

蜡状芽孢杆菌磷脂酶 D 的活性形式及 HKD 活性区域的分子改造对其活性的影响

徐银凤¹⁾, 赵雨^{1),2)}, 孙迪¹⁾, 张春枝^{1)*}

(¹⁾大连工业大学生物工程学院, 辽宁大连 116034; ²⁾齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江齐齐哈尔 161100)

摘要 磷脂酶 D 是一类特殊的酯键水解酶, 它能水解磷脂生成磷脂酸和羟基化合物, 并能催化某些含羟基的化合物结合到磷脂的酰基上, 形成新的磷脂, 在食品和医药领域应用潜力巨大。本研究实现了蜡状芽孢杆菌磷脂酶 D 的克隆, 并在大肠杆菌中成功表达。通常情况下, 磷脂酶 D 存在 2 个 HKD 保守序列, 以单体形式产生活性; 少数原核生物中磷脂酶 D 只有 1 个 HKD 保守序列, 以二聚体形式产生活性。通过酵母双杂实验发现, 源于蜡状芽孢杆菌的磷脂酶 D 活性存在形式是单体结构, 但其只具有 1 个 HKD 保守序列, 靠近 N 端存在 1 个 HRD 序列, 即 HKD 中 K 被 R 取代。将 HRD 定点突变为 HKD, 恢复为经典的 2 个 HKD 保守序列, 其酶活性提高了 10% 左右, 蛋白质水平的表达量和稳定性无显著变化。通过定点突变提高磷脂酶 D 活性, 为工业化高效生产新型磷脂奠定了理论基础。

关键词 磷脂酶 D; 定点突变; 酵母双杂交

中图分类号 Q812

The Active Form of Phospholipase D from *Bacillus cereus* and the Effect of Molecular Modification of HKD Active Region on its Activity

XU Yin-Feng¹⁾, ZHAO Yu^{1),2)}, SUN Di¹⁾, ZHANG Chun-Zhi^{1)*}

(¹⁾School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China;

²⁾School of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161100, Heilongjiang, China)

Abstract Phospholipase D, a special kind of ester hydrolase, can hydrolyze phospholipids to generate phosphatidic acid and hydroxyl compounds and catalyze the reaction that some hydroxyl containing compounds bind to phospholipid acyl to form new phospholipids. It shows great potential in food and medicine fields. In this study, the *Bacillus cereus* phospholipase D was cloned and successfully expressed in *Escherichia coli*. Typically, phospholipase D has two HKD conserved sequences and elicits activity in monomer. Few prokaryotic phospholipase D has only one conserved HKD sequence and produces activity in dimeric form. With yeast two-hybrid experiment, it was found that the active form of phospholipase D from *Bacillus cereus* was monomer and has only one HKD conserved sequence. In its N-terminal region, there was a sequence of HRD, in which K (lysine) was replaced by R (Arginine) in HKD. The HRD was then site-directed mutated to HKD to restore the classic two conserved HKD sequences. The results showed that enzyme activity of the mutant was increased by 10%, and its protein expression and stability in *E. coli* had no significant variation after mutation. The present study showed that the activity promotion of phospholipase D could be achieved by site-directed mutagenesis, which provided a possibility to

收稿日期: 2017-08-25; 修回日期: 2017-09-30; 接受日期: 2017-10-28

辽宁省教育厅基本科研业务项目(No. 2016J048)资助

* 通讯作者 Tel: 13942063250; E-mail: zhangcz@dlpu.edu.cn

Received: August 25, 2017; Revised: September 30, 2017; Accepted: October 28, 2017

Supported by Basic Research Project, Liaoning Provincial Department of Education(No. 2016J048)

* Corresponding author Tel: 13942063250; E-mail: zhangcz@dlpu.edu.cn

increase industrial production of new phospholipids.

Key words phospholipase D; site-directed mutagenesis; yeast two hybridization

磷脂酶 D(phospholipase D, PLD) 是一类酯键水解酶, 可催化发生两种反应: 其一, 水解磷脂生成磷脂酸和羟基化合物; 其二, 当有另一种含羟基的化合物存在时, 可催化其结合到磷脂的碱基上, 形成新的磷脂, 此为磷脂酶 D 的转磷酸化反应或碱基交换反应。由于磷脂酶 D 可催化制备自然界稀少的难以分离提纯的单体磷脂及磷脂衍生物, 在食品及医药行业的应用中发挥重要的作用。从最初植物磷脂酶 D 到微生物磷脂酶 D, 其制备及应用得到了重视和发展^[1]。相对于动植物来源的磷脂酶 D, 微生物磷脂酶 D 具有更强大的转磷酸能力和较广泛的底物专一性。从 20 世纪 70 年代起, 国外许多学者开始研究开发微生物磷脂酶 D, 至今已报道的产生磷脂酶 D 的微生物种类有链霉菌、棒状杆菌、大肠杆菌、假单胞菌和沙门氏杆菌等^[2]。

