

## 技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001443

## 绿脓杆菌芳香硫酸酯酶序列与活性关系的初步表征

李雨薇,袁梅,杨晓兰,廖飞

(重庆医科大学检验医学院,重庆 400016)

**【摘要】目的:**通过定点突变初步表征绿脓杆菌芳香硫酸酯酶(Pseudomonas Aeruginosa arylsulfatase, PAAS)序列-活性关系,识别通过迭代饱和突变提高突变体比活性的合适位点。**方法:**分析 PAAS 活性中心三维构象初步识别催化相关位点;定点突变获得突变体,重组表达后 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和纯化,表征其酶学性质。**结果:**与野生型相比,R55、M72、G138、D317、K375 等位点用常见氨基酸替换/突变都显著降低其催化活性;R55、D317 和 K375 等突变显著降低底物选择性和/或热稳定性,而 M72 和 G138 突变主要改变其催化活性。**结论:**M72 和 G138 适合作为通过迭代饱和突变实施定向进化的候选位点。

**【关键词】**芳香硫酸酯酶;定点突变;表征

**【中图分类号】**Q556;R446.61

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2016-06-22

## Preliminary characterization of sequence-activity relationship of Pseudomonas Aeruginosa arylsulfatase

Li Yuwei, Yuan Mei, Yang Xiaolan, Liao Fei

(College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the preliminary sequence-activity relationship of Pseudomonas Aeruginosa arylsulfatase (PAAS) by site-directed mutagenesis and to recognize residues suitable for iterative-saturation-mutagenesis. **Methods:** Candidates of residues involved in catalysis were recognized by analysis of conformation of PAAS active site; mutants were generated by site-directed mutagenesis and characterized after recombinant expression and Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity purification. **Results:** In comparison to the wild type, the mutagenesis of R55, M72, G138, D317 and K375 caused the significant decrease of catalytic efficacy; the mutagenesis of R55, D317 and K375 reduced substrate preference for 4-nitrophenylsulfate and/or thermostability, but the mutagenesis of M72 and G138 caused primarily the decrease of activity. **Conclusion:** M72 and G138 are suitable candidate sites for directed evolution by iterative-saturation-mutagenesis to improve mutant activity.

**【Key words】** arylsulfatase; site-directed mutagenesis; characterization

酶联免疫吸附试验(enzyme-linked-immuno absorbent-assay, ELISA)是生物医药基础研究和实践领域的关键分析技术,但其分析效率低。为提高分析效率,很早提出单通道两组分同步 ELISA,但都未能实现<sup>[1-4]</sup>。本实验室通过在 0.5 s 内变换 2 个波长测定相同溶液的吸收建立光度法单通道双酶同测(spectrophotometric-dual-enzyme-simultaneous assay,

SDESA)的专利技术,用标配 405 nm 和 450 nm 滤光片普通酶标仪(如 Biotek ELX800)与常规 ELISA 相同的操作,同步测定每孔内 2 组分<sup>[5]</sup>,其分析效率加倍<sup>[5-8]</sup>;此技术简称 SDESA-ELISA,但其常规应用还缺乏系统集成所需的特殊标记酶。为适用滤光片式酶标仪,SDESA-ELISA 需 4-硝基-1-萘基磷酸酯(4-nitro-1-naphthylphosphate, 4NNPP)为底物的碱性磷酸酶,及以 4-硝基苯基硫酸酯(4-nitrophenyl sulfate, 4NPS)为底物且最适 pH 偏碱的绿脓杆菌芳香硫酸酯酶(Pseudomonas Aeruginosa arylsulfatase, PAAS)为配对标记酶<sup>[8-9]</sup>。牛小肠黏膜碱性磷酸酶(calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP)水解 4NNPP 比活高和热稳定性已满足 SDESA-ELISA 要求,且

作者介绍:李雨薇,Email:lywaccomplish2013@163.com,

研究方向:酶分子工程与应用评价。

通信作者:杨晓兰,Email:xiaolanyang666@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31570862);教育部博士点基金资助项目(编号:20125503110007)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20171128.1718.070.html>  
(2017-11-28)

其作用于经典底物 4-硝基苯基磷酸酯(4-nitrophenylphosphate, 4NPP)的水解活性非常高。但是,野生型 PAAS 水解 4NPP 比活性仅有所需的 2%<sup>[10-13]</sup>。因此,亟需对 PAAS 进行分子改造以提高其比活性,以实现 SDESA-ELISA 的系统集成并保障灵敏度。

