

研究报告

融合表达氨基转移酶 DsaD 和异构酶 DsaE 合成 L-别异亮氨酸

纪晓奇^{1,2} 李青连^{1*} 鞠建华^{1,2*}

(1. 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广东省海洋药物重点实验室

中国科学院海洋微生物研究中心 广东 广州 510301)

(2. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要:【背景】L-异亮氨酸(L-isoleucine, L-Ile)和 L-别异亮氨酸(L-allo-isoleucine, L-allo-Ile)是自然界中广泛存在的一对同分异构体。抗感染抗生素 Desotamides 结构中含 L-别异亮氨酸结构单元,其生物合成途径中的氨基转移酶 DsaD 和异构酶 DsaE 可以协作催化 L-异亮氨酸和 L-别异亮氨酸相互转化。【目的】通过理性设计,使氨基转移酶 DsaD 和异构酶 DsaE 融合表达,研究融合蛋白 DsaDE 催化异亮氨酸和别异亮氨酸相互转化的功能。【方法】利用 PCR 分别扩增 *dsaE* 基因编码区 DNA 片段、以及含 *dsaD* 基因编码区和 114 个碱基接头序列的 DNA 片段 *dsaD*-linker,利用酶切位点 *Kpn* I 将 *dsaE* 和 *dsaD*-linker 相连,形成 *dasDE* 重组序列,并克隆至 pET28a(+)中,将重组质粒 pET28a-*dsaDE* 转化至 *Escherichia coli* BL21(DE3)中进行融合表达,利用 Ni-NTA 亲和层析法纯化融合蛋白 DsaDE;分别以 L-异亮氨酸和 L-别异亮氨酸为底物进行融合蛋白的体外酶活性检测,利用高效液相色谱对酶反应产物进行分析。【结果】PCR 验证、酶切验证以及测序结果证明 pET28a-*dsaDE* 重组载体具有正确序列;N-末端和 C-末端融合 6 个组氨酸标签的融合蛋白 DsaDE 在 *E. coli* BL21(DE3)中获得可溶性表达,经 Ni-NTA 亲和层析法一步纯化获得纯度约 95% 的融合蛋白,纯化的融合蛋白 DsaDE 具有较好的活性,能够催化 L-isoleucine 和 L-allo-isoleucine 间的相互转化。【结论】氨基转移酶 DsaD 和异构酶 DsaE 成功融合表达,经一步 Ni-NTA 亲和层析法纯化即可获得纯度较高的融合蛋白,融合蛋白同时具有氨基转移酶和异构酶的活性,为进一步研究 L-别异亮氨酸的工业化生产奠定了基础。

关键词: 氨基转移酶, 异构酶, 融合蛋白, 异亮氨酸

Foundation items: Natural Key Research and Development Program of China (2017YFD0201400); National Natural Science Foundation of China (81425022, 31400072, U1501223); Special Support Program for Training High-Level Talents in Guangdong (2016TQ03R288); The Pearl River Science and Technology Nova Program of Guangzhou (201806010109)

***Corresponding authors:** LI Qing-Lian: Tel: 86-20-34066449; E-mail: liql@scsio.ac.cn
JU Jian-Hua: Tel: 86-20-89023028; E-mail: jju@scsio.ac.cn

Received: May 30, 2018; **Accepted:** July 16, 2018; **Published online** (www.cnki.net): August 15, 2018

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201400); 国家自然科学基金(81425022, 31400072, U1501223); 广东省“特支计划”青年拔尖人才项目(2016TQ03R288); 广州市珠江科技新星项目(201806010109)

***通信作者:** 李青连: Tel: 86-20-34066449; E-mail: liql@scsio.ac.cn

鞠建华: Tel: 86-20-89023028; E-mail: jju@scsio.ac.cn

收稿日期: 2018-05-30; **接受日期:** 2018-07-16; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-08-15

Overexpression of the aminotransferase DsaD and isomerase DsaE as a fusion protein to synthesize L-*allo*-isoleucine

Ji Xiao-Qi^{1,2} LI Qing-Lian^{1*} JU Jian-Hua^{1,2*}

(1. CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, RNAM Center for Marine Microbiology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)

