

# 双催化三联体PET水解酶的制备及其酶活性分析

苏秋东<sup>1\*</sup>, 姚西宁<sup>2\*</sup>, 邱丰<sup>1</sup>, 王锋<sup>1</sup>, 张爽<sup>1</sup>, 徐柯<sup>1</sup>, 毕胜利<sup>1</sup>, 王衍海<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 国家卫生健康委医学病毒和病毒病重点实验室, 北京 102206; <sup>2</sup> 北京贝尔生物工程股份有限公司, 北京 102612)

**摘要** 目的 制备双催化三联体聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)水解酶(PETase), 并评价其对PET的生物降解效果。方法 基于PETase晶体结构分析, 通过点突变方式(T88H/L117D)引入突变位点, 并利用原核表达和层析纯化技术制备双催化三联体PETase重组蛋白, 相对定量产物对苯二甲酸单羟乙基酯(MHET)和对苯二甲酸(TPA)来观察其对PET底物的酶解反应。结果 野生型和突变型PETase均以包涵体形式在大肠埃希菌中高效表达, 约占菌体总蛋白20%。经尿素变性处理后, 通过亲和层析纯化, 目的蛋白主要存在于300 mmol/L咪唑洗脱液中, 其浓度和纯度分别为1.824 mg/mL和83.11%(野生型)、1.833 mg/mL和84.32%(突变型)。进一步的离子交换层析纯化显示, 目的蛋白主要存在于200 mmol/L NaCl洗脱液中, 其浓度和纯度分别为2.776 mg/mL和96.86%(野生型)、1.967 mg/mL和95.13%(突变型)。透析复性后, 野生型和突变型PETase的浓度分别为0.484 mg/mL和0.991 mg/mL。酶活性检测显示, 与野生型PETase相比, 突变型的MHET的产率为(237.67±17.00)%, TPA的产率为(197.33±12.01)%。结论 经过原核表达和层析纯化技术获取了T88H/L117D双催化三联体PETase, 其具有增强的PET降解能力, 为PET的生物降解提供新的思路。

**关键词** 聚对苯二甲酸乙二醇酯; 水解酶; 催化三联体; 点突变; 重组蛋白; 生物降解

**中图分类号** Q814.4

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2026)03-0546-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.03.022

聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)是一种由对苯二甲酸酯(terephthalate, TPA)和乙二醇(ethylene glycol, EG)通过酯键连接而成的高分子量聚合物, 因其优异的耐用性等物理特性被广泛使用<sup>[1-3]</sup>。然而, PET的化学惰性使其难以自然降解, 这使得其高效处理成为亟待解决的问题。生物降解作为一种控制塑料污染的有效方法, 而酶催化降解则为解决塑料环境问题带来了新的希望<sup>[1]</sup>。传统PET降解酶, 如角质酶等, 通常需要在较高温度下才能发挥最大生物活性, 且其降解活性较低, 限制了其在工业应用中的价值<sup>[1]</sup>。2016年, Burgin et al<sup>[4]</sup>从细菌 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 中分离出一种新型PET水解酶(PETase), 该酶可在30 °C下特异高效降解PET, 但其热稳定性较差, 且酶解活性仍有待提高。

PETase能直接作用于固态PET, 释放对苯二甲

酸双羟乙基酯[bis(2-hydroxyethyl) terephthalate, BHET]和对苯二甲酸单羟乙基酯[mono(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET]<sup>[4-5]</sup>。其活性中心主要由7个氨基酸组成<sup>[4]</sup>, 其中Ser160-His237-Asp206构成了催化三联体结构, 而Tyr87和Met161则组成了氧阴离子穴<sup>[4]</sup>。酶解效率受底物结合能力、热稳定性和产物抑制等多种因素的影响。针对这些因素, 众多突变体应运而生<sup>[3,6-8]</sup>。本研究通过分析PETase晶体结构, 利用点突变技术、原核表达和层析纯化技术制备双催化三联体PETase重组蛋白, 并观察其对PET和BHET底物的酶解反应。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。表达载体pET-43.1a由本实验室保存。整合型亲和层析介质Chelating Sepharose Fast Flow和二乙氨基乙基(ethylenediaminetetraacetic acid, DEAE)Streamline阴离子交换介质购自美国GE公司。限制性内切酶 *Nde I* 和 *Xho I* 以及T4 DNA连接酶均购自美国NEB公司。垂直电泳系统, 凝胶成像系统以及Image Lab分析软件均购自美国Bio-rad公司。

2025-11-29 接收

基金项目: 国家重点研发计划项目(编号:2023YFC2605300)

作者简介: 苏秋东, 男, 副研究员;

