

## 随机突变提高单胺氧化酶活性

陈雪君<sup>1</sup>, 马元慧<sup>1,2</sup>, 邵建华<sup>3</sup>, 赖敦岳<sup>2</sup>, 王志国<sup>4</sup>, 陈振明<sup>2</sup>

1 杭州师范大学生命与环境科学学院, 浙江 杭州 310036

2 杭州师范大学生物催化研究室, 浙江 杭州 311121

3 浙江台州清泉医药化工有限公司, 浙江 台州 317300

4 杭州师范大学衰老研究所, 浙江 杭州 311121

陈雪君, 马元慧, 邵建华, 等. 随机突变提高单胺氧化酶活性. 生物工程学报, 2014, 30(1): 109–118.

Chen XJ, Ma YH, Shao JH, et al. Increasing activity of a monoamine oxidase by random mutation. Chin J Biotech, 2014, 30(1): 109–118.

**摘要:** 前期获得了一个对底物美西律具有一定活性的单胺氧化酶突变体 A-1 (F210V/L213C)。为进一步提高其酶活性, 利用 MegaWHOP PCR 构建了库容约为  $10^4$  的随机突变库。筛选后获得了一个最优突变酶 ep-1, 比活力为 A-1 的 189%。选择性测定结果表明, 酶的对映体选择性有较大提高, E 值由 101 提高到 282; 动力学常数测定揭示, 酶催化效率有较大提高,  $k_{cat}/K_m$  由 0.001 51 mmol/(L·s) 提高到 0.002 89 mmol/(L·s)。和 A-1 酶相比, 在所测定的 11 种胺类底物中, ep-1 对其他 7 种底物的比活力有较明显提高, 对其他 4 种底物的比活力变化不大。序列分析表明, ep-1 的突变为 T162A。分子动力学模拟结果提示, 该突变主要通过修正通道氨基酸的二级结构和扩大活性口袋来发挥作用。

**关键词:** 单胺氧化酶, 易错 PCR, 酶活力, 分子动力学模拟

## Increasing activity of a monoamine oxidase by random mutation

Xuejun Chen<sup>1</sup>, Yuanhui Ma<sup>1,2</sup>, Jianhua Shao<sup>3</sup>, Dunyue Lai<sup>2</sup>, Zhiguo Wang<sup>4</sup>, and Zhenming Chen<sup>2</sup>

1 College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, Zhejiang, China

2 Laboratory of Biocatalysis, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, Zhejiang, China

3 Zhejiang Taizhou Qingquan Medical & Chemical Co. Ltd., Taizhou 317300, Zhejiang, China

4 Institute of Aging Research, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, Zhejiang, China

**Abstract:** The monoamine oxidase mutant A-1 (F210V/L213C) from *Aspergillus niger* showed some catalytic activity on

**Received:** July 25, 2013; **Accepted:** September 30, 2013

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31100584).

**Corresponding author:** Zhenming Chen. Tel/Fax: +86-571-28869373; E-mail: zmchen05@gmail.com

Zhiguo Wang. Tel: +86-571-28861733; E-mail: zhgwang@aliyun.com

国家自然科学基金 (No. 31100584) 资助。

mexiletine. To further improve its activity, the mutant was subjected to directed evolution with MegaWHOP PCR (Megaprimer PCR of Whole Plasmid) and selection employing a high-throughput agar plate-based colorimetric screen. This approach led to the identification of a mutant ep-1, which specific activity was 189% of that for A-1. The ep-1 also showed significantly improved enantioselectivity, with the E value increased from 101 to 282; its kinetic  $k_{\text{cat}}/K_m$  value increased from 0.001 51 mmol/(L·s) to 0.002 89 mmol/(L·s), suggesting that catalytic efficiency of ep-1 had been improved. The mutant showed obviously higher specific activities on 7 of all tested 11 amines substrates, and the others were comparable. Sequence analysis revealed that there was a new mutation T162A on ep-1. The molecular dynamics simulation indicated that T162A may affect the secondary structure of the substrate channel and expand the binding pocket.

**Keywords:** monoamine oxidase, error-prone PCR, activity, molecular dynamics simulation

美西律 (图 1) 是一种钠通道阻断剂, 临床上常以消旋的形式用作抗心律失常药和镇痛剂。药理学研究表明<sup>[1-2]</sup>, 美西律的 *R*-型对映体优先和心脏钠通道结合; 与 *S* 构型相比, (*R*)-美西律与人骨骼肌纤维的结合作用更强。因此, 有必要开展美西律的手性合成研究<sup>[3]</sup>。

