

研究报告

基于 Biomek i7 自动化工作站筛选高效固碳脱羧酶突变体的方法

蒋昕珊¹, 范雁², 刘霖¹, 薛松^{*1}

1 大连理工大学生物工程学院, 辽宁 大连 116023

2 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东 广州 510225

蒋昕珊, 范雁, 刘霖, 薛松. 基于 Biomek i7 自动化工作站筛选高效固碳脱羧酶突变体的方法[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 792-800.

JIANG Xinshan, FAN Yan, LIU Lin, XUE Song. A high-throughput screening method for decarboxylase mutants with efficient carbon fixing based on Biomek i7 automated workstation[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 792-800.

摘要:【背景】2,3-二羟基苯甲酸脱羧酶(2,3-dihydroxybenzoic acid decarboxylase, 2,3-DHBD)能够催化 CO₂ 与酚类化合物羧化生成芳香羧酸, 为固定 CO₂ 合成增值化学品提供一种新的策略。由于目前转化效率低, 限制了其应用。【目的】提高酶的催化效率, 建立基于 Biomek i7 自动化工作站的高通量筛选方法以期实现高效筛选高羧化活性的苯甲酸脱羧酶的突变体, 并建立一个从突变体构建到其酶活筛选的标准方法。【方法】基于 Biomek i7 自动化工作站对来源于米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的 2,3-DHBD (2,3-DHBD_Ao)进行突变体定点半饱和突变、克隆挑选、培养及酶活检测, 实现 508 个克隆的两轮筛选, 并利用 HPLC 评估高通量筛选方法的准确性。【结果】确定了高通量筛选粗酶催化的脱羧及羧化反应体系和 Biomek i7 自动化工作站筛选流程, 对 508 个克隆进行两轮筛选, 得到 13 个正向突变, HPLC 检测最终确定 3 个正向突变体, 构建的文库阳性突变率为 0.6%, 获得羧化活性最高的突变体是野生型 2,3-DHBD_Ao 的 120%。【结论】利用 Biomek i7 自动化工作站建立了高通量筛选高羧化活性脱羧酶的方法, 首次将自动化高通量设备与突变体筛选结合, 提供了筛选时评价指标的确定思路, 经过 175 h 即可完成 508 个克隆的两轮筛选工作, 相较于人工筛选, 该方法缩短了筛选周期, 具有快速、准确和高效的特点。

关键词: 高通量筛选; 2,3-二羟基苯甲酸脱羧酶; 酶的进化; 羧化

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2103702)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103702).

*Corresponding author. E-mail: xuesong@dlut.edu.cn

Received: 2023-08-21; Accepted: 2023-11-03; Published online: 2023-12-07

A high-throughput screening method for decarboxylase mutants with efficient carbon fixing based on Biomek i7 automated workstation

JIANG Xinshan¹, FAN Yan², LIU Lin¹, XUE Song^{*1}

¹ School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116023, Liaoning, China

² College of Light Industry and Food, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, Guangdong, China

Abstract: [Background] 2,3-dihydroxybenzoic acid decarboxylase (2,3-DHBD) can catalyze the carboxylation of CO₂ with phenolic compounds to generate aromatic carboxylic acids, providing a new strategy for the synthesis of value-added chemicals from fixed CO₂. However, its application is limited by the low conversion efficiency. [Objective] To improve the catalytic efficiency of 2,3-DHBD, we established a high-throughput screening method based on the Biomek i7 automated workstation to achieve efficient screening of benzoic acid decarboxylases with high carboxylation activity, providing a method for enzyme engineering. [Methods] First, 508 clones were obtained by targeted hemi-saturation mutagenesis of the 2,3-DHBD from *Aspergillus oryzae* (2,3-DHBD_Ao). Then, mutant library construction, clone selection, culture, and enzyme activity assay were performed based on Biomek i7 automated workstation to achieve two rounds of screening for the mutants. The accuracy of the high-throughput screening method was evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC). [Results] The decarboxylation and carboxylation reaction system catalyzed by the crude enzyme and the Biomek i7 automated workstation screening process were determined. The two rounds of high-throughput screening from 508 clones yielded 13 positive mutants, and the HPLC confirmed 3 positive mutants. The positive mutation rate of the constructed library was 0.6%, and the mutant with the highest carboxylation activity showed the activity 120% of the wild type. [Conclusion] A high-throughput screening method for the decarboxylases with high carboxylation activity was successfully established based on the Biomek i7 automated workstation. For the first time, the automated high-throughput equipment was combined with mutant screening, which provided the idea of determining the evaluation indexes during the screening. It took 175 h to conduct two rounds of screening for 508 clones, which shortened the screening cycle compared with manual screening.

