

· 生物技术与方法 ·

# 半理性设计提高丁酰胆碱酯酶催化生长激素释放肽活性

蔡应婷<sup>1,2\*</sup>, 张天竹<sup>1,2</sup>, 林凤云<sup>1,2</sup>

1 重庆医药高等专科学校, 重庆 401331

2 重庆市药物制剂工程技术研究中心, 重庆 401331

蔡应婷, 张天竹, 林凤云. 半理性设计提高丁酰胆碱酯酶催化生长激素释放肽活性[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4228-4241.  
CAI Yingting, ZHANG Tianzhu, LIN Fengyun. Semi-rational design improves the catalytic activity of butyrylcholinesterase against ghrelin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4228-4241.

**摘要:** 生长激素释放肽(ghrelin)是一种对于生长激素的分泌、食欲等具有重要调节作用的脑肠肽, 还可调节体内糖脂代谢过程, 已成为相关疾病治疗的研究热点。人体中的丁酰胆碱酯酶(human butyrylcholinesterase, hBChE)可将 ghrelin 水解为去酰基化状态, 但是催化效率极低, 限制了其应用。本研究通过 HotSpot Wizard 3.0 分析原核可溶性表达的 hBChE 突变体结构, 理性选取 10 个新突变体, 再对不同底物催化动力学与热力学稳定性进行测定, 最终筛选出的新突变体 E197D 与 A199S 对于 ghrelin 催化水解活性分别上升 4.6 倍与 3.5 倍, 为实现体外给药调节体内 ghrelin 进行相关疾病治疗提供了可能。

**关键词:** 丁酰胆碱酯酶; 生长激素释放肽; 半理性设计; 可溶性表达; 热稳定性

## Semi-rational design improves the catalytic activity of butyrylcholinesterase against ghrelin

CAI Yingting<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Tianzhu<sup>1,2</sup>, LIN Fengyun<sup>1,2</sup>

1 Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China

2 Chongqing Engineering Research Center of Pharmaceutical Sciences, Chongqing 401331, China

**Abstract:** Ghrelin, a hormone mainly produced and released by the stomach, has numerous functions, including releasing growth hormones, regulating appetite, and processing sugar and lipids. Researchers have made great efforts to study the relationship between ghrelin and

资助项目: 重庆医药高等专科学校科研项目(ygz2021115)

This work was supported by the Research Program of Chongqing Medical and Pharmaceutical College (ygz2021115).

\*Corresponding author. E-mail: 2020432@cqmpc.edu.cn

Received: 2024-03-05; Accepted: 2024-06-27; Published online: 2024-07-01

metabolic diseases. It is believed that human butyrylcholinesterase (hBChE) could hydrolyze ghrelin to the inactive form (desacyl-ghrelin). However, the low catalytic activity of wild hBChE against ghrelin hinders the clinical application. Recently, a soluble catalytically active hBChE mutant was successfully expressed in *Escherichia coli* for the first time. We then adopted HotSpot Wizard 3.0 to analyze the mutant structure and rationally selected 10 mutants. Furthermore, we determined the catalytic activities of the mutants against several substrates and the thermostability of these mutants. The results showed that the mutants E197D and A199S improved catalytic activity against ghrelin by 4.6 times and 3.5 times, respectively. The findings provide clues for treating endocrine diseases with the agents for regulating ghrelin.

**Keywords:** butyrylcholinesterase; ghrelin; semi-rational design; soluble expression; thermostability

随着社会经济的发展, 人类饮食结构与生活方式发生了巨大的改变, 糖尿病、肥胖等代谢性疾病发病率日益增长, 给公共健康带来了严重影响。生长激素释放肽(ghrelin)是一种在胃部产生的由 28 个氨基酸组成的脑肠肽, 作用于全身多个系统, 对于食欲、生长激素的分泌、心理健康等具有重要的调节功能。ghrelin 在体内的存在形式分别为 N 端第 3 位丝氨酸辛酰基化(acylated ghrelin, AG)与水解发生去辛酰基化(des-acyl ghrelin, DAG)。研究表明, AG 是发挥上述复杂生理调节功能的主要形式, 但是稳定性较低、分布较为局限, 尤其是难以穿透血脑屏障<sup>[1]</sup>。AG 需要酯酶催化去酰基化反应生成 DAG 与正辛酸, 以 DAG 形式实现转运, 反应中的关键酶是人丁酰胆碱酯酶(human butyrylcholinesterase, hBChE, EC 3.1.1.8, 图 1)<sup>[2]</sup>。当 DAG 转运到达靶器官时需要发生再酰化反应成为 AG, 才能与受体结合发挥生理活性, 关键酶是 ghrelin O-酰基转移酶(ghrelin O-acyltransferase, GOAT)<sup>[3]</sup>。人血液中 AG 与 DAG 比例约为 1:9<sup>[4]</sup>, 该比例的变化对于机体糖脂代谢过程具有重大的影响。例如, AG 刺激肝细胞的葡萄糖输出, 而 DAG 的作用相反<sup>[5]</sup>。DAG 能够恢复 2 型糖尿病小鼠受损的胰岛素信号通路, 调节空腹血糖水平, 防止高脂肪饮食诱导大鼠的高血糖和胰岛素抵抗<sup>[6]</sup>。大鼠注

射外源 DAG 可以抑制 AG 的促食欲作用<sup>[7]</sup>。基于此, AG 与 DAG 比例的变化可能预示疾病的发生与发展, 同时也可以成为相关疾病的治疗靶标。

hBChE 是由肝脏合成的一种非特异性酯酶, 血清中的含量约为 3.5–9.3 mg/L<sup>[8]</sup>, 在许多生理功能和疾病发展中扮演重要角色。例如, 使用人血清中分离的 BChE 救治有机磷中毒在临床上已有 50 余年的历史, 一直表现出良好的治疗效果及安全性<sup>[9]</sup>, 但是存在价格高、获取周期长、有伦理限制等缺点。这使得研究人员致力于发现对不同底物具有高催化活性的重组 BChE 突变体<sup>[10]</sup>。例如, 通过理性设计发现了对于可卡因催化活性( $k_{cat}/K_m$ )较野生型提高数倍的 hBChE 突变体, 具有较高的可卡因过量服用治疗潜能<sup>[11]</sup>。然而, hBChE 催化 AG 水解的效率很低 [ $k_{cat}/K_m=0.6\times 10^6$  L/(mol·min)]<sup>[12]</sup>, 难以调节体内 AG 与 DAG 比例以治疗相关疾病。因此, 获得对于该反应具有更高催化活性的 BChE 突变体或许是相关糖脂代谢性疾病的新治疗策略。

Brazzolotto 等<sup>[13]</sup>通过理性设计成功构建了首个原核系统可溶性表达 hBChE 突变体 BChE-M47 (原文献中的名称为 hBChE-7, 在本研究中重新将其命名为 BChE-M47), 测定发现其特征酶学性质与哺乳动物细胞表达系统制备的重组 hBChE 相近, 为实现原核可溶性表达高效催化 AG 的

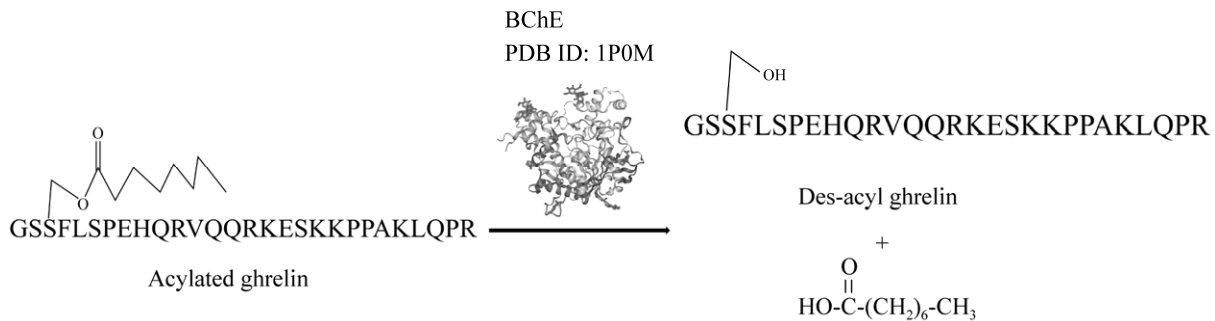


图1 人 BChE 催化 ghrelin 水解示意图

Figure 1 Ghrelin is deacylated by hBChE.

