

研究报告

杀线虫芽孢杆菌 B16 和枯草芽孢杆菌 168 硫酯酶 Ynep 差异分析

牛秋红, 张宏鑫, 武国寒, 田卓, 陈克妍, 韩睿, 张林*

南阳师范学院生命科学与农业工程学院, 河南 南阳 473061

牛秋红, 张宏鑫, 武国寒, 田卓, 陈克妍, 韩睿, 张林. 杀线虫芽孢杆菌 B16 和枯草芽孢杆菌 168 硫酯酶 Ynep 差异分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 433-447.

NIU QiuHong, ZHANG Hongxin, WU Guohan, TIAN Zhuo, CHEN Keyan, HAN Rui, ZHANG Lin. Comparison of thioesterase Ynep in *Bacillus nematocida* B16 and *Bacillus subtilis* 168[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 433-447.

摘要:【背景】线虫生防菌杀线虫芽孢杆菌 B16 和可作为线虫食物的枯草芽孢杆菌 168 对线虫存在差异感知, 线虫引诱剂 2-庚酮的表达量也存在显著差异。【目的】研究线虫生防菌芽孢杆菌 B16 和可作为线虫食物的枯草芽孢杆菌 168 中合成甲基酮的关键因子硫酯酶 Ynep, 并分析它们的异源表达、结构及酶活性质上的差异。【方法】使用定量聚合酶链式反应(quantitative PCR, qPCR)验证两种芽孢杆菌中硫酯酶在转录水平的差异, 通过生物信息学分析两种酶结构的差异, 并通过蛋白异源表达和活性测试验证其蛋白表达水平及特性的差异。【结果】qPCR 显示, 在培养 12 h 和 72 h 后, 菌株 B16 ynep 基因表达分别为菌株 168 的 1.428 和 0.991 倍。生物信息学分析表明两者氨基酸序列一致性为 97.12%, 酶分子量分别为 15 993.35 Da 和 16 007.42 Da, 等电点(isoelectric point, pI)分别为 7.06 和 7.82, 均具有与转录过程中基因表达调控有关的蛋白质(transcriptional enhancer, TE)结构域, 均包含保守的 Asp16-His23-Tyr26 催化三联体。同源建模显示 Ynep 均呈典型“hot dog”结构, 是 TE 超家族最常见的结构折叠。两种酶存在 4 个氨基酸差异, 可能影响硫酯酶四聚体形成。菌株 B16 和 168 Ynep 与底物 β -酮酯酰-CoA 分子对接, 结合能分别为 -5.47 kcal/mol 和 -6.95 kcal/mol。异源表达纯化的酶活性测试显示: 菌株 B16 和 168 的酶活分别为 1.243 U/mL 和 1.233 9 U/mL, 最适反应温度均为 30 °C, 最适 pH 分别为 8.0 和 9.0。两种酶在 10–30 °C、pH 7.0–8.0 均表现出良好的稳定性, 且菌株 168 中 Ynep 对温度耐受性更佳。【结论】两种芽孢杆菌中的硫酯酶 Ynep 在异源表达、结构及酶活性质方面均有差异, 导致其合成线虫引诱剂 2-庚酮量有所不同。这些研究结果有助于解析不同芽孢杆菌差异感知线虫的分子机理, 为进一步开发高效新型线虫生防产品提供新思路。

关键词: 杀线虫芽孢杆菌 B16; 枯草芽孢杆菌 168; 硫酯酶; 2-庚酮; 差异分析

资助项目: 国家自然科学基金(3217010010); 河南省杰出青年科学基金(222300420014)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (3217010010) and the Program for the Outstanding Youth Science Fund of Henan Province (222300420014).

*Corresponding author. E-mail: zhanglin201207@163.com

Received: 2023-07-15; Accepted: 2023-08-16; Published online: 2023-09-26

Comparison of thioesterase Ynep in *Bacillus nematocida* B16 and *Bacillus subtilis* 168

NIU QiuHong, ZHANG Hongxin, WU Guohan, TIAN Zhuo, CHEN Keyan, HAN Rui, ZHANG Lin*

College of Life Science and Agricultural Engineering, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan, China

Abstract: [Background] The biocontrol bacteria *Bacillus nematocida* B16 and *B. subtilis* 168 present different perceptions for nematodes and have significant differences in the expression of the nematode attractant 2-heptanone. [Objective] To investigate the key factor, the thioesterase Ynep, involved in methyl ketone synthesis in *B. nematocida* B16 and *B. subtilis* 168, and compare the heterologous expression, structure, and activity of this enzyme between the two strains. [Methods] Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was employed to examine the transcriptional levels of thioesterase in the two *Bacillus* strains. Bioinformatics analysis was conducted to compare the structural differences of this enzyme. Furthermore, the heterologous expression level and activity of this protein were compared between the two strains. [Results] The transcription level of *ynep* in *B. nematocida* B16 was 1.428 and 0.991 folds of that in *B. subtilis* 168 at the time points of 12 and 72 h, respectively. Bioinformatics analysis indicated an amino acid sequence identity of 97.12% between the two enzymes. The two enzymes were predicted to have the molecular weights of 15 993.35 Da and 16 007.42 Da and the isoelectric point (pI) values of 7.06 and 7.82, respectively. They possessed the transcriptional enhancer (TE) domain with the conserved catalytic triad Asp16-His23-Tyr26. Homology modeling revealed that both Ynep enzymes presented the typical “hot dog” fold, a common structure in the TE superfamily. Four residue differences existed between the two enzymes, potentially influencing the formation of the thioesterase tetramer. The Ynep in *B. nematocida* B16 and *B. subtilis* 168 showed the binding energy of -5.47 kcal/mol and -6.95 kcal/mol, respectively, with the substrate β -ketoacyl-CoA. The purified recombinant enzymes of *B. nematocida* B16 and *B. subtilis* 168 demonstrated the activities of 1.243 U/mL and 1.233 9 U/mL, respectively. Both enzymes exhibited optimal reaction temperatures of 30 °C and optimal pH 8.0 and 9.0, respectively. Both enzymes demonstrated good stability within the temperature range from 10 °C to 30 °C and at pH 7.0–8.0. Moreover, the Ynep in *B. subtilis* 168 had stronger thermal tolerance than that in *B. nematocida* B16. [Conclusion] The thioesterase Ynep in the two *Bacillus* strains shows differences in heterologous expression, structure, and enzyme activity, which lead to variations in the synthesis of 2-heptanone. The findings contribute to the understanding of the molecular mechanisms underlying the different perceptions of nematodes by different *Bacillus* strains, providing new insights for the development of efficient biocontrol products against nematodes.

Keywords: *Bacillus nematocida* B16; *Bacillus subtilis* 168; thioesterase; 2-heptanone; differential analysis

线虫看似是一类非常简单的生物,却可以在复杂的环境中进行生命活动。例如寻找食物或者躲避有毒物质^[1]。同时,细菌也在不断进化,细菌产生的一些挥发性代谢物具有吸引并杀死线虫的作用^[2-6],这也从侧面证实了细菌作为植物寄生线虫生物防治领域的巨大潜能。柑橘腐烂过程中乳酸菌会产生挥发性气体双乙酰,被证实具有吸引线虫的能力^[3-4]。孔祥梅从所筛选的 450 株细菌中,发现有 17 株对秀丽隐杆线虫具有强引诱活性,鉴定出引诱线虫的细菌挥发物共 11 种,其中 2-十三烷酮引诱能力最强^[3]。从杀线虫芽孢杆菌 B16 产生的挥发性代谢物中筛选出了具有吸引线虫作用的 2-庚酮、苯甲醛和 2-乙基己醇^[2]。张春媚等的研究表明,线虫的 AWC 神经元能够感知 2-庚酮^[2,4-6],进一步证明了甲基酮类化合物在吸引线虫方面的重要作用。

2-庚酮是一种重要的甲基酮类化合物,前期实验发现作为线虫病原菌杀线虫芽孢杆菌 B16 和线虫食物细菌枯草芽孢杆菌 168 中 2-庚酮的分泌量存在显著差异,而 2-庚酮的合成途径也已在微生物中有相关报道^[2]:在芽孢杆菌中,脂肪酸通过 β 氧化生成 β -酮脂酰 CoA,经过硫酯酶 Ynep

