



植物乳杆菌环二腺苷酸合成酶的克隆表达与活性分析

杜斌¹ 刘喜朋^{*2} 韦曾传¹ 汪肖¹ 刘正红¹ 林栋¹

1 贵阳学院食品与制药工程学院 贵州 贵阳 550005

2 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240

摘要:【背景】环二腺苷酸(Cyclic Diadenosine Monophosphate, c-di-AMP)是一种主要存在于革兰氏阳性菌中的重要的第二信使分子,其参与细菌的生长、生存、抗逆性等多种生理活动,但目前关于乳酸菌中 c-di-AMP 的研究甚少。【目的】从植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)中克隆得到 c-di-AMP 合成酶基因,在大肠杆菌中进行可溶性表达并研究其体外活性。【方法】使用高效液相色谱以及质谱分析对植物乳杆菌-YRA7 细胞内容物中的 c-di-AMP 进行检测;以植物乳杆菌-YRA7 基因组 DNA 为模板,克隆 c-di-AMP 合成酶基因(*lpDacA*),构建重组表达载体 pET-28a-*lpDacA* 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达,通过 Ni-NTA 亲和层析纯化后进行体外活性研究。【结果】在植物乳杆菌中检测到 c-di-AMP 分子;成功构建了 c-di-AMP 合成酶基因的重组表达质粒,该重组蛋白在大肠杆菌中得到可溶性表达;体外活性分析显示,该重组蛋白可以催化 ATP 生成 c-di-AMP,其活性依赖于二价阳离子的存在,在 Mg²⁺ 存在以及碱性环境下活性较强;RHR 是合成酶活性的关键基序,是环二腺苷酸合成酶与 ATP 的结合位点。【结论】植物乳杆菌 c-di-AMP 合成酶的克隆表达及活性分析为进一步研究 c-di-AMP 在植物乳杆菌中的作用奠定了基础。

关键词: 环二腺苷酸, 植物乳杆菌, 原核表达

Foundation items: Science and Technology Foundation of Guizhou Province ([2017]1003); National Natural Science Foundation of China (U1832161); Discipline and Master's Site Construction Project of Guiyang University by Guiyang Financial Support Guiyang University (SY-2020); Guizhou Provincial Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (20190265139016); Natural Science Foundation of the Department of Education of Guizhou Province ([2017] 241); Guizhou General University Engineering Research Center ([2019] 051)

***Corresponding author:** E-mail: xpliu@sjtu.edu.cn

Received: 28-06-2020; **Accepted:** 11-08-2020; **Published online:** 04-11-2020

基金项目: 贵州省科学技术基金(黔科合基础[2017]1003); 国家自然科学基金(U1832161); 贵阳市财政支持贵阳学院学科建设与研究生教育项目(SY-2020); 贵州省大学生创新创业训练计划项目(20190265139016); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2017] 241); 贵州省高等学校工程研究中心建设项目:(黔教合 KY 字[2019] 051)

***通信作者:** E-mail: xpliu@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-06-28; **接受日期:** 2020-08-11; **网络首发日期:** 2020-11-04

Cloning, expression and characterization of c-di-AMP-synthesizing enzyme from *Lactobacillus plantarum*

DU Bin¹ LIU Xipeng^{*2} WEI Zengchuan¹ WANG Xiao¹ LIU Zhenghong¹
LIN Dong¹

1 College of Food and Pharmacy Engineering, Guiyang University, Guiyang, Guizhou 550005, China

2 School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] Cyclic diadenosine monophosphate (c-di-AMP) is an important secondary messenger molecule produced primarily within Gram-positive bacteria and is involved in cell growth, survival, stress resistance and many other aspects of bacterial physiology; however, there are few studies on c-di-AMP in lactic acid bacteria currently. [Objective] The gene of c-di-AMP-synthesizing enzyme from *Lactobacillus plantarum* was cloned and efficiently heterologous expressed in *Escherichia coli*, and its biochemical activity *in vitro* was studied. [Methods] c-di-AMP in *L. plantarum*-YRA7 was detected by HPLC and ESI-MS using the cell extract. Then the c-di-AMP-synthesizing enzyme gene (*lpDacA*) was cloned from the genomic DNA of *L. plantarum*-YRA7 and the recombinant plasmid pET-28a-*lpDacA* was constructed. The recombinant protein was successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3), and purified by Ni-NTA affinity chromatography. Then enzymatic characteristics *in vitro* was studied. [Results] c-di-AMP was detected in *L. plantarum*-YRA7. The recombinant expression plasmid pET-28a-*lpDacA* was constructed and the purified recombinant protein was obtained. The biochemical activity study showed that the purified recombinant protein converted ATP into c-di-AMP *in vitro*. Its c-di-AMP-synthesizing activity was dependent on divalent metal ions and exhibited higher activity in the presence of Mg²⁺ at a basic pH. We also found that RHR motif is essential for the c-di-AMP-synthesizing activity and is the ATP binding site of *lpDacA*. [Conclusion] Cloning, expression and characterization of c-di-AMP-synthesizing enzyme from *L. plantarum* will laid a solid foundation for future exploration on the physiological role of c-di-AMP in *L. plantarum*.

