

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00225

大肠杆菌 O152 中 *wfgD* 基因编码的 β -1, 3-葡萄糖基转移酶产物结构的质谱表征

周大炜^{* 1 2 3} 胡波¹ 刘斌^{1 2 3} 吴俊丽^{1 2 3} 韩艳芳¹

(南开大学泰达生物技术学院¹, 天津市微生物功能基因组学重点实验室²,

分子微生物学与技术教育部重点实验室³, 天津 300457)

摘 要 大肠杆菌 O152 抗原的寡糖重复单位中含葡萄糖- β -1, 3-*N*-乙酰葡萄糖胺 (Glc- β -1, 3-GlcNAc) 连接键。本研究采用电喷雾离子化多级串联质谱技术对以人工合成的天然受体底物的结构类似物苯氧基十一烷二磷酸-*N*-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc- β -PO₃-PO₃-(CH₂)₁₁-O-phenyl(GlcNAc-PP-PhU)) 为受体底物, 尿苷二磷酸葡萄糖 (UDP-Glc) 为给予体底物的酶促反应产物进行了详细的结构表征。电喷雾离子化多级串联质谱图中观察到的主要碎片源于磷酸二酯键部分和糖苷键的裂解。此外, 由观察到的二糖产物非还原端碎片获得了序列信息; 跨环断裂碎片及源于吡喃环取代基消除的‘内在’碎裂离子可提供组成产物的单糖残基连接方式信息。广泛的碎裂信息表明 *wfgD* 基因编码 UDP-Glc: GlcNAc pyrophosphate lipid 中的 β -1-3 葡萄糖基转移酶。

关键词 糖基转移酶; 电喷雾离子化多级质谱; 大肠杆菌

1 引言

糖类化合物作为自然界中含量最丰富的生物大分子之一和参与生命过程的重要分子。细菌表面多糖抗原基因簇中含有丰富的糖合成基因资源。以细菌表面多糖抗原合成基因为研究材料, 可以同时破译和鉴定大量糖基转移酶, 具有重要的科学和应用价值。但是寡糖中仅有很少一部分假定的糖基转移酶特定功能得到了鉴定。本研究组通过破译大肠杆菌 O152 抗原基因簇, 运用生物信息学方法推测出大肠杆菌 O152 的 O 抗原基因簇中的糖基转移酶基因 *wfgD* 编码的蛋白为 β -1, 3-葡萄糖转移酶, 负责 Glc- β -1-3-GlcNAc 键的形成。在此基础上, 同加拿大女皇大学的 Inka Brockhausen 博士研究小组合作, 应用核磁共振 (NMR) 技术首次证明了该基因的功能^[1]。一维和二维 NMR 技术是现有测定糖链结构最常用的方法^[2, 3], 但其灵敏度较低, 特别是涉及耗时较长和繁琐的分离纯化制备步骤。

近年来, 电喷雾电离 (ESI) 离子化方式的发展和成熟, 特别是碰撞诱导解离 (CID) 技术的应用及多级串联质谱技术的发展为寡糖糖链序列和精细结构的解析提供了技术平台^[4~6]。本研究在对基因 *wfgD* 进行克隆、大肠杆菌中高效表达基础上, 以人工合成的 GlcNAc-PP-PhU 为受体底物, UDP-Glc 为给予体底物进行酶促反应, 应用电喷雾离子化多级串联质谱对酶促反应二糖产物的糖链序列和精细结构进行了分析。建立了高效、准确、快捷和灵敏的寡糖结构生物质谱分析方法, 对酶基转移酶基因特定功能的鉴定有普遍适用性。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Finnigan LCQ Advantage MAX 电喷雾离子阱质谱仪 (Thermo Electron 公司)。甲醇、乙腈 (色谱纯, Fisher 公司); 二次蒸馏水; GDP-Glc (Sigma-Aldrich 公司)。本实验涉及的菌株、质粒、酶及其它生化试

2009-07-17 收稿; 2009-10-20 接受

本文系南开大学引进人才科研启动 (Naj02006) 资金资助

* E-mail: daweizhou@nankai.edu.cn

剂参见文献[1]。

2.2 酶活反应

大肠杆菌 152 抗原中 *wfgD* 基因的克隆、含重组质粒的细菌培养及酶活反应细胞膜提取物的制备按文献[1]方法进行。由于 *wfgD* 与细胞膜之间存在相互作用, 利用 H 1517(含 *wfgD* 基因的重组质粒)的细胞膜部分作为酶的来源进行酶促反应。