水解形成 β -酮酸, β -酮酸是甲基酮合成的前体物质,它是一种不稳定的化合物,会在温和的条件下自发脱羧形成甲基酮,代谢途径如图 1 所示,而在植物中 β -酮酸会在甲基酮合酶 1 (*Solanum habrochaites* methylketone synthase 1, ShMKS1)的作用下脱羧形成甲基酮^[7],从而认为芽孢杆菌中的硫酯酶 Ynep 可能是合成 2-庚酮的关键酶。因此,本研究以芽孢杆菌 B16、168 的硫酯酶 Ynep 为研究对象,通过定量聚合酶链式反应 (quantitative PCR, qPCR)、异源表达纯化、酶活性分析和生物信息学分析等方法解析 2 种酶在转录水平、活性水平、结构和特性等方面的差异,以期揭示代谢物作为“信号分子”调控细菌感知线虫的意义,为深入研究线虫和细菌互作关系奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

线虫芽孢杆菌(*Bacillus nematocida*) B16 和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) 168 均由南阳师范学院农业生物质资源化工程技术研究中心保存,秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)由本工程中心培养。

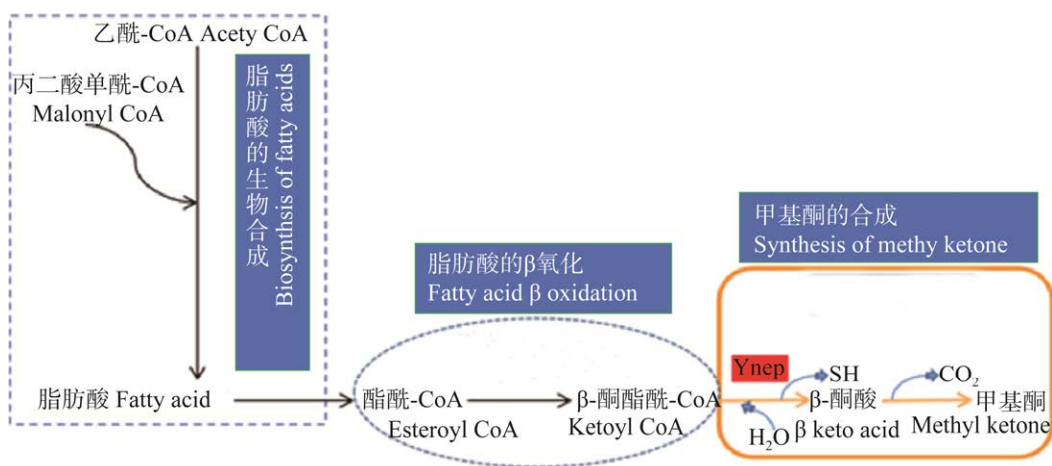


图 1 芽孢杆菌中甲基酮的合成途径^[2]

Figure 1 Synthetic pathway of methyl ketone in *Bacillus*, referenced by the literature^[2].

LB 培养基按照参考文献[5]配制。

所有化学试剂购自 Sigma-Aldrich 公司; 所有分子生物学试剂、试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司。定量 PCR 仪, 赛默飞公司。

1.2 硫酯酶 *yneP* 基因克隆

从美吉生物云平台中的 B16 全基因组中下载硫酯酶 *Ynep* 对应的基因序列, 在 NCBI 数据库中下载 168 硫酯酶 *Ynep* 对应的基因序列, 用 Primer、DNAMAN 软件设计 B16 *yneP* 引物 B16-F (5'-TTGCATGTGTCAAAAAAAG-3') 和 B16-R (5'-TTATTTTTTGCCTTTTCGT-3')。168 *yneP* 引物为 168-F (5'-TTGCATGTGTCAAAAAAAG-3') 和 168-R (5'-CTATTTTTTGCCTTTTCAT-3')。参照文献[8]的方法分别提取菌株 B6 和菌株 168 的基因组 DNA, 以提取的基因组 DNA 为模板, 分别以 B16-F/B16-R 和 168-F/168-R 为引物对, 扩增各菌株的硫酯酶 *yneP* 基因。PCR 反应体系(50 μ L): 10 \times 加载缓冲液 5 μ L, dNTPs (200 μ mol/L) 4 μ L, 上游引物(10 μ mol/L) 2 μ L, 下游引物(10 μ mol/L) 2 μ L, DNA (50 μ g/mL) 2–3 μ L、*Taq* 酶(2 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 33.5–34.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 57 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min^[9]。

PCR 完成后进行琼脂糖凝胶电泳检测, 并对照分子量标记判断 PCR 产物分子量大小, 验证正确后, 将克隆产物进行胶回收。将 PCR 产物的回收片段连接到 pMD18-T 载体上后进行酶切反应验证, 将验证正确的克隆菌株送到生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.3 硫酯酶 *Ynep* 的 qPCR 验证

选用芽孢杆菌中 16S rRNA 基因序列作为内参基因, 内参引物为 F (5'-GCTCGTGTCTGAGATGTTG-3') 和 R (5'-GGTTTCGCTGCCCTTTGT-3')。基于细菌总 RNA 提取试剂盒提取 2 株芽孢杆菌的 RNA 进行反转录, 反应体系为: mRNA

模板(约 0.4 μ g/mL) 1 μ L、Anchored Oligo (dT) 18 (0.5 μ g/ μ L) 1 μ L、RNase-free water 补至 9 μ L。65 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 冰浴 2 min 后加入 2 \times TS Reaction Mix 10 μ L、TransScript RT/RI Enzyme Mix 1 μ L, 反应总体积为 20 μ L。42 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 85 $^{\circ}$ C 加热 5 min 酶失活, 反应被终止。待提取的 cDNA 纯度和浓度检测完成后进行 qPCR 试验。

1.4 硫酯酶 *Ynep* 的生物信息学分析

所用的数据库及分析软件为: DNAMAN: 氨基酸序列比对; ExPASy ProtParam Tool: <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>; ProtScale: <http://ca.expasy.org/tools/protscale.html>; CLUSTALW: <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>; ESPrpt: <https://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>; SWISS-MODEL: <http://swissmodel.expasy.org/interactive>; Discovery Studio、PyMOL: 分子模拟、结构分析。

使用 BLAST 软件、GenBank 和核糖体数据库 (Ribosomal Database Project, RDP) 进行相似性分析, 使用 MEGA 5.0.2 软件包中的 neighbor-joining 法构建系统发育树, 对硫酯酶的氨基酸序列进行同源分析^[10]。通过 ExPASy ProtParam tool 对蛋白质的理化性质进行分析, 包括蛋白质的相对分子量、理论等电点、半衰期和不稳定系数^[11]。利用 SWISS-MODEL 进行硫酯酶 *Ynep* 三维结构同源建模和分析^[12]。利用 Discovery Studio 和 PyMOL 进行分子模拟和结构分析^[13]。

1.5 异源表达载体的构建及目标蛋白的诱导、表达与纯化

使用内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 对重组克隆质粒和 pET-32a(+) 质粒进行双酶切, 构建用于原核表达的质粒。将重组质粒转化到宿主菌 *Escherichia coli* BL21 中, 以寻找最佳的 IPTG 诱导条件。将培养液以 8 000 r/min 的速度在常温离心 20 min, 收集表达后的菌体。菌体在以下超

声波破碎条件下进行破碎：冰浴，功率 400 W，1/2 探头，破碎 3 s，停 10 s，全程时间 30 min (30 次左右)。使用 Ni-NTA 亲和层析介质进行金属螯合纯化，对目标蛋白进行梯度洗脱，并通过 SDS-PAGE 检测洗脱液^[14]。

1.6 硫酯酶 Ynep 的酶学性质探究

1.6.1 酶活的测定

通过对硝基苯酚比色法测定硫酯酶的活性^[15]。总反应体积为 2 mL：100 μ L 酶液加入 1.9 mL 的底物缓冲液中。底物缓冲液配比为：第一部分用异丙醇配制 10 mmol/L 的 4-硝基苯酚辛酸酯溶液；第二部分包括 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)、0.1%的阿拉伯树粉和 0.6% Triton X-100。将上述两部分溶液以 1:9 的比例进行混合。将酶液与底物缓冲液混合后于 30 $^{\circ}$ C 水浴锅中反应 15 min，立即加入 95%乙醇 1 mL 终止反应，空白对照为 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)代替酶液。配制不同浓度的对硝基苯酚(溶于异丙醇中)并检测 410 nm 处的吸光度，绘制出标准曲线。酶活定义：在一定条件下，每分钟催化分解底物所释放 1 μ mol 对硝基苯酚的量定义为一个酶活力单位(U)。

1.6.2 最适温度、pH、稳定性的测定

最适温度、温度稳定性：反应温度范围为 10–60 $^{\circ}$ C，以 10 $^{\circ}$ C 为一个间隔，只有温度为变量，酶活测定方法同 1.6.1，将最高的酶活力定义为 100%，酶液在不同温度下放置 30 min 后测定酶活，以未保温的酶活力定义为 100%^[16]。