(2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Background] L-isoleucine (L-Ile) and L-*allo*-isoleucine (L-*allo*-Ile) are two isomers in nature. The anti-infective antibiotic desotamides contain an L-*allo*-Ile moiety, and the aminotransferase DsaD and isomerase DsaE in their biosynthetic pathway catalyze the interconversion between L-Ile and L-*allo*-Ile. [Objective] To overexpress the aminotransferase DsaD and isomerase DsaE as a fusion protein DsaDE, and assay its activity to catalyze the interconversion between L-Ile and L-*allo*-Ile. [Methods] The coding region of *dsaE* and *dsaD*-linker (coding region of *dasD* containing 114 bp linker) were amplified by PCR; the purified DNA fragments were digested and ligated into pET28a(+), and the resulting recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) to overexpress the fusion protein; the fusion protein DsaDE was purified by Ni-NTA affinity chromatography, then the activity of the fusion protein DsaDE was assayed using L-Ile or L-*allo*-Ile as substrate, respectively; the reaction mixtures were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). [Results] PCR analyses, restriction endonuclease digestion and sequencing demonstrated that *dsaE* and *dsaD*-linker were correctly ligated into pET28a(+); the fusion protein DsaDE with His₆ tags at both the N-terminus and C-terminus was solubly produced in *E. coli* BL21(DE3) and purified to ~95% homogeneity. The purified fusion protein can catalyze the interconversion between L-Ile and L-*allo*-Ile efficiently *in vitro*. [Conclusion] The aminotransferase DsaD and isomerase DsaE were successfully overexpressed as a fusion protein; the fusion protein was readily purified by one-step Ni-NTA affinity chromatography; and purified fusion protein can catalyze the interconversion between L-Ile and L-*allo*-Ile efficiently, laying the foundation for further research on the industrial production of L-*allo*-Ile.

Keywords: Aminotransferase, Isomerase, Fusion protein, Isoleucine

L-异亮氨酸(L-isoleucine, L-Ile)作为 8 种必需氨基酸之一, 因其在人体生命活动中起到重要作用而备受关注, 并且在食品和医药领域具有重要的应用前景。L-别异亮氨酸(L-*allo*-isoleucine, L-*allo*-Ile)是 L-亮氨酸的一个立体同分异构体, 两者的区别在于 β 位碳原子上的甲基构象不同: (2*S*,3*S*)L-异亮氨酸和(2*S*,3*R*)L-别异亮氨酸(图 1)。L-别异亮氨酸于 1958 年首次被发现^[1], 在自然界中广泛存在, 除了存在于棕榈科植物海枣之外, 在真菌次级代谢产物中的 Aureobasidin A^[2]以及放线菌次级代谢产物中球状霉素^[3]、Desotamides^[4]、Marformycins^[5]等化合物中都发现含有 L-别异亮氨

酸结构单元。L-别异亮氨酸在血浆中的浓度水平还可以作为罕见的常染色体隐性遗传病——枫糖尿症(Maple syrup urine disease)检测时的重要指标^[6]。Li 等^[7]和 Liu 等^[8]对抗感染环肽抗生素 Desotamides 和 Marformycins 的生物合成进行研究时, 分别鉴定了其生物合成基因簇。Li 等深入阐明了 Desotamides 和 Marformycins 中 L-别异亮氨酸结构单元的生物合成机制, 他们在 Desotamide 和 Marformycin 的生物合成途径中分别鉴定了一对由磷酸吡哆醛(Pyridoxal 5'-phosphate, PLP)依赖的“氨基转移酶”和新颖异构酶(Isomerase)组成的酶对 DsaD/DsaE 和 MfnO/MfnH; 利用体外生化实验证

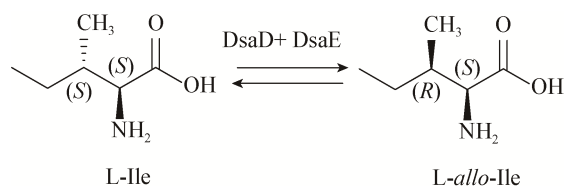


图 1 氨基转移酶 DsaD 和异构酶 DsaE 协作催化 L-Ile 和 L-allo-Ile 之间相互转化

Figure 1 Interconversion between L-Ile and L-allo-Ile catalyzed by aminotransferase DsaD and isomerase DsaE

明, L-别异亮氨酸的生物合成来源是 L-异亮氨酸, 纯化的 DsaD/DsaE (或 MfnO/MfnH) 在不需要添加额外辅因子的条件下可以协作催化 L-亮氨酸和 L-别异亮氨酸间的可逆转化(图 1); 并进一步在体外蛋白定点突变实验中证明, 氨基转移酶 DsaD 和 MfnO 的催化位点分别是其第 198 位和第 206 位赖氨酸残基, 异构酶 DsaE 和 MfnH 的关键催化位点分别是位于其 C-端的第 115 位和第 107 位精氨酸残基^[9]。