Keywords: c-di-AMP, *Lactobacillus plantarum*, prokaryotic expression

乳酸菌(Lactic Acid Bacteria, LAB)是一类可通过发酵碳水化合物产生乳酸,但不产孢子的革兰氏阳性细菌的统称。由于乳酸菌在食品安全性能上具有独特的优势,被广泛应用于食品、饲料、医药、精细化工等行业中^[1]。植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)是一类可在多种环境下生存的乳酸菌,广泛存在于各类发酵食品中;其还是正常人体肠道的定殖菌群,具有维持肠道微生态平衡、促进营养物质吸收、提高机体免疫力等多种功能^[2]。基于上述特点,在食品发酵、工业生产以及医疗保健等领域,植物乳杆菌都有着广泛的应用。通常植物乳杆菌在食品发酵和保鲜过程中会遇到盐胁迫、酸胁迫、高温低温胁迫等不良环境^[3],因此,乳杆菌在不良环境中存活、生长、代谢的能力对于工业生产

至关重要。

环二腺苷酸(Cyclic Diadenosine Monophosphate, c-di-AMP)是一种细菌第二信使分子,由2分子ATP或者2分子ADP经含有环化酶(Diadenylate Cyclase, DAC)活性结构域的蛋白催化形成的一种环状分子。具有催化活性的DAC结构域首先发现于枯草芽孢杆菌的c-di-AMP合成酶DisA中,同时研究发现该结构域中均存在RHR(Arg-His-Arg)和DGA(Asp-Gly-Ala)2个氨基酸保守基序^[4]。随后,在许多细菌和古细菌中均发现了含有DAC结构域的蛋白;目前该蛋白主要有DisA、CdaS、CdaM和DacA这4类,其中包含一个DAC结构域和一个跨膜区的DacA(也称CdaA),广泛分布于多种细菌中,如金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、化脓隐

秘杆菌和单增李斯特菌等^[5]。现已发现 c-di-AMP 与枯草芽孢杆菌的耐酸^[6]、金黄色葡萄球菌对低磷酸盐环境的耐受^[7]、化脓链球菌的高盐耐受^[8]等抗胁迫能力密切相关。本研究以从侗族传统酸肉与腌鱼中分离获得的植物乳杆菌-YRA7^[9]作为研究对象,首次对植物乳杆菌中的 c-di-AMP 及其合成酶基因进行研究,以期为进一步深入探讨 c-di-AMP 在植物乳杆菌中发挥的生物学功能及其与植物乳杆菌抗胁迫能力的关系奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器

植物乳杆菌-YRA7 分离自侗族传统酸肉^[9],实验室保存;大肠埃希氏菌 DH5 α 、BL21(DE3),实验室制备保存;原核表达载体 pET-28a, Novagen 公司; γ -linked ATP-Sepharose, Innova Biosciences 公司; MRS 培养基,北京奥博星生物技术有限责任公司; *Taq* DNA 聚合酶,宝生物工程(大连)有限公司; DNA 高保真聚合酶 Trans *Taq*[®] High Fidelity (HiFi) PCR SuperMix I、DNA 分子量标准,北京全式金生物技术有限公司;质粒小提中量试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;蛋白质低分子量标准、*Bam*H I/*Eco*R I 限制性内切酶、T4 连接酶, Thermo Fisher Scientific 公司; IPTG、PAGE 电泳相关试剂,生工生物工程(上海)股份有限公司; ATP、c-di-AMP 标准品, Biolog 公司。

PCR 仪, Applied Biosystems 公司;凝胶成像仪,上海复日科技仪器有限公司;高压细胞破碎仪,ATS Engineering 公司;250 mm \times 4.5 mm RPC-18 Column 色谱分析柱, Kromasil 公司。

1.2 方 法

1.2.1 植物乳杆菌 c-di-AMP 分子的检测

(1) 植物乳杆菌细胞提取物的制备

提取过程参照文献[10]进行,略有改动,具体如下:挑取植物乳杆菌-YRA7 单菌落接种于 5 mL MRS 液体培养基 37 °C、120 r/min 培养过夜,次

日 1:100 接种于 500 mL 新鲜 MRS 培养基,37 °C 振荡培养至对数生长期,将菌液 4 °C、9 000 \times g 离心 5 min,收集上清。20 mL 抽提液重悬菌体,置于液氮中作用 15 s。然后 100 °C 水浴锅作用 10 min,4 °C 冷却 30 min。设定细胞破碎机压强为 1 500 bar,重悬液 4 °C 于细胞破碎机中作用 3 次,所得溶液于 10 000 \times g 离心 30 min 收集上清。上清经 45 °C 旋转真空干燥后,用 500 μ L 去离子水溶解样品,再经 0.22 μ m 滤器过滤后,样品于 -80 °C 保存备用。

(2) c-di-AMP 分子的鉴定

参照文献[11]对上述样品进行反向高效液相色谱分析,设置检测条件为:进样量为 20 μ L,以 100%至 50%流动相 A (10 mmol/L 质谱纯级乙酸铵溶液,调整 pH 值为 5.5)梯度洗脱 20 min (流动相 B 相溶液为甲醇)。设置流速 0.7 mL/min、柱温 25 °C、吸收波长 254 nm。根据 c-di-AMP 标准品的出峰时间,对提取物中是否含有 c-di-AMP 进行初步判断。