最适 pH、pH 稳定性：测定在不同 pH 缓冲液中的酶活，只有缓冲液为变量，酶活测定方法同 1.6.1，将最高的酶活力定义为 100%，将酶液与不同 pH 缓冲液(1:1)在 30 $^{\circ}$ C 不同 pH 下放置 30 min 后测定酶活，以原酶液的酶活力定义为 100%。50 mmol/L 缓冲液：柠檬酸缓冲液(pH 4.0–6.0)、Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0–10.0)。

2 结果与分析

2.1 硫酯酶 yneP 基因的克隆

分别以菌株 B16 和 168 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，结果如图 2 所示，菌株 B16 和 168 中二庚酮合成酶硫酯酶 yneP 基因全长均约为 417 bp，为均一条带，说明基因均扩增成功。

对 B16、168 菌株二庚酮合成酶硫酯酶 yneP 基因进行胶回收后分别与 pMD18-T 载体相连并且转入感受态细胞，第 2 天对单菌落进行 PCR 验证，结果如图 3 所示，目的片段大小正确，B16-T 的 7 个菌落均为阳性克隆，挑选 2 泳道的克隆进行测序验证。168-T 的 8 个菌落均为阳性克隆，挑选 7 泳道的阳性克隆菌落进行测序验证。

2.2 B16、168 硫酯酶 Ynep 系统发育分析

将测序验证正确的 2 株芽孢杆菌中的硫酯酶氨基酸序列进行比对，选取在 NCBI 比对结果中同源性相近、来自其他芽孢杆菌的硫酯酶氨基酸序列并下载，构建基于硫酯酶氨基酸序列的 B16、168 系统发育树，如图 4 所示，B16 和 168 菌株中二庚酮合成酶硫酯酶 yneP 基因全长均为 417 bp，编码 138 个氨基酸，2 个硫酯酶一级氨基酸序列有 97.12% 的相似性。

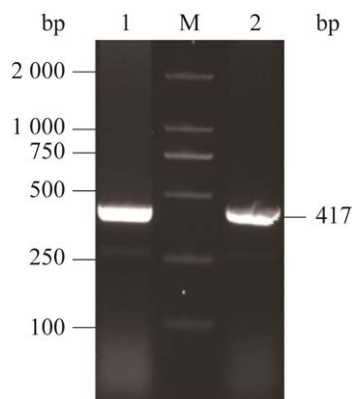


图 2 目的基因的 PCR 结果 M: DNA Marker; 1: B16 硫酯酶 Ynep; 2: 168 硫酯酶 Ynep

Figure 2 Target gene PCR results. M: DNA Marker; 1: B16 thioesterase Ynep; 2: 168 thioesterase Ynep.

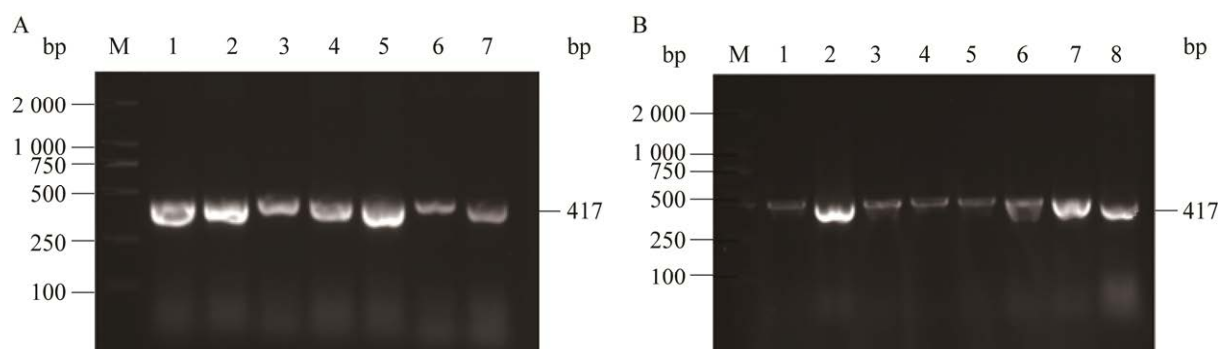


图3 菌落 PCR 验证结果 A: B16-T 菌落 PCR 结果. B: 168-T 菌落 PCR 结果. M: DNA Marker; 1–8: 克隆菌落编号

Figure 3 Colony PCR validation results. A: PCR results of B16-T colony. B: PCR results of 168-T colony. M: DNA Marker; 1–8: Numbers of different colonies.

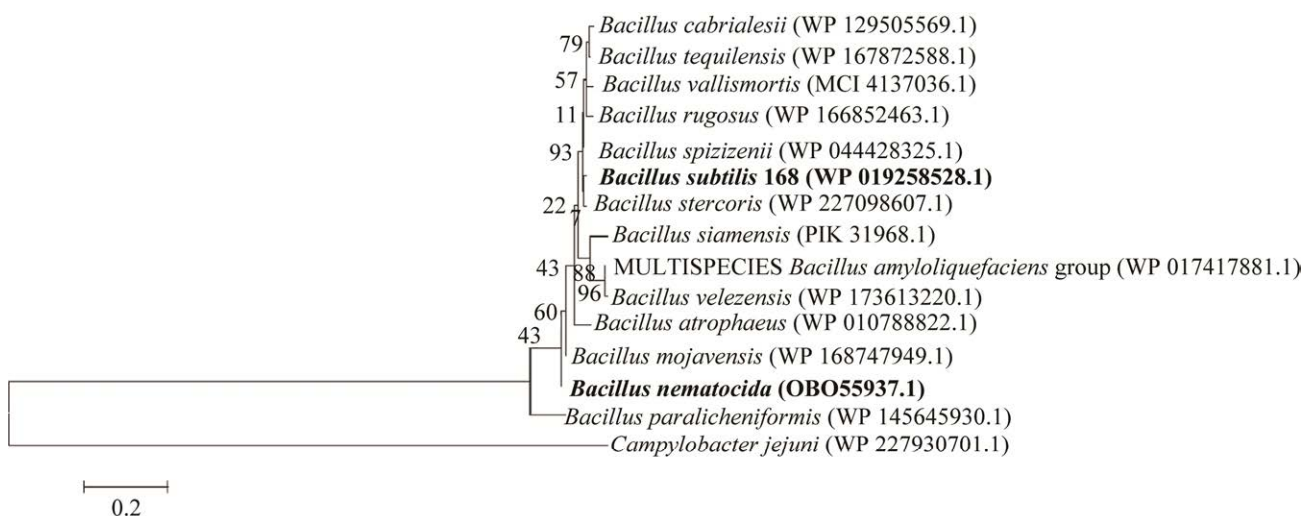


图4 基于菌株 B16、168 硫酯酶氨基酸序列构建的系统发育树 发育树节点的数字表示 Bootstrap 值; 括号中的数字为序列登录号; 标尺显示每个氨基酸是 0.2 的遗传距离

Figure 4 A phylogenetic tree based on the amino acid sequence of thioesterase from strain B16 and strain 168. The numbers at each branch points indicated the percentage supported by bootstrap. Numbers in parentheses are accession numbers of sequence in GenBank. The scale bar indicates 0.2 substitutions per amino acid position.

2.3 硫酯酶 *yneP* 基因的 qPCR 验证

为了研究两种芽孢杆菌硫酯酶 *Ynep* 转录水平的差异,使用 Bacteria RNA Kit 分别提取两种芽孢杆菌培养 12 h 和 72 h 的 RNA,随后进行反转录,确保 cDNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值均大于 1.8,以便进行后续的 qPCR 验证。使用实时荧光定量 PCR 仪对所设计的内参基因和目的基

因进行 qPCR 验证,两种芽孢杆菌在分别培养 12 h 时,菌株 B16 硫酯酶 *yneP* 基因的表达量是菌株 168 的 1.428 倍,在培养 72 h 时,菌株 B16 硫酯酶 *yneP* 基因的表达量是菌株 168 的 0.991 倍,如图 5 所示,结果说明菌株 B16 和菌株 168 代谢物质 2-庚酮产量差异与它们的转录水平无关。

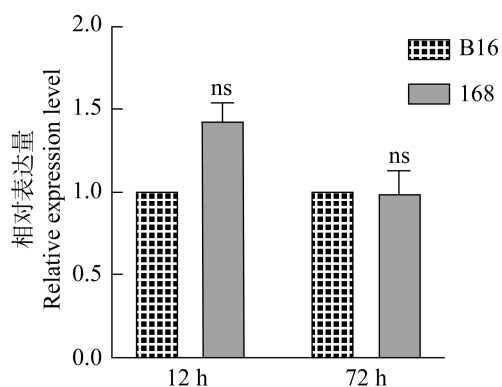


图 5 基因 *ynep* 的 qPCR 验证 ns: 无差异

Figure 5 qPCR verification of the gene *ynep*. ns: No significant difference.

