

• 农业生物技术 •

定点突变提高虎杖聚酮合酶的苯亚甲基丙酮合酶活性

贺志敏, 马文瑞, 于丽平, 吕鹤书*, 杨明峰*

北京农学院 农业农村部华北都市农业重点实验室, 北京 102206

贺志敏, 马文瑞, 于丽平, 吕鹤书, 杨明峰. 定点突变提高虎杖聚酮合酶的苯亚甲基丙酮合酶活性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2806-2817.

HE Zhimin, MA Wenrui, YU Liping, LÜ Heshu, YANG Mingfeng. Site-directed mutagenesis enhances the activity of benzylidene acetone synthase of polyketide synthase from *Polygonum cuspidatum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2806-2817.

摘 要: 虎杖(*Polygonum cuspidatum*)聚酮合酶(polyketide synthase 1, PcPKS1)同时具有查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)及苯亚甲基丙酮合酶(benzylidene acetone synthase, BAS)催化活性, 能够催化生成聚酮类化合物柚皮素查尔酮和苯亚甲基丙酮, 进而催化合成黄酮类或覆盆子酮等具有多种生物学活性的化合物。本研究通过分析虎杖 PcPKS1 与掌叶大黄(*Rheum palmatum*) BAS、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) CHS 等家族成员的序列以及酶催化位点的构象, 确定可能影响酶功能的 3 个氨基酸位点: Thr133、Ser134、Ser339。采用定点突变对 PcPKS1 进行分子修饰, 成功获得 2 个突变体并进行相关体外酶促反应, 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)产物分析结果表明, 在 pH 7.0 和 pH 9.0 的体外酶促条件下, 突变体 T133LS134A 和 S339V 维持 BAS 和 CHS 双功能活性, 且 BAS 活性显著高于原 PcPKS1。本研究为利用 PcPKS1 进行基因工程调节黄酮类和覆盆子酮化合物的生物合成提供理论依据。

关键词: 查尔酮合酶; 定点突变; 苯亚甲基丙酮合酶; 高效液相色谱

*Corresponding authors. E-mail: YANG Mingfeng, mfyang@bua.edu.cn; LÜ Heshu, lvheshu@163.com

Received: 2022-10-10; Accepted: 2022-12-06; Published online: 2022-12-09

Site-directed mutagenesis enhances the activity of benzylidene acetone synthase of polyketide synthase from *Polygonum cuspidatum*

HE Zhimin, MA Wenrui, YU Liping, LÜ Heshu^{*}, YANG Mingfeng^{*}

Key Laboratory for Northern Urban Agriculture of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

Abstract: *Polygonum cuspidatum* polyketide synthase 1 (PcPKS1) has the catalytic activity of chalcone synthase (CHS) and benzylidene acetone synthase (BAS), which can catalyze the production of polyketides naringenin chalcone and benzylidene acetone, and then catalyze the synthesis of flavonoids or benzylidene acetone. In this study, three amino acid sites (Thr133, Ser134, Ser33) that may affect the function of PcPKS1 were identified by analyzing the sequences of *PcPKS1*, the BAS from *Rheum palmatum* and the CHS from *Arabidopsis thaliana*, as well as the conformation of the catalytic site of the enzyme. Molecular modification of *PcPKS1* was carried out by site-directed mutagenesis, and two mutants were successfully obtained. The *in vitro* enzymatic reactions were carried out, and the differences in activity were detected by high performance liquid chromatography (HPLC). Finally, mutants T133LS134A and S339V with bifunctional activity were obtained. In addition to bifunctional activities of BAS and CHS, the modified PcPKS1 had much higher BAS activity than that of the wild type PcPKS1 under the conditions of pH 7.0 and pH 9.0, respectively. It provides a theoretical basis for future use of *PcPKS1* in genetic engineering to regulate the biosynthesis of flavonoids and raspberry ketones.

Keywords: chalcone synthase; site-directed mutagenesis; benzylidene acetone synthase; high performance liquid chromatography

聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)广泛存在于细菌、真菌及植物体内^[1-2], 参与催化合成聚酮类化合物(polyketide, PK)^[3], 这些化合物具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、心血管保护等多种功能^[4-6]。PKS 大体上可分为 3 类, 其中 I 型 PKS (type I polyketide synthase) 和 II 型 PKS (type II polyketide synthase) 主要存在于微生物中; III 型 PKS (type III polyketide synthase) 即查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)家族, 主要存在于植物中。CHS 催化丙二酰辅酶 A 和 4-香豆酰

辅酶 A 通过 Claisen 缩合反应生成柚皮素查尔酮(naringenin chalcone, Nar), 进而生成类黄酮化合物^[7], 而苯亚甲基丙酮合酶(benzylidene acetone synthase, BAS)使用与 CHS 相同的底物, 催化合成苯亚甲基丙酮(benzalacetone, BA), 进而生成一系列苯丁烷类化合物(图 1)。

自 1999 年 Ferrer 等解析了紫花苜蓿(*Medicago sativa*)的 CHS 晶体结构后, 开始了对植物 III 型聚酮合酶原子水平的研究^[9]。研究结果表明, 植物 III 型 PKS 超家族成员的三维

