

基于酮基荧光探针的转氨酶高通量筛选及应用

叶鸿博, 李清叶, 汤晓玲, 郑仁朝*

浙江工业大学 生物工程学院, 浙江 杭州 310014

叶鸿博, 李清叶, 汤晓玲, 郑仁朝. 基于酮基荧光探针的转氨酶高通量筛选及应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 416-426.

YE Hongbo, LI Qingye, TANG Xiaoling, ZHENG Renchao. Transaminases: high-throughput screening via a ketone-fluorescent probe and applications[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 416-426.

摘要: 转氨酶是一类催化氨基酸和酮酸之间氨基转移反应的酶, 在有机胺及其衍生物的合成中具有重要作用。然而天然酶通常对非天然底物催化效率低, 限制了其广泛应用。对转氨酶的蛋白质改造可有效提升其催化性能, 从而拓宽应用范围。本研究基于对甲氧基-2-氨基苄胺肟(para-methoxy-2-amino benzamidoxime, PMA)与酮类化合物之间产生荧光显色反应从而能够有效监测酮类化合物浓度变化的机制, 建立了适用于转氨酶活性的高通量筛选方法, 通过体系的系统优化, 显著提升了筛选方法的高效性、灵敏性和精确性, 以 4-羟基-2-丁酮为底物, 构建了放线菌(*Actinobacteria* sp.)来源的转氨酶突变文库, 成功获得了活力提升的突变体, 提高了(*R*)-3-氨基丁醇的酶法合成效率。本研究为高效筛选、改造转氨酶并实现其应用奠定了重要基础。

关键词: 转氨酶; 高通量筛选; 荧光显色反应; 有益突变体

Transaminases: high-throughput screening via a ketone-fluorescent probe and applications

YE Hongbo, LI Qingye, TANG Xiaoling, ZHENG Renchao*

College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: Transaminases are a class of enzymes that catalyze the transfer of amino between amino acids and keto acids, playing an important role in the biosynthesis of organic amines and the corresponding derivatives. However, natural enzymes often have low catalytic efficiency against non-natural substrates, which limits their widespread applications. Enzyme engineering serves as an effective approach to improve the catalytic properties and thereby expand the

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFA1501400); 中国石油化工股份有限公司石油化工科学研究院资助科研项目

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA1501400) and the Sinopec Research Institute of Petroleum Processing.

*Corresponding author. E-mail: zhengrc@zjut.edu.cn

Received: 2024-03-11; Accepted: 2024-06-04

application scope of transaminases. In this study, a high-throughput screening method for transaminases was established based on the fluorescent color reaction between methoxy-2-aminobenzoxime (PMA) and ketones. According to the changes in fluorescence intensity, the concentration changes of ketones could be easily monitored. The efficiency, sensitivity, and accuracy of the screening method were improved by optimization of the system. With 4-hydroxy-2-butanone as the substrate, the mutant library of the transaminase from *Actinobacteria* sp. was established and a mutant with increased activity was successfully obtained, which improved the production efficiency of (*R*)-3-aminobutanol by enzyme-catalyzed synthesis. This study laid an important foundation for efficient screening, modification, and application of transaminase.

Keywords: transaminase; high-throughput screening; fluorescent color reaction; positive mutant

转氨酶是一类以 5'-磷酸吡哆醛(pyridoxal 5'-phosphate, PLP)为辅因子, 催化氨基酸和酮酸间氨基转移反应的酶^[1], 在手性胺等化合物的合成中发挥着重要作用^[2]。(R)-3-氨基丁醇是抗艾滋病药物杜鲁特韦的关键手性中间体^[3], 同时也可用于合成抗肿瘤药物 4-甲基环磷酰胺和青霉烯类抗生素^[4], 其绿色、高效制造受到了广泛关注。目前, (R)-3-氨基丁醇的主要通过化学法合成^[5]。例如以丙酮和甲醛为起始原料, 在碱催化下合成 4-羟基-2-丁酮后与盐酸羟胺反应得到 4-羟基-2-丁酮肟, 加氢得到消旋 3-氨基丁醇后经酒石酸拆分, 从而制备(R)-3-氨基丁醇。但上述反应存在步骤繁琐、得率低、三废排放量大等问题, 严重限制了其工业应用。生物催化被认为是解决此类问题的有效方法, 具有反应条件温和、对映选择性高等优点, 已普遍用于医药、农药中间体和精细化学品的合成中^[6]。近年来, 转氨酶^[7]、亚胺还原酶^[8]、胺脱氢酶^[9]等陆续被开发用于手性胺的合成^[10]。以转氨酶为生物催化剂, 在氨基供体的作用下, 可一步催化 4-羟基-2-丁酮合成(R)-3-氨基丁醇, 反应过程简单、原子经济性高、环境友好, 具有广阔的应用前景^[11]。然而, 自然界中存在的天然酶是长期适应自然进化的结果, 结构严密、调控精确, 通常对非天然底物催化效率低, 是制约其应用的关键瓶颈之一。因此, 创制高效

转氨酶并建立生物酶法合成如(R)-3-氨基丁醇等产品的路线迫在眉睫。

随着生物技术的快速发展, 基于计算机辅助设计的蛋白质改造成为有效提升酶活性、选择性等催化属性的重要策略^[12-14]。Khatik 等^[15]开发了利用 *R*-选择性转氨酶(ATA-415)合成(R)-3-氨基丁醇的路线, 对 12 g/L 底物的转化率达 75%; Liu 等^[16]通过活性位点重塑和共识序列策略对沉积物矿弯菌(*Fodinicurvata sediminis*)来源的转氨酶进行定向进化, 获得了催化效率提高 7.95 倍和热稳定性增强的四重突变体, 其对 5 mmol/L 底物的转化率为 82.4%。尽管以上研究对构建酶法合成(R)-3-氨基丁醇具有重要意义, 但是仍存在合成效率低、规模化生产困难等问题。因此, 急需进一步建立转氨酶高效筛选和改造策略以提升其应用属性。