Keywords: high-throughput screening; 2,3-dihydroxybenzoic acid decarboxylase; enzyme evolution; carboxylation

2,3-二羟基苯甲酸脱羧酶(2,3-dihydroxybenzoic acid decarboxylase, 2,3-DHBD)属于苯甲酸脱羧酶家族,其催化的脱羧反应被广泛应用于有机合成以制备新型化合物,如光学纯药物分子和高附

加值化学品^[1-2],通过改变反应条件这类酶还能够 在弱碱性条件下催化羧化反应,提供一种新的生物催化方法,用于固定 CO₂ 生产增值化合物^[3-4]。来源于米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的 2,3-二羟基

苯甲酸脱羧酶(2,3-DHBD_Ao)在 0.2 MPa CO₂ 和 2.7 mol/L 碳酸氢钾的反应条件下催化邻苯二酚生成 2,3-二羟基苯甲酸(2,3-dihydroxybenzoic acid, 2,3-DHBA), 15 min 产率可达 30%^[5]。通过酶的改造获得羧化效率高的苯甲酸脱羧酶是目前的研究难点。进一步提高羧化效率改造出脱羧活性低、羧化活性高的突变体并确定影响脱羧和羧化反应的关键氨基酸残基是必要的。酶的进化作为改造酶的有效手段, 主要包括文库的构建和筛选, 其中基于结构导向的半理性设计构建文库兼顾筛选工作量和序列空间的多样性, 成为一种重要的文库构建方法^[6]。对于具有通道的酶, 人们会首先关注通道内氨基酸残基对酶活的影响^[7]。2,3-DHBD_Ao 催化脱羧和羧化反应的通道是一个 V 型通道^[8], 基于 2,3-DHBD_Ao 的通道特点, 对其周围氨基酸残基进行突变改造有望获得脱羧活性低、羧化活性高的突变体。

高通量自动化筛选技术^[9-11]是以微孔板为载体的微量试验体系^[12], 自动化的试验过程和灵敏快速的检测方法改变了常规筛选模式。2,3-DHBA 在 308 nm 处具有特征吸收, 可以在酶标仪上使用 96 微孔板对脱羧反应底物/羧化反应产物进行定量^[13], 利用 Biomek i7 自动化工作站^[14]可实现 2,3-DHBD_Ao 从突变体文库构建到酶活检测的全自动化操作, 主要包括 5 个部分, 分别是加样、PCR、高通量热激转化、高通量微生物培养及酶活检测。在整个过程中, 实现高通量筛选的关键是如何利用吸光度值确定筛选突变体的评价标准。

本研究在 Biomek i7 自动化工作站上实现了文库构建、传统培养及光谱检测的自动化流程, 选择 2,3-DHBD_Ao 催化邻苯二酚的羧化反应体系, 对结构导向的 11 个突变位点进行半饱和突变体的高通量筛选, 确定筛选高羧化活性

2,3-DHBD_Ao 的吸光度值评价指标, 为获得高效固定 CO₂ 的苯甲酸脱羧酶提供高效方法。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)感受态细胞, 北京全式金生物技术有限公司; 米曲霉来源的野生型 2,3-DHBD [2,3-DHBD_Ao (WT)]表达质粒及突变体 PCR 引物, 苏州金唯智生物科技有限公司。

1.1.2 培养基

LB 液体培养基和 LB 固体培养基均按照参考文献^[15]配制。

1.1.3 主要试剂和仪器

邻苯二酚、2,3-DHBA 和乙腈, 默克公司; 三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA), 上海阿拉丁生化科技有限公司; 乙醇、碳酸氢钾(KHCO₃)、磷酸、氯化镁(MgCl₂)和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO), 天津科密欧公司; 溶菌酶、核酸电泳试剂、卡那霉素和 IPTG, 生工生物工程(上海)股份有限公司; DNA Marker、QuickCut Buffer (10×)和 *Dpn* I, 大连宝生物工程有限公司; PrimerStar Max, TaKaRa 公司。

电子天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; 紫外分光光度计, 日立高新技术(上海)国际贸易有限公司; 高效液相色谱仪, 安捷伦科技(中国)有限公司; Biomek i7 自动化工作站, 贝克曼库尔特有限公司; 蛋白纯化系统, Cytiva 公司。

1.2 方法

1.2.1 粗酶液催化脱羧反应体系的确定

将野生型 2,3-DHBD_Ao 单克隆接种至含有 1 mL LB 培养基的 24 深孔板中, 37 °C、190 r/min 培养过夜, 将种子液转接到含有 5 mL LB 培养基的 24 深孔板中, 保持接种量一致, 继续培养