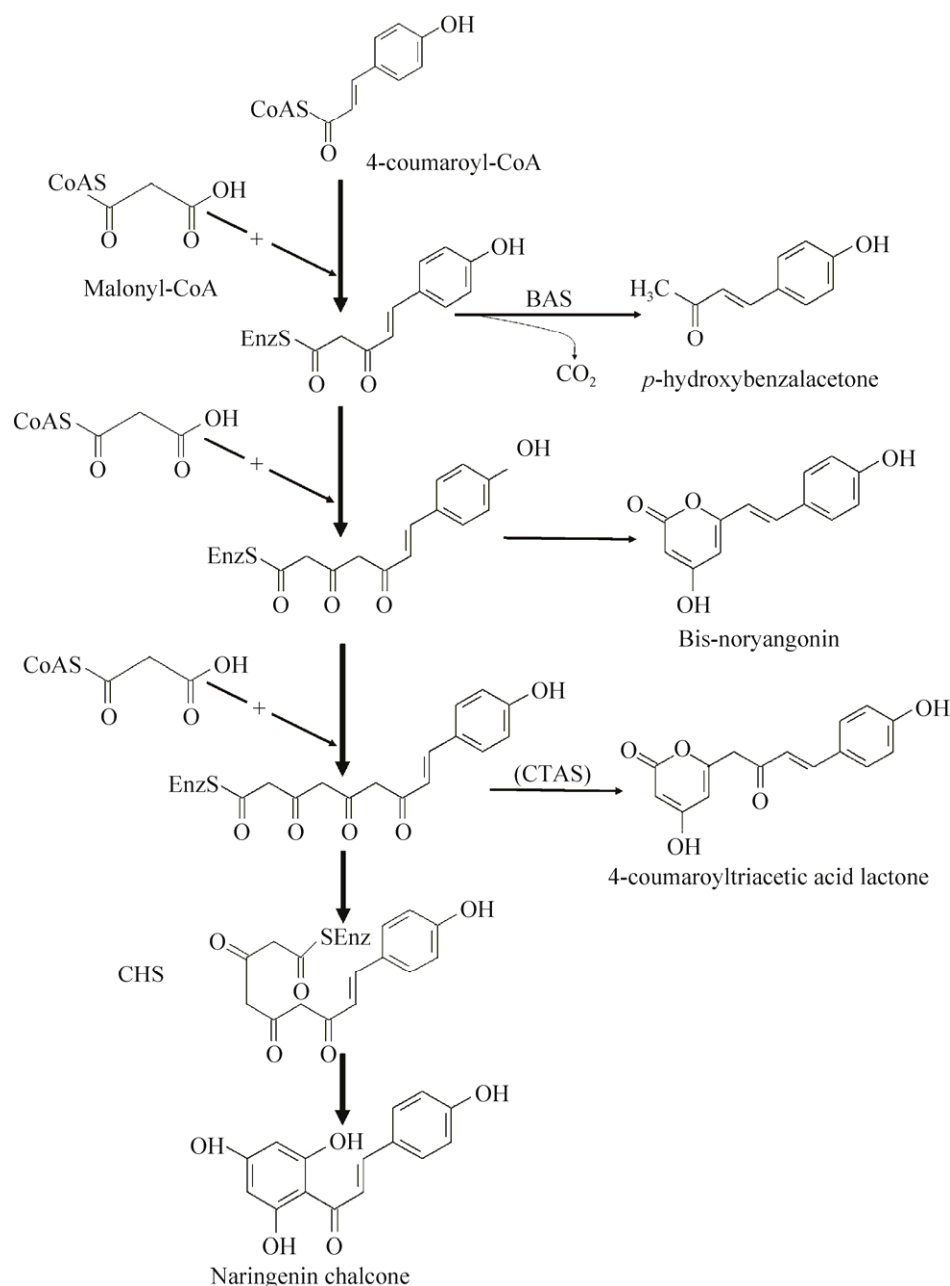


图1 虎杖黄酮类化合物合成途径^[8]

Figure 1 Reactions underlying the conversion of 4-coumaroyl-CoA and malonyl-CoA to *p*-hydroxy benzalacetone by benzylidene acetone synthase (BAS), to naringenin chalcone by chalcone synthase (CHS), and to 4-CTAL by *p*-coumaroyl triacytic acid synthase (CTAS). Polyketide pyrones, BNY and CTAL, are derailment products of the CHS reactions *in vitro* when the reaction mixtures are acidified before extraction^[8].

结构和催化机制极其相似，催化活性中心的 Cys164、His303 和 Asn336 (紫花苜蓿 CHS 氨基酸序列顺序, 其他下同) 在所有的 III 型 PKS 中都

高度保守，构成了酶活性中心催化三联体；Phe215 和 Phe265 起到“gatekeeper”的作用^[10]，与该酶活性有关的其他活性位点残基还有

Thr132、Ser133、Glu192、Thr194、Thr197、Phe215、Phe265、Ser338 和 Pro375。这些氨基酸在 CHS 中高度保守,但在其他Ⅲ型 PKS 中被其他氨基酸所取代,正是这些特定位置的氨基酸决定了聚酮合酶的不同催化活性。定点突变技术是研究蛋白结构与功能的常用方法,Jez 等将紫花苜蓿(*M. sativa*) MsCHS 的 197 位、256 位和 338 位突变成非洲菊(*Gerbera hybrid*) 2-吡喃酮合酶(2-pyrazone synthase, 2-PS)相对应的氨基酸(T197L、G256L、S338I)之后,突变体能利用小分子乙酰辅酶 A 为底物生成较查尔酮更小的吡喃酮^[11]。这是对植物Ⅲ型 PKS 的首次定向突变^[11]。

虎杖(*Polygonum cuspidatum* Sieb.et Zucc.) 属于蓼科(Polygonaceae)多年生草本植物,其虎杖苷、白藜芦醇、黄酮类等化合物含量丰富,具有多种药理活性,其根和茎可广泛入药^[12]。已有研究表明,虎杖的药用价值与虎杖中所含有的黄酮类化合物相关^[13]。PcPKS1 是虎杖合成黄酮类化合物的关键限速酶,具有 CHS 和 BAS 双功能活性。目前已经从苔藓、蕨类、裸子植物和被子植物等多种植物中克隆了 CHS 基因序列^[14]。由于聚酮合酶结构的复杂性,通过晶体结构和点突变等手段寻找关键活性位点,从而合理改造 PKS,使之产生更有效的药用化合物成为一大研究方向。PKS 基因结构多样,但对于虎杖 PcPKS1 的关键活性位点的研究相对较少。

本实验室在前期研究工作中,从虎杖中克

隆到 *PcPKS1* 基因并表明 PcPKS1 具有 CHS 和 BAS 双功能酶特性^[15]。经系统发育分析表明,PcPKS1 是一个典型的 CHS,而功能和酶学分析表明 PcPKS1 同时具有 CHS 和 BAS 催化活性^[15]。本研究采用定点突变对 *PcPKS1* 进行分子修饰并测定修饰后功能变化,以深入了解关键氨基酸位点的改变对 PcPKS1 酶活性的变化,为进一步利用虎杖 *PcPKS1* 进行基因工程操作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

原核表达载体 pET30a 及大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 购自北京博迈德基因技术有限公司;大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3) pLysS 购于北京全式金生物技术有限公司;重组质粒 pET30a-*PcPKS1* 由 Guo 等于 2017 年构建^[16];Muta-directTM 定点突变试剂盒购于北京赛百盛基因技术有限公司;引物合成及序列测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。本研究所用引物如表 1 所示。

