

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.05.038

新型核苷碱基卤化酶 AcmX 的原核表达和结晶

杨 婷, 柯 丹, 张金珠, 朱晓峰

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 在链霉菌中发现了一类能对核苷碱基进行特异位点卤化修饰的新型卤化酶, 通过表达纯化新型卤化酶的活性蛋白、制备蛋白晶体, 可对其进行蛋白结构的解析, 揭示生物催化卤化反应的机理. 在大肠杆菌直接原核表达 AcmX, 只能得到没有活性的 AcmX 的蛋白包涵体. 借助分子伴侣的表达质粒 pGro7, 构建 AcmX、分子伴侣的共表达系统, 发现在 30℃, 0.5 mM IPTG 和 0.3g/L 阿拉伯糖诱导表达 3 h, 可避免目标蛋白 AcmX 包涵体的形成, 并得到足够表达量的目标蛋白, 通过高分辨率的分子筛凝胶层析步骤, 可去除混入 AcmX 样品的分子伴侣蛋白 GroEL, 得到可以用于结晶实验的高均一性的活性 AcmX 蛋白样品.

关键词: 核苷碱基卤化酶; 位点特异的卤化反应; 与分子伴侣蛋白共表达; 蛋白结晶

中图分类号: Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)05-1113-06

Overexpression and crystallization of a novel nucleoside base halogenase AcmX

YANG Ting, KE Dan, ZHANG Jin-Zhu, ZHU Xiao-Feng

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract: Most recently a new group of regioselective adenine halogenases have been found in *Streptomyces*. In order to solve the structure and elucidate the catalysis mechanism of this new halogenase family, it requires the overexpression, purification and crystallization of the novel halogenase. Routine prokaryotic expression of AcmX in *Escherichia coli* failed to provide the active AcmX sample other than the inactive inclusion bodies. The co-expression system of AcmX with chaperone was established by using the chaperone expression plasmid pGro7. The inclusion body of AcmX can be avoided and sufficient target protein can be obtained with the help of the chaperone, as the expression was induced by 0.5 mM IPTG and 0.3 g / L arabinose at 30 °C for 3 hours. The ideal homogeneous AcmX protein sample can be finally obtained after a further purification step to remove the contaminated chaperone protein GroEL by using high resolution gel filtration chromatography, which successfully produced protein crystals of AcmX.

Keywords: Nucleoside base halogenase; Regioselective halogenation; Coexpression with chaperone; Protein crystallization

1 引言

由于卤素原子的特殊性质(如氟的强电负性,

氯和其他卤素的亲电子性), 卤代天然产物往往具有重要的生物活性^[1], 是药用天然产物的重要组成部分. 目前已有超过 4700 种卤代天然产物被发现,

收稿日期: 2016-04-29

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金(2015-1098-5-5)

作者简介: 杨婷(1991-), 女, 四川遂宁人, 硕士, 研究方向为生化与分子生物学. E-mail: yangting71@126.com

通讯作者: 朱晓峰. E-mail: zhuxiaofeng@scu.edu.cn

某些天然产物卤代与否甚至决定其生物活性^[2]。比如用于治疗超级细菌感染的万古霉素(Vancomycin),其抗生素活性就依赖于药物分子的氯化取代^[3],与之类似的还有 Balhimycin、氯代四环素、氯霉素等^[4]。高效抗肿瘤药物 Cryptophycin A^[5,6]和雷别卡霉素(Rebecamycin)^[7]的抗肿瘤活性也取决于药物分子芳香环上的氯代。

在现有药物分子特定位置的卤代,可改变药物分子的极性和理化性质,提高药物分子与靶点的结合能力、生物利用度和稳定性,得到效果更优或具有全新治疗效果的药物分子,因此药物的卤化改性是药物升级研发的一个热点方向,而发现和利用生物卤化酶的特异性卤化能力是进行药物卤化改性的一种重要途径。