根据出峰时间对样品中的疑似检测波峰进行收集,收集样品经真空干燥后溶于 100 μ L 去离子水,然后进行质谱分析。质谱仪参数设定为:电离模式:电喷雾离子源,负离子模式;毛细管电压 2.8 kV;离子源温度 100 °C;雾化气温度 350 °C;雾化气流量 600.0 L/h;碰撞电压 4.0 eV;扫描时间:0.500 s;扫描范围:100-1 000 m/z ;在线校正:200 ng/mL 亮氨酸脑啡肽(556.277 1 m/z)。

1.2.2 植物乳杆菌 c-di-AMP 合成基因的生物信息学分析

(1) 植物乳杆菌 c-di-AMP 合成酶基因的克隆

以植物乳杆菌标准株 ATCC 14917 基因组数据(GenBank 登录号 AZEJ01000008.1)为参考,通过“Diadenylate Cyclase/c-di-AMP Synthetase”关键词检索出潜在的 c-di-AMP 合成酶蛋白编码基因(Protein_id: FC76_GL002863),并以其核酸序列为参照,设计包含完整阅读框的引物对 DacA-F (5'-A TGATTTTCATGAGGAGGAGA-3')和 DacA-R (5'-T

CATTTTCGGGGACCTCCTC-3')。采用 Trans Taq[®] High Fidelity (HiFi) PCR SuperMix I 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系(50 μ L): 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 1.0 μ L, 基因组 DNA 2.0 μ L, 2 \times PCR SuperMix 25 μ L, ddH₂O 补齐至 50 μ L。PCR 反应设置退火温度为 58 $^{\circ}$ C, 其余条件参照产品使用说明书共进行 35 个循环。产物经琼脂糖凝胶电泳检测后回收目的片段, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。

(2) 植物乳杆菌 c-di-AMP 合成基因的序列分析

根据测序结果, 采用在线软件 Clustal Omega 对植物乳杆菌 c-di-AMP 合成酶基因进行同源比对分析, 结果用 ESPript 3.0 在线工具进行处理。利用 NCBI 保守性结构域检索工具(NCBI Conserved Domain Search)对 c-di-AMP 合成酶的功能结构域进行分析。

1.2.3 植物乳杆菌 c-di-AMP 合成酶基因胞内功能域的表达与纯化

(1) c-di-AMP 合成酶基因胞内功能域序列的扩增

c-di-AMP 合成酶 IpDacA 胞内功能域部分(95–280 aa)的扩增以 1.2.2 纯化产物为模板, 设计引物对 IpDacA in-F (5'-CGGGATCCGGGCGTGGCTCCATGTTTGCG-3', 划线部分为 BamH I 酶切位点) 和 IpDacA in-R (5'-CGGAATTCTCATTTCGGGGA CCTCCTCC-3', 划线部分为 EcoR I 酶切位点)。

PCR 反应体系(50 μ L): 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 1.0 μ L, 5 \times FastPfu Buffer 10 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 5 μ L, 基因组 DNA 2.0 μ L, RNase-Free ddH₂O 30 μ L, FastPfu DNA Polymerase (2.5 U/ μ L) 1 μ L。PCR 反应设置退火温度为 58 $^{\circ}$ C, 其余条件参照产品使用说明书共进行 35 个循环。产物经琼脂糖凝胶电泳检测后回收目的片段。

(2) 表达载体的构建

原核表达载体 pET-28a 及 PCR 扩增产物用 BamH I/EcoR I 进行双酶切, 纯化后进行连接反应, 将连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12–16 h 直至出现菌落。

挑取单克隆分别接种于 5 mL 含 30 μ g/mL 卡

那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜并参照质粒提取试剂盒说明提取质粒。对经双酶切鉴定为阳性的重组质粒进行序列测定。

(3) 重组蛋白的诱导表达

将构建成功的重组质粒以转化大肠杆菌 DH5 α 的相同条件转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 同时转化空质粒作为阴性对照。分别挑取单菌落于 5 mL 含 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日按体积比 1:100 转接于 200 mL 含 30 μ g/mL 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6–0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L。37 $^{\circ}$ C 继续诱导培养 6 h 后 12 000 \times g 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 PBS 重悬后进行 SDS-PAGE 电泳分析。

(4) 重组蛋白的纯化

将保存的阳性克隆接种于含 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、160 r/min 振荡过夜, 取 10 mL 菌液接种于 1 L 含 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6–0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L。继续以优化后的条件, 即 27 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 5 h 后, 培养液于 4 $^{\circ}$ C、6 000 \times g 离心 10 min, 弃上清。菌体沉淀用 PBS (pH 7.4) 清洗 3 遍后, 再加入 30 mL 含 20 mmol/L 咪唑的 Binding Buffer 重悬菌体。重悬液冰浴并于细胞超声破碎仪中 200 W 超声(工作 5 s, 间隔 5 s) 20 min, 然后 4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g 离心 20 min, 取上清并用 0.22 μ m 滤器过滤后备用。

参照 HisTrap HP 纯化柱使用说明对重组蛋白进行纯化, 具体步骤如下: 首先用 5 倍柱体积的去离子水清洗纯化柱, 然后以 1 mL/min 的流速, 用 10 倍柱体积的含 20 mmol/L 咪唑的上样缓冲液平衡纯化柱。样品以 0.5 mL/min 的流速于 4 $^{\circ}$ C 进行上样后, 再用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液进行线性梯度洗脱, 并收集洗脱液。根据目的蛋白的分子量, 采用 10 kD 规格超滤离心管对纯化蛋白进行脱盐以及浓缩, 浓缩后的蛋白采用 Bradford 法进行浓度测定。

