

不动杆菌磷脂酶D基因的表达、生物信息学及底物选择性分析

吴思怡, 吴林秀, 王凡, 卢梦瑶, 童欣, 李敏, 付新宇, 胡荣康

Gene Expression, Bioinformatics and Substrate Selectivity of Phospholipase D from *Acinetobacter* sp.

WU Siyi, WU Linxiu, WANG Fan, LU Mengyao, TONG Xin, LI Min, FU Xinyu, and HU Rongkang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023090014>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

微生物磷脂酶D的克隆表达研究进展

Current Developments on the Cloning and Expression of Microbial Phospholipase D

食品工业科技. 2021, 42(15): 396-402 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070257>

人源磷脂酶PLA₂异源可溶表达纯化及酶学分析

Prokaryotic Expression, Purification and Enzymatic Characterization of Recombinant Human Phospholipase A₂

食品工业科技. 2021, 42(2): 70-75,82 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020040039>

蛋白质工程改造磷脂酶D提高磷脂酰丝氨酸产量

Protein Engineering of Phospholipase D to Improve the Production of Phosphatidylserine

食品工业科技. 2020, 41(17): 98-103,108 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.17.016>

基因共表达对人源LysoPLD异源可溶性表达、纯化及酶学性质的影响

Effect of Gene Co-expression on Heterologous Soluble Expression, Purification and Enzymatic Properties of Human LysoPLD

食品工业科技. 2021, 42(7): 102-109 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060091>

超临界CO₂体系中磷脂酶A₂催化合成高DHA含量DHA-PC的研究

Catalytic synthesis of DHA-PC with high DHA contents by phospholipase A₂ in supercritical CO₂ system

食品工业科技. 2017(18): 85-89 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.18.017>

蜡样芽孢杆菌LJ01中亚硝酸盐还原酶的基因克隆和生物信息学分析

Gene Cloning and Bioinformatics Analysis of Nitrite Reductase from *Bacillus cereus* LJ01

食品工业科技. 2020, 41(6): 94-98,105 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.06.016>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

吴思怡, 吴林秀, 王凡, 等. 不动杆菌磷脂酶 D 基因的表达、生物信息学及底物选择性分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(13): 132-139. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090014

WU Siyi, WU Linxiu, WANG Fan, et al. Gene Expression, Bioinformatics and Substrate Selectivity of Phospholipase D from *Acinetobacter* sp. [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(13): 132-139. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090014

· 生物工程 ·

不动杆菌磷脂酶 D 基因的表达、生物信息学及底物选择性分析

吴思怡¹, 吴林秀², 王凡¹, 卢梦瑶¹, 童欣¹, 李敏¹, 付新宇¹, 胡荣康^{1,*}

(1. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽芜湖 241000;

2. 皖南医学院第二附属医院, 安徽芜湖 241000)

摘要: 微生物来源磷脂酶 D (Phospholipase D, PLD) 因其较高的催化活性和广泛的底物选择谱而成为磷脂合成应用中的热点。本研究以 *Acinetobacter* sp. DUT-2 来源的 PLD (ADPLD) 为研究对象, 首先通过生物信息学分析蛋白序列特征, 然后构建重组质粒并在大肠杆菌中实现异源表达, 进一步纯化酶蛋白并分析 ADPLD 对不同酰基链长磷脂酰胆碱 (PC) 的底物选择性, 最后通过分子对接和分子模拟探究 ADPLD 的底物识别机制。通过对 ADPLD 和其他微生物来源的 PLD 多序列比对和进化树分析表明, ADPLD 与链霉菌来源 PLD 序列相似度低于 30%, 且只有一个保守的 HKD 基序, 这表明 ADPLD 的催化机制可能与传统认知中需要两个 HKD 基序完成 PLD 催化过程的反应机制有所不同。ADPLD 主要以可溶性蛋白形式表达, 仅通过 Ni²⁺亲和和层析在 50 mmol/L 的低浓度咪唑下便能纯化出较为均一的蛋白, 以大豆 PC 为底物时的比活性约为 4.09 U/mg。ADPLD 对中和短链 PC (C6-C14) 的活性相对较高, 其中 ADPLD 对 8:0/8:0-PC 的比活性高于其它酰基链长的 PC 底物, 为 13.2 U/mg。当 PC 的酰基链长从 C14 增加至 C16 时, ADPLD 对 PC 的活性明显降低。分子模拟和分子对接结果显示 ADPLD 的氨基酸残基 Thr205、Pro209、Phe293、Ala324、Lys329 和 Phe453 能够分别与 PC 形成疏水相互作用。Arg383 和 Gly326 能够与 PC 形成氢键, 其中 Arg383 (N)、Gly326 (N) 与 PC (P) 之间的距离 < 3 Å。这些结果表明, ADPLD 能够与磷脂分子形成一个稳定的酶与底物的中间体。研究结果为 ADPLD 的分子改造和进一步工业应用奠定了基础。

关键词: 不动杆菌, 磷脂酶 D, 酶学性质, 蛋白表达, 磷脂

中图分类号: TS201.2²

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)13-0132-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090014

本文网刊:



Gene Expression, Bioinformatics and Substrate Selectivity of Phospholipase D from *Acinetobacter* sp.

