

陈传玉,谭樊杰,殷平,等. 酶法体外高效制备信号分子(pp)pGpp[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(4): 271-278.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.04.033

酶法体外高效制备信号分子(pp)pGpp

陈传玉,谭樊杰,殷平,张德林

作物遗传改良全国重点实验室/湖北洪山实验室/华中农业大学生命科学技术学院,武汉 430070

摘要 针对目前信使分子(pp)pGpp提取和合成成本高、时间长、技术难的问题,以现有的体外酶合成(pp)pGpp的方法为基础,建立和优化了新的体外合成技术。结果显示,通过(pp)pGpp合成酶RelA、GppA和YvcI在25 mmol/L Tris-HCl(pH 9.0)、15 mmol/L MgCl₂、100 mmol/L NaCl条件下于37 °C反应30 min,经阴离子交换进一步纯化,即可获得高纯度(pp)pGpp分子。此方法与传统的细菌或植物体内直接提取、现有的体外酶法制备流程相比,具有操作简单、快速、成本低、环境友好等优势,能够满足下游生化分析和结构生物学实验需求,为微生物信号通路及开发新的抗菌药物研究提供物质基础。

关键词 (pp)pGpp; 合成生物学; 体外合成; RelA; GppA; YvcI

中图分类号 Q503 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)04-0271-08

植物和细菌处于营养胁迫时,会产生一种由核苷酸代谢产物(pp)pGpp诱导的严谨反应^[1],即氨基酸饥饿时发生蛋白合成及相关基因表达停滞的反应^[2-3]。信使分子(pp)pGpp,也被称为警报素分子,是细菌和植物生存所必需的。信使分子(pp)pGpp主要分为3种:鸟苷五磷酸(pppGpp, G5P)、鸟苷四磷酸(ppGpp, G4P)和鸟苷三磷酸(pGpp, G3P)。(pp)pGpp与GTP结构非常相似,在五碳糖的5'依次递减一个磷酸基团,五碳糖的3'焦磷酸基团被一个羟基取代。

(pp)pGpp作为常用的信号传递分子^[4],对许多病原菌(例如大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌)的黏附^[5]、侵入^[6]、免疫逃避、传播、生物膜形成^[7]和慢性感染^[7]起着重要作用。鞭毛是大多数细菌黏附宿主细胞的关键。(pp)pGpp能够通过抑制病原体鞭毛基因的表达,从而影响病原体入侵。(pp)pGpp通过产生毒素和调节生物膜形成在免疫逃避和细菌传播中发挥作用^[8]。由于信使分子(pp)pGpp对细菌和病原体的毒性、致病性的特殊作用,使其可能成为一种潜在的新型的抗菌药物^[9-11]。

在细菌中,主要由3种信使分子合成酶(RelA、GppA、YvcI)负责催化合成(pp)pGpp^[12]。细菌中(pp)pGpp的合成和水解主要由双功能RSH代谢酶(例如RelA)决定,RSH合成酶活性过高,(pp)pGpp

水平升高,激活应激反应,抑制细胞生长和基因表达。RSH水解酶使(pp)pGpp水平过低,细胞不能对营养胁迫产生适当的反应。而RSH酶特有的严谨反应不存在哺乳细胞中,因此,利用(pp)pGpp类似物抑制细菌生长为开发新的抗菌药物提供了可能。尽管(pp)pGpp被发现已有近50年的历史,但是(pp)pGpp的代谢和信号传递过程仍是关注的重点。近年来,蓝细菌中的(pp)pGpp代谢机制逐渐被人们发现,可能与现有的代谢调控有所差异。由于蓝细菌是具有叶绿体的放氧光合性细菌,其类似的RSH活性调控机制为日益严重的蓝藻水华治理提供了可能。

现有的研究中,(pp)pGpp主要来源于植物和细菌的内源提取以及酶生物合成^[13-14],具有操作复杂、成本高昂、使用有毒试剂的弊端,无法满足快速获得大量的(pp)pGpp的需求。因此,本研究以体外酶合成(pp)pGpp的方法为基础,建立和优化新的生物合成(pp)pGpp体系,以期对相关生化和微生物学研究高效提供物质保障。

1 材料与方法

1.1 菌株

所需菌株为大肠杆菌BL21(λDE3)和DH5α,枯草芽孢杆菌168 strain。其中,信使分子(pp)pGpp合

收稿日期:2022-05-08

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31770878)

陈传玉, E-mail: chenchuanhuazu@163.com

通信作者:张德林: zdl@mail.hzau.edu.cn

成酶的基因(*relA*、*gppA*)序列来源于大肠杆菌 BL21 (λ DE3),*yvcI*来源于枯草芽孢杆菌 168 strain。蛋白表达纯化使用大肠杆菌 BL21 (λ DE3),质粒扩繁使用大肠杆菌 DH5 α 。

1.2 主要试剂和仪器

1)分子克隆。引物合成和测序由武汉擎科生物有限公司完成,dNTP购买于New England Biolabs公司,Pfu和Taq酶由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室 Yin Lab 提供。普通DNA产物回收试剂盒(DP204-02)和普通质粒小提试剂盒(DP103-02)购自天根生化科技(北京)有限公司。

