

孔亚丽, 叶伟, 李赛妮, 等. 巴戟天内生真菌 *Cytospora rhizophorae* 中 ProL 蛋白的表达纯化及性质分析 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(4): 82-89.
KONG Yali, YE Wei, LI Saini, et al. Expression, purification and characterization of ProL protein in the endophytic fungus *Cytospora rhizophorae* from *Morinda officinalis*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(4): 82-89.

巴戟天内生真菌 *Cytospora rhizophorae* 中 ProL 蛋白的表达纯化及性质分析

孔亚丽^{1,2}, 叶伟², 李赛妮², 朱牧孜², 钟国华¹, 章卫民²

(1 华南农业大学 农学院/ 农业农村部华南作物有害生物综合防治重点实验室/天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广东 广州 510642; 2 广东省科学院 广东省微生物研究所/华南应用微生物国家重点实验室/广东省菌种保藏与应用重点实验室/广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070)

摘要:【目的】从巴戟天内生真菌 *Cytospora rhizophorae* 中克隆 *proL* 基因, 异源表达 ProL 蛋白并研究其理化性质, 为解析 ProL 在合成 Cytorhizins 类新骨架活性化合物途径中的生物学功能奠定基础。【方法】利用 PCR 技术从 *C. rhizophorae* 中克隆 *proL* 基因, 通过同源重组的方法将 *proL* 基因片段插入到 pET28a 原核表达载体, 在大肠埃希菌 *Escherichia coli* 中异源表达, 使用尿素对 ProL 蛋白梯度复性, 采用 SDS-PAGE 技术和质谱测序对 ProL 蛋白进行分析和鉴定, 运用生物信息学方法对 ProL 蛋白的氨基酸序列相似性进行分析, 推测其编码蛋白的结构和功能。【结果】克隆得到 *proL* 基因的编码序列, 开放阅读框全长 909 bp, 编码 303 个氨基酸, ProL 蛋白分子式为 C₁₄₉₅H₂₃₂₀N₄₂₄O₄₄₄S₁₃, 相对分子质量为 33 754.22, 原子数为 4 696, 等电点为 5.69, 为酸性蛋白。ProL 蛋白在大肠埃希菌中以包涵体的形式大量表达, 尿素梯度复性获得了纯度为 98.9% 的 ProL 蛋白。生物信息学分析发现 ProL 氨基酸序列在已知蛋白中与 *Aspergillus ibericus* XP025570169.1 的酰胺水解酶 2 相似性最高, 为 59.40%, 其三维结构模型中包含 8 个 α -螺旋和 8 个 β -折叠, 保守氨基酸序列为 207~216 位。【结论】ProL 蛋白属于酰胺水解酶超家族, 预测其为一种新颖蛋白, 该蛋白可能在生成高度氧化的二苯甲酮类化合物途径中起水解作用。

关键词: 巴戟天; *Cytospora rhizophorae*; *proL* 基因; 克隆; 表达; 生物信息学
中图分类号: Q936 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)04-0082-08

Expression, purification and characterization of ProL protein in the endophytic fungus *Cytospora rhizophorae* from *Morinda officinalis*

KONG Yali^{1,2}, YE Wei², LI Saini², ZHU Muzi², ZHONG Guohua¹, ZHANG Weimin²
(1 College of Agriculture, South China Agricultural University/Key Laboratory of Crop Integrated Pest Management in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/ Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Guangzhou 510642, China; 2 Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences/State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China/ Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application/ Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: 【Objective】To clone the coding sequence of *proL* gene in the endophytic fungus *Cytospora rhizophorae* derived from *Morinda officinalis*, obtain ProL protein by heterologous expression and investigate its

收稿日期:2019-12-17 网络首发时间:2020-06-17 10:58:57
网络首发地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20200617.1041.002.html>
作者简介:孔亚丽 (1994—), 女, 硕士研究生, E-mail: 1395726681@qq.com; 通信作者: 钟国华 (1973—), 男, 教授, 博士, E-mail: guohuazhong@scau.edu.cn; 章卫民 (1965—), 男, 研究员, 博士, E-mail: wmzhang58@qq.com
基金项目:国家自然科学基金 (31600271); 广东省科技计划 (2107A020211023); 广州市珠江科技新星项目 (201806010080)

physicochemical properties, thereby providing a basis for the subsequent research on biological function of the ProL in the biosynthesis pathway of new bioactive compounds cytorhizins. 【Method】 The *proL* gene from *C. rhizophorae* was amplified by PCR, the *proL* gene fragment was inserted into the prokaryotic expression vector of pET28a by the homologous recombination method and heterologously expressed in *Escherichia coli*. The ProL protein was renatured by refolding buffer containing urea with a gradiently decreased concentration, and SDS-PAGE analysis and mass spectrometry sequencing were used to verify the target ProL protein. The bioinformatic methods were employed to analyze the similarity of ProL protein with other related proteins, and predict the structure and function of ProL protein. 【Result】 The coding sequence of *proL* gene was cloned, the open reading frame of *proL* gene is 909 bp in length, which encodes 303 amino acids, the molecular formula of ProL is C₁₄₉₅H₂₃₂₀N₄₂₄O₄₄₄S₁₃, the relative molecular weight is 33 754.22, the total number of atoms is 4 696, PI is 5.69, so ProL is an acidic protein. ProL protein was abundantly expressed as inclusion bodies in *E.coli*, the recombinant ProL was obtained with a purity of 98.9%. Bioinformatics analysis results indicated that ProL protein had the highest amino acid sequence similarity (59.40%) with amidohydrolase 2 from *Aspergillus ibericus* XP025570169.1. The three-dimensional structure model of ProL protein is composed of eight α -helixes and eight β -folds. The conserved amino acid sequence is located at the position from 207 to 216. 【Conclusions】 ProL protein belongs to the amidohydrolase superfamily, and is predicted as a novel protein. ProL protein might play a role of hydrolysis in the biosynthesis pathway of highly oxidized benzophenones.

