

• 药材与资源 •

阳春砂龙脑基二磷酸合酶关键氨基酸位点筛选及突变体的构建

赵圆圆, 孙叶雯, 郑诗敏, 李 萌, 马东明, 杨锦芬*

广州中医药大学中药学院(中药数理工程研究院)岭南中药资源教育部重点实验室, 广东 广州 510006

摘要:目的 对阳春砂萜类合成关键酶龙脑基二磷酸合酶(bornyl diphosphate synthase, BPPS)催化生成龙脑基二磷酸(bornyl diphosphate, BPP)的关键氨基酸位点解析,为阳春砂 BPPS 的功能优化并且促进其在代谢工程中的应用奠定基础。方法 比较阳春砂、海南砂的 BPPS(AvBPPS、AlBPPS)及已报道的其余 3 种植物的 BPPS,发现 AvBPPS 催化产生 BPP 的比率较高。通过分子建模和底物对接、保守基序预测,以及与其他 BPPS、单萜合酶序列多重比对的方法,筛选关键氨基酸位点,探索决定 AvBPPS 产生 BPP 及其较高比率 BPP 的关键活性位点,据此设计突变体,并用快速定点突变的方法获得突变体。结果 筛选出了 20 个可能影响 AvBPPS 催化的关键位点,并根据这些位点,设计了 20 个 AvBPPS 突变体及 1 个 AlBPPS 突变体,成功构建其中 17 个突变体,诱导表达获得了纯化蛋白。结论 综合使用多种分析方法,理性设计 BPPS 的突变位点,并获得了相应突变体及蛋白,为通过氨基酸定点突变探索 BPPS 的催化机制及功能优化提供了基础。

关键词: 阳春砂; 海南砂; 龙脑基二磷酸合酶; 定点突变; 蛋白表达

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)02-0529-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.02.023

Screening of key amino acid sites of AvBPPS and construction of mutants

ZHAO Yuan-yuan, SUN Ye-wen, ZHENG Shi-min, LI Meng, MA Dong-ming, YANG Jin-fen

Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, School of Pharmaceutical Sciences (Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine), Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510006, China

Abstract: Objective Bornyl diphosphate synthase (BPPS) is a special monoterpene synthase which produces bornyl diphosphate (BPP). BPP is the key precursor for the medicinal terpenoids biosynthesis of *Amomum villosum*. The understanding of the BPPS key amino acid sites catalyzing the production of BPP in *A. villosum* will help to optimize the function of BPPS and improve its application in metabolic engineering. **Methods** The comparison of BPPSs from *A. villosum*, *A. longiligulare* (another plant source for *Fructus Amomi*) and three other BPPSs which have been reported showed that AvBPPS had higher ratio of BPP production than other four BPPSs. Through the methods of molecular modeling, substrate docking, prediction of conserved motifs, and multiple alignments to explore the key active sites of AvBPPS that determine the production for BPP. The method of fast Site-Directed Mutagenesis was used to obtain the mutants. **Result** Twenty key sites of AvBPPS were screened out and predicted, and according to these selected sites, 20 AvBPPS mutants and one AlBPPS mutant were designed, 17 mutants and their purified proteins have been successfully obtained. **Conclusion** Intergrated analysis methods were used to design BPPS mutants rationally in this study, which provides the basis to explore the catalytic mechanism and to optimize the function of AvBPPS.

Key words: *Amomum villosum* Lour.; *Amomum longiligulare* T. L. Wu; bornyl diphosphate synthase (BPPS); site directed mutagenesis; protein expression

阳春砂 *Amomum villosum* Lour.为中药砂仁的主要来源植物,具有化湿开胃、温脾止泻、理气安胎等功效,也是我国著名的道地南药^[1]。在抗击新冠肺炎疫情期间,砂仁作为中药处方药参与后期治疗^[2]。

阳春砂的主要活性成分为其果实中的挥发性萜类,主要由单萜、倍半萜及其衍生物组成,其中,含量较大的有乙酸龙脑酯、樟脑、龙脑等,乙酸龙脑酯为《中国药典》2020年版规定的指标成分,不仅

收稿日期: 2021-08-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81872954)

作者简介: 赵圆圆, 硕士研究生, 研究方向为中药药成分次生代谢、萜类合酶催化机制。E-mail: yuanyzhao@foxmail.com

*通信作者: 杨锦芬, 研究员, 研究方向为中药药用成分代谢途径。E-mail: yangjf@gzucm.edu.cn

具有镇痛、抗炎的功效，还具有抗肿瘤和抗焦虑的活性^[3-7]。近年来，砂仁产量不断下降^[8]，品质也受到影响，其资源供给远远不能满足人们的需求。因此，通过现代生物技术研究砂仁药效物质的合成及富集机制具有重要的科学意义，也为应用代谢工程提高砂仁药材品质提供重要基础。

单萜合酶大多能够催化底物香叶基焦磷酸(geranyl diphosphate, GPP)生成不带磷酸基团的单萜，而龙脑基二磷酸合酶(bornyl diphosphate synthase, BPPS)是一种特殊的单萜合酶，它催化了一种不同寻常的反应——在GPP环化的过程中，磷酸基团经历了脱离并重新与碳正离子结合的过程，生成了含有磷酸基团、溶于水的龙脑基二磷酸(bornyl diphosphate, BPP)^[9]。阳春砂龙脑基二磷酸合酶(AvBPPS)以BPP为主产物，BPP是阳春砂主要药效成分龙脑和乙酸龙脑酯的前体，因此AvBPPS是阳春砂主要药效成分合成途径的关键酶^[10]。由于阳春砂的同属植物海南砂*Amomum longiligulare* T. L. Wu也是药典中规定的砂仁来源品种，课题组也克隆了海南砂的BPPS基因(AIBPPS)^[11]。

