

蛇足石杉中赖氨酸脱羧酶基因的克隆表达及功能鉴定

李赛男, 王雯静, 张蓓蓓, 张泽坤, 葛祥宇, 杜宇, 张晓雪, 王娟*, 史社坡*

(北京中医药大学中药现代研究中心, 北京 100029)

摘要: 赖氨酸脱羧酶是石杉碱甲等石松生物碱上游生物合成步骤中催化赖氨酸脱羧生成1,5-戊二胺(尸胺)的关键酶。通过对蛇足石杉(*Huperzia serrata*)转录组数据的挖掘分析,并结合RT-PCR技术从蛇足石杉中成功克隆出3个赖氨酸脱羧酶基因(*HsLDC-L1*、*HsLDC-L2*、*HsLDC-L3*);利用在线生物信息学分析软件以及DNAMAN、MEGA 7.0等对上述3个基因编码蛋白的性质、二级和三级结构、序列同源性、进化关系等进行了预测分析,发现3个基因编码蛋白均具有植物赖氨酸脱羧酶的保守结构域和活性位点,且与文献报道的产石杉碱甲植物中的赖氨酸脱羧酶具有较近的亲缘关系。进一步尝试利用不同载体在大肠杆菌中对上述3个基因进行表达,结果仅*HsLDC-L1*与载体pCold TF构建的重组质粒在大肠杆菌*E. coli* BL21 (DE3)中成功实现可溶性表达,利用Ni²⁺亲和色谱柱分离纯化得到重组蛋白HsLDC-L1;HsLDC-L1全长由469个氨基酸组成,理论分子质量为50.50 kDa。体外酶活性分析证明HsLDC-L1可以催化赖氨酸脱羧生成尸胺。底物适应性实验发现HsLDC-L1还可以催化鸟氨酸脱羧生成腐胺,但不能催化酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸脱羧。上述结果为进一步研究包括石杉碱甲在内的石松类生物碱的生物合成提供参考,为利用合成生物学策略构建产 Δ^1 -吡啶、石榴碱等石松类生物碱生物合成关键前体的工程菌提供重要的基因元件。

关键词: 蛇足石杉; 赖氨酸脱羧酶; 基因克隆; 石杉碱甲; 石松生物碱

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)11-3437-09

Gene cloning and functional characterization of a lysine decarboxylase from *Huperzia serrata*

LI Sai-nan, WANG Wen-jing, ZHANG Bei-bei, ZHANG Ze-kun, GE Xiang-yu, DU Yu,
ZHANG Xiao-xue, WANG Juan*, SHI She-po*

(Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: Lysine decarboxylase is a key enzyme involved in the upstream biosynthesis of lycopodium alkaloids (LAs) such as huperzine A, contributing to the decarboxylation of lysine to 1,5-pentanediamine (cadaverine). Three lysine decarboxylase genes (*HsLDC-L1*, *HsLDC-L2*, *HsLDC-L3*) were successfully cloned from *Huperzia serrata* using transcriptomic sequence data mining strategy combined with reverse transcription PCR. The physicochemical properties, secondary and tertiary structures, amino acid identities, and evolutionary relationship of the three LDCs were analyzed by online bioinformatics analysis platforms and DNAMAN, MEGA 7.0 software, revealing that all of these proteins had the conserved PLP binding domain and active site residues were completely conserved in LDCs. Phylogenetic analysis showed that these LDCs were located in the same branch as other known LDCs from LA-producing plants. Accordingly, the ORFs of these three *HsLDCs* were inserted into different expression plasmids for further expression in *E. coli*. However, only *HsLDC-L1* was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) by inserting into a pCold TF vector. The recombinant protein was purified by Ni²⁺ affinity chromatography purification.

收稿日期: 2022-06-03; 修回日期: 2022-06-13.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573312).

*通讯作者 E-mail: shishepo@163.com; wjwangjuan2012@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0693

tion. HsLDC-L1 contains 469 amino acid residues, with a calculated molecular weight of 50.50 kDa. HsLDC-L1 expectedly catalyzed the decarboxylation of lysine to produce cadaverine. In addition, HsLDC-L1 can also catalyze the generation of putrescine from ornithine. However, it cannot catalyze the decarboxylation of tyrosine, phenylalanine, tryptophan and histidine. The results not only provide insight into the biosynthesis of LAs including huperzine A, but also provide a critical genetic element for the overproduction of Δ^1 -piperidine and pelletierine, the essential biosynthetic precursors of LAs, using synthetic biology strategies.

Key words: *Huperzia serrata*; lysine decarboxylase; gene cloning; huperzine A; lycopodium alkaloids

蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. 为石杉科石杉属多年生草本蕨类植物, 民间俗称千层塔、蛇足草等, 为珍稀名贵中药, 具有散瘀消肿、利尿、解毒和止痛等功效^[1,2]。20世纪80年代, 我国学者率先从蛇足石杉中分离纯化得到具有高效、可逆、高选择性乙酰胆碱酯酶抑制活性的石杉碱甲 (huperzine A)^[3,4], 并将其开发成抗老年痴呆药物已在临床应用近30年, 美国FDA也将石杉碱甲作为膳食补充剂批准上市^[5]。目前, 石杉碱甲主要依靠从蛇足石杉等植物中提取获得, 但由于石杉碱甲在植物中含量低、蛇足石杉植株矮小、生长缓慢, 仅依靠从植物中提取获得该化合物周期较长且会引起药源紧张等问题, 并且石杉碱甲结构复杂, 化学合成尤其是立体选择性合成难度大, 利用化学合成进行工业化生产仍有难度^[6-8], 因此, 石杉碱甲的药源瓶颈严重制约其作为抗老年痴呆药物的生产和深度研发。

随着合成生物学的飞速发展, 越来越多天然产物的生物合成调控基因及生物合成途径被阐明, 如紫杉醇、青蒿素、吲哚类生物碱等已实现目标产物在生物工程菌 (或生物工程植株) 中的快速合成^[9,10]。因此利用合成生物学的方法解决石杉碱甲的药源问题备受关注。然而, 想要实现石杉碱甲的合成生物学生产, 首先必须彻底阐明石杉碱甲的生物合成途径及其催化酶。同位素标记实验表明^[11,12], 石杉碱甲等石松生物碱是由赖氨酸 (lysine) 在赖氨酸脱羧酶 (LDC) 的作用下脱

