

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.05.034

磷酸乙醇胺转移酶 MCR1 结构与功能的研究

邢平, 李硕

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 本实验克隆了来源于 *E. coli* 的 MCR1 基因酶催化结构域, 以 *E. coli* 表达系统表达蛋白. 采用亲和层析、阴离子交换层析、分子筛层析等纯化方法获得纯度高、均一性好的蛋白; 采用座滴和悬滴法, 获得酶催化区域的蛋白质晶体; 收集 X 射线数据后, 分子置换法解析出酶催化区域的结构, 其分辨率达到 1.63 埃. 反常散射信号检测到 4 个锌离子信号, 结构分析锌离子与周围 Thr285、His465、His466、His395 位氨基酸联系紧密, 且 Thr285 被磷酸化. Thr285、His465、His466 和 His395 点突变为丙氨酸后, 宿主菌粘菌素抗性显著降低, 表明该区域与酶活密切相关. 本实验解析出 MCR1 酶活性区域的结构, 鉴定出酶活性中心, 为寻找抗 MCR1 靶向药物提供可用信息.

关键词: 磷酸乙醇胺转移酶; MCR1; 蛋白质纯化; 蛋白质晶体学

中图分类号: Q51 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2018)05-1127-06

Study on structure and function of phosphoethanolamine transferase MCR1

XING Ping, LI Shuo

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In this experiment, the MCR1 gene enzyme catalytic domain derived from *E. coli* was cloned and expressed in *E. coli* expression system. Purified proteins with high purity and good homogeneity were obtained by affinity chromatography, anion exchange chromatography and molecular sieve chromatography. The protein crystals of the enzyme catalyzed region were screened by the method of seating drop and the hanging drop. After collecting x-ray data, the structure of enzyme catalytic region was analyzed by molecular displacement method, and the resolution reached 1.63 angstrom. Four zinc ion signals were detected by the anomalous scattering signal. The structural analysis found that zinc ions was closely related to the surrounding amino acids of Thr285, His465, His466 and His395, and Thr285 was phosphorylated. After the mutation of Thr285, His465, His466 and His395 to alanine, the resistance of host bacteria to colistin decreased significantly, indicating that the region was closely related to enzyme activity. In this experiment, the structure of MCR1 enzyme was analyzed, the active region and the active center of enzyme was identified, which provided useful information for searching for anti MCR1 targeted drugs.

Keywords: Phosphoethanolamine transferase; MCR1; Protein purification; Protein crystallography

收稿日期: 2017-08-18

基金项目: 国家自然科学基金(31300618)

作者简介: 邢平(1990-), 男, 湖北黄冈人, 硕士, 主要研究方向为基因工程与蛋白工程. E-mail: xingping2048@163.com

通讯作者: 李硕. E-mail: lishuo@scu.edu.cn

1 引言

革兰氏阴性菌抗生素耐药性的增加对全球健康造成严重威胁。由于医院内感染抗生素耐药性的革兰氏阴性菌几率越来越大,使患者发病率和死亡率急剧增加^[1]。多粘菌素是一种阳离子多肽,可以结合在脂多糖的脂质 A 上,破坏细菌细胞膜^[2]。第三代头孢菌素类、碳青霉烯类在治疗抗生素耐药性革兰氏阴性菌引起的感染效果不佳后,多粘菌素被当做治疗的最后手段^[3]。许多革兰氏阴性菌和其他菌株,如奈瑟氏菌属、沙雷菌属,对多粘菌素具有内在的抗性^[4]。革兰氏阴性菌获得多粘菌素抗性最常见的手段是通过磷酸乙醇胺转移酶修饰脂质 A 上的 1' 和 4' 磷酸基团,中和革兰氏阴性菌外膜负电荷,使多粘菌素与外膜的结合力下降^[5]。

最近在中国发现一种来源于肠杆菌,由质粒编码的脂多糖修饰酶,叫做 MCR1^[6]。MCR1 是第一个被发现可以通过质粒转移的多粘菌素抗性基因。随后在全球范围内检测到致病菌的质粒上携带 MCR1 基因^[7-11]。MCR1 与解析出结构的磷酸乙