AvBPPS和AIBPPS是迄今发现的第4、5个BPPS基因，另外3个已报道的BPPS来源于芳香植物撒尔维亚*Salvia officinalis* L.^[12]、薰衣草*Lavandula angustifolia* L.^[13]和甜舌草*Lippia dulcis* L.^[14]，分别命名为SoBPPS、LaBPPS、LdBPPS。Whittington等^[15]分析了SoBPPS的晶体结构，并通过建立酶与底物及反应中间体的模型，推测了酶与底物结合的关键残基位点，通过分子建模发现，LaBPPS与SoBPPS的活性残基位点存在差异^[13]。虽然对BPPS的催化机制已有研究^[15-18]，但只是基于分子建模及动力学模拟的推断，而哪些氨基酸位点是生成BPP的关键催化位点，仍不明确。结合文献及本课题组前期的实验结果，对5个BPPS龙脑产率的比较发现，AvBPPS的龙脑产率(53.6%)略低于SoBPPS(57.8%)，但高于其他3个BPPS^[10,12]。AIBPPS是与AvBPPS亲缘关系最近且核苷酸序列相似性最高的序列，二者已知的几个保守基序中，仅(N、D)D(L、I、V)X(S、T)XXXE保守基序第495位氨基酸位点有差别，但AIBPPS的BPP产率却远低于AvBPPS，其主要产物是Camphene，而非BPP^[11]。因此，推测AvBPPS含有的某些关键氨基酸位点决定了其产生较高比率的BPP。

体外定点突变技术是当前生物、医学各领域研究中的一种重要实验手段，是改造、优化基因的便捷方法，也是研究蛋白质结构和功能之间的复杂关系的有力工具^[19]。为了探究AvBPPS如何催化生成龙脑前体BPP，以及决定其较高BPP产率的关键氨基酸位点，本研究参考撒尔维亚BPPS(SoBPPS)晶体结构，对AvBPPS进行分子建模、底物对接、保守基序预测，以及进行种内单萜合酶序列比对和不同BPPS序列比对，综合筛选出可能决定其功能的位点，并通过位点突变的方法构建相应的突变体，为后续通过体外酶活催化反应验证AvBPPS催化产生BPP的关键位点，以及获得能产生更高比率BPP的AvBPPS突变体，提供基础。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

pET-32a(+)原核表达载体由本实验室保存，重组pET32a-AvBPPS表达载体由本课题组前期构建。

大肠杆菌DH5 α 、BL21(DE3)、蛋白Marker购自TaKaRa公司；FastBlue蛋白快速染液、PBStm唑购自广州顺博生物技术有限公司；异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、快速定点突变试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司；氨苄青霉素购自赛国生物科技有限公司。

1.2 仪器

PCR仪、蛋白电泳仪(美国Bio-Rad公司)，洁净工作台(苏净安泰苏州安泰空气技术有限公司)、台式恒温振荡器(广州合众生物科技有限公司)、冷冻离心机(Sigma公司)。

2 方法

2.1 同源建模与模型评价

通过SWISS-MODOL(<https://swissmodel.expasy.org/>)网站建立AvBPPS模拟蛋白结构，选择SoBPPS的1N24.1.A蛋白为模板进行同源建模。用Procheck(<https://www.wwpdb.org/documentation/biocuration>)评估模板可靠性。用Pymol(<http://www.pymol.org/pymol.html>)软件对模拟蛋白三维结构进行分析。

2.2 分子对接及底物结合口袋分析

从ZINC(<http://zinc15.docking.org/>)数据库下载获得GPP的三维结构，用AutoDock Tools4.0处理，生成配体结构文件。用AutoDock(<http://autodock.scripps.edu/>)软件，对AvBPPS模拟蛋白

进行去水、加氢等处理,保留蛋白原有电荷,指定为受体结构。选择结合口袋,使对接区域包裹配体小分子。采用 AutoDock4 进行刚性对接。

2.3 保守基序 (motif) 预测

用 MEME 网站 (<http://meme-suite.org/>) 预测保守基序,将 AvBPPS、AIBPPS 以及课题组已克隆并鉴定功能的阳春砂其他单萜合酶 (monoterpene synthase, AvmTPS),包括蒎烯合酶 (AvPIS)、芳樟醇合酶 (AvLIS)、AvLIS/橙花醇合酶 (AvNES)、可帕烯合酶 (AvOCS) 1、AvOCS2 的氨基酸序列输入,预测 5 个保守基序,选择排名前 3 的基序作为主要保守基序。

2.4 序列多重比对

AvBPPS、AIBPPS 与阳春砂中已知的其他单萜合酶序列比对及其他 BPPS 序列比对。采用 DNAMEN6.0.40 (<http://www.lynnon.com/>) 软件,对 AvBPPS、AIBPPS 以及“2.3”项下提及的阳春砂 5 种单萜合酶 (monoterpene synthase, AvmTPS) 进行序列比对,寻找影响 AvBPPS 产生独特产物 BPP 的关键位点;同时对 AvBPPS、AIBPPS、SoBPPS、LaBPPS、LdBPPS (表 1) 进行序列比对,分析决定 AvBPPS 产生较高比率 BPP 的关键位点。

表 1 氨基酸序列信息

Table 1 Information of amino acid sequences

酶名称	GenBank 登录号	文献
AvBPPS	AWW87313	10
AIBPPS	QOC69158	11
SoBPPS	AF051900	12
LaBPPS	AJW68082	13
LdBPPS	ATY48638	14
AvPIS	AWW87312	10
AvLIS	QOC69160	11
AvLIS/NES	QOC69154	20
AvOCS1	-	20
AvOCS2	-	20

2.5 突变体的构建

参照 TIANGEN 快速定点突变试剂盒说明书,在拟突变位点的两端设计相应引物。以野生型 pET32a-AvBPPS-T、pET32a-AIBPPS 质粒^[11]为模板,用高保真酶 Fast Alteration DNA Polymerase 进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为

Fast Alteration DNA Polymerase 1 μ L, 5 \times FastAlteration Buffer 10 μ L 正反向引物各 2 μ L, 质粒 DNA 1 μ L, ddH₂O 34 μ L。PCR 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性, 58 $^{\circ}$ C 退火, 68 $^{\circ}$ C、2.5 min, 18 个循环, 68 $^{\circ}$ C 反应 5 min。用 Dpn I 消化模板质粒。将获得的产物用热击法转化 FDM 感受态细胞,用含羧苄 (carb) 抗性的固体 LB 琼脂培养基倒置培养,挑单菌落至相同抗性的液体 LB 中培养 12~16 h。取新鲜菌液测序,将得到的测序结果翻译成氨基酸,与野生型 AvBPPS、AIBPPS 序列比对,验证突变位点,比对结果除突变位点外,应无其他位点改变。引物及测序均由北京擎科生物技术有限公司完成。