羧生成尸胺 (cadaverine), 再由铜胺氧化酶 (CAO) 氧化脱氢并自发环合生成哌啶 (Δ^1 -piperidine), 哌啶再与丙酮二羧酸 (1,3-acetonedicarboxylic acid) 缩合并脱羧生成所有石松生物碱生物合成的关键前体石榴碱 (pelletierine), 石榴碱与其未脱羧产物4-(2-哌啶基) 乙酰乙酸 [4-(2-piperidyl) acetoacetic acid, 4PAA] 缩合形成所有石松生物碱生物合成的共同中间体 phlegmarine, 然后在一系列氧化酶的作用下, 经氧化环合、开环、脱氢等反应生成石杉碱甲 (huperzine A) (图1)。由于蛇足石杉等在体内含有大量的内生菌^[13], 建立离体组织培养体系非常困难, 这严重影响了石杉碱甲等石松生物碱生物合成相关酶的鉴定, 早期仅有关于赖氨酸脱羧酶和铜胺氧化酶的报道, 但也仅是少数对其进行了异源表达和催化功能确认^[14-16]。本课题组一直致力于石杉碱甲的生物合成研究, 已成功从蛇足石杉及近缘植物柳杉叶马尾杉中克隆鉴定了多个植物聚酮合酶, 率先报道了石杉碱甲生物合成的关键前体石榴碱的生物合成机制及催化酶^[17-19]。非常有意思的是, 最近美国斯坦福大学 Elizabeth Sattely 教授团队从马尾杉属植物 *Phlegmariurus tetrastichus* 中也发现能够催化石榴碱合成的聚酮合酶 PtPIKS, 同时还报道了2个催化石杉碱乙氧化开环生成石杉碱丙, 再经双键异构化生成石杉碱甲的铁 (II)/2-酮戊二酸依赖性氧化酶^[14]。近来, 本课题组为了利用已鉴定的聚酮合酶构建高效合

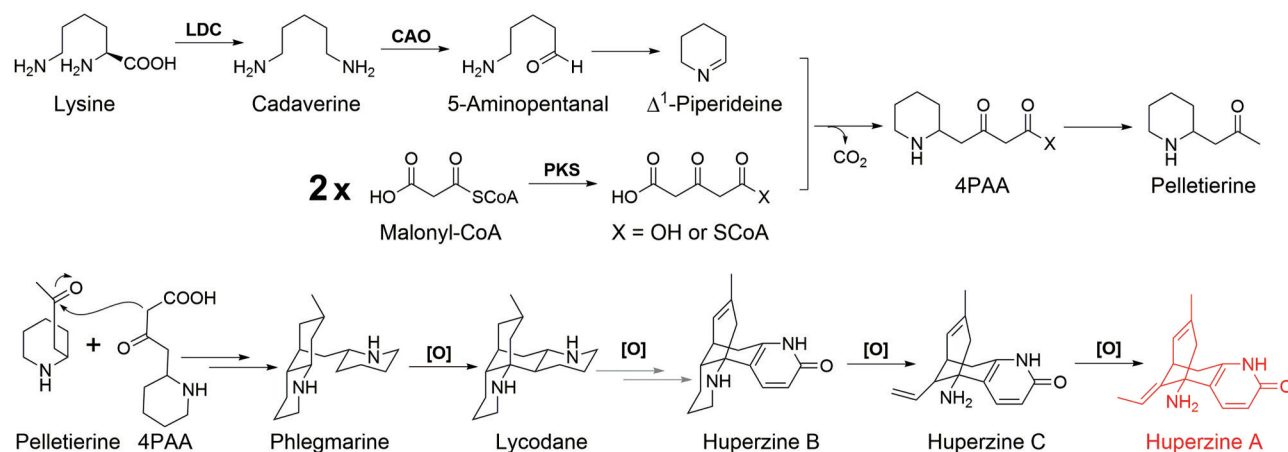


Figure 1 Proposed biosynthetic pathway of huperzine A

成石杉碱甲关键生物合成前体石榴碱的工程菌,对蛇足石杉中的赖氨酸脱羧酶也进行了研究,本文报道了从蛇足石杉中筛选出的3条赖氨酸脱羧酶基因(*HsLDC-L1*、*HsLDC-L2*、*HsLDC-L3*),重点对成功实现可溶性表达并确认催化功能的赖氨酸脱羧酶*HsLDC-L1*进行讨论。

材料及方法

材料 蛇足石杉 (*Huperzia serrata*) 采自湖南省吉首市保靖县。

试剂 大肠杆菌感受态细胞TOP10和BL21 (DE3) 购自北京全式金生物科技有限公司;载体pET28a、pCold I和pCold TF为本课题组自存;逆转录试剂盒(Qiagen 205111)、植物RNA提取试剂盒Plant RNA Kit (OMEGA)、原核克隆载体pCE2 TA/Blunt-Zero (7E480L0)、胶回收试剂盒(017E2291DA)、高保真聚合酶Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase (7G542H1)、无缝克隆试剂盒(7E571J1) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司;赖氨酸、鸟氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸均购自北京拜尔迪生物技术有限公司;限制性内切酶*EcoR* I和*Sal* I (TaKaRa) 购自北京宝日医生物科技有限公司。

总RNA的提取与cDNA的合成 选新鲜蛇足石杉茎叶,液氮冷冻法进行研磨,参照试剂盒实验操作步骤快速提取植物中的总RNA,利用NanoDrop 2000C检测RNA浓度,同时利用1.3%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性和质量,使用反转录酶试剂盒(Qiagen 205111)反转录合成cDNA。

