

• 工业生物技术 •

## 红球菌低分子量型腈水合酶的异源激活及激活子的结构域功能

王甜忆, 程中一, 郭军玲, 夏媛媛, 刘中美, 周哲敏

江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

王甜忆, 程中一, 郭军玲, 等. 红球菌低分子量型腈水合酶的异源激活及激活子的结构域功能. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1578–1589.

Wang TY, Cheng ZY, Guo JL, et al. Activation of low-molecular-mass nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 by heterologous activators. Chin J Biotech, 2020, 36(8): 1578–1589.

**摘要:** 腈水合酶激活子具有亚基自身交换伴随子或者金属离子伴随子的功能, 能够辅助腈水合酶摄取金属离子, 对于腈水合酶的活性表达必不可少。与腈水合酶自身相比, 激活子的序列保守性低, 研究其激活作用的特点, 探索其结构与功能之间的关系, 对于理解腈水合酶的成熟机制具有重要意义。将红球菌 *Rhodococcus rhodochrous* J1 低分子量型腈水合酶 L-NHase 分别与 4 种异源激活子组合共表达, 测定异源激活子对 L-NHase 的激活作用, 进一步对激活子进行序列分析和结构模拟, 并研究关键结构域的功能。结果表明, 4 种异源激活子均能激活 L-NHase, 但激活后 L-NHase 的比酶活存在差异, 激活子 A 对 L-NHase 的激活程度最高, 激活后的 L-NHase 比酶活为出发酶的 97.79%; 激活子 G 对 L-NHase 的激活程度最低, 激活后的 L-NHase 比酶活为出发酶的 23.94%。激活子 E 和激活子 G 具有保守结构域 TIGR03889, 缺失其中部分序列会使两者的激活作用基本丧失。将激活子 G 的 N 端序列替换为激活子 E 的 N 端序列, 并将激活子 E 的 C 端序列添加至激活子 G 的 C 端, 能够使 L-NHase 的比酶活提高 178.40%。激活子的激活作用具有普遍性和特异性, 其保守结构域对激活作用至关重要, 同时 N 端结构域和 C 端结构域也对激活作用产生重要影响。

**关键词:** 腈水合酶, 激活子, 结构模拟, 蛋白质结构域

## Activation of low-molecular-mass nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 by heterologous activators

Tianyi Wang, Zhongyi Cheng, Junling Guo, Yuanyuan Xia, Zhongmei Liu, and Zhemin Zhou

Key Laboratory of Industrial Biotechnology (MOE), School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** As self-subunit swapping chaperones or metallochaperones, the activators assist nitrile hydratases to take up metal

**Received:** December 17, 2019; **Accepted:** February 17, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 21878125), International S&T Innovation Cooperation Key Project (Nos. 2016YFE0127400, SQ2017YFGH001004).

**Corresponding author:** Zhemin Zhou. Tel: +86-510-85325210; Fax: +86-510-85197551; E-mail: zhmzhou@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21878125), 国家重点研发计划 (Nos. 2016YFE0127400, SQ2017YFGH001004) 资助。

ions and they are essential for active expression of nitrile hydratases. Compared with nitrile hydratases, the activators have a low sequence identity. Study of the activation characteristics and the relationships between structures and functions of the activators is of great significance for understanding the maturation mechanism of nitrile hydratase. We co-expressed low-molecular-mass nitrile hydratase (L-NHase) from *Rhodococcus rhodochrous* J1 with four heterologous activators respectively and determined their activation abilities. Then we made sequence analysis and structure modelling, and studied the functions of the important domains of the activators. Results showed that all four heterologous activators could activate L-NHase, however, the specific activities of L-NHases were different after activation. L-NHase showed the highest specific activity after being activated by activator A, which was 97.79% of that of the original enzyme, but the specific activity of L-NHase after being activated by activator G was only 23.94% of that of the original enzyme. Activator E and activator G had conserved domains (TIGR03889), and deletion of their partial sequences resulted in a substantial loss of activation abilities for both activators. Replacing the N-terminal sequence of activator G with the N-terminal sequence of activator E, and adding the C-terminal sequence of activator E to the C-terminus of activator G could increase the specific activity of L-NHase by 178.40%. The activation by nitrile hydratase activators was universal and specific, and the conserved domains of activators were critical for activation, while the N-terminal domain and C-terminal domain also had important effects on activation.

**Keywords:** nitrile hydratase, activator, structure modelling, protein domain

腈水合酶 (Nitrile hydratase, 简称 NHase, EC 4.2.1.84) 是一类能将腈类化合物通过水合作用生成相应酰胺化合物的金属酶<sup>[1]</sup>。与化学法合成酰胺相比, 酶法合成酰胺具有反应条件温和、转化率高、产量高等优势, 因此 NHase 作为生物催化剂, 在工业上应用于大规模生产丙烯酰胺、烟酰胺和 5-氰基戊酰胺等产品<sup>[2]</sup>。晶体结构分析表明 NHase 由  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基等比例组成<sup>[3]</sup>。 $\alpha$  亚基具有一段高度保守的序列 VC (S/T) LCSC (T/Y), 该序列构成 NHase 的活性中心<sup>[4-5]</sup>, 根据活性中心结合的金属离子 (一个非卟啉铁离子或一个非咕啉钴离子) 不同, 可将 NHase 分为铁型腈水合酶 (Fe-NHase)<sup>[6]</sup>和钴型腈水合酶 (Co-NHase)<sup>[7]</sup>。NHase 通常表现为  $\alpha_2\beta_2$  四聚体<sup>[8-10]</sup>, 此外也有八聚体、二十四聚体等四级结构形式。

NHase 最早由 Asano 等在节杆菌 *Arthrobacter* sp. J-1 中发现<sup>[11]</sup>, 随后在假单胞菌<sup>[12-13]</sup>、芽胞杆菌<sup>[9]</sup>、假诺卡氏菌<sup>[8]</sup>等原核生物中得到报道, 随着基因组数据的不断增长, 近年来在真核生物中也发现了 NHase 的存在<sup>[14]</sup>。在原核生物的基因组中, 编码  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基的结构基因下游通常具有一个开放阅读框, 其编码的蛋白产物被称为激活子。NHase 获取金属离子, 完成翻译后修饰, 最终形

成有功能的成熟酶, 一般需要激活子的协助<sup>[15]</sup>。尽管 Fe-NHase 与 Co-NHase 的序列相似性较高, 但两者激活子的序列相似性却很低, 在大小上也存在很大差异。也有报道羧基酮丛毛单胞菌 *Comamonas testosteroni* Ni1 来源的 Fe-NHase 和真核生物领鞭毛虫 *Monosiga brevicollis* 来源的 Co-NHase 不需要激活子<sup>[16-17]</sup>。

虽然激活子对于 NHase 的活性表达具有至关重要的作用, 但与 NHase 本身的研究相比, 关于激活子的研究较少, 尚未有结构、功能方面的全面报道。尤其是 Co-NHase 激活子, 由于分子量小、不稳定等因素, 有时难以检测到其表达。Liu 等通过 N 端序列改造在大肠杆菌中成功表达了来源于恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* NRRL-18668 的 NHase 激活子 P14K<sup>[18]</sup>。

目前认为 Fe-NHase 激活子作为金属离子伴随子, 主要参与 Fe-NHase 生物合成过程中的铁离子输送。通过序列比对发现 Fe-NHase 激活子具有一段保守基序 CXCC, 可能构成金属离子结合位点, 对于该基序中 3 个保守的半胱氨酸残基进行突变, 将影响 Fe-NHase 的正常表达<sup>[19]</sup>。马红球菌 *Rhodococcus equi* TG328-2 来源的 Fe-NHase 激活子属于 GTPase 的一个亚家族, 具有将 GTP 水

