

文章编号: 1006-9798(2016)02-0107-09; DOI: 10.13306/j.1006-9798.2016.02.019

短密青霉 NRRL 864 异戊烯基转移酶 PbPT 的克隆表达及功能分析

孙靖然^{1,2}, 刘长宁³, 李荣贵¹, 张伟², 李盛英²

(1. 青岛大学生命科学学院, 山东 青岛 266071;

2. 山东省合成生物学重点实验室, 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101;

3. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 勐伦 666303)

摘要: 在对丝状真菌短密青霉(*penicillium brevicompactum* NRRL 864)的全基因组进行分析时,发现该真菌可能表达一种异戊烯基转移酶 PbPT。通过反转录 RT-PCR(Reverse Transcription, RT-PCR)获得真菌 cDNA,并以 cDNA 为模版,将编码 PbPT 的开放阅读框克隆到 pET-28b 构建表达载体 pET28b-PbPT,将 pET28b-PbPT 转化 *Escherichia coli* BL21(DE3)获得表达菌株。异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)诱导高效表达 PbPT,利用 Ni-NTA 树脂亲和纯化重组 PbPT 活性蛋白,并对该蛋白进行了底物特异性分析、产物结构鉴定以及酶促动力学分析。分析结果表明,以二甲基丙烯基二磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)为供体, PbPT 特异性催化异戊烯基转移至 Brevianamide F 的 α 位 C 上,生成 Deoxybrevianamide E。Brevianamide F 是合成真菌生物碱类杀虫抗生素 brevianamides 的重要中间体,真菌吲哚类异戊烯基转移酶家族新成员 PbPT 的发现。该研究为进一步寻找和阐明真菌生物碱类杀虫抗生素 brevianamides 的生物合成基因簇和合成途径奠定了基础。

关键词: 短密青霉; 异戊烯基转移酶; 丝状真菌; DMAPP; 功能分析

中图分类号: Q814.1

文献标识码: A

微生物次级代谢产物是药物先导化合物的重要来源。高等丝状真菌次级代谢产物具有极为丰富的结构骨架类型,如聚酮类,非核糖体肽类,萜类以及生物碱类化合物等;且多具有良好的生物活性,例如广谱抗生素青霉素、免疫抑制剂环孢菌素和降血脂药物洛伐他汀等^[1-2]。许多真菌次级代谢产物的基本骨架结构由聚酮合酶或者非核糖体肽合酶负责合成,结构骨架的后修饰过程对化合物的成药性具有重要意义。异戊烯基转移酶是一种重要的真菌次级代谢产物后修饰酶,负责催化将二甲基丙烯基二磷酸携带的异戊烯基单位转移到受体结构的反应,其受体包括氨基酸、生物碱、芳香族化合物等小分子活性物质^[3-7],产生吲哚碱、类黄酮、香豆素、氧杂蒽酮、醌和樟脑等数量庞大的次级代谢产物^[8-9]。真菌吲哚类异戊烯基转移酶家族的研究非常广泛,已经克隆鉴定的家族成员有 30 多个,其中, FgaPT2 (EAL94103, 基因序列号)、FtmPT1 (AAX56314)、CdpNPT (ABR14712)和 AnaPT (EAW16181)^[10-16] 4 个蛋白的晶体结构已获得解析。目前,已知的 DMATS 家族蛋白均已获得功能性表达,且大多数成员的底物谱较为宽泛,可以识别吲哚类结构衍生物,同时还可以识别酪氨酸、氧杂蒽酮、三元环芳香化合物、四元环芳香化合物及一些非芳香类化合物,该家族蛋白均以二甲基丙烯基二磷酸(DMAPP)作为异戊烯基的天然供体进行相应的催化反应。基于此,本

收稿日期: 2015-12-02; 修回日期: 2016-02-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21472204)

作者简介: 孙靖然(1990-),男,硕士研究生,主要研究方向为微生物学。

通讯作者: 张伟,男,博士,副研究员,硕士生导师。Email: zhang_wei@qibebt.ac.cn

实验对一株短密青霉进行全基因组测序,并从底物特异性、最适温度与 pH、金属离子依赖性、产物结构和酶促动力学等方面对 PbPT 的酶学特性进行分析,同时结合序列分析及功能预测,从其基因组中获得一个属于异戊烯基转移酶家族的成员,命名为 P. 短密基转移酶(P. *brevicomactum* prenyl transferase, PbPT)。通过生物信息学分析和序列比对,发现该酶属于 DMATS 家族。

1 材料与方 法

1.1 菌株及培养条件

短密青霉 NRRL 864 原始菌株来自美国农业部培养物集存库 (american type culture collection, ATCC),由本实验室保藏。该菌株在温度为 28 °C 的 PDA 液体培养基中避光静置培养 7~10 d。

1.2 基因组提取及全基因组测序

短密青霉 NRRL 864 培养后的菌液使用 8 层纱布过滤去除培养基,菌体用纱布挤干后,使用真菌基因组 DNA 提取试剂盒来提取其基因组。基因组测序工作由诺禾致源公司完成。

1.3 PbPT 编码基因的挖掘

对基因组序列进行 De novo 组装和生物信息学分析,以异戊烯基转移酶保守序列为探针,通过 NCBI 序列比对,成功挖掘到编码 PbPT 的 DNA 序列信息。