2.6 原核表达及蛋白纯化

将突变体质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株,挑取 2~3 个菌落加入到含羧苄和氯霉素的液体 LB 培养基中,225 r/min, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。按照 1:100 稀释扩大培养,相同条件培养至 $A_{600}=0.4\sim 0.6$,以 0.1 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白。离心收集菌体,以磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 10 mmol/L 咪唑 [2 mL 1:10 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) + 异丙醇] 重悬,超声破碎,低温高速离心,留上清备用。采用 NI-NTA 柱法梯度洗脱目标蛋白,并用 pD-10 柱进行 Reaction buffer (25 mmol/L Hepes, pH 7.2, 5 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L DTT) 置换。配制 12% 的分离胶及 5% 的浓缩胶,进行变性聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳,将得到的纯化蛋白经 SDS 染液染色、灭活,每个点样孔上样 10 μ L,稳压 120 V 进行电泳。用 FastBlue 蛋白快速染液染色,后用脱色液脱色,直到条带清晰。

3 结果与分析

3.1 同源建模和分子对接结果

3.1.1 AvBPPS 的同源建模结果 以 SoBPPS 二聚体的晶体结构 1N24.1.A [crystal structure of (+)-bornyl diphosphate synthase] 为模版 (与 AvBPPS 的相似度为 41.76%),对 AvBPPS 进行分子建模,图 1-A 为 AvBPPS 三维结构。用 Procheck 评估 AvBPPS 蛋白模型的可靠性,结果如图 1-B 所示:93% 位于最适区域 (图中红色区域),5.1% 其他允许区域 (图中褐色区域),0.8% 一般允许区域 (图中黄色区域),0.2% 不允许区域 (图中淡黄色区域),表明该模型基本合理。

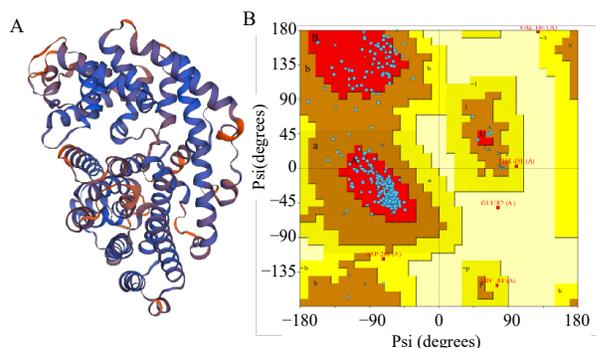
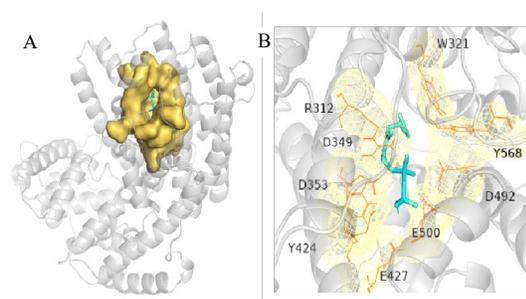


图1 AvBPPS的同源建模结构(A)和拉氏图(B)
Fig. 1 Homology model for 3D structure (A) and Ramachandran plot (B) of AvBPPS

3.1.2 分子对接及底物结合口袋分析 AvBPPS与底物GPP对接结果如图2-A所示。参照SoBPPS活性口袋位置,设置AvBPPS对接范围并生成结合口袋,观察分子对接中AvBPPS与GPP形成结合口袋的氨基酸位点共20个,参照文献报道^[22],可能参与BPPS催化生成碳阳离子中间体的活性位点有9个,如图2-B所示,包括R312、W321、D349、D353、Y424、E427、D492、E500和Y568。

3.2 保守基序(motif)预测结果

预测得到的主要保守基序氨基酸位点分别位于307~357(amino acid, aa)、367~417 aa、420~470 aa,分别命名为motif 1、motif 2、motif 3(图3),其中motif1包括已知的TPS基序“RXR、DDXXD”。此预测结果为后续的突变位点选择提供参考。



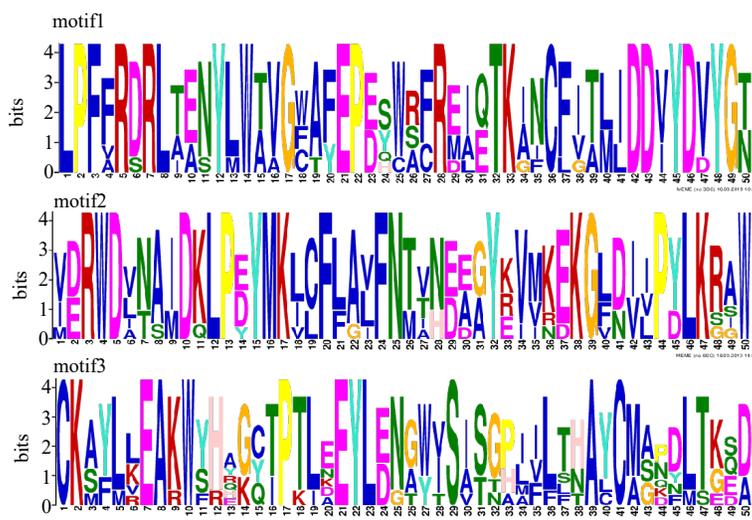
中间蓝色棍棒状为底物GPP,灰色为AvBPPS蛋白结构,黄色部分表示底物与蛋白对接形成的结合口袋及关键氨基酸位点;
A-AvBPPS-GPP复合体对接模型 B-AvBPPS与GPP对接的结合口袋
Blue sticks in the middle is the substrate GPP, the gray ribbon is the protein of AvBPPS, the yellow part indicates the docking result of the binding pocket and key amino acid sites. A-The docking model of AvBPPS-GPP Complex. B-The docking pocket of AvBPPS and GPP