磷脂酶 D 普遍具有 2 个 HKD 活性区域, 氨基酸序列为 HX_1KX_4D , 其中 X 为任意氨基酸。这两个保守序列是酶活性中心, 任意氨基酸的改变都会影响磷脂酶 D 的生物活性。其中, 第一个保守序列中的组氨酸, 主要实现水解过程中质子的离去功能, 是酶保持活性的重要氨基酸。研究磷脂酶 D 活性区域保守序列, 通过定点突变方式进行分子改造^[3]。多数研究集中在定点突变保守序列 HKD 中的组氨酸, 检测酶活力降低情况^[4]。通过定点突变 HKD 活性区域中的氨基酸, 提高酶活性的做法鲜有报道。

本室前期研究, 从油厂土壤中筛选到一株产磷脂酶 D 的菌株, 该菌株为原核生物, 初步鉴定为芽孢杆菌属, 生理生化检测结果与蜡状芽孢杆菌最接近。以该菌株为出发菌株, 克隆获得磷脂酶 D 基因 (GenBank accession number: KY852313)。分析多个芽孢杆菌属磷脂酶 D 的氨基酸序列, 发现部分磷脂酶 D 只具有 1 个 HKD 活性区域。研究表明, 少数原核生物磷脂酶 D 含有 1 个保守序列, 通过形成二聚体使磷脂酶 D 具有活性^[5,6]。用该菌株扩增获得的磷脂酶 D 基因, 经过大肠杆菌异源表达后, 与已报道的链霉菌属中获得的磷脂酶 D 相比, 酶活力较低^[7,8]。本研究试图通过解析芽孢杆菌属磷脂酶 D 的活性形式对酶活性的影响, 及通过定点突变方式进行分子改造磷脂酶 D, 提高磷脂酶 D 酶活性。为深入研究磷脂酶 D 蛋白结构与功能关系提供有利的参考数据。

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒

大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (Lyss)、酵母菌 AH109, 质粒 pET30b、pGBK、pGAD、pGMT, 均由本室保藏。磷脂酶 D 大肠杆菌基因工程菌 BL21 (Lyss) 包含质粒 pET30b-PLD-1146-his、pET30b-PLD-1146、pET30b-PLD-1146-his-m、pET30b-PLD-1146-m, 酵母菌 AH109 包含质粒 pGAD-PLD-1212、pGAD-PLD-1146、pGBK-PLD-1212、pGBK-PLD-1146, 由本室构建。

1.2 培养基

LB 培养液 (10 g 蛋白胨, 5 g 酵母浸粉, 5 g 氯化钠, 溶于 1 L 水中, 调 pH7.0), YPD 培养液 (10 g 酵母浸粉, 20 g 蛋白胨, 20 g 葡萄糖, 溶于 1 L 水中, 调 pH6.5), SD/-Trp-Leu (6.7 g 酵母浸粉, 20 g 葡萄糖, 40 mg 腺嘌呤, 20 mg L-组氨酸, 溶于 1 L 水中, 调 pH6.5), SD/-Trp-Leu-His (6.7 g 酵母浸粉, 20 g 葡萄糖, 40 mg 腺嘌呤, 溶于 1 L 水中, 调 pH6.5)。

1.3 试剂和酶

Taq 酶、dNTPs、primer star 高保真聚合酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I、*Sal* I、*Hind* III 和 DNA 梯形标记均购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.4 酵母双杂交质粒构建

磷脂酶 D 基因完整序列 (PLD-1212) 及 N 端 66 个碱基缺失序列 (PLD-1146), 通过 PCR 引入 *Nde* I、*Xho* I 两个酶切位点 (本室前期工作)。*Nde* I、*Xho* I 酶切 PLD-1212、PLD-1146 载体 pGAD 质粒, 将酶切后的 2 个目的基因分别与载体 pGAD 连接。*Nde* I、*Sal* I (*Sal* I 与 *Xho* I 具有相同粘性末端) 酶切 pGBK 质粒, 将酶切后的 2 个目的基因分别与载体 pGBK 连接。构建质粒 pGAD-PLD-1212、pGBK-PLD-1212、pGAD-PLD-1146、pGBK-PLD-1146, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 将 PCR 鉴定正确的转化子进一步酶切鉴定并测序。

1.5 蛋白质互作检测

pGAD-PLD-1212、pGBK-PLD-1212 共转化 AH109 酵母感受态, pGAD-PLD-1146、pGBK-PLD-1146 共转化 AH109 酵母感受态, 酵母转化通过 LioAc 的方法进行^[9]。将转化细胞涂于 SD/-Trp-Leu

固体培养基,28 ℃ 培养 2 d,观察菌落生长情况。挑取 SD/-Trp-Leu 固体培养基上单菌落于 SD/-Trp-Leu 培养液中,150 r/min、28 ℃ 培养 48 h,取 1 mL 菌液离心,去上清,菌体涂布于 SD/-Trp-Leu-His 固体培养基,28 ℃ 培养 2 d,观察菌落生长情况。

