

友菌素核苷转移酶 *amiE* 基因的克隆、表达和功能鉴定

胡涛^{1,2} 张光涛² 朱义广² 李苏梅² 张海波² 张改云² 杨晓红^{1*} 鞠建华² 张长生^{2*}

¹南方山地园艺学教育部重点实验室,西南大学园艺园林学院,重庆 400715

²海洋生物资源可持续利用重点实验室,中国科学院海洋微生物研究中心,广东省海洋药物重点实验室,中国科学院南海海洋研究所,广州 510301

摘要: 【目的】克隆和表达二糖核苷类抗生素友菌素生物合成基因簇中的核苷转移酶基因 *amiE*, 并研究 AmiE 的体外催化功能。【方法】采用 PCR 技术将编码 257 个氨基酸的葡萄糖-1-磷酸核苷转移酶基因 *amiE* 克隆到表达载体 pET28a 上, 构建质粒 pCSG4001, 转化入大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中诱导表达; 利用亲和层析分离纯化蛋白 AmiE, 以葡萄糖-1-磷酸和胸腺嘧啶三磷酸 (TTP) 或尿嘧啶三磷酸 (UTP) 为底物, 利用高效液相检测 AmiE 的体外酶活; 以甘露糖-1-磷酸、半乳糖胺-1-磷酸和半乳糖-1-磷酸和 TTP 作为底物, 进一步研究 AmiE 对底物的选择性。【结果】N-末端融合组氨酸标签的 AmiE 蛋白在大肠杆菌中获得了可溶性表达, 通过亲和层析纯化出的 AmiE 能够以 TTP (或 UTP) 和葡萄糖-1-磷酸作为底物, 催化形成胸腺嘧啶二磷酸葡萄糖 (TDP-glucose) 或者尿嘧啶二磷酸葡萄糖 (UDP-glucose), 但对其他三种底物, 无明显催化活性。【结论】大肠杆菌中表达纯化的核苷转移酶 AmiE 能够体外催化形成 TDP-葡萄糖 (或 UDP-葡萄糖), 确证了 AmiE 作为核苷转移酶的催化功能, 同时表明 AmiE 对底物具有一定的选择性。

关键词: 二糖核苷类抗生素, 友菌素, 核苷转移酶, 脱氧糖, 生物合成

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 02-0214-07

友菌素是第一个从自然界中分离得到的二糖核苷类抗生素^[1], 也可由 *Streptomyces vinaceus-drappus* NRRL 2363 生产^[2]。友菌素的主要结构特点是以胞嘧啶为基本骨架, 通过一位氮连接了 2 个脱氧己糖, 四位氨基耦合一分子的对氨基苯甲酸 (*p*-amino benzoic acid) 和一分子的 α -甲基丝氨酸 (图 1-A)。迄今, 已经发现了十几种友菌素的类似物, 它们共同的特点是拥有一个通过 α -(1-4) 糖苷键连接的、由 amosamine 和 amicetose 组成的二糖链 (图 1-A)^[3]。

友菌素具有多种生物活性, 能有效抑制革兰氏阳性和阴性细菌, 尤其对结核杆菌具有很好的抑制作用^[2], 还具有一定的抗病毒功能^[4]。友菌素的主要抗菌作用机制是结合到宿主 23S 核糖体 RNA 的一个非常保守的“肽酰转移酶中心”区域, 从而阻断宿主的蛋白质合成。1994 年, Leviev 等利用点突变和足迹法 (footprinting), 确立了友菌素的结合区域^[5]。科学家们还确定了其他一些抗生素同 30S 和 50S rRNA 的复合物晶体结构, 揭示了这些抗生素所含

基金项目: 国家自然科学基金 (30870060, 31125001); 国家重点基础研究发展计划 (973 项目) (2010CB833805); 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX2-YW-G-065, KZCX2-YW-JC202, KSCX2-EW-G-12); 中国博士后基金 (20090460837); 中国科学院百人计划项目 (08SL111002)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-89023038, E-mail: czhang2006@gmail.com; Tel: +86-23-68251274, E-mail: yangxh2@swu.edu.cn.

