



解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 中 *ysnE* 参与吲哚-3-乙酸合成的代谢途径研究

周慧娟¹, 余梦林¹, 李孜燕¹, 高林², 高加明³, 蔡冬波¹, 杨之帆¹, 陈守文¹, 马昕^{1*}

- 1 湖北大学生命科学学院 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室 湖北省环境微生物工程技术研究中心, 湖北 武汉 430062
- 2 中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛 266101
- 3 中国烟草总公司湖北省公司, 湖北 武汉 430000

周慧娟, 余梦林, 李孜燕, 高林, 高加明, 蔡冬波, 杨之帆, 陈守文, 马昕. 解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 中 *ysnE* 参与吲哚-3-乙酸合成的代谢途径研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 845-854.

ZHOU Huijuan, SHE Menglin, LI Ziyang, GAO Lin, GAO Jiaming, CAI Dongbo, YANG Zhifan, CHEN Shouwen, MA Xin. Metabolic pathways of *ysnE* involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* HZ-12[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 845-854.

摘要: 【目的】吲哚-3-乙酸是调控植物生长发育和生理活动的重要激素, 吲哚-3-乙酸 N-乙酰转移酶 YsnE 在吲哚-3-乙酸合成中发挥重要作用, 本研究拟解析解淀粉芽胞杆菌中 YsnE 参与吲哚-3-乙酸合成的代谢途径。【方法】通过基因 *ysnE* 缺失和强化表达, 分析 *ysnE* 对吲哚-3-乙酸合成影响, 结合吲哚-3-乙酸合成中间物(吲哚丙酮酸、吲哚乙酰胺、色胺和吲哚乙腈)添加和体外酶转化实验, 解析 *ysnE* 参与吲哚-3-乙酸合成的代谢途径。【结果】明确了 YsnE 在解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 吲哚-3-乙酸合成中发挥重要作用。发现 *ysnE* 缺失菌株中的吲哚丙酮酸、吲哚乙酰胺和吲哚乙腈利用显著降低, 揭示了 YsnE 主要发挥吲哚丙酮酸脱羧酶 YclB 和吲哚乙酰胺水解酶/腈水解酶/腈水合酶 YhcX 的功能, 并通过参与吲哚丙酮酸、吲哚乙酰胺和吲哚乙腈途径来影响吲哚-3-乙酸合成。【结论】初步揭示了 YsnE 通过影响吲哚丙酮酸、吲哚乙酰胺和吲哚乙腈途径参与吲哚-3-乙酸合成的代谢机理, 为吲哚-3-乙酸合成途径解析和代谢工程育种构建吲哚-3-乙酸高产菌株奠定了基础。

关键词: 吲哚-3-乙酸; 解淀粉芽胞杆菌; YsnE; 代谢途径

Metabolic pathways of *ysnE* involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* HZ-12

ZHOU Huijuan¹, SHE Menglin¹, LI Ziyang¹, GAO Lin², GAO Jiaming³, CAI Dongbo¹, YANG Zhifan¹, CHEN Shouwen¹, MA Xin^{1*}

1 Environmental Microbial Technology Center of Hubei Province, State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

2 Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

3 Hubei Corporation of China National Tobacco Corporation, Wuhan 430000, Hubei, China

Abstract: [Objective] Indole-3-acetic acid is crucial for plant growth and development and physiological activities. Indole-3-acetic acid N-acetyltransferase YsnE plays an important part in indole-3-acetic acid synthesis. This study aims to analyze the metabolic pathways of YsnE involved in indole-3-acetic acid synthesis of *Bacillus amyloliquefaciens*. [Methods] Through deletion and overexpression of *ysnE*, the role of *ysnE* in indole-3-acetic acid synthesis was elucidated. Combined with the addition of indole-3-acetic acid synthesis intermediates (indole pyruvic acid (IPA), indole-3-acetamide (IAM), tryptamine (TAM), indole-3-acetonitrile (IAN)) and *in vitro* enzymatic conversion experiments, the metabolic pathways of *ysnE* involved in indole-3-acetic acid synthesis were clarified. [Results] YsnE played an important role in indole-3-acetic acid synthesis in *B. amyloliquefaciens* HZ-12. The amount of IPA, IAM, and IAN consumed in *ysnE* deletion strain was significantly reduced, and YsnE functioned as indolepyruvate decarboxylase YclB, and indoleacetamide hydrolase/nitrilase/nitrile hydratase YhcX, and affected indole-3-acetic acid synthesis by participating in IPA, IAM, and IAN pathways. [Conclusion] YsnE influences the IPA, IAM, and IAN pathways to involve in indole-3-acetic acid synthesis, which lays a foundation for analysis of indole-3-acetic acid synthesis pathway and breeding strains with high yield of indole-3-acetic acid by metabolic engineering.