醇胺转移酶 LptA^[12] 和 EptC^[13] 有接近 40% 的同源性,根据序列比对发现,它们的活性位点相当保守。磷酸乙醇胺转移酶的 N 端是跨膜区,C 端是处在周质空间的酶催化区域。本研究用 X 射线晶体学的方法获得 MCR1 酶催化区域的结构,分辨率为 1.63 埃。结构显示催化区域是锌离子结合蛋白,有三个分子内二硫键。多粘菌素敏感性实验发现,285 位苏氨酸残基、395 位组氨酸残基、465 位天冬氨酸残基、466 位组氨酸残基都是与酶活性关联的重要残基。

2 材料与方 法

2.1 材 料

2.1.1 质粒和菌株 pET15b 由本实验室保存, DH5 α 和 BL21(DE3)感受态由本实验室制作。

2.1.2 主要试剂 Pfu 酶、限制性酶切酶、DNA 重组酶购自 Takara 公司;质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自康为世纪有限公司;其他化学试剂均为国产或进口分析纯;引物合成、测序由成都擎科生物科技有限公司完成,实验引物见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primers sequence

引物名称	序列(5'→3')
MCR1(214-541)F	GATGAAGTTGATGCACATATGAGTGCGCCAAAAGATAACC
MCR1-15 F	GATGAAGTTGATGCACATATG ATGCAGCATACTTCTGTG
MCR1-15R	GTTAGCAGCCGGATCCTTCTCGAGTCAGCGGATGAATGCGGT
T285A F	ACATCGTGCGGCACATCGGCAGCGTATTCTGTGCCGTGT
T285AR	ACACGGCACAGAATACGCTGCCGATGTGCCGCACGATGT
D465A F	TCAATGCTGTATGTGTCAGCGCACATGGCGAAAGTCTGGGT
D465A R	ACCCAGACTTTTCGCCATGTGCGCTGACATACAGCATTGA
H466A F	ATGCTGTATGTGTCAGCGATGCAGGCGAAAAGTCTGGGTGAG
H466A R	CTCACCCAGACTTTTCGCTGCATCGCTGACATACAGCAT
K401A F	CACGGGCTGCGTATTTTGCACGATATGATGAAAAGTTT
K401A R	AAACTTTTCATCATATCGTGCAAAAATACGCAGGCCCGTG
H395A F	CTGCACCAAATGGGCAATGCAGGGCCTGCGTATTTTAAG
H395A R	CTTAAAATACGCAGGCCCTGCATTGCCCATTTGGTGCAG

2.2 方 法

2.2.1 目的基因的扩增 以 pET15b-MCR1 质粒为模板,设计两端引物,PCR 扩增目的基因。PCR 扩增操作如下:向 PCR 管中加 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液,4 μ L dNTP(2.5 mM each),1 μ L 上游引物(10 μ M),1 μ L 下游引物(10 μ M),1 μ L pET15b-MCR1 质粒,1 μ L Pfu 酶,37 μ L ddH₂O,混匀,转

移到 PCR 仪中,PCR 反应过程如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;然后 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,进行 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶跑胶验证,切胶后,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收产物。

2.2.2 载体的构建 pET15b 载体双酶切后用琼脂糖凝胶跑胶验证,切胶后,用 DNA 凝胶回收试

剂盒回收产物.酶切后载体和 PCR 产物以同源重组的方法连接,用热激法将连接产物转入 DH5 α 感受态中.

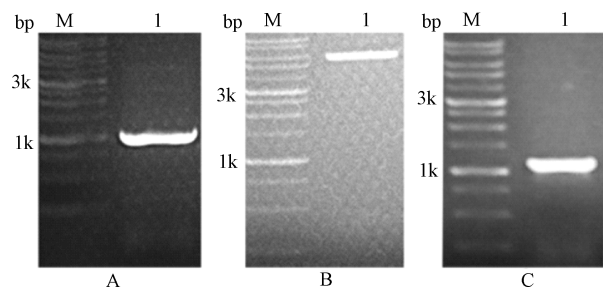


图1 MCR1(214~541)基因的克隆

(A)MCR1(214~541)基因扩增;(B)表达载体 pET15b 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切;(C)菌液 PCR 验证结果.

