

毛竹脱氧辛糖酸-8-磷酸合酶的原核表达、纯化及酶的特性

朱丰晓, 张凤雪, 张智俊, 吴林军

浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 临安 311300

朱丰晓, 张凤雪, 张智俊, 等. 毛竹脱氧辛糖酸-8-磷酸合酶的原核表达、纯化及酶的特性. 生物工程学报, 2017, 33(12): 1989–1998.

Zhu FX, Zhang FX, Zhang ZJ, et al. Expression, purification and characterization of 3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase from *Phyllostachys edulis*. Chin J Biotech, 2017, 33(12): 1989–1998.

摘要: 脱氧辛糖酸-8-磷酸合酶 (3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase, KDO8PS) 是一种参与细胞壁八碳糖 (KDO) 合成代谢的关键酶之一。为了解该酶催化特性和功能, 本实验采用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 方法首次分离得到毛竹 *PeKDO8PS* 基因。序列分析表明该基因 CDS 区全长 876 bp, 编码 291 个氨基酸。通过 IPTG 诱导, 含有该基因的原核表达载体在大肠杆菌中获得了大量可溶性活性蛋白表达; 经 Ni-NTA 亲和层析和分子筛层析 (SEC) 方法进行酶蛋白的两步分离纯化, 得到纯度大于 90% 以上的高纯度酶; SEC 结果发现, 纯化后目的蛋白 KDO8PS 在溶液中主要以二聚体形式存在。戊二醛交联实验证实该酶具有形成二聚体/四聚体的可能性, 进一步通过超速离心 (AUC) 分析, 发现水溶液中 KDO8PS 在高浓度时二聚体会聚合转化形成四聚体。推测形成二聚体/四聚体可能是保持酶稳定性的一种机制。通过测定毛竹 KDO8PS 酶学性质, 发现该酶催化反应的 pH 值范围在 4.0–9.0, 最适 pH 值为 8.0; 热稳定性范围 25–65 °C, 最适作用温度为 55 °C; 各种二价金属阳离子在低浓度下均对酶活性存在不同程度的抑制作用, 其中以 Fe^{3+} 对酶活性的抑制作用最强, 而低浓度 EDTA 可通过螯合作用消除金属离子的抑制作用。以上研究结果为植物 KDO8PS 蛋白结构与功能及其在新型抗生素领域中的工业化应用提供了重要理论基础。

关键词: 毛竹, 脱氧辛糖酸-8-磷酸合酶, 原核表达, 纯化, 酶学性质

Received: March 4, 2017; **Accepted:** June 19, 2017

Supported by: Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. LY14C160009), National Natural Science Foundation of China (No. 31770721).

Corresponding author: Zhijun Zhang. Tel: +86-571-63741297; E-mail: 397942805@qq.com

浙江省自然科学基金 (No. LY14C160009), 国家自然科学基金 (No. 31770721) 资助。

网络出版时间: 2017-06-26

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170626.1452.002.html>

Expression, purification and characterization of 3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase from *Phyllostachys edulis*

Fengxiao Zhu, Fengxue Zhang, Zhijun Zhang, and Linjun Wu

State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China

Abstract: 3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase (KDO8PS) is the key enzyme to synthesize eight-carbon sugar in plant and gram-negative bacterial cell wall. To analyze the polymerization and characterization in plant KDO8PS, the candidate gene was cloned from fresh *Phyllostachys edulis* seedling by RT-PCR. The open reading frame of *PeKDO8PS* is 876 bp deduced into 291 amino acid residues. The target protein was overexpressed in *Escherichia coli* induced by IPTG and then larger amount of fusion protein was purified through two-step methods with affinity chromatography and size-exclusion chromatography (SEC). SEC analysis shows that *PeKDO8PS* protein existed mainly in the form of dimer in solution. Glutaraldehyde cross-linking experiments confirmed that the enzyme could form dimers. Further we identified that KDO8PS at high concentration two dimers could form tetramer in aqueous solution by analytical ultracentrifuge (AUC) analysis. The pH of the catalytic reaction was between 4.0 and 9.0, the optimum pH value was 8, the thermal stability range was between 25 and 65 °C, and the optimum temperature was about 55 °C. The enzyme activity was inhibited by some metal ions at lower concentrations, especially in the presence of Fe^{3+} metal ion and activated by metal protease inhibitor EDTA at low concentration.