Key words: *Morinda officinalis*; *Cytospora rhizophorae*; *proL* gene; cloning; expression; bioinformatic

二苯甲酮类化合物广泛应用于工业、农业和医药等领域,如:在工业方面可作为紫外线吸收剂、UV 涂料、染料等的中间体^[1-2];二苯甲酮类杀菌剂氟吗啉、丁吡吗啉、苯菌酮等已广泛应用于农业^[3-4];在医药方面可作为酮基布洛芬、安定、苯海拉明、双环己哌啶等药物的中间体或原料^[5];此外,二苯甲酮类化合物还可应用于香水、食用香精中,能使空气更加清新,食物变得香甜可口。天然的二苯甲酮类化合物一般存在于鸚尾科、藤黄科、樟科、桑科、蔷薇科、瑞香科、桃金娘科等植物中并具有一些特殊结构和功能,它是生物体内合成酮的中间体^[6],并且不少天然的二苯甲酮类化合物具有抗菌、细胞毒和神经保护等生物活性,因此具有开发成为抗菌剂的潜力。例如,从藤黄 *Garcinia cowa* 叶中分离获得的聚异戊二烯二苯甲酮化合物 Chamuangone 对化脓性链球菌有较强的抗菌活性 (MIC 值为 7.8 $\mu\text{g/mL}$)^[7];从 *Clusia burlemarxii* 树干中分离获得的聚异戊二烯基二苯甲酮衍生物 Burlemarxione A 和 Sampsonine N 对人胶质母细胞瘤 GL15 具有很强的体外细胞毒活性^[8];从知母 *Anemarrhena asphodeloides* 须根中分离获得的二苯甲酮新化合物 Methyl 2-[2, 4-dihydroxy-3-(4-hydroxybenzoyl)-6-methoxyphenyl]acetate 对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 神经细胞损伤具有保护作用^[9]。另外,从内生真菌中也分离获得了具有生物活性的二苯甲酮类化合物,如从红树林内生真菌 *Penicillium citrinum* HL-

5126 中分离获得的氯代二苯甲酮化合物 Penibenzophenones A 具有抗金黄色葡萄球菌的活性 (MIC 值为 20 $\mu\text{g/mL}$)^[10];从 1 株软珊瑚来源的真菌 *Pestalotiopsis* sp. 中分离得到的氯代二苯甲酮类化合物 Pestalachloride F 具有抗藤壶 *Balanus amphitrite* 幼虫附着活性,其 EC₅₀ 值为 0.55 $\mu\text{g/mL}$,且毒性功效比值 (LC₅₀/EC₅₀) 大于 15,具有开发成为安全高效海洋防污剂的潜能^[11]。已有研究从巴戟天 *Morinda officinalis* 内生真菌 *Cytospora rhizophorae* A761 的发酵粗提物中分离得到二苯甲酮类新骨架分子 Cytorhizins A~D,其具有细胞毒活性,是自然界中非常罕见的一类高度氧化的新骨架天然产物^[12]。广东省微生物研究所药用真菌组前期对该菌株的基因组和转录组进行了测序,根据测序结果预测了二苯甲酮类化合物的生物合成相关基因簇及其关键生物合成基因 *proL*。本研究旨在克隆 *proL* 基因,并对 ProL 蛋白进行表达和纯化,以获得高纯度的 ProL 蛋白,运用生物信息学方法推测该蛋白的结构和功能,为解析 ProL 在合成 Cytorhizins 类新骨架活性化合物途径中的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与试剂 菌株:巴戟天内生真菌 *C. rhizophorae* A761(基因登录号:KU529867.1)于

2015 年从广东省高要市采集的巴戟天中分离得到。

试剂: DNA 提取试剂盒 (美基生物科技有限公司, 广州), DNA 胶纯化回收试剂盒和快速质粒小提试剂盒 (天根生化试剂公司, 北京), 限制性内切酶 *NdeI*、*HindIII* (Thermo, 北京), 2×Hiffe *Taq* master mix (Yeasen, 上海), 截留相对分子质量为 50 000 的透析袋 (光谱医学, 美国), pET28a 质粒 (淼灵生物科技有限公司, 武汉), Trans5α 和 BL21(DE3) 感受态细胞 (全式金生物技术有限公司, 北京), One-step ClonTing Kit (Yeasen, 上海)。复性液母液 (1 L): 50 mmol/L Tris-HCl, 0.4 mol/L L-Arg, 0.4 mmol/L GSSG, 2 mmol/L GSH, 体积分数为 10% 的甘油, 10 mmol/L CaCl₂。

1.1.2 仪器 梯度 PCR 仪 (天根生化试剂公司, 北京), 凝胶成像仪 (Oxoid, 英格兰), 电热恒温培养箱 (Oxoid, 英国), 细胞超声破碎仪 (Sonics, 美国), 台式微量离心机 (Yeason, 上海), 台式高速冷冻离心机 SIGMA3-30KS (Sartorius, 德国), 酶标仪 (Thermo, 美国), 5 mL HisTrap HP (GE 公司, 美国), 5 mL HiPrep Desalting (GE 公司, 美国), 蛋白纯化仪 (通用电气医疗集团, 瑞典), 核酸检测仪 (基因有限公司, 香港)。