随着对生物基因组测序的高速发展和低成本化,基因组序列分析是发现全生物卤化酶的首要手段^[8,9]。最近发现链霉菌 JCM9888 可产生含有 2-氯-腺苷骨架的广谱抗生素 Ascamin^[10],推测该链霉菌具有催化腺嘌呤 2-位氯化的能力。对该链霉菌基因组的测序,仅发现两个高度同源的依赖 FAD 的卤化酶基因 AcmX 和 AcmY,由此认为卤化酶 AcmX 和 AcmY 可能催化在腺嘌呤碱基 2-位的氯化反应,是一类新型核苷碱基卤化酶,具有对核苷类药物进行卤化改性的潜力。

除了通过同源建模的方法对其三维结构进行预测外^[11],主流的方法是对目标酶进行晶体结构分析。为了阐明该类新型核苷碱基卤化酶的催化机理,选择卤化酶 AcmX 进行晶体结构解析,其前提是获得足够量的 AcmX 活性蛋白用于结晶实验。本研究利用大肠杆菌原核表达 AcmX,最初只能得到没有活性的蛋白包涵体,无法用于后续的晶体制备。通过在大肠杆菌引入分子伴侣蛋白的表达质粒,建立 AcmX、分子伴侣蛋白的共表达系统,摸索表达和纯化有活性的 AcmX 的条件和方法,利用纯化得到的活性 AcmX 蛋白,已成功获得了 AcmX 的蛋白晶体。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 菌种与质粒 卤化酶 AcmX 的重组表达质粒 pET28a-AcmX 由武汉大学赵春华博士提供^[10]。用于克隆和表达的大肠杆菌菌株 DH5 α 和 BL21(DE3)由本实验室保存。

2.1.2 试剂 分子伴侣试剂盒购于 Takara 公司;

异丙基硫代半乳糖苷(IPTG),三羟甲基氨基甲烷,咪唑,4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)及其他化学试剂购于 Sigma-Aldrich 公司的 Vetec 分部;结晶筛选试剂盒购于 Qiagen 公司;Ni²⁺亲和层析柱和 HiLoad Superdex 200 16/60 分子筛层析柱购于 GE 公司。

2.2 方法

2.2.1 卤化酶 AcmX 表达条件的优化 单独诱导重组蛋白 AcmX 表达的尝试:将构建好的 pET28a-AcmX 重组质粒转化入 BL21(DE3)大肠杆菌得到转化子。挑取单克隆接种于 10mL 含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基过夜培养,随后放大至两瓶 1L 的培养体积,在 37 $^{\circ}$ C 培养,待细胞浓度生长至 OD₆₀₀ = 0.6~0.8,分别加入终浓度为 0.5mM IPTG 诱导 AcmX 的表达。其中 1L 的培养物继续在 37 $^{\circ}$ C 培养 3 min,另外 1L 的培养物在 16 $^{\circ}$ C 培养 20 h 后 4000r/min 离心 15min 收集培养的细胞,用于纯化 AcmX 的尝试。

重组蛋白 AcmX 与分子伴侣共表达体系的小样培养及放大:将 pET28a-AcmX 质粒和分子伴侣蛋白 pGro7 质粒共同转入 BL21(DE3)大肠杆菌中,涂布在含有 50 μ g/mL 卡那霉素和 34 μ g/mL 氯霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,得到两个质粒共同转化的转化子。挑取单克隆接种于 10mL 含有 50 μ g/mL 卡那霉素,34 μ g/mL 氯霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 达到 0.4~0.6,加入终浓度为 0.5 mM 的 IPTG 诱导表达 AcmX,同时不加或加入 0.1 mg/mL 阿拉伯糖诱导分子伴侣蛋白的表达。继续在 37 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 和 16 $^{\circ}$ C 分别培养 3 h、3 h 和 20 h。离心收菌,用 20mM Tris-HCl pH 7.8 缓冲液悬浮菌体后,用超生破碎仪进行细胞破碎。通过离心,将样品分为诱导表达前后细胞破碎后的总蛋白样品,高速离心后上清和沉淀 4 个样品。分别与 SDS-PAGE 上样缓冲液混匀,100 $^{\circ}$ C 加热 5 min,用 SDS-PAGE 分析各样品的蛋白组成。类似的小样培养方法被用来分析不同阿拉伯糖诱导浓度对分子伴侣表达水平及目标蛋白 AcmX 的影响,选择最合适的 IPTG、阿拉伯糖诱导浓度和培养温度和时间用于放大培养,收集培养的菌体,用于 AcmX 的纯化。