hBChE 突变体提供可能。因此,本研究将在 BChE-M47 基础上,通过计算机辅助设计与实验相结合的方式,发掘 AG 去辛酰基化活性更高的 hBChE 突变体,为治疗相关疾病提供候选分子。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂和仪器

LB 培养基、IPTG、Tris-HCl、咪唑、HisPur 镍-NTA 树脂、碘化硫代丁酰胆碱(S-butrylthiocholine iodide, BTC)、碘化硫代乙酰胆碱(S-acetylthiocholine iodide, ATC)、5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸) [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DNTB]、对氧磷、四异丙基焦磷酸亚胺、人辛酰化 ghrelin (CAS number: 258279-04-8)等均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; Genejet 质粒抽提试剂盒、Q5 热启动超保真 2×Master Mix、Shuffle T7 Express 感受态细胞等均购自 New England Biolabs; 去辛酰化 ghrelin EIA 试剂盒购自 Cayman Chemical。

Mastercycler pro PCR 仪、Fisherbrand basic 60 L 培养箱、French press FA032 高压匀浆机、Genios pro 酶标检测仪为本研究主要使用设备。

#### 1.1.2 菌株和引物

本研究采用的表达宿主为 Shuffle T7 Express

感受态细胞,引物与 BChE-M47 的基因序列由生物工程(上海)股份有限公司合成,将合成的基因克隆至 pET-22b(+)表达载体。引物序列如表 1 所示。

表 1 突变涉及的引物

Table 1 Primers for mutagenesis

Primer name	Primer sequence (5'→3')
D70K-F	GCAGAATATCaaaACCAGCTTTCC
D70K-R	ATACAGCTATTGGCATATTTG
S79D-F	TTTTTCATGGTgatGAAATGTGGAATCCGAATAC
S79D-R	CCCGGAAAGCTGGTATC
Y114S-F	GGTTTGGATTtagCGGTGGTGGTTTTTC
Y114S-R	ATAACGGTTGCATTTTTTC
F118S-F	TGGTGGTGGTtagCAGACCGGCA
F118S-R	TAAATCCAAACCATAACGGTTGC
T120F-F	TGGTTTTTCAGtttGGCACCAGCAG
T120F-R	CCACCATAAAATCCAAACC
T122H-F	TCAGACCGGCcatAGCAGCCTGC
T122H-R	AAACCACCACCATAAAATCC
L125H-F	CACCAGCAGCcatCCGGTTTATG
L125H-R	CCGGTCTGAAAACCAC
Y128H-F	CCTGCCGGTtcatGATGGTAAATTTTC
Y128H-R	CTGCTGGTGCCGGTC
E197D-F	CCTGTTTGGTgatAGTGCCGGTG
E197D-R	GTAACACGATTCGGATCGC
A199S-F	TGGTGAAAGTagCGGTGCAGCAA
A199S-R	AACAGGGTAAACACGATTC

The amino acid codons written in lowercase letters are mutant sites.

## 1.2 方法

### 1.2.1 突变体的构建与蛋白纯化

合成的 4 mg pET-22b(+)-BChE-M47 重组质粒使用 ddH<sub>2</sub>O 溶解, -20 °C 分装保存。使用 ddH<sub>2</sub>O 将 pET-22b(+)-BChE-M47 稀释至 1 ng/ $\mu$ L 作为模板序列, 通过 PCR 反应分别引入突变位点: D70K、S79D、Y114S、F118S、T120F、T122H、L125H、Y128H、A199S、E197D。分别取 5.0  $\mu$ L PCR 产物热激转化 Top 10 感受态细胞, 次日挑取单克隆、扩增培养、质粒提取、测序, 使用软件 Codoncode Aligner 6.0 (CodonCode Corporation) 查看测序结果, 确认突变成功。

将构建成功的重组质粒分别热激转化至 Shuffle T7 Express 感受态细胞。分别挑取 2 个单克隆菌落至 5 mL LB 液体培养基(100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素), 30 °C、225 r/min 振荡培养 16 h。之后将 5 mL LB 菌液倒入 1 L LB 培养基, 30 °C、225 r/min 振荡培养约 4–5 h 至菌液 OD<sub>600</sub> 约为 0.6, 加入 4 mL 100 mmol/L IPTG, 温度降至 18 °C 继续诱导表达 24 h。

培养完成后, 5 000 r/min 离心 20 min 分别收集培养液, 弃去上清, 置于冰上。加入 100 mL Washing buffer (7.880 g Tris-HCl, 17.532 g NaCl 和 1.021 g 咪唑, 溶解于 1 L 超纯水, 调节 pH 至 7.5), 彻底重悬菌体。逐次加入 20 mL 重悬菌液至破碎仪(French press FA032)压力池中, 调节压力至 13 000 Pa 维持 30 s 后释放压力, 收集破碎的菌液。将破碎后的菌液分装至 40 mL 超速离心管中, 于 Avanti J-30I 超速离心机 4 °C、20 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液约 100 mL。

将超离心收集的上清液用 400 mL Washing buffer 稀释, 混合均匀后备用。取 10 mL Hispur 树脂自装亲和柱, 使用约 300 mL Washing buffer 冲洗平衡树脂。将稀释后上清液分别载入亲和柱, 流速设置为 2 mL/min, 使结构中组氨酸标

签与树脂配基进行充分特异性结合, 期间可采用 1 mmol/L BTC 和 1 mmol/L DTNB 混合溶液进行 Ellman 显色反应<sup>[14]</sup>, 检测是否仍有未结合的目标蛋白流出。Ellman 分光光度法原理为: ATC 是乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)的碘化硫代酸酯类似物, BTC 是丁酰胆碱的碘化硫代酸酯类似物, ATC 与 BTC 均可被 BChE 水解生成硫代胆碱, 硫代胆碱结构中的巯基(-SH)能够与 DTNB 生成黄颜色的 5-巯基-2-硝基苯甲酸(5-thio-2-nitrobenzoate, TNB)。TNB 在 412 nm 波长附近有很强吸收, 而 DTNB 没有。再通过分光光度法测定一段时间内产物 TNB 的生产量计算 BChE 催化酶促反应速率(图 2)。

目标蛋白结合完成后使用 1 L Washing buffer 再次淋洗树脂, 直到流出的液体 OD<sub>280</sub> 低于 0.01。使用 50 mL Elution buffer (7.880 g Tris-HCl, 17.532 g NaCl 和 20.424 g 咪唑, 溶解于 1 L 超纯水, 调节 pH 至 7.5)洗脱目标蛋白。使用 Amicon ultra-15 centrifugal filter unit, 4 °C、4 000 r/min 离心浓缩洗脱液, 并离心置换贮存液体为 100 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(PB, pH 7.4), 分装保存于 -80 °C 冰箱。

### 1.2.2 电泳鉴定

使用 Pierce Coomassie Bradford protein assay 试剂盒测定纯化后各突变体与 BChE-M47 (后简称 M47)的总蛋白浓度。在 96 孔板中分别加入 10  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 和 125–2 000  $\mu$ g/mL 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)标准品。使用排枪加入 200  $\mu$ L 的 Coomassie G-250 dye, 混匀后置于室温反应 10 min。使用 Genios pro 酶标仪测定 OD<sub>620</sub>, 以 OD<sub>620</sub> 值为横坐标, BSA 浓度为纵坐标, 使用软件 Curve expert basic 2.1.0 (Hyams Development)绘制标准曲线。

