

大肠杆菌 holo-ACP 突变体的表达纯化及相应 acyl-ACP 的性质初探

王文青¹, 杨淼², 冯延宾², 姬芳玲¹, 薛松²

(1. 大连理工大学 生物工程学院, 辽宁, 大连 116024; 2. 中国科学院 大连化学物理研究所, 辽宁, 大连 116023)

摘要: 酰基-酰基载体蛋白(acyl-acyl carrier protein, acyl-ACP)作为酰基供体,在脂肪酸、聚酮等天然产物合成途径中具有重要作用。目前,常以酰基-辅酶 A(acyl-CoA)来代替尚未商品化的 acyl-ACP 进行相关酶的体外活性研究。由于底物蛋白 acyl-ACP 的 ACP 部分与相关酶发生相互作用,影响酶的催化特性,这种替代无法真实认识相关酶的酰基转移特性。本文以大肠杆菌 pET-28a(+)-ACP 为模板,构建 12 株单点突变体,表达纯化出相应 holo-ACP,并进一步合成 C16:0-ACP 和 C18:1-ACP。高效液相色谱的结果表明,ACP 单点突变会影响 acyl-ACP 整体的性质,其中 T40 残基的改变对 acyl-ACP 的疏水性、紫外吸收响应和稳定性均产生了显著影响。ACP 突变体的性质表征为 acyl-ACP 与相关酶的互作机制研究奠定了基础。

关键词: acyl-ACP; 单点突变体; 高效液相色谱; 性质差异

中图分类号: Q816 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-0645(2020)08-0901-07

DOI: 10.15918/j.tbit.1001-0645.2019.123

Expression and Purification of holo-ACP Mutant and Property Study on the Corresponding acyl-ACP from *Escherichia Coli*

WANG Wen-qing¹, YANG Miao², FENG Yan-bin², JI Fang-ling¹, XUE Song²

(1. Bioengineering College, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China;

2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: As an acyl donor, the acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) plays pivotal roles in biosynthesis of various natural products, including fatty acids, polyketones and so on. At present the acyl-CoA has been used as a substitute for uncommercialized acyl-ACP to perform in vitro study of the relevant enzyme activity. By using acyl-CoA, the catalytic specificity of the enzymes can't be revealed correctly because the substrate protein acyl-ACP could interact with the relevant enzymes through the ACP. Based on the plasmid pET-28a (+)-ACP derived from *Escherichia coli*, 12 single-site ACP mutants were designed, and the corresponding holo-ACPs were expressed and purified. These holo-ACPs were subsequently used as substrates to synthesize C16: 0-ACP and C18: 1-ACP. The HPLC results show that, ACP mutant with change in a single amino acid can effect on the acyl-ACP feature. In particular, the ACP mutant with change in T40 residue has notable impacts on hydrophobicity, ultraviolet absorption response and stability of acyl-ACP as well.

Key words: acyl-ACP; single-site mutant; high-performance liquid phase chromatography; property difference

收稿日期: 2019-04-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21877110, 21708040, 21506025)

作者简介: 王文青(1994—),女,硕士生, E-mail: wwq803@mail.dlut.edu.cn; 杨淼(1987—),女,博士, E-mail: yangmiao0314@dicp.ac.cn.

通信作者: 薛松(1972—),女,研究员,博士生导师, E-mail: xuesong@dicp.ac.cn; 姬芳玲(1983—),女,副教授,硕士生导师, E-mail: fanlingji@dlut.edu.cn.

酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)广泛存在于动植物及微生物细胞中,参与脱氢、水解、环化及酰基转移等30余种酶催化反应^[1-3],为脂肪酸、类脂A、聚酮类抗生素、非核糖体多肽等天然产物合成^[4-5]提供目的酰基,是细胞代谢途径中不可缺少的辅助蛋白。ACP由70~100个氨基酸残基组成^[6],其3级结构由4个 α 螺旋及3个loop区组成,彼此共同构成一个具有疏水性可容纳酰基的空腔^[7]。细胞首先合成无活性的apo-ACP,通过 $\alpha 2$ 螺旋上Ser36的羟基与4'-磷酸泛酰巯基乙胺(4'-PPT)基团以磷脂键连接形成holo-ACP,脂酰基与holo-ACP的4'-PPT末端巯基以硫酯键结合形成acyl-ACP^[1,8]。

