

Zwittermicin A 合成基因簇中腺苷酰化功能域的预测、 表达与活性验证

宋春旭, 赵昌明, 喻子牛, 孙明*

(华中农业大学生命科学技术学院, 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要:【目的】腺苷酰化功能域为非核糖体肽合成反应第一步底物活化的必需酶, 本研究目的为验证 2,3-二氨基丙酸是 Zwittermicin A 生物合成的直接前体物之一。【方法】本研究通过 PCR 的方法从苏云金芽胞杆菌菌株 YBT-1520 的 Zwittermicin A 合成基因簇中扩增得到一腺苷酰化功能域, 经过双酶切和亚克隆, 将此功能域克隆至超量表达载体 pGEX-6p-1, 将此功能域构建重组质粒 pBMB1312; 采用不同的 IPTG 浓度和温度梯度对其进行诱导, 摸索了该功能域在大肠杆菌中超量表达纯化的最佳条件。【结果】得出在 20 ℃, 0.1 mmol/L IPTG, 宿主菌为 BL21 codon plus RP(DE3)的条件下, 该功能域可以被有效纯化。同时, 焦磷酸释放实验证实该功能域可以对 Zwittermicin A 的假想前体物 2,3-二氨基丙酸进行腺苷酰化。【结论】进一步支持了 2,3-二氨基丙酸是 Zwittermicin A 生物合成的直接前体物之一的假设。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; Zwittermicin A; 2,3-二氨基丙酸; 腺苷酰化功能域

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 09-1260-06

Zwittermicin A (简称 ZwA)是由蜡样芽胞杆菌以及苏云金芽胞杆菌产生的一种氨基多元醇(aminopolyol)类抗生素^[1,2], 分子量大小为 396 Da。它对多种真核及原核微生物有抑制作用^[3]。此外, ZwA 还可以增加苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)晶体蛋白的杀虫活性^[4]。基于 ZwA 的化学结构式和 ZwA 合成相关基因, 推测 ZwA 生物合成需要 5 种前体物: L-丝氨酸(L-serine), 丙二酸单酰辅酶 A(malonyl CoA), 氨基丙二酰-ACP(Amino-malonyl-ACP), 羟基丙二酰-ACP (Hydroxy-malonyl-ACP), 2,3-二氨基丙酸(2,3-diamino-propionate)^[4]。其假想前体物中, 氨基丙二酰-ACP、羟基丙二酰-ACP 和 2,3-二氨基丙酸需要从头合成。但是到目前为止, 还没有实验证据证实生物体内, ZwA 就是由此五种前体物组装而成。

抗生素按照其生物合成途径可分为非核糖体肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetases, NRPSs)途径, 聚酮合成酶(polyketide synthetases, PKSs)途径以及非核糖体肽合成酶-聚酮合成酶(NRPSs-PKSs)杂合途径^[5-7]。ZwA 合成基因簇中的一个已知合成酶是非核糖体肽-聚酮杂合合成酶^[4,8], 其假定前体物中既有非核糖体肽延伸单元(L-丝氨酸, 2,3-二氨基丙酸), 又有聚酮延伸单元(丙二酸单酰辅酶 A, 氨基丙二酰-ACP, 羟基丙二酰-ACP)^[4], 因此 ZwA 的合成符合非核糖体肽-聚酮的杂合途径合成模式。

腺苷酰化功能域是非核糖体肽合成酶催化 1 个延伸单元延伸所需要的 3 个必需功能域之一(另两个分别为肽运载蛋白和缩合功能域), 与氨基酰-tRNA 合成酶功能相似, 都是催化多肽合成的第一步反应, 具有底物专一性, 但是二者在初级结构和高级结构上

基金项目: 国家自然科学基金(30770020); 国家“863 计划”(2006AA02Z174; 2006AA03A243); 国家“973 项目”(2003CB114201)

*通讯作者。Tel: +86-27-87283455; Fax: +86-27-87280670; E-mail: m98sun@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 宋春旭(1983-), 女, 北京人, 硕士研究生, 主要从事芽胞杆菌分子生物学研究。

