

群体感应淬灭酶 PF-1240 的半理性设计及其对蜂房哈夫尼亚菌群体感应的抑制

崔方超¹, 宁媛媛¹, 申悦¹, 王当丰¹, 檀茜倩¹, 李秋莹¹, 励建荣^{1*}, 李婷婷^{2*}

(¹渤海大学食品科学与工程学院 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心

中国轻工业海水鱼加工重点实验室 辽宁锦州 121013

²大连民族大学生命科学院 辽宁大连 116600)

摘要 群体感应(QS)是细菌通过 *N*-酰基高丝氨酸内酯(AHLs)等信号分子相互交流的过程。通过群体感应淬灭(QQ)酶体外降解 AHLs,是抑制腐败菌致病因子产生的一种有效手段。为进一步提升 QQ 酶 PF-1240 的活性和实用性,通过同源建模手段构建酶 PF-1240 的三维预测模型,并将其与不同的 AHLs 进行分子对接。以此为基础,利用虚拟突变手段对影响酶活性的关键位点进行筛选并鉴定出 Asn418 为最佳突变位点,进而对突变体进行表达,分析其酶学性质和 QS 抑制效果。结果表明:突变酶对短链 AHLs 有较强的淬灭能力,其最适 pH 值变为 7,最适温度由 30 °C 变为 20 °C。此外,突变酶有效降低了蜂房哈夫尼亚菌的群集和泳动能力,当其质量浓度为 15 μg/mL 时,生物膜的抑制率为 41.93%,抑制效果远好于野生酶。本研究表明 Asn418 是影响 PF-1240 酶学性质及酶活性的关键氨基酸,为酶 PF-1240 的理性设计及在水产品保鲜领域应用提供了理论依据。

关键词 群体感应; *N*-酰基高丝氨酸内酯酰化酶; 分子对接; 虚拟突变; 水产品腐败

文章编号 1009-7848(2024)07-0024-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.07.003

随着生物技术的不断发展,酶制剂作为食品保鲜剂已得到研究者和消费者的认可,例如溶菌酶。酶制剂具有绿色环保,反应条件温和,来源广泛等优点,然而同时也存在催化底物类型有限,选择性不高等缺点,这为其实际应用增加了阻力。因此,对天然酶进行定向设计改造,提升其工业应用性能,具有重要的基础研究意义和实际应用价值^[1]。半理性设计主要借助生物信息学,基于同源蛋白序列比对、三维结构,选取多个氨基酸残基作为改造靶点,进行饱和突变,筛选性质优良的突变体,有目的地对蛋白质进行改造^[2-3],能够极大地减少突变库和试验量。然而,半理性设计仍需进行大量试验。随着近年来计算机辅助设计蛋白结构的快速发展,可以通过对某一位点的虚拟突变来预测突变前、后酶活性的变化。

群体感应(Quorum sensing, QS)是一种广泛存在于微生物群中的细胞间通信系统,高密度的菌落群体可以产生足够数量的被称作自诱导物(Autoinducer, AI)的信号分子,激活包括毒力因子产生、生物膜形成在内的机制,以适应环境的变化^[4]。AHLs 是一种关键的 AI,基于 AHLs 的 QS 信号分子在 70 多种细菌中被发现,大多数革兰氏阴性(G⁻)细菌通过分泌 AHLs 介导 QS^[5]。AHLs 由 1 个高丝氨酸内酯环和 1 个酰基侧链组成^[6],酰基侧链的长度、3 位碳双键及取代基的不同决定了 AHLs 的特异性^[7]。抑制 QS 能够有效抑制细菌致病因子的产生,其中能够破坏 QS 通路并降低 QS 控制基因表达的化学物质被称为群体感应抑制剂(Quorum sensing inhibitors, QSI)。QSI 多为信号分子合成阻断剂或信号分子竞争性抑制剂,其应用受限于专一性不强和浓度较难控制。与之相比,群体感应淬灭(Quorum quenching, QQ)酶能够使 QS 信号分子失活,具有专一性强,催化效率高,化学污染少等优点,能够针对特定的底物发挥作用,并且不会影响细菌生长^[8]。

Li 等^[9]首次证明可以利用 QQ 酶来控制细菌感染,目前的研究热点主要针对 AHLs 的酶学降

收稿日期: 2023-07-07

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(U20A2067);辽宁省自然科学基金博士科研启动基金计划项目(2022-BS-301)

第一作者: 崔方超,男,博士,副教授

通信作者: 励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

李婷婷 E-mail: tingting780612@163.com

解或修饰。Wang 等^[10]从荧光假单胞菌 PF08 (*Pseudomonas fluorescens* 08) 中分离出 1 种新型 AHL 酰化酶 PF2571, 可以抑制维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) QS 的腐败相关因子, 经过 PF2571 处理的红鲷鱼片能够有效延长其货架期, 这意味着 QQ 酶有作为食品保鲜剂的潜在价值。前期工作中, 本团队从 1 株大菱鲆源荧光假单胞菌中成功得到 1 种新型 QS 淬灭酶 PF-1240, 属于 AHL 酰化酶, 能够干扰蜂房哈夫尼亚菌 (*Hafnia alvei*) 的 QS, 并抑制其致腐因子的产生^[11]。本研究中, 为进一步提高 PF-1240 的淬灭活性, 通过构建 PF-1240 的三维模型和分子对接, 选择潜在的能够提高酶活性的突变位点, 并对 PF-1240 进行改造, 探究突变后 PF-1240 的酶学性质及 QS 抑制效果的变化, 为 PF-1240 在实际中的应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蜂房哈夫尼亚菌分离自腐败大菱鲆, 保藏于渤海大学水产品贮藏加工研究所^[12]。

TIANprep Mini Plasmid Kit 质粒小提试剂盒, 北京 TIANGEN 公司; DNA 分子量标准 Marker (100~5 000 bp), 生工生物工程(上海)股份有限公司; Ni-NTA 6FF His 标签蛋白纯化试剂盒、脱脂奶粉, 生工生物工程(上海)股份有限公司; PBS 缓冲液、2×SDS 蛋白质上样缓冲液 (含 DTT)、SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒、硫酸卡那霉素、琼脂糖, 北京索莱宝生物科技有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; AHLs 信号分子 (C₄-HSL、C₆-HSL、C₈-HSL、C₁₀-HSL、C₁₂-HSL、C₁₄-HSL), 美国 Sigma 公司; LB 营养琼脂、LB 肉汤, 青岛海博生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

7890N/5975 气相色谱质谱联用 (Gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS) 仪, 美国 Agilent 公司; 超声破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Mini-PROTEAN 电泳仪、GelDoc XR+ 全自动凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; PE Victor X3 酶标仪, 美国 Perkin Elmer 公司; UA-