基因全长的克隆 利用本课题组前期获得的蛇足石杉转录组测序数据,对其进行分析挖掘,成功筛选到3个可能编码赖氨酸脱羧酶的全长基因。设计特异性引物(引物序列见表1),以合成的cDNA为模板进行扩增,扩增反应程序如下:95 °C预变性30 s;然后进行35次循环(95 °C变性温度15 s,退火温度依次为56.5 °C (*HsLDC-L1*)、58.7 °C (*HsLDC-L2*)、57.1 °C (*HsLDC-L3*),时间15 s,72 °C延伸68 s);程序循环结束后72 °C延伸5 min。反应结束后,利用1%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,目的片段回收纯化后与克隆载体pCE2 TA/

Blunt-Zero连接,转化到TOP10菌株中,在含有氨苄霉素(Amp, 100 μg·mL⁻¹)的LB固体培养基过夜培养后,菌落PCR筛选阳性克隆并测序确认。

Table 1 Primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>HsLDC-L1-F</i>	ATGACGTTTGGTCGCATGGAAG
<i>HsLDC-L1-R</i>	TTATTGGATGCAGGTGTTGTTG
<i>HsLDC-L2-F</i>	ATGGCAGCTTGTGACTCTC
<i>HsLDC-L2-R</i>	CTAGTAAATCACAGAAAAATGGAAAAG
<i>HsLDC-L3-F</i>	ATGCCTCTACTGCTCTCAACAAGC
<i>HsLDC-L3-R</i>	TTACTCGCGGTCTTCGCCAG

生物信息学分析 利用在线软件ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protpar-am.html>) 预测蛋白结构参数;利用软件TMHMM 2.0进行蛋白质跨膜结构分析;利用DNAMAN将LDCs与其他物种的LDCs氨基酸序列进行同源性比对;通过MEGA 7.0软件构建Maximum-Likelihood系统进化树,进化距离的计算采用泊松校正法,Bootstrap重复次数为1 000次;通过ExPASy中SOPMA工具 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpres_sopmal.pl) 分析蛋白质序列的二级结构;利用SWISS-MODEL Workspace在线分析软件 (<http://swissmodel.expasy.org>) 构建蛋白质三级结构模型。

***HsLDC-L1*的表达与纯化** 采用无缝克隆策略设计相关引物(表2)进行扩增。扩增产物与*EcoR* I、*Sal* I双酶切的载体(pCold I、pCold TF、pET22b和pET28a)在Exnase[®] II重组酶的催化下反应30 min进行连接,连接产物转入TOP10感受态细胞,在相应的Amp (100 μg·mL⁻¹)或卡那霉素(Kana, 50 μg·mL⁻¹)抗性LB固体培养基37 °C下培养12 h,菌落PCR筛选阳性菌落,进行测序验证后,重组质粒转入表达菌株BL21 (DE3)中,构建LDCs重组表达菌株。挑取含有重组质粒的单菌落,接种到10 mL含100 μg·mL⁻¹ Amp的LB液体培养基中,37 °C、200 r·min⁻¹过夜培养,次日按1:100 (V/V)的比例将活化菌液加入含100 μg·mL⁻¹ Amp、总体积为1 L新鲜LB液体培养基中,37 °C、200 r·min⁻¹培养至OD₆₀₀值为0.6时,加入0.8 mmol·L⁻¹的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导蛋白表达,分别在15 °C继续培养24 h (pCold系列载体)及23 °C (pET系列载体)

Table 2 Primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>HsL1pTF-F</i>	accctcgaggatccgaattcATGACGTTTGGTCGCATGGA
<i>HsL1pTF-R</i>	ctatctagactgcaggtcgacTTATTTGGATGCAGGTGTTGTTG
<i>HsL2pTF-F</i>	ctcggtaccctcgaggatccATGGCAGCTTGTGACTCTCCA
<i>HsL2pTF-R</i>	agactgcaggtcgacaagcttCTAGTAAATCACAGAAAAATGGAAAAG
<i>HsL3pTF-F</i>	ctcggtaccctcgaggatccATGGCAGCTTGTGACTCTCCA
<i>HsL3pTF-R</i>	agactgcaggtcgacaagcttTCACAGAAAATCGTTTATTGAGTCTTC

继续培养 16 h。离心法 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $7\ 400\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 收集菌体后重悬于预冷的 $40\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KPB 缓冲液 ($100\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑, pH 7.9) 中, 超声破碎后, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $8\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 h。上清液经 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤后上样于经预平衡的 Ni^{2+} 亲和色谱柱, 用 $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KPB 缓冲液 ($500\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $40\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑, pH 7.9) 除去杂蛋白后, 用 $15\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KPB 缓冲液 (10% 甘油, $400\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑, pH 7.9) 进行洗脱获重组蛋白, 利用 Centricon Plus-80 Millipore 离心浓缩除盐后, 保存于 $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KPB 缓冲液 ($1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 10% 甘油, pH 8.0) 中备用。利用 SDS-PAGE 考察蛋白表达纯化情况, 采用 Bio-rad Bradford 法测定蛋白浓度。

HsLDC-L1 酶功能鉴定 酶活性分析反应体系如下: $500\ \mu\text{L}$ $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KPB 缓冲液 (pH 7.5) 中加入 $0.68\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HsLDC-L1、 $0.4\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸吡哆醛 (pyridoxal5-phosphate monohydrate, PLP) 和 $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 赖氨酸 (或鸟氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h, 对照反应在相同的条件中加入等浓度的高温灭活的蛋白。由于赖氨酸和鸟氨酸的脱羧产物尸胺和腐胺紫外吸收极弱, 难于检测分离, 故将产物通过 2,4-二硝基氟苯 (1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, FDNB) 衍生化后进行 LC-MS 检测。衍生化反应体系如下: 每 $100\ \mu\text{L}$ 酶反应混合液中添加 $400\ \mu\text{L}$ $0.625\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 K_2CO_3 水溶液和 $50\ \mu\text{L}$ $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 FDNB 乙腈溶液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min, 加入 $12\ \mu\text{L}$ 的甲酸终止反应, $14\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高速离心 20 min, 上清液用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 取 $20\ \mu\text{L}$ 进行 LCMS-IT-TOF 分析。色谱分析条件: 色谱柱为 Agilent Extend-C18 column ($4.6\ \text{mm}\times 250\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$), 流速为 $1.0\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 流动相为 0.1% 甲酸水 (A) 和乙腈 (B) 混合液梯度洗脱: 0~10 min, 5%~40% B; 10~30 min, 40%~80% B; 30~35 min, 80%~95% B。