作者简介: 胡涛 (1985-) 男, 安徽滁州人, 硕士, 主要研究方向为微生物天然产物生物合成。E-mail: hutao_122@126.com

收稿日期: 2011-11-07; 修回日期: 2011-12-27

的脱氧糖基在与核糖体结合形成复合物时起重要作用^[6-7]。因此, 对于这些抗生素的糖基进行改造, 有可能影响它们同宿主核糖体 RNA 的结合方式, 从而获得新颖药物。近年来, 美国学者 Thorson 等发展了化学-酶学的“糖基随机化”的技术平台^[8], 利用抗生素糖基转移酶的底物普适性进行糖基结构改造^[9-10]。其中, 糖基转移酶的供体糖基底物通常是核苷糖, 在抗生素的生物合成途径中, 糖基合成的起始往往是由核苷转移酶催化, 将葡萄糖-1-磷酸转化为核苷葡萄糖^[11]。

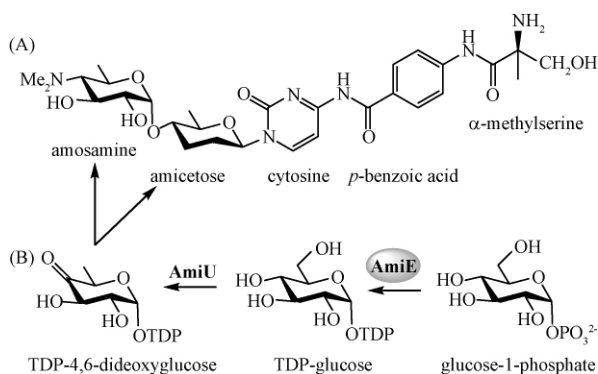


图1 友菌素的化学结构(A)和 AmiE 催化的化学反应(B)

Fig. 1 Chemical structure of amicetin (A) and AmiE-catalyzed chemical reactions (B).

最近, 我们从菌株 *Streptomyces vinaceus-drappus* NRRL 2363 中克隆和鉴定了友菌素生物合成基因簇^[12]。基于生物信息学分析, 我们发现了 8 个基因可能参与友菌素中两个脱氧糖基 amosamine 和 amicetose 的生物合成^[12]。其中, 核苷转移酶 AmiE 可能在两个脱氧己糖合成中起着关键的单糖活化作用(图 1-B), 催化形成 TDP-葡萄糖, 为后续的氨基化、甲基化和脱氧等一系列化学修饰提供基础^[12]。本文报道了核苷转移酶编码基因 *amiE* 的克隆和表达, 验证了核苷转移酶 AmiE 的催化活性和对底物的选择性, 为进一步体外研究 amosamine 和 amicetose 的生物合成提供了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养条件: 大肠杆菌菌株 DH5 α 和 BL21 (DE3), 包含友菌素生物合成基因簇的质粒 pCSG3104 和表达载体 pET28a 均由实验室

保藏, 核苷转移酶基因 *amiE* 的表达质粒 pCSG4001 由本研究构建。大肠杆菌用 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g, 酵母抽提物 5 g, 氯化钠 10 g, 加水至 1 L, pH 7.0)于 37 $^{\circ}$ C 或者 28 $^{\circ}$ C 培养。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶 *Nde*I 和 *Bam*HI, T4-DNA 连接酶, 高保真 DNA 扩增酶 Pyrobest, DNA Marker 和蛋白 Marker 购自 TaRaKa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒购自 Axygen 生物技术有限公司; TTP, UTP, 葡萄糖-1-磷酸, 乳糖-1-磷酸, 半乳糖-1-磷酸、甘露糖-1-磷酸、TDP-葡萄糖和 UDP-葡萄糖购于美国 Sigma 公司, 其他生化试剂为国产或进口分析纯, 抗生素购自国内试剂公司, 使用浓度为氨苄青霉素 (ampicillin) 100 mg/L, 卡那霉素 (kanamycin) 50 mg/L。主要仪器包括: Eppendorf Mastercycler ep 梯度 PCR 仪, Eppendorf 5810R 冷冻离心机, Eppendorf 5418 小型台式高速离心机, 美国 SONICS 公司 VCX-130 超声波破碎仪, 日本日立公司 L-2000 HPLC 高效液相色谱仪, AKTA Purifier 10 蛋白层析系统。

1.2 核苷转移酶基因 *amiE* 的克隆

以包含友菌素生物合成基因簇的 cosmid 质粒 pCSG3104 为模板^[12], 用引物 amiEs (5'-GGTAG CATATGGGGGCAACGAACCCTG-3', *Nde*I) 和 amiEa (5'-TTAAGGATCCTGAGCTGGGGCGTTC-3' *Bam*HI) 扩增出约 0.8 kb 的 *amiE* 片段, 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, PCR 条件如下: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。0.8 kb 的 PCR 片段经 *Nde*I 和 *Bam*HI 双酶切后, 连接入经同样酶切的载体 pET28a, 转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 筛选后获得重组质粒 pCSG4001, 经测序验证包含了正确的 *amiE* 基因, 预计表达出 N-末端融合了 6 个组氨酸的 AmiE 蛋白。

