

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(11):1415-1420; 4 November 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

一种新的抗菌药物靶标蛋白质(3,4-二羟基-2-丁酮-4-磷酸合成酶)的克隆、表达、纯化及酶活性鉴定

金丽, 周华, 赵沙沙, 杨伟, 牛司强, 汪德强*

重庆医科大学检验医学院, 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016

摘要: 【目的】核黄素(vitamin B12, riboflavin)是辅因子黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)和黄素单核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)的前体物,对生物体的生物合成至关重要。如果细菌不能够从外界摄取足够的黄素(flavin)就需要自身合成核黄素以维持菌体的生存与增殖。3,4-二羟基-2-丁酮-4-磷酸合成酶(3,4-Dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase, DHBPs)为核黄素生物合成途径中关键酶之一。在镁离子存在的情况下, DHBPs将5-磷酸核酮糖(ribulose-5-phosphate, Ru5P)转换成3,4-二羟基-2-丁酮-4-磷酸(3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate, DHBP)和甲酸盐(formate),生成的DHBP为核黄素合成的必需原料之一。人类没有合成核黄素的相关途径,因此细菌参与合成核黄素的DHBPs等相关酶就有望成为抗菌药物作用的靶位点。本课题通过对肺炎链球菌的DHBPs进行克隆表达纯化与酶学性质鉴定,为开展其三维结构的解析和抗菌药物设计提供重要的工作基础。【方法】利用PCR技术扩增DHBPs基因,构建重组表达载体pW28-DHBPs。将其转入大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中表达,用Ni离子亲和层析及离子交换(DEAE)纯化获得有活性的DHBPs后,进行酶学性质鉴定。【结果】酶切和测序证实成功构建了质粒pW28-DHBPs,在*E. coli* BL21中表达了可溶性DHBPs,纯化后获得了纯度为95%的靶蛋白质,经分子筛分析DHBPs在溶液中以二聚体形式存在。对DHBPs进行酶学性质分析表明,在25℃、pH为7.5和Mg²⁺存在的情况下,DHBPs具有将5-磷酸核酮糖转换成DHBP和甲酸盐的活性。【结论】第一次成功克隆并在*E. coli* BL21中表达了一种肺炎链球菌合成核黄素的相关酶—DHBPs,纯化后的重组DHBPs具有较好的5-磷酸核酮糖分解活性,这为解析其三维结构和基于结构进行的新一代抗菌药物设计提供重要的工作基础。

关键词: 肺炎链球菌, 3,4-二羟基-2-丁酮-4-磷酸合成酶(3,4-Dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase, DHBPs), 抗菌药物, 酶活性

中图分类号: Q816 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2012)11-1415-06

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*),是一种常见的革兰氏阳性条件致病菌,可引起肺炎、中耳炎、菌血症、脑膜炎等严重疾病,在全球有较高的发病率和死亡率^[1]。目前市场上缺乏针对肺炎链

球菌感染的特效抗生素,临床长期使用青霉素、红霉素等广谱抗生素来控制肺炎链球菌感染,已经导致严重的耐药性(包括多重耐药),是临床感染控制中非常棘手的难题。更加严重的是有关耐万古霉素的

基金项目: 国家自然科学基金(30970563)

