

项目编号	
------	--

# 华东理工大学

## 大学生创新创业训练计划创新训练类 项目申报书

项目名称	PLP 依赖酶 CsmE 的催化机理解析
------	----------------------

项目所属一级学科	生物工程
----------	------

项目负责人	王孜齐
-------	-----

项目组成员	周锦灿、谢宇峰
-------	---------

指导教师	刘雪婷（教授）
------	---------

所在学院	生物工程学院
------	--------

填报日期	2024.11.7
------	-----------

华东理工大学创新创业教育中心制表

## 填表说明

一、本表要求按顺序逐项填写，项目要实事求是，讲究诚信，不能有雷同，表达要明确、严谨。空缺项要填“无”。一律用 A4 纸打印，于左侧装订成册。

二、申请参加本项目团队人数不得超过 4 人（1 人为立项负责人，参与合作研究者 1-3 人）。

三、申请参加本项目的个人或团队必须聘请教师作为项目指导教师，并请指导教师在申请书上签名。

四、项目执行周期一般为 1 年半，允许项目开展 1 年后申请提前结题。

五、本表由指导教师所在院系初审，签署意见后，由学院统一保存。

## 一、项目基本情况

项目名称		PLP 酶 CsmE 的催化机理解析				
项目所属一级学科（可以是一种或多种跨学科）					工学	
项目来源		<input type="checkbox"/> 学生自选课题		<input type="checkbox"/> 导师科研项目		
		<input type="checkbox"/> 与专业实践相关		<input type="checkbox"/> 与课程设计相关		
		是否以 USRP 课题为基础 <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 如果是，请填写 USRP 课题名称：				
成果导向		<input type="checkbox"/> 以参与科创竞赛为导向，请填写竞赛名称： <input type="checkbox"/> 以发表学术论文或专利为导向				
负责人	姓名	学号	所在院系	专业	手机	E-mail
	王孜齐	23012320	生物工程学院	食品质量与安全	18721753089	2680015338@qq.com
参与组员	周锦灿	23012260	生物工程学院	生物技术	18757386393	3122449783@qq.com
	谢宇峰	23012387	生物工程学院	生物工程	18057994768	2496083325@qq.com
指导教师	姓名	刘雪婷	所在院系	生物工程学院		
	联系电话	021-64253020	手机	13764549729	E-mail	liuxt2010@126.com
	职务/职称	教授		主要研究方向	微生物来源的活性天然产物研究；利用合成生物学策略合成“非天然”的活性天然产物	

## 二、项目申请理由

### 项目背景和意义

(选题的来源, 国内外同类研究工作的现状、方法、难点等, 前期准备工作)

#### 1. 选题来源

天然产物在药物研发中占据着重要地位, 然而随着研究的深入, 已知化合物的重复发现成为制约该领域发展的关键问题。在微生物中, 天然产物的生物合成基因成簇分布, 这为基因组挖掘提供了可能。真菌作为天然产物的重要来源, 真菌来源的倍半萜类化合物的生物合成备受关注。在对真菌倍半萜生物合成的研究中, 我们开发了一系列生物信息学算法来挖掘新颖的倍半萜合酶及其后修饰酶。在这一过程中, 我们发现了一类尚未被报道的可催化倍半萜生物合成的 PLP 依赖酶。基于此, 我们确定了“PLP 依赖酶 CsmE 的催化机理解析”这一研究课题, 旨在深入探究该酶在倍半萜类化合物生物合成中的催化机制, 为天然产物的合成研究提供新的思路 and 理论依据。

#### 1.1 生物合成基因簇的挖掘

天然产物种类繁多, 结构多样, 但其在生物体内的合成基本遵循着相似的原则, 先由生物合成核心酶 (Core enzyme) 将简单的前体如氨基酸, 短链羧酸, 异戊二烯链等催化生成结构复杂的骨架, 再由后修饰酶 (Post-modification enzyme) 在骨架上进行修饰, 进一步拓宽其化学多样性。

在微生物中, 绝大多数情况下编码这些天然产物合成酶的生物合成基因会在基因组上聚集, 形成生物合成基因簇 (Biosynthetic gene cluster, BGC), 而在植物和动物中, 这些基因大都分散在基因组中, 在真菌和植物中, 有时候也会出现一部分生物合成基因成簇的情况。微生物中生物合成基因成簇的性质使得我们对其进行系统挖掘成为了可能, 通常情况下, 只要在基因组中定位到生物合成核心基因, 那么就可以定位到其所在的生物合成基因簇, 进而挖掘到生物合成途径上的一系列修饰基因。同时, 基因簇中也有可能含有生物合成相关的其他基因的如调控基因, 抗性基因等, 这使我们有可能对基因簇的表达进行调控及对其产物的活性进行预测。

天然产物具有结构新颖而多变, 活性广泛等诸多优点, 但随着研究的不断深入, 研究者也遭遇了诸多的问题。其中一大问题就是相似结构化合物的重复发现, 自 1950 年后, 随着研究人员的增多和技术的进步, 每年分离到的化合物数量逐年上涨, 但化合物的结构新颖程度却逐年下降。造成这一问题的原因之一是在上个世纪, 天然产物研究领域多数采用“自上而下”的策略, 即先通过活性追踪分离发现活性化合物, 再鉴定其结构, 这就导致了大量已知化合物的重复发现。但随着基因测序技术的快速发展, “自下而上”的策略也随之出现, 即通过生物信息学方法, 在基因组中寻找可能催化新颖天然产物的生物合成相关基因, 再有针对性的分离对应的化合物, 这种策略被称为“基因组挖掘”在微生物中天然产物的生物合成基因具有成簇的特性, 使其在基因组挖掘领域相较植物与动物有得天独厚的优势。

在调取生物合成基因簇方面，基因组挖掘领域的研究者在近 20 年期间开发了十余种算法，用于不同物种，不同类型生物合成基因簇的调取，这些软件根据原理大致可以分为四类：一是基于生物合成核心基因的基因簇调取，二是基于生物合成基因簇中蛋白结构域结构特征的调取，三是基于系统发育进化的调取，四是基于比较基因组学的调取。其中第一种方法调取到的基因簇准确度高，但只能调取到已研究过的生物合成基因簇类型，第二、三、四种方法调取出的基因簇会有较多的假阳性，但是可以调取到全新类型，完全未被研究过的基因簇类型。