1.2 方法

1.2.1 目的基因扩增及原核表达载体的构建 根据前期菌株 A761 的转录组测序结果获得的目的基因 *proL* 的序列, 在计算机软件 SnapGene2.3.2 的辅助下, 设计含有同源臂的特异性引物, 引物序列为 *proL*-F: 5'-ACTTTAAGAAGGAGATATACATGGCTACACCAGGACTAATTCCAC-3', *proL*-R: 5'-GTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCAAACAGCCGCTTGGATTATCAC-3', 引物由广州天一辉远公司合成。以基因组为模板, 利用 PCR 扩增目的基因 *proL*, 反应体系 50 μL: *proL*-F 0.5 μL, *proL*-R 0.5 μL, 基因组 1 μL, 2×*Taq* master mix 25 μL, ddH₂O 23 μL。PCR 程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。用限制性内切酶 *NdeI*、*HindIII* 双酶切质粒 pET28a, 37 °C 孵育 3 h。双酶切反应体系 30 μL: pET28a 7 μL, *NdeI* 1.5 μL, *HindIII* 1.5 μL, FD buffer 3 μL, ddH₂O 17 μL。用同源重组酶将 PCR 产物连接至双酶切的 pET28a 载体, 构建 *ProL* 蛋白原核表达载体。转化至 Trans5α 感受态细胞, 用含硫酸卡那霉素的 LB 平板筛选, 菌液 PCR 筛选阳性克隆, PCR 产物用 10 g/L DNA 琼脂糖凝胶电泳鉴定、纯化回收、测定其浓度和纯度。将阳性克隆子扩大培养, 提取质粒进行测序鉴定。测序由广州天一辉远公司完成。

根据测序结果, 克隆的 DNA 片段中含有内含

子, 需要进一步去除内含子以获取完整的编码序列。于是利用同源重组的方法去除内含子, 在 pET28a-*proL* 上设计 2 对引物 *proL*2-F: 5'-TTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCC-3', *proL*2-R: 5'-TGCGGCCAATCTGATCCGTACAGTATCCTCTCCGG-3'; *proL*3-F: 5'-TACGGATCAGATTGGCCGCATACCCAGCT-3', *proL*3-R: 5'-GCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGG-3'。利用重叠延伸 PCR 技术^[13] 将 2 对引物扩增的片段整合在一起, 进而将内含子去除, 获取不含内含子的表达载体 pET28a-*proL*, 并进行扩增 *proL* 片段验证和测序结果比对。

1.2.2 *ProL* 蛋白原核表达 将测序结果与 NCBI 中 *proL* 原始序列完全一致的 pET28a-*proL* 质粒转入大肠埃希菌 BL21(DE3) 感受态细胞中, 挑取抗性 LB 平板筛选的阳性克隆接种于含 50 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基, 37 °C、180 r/min 过夜培养, 按体积分数为 1% 的接种量接种于含 50 μg/mL 硫酸卡那霉素的 200 mL LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 2~3 h 至 *D*_{600 nm} 为 0.4~0.6, IPTG 诱导至终浓度为 0.5 mmol/L, 37 °C 和 25 °C 条件下培养菌体至 *D*_{600 nm} 为 1.2 左右, 4 °C、8 500 r/min 收集菌体进行超声破碎, 分别取未诱导的全菌、诱导后的上清、诱导后的沉淀样品用 SDS-PAGE 电泳鉴定^[14]。

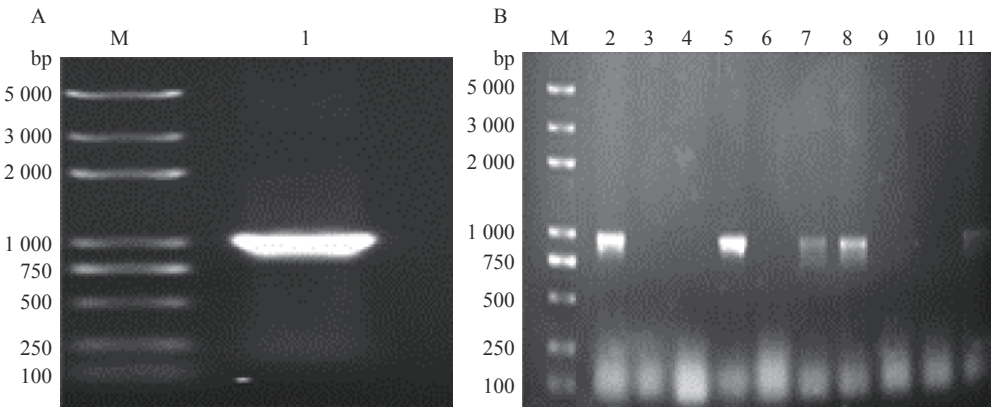
1.2.3 *ProL* 蛋白的复性纯化 采用“1.2.2”中 IPTG 诱导蛋白表达的方法, 同样条件下大量诱导。沉淀用包涵体提取液 (8 mol/L 尿素+复性液母液) 溶解, 然后依次用含 4、2、1、0 mol/L 尿素的复性液及 20 mmol/L PBS 缓冲液在截留相对分子质量为 50 000 的透析袋中 4 °C 条件下透析复性 12 h, 将透析后的上清用 0.22 μm 滤膜过滤, 使用 5 mL HisTrap HP 柱纯化得到目的蛋白: 采用 Buffer A (20 mmol/L PBS、0.5 mol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑) 平衡层析柱, 再用体积分数为 10%、30% 和 60% 的 Buffer B (20 mmol/L PBS、0.5 mol/L NaCl、0.5 mol/L 咪唑) 梯度洗脱目的蛋白。收集洗脱峰, SDS-PAGE 电泳分析目的蛋白。使用微量核酸检测仪测定蛋白浓度, 用 5 mL HiPrep Desalting 脱盐柱和缓冲液 Buffer Store (20 mmol/L PBS、0.5 mol/L NaCl、体积分数为 20% 的甘油) 将纯化的 *ProL* 蛋白中的咪唑洗脱, 收集咪唑的洗脱峰, SDS-PAGE 电泳分析脱盐的目的蛋白, 使用 BandScan 5.0 分析蛋白纯度。将目的蛋白切胶, 送广州辉骏生物科技有限公司进行质谱鉴定, 再将 *ProL* 氨基酸序列上传至 Uniprot 的数据库中, 最后将质谱测序结果在数据库中进行高级检索和氨基酸比对。