美西律对映体的合成有过多篇报道, 其中包括消旋中间体的拆分, *N*-乙酰衍生物的酶水解以及多步立体选择性合成<sup>[4-6]</sup>。最近, Koszelewski等<sup>[7]</sup>利用 $\omega$ -转氨酶进行了消旋美西律的去消旋化研究。通过一锅二步反应, 底物浓度为28 mmol/L时, 反应48 h后消旋美西律可被完全转化为(*S*)-或(*R*)-美西律, 产物*ee*值可超过99%, 得率97%; 但是其中一个比较明显的问题是反应中需要用到多种酶, 包括 (*S*)- $\omega$ -转氨酶、(*R*)- $\omega$ -转氨酶、氨基酸氧化酶和脱氢酶。

利用单胺氧化酶(MAO, EC 1.4.3.4)进行拆分是一种很有潜力的获得手性胺的方法<sup>[8-9]</sup>。单胺氧化酶为黄素酶, 可选择性地将消旋胺的一个对映体氧化为亚胺, 亚胺与酶解离后在水中分解为酮与氨(图1)。如果单胺氧化酶的对映体选择性足够高, 反应速度较慢的对映体在反应速度快的对映体反应完全后成为光学纯的手性胺。利用来自黑曲霉的MAO, Turner等<sup>[10]</sup>在反应

体系中加入硼烷这种简单廉价的还原剂, 使“废物”亚胺被还原为消旋的胺, 这些胺再进行第二次酶催化氧化反应。两个反应循环进行, 最终可得到100%的光学纯手性胺<sup>[9]</sup>。这一体系是“一锅”式反应, 而且反应不需要添加通常氧化还原酶所需要的辅助因子。另外, Turner等的研究证实<sup>[11-12]</sup>, MAO-N在酶改造后有可能大幅度提高酶活力, 并具备广泛的底物谱, 其中包括环状二级胺和三级胺等。

MAO-N-D5 是 Turner 实验室经过多轮定向进化获得的含 5 个突变位点的黑曲霉 MAO 突变子<sup>[8]</sup>, 具高度应用潜力。但是我们的前期研究表明, MAO-N-D5 对消旋美西律基本无活性; 经过基于 CASTing 的半理性定向进化研究, 我们获得了一个有一定活性的单胺氧化酶突变体 A-1 (F210V/L213C)。本研究以此为起点, 探讨通过随机突变进一步提高酶活性的可能性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 基因、菌种与质粒

MAO-N-D5 由南京金斯瑞公司优化合成; 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , *Escherichia coli* BL21 (DE3)和 JM109(DE3)均为本实验室保存菌种; 表达质粒 pET-28a(+)购自 Novagen 公司。

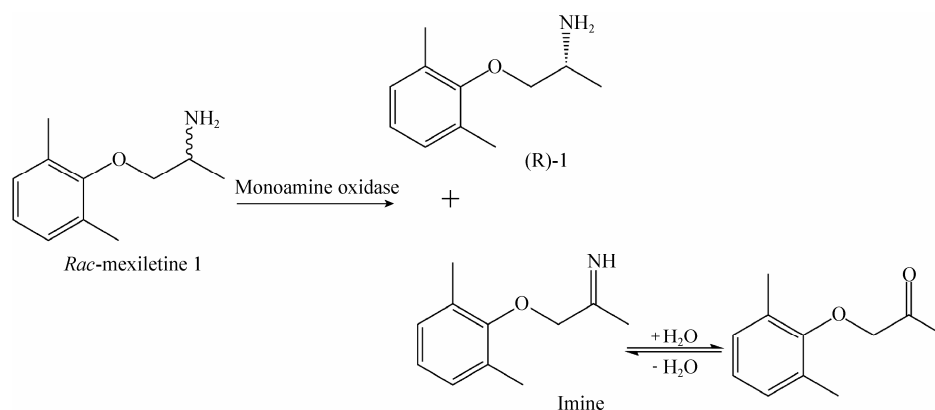


图 1 美西律选择性拆分过程

Fig. 1 Kinetic resolution process of rac-mexiletine to R-mexiletine by monoamine oxidase.

## 1.2 酶和试剂

限制性内切酶 *Nde* I、*Bam*H I 购自英国 NEB 公司；DNA 聚合酶 KOD-plus-neo、高效连接酶 ligation high 和磷酸化酶 PNK 购自上海东洋纺生物科技有限公司；PCR cleaning 试剂盒、质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒和超级感受态细胞 JM109 (DE3) 等购自杭州爱思进生物技术有限公司。

IPTG、卡那霉素和十二烷基磺酸钠购自上海生工生物工程有限公司；TBHBA、盐酸美西律、香草酸、DAB 和 4-AAP 购自 Sigma 公司；辣根过氧化酶购自德国 Roche 公司；融合蛋白纯化试剂盒 MagExtractor-His-tag 购自美国 GE 公司；液相分析用试剂正己烷、三乙胺和乙醇等均为色谱纯试剂，购自百灵威科技有限公司。

## 1.3 易错 PCR

以编码 A-1 的基因 (后均用 *a-1* 表示) 序列为模板，设计易错 PCR 引物。上游引物：5'-ATGACGAGCCGCGACGGTTACCAAT-3'；下游引物：5'-CAGACGGGCTTTCACCTTCGCGTTT