## 1.2 常见的 PLP 依赖酶结构

基于蛋白家族出现频率的新颖后修饰酶挖掘算法的开发，首次发现了 PLP 依赖酶可催化倍半萜生物合成：前期课题组开发了一款基于蛋白家族出现频率的算法，用于定位催化新颖反应的其它后修饰酶家族。通过对倍半萜生物合成基因簇上出现的所有基因进行统计分析，前期课题组筛选到了 PLP 依赖酶，这类后修饰酶家族尚未报道可以催化倍半萜的生物合成。通过对含 PLP 依赖酶的基因簇进行异源表达，课题组前期分离鉴定了两个新颖杂萜，同时推测 PLP 依赖酶可以催化氨基酸和萜类骨架之间形成醚键，这也是一条全新的杂萜生物合成途径。本课题聚焦于 PLP 依赖酶 CsmE 的催化机理解析研究。

目前常见的 PLP 依赖酶结构还有：

1. 胱硫醚  $\beta$ -合酶 (Cystathionine  $\beta$ -synthase)：属于折叠类型 II，人类的胱硫醚  $\beta$ -合酶含有三个结构域，其 N 末端结构域有一个浅口袋用于结合血红素，催化核心含有 CXXC 氧化还原酶基序，C 末端调节结构域有一个由两个串联 CBS 基序组成的 Bateman 模块，形成两个结合位点用于结合 AdoMet。基础状态下，一个亚基的调节结构域会阻挡相邻亚基的活性位点，结合 AdoMet 后，调节结构域移动，使活性位点开放。

2. 真核生物鸟氨酸脱羧酶 (Eukaryotic ornithine decarboxylase)：属于折叠类型 III，人类鸟氨酸脱羧酶结合 AntizymeI 后形成异二聚体，两个基础降解元件暴露，导致泛素非依赖性的蛋白酶体降解。一个蛋白酶敏感环定位活性位点残基用于催化，活性位点的 PLP 和赖氨酸残基在催化中起重要作用。

3. 赖氨酸 5,6-氨基变位酶 (Lysine5,6-aminomutase) 和赖氨酸 2,3-氨基变位酶 (Lysine2,3-aminomutase)：赖氨酸 5,6-氨基变位酶活性形式为  $\alpha_2\beta_2$  四聚体，可与另一种称为 E2 成分的蛋白质相互作用实现再活化和 ATP 调节。赖氨酸 2,3-氨基变位酶使用三种辅因子 (PLP、AdoMet 和 [4Fe - 4S]<sup>+</sup>) 进行催化，AdoMet 和 [4Fe - 4S]<sup>+</sup> 共同作用形成腺苷自由基，但这一步受 4Fe - 4S 簇形成和还原到 +1 状态的限制，与还原蛋白相互作用可激活赖氨酸 2,3-氨基变位酶。

## 1.3 PLP 依赖酶的催化反应

PLP 依赖酶虽未见在萜类的生物合成中有报道，但在其它天然产物的生物合成中非常常见，其主要催化含氮天然产物的生物合成，我们推测其可能催化含氮杂萜的生物合成。PLP 依赖酶可以以 PLP 为辅因子，以氨基酸、含氧酸和胺等分子为底物，催化转胺，克莱森缩合， $\beta$  消除， $\beta$  取代， $\gamma$  消除， $\gamma$  取代，异构化及脱羧等反应，在天然产物的生物合成中也起至关重要的作用，可以极大地拓宽天然产物骨架和官能团的多样性。

PLP 依赖酶虽然催化的反应极其多样，但其催化机制大体相同，PLP 作为辅因子，会和酶口袋中的赖氨酸以希夫键相连，在发生反应时，底物中的氮原子会与 PLP 结合从而形成底物-PLP 加合物，这一活泼的中间体可能会在不同位置发生断键从而催化不同的反应，同时这一中间体也可能和其它底物分子反应。而在这一过程中，PLP 主要起稳定电子云的作用。（见图 1）

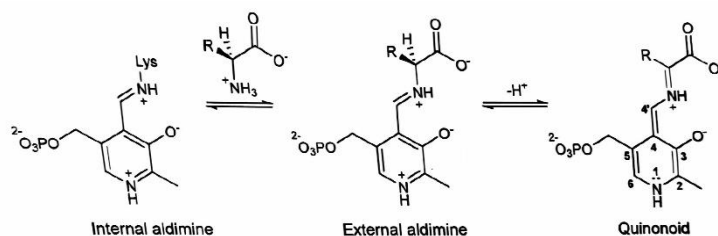


图 1 PLP 依赖酶的催化机制

PLP 依赖酶的催化机制决定了其底物一定含有氮原子，而倍半萜分子在骨架的合成及后续氧化过程中都不涉及到氮原子的引入，所以推测如果 PLP 依赖酶如果在萜类的生物合成中起作用，可能负责将含氮的底物，比如氨基酸链接到萜类骨架上从而形成杂萜。为了确定具体进行异源表达的基因簇，课题组前期首先调取了所有含 PLP 依赖酶的基因簇，并使用 BiG-SCAPE 进行聚类分析（见图 2）。

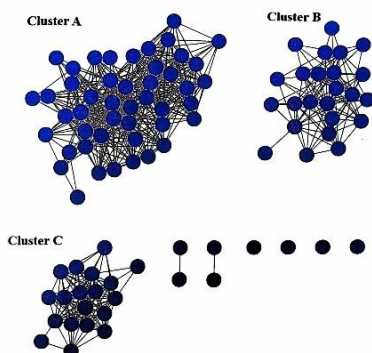


图 2 含 PLP 依赖酶的基因簇 BiG-SCAPE 聚类

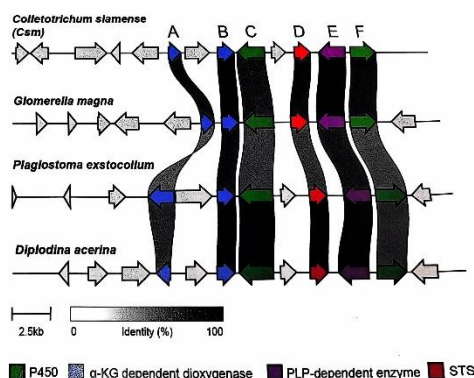


图 3 C 家族中的生物合成基因簇

在 C 家族中的基因簇中（见图 3），保守的基因除 PLP 依赖酶及倍半萜合酶外，还存在一系列的氧化还原酶包括单核非血红素铁 /  $\alpha$ -酮戊二酸依赖氧化酶及细胞色素 P450 酶，其中两个单核非血红素铁 /  $\alpha$ -酮戊二酸依赖氧化酶及两个细胞色素 P450 酶在一系列基因簇中比较保守，该基因簇中含有丰富的氧化还原酶，有可能行使生物催化的功能，所以从中选择一条生物合成基因簇进行异源表达以初步确定 PLP 依赖酶的功能。