2)蛋白纯化试剂。丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺(B546018)、Tris SDS pH 6.8(B546022)、Tris SDS pH 8.8(C526033)购自生工生物工程股份有限公司、Tris(V900866)、NaCl(V900058)、咪唑(V900153)购买于Sigma公司。

3)信使分子合成试剂。ATP(A600020)和GTP(A620250)购于生工生物工程股份有限公司,Tris、MgCl₂、NaCl试剂均购买于Sigma公司。

4)主要仪器。蛋白纯化仪(ÄKTA™ pure 25, GE Healthcare)、制冷型台式真空离心浓缩仪(北京中科科尔仪器有限公司)。

1.3 质粒构建

负责合成(pp)pGpp的3种酶基因来源于大肠杆菌 BL21 (λ DE3)和枯草芽孢杆菌(168 strain)。将大肠杆菌 BL21 (λ DE3)和枯草芽孢杆菌(168 strain)菌株分别涂布无抗生素的LB平板,培养6~8 h;随后挑取多菌落于50 μ L超纯水,100 $^{\circ}$ C煮5 min破碎细胞壁,12 000 r/min离心5 min后,取5 μ L的上清作为模板进行PCR反应,获得DNA片段;将DNA片段装载于pET15D或pET21b,进行菌落PCR反应,选取阳性克隆测序,确定基因序列,进行质粒提取。

1.4 大肠杆菌培养

将构建好的质粒转入大肠杆菌 BL21(λ DE3)感受态细胞中,接入10 mL含有相应抗性的LB培养基中,于37 $^{\circ}$ C、200 r/min摇床培养12 h。再按照1:100的比例将其接入1 L LB培养基中,200 r/min、37 $^{\circ}$ C培养4~5 h至OD₆₀₀达到1.0左右;将温度降至16 $^{\circ}$ C诱导14~16 h。

1.5 蛋白纯化

使用高压破碎的方式破碎细菌,使细菌细胞壁和细胞膜破碎,释放胞质中的蛋白。破碎好的菌液,14 000 r/min 4 $^{\circ}$ C冷冻离心1 h,离心后取上清。因

pET15D载体的N端融合6 \times His纯化标签或pET21b载体C端融合8 \times His纯化标签,通常使用Ni柱亲和层析获得目的蛋白,随后进一步使用Source Q 10-100进行纯化,获得高纯度的信使分子(pp)pGpp合成酶。

1.6 酶活反应

以ATP和GTP为原料,通过RelA催化合成G5P,再由焦磷酸激酶GppA水解G5P生成G4P,最后磷酸水解酶YvcI水解G5P或G4P生成G3P。

1)RelA的催化反应。RelA以ATP和GTP为原料,将底物ATP-5'端的焦磷酸转移到GTP的3'端上,取代羟基的位置,合成产物AMP和pppGpp。

2)GppA的催化反应。GppA以pppGpp为底物,降解其5'端的 γ -磷酸基团,催化生成产物ppGpp。

3)YvcI的催化反应。YvcI以pppGpp和ppGpp为底物,降解5'端的 γ 和 β -磷酸基团,催化生成产物pGpp。

表1 信使分子合成体系

Table 1 Messenger molecule synthesis system

试剂 Reagent	浓度/ $(\mu\text{mol/L})$ Concentration
ATP	8 000
GTP	6 000
Tris-HCl(pH 8.0)	25 000
MgCl ₂	15 000
NaCl	100 000
RelA ¹⁻⁴⁰⁰	1

RelA¹⁻⁴⁰⁰以ATP和GTP为底物,于37 $^{\circ}$ C反应30 min后使用Source Q 10-100进行分离纯化,获得G5P。随后GppA以G5P为底物催化生成G4P。经验证YvcI以G5P和G4P作为底物,催化合成G3P。

1.7 终止反应

于95 $^{\circ}$ C终止反应,避免使用苯酚等试剂危害人体,同时将蛋白酶变性形成沉淀,除去蛋白等杂质,为进一步提纯信使分子做准备。

1.8 信使分子(pp)pGpp分离提纯

与传统信使分子提取分离不同,不需要使用有机试剂萃取,采取更为环保安全的方式进行纯化。根据底物和产物所带电荷不同,利用Source Q 10-100对信使分子进一步分离提纯,其中A buffer:25 mmol/L Tris pH 8.0, B buffer:25 mmol/L Tris pH 8.0,1 mol/L NaCl。