至 OD_{600} 达到 0.5–0.6, 加入 0.4 mmol/L IPTG 在 37 °C、190 r/min 下诱导 5.5 h, 诱导后的菌液在 4 °C、4 000 r/min 离心 6 min 收集菌体。加入 1 mL 裂解液(100 mmol/L Tris pH 8.0、100 mmol/L $MgCl_2$ 、1 mg/mL 溶菌酶) 37 °C、190 r/min 裂解 0.5 h 破碎细胞, 5 000 r/min 离心 3 min 收集上清液用于催化反应, 分别吸取 2、4、8、16、20 和 40 μ L 上清液于 96 微孔板中, 对应加入 20 μ L 2 mmol/L 2,3-DHBA, 然后用 66.7 mmol/L PBS 缓冲液(pH 5.0)补齐 200 μ L 体系, 在 30 °C 反应 8 min 后通过检测 308 nm 处的吸光度值 (A_{308}) 实现对 2,3-DHBA 的定量, 以底物 2,3-DHBA 的消耗量作为脱羧活性的评价标准。以未诱导表达的菌液进行脱羧反应后读取的 A_{308} 作为对照。

1.2.2 粗酶液催化羧化反应体系的确定

按照 1.2.1 所述方法得到细胞破碎后的上清液, 吸取 900 μ L 至 24 深孔板, 每个孔加入 0.3 g $KHCO_3$ 和 100 μ L 100 mmol/L 邻苯二酚, 反应总体积为 1 mL。将 24 深孔板置于 30 °C 培养箱中, 190 r/min 反应 2 h, 5 000 r/min 离心 3 min, 取上清 20 μ L 至含有 300 μ L 终止剂(水:乙醇:磷酸的体积比为 4:2:1)的 96 深孔板中终止反应, 吸取 200 μ L 终止后的反应液于 96 微孔板, 通过检测 A_{308} 实现对 2,3-DHBA 的定量, 以产物 2,3-DHBA 的生成量作为羧化活性的评价标准。以未诱导表达的菌液进行羧化反应后读取的 A_{308} 作为对照。同时将粗酶液催化羧化反应终止后的溶液置于 HPLC 上测定, 对羧化产物进行准确定量。

1.2.3 突变体文库高通量筛选流程

利用 Biomek i7 实现高通量筛选, 具体模块如下。

1) 高通量 PCR 扩增: 以 pET-28a-2,3-DHBD_Ao 质粒为模板, 用表 1 所示引物进行

全质粒 PCR 扩增。PCR 反应体系按照参考文献[16]设置。按反应体系要求将 ddH₂O、模板、PrimerStar Max 混合并分装在 1.5 mL EP 管中, 置于 BCTubeRack 中放在台面上, 取名 PCR Mix, 使用 96 通道加样器先后吸取 2 μ L (10 μ mol/L) 上、下游引物于 Bio_RadPCR96 中, 然后使用 Span8 灵活 8 通道加样器吸取 46 μ L PCR Mix 于 Bio_RadPCR96, 由 360°旋转抓板机械手移到 PCR 仪中并盖上 96 孔板盖, PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 50 °C 15 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。

2) 高通量热激转化: 首先对扩增的突变体进行消化, 将 QuickCut Buffer (10 \times)和 *Dpn* I 按体积比 2:1 混合并分装在 1.5 mL EP 管中, 置于 BCTubeRack 中放在台面上, 取名 digestion Mix, 使用 96 通道加样器吸取 8.5 μ L PCR 产物于 Bio-RadPCR96 中, 使用 Span8 灵活 8 通道加样器吸取 1.5 μ L digestion Mix 于 Bio-RadPCR96, 由 360°旋转抓板机械手移到 PCR 仪中并盖上 96 孔板盖, 调用参数: 37 °C 30 min; 4 °C 保存; 反应结束后使用 Span8 灵活 8 通道加样器吸取感受态细胞到消化后的 PCR 产物中, 由 360°旋转抓板机械手移到 PCR 仪中并盖上 96 微孔板盖, 调用参数: 4 °C 30 min; 42 °C 90 s 进行孵育热激, 分别取 100 μ L 加到 6 孔板的 LB 固体培养基中, 高速振荡至均匀铺开, 37 °C 培养 16 h。

3) Qpix460 全自动高通量克隆挑菌进行培养: 使用 96 通道加样器将 LB 培养基以每孔 1 mL 分装于 96 深孔板中, 利用 Biomek i7 自带的 Qpix460 全自动高通量克隆挑选系统对平板上生长的突变株进行挑选, 15 min 内可完成多达 1 000 个突变株的挑选工作, 并将单菌落接种于相应孔中, 每个 96 深孔板中分别设有野生型对照和空白对照各 3 个, 按 1.2.1 所述方法进行培养。