2.4 生物信息学分析结果

2.4.1 理化性质分析

菌株 B16 硫酯酶 Ynep 的分子量是 15 993.35 Da, 等电点(pI)为 7.06, 分子式为 $C_{736}H_{1113}N_{185}O_{205}S_5$, 原子总数为 2 244 个。蛋白质不稳定性参数为 47.14, 高于阈值 40, 可被视为稳定蛋白质。估计在哺乳动物网状细胞体外环境中其半衰期为 30 h, 在酵母体内环境中大约为 20 h, 而在大肠杆菌体内环境中则约为 10 h。菌株 168 硫酯酶 Ynep 的分子量是 16 007.42 Da, 等电点(pI)为 7.82, 分子式为 $C_{738}H_{1119}N_{185}O_{204}S_5$, 原子总数为 2 251 个。蛋白质

不稳定性参数为 35.75, 虽然略低于阈值 40, 但仍可被视为相对稳定的蛋白质。采用 ProtScale 工具分析蛋白的亲水性/疏水性。B16 硫酯酶 Ynep 的疏水性最大值为 1.622, 位于第 56 个氨基酸处; 最小值为 -1.700, 位于第 68 个氨基酸处(图 6A)。168 硫酯酶 Ynep 的疏水性最大值为 1.743, 位于第 53 个氨基酸处; 最小值为 -1.688, 位于第 65 个氨基酸处(图 6B)。两蛋白均为亲水性蛋白。

2.4.2 硫酯酶 Ynep 的蛋白质多序列比对

菌株 B16 硫酯酶 Ynep 和 168 硫酯酶 Ynep 的氨基酸序列高度同源, 一致性达 97.12%, 以 B16 硫酯酶 Ynep 的氨基酸序列作为模板, 在 GenBank 数据库中使用 BLAST 功能搜寻与 B16 硫酯酶 Ynep 相似度大于 60% 的序列; 再使用 CLUSTALW 工具将 B16 Ynep、168 Ynep 与选定的硫酯酶序列进行多序列比对, 使用 ESPript 工具将多序列比对结果可视化, 分析氨基酸的保守性, 如图 7 结果所示, B16 硫酯酶 Ynep、168 硫酯酶 Ynep 与贝莱斯芽孢杆菌(QPQ08599)、副地衣芽孢杆菌(OMI10490)和巨大普里斯特氏菌(*Priestia megaterium*) TYR80574 来源的硫酯酶相似性分别为 89.17%、76.69% 和 64.96%。它们具有

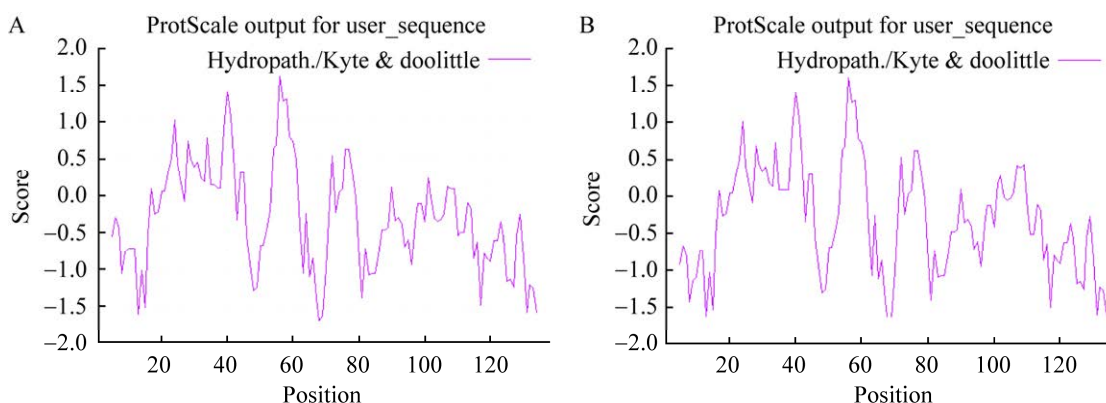


图 6 B16 Ynep (A) 和 168 Ynep (B) 蛋白的亲疏水性分析

Figure 6 Hydrophilic analysis of B16 Ynep (A) and 168 Ynep (B) proteins.

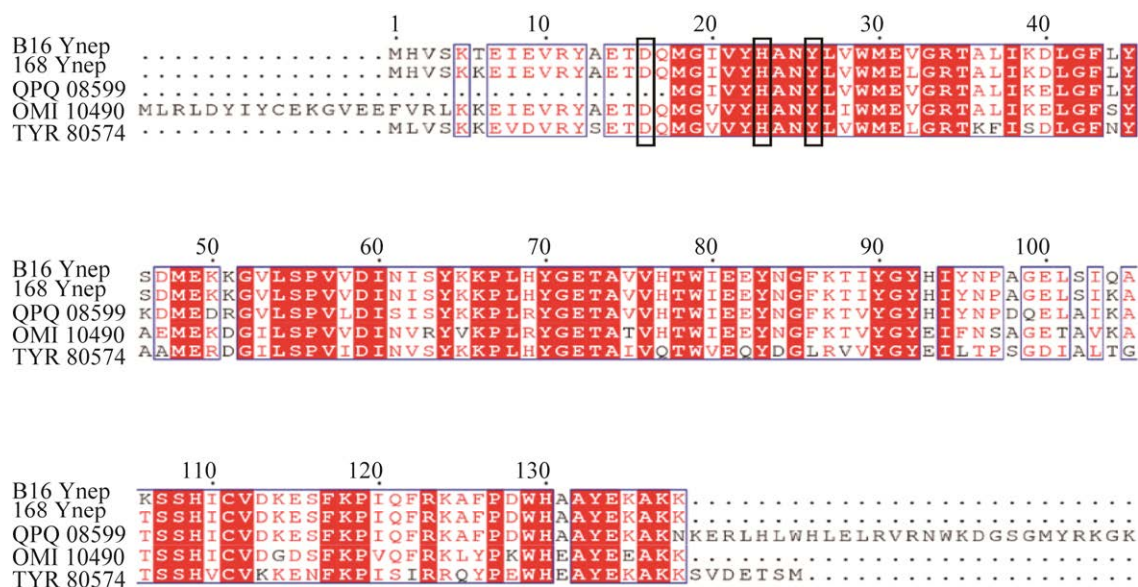


图 7 硫酯酶同源序列比对

Figure 7 Thioesterase homologous sequence alignment.

典型的 TE 结构域, 均含有保守的催化三联体 Asp16-His23-Tyr26, 起到终止反应和释放产物的功能。其中 Asp 对 His 残基有稳定作用, Tyr 作为亲核试剂, 通过 His 接受 Tyr 羟基的质子 H, 使 Tyr 残基的亲核基团 O 进攻酰硫酯键中羰基碳, 形成酰-硫-O-TE 中间产物并被水解形成线性肽, 或被分子内的亲核基团攻击而形成环化产物。

2.4.3 硫酯酶 Ynep 的三维结构同源建模和分析

由于菌株 B16 硫酯酶 Ynep 和菌株 168 硫酯酶 Ynep 的氨基酸序列高度同源, 一致性达 97.12%, 因此以 B16 硫酯酶 Ynep 为例分析蛋白质三维结构。在 PDB 蛋白结构数据库中找到的与 B16 硫酯酶 Ynep 氨基酸序列相似性为 50.37% 的金黄色葡萄球菌 DHNA-CoA 硫酯酶晶体结构 (PDB:6FDG.1) 作为模板, 使用 SWISS-MODEL 进行同源建模, 使用 PyMOL 对构建的模型进行分析。根据序列保守性、三级结构、活性位点构型和催化机理可对硫酯酶进行分类, 其中 TE 家族中的 TE1-13 和 TE24-25 对脂肪酰辅酶 A 内的巯基键具有活性^[17]。“hot dog”结构域是 TE 超家

族中最常见的结构折叠, 折叠是由一个 α -螺旋 (代表“hot dog”的“香肠”) 围绕着一个反平行的 β 片 (形成“面包”)。该折叠最早在 1996 年被描述为大肠杆菌 3-羟基葵酯酰 ACP 脱水酶 FabA^[18]。而 B16 硫酯酶 Ynep 的二级结构为 $\beta 1-\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3-\beta 2-\beta 3-\beta 4-\beta 5-\alpha 4$, 与 TE5 类硫酯酶相同 (图 8A), 其三级结构也呈现典型的“hot dog”结构 (图 8B), 其中 β 链为黄色箭头, α 螺旋为红色矩形, 环为绿色。TE5 家族成员具有一个作为四聚体排列的“hot dog”域。定位在第 1 个 α 螺旋旋转后的 Asp 残基可能是催化作用的关键^[19]。