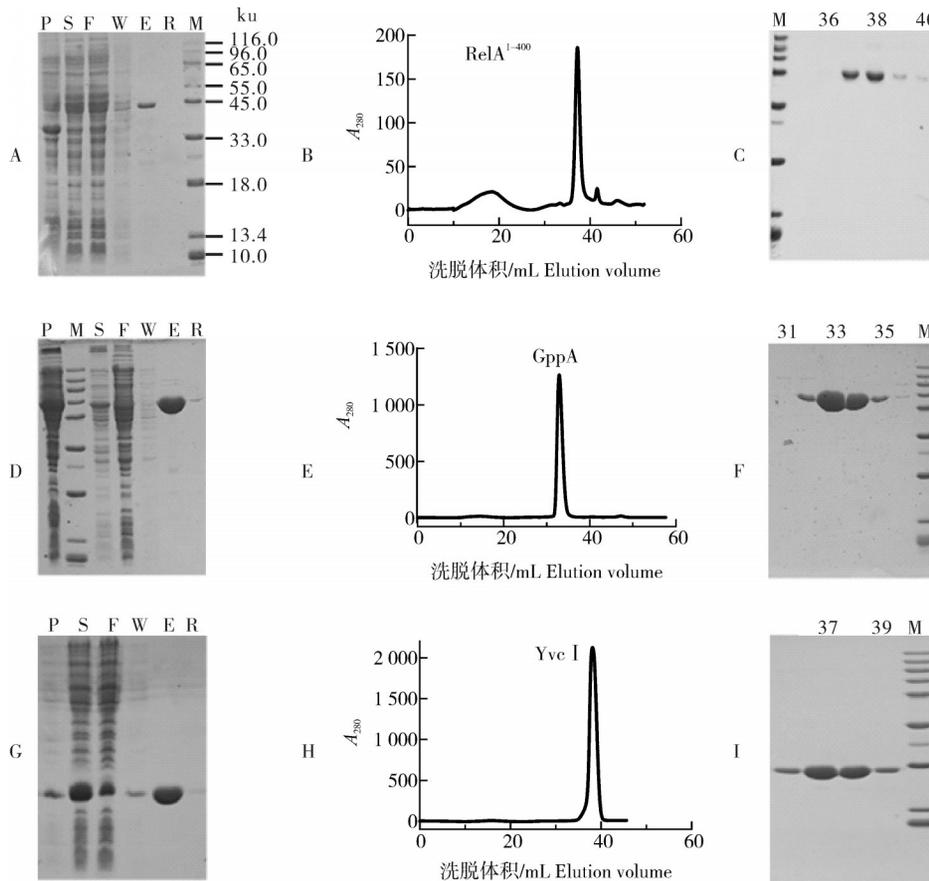
1.9 冻干

利用脱盐柱将纯化后的信使分子置换到需要的

超纯水中,随后使用制冷型真空离心浓缩仪,将信使分子浓缩冷冻成干粉,可于-80℃长期保存。

1.10 浓度测定

利用公式 $C = \frac{A_{260}}{\epsilon \times M \times V} \times 10^3$ 计算信使分子(pp)pGpp的浓度,式中,C:浓度,mmol/L;M:信使分子的摩尔质量,g/mol,G5P、G4P、G3P分别为683.14、636.16、518.14;ε:信使分子的消光系数,取值13.6(pH 7.5);V:信使分子的溶解体积,μL。



图A、图B和图C分别是RelA¹⁻⁴⁰⁰镍柱亲和层析SDS PAGE胶图、离子交换层析峰图和SDS PAGE胶图。图D、图E和图F分别是GppA镍柱亲和层析SDS PAGE胶图、离子交换层析峰图和SDS PAGE胶图。图G、H和I分别是YvcI镍柱亲和层析SDS PAGE胶图、离子交换层析峰图和SDS PAGE胶图。P表示大肠杆菌裂解后的沉淀;S表示大肠杆菌裂解后获得的上清;F表示菌液穿流后的样品;W表示洗脱杂蛋白时获得的样品;E表示洗脱的蛋白样品;R表示重悬介质的样品;M表示蛋白marker。Fig. A, B and C are RelA¹⁻⁴⁰⁰ nickel column affinity chromatography SDS PAGE gel image, ion exchange chromatography peak image and SDS PAGE gel image, respectively. Fig. D, E and F are GppA nickel column affinity chromatography SDS PAGE gel image, ion exchange chromatography peak image and SDS PAGE gel image, respectively. Fig. G, H and I are YvcI nickel column affinity chromatography SDS PAGE gel image, ion exchange chromatography peak image and SDS PAGE gel image, respectively. P represents the precipitate after lysis of *Escherichia coli*; S represents the supernatant obtained after lysis of *E. coli*; F represents the sample after bacterial liquid flow through; W represents the sample obtained when eluting impurity proteins; E represents the eluted protein sample; R indicates samples in resuspended medium; M indicates protein marker.

