

淋球菌肽聚糖乙酰化对大肠杆菌溶解性转糖酶A酶切作用的影响**☆

吴腾飞, 张巧灵, 邓旭明, 刘波

Effects of peptidoglycan acetylation in *Neisseria gonorrhoeae* on catalysis activity of murein lytic transglycosylase A from *E. coli*

Wu Teng-fei, Zhang Qiao-ling, Deng Xu-ming, Liu Bo

Abstract

BACKGROUND: Studies have demonstrated that *E. coli* peptidoglycan (PG) acetylation suppresses catalysis activity of lytic transglycosylase. However, whether PG acetylation in *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) has the same effect remains poorly understood.

OBJECTIVE: To identify effect of PG acetylation in *N. gonorrhoeae* on catalysis activity of lytic transglycosylase family 2 in gram-negative bacteria.

METHODS: PG acetylation genes (*pacAB*) in *N. gonorrhoeae* FA19 were knocked out through transformation by homologous recombination. ³H-glucosamine labeled PG from either wild type *N. gonorrhoeae* FA19 (PG1) or *pacAB* mutant strain (PG2) were isolated respectively. We amplified, cloned, expressed and purified lytic transglycosylase (MltA) from *E. coli*. The catalysis activity of MltA on PG1 and PG2 was detected, and the optimum reaction temperature was measured.

RESULTS AND CONCLUSION: The recombinant MltA was obtained at the concentration of 26.12 g/mL. Only 9.71% PG1 was cleaved, but around 93.45% of no-acetylation PG2 was cleaved. The optimum reaction temperature was 30 °C. PG with O-acetylation decreased catalysis capability of MltA. It suggests acetylation of PG in *N. gonorrhoeae* inhibited the autolysis caused by MltA.

Wu TF, Zhang QL, Deng XM, Liu B. Effects of peptidoglycan acetylation in *Neisseria gonorrhoeae* on catalysis activity of murein lytic transglycosylase A from *E. coli*. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(46): 8643-8646. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 有研究表明大肠杆菌(*E.coli*)肽聚糖乙酰化抑制溶解性转糖酶的酶切活性, 但对淋球菌胞壁质乙酰化对该类酶的影响未见报道。

目的: 观察淋球菌的肽聚糖乙酰化对革兰阴性菌溶解性转糖酶家族二的酶切效果的影响。

方法: 运用同源重组方法敲除淋球菌的肽聚糖乙酰化基因A和B($\Delta pacAB$), 制备³H标记的野生株和突变株的肽聚糖。应用分子克隆和蛋白表达纯化技术获得溶解性转糖酶A, 体外测定溶解性转糖酶A对淋球菌和突变株($\Delta pacAB$)的肽聚糖酶切效果和最适酶切温度。

结果与结论: 溶解性转糖酶A经克隆、表达和纯化得到浓度为26.12 g/mL蛋白; 氘代葡萄糖胺标记并纯化得到氘代淋球菌肽聚糖多聚体; 溶解性转糖酶A对40%乙酰化的淋球菌FA19肽聚糖酶切效果仅为9.71%, 但对去乙酰化的突变株肽聚糖的酶切效果达93.45%; 溶解性转糖酶对淋球菌肽聚糖酶的最佳酶反应温度为30 °C。结果提示, 淋球菌的肽聚糖乙酰化抑制溶解性转糖酶蛋白的切割活性, 淋球菌可能通过胞壁酸乙酰化抑制溶解性转糖酶A引起的自溶的发生。

关键词: 淋球菌; 肽聚糖; 肽聚糖乙酰化基因; 溶解性转糖酶A; 组织构建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.46.022

吴腾飞, 张巧灵, 邓旭明, 刘波. 淋球菌肽聚糖乙酰化对大肠杆菌溶解性转糖酶A酶切作用的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(46):8643-8646. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Laboratory of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin Province, China

Wu Teng-fei ☆, Doctor, Laboratory of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin Province, China Tengfei_Wu@yahoo.com

Correspondence to: Liu Bo, Professor, Doctoral supervisor, Laboratory of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin Province, China Liuboy@hotmail.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30972170*; Scientific Frontier and Cross-Disciplinary Innovation Item, No. 200903337*

