

# 与 GyrA 相互作用的 GyrB 结构域突变 对结核分枝杆菌螺旋酶功能的影响

王茂淋 黄友谊 左怀雨 张吉斌

农业微生物学国家重点实验室/华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

**摘要** DNA 螺旋酶中的 GyrA 与 GyrB 亚基只有互作重组后才有酶活性。为寻找 GyrB 亚基和 GyrA 亚基相互作用的关键区域, 构建了不同的 GyrB 亚基突变体, 分析 GyrB 各突变体与 GyrA 亚基的相互作用对全酶活性的影响。结果显示, GyrB 亚基 C 端是其与 GyrA 相互作用的主要结构域, 结合 GyrB 的二维结构, 提出 GyrB 中第 531~550 位氨基酸是影响螺旋酶功能的关键区域, 并可能是理想的新药设计靶标。

**关键词** 结核分枝杆菌 DNA 螺旋酶; GyrB 缺失突变体; 松弛活性; 切割活性

**中图分类号** Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)04-0071-05

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)螺旋酶是由 2 个 GyrA 亚基和 2 个 GyrB 亚基组成的四聚体, GyrA 和 GyrB 亚基只有结合在一起才具有催化活性。20 世纪 90 年代, 人们普遍认为 *gyrB* 基因与 *gyrA* 基因同时发生突变导致菌株出现高水平抗性<sup>[1-2]</sup>。近 10 年在喹诺酮类耐药结核分枝杆菌中不断观察到 *gyrB* 基因单独突变<sup>[3-8]</sup>。当前的研究热点是探讨 GyrA 和 GyrB 亚基的相互作用, 发现其相互作用关键区域, 寻找新的靶标。本研究通过构建不同的 GyrB 亚基突变体, 分析 GyrB 各突变体与 GyrA 亚基的相互作用对全酶活性的影响, 阐明 GyrB 与 GyrA 亚基互作的关键区间, 进一步揭示螺旋酶的催化机制, 旨在为抗结核新药提供理想的靶标。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

构建的蛋白如下: GyrB1-518(GyrB 第 1~518 位氨基酸)、GyrB1-531(GyrB 第 1~531 位氨基酸)、GyrB $\Delta$ 531-550(GyrB 敲除第 531~550 位氨基酸)、GyrB $\Delta$ 548-564(GyrB 敲除第 548~564 位氨基酸)、GyrB-CTD(GyrB 第 463~714 位氨基酸)、GyrB-NTD(GyrB 第 1~462 位氨基酸); GyrB 为未突变的 B 亚基, 表达载体均为 pET-28a; GyrA 为未

突变的 A 亚基, 以 pET-20b 载体表达。 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、松弛型 pBR322、pET-20b、pET-28a 均由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保存。

酵母膏、Typton 购买自 Oxoid 公司, tRNA 购买自上海源叶生物科技有限公司, Plasmid Midiprep Kit 购买自庄盟国际生物基因科技有限公司(庄盟生物), 其他试剂均为国产分析纯。多序列比对软件采用 Clustal W; 序列分析软件采用 MEGA 5; 分子设计软件采用 MOE; 分子结构软件采用 PyMol。

### 1.2 pET-20b 质粒提取

活化含 pET-20b 质粒的菌株, 然后接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 °C、190 r/min 培养 12 h, 12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 按照试剂盒要求提取质粒。

### 1.3 蛋白表达、纯化

活化含重组质粒的菌株, 按 1% 的接种量接种含重组质粒的菌株于 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C 12 h, IPTG 诱导。含质粒 pET-28a 菌株的 IPTG 诱导剂量为 1 mmol/L, 含质粒 pET-20b 菌株的剂量为 0.4 mmol/L。将菌体收集, 超声破碎, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 上清过滤后 4 °C 备用。蛋白的纯化步骤按照 GE 公司说明书操作, 蛋白纯化后进行 SDS-PAGE 检测。

收稿日期: 2017-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070685)

王茂淋, 硕士研究生。研究方向: 微生物工程与制剂。E-mail: wmmml1@163.com

通信作者: 张吉斌, 教授。研究方向: 微生物学。E-mail: zhangjb05@163.com

利用超滤离心管进行蛋白浓缩。3 500~4 000 r/min 于 4 °C 下离心 30 min 进行浓缩,再加入蛋白保存液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 5 mmol/L DTT, 30%甘油)至 2 mL,收集超滤管中浓缩液,于 4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清,于 -20 °C 保存备用。

