

基于柔性区域的计算设计改造玉米赤霉烯酮水解酶热稳定性

陈权, 吕成, 许菲

江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

陈权, 吕成, 许菲. 基于柔性区域的计算设计改造玉米赤霉烯酮水解酶热稳定性. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4415-4429.
Chen Q, Lü C, Xu F. Computation-aided design of the flexible region of zearalenone hydrolase improves its thermal stability. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4415-4429.

摘要: 来源于粉红螺旋聚孢霉 *Clonostachys rosea* 的玉米赤霉烯酮水解酶 (ZHD101) 可以有效降解谷物农副产品和饲料中的霉菌毒素玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN), 但是, 该酶的热稳定性较低, 限制了其在工业中的应用。由于水解 ZEN 的反应没有吸光值的变化, 不适合高通量筛选。本文以 ZHD101 为模式酶, 进行计算虚拟突变并结合实验验证。通过比对不同温度下的分子动力学模拟轨迹, 选取 32 个柔性位点; 再通过位置特异性评分和酶构象自由能计算, 从 32 个柔性位点上的 608 个虚拟饱和突变体中筛选出 12 个突变体。经实验验证, 其中 3 个突变体 N156F、S194T 和 T259F 的热熔融温度有一定程度的提升 ($\Delta T_m > 4$ °C), 且酶活性与野生型类似甚至更高 (相对酶活性为 95.8%、131.6% 和 169.0%)。分子动力学模拟分析显示, 导致 3 个突变体热稳定性提高的可能作用机理分别为 NH- π 作用力、盐桥重排和分子表面空穴填充。将 3 个突变体进行迭代组合突变, N156F/S194T 表现出最高的热稳定性 ($\Delta T_m = 6.7$ °C)。这项工作表明基于柔性区域的虚拟饱和突变在酶稳定性改造上的可行性, 探索计算虚拟改造结合实验验证的酶改造策略。

关键词: 玉米赤霉烯酮水解酶, 柔性区域, 蛋白质计算设计, 分子动力学模拟, 虚拟饱和突变

Computation-aided design of the flexible region of zearalenone hydrolase improves its thermal stability

Quan Chen, Cheng Lü, and Fei Xu

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: The zearalenone hydrolase (ZHD101) derived from *Clonostachys rosea* can effectively degrade the mycotoxin zearalenone (ZEN) present in grain by-products and feed. However, the low thermal stability of ZHD101 hampers its

Received: January 21, 2021; **Accepted:** April 8, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0901600), National Natural Science Foundation of China (Nos. 22078129, 31700648), Postdoctoral Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. 2020Z072).

Corresponding authors: Fei Xu. Tel: +86-510-85197571; E-mail: feixu@jiangnan.edu.cn

Cheng Lü. Tel: +86-510-85197571; E-mail: cheng.lu@jiangnan.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0901600), 国家自然科学基金 (Nos. 22078129, 31700648), 江苏省博士后科学基金 (No. 2020Z072) 资助。

applications. High throughput screening of variants using spectrophotometer is challenging because the reaction of hydrolyzing ZEN does not change absorbance. In this study, we used ZHD101 as a model enzyme to perform computation-aided design followed by experimental verification. By comparing the molecular dynamics simulation trajectories of ZHD101 at different temperatures, 32 flexible sites were selected. 608 saturated mutations were introduced into the 32 flexible sites virtually, from which 12 virtual mutants were screened according to the position specific score and enzyme conformation free energy calculation. Three of the mutants N156F, S194T and T259F showed an increase in thermal melting temperature ($\Delta T_m > 4$ °C), and their enzyme activities were similar to or even higher than that of the wild type (relative enzyme activity 95.8%, 131.6% and 169.0%, respectively). Molecular dynamics simulation analysis showed that the possible mechanisms leading to the improved thermal stability were NH- π force, salt bridge rearrangement, and hole filling on the molecular surface. The three mutants were combined iteratively, and the combination of N156F/S194T showed the highest thermal stability ($\Delta T_m = 6.7$ °C). This work demonstrated the feasibility of engineering the flexible region to improve enzyme performance by combining virtual computational mutations with experimental verification.

Keywords: zearalenone hydrolase, flexible region, protein design, molecular dynamics simulations, virtual saturation mutation

玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 是造成全球粮食污染的霉菌毒素之一, 对饲料行业和养殖业带来巨大损失^[1]。此外, ZEN 的生殖发育毒性^[2]和致癌性^[3]严重危害牲畜以及人类健康。2013年, 程传民等^[4]对我国玉米副产物中 ZEN 的含量进行了抽样调查, 发现其平均含量为 678 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 远高于饲料卫生国家标准 (GB13078-2017) 中^[5] ZEN 的最高允许量 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。同时, 玉米副产物中 ZEN 的检出率高达 95.6%, 其中中度污染率 (检出量为 500–3 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 达到 38.1%。由于 ZEN 广泛存在于玉米、小麦等谷物的存贮过程中, 对谷物农副产品及饲料进行 ZEN 脱毒是防治其危害的重要措施之一。然而, 传统的基于物理吸附^[6]和化学降解^[7]的脱毒策略对农副产品及饲料中营养物质都有着不可避免的破坏。物理吸附剂会因为脱毒的同时对营养物质的吸附导致营养物质的流失, 而化学法脱毒会因为化学试剂的引入造成营养物质的二次污染。由于生物脱毒法是在玉米加工和生产的任一环节添加活菌或微生物制备的酶制剂, 对毒素进行降解, 反应条件相对温和^[8], 所以基于活菌降解或酶降解的生物脱毒方式在防治 ZEN 污染的研究中逐渐得到重视^[9]。目前, 酵母菌^[10]、芽孢杆菌^[11]和乳杆菌^[12]等都可以实现 ZEN 毒素的有效降解。此外, 来源于 *Clonostachys rosea* 的玉米赤霉烯酮水解酶

(Zearalenone hydrolase, ZHD) 可以破坏 ZEN 的内酯环, 实现降解^[13]。由于活菌降解存在菌株培养周期长、降解活性低等不利因素, 因此酶降解法在 ZEN 生物脱毒方面具有更重要的工业应用价值。2002年, Takahashi-Ando 等^[14]首次将 *Clonostachys rosea* 中提取的碱性水解酶 ZHD101 测序并在裂殖酵母和大肠杆菌中实现异源表达。2014年, Peng 等^[15]解析了 ZHD101 水解酶 (PDB ID: 3WZL) 及其与 ZEN 复合体 (PDB ID: 3WZM) 的晶体结构, 并确认了影响 ZHD101 水解 ZEN 能力的关键残基与底物结合位点, 为 ZHD101 水解能力的进一步改造以及应用打下了基础。然而, ZHD101 酶学功能的最适温度在 37–45 °C 左右, 当温度升高至 50 °C 时, ZHD101 就会丧失大部分活性^[16]。较弱的热稳定性阻碍了 ZHD101 在工业中的应用。此外, 由于 ZHD101 催化 ZEN 的反应没有吸光值的变化, 难以进行高通量筛选, 这也是进一步改造 ZHD101 获得优良突变体的主要障碍。

近年来, 计算机运算能力的持续提升和先进算法的不断涌现推动着蛋白质工程的发展^[17-18], 多种计算设计手段成功地实现了酶热稳定性改造^[17]。其中, 分子动力学 (Molecular dynamics, MD) 模拟可以通过提供动态的分子相互作用信息指导有助于结构稳定的蛋白质设计^[19]。结合分子动力学模拟, 降低柔性位点的波动性是提高蛋