1.2.4 ProL 蛋白生物信息学分析 在 NCBI 数据库中对 ProL 蛋白的氨基酸序列进行 Blastp 比对, 使用软件 MEGA6.06, 采用邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 对相似度高的已知的 8 个菌株的氨基酸序列和 ProL 氨基酸序列构建蛋白进化树。使用 Protein 软件预测蛋白质的基本特性。利用 ExPASy Proteomics Server 在线软件 Protparam(<http://www.cn.expasy.org/tools/protparm.html>) 对 ProL 蛋白进行理化性质预测分析, 运用 PredictProtein(<http://www.predictprotein.org>) 预测 *proL* 基因编码的蛋白质二级结构, 最后以 [4d8l.1.A] 蛋白的 3D 结构为模板, 分别在 Swiss-Model(<http://swissmodel.expasy.org/>) 和 Discovery Studio 2.5 软件上进行蛋白的三维结构预测和分析。

2 结果与分析

2.1 目的基因片段的获取及表达载体的构建

提取内生真菌 *C. rhizophorae* A761 的基因组, 用 *proL*-F 和 *proL*-R 引物扩增目的基因, 扩增得到 1 条与目的基因大小一致的核酸片段 (GenBank 登录号: MN180086)(图 1A)。限制性内切酶 *Nde*I 和 *Hind*III 双酶切载体 pET28a。利用同源重组将纯化的 PCR 产物连接至纯化的双酶切 pET28a 载体中, 构建原核表达载体 pET28a-*proL*。菌液 PCR 结果初步验证 *proL* 基因成功插入至 pET28a 质粒 (图 1B)。测序结果显示, 克隆的 DNA 片段中包含了 75 bp 的内含子, 需要进一步去除内含子以获取完整的编码序列。



A: *proL* 基因扩增; B: 菌液 PCR 验证; M: DNA marker 2k plus; 1: *proL* 基因; 2~11: pET28a-*proL* 克隆子

A: *proL* gene amplification; B: Bacterial liquid verification by PCR; M: DNA marker 2k plus; 1: *proL* gene; 2-11: Clones of pET28a-*proL*

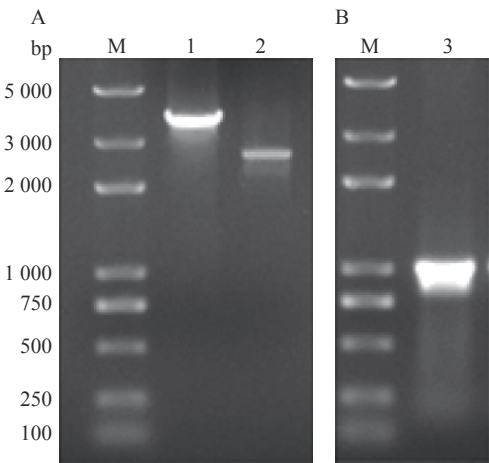
图 1 目的基因 *proL* 的 PCR 验证

Fig. 1 Verification of target gene *proL* by PCR

利用同源重组的方法成功去除内含子。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 用引物 *proL*2-F 和 *proL*2-R 扩增得到片段 1, 用引物 *proL*3-F 和 *proL*3-R 扩增得到片段 2(图 2A)。将片段 1 和 2 融合在一起后, 扩增得到大小约 1 000 bp 的片段 (图 2B)。经测序比对, 确定为 909 bp 的 *proL* 目的基因条带, 成功构建表达载体 pET28a-*proL*。

2.2 ProL 蛋白相似性及同源性分析

在 NCBI 数据库中对 ProL 蛋白的氨基酸序列进行 Blastp 比对, 结果显示与 *C. rhizophorae* A761 KU529867.1 的 ProL 相似度高的蛋白主要是未知蛋白和水解酶, 水解酶中包括酰胺水解酶 2, 2-吡喃酮-4,6-二羧酸内酯酶等。根据氨基酸比对结果, 其中相似度最高的是 *Aspergillus ibericus* XP025570169.1 的酰胺水解酶 2, 其相似性为 59.40%; 与 *A. sclerotium* XP 025461827.1 和 *A. sclerotium carbonarius* PY101400.1 的酰胺水解酶 2、



M: DNA marker 2k plus; 1, 2: pET28a-*proL* 中的片段 1 和 2; 3: 无内含子的目的基因

M: DNA marker 2k plus; 1, 2: Fragments 1 and 2 of pET28a-*proL*; 3: Target gene with intron excision

图 2 无内含子的 pET28a-*proL* 重组质粒构建

Fig. 2 Construction of pET28a-*proL* recombinant plasmids with intron excision

Rasamsonia emersonii XP 013330163.1 的 2-吡喃酮-4, 6-二羧酸内酯酶、*A. vadensis* XP 025558746.1 和 *A. costaricaensis* XP 025542599.1 的酰胺水解酶 2、*A. awamori* GCB25411.1 的 4-磺基内酯水解酶以及 *A. piperis* XP025511999.1 的酰胺水解酶 2 也具有较高的相似性, 相似性分别为 59.06%、59.40%、57.86%、57.72%、57.72%、57.72% 和 57.02%。使用 MEGA6.06 将 ProL 氨基酸序列和相似性高的 8 条已知菌株的氨基酸序列进行比对, 发现其保守氨基酸序列为 207~216 位 (图 3), 推测该范围可能是菌株 A761 的 ProL 氨基酸序列中酰胺水解酶的保守序列。根据选取的 8 条相似度高的氨基酸序列比对结果和亲缘关系, 这些水解酶聚为 3 支: *Aspergillus* spp. 酰胺水解酶 2、*R. emersonii* 的 2-吡喃酮-4,