Fig. 1 Cloning of MCR1(214~541) gene

(A)MCR1(214~541)gene amplification; (B)Expression vector pET15b double digestion by *Nde* I and *Xho* I; (C) The positive clones were confirmed by bacteria liquid PCR

2.2.3 蛋白表达及纯化 验证成功的质粒转入 BL21(DE3)感受态中,12 mL 摇菌管中 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养过夜,转入到 1 L 培养瓶中,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至 OD₆₀₀=0.8 时,降温到 18 $^{\circ}$ C,加入终浓度为 0.2 mM IPTG 诱导表达过夜.

4000 r/min 离心 15 min 收集菌体,每升菌液加 20 mL 预冷的裂解缓冲液(25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl)重悬,加入 1% PMSF (100 mM),高压破碎仪破碎细菌. 4 $^{\circ}$ C, 15000 r/min 离心 30 min,上清加入含有 Ni-NAT 的柱子中,流穿两次. 洗杂溶液为 15 mM 咪唑,25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl,每次向一根柱子中加 10 mL 洗杂溶液,上一次过完后,再加下一次溶液,共 5 次. 洗脱溶液的组分为 300 mM 咪唑,25 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl,每次加 5 mL 洗脱溶液,共两次.

阴离子交换层析: MCR1(214~541)蛋白经 Ni-NAT 亲和层析纯化后,上样到阴离子交换层析柱,溶液 A: 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 溶液 B: 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl. 流速为 3 mL/min, 40 个柱体积从 0% 溶液 B 到 50% 的溶液 B.

分子筛层析: 离子交换层析纯化后的蛋白质样品用 30 kD 浓缩管浓缩至 1 mL,上样到分子筛柱子中,分子筛层析使用的溶液为 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl,过柱 28 mL,流速为 0.5 mL/min.

2.2.4 晶体生长及优化 经分子筛纯化后的蛋白质样品,浓缩至 7~8 mg/mL,使用坐滴法筛选晶体. 池液 70 μ L,蛋白质和池液以体积比为 1:1 混合,置于 18 $^{\circ}$ C 中.

2.2.5 结构解析 原始数据使用 HKL2000 软件包处理;用分子置换法确定相位解析结构,同源蛋白为 PDB:5K4P;用 Coot 软件搭建原始模型;使用 Phenix 精修结构^[14,15].

2.2.6 抗生素敏感性实验 挑取野生型和突变型菌株的单克隆到 15 mL 的摇菌管中,摇菌管含有 4 mL 氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 的摇床中生长至 OD₆₀₀=0.5. 接种 100 μ L 到 4 mL 终浓度为 100 μ g/mL 氨苄青霉素、3 μ g/mL 的硫酸粘菌素 B、0.05 mM IPTG 的 LB 液体培养基中,于转速为 220 r/min 的 37 $^{\circ}$ C 的摇床中培养 12h,然后用紫外分光光度计测菌液 OD₆₀₀ 的值.

3 结果及分析

3.1 MCR1 序列分析

使用 OCTOPUS: Prediction of membrane protein topology 网站预测 MCR1 的跨膜结构域及可溶性区域. 分析发现, MCR1 的全长为 541 个氨基酸残基, N 端为跨膜区域, 共有 5 个跨膜螺旋, 约 180 个氨基酸残基, C 端为可溶性区域. 用 Editseq 软件预测 MCR1(214~541) 分子量为 36.5 kD, 等电点为 5.09.

3.2 基因的克隆

以 pET15b-MCR1 为模板, PCR 扩增 MCR1(214~541)(图 2A); pET15b 质粒使用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切(图 2B); PCR 扩增产物和酶切载体回收后, 使用同源重组的方法连接. 阳性克隆经菌液 PCR(图 2C)和质粒测序验证正确.

3.3 蛋白质纯化

经阴离子交换层析后可以看到出现两个紫外吸收峰(图 3A), 去两个峰的样品进行 SDS-PAGE 验证(图 3B), 发现都是目的蛋白. 收集前一个紫外吸收峰的样品, 经分子筛层析进一步纯化, 得到高纯度的目的蛋白(图 3C、3D).

3.4 结构分析

MCR1(214~541) 的结构 α 螺旋- β 折叠- α 螺旋(图 4A). 在结构中发现 8 个锌离子, 有四个处在蛋白质内部, 4 个处在蛋白质的表面. 另外形成 3 对分子内二硫键.