白质热稳定性的常见策略^[20]。例如,使用刚性较强的脯氨酸取代甘氨酸^[21]、或引入二硫键降低柔性区域的波动性^[22]以及优化蛋白表面静电相互作用,都可以有效实现蛋白质稳定性的提升^[23]。但是在通常情况下,基于 MD 模拟的分子间作用力分析提供的突变设计数量较少。最近,通过优化能量函数进行序列自动设计逐渐成为蛋白质计算设计的主流策略^[24-25]。该设计方法的覆盖范围广且会得到较多潜在的突变体;但是相应的计算量也较为庞大,而且存在“假阳性”设计^[26]。将蛋白质计算设计和同源蛋白的多序列比对相结合是一种有效的改善方法。这种方法不仅可以有效地减少突变设计文库,同时还可以避免突变设计对酶的活性位点构型的影响。Meng 等^[27]针对二聚体亚基界面敏感区域,结合二硫键挖掘、FRESCO 策略计算和保守序列分析等多种手段进行突变预测,突变体有效改善了耶式假单胞菌转氨酶的稳定性,同时提高了生产纯酶的产率,其中的正向突变设计比例高达 56%。Xiong 等^[28]建立的 ABACUS 策略通过统计能量函数进行序列设计,得到的人工蛋白的热稳定性远超天然蛋白, T_m 值可达 123.3 °C。Goldenzweig 等^[26]基于多序列比对的位置特异性信息与 Rosetta 设计模拟开发了 PROSS 自动计算策略,并成功设计了带有 51 个突变的乙酰胆碱酯酶突变体,与野生型相比,该突变体表现出 20 °C 的热稳定性增强,突变的引入有效改善了蛋白的核心堆积、表面极性和骨架刚性等,同时提高了重组蛋白的表达水平,降低了酶分子的聚集倾向。

本研究借助分子动力学模拟从 ZHD101 的柔性区域中选取了 32 个突变位点,由于 ZHD101 催化 ZEN 反应的吸光值没有变化,难以进行高通量筛选,因此选取其作为模式蛋白,进行虚拟饱和和突变(共计 608 个),得到了 12 个突变体。其中 3 个突变体设计可以有效实现热稳定性的提高,并保留甚至提高了对 ZEN 的水解活性。以 ZHD101 为模式蛋白,可以探索基于柔性区域的

虚拟饱和突变的可行性,并为 ZHD101 以后的工业应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

Escherichia coli BL21 (DE3) 菌株与表达载体 pET-28a (+) 购自 Novagen 公司,玉米赤霉烯酮水解酶基因 *zhd101* 由苏州金唯智生物技术有限公司合成。

1.1.2 主要试剂

PrimeSTAR HS (Premix) 高保真 PCR 酶,限制性核酸内切酶 *Hind* III, *Nco* I, DL 10 000 DNA marker 以及 Premixed Protein marker 购买自宝日医生物技术有限公司。质粒 DNA 提取试剂盒以及 DNA 胶回收试剂盒购自爱思进生物技术有限公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。玉米赤霉烯酮购自 Sigma-Aldrich 公司。甲醇与乙腈为市售高效液相色谱纯,其余试剂均为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 分子动力学模拟

以 ZHD101 的晶体结构 (PDB ID: 3WZL) 作为分子动力学模拟的初始结构,突变体初始构象通过氨基酸替换获得。本研究所有的分子动力学模拟均使用 AMBER99SB-ILDN 力场在 Gromacs 5.0.4 中实现^[29]。酶分子被置于立方体的水盒子中,到盒子边缘的距离至少为 1.0 nm,水分子采用的是 TIP3P 模型^[30]。静电相互作用和范德华相互作用的最小截止距离设置为 1.2 nm。模拟的时间步长设置为 2 fs。采用 steepest descent 方法^[31]对系统进行能量最小化。随后通过 velocity rescaling 算法保持体系温度,并且使用 Berendsen 的弱耦合方法控制压力为 0.1 MPa^[32],先后进行 50 ns NPT 的模型优化和 200 ns NVT 平衡模拟。我们对野生型 (298 K) 和 3 个突变体进行了重复实验,

为了增大采样的随机性, 分别在 NPT 模拟不同时间段提取结构作为初始构象, 并设置了不同的随机数种子。轨迹 1 和轨迹 2 的随机种子数分别为 18 777 和 20 289 (野生型), 160 866 和 115 386 (N156F), 291 715 和 22 903 (S194T), 5 934 和 24 158 (T259F)。

根据 Barlow 等^[33]的定义, 盐桥相互作用由带负电氨基酸 (Glu 或 Asp) 羧酸酯基团中的氧原子与带正电氨基酸 (Arg 或 Lys) 酰胺基团中的氮原子之间的距离确定, 当带电氨基酸之间原子间最小距离小于 4 Å 时带电残基之间形成盐桥相互作用。

在分子动力学模拟过程中, 残基的二级结构类型 (Definition of secondary structure of proteins, DSSP) 会随作用力以及位置发生变化。其中, 较为稳定的残基的二级结构会基本保持该残基初始结构中的类型; 而较为灵活或不够稳定的残基的二级结构类型会在模拟过程中不断改变, 很难一直维持初始结构。本研究统计了模拟过程中残基维持初始结构中二级结构类型的步数占总步数的比例, 即二级结构倾向性 (P_{DSSP} , propensity of DSSP)。该信息有助于选取出较为灵活的残基。

1.2.2 构象自由能计算

使用 Rosetta Cartesian DDG 对结构进行优化和构象自由能的计算, 以评估野生型与突变体的稳定性变化。目标位点的残基分别突变为其他 19 种氨基酸, 突变体构象自由能变化值 ($\Delta\Delta G$) 越小表示设计的突变体越稳定^[34]。使用 FastRelax 流程在笛卡尔空间中优化野生型蛋白质, Rosetta Cartesian DDG 在允许小幅度的主链运动的前提下, 确定野生型和每个突变的最佳旋转异构体侧链构象^[35]。与传统的自由能计算方法相比, Rosetta Cartesian DDG 的计算速度更快^[34]。由于在本研究中经过多轮筛选后剩余的突变设计相对较少, 同时为了富集正向突变, 本研究选取 $\Delta\Delta G < -0.45$ kcal/mol 作为筛选标准。

1.2.3 位置特异性评分矩阵

利用 NCBI 数据库搜寻 ZHD101 的同源序列

进行多序列比对 (Multiple sequence alignment, MSA), 通过 MSA 产生位置特异性评分矩阵 (Position specific scoring matrix, PSSM)^[36]。该矩阵根据残基在 MSA 中出现的可能性对氨基酸同一性进行加权, 对每个位置中 20 种氨基酸出现的对数概率进行统计, 以表示每个位点中所有 20 种氨基酸各自的对数似然性^[26]。出现概率高的氨基酸会有较高的 PSSM 得分, 出现概率较低的氨基酸 PSSM 得分较低。PSSM 比对扫描可以帮助消除有害突变以及自然界中罕见或从未出现过的突变。PSSM 得分大于 0 为有利突变, 而 PSSM 得分小于 0 则为不利突变。本研究选取 PSSM 得分大于 0 作为筛选标准, 实现突变为最常见的氨基酸。

1.2.4 定点突变及表达纯化

以质粒 pET28a-zhd101 为模板, 根据突变位点设计引物并进行全质粒 PCR, 将 PCR 产物进行回收后转化至 *E. coli* BL21 (DE3)感受态中。本研究所使用的引物如表 1 所示。

将 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-zhd101 及其突变菌株平板划线于 LB 固体培养基, 37 °C 恒温培养 8 h, 挑取单菌落接种至 20 mL LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 摇床培养 12 h 后, 按 1%接种量转接至 100 mL TB 培养基, 37 °C、200 r/min 摇床培养约 2 h 至 OD_{600} 为 0.6–0.8 后加入诱导剂, 25 °C、200 r/min 诱导发酵 24 h。