在来源于 C 家族的基因簇中，由于 *Colletotrichum siamense* 菌株在库，可以通过 PCR 快速，低成本地获取生物合成基因，所以我们挑选了来源于 *Colletotrichum siamense* 的基因簇，并将其命名为 *Csm* 基因簇，在这条基因簇上，除了在 C 家族一系列基因簇中比较保守的倍半萜合酶，PLP 依赖酶，两个细胞色素 P450 酶及两个单核非血红素铁 /  $\alpha$ -酮戊二酸依赖氧化酶外（*CsmABCDEF*），还存在另一个在其它同源基因簇中出现频率较低的细胞色素 P450 酶及短链脱氢酶（*CsmGH*）。（见表 1）

表 1 *Csm* 生物合成基因簇的注释

	Length	Pfam	Homologous protein	Identity	Similarity
A	270		Hydroxylase/desaturase CTB9	30.96	49.47
G	450	p450	Cytochrome P450 monooxygenase ORF9	60.61	75.52
B	354	2OG-FeII_Oxy	$\alpha$ -KG-dependent dioxygenase FG08081	32.18	51.42
C	516	p450	Cytochrome P450 monooxygenase ORF11	54.63	73.57
H	301	adh_short	Short-chain dehydrogenase/reductase prx4	53.18	68.56
D	341	Terpene_syn_C_2	Aristolochene synthase	62.33	76.67
E	520	Cys_Met_Meta_PP	Homocysteine synthase	52.73	73.4
F	520	p450	Cytochrome P450 monooxygenase AN1598	34.44	54.75

不同于氧化还原酶大部分都是负责在骨架上进行氧化反应,可能的产物分子量易于预测, PLP 依赖酶催化的反应类型众多,其产物的分子量难以预测,为了能更准确的从发酵产物数据中寻找找到 PLP 依赖酶的催化产物,首先将 *Csm* 基因簇上的 PLP 依赖酶与所有真菌来源已鉴定功能的 PLP 依赖酶共同进行系统发育分析,我们发现在进化树中(见图 4),本课题 PLP 依赖酶所在的蓝色分支中,所有已鉴定功能的 PLP 依赖酶均以 L-乙酰-O-高丝氨酸为底物, L-乙酰-o-高丝氨酸通过  $\gamma$ -取代,将另一底物与高丝氨酸相,所以我们推测产物应为在倍半萜上连接一个高丝氨酸,分子量应为奇数,大于 300,且碳原子数大于 19。

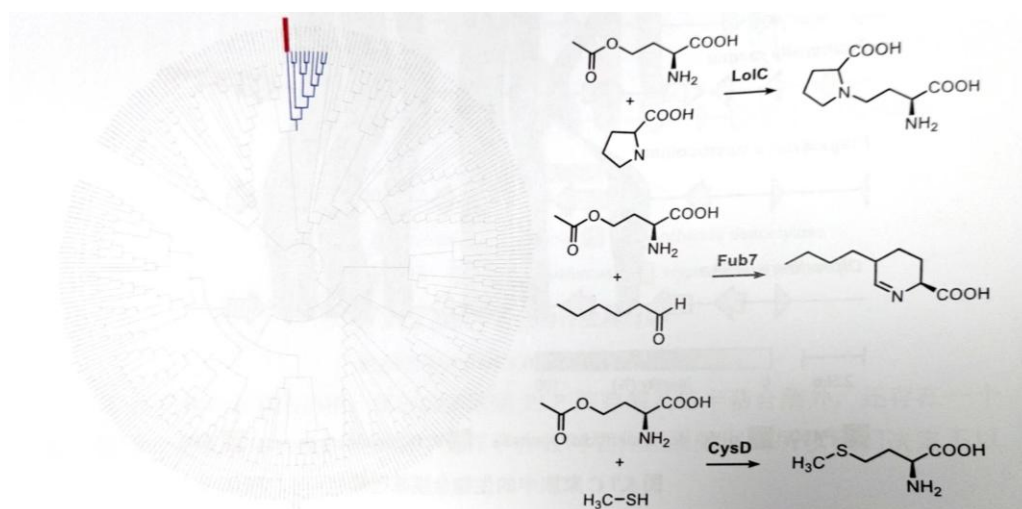


图 4 PLP 依赖酶的系统发育分析及蓝色分支中 PLP 依赖酶催化的反应

虽然 *CsmHI* 并不保守,但其距离倍半萜合酶距离较近,仍有可能参与化合物的生物合成,所以我们决定也将这两个基因转入米曲霉,为了快速确定 PLP 依赖酶在生物合成中是否起作用及生物合成的最小生物合成基因簇,首先构建了四个米曲霉转化子:*A.oryzae-CsmABCDEF* (六基因含 PLP 依赖酶), *A.oryzae-CsmABCDF* (五基因不含 PLP 依赖酶), *A.oryzae-CsmABCDEFGH* (八基因含 PLP 依赖酶) 及 *A.oryzae-CsmABCDFGH* (七基因不含 PLP 依赖酶),在对发酵产物进行检测时,我们发现相较于不含 PLP 依赖酶的转化子,包含 PLP 依赖酶的转化子多出了两个分子量为 363( $C_{21}H_{32}O_4N$ )及 379( $C_{21}H_{32}O_5N$ )的差异峰,这一分子量符合的推测。

包含 *CsmHI* 的八基因转化子与六基因转化子均产生了相同的差异峰,这一系列结果说明 PLP 依赖酶参与了生物合成并向倍半萜骨架上引入氨基酸生成了杂萜,且 *CsmHI* 未

参与这两个杂萜的生物合成。由于倍半萜骨架的氧化程度较低，我们推测不需要四个氧化酶对骨架进行氧化，为了确定该杂萜的最小生物合成基因簇，我们接下来决定将 4 个氧化酶与倍半萜合酶及 PLP 依赖酶分别组合并转入米曲霉中，以此确定参与杂萜生物合成的氧化酶。

构建了四个米曲霉转化子：*A.oryzae-CsmADE*（六基因含 PLP 依赖酶），*A.oryzae-CsmBDE*（五基因不含 PLP 依赖酶），*A.oryzae-CsmFDE*（八基因含 PLP 依赖酶）及 *A.oryzae-CsmCDE*（七基因不含 PLP 依赖酶），并对它们的发酵产物进行检测，我们发现只有 *A.oryzae-CsmCDE* 的转化子产生了化合物 C1 和 C2，其余三个三基因转化子均未检测到这两个产物，所以我们推测只有细胞色素 P450 酶 *CsmC* 参与了化合物 C1 和 C2 的生物合成。（见图 5、图 6）