40 μL 标准反应体系为: 1 mmol/L 受体 GlNAc-PP-PhU (空白对照以二次重蒸水替代), 5 mmol/L MnCl_2 , 75 mmol/L MES Buffer (pH 7.0), 5 mmol/L GDP-Glc 和 10 μL 细菌膜提取物 (含 1~12 μg Protein, 阴性对照分别以大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 替代)。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 10 min 后, 沸水浴中加热 1 min, 离心 (12000 r/min, 5 min)。取上清液部分加入 500 μL 二次蒸馏水, 混匀后加入再生的 Sep-Pak C_{18} 柱, 4 mL 二次蒸馏水缓慢洗脱杂质后, 再以 1 mL 甲醇洗脱酶促反应产物。经 Sep-Pak C_{18} 前处理的产物混合物直接用于电喷雾离子化-离子阱多级质谱分析。

2.3 ESHMS 分析条件

流动注射泵进样, 进样量 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。在负离子模式条件下分析: 喷雾电压 -4.5 kV; 壳气 (N_2) 流速 35 个单位; 金属毛细管温度 220 $^{\circ}\text{C}$, 二级和三级串联质谱实验中, 氮气为碰撞气体, 氦气为辅助气体; 使用的碰撞能量范围 20~35 eV。为质谱解析方便起见, 本研究暂将预期的酶促反应产物——苯氧基十一烷基二磷酸二糖当成五糖 (寡糖)、苯氧基十一烷基和二磷酸基相应地分别代表 1 个和 2 个糖环。所有碎片应用 Damon-Costello 命名法识别^[7]。

3 结果与讨论

3.1 ESHMS 质谱结果

对于酶促反应产物, 负离子模式下的 ESHMS 分析结果见图 1。基峰-质荷比为 788.33 的峰与预期酶促反应产物的分子量相对应, 表明在 *wfgD* 基因催化下, Glc 被连接到 GlNAc-PP-PhU 受体上, 从而形成了 Glc-GlNAc-PP-PhU。

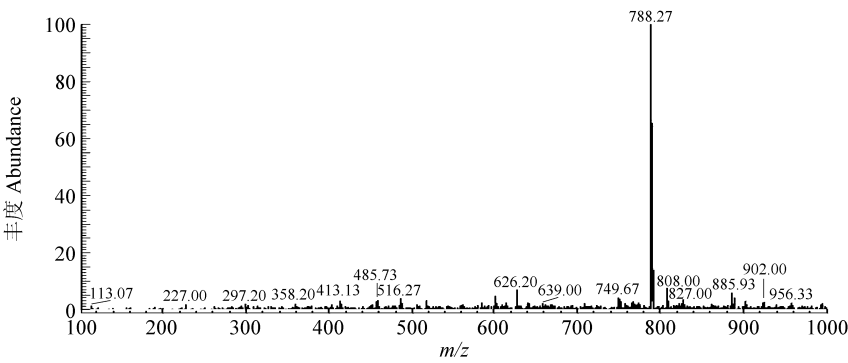


图 1 *wfgD* 催化产物的 ESHMS 谱图
Fig 1 ESHMS spectrum of *wfgD* product

3.2 Electrospray-CID-MSⁿ 质谱结果

图 2 为负离子模式下 m/z 788.33 离子的二级质谱图。以 m/z 788.33 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 为前驱离子, 观察到源于磷酸二酯键部分碎裂的 MS^2 产物离子 m/z 444.27 $[\text{B}_3]$, m/z 524.20 $[\text{B}_4]$ 和 m/z 405.20 $[\text{Z}_3]$; 源于糖苷键断裂的产物离子 m/z 240.93 $[\text{B}_3 - \text{Glc} - \text{Ac}]$, m/z 626.33 $[\text{Y}_4]$ 和 m/z 527.73 $[\text{Y}_4 - \text{H}_3\text{PO}_4]$; 未发现涉及开环的产物离子 (图 2)。

