



普通烟草 NtASAT2 的结构预测、克隆表达及功能验证

韩丽^{1,2},董滋强¹,王丽娇¹,李文钦¹,王晨辉¹,肖成志¹,毛多斌^{1,2}

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;
2. 郑州轻工业大学 烟草工业生物技术重点实验室,河南 郑州 450001

摘要:为获得具有活性的普通烟草酰基糖酰基转移酶(NtASAT2),采取生物信息学方法对其序列及结构进行分析和预测,并对其基因进行克隆、原核表达与纯化,通过酶催化反应对获得的重组蛋白进行功能验证。结果表明:在 NtASAT2 二级结构中, α -螺旋及无规则卷曲占比较大,分别为 39.04%和 41.13%,且 NtASAT2 的氨基酸序列与粘毛烟草 NacASAT2 高度相似;在原核细胞 BL21(DE3)表达的重组蛋白中,可溶性 NtASAT2 含量较少,且 NtASAT2 与镍柱的亲和力较弱,纯化后仅得到少量目标蛋白;在含有底物的酶催化反应体系中,NtASAT2 表现出酶活性并催化生成蔗糖二酯。该研究结果可为 NtASAT2 在酶催化合成蔗糖酯方面的应用提供理论参考。

关键词:普通烟草;酰基糖酰基转移酶;蔗糖酯;克隆;表达与纯化

中图分类号:TS41⁺3;Q786 **文献标识码:**A

0 引言

蔗糖酯又名酰基蔗糖,是蔗糖和脂肪酸经酯化反应形成的酯类化合物。蔗糖具有 8 个羟基,不同位置羟基结合不同脂肪酸可形成结构多样的蔗糖酯。不同蔗糖酯具有不同的亲水亲油平衡值(Hydrophile-lipophile Balance,HLB)^[1],因此可作为表面活性剂使用;此外,其还能作为植物生长调节剂、杀虫剂、增塑剂等^[2],广泛应用于生物、医药、食品等行业中^[3]。蔗糖酯主要通过化学法和酶催化法制备获得,其中化学法包括酰氯酯化法、直接脱水法及酯交换法,而酶催化法主要是利用脂肪酶催

化获取蔗糖酯^[4]。目前,无论是化学法还是酶催化法,均无法直接实现蔗糖特定位点羟基的酯化反应,因此,若想获得结构更为复杂的蔗糖酯,还需探寻新的酶。

研究人员已在一些茄科作物(番茄^[5-6]、矮牵牛^[7]、美人襟^[8]及烟草^[9-11])的腺毛组织中发现了蔗糖酯的存在,这些天然蔗糖酯的脂肪酸侧链中包含短链脂肪酸、中等长度链长脂肪酸及一些支链脂肪酸,且多为蔗糖多酯,比目前工业途径获得的蔗糖酯结构更为丰富。在植物中,催化合成蔗糖酯的关键酶为酰基糖酰基转移酶(Acylsugar Acyltransferase,ASAT),其属于 BAHD 酰基转移酶^[12],主要负责将

收稿日期:2024-05-10;修回日期:2024-05-27

基金项目:中国烟草总公司重点研发项目(110202202006)

作者简介:韩丽(1983—),女,内蒙古自治区牙克石市人,郑州轻工业大学副教授,博士,主要研究方向为酶工程。E-mail:han_l@zzuli.edu.cn



酯酰基辅酶 A 中的酯酰基基团转移到蔗糖或酰基蔗糖的羟基上。目前,茄科作物中,番茄^[6]、矮牵牛^[7]、美人襟^[8]、粘毛烟草(*Nicotiana acuminata*)等^[11]的 ASAT 研究较为深入,普通烟草(*N. tabacum* L.)中蔗糖酯的结构也有报道^[13-14],其酰基糖酰基转移酶 NtASAT1 和 NtASAT2 的功能已被初步解析,NtASAT1 主要负责催化蔗糖与酯酰基辅酶 A 形成蔗糖一酯,而 NtASAT2 则负责催化酯酰基辅酶 A 与蔗糖一酯形成蔗糖二酯^[15]。酶的异源表达与纯化是深入研究酶结构与功能的一种有效手段^[16-17],例如,韩丽等^[18]成功克隆了普通烟草 NtASAT1 基因,通过异源表达与纯化验证了 NtASAT1 的功能,但 NtASAT2 的异源表达、纯化及功能验证尚未见报道。

鉴于此,本文拟对普通烟草 NtASAT2 的序列及结构进行分析和预测,克隆 *NtASAT2* 基因并在 BL21 (DE3) 中进行异源表达,通过镍柱亲和层析纯化 NtASAT2 并对其进行功能验证,以期在 NtASAT2 在蔗糖酯催化技术方面的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3)、AP221-01 型 TransStart[®] FastPfu DNA Polymerase、CW2583 S 型 DNA 2K Marker,北京全式金生物技术有限公司;pET28a 质粒,郑州轻工业大学烟草工业生物技术重点实验室保存;CW2302 M 型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,康为世纪生物科技有限公司;B518191 型 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、B600511 型 T4 DNA 连接酶,生工生物工程(上海)股份有限公司;A55860 型 BCA 蛋白定量试剂盒,Thermo Fisher Scientific 有限公司;常规分析纯化学试剂,上海麦克林生化科技有限公司;普通烟草 cDNA,郑州轻工业大学烟草科学与工程学院提供。

1.2 主要仪器与设备

C1000 Touch Thermal Cycler,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;ZWY-2102C 型恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;JY92-IIIN 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;