依据测定的各突变体总蛋白浓度确定上样前的稀释倍数, 电源设置 150 V, 进行 SDS-PAGE

电泳, 时长 90 min。电泳完成后将胶片在超纯水中清洗 3 次, 使用 Simpleblue safe stain 室温振荡染色 60 min, 再使用超纯水振荡脱色 120 min。最后用 Image lab 凝胶成像系统拍照记录。

### 1.2.3 BChE 活性中心滴定

BChE 活性中心的 Ser198 可以迅速与有机磷毒剂酯键发生不可逆共价结合, 以 1:1 比例解毒有机磷, 该性质被广泛应用于重组 BChE 活性中心浓度的测定<sup>[15-17]</sup>。使用 ddH<sub>2</sub>O 将对氧磷梯度稀释至 2.0、1.6、1.2、0.8、0.4、0.2 nmol/L; 使用 100 mmol/L PB (pH 7.4) 配制 1 mg/mL BSA, 并使用该溶液将纯化后的各突变体稀释至适宜浓度, 可最大程度上减少蛋白黏附在 EP 管壁造成的浓度偏差, 分别与上述梯度对氧磷等体积混合均匀置于 4 °C, 设置未含有对氧磷样品为对照。24 h 后使用 Ellman 分光光度法测定剩余催化活性。

以未含有对氧磷样品的催化速率(residual activity)为 100%, 不同浓度对氧磷抑制后的 residual activity 呈线性衰减, 外推至 residual activity 为 0 (Y=0) 时得到抑制所有活性中心的对氧磷浓度, 由于抑制以 1:1 比例进行, 所以该浓度即是 BChE 活性中心浓度(concentration of active centers, [E])。

### 1.2.4 AG 催化活性测定

将购买的 AG 以 ddH<sub>2</sub>O 溶解, 配制为 100 μmol/L 母液, 分装保存于 -20 °C。分别使用 50 μmol/L Tris-HCl (pH 7.4, 0.1% BSA) 稀释各突变体及 M47 的 [E] 至 20 nmol/L, 分别加入底物 10 μmol/L AG 于 25 °C 反应 10 min, 使用干冰冷冻停止酶促反应。测定前, 于前述混合溶液中加入 100 μmol/L 四异丙基焦磷酸亚胺, 再使用去辛酰化 ghrelin EIA 试剂盒(10008952), 按照说明书提供的方法测定体系中生成 DAG 的浓度, 以 M47 为 100% 活性对照, 计算 10 个不同突变体的相对催化活性。

### 1.2.5 ATC 和 BTC 催化水解活性测定

首先配制以下溶液:

(1) ATC 底物溶液: 称取 2.89 g ATC 溶解于 100 mL 的 100 mmol/L PB (pH 7.4), 得到 100 mmol/L ATC, 再使用 PB 将其梯度稀释至 0.01–20.00 mmol/L。

(2) BTC 底物溶液: 称取 3.17 g BTC 溶解于 100 mL 的 100 mmol/L PB (pH 7.4), 得到 100 mmol/L BTC, 再使用 PB 将其梯度稀释至 0.01–20.00 mmol/L。

(3) 20 mmol/L DTNB: 称取 0.792 g DTNB 溶解于 100 mL 的 100 mmol/L PB (pH 7.4)。

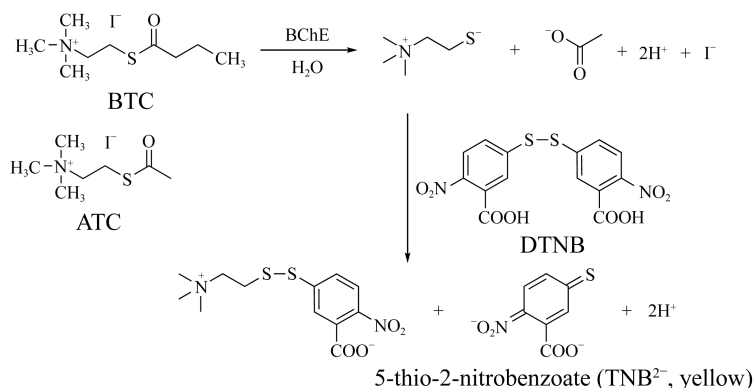


图 2 Ellman 法化学反应机制

Figure 2 Chemical mechanism of Ellman's method.

使用 100 mmol/L PB (pH 7.4) 将各突变体及 M47 稀释[E]至 1 nmol/L, 分别取 100  $\mu$ L 加入 96 孔板, 使用排枪快速加入 100  $\mu$ L 梯度 (0.02–2.00 mmol/L) BTC 与等体积 2 mmol/L DTNB 混合溶液。振摇混合均匀, 使用酶标仪测定 25  $^{\circ}$ C 时 450 nm 下 20 min 内每 60 s 吸光度。计算公式为公式(1), Abs/min 是单位时间内吸光度斜率; TNB 在 450 nm 消光系数为 14 150; 96 孔板 200  $\mu$ L 溶液通过的光径长度为 0.56 cm。ATC 催化水解活性测定方法与 BTC 相同。使用 Michaelis-Menten 模型拟合, 通过公式(1)计算动力学参数。

$$V(\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})) = \frac{\text{Abs}/\text{min}}{14150 \times 0.56} \quad (1)$$

### 1.2.6 AG 催化动力学参数的测定

分别设置底物 AG 终浓度为 0.5、1、2、4、8、16、32、64  $\mu$ mol/L, 与终浓度[E]为 1 nmol/L 的突变体 E197D、A199S 及 M47, 25  $^{\circ}$ C 反应 20 min, 干冰冷冻停止酶促反应。再使用去乙酰化 ghrelin EIA 试剂盒(10008952)测定体系中生成 DAG 的含量, 计算酶促反应速率, 使用 Michaelis-Menten 模型拟合, 计算动力学参数。

### 1.2.7 动力学稳定性

使用 100 mmol/L PB (pH 7.4) 配制 1 mg/mL BSA 溶液, 将突变体 E197D、A199S 及 M47 分别稀释至适宜浓度, 分装于灭菌 1.5 mL EP 管, 并且使用封口膜密封放置于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱。此间取相同浓度酶液置于室温(25  $^{\circ}$ C), 作为 100%活性对照。分别于 1 h–14 d 相应时间, 使用 Ellman 分光光度法测定剩余酶活性。

### 1.2.8 热力学稳定性

使用 100 mmol/L PB (pH 7.4) 配制 1 mg/mL BSA 溶液, 将突变体 E197D、A199S 及 M47 分别稀释至适宜浓度, 分别取 50  $\mu$ L 至 PCR 管。使用 PCR 仪梯度温度功能, 设置 50–72  $^{\circ}$ C 等 12 个

温度梯度(每个温度 3 个重复)。加热 30 min 后将温度降至 4  $^{\circ}$ C 并保持 10 min, 此间取相同浓度酶液置于室温(25  $^{\circ}$ C)作为 100%活性对照, 使用 Ellman 分光光度法测定剩余酶活性。