收稿日期: 2008-03-03; 修回日期: 2008-04-21

没有相似之处^[7]。对环孢素合成酶腺苷酰化功能域氨基酸结合区的构象模拟(modeling)研究结果显示,只需3个氨基酸就能决定底物氨基酸侧链的特异性;氨基酸序列的对线分析(alignments)也把底物识别区限定在大约100个氨基酸的区段上^[9]。然而,仅仅对腺苷酰化功能域氨基酸序列进行比对不能够很准确的预测其特异性的底物,如环10肽短杆菌酪胺是在2个位点上有变化的4种化合物的混合物,而11肽的免疫抑制剂环孢菌素已知有大约30种变体^[10]。因此,通过实验调查腺苷酰化功能域的底物特异性是必要的。

本研究组在苏云金芽胞杆菌菌株 YBT-1520 中 Zwittermicin A 合成相关的 16 kb DNA 片段^[4,8]与 *zwa-6-5A-5B* 之间鉴定了一个非核糖体肽合成酶基因 *orf3* (GenBank 登陆号 EU520420)(待发表资料)。此 16 kb 的序列只包含假想前体物氨基丙二酰-ACP 和羟基丙二酰-ACP 合成的相关基因,且通过体外实验进行了验证^[11]。假想前体物 2,3-二氨基丙酸的从头合成候选基因已经被克隆(即 *zwa5A-5B*),但是合成途径尚未被确证。序列分析表明,非核糖体肽合成酶基因 *orf3* 可能编码组装 2,3-二氨基丙酸的相关酶。本研究对该非核糖体肽合成酶 ORF3 的腺苷酰化功能域进行超量表达,并检测了它对 2,3-二氨基丙酸的腺苷酰化能力,从而从侧面证实 2,3-二氨基丙酸为 Zwittermicin A 合成的前体物。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:苏云金芽胞杆菌菌株 YBT-1520 为本室分离保存的高毒力菌株,Zwittermicin A 产生菌株^[8];大肠杆菌菌株 BL21 codon plus RP(DE3)是被 DE3 噬菌体侵染的 BL21 codon plus RP 大肠杆菌,其基因组上整合了 T7 RNA P 的基因,且含有的两个小质粒可以提供脯氨酸和精氨酸的 tRNA 产物。pGEX-6p-1 载体为具有 Ptac 启动子和终止子的原核表达载体^[12,13]。

1.1.2 主要试剂和仪器:各种限制性内切酶,DNA 连接酶,DNA 聚合酶,dNTP,各种 DNA、蛋白质分子量标准等均为 TaKaRa 公司产品;2,3-二氨基丙酸为 Sigma 公司产品;pGEX-6p-1 载体购自 Stratagene 公司;Gel Extraction Kit(Omega)用于 PCR 扩增产物及琼脂糖凝胶中 DNA 片段的回收;BugBuster

GST•Bind™ Purification Kit(Novagen)用于带谷胱甘肽转移酶标签的重组蛋白的纯化;EnzChek Pyrophosphate Assay Kit(Molecular Probe)用于腺苷酰化功能域活性检测反应中焦磷酸的测定。

1.2 生物信息学预测 ORF 3 的腺苷酰化功能域

本研究将 ORF3 的核苷酸序列通过 Clone 软件预测得到氨基酸序列,继而在 NRPS-PKS 网站上^[14]进行预测分析其组成单元。将预测得出的结构域采用 BLASTP 的方法,在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的蛋白质数据库中进行搜索,BLASTP 程序采用网页上默认的参数运行。然后选取其中研究背景明晰的5个菌株中不同酶的腺苷酰化功能域相关蛋白的氨基酸序列在 Vector NTI 软件上利用 Align 功能进行多重序列比对,得到的比对结果用 GeneDoc 软件(<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>)^[15]进行人工调整,使序列中一些相对应的氨基酸能更好的对齐。

1.3 物设计与合成

扩增 Adenylation 功能域引物:A2P0(5'-CC₂TCCTGCGTAATATTAATATGTT-3')A2P5(5'-ACCTGTAACTACTATCTATGTCATTTC-3'),下划线序列分别表示 BamHI 和 XhoI 酶切位点;

