

力复霉素产生菌地中海拟无枝菌酸菌 U32 丙氨酸脱氢酶基因克隆及表达*

姚玉峰 卢捷 俞浩 赵国屏 姜卫红 焦瑞身**

(中国科学院上海植物生理生态研究所微生物次生代谢分子调控研究实验室 上海 200032)

摘 要 丙氨酸脱氢酶(EC 1.4.1.1)可逆催化丙氨酸脱氢生成丙酮酸和 NADH。它是生物体内的氨基酸代谢和氮同化途径的关键酶。在地中海拟无枝菌酸菌(*Amycolatopsis mediterranei*) U32 中, 丙氨酸脱氢酶的活力与力复霉素的生物合成有负相关现象, 其活力受 KNO_3 全局效应的调控。根据结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)和天蓝链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)的丙氨酸脱氢酶氨基酸的保守序列和地中海拟无枝菌酸菌 U32 对氨基酸密码子的使用偏好, 设计一对简并 PCR 引物。以此引物从地中海拟无枝菌酸菌 U32 中扩增到一 555bp 的片段, 并以此片段为探针从地中海拟无枝菌酸菌 U32 基因组 cosmid 文库中成功的克隆到了丙氨酸脱氢酶结构基因(*ald*)。它编码了一个 371 个氨基酸的蛋白质, 基因的 GC 含量为 72.5%, 符合链霉菌的基因结构特征。在起始密码子的上游 6 个碱基处, 有一典型的链霉菌核糖体结合位点(RBS): AGGAGG, 第 75 位的氨基酸为赖氨酸, 是丙酮酸结合位点。以 pET28b 为载体, 在 *E. coli* BL21(DE3)中高效表达了 *ald* 基因。用 IPTG 在 22℃ 时诱导得到的丙氨酸脱氢酶活力最高。用 His-Tag 柱纯化了表达的丙氨酸脱氢酶。酶学性质研究表明该酶专一性以 L-Ala 和 NAD⁺ 为底物。

关键词 : 地中海拟无枝菌酸菌, 丙氨酸脱氢酶, 克隆, 表达

中图分类号 : Q93 文献标识码 : A 文章编号 : 1001-6179(2003) 02-0206-08

丙氨酸脱氢酶(L-alanine : NAD⁺ oxidoreductase, EC 1.4.1.1.)属于氨基酸脱氢酶类^[1]。氨基酸脱氢酶可以直接将氨基酸上的氨脱去形成自由的氨, 使氨基酸的碳骨架在进入糖酵解或 TCA 循环, 产生的氨可被细胞各种代谢途径利用。此外这个脱氨过程还伴随着还原力的产生(NADH/NADPH), 以满足细胞对能量的要求。它的逆反应可将自由氨掺入到氨基酸中, 从而进行氮的同化作用, 这个现象普遍存在于一些固氮以及高氨条件下生长的生物体内。在枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)中丙氨酸脱氢酶与芽孢的产生有关, 该基因被中断后无法形成芽孢^[2]。此外对黄色粘球菌(*Myxococcus xanthus*)的发育也有很大影响^[3]。

地中海拟无枝菌酸菌 U32(以下简称 U32)是力复霉素 SV 的高产菌。本实验室自 70 年代以来, 对 U32 合成力复霉素 SV 的代谢途径进行了深入的生理生化研究。长期的研究中发现硝酸盐对 U32 力复霉素 SV 的生物合成具有全局性的影响, 即当培养基中加入 0.8% KNO_3 后, 力复霉素的产量提高 70%, 与此同时很多参与初级代谢的酶的活力受到

* 国家自然科学基金重点项目资助(10039630010)

** 通讯作者。E-mail : wjiang@iris.sipp.ac.cn 或 jschiao@iris.sipp.ac.cn

作者简介 姚玉峰(1974-)男, 安徽五河人, 98 级博士生。

收稿日期 2002-05-13, 修回日期 2002-10-14

KNO_3 的影响(活力上升或下降)。在含 0.8% KNO_3 的培养基中丙氨酸脱氢酶的活力远远低于在铵盐培养基中的活力,特别是在高氨环境中(0.8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)^[4]。由于抗生素的生物合成受培养基中氮源的影响,而丙氨酸脱氢酶在很多情况下调控细胞内的氮代谢,从而可能间接调节了抗生素的生物合成。因此对丙氨酸脱氢酶的研究对于 U32 力复霉素生物合成,在分子水平上研究硝酸钾的全局性调控机理以及对放线菌氮同化作用都有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