合理设计和定向进化是获得高活性酶突变体的主要策略<sup>[14-16]</sup>。合理设计技术复杂且依赖大型计算资源,而定向进化却简单易行。常规定向进化筛选酶蛋白氨基酸序列随机突变所得突变体,需制备和筛选大量突变体才能获得高活性突变体,其效率很低且成本高。迭代饱和和突变是近年提出的酶定向进化新策略,其实施效率很高且成本显著降低<sup>[17-22]</sup>,但需明确对酶催化活性有显著影响的催化相关残基。已知 PAAS 催化区螯合  $\text{Ca}^{2+}$  和 H211 的咪唑环是活性必需基团<sup>[23-24]</sup>,但其他催化相关残基未明确。本文通过分析活性中心构象识别其余的候选催化相关残基,通过定点突变、诱导表达、纯化后测定酶学性质确定催化相关残基,为用迭代饱和和突变高效实施其定向进化奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与材料

PAAS 底物 4NPS 和碱性磷酸酶底物 4NPP 都购自 Sigma-Aldrich; 4NNPP 为此前本实验室合成<sup>[6-9]</sup>。酵母粉和胰蛋白酶购自美国 OXOID。PAAS 表达载体 PET-24a 为本实验室此前所用,并在蛋白 N 端添加 6His 亲和纯化标签<sup>[9]</sup>。大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3)、 $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 亲和层析填料等购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。其余试剂均为国产化学纯试剂。

### 1.2 PAAS 催化相关残基的识别、定点突变及突变体的诱导表达和制备

分析 PAAS 三维结构识别候选催化相关残基。PAAS 晶体结构来自 1HDH.Pdb,用 PyMol (Version 1.0) 显示三维结构、测定原子间距。用寡核苷酸引物介导的 PCR 实现预期定点突变[由中美泰和生物技术(北京)有限公司提供技术服务完成]。各突变体构建的 pET24a 质粒分别转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,培养、诱导、离心收集菌体、JH90 超声细胞粉碎机碎菌、离心所得上清为粗酶。上清液中粗酶用  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 亲和层析纯化一次得纯化酶。用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析样品中目标蛋白丰度。

### 1.3 酶学性质的表征

1.3.1 水解 4NPS 的活力 反应缓冲液为 1.0 mol/L pH 9.0 Tris-HCl, 4NPS 终浓度 5.0 mmol/L; 用 Mapada UV1600 分光光度计以 5 s 间隔记录 405 nm 处吸收变化<sup>[9]</sup>。对硝基苯酚消

光系数为  $16.0(\text{mmol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  产物为 1 个单位; 用 60 s 内吸收变化确定活性。

1.3.2 水解 4NPP 和 4NNPP 的活力 反应缓冲液为 1.0 mol/L pH 10.0 二乙醇胺(diethanol amine, DEA)-HCl 或 1.0 mol/L pH 9.0 Tris-HCl, 都含 2.0 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ ; 4NPP 终浓度为 10 mmol/L, 4NNPP 终浓度为 0.20 mmol/L。以 5 s 间隔记录 4NPP 水解产物在 405 nm 处吸收变化, 或 4NNPP 水解产物在 450 nm 处吸收变化。4NNPP 水解产物 4-硝基-1-萘酚消光系数为  $26.0(\text{mmol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ <sup>[15, 7-8]</sup>; 用启动反应 60 s 内吸收变化确定初速度和活性。每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  产物的酶量为 1 个单位。

1.3.3 蛋白浓度 蛋白浓度用 Bradford 法测定<sup>[25]</sup>, 以牛血清蛋白为参考。

1.3.4 动力学参数 测定米氏常数( $K_m$ )时, 4NPS 浓度分布在  $K_m$  两侧且这些浓度的倒数接近成等差数列分布。基于双倒数分析法原理进行数据处理, 回归分析确定  $K_m$ 。据经过亲和纯化的 PAAS 及其突变体的最大初速度计算催化常数  $k_{cat}$ , 并将 PAAS 及其突变体的分子量都假定为 61 kD, 纯化酶的丰度假定为 100%。用 Microsoft Excel 6.0 进行回归分析处理上述数据。