1.3 核苷转移酶基因 *amiE* 的表达和纯化

将重组质粒 pCSG4001 转化入 *E. coli* BL21 (DE3), 挑取单克隆接入 50 mL LB 培养基(含 50 mg/L 卡那霉素), 于 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后, 以 1% 的接种量接入 LB 培养基(1 L, 含 50 mg/L 卡那霉素)中, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 3-4 h, 待 OD_{600} 达到 0.6-0.8 时, 加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.4 mmol/L, 于 28 $^{\circ}$ C 诱导表达 5 h。高速离心收集菌体 (12400 \times g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C), 用 60 mL 缓冲液 A (20 mmol/L NaH₂PO₄ 缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 10

mmol/L 咪唑, pH 7.5) 洗涤菌体 2 遍后, 重悬于 30 mL 缓冲液 A 中, 进行超声波破碎以释放蛋白, 然后高速冷冻低温离心 ($12400 \times g$, 1 h, 4°C) 除去不溶部分。取 15 μL 上清和沉淀样品 100°C 煮沸, 离心后 ($12400 \times g$, 30 min, 4°C) 用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测融合 AmiE 蛋白的表达情况与可溶性, 分离胶浓度为 12%。将可溶性上清部分上样到镍柱 HisTrap HT column (1 mL, GE Healthcare) 上, 采用 AKTA Purifier 10 层析系统来进行蛋白纯化: A 泵为缓冲液 A, B 泵为缓冲液 B (20 mmol/L NaH_2PO_4 缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.5), 走样时间为 100 min, 0–25 min (0% B), 25–50 min (5% B), 50–80 min (5%–100% B), 80–100 min (100% B), 洗脱流速为 1 mL/min, 线性洗脱梯度开始 (50 min) 以 2 mL 为单位收集洗脱液。根据紫外吸收情况和 SDS-PAGE 检测情况, 收集包含融合 AmiE 蛋白的洗脱液, 使用 Vivaspin (20 mL, 10 kDa) 浓缩至 2.5 mL, 经 PD-10 脱盐柱 (GE Healthcare) 脱盐后, 溶解于含 10% 甘油的 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 8.0), 采用 Bradford 方法测定蛋白浓度^[13], 分装保存于 -80°C 备用。

1.4 核苷转移酶 AmiE 的酶催化反应和高效液相检测

采用 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 8.0) 进行 AmiE 的 50 μL 酶促反应, 包含 5 mmol/L 核苷酸底物 (TTP 或 UTP), 10 mmol/L 磷酸单糖 (如葡萄糖-1-磷酸, 乳糖-1-磷酸, 半乳糖-1-磷酸, 甘露糖-1-磷酸等), 2 mmol/L MgCl_2 , 6 $\mu\text{mol/L}$ AmiE, 30°C , 反应 1 h 后, 100°C 煮沸 5 min, 高速离心 ($12400 \times g$, 10 min, 4°C) 后, 取 10 μL 上清进行高效液相 (HPLC) 分析, 检测酶促反应情况, 检测条件为^[14]: 流动相 A 相为 2 mmol/L 甲酸铵溶液, 流动相 B 相为 600 mmol/L 甲酸铵溶液; 流速为 1 mL/min, 紫外检测波长为 254 nm; 走样时间为 25 min, 使用线性甲酸铵溶液 (0%–100% B 相) 进行洗脱, 离子交换色谱柱为 SphereClone SAX 5 μm 250 \times 4.60 mm。

