



研究报告

蓝杆藻 ATCC51142 中琥珀酸半醛脱氢酶的原核表达及生化表征

谢琮琮¹ 李至敏² 王小琴¹ 雷国风¹ 张伟¹ 李志敏^{*1,3}¹ 江西农业大学生物科学与工程学院 江西 南昌 330045² 江西农业大学理学院 江西 南昌 330045³ 江西农业大学 菌物资源保护与利用江西省重点实验室 江西 南昌 330045

摘要:【背景】蓝藻中生成琥珀酸的三羧酸循环途径与其他物种不同。由于 α -酮戊二酸脱羧酶和琥珀酸半醛脱氢酶的存在使得蓝藻的三羧酸循环途径变得完整。琥珀酸半醛脱氢酶催化琥珀酸半醛氧化为琥珀酸，在蓝藻中广泛存在。【目的】克隆、表达和纯化蓝杆藻 ATCC51142 中 *cce4228* 基因编码蛋白，并对其进行生化表征。【方法】以蓝杆藻 ATCC51142 基因组为模板克隆得到 *cce4228* 基因，将其插入到原核表达载体 pET-28a 上，在大肠杆菌 BL21(DE3)细胞中进行异源表达，利用 Ni-NTA 树脂纯化 *cce4228* 蛋白。运用紫外分光光度法和生物信息学方法表征重组 *cce4228* 蛋白生化特性。

【结果】构建了 pET-28a-*cce4228* 重组表达质粒，重组 *cce4228* 蛋白在大肠杆菌中得到可溶性表达，获得了纯度大于 90% 的 *cce4228* 蛋白。酶动力学测试和生物信息学分析结果显示，*cce4228* 蛋白是一个 NADP⁺-依赖型的琥珀酸半醛脱氢酶。【结论】蓝杆藻 ATCC51142 中 *cce4228* 基因编码一个偏好 NADP⁺辅因子的琥珀酸半醛脱氢酶，*cce4228* 蛋白的生化表征结果为进一步深入研究 *cce4228* 蛋白的结构功能关系及催化机制奠定了基础。

关键词: 蓝杆藻 ATCC51142, 琥珀酸半醛脱氢酶, 原核表达, 蛋白纯化及表征

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31560250, 31860249); Major Program Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20161ACB21012); Science and Technology Project Founded by the Education Department of Jiangxi Province (GJJ160353)

***Corresponding author:** Tel: 86-791-83813459; E-mail: zmlizm@126.com

Received: 19-12-2018; **Accepted:** 19-02-2019; **Published online:** 02-04-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31560250, 31860249); 江西省自然科学基金重大项目(20161ACB21012); 江西省教育厅科技研究重点项目(GJJ160353)

***通信作者:** Tel: 0791-83813459; E-mail: zmlizm@126.com

收稿日期: 2018-12-19; **接受日期:** 2019-02-19; **网络首发日期:** 2019-04-02

Expression and characterization of succinic semialdehyde dehydrogenase from *Cyanothece* sp. ATCC51142

XIE Cong-Cong¹ LI Zhi-Min² WANG Xiao-Qin¹ LEI Guo-Feng¹ ZHANG Wei¹
LI Zhi-Min^{*1,3}

1 College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China

2 College of Science, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China

3 Jiangxi Key Laboratory for Conservation and Utilization of Fungal Resources, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China

Abstract: [Background] The cyanobacterial tricarboxylic acid cycle, which produces succinic acid, is different from that of other species. The existences of α -ketoglutarate decarboxylase and succinic semialdehyde dehydrogenase in cyanobacterium make its tricarboxylic acid cycle complete. Succinic semialdehyde dehydrogenases that catalyze the conversion of succinic semialdehyde to succinic acid, exist in cyanobacteria extensively. **[Objective]** Clone, express and purify the protein encoded by the *cce4228* gene of *Cyanothece* sp. ATCC51142, and characterize its biochemical properties *in vitro*. **[Methods]** *cce4228* gene was cloned into pET-28a vector, overexpression of recombinant *cce4228* protein was induced by isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) in *E. coli* BL21(DE3) and then the protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography. The biochemical properties of *cce4228* protein were characterized by spectrophotometric and bioinformatics methods. **[Results]** An expression plasmid pET-28a-*cce4228* was constructed and *cce4228* protein was overexpressed in soluble form in *E. coli* BL21(DE3). Recombinant *cce4228* protein with purity higher than 90% was obtained. Steady-state kinetic and bioinformatic studies demonstrated that *cce4228* protein was a NADP⁺-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase. **[Conclusion]** The *cce4228* gene in *Cyanothece* sp. ATCC51142 encodes a succinic semialdehyde dehydrogenase, which prefers to use NADP⁺ rather than NAD⁺ as its cofactor. These results will provide basis to understand the structure-function relationship and catalytic mechanism of *cce4228* protein further.

Keywords: *Cyanothece* sp. ATCC51142, Succinic semialdehyde dehydrogenase, Prokaryotic expression, Protein purification and characterization

蓝藻, 又称蓝细菌或蓝绿藻, 在藻类中是最简单、最原始、最早发现能进行光合释氧的单细胞原核生物^[1]。目前已知的蓝藻种类超过 2 000 种, 遍布世界各地^[2]。蓝杆藻 ATCC51142 是一种白天进行光合作用储存糖原, 夜间通过固氮作用产氢储存氮源的固氮型蓝细菌^[3]。2011 年 Zhang 等报道除少数海洋蓝藻外大多数蓝藻都存在分别编码 α -酮戊二酸脱羧酶(α -Ketoglutarate decarboxylase, KGD)和琥珀酸半醛脱氢酶(Succinic semialdehyde dehydrogenase, SSADH)的基因, 这 2 个基因的存在使得蓝藻的三羧酸(Tricarboxylic acid cycle, TCA)循环途径变得完整, 打破了长达半个世纪的蓝藻没有完整的 TCA 循环途径的认知^[4-5]。蓝杆藻 ATCC51142 的基因组序

列测序于 2008 年完成^[6]。本课题组通过 BLAST 序列分析发现, 蓝杆藻 ATCC51142 中编码 KGD 和 SSADH 的基因分别是 *cce4227* 和 *cce4228*。*cce4227* 基因编码 KGD 蛋白的生化功能已被证实^[7]。

SSADH (EC 1.2.1.79)催化琥珀酸半醛氧化成琥珀酸从而进入 TCA 循环。因为 SSADH 是 α -酮戊二酸和 γ -氨基丁酸代谢旁路中的一个关键酶, 所以 SSADH 的存在丰富了经典的 TCA 循环途径^[8-9]。此外, SSADH 在生物体内还发挥重要的作用。例如, 在细菌中, SSADH 参与调控细胞内的碳氮代谢平衡^[10]; 在真核生物中, SSADH 为 TCA 循环提供碳源^[5,11-12]。植物中的 SSADH 基因突变或缺失会造成植物发育、表型和对热、光照敏感程度的变