图2 AvBPPS与GPP的分子对接结果

Fig. 2 Result of molecular docking between AvBPPS and GPP

3.3 多序列比对结果

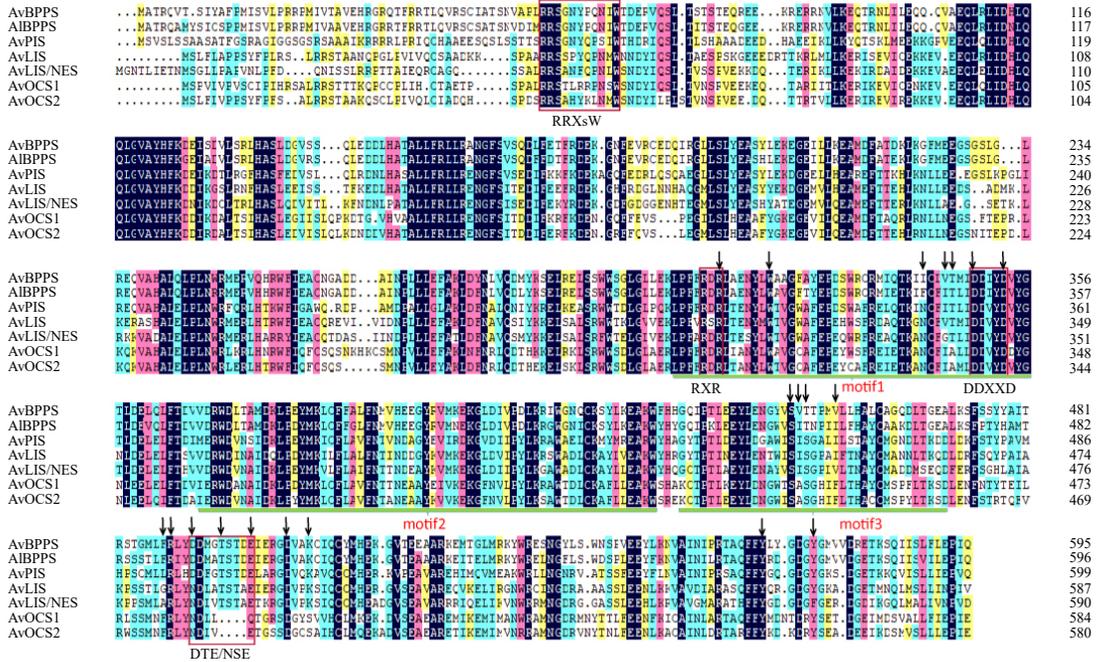
3.3.1 AvBPPS、AIBPPS与阳春砂中其他单萜合酶(AvmTPS)序列的比对结果 通过AvBPPS、AIBPPS与AvmTPS序列比对(图4),主要对AvBPPS底物结合口袋氨基酸位点、TPS已知的保守基序和前文预测的主要基序进行分析,比较BPPS与其他AvmTPS关键位点的不同,选择出可能影响AvBPPS催化产生独特产物BPP的关键位点。



氨基酸相应字母的高矮表示其出现的频率,字母越高,相应氨基酸出现频率越高

Height of the corresponding letter of amino acid indicates its occurrence frequency, higher the letter, the higher the occurrence frequency of the corresponding amino acid

图3 MEME预测的主要基序
Fig. 3 Main motifs predicted by MEME



红色方框表示 TPS 保守基序 RRXX₈W, RXR, DDXXD, DTE/NSE; 黑色箭头表示 AvBPPS 组成结合口袋的氨基酸序列; 绿色线条表示 MEME 预测的主要 Motifs

The red box indicates the motifs of TPS, including RRXX₈W, RXR, DDXXD, DTE/NSE; The black arrows indicates amino acid sequence constituting binding pocket, The green lines indicates the main motifs predicted by MEME

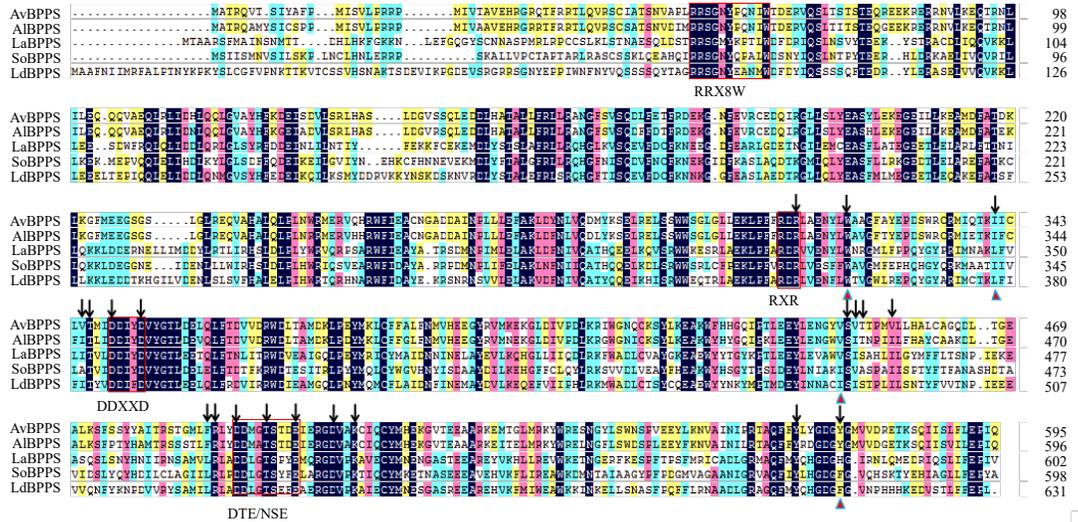
图 4 AvBPPS、AIBPPS 和其他 AvmTPS 的序列比对

Fig. 4 Sequence alignment of AvBPPS, AIBPPS and other AvmTPSs of *A. villosum*

3.3.2 AvBPPS 序列与其他 BPPS 的序列比对结果

通过 AvBPPS 序列与其他 BPPS 序列比对, 特别关注 AvBPPS 底物结合口袋氨基酸位点、motif、SoBPPS

预测的关键氨基酸位点, 观察 AvBPPS 与其他 BPPS 关键位点的不同, 选择出可能影响 AvBPPS 催化产生较高比率 BPP 的关键位点, 序列比对结果见图 5。