DYCP-31E 型琼脂糖水平电泳仪电泳槽,北京六一生物科技有限公司;1260 Infinity II 型安捷伦高效液相色谱-TripleTOF[™]6600 型 SCIEX 超高分辨质谱联用(LC-MS)仪,安捷伦科技(新加坡)有限公司;TW100-1 型氮吹仪,天津奥淇科化医疗供应链管理服务有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 NtASAT2 序列分析与结构预测 利用在线工具 ExPASy(<http://www.expasy.org>)软件预测并分析 NtASAT2 的氨基酸序列;使用 MEGA7 软件构建和绘制 NtASAT2 蛋白质进化树;采用 SOPMA 预测 NtASAT2 的二级结构;通过 Phyre2 进行 NtASAT2 的三级结构建模及模拟。

1.3.2 NtASAT2 基因克隆及表达载体构建 提取普通烟草的 RNA 并反转录,得到 cDNA。通过 Primer 5.0 设计引物 F(CATATGGCTATTTCAAGGCTTGTTTTA)及 R(TCGAGCTAGAGTCCTGAGCTTGGAGA),并进行 PCR 扩增获得 *NtASAT2* 基因片段,使用 NdeI 酶和 XhoI 酶分别双酶切 *NtASAT2* 基因片段和 pET28a 质粒,将酶切后的 *NtASAT2* 基因片段和 pET28a 质粒载体进行胶回收,使用 T4 DNA 连接酶连接并转化大肠杆菌 DH5 α 。通过 PCR 菌液质粒双酶切鉴定及测序验证获得阳性转化子,将其转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,获得重组菌株(含 pET28a-*NtASAT2* 质粒)。同时,将质粒 pET28a 转入 BL21 (DE3) 中作为空白对照。

1.3.3 重组蛋白表达与纯化 1) 重组蛋白表达。分别挑选重组菌株和对照组单菌落,并将其分别接种至 LB 液体培养基中过夜培养,获得种子液。以 1%(如无特殊说明,百分号均指体积分数)的接种量将种子液接种至 20 mL LB 液体培养基(含 50 mg/L 卡那霉素)中,在 37 ℃、180 r/min 条件下振荡培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8。添加不同浓度(0.05 mmol/L、0.10 mmol/L 和 0.20 mmol/L)的诱导剂 IPTG,在 20 ℃、180 r/min 条件下诱导表达 8~10 h。取菌液各 1 mL,在 8000 r/min 条件下离心 2 min,收集菌体并加入 500 μ L 缓冲液(50 mmol/L Na₃PO₄、150 mmol/L NaCl,pH 值为 7.3,下同),得到全蛋白;再取 5 mL 菌液,于 8000 r/min 条件下离

心 2 min,弃上清液,将沉淀用 3 mL 缓冲液重悬后进行超声破碎(功率 260 W,每超声 3 s,间歇 5 s,共超声 6 min),于 12 000 r/min 条件下离心 10 min,收集上清液,即为可溶性蛋白;将沉淀用缓冲液重悬后,得到不溶性蛋白。将获得的蛋白加入缓冲液中,进行 SDS-PAGE 检测。

2) 重组蛋白纯化。将重组菌株的种子液按 1% 的接种量接种至 600 mL LB 培养基中,在 37 ℃、180 r/min 条件下培养,直到 OD_{600} 达到 0.6~0.8。添加 0.05 mmol/L 的 IPTG,在 20 ℃、150 r/min 的条件下诱导表达 8 h 后,在 4 ℃、10 000 r/min 条件下离心 10 min,去除上清液并收集菌体,将菌体置于冰冷的缓冲液中进行超声破碎(功率 300 W,每超声 5 s,间歇 5 s,共超声 30 min),将破碎后的菌液于 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 10 min,上清液即为目标粗蛋白。通过镍柱亲和层析对目标粗蛋白进行纯化,使用 Millipore 超滤管将纯化后的蛋白溶液浓缩至 1 mL,加入 50 mmol/L 乙酸铵缓冲液(pH 值为 6.0)进行连续稀释并置换咪唑,重复超滤处理 5 次以上,得到浓缩蛋白溶液。使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测浓缩蛋白溶液的浓度后,置于-80 ℃冰箱中保存,备用。

1.3.4 重组 NtASAT2 功能验证 将纯化后的 NtASAT1 与 200 μ mol/L 异戊酰辅酶 A、1 mmol/L 蔗糖(底物)混合后进行酶催化反应(过程中加入 5 mmol/L $MgCl_2$ 和 5 mmol/L ATP),37 ℃条件下反应 40 min,取部分反应液留待检测,其余反应液加入纯化后的 NtASAT2,继续反应 40 min,加入 2 倍体积的终止液(V (乙腈): V (异丙醇): V (甲酸)=1:1:0.001),于 10 000 r/min 条件下离心 10 min,收集上清液,过 0.22 μ m 滤膜后,4 ℃保存,待测。对照组设置为:NtASAT2 与 200 μ mol/L 异戊酰辅酶 A、1 mmol/L 蔗糖(底物)混合后进行酶催化反应。

通过 LC-MS 检测酶催化反应后样品中的蔗糖酯,使用的色谱柱为 Ascentis Express C18 柱(2.1 mm $\times$ 10 cm $\times$ 2.7 μ m)。LC 条件:柱温 40 ℃;流动相为 A(0.15%甲酸水溶液)和 B(乙腈),流动相均需进行抽滤,并超声处理 20 min 以排出气泡,流速为 3 mL/min;梯度洗脱条件为起始时 95%A 和