Received: 2010-09-15 Accepted: 2010-10-10

0 引言

淋球菌细胞壁由肽聚糖(peptidoglycan, PG)骨架结构组成^[1], 在淋球菌生长和分裂过程中, 溶解性转糖酶(murein lytic transglycosylase, Mlt)等水解酶切割PG骨架、释放的PG片段诱导上皮细胞死亡, 刺激炎症细胞因子产生和引发关节炎^[2-4]。淋球菌PG胞壁酸C6位的乙酰化是与致病有关的重要结构, 实验所用淋球菌FA19的PG乙酰化程度为40%。PG乙酰化使释放的PG单体毒性增强, 帮助细菌抵御外界酶的侵入, 延长在宿主体内的存活时间^[2, 5], 增加

机体炎症反应强度^[2], 但是否影响Mlt家族二的酶切效果的研究尚未见报道。

Mlt是锚定在细菌细胞壁上的功能性酶, 通过切割肽聚糖 β -1,4糖苷键, 形成1,6-脱水胞壁酸末端, 在细菌生长和分裂以及肽聚糖的释放中发挥作用^[6]。已证实铜绿假单胞菌MltB和蛋清溶菌酶的酶切活性受肽聚糖的高度乙酰化抑制^[7], 但淋球菌的肽聚糖乙酰化影响该酶酶切效果的研究尚未见报道。*E.coli* MltA, 淋球菌溶解性转糖酶C(LtgC)^[8-9]和脑膜炎球菌的基因组起源的奈瑟菌抗原33(GNA33)是同源蛋白^[10-11]。LtgC和GNA33蛋白与细菌生长分裂和肽聚糖释放密切相关, 它们同源蛋白空间结构相似,

吉林大学畜牧兽医学基础兽医学教研室, 吉林省长春市 130062

吴腾飞☆, 1981年生, 男, 辽宁省沈阳市人, 博士, 主要从事病原微生物学等领域的研究。
Tengfei_Wu@yahoo.com

通讯作者: 刘波, 女, 教授, 博士生导师, 吉林大学畜牧兽医学基础兽医学教研室, 吉林省长春市 130062
Liuboy@hotmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)46-08643-04

收稿日期: 2010-09-15
修回日期: 2010-10-10
(20100915005/WJ·Z)

功能相近, 通过研究淋球菌PG乙酰化对*E.coli*的MltA酶切影响, 揭示淋球菌LtgC与乙酰化肽聚糖的相互作用机制及在自溶中的作用。

淋球菌PG乙酰化基因包括A(pacA)和B(pacB)^[9], pacA敲除突变株的PG乙酰化全部消失^[10], 该突变株比野生株对EDTA敏感, EDTA会刺激淋球菌自溶^[12]。PG乙酰化防止水解酶对PG降解, 可能存在某些机制调控自溶发生^[10]。

实验敲除淋球菌的pacA和pacB基因, 制备去乙酰化的氘带标记的PG多聚体, 首次观察淋球菌PG乙酰化对MltA酶切活性的影响, 观察了淋球菌PG乙酰化对溶解性转糖酶家族二的影响, 以阐明乙酰化在淋球菌自溶中的作用。

1 材料和方法

设计: 基因学实验。

时间及地点: 于2010-01/06在吉林大学基础兽医学实验室完成。

材料: 淋球菌标准株FA19, *E.coli* K12, BL21(DE3), MC1061和质粒pT7-7K均由本实验室保存; 质粒pUC18-pacAB-del 由美国北卡罗莱纳大学尼古拉斯教授惠赠。

主要试剂:

| 试剂 | 来源 |
|--------------------------------|--------------|
| 限制性内切酶, T ₄ DNA 连接酶 | 美国 NEB 公司 |
| 那霉素, 丙酮酸 | 美国 Sigma 公司 |
| 氘代葡萄糖 | 美国 Perkin 公司 |

实验方法:

溶解性转糖酶A的克隆和鉴定: 根据Genebank中*E.coli* K12中MltA(登录号为:89109599)基因序列设计引物。

引物信息:

| Gene | Sequence(5'-3') |
|-----------------------|--|
| Primer 1 (Upstream) | GGA ATT CCA TAT GAA AGG ACG TTG GGT AAA G |
| Primer 2 (Downstream) | TCT GGA TCC TAG TGA TGG TGA TGG TGA TGG CCG CTA AAG ACG TTAC CTG |

用上述引物扩增MltA基因片段。将PCR产物克隆到pT7-7K载体, 转化*E.coli* MC1061感受态细胞, 培养于卡那霉素抗性的LB平板。挑选单克隆菌落培养于含卡那霉素的LB培养基, 抽提质粒, PCR检测和酶切鉴定, 测序。