Keywords: indole-3-acetic acid; *Bacillus amyloliquefaciens*; YsnE; metabolic pathway

吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)是最早被发现的调节植物发育和生理过程的内源激素,属于吲哚类化合物^[1-2]。吲哚-3-乙酸具有促进植物生长和养分转运、维持顶端优势、促进光合产物运输,以及抑制花朵脱落的作用。从植物或其特定内生菌中提取获得的吲哚-3-乙酸,在植物生长调节和人工定向培育中具有重要作用。

芽胞杆菌是一种好氧或兼性好氧的革兰氏阳性菌,因其具有培养条件简单、蛋白分泌量高

和不含内毒素等特点,在微生态菌剂、益生菌开发、酶制剂和生化产品生产等方面应用广泛^[3],芽胞杆菌也是吲哚-3-乙酸合成的优良宿主。文献报道指出,吲哚-3-乙酸的生物合成分为色氨酸依赖和非依赖型两种^[4-5]。针对于色氨酸非依赖型途径,通过标记底物添加实验发现,当培养基中不存在色氨酸时,90%吲哚-3-乙酸通过色氨酸非依赖型途径合成。然而,大多数吲哚-3-乙酸生物合成途径以 L-色氨酸为起始物,通过吲

吲哚-3-丙酮酸(indole-3-pyruvic acid, IPA)、吲哚-3-乙酰胺(indole-3-acetamide, IAM)、吲哚-3-乙腈(3-indoleacetonitrile, IAN)、色胺(tryptamine, TAM)和色氨酸侧链氧化酶(tryptophan side chain oxidase, TSO)等途径合成吲哚-3-乙酸^[6-9]。Shao等通过对生防解淀粉芽胞杆菌 SQR9 中吲哚-3-乙酸合成途径分析,发现 SQR9 菌株中吲哚-3-乙酸是通过多条途径合成的^[1],并研究了酰基转移酶 YsnE 影响吲哚-3-乙酸合成的主要途径^[10]。此外,随着人们对吲哚-3-乙酸合成途径了解的不断深入,通过引入醛脱氢酶,实现了吲哚-3-乙酸在大肠杆菌中的从头合成^[11]。Kochar等通过强化表达吲哚丙酮酸和吲哚乙酰胺途径

关键基因,提高了荧光假单胞菌中吲哚-3-乙酸合成水平^[12]。

解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 是由本课题组分离保藏的一株野生生防菌株。之前研究中通过代谢工程育种,显著提高了该菌株伊枯草菌素 A 的合成水平,为该菌株在生物防治中的应用奠定了基础。此外,课题组研究还发现,该菌株具有吲哚-3-乙酸合成能力,但其合成途径尚不明了,限制了吲哚-3-乙酸高产的代谢工程育种。本研究中,我们研究了 YsnE 参与吲哚-3-乙酸合成的代谢途径(图 1),为解淀粉芽胞杆菌中吲哚-3-乙酸合成途径解析及代谢工程育种构建吲哚-3-乙酸高产菌株奠定了基础。