5%B,1 min 时 B 的体积分数升至 40%,5 min 时 B 的体积分数升至 100%并保持 1 min,6.01 min 时 B 的体积分数降至 5%并保持到 7 min。MS 条件:负离子模式为电喷雾电离;毛细管电压 2.14 kV;源温度 90 ℃,去溶剂温度 350 ℃;去溶 N_2 流速 600 L/h;锥体电压 10 V;扫描质量范围(m/z)为 50~1000 amu;光谱累积量 0.1 s/次。

2 结果与讨论

2.1 NtASAT2 序列及结构预测结果分析

2.1.1 NtASAT2 氨基酸序列 利用 ExPASy 软件对 NtASAT2 氨基酸序列进行分析,发现 NtASAT2 的相对分子质量为 46 757.41,理论等电点为 6.62,总原子数为 6572。此外,NtASAT2 的不稳定系数为 43.87,稳定蛋白的标准阈值为 40,表明其具有一定的不稳定性。NtASAT2 由 420 个氨基酸组成,其中 Ser 含量最高,占总氨基酸含量的 10.70%;其次是 Leu 和 Ala,分别占总氨基酸含量的 10.0%和 6.90%;而 Trp 含量最低,仅占总氨基酸含量的 0.70%。带正电荷的氨基酸残基总数为 42,带负电荷的氨基酸残基总数为 43,带电荷氨基酸为总氨基酸的 20.23%。

将 NtASAT2 与目前已报道的一些 ASAT 氨基酸序列进行比对,并基于 NtASAT2 序列构建蛋白质进化树,结果如图 1 所示。由图 1 可知,NtASAT2 与粘毛烟草的 NacASAT2 聚为一类,同时与 *Salpiglossis sinuata* 和 *Petunia axillaris* 的 ASAT2 亲缘关系较近,相似度分别为 72.07% 和 74.13%。虽然 ASAT2 在茄科作物中均负责蔗糖酯生物合成的第二步(将酯酰基团转移到蔗糖一酯的羟基上),但由于不同的酶具有不同的立体选择性,不同种属的 ASAT2 负责催化的羟基位置不同,故催化底物的特异性亦不同。*S.sinuata* 和 *P.axillaris* 与普通烟草中的 ASAT2 均负责催化酯酰基辅酶 A 中酯酰基团转移到蔗糖一酯葡萄糖环的 R4 号羟基上,形成蔗糖二酯。这可能是因为 NtASAT2 与 *S.sinuata* 和 *P.axillaris* 中 ASAT2 亲缘关系较近,也可能是酶对底物的相同立体选择引起的进化现象。