#### 1.4 螺旋酶松弛活性的测定

反应底物来自提取的 pET-20b 质粒,采用 20  $\mu$ L 反应体系(mmol/L): Tris-HCl 20 (pH 7.5),氯化钾 50,氯化镁 4,亚精胺 1.8,DTT 3,EDTA 0.5; *E. coli* tRNA 30 mg/L,牛血清白蛋白 0.36 mg/L, pET-20b 质粒 70 ng,螺旋酶 GyrA 亚基和 GyrB 亚基重组全酶,再用双蒸水添加至 20  $\mu$ L。

测定酶活性之前,将纯化的螺旋酶 A、B 亚基以相同的物质的量混合<sup>[9]</sup>,15 °C 放置 20 min,再测定酶活性。反应混合物 37 °C 下反应 4 h 后终止反应,电泳、染胶。

松弛活性测定前,先确定反应体系中是否添加亚精胺、EDTA、DTT 和 tRNA,结果显示,反应体系中除 EDTA 不加入,其他试剂都要加入(数据未提供)。先优化螺旋酶反应的合适浓度,然后优化酶反应条件(反应温度和时间)。

反应混合物在 37 °C 条件下反应不同时间,然后加入 5  $\mu$ L 终止液[5% (m/V) SDS, 25% 甘油, 25  $\mu$ g/mL 溴酚蓝],37 °C、30 min 终止酶反应<sup>[10]</sup>。琼脂糖凝胶电泳条件为:0.7% 无 EB 琼脂糖凝胶,

90 V 电泳 2.5 h,缓冲液为 1  $\times$  TBE (45 mmol/L Tris-硼酸, 1 mmol/L EDTA)。EB 溶液 (0.7  $\mu$ g/mL) 染色 30 min,再用 Bio-Rad 凝胶扫描仪定量。

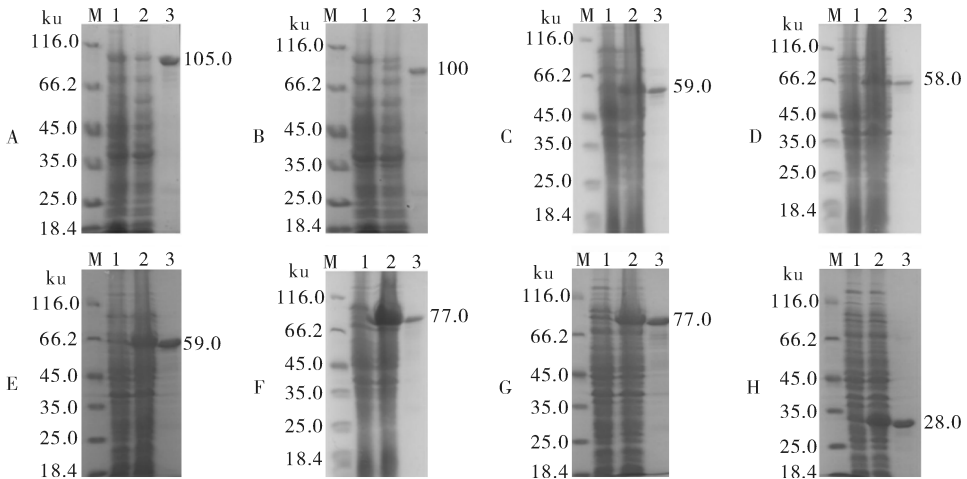
#### 1.5 螺旋酶切割活性的测定

螺旋酶 DNA 诱导切割活性的反应体系与松弛反应的相同,底物是 75 ng 超螺旋酶 pET-20b<sup>[11]</sup>。在确定重组螺旋酶使用量前提下,以 0.1~120  $\mu$ g/mL 诺氟沙星初测切割活性效果,并确定合适的药物剂量。螺旋酶的药物诱导切割活性条件如下:37 °C 条件下反应不同时间,然后加入 5  $\mu$ L 终止液和 2  $\mu$ L 20 mg/mL 的蛋白酶 K,37 °C 反应 30 min。反应后切割活性与松弛活性检测方法相同。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变体蛋白表达与纯化