1.4 腺苷酰化功能域重组质粒的构建

提取苏云金芽胞杆菌菌株 YBT-1520 的总 DNA^[16]。以 YBT-1520 总 DNA 为模板,用 A2P0 和 A2P5 引物扩增腺苷酰化功能域。扩增程序为:94 5 min,94 1 min,56 1 min,72 2 min,30 个循环,72 10 min。扩增产物采用 Gel Extraction Kit(Omega)分别纯化、回收,然后,利用 BamHI 和 XhoI 定向克隆进 pGEX-6p-1 载体得到重组质粒 pBMB1312。重组质粒采用酶切和序列测定进行鉴定。

1.5 腺苷酰化功能域重组菌株的超量表达及纯化

将腺苷酰化功能域重组质粒采用 CaCl₂ 法^[17]分别转化菌株 BL21(DE3),BL21 codon plus RIL(DE3),BL21 codon plus RP(DE3)。

重组菌株分别接种于 5 mL LB 液体培养基中(氨苄青霉素终浓度为 100 μg/mL,氯霉素终浓度为 25 μg/mL),过夜活化。以 1:100 转接至 50 mL LB 液体培养基中,置于 37 °C 摇床培养至 OD₆₀₀ 为 0.5~0.8 左右,添加不同浓度的 IPTG(终浓度为 0.05~1 mmol/L),并在不同温度条件下(16~42 °C)诱导培养 4 h,离心收集菌体。

腺苷酰化功能域蛋白的纯化按照试剂盒 GST•Bind™(Novagen)操作说明书进行。

1.6 腺苷酰化功能域对 2,3-二氨基丙酸的特异性检测
 腺苷酰化功能域是非核糖体肽合成酶中每个模块都必须含有的 3 个功能域之一，催化氨酰腺苷酸 (aminoacyl adenylate)中间体的生成，伴随焦磷酸的生成。参考 Ehmann 的方法^[18]，通过检测反应体系中焦磷酸的生成，检测腺苷酰化功能域对 2,3-二氨基丙酸的催化活性。焦磷酸用 EnzChek Pyrophosphate Assay Kit 检测，其反应原理为，首先焦磷酸被 IP(inorganic pyrophosphatase)催化生成磷酸；然后在 PNP(purine nucleoside phosphorylase)的催化下，磷酸与底物 MesG(guanosine analogue)一起反应，生成生色产物。此时反应体系的最大吸收波长从 325~330 nm 变为 355~360 nm^[16,17]。参照焦磷酸检测试剂盒的使用说明，设计反应体系如下(200 μL 体系)：4 mmol/L ATP，4 mmol/L 2,3-二氨基丙酸(4 mmol/L L-丝氨酸)，

2 μmol/L 2,3-二氨基丙酸腺苷酰化功能域，0.4 mmol/L MesG，0.2U PNP，0.2U IP，10 mmol/L MgCl₂，10 μL 20×Buffer，30 反应 30 min，然后通过紫外分光光度计进行全波段扫描。

2 结果和分析

2.1 生物信息学预测得到 ORF 3 的腺苷酰化功能域
 据文献报道^[9]，腺苷酰化功能域中有一段由 550 个氨基酸组成的同源区段，该区段含有 6 个高度保守的 motif。本研究将 ORF3 的核苷酸序列通过 clone 软件预测得到氨基酸序列，继而在 NRPS-PKS 网站上进行预测分析，预测得知此 ORF 可能为一个 NRPS 的合成途径，其中含有一腺苷酰化功能域，一肽运载蛋白结构域和一缩合功能域。将其中预测得到的腺苷酰化功能域在 NCBI 上进行蛋白质的 BLASTP 分析，得