2 结果和分析

2.1 友菌素核苷转移酶基因 *amiE* 的生物信息学分析及其表达质粒的构建

我们成功克隆和鉴定了友菌素的生物合成基因

簇 (GenBank HM748814)^[12], 对该基因簇生物信息学分析发现 *amiE* 基因编码 257 个氨基酸, 与来自 *Thermocrinis albus* DSM 14484 的核苷转移酶 Thal_1465 (GenBank YP_003474221) 最为相似, 氨基酸水平的一致性 (identity) 和相似性 (similarity) 分别为 37% 和 55%, 推测 AmiE 可能具有核苷转移酶的功能。鉴于来自不同细菌的核苷转移酶已经先后获得了三维晶体结构, 如 *Pseudomonas aeruginosa* 的 RmlA^[15], *Salmonella enterica* LT2 的 RmlA^[16], *Escherichia coli* 的 RmlA^[17], 我们利用 ClustalW 在线程序 (EMBL-EBI) 重点分析了 AmiE 与这 3 个蛋白的氨基酸水平的异同 (图 2), 结果发现, 虽然 AmiE 在 C-末端少了 30 多个氨基酸残基 (图 2), 但与核苷转移酶催化活性、底物结合相关的保守氨基酸残基都存在于 AmiE 中 (详见讨论部分), 进一步说明 AmiE 很有可能在友菌素的生物合成中发挥着核苷转移酶的功能, 将葡萄糖-1-磷酸转化为 TDP-葡萄糖 (图 1)。因此, 我们设计 PCR 引物对 *amiE*s 和 *amiE*a, 以质粒 pCSG3104 为模板^[12], PCR 扩增出了约 0.8 kb 的 *amiE* 基因, 克隆入表达载体 pET28a 获得重组质粒 pCSG4001, 经测序验证插入片段包含了正确的 *amiE*。

2.2 重组核苷转移酶 AmiE 的表达和纯化

将重组质粒 pCSG4001 转入 *E. coli* BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导后, AmiE 获得了可溶性表达 (图 3), 经 SDS-PAGE 检测, 其分子量约为 30 kDa 左右, 与预测的 N-末端融合 6 个组氨酸的重组 AmiE 分子量 (29.8 kDa) 一致 (图 3)。采用镍离子金属螯合亲和层析的方法, 使用 AKTA Purifier 10 层析系统对 AmiE 融合蛋白进行了分离纯化。如图 3-A 所示, 低浓度的咪唑 (Buffer B) 能够将非特异性结合到镍柱上的杂蛋白首先洗脱下来, 如出现于 30–40 min 的小 UV 吸收峰。随着咪唑浓度的提高, 呈线性增加时 (50–80 min), AmiE 蛋白被逐渐洗脱下来, 随后的 SDS-PAGE 分析表明 (图 3-B), 与图 3-A 中出现的强 UV 吸收峰一致, 大部分 AmiE 的洗脱时间为 60–70 min。将包含 AmiE 蛋白的组分收集、浓缩和脱盐后, 再次浓缩至 1 mL 左右, 用 Bradford 法^[13] 测定纯化后的 AmiE 蛋白浓度约为 9 g/L ($\sim 300 \mu\text{mol/L}$)。