ACP的空间结构灵活多变、可塑性强,不同形式或酰基修饰的ACP在3维结构上呈现多样性。研究表明apo-ACP经4'-PPT修饰后形成holo-ACP的构象变化,主要表现为不同 α 螺旋和相关残基的位置发生偏移,以及所形成疏水性空腔的体积变化等^[7];通过对ACP和类脂A合成相关酰基转移酶LpxD天然复合物的3种X射线共结晶结构解析,发现酰基转移期间ACP上的 $\alpha 3$ 和 $\alpha 4$ 螺旋以及loop2和loop3的空间构象发生了明显变化,这些变化与相关酶的底物选择性及催化活性密切相关^[9]。目前,特定链长的acyl-ACP尚未商品化,常以酰基-辅酶A(acyl-CoA)来代替acyl-ACP进行相关酶的体外活性研究^[10-11]。以acyl-CoA为酰基供体,缺乏重要的载体蛋白ACP与酶的相互作用^[9,12],进而无法全面认识酶的催化特性。因此,获得系列acyl-ACP及其突变体,对其性质特点进行差异比较和分析,将为acyl-ACP与相关酶的互作机制研究奠定重要基础。

本文以ACP 3维结构为基础,设计12株ACP单点突变体,表达纯化相应holo-ACP突变体,在哈氏弧菌acyl-ACP合成酶(AasS)的催化下进一步合成系列C16:0-ACP和C18:1-ACP,并对不同acyl-ACP突变体的疏水性、紫外吸收响应和稳定性进行

比较分析,探究氨基酸位点突变对acyl-ACP整体性质的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒

本文使用的菌株包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、BL21和BAP1菌株,质粒载体有pET-28a(+)-ACP和pET-28a(+)-AasS,均由中科院大连化学物理研究所海洋生物工程组实验室保存。

1.1.2 培养基

大肠杆菌表达菌株培养采用Luria Broth(LB)培养基,LB培养基包括10 g/L胰蛋白胨、10 g/L NaCl和5 g/L酵母浸粉,pH 7.2。其中胰蛋白胨和酵母浸粉购自北京奥博星生物技术有限责任公司,NaCl购自天津市科密欧化学试剂有限公司。

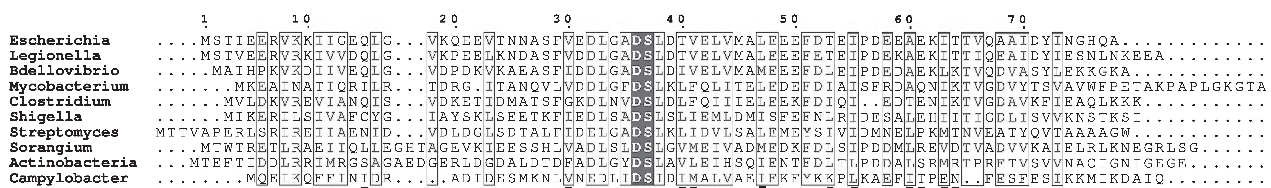
1.1.3 酶与试剂

异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、PrimeSTAR MAX DNA聚合酶Premix、Dpn I内切酶和DNA分子质量标准品均购自大连TaKaRa公司,质粒提取试剂盒、硫酸卡那霉素和咪唑购自上海生物工程股份有限公司,二硫苏糖醇(DTT)购自美国Inalco公司,蛋白质浓度测定试剂盒购自美国Bio-Rad公司,乙腈购自德国Merck公司,三氟乙酸(TFA)、软脂酸和油酸购自美国Sigma公司。

1.2 实验方法

1.2.1 ACP突变体的设计及质粒构建

通过对不同物种来源的ACP氨基酸序列进行同源性比较(图1),结合大肠杆菌来源酰基-ACP的氨基酸序列和三维结构信息^[13],在ACP的酰基入口区域、表面互作区域和酰基结合口袋区域设计11个突变位点,共12株ACP突变体,分别为:Q15D, V30L, T40I, T40L, V41M, L47F, T53F, I55F, A60P, E61Q, I63R和T64N(图1)。



■为设计的突变位点,对应的是大肠杆菌来源ACP;相同氨基酸残基用深色阴影显示,保守位点用深色字体显示

图1 不同物种来源的ACP序列同源性比较

Fig. 1 Sequence alignment of distinct species of ACP

ACP 突变体的定点突变采用的模板是大肠杆菌 pET-28a(+)-ACP 质粒,根据突变位点设计引物(表1),采用 50 μ L 体系,包括上游及下游引物各 2 μ L、模板质粒 0.3 μ L、PrimeSTAR MAX DNA 聚合酶 Premix 25 μ L 以及无菌水 20.7 μ L。PCR 条件设置为 98 $^{\circ}$ C 2 min、98 $^{\circ}$ C 10 s、50 $^{\circ}$ C 15 s、72 $^{\circ}$ C 45 s,30 个循环;循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证后,37 $^{\circ}$ C 条件下 Dpn I 内切酶消化载体 30 min,使用热激法转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,挑取阳性克隆菌落,并进行测序验证。

