

万古霉素糖基转移酶 GtfE 的异源表达与体外活性检测

王元希¹, 陈俊升¹, 邵雷¹, 李继安¹, 林惠敏¹, 陈代杰^{2*}(¹上海医药工业研究院 创新药物与制药工艺国家重点实验室, 上海 200040; ²中国医药工业研究总院, 上海 200040)

摘要 为了得到具有糖基转移酶活性的重组蛋白, 从万古霉素产生菌总 DNA 中克隆万古霉素糖基转移酶基因 *gtfE*, 连入 pET-37b 构建表达质粒并转入大肠杆菌 BL21(DE3) 表达, 体外测定纯化后的重组蛋白糖基转移酶活性, 用 HPLC 和 ESI-MS 检测反应产物。结果表明, 重组蛋白具有预期活性, 可以催化尿苷二磷酸葡萄糖与万古霉素苷元的糖基化反应。本研究为获得糖基多样性的万古霉素奠定理论基础。

关键词 万古霉素; 生物合成; 糖基转移酶; 异源表达; 体外转糖反应

中图分类号 Q786 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2013)03-0272-05

Heterologous expression and *in vitro* activity of vancomycin glycosyltransferase GtfEWANG Yuanxi¹, CHEN Junsheng¹, SHAO Lei¹, LI Ji'an¹, LIN Huimin¹, CHEN Daijie^{2*}¹State Key Laboratory of New Drug & Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040;²China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China

Abstract Recombinant protein of vancomycin glycosyltransferase, GtfE, was obtained by gene cloning and heterologous expression. Gene *gtfE* was amplified from the genomic DNA of vancomycin producing strain and ligated into expression vector pET-37b, the recombinant plasmid GtfE/pET-37b was transformed into *E. coli* BL21(DE3). The product of *in vitro* glucosylation reaction catalyzed by purified GtfE was isolated and identified by HPLC and ESI-MS, respectively. The assay indicated that the recombinant protein GtfE had expected glucosylation activity to transfer uridine 5'-diphosphoglucose to the vancomycin aglycone. This study laid the foundation for producing glycosyl diversity of vancomycin.

Key words vancomycin; biosynthesis; glycosyltransferase; heterologous expression; *in vitro* glycosylation reaction

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81072557, 81172962), and China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. 2012ZX09201101-008)

万古霉素作为临床上使用的第 1 个糖肽类抗生素, 可以抑制细菌肽聚糖形成过程中所需的转糖苷作用和转肽作用的最后步骤, 从而导致细菌细胞的溶解。其能够治疗由耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)或耐甲氧西林表皮葡萄球菌(MRSE), 肠球菌属细菌, 难辨梭状芽孢杆菌等引起的各种感染, 被誉为“对抗耐药菌感染的最后一道防线”^[1-2]。万古霉素是由东方拟无枝酸菌

(*Amycolatopsis orientalis*) 产生的糖肽类抗生素。该抗生素由非核糖体合成多肽(NRPS)途径合成环肽骨架, 并经糖基化等后修饰步骤生物合成。糖基转移酶是万古霉素糖基化过程中的关键酶, 催化核糖二磷酸糖(NDP-sugar)和苷元的反应^[3]。在万古霉素生物合成途径中, *gtfE* 负责催化活性葡萄糖连接至万古霉素苷元, *gtfD* 负责催化活性氨基糖连接至去万古糖胺万古霉素^[4-7]

* 收稿日期 2013-01-16 通信作者 Tel: 021-62479808-703 E-mail: hccb001@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81072557, No. 81172962); 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(No. 2012ZX09201101-008)