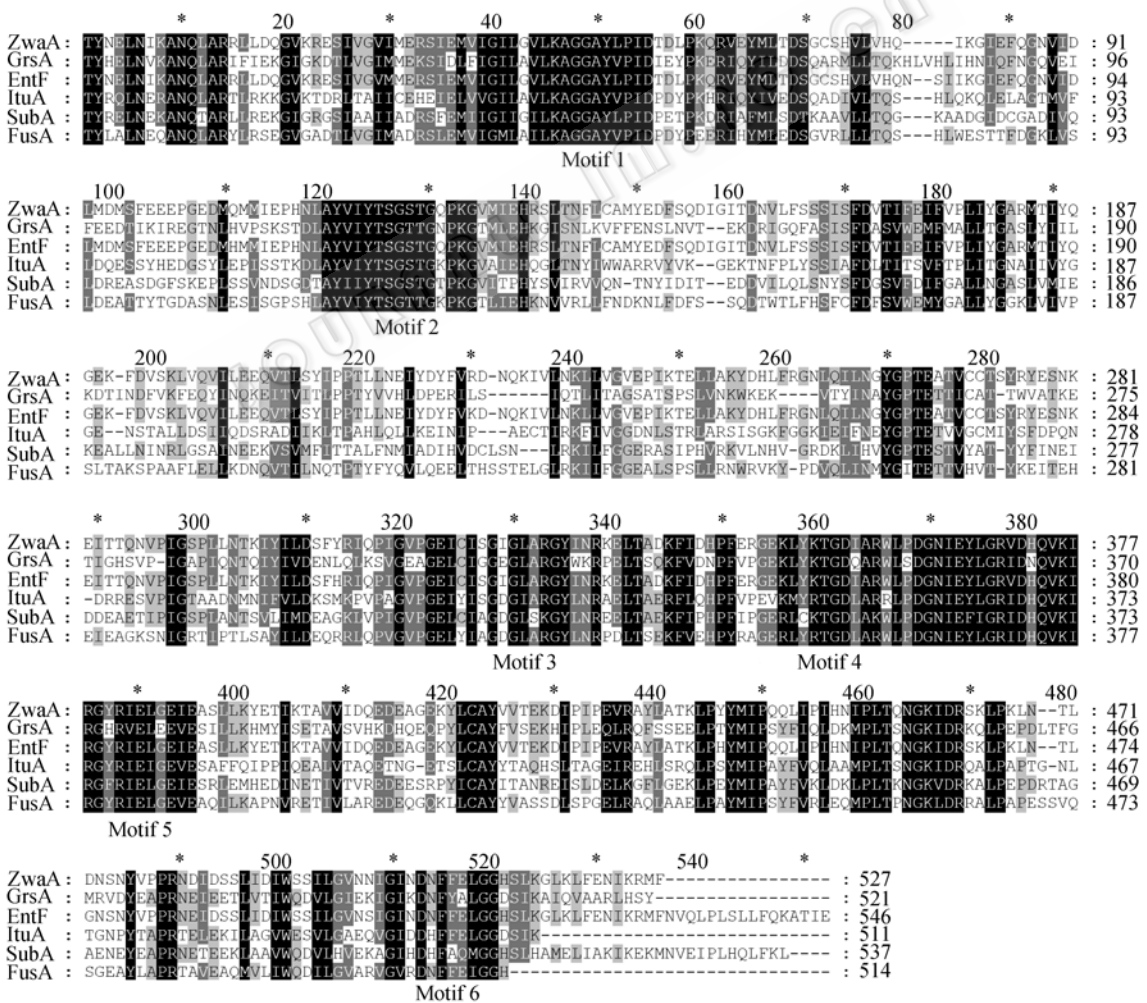


图 1 腺苷酰化功能域的多序列比对

Fig. 1 Multiple sequence alignment of Adenylation domain of putative Adenylation domain ZwaA of this study and GrsA from *Aneurinibacillus migulanus*^[21], EntF from *Escherichia coli*^[18], ItuA from *Bacillus Subtilis*^[22], SubA from *Bacillus Subtilis*^[23], FusA from *Paenibacillus polymyxa*^[24].