2.2.2 重组蛋白 AcmX 的纯化 用缓冲液 A (20mM Tris-HCl pH7.8,500mM NaCl,30mM 咪唑)悬浮菌体。在低温下对菌液进行高压匀浆破碎。将破碎完全的菌液在 4 $^{\circ}$ C 下 15,000 r/min 离心 30

min 去除细胞碎片,收集上清,上样于 Ni^{2+} 亲和层析柱,用 3 个柱床体积的缓冲液 A 清洗非特异结合的杂蛋白,和 50% 的洗脱缓冲液 B (20 mM Tris-HCl pH7.8, 500 mM NaCl, 500 mM 咪唑) 线性梯度混合洗脱带有 N-端组氨酸标签的目的蛋白,洗脱完成后用 100% 洗脱缓冲液 B 清洗亲和层析柱. 收集不同纯化阶段的蛋白样品,用 SDS-PAGE 显示目标蛋白在每个纯化步骤中的状态.

重组蛋白与分子伴侣共表达的蛋白样品的纯化步骤同上述基本相同,但为了更好地将目的蛋白与分子伴侣分离开,在缓冲液中加入了适量 Mg^{2+} , 所用缓冲液 A 为 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 500 mM NaCl, 30 mM 咪唑, 5 mM MgSO_4 , 洗脱缓冲液 B 为 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 500 mM NaCl, 500 mM 咪唑, 5 mM MgSO_4 . 洗脱过程采取线性梯度混合洗脱,先用终浓度为 80 mM 咪唑 (10% 洗脱缓冲液 B) 清洗杂蛋白 (分子伴侣蛋白),之后用 250 mM 咪唑直接洗脱目的蛋白. 将亲和层析中初步纯化的 AcmX 样品,用超滤浓缩管浓缩至 5.5 mL 左右,将蛋白样品上样到 HiLoad Superdex200 16/60 分子筛凝胶层析柱,用缓冲液 C (20 mM HEPES-NaOH 缓冲液, pH 7.2, 0.1 mM NaCl) 进行洗脱,收集主要蛋白峰所对应的蛋白样品. 纯化后的蛋白样品用超滤管浓缩至 12 mg/mL, 分装保存,用于结晶条件的筛选.

2.2.3 AcmX 的结晶实验 将得到的活性蛋白样品用于结晶实验. 采取坐滴法,在 96 孔板的大孔中加入 70 μL 结晶条件筛选试剂,在小孔中先加入 0.7 μL 蛋白溶液,再加入 0.7 μL 的筛选试剂与蛋白混合,最后用专用膜密封结晶板,放入 20 $^{\circ}\text{C}$ 晶体培养箱进行培养. 3~5 d 后观察是否有晶体出现.

3 结果

3.1 AcmX 原核表达条件的优化

为了获得用于结晶的卤化酶 AcmX 蛋白样品,首先对 AcmX 原核表达条件进行尝试. 用 N-端带有组氨酸标签的 AcmX 表达质粒转化大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3), 固定 IPTG 的诱导浓度为 0.5 mM, 观察诱导表达时的温度对 AcmX 表达的影响. 选择最常用的两个温度条件进行诱导表达,即 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 3 h 和 16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 20 h. 对两个温度条件下的大肠杆菌培养物进行细胞破碎和离心,将上清液上样到 Ni^{2+} 亲和层析柱,用咪唑洗脱与亲和层析柱结合的蛋白. 利用 SDS-PAGE 检