本文所用的菌株与质粒列于表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristic	Source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80 dlacZ Δ M(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁻) supE44 λ -thi-1 gyr96 relA1	GIBCO
<i>E. coli</i> BL21(ED3)	F' ompT r _B ⁻ m _B ⁻ (DE3)	Novagen
<i>A. mediterranei</i> U32	A high-yield producer of rifamycin SV	This lab
Plasmids		
pBluescriptII KS	pUC18-derived cloning vector	Stratagene
pET-28b	Expression vector carrying an N-terminal T ₇ [*] tag sequence	Novagen
pLAFR3	cos ⁺ , mob ⁺ , Tra ⁻ , IncP, Tc ^r	Staskawicz
ALD7-66	A cosmid with <i>ald</i> gene in pLAFR3	This work
pAld555	pMD18T vector harboring 555bp PCR fragment of <i>ald</i>	This work
pAldB	pBluescriptII KS harboring 1.8kb <i>Bam</i> H I	This work
pEX-Ald	pET28b carrying <i>ald</i> PCR product for expression	This work

1.2 培养基和抗生素

大肠杆菌的培养用 LB 培养基,培养温度为 37℃。U32 用本氏培养基^[5],提取染色体 DNA 需加 0.25% 的甘氨酸,培养温度为 28℃。抗生素使用浓度为:氯苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,四环素为 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$,卡那霉素为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3 酶和试剂

限制性内切酶、T4DNA 连接酶、CIAP 等为 TaKaRa 公司产品,辅酶、溶菌酶、RNase 为 Sigma 公司产品 [α -³²P]-dCTP 为北京亚辉生物医学工程公司产品。正电荷尼龙膜购自 Boehringer Mannheim 公司。

1.4 DNA 操作

U32 基因组 DNA 的提取参照《链霉菌遗传操作手册》^[6],基因组 DNA 的完全酶切参照《分子克隆》^[7],质粒抽提、酶切、脱磷、连接、电泳、Southern 杂交等参照《分子克隆》,探针的

制备采用 Prime-a-Gene 标记试剂盒(Promega 公司)。U32 的 cosmid 基因文库由彭文涛博士构建。

1.5 引物合成和 DNA 序列测定和分析

引物合成和 DNA 序列测定由基康生物技术有限公司完成。序列的编辑和比较使用 BioEdit Sequence Alignment Editor ,序列同源性及蛋白序列查找使用 BLAST 和 FASTA。

1.6 基因序列

丙氨酸脱氢酶基因(*ald*)的 GenBank 登录号 :AF498372。

1.7 蛋白质浓度测定

蛋白质的浓度测定采用 Bradford 法 ,以牛血清白蛋白为标准^[8]。

1.8 丙氨酸脱氢酶纯化及活力测定

丙氨酸脱氢酶的表达和 SDS-PAGE 按《分子克隆》进行。His-Tag 亲和柱纯化丙氨酸脱氢酶按 Qiagen 公司的操作手册进行。丙氨酸脱氢酶活力是依据氧化脱氨基反应的产物 NADH 在 340nm 处有一强吸收峰来测定^[9]。

2 结果和分析

2.1 丙氨酸脱氢酶基因克隆及鉴定

根据本实验室已经克隆的一些基因的序列分析表明 ,U32 的基因与结核分枝杆菌和天蓝链霉菌的基因有着很高的同源性^[10-11]。因此根据这两种放线菌丙氨酸脱氢酶的氨基酸序列 ,进行同源比较得到两个保守序区 ,并考虑到 U32 对氨基酸密码子的使用偏好 ,设计一对简并引物 :

pAld555A : 5'-GGAATTC(G/C)CT(G/C)G(G/C)CCGATGTC-3'