溶解性转糖酶A的表达和纯化: 将重组pT7-7K-MltA质粒转化到*E.coli* BL21(DE3), 培

养含于卡那霉素的LB平板上。挑取单克隆于10 mL含卡那霉素的LB培养基中, 过夜培养, 第2天转入1 L含卡那霉素的LB培养基中, 培养至A_{600nm}=0.5, 加入终浓度0.3 mmol/L的IPTG, 30 °C诱导3 h, 5 000 r/min离心10 min, 弃上清。按照Invitrogen公司的Ni-NTA purification system中提供的实验方法纯化蛋白。用鼠抗His-tag抗体进行产物Western blot分析。

淋球菌体内的pacAB的敲除和鉴定: 取过夜培养的淋球菌FA19菌落, 悬浮于淋球菌液体培养基中^[13], 稀释到A_{560 nm}=0.18。将0.9 mL淋球菌悬液和5 μg的pUC18-pacAB-del质粒(卡那霉素抗性基因代替pacAB基因)于37 °C, CO₂培养箱中孵育5 h。菌液过夜培养于含卡那霉素的淋球菌平板上(GC+), 挑单克隆培养, PCR检测。

氘代葡萄糖标记并纯化淋球菌肽聚糖PG: 将过夜培养的淋球菌FA19和pacAB敲除突变菌株分别悬浮于淋球菌液体培养基中, 稀释细菌至50 mL A_{560nm}=0.1, 培养至对数期, 1 700 g离心, 用GCB液体培养基(含体积分数0.4%丙酮酸)洗涤, 离心, 重悬于相同培养基, 稀释至A_{560nm}=0.2, 加入³H葡萄糖(终浓度74 MBq/L)。培养2 h后, 离心, 菌体悬浮于50 mmol/L乙酸钠。加入同体积的体积分数8% SDS溶液, 煮沸30 min, 超速离心41 000 g, 30 min, 得到肽聚糖PG沉淀, 洗涤, 悬浮于少量去离子水中, 测定PG1(野生株)和PG2(突变株)³H的含量^[14-15]。

测溶解性转糖酶对不同乙酰化程度的肽聚糖的酶切活性: 溶解性转糖酶酶切反应条件: pH 4.2, 10 mmol/L Tris盐酸, 1 mmol/L DTT, 10 mmol/L MgCl₂; 以PG为底物, 测定20, 25, 28, 30, 32, 35, 40 °C条件下MltA最适酶反应温度。溶菌酶的酶切条件: 37 °C, pH 6.4, 50 mmol/L Na₃PO₄缓冲液中反应^[16]。

酶切过程: 取10 μL淋球菌PG多聚体PG1或PG2为底物, 加入180 μL缓冲液和10 μL 0.5 g/L MltA或溶菌酶。取5 μL肽聚糖测定0时间点PG标记量作为对照, 相应温度水浴1 h, 加入200 μL体积分数26% TCA, 冰浴30 min, 41 000 g离心30 min。取上清测定氘代同位素标记量, 结果与加入的肽聚糖标记量百分比结果为酶切效果。

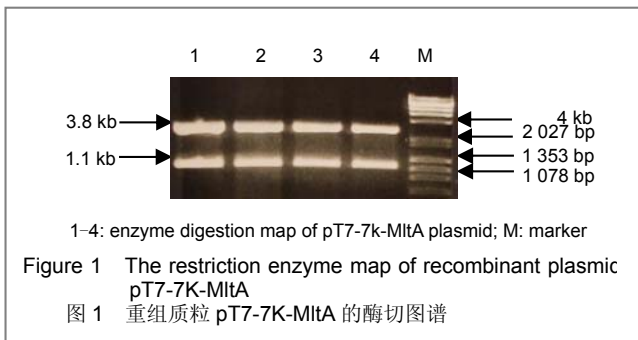
设计、实施、评估者: 实验设计、实施、评估者均由第一作者完成, 采用盲法评估。

主要观察指标: 琼脂糖电泳观察DNA片段大小; SDS检测重组表达蛋白大小和His标签; FA19中pacAB基因敲除后PCR鉴定结果; PG纯

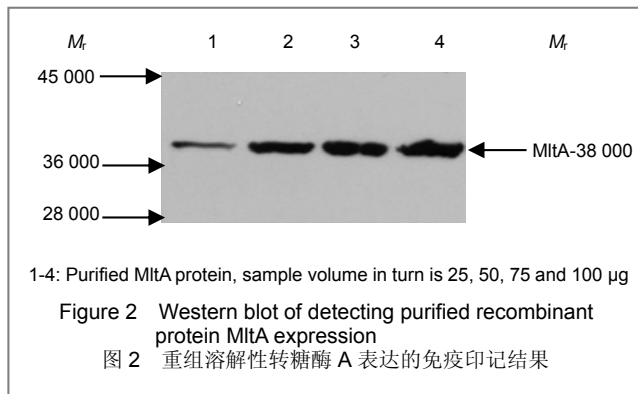
化后标记量; MItA和溶菌酶对乙酰化程度不同的肽聚糖的酶切效果及MItA的最适酶切温度。