本研究基于转氨酶催化底物 4-羟基-2-丁酮与对甲氧基-2-氨基苄胺肟(para-methoxy-2-amino benzamidoxime, PMA)反应生成荧光物质的机理^[17-18], 开发了基于酮基荧光探针的新型转氨酶高通量筛选方法(图 1)。该方法可根据荧光强度跟踪底物浓度变化, 从而有效监测和评估转氨酶的活性^[19]。同时, 为提高转氨酶的催化性能, 利用计算机辅助设计, 锚定了放线菌(*Actinobacteria* sp.)来源转氨酶(As-TA)活性口袋附近的关键氨基酸残基, 通过饱和突变方法建

立了突变文库并利用该高通量方法筛选获得了活性提高的突变体,对 As-TA 及其突变体进行了构效关系分析,以期指导对该酶的进一步改造,从而为其高效催化合成(R)-3-氨基丁醇奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株、质粒与化学试剂

不同 pH 值(4.5、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5)的磷酸缓冲液制备:分别称取 5.0 g 磷酸二氢钾和 4.0 g 磷酸氢二钾,溶解于 500 mL 去离子水中,以分别制得 50 mmol/L 浓度的磷酸二氢钾溶液和磷酸氢二钾溶液。这些溶液将用于调整和制备所需 pH 值的磷酸缓冲液。

对甲氧基-2-氨基苄胺肟溶液(2 mol/L):将 362 mg PMA 溶于 1 mL DMSO 中进行配制。

对甲氧基-2-氨基苄胺肟:由实验室自主合成,并通过质谱确定。

4-羟基-2-丁酮购自上海毕得医药科技股份有限公司;丙酮购自上海泰坦科技股份有限公司;甲氧基丙酮购自上海迈瑞尔生化科技有限公司;乙腈购自杭州邦易化工有限公司;二甲

基亚砷购自杭州邦易化工有限公司;其余试剂均为市售分析纯。选用大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)用于转氨酶基因的表达,质粒 pET-28b 购自 Novagen 公司,表达 As-TA 的重组质粒和重组大肠杆菌均由实验室前期构建获得^[20]。

1.2 转氨酶高通量筛选

本研究建立了基于酮基荧光探针的转氨酶高通量筛选方法。首先确定激发波长(Ex)和发射波长(Em),用多扫描光谱(SpectraMax M5)分别对缓冲液、4-羟基-2-丁酮、PMA 和反应混合物进行全波长扫描。在此基础上建立的高通量筛选流程如图 1 所示。

在已灭菌的 LB 培养基中加入卡那霉素(终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),混合均匀后倒入灭菌的平板中,用排枪抽取 800 μL 培养基到 96 孔板中,再从突变的平板中用灭菌的牙签将单菌落挑到 96 孔板中。37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下摇床培养 20 h。在已灭菌的培养基中加入卡那霉素(终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 IPTG (终浓度为 0.1 mmol/L)。另取 96 孔板加入 600 μL LB 培养基,再向其中加入 200 μL 种子液。于 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下摇床培养 12 h。最后将

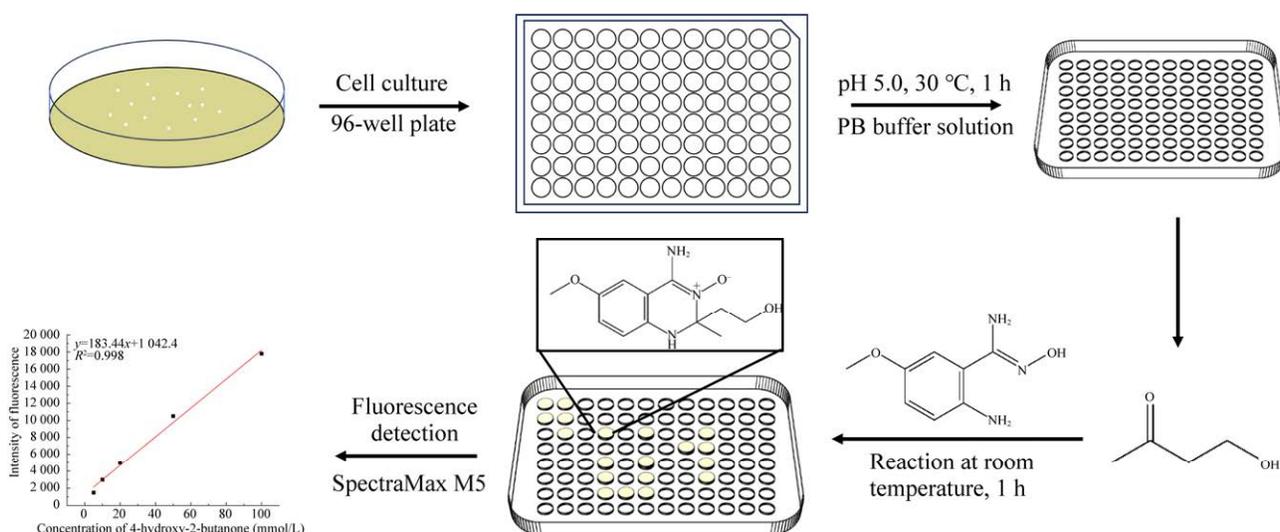


图 1 转氨酶催化酮类化合物的高通量筛选流程图

Figure 1 High-throughput screening flowchart of transaminases for biocatalysis of ketone compounds.