图1 信使分子合成酶的体外表达纯化

Fig.1 *In vitro* expression and purification of messenger molecule synthase

2.2 信使分子合成酶活性测定

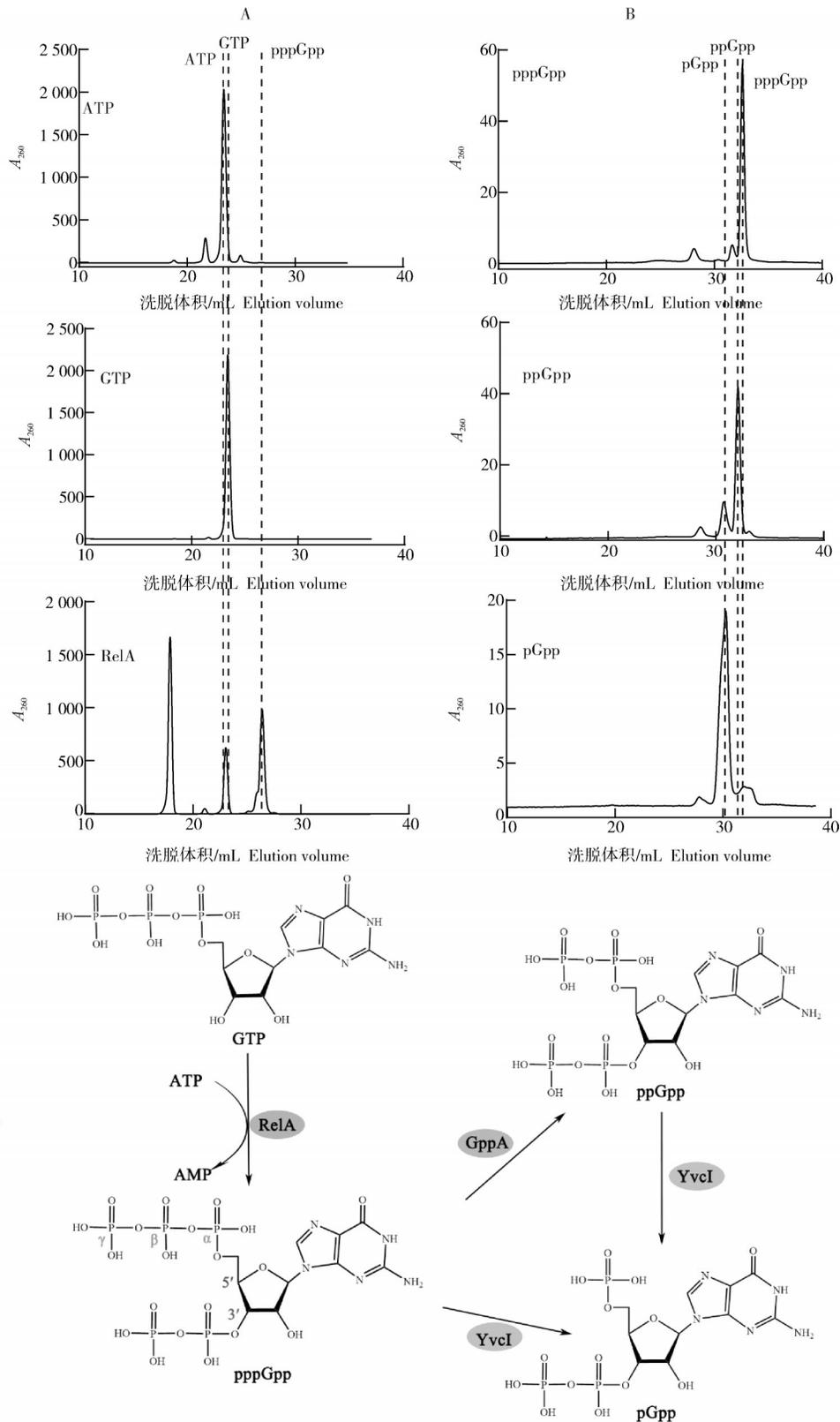
RelA以ATP和GTP为原料,催化ATP的5'端β位磷酸基团断裂,转移到GTP的3'端取代羟基,合

2 结果与分析

2.1 酶的体外表达纯化

将负责合成(pp)pGpp的3种酶基因relA、gppA、yvcI,从*E. coli* BL21 (λDE3)和*Bacillus subtilis* 168 strain基因组中克隆到pET15b或pET21D载体上,进行蛋白表达和纯化。如图1所示,经镍柱亲和层析和离子交换层析,3种信使分子合成酶蛋白纯度高、性质稳定,可用于信使分子的体外合成。

成信使分子G5P(图2A)。GppA催化G5P的5'端γ位磷酸断裂合成G4P(图2B),YvcI以G5P或G4P为底物,催化合成产物G3P(图2B)。



A: RelA 催化 GTP 合成信使分子 G5P; B: GppA 催化 G5P 合成信使分子 G4P, YvcI 催化 G5P 合成信使分子 G3P; C: 3 种信使分子酶合成示意图。A: RelA catalyzes the synthesis of the messenger molecule G5P from GTP. B: GppA catalyzes the synthesis of messenger molecule G4P from G5P, and YvcI catalyzes the synthesis of messenger molecule G3P from G5P. C: Schematic diagram of the synthesis of three messenger molecules.