### 1.2.9 分子动力学模拟

自 Protein Data Bank 下载 BChE-M47 晶体结构(PDB ID: 6EMI), 使用软件 Pymol 引入双突变位点 E197D/A199S。通过 Alphafold2 预测 AG 空间构象, 使用 MOE2019 进行酶-底物的分子对接, 选择 sitefinder 模块选择匹配的最佳对接位点。采用 Gromacs2018 动力学模拟软件, Amber ff99sb-ildn 力场, 采用 TIP3P 模型对体系添加 TIP3P 水, 建立大小为 10 nm $\times$ 10 nm $\times$ 10 nm 的水盒子(水盒子的边缘距离蛋白边缘至少 1.2 nm), 添加离子自动平衡体系<sup>[18]</sup>。Particle-mesh Ewald (PME)处理静电相互作用, 使用最陡下降法进行最大步数(50 000 步)的能量最小化。库伦力截止距离和范德华半径截止距离均为 1 nm, 最后采用正则系统和等温等压系统平衡体系, 然后在常温常压下进行 100 ns 的动力学模拟。非键相互作用截断值设为 10  $\text{\AA}$ 。采用 V-rescale 温度耦合方法控制模拟温度为 300 K, Berendsen 方法控制压力为 1 bar。采用 Gromacs2018 内置的分析模块对模拟轨迹进行数据分析。采用 Gmx\_MMPBSA 计算结合自由能。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变位点的选择

自 Protein Data Bank 下载 BChE-M47 晶体结构(PDB ID: 6EMI), 将其上传至 HotSpot Wizard 平台 (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard/>), Calculation of pocket 设置 Probe radius 为 2.7  $\text{\AA}$ , Essential residue 选择 Ser198、His438 与 Glu325, Calculate Tunnels 设置 Probe radius 范围为 1.7  $\text{\AA}$  到 3.5  $\text{\AA}$ <sup>[19]</sup>, 将 H<sub>2</sub>O 分子计

算在内, 其他条件为默认设置。预测结果中“FUNCTIONAL HOT SPOTS”模块所预测的可突变位点位于催化口袋或通道, 主要涉及催化活性改变、底物特异性、选择性等<sup>[20]</sup>, 选择可变性得分(mutability score) 6 分以上的突变位点, 考虑结构分析的结果, 最终选择 10 个突变位点: D70K、S79D、Y114S、F118S、T120F、T122H、L125H、Y128H、E197D、A199S。

## 2.2 突变体的构建与纯度鉴定

为了构建更加方便获取、融合标签更少的重组蛋白, 本研究将 M47 的编码基因片段亚克隆至 pET-22b(+)表达载体, 而非 Brazzolotto 等<sup>[13]</sup>报道的 pET-32b(+)表达载体, 因为 pET-22b(+)表达载体没有硫氧还蛋白(thioredoxins, Trx)标签, 可减少纯化后切除的操作步骤。此外, 本研究对 Brazzolotto 等<sup>[13]</sup>报道的诱导表达条件进行了一定优化, 主要策略是将诱导表达温度从 37 °C 降低至 18 °C, 并延长诱导时间至 24 h。

结果表明各突变体均顺利实现在大肠杆菌(*Escherichia coli*)胞内的可溶性表达, 经纯化后的各突变体蛋白与 M47 蛋白在 SDS-PAGE 中迁移至 45–66 kDa 之间(理论分子量 60 kDa, 图 3), 各目标条带单一, 纯度达 95% 以上, 可用于后续催化活性测定。

## 2.3 AG 催化活性的比较

以 M47 催化 AG 水解为 DAG 的酶活性([E]=20 nmol/L 催化生成 DAG 的速率)为 100%, 10 个突变体的相对催化活性结果如图 4 所示, 其中突变体 E197D 催化活性约为 M47 的 4.5 倍, 突变体 A199S 催化活性约为 M47 的 3.4 倍, 其余突变体催化活性则并未显著高于 M47, 因此后续将探究 E197D 与 A199S 的酶催化动力学与热稳定性。

## 2.4 催化动力学表征

### 2.4.1 ATC 与 BTC 催化动力学

本研究测定了 1 nmol/L 的 M47、E197D 与

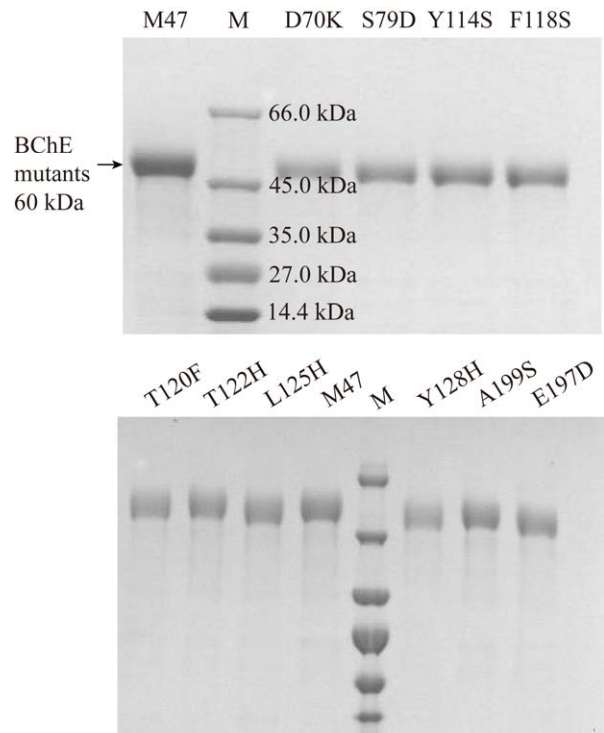


图 3 纯化后各突变体与 M47 的 SDS-PAGE 结果  
Figure 3 Coomassie-blue stained reducing SDS-PAGE of all the BChE mutants and M47.

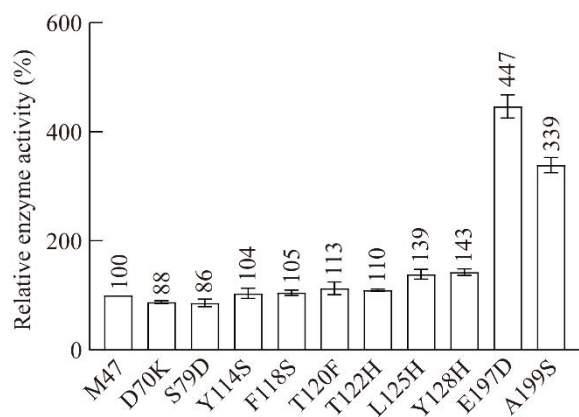


图 4 M47 与各突变体催化 AG 的相对酶活性  
Figure 4 Relatively hydrolytic activity for AG by M47 and mutants.

A199S 催化终浓度为 5–500  $\mu\text{mol/L}$  的 ATC 和 BTC 水解反应动力学。结果显示反应速率与底物浓度符合 Michaelis-Menten 动力学关系(图 5A、5B)。[E]由对氧磷滴定法测得, 具有极高的浓度精确