C-3'。易错 PCR 反应体系为：反应体积 50  $\mu$ L，MgCl<sub>2</sub> 7 mmol/L，MnCl<sub>2</sub> 和 dNTPs 各 0.2 mmol/L，dCTP 和 dTTP 各 1 mmol/L，10 $\times$  PCR 缓冲液 5  $\mu$ L，pET-28a-*a-1* 10 ng，上下游引物各 0.3  $\mu$ mol/L，*Taq* 聚合酶 1.25 U。易错 PCR 反应条件：预变性，94  $^{\circ}$ C 2 min；98  $^{\circ}$ C 20 s，58  $^{\circ}$ C 15 s，72  $^{\circ}$ C 2 min，28 个循环；72  $^{\circ}$ C 5 min。

## 1.4 易错 PCR 突变文库的构建

反应体系组成：反应体积 50  $\mu$ L，纯化的易错 PCR 产物 0.5  $\mu$ L，pET-28a-*a-1* 0.5  $\mu$ L，MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L，dNTPs 0.2 mmol/L，10 $\times$ 缓冲液 5  $\mu$ L，KOD-plus-neo 1  $\mu$ L。MegaWHOP PCR 反应条件为：68  $^{\circ}$ C 5 min；预变性，94 $^{\circ}$ C 2 min；95  $^{\circ}$ C 20 s，55  $^{\circ}$ C 20 s，68  $^{\circ}$ C 180 s，25 个循环；68  $^{\circ}$ C 5 min。其中反应体系先在 68  $^{\circ}$ C 保温 5 min 的目的是利用 KOD 聚合酶 3'-5'外切酶活性，切除 epPCR 在扩增产物的 3'端引入的 A 碱基<sup>[15]</sup>。

往上述 50  $\mu$ L MegaWHOP PCR 产物中加入 2  $\mu$ L 甲基化酶 *Dpn* I，37  $^{\circ}$ C 放置 1.5 h。该步目的是去除甲基化的母链模板。然后取 *Dpn* I 消

化的 PCR 产物 5  $\mu\text{L}$ , 转化入超级感受态细胞 JM109 (DE3); 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱过夜后, 冲洗平板上的菌体, 提取质粒。

## 1.5 突变文库的筛选

### 1.5.1 平板初筛

配制平板筛选显色液<sup>[13]</sup>: 往 20 mL 磷酸缓冲液 (100 mmol/L, pH 7.4) 加入 1% 高纯度琼脂糖, 微波加热至琼脂完全溶解, 冷却至 50  $^{\circ}\text{C}$  后加入 DAB 至终浓度 0.5 g/L, 缓慢搅动至 DAB 完全溶解后加入辣根过氧化物酶 (终浓度 2 U/mL) 与目标底物 (终浓度 10 mmol/L), 45  $^{\circ}\text{C}$  温浴待用。

筛选过程<sup>[13]</sup>: 将 1.4 中获得的随机突变质粒 5  $\mu\text{L}$  转化入 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 涂板于 5 个覆盖有硝酸纤维素膜的含卡那霉素抗性的 LB 平板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 8–10 h; 然后将长有菌落的硝酸纤维素膜揭下, 覆盖于含 1 mmol/L IPTG 的 LB 平板上, 20  $^{\circ}\text{C}$  培养 14 h; 揭下硝酸纤维素膜, 平铺于灭菌的干净平板底部, 将冷却至 40  $^{\circ}\text{C}$  左右的平板显色液迅速倒入平板内, 使显色液完全浸没硝酸纤维素膜; 待显色缓冲液凝固后, 将平板放入 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱培养, 每 0.5 h 观察一次; 当出现棕色菌落时, 用灭菌牙签挑取, 接种, 保存备用。

### 1.5.2 96 孔板复筛

配制显色液<sup>[14]</sup>: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4), 4-AAP(4-aminoantipyrine) 7.5 mmol/L, 0.2% (W/V) 香草酸, 辣根过氧化物酶 4 U/mL, 盐酸美西律 10 mmol/L。

筛选过程<sup>[14]</sup>: 将初筛得到的菌落接种于 2 mL LB 液体培养基中用 IPTG 诱导培养 (方法见 1.6) 后收集菌体, 洗涤后破碎取上清液; 往

透明 96 孔板加入显色液, 每孔 90  $\mu\text{L}$ , 再分别加入 10  $\mu\text{L}$  上清液; 封口, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中放置 20 min, 观察颜色变化。

## 1.6 酶基因的测序、表达及酶纯化

测序由南京金斯瑞公司完成。

诱导表达: 将经初筛和复筛获得的目标菌落接种于 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养至  $OD_{600}$  约为 0.4–0.6; 添加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 25  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min, 诱导 16 h, 超声波破碎后取上清液, 利用融合蛋白纯化试剂盒 MagExtractor-His-tag 对重组蛋白进行纯化, 最后按 Bradford 法测定其蛋白质的含量。