1.3.5 最适反应 pH 和热稳定性 测定最适 pH 用 1.0 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 为 8.0~10.0。测定热稳定性时, 将样品稀释到所标示最终缓冲液(含 2.5 mmol/L 对氨基苯甲脒)中, 0.22  $\mu\text{m}$  膜过滤除菌, 密封后在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中保存。以剩余活性降到初始值 50% 的时间( $t_{0.5}$ )为指标, 定量反映 PAAS 及其突变体热稳定性。

## 2 结果

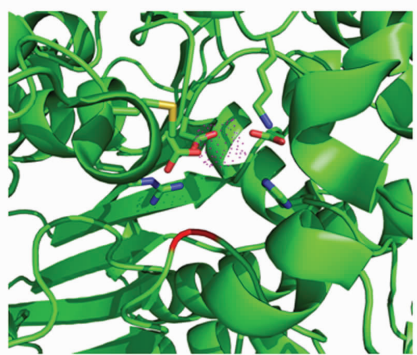
### 2.1 分析三维结构识别候选的催化相关残基

PAAS 中来自 C51 氧化生成的甲酰基、螯合的  $\text{Ca}^{2+}$  及 H211 是公认催化残基<sup>[23]</sup>。不直接与底物接触, 但与上述公认催化残基作用也可影响酶活性, 如位于螯合  $\text{Ca}^{2+}$  背后的 2 个天冬氨酸残基 D14 和 D317(图 1)。位于底物进入活性中心通道上且侧链与 DDZ 及螯合  $\text{Ca}^{2+}$  相距较近的残基, 也会影响底物在活性中心取向而成为候选催化相关残基, 如 R55、M72、G138、K375(图 1)。其中 G138 没有侧链, 但位于底物进入通道, 其突变可能对催化过程有影响, 也考虑为潜在催化相关残基。

### 2.2 所选位点突变对水解 4NPS 和 4NPP 活性的影响

PAAS 及其突变体都有很高的诱导表达效率, 在细胞裂解液中已有很高丰度, 经过亲和纯化后 PAAS 及其突变体中杂蛋白可忽略, 但比活性提高都不超过 4 倍(图 2)。所选催化相关残基突变都对水解 4NPS 活性产生显著影响(表 1), 且同类理化性质突变也显著降低突变体水解 4NPS 活性, 如 K375R 和 R55K。这些突变体在 1.0 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0)中水解 0.20 mmol/L 4NNPP 活性都低于在 1.0 mol/L

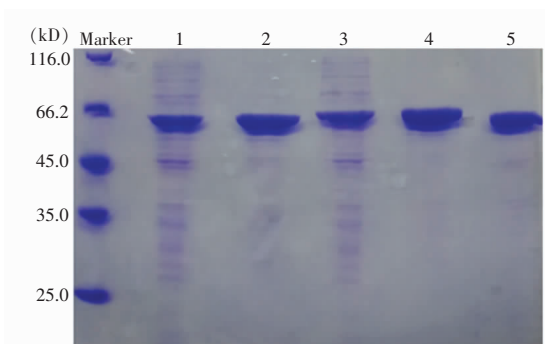
DEA-HCl(pH 10.0)中水解 10.0 mmol/L 4NPP 活性的 40%。除了 K375E 和 K375H,这些突变体即使在 1.0 mol/L DEA-HCl(pH 10.0)缓冲液中水解 4NPP 活性也不超过在 1.0 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0)中水解 4NPS 活性的 4%。可见除 K375E+K375H 突变,其余位点突变不会显著增加其水解 4NPP 活性。另外,R55、D317 和 K375 协同突变都使活性下降。



亮红色小点代表螯合 Ca<sup>2+</sup>;G138 主链显红色; DDZ 紧邻 R55 但外形和羧基未区分

图 1 PAAS 活性中心靠近甲酰基(来自 C51)和螯合钙离子的潜在催化相关残基

Fig.1 Potentially catalytic residues close to formyl (from C51) and chelated Ca<sup>2+</sup> in PAAS active center



1:M72N 表达裂解液;2:纯化 M72N;3: M72D 表达裂解液;4:纯化 M72D;5:纯化 PAAS

图 2 PAAS 及其代表突变体在亲和纯化前后丰度差异  
Fig.2 Abundance of PAAS and mutants after purification