同源建模结果显示, B16 硫酯酶 Ynep 作为 TE5 类硫酯酶以四聚体 A-B-C-D 形式存在催化反应, 即每个 B16 硫酯酶 Ynep 为一个单一的“hot dog”结构域, 在两单体的 $\beta 2$ 间相互作用下形成二聚体 A-B、C-D, 再“面对面”结合形成四聚体 (图 9)。其中 A 的催化三联体 Asp16-His23-Tyr26 会催化 B 底物通道中的底物, 而 B 中的催化三联体也会催化 A 通道中的底物。

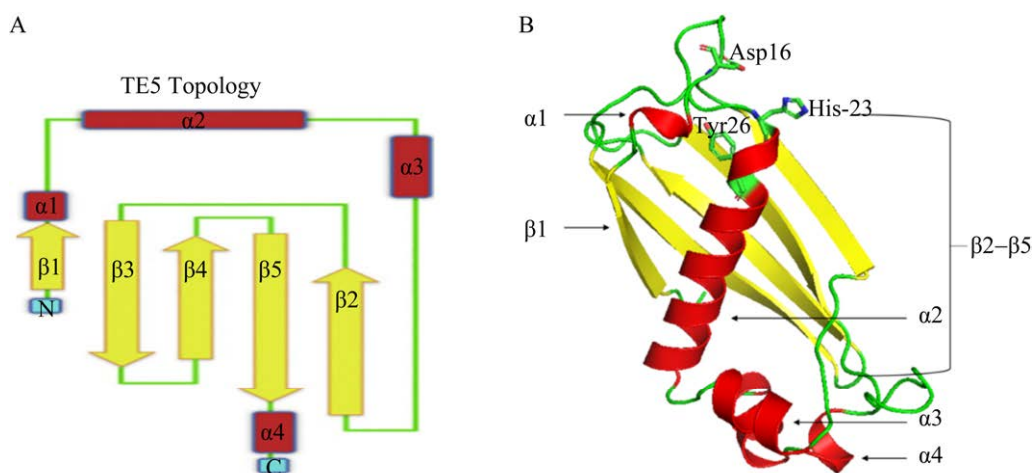


图 8 TE5 类硫酯酶二级结构拓扑图(A)和 B16 硫酯酶 Ynep 单体的三维结构模型(B)^[17]

Figure 8 The secondary structure topology diagram of TE5-type thioesterase (A) and the three-dimensional structure model of the monomer of B16 thioesterase Ynep (B)^[17].

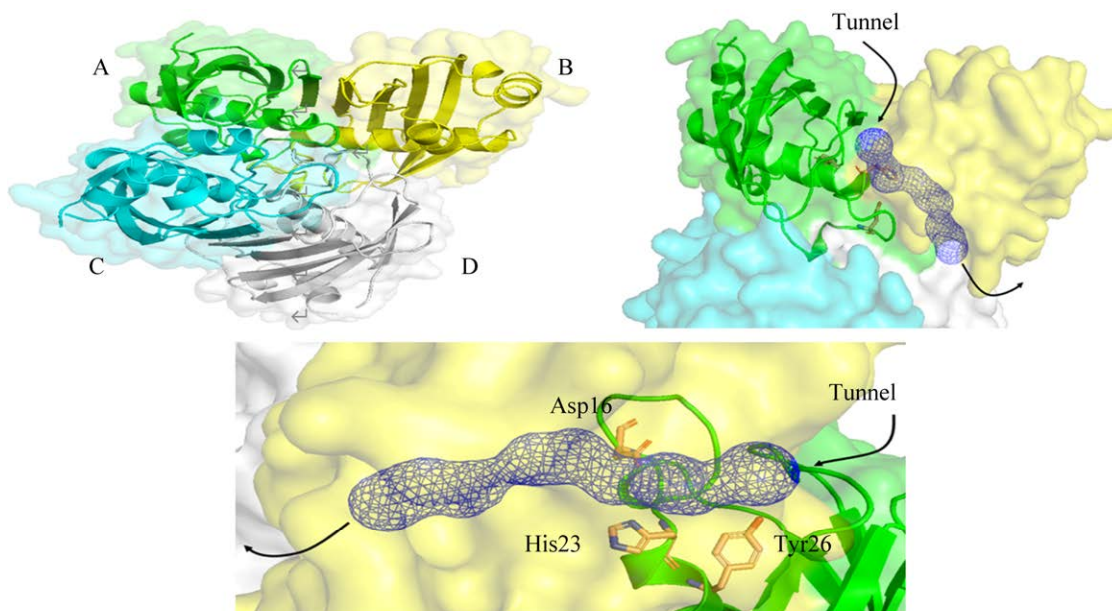


图 9 B16 硫酯酶 Ynep 四聚体三维结构和底物通道分析

Figure 9 Three-dimensional structure and substrate channel analysis of B16 thioesterase Ynep tetramer.

菌株 B16、168 硫酯酶 Ynep 的氨基酸序列高度同源, 一致性达 97.12%, 存在 4 个差异氨基酸, 分别为 Thr6-Lys6、Val32-Leu32、Gln104-Lys104 和 Lys106-Thr106。通过四聚体三维结构可以很明显看出, 4 个差异氨基酸均不位于底物口袋和活性中心中, Thr6-Lys6、Val32-Leu32 位于 A-B 和 C-D 形成四聚体的交

界处(图 10 左) Gln104-Lys104、Lys106-Thr106 位于四聚体表面(图 10 右)。位于单体 B 的第 6 位氨基酸由 B16 硫酯酶 Ynep 的苏氨酸变为 B16 硫酯酶 Ynep 的赖氨酸, 与单体 C 的第 11 位氨基酸精氨酸之间的距离产生较大变化, 这可能导致 A-B 与 C-D 两平面的结合, 从而影响硫酯酶四聚体形成(图 11)。

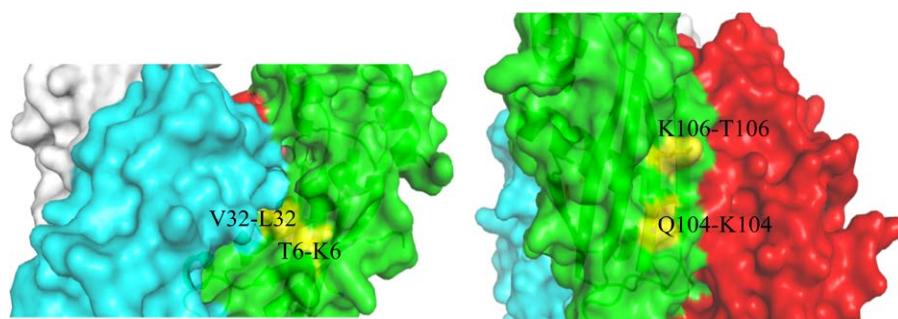


图 10 四个差异氨基酸 Thr6-Lys6、Val32-Leu32、Gln104-Lys104 和 Lys106-Thr106 位点
Figure 10 Four distinct amino acid sites (Thr6-Lys6, Val32-Leu32, Gln104-Lys104, Lys106-Thr106).

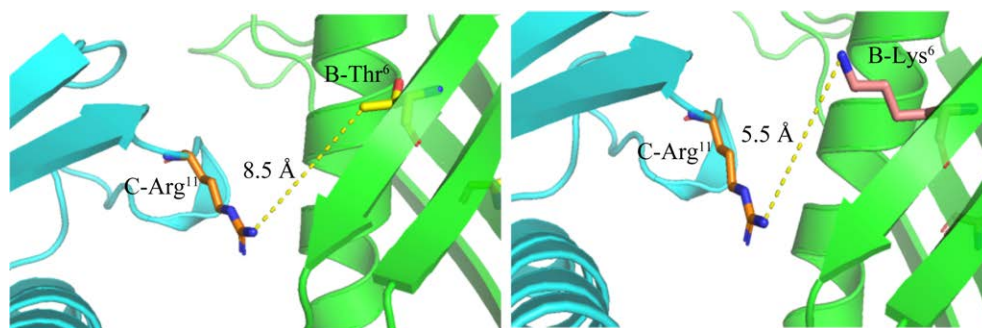


图 11 第 6 位氨基酸变化及其与另一单体的第 11 位氨基酸的距离变化
Figure 11 The change in the 6th amino acid position and its impact on the distance change with the 11th amino acid of another monomer.