1.6 基因序列定点突变

利用重叠延伸 PCR 对磷脂酶 D 基因进行定点突变^[10], (引物见 Table 1,突变碱基用下划线已注明)。PCR 反应程序为: 98 ℃ 2 min;98 ℃ 20 s,50 ℃ 40 s,72 ℃ 45 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,选择目的条带,切胶回收,连接 T 载体,4 ℃ 连接过夜并转化大肠杆菌 DH5α。将菌液均匀涂布在含有氨苄青霉素 (100

Table 1 Primers for the site-directed mutagenesis

Primers	Nucleotide sequence(5'-3')
<i>PLD-RMK-F</i>	CGTAACCACCGT <u>AAAA</u> TCACCACCATC
<i>PLD-RMK-R</i>	GATGGTGGTGAT <u>TTT</u> TACGGTGGTTACG
30b-PLD-1212-F	GCCATATGCACATCGACGTTACCCT
30b-PLD-1146-F	GCCATATGCACATCGACGTTACCCT
30b-PLD-his-R	GCCTCGAGTTACAGGTAGAAGTCGATCC
30b-PLD-R	GCCTCGAGTCACAGGTAGAAGTCGATCC

F: forward primers, R: reverse primers. Mutation bases are underlined

1.8 SDS-PAGE 及 Western 印迹分析

SDS-PAGE 采用 5% 浓缩胶、12% 分离胶,每孔上样总蛋白质为 200 μg,电泳过程中电流强度控制在 50 ~ 80 mA。SDS-PAGE 结束后,转移至硝酸纤维素 (NC) 膜;NC 膜经 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入 his 标签抗体 (抗体稀释 1: 1 000 倍) 孵育 NC 膜,置于 4 ℃ 过夜;次日复温 30 min。TBST 洗膜 3 次/10 min;加入二抗 (抗体稀释 1: 10 000 倍) 孵育,37 ℃ 恒温水平摇床反应 1 h。TBST 洗膜 3 次/10 min, ECL (A 液: B 液 = 1: 1) 显色,暗室中进行胶片曝光及冲洗^[11-13]。

1.9 磷脂酶 D 镍柱纯化

Ni²⁺-NTA 亲和层析柱预先以两倍柱体积的 PBS (pH7.0) 平衡。取 50 mL 诱导后工程菌菌液 (带有 his 标签),离心收集菌体,10 mL 超纯水重悬菌体,离心收集菌体,10 mL PBS (pH7.0) 缓冲液重悬菌体,300 W 超声波破碎 (工作时间 1 s,间歇时间 3 s,工作总时间 10 min)。将破碎的菌悬液离心,取上清液 2 mL 于 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱,4 ℃ 孵育 1 h,应用 AKTA 蛋白纯化仪,进行镍柱纯化线性洗脱,洗脱液含 20 mmol/L 磷酸盐,0.5 mol/L 氯化钠,0.5 mol/L 咪唑,pH7.4。SDS-PAGE 检测峰值时的蛋白质纯度,以截留分子质量 10 kD 的透析袋在 PBS

mg/mL) 的 LB 固体培养基上,37 ℃ 培养过夜,筛选阳性转化子,质粒 PCR、酶切鉴定正确后,送北京华大基因研究中心进行测序。

1.7 磷脂酶 D 诱导表达

大肠杆菌基因工程菌保存在 50% 甘油中,培养时按 1% 接种量接种于 LB 培养液,37 ℃、200 r/min 培养至 A₆₀₀ 达到 0.3。LB 培养液诱导方法为:在 LB 培养液中加入 IPTG,至终浓度为 0.2 mmol/L,16 ℃、150 r/min 诱导 20 h。LB 固体培养基诱导方法为:取 IPTG 16 μL (0.1 mol/L) 均匀涂布于 LB 固体培养基表面,吸取 20 μL 大肠杆菌基因工程菌液 (A₆₀₀ 为 0.3),点于涂有 IPTG 的 LB 固体培养基上,16 ℃ 培养 2 d,观察菌落生长情况。

(pH7.0) 缓冲液中透析该洗脱液,4 ℃ 过夜,去除咪唑。采用 Bradford 法检测蛋白质浓度^[14]。

1.10 磷脂酶 D 活力测定

酶联比色法:100 μL PC 乙醚 (称取卵磷脂 0.5 g,加乙醚 1 mL,制成 500 mg/mL 的溶液,加水定容至 10 mL,冰浴振荡形成乳液)、100 μL 酶液、100 μL 柠檬酸-柠檬酸钠 (0.1 mol/L, pH6.0)、50 μL 氯化钙 (0.1 mol/L)、150 μL Triton X-100 (7.5%)。37 ℃ 水浴摇床反应 10 min。沸水浴 3 min 终止酶反应,冷却至室温,加入 4 mL Tris-HCl (其中包含 4-氨基安替比林 2 mg、胆碱氧化酶 4 U、过氧化物酶 4 U、苯酚 1 mg 和 Triton X-100 20 mg),37 ℃ 水浴摇床反应 20 min,测量反应液在 500 nm 处测吸光值^[15]。

