增强患者体内胰岛素的敏感性使胰岛素起到更好调节血糖的作用，还可以通过抑制肝糖原的分解减少肝脏葡萄糖的生成以调节血糖水平。噻唑烷二酮类的作用机制是加速细胞内葡萄糖转运体的生成，提高细胞摄取葡萄糖的效率来达到降低血糖的目的，该类药物的代表药有曲格列酮和吡格列酮等^[7]。

1.3 阿卡波糖的概述

阿卡波糖（Acarbose）是一种氨基环醇类的假四糖物质，是首个被批准用于治疗 II 型糖尿病的 α -葡萄糖苷酶抑制剂，其通过竞争性抑制 α -糖苷酶的活性，从而控制人小肠对碳水化合物的降解与吸收，进而起到调节血糖的作用^[8]。阿卡波糖凭借着药效作用长久和毒副作用小等优点自 1990 年上市起很快占据了降糖药的市场，由于阿卡波糖结构复杂难以通过化学法合成，因此目前获得阿卡波糖的主要途径是通过游动放线菌发酵获得^[9]。

1.3.1 阿卡波糖的理化性质

阿卡波糖的颜色为白色或浅黄色，状态为不规则粉末，易溶于水，pKa 为 5.1，化学结构式为 $C_{25}H_{43}NO_{18}$ ，分子量为 645.60。阿卡波糖的化学结构由 C₇-环醇、4-氨基-4,6-双脱氧葡萄糖和一分子麦芽糖组成（图 1-1），由 C₇-环醇和 4-氨基-4,6-双脱氧葡萄糖构成的假二糖部分又被称为阿卡维基（Acarvioside）^[10]。

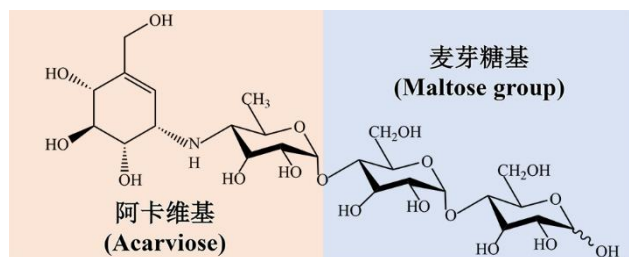


图 1-1 阿卡波糖结构式

Figure 1-1 Structural formula of acarbose

1.3.2 阿卡波糖的药理作用

人通过食物获得的碳水化合物一般不能被人体直接利用，一般要先通过唾液淀粉酶的作用分解为简单的寡糖，继而在 α -葡萄糖苷酶的作用下水解为单糖才能被吸收利用。阿卡波糖是一种假四糖类似物，其在结构上与某些寡糖相似，这导致阿卡可竞争性的结合 α -葡萄糖苷酶的活性位点，从而抑制肠道内蔗糖酶、麦芽糖酶和葡萄糖淀粉酶的活性，减缓多糖、寡糖和双糖变成可葡萄糖、果糖等可供人体直接利用的单糖的水解过程，从而避免餐后血糖急剧上升，并抑制胰岛素分泌，改善过胰岛素的过度反应，将血糖控制在良好的状态^[11]。

1.4 阿卡波糖代谢途径的研究进展

1.4.1 阿卡波糖代谢途径的相关基因

Wehmeier 等^[12]最先发现 *Actinoplanes* sp. SE50/110 全基因组中含有阿卡波糖生物合成相关基因簇 (*acb* 基因簇)。Schwientek 等^[13]对 *Actinoplanes* sp. SE50/110 的全基因组进行测序证实了该基因组中含有完整的 *acb* 基因簇，随后首次在 NCBI 上公开了第一个 *Actinoplanes* sp. 的全基因组信息 (GenBank accession No.: CP003170)^[14]。Wendler 等^[15]对 *Actinoplanes* sp. SE50/110 通过全面的蛋白质组学分析 *acb* 基因簇在全基因组中的定位。目前，*acb* 基因簇^[16-19]已基本清晰，其示意图见图 1-2。

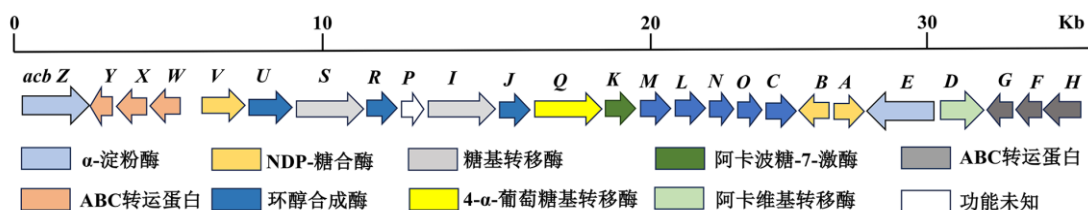


图 1-2 *Actinoplanes* sp. SE50/110 的 *acb* 基因簇及表达产物

Figure 1-2 *Acb* gene cluster and the corresponding expression products from *Actinoplanes* sp. SE50/110

1.4.2 阿卡波糖的代谢途径

阿卡波糖的合成途径最早由 Zhang 等^[20]提出，后由 Rockser 等^[21]更新。由于该途径的复杂性，研究者们通过基因组学和代谢组学等手段仅证明了该途径的前一部分反应，后续反应通过公布的基因簇推测各基因编码的蛋白活性来建

立，直到最近 Tsunoda 等^[22]纠正并完善了阿卡波糖的合成途径，该途径被分为四个部分。

(1) C₇-环醇的合成：C₇-环醇合成模块的起始化合物为 EEV，该化合物是由源自磷酸戊糖途径的一个中间化合物 SH7P 经 Acb C 催化生成^[23]。紧接着，EEV 在 Acb M 的作用下磷酸化形成 EEV7P，随后又经 Acb O 差向异构化形成 EV7P，目前该产物已得到质谱和核磁共振验证^[24-26]。然后，EV7P 在环脱水酶 Acb L 的催化作用下脱水形成 V7P(1)，再由 NADPH-依赖的氧化还原酶 Acb N 催化生成 V7P(2)，后在磷酸激酶 Acb U 的作用下转化为 V1,7PP，再由 *acb J* 编码的磷酸酶脱磷酸化生成 V1P，最后在 Acb R 的作用下将 V1P 核苷酸化生成 NDP-V^[22]。

(2) 双脱氧氨基葡萄糖的合成：该合成路径是阿卡波糖合成过程中最为简单的一部分，该模块的合成起始化合物是 G1P，首先，在 Acb A 的催化作用下 G1P 核苷酸化生成 dTDP-G。接着，dTDP-G 在 Acb B 作用下脱去一分子水形成 dTDP-4k6dG，最终 dTDP-4k6dG 又在氨基转移酶 Acb V 的介导下生成 dTDP-4a6dG，即双脱氧氨基葡萄糖^[27-29]。

(3) 麦芽糖的整合进入：dTDP-4a6dG 在假糖基转移酶 Acb I 的作用下先和细胞中的麦芽糖结合形成复合物 4-aminoDGG，最后复合物 4-aminoDGG 在 Acb S 的作用下与 NDP-V 结合最终生成阿卡波糖^[22,30]。

(4) 阿卡波糖及其同系物的转运 (Carbophore 循环)：首先，胞外淀粉由淀粉水解酶 Acb E 和 Acb Z 催化生成不同聚合度的寡糖，再经阿卡维基转移酶 Acb D 的转糖基作用与 Acarviose (主要来自阿卡波糖) 相连形成不同种类的阿卡波糖同系物，而后阿卡波糖同系物经转运蛋白复合体 Acb FGH 转至胞内在 Acb K 作用下使 C₇ 位磷酸化^[31-33]。随后，由 4- α -葡萄糖糖基转移酶 Acb Q 作用脱去所结合的糖基生成阿卡波糖-7-磷酸，最后再由另一种转运蛋白复合体 Acb WXY 转运至胞外形成阿卡波糖，至此完成一个循环，推测该循环的作用与细胞内的碳源利用有关^[34]。由于和阿卡波糖及其同系物胞外代谢相关的三个酶中仅有 Acb D 的功能得到了证实，Acb E 和 Acb Z 的功能尚不明确，因此“Carbophore 循环”仍处于假说阶段 (图 1-3)。

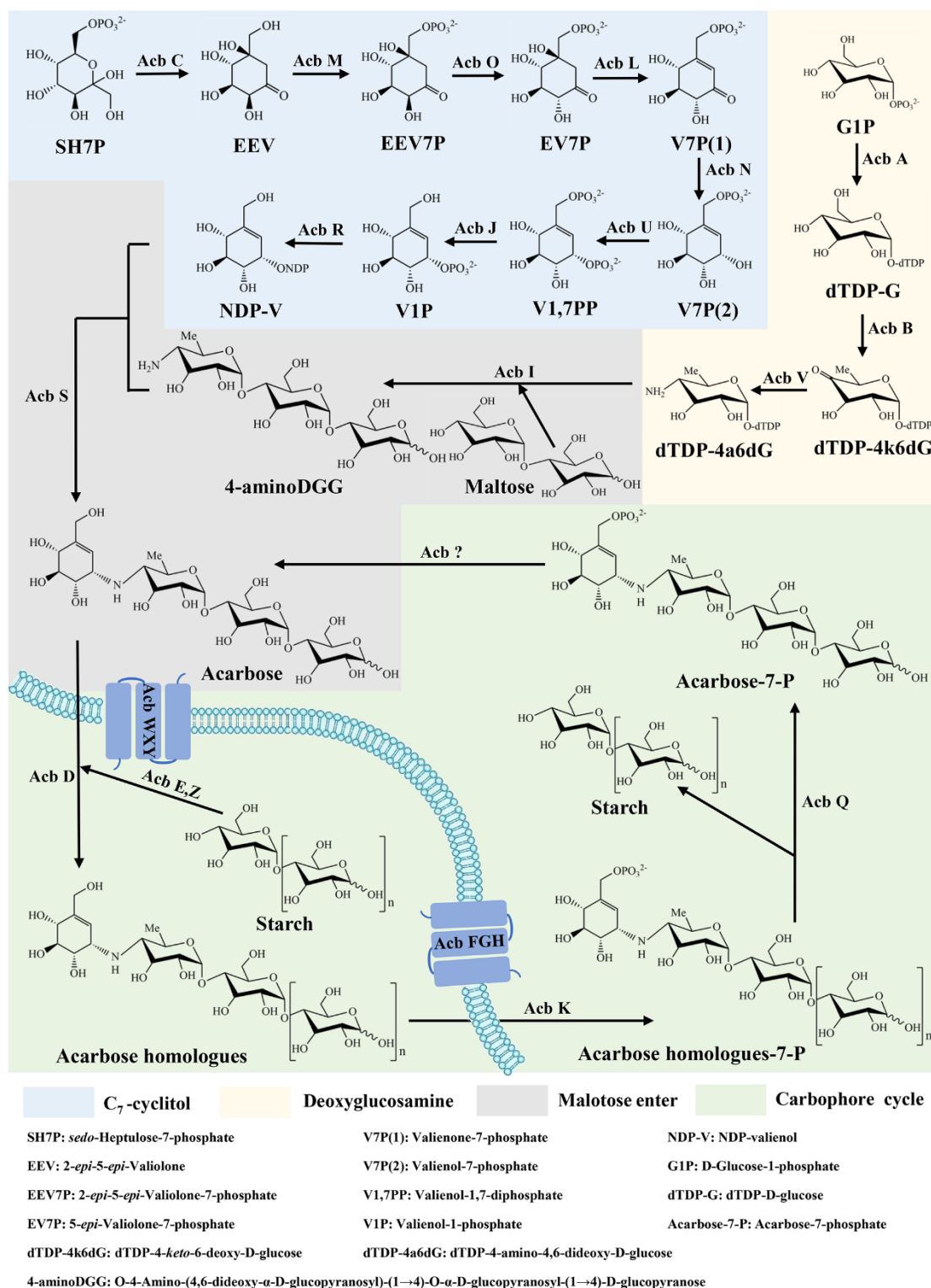


图 1-3 阿卡波糖的合成路径
Figure 1-3 Synthesis pathway of acarbose

1.4.3 阿卡波糖代谢途径改造的研究进展

利用游动放线菌发酵生产阿卡波糖时所生成的阿卡波糖同系物(组分 A、B、C、D、4a、4b、4c 和假阿卡波糖等) [35]将增加下游分离纯化工作的难度, 得益于放线菌全基因组信息的注释与公布, 阿卡波糖发酵菌株的分子改造取得了很大的进展, 见表 1-1。

表 1-1 阿卡波糖代谢途径改造的研究进展

Table 1-1 Advances in transformation of acarbose metabolic pathway

时间	改造菌株	研究内容
2015	<i>Actinoplanes</i> 8-22	首次报道了工业游动放线菌株与 <i>E. coli</i> ET2567 之间的结合转移体系, 利用同源重组技术敲除 <i>tre Y</i> 基因, 使发酵液中阿卡波糖类似物 C 的含量降低了十倍 ^[36] 。
2016	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	基于 pKC1139 质粒构建, 利用 CRIPSR/Cas9 基因编辑技术敲除 <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 基因组中酪氨酸酶的编码基因 <i>MelC</i> , 使得发酵液中黑色素的含量显著降低, 证明了 <i>MelC</i> 与发酵液中黑色素的形成相关 ^[37] 。
2017	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	调整了受体和供体细胞的数量及比例, 优化了孵育时间和培养基中 $MgCl_2$ 的浓度, 使用甲氧苄啶代替萘啶酮酸来抑制大肠杆菌的生长, 提高了种属间接合转移的效率。借助高效的基因操作方法, 将 <i>acb</i> 基因簇过表达使阿卡波糖的产量提升了 35% ^[38] 。
2019	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50	通过对比 <i>Actinoplanes</i> sp. SE50 与其衍生菌株 <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 的 <i>acb</i> 基因转录水平, 对 <i>Actinoplanes</i> sp. SE50 基因组上发生突变的 8 个编码基因分别敲除验证, 发现 CWT_4325 的敲除可使阿卡波糖的产量提高 25%。推测该基因的敲除直接导致细胞内乙醇及乙酰辅酶 A 的累积, 进而导致了 C ₇ -环醇前体物质 7-磷酸-景天庚酮糖的含量增高 ^[18] 。

续表 1-1

时间	改造菌株	研究内容
2019	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	通过检测不同麦芽糖浓度下阿卡波糖合成相关基因的转录水平，发现麦芽糖浓度的提高显著促进基因 <i>acbW</i> 的转录。敲除 <i>acbW</i> 基因就没有阿卡波糖积累，证实了 <i>acbW</i> 在阿卡波糖生物合成中的重要作用。将 <i>acbW</i> 和 <i>acbWXY</i> 基因过表达，使阿卡波糖合成量分别提高了 6.4% 和 8% ^[39] 。
2020	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	通过生物实验证明了发酵液中存在两种分流产物，并认为分流产物的形成与磷酸水解酶有着很大关系。为减少分流产物的形成，敲除水解酶基因 ACPL_8310 和 ACPL_2834 并将 <i>acb J</i> 基因的启动子替换为弱启动子 WVp 和 kasOp*，同时最大限度增加氨基脱氧己糖部分供应的策略，使阿卡波糖效价达到了 7.4 g/L ^[26] 。
2022	<i>Actinoplanes</i> sp. SIP112-34	通过对 Tet R 家族转录调控因子的基因 <i>TetR1</i> 敲除和回补，证实其可以促进 <i>acbB</i> 和 <i>acbD</i> 基因的表达，对阿卡波糖的生物合成有正向作用 ^[40] 。

1.4.4 阿卡波糖代谢途径的酶系

阿卡波糖的代谢途径错综复杂，但其归根结底是一系列存在着级联关系的酶促反应过程的总和，参与代谢途径的完整酶系见表 1-2，各酶系的功能见表中标注的参考文献。

表 1-2 阿卡波糖代谢途径的酶系
Table 1-2 Enzymes of acarbose metabolic pathway

代谢途径	Acb 蛋白	名称或功能
C ₇ -环醇	Acb C	2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -valiolone 合成酶 ^[23,44-45]
	Acb M	2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -valiolone-7-激酶 ^[20,24,46]
	Acb O	差向异构酶 ^[24]

续表 1-2

代谢途径	Acb 蛋白	名称或功能
C ₇ -环醇	Acb L	环醇脱氢酶 ^[20,26]
	Acb N	环醇氧化还原酶 ^[26]
	Acb U	valienol-7-P-1-激酶 ^[22,26]
	Acb J	HAD 家族水解酶 ^[22,26]
	Acb R	核苷转移酶 ^[22,25]
双脱氧氨基葡萄糖	Acb A	D-葡萄糖-1-P-胸腺嘧啶转移酶 ^[28-29]
	Acb B	dTDP-D-葡萄糖-4,6-脱水酶 ^[29,47]
	Acb V	氨基转移酶 ^[29,47]
麦芽糖整合进入	Acb I	葡萄糖基转移酶 ^[22]
	Acb S	葡萄糖基转移酶 ^[22]
	Acb Z	α -淀粉酶
	Acb E	α -淀粉酶
	Acb D	阿卡维基转移酶 ^[32-33,48-49]
	Acb Q	4- α -葡萄糖糖基转移酶 ^[22,25,34,50-51]
	Acb K	阿卡波糖-7-激酶 ^[20-21,31]
Carbophore 循环	Acb W	ABC 转运蛋白（ATP 酶部分）
	Acb X	ABC 转运蛋白（跨膜部分）
	Acb Y	ABC 转运蛋白（跨膜部分）
	Acb H	ABC 转运蛋白（ATP 酶部分）
	Acb F	ABC 转运蛋白（跨膜部分）
	Acb G	ABC 转运蛋白（跨膜部分）
未知	Acb P	NUDIX 水解酶

1.4.5 阿卡维基转移酶

糖基转移酶（GTs）是一类通过糖残基从供体底物转移到受体来催化糖苷键合成的酶^[52]。受体底物可以是单碳水化合物、二碳水化合物、低碳水化合物，蛋白质、脂质、DNA 和许多其他小分子，因此它们在低聚物和多糖的生物合成途径，以及蛋白质糖基化和有价值的天然产物的形成中发挥重要作用^[53]。

Hemker 等^[32]在阿卡波糖发酵液中发现了一种胞外酶活性，经鉴定可知该酶是 *acb D* 基因编码的阿卡维基转移酶（Acarviosyltransferase, ATase）。Acb D 属于 α -淀粉酶（Glycoside hydrolases 13, GH13）超家族，具有 α -糖苷酶的结构特征，唯一一种以阿卡波糖作为底物且不受底物本身抑制的糖基转移酶，与该家族的环糊精糖基转移酶（Cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase）有着 46% 的同源性，但 Acb D 并不表现 CGTase 的功能，目前仅在阿卡波糖发酵液的上清中发现存在 Acb D^[54]。基于放射性标记法的实验表明，Acb D 能够以阿卡波糖和多种阿卡波糖同系物作为 Acarviose 供体以及多种糖及衍生物作为糖基受体，该酶的具体功能是将 Acarviose 转移至糖基分子上生成阿卡波糖或其同系物。Leemhuis 等^[48]通过定点突变把 Acb D 保守序列中的 140 位氨基酸变为 His 或去掉 CGTase 序列中的 His140，发现二者的催化活性可部分互换。许贤恩^[49]从放线菌的胞外提取物中分离纯得到 Acb D，用其催化阿卡波糖和寡糖的混合物确定了阿卡波糖同系物 4b (Acarviosy-1,4-glucose-1,4-glucose-1,4-glucose) 的形成机制。张欣等^[33]构建基因 *acb D* 的缺失菌株，结果致使阿卡波糖的合成量下降了 42%，通过基因回补，其合成阿卡波糖的能力又恢复正常，这表明 Acb D 在阿卡波糖的合成过程中发挥着重要作用。