1.4 基因克隆

短密青霉 NRRL 864 菌体用纱布挤干后迅速冻存于 -80 °C 超低温冰箱或直接进行 RNA 提取。菌体在液氮作用下充分研磨,每 100 mg 菌体加入 1 mL Trizol(Invitrogen,Life Science)试剂。按照 Trizol(Invitrogen)法获得 mRNA,2% 琼脂糖凝胶检验 RNA 质量。使用反转录试剂盒(Takara)进行反转录 PCR(RT-PCR)获得相应的 cDNA。根据 PbPT 全长基因设计特异性引物 PbPT-F 和 PbPT-R,用于克隆 PbPT 基因的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)引物如表 1 所示。

以 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增 PbPT 的全长编码基因。PCR 产物经琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒进行纯化,NdeI 和 HindIII 双酶切后,克隆到表达载体 pET28b,构建 pET28b-PbPT,通过菌落 PCR 检验及质粒 DNA 测序,确定克隆结果的正确性。

1.5 PbPT 的表达及纯化

将质粒 pET28b-PbPT 转化至 E. coli BL21(DE3),获得 PbPT 的表达宿主。挑取单菌落至 10 mL 含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基,37 °C,220 rad/min 培养至对数生长期,接种至 1 L 含有 1% 甘油的 LB 培养基中;37 °C,220 rad/min 培养至 OD₆₀₀ 介于 0.6~1.0 之间,加入 IPTG 至终摩尔浓度为 150 μmol/L 进行蛋白表达诱导,18 °C,200 rad/min 表达 16 h;6 000 rad/min,4 °C 离心 10 min 收集菌体。菌体储藏于 -80 °C 超低温冰箱或直接用于蛋白纯化。菌体用 50 mL Lysis buffer(1×PBS,10%甘油,10 mmol/L 咪唑,pH 8.0)重悬,超声破碎菌体。细胞裂解液经 12 000 rad/min 离心 30 min,弃沉淀,上清中加入 1 mL Ni-NTA 亲和吸附树脂(QIAGEN),4 °C 孵育 1 h。装柱后,先用 100 mL Wash buffer(1×PBS,10%甘油,20 mmol/L 咪唑,pH 8.0)冲洗,再用 10 mL Elution buffer(1×PBS,10%甘油,250 mmol/L 咪唑,pH 8.0)洗脱目标蛋白。G250(碧云天)检测并合并目标蛋白,使用 Amicon-Ultra-15 超滤管(MWCO 30 kD)(Millipore)进行浓缩,PD-10(GE Healthcare)脱盐,液氮速冻后于 -80 °C 超低温冰箱保存,或直接用于 SDS-PAGE 电泳检验及其他后续实验。

1.6 PbPT 的最适底物检测

在 100 μL 的反应体系中加入 5 mmol/L MgCl₂,1 mmol/L 底物(Brevianamide F(广州晶莱)、_L-Trp、_D-Trp、1-Methyl-_L-Trp、5-OH-_L-Trp、_L-Abrine、_L-Ala-_L-Trp、_L-Phe、_L-Tyr、_L-His (Aladdin)中的一种),0.5 mmol/L DMAPP(Sigma-Aldrich),10 μmol/L PbPT,50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),30 °C 反应 20 min。加

表 1 用于克隆 PbPT 基因的 PCR 引物

名称	序列(5'-3')	功能
PbPT-F	GGAATTC <u>CATATG</u> ACCAAGTCAAACGAA	基因克隆
PbPT-R	TATG <u>AAGCTT</u> TTCAGTTCTCCACGGATA	基因克隆

注:PbPT-F 斜体下划线碱基为 NdeI 酶切位点;PbPT-R 斜体下划线碱基为 HindIII 酶切位点。

入 100 μL 甲醇终止反应。20 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清液用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 进行检测, 根据 HPLC 谱图中是否有新峰的产生, 判断 PbPT 对不同底物的反应性。HPLC 检测条件如下:

- 1) 流动相为乙腈-水(含 1% 三氟乙酸), 洗脱程序为时间为 0 ~ 4 min, 乙腈 30% 等度洗。
- 2) 时间为 4~24 min, 乙腈从 30%~60% 梯度洗脱。
- 3) 时间为 24~25 min, 乙腈从 60%~100% 梯度洗脱。
- 4) 时间为 25~29 min, 100% 乙腈等度洗脱。
- 5) 时间为 29~30 min, 乙腈从 100%~30%。

分析用色谱柱为 Thermo ODS HYPERSIL (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 检测波长为 280 nm, 流速为 1 mL/min。化合物 HPLC 制备条件与检测条件相同。

1.7 PbPT 最适反应条件分析

利用最适底物 Brevianamide F, 在 4, 15, 25, 30, 37, 42, 50 $^{\circ}\text{C}$ 温度下, 反应 20 min, 利用高压液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测分析产物的转化率, 获得 PbPT 的最适反应温度; 在最适反应温度条件下, 将反应体系中的 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.5) 替换 pH 分别为 4.0, 5.0, 6.0, 7.5, 8.0, 9.0, 10.0 的磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L), 反应 20 min 后, 按前述相同方法处理样品, 利用 HPLC 检测分析产物的转化率, 获得该酶的最适反应 pH。

1.8 PbPT 的酶促反应动力学分析

在最适温度和 pH 条件下, 在反应体系中加入不同摩尔浓度 (10~500 $\mu\text{mol/L}$) 的 Brevianamide F, 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应, 于不同时间点加入 100 μL 甲醇终止反应。20 000 g 离心 10 min, 取 50 μL 进行 HPLC 检测。同时, 采用米氏方程 (Michaelis-Menten equation) 进行非线性拟合, 计算 K_m 和 k_{cat} 值。