经 IPTG 诱导表达后, pET20b-gyrA BL21 的全蛋白 GyrA 分子质量约 105 ku,全蛋白 GyrB 约 100 ku, GyrB-CTD 突变体蛋白约 28 ku, GyrB1-518 突变体蛋白约 58 ku, GyrB1-531 突变体蛋白约 59 ku, GyrB $\Delta$ 531-550 突变体蛋白 77 ku, GyrB $\Delta$ 548-564 突变体蛋白 77 ku, GyrB-NTD 突变体蛋白 59 ku,如图 1。蛋白浓缩后,先测定各蛋白浓度。根据分子质量大小,加入相同浓度的 GyrA 和 GyrB 以及 GyrB 突变体,短期使用的蛋白于 -20 °C 保存,其余蛋白于 -80 °C 保存。



泳道 1: 无 IPTG 诱导的全蛋白 The whole proteins with no IPTG induction; 泳道 2: 经 IPTG 诱导的全蛋白 The whole proteins with IPTG induction; 泳道 3: 纯化的蛋白 Purified protein. A: GyrA; B: GyrB; C: GyrB-NTD; D: GyrB1-518; E: GyrB1-531; F: GyrB $\Delta$ 531-550; G: GyrB $\Delta$ 548-564; H: GyrB-CTD.

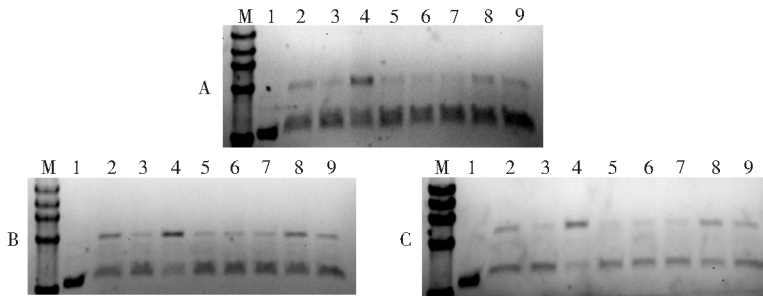
图 1 亚基的表达和纯化

Fig.1 Expression and purification of subunits

### 2.2 螺旋酶活性

1) 松弛活性。通过优化酶的终浓度、反应时间、反应温度等条件,最终确定酶的松弛活性测定的反

应时间为 20 min,温度为 37 °C,酶终浓度分别为 1.03、2.06、3.08 μmol/L。图 2 显示,不同酶浓度下反应得到的结果相同,证明酶活性是稳定的。



GyrA 和 GyrB 的浓度为:A.1.03 μmol/L; B.2.06 μmol/L; C.3.08 μmol/L; 泳道 1:仅仅是超螺旋型质粒 pET-20b; 泳道 2~9:用 GyrB1-518、GyrB1-531、GyrBΔ531-550、GyrBΔ548-564、wild-type A2B2、GyrB-CTD、GyrB-NTD、GyrB-CTD+GyrB-NTD 处理的超螺旋型质粒 pET-20b,GyrB-CTD+GyrB-NTD,表示将 GyrB 亚基的 C 端突变体和 N 端突变体按等物质的量比混合后,再加入相同物质的量比的 GyrA 亚基进行混匀。Concentration of GyrA and GyrB were A.1.03 μmol/L; B.2.06 μmol/L; C.3.08 μmol/L; Lane 1:Only supercoiled pET-20b; Lane 2-9:Supercoiled pET-20b treated with GyrB1-518, GyrB1-531, GyrBΔ531-550, GyrBΔ548-564, wild-type A2B2, GyrB-CTD, GyrB-NTD, GyrB-CTD+GyrB-NTD.