表 1 定点半饱和突变所用引物

Table 1 Primers used for site-directed semi-saturated mutagenesis

Gene	Primer name	Primer sequence (5'→3')
K19	K19-F	CGCTTTGAAGAGNDTACCCGTTGGTGG
	K19-R	CCACCAACGGGTAHNCTCTTCAAAGCG
T20	T20-F	CTTTGAAGAGAAAANDTCGTTGGTGGGCAT
	T20-R	ATGCCACCAACGAHNNTTCTCTTCAAAG
F27	F27-F	GTGGGCATCTTTANDTAGCACCGATGCCG
	F27-R	CGGCATCGGTGCTAHNTAAAGATGCCAC
P64	P64-F	AGCTATACCGCANDTGGCGTTCAAGAT
	P64-R	ATCTTGAACGCCAHNTGCGGTATAGCT
R169	R169-F	TTACATGCACCCGNDTAACCCGAC
	R169-R	GTCGGGTTAHNCGGGTGCATGTAA
N170	N170-F	TTTACATGCACCCGCGTNDTCCGACCGGTACCATCTA
	N170-R	TAGATGGTACCGGTTCGGAHNACGCGGGTGCATGTAAA
P189	P189-F	CGCAAATGGCTGGTGGGTNDTCCGCTGAGCTTCGCAC
	P189-R	GTGCGAAGCTCAGCGGAHNACCCACCAGCCATTGCG
F193	F193-F	TCCGCCGCTGAGCNDTGCACATGGCGTGT
	F193-R	ACACGCCATGTGCAHNGCTCAGCGGCGGA
R233	R233-F	TGACATGTGGNDTATCAATCACT
	R233-R	AGTGATTGATAHNCCACATGTCA
H236	H236-F	TGGCGCATCAATNDTTGGTTCGAAGAC
	H236-R	GTCTTCGAACCAAHNATTGATGCGCCA
R241	R241-F	TGTGGGCCGATNDTAAATGGCTGGT
	R241-R	ACCAGCCATTTAHNATCGGCCACA

4) 96 孔板中进行粗酶催化脱羧反应: 按 1.2.1 所述方法确定的反应体系, 借助自动化工作站使反应在 96 孔板中进行, 利用酶标仪进行突变体粗酶活的测定。

1.2.4 2,3-DHBD_Ao 的重组表达纯化

野生型或突变体 2,3-DHBD_Ao 经诱导表达后, 4 °C、4 500 r/min 离心 10 min 收集菌体, 300 W 超声破碎 15 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 即得到粗酶液, 之后通过镍离子亲和层析和凝胶过滤色谱层析收集目的蛋白, 浓缩后使用 Bradford 法测定浓度, 于-80 °C 保存。

1.2.5 HPLC 法测定纯酶酶活

纯酶催化羧化反应方法^[13]: 缓冲溶液为 2.7 mol/L KHCO₃ (pH 8.6) 溶液, 底物邻苯二酚

浓度为 10 mmol/L, 加入 200 μg 的 2,3-DHBD_Ao, 30 °C 下通入 0.2 MPa CO₂ 反应 15 min, 加入终止剂(水:乙醇:磷酸, 体积比为 4:2:1)终止反应。纯酶催化脱羧反应方法^[13]: 缓冲溶液为 66.7 mmol/L PBS (pH 5.0) 溶液, 底物 2,3-DHBA 为 0.2 mmol/L, 加入 1 μg 的 2,3-DHBD_Ao, 30 °C 反应 8 min, 加入终止剂(磷酸)终止反应。脱羧/羧化反应活性通过 HPLC 定量 2,3-DHBA, 计算其转化率/产率确定。

1.2.6 2,3-DHBD_Ao 羧化反应酶动力学常数测定

在标准反应体系下(方法 1.2.5)分别加入 2、4、6、8、10、20、40、60、80 和 100 mmol/L 邻苯二酚, 分别加入 200 μg 的 2,3-DHBD_Ao

(WT)和 2,3-DHBD_Ao (R233S), 30 °C下反应一段时间后检测不同浓度底物下的酶促反应速度, 测定羧化反应的动力学参数。使用 Origin 7 软件进行动力学方程拟合, 计算 2,3-DHBD_Ao 和突变体催化邻苯二酚的 K_m 和 k_{cat} 值。

2 结果与讨论

2.1 突变体文库高通量筛选方法时效性

高通量筛选设备不仅能满足突变体文库构建、培养、菌液处理及光谱检测的自动化操作, 还能通过优化工作站布局进一步提高筛选效率。工作站配置 1 个 96 通道加样器和 2 个 8 通道加样器, 以及 2 个 360°旋转抓板机械手和 45 个板位, 从 PCR 到酶活检测的整个过程中, 共有组分使用 96 通道加样器加样, 差异组分使用 8 通道加样器加样, 因此通过对板位布局的调整可以使加样器和机械手得到最大化的利用。图 1 展示了利用高通量筛选设备 Biomek i7 进行突变体文库高通量筛选的流程。首先进行理性设计及引物