Keywords: *Phyllostachys edulis*, 3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase, heterologous expression, purification, enzyme properties

脱氧辛糖酸-8-磷酸合酶 (3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase, KDO8PS) [EC: 2.5.1.55] 是 2-酮基-3-脱氧-D-甘露辛酮糖酸 (CMP-KDO) 合成途径中的一种关键酶^[1], 其基因表达及酶活性高低直接影响到革兰氏阴性菌 G⁻细胞壁的合成, 对于植物细胞壁合成同样重要, 可对植物花粉管、芽的生长、伸长等有重要调控作用^[2]。

KDO8PS 属于醛缩酶超家族蛋白, 分布于革兰氏阴性菌 G⁻及植物细胞, 主要负责催化磷酸烯醇式丙酮酸与 α -阿拉伯糖-5-磷酸产生 2-酮-3-脱氧辛糖 8 磷酸 (KDO8P), 并释放无机磷酸 (Pi)。其中产物 2-酮-3-脱氧辛糖-8-磷酸是 2-酮-3-脱氧

辛糖酸 (KDO) 的前体^[3-5]。研究表明在已知众多致病革兰氏阴性菌中, Lipid A 是内毒素的物质基础, 其 O-抗原的多样性决定了 G⁻表面抗原决定簇的多样性, 这也是致病菌产生抗药性的物质基础之一^[6]。而 KDO 是脂多糖 (LPS) 组分中必需的八碳糖, 它连接类脂 A (Lipid A) 与 O-特异侧链共同嵌入细胞壁的外膜上^[7]。通常 Lipid A 与两个 KDO 残基组成的脂多糖 (LPS) 构成革兰氏阴性菌外膜的外壳, 这种外壳对革兰氏阴性菌细菌细胞膜的完整性及侵染至关重要。基于这种 G⁻细胞壁的构成特点, 如阻断 KDO 的生物合成, 能破坏 G⁻的细胞壁合成, 并避免致病菌产生耐药性。因此, 基于 G⁻细菌

KDOPS 开展相关抑制剂筛选,进而开发新的抗生素药物是目前 KDO8PS 的研究热点^[8]。同样,在植物细胞中,KDO8PS 所催化的终产物 KDO 主要是高等植物细胞壁以及一些绿色藻类植物细胞壁果胶多糖鼠李糖半乳糖醛酸聚糖 II (RG-II) 的重要组分^[9-10]。因此,了解植物 KDO8PS 的结构与功能,不仅有助于完善植物细胞壁生物合成的代谢途径,而且对于未来新型抗 G⁻菌农药的开发也具有重要应用价值。但植物 KDO8PS 相关研究尚处于起步阶段,阻碍了该酶的进一步应用。

截止到目前尚未有植物 KDO8PS 结构的报道,查询 PDB 数据库发现,植物中 KDO8PS 晶体结构还尚未解析^[11],但已有多个微生物来源的 KDO8PS 晶体结构被解析,从其晶体学结构可以看到该酶是一个同源四聚体,其中每个单体都含有(β/α)₈桶状折叠。依据结构的活性位点特性分析,单体中 PEP 与 A5P 被预测结合于 KDO8PS 的磷酸位点 13 Å 部分^[3,5-6,12-13]。微生物来源的 KDO8PS 酶依据催化是否需金属离子参与,分为金属依赖性和非金属依赖性 2 类,但其催化机制基本相同。KDO8PS 发生催化反应需 2 个底物,该酶与底物结合的顺序首先是 PEP 的靠近以及定向结合在酶的结合位点,释放产生 1 分子无机磷酸,并引起酶构象的改变形成一个过渡态结构,然后此过渡态结构再同 A5P 结合,完成催化最终产生 KDO8P^[14-17]。

植物来源的 KDO8PS 研究在拟南芥中首先获得突破,已成功分离鉴定出 2 个编码 KDO8PS 的旁系同源基因 *AtKDSA1* 和 *AtKDSA2*,经荧光定量分析,发现在成熟的花中,负责合成 KDO8PS 的 *AtKDSA2* 基因的表达量明显增高,推测其对花粉管的生长和伸长具有一定的作用^[2]。尽管酶

催化活性位点氨基酸保守,植物 KDO8PS 催化作用机制与微生物的类似,但不同来源的 KDO8PS 酶,一级结构序列间差异显著,会导致酶空间结构的变化,则相应的酶催化活性、热稳定性、催化反应 pH 等存在何种功能差异仍需深入研究。

本研究在毛竹 *KDO8PS* 基因克隆的基础上,着重进行 KDO8PS 的原核表达、蛋白纯化,溶液中酶的状态及酶学性质研究,研究结果不仅为后续植物来源 *KDO8PS* 基因功能及晶体学结构解析奠定了基础,而且对于今后植物八碳糖的生物合成及新型植物农药研发具有重要应用价值。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与试剂

大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5α 和 BL21(DE3)、原核表达载体 pET-HTT 均由本实验室保存;RNA 提取试剂/Trigol 购自北京鼎国生物公司;AMV 酶反转录试剂盒、*Bam*H I、*Eco*R I、T4 DNA 连接酶和 pMD18-T simple vector 购自 TaKaRa 公司;DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自上海生工公司。A5P 与 PEP 购自 Sigma (美国);其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 仪器与设备