到其与已有实验证据证明的腺苷酰化功能域的氨基酸同源性都很高,其中与 *Brevibacillus brevis* 中的短杆菌肽合成酶 1 内的腺苷酰化功能域 (gi:3318718) [19] 的氨基端序列的同一性为 42%,相似性为 64%。进而选取有代表性的 5 个菌株中不同酶的腺苷酰化功能域与此功能域通过 Vector NTI 软件中的 Align 功能进行多序列比对。与短杆菌肽合成酶 1 中的腺苷酰化功能域进行对比,得到的比对结果用 GeneDoc 软件进行人工调整,可以在其氨基酸序列中找到保守的 6 个 motif,见图 1 和表 1。由此得知,此功能域应该为一腺苷酰化功能域。根据文献报道,只有当取 motif 1 的前 100 个氨基酸与 motif 5 的后 100 个氨基酸时,所表达的蛋白才是可溶且有活性的 [20]。以此为依据,我们进行了引物的设计。

表 1 腺苷酰化功能域中 6 个保守 motif 的序列及功能 (据文献[9]改绘)

Table 1 Sequence and function of the six conserved motifs of Adenylation domain

Motif	Sequence	Function (putative)
1	LKAGGAYLPID	Unknown
2	TSGSTGXPKG	ATP binding
3	GEXXIXGXGXRGYX	ATP binding
4	XKTGD	ATPase motif
5	VKIRGXRIELXEIE	ATP binding
6	DXFXXXGGXXX	4'-phosphopantetheine binding (thioester formation)

2.2 腺苷酰化功能域的扩增

利用设计的 A2P0, A2P5 为引物和菌株 YBT-1520 的总 DNA 为模板,对腺苷酰化功能域进行 PCR 扩增,扩增产物用琼脂糖电泳分离。片段的理论大小为 1628 bp,扩增产物大小与理论值相符。

2.3 腺苷酰化功能域重组质粒的构建

将上述扩增得到的腺苷酰化功能域经 *Bam*H 和 *Xho* 双酶切,同时将质粒 pGEX-6p-1 进行相同酶切,回收 pGEX-6p-1 片段序列,连接两者,获得重组质粒 pBMB1312。对 pBMB1312 重组质粒进行 *Bam*H 和 *Xho* 双酶切验证,片段大小与预期大小一致,进一步的测序结果表明腺苷酰化功能域片段被正确地插入了 pGEX-6p-1 载体中。

2.4 腺苷酰化功能域重组菌株的超量表达

由于超量表达的蛋白在随后的实验中需要发挥的是酶学的活性,则所表达的蛋白需要以上清的形式存在才能纯化出有活性的蛋白。而根据文献报道,取 motif 1(LKAGGA)前面 100 个氨基酸残基到 motif 5 (RIELGEIE)后面 100 个氨基酸残基的区域时,在合适

的培养温度, IPTG 诱导浓度下就可以表达出可溶的该功能域 [18, 25]。首先,将重组质粒 pBMB1312 导入 3 种不同的大肠杆菌宿主菌中: BL21(DE3), BL21 codon plus RIL(DE3), BL21 codon plus RP(DE3)中,重组质粒 pBMB1312 在大肠杆菌菌株 BL21 codon plus RP(DE3)中表达的浓度远远高于其它两种菌株,则将重组质粒 pBMB1312 转化到大肠杆菌菌株 BL21 codon plus RP(DE3)中命名为 BMB1312。

为了摸索大肠杆菌菌株 BMB1312 超量表达的最佳条件,如表 2 所示,设计 IPTG 终浓度梯度为 0.05~1.0 mmol/L,诱导温度梯度为 16~42 的实验条件,本研究结果显示只有在 20、0.1 mmol/L IPTG 诱导浓度条件下,在上清以及沉淀中检测到了目标蛋白,并且可以将其进行纯化(图 2)。

表 2 大肠杆菌菌株 BMB1312 超量表达的诱导条件

Table 2 The inducement condition of *E.coli* strain BMB1312 over expression

T/	c(enylation domain)(mmol/L)				
	0.05	0.1	0.2	0.4	0.5-1
16	±	±	-	-	-
18	±	-	-	-	-
20	+	-	-	-	-
22	±	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-

+: indicates that the objective protein could be detected and purified during the soluble protein; -: indicates that the objective protein could not be detected during the soluble protein; ±: indicates that the objective protein could just be detected during the soluble protein.

