

D-乳酸脱氢酶基因克隆及其表达

李 剑¹ 唐 赟¹ 梁凤来¹ 马建芳² 刘如林^{1*}

(¹ 南开大学生命科学学院 天津 300071) (² 天津南开戈德集团 天津 300071)

摘 要 构建了一株产 D,L-乳酸的乳杆菌(*Lactobacillus* sp.) MD-1 的基因文库。利用乳酸脱氢酶和丙酮酸裂解酶缺陷的 *Escherichia coli* FMJ144 作为宿主,在厌氧条件下通过互补筛选获得乳酸脱氢酶基因(*ldh*)。非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)检测证明其阳性克隆表现出 D-乳酸脱氢酶(D-LDH)活性。核酸序列分析表明,*ldh* 的 ORF 编码 331 个氨基酸残基组成的蛋白质有两个保守区域,其中 V₁₄₇ ~ D₁₇₆ 区是 NADH 的结合位点, R₇₇ ~ E₁₀₇ 区据报道是酶的活性部位。该菌株 D-LDH 和 D-羟基异己酸脱氢酶(D-HicDH)属于 NADH 依赖性脱氢酶家族,*ldh* 和其他乳杆菌属的 *ldh* 及 D-HicDH 基因和编码的氨基酸序列相似性较低,核酸序列相似性最高达 49.33%,氨基酸序列相同性最高为 42%,是一个新的 D-乳酸脱氢酶基因。

关键词 乳杆菌 MD-1 D-乳酸脱氢酶 基因克隆 表达

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)04-0491-05

乳酸在食品、医药、化工、环保等领域有广泛的用途。L-乳酸的生产及其聚合物作为可降解塑料和医用材料的研究日益深入。D-乳酸的聚合物可以用于药物的缓释技术和可降解环保农药的前体物。因此,高光学纯度的 D-乳酸或 L-乳酸均具有广阔的应用前景^[1]。

乳酸脱氢酶(LDH)是以 NADH 为辅酶,将丙酮酸经过生化反应生成乳酸,因此 LDH 是乳酸菌合成乳酸的关键酶。产 D,L-乳酸的乳杆菌中存在 L 和 D 两种依赖 NADH 的 LDH,分别催化丙酮酸生成 L-乳酸和 D-乳酸。作者筛选到一株产 D,L-乳酸的乳杆菌(*Lactobacillus* sp.) MD-1,能在 48℃ 含 200g/L 葡萄糖的发酵液中快速生长并生产乳酸,72h 产量可达 140g/L 以上。如果使乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶基因(*ldh*)缺失,则只生产高光学纯度的 L-乳酸(理论上光学纯度可达到 100%),同时可以大幅提高 L-乳酸产量。反之,如果使 L-乳酸脱氢酶基因(*ldh*)缺失,则生产高光学纯度的 D-乳酸。

本文报道了 *Lactobacillus* sp. MD-1 菌株的 *ldh* 序列,同时对 *ldh* 及编码的蛋白质的一级结构进行了初步分析,并对 *ldh* 的功能进行了鉴定。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

本文所用的菌株和质粒见表 1。质粒 pJDC9、菌

株 *E. coli* FMJ144 由 Jean Delcour 教授惠赠。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study		
Strain or plasmid	Characteristic(s)	Source or reference
<i>Lactobacillus</i> sp. MD-1	Wild-tape strain	This study
<i>Escherichia coli</i> FMJ144	Δldh <i>pfl::Cam^r trpR his-29(Am^r) pro-2 ary-427 deoB arc tsx IN (rrmD-rrmE) lacY</i>	2
TG1	<i>suoE hsdΔ5 thiΔ(lac-proAB) F⁺ (traD36) ProAB⁺ lacP⁺ lacZΔM15</i>	3
DE3	<i>F⁻ ompT hsdSΔ(r_B⁻ m_B⁻) gal dem Δ(srl-recA) 306::Tn10(Tc^R)</i>	Novegon
Plasmid pJDC9	<i>Em^r ;ldhZα</i>	4
pLZD308	<i>Em^r ;pJDC9 with a 3.11 BamH I fragment from L. MD-1</i>	This study
pET-28a	<i>Kan^r</i>	Novegon

Em^r, Ap^r and Cm^r indicate resistance to erythromycin, ampicillin, and chloramphenicol, respectively.