解为 GDP 的能力<sup>[20]</sup>。

对玫瑰色红球菌 *Rhodococcus rhodochrous* J1 来源的 Co-NHase 进行研究时发现, 它的成熟遵循一种“亚基自身交换”机制<sup>[21]</sup>。在体内,  $\alpha$  亚基与  $\beta$  亚基结合形成不含钴离子的 apo- $\alpha_2\beta_2$ , 与此同时,  $\alpha$  亚基与激活子结合形成含钴离子的蛋白复合物 holo- $\alpha\epsilon_2$ , 在亚基自身交换驱动力的作用下, apo- $\alpha_2\beta_2$  与 holo- $\alpha\epsilon_2$  之间发生  $\alpha$  亚基的交换, 最终形成有活性的 NHase。这种机制在 *P. putida* NRRL-18668 来源的 Co-NHase 中也得到验证<sup>[22]</sup>。另外, Xia 等在对 Co-NHase 进行亚基融合时发现, 在不能发生亚基自身交换的情况下, 激活子同样能激活 Co-NHase<sup>[23]</sup>。上述研究说明 Co-NHase 激活子可以作为亚基自身交换伴随子, 也可能作为金属离子伴随子。Xia 等通过研究提出 Co-NHase 激活子的 C 端区域可能具有潜在的钴离子结合位点<sup>[24]</sup>; Pei 等通过二级结构预测和实验验证提出 Co-NHase 激活子连续的  $\alpha$  螺旋结构对于功能的发挥非常重要<sup>[25]</sup>。

不同来源的 Co-NHase 激活子的序列保守性较低, 但激活子对于 NHase 的成熟十分重要, 因此分析其激活作用的特点, 探索其结构与功能之间的关系, 对于深入了解 Co-NHase 的成熟机制具有重要意义。本研究将 *R. rhodochrous* J1 来源的低分子量型脞水合酶 (L-NHase) 分别与 *R. rhodochrous* J1 高分子量型脞水合酶 (RrH-NHase)、*P. putida* NRRL-18668 脞水合酶 (PpNHase)、温泉热碱芽胞杆菌 *Caldalkalibacillus thermarum* TA2.A1 脞水合酶 (CtNHase) 和嗜热假诺卡氏菌 *Pseudonocardia thermophila* JCM3095 脞水合酶 (PtNHase) 的激活子进行组合, 研究不同来源激活子对 L-NHase 的激活作用, 对激活子的一级序列与三级结构进行分析, 并进一步探索了相关结构域的功能。结果表明 4 种异源激活子均能激活 L-NHase, 但激活后 L-NHase 的比酶活存在差异; 激活子的保守结构域是其行使激活功能的关键, 同时 N 端和 C 端结构域对于激活作用

也具有重要影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株、质粒及培养基

克隆宿主大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3) 由本实验室保藏。实验所用质粒如表 1 所示。种子培养为 LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0; 蛋白表达为 2 $\times$ YT 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 16.0, 酵母提取物 10.0, NaCl 5.0; 培养时添加卡那霉素至终浓度为 50  $\mu$ g/mL; 固体培养基添加 1.5% 的琼脂粉。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

DNA 聚合酶 PrimeSTAR<sup>TM</sup> Max DNA Polymerase、限制性内切酶 Quickcut *Dpn* I、蛋白质定量试剂盒 TaKaRa Bradford Protein Assay Kit、反转录试剂盒 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit 和实时荧光定量 PCR (qPCR) 试剂盒 TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 购于宝生物工程 (大连) 有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和细菌总 RNA 提取试剂盒购于天根生化科技 (北京) 有限公司; 重组试剂盒 2 $\times$ GenRec Assembly Master Mix Kit 购于通用生物系统 (安徽) 有限公司; 脱硫生物素 *d*-Desthiobiotin 购于西格玛奥德里奇中国公司; 3-氰基吡啶 (烟腈) 和烟酰胺购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

PCR 仪、电泳仪、CFX96 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; ÄKTA pure 蛋白纯化仪、StrepTrap HP 1 mL 蛋白纯化柱, 美国通用电气医疗集团; C18 色谱柱, 美国沃特世公司; 高效液相色谱仪、U-3900 紫外可见分光光度计, 日本日立株式会社。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 异源激活子 L-NHase 的构建

采用定向克隆的方法构建异源激活子

L-NHase 的表达质粒 pBA<sub>L-NHase</sub>G、pBA<sub>L-NHase</sub>P、pBA<sub>L-NHase</sub>C 和 pBA<sub>L-NHase</sub>A, 重组质粒的基因结构及构建所用引物分别如图 1 和表 2 所示。以 pBA<sub>L-NHase</sub>E 为模板, 通过反向 PCR 扩增得到删除激活子 E 基因的线性化载体, 同时分别以 pRrH-NHase、pPpNHase、pCtNHase、pPtNHase 为模板, PCR 扩增得到两端带有线性化载体同源序列的激活子 G、P、C 和 A 的基因片段。将上述线性化载体与各激活子基因片段进行琼脂糖凝胶电泳并切胶回收, 然后使用 2×GenRec 重组试剂盒进行重组反应。将重组产物转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 涂布于含有卡那霉素的 LB 平板, 37 °C 培养 20 h, 阳性转化子由天霖生物科技 (无锡) 有限公司进行测序验证。

### 1.2.2 结构域突变激活子 L-NHase 的构建

分别以质粒 pBA<sub>L-NHase</sub>E 和 pBA<sub>L-NHase</sub>G 为模板, 采用全质粒 PCR 的方法构建结构域突变激活

子 L-NHase 的表达质粒 pBA<sub>L-NHase</sub>E<sub>NΔ35</sub>、pBA<sub>L-NHase</sub>E<sub>CΔ27</sub>、pBA<sub>L-NHase</sub>E<sub>ΔWE-YY</sub>、pBA<sub>L-NHase</sub>G<sub>Nex</sub>、pBA<sub>L-NHase</sub>G<sub>Cadd</sub>、pBA<sub>L-NHase</sub>G<sub>NexCadd</sub> 和 pBA<sub>L-NHase</sub>G<sub>ΔWE-YY</sub>, 构建所用引物见表 2。将 PCR 产物回收后, 用 *Dpn* I 进行酶切, 消化模板质粒, 然后转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞并测序验证。

### 1.2.3 L-NHase 的表达与纯化

将重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑取单菌落至 5 mL LB 培养基, 37 °C、200 r/min 培养 8 h 左右。将种子液按 1% (V/V) 转接至 100 mL 2×YT 培养基, 37 °C、200 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6–0.8, 加入终浓度为 0.4 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 以及 0.1 g/L 的 CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 在 24 °C 条件下诱导表达 16 h。

L-NHase 的 β 亚基 C 端融合了 Strep tag (WSHPQFEK), 因此采用亲和层析的方法对其进行纯化。首先离心收集菌体细胞 (10 000 r/min,