### 2.3 所选位点突变对催化效率的影响

与野生型 PAAS 比较,除了 G138S 以外的突变体对 4NPS 亲和力和都显著降低,尤其是 K375R,米氏常数( $K_m$ )达到毫摩尔数量级,提高超过 2 个数量级(表 2)。更重要的是,除 G138S 外,其余突变都使得催化效率( $k_{cat}/K_m$ )显著下降,以 K375R 下降最显著。

### 2.4 所选位点突变对最适 pH 的影响

野生型 PAAS 在 pH 8.0~10.0 间活性相当。所选 PAAS 位点突变造成的最大变化是尽管其最适 pH 仍在碱性区域,

但突变体在 pH>9.5 后活性都显著下降(图 3)。其中突变体 K375R 对反应 pH 变化最敏感,其 pH 升高使得活性下降比其它突变体更明显。

表 1 PAAS 突变体的比活性差异( $\bar{x} \pm s, n, \%$ )

Tab.1 Specific activities of PAAS and mutants for different substrates ( $\bar{x} \pm s, n, \%$ )

PAAS/突变体	比活性 (kU/g)		
	5.0 mmol/L 4NPS (n=3)	10 mmol/L 4NPP (n=3)	比率 (%)
PAAS	32.00 ± 0.60	0.013 ± 0.001	0.03
D317E	1.70 ± 0.10	0.012 ± 0.001	0.70
K375R	0.11 ± 0.01	0.001 ± 0.000	1.50
K375E	0.009 ± 0.000	0.021 ± 0.001	250.00
K375H	0.008 ± 0.000	0.028 ± 0.001	355.00
M72K	0.23 ± 0.01	0.006 ± 0.000	2.40
M72Q	10.70 ± 0.30	0.182 ± 0.005	1.00
M72D	2.70 ± 0.01	0.002 ± 0.000	0.20
M72N	3.30 ± 0.01	0.008 ± 0.000	0.30
M72I	7.10 ± 0.10	0.031 ± 0.001	0.50
G138S	6.10 ± 0.20	0.003 ± 0.000	0.04
R55K	/	0.003 ± 0.000	ND
R55K/D317E	0.002 ± 0.000	/	ND
R55K/K375R	/	/	ND
D317E/K375R	/	/	ND
R55K/D317E/K375R	/	0.002	ND

注:/ 表示启动反应 60 s 内的吸收变化可忽略不计。ND 表示未计算。用 4NPS 时,缓冲液为 1.0 mol/L Tris-HCl, pH 9.0; 用 4NPP 时,缓冲液为 1.0 mol/L DEA-HCl, pH 10.0

表 2 PAAS 及其定点突变体水解 4NPS 的动力学参数( $\bar{x} \pm s, n>2$ )

Tab.2 Kinetic parameters for PAAS and mutants on 4NPS ( $\bar{x} \pm s, n>2$ )

PAAS/突变体	$K_m$ (μmol/L)	$K_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{cat}/K_m$ [L/(mol·s)]
PAAS	7.2 ± 0.2	32.00 ± 0.50	4.5 × 10 <sup>6</sup>
M72K	32.0 ± 1.0	0.22 ± 0.01	7.4 × 10 <sup>3</sup>
M72Q	124.0 ± 4.0	10.80 ± 0.30	9.0 × 10 <sup>4</sup>
M72D	772.0 ± 32.0	2.70 ± 0.10	4.1 × 10 <sup>3</sup>
M72N	484.0 ± 24.0	3.20 ± 0.10	7.6 × 10 <sup>3</sup>
M72I	190.0 ± 8.0	7.10 ± 0.30	3.9 × 10 <sup>4</sup>
G138S	11.5 ± 0.3	6.20 ± 0.20	5.4 × 10 <sup>5</sup>
D317E	68.0 ± 2.0	1.80 ± 0.10	2.6 × 10 <sup>4</sup>
K375R	2 688.0 ± 54.0	0.15 ± 0.01	6.3 × 10 <sup>1</sup>