WU Siyi¹, WU Linxiu², WANG Fan¹, LU Mengyao¹, TONG Xin¹, LI Min¹, FU Xinyu¹, HU Rongkang^{1,*}

(1. College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000, China)

Abstract: Microbial phospholipase D (PLD) showed a more competent potential for phospholipids production due to its higher catalytic activity and broader substrate specificity. In this study, the PLD from *Acinetobacter* sp. DUT-2 (ADPLD) was used as the research object. Firstly, bioinformatics was used to examine the protein sequence characteristics. Then, the recombinant plasmid was generated and heterologously expressed in *Escherichia coli*. The enzyme protein was purified further, and the substrate selectivity of ADPLD to phosphatidylcholine (PC) with various acyl chains was investigated. Finally, the substrate recognition mechanism of ADPLD was investigated using molecular docking and molecular dynamics

收稿日期: 2023-09-05

基金项目: 安徽省高等学校科学研究重点项目 (2022AH050202); 安徽师范大学大学生创新创业训练计划项目资助 (2023032811, 2023079611)。

作者简介: 吴思怡 (2002-), 女, 大学本科, 研究方向: 酶工程, E-mail: 3360707969@qq.com。

* 通信作者: 胡荣康 (1992-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 酶工程, E-mail: Rongkang_Hu@163.com。

simulation. Multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis of ADPLD and other microbial-derived PLDs revealed that the sequence similarity between ADPLD and *Streptomyces*-derived PLDs was less than 30%, and there was only one conserved HKD motif, indicating that the catalytic mechanism of ADPLD might differ from the reaction mechanism in traditional cognition, which required two HKD motifs to complete the PLD catalytic process. ADPLD was mostly produced as a soluble protein, and a relatively uniform protein could be purified using Ni²⁺ affinity chromatography at a low concentration of 50 mmol/L imidazole. When soybean PC was utilized as a substrate, the specific activity of ADPLD was about 4.09 U/mg. ADPLD showed relatively high activity in neutralizing short-chain PC (C6~C14), with a specific activity of 13.2 U/mg for 8:0/8:0-PC, which was higher than that of other PC substrates with long acyl chains. The activity of ADPLD on PC reduced dramatically when the acyl chain length of PC grew from C14 to C16. Molecular dynamics simulation and molecular docking experiments revealed that the ADPLD amino acid residues Thr205, Pro209, Phe293, Ala324, Lys329, and Phe453 might form hydrophobic interactions with PC. Arg383 and Gly326 could form hydrogen bonds with PC when the distance between Arg383 (N), Gly326 (N), and PC (P) was <3 Å. These results indicate that ADPLD can form a stable enzyme substrate intermediate with phospholipid molecules. These findings set the groundwork for ADPLD molecular modification and future industrial applications.

Key words: *Acinetobacter*; phospholipase D; enzymatic property; protein expression; phospholipid

磷脂是所有生物体中生物膜的主要组成成分^[1],其主要消费市场是食品和饮料领域。我国是磷脂的主要消费地区,2018年我国的消费量占全球消费总量的27.70%。2018年,全球卵磷脂的产量为58.3万吨,在发展中国家快速增长的需求下,预计到2025年将增长到85.5万吨。因此,具有多种生理功能的磷脂在食品、化妆品以及制药工业中具有很大的市场潜力^[2-3]。

磷脂酶 D (PLD, EC 3.1.4.4) 是一类水解磷脂生成磷脂酸和羟基化合物的酶。此外, PLD 还可催化磷脂极性头部基团的转移反应,从而将自然界中含量丰富的磷脂酰胆碱(PC)催化合成其他稀有磷脂^[4]。PLD 酶转化法的反应条件温和,高效易控。伴随着近几年绿色生物溶剂的快速发展,以酶制剂为核心的绿色、低碳、高效生物加工成为国际农产品加工领域的发展趋势^[5]。目前报道指出微生物来源 PLD 表现出更加广泛的底物特异性和催化活性^[6]。近年来,人们开发了多种方法来挖掘具有潜在工业应用价值的微生物 PLD,其中传统筛选和宏基因组策略得到了广泛的应用。然而,这些方法需要筛选大量的菌株,并且方法的靶标不明确,往往难以获得高催化活性的 PLD 酶蛋白。随着基因数量呈指数级增长,基因组测序和注释在数据库中得到应用,基因组挖掘近年来备受关注。研究人员可以从 GenBank、Pfam、Brenda 等各种公共数据库中检索出已定义功能的,具有所需属性的基因。Zhou 等^[7]基于基因组测序和注释,建立了氨基酸序列相似度、保守基序和生物来源安全性的 3 个筛选标准。基于这 3 个筛选条件,成功挖掘了一种来源于 *Streptomyces mobaraensis* 的 PLD,该 PLD 可以催化大豆卵磷脂和 L-丝氨酸合成磷脂酰丝氨酸(PS)。截至目前,链霉菌^[8]、芽孢杆菌^[9]、大肠杆菌^[10]、不动杆菌^[11]、苍白杆菌^[12]、铜绿假单胞菌^[13]、鼠伤寒沙门氏菌^[14]和棒状杆菌^[15]等微生物来源的 PLD 已被报道^[16],其中 Mao 等^[11]报道不动杆菌(*Acinetobacter radioresistens* a2) PLD 催化

的转磷脂酰化反应对合成磷脂酰丝氨酸(PS)具有较高转化率和选择性。这些研究提示微生物来源的 PLD(特别是不动杆菌 PLD)可能具有更好的稀有磷脂合成潜力,但与 PLD 超家族大量的序列信息相比,酶学性质信息的极度缺乏严重阻碍了对 PLD 酶结构-功能关系的深入了解及该酶的进一步应用。若能扩大 PLD 的来源,挖掘具有相对更高催化活性和纯化步骤简单的微生物来源 PLD,可助力解决功能食品开发对高品质磷脂的迫切需求,推动我国食品产业的发展。

本研究从 NCBI 数据库中挖掘了一个来源于 *Acinetobacter* sp. DUT-2 的 PLD(ADPLD)。依据大肠杆菌的密码子偏好性设计编码 ADPLD 的基因序列,构建 ADPLD 的大肠杆菌表达载体,并导入大肠杆菌 SHuffle T7 中进行异源表达;利用 Ni 亲和层析分离纯化 ADPLD 蛋白,采用分子模拟和分子对接方法研究 ADPLD 底物识别的分子基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大肠杆菌 SHuffle T7 感受态细胞 购自上海唯地生物技术有限公司; pET-28a 载体质粒 购自 Invitrogen 公司; ADPLD 成熟肽基因、PCR 引物 由生工生物工程(上海)有限公司合成; T4 DNA 连接酶 (350 U/μL)、限制性内切酶(EcoR I, Not I) (1 μg λ DNA/μL)、高保真 PCR 聚合酶(5 sec/kb)、琼脂糖、dNTPs 均购自 TaKaRa 生物技术(北京)有限公司; 辣根过氧化物酶 (300 U/mg)、蛋白中分子量范围 Marker、质粒 DNA 抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、BCA 蛋白质定量检测试剂盒 均购自生工生物工程(上海)有限公司; 卡那霉素(Kanamycin)、三羟甲基甲烷(Tris)、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、甘氨酸(Gly)、酵母提取物、蛋白胍 均购自 Sigma-Aldrich 公司; 大豆 PC(纯度 95%) 购自 Avanti Polar Lipids 公司; 胆碱酶(4 U/mg) 由华南理工大学工业酶与生物脂质实验室制备与保存^[17]。