(见图1)。本文从万古霉素产生菌中克隆了 *gtfE* 基因,构建原核表达质粒,在大肠杆菌中表达并纯化重组蛋白,建立该重组蛋白体外催化万古霉

素苷元糖基化的方法,为获得糖基多样性的万古霉素奠定了基础。

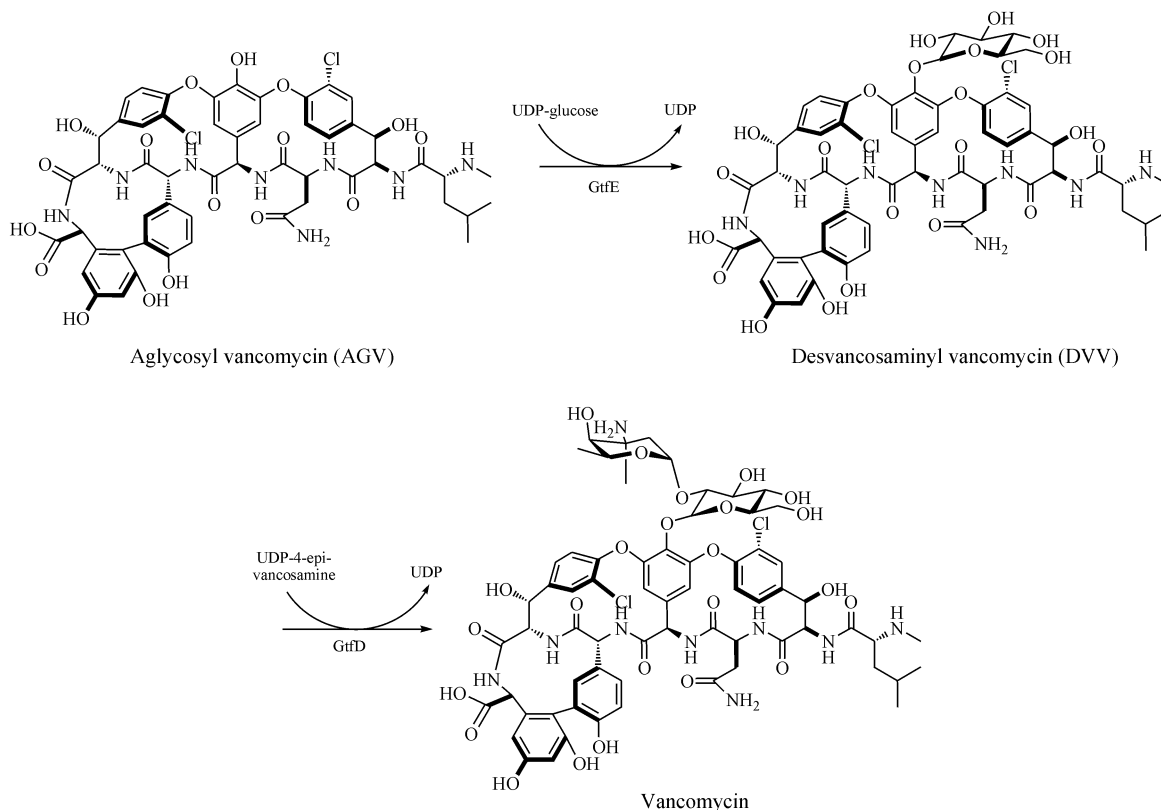


Figure 1 Reaction pathway of vancomycin glycosylation

1 材料

1.1 菌种与质粒

E. coli DH5 α 、*E. coli* BL 21 (DE3)、pET-37b、枯草芽孢杆菌、敏感型金黄色葡萄糖菌 ATCC25923 和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 ATCC43300 由上海医药工业研究院生物部保藏。

1.2 试剂

万古霉素,万古霉素苷元,去万古糖胺万古霉素对照品(上海来益生物药物研发中心);尿苷二磷酸葡萄糖(uridine 5'-diphosphoglucose, 美国 Sigma 公司);限制性内切酶等其他分子生物学试剂购自大连宝生物公司;亲和色谱树脂 Ni-NTA Agarose(德国 Qiagen 公司)。

1.3 仪器

MJ Mini PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);2998 高效液相色谱仪, YA019 Q-TOF 质谱仪(美国 Water 公司)。测序:英潍捷基(上海)贸易有限公司。

