

大肠杆菌 O77 中 *wabD* 基因编码的 β -1,3-甘露糖基 转移酶产物结构的质谱表征

周大炜, 刘 斌, 胡 波, 吴俊丽, 韩艳芳

(南开大学泰达生物技术学院, 天津 300457)

Structure Elucidation of the Product of β -1,3-Mannosyltransferase Encoded by *wabD* Gene in *Escherichia coli* O77 Using Mass Spectrometry

ZHOU Da-wei, LIU Bin, HU Bo, WU Jun-li, HAN Yan-fang

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

Abstract: The O77 antigens of *Escherichia coli* contains a Man- β -1,3-GlcNAc linkage within the repeating unit. A synthetic substrate analog of the natural acceptor substrate undecaprenol-pyrophosphate-lipid [GlcNAc- α -PO₃-PO₃-(CH₂)₁₁-O-phenyl] was used as an acceptor and GDP-Man as a donor substrate. Electrospray ionization tandem mass spectrometry(ESI-MS/MS) is applied for the detailed structural characterization of the enzyme product. A systematic study was conducted on enzyme 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' cleavage ions which are derived from elimination of substituents from around the pyranose ring, were also observed. This extensive fragmentation shows the expected Man- β -1,3-GlcNAc linkage in the product, confirming that *wabD* is form of GDP-Man: GlcNAc-pyrophosphate-lipid β -1,3-mannosyltransferase.

Key words: Mannosyltransferase; electrospray ionization mass spectrometry(ESI); gene function

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0015-02

应用生物技术大量生产糖链是最有前景的途径。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。本实验室完成大肠杆菌 O77 抗原基因簇的破译,运用生物信息学方法预测了 *wabD* 基因为 O77 抗原基因簇中编码涉及 Man- β 1 \rightarrow 3-GlcNAc 键合成的糖基转移酶。为鉴定 *wabD* 基因的功能,本工作在对基因 *wabD* 进行克隆、大肠杆菌中高效表达的基础上,以人工合成的 GlcNAc-PP-PhU 为受体底物, GDP-Man 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分析。探索了高效、准确、快捷和灵敏的寡糖结构生物质谱分析方法,对糖基转移酶基因特定功能的鉴定有普遍适用性。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

本实验涉及的主要仪器,试剂,菌株,质粒,酶及酶活反应参见文献[1]。

1.2 ESI-MS 分析条件

流动注射泵进样, 进样量 $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。负离子模式下分析: 喷雾电压 -4.5 kV ; 壳气 (N_2) 流速 35 个单位; 金属毛细管温度 $220 \text{ }^\circ\text{C}$, 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为 $20\sim 35 \text{ eV}$ 。

2 结果与讨论

2.1 电喷雾离子化质谱结果

对于酶促反应产物, 负离子模式下, ESI-MS 中的基峰-质荷比为 m/z 788.33 的峰与预期酶促反应产物的相对分子质量相对应。

2.2 电喷雾离子化-多级质谱结果

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 产物离子有 m/z 444.20 $[\text{B}_3]$ 、523.87 $[\text{B}_4]$ 和 405.20 $[\text{Z}_3]$; 源于糖苷键的断裂产物离子有 m/z 240.93 $[\text{B}_3-\text{Man}-\text{Ac}]$ 、282.27 $[\text{B}_3-\text{Man}]$ 、321.20 $[\text{B}_4-\text{Man}-\text{Ac}]$ 、585.40 $[\text{Y}_4-\text{Ac}]$; 未发现涉及开环的产物离子。

以 m/z 444.20 为前驱离子, 最丰富的 MS^3 产物离子源于糖苷键的断裂 m/z 282.13 $[\text{B}_3-\text{Man}]$; 产物离子 m/z 222.45 ($^{2,4}\text{A}_2$)、384.25 ($^{0,4}\text{A}_2$) 和 264.10 ($^{1,3}\text{A}_2$) 源于非还原端 GalNAc 开环; 离子 m/z 402.13 对应于 $[\text{B}_3-\text{Ac}]$ 。

酶促反应产物的二级和三级质谱图示于图 1, 2。典型的 Y 型离子碎片 m/z 240.93、282.27、321.20、585.40 和 m/z 282.13 产生于单个的糖苷键断裂, 表明酶促反应产物二糖的连接序列为 Man-GlcNAc-PP-PhU。

A_2 离子是由非还原糖基开环所形成的, 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 ($^{1,3}\text{A}_2$) 源于非还原端糖环上的 C_1-C_3 键的跨环断裂。这就排除了糖苷键 4-位连接的可能, 2-位取代基 NAc 的存在可以推断为酶促反应产物二糖中的非还原糖基为 3 位连接。

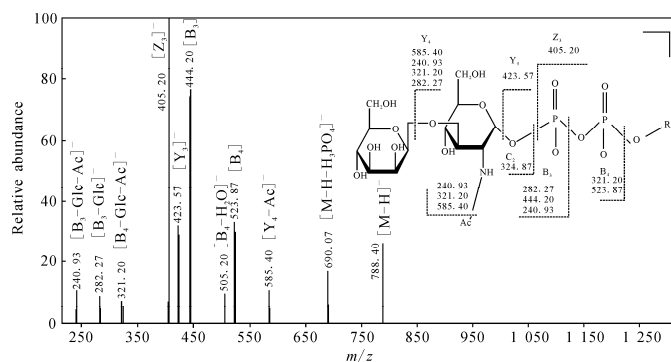


图 1 $wfgD$ 催化产物的 ESI-MS/MS

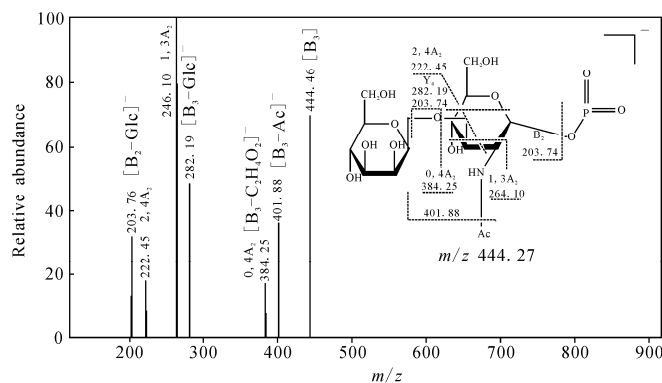


图 2 $wfgD$ 催化产物的 ESI-CID-MS/MS/MS 谱图