CB 800 V 超净工作台 苏洁医疗器械苏州有限公司; K-300 蛋白电泳仪 北京科创锐新生物科技有限公司; ETC811 PCR 仪 苏州东胜兴业科学仪器有限公司; JS-780 全自动凝胶成像仪 上海培清科技有限公司; QuickSpeed 4000 小型高速离心机 莫纳生物科技有限公司; LDZF-50KB 灭菌锅 上海申安医疗器械厂; ZS-N 生化培养箱 浙江华盛源仪器有限公司; BSA224S 分析天平 赛多利斯科学仪器有限公司; PHS-3C pH 计 上海仪电科学仪器股份有限公司; JY96-IIN 超声破碎仪 上海沪析仪器有限公司; H4-20KR 高速冷冻离心机 湖南可成仪器设备有限公司; SPARK 多功能酶标仪 Infinite MNANO TECAN 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 ADPLD 基因序列的生物信息学分析 从 NCBI 数据库中下载不动杆菌 *Acinetobacter* sp. DUT-2 PLD(ADPLD)的完整氨基酸序列(GenBank: AMO39720.1)。采用 Signal-5.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析其信号肽序列。采用 ExPASy-PROSITE(<https://prosite.expasy.org/>)分析其活性位点。采用 ProtParam tool(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析 ADPLD 成熟肽氨基酸组成、分子量及等电点等理化性质^[18]。采用 Multalin 在线分析系统(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>)和 NCBI 中的 BLAST 工具将 ADPLD 的氨基酸序列与 NCBI 数据库中记录的且通过实验证明具有明确 PLD 活性的蛋白同源序列进行比对。基于泊松修正模型(Poisson correction)的邻接法(Neighbor joining method),采用 MEGA X 软件构建系统发育进化树。用自举检验(Bootstrap test)估算系统进化树各分支节点的置信度,累积共 1000 次循环^[19-21]。

1.2.2 ADPLD 基因的克隆 根据大肠杆菌密码子偏好性优化 ADPLD 的成熟肽基因序列。分别将限制性内切酶 EcoRI 和 NotI 酶切位点添加在优化后的基因序列上下游。ADPLD 成熟肽的基因序列由生工生物工程(上海)有限公司进行全基因合成,并插入到 pET-28a 载体中。用软件 Primer Premier 5.0 设计特异性引物进行 PCR 扩增,引物 ADPLD-F 的序列为: GAATTCATCTACCACACCGTGAAACC; 引物 ADPLD-R 的序列为: GCGGCCGCGAAGGTGCTCAG(下划线部分分别为 EcoRI 和 NotI 酶切位点)。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 55 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 1 min 30 s; 30 个循环; 最终 72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,使用 PCR 产物纯化试剂盒回收目的基因。

1.2.3 ADPLD 酶蛋白的发酵表达 将 pET-28a-ADPLD 重组质粒通过热激法转化至大肠杆菌 SHuffle T7 感受态细胞中,将菌液涂布于含有 50 μg/

mL 卡那霉素的肉膏蛋白胨(LB)固体平板上,在 37 °C 恒温培养箱中过夜培养。将菌落 PCR 验证过的阳性克隆子接种于含有 50 μg/mL 卡那霉素的 5 mL LB 液体培养基中,在 37 °C、200 r/min 条件下过夜培养,作为一级种子液。向含有 500 mL LB 液体培养基的 2 L 锥形瓶中接入 1% 的一级种子液扩大培养,在 37 °C、200 r/min 条件下培养至菌体 OD₆₀₀ 为 0.6,将摇床培养温度冷却至 16 °C,于超净台中将 500 μL 的 1 mol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)加入到该 2 L 锥形瓶中(终浓度为 1 mmol/L),然后在 16 °C、200 r/min 条件下继续诱导 12 h。通过冷冻离心机在 4 °C、4000 r/min 条件下离心 10 min 分离发酵液和菌体,收集菌体备用。

1.2.4 ADPLD 酶蛋白的纯化 称取适量菌体加入到菌体湿重 10 倍质量的 Ni 柱(Ni-NTA 琼脂糖纯化树脂)纯化缓冲液 A(20 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L 咪唑, 100 mmol/L NaCl, pH8.0)中,充分搅拌混匀。在功率 70%,破碎 2 s,停止 2 s 条件下超声破碎 20 min。超声破碎后 12000 r/min 条件下离心 20 min 获得 ADPLD 粗酶液。用 Ni 柱纯化缓冲液 A 平衡 Ni 柱,然后将经 0.45 μm 滤膜过滤的粗酶液以 3 mL/min 流速缓慢加样到 Ni 柱中,多次穿过,收集穿过液。待上样结束后,用 5 倍柱体积的 Ni 柱纯化缓冲液 A 冲洗平衡 Ni 柱,接着用不同咪唑浓度的 Ni 柱缓冲液以 2 倍体积,5 mL/min 流速洗脱 Ni 柱,收集各咪唑浓度的洗脱液。测定各组分蛋白浓度,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)蛋白电泳检测目标蛋白。