表1 ACP 突变体引物设计

Tab.1 Primer design of ACP mutants

ACP 突变体	上游引物序列
Q15D	CAGCTGGGCGTTAAG <u>GACGAAGAAGTTACCAAC</u>
V30L	AACAATGCTTCTTTCC <u>TTGAAGACCTGGGCG</u>
T40I	CGGATTCTCTTGAC <u>ATCGTTGAGCTGGTAAT</u>
T40L	GCGGATTCTCTTGAC <u>TTGGTTGAGCTGGTAATG</u>
V41M	GATTCTCTTGACACC <u>ATGGAGCTGGTAATGGCT</u>
L47F	GAGCTGGTAATGGCT <u>TTTGAAGAAGAGTTTGAT</u>
T53F	GAAGAAGAGTTTGAT <u>TTTGAGATTCCGGACGA</u>
I55F	GAGTTTGATACTGAG <u>TTTCCGGACGAAGAAG</u>
A60P	ATTCCGGACGAAGAA <u>CCTGAGAAAATCACCA</u>
E61Q	CCGGACGAAGAAGCT <u>CAGAAAATCACACCG</u>
I63R	GAAGAAGCTGAGAAA <u>CGCACCAACCGTTCAGGC</u>
T64N	AAGCTGAGAAAATC <u>AACACCGTTCAGGCTGC</u>

注:划线部分为突变的碱基,下游引物序列为上游引物序列进行反向互补

1.2.2 holo-ACP 突变体的表达纯化

将测序成功的突变体质粒转入大肠杆菌 BAP1 感受态细胞中使合成的无活性 apo-ACP 进行修饰反应,获得 holo-ACP^[14]。挑取单菌落接种于 5 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中,振荡培养 8~10 h (37 $^{\circ}$ C, 220 r/min)。移取 1 mL 菌液接种于 100 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中,过夜培养 16 h (37 $^{\circ}$ C, 220 r/min),再移取 20 mL 菌液接种于 1 L 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中,振荡培养 (37 $^{\circ}$ C, 220 r/min) 至 OD₆₀₀ 达 0.8~1.0,加 0.5 mmol/L IPTG 诱导 5 h (37 $^{\circ}$ C, 220 r/min),使蛋白大量表达,离心 (4 $^{\circ}$ C, 6500 r/min, 15 min) 收集菌体。

采用镍离子亲和层析和凝胶过滤色谱纯化大肠杆菌表达的 holo-ACP。将收集的菌体经裂解液 (25 mmol/L PBS pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 5% 甘油, 1% β -巯基乙醇) 重悬均匀后超声破碎,离心 (4 $^{\circ}$ C, 15 000 r/min, 40 min) 收集上清液。将收集

的上清液在预平衡的镍柱上缓慢流穿,利用漂洗缓冲液 (25 mmol/L PBS pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 5% 甘油, 20 mmol/L 咪唑) 洗脱吸附在镍柱上的杂蛋白,再用洗脱缓冲液 (25 mmol/L PBS pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 5% 甘油, 350 mmol/L 咪唑) 洗脱并收集目的蛋白,采用 Bradford 检测目的蛋白洗脱情况。将收集的 holo-ACP 洗脱液浓缩至 5 mL 后,上样于 AKTA prime 系统的 HiLoadTM 16/600 SuperdexTM 200 凝胶过滤层析柱中进行分离,于洗脱体积 90 mL 左右处收集目的蛋白 holo-ACP,保存蛋白用缓冲液组成为 25 mmol/L PBS pH 7.5、150 mmol/L NaCl、5% 甘油和 1 mmol/L DTT,采用 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测各 holo-ACP 突变体的电泳迁移差异。

1.2.3 哈氏弧菌 acyl-ACP 合成酶 (AasS) 的表达纯化

AasS 的表达纯化采用丁威等^[15]改进方法进行。将质粒 pET-28a(+)-AasS 转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞中,菌体扩大培养过程同 holo-ACP,待 1 L 大肠杆菌培养液 OD₆₀₀ 达 0.6~0.8 时,加 0.5 mmol/L IPTG,30 $^{\circ}$ C 诱导 6 h,使蛋白大量表达,离心 (4 $^{\circ}$ C, 6 500 r/min, 15 min) 收集菌体。AasS 的纯化方法同 holo-ACP。