为进一步确认酶促反应产物二糖的连接位点, 在相同的条件下应用 CID 技术, 对酶促反应产物进行了电喷雾离子化三级串联质谱分析。

图 3 为负离子模式下产物的三级质谱图。以 m/z 444.20 为前驱离子 (图 3), 最丰富的 MS^3 产物离子源于糖苷键的断裂 m/z 282.13 $[\text{B}_3 - \text{Glc}]$; 产物离子 m/z 221.80 ($^{2,4}\text{A}_2$), m/z 384.13 ($^{0,4}\text{A}_2$) 和 m/z 264.07 ($^{1,3}\text{A}_2$) 源于非还原端 GlNAc 开环; 产物离子 m/z 402.13 $[\text{B}_3 - \text{Ac}]$ 。

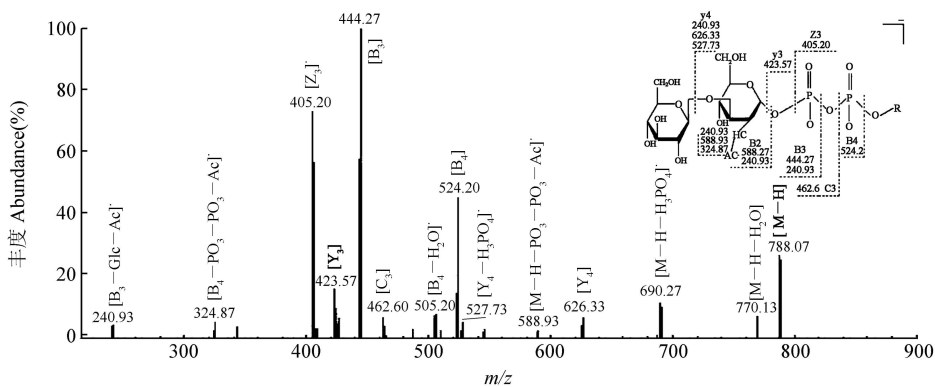


图 2 *wfgD* 催化产物的 ESI-MS/MS 谱图
Fig. 2 Electrospray-CID-MS/MS spectrum of *wfgD* product MS² of m/z 788.40

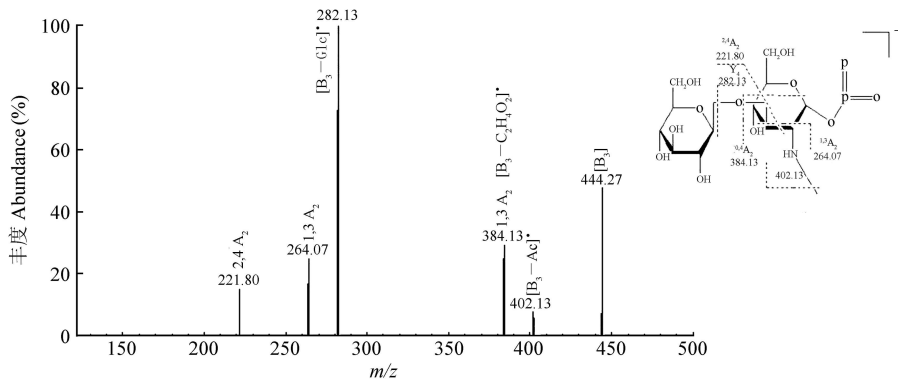


图 3 *wfgD* 催化产物的 ESI-MS/MS/MS 谱图
Fig. 3 Electrospray-CID-MS/MS/MS spectrum of *wfgD* product MS³ of m/z 444.20

在酶促反应产物的二级和三级质谱图中 (图 2 和图 3), 典型的 Y 型离子碎片 m/z 240.93 [$B_3-Glc-Ac$], m/z 626.33 [Y_4] 和 m/z 282.13 [B_3-Glc] 源于单个糖苷键的断裂, 表明酶促反应产物二糖的连接序列为 $Glc-GlcNAc-PP-PHU$ 。

系列 A_2 离子是由非还原糖基开环所形成的, 它提供了重要的非还原糖基连接位点的信息。三级质谱图中的离子碎片 m/z 264.07 ($1,3 A_2$) 源于非还原端糖环上 C_1-C_3 键的跨环断裂, 于是排除了糖苷键 4-位连接的可能。2-位取代基 NAc 的存在可以推断酶促反应产物二糖中的非还原糖基为 3 位连接。