1.2.4 重组蛋白体外活性检测

重组蛋白体外活性检测采用 50 μ L 反应体系, 合成酶反应缓冲液^[12] [40 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L NaCl, 100 μ mol/L ATP] 中加入 2 μ mol/L 重组蛋白, 37 °C 反应 1 h 后, 置于沸水 5 min 终止反应。12 000 \times g 离心 5 min, 取上清 20 μ L, 以 ATP 与 c-di-AMP 的标准品为对照, 参照 1.2.1 中方法进行 HPLC 检测。

1.2.5 pH 值对重组蛋白活性的影响

参照 Bai 等^[13]的方法, 在 1.2.4 方法基础上, 调整反应体系的 pH 分别为 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0 对重组蛋白进行体外活性检测。设定生成 c-di-AMP 最高量 pH 下的活性为 100%, 其他 pH 值下 c-di-AMP 的生成量与最高值进行比较, 得到相对的活性值。

1.2.6 金属离子对重组蛋白活性的影响

参照 Bai 等^[13]的方法, 在获得的最适 pH 条件下, 将反应缓冲液中的 Mg²⁺ 分别更换为 Mn²⁺、Co²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺ 和 Fe²⁺, 然后对重组蛋白进行体外活性检测。参照 1.2.5 的计算方法, 设定生成 c-di-AMP 最高生成量时重组蛋白的活性为 100%, 其他金属离子存在条件下的生成量与该值进行比较, 得到相对的活性值。

1.2.7 RHR 基序对重组蛋白活性的影响

(1) RHR 基序的突变

参照 Du 等^[12]的方法, 针对 RHR 基序设计引物对 rhr-MF (5'-TTCCTAAAGAGTTAGGAAGCTC GGCACCGTGCCGCGGTCGGAATCAGTGA-3') 和 rhr-MR (5'-TCACTGATTCCGACCGCGGC ACGGTGCCGAGTTCCTAACTCTTTAGGAA-3')。结合引物对 lpDacA in-F/lpDacA in-R, 采用重叠延伸 PCR 技术, 将 RHR 基序突变为 AAA (引物下划线部分), 并以相同条件对所得产物进行表达纯化以及体外活性检测。

(2) RHR 基序对合成酶与 ATP 结合的影响

分别取纯化的 RHR 突变前和突变后的重组蛋白 30 μ g, 加入含 50 μ L γ -Linked ATP-Sepharose 的反

应缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl) 混合均匀, 4 °C 反应 2 h, 用反应缓冲液清洗 5 遍后加入 20 μ L 上样缓冲液, 沸水中作用 5 min, 12 000 \times g 离心 2 min 后取上清, 通过 SDS-PAGE 电泳检测各重组蛋白与 ATP 的结合情况。

2 结果与分析

2.1 植物乳杆菌 c-di-AMP 分子的检测

以 c-di-AMP 为标准品, 对植物乳杆菌细胞提取物进行 HPLC 检测。结果显示植物乳杆菌细胞提取物在与 c-di-AMP 标准品相同出峰时间处出现了一个色谱峰 (图 1A)。根据出峰时间对该波峰处的组分进行收集纯化, 经 ESI-MS 质谱检测发现, 检测物与 c-di-AMP 标准品具有相同的分子片段 (图 1B、1C), 表明植物乳杆菌细胞中含有 c-di-AMP。

2.2 植物乳杆菌 c-di-AMP 合成酶基因的克隆以及生物信息学分析

如图 2A 所示, 设计引物成功扩增得到全长为 843 bp 的 DNA 片段。对测序结果进行分析, 结果显示所得 DNA 片段共编码 280 个氨基酸, 经 SMART 结构分析后显示, 该蛋白具有典型的 DacA 蛋白家族结构, 即包含 2 个跨膜区 (蓝色区域) 和 1 个 DisA_N (DAC) 结构域 (图 2B), 将其命名为 lpDacA。再选取近年来报道的具有代表性的菌属中的 c-di-AMP 合成酶氨基酸序列与 lpDacA 进行多重序列比对分析, 结果如图 2C 所示, lpDacA 含有对 c-di-AMP 合成至关重要的 DGA 基序 (为金属离子结合区域) 和 RHR 基序 (为 ATP 结合区域)^[4], 表明其很可能是功能性的 c-di-AMP 合成酶。

2.3 lpDacA 的体外表达

2.3.1 融合表达载体的构建和鉴定

用特异性引物 lpDacA in-F/lpDacA in-R 进行 PCR 扩增, 电泳结果表明成功扩增出 561 bp 的 DNA 片段 (图 3A)。将扩增产物经 BamH I/EcoR I 酶切后, 与原核表达载体 pET-28a 进行定向连接, 构建重组融合表达质粒 pET-28a-lpDacA。重组质粒经双酶切后获得与预期一致的条带 (图 3B), 经测序鉴定表明重组质粒 pET-28a-lpDacA 构建成功。