2 结果

2.1 蜡状芽孢杆菌磷脂酶 D 实现大肠杆菌异源表达

PLD-1212 能够在大肠杆菌中表达,但表达量较低。将 N 端前 22 个疏水性氨基酸 (N 端 66 个碱基) 整体删除 (PLD-1146),实现 PLD-1146 在大肠杆菌中大量表达 (Fig. 1)。相同蛋白质浓度下,与 PLD-1212 相比,PLD-1146 活力稍有下降;但在菌体

浓度相同时与 *PLD*-1212 相比, *PLD*-1146 表达量更高、且相对活力更强。在后续的研究中用 *PLD*-1146 进行。

LB 固体培养基中, 与未添加 IPTG 诱导的大肠杆菌基因工程菌相比, 经 IPTG 诱导的工程菌菌落有菌体自溶现象, 即箭头所指透明圈 (Fig. 2)。磷脂酶 D 能够水解细胞膜的主要成分磷脂, 造成细胞破裂, 导致菌体自溶, 证明磷脂酶 D 在大肠杆菌中表达并具有活性。

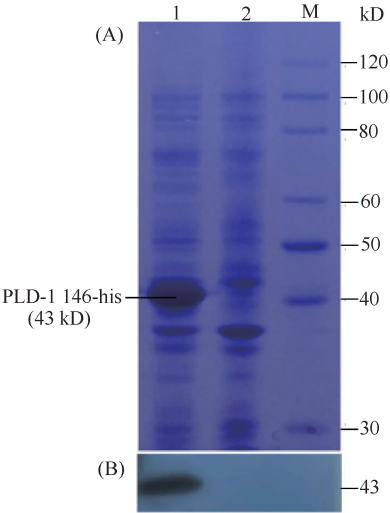


Fig. 1 Heterogenous expression of *PLD*-1146-his in *E. coli* (A) SDS-PAGE analysis of *PLD*-1146-his expressed in *E. coli*. 1: protein extracted from *E. coli* with overexpression of *PLD*-1146-his; 2: protein extracted from *Escherichia coli* with transformed pET30b empty vector; M: protein marker. (B) Western blot analysis of *PLD*-1146-his expressed in *E. coli* by using his-Tag antibody

2.2 蜡状芽孢杆菌磷脂酶 D 活性形式为分子单体

HKD 活性区域为磷脂酶 D 关键保守序列, 多数磷脂酶 D 具有 2 个 HKD 活性区域, 以单体形式产生活性, 少数原核磷脂酶 D 具有 1 个 HKD 活性区域, 以二聚体形式产生活性。该磷脂酶 D 基因测序结果经软件转换为氨基酸序列, 发现其第 1 个 HKD 活性区域中, K (赖氨酸) 被 R (精氨酸) 替代 (Fig.

MIKKILRVTSIIIVFVFIILWMHIDVTLGKMEAGKNMPTEYAPHYSDFQLYVEGKSFYKQLFTDIREAKQSIH
TYFFILSDDKSSHTFLNLLKEKAKEGVNVYLSVDRINDLSFERKMINGLRESGVHFTYSRKPELPFGFYSLHHR
NHRRITTDGEIGYTGGFNIGDEYLGKDKRFGYWRDYHVRLKGEGAKDLEEQFALDWKRDTKEDIKRSTNK
ASKGNTLHTMVSYNHGYVAKKYIELIKQAQHSIVIATPYFIAKNKESMNALIAAQKRGVTVKILWSYKPDPL
IKEAAYPIRQAVNNGITVYGKKGMFHGKLMLDNELTVIGTTNFTSRSFNINDEMNLVIHGGNIVSEVNE
ALVQDFHDSKEMTKEFFEKLSFGERCKEKFAGWIDFYL

Fig. 3 The active area and amino acid sequences of HKD regions in *Bacillus cereus* *PLD* protein HKD regions are marked in italics, and the mutated amino acid is underlined

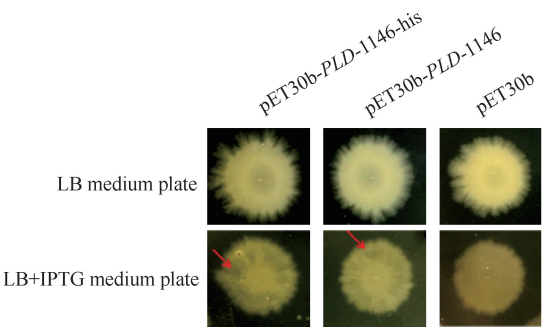


Fig. 2 Autolysis of *E. coli* accompanied with the expression of *PLD* *E. coli* transformed with different vectors were growing on LB solid medium with or without IPTG supplementation at 16 °C for 2 days. The transparent ring pointed by arrowhead indicates bacterial autolysis

