

# 大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶最小活性域的研究

金春生 金 城\*

(中国科学院微生物研究所资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

**摘 要** 比较大肠杆菌与脑膜炎奈瑟氏球菌的 CMP-唾液酸合成酶的氨基酸序列,发现大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶的保守区域主要位于 N-端,其 C-末端似乎对其催化活性没有作用。通过 PCR 方法,对大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶的 C-末端进行了一系列截短,将得到的产物连接至表达载体 pET-15b 中,在大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 中表达。经 IPTG 诱导,发现从 C-末端截去 189 个氨基酸酶仍有催化活性,说明大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶的最小活性域主要集中在 N-末端的 229 个氨基酸。有催化活性的 C-端缺失突变合成酶的比活、最适 pH 及热稳定性发生变化,提示被截去的 C-端氨基酸残基虽不直接参与构成酶的催化活性中心,但可影响催化活性域的构象,从而对酶的催化活性与稳定性产生影响。

**关键词** 唾液酸, CMP-唾液酸合成酶, 截短

**中图分类号** Q784 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)06-0676-07

CMP-唾液酸合成酶(Cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase)是合成唾液酸化糖链的关键酶,催化合成唾液酸的激活形式 CMP-唾液酸。研究发现在哺乳动物细胞中,恶性肿瘤中唾液酸含量高于正常细胞<sup>[1]</sup>。并且发现用药物抑制唾液酸化可减缓肿瘤的迁移<sup>[2,3]</sup>。在细菌中,它是多种致病菌的毒力因子<sup>[4]</sup>。最近,在许多致病真菌的细胞壁中发现有唾液酸存在<sup>[5-7]</sup>。估计这些唾液酸化的糖链在真菌所起的作用与一些病原菌中的作用一样,即通过模拟宿主细胞的表面抗原以逃避宿主细胞的免疫系统<sup>[8]</sup>。此外,最近在昆虫细胞中也发现有唾液酸存在,但具体功能仍不清楚<sup>[9]</sup>。很明显,研究生物体内唾液酸化糖链的机制正引起广泛的兴趣。

我们已从大肠杆菌中分离得到 CMP-唾液酸合成酶,并使其高效表达<sup>[10]</sup>。在与其它 CMP-唾液酸合成酶进行同源性比较时发现,此酶的保守区主要位于 N-末端。本实验以此为基础,利用 PCR 方法,对得到的大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶的 C-末端进行截短,研究 C-末端对 CMP-唾液酸合成酶的影响以及最小活性片段。研究发现 C-端截去 189 个氨基酸

残基后酶仍具有催化活性,进一步截短则导致酶丧失催化活性。硅胶薄层层析分析表明 C-端截去 189 个氨基酸残基的缺失突变合成酶仍可催化合成 CMP-唾液酸,说明大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶最小活性区域位于其 N-末端的 229 个氨基酸之中。对缺失突变合成酶部分酶学性质的分析表明,截去的 C-端可能对催化活性域的构象有影响,并对其有稳定作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株及质粒

大肠杆菌菌株 44277 为中国菌种保藏中心保藏。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自 Bethesda 研究实验室。大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 和 pET-15b 购自 Novagen 公司。质粒 pT74 含大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶基因为本实验室构建<sup>[10]</sup>。

### 1.2 工具酶及试剂

CTP 和 N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, NeuAc)购自 Sigma 公司。限制酶及 *pfu* DNA 聚合酶购自 Promega 公司。T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。其它试剂均为分析纯产品。

收稿日期 2002-06-18, 修回日期 2002-07-10。

基金项目:中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-3-02-01)基金资助,国家攀登计划特别支持。

\* 通讯作者。 Tel 86-10-62587206, Fax 86-10-62653468, E-mail jinc@sun.im.ac.cn

所用寡核苷酸引物为博亚公司及中国科学院微生物所技术室合成。

Primer	Sequence
CS <sub>5</sub>	5'-CTCCATGGCTACCAAGATTATTGCGATAATTCCA
CS <sub>3</sub>	5'-ATGGATCCTTATTTAACAATCTCCGCTAT
D <sub>1185</sub>	5'-GCCGGATCCTTATATTTTTTGTCTATTTTT
D <sub>1017</sub>	5'-GCCGGATCCTTACTTCGAGTTTATACCAGC
D <sub>849</sub>	5'-CGCGGATCCTTATGATGCATCATTTTTCTT
D <sub>738</sub>	5'-GCCGGATCCTTAATCAAATTCATTTCG
D <sub>687</sub>	5'-GCGGGATCCTTAAGTATACATTTTATTTTAG
D <sub>663</sub>	5'-AATGGATCCTTACTGAATGGTAATTGCAAG
D <sub>639</sub>	5'-GCCGGATCCTTAATCCATTCTATCATCTAT
D <sub>630</sub>	5'-AATGGATCCTTAAGAGCTTTCCTTATCCAT