2 方法

2.1 *gtfE* 基因的克隆与表达质粒的构建

提取产万古霉素东方拟无枝酸菌 HCCB10007 基因组 DNA,作为 PCR 反应模板,使用引物(上游引物:5'-AAA CATATG CGTGTGTTGTTGTCGACC-3',划线处为 *Nde* I 酶切位点;下游引物:5'-AAA AAGCTT GCGGGAACGCGGGCTG-3',划线处为 *Hind* III 酶切位点)扩增 *gtfE* 基因。PCR 程序为:98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,65 $^{\circ}$ C 复性 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。将 PCR 产物回收后克隆入 pSP72 载体,得到重组克隆质粒 pSP72/*gtfE*,送测序并比对结果。使用 *Nde* I 和 *Hind* III 将 *gtfE* 基因片段自 pSP72/*gtfE* 切出,连入具有相同酶切位点的 pET-37b 载体,得到重组表达质粒 pYX-0110-27(图2)。使用 *Hind* III 单酶切和 *Nde* I/*Hind* III 双酶切验证质粒 pYX-0110-27 后,将其转入 *E. coli* BL21 (DE3),得到表达融合多聚组

氨酸标签 GtfE 蛋白的基因工程菌株 BL21 (DE3)/*gtfE*。

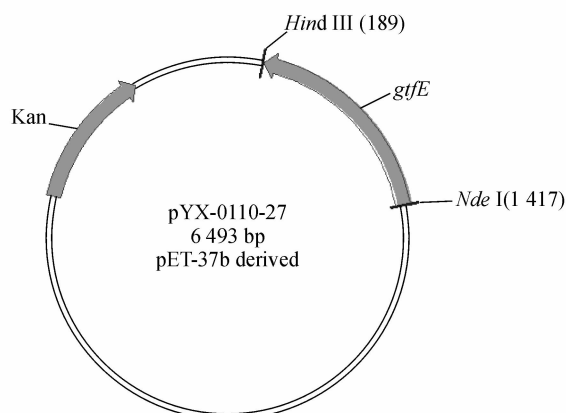


Figure 2 Plasmid map of pYX-0110-27

2.2 重组蛋白表达及表达条件的优化

挑取 BL21 (DE3)/*gtfE* 单菌落,接种至含 100 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基 5 mL 中,于 250 r/min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后,1% 接种于含有相同浓度卡那霉素的 LB 液体培养基 50 mL 中,于 250 r/min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 A_{600} 在 0.5 ~ 1.0 时进行诱导。加入 IPTG 使得终浓度为 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mmol/L, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜诱导后离心收集菌体。将洗涤后的菌体重悬于破菌缓冲液 [20 mmol/L Tris (pH 8.0), 300 mmol/L NaCl] 中,经 2 mg/mL 溶菌酶消化及超声破菌后,于 10 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 1 h, SDS-PAGE 蛋白电泳分析上清液中重组蛋白的可溶性表达量。

2.3 重组蛋白的纯化与电泳鉴定

种子液按 1% 比例接种于含 100 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基 1.6 L 中,按“2.2”节得到的较优 IPTG 浓度诱导蛋白表达。收集得到的菌体用破菌缓冲液重悬至 30 mL,破菌处理后,离心取上清液,依照 Ni-NTA Agarose 的产品说明书纯化重组蛋白。将吸附有目的蛋白的树脂装柱后,用 50, 100, 150, 200 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱^[8],合并含有目的蛋白的洗脱液,透析除去咪唑,超滤浓缩后以 Bradford 法测定蛋白浓度。用 SDS-PAGE 电泳检测纯化后目的蛋白的大小及纯度。

2.4 重组蛋白体外万古霉素苷元转糖活性的检测

初始反应体系 300 μL 中,底物终浓度分别为万古霉素苷元 (AGV) 0.2 mmol/L, 尿苷二磷酸葡萄糖 (UDPG) 0.6 mmol/L, 牛血清清蛋白 (BSA)

1 mg/mL, Tris-HCl (pH 9.0) 50 mmol/L, DTT 5 mmol/L, 反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。加入 GtfE 蛋白至 1.16 $\mu\text{mol/L}$ 开始反应, LC-MS 检测底物与转化产物。优化万古霉素苷元体外转糖反应条件,温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 时,考察 pH 在 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 条件下的转化率; pH 为 9.0 时,考察温度在 25 $^{\circ}\text{C}$, 28 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的转化率。