结果与分析

1 目的基因克隆及其编码蛋白理化性质分析

对本课题组前期获得的蛇足石杉转录组数据进行分析挖掘, 共获得 3 个具有完整开放阅读框的 LDCs 基因, 以 cDNA 为模板扩增 LDCs 基因, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测显示获得的 LDCs 大小约 $1\ 500\ \text{bp}$ 。PCR 产物连接到克隆载体, 测序结果经 NCBI 的 BLAST 比对分析, 确定该扩增产物为具有完整 ORF 的 LDCs 基因, 分别命名为 HsLDC-L1、HsLDC-L2、HsLDC-L3, 序列长度分别为 $1\ 410\ \text{bp}$ 、 $1\ 554\ \text{bp}$ 、 $1\ 530\ \text{bp}$, 编码氨基酸个数依次为 469、517、509。

利用在线生物信息分析软件, 对 HsLDC-L1、HsLDC-

L2、HsLDC-L3 编码蛋白的理化性质进行分析, 结果表明 3 个蛋白的分子式分别为 $\text{C}_{2248}\text{H}_{3510}\text{N}_{590}\text{O}_{679}\text{S}_{24}$ 、 $\text{C}_{2491}\text{H}_{3888}\text{N}_{654}\text{O}_{761}\text{S}_{27}$ 、 $\text{C}_{2417}\text{H}_{3789}\text{N}_{641}\text{O}_{754}\text{S}_{30}$, 其分子量分别为 50.50 kDa、56.04 kDa、54.85 kDa; 等电点 (isoelectric point, pI) 依次 5.17、5.15、5.13, 均为酸性蛋白; 不稳定指数 (instability index, II) 从大到小依次为 HsLDC-L3 (42.88)、HsLDC-L2 (40.47)、HsLDC-L1 (39.84), HsLDC-L1 的不稳定性系数小于 40, 为稳定蛋白, HsLDC-L2 和 HsLDC-L3 不稳定系数都大于 40, 为不稳定蛋白。脂溶系数 (aliphatic index, AI) 分别为 91.11、90.39、85.14; 平均亲水系数 (grand average of hydropathy, GRAVY) 分别为 0.116、0.064、0.000, HsLDC-L3 亲水性在三者中最好, HsLDC-L1 亲水性在三者中最差; TMHMM 2.0 分析结果表明 3 个 LDCs 结构中均不含跨膜区域。

2 蛋白的二级结构及三级结构预测

使用 SOPMA 工具进行二级结构分析, 统计表明 3 个 LDCs 二级结构由 35.08%~39.02% 的 α -螺旋 (α -helices)、5.30%~6.00% 的 β -折叠 (β -turn)、38.17%~43.61% 的无规则卷曲 (random coil) 及 15.72%~17.06% 的延伸链 (extended strand) 组成。分别以 PDB 数据库中 (Protein Data Bank) 收录的脱羧酶 1d7k.1.A、1d7k.1.A、2oo0.1.A 为模板, 对 HsLDC-L1、HsLDC-L2 和 HsLDC-L3 的三级结构进行预测, 结果如图 2 所示。

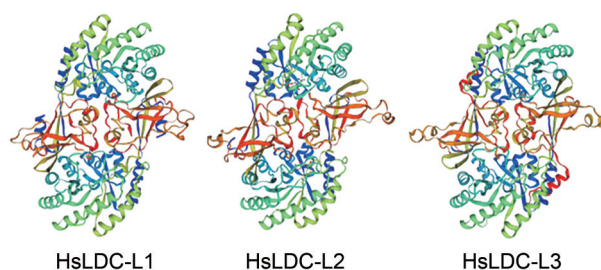


Figure 2 Homology modeling structures of lysine decarboxylases from *H. serrata* (HsLDCs)

3 氨基酸序列比对与系统进化树分析

将 HsLDC-L1、HsLDC-L2、HsLDC-L3 氨基酸序列与文献中从石松科和石杉科植物中获得的赖氨酸脱羧酶的序列进行比对, 结果发现 3 个蛋白均属于 PLP 依赖性超家族酶, 均存在高度保守的 N 端 PLP 结合域和 C 端底物赖氨酸结合域 (图 3)。3 条序列与目前已经确定催化活性的赖氨酸脱羧酶的序列进行比对, 发现 HsLDC-L1 与 *H. serrata* 中报道的赖氨酸脱羧酶 HsLDC-X1 的相似度最高 (相似度为 98.93%)^[15], HsLDC-L2 与 *P. tetrastrichus* 中的赖氨酸脱羧酶 PtLDC (GenBank 号: QWQ66219.1) 的相似度最高 (相似度为 89.94%)^[14], HsLDC-L3 与 *H. serrata* 中的赖氨酸脱羧酶 HsLDC