王衍海, 男, 研究员, 通信作者, E-mail: wangyh@ivdc.chinacdc.cn

\*对本文具有同等贡献

**1.2 表达质粒的构建** 野生型PETase(UniProt A0A0K8P6T7)的Gln28-Ser290片段经密码子优化后,在5'端添加*Nde I*酶切位点,在3'端添加*Xho I*酶切位点。该基因片段由生工生物工程(上海)股份有限公司全基因合成,并插入pMD-19T载体中。突变型PETase的构建如图1所示,将野生型PETase的第88位苏氨酸(T)突变为组氨酸(H),第117位亮氨酸(L)突变为天冬氨酸(D)。编码突变型PETase的基因片段同样经过密码子优化后,并在5'端添加*Nde I*酶切位点,在3'端添加*Xho I*酶切位点。该突变基因片段也由生工生物工程(上海)股份有限公司全基因合成,并插入到pMD-19T载体中。随后,使用*Nde I*和*Xho I*分别处理含有野生型和突变型PETase基因的pMD-19T质粒以及表达载体pET-43.1a。通过凝胶回收带有黏性末端的目的片段和pET-43.1a载体后,利用T4 DNA连接酶连接后转化到*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中。最终通过测序及双酶切鉴定确认重组质粒的正确性。

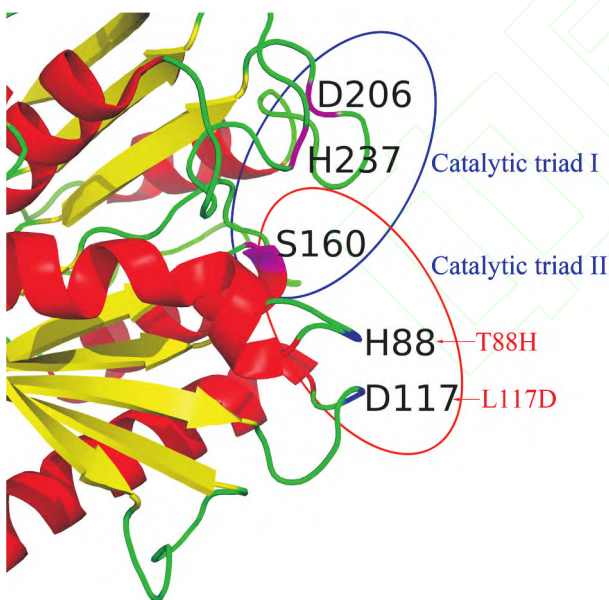


图1 突变型PETase突变位点示意图

Fig. 1 Schematic diagram of mutated sites in mutant PETase

### 1.3 野生型和突变型PETase的制备

**1.3.1 野生型和突变型PETase的表达** 将野生型和突变型PETase表达质粒转化至BL21(DE3)感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素(Amp)的固体LB培养基,37℃培养过夜。次日挑取单克隆接种于1.5 mL液体LB培养基(10 g/L蛋白胨,5 g/L酵母提取液,10 g/L NaCl,50 μg/mL Amp,pH 7.0)中,37℃、220 r/min振荡培养4 h。当菌液OD<sub>600</sub>≈0.8时,加入终浓度1

mmol/L的IPTG,继续培养2 h后取样,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)以评估蛋白的表达水平。根据初筛结果,选取表达水平最高的菌株以1:1 000比例接种于2 L LB培养液(50 μg/mL Amp)中进行大量表达。当菌液OD<sub>600</sub>约为0.8时,加入终浓度为0.8 mmol/L的IPTG,将温度调整为28℃,继续培养5 h。离心收集菌体(4 000 r/min,10 min,4℃),用Buffer I(20 mmol/L Tris-HCl,0.5% Triton X-100,pH 8.0)重悬菌体沉淀。超声处理菌体重悬液(工作功率250 W,工作时间25 s,间歇时间25 s,30个循环)后,离心(12 000 r/min,10 min,4℃)分离上清液和沉淀,进行SDS-PAGE观察目的蛋白的表达情况及分布情况。

**1.3.2 野生型和突变型PETase的纯化** 弃去上清液后,用Buffer II(50 mmol/L Tris-HCl,10 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid,EDTA),100 mmol/L NaCl,0.5% Triton X-100,pH 8.0)洗涤包涵体。随后,用含2 mol/L尿素的Buffer II再洗涤一次。最后,用Buffer III(50 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L NaCl,8 mol/L尿素,pH 8.0)对包涵体进行蛋白变性处理。离心(12 000 r/min,10 min,4℃)收集上清液,即获得变性蛋白溶液。将此上清液行镍离子亲和层析,依次以含0、30、60、300 mmol/L咪唑的Buffer III进行梯度洗脱,并收集各洗脱峰。随后选择浓度高纯度好的洗脱液在Buffer IV(50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0)中透析。随后,将透析液行DEAE阴离子交换层析,依次以含0、100、200、400 mmol/L NaCl的Buffer IV进行梯度洗脱。各梯度洗脱液均进行SDS-PAGE以观察目的蛋白的分布和含量,用Image Lab软件对蛋白条带进行分析。