1.2 方法

1.2.1 *PcPKS1* 基因定点突变及表达载体构建

以 pET30a-*PcPKS1* 质粒为模板,50 μ L PCR 反应体系进行 PCR 扩增,PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 1 min,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 反应结束后加入 1 μ L (10 U/ μ L) MutazymeTM 酶消化甲基化

表 1 定点突变所用引物

Table 1 Primers used for site-directed mutagenesis

Mutation site	Primer name	Primer sequence (5'→3')
T133LS134A	M13301	CCATGTCATCATGTGCACA <u>CTCGCT</u> GGTGTTGACATGC
	M13302	GCATGTCAACACC <u>AGCGAGT</u> GTGCACATGATGACATGG
S339V	M33901	CGACTACGGAACAT <u>GCT</u> GAGTGCGTGTGTGTTGTTC
	M33902	GAACAACACACACGCACT <u>CAC</u> CATGTTTCCGTAGTCG

The shaded part represents the codon corresponding to the mutated amino acid; The underline represents the mutated base.

质粒, 热激法转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 待平板长出单克隆之后, 进行测序鉴定。将测序正确的质粒记为 pET30a-T133LS134A、pET30a-F216V、pET30a-F266W、pET30a-S339V、pET30a-S339A、pET30a-S339F。

1.2.2 PcPKS1 和突变体的原核表达与纯化

将测序正确的 2 个重组质粒通过热激法转入大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 感受态细胞, 于 37 °C 倒置培养 12–16 h, 构成突变表达菌株。在重组表达菌株和突变表达菌株中加入 0.5 mmol/L IPTG, 25 °C、180 r/min, 大量诱导表达 6 h, 经超声破碎细胞后, 采用镍螯合亲和层析纯化, 使用批量法使重组蛋白与树脂在容器中通过摇动而充分结合, 通过离心分离树脂, 再装柱进行洗脱。经镍柱纯化后的样品含有较高的盐和咪唑, 采用脱盐柱 PD-10 (填料葡聚糖凝胶 G-25) 进行脱盐, 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测表达情况。

1.2.3 PcPKS1 和突变体体外酶促反应与产物检测

PcPKS1 和突变体体外酶促反应体系 (250 μ L), 以终浓度为 25 μ mol/L 4-香豆酰辅酶 A、65 μ mol/L 丙二酰辅酶 A 为底物, 在不同 pH 的 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲溶液 (pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0) 中, 加入 2.0 μ g 纯化好的 PcPKS1 蛋白和突变体蛋白。整个反应体系于 30 °C 恒温水浴锅中反应 30 min 后取出, 加入终浓度 5% 的冰醋酸, 然后用等体积 250 μ L 的乙酸乙酯振荡萃取 2 次, 10 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层有机相至新的离心管, 利用氮吹仪吹干后, 用 50 μ L 50% (体积分数) 色谱甲醇水溶解。

酶促反应产物经 SunfireTM C18 反相柱 (5.0 μ m, 4.6 mm \times 150 mm) 的 Waters HPLC 检测。流动相为甲醇 (A) 和水 (B), 流速为 0.8 mL/min,

梯度洗脱条件: 10%–70% A 30 min、70% A 10 min。苯亚甲基丙酮的最大吸收波长为 323 nm, 柚皮素查尔酮的最大吸收波长为 289 nm。

2 结果与分析

2.1 PcPKS1 突变位点的选择

PcPKS1 是一个由 1 182 个碱基编码 393 个氨基酸的蛋白质酶, 将 PcPKS1 与植物类型 III PKS 超家族中不同种属的 CHS、BAS 重要氨基酸序列进行比较。发现存在多个氨基酸残基可能影响到其双功能酶特性, 包括苏氨酸 (Thr133)、丝氨酸 (Ser134)、丝氨酸 (Ser339) (图 2)。

2.2 PcPKS1 基因的定点突变及原核表达载体构建

将测序结果与野生型 PcPKS1 基因比对, 成功将 PcPKS1 的第 133 位苏氨酸突变成亮氨酸, 第 134 位丝氨酸突变成丙氨酸, 第 339 位丝氨酸突变成缬氨酸, 构建了 2 个突变体 T133LS134A 和 S339V。2 个突变基因有关突变位置基因序列比对结果如图 3 所示。

2.3 重组蛋白的原核表达及纯化

重组菌经 0.5 mmol/L IPTG 诱导大量表达后, 成功表达出目的蛋白。收集破碎细胞上清液和沉淀, 上清液中的蛋白含量明显多于沉淀中的。取上清液经 Ni 柱亲和层析纯化 2 次及 PD-10 柱脱盐, 其中, PcPKS1 得到 43 kDa 的单一目的条带 (图 4)。突变体 T133LS134A 及 S339V 蛋白同样分离到 43 kDa 的可溶性蛋白, 且表达量比野生型 PcPKS1 蛋白表达量高 (图 5)。

2.4 PcPKS1 突变体体外酶促催化反应与产物检测

取苯亚甲基丙酮 (benzalacetone, BA) 及柚皮素查尔酮 (naringenin chalcone, Nar) 标准品混合液 10 μ L 进行 HPLC 检测。运行结束后, HPLC