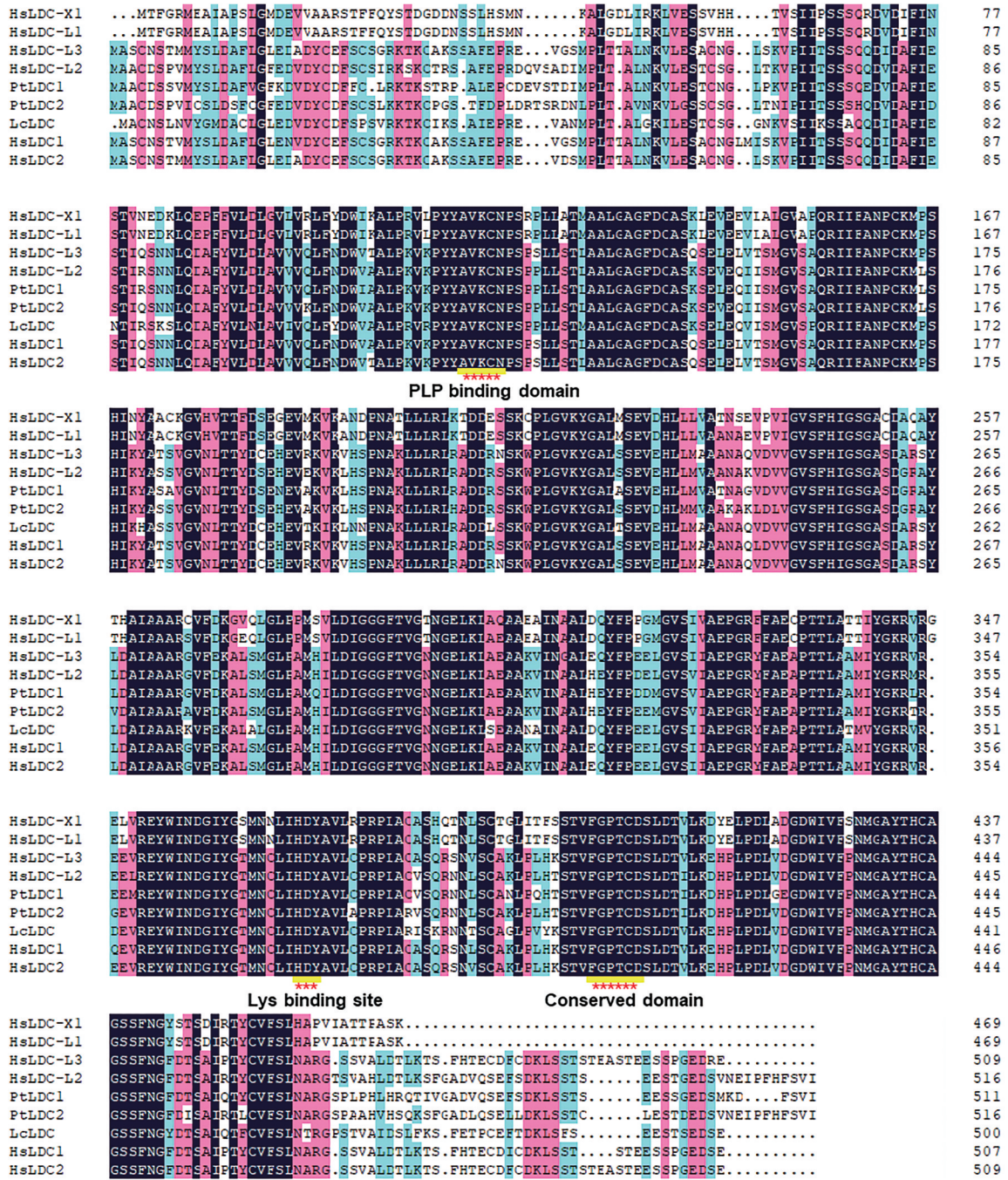


Figure 3 Multiple sequence alignment of lysine decarboxylases (LDCs) from different *Lycopodium* species. Combination of red asterisk and yellow underscore represent the pyridoxal 5-phosphatemonohydrate (PLP) binding domain, lysine (Lys) binding site and conserved domains, respectively

(GenBank 号: AB915697.1) 的相似度最高 (相似度为 99.41%)^[20]。3 个氨基酸序列之间的相似度为: HsLDC-L1 与 HsLDC-L2 相似度 57.61%, 与 HsLDC-L3 相似度为 57.84%, HsLDC-L2 和 HsLDC-L3 的相似度为 83.01%。采用 MEGA 7.0 将 HsLDC-L1、HsLDC-L2、HsLDC-L3 与目前 NCBI 数据库中收录的赖氨酸脱羧酶一起构建进化树 (图 4), 结果发现 HsLDC-L1、HsLDC-L2、

HsLDC-L3 与石松类植物中的赖氨酸脱羧酶明显的位于同一个分支, 提示编码这些赖氨酸脱羧酶的基因在进化上具有较近的亲缘关系。

4 LDCs 的原核表达分析

通过构建不同的表达质粒, 尝试将 3 个目标蛋白在大肠杆菌中进行表达, 结果仅 *HsLDC-L1* 在构建到 pCold TF 表达载体中后, 经低温诱导才成功实现了该