1.5 环糊精糖基转移酶定向改造的研究进展

Acb D 属于 GH13 超家族，并且与该家族中的 CGTase 的同源性最高^[32]。目前，关于 Acb D 的定向改造尚空白，因此改造方法参考 CGTase。CGTase 是一类能够把淀粉转化成环糊精（Cyclodextrin, CD）或者其他由 α -1,4-糖苷键连接葡萄糖聚合物的酶，其产物通常是 α -CD， β -CD 和 γ -CD 的混合物，这些种类的 CD 被广泛运用到食品、医药、化妆品和农业等多种行业中^[55]。CGTase 常用的改造方法有定点突变和定点饱和突变，近年来使用定点突变对 CGTase 进行改造的主

要研究策略见表 1-3。

表 1-3 CGTase 定点突变的研究进展
Table 1-3 Advances in site-directed mutation of CGTase

基因来源	突变位点	改造结果
<i>B. circulans</i> STB01	A599、Y633	突变体 A599N/Y633A 降低了混合型产物抑制，使 CD 的产率分别提升了 22.4%和 15.8% ^[56] 。
<i>B. stearrowthermophilus</i>	E142、L277	突变体 E142P/L277M 的 α -CD 产量是野生型的 1.7 g/L 和 14.3% ^[57] 。
<i>B. stearrowthermophilus</i>	E142、N355	突变体 E142P/N353A 的 α -CD 产量分别提高了 9.65%和 15.62% ^[58] 。
<i>B. clarkii</i> 7346	F91、Y186	F91N/L 活性分别提升至 18.72 和 19.32/ U/mg; Y186W 的 γ -CD 产物提升至 94.6% ^[59] 。
<i>Paenibacillus</i> sp.	Y100、S145、 Y167、A315	Y100I、S145G 和 Y167H 产 β -CD 量提高; S145P、A315H/R/S 产 γ -CD 量提高; A315D 热稳定性提高 ^[60] 。
<i>Bacillus</i> sp. G-825-6	Y211	突变体 Y211L 产 γ -CD 的质量分数提升到 97% ^[61] 。
<i>B. circulans</i> STB01	N603	突变体 N603D 降低了混合型产物抑制，单位酶的 CD 产量比野生型提高了 23.9% ^[62] 。
<i>B. circulans</i> STB01	L600	L600E/R 降低了混合型产物抑制，提升了 β -CD 的产量 ^[63] 。
<i>B. circulans</i> STB01	A315、D577	A315D 和 D577 将酶在 60 °C 的半衰期分别提高了 80%和 130% ^[64] 。
<i>B. circulans</i>	F183、F259	F183S/F259N 酶活性比由野生型的 1:90 提升到 15:1 ^[65] 。

续表 1-3

基因来源	突变位点	改造结果
<i>Bacillus</i> sp. FJAT-44876	G208	G208S 在 60 °C 下热稳定半衰期提高了 1.85 倍 ^[66] 。
<i>Bacillus</i> sp. Y112	R81	R81T 使 α -CD 和 β -CD 所占比例分别降低和提高了 8%、7% ^[67] 。

1.6 生物信息学

1.6.1 生物信息学概念及发展史

生物信息学是一门自 1990 年美国启动人类基因组计划而兴起的交叉学科，它将计算机和信息科学技术运用到生命科学，尤其是运用到分子生物学的研究中^[68]。随着计算机技术的发展，生物信息学发展的势头愈加蓬勃，因此生物信息学已经深入生命科学的方方面面。

截止到今日，生物信息学的发展历程可大致分为三个阶段，20 世纪 50 年代至 20 世纪 80 年代末位前基因组时代，这一时期研究者们开始使用计算机进行生物数据的简单处理分析，初步建立生物数据库以和开发简单的检索工具等^[69]。20 世纪 90 年代至 21 世纪初为基因组时代，这一时期完成了各种生物种类的基因组序列测定，网络数据库系统逐步建立，交互界面工具也不断开发，以便更好地存储和分析海量的基因组数据^[70]。21 世纪初至今为后基因组时代，这一时期研究重点转移到基因组学和蛋白质组学等方面，旨在从基因组和蛋白质组的水平上，通过核酸、蛋白质序列等深入分析序列中表达的结构功能、基因调控网络和生化代谢途径等生物信息为理解生命现象和疾病发生机制等提供更全面的视角^[71]。

1.6.2 生物信息学的研究方法

生物信息学的主要包括两种研究方法，即一级序列研究和空间结构研究^[72]。序列的研究方法一般是以核酸或者氨基酸序列为基础，可通过 NCBI 数据库中的 BLAST 板块的功能寻找同源序列，获得的同源序列可进行序列比对分析其保守氨基酸位点，从而从已知蛋白推测未知蛋白的功能，这也为进一步的

模型构建提供了基础^[73-74]。蛋白质的空间结构决定着蛋白质的活性，因此对于分子空间结构的研究也同等重要，但目前研究者们所分析的蛋白质结构的数量远落后于现有蛋白质的数量。传统方法依赖实验测定高分辨率结构以实现有序列空间的更广泛覆盖，但这一过程需要进行大量实验并不断试错，造成人力和物力资源的浪费^[75]。虽然电子低温显微镜以及用于结构测定的杂交和整合方法领域取得了最新进展，加快了结构测定的速度，但已知蛋白质序列与实验测定的蛋白质结构之间的差距仍在不断扩大^[76]。因此，借助计算机模拟构建蛋白质三维模型的技术十分重要，随着科技的飞速进步，该技术也愈加成熟，计算机模拟构建蛋白三维模型的准确性也变得更高^[77]。

1.6.3 蛋白空间结构的构建方式

生物信息学中用于预测蛋白质三维结构的最常用的方法是同源建模，除此之外还有从头预测法和穿线法。同源建模是基于已知蛋白质的三维结构来预测未知蛋白质结构的技术。常用的同源建模软件和在线网站有：SWISS-Model^[78]、Rosetta^[79]、Modeller^[80]和 FAMS^[81]等，但同源建模的前提是未知蛋白要与已知结构的蛋白具有较高的序列相似性，因此同源建模的局限性在于未知蛋白序列与已知蛋白的同源性要高于 30%，因此同源建模并不适用于所有的蛋白质建模。从头预测法是依据物理化学原理，从蛋白质的氨基酸序列出发，考虑氨基酸间相互作用等因素，通过计算搜索能量最低的三维结构，适用于无已知同源结构的蛋白质，但该方法的计算成本高，准确性有待提高^[82]。穿线法可将目标蛋白序列与已知的蛋白质结构模板库进行匹配，寻找最合适的结构模板来构建模型，可用于序列相似性较低的情况，但该方法对模板库依赖大^[83]。人工智能的兴起使蛋白质三维结构的运算发展地更加准确和全面，其中代表产品是由 DeepMind 开发 Alpha Fold，它基于蛋白质的氨基酸序列，运用一系列算法流程来攻克蛋白质折叠难题。首先对序列以及多序列比对进行特征提取，接着通过深度神经网络预测蛋白质结构进行打分评估，最后生成蛋白质结构，整个过程有着极高的精确度^[84]。除此之外，在蛋白结构预测技术迅猛发展的进程中，像 Pymol^[85]等可视化软件接连问世，这些软件实现了蛋白结构的可视化呈现，让人们能够深入剖析结构信息，也为依照需求对蛋白分子进行改造创造了条件。

1.6.4 分子对接概述及其应用

分子对接 (Molecular docking) 是运用生物信息学分析受体和配体间相互作用的重要手段, 它采用计算机模拟手段把小分子配体和生物大分子 (蛋白质、核酸等小分子物质) 放在一起进行精准的空间位置匹配, 同时分析它们之间的相互作用情况, 以此预测二者的结合方式和亲和力大小^[86]。依据当前软件的对接模式, 对接方式主要有刚性对接、半柔性对接和柔性对接这三类, 刚性对接技术主要用于探寻蛋白质分子间的相互作用; 半柔性对接和柔性对接则常常应用于研究小分子化合物与其他物质的相互作用^[87]。基于以上几种对接方式, 相关方式的对接软件陆续问世, 如 GOLD、AutoDock Vina、Smina 以及 Discovery Studio (DS) 等。这些软件均采用柔性分子对接保持蛋白质骨架固定不变同时为氨基酸残基赋予一定的自由度, 在明确相互作用力之后结合热力学实验, 以达到更为精准地阐释分子间相互作用机制的目的^[88]。目前, 分子对接主要运用在药物研发领域^[89]、材料科学领域^[90]、酶学研究领域^[91]和食品科学^[92]等领域。

1.6.5 定点突变概述及其应用

定点突变 (Site-directed mutagenesis) 也是生物信息学在生命科学等研究领域的技术手段之一, 它基于 DNA 合成与 PCR 技术设计含有预期突变位点的寡核苷酸引物, 使其与模板 DNA 互补结合, 在 DNA 聚合酶作用下以引物为起点合成含有突变的 DNA 链, 经过多轮复制实现对特定碱基的替换、插入或缺失^[93]。定点突变主要应用在生物医药和生物工程等研究领域, 尤其是蛋白质结构与功能研究中, 是改造或者优化酶分子的有效手段。如 Yu 等^[94]基于分子对接和定点突变技术改造细菌细胞中的二氯甲烷脱卤酶, 使酶的活性大大提高, 最优突变酶体的活性比野生型增加了 52.8%。曾静等^[95]通过蛋白质分子表面氨基酸突变策略有效提高植酸酶的活性和热稳定性。Emruzi 等^[96]通过定点突变技术将源自 *Serratia marcescens* B4A 几丁质酶的 191 位的甘氨酸变为缬氨酸大大提高了几丁质酶的热稳定性。贺志敏等^[97]通过同源序列分析, 确定可能影响虎杖聚酮合酶功能的 3 个氨基酸位点, 采用定点突变对酶分子进行修饰提高了该酶的活性。

1.7 研究意义及内容

1.7.1 研究意义

(1) 糖尿病现在已经成为继癌症和心脑血管疾病之外第二大影响人类生命健康的慢性疾病且发展迅猛，国际糖尿病联盟发布的数据显示，全球截至 2022 年约有 5.37 亿的糖尿病患者，其中 II 型糖尿病患者占比高达 90%^[98]。肾脏、视网膜、心血管系统、神经元和肝脏功能障碍等并发症严重危害着人们的生命健康，随着人民饮食作息的改变，糖尿病的发展趋势也愈加迅猛，因此对于阿卡波糖的需求量也大大增加^[99]。

(2) 阿卡波糖是首个被批准用于治疗糖尿病的 α -糖苷酶抑制剂，自 1990 年上市后凭借着效果好、安全性高和毒副作用小等优良的药理作用很快就占据了国内外口服降糖药的市场^[100]。目前，阿卡波糖主要是由游动放线菌发酵获得，但由于放线菌在发酵过程中不稳定导致除了产生阿卡波糖外还会产生多种副产物——即阿卡波糖同系物。此外，阿卡波糖的合成代谢过程是一个多酶级联的复杂系统，近年来，研究者们多集中于对生产菌株的改造来改善阿卡波糖的产品质量，而对各个酶的具体性质和功能涉猎较少。而 Acb D 是一种十分重要的酶，它在阿卡波糖的合成代谢中起着十分重要的作用，它不仅参与阿卡波糖的合成，还与几种典型的同系物形成相关^[25]。因此，明确该酶的催化结构和功能对于阿卡波糖及其同系物的合成机制有着重要的意义。

(3) 目前，生物信息学的飞速发展可有效避免直接实验的盲目性，以计算机模拟为基础的定点突变是酶分子改造的有效手段之一^[101]。通过计算机辅助，明确该酶与底物作用的活性口袋，对关键氨基酸位点进行突变，初步探索出一条以提升 Acb D 催化活性为导向的关键氨基酸改造路线。

1.7.2 研究内容

(1) 使用 NCBI 数据库挖掘得到基因 *acb D*，利用生物信息学软件分析相关理化特性，随后从游动放线菌基因组中克隆得到 *acb D*，构建重组质粒 pColdII-*acb D*，后导入到 *E. coli* BL21 (DE3) 中获得重组菌株 *E. coli/acb D* 并对诱导条件进行优化。

(2) 测定重组 Acb D 的反应进程、酶活性、最适温度及温度稳定性、最适 pH 等相关酶学性质；使用不同类型的单糖、寡糖及其衍生物，在最适反应条件下研究 Acb D 的转糖基偏好性。

(3) 分析 Acb D 的三维模型，运用分子对接软件将 Acb D 的三维结构与底物分子对接，在对接的基础上获得酶与底物相互作用的氨基酸，并探索出一条以提升 Acb D 催化活性为导向的关键氨基酸改造路线。

1.7.3 技术路线

本研究主要技术方法及操作路线见图 1-4。

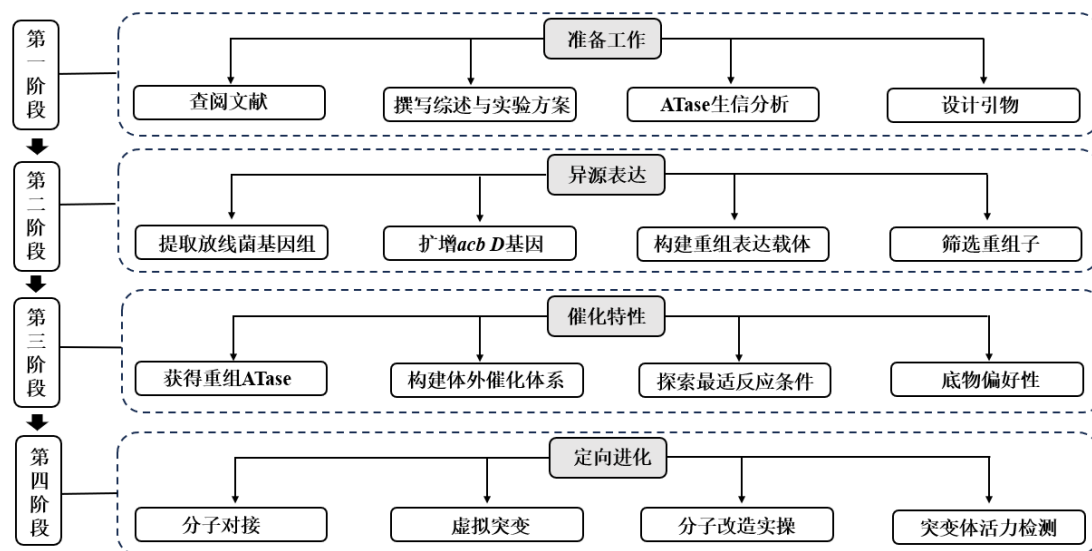


图 1-4 技术路线图

Figure 1-4 Technology roadmap

第2章 阿卡维基转移酶 Acb D 生物信息学分析及异源表达

2.1 引言

阿卡波糖 (Acarbose) 是一种 α -糖苷酶抑制剂, 其不仅可竞争性抑制 α -糖苷酶的活性调节患者餐后的血糖水平, 还能显著降低由糖耐量异常转化为糖尿病的风险, 因此该药自 1990 年上市之后就被广泛用于糖尿病的预防和治疗中^[102]。放线菌发酵生产阿卡波糖的过程十分复杂, 涉及到多个酶的级联反应, 其中 Hemker 等^[32]在放线菌发酵液的上清中分离得到一种酶活性, 经鉴定认为该酶是由 *acb* 基因簇中的 *acb D* 基因编码的阿卡维基转移 (Acarviosyltransferase, ATase); 研究表明, 该酶在放线菌发酵生产阿卡波糖的代谢过程中起着重要的作用, 与阿卡波糖及其同系物的形成相关, 因此明确该酶的结构功能和催化性质对不仅对明确阿卡波糖的代谢过程有重要意义, 还能在为发酵液中杂质组分的控制提供研究基础。

目前, 国内外对于 Acb D 研究报道较少, 生物信息学的发展使得计算机在现代生物学的研究中应用更广泛, 可有效避免直接实验的盲目性^[103]。本章借助计算机辅助的酶挖掘和鉴定技术挖掘出游动放线菌基因组内的 Acb D 并通过生物信息学分析其结构性质, 构建重组工程菌株 *E. coli/acb D* 实现 Acb D 的异源表达, 为后续探究其催化特性提供实验基础。

2.2 实验材料

2.2.1 菌株及培养基

菌种 *Actinoplanes* sp. SE50、含有空载表达质粒 pCold II 的菌株 *E. coli/pCold II* 由本实验室保藏; 菌种 *E. coli* JM109 和 *E. coli* BL21(DE3) 购买自美国 Invitrogen 公司; 克隆质粒 pMD18-T 购买自上海生工生物工程股份有限公司; 表达质粒 pCold II 购买自日本 TaKaRa 公司, 本章所用的培养基配方如下:

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10、酵母提取物 5、NaCl 10, pH 6.5~7.0; 固体培养基另外添加琼脂 20。

分离、斜面培养基 (g/L): 蔗糖 30、蛋白胨 5、L-酪氨酸 1、KCl 0.5、

MgSO₄·7H₂O 0.5、K₂HPO₄·3H₂O 1、琼脂 18，pH 7.0~7.3。

种子培养基（g/L）：黄豆饼粉 40、丙三醇 20、玉米淀粉 10、CaCO₃ 2，pH 6.4~7.0。

摇瓶发酵培养基（g/L）：葡萄糖 23、麦芽糖 96、黄豆饼粉 10、CaCl₂ 3.5、谷氨酸钠 5、K₂HPO₄·3H₂O 1、丙三醇 5、CaCO₃ 3、FeCl₃·6H₂O 0.5，pH 6.4~6.7。
以上培养基均需在 121 °C，25 min 灭菌后使用。

2.2.2 实验试剂

细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、考马斯亮蓝 R250、氨苄青霉素钠(Amp)和异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG): 上海生工生物工程股份有限公司; PCR-Advantage[®]GC 2 Kit、DNA 连接试剂盒、DNA marker (250 bp)、胶回收试剂盒和限制性核酸内切酶 *Nde* I和 *Sal* I: 日本 TaKaRa 公司; DNA 纯化试剂盒和标签蛋白纯化试剂盒: 碧云天生物技术有限公司; CaCl₂、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、甘氨酸、Tris、SDS、冰醋酸等国产分析纯试剂均购买自中国医药集团有限公司。

2.2.3 实验仪器

表 2-1 主要实验仪器
Table 2-1 Primary experimental instruments

仪器名称	型号	生产厂家
生物洁净工作台	VD650	苏净净化设备有限公司
冷冻离心机	湘仪 TGL-16M	湖南湘仪
电子分析天平	ME104E	梅特勒-托利多
全自动蒸汽灭菌锅	HVE-50	日本 SANYD
恒温培养箱	QZY-85BS	上海知楚仪器有限公司
PCR 仪	A300	杭州郎基科学仪器有限公司
核酸电泳装置	DYY-6C	北京六一仪器厂
凝胶成像系统	G: BOX iChemixR	Syngene
电热恒温鼓风箱	DHG-9071A	上海申安
PH 计	FE20K	梅特勒-托利多
超声波清洗机	KQ-500CDE	昆山市超声仪器有限公司

2.3 实验方法

2.3.1 目的基因的确定

经查阅文献获得 *Actinoplanes* sp. SE50 在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库基因组注释结果 (CP023298.1), 从 *acb* 基因簇中筛选出 *Acb D* 的编码基因 *acb D*。