2.4.4 硫酯酶 Ynep 的分子对接分析

通过同源建模得到的菌株 B16 硫酯酶 Ynep 三维结构与代谢底物 β -酮酯酰-CoA 进行分子对接,发现 β -酮酯酰-CoA 可以对接到底物口袋中(图 12)。基于硫酯酶的催化机制, B16 硫酯酶

Ynep 的催化三联体 Asp16-His23-Tyr26 与代谢底物 β -酮酯酰-CoA 的硫酯键上的羰基碳距离小于 3.5 Å, Asp16 对 His23 残基有稳定作用, Tyr26 作为亲核试剂, 通过 His 接受 Tyr 羟基的质子 H, 使 Tyr 残基的亲核基团 O 进攻酰硫酯键中

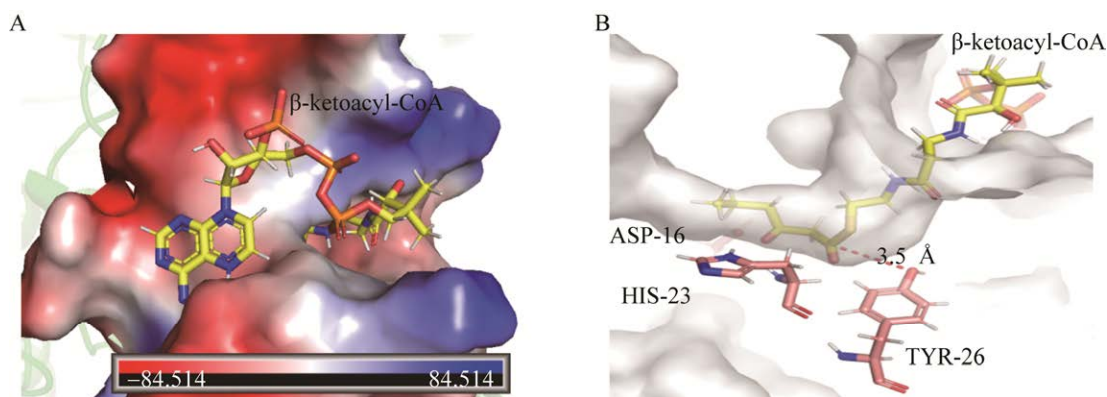


图 12 B16 硫酯酶 Ynep 与代谢底物 β -酮酯酰-CoA 对接概图(A)与详图(B)
Figure 12 Docking results overview(A)and detailed diagram(B)of the interactions between B16 thioesterase Ynep and the metabolic substrate β -ketoacyl-CoA.

羰基碳, 形成酰-O-TE 中间产物并被水解形成 β -酮酸。B16、168 硫酯酶 Ynep 分别与代谢底物 β -酮酯酰-CoA 进行分子对接, 结合能分别为 -5.47 kcal/mol 和 -6.95 kcal/mol。

2.5 表达载体的构建及目标蛋白诱导、表达与纯化结果

用内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 对构建的重组表达质粒进行双酶切验证, 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 如图 13 所示, 菌株 B16 和 168 均在约 417 bp 处各出现单一明亮条带(图 13), 表明重组质粒构建成功, 将重组质粒转化至宿主 *E. coli* BL21 中进行诱导表达。

通过对诱导条件的优化, 0.2 mmol/L IPTG、16 °C、200 r/min 诱导 10 h 获得 B16 硫酯酶 Ynep 目的蛋白, 其分子量大约为 18 kDa, 168 硫酯酶 Ynep 目的蛋白, 其分子量大约为 17 kDa。经过优化诱导表达条件后都以可溶蛋白存在, 通过不同咪唑浓度如 40、60、100、200、300 和 500 mmol/L 对目的蛋白进行洗脱, 结果如图 14A 所示, 在重组酶 B16-Ynep 的洗脱过程观察到, 在 40、60 和 100 mmol/L 的咪唑浓度下, 更多的杂蛋白被洗脱, 而在 200 mmol/L 和 300 mmol/L 的咪唑浓度下,

开始有目的蛋白被有选择性地洗脱。在 500 mmol/L 的咪唑浓度下, 目的蛋白被大量洗脱; 从图 14B 中可以看到, 在重组酶 168-Ynep 的洗脱过程中, 40、60 和 100 mmol/L 的咪唑浓度下虽然有目的蛋白被洗脱, 但更多的杂蛋白也被一同洗脱; 在 200、300 和 500 mmol/L 的咪唑浓度下杂蛋白显著减少, 同时目的蛋白的浓度逐渐增加, 其中在 500 mmol/L 咪唑浓度下目的蛋白的量最大, 而且呈现出单一的条带。因此, 500 mmol/L 的咪唑浓度是 2 个目的蛋白的最佳洗脱浓度。

2.6 酶学性质

温度对两种酶酶活的影响如图 15 所示, B16、168 硫酯酶 Ynep 都在 30 °C 时酶活达到最大, 酶活分别为 1.243 U/mL 和 1.233 9 U/mL, 说明 30 °C 为最适温度, 温度的升高或降低均会导致酶活下降, 但是除了最适温度外, 不同温度下 168 Ynep 相对酶活活性始终高于 B16 Ynep, 说明 168 Ynep 对温度耐受性比 B16 好。在温度稳定性方面, B16、168 硫酯酶 Ynep 在 10–30 °C 稳定性都较好, 相对酶活均在 60% 以上。

pH 对两种酶酶活的影响如图 16 所示, B16

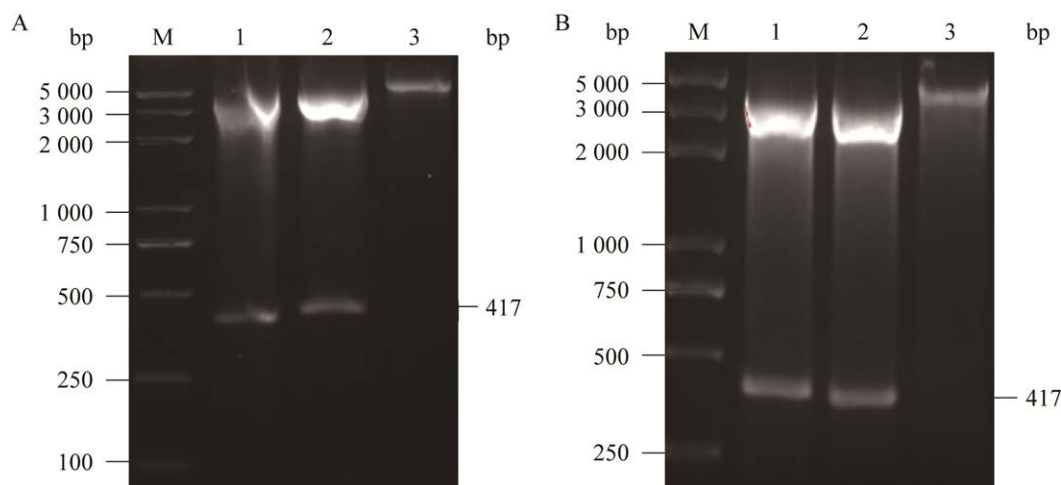


图 13 pET-32a-B16-ynep (A)和 pET-32a-168-ynep (B)的双酶切结果 M: DNA Marker; 1–2: 重组质粒双酶切结果; 3: pET-32a 的双酶切结果

Figure 13 Results of double enzyme digestion of pET-32a-B16-ynep (A) and pET-32a-168-ynep (B). A: DNA Marker; 1–2: Results of double enzyme digestion of the expression plasmids; 3: Results of pET-32a double enzyme digestion.