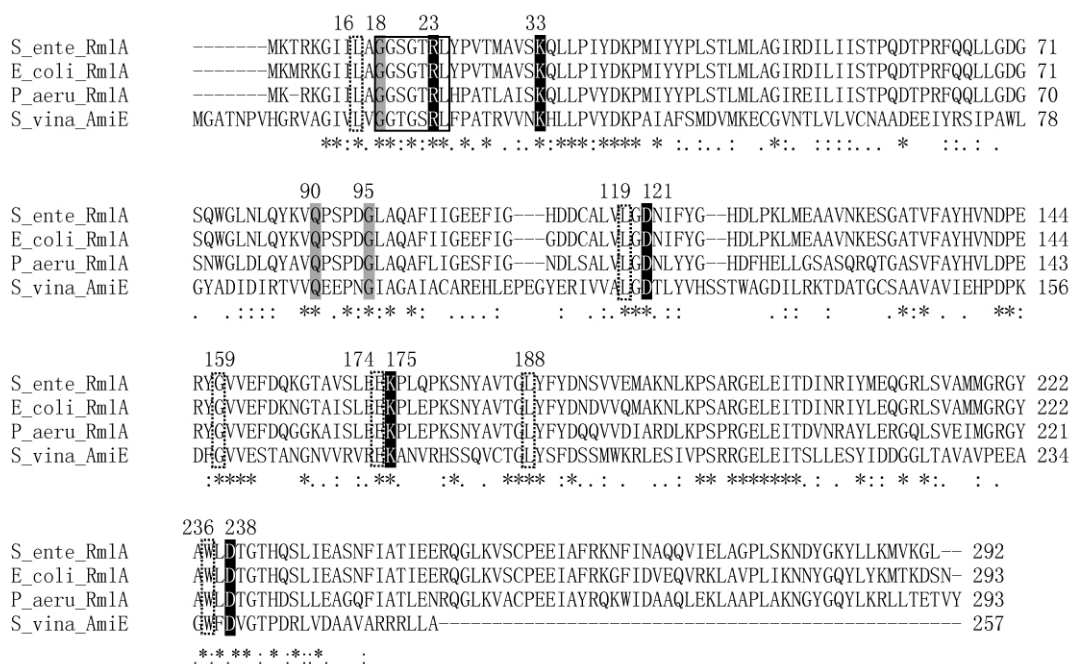


图 2 AmiE 与其它细菌核苷转移酶的比对分析

Fig.2 Alignment of AmiE with nucleotidyltransferases from other bacteria by ClustalW2 program. P_aeru_RmlA (accession no. CAC82197) from *Pseudomonas aeruginosa*; S_ente_RmlA (accession no. CAA40117) from *Salmonella enterica* LT2; E_coli_Rflh (accession no. NP_416543) from *Escherichia coli* MG1655; S_vina_AmiE (accession no. HM748814) from *S. vinaceus-drappus* NRRL 2363. Conserved amino acid residues are highlighted and numbered according to the amino acid sequences of AmiE (see also discussion part).

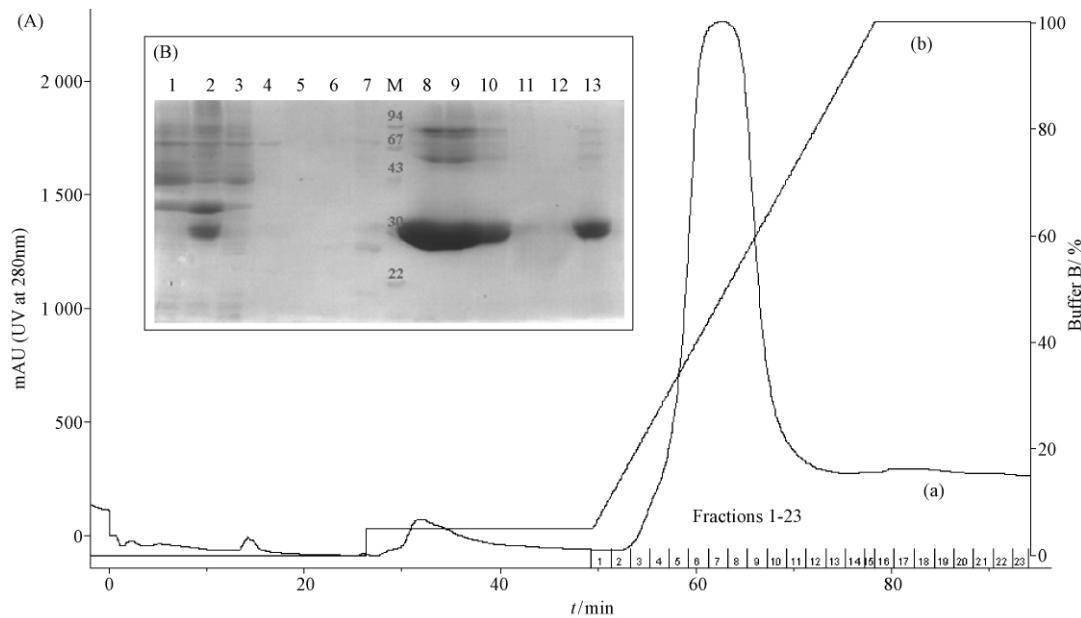


图 3 重组 AmiE 蛋白的亲层析纯化图 (A) 和 SDS-PAGE 分析 (B)

Fig.3 Purification of AmiE by affinity chromatography via AKTA Purifier 10 system (A) and SDS-PAGE analysis (B). (A) Line (a) denotes the UV absorbance (mAU at 280 nm) and line (b) denotes the concentration of buffer B (%). Collected fractions (2 mL each) are also marked. (B) Lane 1, supernatants from control strain *E. coli* BL21 (DE3) /pET28a; lane 2, supernatants from *E. coli* BL21 (DE3) /pCSG4001; lane 3, flow-through after loading onto His-Trap HP column; lanes 4, fraction 1; lane 5, fractions 2; lane 6, fraction 3; lane 7, fraction 4; lane 8, fraction 7; lane 9, fraction 8; lane 10, fraction 9; lane 11, fraction 15; lane 12, fraction 21; lane 13, purified AmiE after desalting and concentration; lane M, protein molecular weight marker.