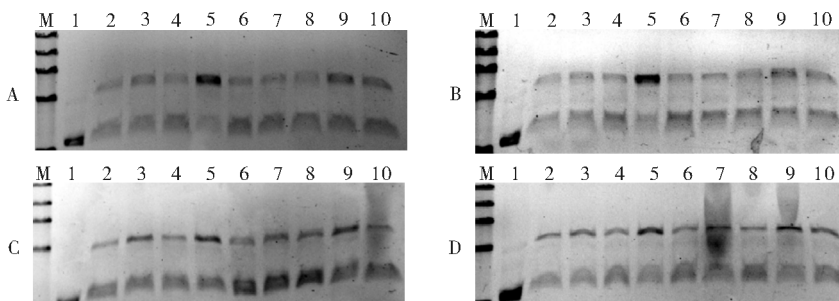
图 2 结核分枝杆菌螺旋酶 DNA 松弛活性

Fig.2 The relaxation activity of *M. tuberculosis* combined DNA Gyrase

图 2 结果表明,与超螺旋型质粒 pET-20b 相比(带 1),其他加入全酶或全酶突变体的反应体系中,都有一定量的超螺旋型 DNA 转换为松弛型 DNA。与全酶(条带 6)的松弛活性比较,GyrB1-518(带 2)、GyrBΔ531-550(带 4)、GyrB-N(带 8)、GyrB-C+N(带 9)4 个全酶突变体将超螺旋型 DNA 转换为松弛型 DNA 的能力都出现了不同程度的加强;GyrB1-531(带 3)、GyrB-C(带 7)3 个突变体全酶可

以转换一定量的超螺旋型 DNA,其中 GyrBΔ531-550(带 4)突变体全酶具备最强的转换超螺旋型 DNA 为松弛型 DNA 的能力。

2) 切割活性。通过预备试验,确定以诺氟沙星为底物时螺旋酶切割活性的反应条件为反应温度 37 °C、反应时间 20 min。分别以终浓度为 5、10、20、30 μg/mL 的诺氟沙星测定了各突变体的切割活性(图 3)。



GyrA 和 GyrB 按等浓度(约 1.03 μmol/L)混合; 泳道 1:仅仅是超螺旋型质粒 pET-20b; 泳道 2:用野生型 A2B2 处理的超螺旋型质粒 pET-20b,泳道 3~10:将 GyrB1-518、GyrB1-531、GyrBΔ531-550、GyrBΔ548-564、wild-type A2B2、GyrB-CTD、GyrB-NTD、GyrB-CTD+GyrB-NTD 分别在 5 μg/mL (A),10 μg/mL (B),20 μg/mL (C) 和 30 μg/mL (D) 的诺氟沙星中处理 20 min 的超螺旋型质粒 pET-20b。GyrA and GyrB were mixed at all equal molar concentration (≈1.03 μmol/L); Lane 1:Only supercoiled pET-20b; Lane 2: Supercoiled pET-20b treated with wild-type A2B2 for 20 min; Lane 3-10:Supercoiled pET-20b treated with GyrB1-518, GyrB1-531, GyrBΔ531-550, GyrBΔ548-564, wild-type A2B2, GyrB-CTD, GyrB-NTD, GyrB-CTD+GyrB-NTD under 5 μg/mL (A), 10 μg/mL (B), 20 μg/mL (C), and 30 μg/mL (D) norfloxacin for 20 min, respectively.

图 3 结核分枝杆菌螺旋酶的 DNA 切割活性

Fig.3 The cleavage activity of *M. tuberculosis* combined DNA gyrase

检测结果(图 3)显示与超螺旋型质粒 pET-20b 相比(带 1),其他加入全酶或全酶突变体均有一定

量超螺旋型 DNA 被切割,但程度不同。与全酶(条带 7)的切割活性比较,4 个突变体 GyrB1-518

(带 2)、GyrB $\Delta$ 531-550(带 5)、GyrB-N(带 9)、GyrB-(C+N)(带 10)与 GyrA 形成的全酶切割能力都稍有提高;GyrB1-531(带 4)、GyrB $\Delta$ 548-564(带 6)、GyrB-C(带 7)3 个突变体与 GyrA 形成的全酶切割超螺旋型 DNA 活性与野生型全酶无明显差异;而 GyrB $\Delta$ 531-550(带 5)突变体与 GyrA 形成的全酶切割超螺旋型 DNA 并将其转换为松弛型 DNA 的能力最强。