合成; 第 2 步 PCR 可同时进行 96 个反应体系, 除了实现精准加样, 效率也提高 100 倍以上; 第 3 步 15 min 即可实现将 1 000 个单克隆挑取于培养基中, 克隆培养过程实现全自动化, 包括吸光度的测定、IPTG 的加入、孔板离心以及菌体破碎等; 第 4 步进行的脱羧反应 8 min 即可完成一次检测, 第 1 轮粗酶催化突变体的脱羧反应筛选共耗时 100 h; 进行的羧化反应 2 h 完成一次检测, 一次可检测 96 个样品, 第 2 轮粗酶催化突变体的羧化反应筛选共耗时 75 h。因此利用 Biomek i7 外加一个振荡培养箱, 下文提到的 508 个克隆的获取及培育和两轮筛选耗时 175 h 即可完成。

2.2 脱羧反应粗酶液量及突变体筛选中 2,3-DHBA 吸光度阈值的确定

根据实验室前期对该酶机制的研究^[8], 2,3-DHBD_Ao 中不同氨基酸残基在催化脱羧和羧化反应时影响酶活的变化趋势不同, 表明可以通过改造 2,3-DHBD_Ao 得到羧化活性提

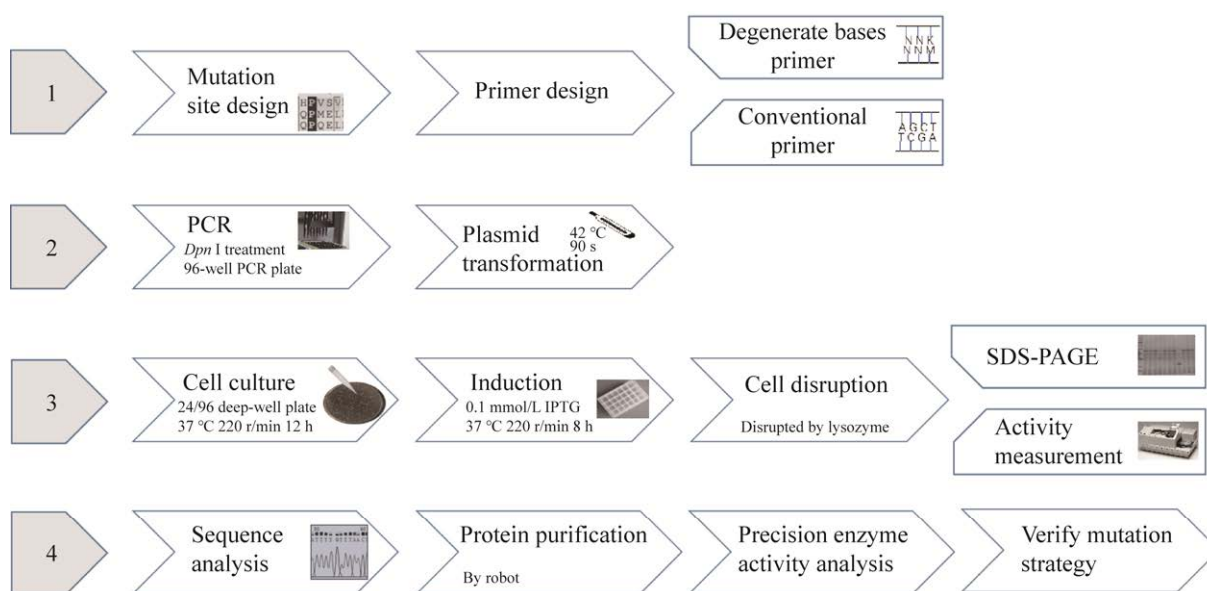


图 1 利用 Biomek i7 进行突变体文库高通量筛选流程

Figure 1 High throughput screening process for mutant libraries using Biomek i7.