### 2.5 所选位点突变对金属离子效应的影响

除 M72D 外,突变体水解 4NPS 活性对 Zn<sup>2+</sup> 抗性增强。除 K375 外,Mg<sup>2+</sup>和 Ca<sup>2+</sup>增强其余位点突变体水解 4NPS 活性(表 3)。水解 4NPP 时,Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和 Ca<sup>2+</sup>对多数突变体有抑制效应,仅 D317E 水解 4NPP 活性受到 Mg<sup>2+</sup>明显激活,受 Ca<sup>2+</sup>的弱激活;G138S 对 Mg<sup>2+</sup>不响应,但可被 Zn<sup>2+</sup>弱激活(表 4)。

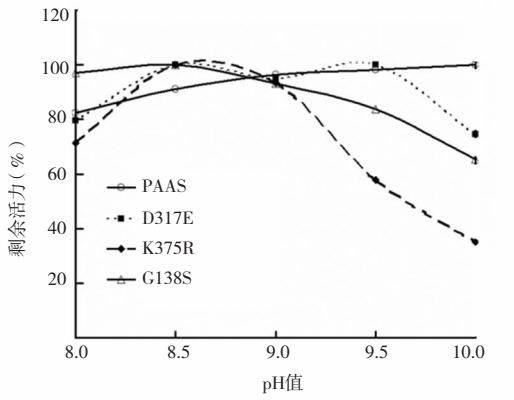


图 3 PAAS 及突变体水解 4NPS 的最适 pH

Fig.3 Optimum pH of PAAS and mutants for hydrolyzing 4NPS

表 3 金属离子对 PAAS 及其突变体水解 4NPS 影响(%)

Tab.3 Effects of metal ions on PAAS and mutants for hydrolyzing 4NPS(%)

PAAS/突变体	保留活性		
	2.0 mmol/L Ca <sup>2+</sup>	2.0 mmol/L Mg <sup>2+</sup>	2.0 mmol/L Zn <sup>2+</sup>
PAAS	93	94	45
M72K	144	138	174
M72Q	116	142	109
M72D	143	147	50
M72N	208	232	138
M72I	130	139	88
G138S	114	112	94
D317E	107	99	101
K375R	95	87	97

表 4 金属离子对 PAAS 及其定点突变体水解 4NPP 影响(%)

Tab.4 Effects of metal ions on PAAS and mutants for hydrolyzing 4NPP(%)

PAAS/突变体	保留活性		
	2.0 mmol/L Ca <sup>2+</sup>	2.0 mmol/L Mg <sup>2+</sup>	2.0 mmol/L Zn <sup>2+</sup>
PAAS	205	117	43
D317E	259	219	25
K375E	115	43	15
K375H	116	53	19
G138S	110	106	53
M72I	117	47	18
M72Q	75	70	42

### 2.6 所选位点突变对热稳定性的影响

PAAS 本身在 4 °C 稳定性较好,定量比较其突变体在 4 °C 的热稳定性太耗时。PAAS 及其突变体在 37 °C 的热失活曲线表明其基本属于单指数函数衰减(图 4),可用在 37 °C 加速失活过程中的活性衰减半衰期( $t_{0.5}$ )近似定量表征其热稳定性。结果表明,除了 D317E,所选位点的突变体在加速失活过程中的  $t_{0.5}$  都没有显著缩短(表 5),且通常在中性条件下的热稳定性更强。

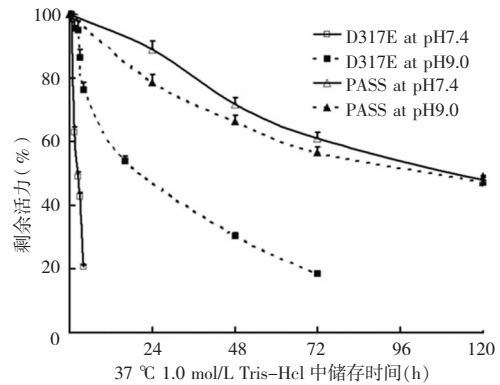


图 4 PAAS 和 D317E 在 37 °C 保存期间的活性衰减曲线

Fig.4 Decrease of activities of PAAS and D317E at 37 °C

表 5 PAAS 及其突变体在 37 °C 1.0 mol/L Tris-HCl 中的热失活半衰期

Tab.5 Effects of mutation on  $t_{0.5}$  in 1.0 mol/L Tris-HCl at 37 °C

突变体	$t_{0.5}$ at pH 7.4 (d)	$t_{0.5}$ at pH 9.0 (d)
PAAS	4.0 ± 0.1 (3)	4.0 ± 0.1 (3)
D317E	0.08	0.75
K375R	22.0 ± 0.9 (3)	7.0 ± 0.3 (3)
G138S	7.5 ± 0.2 (2)	3.5 ± 0.1 (2)
M72D	14.0 ± 0.4 (2)	9.0 ± 0.4 (2)
M72I	9.0 ± 0.3 (2)	5.3 ± 0.2 (2)
M72N	25.0 ± 1.0 (2)	4.0 ± 0.1 (2)
M72Q	15.0 ± 0.4 (2)	8.0 ± 0.4 (2)