表 1 本研究所用质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmid	Description	Source
pET-24a(+)	<i>E. coli</i> expression vector, T7 promoter, Kan <sup>r</sup>	Lab stock
pRrH-NHase	pET-24a(+) with H-NHase from <i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	Lab stock
pPpNHase	pET-24a(+) with NHase from <i>Pseudomonas putida</i> NRRL-18668	Lab stock
pCtNHase	pET-24a(+) with NHase from <i>Caldalkalibacillus thermarum</i> TA2.A1	Lab stock
pPtNHase	pET-24a(+) with NHase from <i>Pseudonocardia thermophila</i> JCM3095	Lab stock
pBA <sub>L-NHase</sub> E	pET-24a(+) with β subunit, α subunit, activator E	Lab stock
pBA <sub>L-NHase</sub>	pET-24a(+) with β subunit, α subunit	Lab stock
pBA <sub>L-NHase</sub> G	pET-24a(+) with β subunit, α subunit, activator G	This study
pBA <sub>L-NHase</sub> P	pET-24a(+) with β subunit, α subunit, activator P	This study
pBA <sub>L-NHase</sub> C	pET-24a(+) with β subunit, α subunit, activator C	This study
pBA <sub>L-NHase</sub> A	pET-24a(+) with β subunit, α subunit, activator A	This study
pBA <sub>L-NHase</sub> E <sub>NΔ35</sub>	Derived from pBA <sub>L-NHase</sub> E by deleting 35 N-terminal amino acids of activator E	This study
pBA <sub>L-NHase</sub> E <sub>CΔ27</sub>	Derived from pBA <sub>L-NHase</sub> E by deleting 27 C-terminal amino acids of activator E	This study
pBA <sub>L-NHase</sub> E <sub>ΔWE-YY</sub>	Derived from pBA <sub>L-NHase</sub> E by deleting 47 conserved domain amino acids of activator E	This study
pBA <sub>L-NHase</sub> G <sub>Nex</sub>	Derived from pBA <sub>L-NHase</sub> G by exchanging N-terminal amino acids of activator G with activator E	This study
pBA <sub>L-NHase</sub> G <sub>Cadd</sub>	Derived from pBA <sub>L-NHase</sub> G by adding 27 C-terminal amino acids of activator E to activator G	This study
pBA <sub>L-NHase</sub> G <sub>NexCadd</sub>	Derived from pBA <sub>L-NHase</sub> G <sub>Nex</sub> by adding 27 C-terminal amino acids of activator E to activator G	This study
pBA <sub>L-NHase</sub> G <sub>ΔWE-YY</sub>	Derived from pBA <sub>L-NHase</sub> G by deleting 41 conserved domain amino acids of activator G	This study

3 min), 弃培养基上清。然后用 20 mL 结合缓冲液 (20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 280 mmol/L NaCl, 6 mmol/L KCl, pH 7.4) 重悬细胞, 于冰水混合物中超声破碎 (150 W, 15 min)。将破碎后的粗酶液离心 (4 °C, 12 000 r/min, 40 min), 去除细胞碎片和不可溶蛋白, 取上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 以备上样。

纯化操作在 4 °C 下进行, 首先以 1 mL/min 的流速, 用结合缓冲液平衡 StrepTrap HP 1 mL 蛋白纯化预装柱。然后进行上样, 完成上样后用结合缓冲液洗去未结合蛋白, 直至穿透峰回到基线。最后用 100% 的洗脱缓冲液 (20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 280 mmol/L NaCl, 6 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L *d*-Desthiobiotin, pH 7.4) 进行目的蛋白的洗脱, 收集洗脱峰对应的蛋白样品。收集的目的蛋白于 10 mmol/L 磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液 (pH 7.4) 中透析脱盐。蛋白浓度通过 Bradford 蛋白质定量试剂盒进行测定。目的蛋白的表达与纯化情况通过 SDS-PAGE 检测。

#### 1.2.4 激活子表达水平的测定

将  $\text{BA}_{\text{L-NHaseG}}$  和  $\text{BA}_{\text{L-NHaseP}}$  诱导表达 16 h 后, 按照细菌总 RNA 提取试剂盒, 分别提取其总 RNA, 进一步按照反转录试剂盒合成 cDNA。分别设计大肠杆菌 16S rRNA、L-NHase 的  $\beta$  亚基、

L-NHase 的  $\alpha$  亚基、激活子 G 和激活子 P 的基因引物, 按照 qPCR 试剂盒进行反应, 检测各基因的表达水平, 记录 PCR 过程中达到一定荧光强度阈值时所需要的循环数 ( $C_t$  值)。

#### 1.2.5 L-NHase 酶活力的测定

用 10 mmol/L 磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液 (pH 7.4) 将纯酶的浓度稀释为 0.5 mg/mL, 取 10  $\mu\text{L}$  至 1.5 mL 离心管中, 置于 25 °C 金属浴上。向离心管中加入 490  $\mu\text{L}$  200 mmol/L 烟腈溶液作为底物, 充分涡旋混匀, 25 °C 下反应 10 min, 然后加入 500  $\mu\text{L}$  100% 乙腈溶液终止反应。将反应液离心, 上清液用 100% 乙腈溶液稀释适当倍数, 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜。

液相检测方法: 检测波长为 215 nm, 柱温为 40 °C, 流动相组成为乙腈: 水=1:2 (V/V), 流速为 0.6 mL/min, 测定反应体系中产物烟酰胺的生成量。一个酶活力单位 (U) 定义为 25 °C 下, 每分钟催化生成 1  $\mu\text{mol}$  烟酰胺所需要的酶量。比酶活 (U/mg) 定义为每毫克 L-NHase 纯酶 ( $\alpha_2\beta_2$  四聚体) 所具有的酶活力单位数。

#### 1.2.6 L-NHase 钴离子特征吸收峰的测定

采用紫外-可见光扫描的方法检测 L-NHase 中钴离子的特征吸收峰, 定性反映钴离子含量。将纯酶的浓度用 10 mmol/L 磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液 (pH 7.4) 稀释为 0.5 mg/mL, 首先以空白缓冲液校正基线, 然后设置波长扫描范围为 300–450 nm, 扫描速度为 300 nm/min, 取 300  $\mu\text{L}$  蛋白样品至微量石英比色皿中进行测定。根据不同波长下样品的吸收值绘制曲线图。

#### 1.2.7 激活子的序列分析与结构预测

激活子 E、G、P、C 和 A 的保守结构域分析基于 NCBI 的 Conserved Domain Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)<sup>[26]</sup>; 激活子 E、G、P、C、A 与 L-NHase 的  $\beta$  亚基的一级序列比对使用在线软件 Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>); 激活子 E 和 G 的三级结构模拟使用在线软件 C-QUARK (<https://zhanglab.cmb>

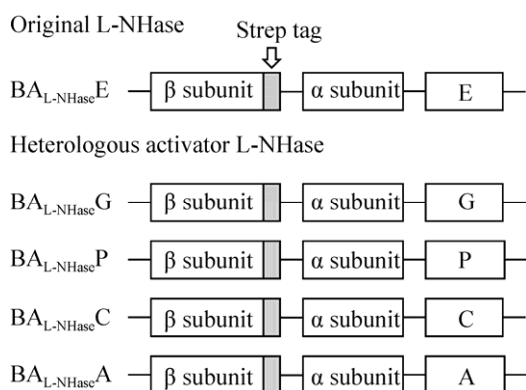


图 1 出发酶及异源激活子 L-NHase 的基因结构  
Fig. 1 Gene structures of the original L-NHase and the heterologous activator L-NHases.