离心收集发酵菌体后重悬菌体, 超声破碎 20 min 后, 离心 20 min 收集破壁上清, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 进行 Ni²⁺柱亲和和层析纯化: 先用 A 液 (0.02 mol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl, 0.02 mol/L 咪唑) 平衡 Ni²⁺亲和层析柱 15 个柱体积, 再将破壁上清以 1 mL/min 的流速上样, 上样结束后, 用 10%的 B 液 (0.02 mol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L 咪唑) 除去杂蛋白, 然后进行梯度洗脱 (25%和 100%的 B 液) 获得目的蛋白, 再用 Desalting 凝胶柱对目的蛋白进行脱盐处理。最后将目的蛋白稀释至 0.2 mg/mL, 对分离纯化后产物, 用 SDS-PAGE 电泳进行检验。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'-3')	Size (bp)
N152V-F	CCTGGCCGTTGTTATGCTGAAC	22
N152V-R	GCTGATTCCTCGTCTTCCAGC	22
V153F-F	GCCAACTTATGCTGAACGAC	21
V153F-R	CTTGCTGATTCCTCGTCTTC	21
M154F-F	CAACGTTTTCCTGAACGACG	20
M154F-R	GATCTTGCTGATTCCTCGTC	21
N156F-F	GTTATGCTGTTTGACGTGAGC	21
N156F-R	CAGGATCTTGCTGATTCCTC	21
D157Q-F	GAACCAGGTGAGCGGTGGTAG	21
D157Q-R	CATAACGTTGGCCAGGATCTT	21
Q166F-F	GAAGCCTGGTTTGCAATGGGC	21
Q166F-R	GCTACCACCGCTCACGTCGTT	21
S194T-F	CATTCTCCGACCGCACCGGT	21
S194T-R	CGGATAACCACGGGCCACAC	21
T259F-F	CAAGTATGTGGTGAATTTACC	22
T259F-R	CTTGCGAACACGTCCGGATG	21
T260V-F	GGTGGAACCGTTCAGAAAC	20
T260V-R	CTTGCGAACACGTCCGGATG	21
Q261R-F	GTGGAAACCACCCGTAAACAT	21
Q261R-R	CACATACTTGCGAACACGTC	21
K262R-F	GTGGAAACCACCCAGCGTCAT	21
K262R-R	CCACATACTTGCGAACACGT	21
H263Y-F	GTGGAAACCACCCAGAAATAT	21
H263Y-R	CACCACATACTTGCGAACAC	21

1.2.5 圆二色谱实验

圆二色谱 (Circular dichroism, CD) 实验可测定蛋白二级结构及热熔融温度 (T_m)。使用 Chirascan 圆二色谱仪和光程为 0.1 cm 的石英比色皿进行 CD 实验。将纯化脱盐后的酶液浓度均调节至 0.2 mg/mL, 取 200 μ L 酶液在 4 $^{\circ}$ C, 190–260 nm 波长范围内进行全波长扫描, 每步增量为 0.5 nm, 平均扫描时间为 2 ns。取最低吸收值处波长 220 nm 处作为热变吸光值进行热变实验, 热变温度范围 4–80 $^{\circ}$ C, 升温梯度为 1 $^{\circ}$ C/min, 测定 220 nm 处的椭圆率。热熔融温度 T_m 通过以下公式估算:

$$F(T) = \frac{\theta(T) - \theta_U(T)}{\theta_F(T) - \theta_U(T)}$$

其中 $\theta(T)$ 是观测到的椭圆率, $\theta_F(T)$ 和 $\theta_U(T)$ 是对折叠和展开的基线进行线性拟合得到的估计椭圆率。热熔融温度 T_m 为 T, 其中 $F(T)=0.5$ 。

1.2.6 酶活性测定

ZHD101 活性测定方法由底物减少量来表征。在 100 μ L 的 Tris-HCl (0.05 mol/L, pH 7.5) 缓冲液中加入 20 μ L ZEN 标准品, 混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 的反应温度预热 10 min, 加入 40 μ L 酶液, 反应 3 min 后, 加入 200 μ L 纯甲醇终止反应。反应结束后经 0.22 μ m 滤膜过滤后, 取 200 μ L 样品用于高效液相色谱检测。样品被 60% 的乙腈水溶液以 1 mL/min 的流速洗脱下来, 在 254 nm 处测定吸光值, 剩余底物的量在 HPLC 曲线下根据峰面积计算得出。

此外, 将野生型和突变体的酶液分别在 50 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 min, 然后在冰上冷却 10 min, 按照反应体系进行反应, 测定残余活性, 以表征高温处理之后酶活性的动力学稳定性。

2 结果与分析

2.1 柔性区域的选取

柔性区域和热敏感区域容易触发蛋白质解折叠, 可以作为改造热稳定性的靶标。ZHD101 分子的柔性区域, 主要体现在晶体结构中温度因子 (B-factor) 数值较大和蛋白结构动态波动性 RMSF (均方根涨落, root mean square fluctuation) 数值较大的区域。借助 B-FITTER 软件^[37], 每个残基标准化后的 B-factor 可以从 ZHD101 晶体结构数据中提取并统计 (图 1A)^[15]。ZHD101 结构中表现出较高模糊性的区域主要包括帽子区域 (132–187, B-factor 可达 91.1 \AA^2), C-末端区域 (250–264, B-factor 可达 71.3 \AA^2) 以及连接帽子区域和核心区的 $\alpha 9$ – $\alpha 10$ 螺旋 (191–203, B-factor 可达 68.1 \AA^2)。同时, 我们对 ZHD101 晶体结构在 298 K 温度下进行了 200 ns 的分子动力学模拟。结构的波动特征通过统计模拟过程中残基的位置偏移, 即均方根涨落来反映, RMSF 越大表明该

区域的构象波动性越大。在 ZHD101 结构中具有较高的波动性的区域位于帽子区域和 $\alpha 9$ - $\alpha 10$ 螺旋。RMSF 在预测 ZHD101 的柔性区域方面表现出与 B-factor 分析较高的一致性。

2.2 热敏感区域的选取

高温下的分子动力学模拟可以帮助选取蛋白质解折叠的热敏感区域，对 ZHD101 晶体结构在 323 K 温度下进行了 200 ns 的分子动力学模拟。比对 298 K 和 323 K 温度下 ZHD101 构象动力学特征，帽子区域的 RMSF 以及二级结构倾向性 (P_{DSSP}) 发生显著的变化 (图 1B), $\Delta RMSF$ 最高可达 3.3 Å, ΔP_{DSSP} 最低可达 -55.8%。虽然 C-末端区域在 298K 的波动性较弱 (RMSF_{298K} 最高为 1.0 Å), 但是该区域对温度表现出较高的敏感性。当温度升高时, 该区域残基的 RMSF 有明显上升

($\Delta RMSF$ 最高为 1.3 Å), 同时 P_{DSSP} 下降明显 (ΔP_{DSSP} 最低可达 -20.5%)。

当温度升高时, ZHD101 结构中热敏感区域与柔性区域 (如图 1B 中红色位点所示) 高度重叠。在柔性区域内, $\Delta RMSF > 0.5$ Å 和 $\Delta P_{DSSP} < -10\%$ 作为筛选标准筛选出 32 个同时表现出较高柔性和热敏感性的位点 (图 1C)。其中有 19 个位点位于帽子区域 (L141, D143, E144, A151, N152, V153, M154, L155, N156, D157, V158, S159, E163, A164, W165, Q166, A167, H177, K178, Y187), 5 个位点分布于 C 末端的 α -螺旋区域 (T259, T260, Q261, K262, H263), 此外还有 8 个位点分布于帽子区域下方的 loop2 (I13)、loop8 (T73, E74)、loop14 (R189, T190)、 $\alpha 9$ 螺旋 (S194) 以及 $\alpha 10$ 螺旋 (D199)。