图谱显示在 25 min 左右出现苯亚甲基丙酮吸收峰, 且 323 nm 处为其最大吸收波长, 在 30 min

左右出现柚皮素查尔酮吸收峰且 289 nm 为其最大吸收波长(图 6)。

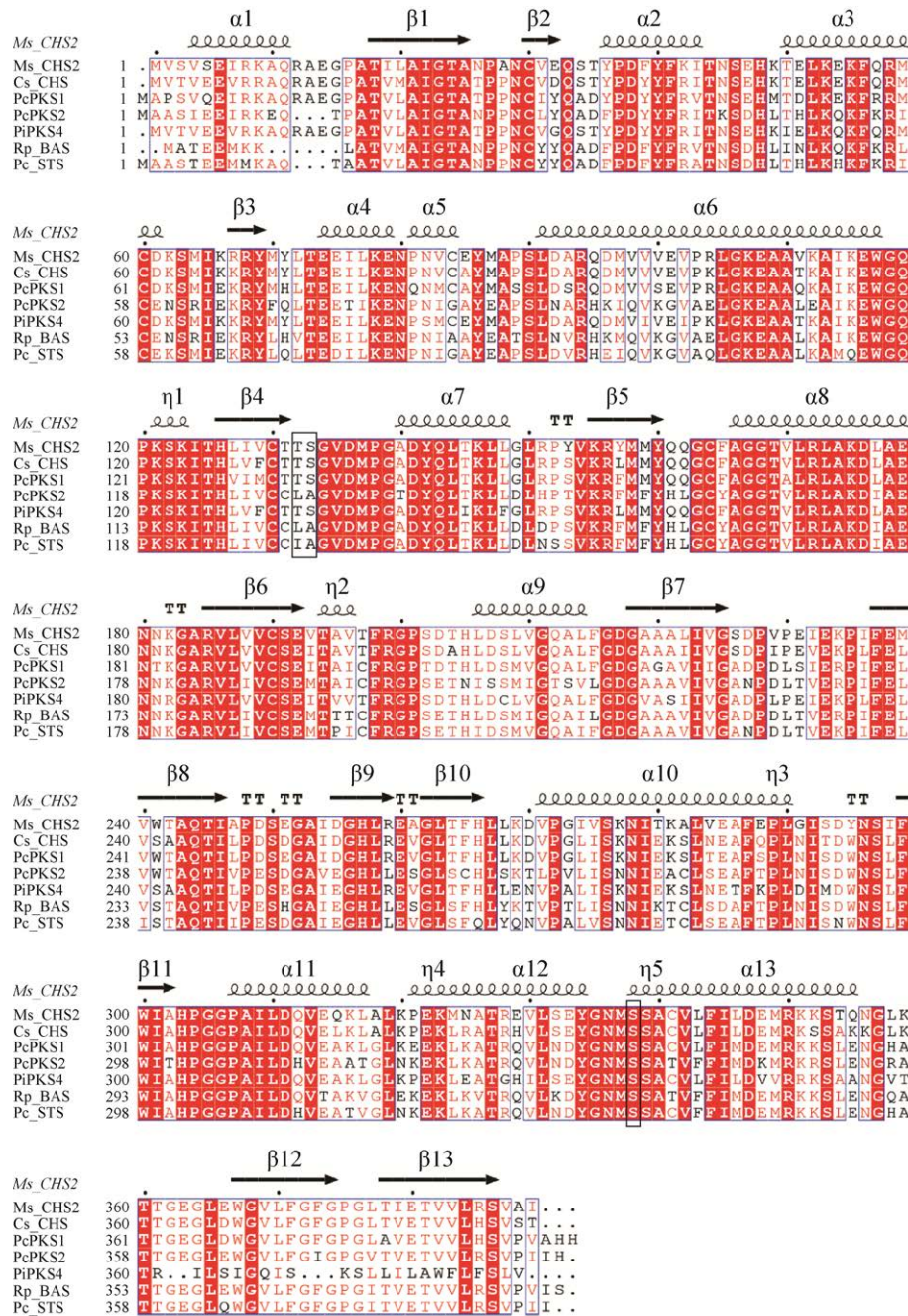


图 2 六种植物类型 III PKS 家族氨基酸序列比对

Figure 2 Comparison of amino acid sequences of III PKS family of six plant types. *Ms_CHS2*: *Medicago sativa* CHS2; *Cs_CHS*: *Cucumis sativus* CHS. *PcPKS1*, *PcPKS2*: *Polygonum cuspidatum* *PcPKS1*, *PcPKS2*; *RiPKS4*: *Rubus idaeus* *RiPKS4*; *Rp_BAS*: *Rheum Palmatum* BAS; *Pc_STS*: *Polygonum cuspidatum* STS. Black boxes mark the amino acid sites for mutation.

PcPKS1 TGCACAACCTCTGGTGTGACATGCCCGGC
 T133LS134A TGCACACTCGCTGGTGTGACATGCCCGGC
 PcPKS1 S339V GTGTTGAACGACTACGGAACATGTCGAGT
 GTGTTGAACGACTACGGAACATGTCGAGT

图3 *PcPKS1* 与突变体突变位置基因序列比对
 Figure 3 Nucleotide sequence alignment of *PcPKS1* and mutant.

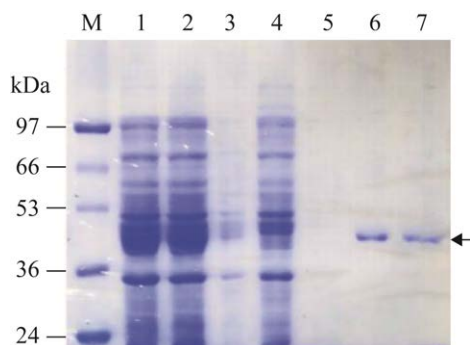
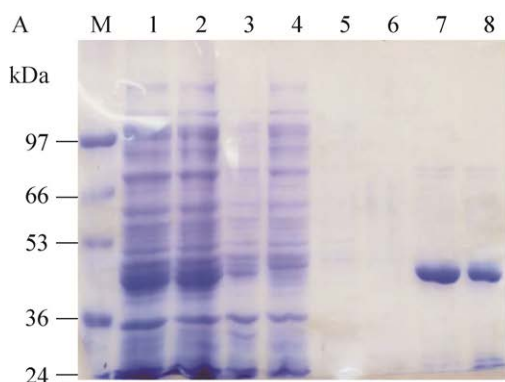


图4 虎杖 *PcPKS1* 蛋白表达与纯化
 Figure 4 Expression and purification of *PcPKS1* from *Polygonum cuspidatum*. 1: Total protein; 2: Supernatant protein after ultrasonic centrifugation; 3: Precipitated protein after ultrasonic centrifugation; 4: Supernatant after incubation with Ni^{2+} resin once; 5: Supernatant after 2 incubations with Ni^{2+} resin; 6: Ni^{2+} resin elution collection solution; 7: PD-10 column protein elution collection solution.