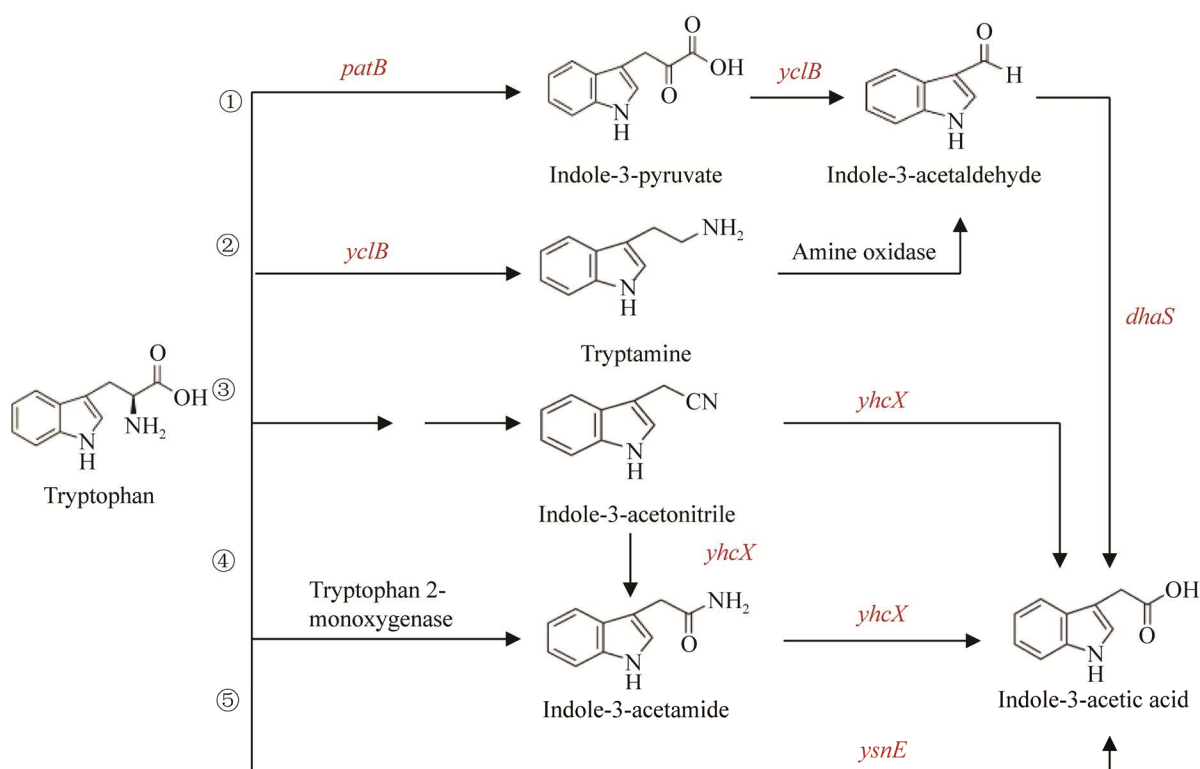


图 1 解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 中吲哚-3-乙酸生物合成途径

Figure 1 Indole-3-acetic acid biosynthesis pathways in *Bacillus amyloliquefaciens* HZ-12. ①: Indole 3-pyruvate pathway (IPA); ②: Tryptamine pathway (TAM); ③: Indole 3-acetonitrile pathway (IAN); ④: Indole 3-acetamide pathway (IAM); ⑤: Predicted YsnE participated pathway. *patB*: Tryptophan transaminase; *yclB*: Indole-3-pyruvate decarboxylase; *dhaS*: Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase; *yhcX*: Indole-3-acetamide hydrolase/nitrilase/nitrile hydratase; *ysnE*: Indole-3-acetic acid acetyltransferase.

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和质粒

本研究出发菌株为解淀粉芽胞杆菌 HZ-12, 所用菌株和质粒见表 1, 相关引物见表 2。

1.2 培养基

LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, pH 为 7.0–7.2。

LB 固体培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 琼脂 18, pH 为 7.0–7.2。

Landy 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20, L-谷氨酸钠 5, 磷酸二氢钾 1, 酵母提取物 5, 七水合硫酸镁 0.5, 氯化钾 0.5, 四水合硫酸锰 0.005, 七水合硫酸铜 0.000 16, 七水合硫酸亚铁 0.000 15, L-苯丙氨酸 0.002, pH 为 7.0–7.2。

灭菌条件: 所有培养基均 115 °C 灭菌 20 min。

1.3 主要试剂

Taq DNA 聚合酶, 北京全式金生物科技有

限公司; DNA 分子量标准、T4 DNA 连接酶、DNA 限制性内切酶, 宝生物工程(大连)有限公司; DNA 回收纯化试剂盒和质粒小提试剂盒, Omega Bio-Tek 公司; 金牌 Mix, 擎科生物有限公司(武汉); 引物合成及测序, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 蛋白胨、酵母提取物和琼脂糖, Spanish 公司; α -淀粉酶、抗生素(Amp、Kan、Tet), 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 其他国产分析纯试剂, 国药集团化学试剂有限公司。

1.4 工程菌株的构建

1.4.1 解淀粉芽胞杆菌基因 *ysnE* 游离表达菌株的构建

以枯草芽胞杆菌 168 基因组为模板, 使用引物 pHY-*ysnE*-1/2 扩增 P43 启动子。以解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 基因组 DNA 为模板, 使用 pHY-*ysnE*-3/4 扩增 *ysnE* 基因(含自身终止子)。采用重叠延伸 PCR (SOE-PCR)连接启动子、*ysnE* 基因(引物 pHY-*ysnE*-1/4)。随后, 用限制

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Sources/References
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Host strain for plasmid construction	TaKaRa Co., Ltd
BL21/pET-YsnE	BL21 harboring plasmid pET-YsnE	This study
<i>B. amyloliquefaciens</i> HZ-12	Wild-type strain for indole-3-acetic acid biosynthesis	Lab collection
HZ-12/pHY-300	HZ-12 harboring plasmid pHY300PLK	This study
HZ-12/pHY- <i>ysnE</i>	HZ-12 harboring plasmid pHY- <i>ysnE</i>	This study
HZ-12 Δ <i>ysnE</i>	Knockout of gene <i>ysnE</i> in HZ-12	This study
Plasmids		
pHY300PLK	<i>E. coli</i> - <i>Bacillus</i> shuttle vector; Amp ^r in <i>E. coli</i> , Tc ^r in both <i>E. coli</i> and <i>B. subtilis</i>	Lab collection
pHY- <i>ysnE</i>	Plasmid pHY300PLK containing P43 promoter, gene <i>ysnE</i> and its terminator	This study
T2(2)-ori	<i>E. coli</i> - <i>B. amyloliquefaciens</i> shuttle vector, for gene knockout	Lab collection
T2- <i>ysnE</i>	T2(2)-ori derivative containing homologous arms of gene <i>ysnE</i> , for <i>ysnE</i> deletion	This study
pET-YsnE	Plasmid pET-28a containing gene <i>ysnE</i>	This study