化^[13-15]。对于人而言, *SSADH* 基因突变或缺失将会导致遗传性神经失调疾病^[16-19]。

由于 *SSADH* 在生物体内具有重要的生理功能, 学术界对 *SSADH* 酶学功能的研究也较多^[20-22]。*SSADH* 在催化琥珀酸半醛转化成琥珀酸的过程中需要 NAD^+ 或 NADP^+ 辅因子的参与。最初由于大肠杆菌中存在两种分别由 *GabD* 基因和 *YneI* 基因编码的 *SSADH*, 其分别依赖 NADP^+ 和 NAD^+ (或 NADP^+) 辅因子, 因此 *SSADH* 又分为 *GabD* 和 *YneI* 两种类型。辅因子偏好性不同的主要原因是不同类型的 *SSADH* 蛋白结构不同。例如, 来自酿脓链球菌的 *SSADH* 在其活性中心具有较小的 Ser158 氨基酸残基, 可以接纳 NADP^+ 辅因子中腺嘌呤核苷的磷酸根, 因此其偏好 NADP^+ 辅因子^[23]; 然而来自鼠伤寒沙门氏菌的 *SSADH* 偏好 NAD^+ 辅因子, 原因就是其活性中心具有较大的 Lys160 氨基酸残基, 无法容纳磷酸根^[22]。本课题组此前研究发现来自鱼腥藻 PCC7120 的 *SSADH* (*all3556* 基因编码) 倾向于使用 NADP^+ 辅因子, 并且使用 NADP^+ 辅因子时其催化活性是使用 NAD^+ 辅因子的 7 倍多^[8]。BLAST 序列分析发现蓝杆藻 ATCC51142 中 *cce4228* 基因与 *all3556* 和 *a2771* 基因高度一致, 并且蛋白氨基酸序列及建模结构分析发现与鱼腥藻 PCC7120 和聚球藻 PCC7002 的 *SSADH* 一样, 蓝杆藻 ATCC51142 中 *cce4228* 基因编码蛋白在活性中心也具有 Ser 氨基酸残基。为了证实蓝杆藻 ATCC51142 中 *cce4228* 基因编码蛋白的催化功能并表征其相关生化性质, 本研究从蓝杆藻 ATCC51142 基因组中克隆得到 *cce4228* 基因, 并将构建的 pET-28a-*cce4228* 重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞后进行诱导表达, 通过 Ni-NTA 亲和层析分离纯化得到 *cce4228* 重组蛋白。生物信息学及酶学研究结果表明 *cce4228* 基因编码一个偏好 NADP^+ 辅因子的琥珀酸半醛脱氢酶。本研究为进一步探索 *cce4228* 蛋白的结构功能关系及催化机制奠定了重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3) 菌株, 表达载体 pET-28a 为本实验室保存。蓝杆藻 ATCC51142 基因组购于美国模式菌种保藏中心。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶、5 000 DNA Marker, 北京全式金生物技术有限公司; Protein Marker, Thermo Scientific 公司; 2×*Taq* Mix、普通 DNA 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; Ni-NTA 树脂, QIAGEN 公司; 其他主要试剂均为分析纯, 北京索莱宝科技有限公司。所用引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成; 质粒测序由上海祥音生物技术有限公司完成。PCR 仪, Bio-Rad 公司; 高速冷冻离心机, Beckman 公司; 细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 层析冷柜, 上海沪西仪器厂; 紫外可见分光光度计, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.2 琥珀酸半醛脱氢酶表达质粒(pET-28a-*cce4228*)的构建

根据蓝杆藻 ATCC51142 中 *cce4228* 基因序列设计特异性引物(表 1), 以蓝杆藻 ATCC51142 基因组为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 模板 1 μL (约 30 ng), 上、下游引物(终浓度 0.2 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , 2×*Taq* Mix 25 μL , 灭菌水 22 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离纯化后加入 *Nde* I 和 *Xho* I 限制性内切酶进行双酶切。用同样的方法双酶切 pET-28a 载体。然后将酶切后纯化回收得到的 *cce4228* 基因片段和 pET-28a 载体线性片段(基因片段与载体片段的摩尔比为 6:1)在 16 °C 金属浴恒温下用 T4 DNA 连接酶过夜连接。连接产物 5 μL 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞(100 μL) 后, 用含

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Sequences (5'→3')
cce4228F- <i>Nde</i> I	TGTA <u>ACTCATATG</u> GGTATCGCTACAGTTA ACCC
cce4228R- <i>Xho</i> I	TATCTCGAGTCACTTGATCCATACGGTTT TTAC

注：引物序列中下划线为相应酶切位点。

Note: The underlined are restriction enzymes cutting sites.

有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 固体平板培养基筛选阳性克隆。将经菌落 PCR 验证正确的阳性克隆单菌落摇菌提取质粒后送检测序。

1.3 琥珀酸半醛脱氢酶的诱导表达及纯化

将测序正确的单克隆菌落加入 10 mL 含有卡那霉素(50 $\mu\text{g/mL}$)的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜。然后按 1% (体积比)的接种量将过夜培养液加入至 800 mL LB 液体培养基中(含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素)进行菌体扩大培养。待培养液 OD_{600} 至 0.6 时冰水浴后加入 IPTG (终浓度为 0.2 mmol/L), 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 继续培养 24 h。将于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r/min 离心 20 min 所得的菌体用 20 倍体积的平衡缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 缓冲液)重悬, 于冰水浴中超声破碎后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 1 h 得到菌体上清液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 将上清过 Ni-NTA 树脂(事先用平衡缓冲液进行平衡处理), 然后用含咪唑的平衡缓冲液进行浓度梯度洗脱, 分别收集每个浓度的流出液, 用 SDS-PAGE 检测目的蛋白。汇集含有目的蛋白的洗脱液后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下采用透析袋进行浓缩和透析, 然后用 Bradford 方法对目的蛋白进行定量。

1.4 金属离子对琥珀酸半醛脱氢酶催化活性的影响

在 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5 的缓冲液中, 分别加入终浓度为 2 mmol/L 的金属离子(Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), 测定 cce4228 蛋白在添加不同金属离子时催化琥珀酸半醛转化成琥珀酸的最大初始反应速度。反应总体

积为 500 μL , 反应体系中含有上述不同的金属离子, 0.5 mmol/L NADP 二钠盐, 0.2 mmol/L 琥珀酸半醛和 0.135 $\mu\text{mol/L}$ cce4228 蛋白。使用紫外分光光度计在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下连续监测反应混合液在 340 nm 的吸光值(A_{340})变化。根据吸光值的变化速率计算反应速度。实验重复 3 次。