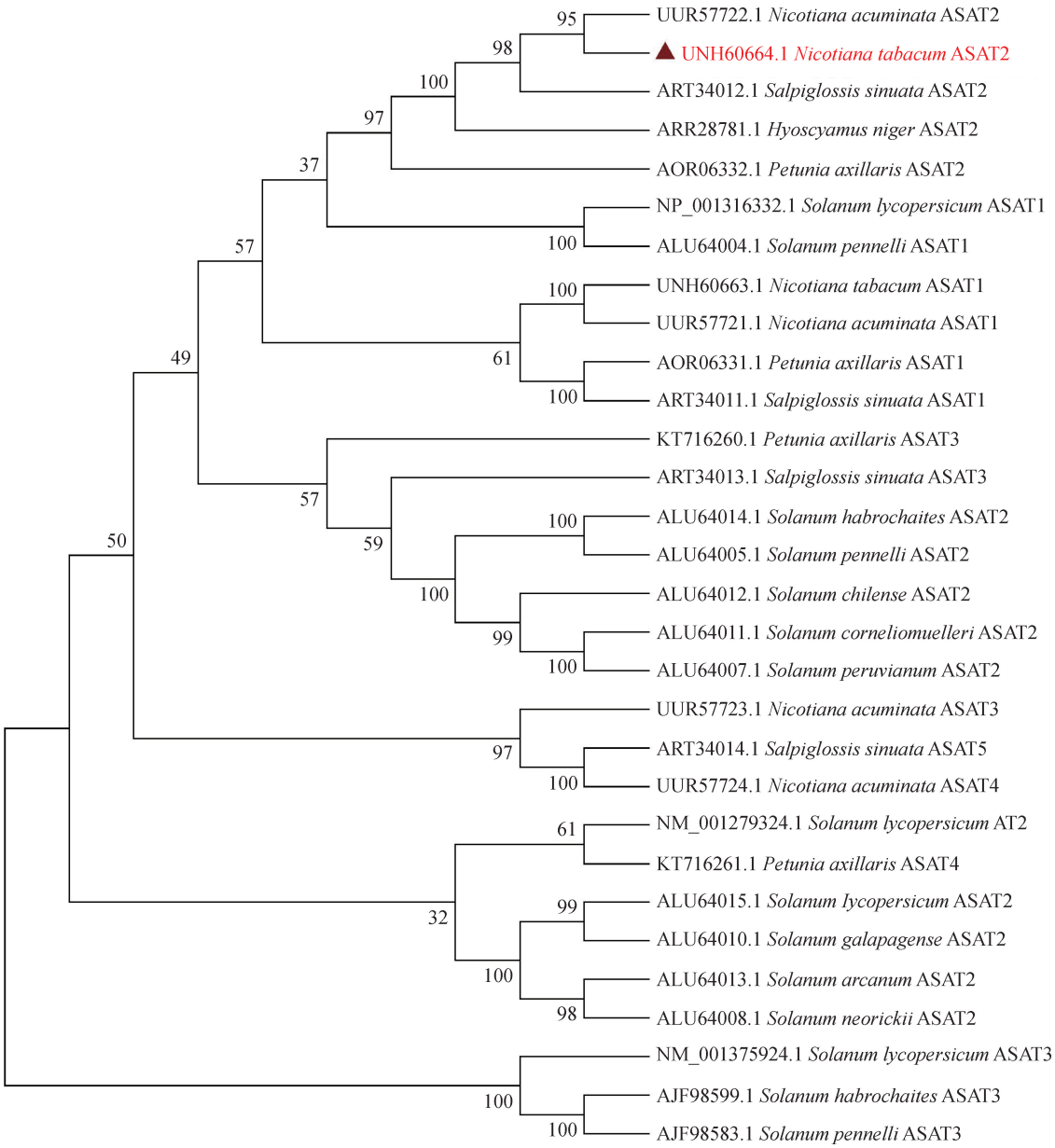


图 1 基于 NtASAT2 序列的蛋白质进化树

Fig. 1 The evolutionary tree of the protein based on the NtASAT2 sequence

2.1.2 NtASAT2 二级及三级结构预测结果 在氨基酸序列分析的基础上,对 NtASAT2 的二级结构进行预测分析,结果如图 2 所示。由图 2 可知,二级结构中,α-螺旋占比为 39.04%,延伸链占比为 16.91%,β-转角占比为 2.92%,无规则卷曲占比为 41.13%。进一步通过 SignalP 软件进行预测,发现蛋白中不含信号肽。TMHMMOL/L 在线工具分析结果显示,普通烟草 NtASAT2 不存在跨膜结构域。这些生物信息学数据可为后续基因的克隆、表达、纯化等提供参考。

以 PDB 数据库中的 2bgh (Vinorine Synthase,

是目前结构解析清楚且与 NtASAT2 氨基酸序列相似度最高的蛋白) 为模板,通过在线软件 Phyre2 对 NtASAT2 三级结构进行预测,结果如图 3 所示。由图 3 可知,NtASAT2 与模板 2bgh 氨基酸序列相似度为 31%,NtASAT2 中 α-螺旋及无规则卷曲占比较大,而延伸链占比较小,这与二级结构预测结果一致。目前,尚无法通过三级结构预测确定 NtASAT2 是否为多聚体蛋白质,同时其底物结合区域、负责催化的氨基酸基团等信息也需进一步选择其他模板建模或通过实验数据获取。