2.3.2 *Acb D* 生物信息学分析

使用在线网站 SignalP 5.0 预测 *Acb D* 的信号肽和切割位点 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>), 接着使用网站 TargetP 1.1 预测亚细胞定位 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)^[104]。根据 SignalP 5.0 的预测结果去除 *Acb D* 信号肽后借助 ProtParam 计算理论相对分子质量、氨基酸数目、理论 pI、原子组成和不稳定指数等 (<http://web.expasy.org/protparam/>); 使用 NetPhos-3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) 预测分析 *Acb D* 的磷酸化位点; 利用 NCBI 工具栏中的 CDD 数据库分析 *Acb D* 所属的蛋白超家族类别及保守结构域(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 接着使用 AlphaFold v2.3.2 对 *Acb D* 进行同源建模 (<http://easy2md.com/AlphaFold2/>), 构建的模型使用 SAVES 6.0 中的 PROCHECK 模块评估质量 (<http://services.mbi.ucla.edu/>); 使用 Caver 3.0 预测 *Acb D* 底物结合口袋 (<http://caver.cz>); 借助软件 Amber 22 开展分子动力学模拟, 用 pdb4amber 去除氢键后采用 ff19SB 力场用于计算系统的力场参数^[105]。然后, 使用 TIP3P 水模型进行溶剂化并添加抗衡离子 (Na^+/Cl^-) 来中和系统, 系统能量最小化后在 500 ps 以内将系统从 0 K 分别加热到 303 (30 °C) 和 323 K (50 °C)。在规范集合系综中进行体系限制, 然后在各自温度下进行预平衡, 接着在等温等压系统中进行 100 ns 分子模拟以保持周期性边界条件, 最后使用 AmberTools23 分析动力学结果重原子的根均方偏差 (Root-mean-square deviation, RMSD)。

2.3.3 放线菌全基因组提取

将-80 °C保存的菌株取出于 4 °C解冻, 在分离、斜面培养基上采用划线法接种, 于 28 °C, 50% RH 的恒温恒湿摇床中倒置培养 5~7 天 (d), 接着使用接种

铲刮出约 1 cm² 大小菌落接至种子培养基中，于 28 °C，50% RH，220 rpm 恒温恒湿摇床中震荡培养 48 h 后用于后续基因组提取，提取放线菌全基因组的具体步骤如下：取 1 mL 培养好的菌液至 1.5 mL 离心管中，室温，8,000 rpm，离心 1 min 后弃上清收集菌体。加入 180 μL 溶菌酶使收集的菌体重悬，37 °C，水浴 40 min 后加入 400 μL Buffer 的 Digestion 并使用移液枪吹打混匀，于 65 °C 的水浴锅中放置 1 h 至细胞全部裂解。接着，加入等体积的异丙醇，上下温和颠倒 5~8 次使之与细胞裂解液混匀，放置 2~3 min 后 10,000 rpm 离心 5 min 后弃上清。加入 1 mL 75% 无水乙醇，颠倒漂洗 1~3 min，10,000 rpm 离心 5 min，去上清，随后将此步骤重复一次。最后，将离心管盖子打开倒置 5~10 min 使残留的乙醇全部挥发，所得 DNA 用 50~100 μL 的 TE Buffer 溶解，用于下一步实验。

2.3.4 目的基因的克隆

根据基因 *acb D* 的序列，结合 pCold II 多克隆位点的序列特征设计 PCR 特异性引物，本章所用到的所有引物序列见表 2-2，具体 PCR 反应条件见 PCR-Advantage[®]GC 2 Kit 操作说明书 (<https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/PT3316/PT3316-2>)，扩增结束后采用琼脂糖凝胶电泳验证，将验证正确的基因条带切胶回收，操作步骤见 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明书。

表 2-2 实验所用引物

Table 2-2 Primers used in the experiment

引物名称	序列 (5'→3')	用途
<i>acb D</i> -F ₁	<u>CATATG</u> CGGGCGCGAGTGC GGTTGT	扩增有信号肽 <i>Acb D</i> 的特异引物
<i>acb D</i> -R ₁	<u>GTCGACTAGCGCTGCCAGGTCAGGGTC</u>	
<i>acb D</i> -F ₂	<u>CATATG</u> GTTTCAGCGCCATGCGCGC	扩增无信号肽 <i>Acb D</i> 的特异引物
<i>acb D</i> -R ₂	<u>GTCGACTAGCGCTGCCAGGTCAGGGTC</u>	
pMD18-F	CAGGAAACAGCTATGAC	菌落 PCR 鉴定通用引物
pMD18-R	GTTTTCCCAGTCACGAC	
pCold II-F	ACGCCATATCGCCGAAAGG	菌落 PCR 鉴定通用引物
pCold II-R	GGCAGGGATCTTAGATTCTG	

注：下划线分别为 *Nde* I 和 *Sal* I 的酶切位点，由于本基因的 GC 比含量较高，约为 70%，因此 PCR 时使用 PCR-Advantage[®]GC 2 Kit。

2.3.5 克隆载体的构建

切胶回收后的产物与 pMD18-T 相连，连接体系与反应条件见表 2-3。

表 2-3 DNA 连接体系
Table 2-3 DNA link system

试剂	体积 (μL)
pMD18-T	1.0
胶回收产物	1.0
DNA Ligation Kit	5.0
灭菌水	3.0

感受态的制备：（1）挑取过夜培养的 *E. coli* JM109 菌落于装有 5 mL LB 液体培养基的试管中 220 rpm，37 °C 过夜培养；（2）将过夜培养的 *E. coli* JM109 菌液以 1% 的接种量转接到含 100 mL LB 液体培养基的三角瓶中，220 rpm，37 °C 培养至 OD 值为 0.4~0.5；（3）将 0.1 M CaCl₂ 溶液和 0.1 M CaCl₂-15% 甘油于冰上预冷，后续所有操作步骤均在无菌工作台和冰上；（4）将菌液分装到两个 50 mL 灭菌的离心管中，于冰上放置超 10 min；（5）4 °C，4,000 rpm 离心 5 min；（6）离心后弃上清，每个离心管中加入 20 mL 预冷的 CaCl₂，使用移液枪吹打混匀使细胞重悬，于冰上放置 20 min；（7）4 °C，4,000 rpm 离心 5 min；（8）离心后弃上清，每个离心管中加入 2 mL 预冷的 0.1 M CaCl₂-15% 甘油，使用移液枪吹打混匀使细胞重悬；（8）分装 100 μL 至灭菌的 1.5 mL 离心管中放于 -80 °C 用于后续转化实验。

蓝白斑的筛选：（1）微波炉中加热溶解 LB 固体培养基，至温度冷却至手背可以接受时的温度时加入终浓度为 1 mM 的 Amp 抗性；（2）再加入 20 μL 200 mg/mL 的 IPTG 和 100 μL 20 mg/mL 的 X-Gal 将三者混匀后倒平板，倒好的平板避光正置使培养基充分吸收药品；（3）从 -80 °C 取出保存的感受细胞放至冰上融化，加入 10 μL 的连接产物，轻轻吹打混匀，冰上放置 30 min，接着在 42 °C 水浴锅中热激 80 s，此过程切勿摇动试管；（4）热激结束后将离心管移至冰上放置 10 min；（5）往离心管中 400 μL 的 LB 液体培养基，37 °C、220 rpm 培养 1 h 使菌体复苏；（6）复苏后的菌体于室温下 6,000 rpm 离心 5 min，弃 400 μL 上清液后使用移液枪吹打混匀；（7）将混匀后的菌体涂布至平板上，37 °C 培养箱中正置

培养 1 h 后倒置过夜。

转化子的检测：（1）在超净工作台中用白色枪头在过夜培养的平板上挑取 1 个蓝斑（对照）和若干个白斑，接种到含 5 mL LB 液体培养基（Amp 终浓度为 1 mM）的试管中；（2）将试管放入摇床中 37 °C、220 rpm 培养 5 h；（3）按照表 2-4 配制菌液 PCR 的反应体系。

表 2-4 菌液 PCR 反应体系
Table 2-4 PCR system of bacterial solution

试剂	体积	条件
ddH ₂ O	17.25	预变性：95 °C 5 min
10 x Ex Taq Buffer	2.5	变性：95 °C 30 s
dNTP	3.0	退火：47 °C 30 s
pMD 18-F	0.5	延伸：72 °C 1 min
pMD 18-R	0.5	30 个循环
菌液	1.0	充分延伸：10 min
rTaq 聚合酶	0.25	保存：4 °C

PCR 反应完成后进行琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果，将菌液 PCR 验证正确的克隆质粒命名为 pMD18-T-*acb D*，送至测序公司测序。

2.3.6 表达载体的构建

提取克隆载体 pMD18-T-*acb D*，分别用 *Nde* I 和 *Sal* I 处理质粒 pCold II 和克隆载体 pMD18-T-*acb D*，双酶切反应体系见表 2-5。

表 2-5 双酶切反应体系
Table 2-5 Double enzyme digestion reaction system

反应体系	pCold II (20 μL)	pMD18-T- <i>acb D</i> (20 μL)
10 x H Buffer	2	2
超纯水	16	16
<i>Nde</i> I	1	1
<i>Sal</i> I	1	1

接着，将双酶切后的产物分别使用试剂盒纯化，纯化步骤如下：（1）往 DNA 样品中加入与样品等体积的溶液 I 使二者混匀；（2）把混匀后的样品移至 DNA

纯化柱内，室温放置 1 min。通常室温放置数秒待溶液浸润到纯化柱中即可；（3）室温，12,000 rpm，离心 1 min 后倒掉收集管内的液体；（4）加入 700 μL 溶液 II 至 DNA 纯化柱内，室温放置 1 min；（5）12,000 rpm 离心 1 min，此步骤是为了洗去杂质，离心后弃去收集管内的液体；（6）加入 500 μL 溶液 II，12,000 rpm 离心 1 min，此步骤是为了进一步洗去杂质，倒掉收集管内的液体；（7）12,000 rpm，离心 1 min，此步骤是为了去除残留液体并让乙醇充分挥发；（8）将 DNA 纯化柱置于一个干净的 1.5 mL 离心管上，往管内柱面上加入 30 μL 溶液 III，放置 1 min；（9）12,000 rpm 离心 1 min 后得到的液体即为高纯度 DNA，接着将纯化后的产物按照表 2-6 的体系于 17 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜。

表 2-6 DNA 连接体系
Table 2-6 DNA link system

试剂	体积 (μL)
纯化的 pCold II	5.0
纯化的基因片段	3.0
T ₄ DNA Ligase	1.0
10 x T ₄ DNA Ligase Buffer	1.0

按照 2.3.5 所述的方法制备 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞并进行转化，采用 Amp 抗性平板筛选重组子，在过夜培养的平板上挑取数个单菌落，按照表 2-4 的体系用菌液 PCR 验证，通用引物 pMD 18-F/pMD 18-R 改为通用引物 pCold II-F/pCold II-R；退火温度变成 53 $^{\circ}\text{C}$ ，其他条件相同。待 PCR 结束后采取琼脂糖凝胶电泳验证，验证正确的结果送至测序公司测序，将测序正确的菌株命名为 *E. coli/acb D*。

2.3.7 重组菌株的诱导表达

以 1% 的接种量将保藏的 *E. coli/acb D* 接种至 5 mL LB 的液体培养基（Amp 终浓度为 1 mM），37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 rpm 过夜培养。将过夜培养的种子液，以 1% 的接种量接种至 100 mL LB 的锥形瓶中，待培养至 OD_{600} 值为 0.6 时加入 IPTG（终浓度为 0.4 mM），15 $^{\circ}\text{C}$ ，220 rpm 诱导表达 24 h 后离心收集菌体（12,000 rpm，2 min）。接下来将收集的菌体用 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液（100 mM，pH 7.5，

1 mM Ca^{2+}) 重悬, 后将菌液稀释至 OD_{600} 达到 7.5 时经超声波破碎, 超声条件为功率 30%、超声开 3 s 关 5 s, 总时间为 30 min。将超声破碎后的菌体使用冷冻干燥离心机在 4 °C 离心 (12,000 rpm, 5 min), 离心后通过亲和层析获得纯酶, 具体纯化操作步骤见标签蛋白纯化试剂盒说明书, 接着使用 SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达情况。

2.4 结果与讨论

2.4.1 基本理化性质分析

根据 SignalP 5.0 预测的结果可知 Acb D 存在信号肽, Sec/SPI 存在的概率为 0.9569。切割位点可能位于第 26 个氨基酸和 27 个氨基酸之间, 见图 2-1, 后续用于分析的序列均为去除信号肽的序列。

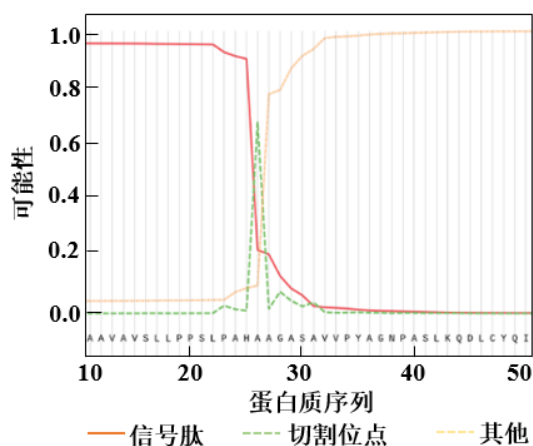


图 2-1 信号肽及其切割位点

Figure 2-1 Signal peptide analysis

蛋白质的磷酸化对于酶蛋白本身有许多重要意义, 许多酶蛋白的活性可通过磷酸化位点的磷酸化与去磷酸化来调节, 比如糖原合成酶, 其特定丝氨酸残基磷酸化后会失去活性, 从而抑制糖原合成; 一些蛋白质通过磷酸化位点的修饰来改变自身的定位, 比如细胞周期蛋白 B 在间期时, 其 Thr14 和 Tyr15 位点磷酸化, 使它滞留在细胞质中^[106-107]。Acb D 的磷酸化位点预测结果见图 2-2, 图 2-2 中的 Threshold 代表着磷酸化位点的基准线, 当氨基酸的数值超过基准线说明在此处存在着磷酸化位点, Serine 为丝氨酸, Threonine 为苏氨酸, Tyrosine 为色氨酸。由图 2-2 中可以看出, Acb D 存在着多个磷酸化位点, 其中丝氨酸的磷酸位点位

于 4、15、30、87、172、239、243、250、266、280、292、302、377、406、505、539、581、614、640 和 645 位氨基酸上；苏氨酸的磷酸化位点位于 26、70、120、143、289、296、313、325、337、358、473、491、529、542、561、590、593、683、691 和 695 位氨基酸上；色氨酸的磷酸位点位于 159、189、193、270、288、368、384、396、417、430、465 和 682 位氨基酸上，推测存在多个磷酸化位点的原因可能是由于 Acb D 蛋白的跨膜运输。

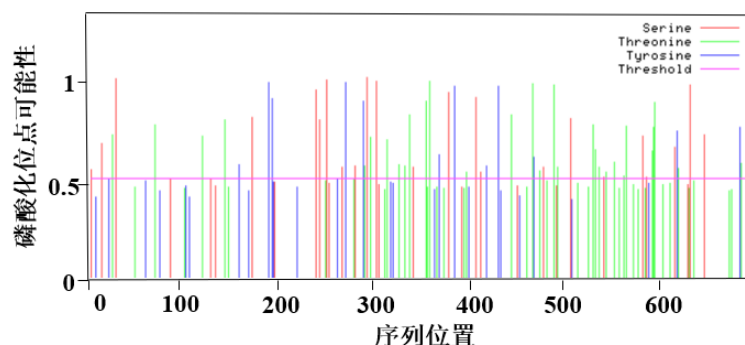


图 2-2 磷酸化位点分析结果

Figure 2-2 Analysis results of the phosphorylation sites

根据 Protparam 分析结果可知，Acb D 分子式为 $C_{3324}H_{5068}N_{940}O_{1048}S_{12}$ ，由 698 个氨基酸组成。其分子量为 75,351.20 Da；理论等电点为 5.02，偏酸性；带负电荷即 Asp 和 Glu 共 82 个，带正电荷即 Arg 与 Lys 共 58 个；失稳指数是判断蛋白质分子是否为稳定蛋白的一个重要参数，当失稳指数值大于 40 时，就可判定该蛋白是一个不稳定蛋白，当失稳指数值小于 40 时，就可判定该蛋白是一个稳定蛋白，分析显示 Acb D 的不稳定指数为 24.37，可判断 Acb D 是一个稳定蛋白；疏水性指数（GRAVY）的值与蛋白的亲疏水性相关，蛋白的 GRAVY 值大于 0 时可判定蛋白为疏水蛋白，蛋白的 GRAVY 值小于 0 时可判断蛋白为亲水蛋白，预测结果表明 Acb D 的 GRAVY 值为 -0.440，该值小于 0，可判断 Acb D 是一个亲水蛋白，其各个氨基酸位点亲水值见图 2-3；TargetP 1.1 亚细胞定位显示 Acb D 分布在细胞外。

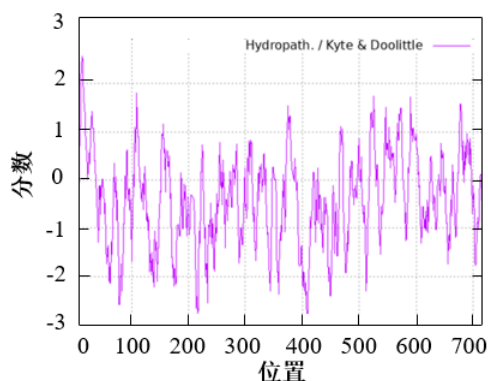


图 2-3 疏水性分析

Figure 2-3 Hydrophobicity analysis

2.4.2 一级序列分析

使用 NCBI 的 CDD 数据库预测 Acb D 的结构域，结果见图 2-4，由图 2-4 可知序列 17~411 个氨基酸属于 α -淀粉酶（GH13）超家族，其特定匹配在 CGTase 区域。 α -淀粉酶家族均含有 A、B、C 三个保守结构域，而 CGTase 除 α -淀粉酶家族共有的三个结构域外，还具有两个特有的结构域 D 和 E（CBM20），已有的研究表明 Acb D 和 CGTase 有着五个相同的结构域^[108]。保守结构域中的关键氨基酸位点是高度保守的，A 域是由 8 个 α -螺旋和 8 个 β -折叠组成的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状催化域，B 是位于 A 域第三个 α -螺旋和 β -折叠之间的一个环状区域，A 与 B 域之间存在一个活性位点裂隙，由催化三联体（Asp、Glu 和 Asp）组成，该三联体在所有 α -淀粉酶中高度保守^[109]。保守的钙离子结合位点位于 A 域和 B 域之间的界面上，它的作用是稳定酶与底物的结合裂隙^[110]。C 域是 β -片状结构，其包含一个麦芽糖结合位点，可推测在 Acb D 的 C 域也可与某些糖及其取代物结合。氨基酸序列 421~508 个氨基酸是 α -淀粉酶的 C 端结构域^[11-112]。序列 514~593 个氨基酸是与 CGTase 相似的 D 结构域，该结构域的功能尚未明确^[113]。序列 595~684 个氨基酸是 CBM20 域，也称淀粉结构域，该结构存在于大量淀粉降解酶中^[114]。

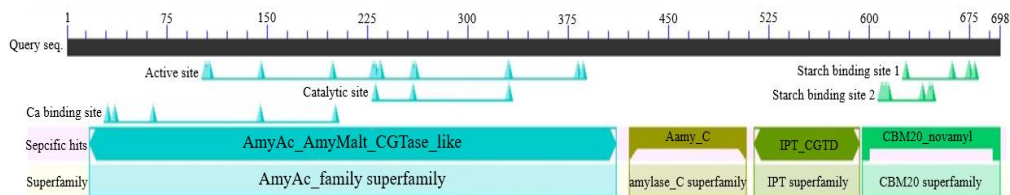


图 2-4 保守结构域预测

Figure 2-4 Conservative domain prediction

2.4.3 同源建模及模型结构评估

研究表明,蛋白质的一级结构决定其空间结构,空间结构继而影响着蛋白质的活性功能,因此模型的构建对酶蛋白活性功能的研究有重要意义^[115]。以 Acb D 的一级序列为基础,使用 AlphaFold v2.3.2 对 Acb D 的空间结构进行建模,建模后的模型结构见图 2-5。