### 2.3 二级结构分析

经分析二级结构发现,GyrB 531~550 区域对 Toprim 结构域的结构支撑和功能发挥都具有重要作用。GyrB 的 463~518、548~564 位氨基酸均由一条不规则的  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠连接。从三维结构来看,548~564 氨基酸位于 Toprim 结构域的拐角处(图 4B),GyrB $\Delta$ 548-564 酶活性比野生型稍强,但不是很明显,说明 548~564 位氨基酸在 GyrB 和 GyrA 的相互作用中可能不太重要。第 463~518 位氨基酸位于 GyrB 与 GyrA 亚基相互支撑的内侧界面(图 4C),它们可能在维持 Toprim 构象的稳定性上发挥更多的作用,与其他的区域相互配合维持 Toprim 的功能。在结构上,GyrB 的 531~550 位氨基酸是一个  $\alpha$ -螺旋结构(图 4A),位于 Toprim 结构域二聚体界面的内侧,是 Toprim 结构域的重要支架结构,稳定和维持着 Toprim 的构型;如果 531~550 位氨基酸缺失,可能会导致 Toprim 构型无法支撑,影响到 GyrB 二聚体的形成,从而影响 GyrB 和

GyrA 亚基的相互作用<sup>[12]</sup>。王艳<sup>[13]</sup>通过酵母双杂交实验证明 GyrB 531~550 位氨基酸缺失后与 GyrA 无相互作用,而本研究中 GyrB 531~550 位氨基酸缺失后转化超螺旋型 DNA 的效果更明显(图 2),表明 531~550 位氨基酸应是调控螺旋酶活性的关键区域。可见,GyrB 531~550 位氨基酸是通过影响 Toprim 结构而影响 GyrB 与 GyrA 的相互作用,从而实现螺旋酶催化活性的调控。

## 3 讨论

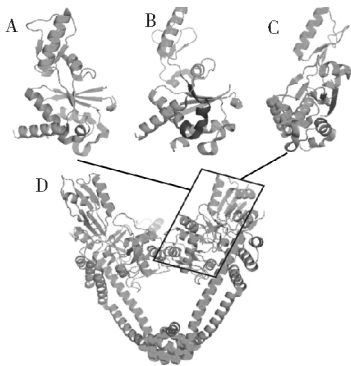
GyrB 亚基的 N 端、1~518 位氨基酸以及 531~550 位氨基酸区域是影响螺旋酶松弛活性较为关键的区域,本研究显示,缺失 531~550 位氨基酸对全酶的松弛活性和切割活性影响最为明显,表明此区域是影响酶功能的关键区域。GyrB 亚基的 C 端也能具有微弱的松弛活性和切割活性,表明 C 端也影响酶功能。

GyrB 的 C 端为 463~714 位氨基酸,其转化能力较野生型酶弱,N 端突变体与 C 端突变体组合形成的螺旋酶突变体(图 2C,C+N,条带 9)的转化能力比 N 端的稍弱,但比 C 端单一突变体的强,说明 GyrA 和 GyrB 亚基的 C 端有相互作用。酵母双杂交实验表明 GyrA 与 GyrB 的 N 端没有明显的相互作用,与 GyrA 亚基互作的关键区间在 GyrB 亚基的 463~564 位氨基酸;而 463~564 位氨基酸在 Toprim 结构域内<sup>[14]</sup>。GyrB 的 C 端一系列突变体酶活测定证明 GyrB 的 C 端是螺旋酶催化中心的重要部分。

此外,Wu 等<sup>[12]</sup>报道 GyrB'突变体会影响 GyrB 二聚体的形成,并将 GyrB'疏水核心暴露出来。但影响螺旋酶切割活性的时间段可能有 2 个,其一为切割反应期间,其二为切割前的一个步骤,而在切割前 GyrB'很可能不以二聚体的形式存在,因为切割复合物中的 DxD 模体构象与其在二聚体中的构象完全不同<sup>[15]</sup>。有研究者提出 *M. tuberculosis* GyrB 喹诺酮抑制决定区域(QRDR 区域)为 Asn493-Asn540<sup>[16-17]</sup>,而本试验中 GyrB 的 531~550 位氨基酸均位于 GyrB 的 QRDR 区域中,表明 GyrB 的 531~550 区域可能作为新药设计靶标。

### 参 考 文 献

- [1] KOCAGÖZ T, HACKBARTH C J, UNSAL I, et al. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra[J]. Antimi-



A:GyrB 531~550 位氨基酸的结构; B:GyrB 548~564 位氨基酸的结构; C:GyrB 463~518 位氨基酸的结构; D:结核分枝杆菌断裂重接结构域。A: Structure of 531-550 aa; B: Structure of 548-564 aa; C: Structure of 463-518 aa; D: Breakage-reunion domain of *M. tuberculosis*.