1.9 金属离子对重组 PbPT 活性的影响

将上述反应体系中的 Mg^{2+} 替换为 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 等不同的二价金属阳离子, 并不加入二价金属离子的反应体系作为对照, 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min, 加入 100 μL 甲醇终止反应。20 000 g 离心 10 min, HPLC 检测反应产物。

2 结果与分析

2.1 PbPT 序列分析

编码 PbPT 的 cDNA 全长 1 314 bp, 翻译后形成 437 个氨基酸组成的多肽, 通过基因组 DNA 与 cDNA 测序结果比对, 发现该基因含有一个内含子 (第 1 188 个碱基到第 1 262 个碱基), PbPT 基因序列 (加粗和下划线部分为内含子) 及其编码的氨基酸序列如图 1 所示。

PbPT 进化树及保守位点分析如图 2 所示。对 PbPT 的蛋白序列进行 Blast 分析, 并与已报道的异戊烯基转移酶进行比对, 可知 PbPT 与来自 *Aspergillus* sp. 的 NotF (ADM34132), 来自 *Aspergillus versicolor* 的 BrePT (AFM09725) 以及来自 *Aspergillus terreus* 的 CdpC7PT (EAU36020) 具有高度同源性, 其相似度分别达到 56.6%, 58.0%, 32.9% (见图 2a); 通过对保守位点进行分析, 并与已报道的近源蛋白进行比较, 推测 PbPT 的第 198 位和 267 位的赖氨酸残基可能是 DMAPP 的结合位点, 第 109 位的精氨酸残基可能是底物结合位点 (见图 2b)。图 2b 中, 三角号标注的氨基酸为 DMATS 家族的保守活性位点。

2.2 重组表达质粒构建及目的蛋白获取

以 cDNA 为模板, PCR 扩增 PbPT 基因序列, 酶切后克隆至 pET28b 载体, 构建 pET28b-PbPT 重组表达质粒。将 pET28b-PbPT 转化至 BL21 (DE3) 构建 PbPT 表达菌株。经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) 诱导表达, 超声破碎、离心分离后, 上清液中重组蛋白通过 Ni-NTA 树脂富集纯化, 获得带有 N 端组氨酸标签的重组 PbPT 蛋白, 重组 PbPT 蛋白 SDS-PAGE 电泳鉴定及催化反应产物的 HPLC 分析如图 3 所示。由图 3a 可知, 获得的重组蛋白相对分子质量为 52 kDa, 其大小与含有 His-tag 重组蛋白的理论一致; 图 3b 中, 上图为反应对照, 下图为反应。

1 10 20 30 40 50 60 70
 1 ATGACCAAGTCAAACGAAGTCTTAGCCAAAGTTGCTCAGCATGAACTATCGGACCGGACGCCACCGCAAGTCAATC
 M T K S N E V L A K V A H D E L S D R T P T E V I

76 85 95 105 115 125 135 145
 26 GCCAGCACTTGGGTCTTTCCAAGTGAAGACAGGCCAGTGGTGGCAAGATACCGGACCACTGCTTGAGCGGTTTC
 A S T W V F P T E D Q A Q W W Q D T G P L L E R F

151 160 170 180 190 200 210 220
 51 CTTCAGCGGCTTCTTATAATGCTCCACACAATACCAGTGCCTACTCTTTTTCATTGAGCATCTCAATCCGGCA
 L Q A A S Y N A P T Q Y Q C L L F F I Q H L I P A

226 235 245 255 265 275 285 295
 76 CTTGGACCGTATCCCCAGCGATGGAGGAGTACAATCTCACGCAGTGGTCTGCCCAATTGAATTCAGTCTCAACTTT
 L G R Y P Q R W R S T I S R S G L P I E F S L N F

301 310 320 330 340 350 360 370
 101 CAGAAGAACTCAAAGCAGCTCGTGCATCGGGTTCGAGCCAGTCCGATCCTGTCCGGCACCGCGAGCGATCCG
 Q K N S K Q L V R I G F E P V G I L S G T A S D P

376 385 395 405 415 425 435 445
 126 TTCAATAGCATCCCAATCGCAGACATGATAACCAGACTGCGTCAACTGCCGTTGTTGAAGGGGTTTGATCCCGCTG
 F N S I P I A D M I T R L R Q L P L L K G F D P L

451 460 470 480 490 500 510 520
 151 GATTCAATGCTCTAAACACCAAGTTCAGCTTCCCAAGCCGAAACGATGCATTACAGGCTCCGGGCTACGAA
 D F N A L N T S C Q L S Q A E T D A L Q A P G Y E

526 535 545 555 565 575 585 595
 176 TCCATCCGCTCAAGTCGCAGGCCGCTTTGGCTTCGACCTTCTCAGGGACGGCAACATTGTTGTCAAGGGTTAT
 S I P L K S Q A A F G F D L L R D G N I V V K G Y

601 610 620 630 640 650 660 670
 201 AITTTCCCGCATCTCAAGGCCAGGGCCACGGGCGTGAAGATGGGAACCTGATTTCCGAGACTGTCCATCGCTTC
 I F P H L K A R A T G V K M G T L I S E T V H R F

676 685 695 705 715 725 735 745
 226 GATACCGAAGCCAGTTCCTAAAGTCTTCCTCCTTGTCCATGACTACATGAAGGAGAGCAGCGGATACAACGAA
 D T F A Q F L K S F L L V H D Y M K E S S G Y N E