测纯化各步骤中 AcmX 的存在,发现在上述两个温度诱导表达都无法获得活性状态的 AcmX 蛋白. 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 3 h, 可以明显看到大量 AcmX 蛋白的表达,但主要存在于破碎细胞的离心沉淀中,说明在 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达, AcmX 主要以包涵体的形式存在. 将细胞破碎液的上清液加到 Ni^{2+} 亲和层析柱,用 250 mM 的咪唑只能从亲和层析柱上洗脱得到非特异结合的杂蛋白 (图 1A). 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 20 h 表达条件下,不能看到明显的 AcmX 蛋白带 (图 1B). 我们还尝试用不同浓度的 IPTG 诱导表达 AcmX 蛋白,都只能得到 AcmX 蛋白的包涵体或者看不到明显的蛋白表达 (结果未显示).

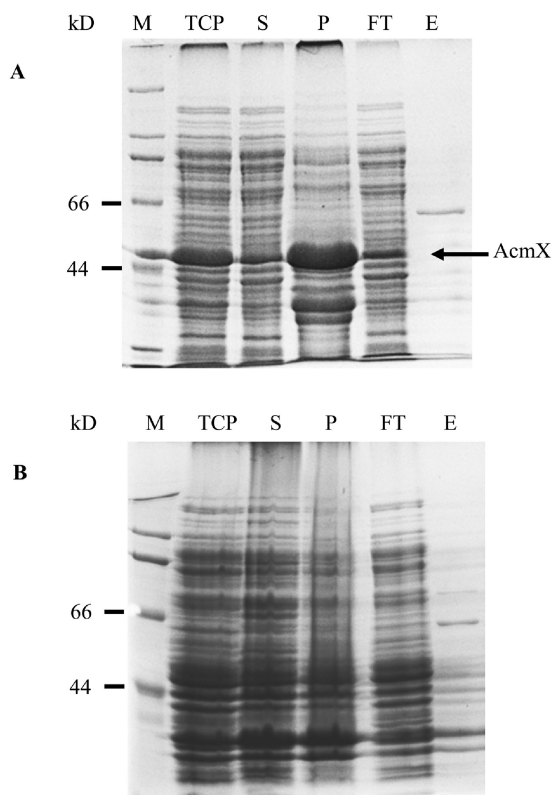


图 1 原核表达 AcmX 纯化各步骤蛋白组分的 SDS-PAGE 分析

A 和 B 分别显示 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 3 h 和 16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 20 h 的结果. 其中电泳泳道从左到右依次为蛋白分子量标准品 (M), 细胞破碎后的总蛋白 (TCP), 细胞破碎后的离心上清液 (S), 细胞破碎后的离心沉淀 (P), Ni^{2+} 亲和层析柱的流穿样品 (FT), 以及 250 mM 咪唑从 Ni^{2+} 亲和层析柱洗脱得到的样品 (E)

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the protein contents of the sample fractions during the purification of AcmX from *E. coli* expression culture

A and B represents the samples from culture which induced by IPTG at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 3 hours (A) and at 16 $^{\circ}\text{C}$ for 20 hours (B) respectively

由于诱导表达出的 AcmX 无法正常折叠形成了包涵体, 因此考虑在表达体系引入分子伴侣的表

达质粒,构建目标蛋白、分子伴侣的共表达体系,以有利于蛋白的正常折叠.选择带有阿拉伯糖启动子的分子伴侣表达质粒 pGro7,在阿拉伯糖的特异诱导下,该质粒可表达 Gro ES(60 kD)和 Gro EL(10 kD)两种伴侣蛋白.在 37℃、30℃条件下小体积培养大肠杆菌共表达体系(10 mL),分析在不同温度诱导分子伴侣的表达是否有助于 AcmX 的正确折叠.在 37℃和 30℃诱导表达 3 h,可见明显的 AcmX 的表达,细胞破碎后的离心沉淀中都有 AcmX 的包涵体;用低浓度的阿拉伯糖(0.1 g/L)诱导分子伴侣表达,沉淀中的包涵体的量有所降低,