然而, 上述研究中 L-别异亮氨酸的催化生产过程比较繁琐, 需要分别表达和纯化氨基转移酶 DsaD (或 MfnO) 和异构酶 DsaE (或 MfnH)。因此, 本研究通过理性设计, 将氨基转移酶 DsaD 和异构酶 DsaE 的基因进行融合表达, 经 Ni-NTA 亲和层析法一步纯化获得融合蛋白 DsaDE, 体外酶反应证明融合蛋白 DsaDE 能同时行使氨基转移酶和异

构酶 2 种酶的功能, 为进一步研究 L-别异亮氨酸的工业化生产奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒及引物

本研究所用的菌种、质粒及引物见表 1。

1.1.2 培养基和培养条件

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0。固体添加 15.0 g 琼脂粉, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 备用。

1.1.3 主要试剂与仪器

限制性核酸内切酶、高保真 DNA 聚合酶 PrimeSTAR、DNA 连接酶和 DNA 标准品等购自 TaKaRa 公司; DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Omega 公司。其他常规试剂均为国产分析纯。氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)的工作终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, 卡那霉素(Kanamycin, Kan)的工作终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, DNA 测序由广州擎科公司完成。

PCR 仪、台式大容量多功能冷冻离心机、小型台式高速离心机、Concentrator plus 旋转浓缩仪, Eppendorf 公司; 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 超声波破碎仪, SONICS 公司; 高效液相色谱仪, Agilent

表 1 本研究所用的菌株、质粒及引物

Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

菌株、质粒及引物 Strains, plasmids and primers	性质 Description	来源 Source
菌株 Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	基因克隆宿主菌	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	蛋白表达宿主菌	Novagen
质粒 Plasmids		
pGEM-T	Amp ^r 抗性, 基因克隆载体	Invitrogen
pET28a(+)	Kan ^r 抗性, 蛋白表达载体	Novagen
引物 Primers		
F1	AAATTTCCCATATGACCGAGAGCTCTCCAC (<i>Nde</i> I 酶切位点用下划线标出)	
R1	ATCTACGGTACCCACCACTGGGGCGAAGAAG (<i>Kpn</i> I 酶切位点用下划线标出)	
F2	ATCTACGGTACCGTCACACCGGCACTCCCGTCGC (<i>Kpn</i> I 酶切位点用下划线标出)	
R2	CGATATGGATCCCTTGTGATCGCCGACTGTCTGG (<i>Bam</i> HI 酶切位点用下划线标出)	

公司; 手性分析型色谱柱 CRS10W 柱(Mitsubishi, 50 mm×4.6 mm, 3 μ m), MCI GEL 公司。

1.2 *dsaD*、*dsaE* 基因和接头序列的克隆

以 Desotamides 产生菌 *Streptomyces scopuliridis* SCSIO ZJ46 的基因组 DNA 为模板, F1 和 R1 为引物 PCR 扩增大小为 375 bp 的 *dsaE* 基因 DNA 片段(图 2A)。PCR 反应体系(25 μ L): 模板 1 ng, dNTPs 100 μ mol/L, DMSO 5%, 2×PrimeSTAR buffer 12.5 μ L, 上、下游引物各 400 μ mol/L, 添加灭菌双蒸水至总体积 25 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 4 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物依次经过胶回收、TA 克隆和测序验证, 得到正确的重组载体 pGEMT-*dsaE*; 同样以 *S. scopuliridis* SCSIO ZJ46 基因组 DNA 为模板, F2 和 R2 为引物 PCR 扩增大小为 1 248 bp 含接头序列(Linker)和 *dsaD* 基因序列的 DNA 片段(图 2A)。PCR 反应体系(25 μ L): 模板 1 ng, dNTPs 100 μ mol/L, DMSO 5%, 2×PrimeSTAR buffer 12.5 μ L, 上、下游引物各 400 μ mol/L, 添加灭菌双蒸水至总体积 25 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 4 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物依次经过胶回收、TA 克隆和测序验证, 得到正确的重组载体 pGEMT-*dsaD*-linker。

1.3 融合表达载体的构建

将测序正确的 pGEMT-*dsaE* 载体进行 *Nde* I/*Kpn* I 双酶切, 同时将 pGEMT-*dsaD*-linker 载体进行 *Kpn* I/*Bam*H I 双酶切; 回收的目的片段连接到 *Nde* I/*Bam*H I 双酶切的 pET28a(+)载体中, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α ; 利用引物 F1 和 R2 进行菌落 PCR 验证, 阳性克隆经质粒提取后进行双酶切验证, 将验证正确的重组表达载体 pET28a-*dsaDE* 转化 *E. coli* BL21(DE3), 从而得到表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*dsaDE*。

1.4 融合蛋白 DsaDE 的表达和纯化

将重组表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*dsaDE* 于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 12 h, 按照 1%