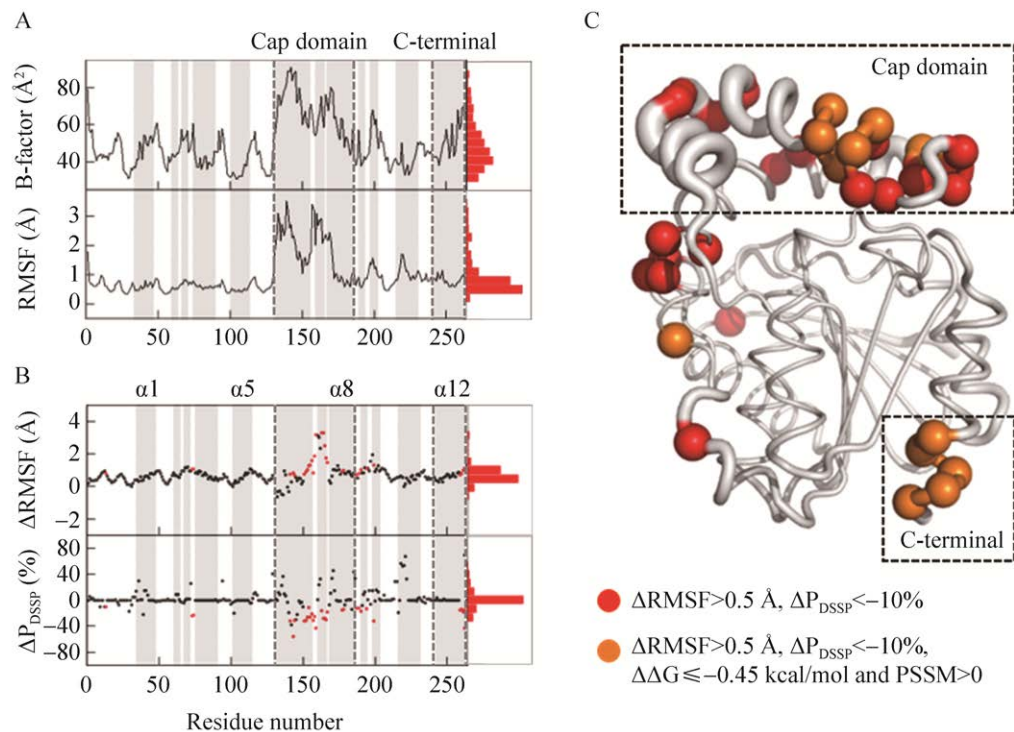


图 1 ZHD101 中柔性 and 热敏感区域的选取

Fig. 1 Identification of flexible and heat sensitive regions in ZHD101. (A) B-factor and RMSF (298 K) of wild type. (B) Shift of RMSF and DSSP under 298 K and 323 K, $\Delta RMSF = RMSF_{323K} - RMSF_{298K}$, $\Delta P_{DSSP} = P_{DSSP 323K} - P_{DSSP 298K}$. The shaded regions are α -helix structures. (C) Mutation sites are shown in the structure of the wild type. Red spheres indicate flexible sites meet the $\Delta RMSF$ and ΔP_{DSSP} . Yellow spheres indicate mutational sites meet the filter, PSSM score and $\Delta \Delta G$ calculation.

2.3 突变体的计算筛选

在选取的 32 个突变位点上,依据突变所引起的构象自由能变化和同源序列比对中获得的氨基酸保守性进行了虚拟饱和突变(共 608 个)。同时满足 PSSM>0 和 $\Delta\Delta G<0$ kcal/mol 的突变设计共有 22 个, $\Delta\Delta G$ 的平均值为 (-1.63 ± 1.20) kcal/mol。为了

富集正向突变,本研究选取了 $\Delta\Delta G<-0.45$ kcal/mol 的 12 个突变设计进行实验验证。

结合自由能计算 ($\Delta\Delta G<-0.45$ kcal/mol) 和序列保守性 (PSSM>0) 的筛选,在 32 个候选位点的 608 个突变中共包含 12 个潜在的热稳定性突变设计(图 2,表 2),包括 N152V, V153F, M154F,

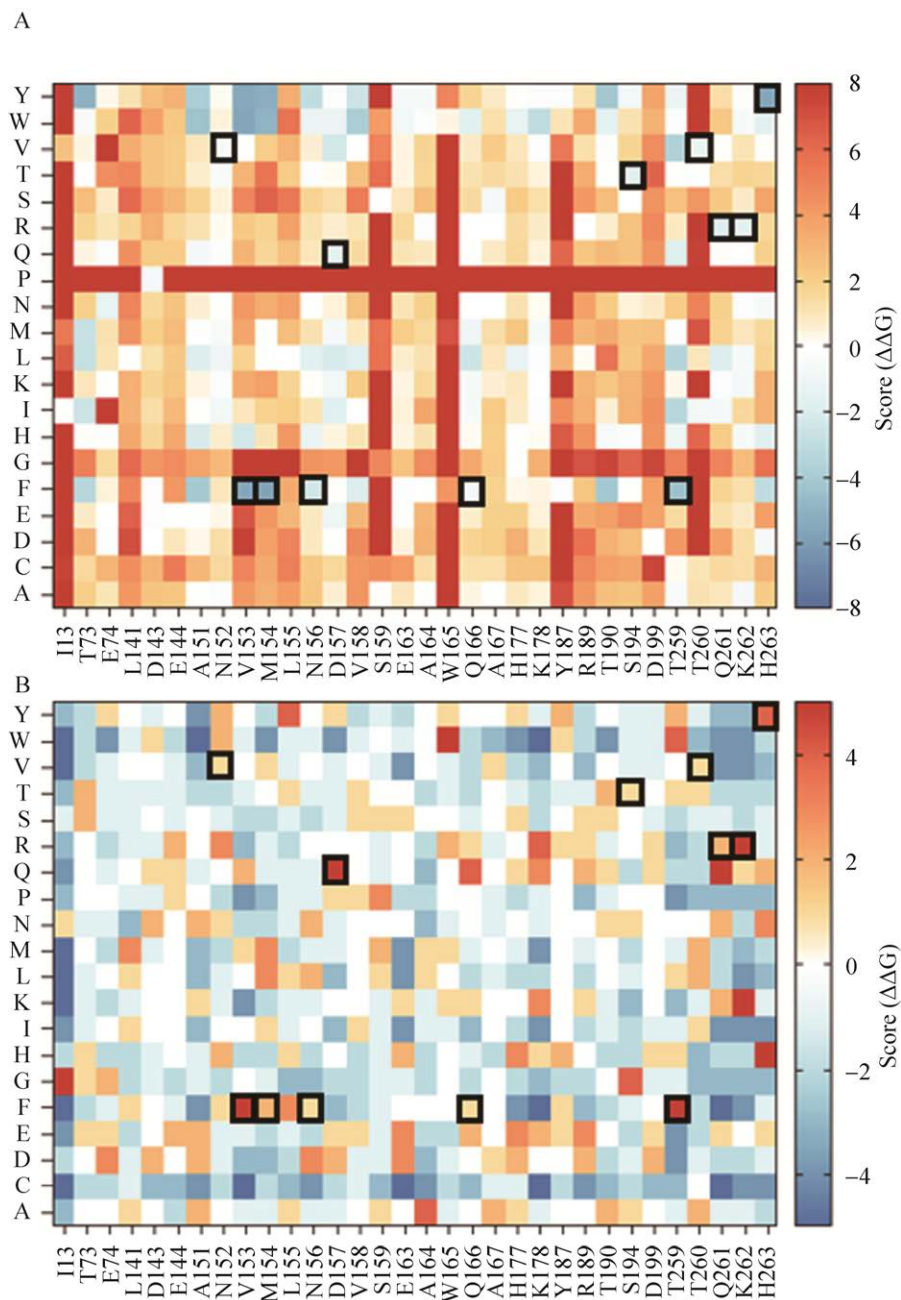


图 2 突变位点的计算设计

Fig. 2 Computational design of mutant sites. (A) Stability prediction of candidate sites ($\Delta\Delta G$) by Rosetta Cartesian DDG. (B) PSSM scores of candidate sites. Black squares highlight the mutants meet both two filters.

表 2 突变设计的筛选参数和稳定性的实验表征

Table 2 Parameters for mutation designs based on Δ RMSF and Δ Propensity extracted from MD trajectories under different temperature, PSSM scores from conservation analysis and $\Delta\Delta$ G energy calculated by Resetta Cartesian. Characteristics of wild type and mutants ZHD101 including T_m , ΔT_m , relative activities and residual activities (activities after heating 10 min under 50 °C)

Mutants	Δ RMSF (Å)	Δ P _{DSSP} (%)	PSSM	$\Delta\Delta$ G (kcal/mol)	T_m (°C)	ΔT_m (°C)	Activity (%)	
							Relative	Residual
WT	–	–	–	–	43.0	–	100	37.1
N152V	0.892	–30.8	1	–0.568	49.8	6.8	79.1	56.9
V153F	1.014	–26.5	6	–5.616	48.8	5.8	72.5	70.0
M154F	1.276	–11.3	2	–5.836	47.5	4.5	0.3	0.1
N156F	1.599	–20.9	1	–2.441	47.8	4.8	95.8	87.8
D157Q	0.815	–31.0	5	–1.524	45.2	2.2	46.8	53.2
Q166F	1.753	–30.1	1	–0.800	44.6	1.6	150.3	9.2
S194T	1.122	–13.4	1	–1.781	47.2	4.2	131.6	48.3
T259F	0.697	–14.8	6	–4.458	47.6	4.6	169.0	81.4
T260V	0.795	–14.1	1	–1.362	47.5	4.5	97.6	9.8
Q261R	0.994	–18.3	2	–1.946	43.1	0.1	98.6	30.1
K262R	1.103	–15.6	5	–1.671	44.8	1.8	110.9	79.2
H263Y	0.999	–20.5	4	–5.557	46.0	3.0	108.1	24.6