表 2 本研究所用的引物

Table 2 The primers used in this study

Primer name	Sequences (5'→3')
pHY-F	GTTTATTATCCATACCCCTTAC
pHY-R	CAGATTTTCGTGATGCTTGTC
T ₂ -L	ATGTGATAAECTCGGCGTA
T ₂ -R	GCAAGCAGCAGATTACGC
pHY- <i>ysnE</i> -1	GCTCTAGAGCGGAATTTCCAATTTTCATG
pHY- <i>ysnE</i> -2	TCTTCTTTCCTTACGTCCACGTGTACATTCTCTC
pHY- <i>ysnE</i> -3	GAGAGGAATGTACACGTGGACGTAAGGAAAGAAGA
pHY- <i>ysnE</i> -4	AAATCCGTCCTCTCTGCTCTTTCAGCCTATGTTTAACGTCATAAAC
T ₂ - <i>ysnE</i> -F1	GGGATCCACTAGTTCTAGAAGCAACATTCGGAACATC
T ₂ - <i>ysnE</i> -R1	TGTTTCGGGTCCCTCTTTATCGGAAATGTGACAGGGTA
T ₂ - <i>ysnE</i> -F2	TACCCTGTACATTTCCGATAAAGAGGACCCGAACA
T ₂ - <i>ysnE</i> -R2	GATCTTTTCTACGAGCTCAAAGGAGCAGCGACAGC
T ₂ - <i>ysnE</i> -KYF	TTGCGTTGTCTATTATTCTG
T ₂ - <i>ysnE</i> -KYR	AGAGGGCTGGAGGGTAAA
pET-F	GGATCCGCGACCCATTTGCTGTCCA
pET-R	CACCACCACCACCACACTGAGATC
pET-YsnE-F	GTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTATGTTTAACGTCAT
pET-YsnE-R	CAAATGGGTGCGGGATCCGTGGACATAACAAAAGAC
T7-YF	TAATACGACTCACTATAGGG
T7-YR	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

性内切酶 *Bam*H I /*Xba* I 酶切片段与质粒 pHY300PLK, 经酶连后转化大肠杆菌 DH5 α , 得到游离表达载体 pHY-*ysnE*。随后, 将 pHY-*ysnE* 电转化至解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 中, 筛选得到的阳性转化子即为游离过表达菌株 HZ-12/pHY-*ysnE*^[13-14]。

1.4.2 解淀粉芽胞杆菌基因 *ysnE* 敲除菌株的构建

以解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 为模板, 使用引物 T₂-*ysnE*-F1/R1 和 T₂-*ysnE*-F2/R2 分别扩增基因 *ysnE* 的上游和下游同源臂。上、下游同源臂经 SOE-PCR 连接, 用相同内切酶酶切 SOE 片段和 T2 (2)-Ori 质粒, 并转化到 *E. coli* DH5 α ^[15], 通过菌落 PCR 和 DNA 测序对重组质粒进行验证, 获得敲除载体 T₂-*ysnE*。将该载体电转化至

解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 中, 经单、双交换传代, 验证并获得基因 *ysnE* 缺失的解淀粉芽胞杆菌菌株 HZ-12 Δ *ysnE*^[14]。

1.4.3 YsnE 蛋白诱导表达菌株的构建

以解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 基因组为模板, PCR 扩增获得基因 *ysnE* 序列, 经限制性内切酶酶切后, 插入经相同内切酶酶切的 pET-28a 质粒中, 并转化大肠杆菌 DH5 α 。通过菌落 PCR 验证和 DNA 测序分析, 验证并获得 *ysnE* 诱导表达载体 pET-YsnE。质粒 pET-YsnE 转化至大肠杆菌 BL21 中, 获得诱导表达菌株 BL21/pET-YsnE^[16]。

1.5 发酵及分析方法

1.5.1 发酵方法

菌种活化: 将保存于超低温冰箱中的菌株在含抗性或无抗性 LB 平板上涂布, 挑取单菌落在

相应 LB 平板上划线, 37 °C 培养 12 h。

种子液培养: 从 LB 平板上挑取单菌落接种至含有 50 mL 液体 LB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 230 r/min、37 °C 振荡培养 10–12 h。

摇瓶发酵培养: 以 1% 接种量将种子液接至含 50 mL Landy 培养基的 250 mL 三角瓶中, 120 r/min、30 °C 培养 72 h (在 36 h 添加终浓度 1 g/L 色氨酸)。

1.5.2 重组蛋白 YsnE 在大肠杆菌 BL21 中的表达

挑选纯化后的 BL21/pET-YsnE 至含有 50 mL 液体 LB 培养基(0.05 mg/mL 氨苄抗生素)的 250 mL 三角瓶中, 37 °C、230 r/min 培养 12 h 至浑浊。吸取 10 mL 种子液转接至装有 500 mL 液体 LB 培养基(0.05 mg/mL 氨苄抗生素)的 2 L 三角瓶中, 37 °C、230 r/min 培养 OD_{600} 至 0.7–0.8, 加入 0.3 mmol/L IPTG 后继续培养 20–25 h (18 °C)。分别取诱导前、后样品, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。

1.5.3 重组蛋白的纯化

将诱导后的发酵菌液经 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。取适量生理盐水重悬菌体, 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。吸取适量裂解缓冲液重悬菌体, 随后采用低温高压细胞破碎仪破碎细胞。细胞破碎液经 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min, 上清经镍柱纯化, 收集流出液获得目的蛋白。

1.5.4 吡啶乙酸的酶法转化合成

酶反应体系: 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 1.6 mL (pH 7.0)、酶液 0.08 mL, 对照采用灭活酶液。底物吡啶丙酮酸、吡啶乙酰胺、吡啶乙腈和色胺的终浓度为 2 mmol/L。酶反应条件为 37 °C、4 h^[17]。

1.6 分析方法

吡啶丙酮酸、吡啶乙酰胺、吡啶乙腈和色胺浓度的检测采用 Agilent 1260 series 高效液相色谱

仪完成, 色谱柱型号 Lichrospher C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相配比 $V(\text{甲醇}):V(0.1\% \text{乙酸})=31.8:68.2$, 流速为 0.8 mL/min, 进样体积为 10 μL, 柱温为 25 °C, 紫外检测器波长为 220 nm^[18]。根据标准品浓度曲线, 测定计算各样品浓度。