1.2.5 PLD 水解活性测定 采用酶联比色法测定 PLD 的水解活性^[22]。反应体系为 100 μL Tris-HCl (100 mmol/L, pH8.0)缓冲液中包含 0.4 mmol/L 大豆 PC 或不同酰基链长的 PC 底物(C6~C18), 20 mmol/L CaCl₂ 和 10 μL 纯酶样品。在 40 °C 振荡孵育 10 min 后,沸水加热反应体系使酶蛋白变性失活,冷却至室温后,加入包含 50 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 42 mmol/L 苯酚, 50 mmol/L 4-氨基安替比林, 0.3 U 过氧化酶和 0.111 U 胆碱氧化酶的 50 μL Tris-HCl 缓冲液(1 mol/L, pH8.0)终止反应并显色。在 37 °C 孵育 60 min, 500 nm 处测定反应混合物的吸光度。对照实验采用 10 μL 蒸馏水代替酶溶液,在同样条件下处理反应体系。用不同浓度的氯化胆碱标准溶液代替反应体系制作标准曲线。PLD 水解活性的定义为:以大豆 PC 为底物,每分钟催化底物水解产生 1 μmol 胆碱所需要的酶量为 1 个单位(U)的 PLD 水解活力。

1.2.6 分子模拟 使用 I-TASSER(<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>)在线系统对 ADPLD 进行建模^[23-25]。使用 PROCHECK^[26] 和 QMEAN^[27] 在线系统对预测的 ADPLD 三维模型进行验证和质量评估。利用 AutoDock tools 软件建立小分子配体和 ADPLD 蛋

白的 pdbqt 文件^[28]。利用 AutoDock tools 软件构建 ADPLD 与底物的复合结构。选择评分最高的 ADPLD 与底物的复合结构作为构象,进行后续分析。使用 Packmol 软件创建 PC 单层膜模型^[29]。采用 GROMACS(Groningen machine for molecular dynamics simulations)和 Charmm36 力场进行膜蛋白分子动力学模拟^[30]。使用 Protein-Ligand Interaction Profiler(<https://plip-tool.biotech.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>)在线系统、PyMOL 和 LigPlus 软件对 ADPLD 与底物的复合结构间的相互作用可视化^[31-34]。

1.3 数据处理

采用 SPSS 软件进行 ANOVA 统计分析,结果以平均值±标准差表示,采用 Origin 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 ADPLD 编码氨基酸序列的比对分析

比较了目前已经被实验证实具有活性的 PLD 酶蛋白的氨基酸序列。如图 1 所示,根据系统进化树分析,可以将鉴定结果分为两类,第一类 PLD 主要来源于链霉菌,显示出较高的氨基酸序列相似性,主要包括 *Streptomyces* sp. YU100(GenBank accession No. ABY71835.1),*S. antibioticus* (2ZE4-A),*S. racemochromogenes* (BAJ15265.1), *Streptomyces* sp. strain PMF (P84147), *S. septatus* (BAB69062.1), *S. mobaraensis* (EME96334.1) 和 *S. cinnamoneus* (BAA75216.1)。截至目前,除 *S. chromofuscus* 外,其他链霉菌来源的 PLD 都具有两个严格保守的 HKD 基序^[35]。另一类 PLD 主要来源于 *S. chromofuscus* (AAM77916.1), *B. licheniformis* (AAH13476.1), *E. coli* K12 (P23830.2),

B. cereus (AUI39259.1), *A. radioresistens* (AQD20577.1) 和 *Acinetobacter* sp. DUT-2 (AMO39720.1), 该类 PLD 与链霉菌来源 PLD 的序列相似度低(<70%)。此外,后者通过进一步序列分析发现 *B. licheniformis* 和 *S. chromofuscus* 来源的 PLD 均没有任何保守的 HKD 基序^[36],而 *B. cereus* 来源的 PLD 有一个 HKD 基序。*E. coli* K12 和 *A. radioresistens* 来源的 PLD 虽然都具有两个 HKD 基序,但与链霉菌 PLD 的序列相似性低,氨基酸组成差异大。值得注意的是,本研究中报道的 *Acinetobacter* sp. DUT-2 PLD 与 *A. radioresistens* (AQD20577.1) 的 PLD 虽均来源于不动杆菌,但 *Acinetobacter* sp. DUT-2 来源的 PLD 只有一个 HKD 基序。目前主流观点认为,PLD 超家族的两个 HKD 基序构成了 PLD 的活性位点。在反应过程中,一个 HKD 基序上的组氨酸亲核进攻底物磷脂的 P-O 键,形成磷脂酰组氨酸中间体,然后另一个 HKD 基序上的组氨酸提供一个氢原子,对进入的醇去质子化,活化的醇作为第二亲核体攻击磷脂酰组氨酸中间体从而产生新的磷脂产物。单一的 HKD 基序可能预示着 ADPLD 在底物识别和催化活性上具有区别于拥有两个 HKD 基序 PLD 的酶学特征^[37]。

2.2 ADPLD 蛋白序列的生物信息学分析

采用 SignalP 5.0 分析 ADPLD 全长基因的信号肽位置和切割位点。如图 2 所示,SP 值在第 1 位氨基酸到第 34 位氨基酸的剪切位点之前较高,而在该剪切位点之后明显降低。因此可以判定 ADPLD 的信号肽切割位点在第 34 位丙氨酸和第 35 位异亮氨酸之间(Ala₃₄-Ile₃₅)。MRIFQRIHQKINWSGRRYM AVLLCVVAIAYLASA 被预测为 ADPLD 的信号