1.2.4 acyl-ACP 的合成

acyl-ACP 的合成采用丁威等^[15]改进方法进行。在 AasS 催化下,以 1.2.2 中纯化的 holo-ACP 为酰基受体,以软脂酸钠和油酸钠为酰基供体,分别合成 C16:0-ACP 和 C18:1-ACP,按表 2 的反应体系依次加入各组分,反应温度为 30 $^{\circ}$ C,于 300 r/min 下搅拌 2 h 进行合成反应,其中软脂酸钠和油酸钠通过软脂酸和油酸与 0.5 mmol/L NaOH 经煮沸反应获得。合成后的 acyl-ACP 产物经凝胶过滤色谱纯化,除去咪唑、ATP、Mg²⁺、AasS、脂肪酸钠盐和其它杂蛋白。将收集的 acyl-ACP 洗脱液利用超滤离心管 (3 KD, Millipore) 浓缩至 2 mmol/L,液氮冷冻后保存于 -80 $^{\circ}$ C。

表2 C16:0-ACP 和 C18:1-ACP 的合成反应体系

Tab.2 The synthesis reaction components of C16:0-ACP and C18:1-ACP

反应体系	母液浓度/ (mmol $\cdot$ L ⁻¹)	工作液浓度/ (mmol $\cdot$ L ⁻¹)
Tris-HCl pH 7.5	1 000	0.1
软脂酸钠/油酸钠	10	0.2

续表

反应体系	母液浓度/ (mmol·L ⁻¹)	工作液浓度/ (mmol·L ⁻¹)
ATP	500	10
MgCl ₂	1000	10
AasS	0.3	0.001
holo-ACP	10	0.1

1.2.5 不同形式 ACP 突变体的纯度检测分析

采用配备有 ODS-C8 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)的 HPLC(Agilent 1260)对不同形式的 ACP 进行检测分析,包括 apo-ACP、holo-ACP 和 acyl-ACP^[15]. 二元泵系统包括流动相 A 和 B,A 为含 0.1% TFA 的水,B 为乙腈,流速设置为 1 mL/min,紫外检测波长为 210 nm,柱温为 25 ℃,反应体系为 50 μL,进样量为 10 μL,洗脱程序见表 3. 利用 HPLC 检测分析 1.2.2 中表达纯化的 holo-ACP 纯度以及 1.2.3 中合成并纯化的 acyl-ACP 纯度.

表 3 HPLC 流动相的梯度洗脱程序

Tab.3 Gradient elution program of mobile phase for HPLC

t/min	流动相 A 含 0.1% TFA 的 H ₂ O/%	流动相 B 乙腈/%
0.00	65	35
16.00	35	65
16.01	65	35
20.00	65	35

2 结果讨论

2.1 holo-ACP 突变体表达纯化性质差异

通过 SDS-PAGE 分析 12 株 holo-ACP 突变体(图 2),除 I63R 出现 3 个条带外,其余 11 株 holo-ACP 突变体均为单一条带,该条带出现在 20 kDa 处,但 holo-ACP 的相对分子质量为 11 kDa,这是由于大肠杆菌 ACP 富含酸性阴离子氨基酸残基-天冬氨酸和谷氨酸,二者所占比例近 50%,使得 holo-ACP 在 SDS-PAGE 中的迁移特征与常规蛋白质有所不同,这与文献[16]一致. 可见,除 I63R 外的 11 株 holo-ACP 突变体均纯化成功(I63R 的 holo-ACP 不再继续合成 acyl-ACP),T64N 的条带位置在其余 10 株突变体条带下方,与野生株(WT)有所不同,上述 10 株突变体的电泳迁移性质与 WT 类似.