* 通信作者: Tel: +86-23-68486780; E-mail: wangd@ustc.edu

作者简介: 金丽(1986-),女,湖北十堰人,硕士研究生,致力于病原微生物蛋白质结构与功能及致病机制研究。E-mail: lijn2011@126.com

收稿日期: 2012-05-18; 修回日期: 2012-07-13

肺炎链球菌株已有报道,这意味着对抗肺炎链球菌现有的最后防线正在丧失^[2-3],因此研究开发新的抗菌药物迫在眉睫。核黄素是辅因子黄素腺嘌呤二核苷酸和黄素单核苷酸的前体物^[4-6],对生物体的生物合成至关重要。研究发现许多革兰氏阳性细菌[如:肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)]、阴性细菌[如:鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)]和真菌[白假丝酵母(*Candida albicans*)]等不能从宿主摄取核黄素就需要自身合成核黄素(vitamin B12, riboflavin)以维持菌体的生存与增殖^[7-9];同时,人等哺乳动物是核黄素缺陷型只能从食物中摄取以维持生存需要,因此核黄素生物合成的相关酶将是潜在的抗菌药物作用靶位点^[9]。DHBPs为核黄素生物合成关键酶之一^[10],在镁离子存在的情况下DHBPs可将5-磷酸核酮糖(ribulose-5-phosphate, Ru5P)转换成3,4-二羟基-2-丁酮-4-磷酸(3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate, DHBP)和甲酸盐(formate),生成的DHBP为核黄素合成的必需原料之一^[5]。如果能够抑制DHBPs的活性,就可能阻断细菌的核黄素的合成,进而抑制细菌的生存和增殖,因此DHBPs可望成为新一代抗菌药物作用的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:肺炎链球菌血清4型标准菌株TIGR4(ATCC-BAA334),购自美国ATCC微生物菌种保存中心。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 购自TaKaRa公司,*E. coli* BL21(DE3)购自NEB公司。质粒pW28由pET-28a(购自Novagen公司)改造而来。

1.1.2 培养基:C + Y半合成培养基,含0.5% Yeast提取物,用于*S. pn*的培养;LB培养基用于*E. coli* DH5 α 和BL21的培养,卡那霉素的终浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.1.3 试剂:质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒及细菌DNA提取试剂盒均购自上海华舜生物工程公司;T4 DNA连接酶及缓冲液购自Promega公司;各种限制性内切酶及缓冲液购自NEB公司;DNA聚合酶购自TaKaRa公司;蛋白质Marker D530A购自TaKaRa公司;用于酶学分析的标准品、底物等试剂均购自Sigma公司。

1.1.4 仪器:NANOD1000微量分光光度计购自

Thermo公司;Ni²⁺-NTA亲和层析柱、DEAE离子交换层析柱、HiLoad Superdex 200凝胶层析柱均购自GE healthcare公司。

1.2 重组质粒pW28-DHBPs的构建

对肺炎链球菌TIGR4的基因组进行分析,发现SPO176基因(1206bp)编码的蛋白质含402个氨基酸,生物信息学分析其包括两个结构域,其中N端为DHBPS结构域(1-204位氨基酸),C端为甘油环化脱氢酶(GTP cyclohydrolase II)(205-402位氨基酸)。设计DHBPs结构域扩增引物,由华大基因合成。正义链引物序列为5'-GGCGAATTCATCGAATATCGAAAATAC-3',反义链引物序列为5'-GTACTCGAGTTACAGCTGATCATATACTTTTC-3',其中下划线区分别为EcoR I和Xho I限制性酶切位点。PCR扩增DHBPs基因,重组质粒的构建参照文献[11],测序工作由本实验室测序中心完成。

1.3 DHBPs的表达

将序列测定正确的质粒转入*E. coli* BL21,铺卡那霉素平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,次日挑取单个菌落入1.0 mL LB培养基(卡那霉素终浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),37 $^{\circ}\text{C}$,200 r/min摇床培养2 h,然后加入终浓度为1 mmol/L IPTG于37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达4 h获取菌体进行SDS-PAGE电泳判断目的基因是否表达。确定有目标蛋白质的表达后,对于诱导条件(如:时间、OD₆₀₀、IPTG浓度、温度等)进行优化,找到可溶性表达效率更高的条件。