的接种量转接至 10 瓶含 50 μ g/mL 卡那霉素的 250 mL LB 培养基中(1 000 mL 三角瓶), 于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 约为 0.4 时, 加入 0.1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG), 置于 16 $^{\circ}$ C、150 r/min 继续振荡培养约 18 h。4 000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 转移至 50 mL 离心管中进行蛋白纯化操作或置于-80 $^{\circ}$ C 备用。

将得到的菌体用磷酸盐缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 8.0)洗涤 2 次后, 用 30 mL 上样缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, pH 8.0)悬浮, 于冰上超声破碎(超声 5 s, 暂停 5 s, 共超声 5 min), 之后 10 000 r/min 离心 40 min 取上清。用 15 mL 上样缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 10%甘油)将 Ni-NTA 亲和层析柱进行预平衡后, 将上清装载到 Ni-NTA 亲和层析柱上。先用 20 mL 洗涤缓冲液 I (50 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 10%甘油)洗涤, 接着用 10 mL 洗涤缓冲液 II (50 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 34 mmol/L 咪唑, 10%甘油)洗涤, 再用 4 mL 洗涤缓冲液 III (50 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 59 mmol/L 咪唑, 10%甘油)洗涤, 最后用 6 mL 洗脱缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, 10%甘油)洗脱。分别收集各个洗脱组分, 进行 SDS-PAGE 检测, 合并含有目标蛋白的洗脱组分用 PD-10 脱盐柱(GE Healthcare)脱盐, 随后用 10 K Amicon Ultra-15 超滤管离心浓缩, 最后储存于储存缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 8.0, 10%甘油)中, 于-80 $^{\circ}$ C 保存备用。使用 Bradford 法^[10]对蛋白浓度进行测定。

1.5 融合蛋白 DsaDE 的酶催化反应和 HPLC 检测

融合蛋白 DsaDE 的体外生化反应参考 Li 等^[9]并略有改动, 反应体系为(100 μ L): 5 μ mol/L 融合蛋白 DsaDE, 1 mmol/L 底物 L-Ile 或 L-*allo*-Ile, 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 8.0), 30 $^{\circ}$ C 反应 4 h。反应结束后, 用 200 μ L

冷甲醇终止反应, 沉淀的蛋白质经高速离心(室温, 13 000 r/min, 20 min)除去。上清液经真空离心浓缩仪旋干, 残留物重新溶于 40 μ L 2 mmol/L CuSO_4 水溶液, 取 25 μ L 进行手性 HPLC 分析。使用 MCI GEL CRS10W 柱(Mitsubishi, 50 mm \times 4.6 mm, 3 μ m)在 Agilent Technologies 1260 Infinity 系统上进行手性 HPLC 分析, 分析条件为: 流动相为 2 mmol/L CuSO_4 水溶液, 使用 1 mL/min 的流速等梯度洗脱 30 min, 紫外检测波长为 254 nm。

2 结果与分析

2.1 DsaDE 融合表达载体的构建

在 Desotamides 的生物合成基因簇中, 氨基转移酶和异构酶的编码基因 *dsaD* 和 *dsaE* 相邻, 且 *dsaE* 基因位于 *dsaD* 的上游, 两者之间有 112 bp 的基因间隔区(图 2A)。为了保证两个酶顺利融合表达, 在设计引物扩增 *dsaE* 基因片段时, 下游引物 R1 去掉了 *dsaE* 的终止密码子, 并在上、下游引物中加上 *Nde* I (F1)和 *Kpn* I (R1)两个酶切位点(表 1 和图 2B)。