PcPKS1 突变体体外酶促反应采用与野生型 *PcPKS1* 体外酶促反应相同配比的 250 μL 体系(表 2 和图 7)。突变体 T133LS134A 在 pH 7.0 时柚皮素查尔酮合成活性显著低于野生型 *PcPKS1*, 在 pH 9.0 时, 突变体 T133LS134A 以苯亚甲基丙酮为主产物, 其活性显著高于野生型 *PcPKS1*。突变体 S339V 在 pH 7.0 时出现柚皮素查尔酮吸收峰, 活性高于突变体 T133LS134A 柚皮素查尔酮活性。在 pH 9.0 时能产生一定量的苯亚甲基丙酮, 其活性介于野生型和突变体 T133LS134A 之间。值得注意的是, 两个突变体的 BAS 活性均显著高于野生型(表 2 和图 8)。

3 讨论

查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS) (EC 2.3.1.74)超家族是聚酮合酶超家族中研究最早、最透彻的家族成员, 1972 年, Kreuzaler 等首次 在欧芹悬浮细胞培养物中检测到 CHS 的体外酶促活性^[17]。研究显示几乎所有的 CHS 在标准体外试验中仅有 CHS 不具有 BAS 的活性^[18]。在本实验室前期研究工作中, 从蓼科植物虎杖中

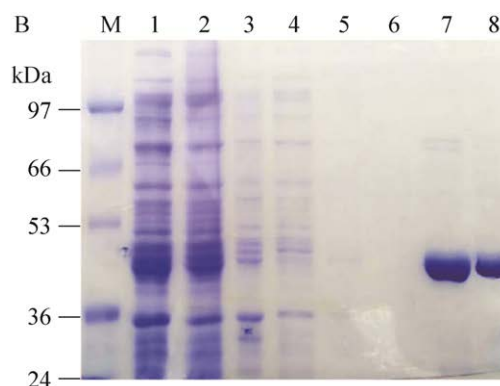


图5 突变体 T133LS134A (A)及 S339V (B)蛋白表达与纯化

Figure 5 Expression and purification of T133LS134A (A) and S339V (B). 1: Total protein; 2: Supernatant protein after ultrasonic centrifugation; 3: Precipitated protein after ultrasonic centrifugation; 4: Supernatant after incubation with Ni^{2+} resin once; 5: Supernatant after incubation with Ni^{2+} resin twice; 6: Supernatant after incubation with Ni^{2+} resin for three times; 7: Ni^{2+} resin elution collection solution; 8: PD-10 column protein elution collection solution.

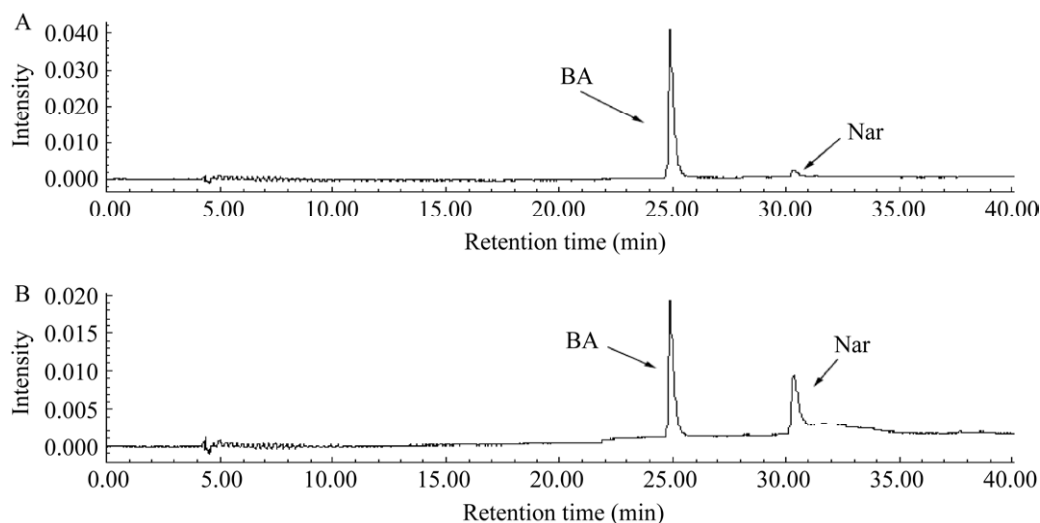


图 6 苯亚甲基丙酮和柚皮素查尔酮标品 HPLC 色谱图

Figure 6 HPLC elution profiles of benzylidene acetone and naringenin chalcone. A: 323 nm HPLC chromatogram. B: 289 nm HPLC chromatogram.

表 2 高效液相色谱定量结果

Table 2 High performance liquid chromatography quantitative results

Sample No.	pH 9.0, 323 nm, active relative area of BAS	pH 7.0, 289 nm, active relative area of CHS
Standard sample	807±0.402	389±0.433
PcPKS1	80±0.258	1 089±0.283
T133LS134A	498±0.374	99±0.345
S339V	453±0.451	521±0.412

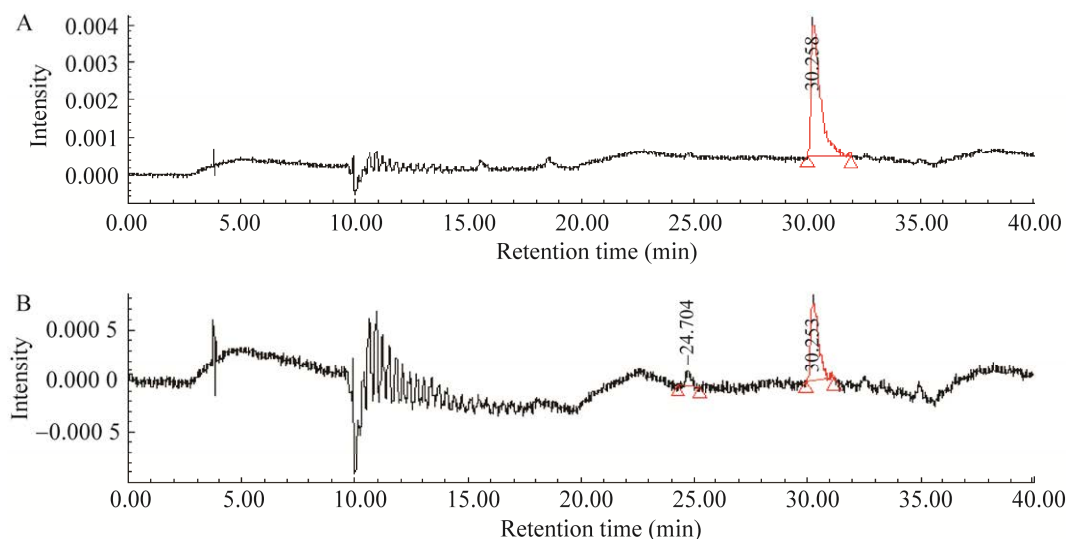


图 7 PcPKS1 体外酶促反应产物 HPLC 色谱图

Figure 7 HPLC elution profiles of PcPKS1 fusion enzymes *in vitro* reaction product. A: HPLC result of enzymatic product at pH 7.0 and 289 nm. B: HPLC result of enzymatic product at pH 9.0 and 323 nm.