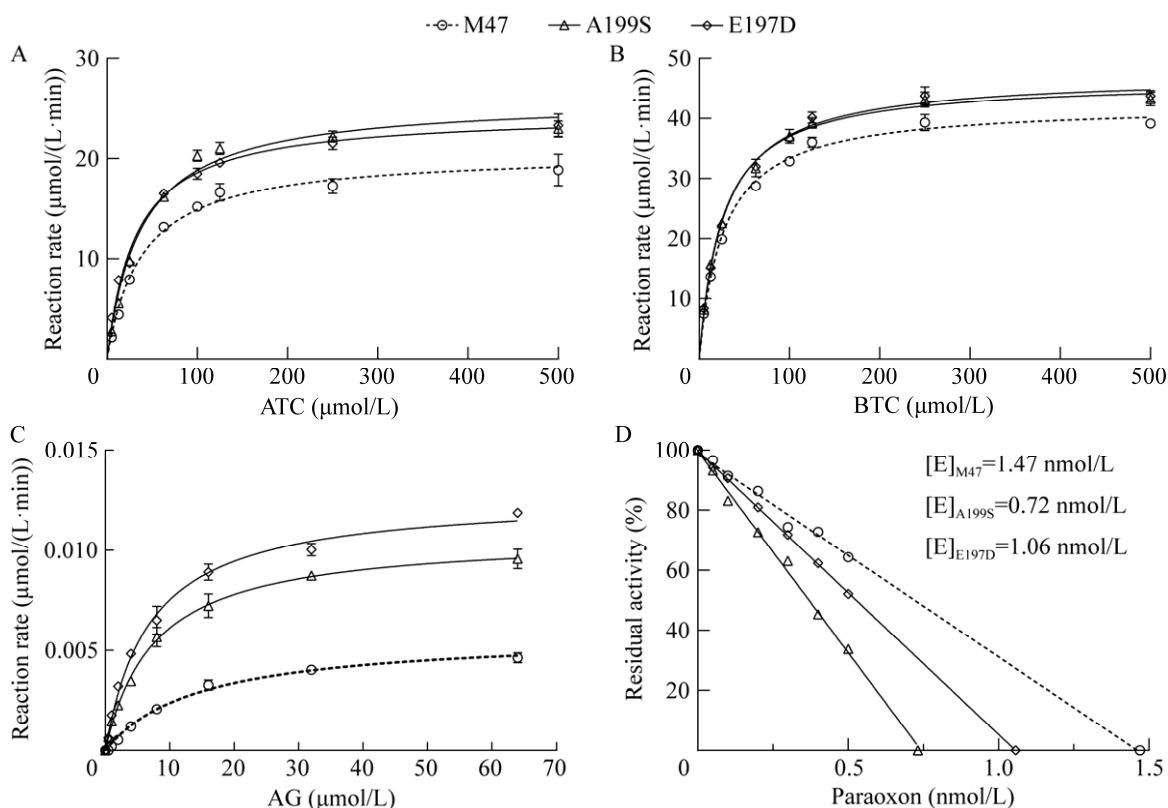


图5 1 nmol/L E197D、A199S 和 M47 催化水解 ATC (A)、BTC (B)和 AG (C)反应的米氏曲线与对氧磷滴定活性中心线性回归图(D)

Figure 5 Michaelis-Menten plots for ATC (A), BTC (B) and AG (C) hydrolysis by 1 nmol/L E197D, A199S and M47, linear regression plot of active site titration (D).

性(图 5D)。具体的催化反应动力学参数结果显示(表 2),与 hBChE 相比,M47、E197D 与 A199S 引入的突变位点均使  $K_m$  与  $k_{cat}$  有所上升,即对于底物的亲和力有所下降,但总体 ATC 和 BTC 的催化活性( $k_{cat}/K_m$ )较为接近,同在一个数量级,未呈现显著性差异。

#### 2.4.2 AG 催化动力学

本研究测定了 25 °C 条件下, [E] 为 1 nmol/L 的 M47、E197D 与 A199S 催化终浓度为 0.50–64.00  $\mu\text{mol/L}$  的 AG 水解反应动力学。结果显示催化反应速率与底物浓度符合 Michaelis-Menten 动力学关系(图 5C)。具体的催化反应动力学参数结果显示(表 2),与 hBChE 相比, M47 对于 AG 的催化的  $K_m$  由 3.6  $\mu\text{mol/L}$  上升至

14.5  $\mu\text{mol/L}$ , 表明实现原核可溶性表达 BChE 而引入的 47 个突变导致酶与底物 AG 的亲和力下降约 75%, 但是 M47 对于 AG 的催化反应的  $k_{cat}$  也上升约 2.6 倍, 总体使得催化活性( $k_{cat}/K_m$ ) 下降约 33%。在 M47 基础上, 引入突变 E197D 与 A199S, 均使得酶与底物 AG 的亲和力上升约 2 倍, 催化反应的  $k_{cat}$  也分别上升约 2 倍, 总体使得催化活性( $k_{cat}/K_m$ ) 分别上升 4.6 倍与 3.5 倍, 具有进一步研究与开发的潜力。

#### 2.5 热稳定性

电泳结果显示 M47、E197D 与 A199S 只存在单体结构, 因此在 37 °C 呈现的活性衰减模式符合 Prism 8.0 中 One-phase exponential decay<sup>[23]</sup>(图 6A)。拟合计算结果显示, M47 的  $t_{1/2}$  为(1.2±0.3) d,



E197D 的  $t_{1/2}$  为(1.4±0.3) d, A199S 的  $t_{1/2}$  为(1.5±0.4) d, 三者未呈现显著性的差异。

以放置于 25 °C 的 M47、E197D 与 A199S 作为 100% 活性对照, 不同温度下孵育 30 min 的相对催化活性变化趋势如图 6B 所示。采用软件 Prism 8.0 中 Boltzmann sigmoidal 模型拟合计算<sup>[24]</sup>。结果显示 M47 的  $T_m$  为(66.4±0.2) °C, E197D 的  $T_m$  为(70.5±1.4) °C, A199S 的  $T_m$  为(68.7±1.2) °C, 新增突变 E197D 对于热力学稳定

性的提升较为明显, 具有较大的开发潜力。

## 2.6 酶活性机制解析

分子动力学模拟遵循牛顿第二定律, 通过计算机模拟多个原子组成的分子体系随时间变化的动态过程, 不仅可以从分子水平提供高时间分辨率的微观结构信息, 同时较准确地预测宏观性质。为了阐释突变位点 E197D 与 A199S 引起的 AG 催化活性提升机制, 本研究首先将 M47、双突变体 E197D/A199S 分别与 AG 对接,

表 2 25 °C 条件下测定的 ATC、BTC、AG 催化参数( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Kinetic parameters determined for ATC, BTC and AG in 25 °C ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Mutants	Substrates	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ )	RCE*
hBChE <sup>[21]</sup>	ATC	20 200.0	33.0	$6.1 \times 10^8$	1.2
M47	ATC	20 630.0±446.6	38.6±3.1	$5.3 \times 10^8$	1.0
A199S	ATC	25 930.0±548.0	37.7±2.9	$6.9 \times 10^8$	1.3
E197D	ATC	24 510.0±393.0	31.9±2.0	$7.7 \times 10^8$	1.4
hBChE <sup>[22]</sup>	BTC	24 000.0	20.0	$1.2 \times 10^9$	0.8
M47	BTC	42 330.0±494.7	26.9±1.3	$1.6 \times 10^9$	1.0
A199S	BTC	46 370.0±533.1	25.5±1.2	$1.8 \times 10^9$	1.2
E197D	BTC	47 210.0±551.6	27.0±1.3	$1.8 \times 10^9$	1.1
hBChE <sup>[12]</sup>	AG	2.2±0.1	3.6±0.3	$0.6 \times 10^6$	1.5
M47	AG	5.8±0.2	14.5±1.2	$0.4 \times 10^6$	1.0
A199S	AG	10.7±0.2	7.6±0.4	$1.4 \times 10^6$	3.5
E197D	AG	12.7±0.2	6.9±0.4	$1.8 \times 10^6$	4.6

\*RCE refers to the relative catalytic efficiency with M47, *i.e.* the ratio of  $k_{cat}/K_m$ .