诱导表达 12 h 后的菌液, 4 000 r/min 离心 10 min 后弃去上清液, 离心后的湿菌体用 PB 缓冲液溶解稀释。其次, 取 10 μ L 4-羟基-2-丁酮(溶于乙腈)和 1 μ L PMA (DMSO 溶液配制)与 89 μ L PB 缓冲液于 96 孔板(Costar 3603)充分混合, 总体积为 100 μ L, 在室温下保存, 并用多扫描光谱(SpectraMax M5)进行反应监测, 根据荧光强度变化对转氨酶的活性进行初步的筛选。

1.3 高通量筛选方法的 Z 因子分析

确定 Z 因子以评估该方法在高通量筛选应用中的潜力^[21]。以转染混合物中含有重组大肠杆菌细胞的比色反应混合物吸光度为阳性对照(p), 以不含重组大肠杆菌细胞的比色反应混合物吸光度为阴性对照(n)。Z 因子计算见公式(1):

$$Z = 1 - \left[\frac{3 \times (\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|} \right] \quad (1)$$

式中: μ_p 、 μ_n 为正、负控制的均值; σ_p 、 σ_n 为标准差; 当 $0.5 \leq Z < 1$ 时, 说明样品信号分布与参照信号之间的分离程度良好, 表明此分析方法优良; $0 < Z < 0.5$ 反映出信号分布具有中等程度的分离, 表明该分析方法可进行分析; $Z=0$ 表示分离差, 属于“是/否”类型的测定; $Z < 0$ 表示不能进行筛选。

1.4 转氨酶突变文库的构建及筛选

饱和突变文库构建: 通过 AutoDock Vina 软件的分子对接及结构分析结果, 锚定了影响 As-TA 的关键氨基酸残基, 确定 L206、E232、P234 及 N237 为突变热点, 并设计饱和突变引物, 简并密码子为 NNK。以 pET-28b-As-TA 为模板, 使用全质粒 PCR 扩增获得重组质粒。其中, PCR 反应体系: 50 μ mol 2 \times Phanta Max Buffer, 15 pmol 上、下游引物, 100 ng 模板, 0.5 U Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase, 5 μ mol dNTPs, 20 μ L 去离子水。PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s,

70 $^{\circ}$ C 2.5 min, 共 30 个循环。

重组质粒的转化: 将 2 μ L 的重组质粒加入到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中, 冰浴 30 min, 42 $^{\circ}$ C 热激 90 s, 再冰浴 90 s, 随后加入 600 μ L 的 LB 液体培养, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 复苏 1 h。4 000 r/min 离心 2 min, 弃 550 μ L 上清, 将细胞重悬涂布于含卡那霉素(终浓度为 50 μ g/mL)的 LB 固体培养基上, 构建完成饱和突变文库。

突变文库的筛选: 基于上述构建的高通量筛选方法对 As-TA 突变文库进行初筛, 所获得的阳性克隆子进一步进行复筛, 具体流程如下: 将初筛获得的阳性克隆子于 10 mL LB 液体培养基(蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, 卡那霉素 50 μ g/mL)中培养过夜后, 按 2%接种量接种至含 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 2 h 后加入 IPTG (终浓度为 0.1 mmol/L), 并于 28 $^{\circ}$ C 条件下诱导 10 h 后离心弃去上清液获得重组细胞。在 10 mL 反应体系中加入 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)、1 mmol/L 磷酸吡哆醇(PLP)、2% DMSO、100 mmol/L 4-羟基-2-丁酮、400 mmol/L 异丙胺以及一定量的重组细胞, 在 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下水浴, 定期取样后分别通过气相(gas chromatography, GC)和高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)进行底物和产物的检测。

1.5 转氨酶及突变体结构模拟分析

运用分子动力学模拟软件 GROMACS 2023 对蛋白小分子复合模型进行研究。通过 b2B 平台的 Acypype 工具分析了 4-羟基-2 丁酮和 5'-磷酸吡哆醇(pyridoxol 5'-phosphate, PMP)这 2 种小分子以获取其拓扑结构, 利用 GROMACS 内置的 grompp 工具生成主要蛋白酶的拓扑文件。模拟体系为十二面体溶剂化盒子, 为模拟

时长 1 ns。恒定体积温度平衡, 时间为 500 ps; 恒定压力温度平衡时间为 1 000 ps, 两者的温度和压力设置为 300 K 和 1 bar。预平衡完成后, 进行 100 ns 的动力学模拟以评估蛋白酶运动轨迹。模拟过程中, 疏水作用截断值设定为 1.2 nm; 库仑半径设定为 1.2 nm。模拟时间步长为 2 fs, 每 10 ps (即 5 000 步) 保存一次模拟构象。模拟结束后, 对运动轨迹进行均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)、均方根波动(root mean square fluctuation, RMSF) 和溶剂可及表面积(solvent-accessible surface area, SASA) 分析。

1.6 GC 和 HPLC 检测方法

底物采用 HP-5 气相色谱柱(尺寸为 30 m×0.32 mm, 膜厚 1.0 μm) 进行分析。分析条件设定如下: 分流比为 30:1, 以氮气作为载气, 进样量设置为 1 μL。进样口温度控制在 230 °C。色谱柱初始温度设定为 50 °C, 并保持 5 min, 随后以每分钟 15 °C 的速率升温至 230 °C, 并保持该温度 6 min, 检测器温度保持在 250 °C。

产物经手性衍生化试剂 N α -(5-氟-2,4-二硝

基苯基)-L-丙氨酰胺(1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide, FDAA) 衍生后利用 HPLC 进行分析。HPLC 检测条件: Agilent 高效液相色谱仪, 色谱柱为 C18 (Welchrom, 4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相由溶液 A: 0.1% 三乙胺缓冲液(pH 2.5, 用磷酸调节): 甲醇=90: 10 (体积比) 和溶液 B: 0.1% 三乙胺缓冲液(pH 2.5, 用磷酸调节): 甲醇=10: 90 (体积比) 组成, 检测过程中采用梯度洗脱程序(0 min: 60% 溶液 A 和 40% 溶液 B; 15–20 min: 30% 溶液 A 和 70% 溶液 B; 24–30 min: 60% 溶液 A 和 40% 溶液 B)。检测波长为 340 nm, 流速为 1 mL/min, 进样量为 10 μL, 柱温设定为 30 °C。(R)-3-氨基丁醇及(S)-3-氨基丁醇的出峰时间分别为 19.620 min 和 15.646 min (图 2)。