1.4 DHBPs的纯化

用Binding Buffer(20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 300 mmol/L NaCl)悬浮菌体,轻轻重悬混匀;冰水浴超声破菌;然后低温离心(4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 r/min, 30 min),弃沉淀,离心上清以4-6 s/drop的流速穿过已预先处理并用Binding Buffer平衡过的Ni²⁺-NTA亲和层析柱,然后用200 mL的Washing Buffer(20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L咪唑)洗脱杂蛋白质,最后Elution Buffer(20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 300 mmol/L NaCl, 200 mmol/L咪唑)洗脱得到目的蛋白质。然后进一步用DEAE-Sepharose Fast Flow column(1.5 cm \times 40 cm)纯化,上样前首先用平衡缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH8.0)平衡DEAE层析柱,随后将Ni²⁺-NTA纯化获得的样品以1.0 mL/min流速上样。上样完后以平衡缓冲液平衡层析柱,最后用600 mL以

NaCl 梯度 0 - 500 mmol/L (20 mmol/L Tris-HCl pH8.0) 进行洗脱, 并使用自动收集盘收集流出样品(6.0 mL/min/管)。用 15% SDS-PAGE 分析纯化所得蛋白质样品的纯度, 用 NANOD2000 微量紫外吸收仪测得蛋白质浓度。

1.5 DHBPs 在溶液中的聚集状态

应用凝胶层析法测定 DHBPs 在溶液中聚集状态。先用标准蛋白质对 Superdex200 进行标定, 然后测定了 DHBPs 在 buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 200 mmol/L NaCl) 中的聚集状态。标准蛋白质为: 牛血浆血清蛋白质(BSA, 67kDa), 鸡卵清蛋白质(Chicken ovalbumin, 43 kDa), 胰凝乳蛋白酶原(Chymotrypsin, 25 kDa) 和溶菌酶(Lysozyme, 14.4 kDa)。由层析洗脱曲线记录下标准蛋白质及 DHBPs 的洗脱体积, 最后计算出 DHBPs 在溶液中的分子量大小并对其聚合形式作出判断。

1.6 DHBPs 的酶学鉴定

采用 Piccollelli 等发明的比色法并经过适当修改后用于测定肺炎链球菌的 DHBPs 酶活性^[12]。125 μ L 反应体系中, 20 μ g DHBPs、50 mmol/L Tris-HCl pH7.5、5 mmol/L MgCl₂、5 mmol/L 5-磷酸核糖、0.25U PPI (pentose phosphate isomerase, 戊糖、磷酸酯异构酶), 25 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 其后依次加入 100 μ L 饱和肌酸 50 μ L α -萘酚 (35 mg/mL 溶于 1 mol/L NaOH), 30 min 后溶液会变成红色 (DHBP 遇 α 萘酚和饱和肌酸), 颜色的深浅与酶活力成正比, 再测定 525 nm 吸收峰。

2 结果

2.1 DHBPs 的克隆与表达质粒的构建

以肺炎链球菌 TIGR4 基因组 DNA 为模板, 设计并合成的两条引物能高效扩增出目的片段。其扩增产物由 1% 琼脂糖电泳检测在 600 bp 出现特异性条带, 与预期的 DHBPs 核酸分子长度一致, 说明已成功扩增出目的基因。经 PCR 筛选的重组质粒经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后电泳在 600 bp 出现 DNA 的条带; 通过 DNA 测序和分析证实其中有 DHBPs 基因插入子, 序列与 GenBank 登录的 DHBPs 基因片段完全相同。

2.2 重组蛋白的表达和纯化

将成功构建的质粒 pW28-DHBPs 转入 *E. coli*

BL21 表达系统表达并进行时间、温度、诱导剂 IPTG 浓度等表达条件的优化, 最终选择以下条件表达重组蛋白质: 过夜培养菌液次日晨以 1:100 体积比接种 LB 培养基 (卡那霉素终浓度为 50 μ g/mL, 于 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 放大培养至 $OD_{600} \approx 0.4$ 时降温至 20 $^{\circ}$ C, 细菌继续增殖至 $OD_{600} \approx 0.6$ 时以终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 于 20 $^{\circ}$ C 进行诱导表达, 12 h 后离心收集菌体。