3), 经典 HKD 活性区域变更为 HRD。严格意义上的该磷脂酶 D 只具有 1 个 HKD 活性区域。因此, 需要分析该磷脂酶 D 活性形式, 通过酵母双杂交实验验证其是否会形成二聚体。构建质粒 pGAD-*PLD*-1212、pGBK-*PLD*-1212、pGAD-*PLD*-1146 和 pGBK-*PLD*-1146, 磷脂酶 D 自身引物验证阳性转化子, 每个平板挑取 5 个单菌落, Fig. 4 A 图中 10 个转化子 pGAD-*PLD*-1212、pGAD-*PLD*-1146 均为阳性, B 图中 GBK-*PLD*-1212 有 1 个转化子为阳性, GBK-*PLD*-1146 无阳性转化子。重新挑取 7 个单菌落 PCR 验证, C 图中出现 2 个阳性转化子。D 图中 *Nde* I、*Hind* III 双酶切验证构建的质粒 (见 Fig. 4)。携带重组质粒 pGAD-*PLD*-1212 和 pGBK-*PLD*-1212 的酵母细胞 AH109, 携带重组质粒 pGAD-*PLD*-1146 和 pGBK-*PLD*-1146 的酵母细胞 AH109, 在 SD/-Trp-Leu 上可以生长, 在 SD/-Trp-Leu-His 上不能生长。结果表明, pGAD-*PLD*-1212 与 pGBK-*PLD*-1212 无相互作用, pGAD-*PLD*-1146 与 pGBK-*PLD*-1146 无相互作用, 不能产生组氨酸, 导致酵母 AH109 在 SD/-Trp-Leu-His 上不能生长 (Fig. 5)。从而证明磷脂酶 D 不能形成二聚体, 即该磷脂酶 D 以单体形式发挥催化作用。

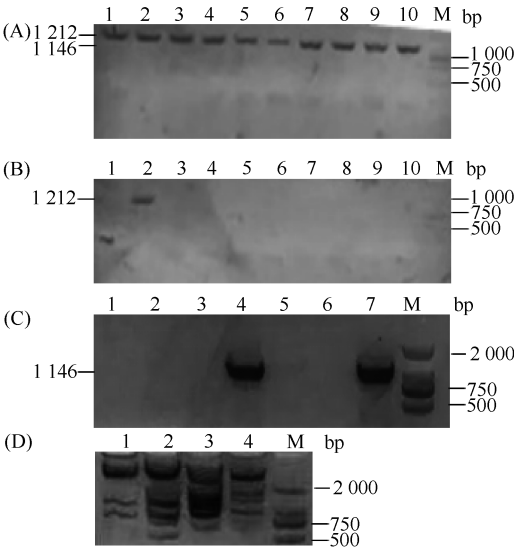


Fig. 4 Identification of positive plasmids constructed for yeast two hybrid assay (A) 1-5: Identification of constructed pGAD-PLD-1212 plasmid by colony PCR using 30b-PLD-1212-F and 30b-PLD-R primers; 6-10: Identification of constructed pGAD-PLD-1146 plasmid by PCR using 30b-PLD-1146-F and 30b-PLD-R primers; M: DNA marker. (B) 1-5: Identification of constructed pGBK-PLD-1212 by PCR using 30b-PLD-1212-F and 30b-PLD-R primers; 6-10: Identification of constructed pGBK-PLD-1146 by PCR using 30b-PLD-1146-F and 30b-PLD-R primers; M: DNA marker. (C) 1-7: Identification of pGBK-PLD-1146 by PCR using 30b-PLD-1146-F and 30b-PLD-R primers; M: DNA marker. (D) Identification of positive plasmids by restriction enzyme digestion. Plasmids were digested by *Nde* I/*Hind* III under 37 °C for 3 hours. 1: pGAD-PLD-1146 plasmid; 2: pGBK-PLD-1212 plasmid; 3: pGBK-PLD-1146 plasmid; 4: pGAD-PLD-1212 plasmid; M: DNA marker

2.3 活性区域定点突变后磷脂酶 D 活性提高

通过重叠延伸 PCR,将磷脂酶 D 序列中 R (精氨酸) 替换为 K (赖氨酸) 获得定点突变后磷脂酶 D (*PLD*-1146-his-m、*PLD*-1146-m) (见 Fig. 6)。Fig. 6 A 图为筛选克隆载体中阳性转化子,各挑取 3 个单克隆,自身引物 PCR 检测,均为阳性;B 图为 *Nde* I、

Xho I 双酶切 pET30b-*PLD*-1146-his-m 和 pET30b-*PLD*-1146-m,检测出目的条带;C 图为定点突变中前后两段胶回收产物;D 图为自身引物验证 pET30b-*PLD*-1146-his-m、pET30b-*PLD*-1146-m 成功导入大肠杆菌表达宿主细胞。