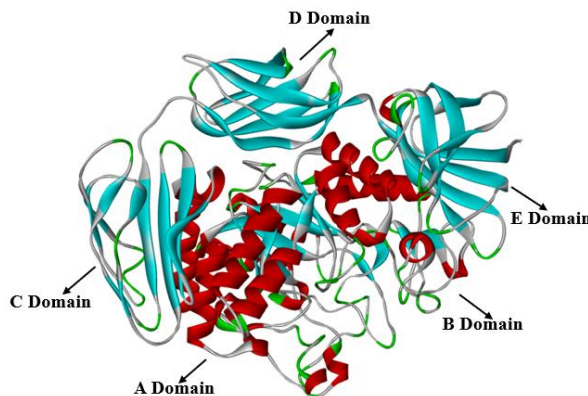


图 2-5 Acb D 的三维结构

Figure 2-5 Three-dimensional structure of Acb D

使用 SAVES 6.0 中 PROCHECK 的板块来评估同源建模后的模型质量,拉式图可通过展示氨基酸残基在空间中可能的构型帮助评估蛋白质构型的合理性。根据拉氏图分析结果可知,建模的模型有 99.7%氨基酸残基落在允许区和最大允许区,表明该同源建模模型的质量可信度较高,模型评估的拉式图见图 2-6。随后,使用 Caver 3.0 预测该模型的底物结合口袋,结果显示 Acb D 的底物结合口袋可能位于 A 结构域和 B 结构域之间,该结果同保守结构域的预测结果一致。

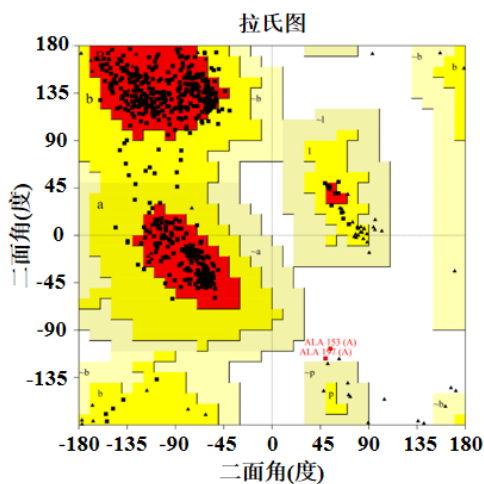


图 2-6 Acb D 的三维结构

Figure 2-6 Three-dimensional structure of Acb D

2.4.4 分子动力学模拟

通过分子动力学的模拟可初步预测蛋白质自身的热稳定性质,蛋白自身的温度性质与功能活性有着密切的关系。在动力学模拟的参数中,RMSD 值表示在特定条件下蛋白质的构象与原始结构之间的平均偏差,RMSD 值越小说明蛋白质的结构就越稳定^[116]。如图 2-7 所示,在体系趋于平衡时 Acb D 在 30 °C (303 K) 的 RMSD 值比在 50 °C (323 K) 的值低且变化幅度小,说明 Acb D 在 30 °C 的环境中结构较为稳定。

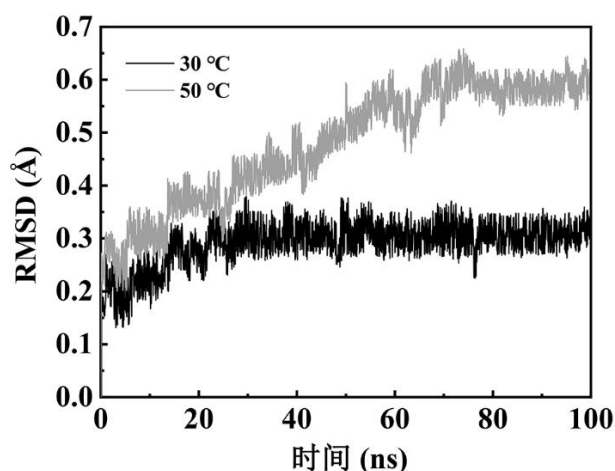
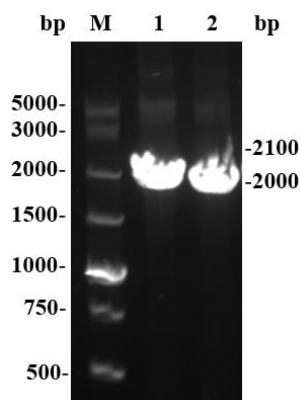


图 2-7 阿卡波糖的反应进程

Figure 2-7 Reaction process of acarbose

2.4.5 目的基因的扩增

以提取的游动放线菌全基因组为模板, *acb D*-F₁/*acb D*-R₁ 和 *acb D*-F₂/*acb D*-R₂ 引物分别扩增有信号肽和无信号肽的 *acb D* 基因。扩增后的结果采用琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示分别在 2100 bp 和 2000 bp 处有目的条带(检测结果见图 2-8),说明基因 *acb D* 成功被克隆出,将目的片段切胶回收,为后续实验做准备。



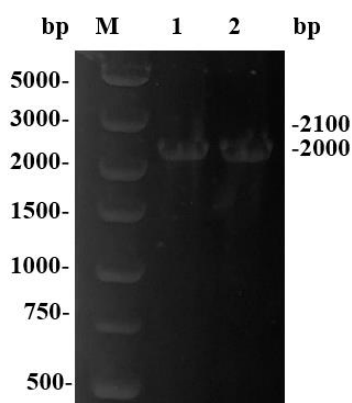
泳道 M: Maeker; 泳道 1: 有信号肽的 *acb D*; 泳道 2: 无信号肽的 *acb D*

图 2-8 核酸电泳检测结果

Figure 2-8 Nucleic acid electrophoresis detection result

2.4.6 重组菌株的构建

提取测序结果正确的克隆质粒 pMD 18-T-*acb D*, 按照表 2-5 中的反应体系使用限制酶 *Nde* I 和 *Sal* I 分别将其和 pCold II 进行双酶切, 反应完成后按表 2-6 中的反应体系将二者连接。接着, 将构建好的表达质粒 pCold II-*acb D* 转化至提前制备好的 *E.coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中, 使用含 Amp 抗性的 LB 平板对筛选重组子, 挑取过夜培养的单菌落至 5 mL LB 液体培养基中 (Amp 终浓度为 1 mM), 37 °C、220 rpm 摇床中培养 4~5 h, 用通用引物 pCold II-F/pCold II-R 进行菌液 PCR, PCR 结束采用琼脂糖凝胶电泳检测, 由图 2-9 可知在 2100 bp 和 2000 bp 处均有目的条带, 表明重组菌株 *E. coli/acb D* 构建成功。



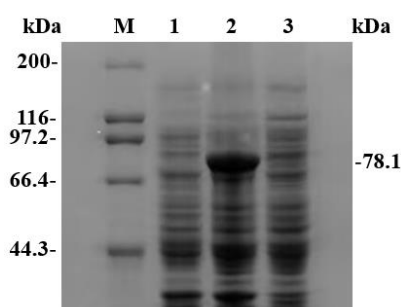
泳道 M: Maeker; 泳道 1: 有信号肽的 *acb D*; 泳道 2: 无信号肽的 *acb D*

图 2-9 菌液 PCR 结果

Figure 2-9 Bacterial liquid PCR result

2.4.7 重组菌株的诱导表达结果

将重组菌株 *E. coli/acb D* 诱导表达 24 h 后收集菌体，收集的菌体使用磷酸盐缓冲液重悬，使用 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达情况。由图 2-10 可知，对比泳道 1，泳道 2 在 78.1 kDa 处出现了蛋白的过量表达，由此可知，重组蛋白在 *E. coli* BL21 (DE3) 中成功实现了异源表达，但通过对比泳道 2 和泳道 3 发现，重组蛋白在上清中存在的量较少，大部分以包涵体的形式存在，后续对去除信号肽的蛋白及表达条件进行探索。



M: 蛋白质 marker; 泳道 1: *E. coli/pCold II* 全细胞; 泳道 2: *E. coli/acb D* 全细胞; 泳道 3: *E. coli/acb D* 破碎上清

图 2-10 SDS-PAGE 分析结果

Figure 2-10 SDS-PAGE analysis of recombinant Acb D expressed in *E. coli/acb D*

2.5 本章小结

通过 NCBI 挖掘获得 Acb D 蛋白的编码基因 *acb D*，借助生物信息学手段预测其理化性质并对一级序列和空间结构进行分析。通过信号肽分析可知，Acb D 存在信号肽，切割位点位于第 26~27 个氨基酸之间；基本理化性质分析可知，Acb D 由 698 个氨基酸组成，其分子量为 75,351.20 Da；理论等电点为 5.02，偏酸性，是一个稳定的亲水蛋白；通过 TargetP 1.1 亚细胞定位分析显示 Acb D 分布在细胞外；通过 NetPhos-3.1 网站分析结果可知，Acb D 存在着多个糖基化位点；通过一级序列分析结果显示，Acb D 与 CGTase 的同源性最高，与 CGTase 一样有着相同的五个结构域。接着，使用 AlphaFold v2.3.2 对 Acb D 进行同源建模并采用 SAVES 6.0 来评估建模结构；Caver 3.0 预测 Acb D 的底物结合口袋可能位于 A 结构域和 B 结构域之间，这与保守结构域的预测结果一致；使用分子动力学软件对 Acb D 的温度稳定进行模拟，结果发现 Acb D 在 30 °C 的环境中较为稳定。随后，对 *acb D* 基因进行克隆以 pCold II 为载体将其转化至 *E. coli* BL21

(DE3), 诱导表达的结果使用 SDS-PAGE 检测, 成功实现了 *acb D* 基因在 *E. coli* BL21 (DE3) 的异源表达。

第3章 重组 Acb D 酶学性质测定及转糖基活性分析

3.1 引言

阿卡维基转移酶 (Acarviosyltransferase, ATase) 是唯一能够以阿卡波糖为底物的糖基转移酶且不受阿卡波糖的抑制, 其具体功能是将多种寡糖类物质转移到阿卡维基上与阿卡波糖及其同系物的形成相关, 在游动放线菌发酵生产阿卡波糖的代谢过程中起着关键作用^[32]。由于基因组学和代谢组学等方面技术的发展, 阿卡波糖的生产菌株的全基因组也已被公布, 因此阿卡波糖的代谢路径也逐步明晰, 其中参与到代谢途径中各个酶的基因和功能也被发掘出来^[117]。但目前为止, 有关 Acb D 的催化功能和机制在国内外却鲜有人研究, 因此明确该酶的功能对进一步完善微生物生产阿卡波糖的代谢途径有重要意义^[118]。此外, 经市场调查可知该酶与阿卡波糖同系物的形成相关, 各个杂质组分标品的价格在每 10 mg 几千至几万元不等, 因此明确该酶的催化机制和性能, 探究该酶与阿卡波糖及其同系物间的形成关系不仅可以提升阿卡波糖的产品质量, 在杂质组分标品的售卖方面也具有广阔的市场。

前两章我们借助生物信息学分析初步预测了该酶的理化性质和模型结构, 通过基因表达操作手段获得了重组菌株 *E. coli/acb D*, 在本章我们将优化重组 Acb D 的诱导表达条件, 随后确定活检测方法, 继而探索反应时间、反应温度、pH 和不同糖基供体的条件下对重组酶催化活性产生的影响。

3.2 实验材料

3.2.1 菌株及培养基

含有空载表达质粒 pCold II 的菌株 *E. coli/pCold II* 和含有基因 *acb D* 的重组菌株 *E. coli/acb D* 由本实验室保藏, 本章所用的培养基配方如下:

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10、酵母提取物 5、NaCl 10, pH 6.5~7.0; 固体培养基另外添加琼脂 20。培养基需在 121 °C, 25 min 灭菌后使用。

3.2.2 实验试剂

醋酸钠、冰醋酸、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 NaOH 等国产分析纯试剂均购买自中国医药集团有限公司，另本章所用到的所有糖基供体见表 3-1，均购买自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

表 3-1 糖基供体汇总
Table 3-1 Summary of glycosyl donors

类别	名称	CAS No.
单糖	D-葡萄糖	50-99-7
	L-葡萄糖	921-60-8
	D-木糖	58-86-6
	L-木糖	609-06-3
	D-果糖	7660-25-5
	L-阿拉伯糖	5328-37-0
	D-甘露糖	3458-28-4
	L-鼠李糖	10485-94-6
	L-山梨糖	87-79-6
双糖	麦芽糖	69-79-4
	木二糖	6860-47-5
	D-纤维二糖	528-50-7
	D-蔗糖	57-50-1
	D-海藻糖	99-20-7
	D-乳糖	63-42-3
三糖	麦芽三糖	1109-28-0
	棉子糖	512-69-6
糖类衍生物	2-脱氧-D-葡萄糖	154-17-6
	α -D-甲基葡萄糖苷	97-30-3
	D-水杨苷	138-52-3
	麦芽糖醇	585-88-6

3.2.3 实验仪器

本章所用到的主要仪器见表 3-2，其他重复仪器见表 2-1。

表 3-2 主要仪器
Table 3-2 Primary instruments

仪器名称	型号	生产厂家
恒温水浴摇床	WS-100	杭州佑宁仪器有限公司
蛋白电泳装置	PowerPac™	美国Bio-Rad公司
全自动雪花制冰机	IMS-20	常熟市雪科电器有限公司
超声波清洗机	KQ-500CDE	昆山市超声仪器有限公司
超声波细胞破碎仪	JY92-IIDN	宁波新芝生物技术股份有限公司
色谱柱	Hypersil APS-2NH ₂	美国赛默飞世尔科技公司
高效液相色谱仪	2695	美国 Waters 公司

3.3 实验方法

3.3.1 诱导条件的优化

前期的实验构建了重组菌株 *E. coli/acb D*，但诱导表达后重组蛋白大部分都以包涵体的形式存在。经查阅文献得知信号肽的存在与包涵体的形成有密切的关系^[119]。根据前期的预测结果显示 *Acb D* 可能存在信号肽，因此后续我们将氨基酸序列的原始密码子输入相关网站（JAVA Codon Adaptation Tool）根据大肠杆菌对密码子的偏好性对密码子进行优化并对重组菌株进行了诱导表达。此外，包涵体的形成与蛋白生产的速度也有着很大的关系，因此在后续的实验，我们分别将诱导剂的终浓度设为 0.4 mM、0.3 mM、0.2 mM、0.1 mM 和 0.05 mM，诱导表达后再次使用 SDS-PAGE 观察目的蛋白的表达情况。

3.3.2 酶活检测的条件建立

重组 *Acb D* 的活性检测方法采用高效液相色谱，外标法，其检测条件为：Thermon Fisher Hypersil APS-2NH₂ 色谱柱（250 × 4.6 mm，Φ 5 μm），流动相为 KH₂PO₄-Na₂HPO₄（3.16 mM，pH=6.8）:乙腈 = 30:70（v/v），紫外检测波长 210 nm，流速 1.0 mL/min、柱温为 40 °C、进样体积 10 μL，在以上检测条件下阿卡

波糖的保留时间约为 13 min。本文中，酶活力定义为在测定条件下每 h 消耗 1 μg 阿卡波糖所需要的酶量为一个活力单位 (U)。

3.3.3 反应进程的考察

同时以阿卡波糖和麦芽三糖为底物，反应体系的构建参考前期报道的方法为基础稍作修改^[49]：6 mL 的底物溶液（含有阿卡波糖和麦芽三糖，终浓度均为 2 mg/mL），加入 4 mL 酶液在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.5、水浴摇床震荡下反应 24 h，期间分别在 0 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h 和 24 h 取样 600 μL ，每个样加入 600 μL 无水乙醇终止反应。反应液离心（12,000 rpm，5 min）后获得的上清经 0.22 μm 滤膜过滤后采用 HPLC 检测阿卡波糖的剩余量，绘制反应时间-阿卡波糖浓度曲线。

3.3.4 重组 Acb D 最适温度和温度稳定性考察

为确定重组蛋白的最适催化温度，按照 3.3.3 所构建的催化体系，反应时间与温度范围分别设置为 20 h 和 15~45 $^{\circ}\text{C}$ （间隔 5 $^{\circ}\text{C}$ ），测定酶液的比活力，设活性最高者即最适温度下 Acb D 的比活力为 100%，绘制温度-相对比活力曲线。关于温度稳定性方面，将酶液在 15~45 $^{\circ}\text{C}$ （每间隔 5 $^{\circ}\text{C}$ ）环境下保温 5 h，后按照 3.3.3 所述构建的催化体系在最适温度下反应 20 h，分别测定酶液的剩余比活力，将未经保温处理的酶液比活力设为 100%，绘制温度-相对比活力曲线。

3.3.5 重组 Acb D 最适 pH 的考察

为确定重组 Acb D 的最适反应 pH，分别配制 100 mM 的醋酸钠-醋酸（pH 4.0~6.0）、 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 （pH 6.0~8.0）和 NaOH -甘氨酸（pH 8.0~10.0）缓冲液（均含 1 mM Ca^{2+} ），按照 2.3.6 所述的实验方法分别制备酶液，在最适温度下反应 20 h 后测定比酶活，设酶活性最高者，即最适 pH 下 Acb D 的比活力为 100%，绘制 pH-相对比活力曲线。

3.3.6 重组 Acb D 催化不同糖基供体的活性测定

为了进一步探究重组 Acb D 的底物谱，即探究该酶在不同糖基供体下催化活性的差异，将原本催化体系中的麦芽三糖分别替换为 21 种常见单、双、三糖

以及糖类衍生物（表 3-1），各个底物组分的终浓度均为 2 mg/mL，按照 3.3.3 所述构建反应体系并置于最适温度和 pH 下反应 20 h，反应结束后测定比活力，并以麦芽三糖作糖基供体时 Acb D 的活力为标准（100%）计算相对值。

3.4 实验结果

3.4.1 密码子的优化

密码子优化是一种通过增加靶基因的翻译效率来提高生物体内蛋白质表达水平的新技术。通常会通过避免稀有密码子，利用偏爱密码子(Preferred codons)、简化 mRNA 的二级结构、优化重复序列、消除限制酶切位点、调整 GC 含量等方法重新设计基因，以提高翻译效率，进而提高蛋白表达水平^[120]。密码子优化主要利用原理是不同的物种编码某氨基酸所使用的密码子偏好性不同，主要原因是不同物种内氨基酸对应的 tRNA 丰度不同，但若在进行密码子优化的时候仅仅把密码子同义替换为该物种密码子对应 tRNA 浓度最高的那个密码子，往往起不到最佳效果，有可能还适得其反^[121]。密码子适应指数（Codon adaptation index, CAI）是衡量基因密码子使用偏好与宿主细胞密码子偏好适配程度的重要指标，常用于评估基因在特定宿主中的表达潜力，图 3-1 为优化前后的密码子适应指数^[122]。

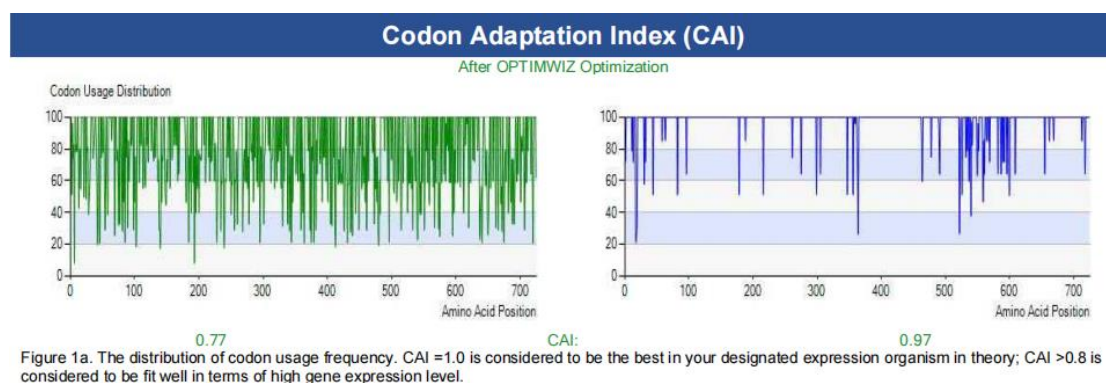


图 3-1 密码子适应指数

Figure 3-1 Codon adaptation index

最优密码子频率（Frequency of optimal codons, FOP）是衡量基因中最优密码子使用情况的指标，是指在某物种高表达基因中使用频率最高的密码子，也有人将一个氨基酸的最优密码子定义为具有最大数量的带有其反密码子 tRNA 基