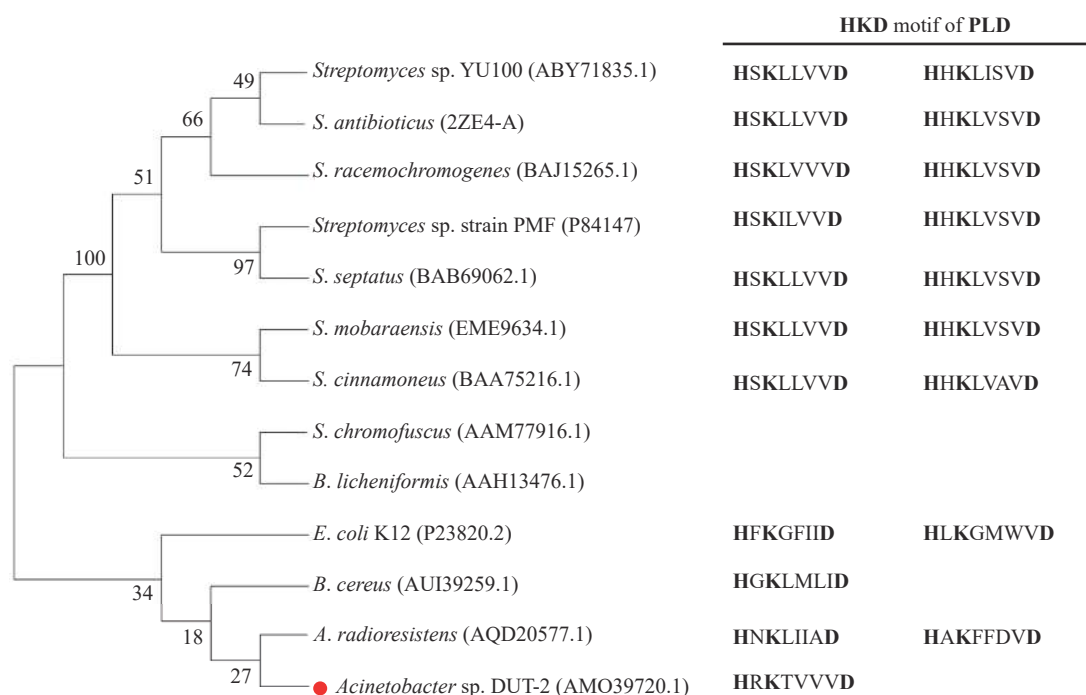


图 1 微生物 PLD 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig.1 Phylogenetic tree analysis of the already identified microbial PLDs amino acid sequences

肽。选用大肠杆菌作为表达宿主时应保留第 34 位丙氨酸之后的成熟肽序列。ExPASy ProtParam 分析表明,ADPLD 的成熟肽含有 453 个氨基酸残基,分子量为 51227.43 Da,蛋白不稳定系数(Instability index)为 30.63,推测蛋白质稳定性强。ADPLD 只有一个保守的 HKD 基序,分别位于 His188、Lys190 和 Asp195。ADPLD 的成熟肽属于疏水性蛋白质,总亲水性平均系数(GRAVY)为-0.368,带正电荷氨基酸残基(Arg, Lys)共有 54 个(占总氨基酸的 11.9%),带负电荷氨基酸残基(Asp, Glu)共有 49 个(占总氨基酸的 10.8%)。ADPLD 理论等电点为 8.79。

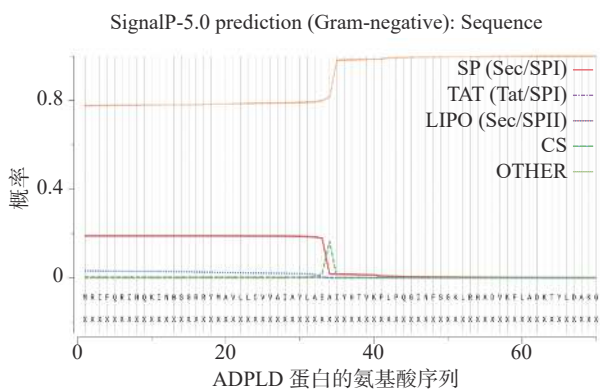


图 2 ADPLD 的信号肽预测分析
Fig.2 Signal peptide prediction of ADPLD

2.3 ADPLD 基因的克隆

生物信息学分析表明 ADPLD 成熟肽含有 453 个氨基酸,一个密码子由 3 个碱基组成,因此 ADPLD 对应的基因序列长度为 1359 bp。将 ADPLD 成熟肽编码的基因序列按照大肠杆菌密码子偏好性优化后,交由上海生工生物公司合成。ADPLD 基因序列经过 PCR 扩增,酶切后与 pET-28a 载体连接。利用 ADPLD 基因上下游引物进行 PCR 反应,PCR 产物的凝胶电泳结果如图 3 所示,从 *Acinetobacter* sp. DUT-2 中克隆得到的 ADPLD 成熟肽基因条带大小约为 1300 bp,所示结果与 ADPLD 基因长度 1359 bp 基本一致。

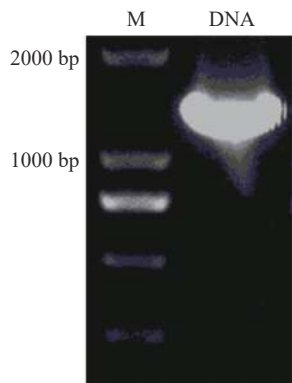


图 3 PCR 克隆 ADPLD 基因的凝胶电泳结果
Fig.3 Gel electrophoresis result of ADPLD gene cloned by PCR
注: M, DL 2000 Marker; DNA, ADPLD 基因。

2.4 ADPLD 酶蛋白的纯化与底物选择性分析

使用表达载体 pET-28a 和大肠杆菌 Shuffle T7 菌株能够成功获得 ADPLD 的可溶性蛋白。仅使用 50 mmol/L 咪唑浓度通过 Ni²⁺亲和和层析便能纯化出较为均一的蛋白(图 4)。以大豆 PC 为天然底物时测定的 ADPLD 比活性约为 4.09 U/mg。磷脂分子由一个极性的亲水头基和两个疏水的酰基链组成,亲水头基的类型和酰基链的长度影响磷脂分子的物理化学性质。目前研究集中在通过 PLD 介导的转磷脂酰化反应催化 PC 头部基团的转换来合成稀有磷脂,然而针对酰基链组成在 PLD 催化识别磷脂中的作用研究甚少。虽然 PLD 的催化位点是保守的,但几何形状高度可变的底物结合口袋为不同酰基链长的磷脂分子提供了弹性环境^[38]。研究 ADPLD 对具有不同酰基链长 PC 底物的活性水平有利于提高对 ADPLD 催化的合成反应质量的认识。如图 5 所示,ADPLD 对中和短链 PC(C6~C14)的活性相对较高,