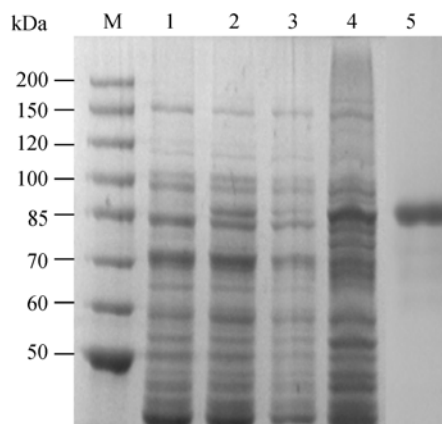


图 2 大肠杆菌菌株 BMB1312 超量表达 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of *E.coli* strain BMB1312 over expression and purification. M: Protein molecular weight standard. 1. Non-induction *E.coli* strain BMB1312. 2. IPTG induction *E.coli* strain BMB1312. 3. Supernatant. 4. Precipitation. 5. Purification protein.

2.5 腺苷酰化功能域对 2,3-二氨基丙酸的特异性检测结果

设置 4 个反应体系, 体系 1(以 L-丝氨酸作为底物), 2(反应体系中不添加腺苷酰化功能域)为负对照, 3 为待检测体系, 体系 4 以试剂盒中提供的焦磷酸为正对照。通过紫外分光光度计对试剂盒反应体系进行全波段扫描, 当在体系中同时存在腺苷酰化功能域和 2,3-二氨基丙酸时, 在 325 nm 波长的光吸收值下降, 同时, 在 355 nm 处的光吸收值有明显上升(图 3), 与体系中直接添加焦磷酸后的光吸收值变化一致, 这说明腺苷酰化功能域能够活化 2,3-二氨基丙酸。同时, 对照实验是以与 2,3-二氨基丙酸结构非常相似的 L-丝氨酸作为底物, 检测结果显示对照反应体系在 355 nm 处光吸收值没有变化, 表明该腺苷酰化功能域不能对 L-丝氨酸进行腺苷酰化。

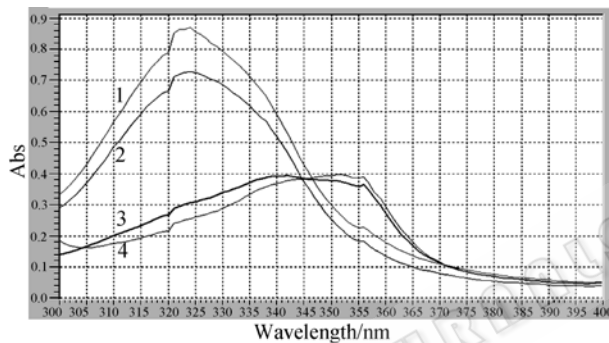


图 3 腺苷酰化反应体系全波长扫描图

Fig. 3 Whole wavelengths scan of the adenylation reaction. 1. 4 mmol/L ATP, 4 mmol/L L-Ser, 2 μ mol/L Adenylation domain, 0.4 mmol/L MesG, 0.2U PNP, 0.2U IP, 10 mmol/L $MgCl_2$, 10 μ L 20 \times Buffer. 2. 4 mmol/L ATP, 4 mmol/L 2,3-diaminopropionate, 0.4 mmol/L MesG, 0.2U PNP, 0.2U IP, 10 mmol/L $MgCl_2$, 10 μ L 20 \times Buffer. 3. 4 mmol/L ATP, 4 mmol/L 2,3-diaminopropionate, 2 μ mol/L Adenylation domain, 0.4 mmol/L MesG, 0.2U PNP, 0.2 U IP, 10 mmol/L $MgCl_2$, 10 μ L 20 \times Buffer. 4. 4 mmol/L ATP, 1 mmol/L PPI, 0.4 mmol/L MesG, 0.2U PNP, 0.2U IP, 10 mmol/L $MgCl_2$, 10 μ L 20 \times Buffer.