高压蒸汽灭菌器 (SANYO MLS-3750)、PCR 仪 (Gene Amp[®] PCR System 9700)、离心机 (Himac CF 16RX versatile Compact Centrifuge)、PYX-DH350 恒温培养箱、GL-25M 高速冷冻离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司)、AKTA 纯化仪器、酶标仪、Beckman/Coulter XL-A 分析超速离心 (AUC) 仪。

1.2 方法

1.2.1 *PeKDO8PS* 基因克隆及序列分析

采用 Trigol 试剂盒提取毛竹新鲜实生苗的总 RNA, 所得 RNA 用 AMV 酶反转录试剂盒合成 cDNA 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存备用。

通过 NCBI 数据库获得双子叶植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana*、单子叶植物水稻 (*Oryza sativa*) KDSA 基因序列 (GenBank Accession No. NM_001035978.2, XM_015763128.1), 根据该基因的保守序列设计 PCR 引物。上游引物 A: 5'-CGGGATCCATGGATGCTTCGTCC-3' *Bam*H I 酶切位点, 下游引物 B: 5'-GGAATTCTCATTCTGGAATGGAGTGAGGT-3' *Eco*R I 酶切位点, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。以毛竹实生苗 cDNA 为模板, 采用 PCR 上游和下游引物配对进行扩增。PCR 反应体系为: $10\times$ 缓冲液 $2\text{ }\mu\text{L}$, 上游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, 反向引物 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, dNTPs (各 2.5 mmol/L) $1\text{ }\mu\text{L}$, cDNA ($0.05\text{ }\mu\text{g/L}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, *rTaq* 酶 ($5\text{ U}/\mu\text{L}$) $0.2\text{ }\mu\text{L}$, 加水至总体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s , 共 32 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min 。PCR 产物电泳分析后经 DNA 胶回收试剂盒回收, 将回收的 DNA 片段连接到 pMD18-T simple vector 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α 菌株, 经菌液 PCR 检测, 阳性克隆测序验证。

序列分析及引物设计使用 VectorNTI 软件完成。

1.2.2 *PeKDO8PS* 原核表达载体构建及诱导表达

将含有目的基因的 pMD18-T 载体质粒进行 *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性双酶切, 回收 876 bp 的目的 DNA 片段。插入经同样酶切后的

pET-HTT 表达载体, 得到一个 C-末端含有 6 个 His 亲和标签的重组子。将重组质粒经热击转化到大肠杆菌 RosettaTM(DE3) 和 BL21(DE3) 感受态细胞, 经菌液 PCR 鉴定阳性克隆, 并测序验证。挑取单克隆, 接入 LB 液体培养基 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养, 当菌体 OD_{600} 达到 0.5 时, 加入 0.4 mmol/L IPTG 诱导, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床上诱导 14 h , 收集菌体。超生裂解不同温度收集的菌体, SDS-PAGE 检测蛋白可溶表达情况。

1.2.3 *PeKDO8PS* 酶分离纯化

将菌体重悬在 25 mL PBS 裂解缓冲液 (含 30 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl), 加入 50% 甘油至终浓度 5%, 超生破碎 (on/off $8\text{ s}/8\text{ s}$, 总时间 15 min , 功率 40%) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $17\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 30 min , 将上清转移至预先平衡过的镍, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 结合 30 min 后, 用 Buffer A (30 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑) 洗杂蛋白, 1 倍体积 Buffer B (30 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑) 洗脱目的蛋白。将洗脱的目的蛋白溶液在 10 kDa 浓缩柱中浓缩后进行分子筛层析。分子筛使用 Superose 12 $10/300\text{ GL}$ 柱, 用 Buffer C (30 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl) 洗脱, 根据出峰的大小顺序, 在目标蛋白峰处每 $500\text{ }\mu\text{L}$ 收集一管, SDS-PAGE 检测每管的纯度, 将蛋白浓缩到 5 mg/mL , $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.4 *PeKDO8PS* 戊二醛交联检测

戊二醛与相邻的蛋白分子上的氨基反应, 而产生交联形成稳定的共价键。为了检测 *PeKDO8PS* 蛋白的体外同源互作, 本实验以 PBS 缓冲液 (pH 8.0) 作为交换溶液去除 KDO8PS 中的 Tris-HCl, 将 KDO8PS 稀释到 $500\text{ }\mu\text{g/mL}$, 同

时将戊二醛稀释到 2.4 mmol/L。KDO8PS 与戊二醛以 1:6 的摩尔比混合置于室温中,此混合液依据交联时间的不同分为交联 0、10、30、90 min 组,此反应由 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 终止,其中 Tris-HCl 的最终浓度为 500 mmol/L,终止时间为 10 min。分别取 20 μ L 样品加入 5 μ L 的 5 \times 蛋白上样缓冲液,煮沸 10 min 后点样 10% SDS-PAGE,分析蛋白交联情况。