6-二羧酸内酯酶类和 *C. rhizophorae* 的 ProL 蛋白。ProL 蛋白与进化树中的另外 2 类蛋白分支较远, 提示该蛋白较为新颖 (图 4)。

2.3 重组蛋白表达及复性

将构建成功的重组质粒转化至大肠埃希菌 BL21(DE3), IPTG 诱导表达, 结果表明经 IPTG 诱导后泳道 3 和 5 检测到与目的蛋白 (相对分子质量为 33 800) 大小一致的条带, 而未诱导的全菌样品和诱导的上清泳道中没有目的条带 (图 5A), 说明 ProL 蛋白均在包涵体中表达, 在 25 ℃、0.5 mmol/L IPTG 诱导条件下, ProL 蛋白表达量较高。经过尿素梯度复性, 5 mL HisTrap HP 纯化、5 mL HiPrep Desalting 脱盐, 得到 ProL 蛋白, 使用 BandScan 5.0 分析蛋白纯度, 其纯度最高为 95.1%, 复性后的

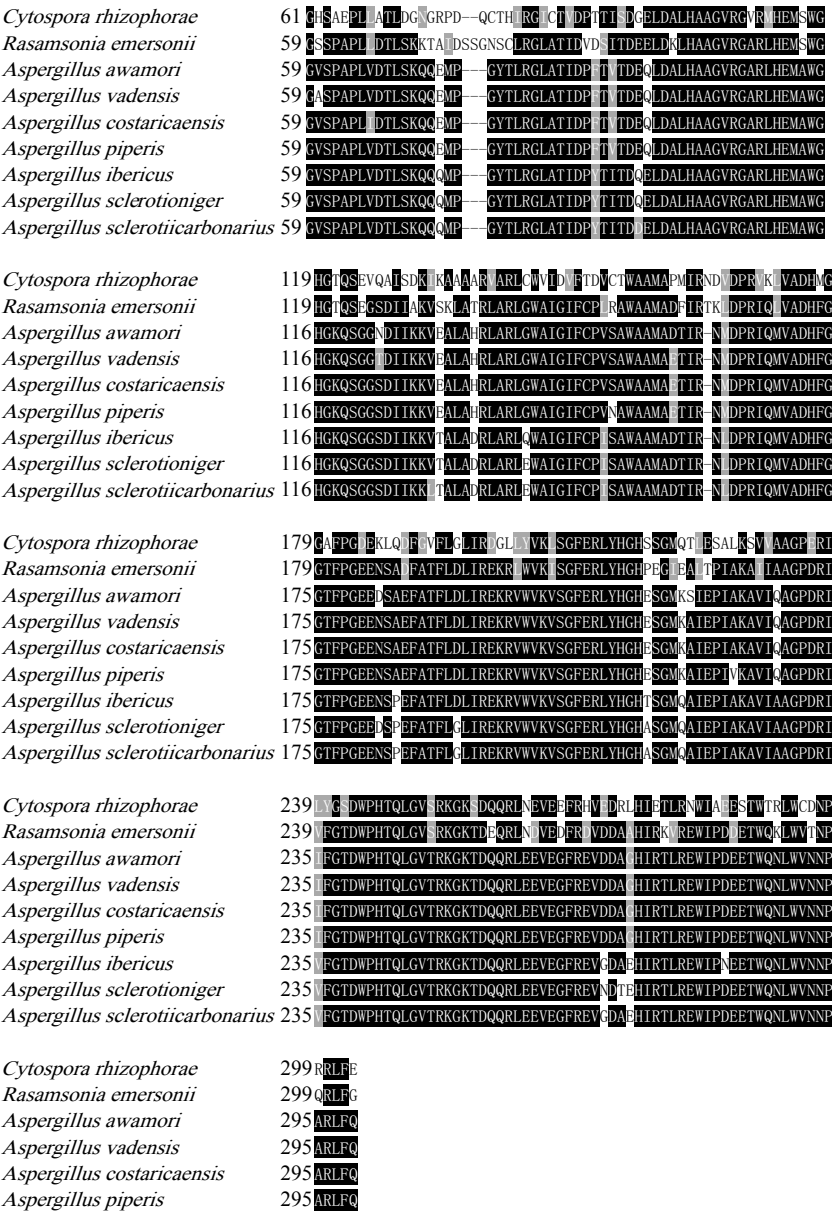


图 3 水解酶序列相似性分析

Fig. 3 The similarity analysis of hydrolases sequence

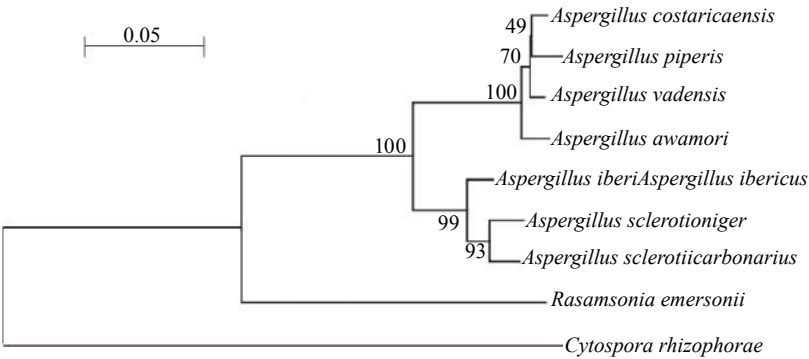
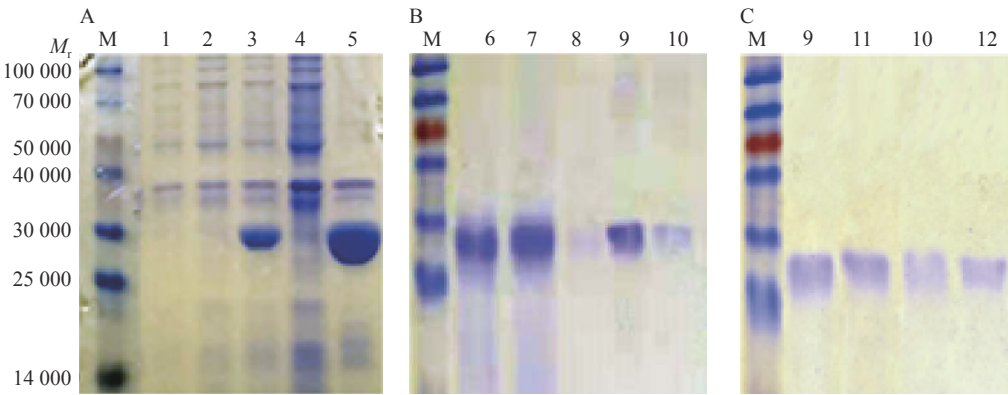


图 4 基于水解酶序列的真菌系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of fungi based on their hydrolase sequences



A: 蛋白表达; B: 蛋白纯化; C: 蛋白脱盐; M: Blue plus marker; 1: 未诱导总蛋白; 2: 37 °C 诱导上清; 3: 37 °C 诱导沉淀; 4: 25 °C 诱导上清; 5: 25 °C 诱导沉淀; 6: 透析前样品; 7: 透析后样品; 8: His-Ni 柱穿过液; 9: 68 mmol/L 咪唑洗脱液 (峰 1); 10: 68 mmol/L 咪唑洗脱液 (峰 2); 11: 68 mmol/L 咪唑洗脱液脱盐 (峰 1); 12: 68 mmol/L 咪唑洗脱液脱盐 (峰 2)

A: Protein expression; B: Protein purification; C: Protein desalination; M: Blue plus marker; 1: Uninduced total protein; 2: Supernatant incubated at 37 °C; 3: Precipitation incubated at 37 °C; 4: Supernatant incubated at 25 °C; 5: Precipitation incubated at 25 °C; 6: Sample before dialysis; 7: Sample after dialysis; 8: His