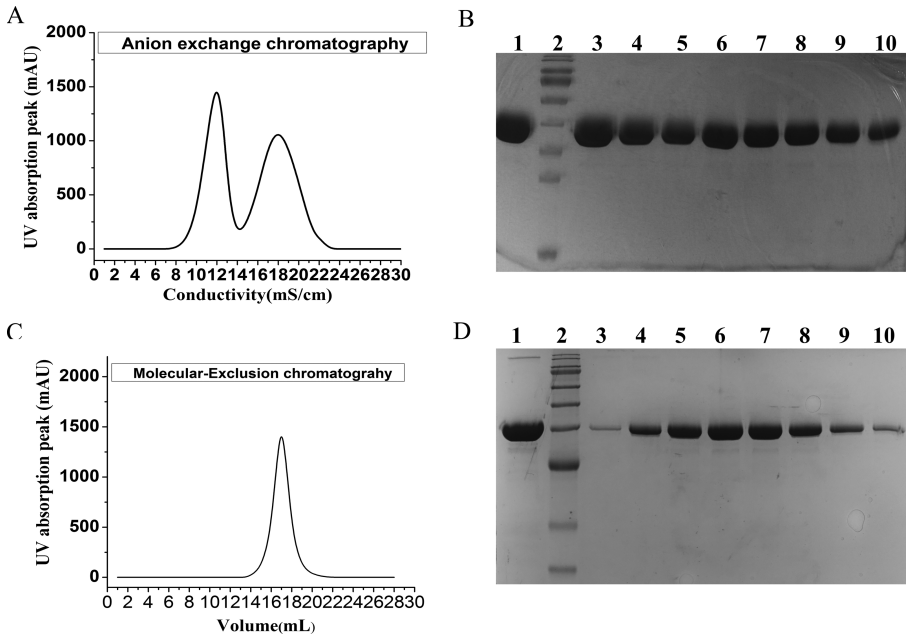


图 2 MCR1(214-541)纯化结果分析

(A)阴离子交换图谱分析;(B)阴离子交换 SDS-PAGE 分析;(C)分子筛层析图谱分析;(D)分子筛层析 SDS-PAGE 分

Fig. 2 Analysis of MCR1(214-541)purification results

(A)Anion exchange analysis ; (B) Anion exchange SDS-PAGE analysis; (C) Molecular sieve chromatographic analysis ; (D)Gel filtration chromatography SDS-PAGE analysis