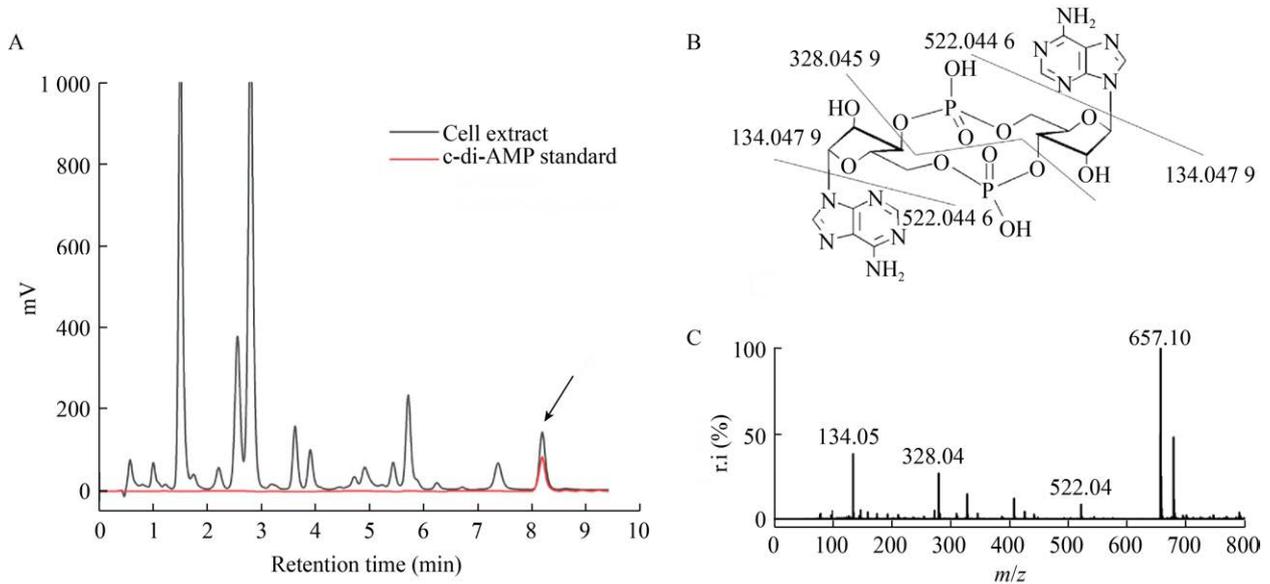


图 1 植物乳杆菌 c-di-AMP 的检测

Figure 1 Detection of c-di-AMP in *L. plantarum*

注: A: c-di-AMP HPLC 检测; B: c-di-AMP 结构示意图; C: 提取物的 ESI-MS 检测

Note: A: Detection of c-di-AMP by HPLC; B: Chemical structure of c-di-AMP; C: ESI-MS analysis of relevant HPLC fractions

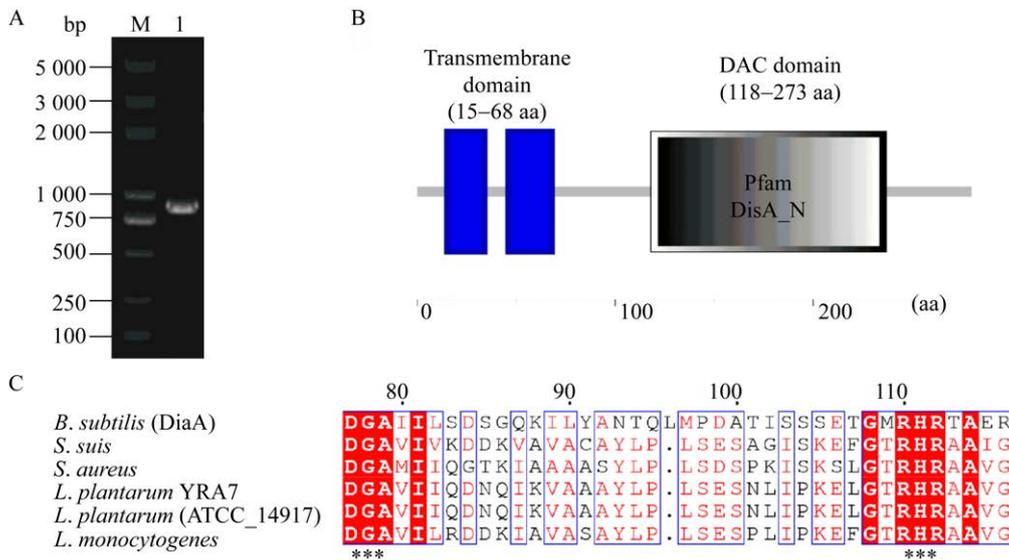


图 2 植物乳杆菌 c-di-AMP 合成酶基因的克隆以及生物信息学分析

Figure 2 Cloning and bioinformatics analysis of *lpDacA* in *L. plantarum*

注: A: M: DNA Marker; 1: PCR 扩增产物。B: c-di-AMP 合成酶的结构分析。C: 蛋白序列多重比对结果; *表示 DGA 基序和 RHR 基序

Note: A: M: DNA Marker; 1: PCR product. B: Structural analysis of *lpDacA*. C: Multiple alignments of *lpDacA* with the related DacA proteins; * refers to DGA motif and RHR motif