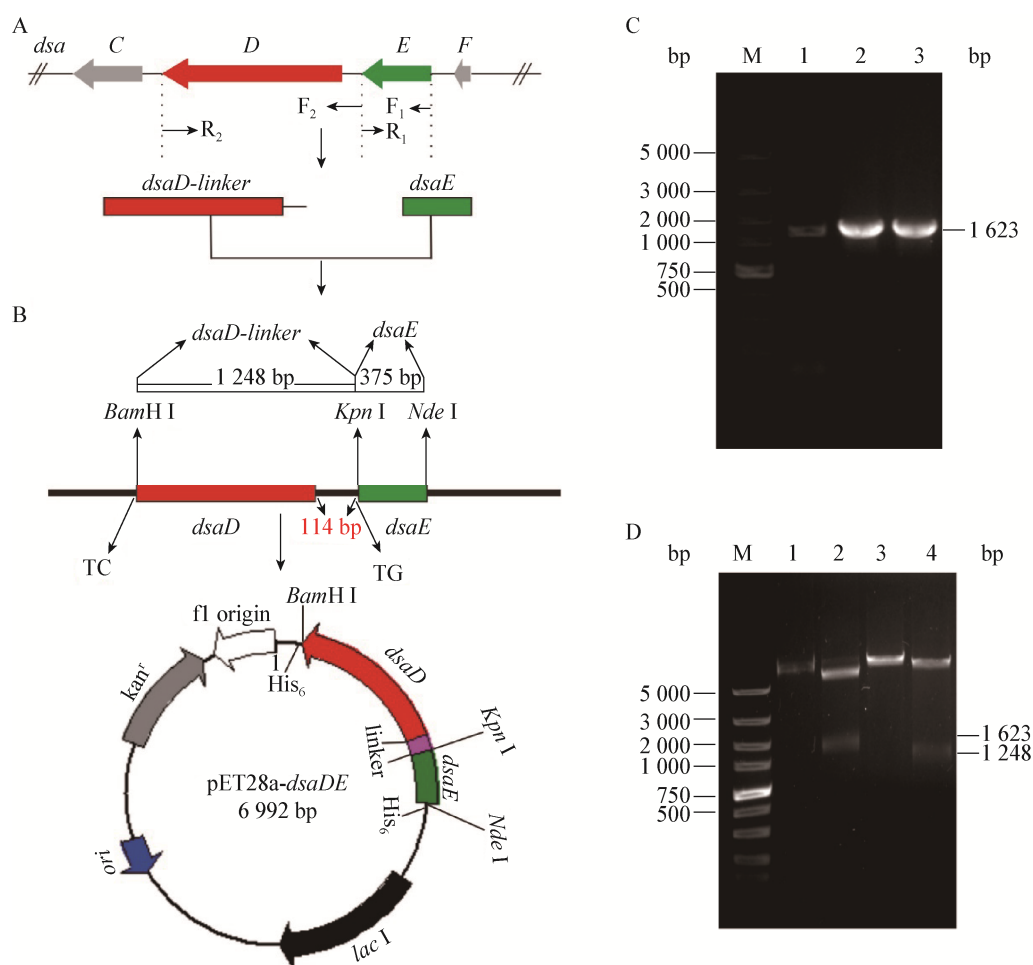


图 2 融合表达载体 pET28a-*dsaDE* 的构建

Figure 2 Construction of the overexpression vector pET28a-*dsaDE*

注: A、B: 融合表达载体 pET28a-*dsaDE* 构建的示意图。M: DNA marker。C: PCR 鉴定融合表达载体 pET28a-*dsaDE*; 1: 对照; 2 和 3: 分别为不同克隆的 *dsaDE*。D: 酶切验证融合表达载体 pET28a-*dsaDE*; 1: pET28a(+)对照; 2: 用 *Nde* I 和 *Bam*HI 酶切 pET28a-*dsaDE*; 3: 用 *Nde* I 和 *Kpn* I 酶切 pET28a-*dsaDE*; 4: 用 *Kpn* I 和 *Bam*HI 酶切 pET28a-*dsaDE*。

Note: A, B: Schematic representation for construction of pET28a-*dsaDE*. M: DNA marker. C: PCR analyses of the recombinant vector pET28a-*dsaDE*; 1: Negative control using *S. scopuliridis* SCSIO ZJ46 genomic DNA as template; 2 and 3: Using different clones of *E. coli* DH5 α /pET28a-*dsaDE* as template. D: Enzyme digestion of the recombinant vector pET28a-*dsaDE*; 1: pET28a(+) empty vector; 2: Recombinant vector pET28a-*dsaDE* digested with *Nde* I and *Bam*HI; 3: Recombinant vector pET28a-*dsaDE* digested with *Kpn* I and *Nde* I; 4: Recombinant vector pET28a-*dsaDE* digested with *Kpn* I and *Bam*HI.

为了保证 2 个蛋白融合表达时能够正确折叠, 减少 2 个蛋白之间的空间位阻, 获得可溶性表达, 设计利用 *dsaE* 和 *dsaD* 之间的基因间隔区作为接头序列 (Linker) 将 2 个基因进行衔接, 因为此基因间隔区为 112 bp, 不是 3 的倍数, 为了防止移码, 在设计引物扩增 *dsaD*-linker 片段时, 于上游引物 F2 的 *Kpn* I 酶切位点之后引入 GT 碱基 (表 1 和图 2B)。为了保证 Ni-NTA 亲和层析法纯化时融合 DsaDE 与 Ni-NTA 填料具有较好的特异性结合能力, 设计一个 N-端和 C-端均融合 6 个组氨酸标签的融合蛋白 His₆-DsaDE-His₆, 在设计引物扩增 *dsaD*-linker 片段时, 下游引物 R2 中去除 *dsaD* 的终止密码子, 并在酶切位点 *Bam* H I 之前引入 CT 碱基以防止 C-端的组氨酸标签移码 (表 1 和图 2B)。