3.3 小结

本研究在负离子模式下 ESI-MS/MS 结果明确证明酶促反应产物二糖的连接方式为 $Glc1\rightarrow 3GlcNAc$; *wfgD* 基因能够催化大肠杆菌 O152 的 O-抗原重复单位合成中二糖键 $Glc\beta-1-3GlcNAc$ 的形成。这与文献 [1] 报道的 2D-NMR (600 MHz) 分析结果相一致。研究结果将对细菌的 O 抗原合成机理的研究及为通过实验探索 O 抗原在细菌生存和致病性中的作用奠定基础。

References

1 Brockhausen I, Hu B, Liu B, Lau K, Szarek W A, Wang L, Feng L. *J. Bacteriol.*, **2008**, 190(14): 4922~ 4932
2 Yi W, Yao Q, Zhang Y, Motari E, Lin S, Wang P G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2006**, 344(2): 631~ 639
3 Li M, Shen J, Liu X, Shao J, Yi W, Chow C S, Wang P G. *Biochem.*, **2008**, 47(44): 11590~ 11597
4 SUN Xun-Jun (孙学军), SUN Zhi-Wei (孙志伟), HU Bao-Jun (户宝军), SHENG Xiao (盛筱), YOU Jin-Mao (尤进茂). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(10): 1309~ 1315
5 Zhai J. *Mass Spectrom. Rev.*, **2004**, 23(3): 161~ 227
6 HAN Yao (韩瑶), LÜ Zhi-Hua (吕志华), JIANG Ting-Fu (姜廷福), WANG Yuan-Hong (王远红). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2006**, 34(9): 1213~ 1218

7. Damon B, Costello C E. *Glycoconjugate J.*, 1988, 5(4): 397~409

Structure Elucidation of Product of β -1, 3-Glucosyltransferase Encoded by *wfgD* Gene in *Escherichia Coli* O152 Using Mass Spectrometry

ZHOU DaWei^{1,2,3}, HU Bo¹, LIU Bin^{1,2,3}, WU Jun-Li^{1,2,3}, HAN Yan-Fang¹

¹(TEDA School of Biological Sciences and Biotechnology, Nankai University, Tianjin 300457)

²(The Engineering and Research Center for Microbial Functional Genomics and Detection Technology,
Ministry of Education, Tianjin 300457)

³(The Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Tianjin 300457)

Abstract The O152 antigens of *Escherichia coli* contains a Glc- β -1, 3-GlcNAc linkage within the repeating unit. The *wfgD* gene in *E. coli* O152 O antigen gene cluster had been demonstrated utilizing NMR technique to encode a glucosyltransferase which is responsible for the synthesis of Glc- β -1, 3-GlcNAc linkage. In this study, a synthetic substrate analog of the natural acceptor substrate undecaprenolpyrophosphate-lipid [GlcNAc- α -PO₃-PO₃-(CH₂)₁₁-O-phenyl] was used as an acceptor and UDP-Glc as a donor substrate, and electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI/MS/MS) was used for the detailed structural characterization of the enzyme product. A systematic study was conducted on product to allow rationalization of the fragmentation processes. The major fragments observed in the ESI/MS/MS spectra result from cleavage of glycosidic bond and diphosphate moiety. The fragment originating from the nonreducing end of the product yields information on sequence. Cross-ring cleavages, which are very informative of the linkages of the monosaccharide residues constituting the product, and “internal” cleavages which are derived from elimination of substituents from around the pyranose ring, were also observed. This extensive fragmentation was shown that the expected Glc- β -1, 3-GlcNAc linkage in the product, confirming that *wfgD* is in the form of UDP-Glc:GlcNAc-pyrophosphate-lipid β -1, 3-glucosyltransferase.

Keywords Glucosyltransferase; Electrospray ionization mass spectrometry; *Escherichia coli*

(Received 17 July 2009; accepted 20 October 2009)

《气相色谱在石油化工中的应用》

该书是色谱金属丛中气相色谱在石油化工中的应用篇, 针对石化分析的主要应用范围分别对一些重要的应用方法作了详尽的描述, 重点讨论了各种方法的特点, 总结了实际应用的经验。该书选择的方法兼顾了生产控制、产品标准和新的研究方法, 包括了一些适用范围宽、可扩展性强、有行业特色和先进性的方法。

该书与一般标准分析方法手册相比, 更强调方法原理的理解和如何应用的技巧。

该书可供石化领域的研究与工作人员、分析化学相关专业的师生及企业分析人员参考。

该书由杨海鹰等编著, 化学工业出版社出版, 定价 35.00 元。