1.5 反应体系 pH 值对琥珀酸半醛脱氢酶催化活性的影响

在不同 pH 值条件下分别测定 cce4228 蛋白催化琥珀酸半醛转化成琥珀酸的最大初始反应速度。采用的缓冲液体系如下: 50 mmol/L MES pH 5.6, 50 mmol/L Bis-Tris pH 6.0、6.5, 50 mmol/L HEPES pH 7.0、7.5, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、8.5, 50 mmol/L N-环己基-2-氨基乙磺酸 CHES (9.0、9.5, 50 mmol/L CAPS) pH 10.0、10.5、11.0。反应总体积为 500 μL , 在上述不同的反应缓冲液中含有 0.2 mmol/L MgCl_2 , 0.5 mmol/L NADP 二钠盐, 0.2 mmol/L 琥珀酸半醛和 0.135 $\mu\text{mol/L}$ cce4228 蛋白。实验重复 3 次。

1.6 琥珀酸半醛脱氢酶的活性测定

琥珀酸半醛脱氢酶的酶动力学参数在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下测定。反应总体积为 500 μL , 反应体系中包含 50 mmol/L CHES pH 为 9.0 的缓冲液, 0.2 mmol/L MgCl_2 , 0.5 mmol/L NADP 二钠盐, 不同浓度的琥珀酸半醛和 0.067 5 $\mu\text{mol/L}$ cce4228 蛋白。测定不同底物浓度(0.005–2 mmol/L)下的初始反应速度, 利用 KaleidaGraph 软件通过米氏方程推导的完全抑制方程 $V = V_{\max}/(1 + K_m/[S] + [S]/K_i)$, 计算出 V_{\max} 、 K_m 、 K_i 和 k_{cat} 。测定 cce4228 蛋白与 NADP 二钠盐的 K_m 时, 固定琥珀酸半醛浓度为 0.2 mmol/L, Mg^{2+} 浓度为 0.2 mmol/L, NADP 二钠盐的浓度范围为 0.005–0.5 mmol/L。测定 cce4228 蛋白与 Mg^{2+} 的 K_m 时, 固定琥珀酸半醛浓度为 0.2 mmol/L, NADP 二钠盐浓度为 0.5 mmol/L, MgCl_2 浓度范围为 0.01–1 mmol/L。上述反应中 cce4228 蛋白浓度为 0.135 $\mu\text{mol/L}$ 。测定在不同浓度的 NADP 二钠盐或 MgCl_2 时 cce4228 蛋白催化琥珀酸半醛转化成

琥珀酸的最大初始反应速度。实验重复 3 次。

1.7 琥珀酸半醛脱氢酶的生物信息学分析

重组 *cce4228* 蛋白的理化性质通过在线网站 <http://web.expasy.org/protparam/> 进行预测分析。*cce4228* 蛋白与其他来源的 SSADH 蛋白用 MEGA 6.0 软件中 ClustalW 方法进行多序列比对并构建系统进化树。

1.8 重组 *cce4228* 蛋白的三维结构预测

重组 *cce4228* 蛋白的三级结构通过在线网站 <http://swissmodel.expasy.org/> 预测。蛋白质模型结构由 Pymol 软件根据预测生成的 pdb 文件制作。

2 结果与分析

2.1 蓝杆藻 ATCC51142 中 *cce4228* 基因的克隆

根据蓝杆藻 ATCC51142 中 *cce4228* 基因序列设计分别带有 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点的上、下游引物(表 1), 以蓝杆藻 ATCC51142 基因组为模板进行 PCR 扩增, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 获得大小约为 1.4 kb 的特异性产物, 该基因片段大小与蓝杆藻 ATCC51142 中 *cce4228* 基因理论碱基数(1 368 bp)相吻合(图 1)。对构建的 pET-28a-*cce4228* 重组质粒的测序结果表明: 获得的基因序列与蓝杆藻 ATCC51142 中的 *cce4228* 基因序列(GenBank 登录号 WP_009543699)一致性为 100%。因此该重组质粒用于后期进行原核表达实验。

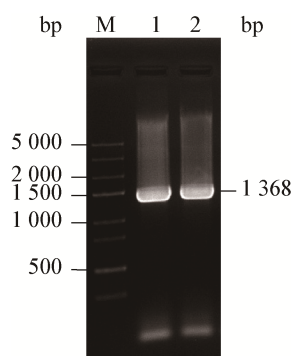


图 1 蓝杆藻 ATCC51142 中 *cce4228* 基因的 PCR 扩增
Figure 1 PCR cloning of *cce4228* gene

注: M: DNA 分子标准; 1、2: PCR 产物。

Note: M: DNA marker; 1, 2: PCR product.

2.2 重组 *cce4228* 蛋白在大肠杆菌中的表达分析

将 pET-28a 空载体和测序正确的 pET-28a-*cce4228* 重组质粒分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞后进行 IPTG 诱导表达, 结果见图 2。由图 2 可见, 泳道 1 在约 50 kD 处未有大量蛋白表达, 然而泳道 4 在该处有明显的蛋白过表达。蓝杆藻 ATCC51142 中 *cce4228* 基因编码一个 49.3 kD 的蛋白质, 与泳道 4 中的蛋白质大小接近。此外, 泳道 5-6 表明细胞破碎后大部分重组 *cce4228* 蛋白释放到上清液中, 而在沉淀中的目的蛋白量相对较少。以上结果表明 pET-28a-*cce4228* 重组质粒在大肠杆菌表达体系中能够正确表达, 并且重组 *cce4228* 具有非常好的溶解性。

2.3 重组 *cce4228* 蛋白的纯化

将离心并过滤得到的含有目的蛋白的上清液过平衡缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)处理好的 Ni-NTA 树脂, 然后用含有 20-100 mmol/L 咪唑的平衡缓冲液进行洗脱, 纯化结果如图 3 所示。SDS-PAGE 结果表明当咪唑浓度增加到 60 mmol/L 时, 少量重组 *cce4228* 蛋白被洗脱, 而大部分重组蛋白在咪唑浓度为 100 mmol/L 时被洗脱。合并图 3 中泳道 3-8 的洗脱液, 并对其进行脱盐浓缩, 得到

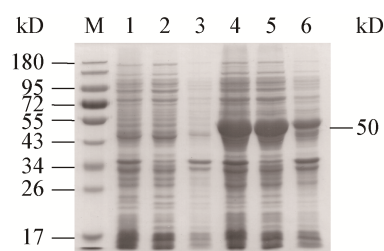


图 2 重组 *cce4228* 蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达
Figure 2 Expression of pET-28a plasmid and pET-28a-*cce4228* plasmid

注: M: 蛋白质标准; 1-3: 转化 pET-28a 空载体的大肠杆菌细胞诱导后破碎液, 离心后上清液和离心后沉淀悬浮液; 4-6: 转化 pET-28a-*cce4228* 重组质粒的大肠杆菌细胞诱导后破碎液, 离心后上清液和离心后沉淀悬浮液。

Note: M: Protein marker; 1-3: Cell lysate, supernatant and pellet suspension of pET-28a after induction; 4-6: Cell lysate, supernatant and pellet suspension of pET-28a-*cce4228* after induction.