Ni-column passing through liquid; 9: 68 mmol/L imidazole eluatetion (peak one); 10: 68 mmol/L imidazole eluate (peak two); 11: Desalted sample of 68 mmol/L imidazole eluate (peak one); 12: Desalted sample of 68 mmol/L imidazole eluate (peak two)

图 5 ProL 蛋白的表达纯化

Fig. 5 Expression and purification of ProL protein

ProL 蛋白纯度最高为 98.9%(图 5B、5C), 说明该方法纯化 ProL 蛋白效果较好。

2.4 质谱鉴定结果与分析

对纯化后的 ProL 蛋白进行质谱分析, 在 Uniprot

数据库中的序列比对结果表明 ProL 氨基酸序列 (图 6) 与转录组测序分析结果一致, 再次验证了纯化复性的目的蛋白是 ProL 蛋白。

MATPGLIPDAWDTHIHIFDPESFPYGTPSYTPKKALLNEYPFDTTTCANLVVVQATVQGHSAEPLLATLDGNRPDQCTHI RGICTVDPTTI
SDGELDALHAAGVRG V RMHEMSWGHGTQSEVQAISDKIKAAAARVARLCWVIDVFTDVCTWAAMAPMIRNDVDPRVKL VADHMGGAFFGDEKLQ
DFGVFLGLIRDGLLYVKLSGFERLYHGHSSGMQTLESALKSVVAAGPERILYGSWPHTQLGVSRKGKSDQQRNLNEVEEFRHVEDRLHIETLRN
WIAEESTWTRLWCDNPRRLFE

灰色阴影部分为 ProL 氨基酸序列

Sequence with grey background is amino acid sequence of ProL

图 6 ProL 蛋白质谱测序结果

Fig. 6 Mass spectrometry sequencing results of ProL protein

2.5 proL 基因编码蛋白特性分析

利用软件 Protparam 对 ProL 蛋白进行理化性质预测分析, 预测其分子式为 C₁₄₉₅H₂₃₂₀N₄₂₄O₄₄₄S₁₃, 相对分子质量为 33 754.22, 原子数为 4 696, 氨基酸数目为 303, 负电残基 (Asp+Glu) 为 40, 正电残基 (Arg+Lys) 为 30, 等电点为 5.69, 为酸性

蛋白。在哺乳动物中其半衰期为 30 h, 在酵母、大肠埃希菌中分别大于 20 和 10 h。该蛋白是稳定的蛋白, 其不稳定系数是 35.72。对 ProL 蛋白的氨基酸亲疏水性进行分析, 其脂肪系数为 82.08, 平均疏水指数 (GRAVY) 为-0.297, 因此, 预测该蛋白是亲水性蛋白。利用 PredictProtein 在线平台