高、脱羧活性降低的突变体^[8]。因此确定突变体的筛选条件为脱羧活性低且羧化活性高。2,3-DHBD_Ao 催化的脱羧反应活性是羧化反应活性的 100 倍以上,因此先测定脱羧反应的酶活进行第 1 轮筛选。脱羧反应底物 2,3-DHBA 在 308 nm 处有特征吸收,以此检测突变体粗酶的脱羧活性。首先要确定反应所需的上清液体积和筛选突变体时 A_{308} 的范围,如图 2 空白对照和阴性对照所示,反应体系中未加入脱羧反应底物 2,3-DHBA 时, A_{308} 是 0.27 ± 0.01 ; 加入 0.2 mmol/L 2,3-DHBA 时, A_{308} 是 0.65 ± 0.05 ,因此 A_{308} 在 0.6–0.7 确定为未反应。按 1.2.1 所述方法加入不同体积梯度的上清液催化反应,测定反应后 2,3-DHBA 的 A_{308} ,加入来自 40 μL 菌液的粗酶上清液催化反应后 2,3-DHBA 的 A_{308} 为 0.59,加入来自 100 μL 菌液的粗酶上清液催化反应后 2,3-DHBA 的 A_{308} 为 0.31,为实现酶活的定量,要求底物 2,3-DHBA 反应不完全,最终确定加入来自 80 μL 菌液的粗酶上清液,30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 8 min。如图 2 所示,此时野生型 2,3-DHBD_Ao 催化脱羧反应后 2,3-DHBA 对应的 A_{308} 是 0.46 ± 0.02 , A_{308} 在这个范围内的突变体酶活较野生型无变化,将 A_{308} 为 0.46 带入 2,3-DHBA 浓度-吸光度值标准曲线^[13],得到野生型催化脱羧反应后底物 2,3-DHBA 浓度为 0.14 mmol/L,通过底物消耗计算转化率为 30%。第 1 轮筛选目标为脱羧活性低于野生型的突变体,所以筛选时选择转化率低于 30%,也就是 A_{308} 大于 0.48 的突变体,由于利用光谱法进行快速筛选,因此筛选值为 A_{308} 。基于前期试验数据,脱羧失活的突变体同时也无羧化活性,因此第一轮筛选突变体的 A_{308} 范围设定在 0.48–0.60。

2.3 突变体文库第一轮脱羧活性筛选

基于 2,3-DHBD_Ao 的结构及 24 种同源蛋白序列比对结果,确定通道内 11 个关键位点,

利用定点半饱和突变构建突变体文库。对通道内选择的 11 个位点使用含有 NDT 简并密码子的引物进行半饱和突变,构建的文库量为 508。第 1 轮筛选结果如图 3 所示,按 2.2 确定的筛选标准选择区域 a 中 182 个突变体进行羧化活性

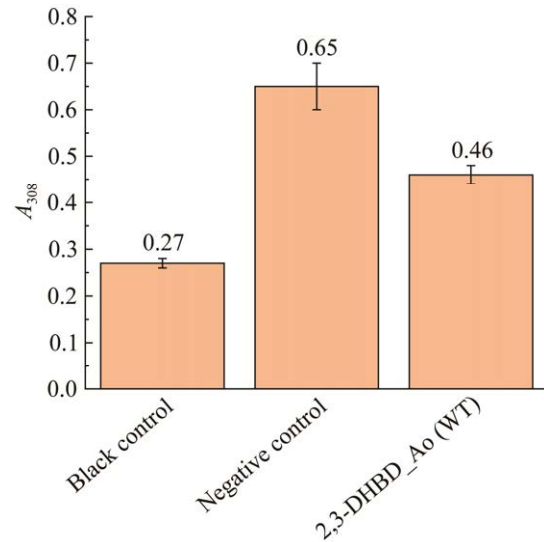


图 2 野生型催化脱羧反应在 308 nm 处的吸光度值检测

Figure 2 Measurement of absorbance values at 308 nm for WT-catalyzed decarboxylation.

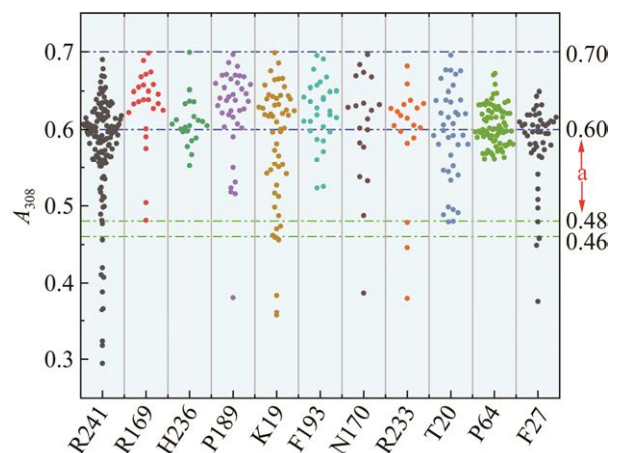


图 3 突变体催化脱羧反应在 308 nm 处的吸光度值分布图

Figure 3 Distribution of absorbance values at 308 nm for the mutant-catalyzed decarboxylation.