将离心收集的菌体经超声破碎后, 离心收集上清经 Ni²⁺-NTA 亲和层析法和阴离子交换层析法 (图谱见图 1) DEAE-Sepharose Fast Flow column (1.5 cm \times 40 cm) 对目的蛋白质进行纯化。表达及纯化后的样品进行 SDS-PAGE, 结果见图 2。图 2 中显示, 与阴性对照相比较, 经过 IPTG 诱导的全细胞液中显现了一条多出的蛋白质条带, 分子量约为 23 kDa, 与表观分子量相符合, 表达产物大部分为可

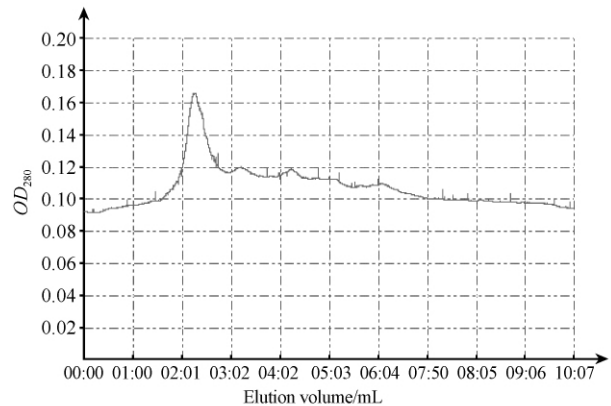


图 1 DHBPs DEAE 层析纯化图谱

Fig. 1 The chromatographic curve of DEAE column.

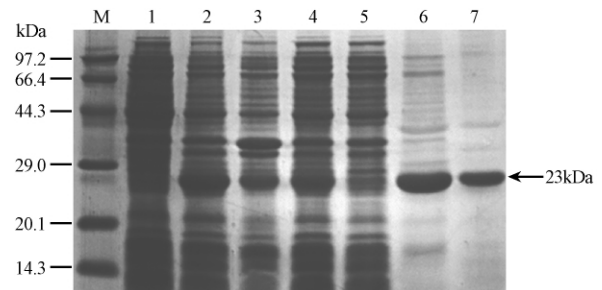


图 2 DHBPs Ni²⁺ 亲和层析柱及 DEAE 纯化凝胶电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE of DHBPs after purification by Ni²⁺-NTA and DEAE column. M: Protein maker; 1: negative control without IPTG; 2: induction by 0.5 mM IPTG; 3: pellet; 4: Supernatant; 5: flow through; 6: Ni²⁺-NTA elution; 7: DEAE elution.

溶性的;经一系列纯化后的产物纯度达 95% (图 2),测得其浓度为 3.4 mg/mL。

2.4 凝胶层析验证 DHBPs 在溶液中的聚集状态

用 Superdex 200 凝胶层析柱对标准蛋白质(牛血浆血清蛋白质,鸡卵清蛋白质,胰凝乳蛋白酶原和溶菌酶)进行层析,流速为 1.0 mL/min,根据洗脱体积和分子量进行拟合,发现分子量和洗脱体积有以下关系: $\text{Log MW} = -0.01712V_e + 6.05667$ (R^2 值为 0.9726)。以同样条件用 Superdex200 进行 DHBPs 层析,发现其洗脱体积为 88.1 mL (图 3)。应用前面获得分子量和洗脱体积的拟合曲线,计算发现其在溶液中分子量约为 35.34 kDa。前面的实验证实,肺炎链球菌 SP0176 基因的 DHBPs 结构域(1-204 个氨基酸残基)克隆插入了表达质粒 pW28,其计算分子量约为 23.4 kDa,提示在溶液(50 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 200 mmol/L NaCl)环境中 DHBPs 是以二聚体形式存在的。