1.2 培养基和培养条件

1.2.1 培养基 MRS 培养基参见文献[5],LB 培养基和 M9 培养基参见文献[7]。*Lactobacillus* sp. MD-1 接种于 MRS 培养基中 48℃ 培养 16h;*E. coli* TG1 用 LB 培养基培养;FMJ144 用 LB 培养和 M9 培养基(补加葡萄糖 0.4% 和酪蛋白水解物 0.2%)培养。红霉素(Em)、氯霉素(Cm)工作浓度分别为 250、

* 通讯作者。Tel/Fax 86-22-23505967 E-mail: meor@nankai.edu.cn

作者简介 李 剑(1970-)男,四川三台人,博士生,研究方向为资源细菌及工程。E-mail: lj_16@eyou.com

收稿日期 2003-12-09,修回日期 2004-03-22

50μg/mL。IPTG 终浓度为 0.1mmol/L。

1.3 DNA 提取和纯化

基因组 DNA 提取及纯化参见文献[6];质粒提取方法参见文献[7]。

1.4 基因文库的构建

将 *Lactobacillus* sp. MD-1 的基因组 DNA 用 *Bam*H I 不完全消化,得到约 2~6kb 的部分消化片段;用 *Bam*H I 酶切 pJDC9,CIAP 去磷酸化,回收 pJDC9,连接 *Lactobacillus* sp. MD-1 的基因组 DNA 消化片段和去磷酸化 pJDC9;将重组质粒电转化到 *E. coli* FMJ144 中,得到 *Lactobacillus* sp. MD-1 的基因组 DNA 的随机基因文库。

1.5 互补筛选

大肠杆菌 FMJ144 是乳酸脱氢酶基因和丙酮酸裂解酶基因缺陷的突变株,在厌氧条件下不能生长;如果将带有乳酸脱氢酶基因(*ldh*)的重组质粒转入大肠杆菌 FMJ144 中表达乳酸脱氢酶(LDH),大肠杆菌 FMJ144 将在厌氧条件下恢复生长。利用菌株 FMJ144 的这种特性,将电转化的 *E. coli* FMJ144 涂布在含有红霉素(Em)的 M9 培养基平板上,厌氧条件下 37℃ 培养 144h 以筛选阳性克隆。提取阳性克隆的重组质粒,进行酶切分析,并转化到 *E. coli* FMJ144 中进行复筛;同时进行阳性克隆的乳酸脱氢酶酶活性及类型分析。

1.6 乳酸脱氢酶粗蛋白的制备和酶活分析

蛋白质粗提物的制备:将阳性克隆接种到 M9 液体培养基中,37℃ 静置培养 48h。然后离心收集菌体,用 0.5mol/L 的磷酸缓冲液悬浮菌体,超声波破碎细胞。14000r/min 离心 30min,其上清液,即蛋白粗提物,其蛋白含量用福林酚法测定^[8]。乳酸脱氢酶活性分析参见文献[6]。酶活单位的定义(U):在 25℃、pH7.0 条件下,1min 氧化 1μmol NADH 的酶量为 1 单位。

乳酸脱氢酶类型分析:反应体系见表 2。反应条件为 37℃ 水浴 30min。

表 2 分析乳酸脱氢酶类型的反应体系				
System	The extraction of strain	Sodium pyruvate	NADH	Phosphate buffer
Concentration	—	5g/L	42g/L	0.5mol/L
Volume/μL	100	100	100	700

用 HPLC 测定反应液中乳酸浓度;用 SBA-40C 葡萄糖-乳酸生物传感器分析反应体系中反应产物 L-乳酸的含量。

1.7 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)

操作方法参见文献[6]。

1.8 序列测定和分析

DNA 序列测定由 TaKaRa 公司完成。DNA 序列分析采用 Artemis v5,蛋白质序列分析采用 DNA-man4.0 和 ClustalX1.8 以及 NCBI 相关数据库和软件。