1.2.5 *PeKDO8PS* 分析超速离心 AUC 检测

用 30 mmol/L Tris (pH 8.0), 200 mmol/L NaCl 混合液稀释目的蛋白光吸收 (OD_{260}) 至 0.4,选择 An60Ti 转子,置于 Beckman/Coulter XL-A 20 $^{\circ}$ C、50 000 r/min 离心 8 h,分析酶多聚类型。对沉降速度数据参照 C(S) 即沉降系数函数模型利用 Sedfit 拟合推算待测样品分子质量。

1.2.6 *PeKDO8PS* 主要酶学特性分析

取 50 μ L 含 3 mmol/L PEP, 3 mmol/L A5P 以及 100 mmol/L Tris/acetate 缓冲液,加入终浓度 100 nmol/L 的酶液。分别测定酶催化的最适反应温度及 pH。最适反应温度测定:将反应温度控制在 20–80 $^{\circ}$ C 范围内,每间隔 10 $^{\circ}$ C 下进行酶促反应 (pH 8.0),然后测定酶活,酶活测定方法参照比色测定法^[18](具体方法略)。最高酶活性设为 100%,用来计算相对酶活性的变化。最适 pH 测定:在 37 $^{\circ}$ C 条件下,pH 4.0–9.0 范围内每隔 0.5 测定酶活,每个样品设 3 个平行组,结果取平均值。以最高酶活力为 100%,计算相对酶活力。金属离子及酶抑制剂对酶活性的影响:分别取浓度为 100 mmol/L 的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Se^{2+} 、 Li^{+} 、 Na^{+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 等 11 种金属离子及金属蛋白酶抑制剂 EDTA 分别与酶液混合,使离子终浓度为 5 mmol/L,以

未经处理的酶液的酶活力为 100% 作对照,在最适反应条件下测定酶活。以上 3 组类型实验每个样品均为 3 次重复处理,利用 EXECL 绘制相关曲线及柱形图。

2 结果与分析

2.1 *PeKDO8PS* 基因克隆及序列分析

以毛竹总 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板,经 PCR 扩增后,扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶 (含 EB) 中电泳后,用凝胶成像分析系统分析在 900 bp 左右有 1 条亮带,与预测的基因片段大小相符。将此片段回收与 pMD18-T simple 连接后,经菌液 PCR 验证后的阳性菌落测序,结果表明插入片段为 876 bp,含有一个完整 ORF,编码 291 个氨基酸,氨基酸序列 Blast 分析发现毛竹 KDO8PS 属于脱氧辛糖酸-8-磷酸合酶超家族,其中与水稻、拟南芥、大肠杆菌 KODO8PS 序列的一致性分别达到 95%、84% 和 43%,第 260–270 位为脱氧辛糖酸-8-磷酸合酶保守区,等电点为 7.7,分子量为 32 kDa。

2.2 *PeKDO8PS* 重组蛋白的表达纯化

重组载体转化表达菌株 RosettaTM(DE3) 和 BL21(DE3) 感受态细胞,诱导表达后超声破碎,分别取上清、沉淀,加入上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C 变性后,SDS-PAGE 变性胶电泳分析,在电泳图谱 32 kDa 处发现一条明显的表达条带,并且对比分析发现表达菌株 RosettaTM(DE3) 较 BL21(DE3) 在 37 $^{\circ}$ C 培养温度下表达量相对高些,故在后续试验中确定表达菌株 RosettaTM(DE3) 在 37 $^{\circ}$ C 为重组蛋白诱导表达的最佳宿主菌株 (图 1)。SEC 洗脱峰在 66 kDa 位置出现明显的二聚体峰,132 kDa 处出现较弱四聚体峰。说明 KDO8PS 在

洗脱溶液 (30 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol/L NaCl) 中主要以二聚体形式存在 (图 2A)。经分子筛 (SEC) 层析纯化后纯度 90% 以上 (图 2B), 可用于后续酶特性实验分析。

2.3 *PeKDO8PS* 水溶液中多聚状态存在形式

2.3.1 戊二醛体外交联

戊二醛有 2 个醛基, 可以同蛋白分子上的氨基反应, 产生交联形成稳定的共价键, 产生不同多聚体状态。*PeKDO8PS* 经戊二醛交联, SDS-PAGE 检测后发现, 在 33、65、100 和 130 kDa 左右均发现条带, 依据单体分子量 (理论值 32 kDa) 推断, 交联后可形成二聚体、三聚体及四聚体蛋白 (图 3)。另外, 随着交联反应时间酶单体的量逐渐减少, 二聚体、三聚体、四聚体的量明显增加。说明戊二醛作用下, *PeKDO8PS* 存在的不同蛋白聚合体形式均有机会发生。