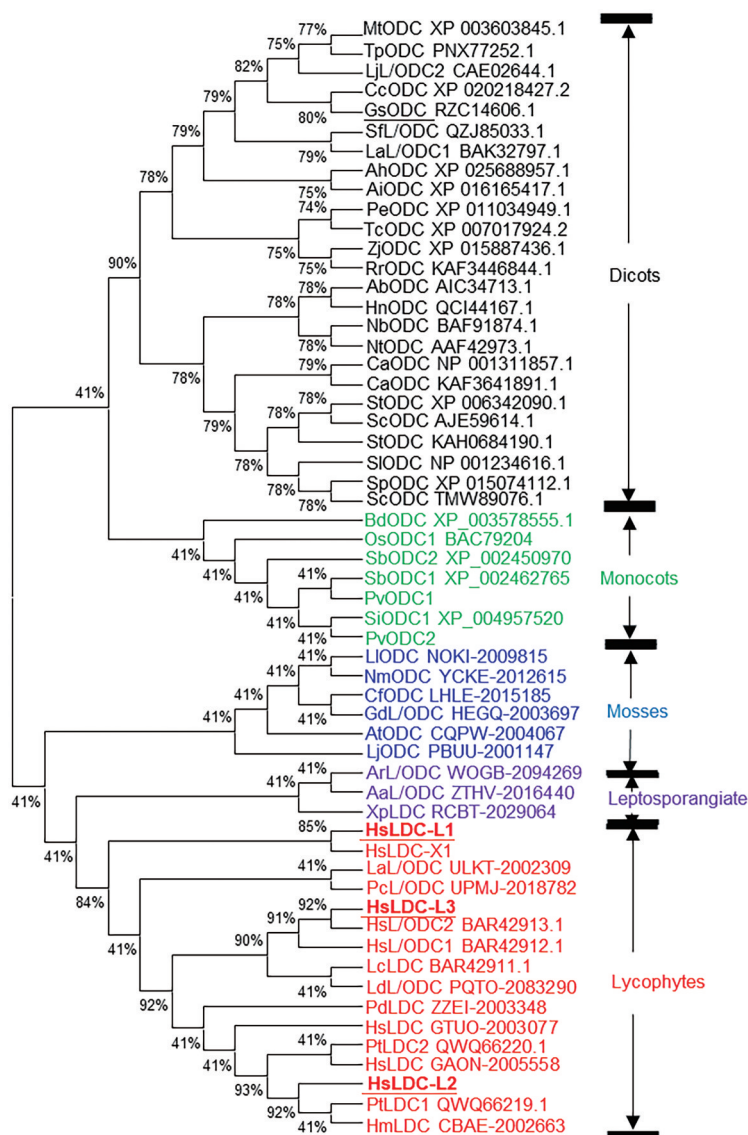


Figure 4 Phylogenetic tree of L/ODCs from various plant species. Analysis showed that the plant L/ODCs grouped into five clusters: dicots (black branch), monocots (green branch), mosses (blue branch), leptosporangiate (purple branch), lycophytes (red branches)

蛋白的可溶性表达, 而其他两个基因 *HsLDC-L2* 和 *HsLDC-L3*, 虽然尝试更换了多个表达载体, 但均未获得可溶性表达。表达的可溶性重组蛋白 *HsLDC-L1* 经 SDS-PAGE 分析, 在 100 kDa 左右出现与目标蛋白大小一致 (重组蛋白携带有 48 kDa 左右的标签) 的条带, 如图 5 所示。

5 *HsLDC-L1* 的酶活性鉴定

由于赖氨酸及其脱羧产物尸胺均无明显的紫外吸收, 难于检测, 酶催化反应结束后在反应体系中加入 2,4-二硝基氟苯 (FDNB) 进行衍生化, 通过检测衍生化产物来确定酶的活性 (图 6)。当 *HsLDC-L1* 与 *L*-赖氨酸和 PLP 共同孵育并经 FDNB 衍生化后, 产物经 LC-MS 分析发现, 反应混合物中检测到 2 个相对分子质量分别为 268 和 434 的产物色谱峰 (图 7A), 保留时间分别在

7.5 min (**P1-L**) 和 20.5 min (**P2-L**)。在产物 **P1-L** 的 HR-ESI-MS 图谱中 (图 7B), 出现 $[M+H]^+$ 峰 m/z 269.122 5 (计算值 269.120 5, $C_{11}H_{17}N_4O_4$), 故确定其分子式为 $C_{11}H_{16}N_4O_4$, 该产物的 MS^2 图谱中出现 m/z 252.102 2 和 86.095 5 碎片峰, 分别为尸胺的单 DNB 衍生物脱氨和脱去间二硝基苯胺后产生的碎片离子峰。在产物 **P2-L** 的 HR-ESI-MS 图谱中 (图 7C), 出现 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰 m/z 435.125 2 (计算值 435.122 0, $C_{17}H_{19}N_6O_8$), 457.105 6 (计算值 457.108 4, $C_{17}H_{18}N_6O_8Na$), 确定 **P2-L** 的分子式为 $C_{17}H_{18}N_6O_8$, **P2-L** 的相对分子质量比 **P1-L** 多了 166, 提示其可能为产物尸胺的双 DNB 衍生物, 在 **P2-L** 的 MS^2 图谱中出现失去一个间二硝基苯胺后的特征碎片 m/z 252.095 2, 进一步确认 **P2-L** 为尸胺的双 DNB 衍生物。相比之下, 在高温灭活的 *HsLDC-L1* 与底物的反

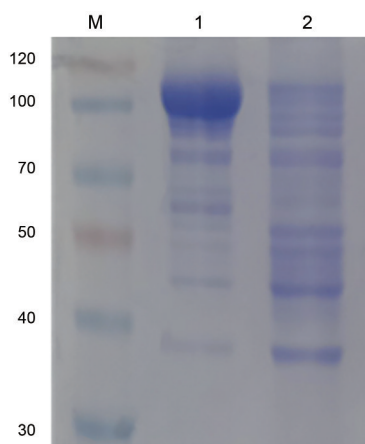


Figure 5 SDS-PAGE of recombinant HsLDC-L1. Lane M: Protein ladder; Lane 1: Soluble crude extract from *E. coli* cells induced by isopropyl-beta-D-thiogalactoside (IPTG); Lane 2: Soluble crude extract from *E. coli* cells without IPTG treatment

应中仅检测到底物 *L*-赖氨酸的单 DNB 衍生物 (**S1-L**) 和双 DNB 衍生物 (**S2-L**)。上述结果证明 HsLDC-L1 为赖氨酸脱羧酶, 可以催化赖氨酸脱羧生成尸胺。

为了进一步考察 HsLDC-L1 的底物适应性, 选择鸟氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸作为底物, 考察酶的催化活性, 结果发现 HsLDC-L1 还能够催化鸟氨酸发生脱羧生成 1,4-丁二胺 (腐胺), 结果如图 8。但 HsLDC-L1 不能催化酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸发生脱羧反应。

讨论

赖氨酸脱羧酶是吡啶类、喹诺里西啶类生物碱生

物合成的关键催化酶, 其催化合成的生物碱在生源上被归属为赖氨酸来源的生物碱。本研究中克隆鉴定的 HsLDC-L1 不仅可以催化赖氨酸脱羧生成尸胺, 其还可以催化鸟氨酸发生脱羧反应生成腐胺, 与文献^[15]中报道的 HsLDC-X1 具有比较相似的功能, 但 HsLDC-L1 不能接受除赖氨酸和鸟氨酸外其他的氨基酸为底物发生脱羧反应。鸟氨酸脱羧后形成的腐胺是吡咯类生物碱生物合成的共同前体, 自然界中如东莨菪碱、颠茄碱等均来自于鸟氨酸脱羧后形成的腐胺。HsLDC-L1 不仅能够催化赖氨酸脱羧, 同时也可以催化鸟氨酸脱羧, 因此, HsLDC-L1 不仅可用于构建合成赖氨酸来源生物碱的工程菌, 同时也可能用于构建合成鸟氨酸来源生物碱的工程菌。此外, 和所有 PLP 依赖性的氨基酸脱羧酶一样, HsLDC-L1 的氨基酸序列中, 也具有保守的 PLP 结合域, 在进行酶活性分析中, 需要加入辅酶因子 PLP, 在 PLP 缺失的酶反应中, HsLDC-L1 不表现出脱羧活性。