## 3 讨论

SDESA-ELISA 需用 2 种显色底物在相同缓冲液中同步测定 2 种标记酶活性。经典单组分 ELISA 用比活性不低于 200 kU/g 的辣根过氧化物酶标记<sup>[26]</sup>,其显色产物消光系数达到 72 (mmol·L<sup>-1</sup>·cm)<sup>-1</sup>。使用滤光片式酶标仪实践 SDESA-ELISA,目前的候选标记酶组合为牛小肠黏膜碱性磷酸酶和绿脓杆菌芳香硫酸酯酶。4NNPP 产物在 460 nm 附件为吸收峰,但在 405 nm 仍有强吸收<sup>[5-8]</sup>。酶标仪在 405 nm 可测吸收范围有限;所用 4NNPP 需不高于 0.20 mmol/L,其在 405 nm 吸收才不超过 1.0。为使 SDESA-ELISA 灵敏度与经典单组分 ELISA 相当,碱性磷酸酶水解 0.20 mmol/L 4NNPP 活性需高于 500 kU/g。在 1.0 mol/L Tris-HCl(pH 9.0)中,牛小肠黏膜碱性磷酸酶水解 0.20 mmol/L 4NNPP 活性能高于 600 kU/g,且 PAAS 活性略高于在 1.0 mol/L DEA-HCl (pH 10.0)。可见,所需碱性磷酸酶已有且 SDESA-

ELISA 可用 1.0 mol/L Tris-HCl (pH 9.0)。SDESA-ELISA 要求 PAAS 突变体在 1.0 mol/L Tris-HCl 中水解 4NPS 活性高于 800 kU/g, 但野生型 PAAS 比活性仅约 30 kU/g<sup>[8]</sup>。可见, SDESA-ELISA 所需碱性磷酸酶已有, 但必须对 PAAS 进行分子改造提高其比活性。

PAAS 对底物 4NPS 亲和力很高(表 2)。考虑成本, 在 SDESA-ELISA 中可用 5.0 mmol/L 以内 4NPS; 只要比活性足够高, 对 4NPS 的  $K_m$  低于 1.0 mmol/L 的 PAAS 突变体都是候选标记酶。SDESA-ELISA 反应体系有 4NNPP 和 4NPS 两种显色底物; PAAS 能水解 4NNPP<sup>[27]</sup>, 但牛小肠黏膜碱性磷酸酶不水解 4NPS; 筛选 PAAS 突变体还需同时考虑其水解 4NNPP 活性才有利于保障可靠性。测定牛小肠黏膜碱性磷酸酶需用  $Mg^{2+}$ <sup>[5-8]</sup>; PAAS 突变体水解 4NNPP 活性不能受到  $Mg^{2+}$  显著激活。考察候选的迭代饱和突变位点时, 需比较其突变体水解 4NNPP 和 4NPS 活性比值及  $Mg^{2+}$  的效应。通常 PAAS 突变体在 1.0 mol/L Tris-HCl (pH 9.0) 缓冲液中水解 0.20 mmol/L 4NNPP 活性低于在 1.0 mol/L DEA-HCl (pH 10.0) 中水解 10.0 mmol/L 4NPP 活性的 40%, 故测定突变体在 1.0 mol/L DEA-HCl (pH 10.0) 中水解 10.0 mmol/L 4NPP 活性以便进行定量比较。尽管多数活性中心的催化相关位点不显著影响酶稳定性, 但 PAAS 活性中心有螯合  $Ca^{2+}$ , 其除了参与催化作用, 可能也会稳定活性中心构象。所以, 也需同时考虑候选突变位点对 PAAS 突变体稳定性的效应。