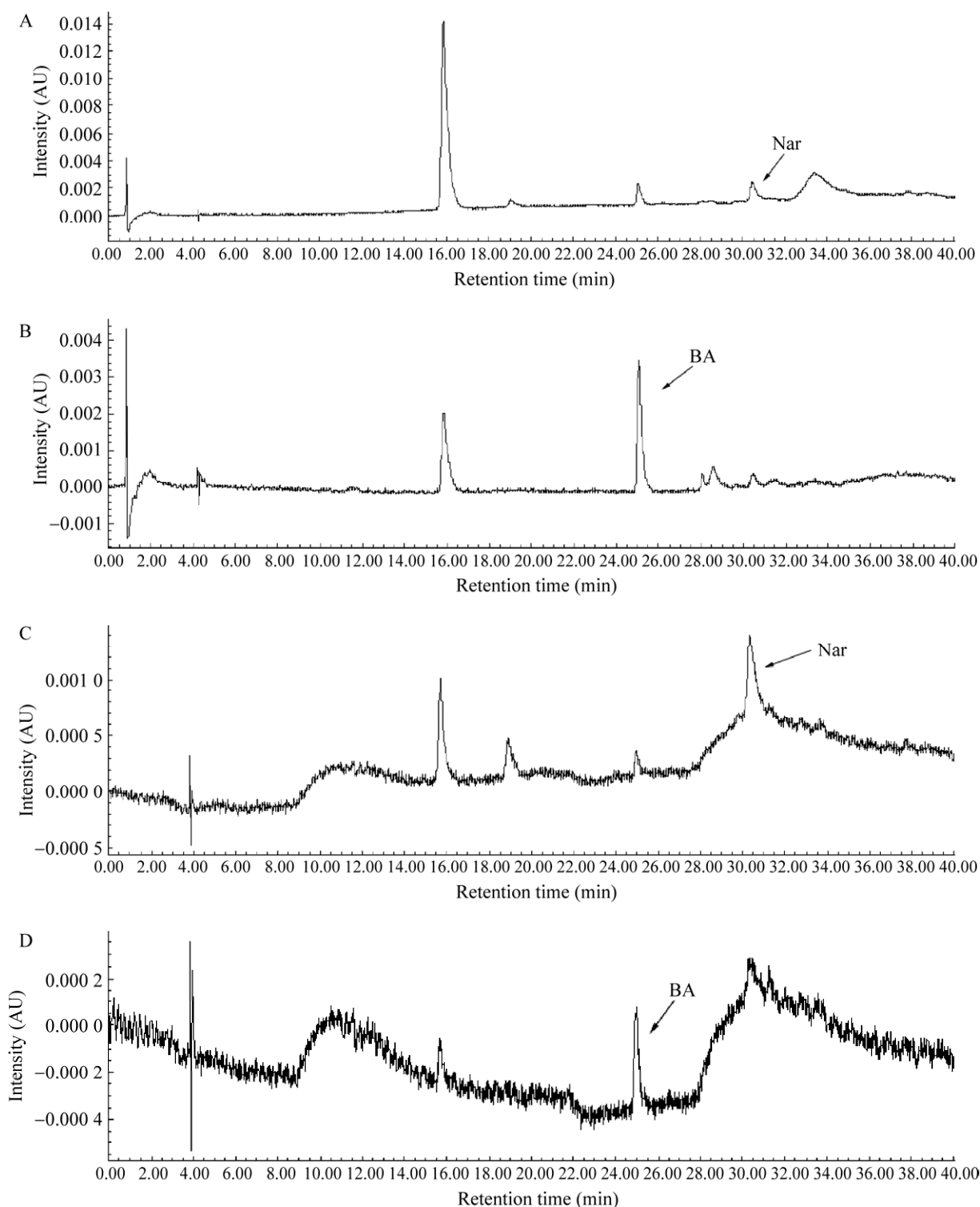


图 8 突变体 T133LS134A 和 S339V 体外酶促反应产物 HPLC 色谱图

Figure 8 HPLC elution profiles of T133LS134A and S339V enzymes *in vitro* reaction product. A: HPLC result of T133LS134A enzymatic product at pH 7.0 and 289 nm. B: HPLC result of T133LS134A enzymatic product at pH 9.0 and 323 nm. C: HPLC results of S339V enzymatic products at pH 7.0 and 289 nm. D: HPLC results of S339V enzymatic products at pH 9.0 and 323 nm.

提取克隆出的 PcPKS1 具有 CHS 和 BAS 双功能酶特性^[9]。PcPKS1 经序列及系统发育分析表明是一个典型的 CHS，而功能和酶学分析中 PcPKS1 呈现出同时具有 CHS 和 BAS 双功能催化活性。

突变体 T133LS134A 和 S339V 与野生型 PcPKS1 相比，其活性位点的改变导致三维结构的改变，BAS 酶活得到了显著提升(图 9)。其中，Ser134 和 Ser338 是与 CHS 产物柚皮素查尔酮的香豆酰衍生部分接触的残基，Ter133 是丙二酰衍生部分与活性腔接触的残基之一。这些位于活性腔周围的多个残基被认为对酶的底物和产物专一性具有重要作用。

本研究定点突变虎杖 *PcPKS1* 基因的 Thr133、Ser134、Ser339 位点(图 10)。Thr132 在植物 III 型 PKS 中高度保守，2010 年，Shimokawa 等对掌叶大黄(*Rheum palmatum*) BAS 的 Leu132 进行了一系列的定点突变(L132G、L132A、L132S、L132C、L132T、L132F、L132Y、L132W 和 L132P)，结果显示，L132T 突变恢复了 RpBAS 的查尔酮合酶活性^[19]。本研