图2 信使分子合成酶活性测定

Fig.2 Messenger molecular synthase activity assay

2.3 不同条件对产物得率的影响

1) pH对信使分子G5P合成的影响。反应体系中的pH依次为Bis-tris pH 6.0, Tris-HCl pH 7.0、8.0、9.0, Glycine pH 10.0, RelA¹⁻⁴⁰⁰用不同的pH稀释100倍, 浓度为1 μmol/L。如图3所示, G5P合成量随pH升高逐渐升高, pH=9时G5P产量最高, RelA¹⁻⁴⁰⁰的活性最强, pH=10时G5P产量反而降低, RelA¹⁻⁴⁰⁰的活性降低。

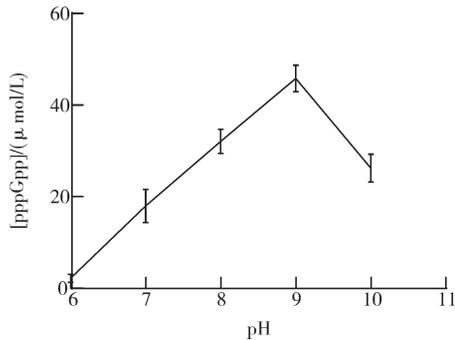


图3 pH对信使分子G5P合成的影响

Fig.3 The effect of pH on the synthesis of the messenger molecule G5P

2) 金属离子对信使分子G5P合成的影响。如图4所示, 在 Tris-HCl pH 9.0、RelA¹⁻⁴⁰⁰浓度为1 μmol/L的反应体系中, 探索金属离子Ca²⁺、Ba²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺对信使分子G5P合成的影响。结果显示, RelA¹⁻⁴⁰⁰在含有Ca²⁺、Ba²⁺、Zn²⁺的反应体系中, 无催化活性, 不合成G5P; RelA¹⁻⁴⁰⁰在Mg²⁺存在下, 合成效率最高, G5P的产量最高。

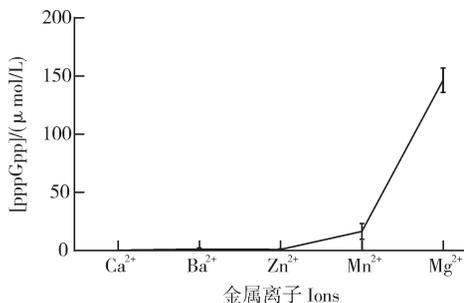


图4 金属离子对信使分子G5P合成的影响

Fig.4 Effects of metal ions on the synthesis of messenger G5P

3) 反应时间对信使分子G5P合成的影响。如图5所示, 在 Tris-HCl pH 9.0、添加Mg²⁺、RelA¹⁻⁴⁰⁰浓度为1 μmol/L的反应体系中, 在5~120 min随时间延长G5P的产量逐渐增加。为缩短反应时间, 提高合成效率, 下文探索G5P合成酶的浓度。

4) 酶浓度对信使分子G5P合成的影响。在 Tris-

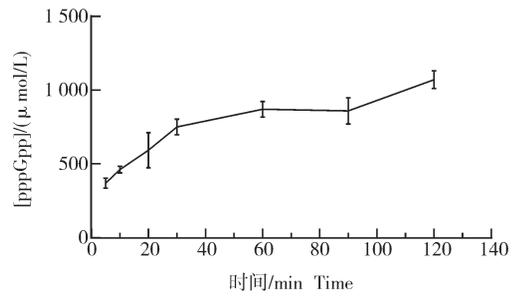


图5 反应时间对信使分子G5P合成的影响

Fig.5 The effect of reaction time on the synthesis of messenger molecule G5P

HCl pH 9.0、添加Mg²⁺、反应时间为10 min的反应体系中, 探索1、2、4、6、8 μmol/L酶浓度对信使分子G5P合成的影响(图6)。结果显示, 酶浓度在2、4、6 μmol/L时RelA¹⁻⁴⁰⁰的活性最高, G5P的合成量最高; 随着酶浓度升高, G5P的产量反而降低。为提高反应效率, 减少反应体系中的蛋白酶, 提高信使分子的纯度, 选择2 μmol/L的RelA¹⁻⁴⁰⁰作为最佳反应酶浓度。

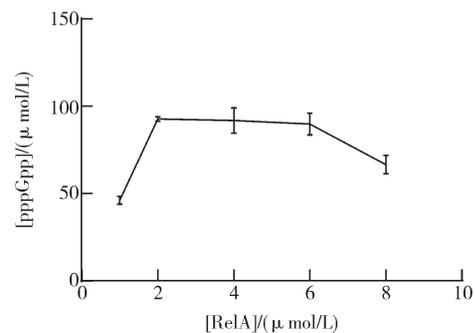


图6 酶浓度对信使分子G5P合成的影响

Fig.6 The effect of enzyme concentration on the synthesis of the messenger molecule G5P

5) 反应时间对信使分子G4P合成的影响。为提高合成效率, 在RelA催化合成反应10 min后, 直接加入GppA或YvcI继续反应合成G4P或G3P。这样, 只需一步纯化就可以获得目标产物, 避免了二次纯化的损失。因此, 本研究在RelA¹⁻⁴⁰⁰合成G5P的基础上, 探索优化合成信使分子G4P、G3P的方法。在 Tris-HCl pH 9.0、添加Mg²⁺、2 μmol/L RelA¹⁻⁴⁰⁰反应10 min后, 继续添加1 μmol/L GppA参与反应, 探索反应时间对信使分子G4P合成的影响(图7)。结果显示, 随时间延长, 信使分子G4P的产量逐渐升高。为提高合成效率, 选取反应时间20 min, 继续优化GppA酶浓度。