所测突变体水解 4NPS 活性都降低; PAAS 催化效率 ( $K_{cat}/K_m$ ) 也很低, 但其对底物亲和力高; 这表明有足够理论空间通过定向进化提高其突变体催化活性。总体而言, 对带电残基 D317、K375 同类替换, 及中性残基 G138、M72 突变, 都造成水解 5.0 mmol/L 4NPS 活性明显下降。所测试突变体水解 4NPS 活性基本不受  $Mg^{2+}$  抑制。除 D317E, 其余 PAAS 突变体水解 4NPP 活性不受  $Mg^{2+}$  明显激活, 但 K375E 和 K375H 表现为磷酸酯酶活性高于硫酸酯酶活性, 而 R55K 突变体对底物选择性也出现了明显反转。除了 D317E, 所选位点的突变基本不显著降低突变体稳定性。可见, D317 主要作用可能是螯合催化活性和结构稳定性所需  $Ca^{2+}$ , 不是迭代饱和突变的优选位点; K375 和 R55 的突变会使突变体转变为磷酸酯酶, 也不是迭代饱和突变的优选位点; 相反, M72 和

G138 是通过迭代饱和突变实施定向进化的恰当候选位点。目前, 以 M72 和 G138 为候选位点, 通过迭代饱和突变实施定向进化提高 PAAS 突变体比活性的探索正在进行中, 结果将随后报道。

## 参 考 文 献

- [1] Blake C, Al-Bassam MN, Gould BJ, et al. Simultaneous enzyme immunoassay of two thyroid hormones[J]. Clin Chem, 1982, 28(7): 1469-1473.
- [2] Choi MJ, Choe IS, Kang HK, et al. Simple enzyme immunoassay for the simultaneous measurement of whole chorionic gonadotropin molecules and free beta-subunits in sera of women with abnormal pregnancies or tumors of the reproductive system[J]. Clin Chem, 1991, 37(5): 673-677.
- [3] Dean KJ, Thompson SG, Burd JF, et al. Simultaneous determination of phenytoin and phenobarbital in serum or plasma by substrate-labeled fluorescent immunoassay[J]. Clin Chem, 1983, 29(6): 1051-1056.
- [4] Ng ML, Rajna A, Khalid BA. Enzyme immunoassay for simultaneous measurement of autoantibodies against thyroglobulin and thyroid microsome in serum[J]. Clin Chem, 1987, 33(12): 2286-2288.
- [5] Liu HB, Yang XL, Liu L, et al. Spectrophotometric-dual-enzyme-simultaneous assay in one reaction solution (SDESA): chemometrics and experimental models[J]. Anal Chem, 2013, 85(4): 2143-2154.
- [6] 廖飞, 杨晓兰, 刘红博, 等. 用多波长吸收单通道同步测定多种酶活性的方法[P]. 中国, 201210355606.8. (2014-10-29)
- [7] Liu HB, Yang XL, Dang JZ, et al. Two glycosidases as label enzymes for concurrent enzyme-linked-immunosorbent-assay of two components via spectrophotometric-dual-enzyme simultaneous-assay in one solution[J]. Anal Methods, 2013, 5(21): 5969-5976.
- [8] Liu H, Yuan M, Yang XL, et al. Comparison of candidate pairs of hydrolytic enzymes for spectrophotometric-dual-enzyme-simultaneous-assay[J]. Anal Sci, 2015, 31(5): 421-427.
- [9] Beil S, Kehrli H, James P, et al. Purification and characterization of the arylsulfatase synthesized by Pseudomonas aeruginosa PAO during growth in sulfate-free medium and cloning of the arylsulfatase gene (atsA)[J]. Eur J Biochem, 1995, 229(2): 385-394.
- [10] Stressler T, Leisibach D, Lutz-Wahl S, et al. Homologous expression and biochemical characterization of the arylsulfatase from Kluyveromyces lactis and its relevance in milk processing[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(12): 5401-5414.
- [11] Benjdia A, Berteau O. Sulfatases and radical SAM enzymes: emerging themes in glycosaminoglycan metabolism and the human microbiota[J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(1): 109-115.
- [12] Wang X, Duan D, Xu J, et al. Characterization of a novel alkaline arylsulfatase from Marinomonas sp. FW-1 and its application in the desulfation of red seaweed agar[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2015, 2(10): 1353-1362.
- [13] Gao C, Jin M, Yi Z, et al. Characterization of a recombinant ther-