751 760 770 780 790 800 810 820
 251 TACACTTCTTGTGATGTGATTGCCTCGACCGTTCGAAGCAGCGGCTCAAACCTTACGGCGCACACACGGAGGTA
 Y T F L S C D C L D R S K Q R L K L Y G A H T E V

826 835 845 855 865 875 885 895
 276 GTCGGGCAAAATCGCCGAGATGTGGACGCTGGGCGGCGACTCAGCGATGAGCCGGAGATCCAACCGGGCTC
 V W A K I A E M W T L G G R L S D E P E I Q R G L

901 910 920 930 940 950 960 970
 301 GAGATCCTCCAGCAATTCTGGAATATGTTGAAGTGCACAGAGGGGAACCGGCCCTTCGCGGGCGGCTTCGATGAT
 E I L Q Q F W N M L K L H E G N R P F A G G F D D

976 985 995 1005 1015 1025 1035 1045
 326 GGCAGTCGGCTCGAGGGCGACGACCAGATCGCTCGCCATCATCTGGAACACTAGAGCTCCATCCCGGCCAATCC
 G S R L E G D D Q I A S P I I W N Y E L H P G H S

1051 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 351 TGGCCGTGCCAAGTTTATTTCCCGTGCACGCAGAAAACGACCAGCTGGTGGCCAGCGCTTTGGCGGGGTTTC
 W P V P K F Y F P V H A E N D Q L V A S A L A G F

1126 1135 1145 1155 1165 1175 1185 1195
 376 TTCGGCTATCTGGGGTGGGAGGTGGAAGCGCGTCTTACGCAGACACATTCCGTGCTTTATAGTAAAGTTGAAGCC
 F G Y L G W E V E A R S Y A D T F R A L Y

1201 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270
 397 CCATCACAATAGACCCCGTCTTACTGGCTATGTATGGCTGACTTGACGTAACAAATCCAGTTCTGAACATGAT
 S E H D

1276 1285 1295 1305 1315 1325 1335 1345
 401 GTCGCGAAACATCGCTCTCCAGTCTTGAATCTCCTTTTCCACACGCAGAAGAAGGGCCCTACCTTAGTGTG
 V A E T S R L Q S W I S F S Y T Q K K G P Y L S V