因的密码子^[123]。FOP 指最优密码子在基因中出现的频率，它在一定程度上能反映外源基因在宿主细胞中的表达情况。FOP 值越高，说明该基因中最优密码子的使用频率越高，这表明该基因在宿主细胞中的翻译效率可能越高，就越有利于基因表达；反之，FOP 值低可能意味着基因表达效率相对较低，图 3-2 为优化前后的最优密码子频率。

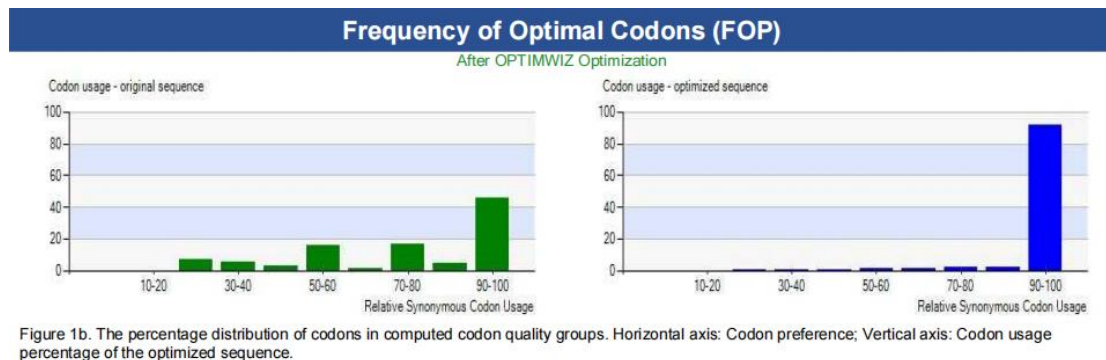
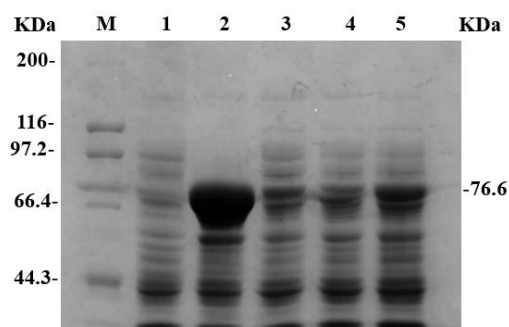


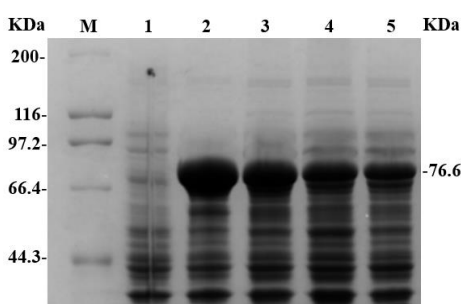
图 3-2 最优密码子频率
Figure 3-2 Frequency of optimal codons

3.4.2 诱导剂浓度的优化

包涵体是指在某些细胞内，因生物大分子如蛋白质等聚集而形成的具有一定形态的结构。一方面，存在信号肽的蛋白质由于原核宿主细胞不能识别信号肽，就容易形成包涵体。另一方面，在蛋白表达过程中蛋白表达量过高，细胞内折叠机制负担过重，新生肽链不能及时正确折叠也会相互聚集形成包涵体^[124]。在基因水平上去除信号肽后，诱导剂的浓度会直接影响着蛋白表达的速度，这和包涵体的形成可能会存在极大的关系。由图 3-3 可知，将 IPTG 的终浓度分别设为 0.4 mM、0.3 mM、0.2 mM、0.1 mM 和 0.05 mM 时，发现随着 IPTG 终浓度的降低全细胞的蛋白表达量在降低，但蛋白可溶性表达含量在逐步增高，并且在 IPTG 终浓度为 0.1 mM 时达到最大值，最终确定添加 IPTG 的终浓度为 0.1 mM，后续诱导蛋白表达时 IPTG 的终浓度均为 0.1 mM。



M:Marker; 泳道 1: 对照; 泳道 2: 全细胞 (IPTG 终浓度 0.4 mM); 泳道 3: 破碎上清 (0.4 mM); 泳道 4: 破碎上清 (0.3 mM); 泳道 5: 破碎上清 (0.3 mM)



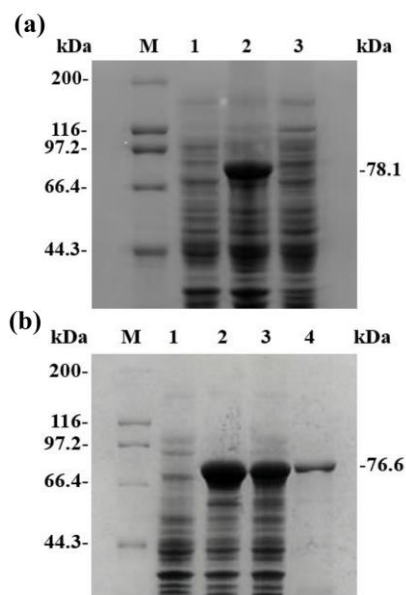
M:Marker; 泳道 1: 对照; 泳道 2: 全细胞 (0.1 mM); 泳道 3: 破碎上清 (0.1 mM) 泳道 4: 全细胞 (0.05 mM); 泳道 5: 破碎上清 (0.05 mM)

图 3-3 不同 IPTG 浓度的 SDS-PAGE 分析结果

Figure 3-3 SDS-PAGE analysis results of different IPTG concentrations

3.4.3 信号肽对重组蛋白可溶性表达的影响

由 SignalP 5.0 预测结果显示 Acb D 可能存在信号肽, 研究表明, 信号肽的主要功能是引导蛋白质到特定的细胞位置进行分泌或跨膜运输, 若信号肽序列异常或与宿主细胞内的转运机制不匹配, 蛋白质就可能无法正确定位到合适的细胞器或细胞外空间, 而在细胞质等不适当的位置积累, 进而增加聚集形成包涵体的概率^[125]。将未去除信号肽序列的基因分别在 *E. coli* BL21 (DE3) 异源表达后并诱导出重组蛋白, 诱导后的蛋白借助软件 Quantity One 分析 SDS-PAGE 的结果显示, 未切除信号肽的重组 Acb D 几乎全部以包涵体形式存在 (图 3-4a, 泳道 2 和 3)。从基因水平上切除信号肽的核苷酸序列后, *E. coli/acb D* 的破碎后的上清液在 76.6 kDa 处存在明显的目的蛋白条带 (图 3-4b, 泳道 2 和 3), 表观分子量略高于其理论分子量, 重组 Acb D 切除信号肽后可溶性表达量提高了 23.4 倍。以上结果证明信号肽对异源蛋白的可溶性表达有着较大负面作用。



M: 蛋白质 marker; 1: *E. coli*/pCold II全细胞; 2: *E. coli/acb D* 全细胞; 3: *E. coli/acb D* 破碎上清; 4: 纯化后的重组 Acb D

图 3-4 重组 Acb D 在信号肽切除前(a)和后(b)在 *E. coli/acb D* 内表达的 SDS-PAGE 分析
Figure 3-4 SDS-PAGE analysis of recombinant Acb D expressed in *E. coli/acb D* before (a) and after (b) signal peptide excision

3.4.4 时间对重组 Acb D 催化活性的影响

阿卡波糖代谢进程需要多种酶协同参与反应，如 4- α -葡萄糖基转移酶、氨基转移酶、葡萄糖-1-磷酸胸腺嘧啶转移酶等，每种酶都有其特定的作用和功能，且这些酶促反应相互关联、相互影响，任何一个环节出现问题都可能影响整个代谢过程，这致使其中多个酶促反应耗时颇长。例如，由 *acb Q* 基因编码的 4- α -葡萄糖基转移酶，在检测酶活性时，需与底物反应 5 h；而由 *acb V* 基因编码的氨基转移酶以及由 *acb A* 基因编码的葡萄糖-1-磷酸胸腺嘧啶转移酶，在检测酶活性时，分别需要 6 h 和 12 h，相关依据可参考文献^[29,34]。从图 3-5 的反应进程曲线能够清晰发现，当酶促反应进行到 20 h 后，阿卡波糖的浓度几乎不再下降。由此确定，重组 Acb D 与底物的反应时长为 20 h，后续实验的反应时间均以此为标准。

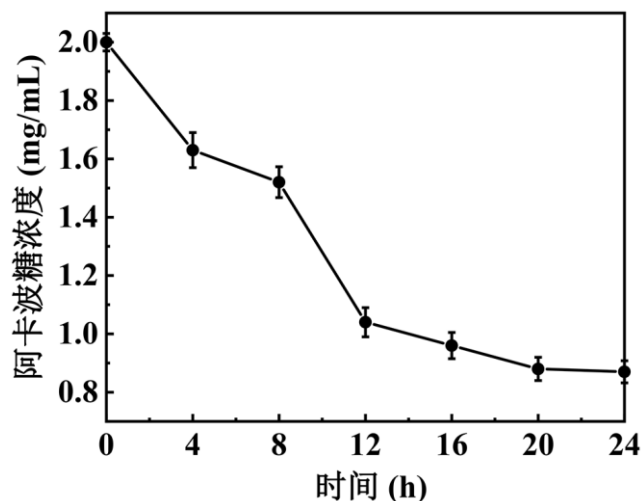


图 3-5 阿卡波糖的反应进程

Figure 3-5 Reaction process of acarbose

将 *Actinoplanes* sp.胞外分泌的原始 Acb D 作为参照酶样,此次反应进程相较于原始的 Acb D 缩短了 4 h。对比图 3-6 中反应 0 h 和 20 h 的液相色谱图,可明显观察到,反应 20 h 后,阿卡波糖的含量显著降低,并且在 19.5 min 时出现了新的物质峰,这一结果与许贤恩的研究成果^[49]相符。

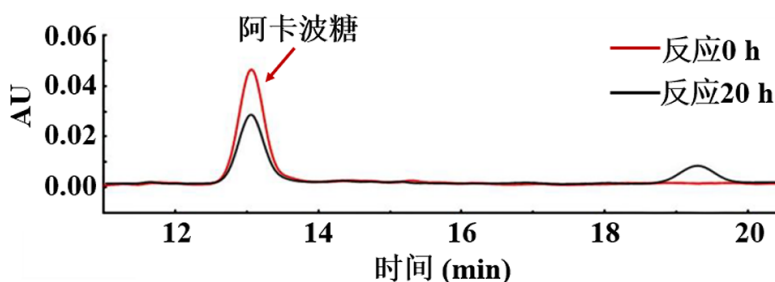


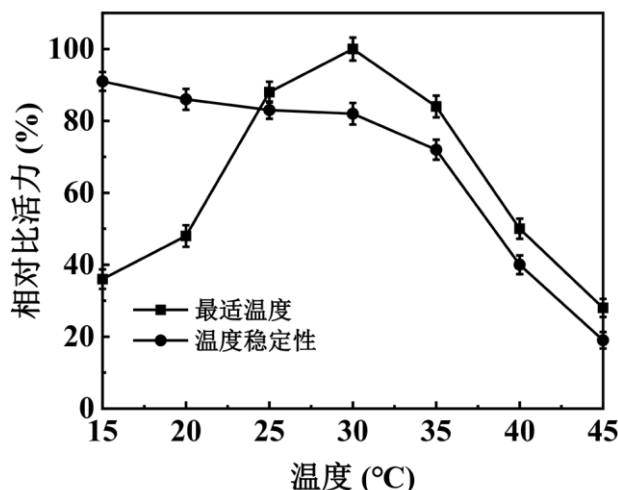
图 3-6 重组 Acb D 催化阿卡波糖与麦芽三糖反应的 HPLC 图

Figure 3-6 HPLC spectrogram of reaction between acarbose and maltotriose by recombinant Acb D

3.4.5 重组 Acb D 的温度特性

温度主要通过能够通过对酶分子的结构、对底物和反应体系和对酶促反应动力学的影响对酶的催化活性产生影响^[126]。因此,我们探讨了在一定范围的温度下重组 Acb D 的酶活性与温度变化产生的关系。由图 3-7 中可知,当反应温度处于 15 °C至 30 °C这个区间时,重组 Acb D 的酶活性会随着温度的上升而逐步提高。然而,一旦温度超过 30 °C,随着温度的继续升高,酶活性便会快速下降。基于此实验结果,我们可以推测出重组 Acb D 的最适宜反应温度为 30 °C,这一

结果与原始 Acb D 的情况是一致的。从图 3-7 中,我们能够清晰地看到,当孵育温度设定为 40 °C 时,酶的比活力仅仅是未处理酶液的 39.0%。通过此次实验可以得知,实验测定的热稳定性与分子动力学模拟中 RMSD 分析的结果相互吻合,即重组 Acb D 的耐热性能较为普通,不太适合在温度较高的环境中进行反应。为了满足工业生产环境的实际需求,后续可以借助定向改造等技术手段,来提升 Acb D 的耐热性,文献^[127]对类似技术应用有参考。



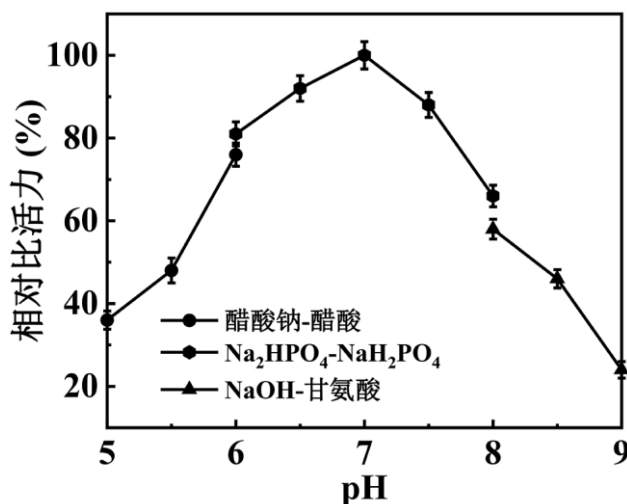
(100%相对比活力的值为 49.76 U/mL)

图 3-7 温度对重组 Acb D 催化活力的影响

Figure 3-7 Effect of temperature on the catalytic activity of recombinant Acb D

3.4.6 重组 Acb D 的最适 pH

在不同的 pH 环境下,酶蛋白分子表面以及活性中心的氨基酸残基会发生离子化现象。这种离子化导致电荷改变,进而对酶分子内部的静电相互作用产生影响。这一系列影响包括改变酶的空间构象,干扰酶与底物结合形成中间复合体的过程,以及改变催化活性部位的电离状态,最终使得酶的活性受到影响^[128]。从图 3-8 中能够看出,重组酶 Acb D 在 pH 值接近中性缓冲液里稳定性较好,对酸性和碱性环境都较为敏感。当 pH 值处于 5.0~7.0 这个区间时,随着 pH 值逐渐升高,该酶的催化活性也随之增强。然而,当 pH 值超过 7.0 后,催化活性却会随着 pH 值的上升而降低。基于此,我们可以推测重组 Acb D 的最佳反应 pH 值为 7.0,这与原始 Acb D 的最适 pH 值是一样的。另外,在相同的 pH 值(6.0 和 8.0)条件下,重组 Acb D 在 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 磷酸盐缓冲体系中展现出了更高的催化活力。



(100%相对比活力的值为 56.55 U/mL)

图 3-8 pH 对重组 Acb D 催化活力的影响

Figure 3-8 Effect of pH on the catalytic activity of recombinant Acb D

3.4.7 重组 Acb D 的底物谱分析

酶的相对专一性能够使一种酶催化多种底物反应,不同底物的差异有可能对酶的催化活性产生显著影响^[129]。Hemker 等人在文献^[32]中的研究成果表明, Acb D 能够接纳多种糖基供体,其中涵盖葡萄糖、麦芽寡糖、木糖以及它们的衍生物。基于此,本研究选取了 21 种常见糖类及其衍生物作为底物,旨在探究在不同底物组合情况下酶活力的差异,具体的研究结果详见表 3-3。研究发现,重组 Acb D 对 D-水杨苷的催化活性最高,其比活力达到 82.85 U/mL,是麦芽三糖比活力的 146.5%。其次是以 L-山梨糖作为底物时,重组 Acb D 的比活力能够达到 63.75 U/mL,是麦芽三糖比活力的 112.7%。值得一提的是,这是首次证实 L-山梨糖能够作为 Acb D 的糖基供体,并且它与 Acb D 之间具有较好的亲和力。除此之外,酶促反应与底物的构型紧密相关,糖的构型同样会对 Acb D 的催化活性造成影响^[130]。比如,当分别以 L-木糖和 D-木糖作为糖基供体时, L-木糖对应的比活力是 D-木糖的 1.76 倍。

表 3-3 重组 Acb D 催化不同糖基供体的比活力

Table 3-3 Specific activity of recombinant Acb D towards different glycosyl donors

糖基供体	比活力/ (U/mL)	相对值 (%)
D-水杨苷	82.85	146.5
L-山梨糖	63.75	112.7
麦芽三糖	56.55	100.0
木二糖	56.37	99.7
L-木糖	49.87	88.2
α -D-甲基葡萄糖苷	43.88	77.6
麦芽糖	38.37	67.8
D-纤维二糖	34.75	61.4
L-葡萄糖	33.30	58.9
D-葡萄糖	30.62	54.1
D-木糖	28.25	50.0
2-脱氧-D-葡萄糖	16.88	29.8

注：未检测出转糖基活性的供体有 L-阿拉伯糖、L-果糖、D-甘露糖、D-蔗糖、D-乳糖、麦芽糖醇、D-海藻糖、L-鼠李糖和棉子糖。

3.5 本章小结

以大肠杆菌宿主细胞对密码子的偏好性对 *acb D* 基因进行了密码子优化；随后，确立了诱导剂添加终浓度为 0.1 M 重组蛋白的可溶性表达含量可达到最高，在最佳诱导浓度的条件下分别诱导去除信号肽和未取出信号肽的重组 Acb D 以分析信号肽对异源蛋白的重组表达产生的影响；探究了反应时间、温度和 pH 对重组 Acb D 催化活性的影响，确定了重组 Acb D 的最适反应时间、最适温度及其对温度的耐受性和最佳催化 pH。最后，探索了重组 Acb D 在 21 种不同糖基供体下催化活力的差异，发现重组 Acb D 催化 D-水杨苷时的活力最好，其次是 L-山梨糖，这也是首次发现 L-山梨糖可作为 Acb D 的糖基供体并且催化活性较好。本章节探索了 Acb D 的催化性质，以上结果可为深入研究阿卡波糖结构类似物的合成机制提供参考，基于阿卡波糖反应时间长和反应不彻底等反应效能，后续可通过分子改造提高 Acb D 的催化效率。

第 4 章 Acb D 酶分子的定向改造

4.1 引言

定点突变是酶分子改造等领域的重要技术手段,能够精确调整酶的活性中心氨基酸残基,使酶对特定底物的亲和力增强或催化效率提高。如在某些蛋白酶中,通过定点突变改变活性位点氨基酸,可提升酶的催化活性^[131]。夏冰冰等^[132]采用定点突变的改造方法对来自海洋氧化节杆菌 (*Arthrobacter oxidans*) 的右旋糖酐酶“隧道状结合位点”附近的氨基酸进行改造,并在此基础上对 507 位氨基酸进行饱和突变,使得右旋糖酐酶的酶活力和催化效率大幅提高。Wang 等^[133]基于“回到共识突变”假设,将理性设计应用于先前鉴定的来自梭菌属 (*Clostridium bolteae*) D-阿洛酮糖-3-差向异构酶的活性提升为野生酶活力的 2.0 倍。刘嘉琦等^[134]通过同源建模和分子对接等技术,对源自戈特沙尔克厌氧分枝杆菌 (*Anaerobranca gottschalkii*) 环糊精糖基转移酶的活性中心中能够与受体结合的氨基酸位点进行分子改造,通过改造获得优良的突变体使该酶催化合成 α -熊果苷产量达到 15.4 g/L,对苯二酚转化率达到 63%。