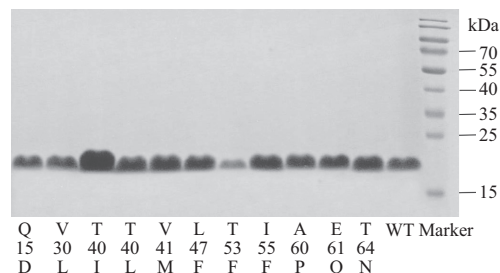


图 2 holo-ACP 突变体的 SDS-PAGE 分析,WT 为野生株

Fig.2 SDS-PAGE analysis of holo-ACP mutant,WT indicates wild type strain

由表 4 可知,holo-ACP 突变体表达过程中,先表达的 apo-ACP 进一步发生后修饰反应,生成 holo-ACP,apo-ACP 没有完全反应生成 holo-ACP. 除 I63R 的 holo-ACP 纯度只有 49%外,WT 和其余 11 株突变体的 holo-ACP 纯度在 84%~99%之间. 12 株 holo-ACP 突变体中,I63R 的蛋白获得量最低,为 5.1 mg/L,T40I,L47F,I55F 和 A60P 与 WT 的蛋白获得量在同一水平,均在 10 mg/L 以上,其余 7 株 holo-ACP 突变体的蛋白获得量在 7~9 mg/L 之间.

表 4 holo-ACP 突变体的分离纯化结果

Tab.4 Results of separation and purification of holo-ACP mutants

菌株	保留时间/min	蛋白质获得量/ (mg·L ⁻¹)	holo-ACP 纯度/%
WT	96.6	13.5	86.0
Q15D	90.5	7.7	87.0
V30L	92.2	8.3	93.0
T40I	95.3	13.1	88.0
T40L	95.6	9.0	91.0
V41M	93.0	8.5	90.0
L47F	92.4	12.1	92.0
T53F	92.7	6.85	91.0
I55F	92.3	12.4	84.0
A60P	92.5	14.0	99.0
E61Q	93.0	8.1	91.0
I63R	83.7	5.1	49.0
T64N	93.1	9.0	95.0

注:WT 为野生株,保留时间为 holo-ACP 突变体在凝胶过滤色谱中峰值位置对应的时间

12 株 holo-ACP 突变体在凝胶过滤色谱中的分离性质差异较大,其保留时间均比 WT 提前,最明显的是 I63R,保留时间比 WT 提前 13 min,这与其蛋白表达量和纯度的特殊性相对应(表 4). 此外 T40I 和 T40L 的保留时间与 WT 最接近,其余 9 株突变体的保留时间比 WT 提前 4~6 min. Parris

等^[17]研究结果表明,holo-ACP 合成酶 ACPS 的单位点突变体在凝胶过滤色谱中的保留时间差异与其蛋白分子摩尔质量差异相一致,如 Q113E 的保留时间比 WT 提前 0.4 min,而 Q113R 和 I5R 比 WT 延迟 1.7 min. 本文中,12 株 ACP 突变体的载体序列相同,蛋白分子摩尔质量相近,其在凝胶过滤色谱中保留时间的差异可能与 apo-ACP 和 holo-ACP 空间构象不同有关,apo-ACP 通过与 4'-PPPT 相结合形成 holo-ACP,使得 ACP 构象由封闭向开放状态转变^[7],导致二者在凝胶中的渗滤速度不同,特别是 I63R,其 holo-ACP 纯度只有 49%,高比例 apo-ACP 的存在使得其在凝胶色谱中的分离性质变得非常不同,因此 ACP 突变体在凝胶过滤色谱中的保留时间差异表明不同 ACP 突变体的空间构象发生了改变.

2.2 HPLC 检测分析 acyl-ACP 的性质差异

通过 HPLC 对 acyl-ACP 合成产物(包括 holo-, apo-和 acyl-ACP)进行分析,对不同 ACP 突变体的疏水性、紫外吸收响应和稳定性进行了比较.

首先,由表 5 可知,各 ACP 突变体的 C16:0-ACP 和 C18:1-ACP 合成产物的色谱分离结果有所不同. 色谱柱 ODS-C8 具有疏水性特性. ACP 的疏水性越强,与色谱柱的吸附作用越强,保留时间就越长. 影响 ACP 疏水性的因素包括结构和所携带的酰基. 脂酰基 C18:1 的疏水性强于 C16:0-ACP,使得 C18:1-ACP 保留时间较 C16:0-ACP 延迟. 突变体 V30L, T40I, T40L 和 T53F 的 holo-, apo-和 acyl-ACP 保留时间均较 WT 延迟, A60P 和 E61Q 的保留时间均较 WT 提前. 其中, V30L 中亮氨酸 L 较缬氨酸 V 多一个甲基,二者均为脂肪族氨基酸, V 相对于 L 的疏水性强,因此保留时间延迟; T40I, T40L 和 T53F 中苏氨酸 T 为含羟基氨基酸, 异亮氨酸 I 和亮氨酸 L 均为脂肪族氨基酸, 苯丙氨酸 F 含有苯环, I, L 和 F 相对于 T 的疏水性均增强,因此保留时间延迟,特别是 T40I 和 T40L 的保留时间延迟近 2 min,其疏水性明显增强; A60P 中丙氨酸 A 为脂肪族氨基酸, 脯氨酸 P 为非极性氨基酸; E61Q 中谷氨酸 E 为酸性氨基酸, 谷氨酰胺 Q 为极性氨基酸; P 相对于 A, 以及 Q 相对于 E 的亲水性均有所增强,因此保留时间提前. 由此可见, 11 株 ACP 突变体中, T40I 和 T40L 的疏水性变化最显著,这也表明 T40 氨基酸残基在 ACP 性质稳定性方面发挥着重要作用.

