



微生物学报

ACTA MICROBIOLOGICA SINICA



期刊介绍

投稿须知

编委会

学科先贤

下载专区

常见问题

广告服务

友情链接

友菌素核苷转移酶amiE基因的克隆、表达和功能鉴定

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

投稿时间: 2011-11-7 最后修改时间: 2011-12-27

中文关键词: [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](#)

英文关键词: [Keywords: disaccharide nucleoside antibiotics amicetin nucleotidyltransferase deoxysugar biosynthesis](#)

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)

作者 单位

E-mail

[胡涛](#) [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](#)

E-mail: czhang2006@gmail.com

[张光涛](#) [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](#)

[朱义广](#) [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](#)

[李苏梅](#) [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](#)

[张海波](#) [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](#)

[张改云](#) [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](#)

[杨晓红](#) [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](#)

[鞠建华](#) [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](#)

[张长生](#) [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](#)

摘要点击次数: 85

全文下载次数: 51

中文摘要:

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。

英文摘要:

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.

胡涛, 张光涛, 朱义广, 李苏梅, 张海波, 张改云, 杨晓红, 鞠建华, 张长生. 友菌素核苷转移酶amiE基因的克隆、表达和功能鉴定. 微生物学报, 2012, 52(2):214-220

[查看全文](#) [查看/发表评论](#) [下载PDF阅读器](#)

地址: 北京朝阳区北辰西路1号院3号中科院微生物所内 邮编: 100101

收信(款)人: 《微生物学报》编辑部

电话: 010-64807516 传真: 010-64807327 电子信箱: actamicro@im.ac.cn

本刊全文数据库版权所有, 未经许可, 转载、链接及印刷或制作光盘均属违法, 本刊将保留追究法律责任的权利