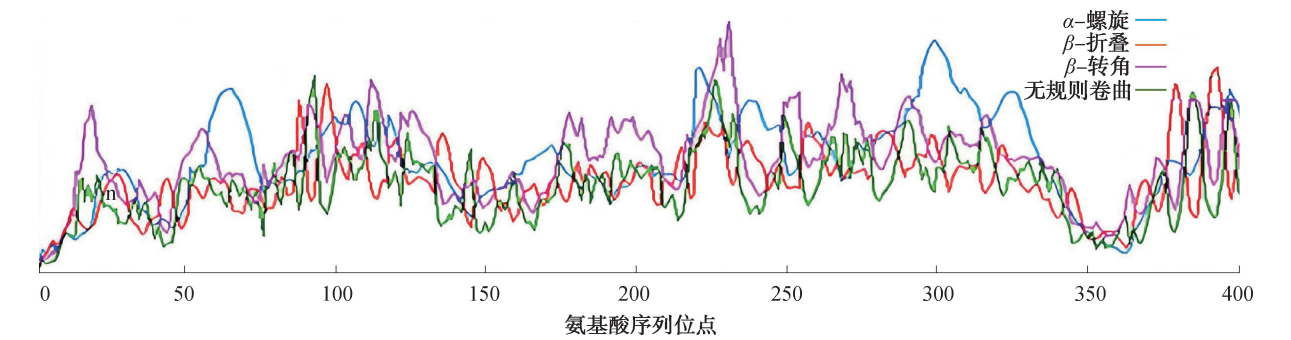


图 2 NtASAT2 的二级结构
Fig. 2 The secondary structure of the NtASAT2

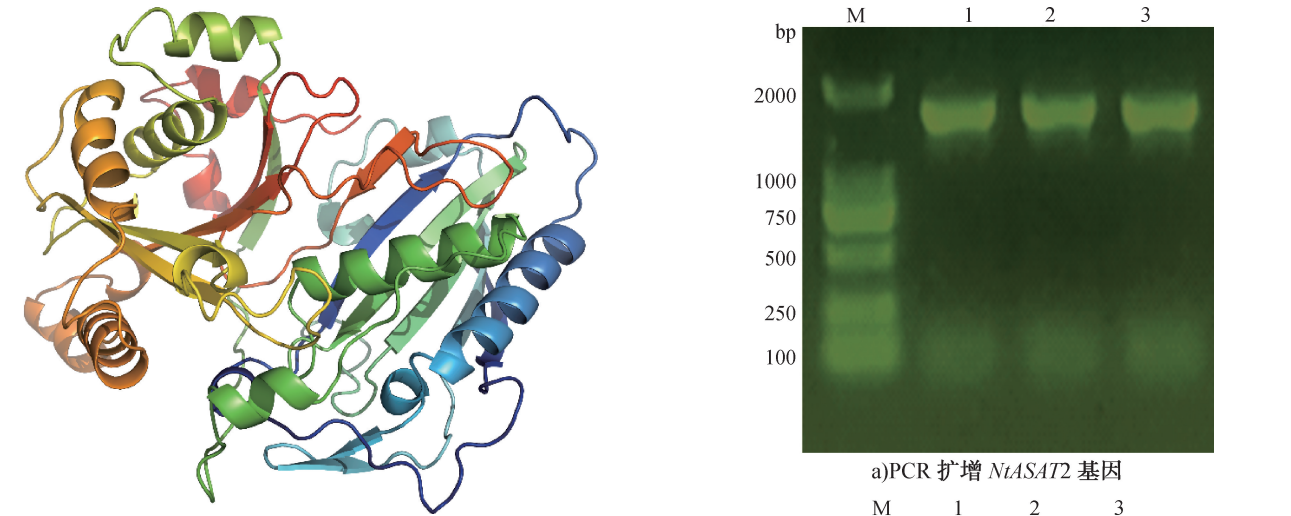


图 3 NtASAT2 的三级结构
Fig. 3 The tertiary structure of NtASAT2

2.2 NtASAT2 基因克隆及表达载体构建结果分析

NtASAT2 基因克隆及表达载体构建结果如图 4 所示。图 4a)中 M 为 2000 bp 的 DNA Marker,泳道 1、2、3 表示以烟草 cDNA 为模板获得的 NtASAT2 基因片段。由图 4a)可知,以烟草 cDNA 为模板,扩增得到的 NtASAT2 基因约为 1300 bp。图 4b)中,M 为 10 000 bp 的 DNA Marker,泳道 1、2、3 分别表示质粒经双酶切后的基因片段。由图 4b)可知,pET28a-NtASAT2 质粒经双酶切后,所得基因片段分别约为 5300 bp(质粒载体)和 1300 bp(目标 NtASAT2 基因片段),证明双酶切结果与预期一致。最终挑选图 4b)中泳道 1 的克隆进行质粒测序,测序结果正确,证明 NtASAT2 基因克隆正确,表达载体构建成功。

2.3 重组 NtASAT2 的表达与纯化结果分析

2.3.1 重组 NtASAT2 表达结果 诱导表达中 NtASAT2 的 SDS-PAGE 检测结果如图 5 所示。图 5a)中,M 为蛋白 Marker,泳道 1、2 分别表示空白组 (pET28a 质粒)未加 IPTG 的全蛋白和加入 0.05 mmol/L

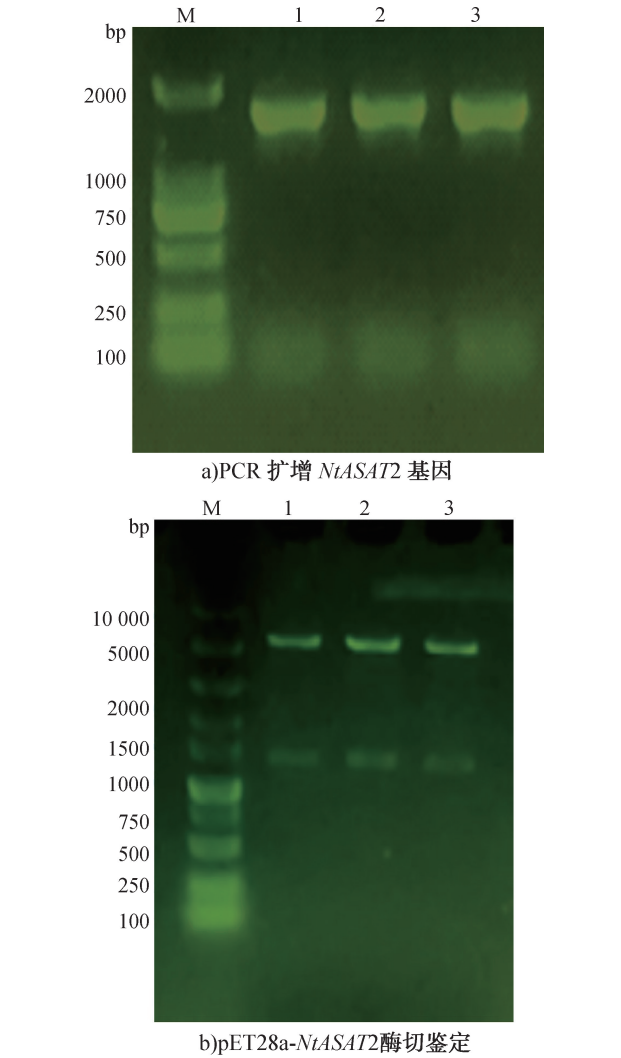


图 4 NtASAT2 基因克隆及表达载体构建结果
Fig. 4 The cloning and expression vector constructy of gene NtASAT2

IPTG 后的全蛋白,泳道 3、4 分别表示实验组 (pET28a-NtASAT2 质粒)未加 IPTG 的全蛋白和加入 0.05 mmol/L IPTG 后的全蛋白。由图 5a)可知,泳道 4 中白色箭头所指蛋白约为 47.0 kDa,与 NtASAT2 大小一致,结合泳道 1、2 和 3,确定其为加

入 IPTG 诱导后表达的目标蛋白 NtASAT2。

20 ℃ 条件下,不同浓度 IPTG 对 NtASAT2 表达的影响如图 5b) 所示。其中泳道 1、2 分别表示 0.05 mmol/L IPTG 条件下的上清液及沉淀;泳道 3、4 分别为 0.10 mmol/L IPTG 诱导条件下的上清液及沉淀;泳道 5、6 分别表示 0.20 mmol/L IPTG 诱导条件下的上清液及沉淀,白色箭头为目标蛋白 NtASAT2。由图 5b) 可知,0.05 mmol/L IPTG 诱导时,NtASAT2 的可溶性表达较多(泳道 1 白色箭头处),而当 0.20 mmol/L IPTG 诱导时,大部分 NtASAT2 以不可溶的包涵体形式存在(泳道 5 白色箭头处)。最终选择 0.05 mmol/L IPTG 的诱导条件进行后续实验。