EcoR I

pAld555B : 5'-GTCTAGAGT(G/C)GT(G/C)A(G/C)GCGTA(G/C)G-3'

Xba I

利用这对引物以 U32 基因组 DNA 为模板 ,扩增到一 555bp 的片段。将此片段克隆到 pMD18-T 载体上 ,然后测序分析 ,BLAST(X)结果表明该片段为 *ald* 基因的一部分。采用斑点杂交的方法 ,将 U32 基因组 cosmid 文库分成 53 组 ,每组含 96 个单克隆 ,接种于 LB 试管中 ,培养过夜 ,提取混合质粒 ,变性后点于尼龙膜上 ,以前面获得的 PCR 片段(*ald* 555bp)为探针进行 Southern 分析。经过三轮杂交 ,我们筛选到了 5 个阳性克隆 ,分别命名为 ALD7-66、ALD16-56、ALD17-57、ALD25-96 和 ALD51-82。Southern 结果确认了这几个阳性克隆都来源于 U32 ,由于 cosmid 的插入片段比较大 ,约为 20kb ,所以选择 ALD7-66 作进一步分析。提取 U32 的基因组 DNA 与阳性克隆 ALD7-66 的质粒 DNA ,分别进行 *Bam*HI , *Sma*I 和 *Xho*I 酶切 ,电泳 ,Southern 转移 ,以 555bp 的 PCR 产物为探针进行分子杂交(图 1) ,结果表明 U32 基因组 DNA 和阳性克隆的质粒 DNA 有相同大小的杂交带 ,这就证明了阳性克隆 ALD7-66 中的外源片段确实来源于 U32。

2.2 丙氨酸脱氢酶基因序列分析

将阳性克隆 ALD7-66 用多种不同的限制酶进行酶切 ,电泳 ,Southern 转移 ,以 555bp 的 PCR 产物为探针进行杂交 ,通过对杂交片段大小的计算与分析 ,初步得到了 ALD7-66 中含

可能的 *ald* 基因片段的酶谱(如图 2)。

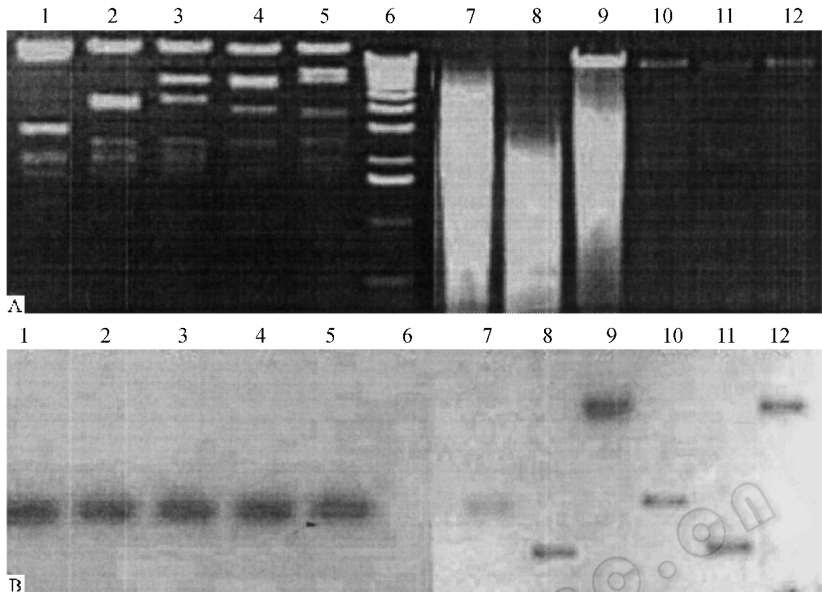


图 1 *ald* 阳性克隆的 Southern 验证

Fig.1 Confirmation of 5 *A. mediterranei* U32 positive clones by southern hybridization

A. Ethidium bromide-stained agarose electrophoresis of restriction enzyme digested positive clones and U32 genomic DNA ; B. Autoradiograph of southern blot.