1.9 基因扩增

将阳性克隆的插入片段进行测序,分析测序结果,设计以下特异引物:上游引物为 5'-AAAGCTAGCGTGAAATTAATTGTTTATAATGTTTCG-3'(含 *Nhe* I 酶切位点);下游引物为 5'-AAAAAGCTTTTACTCAAC-TAGATCGGCTG-3'(含 *Hind* III 酶切位点),扩增乳酸脱氢酶的 ORF。扩增条件:94℃ 45s,53℃ 45s,72℃ 1min 30s,30 个循环。

1.10 SDS-PAGE 检测

操作方法参见文献[7]。

2 结果和讨论

2.1 *Lactobacillus* sp. MD-1 乳酸脱氢酶基因的克隆

构建了约有 200000 重组质粒的基因组文库,采用电转化的方法将重组质粒转入 *E. coli* FMJ144 中,将涂有转化产物的 M9 平板置于 37℃ 厌氧培养 168h,在厌氧条件下筛选到 60 个阳性克隆。将阳性克隆划线在含有 Em、Cm 的 LB 平板上,37℃ 厌氧培养 168h,复筛得到 8 个阳性克隆。

2.2 阳性克隆的鉴定

提取阳性克隆的粗蛋白物,以丙酮酸作底物,NADH 为辅酶测定 LDH 活性(图 1)。图 1 表明,复筛的 8 个阳性克隆均有明显的 LDH 活性,其中 H 的酶活最高,为 1.108U/mg,*E. coli* FMJ144/pJDC9 的酶

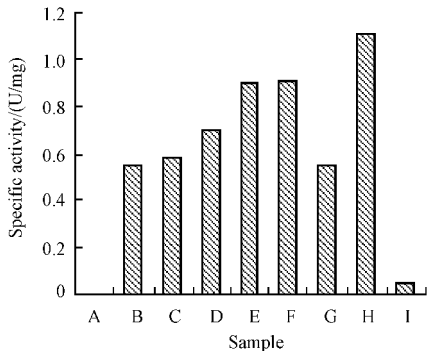


图 1 乳酸脱氢酶活性分析

Fig.1 Analysis of LDH activity

A. Blank; B~H. Postive clones; I. Control.

活只有 H 的 2% ~ 3% ,因此 ,阳性克隆 H 的重组质粒中具有 *Lactobacillus* sp. MD-1 完整的乳酸脱氢酶基因。选取 H 作进一步分析。将阳性克隆 H 粗蛋白提取物进行非变性电泳 ,然后用底物显色 ,结果表明 ,阳性克隆表达的 LDH 能被 D ,L-乳酸显色 ,而不能被 L-乳酸显色 ,说明阳性克隆 H 表达的 LDH 属于 D 型 (图 2) 。将筛选得到的阳性克隆进行部分限制性内切酶分析 ,结果表明 ,在阳性克隆中 ,pJDC9 的 *Bam*H I 位点均有插入片段 ;其中酶活最高的 H 在 *Bam*H I 位点插入 3.4kb 的基因组片段 ,将此重组质粒命名为 pLZD3081。

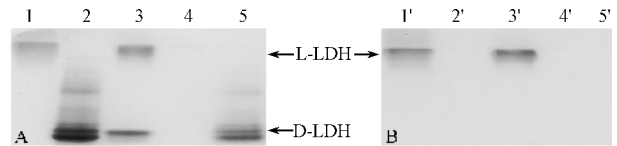


图 2 阳性克隆的非变性-PAGE (A.D ,L-乳酸显色 ,B.L-乳酸显色)

Fig.2 Native-PAGE of LDH stained for activity on D/L lactate (A. Stained by D ,L-lactic acid ;B. Stained by L-lactic acid)

1 1' . L-LDH (4ng ,Sigma) ;2 2' . D-LDH (20ng ,Sigma) ;3 3' . Crude extracts from *Lactobacillus* sp. MD-1 (1.49 μg) ;4 4' . Crude extracts from *E. coli* FMJ144/pJDC9 (2.1 μg) ;5 5' . Crude extracts from positive clone H (2.87 μg) .