## 1.7 酶活力测定

根据 Braun 等<sup>[15]</sup>报道的方法, 测定纯化的单胺氧化酶的活力。其中酶反应液的配置过程为: 5 mL 磷酸缓冲液 (1 mol/L, pH 7.6), 500  $\mu\text{L}$  2,4,6-三溴-3-羟基苯甲酸 (2%, 溶于 DMSO), 37.5  $\mu\text{L}$  4-AAP (1 mol/L), 50  $\mu\text{L}$  辣根过氧化物酶 (终浓度 2 U/mL), 20  $\mu\text{L}$  消旋盐酸美西律 (终浓度 10 mmol/L), 补足水至 50 mL。往 1 mL 酶反应液中加入 10  $\mu\text{L}$  纯化的酶液, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 10 min 后, 测定 510 nm 吸光值。酶活单位定义为: 37  $^{\circ}\text{C}$  下每分钟催化生成 1  $\mu\text{mol}$  过氧化氢所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。  $k_{\text{cat}}$  和  $K_{\text{m}}$  值的测定采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 选用的底物浓度分别为 1、2.5、5、10、20、40 和 80 mmol/L。

## 1.8 单胺氧化酶拆分反应

拆分反应和样品制备: 反应体系包含 100  $\mu\text{L}$  纯化的酶液, 消旋美西律 10 mmol/L, 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.6), 总体积 2 mL。37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡反应 24 h; 取 200  $\mu\text{L}$  反应液, 加入氯化钠至饱和, 加入 2 mL 异丙醇, 振荡, 从盐

水中萃取底物和产物；取出上层有机相，加入无水氯化钙固体颗粒干燥并用0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤后，进行液相分析。HPLC分析条件：手性色谱柱Chiralcel AS-H (Daicel Chemical Industries, Japan,  $\phi 0.46 \times 25$ )，流动相为正己烷/乙醇 (94/6, V/V)，流速1 mL/min，柱温35  $^{\circ}\text{C}$ ，检测波长274 nm。

## 1.9 分子机制分析

### 1.9.1 分子对接

应用分子对接软件 AutoDock<sup>[16]</sup>，针对 MAO-N-D5 单胺氧化酶晶体结构<sup>[17-18]</sup> (PDB ID: 2VVM) 和底物盐酸美西律 (R型和S型) 进行了分子对接研究，以揭示二者之间的作用模式。对接应用 Lamarckian genetic algorithm，蛋白酶分子采用 Kollman 电荷<sup>[19-20]</sup>，相互作用的格点空间以 FAD 末端为中心，大小为  $60 \times 60 \times 60$ ，其他参数采用软件默认，分别进行 150 次独立的对接运算。对接结果按照其构象之间的均方根偏差 RMSD 进行分组，以 1.0  $\text{\AA}$  为标准。最后选取含有构象最多的分组中对接自由能最高的构象作为单胺氧化酶和盐酸美西律潜在的结合构象。

### 1.9.2 分子动力学

为研究残基突变对蛋白酶三维结构的影响，我们以 MAO-N-D5 单胺氧化酶的晶体结构为基础，应用 Chimera 软件<sup>[21]</sup>分别构建了突变体 A-1 和 ep-1 的三维结构，然后应用 Gromacs 软件<sup>[22]</sup>分别对 A-1 和 ep-1 体系进行分子动力学研究，以得到平衡状态下两突变体的稳定构象。首先将两个体系分别置于大小为  $78 \text{\AA} \times 78 \text{\AA} \times 78 \text{\AA}$  周期性水盒子中 (水分子采用 TIP3P 模型)，并在 AMBER99SB 力场下相继应用最陡下降法和共轭梯度法分别对体系进行 3 000 步的能量最小化运算；然后进行模拟退火运算，使体系在 300 ps 内由 0 K 逐步升温到 300 K；随后

对体系进行 200 ps 的限制性动力学计算，以进一步优化溶剂环境；最后采用 NPT 系综分别进行 20 ns 的动力学运算，使体系达到动力学平衡状态。

## 2 结果与分析

### 2.1 易错 PCR 突变库的构建

首先以 A-1 基因为模板，按照易错 PCR 常规条件 (高浓度  $\text{Mg}^{2+}$  和不均衡 dNTPs 浓度) 进行随机突变。易错 PCR 结果如图 2 所示，目的条带在 1 500 bp 附近，与理论值 1 488 bp 接近。

传统上，随机突变文库的构建过程涉及双酶切、回收、连接和转化等多个步骤，效率低下。本研究根据 MegaWHOP<sup>[23]</sup>的原理，以易错 PCR 产物为引物，以携带 *a-1* 基因的质粒为模板，经过相对简单的 PCR 扩增和 *Dpn* I 处理，即可用于转化超级感受态细胞 JM109 (DE3)。这种方法节约时间，减少并简化实验步骤，提高突变效率。取 MegaWHOP PCR 产物转化入超级感受态细胞 JM109 (DE3)，培养过夜，收集菌体后提取