暗示分子伴侣蛋白 GroEL 和 GroES 可帮助 AcmX 的折叠,但仍有部分 AcmX 无法正常折叠而形成包涵体(图 2A、2B).固定诱导温度在 30℃,增加阿拉伯糖的浓度到 0.3g/L,分子伴侣蛋白的表达量显著增高,在破碎细胞的离心沉淀中没检测到 AcmX,说明提高分子伴侣蛋白的表达量,可增强对目标蛋白正确折叠的能力,避免错误折叠产生的包涵体.综合以上结果,选择 0.3g/L 的阿拉伯糖和 0.5 mM IPTG 在 30℃诱导分子伴侣和目标蛋白 AcmX 表达 3h 作为放大培养的条件.

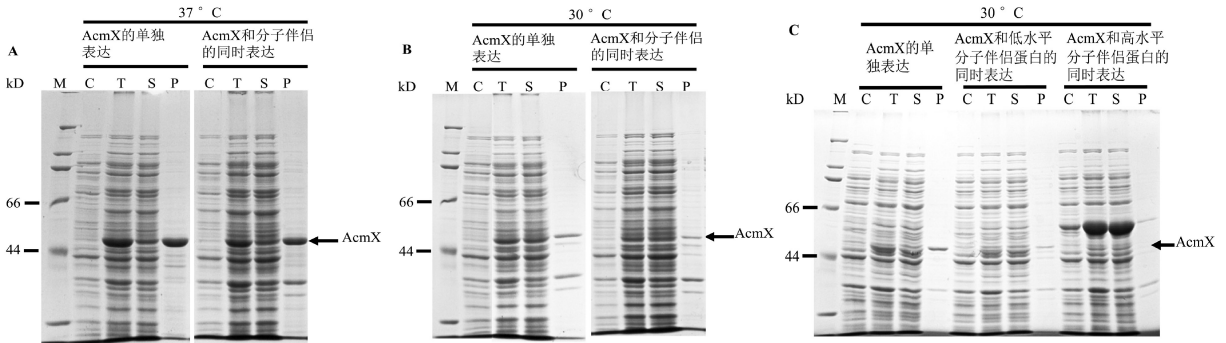


图 2 对分子伴侣、目标蛋白共表达体系进行优化过程中,对各收集样品的 SDS-PAGE 分析

A 和 B 分别表示在 37℃(A)和 30℃(B)温度下,单独诱导 AcmX 和诱导 AcmX 和分子伴侣蛋白共表达时的差异;C 显示在 30℃温度下,不同分子伴侣表达水平对 AcmX 的影响.泳道标记 C、T、S 和 P 分别表示诱导前的总蛋白、诱导后的总蛋白、诱导后细胞破碎物的离心上清液和诱导后细胞破碎物的离心沉淀

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the sample fractions during the optimization of the coexpression system of AcmX and pGro7

A and B show the difference of the protein content in recombinant coexpression system of AcmX and pGro7 grown at 37℃(A) and 30℃(B) for 3 hours after inducing AcmX alone (left) or both plasmids together (right); Panel C show the influence of different expression levels of pGro 7 on AcmX at 30℃ for 3 hours after induction

3.2 卤化酶 AcmX 的纯化

为了帮助目标蛋白 AcmX 的正常折叠,引入分子伴侣的表达质粒,但这给纯化带来了新的问题.分子伴侣蛋白,特别是 GroEL,在帮助目标蛋白折叠时,不可避免地会与目标蛋白相互作用,用亲和层析柱纯化目标蛋白时,往往将分子伴侣和目标蛋白共同纯化出来(图 3A).为了减弱 AcmX 和分子伴侣蛋白 GroEL 的相互作用,我们优化纯化条件,在纯化溶液中加入 5 mM 的 Mg^{2+} ,干扰目标蛋白和分子伴侣的作用,但还是无法将二者完全分开(图 3B).