2.3.2 重组 NtASAT2 纯化结果 NtASAT2 的纯化结果如图 6 所示。图 6a) 中,M 表示蛋白 Maker,泳道 1 表示全蛋白,泳道 2 表示流穿液,泳道 3 表示

10 mmol/L 咪唑洗脱液,泳道 4 表示 50 mmol/L 咪唑洗脱液,泳道 5 表示 100 mmol/L 咪唑洗脱液,泳道 6 表示 200 mmol/L 咪唑洗脱液,泳道 7 表示 500 mmol/L 咪唑洗脱液。由图 6a) 可知,在使用咪唑进行梯度洗脱后,大部分 NtASAT2 在融合组氨酸 (His) 标签后能够与镍柱结合,仅有小部分 NtASAT2 未与镍柱结合并直接流穿下来。使用 50 mmol/L 咪唑进行洗脱时,所含 NtASAT2 浓度最高,但该浓度下洗脱液中的杂蛋白也相对较多,因此目标蛋白 NtASAT2 纯度较低。使用 100 mmol/L 咪唑进行洗脱后,NtASAT2 纯度明显提高,但其浓度下降,且仍存在少量的杂蛋白。使用 200 mmol/L 咪唑进行洗脱后,未见目标蛋白条带,结合 100 mmol/L 咪唑洗脱情况,推测 NtASAT2 完全被洗脱。通过镍柱亲和和层析结果发现,NtASAT2 在融合 His 标签后,

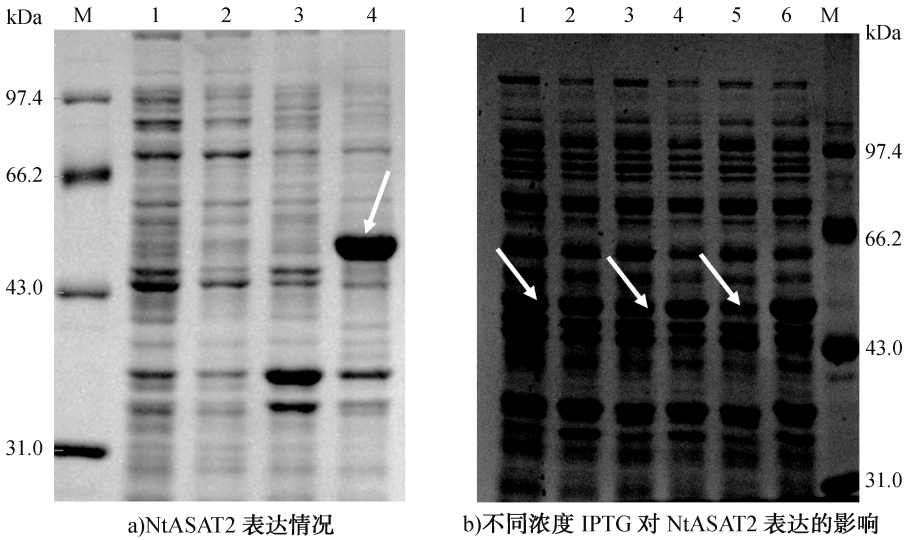


图 5 诱导表达中 NtASAT2 的 SDS-PAGE 检测结果
Fig. 5 Detection results of NtASAT2 during inducing expression by SDS-PAGE

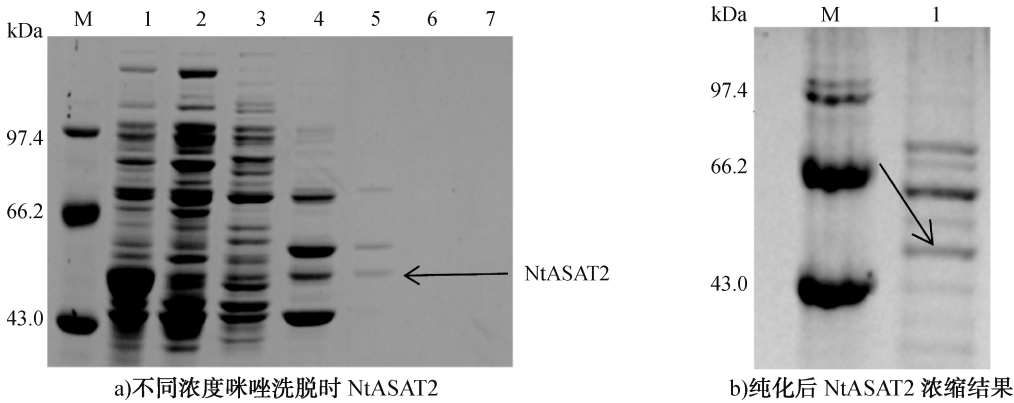


图 6 NtASAT2 的纯化结果
Fig. 6 Purification results of the NtASAT2

与镍柱的亲合力不强,低浓度咪唑就可将其洗脱下来(过程中杂蛋白被一起洗脱下来),所得 NtASAT2 纯度较低,因此可考虑变换不同的亲和标签或将标签置于基因的 C 端进行不同的尝试^[19-20],以确定最佳亲和层析纯化方案。其次,NtASAT2 在 BL21(DE3) 中大部分以包涵体形式存在,从一定程度上影响了目标蛋白的纯化得率,可尝试通过包涵体复性^[21]、理性设计改变目标蛋白的氨基酸序列以提升 NtASAT2 的可溶性^[22-23],进而提高 NtASAT2 的纯化得率。