将扩增的 *dsaE* 和 *dsaD*-linker 片段经酶切、连接后克隆至 pET28a(+) 表达载体的 *Nde* I 和 *Bam* H I 之间。首先, 利用引物 F1 和 R2 对所构建的 pET28a-*dsaDE* 融合表达载体进行菌落 PCR 验证, 结果表明, 获得大小约为 1.6 kb 的 DNA 片段 (图 2B 和 C), 与预测大小一致。将 PCR 验证正确的阳性

克隆提取质粒后, 分别用 *Nde* I 和 *Kpn* I 以及 *Kpn* I 和 *Bam* H I 对质粒 pET28a-*dsaDE* 进行酶切鉴定, 分别获得大小约为 1 623 bp 和 1 248 bp 的 DNA 片段 (图 2B 和 D), 与预测结果一致。以上结果说明, *dsaE* 和 *dsaD*-linker 已经正确连接并克隆至 pET28a(+) 中。

2.2 融合蛋白 DsaDE 的表达和纯化

将构建成功的融合表达载体 pET28a(+)-*dsaDE* 转化 *E. coli* BL21(DE3) 后, 放大发酵, 利用 Ni-NTA 亲和层析法对融合表达蛋白进行纯化。利用 SDS-PAGE 对诱导细胞的裂解物样品进行检测, 发现融合蛋白 DsaDE 在上清中获得较好的可溶性表达, 同时也有部分在沉淀中以包涵体的形式存在 (图 3A)。对纯化过程中的各洗脱组分进行 SDS-PAGE 分析, 结果表明目标蛋白主要存在于洗脱缓冲液的相应组分中, 而在洗涤缓冲液 III 相应组分中也有分布, 但量较少。因此, 仅对洗脱缓冲液洗脱组分进行脱盐和浓缩, 经 SDS-PAGE 检测, 纯化的融合蛋白 DsaDE 纯度达到 95% 以上 (图 3B)。纯化的融合蛋白 DsaDE 浓度测定为 23.97 mg/mL。

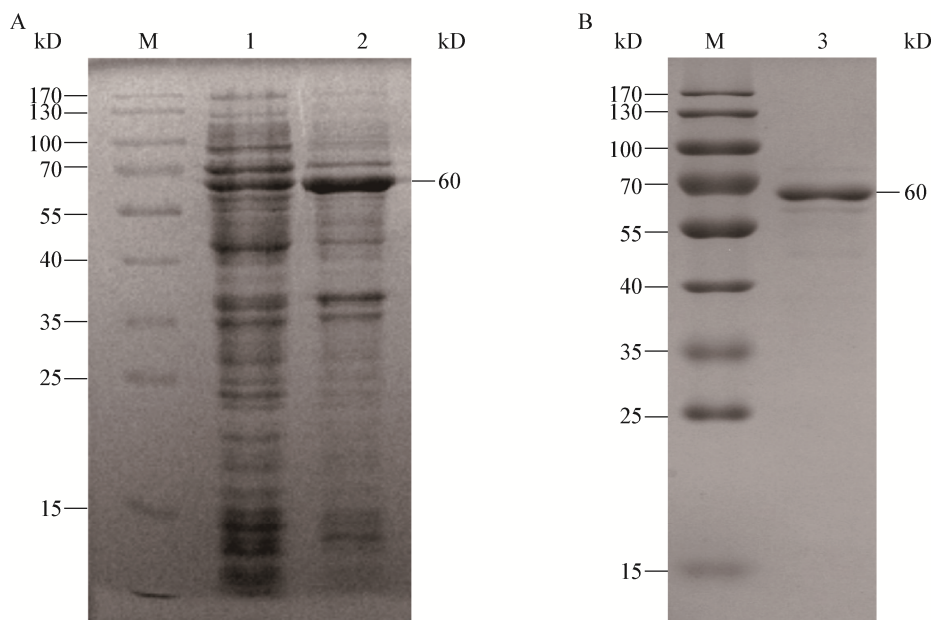


图 3 DsaDE 的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of DsaDE

注: M: Marker; 1: 诱导表达细胞裂解物的可溶性上清; 2: 诱导表达细胞裂解物的沉淀; 3: 纯化后的 DsaDE.

Note: M: Marker; 1: The soluble lysate of induced cells; 2: The insoluble lysate of induced cells; 3: Purified DsaDE.