2.5 万古霉素苷元及其糖基化产物的抗菌活性测定

将枯草芽孢杆菌与金黄色葡萄球菌 ATCC25923 制成菌悬液,取适量到 40 ~ 50 $^{\circ}\text{C}$ 的 LB 培养基中,混匀倒平板。将万古霉素、万古霉素苷元及去万古糖胺万古霉素对照品,用无菌水配制成 1 mg/mL 水溶液,分别取 10 μL 于灭菌纸片平铺到平板上,考察其抑菌圈大小。按照美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 准则下,使用常量稀释液体培养法测定万古霉素、万古霉素苷元及去万古糖胺万古霉素对于以耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (ATCC43300), 敏感型金黄色葡萄糖菌 (ATCC25923) 的最低抑菌浓度 (MIC)。将化合物样品连续稀释在无菌玻璃试管中的 Mueller-Hinton 培养液内,然后按每管 5×10^5 cfu/mL 接种,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,次日测定 MIC。

3 结果

3.1 *gtfE* 基因的克隆及其表达质粒的构建与验证

以产万古霉素东方拟无枝酸菌 HCCB10007 总 DNA 为模板 PCR 扩增,得到约 1.2 kb 条带,回收后连入 pSP72 质粒,测序结果表明克隆片段序列与预期完全同源 (GenBank: HQ679900.1), 将表达酶基因片段连入 pET-37b 质粒构建 pYX-0110-27 阳性表达质粒。分别用 *Hind* III 单酶切验证和 *Nde* I、*Hind* III 双酶切,双酶切后电泳检测于 5.3 kb 和 1.2 kb 处出现条带; *Hind* III 单酶切后于 6.5 kb 处出现条带 (图 3)。所有条带大小符合预期,表达质粒构建正确。

3.2 GtfE 的表达及表达条件的优化

使用 SDS-PAGE 蛋白质电泳检测 GtfE 的可溶性表达。在诱导前重组菌株表达目的蛋白的量较少。在 A_{600} 达到 0.6 左右时加入 IPTG, 12 h 后收集菌体检测目的蛋白表达量。结果表明, IPTG 终浓度在 0.01 ~ 1.0 mmol/L 范围内,对目的蛋白表达影响不大 (图 4-A)。故选择 IPTG 终

浓度为 0.01 mmol/L 进行蛋白诱导表达。

3.3 重组蛋白的纯化与鉴定

吸附有目的蛋白的 Ni-NTA Agarose 树脂装柱后经 50 mmol/L 咪唑缓冲液目的蛋白即可被洗脱。使用 100 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱时,可得纯度较高的目的蛋白。收集并透析洗脱液,超滤浓缩后,以 Bradford 法测定蛋白质量浓度为 2.96 mg/mL。用 SDS-PAGE 电泳检测纯化后目的蛋白的相对分子质量及纯度。结果表明,纯化的重组蛋白产物大小在 43 kD 左右,与预期相符(图 4-B)。

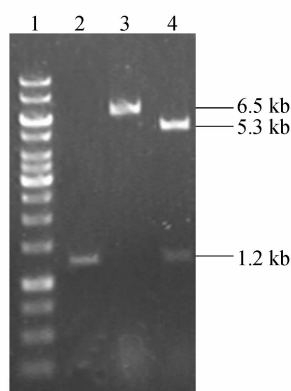


Figure 3 Analysis of construction of pXY-0110-27

1: DNA marker; 2: PCR product of *gtFE*; 3: Digested by *Hind* III; 4: Digested by *Nde* I and *Hind* III