1.3 C-末端缺失突变 CMP-唾液酸合成酶的构建

以含有大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶基因的质粒 pT74 为模板 ,利用合成的寡核苷酸引物扩增出不同长度 C-末端截短的 DNA 片段。在片段的 5'端引入 *Nco*I 位点 ,3'端引入终止密码子 TAA 及 *Bam*HI 位点。连接至表达载体 pET-15b 的 *Nco*I 和 *Bam*HI 位点中 ,转化大肠杆菌 BL21( DE3 )pLysS ,得到不同长度缺失 C-末端的 CMP-唾液酸合成酶。PCR 反应条件为 :94℃ 变性 1min ,55℃ 退火 1min ,72℃ 延伸 1.5min ,循环 30 次。

1.4 转化菌株的培养

以构建的重组质粒转化的菌株在 37℃ 下 LB 培养基(含氨卞青霉素 100μg/mL)中培养。当 OD 值达到 0.6 ~ 0.8 时 ,加入终浓度为 0.4mmol/L 的 IPTG ,25℃ 诱导 10h。离心( 5000r/min ,15min )收获菌体 ,保存于 -70℃。

1.5 制备纯化缺失 C 末端的 CMP-唾液酸合成酶

1L 含有重组质粒的大肠杆菌细胞经 IPTG 诱导 ,离心( 5000r/min ,15min )收获菌体。用 80mL 50mmol/L Tris-HCl ,pH8.0 缓冲液悬浮菌体。置于冰上超声破碎细胞 ,离心( 14000g 15min )去除细胞碎片。向上清液中缓慢加入固体硫酸铵 ,收集 35% ~ 60% 饱和度的沉淀。溶于 50mL 同种缓冲液中 ,用 3L 的含 0.1mol/L NaCl 的 50mmol/L Tris-HCl ,pH7.6 透析过夜。除盐的粗酶冻干浓缩。进一步用离子交换柱 DEAE-52( 2.5cm × 30cm )纯化。用含 0.1mol/L

NaCl 的 50mmol/L Tris-HCl ,pH7.6 缓冲液平衡柱 ,上样后 ,先用一个柱体积的平衡缓冲液洗脱掉未结合的蛋白。然后用 2L 同种缓冲液配制的 0.10mol/L 至 0.25mol/L 的 NaCl 进行梯度洗脱 ,SDS-PAGE 检测目的蛋白 ,合并有活力的各个部分 ,对平衡缓冲液透析过夜 ,冻干浓缩。以上各步骤均在 4℃ 进行。

1.6 酶活测定

用 2-硫代巴比妥酸的方法测定<sup>[11]</sup>。250μL 反应体系中含有 5.5 mmol/L CTP ,2.8 mmol/L 唾液酸 ,0.2mol/L Tris-HCl ,pH9.0 ,20mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 0.2mmol/L DTT。在 37℃ 保温 1h ,加入 1.6mol/L NaBH<sub>4</sub> 置于室温 15min。用于还原剩余的唾液酸。然后加入 50μL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 置于 0℃ 5min ,用于消除剩余的 NaBH<sub>4</sub>。再在 37℃ 水浴中保温 10min ,用来断裂 CMP-唾液酸中的磷酸酯键。加入 50μL 0.02mol/L NaIO<sub>4</sub> 来氧化解离下来的唾液酸 ,置于室温 10min。再加入 400μL 溶于 0.5mol/L HCl 的 4% NaAsO<sub>2</sub> ,而后加入 1mL 溶于 0.5mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的 0.6% 2-硫代巴比妥酸。于沸水中加热 15min。加入 1mL 环己酮 ,将液相的粉红色萃取至有机相。将有机相在 549nm 比色。酶的活力单位定义为在 37℃ 1min 内催化生成 1μmol CMP-唾液酸的酶量。

1.7 CMP-唾液酸的合成

250μL 反应体系中含有 5.5mmol/L CTP ,2.8 mmol/L 唾液酸 ,0.2mol/L Tris-HCl ,pH9.0 ,20mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 0.2mmol/L DTT 及适量的酶 ,37℃ 反应 60min。反应产物经滤纸过滤 ,向滤液加入乙醇( 9:1 V/V ) ,沉淀 5h。冷冻干燥后悬浮于 50 mmol/L Tris-HCl pH8.0 中 ,进行硅胶薄层层析。展层液为 95% 乙醇与 1mol/L NH<sub>4</sub>Ac pH6.0 的混合物( 7:3 )。