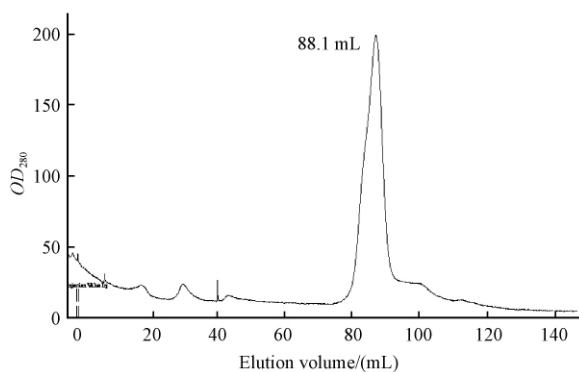


图 3 凝胶层析检测 DHBPs 在溶液中的聚集形式

Fig. 3 The gathered form of DHBPs in solution detected by Superdex 200 gel filtration column oligomerization state determination using gel filtration (Hiload Superdex 200).

2.5 酶学性质的测定

酶活性测定采用比色法,分光光度测定 DHBP 是基于在碱性条件下 2,3-丁二酮与显色剂肌酸和 α -萘酚发展而来的^[13,14]。标准曲线是用 DHBP 与显色剂肌酸和 α -萘酚反应,测定 525 nm 吸光度绘制的。DHBP 的浓度与结果显示,在 10-50 mmol/L 浓度范围内,525 nm 吸收值与 DHBP 的浓度具有良好的线性关系。对吸收值和浓度进行拟合,得到其线性关系为: $A = 0.0793C + 0.2361$ [中 A 为 525 nm 吸收值, C 为 DHBP 的浓度 (nmol/L), 方差为 $R^2 = 0.9821$]。Piccollelli 等方法,在底物浓度为 16.8 mmol/L,反应温度为 25°C,金属离子 Mg^{2+} 存

在的情况下,获得了如图 4 所示的反应曲线,结果表明,Ru5P 在反应进行到 400 分钟时候基本反应完毕。通过本实验重组表达获得的肺炎链球菌 DHBPs 具有将 5-磷酸核酮糖分解为 3,4-二羟基-2-丁酮-4-磷酸和甲酸盐的酶活性。

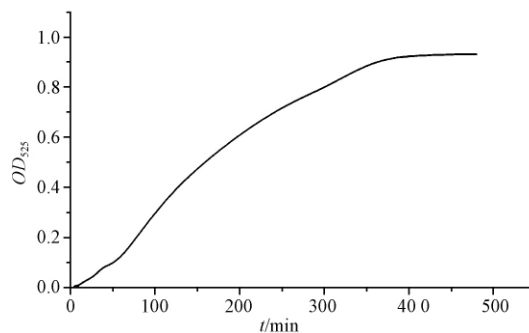


图 4 DHBPs 降解 5-磷酸核酮糖为 3,4-二羟基-2-丁酮-4-磷酸和甲酸盐的反应曲线

Fig. 4 The reaction curve of DHBPs degrading Ru5P to DHBP and formate.

3 讨论

近年来全世界范围内 *S. pn* 耐药菌株的感染发病率显著增加,使得 *S. pn* 感染的治疗面临越来越大的挑战^[15]。寻求可以有效控制肺炎链球菌感染的新一代抗生素显得尤为重要,潜在的药物靶标蛋白质 DHBPs 的研究对于新药的开发具有重大的意义。本研究成功克隆,表达,纯化了具有 5-磷酸核酮糖水解活性的 DHBPs,这对深入理解肺炎链球菌核黄素(riboflavin)合成与代谢的机制具有重要作用。生物信息学研究发现,肺炎链球菌的 SP0176 基因为双功能基因,编码一个双功能酶,其中 DHBPs 位于氨基端,而羧基端则具有三磷酸鸟苷环化水解酶 II (GTP cyclohydrolase II) 的活性。目前发现其他物种 DHBPs 和 GTP cyclohydrolase II 都由两个独立的基因进行编码,例如大肠杆菌、稻瘟病菌、詹氏甲烷球菌、白色念珠菌和鼠伤寒沙门菌等,预示肺炎链球菌的核黄素的合成与代谢具有一些不同于其他物种的特性^[16-21]。重组获得的肺炎链球菌 DHBPs 在溶液中的聚集状态为二聚体,这可能与发挥水解 Ru5P 的活性相关。Kumar 等解析发现鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 编码的 DHBPs 的晶体结构时发现,在晶体的一个不对称单位中存在两个