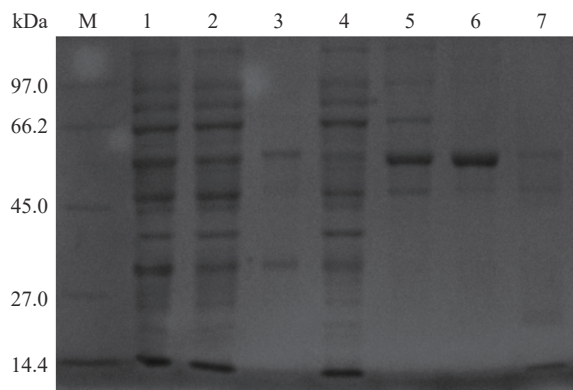


图 4 重组 ADPLD 表达与纯化电泳图

Fig.4 Electrophoresis of expression and purification of recombinant ADPLD

注: M, 中分子量蛋白 Marker; 泳道 1, 细胞总裂解液; 泳道 2, 裂解上清液; 泳道 3, 菌体沉淀; 泳道 4, 穿过液; 泳道 5, Ni²⁺亲和和层析中 20 mmol/L 咪唑洗脱样品; 泳道 6, Ni²⁺亲和和层析中 50 mmol/L 咪唑洗脱样品; 泳道 7, Ni²⁺亲和和层析中 100 mmol/L 咪唑洗脱样品。

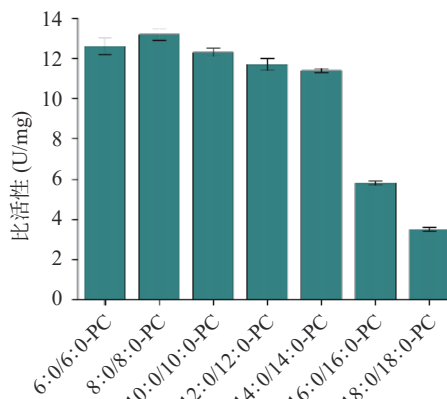


图 5 纯化后的重组酶 ADPLD 对不同酰基链长 PC 的水解活力

Fig.5 Hydrolysis activity of the purified recombinant enzyme ADPLD toward PCs with different acyl chain lengths

其中 ADPLD 对 8:0/8:0-PC 的比活性最大,约为 13.2 U/mg。当 PC 的酰基链长从 C14 增加至 C16 时,ADPLD 对 PC 的活性出现明显下降。与 ADPLD 对 8:0/8:0-PC 的比活性相比,ADPLD 对 16:0/16:0-PC 和 18:0/18:0-PC 的比活性分别下降了约 56.06% 和 73.48%。目前仅有链霉菌来源的 PLD 对磷脂底物的酰基链长特异性被报道,研究指出 *S. antibioticus* PLD 对 *sn*-2 位为中和长酰基链的 PC 具有较高的催化活性,而对 *sn*-2 位为短酰基链的 PC 底物特异性较低^[39]。综上所述,具有中和短酰基链的 PC 比长酰基链 PC 更适合作为 ADPLD 的底物,这一特性有利于在要求更宽底物范围的工业环境中对 PLD 介导的生物合成提供补充。

2.5 ADPLD 底物识别的分子基础

使用分子对接技术构建了 *Acinetobacter* sp. DUT-2 的 PLD 与配体(2R)-3-(phosphonoxy) propane-1,2-diyl diheptanoate(PDB ID: PD7)的复合物结构模型。图 6A 显示了 ADPLD 的三维模型结构,ADPLD 包含 13 个 α -Helix、15 个 β -Strand 和部分 Coil。此外,ADPLD 底物结合口袋的面积为 1174.44 \AA^2 ,空间体积为 1131.52 \AA^3 (图 6B)。

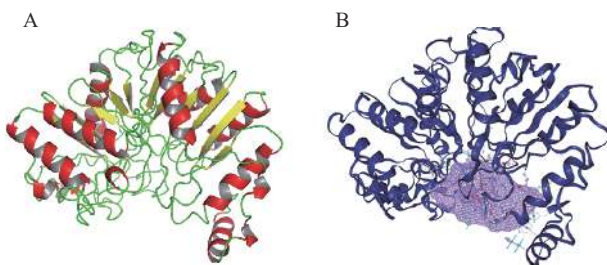


图 6 ADPLD 的三维结构模型

Fig.6 Three-dimensional (3D) structure model of ADPLD
注:红色结构为 Helix,黄色结构为 Strand,绿色部分为 Coil。ADPLD 底物结合口袋的体积形状显示为紫色网格。

PLD 是一种在脂水界面完成催化反应的界面酶,构建了 ADPLD 在脂水界面的分子动力学模拟体系。从图 7A 中可以看出,ADPLD 蛋白内氢键数目在 50 ns 模拟之后达到了平衡,约为 380 对氢键,对蛋白结构的稳定起主要作用。PLD 的底物结合口袋与磷脂的非极性酰基链之间主要以疏水作用相结合^[40]。平衡后,蛋白与周围磷脂分子间氢键数目约为 12 对(图 7B),远小于蛋白内部氢键,推测 ADPLD 与磷脂分子间主要是疏水相互作用。因此进一步研究了当 PC 分子进入 ADPLD 底物结合口袋后受体与配体之间的相互作用(图 8)。氢键和范德华作为分子间作用力有助于 PC 与 ADPLD 底物结合口袋紧密且稳定的结合。PLIP 分析结果显示残基 Thr205、Pro209、Phe293、Ala324、Lys329 和 Phe453 能够分别与 PC 形成疏水相互作用。Arg383 和 Gly326 能够与 PC 形成氢键,其中 Arg383(N)、Gly326(N)与 PC(P)之间的距离 $<3 \text{\AA}$ 。这些结果表明,ADPLD 能够与磷脂分子形成一个稳定的酶与底