图 4 GyrB 中 531~550、548~564 和 463~518 位氨基酸区域的结构

Fig.4 Structure of 531-550,548-564 and 463-518 domain in GyrB

- crobial agents and chemotherapy, 1996, 40(8):1768-1774.
- [2] HOOPER D C, RUBINSTEIN E. Quinolone antimicrobial agents[M]. Washington, DC: ASM Press, 2003.
- [3] PITAKSAJJAKUL P, WONGWIT W, PUNPRASIT W, et al. Mutations in the gyrA and gyrB genes of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from TB patients in Thailand[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2005, 36 (Sup): 228-237.
- [4] WANG J, LEE L, LAI H, et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure[J]. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2007, 59(5): 860-865.
- [5] MOKROUSOV I, OTTEN T, MANICHEVA O, et al. Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2008, 52(8): 2937-2939.
- [6] AN D D, DUYEN N T H, LAN N T N, et al. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with high-level fluoroquinolone resistance in Vietnam[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009, 53(11): 4835-4839.
- [7] FEUERRIEGEL S, COX H S, ZARKUA N, et al. Sequence analyses of just four genes to detect extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in multidrug-resistant tuberculosis patients undergoing treatment[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009, 53(8): 3353-3356.
- [8] BROSSIER F, VEZIRIS N, AUBRY A, et al. Detection by genotype MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates[J]. Journal of clinical microbiology, 2010, 48(5): 1683-1689.
- [9] 黄友谊. 结核分枝杆菌螺旋酶与 DNA 的相互作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [10] MANJUNATHA U H, DALAL M, CHATTERJI M, et al. Functional characterisation of mycobacterial DNA gyrase: an efficient decatenase[J]. Nucleic acids research, 2002, 30(10): 2144-2153.
- [11] KAMPRANIS S C, BATES A D, MAXWELL A. A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96(15): 8414-8419.
- [12] WU J J, ZHANG Z, MITCHENALL L A, et al. The dimer state of GyrB is an active form: implications for the initial complex assembly and processive strand passage[J]. Nucleic acids research, 2011, 39(19): 8488-8502.
- [13] 王艳. 结核分枝杆菌螺旋酶 GyrB 与 GyrA 相互作用核心区域的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [14] 高婷. 结核分枝杆菌螺旋酶 A、B 亚基相互作用的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [15] FU G, WU J, LIU W, et al. Crystal structure of DNA gyrase B' domain sheds lights on the mechanism for T-segment navigation[J]. Nucleic acids research, 2009, 37(17): 5908-5916.
- [16] PITON J, PETRELLA S, DELARUE M, et al. Structural insights into the quinolone resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase [J]. PLoS ONE, 2010, 5(8): e12245.
- [17] BUHLER C, GADELLE D, FORTERRE P, et al. Reconstitution of DNA topoisomerase VI of the thermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* from subunits separately overexpressed in *Escherichia coli* [J]. Nucleic acids research, 1998, 26(22): 5157-5162.

## Effects of domain truncated mutant of GyrB interacting with GyrA of DNA gyrase from *Mycobacterium tuberculosis* on its holoenzymical function

WANG Maolin HUANG Youyi ZUO Huaiyu ZHANG Jibin

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** DNA gyrase has no activity before subunits of GyrA and GyrB recombine to a tetrameric holoenzyme. A series of GyrB mutants has been constructed and the enzymatic activity of these GyrB mutants was analyzed to study the interaction domains of GyrB and GyrA subunits. Results showed that the C-terminus of GyrB subunit is the key domain to interact with GyrA subunit. Combined with analyzing GyrB dimensional structure, 531-550 aa of GyrB was proposed to be the key domain of controlling enzymical activity of DNA gyrase and an ideal target for designing drug.

**Keywords** *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase; truncated mutants of GyrB; relaxation activity; cleavage activity