2550 紫外分光光度计、LC2030 型高效液相色谱仪, 日本岛津; Agilent1260 高效液相色谱, 美国安捷伦; pH-25 型 pH 计, 上海雷磁; LEGEND MI-CRO 21R 型冷冻离心机, 美国赛默飞世尔。

1.3 试验方法

1.3.1 同源建模及模型评价 通过 DS 同源建模构建 PF-1240 的三维结构。首先进行序列比对, 选择序列相似度较高的来源于假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 130 中的蛋白 4e56 为模板, 将蛋白序列分割为 2 个亚基, 即 β 链的第 1 个氨基酸为保守氨基酸 Ser。模型建好后, 在网站上对模型进行评价 (<https://swissmodel.expasy.org/assess>)。

1.3.2 分子对接及突变位点的选择 将 PF-1240 蛋白作为受体蛋白进行分子对接。使用 DS 软件进行蛋白质结构的优化处理, 将小分子能量最低化, 以便更准确地评估构象^[13]。不同碳链的 AHLs 的 3D 结构来源于 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>), 并由 DS 软件进行结构优化。将这些小分子用 Cdocker 与蛋白对接, 观察各个 AHL 与蛋白的结合位点及结合能的大小, 推断是否与蛋白结合成功。根据分子对接结果, 确定出与底物结合的保守氨基酸并作为定点饱和突变的首选位点^[14]。

1.3.3 单点虚拟饱和突变 根据结合口袋疏水性确定底物结合保守氨基酸, 利用蛋白质结构计算氨基酸突变能, 预测影响蛋白活性的关键氨基酸^[15]。在 DS 中导入蛋白结构后, 对蛋白进行去水、Prepare Protein 等处理, 并将 C₈-HSL 设置为原配体, 命名为 Ligand, 方便后续操作。在工具栏中输入所要突变的氨基酸, 进行饱和突变^[16]。点击 Run 运行任务即可。在 Report 报告中的 Summary 栏表格中会按照突变能 (Mutation energy) 从低到高对氨基酸突变的结果进行排序, 只展示突变能最高的和最低的各 5 个氨基酸突变。

1.3.4 Asn418Trp 突变酶的构建及表达

1.3.4.1 突变质粒转化表达宿主菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 根据 1.3.3 中的虚拟突变结果, 选择结合最稳定的 Asn418 进行定点突变。将质粒送往上海生工进行定点突变。突变后的质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 随后取 50 μ L 转化液, 涂布到含硫酸卡那霉素 (Kna, 50 μ g/mL) 的 LB 选择性平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜

培养。

挑取单菌落接种在含 2 mL Kna (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基中扩大培养。取 1 mL 处于对数生长期的菌体,利用 T7/T7 terminator 通用引物进行 PCR 扩增,凝胶电泳筛选阳性菌株,将阳性菌株所对应的平板菌落用甘油进行保藏,用于下一步骤。

1.3.4.2 重组蛋白的诱导表达

1) 阳性菌株按照 1:100(V/V)的比例接种到含 Kna(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 液体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$,160 r/min 条件下摇床过夜培养。

2) 将菌液培养到对数期,吸取一定的量,按 1:50 的比例接种于含有上述抗生素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 $\text{OD}_{595\text{nm}}$ 值约为 0.6。

3) 当菌株生长到对数期时就可对其进行诱导,在无菌操作台中向上述菌液添加 IPTG(终浓度为 0.4 mmol/L IPTG)进行诱导表达,16 $^{\circ}\text{C}$ 快速摇动诱导 12 h 后,离心菌液,收集菌体。

4) 将离心后的菌体用预冷的 PBS 缓冲液

(pH=7.4)进行清洗,除去残余培养基中的杂质后,向其中加入适量 PBS,使菌体充分悬浮;随后在冰浴条件下超声波破碎;当菌体破碎液逐渐趋于澄清时,对其进行离心(12 000 r/min,5 min)。

5) 用上述离心后的上清液和沉淀制备蛋白电泳样品。上清液和沉淀(用 PBS 重悬)各取 20 μL ,分别加入等体积的 2 \times SDS 蛋白上样缓冲液(含 DTT),沸水浴 5~10 min,进行 SDS-PAGE 电泳,其余蛋白样品可暂时置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.4.3 SDS-PAGE 蛋白电泳 首先按照表 1 先后配制 12%的分离胶、5%的浓缩胶;将获得的蛋白质样品直接上样,上样量为 10 μL 。电泳后的凝胶轻轻从模具中倒入含有 FastBlue 快速染液的染色容器中,室温下摇床缓慢染色 20 min。染色至能看到深浅不一的条带后,使用清水进行脱色处理,尽量使胶的颜色呈透明状。最后采用 Quantity One 软件拍照分析。SDS-PAGE 分离胶和浓缩胶配制见表 1。

表 1 凝胶配制表

Table 1 The gel preparation table

组分	12%分离胶(10 mL)	5%浓缩胶(5 mL)
30%制胶液(29:1)/mL	4	0.83
1 mol/L Tris-HCl(pH 6.8)/mL	0	0.625
1.5 mol/L Tris-HCl(pH 8.8)/mL	2.5	0
10%SDS/ μL	100	50
10%PAGE 胶凝固剂/ μL	100	75
PAGE 胶促凝剂/ μL	10	7.5
ddH ₂ O/mL	3.3	3.42
总体积/mL	10.0	10.0

1.3.4.4 Ni-NTA 琼脂糖树脂纯化 采用 Ni-NTA 6FF His 标签蛋白纯化试剂盒对目的蛋白进行纯化。具体步骤如下:

1) 取出 Ni-NTA 预装柱,将其固定在试管架上,拧开底部的盖子,让内部的缓冲液在重力作用下自然流出并收集。

2) 取 2 倍柱体积的 Elution Buffer 置于预装柱中,平衡柱子,使其缓慢排出。

3) 继续加入 2 倍柱体积的超纯水,使其缓慢排出。

4) 开始上样,将样品加入柱中,重复上样,以提高纯化效率。

5) 上样完成后,使用 2 倍柱体积的 Binding Buffer 清洗柱子并收集流穿液,重复此操作,直至流穿液在波长 280 nm 处的吸光度接近基线。

6) 清洗结束后,使用 2 倍柱体积的不同浓度的 Elution Buffer 洗脱目的蛋白,重复此操作,收集每次的流穿液,直到其在波长 280 nm 处的吸光度接近基线。

7) 清洗柱子,使用 5 倍柱体积的 Elution Buffer 洗脱后,继续用 5 倍柱体积的超纯水清洗,随后加入步骤(1)中收集的保护液,2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.5 PF-1240 突变酶的酶学性质测定 使用气相色谱-质谱法(GC-MS)测定 PF-1240 突变酶对