表 5 acyl-ACP 合成产物在 HPLC 上的保留时间
Tab. 5 Retention time of synthesis products of acyl-ACP in HPLC

菌株	C16:0-ACP 合成产物			C18:1-ACP 合成产物		
	holo-ACP	apo-ACP	acyl-ACP	holo-ACP	apo-ACP	acyl-ACP
WT	5.43	7.84	11.34	5.58	7.96	11.73
Q15D	5.53	7.85	11.32	5.62	7.96	11.74
V30L	5.90	8.54	11.60	5.94	8.58	11.91
T40I	7.11	10.05	13.03	7.30	10.18	13.26
T40L	7.12	9.36	12.90	7.47	9.66	13.53
V41M	5.50	7.81	11.37	4.89	7.91	11.74
L47F	5.47	7.66	11.34	5.63	7.82	11.75
T53F	5.75	8.01	11.79	5.91	8.17	12.16
I55F	5.51	7.85	11.39	6.67	8.91	11.87
A60P	4.74	7.20	10.78	4.85	7.44	11.43
E61Q	5.40	7.60	11.29	5.48	7.67	11.61
T64N	5.41	7.63	11.29	5.58	7.78	11.71

其次,本文比较了各 C16:0-ACP 和 C18:1-ACP 突变体在 HPLC 中检测信号的单位峰面积所代表的物质的量(fmol/mAU)的差异(图 3),以此来表征其在紫外吸收响应方面的性质差异, fmol/mAU 越小,表明该蛋白的紫外吸收响应越强. 由图 3 可知,单位点突变使大部分 C16:0-ACP 和 C18:1-ACP 突变体的紫外吸收响应增强,其中与 WT 相比, C16:0-ACP 突变体在 210 nm 处的紫外吸收响应差异较大的为 T40L 和 A60P, C16:0-ACP 的 fmol/mAU 分别只有 WT 的 0.4 和 0.3 倍,其余 10 株突变体与 WT 相近; 对于 C18:1-ACP,除 Q15D 和 V30L 外,其余 10 株突变体的紫外吸收响应均显著高于 WT,特别是 T40I, T40L 和 I55F,其 C18:1-ACP 的 fmol/mAU 分别只有 WT 的 0.2, 0.5 和 0.5 倍. 因此, T40 氨基酸残基也使 ACP 的紫外吸收发生了明显的变化.

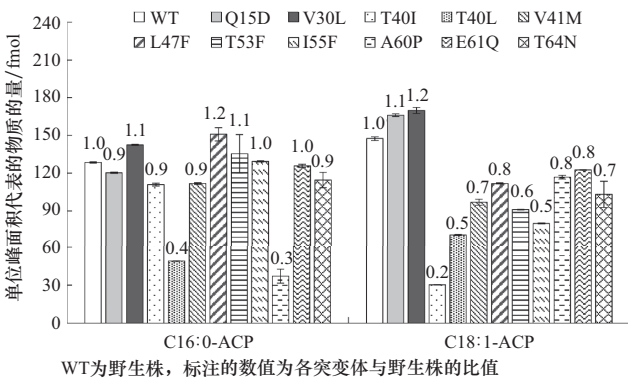
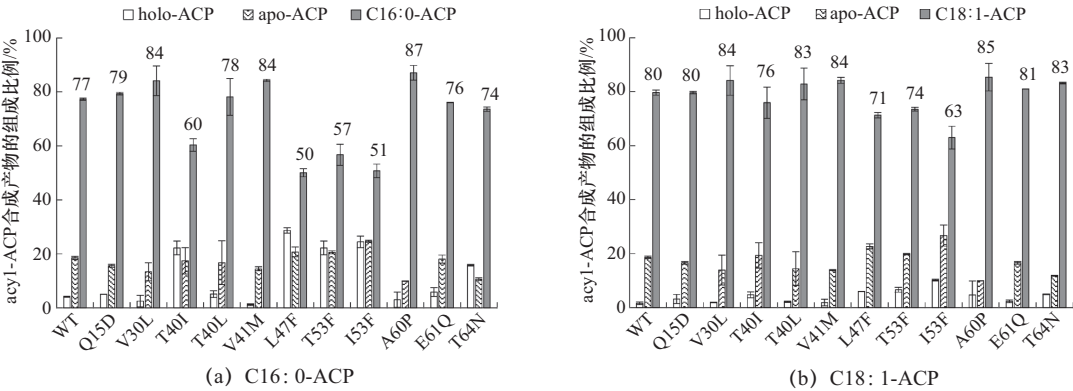