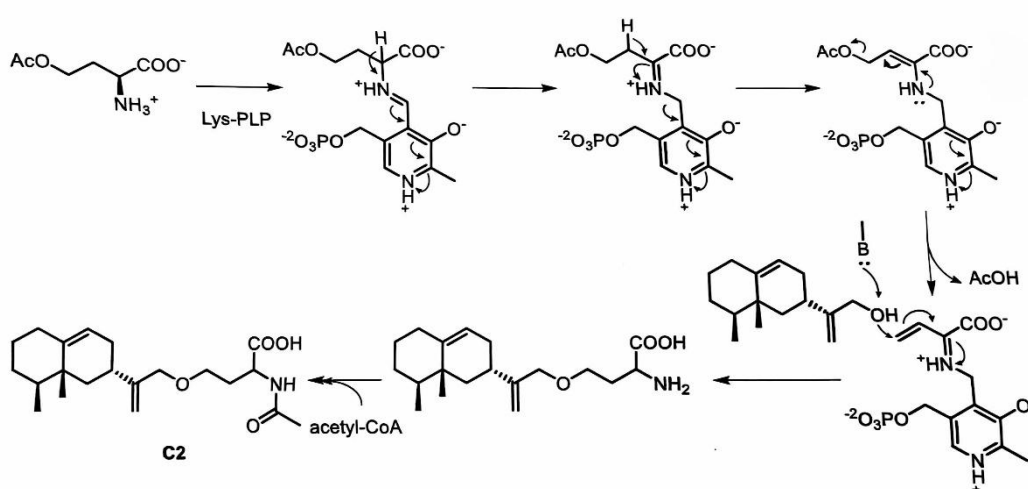


图 5 PLP 依赖酶 CsmE 的催化机制

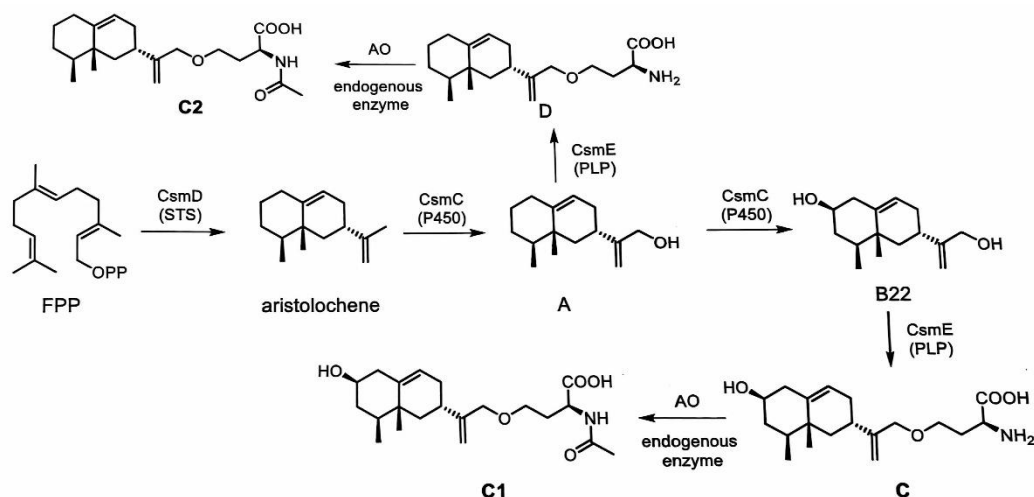


图 6 化合物 C1,C2 的推测生物合成途径

## 2. 国内外同类研究工作的现状

### 2.1 PLP 依赖酶的结构与功能研究

国内外众多研究对 PLP 依赖酶的结构和功能进行了广泛探索。已解析出多种 PLP 依赖酶的晶体结构，如酵母 4-氨基-4-脱氧分支酸裂解酶 (*yeast Abz2*)、赖氨酸脱羧酶

等，这些研究揭示了 PLP 依赖酶的活性中心结构、底物结合模式等重要信息，为理解其催化机制奠定了基础。同时，对 PLP 依赖酶催化的反应类型也有深入研究，包括转胺、克莱森缩合、 $\beta$  消除、 $\beta$  取代、 $\gamma$  消除、 $\gamma$  取代、异构化及脱羧等反应，并且明确了这些反应在天然产物生物合成中的重要作用。

## 2.2 酶催化机理的研究方法

常用的研究方法包括蛋白质结构解析方法（如 X 射线晶体衍射、核磁共振等）、单分子分析检测技术及计算机模拟技术（如量子化学计算、分子动力学模拟等）。这些方法相互结合，从不同层面深入剖析酶的催化机理。例如，通过蛋白质结构解析确定酶的三维结构，再利用量子化学计算方法研究酶与底物的相互作用、反应中间体和过渡态结构等，从而全面理解酶的催化过程。

## 2.3 杂萜生物合成途径

在本课题中，我们开发了基于蛋白家族出现频率的生物信息学算法用来锁定倍半萜生物合成中不寻常的后修饰酶。通过这个算法，我们成功定位到了 PLP 依赖酶。

在本工作前，所有已报道的杂萜生物合成途径可以分为两类，一类需要异戊二烯转移酶将萜类部分加载到非萜类部分上，在生物合成基因簇上会有一个特征性的异戊二烯转移酶，比如杂萜 *pyripyropene A*, *yaminterritrem B* 及 *mycophenolic acid* 等的生物合成。另一类首先由萜类合酶环化生成萜类骨架，然后由 PKS 或 NRPS 合成非萜类部分，最终由一个连接酶将两者连接在一起，在生物合成基因簇上会同时存在萜类合酶及 PKS 或 NRPS，比如 *fumagillin*, *flavunoidine* 及 *aculane A* 等的生物合成。（见图 7）

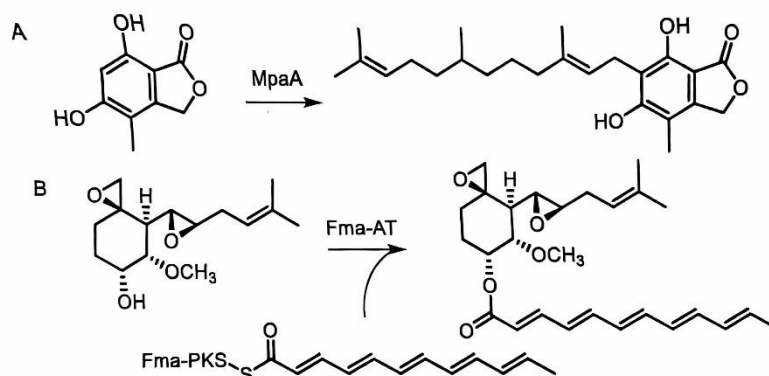


图 7 杂萜的生物合成途径

而在本课题中的杂萜的生物合成方式不同于前两种，是由 PLP 依赖酶将氨基酸基团连接到萜类骨架上，这也是一条全新的杂萜生物合成途径。

通过对含 PLP 依赖酶的基因簇进行异源表达，我们分离鉴定了两个新颖杂萜，并通过串联表达初步解析了其生物合成途径，根据其结构，我们推测 PLP 依赖酶可以催化氨基酸和萜类之间形成醚键从而生成杂萜分子。