然而, 虽然体外酶活性证明 HsLDC-L1 确实能够催化赖氨酸脱羧生成石松类生物碱合成的关键前体尸胺, 提示其可能参与石杉碱甲等石松类生物碱的生物合成, 但尸胺在很多植物中也同样存在, 在植物的生长、发育和抗逆反应中具有重要的生理功能, 因此 HsLDC-L1 在体内是否确实参与了石杉碱甲等石松类生物碱的合成, 尚需进一步通过体内的相关实验进行确证。但是由于蛇足石杉离体培养难度大, 难以直接进行体内的基因沉默或者过表达等方法来快速确定酶的体内功能。本研究中相关赖氨酸脱羧酶的鉴定, 主要是用于构建合成石杉碱甲生物合成关键前体石榴碱

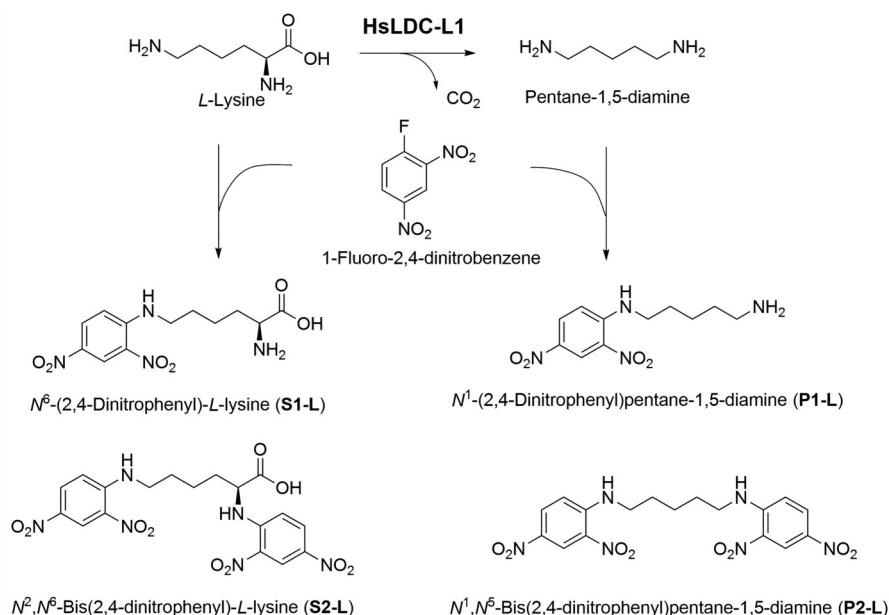


Figure 6 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) derivatization of the enzymatic products produced by HsLDC-L1

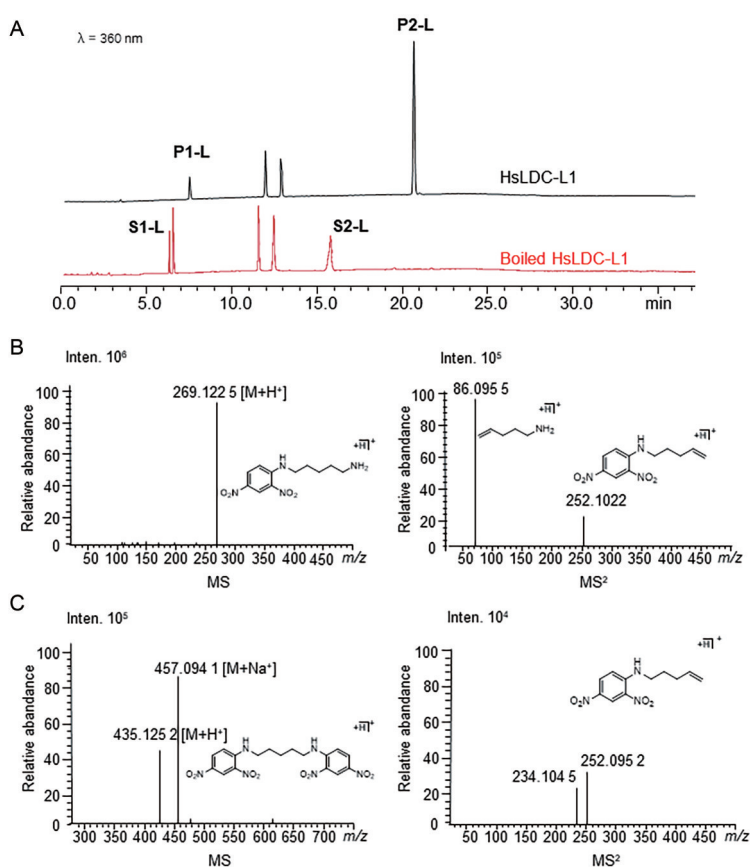


Figure 7 LC-MS analysis of the FDNB derivatized products. A: HPLC chromatograms (360 nm) for the reaction using lysine as substrate; B: The MS spectra of **P1-L**; C: The MS spectra of **P2-L**