3 讨论

本研究中, 在苏云金芽孢杆菌 YBT-1520 中克隆得到 Zwittermicin A 合成基因簇中的腺苷酰化功能域, 并对其在大肠杆菌的超量表达, 在取 motif 1(LKAGGA)前面 100 个氨基酸残基到 motif 5 (RIELGEIE)后面 100 个氨基酸残基时, 在 20 μ M, 0.1 mmol/L IPTG 诱导浓度条件下可以表达出可溶的该功能域。

腺苷酰化功能域是非核糖体肽合成酶的一个功能域, 文献报道和本研究的结果表明, 当所表达的蛋白的长度、表达的温度以及诱导物的浓度不适时均会

导致所表达的目标蛋白以沉淀的形式存在, 而形成沉淀的腺苷酰化功能域或者无法与 GST 树脂结合, 从而不能被纯化, 或者即使复性后可以被纯化到, 但是已经丧失其酶学活性。1997 年, 对短芽孢杆菌中短杆菌肽 S 合成酶的研究表明, 该酶第一个组件(module)的腺苷酰化功能域(PheA)是一个能特定地活化苯丙氨酸的功能域, 由 556 个氨基酸残基组成, 它能将底物苯丙氨酸活化成苯丙氨酰腺苷酸^[26]。PheA 在结构上又是由两个主要的亚结构域组成: 小的 C 端亚结构域和大的 N 端结构域。结构域具有丰富的 α 螺旋、 β 折叠等结构单元^[19]。只有当这些结构单元都存在的时候, 这个功能域才能正确的折叠并发挥活性。所以当进行超量表达的时候必须保证结构单元的完整性, 并且氨基端不能有冗余片段。这也是本实验设计腺苷酰化功能域超量表达的重要依据。

本研究首次证实了 2,3-二氨基丙酸确实可以被 Zwittermicin A 合成基因簇中的腺苷酰化功能域进行催化, 从酶学水平证实了 2,3-二氨基丙酸可以作为 Zwittermicin A 合成的前体物, 为完善 Zwittermicin A 的生物合成途径提供了有力的证据。

2,3-二氨基丙酸可以被腺苷酰化, 但是还不能说明是否为我们超量表达出来的腺苷酰化功能域的特异性底物, 要说明此问题, 还需要进一步的实验证据, 如对其它氨基酸同时进行实验。在此实验中, 我们仅仅采用了 L-丝氨酸进行对照实验, 如需进一步说明此问题, 还应该在此基础上对其它的结构相似的氨基酸进行实验, 并进行动力学曲线的描绘, 相应的工作正在进行中。

参 考 文 献

- [1] He HY, Silo-Suh LA, Handelsman J, et al. Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus*. *Tetrahedron Lett*, 1994, 35(16): 2499–2502.
- [2] Milner JL, Stohl EA, Handelsman J, et al. Zwittermicin A resistance gene from *Bacillus cereus*. *J Bacteriol*, 1996, 78: 4266–4272.
- [3] Kalman S, Kiehne KL, Cooper N, et al. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(8): 3063–3068.
- [4] Emmert E, Klimowicz AK, Thomas MG, et al. Genetics of zwittermicin A production by *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70 (1): 104–113.
- [5] Ansari MZ, Yadav G, Gokhale RS, et al. NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases. *Nuc Acids Res*, 2004, 32: W405–W413.
- [6] Du LC, Shen B. Identification and characterization of a type II peptidyl carrier protein from the bleomycin producer *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *Chem Biol*, 1999, 6: 507–517