## 2.4 酶工程策略推动酶的开发和优化

自然界中存在的酶拥有多种多样的功能，它们已经被应用在工业生产和学术研究中，但其中许多酶的性质和功能还不能完全满足应用需要，通过改造来提升这类酶的某些特性是酶工程的重要任务。酶工程主要包括理性设计、定向进化、半理性设计和人工智能辅助

设计等策略。理性设计方法根据酶的催化机理、结构等先验知识进行改造。定向进化技术通过构建随机突变文库和高通量筛选提升目标酶的稳定性和活性等性质。半理性设计方法借助一系列计算方法构建相比于定向进化更小也更合理的突变文库以降低筛选工作量。人工智能技术在大量数据驱动下可以学习有关蛋白质构成和进化的特征信息。

酶分子的理性设计是利用各种生物化学、生物物理、结构生物学方法获得有关酶分子的结构、性质和功能的信息，并基于已知结构和功能之间的关系，改变酶分子中个别氨基酸残基和结构域改造酶分子，甚至设计并预测酶的空间结构并从头开始设计酶的一级结构，以期获得具有新性状的突变酶。

整合生物化学、结构生物学和计算化学的方法可以为解析 PLP 酶 CsmE 的催化机理提供更全面、深入的理解。通过生物化学方法可以测定酶的活性、底物特异性和抑制剂等信息；通过结构生物学方法可以提供酶的三维结构信息；通过计算化学方法可以提供酶催化反应的理论模型。将这些方法相结合，可以更好地理解 PLP 酶 CsmE 的催化机理，为开发新型药物和生物技术提供理论基础。

### 3.前期准备工作

#### 3.1 文献调研

广泛收集国内外关于 PLP 依赖型酶和 CsmE 的相关文献资料，了解其研究现状、已有的研究方法和成果，梳理 CsmE 研究中的空白点和关键问题，重点关注 PLP 酶 CsmE 相关的文献，收集有关该酶的结构、功能、催化机理等方面的信息，为项目的开展提供具体的研究方向和问题。

#### 3.2 实验材料准备

获取 CsmE 的基因序列，构建合适的表达载体，将其转化到高效表达的宿主细胞（如大肠杆菌）中，通过优化培养条件，提高 CsmE 蛋白的表达量；同时，准备用于蛋白质纯化的试剂和设备，如层析柱、缓冲液等，以便获得高纯度的 CsmE 蛋白用于后续研究。

#### 3.3 技术方法学习与优化

团队成员学习和掌握蛋白质结构解析、酶活性测定、量子化学计算等相关技术方法，针对可能遇到的问题（如蛋白纯化过程中的杂质去除、计算模型的选择和优化等）进行预实验和模拟分析，确保在项目正式开展时能够熟练运用这些技术，并根据实际情况进行优化。

参考文献：<sup>1-28</sup>

1.Percudani, R. & Peracchi, A. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep.* 4, 850–854 (2003).

2.Analysis of Pyridoxal 5'-Phosphate Dependent Enzymes with Molecular Probes, Simulations, and Kinetic Analysis-All Databases. <https://webofscience.clarivate.cn/wos/alldb/full-record/PQDT:61160257>.

3.F, S.-M. et al. Bioinformatic analysis of a PLP-dependent enzyme superfamily suitable for biocatalytic applications. *Biotechnology advances* 33, (2015).

4.Phillips, R. S. Chemistry and diversity of pyridoxal-5'-phosphate dependent enzymes.

BBA-Proteins Proteomics 1854, 1167–1174 (2015).

5. Singh, R. et al. Chemogenomics of pyridoxal 5'-phosphate dependent enzymes. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 28, 183–194 (2013).

6. Ho-Phuong-Thuy, N. et al. Conformational change of organic cofactor PLP is essential for catalysis in PLP-dependent enzymes. *BMB Rep.* 55, 439–446 (2022).

7. Liang, J., Han, Q., Tan, Y., Ding, H. & Li, J. Current Advances on Structure-Function Relationships of Pyridoxal 5'-Phosphate-Dependent Enzymes. *Front. Mol. Biosci.* 6, 4 (2019).

8. Di Salvo, M. L., Fesko, K., Phillips, R. S. & Contestabile, R. Editorial: PLP-Dependent Enzymes: Extraordinary Versatile Catalysts and Ideal Biotechnological Tools for the Production of Unnatural Amino Acids and Related Compounds. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 52 (2020).

9. Mozzarelli, A. & Bettati, S. Exploring the pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes. *Chem. Rec.* 6, 275–287 (2006).

10. Catazaro, J., Caprez, A., Guru, A., Swanson, D. & Powers, R. Functional evolution of PLP-dependent enzymes based on active-site structural similarities. *Proteins* 82, 2597–2608 (2014).

11. Lopez, C., Rios, S. D., Lopez-Santin, J., Caminal, G. & Alvaro, G. Immobilization of PLP-dependent enzymes with cofactor retention and enhanced stability. *Biochem. Eng. J.* 49, 414–421 (2010).

12. Fleischman, N. M. et al. Molecular characterization of novel pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes from the human microbiome. *Protein Sci.* 23, 1060–1076 (2014).

13. Drago, V. N., Dajnowicz, S., Kovalevsky, A. & Mueser, T. C. Neutron Diffraction Studies of PLP-Dependent Enzymes. *Acta Crystallogr. Sect. A* 75, A131–A131 (2019).

14. Kirsch, J. F., Feng, L. & McCarthy, D. L. New developments in PLP-dependent enzyme mechanisms. *Faseb J.* 13, A1425–A1425 (1999).

15. Daniel-Ivad, P. & Ryan, K. S. New reactions by pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 81, 102472 (2024).

16. Bisello, G., Longo, C., Rossignoli, G., Phillips, R. S. & Bertoldi, M. Oxygen reactivity with pyridoxal 5'-phosphate enzymes: biochemical implications and functional relevance. *Amino Acids* 52, 1089–1105 (2020).

17. Denesyuk, A. I., Denessiouk, K. A., Korpela, T. & Johnson, M. S. Phosphate group binding 'cup' of PLP-dependent and non-PLP-dependent enzymes: leitmotif and variations. *BBA-Proteins Proteomics* 1647, 234–238 (2003).

18. Ho-Phuong-Thuy, N. et al. PLP undergoes conformational changes during the course of an enzymatic reaction. *Acta Crystallogr. Sect. D-Struct. Biol.* 70, 596–606 (2014).