表 2 本研究所用引物序列

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
BA-F	AGCTCCGTCGACAAGCTTGC	20
BA-R	TCAGGCCTTGCTGGGTGTGG	20
RrG-F	CCCCACCACACCCAGCAAGGCCTGAAAGGAGATATAGATATGAGCGAAGATACCCTGAC	59
RrG-R	CGGCCGCAAGCTTGTGCGACGGAGCTTTAATCAATAATGGCCATACTTTCCATACGTTCC	58
PpP-F	CCCCACCACACCCAGCAAGGCCTGAAAGGAGATATAGATATGAAAGACGAACGGTTTCC	59
PpP-R	CGGCCGCAAGCTTGTGCGACGGAGCTTCAAGCCATTGCGGCAACGAC	46
CiC-F	CCCCACCACACCCAGCAAGGCCTGAAAGGAGATATAGATATGGAGAAAAATTGCGTGAGCCAG	63
CiC-R	CGGCCGCAAGCTTGTGCGACGGAGCTTTAAAAAACTCATCGCGTTTCGCCG	50
PtA-F	CCCCACCACACCCAGCAAGGCCTGAAAGGAGATATAGATATGAGCGCTGAAGCCAAAGTG	60
PtA-R	CGGCCGCAAGCTTGTGCGACGGAGCTTTAGCTGCGAACTGCCGGATG	46
ENdele35-F	CTGAAAGGAGATATAGATATGGCCTTCGATCAGGCCTGGGAG	42
ENdele35-R	CATATCTATATCTCCTTTCAGGCCTTGCTGGGTGTGG	37
ECdele27-F	GGTGCTGGCAACGCCCTGAAGCTCCGTCGACAAGCTTGC	39
ECdele27-R	GGGCGTTGCCAGCACCTGCTCGGTAC	26
EdeleWE-YY-F	TTCGATCAGGCCGAGCGTTGGATGCTCGCACTCGAA	36
EdeleWE-YY-R	CATCCAACGCTCGGCCTGATCGAAGGCGACCTCGCC	36
GNex-F	ACCCAGCAAGGCCTGAAAGGAGATATAGATATGCCCGACTCAACGAACAACCCACCCGG GTCTCGAAGCCAACCTCGGCGACCTGGTACAGAATCTGCCGTTCAACGAACGAATCCCCCGC CGTCCGGTGAAGTGGTTTTTACCGAACCCTGG	156
GNex-R	CTGATCGCTCAGTGCAATGGC	21
GCadd-F	GAAAGTATGGCCATTATTGATGCCGGCGCCCATCACCAGCACGCCGTGCGTGATCCCATCGCCGT GCACGCCATCGGCACACGCACCACTGACTCCGACGGGTAAAGCTCCGTCGACAAGCTTGGCG	127
GCadd-R	TTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTG	24
GdeleWE-YY-F	GGTGAAGTGGTTTTTACCGAACCAGGAAAGTTGGACCAAAGCACTGG	46
GdeleWE-YY-R	CGGTTCCGGTAAAAACCAGTTCACCATTATCACGAGGAGGTGC	42
Pq-16S-F	TAATACCTTTGCTCATTG	18
Pq-16S-R	CCAGTAATCCGATTAAC	18
Pq-B-F	TTCAATCTCGACCAGTTC	18
Pq-B-R	ATCCAGTGCTCGTAGTAT	18
Pq-A-F	CAGGGCGAAGAAATGGTC	18
Pq-A-R	ATAGCACGAGCACAAGGTA	19
Pq-G-F	CGTCTGATTCATAGCATT	18
Pq-G-R	CCACTATCAACAACACTT	18
Pq-P-F	TGTGTTTGACGAGCCTTG	18
Pq-P-R	TTCCACTGAAAGAGACCG	18

med.umich.edu/C-QUARK/); 蛋白质模型评估使用网站 SAVES v5.0 (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>)中的 Verify 3D<sup>[27]</sup>和 PROCHECK 程序。

## 2 结果与分析

### 2.1 异源激活子对 L-NHase 的激活作用

为了研究异源激活子对 L-NHase 的激活作用,以缺失激活子 E 的 BA<sub>L-NHase</sub> 作为对照,并将

出发酶  $BA_{L-NHaseE}$  的激活子 E 分别替换为  $RrH-NHase$ 、 $PpNHase$ 、 $CtNHase$  以及  $PtNHase$  的激活子 G、P、C 和 A, 构建了  $BA_{L-NHaseG}$ 、 $BA_{L-NHaseP}$ 、 $BA_{L-NHaseC}$  和  $BA_{L-NHaseA}$ 。将出发酶与异源激活子 L-NHase 在大肠杆菌中表达, 并通过  $\beta$  亚基 C 端带有的 Strep 亲和层析标签, 进行 L-NHase 的纯化, 结果如图 2 所示。激活子的替换没有对 L-NHase 的表达产生较大影响, 可以观察到激活子 E、C 和 A 的条带, 但激活子 G 和 P 的表达情况难以检测。

为了检测激活子 G 和 P 的表达水平, 对  $BA_{L-NHaseG}$  和  $BA_{L-NHaseP}$  进行 qPCR 实验, 分别测定了  $BA_{L-NHaseG}$  中 16S rRNA、 $\beta$  亚基、 $\alpha$  亚基和激活子 G 的表达水平, 以及  $BA_{L-NHaseP}$  中

16S rRNA、 $\beta$  亚基、 $\alpha$  亚基和激活子 P 的表达水平。结果如图 3 所示,  $\beta$  亚基、 $\alpha$  亚基和激活子 G (或 P) 的  $C_t$  值均低于大肠杆菌内源的 16S rRNA, 说明  $\beta$  亚基、 $\alpha$  亚基和激活子 G (或 P) 均实现了过表达; 激活子 G (或 P) 的  $C_t$  值与  $\beta$  亚基和  $\alpha$  亚基基本一致, 说明激活子 G (或 P) 在转录水平上与  $\beta$  亚基和  $\alpha$  亚基并无差异。根据前期研究<sup>[18]</sup>, 激活子 G 和 P 无法在 SDS-PAGE 上进行检测, 可能主要与其性质不稳定、半衰期短有关。

通过高效液相色谱法测定了出发酶及异源激活子 L-NHase 的比酶活, 以此表征不同来源的激活子对 L-NHase 的激活作用。如图 4 所示, 在共表达激活子的情况下, L-NHase 的比酶活均高于对照  $BA_{L-NHase}$  的比酶活 ( $120.10 \pm 2.13$ ) U/mg, 说

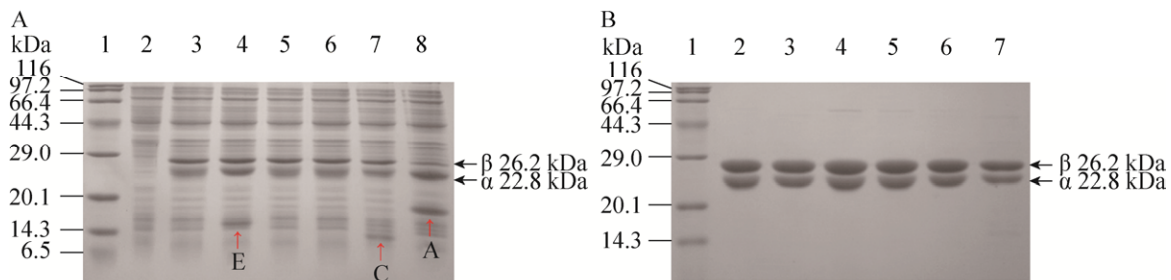


图 2 SDS-PAGE 分析异源激活子 L-NHase 的表达和纯化

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the heterologous activator L-NHases. (A) SDS-PAGE of the cell-free extracts. 1: marker; 2: control; 3:  $BA_{L-NHase}$ ; 4:  $BA_{L-NHaseE}$ ; 5:  $BA_{L-NHaseG}$ ; 6:  $BA_{L-NHaseP}$ ; 7:  $BA_{L-NHaseC}$ ; 8:  $BA_{L-NHaseA}$ . (B) SDS-PAGE of the purified enzymes. 1: marker; 2:  $BA_{L-NHase}$ ; 3:  $BA_{L-NHaseE}$ ; 4:  $BA_{L-NHaseG}$ ; 5:  $BA_{L-NHaseP}$ ; 6:  $BA_{L-NHaseC}$ ; 7:  $BA_{L-NHaseA}$ . The red arrows indicate the bands of the activators.