为更好地研究磷脂酶 D 各项特征,通过镍柱纯化获得带有组氨酸标签的重组磷脂酶 D (*PLD*-1146-his)。纯化后样品经 SDS-PAGE 检测结果见 Fig. 7。*PLD*-1146-his-m 纯化结果与该结果相似,无明显差异,可见纯度较高的目的蛋白质,经 4 °C 透析除去咪唑,测定蛋白质浓度并鉴定磷脂酶 D 活性。

定点突变后的基因序列在大肠杆菌中表达,与原始序列相比,表达量无明显变化,结果见 Fig. 8。

蛋白质浓度相同情况下,与原始序列相比,突变后磷脂酶 D 活性提高 10% 左右 (见 Fig. 9)。酶热稳定性、pH 敏感性、4 °C 储存酶活力改变均不显著。

3 讨论

蜡状芽孢杆菌磷脂酶 D 基因在大肠杆菌中实现高效表达,酶活性与链霉菌属磷脂酶 D 相比,存在一定差距。但对蜡状芽孢杆菌磷脂酶 D 活性形式及 HKD 活性区域的深入研究,可以拓宽现阶段磷脂酶 D 研究领域,为获得高效磷脂酶 D 提供理论依据。

蜡状芽孢杆菌磷脂酶 D 蛋白序列分析结果显示,该磷脂酶 D 只具有 1 个 HKD 活性区域。通过酵母双杂实验验证,磷脂酶 D 全长序列 (*PLD*-1212) 及缺失 66 个碱基序列 (*PLD*-1146)^[16],均不能形成同源二聚体,以单体产生酶活性^[17]。以单体形式存在的磷脂酶 D 多数都具有 2 个 HKD 活性区域。本研究通过定点突变,恢复磷脂酶 D 两个 HKD 活性区域,结果表明酶活性提高 10%。

据多篇文献报道, HKD 活性区域中 H (组氨酸) 对活性有关键影响。而对 K (赖氨酸) 在维持活性

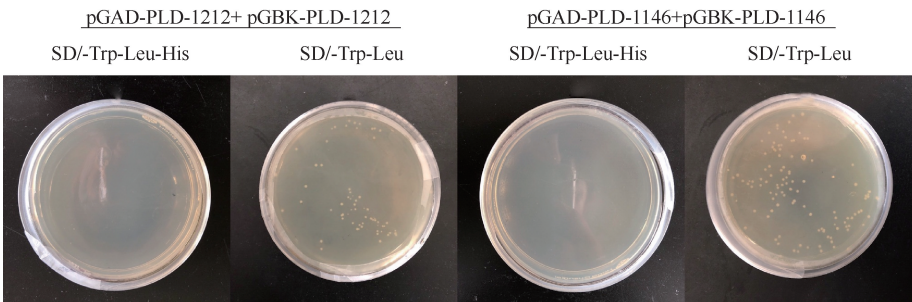


Fig. 5 Identification of proteins interaction by yeast two hybrid assay Transformed AH109 was grown on solid medium plates at 28 °C for 2 days

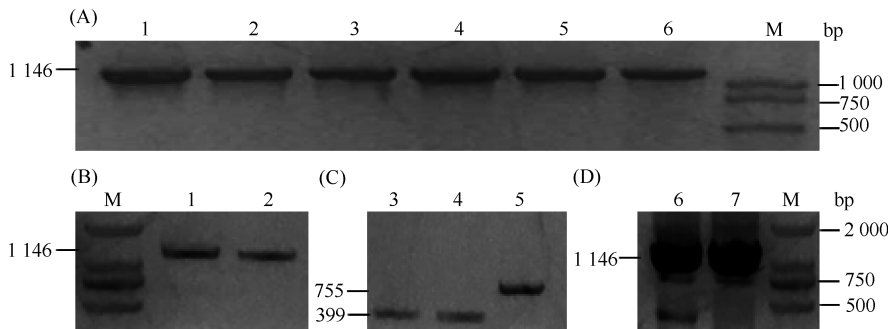


Fig. 6 Identification of positive plasmids with site-specific mutagenesis (A) 1-3: Identification of constructed pGMT-PLD-1146-his-m plasmid by PCR using 30b-PLD-1146-F and 30b-PLD-his-R primers; 4-6: Identification of constructed pGMT-PLD-1146-m plasmid by PCR using 30b-PLD-1146-F and 30b-PLD-his-R primers. (B) Identification of positive plasmids by restriction enzyme digestion. Plasmids were digested by *Nde* I/*Hind* III under 37 °C for 3 hours and the target band is shown. 1: pET30b-PLD-1146-his-m plasmid; 2: pET30b-PLD-1146-m plasmid. (C) Two parts of SOE-PCR fragments for site-specific mutagenesis. 3: PCR fragment of *PLD*-399-his; 4: PCR fragment of *PLD*-399; 5: PCR fragment of *PLD*-795. (D) 6: Identification of constructed pET30b-PLD-1146-his-m plasmid by PCR using 30b-PLD-1146-F and 30b-PLD-his-R primers; 7: Identification of constructed pET30b-PLD-1146-m plasmid by PCR using 30b-PLD-1146-F and 30b-PLD-his-R primers; M: DNA marker