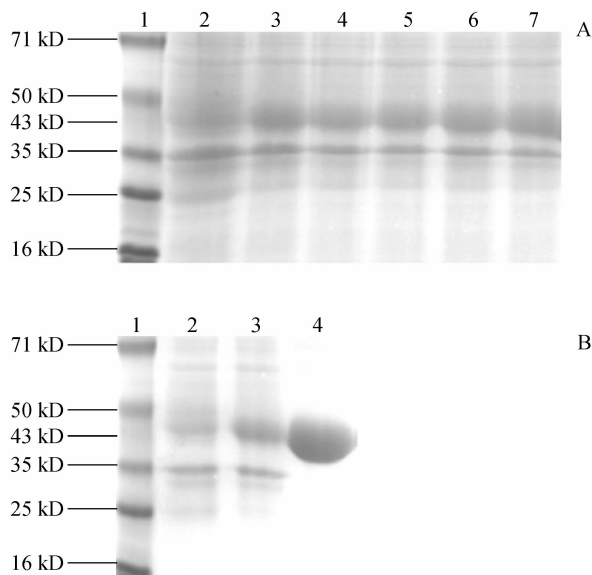


Figure 4 SDS-PAGE analysis of the GtFE expression

A: 1. Marker PM0032; 2. Total protein of BL21 (DE3) cell without induction; 3-7. Total protein of BL21 (DE3) cells induced by 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mmol/L IPTG, respectively; B: 1. Marker PM0032; 2. Total protein of BL21 (DE3) cell without induction; 3. Total protein of BL21 (DE3) cells induced by IPTG; 4. GtFE purified by Ni-NTA agarose

3.4 重组蛋白活性

使用高效液相色谱检测重组蛋白体外万古霉素苷元转糖活性反应体系。结果表明,万古霉素苷元在万古葡萄糖基转移酶 GtFE 的作用下能够转化尿苷二磷酸葡萄糖,得到的反应产物在 200 ~ 210 nm 与 281 nm 处有强紫外吸收,该产物的保留时间和紫外特征吸收与去万古糖胺万古霉素标准品特征一致。收集反应产物经 ESI-MS 检测表明,反应产物加 H 峰: m/z 1 305;加 Na 峰: m/z 1 327,确定相对分子质量为 1 304,与去万古糖胺万古霉素相对分子质量一致(图 5)。同时,初步考察 GtFE 体外转糖酶催化反应条件的结果表明,pH 9.0 和温度 37 °C 的初始酶反应条件为最优。

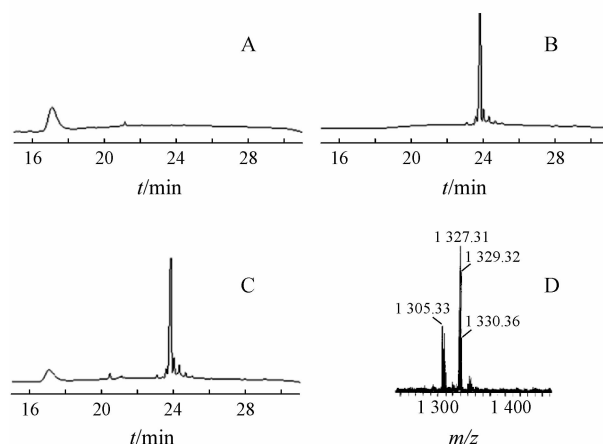


Figure 5 HPLC and ESI-MS analysis of conversion of aglycosyl vancomycin to desvancosaminyl vancomycin

A: Standard of desvancosaminyl vancomycin; B: Conversion system without GtFE; C: Conversion system with uridine 5'-diphosphoglucose; D: ESI-MS analysis of desvancosaminyl vancomycin

3.5 万古霉素苷元及其糖基化产物的抗菌活性

抗菌活性测定结果表明,万古霉素与万古霉素苷元抑菌活性相当,且两者活性均优于去万古糖胺万古霉素(图 6)。常量稀释液体培养法测得万古霉素抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(ATCC43300)和敏感型金黄色葡萄球菌(ATCC25923)的 MIC 分别为 2 和 0.5 $\mu\text{g/mL}$,万古霉素苷元对上述细菌的 MIC 均为 2 $\mu\text{g/mL}$,去万古糖胺万古霉素对上述细菌的 MIC 分别为 4 和 8 $\mu\text{g/mL}$ 。