2.3 D-乳酸脱氢酶基因的序列分析

将 pLZD3081 中 MD-1 菌株基因组 DNA 插入片段测序并将测出的全部序列用相关软件进行分析 ,得到 2 个开放阅读框架 ORF G 和 ORF I (中国专利申请号为 200310107150.4 ,GenBank Accession No. AY496011) 。其中 ORF G 编码半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶 (GALT) ,ORF L 编码 D-LDH。 *ldhD* 核苷酸序列如图 3 所示。分析表明 ,*Lactobacillus* sp. MD-1 的

ldhD 大小约有 1320bp ,开放阅读框架编码 331 个氨基酸 ,编码的蛋白质分子量约为 36.6kD ,pI 值为 5.21。 *ldhD* 以 144 位点的 GTG 为起始密码子 ,以 1138 位点的 TAA 为终止密码子。起始密码子上游有推测的典型核糖体结合位点 GGAGGAA ,位于起始密码子上游的第 7 个碱基 ;该区域的中心 AGGA 到翻译起始位点的距离是 8 个碱基 ,与 *E. coli* 和 *Bacillus subtilis* 中已证实的最适距离 7 ~ 9bp 相一致^[3,6]。 *ldhD* 推测的 SD 框 TATAGTA 和 *L. plantarum* 16S rRNA (EMBL 序列号 ,M58827) 3' 端的 3'-UUCCUC-5' 碱基严格互补。从而也可以说明 *Lactobacillus* sp. MD-1 和 *L. plantarum* 在系统发育中亲缘关系较近^[9]。在 5' 端非编码区中还有一个推测的-35 区 TGGTTTG ,和推测的-10 区 TATAGTA 相距 16nt ,共同构成了 *ldhD* 的启动子。在 *ldhD* 的 3' 端非编码区中存在典型的回文结构 AAACGGGAT-AGGGTCAAAAATTATTTTGGACCCT ATCCCGTTT ,形成了 *ldhD* 的典型终止子。 *ldhD* 的终止子的双螺旋形成的自由能 ΔG = - 50.74kcal/mol。对乳杆菌 MD-1、德氏乳杆菌 (*L. delbrueckii* ,X60220) 、瑞士乳杆菌 (*L. helveticus* ,X66723) 的 *ldhD* 以及干酪乳杆菌 (*L. casei* ,M26929) 的 D-HicDH 基因序列进行比对 ,结果表明 *Lactobacillus* sp. MD-1 的 *ldhD* 与其他菌株相同基因的相似性为 46.52%、47.56%、49.33% ,相似性较低。

2.4 D-乳酸脱氢酶的氨基酸序列分析

根据 *ldhD* 推测的氨基酸序列 (GenBank Accession No. AAR85484) 和 GenBank 中的德氏乳杆菌 (*L. delbrueckii* ,A38094) 、瑞士乳杆菌 (*L. helveticus* ,P30901) 以及植物乳杆菌 (*L. plantarum* ,NP-785580) -10