**1.3.3 野生型和突变型PETase的复性** 纯化后的目的蛋白洗脱液中加入终浓度为100 mmol/L二硫苏糖醇(DTT)、0.4 mol/L L-精氨酸、5 mmol/L还原型谷胱甘肽(reduced glutathione,GSH)、1 mmol/L氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione disulfide,GSSG)的复性缓冲液后装入透析袋。透析袋外缓冲液为20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L DTT、500 mmol/L NaCl、0.4 mol/L L-精氨酸、5 mmol/L GSH、1 mmol/L GSSG、pH 8.0,并按照6→4→3→2→1→0 mol/L梯度递减尿素浓度;每级梯度于4℃温和搅拌3 h,严格避光。尿素完全去除后,将样本转入Buffer V(20 mmol/L Tris-HCl,150 mmol/L NaCl,pH 8.0)中继续

透析2次。最后将蛋白统一浓缩至1 mg/mL,加入终体积50%预冷甘油,-20 °C保存备用。

**1.4 PET降解检测** 称取36 mg PET膜(1.5 cm × 1.0 cm),置于含有50 μg/mL纯化酶(野生型或突变型PETase)的缓冲液VI(50 mmol/L glycine-NaOH, pH 9.4)中,30~60 °C梯度(每隔5 °C为一组)低速振荡孵育48 h。56 °C热处理10 min以终止反应。冷却后,4 °C、10 000 r/min离心10 min,上清液经0.22 μm滤膜过滤,立即用于反相高效液相色谱(reversed-phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)分析。色谱条件:分析柱为Welch Ultimate XB-C18 column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相A:20 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 2.5),流动相B:甲醇;梯度洗脱0~25 min,B由25%线性升至95%;流速0.8 mL/min;柱温30 °C;检测波长240 nm。按峰面积外标法定量BHET、MHET和TPA。每个样品均设3次独立重复。

**1.5 统计学处理** 蛋白浓度采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定,结果以mg/mL表示;纯度通过Image Lab软件对SDS-PAGE图形进行灰度分析,计算目的蛋白占泳道中总蛋白的百分比。酶活性以野生型PETase酶产物量中位数为100%,突变型相对产率以百分数标化,并以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )呈现。统计分析及图形绘制使用GraphPad Prism 9.5软件;两组间比较采用双尾 $t$ 检验;多组比较采用单因素方差分析( $F$ 检验)。 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 野生型和突变型PETase表达细胞株成功构

**建** 根据PETase氨基酸序列和大肠埃希菌密码子偏好性,确定野生型和突变型PETase编码基因序列,两个基因片段长度均为879 bp。凝胶回收带有互补黏性末端的目的片段(879 bp;图2A,泳道1)和pET-43.1a载体(5 488 bp;图2A,泳道2),经连接酶将两者进行连接构建表达质粒。提取质粒进行双酶切鉴定,可见5 500 bp(载体)和900 bp(插入片段)两条清晰条带(图2B,泳道3)。表达质粒转化入BL21(DE3)后,次日挑取单克隆接种于2 mL LB培养基中(50 mg/L Amp)进行少量表达。SDS-PAGE在约31 ku处出现明显条带(图2C),与预期一致。重组质粒送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。比对结果显示(图3),两种质粒的核苷酸序列与设计完全一致;与野生型相比,突变型在对应位点出现T88H(ACC→CAC)和L117D(CTG→GAT)两处定点突变。结果显示,野生型及突变型PETase表达菌株构建成功。

**2.2 可溶性野生型和突变型PETase的制备** 经过大肠埃希菌表达后,野生型和突变型PETase均以包涵体形式存在(图4A、4B)。包涵体经过两次洗涤后,用8 mol/L尿素进行溶解变性。镍离子亲和层析结果显示,两种蛋白均能很好结合层析介质,并于300 mmol/L咪唑条件下被特异性洗脱:野生型PETase浓度为1.824 mg/mL,纯度为83.11%(图4C,泳道8);突变型PETase浓度为1.833 mg/mL,纯度为84.32%(图4D,泳道11)。阴离子交换层析结果显示,二者均主要在200 mmol/L NaCl洗脱峰中富集:野生型PETase浓度为2.776 mg/mL,纯度为96.86%(图4C,泳道7);突变型PETase浓度为1.967 mg/mL,纯度为95.13%(图4D,泳道10)。透析复性后,