图 3 C16:0-ACP 和 C18:1-ACP 突变体紫外吸收响应的差异比较
Fig. 3 Distinction comparison of ultraviolet absorption response between C16:0-ACP and C18:1-ACP

最后,对 acyl-ACP 合成产物中 C16:0-ACP 和 C18:1-ACP 的纯度及其稳定性进行了评价. 由图 4 可知,WT 和大多突变体的 C16:0-ACP 纯度低于相应的 C18:1-ACP 纯度,表明 ACP 的单点突变对 C16:0-ACP 稳定性的影响更大. 在 11 株 ACP 突变体中, C16:0-ACP 和 C18:1-ACP 与 WT 之间纯度差异较大的为 T40I, L47F, T53F 和 I55F,这 4 株突变体的 C16:0-ACP 纯度均在 60% 以下, C18:1-ACP 纯度均在 75% 以下;其余 7 株突变体的纯度均等同于或高于 WT. 由表 6 可知,上述 4 株 C16:0-ACP 突变体经 -80 ℃ 冻融后,其 holo-ACP 比例均提高至 20% 以上,相应的 C18:1-ACP 突变体经冻融后的 holo-ACP 比例提高至 5%~10% 之间,WT 和其余 7 株突变体的 holo-ACP 比例变化不大. 这些结果表明上述 4 株突变体的 acyl-ACP 易水解,性质相对不稳定. 此外,

上述 4 株 holo-ACP 突变体合成 acyl-ACP 后,所含 apo-ACP 比例会明显增大(表 4 和图 4),这可能是在 30 ℃ 合成反应期间 ACP 上 Ser36 的羟基与 4'-PPT 磷酸基之间的磷酸键水解造成的. 可见,ACP 的单点突变 T40I, L47F, T53F 和 I55F 会使 acyl-ACP 合成反应体系的不稳定性提高,还会影响其已合成 C16:0-ACP 和 C18:1-ACP 的水解,表明这些氨基酸残基在维持 ACP 的结构和性质稳定方面具有重要作用. 根据 ACP 氨基酸位点的分布信息, T40 和 L47 位于 α 2 螺旋, T53 和 I55 位于 L2. Masoudi 等研究^[9]表明, ACP 可通过调节 α 2 螺旋、L2 和 α 3 螺旋的位置来控制其疏水空腔大小,以容纳不同链长的酰基,导致 acyl-ACP 整体构象发生改变. 因此,本研究进一步表明了氨基酸残基 T40、L47、T53 和 I55 在维持 ACP 构象稳定中发挥的重要作用.



WT 为野生株,标注的数值代表各菌株 acyl-ACP 所占比例

图 4 C16:0-ACP 和 C18:1-ACP 突变体的纯度比较

Fig. 4 Purity comparison between C16:0-ACP mutant and C18:1-ACP mutant

表 6 C16:0-ACP 和 C18:1-ACP 突变体的稳定性

Tab. 6 Stability of C16:0-ACP mutant and C18:1-ACP mutant

菌株	C16:0-ACP 合成产物中 holo-ACP 比例/%		C18:1-ACP 合成产物中 holo-ACP 比例/%	
	冷冻前	冻融后	冷冻前	冻融后
WT	3	4	1	1
Q15D	7	5	5	4
V30L	1	4	3	2
T40I	0	20	0	6
T40L	5	4	2	2
V41M	1	1	1	3
L47F	2	29	2	6
T53F	1	20	1	7
I55F	7	23	6	10
A60P	0	5	4	8
E61Q	1	5	2	3
T64N	1	16	2	5