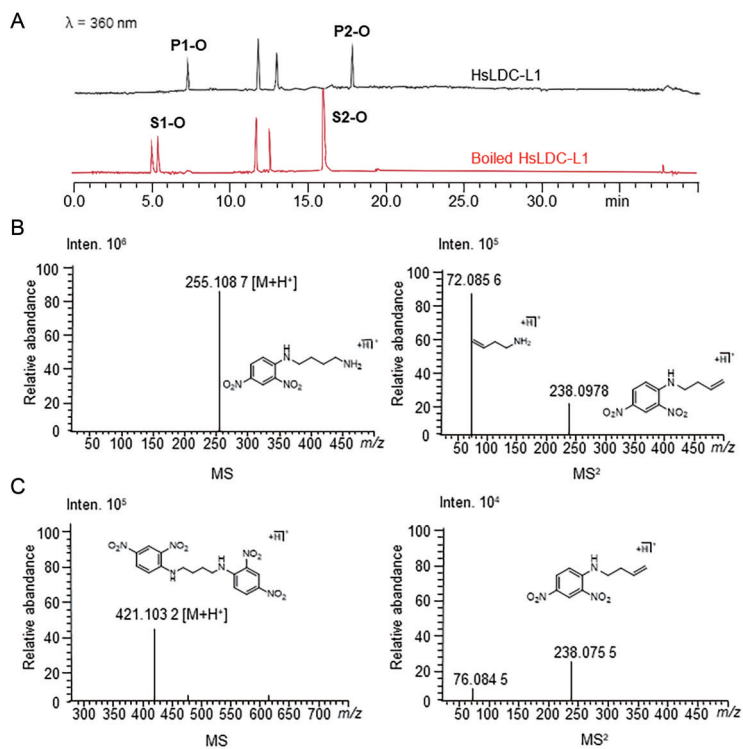


Figure 8 LC-MS analysis of the FDNB derivatized products. A: HPLC chromatograms (360 nm) using ornithine as substrate; B: The MS spectra of **P1-O**; C: The MS spectra of **P2-O**

的工程菌, 因此没有进一步探讨 HsLDC-L1 在体内是否确实与石杉碱甲等石松生物碱的生物合成相关。

作者贡献: 李赛男负责 HsLDC-L1 转录组数据分析、基因克隆、原核表达、体外酶活鉴定以及论文初稿的撰写; 王雯静、张蓓蓓、张泽坤负责 RNA 提取, 并协助转录组数据分析; 杜宇、张晓雪、葛祥宇负责反转录; 王娟为本研究提供实验指导并对论文初稿进行修改; 史社坡负责实验方案设计、实验技术指导、论文撰写及修改。

利益冲突: 无相关利益冲突。

References

- [1] Editorial Board of National Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese Materia Medica (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999.
- [2] Yuan JQ, Zhou XL, Wang S, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Huperzia serrata* [J]. Chin Herb Med, 2012, 2: 399-407.
- [3] Zhu XD, Tang XC. Facilitatory effects of huperzine A and B on learning and memory of spatial discrimination in mice [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 1987, 22: 812-817.
- [4] Liu JL, Yu CM, Zhou YZ, et al. Chemical study of huperzine A and huperzine B [J]. Acta Chim Sin (化学学报), 1986, 44: 1035-1040.
- [5] Du RR, Qu LY, Sun SS, et al. Research status on drug therapy of Alzheimer's disease [J]. J Clin Pharmacol, 2019, 35: 489-492.
- [6] Jin GY, Xia Y, Bai DL. Advances in search for acetylcholinesterase inhibitor based on the double active sites hypothesis [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2002, 37: 749-752.
- [7] James DW, Yang L, Jungchul K, et al. A novel synthesis of (-)-huperzine A via tandem intramolecular aza-prins cyclization-cyclobutane fragmentation [J]. Org Lett, 2013, 15: 882-885.
- [8] He XC, Yu GL, Bai DL. Studies on analogues of huperzine A for treatment of senile dementia VI. Asymmetric total synthesis of 14-nor-huperzine A and its inhibitory activity of acetylcholinesterase [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2003, 38: 346-349.
- [9] Cravens A, Payne J, Smolke CD. Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products [J]. Nat Commun, 2019, 10: 2142.
- [10] Liu X, Ding W, Jiang H, et al. Engineering microbial cell factories for the production of plant natural products: from design principles to industrial-scale production [J]. Microb Cell Fact, 2017, 16: 125.
- [11] Braekman JC, Gupta RN, MacLean DB, et al. Biosynthesis of lycopodine. pelletierine as an obligatory intermediate [J]. Can J Chem, 1972, 50: 2591-2602.
- [12] Lichman BR. The scaffold-forming steps of plant alkaloid biosynthesis [J]. Nat Prod Rep, 2021, 38: 103-129.
- [13] Li WK, Hu ZB. Endophytes and natural medicines [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2005, 3: 193-199.
- [14] Nett RS, Dho Y, Low YY, et al. A metabolic regulon reveals early and late acting enzymes in neuroactive lycopodium alkaloid biosynthesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118: e2102949118.
- [15] Xu B, Lei L, Zhu X, et al. Identification and characterization of L-lysine decarboxylase from *Huperzia serrata* and its role in the metabolic pathway of lycopodium alkaloid [J]. Phytochemistry, 2017, 136: 23-30.
- [16] Sun J, Morita H, Chen G, et al. Molecular cloning and characterization of copper amine oxidase from *Huperzia serrata* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22: 5784-5790.
- [17] Wang J, Zhang ZK, Jiang FF, et al. Deciphering the biosynthetic mechanism of pelletierine in lycopodium alkaloid biosynthesis [J]. Org Lett, 2020, 22: 8725-8729.
- [18] Wang J, Ding N, Wu Y, et al. Enzymatic synthesis of 2-hydroxy-4*H*-quinolizin-4-one scaffolds by integrating coenzyme a ligases and a type III PKS from *Huperzia serrata* [J]. RSC Adv, 2020, 10: 23566-23572.
- [19] Wang J, Wang XH, Liu X, et al. Synthesis of unnatural 2-substituted quinolones and 1,3-diketones by a member of type III polyketide synthases from *Huperzia serrata* [J]. Org Lett, 2016, 18: 3550-3553.
- [20] Bunsupa S, Hanada K, Maruyama A, et al. Molecular evolution and functional characterization of a bifunctional decarboxylase involved in lycopodium alkaloid biosynthesis [J]. Plant Physiol, 2016, 171: 2432-2444.