1~5. *Bam*HI digested 5 positive clones ; 6. Gibco 1kb ladder ; 7~9. U32 genomic DNA digested by *Bam*HI , *Sma*I and *Xho*I respectively ; 10~12. ALD7-66 digested by *Bam*HI , *Sma*I and *Xho*I respectively.

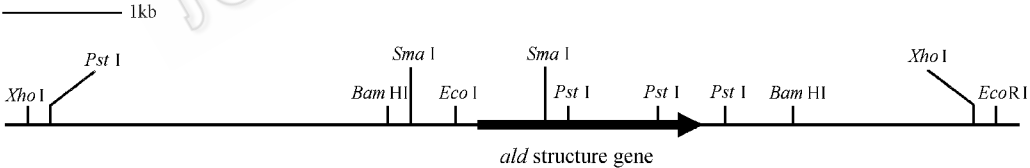


图 2 ALD7-66 部分的酶切图谱

Fig.2 Restriction map of ALD7-66 partial fragment encoding *ald* gene

Results from southern analysis indicated that the *ald* gene was involved within approximately a 1.8kb *Bam*HI/ *Bam*HI DNA fragment.

回收阳性克隆上的 1.8kb *Bam*H I 分别克隆到 pBluescript II KS 上 ,命名为 pAldB。对 pAldB 进行双脱氧法测序 ,得到长 1784bp 的序列。分析结果表明此外源片段含有一个完整的长度为 1113bp 的开放读码框(ORF) ,起始于 242 位的核苷酸 ,终止于 1355 位的核苷酸 ,起始密码子为 GTG。它编码了一个 371 个氨基酸的蛋白质 ,基因的 GC 含量为 72.5% ,符合链霉菌的基因结构特征。在起始密码子的上游 6 个碱基处 ,有一典型的链霉菌 RBS : AGGAGG。第 75 位的氨基酸是赖氨酸 ,是一典型的丙酮酸结合位点。

U32 丙氨酸脱氢酶结构基因的氨基酸序列与 GenBank 中其它生物的丙氨酸脱氢酶有很高的同源性。它与天蓝链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)有 68% 的相似性(57% 相同性) ,结

核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)有 69% 的相似性(54% 相同性);枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)有 60% 的相似性(48% 相同性);黄色粘球菌(*Myxococcus xanthus*)有 68% 的相似性(57% 相同性)。

2.3 丙氨酸脱氢酶基因在大肠杆菌中的表达及活力测定

根据 U32 丙氨酸脱氢酶的序列 ,设计一对引物 ,并引入 *Nde* I 和 *Eco*R I 位点 ,引物序列如下 :

pEX-AldA : 5'-CATATGACCGTGCCTATCGCCGTTTC-3'
Nde I

PEX-AldB : 5'-GAATTCAGGCCGAGGACGGTGTCCAG-3'
*Eco*R I

用 *pfu* Taq 扩增所需的片段 ,并连于 pET28b 表达载体上 ,构建成丙氨酸脱氢酶表达质粒 pEX-Ald ,转化大肠杆菌 BL21(DE3) ,测序鉴定重组子。含重组质粒的大肠杆菌于 37℃ 培养 ,*OD*₆₀₀ 达到 0.6 ~ 0.8 时加入 IPTG 至终浓度为 0.1mmol/L ,然后分别于 22℃ ,28℃ ,37℃ 诱导 1h。表达产物经 12% SDS-PAGE 分离 ,染色后可观察到一条约 45kD 的特异性蛋白带 ,其大小与预测的结果相符(图 3)。

收集 10mL 表达的菌体 ,用 10mL 生理盐水洗涤离心后重悬于 1mL PBS 中 ,在冰浴条件下超声波破碎菌体 ,高速离心后取上清测定酶活力。采用分光光度法对不同温度下诱导的蛋白测定丙氨酸脱氢酶活力(图 4)。从图 4 可看出在 22℃ ,28℃ ,37℃ 下诱导时 ,重组蛋白的表达量逐渐上升 ,但酶活力却是逐渐下降的(图 4)。这说明较高的温度促进丙氨酸脱氢酶的表达 ,但大多形成了不具活力的包涵体。而温度降低后 ,有利于表达的蛋白进行加工 ,形成有活力的天然构象 ,虽然蛋白总的表达量降低 ,但其比活力大大提高。