2 结 果

2.1 大肠杆菌与其它细菌来源的 CMP-唾液酸合成酶氨基酸序列的同源性比较

大肠杆菌与其它细菌的 CMP-唾液酸合成酶氨基酸序列同源性比较发现 ,此类胞苷基转移酶的保守残基主要集中在 N-端的 210 个氨基酸中。细菌 *Nerisseria meningitidis* ,*Haemophilus influenzae* 和 *Haemophilus ducreyi* 的 CMP-唾液酸合成酶分别有 228 ,228 和 229 个氨基酸残基<sup>[12~14]</sup> ;大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶虽有 418 个氨基酸 ,但其保守序列也主要集中在 N-端的 210 个氨基酸中( 图 1 )。

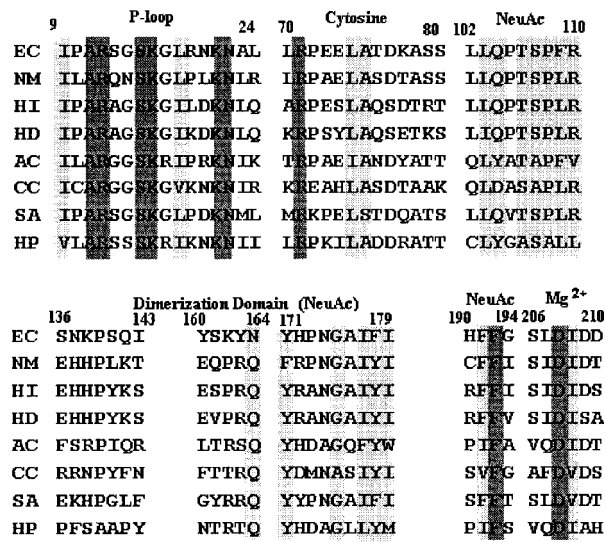


图 1 大肠杆菌与其它已知的 CMP-唾液酸合成酶底物结合区域保守氨基酸的序列比较

Fig.1 Amino acid sequence alignment of the substrate binding regions of known bacterial CMP-NeuAc synthetase

EC( *E. coli* ),NM( *N. meningitides* ),HI( *H. influenza* ),HD( *H. ducreyi* ),AC( *Aeromonas caviae* ),CC( *Campylobacter coli* )SA( *Streptococcus agalactiae* ),HI( *Helicobacter pylori* )

## 2.2 C-末端缺失突变 CMP-唾液酸合成酶的构建

根据对不同细菌来源的 CMP-唾液酸合成酶的同源性分析,推测大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶的催化活性域位于 N-末端的 210 个氨基酸内,为此我们对该酶进行了缺失突变。用 PCR 方法扩增出大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶基因编码区 3'-端缺失片段,并在扩增片段的 3'-端分别引入终止密码子 TAA(图 2A)。将扩增片段分别连接到 pET-15b 的 *Nco*I/*Bam*HI 位点后,转化大肠杆菌 BL21( DE3 )pLysS。经测序证实所克隆的片段均为预期突变基因,其编码的蛋白如图 2B 所示,其中 CS-Δ23 包括 395 个氨基酸;CS-Δ79 含有 339 个氨基酸;CS-Δ135 含有 283 个氨基酸;CS-Δ172 含有 246 个氨基酸;CS-Δ189 含有 229 个氨基酸;CS-Δ197 含有 221 个氨基酸;CS-Δ205 含有 213 个氨基酸;而 CS-Δ208 含有 210 个氨基酸。

## 2.3 缺失突变 CMP-唾液酸合成酶的表达与活力测定

将构建好的含缺失突变 CMP-唾液酸合成酶基因的表 达 质 粒 分 别 转 化 大 肠 杆 菌 BL21( DE3 )pLysS,经 IPTG 诱导后,用 SDS-PAGE 分析表达产物,得到不同大小的缺失突变 CMP-唾液酸合成酶,表达蛋白的分子量与预期的大小相符(图 3)。