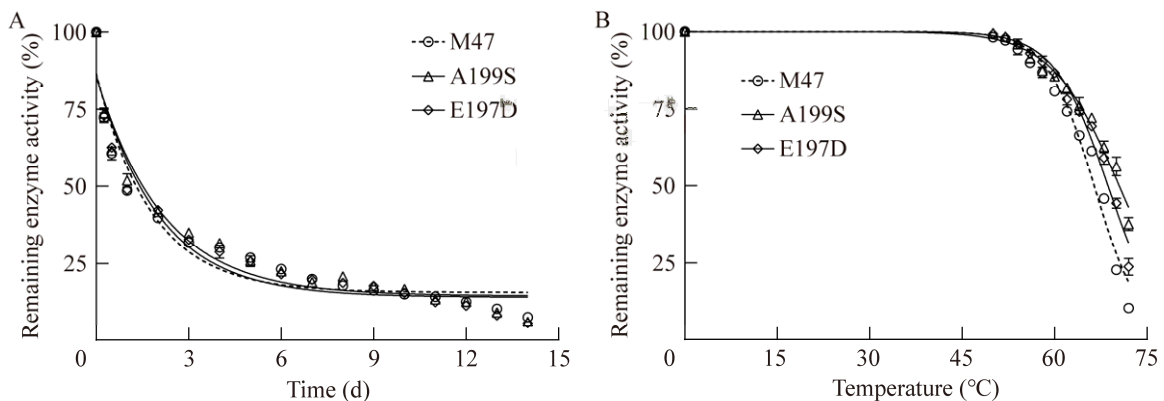


图 6 E197D、A199S 和 M47 在 37 °C 下不同时间(A)以及不同温度下(B)催化活力变化

Figure 6 The *in vitro* kinetic stability at 37 °C in different time (A), and *in vitro* thermodynamics stability at different temperature (B) of E197D, A199S and M47 versus remaining enzymatic activity.

进行 100 ns 动力学模拟,分析蛋白质骨架的均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)、均方根波动(root mean square function, RMSF)和旋转半径(radius of gyration, Rg)等评价结构稳定性。

结果显示, M47-AG, E197D/A199S-AG 的 Rg 值保持稳定,数值在 2.3 nm 左右波动(图 7A)。与 Rg 趋势一致, RMSD 值在模拟的前期发生略微波动,但随着模拟时间延长趋于稳定,最终 M47-AG 的 RMSD 值为 0.26 nm, E197D/A199S-AG 为 0.21 nm (图 7B),表明突变位点 E197D/A199S 的引入,使酶与底物结合稳定性更高。RMSF 反映出氨基酸位点的灵活性,如图 7 所示,蛋白的所有氨基酸残基的 RMSF 值均 $<1$  nm,大部分残基的表现稳定。其中 E197D/A199S-AG 的整体 RMSF 值相较于 M47 更小,尤其是残基 68–76、372–381 区域的波动明显降低(图 7C)。100 ns 动力学模拟显示 M47-AG 形成的氢键数量为 $(4\pm 2)$ 个, E197D/A199S-AG 形成的氢键为 $(5\pm 2)$ 个,80 ns 后开始出现 E197D/A199S-AG 氢键数量低于 M47-AG 的波动情况(图 7D)。

此外,本研究分析了 M47-AG, E197D/A199S-AG 的结合自由能。其中 GGAS 代表气相自由能,由 VDWAALS (van der Waals energy) 和 EEL (electrostatic energy) 综合计算而得。VDWAALS $<0$ , EEL $>0$ ,表示范德华作用利于结合,静电能不利于结合;GSOLV 中的 ESURF (non-polar solvation energy) 为负值,但数值较小,EGP (polar solvation energy) 为正数,表明极性溶剂不利于结合。M47-AG 的最终结合自由能为 $(-54.77\pm 8.05)$  kcal/mol, E197D/A199S-AG 的最终结合自由能为 $(-66.04\pm 9.54)$  kcal/mol (图 7E),表明相较于 M47,突变体 E197D/A199S 与 AG 的亲合性更强。残基分解图体现 M47-AG 与 E197D/A199S-AG 结构中其他氨基酸残基对结合的贡献差异(图 7F),负值越大,代表贡献越大,

若其值为正数,则代表该残基位点不利于结合,可为下一步的活性提升研究提供参考。

### 3 讨论与结论

随着蛋白质组学、药物基因组学等多学科领域飞速发展,众多疾病致病机理的不断阐明,生物大分子药物以迅猛的发展态势成为全球医药市场重要的增长驱动力。治疗酶是重要的研究热点之一<sup>[25]</sup>。酶是具有高度底物专一性和高效催化活性的蛋白质,随着对酶催化作用机理的深入研究,理性设计(rational design)被用于发现更加高效的活性候选酶分子,并已涌现出许多策略和具有实用性的生物信息学工具,酶类新药研发的进程有望加快<sup>[26-27]</sup>。

BChE 高活性突变体的重组表达大多采用哺乳动物细胞<sup>[28]</sup>、昆虫<sup>[29]</sup>、植物<sup>[30-31]</sup>、转基因动物<sup>[32]</sup>等,普遍存在成本高、获取周期长等缺点。有研究表明自哺乳动物细胞制备的重组人源蛋白药物每 kg 售价至少为使用 *E. coli* 系统制备的 15 倍<sup>[33]</sup>,导致许多活性候选酶分子面临治疗费用高昂、无法实现临床上广泛使用的困境。因此,本研究选择 HotSpot Wizard 平台计算分析的对象是首个在原核系统中可溶性表达的人 BChE 突变体 M47,初步挑选出具有潜力的 10 个新突变体,再以对 AG 催化活性的测定筛选出最高活性突变体 E197D 和 A199S。

良好的热稳定性是活性候选酶分子不可或缺的成药性之一,本研究选择热力学稳定性(thermodynamics stability)和动力学稳定性(kinetic stability)<sup>[34]</sup>描述实际的热稳定性,前者描述其解折叠状态趋势,以稳定自由能( $\Delta G_{stab}$ )或解折叠 50% 的温度( $T_m$ )表示;后者描述其经历不可逆性维持某部分活性的时间,以某温度下半衰期( $t_{1/2}$ )表示<sup>[35]</sup>。尤其活性候选酶分子在生理温度 37 °C 下具有适当的  $t_{1/2}$  对于其能否在制备、贮存