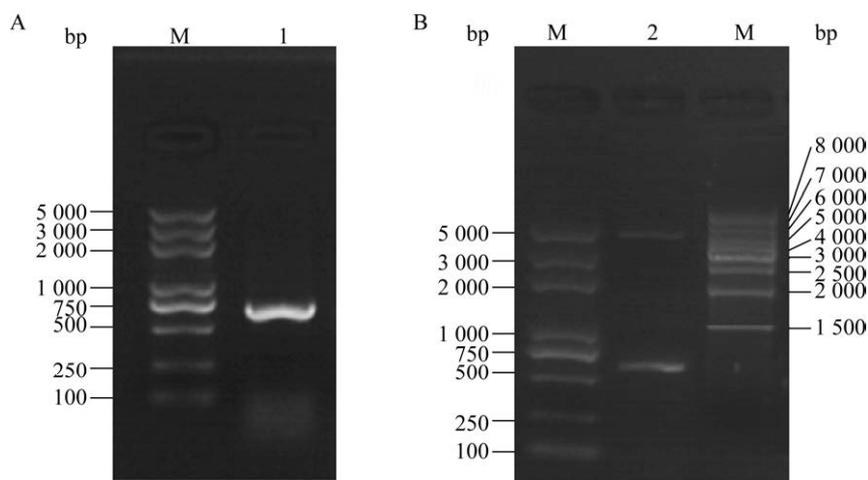


图3 重组表达质粒的PCR扩增(A)和双酶切(B)鉴定结果

Figure 3 Identified of recombinant plasmid by PCR (A) and dual enzyme digestion (B)

注: M: DNA Marker; 1: PCR 扩增产物; 2: 双酶切产物

Note: M: DNA Marker; 1: PCR product; 2: Dual enzyme digestion of pET-28a-lpDacA

2.3.2 重组蛋白的表达与纯化

如图4所示,经IPTG诱导后,与对照组相比,重组质粒pET-28a-lpDacA在约25 kD处出现新条带,并与预期表达产物大小相符。同时表达的上清蛋白经纯化、浓缩后也检测到相同大小的片段,因此确定lpDacA₉₅₋₂₈₀在大肠杆菌BL21(DE3)中得到了成功表达。采用Bradford方法测定原液蛋白浓度为5.17 mg/mL。

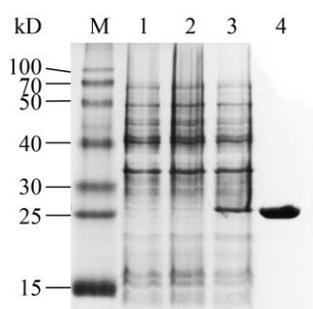


图4 重组蛋白的SDS-PAGE分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis of purified recombinant proteins

注: M: Marker; 1: BL21(DE3); 2: 空质粒对照; 3: 重组质粒诱导后全菌蛋白; 4: 纯化的lpDacA₉₅₋₂₈₀重组蛋白

Note: M: Marker; 1: BL21(DE3); 2: Negative control; 3: Induced lpDacA₉₅₋₂₈₀ with 0.1 mmol/L IPTG; 4: Purified lpDacA₉₅₋₂₈₀

2.4 重组蛋白体外活性检测

经HPLC检测结果显示,重组蛋白lpDacA₉₅₋₂₈₀在与ATP标准品反应后,在与c-di-AMP标准品相同出峰时间(图5A)处出现一个产物峰,表明重组蛋白具备合成c-di-AMP的能力。酸碱环境对重组蛋白的体外活性影响结果如图5B所示,重组蛋白在pH 8.0时表现出较强活性,提示重组蛋白在偏碱性环境中具有较高活性。同时,如图5C所示,金属离子是重组蛋白在体外发挥活性的必要条件,重组蛋白能够在Mg²⁺、Mn²⁺和Co²⁺存在的条件下发挥作用,且在含有Mg²⁺的缓冲液中相对活性较强,而在含有Ca²⁺、Fe²⁺和Cu²⁺的缓冲液中无活性。

2.5 RHR基序是lpDacA发挥作用的关键基序

通过SOE PCR方法,将合成酶的RHR基序突变为AAA(lpDacA_{RHR}),体外活性检测显示,RHR基序突变后,合成酶失去合成活性(图6A),表明RHR基序是lpDacA发挥作用的重要基序。此外,ATP结合试验结果显示,将RHR基序突变为AAA后,重组蛋白无法与ATP结合(图6B),上述结果表明RHR是合成酶发挥活性的关键基序,并且参与合成酶与ATP的结合。