2.3 重组核苷转移酶 AmiE 的体外功能分析

为了验证 AmiE 的催化功能,我们采用 50 μ L 的酶反应体系,包含 5 mmol/L TTP,10 mmol/L 葡萄糖-1-磷酸,2 mmol/L $MgCl_2$,约 6 μ mol/L AmiE,在缓冲液 Tris-HCl(50 mmol/L,pH 8.0)中于 30 $^{\circ}C$ 反应 1 h,以不添加 AmiE 的同样体系作为反应对照。高效液相(HPLC)分析表明,AmiE 能够催化 TTP 转化为 TDP-葡萄糖(图 4-A),反应产物与 TDP-葡萄糖标准品的保留时间(约为 13 min)一致(图 4-B),而在不加 AmiE 的对照试验中,TTP 无任何变化(图 4-C)。这个结果证明了 AmiE 的确能够在 TTP 的存在时,将葡萄糖-1-磷酸转化为 TDP-葡萄糖(图 1-B),验证了 AmiE 在友菌素的生物合成中起始脱氧糖的生物合成的作用。尽管细菌的核苷转移酶的天然底物是葡萄糖-1-磷酸,但一些细菌的核苷转移酶也能识别非天然底物^[16],因此,我们也测试了 AmiE 是否能将其他单糖-1-磷酸转化为相应的核苷糖。结果表明,在 TTP 和 AmiE 存在的条件下,以半乳糖-1-磷酸(图 4-D)、半乳糖胺-1-磷酸(图 4-E)和甘露糖-1-磷酸(图 4-F)等为底物,没有发现明显的催化反应。同时,我们也测试了 AmiE 是否能识别其他核苷酸,结果发现,AmiE 也能在 UTP 存在的条件下,把葡萄糖-1-磷酸转变为 UDP-葡萄糖(图 4-H),反应产物与 UDP-葡萄糖标准品的保留时间(约为 12.5 min)一致(图 4-G),在不加 AmiE 的对照试验中,UTP 无任何变化(图 4-I)。

3 讨论

糖基对微生物糖苷类抗生素的生物活性具有非常重要的作用,在天然糖苷类抗生素中也存在着多种多样的糖基^[10-11]。通常糖基配体的生物合成由 3 种类型的酶完成:第一类是对 1-磷酸单糖进行活化形成核苷衍生物(通常是 TDP-葡萄糖)的核苷转移酶,第二类是对核苷糖进行脱氧、甲基化、氨基化等多种作用的修饰酶,第三类是负责将修饰后的核苷糖连接到抗生素母核分子上的糖基转移酶^[10-11]。

友菌素属于二糖核苷类抗生素,与此对应,我们在友菌素的生物合成基因簇中发现了一系列与糖基合成相关的基因,其中,amiE 编码了一个核苷转移酶^[12]。与 3 个已获得三维晶体结构的细菌核苷转移酶相比(图 2)^[15-17],AmiE 中存在着核苷转移酶

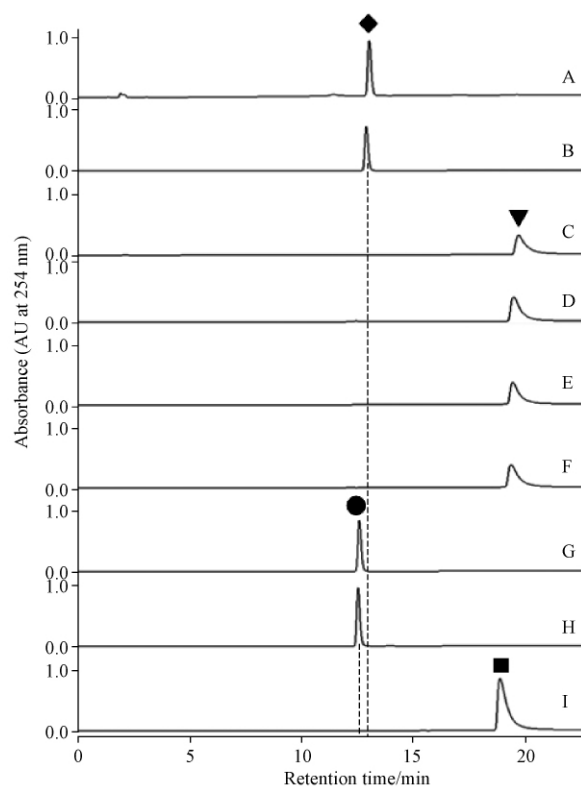


图 4 AmiE 酶催化反应的高效液相分析

Fig. 4 HPLC analyses of AmiE-catalyzed reactions. A: glucose-1-phosphate + TTP + AmiE; B: TDP-glucose standard (◆); C: glucose-1-phosphate + TTP (▼), without AmiE; D: galactose-1-phosphate + TTP + AmiE; E: galactosamine-1-phosphate + TTP + AmiE; F: mannose-1-phosphate + TTP + AmiE; G: UDP-glucose standard (●); H: glucose-1-phosphate + UTP + AmiE; I: glucose-1-phosphate + UTP (■), without AmiE.