究突变体 T133LS134A 仍具有双功能酶活性，在 pH 7.0 的条件下，其 CHS 活性显著低于野生型 PcPKS1，这与掌叶大黄的研究结果一致，再次确认了该位点对于聚酮合酶的活性具有较大影响。2009 年，Klundt 等将金丝桃(*Hypericum androsaemum*)的二苯甲酮合酶(benzophenone synthase, BPS)活性口袋内的 T135 (对应 MsCHS 中 T132)突变为 Leu，与本研究突变位点及突变氨基酸均一致，突变结果表明原本催化苯甲酰 CoA 与丙二酰 CoA 聚合形成二苯甲酮的 BPS 在功能上转变为苯基吡喃酮合酶活性，该位点的突变改变了野生型 BPS 的底物和产物特异性^[20]。该研究也充分证明，单一活性位点氨基酸残基的改变完全可以彻底改变一种 III 型 PKS 原有的活性而产生另一种全新的酶。

2007 年，Abe 等将掌叶大黄(*R. palmatum*) BAS 的 338 位丝氨酸突变为缬氨酸(S338V)后，其 BAS 活性增加了 2 倍^[21]，与本研究 338 位点的突变效果相同，表明 338 位点对于 PcPKS1 发挥 BAS 酶活性具有重要作用。推测 S338 位点更有利于底物与酶的结合，从而提高酶的催化效率。

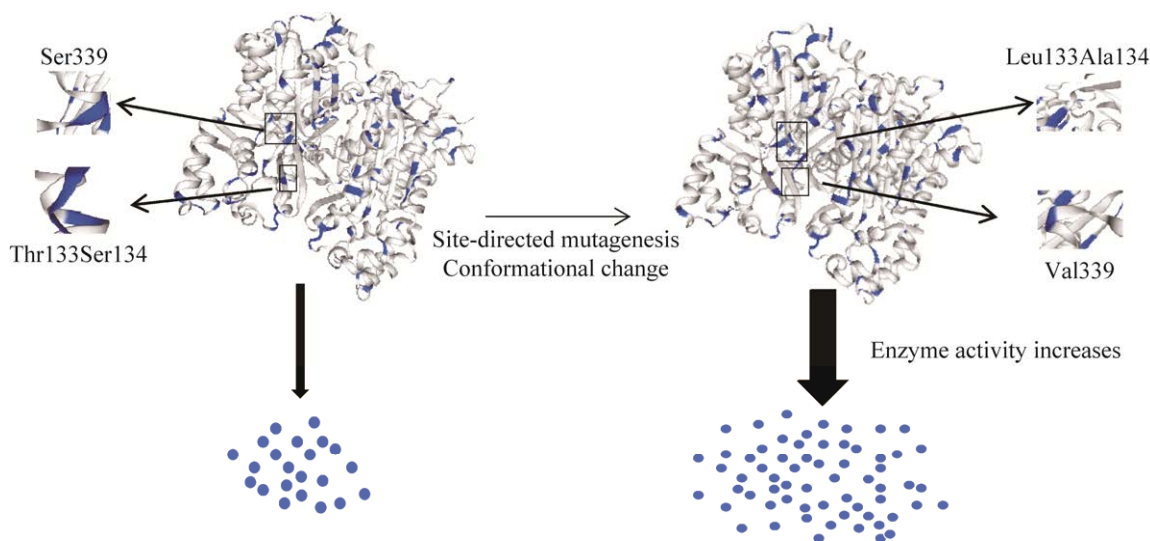


图 9 *PcPKS1* 与突变体三维结构模式图

Figure 9 3D structure pattern diagram of *PcPKS1* and mutant.

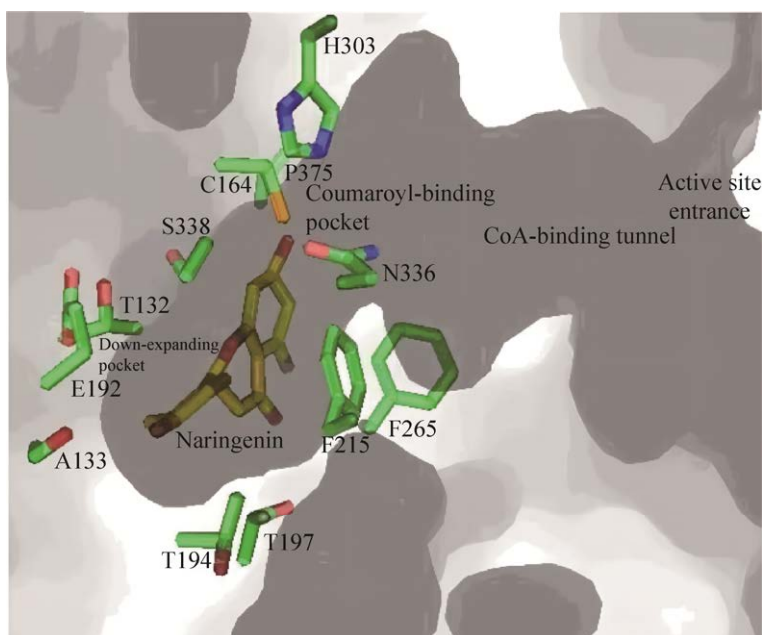


图 10 紫花苜蓿 CHS2 活性位点腔结构^[22] 关键活性位点残基(Thr132、Ser133、Glu192、Thr194、Thr197、Phe215、Phe265、Ser338 和 Pro375), 其中 T132 为虎杖 Thr133、A133 为虎杖 Ser134、S338 表示虎杖 Ser339

Figure 10 Enzyme reaction, overall structure and detailed active site cavity structure of *Medicago sativa* CHS2^[22]. The side chains of Thr132, Ser133, Thr194, Thr197, Phe215, Gly256, Phe265, Ser338 和 Pro375 are shown as stick models with carbons in green; among them, T132 is *Polygonum cuspidatum* Thr133, A133 is *P. cuspidatum* Ser134, S338 means *P. cuspidatum* Ser339.