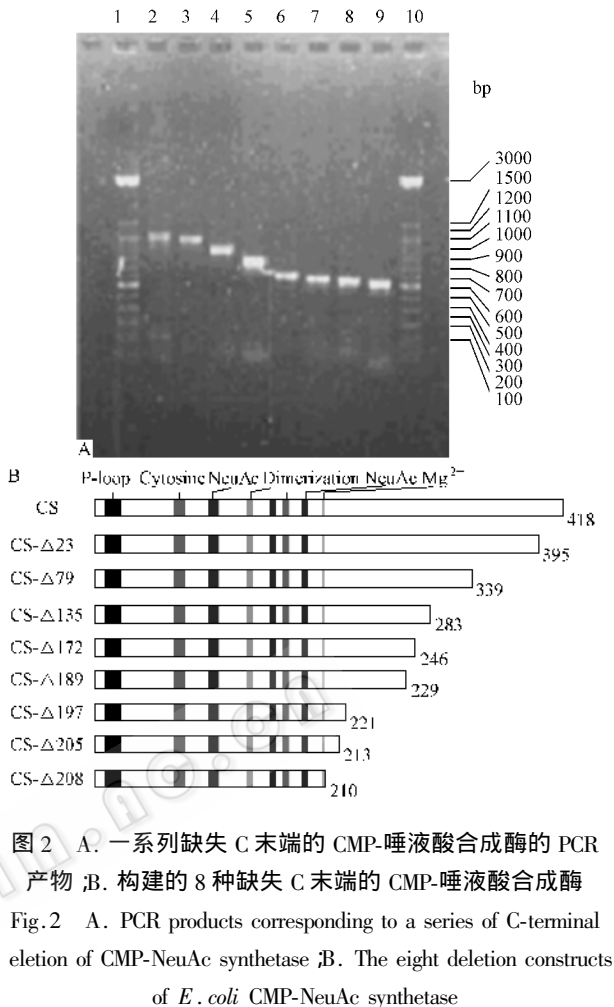


图 2 A. 一系列缺失 C 末端的 CMP-唾液酸合成酶的 PCR 产物;B. 构建的 8 种缺失 C 末端的 CMP-唾液酸合成酶

Fig.2 A. PCR products corresponding to a series of C-terminal elation of CMP-NeuAc synthetase;B. The eight deletion constructs of *E. coli* CMP-NeuAc synthetase

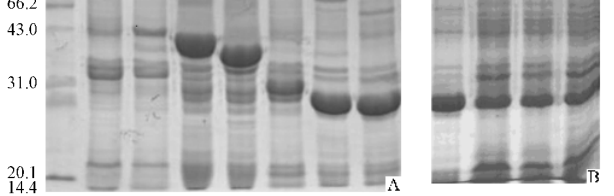


图 3 SDS-PAGE 分析野生的与缺失突变 CMP-唾液酸合成酶

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the native and truncated CMP-NeuAc synthetase from *E. coli*

- A. M. Molecular weight standards;1. BL21( DE3 )pET-15b;2. CS;3. CS-Δ23;4. CS-Δ79;5. CS-Δ135;6. CS-Δ172;7. CS-Δ189.
- B. 1. CS-Δ189;2. CS-Δ197;3. CS-Δ205;4. CS-Δ208

将表达产物分别经离子交换柱 DEAE-52 层析纯化,测定纯化的缺失突变 CMP-唾液酸合成酶酶

活 ,发现 CS-△23、CS-△79、CS-△135、CS-△172 和 CS-△189 的分子比活( u/mol )分别为全长唾液酸合成酶的 65%、38%、31%、15% 和 43% ;而 CS-△197、CS-△205 和 CS-△208 则检测不到活性( 表 1 )。

表 1 野生型与重组 CMP-唾液酸合成酶活力比较  
Table 1 the specific activity of native and truncated CMP-NeuAc synthetase from *E. coli*

	Number of amino acids	Theoretical molecular mass/kD	Enzyme activity ( u , 10 <sup>-3</sup> )*	Specific activity/ ( u/mol , 10 <sup>7</sup> )	Relative activity /%
CS full length	418	48.6	2.6230	4.41	100
CS-△23	395	46.0	1.2996	2.86	64.85
CS-△79	339	39.4	1.1833	1.66	37.64
CS-△135	283	32.6	1.2500	1.38	31.29
CS-△172	246	28.5	1.6733	0.64	14.51
CS-△189	229	26.3	1.9750	1.88	42.63
CS-△197	221	25.3	N. D.	—	—
CS-△205	213	24.4	N. D.	—	—
CS-△208	210	24.0	N. D.	—	—

\* One unit is defined as the amount of enzyme which synthesized 1μmol of CMP-NeuAc per min at 37℃ .

2.4 缺失突变 CMP-唾液酸合成酶部分酶学性质分析

为确定大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶 C-末端被截短后对其酶学性质的影响 ,我们对具有酶活力的 CS-△23、CS-△79、CS-△135、CS-△172 和 CS-△189 进行了部分酶学性质的研究。

2.4.1 最适温度 :在不同温度下 ,按标准测活方法测定缺失突变 CMP-唾液酸合成酶的酶活。结果表明缺失突变 CMP-唾液酸合成酶的最适温度均在 37℃( 图 4 ) ,与全长的酶相同。