1351 1360 1370 1380
 426 TACTATCACTCCAGCGGTCTATCCGTGGGAGAACTGA
 Y Y H S Q R S Y P W E N *

图 1 PbPT 基因序列(加粗和下划线部分为内含子)及其编码的氨基酸序列

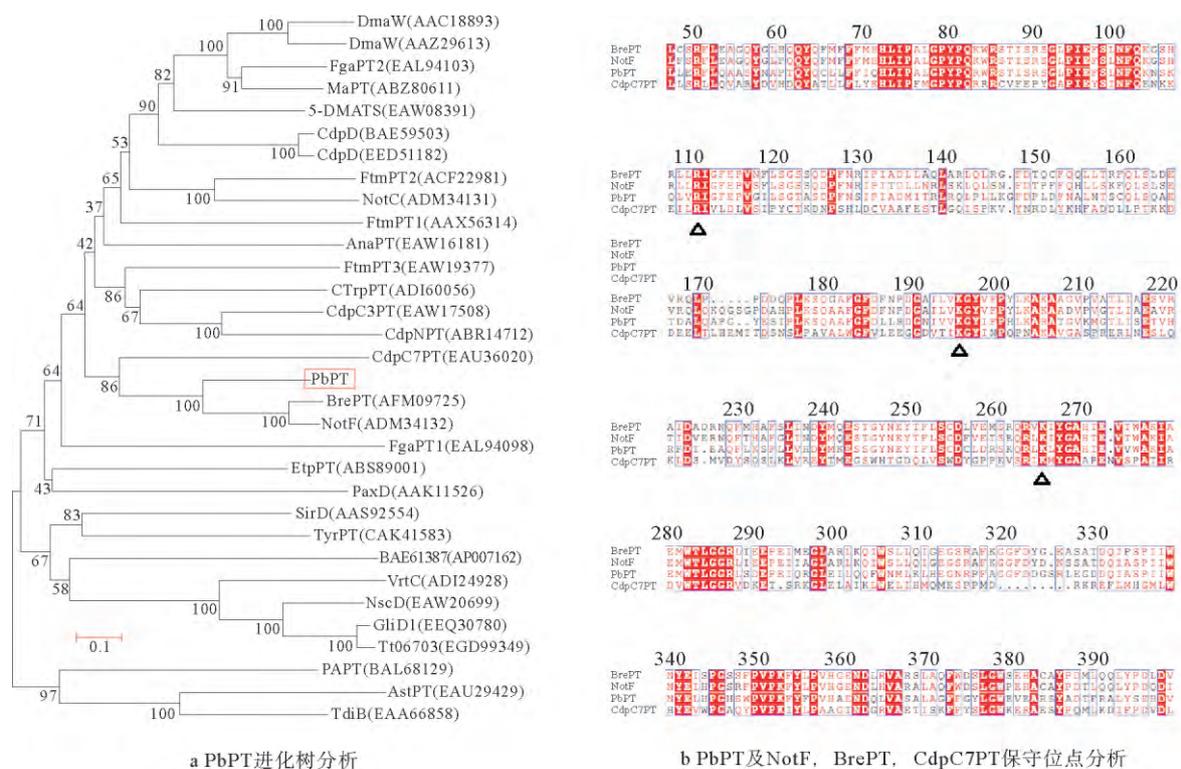


图 2 PbPT 进化树及保守位点分析

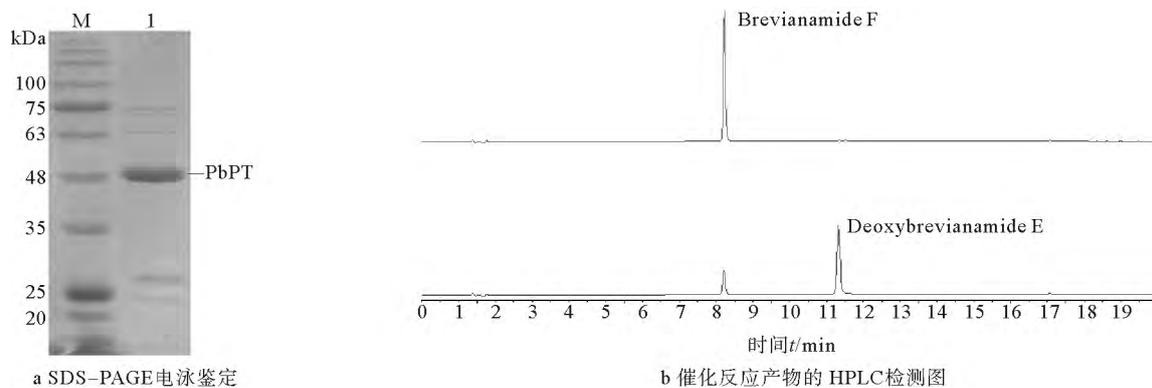


图 3 重组 PbPT 蛋白 SDS-PAGE 电泳鉴定及催化反应产物的 HPLC 分析

2.3 PbPT 的底物选择性研究

以不同底物 (Brevianamide F, L -Trp, D -Trp, 1-Methyl- L -Trp, 5-OH- L -Trp, L -Abrine, L -Ala- L -Trp, L -Phe, L -Tyr 或 L -His) 在标准反应体系相同条件下, 测试 PbPT 的催化活性, HPLC 分析结果显示, 除 Brevianamide F 外, 其他氨基酸及环二肽底物均未检测到产物 (数据未显示)。为进一步确认该酶的底物选择性, 设置相同的反应体系, 将反应时间从 20 min 延长至 16 h, HPLC 检测发现, 除 Brevianamide F 外, 其他底物仍未能发现新产物峰。LC-MS 分析结果进一步证实, 单一的氨基酸不能被 PbPT 识别和转化, 与 Brevianamide F 结构类似的 L -Ala- L -Trp 仅能被微量地转化为相应产物, 但转化率极低, 无法纯化获得足够产物 (数据未显示)。

文献[10,12,16,20]报道异戊烯基转移酶往往具有宽泛底物选择性, 能够识别多种含有苯环结构的环二肽或者氨基酸。本研究选取了 2 种环二肽和 8 种氨基酸作为 PbPT 的潜在底物, 对该酶的底物特异性进行了研究, 发现测试的 10 种底物中, PbPT 仅能高效、特异性地识别 Brevianamide F, 说明该酶具有较严格的底

物选择性,为该酶的后续研究提供了参考。将反应时间延长至 16 h,异戊烯基转移酶 PbPT 对不同底物的选择催化活性如表 2 所示。

表 2 异戊烯基转移酶 PbPT 对不同底物的选择催化活性

底物	底物消耗 /%	产物分子量 M_r	LCMS 结果 $[M+H]^+$	底物	底物消耗 /%	产物分子量 M_r	LCMS 结果 $[M+H]^+$
Brevianamide F	70±12	353.2	354.1	L-Abrine	ND	ND	ND
L-Trp	ND	ND	ND	L-Ala-L-Trp	微量	343.2	344.3
D-Trp	ND	ND	ND	L-Phe	ND	ND	ND
1-Methyl-L-Trp	ND	ND	ND	L-Tyr	ND	ND	ND
5-OH-L-Trp	ND	ND	ND	L-His	ND	ND	ND

注:ND表示未检测到反应产物;异戊二烯基供体 DMAPP 不足,底物未完全转化。

在 15 mL 反应体系中,加入 5 mmol/L $MgCl_2$,0.5 mmol/L Brevianamide F,0.5 mmol/L DMAPP,10 mmol/L PbPT,50 mmol/L Tris-HCl,30 °C 反应 16 h。加入等体积乙酸乙酯涡旋震荡,20 000 g 离心后吸取上层乙酸乙酯相,重复萃取 3 次后,合并乙酸乙酯相,氮气吹干,加入 1 mL 甲醇溶解,HPLC 制备纯化后获得 1.8 mg 产物。

将反应产物的 1H NMR 数据与底物 Brevianamide F 进行比对,发现产物氢谱中明显多出一组叔碳取代的二甲基丙烯基信号:1.56 ppm (6H, d, $J = 10.1$ Hz); 5.11 ppm (2H, ddd, $J = 14.0, 11.6, 1.0$ Hz); 6.22 ppm (1H, dd, $J = 17.4, 10.6$ Hz),与此同时,底物 Brevianamide F 中 α -碳的氢信号(7.09 $\mu g/mL$, 1H, s)消失,而其他叔碳氢信号并未发生明显改变,通过进一步与文献数据对比^[1,20],确定了产物结构为 Deoxybrevianamide E,由此证实由 PbPT 催化发生了 α 取代的异戊二烯基转移反应,生成了产物 Deoxybrevianamide E,PbPT 催化的化学反应和 Deoxybrevianamide E 的 1H NMR 图谱如图 4 所示。