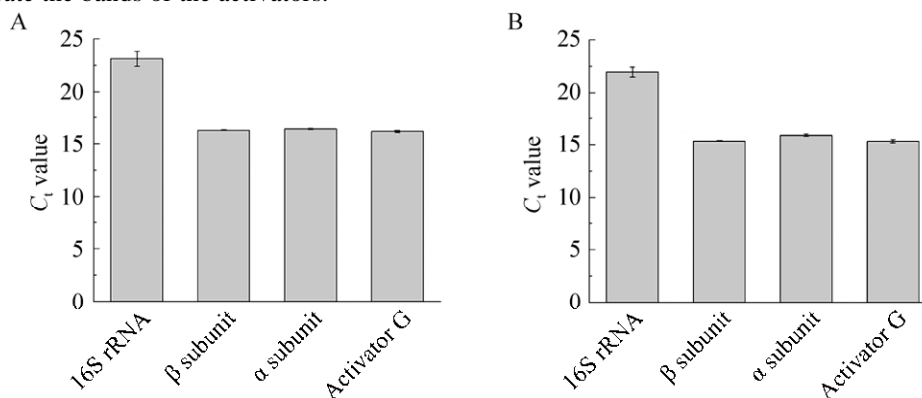


图 3  $BA_{L-NHaseG}$  和  $BA_{L-NHaseP}$  的实时荧光定量 PCR

Fig. 3 qPCR of  $BA_{L-NHaseG}$  and  $BA_{L-NHaseP}$ . (A)  $C_t$  value of 16S rRNA,  $\beta$  subunit,  $\alpha$  subunit and activator G in  $BA_{L-NHaseG}$ . (B)  $C_t$  value of 16S rRNA,  $\beta$  subunit,  $\alpha$  subunit and activator P in  $BA_{L-NHaseP}$ .



明激活子对于 L-NHase 的激活作用具有普遍性; 其中 BA<sub>L-NHase</sub>A 的比酶活为 (1 336.62±16.77) U/mg, 达到出发酶比酶活 (1 366.88±10.34) U/mg 的 97.79%, BA<sub>L-NHase</sub>G 的比酶活最低, 为 (327.24±11.00) U/mg, 是出发酶比酶活的 23.94%, 说明激活子对于 L-NHase 的激活作用具有特异性, 激活子 A 对 L-NHase 的激活程度与激活子 E 相近, 而激活子 G 对 L-NHase 的激活程度最低。

钴离子对于 Co-NHase 的活性必不可少, Co-NHase 激活子在细胞体内作为亚基自身交换伴随子发挥作用, 协助  $\alpha$  亚基摄取钴离子。推测不同来源的激活子通过影响 L-NHase 的钴离子含量, 从而影响其活性。由于活性中心半胱氨酸残基 S 原子向配体 Co<sup>3+</sup> 的电荷转移, Co-NHase 在 300–350 nm 波长区域存在吸收<sup>[28]</sup>, 吸收峰的高低可以定性反映 Co-NHase 中钴离子含量的多少。为了验证上述推测, 对出发酶及异源激活子 L-NHase 进行紫外-可见光扫描。如图 5 所示, 出发酶及各异源激活子 L-NHase 在 300–350 nm 波长区域的吸收峰均高于对照 BA<sub>L-NHase</sub>, 且吸收峰值的高低与比酶活的高低趋势一致, 说明不同来源的激活子均能通过协助  $\alpha$  亚基摄取钴离子从而激活 L-NHase, 激活效果的差异是由于最终 L-NHase 的  $\alpha$  亚基中钴离子的含量不同导致的。

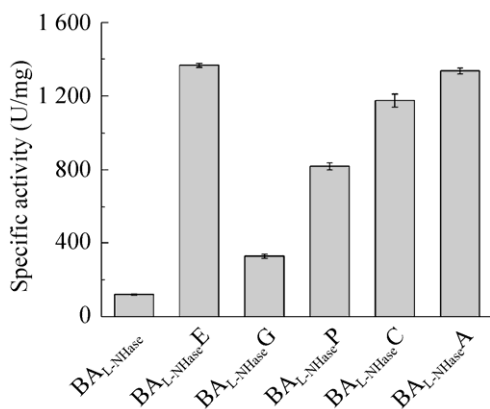


图 4 异源激活子 L-NHase 的比酶活  
Fig. 4 Specific activities of the heterologous activator L-NHases.

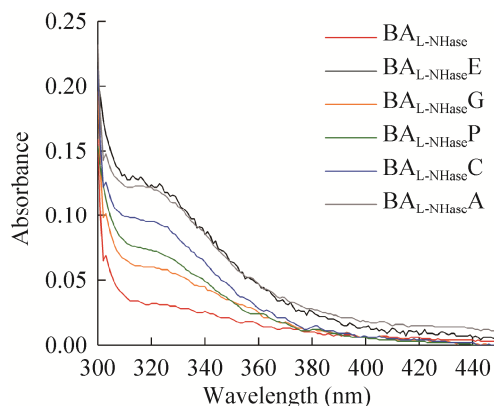


图 5 异源激活子 L-NHase 的紫外-可见光扫描  
Fig. 5 UV-Vis absorption spectra of the heterologous activator L-NHases.

## 2.2 激活子的一级序列及三级结构分析

尽管来源各不相同, 在表达过程中的稳定性也存在差异, 上述 5 个激活子均能对 L-NHase 产生激活作用, 为了研究激活子结构与功能上的关系, 对其一级序列进行保守性分析。蛋白质保守结构域是蛋白质在进化过程中或者一个蛋白质家族所具有的相同的结构域, 一般具有重要的功能。将激活子 E、G、P、C 和 A 的氨基酸序列提交至 NCBI 的保守结构域数据库 (Conserved domain database), 结果显示 5 条氨基酸序列均包含激活子保守结构域 (登录号: TIGR03889), 该结构域属于 NHase 的  $\beta$  亚基超家族。说明激活子 E、G、P、C 和 A 都具有结构相似的功能区域, 因此均能激活 L-NHase。另外, 激活子与 NHase 的  $\beta$  亚基可能在序列上存在关联, 因此将激活子和 L-NHase 的  $\beta$  亚基的氨基酸序列进行比对, 结果如图 6 所示, 5 条激活子序列与  $\beta$  亚基的 N 端序列存在一定的相似性。

获得激活子的三维结构可以更加直观地研究其性质和功能。尽管 PDB 数据库中已有数十个与 NHase 相关的晶体结构, 目前仍未有激活子的结构得到解析。随着生物信息学的快速发展, 已有许多方法可以对结构未知的蛋白质进行模拟, 对于没有建模模板的蛋白质, 也可以通过从头计算的方式预测结构。C-QUARK 是 Zhang Lab 建立