吡啶-3-乙酸浓度采用分光光度计检测^[19]。显色液: 774.2 g/L H₂SO₄, 12 g/L FeCl₃, 现配现用。将发酵液 12 000 r/min 离心 10 min, 取上层发酵液, 以 1:1 加入显色液, 避光反应 30 min (浓硫酸存在下, 氯化铁与吡啶乙酸发生显色反应, 颜色为粉红色至红色), 用分光光度计测定 OD_{535} 值, 其中以 Landy 培养基为空白对照。根据标准曲线计算样品中吡啶-3-乙酸浓度。

2 结果与分析

2.1 解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 中 *ysnE* 缺失/强化表达对吡啶-3-乙酸合成的影响

文献报道指出, 80% 根际促生细菌具有吡啶-3-乙酸合成能力, 其中大多数是以色氨酸为前体物^[20], 其合成途径可分为吡啶乙酰胺(IAM)途径、吡啶丙酮酸(IPA)途径、色氨酸侧链(TSO)途径、色胺(TAM)途径和吡啶乙腈(IAN)途径等。吡啶-3-乙酸 N-乙酰转移酶 YsnE 在吡啶-3-乙酸合成中发挥重要作用, 然而其具体功能并不清晰。

为了验证基因 *ysnE* 在吡啶-3-乙酸生物合成中的重要作用, 在解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 基础上, 分别构建了基因 *ysnE* 缺失菌株 HZ-12Δ*ysnE* 及强化表达菌株 HZ-12/pHY-*ysnE*, 发酵并检测各个菌株吡啶-3-乙酸合成水平。结果表明, *ysnE* 缺失菌株的吡啶-3-乙酸含量显著下降, 相比对照 HZ-12 减少了 18.3%。*ysnE* 强化表达有利于吡啶-3-乙酸合成, 其合成水平相比于对照提高了 63.8% ($P < 0.01$) (图 2)。由此说明吡啶-3-乙酸

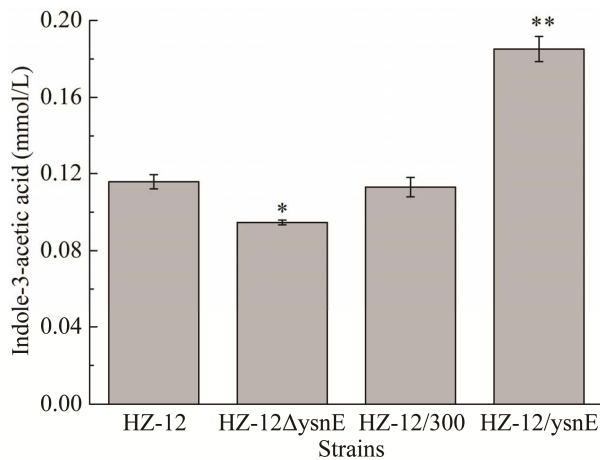


图2 基因 *ysnE* 缺失/强化表达对吲哚-3-乙酸合成的影响

Figure 2 Effects of gene *ysnE* deletion or overexpression on indole 3-acetic acid production. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ indicate the significance levels between recombinant strains and control strain.

酰基转移酶 YsnE 在解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 吲哚-3-乙酸合成中也发挥重要作用。

2.2 YsnE 影响解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 中吲哚-3-乙酸合成的体内分析

为了研究 YsnE 影响解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 中吲哚-3-乙酸合成的代谢途径, 我们在菌株 HZ-12 和 HZ-12Δ*ysnE* 发酵 36 h 时分别添加相应中间代谢物(吲哚丙酮酸、吲哚乙酰胺、吲哚乙腈、色胺, 终浓度为 0.25 mmol/L, 不添加色氨酸), 并检测发酵终点吲哚-3-乙酸和相应中间代谢物浓度。结果表明, 添加吲哚乙酰胺后, 吲哚-3-乙酸的浓度最高, 说明解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 中的吲哚乙酰胺途径相关酶系表达水平较高。而 HZ-12 和 HZ-12Δ*ysnE* 在添加色胺培养基中均不能合成吲哚-3-乙酸, 说明解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 不能通过色胺途径合成吲哚-3-乙酸(图 3)。此外, 敲除基因 *ysnE* 后, 吲哚-3-乙酸合成水平均有所下降, 说明 YsnE 可能会影响相应中间代谢物利用来影响吲哚-3-乙酸合成。

随后, 检测了各个试验组中间代谢物浓度。发现 *ysnE* 缺失菌株的底物浓度均高于对照菌株 HZ-12(图 4), 推测基因 *ysnE* 催化吲哚丙酮酸、吲哚乙腈、吲哚乙酰胺的利用。基因 *ysnE* 缺失后, 上述中间代谢物的利用率降低, 培养基中积累量增加。