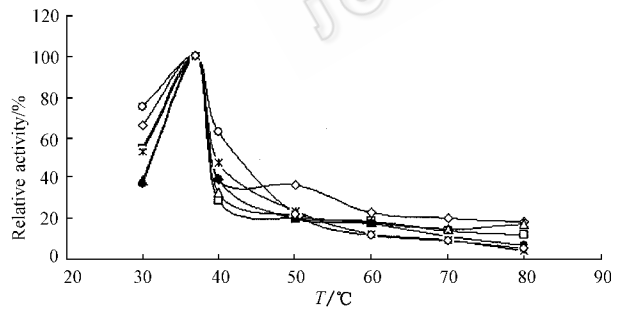


图 4 温度对缺失突变大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶活力的影响

Fig.4 Effect of temperature on truncated CMP-NeuAc synthetase activities

—◇— CS-full length ; —□— CS-△23 ; —△— CS-△79 ;  
—●— CS-△135 ; —○— CS-△172 ; —○— CS-△189

2.4.2 最适 pH :在 pH6.0 ~ 11.0 范围内测定缺失突变 CMP-唾液酸合成酶的最适 pH 值。发现除 CS-△189 具有与全长酶相似的最适 pH ( pH9.0 )外 ,其它缺失 C 末端的 CMP-唾液酸合成酶的最适 pH 均小于全长酶的最适 pH ,而且最适 pH 的范围也变大 ,介

于 7.0 ~ 8.0 之间 ,而且在 C-末端截去 23 个氨基酸残基( CS-△23 )后 ,其最适 pH 范围为 7 ~ 9( 图 5 )。

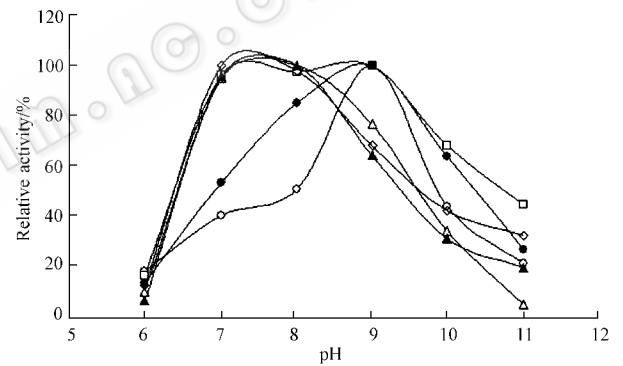


图 5 pH 对缺失突变大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶活力的影响

Fig.5 Effect of pH ( Tris-HCl ( pH 5.0-8.0 ) , and glycine-NaOH

( pH 9.0-11.0 )) on truncated CMP-NeuAc synthetase activities  
—○— CS-full length ; —□— CS-△23 ; —△— CS-△79 ; —◇— CS-△135 ; —▲— CS-△172 ; —●— CS-△189

2.4.3 热稳定性 :将缺失突变的大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶 ( CS-△23、CS-△79、CS-△135、CS-△172 和 CS-△189 )在 30℃、37℃、40℃、50℃ 和 60℃ 下保温 0min、10min、20min、30min、40min、50min、60min 和 70min ,再按常规法加入底物测定酶活。如图 6 所示 ,全长的大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶在 37℃ 很稳定 ,在 40℃ 保温 70min 丧失 20% 的活力 ,而在 50℃ 和 60℃ 保温 10min ,仅剩 10% 的活力 ,此外还伴随着蛋白的聚集使反应液变混浊。缺失突变 CMP-唾液酸合成酶 CS-△23、CS-△79 和 CS-△135 的热稳定性