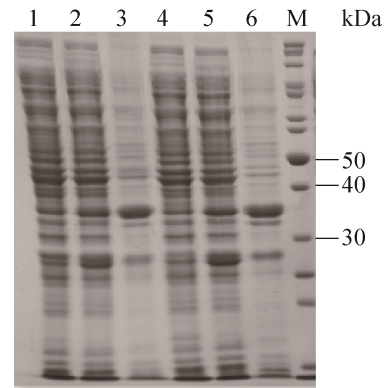


图 1 *PeKDO8PS* 分别在表达菌株 Rosetta™(DE3) 和 BL21(DE3) 中的表达

Fig. 1 Prokaryotic expression of *PeKDO8PS* in Rosetta™(DE3) and BL21(DE3) host cells. M: molecular mass standards (kDa); Lane 1, 2: CK, cell supernatant not induced by IPTG in Rosetta™(DE3) and BL21(DE3) cells respectively; Lane 3, 4: cell pellet/supernatant induced by IPTG at 37 °C in Rosetta™(DE3); Lane 5, 6: cell pellet/supernatant induced by IPTG at 37 °C in BL21(DE3) cells.

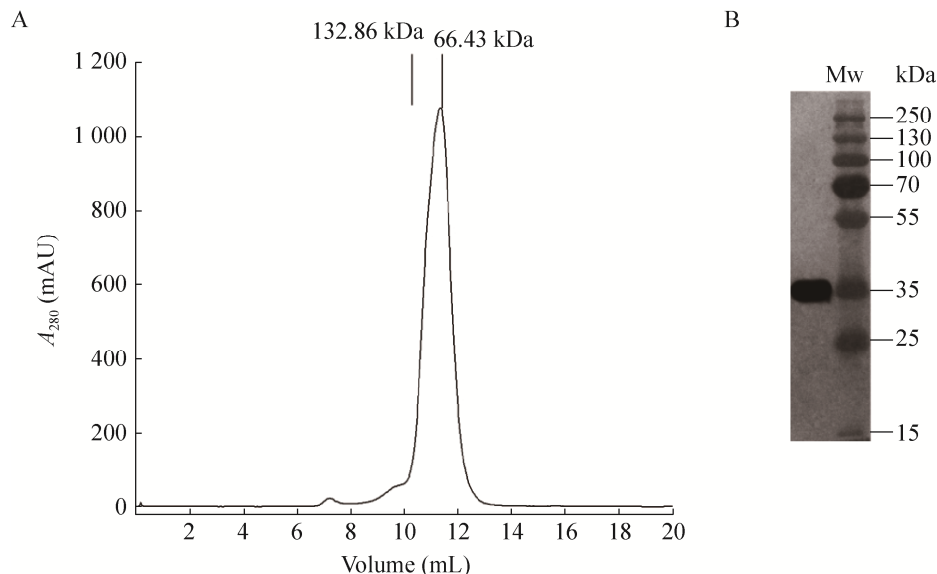


图 2 *PeKDO8PS* 分子筛层析 (A) 及 SDS-PAGE 检测 (B)

Fig. 2 The purification of *PeKDO8PS* by size exclusion chromatography (A) and identification by SDS-PAGE (B).

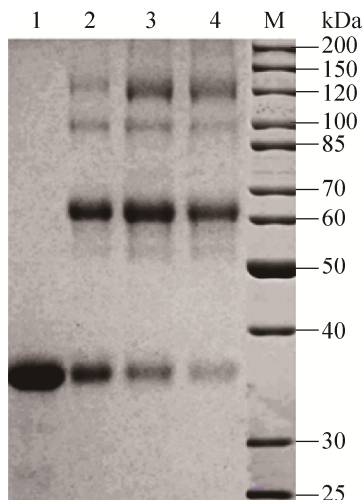


图3 *PeKDO8PS* 戊二醛交联检测

Fig. 3 The cross-linking of KDO8PS with glutaraldehyde. M: protein standard marker; Line 1: monomer; Line 2–4: glutaraldehyde cross-linking of KDO8PS with 10 min, 30 min and 90 min.

2.3.2 AUC 分析

AUC 分析超速离心技术主要用于生物大分子的相对分子质量测定,估算样品的纯度和检测生物大分子构象的变化等。根据 AUC 分析获得 *PeKDO8PS* 蛋白的沉降系数,通过 Sedfit 软件拟合后可知,在超高速离心力作用下,酶分子沉降过程中存在多种聚体形式,且不同蛋白聚合形式得以有效分离。从图 4 可知,6S 左右的沉降系数所对应的分子量大小在 120 kDa 左右,推断为 KDO8PS 的四聚体 (Tetramer, T),其余为少量二聚体 (Dimer, D) 和单体 (Monomer, M)。另外,6S 所占的比例最大,说明 *PeKDO8PS* 在溶液中主要以四聚体存在。