的一种性能较好的从头预测蛋白质结构的计算方法<sup>[29]</sup>, 因此适用于尚无同源模板的激活子。在上述激活子中, 由激活子 E 激活后的 L-NHase 的比酶活最高, 而由激活子 G 激活后的 L-NHase 的比酶活最低, 为了探究其中的原因, 对激活子 E 和 G 的结构进行进一步研究。将两者的氨基酸序列提交至 C-QUARK 网站建模, 然后通过 SAVES v5.0 网站中的 Verify 3D 和 PROCHECK 评分系统对建立好的模型进行质量评估。综合评分最高的激活子 E 和 G 的三维结构模型如图 7 所示, 发现两者的结构在 N 端存在差异, 激活子 E 的 N 端是一段由  $\alpha$  螺旋和 loop 构成的臂状结构, 而激活子 G 的 N 端主要是 loop 结构; 激活子 G 的序列短于激活子 E, 在模型上体现为激活子 E 的 C 端比激

活子 G 多出一段  $\alpha$  螺旋结构; 其他部分的结构非常相似。结合一级序列分析, 推测激活子的保守结构域决定了其激活作用, 而对 L-NHase 激活能力的差异主要是由其 N 端和 C 端的结构不同导致的。

### 2.3 激活子 E 的结构域突变对激活作用的影响

为了探究激活子的 N 端结构域、C 端结构域和保守结构域对激活作用的影响, 构建了  $BA_{L-NHase}E_{N\Delta 35}$ 、 $BA_{L-NHase}E_{C\Delta 27}$  和  $BA_{L-NHase}E_{\Delta WE-YY}$ 。其中  $BA_{L-NHase}E_{N\Delta 35}$  代表将激活子 E 的 N 端序列截短 35 个氨基酸,  $BA_{L-NHase}E_{C\Delta 27}$  代表将激活子 E 的 C 端序列截短 27 个氨基酸,  $BA_{L-NHase}E_{\Delta WE-YY}$  代表将激活子 E 的保守结构域中 Trp42 至 Tyr88 的氨基酸序列 (图 6 中黑色框线内氨基酸序列) 删除。出发酶及结构域突变激活子 (E) L-NHase

```

β -----MDGIH-DLGGRAGLGPIKPESEDEPVFHSWDWERSVLTMTFPAMAL 42
P -----MKDERFPLPEG--SLKDLGDPVFDEPWQSQAFALVVMHK 38
G -----MSEDTLTDRLPATGTAAPPRDNGELVFTEPWEATAFGVAIALSD 44
C -----MEKNC---VSQVDSKIAIYLPESAAPPRKNGELVFEEPWERRSFGMALALYE 49
E ----MPELNEQPHPGLEANLGLVQNLPFNERIPRRSGEVAFDQAWEIFRAFSIATALHG 55
A MSAEAKVRLKHCPTAEDRAAADALLAQLPGGD---RALDRGFDEPWQLRAFALAVAACR 56
      * . * : : :
β AGAF-NLDQFRGAM-----EQIPPHDYLTSSQYIEHWMHAMIHHGIEAGIFDSDELDRR 94
P AGLF-QWKDWAETFTAIEDASPALP-GESVNDTYRQWVSALEKLVASLGLVTGGDVNSR 96
G QKSY-EWEFFRQLIHSIAEANGC-----EAYYESWTKALEASVVDSEGLISEDEIRER 96
C EKRYTSWDDFRTRLIQEIAKWESSENQDKLDWNYIEHWLAALEQLVVEVTGMIDKHDIDAR 109
E QGRF-EWDEFQSRLIESIKQWEAEHAT-TEQWSYIERWMLALEELLHDKGFVAGEELAHR 113
A AGRF-EWKQLQALISSIGEWERTHLDLDDPSWSYIEHFVAALLESVLGEEGIVEPEALDER 115
      : . . : ** : * : . * : *
β TQYYMDHPDDTTPTR--QDPQLVETISQLITHGAD-YRRPTDTEAAFAVGDKVIVRSDAS 151
P AQEWKQAHLNTPHGHPILLAHALCPPAIDPKHKHEPQRSPIKVVAAMA----- 144
G MESMAID----- 104
C TKEFLSGERDEFF----- 122
E TEQVLATPAGAHHQHAVRDPPIAVHAIGTRTTSDG----- 148
A TAEVLANPPNKDHHGPHLEPVAVHPAVRS----- 144

β PNTHTRRAGYVRGRVGEVATHGAYVFPDTNALGAGESPEHLYTVRFSATELWGEPAAPN 211
P ----- 144
G ----- 104
C ----- 122
E ----- 148
A ----- 144

β VVNHIDVFEPYLLPA 226
P ----- 144
G ----- 104
C ----- 122
E ----- 148
A ----- 144

```

图 6 激活子 E、G、P、C、A 和 L-NHase 的  $\beta$  亚基的一级序列比对

Fig. 6 Multiple sequence alignment of activator E, G, P, C, A and  $\beta$  subunit of L-NHase. The conserved domain (TIGR03889) is highlighted in red and the black boxes represent partial sequences of the conserved domain.

的表达和纯化情况如图 8 所示, 当对激活子 E 进行结构域突变后, 激活子的表达量难以检测, 说明其稳定性可能受到了影响。测定出发酶与结构域突变激活子 (E) L-NHase 的比酶活, 如图 9 所示,  $BA_{L-NHase}E_{N\Delta 35}$ 、 $BA_{L-NHase}E_{C\Delta 27}$  和  $BA_{L-NHase}E_{\Delta WE-YY}$  的比酶活分别为  $(255.04 \pm 3.01)$  U/mg、 $(1\ 144.62 \pm 3.75)$  U/mg 和  $(177.12 \pm 2.74)$  U/mg。激活子 E 的 N 端 35 个氨基酸在三维模型中构成臂状结构, 当其缺失后, L-NHase 的比酶活下降了 81.34%, 表明 N 端结构域对于激活子的激活作用非常重要。由于激活子 E 与  $\beta$  亚基的 N 端序列具有一定的相似性, 且在晶体结构已知的 NHase 中,  $\beta$  亚基的 N 端会形成一段环绕  $\alpha$  亚基的 loop, 激活子 E 的 N 端可能也与  $\alpha$  亚基具有相互作用, 因此 N 端结构域的缺失会显著影响激活作用。当激活子 E 的 C 端 27 个氨基酸缺失时, L-NHase 的比酶活下降了 16.26%, 说明 C 端结构域对于激活子的激活作用也有一定影响。激

活子 E 的 Trp42 至 Tyr88 的氨基酸序列属于保守结构域的一部分, 在三维模型中构成两个连续的螺旋结构, 当其缺失时, L-NHase 的比酶活接近对照  $BA_{L-NHase}$ , 说明突变后的激活子基本失去激活作用, 该保守结构域对于激活子 E 非常关键。

#### 2.4 激活子 G 的结构域突变对激活作用的影响

为了进一步验证激活子的 N 端结构域、C 端结构域和保守结构域对激活作用的影响, 在  $BA_{L-NHase}G$  的基础上, 构建了  $BA_{L-NHase}G_{Nex}$ 、 $BA_{L-NHase}G_{Cadd}$ 、 $BA_{L-NHase}G_{NexCadd}$  和  $BA_{L-NHase}G_{\Delta WE-YY}$ 。其中  $BA_{L-NHase}G_{Nex}$  代表用激活子 E 的 N 端 32 个氨基酸替换激活子 G 的 N 端 21 个氨基酸,  $BA_{L-NHase}G_{Cadd}$  代表将激活子 E 的 C 端 27 个氨基酸添加至激活子 G 的 C 端,  $BA_{L-NHase}G_{NexCadd}$  代表在  $BA_{L-NHase}G_{Nex}$  的基础上, 将激活子 E 的 C 端 27 个氨基酸添加至激活子 G 的 C 端,  $BA_{L-NHase}G_{\Delta WE-YY}$  代表将激活子 G 的保守结构域中 Trp31 至 Tyr71 的氨基酸序列 (图 6 中黑色框

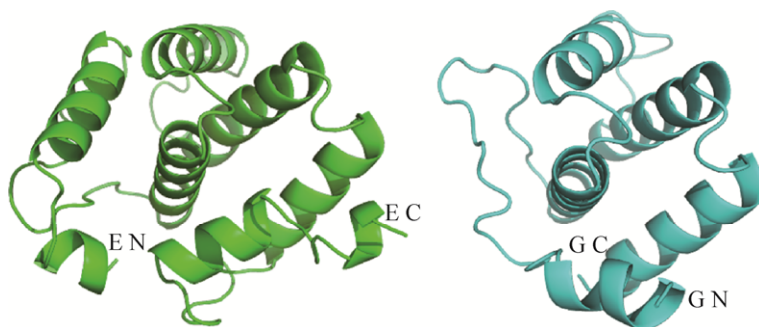


图 7 激活子 E (绿色) 和激活子 G (蓝色) 的模拟结构

Fig. 7 Three-dimensional models of activator E (green) and activator G (blue).