2 结果与分析

2.1 转氨酶高通量筛选方法的构建与体系优化

基于 PMA 与 4-羟基-2-丁酮的反应机制(图 3), 对反应体系中各个组分(缓冲液、4-羟基-2-丁

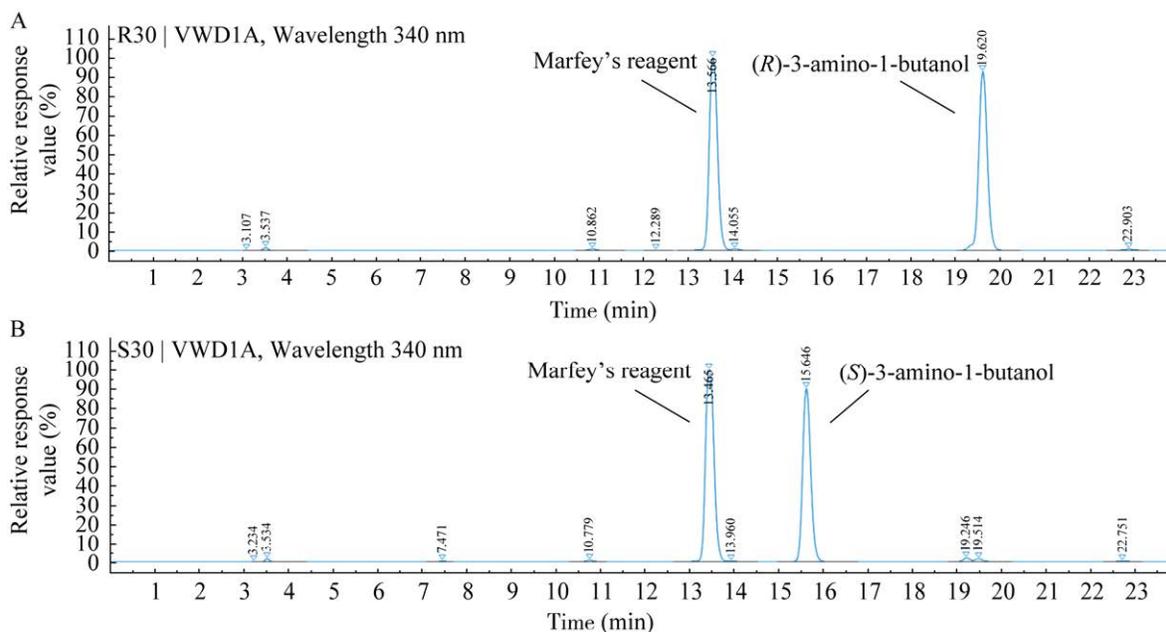


图 2 (R)-3-氨基丁醇(A)和(S)-3-氨基丁醇(B)液相色谱图

Figure 2 HPLC analysis result of (R)-3-amino-1-butanol (A) and (S)-3-amino-1-butanol (B).

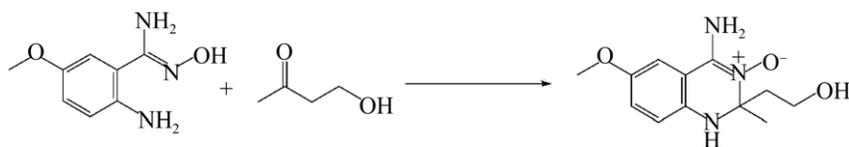


图3 PMA与4-羟基-2-丁酮反应机制

Figure 3 Reaction mechanism between PMA and 4-hydroxy-2-butanone.

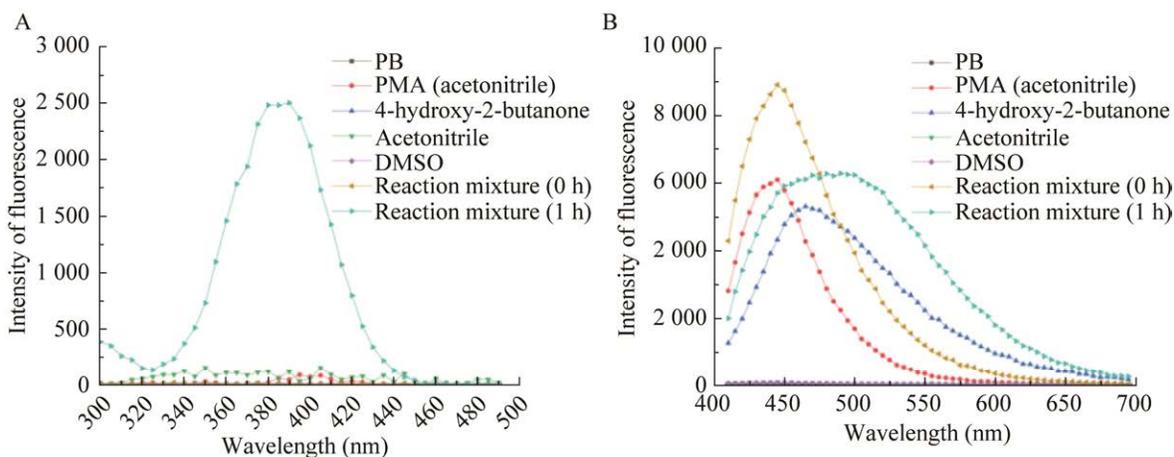


图4 激发光谱(A)和发射光谱(B)全波长扫描

Figure 4 Full wavelength scanning excitation spectrum (A) and emission spectrum (B).

酮、PMA)以及最终反应混合物进行全波长光谱扫描。光谱分析(图4)发现,反应于1 h后450 nm波长处荧光强度明显减弱而520 nm波长附近荧光显著增强。此外,对转氨酶催化反应产物也进行了同样的全波长扫描,在520 nm波长处没有明显的荧光强度,证明可根据PMA与4-羟基-2-丁酮反应产物的荧光强度进行转氨酶活性的筛选。

为确定最佳反应条件,采用单因素实验对反应体系中的pH值、PMA浓度和反应时间进行优化(图5)。结果表明,在pH 5.0条件下显示出最大的荧光强度,且以1 mol/L PMA为荧光反应液浓度时荧光强度达到最大,因此1 mol/L PMA为最佳浓度。由反应时间曲线可以看出前2 h荧光强度与反应时间呈线性关系,设定1 h为反应时间。同时,在上述条件下构建了不同浓度(终浓度分别为0.5、1、2、5、10 mmol/L)