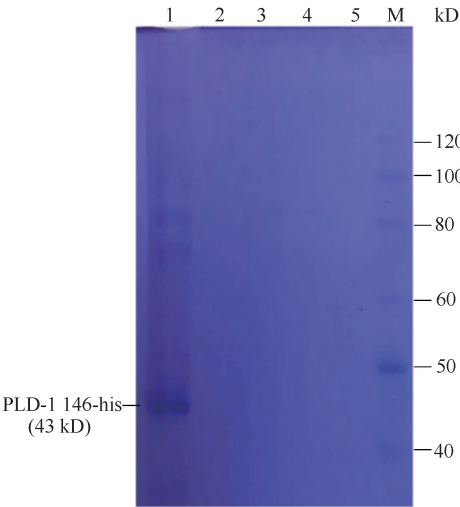


Fig. 7 PLD expressed in *Escherichia coli* was purified with Ni²⁺-NTA affinity chromatography 1: Purified *PLD*-1146-his protein (Elution peak); 2-5: The penetrate peak; M: Protein marker

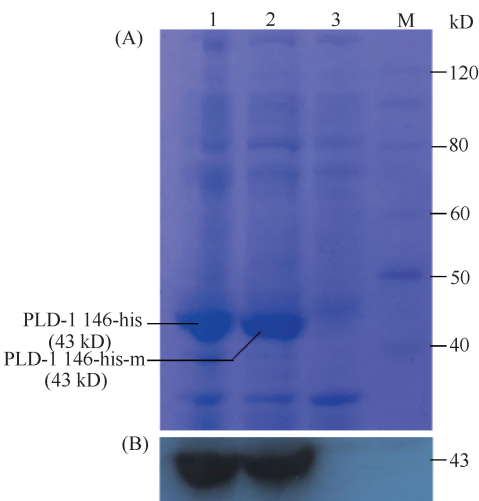


Fig. 8 The original and mutated phospholipase D were expressed respectively in *E. coli* (A) Identification of *PLD*-1146-his and *PLD*-1146-his-m expressed in *E. coli* by 12 % SDS-PAGE. 1: Protein extracted from *E. coli* with overexpression of *PLD*-1146-his; 2: Protein extracted from *E. coli* with overexpression of *PLD*-1146-his-m; 3: Protein extracted from *E. coli* with transformed pET30b empty vector; M: Protein marker. (B) Western blot analysis of *PLD*-1146-his and *PLD*-1146-his-m expressed in *E. coli* by using his-Tag antibody

方面的研究较少^[6]。虽然 K(赖氨酸)在维持磷脂酶 D 空间构型上有一定作用,但其缺失并未对磷脂酶 D 的活性产生决定性的影响^[18]。在其它多项测定中,突变后磷脂酶 D 与野生型比较,均无明显差异,实验数据未显示,说明 K(赖氨酸)的缺失对磷脂酶 D 的其它酶学特性无影响。为确定定点突变后蛋白质空间结构是否发生改变,将两段氨基酸序列(突变前后) 利用在线蛋白质结构模拟网站(<https://swissmodel.expasy.org/>), 获得蛋白质三维结构图。与原始序列的蛋白质模拟结构相比,定点突变后蛋白质模拟结构无明显变化。但由于提供

的磷脂酶 D 序列与网站中已有序列相似性均低于 30%, 一般认为, 此时模拟的蛋白质结构准确性较差, 因此, 定点突变后蛋白质空间结构是否改变, 仍需要其它实验进一步验证^[19]。

本文构建表达载体时, 为方便后续纯化, 目的蛋白添加组氨酸标签, 与未添加组氨酸的磷脂酶 D 比较, 在表达量、酶活性等方面无显著差异, 表明

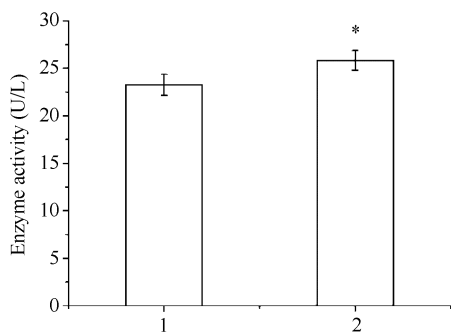


Fig. 9 Activity assay of original and mutated phospholipase D 1: Activity of recombinant PLD-1146-his protein. 2: Activity of recombinant PLD-1146-his-m protein. Error bars represent standard deviations from three independent experiments, and asterisks indicate statistically significant differences. * $P < 0.05$

组氨酸的添加不会影响磷脂酶 D 活性及其他相关特性。

对原始菌株进一步研究发现,硫酸铵沉淀目的蛋白后,进行酶活检测,在酶浓度增加的情况下,酶活力反而下降。这说明磷脂酶 D 在产生活性时,有其他某些辅助因子或辅助蛋白的参与。通过硫酸铵沉淀浓缩或是异源表达后,破坏了原有的辅助机制,导致酶活力下降^[20]。