2.4 *PeKDO8PS* 酶学性质

酶活性测定结果表明该酶最适温度为 60 °C,在 25–65 °C 范围内酶活力较高,65–80 °C 酶活力急剧下降,而在 25 °C 时仍保持在 60% 以

上 (图 5);温度为 55 °C 时,测定该酶最适 pH 为 8.0,属于弱碱性酶。在 pH 6.0–8.0 范围酶活快速升高,pH 7.0–8.5 之间酶的活性稳定在 80% 以上 (图 6),超出这一范围,则酶活迅速下降。

各种金属阳离子及金属蛋白酶抑制剂 EDTA 对 KDO8PS 酶活影响结果显示 (图 7),各种金属离子对酶活性存在不同程度的抑制作用。其中以 Fe^{3+} 对酶活的抑制作用最强; Cu^{2+} 、 Se^{2+} 抑制作

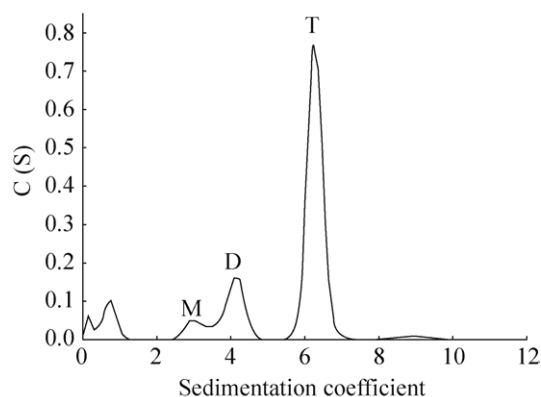


图4 *PeKDO8PS* 分析超速离心的沉降分布曲线

Fig. 4 The sedimentation distribution profile from the AUC experiment for *PeKDO8PS*. The sedimentation coefficient positions corresponding to the monomer (M), dimers (D) and tetramer (T) are indicated.

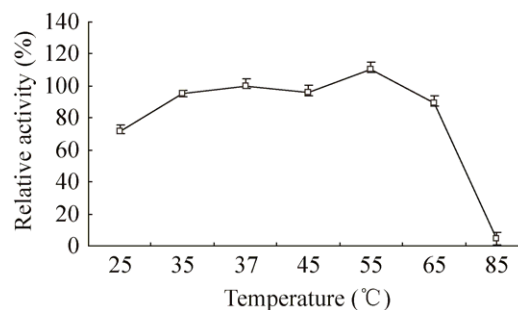


图5 温度对 KDO8PS 酶活性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on activities of *Phyllostachys edulis* KDO8PS. Error bars represent \bar{x} for three determinations.

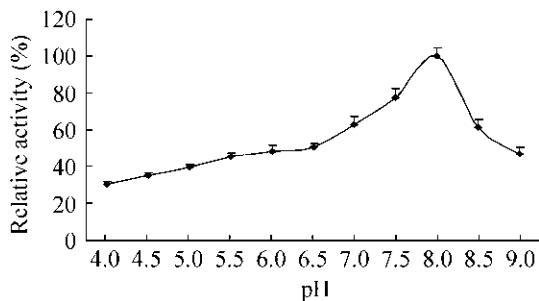


图6 pH对KDO8PS酶活性的影响

Fig. 6 Effect of pH on activities of *Phyllostachys edulis* KDO8PS. The maximum activity was taken as 100%. Error bars represent \bar{x} for three determinations.

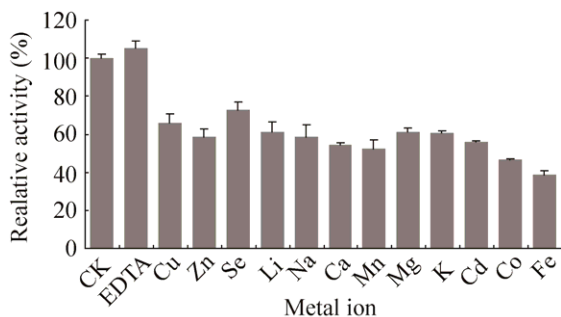


图7 金属阳离子及金属蛋白酶抑制剂EDTA对KDO8PS酶活影响

Fig. 7 Effect of different metal ions and EDTA on KDO8PS activity. Activity of KDO8PS as isolated was measured at 37 °C in the presence of various metal or EDTA (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 3 mmol/L PEP, 3 mmol/L A5P, 5 mmol/L metal or EDTA). Error bars represent \bar{x} for three determinations.