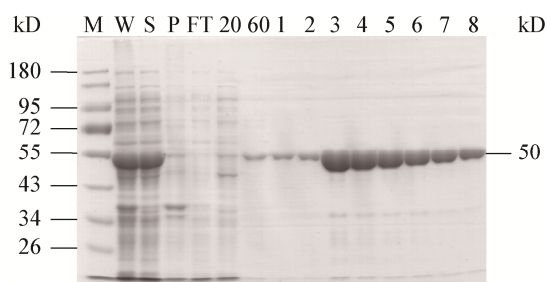


图3 重组 cce4228 蛋白亲和层析纯化组分的电泳分析
Figure 3 SDS-PAGE of cce4228 protein purification

注: M: 蛋白质标准; W: 细胞破碎液; S: 离心后上清液; P: 离心后沉淀重悬液; FT: 流穿液; 20: 20 mmol/L 咪唑洗脱液; 60: 60 mmol/L 咪唑洗脱液; 1-8: 100 mmol/L 咪唑洗脱液。

Note: M: Protein marker; W: pET-28a-cce4228 cell lysate; S: Supernatant; P: Pellet; FT: Flow-through; 20: 20 mmol/L imidazole elution; 60: 60 mmol/L imidazole elution; 1-8: 100 mmol/L imidazole elution.

纯度大于90%的目的蛋白。用Bradford方法测定浓缩后的重组蛋白的浓度为6.75 g/L (135 $\mu\text{mol/L}$), 目的蛋白的收率为15.6 mg/g 菌体。

2.4 重组 cce4228 蛋白的生化表征

2.4.1 金属离子对重组 cce4228 蛋白催化活性的影响

金属离子对重组 cce4228 蛋白催化琥珀酸半醛氧化成琥珀酸的活性有显著影响。相比较无金属离子添加时, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 离子对 cce4228 蛋

白有激活作用, Mg^{2+} 对 cce4228 蛋白的激活作用最显著; 然而 Ni^{2+} 和 Cu^{2+} 离子会明显抑制 cce4228 蛋白的催化活性, Co^{2+} 离子会部分抑制 cce4228 蛋白的催化活性, 当添加 2 mmol/L Zn^{2+} 时 cce4228 蛋白的催化活性不能被检测到(图 4A)。在标准试验条件下, 在不同 Mg^{2+} 浓度下 cce4228 蛋白的动力学活性符合米氏方程(图 4B)。测得的最大初始反应速度 (V_{max}) 为 $0.316 \pm 0.005 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$, 重组 cce4228 蛋白与 Mg^{2+} 的结合常数 (K_{m}) 为 $0.0062 \pm 0.0007 \text{ mmol/L}$, 反应所用的 cce4228 浓度为 $0.135 \mu\text{mol/L}$, 因此可以计算得到 k_{cat} 为 2.34 s^{-1} , $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 为 $3.77 \times 10^5 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ 。

2.4.2 反应体系 pH 值对重组 cce4228 蛋白催化活性的影响

反应体系 pH 值对重组 cce4228 蛋白催化活性的影响如图 5 所示。选定的 pH 范围为 5.6-11.0, 在不同 pH 值缓冲液体系中 cce4228 蛋白表现出不同的催化活性。当缓冲液体系在 50 mmol/L CHES, pH 9.0 时, cce4228 蛋白的催化活性最高; 相比较而言, 在碱性条件下 cce4228 蛋白的催化活性比酸性条件下更高; 当反应缓冲液 pH 低于 7.0 时, cce4228 蛋白的催化活性急剧减弱。

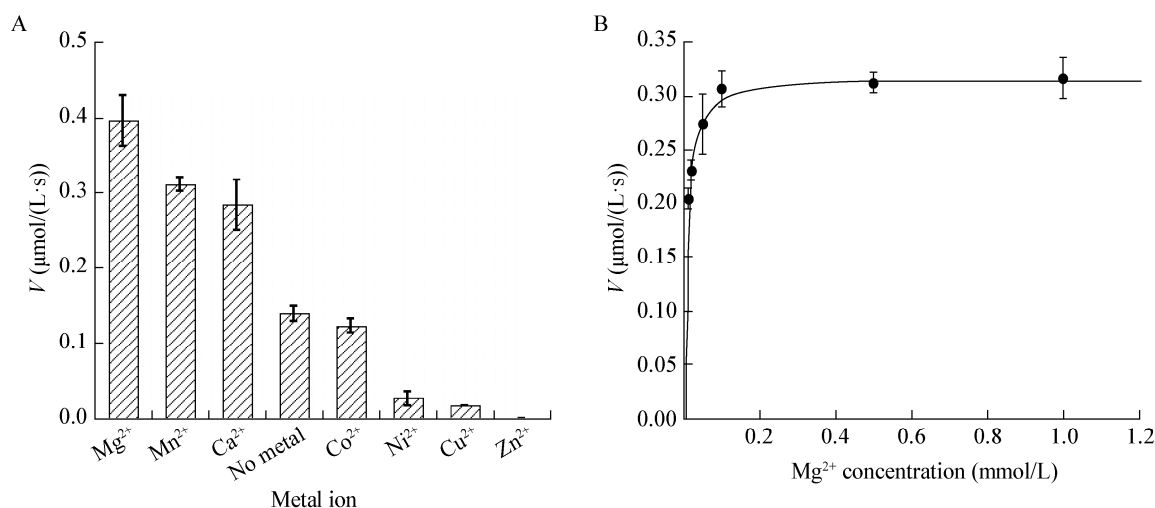


图4 金属离子对重组 cce4228 蛋白催化活性的影响

Figure 4 Effects of metal ions on the catalytic activity of cce4228 protein

注: A: 添加不同金属离子时的最大初始反应速度; B: 不同 Mg^{2+} 浓度时的最大初始反应速度。数据以平均值 \pm 标准差表示, $n=3$ 。

Note: A: The maximum initial velocities with addition of different metal ions; B: The maximum initial velocities at different Mg^{2+} concentrations. Data are expressed as the mean \pm standard deviation, $n=3$.