N156F, D157Q (帽子区域), T259F, T260V, Q261R, K262R, H263Y (C-末端区域), S194T (α 9 螺旋) (图 1C, 橘色球状位点)。其中, 帽子区域和 C-末端均有自由能降低较多 ($\Delta\Delta$ G \leq –5.5 kcal/mol) 和 PSSM 得分较高 (PSSM \geq 4) 的突变。在帽子区域中, V153F 和 M154F 突变自由能降低最为明显 ($\Delta\Delta$ G \leq –5.5 kcal/mol), V153F 和 D157Q 有较高的 PSSM 得分, 而 N152V 和 Q166F 两个突变的自由能仅略微降低 ($-1 < \Delta\Delta$ G < 0 kcal/mol)。C-末端中, T259F 和 H263Y 的自由能变化远高于其他位点 (T260V, Q261R 和 K262R) 的自由能降低幅度 ($\Delta\Delta$ G \leq –4.4 kcal/mol), 同时 T259F 有着较高的 PSSM 得分。在 α 9 和 α 10 螺旋区域, 只有 S194T 符合筛选的条件 (PSSM=1, $\Delta\Delta$ G=–1.781 kcal/mol)。

2.4 野生型及突变体的表达纯化

突变体使用表 1 中的引物进行全质粒 PCR 所构建, 突变后的质粒转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 后进行全基因测序, 结果正确后进行表达纯化。将

野生型玉米赤霉烯酮水解酶 ZHD101 表达纯化后, 用 Tris-HCl 缓冲液稀释至浓度为 0.2 mg/mL, 取 20 μ L 酶液上样至 SDS-PAGE 进行分子量分析。SDS-PAGE 中目的蛋白条带与 29.0 kDa 的 Marker 条带齐平 (图 3, 泳道 1), 与 ZHD101 理论分子量 (28.75 kDa) 相符合。所有的突变体均能在大肠杆菌中可溶性表达, 且条带对应的分子量大小正确, 纯度在 90% 以上 (图 3, 泳道 2–17)。

2.5 野生型及突变体的性质表征

野生型和突变体在 4 °C 进行 190–260 nm 的全波长扫描 (图 4A)。野生型与突变体在 220 nm 处均存在最低吸收值, 所有蛋白全部折叠形成了正确的二级结构。在 4–80 °C 的范围内测定蛋白质热熔融过程中椭圆率的变化情况。蛋白的热熔融温度 (T_m) 由 220 nm 波长下的热变曲线获得 (图 4B)。

同时, 本研究测定了野生型与突变体的相对酶活性和在 50 °C 热处理 10 min 后的残余酶活性 (表 2) 以表征突变设计对酶活性的影响。

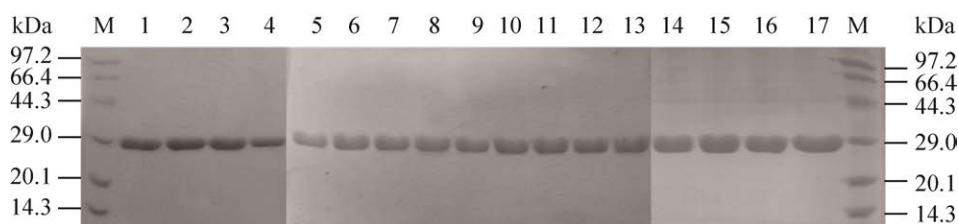


图 3 野生型 ZHD101 及其突变体在大肠杆菌中的表达纯化

Fig. 3 Expression and purification of wild type ZHD and its mutants expressed in *E. coli* BL21 (DE3). M: premixed protein marker; 1: purified wild type ZHD; 2–17: purified protein of mutant N152V, V153F, M154F, N156F, D157Q, Q166F, S194T, T259F, T260V, Q261R, K262R, H263Y, N156F/S194T, N156F/T259F, S194T/T259F, N156F/S194T/T259F.

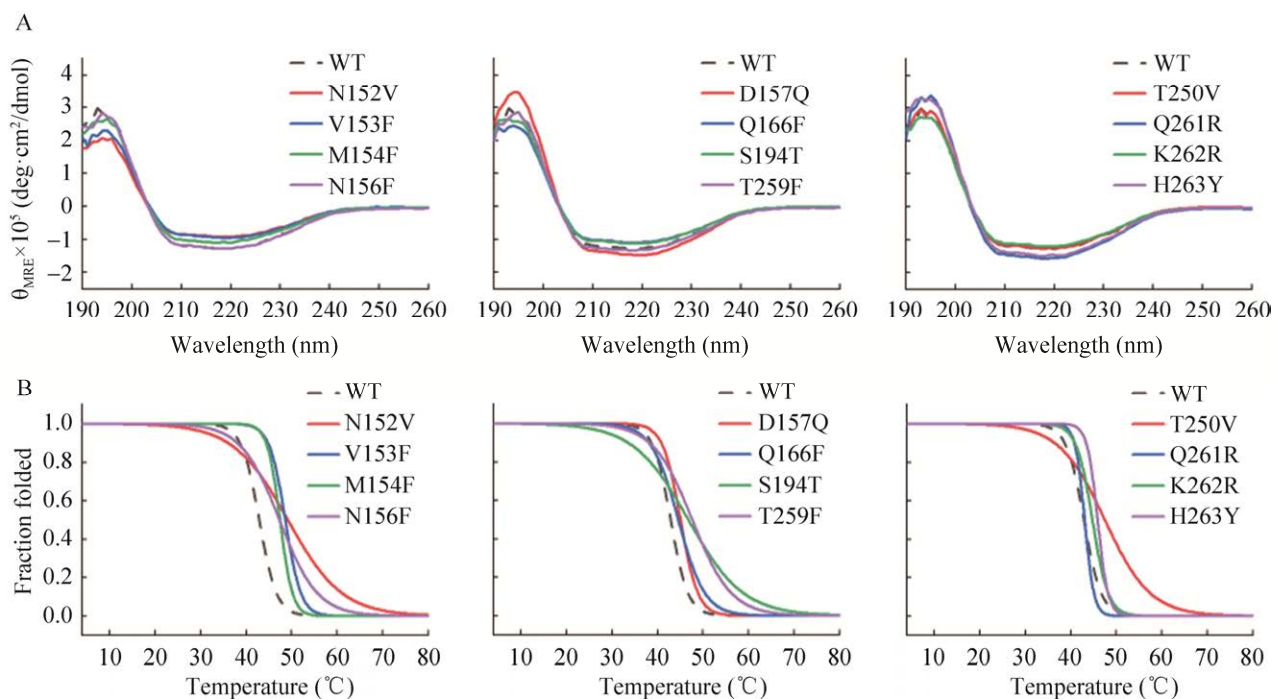


图 4 野生型及突变体的热力学稳定性表征

Fig. 4 Far-UV CD spectra and thermal denaturation of wild type and mutants. (A) CD spectra at 4 °C in 0.02 mol/L Tris-HCl buffer (pH 7). (B) Thermal melting curves monitored at 220 nm in Tris-HCl buffer. The samples were shown in different colors as labeled in the plots.