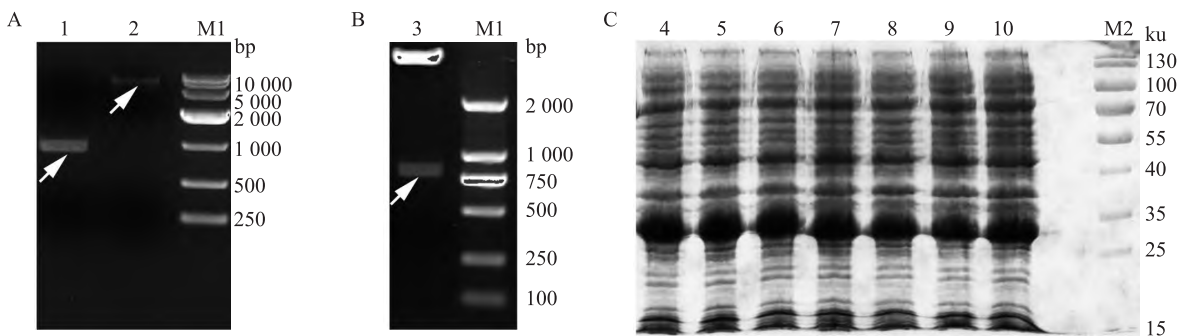


图2 野生型/突变型PETase表达细胞株的构建

Fig. 2 Construction of wild-type/mutant PETase expression strains

A, B: Construction and identification of wild-type and mutant PETase expression plasmids; 1: Recovered pET-43.1a vector after double restriction endonuclease digestion; 2: Recovered target fragment after double restriction endonuclease digestion; 3: Expression plasmids digested with double restriction endonuclease digestion; C: Small-scale expression results of mutant (lanes 4-7) and wild-type (lanes 8-10) PETase; M1: DNA Marker; M2: Protein Marker.