与全长的酶相同。但 CS-△189 表现出稳定性下降，在 37℃ 保温 20min 损失 10% 的酶活；在 40℃，保温

20min 仅剩 60% 的活力。CS-△172 虽然在 37℃ 依然稳定，但在 40℃，保温 20min 仅剩 60% 的活力。

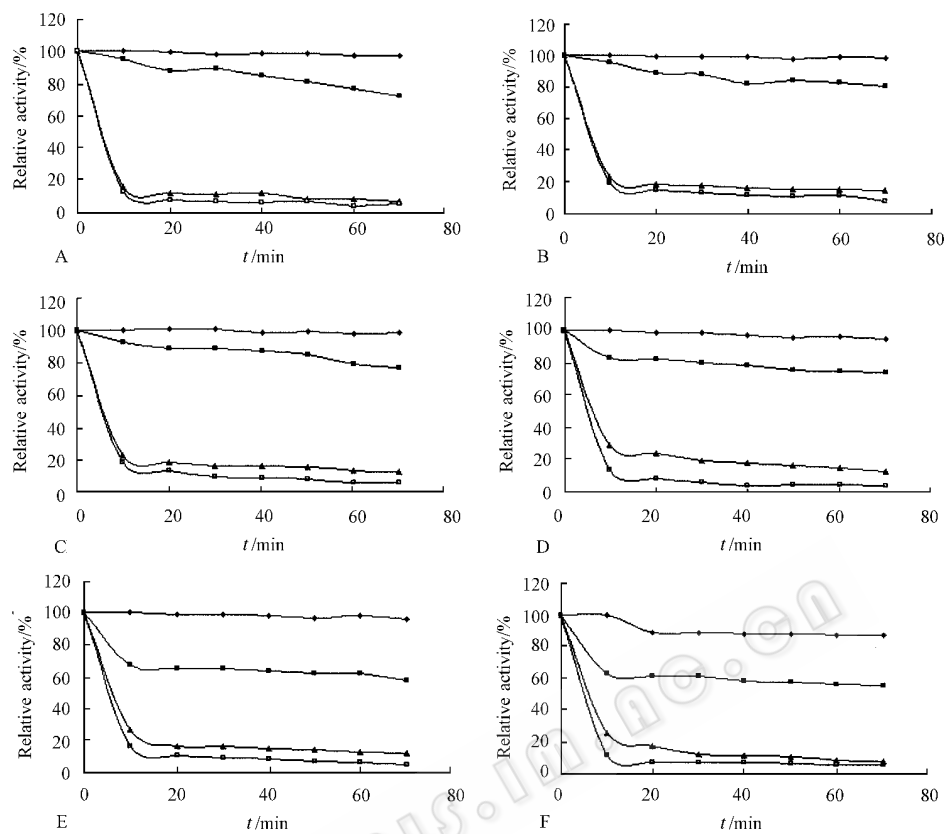


图 6 缺失突变大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶的热稳定性

Fig.6 Thermostabilities of truncated enzymes

The enzymes were incubated at 37℃(◆) 40℃(■) 50℃(▲) and 60℃(□)for different times.

A. CS-full length ; B. CS-△23 ; C. CS-△79 ; D. CS-△135 ; E. CS-△172 ; F. CS-△189

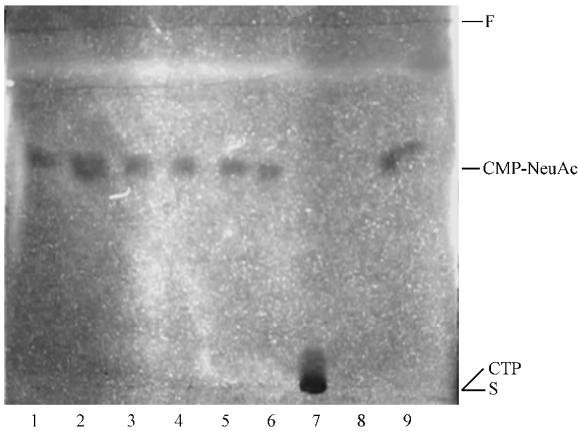


图 7 薄层层析(TLC)分析合成的 CMP-唾液酸

Fig.7 TLC analysis of the reaction products catalyzed by the recombinant enzymes.

1. CS ; 2. CS-△23 ; 3. CS-△79 ; 4. CS-△135 ; 5. CS-△172 ; 6. CS-△189 ; 7. CTP standard ; 8. NeuAc standard ; 9. CMP-NeuAc standard

2.5 用缺失突变的大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶合成 CMP-唾液酸

用纯化的缺失突变酶进行小量 CMP-唾液酸的制备，结果表明缺失突变大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶( CS-△23、CS-△79、CS-△135、CS-△172 和 CS-△189 )均能用于合成 CMP-唾液酸( 图 7 )。

3 讨 论

对不同来源的 CMP-唾液酸合成酶的氨基酸序列比较发现，其高度保守的区域主要集中在蛋白的从 N-端起始的约 210 个氨基酸残基内，包括磷酸结合位点、单核苷酸结合位点、唾液酸结合位点以及 Mg<sup>2+</sup> 结合位点。在分子量相对较小的 *N. meningitidis* CMP-唾液酸合成酶中，形成二聚体的亚基间相互作用区域内的保守氨基酸残基也存在大肠杆菌的酶的相应区域。而大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶的分子量几乎是 *N. meningitidis* 酶的 2 倍，推测其 C-末端

对其催化功能似乎是冗余的。

对大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶的 C-末端进行截短,对所得的缺失突变酶进行酶活性检测,发现从 C-末端截去 23、79、135、172 和 189 个氨基酸,酶活力有不同程度的降低。但进一步截去 197、205 和 208 个氨基酸,则酶的催化活性完全丧失。对酶的二级结构预测表明,CS-△189 的二级结构与 *N. meningitidis* 的二级结构几乎完全相同<sup>[12]</sup>,同源建模的方法也发现 CS-△189 的三维结构与 *N. meningitidis* 相同<sup>[13]</sup>,其 C-末端形成一个  $\alpha$ -helix;CS-△197 与 CS-△189 相比缺少 C-端的 QKKNRQKI,其中较保守的 QKK 缺失使 CS-△197 的 C-末端  $\alpha$ -helix(RMDFELTIQ)不完整,推测由 RMDFELTIQQKK 形成的 C-末端的  $\alpha$ -helix 时保持催化域正确构象是非常关键的;完全缺少 C-末端  $\alpha$ -helix(CS-△208 与 CS-△213)无活性也说明这点。