2.3 融合蛋白 DsaDE 的体外酶反应分析

为证明 DsaDE 融合蛋白同时具有氨基转移酶和异构酶的功能, 分别以 L-异亮氨酸和 L-别异亮氨酸底物对以上纯化的融合蛋白 DsaDE 进行体外酶反应分析。利用 HPLC 对酶反应产物的分析结果表明: 当以 L-异亮氨酸为底物时, 与不添加酶的空白对照相比较, 在添加了 DsaDE 融合蛋白的反应中可以检测到保留时间(13.5 min)与 L-别异亮氨酸标准品完全一致的峰(图 4A, 图谱 iii 和 iv); 同样, 当以 L-别异亮氨酸为底物时, 与不添加酶的空白对照相比较, 在添加了 DsaDE 融合蛋白的反应中可以检测到保留时间(18 min)与 L-异亮氨酸标准品完全一致的峰(图 4B, 图谱 iii 和 iv)。以上结果说明, 融合蛋白 DsaDE 同时具备了氨基转移酶和异构酶的功能, 能够催化 L-异亮氨酸和 L-别异亮氨酸的相互转化。

3 讨论与结论

L-Ile 与 L-allo-Ile 之间的体外相互转化需要在氨基转移酶和异构酶共同作用下完成^[9]。虽然该反应在前人的努力下可以通过酶催化实现, 但是菌种的选育、优化尤其是多个酶的纯化等过程都比较复杂, 限制了大规模的工业生产应用。通过基因工程等方法将反应所需的氨基转移酶和异构酶整合到单一菌株内, 使大规模的工业生产模式更为简单, 生产过程更易调控。在本研究中, 氨基转移酶和异构酶融合的设计是一个关键点, *dsaE* 和 *dsaD* 之间的基因间隔区为 112 bp, 为了保证两种酶的融合表达, 因此需要在基因间隔区的上游引物酶切位点之后加入两个碱基 GT 防止移码。因为要将融合蛋白设计为 N-末端和 C-末端均融合表达组氨酸标签, 所以将 *dsaD* 的终止密码子去掉, 并在 *Bam*H I 酶切位点之前加上两个碱基 CT, 以防

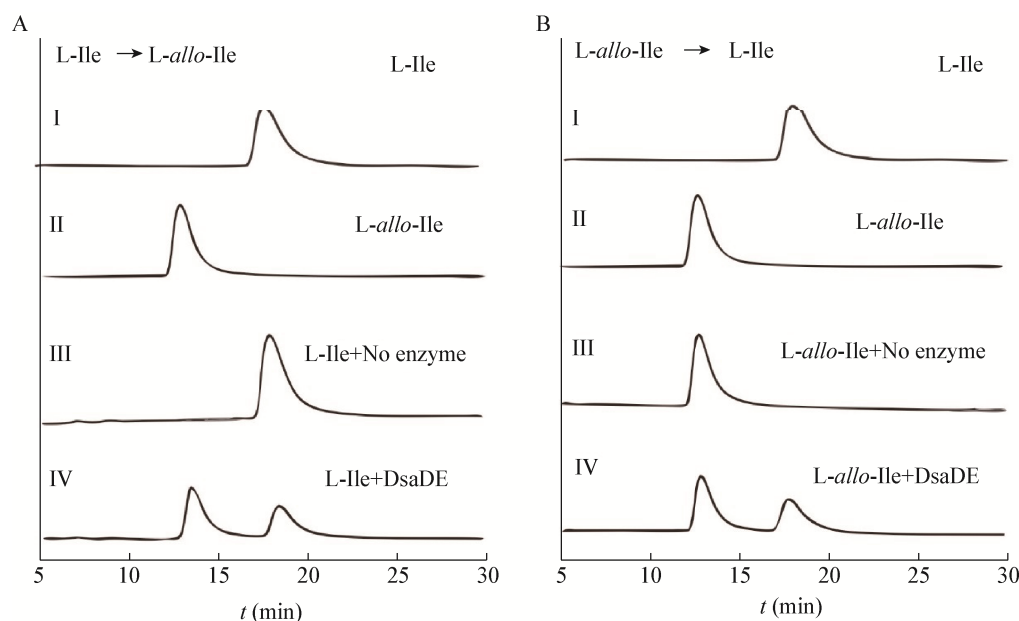


图 4 DsaDE 体外酶反应产物的 HPLC 分析

Figure 4 HPLC analyses of the reaction mixtures catalyzed by DsaDE

注: A: 以 L-Ile 为底物的 HPLC 分析; i: L-Ile 标准品; ii: L-allo-Ile 标准品; iii: L-Ile 为底物不加酶的对照; iv: L-Ile 为底物加入 DsaDE 酶反应。B: 以 L-allo-Ile 为底物的 HPLC 分析; i: L-Ile 标准品; ii: L-allo-Ile 标准品; iii: L-allo-Ile 为底物不加酶的对照; iv: L-allo-Ile 为底物加入 DsaDE 酶反应。