本章基于同源建模和底物结合口袋预测的基础,通过分子对接获得 Acb D 与阿卡波糖分子相互作用的氨基酸位点,借助软件 Discovery Studio 2020 对这些氨基酸进行丙氨酸扫描,在丙氨酸扫描的基础上进行虚拟饱和突变,根据虚拟饱和突变的结果获得可突变的氨基酸位点对 Acb D 进行改造以期提升 Acb D 的催化活性;以来源不同的环糊精糖基转移酶与 Acb D 进行序列比对,以提升 Acb D 的催化效率和活性为目的改造 Acb D 蛋白并检测突变体的催化活性。

4.2 实验材料

4.2.1 菌株及培养基

E. coli BL21(DE3) 和重组菌株 *E. coli/acb D* 由本实验室保藏,本章所用的培养基配方如下:

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10、酵母提取物 5、NaCl 10, pH 6.5~7.0; 固

体培养基另外添加琼脂 20。培养基需在 121 °C，25 min 灭菌后使用。

4.2.2 实验试剂

SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒：上海生工生物工程股份有限公司；快速 PCR 聚合酶 PrimesSTAR® Max DNA Polymerase 和限制酶 *Dpn* I：日本 TaKaRa 公司；DNA 纯化试剂盒：碧云天生物技术有限公司；其他试剂均为国产分析纯。

4.2.3 所用软件及网站

分子对接、丙氨酸扫描及虚拟饱和突变使用软件 Discovery Studio 2020（后简称 DS）；借助软件 PyMOL 对结果可视化分析；引物设计使用 SnapGene；同源序列的获取使用 NCBI 数据库；多序列比对和格式转化使用网站 ClustalW2；比对后作图使用 ESPript 3.0^[135]。

4.2.4 实验所用引物

本章节所用 PCR 的引物所有 DNA 测序均由南京金斯瑞生物科技有限公司完成，突变所用到的引物见表 4-1。

表 4-1 突变所用引物
Table 4-1 Primers used for mutation

引物名称	序列 (5'→3')
Y106Q-F	TATCATGGCCAATGGCCGCGCGATT
Y106Q-R	AATCGCGCGGCCATTGGCCATGAT
W107Y-F	TATCATGGCTATTATCCGCGCGATT
W107Y-R	AATCGCGCGGATAATAGCCATGAT
G146H-F	AGTGATTATGGATTGGACCCCGAACCACAC
G146H-R	TTGGTGTGGTTCGGGGTCCAATCCATAATC
L196R-F	CAGTATTATAGCCGCGCGGATATTGC
L196R-R	TCCGCGCGGCTATAATACTGATCT
I199Q-F	GATCAAGCGGATCTGGATCAGC
I199Q-R	GATCCAGATCCGCTTGATCCG

续表 4-1

引物名称	序列 (5'→3')
A255F-F	AAGCGCGTTTATTTTGGCGAAT
A255F-R	AAATAAACGCGCTTTTATGGCTC
Y261W-F	TTTGGCGAATGGTGGATGGGCGATCAGAG
Y261W-R	CTGATCGCCCATCCACCATTCGCCAAAAATC
T296V-F	AGCATTCGCGATGTGTTTGC
T296V-R	GCAAACACATCGCGAATGCTG
Q330H-F	ATAACCATGATACCCGTCGCTTTG
Q330H-R	CGACGGGTATCATGGTTATCC
T322M-F	ATAACCAAGATATGCGTCGCTTTG
T322M-R	CGACGCATATCTTGGTTATCC
F362Y-F	CCTGTATTATGGCACCGAACAGT
F362Y-R	GTTTCGGTGCCATAATACAGGCAC

4.2.5 实验仪器

本章所用到的主要仪器见表 4-2，其他重复仪器见表 2-1 和 3-1。

表 4-2 主要仪器

Table 4-2 Primary instruments

仪器名称	型号	生产厂家
艾本德小型台式高速离心机	5418	上海艾研生物科技有限公司
全波长酶标分析仪	HBS-SCANX	南京德铁生物科技有限公司

4.3 实验方法

4.3.1 分子对接

从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载阿卡波糖的三维结构并导入 DS，优化小分子的结构后赋予 CHARMm 力场。之后将 Acb D 蛋白的三维结构也导入 DS 软件中做好对接前的准备工作并赋予 CHARMm 力场。使

用工具栏 Receptor-ligand Interactions 中 Dock ligands 板块的 CDOCKER 将 Acb D 与阿卡波糖进行分子对接，对接后的结果采用软件 PyMOL 进行可视化分析。

4.3.2 丙氨酸扫描

首先，将分子对接后获得的文件导入 DS 中，对其进行初步的结构准备后并赋予 CHARMM 力场。随后，选中底物和蛋白相互作用 8 Å 内的氨基酸为待突变氨基酸组，使用工具栏 Macromolecules Design Protein 中的 Calculate Mutation 板块的 Energy (Binding) 对该组氨基酸进行丙氨酸扫描。此过程中，将参数设置板面中的 Input Typed Molecule 和 Ligand Chain 设置为 Acb D; Mutation Site 设置为 Single Mutation; pH Dependent Electrostatics 设置为 True，使蛋白处于中性环境中，其余参数均为默认值。

4.3.3 虚拟饱和突变

以丙氨酸扫描后筛选得到可能对蛋白和小分子相互作用产生影响的氨基酸，对这些氨基酸继续进行饱和突变，在工具栏 Define Mutants 中选中筛选获得的氨基酸为待突变氨基酸并将其突变为其他 19 种氨基酸。将参数设置板面中的 Input Typed Molecule 和 Ligand Chain 设置为 Acb D; Mutation Site 设置为 Single Mutation; pH Dependent Electrostatics 设置为 True，使蛋白处于中性环境中，其余参数均为默认值。

4.3.4 序列比对

以文献^[32]为依据从 NCBI 中获取四种不同来源且与 Acb D 同源性较高的 CGTase，其来源菌株和登录号分别为 *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (P26827)、*Bacillus circulans* 251 (P43379)、*Paenibacillus macerans* (P31835) 和 *Klebsiella pneumoniae* (P08704)。随后，使用在线软件 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 完成同源序列的多序列比对和格式转化；使用 ESPript 3.0 (<https://esprict.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>) 进行比对后作图。

4.3.5 突变体的构建

将 *E. coli/acb D* 接入 5 mL 的 LB 液体培养基（Amp 终浓度为 1 mM）中，过夜培养（12~16 h）使用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取重组质粒 pColdII-*acb D*，以 pColdII-*acb D* 为模板，表 4-1 中的引物和快速 PCR 聚合酶 PrimesSTAR® Max DNA Polymerase 进行 PCR，具体 PCR 反应条件见表 4-3。

表 4-3 突变 PCR 反应体系及条件

Table 4-3 Mutation PCR reaction system and condition

试剂	体积 (μL)	条件
PrimeSTAR Max Premix	25	预变性: 98 °C 3min
上游引物	1.5	变性: 98 °C 10 s
下游引物	1.5	退火: 62 °C 5s
模板	1.0	延伸: 68 °C 3.5 min
灭菌水	21	充分延伸: 68 °C 7 min
总体积	50	循环次数 30

PCR 反应结束后，取 5 μL 的产物采用琼脂糖凝胶电泳检测验证目的条带，验证完成后在余下的产物中加入 *DPnI* 以消除 PCR 体系中剩余的 pCold II-*acb D*，反应条件为静置 37 °C，1 h，反应体系见表 4-4。

表 4-4 *DPnI* 催化体系

Table 4-4 Catalytic system of *DPnI*

试剂	体积
10x T buffer	2 μL
<i>DPnI</i>	1 μL
DNA	≤ 1μg
灭菌水	up to 20 μL

待消解完成后，使用柱纯化试剂盒纯化消化后的 PCR 产物，具体纯化步骤与 2.3.5 所述基因纯化步骤一致。将纯化好的质粒导入至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞，将转化后的细胞涂布至 Amp 抗性平板培养 12 h 后挑取长势较优的菌落转接到 LB 液体培养基 (Amp 终浓度为 1 mM) 中，37 °C，220 rpm，生长 5 h 后进行菌落 PCR 验证 (条件同表 2-4 菌液 PCR 检测一致)，将验证正确的菌株至送生物公司测序。

4.3.6 突变体的酶活力的检测

对测序正确后的菌株进行诱导表达，以突变酶体催化阿卡波糖和麦芽三糖，突变体活力的检测方法同 2.3.2 节介绍的检测条件一致。

4.3.7 突变体分子对接和结构分析

使用 AlphaFold v2.3.2 以 Acb D 为模板对优良突变体进行同源建模得到突变体的三维结构 (<http://easy2md.com/AlphaFold2/>)，随后采用分子对接分析阿卡波糖与突变酶体的相互作用力。

4.4 实验结果

4.1.1 分子对接结果

分子对接能直观呈现蛋白质与配体 (如小分子、多肽等) 的结合位点、结合模式及相互作用力类型，如揭示神经退行性疾病相关蛋白与小分子配体的作用方式，为疾病机制研究提供依据^[136]。为获得 Acb D 和阿卡波糖相互作用的关键氨基酸位点，使用软件 DS 将 Acb D 与阿卡波糖进行分子对接，对接后的结果采用 PyMOL 分析，结果显示 Acb D 与阿卡波糖相互作用的活性位点位于 A 结构域和 B 结构域之间，通过同源序列比对确定保守的催化三联体为 Asp231-Glu259-Asp331，这和保守结构域的预测一致 (图 4-1)。

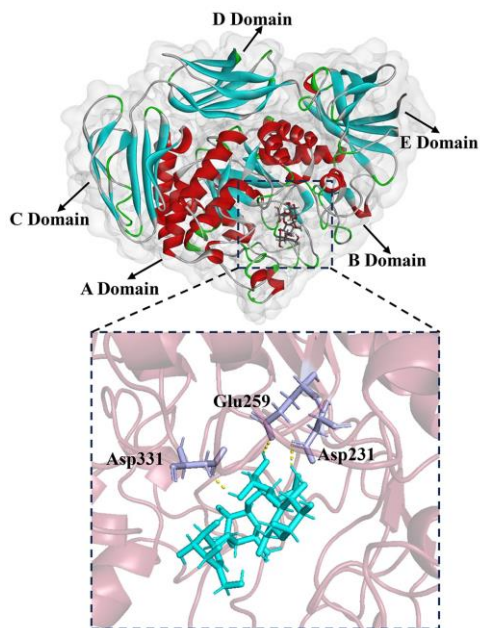


图 4-1 分子对接分析结果

Figure 4-1 Result of molecular docking analysis

4.4.2 丙氨酸扫描结果

丙氨酸是手性氨基酸中侧链最短的,把蛋白质里的氨基酸残基替换成没有特殊侧链的丙氨酸,通过研究突变前后蛋白质功能是否改变,以此来确定蛋白质的关键氨基酸位点,进而可为蛋白质氨基酸的定点突变提供指导^[137]。以分子对接的结果为基础,对酶和底物 8 Å 范围内的氨基酸进行扫描,扫描结果见表 4-5,表中为突变后可能会影响蛋白质稳定性的结果,突变能 (Mutation energy) 的排列方式由低到高,由于 GLU259 和 ASP231 是构成催化三联体的重要氨基酸,因此对表中除 GLU259 和 ASP231 继续进行虚拟饱和突变。

表 4-5 丙氨酸扫描突变结果
Table 4-5 Alanine scan mutation results

Num	Mutation	Mutation Energy	Effect of Mutation
1	A: LYS234>ALA	0.51	DESTABILIZING
2	A: LEU196>ALA	0.52	DESTABILIZING
3	A: GLU259>ALA	0.59	DESTABILIZING
4	A: ARG229>ALA	0.6	DESTABILIZING
5	A: PHE185>ALA	0.69	DESTABILIZING
6	A: TYR261>ALA	0.76	DESTABILIZING
7	A: ILE199>ALA	0.77	DESTABILIZING
8	A: HIS104>ALA	0.83	DESTABILIZING
9	A: TRP107>ALA	0.84	DESTABILIZING
10	A: ASP231>ALA	0.91	DESTABILIZING
11	A: ARG386>ALA	1.16	DESTABILIZING
12	A: HIS235>ALA	1.25	DESTABILIZING
13	A: TYR106>ALA	1.29	DESTABILIZING
14	A: LEU196>ALA	1.58	DESTABILIZING

4.4.3 虚拟饱和突变结果

饱和突变是一种旨在特定基因或 DNA 区域的每个可能位点上突变的定点突变技术,其使该区域的所有核苷酸或氨基酸都有机会被其他种类的核苷酸或氨基酸所取代,从而创建一个包含各种可能突变体的文库,可用于研究基因功能、蛋白质结构与功能关系^[138]。将丙氨酸筛选得到的氨基酸继续进行饱和突变,根据饱和突变的结合能为依据,最终确定构建的突变体为Y261W、L196R、Y106Q、W107Y 和 I199Q (表 4-6)。

表 4-6 虚拟饱和突变结果
Table 4-6 Virtual saturation mutation result

Num	Mutation Energy	Effect of Mutation
A: TYR261>TRP	-1	STABILIZING
A: LEU196>ARG	-0.78	STABILIZING
A: TYR261>LYS	-0.66	STABILIZING
A: TYR106>GLN	-0.62	STABILIZING
A: TRP107>TYR	-0.58	STABILIZING
A: ILE199>GLN	-0.52	STABILIZING
A: LEU196>LYS	-0.50	STABILIZING

4.4.4 多序列比对结果

多序列比对是生物信息学中一项基本且重要的分析方法,通过比对判断未知序列与已知序列的相似性,若与功能已知的序列相似,可推测其具有相似功能^[139]。从 NCBI 数据库获得四种不同生物体来源的 CGTase, 使用 ClustalW2 和 ESPript 进行多序列比对和作图, 比对结果见图 4-2。在生物体进化过程中, 大多序列都相似的氨基酸成为保守氨基酸, 其对蛋白质的功能至关重要, 我们根据序列比对的结果筛选得到了位于催化三联体附件的氨基酸位点, 这些氨基酸位点在其他五种来源的 CGTase 中均不变, 因此我们将 Acb D 中同位点的氨基酸替换成 CGTase 中的氨基酸, 最终确定构建的突变体为 G146H、A255F、T296V、Q330H、T322M、和 F362Y。

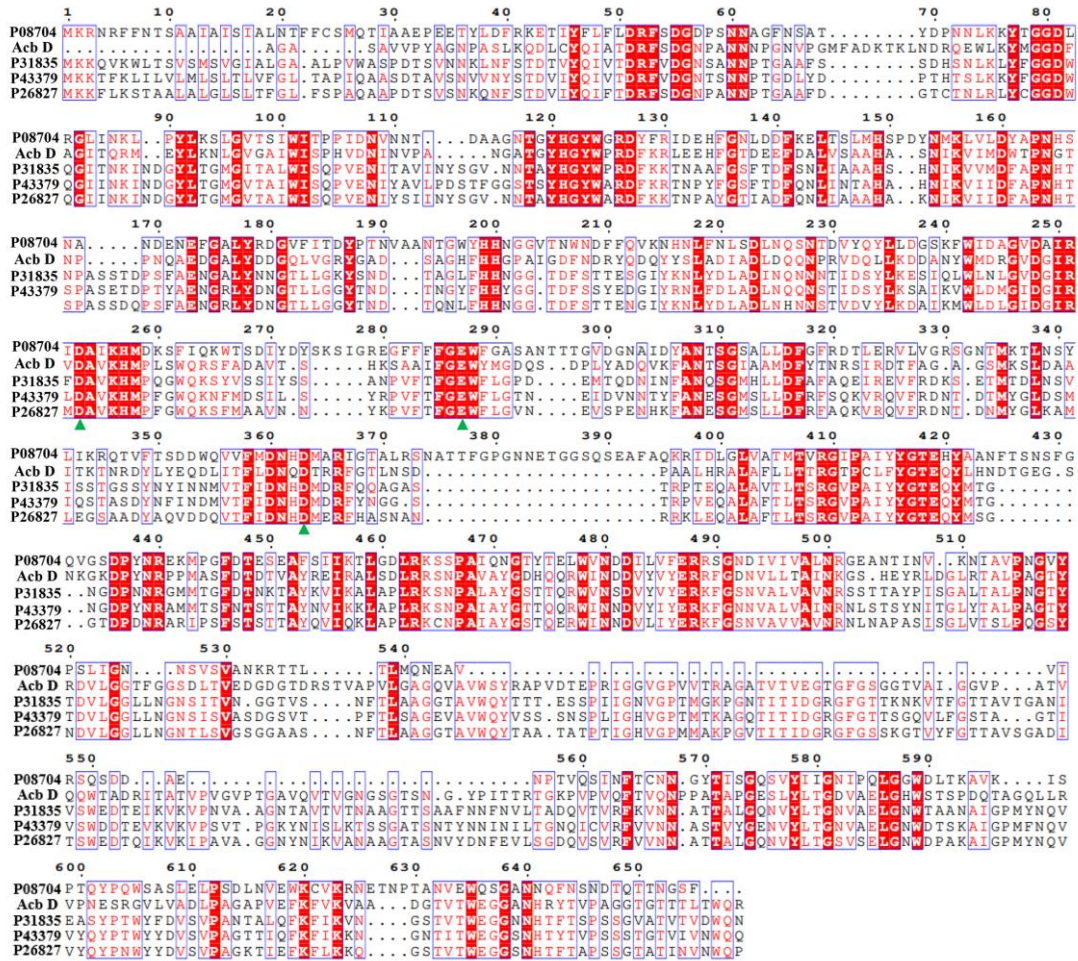
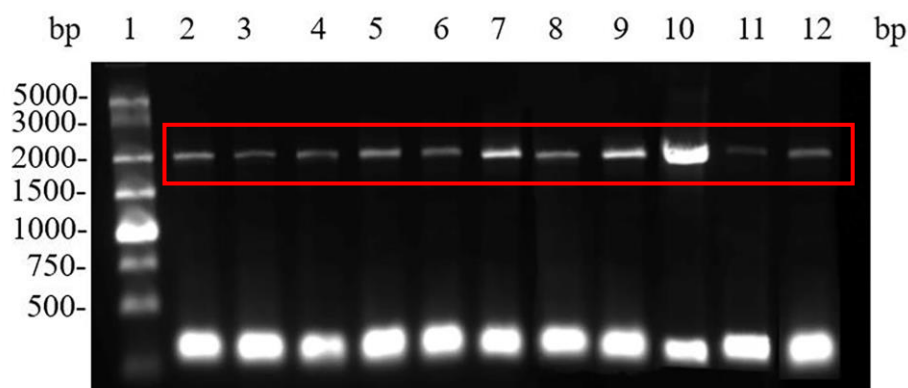


图 4-2 多序列比对结果

Figure 4-2 results of multi-sequence alignment

4.4.5 突变体的构建

以重组质粒 pCold II-*acb D* 为模板, 借助 PCR 技术引入突变氨基酸, 将扩增完成的质粒进行纯化后倒入 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞中, 接着涂布至 LB 平板上初步筛选, 将过夜培养的菌落挑至含 Amp 抗性的 LB 液体培养基中继续培养, 使用菌液 PCR 验证转化情况, PCR 产物的核酸胶图见 4-3, 由图可知, 11 种突变体在 2000 bp 均产生了目的条带, 后续将验证正确的菌株送至生物公司测序, 测序成功说明突变体构建成功。