图 3 *LdhD* 的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of D-LDH

的 D-LDH 和干酪乳杆菌(*L. casei* ,DELBC)的 D-HicDH 用 ClustalX1.8 进行比对。结果表明 ,D-LDH 有两个保守区域 ,即 $R_{77} \sim E_{107}$ 区和 $V_{147} \sim D_{176}$ 区。其中 $V_{147} \sim D_{176}$ 是辅酶 NADH 的结合域 ,此保守序列中有典型的 GXGXXG 结构 ,典型结构后面还有 17-20 个保守的氨基酸残基。 D_{176} 天冬氨酸残基决定了辅酶是 NADH 而不是 $NADPH^{[6,10]}$ 。 $R_{77} \sim E_{107}$ 区据报道是酶的催化活性部位^[11]。 D-LDH 与 D-hydroxyisocaproate dehydrogenase(D-HicDH)有很高的相似性 ,说明 D-LDH 和 D-HicDH 均属于 NADH 依赖性脱氢酶家族^[11]。对 *Lactobacillus* sp. MD-1 的 D-LDH 与德氏乳杆菌、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌的 D-LDH 和干酪乳杆菌的 D-HicDH 用 Blast 进行比对 ,结果表明 *Lactobacillus* sp. MD-1 的 D-LDH 与德氏乳杆菌、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌的 D-LDH 相似性分别为 36%、38% 和 39% ;其中与干酪乳杆菌的 D-HicDH 相似性最高 ,为 42% ;同时 *Lactobacillus* sp. MD-1 的 D-LDH 的核苷酸序列与乳杆菌属其他种相似性也较低。因此 ,*Lactobacillus* sp. MD-1 的 D-乳酸脱氢酶基因是一个新的 D-乳酸脱氢酶基因。

2.5 D-LDH 基因的功能分析

通过 PCR 扩增出 *ldhD* 的 ORF 构建 *ldhD* 表达重组质粒 pLOD3081。用 IPTG 诱导 ,在 *E. coli* DE3 中表达出 D-LDH。经酶活性测定鉴定其预测的蛋白质功能(图 4)。 SDS-PAGE 结果表明在 *E. coli* DE3 有大量蛋白质表达 ,其分子量约为 40kD ,除去载体上的 His-tag(分子量约为 3kD) ,其实际表达的蛋白质多肽分子量约为 37kD ,和推测的多肽分子量一

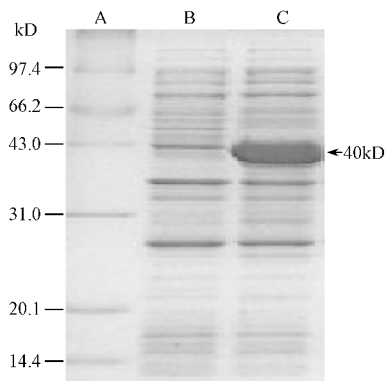


图 4 在 *E. coli* DE3 中表达的 D-LDH 的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of D-LDH expression in *E. coli* DE3

A. Marker ; B. DE3/pET-28a(+) (2.90 μ g) ; C. DE3/pLOD3081 (3.69 μ g).

致。测定 *E. coli* DE3 中表达的蛋白质中乳酸脱氢酶活性 ,结果表明表达的蛋白具有乳酸脱氢酶活性 ,酶活性为 1.84U/mg ,比对照菌株 *E. coli* DE3 (pET-28a(+))酶活性约高 50 倍 ,酶促反应液中乳酸浓度为 45mg/mL ,但是用 SBA-40C 葡萄糖-乳酸生物传感器分析不到 L-乳酸的存在 ,说明反应液中仅存在 D-乳酸 ,证明该酶是 D-乳酸脱氢酶。从而证明了通过表达文库筛选出的阳性克隆的 ORF L 编码 D-LDH。

参 考 文 献

- [1] 乔长晟,汤凤霞,苏建宇,等. L-乳酸高产菌株的诱变选育. 食品工业科技, 2002, 23(2): 35-37.
- [2] Fairoz Mat-Jan, Kiswar Y A, David P C. Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J Bacteriol*, 1989, 171(1): 342-348.
- [3] Thlery F, Dominique G, Nathalie B, et al. *Lactobacillus plantarum* *ldhL* Gene: Overexpression and deletion. *J Bacteriol*, 1994, 176(3): 596-601.
- [4] Jau-Der Chen, Donald A. Morrison. Construction and properties of a new insertion vector, pJDC9, that is protected by transcriptional terminators and useful for cloning of DNA from *Streptococcus pneumoniae*. *Gene*, 1988, 64: 155-164.
- [5] 凌代文,东秀珠,编. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 85.
- [6] Nathalie B, Thierry F, Dominique G, et al. Cloning of a lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by complementation in *Escherichia coli*. *FEBS*, 1991, 61-64.
- [7] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁,等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992: 19-21, 880-885.
- [8] 李建武,余瑞元,袁明秀,等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994: 351-357.
- [9] Dominique G, Thierry F, Nathalie B, et al. Cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analysis of the *Pediococcus acidilactici* L(+) Lactate dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(1), 266-272.
- [10] Nathalie B, Keyji J, Holbrook J, et al. D175 discriminates between NADH and NADPH in the coenzyme binding site of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* D-Lactate dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1995, 208(3): 895-900.
- [11] Sunil K, Peter E H, Phaik Leong-Morgenthaler, et al. Evolutionary Relationship of NAD⁺-Dependent D-Lactate Dehydrogenase: Comparison of primary structure of 2-Hydroxy acid dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1992, 184(1): 60-66.