19. Aleshin, V. A. & Bunik, V. I. Protein-Protein Interfaces as Druggable Targets: A Common Motif of the Pyridoxal-5'-Phosphate-Dependent Enzymes to Receive the Coenzyme

from Its Producers. Biochem.-Moscow 88, 1022–1033 (2023).

20.Ac, E. & Jf, K. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. Annual review of biochemistry 73, (2004).

21.Ryan, K. Pyridoxal phosphate-dependent reactions in natural products biosynthesis. Faseb J. 36, (2022).

22.Du, Y.-L. & Ryan, K. S. Pyridoxal phosphate-dependent reactions in the biosynthesis of natural products. Nat. Prod. Rep. 36, 430–457 (2019).

23.Toney, M. D. Reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. Arch. Biochem. Biophys. 433, 279–287 (2005).

24.Cai, X. et al. [Recent advances in pyridoxal phosphate-dependent enzymes and their applications]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 40, 2771–2785 (2024).

25.Screening drug candidates using conformational changes, by cloning gene to express pyridoxal phosphate (PLP)-dependent enzyme, processing, coupling with substrate, adding PLP, and selecting substrate after processing with candidate.

26.Stereospecificity for the hydrogen transfer and molecular evolution of pyridoxal enzymes-All Databases.  
<https://webofscience.clarivate.cn/wos/alldb/full-record/BIOSIS:PREV199698790115>.

27.Tran, J. U. & Brown, B. L. Structural Basis for Allostery in PLP-dependent Enzymes. Front. Mol. Biosci. 9, 884281 (2022).

28.Percudani, R. & Peracchi, A. The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. BMC Bioinformatics 10, 273 (2009).

(项目团队成员具备的知识基础、能力素养、兴趣特长和已参加的科研等条件)

1. 团队成员已经了解过多篇有关 PLP 依赖酶的文献，对 PLP 依赖酶的结构特征、构效关系、作用机理、合成途径等有了一定了解。

2. 团队成员与指导教师交流密切，对整个实验流程有了一定了解，并将在指导教师的帮助下更熟练地掌握实验流程、学习实验相关技术。

3. 团队成员认真学习了有机化学等基础学科，对将要学习的生物信息学、生物化学、分子生物学进行了初步了解，并已积累了一定生物学实验的经验，在日后的研究过程中也将继续与指导教师和师兄师姐保持交流，学习相关知识与实验操作，以具备可以独立完成实验的能力。

4. 团队成员对生物学和相关实验怀有浓厚的学习兴趣，热衷于探索未知的新事物，有一定的发现问题和解决问题的能力，同时做事严谨，十分注意实验室的操作安全，成员之间具备一定默契，互相信任，合作密切，有利于问题的解决和实验的顺利展开。

项目  
申请  
理由

### 三、项目研究内容

项目研究的主要内容及目标

(主要研究内容, 重点和难点, 研究思路和方法等)

#### 1. 研究方法

##### 生物信息学分析

(1) 序列比对与系统发育分析: 对 PLP 酶 CsmE 及相关同源蛋白进行序列比对, 构建系统发育树, 分析其在 PLP 依赖酶家族中的进化关系, 预测其可能的功能和催化特性。

(2) 基因簇分析: 研究 PLP 酶 CsmE 所在基因簇的结构和组成, 分析基因簇中其他基因与 CsmE 的协同作用关系, 推测其在生物合成途径中的角色。

##### 1.2 蛋白质表达与纯化

(1) 克隆与表达: 将编码 PLP 酶 CsmE 的基因克隆到合适的表达载体中, 转化至宿主细胞 (如大肠杆菌、酵母等), 通过诱导表达获得重组蛋白。

(2) 蛋白纯化: 采用亲和层析、离子交换层析、凝胶过滤层析等方法对表达的重组蛋白进行纯化, 获得高纯度的 PLP 酶 CsmE 用于后续实验。

##### 1.3 新颖后修饰基因的功能鉴定

(1) 功能解析: 根据推测的生物合成途径, 设计串联表达, 底物饲喂, 敲除, 体外酶反应等实验对新颖生物合成基因的功能进行解析。

(2) 定点突变: 对 PLP 酶 CsmE 的关键氨基酸残基进行定点突变, 研究突变对酶活性的影响, 确定参与催化反应的关键残基。

##### 1.4 酶活性测定与动力学分析

(1) 建立酶活性测定方法: 根据 PLP 酶 CsmE 可能的催化反应, 设计合适的酶活性测定体系, 通过检测底物的消耗或产物的生成来确定酶活性。

(2) 动力学参数测定: 测定不同底物浓度下的酶反应初速度, 采用米氏方程拟合数据, 计算酶的米氏常数 ( $K_m$ )、最大反应速率 ( $V_{max}$ ) 等动力学参数, 分析酶对底物的亲和力和催化效率。

##### 1.5 结构生物学研究

(1) 晶体结构解析: 尝试结晶 PLP 酶 CsmE, 利用 X 射线晶体衍射技术收集衍射数据, 解析其三维结构, 确定活性中心的结构特征、PLP 辅因子的结合模式以及与底物的相互作用位点。

(2) 冷冻电镜技术 (如有需要): 若晶体结构解析困难, 可考虑采用冷冻电镜技术研究 PLP 酶 CsmE 在溶液中的结构状态, 获取其结构信息。

##### 1.6 量子化学计算与模拟

(1) 反应机理模拟: 运用量子化学计算方法, 对 PLP 酶 CsmE 催化反应的过渡态、中间体进行计算模拟, 分析反应过程中的电子转移、化学键变化等微观过程, 揭示催化反应的机理。

(2) 结合模式分析：计算 PLP 酶 CsmE 与底物、产物的结合能，分析它们之间的相互作用模式，探讨影响酶催化活性的关键因素。

## 2. 研究难点与重点

1. 结构解析困难：CsmE 蛋白的表达量可能较低，难以获得足够量的蛋白用于结构解析；其结构可能不稳定，容易发生构象变化，影响晶体生长和结构测定的准确性；此外，CsmE 可能存在翻译后修饰等复杂情况，增加了结构解析的难度。

2. 催化机理研究复杂：CsmE 的催化反应可能涉及多个步骤和复杂的中间体，准确捕捉和鉴定这些中间体具有挑战性；由于 PLP 在催化过程中的作用机制复杂，且 CsmE 可能与其他蛋白质或分子存在相互作用，从而影响其催化机理，区分这些因素的具体贡献较为困难。

3. 实验数据与计算模型的整合：实验方法和计算方法得到的数据在类型、精度和可靠性等方面存在差异，如何将二者有机结合，相互验证和补充，以构建准确的催化机理模型是一个难点。例如，实验测定的活性数据可能受到多种因素干扰，而计算模型的假设和参数设置可能影响其对实际催化过程的模拟准确性。