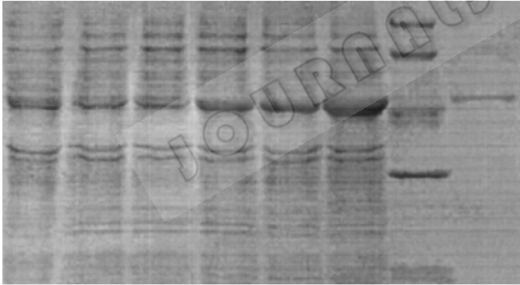


图 3 丙氨酸脱氢酶的诱导表达

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expression products of alanine dehydrogenase gene in *E. coli* BL21

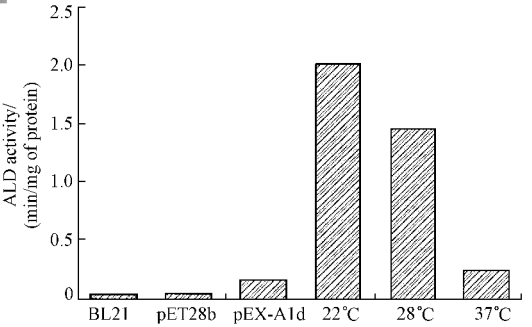


图 4 丙氨酸脱氢酶在 *E. coli* 中的诱导

Fig.4 Alanine dehydrogenase activity in *E. coli* induced by IPTG

1. *E. coli* BL21(DE3) induced by 0.1mmol/L IPTG for 2h ; 2. *E. coli* BL21(DE3) harboring pET28b , induced by 0.1mmol/L IPTG for 2h ; 3. *E. coli* BL21(DE3) harboring pEX-ALD , not induced ; 4. *E. coli* BL21(DE3) harboring pEX-ALD , induced by 0.1mmol/L IPTG for 2h at 22℃ ; 5. *E. coli* BL21(DE3) harboring pEX-ALD , induced by 0.1mmol/L IPTG for 2h at 28℃ ; 6. *E. coli* BL21(DE3) harboring pEX-ALD , induced by 0.1mmol/L IPTG for 2h at 37℃ ; 7. Protein molecular weight marker (94.0 ; 67.0 ; 43.0 ; 30.0 and 14.4kD) ; 8. Expression product purified by His-tag.

2.4 丙氨酸脱氢酶底物专一性研究

由于 pET28b 所表达的蛋白在 N 端带有 6 个连续 His ,所以利用这一特性可将表达的蛋白进行亲和层析纯化。将 pEX-Ald 于 22℃ 诱导表达 ,收集菌体并用超声波破碎菌体 ,高速离心后的上清即为进行亲和层析的粗酶液。纯化后的蛋白在 SDS-PAGE 上显示为单一条带(图 3 Lane 8) 。利用纯化的蛋白进行了丙氨酸脱氢酶的底物专一性研究 ,结果列于表 2。

从表 2 可以看出 ,当以 L-Ala 和 NAD(H)为底物时酶活力非常高 ,而对底物的类似物 D-Ala 和 NADH(H)的活力非常低 ,不到对照的十分之一。这说明该酶专一性的以 L-Ala 和 NAD(H)为底物 ,这与其它生物体内的丙氨酸脱氢酶是一致的^[12]。

表 2 丙氨酸脱氢酶的底物专一性
Table 2 Substrate specificity of alanine dehydrogenase

Oxidative deamination		Reductive amination	
Substrate	Activity/ %	Substrate	Activity/ %
L-Ala(100mmol/L)	100	Pyruvate(20mmol/L)	100
D-Ala(100mmol/L)	3.2	NADH(1.25mmol/L)	100
NAD ⁺ (1.25mmol/L)	100	NADPH(1.25mmol/L)	1.4
NADP ⁺ (1.25mmol/L)	2.5		