预测了 *proL* 基因编码的蛋白质二级结构, 其中 α -螺旋结构占总氨基酸的 34.7%, 其他结构占总氨基酸的 65.4%。使用 Swiss-Model 软件预测 ProL 蛋白的三维结构, 预测其保守氨基酸序列为 207~216 位, 成熟的 ProL 蛋白含有 8 个 α -螺旋, 8 个 β -折叠(图 7)。用 Discovery studio 2.5 对该蛋白进行底物结合口袋分析, 结果表明其活性氨基酸位点主要为 Glu210、Arg211 和 His 216, 其中 Arg211 和 His 216 带正电荷, 提供质子, Glu210 带负电荷, 接收质子, 形成底物结合口袋。

根据 ProL 蛋白理化性质分析及其功能预测, 其功能是在生成高度氧化的二苯甲酮类化合物途径中起水解作用, 由此推测二苯甲酮类化合物的生物合成途径(图 8)为: 7 个乙酰辅酶 A 在聚酮合酶的催化下通过聚合、克莱森等反应生成 Endocrocinanthrone 前体, 而后在单加氧酶催化下氧化脱羧生成 Emodin 前体, 接着氧化生成 1,2,3,8-tetrahydroxy-6-methylantracene-9,10-dione, 再氧化

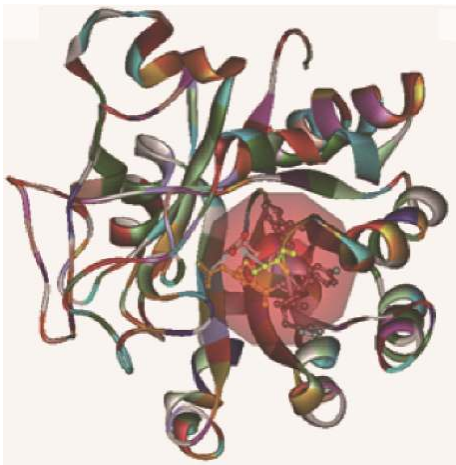
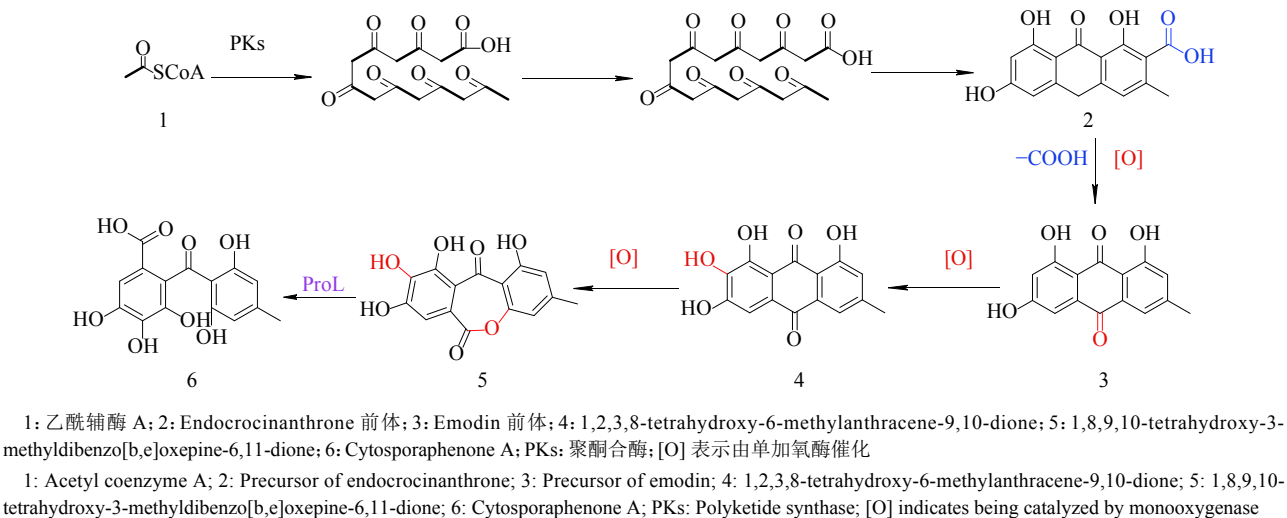


图 7 ProL 蛋白三维结构预测
Fig. 7 Predicted 3D structure of ProL protein

生成 1,8,9,10-tetrahydroxy-3-methyldibenzo[b,e]oxepine-6,11-dione, 最后在 ProL 的催化下水解生成 Cytorhizins A~D 的前体 Cytosporaphenone A^[15]。



1: 乙酰辅酶 A; 2: Endocrocinanthrone 前体; 3: Emodin 前体; 4: 1,2,3,8-tetrahydroxy-6-methylantracene-9,10-dione; 5: 1,8,9,10-tetrahydroxy-3-methyldibenzo[b,e]oxepine-6,11-dione; 6: Cytosporaphenone A; PKs: 聚酮合酶; [O] 表示由单加氧酶催化
1: Acetyl coenzyme A; 2: Precursor of endocrocinanthrone; 3: Precursor of emodin; 4: 1,2,3,8-tetrahydroxy-6-methylantracene-9,10-dione; 5: 1,8,9,10-tetrahydroxy-3-methyldibenzo[b,e]oxepine-6,11-dione; 6: Cytosporaphenone A; PKs: Polyketide synthase; [O] indicates being catalyzed by monooxygenase
图 8 *Cytospora rhizophorae* A761 中二苯甲酮类化合物生物合成途径预测
Fig. 8 Prediction of the biosynthesis pathway of benzophenones in *Cytospora rhizophorae* A761

3 讨论与结论

proL 基因编码的 2-吡喃酮-4,6-二羧酸内酯酶, 属于酰胺水解酶超家族。ProL 对底物的作用主要是酰胺键或酯键的水解、核酸的脱氨、异构化和脱羧反应^[16-17]。Maruyama 等^[18]从假单胞菌 *Pseudomonas ochraceae* NGJ1 中克隆得到 *proL* 基因的 DNA 片段, 并在大肠埃希菌中进行过表达, 经鉴定该 *proL* 基因是原儿茶酸 4,5-裂解途径中关键操纵子之一; Hobbs 等^[19]对少动鞘脂氨醇单胞菌 *Sphingomonas paucimobilis* 中的 *proL* 基因进行了异源表达, 并且 ProL 在木质素的降解途径中催化