为了避免残留的分子伴侣蛋白 GroEL 对 AcmX 结晶的影响,利用高分辨率的分子筛凝胶层析(Superdex200)进一步纯化,得到对称性好的单个主要蛋白洗脱峰,其洗脱体积和 AcmX 单体的分子量相对应. SDS-PAGE 分析发现蛋白洗脱峰为高纯度的 AcmX 蛋白,有效去除了分子伴侣蛋白

GroEL 的污染.所以高分辨率分子筛(Superdex 200)的进一步纯化是得到不含 GroEL 污染的 AcmX 蛋白纯品的关键(图 3C),与此同时分子筛的结果还提示 AcmX 蛋白以单体形式存在.

经过分子伴侣蛋白帮助折叠,亲和层析和分子筛凝胶层析纯化后的 AcmX 样品呈现黄色,这和 AcmX 利用 FAD 作为辅因子催化卤化反应相符(辅因子 FAD 为黄色),表明得到的 AcmX 的蛋白样品,结合有辅因子 FAD,以活性形式存在,适合下一步的结晶实验.

3.3 卤化酶 AcmX 的结晶实验

对获得的 AcmX 活性样品进行蛋白结晶条件的初步筛选.从氨基酸序列的同源性,已知 AcmX 是依赖 FAD 的卤化酶,辅因子 FAD 可以稳定 FAD 的结合位点.为了防止 AcmX 随纯化带下的 FAD 辅因子的不足,外加 1mM 的 FAD,以保证 AcmX 蛋白样品的均一性.利用蛋白结晶条件筛选

试剂盒, 筛选了 288 个条件, 涵盖不同的缓冲液系统, pH 范围, 阴阳离子和沉淀剂的变化, 以寻找适合 AcmX 的结晶条件. 经过 7 d 20°C 的培养, 在两个条件下观察到晶体的形成, 晶体的颜色也呈现黄

色(FAD 的颜色)(图 4). 两个结晶条件下, 一种晶体呈矩形片状(图 4A); 另一种晶体呈堆积的棍状, 暗示后一晶体的蛋白分子 AcmX 的堆积状态更好, 晶体质量更高(图 4B).

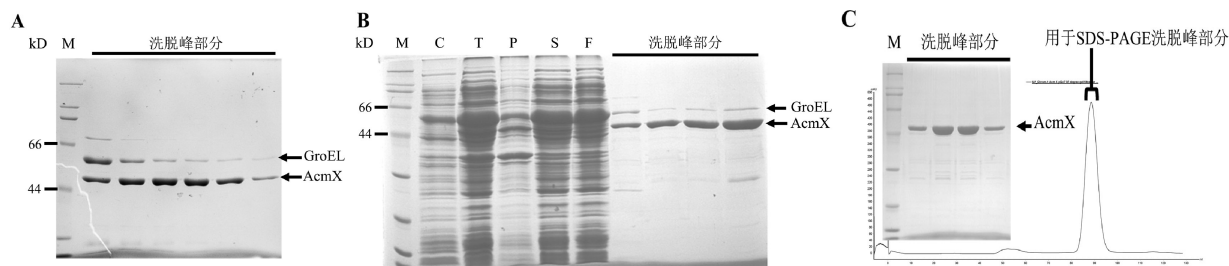


图 3 在 AcmX 纯化过程中, 对收集样品的 SDS-PAGE 分析

A: Ni^{2+} 亲和层析柱洗脱峰的蛋白组分分析; B: 使用镁离子降低 AcmX 和分子伴侣蛋白相互作用条件下, Ni^{2+} 亲和层析各纯化步骤蛋白组分分析; C: 在高分辨率分子筛凝胶层析中主要蛋白洗脱峰的组分分析及蛋白洗脱峰的位置

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the sample fractions during the purification of AcmX from coexpression system.