AHLs 的水解活性。根据梅永超^[13]的方法,采用自动进样的方式,所有样品均以 50:1 的拆分模式注入毛细管分析柱中,使用氦气作为载气,流速为 1 mL/min。通过全扫描模式(m/z 800)和选择离子监测(SIM)模式(m/z 143)采集数据。

将 PF-1240 突变酶与不同种类的 AHLs 标准品 (C_4 -HSL、 C_6 -HSL、 C_8 -HSL、 C_{10} -HSL、 C_{12} -HSL、 C_{14} -HSL)混合,以达到 10 mmol/L 的最终浓度(反应体系中含有 20 μ L AHL,500 μ L PF-1250,480 μ L PBS 缓冲液,总体积为 1 mL)。在 30 $^{\circ}$ C 下反应 3 h 后,通过 GC-MS 测定残留 AHL 的量,并计算 3 次平均值。最高酶活性定义为 100%,并计算 PF-1240 对不同底物的相对酶活。同样,在 5~50 $^{\circ}$ C 下培养 3 h 后,测定 C_8 -HSL 的剩余含量。制备不同的 pH 缓冲液:pH 6.0~9.0 (PBS 缓冲液),在 30 $^{\circ}$ C 的反应温度下,将 PF-1240 加入不同 pH 缓冲液中与 C_8 -HSL 反应。3 h 后,测定剩余 C_8 -HSL 的量,以确定 PF-1240 的最佳反应 pH 值。

1.3.6 PF-1240 突变酶对 QS 的抑制作用

1.3.6.1 PF-1240 对蜂房哈夫尼亚菌生物膜的影响 各质量浓度的 PF-1240 (0,5,10,15,20,25 μ g/mL)在 28 $^{\circ}$ C 下培养 48 h 后离心(6 000 r/min, 10 min)。用无菌水冲洗 3 次后干燥,固定 35 min。然后,加入 1 mL 的 0.1 g/100 mL 结晶紫,室温染色 15 min,随后继续用无菌水清洗,待清洗液无色后,将管内的生物膜溶解在 33%(V/V)冰醋酸溶液中,并使用酶标仪测定 OD_{595nm}。使用公式(1)计算生物膜的相对抑制率^[17]。

生物膜相对抑制率(%)=

$$\frac{\text{对照组 OD}_{595\text{nm}} - \text{试验组 OD}_{595\text{nm}}}{\text{对照组 OD}_{595\text{nm}}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.6.2 蛋白酶及运动性的测定 制作牛奶琼脂平板,向牛津杯孔中加入在不同质量浓度 PF-1240 (0,5,10,15,20,25 μ g/mL)下培养过夜的蜂房哈夫尼亚菌上清液。在 28 $^{\circ}$ C 下培养 18~24 h。牛奶蛋白被蛋白酶水解后,孔周围会出现透明的水解圈。使用群集和泳动培养基检测群集和游泳运动,将 5 μ L 蜂房哈夫尼亚菌悬浮液添加到琼脂平板的中心,将琼脂平板在 28 $^{\circ}$ C 下培养 48 h,以确定迁移直径^[18]。

2 结果与分析

2.1 序列比对及同源建模

了解蛋白质的结构对认识其功能十分重要,然而目前解析蛋白质结构的技术手段(主要为 X-ray, NMR)成本较高,要求严格,投入大,周期长^[19]。对于某些具有潜在功能的蛋白,解析结构需要承担较大的失败风险。另一方面,高通量测序技术的发展,使得越来越多的功能性基因序列被发现。因此,需要一种能够简便、快速且相对准确的技术来预测蛋白质的空间结构。

同源建模技术可以很好地解决上述问题,从蛋白质的氨基酸序列(一级结构)出发,通过同源建模可推断出蛋白质的高级结构(主要为三级结构)^[20]。在所有方法中,同源建模法使用最为广泛,预测的结果准确性最高,已有研究证明,一个已知结构超过 30% 的蛋白质序列通常可以被预测,其精度相当于低分辨率的 X-射线结果^[21]。一个蛋白质的结构由其氨基酸序列唯一决定,蛋白质三级结构的保守性远超过一级结构的保守性是同源建模的理论基础^[16]。本研究使用 DS 的 MODELER 程序进行同源建模。目前已有研究的大部分 AHL 酰化酶为双链,由 α 、 β 链 2 个大小亚基组成,活性位点 Ser 位于大亚基 β 链的头部,并且在不同的双链 AHL 酰化酶中具有保守性^[8]。以来自假单胞菌属 130 中的 4e56 (间隔子 8aa 缩短型头孢菌素酰化酶突变体)为模板,进行同源建模,得到了如图 1 所示的 PF-1240 三维结构,可以看出该蛋白具有与其它酰化酶类似的 $\alpha\beta\alpha$ 结构。

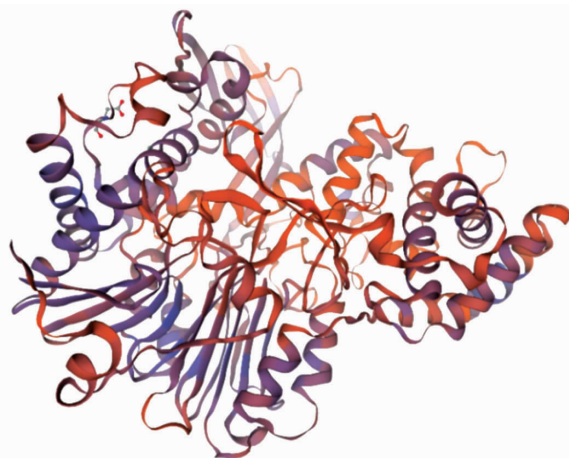


图 1 PF-1240 三维结构

Fig.1 Three-dimensional structure of PF-1240

2.2 模型评价

对于所构建的 PF-1240 蛋白模型质量采用拉氏构象图和 QMEAN 方法来评价。拉氏构象图作为一种可视化方法,能够预测蛋白结构中的氨基酸残基是否在优势区域,反映出结构构象的合理性^[22]。图中有利区域存在超过 90.0%的残基,表明模型结构具有较高的合理性。从图 2 可以看出,PF-1240 有 99.7%的氨基酸残基分布在第 1 等高线内,说明该模型质量较高。

Z-score 表示该模型的 QMEAN 分数,表示模型结构是否与试验结构的预期值具有可比性,其分值越接近于 0 表明模型结构与试验结构的一致性越高^[23]。比较得分图反映了标准化的 QMEAN 评分,表示与模型平均分数有多少标准偏差^[24]。从图 3a 可以看出,PF-1240 的红星处于灰色区域,QMEAN 的 Z-score 分值小于 1。由全局质量得分图(图 3b)可以看出,PF-1240 的 QMEAN 分值为 0.31,该值接近于 0,说明模型良好,有利于下一步试验。