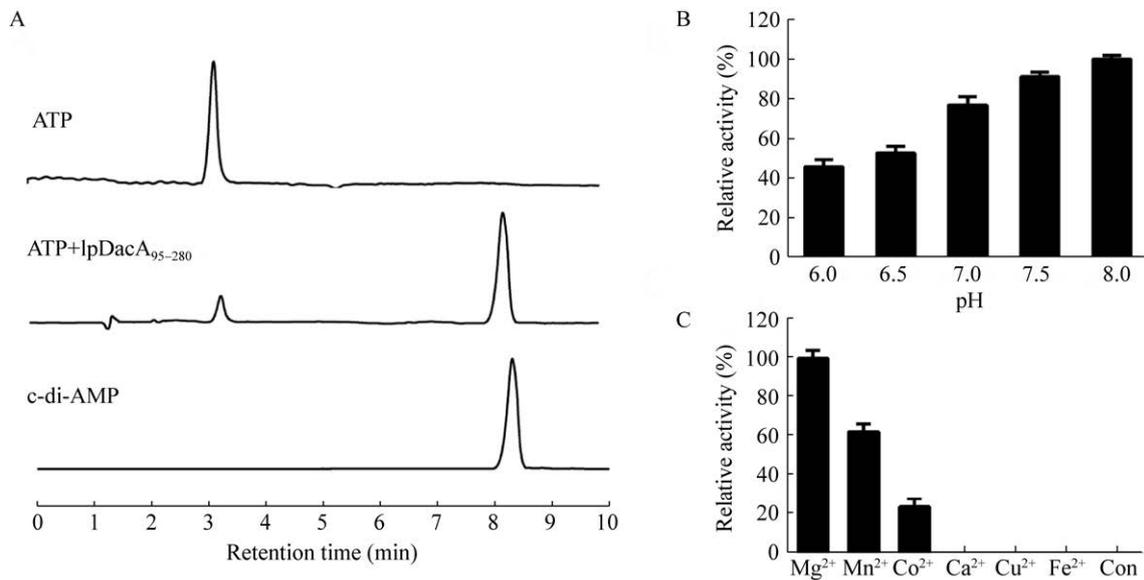


图 5 重组 lpDacA₉₅₋₂₈₀ 的体外活性检测结果

Figure 5 Determination of lpDacA₉₅₋₂₈₀ activities *in vitro*

注: A: HPLC 检测; B: pH 值对 lpDacA₉₅₋₂₈₀ 体外活性的影响; C: 金属离子对 lpDacA₉₅₋₂₈₀ 体外活性的影响

Note: A: Determination of lpDacA₉₅₋₂₈₀'s activities using HPLC; B: Effect of pH on enzyme activity; C: Effect of divalent metal ions on enzyme activity

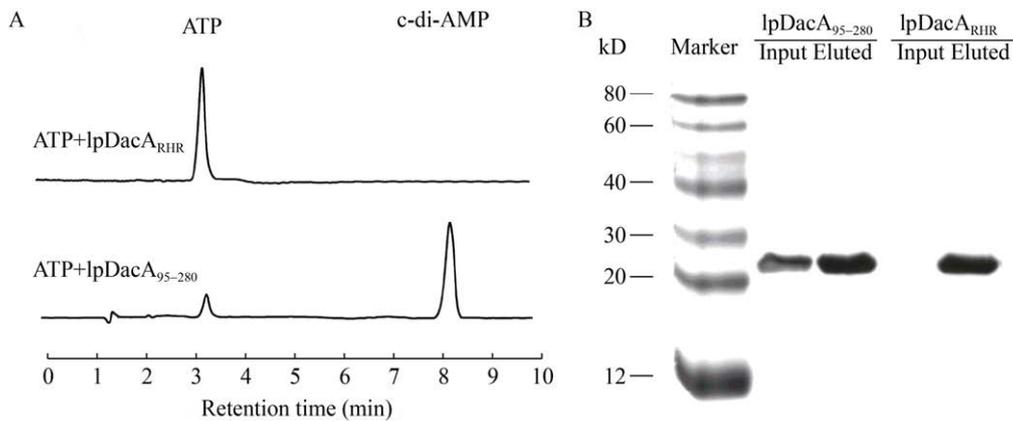


图 6 lpDacA_{RHR} 的特性分析

Figure 6 Characteristic analysis of lpDacA_{RHR}

注: A: lpDacA_{RHR} 体外活性的检测; B: ATP 结合试验

Note: A: Determination of lpDacA_{RHR}'s activities using HPLC; B: ATP binding assay

3 讨论与结论

c-di-AMP 是在研究枯草芽孢杆菌 DNA 完整性监测蛋白的结晶结构时最先发现的^[4], 由两分子的 ATP 经具有 DAC 结构域的合成酶催化合成。该信号分子广泛存在于细菌特别是革兰氏阳性菌中, 并参与了多种生理功能的调节^[14-17]。本文运用高效液相色谱以及质谱检测对植物乳杆菌细胞提取物进行了分析, 结果证实了植物乳杆菌中存在 c-di-AMP 信号分子, 并通过“Diadenylate Cyclase/c-di-AMP Synthetase”关键词检索出植物乳杆菌中潜在的 c-di-AMP 合成酶蛋白编码基因, 并对其进行了克隆表达及体外活性检测。

存在于已有的蛋白质家族结构域数据库(Pfam)中的 1 438 种生物中, 含有 1 956 个具有 DAC 功能结构域的蛋白。这些蛋白主要包含于细菌中, 特别是在革兰氏阳性硬壁菌中最为常见^[18]。含有 DAC 功能结构域的蛋白根据其结构域构造不同又分为 DisA、CdaS、CdaM 和 DacA 这 4 类^[4], 对植物乳杆菌的 c-di-AMP 合成酶 IpDacA 进行结构分析, 结果显示其是典型的含有 DAC 功能结构域 DisA_N 以及 2 个跨膜结构域的 DacA 类蛋白。通过表达 IpDacA 蛋白含胞内具有 DAC 活性结构域部分并进行体外活性检测, 结果显示重组蛋白具有 c-di-AMP 合成活性, 提示 IpDacA 在植物乳杆菌中参与了 c-di-AMP 的合成。