A shows the elution fraction from Ni^{2+} affinity chromatography column; B shows the elution fraction and other fractions during the purification by increasing imidazole concentration in wash buffer in the presence of Mg^{2+} ; C shows the elution fraction of major protein peak and its position in gel-filtration chromatography

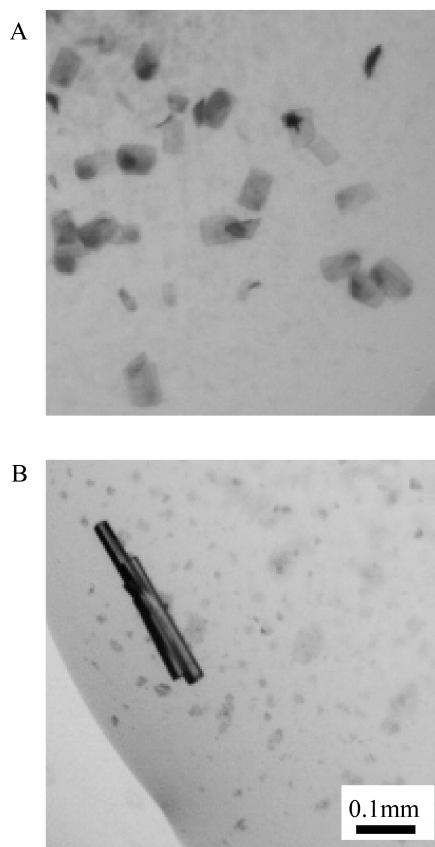


图 4 卤化酶 AcmX 的蛋白晶体

Fig. 4 Crystal of halogenase AcmX

卤化反应^[9]. 为了解析其中一个卤化酶 AcmX 的晶体结构, 对 AcmX 大肠杆菌原核表达条件进行摸索, 却只能得到包涵体形式的无活性的 AcmX. 利用分子伴侣的表达质粒 pGro7, 构建了与目标蛋白 AcmX 的共表达系统. 提高分子伴侣质粒 pGro7 编码的两个伴侣蛋白表达水平, 可有效帮助 AcmX 的折叠. 由于分子伴侣蛋白与 AcmX 的相互作用, 导致部分分子伴侣蛋白 GroEL 伴随 AcmX 一起被纯化. 利用高分辨率的分子筛凝胶层析去除 GroEL, 得到可用于结晶的高纯度 AcmX 蛋白样品, 并在商品化的结晶试剂盒发现两个可获得 AcmX 晶体的条件.

蛋白结晶是蛋白分子在三维空间严格有序并且高度对称的堆积^[12]. 通常说来, 用于结晶实验的蛋白样品除了对纯度要求高之外 (SDS-PAGE 显示为均一的蛋白条带), 还对样品的均一性有非常高的要求 (表现为对称均一的单一分子筛洗脱峰). 任何影响蛋白样品均一性的步骤都不利于蛋白晶体的形成. 最初 AcmX 主要以包涵体的形式存在, 为了得到均一性好的蛋白样品, 本研究摒弃了对 AcmX 包涵体变性、复性的制备方法, 因为变性、复性的步骤很难保证所有目标蛋白分子均一的正确折叠, 所以我们倾向于优化培养条件, 引入分子伴侣, 帮助目的蛋白在细胞内表达过程中的正常折叠. 同样道理, 最后得到的 AcmX 样品呈现黄色, 表明有辅因子 FAD 的结合, 但不能保证所有 AcmX 蛋白分子都有 FAD 辅因子的结合, 仍有样品

4 讨论

从链霉菌 JCM9888 中发现了两种新型卤化酶 AcmX 和 AcmY, 可能催化在腺苷碱基特定位置的

不均一的风险,采用外加 1 mM 的 FAD 辅因子(浓度是已报道的卤化酶结合 FAD 的结合常数平均值的 10 倍),尽量实现所有 AcmX 分子都有 FAD 的结合,维持样品的均一性.所有这些步骤的共同目的是最大程度地维持蛋白样品的均一性,增大蛋白分子在三维方向严格有序堆积的可能,即促进蛋白晶体的形成.