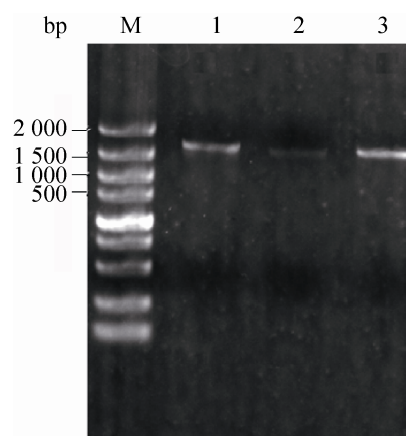


图 2 易错 PCR 核酸电泳图

Fig. 2 Result of epPCR. M: standard nucleic acid molecular weight; 1, 2, 3: three samples of parallel epPCR.

质粒, 即获得随机突变库。质粒检测结果如图 3 所示。

## 2.2 突变库的筛选

### 2.2.1 平板筛选

单胺氧化酶在催化胺的过程中产生微量过氧化氢, 后者能被辣根过氧化物酶与二氨基联苯胺捕获, 从而使有单胺氧化酶活性的菌落显

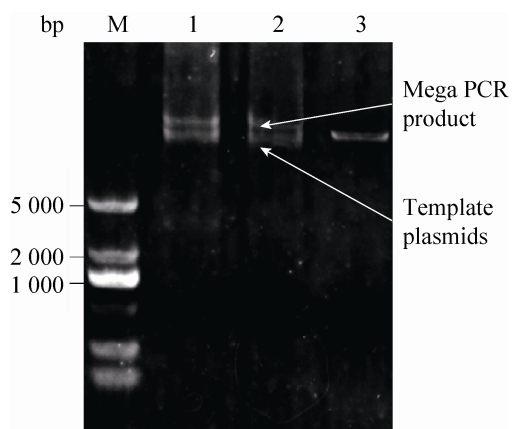


图 3 Mega PCR 核酸电泳图

Fig. 3 Result of Mega PCR. M: nucleic acid marker; 1, 2: two samples of Mega PCR; 3: plasmid pET28a-MAO-N-D5.

棕色。根据这一原理筛选了大约 10 000 个菌落的随机突变库, 挑取 90 个阳性菌落进行复筛。

### 2.2.2 96 孔板筛选

单胺氧化酶催化反应所产生的过氧化氢在辣根过氧化物酶作用下, 以 4-AAP (4-aminoantipyrine) 作为氢供体, 被还原为水分子, 4-AAP 则以其氧化态存在, 并与香草酸形成红色物质醌亚胺。通过红色的深浅, 可初步判定单胺氧化酶活力的高低<sup>[24]</sup>。根据这一原理在 96 孔板上进行复筛, 挑选颜色最深的 10 个突变菌株, 进行下一步的工作。

## 2.3 突变酶的活力测定及酶催化性质的初步分析

将 96 孔板筛选获得的 10 个突变株, 进行基因表达和蛋白纯化后测定比活力。选出比活力最高的 6 个菌株进行 DNA 测序, 结果表明有 3 个突变株发生了突变, 其中 ep-1 的突变为 T162A, ep-7 为 W262L/D287N, ep-10 为 T324A。这 3 个突变株的相对比活力测定结果 (表 1) 表明: ep-1 的比活力比 A-1 提高了 89%; 另两个菌株则差别不大, 甚至有所下降。

表 1 突变菌株的活力测定

Table 1 Specific activities of wild-type and mutant MAO enzymes

Variant	Mutations	Relative activity (%) <sup>b,c</sup>
MAO-N-D5	-- <sup>a</sup>	--
A-1	F210V/L213C	100 <sup>d</sup>
ep-1	F210V/L213C/T162A	189
ep-7	F210V/L213C/W262L/D287N	78
ep-10	F210V/L213C/T324A	101

a: indicates no activity was detected; b: relative activity were measured under standard conditions and calculated by defining the activity for A-1 as 100%; c: values are means of three replications; d: relative activity of 100% corresponds to an activity of 1.2 U/mg protein.