的共有保守结构域(G)GXGXR(L)(图 2,实框)。根据 *P. aeruginosa* 的 RmlA 与底物结合的复合晶体结构^[15],保守的氨基酸残基(参照 AmiE 编号,黑底白字,图 1)R23、K33、D121、K175 和 D238 在核苷转移酶的催化活性中发挥着重要作用^[15],而保守的氨基酸残基(灰底,图 1)Q90、G95 和 G18 则和胸腺嘧啶的结合紧密相关。葡萄糖与核苷转移酶的结合涉及到了氢键的形成和范德华力,与此相关的保守氨基酸残基(虚框,图 1)包括 L16、L119、G159、E174、L188 和 W236 等。因此,通过生物信息学分析,AmiE 中与核苷转移酶的催化活性和底物结合相关的保守氨基酸残基都能一一对应。

Thorson 等的研究表明, *Salmonella enterica* LT2 的 RmlA 具有一定的底物宽泛性^[16]。除了催化葡萄糖-1-磷酸和 TTP 生成 TDP-葡萄糖之外,还能够以

其他近 20 个 1-磷酸单糖为底物,包括半乳糖-1-磷酸、半乳糖胺-1-磷酸和甘露糖-1-磷酸等,和 TTP 作用催化形成相应的核苷糖^[16],这些核苷糖随后被直接作为各种糖基转移酶的底物,构建了系列糖基结构多样化的天然产物库^[9-10]。我们也通过体外生化实验确证了 *AmiE* 的生物学功能,证实了 *AmiE* 能够利用 TTP 或者 UTP 做为底物,催化葡萄糖-1-磷酸形成 TDP-葡萄糖或者 UDP-葡萄糖(图 4),但与 *S. enterica* LT2 的 *RmlA* 相比,*AmiE* 表现出了一定的底物选择性,不能够识别半乳糖-1-磷酸、半乳糖胺-1-磷酸和甘露糖-1-磷酸等非天然底物。尽管如此,通过本文的研究,我们成功克隆和表达了友菌素的脱氧糖基生物合成中的第一个酶-核苷转移酶 *AmiE*,并利用体外生化实验阐明了 *AmiE* 的功能,为研究友菌素中的二糖侧链的生物合成奠定了基础。

参考文献

- [1] McCormick MH, Hoehn MM. Isolation of a new antibiotic from *Streptomyces fasciculatus* nov. sp. . *Antibiotics and Chemotherapy*, 1953, 3: 718-720.
- [2] DeBoer C, Caron EL, Hinman JW. Amicetin, A new streptomyces antibiotic. *Journal of American Chemical Society*, 1953, 75(2): 499-500.
- [3] Haneda K, Shinose M, Seino A, Tabata N, Tomoda H, Iwai Y, Omura S. Cytosaminomycins, new anticoccidial agents produced by *Streptomyces* sp. KO-8119. I. Taxonomy, production, isolation and physico-chemical and biological properties. *Journal of Antibiotics*, 1994, 47(7): 774-781.
- [4] Carrasco L, Vazquez D. Molecular bases for the action and selectivity of nucleoside antibiotics. *Medicinal Research Reviews*, 1984, 4(4): 471-512.
- [5] Leviev IG, Rodriguez-Fonseca C, Phan H, Garrett RA, Heilek G, Noller HF, Mankin AS. A conserved secondary structural motif in 23S rRNA defines the site of interaction of amicetin, a universal inhibitor of peptide bond formation. *EMBO Journal*, 1994, 13(7): 1682-1686.
- [6] Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, 2000, 407(6802): 340-348.
- [7] Tu D, Blaha G, Moore PB, Steitz TA. Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance. *Cell*, 2005, 121(2): 257-270.
- [8] Fu X, Albermann C, Jiang J, Liao J, Zhang C, Thorson JS. Antibiotic optimization via *in vitro* glycorandomization. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(12): 1467-1469.
- [9] Zhang C, Griffith BR, Fu Q, Albermann C, Fu X, Lee IK, Li L, Thorson JS. Exploiting the reversibility of natural product glycosyltransferase-catalyzed reactions. *Science*, 2006, 313(5791): 1291-1294.
- [10] Gantt RW, Peltier-Pain P, Thorson JS. Enzymatic methods for glyco (diversification/randomization) of drugs and small molecules. *Natural Product Reports*, 2011, 28(11): 1811-1853.
- [11] Thibodeaux CJ, Melancon CE, Liu HW. Natural-product sugar biosynthesis and enzymatic glycodiversification. *Angewandte Chemie International Edition English*, 2008, 47(51): 9814-9859.
- [12] Zhang G, Zhang H, Li S, Xiao J, Zhang G, Zhu Y, Niu S, Ju J, Zhang C. Characterization of the amicetin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces vinaceus-drappus* NRRL 2363 implicates two alternative strategies for amide bond formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, doi: 10.1128/AEM.07185-11.
- [13] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(248-254).
- [14] Pattathil S, Harper AD, Bar-Peled M. Biosynthesis of UDP-xylose: characterization of membrane-bound AtUxs2. *Planta*, 2005, 221(4): 538-548.
- [15] Blankenfeldt W, Asuncion M, Lam JS, Naismith JH. The structural basis of the catalytic mechanism and regulation of glucose-1-phosphate thymidyltransferase (*RmlA*). *EMBO Journal*, 2000, 19(24): 6652-6663.
- [16] Barton WA, Lesniak J, Biggins JB, Jeffrey PD, Jiang J, Rajashankar KR, Thorson JS, Nikolov DB. Structure, mechanism and engineering of a nucleotidyltransferase as a first step toward glycorandomization. *Nature Structural Biology*, 2001, 8(6): 545-551.
- [17] Zuccotti S, Zanardi D, Rosano C, Sturla L, Tonetti M, Bolognesi M. Kinetic and crystallographic analyses support a sequential-ordered bi bi catalytic mechanism for *Escherichia coli* glucose-1-phosphate thymidyltransferase. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 313(4): 831-843.