4 讨论

糖肽类抗生素是一类抗革兰阳性细菌相关的重要抗生素,其基本结构中均含有糖基配体结构。阐明糖肽类抗生素生物合成途径中的糖基

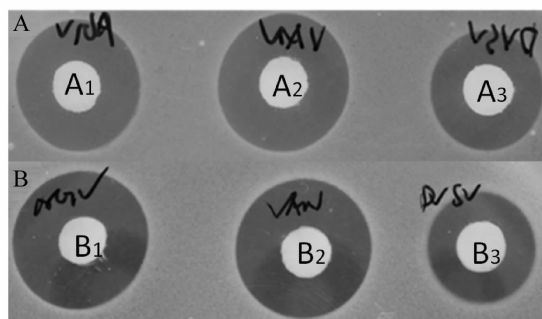


Figure 6 Antimicrobial activity determination of aglycosyl vancomycin, vancomycin and desvancosaminyl vancomycin

A: *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (A₁: aglycosyl vancomycin, A₂: vancomycin, A₃: desvancosaminyl vancomycin); B: *Bacillus subtilis* (B₁: aglycosyl vancomycin, B₂: vancomycin, B₃: desvancosaminyl vancomycin)

化机制是当前该领域研究的重点之一,也是基于组合生物合成产生糖基配体多样化杂合抗生素的基础。由于天然产物结构的复杂性,通过化学合成方法改变其糖基配体结构比较困难,糖基转移酶作为用以获得具有糖基多样性新型化合物的一种新工具受到重视^[9-10]。万古霉素目前为临床上治疗 MRSA 引起感染的首选药物,其糖基侧链在万古霉素抗菌活性与药物的水溶性等方面都起着重要作用。本研究异源表达了万古霉素生物合成途径中的糖基转移酶,并在体外实现了酶催化万古霉素苷元的葡萄糖基化。鉴于很多糖基转移酶都具有底物选择的宽泛性,可以尝试不同苷元与不同糖基配体之间的体外酶催化反应,从而获得多样性的糖肽类杂合抗生素。在此基础上可以尝试利用此糖基转移酶实现其他肽环结构的糖基化,从而达到获得杂合抗生素的目的。本研究不但验证了 GtfE 在万古霉素生物合成途径中的糖基转移酶功能,而且成功尝试了体外酶催化转糖基反应测活的方法,这为利用

GtfE 糖基转移酶获得相关杂合抗生素的工作打下了基础。

参考文献

- [1] Li TL, Liu YC, Lyu SY. Combining biocatalysis and chemoselective chemistries for glycopeptide antibiotics modification[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2012, **16**(1/2): 170–178.
- [2] Gantt RW, Peltier-Pain P, Cournoyer WJ, et al. Using simple donors to drive the equilibria of glycosyltransferase-catalyzed reactions[J]. *Nat Chem Biol*, 2011, **7**(10): 685–691.
- [3] Hubbard BK, Walsh CT. Vancomycin assembly: nature's way [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003, **42**(7): 730–765.
- [4] Losey HC, Jiang J, Biggins JB, et al. Incorporation of glucose analogs by GtfE and GtfD from the vancomycin biosynthetic pathway to generate variant glycopeptides [J]. *Chem Biol*, 2002, **9**(12): 1305–1314.
- [5] Losey HC, Pecuh MW, Chen Z, et al. Tandem action of glycosyltransferases in the maturation of vancomycin and teicoplanin aglycones: novel glycopeptides [J]. *Biochemistry*, 2001, **40**(15): 4745–4755.
- [6] Solenberg PJ, Matsushima P, Stack DR, et al. Production of hybrid glycopeptide antibiotics *in vitro* and in *Streptomyces toyocaensis* [J]. *Chem Biol*, 1997, **4**(3): 195–202.
- [7] Baltz RH, Solenberg PJ, Treadway PJ, et al. Glycopeptides produced using amycolatopsis orientalis glycosyltransferase gtfE; US, 7439322B2 [P]. 2008-10-21.
- [8] Chen JS, Su M, Chen DJ, et al. Cloning, over-expression and *in vitro* activity of aminoglycoside phosphotransferase from clinical MRSA isolates [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2010, **41**(1): 81–85.
- [9] Peltier-Pain P, Marchillo K, Zhou MQ, et al. Natural product disaccharide engineering through tandem glycosyltransferase catalysis reversibility and neoglycosylation [J]. *Org Lett*, 2012, **14**(19): 5086–5089.
- [10] Mendez C, Salas JA. Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds [J]. *Trends Biotechnol*, 2001, **19**(11): 449–456.