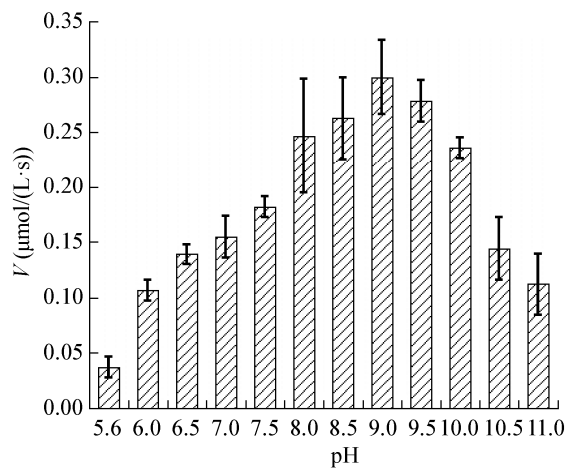


图5 反应体系 pH 值对重组 cce4228 蛋白催化活性的影响
Figure 5 Effects of pH on the catalytic activity of cce4228 protein

2.4.3 重组 cce4228 蛋白的酶动力学参数

在标准试验条件下, 当用琥珀酸半醛作为底物, NADP^+ 或 NAD^+ 为辅因子时, 重组 cce4228 蛋白的动力学活性符合由米氏方程推导的完全抑制方程: $V = V_{\max} / (1 + K_m/[S] + [S]/K_i)$ 。详细酶动力学参数如表 2 所示。以 NADP^+ (0.5 mmol/L) 作为辅因子时, 测得的 V_{\max} 为 $0.26 \pm 0.02 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$, cce4228 蛋白与底物的 K_m 为 $0.008 \pm 0.003 \text{ mmol}/\text{L}$, cce4228 蛋白与底物的抑制常数(K_i)为 $0.8 \pm 0.2 \text{ mmol}/\text{L}$, 反应所用的 cce4228 蛋白的浓度为 $0.0675 \mu\text{mol}/\text{L}$, 因此可以计算得到 k_{cat} 为 3.85 s^{-1} , k_{cat}/K_m 为 $4.81 \times 10^5 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ (图 6A)。当固定琥珀酸半醛浓度为 $0.2 \text{ mmol}/\text{L}$, 改变 NADP^+ 浓度时, 测得 V_{\max} 为 $0.239 \pm 0.008 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$, cce4228 蛋白与 NADP^+ 的 K_m 为 $0.034 \pm 0.002 \text{ mmol}/\text{L}$ (图 6B), 通过计算得到 k_{cat} 为 3.54 s^{-1} , k_{cat}/K_m 为 $1.04 \times 10^5 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ 。以 NAD^+ (10 mmol/L) 作为辅因子时, 测得的 V_{\max} 为

$0.23 \pm 0.01 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$, cce4228 蛋白与底物的 K_m 为 $0.0041 \pm 0.0005 \text{ mmol}/\text{L}$, cce4228 蛋白与底物的 K_i 为 $0.052 \pm 0.004 \text{ mmol}/\text{L}$, 反应所用的 cce4228 蛋白的浓度为 $0.135 \mu\text{mol}/\text{L}$, 因此可以计算得到 k_{cat} 为 1.70 s^{-1} , k_{cat}/K_m 为 $4.15 \times 10^5 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ (图 6C)。当固定琥珀酸半醛浓度为 $0.02 \text{ mmol}/\text{L}$, 改变 NAD^+ 浓度时, 测得 V_{\max} 为 $0.35 \pm 0.01 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$, cce4228 蛋白与 NAD^+ 的 K_m 为 $1.72 \pm 0.17 \text{ mmol}/\text{L}$ (图 6D), 通过计算得到 k_{cat} 为 2.59 s^{-1} , k_{cat}/K_m 为 $1.51 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ 。由此可以得出 cce4228 蛋白偏好使用 NADP^+ 辅因子, 为一类 NADP^+ -依赖型的琥珀酸半醛脱氢酶。

2.5 重组 cce4228 蛋白的生物信息学分析

蓝杆藻 ATCC51142 中的 cce4228 基因编码的蛋白质含有 455 个氨基酸残基。重组 cce4228 蛋白的理论相对分子质量为 49 289.69 Da, 理论等电点为 4.77, 摩尔消光系数 ϵ 为 $41\,285 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。为分析 cce4228 蛋白与其他来源的 SSADH 蛋白的进化关系, 利用 MEGA 6.0 软件中的 ClustalW 方法进行多序列比对, 再用 Neighbor-Joining (N-J) 法进行 1 000 次 Bootstrap 构建系统进化树(图 7), 其中不同来源的 SSADH 包括: 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、人(Human)、大肠杆菌(*Escherichia coli* GabD 和 *Escherichia coli* YneI)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、聚球藻(*Synechococcus* sp. PCC 7002)、鱼腥藻(*Anabaena* sp. PCC 7120)。图 7 结果表明 cce4228 蛋白与聚球藻和鱼腥藻的 SSADH 蛋白为同一分支, 而与拟南芥、人、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌属于不同分支, 表明蓝杆藻 ATCC51142 中

表 2 不同辅因子时重组 cce4228 蛋白催化 SSA 的酶动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of recombinant cce4228 with SSA as substrate using different cofactors

Cofactors	K_m (mmol/L)	K_i (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$)	K_m (mmol/L)*
NADP^+	0.008 ± 0.003	0.8 ± 0.2	3.85	4.81×10^5	0.034 ± 0.002
NAD^+	0.0041 ± 0.0005	0.052 ± 0.004	1.70	4.15×10^5	1.72 ± 0.17

注: *: 辅因子的米氏常数。

Note: *: K_m for cofactors.