2 结果

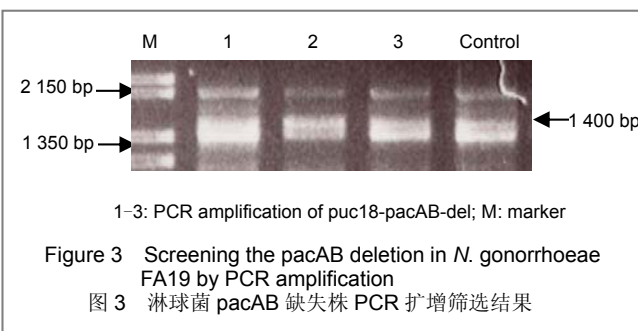
2.1 溶解性转糖酶A的扩增和重组质粒的构建 PCR扩增MItA基因得到约1.1 kb的特异性条带, 与预期MItA序列长度相符。将扩增的MItA 片段连入质粒pT7-7K, 获得阳性克隆后, 经酶切鉴定, 获得1.1 kb的目的片段, 测序结果和*E.coli* MItA基因序列完全一致, 见图1。



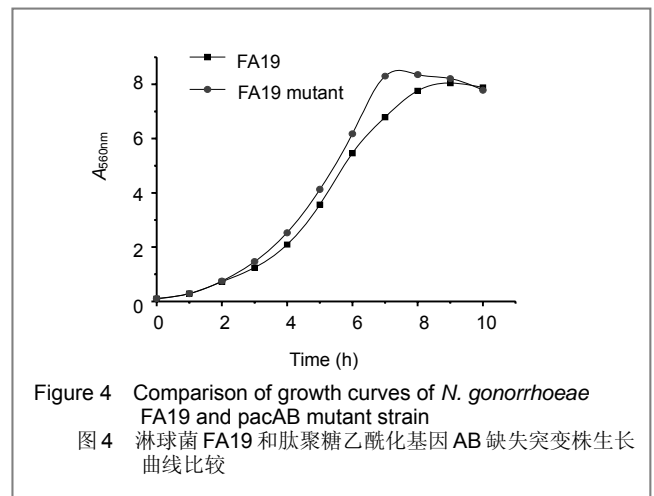
2.2 溶解性转糖酶A重组蛋白的表达和纯化结果 用鼠抗His-tag抗体进行Western blot分析显示, 在相对分子质量38 000处可见一明显的条带, 表明目的蛋白为溶解性转糖酶A蛋白, 见图2。MItA蛋白浓度为26.12 g/mL。



2.3 淋球菌FA19 pacAB基因敲除突变株的鉴定结果 pUC18-pacAB-del转化到淋球菌FA19基因组, 得到26个阳性克隆。PCR扩增得到pacAB突变株基因片段为1.4 kb, 见图3。