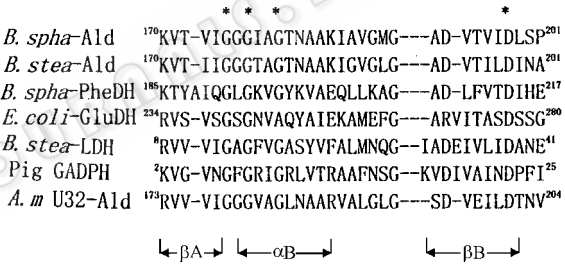


图 5 一些 NAD(P)⁺ 依赖的脱氢酶的序列比较
Fig.5 Sequence comparison of the β A- α B- β B regions
of several NAD(P)⁺-dependent dehydrogenases

Conserved residues that are believed to be important for coenzyme binding are indicated by asterisks. The sequence numbers of the first and last residues involved in this region are shown above each sequence.

Abbreviations: Ald. Alanine dehydrogenase; LeuDH. Leucine dehydrogenase; PheDH. Phenylalanine dehydrogenase; GluDH. Glutamate dehydrogenase; LDH. Lactate dehydrogenase; GAPDH. Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; *B. spha*. *B. sphaericus*; *B. stea*. *B. staerothermophilus*.

3 讨 论

在分类地位上 U32 和天蓝色链霉菌以及结核分枝杆菌的亲缘关系较近 ,在基因结构上有很多的相似之处 ,如基因组的 GC 含量高(达到 70% 以上) ,密码子的第三位偏向于 G 或 C 可达 90% 以上) 。所以对天蓝色链霉菌和结核分枝杆菌丙氨酸脱氢酶的氨基酸序列进行同源比较 ,得到保守序列然后按照 U32 对氨基酸密码子的使用偏好来设计简并引

物进行 PCR 扩增,以 PCR 产物为探针采用 Southern 杂交克隆 U32 的丙氨酸脱氢酶基因。实验的结果证明这是一个简便可行的方法。克隆到的丙氨酸脱氢酶结构基因的起始密码子的上游 6 个碱基处,有一典型的链霉菌核糖体结合位点(RBS):AGGAGG^[13],第 75 位的氨基酸为赖氨酸,是丙酮酸结合位点^[14]。

根据对 GenBank 中一些脱氢酶的序列分析表明,U32 的丙氨酸脱氢酶与其它一些 NAD(P)⁺ 依赖的脱氢酶的全序列的相似性只有 11%~20%。但其中的部分序列(29 个残基:Lys¹⁷³-Asp²⁰¹)与很多脱氢酶的尼克酰胺辅酶的结合区高度相似(图 5)。据报道丙氨酸脱氢酶的辅酶结合区相当保守,一般由 4 条平行的 β -折叠和一条 α 螺旋组成^[15],但谷氨酸脱氢酶和亮氨酸脱氢酶的辅酶结合区只有 2 条平行的 β -折叠和一条 α 螺旋。按照 Wierenga 的氨基酸序列指纹方法预测这 29 个残基可能形成 ADP 结合的 $\beta\alpha\beta$ -折叠^[16]。这说明该区域可能参与了 NAD⁺ 的结合。