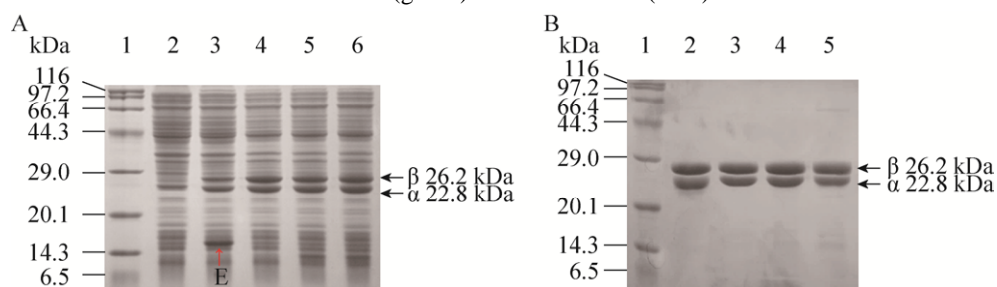


图 8 SDS-PAGE 分析结构域突变激活子 (E) L-NHase 的表达和纯化

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of the domain-mutated activator (E) L-NHases. (A) SDS-PAGE of the cell-free extracts. 1: marker; 2: control; 3:  $BA_{L-NHase}E$ ; 4:  $BA_{L-NHase}E_{N\Delta 35}$ ; 5:  $BA_{L-NHase}E_{C\Delta 27}$ ; 6:  $BA_{L-NHase}E_{\Delta WE-YY}$ . (B) SDS-PAGE of the purified enzymes. 1: marker; 2:  $BA_{L-NHase}E$ ; 3:  $BA_{L-NHase}E_{N\Delta 35}$ ; 4:  $BA_{L-NHase}E_{C\Delta 27}$ ; 5:  $BA_{L-NHase}E_{\Delta WE-YY}$ . The red arrow indicates the band of the activator.

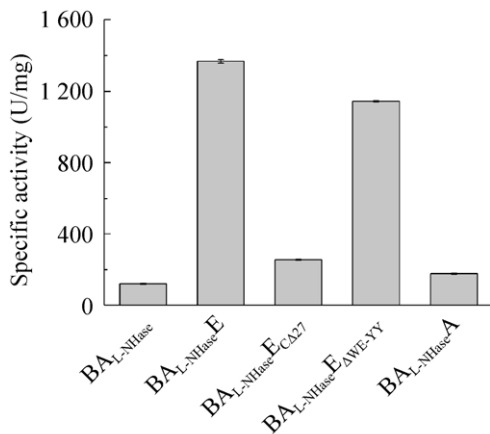


图9 结构域突变激活子(E) L-NHase的比酶活

Fig. 9 Specific activities of the domain-mutated activator (E) L-NHases.

线内氨基酸序列)删除。结构域突变激活子(G) L-NHase的表达和纯化情况如图10所示,可见 $BA_{L-NHase}G_{Cadd}$ 和 $BA_{L-NHase}G_{NexCadd}$ 的激活子表达量有比较明显的增加,表明添加激活子E的C端结构域可以使激活子G在表达时更加稳定。结构域突变激活子(G) L-NHase的比酶活如图11所示, $BA_{L-NHase}G_{Nex}$ 、 $BA_{L-NHase}G_{Cadd}$ 和 $BA_{L-NHase}G_{NexCadd}$ 的比酶活分别为 $(405.53 \pm 4.09)$  U/mg、 $(673.70 \pm 13.96)$  U/mg和 $(911.03 \pm 9.87)$  U/mg,分别比 $BA_{L-NHase}G$ 的比酶活提高了23.85%、105.87%和178.40%。其中N端结构域替换对激活子G的激活能力提高不明显,而C端结构域延长能够使激活子G的激活能力明显提升,将N端结构域替换和C端结构域延长进行组合突变,能够使L-NHase的比酶活得到进一步提高,原因可能是激活子G的稳定性增加

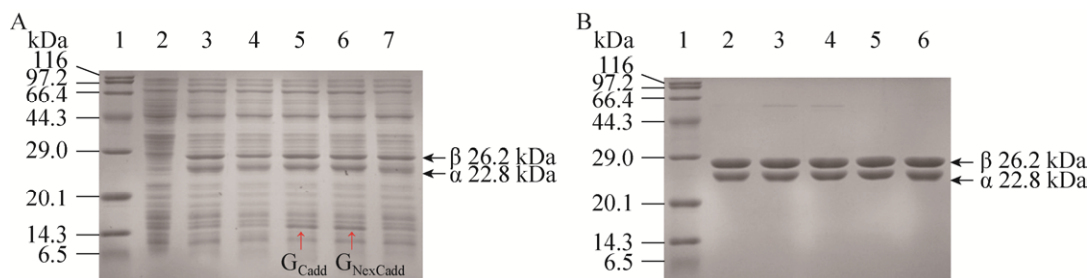


图10 SDS-PAGE分析结构域突变激活子(G) L-NHase的表达和纯化

Fig. 10 SDS-PAGE analysis of the domain-mutated activator (G) L-NHases. (A) SDS-PAGE of the cell-free extracts. 1: marker; 2: control; 3:  $BA_{L-NHase}G$ ; 4:  $BA_{L-NHase}G_{Nex}$ ; 5:  $BA_{L-NHase}G_{Cadd}$ ; 6:  $BA_{L-NHase}G_{NexCadd}$ ; 7:  $BA_{L-NHase}G_{\Delta WE-YY}$ . (B) SDS-PAGE of the purified enzymes. 1: marker; 2:  $BA_{L-NHase}G$ ; 3:  $BA_{L-NHase}G_{Nex}$ ; 4:  $BA_{L-NHase}G_{Cadd}$ ; 5:  $BA_{L-NHase}G_{NexCadd}$ ; 6:  $BA_{L-NHase}G_{\Delta WE-YY}$ . The red arrows indicate the bands of the activators.