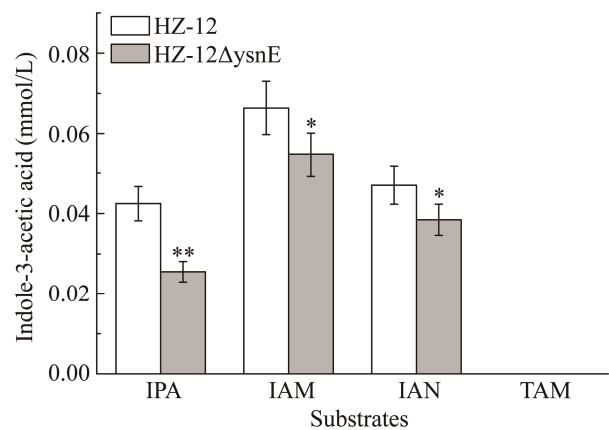


图3 基因 *ysnE* 缺失对吲哚-3-乙酸浓度的影响

Figure 3 Effect of gene *ysnE* deletion on indole-3-acetic acid concentration. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ indicate the significance levels between recombinant strains and control strain.

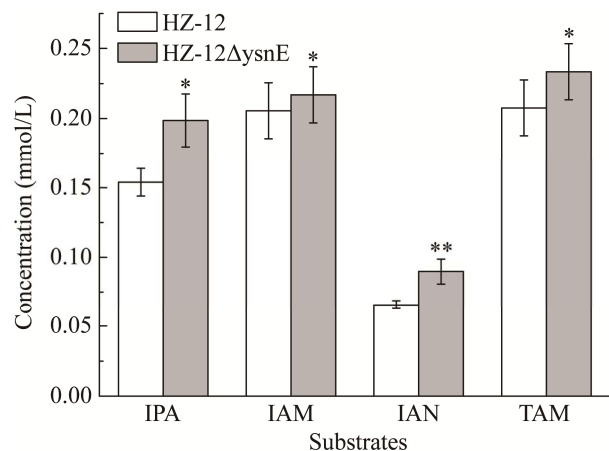


图4 基因 *ysnE* 缺失对中间代谢物浓度的影响

Figure 4 Effects of gene *ysnE* deletion on intermediate metabolite concentrations. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ indicate the significance levels between recombinant strains and control strain.

2.3 YsnE 影响吲哚-3-乙酸合成的体外分析

随后,构建了 YsnE 诱导表达载体 pET-YsnE,并转化大肠杆菌 BL21,获得了诱导表达菌株 BL21/pET-YsnE。经诱导表达、细胞破碎后,通过 SDS-PAGE 检测了 YsnE 蛋白表达情况。由图 5 所示, BL21/pET-YsnE 诱导样品在 15–25 kDa 处有明显条带,与 YsnE 蛋白条带大小接近,说明 YsnE 蛋白诱导成功。随后,细胞破碎液经镍柱纯化,并进行 SDS-PAGE 分析,得到单一条带,说明 YsnE 蛋白纯化成功。

在 2.0 mL 反应体系中加入 1.6 mL 50 mmol/L (pH 7.0)磷酸盐缓冲液和 0.08 mL 纯化酶液,并分别加入 0.32 mL 12.5 mmol/L 吲哚丙酮酸、吲哚乙酰胺、吲哚乙腈和色胺(即终浓度为 2 mmol/L)。随后,将反应液放置于 37 °C 培养箱中进行酶转化,对照组采用相同体积灭活酶液,4 h 后检测相应底物和吲哚-3-乙酸浓度。如图 6 所示,与对照组相比,实验组中吲哚丙酮酸、吲哚乙酰胺和吲哚乙腈浓度均有所降低,分别降低了 8.5%、7.1%和 7.2%。由于吲哚乙酰胺水解酶、腈水解酶和腈水合酶均由基因 *yhcX* 编码^[21],

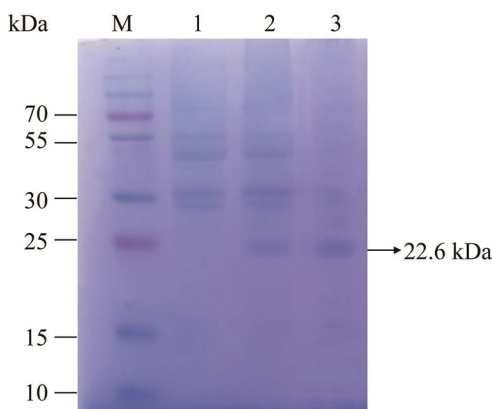


图 5 蛋白 YsnE 的诱导表达与纯化

Figure 5 Induction expression and purification of YsnE. M: Protein Marker; 1: Sample before induction; 2: Sample after induction; 3: Protein YsnE purified samples.

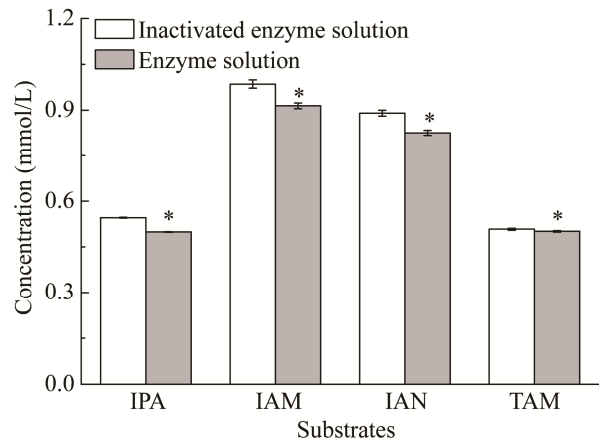


图 6 酶转化反应对中间物浓度的影响

Figure 6 Effects of enzymatic conversion reaction on intermediate metabolites concentrations. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ indicate the significance levels between recombinant strains and control strain.