为验证筛选到的突变株的手性选择性, 利用纯化酶进行消旋美西律的拆分反应。结果(表2)显示, ep-1是效果最好的突变子, 对映体过量值和出发酶A-1一样, 均在99%以上, 表征对映体选择性的E值则由101提高到282; 另外两个突变酶的选择性则较A-1有所下降。

以A-1为对照, 进一步测定突变子ep-1的动力学参数。测定结果表明(表3), 与A-1相比, ep-1的 $K_m$ 值由60.74 mmol/L降低到35.94 mmol/L; ep-1的 $k_{cat}$ 值有所增加, 但是并不明显;  $k_{cat}/K_m$ 由0.001 51 mmol/(L·s) 提高到0.002 89 mmol/(L·s)。

#### 2.4 突变酶的底物特异性分析

以11种胺类物质为底物, 包括非手性胺、手性一级胺、二级胺、芳香胺和脂肪胺, 测定MAO-N-D5、A-1和ep-1三种酶的底物特异性, 结果见表4。可以看出, ep-1的相对活力总体比A-1活力高。与未突变的MAO-N-D5相比, A-1与ep-1对其中1、2、4和6四种底物的活力有较大提升, 其他则变化不明显。

#### 2.5 MAO-底物结合模式及突变体三维结构分析

应用分子对接研究得到了代表性底物盐酸

美西律和MAO-N-D5的结合模式(图4)。图中底物为盐酸美西律(S)-异构体, 其手性C原子以粉红色圆球标出。据MAO对手性胺的催化机制可知, 只有在这种取向下, 底物手性C上的H原子才能有效地转移到辅酶FAD上, 进而完成催化反应; R型异构体手性C上的H原子取向与S型相反, 朝向远离FAD的方向, 导致R型底物不能

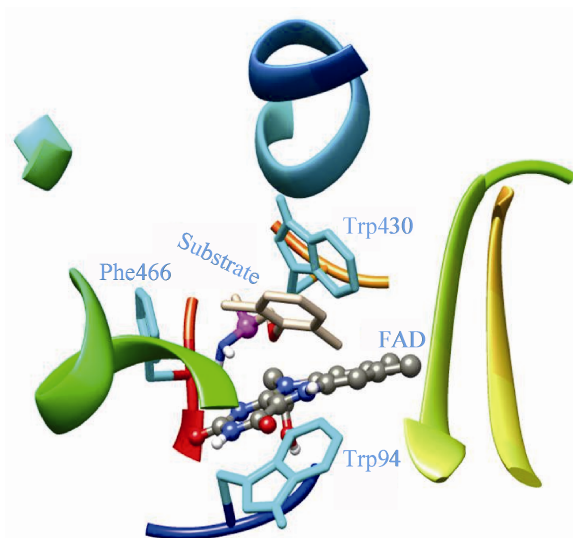


图4 MAO-N-D5与底物(S)-盐酸美西律的结合模式  
Fig. 4 Binding conformation of MAO-N-D5 and (S)-mexiletine.

表2 美西律拆分反应

Table 2 Specific conversions of MAO variants to mexiletine enantiomers

Mutations	Conversion (%) <sup>a</sup>	$ee_s$ (%) <sup>b</sup>	E <sup>c</sup>
MAO-N-D5	--	--	--
A-1	53.6	99.9	101.0±34.2
ep-1	51.3	99.9	282.0±56.7
ep-7	39.6	48.4	11.0±1.3
ep-10	52.1	89.5	31.0±2.5

a: substrate conversion; b: enantiomeric excess of substrate; c: enzyme enantioselectivity.

表3 突变酶的动力学常数

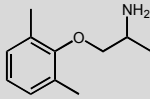
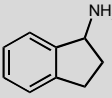
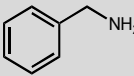
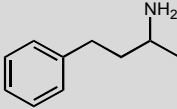
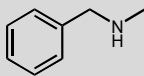
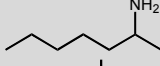
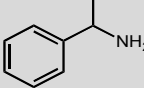
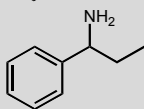
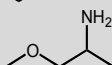

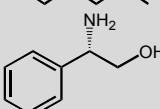
Table 3 Kinetic comparison of two mutant MAO enzymes<sup>a</sup>

Variant	$K_m$ (mmol/L)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (mmol/(L·s))
A-1	60.74±5.86	0.092±0.009	0.001 51
ep-1	35.94±8.09	0.104±0.013	0.002 89

The steady-state kinetic parameters were determined in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.6) at 37 °C.

表 4 突变酶底物特异性

Table 4 Substrate specificity of MAO-N-D5 mutants<sup>a,b</sup>

No.	Constitutional formula	MAO-D5 relative activity (%)	A-1 relative activity (%)	ep-1 relative activity (%)
1		0	100	189
2		3	177	174
3		347	146	199
4		121	173	228
5		2 675	2 260	2 772
6		88	139	210
7		589	112	209
8		731	778	724
9		1	6	5
10		156	41	73
11		9	0	5

a: purified sample (10  $\mu$ L) was added in 1 mL enzyme activity assay mixture and absorbance at 510 nm was measured after 10 min incubation at 37  $^{\circ}$ C against a control without sample; b: relative activity were measured under standard conditions and calculated by defining the activity for A-1 reduction of mexiletine (1) as 100 %.