筛选,并同步进行测序。利用 Biomek i7 自动化工作站,508 个克隆的第 1 轮筛选仅需 100 h,相较于前期的人工筛选,相同时间效率提高 5 倍。重要的是,与自动化工作站结合后可以实现更高通量的不间断筛选,大大节省了精力和时间,这是人工筛选无法比拟的。

2.4 突变体文库第 2 轮羧化活性筛选及 HPLC 检测

按 1.2.2 所述方法对第 1 轮筛选得到的 182 个突变体进行羧化活性筛选。野生型 2,3-DHBD_Ao 粗酶催化羧化反应后 2,3-DHBA 的 A_{308} 为 0.85 ± 0.05 , 此时转化率为 $12\% \pm 2\%$, A_{308} 在这个范围内突变体酶活与野生型 2,3-DHBD_Ao 差异不大,但羧化反应加入了全部上清(5 mL 菌液),考虑到蛋白表达量对比较酶活有较大影响,为避免因突变体表达量低于野生型 2,3-DHBD_Ao 而发生漏筛,设定 A_{308} 高于 0.8 作为第 2 轮的筛选标准。如图 4 所示,构建的文库量为 508,对第 1 轮初筛得到的 182 个克隆测序,在 10 个位点得到 46 个突变体,结合第 2 轮筛选结果,共得到 13 个正向突变。按 1.2.5 所述方法对 13 个突变体经 HPLC 进行纯酶酶活验证,图 5 展示了 46 个突变体在 10 个位点的分布及按 1.2.4 所述方法纯化得到的纯酶经 HPLC 检测酶活后正向突变体个数,脱羧活性下降,羧化活性高于野生型 2,3-DHBD_Ao 10% 以上的突变体有 3 个,分别位于 R233 和 K19 两个位点。阳性突变率为 0.6%,最终筛选到羧化活性最高的突变体是野生型 2,3-DHBD_Ao 的 120%。对 2,3-DHBD_Ao (WT) 及正向突变体 2,3-DHBD_Ao (R233S) 按 1.2.6 所述方法进行酶促反应动力学试验,结果如表 2 所示,突变体 K_m 值较野生型从 10.8 mmol/L 下降到 8.3 mmol/L,与羧化底物邻苯二酚亲和力上升; k_{cat}/K_m 值较野生型从 9.7 L/(mmol·min) 上升到 12.8 L/(mmol·min),羧化活性上升。

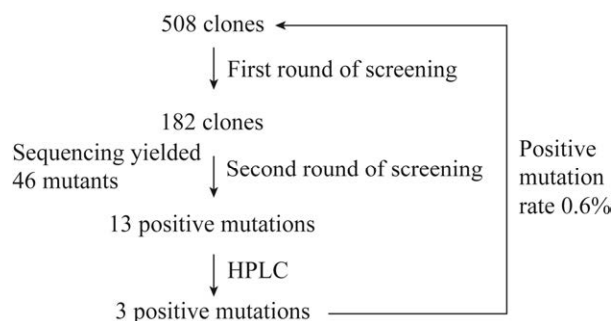


图 4 定点半饱和和突变体筛选流程

Figure 4 Targeted half-saturation and mutant screening process.

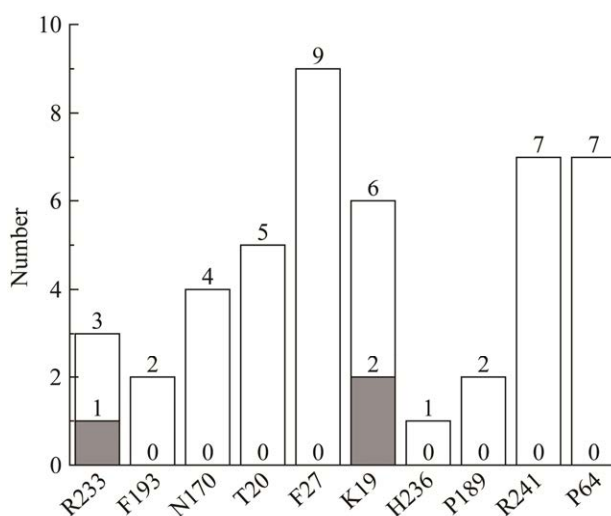


图 5 46 个突变体及正向突变体在每个位点的分布 白色: 每个位点获得突变体个数; 灰色: 每个位点获得正向突变体个数

Figure 5 Distribution of 46 mutants and positive mutants at each locus. White: Number of mutants obtained per locus; Grey: Number of positive mutants obtained per locus.

表 2 2,3-DHBD_Ao 及其正向突变体羧化的稳态动力学

Table 2 Steady-state kinetics for carboxylation by 2,3-DHBD_Ao and its mutants

Carboxylation	WT	R233S
K_m (mmol/L)	10.8 ± 1.0	8.3 ± 1.0
k_{cat} (min^{-1})	105.0 ± 5.0	106.0 ± 3.0
k_{cat}/K_m (L/(mmol·min))	9.7 ± 0.9	12.8 ± 1.5