物的中间体。

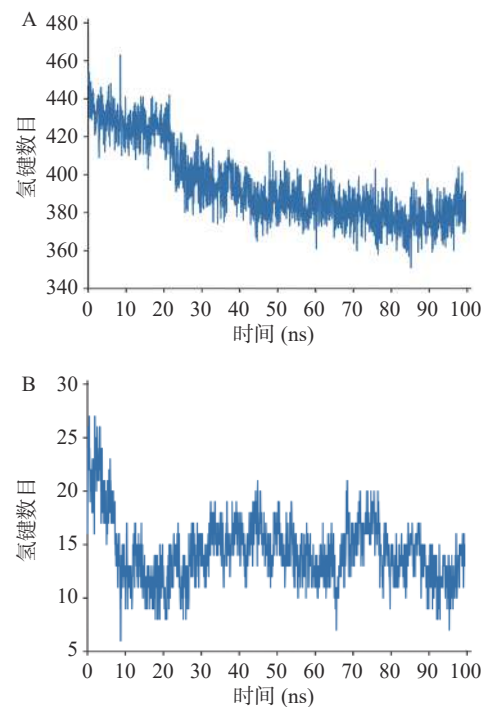


图 7 膜蛋白系统中 ADPLD 在 100 ns 分子动力学模拟中的氢键数量

Fig.7 Number of hydrogen bonds in 100 ns molecular dynamics simulation of ADPLD in membrane protein system
注:A.蛋白内的氢键数量变化;B.蛋白与 PC 单层膜间的氢键数量变化。

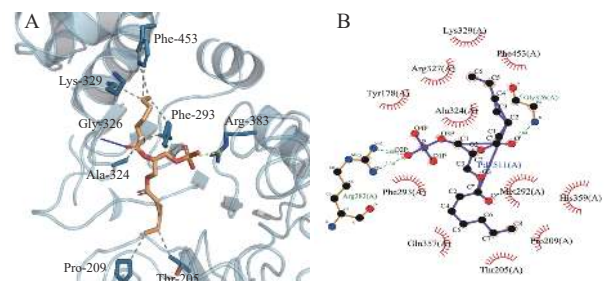


图 8 (2R)-3-(phosphonoxy) propane-1,2-diyl diheptanoate(PDB ID:PD7)配体与 ADPLD 的分子对接结果

Fig.8 Molecular docking results of (2R)-3-(phosphonoxy) propane-1,2-diyl diheptanoate ligand model (PDB ID:PD7) into the substrate-binding pocket of ADPLD
注:PC 分子与 ADPLD 底物结合口袋的关键残基相互作用。在 3D 模型中,ADPLD 底物结合口袋中与 PC 底物形成氢键和疏水相互作用的氨基酸显示为棒状结构,疏水相互作用展示为灰色虚线,氢键展示为蓝色实线。在 2D 模型中,氢键和疏水作用分别展示为绿色虚线和红色虚线。

3 结论

本研究从 NCBI 数据库中挖掘了一个来源于 *Acinetobacter* sp. DUT-2 的 PLD(ADPLD),依据大肠杆菌的密码子偏好性设计编码 ADPLD 的基因序列,构建大肠杆菌表达载体并在大肠杆菌表达系统中进行异源表达,分离纯化重组蛋白。研究发现 ADPLD 的分子量约为 51 kDa,且只有一个 HKD 基序,这表