方框表示 TPS 保守基序 RRXX₈W, RXR, DDXXD, DTE/NSE; 箭头表示 AvBPPS 组成结合口袋的氨基酸序列; 三角形表示 SoBPPS 晶体结构预测的活性位点

The red boxes indicate the motifs of TPS, including RRXX₈W, RXR, DDXXD, DTE/NSE; The black arrows indicate amino acid sequence constituting binding pocket, The red triangles indicate the active sites of SoBPPS crystal structure predicted by MEME

图 5 AvBPPS 与其他 BPPS 比对结果

Fig. 5 A snapshot of alignment of AvBPPS and other BPPS

3.4 基于 SoBPPS 晶体结构分析 AvBPPS 关键位点

根据文献对 SoBPPS 晶体结构及其关键位点的报道, 选取其稳定碳正离子中间体关键位点 D³⁵⁵、R⁴⁹³、R⁴⁹⁶[21-22]、W³²³、I³⁴⁴、V⁴⁵²、F⁵⁷⁸, 及水分子结合的关键位点 D³⁵¹、Y⁴²⁶[15], 将以上位点对应到 AvBPPS, 选择 D³⁴⁹、R⁴⁸⁹、R⁴⁹²、W³²¹、I³⁴²、V⁴⁵⁰、Y⁵⁷⁴、D³⁵³、Y⁴²⁴ 作为突变候选位点。

3.5 突变位点的设计

3.5.1 根据 AvBPPS 与 GPP 结合口袋设计突变位点

(1) 结合序列多重比对结果, 对组成结合口袋的 20 个氨基酸进行保守性分析, 发现 R³¹⁴、W³²¹、T³⁴⁶、D³⁴⁹、D³⁵³、S⁴⁴⁹、R⁴⁸⁹、D⁴⁹²、T⁴⁹⁶、E⁵⁰⁰、D⁵⁰⁵、K⁵⁰⁸、Y⁵⁶⁸ 相对保守 (图 4、5)。在进化过程中, 绝对保守的氨基酸往往发挥重要作用, 因此不作为突变候选位点。I³⁴²、V³⁴⁵、V⁴⁵⁰、T⁴⁵¹、V⁴⁵⁵、F⁴⁸⁸、Y⁵⁷⁴ 不完全保守, 设计将 V⁴⁵⁰ 侧链减小, 活性口袋变大, 构建突变体 V450A; 将 I³⁴²、V³⁴⁵、T⁴⁵¹、V⁴⁵⁵、F⁴⁸⁸、Y⁵⁷⁴ 侧链增大, 活性口袋变小, 构建突变体 I342R、V345R、T451R、V455W、F488W、Y574R。通过这 2 种突变方向的改变, 观察突变体结合口袋、产物变化来解析 AvBPPS 催化机制。

(2) A⁵⁰⁷、L⁵⁶⁹、Y⁵⁷⁰ 虽然不属于构成结合口袋的氨基酸, 但其所处的位置周围富集结合口袋氨基酸, 若这些位置发生突变, 可能会通过影响构成结合口袋的氨基酸的来影响 AvBPPS 与底物的结合, 由于这 3 个氨基酸均不带电荷, 设计将这些位点突变为带正电荷的氨基酸, 及在其他序列中的不保守氨基酸, 构建突变体 A507R、A507P、A507Q、LY569570RR, 研究这 3 个位点是否会影响结合口袋从而对 AvBPPS 产物。

3.5.2 基于 BPPS 与水分子作用力设计突变位点 参考 SoBPPS 与水分子结合的 2 个位点, AvBPPS 水分子结合位点为 D³⁴⁹ 和 Y⁴²⁴, 其中 D³⁴⁹ 为基序 DDXXD 的第一个氨基酸, 在所有 TPS 均保守, 因此不作为突变候选位点; 而 Y⁴²⁴ 在所有 BPPS 中保守, 在其他 AvmTPS 中不保守, 选择这一位点将其突变成其他 TPS 中的氨基酸 F (Phe), 设计突变体 Y424F, 探索这一位点是否为决定 AvBPPS 生成独特产物 BPP 的关键位点。

3.5.3 根据保守基序预测结果设计突变位点 结合序列多重比对及结合口袋在 BPPS 中的定位置, 将预测得到的保守基序结合分析, 选择 motif3 中的氨基酸 Q435、A470 进行突变, 这 2 个位点在

AvBPPS、AIBPPS 中相对保守, 而在其他序列中不保守, 设计将这 2 个位点突变成其他序列中的氨基酸, 构建突变体 Q435Y、Q435R、A470D, 探索这些位点是否为影响 BPPS 生成 BPP 的关键位点。

3.5.4 根据序列多重比对结果设计突变位点

(1) 通过序列多重比对结果, 结合分子对接结合口袋分析, 选择 P⁶¹、Q⁶²、I³⁵¹、Y³⁵²、A⁵⁰⁷、Y⁵¹³ 进行突变。P⁶¹、Q⁶² 位于基序 RRX₈W 中, 为连续位点, 在 AvBPPS、AIBPPS 中为 P 和 Q, 与其他 BPPS 及 AvmTPS 差异明显, 设计突变体 PQ6162QP, 探索这一连续位点是否为影响 AvBPPS 生成较高比率 BPP 的关键位点; I³⁵¹ 和 Y³⁵² 均位于基序 DDXXD, 参与催化过程中 Mg⁺的结合^[23], 为探索这两个不保守位点在 BPPS 催化过程中的作用, 设计将这两个位点突变成不带电荷的疏水性氨基酸 A (Ala), 构建突变体 I351A、Y352A, 探索这 2 个位点是否为影响 AvBPPS 生成 BPP 的关键位点; Y⁵¹³ 在所有 BPPS 序列中均保守, 而在其他 AvmTPS 中为其他氨基酸, 设计将这一位点突变成其他 AvmTPS 中的氨基酸 L (Leu), 构建突变体 Y513L, 探索这一位点是否为影响 BPPS 生成 BPP 的关键位点。