DHBPs 分子, 而二聚体结合的界面上存在多个疏水的氨基酸(包括 Ile65, Val97, Met83 和 Phe138)^[21]。Kumar 等还发现, 酶的活性中心位于二聚体的结合处, 来源于二聚体两个亚基的多个氨基酸残基参与了与底物的结合。然而由于目前缺乏肺炎链球菌的 DHBPs 晶体结构, DHBPs 两个亚基如何形成催化活性中心尚不清楚。另外, DHBPs 发挥其酶活性的最适宜温度、最适宜 pH 及最适宜金属离子等仍然未知。本课题组将继续关注基于本实验获得的具有水解 Ru5P 活性的 DHBPs 并开展其三维结构的解析, 推动从分子水平认识其结构和酶活性的关系研究, 为基于结构开展新型的特有的抗肺炎链球菌等抗菌药物的设计提供重要的结构模型。

参考文献

- [1] Balakrishnan I, Crook P, Morris R, Gillespie SH. Early predictors of mortality in pneumococcal bacteraemia. *Journal of Infection*, 2000, 40(3): 256-261.
- [2] Cunha BA. Antimicrobial therapy of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*, vancomycin-resistant enterococci, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Medical Clinics of North America*, 2006, 90(6): 1165-1182.
- [3] Lynch JP III, Zhanel GG. *Streptococcus Pneumoniae*: epidemiology, risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 2010, 16(3): 217-225.
- [4] Bacher A, Eberhardt S, Eisenreich W, Fischer M, Herz S, Illarionov B, Kis K, Richter G. Biosynthesis of Riboflavin//Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2nd eds. Washington: ASM Press, 1996: 1-49.
- [5] Volk R, Bacher A. Biosynthesis of riboflavin. Studies on the mechanism of L-3, 4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(31): 20610-20618.
- [6] Richter G, Ritz H, Katzenmeier G, Volk R, Kohnle A. Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, mapping and expression of the gene coding for GTP cyclohydrolase II in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(13): 4045-4051.
- [7] Richter G, Fischer M, Krieger C, et al. Biosynthesis of riboflavin. Characterization of the bifunctional deaminase/reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(6): 2022-2028.
- [8] Volk R, Bacher A. Studies on the 4-carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. Purification and properties of L-3, 4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(32): 19479-19485.
- [9] Liao DI, Calabrese JC, Wawrzak Z, Viitanen PV, Jordan DB. Crystal structure of 3, 4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase of riboflavin biosynthesis. *Structure*, 2001, 9(1): 11-18.
- [10] Alexander S, Lili H, Dinshaw J. Coenzyme recognition and gene regulation by a flavin mononucleotide riboswitch. *Nature*, 2009, 458(7235): 233-237.
- [11] 徐书景, 张彩凤, 薛张伟, 何广正, 鞠建松, 赵宝华. 嗜酸热脂环酸杆菌中甘露聚糖酶活性位点的确立. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2011, 51(1): 66-74.
- [12] Picollelli MA, Viitanen PV, Jordan DB. Spectrophotometric determination of 3, 4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase activity. *Analytical Biochemistry*, 2000, 287(2): 347-349.
- [13] Westerfeld WW. A colorimetric determination of blood acetoin. *The Journal of Biological Chemistry*, 1945, 161(2): 495-502.
- [14] Mattessich J, Coope JR. The spectrophotometric determination of diacetyl. *Analytical Biochemistry*, 1989, 180(2): 349-350.
- [15] 孟江萍, 尹一兵, 张雪梅, 黄远帅, 蓝轶. 肺炎链球菌体内诱导基因的筛选及初步鉴定. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46(4): 537-541.
- [16] Kelly MJ, Ball LJ, Krieger C, Yu YH, Fischer M, Schiffmann S, Schmieder P, Kuhne R, Bermel W, Bacher A, Richter G, Oschkinat H. The NMR structure of the 47-kDa dimeric enzyme 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase and ligand binding studies reveal the location of the active site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(23): 13025-13030.
- [17] Echt S, Bauer S, Steinbacher S, Huber R, Bacher A, Fischer M. Potential anti-infective targets in pathogenic yeasts: structure and properties of 3, 4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of *Candida albicans*. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 341(4): 1085-1096.
- [18] Steinbacher S, Schiffmann S, Richter G, Huber R, Bacher A, Fischer M. Studies on the 4-carbon precursor