用较弱。而EDTA对酶活性有一定激活作用，分析认为EDTA是通过其螯合作用减弱了金属离子对酶活性的影响，从而对酶活性起到激活作用。

3 讨论

KDO8PS在KDO合成途径中是唯一的合成酶，可催化两种底物A5P和磷酸烯醇式酸PEP发生共价键结合形成八碳糖骨架，这为最终八碳糖的KDO产生奠定了关键的物质基础。其酶活

性的高低将直接影响植物细胞壁果胶类RG-II多糖的合成，最终影响细胞的生长发育相关的一系列代谢活动。KDO8PS催化反应途径与3-脱氧-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸合酶(DAH7P synthase)相似。3-脱氧-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸合酶(DAH7P synthase)可以催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)与赤藓糖-4-磷酸产生3-脱氧-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸，还发现这两种酶的底物结合位点也是相似的^[14,19]，说明KDO8PS与DAH7PS的起源采用相同的合成催化机理，但两者结构上的具体差异，还需进一步结构生物学方面的比较研究。

在*Pe*KDO8PS酶的分离纯化过程中，本研究通过两步法快速获得了该蛋白的纯酶液，纯度达90%以上。SEC结果显示，毛竹KDO8PS在30 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、200 mmol/L NaCl溶液条件下，主要以二聚体形式存在^[20]，而微生物KDO8PS晶体学结构显示为四聚体形式存在^[23]，初步认为这可能与它们之间的序列差异性有关。进一步分析超速离心(AUC)实验验证表明溶液中该酶主要为四聚体构象。相比较SEC结果而言，AUC分析蛋白质复合物寡聚物的结果更为精准。而两者出现分歧的原因可能是蛋白溶液中的浓度差异造成的，推测KDO8PS在高浓度的情况下易发生二聚体向四聚体的转变，这一推论在AUC峰图上也得到验证，即除了四聚体外，存在少量单体和二聚体。在添加戊二醛交联剂的情况下，出现了单体和不同类型的寡聚物，说明KDO8PS在溶液中出现不同的构象形式是完全可能的，也体现出KDO8PS分子同其他蛋白类似，水溶液中具有柔性。至于还有何种外界环境因素和内在结构影响酶构象的变化，还需进一步深入研究。

*Pe*KDO8PS 经酶学性质测定, 该蛋白的最适反应温度为 55 °C, 最适 pH 8.0, 与已报道的拟南芥酶特性类似, 但酶催化的温度及 pH 作用范围较大。大肠杆菌 KDO8PS 更宽泛^[21-22], 推测这与酶序列差异及结构复杂程度有关。通过多序列比对发现, KOO8PS 序列除在催化活性位点、GNR_xQ 模体和 KANRS 模体非常保守外, 毛竹、拟南芥 KOO8PS 同微生物来源的 KOO8PS 序列相似度只有 40% 左右^[23-24], 在 Loop 区差异较大。这些区域的序列实际差异, 除了可能影响酶聚合物状态外, 还会影响酶催化特性、稳定性等功能^[25], 并最终影响毛竹细胞壁的生物合成。当溶液中存在各种金属阳离子时均对酶活性有不同程度的抑制作用, 其中 Cu²⁺、Zn²⁺对酶活性的抑制作用较弱, 而 Fe³⁺对酶活性的抑制作用最强。这说明 KDO8PS 具有较差的三价金属离子耐受性。尽管目前尚未得到植物来源 KDO8PS 的晶体学结构, 但本文开展的酶分离纯化、酶特性相关研究结果可为今后该蛋白的空间结构与功能研究奠定基础, 同时也为八碳糖保健食品和植物新型农药的研发提供十分重要的参考。

REFERENCES

- [1] Smyth KM, Marchant A. Conservation of the 2-keto-3-deoxymanno-octulosonic acid (KDo) biosynthesis pathway between plants and bacteria. *Carbohydr Res*, 2013, 380: 70–75.
- [2] Wu J, Patel MA, Sundaram AK, et al. Functional and biochemical characterization of a recombinant *Arabidopsis thaliana* 3-deoxy-D-manno-octulasonate 8-phosphate synthase. *Biochem J*, 2004, 381(1): 185–193.
- [3] Kona F, Xu XJ, Martin P, et al. Structural and mechanistic changes along an engineered path from metallo to nonmetallo 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthases. *Biochemistry*, 2007, 46(15): 4532–4544.
- [4] Xu XJ, Kona F, Wang J, et al. The catalytic and conformational cycle of *Aquifex aeolicus* KDO8P synthase: role of the L7 loop. *Biochemistry*, 2005, 44(37): 12434–12444.
- [5] Vainer R, Belakhov V, Rabkin E, et al. Crystal structures of *Escherichia coli* KDO8P synthase complexes reveal the source of catalytic irreversibility. *J Mol Biol*, 2005, 351(3): 641–652.
- [6] Kabanov DS, Prokhorenko IR. Structural analysis of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 2010, 75(4): 383–404.
- [7] Allison TM, Cochrane FC, Jameson GB, et al. Examining the role of intersubunit contacts in catalysis by 3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase. *Biochemistry*, 2013, 52(27): 4676–4686.
- [8] Perumal D, Lim CS, Sakharkar MK. *In silico* identification of putative drug targets in *Pseudomonas aeruginosa* through metabolic pathway analysis//Proceedings of the 2nd IAPR International Conference on Pattern Recognition in Bioinformatics. Berlin, Heidelberg: Springer, 2007: 323–336.
- [9] Qu YP, Zhang ZJ, Wang CL, et al. Expression, purification and characterization of arabinose-5-phosphate isomerase from *Arabidopsis thaliana*. *Chin J Biotech*, 2016, 32(8): 1060–1069 (in Chinese). 屈亚平, 张智俊, 王超莉, 等. 拟南芥阿拉伯糖-5-磷酸异构酶的原核表达、纯化及酶催化特性. *生物工程学报*, 2016, 32(8): 1060–1069.
- [10] Qu YP, Zhang ZJ, Wang CL, et al. Gene cloning, expression, and purification of the arabinose-5-phosphate isomerase from *Phyllostachys edulis*. *J Zhejiang A&F Univ*, 2016, 33(6): 928–934 (in Chinese). 屈亚平, 张智俊, 王超莉, 等. 毛竹阿拉伯糖-5-磷酸异构酶的基因克隆、原核表达及纯化. *浙江农林大学学报*, 2016, 33(6): 928–934.
- [11] Zhang FX, Xu YW, Zhang ZJ. Heterologous

- expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of KDO8P synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Expr Purif*, 2014, 101: 133–137.
- [12] Nelson SK, Kelleher A, Robinson G, et al. Structure of 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonate-8-phosphate synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2013, 69(10): 1084–1088.
- [13] Li ZL, Sau AK. Structural studies on *Helicobacter pylori* 3-deoxy-D-manno-2-octulosonate-8-phosphate synthase using electrospray ionization mass spectrometry: a tetrameric complex composed of dimeric dimers. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(11): 1573–1578.
- [14] Ahn M, Pietersma AL, Schofield LR, et al. Mechanistic divergence of two closely related aldol-like enzyme-catalysed reactions. *Org Biomol Chem*, 2005, 3(22): 4046–4049.
- [15] Shumilin IA, Bauerle R, Wu J, et al. Crystal structure of the reaction complex of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Thermotoga maritima* refines the catalytic mechanism and indicates a new mechanism of allosteric regulation. *J Mol Biol*, 2004, 341(2): 455–466.
- [16] Li JJ, Wu J, Fleischhacker AS, et al. Conversion of *Aquifex aeolicus* 3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase, a metalloenzyme, into a nonmetalloenzyme. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(24): 7448–7449.
- [17] König V, Pfeil A, Braus GH, et al. Substrate and metal complexes of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Saccharomyces cerevisiae* provide new insights into the catalytic mechanism. *J Mol Biol*, 2004, 337(3): 675–690.
- [18] Shulami S, Yaniv O, Rabkin E, et al. Cloning, expression, and biochemical characterization of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonate-8-phosphate (KDO8P) synthase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex pyrophilus*. *Extremophiles*, 2003, 7(6): 471–481.
- [19] Sau AK, Li ZL, Anderson KS. Probing the role of metal ions in the catalysis of *Helicobacter pylori* 3-deoxy-D-manno-octulosonate-8-phosphate synthase using a transient kinetic analysis. *J Biol Chem*, 2004, 279(16): 15787–15794.
- [20] Zhang FX, Xu YW, Zhang ZJ, et al. Expression, purification and crystallization of KDO8PS from *Phyllostachys edulis*. *J Zhejiang A&F Univ*, 2014, 31(4): 515–520 (in Chinese).
张凤雪, 徐英武, 张智俊, 等. 毛竹 KDO8PS 的原核表达纯化及晶体生长. *浙江农林大学学报*, 2014, 31(4): 515–520.
- [21] Kona F, Tao P, Martin P, et al. Electronic structure of the metal center in the Cd²⁺, Zn²⁺, and Cu²⁺ substituted forms of KDO8P synthase: implications for catalysis. *Biochemistry*, 2009, 48(16): 3610–3630.
- [22] Tao P, Gatti DL, Schlegel HB. The energy landscape of 3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase. *Biochemistry*, 2009, 48(49): 11706–11714.
- [23] Cho S, Im H, Lee KY, et al. Identification of novel scaffolds for potential anti-*Helicobacter pylori* agents based on the crystal structure of *H. pylori* 3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase (HpKDO8PS). *Eur J Med Chem*, 2016, 108: 188–202.
- [24] Nelson SK, Kelleher A, Robinson G, et al. Structure of 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonate-8-phosphate synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2013, 69(10): 1084–1088.
- [25] Allison TM, Hutton RD, Jiao W, et al. An extended beta7alpha7 substrate-binding loop is essential for efficient catalysis by 3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase. *Biochemistry*, 2011, 50(43): 9318–9327.

(本文责编 陈宏宇)