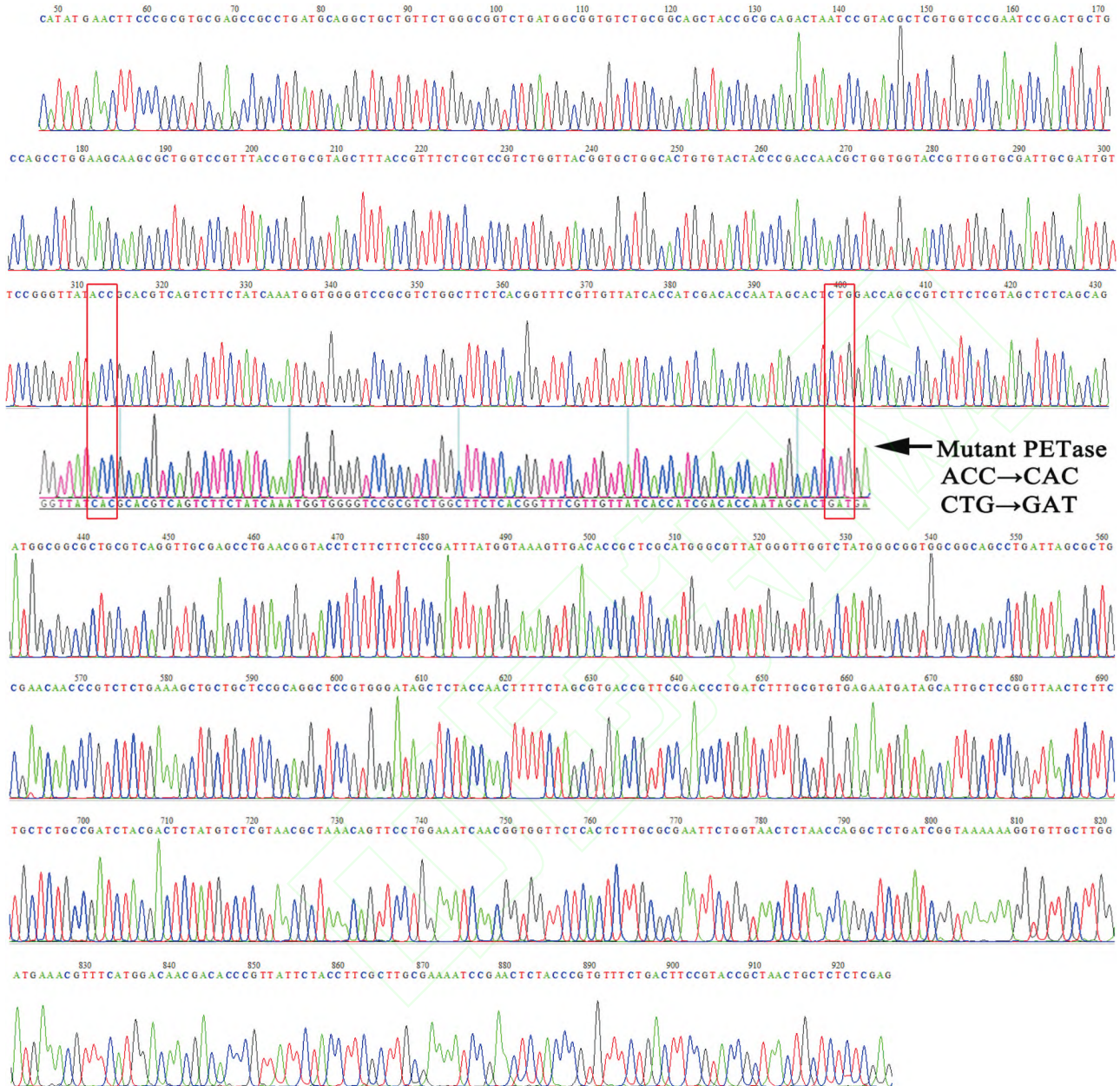


图3 野生型/突变型PETase表达质粒测序验证

Fig. 3 Sequencing verification of wild-type and mutant PETase expression plasmids

突变型和野生型PETase终浓度分别为0.484 mg/mL (图4E,泳道12)和0.991 mg/mL(图4E,泳道13)。

**2.3 突变型PETase对MHET和TPA产率的提升作用** 突变型PETase催化生成MHET和TPA的产率中值设定为100%(图5A),MHET与TPA产率均随温度变化差异有统计学意义(MHET: $F=233.43$ ,  $P<0.001$ ;TPA: $F=267.31$ ,  $P<0.001$ )。齐性子集分析显示,二者均在45℃时产率最高(MHET:101.67%;TPA:100.67%),其次为40℃与50℃,60℃时最低(MHET:8.00%;TPA:10.33%)。结果表明该酶最适温度为45℃。各温度下MHET与

TPA产率之间差异无统计学意义( $t=0.09$ ,  $P=0.928$ )。与野生型相比,突变型PETase的MHET产率为(237.67 ± 17.00)%,TPA产率为(197.33 ± 12.01)%,且两者产量均显著高于野生型(MHET: $t=-12.72$ ,  $P<0.001$ ;TPA: $t=-10.41$ ,  $P<0.001$ ),表明其催化效率显著提升(图5B)。