参 考 文 献

- [1] Brunhuber N M, Blanchard J S. The biochemistry and enzymology of amino acid dehydrogenases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1994, **29**(6): 415~467.
- [2] Siranosian K J, Ireton K, Grossman A D. Alanine dehydrogenase(ald) is required for normal sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1993, **175**(21): 6789~96.
- [3] Ward M J, Lew H, Zusman D R. Disruption of aldA influences the developmental process in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol*, 2000, **182**(2): 546~50.
- [4] 倪榴英,刘慈俊,金志坤,等.力复霉素合成与谷氨酰胺合成酶活力的正相关性.微生物学报,1984, **24**(3): 217~223.
- [5] Mejia A, Barrios-Gonzalez J, Viniestra-Gonzalez G. Overproduction of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei* and its relationship with the toxic effect of barbital on growth. *J Antibiot (Tokyo)*. 1998, **51**: 58~63.
- [6] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F, et al. Genetic manipulation of streptomycetes. A laboratory manual. England: John Innes Foundation Press, 1985.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Handbook, 2nd eds. , NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976, **72**(2): 248~254.
- [9] Andersen A B, Andersen P, Ljungqvist L. Structure and function of a 40 000-molecular-weight protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 1992, **60**(6): 2317~2323.
- [10] 高瑾,王伟武,姜卫红,等.地中海拟无枝菌酸菌 U32 中 *amrC/amkC* 基因序列分析及在大肠杆菌中的表达.生物工程学报,2000, **16**(6): 684~689.
- [11] Yang L, Zhang W, Chiao J, et al. An eukaryotic-type serine/threonine protein kinase involved in the carbon source-dependent pigment biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* U32. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2001, **284**: 357~362.
- [12] Smith M T, Emerich D W. Alanine dehydrogenase from soybean nodule bacteroids: purification and properties. *Arch Biochem Biophys*, 1993, **304**(2): 379~85.
- [13] Strohl W R. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Research*, 1992, **20**(5): 961~974.
- [14] Delforge D, Devreese B, Dieu M, et al. Identification of lysine 74 in the pyruvate binding site of alanine dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. Chemical modification with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, n-succinimidyl 3-(2-pyridylidithio) propionate, and 5'-[p-(fluorosulfonyl)benzoyl]adenosine. *J Biol Chem*, 1997, **272**(4): 2276~2284.
- [15] Delforge D, Depiereux E, De Bolle X, et al. Similarities between alanine dehydrogenase and the N-terminal part of pyridine nucleotide transhydrogenase and their possible implication in the virulence mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **190**(3): 1073~1079.
- [16] Wierenga R K, Terpstra P, Hol W G J. Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol*, 1986, **187**: 101~107.

Cloning and Characterization of Alanine Dehydrogenase Gene(*ald*)
from *Amycolatopsis mediterranei* U32^{*}

Yao Yufeng Lu Jie Yu Hao Zhao Guoping Jiang Weihong Jiao Ruishen^{**}

(Laboratory of Molecular Regulation for Microbial Secondary Metabolism , Shanghai institute of
Plant Physiology and Ecology , Chinese Academy of Sciences , 300 Fenglin Road , Shanghai 200032 , China)

Abstract : Alanine dehydrogenase (L-Alanine : NAD⁺ oxidoreductase , deaminating , EC 1.4.1.1) catalyzes a reversible oxidative deamination of L-Alanine to pyruvate and ammonia , with NAD⁺ as cofactor. It is a key enzyme in alanine catabolism and ammonia assimilation. According to the biased usage in the third codon of G or C , and conservative regions in amino acid sequence of Alanine dehydrogenase from *S. coelicolor* and *M. tuberculosis* , a pair of degenerate primers were designed. The product of the degenerate primers PCR , 555bp , was amplified from U32 genomic DNA. The *ald* gene was cloned and sequenced after screening the cosmid library of U32 strain , with the PCR product as a probe. The open reading frame of *ald* encodes a protein of 371 amino acids with a calculated molecular mass of around 43kD. There is a typical streptomycetes RBS : AGGAGG at the - 6 position upstream of start codon GTG. Lys75 is a pyruvate binding site. The *ald* gene was introduced into *E. coli* BL21(DE3) by pET28b vector. The *ald* was induced by IPTG at 22℃ , 28℃ , 37℃ . The activity of alanine dehydrogenase was highest when it was induced at 22℃ . It is seen the enzyme is NADH/NAD⁺ and L-Ala specific.

Key words : *Amycolatopsis mediterranei* , Alanine dehydrogenase , Cloning , Expression

^{*} This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China(10039630010)
^{**} Corresponding author. E-mail : wjiang@iris.sipp.ac.cn ; jschiao@iris.sipp.ac.cn

致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了使您的科研成果尽快得到交流,本刊2003年每册增加到144面。全部道林纸印刷,内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。发表周期更短,内容丰富翔实,能及时反映我国微生物学科前沿和最新研究水平。在新的一年里《微生物学报》将更好地为科研工作者服务,为促进科技资源信息化最大限度的共享做出积极贡献。

欢迎投稿!欢迎订阅!欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部