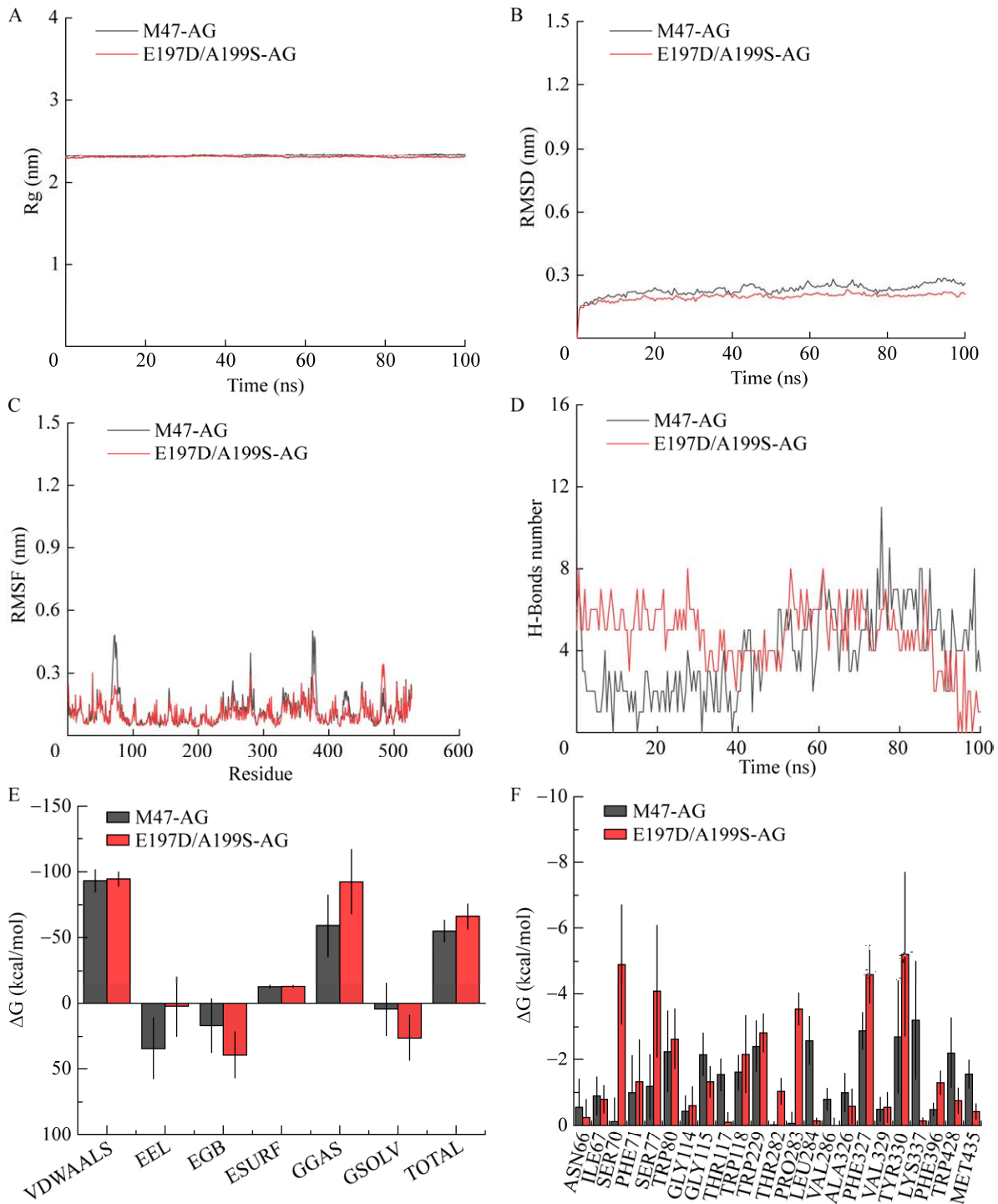


图7 M47-AG 和 E197D/A199S-AG 分子动力学模拟 Rg 结果图(A)、RMSD 结果图(B)、RMSF 结果图(C)、氢键数量计算图(D)、结合自由能计算图(E)、其余残基对结合的贡献分解图(F)

Figure 7 MD simulation analysis of M47-AG and E197D/A199S-AG, Rg (A), RMSD (B), RMSF (C), H-bonds number calculation (D), binding free energy calculation (E) and energy contribution of other residues (F).

及体内发挥作用等方面保持稳定具有重要意义。结果显示 E197D 与 A199S 在 37 °C 下  $t_{1/2}$  与 M47 相当, 但  $T_m$  分别提升 4 °C 与 2 °C, 具有一定的应用潜力。

测定 BChE 突变体的 ATC 催化活性可评价其进入机体后是否可能造成体内 ACh 代谢紊乱。ACh 作为神经递质在神经系统中的作用广为人知, 相关研究还表明淋巴细胞等非神经性组织和细胞中也发现了 ACh, 证实其在免疫系统也发挥重要作用<sup>[36-38]</sup>, 若治疗药物对 ACh 的代谢活性过高可能造成机体免疫系统损伤。结果显示 E197D 与 A199S 对于 ATC 的催化活性与 hBChE 十分相近, 更远低于人 AChE (hAChE) 的 ACh 催化活性 $[k_{cat}/K_m=4.4\times 10^9 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{min})]$ 。人体血液中 hBChE 与 hAChE 浓度相当, 但 hBChE 的 ACh 水解活性低于 hAChE, 使其仅在 hAChE 失活状态下才可能代谢 ACh<sup>[39]</sup>。因此, 使用一定量的 E197D 或 A199S 也不会引起机体 ACh 的代谢紊乱, 具有一定安全性。人体免疫原性也是活性候选酶分子重要的成药性评价指标之一。任何外源蛋白都具有潜在免疫原性, 该潜力大小与蛋白分子纯化方式、非人源化序列、制剂方式、给药剂量、给药方式与持续时间等因素相关, 是限制蛋白质药物在体内的生物利用度的主要因素之一, 甚至可能造成机体过敏、刺激自身免疫疾病等不良反应。免疫原性的产生可分为内源性和外源性两大方面。本研究的 hBChE 突变体点突变位点较多, 且为原核系统异源表达, 存在翻译后修饰程度差异较大的内源免疫原性可能, 后期拟采用生物信息学技术进行抗原表位预测, 开展去免疫原性研究。外源免疫原性尤其关注下游纯化工艺中可能存在的外源 DNA、内毒素、化学试剂等杂质残留, 可通过结合液相分离法、分子筛法、疏水层析法等去除, 再采用经验证的酶联免

疫试剂盒进行测定残留量是否符合相应要求<sup>[40]</sup>。

分子模拟分析结构-性质-反应-功能(structure-property-activity-function)的相互关系, 可使酶催化机理的研究更直观和动态<sup>[41]</sup>。E197D 和 A199S 对于 BTC 的催化活性与 M47 十分接近, 但 AG 分子量比 BTC 更大, 推测 AG 的 N 端 4 个氨基酸残基进入活性口袋发生反应。BChE 的活性中心由催化三联体 Ser198、His438 及 Glu325 构成, E197D 与 A199S 是距离活性中心较近的位点, 突变后可能影响酶与底物结合时的构象变化, 进而影响催化活性。本研究通过比较 M47 与引入双突变位点 E197D/A199S 后与 AG 对接形成复合物的分子动力学模拟轨迹各项指标, 发现 E197D/A199S 与底物 AG 的亲合力高于 M47, 形成复合物的结构稳定性也高于 M47, 下一步拟开展实验研究引入双突变位点 E197D/A199S 产生的酶学性质变化及实际应用性的相关研究。

本研究在首个原核可溶性表达人源 BChE 突变体 M47 基础上, 通过半理性设计和试验验证, 发现新突变体 E197D 和 A199S 具有成为候选新型减肥药或相关糖脂代谢性疾病治疗分子的潜力, 为实现体外给药调节体内 AG 与 DAG 比例进行相关疾病治疗提供了可能。同时, 本研究也对发现其他原核体系 BChE 酶活性改造具有一定指导意义。

## REFERENCES

- [1] AKALU Y, MOLLA MD, DESSIE G, AYELIGN B. Physiological effect of ghrelin on body systems[J]. *International Journal of Endocrinology*, 2020, 2020: 1385138.
- [2] CHEN VP, GAO Y, GENG LY, PARKS RJ, PANG YP, BRIMIJOIN S. Plasma butyrylcholinesterase regulates ghrelin to control aggression[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(7): 2251-2256.
- [3] MURTUZA MI, ISOKAWA M. Endogenous ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) acylates local ghrelin