### 3 讨论

PET是目前应用最广且是环境中主要的塑料污染物。PETase介导的PET解聚是由丝氨酸-组氨酸-天冬氨酸(SHD)催化三联体介导的一种二步酰

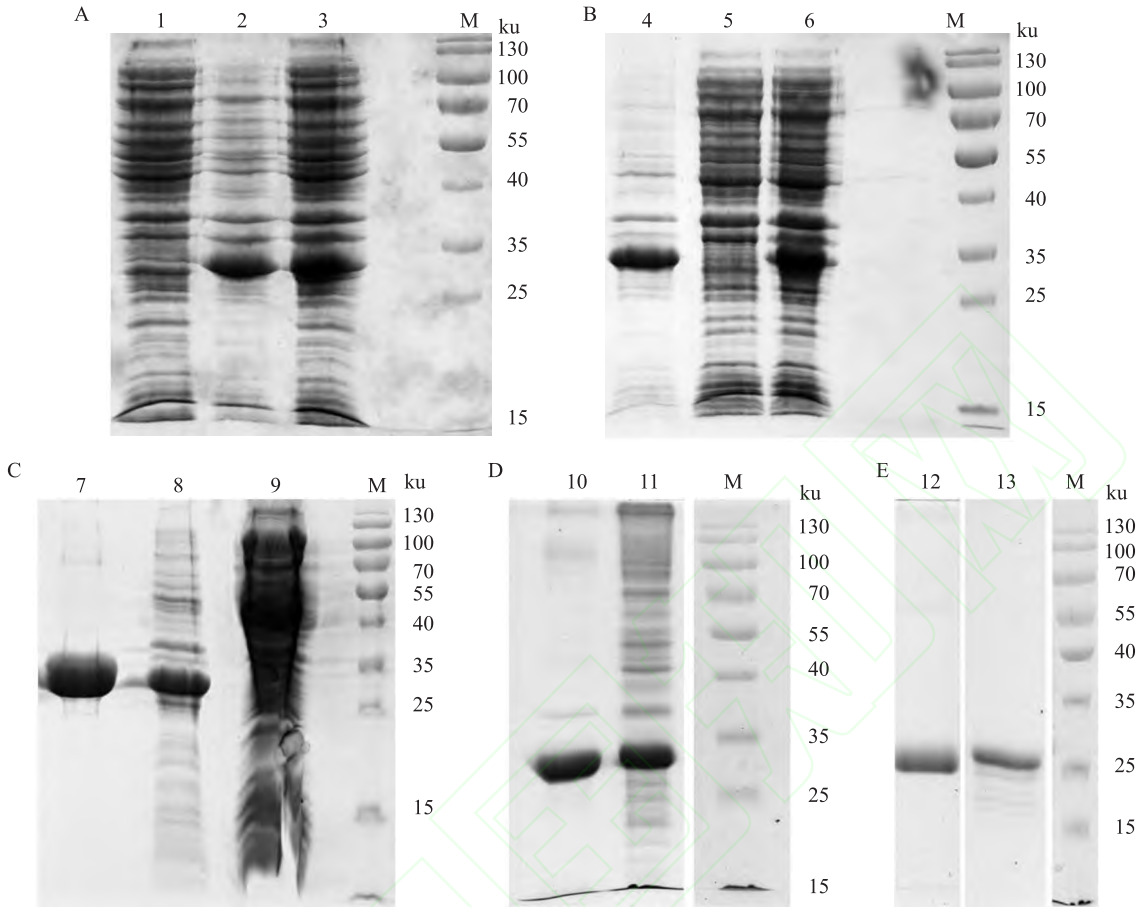


图4 野生型和突变型PETase的制备

Fig. 4 Preparation of wild-type and mutant PETase

A: Large-scale expression of wild-type PETase (after ultrasonication); B: Large-scale expression of mutant PETase (after ultrasonication); C: Chromatographic purification of wild-type PETase; D: Chromatographic purification of mutant PETase; E: Dialysis and refolding; 1: Supernatant; 2: Pellet; 3: Whole-cell lysate; 4: Pellet; 5: Supernatant; 6: Whole-cell lysate; 7: Eluate from DEAE chromatography using 200 mmol/L NaCl; 8: Eluate from affinity chromatography using 300 mmol/L imidazole; 9: Flow-through from affinity chromatography; 10: Eluate from DEAE chromatography using 200 mmol/L NaCl; 11: Eluate from affinity chromatography using 300 mmol/L imidazole; 12: Mutant PETase; 13: Wild-type PETase; M: Protein Marker.

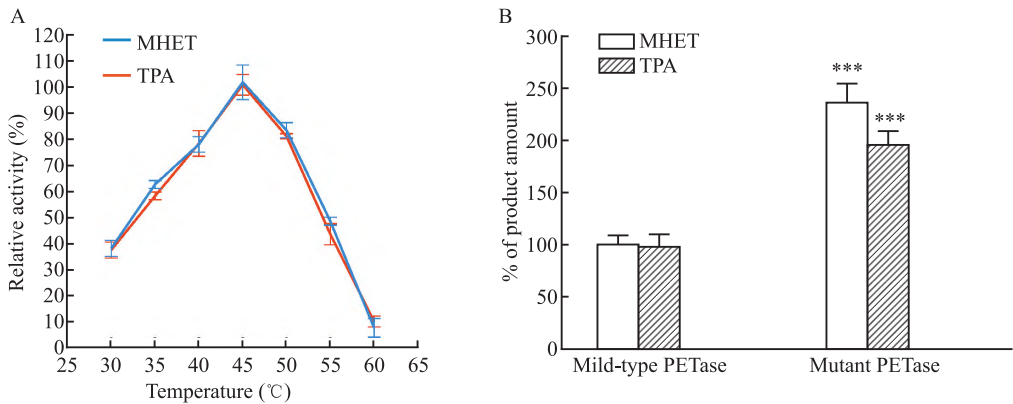


图5 突变型PETase酶活性分析

Fig. 5 Analysis of enzymatic activity of mutant PETase

A: Analysis of the optimal working temperature for mutant PETase; B: Comparative activity analysis of wild-type and mutant PETase; \*\*\* $P < 0.001$  vs Mild-type PETase group.