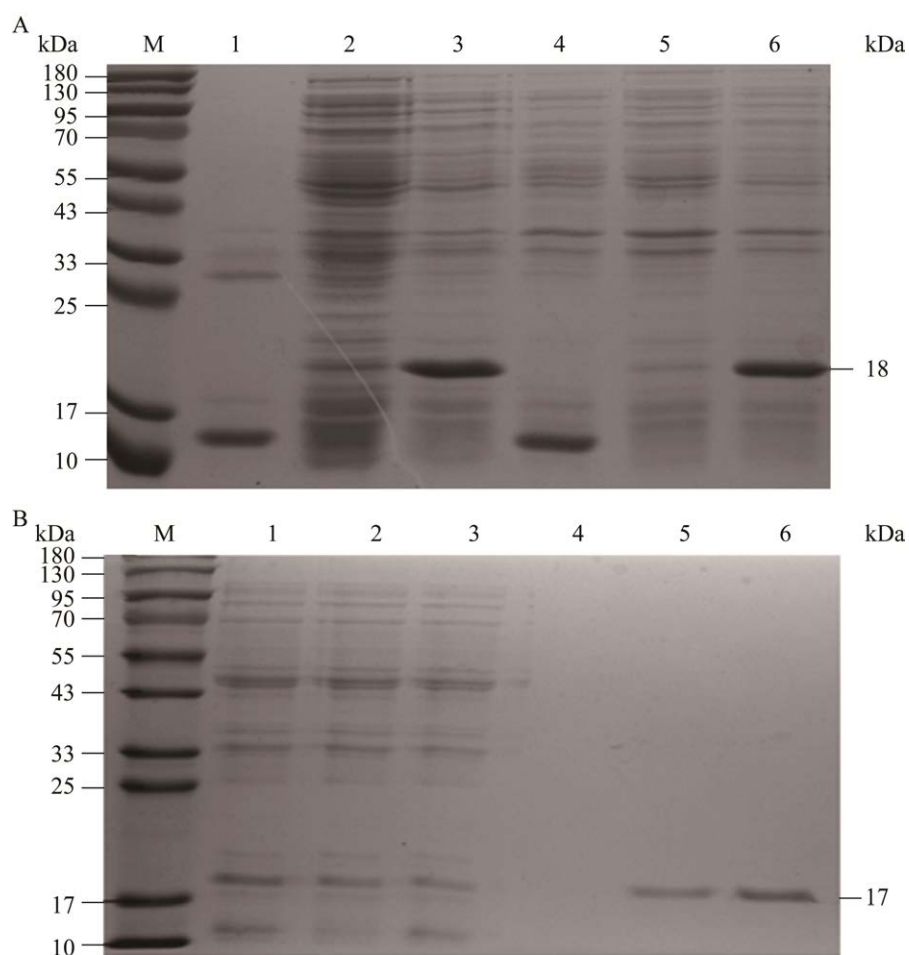


图 14 重组酶 B16-Ynep (A)和 168-Ynep (B)的 SDS-PAGE 结果 M: Protein Marker; 1-6: 咪唑浓度 40、60、100、200、300 和 500 mmol/L 穿透液

Figure 14 SDS-PAGE results of the recombinant enzymes B16-Ynep (A) and 168-Ynep (B). M: Protein Marker; 1-6: Imidazole concentrations of 40, 60, 100, 200, 300 and 500 mmol/L penetrating solution.

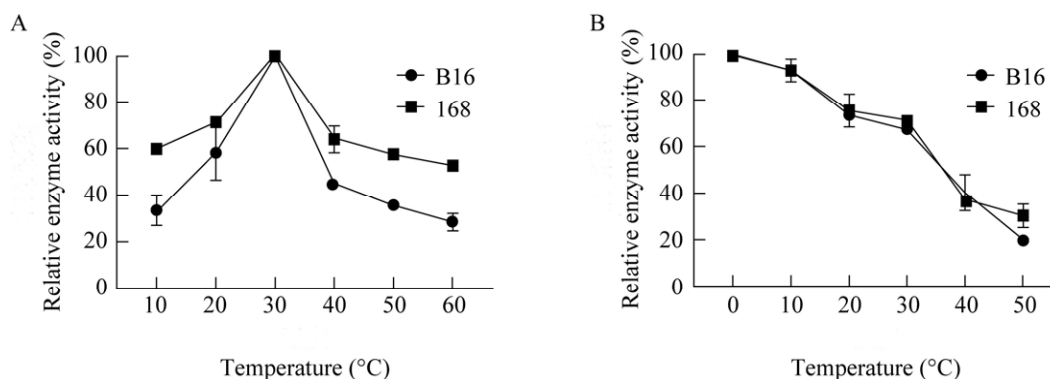


图 15 重组酶 Ynep 的最适温度(A)和温度稳定性(B)

Figure 15 Optimal temperature (A) and temperature stability (B) of recombinant enzyme Ynep.

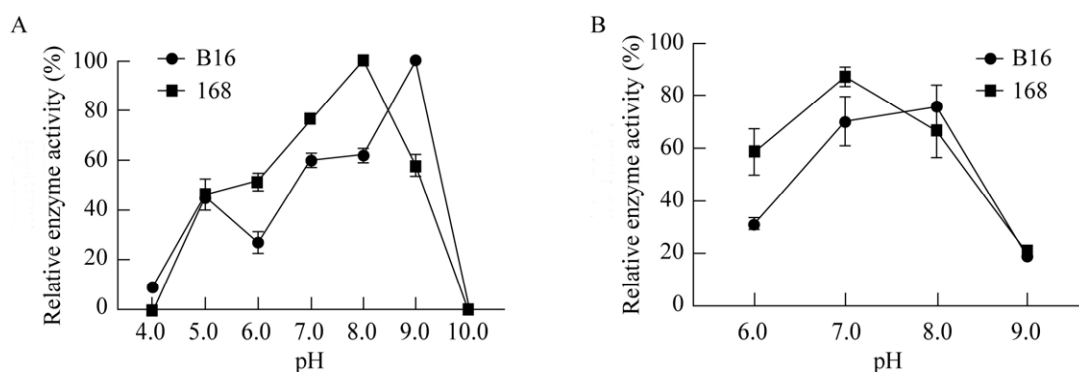


图 16 重组酶 Ynep 的最适 pH(A)和 pH 稳定性(B)

Figure 16 Optimal pH (A) and pH stability (B) of recombinant enzyme Ynep.

硫酯酶 Ynep 在 pH 8.0 时酶活力达到最大, 168 硫酯酶 Ynep 在 pH 9.0 时酶活达到最大, 在 pH 4.0 时 B16 Ynep 活力丧失, 168 Ynep 相对酶活不到 10%, 两种酶都在 pH 10.0 时丧失酶活, 但是在不同 pH 下 168 Ynep 的相对酶活活性始终高于 B16 Ynep, 说明 168 Ynep 对酸碱耐受性比 B16 好。在 pH 稳定性方面, B16、168 硫酯酶 Ynep 在 pH 7.0–8.0 稳定性都较好, 相对酶活均在 60% 以上。

3 讨论

植物寄生线虫给全球农业造成了巨大的经济损失, 生物防治植物寄生线虫具有致死能力强、对环境友好等优点, 从而成为植物寄生线虫防治的主要方法^[20-21]。前期研究发现, 杀线虫芽孢杆菌 B16 是一株具有显著杀线活性的芽孢杆菌, 该菌株可以感知到线虫的存在, 线虫产生的吗啉分子可诱导 B16 提前形成芽孢、在线虫肠道定殖从而杀死线虫^[5,22]。大量文献表明, 代谢物作为一种信号分子, 可调控细胞信号传导和表观遗传修饰, 在细菌与线虫互作中发挥至关重要的作用^[22-25]。B16 对线虫的吸引能力要大于同为芽孢杆菌属的枯草芽孢杆菌 168, 这个过程挥发性物质起着非常重要的作用, 前期通过代谢组学

发现两种芽孢杆菌 B16、168 产生的线虫引诱剂二庚酮的含量存在明显的差异, 菌株 168 的二庚酮含量是 B16 的 4 倍, 通过查阅文献发现硫酯酶 Ynep 是甲基酮合成的关键酶基因, 其在二庚酮的合成中发挥重要的作用^[24-25]。

感知作为侵染线虫的第一步, 很大程度上影响了 B16 的杀线虫效果。本文的创新点在于: 通过生物信息学分析确定了芽孢杆菌中甲基酮合成酶硫酯酶 Ynep 的结构和活性位点, 同时从结构和酶学性质上解析了两种芽孢杆菌硫酯酶 Ynep 之间的差异。本研究围绕感知过程, 锁定线虫引诱剂 2-庚酮合成的关键酶硫酯酶, 分析两种芽孢杆菌中硫酯酶结构及活性差异, 为深入研究线虫和细菌互作关系奠定了理论基础。

4 结论

本研究通过 qPCR 验证两种芽孢杆菌不同时间段 *yneP* 转录水平无显著差异。生物信息学分析发现两种酶氨基酸序列一致性达到 97.12%。两种硫酯酶都具有典型的 TE 结构域, 均含有保守的催化三联体 Asp16-His23-Tyr26, 起到终止反应和释放产物的功能。这两种酶存在的 4 个差异氨基酸并不位于底物口袋和活性中心, 而是位于单体 B 的第 6 位氨基酸, 由 B16 Ynep 的苏氨

酸变为 168 Ynep 的赖氨酸。这种变化导致与单体 C 第 11 位精氨酸之间的距离发生较大变化,可能影响硫酸酯酶四聚体的形成,进而影响 A-B 和 C-D 两个平面的结合。