的4-羟基-2-丁酮在反应1 h后的标准曲线。排除背景干扰后的4-羟基-2-丁酮标准曲线 R^2 为0.998,且经过重复实验后的4-羟基-2-丁酮标准曲线的 R^2 仍大于0.990(图5),体现了其具有较强的抗干扰能力和高灵敏度,确定了设置的反应时间足以准确反映反应的程度和效率。

同时计算得到该高通量方法的Z因子为0.65,体现了该方法信号分布的分离程度良好,可以用于高通量筛选。这些优化结果为基于PMA荧光的高通量筛选提供了重要的实验参数参考。

为精确评估该高通量筛选技术的准确性,本研究采用特定转氨酶菌株催化4-羟基-2-丁酮的转化,并利用PMA荧光比色法及气相色谱对反应过程进行监测。实验中,先称取0.5 g菌体置于10 mL PB缓冲液中,随后加入100 mmol/L浓度的4-羟基-2-丁酮。设定反应时间为12 h,

每 2 h 取 200 μL 反应液, 分别应用 PMA 荧光比色法和气相色谱法进行定量分析。结果表明, 荧光比色法与气相色谱法测定的结果具有较高一

致性, 验证了该筛选方法的准确性(表 1)。此外, 反应动力学分析进一步证实了反应的稳定性和重复性, 确保了实验条件下测定结果的可靠性。

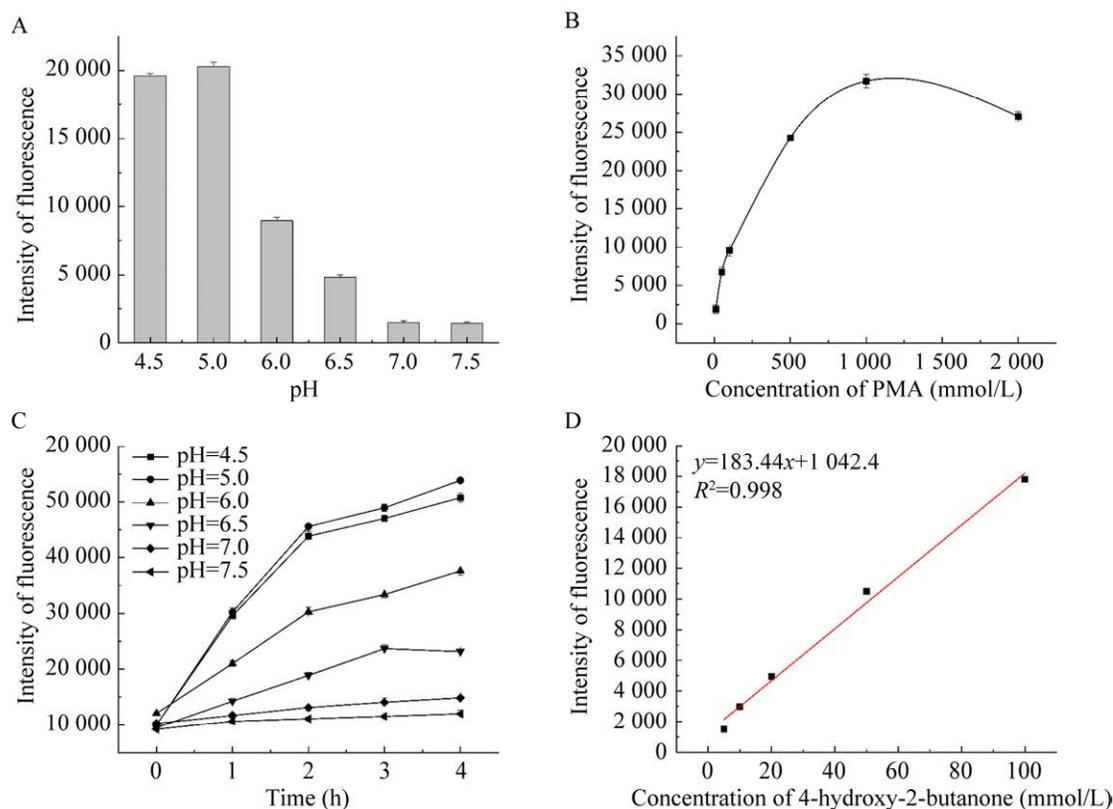


图 5 高通量筛选方法的优化 A: 不同 pH 下反应 1 h 的荧光强度; B: 不同 PMA 浓度下的荧光强度; C: 不同反应时间下的荧光强度; D: 4-羟基-2-丁酮标准曲线图。

Figure 5 Optimization of the high-throughput screening method. A: Fluorescence intensity at different pH values after 1 h reaction; B: Fluorescence intensity at different PMA concentrations; C: Fluorescence intensity after reaction for different times; D: Concentration standard curves of hydroxy-2-butanone.

表 1 高通量筛选方法和气相(GC)检测方法获得的底物转化率对比结果

Table 1 Comparison of substrate conversion obtained from high-throughput screening method and GC detection method

Reaction time (h)	Conversion of substrate (%)	
	Results from GC analysis	Results from high-throughput screening
2	16.94±0.31	15.86±0.41
4	30.56±0.42	31.58±0.45
6	42.59±0.44	40.45±0.53
8	51.89±1.23	52.11±0.89
10	54.07±0.79	55.46±1.09
12	56.43±0.84	56.12±0.63

2.2 高通量筛选方法应用的拓展

为了评估 PMA 作为酮类化合物探针的应用潜力,本研究探讨了多种具有不同结构特征的酮类物质在 PB 缓冲液中与 PMA 的反应性。研究发现,酮类化合物所生成的二氢喹啉衍生物可以通过荧光检测技术成功检出。此外,建立酮类化合物的浓度与其荧光强度之间的定量关系也显得尤为重要。本研究选取的几种代表性底物,包括 4-羟基-2-丁酮、丙酮和甲氧基丙酮,在不同浓度下所表现出的荧光强度与浓度的相关性均高于 0.990。这一结果(图 6)不仅证明了 PMA 作为酮类化合物探针的有效性,而且为其进一步的应用提供了定量基础。