化和脱酰机制<sup>[4]</sup>。本研究主要针对酶的活性中心进行点突变改造,以制备具有双活性中心的PETase基因工程重组蛋白酶。

PETase的工程改造主要集中在3个方向,一是扩宽酶的底物结合口袋;二是增强酶的稳定性;三是减少酶的产物抑制。而本研究从酶的活性中心入手,建构了具有双催化三联体的PETase。Ser160对PET羧基碳进行亲核攻击,在双催化三联体构建中仍作为中心被共用。根据PETase的晶体结构,T88与H237、L117与D206遥相对应。因此,双催化三联体基于T88H和L117D两个点突变。预测PET进入活性中心后,两个催化三联体分列在PET分子的两侧,基本呈镜像分布。Sevilla et al<sup>[9]</sup>研究表明,酶活性中心3个点突变均增强了对PET的降解活性,尤其是S238Y突变型,酶活性增加了3.3倍,而R89A和L117F的相对活性为2.1倍。本研究引入T88H和L117D双突变后,显示突变型PETase的主要产物MHET的产率得到了提高(图4),推测双催化三联体的存在提高了酶的催化活性,从而增强了酶处理底物的能力。此外,研究还表明,与野生型PETase相比,突变型PETase催化产生次要产物TPA的能力也有所提升,这与N233A/R280A突变体的结果类似<sup>[3]</sup>。

大肠埃希菌表达系统因其遗传背景清晰、构建简单、技术成熟稳定、表达效率高、周期短、成本低等优点而被广泛应用<sup>[10-12]</sup>。本研究构建中,目的蛋白的表达量约占菌体总蛋白的20%。虽然包涵体的存在形式给蛋白的复性带来了挑战,但也使得纯化过程变得更加容易。包涵体蛋白的复性一直是原核表达系统蛋白制备的难点问题。本研究中,利用氧化型和还原型谷胱甘肽来营造蛋白复性的氧化-还原环境,成功获取了可溶并具有酶活性的PETase。尽管野生型和突变型PETase之间仅有两个氨基酸的差异,但在纯化过程中,两者的中间产物浓度和大小略有不同。推测其三维结构的差异导致了它们在纯化过程中的表现以及在电泳条件下的展示存在差异,进一步的研究需要深入分析其三维结构的差异及其相关影响。

### 参考文献

[1] 经楠楠,刘文红,李强,等. PET塑料降解及其降解酶改造方法的研究进展[J]. 石油化工高等学校学报, 2024, 37(1): 16-24. doi:10.12422/j.issn.1006-396X.2024.01.003.

[1] Jing N N, Liu W H, Li Q, et al. Research progress of PET

plastic degradation and modification methods of degrading enzymes [J]. J Petrochem Univ, 2024, 37 (1) : 16-24. doi: 10.12422/j.issn.1006-396X.2024.01.003.

[2] Barclay A, Acharya K R. Engineering plastic eating enzymes using structural biology [J]. Biomolecules, 2023, 13(9): 1407. doi:10.3390/biom13091407.

[3] 陈纯琪,韩旭,刘卫东,等. 基于结构改造来源于大阪伊德氏杆菌201-F6的PET水解酶[J]. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3268-75. doi:10.13345/j.cjb.200632.

[3] Chen C Q, Han X, Liu W D, et al. Structure-based engineering of PET hydrolase from *Ideonella sakaiensis* [J]. Chin J Biotechnol, 2021, 37 (9) : 3268-75. doi:10.13345/j.cjb.200632.

[4] Burgin T, Pollard B C, Knott B C, et al. The reaction mechanism of the *Ideonella sakaiensis* PETase enzyme [J]. Commun Chem, 2024, 7(1): 65. doi:10.1038/s42004-024-01154-x.

[5] Waltmann C, Mills C E, Wang J, et al. Functional enzyme-polymer complexes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(13): e2119509119. doi:10.1073/pnas.2119509119.

[6] Son H F, Joo S, Seo H, et al. Structural bioinformatics-based protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis* [J]. Enzyme Microb Technol, 2020, 141: 109656. doi:10.1016/j.enzmictec.2020.109656.

[7] Zurier H S, Goddard J M. A high-throughput expression and screening platform for applications-driven PETase engineering [J]. Biotechnol Bioeng, 2023, 120(4): 1000-14. doi:10.1002/bit.28319.

[8] Liu F, Wang T, Yang W, et al. Current advances in the structural biology and molecular engineering of PETase [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2023, 11: 1263996. doi: 10.3389/fbioe.2023.1263996.

[9] Sevilla M E, Garcia M D, Perez-Castillo Y, et al. Degradation of PET bottles by an engineered *Ideonella sakaiensis* PETase [J]. Polymers, 2023, 15(7): 1779. doi:10.3390/polym15071779.