6) 酶浓度对信使分子G4P合成的影响。在 Tris-

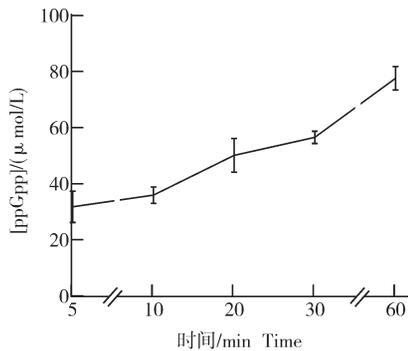


图7 反应时间对信使分子G4P合成的影响

Fig.7 The effect of reaction time on the synthesis of messenger molecule G4P

HCl pH 9.0、添加 Mg^{2+} 、 $2 \mu\text{mol/L}$ RelA¹⁻⁴⁰⁰ 反应 10 min 后,继续添加 GppA 参与反应 20 min,探索了不同的酶浓度对信使分子 G4P 合成的影响(图 8)。结果显示,随 GppA 的浓度升高,信使分子 G4P 的产量逐渐升高,添加 $6 \mu\text{mol/L}$ GppA 反应 20 min,信使分子 G4P 的产量最高。

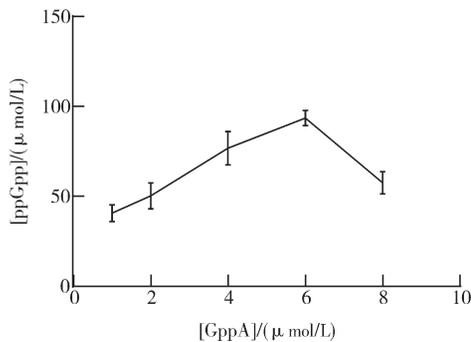


图8 酶浓度对信使分子G4P合成的影响

Fig.8 The effect of enzyme concentration on the synthesis of messenger G4P

7) 反应时间对信使分子 G3P 合成的影响。在 Tris-HCl pH 9.0、添加 Mg^{2+} 、 $2 \mu\text{mol/L}$ RelA¹⁻⁴⁰⁰ 反应 10 min 后,继续添加 $1 \mu\text{mol/L}$ YvcI 参与反应,探索不同反应时间对信使分子 G3P 合成的影响(图 9)。结果显示,随反应时间延长,信使分子 G3P 的产量逐渐升高。添加 $1 \mu\text{mol/L}$ YvcI 反应 20 min 后,底物基本消耗完。

8) 酶浓度对信使分子 G3P 合成的影响。如图 10 所示,在 Tris-HCl pH 9.0、添加 Mg^{2+} 、 $2 \mu\text{mol/L}$ RelA¹⁻⁴⁰⁰ 反应 10 min 后,继续添加 YvcI 参与反应 20 min,探索不同酶浓度对信使分子 G4P 合成的影响。结果显示,随 YvcI 的浓度升高,信使分子 G3P 的产量逐渐升高,添加 $4 \mu\text{mol/L}$ YvcI 反应 20 min 后,信使分子 G3P 的产量最高。

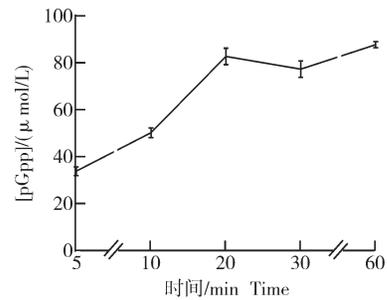


图9 反应时间对信使分子G3P合成的影响

Fig.9 The effect of reaction time on the synthesis of messenger molecule G3P

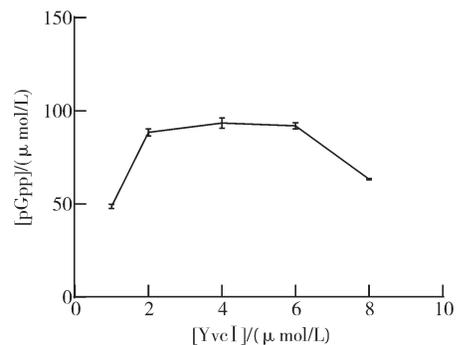


图10 酶浓度对信使分子G3P合成的影响

Fig.10 The effect of enzyme concentration on the synthesis of messenger G3P

2.4 制备小分子的适用范围测定

(pp)pGpp 信使分子参与嘌呤合成通路,与嘌呤合成蛋白结合(Gmk)并抑制其功能。蛋白样品中不能存在 DTT,所以纯化蛋白全程不添加 DTT,并且分子筛纯化时,补加 10 mmol/L $MgCl_2$ (即 25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L $MgCl_2$),与此同时冻干的信使分子也溶解于此试剂。采用信使分子滴定嘌呤合成蛋白的方法(20:1)进行 ITC(isothermal titration calorimetry)实验。ITC 验证了嘌呤合成蛋白(Gmk)与信使分子(pp)pGpp 发生了强烈互作(图 11),说明信使分子(pp)pGpp 可以应用于生化分析。