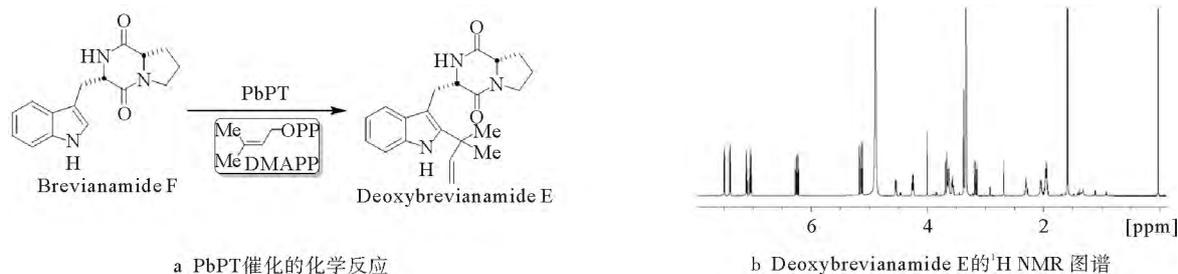


图 4 PbPT 催化的的化学反应和 Deoxybrevianamide E 的 1H NMR 图谱

2.4 PbPT 最适反应温度和 pH

以 Brevianamide F 为底物,分别在 4,15,25,30,37,42,50 °C 及 pH 为 4.0,5.0,6.0,7.0,7.5,8.0,9.0,10.0 的磷酸盐缓冲液中反应 20 min,加入 100 μL 甲醇终止反应,20 000 g 离心 10 min,50 μL 进样 HPLC 检测。PbPT 对底物 Brevianamide F 的最适温度和最佳 pH 如图 5 所示。图 5 中,以 Brevianamide F 为底物时的最佳反应温度为 30 °C,最佳 pH 值为 7.5。

2.5 PbPT 金属离子依赖性分析及米氏常数测定

在最适反应条件下,以 Brevianamide F 为底物,加入 5 mmol/L Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 等不同的二价金属阳离子进行反应,在相同反应时间内, Mg^{2+} 的存在使该酶的催化效率提高约 15%;其他金属离子均不同程度抑制 PbPT 的活性,不同金属离子对 PbPT 活性的影响如图 6 所示。

以 Brevianamide F 为底物,采用 HPLC 检测底物消耗,应用 Origin 9 软件作图,通过米氏方程进行非线性拟合,计算得到 PbPT 的表现 K_m 值为 33.1 $\mu mol/L$, k_{cat} 为 1.5 min^{-1} ,在最适反应条件下,PbPT 酶促动力学曲线如图 7 所示。