被有效催化，这也是 MAO-N-D5 蛋白酶对底物具有手性拆分能力的结构基础<sup>[17]</sup>。图 4 中还可以看到，以蓝青色标出的 Trp430、Phe466 和 Trp94 三个保守性残基将辅酶 FAD 和底物紧紧包围在一个较小的疏水性的口袋中，从而导致该蛋白酶对分子较大或极性较高的底物催化能力较差。

为了揭示残基突变如何在结构进而在功能上影响 MAO-N-D5，我们将达到分子动力学平衡状态的突变体 A-1 和 ep-1 的三维结构与 MAO-N-D5 的晶体结构进行了叠加，其催化中心附近残基 (以辅酶 FAD 末端异咯嗪 N5 原子为中心，周围 10  $\text{Å}$  以内的所有残基) 的叠加情况见图 5。由图可知，3 个结构大部分结构均能较好的重



叠 (MAO-N-D5、A-1 和 ep-1 的结构分别标记为黄色、绿色和红色), 表明相关突变没有导致 MAO-N-D5 的结构产生巨大变化。但是, 图中有两个值得注意的地方: 其一, 蓝青色 Trp430、Phe466 和 Trp94 的位置。每个突变体上 3 个残基均比突变前更向外扩展, 其中以 ep-1 在 Trp94 loop 上的表现最为明显, 这表明两个突变体 A-1 和 ep-1 能够依次容纳更大的底物; 其二, 圆桶中紧邻催化中心的结构。该结构处在底物进出活性口袋的通道上, 在 MAO-N-D5 为柔性较低的  $\alpha$ -helix, 在 A-1 中为 loop 和  $\alpha$ -helix 的结合, 而在 ep-1 中则全部为柔性较高的 loop 结构。显然 loop 结构在酶结合较大的底物分子时较  $\alpha$ -螺旋更为有利。正是以上两点结构上的变化为 A-1 和 ep-1 在催化盐酸美西律及类似底物时表现出更强的催化能力创造了结构基础。图中并未标出第 210、213 和 162 号突变残基, 这是由于 3 个残基距离

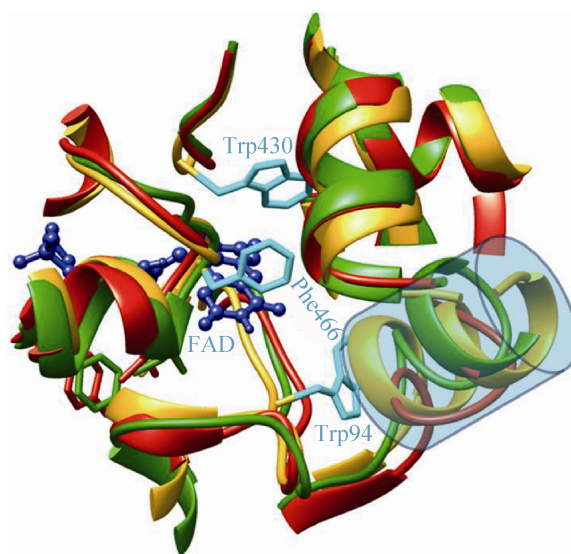


图 5 突变体 A-1 (绿色) 和 ep-1 (红色) 与 MAO-N-D5 (黄色) 催化中心三维结构的叠加  
Fig. 5 3D superimposition of catalytic centers of A-1, ep-1 and MAO-N-D5.

FAD 末端异咯嗪部分较远, 超出了催化中心的范围。这种结构特征表明残基突变并非与活性中心残基相关, 而是通过改变其所属的二级结构来扩大活性口袋从而间接发挥作用的。

### 3 讨论

经过平板初筛、96 孔板复筛及酶活测定, 获得了 1 个突变子 ep-1, 其所包含的突变 T162A 使酶活提高了 89%。选择性测定结果显示, ep-1 的对映体过量值和 A-1 相似,  $ee_s$  均在 99% 以上; 表征对映体选择性的 E 值则有较大幅度的提高。这说明 T162A 突变提高了酶催化反应的选择性。

动力学测定结果表明, ep-1 的  $K_m$  值明显降低, 表明 ep-1 对底物的亲和力有所提高, 表征催化底物氧化的能力的  $k_{cat}$  值则增加不明显。综合两个结果, T162A 突变显著提高了酶的催化效率 ( $k_{cat}/K_m$ )。分子对接和分子动力学研究表明 T162A 突变在稳定保持活性中心残基构象的基础上, 使得活性通道氨基酸的二级结构由 A-1 的 loop-helix 结构转变为完全的高柔性 loop 结构, 从而为底物的高效结合与催化创造了条件。

尽管 ep-1 比 A-1 的比酶活提高了 89%, 但是实际上仍只是具备了初步活性, 离工业化应用所需要的酶活还有较长的距离<sup>[25]</sup>, 需通过进一步的优化进行改造。

### REFERENCES

- [1] Turgeon J, Uprichard ACG, Bélanger PM, et al. Resolution and electrophysiological effects of mexiletine enantiomers. *J Pharm Pharmacol*, 1991, 43(9): 630–635.
- [2] Luca AD, Natuzzi F, Falcone G, et al. Inhibition of frog skeletal muscle sodium channels by newly synthesized chiral derivatives of mexiletine and tocainide. *N-S Arch Pharmacol*, 1997, 356(6): 777–787.