(2) 在 AvBPPS 序列与 AIBPPS 序列比对结果中, 发现在二者 TPS 共有的基序中, 仅 DTE 有一个氨基酸位点的差别 (图 5)—AvBPPS 的 495 位是 G (DDMGTSTDE), 对应 AIBPPS 的 496 位是 A (DDMATSTDE), 设计这一位点进行双向突变, 设计突变体 AvBPPS-G495A、AIBPPS-A496G, 探索这一位点是否为影响 AvBPPS 生成较高比率 BPP 的关键位点。

以上定点突变位点汇总见表 2。

3.6 突变体的构建

3.6.1 突变结果的分析 根据前文的突变位点设计附表 1 中的引物, 以野生型质粒为模板, PCR 扩增突变体, 获得 17 个阳性突变体。将获得的突变体测序结果翻译成氨基酸序列, 并与相应的野生型 BPPS 序列进行比对, 结果显示, 17 个突变体均对目的位点突变成功。其中 16 个突变体为 AvBPPS 突变体, 1 个为 AIBPPS 突变体 (AIBPPS-A496G)。突变位点的序列比对结果如图 6 所示。

3.6.2 突变体蛋白的获得 将突变体质粒转化到大肠杆菌中, 诱导蛋白表达, 通过 NI 柱梯度洗脱, 经 pD-10 柱置换脱盐后, 进行 SDS-PAGE 检测。如图 7 所示, 17 个突变体均获得纯化蛋白。

表 2 定点突变位点汇总
Table 2 Lists of site-directed mutagenesis

突变位点	突变目的
V450A、Y574R、I342R、V345R、T451R、V455W、F488W、A507R、A507P、A507Q、LY569570RR Y424F	通过多种方式的突变设计，改变 AvBPPS 与底物 GPP 的结合口袋，解析 AvBPPS 催化机制，以期获得能产生更高比率 BPP 的突变体
Q435Y、Q435R、A470D	解析水分子在 AvBPPS 催化过程中的重要作用
PQ6162QP、I351A、Y352A、Y513L	探索这些位点是否为影响 AvBPPS 生成独特产物 BPP 的关键位点
G495A、AIBPPS-A496G	探索这些位点是否为影响 BPPS 生成 BPP 及较高产率 BPP 的关键位点
	双向突变，验证其是否为影响 BPP 产率的关键位点

突变体未标注基因名的均为 AvBPPS 的突变位点

Mutants without annotated gene name are the mutation sites of AvBPPS

AvBPPS	CKSYLKEAKWFHHGQIPTLEEYLENGYVS	VT	PMVLLHALCAGQDLTGEALKSFSSYYA	480	AvBPPS	GYLSWNSPVEEYLNVAINI	IPRTAQFFLYLGDGY	GMVVDRETKSQI	ISLFLEP	IQI	596										
V450A	CKSYLKEAKWFHHGQIPTLEEYLENGYVS	AT	TPMVLVLLHALCAGQDLTGEALKSFSSYYA	480	Y574R	GYLSWNSPVEEYLNVAINI	IPRTAQFFLYLGDGR	GMVVDRETKSQI	ISLFLEP	IQI	596										

AvBPPS	GLLLEKLPFFDRDLAENYLWAAGFAYEPDS	WRCRM	IQT	K	I	CLVTM	IDD	YDVYGT	LDE	360	AvBPPS	TRSTGMLFRLYDDMG	TSTDE	IERGDV	AKC	I	QCYMHEK	GVTEEAARK	EMTGLMRKY	WRESN	540
I342R	GLLLEKLPFFDRDLAENYLWAAGFAYEPDS	WRCRM	IQT	K	I	CLVTM	IDD	YDVYGT	LDE	360	A507R	TRSTGMLFRLYDDMG	TSTDE	IERGDV	RKC	I	QCYMHEK	GVTEEAARK	EMTGLMRKY	WRESN	540

AvBPPS	TRSTGMLFRLYDDMG	TSTDE	IERGDV	AKC	I	QCYMHEK	GVTEEAARK	EMTGLMRKY	WRESN	540	AvBPPS	TRSTGMLFRLYDDMG	TSTDE	IERGDV	AKC	I	QCYMHEK	GVTEEAARK	EMTGLMRKY	WRESN	540
A507P	TRSTGMLFRLYDDMG	TSTDE	IERGDV	PKC	I	QCYMHEK	GVTEEAARK	EMTGLMRKY	WRESN	540	A507Q	TRSTGMLFRLYDDMG	TSTDE	IERGDV	QKC	I	QCYMHEK	GVTEEAARK	EMTGLMRKY	WRESN	540

AvBPPS	GYLSWNSPVEEYLNVAINI	IPRTAQFF	LY	GDGYGMVVDRETKSQI	ISLFLEP	IQI	596	AvBPPS	CKSYLKEAKWFHHGQIPTLEEYLENGYVS	VT	PMVLLHALCAGQDLTGEALKSFSSYYA	480									
LY569570RR	GYLSWNSPVEEYLNVAINI	IPRTAQFF	YR	GDGYGMVVDRETKSQI	ISLFLEP	IQI	596	Y424F	CKSFL	KEAKWFHHGQIPTLEEYLENGYVS	VT	PMVLLHALCAGQDLTGEALKSFSSYYA	480								

AvBPPS	CKSYLKEAKWFHHGQIPTLEEYLENGYVS	VT	PMVLLHALCAGQDLTGEALKSFSSYYA	480	AvBPPS	CKSYLKEAKWFHHGQIPTLEEYLENGYVS	VT	PMVLLHALCAGQDLTGEALKSFSSYYA	480												
Q435Y	CKSYLKEAKWFHHGQIPTLEEYLENGYVS	VT	PMVLLHALCAGQDLTGEALKSFSSYYA	480	Q435R	CKSYLKEAKWFHHGQIPTLEEYLENGYVS	VT	PMVLLHALCAGQDLTGEALKSFSSYYA	480												