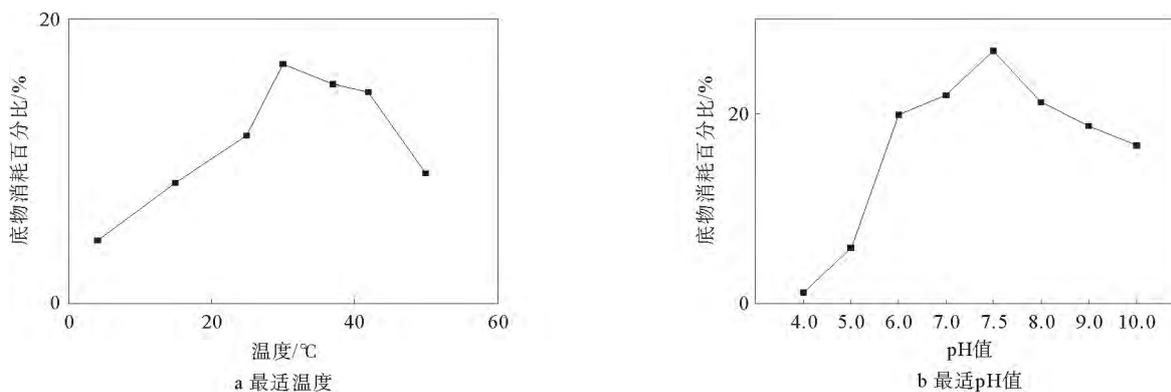


图 5 PbPT 对底物 Brevianamide F 的最适温度和 pH 值

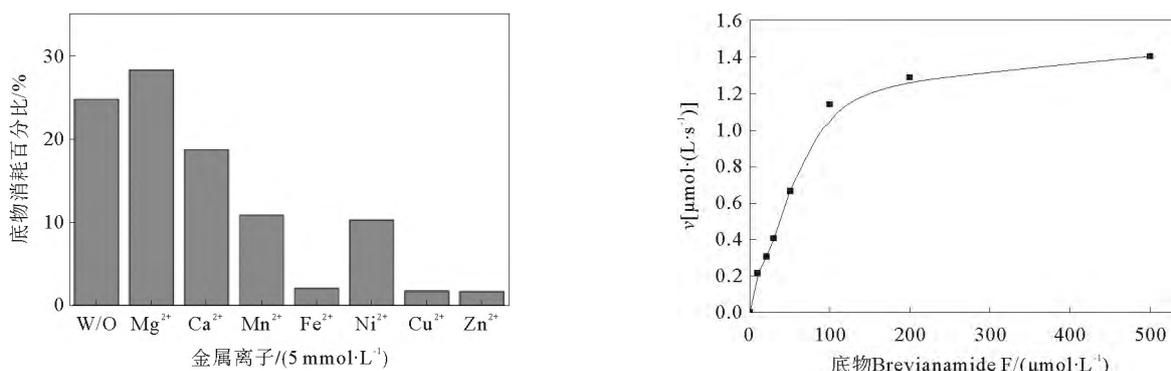


图 6 不同金属离子对 PbPT 活性的影响

图 7 PbPT 酶促动力学曲线

3 讨论

1) 短密青霉(*Penicillium brevicompactum* NRRL 864)能够产生多种具有不同生物活性的次级代谢产物^[1-2],其代表性产物霉酚酸已经成功的开发为免疫抑制剂^[17-18]。本研究通过基因组测序,基因挖掘分析从该菌株成功获得一种异戊烯基转移酶 PbPT。该蛋白由 437 个氨基酸残基构成,并且与已报道的来自 *Aspergillus* sp. 的 NotF(ADM34132),来自 *Aspergillus versicolor* 的 BrePT(AFM09725)以及来自 *Aspergillus terreus* 的 CdpC7PT(EAU36020)具有高度同源性(见图 2a)。通过与已报道的近缘异戊烯基转移酶比较,预测 PbPT 的第 198 位和 267 位的赖氨酸残基可能是 DMAPP 的结合位点,第 109 位的精氨酸残基可能是底物结合位点(见图 2b)^[20]。通过 RT-PCR、cDNA 克隆及表达纯化得到了带有 N 端组氨酸标签的 PbPT 重组蛋白。通过序列分析及文献调研推测 PbPT 极有可能催化色氨酸 α 位 C 的异戊烯基转移反应^[6,16,19,20]。本研究以 10 种可能的底物,对 PbPT 进行了体外生化活性分析(见表 2)。HPLC 检测结果显示 PbPT 具有较高的底物特异性,在被检测的 10 种底物中,PbPT 仅能高效识别 Brevianamide F,催化生成产物 Deoxybrevianamide E,其异戊烯基单位被转移到 Brevianamide F 的 C-α 位(见图 4)。该酶对底物的严格选择性与已报道的其他同类异戊烯基转移酶能够催化多种底物反应有所不同^[16,20],为后续研究和利用该酶的活性提供了重要信息。

2) 对该酶的最适反应温度和 pH 进行了详细的研究,结果显示 PbPT 的最适反应温度为 30 °C,最适反应 pH 为 7.5,与文献中报道的 NotF(ADM34132),BrePT(AFM09725)及 CdpC7PT(EAU36020)的最适温度和 pH 基本相同^[16]。文献报道异戊烯基转移酶的活性可能需要二价阳离子的参与^[18],实验结果显示,在添加不同二价阳离子的条件下,该酶的催化活性受到不同程度的影响,Mg²⁺ 能够提高 PbPT 的催化效率约 15%,而其他 6 种金属离子对 PbPT 的催化活性则具有不同程度的抑制作用。结合该酶的氨基酸序列中不含有(N/D)DxxD 保守区(motifs)等特征,PbPT 属于吡啶类异戊烯基转移酶家族(DMATs)。

3) PbPT 能够高效催化异戊二烯基转移至 Brevianamide F 的 α 位 C 上,与已报道的具有类似活性的

DMATS 家族成员相比, PbPT 是第一个来源于青霉属的催化 α 位 C 异戊烯基化反应的 DMATS 转移酶。PbPT 能够高效地识别底物 Brevianamide F, 并将其转化为产物 Deoxybrevianamide E ($K_m = 33.1 \mu\text{mol/L}$ 和 $k_{\text{cat}} = 1.5 \text{ min}^{-1}$), 提示该酶可能直接参与 Brevianamide F 及其衍生物的生物合成途径后修饰过程, 目前相关工作正在进行中, 以期阐明该酶在短密青霉 NRRL 864 中所发挥的生物学作用。

4 结束语

本文通过对丝状真菌短密青霉的全基因组序列分析, 发现其基因组中含有一种异戊烯基转移酶 PbPT。通过 RT-PCR 等方法成功克隆该基因的编码序列, 并在大肠杆菌中获得功能性表达, 其编码区全长 1 314 bp, 编码 437 个氨基酸。对进化树及保守位点分析、底物选择性、最适酶反应温度、pH 及金属离子依赖性的研究表明, PbPT 属于真菌吲哚类异戊烯基转移酶家族新成员, 在最适条件下, PbPT 能够以二甲基丙烯基二磷酸为供体, 催化异戊烯基转移至 Brevianamide F α 位 C 的反应, 生成 Deoxybrevianamide E。不同于已报道的异戊烯基转移酶能够识别多种底物, PbPT 具有严格的底物选择性, 提示该酶可能直接参与 Brevianamide F 及其衍生物的生物合成途径后修饰过程, brevianamides 是真菌生物碱类杀虫抗生素, 从化学结构分析, brevianamides 中的双环[2.2.2]-重氮辛烷单元很可能来源于含有杂(氮)原子的分子内 D-A (Diels-Alder) 反应, 但具体由何种酶负责催化一直处于未知状态。Brevianamide F 是合成该类生物碱的重要中间体, 能够特异性识别 brevianamide F 的异戊烯基转移酶的发现, 能够为阐明该类生物碱的生物合成途径, 并进一步寻找和发现能够催化[4+2]分子内 Diels-Alder 反应形成独特的双环[2.2.2]-重氮辛烷结构单元的 D-A 酶奠定理论基础。

参考文献:

- [1] Keller N P, Bennett J J W. Fungal Secondary Metabolism—from Biochemistry to Genomics[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(12): 937-947.
- [2] 梁宗琦. 真菌次生代谢产物多样性及其潜在应用价值[J]. *生物多样性*, 1999, 7(2): 145-150.
- [3] David S. Prevalence of Mrsa in Us Hospitals Hits New High[J]. *BMJ*, 2007, 335(7627): 961.
- [4] Dumelin C E, Chen Yiyun, Leconte A M, et al. Discovery and Biological Characterization of Geranylated RNA in Bacteria[J]. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8(11): 913-919.
- [5] Heide L. Prenyl Transfer to Aromatic Substrates: Genetics and Enzymology[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2009, 13(2): 171-179.
- [6] Li Shuming. Applications of Dimethylallyltryptophan Synthases and Other Indole Prenyltransferases for Structural Modification of Natural Products[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(4): 631-639.
- [7] 刘晓, 陈日道, 谢丹, 等. 微生物来源芳香类化合物异戊烯基转移酶研究进展[J]. *药学学报*, 2013, 48(2): 161-169.
- [8] Liang Pohuang, Ko T P, Wang A H. Structure, Mechanism and Function of Prenyltransferases[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(14): 3339-3354.
- [9] Walsh C T. Revealing Coupling Patterns in Isoprenoid Alkylation Biocatalysis[J]. *ACS Chemical Biology*, 2007, 2(5): 296-298.
- [10] Alexander G, Li Shuming. Overproduction, Purification and Characterization of FtmPT1, a Brevianamide F Prenyltransferase from *Aspergillus Fumigatus*[J]. *Microbiology*, 2005, 151(7): 2199-2207.
- [11] Nierman W C, Arnab P, Anderson M J, et al. Genomic Sequence of the Pathogenic and Allergenic Filamentous Fungus *Aspergillus Fumigatus*[J]. *Nature*, 2005, 438(7071): 1151-1156.
- [12] Yin Wenbin, Ruan Hanli, Westrich L, et al. CdpNPT, an N-prenyltransferase from *Aspergillus Fumigatus*: Overproduction, Purification and Biochemical Characterisation[J]. *Chembiochem*, 2007, 8(10): 1154-1161.
- [13] Tanner M E. Mechanistic Studies on the Indole Prenyltransferases[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 32(1): 88-101.
- [14] Walsh C T. Biological Matching of Chemical Reactivity: Pairing Indole Nucleophilicity with Electrophilic Isoprenoids [J]. *ACS Chemical Biology*, 2014, 9(12): 2718-2728.
- [15] Yu Xia, Liu Yan, Xie Xiulan, et al. Biochemical Characterization of Indole Prenyltransferases: Filling the Last Gap of

- Prenylation Positions by a 5-Dimethylallyltryptophan Synthase from *Aspergillus Clavatus*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(2): 1371-1380.
- [16] Winkelblech J, Fan Aili, Li Shuming. Prenyltransferases as Key Enzymes in Primary and Secondary Metabolism[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(18): 7379-7397.
- [17] Bird B A, Campbell I M. Disposition of Mycophenolic Acid, Brevianamide a, Asperphenamate, and Ergosterol in Solid Cultures of *Penicillium Brevicompactum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43(2): 345-348.
- [18] Bartman C D, Doerfler D L, Bird B A, et al. Mycophenolic Acid Production by *Penicillium Brevicompactum* on Solid Media[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 41(3): 729-736.
- [19] Ding Yousong, Wet J R D, James C, et al. Genome-Based Characterization of Two Prenylation Steps in the Assembly of the Stephacidin and Notoamide Anticancer Agents in a Marine-Derived *Aspergillus Sp.* [J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(36): 12733-12740.
- [20] Ding Yousong, Williams R M, Sherman D H. Molecular Analysis of a 4-Dimethylallyltryptophan Synthase from *Malbranchea Aurantiaca*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(23): 16068-16076.

Functional Characterization of PbPT, a Prenyltransferase from *Penicillium Brevicompactum* NRRL 864

SUN Jingran^{1,2}, LIU Changning³, LI Ronggui¹, ZHANG Wei², LI Shengying²

(1. College of Life Sciences, Qingdao University, Qingdao 266071, China;

2. Shandong Provincial Key Laboratory of Synthetic Biology, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China;

3. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Menglun 666303, China)

Abstract: A novel prenyltransferase PbPT was mined out during the whole genome analysis of the filamentous fungal strain *Penicillium brevicompactum* NRRL 864. The open reading frame of PbPT was amplified by RT-PCR(Reverse Transcription PCR) using cDNA as template and cloned into pET28b to construct the expression vector pET28b-PbPT. The recombinant PbPT was overexpressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and purified to homogeneity by one-step Ni-NTA affinity chromatography. The catalytic features of PbPT including substrate specificity, kinetic parameters, optimal pH and temperature, and preferred metal ions were determined. The results showed that PbPT is able to specifically catalyze the prenylation of brevianamide F at the C- α position when dimethylallyl diphosphate (DMAPP) was used as the prenyl group donor. The product was structurally determined to be deoxybrevianamide E using MS and NMR analysis. Brevianamide F is an important intermediate for the biosynthesis of brevianamides, which belong to a family of fungal alkaloid antibiotics. The identification of PbPT as a new member of dimethylallyl tryptophan synthase, could set the foundation for searching the biosynthetic gene cluster and illuminating the biosynthetic mechanism of this novel family of fungal alkaloid brevianamides.

Key words: *Penicillium brevicompactum*; prenyltransferase; filamentous fungi; DMAPP; functional characterization