2.5 合成通路的优化

如图 12 所示,与传统的合成方法相比,新的合成方法只需要将反应产物经离子交换柱进行分离纯化,除去多余的底物和产物,随后将得到的信使分子置换到超纯水中,冻成干粉即可。此方法简单快速,不需要任何有毒试剂,安全环保。

2.6 成本对比分析

合成信使分子成本对比分析结果(表 2)显示,与商业化购买的信使分子相比,合成信使分子(pp)pGpp 的成本降低了 96%。

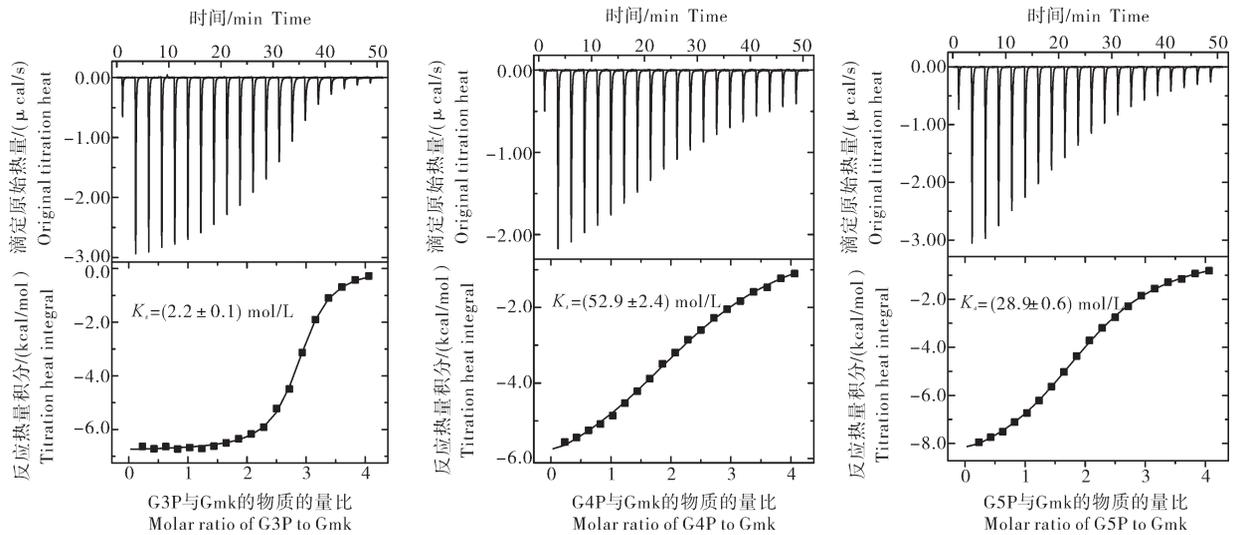


图 11 信使分子(pp)pGpp与Gmk的互作验证

Fig.11 Interaction verification of messenger molecule (pp)pGpp and Gmk

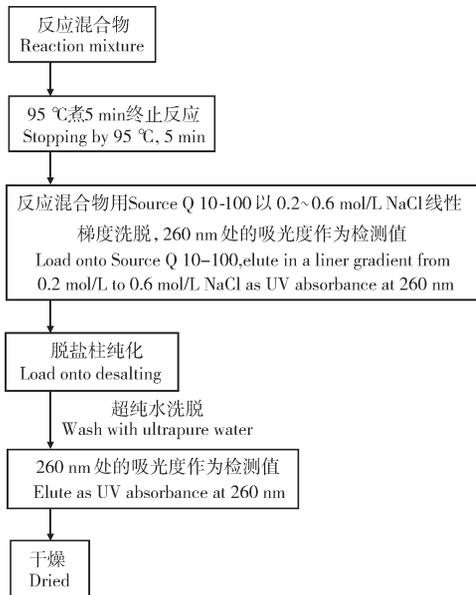


图 12 合成通路优化

Fig.12 Synthetic pathway optimization

表 2 合成信使分子成本对比分析

Table 2 Comparative analysis of the cost of synthetic messenger molecules

信使分子名称 Name	质量/mg Mass	市售价格/¥ Market price	成本 Cost
G5P	0.30	1 487.5	53.31
G4P	0.27	1 487.5	53.31
G3P	0.23	1 487.5	53.31

注：表中下划线所示价格为上海玉博生物科技有限公司所售信使分子的价格。Note: The price indicated by the underline in the table is the price of the messenger molecule sold by Shanghai Yubo Biotechnology Co., Ltd.

3 讨论

选择合适的pH和金属离子是信使分子合成酶发挥功能的关键,但其他因素也是影响信使分子体外合成的重要因素。体外合成信使分子容易出现蛋白杂质,因此,本方法在终止反应时,为使蛋白变性而不引入其他有机试剂,防止其他杂质对信使分子纯度的影响。另外,本研究体外合成的信使分子经验证,可以运用到ITC分析。Takahashi等^[13]从拟南芥中提取信使分子,采用甲酸、甲醇等具有强腐蚀性和毒性的试剂进行信使分子的萃取,进一步进行HPLC纯化获得信使分子。与其相比,本研究建立的体外合成方法,具有以下优势:一是方法简单,不需要特殊的有毒试剂;二是原料简单,常用的ATP、GTP即可参与反应;三是无需任何冰上或者4 °C操作,室温操作即可;四是反应时间大大缩短。

参考文献 References

[1] 张腾飞,罗青平,邵华斌,等.细菌的严谨反应研究进展[J].湖北畜牧兽医,2019,40(12):14-16.ZHANG T F, LUO Q P, SHAO H B, et al. Advances in rigorous response research in bacteria[J]. Hubei journal of animal and veterinary sciences, 2019, 40(12):14-16 (in Chinese without English abstract).