纯化后 NtASAT2 的浓缩结果如图 6b) 所示,其中,M 表示蛋白 Maker,泳道 1 表示浓缩 NtASAT2 蛋白。由图 6b) 可知,浓缩后的 NtASAT2 仍含有一部分杂质,对其进行总浓度测定,发现蛋白质浓度为 0.037 5 mg/mL。

2.4 重组 NtASAT2 功能验证结果分析

重组 NtASAT2 的功能验证结果如图 7 所示。

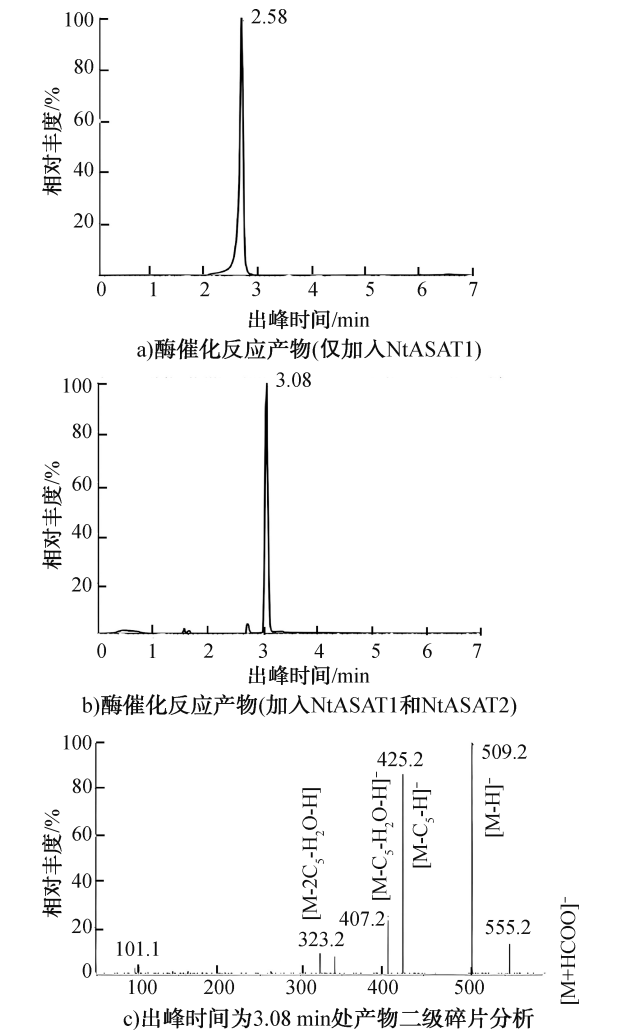


图 7 重组 NtASAT2 的功能验证结果
Fig. 7 Functional verification of recombinant NtASAT2

由图 7a) 可知,当反应体系中仅有 NtASAT1、蔗糖及异戊酰辅酶 A 时,酶催化反应后可检测到蔗糖一酯的存在。由图 7b) 可知,当加入纯化后的 NtASAT2 时,酶催化反应产物在 3.08 min 处出现一新峰(m/z 为 555.2)。而在只加入 NtASAT2 的对照组中,未检测到任何蔗糖酯类化合物的生成。进一步对新峰处的化合物进行二次轰击(负离子模式,电压为 20 V),结果如图 7c) 所示。由图 7c) 可知,新峰处的化合物在二次轰击的作用下产生质荷比为 555.2、509.2、425.2 和 323.2 的碎片,这与蔗糖二酯产生的二级碎片完全相同,因此可确定在加入 NtASAT2 后生成了蔗糖二酯。本文获得的重组 NtASAT2 虽纯度不高,但可催化生成蔗糖二酯。因此,纯化后的 NtASAT2 具有一定酶活性。

3 结论

本文对 NtASAT2 的氨基酸序列、二级结构及三级结构进行了分析和预测,发现普通烟草 NtASAT2 与茄科作物粘毛烟草 NacASAT2 具有较高相似度;将 NtASAT2 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行表达,发现其可顺序表达,但大部分为不可溶蛋白;融合 His 标签进行镍柱亲和层析纯化,发现融合表达后的 NtASAT2 与镍柱亲和力较弱,因此纯化后的 NtASAT2 含有少量杂蛋白;进一步将纯化后的 NtASAT2 加入可产生蔗糖一酯的酶催化反应体系中,通过 LC-MS 鉴定发现生成了新产物蔗糖二酯,证明纯化后的 NtASAT2 具有一定酶活性。

本研究结果可为未来 NtASAT2 在蔗糖酯合成方面的应用提供理论参考。但目前实验中发现,NtASAT2 基因的表达需较低温度进行诱导,且 NtASAT2 纯化后得率不高,后续将进一步根据三维结构预测结果改变其表面氨基酸序列,以提高其可溶性表达,进而提高其纯化效率。

参考文献:

[1] BAKER I J A, FURLONG D N, GRIESER F, et al. Sugar fatty acid ester surfactants: Base-catalyzed hydrolysis [J]. Journal of Surfactants and Detergents, 2000, 3(1): 29-32.