- in the hippocampus[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2018, 144(1): 58-67.
- [4] AKAMIZU T, SHINOMIYA T, IRAKO T, FUKUNAGA M, NAKAI Y, NAKAI Y, KANGAWA K. Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005, 90(1): 6-9.
- [5] GAUNA C, DELHANTY PJD, HOFLAND LJ, JANSSEN JAMJL, BROGLIO F, ROSS RJM, GHIGO E, van der LELY AJ. Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2005, 90(2): 1055-1060.
- [6] GORTAN CAPPELLARI G, ZANETTI M, SEMOLIC A, VINCI P, RUOZI G, FALCIONE A, FILIGHEDDU N, GUARNIERI G, GRAZIANI A, GIACCA M, BARAZZONI R. Unacylated ghrelin reduces skeletal muscle reactive oxygen species generation and inflammation and prevents high-fat diet-induced hyperglycemia and whole-body insulin resistance in rodents[J]. *Diabetes*, 2016, 65(4): 874-886.
- [7] INHOFF T, MÖNNIKES H, NOETZEL S, STENGEL A, GOEBEL M, DINH QT, RIEDL A, BANNERT N, WISSER AS, WIEDENMANN B, KLAPP BF, TACHÉ Y, KOBELT P. Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats[J]. *Peptides*, 2008, 29(12): 2159-2168.
- [8] GRUNWALD J, MARCUS D, PAPIER Y, RAVEH L, PITTEL Z, ASHANI Y. Large-scale purification and long-term stability of human butyrylcholinesterase: a potential bioscavenger drug[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1997, 34(2): 123-135.
- [9] CHATONNET A, LOCKRIDGE O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase[J]. *Biochemical Journal*, 1989, 260(3): 625-634.
- [10] HA ZY, MATHEW S, YEONG KY. Butyrylcholinesterase: a multifaceted pharmacological target and tool[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2020, 21(1): 99-109.
- [11] SUN H, PANG YP, LOCKRIDGE O, BRIMIJOIN S. Re-engineering butyrylcholinesterase as a cocaine hydrolase[J]. *Molecular Pharmacology*, 2002, 62(2): 220-224.
- [12] CHEN VP, GAO Y, GENG LY, BRIMIJOIN S. Radiometric assay of ghrelin hydrolase activity and 3H-ghrelin distribution into mouse tissues[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2015, 98(4): 732-739.
- [13] BRAZZOLOTTO X, IGERT A, GUILLON V, SANTONI G, NACHON F. Bacterial expression of human butyrylcholinesterase as a tool for nerve agent bioscavengers development[J]. *Molecules*, 2017, 22(11): 1828.
- [14] ELLMAN GL, COURTNEY KD, ANDRES V Jr, FEATHER-STONE RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1961, 7: 88-95.
- [15] SAXENA A, BELINSKAYA T, SCHOPFER LM, LOCKRIDGE O. Characterization of butyrylcholinesterase from porcine milk[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2018, 652: 38-49.
- [16] GAO Y, LaFleur D, Shahb R, ZHAO QH, SINGH M, BRIMIJOIN S. An albumin-butyrylcholinesterase for cocaine toxicity and addiction: catalytic and pharmacokinetic properties[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2008, 175(1/2/3): 83-87.
- [17] DAFFERNER AJ, LUSHCHEKINA S, MASSON P, XIAO GP, SCHOPFER LM, LOCKRIDGE O. Characterization of butyrylcholinesterase in bovine serum[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2017, 266: 17-27.
- [18] KUTZNER C, PÁLL S, FECHNER M, ESZTERMANN A, de GROOT BL, GRUBMÜLLER H. More bang for your buck: improved use of GPU nodes for GROMACS 2018[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2019, 40(27): 2418-2431.
- [19] BREZOVSKY J, KOZLIKOVA B, DAMBORSKY J. *Protein Engineering: Methods and Protocols*[M]. Berlin: Springer Nature, 2018: 25-42.
- [20] SUMBALOVA L, STOURAC J, MARTINEK T, BEDNAR D, DAMBORSKY J. HotSpot Wizard 3.0: web server for automated design of mutations and smart libraries based on sequence input information[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W356-W362.
- [21] BOECK AT, SCHOPFER LM, LOCKRIDGE O. DNA sequence of butyrylcholinesterase from the rat: expression of the protein and characterization of the properties of rat butyrylcholinesterase[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2002, 63(12): 2101-2110.
- [22] LOCKRIDGE O, BLONG RM, MASSON P, FROMENT MT, MILLARD CB, BROOMFIELD CA. A single amino acid substitution, Gly117His, confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase[J]. *Biochemistry*, 1997, 36(4): 786-795.
- [23] GUERRA R, BIANCONI ML. Increased stability and catalytic efficiency of yeast hexokinase upon interaction with zwitterionic micelles. kinetics and conformational studies[J]. *Bioscience Reports*, 2000, 20(1): 41-49.

- [24] ALEXANDROV AI, MILENI M, CHIEN EYT, HANSON MA, STEVENS RC. Microscale fluorescent thermal stability assay for membrane proteins[J]. *Structure*, 2008, 16(3): 351-359.
- [25] 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.
- [26] SONG ZD, ZHANG QF, WU WH, PU ZJ, YU HR. Rational design of enzyme activity and enantioselectivity[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1129149.
- [27] KOUBA P, KOHOUT P, HADDADI F, BUSHUIEV A, SAMUSEVICH R, SEDLAR J, DAMBORSKY J, PLUSKAL T, SIVIC J, MAZURENKO S. Machine learning-guided protein engineering[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(21): 13863-13895.
- [28] ILYUSHIN DG, HAERTLEY OM, BOBIK TV, SHAMBORANT OG, SURINA EA, KNORRE VD, MASSON P, SMIRNOV IV, GABIBOV AG, PONOMARENKO NA. Recombinant human butyrylcholinesterase as a new-age bioscavenger drug: development of the expression system[J]. *Acta Naturae*, 2013, 5(1): 73-84.
- [29] BRAZZOLOTTO X, WANDHAMMER M, RONCO C, TROVASLET M, JEAN L, LOCKRIDGE O, RENARD PY, NACHON F. Human butyrylcholinesterase produced in insect cells: huPrine-based affinity purification and crystal structure[J]. *The FEBS Journal*, 2012, 279(16): 2905-2916.
- [30] GEYER BC, KANNAN L, CHERNI I, WOODS RR, SOREQ H, MOR TS. Transgenic plants as a source for the bioscavenging enzyme, human butyrylcholinesterase[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2010, 8(8): 873-886.
- [31] PAIVA dos SANTOS B, GARBAY B, PASQUA M, CHEVRON E, CHINOY ZS, CULLIN C, BATHANY K, LECOMMANDOUX S, AMÉDÉE J, OLIVEIRA H, GARANGER E. Production, purification and characterization of an elastin-like polypeptide containing the Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV) peptide for tissue engineering applications[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 298: 35-44.
- [32] LU D, LIU S, WU Y, WU FF, TAN T, LI QY. Expression of recombinant human butyrylcholinesterase in the milk of transgenic mice[J]. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 2014, 1(3): 179-184.
- [33] PUETZ J, WURM FM. Recombinant proteins for industrial versus pharmaceutical purposes: a review of process and pricing[J]. *Processes*, 2019, 7(8): 476.
- [34] YU HR, YAN YH, ZHANG C, DALBY PA. Two strategies to engineer flexible loops for improved enzyme thermostability[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 41212.
- [35] POLIZZI KM, BOMMARIUS AS, BROERING JM, CHAPARRO-RIGGERS JF. Stability of biocatalysts[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2007, 11(2): 220-225.
- [36] KAWASHIMA K, FUJII T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2000, 86(1): 29-48.
- [37] KAWASHIMA K, FUJII T, MORIWAKI Y, MISAWA H. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function[J]. *Life Sciences*, 2012, 91(21/22): 1027-1032.
- [38] GRANDO SA, KAWASHIMA K, WESSLER I. A historic perspective on the current progress in elucidation of the biologic significance of non-neuronal acetylcholine[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 81: 106289.
- [39] LI B, STRIBLEY JA, TICU A, XIE W, SCHOPFER LM, HAMMOND P, BRIMIJOIN S, HINRICHS SH, LOCKRIDGE O. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2000, 75(3): 1320-1331.
- [40] 黄瑛, 姜华, 李路路, 李伟, 王欣, 霍艳. 生物技术药物免疫原性评价的技术发展概述[J]. *药物评价研究*, 2017, 40(7): 999-1004.
- [40] HUANG Y, JIANG H, LI LL, LI W, WANG X, HUO Y. Technology development of immunogenicity assessment for biopharmaceuticals[J]. *Drug Evaluation Research*, 2017, 40(7): 999-1004 (in Chinese).
- [41] 肖杰文, 韩瑾, 乔郅钠, 张国栋, 黄武军, 钱凯, 徐美娟, 张显, 杨套伟, 饶志明. 植物乳杆菌谷氨酸脱羧酶催化pH范围的理性改造及高效转化生产γ-氨基丁酸[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(6): 2108-2125.
- [41] XIAO JW, HAN J, QIAO ZN, ZHANG GD, HUANG WJ, QIAN K, XU MJ, ZHANG X, YANG TW, RAO ZM. Efficient biosynthesis of γ-aminobutyric acid by rationally engineering the catalytic pH range of a glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(6): 2108-2125 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)