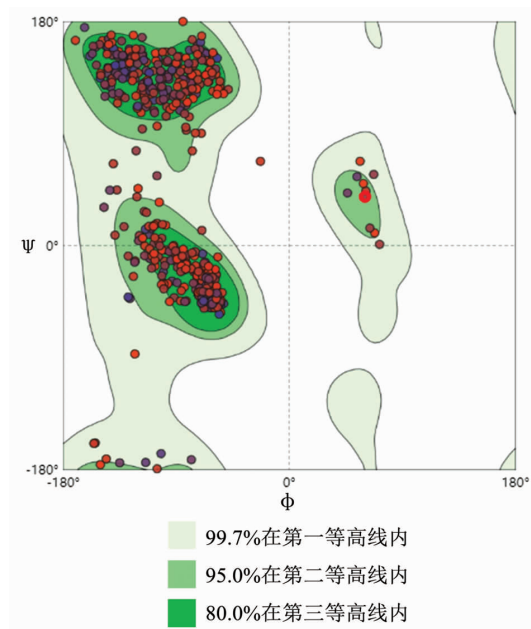


图 2 PF-1240 蛋白模型的拉氏构象图评估结果

Fig.2 Laplace conformation evaluation results of PF-1240 protein model

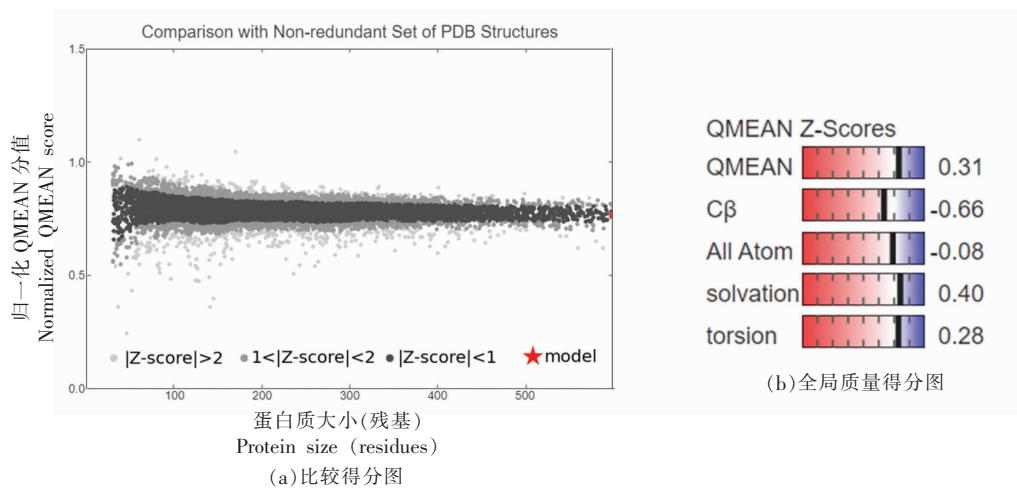


图 3 PF-1240 蛋白模型质量评价结果

Fig.3 PF1240 protein model quality evaluation results

2.3 PF-1240 与 AHLs 的分子对接

在前期研究中,选用大肠杆菌异源表达系统对 PF-1240 进行过表达,并利用 GC-MS 对其酶学性质进行研究,发现 PF-1240 能够淬灭不同酰基链长度的 AHLs^[11],为阐明 PF-1240 与不同 AHLs 之间的相互作用,确定底物与酶之间结合的关键氨基酸,通过分子对接确定酶活性中心的保

守氨基酸,为下一步的定点突变提供理论参考。从图 4 可以看出,PF-1240 中与 AHLs 通过氢键(绿色虚线)相连的氨基酸残基都位于 β 链,说明 β 链在 PF-1240 的催化功能中发挥主要作用。其中 Ser176 与 C₆-HSL、C₈-HSL、C₁₀-HSL、C₁₂-HSL、C₁₄-HSL 有氢键相互作用,而 Gln244 与 C₈-HSL、C₁₀-HSL、C₁₂-HSL 有氢键相互作用,因此上述 2 个氨

氨酸在 PF-1240 活性中心具有较高的保守性。除了氢键外,还有一些氨基酸残基与 AHLs 形成疏水相互作用(粉色虚线)。由表 2 可知,PF-1240 与 AHLs 的对接能量均为负值,并且随着碳链长度的