明 ADPLD 的催化机制可能与传统认知中需要两个 HKD 基序完成 PLD 催化过程的反应机制有所不同。当 ADPLD 以大豆 PC 为底物时的比活性为 4.09 U/mg。ADPLD 对中和短链 PC(C6~C14) 的活性相对较高, 当 PC 的酰基链长从 C14 增加至 C16 时, ADPLD 对 PC 的活性出现明显下降。分子模拟结果推测 ADPLD 与周围磷脂间主要是疏水相互作用。分子对接结果表明 ADPLD 能够与磷脂分子形成一个稳定的酶与底物的中间体。本研究不仅提供了一个高催化活性的微生物来源 PLD, 而且为理解 ADPLD 的结构功能关系提供了重要信息。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] CERMINATI S, PAOLETTI L, AGUIRRE A, et al. Industrial uses of phospholipases: current state and future applications[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2019, 103(6): 2571–2582.
- [2] 袁雪丹, 王溪, 毛宗福, 等. 健康中国战略下国民健康与经济增长的联动关系研究-基于人力, 技术和产业视角[J]. *华东经济管理*, 2022, 36(5): 89–95. [YUAN X D, WANG X, MAO Z F, et al. Research on the linkage between national health and economic growth under the healthy China strategy: From the perspective of human capital, technology, and industry[J]. *East China Economic Management*, 2022, 36(5): 89–95.]
- [3] ALI A H, ZOU X Q, ABED S M, et al. Natural phospholipids: Occurrence, biosynthesis, separation, identification, and beneficial health aspects[J]. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 2019, 59(2): 253–275.
- [4] 刘琦, 张海洋, 李雪晗, 等. 产磷脂酶 D 工程菌构建及发酵条件优化[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(11): 26–34. [LIU Q, ZHANG H Y, LI X H, et al. Engineering phospholipase D-producing strains of *Bacillus subtilis* and optimization of fermentation conditions[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(11): 26–34.]
- [5] 周彦峰, 张涛, 江波, 等. 磷脂酰丝氨酸的酶法制备与分离研究进展[J]. *中国油脂*, 2018, 43(10): 53–57. [ZHOU Y F, ZHANG T, JIANG B, et al. Advance in enzymatic preparation and separation of phosphatidylserine[J]. *China Oils and Fats*, 2018, 43(10): 53–57.]
- [6] SHIGEYUKI I, YOSHIFUMI H. Purification of *Streptomyces chromofuscus* phospholipase D by hydrophobic affinity chromatography on palmitoyl cellulose[J]. *The Journal of Biochemistry*, 1979, 85(1): 79–95.
- [7] ZHOU W B, GONG J S, HOU H J, et al. Mining of a phospholipase D and its application in enzymatic preparation of phosphatidylserine[J]. *Bioengineered*, 2018, 9(1): 80–89.
- [8] CHOOJIT S, BORNSCHEUER U T, UPAICHIT A, et al. Efficient phosphatidylserine synthesis by a phospholipase D from *Streptomyces* sp. SC734 isolated from soil-contaminated palm oil[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2016, 118(5): 803–813.
- [9] ZHAO Y, XU Y F, YU F, et al. Identification of a novel phospholipase D gene and effects of carbon sources on its expression in *Bacillus cereus* ZY12[J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 56(4): 264–271.
- [10] ZHANG Y N, LU F P, CHEN G Q, et al. Expression, purification, and characterization of phosphatidylserine synthase from *Escherichia coli* K12 in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(1): 122–126.
- [11] MAO X Z, LIU Q Q, QIU Y Q, et al. Identification of a novel phospholipase D with high transphosphatidylase activity and its application in synthesis of phosphatidylserine and DHA-phosphatidylserine[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 249: 51–58.
- [12] HU F, WANG H, DUAN Z Q, et al. A novel phospholipase D constitutively secreted by *Ochrobactrum* sp. ASAG-PL1 capable of enzymatic synthesis of phosphatidylserine[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(8): 1317–1321.
- [13] WILDERMAN P J, VASIL A I, JOHNSON Z, et al. Genetic and biochemical analyses of a eukaryotic-like phospholipase D of *Pseudomonas aeruginosa* suggest horizontal acquisition and a role for persistence in a chronic pulmonary infection model[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 39(2): 291–303.
- [14] PROCYK K J, KOVARIK P, GABAIN A V, et al. *Salmonella typhimurium* and lipopolysaccharide stimulate extracellularly regulated kinase activation in macrophages by a mechanism involving phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase D as novel intermediates[J]. *Infection & Immunity*, 1999, 67(3): 1011–1017.
- [15] HODGSON A L, BIRD P, NISBET I T. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(3): 1256–1261.
- [16] ZHANG Z, CHEN M, XU W, et al. Microbial phospholipase D: Identification, modification and application[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 96: 145–156.
- [17] HU R K, CUI R G, TANG Q Y, et al. Enhancement of phospholipid binding and catalytic efficiency of *Streptomyces klenkii* phospholipase D by increasing hydrophobicity of the active site loop[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(37): 11110–11120.
- [18] WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIROCH A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExpASY server[J]. *Methods Molecular Biology*, 1999, 112: 531–552.
- [19] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology Evolution*, 1987, 4(4): 406–425.
- [20] SUDHIR K, GLEN S, MICHAEL L, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547–1549.
- [21] DIMITROV R A, GOULIAMOVA D E. Biological sequence comparison, molecular evolution and phylogenetics[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2012, 26(1): 209–217.
- [22] HU R K, CUI R G, LAN D M, et al. Acyl chain specificity of marine *Streptomyces klenkii* phospholipase D and its application in enzymatic preparation of phosphatidylserine[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19): 10580.
- [23] ZHENG W, ZHANG C X, LI Y, et al. Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations[J]. *Cell Reports Methods*, 2021, 1(3): 100014.
- [24] ZHANG C, FREDDOLINO P L, ZHANG Y. COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, se-

- quence and protein-protein interaction information[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W291–W299.
- [25] YANG J, ZHANG Y. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(W1): W174–W181.
- [26] LASKOWSKI R A, MACARTHUR M W, MOSS D S, et al. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures[J]. *Journal of Applied Crystallography*, 1993, 26 (Part 2): 283–291.
- [27] BENKERT P, BIASINI M, SCHWEDE T, et al. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models[J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2011, 27(3): 343–350.
- [28] BERMAN H M, WESTBROOK J, FENG Z, et al. The protein data bank[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 235–242.
- [29] MARTÍNEZ L, ANDRADE R, BIRGIN E G, et al. PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2009, 30(13): 2157–2164.
- [30] VANOMMESLAEGHE K, HATCHER E, ACHARYA C, et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2010, 31(4): 671–690.
- [31] DELANO W L. The pymol molecular graphics system[J]. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 2002, 30: 442–454.
- [32] LASKOWSKI R A, SWINDELLS M B. LigPlot⁺: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2011, 51(10): 2778–2786.
- [33] VOLKAMER A, GRIEWEL A, GROMBACHER T, et al. Analyzing the topology of active sites: On the prediction of pockets and subpockets[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2010, 50(11): 2041–2052.
- [34] VOLKAMER A, KUHN D, GROMBACHER T, et al. Combining global and local measures for structure-based druggability predictions[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012, 52(2): 360–372.
- [35] UESUGI Y, HATANAKA T. Phospholipase D mechanism using *Streptomyces* PLD[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2009, 1791(9): 962–969.
- [36] YANG H Y, ROBERTS M F. Cloning, overexpression, and characterization of a bacterial Ca²⁺-dependent phospholipase D[J]. *Protein Science*, 2002, 11(12): 2958–2968.
- [37] BHUSHAN A, MCNAMEE M G. Correlation of phospholipid structure with functional effects on the nicotinic acetylcholine receptor. A modulatory role for phosphatidic acid[J]. *Biophysical Journal*, 1993, 64(3): 716–723.
- [38] PLEISS J, FISCHER M, SCHMID R D. Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site[J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1998, 93(1-2): 67–80.
- [39] DAMNJANOVIĆ J, NAKANO H, IWASAKI Y. Acyl chain that matters: Introducing sn-2 acyl chain preference to a phospholipase D by protein engineering[J]. *Protein Engineering Design and Selection*, 2019, 32(1): 1–11.
- [40] HU R K, WU L X, CHENG Q P, et al. Structural variations and phospholipid binding characteristics of *Streptomyces klenkii* phospholipase D at the lipid-water interface[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2023, 179: 114672.