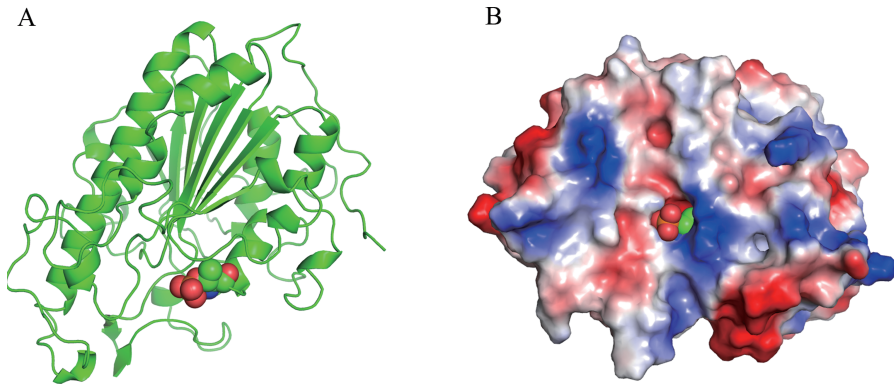


图 3 MCR1 酶催化活性区域的结构示意图

Fig. 3 The Overall structure of MCR1's catalyzed active region

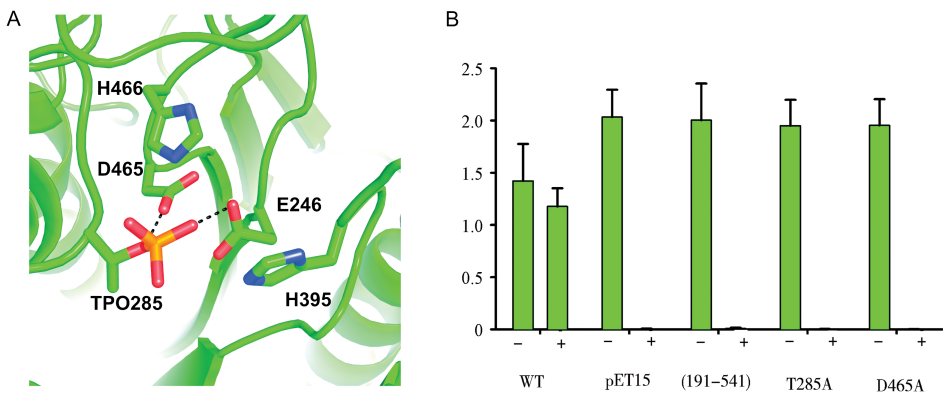


图 4 酶活中心关键氨基酸残基分析

Fig. 4 Analysis of key amino acid residues in enzyme center

3.5 点突变及抗生素敏感性分析

本实验以野生型、pET15b 质粒作为对照,结果显示野生型的基因可以在抗生素存在的情况下正常生长,转入 pET15b 空载体的 BL21(DE3)的菌株不能生长(图 5B)。T285、D465、H395、H466 突变成丙氨酸残基后(图 5、图 6),均会使 MCR1 的酶活性降低。菌株不具备多粘菌素抗性后,在含有多粘菌素的培养基中不能生长。

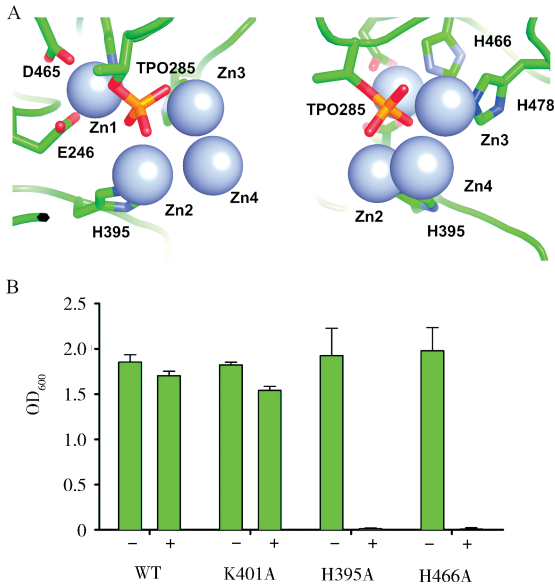


图 5 锌离子相互作用氨基酸残基分析

Fig. 5 Analysis of Amino Acid Residues in Interaction of Zinc Ion

4 讨论

具有抗生素耐药性的微生物在全球范围内广泛传播,对人类健康造成严重威胁。多粘菌素作为抵御多重耐药细菌感染的重要防疫手段,然而近期的研究发现质粒上携带的 MCR1 基因, MCR1 的表达可以赋予宿主多粘菌素耐药性。本研究克隆了 *E. coli* 为来源的 MCR1 基因的酶催化区域,于 BL21(DE3)中表达。为了纯化蛋白质,通常会在蛋白质的两端加上亲和层析的标签。本实验在 MCR1 (214~541)的 N 端加上 6×组氨酸标签,组氨酸标签与蛋白质之间有柔性氨基酸残基。蛋白质在结晶的过程中,需要蛋白质按照一定的顺序排列,而蛋白质的柔性区域不停地变化,影响蛋白质的排列,使蛋白质结晶困难。在实验过程中,使用凝血酶除去 N 端的组氨酸标签。在 MCR1 (214~541)经阴离子交换层析的纯化过程中,可以发现出现两个紫外吸收峰。验证发现前后两个峰都是 MCR1 (214~541)蛋白,阴离子交换层析根据蛋白质表面带电荷