Note: A: HPLC analyses of the reaction mixtures using L-Ile as substrate; i: L-Ile standard; ii: L-allo-Ile standard; iii: Negative control lacks DsaDE; iv: L-Ile incubated with DsaDE. B: HPLC analyses of the reaction mixtures using L-allo-Ile as substrate; i: L-Ile standard; ii: L-allo-Ile standard; iii: Negative control lacks DsaDE; iv: L-allo-Ile incubated with DsaDE.

止移码。最终两个酶位于同一个开放阅读框(ORF)之内, 获得了融合基因 *dsaDE*, 并将其插入到了大肠杆菌表达载体 pET28a(+)中。PCR 和酶切鉴定结果显示, 本研究成功构建了 pET28a-*dsaDE* 融合表达载体, 将该重组载体转化到 *E. coli* BL21(DE3)中后, 经诱导融合蛋白可以成功在大肠杆菌中可溶性表达, 经过 Ni-NTA 亲和层析柱的一步纯化就可以得到纯度达到 95%以上的融合蛋白。因为设计使用天然间隔区作为碱基接头, 所以融合蛋白 DsaDE 在体外酶反应中显示了较好的活性。但是在大肠杆菌中表达融合蛋白的稳定性和 pET 系列表达载体的蛋白容易形成包涵体^[11], 这是融合蛋白在表达时需要注意的问题。

在未来的工业生产中, 只有新型的酶是远远不够的, 反应条件的变化和生产过程中杂质的产生都容易使酶失活, 而且酶的分离、纯化和大规模制备困难^[12], 但是酶的固定化是解决这些问题的重要方法, 因此, 未来可以将融合蛋白 DsaDE 与有机高分子材料载体、无机载体(玻璃、金属氧化物)和生物大分子进行固定化, 将会更进一步提升融合蛋白 DsaDE 在实际生产中的价值。

REFERENCES

- [1] van Dam-Bakker AWI. Isoleucine and *allo*-isoleucine[J]. *Nature*, 1958, 181(4602): 116-117
- [2] Ikai K, Takesako K, Shiomi K, et al. Structure of aureobasidin A[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1991, 44(9): 925-933
- [3] Kiho T, Nakayama M, Yasuda K, et al. Synthesis and antimicrobial activity of novel globomycin analogues[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2003, 13(14): 2315-2318
- [4] Song YX, Li QL, Liu X, et al. Cyclic hexapeptides from the deep south China Sea-derived *Streptomyces scopuliridis* SCSIO ZJ46 active against pathogenic gram-positive bacteria[J]. *Journal of Natural Products*, 2014, 77(8): 1937-1941
- [5] Zhou X, Huang HB, Li J, et al. New anti-infective cycloheptadepsipeptide congeners and absolute stereochemistry from the deep sea-derived *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141[J]. *Tetrahedron*, 2014, 70(42): 7795-7801
- [6] Schadewaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, et al. Significance of L-*allo*-isoleucine in plasma for diagnosis of maple syrup urine disease[J]. *Clinical Chemistry*, 1999, 45(10): 1734-1740
- [7] Li QL, Song YX, Qin XJ, et al. Identification of the biosynthetic gene cluster for the anti-infective desotamides and production of a new analogue in a heterologous host[J]. *Journal of Natural Products*, 2015, 78(4): 944-948
- [8] Liu J, Wang B, Li HZ, et al. Biosynthesis of the anti-infective marformycins featuring pre-NRPS assembly line *N*-formylation and *O*-methylation and post-assembly line C-hydroxylation chemistries[J]. *Organic Letters*, 2015, 17(6): 1509-1512
- [9] Li QL, Qin XJ, Liu J, et al. Deciphering the biosynthetic origin of *s*-*allo*-isoleucine[J]. *Journal of the American Chemistry Society*, 2016, 138(1): 408-415
- [10] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254
- [11] Mierendorf R, Yeager K, Novry R. The pET system: Your choice for expression[J]. *Advanced Products and Protocols for Molecular Biology Research*, 1994, 1(1): 1-3
- [12] Li Y. Enzymes immobilization and their applications[J]. *Journal of Molecular Catalysis (China)*, 2008, 22(1): 86-96 (in Chinese) 李晔. 酶的固定化及其应用[J]. *分子催化*, 2008, 22(1): 86-96