有利于其更好地发挥激活作用,同时说明N端结构域和C端结构域共同影响了激活子的激活能力。与 $BA_{L-NHase}E_{\Delta WE-YY}$ 的结果类似,缺失保守结构域部分氨基酸序列的 $BA_{L-NHase}G_{\Delta WE-YY}$ 的比酶活为 $(140.84 \pm 5.47)$  U/mg,接近对照 $BA_{L-NHase}$ 的比酶活,说明突变后的激活子基本失去激活作用,同样验证了保守结构域的关键作用。

### 3 结论

本研究将*R. rhodochrous* J1来源L-NHase的激活子替换为其他4种异源激活子,研究它们对L-NHase的激活作用,并对激活子进行一级序列和三级结构分析,探究激活子中重要结构域的功能。四种异源激活子均能激活L-NHase,在功能上具有普遍性,但它们对于L-NHase的激活程度存在差异,在功能上也具有特异性。原因是各激活子均能协助 $\alpha$ 亚基摄取钴离子,但最终L-NHase的钴离子含量存在差异。*Pt*NHase的激活子A对L-NHase的激活程度最高,激活后的L-NHase比酶活为出发酶的97.79%;*Rr*H-NHase的激活子G对L-NHase的激活程度最低,激活后的L-NHase比酶活为出发酶的23.94%。激活子保守结构域对其激活作用非常关键,缺失部分序列将导致激活作用基本丧失。N端结构域和C端结构域对于激活子的激活作用也具有重要影响,将激活子G的N端序列替换为激活子E的N端序列,并将激活子E的C端序列添加至激活子G的C端,能够

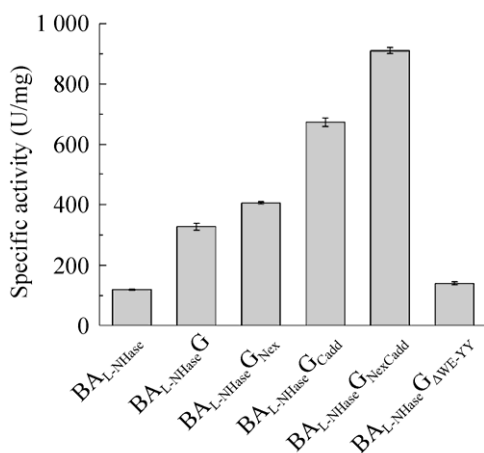


图 11 结构域突变激活子 (G) L-NHase 的比酶活

Fig. 11 Specific activities of the domain-mutated activator (G) L-NHases.

使 L-NHase 的比酶活提高 178.40%。上述结果对于认识 Co-NHase 激活子结构与功能之间的关系、进一步研究 Co-NHase 的成熟机制具有重要意义。

## REFERENCES

- [1] Kobayashi M, Shimizu S. Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation, and application to biotechnology. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(8): 733–736.
- [2] Prasad S, Bhalla TC. Nitrile hydratases (NHases): at the interface of academia and industry. *Biotechnol Adv*, 2010, 28(6): 725–741.
- [3] Supreetha K, Rao SN, Srividya D, et al. Advances in cloning, structural and bioremediation aspects of nitrile hydratases. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(4): 4661–4673.
- [4] Miyanaga A, Fushinobu S, Ito K, et al. Mutational and structural analysis of cobalt-containing nitrile hydratase on substrate and metal binding. *Eur J Biochem*, 2004, 271(2): 429–438.
- [5] Hashimoto Y, Sasaki S, Herai S, et al. Site-directed mutagenesis for cysteine residues of cobalt-containing nitrile hydratase. *J Inorg Biochem*, 2002, 91(1): 70–77.
- [6] Sugiura Y, Kuwahara J, Nagasawa T, et al. Nitrile hydratase: the first non-heme iron enzyme with a typical low-spin iron(III)-active center. *J Am Chem Soc*, 1987, 109(19): 5848–5850.
- [7] Brennan BA, Alms G, Nelso MJ, et al. Nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 contains a non-corrin cobalt ion with two sulfur ligands. *J Am Chem Soc*, 1996, 118(38): 9194–9195.
- [8] Miyanaga A, Fushinobu S, Ito K, et al. Crystal structure of cobalt-containing nitrile hydratase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288(5): 1169–1174.
- [9] Hourai S, Miki M, Takashima Y, et al. Crystal structure of nitrile hydratase from a thermophilic *Bacillus smithii*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312(2): 340–345.
- [10] Huang WJ, Jia J, Cummings J, et al. Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron centre in a novel fold. *Structure*, 1997, 5(5): 691–699.
- [11] Asano Y, Tani Y, Yamada H. A new enzyme “nitrile hydratase” which degrades acetonitrile in combination with amidase. *Agric Biol Chem*, 1980, 44(9): 2251–2252.
- [12] Payne MS, Wu SJ, Fallon RD, et al. A stereoselective cobalt-containing nitrile hydratase. *Biochemistry*, 1997, 36(18): 5447–5454.
- [13] Masutomo S, Inoue A, Kumagai K, et al. Enantioselective hydrolysis of (R,S)-2-Isopropyl-4'-chlorophenylacetonitrile by *Pseudomonas* sp. B21C9. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59(4): 720–722.
- [14] Marron AO, Akam M, Walker G. Nitrile hydratase genes are present in multiple eukaryotic supergroups. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e32867.
- [15] Nojiri M, Yohda M, Odaka M, et al. Functional expression of nitrile hydratase in *Escherichia coli*: requirement of a nitrile hydratase activator and post-translational modification of a ligand cysteine. *J Biochem*, 1999, 125(4): 696–704.
- [16] Martinez S, Yang XH, Bennett B, et al. A cobalt-containing eukaryotic nitrile hydratase. *Biochim Biophys Acta Prot Proteom*, 2017, 1865(1): 107–112.
- [17] Kuhn ML, Martinez N, Gumataotao N, et al. The Fe-type nitrile hydratase from *Comamonas testosteroni* N11 does not require an activator accessory protein for expression in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424(3): 365–370.
- [18] Liu Y, Cui WJ, Fang YQ, et al. Strategy for successful expression of the *Pseudomonas putida* nitrile hydratase activator P14K in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol*, 2013, 13: 48.
- [19] Lu J, Zheng YJ, Yamagishi H, et al. Motif CXCC in nitrile hydratase activator is critical for NHase biogenesis *in vivo*. *FEBS Lett*, 2003, 553(3): 391–396.
- [20] Gumataotao N, Lankathilaka KPW, Bennett B, et al. The iron-type nitrile hydratase activator protein is a GTPase. *Biochem J*, 2017, 474(2): 247–258.
- [21] Zhou ZM, Hashimoto Y, Shiraki K, et al. Discovery of posttranslational maturation by self-subunit swapping. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(39): 14849–14854.
- [22] Liu Y, Cui WJ, Xia YY, et al. Self-subunit swapping occurs in another gene type of cobalt nitrile hydratase. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50829.
- [23] Xia YY, Cui WJ, Liu ZM, et al. Construction of a subunit-fusion nitrile hydratase and discovery of an innovative metal ion transfer pattern. *Sci Rep*, 2016, 6: 19183.
- [24] Xia YY, Peplowski L, Cheng ZY, et al. Metallochaperone function of the self-subunit swapping chaperone involved in the maturation of subunit-fused cobalt-type nitrile hydratase. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(3): 481–489.
- [25] Pei XL, Yang ZF, Wang AM, et al. Identification and functional analysis of the activator gene involved in the biosynthesis of Co-type nitrile hydratase from *Aurantimonas manganoxydans*. *J Biotechnol*, 2017, 251: 38–46.
- [26] Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, et al. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(D1): D222–D226.
- [27] Eisenberg D, Lüthy R, Bowie JU. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods Enzymol*, 1997, 277: 396–404.
- [28] Nojiri M, Nakayama H, Odaka M, et al. Cobalt-substituted Fe-type nitrile hydratase of *Rhodococcus* sp. N-771. *FEBS Lett*, 2000, 465(2/3): 173–177.
- [29] Zheng W, Li Y, Zhang CX, et al. Deep-learning contact-map guided protein structure prediction in CASP13. *Proteins*, 2019, 87: 1149–1164.

(本文责编 郝丽芳)