PcPKS1 在 pH 7.0 时仅具有 CHS 活性, 在 pH 9.0 时同时具有 BAS 和 CHS 活性, 表明 PcPKS1 相对于其他单一 CHS 而言具有更加复杂的空间结构来使其在不同生理状态下表现出不同的催化活性。突变体 T133LS134A 和 S339V 均具有双功能酶活性, 但在 pH 9.0 时只体现苯亚甲基丙酮合酶活性, 表明活性位点周围的单个或多个氨基酸均能对酶活性产生直接影响。这也反映了植物 III 型聚酮合酶结构与功能之间的复杂性。

4 结论

本研究以虎杖 *PcPKS1* 基因为入手点, 对 *PcPKS1* 进行定点突变, 最终成功构建了 2 个突

变体。研究发现突变体 T133LS134A 和 S339V 在 pH 7.0 和 pH 9.0 的体外酶促条件下, 具有一定的 BAS 和 CHS 双功能活性, 同时两个突变体 BAS 活性均显著高于野生型 PcPKS1 酶活性。

REFERENCES

- [1] BARTON SD, NAKANISHI K, METH-COHN O. Editors-in-chief[M]//Comprehensive Natural Products Chemistry. Amsterdam: Elsevier, 1999.
- [2] LIM Y, GO M, YEW W. Exploiting the biosynthetic potential of type III polyketide synthases[J]. Molecules, 2016, 21(6): 806.
- [3] YI T, ZHANG H, CAI ZW. Analysis of Rhizoma Polygoni Cuspidati by HPLC and HPLC-ESI/MS[J]. Phytochemical Analysis, 2007, 18(5): 387-392.
- [4] 马兰青, 师光禄, 叶和春, 刘本叶, 王有年. 植物类

- 型III聚酮合酶超家族基因结构、功能及代谢产物[J]. 生物工程学报, 2010, 26(11): 1482-1492.
- MA LQ, SHI GL, YE HC, LIU BY, WANG YN. Plant-specific type III polyketide synthase superfamily: gene structure, function and metabolites[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(11): 1482-1492 (in Chinese).
- [5] SHEN B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2003, 7(2): 285-295.
- [6] SCHRODER J. A family of plant-specific polyketide synthases: facts and predictions[J]. Trends in Plant Science, 1997, 2(10): 373-378.
- [7] MOORE BS, HOPKE JN. Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway[J]. ChemBiochem a European Journal of Chemical Biology, 2001, 2(1): 35-38.
- [8] MA LQ, GUO YW, GAO DY, MA DM, WANG YN, LI GF, LIU BY, WANG H, YE HC. Identification of a *Polygonum cuspidatum* three-intron gene encoding a type III polyketide synthase producing both naringenin and *p*-hydroxybenzalacetone[J]. Planta, 2009, 229(5): 1077-1086.
- [9] FERRER JL, JEZ JM, BOWMAN ME, DIXON RA, NOEL JP. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis[J]. Nature Structural Biology, 1999, 6(8): 775-784.
- [10] AUSTIN MB, NOELL JP. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases[J]. Natural Product Reports, 2003, 20(1): 79-110.
- [11] JEZ JM, AUSTIN MB, FERRER JL, BOWMAN ME, SCHRÖDER J, NOEL JP. Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases[J]. Chemistry & Biology, 2000, 7(12): 919-930.
- [12] 胡春生, 吴祖泽, 张庆林. 聚酮类化合物异源表达研究进展[J]. 生物技术通讯, 2013, 24(4): 573-578.
- HU CS, WU ZZ, ZHANG QL. Research progress in heterologous express of polyketides[J]. Letters in Biotechnology, 2013, 24(4): 573-578 (in Chinese).
- [13] MAIOLO SA, FAN PH, PBOBROVSKAYA L. Bioactive constituents from cinnamon, hemp seed and *Polygonum cuspidatum* protect against H₂O₂ but not rotenone toxicity in a cellular model of Parkinson's disease[J]. Journal of Traditional Complementary Medicine, 2018, 8(3): 420-427.
- [14] REIMOLD U, KRÖGER M, KREUZALER F, HAHNBROCK K. Coding and 3' non-coding nucleotide sequence of chalcone synthase mRNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme[J]. The EMBO Journal, 1983, 2(10): 1801-1805.
- [15] MA LQ, PANG XB, SHEN HY, PU GB, WANG HH, LEI CY, WANG H, LI GF, LIU BY, YE HC. A novel type III polyketide synthase encoded by a three-intron gene from *Polygonum cuspidatum*[J]. Planta, 2009, 229(3): 457-469.
- [16] GUO HL, YANG YD, MA YD, LIU WB, FENG J, LUO ZQ, LU HS, LIU CM, YANG MF, WANG YN, MA LQ. A bifunctional type III polyketide synthase from raspberry (*Rubus idaeus* L.) with both chalcone synthase and benzalacetone synthase activity[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2017, 26(1): 80-90.
- [17] KREUZALER F, HAHNBROCK K. Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants: formation of naringenin (5,7,4'-trihydroxyflavanone) from *p*-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A[J]. FEBS Letters, 1972, 28(1): 69-72.
- [18] 杨继, 顾红雅. 查尔酮合酶超家族(chalcone synthase superfamily)基因重复和分化的式样[J]. 科学通报, 2006, 51(7): 745-749.
- YANG J, GU HY. Patterns of gene repetition and differentiation in chalcone synthase superfamily[J]. Chinese Science Bulletin, 2006, 51(7): 745-749 (in Chinese).
- [19] SHIMOKAWA Y, MORITA H, ABE I. Structure-based engineering of benzalacetone synthase[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010, 20(17): 5099-5103.
- [20] KLUNDT T, BOCOLA M, LUTGE M, BEUERLE T, LIU BY, BEERHUES L. A single amino acid substitution converts benzophenone synthase into phenylpyrone synthase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(45): 30957-30964.
- [21] ABE T, MORITA H, NOMA H, KOHON T, NOGUCHI H, ABE I. Structure function analysis of benzalacetone synthase from *Rheum palmatum*[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007, 17(11): 3161-3166.
- [22] 吕鹤书, 柳春梅, 路平, 师光禄, 马兰青, 王有年. 植物类型III聚酮合酶超家族晶体结构与功能[J]. 生物工程学报, 2012, 28(1): 1-14.
- LU HS, LIU CM, LU P, SHI GL, MA LQ, WANG YN. Plant-specific type III polyketide synthases superfamily: crystal structures and functions[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2012, 28(1): 1-14 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)