- [3] Franchini C, Carocci A, Catalano A, et al. Optically active mexiletine analogues as stereoselective blockers of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *J Med Chem*, 2003, 46(24): 5238–5248.
- [4] Carocci A, Catalano A, Bruno C, et al. Synthesis and in vitro sodium channel blocking activity evaluation of novel homochiral mexiletine analogs. *Chirality*, 2010, 22(3): 299–307.
- [5] Höhne M, Bornscheuer UT. Biocatalytic routes to optically active amines. *ChemCatChem*, 2009, 1(1): 42–51.
- [6] Koszelewski D, Clay D, Rozzell D, et al. Deracemisation of  $\alpha$ -Chiral primary amines by a one-pot, two-step cascade reaction catalysed by  $\omega$ -transaminases. *European J Organic Chem*, 2009, 2009(14): 2289–2292.
- [7] Koszelewski D, Pressnitz D, Clay D, et al. Deracemization of mexiletine biocatalyzed by  $\omega$ -transaminases. *Org Lett*, 2009, 11(21): 4810–4812.
- [8] Turner N, Fotheringham I, Speight R. Novel biocatalyst technology for the preparation of chiral amines. *Innov Pharma Technol*, 2004, 4(14): 114–116.
- [9] Carr R, Alexeeva M, Enright A, et al. Directed evolution of an amine oxidase possessing both broad substrate specificity and high enantioselectivity. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42(39): 4807–4810.
- [10] Alexeeva M, Enright A, Dawson MJ, et al. Deracemization of  $\alpha$ -methylbenzylamine using an enzyme obtained by *in vitro* evolution. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41(17): 3177–3180.
- [11] Eve TSC, Wells A, Turner NJ. Enantioselective oxidation of O-methyl-N-hydroxylamines using monoamine oxidase N as catalyst. *Chem Commun*, 2007(15): 1530–1531.
- [12] Dunsmore CJ, Carr R, Fleming T, et al. A chemo-enzymatic route to enantiomerically pure cyclic tertiary amines. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(7): 2224–2225.
- [13] Kim MJ, Kim WH, Han K, et al. Dynamic kinetic resolution of primary amines with a recyclable Pd nanocatalyst for racemization. *Org Lett*, 2007, 9(6): 1157–1159.
- [14] Holt A, Palcic MM. A peroxidase-coupled continuous absorbance plate-reader assay for flavin monoamine oxidases, copper-containing amine oxidases and related enzymes. *Nature Protocols*, 2006, 1(5): 2498–2505.
- [15] Braun M, Kim JM, Schmid RD. Purification and some properties of an extracellular L-amino acid oxidase from *Cellulomonas cellulans* AM8 isolated from soil. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, 37(5): 594–598.
- [16] Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Computational Chem*, 1998, 19(14): 1639–1662.
- [17] Atkin KE, Reiss R, Koehler V, et al. The structure of monoamine oxidase from *Aspergillus niger* provides a molecular context for improvements in activity obtained by directed evolution. *J Mol Biol*, 2008, 384(5): 1218–1231.
- [18] Atkin KE, Reiss R, Turner NJ, et al. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of variants of monoamine oxidase from *Aspergillus niger*. *Acta Crystallogr Sect F: Struct Biol Cryst Commun*, 2008, 64(3): 182–185.
- [19] La Motta C, Sartini S, Mugnaini L, et al. Pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one Derivatives as a novel class of selective aldose reductase inhibitors exhibiting antioxidant activity. *J Med Chem*, 2007, 50(20): 4917–4927.
- [20] Wang Z, Ling B, Zhang R, et al. Docking and molecular dynamics study on the inhibitory activity of coumarins on aldose reductase. *J Phys Chem B*, 2008, 112(32): 10033–10040.
- [21] Pettersen EF, Goddard TD, Huang C, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 2004, 25(13): 1605–1612.
- [22] Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, et al. GROMACS: fast, flexible and free. *J Comput Chem*, 2005, 26 (16): 1701–1718.
- [23] Kentaro M, Misa T. Creating random mutagenesis libraries using megaprimer PCR of whole plasmid. *Biotechniques*, 2002, 33(5): 1033–1038.
- [24] Turner N, Fotheringham I, Speight R. Novel biocatalyst technology for the preparation of chiral amines. *Innov Pharma Technol*, 2004, 4(14): 114–116.
- [25] Liang J, Lalonde J, Borup B, et al. Development of a biocatalytic process as an alternative to the (-)-DIP-CI-Mediated. *Org Process Res Dev*, 2009, 14(1): 193–198.

(本文责编 陈宏宇)