M: Marker; 2~12: PCR 产物

图 4-3 菌液 PCR 结果

Figure 4-3 Bacterial liquid PCR result

4.4.6 突变体酶活力检测结果

对获得的突变体的酶活力进行检测，各个突变体的酶活力与 WT 的相对值如图 4-4 所示，在 11 个突变体中有 2 个比 WT 表现出了更好的酶活力，其中突变体 I199Q 的相对酶活力是 WT 的 126.4%，F362Y 的酶活力最优，是 WT 的 127.2%。T332M 的酶活力接近 WT，是 WT 的 96.4%，其余突变体的酶活力较 WT 相比均有所降低，尤其 W107Y 的酶活力仅为 WT 的 16.3%。

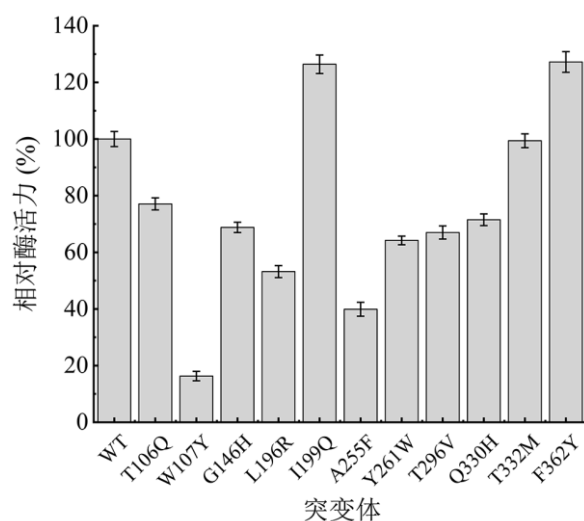


图 4-4 突变体酶活力检测结果

Figure 4-4 Detection results of mutant enzyme activity

4.4.7 突变体的分子对接及结构分析

将同源建模获得的 I199Q 和 F362Y 的三维结构使用 DS 与阿卡波糖分子对接，对接后采用 pyMol 分析二者相互作用的结果如 4-5，图 4-5(a)和(b)分别为 WT

和突变体 I199Q 的“底物结合口袋”示意图，推测 199 位点 Ile 突变为 Gln，侧链在空间伸展导致口袋扩增，使得底物更容易与酶分子结合从而提升了酶的催化效率。图 4-5(c)和(d)为 WT 和 F362Y 与底物分子相互作用力，虽然 362 位氨基酸的变化对结合口袋造成的影响不大，但由于 Phe 突变为 Tyr 导致蛋白的空间结构发生变化，配体与周围的氨基酸产生了更多的氢键，如 Arg55、Arg299 和 Asp382 处形成了新的氢键，氢键总体数目增加使得酶和底物在催化过程中有了更高的亲和力，从而酶的催化效率得以提升。

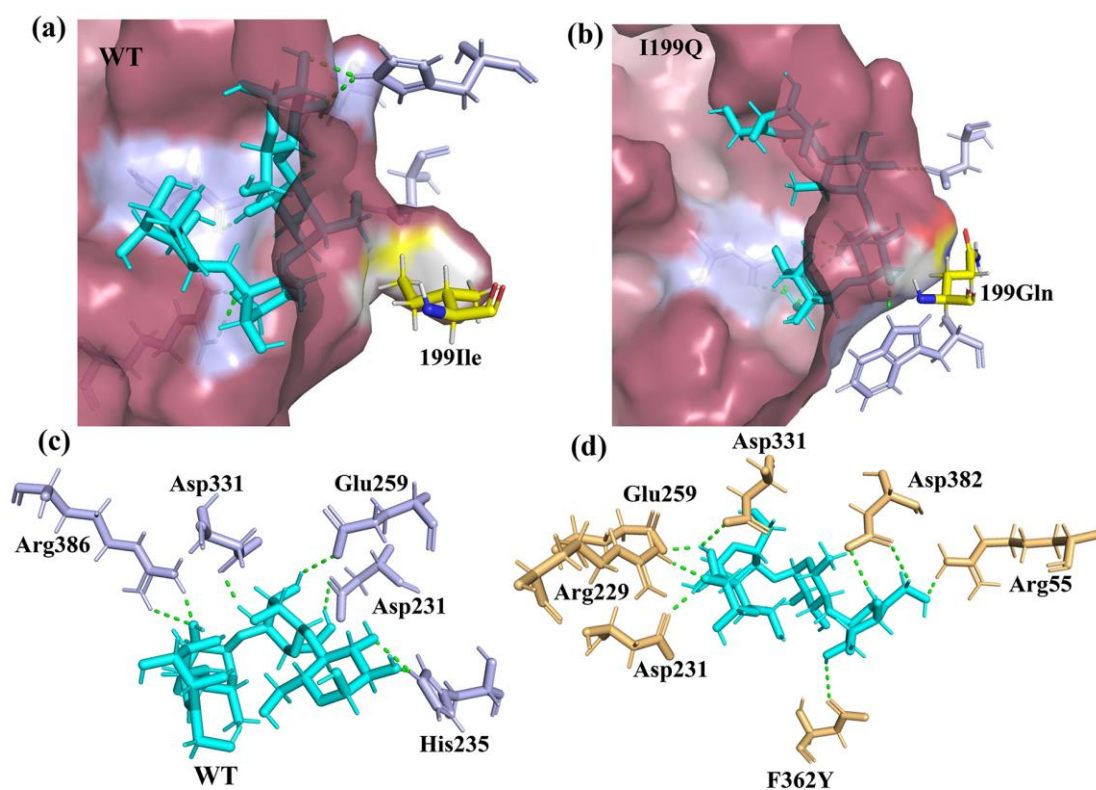


图 4-5 对接结果分析

Figure 4-5 Analysis of docking results

4.5 本章小节

本章从 Acb D 的三维结构出发，以分子对接为基础将 Acb D 与阿卡波糖对接，根据二者相互作用的“底物通道”，对通道附件的氨基酸进行丙氨酸扫描，在扫描的基础上，选取变化可能会对 Acb D 活性造成影响的氨基酸进行虚拟饱和突变，最终筛选得到了 Y106Q、W107Y、L196R、I199Q 和 Y261W 共 5 个突变体。又以序列比对为依据，选取了四个不同来源的 CGTase 与 Acb D 的一级序列比对，通过比对获得保守氨基酸位点，根据这些保守的氨基酸位点，最终筛选

得到了 G146H、A255F、Q330H、T296V、T322M 和 F362Y 共 6 个突变体。接着，构建突变体后对突变体的酶活力进行检测，结果得到了 2 个较优的突变酶体，变体 I199Q 的相对酶活力是 WT 的 126.4%，F362Y 的酶活力最优，是 WT 的 127.2%。经过分子对接分析发现，I199Q 催化效率提升是因为 199 位氨基酸的变化使“底物结合口袋”扩宽，酶分子和底物更容易结合。F362Y 催化效率提升是因为突变导致蛋白质的构象发生了变化，配体和周围的氨基酸产生了更多的氢键，这些氢键导致 F362Y 和底物有更高的亲和力，因此酶活力得到提升。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论

由于游动放线菌在发酵过程中不稳定,导致在生产阿卡波糖的同时也会有一系列的副产物,这使得下游纯化困难生产成本增大。阿卡波糖的代谢网络庞大复杂,涉及到多种酶的级联反应。其中有一种名为阿卡维基转移酶的糖基转移酶在整个代谢过程中起着至关重要的作用,它影响着阿卡波糖及其同系物的形成。但迄今为止,国内外有关该酶的研究较少,该酶在阿卡波糖代谢途径中起到的作用和与同系物形成的关系也尚不明晰,因此对于该酶的研究意义重大。本研究借助 NCBI 数据库从游动放线菌 *acb* 基因簇中确定了阿卡维基转移酶的编码基因 *acb D*,运用生物信息学手段分析其基本理化性质和结构功能;以放线菌的全基因组中为模板克隆出 *acb D* 并以 pCold II 为载体将其转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中,成功实现了异源蛋白的可溶性表达。随后,考察了反应时间、反应温度、反应 pH 和不同的反应底物对酶活性造成的影响,又以计算机模拟手段对 Acb D 进行改造,获得了催化效率较好的突变体,总结以上研究的相关结论如下:

(1) 由 NCBI 数据库确定基因 *acb D* 并借助生物信息学手段进行分析,分析结果可知 Acb D 存在信号肽,切割位点位于第 26~27 个氨基酸之间;Acb D 由 724 个氨基酸组成,其分子量为 75,351.20 Da;理论等电点为 5.02,偏酸性,是一个稳定的亲水蛋白;亚细胞定位显示 Acb D 分布在细胞外,存在着多个糖基化位点;Acb D 与 CGTase 的同源性最高,与 CGTase 一样有着相同的五个结构域;使用 AlphaFold v2.3.2 成功对 Acb D 进行同源建模后预测 Acb D 的底物结合口袋显示位于 A 结构域和 B 结构域之间,这和保守结构域的预测结果一致;分子动力学软件对 Acb D 的温度稳定进行模拟,结果发现 Acb D 在 30 °C 的环境中较为稳定。

(2) 以大肠杆菌宿主细胞对密码子的偏好性优化了 *acb D* 基因的密码子,确立了诱导的添加终浓度为 0.1 mM;分析发现信号肽对异源蛋白的可溶性表达起负面作用,去除信号肽之后蛋白的可溶性表达量提高了 23.4 倍;确定了重组

Acb D 的最适反应时间为 20 h；最适反应温度为 30 °C，重组蛋白的对温度的耐受性一般，最大的热稳定仅达到 40 °C；最佳催化 pH 为 7.0，磷酸盐缓冲液对重组蛋白的缓冲能力最好；重组蛋白可催化多种糖及其衍生物和阿卡波糖反应，其中催化 D-水杨苷时的活力最好，比活力达到 82.85 U/mL，是麦芽三糖比活力的 146.5%，其次是以 L-山梨糖作为底物时，重组蛋白的比活力能够达到 63.75 U/mL，是麦芽三糖比活力的 112.7%，这是首次证实 L-山梨糖能够作为 Acb D 的糖基供体，并且它与 Acb D 之间具有较好的亲和力，另外糖的构型同样会对酶的催化活性产生影响，比如当分别催化 L-木糖和 D-木糖作为底物与阿卡波糖反应时时，催化 L-木糖对应的比活力是催化 D-木糖的时 1.76 倍。

(3) 基于分子对接技术，将阿卡波糖和 Acb D 进行对接，以确定二者相互作用的氨基酸，结果发现二者的结合位点位于 A 结构域和 B 结构域之间，与底物结合口袋预测的结果相同，确定了 Acb D 催化三联体氨基酸为 Asp231-Glu259-Asp331；借助计算机辅助技术，对 Acb D 蛋白和阿卡波糖 8 Å 范围内相互作用的氨基酸进行丙氨酸扫描突变，基于丙氨酸扫描突变后的结果继续进行单点饱和突变，根据饱和突变的结果选取合适的位点来改造 Acb D，此外，以来源不同的四种 CGTase 与 Acb D 序列比对，通过保守氨基酸位点的分析选择需要改造的氨基酸位点，最终获得了突变体 Y106Q、W107Y、G146H、L196R、I199Q、A255F、Y261W、T296V、Q330H、T332M 和 F362Y，对突变体的酶活性进行检测，结果得到了 2 个活性较好的突变体，其中 I199Q 的酶活力是 WT 的 126.4%，F362Y 的酶活力是 WT 的 127.2%。将突变酶体与底物进行对接的结果发现，I199Q 催化效率提升是因为 199 位氨基酸的变化使“底物结合口袋”扩宽，酶分子和底物更容易结合。F362Y 催化效率提升是因为突变导致蛋白质的构象发生了变化，配体和周围的氨基酸产生了更多的氢键，这些氢键导致 F362Y 和底物有更高的亲和力，因此酶活力得到提升。

5.2 展望

本研究通过生物信息学分析和分子手段，探索了重组蛋白的催化性质并初步对 Acb D 分子进行了改造，为进一步完善阿卡波糖的代谢网络提供了基础，但在以也存在着一些不足，后续可从下面几个方面继续探索：

(1) **Acb D** 与阿卡波糖及其同系物的形成相关, 后续可以借助计算机技术, 在分子的结构方面进一步探索与 **Acb D** 相关的同系物形成机制, 将酶往只催化产生阿卡波糖而减少产生杂质的方向改造。

(2) 在温度对酶活性产生的影响中我们可以发现, **Acb D** 对温度的耐受性一般, 而酶温度的稳定性是在工业生产中必不可少的需求, 后续可根据来提升 **Acb D** 的耐热性。

(3) **Acb D** 影响着阿卡波糖的合成, 可在基因水平上构建 *acb D* 过表达菌株, 有望大大提高阿卡波糖的产量。

参考文献

- [1] 龚文华. 临床糖尿病学[M]. 浙江工商大学出版社: 2014.
- [2] Lebovitz, Harold E. Etiology and pathogenesis of diabetes mellitus[J]. *Pediatric Clinics of North America*, 1984, 31(3):521-530.
- [3] 翟亚钦, 吕婷玉, 王娟. 2 型糖尿病并发症的研究现状[J]. *婚育与健康*, 2024, 30(02): 22-24.
- [4] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2022, 183: 109119.
- [5] 李兰英, 孙曙光. 我国糖尿病健康教育模式的研究现状及展望[J]. *中国医学创新*, 2022, 19(17): 173-178.
- [6] 潘晓黎. 糖尿病患者口服降糖药物的用药指导[J]. *中华护理杂志*, 2006, (07): 668-669.
- [7] 宋捷, 林海, 金春林等. 国内外糖尿病用药结构比较与分析[J]. *中国药业*, 2020, 29(22): 7-10.
- [8] Campbell L K, White J R, Campbell R K. Acarbose: Its role in the treatment of diabetes mellitus[J]. *The Annals of Pharmacotherapy*, 1996, 30(11): 1255-1262.
- [9] Lee S, Sauerbrei B, Niggemann J, et al. Biosynthetic studies on the alpha-glucosidase inhibitor acarbose in *Actinoplanes* sp.: Source of the maltose unit[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1997, 50(11): 954-960.
- [10] Daali Y, Cherkaoui S, Cahours X, et al. High performance liquid chromatography of acarbose and its metabolite on porous graphitic carbon column[J]. *Journal of Separation Science*, 2002, 25(5): 280-284.
- [11] Dalsgaard N B, Gasbjerg L S, Hansen L S, et al. The role of GLP-1 in the postprandial effects of acarbose in type 2 diabetes[J]. *European Journal of Endocrinology*, 2021, 184(3): 383-394.
- [12] Wehmeier U F. The biosynthesis and metabolism of acarbose in *Actinoplanes* sp. SE50/110: A progress report[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2003, 21(4/5): 279-284.

- [13] Schwientek P, Szczepanowski R, Rückert C, et al. Sequencing of high G+C microbial genomes using the ultrafast pyrosequencing technology[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 155(1): 68-77.
- [14] Schwientek P, Szczepanowski R, Rückert C, et al.. The complete genome sequence of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 112.
- [15] Wendler S, Otto A, Ortseifen V, et al. Comprehensive proteome analysis of *Actinoplanes* sp. SE50/110 highlighting the location of proteins encoded by the acarbose and the pyochelin biosynthesis gene cluster[J]. Journal of Proteomics, 2015, 125: 1-16.
- [16] Wendler S, Hürtgen D, Kalinowski J, et al. The cytosolic and extracellular proteomes of *Actinoplanes* sp. SE50/110 led to the identification of gene products involved in acarbose metabolism[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 167(2): 178-189.
- [17] 汪雪梅, 翁倩卉, 赵芹芹, 等. 阿卡波糖生物合成调控蛋白的钓取与功能解析[J]. 微生物学报, 2021, 61(11): 3667-3685.
- [18] Xie H X, Zhao Q Q, Zhang X, et al. Comparative functional genomics of the acarbose producers reveals potential targets for metabolic engineering[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2019, 4(1): 49-56.
- [19] 王远山, 戴科磊, 谢卡茜, 等. 阿卡波糖及其结构类似杂质生物合成与调控的研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 605-619
- [20] Zhang C S, Stratmann A, Block O, et al. Biosynthesis of the C(7)-cyclitol moiety of acarbose in *Actinoplanes* species SE50/110.7-O-phosphorylation of the initial cyclitol precursor leads to proposal of a new biosynthetic pathway[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(25): 22853-22862.
- [21] Rockser Y, Wehmeier U F. The gac-gene cluster for the production of acarbose from *Streptomyces glaucescens* GLA.O—Identification, isolation and characterization[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 140(1/2): 114-123.
- [22] Tsunoda T, Samadi A, Burade S, et al. Complete biosynthetic pathway to the

- antidiabetic drug acarbose[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 3455.
- [23] Stratmann A, Mahmud T, Lee S, et al. The AcbC protein from *Actinoplanes* species is a C₇-cyclitol synthase related to 3-dehydroquinate synthases and is involved in the biosynthesis of the α -glucosidase inhibitor acarbose[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(16): 10889-10896.
- [24] Zhang C S, Podeschwa M, Altenbach H J, et al. The acarbose-biosynthetic enzyme AcbO from *Actinoplanes* sp. SE 50/110 is a 2-*epi*-5-*epi*-valiolone-7-phosphate 2-epimerase[J]. *FEBS Letters*, 2003, 540(1/2/3): 47-52.
- [25] Wehmeier U F, Piepersberg W. Biotechnology and molecular biology of the α -glucosidase inhibitor acarbose[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63(6): 613-625.
- [26] Zhao Q Q, Luo Y C, Zhang X, et al. A severe leakage of intermediates to shunt products in acarbose biosynthesis[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1468.
- [27] Liu H W, Thorson J S. Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1994, 48: 223-256.
- [28] Mahmud T, Lee S, Floss H G. The biosynthesis of acarbose and validamycin[J]. *Chemical Record*, 2001, 1(4): 300-310.
- [29] 张丹, 赵芹芹, 蒋明, 等. 游动放线菌 *Actinoplanes* sp. SE50/110 中阿卡波糖脱氧氨基糖单元的生物合成[J]. *微生物学报*, 2020, 60(1): 118-134.
- [30] Tsunoda T, Abuelizz H A, Samadi A, et al. Catalytic mechanism of nonglycosidic C-N bond formation by the pseudoglycosyltransferase enzyme VldE[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(20): 13369-13382.
- [31] Drepper A, Pape H. Acarbose 7-phosphotransferase from *Actinoplanes* sp.: purification, properties, and possible physiological function[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1996, 49(7): 664-668.
- [32] Hemker M, Stratmann A, Goeke K, et al. Identification, cloning, expression, and characterization of the extracellular acarbose-modifying glycosyltransferase, AcbD, from *Actinoplanes* sp. strain SE50[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(15): 4484-4492.

- [33] 张欣, 赵芹芹, 白林泉. 游动放线菌 *Actinoplanes* sp. SE50/110 阿卡波糖胞外代谢相关基因功能的初步研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2022, 41(5): 1006-1016.
- [34] Nölting S, März C, Jacob L, et al. The 4- α -glucanotransferase AcbQ is involved in acarbose modification in *Actinoplanes* sp. SE50/110[J]. Microorganisms, 2023, 11(4): 848.
- [35] Leistner A, Holzgrabe U. Alternative methods to assess the impurity profile of a monographed API using acarbose as an example[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2022, 221: 115063.
- [36] 余贞, 李美红, 李娜, 等. 游动放线菌 8-22 中 *treY* 基因敲除对于降低阿卡波糖 C 组分的作用[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1301-1306.
- [37] Wolf T, Gren T, Thieme E, et al. Targeted genome editing in the rare actinomycete *Actinoplanes* sp. SE50/110 by using the CRISPR/Cas9 System[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 231: 122-128.
- [38] Zhao Q Q, Xie H X, Peng Y, et al. Improving acarbose production and eliminating the by-product component C with an efficient genetic manipulation system of *Actinoplanes* sp. SE50/110[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2017, 2(4): 302-309.
- [39] 解慧欣, 赵芹芹, 白林泉. 麦芽糖及转运蛋白对游动放线菌生产阿卡波糖的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(10): 4536-4544.
- [40] Li Z X, Yang S B, Zhang Z Y, et al. Enhancement of acarbose production by genetic engineering and fed-batch fermentation strategy in *Actinoplanes* sp. SIPI12-34[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 240-254.
- [41] 周健, 李翔飞, 李闯, 等. 游动放线菌产阿卡波糖高通量筛选模型的建立及优化[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(20): 73-80.
- [42] 周健. 阿卡波糖高产菌株选育及分子改造[D]. 芜湖: 安徽工程大学硕士学位论文, 2023.
- [43] 薛正莲, 李翔飞, 韩如梦, 等. 一种游动放线菌来源的转录因子 AcaR、基因、重组菌及其制备方法和应用: CN117843740A[P]. 2024-04-09.