位于帽子区域的 6 个突变体有 4 个热稳定性有一定程度的提升, 包括 N152V ($\Delta T_m=6.8$ °C)、V153F ($\Delta T_m=5.8$ °C)、M154F ($\Delta T_m=4.5$ °C) 和 N156F ($\Delta T_m=4.8$ °C), 其中只有 N156F 突变保持了酶活性 (相对酶活性为 95.8%, 以野生型未热处理的酶活性为相对标准), 并且在加热处理后残余酶活性 (87.8%) 也得到了明显改善; N152V 和

V153F 的相对酶活性 (<80%) 受到一定程度的损失; 而 M154F 突变导致酶完全失活 (表 2)。这是由于帽子区域与底物结合有关, 突变可能对酶的催化过程有一定影响, 导致了某些突变体相对酶活性的损失。

位于 C-末端的 5 个突变体中, T259F 和 T260V 热稳定性的提高相对较多 ($\Delta T_m>4.0$ °C)。由于位

于 C-末端, 远离催化中心, 对酶活性基本没有影响, 并且 T259F 的相对酶活性 (169.0%) 有一定的提高。

此外, S194T 作为 $\alpha 9$ 螺旋中唯一存在的位点, 热稳定性有所提升 ($\Delta T_m = 4.2$ °C), 且表现出相对酶活性与残余酶活性均高于野生型 (131.6% 和 48.3%)。

2.6 突变体的分子动力学模拟

对于热稳定性有所提升 ($\Delta T_m > 4.0$ °C), 并且酶活性与野生型相似甚至高于野生型 (相对酶活性 $> 95\%$, 残余酶活性 $> 40\%$) 的 3 个突变体 N156F、S194T 和 T259F 进行了 200 ns 的动力学模拟。从主链原子的均方根偏差 (Root mean square deviation, RMSD) 的变化趋势可以看出, 野生型及突变体的构象在 60 ns 后达到平衡状态 (图 5A)。在轨迹 1 中, 达到平衡后 3 个突变体的 RMSD 值 (相对结构为 NVT 模拟的初始结构) 均低于野生型, 与野生型相比 (2.28 ± 0.12 Å), N156F、S194T 和 T259F 在后 100 ns 轨迹内的平均 RMSD 分别下降至 (1.85 ± 0.14) Å、(1.82 ± 0.10) Å 和 (1.69 ± 0.11) Å, 轨迹 2 的数值与轨迹 1 相似,

相较于野生型, 突变引入减弱了构象波动性, 更有利于 ZHD101 结构稳定性的提高。此外, 对野生型及 3 个突变体后 100 ns 的轨迹进行 RMSF 分析可以发现, 相对于野生型帽子区域较高的波动性 (图 5B), 3 个突变体位于帽子区域残基的 RMSF 都有明显降低。

2.7 机理分析

S194T 突变的引入并没有实现局部柔性区域的刚性化。相反, 该突变导致附近残基的二级结构倾向性均有一定程度的降低, 在构象上可能表现出更大的自由度。这种区域的结构特征变化导致位于 $\alpha 9$ 螺旋的 R189 与位于帽子区域的 E142 之间的盐桥相互作用被破坏 (图 6A)。该区域强相互作用力的丢失有一定概率引起突变位点附近区域以及帽子区域的构象以及盐桥作用力的调整 (图 6B), 其中 R189 与 E74 以及 E142 与 R185 之间的盐桥成键概率分别增加了 13.1% (轨迹 2: 24.2%) 和 33.0% (轨迹 2: 52.9%)。由 S194T 突变引起的区域盐桥相互作用力重排, 对构象稳定性的提高可能有所帮助。此外, 在野生型 ZHD101 中, 帽子区域的残基与其他区域的多个残基之间

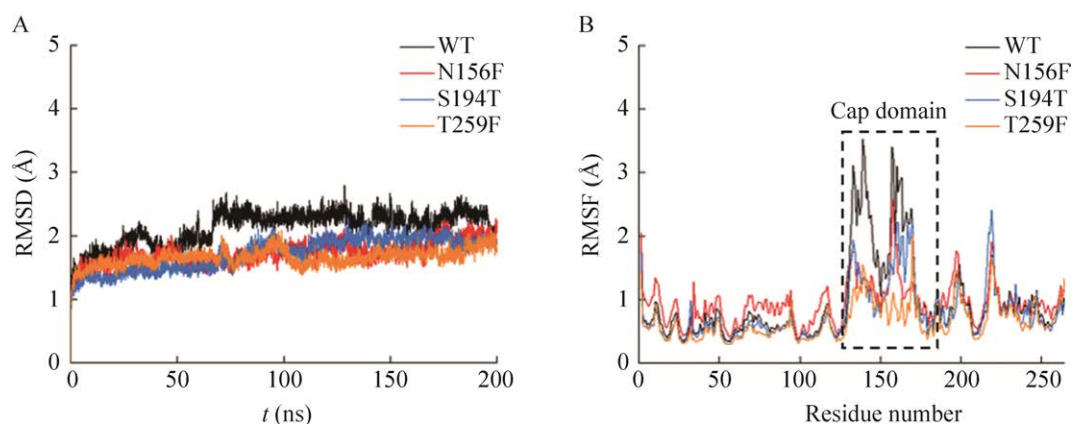


图 5 野生型 ZHD101 (黑色) 及突变体 N156F (红色)、S194T (蓝色) 和 T259F (橙色) 的分子动力学模拟分析 (A: 均方根偏差; B: 均方根波动. 黑框标出的为帽子区域)

Fig. 5 Molecular dynamics simulation analysis for wild type ZHD101 (black) and mutant N156F (red), S194T (blue) and T259F (orange). (A) The root mean square deviation (RMSD). (B) The root mean square fluctuation (RMSF). Black squares highlight the cap domain.

存在显著的动力学相关性。当 S194T 突变后，由于帽子区域的 E142 残基与本体 R189 残基之间的相互作用的丢失切断了 $\alpha 9$ 螺旋与帽子区域的联系，我们推测区域内的构象变化与作用力的重排进一步减弱了区域间残基之间的动力学相关性。

值得注意的是，N156F 突变设计位于结构的表面，在通常情况下并不利于蛋白质的折叠。由此推断，N156F 可能与邻近的残基形成非典型性的非共价相互作用，比如与 L155 形成 CH- π 相互作用^[38]，或者与 N152 形成 NH- π 相互作用(图 6C)^[39]。这些非共价相互作用在蛋白结构中常有发生，并对蛋白的热稳定性具有一定的贡献^[40]。从图 6D 中可以看出，N156 与 N152 侧链之间的平均距离为 $9.1 \text{ \AA} \pm 2.7 \text{ \AA}$ (轨迹 2: $8.4 \text{ \AA} \pm 2.1 \text{ \AA}$)。

而 N156 突变为苯丙氨酸后，其侧链苯环质心与 N152 侧链氮原子的平均距离仅为 $3.4 \text{ \AA} \pm 0.7 \text{ \AA}$ (轨迹 2: $3.7 \text{ \AA} \pm 0.3 \text{ \AA}$)，可形成 NH- π 相互作用。

T259 位于蛋白质表面的空穴中，突变位点由苏氨酸突变成苯丙氨酸后，残基侧链长度和疏水性的增加可以将侧链埋藏于蛋白内部，并填充表面空穴，从而提高蛋白质的热稳定性(图 6E)^[41]。将位于表面的疏水残基的侧链隐藏在蛋白内部已经被证明可以提高天然蛋白的稳定性^[42]。从图 6F 中可以看出，与野生型相比 ($11,339.9 \pm 216.8 \text{ \AA}^2$)，T259F 的溶剂可及表面积 (SASA, solvent accessible surface area) 有所减小 (轨迹 1: $11,068.6 \pm 172.9 \text{ \AA}^2$ ，轨迹 2: $11,104.6 \pm 218.5 \text{ \AA}^2$)，这对热稳定性的提高可能具有一定的贡献。