增加,对接能量逐渐减小。对接能量绝对值越大,说明对接越好,因此 PF-1240 对长链 AHLs 具有更好的淬灭效果。

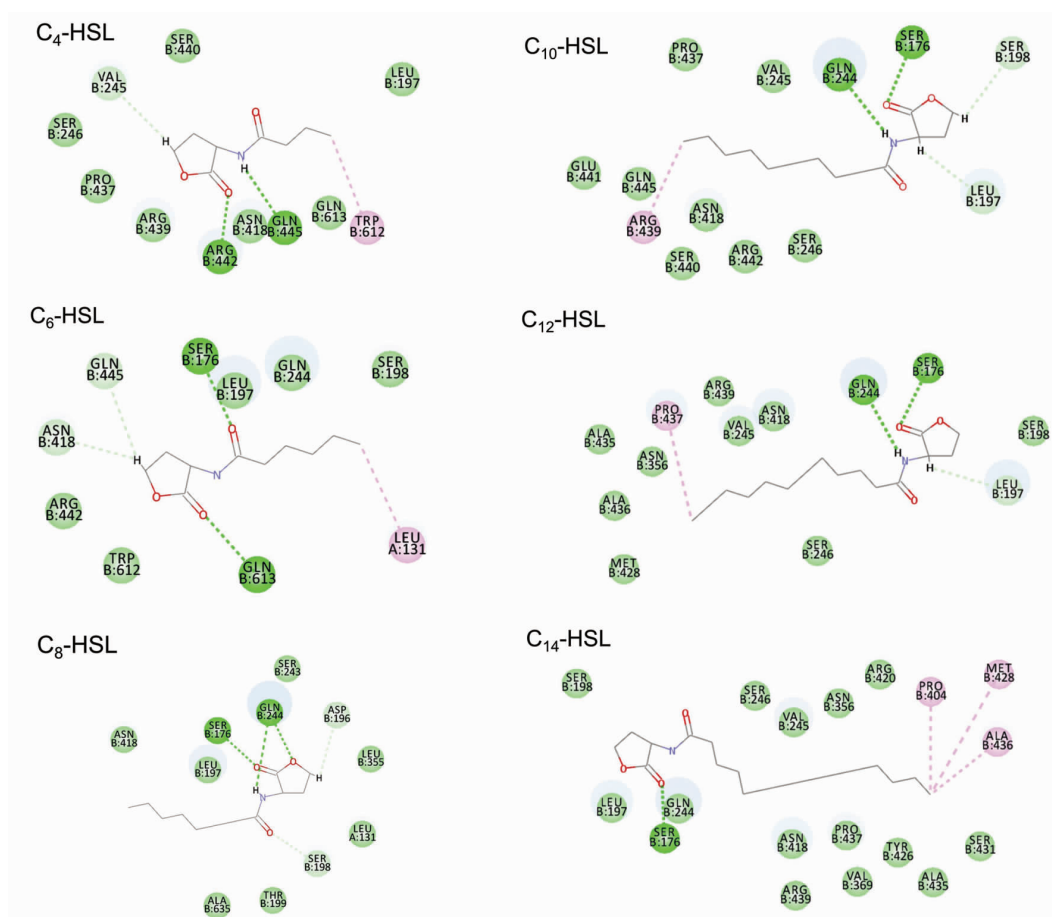


图 4 PF-1240 与不同 AHLs 的分子对接 2D 图

Fig.4 2D diagram of molecular docking between PF-1240 and different AHLs

表 2 PF-1240 与不同 AHLs 结合位点的氨基酸残基

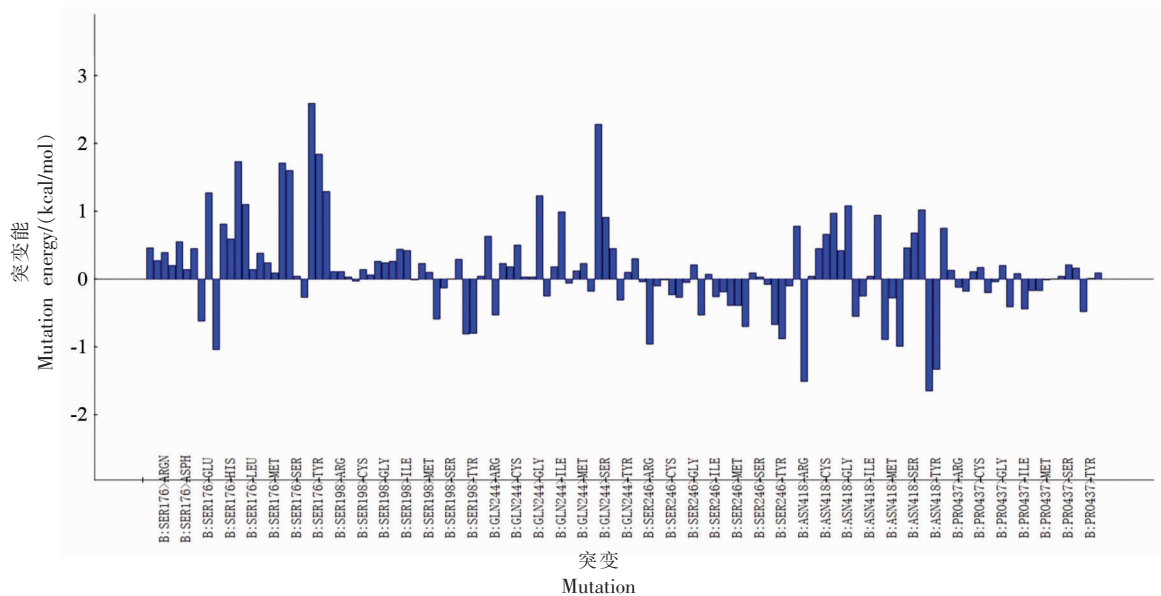
Table 2 Amino acid residues of PF-1240 with different AHLs binding sites

AHLs	对接能量	结合口袋氨基酸残基
C ₄ -HSL	-20.9405	Leu197 Val245 Ser246 Asn418 Pro437 Arg439 Ser440 Arg442 Gln445 Gln613
C ₆ -HSL	-29.0439	Leu131 Ser176 Leu197 Ser198 Gln244 Asn418 Arg442 Gln445 Trp612 Gln613
C ₈ -HSL	-30.4758	Leu131 Ser176 Asp196 Leu197 Ser198 Thr199 Ser243 Gln244 Asn418 Ala635
C ₁₀ -HSL	-37.0665	Ser176 Leu197 Ser198 Gln244 Val245 Ser246 Asn418 Pro437 Arg439 Ser440 Glu441 Arg442 Glu445
C ₁₂ -HSL	-38.4831	Ser176 Leu197 Ser198 Gln244 Val245 Ser246 Asn356 Asn418 Met428 Ala435 Ala436 Pro437 Arg439
C ₁₄ -HSL	-45.1476	Ser176 Leu197 Ser198 Gln244 Val245 Ser246 Asn356 Val369 Pro404 Asn418 Arg420 Tyr426 Met428 Ser431 Ala435 Ala436 Pro437 Arg439

2.4 PF-1240 虚拟突变

对蛋白质的结构进行分析,寻找能与底物结合的口袋,并预测出可能的结合位点后,基于酶催化口袋的理化性质及其亲疏水性,理性选取某一特定的氨基酸密码子作为突变位点,重塑酶催化口袋,有助于提高酶对底物的适应性^[9]。根据表2中各个结合位点的保守氨基酸及其亲水指数,选择了Ser176、Leu197、Ser198、Gln244、Val245、Ser246、

Asn418、Pro437和Arg439进行虚拟饱和单点突变。如图5所示,不同突变位点突变后的结合能不同,结合能越低说明突变效果越好,可以看出将418位的天冬酰胺突变为色氨酸后,其结合能最低,为-1.65 kcal/mol,说明突变后酶与底物结合更稳定,作用力更强。然而,这只是虚拟突变的结果,具体的突变效果还需要试验验证。



Summary

130 Single Mutations generated for QQ3.M0002

Index	Mutation	Mutation Energy (kcal/mol)	Effect
1	B::ASN418>TRP	-1.65	STABILIZING
2	B::ASN418>ARG	-1.51	STABILIZING
3	B::ASN418>TYR	-1.33	STABILIZING
4	B::SER176>GLUH	-1.04	STABILIZING
5	B::ASN418>PHE	-0.99	STABILIZING
126	B::SER176>PHE	1.71	DESTABILIZING
127	B::SER176>HSC	1.73	DESTABILIZING
128	B::SER176>TYR	1.84	DESTABILIZING
129	B::GLN244>PRO	2.28	DESTABILIZING
130	B::SER176>TRP	2.59	DESTABILIZING

The table reports up to 5 lowest energy and up to 5 highest energy mutations. For the full list of results click the links in the Results section.