4. 量子化学计算的复杂性：PLP 酶 CsmE 与底物的相互作用涉及多个原子和化学键，量子化学计算的难度较大，需要选择合适的计算方法和参数，以确保计算结果的可靠性。

5. 酶活性测定的干扰因素：PLP 酶 CsmE 的催化反应可能受到多种因素的影响，如温度、pH 值、离子强度等，需要严格控制实验条件，排除干扰因素，以准确测定酶活性。

6. 定点突变的不确定性：定点突变可能会导致酶的结构和功能发生不可预测的变化，需要进行大量的实验验证，以确定突变对酶活性的影响。

## 3. 项目研究的主要内容及目标

### 3.1 主要内容

#### 1. CsmE 的结构解析

表达和纯化 CsmE 蛋白，优化表达和纯化条件，提高蛋白的产量和纯度。

运用 X 射线晶体学或冷冻电镜技术获取 CsmE 的三维结构，分析其二级结构、三级结构特征，确定活性中心和辅因子结合位点等关键结构域。

研究 CsmE 与其他相关蛋白质或分子的相互作用，探讨其在生物体内的作用模式和功能调节机制。

#### 2. CsmE 的催化机理研究

测定 CsmE 的酶活性，分析其对不同底物的催化活性和动力学参数，确定最适反应条件和底物特异性。

运用量子化学计算和分子动力学模拟方法，研究 CsmE 催化反应的过渡态、中间体和反应路径，揭示其催化反应的分子机制。

探讨辅因子 PLP 在 CsmE 催化过程中的作用机制，包括其与酶蛋白的结合方式、电子转移过程以及对催化活性的影响。

#### 3. 结构与功能关系研究

通过定点突变等技术改变 CsmE 的关键氨基酸残基，研究突变体的结构变化和酶活性

	<p>变化，确定对催化功能至关重要的氨基酸残基。</p> <p>分析 CsmE 的结构动态变化与其催化功能之间的关系，揭示结构柔性在催化过程中的作用。</p> <p>研究环境因素（如温度、pH 值、离子强度等）对 CsmE 结构和功能的影响，建立结构-功能关系模型。</p> <p>3.2 目标</p> <p>同源蛋白序列比对、调取所有同源蛋白、SSN 分析确定该酶所处的分区、分区是否和催化功能及反应类型关联。阐明 CsmE 的三维结构特征，明确其活性中心和辅因子结合位点的结构特点。解析 CsmE 的催化机理，包括底物识别、结合、催化反应的具体步骤以及产物释放过程。揭示 CsmE 结构与功能之间的关系，确定影响其催化活性和特异性的关键结构因素。基于研究成果，为开发基于 CsmE 的新型生物催化剂或生物合成途径提供理论依据，推动生物化学领域相关技术的发展。</p>
项目创新点	<ol style="list-style-type: none"> <li>1、利用新思路进行酶的催化机制解析</li> <li>2、该酶是首次报道的能催化萜类中间体和高丝氨酸偶联的酶</li> <li>3、是首次报道的参与生物合成途径的 PLP 依赖酶</li> </ol>

#### 四、项目进度安排

项目进度安排	<p>(查阅资料、自主设计项目研究方案、实验研究、数据统计、处理与分析、研制开发、中期检查、填写结题表、撰写研究论文和总结报告、参加结题答辩和成果推广等)</p> <p>1. 总体进程</p> <p>查阅有关 PLP 依赖酶的相关资料，学习相关有机化学、生物信息学、生物化学、分子生物学的相关知识和实验操作，了解实验室在 PLP 依赖酶的相关知识与发展，设计实验并准备好实验相关材料，对接好实验室的相关实验工作。实验正式开展之后，利用好专业知识，向指导教师与师兄师姐学习相关研究方法和基本实验操作，最终对 PLP 依赖酶的 CsmE 的催化机理进行解析。</p> <p>2. 工作安排</p> <p>2025 年 1 月~2025 年 3 月，查阅文献资料、学习基本实验技术方法、设计实验流程</p> <p>2025 年 4 月~2025 年 12 月，按照相应流程进行实验，进行中期检查，与指导教师讨</p>
--------	---

论并完善实验方案

2026年1月~2026年5月, 检验实验结果、撰写研究论文

2026年6月~2026年7月, 填写结题表、撰写总结报告、制作PPT、参加课题答辩

## 五、项目实施条件

(依托的科研或教学实验基地, 实验仪器设备的配置, 图书资料, 实验或实践场地等项目实施的条件)

1. 本项目所依托的团队为“华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室”, 实验室课题组已构建“万株微生物基因组”数据库、搭建好米曲霉异源表达平台, 同时掌握多种生物信息学相关工具, 足以保证该实验项目正常进行。

2. 华东理工大学生物反应器国家重点实验室为团队提供的实验平台设施完善, 申请人所在课题组具有比较完整的分子克隆、蛋白表达纯化、蛋白结晶、生物化学测量等本课题所需仪器设备, 包括恒温恒湿摇瓶培养间、培养箱; 分子生物学相关: PCR 仪、凝胶成像仪、电泳仪、冷冻离心机、多功能酶标仪、冷冻干燥机等; 化学工作相关: 高效液相色谱仪、LC-MS 液质联用仪、GC-MS 气质联用仪、高分辨飞行质谱仪、紫外可见分光光度计、旋光仪、600 MHz 核磁共振波谱仪、800 MHz 核磁共振波谱仪、X 射线衍射仪、电子顺磁共振波谱仪、圆二色谱仪等; 蛋白表达纯化相关: 无氧手套箱、AKTA 蛋白纯化系统、Millipore 膜超滤浓缩设备、蛋白质二维凝胶电泳分析系统等; 蛋白结晶相关: Hampton 晶体筛选试剂盒、Molecular Dimensions 晶体筛选试剂盒、体视显微镜; 计算模拟相关: Gaussian、Amber、ChemShell、GROMACS、Autodock、Discovery Studio、Modeller、VMD、PyMOL 等软件, 配备图形处理器的工作站, 云服务器等, 可以基本满足本课题研究实验技术所需的工作条件。

3. 本项目所依托的课题组是一支具有多学科交叉, 富有创新意识的团队。团队老师具有分子生物学、生物化学、天然产物化学、生物信息学、结构生物学等专业背景, 多学科交叉, 能够保证本申请项目的顺利执行。本项目的指导老师长期聚焦于生物催化和生物合成天然产物相关的酶学研究, 重点关注利用酶工程策略改造关键酶创制新结构的活性天然产物, 在萜类合酶和非血红素铁酶两类酶家族的酶工程优化中具有丰富的研究经验, 可为本项目的顺利实施提供有效的科学指导。