3 结论

本研究以米曲霉来源的 2,3-二羟基苯甲酸脱羧酶作为筛选酶, 通过优化反应条件, 使用 Biomek i7 外加一个振荡培养箱, 提供了筛选时评价指标的确定思路与方法, 175 h 即可完成 508 个克隆的两轮筛选, 阳性突变率为 0.6%。因此利用 Biomek i7 建立的突变体文库高通量筛选的方法可高效、快速、大量地实现高羧化活性 2,3-DHBD_Ao 的筛选。同时为其他类苯甲酸脱羧酶筛选高活性、高底物选择性突变体提供了一种高通量、合理的方法。

REFERENCES

- [1] KOURIST R, GUTERL JK, MIYAMOTO K, SIEBER V. Enzymatic decarboxylation: an emerging reaction for chemicals production from renewable resources[J]. *Chem Cat Chem*, 2014, 6(3): 689-701.
- [2] SCHADA von BORZYSKOWSKI L, ROSENTHAL RG, ERB TJ. Evolutionary history and biotechnological future of carboxylases[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 168(3): 243-251.
- [3] ALEKU GA, ROBERTS GW, TITCHINER GR, LEYS D. Synthetic enzyme-catalyzed CO₂ fixation reactions[J]. *Chem Sus Chem*, 2021, 14(8): 1781-1804.
- [4] PESCI L, GLUECK SM, GURIKOV P, SMIRNOVA I, FABER K, LIESE A. Biocatalytic carboxylation of phenol derivatives: kinetics and thermodynamics of the biological Kolbe-Schmitt synthesis[J]. *The FEBS Journal*, 2015, 282(7): 1334-1345.
- [5] FAN Y, FENG JQ, YANG M, TAN X, FAN HJ, GUO MJ, WANG BJ, XUE S. CO₂(aq) concentration-dependent CO₂ fixation via carboxylation by decarboxylase[J]. *Green Chemistry*, 2021, 23(12): 4403-4409.
- [6] CHENG F, ZHU LL, SCHWANEBERG U. Directed evolution 2.0: improving and deciphering enzyme properties[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(48): 9760-9772.
- [7] PRAKINEE K, PHINTHA A, VISITSATTHAWONG S, LAWAN N, SUCHARITAKUL J, KANTIWIWIYAWANITCH C, DAMBORSKY J, CHITNUMSUB P, van PÉE KH, CHAIYEN P. Mechanism-guided tunnel engineering to increase the efficiency of a flavin-dependent halogenase[J]. *Nature Catalysis*, 2022, 5(6): 534-544.
- [8] FAN Y, WU SJ, SHI JP, LING XL, YANG YL, FENG YB, XUE. The catalytic mechanism of direction-dependent interactions for 2,3-dihydroxybenzoate decarboxylase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(24): 7451-7462.
- [9] ZENG WZ, GUO LK, XU S, CHEN J, ZHOU JW. High-throughput screening technology in industrial biotechnology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(8): 888-906.
- [10] LONGWELL CK, LABANIEH L, COCHRAN JR. High-throughput screening technologies for enzyme engineering[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2017, 48: 196-202.
- [11] LIU ZZ, CHEN S, WU J. Advances in ultrahigh-throughput screening technologies for protein evolution[J]. *Trends in Biotechnology*, 2023, 41(9): 1168-1181.
- [12] SINHA S, JIKARE A, ANKULKAR R, MIRZA Y. Development of miniaturized agar based assays in 96-well microplates applicable to high-throughput screening of industrially valuable microorganisms[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2022, 199: 106526.
- [13] 范雁, 杨森, 薛松. 基于光谱法-图像灰度法高通量筛选高效固定 CO₂ 的苯甲酸脱羧酶[J]. *中国生物工程杂志*, 2021, 41(11): 55-63.
- [14] FAN Y, YANG M, XUE S. High-throughput screening of benzoate decarboxylase for efficient CO₂ fixation based on spectroscopy-image grayscale method[J]. *Chinese Journal of Biological Engineering*, 2021, 44(11): 55-63 (in Chinese).
- [15] GRIFFITHS RL, BERG JD. Automation of the whole-blood thiopurine S-methyltransferase (TPMT) phenotyping assay using the Biomek NX^P and Biomek i5 liquid-handling workstations[J]. *SLAS Technology*, 2021, 26(5): 488-497.
- [16] SCHRIMPE-RUTLEDGE AC, CODREANU SG, SHERROD SD, MCLEAN JA. Untargeted metabolomics strategies: challenges and emerging directions[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2016, 27(12): 1897-905.
- [17] 张经纬, 刘晓青, 田健, 罗会颖, 姚斌, 涂涛. 基于结构基础的嗜热细菌 *Caldicellulosiruptor bescii* 木聚糖酶 CbXyn10C 的热稳定性分子改良[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(12): 1-14.
- [18] ZHANG JW, LIU XQ, TIAN J, LUO HY, YAO B, TU Tao. Improvement of the thermal stability of xylanase CbXyn10C from the thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor bescii* based on structural information[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(12): 1-14 (in Chinese).