2-吡喃酮 4,6-二羧酸酯可逆水解为 4-草酰胺基甲酸酯和 4-羧基-2-羟基粘康酸酯。本文对从植物内生真菌 *C. rhizophorae* A761 中新颖的二苯甲酮类化合物生物合成基因 *proL* 进行表达和理化性质分析, 对 *proL* 基因进行克隆表达, 扩增得到 909 bp 的 *proL* 基因片段, 并成功构建了表达载体 pET28a-*proL*, 将其导入大肠埃希菌中进行异源表达, 利用尿素梯度复性对 ProL 蛋白进行复性并纯化, 其纯度高达 98.9%。在 NCBI 数据库中通过序列比对和系统进化树分析, 推测 ProL 为一种新颖的酰胺水解酶, 其功能是在生成高度氧化的二苯甲酮类化合物途径中起水解作用。本文结果将为后续 ProL 蛋

白生物学功能的研究、内生真菌 *C. rhizophorae* A761 中高度氧化的二苯甲酮类化合物生物合成机制的解析以及新型二苯甲酮类活性先导化合物的挖掘提供参考, 并为将 ProL 蛋白应用于医药和植物源农药的研发奠定初步基础。

参考文献:

[1] ROELANDTS R, VANHEE J, BONAMIE A, et al. A survey of ultraviolet absorbers in commercially available sun products[J]. *Int J Dermatol*, 1983, 22(4): 247-255.

[2] 郭振宇, 丁著明. 二苯酮类紫外线吸收剂的研究进展[J]. *塑料助剂*, 2018(2): 1-5.

[3] 李新, 赵平, 严秋旭, 等. 杀菌剂烯酰吗啉的应用及市场概况[J]. *农药*, 2011, 50(12): 862-863.

[4] KRYSTINA S O, STEFAN T, KOGEL K H et al. Metrafenone: Studies on the mode of action of a novel cereal powdery mildew fungicide[J]. *Pest Manag Sci*, 2006,62(5):393-401.

[5] 冯淑玲, 庄波阳, 王凌. HPLC 测定盐酸苯海拉明注射液 中二苯甲醇和二苯甲酮含量[J]. *中国现代应用药学*, 2013, 30(5): 519-522.

[6] 李赛谋, 戚进, 寇俊萍. 来源于植物的天然二苯甲酮类化合物的研究现状[J]. *药学进展*, 2012, 36(10): 452-458.

[7] SAKUNPAK A, PANICHAYUPAKARANANT P. Anti-bacterial activity of Thai edible plants against gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone[J]. *Food Chem*, 2012, 130(4): 826-831.

[8] FERRAZ C G, RIBEIRO P R, MARQUES E J, et al. Polyprenylated benzophenone derivatives with a novel tetracyclo[8.3.1.03,11.05,10] tetradecane core skeleton from *Clusia burllemarxii* exhibited cytotoxicity against GL-15 glioblastoma-derived human cell line[J]. *Fitoterapia*, 2019, 138: 104346.

[9] 廖振东, 许凤清, 吴德玲, 等. 知母须根中 1 个新的二苯甲酮类化合物[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(7): 1392-1396.

[10] ZHENG C J, LIAO H X, MEI R Q, et al. Two new benzophenones and one new natural amide alkaloid isolated from a mangrove-derived fungus *Penicillium citrinum*[J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33(8): 1127-1134.

[11] 邢倩. 一株软珊瑚来源真菌 *Pestalotiopsis* sp. 氯代二苯甲酮类化合物及其生物活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.

[12] LIU H X, TAN H B, CHEN Y C, et al. Cytorhizins A-D, four highly structure-combined benzophenones from the endophytic fungus *Cytospora rhizophorae*[J]. *Org Lett*, 2019, 21(4): 1063-1067.

[13] 罗成, 齐江娇, 王元元, 等. 利用重叠延伸 PCR 构建红色荧光蛋白布鲁氏菌表达载体[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(9): 2394-2400.

[14] 赵逸群. 荧光假单胞菌超氧化物歧化酶基因的克隆、表达及性质研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2018.

[15] LIU H X, TAN H B, LIU Y, et al. Three new highly-oxygenated metabolites from the endophytic fungus *Cytospora rhizophorae* A761[J]. *Fitoterapia*, 2017, 117: 1-5.

[16] ZHANG S, MA G, LIU Y, et al. Theoretical study of the hydrolysis mechanism of 2-pyrone-4,6-dicarboxylate (PDC) catalyzed by LigI[J]. *J Mol Graph Model*, 2015, 61: 21-29.

[17] HOBBS M E, VETTING M, WILLIAMS H J, et al. Discovery of an *L*-fucono-1,5-lactonase from cog3618 of the amidohydrolase superfamily[J]. *Biochemistry*, 2013, 52(1): 239-253.

[18] MARUYAMA K, SHIBAYAMA T, ICHIKAWA A, et al. Cloning and characterization of the genes encoding enzymes for the protocatechuate meta-degradation pathway of *Pseudomonas ochraceae* NGJ1[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(7): 1434-1441.

[19] HOBBS M E, MALASHKEVICH V, WILLIAMS H J, et al. Structure and catalytic mechanism of LigI: Insight into the amidohydrolase enzymes of cog3618 and lignin degradation[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(16): 3497-3507.

【责任编辑 庄 延】