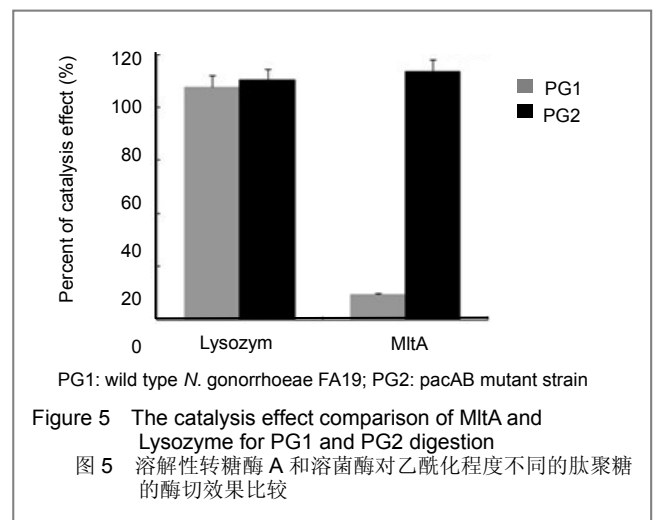


样品测序结果与原质粒序列相一致, 证实淋球菌FA19的pacAB基因被敲除。显微镜观察淋球菌突变株和野生株形态相似, 生长速度未见显著性差异, 见图4。



2.4 淋球菌FA19和pacAB突变株PG的制备和纯化结果 将培养淋球菌FA19和pacAB突变株至 $A_{560\text{ nm}}=1.5$, 标记和纯化得到两种PG的无色透明沉淀, 即乙酰化程度高的FA19的PG(PG1)和去乙酰化突变株的PG(PG2), 其中PG1氘代标记浓度3 012 CPM/ μL , PG2氘代标记浓度为3 087 CPM/ μL 。

2.5 溶解性转糖酶A的最适酶切温度和对淋球菌PG的酶切效果 为证实淋球菌PG乙酰化对MItA酶切活性的影响, 分别用0.025 ng/L的溶菌酶或MItA切割淋球菌野生株和去乙酰化的突变株PG。MItA的活性受PG乙酰化影响显著, 对乙酰化的PG1酶切百分比仅有9.71%, 而对去乙酰化的PG2的酶切效果达到93.45%。但溶菌酶对高度乙酰化的PG1和去乙酰化的PG2酶切效果均明显, 分别是86.61%和90.12%, 见图5。



MItA对淋球菌PG的酶切效果受温度影响, 温度从20 $^{\circ}\text{C}$ 升至30 $^{\circ}\text{C}$ 时, MItA的酶切效果逐渐增加, 30 $^{\circ}\text{C}$ 达到峰值, 温度的继续增加, 酶切效果显著降低, 见图6。

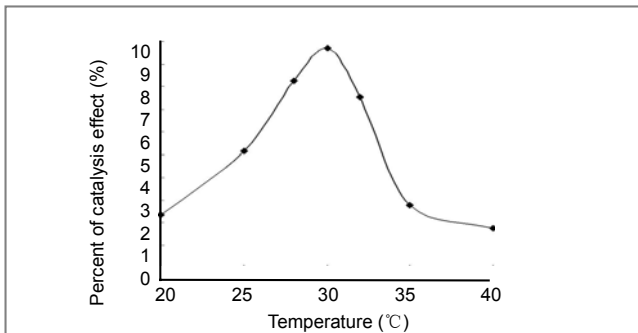


Figure 6 The catalysis activity of MltA for PG1 digestion in different temperatures

图6 不同温度条件下溶解性转糖酶A酶切肽聚糖PG1的酶学活性

3 讨论

淋球菌PG的乙酰化增加释放的PG片段的毒性, 增强对小鼠炎症反应的诱导^[2], 在致病和稳定细菌细胞壁结构等多方面发挥重要作用, 但对其机制的研究较少。溶解性转糖酶切割PG的 β -1,4糖苷键, 同时催化胞壁酸脱水形成末端为1,6-无水胞壁酸内酯^[6]。已证实*E.coli*和铜绿假单胞菌的PG乙酰化抑制溶解性转糖酶活性^[8], 但淋球菌PG乙酰化是否影响溶解性转糖酶的酶切活性尚不清楚。

实验首次证实40%乙酰化的淋球菌FA19的PG抑制*E.coli*溶解性转糖酶A酶切效果, 但MltA对乙酰化基因敲除的淋球菌PG酶切效果很好, 证明溶解性转糖酶MltA的活性明显受到淋球菌细胞壁PG的乙酰化影响, 可能是因为MltA切割PG的糖苷键后, 需要继续催化胞壁酸脱水形成1,6-无水胞壁酸内酯, PG的C6位乙酰化取代原来位置的羟基, 形成溶解性转糖酶难于作用的底物结构, 进而抑制MltA的活性^[7]。溶菌酶切割PG后不形成1,6-无水胞壁酸内酯, 所以乙酰化的PG没有抑制溶菌酶的活性。实验证实溶菌酶对高度乙酰化的PG和去乙酰化的PG均有明显的酶切效果, 间接证明淋球菌细胞壁PG的乙酰化影响MltA酶切活性。MltA^[16]和淋球菌LtgC是同一家族的同源蛋白, 空间结构相似^[8], 因未知因素LtgC体外对PG无酶切活性, 因此实验选用MltA代替LtgC研究淋球菌PG乙酰化对溶解性转糖酶家族蛋白的影响溶解性转糖酶在淋球菌体内和其他蛋白形成多酶复合体共同发挥作用, 因此其活性受到其他酶活性的影响, 具体作用机制有待进一步研究。