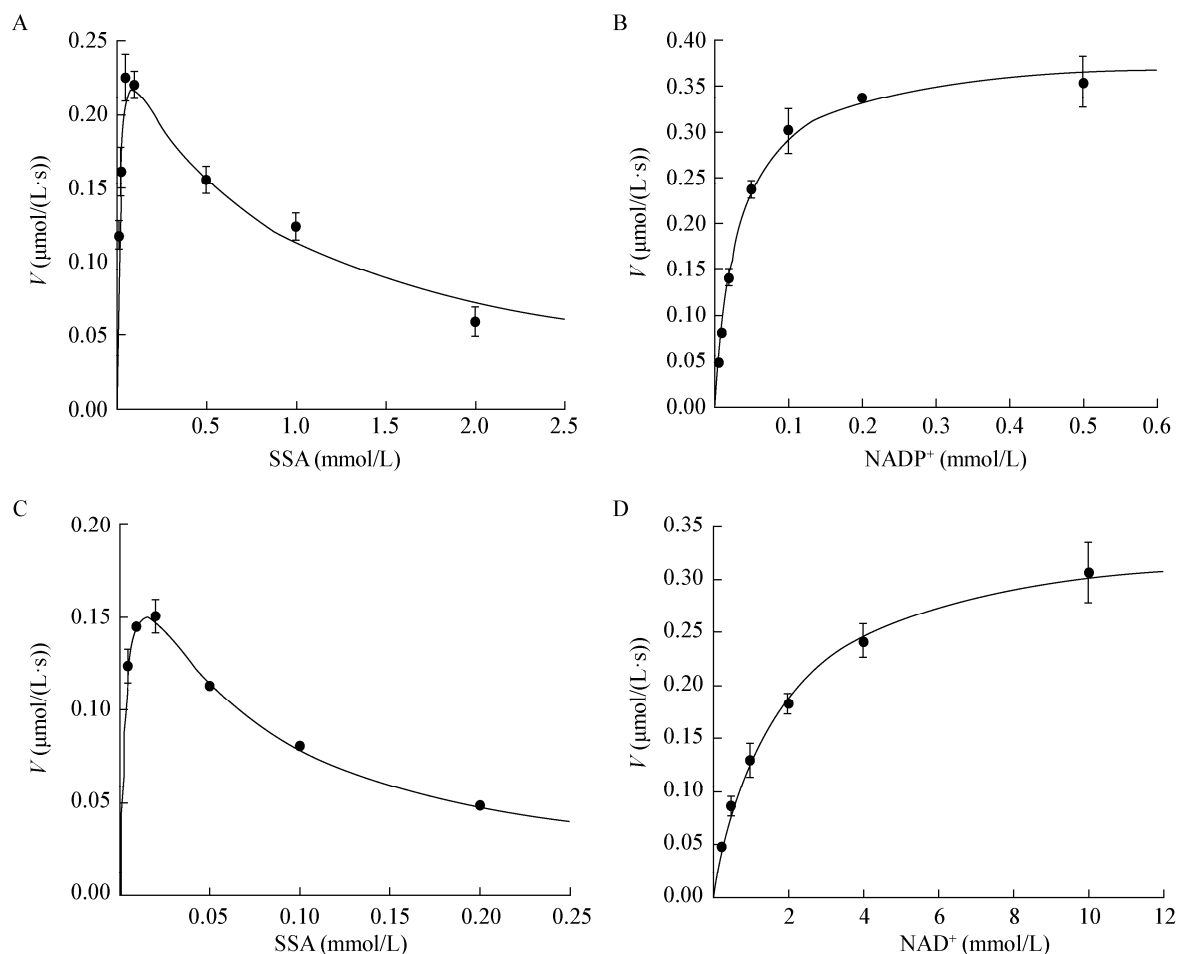


图6 重组 *cce4228* 蛋白的酶动力学参数

Figure 6 Kinetic profiles of *cce4228* protein

注：A：初始反应速度随琥珀酸半醛浓度的变化曲线，固定 NADP^+ 的浓度为 0.5 mmol/L；B：初始反应速度随 NADP^+ 浓度的变化曲线，固定琥珀酸半醛浓度为 0.2 mmol/L；C：初始反应速度随琥珀酸半醛浓度的变化曲线，固定 NADP^+ 的浓度为 10 mmol/L；D：初始反应速度随 NADP^+ 浓度的变化曲线，固定琥珀酸半醛浓度为 0.02 mmol/L。

Note: A: Plot of the initial velocities as function of SSA concentrations, the concentration of NADP^+ was fixed at 0.5 mmol/L; B: Plot of the initial velocities as function of NADP^+ concentrations, the concentration of SSA was fixed at 0.2 mmol/L; C: Plot of the initial velocities as function of SSA concentrations, the concentration of NADP^+ was fixed at 10 mmol/L; D: Plot of the initial velocities as function of NADP^+ concentrations, the concentration of SSA was fixed at 0.02 mmol/L.

的 *cce4228* 蛋白与聚球藻和鱼腥藻的 SSADH (分别为 a2771 和 all3556 蛋白) 亲缘关系较近。BLAST 序列分析发现，蓝杆藻 ATCC51142 中 *cce4228* 蛋白与鱼腥藻 PCC7120 中 all3556 蛋白的氨基酸序列一致性高达 73%，与聚球藻 PCC7002 中 a2771 蛋白的氨基酸序列一致性达到 65%，而聚球藻 PCC7002 中的 a2771 和鱼腥藻 PCC7120 中的 all3556 蛋白均已被证实为 NADP^+ -依赖型的琥珀酸半醛脱氢酶^[4,21,24-25]。

2.6 重组 *cce4228* 蛋白的三级结构分析

以聚球藻 PCC7002 中 a2771 蛋白晶体结构 (PDB: 3vz3) 为模板对 *cce4228* 蛋白的三维结构进行建模(图 8)。由图 8 可以发现 *cce4228* 蛋白的催化中心位于晶体结构的中心区域， NADP^+ 辅因子采取一个伸展的构象，其酰胺基末端深入活性中心区域。*cce4228* 蛋白催化中心的结构示意图如图 9 所示。底物琥珀酸半醛的醛基氧原子与 Cys262 和 Asn131

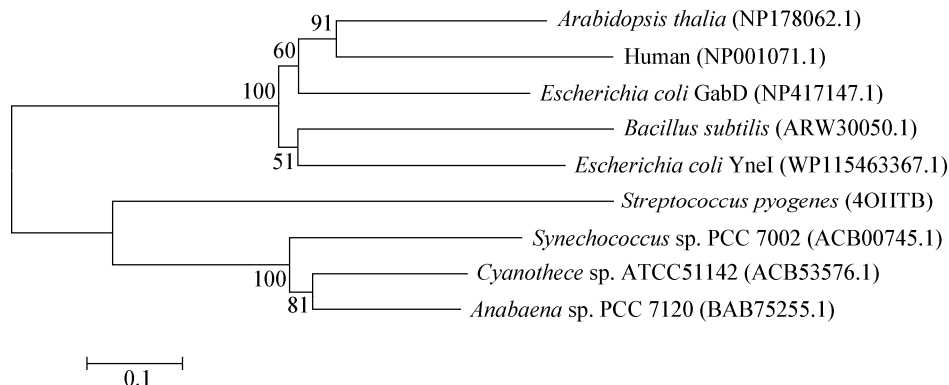


图 7 蓝杆藻 ATCC51142 中 *cce4228* 蛋白与其他来源的 SSADH 蛋白系统进化分析

Figure 7 Phylogenetic analysis of *cce4228* with other SSADHs from different sources

注: 0.1 表示距离标尺; 线表示分支长度(支长距离越近, 差异越小, 反之差异越大); 数字表示自展值(>50%认为可信, <50%隐去).
Note: 0.1 represents the distance ruler; Line represents branch length (The closer the branch length is, the smaller the difference, and the greater the difference); Number represents self-expanding value (>50% believes credible, <50% hides).