的不同,从而达到分离纯化蛋白的目的。此时蛋白质可能处于两种不同的状态,致使蛋白质的表面电荷不一致。最后只有前一个峰出现蛋白质晶体,并成功解析出结构。

LPS 由磷脂、核心多糖和外围的 O-抗原组成,磷脂开始锚定在内膜,由细胞之中的酶将其与核心多糖连接在一起,翻转后,核心多糖暴露在周质空间之中;然后被加上 O-抗原,之后被运送到外膜的外表面。使革兰氏阴性菌具有抗生素抗性的机制有两种,一种是 ArnT 通过向脂质 A 的 1,4 磷酸基团上加上阿拉伯糖^[16];另外一种磷酸乙醇胺转移酶将磷酸乙醇胺加上 1'磷酸基团或者是 4'磷酸基团上。根据序列分析, MCR1 属于磷酸乙醇胺转移酶家族的一员。关于 MCR1 蛋白在什么地方发挥作用,之前的研究并没有给出答案。MCR1 蛋白的跨膜区处在内膜上,酶活性区域处在周质空间,可以推测, LPS 是在周质空间中被磷酸乙醇胺转移酶加上磷酸乙醇胺的。另外一个问题是磷酸乙醇胺转移酶是在 O-抗原被加上之前还是 O-抗原加上之后发挥作用,并不是很清楚。根据现有的磷酸乙醇胺转移酶家族的结构,并没有直接找到底物结合的位置,也就是没有找到磷酸乙醇胺与酶结合的位点,对于它直接作用的研究还只是处于推测。

本研究中的 MCR1 蛋白结构可以看到 T285 氨基酸残基被磷酸化。之前研究的磷酸乙醇胺转移酶家族 Eptc 和 Lpta 蛋白质也只是得到酶催化活性区域,而且都有苏氨酸残基的磷酸化,对于苏氨酸磷酸化的解释是该蛋白质处在一个酶催化的中间态^{[12][13]}。对于 MCR1 结合底物的位点,苏氨酸磷酸化的原因还需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] Peleg A Y, Hooper D C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria[J]. N Engl J Med, 2010, 363: 1483.
- [2] Falagas M E, Kasiakou S K. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections[J]. Clin Infect Dis, 2005, 40:1333.
- [3] Biswas S, Brunel J M, Dubus J C, et al. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2014, 10:917.
- [4] Olaitan A O, Morand S, Rolain J M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria[J]. Front Microbiol, 2014,

- 5:643.
- [5] Falagas M E, Rafailidis P I, Matthaïou D K. Resistance to polymixins: mechanisms, frequency and treatment options[J]. *Drug Resist Updates*, 2010, 13:132.
- [6] Liu Y Y, Wang Y, Walsh T R, *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16:161.
- [7] Hong D, Liang C, Tang Y W, *et al.* Emergence of the mcr-1, colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae[J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16:287.
- [8] Haenni M, Poirel L, Kieffer N, *et al.* Co-occurrence of extended spectrum β -lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16: 281.
- [9] Nordmann P, Poirel L. Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22: 398.
- [10] Poirel L, Kieffer N, Liassine N, *et al.* Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli* [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16: 281.
- [11] Nordmann P, Lienhard R, Kieffer N, *et al.* Plasmid-Mediated Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Bacteremia in Switzerland [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 62: 124.
- [12] Wanty C, Anandan A, Piek S, *et al.* The structure of the neisserial lipooligosaccharide phosphoethanolamine transferase A (LptA) required for resistance to polymyxin. [J]. *J Mol Biol*, 2013, 425: 3389.
- [13] Fage C D, Brown D B, Boll J M, *et al.* Crystallographic study of the phosphoethanolamine transferase EptC required for polymyxin resistance and motility in *Campylobacter jejuni* [J]. *Acta Crystallogr D: Biol Crystallogr*, 2014, 70: 2730.
- [14] Emsley P, Lohkamp B, Scott W G, *et al.* Features and development of Coot [J]. *Acta Crystallogr D: Biol Crystallogr*, 2010, 66: 486.
- [15] Adams P D, Afonine P V, Bunkóczi G, *et al.* PHENIX : a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution [J]. *Acta Crystallogr D: Biol Crystallogr*, 2010, 66: 213.
- [16] Petrou V I, Herrera C M, Schultz K M, *et al.* Structures of aminoarabinose transferase ArnT suggest a molecular basis for lipid A glycosylation. [J]. *Science*, 2016, 351: 608.

引用本文格式:

- 中文: 邢平, 李硕. 磷酸乙醇胺转移酶 MCR1 结构与功能的研究[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2018, 55: 1127.
- 英文: Xing P, Li S. Study on structure and function of phosphoethanolamine transferase MCR1 [J]. *J Sichuan Univ; Nat Sci Ed*, 2018, 55: 1127.