- in the biosynthesis of riboflavin. Purification and properties of L-3, 4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (43) :42256-42265.
- [19] Liao DI, Viitanen PV, Jordan DB. Cloning, expression, purification and crystallization of dihydroxybutanone phosphate synthase from *Magnaporthe grisea*. *Acta Crystallographica Section D. Biological Crystallography*, 2000, 56 (Pt 11) :1495-1497.
- [20] Liao DI, Zheng YJ, Viitanen PV, Jordan DB. Structural Definition of the Active Site and Catalytic Mechanism of 3, 4-Dihydroxy-2-butanone-4-phosphate Synthase. *Biochemistry*, 2002, 41 (6) : 1795-1806.
- [21] Kumar P, Singh M, Gautam R, Karthikeyan S. Potential anti-bacterial drug target: Structural characterization of 3, 4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase from *Salmonella typhimurium* LT2. *Proteins*, 2010, 78 (16) : 3292-3330.

Cloning and characterization of a new antibacterial target, 3,4-Dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase

Li Jin, Hua Zhou, Shasha Zhao, Wei Yang, Siqiang Niu, Deqiang Wang*

Key Laboratory of Molecular Biology of Infectious Diseases, Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: [Objective] Riboflavin, called generally vitamin B12, is the precursor of cofactor flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide, which plays crucial roles in the biosynthesis of organisms. Bacteria need to synthesize riboflavin to maintain their survival and proliferation if they cannot obtain flavin from the surroundings. 3,4-Dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase (DHBP) is one of the key enzymes in biosynthesis of riboflavin. In the presence of Mg^{2+} , DHBPs can degrade ribulose-5-phosphate (Ru5P) into formate and 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate (DHBP). Potentially, these enzymes related to biosynthesis and metabolism of riboflavin, including DHBPs, may serve as the target for new antibacterial drug. In order to determine the three-dimensional structure and screen small molecule of inhibitor of DHBPs, we expressed and purified DHBPs from *Streptococcus pneumoniae* (*S. pn*), and characterized the activity of this enzyme. [Method] DHBP gene was amplified by PCR, and over-expression plasmid pW28-DHBP was constructed. pW28-DHBP was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) to express DHBPs; the recombinant protein was purified by nickel column and ion-exchange column. The enzymatic activity was tested using spectroscopy. [Results] The plasmid of pW28-DHBP was verified by restrictive enzyme digestion and sequencing. Soluble DHBP was expressed in *E. coli* BL21, and purified with 95% purity. The result of size exclusion chromatography indicates that DHBP was dimer in solution. Additionally, the recombinant protein has activity to hydrolyze Ru5P into formate and DHBP in the conditions of pH 7.5 and 25°C and in the presence of Mg^{2+} . [Conclusions] DHBP could be highly expressed in soluble form in *E. coli* BL21 strain, and the recombinant protein has activity to hydrolyze Ru5P.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, DHBP (3,4-Dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase), antibiotic, enzymatic activity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30970563)

* Corresponding author. Tel: +86-23-68486780; E-mail: wangd@ustc.edu

Received: 18 May 2012/Revised: 13 July 2012