的侧链均有氢键作用(距离均<0.3 nm, 图中未显示), 琥珀酸半醛的羧酸根氧原子与 Ser420 的侧链有氢键作用。此外, NADP⁺辅因子与 Glu228 和 Arg139 的侧链的氢键作用对稳定 NADP⁺的伸展构象起着重要作用(图 9)。

3 讨论

由于在蓝藻中没有检测到 α -酮戊二酸脱氢酶基因, 长期以来蓝藻被认为不具备完整的 TCA 循环途径。最近的研究发现蓝藻可以通过 α -酮戊二

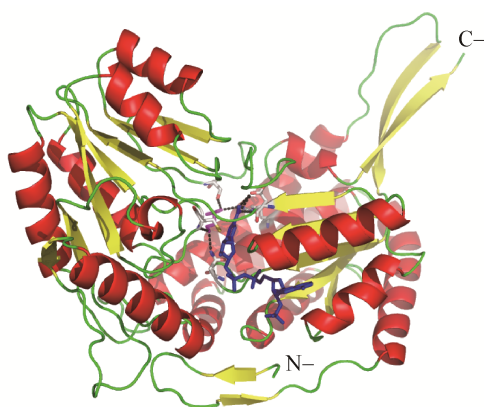


图 8 重组 *cce4228* 蛋白模拟结构卡通示意图

Figure 8 Modeled cartoon structure of *cce4228*

注: 关键氨基酸残基、琥珀酸半醛底物及 NADP⁺辅因子均为棍棒结构, 其颜色分别为浅灰色(碳原子)、紫色及蓝色。α-螺旋、β-折叠及无规则卷曲分别为红色、黄色和绿色。N-指蛋白质氮端, C-指蛋白质碳端。黑色虚线为催化中心的氢键。

Note: Key residues, SSA substrate and NADP⁺ cofactor are showed as sticks, represented by light gray (carbon atom), magenta and blue, respectively. The α-helix, β-strands and loops are depicted as red, yellow and green, respectively. N- indicates the N-terminal and C- indicates the C-terminal of *cce4228*. The hydrogen bonds are shown as black dotted lines.

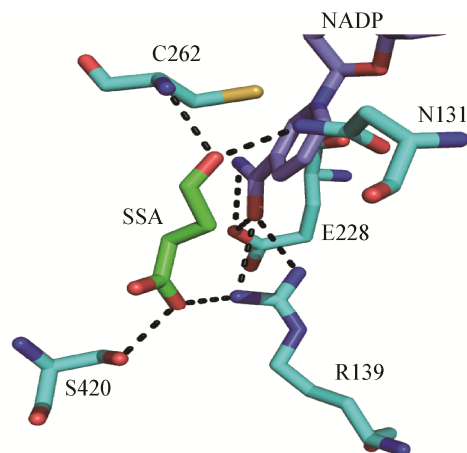


图 9 重组 *cce4228* 蛋白催化中心示意图

Figure 9 Stick view of catalytic center structure of *cce4228*

注: SSA 指琥珀酸半醛(碳原子为绿色), NADP 为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸辅因子(紫色碳链), 关键氨基酸残基(碳原子为浅蓝色), 数字为其在氨基酸序列中的位置。黑色虚线为催化中心的氢键。

Note: SSA indicates succinic semialdehyde (green carbon), NADP indicates the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate cofactor (purple carbon chain) and the numbers next to the key residues (cyan carbon) are the positions in the amino acids sequence of *cce4228*. The hydrogen bonds are showed as black dotted lines.

酸和 γ -氨基丁酸两条代谢旁路使得 TCA 循环变得完整^[26]。琥珀酸半醛是这两条代谢旁路的共同中间代谢物,而 SSADH 的催化底物正是琥珀酸半醛,催化产物是琥珀酸。因此 SSADH 在生物体内不但可以降低具有细胞毒性的琥珀酸半醛浓度,还可以生成 TCA 循环提供碳源的琥珀酸。

SSADH 属于醛脱氢酶超家族第五亚族^[27-28]。该家族酶需要 NADP^+ 或 NAD^+ 辅因子参与电子传递。此外,研究发现 SSADH 存在明显的非竞争性底物抑制现象,其抑制作用结构基础也得到阐明,即高浓度的琥珀酸半醛底物通过占据辅因子 (NADP^+ 或 NAD^+) 结合中心从而抑制 SSADH 活性^[29]。酶动力学结果发现 cce4228 蛋白与 NADP^+ 辅因子的结合能力是与 NAD^+ 辅因子结合能力的 50 倍(表 2、图 6B 和 6D),同时使用饱和浓度的 NADP^+ 辅因子时 cce4228 蛋白的催化速度常数也是使用饱和浓度的 NAD^+ 辅因子时的 2 倍左右(表 2、图 6A 和 6C)。本研究同样发现 cce4228 蛋白存在底物抑制现象,但是使用不同的辅因子时底物抑制浓度有所不同。以 NADP^+ 为辅因子时琥珀酸半醛浓度超过 0.1 mmol/L 时才开始对 cce4228 蛋白活性有抑制作用,然而以 NAD^+ 为辅因子时琥珀酸半醛浓度超过 0.02 mmol/L 时就开始抑制 cce4228 蛋白催化活性(图 6A 和 6C)。因为底物抑制是底物通过占据辅因子的结合中心来实现的,而 cce4228 蛋白与 NADP^+ 辅因子的结合能力要大于与 NAD^+ 辅因子的结合能力,因此使用 NADP^+ 辅因子时需要更高浓度的底物才会抑制 cce4228 催化活性。此外,与其他来源的 SSADH 类似,不同的金属离子和反应体系 pH 对 cce4228 蛋白的催化活性有较大影响(图 4 和图 5)。

生物信息学分析结果表明蓝杆藻 ATCC51142 的 cce4228 蛋白与同为蓝藻的聚球藻 PCC7002 和鱼腥藻 PCC7120 来源的 SSADH 亲缘关系较近(图 7)。事实上,本研究发现 cce4228 蛋白的酶动力学性质也和鱼腥藻 PCC7120 的 SSADH 类似^[8]。建模结构分析发现 cce4228 蛋白的活性中心氨基酸残基

与来自聚球藻 PCC7002 的 SSADH 高度保守^[21,25],这就为进一步深入研究 cce4228 蛋白的结构功能关系提供了极大便利。此外,与鱼腥藻 PCC7120 中的 SSADH 相同,在 cce4228 蛋白中与 NADP^+ 辅因子的磷酸根基团临近的氨基酸残基为 Ser157,这一残基是否决定了 cce4228 蛋白的辅因子偏好性值得进一步研究。