2.3 转氨酶突变文库的构建及筛选

以 4-羟基-2-丁酮为底物,建立了来源于

Actinobacteria sp.转氨酶(As-TA)的突变文库,并对活力提升的突变体进行高效筛选。

经过高通量培养获得突变体重组细胞,并催化 4-羟基-2-丁酮合成(R)-3-氨基丁醇。反应液与 PMA 进行混合,经反应过程的荧光强度监测,确定 96 孔反应板上 D4、E5 所在孔反应液的荧光强度明显降低(表 2),表明孔内菌体的底物消耗能力要强于对照(A1、A2、H11、H12),从而初步筛选获得对应孔中培养的突变体活力提升。进一步对活力提高的突变体进行摇瓶培养后分析其酶活,从 GC 检测结果及测序结果可以看出突变体的酶活性提高了 40%,且两孔中培养的优势突变体均为 As-TA-N237M。上述结果表明本研究所构建的高通量筛选方法对转氨酶活性筛选具有可行性。

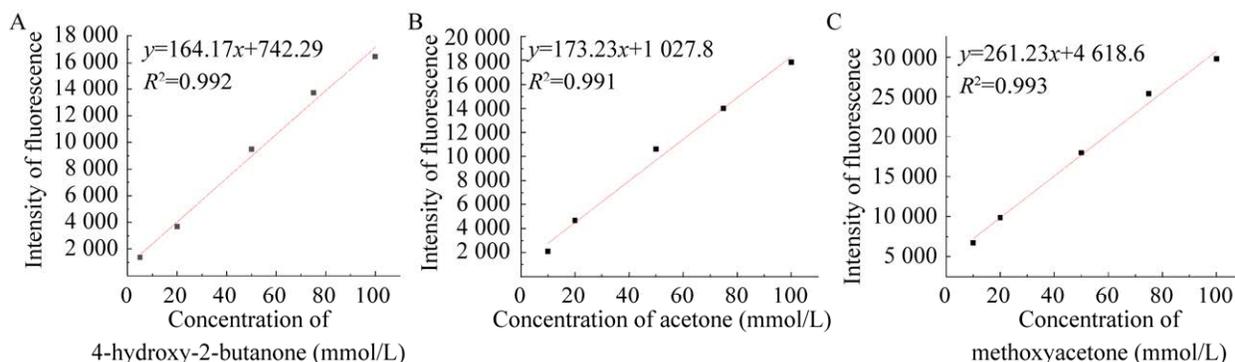


图 6 酮类化合物 4-羟基-2-丁酮(A)、丙酮(B)和甲氧基丙酮(C)浓度与荧光强度关联曲线

Figure 6 Correlation curves between fluorescence intensity and concentration of ketone compounds 4-hydroxy-2-butanone (A), acetone (B), and methoxyacetone (C).

表 2 基于荧光强度变化的转氨酶突变文库 96 孔板高通量筛选结果

Table 2 High-throughput screening results of transaminase mutation library on 96 well plates based on fluorescence intensity changes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4 994	4 860	6 855	9 272	9 522	9 045	9 265	9 219	8 777	7 100	9 040	9 524
B	9 540	9 549	9 517	8 991	7 226	9 029	6 641	8 583	7 079	8 451	9 484	9 268
C	9 258	8 128	9 102	8 958	9 497	8 968	7 483	9 342	6 840	8 150	8 955	7 282
D	9 216	9 334	9 094	3 609	9 308	8 982	8 186	9 091	8 480	8 125	9 307	6 429
E	9 054	9 523	5 475	7 390	3 699	9 555	9 375	8 963	8 090	8 805	9 160	9 448
F	9 325	9 336	9 007	9 187	7 712	9 081	9 574	6 519	9 471	7 133	9 175	9 457
G	9 417	8 628	7 693	8 509	9 148	9 111	6 366	8 967	9 287	6 456	9 177	9 341
H	9 476	8 969	7 681	9 020	9 435	9 320	7 882	9 003	9 041	7 527	4 720	4 775

Note: A1, A2, H11 and H12 were the control group.

2.4 转氨酶及其突变体催化性能表征及合成(R)-3-氨基丁醇的反应进程

将从 96 孔板中筛选出来的突变体 *As*-TA-N237M 进行培养后纯化, 对其酶促动力学进行表征。结果显示, 突变体的 K_m 为 19.39 mmol/L, 低于野生型(21.26 mmol/L), k_{cat} 为 1 742 s⁻¹, 比野生型(1 414 s⁻¹)有所提高, 且 k_{cat}/K_m [89.86 L/(mmol·s)] 要高于野生型[66.51 L/(mmol·s)] (表 3)。证明突变体的催化效率和对底物亲和力都要优于野生型。

以表达野生型 *As*-TA 和突变体 *As*-TA-N237M 的重组细胞为催化剂, 考察其催化 4-羟基-2-丁酮合成(R)-3-氨基丁醇的反应进程。如图 7 所示, 以 50 g/L *As*-TA 重组细胞催化 200 mmol/L 底物, 反应 16 h, 转化率达 67.42%, 与本课题组前期报道的转化率相一致^[20]。而 50 g/L 的

表 3 转氨酶 *As*-TA 及其突变体的酶促动力学
Table 3 Enzyme kinetics of *As*-TA and *As*-TA-N237M

Enzyme	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))
<i>As</i> -TA	21.26	1 414	66.51
<i>As</i> -TA-N237M	19.39	1 742	89.86

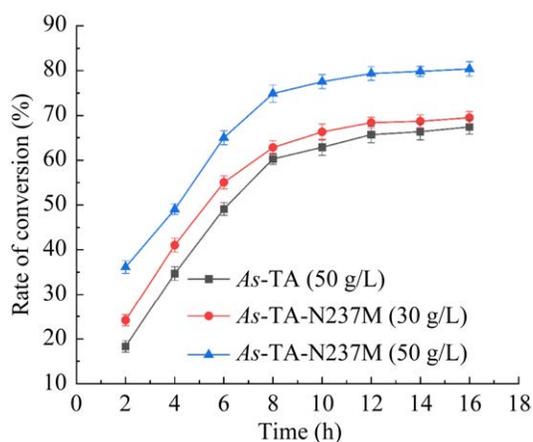


图 7 *As*-TA 和 *As*-TA-N237M 催化 4-羟基-2-丁酮的反应进程

Figure 7 The reaction process of 4-hydroxy-2-butanone catalyzed by *As*-TA and *As*-TA-N237M.