Cloning , expression and characterization of the nucleotidyltransferase gene *-amiE* in amicetin biosynthesis

Tao Hu^{1,2} , Guangtao Zhang² , Yiguang Zhu² , Sumei Li² , Haibo Zhang² , Gaiyun Zhang² , Xiaohong Yang^{1*} , Jianhua Ju² , Changsheng Zhang^{2*}

¹ Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions , Ministry of Education , College of Horticulture and Landscape Architecture , Southwest University , Chongqing 400715 , China

² CAS Key Laboratory of Marine Bio-resource Sustainable Utilization , RNAM Center of Marine Microbiology , Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica , South China Sea Institute of Oceanology , Chinese Academy of Sciences , Guangzhou 510301 , China

Abstract: [Objective] The aim of this study is to clone and express the nucleotidyltransferase encoding gene *-amiE* from the biosynthetic gene cluster of amicetin , a disaccharide nucleoside antibiotic , and to characterize AmiE *in vitro*. [Methods] The *amiE* , encoding a nucleotidyltransferase of 257 amino acid , was PCR amplified and cloned into pET28a , resulting in the plasmid pCSG4001 , which was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for expressing N-(His)₆-tag AmiE. The recombinant AmiE was purified by affinity chromatography via AKTA Purifier 10 system. The AmiE-catalyzed reactions were performed using TTP (or UTP) and glucose-1-phosphate as substrates. The enzyme assays were analyzed by HPLC; the substrate flexibility of AmiE was probed with three unnatural sugars-1-phosphate , including galactose-1-phosphate , galactosamine-1-phosphate and mannos-1-phosphate. [Results] The N-(His)₆-tag AmiE was expressed in *E. coli* in soluble form and was successfully purified via Ni₂⁺ mediated affinity chromatography; *in vitro* biochemical experiments showed that AmiE could convert glucose-1-phosphate into TDP-glucose (or UDP-glucose) in the presence of TTP (or UTP). However , galactose-1-phosphate , galactosamine-1-phosphate and mannos-1-phosphate were not substrates of AmiE. [Conclusion] The *amiE* was successfully cloned and expressed in *E. coli* , and the purified AmiE was biochemically confirmed to be a nucleotidyltransferase in amicetin biosynthesis pathway.

Keywords: disaccharide nucleoside antibiotics , amicetin , nucleotidyltransferase , deoxysugar , biosynthesis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Science Foundation of China (30870060 , 31125001) , by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2010CB833805) , by the Funds of the Chinese Academy of Sciences for Key Topics in Innovation Engineering (KZCX2-YW-JC202 , KZCX2-YW-G-065 , KSCX2-EW-G-12) , by the China Postdoctoral Science Foundation (20090460837) and by the '100 Talents Project' of Chinese Academy of Sciences (08SL111002)

* Corresponding authors. Tel: +86-20-89023038 , E-mail: czhang2006@gmail.com; Tel: +86-23-68251772 , E-mail: yangxh2@swu.edu.cn

Received: 7 November 2011 / Revised: 27 December 2011