实验中观察到有酶活的缺失突变酶催化能力下降,其中值得注意的是 CS-△172 的催化活性只有全长酶的 15%,而 C-末端比 CS-△172 还少 17 个氨基酸(LYQNIHNRINEKRNEFD)的 CS-△189 却有约 43% 的酶活力,从二级结构上看这 17 个氨基酸可形成一个  $\alpha$ -helix,这一  $\alpha$ -helix 的空间取向可能影响了活性中心的可接近性。CS-△189 在 30℃ 时的相对活力比全长酶的相对酶活略高,以及其最适 pH 范围与全长酶类似也表明 CS-△189 的折叠更接近全长酶中催化活性域的折叠,而且 CS-△189 由于缺失 C-末端其构象的柔性更大,这可能是 CS-△189 比 CS-△172 活性更高的原因。缺失突变酶中仅 CS-△197 在 40℃ 稳定性下降,而 CS-△189 在 37℃ 就很不稳定(图 6),提示第 230-245 位间的氨基酸残基所形成的  $\alpha$ -helix 在稳定催化活性域的构象上可能起关键作用,而第 246-283 位残基间形成的一段  $\alpha$ -helix 对活性域的构象也起部分稳定作用。三维模型显示,大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶的催化活性域的构象与 *N. meningitidis* CMP-唾液酸合成酶亚基的构象相同,也有一个类似于亚基相互作用区域的空间结构,推测由 230-283 间的氨基酸残基所形成的二级结构可在空间取向上接近该区域,并起到类似 *N. meningitidis* 的亚基间的稳定作用相似的作用。

本研究表明大肠杆菌 CMP-唾液酸合成酶的催化活性域位于 N-端的 229 个氨基酸残基内,位于

230-283 位的氨基酸残基对催化域的构象起稳定作用,但 C-端是否还有其它的功能尚不清楚,深入的研究正在进行中。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Kem WF, Spier CM, Miller TP, Grogan TM. NCAM (CD56)-positive malignant lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 1993, **12** (1-2): 1 ~ 10
- [2] Harvey BE, Thomas P. Inhibition of CMP-sialic acid transport in human liver and colorectal cancer cell lines by a sialic acid nucleoside conjugate (KI-8110). *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **190** (2): 571 ~ 575
- [3] Takano R, Muchmore E, Dennis JW. Sialylation and malignant potential in tumour cell glycosylation mutants. *Glycobiology*, 1994, **4** (5): 665 ~ 674
- [4] Jann B, Jann K. Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1990, **150**: 19 ~ 42
- [5] Soares RM, de A Soares RM, Alviano DS, Angluster J, Alviano CS, Travassos LR. Identification of sialic acids on the cell surface of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1474**: 262 ~ 268
- [6] Soares RM, Costae e Silva-Filho F, Rozental S *et al.* Anionogenic groups and surface sialoglycocojugate structures of yeast forms of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology*, 1998, **144**: 309 ~ 314
- [7] Rodrigues ML, Rozental S, Couceiro JN *et al.* Identification of N-acetylneuraminic acid and its 9-O-acetylated derivative on the cell surface of *Cryptococcus neoformans*: influence on fungal phagocytosis. *Infect Immun*, 1997, **65**: 4937 ~ 4942
- [8] Wasylnka JA, Simmer MI, Moore MM. Differences in sialic acid density in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species. *Microbiology*, 2001, **147**: 869 ~ 877
- [9] Jarvis DL, Howe D, Aumiller JJ. Novel baculovirus expression vectors that provide sialylation of recombinant glycoproteins in lepidopteran insect cells. *J Virol*, 2001, **75**: 6223 ~ 6227
- [10] Xia G, Han X, Ding H *et al.* Cloning and overexpression of a cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase from *Escherichia coli*. *J Mol Catal B: Enzymatic*, 2001, **10**: 199 ~ 206
- [11] Vann WF, Silver RS, Abejion C. Purification, properties, and genetic location of *Escherichia coli* cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase. *J Biol Chem*, 1987, **262**: 17556 ~ 17562
- [12] Pan X.-M. Multiple linear regression for protein secondary structure prediction. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 2001, **43**: 256 ~ 259
- [13] Mosimann SC, Gilbert M, Dombrowski D *et al.* Structure of a sialic acid-activating synthetase, CMP-acylneuraminate synthetase in the presence and absence of CDP. *J Biol Chem*, 2001, **276** (11): 8190 ~ 8196