- [44] Carpenter E P, Hawkins A R, Frost J W, et al. Structure of dehydroquinase synthase reveals an active site capable of multistep catalysis[J]. *Nature*, 1998, 394(6690): 299-302.
- [45] Schaffert L, Marz C, Burkhardt L, et al. Evaluation of vector systems and promoters for overexpression of the acarbose biosynthesis gene *acbC* in *Actinoplanes* sp. SE50/110[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 114.
- [46] Romero-Rodríguez A, Ruiz-Villafán B, Rocha-Mendoza D, et al. Biochemistry and regulatory functions of bacterial glucose kinases[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015, 577: 1-10.
- [47] 张丹. 解析阿卡波糖中 C7-环醇和双脱氧糖模块的生物合成[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2019.
- [48] Leemhuis H, Wehmeier U F, Dijkhuizen L. Single amino acid mutations interchange the reaction specificities of cyclodextrin glycosyltransferase and the acarbose-modifying enzyme acarviosyl transferase[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(41): 13204-13213.
- [49] 许贤恩. *Actinoplanes* sp. ZJB03852 阿卡波糖结构类似杂质组分形成酶学基础及其发酵控制研究[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2014.
- [50] Nguyen D H D, Park S H, Tran P L, et al. Characterization of the transglycosylation reaction of 4- α -glucanotransferase (MalQ) and its role in glycogen breakdown in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(3): 357-366.
- [51] Kim J E, Tran P L, Ko J M, et al. Comparison of catalyzing properties of bacterial 4- α -glucanotransferases focusing on their cyclizing activity[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 31(1): 43-50.
- [52] Lairson L L, Henrissat B, Davies G J, et al. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2008, 77(1): 521-555.
- [53] Breton C, Imbert A. Structure/function studies of glycosyltransferases[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1999, 9(5):563-571.

- [54] Lim C H, Rasti B, Sulisty J, et al. Comprehensive study on transglycosylation of CGTase from various sources[J]. *Heliyon*, 2021, 7(2): e06305.
- [55] 陶大炜, 张颖琦, 赵赛赛. 产环糊精葡萄糖基转移酶的菌株选育及酶分子改造研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(15): 359-371.
- [56] Li C, You Y, Zhang Y, et al. Maltose binding site 2 mutations affect product inhibition of *Bacillus circulans* STB01 cyclodextrin glycosyltransferase[J]. *Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 175: 254-261.
- [57] 孔德民, 左方圆, 吴敬, 等. *Bacillus stearothermophilus* NO2 环糊精葡萄糖基转移酶 Leu277 突变提高 α -环糊精产量[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(15): 1-7.
- [58] 左方圆. *Bacillus stearothermophilus* NO2 环糊精葡萄糖基转移酶的分子改造及制备 α -环糊精的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2022.
- [59] Wang L, Xia Y M, Su L Q, et al. Modification of *Bacillus clar-kill* γ -cyclodextrin glycosyltransferase and addition of complexing agents to increase γ -cyclodextrin production[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(43): 12079-12085.
- [60] Li Y, Wei L K, Zhu Z L, et al. Rational design to change product specificities and thermostability of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp[J]. *RSC Advances*, 2017,7(23): 13726-12732.
- [61] 王金鹏, 王萍, 苑征, 等. γ -CGTase 突变体制备及其产 γ -CD 条件优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2018, 37(10): 1015-1020.
- [62] Chen S, Li Z, Gu Z, et al. Variants at position 603 of the CGTase from *Bacillus circulans* STB01 for reducing product inhibition[J]. *Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 136: 460-468.
- [63] Chen S, Li Z, Gu Z, et al. Leu600 mutations decrease product inhibition of the β -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* STB01[J]. *Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 115: 1194-1201.
- [64] Li C, Ban X, Gu Z, et al. Calcium ion contribution to thermostability of cyclodextrin glycosyltransferase is closely related to calcium-binding site CaIII[J].

- Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(37): 8836-8841.
- [65] Van der veen B A, Leemhuis H, Kralj S, et al. Hydrophobic amino acid residues in the acceptor binding site are main determinants for reaction mechanism and specificity of cyclodextrin glycosyltransferase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(48): 44557-44562.
- [66] 郑丹妮. *Bacillus* sp. FJAT-44876 γ -环糊精葡萄糖基转移酶的特征及热稳定性提升研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2020.
- [67] 李晓涵, 郭姣梅, 宋凯, 等. *Bacillus* sp. Y112 环糊精葡萄糖基转移酶位点 R81 定点突变提高产物特异性[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 133-138.
- [68] 陈铭. 生物信息学 (第四版) [M]. 北京: 科学出版社, 2022.
- [69] Zhao Y. The Research Status and Development Tendency of Bioinformatics [J]. Journal of Medical Informatics, 2012: 223-245.
- [70] Aleksander K, Maria G A, Tymoteusz O, et al. CABS-flex 2.0: A web server for fast simulations of flexibility of protein structures[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W338-W343.
- [71] 王正华, 王勇献. 后基因组时代生物信息学的新进展[J]. 国防科技大学学报, 2003, 25(1): 1-7.
- [72] Uesaka K, Oka H, Kato R, et al. Bioinformatics in bioscience and bioengineering: Recent advances, applications, and perspectives[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2022, 134(5): 363-373.
- [73] Altschul S F, Madden T L, Schffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [74] Sauder J M, Arthur J W, Dunbrack R L J R. Large-scale comparison of protein sequence alignment algorithms with structure alignments[J]. Proteins, 2000, 40(1): 6-22.
- [75] Sameer V, Glen V G, Younes A, et al. PDBe: Improved accessibility of macromolecular structure data from PDB and EMDB [J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(D1): D385-D395.

- [76] Davis I. The 'super-resolution' revolution[J]. Biochemical Society Transactions, 2009, 37(5): 1042-1044.
- [77] Richon A B. Current status and future direction of the molecular modeling industry[J]. Drug Discovery Today, 2008, 13(15-16): 665-669.
- [78] Torsten S, Kopp Jürgen, Nicolas G, et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3381-3385.
- [79] Watkins A M, Rangan R, Das R. Using Rosetta for RNA homology modeling[J]. Methods in enzymology, 2019, 623:177-207.
- [80] Webb B, Sali A. Protein structure modeling with MODELLER[J]. Methods in Molecular Biology, 2021, 2199: 239-255.
- [81] Takeda-Shitaka M, Terashi G, Chiba C, et al. FAMS complex: A fully automated homology modeling system for protein complex structures[J]. Medicinal chemistry, 2006, 2(2): 191-201.
- [82] Hardin C, Pogorelov T V, Luthey-Schulten Z. Ab initio protein structure prediction[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2002, 12(2): 176-181.
- [83] Peng J, Xu J. Low-homology protein threading[J]. Bioinformatics, 2010, 26(12): i294-i300.
- [84] Hiranuma N, Park H, Baek M, et al. Improved protein structure refinement guided by deep learning based accuracy estimation[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 1340.
- [85] Delano W L. The PyMol Molecular Graphics System[J]. Proteins Structure Function and Bioinformatics, 2002, 30: 442-54
- [86] Dong D, Xu Z, Zhong W, et al. Parallelization of molecular docking: A review[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2018, 18(12): 1015-1028.
- [87] Huang S Y, Zou X. Advances and challenges in protein-ligand docking[J]. Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(8): 3016-3034.
- [88] Yuriev E, Holien J, Ramsland PA. Improvements, trends, and new ideas in molecular docking: 2012-2013 in review[J]. Journal of Molecular Recognition: JMR, 2015, 28(10): 581-604.

- [89] Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting paradigms in drug discovery[J]. *Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4331.
- [90] Lin R, Zhang J, Xu R, et al. Developments in molecular docking technologies for application of polysaccharide-based materials: A review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024, 64(24): 8540-8552.
- [91] Isa M A, Majumdar R S, Haider S. In silico docking and molecular dynamics simulation of 3-dehydroquinate synthase (DHQS) from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2018, 24(6): 132.
- [92] Yu Y, Xu S, He R, et al. Application of molecular simulation methods in food science: Status and prospects[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(6): 2684-2703.
- [93] Bachman J. Site-directed mutagenesis[J]. *Methods in enzymology*, 2013, 529: 241-248.
- [94] Yu J, Shi J, Zhang Y, et al. Molecular docking and site-directed mutagenesis of dichloromethane dehalogenase to improve enzyme activity for dichloromethane degradation[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 190(2): 487-505.
- [95] 曾静, 郭建军, 王通, 等. 蛋白质分子表面氨基酸突变提高植酸酶 Yi APPA 的活性和热稳定性[J]. *食品科学*, 2024, 45(18): 77-86.
- [96] Emruzi Z, Aminzadeh S, Karkhane A A, et al. Improving the thermostability of *Serratia marcescens* B4A chitinase via G191V site-directed mutagenesis[J]. *Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 116: 64-70
- [97] 贺志敏, 马文瑞, 于丽平, 等. 定点突变提高虎杖聚酮合酶的苯亚甲基丙酮合酶活性[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(07): 2806-2817.
- [98] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2019, 11(157): 107843.
- [99] Cloete L. Diabetes mellitus: An overview of the types, symptoms, complications and management[J]. *Nursing Standard*, 2022, 37(1): 61-66.

- [100]Chan J C, Chan K W A, Ho L L, et al. An asian multicenter clinical trial to assess the efficacy and tolerability of acarbose compared with placebo in type 2 diabetic patients previously treated with diet[J]. *Diabetes Care*, 1998, 21(7): 1058.
- [101]Yaghoubzad-maleki M, Habibi S, Heshmati E, et al. Bioinformatics and molecular dynamics studies on the human DISC1 in complex with the Nde11[J]. *Journal of Computational Biophysics and Chemistry*, 2023, 22(2): 147-156.
- [102]Campbell L K, White J R, Campbell R K. Acarbose: Its role in the treatment of diabetes mellitus[J]. *Annals of Pharmacotherapy*, 1996, 30(11): 1255-1262.
- [103]王芳, 周健, 王珊, 等. 费氏链霉菌脱氢酶 NeoE 的生物信息学分析及其对产新霉素的影响[J]. *中国抗生素杂志*, 2022, 47(12): 1260-1266.
- [104]张慧敏, 李剑芳, 等. 圆弧青霉脂肪酶基因序列的生物信息学分析[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(4): 602-608.
- [105]沈玲, 赵丽婷, 沈昱, 等. D-甘露糖异构酶的酶学性质探究和热稳定性改造[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(24): 103-110+124.
- [106]Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence[J]. *Proteomics*, 2004, 4(6): 1633-1649.
- [107]Mathis C L, Barrios A M. Histidine phosphorylation in metalloprotein binding sites[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2021, 225(237): 111606.
- [108]Ara K Z G, Pontus L, Fridjonsson O H, et al. A CGTase with high coupling activity using γ -cyclodextrin isolated from a novel strain clustering under the genus *Carboxydocella*[J]. *Glycobiology*, 2015(5): 514-23.
- [109]Hleapap J S, Blouin C. Evolutionary variance analysis of the Glycoside Hydrolase Family13: Structural evidence in classification and evolution[J]. *bioRxiv*, 2017, 06(8):1247-1253.
- [110]Subramani P A, Narala V R, Michael R D, et al. Molecular docking and simulation of Curcumin with Geranylgeranyl Transferase1(GGTase1) and Farnesyl Transferase (FTase)[J]. *Bioinformation*, 2015, 11(5): 248-253.
- [111]Ernest V, Sekar G, Mukherjee A, et al. Studies on the effect of AgNP binding on

- α -amylase structure of porcine pancreas and *Bacillus subtilis* by multi-spectroscopic methods[J]. *Journal of Luminescence*, 2014, 146(12): 263-268.
- [112]Wang Y, Bai Y, Ji H, et al. Insights into rice starch degradation by maltogenic α -amylase: Effect of starch structure on its rheological properties[J]. *Food hydrocolloids*, 2022, 124(PartA): 107289.
- [113]Poláček, Adam, Janeek T. Sequence-structural features and evolution of the α -amylase family GH119 revealed by the in silico analysis of its relatedness to the family GH57[J]. *Biologia*, 2023, 78(7): 1847-1860.
- [114]Zhong Y, Sagnelli D, Topbjerg H B, et al. Expression of starch-binding factor CBM20 in barley plastids controls the number of starch granules and the level of CO₂ fixation[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(1): 234-246.
- [115]Noree C, Sirinonthanawe N. Coupled regulations of enzymatic activity and structure formation of aldehyde dehydrogenase Ald4p[J]. *Biology Open*, 2020, 9(4): bio051110.
- [116]Liao H, Gong J Y, Yang Y, et al. Enhancement of the thermostability of *Aspergillus niger* α -L-rhamnosidase based on PoPMuSiC algorithm[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(8): e12945.
- [117]李振鑫. 阿卡波糖生产菌的基因改造及发酵工艺优化[D]. 上海: 中国医药工业研究总院, 2023.
- [118]Michio S, Namio H, Ichiro C, et al. Effects of a single administration of acarbose on postprandial glucose excursion and endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients: a randomized crossover study[J]. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 2006(3):837-842.
- [119]何若昱, 林福玉, 高向东, 等. 信号肽在大肠杆菌分泌系统中的研究与应用进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2021, 41(5): 87-93.
- [120]Alper E, Kamyar K, Akgün E, et al. Codon optimization: a mathematical programing approach[J]. *Bioinformatics*, 2020(13): 4012-4020.
- [121]Alirezaeizanjani Z, Trsemeier J H, Kamp C, et al. Tailoring codon usage to the underlying biology for protein expression optimization[J]. *Methods in molecular*

- biology, 2022, 2406: 85-92.
- [122]Arella D, Dilucca M, Giansanti A. Codon usage bias and environmental adaptation in microbial organisms[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2021, 296(3): 751-762.
- [123]Jin Y T, Ma C, Wang X, et al. Consistent clustering pattern of prokaryotic genes based on base frequency at the second codon position and its association with functional category preference[J]. Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences, 2022, 14(2): 349-357.
- [124]李倩倩, 李中媛, 冯舵, 等. 芽孢杆菌 β -折叠桶植酸酶的原核可溶性表达优化及包涵体复性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(08): 49-55.
- [125]Owji H, Nezafat N, Negahdaripour M, et al. A Comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications[J]. Journal of Cell Biology, 2018, 97(6): 422-441.
- [126]Al-masqari Z A, Guo H P, Wang R Y, et al. Effects of high temperature on water quality, growth performance, enzyme activity and the gut bacterial community of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Aquaculture Research, 2022, 53(9): 3283-3296.
- [127]Wu X Y, Tian Z N, Jiang X K, et al. Enhancement in catalytic activity of *Aspergillus niger* XynB by selective site-directed mutagenesis of active site amino acids[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(1): 249-260.
- [128]Zeng J, An D, Jiao C, et al. Cloning, expression, and characterization of a new pH- and heat-stable alginate lyase from *Pseudoalteromonas carrageenovora* ASY5[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(7): e12886.
- [129]李希希, 王嘉良, 曹卫, 等. 钙霉素聚酮链释放亚基蛋白性质优化及底物选择性[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 194-205.
- [130]Francis J W, Shao Z Y, Narkhede P, et al. The FAM86 domain of FAM86A confers substrate specificity to promote EE2-Lys525 methylation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2023, 299(7): 104842.
- [131]Jiang S J, Zhou Z F, Han J H. Enhanced enzyme thermostability of a family I.3

- lipase LipSR1 by T118A mutation at the calcium-binding site[J]. *Biotechnology Letters*, 2023,45(9): 1199-1207.
- [132]夏冰冰, 马岱, 叶子凡, 等. 定点突变提高海洋氧化节杆菌 KQ11 右旋糖酐酶的催化活性[J]. *生物工程学报*, 2024,40(09): 3072-3082.
- [133]Wang Z Q, Wang H Y, Feng T T, et al. Simultaneous enhancement of the thermostability and catalytic activity of D-Allulose 3-Epimerase from *Clostridium bolteae* ATTCBAA-613 based on the “back to consensus mutations” hypothesis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 72: 9297-9306.
- [134]刘嘉琦, 谭明, 董钧, 等. 环糊精葡萄糖基转移酶的分子改造及其在合成 α -熊果苷中的应用[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(6): 1845-1855.
- [135]Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(W1): W320-W324.
- [136]Leonardo F, Ricardo D S, Glaucius O, et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies[J]. *Molecules*, 2015, 20(7): 13384-13421.
- [137]李梦, 刘艳丽, 王真, 等. 利用丙氨酸扫描突变探究 crotalphine 结构与镇痛活性的关系[J]. *生物技术通讯*, 2020, 31(06): 710-713.
- [138]Karmakar S, Nag S K, Taher M, et al. Enhanced substrate specificity of thermostable cytochrome P450 CYP175A1 by site saturation mutation on tyrosine 68[J]. *The Protein Journal*, 2022, 41(6): 659-770.
- [139]Lian K, Zhang M, Liang X, et al. Identification and characteristics of a novel cecropin from the armyworm, *Mythimna separata*[J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1): 233.

攻读硕士期间成果

- (1) 薛正莲, **王雨晴**, 李闯, 等. 阿卡维基转移酶的异源表达及转糖基作用[J]. 食品科学, 2025, 46(02): 81-88.
- (2) **王雨晴**, 张贤, 李闯, 等. 阿卡波糖代谢途径、酶系及发酵菌种改造的研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(12): 4760-4773.
- (3) Chuang L, Zhang X, **Wang YQ**, et al. Multi-path asymmetric reactions of racemic epoxides mediated by an engineered *Escherichia coli* overexpressing SfEH2, a newfound epoxide hydrolase from *Streptomyces fradiae* SF-2[J]. Process Biochemistry, 2024, 142(2024): 204-211.

致谢

即将来临的盛夏，意味着又一个毕业季的到来。在键盘上敲下这句话的时候，我的学生时代即将要落幕的画面才有了实感，虽然窗外还没有聒噪的蝉鸣声，但宿舍楼外茂密的梧桐树叶已为抵御即将来临的烈日做好准备。三载光阴转瞬即逝，在这个校园里经历过的林林总总还历历在目，二十年求学光阴，至此画下句号。

桃李不言下自成蹊，首先，感谢我的两位导师薛正莲和李闯，感谢他们成为我学术海域中的灯塔，指引我不断前行，最终平稳到达了彼方。

接着，感谢我的母亲父亲，奶奶爷爷及其他关爱我的至亲们，感谢你们的托举，让我从乡间小道和一望无际的田野中看到了不一样的天空。

然后，感谢丁永康同学，无论在生活中还是学习中，你是我每次面对困难时的依靠，是我想要携手相伴一生的人，愿我们都不要忘记来时的路。

此时，正值棠梨花盛开的季节，感谢我生命中最重要的三个女孩子，刘亚茹，吴敏和周缓缓，你们是我干涸心灵的养料，是我一生一次幸会的感动。

最后，感谢各位论文评审专家，感谢我的师妹张贤，感谢我的室友黄杰、朱淼淼和高梦蝶，感谢有你们，让这几年的光阴变得鲜活起来。最后的最后，我想用四年前大学毕业时候的那句话作为结尾：“一起去啊，更远的地方。”借以此句，希望未来的我们都会迈向属于自己的康庄大道。