AvBPPS	CKSYLKEAKWFHHGQIPTLEEYLENGYVS	VT	PMVLLHALCAGQDLTGEALKSFSSYYA	480	AvBPPS	PKN	I	WTDER	VQSL	TSTSTEQ	REEKRERRN	LKEQ	TRNL	I	LEQQV	AEQLR	IDHL	QQLGV	120		
A470D	CKSYLKEAKWFHHGQIPTLEEYLENGYVS	VT	PMVLLHALCAGQDLTGEALKSFSSYYA	480	PQ6162QP	QPN	I	WTDER	VQSL	TSTSTEQ	REEKRERRN	LKEQ	TRNL	I	LEQQV	AEQLR	IDHL	QQLGV	120		

AvBPPS	GLLLEKLPFFDRDLAENYLWAAGFAYEPDS	WRCRM	IQT	K	I	CLVTM	IDD	YDVYGT	LDE	360	AvBPPS	GLLLEKLPFFDRDLAENYLWAAGFAYEPDS	WRCRM	IQT	K	I	CLVTM	IDD	YDVYGT	LDE	360
I351A	GLLLEKLPFFDRDLAENYLWAAGFAYEPDS	WRCRM	IQT	K	I	CLVTM	IDD	YDVYGT	LDE	360	Y352W	GLLLEKLPFFDRDLAENYLWAAGFAYEPDS	WRCRM	IQT	K	I	CLVTM	IDD	YDVYGT	LDE	360

AvBPPS	TRSTGMLFRLYDDMG	TSTDE	IERGDV	AKC	I	QCYMHEK	GVTEEAARK	EMTGLMRKY	WRESN	540	AvBPPS	TRSTGMLFRLYDDMG	TSTDE	IERGDV	AKC	I	QCYMHEK	GVTEEAARK	EMTGLMRKY	WRESN	540
Y513L	TRSTGMLFRLYDDMG	TSTDE	IERGDV	AKC	I	QCYMHEK	GVTEEAARK	EMTGLMRKY	WRESN	540	G495A	TRSTGMLFRLYDDMG	TSTDE	IERGDV	AKC	I	QCYMHEK	GVTEEAARK	EMTGLMRKY	WRESN	540

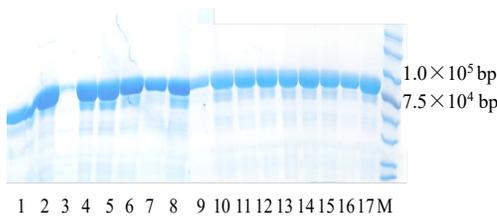
AIBPPS	MTRSSSTLFR	I	YDDM	AT	TSTDE	IERGDV	AKC	I	QCYMHEK	GVTEEAARKE	I	TELMRKY	WREL	540							
A496G	MTRSSSTLFR	I	YDDM	GT	TSTDE	IERGDV	AKC	I	QCYMHEK	GVTEEAARKE	I	TELMRKY	WREL	540							

红色字母表示突变氨基酸位点

The red letter indicates the amino acid site of mutant

图 6 野生型与突变体 BPPS 的氨基酸突变序列比对

Fig. 6 Mutagenic amino acid sequence alignment of wild type BPPS and mutants



M-Marker 1-V450A 2-Y574R 3-I342R 4-A507R 5-A507P
6-A507Q 7-LY569570RR 8-Y424F 9-Q435Y 10-Q435R
11-A470D 12-PQ6162QP 13-I351A 14-Y352A 15-Y513L
16-G495A 17-AIBPPS-A496G

图 7 突变体蛋白电泳分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of mutants

4 讨论

BPPS 是存在于植物体内的一种特殊的 TPS，其主产物 BPP 是龙脑的直接前体，龙脑经过乙酰化生成乙酸龙脑酯^[8-13]。乙酸龙脑酯为阳春砂中最主要的单萜，也是主要的药效成分，因此 AvBPPS 是合成阳春砂主要萜类成分的关键酶。目前，BPPS 仅在 5 种植物中克隆并鉴定，对比发现 AvBPPS 是催化产生 BPP 产率较高的 BPPS。

本研究聚焦于 BPPS 的结构及其与几种 BPPS 的差异性，筛选可能决定 AvBPPS 产生 BPP 的关键位点及决定其产生较高比率 BPP 的关键位点。

参考 Whittington 等^[15]获得了撒尔维亚 (SoBPPS) 晶体结构及预测的 BPPS 活性位点; 结合萜类合酶中与镁离子结合的基序分析^[18]; 及同类 BPPS 分子建模和底物结合口袋分析, 预测其可能的活性位点^[13]; 前人均对 BPPS 可能的活性位点进行了预测, 但并未设计突变进行验证; 结合 Das 等^[24]通过 EnzyDock 软件对 SoBPPS 催化 GPP 酶的配位反应过程进行模拟, 预测出 GPP 在催化过程中碳正离子在结合口袋中的结构变化。

目前, 突变体的构建体系已经成熟, 已成为关键氨基酸位点比较、蛋白结构分析和基因改良等研究的常用方法。在蛋白质工程研究中, 目前常用的方法有定向进化和理性设计^[25]。定向进化需要构建庞大的突变体文库, 在突变体文库中筛选适合的突变体。张圆圆等^[26]通过位点突变的方法, 构建了番茄的突变体, 建立了 CRISPR/Cas9 基因编辑体系, 并实现对糖苷水解酶基因 α -Man 的编辑。孙熙麟等^[27]通过氨基酸位点突变的方法, 获得了稳定性提高但生物学活性不变的灵芝免疫调节蛋白 LZ-8 的突变体。这一方法能够获得合适的目标蛋白, 但是却费时、费力、工作量大。而理性设计的方法在了解蛋白质结构的基础上, 在特定的位点引入突变, 却没有通用的方法、很难被复制^[22]。Leferinck 等^[28]通过分子建模和突变数据分析等方法, 揭示了突变位点与单萜产物之间的关联。本研究为了更深入地研究 BPPS 催化机制, 对 AvBPPS 进行同源建模、底物分子对接、保守基序预测、基序分析以及与其他 BPPS、阳春砂其他单萜合酶序列的多重比对, 综合以上结果分析可能影响 AvBPPS 催化的关键位点, 相应设计了不同突变方向的突变体对这些位点进行验证, 并获得了 17 个突变体及其纯化蛋白。

本实验定位了 BPPS 可能的活性位点, 减少了以往选择突变位点的随机性, 也减少了随机突变的工作量, 增大了筛选活性位点的可能性。后续在已获得的突变体蛋白基础上, 将对其进行体外酶活性测定, 验证氨基酸位点的功能, 并筛选 BPP 产率更高的突变体。本研究加深了对单萜环化酶的认识, 为探索 BPPS 的结构与功能的关系、AvBPPS 功能优化提供了基础, 也为阳春砂萜类代谢工程的深入研究提供重要基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 吴晓松, 李晓光, 肖飞, 等. 砂仁挥发油中乙酸龙脑酯

镇痛抗炎作用的研究 [J]. 中药材, 2004, 27(6): 438-439.