Minimal Functional Domain of Cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic Acid ( CMP-NeuAc ) Synthetase from *Escherichia coli*

JIN Chun-Sheng JIN Cheng\*

( State Key Laboratory of Microbial Resources , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

**Abstract** In comparison with its counterpart from *N. meningitidis* , all conserved motifs were found in the N-termini of *E. coli* CMP-NeuAc synthetase. *E. coli* CMP-NeuAc synthetase seems to have redundant C-termini with a less effect on its activity. To explain this speculation , a series of recombinant DNAs with deletion from 3'-end of CMP-NeuAc synthetase were produced by PCR , ligated into expression vector pET-15b and expressed in BL21( DE3 )pLysS. After induction with IPTG , we found that the recombinant enzyme with deletion of 189 amino acids from C-termini retained its activity. This result demonstrates that the 229 amino acids of N-termini was the minimal functional domain of *E. coli* CMP-NeuAc synthetase. The deletions altered the optimum pH and thermostability of active truncated enzymes , indicating that the truncated C-terminal amino acids of *E. coli* CMP-NeuAc synthetase could affect the conformation of the enzymatic catalytic domain and therefore affect its catalytic activity and thermostability , although it is not involved in enzymatic activity directly.

**Key words** sialic acid , CMP-NeuAc synthetase , deletion

Received : 06-18-2002

This work was supported by Grants from the Chinese Academy of Sciences( No. KSCX2-3-02-01 ) and Ministry of Science and Technology of China( Special-aid for basic research ).

\* Corresponding author. Tel : 86-10-62587206 ; Fax : 86-10-62653468 ; E-mail : jinc@sun.im.ac.cn

DNA 指纹技术

在法医鉴定中 ,DNA 指纹技术主要包括 3 个步骤。从犯罪点收集生物学证据如头发 ,血迹等 ,分析这些线索的 DNA 序列 ; 将从犯罪嫌疑人处取来的样本与这些线索进行比较。如果两者相配 ,就可以断定嫌疑人在案发现场。

因为在染色体中碱基对很多 ,从细胞提取的 DNA 链要用一定的酶在限制位点酶解成小的片段 ,这也会使双链结构破坏。得到的不同大小 DNA 片段然后用凝胶电泳分离 ,在此过程中 ,给加有 DNA 的凝胶加上外部电场 ,则 DNA 发生移动 ,不同 DNA 片段移动的距离决定于 DNA 片段的大小。

凝胶用溴化乙啶染色 ,切下分离各种 DNA 片段。各种 DNA 片段是通过将这些胶段放到紫外电泳凝胶上来进行观察的。当暴露在中波紫外光( 其中心波长为 312nm )下时 ,用溴化乙啶染色的 DNA 会发出荧光 ,可对染色的 DNA 胶进行照相以便进行记录、文档处理及定量分析。这种分析能测定出目标 DNA 片段的碱基对数 ,可变强度的紫外观察仪如美国 SP 公司的 TV 系列产品对胶片段准备和分析很有效 ,为了减少 DNA 照片裂痕和变白的可能性 ,在切胶过程中设定低紫外照射强度 ,之后 ,将设备调到高紫外强度 ,对高清晰带进行分析。

再将 DNA 片段转到尼龙膜或硝化纤维膜上 ,这个过程称为“ Southern ”印迹。DNA 的转移是通过电场或毛细管现象实现的。印迹之后 ,DNA 片段与各种叫做探针的具有放射性标记的核酸链杂交 ,以形成碱基的互补配对。因为要经过多次杂交步骤和之后的洗膜 ,因此 ,保证 DNA 片段共价固着到膜上是很重要的。否则 ,从放射自显影得到的杂交信号在经过多次洗膜后会很糟糕。UV 紫外快速固着仪如 XL- 1000 或 XL- 1500 为 DNA 结合于膜上提供了最有效的方法 ,用这些设备做实验时 ,即使在很多次的洗膜后 ,仍能显著提高杂交信号。

固着到膜上后 ,DNA 片段与放射性标记的已知序列的 DNA 探针进行杂交 ,通常是用同位素磷酸在 DNA 片段和探针间建立碱基配对。将含有探针和 DNA 片段的膜放入不透光的放射自显影暗盒中 ,暗盒在 - 70℃ 的温度下放置 3 ~ 4 天。放射性将导致碱基对在放在暗盒的 X 射线片子上形成一种图像 ,在暗盒里使用增强屏可以显著加速膜的曝光过程。片子形成后 ,就可以将样品形成的 DNA 带与嫌疑人进行比较 ,相同带形就是嫌疑犯在案发现场的证据 ,可以确认其犯罪身份。

( 北京博朗特科技有限公司 单韶峰 )