图5 PF-1240的虚拟突变

Fig.5 Virtual mutation of PF-1240

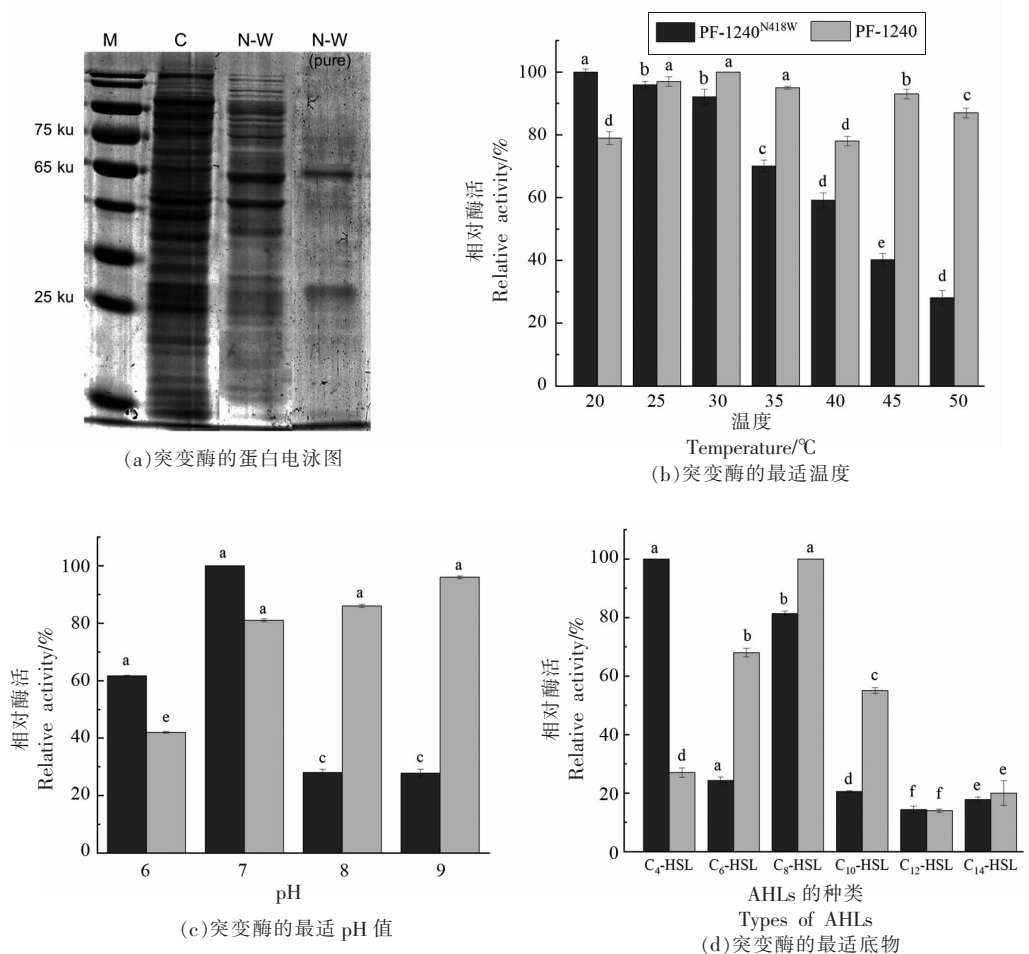
2.5 PF-1240^{N418W}的表达及其酶学性质分析

图6a为突变酶PF-1240^{N418W}的蛋白电泳图,其中M为蛋白Maker;C为对照;N-W为粗蛋白;N-W(pure)为纯化后的蛋白,从图6a可以看出,成功表达出了具有大小两个亚基(一个低于65

ku,一个低于25ku)的PF-1240突变酶,其实际的大小与野生酶的大小相同,说明突变酶构建成功。使用BSA蛋白质浓度测定试剂盒测定PF-1240的浓度,从150mL细菌溶液中提取酶,稀释后测定蛋白质浓度,纯化后的酶浓度可达到43.48 μg/

mL。在之前的研究中,PF-1240 的最适温度为 30 °C,经过突变后,从图 6b 中可以看出突变酶的最适温度有所降低,变为 20 °C,并且在低温下也有较好的活性,这就意味着突变酶的低温适应性有所提高,为将来在低温水产保鲜中的应用提供了理论基础。此外,突变酶的最适 pH 值也发生了改变(图 6c),从 pH 9 变成了 pH 7。当 pH>7 时,突

变酶的活力开始减小,说明 Asn418 位点的突变削弱了酶对碱性条件的抵抗能力。PF-1240 的最适底物也发生了改变,由 C₈-HSL 变为了 C₄-HSL(图 6d),拓展了酶对短链 AHLs 的适应性,然而对长链 AHLs 的降解能力相对减小,说明 Asn418 是酶结合口袋中决定底物特异性的一个关键氨基酸。



注:图 a 中,M 为蛋白 Maker,C 为对照,N-W 为粗蛋白,N-W(pure)为纯化后的蛋白。

图 6 PF-1240^{N418W} 的表达及其酶学性质

Fig.6 Expression and enzymatic properties of PF-1240^{N418W}

2.6 PF-1240^{N418W} 对蜂房哈夫尼亚菌 QS 的抑制效果

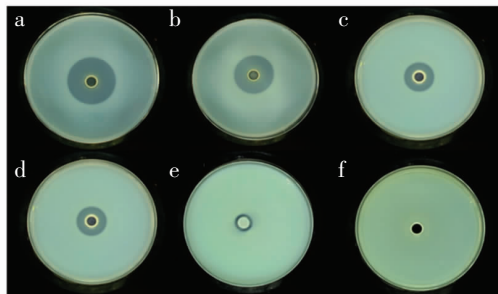
生物膜由细菌分泌的胞外聚合物、核酸、蛋白质和脂质组成,可抵御极端环境,对细菌起到保护作用^[25-26]。有研究表明,生物膜是导致食品变质的直接原因,以细菌为主体形成的生物膜容易存在于液体与空气的交界面以及黏附在固体表面,比浮游细菌更难清除,造成食品加工设备的污染,进

一步污染新鲜的食物,最终加剧食品的腐败^[27-28]。QQ 酶通过防止细菌产生或感知 QS 信号以及降解 QS 信号来抑制生物膜的形成^[29]。为进一步验证突变酶对 QS 抑制效果的提升,更好的与野生酶的作用进行对比,探究了不同质量浓度的突变酶对蜂房哈夫尼亚菌生物膜和其运动性的影响,结果如图 7 所示。