Cloning and Expression of D-Lactate Dehydrogenase Gene in *Lactobacillus* sp. MD-1

LI Jian¹ TANG Yun¹ LIANG Feng-Lai¹ MA Jian-Fang² LIU Ru-Lin^{1*}

(¹ Life College, NanKai University, Tianjin 300071, China)

(² Tianjin NanKai Guard Group Limited Corporation, Tianjin 300071, China)

Abstract : It was constructed that a genomic DNA library from *Lactobacillus* sp. MD-1 yielding D,L-lactic acid, and the gene encoding D-lactate dehydrogenase(*ldhD*) was cloned from a library of *Lactobacillus* sp. MD-1 DNA by complementation for growth under anaerobic of an *Escherichia coli* that is lactate dehydrogenase and pyruvate-formate lyase double defective mutant. D-lactate dehydrogenase(D-LDH) activity was demonstrated by Native-PAGE. The nucleotide sequence of *ldhD* encodes a protein of 331 amino acids with a predicted molecular mass of 36.6kD. The *ldhD* gene showed 36%, 38%, 39% and 42% amino acid identity with D(-)-lactate dehydrogenases of *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. plantarum* and D-hydroxyisocaproate dehydrogenase(D-HicDH) of *Lactobacillus casei*. Two highly homologous regions(R₇₇ ~ E₁₀₇ and V₁₄₇ ~ D₁₇₆) with several conserved residues has been identified. R₇₇ ~ E₁₀₇ was a active site, and V₁₄₇ ~ D₁₇₆ is NADH-binding site. D-LDH shows no similarity to L-lactate dehydrogenase, but highly identical to hydroxyacid dehydrogenase(D-HicDH).

Key words : *Lactobacillus* sp. MD-1, D-lactate dehydrogenase, Cloning, Expression

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-22-23505967 ; E-mail : meor@nankai.edu.cn

Received date : 12-09-2003

《微生物学报》投稿要求

1. 投稿范围 : 凡有关微生物学基础研究、应用基础研究及其高技术创新等领域的研究成果, 包括普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究报告、简报等, 本刊均欢迎投稿。
2. 应首次发表 : 所有来稿均应未在公开出版的刊物上发表过。要求论点明确、数据可靠、行文简练、用词规范、图表清晰、结论合理。
3. 介绍信 : 所有来稿要求一式两份。论文是否涉及保密、署名是否无误, 请出示第一署名单位的介绍信。若是与国外作者合写的论文, 应出示国外作者同意以中文形式发表及署名顺序的信函说明。
4. 作者联系方式 : 请在投稿时提供通讯作者或第一作者的 Tel、Fax 和 E-mail 地址。
5. 审稿费 : 投稿时请随寄 100 元审稿费, 可通过邮局汇来(务请在汇款单上注明汇款单位和稿件第一作者, 我们将开具正式发票)。
6. 投稿方式 : 本刊中英文稿件均收, 采用邮寄投稿。要求五号宋体、A4 纸单面打印稿 2 份, 并同时要求提供电子版(附软盘或 E-mail 传来 actamicro@sun.im.ac.cn)。
7. 投稿及汇款地址 : (100080) 北京中关村中国科学院微生物研究所内 《微生物学报》编辑部
欲知更详细的投稿要求请登陆我刊的网址 : [Http://www.im.ac.cn/journals](http://www.im.ac.cn/journals)