- [7] Stein T, Vater J, Kruff V, *et al.* The multiple carrier model of non-ribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J Biol Chem*, 1996, 271(26): 15428–15435.
- [8] Zhao C, Luo Y, Song CX, *et al.* Identification of three Zwittermicin A biosynthesis-related genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain YBT-1520. *Arch Microbiol*, 2007, 187 (4): 313–319.
- [9] Husi, H, Schorgendorfer K, Stempffer G, *et al.* Prediction of substrate-specific pockets in cyclosporin synthetase. *FEBS Lett*, 1997, 414 (3): 532–536.
- [10] Stachelhaus T, Marahiel MA. Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. *J Biol Chem*, 1995, 6163–6169.
- [11] Yolande AC, Michael TB, Angela MP, *et al.* Hydroxymalonyl-acyl carrier protein (ACP) and aminomalonyl-ACP are two additional type I polyketide synthase extender units. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103(39): 14349–14354
- [12] Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 1996, 60: 512–538.
- [13] Vergani L, Grattarola M, Dondero F, *et al.* Viarengo A, Expression, purification, and characterization of metallothionein- A from rainbow trout. *Protein Expr Purif*, 2003, 27: 338–345.
- [14] Ansari MZ, Yadav G, Gokhale RS, *et al.* NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS-PKS megasynthases. *Nucleic Acids Res* 32(web server issue), 2004, W405–W413.
- [15] Nicholas KB, Nicholas HBJ, Deerfield DWI. Genedoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnw News*, 1997, 4: 14.
- [16] Kalman S, Kiehne KL, Cooper N, *et al.* Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(8): 3063–3068.
- [17] Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [18] Ehmann DE, Shaw-Reid CA, Losey HC, *et al.* The EntF and EntE adenylation domains of *Escherichia coli* enterobactin synthetase: sequestration and selectivity in acyl-AMP transfers to thiolation domain cosubstrates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(6): 2509–2514.
- [19] Conti E, Stachelhaus T, Marahiel MA, *et al.* Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J*, 1997, 16 (14): 4174–4183.
- [20] Mootz HD, Marahiel MA. The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol*, 1997, 6843–6850.
- [21] Kratzschmar J, Krause M, Marahiel MA. Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes grsA and grsB has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *J Bacteriol*, 1989, 71(10): 5422–5429.
- [22] Tsuge K, Akiyama T, Shoda M. Cloning, sequencing and characterization of the iturin A operon. *J Bacteriol*, 2001, 183(21): 6265–6273.
- [23] Wu S, Zhong J, Huan L. Genetics of subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B production by *Bacillus subtilis* JM4. *Biochem. Biophys Res Commun*, 2006, 344(4): 1147–1154.
- [24] Chio SK, Park SY, Kim R, *et al.* Identification and functional analysis of the fusaricidin biosynthetic gene of *Paenibacillus polymyxa* E681. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 365(1): 89–95.
- [25] Martin RW. A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, 4884–4887.
- [26] Conti E, Stachelhaus T, Marahiel MA, *et al.* Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J*, 1997, 16 (14): 4174–4183.

Prediction, overexpression and activity confirmation of adenylation domain in Zwittermicin A biosynthesis gene cluster

Chunxu Song, Changming Zhao, Ziniu Yu, Ming Sun*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: [Objective] The adenylation domain is required for the substrate activation of non-ribosomal peptide synthesis. The objective of this research was to prove that 2, 3-diaminopropionate is one of the presume precursors of Zwittermicin A biosynthesis. **[Methods]** We cloned the adenylation domain in the Zwittermicin A synthesis cluster of *Bacillus thuringiensis* strain YBT-1520 with PCR amplification. After a series of enzyme digestions and subclonings, new expression vectors pBMB1312 was obtained. In order to detect the proper condition for overexpression, we tried different Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) concentration and temperature during overexpression. **[Results]** The overexpression protein of this domain could be purified under 20 , 0.1 mmol/L Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), BL21 codon plus RP (DE3) as the host strain. Then, PPI release assay indicated that 2, 3-diaminopropionate, the presume precursor of Zwittermicin A, could be adenylated by the adenylation domain. **[Conclusion]** This research confirmed that 2, 3-diaminopropionate is one of the presume precursors of Zwittermicin A biosynthesis.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Zwittermicin A; 2, 3-diaminopropionate; Adenylation domain

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30770020), the National programs for High Technology Research and Development of China (2006AA02Z174; 2006AA03A243) and the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2003CB114201)

*Corresponding author. Tel: +86-27-87283455; Fax: +86-27-87280670; E-mail: m98sun@mail.hzau.edu.cn

Received: 3 March 2008 / Revised: 21 April 2008