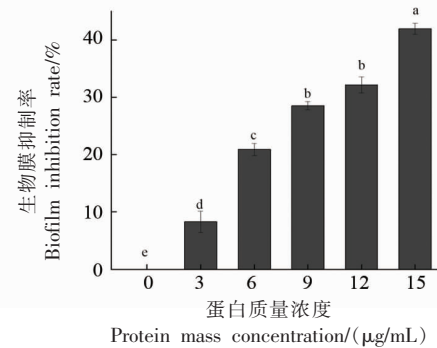
胞外蛋白酶是细菌的主要致病因子,从图 7a

可知随着加入的 QQ 酶质量浓度增加,透明圈逐渐减小,当添加量为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时,胞外蛋白酶的活性被完全抑制。如图 7b 所示,生物膜的抑制率随着酶质量浓度的增加而逐渐增强,显示出与野生酶相同的抑制趋势,当突变酶质量浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$ 时,生物膜的抑制率为 41.93%,在抑制等量生物膜的情况下,突变酶比野生酶的用量降低了近 20%,说明突变后酶活力有所提升,是一个比较理想的突变效果。细菌表面迁移与群集和泳动

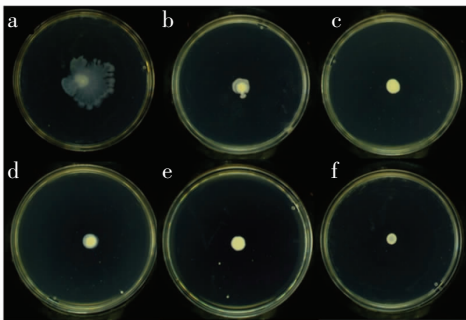
有关,调节这些行为的基因受 QS 系统调控^[30],从图 7c 和 7d 可看出蜂房哈夫尼亚菌的群集和泳动能力随着突变酶质量浓度的增加逐渐减弱,并且相比野生酶,突变酶对蜂房哈夫尼亚菌运动性的削弱能力更显著。降低环境中 AHLs 的含量,可以抑制细胞外蛋白酶的表达,削弱细菌间的信息交流,从而影响细菌的运动性。总体来看,突变酶对蜂房哈夫尼亚菌的 QS 依然有抑制效果,并且抑制能力有所增强。



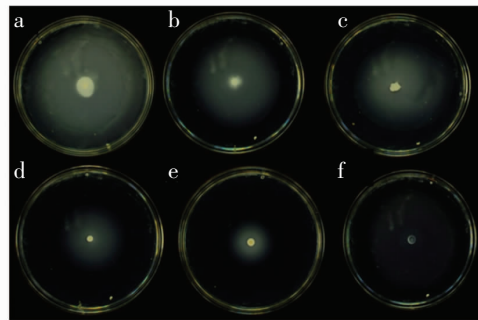
(a) 突变酶对蜂房哈夫尼亚菌蛋白酶的影响



(b) 突变酶对生物膜抑制率的影响



(c) 突变酶对群集的影响



(d) 突变酶对泳动的影响

注:图 a,c,d 中分图号 a-f 对应不同质量浓度的 PF-1240(0,5,10,15,20,25 $\mu\text{g/mL}$)。

图 7 不同质量浓度 PF-1240^{N418W} 对 QS 表型的影响

Fig.7 Effects of different mass concentrations of PF-1240^{N418W} on QS phenotype

3 结论

前期研究中发现的 QQ 酶 PF-1240 能够降解不同碳链的 AHLs,抑制蜂房哈夫尼亚菌的 QS^[11]。在此基础上,本文构建了 PF-1240 的三维结构并选择 Asn418 进行定点突变,对突变酶的功能进行验证。结果发现突变酶对短链 AHLs,尤其是 C₄-HSL 显示了较强的淬灭能力。与野生 PF-1240 相比,突变酶在低温条件下仍然保持了较高的酶活性,体现出了较高的低温适应性。突变后的最适

pH 值变为 7,更有助于其在鱼体表面发挥作用,然而其在碱性条件下的活力受到了抑制。对突变酶的 QS 抑制效果进行验证,结果显示对于蜂房哈夫尼亚菌的运动性、生物膜和胞外蛋白酶这些受 QS 调控的腐败表型,突变酶比野生酶都有更强的抑制效果,说明 Asn418 是影响 PF-1240 酶学性质及酶活性的关键氨基酸,适当对其进行突变有助于朝着更加有助于酶实际应用的方向进化,为今后 PF-1240 进一步改造奠定理论基础。

参 考 文 献

- [1] QU G, BI Y X, LIU B B, et al. Unlocking the stereoselectivity and substrate acceptance of enzymes: Proline-induced loop engineering test[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2022, 61(1): 202110793.
- [2] 曲戈, 赵晶, 郑平, 等. 定向进化技术的最新进展[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(1): 1-11.
QU G, ZHAO J, ZHAO P, et al. Recent advances in directed evolution[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(1): 1-11.
- [3] ZHU S Q, WU H H, ZENG M Y, et al. The involvement of bacterial quorum sensing in the spoilage of refrigerated *Litopenaeus vannamei*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 192: 26-33.
- [4] ZHAO X H, YU Z X, DING T. Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(3): 425.
- [5] FONG J, ZHANG C D, YANG R L, et al. Combination therapy strategy of quorum quenching enzyme and quorum sensing inhibitor in suppressing multiple quorum sensing pathways of *P. aeruginosa*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 1155.
- [6] 窦懿. 鲍曼不动杆菌群体感应系统信号分子 *N*-酰基高丝氨酸内酯的鉴定以及与耐药基因相关性的研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2015.
DOU Y. Study on *N*-acyl homoserine lactones of *Acinetobacter baumannii* quorum sensing and its relation to drug resistant gene expression[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2015.
- [7] WATERS C M, BASSLER B L. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2005, 21: 319-346.
- [8] SIKDAR R, ELIAS M. Quorum quenching enzymes and their effects on virulence, biofilm, and microbiomes: A review of recent advances[J]. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2020, 18(12): 1221-1233.
- [9] LI Y H, LAU P C, LEE J H, et al. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(3): 897-908.
- [10] WANG D F, CHEN H T, LI J R, et al. Screening and validation of quorum quenching enzyme PF2571 from *Pseudomonas fluorescens* strain PF08 to inhibit the spoilage of red sea bream filets[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2022, 362: 109476.
- [11] SHEN Y, CUI F C, WANG D F, et al. Quorum quenching enzyme (PF-1240) capable to degrade AHLs as a candidate for inhibiting quorum sensing in food spoilage bacterium *Hafnia alvei*[J]. *Foods*, 2021, 10(11): 2700.
- [12] 刘景云, 李婷婷, 王当丰, 等. 丹皮酚对格氏沙雷菌群体感应现象及生物被膜形成的影响[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(8): 25-34.
LIU J Y, LI T T, WANG D F, et al. Effect of paeonol on quorum sensing phenomenon and biofilm formation of *Serratia grimesii*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(8): 25-34.
- [13] 梅永超. 大菱鲆源蜂房哈夫尼亚菌群体感应基因 *halI/R* 的克隆、表达及功能初析[D]. 锦州: 渤海大学, 2019.
MEI Y C. Cloning, expression and function analysis of quorum sensing genes *halI/R* of *Hafnia alvei*[D]. Jinzhou: Bohai University, 2019.
- [14] 蓝瑶. 基于半理性设计和理性设计的腈水合酶酶活及其热稳定性的改造[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
LAN Y. Modification of nitrile hydratase activity and thermal stability based on semi-rational design and rational design[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [15] 齐芪. 毛白杨 CRTISO 的 ABA 顺反异构功能与酶学特性研究-附: 植物激素等次生代谢物分析方法[D]. 北京: 北京林业大学, 2019.
QI Q. NovoFunction of PtCRTISO in cis-ABA to trans-ABA isomerization and studies on instrumental analytical methodology of plant secondary metabolites and all-type phytohormones [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2019.
- [16] 杨本军, 武明飞, 徐涛. 连翘苷调控炎症的抑制作用及机制研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(7): 1093-1097.
YANG B J, WU M F, XU T. Effect and mechanism of phillyrin on inhibiting inflammation[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2020, 55(7): 1093-1097.
- [17] 朱金帅, 李秋莹, 于昕睿, 等. 酚酸对水产品腐败希瓦氏菌的抑菌作用[J]. *食品与机械*, 2020, 36