- [2] 沈洁, 郑敏霞, 谢升阳, 等. 新型冠状病毒肺炎中医药防治组方规律分析 [J]. 中国药业, 2020, 29(6): 25-28
- [3] 余竞光, 孙兰, 周立东, 等. 中药砂仁化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(4): 39-40.
- [4] Chen N, Sun G, Yuan X, *et al.* Inhibition of lung inflammatory responses by bornyl acetate is correlated with regulation of myeloperoxidase activity [J]. *J Surg Res*, 2014, 186(1): 436-445.
- [5] Li J, Wang S X. Synergistic enhancement of the antitumor activity of 5-fluorouracil by bornyl acetate in SGC-7901 human gastric cancer cells and the determination of the underlying mechanism of action [J]. *J Buon*, 2016, 21(1): 108-117.
- [6] Sajjadi S E, Jamali M, Shokoohinia Y, *et al.* Antiproliferative evaluation of terpenoids and terpenoid coumarins from *Ferulago macrocarpa* (Fenzl) Boiss. fruits [J]. *Pharmacognosy Res*, 2014, 7(4): 322-328.
- [7] Matsubara E, Fukagawa M, Okamoto T, *et al.* (-)-Bornyl acetate induces autonomic relaxation and reduces arousal level after visual display terminal work without any influences of task performance in low-dose condition [J]. *Biomed Res*, 2011, 32(2): 151-157.
- [8] 欧阳霄妮. 阳春砂资源调查与品质评价研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
- [9] Christianson D W. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases [J]. *Chem Rev*, 2017, 117(17): 11570-11648.
- [10] Wang H, Ma D, Yang J, *et al.* An integrative volatile terpenoid profiling and transcriptomics analysis for gene mining and functional characterization of AvBPPS and AvPS involved in the monoterpenoid biosynthesis in *Amomum villosum* [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 846.
- [11] 李萌. 阳春砂单萜和倍半萜合酶的功能鉴定及 BPPS 的功能比较 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [12] Wise M L, Savage T J, Katahira E, *et al.* Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*) [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(24): 14891-14899.
- [13] Despinasse Y, Fiorucci S, Antonczak S, *et al.* Bornyl-diphosphate synthase from *Lavandula angustifolia*: A major monoterpene synthase involved in essential oil quality [J]. *Phytochemistry*, 2017, 137: 24-33.
- [14] Hurd M C, Kwon M, Ro D K. Functional identification of a *Lippia dulcis* bornyl diphosphate synthase that contains a duplicated, inhibitory arginine-rich motif [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(3): 963-968.
- [15] Whittington D A, Wise M L, Urbansky M, *et al.* Bornyl

- diphosphate synthase: Structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase [J]. *PNAS*, 2002, 99(24): 15375-15380.
- [16] Christianson D W. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases [J]. *Chem Rev*, 2017, 117(17): 11570-11648.
- [17] Weitman M, Major D T. Challenges posed to bornyl diphosphate synthase: Diverging reaction mechanisms in monoterpenes [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(18): 6349-6360.
- [18] Zhou K, Peters R J. Investigating the conservation pattern of a putative second terpene synthase divalent metal binding motif in plants [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(3): 366-369.
- [19] 赵焕英, 赵君朋, 杨慧, 等. 重组 PCR 快速基因定点突变的技术方法 [J]. 首都医科大学学报, 2007, 28(2): 260-261.
- [20] 赵海莹. 阳春砂萜类合酶及其启动子参与挥发性萜类合成的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
- [21] Weitman M, Major D T. Challenges posed to bornyl diphosphate synthase: Diverging reaction mechanisms in monoterpenes [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(18): 6349-6360.
- [22] O'Brien T E, Bertolani S J, Zhang Y, *et al.* Predicting productive binding modes for substrates and carbocation intermediates in terpene synthases-bornyl diphosphate synthase as a representative case [J]. *ACS Catal*, 2018, 8(4): 3322-3330.
- [23] Aaron J A, Christianson D W. Trinuclear metal clusters in catalysis by terpenoid synthases [J]. *Pure Appl Chem*, 2010, 82(8): 1585-1597.
- [24] Das S, Shimshi M, Raz K, *et al.* EnzyDock: Protein-ligand docking of multiple reactive states along a reaction coordinate in enzymes [J]. *J Chem Theory Comput*, 2019, 15(9): 5116-5134.
- [25] 易华伟, 唐晓峰. 基于氨基酸序列和模拟结构预测蛋白质稳定性的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2017, 33(4): 83-89.
- [26] 张圆圆, 邵冬南, 崔百明. 基于 CRISPR/Cas9 加工番茄 α -Man 突变体的构建 [J]. 生物技术通报, 2019, 35(6):9-15.
- [27] 孙熙麟, 蒋振彦, 刘志屹, 等. 氨基酸定点突变提高灵芝蛋白 LZ-8 热稳定性的研究 [J]. 生物技术通报, 2020, 36(1):23-28.
- [28] Leferink N G H, Ranaghan K E, Karuppiah V, *et al.* Experiment and simulation reveal how mutations in functional plasticity regions guide plant monoterpene synthase product outcome [J]. *ACS Catal*, 2018, 8(5): 3780-3791.

[责任编辑 时圣明]