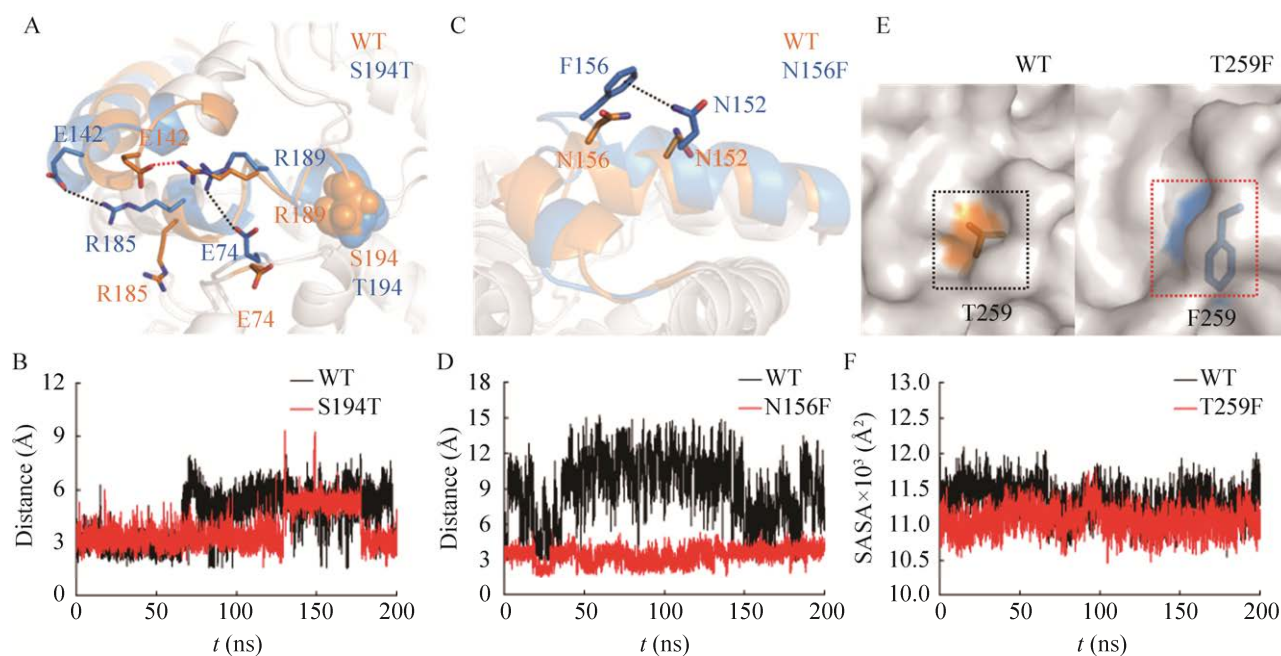


图 6 N156F、S194T 和 T259F 热稳定性提高的机理分析

Fig. 6 Mechanism analysis of improved thermal stability of N156F, S194T and T259F. (A) Local salt bridge changes caused by S194T mutation. (B) Comparison of the distance between the oxygen atom in the side chain of E142 and the nitrogen atom in the side chain of R185 in wild type and S194T. (C) Atypical non-covalent effects introduced by the N156F mutation. (D) The comparison of the distance between the oxygen atom of N156 side chain and the centroid of benzene ring of F156 side chain and the nitrogen atom of N152 side chain. (E) The T259F mutation fills the cavities on the surface of the protein, and the black and red squares highlight the cavities. (F) The comparison of the residue solvent accessible surface area (SASA) between WT and the T259F mutant.

表 3 组合突变体的性质表征

Table 3 Characteristics of wild type and mutants ZHD101 including T_m , ΔT_m , relative activities and residual activities (activities after heating 10 min under 50 °C)

Mutants	T_m (°C)	ΔT_m (°C)	Activity (%)	
			Relative	Residual
WT	43.0	—	100	37.1
N156F/S194T	49.7	6.7	103.6	89.7
N156F/T259F	46.7	3.7	150.1	60.3
S194T/T259F	46.3	3.3	171.4	54.6
N156F/S194T/T259F	49.1	6.1	152.9	80.2

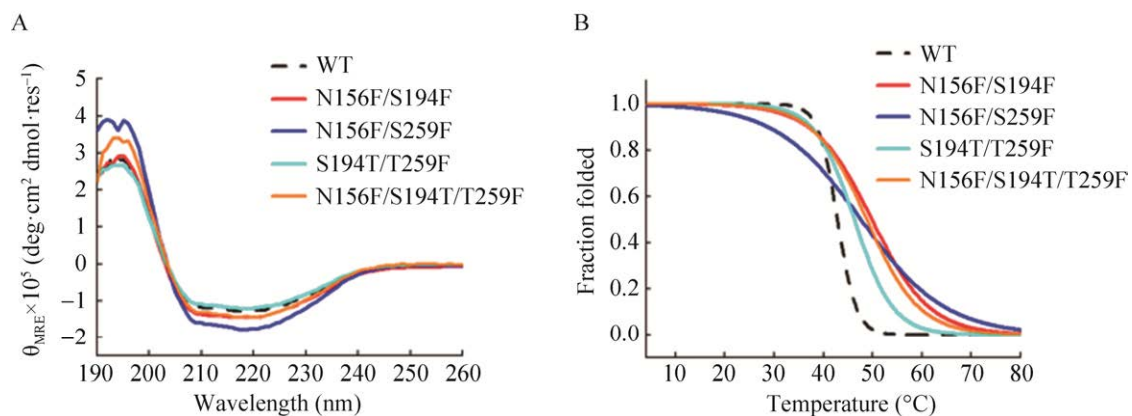


图 7 野生型及组合突变体的热力学稳定性表征

Fig. 7 Thermal denaturation of wild type and combined mutants. (A) CD spectra at 4 °C in 0.02 mol/L Tris-HCl buffer (pH 7). (B) Thermal melting curves monitored at 220 nm in Tris-HCl buffer. The samples were shown in different colors as labeled in the plots.

2.8 组合突变体的性质表征

为了获得性质较好的突变体，并考察突变位点的上位效应，对 N156F、S194T 和 T259F 进行迭代组合突变，分别为 N156F/S194T、N156F/T259F、S194T/T259F、N156F/S194T/T259F。全波长扫描结果显示，这 4 个组合突变体折叠形成了正确的二级结构，在 220 nm 处存在最低吸收峰 (图 7A)。3 个组合突变体热的熔融温度 (T_m) 由 220 ns 波长下的热变曲线获得 (图 7B)。其中热稳定性提高较多的为 N156F/S194T ($\Delta T_m=6.7$ °C)，所有组合突变体的 T_m 提高效果都弱于单点突变的 T_m 叠加效果，这说明了这 3 个突变之间可能存在负上位效应。与野生型相比，4 个组合突变的相对酶活性 (>100%) 和残余酶活性均有所提升 (>50%)

(表 3)。

这 3 个位点相互之间距离较远，稳定蛋白质的机理各不相同，且组合后表现出不同效果。N156F 和 S194T 热稳定性的提高是可叠加的 ($\Delta T_m \approx 7$ °C)，T259F 与 N156F、S194T 形成的双点突变的 T_m 与单点突变类似 ($\Delta T_m \approx 4$ °C)，T259F/N156F/S194T 的三点突变与双点突变类似 ($\Delta T_m \approx 7$ °C)，似乎 T259F 对稳定性的增强作用被抑制了。N156F 和 S194T 是通过作用力改变提升热稳定性，T259F 通过表面填充改变蛋白质疏水特性提升热稳定性。T259F 位于 C-末端区域，可能该区域构象多变并且对蛋白质整体构象依赖性高，这可能是在组合突变中 T259F 稳定性被抑制的一个原因。

3 结论

本研究通过柔性和热敏感区域的分析,确定了3个区域的32个突变位点。因此,对于每个位点进行了虚拟饱和突变,共计608个突变体。依据构象自由能变化和多序列比对保守性筛选出了12个合理的突变体。在12个突变体中,其中7个热稳定性有一定程度的提升($\Delta T_m > 4\text{ }^\circ\text{C}$)。在热稳定性提高显著的突变体中,N156F、S194T和T259F这3个突变体保留了野生型的酶活性,甚至有一定幅度的提高(相对酶活性分别为95.8%、131.6%和169.0%)。

S194T、N156F和T259F可能分别通过盐桥重排,形成NH- π 和填补蛋白表面空腔提高热稳定性。通常情况下,热稳定性的提高以酶活性作为补偿。但是这3个突变体保留甚至提高了酶活性,它们对催化作用的影响机理可能比较复杂。以S194T为例,S194T突变与催化中心距离较远,但是该突变可能会导致附近残基在构象上发生变化,区域盐桥相互作用力重排,可能影响了催化中心与ZEN的结合,对酶活性产生了影响,这种别构效应在功能蛋白中普遍存在,比如在酪氨酸磷脂酶蛋白中被观察到^[43]。因此,选取ZHD101作为模式蛋白,通过分子动力学模拟结合虚拟饱和突变的策略,可有效提高ZHD101的热稳定性及其在工业应用中的潜力。