As-TA-N237M 重组细胞催化反应的转化率为 80.36%, 比野生型提高了 12.94%。进一步考察了 30 g/L *As*-TA-N237M 重组细胞的催化效率, 结果显示其转化率达 68.49%, 与野生型相当。突变体 *As*-TA-N237M 所展现的更优催化性能为构建酶法合成(R)-3-氨基丁醇的工艺路线奠定了基础。

2.5 转氨酶及其突变体结构的分子动力学模拟分析

基于野生型 *As*-TA 和突变体 *As*-TA-N237M 的酶与底物复合物预测结构, 对其进行 100 ns 的分子动力学模拟。对其运动轨迹分析结果显示(图 8), 突变体的平均 RMSD (0.32 nm) 要低于野生型的平均 RMSD (0.32 nm), 表明酶整体的柔性增加; 突变体的平均 RMSF (0.128 nm) 小于野生型的平均 RMSF (0.136 nm), 说明配体小分子对酶的干扰降低; 突变体的平均 SASA (163.82 nm²) 低于野生型的平均 SASA (164.66 nm²), 表明酶疏水区域的可及表面积减少。综合而言, 酶柔性增加导致了催化活性的提高; 小分子对酶干扰减少使得酶的稳定性增加; 酶疏水区域减少表明酶与小分子之间的结合更为紧密, 这些结果均与酶催化效率的提高密切相关。

同时, 在进行原始菌株 *As*-TA 与突变菌株 *As*-TA-N237M 的蛋白质与小分子(4-羟基-2-丁酮)的对接模拟分析中, 对接结果显示 4-羟基-2-丁酮的羰基与辅酶的氨基间形成的氢键长度从 2.94 Å 缩短至 2.05 Å (图 9)。这一变化可能源于辅酶邻近的第 237 位氨基酸由含羰基和羟基的残基变为含巯基的残基, 导致静电势的改变^[22]。此变化促使辅酶以更为适宜的姿态与 4-羟基-2-丁酮进行对接, 最终提升了突变体的酶活性。

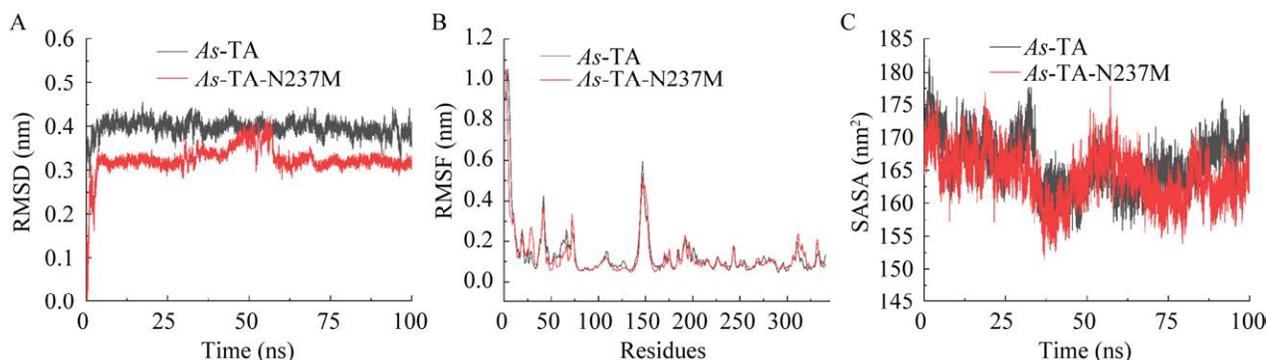


图 8 野生型转氨酶及其突变体的 RMSD (A)、RMSF (B)和 SASA (C)分析

Figure 8 RMSD (A), RMSF (B) and SASA (C) analysis of wild type *As-TA* and the mutant *As-TA-N237M*.

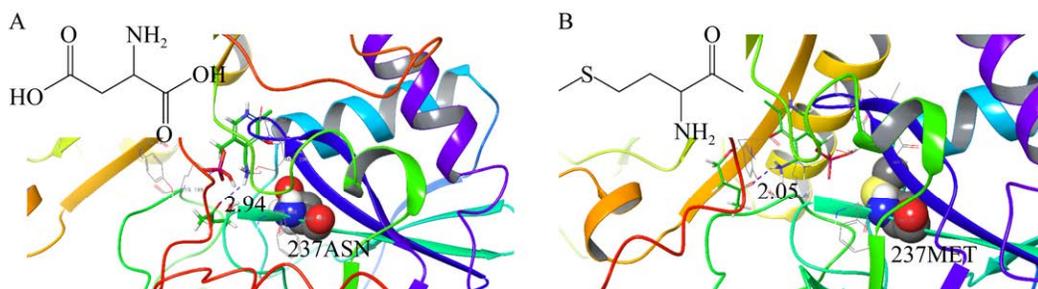


图 9 野生型转氨酶(A)及其突变体(B)与底物的对接模拟图

Figure 9 Docking simulation diagram between substrate and wild type *As-TA* (A) and the mutant *As-TA-N237M* (B).