利用 pET-32a 载体构建异源表达质粒并转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞获得 B16-pET30a-BL21 和 168-pET28a-BL21 菌株。这两株菌的最佳诱导条件为: 0.2 mmol/L IPTG, 在 16 °C、180 r/min 的条件下诱导 10 h, 可获得 B16 硫酸酯酶 Ynep 可溶性目的蛋白, 其分子量大约为 18 kDa, 可获得 168 硫酸酯酶 Ynep 可溶性目的蛋白, 其分子量大约为 17 kDa。对目的蛋白进行纯化, 确定 500 mmol/L 的咪唑浓度是两个重组目的蛋白的最佳洗脱浓度。进一步对重组酶学性质进行探究, B16、168 硫酸酯酶 Ynep 酶活分别为 1.243 和 1.233 9 U/mL。两种重组酶的最适温度均为 30 °C, 最适 pH 分别为 8.0、9.0。此外, 168 Ynep 的相对酶活活性始终高于 B16 Ynep, 说明 168 Ynep 相较于 B16 Ynep。对温度和 pH 值的耐受性更强, 这可能是导致它们产生差异代谢物的原因。两种重组酶在 10–30 °C、pH 7.0–8.0 稳定性都较好。

综上所述, 两种芽孢杆菌产生的挥发性代谢物差异与引诱线虫的化合物 2-庚酮的转录水平无关。尽管基因表达存在显著变化, 但在两种芽孢杆菌中比较甲基酮合成关键酶 Ynep 的结果显示其结构和活性差异很小。然而, 与 B16 Ynep 相比, 168 Ynep 在对温度和 pH 值的耐受性方面更优, 这可能解释了它们产生不同浓度代谢物的差异。这种增强的耐受性可能会影响代谢途径和中间产物, 从而导致产生不同浓度的化合物。

尽管 168 菌株产生的 2-庚酮较多, 但 B16 菌株对线虫的吸引力更强。因此, 细菌对线虫的吸引不仅仅是个别挥发性代谢物的作用, 而更可能是多种挥发性化合物共同作用的结果。然而需要注意的是, 虽然两种酶基因的转录无显著差异,

但进一步研究它们在线虫吸引过程中的具体作用还需要更多的遗传学、生理学和生化学证据代谢物组成差异及其对线虫吸引的影响机制仍是未来研究的方向。

REFERENCES

- [1] CHOI JI, YOON KH, SUBBAMMAL KALICHAMY S, YOON SS, LEE JI. A natural odor attraction between lactic acid bacteria and the nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. The ISME Journal, 2016, 10(3): 558-567.
- [2] 张春媚. 线虫(*Caenorhabditis elegans*)感知吸引性信号分子 2-庚酮的信号途径[D]. 昆明: 云南大学博士学位论文, 2013.
ZHANG CM. Signal pathway of *C. elegans* in sensing the attractive signaling molecule 2-heptanone[D]. Kunming: Doctoral Dissertation of Yunnan University, 2013 (in Chinese).
- [3] 孔祥梅. 吸引线虫的细菌多样性及其活性挥发物研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2019.
KONG XM. Research on the bacterial diversity and bioactive volatiles attracting *Caenorhabditis elegans*[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2019 (in Chinese).
- [4] 杨亮亮. 根际细菌对两种线虫趋化性的作用[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2016.
YANG LL. The role of rhizobacteria in the chemotaxis of two nematode species[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2016 (in Chinese).
- [5] SCHRIMPE-RUTLEDGE AC, CODREANU SG, SHERROD SD, MCLEAN JA. Untargeted metabolomics strategies—challenges and emerging directions[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2016, 27(12): 1897-1905.
- [6] NIU QH, HUANG XW, ZHANG L, XU JP, YANG DM, WEI KB, NIU XM, AN ZQ, BENNETT JW, ZOU CG, YANG JK, ZHANG KQ. A trojan horse mechanism of bacterial pathogenesis against nematodes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(38): 16631-16636.
- [7] TAYLOR SC, NADEAU K, ABBASI M, LACHANCE C, NGUYEN M, FENRICH J. The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time[J]. Trends in Biotechnology, 2019, 37(7): 761-774.
- [8] MCSPADDEN GARDENER BB, WELLER DM. Changes in populations of rhizosphere bacteria

- associated with take-all disease of wheat[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(10): 4414-4425.
- [9] VOISARD C, KEEL C, HAAS D, DÈFAGO G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions[J]. The EMBO Journal, 1989, 8(2): 351-358.
- [10] NANNIPIERI P, ASCHER J, CECCHERINI MT, LANDI L, PIETRAMELLARA G, RENELLA G. Microbial diversity and soil functions[J]. European Journal of Soil Science, 2017, 68(1): 12-26.
- [11] 孙佳庆, 乔岩, 刘越. 龙胆目查尔酮合成酶的生物信息学分析[J]. 沈阳药科大学学报, 2020, 37(1): 21-30.
SUN JQ, QIAO Y, LIU Y. Bioinformatics analysis of the chalcone synthase gene in gentianales plants[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2020, 37(1): 21-30 (in Chinese).
- [12] BURLEY SK, BERMAN HM, DUARTE JM, FENG ZK, FLATT JW, HUDSON BP, LOWE R, PEISACH E, PIEHL DW, ROSE Y, SALI A, SEKHARAN M, SHAO CH, VALLAT B, VOIGT M, WESTBROOK JD, YOUNG JY, ZARDECKI C. Protein data bank: a comprehensive review of 3D structure holdings and worldwide utilization by researchers, educators, and students[J]. Biomolecules, 2022, 12(10): 1425.
- [13] 姜媛, 肖冰茹, 曹洪玉. G 蛋白偶联受体 34 同源建模及其与 lysoPS 类似物对接研究[J]. 化学研究与应用, 2022, 34(4): 722-729.
JIANG Y, XIAO BR, CAO HY. Homology modeling of G protein-coupled receptor 34 and its docking study with lysoPS analogs[J]. Chemical Research and Application, 2022, 34(4): 722-729 (in Chinese).
- [14] 林源, 崔焯挺, 马雪磊, 张伟, 杨延辉. 结核分枝杆菌 lys A 蛋白的异源表达及活性测定[J]. 大健康, 2020, 36(6): 2096-3556.
LIN Y, CUI HT, MA XL, ZHANG W, YANG YH. Expression and activity assay of the heterologously expressed lys A protein from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Great Health, 2020, 36(6): 2096-3556 (in Chinese).
- [15] BROWN HM, MCDANIEL TJ, FEDICK PW, MULLIGAN CC. The current role of mass spectrometry in forensics and future prospects[J]. Analytical Methods, 2020, 12(32): 3974-3997.
- [16] NIU QH, ZHANG G, ZHANG L, MA YL, SHI Q, FU WW. Purification and characterization of a thermophilic 1,3-1,4- β -glucanase from *Bacillus methylotrophicus* S2 isolated from booklice[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 121(5): 503-508.
- [17] WIDMER TL, MITKOWSKI NA, ABAWI GS. Soil organic matter and management of plant-parasitic nematodes[J]. Journal of Nematology, 2002, 34(4): 289-295.
- [18] AHMAD G, KHAN A, KHAN AA, ALI A, MOHAMMAD HI. Biological control: a novel strategy for the control of the plant parasitic nematodes[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2021, 114(7): 885-912.
- [19] PIRES D, VICENTE CSL, MENÉNDEZ E, FARIA JMS, RUSINQUE L, CAMACHO MJ, INÁCIO ML. The fight against plant-parasitic nematodes: current status of bacterial and fungal biocontrol agents[J]. Pathogens, 2022, 11(10): 1178.
- [20] ZHANG L, WEI YP, TAO Y, ZHAO SY, WEI XY, YIN XY, LIU SY, NIU QH. Molecular mechanism of the smart attack of pathogenic bacteria on nematodes[J]. Microbial Biotechnology, 2020, 13(3): 683-705.
- [21] DIALLO M, KENGEN SWM, LÓPEZ-CONTRERAS AM. Sporulation in solventogenic and acetogenic clostridia[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(9): 3533-3557.
- [22] SCHULZ S, DICKSCHAT JS. Bacterial volatiles: the smell of small organisms[J]. Natural Product Reports, 2007, 24(4): 814-842.
- [23] KONG WL, LI PS, WU XQ, WU TY, SUN XR. Forest tree associated bacterial diffusible and volatile organic compounds against various phytopathogenic fungi[J]. Microorganisms, 2020, 8(4): 590.
- [24] YAN Q, SIMMONS TR, CORDELL WT, HERNÁNDEZ LOZADA NJ, BRECHNER CJ, CHEN XQ, JINDRA MA, PFLEGER BF. Metabolic engineering of β -oxidation to leverage thioesterases for production of 2-heptanone, 2-nonanone and 2-undecanone[J]. Metabolic Engineering, 2020, 61: 335-343.
- [25] NIES S, ALTER T, NÖLTING S, THIERY S, EBERT BE. High titer methyl ketone production with tailored *Pseudomonas taiwanensis* VLB120[J]. Metabolic Engineering, 2020, 62: 84-94.