- (6): 133–137.
- ZHU J S, LI Q Y, YU X R, et al. Antibacterial effect of phenolic acid on *Shewanella putrefaciens* from aquatic product[J]. Food & Machinery, 2020, 36(6): 133–137.
- [18] LI T T, CUI F C, BAI F L, et al. Involvement of acylated homoserine lactones (AHLs) of *Aeromonas sobria* in spoilage of refrigerated turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. Sensors, 2016, 16(7): 1083.
- [19] 王松莹. 苜蓿盲蝽气味结合蛋白 AlinOBP5 的结构预测及结合特性[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- WANG S Y. 3-D structure prediction and binding characterization of odorant binding protein AlinOBP5 in *Adelphocoris lineolatus* [D]. Beijing: Beijing Academy of Agricultural Sciences, 2012.
- [20] WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W296–W303.
- [21] XIANG Z X. Advances in homology protein structure modeling [J]. Current Protein & Peptide Science, 2006, 7(3): 217–227.
- [22] 孙晓佳. 大菱鲆源温和气单胞菌群体感应 *luxI/luxR* 基因表达及其抑制剂的研究[D]. 锦州: 渤海大学, 2020.
- SUN X J. Study on quorum sensing *luxI/luxR* gene expression and its inhibitors in *Aeromonas sobria* isolated from turbot[D]. Jinzhou: Bohai University, 2020.
- [23] 陈笑, 李江华, 刘松, 等. 采用饱和突变提高谷氨酰胺酶的热稳定性[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(5): 1–7.
- CHEN X, LI J H, LIU S, et al. Improved thermal stability of glutaminase through saturated mutations [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(5): 1–7.
- [24] 丁婷. 基于荧光假单胞菌群体感应的抑制剂筛选及抑制机理探究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- DING T. Screening and inhibitory mechanism of quorum sensing inhibitors of *Pseudomonas fluorescens* P07[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [25] SOLANO C, ECHEVERZ M, LASA I. Biofilm dispersion and quorum sensing[J]. Current Opinion in Microbiology, 2014, 18: 96–104.
- [26] YIN W, WANG Y T, LIU L, et al. Biofilms: The microbial "protective clothing" in extreme environments[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(14): 3423.
- [27] DE FARIA A F, TEODORO MARTINEZ D S, MEISTER MEIRA S M, et al. Anti-adhesion and antibacterial activity of silver nanoparticles supported on graphene oxide sheets [J]. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2014, 113: 115–124.
- [28] RASAMIRAVAKA T, LABTANI Q, DUEZ P, et al. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms[J]. Biomed Research International, 2015, 2015: 759348.
- [29] BZDRENGA J, DAUDE D, REMY B, et al. Biotechnological applications of quorum quenching enzymes[J]. Chemico-Biological Interactions, 2017, 267: 104–115.
- [30] COLEMAN S R, PLETZER D, HANCOCK R E W. Contribution of swarming motility to dissemination in a *Pseudomonas aeruginosa* murine skin abscess infection model[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2020, 224(4): 726–733.

Semi-Rational Design of the Quorum Quenching Enzyme PF-1240 and Its Inhibition of Quorum Sensing in *Hafnia alvei*

Cui Fangchao¹, Ning Yuanyuan¹, Shen Yue¹, Wang Dangfeng¹, Tan Xiqian¹,
Li Qiuying¹, Li Jianrong^{1*}, Li Tingting^{2*}

¹College of Food Science and Engineering, Bohai University; National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, China Light Industry Key Laboratory of Marine Fish Processing, Jinzhou 121013, Liaoning

²College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning)

Abstract Quorum sensing (QS) is a process by which bacteria communicate with each other through signaling molecules

such as *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs). *In vitro* degradation of AHLs by the Quorum quenching (QQ) enzyme is an effective means of inhibiting the production of spoilage factors by spoilage bacteria. To further enhance the activity and usefulness of the QQ enzyme PF-1240, a three-dimensional prediction model of enzyme PF-1240 was constructed by homology modeling and molecular docked with different AHLs, based on which the key sites affecting the enzyme activity were screened by virtual mutation and Asn418 was identified as the best mutation site, and then the mutant was expressed to analyze its enzymatic properties and QS inhibition effect. The results showed that the mutant enzyme had a strong quenching ability for short-chain AHLs, and its optimum pH changed to 7 and the optimum temperature changed from 30 °C to 20 °C. In addition, the mutant enzyme effectively reduced the swarming and swimming ability of *Hafnia alvei*, and the biofilm inhibition rate was 41.93% when its mass concentration was 15 µg/mL, which was much better than wild enzyme. This study shows that Asn418 is the key amino acid affecting the enzymatic properties and enzymatic activity of PF-1240, which provides a theoretical basis for the rational design of the enzyme PF-1240 and its application in the field of fish preservation.

Keywords quorum sensing; *N*-acylhomoserine lactone acylase; molecular docking; virtual mutation; aquatic product corruption