[10] Murakami M, Murakami A M, Yonekura M, et al. A simple, dual direct expression plasmid system in prokaryotic and mammalian cells [J]. PNAS Nexus, 2023, 2(5): pgad139. doi: 10.1093/pnasnexus/pgad139.

[11] 田甜,张星娟,杨明夏. 人源性RPL22基因的原核表达与纯化及功能分析[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(10): 1785-93. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.013.

[11] Tian T, Zhang X J, Yang M X. Prokaryotic expression, purification and functional analysis of human RPL22 gene [J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(10): 1785-93. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.013.

[12] 张雨琪,丁明珠,吴金凤,等. 雄激素受体基因各功能域片段的原核表达与功能鉴定[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(2): 219-24. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.008.

[12] Zhang Y Q, Ding M Z, Wu J F, et al. Prokaryotic expression and functional identification of androgen receptor functional domains [J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58 (2) : 219-24. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.008.

structured and evaluated for discriminative ability, calibration, and clinical utility using receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, calibration plots, and decision curve analysis (DCA). **Results** Seven independent risk factors were ultimately identified and included in the prediction model: female sex, hypertension, diabetes, red blood cell distribution width-SD (RDW-SD), body mass index (BMI), left atrial diameter (LAD), and left ventricular ejection fraction (LVEF). The area under the ROC curve (AUC) in the training set was 0.862 (95% CI: 0.834-0.890), and in the validation set, it was 0.870 (95% CI: 0.829-0.911), demonstrating excellent predictive performance. **Conclusion** Independent risk factors for LVH in PeAF patients include female, hypertension, diabetes, RDW-SD, BMI, LAD, and LVEF. The prediction model built based on this can help early identification of PeAF patients with high risk of LVH. At the same time, the incidence of major adverse cardiovascular events (MACE) is higher in PeAF patients with LVH. Patients with atrial fibrillation combined with LVH may benefit from catheter ablation.

**Key words** persistent atrial fibrillation; left ventricular hypertrophy; risk factor; nomogram; major adverse cardiovascular events; recrudescence; Cox regression analysis

**Fund program** National Natural Science Foundation of China (No. 82371949)

上接第 551 页

## Preparation and hydrolytic activity analysis of dual-catalytic-triad PETase

Su Qiudong<sup>1</sup>, Yao Xining<sup>2</sup>, Qiu Feng<sup>1</sup>, Wang Feng<sup>1</sup>, Zhang Shuang<sup>1</sup>, Xu Ke<sup>1</sup>, Bi Shengli<sup>1</sup>, Wang Yanhai<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> NHC Key Laboratory of Medical Virology and Viral Diseases, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC, Beijing 102206; <sup>2</sup> Beijing Beier Bioengineering Co. Ltd., Beijing 102612)

**Abstract Objective** To prepare a recombinant PETase with a dual-catalytic-triad and to evaluate its efficiency in the biodegradation of polyethylene terephthalate (PET). **Methods** Based on the crystal structure of wild-type PETase, point mutations (T88H/L117D) were introduced *via* site-directed mutagenesis. The recombinant protein was prepared using prokaryotic expression and chromatography purification techniques. The enzymatic hydrolysis of the mutant PETase was assessed by relatively quantifying the products mono (2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET) and terephthalic acid (TPA). **Results** Both wild-type and mutant PETases accumulated as inclusion bodies, accounting for approximately 20% of the total bacterial protein. After solubilization in urea, the proteins were eluted at 300 mmol/L imidazole during affinity chromatography purification, with concentrations of 1.824 and 1.833 mg/mL and purities of 83.11% and 84.32%, respectively. Subsequent anion-exchange chromatography yielded highly pure enzymes in the 200 mmol/L NaCl fraction: 2.776 mg/mL (96.86% purity) for the wild type and 1.967 mg/mL (95.13% purity) for the mutant. Following refolding, the final concentrations were 0.484 mg/mL for the wild type and 0.991 mg/mL for the mutant. Hydrolysis assays revealed that the mutant released MHET and TPA at (237.67±17.00)% and (197.33±12.01)% of the wild-type levels, respectively. **Conclusion** The T88H/L117D dual-catalytic-triad PETase is successfully prepared and it significantly enhanced PET-degrading activity, thus, it's a promising biocatalyst for PET bioremediation.

**Key words** polyethylene terephthalate; hydrolase; dual catalytic triad; site-directed mutagenesis; recombinant protein; biodegradation

**Fund program** National Key Research and Development Program of China (No. 2023YFC2605300)

**Corresponding author** Wang Yanhai, E-mail: wangyh@ivdc.chinacdc.cn

**Corresponding author** Zhao Ren, E-mail: zhaoren@ahmu.edu.cn