3 结 论

本文通过构建系列大肠杆菌来源 ACP 单点突变体,表达纯化出相应 holo-ACP,并进一步合成 C16:0-ACP 和 C18:1-ACP,采用 HPLC 法比较分析了不同 acyl-ACP 突变体的疏水性、紫外吸收响应和稳定性. 结果表明, T40I 和 T40L 在疏水性色谱柱中的保留时间较野生株延迟近 2 min,二者在疏水性质方面变化最显著;在单位峰面积所代表的物质的量方面, T40L 的 C16:0-ACP 和 C18:1-ACP 分别只有野生株的 0.4 和 0.5 倍,该 acyl-ACP 突变体的紫外吸收响应显著增强;此外, T40I, L47F, T53F 和 I55F 使 acyl-ACP 合成反应体系的不稳定性提高,还影响 C16:0-ACP 和 C18:1-ACP 的水解,

这些氨基酸残基在维持 ACP 的结构和性质稳定方面具有重要作用. 因此, ACP $\alpha 2$ 螺旋上 T40 残基的改变会影响 acyl-ACP 整体的性质, 关于 T40 残基对 ACP 三维结构及相关酶催化特性的影响还有待进一步研究. 这些结果为 acyl-ACP 与相关酶的相互作用机制研究奠定了基础.

参考文献:

- [1] Cronan J E. The chain-flipping mechanism of ACP (acyl carrier protein)-dependent enzymes appears universal [J]. *Biochemical Journal*, 2014, 460(2): 157 - 163.
- [2] Butland G, Peregrin-Alvarez J M, Li J, et al. Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli* [J]. *Nature*, 2005, 433(7025): 531 - 537.
- [3] Byers D M, Gong H S. Acyl carrier protein; structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family [J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2007, 85: 649 - 662.
- [4] Paul S, Ishida H, Nguyen L T, et al. Structural and dynamic characterization of a freestanding acyl carrier protein involved in the biosynthesis of cyclic lipopeptide antibiotics [J]. *Protein Science*, 2017, 26: 946 - 959.
- [5] Robbins T, Liu Y C, Cane D E, et al. Structure and mechanism of assembly line polyketide synthases [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2016, 41: 10 - 18.
- [6] Huang W Y, Stoops J K, Wakil S J. Complete amino-acid sequence of chicken liver acyl carrier protein derived from the fatty-acid synthase [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1989, 270: 92 - 98.
- [7] Arya R, Sharma B, Dhembala C, et al. A conformational switch from a closed apo- to an open holo-form equips the acyl carrier protein for acyl chain accommodation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 2019, 1867(3): 163 - 174.
- [8] Kim Y, Kovrigin E L, Eletr Z. NMR studies of *Escherichia coli* acyl carrier protein; dynamic and structural differences of the apo- and holo-forms [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 341: 776 - 783.
- [9] Masoudi A, Raetz C R, Zhou P, et al. Chasing acyl carrier protein through a catalytic cycle of lipid A production [J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 422 - 426.
- [10] Yoon K, Han D, Li Y, et al. Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(9): 3708 - 3724.
- [11] Xin Y, Shen C, She Y, et al. Biosynthesis of triacylglycerol molecules with a tailored PUFA profile in industrial microalgae [J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(4): 474 - 488.
- [12] Nguyen C, Haushalter R W, Lee D J, et al. Trapping the dynamic acyl carrier protein in fatty acid biosynthesis [J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 427 - 431.
- [13] Roujeinikova A, Simon W J, Gilroy J, et al. Structural studies of fatty acyl-(acyl carrier protein) thioesters reveal a hydrophobic binding cavity that can expand to fit longer substrates [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 365(1): 135 - 145.
- [14] Liu T, Vora H, Khosla C, et al. Quantitative analysis and engineering of fatty acid biosynthesis in *E. coli* [J]. *Metabolic Engineering*, 2010, 12(4): 378 - 386.
- [15] 丁威, 冯延宾, 曹旭鹏, 等. Acyl-ACPs 的规模化合成 [J]. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(4): 63 - 69.
Ding Wei, Feng Yanbin, Cao Xupeng, et al. Large-scale synthesis of acyl-ACPs [J]. *Chinese Journal of Bioengineering*, 2018, 38(4): 63 - 69. (in Chinese)
- [16] Chan D, Vogel H. Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein [J]. *Biochemical Journal*, 2010, 430(1): 1 - 19.
- [17] Parris K D, Lin L, Tam A, et al. Crystal structures of substrate binding to *Bacillus subtilis* holo-(acyl carrier protein) synthase reveal a novel trimeric arrangement of molecules resulting in three active sites [J]. *Structure*, 2000, 8(8): 883 - 895.

(责任编辑: 李兵)