4 结论

本研究通过分子生物学手段成功得到 pET-28a-cce4228 重组质粒并将其转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中进行原核表达,通过 IPTG 诱导表达和 Ni-NTA 亲和层析纯化获得纯度大于 90% 的重组 cce4228 蛋白。运用生物信息学手段对 cce4228 蛋白的理化性质进行分析, cce4228 蛋白与其他不同来源的 SSADH 蛋白的系统进化分析结果表明 cce4228 蛋白与聚球藻 PCC7002 和鱼腥藻 PCC7120 的 SSADH 为同一分支且亲缘关系较近。酶动力学结果证实蓝杆藻 ATCC51142 的 cce4228 蛋白是依赖于 NADP^+ 辅因子的 GabD 类的 SSADH。本研究结果为阐明 cce4228 蛋白作为 SSADH 的催化反应机制奠定了重要基础。

REFERENCES

- [1] Falcón LI, Magallón S, Castillo A. Dating the cyanobacterial ancestor of the chloroplast[J]. The ISME Journal, 2010, 4(6): 777-783
- [2] Stanier RY, Cohen-Bazire G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 1977, 31: 225-274
- [3] Alagesan S, Gaudana SB, Sinha A, et al. Metabolic flux analysis of *Cyanothece* sp. ATCC 51142 under mixotrophic conditions[J]. Photosynthesis Research, 2013, 118(1/2): 191-198
- [4] Zhang SY, Bryant DA. The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria[J]. Science, 2011, 334(6062): 1551-1553
- [5] Steinhauser D, Fernie AR, Araújo WL. Unusual cyanobacterial TCA cycles: not broken just different[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(9): 503-509
- [6] Welsh EA, Liberton M, Stöckel J, et al. The genome of *Cyanothece* 51142, a unicellular diazotrophic cyanobacterium important in the marine nitrogen cycle[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(39): 15094-15099
- [7] Xie CC, Xu WW, Li ZM, et al. Cloning and expression of

- α -ketoglutarate decarboxylase from *Cyanothece* sp. ATCC 51142[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(19): 37-39 (in Chinese)
- 谢琮琮, 许文武, 李至敏, 等. 蓝杆藻 ATCC 51142 中 α -酮戊二酸脱羧酶的克隆与表达[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(19): 37-39
- [8] Wang XQ, Lai CD, Lei GF, et al. Kinetic characterization and structural modeling of an NADP⁺-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from *Anabaena* sp. PCC7120[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 108: 615-624
- [9] Zhang SY, Qian X, Chang S, et al. Natural and synthetic variants of the tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria: introduction of the GABA shunt into *Synechococcus* sp. PCC 7002[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1972
- [10] Schneider BL, Reitzer L. Pathway and enzyme redundancy in putrescine catabolism in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(15): 4080-4088
- [11] Fait A, Fromm H, Walter D, et al. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(1): 14-19
- [12] Kim KJ, Pearl PL, Jensen K, et al. Succinic semialdehyde dehydrogenase: biochemical-molecular-clinical disease mechanisms, redox regulation, and functional significance[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2011, 15(3): 691-718
- [13] Ludewig F, Hüser A, Fromm H, et al. Mutants of GABA transaminase (POP2) suppress the severe phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase (*ssadh*) mutants in arabidopsis[J]. PLoS One, 2008, 3(10): e3383
- [14] Toyokura K, Watanabe K, Oiwa A, et al. Succinic semialdehyde dehydrogenase is involved in the robust patterning of Arabidopsis leaves along the adaxial-abaxial axis[J]. Plant and Cell Physiology, 2011, 52(8): 1340-1353
- [15] Wang LH, Yang ZW, Zhu L, et al. Cloning and prokaryotic expression of sweet sorghum succinic semialdehyde dehydrogenase *SbSSADH*[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(7): 83-90 (in Chinese)
- 王龙海, 杨泽伟, 朱莉, 等. 甜高粱琥珀酸半醛脱氢酶 *SbSSADH* 基因克隆及原核表达[J]. 生物技术通报, 2015, 31(7): 83-90
- [16] Kim YG, Lee S, Kwon OS, et al. Redox-switch modulation of human SSADH by dynamic catalytic loop[J]. The EMBO Journal, 2009, 28(7): 959-968
- [17] Parviz M, Vogel K, Gibson KM, et al. Disorders of GABA metabolism: SSADH and GABA-transaminase deficiencies[J]. Journal of Pediatric Epilepsy, 2014, 3(4): 217-227
- [18] Lin CY, Weng WC, Lee WT. A novel mutation of *ALDH5A1* gene associated with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency[J]. Journal of Child Neurology, 2014, 30(4): 486-489
- [19] Niemi AK, Brown C, Moore T, et al. Evidence of redox imbalance in a patient with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency[J]. Molecular Genetics and Metabolism Reports, 2014, 1: 129-132
- [20] Park SA, Park YS, Lee KS. Kinetic characterization and molecular modeling of NAD(P)⁺-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis* as an ortholog YneI[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(7): 954-958
- [21] Park J, Rhee S. Structural basis for a cofactor-dependent oxidation protection and catalysis of cyanobacterial succinic semialdehyde dehydrogenase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(22): 15760-15770
- [22] Zheng HY, Beliaevsky A, Tchigvintsev A, et al. Structure and activity of the NAD(P)⁺-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase YneI from *Salmonella typhimurium*[J]. Proteins, 2013, 81(6): 1031-1041
- [23] Jang EH, Park SA, Chi YM, et al. Kinetic and structural characterization for cofactor preference of succinic semialdehyde dehydrogenase from *Streptococcus pyogenes*[J]. Molecules and Cells, 2014, 37(10): 719-726
- [24] Wang XQ, Li ZM, Lei GF, et al. Preliminary characterization and structural analysis of succinic semialdehyde dehydrogenase from *Anabaena* sp. PCC7120[J]. Life Science Research, 2017, 21(4): 318-324 (in Chinese)
- 王小琴, 李至敏, 雷国风, 等. 鱼腥藻 PCC7120 中琥珀酸半醛脱氢酶的初步表征及结构分析[J]. 生命科学研究, 2017, 21(4): 318-324
- [25] Yuan ZN, Yin B, Wei DZ, et al. Structural basis for cofactor and substrate selection by cyanobacterium succinic semialdehyde dehydrogenase[J]. Journal of Structural Biology, 2013, 182(2): 125-135
- [26] Xiong W, Brune D, Vermaas WFJ. The γ -aminobutyric acid shunt contributes to closing the tricarboxylic acid cycle in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Molecular Microbiology, 2014, 93(4): 786-796
- [27] Perozich J, Nicholas H, Wang BC, et al. Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family[J]. Protein Science, 1999, 8(1): 137-146
- [28] Kirch HH, Bartels D, Wei YL, et al. The ALDH gene superfamily of *Arabidopsis*[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(8): 371-377
- [29] Jang EH, Park SA, Chi YM, et al. Structural insight into the substrate inhibition mechanism of NADP⁺-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from *Streptococcus pyogenes*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 461(3): 487-493