4. 本项目所依托单位华东理工大学具有丰富且完备的文献信息资源, 团队成员可以使用校园网及图书馆入口端在 Web of science、Scopus、NCBI、知网、万方等数据库中快捷查阅相关文献资料, 为本项目实施提供坚实的文献信息参考。

5. 本项目小组各成员已具备一定的理论知识和实验操作能力, 对生物学科以及科研

项目实施的  
条件和资源

实验抱有极大的兴趣，能够确保项目如期完成。

## 六、项目预期效果及成果形式

项目预期成果及其形式	<p>(学术论文、专利申请、竞赛获奖、开发软件、研制产品、项目鉴定, 推广应用等, 其中前三项至少任选其一)</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. 阐明 CsmE 的三维结构特征, 明确其活性中心和辅因子结合位点的结构特点。解析 CsmE 的催化机理, 包括底物识别、结合、催化反应的具体步骤以及产物释放过程。揭示 CsmE 结构与功能之间的关系, 确定影响其催化活性和特异性的关键结构因素。</li><li>2. 申请专利 1 项;</li><li>3. 发表高水平 SCI 论文 1 篇;</li><li>4. 参加中国国际“互联网+”大学生创新创业大赛和“挑战杯”全国大学生课外学术科技作品竞赛。</li></ol>
结合专业学习的计划	<p>(是否有进一步深造的想法? 如何通过参与项目研究加强专业学习, 培养自身的实践能力、科研能力。)</p> <p>团队各成员在本科后均有读研深造的想法。</p> <p>在专业学习方面, 本次项目与生物化学、分子生物学等本科阶段专业课程密切相关, 并在实验中得以应用加深理解, 在科研实践中提高分析具体问题的能力, 同时继续认真学习本科专业课程, 将在项目研究过程中获得的新知识和分析能力同本科专业课程内容结合起来, 一方面尽可能将专业所学的基础知识应用于解决项目中出现的实际问题的过程中, 另一方面利用这些新知识和分析能力巩固对本科专业课程的基础知识的掌握。借项目研究, 深入探究 PLP 依赖酶相关理论。对比 CsmE 与其他同类酶, 明晰其异同, 构建完善酶学知识体系。研读经典教材与前沿文献, 把握酶催化原理、动力学及调节机制, 为解析 CsmE 催化机理筑牢理论根基。围绕 CsmE 研究, 拓展学习蛋白质结构解析、生物分子相互作用及代谢途径调控知识。了解结构测定实验与计算方法原理, 掌握生物分子作用模式</p>

及代谢酶调控机制，拓宽知识面，提升对生物化学体系的理解。

在科研素养方面，面对 CsmE 催化机理研究难题，运用科学思维分析思考。基于已有成果与数据提出假设，如关键氨基酸残基作用假设等；设计实验验证，如定点突变实验，依结果推理分析得出结论。在过程中锻炼观察、分析与解决问题能力，提升思维严谨性与逻辑性。定期文献调研，跟踪领域进展。运用检索工具获取文献，筛选、阅读、归纳信息，为项目提供参考。在项目不同阶段撰写综述，总结前人成果与不足，提出见解思路。通过此提高文献分析与学术写作能力，培养独立思考与创新思维，为日后的科研实践打下基础，将来为生物化学领域发展贡献力量。

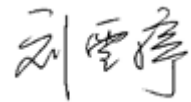
## 七、项目经费预算

(包括大概支出科目(含配套经费)、金额、计算根据及理由, 如果别的经费支持请说明)			
项目 经费 使用 计划	支出科目	金额(元)	计算根据及理由
	实验材料费	6000	培养基、色谱柱、分子生物学工具酶、试剂盒购置费以及各种试剂
	测试化验加工费	5000	高分辨质谱测试、GC-MS 测试、氢谱和碳谱等
	出版物/信息传播费	2000	国内调研和学术会议费、资料复印、论文发表、专利申请费等

## 八、指导老师意见

指导  
教师

(指导教师指导项目实施的机会和安排, 并从项目学科性、前沿性、可行性、研究性、可操作性和成效性加以评价)

意见及 指导 计划	<p>该项目围绕复杂萜类化合物生物合成关键酶的机制研究,小组成员通过前期和课题组老师、同学充分沟通交流后,着手进行阅读和整理文献后,拟从萜类生物合成基因簇中少见的 PLP 依赖酶 CsmE 作为切入点,采用生物信息学和蛋白酶机制解析手段研究该酶的催化机制,项目选题初步具备了科学问题的思考和凝练。此外,萜类作为一类重要的药物来源,具有很好的应用价值和前景,项目选题聚焦新颖的酶学机制,具有一定的前沿性。该项目技术路线的提出和实验方案设计具有可行性;该项目也能作为一个重要的研究命题,对小组成员进行科研思维进行系统训练。</p> <p style="text-align: right;">指导教师签字: </p> <p style="text-align: right;">年 月 日</p>
-----------------	---

## 九、审查意见

答辩 专家 组 意 见	<p style="text-align: right;">答辩专家组签字:</p> <p style="text-align: right;">年 月 日</p>
学 院 意 见	<p style="text-align: right;">学院负责人签字:</p> <p style="text-align: right;">年 月 日</p> <p style="text-align: right;">(学院盖章)</p>

学校  
意见

负责人签字:

年 月 日

(盖章)

## 附：华东理工大学“大学生创新创业训练计划”项目承诺书

为确保“大学生创新创业训练计划”项目的顺利实施，本项目承诺遵守以下条款要求：

- 1 在项目实施的过程中遵守学校有关规定，恪守学术规范，真正做到诚实守信，实事求是；
- 2 项目经费严格按学校“大学生创新创业训练计划”项目管理的有关规定执行，按照专款专用原则，保证项目经费的有效合理使用；
- 3 接受学校及学院对本项目的检查与监督；
4. 保证研究项目的有序进行，并按华东理工大学“大学生创新创业训练计划”项目管理办法的要求，接受学校的中期检查。
- 5 按期完成研究项目并由负责人提交结题报告及有关研究成果、项目经费决算(含使用明细)、等材料，并且归还仪器设备、工具、资料等；
- 6 因主观原因致使项目无法执行的，将根据实际情况退回全部或部分资助经费；
- 7 研究成果如果需要按技术秘密进行保密的，项目负责人及指导教师应制定具体

方案并报学校批准；

8 凡研究工作有发明创造，经学校科研院审查符合条件的，可由科研院协助申报专利，以保护知识产权，维护学校的合法权益；

9 本承诺书由本项目全体成员及指导老师签字并经创新创业教育中心确认后生效，如有违反，愿承担相应责任。

项目成员（签字）：周锦灿 谢宇峰 王孜齐

指导教师（签字）：刘雪婷

年 月 日

说明： 本承诺书是华东理工大学“大学生创新创业训练计划”项目管理和经费划拨的依据。