说明 YnsE 主要发挥吲哚丙酮酸脱羧酶和吲哚乙酰胺水解酶/腈水解酶/腈水合酶 YhcX 的功能,对色胺几乎没有催化作用。

最后,检测了反应体系中吲哚-3-乙酸浓度。灭活酶液组未检测到吲哚-3-乙酸生成。试验组中,添加吲哚丙酮酸、吲哚乙酰胺和吲哚乙腈后,吲哚-3-乙酸浓度分别为 0.025、0.005 和 0.007 mmol/L,在添加色胺的酶反应体系中未检测吲哚-3-乙酸生成。上述结果证实了 YsnE 可能主要作用于吲哚丙酮酸、吲哚乙腈和吲哚乙酰胺途径,不参与色胺合成途径。此外,由于体系中可能存在其他酶的干扰或中间物质的分解作用,上述 4 种中间物的浓度均相比于初始添加量均有所降低。

2.4 YsnE 发挥吲哚-3-乙酸合成相关基因功能的生物信息学分析

由上述结果可知,吲哚-3-乙酸酰基转移酶 YsnE 主要催化吲哚丙酮酸、吲哚乙酰胺和吲哚乙腈的利用,发挥着吲哚丙酮酸脱羧酶 YclB 和吲哚乙酰胺水解酶/腈水解酶/腈水合酶 YhcX 的功能。因此,接着对 YsnE 及吲哚丙酮酸脱羧酶

YclB 和吲哚乙酰胺水解酶/脲水解酶/脲水合酶 YhcX 的氨基酸序列进行对比分析。上述 3 种蛋白的氨基酸序列两两相似性均为 12%左右, 具有一定相似性, 但相似度并不高。基于 Uniprot 分析, YsnE 被预测为 GNAT 家族 N-乙酰转移酶, 只包含 1 个乙酰转移酶结构域。根据蛋白相似性预测, 与 YsnE 序列相似性在 50%以上的蛋白均为乙酰转移酶相关酶系。此外, 没有预测到 YsnE 中含有其他功能结构域或辅因子结合位点。综上所述, 解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 中 YsnE 发挥着吲哚丙酮酸脱羧酶和吲哚乙酰胺水解酶/脲水解酶/脲水合酶的部分功能来参与吲哚-3-乙酸生物合成。

3 讨论与结论

吲哚-3-乙酸是最丰富的天然植物激素, 具有生长素活性, 调节着植物许多生理过程^[21-22]。赖氨酸合成的几种途径中都有其特殊的中间吲哚衍生物, 根据这些中间吲哚衍生物类型, 吲哚-3-乙酸合成途径分为吲哚丙酮酸、吲哚色胺、吲哚乙酰胺和吲哚乙脲等^[7-8]。此外, 吲哚-3-乙酸中间代谢物添加实验也表明, 作为色氨酸依赖型的吲哚 3-乙酸合成菌株, 解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 中吲哚-3-乙酸的合成主要依赖于色氨酸衍生物途径, 添加相应中间物(吲哚丙酮酸、吲哚乙酰胺和吲哚乙脲)有利于吲哚 3-乙酸的合成。同时, 解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 中色胺转化生成吲哚 3-乙酸相关酶系表达量不高, 添加色胺并不能合成吲哚-3-乙酸。

之前的研究表明, YsnE 表达水平高低对吲哚-3-乙酸合成影响较大, 然后具体功能并不清晰。Shao 等通过在解淀粉芽胞杆菌 SQR9 中构建相应途径基因缺失菌株, 发现基因 *ysnE* 对于吲哚-3-乙酸的合成至关重要, 随后进一步得出 YsnE 可能主要通过影响吲哚丙酮酸和吲哚色胺

途径来参与吲哚 3-乙酸合成^[10]。本研究通过构建 *ysnE* 缺失和过表达菌株, 证实 YsnE 在解淀粉芽胞杆菌 HZ-12 中也同样发挥重要作用, 并结合体内分析、体外转化实验, 得出 YsnE 主要发挥着吲哚丙酮酸脱羧酶 YclB 和吲哚乙酰胺水解酶/脲水解酶/脲水合酶 YhcX 的功能, 通过参与吲哚丙酮酸、吲哚乙酰胺和吲哚乙脲途径来影响吲哚-3-乙酸合成, 并不参与吲哚色胺途径。综上所述, 本研究揭示了 YsnE 通过影响吲哚丙酮酸、吲哚乙酰胺和吲哚乙脲途径参与吲哚-3-乙酸合成的代谢机理, 为解淀粉芽胞杆菌中吲哚-3-乙酸的合成途径解析和吲哚-3-乙酸高产的代谢工程育种奠定了基础。