[2] PAUSCH P, ABDEL SHAHID M, STEINCHEN W, et al. Structural basis for regulation of the opposing (p)ppGpp synthetase and hydrolase within the stringent response Orchestrator Rel [J/OL]. Cell Rep, 2020, 32(11): 108157 [2022-05-17]. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108157>.

[3] 刘彪,宁德刚.细菌应激反应中(p)ppGpp代谢的调控[J].微生物学通报,2011,38(9):1425-1429.LIU B, NING D G. Modula-

- tion of (p)ppGpp metabolism during bacterial stringent response [J]. *Microbiology China*, 2011, 38(9): 1425-1429 (in Chinese with English abstract).
- [4] ATKINSON G C, TENSON T, HAURYLIUK V. The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life [J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23479 [2022-05-17]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023479>.
- [5] DALEBROUX Z D, SWANSON M S. ppGpp: magic beyond RNA polymerase[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10(3): 203-212.
- [6] PIZARRO-CERDÁ J, TEDIN K. The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression [J]. *Mol Microbiol*, 2004, 52(6): 1827-1844.
- [7] 王琦, 岳盈盈, 李冰清. 持留菌的形成及致病机制的研究进展[J]. *中国病原生物学杂志*, 2020, 15(11): 1357-1362. WANG Q, YUE Y Y, LI B Q. Advances in research on the creation and the pathogenic mechanism of persisters [J]. *Journal of pathogen biology*, 2020, 15(11): 1357-1362 (in Chinese with English abstract).
- [8] IRVING S E, CHOUDHURY N R, CORRIGAN R M. The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(4): 256-271.
- [9] 陆继爽, 李波, 单春乔, 等. 抗生素耐药性研究进展 [J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(10): 2088-2095. LU J S, LI B, SHAN C Q, et al. Progress of solutions against antibiotic resistance [J]. *Chinese journal of animal and veterinary sciences*, 2019, 39(10): 2088-2095 (in Chinese with English abstract).
- [10] 卢文珺, 王金文, 徐俊. 信号分子 ppGpp 与微生物环境适应性 [J]. *生命科学*, 2012, 24(4): 385-389. LU W J, WANG J W, XU J. Alarmone ppGpp and its role in the environmental adaptations of microorganisms [J]. *Chinese bulletin of life sciences*, 2012, 24(4): 385-389 (in Chinese with English abstract).
- [11] LI Gang, ZHAO Qian, LUAN Tian. 信号素分子 (p)ppGpp 对胸膜肺炎放线杆菌生理适应机制的影响 [J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(3): 324. LI G, ZHAO Q, LUAN T. Basal-level effects of (p)ppGpp in the absence of branched chain amino acids in *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *Chinese journal of preventive veterinary medicine*, 2020, 42(3): 324 (in Chinese).
- [12] YANG J, ANDERSON B W, TURDIEV A, et al. The nucleotide pGpp acts as a third alarmone in *Bacillus*, with functions distinct from those of (p)ppGpp [J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5388 [2022-05-17]. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24209-2>.
- [13] TAKAHASHI K, KASAI K, OCHI K. Identification of the bacterial alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) in plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(12): 4320-4324.
- [14] MECHOLD U, POTRYKUS K, MURPHY H. Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(12): 6175-6189.

Efficient preparation of signal molecule (pp)pGpp in vitro by enzymatic method

CHEN Chuanyu, TAN Fanjie, YIN Ping, ZHANG Delin

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/Hubei Hongshan Laboratory/
College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract In view of the problems of high cost, long time and technical difficulty in the extraction and synthesis of messenger molecule (pp)pGpp, a new *in vitro* synthesis technology was established and optimized based on the existing *in vitro* enzymatic synthesis of (pp)pGpp. This method achieves the goals of high efficiency, convenience, safety and environmental protection, and low cost. The results showed that high purity (pp)pGpp can be obtained by reacting (pp)pGpp synthetases: RelA, GppA and YvcI in 25 mmol/L Tris-HCl pH 9.0, 15 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L NaCl at 37 °C for 30 minutes, and further purified by anion exchange (pp)pGpp molecule. Compared with the traditional direct extraction from bacteria or plants and the existing *in vitro* enzymatic preparation process, this method has the advantages of simple operation, rapidity, low cost, and environmental friendliness, and can meet the needs of downstream biochemical analysis and structural biology experiments. More importantly, it provides a material basis for microbial signaling pathways and the development of new antibacterial drugs.

Keywords (pp)pGpp; synthetic biology; *in vitro* synthesis; RelA; GppA; YvcI

(责任编辑:张志钰)