3 讨论与结论

建立高通量筛选策略对于从庞大的蛋白质改造突变文库中筛选获得有益突变体，并应用于化学品的高效合成至关重要。本研究报道了一种针对转氨酶催化活性的高效筛选技术。研究发现，4-羟基-2-丁酮与 PMA 反应所生成的化合物，在激发波长为 380 nm 和发射波长为 520 nm 处展现出显著的荧光特性。通过筛选条件系统优化，可有效监测 4-羟基-2-丁酮浓度变化，基于此，成功建立了高效、灵敏、精确的转氨酶对 4-羟基-2-丁酮催化活力的筛选方法。从转氨酶突变文库中筛选获得的阳性突变体对 4-羟基-2-丁酮的催化效率显著提升，强化了转氨酶催化合成(*R*)-3-氨基丁醇的能力，对构建酶法合

成(*R*)-3-氨基丁醇的技术路线具有重要意义。在此基础上，进一步对野生型及突变体进行了构效关系研究，为其后续的改造提供了重要指导。随着分子改造手段的进一步发展和完善，有望显著提升转氨酶催化性能，实现其在工业规模中的应用。

REFERENCES

- [1] BEZSUDNOVA EY, BOYKO KM, NIKOLAEVA AY, ZEIFMAN YS, RAKITINA TV, SUPLATOV DA, POPOV VO. Biochemical and structural insights into PLP fold type IV transaminase from *Thermobaculum terrenum*[J]. Biochimie, 2019, 158: 130-138.
- [2] NAKAI Y, HAYASHI H, KAGAMIYAMA H. Cloning and characterization of the *tyrB* gene from *Salmonella typhimurium*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1308(3): 189-192.
- [3] POLLICITA M, SURDO M, Di SANTO F, CORTESE MF, FABENI L, FEDELE V, MALET I, MARCELIN AG, CALVEZ V, CECCHERINI-SILBERSTEIN F,

- PERNO CF, SVICHER V. Comparative replication capacity of raltegravir-resistant strains and antiviral activity of the new-generation integrase inhibitor dolutegravir in human primary macrophages and lymphocytes[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2014, 69(9): 2412-2419.
- [4] KIM J, KYUNG D, YUN H, CHO BK, SEO JH, CHA M, KIM BG. Cloning and characterization of a novel beta-transaminase from *Mesorhizobium* sp. strain LUK: a new biocatalyst for the synthesis of enantiomerically pure beta-amino acids[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(6): 1772-1782.
- [5] RAO YS, BABU BH, AMINUAL I, NAGESHWAR D, SATYANARAYANA PVV. An improved preparation of (*R*)-3-aminobutanol, a key intermediate for the synthesis of dolutegravir sodium[J]. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2017, 14(12): 1371-1375.
- [6] TOOGOOD HS, SCRUTTON NS. Discovery, characterisation, engineering and applications of ene reductases for industrial biocatalysis[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 8(4): 3532-3549.
- [7] GUO F, BERGLUND P. Transaminase biocatalysis: optimization and application[J]. *Green Chemistry*, 2017, 19(2): 333-360.
- [8] MANGAS-SANCHEZ J, FRANCE SP, MONTGOMERY SL, ALEKU GA, MAN H, SHARMA M, RAMSDEN JI, GROGAN G, TURNER NJ. Imine reductases (IREDS)[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, 37: 19-25.
- [9] SHARMA M, MANGAS-SANCHEZ J, TURNER NJ, GROGAN G. NAD(P)H-dependent dehydrogenases for the asymmetric reductive amination of ketones: structure, mechanism, evolution and application[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2017, 359(12): 2011-2025.
- [10] TURNER NJ, TRUPPO MD. Biocatalytic routes to nonracemic chiral amines[J]. *ChemInform*, 2010, 42: 431-459.
- [11] GOMM A, O'REILLY E. Transaminases for chiral amine synthesis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2018, 43: 106-112.
- [12] VICTORINO Da SILVA AMATTO I, GONSALES Da ROSA-GARZON N, ANTÔNIO de OLIVEIRA SIMÕES F, SANTIAGO F, PEREIRA Da SILVA LEITE N, RASPANTE MARTINS J, CABRAL H. Enzyme engineering and its industrial applications[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2022, 69(2): 389-409.
- [13] FERRANDI EE, MONTI D. Amine transaminases in chiral amines synthesis: recent advances and challenges[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 34(1): 13.
- [14] LI FL, LIANG YX, WEI YW, ZHENG YK, DU Y, YU HM. Biochemical and structural characterization of an (*R*)-selective transaminase in the asymmetric synthesis of chiral hydroxy amines[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2021, 363(19): 4582-4589.
- [15] KHATIK AG, HUSAIN M. Enzymatic process for the preparation of (*R*)-3-aminobutan-1-ol, useful in preparation of dolutegravir: WO2018020380A1[P]. 2018-02-01.
- [16] LIU H, WANG SX, XU M, ZHANG KY, GAO Q, WANG HL, WEI DZ. Engineering an (*R*)-selective transaminase for asymmetric synthesis of (*R*)-3-aminobutanol[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2024, 146: 107264.
- [17] MEI ZL, ZHANG K, QU G, LI JK, LIU BY, MA JN, TU R, SUN ZT. High-throughput fluorescence assay for ketone detection and its applications in enzyme mining and protein engineering[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(23): 13588-13594.
- [18] MING H, YUAN B, QU G, SUN ZT. Engineering the activity of amine dehydrogenase in the asymmetric reductive amination of hydroxyl ketones[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2022, 12(19): 5952-5960.
- [19] SCHWENDENWEIN D, RESSMANN AK, DOERR M, HÖHNE M, BORNSCHEUER UT, MIHOVILOVIC MD, RUDROFF F, WINKLER M. Random mutagenesis-driven improvement of carboxylate reductase activity using an amino benzamidoxime-mediated high-throughput assay[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2019, 361(11): 2544-2549.
- [20] TANG XL, ZHANG NN, YE GY, ZHENG YG. Efficient biosynthesis of (*R*)-3-amino-1-butanol by a novel (*R*)-selective transaminase from *Actinobacteria* sp.[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 295: 49-54.
- [21] ZHANG XD, WANG DD, SUN SX, ZHANG HP. Issues of Z-factor and an approach to avoid them for quality control in high-throughput screening studies[J]. *Bioinformatics*, 2021, 36(22/23): 5299-5303.
- [22] VOSS M, DAS D, GENZ M, KUMAR A, KULKARNI N, KUSTOSZ J, KUMAR P, BORNSCHEUER UT, HÖHNE M. In silico based engineering approach to improve transaminases for the conversion of bulky substrates[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(12): 11524-11533.