参考文献

- [1] SHAO JH, LI SQ, ZHANG N, CUI XS, ZHOU X, ZHANG GS, SHEN QR, ZHANG RF. Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 130.
- [2] 王家利, 刘冬成, 郭小丽, 张爱民. 生长素合成途径的研究进展[J]. *植物学报*, 2012, 47(3): 292-301. WANG JL, LIU DC, GUO XL, ZHANG AM. Research advances in auxin biosynthesis[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2012, 47(3): 292-301 (in Chinese).
- [3] 田辉, 王帅, 刘波. 基于游离质粒的木糖诱导型枯草芽胞杆菌转化体系的建立及其应用[J]. *生物技术进展*, 2021, 11(6): 741-748. TIAN H, WANG S, LIU B. Construction and application of plasmid-based and xylose-induced transformation system of *Bacillus subtilis*[J]. *Current Biotechnology*, 2021, 11(6): 741-748 (in Chinese).
- [4] KHALID A, TAHIR S, ARSHAD M, ZAHIR ZA. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils[J]. *Soil Research*, 2004, 42(8): 921.
- [5] KOCHAR M, VAISHNAVI A, UPADHYAY A, SRIVASTAVA S. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid: signal messenger service[A]//*Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*[M]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013: 309-325.

- [6] DUCA D, LORV J, PATTEN CL, ROSE D, GLICK BR. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2014, 106(1): 85-125.
- [7] ROMASI EF, LEE J. Development of indole-3-acetic acid-producing *Escherichia coli* by functional expression of IpdC, AspC, and Iad1[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 23(12): 1726-1736.
- [8] SPAEPEN S, VANDERLEYDEN J, REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2007, 31(4): 425-448.
- [9] MCCLERKLIN SA, LEE SG, HARPER CP, NWUMEH R, JEZ JM, KUNKEL BN. Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase-dependent auxin synthesis contributes to virulence of *Pseudomonas syringae* strain DC3000[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(1): e1006811.
- [10] SHAO JH, LI YC, LI ZF, XU ZH, XUN WB, ZHANG N, FENG HC, MIAO YZ, SHEN QR, ZHANG RF. Participating mechanism of a major contributing gene *ysnE* for auxin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2021, 61(6): 569-575.
- [11] GUO DY, KONG SJ, CHU X, LI X, PAN H. *De novo biosynthesis of indole-3-acetic acid in engineered Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(29): 8186-8190.
- [12] KOCHAR M, UPADHYAY A, SRIVASTAVA S. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression[J]. *Research in Microbiology*, 2011, 162(4): 426-435.
- [13] CAI DB, ZHU J, ZHU S, LU Y, ZHANG BW, LU K, LI JH, MA X, CHEN SW. Metabolic engineering of main transcription factors in carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms for enhanced production of bacitracin in *Bacillus licheniformis*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(4): 866-875.
- [14] 张清, 朱杉, 崔乃香, 张博闻, 王志, 陈晓斌, 刘军, 李俊辉, 蔡冬波, 杨之帆, 陈守文, 马昕. 能量代谢工程促地衣芽胞杆菌 DW2 高效合成杆菌肽[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(6): 1126-1137.
- ZHANG Q, ZHU S, CUI NX, ZHANG BW, WANG Z, CHEN XB, LIU J, LI JH, CAI DB, YANG ZF, CHEN SW, MA X. Enhanced production of bacitracin via energy metabolism engineering in *Bacillus licheniformis* DW2[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(6): 1126-1137 (in Chinese).
- [15] CAI DB, ZHANG BW, RAO Y, LI LF, ZHU J, LI JH, MA X, CHEN SW. Improving the utilization rate of soybean meal for efficient production of bacitracin and heterologous proteins in the *aprA*-deficient strain of *Bacillus licheniformis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(12): 4789-4799.
- [16] YANG F, LIU N, CHEN YZ, WANG S, LIU J, ZHAO L, MA X, CAI DB, CHEN SW. Rational engineering of cofactor specificity of glutamate dehydrogenase for poly- γ -glutamic acid synthesis in *Bacillus licheniformis*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2022, 155: 109979.
- [17] 赵连真, 张梁, 石贵阳. 谷氨酸棒杆菌 L-天冬氨酸 α -脱羧酶在大肠杆菌中的表达及酶转化生产 β -丙氨酸[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(12): 2161-2170.
- ZHAO LZ, ZHANG L, SHI GY. Expression of L-aspartate α -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli* and its application in enzymatic synthesis of β -alanine[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(12): 2161-2170 (in Chinese).
- [18] 晁春艳, 王啸波, 李朝昉. 高效液相色谱法分离植物促生菌中的激素 GA、IAA[J]. *化学工程与装备*, 2008(8): 94-97, 91.
- CHAO CY, WANG XB, LI CF. Separation of hormones GA and IAA in plant growth-promoting bacteria by high performance liquid chromatography[J]. *Chemical Engineering & Equipment*, 2008(8): 94-97, 91 (in Chinese).
- [19] GLICKMANN E, DESSAUX Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(2): 793-796.
- [20] WU HX, YANG JH, SHEN PJ, LI QC, WU WB, JIANG XZ, QIN LN, HUANG JZ, CAO X, QI F. High-level production of indole-3-acetic acid in the metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(6): 1916-1924.
- [21] IDRIS EE, IGLESIAS DJ, TALON M, BORRIS R. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 2007, 20(6): 619-626.
- [22] KASAHARA H. Current aspects of auxin biosynthesis in plants[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, 80(1): 34-42.