研究显示, 在枯草芽孢杆菌、肺炎分枝杆菌以及结核分枝杆菌的细菌中, c-di-AMP 合成酶作用的发挥^[4,13]严格依赖于二价金属离子。同样, 我们研究发现, 植物乳杆菌 c-di-AMP 合成酶发挥其活性同样依赖于金属离子的存在, 其中合成酶在 Mg^{2+} 存在的条件下活性最强。研究显示, 这些离子也是大部分信号分子的代谢蛋白发挥作用的协同因子^[13]。此外, 与其他菌种中 c-di-AMP 合成酶的研究结果一致^[6,13,16], IpDacA 在偏碱性环境下表现出较强活性, 这些结果均提示 c-di-AMP 合成酶在细胞内发挥作用的环境基本一致。研究表明

RHR 是 c-di-AMP 合成酶的关键基序^[4,13], 经同源序列比对分析显示, IpDacA 的 DAC 结构域 DisA_N 中同样包含了 RHR 基序。通过点突变方法进行的研究, 结果显示将 IpDacA 的 RHR 基序突变为 AAA 后, 破坏了重组蛋白的体外活性, 同时也使其丧失了与 ATP 的结合能力, 表明 RHR 基序是 IpDacA 的 ATP 结合位点, 对合成酶作用的发挥起到了关键作用。

总之, 目前研究发现 c-di-AMP 与细菌的抗胁迫能力密切相关^[6-8], 而本研究对植物乳杆菌 c-di-AMP 及其合成酶的研究, 为进一步探索 c-di-AMP 及其代谢基因在植物乳杆菌中发挥的生物学功能及其与植物乳杆菌的抗胁迫能力之间的关系奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Carvalheiro F, Moniz, Duarte LC, Esteves MP, Gírio FM. Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(1): 221-227
- [2] Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(12): 5857-5860
- [3] Zhang YH, Zhang YP, Zhu Y, Mao SM, Li Y. Proteomic analyses to reveal the protective role of glutathione in resistance of *Lactococcus lactis* to osmotic stress[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(10): 3177-3186
- [4] Witte G, Hartung S, Büttner K, Hopfner KP. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates[J]. Molecular Cell, 2008, 30(2): 167-178
- [5] Huynh TN, Woodward JJ. Too much of a good thing: regulated depletion of c-di-AMP in the bacterial cytoplasm[J]. Current Opinion in Microbiology, 2016, 30: 22-29
- [6] Rao F, See RY, Zhang DW, Toh DC, Ji Q, Liang ZX. YybT is a signaling protein that contains a cyclic dinucleotide phosphodiesterase domain and a GGDEF domain with ATPase activity[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(1): 473-482
- [7] Corrigan RM, Campeotto I, Jeganathan T, Roelofs KG, Lee VT, Grundling A. Systematic identification of conserved bacterial c-di-AMP receptor proteins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of

- America, 2013, 110(22): 9084-9089
- [8] Fahmi T, Faozia S, Port GC, Cho KH. The second messenger c-di-AMP regulates diverse cellular pathways involved in stress response, biofilm formation, cell wall homeostasis, SpeB expression, and virulence in *Streptococcus pyogenes*[J]. *Infection and Immunity*, 2019, 87(6): e00147-19
- [9] Du B, Li MM, Chai C, Wang J, Zhou XL, Wu WN, Wang BS. Screening and identification of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from Dong minority traditional fermented sour fish and meat[J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(11): 8-13 (in Chinese)
杜斌, 李苗苗, 柴才, 王娟, 周笑犁, 吴文能, 王秉帅. 侗族传统酸肉与腌鱼中降胆固醇乳酸菌的筛选与鉴定[J]. *食品科技*, 2017, 42(11): 8-13
- [10] Corrigan RM, Abbott JC, Burhenne H, Kaefer V, Gründling A. c-di-AMP is a new second messenger in *Staphylococcus aureus* with a role in controlling cell size and envelope stress[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(9): e1002217
- [11] Oppenheimer-Shaanan Y, Wexselblatt E, Katzhendler J, Yavin E, Ben-Yehuda S. C-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in *Bacillus subtilis*[J]. *EMBO Reports*, 2011, 12(6): 594-601
- [12] Du B, Sun JH. Diadenylate cyclase evaluation of ssDacA (SSU98_1483) in *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(2): 6917-6924
- [13] Bai YL, Yang J, Zhou X, Ding XX, Eisele LE, Bai GC. *Mycobacterium tuberculosis* Rv3586 (DacA) is a diadenylate cyclase that converts ATP or ADP into c-di-AMP[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35206
- [14] Sureka K, Choi PH, Precit M, Delince M, Pensinger DA, Huynh TN, Jurado AR, Goo YA, Sadilek M, Iavarone AT, et al. The cyclic dinucleotide c-di-AMP is an allosteric regulator of metabolic enzyme function[J]. *Cell*, 2014, 158(6): 1389-1401
- [15] Bai YL, Yang J, Zarrella TM, Zhang Y, Metzger DW, Bai GC. Cyclic di-AMP impairs potassium uptake mediated by a cyclic di-AMP binding protein in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(3): 614-623
- [16] Zheng C, Wang JP, Luo YC, Fu Y, Su JM, He J. Highly efficient enzymatic preparation of c-di-AMP using the diadenylate cyclase DisA from *Bacillus thuringiensis*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2013, 52(6/7): 319-324
- [17] Kalia D, Meray G, Nakayama S, Zheng Y, Zhou J, Luo YL, Guo M, Roembke BT, Sintim HO. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(1): 305-341
- [18] Corrigan RM, Gründling A. Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(8): 513-524