在研究中,发现低浓度(0.1g/L)的阿拉伯糖只能诱导分子伴侣蛋白的低水平表达,帮助目标蛋白 AcmX 折叠的能力有限,在细胞破碎离心的沉淀中仍可见 AcmX 的包涵体;提高阿拉伯糖的浓度到 0.3g/L,分子伴侣蛋白的表达显著升高,对目标蛋白的正确折叠产生更加有效的作用.但这并不意味着分子伴侣蛋白的表达量可不受限制.过高的分子伴侣表达量,除了与目标蛋白竞争蛋白合成的资源外,还会与目标蛋白相互结合而一同被洗脱,为后续的纯化带来困难.因此在使用分子伴侣、目标蛋白共表达系统时,应控制分子伴侣蛋白表达量,找到一个既有利于目标蛋白的折叠又不会过分影响目标蛋白纯化的平衡点.

通过构建和优化适当的表达系统和纯化步骤,我们从目标蛋白 AcmX 的包涵体进步到高质量的活性蛋白样品,将 AcmX 蛋白样品用于结晶,已发现 AcmX 的两个结晶条件,其中一个结晶条件产生的晶体质量较好,可用于 X-射线的衍射实验.为了提高晶体的质量,可进一步提高蛋白样品的均一性.我们发现目的条带的下方有一些分子量较低的蛋白条带,暗示可能发生了 AcmX 的降解,影响了晶体的生长,在后续实验中将加入适当的蛋白酶抑制剂,减少目标蛋白的降解;或从相反的角度,在蛋白样品里加入微量的蛋白酶,有目的地降解位于蛋白表面位置活跃的环状结构,得到稳定的蛋白核心结构,也有可能获得更高质量的晶体^[13,14].

参考文献:

- [1] Smith D R, Gruschow S, and Goss R J. Scope and potential of halogenases in biosynthetic applications [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17: 276.
- [2] van Pee K H, Patallo E P. Flavin-dependent halogenases involved in secondary metabolism in bacteria [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70: 631.
- [3] Williams D H, Bardsley B. The vancomycin group of antibiotics and the fight against resistant bacteria [J]. *Angew Chem Int Edit*, 1999, 38: 1173.
- [4] Pirae M, White, R L, Vining L C. Biosynthesis of the dichloroacetyl component of chloramphenicol in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: genes required for halogenation[J]. *Microbiology*, 2004, 150: 85.
- [5] Sailler B, Glombitza K W. Halogenated phloretols and fucophloretols from the brown alga *Cystophora retroflexa*[J]. *Nat Toxins*, 1999, 7: 57.
- [6] Kerksiek K, Mejillano, M R, Schwartz, R E, *et al.* Interaction of cryptophycin 1 with tubulin and microtubules[J]. *FEBS Lett*, 1995, 377: 59.
- [7] Pereira E R, Belin L, Sancelme M, *et al.* Structure-activity relationships in a series of substituted indolocarbazoles: topoisomerase I and protein kinase C inhibition and antitumoral and antimicrobial properties[J]. *J Med Chem*, 1996, 39: 4471.
- [8] Doroghazi J R, Albright, J C, Goering, A W, *et al.* A roadmap for natural product discovery based on large-scale genomics and metabolomics[J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 963.
- [9] Zhao Q, Wang M, Xu D, *et al.* Metabolic coupling of two small-molecule thiols programs the biosynthesis of lincomycin A [J]. *Nature*, 2015, 518: 115.
- [10] Zhao C, Qi J, Tao W, *et al.* Characterization of biosynthetic genes of ascamycin/dealanylascamycin featuring a 5'-O-sulfonamide moiety in *Streptomyces* sp. JCM9888[J]. *PLoS One*, 2014, 9: e114722.
- [11] 刘继龙,肖智雄,曹洋. 同源建模方法预测蛋白质突变结构的适用性分析[J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2017, 54(3):658.
- [12] Rupp B. *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology* (1st ed) [M]. New York: Garland Science, 2009.
- [13] Dong A, Xu X, Edwards A M, *et al.* In situ proteolysis for protein crystallization and structure determination[J]. *Nat Methods*, 2007, 4: 1019.
- [14] Imada K. Design and Preparation of the Fragment Proteins of the Flagellar Components Suitable for X-Ray Crystal Structure Analysis[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1593: 97.