有研究证实PG的C6位乙酰化过高时, 会抑制溶解性转糖酶活性^[8], 当淋球菌PG水解酶类, 如溶解性转糖酶^[19]和脱氨基酶活性过高, 引起菌体自溶。淋球菌通过细胞壁的乙酰化作用来抑制溶解性转糖酶活性, 保护菌体和抵抗由溶解性转糖酶引起的自溶。已有实验证实PG乙酰化基因敲除株对EDTA敏感, 易发生菌体自

溶^[10]。淋球菌PG乙酰化抑制溶解性转糖酶家族二MltA蛋白酶切效果, 可能抑制菌体自溶的发生, 延长淋球菌存活时间, 增加对机体的致病性。

4 参考文献

- [1] Vollmer W, Höltje JV. The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? *J Bacteriol.* 2004;186(18):5978-5987.
- [2] Fleming TJ, Wallsmith DE, Rosenthal RS. Arthropathic properties of gonococcal peptidoglycan fragments: implications for the pathogenesis of disseminated gonococcal disease. *Infect Immun.* 1986;52(2):600-608.
- [3] Melly MA, McGee ZA, Rosenthal RS. Ability of monomeric peptidoglycan fragments from *Neisseria gonorrhoeae* to damage human fallopian-tube mucosa. *J Infect Dis.* 1984;149(3): 378-386.
- [4] Petersen BH, Rosenthal RS. Complement consumption gonococcal peptidoglycan. *Infect Immun.* 1982;35(2):442-448.
- [5] Swim SC, Gfell MA, Rosenthal RS, et al. Strain distribution in extents of lysozyme resistance and O-acetylation of gonococcal peptidoglycan determined by high-performance liquid chromatography. *Infect Immun.* 1983;42(2):446-452.
- [6] Blackburn NT, Clarke AJ. Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases. *J Mol Evol.* 2001;52(1): 78-84.
- [7] Blackburn NT, Clarke AJ. Characterization of soluble and membrane-bound family 3 lytic transglycosylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry.* 2002;41(3): 1001-1013.
- [8] Powell AJ, Liu ZL, Nicholas RA, et al. Crystal structures of the lytic transglycosylase MltA from *N.gonorrhoeae* and *E.coli*: insights into interdomain movements and substrate binding. *J Mol Biol.* 2006;359(1):122-136.
- [9] Cloud KA, Dillard JP. Mutation of a single lytic transglycosylase causes aberrant septation and inhibits cell separation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* 2004;186(22):7811-7814.
- [10] Dillard JP, Hackett KT. Mutations affecting peptidoglycan acetylation in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* 2005;73(9):5697-5705.
- [11] Jennings GT, Savino S, Marchetti E, et al. GNA33 from *Neisseria meningitidis* serogroup B encodes a membrane-bound lytic transglycosylase (MltA). *Eur J Biochem.* 2002;269(15):3722-3731.
- [12] Elmros T, Burman LG, Bloom GD. Autolysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* 1976;126(2):969-976.
- [13] Kellogg DS, Peacock WL, Deacon WE, et al. *Neisseria Gonorrhoeae*. I. Virulence Genetically Linked to Clonal Variation. *J Bacteriol.* 1963;85:1274-1279.
- [14] Cloud KA, Dillard JP. A lytic transglycosylase of *Neisseria gonorrhoeae* is involved in peptidoglycan-derived cytotoxin production. *Infect Immun.* 2002;70(6):2752-2757.
- [15] Rosenthal RS, Dziarski R. Isolation of peptidoglycan and soluble peptidoglycan fragments. *Methods Enzymol.* 1994;235: 253-285.
- [16] Lommatzsch J, Templin MF, Kraft AR, et al. Outer membrane localization of murein hydrolases: MltA, a third lipoprotein lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1997;179(17): 5465-5470.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 国家自然科学基金(30972170), 项目名称: 2型猪链球菌消化道感染机制及其诱导的自噬作用研究; 科学前沿与交叉学科创新项目(200903337), 项目名称: 2型猪链球菌(SS2)经消化道黏膜感染的研究资助。

致谢: 感谢吉林大学基础兽医学实验室各位老师对本实验的支持。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 实验首次鉴定溶解性转糖酶家族二受肽聚糖乙酰化抑制作用。

提供临床借鉴的价值: 实验对抗淋球菌药物的研发具有一定的指导意义。