[2] DAUDÉ D, REMAUD-SIMÉON M, ANDRÉ I. Sucrose analogs: An attractive (bio) source for glycodiversification



- [J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(9): 945–960.
- [3] FARRÁN A, CAI C, SANDOVAL M, et al. Green solvents in carbohydrate chemistry: From raw materials to fine chemicals[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(14): 6811–6853.
- [4] 马亚茹. 糖酯的酶促合成及其功能特性的研究[D]. 广州: 暨南大学, 2018.
- [5] SCHILMILLER A L, MOGHE G D, FAN P X, et al. Functionally divergent alleles and duplicated Loci encoding an acyltransferase contribute to acylsugar metabolite diversity in *Solanum* trichomes[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(4): 1002–1017.
- [6] SCHILMILLER A L, CHARBONNEAU A L, LAST R L. Identification of a BAHD acetyltransferase that produces protective acyl sugars in tomato trichomes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(40): 16377–16382.
- [7] FAN P X, MILLER A M, SCHILMILLER A L, et al. *In vitro* reconstruction and analysis of evolutionary variation of the tomato acylsucrose metabolic network [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(2): E239–E248.
- [8] NADAKUDUTI S S, UEBLER J B, LIU X X, et al. Characterization of trichome-expressed BAHD-acyltransferases in *Petunia axillaris* reveals distinct acylsugar assembly mechanisms within the Solanaceae [J]. *Plant Physiology*, 2017, 175(1): 36–50.
- [9] SLOCOMBE S P, SCHAUVINHOLD I, MCQUINN R P, et al. Transcriptomic and reverse genetic analyses of branched-chain fatty acid and acyl sugar production in *Solanum pennellii* and *Nicotiana benthamiana* [J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(4): 1830–1846.
- [10] CHANG A X, HU Z Y, CHEN B, et al. Characterization of trichome-specific BAHD acyltransferases involved in acylsugar biosynthesis in *Nicotiana tabacum* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(12): 3913–3928.
- [11] SCHENCK C A, ANTHONY T M, JACOBS M, et al. Natural variation meets synthetic biology: Promiscuous trichome-expressed acyltransferases from *Nicotiana* [J]. *Plant Physiology*, 2022, 190(1): 146–164.
- [12] ZHENG Z Y, QUALLEY A, FAN B F, et al. An important role of a BAHD acyl transferase-like protein in plant innate immunity[J]. *Plant Journal*, 2009, 57(6): 1040–1053.
- [13] GHOSH B, WESTBROOK T C, JONES A D. Comparative structural profiling of trichome specialized metabolites in tomato (*Solanum lycopersicum*) and *S. habrochaites*: Acylsugar profiles revealed by UHPLC/MS and NMR [J]. *Metabolomics*, 2014, 10(3): 496–507.
- [14] SEVERSON R F, ARRENDALE R F, CHORTYK O T, et al. Isolation and characterization of the sucrose esters of the cuticular waxes of green tobacco leaf[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1985, 33(5): 870–875.
- [15] 黄中, 闫茗熠, 陈梦月, 等. 基于转录组测序和 RT-qPCR 技术的烟草糖酯合成基因挖掘[J]. *轻工学报*, 2023, 38(6): 78–84.
- [16] 周烨, 刘哲益, 王方军. 结构蛋白质组学研究进展[J]. *色谱*, 2019, 37(8): 788–797.
- [17] 熊强, 丁立新, 姜晓燕, 等. X 射线测定蛋白质结构的技术进展与研究现状[J]. *癌变·畸变·突变*, 2019, 31(1): 82–85.
- [18] 韩丽, 王丽娇, 肖成志, 等. 烟草 NtASAT1 基因的原核表达、纯化及功能验证[J]. *中国生物工程杂志*, 2023, 43(4): 30–40.
- [19] DHAKAL S, SAPKOTA K, HUANG F Q, et al. Cloning, expression and purification of the low-complexity region of RanBP9 protein[J]. *Protein Expression and Purification*, 2020, 172: 105630.
- [20] PUIG O, CASPARY F, RIGAUT G, et al. The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification[J]. *Methods*, 2001, 24(3): 218–229.
- [21] 罗莉, 李坤, 王保成, 等. 包涵体变复性技术研究进展[J]. *中国医药生物技术*, 2012, 7(4): 290–293.
- [22] KURIATA A, IGLESIAS V, PUJOLS J, et al. Aggrescan3D (A3D) 2.0: Prediction and engineering of protein solubility[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W300–W307.
- [23] 苗朝悦, 杜乐, 王佳琦, 等. 重组蛋白质在大肠杆菌体系中的可溶性表达策略[J]. *中国生物工程杂志*, 2023, 43(9): 33–45.

Structural prediction, cloning expression and functional verification of NtASAT2 from *Nicotiana tabacum* L.

HAN Li^{1,2}, DONG Ziqiang¹, WANG Lijiao¹, LI Wenqin¹, WANG Chenhui¹, XIAO Chengzhi¹, MAO Duobin^{1,2}

1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Key Laboratory of Biotechnology in Tobacco Industry, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

Abstract: To obtain functional acyl sugar acyltransferase NtASAT2 of *Nicotiana tabacum* L., bioinformatic methods were applied to analyze and predict the sequences and structure of NtASAT2. The gene of NtASAT2 was cloned,

prokaryotic expressed, and then purified. The function of the recombinant protein was verified through enzymatic catalysis. The results showed that in the secondary structure of NtASAT2, α -helices and random coils account for a large proportion with 39.04% and 41.13%, respectively. The amino acid sequence of NtASAT2 was highly similar to that of sticky tobacco NacASAT2. The content of soluble NtASAT2 in the recombinant protein expressed by prokaryotic cell BL21 (DE3) was relatively low, and the affinity of NtASAT2 to nickel column was weak. After purification, only a small amount of the target protein was obtained. In enzymatic reaction systems containing substrates, NtASAT2 showed enzyme activity and catalyzed the formation of sucrose diesters. The research results could provide a theoretical basis for the application of acyl sugar acyltransferase in enzymatic synthesis of sucrose esters.

Key words:*Nicotiana tabacum* L. ;acylsugar acyltransferase;sucrose ester;cloning;expression and purification

[责任编辑:杨晓娟 刘春奎]