REFERENCES

- [1] Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of Zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(1): 1-18.
- [2] D'Mello JPF, Placinta CM, MacDonald AMC. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Sci Technol*, 1999, 80(3/4): 183-205.
- [3] Berek L, Petri IB, Mesterházy A, et al. Effects of mycotoxins on human immune functions *in vitro*. *Toxicol Vitro*, 2001, 15(1): 25-30.
- [4] 程传民, 柏凡, 李云, 等. 2013年玉米赤霉烯酮在饲料原料中的污染分布规律. *中国畜牧杂志*, 2014, 50(16): 68-72, 77.
Cheng CM, Bai F, Li Y, et al. Distribution of zearalenone contamination of feed raw materials in 2013. *Chin J Animal Sci*, 2014, 50(16): 68-72, 77 (in Chinese).
- [5] 国家标准化管理委员会, 国家质量监督检验检疫总局. 饲料卫生标准: GB 13078-2017. Standardization Administration, State Administration for Market Regulation. Hygienical standard for feeds: GB 13078-2017 (in Chinese).
- [6] Bueno DJ, Di Marco L, Oliver G, et al. *In vitro* binding of zearalenone to different adsorbents. *J Food Prot*, 2005, 68(3): 613-615.
- [7] Abd Alla ES. Zearalenone: incidence, toxigenic fungi and chemical decontamination in Egyptian cereals. *Nahrung*, 1997, 41(6): 362-365.
- [8] 俞建良, 苏会波, 李凡, 等. 玉米干法酒精生产过程中真菌毒素降解技术的探讨. *酿酒科技*, 2016(9): 59-64.
Yu JL, Su HB, Li F, et al. Mycotoxin degradation technology in ethanol production by dry milling corn. *Liquor-Mak Sci Technol*, 2016(9): 59-64 (in Chinese).
- [9] 赵仁勇, 宋斌. 玉米赤霉烯酮生物脱毒研究进展. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2018, 39(2): 113-121.
Zhao RY, Song B. Advances in biological detoxification of zearalenone. *J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed)*, 2018, 39(2): 113-121 (in Chinese).
- [10] Vekiru E, Hametner C, Mitterbauer R, et al. Cleavage of zearalenone by *Trichosporon* mycotoxinivorans to a novel nonestrogenic metabolite. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(7): 2353-2359.
- [11] Lei YP, Zhao LH, Ma QG, et al. Degradation of zearalenone in swine feed and feed ingredients by *Bacillus subtilis* ANSB01G. *World Mycotoxin J*, 2014, 7(2): 143-151.
- [12] El-Nezami H, Polychronaki N, Lee YK, et al. Chemical moieties and interactions involved in the

- binding of zearalenone to the surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(14): 4577-4581.
- [13] Kakeya H, Takahashi-Ando N, Kimura M, et al. Biotransformation of the mycotoxin, zearalenone, to a non-estrogenic compound by a fungal strain of *Clonostachys* sp.. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(12): 2723-2726.
- [14] Takahashi-Ando N, Kimura M, Kakeya H, et al. A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. *Biochem J*, 2002, 365(pt 1): 1-6.
- [15] Peng W, Ko TP, Yang YY, et al. Crystal structure and substrate-binding mode of the mycoestrogen-detoxifying lactonase ZHD from *Clonostachys rosea*. *RSC Adv*, 2014, 4(107): 62321-62325.
- [16] Takahashi-Ando N, Ohsato S, Shibata T, et al. Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(6): 3239-3245.
- [17] 曲戈, 朱彤, 蒋迎迎, 等. 蛋白质工程: 从定向进化到计算设计. *生物工程学报*, 2019, 35(10): 1843-1856.
- Qu G, Zhu T, Jiang YY, et al. Protein engineering: from directed evolution to computational design. *Chin J Biotech*, 2019, 35(10): 1843-1856 (in Chinese).
- [18] 田健, 王平, 伍宁丰, 等. 理性设计提高蛋白质热稳定性的研究进展. *生物技术进展*, 2012, 2(4): 233-239.
- Tian J, Wang P, Wu NF, et al. Recent advances in the rational design to improve the protein thermostability. *Curr Biotechnol*, 2012, 2(4): 233-239 (in Chinese).
- [19] Childers MC, Daggett V. Insights from molecular dynamics simulations for computational protein design. *Mol Syst Des Eng*, 2017, 2(1): 9-33.
- [20] Yu H, Huang H. Engineering proteins for thermostability through rigidifying flexible sites. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(2): 308-315.
- [21] Tian J, Wang P, Gao S, et al. Enhanced thermostability of methyl parathion hydrolase from *Ochrobactrum* sp. M231 by rational engineering of a glycine to proline mutation. *FEBS J*, 2010, 277(23): 4901-4908.
- [22] Pikkemaat MG, Linssen ABM, Berendsen HJC, et al. Molecular dynamics simulations as a tool for improving protein stability. *Protein Eng Des Sel*, 2002, 15(3): 185-192.
- [23] Strickler SS, Gribenko AV, Gribenko AV, et al. Protein stability and surface electrostatics: a charged relationship. *Biochemistry*, 2006, 45(9): 2761-2766.
- [24] Rohl CA, Strauss CE, Misura KM, et al. Protein structure prediction using Rosetta. *Methods Enzymol*, 2004, 383: 66-93.
- [25] Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, et al. The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(web server issue): W382-W388.
- [26] Goldenzweig A, Goldsmith M, Hill SE, et al. Automated structure-and sequence-based design of proteins for high bacterial expression and stability. *Mol Cell*, 2016, 63(2): 337-346.
- [27] Meng QL, Capra N, Palacio CM, et al. Robust ω -transaminases by computational stabilization of the subunit interface. *ACS Catal*, 2020, 10(5): 2915-2928.
- [28] Xiong P, Wang M, Zhou X, et al. Protein design with a comprehensive statistical energy function and boosted by experimental selection for foldability. *Nat Commun*, 2014, 5: 5330.
- [29] Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins*, 2010, 78(8): 1950-1958.
- [30] Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys*, 1983, 79(2): 926-935.
- [31] Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys*, 2007, 126(1): 014101.
- [32] Berendsen HJC, Postma JPM, Van Gunsteren WF, et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys*, 1984, 81(8): 3684-3690.

- [33] Barlow DJ, Thornton JM. Ion-pairs in proteins. *J Mol Biol*, 1983, 168(4): 867-885.
- [34] Park H, Bradley P, Greisen P, et al. Simultaneous optimization of biomolecular energy functions on features from small molecules and macromolecules. *J Chem Theory Comput*, 2016, 12(12): 6201-6212.
- [35] Kellogg EH, Leaver-Fay A, Baker D. Role of conformational sampling in computing mutation-induced changes in protein structure and stability. *Proteins*, 2011, 79(3): 830-838.
- [36] Altschul SF, Gertz EM, Agarwala R, et al. PSI-BLAST pseudocounts and the minimum description length principle. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(3): 815-824.
- [37] Reetz MT, Carballeira JD, Vogel A. Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006, 45(46): 7745-7751.
- [38] Scheiner S, Kar T, Gu Y. Strength of the Calpha H..O hydrogen bond of amino acid residues. *J Biol Chem*, 2001, 276(13): 9832-9837.
- [39] Steiner T, Koellner G. Hydrogen bonds with pi-acceptors in proteins: frequencies and role in stabilizing local 3D structures. *J Mol Biol*, 2001, 305(3): 535-557.
- [40] Hughes RM, Waters ML. Influence of N-methylation on a cation- π interaction produces a remarkably stable β -hairpin peptide. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(18): 6518-6519.
- [41] Borgo B, Havranek JJ. Automated selection of stabilizing mutations in designed and natural proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(5): 1494-1499.
- [42] Munson M, Balasubramanian S, Fleming KG, et al. What makes a protein a protein? Hydrophobic core designs that specify stability and structural properties. *Protein Sci*, 1996, 5(8): 1584-1593.
- [43] Lu C, Knecht V, Stock G. Long-range conformational response of a PDZ domain to ligand binding and release: a molecular dynamics study. *J Chem Theory Comput*, 2016, 12(2): 870-878.

(本文责编 陈宏宇)