对芽孢杆菌属磷脂酶 D 活性产生及活性影响因素的进一步探究仍在进行。希望通过后续研究,阐明这一现象的分子机制,可为磷脂酶 D 的研究提供理论依据。

参考文献 (References)

[1] Liu Y, Zhang T, Qiao J, *et al.* High-yield phosphatidylserine production via yeast surface display of phospholipase D from *Streptomyces chromofuscus* on *Pichia pastoris* [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, **62**(23) : 5354-5360

[2] Mao X, Liu Q, Qiu Y, *et al.* Identification of a novel phospholipase D with high transphosphatidylase activity and its application in synthesis of phosphatidylserine and DHA-phosphatidylserine [J]. *J Biotechnol*, 2017, **249**:51-58

[3] Tu Y, Wang Y, Wang G, *et al.* High-level expression and immunogenicity of a porcine circovirus type 2 capsid protein through codon optimization in *Pichia pastoris* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, **97**(7) : 2867- 2875

[4] Ponting CP, Kerr ID. A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues [J]. *Protein Sci*, 1996, **5**(5) :914-922

[5] Okamoto M, Peterson F C, Defries A, *et al.* Activation of dimeric ABA receptors elicits guard cell closure, ABA-regulated gene expression, and drought tolerance [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**(29) :12132- 12137

[6] Uesugi Y, Hatanaka T. Phospholipase D mechanism using *Streptomyces* PLD [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, **1791** (9) :962-969

[7] Iwasaki Y, Mishima N, Mizumoto K, *et al.* Extracellular production of phospholipase D of *Streptomyces antibioticus* using recombinant *Escherichia coli* [J]. *J Ferment Bioeng*, 1995, **79** (79) :417-421

[8] Esnault C, Leiber D, Toffano-Nioche C, *et al.* Another example of enzymatic promiscuity: the polyphosphate kinase of *Streptomyces lividans* is endowed with phospholipase D activity [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, **101**(1) :139-145

[9] Gietz R D. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/ PEG method [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, **1205**: 1-12

[10] Jaya LG, Ram KS, Mohan GR, *et al.* Site directed mutagenesis, molecular cloning and expression of interleukin-17E to generate structural variant with enhanced specific activity using industrial friendly salt inducible *Escherichia coli* GJ1158 [J]. *Int J Adv Sci Technol*, 2015, **75**:11-20

[11] 赵兵令,杨玉静,陈天直,等. 紫外线 b 促进绵羊黑色素细胞中 GPNMB 和 PMEL 的表达 [J]. *中国生物化学与分子生物学报* (Zhao BL, Yang YJ, Chen TZ, *et al.* UVB increases the expression of GPNMB and PMEL in sheep melanocytes [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2017, **33**(8) :845-852

[12] 陈丽燕,张光祥,黄春萍,等. 两株高产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及酶学特性 [J]. *微生物学通报* (Chen LY, Zhang GX, Huang CP, *et al.* Isolation, identification and enzymatic characteristics of cellulose- producing strains with high cellulase activity [J]. *Microbiology (Beijing, Chin)*, 2011, **38**(4) :531-538

[13] Zhao X C, Sharp P J. An improved 1-D SDS-PAGE method for the identification of three bread wheat ‘waxy’ proteins [J]. *J Cereal Sci*, 1996, **23**(2) :191-193

[14] Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies [J]. *Anal Biochem*, 1996, **236**(2) : 302-308

[15] 张红宇,万嗣宝,尹京苑. 低温贮藏中桃果实磷脂酶 D 活性的测定 [J]. *食品科技* (Zhang HY, Wan SB, Yin JY. Improved method detecting phospholipase D activity of peach fruit during cold storage [J]. *Food Sci Technol*), 2012, **37**(5) :22-25

[16] Zhu LX, Xu J F, Yu C X, *et al.* Expression of the N-terminus truncated phosphatase D in *Escherichia coli* and characterization of its anti-inflammatory activity [J]. *Chin J Zoonoses*, 2008, **24** (11) :991-998

[17] Stuckey J A, Dixon J E. Crystal structure of a phospholipase D family member [J]. *Nat Struct Biol*, 1999, **6** (3) :278-284

[18] El Kirat K, Duprès V, Dufrène YF. Blistering of supported lipid membranes induced by Phospholipase D, as observed by real-time atomic force microscopy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1778**(1) :276-282

[19] Magotti P, Bauer I, Igarashi M. Structure of human N-acylphosphatidylethanolamine- hydrolyzing phospholipase D: regulation of fatty acid ethanolamide biosynthesis by bile acids [J]. *Structure*, 2015, **23**(3) : 598-604

[20] Jang J H, Lee C S, Hwang D, *et al.* Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners [J]. *Prog Lipid Res*, 2012, **51**(2) :71-81