

恶臭假单胞菌丙氨酸消旋酶基因的克隆、序列分析及表达

曹 芹^{1,2} 赵 智¹ 张英姿¹ 王 宇¹ 丁久元^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(² 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要: 从恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) 200 的基因组出发, 用 PCR 方法克隆到两个独立作用的丙氨酸消旋酶基因, 称之为 *dadX* 和 *alr*。*DadX* 编码 357 个氨基酸长的多肽, 计算分子量为 38.82kDa, *alr* 编码 409 个氨基酸长的多肽, 计算分子量为 44.182kDa。序列分析显示, *DadX* 的氨基酸序列与 *Pseudomonas putida* KT2440, 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) 的 *DadX* 比较, 相似性分别为 96.64%、71.99%、44.88% 和 47.37%。*Alr* 的氨基酸序列与 *Pseudomonas putida* KT2440 比较, 同源率为 94.38%, 而与铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*), 鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*) 和大肠杆菌(*E. coli*) 的 *Alr* 比较, 同源性均较低, 分别为 22.89%、25.72% 和 26.44%。在 *P. putida* 200 的 *DadX* 和 *Alr* 氨基酸序列中部发现有对于酶活性至关重要的保守区域, 如磷酸吡哆醛(PLP) 结合位点。*DadX* 和 *alr* 在大肠杆菌中得到表达, *DadX* 丙氨酸消旋酶只对丙氨酸有消旋作用, 而 *Alr* 丙氨酸消旋酶可以作用于丙氨酸和丝氨酸两种底物, 且对丝氨酸特异性更高。*Alr* 的表达不依赖于外源启动子, 说明在其结构基因上游存在启动子结构。

关键词: 恶臭假单胞菌 丙氨酸消旋酶 基因克隆 表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)01-0080-05

氨基酸消旋酶催化 L-氨基酸和 D-氨基酸的消旋。自从发现乳酸细菌可以酶促催化乳酸的消旋以来, 已经在细菌、古菌、真核生物, 包括哺乳动物中发现了各种各样的氨基酸消旋酶^[1]。它们可以分为磷酸吡哆醛(PLP) 依赖型和非 PLP 依赖型两类。丙氨酸消旋酶(EC 5.1.1.1) 是属于 PLP 依赖型。自最早在粪肠球菌(*Streptococcus faecalis*) 中发现丙氨酸消旋酶以来^[2], 在多种菌中相继报道有该酶存在。该酶能够提供 D-丙氨酸, 在细胞生长过程中起重要作用。Wasserman 等人从鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) 染色体中分离鉴定了两种独特的丙氨酸消旋酶基因, 分别是 *dadB* 和 *alr*。*DadB* 丙氨酸消旋酶的形成受 L-丙氨酸诱导, 在 L-丙氨酸的分解代谢过程中起作用。*Alr* 丙氨酸消旋酶是组成型合成, 在细胞壁肽聚糖的合成中提供 D-丙氨酸^[3,4]。在大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 以及霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) 的染色体上也已经发现有这两种独特的丙氨酸消旋酶基因^[1]。由于丙氨酸消旋酶在细胞壁合成中的特定作用, 而且只独特分布在原核生物中, 该酶已经成为抗生素药物研制的

目标, 已从分子水平上对其作用机制进行了深入探讨^[5]。国内尚未有关于氨基酸消旋酶的研究报道。

本文从具有氨基酸消旋酶活性的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) 出发, 克隆了 *dadX* 和 *alr* 基因, 并对其进行了序列分析, 这两个酶基因均在大肠杆菌中得到表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 实验所用的菌株和质粒如表 1 所示。

1.1.2 主要试剂和仪器: 所用分子生物学试剂均购自 TaKaRa 公司; PCR 使用酶为 TaKaRa Ex Taq™ DNA 聚合酶; 生化药品为进口或国产分析纯试剂; 基因扩增仪为 MJ 公司 PTC-150 型基因扩增仪; Perkin-Elmer 241 旋光仪。

1.2 培养基和培养条件

LB 培养基^[6]用于细菌培养, 大肠杆菌在 37℃ 培养, 假单胞菌在 30℃ 培养。抗生素使用浓度分别为氨苄青霉素 100μg/mL, 卡那霉素 50μg/mL。

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62554588; E-mail: dingjy@sun.im.ac.cn

作者简介: 曹 芹(1978-), 女, 江苏丹徒人, 硕士研究生, 主要从事氨基酸代谢方面的研究。

收稿日期: 2005-05-23; 接受日期: 2005-05-31; 修回日期: 2005-07-13

表 1 菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this work

Strain/Plasmid	Characteristics	Source
<i>Escherichia coli</i> TG1	<i>supE</i> , <i>hsd</i> Δ5 , <i>thi</i> ,Δ <i>lac-proAB</i>)F[<i>traD</i> 36 , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^H , <i>lacD</i> Δ <i>M15</i>]	Stored in this lab
<i>Pseudomonas putida</i> 200	wild type	Stored in this lab
Plasmid		
pMD18-T	T-vector , 2.7kb , Amp ^r , lacZ	TaKaRa Co.
pBR322	4.3kb , Amp ^r , tetr ^r	Stored in this lab
pCTD	1.1 kb PCR fragment containing <i>dadX</i> gene in pMD18-T	This study
pCTA	1.3kb PCR fragment containing <i>alr</i> gene in pMD18-T	This study
pCBD	1.1kb fragment containing <i>dadX</i> gene in pBR322	This study
pCBA	1.3 kb fragment containing <i>alr</i> gene in pBR322	This study

1.3 DNA 操作

大肠杆菌和假单胞菌 DNA 操作参照文献 [6]

1.4 PCR 法基因扩增

参考已经报道的 *P. putida* KT2440 的 *dadX* 和 *alr* 基因(Accession No. NC002947),设计以下引物 : P1 : 5'-CCGGATCCCGAATTATCCACCACCGATTTC AAC CC-3' ; P2 : 5'-TTAAGCTTAACACACCGCCCCCAACC TGTCCGC-3' ; P3 : 5'-TAGGATCCATCGAA CTCAAAC ACACCTGCGTC-3' ; P4 : 5'-CGAAGCTTTGGCAATTT CAGTCGACGAGTATC-3' ,下划线处依次为 *Bam*H I 、 *Hind* III 、 *Bam*H I 、 *Hind* III 酶切位点。引物对 P1/P2 和 P3/P4 分别用于扩增 *P. putida* 200 *dadX* 和 *alr* 基因序列 ,由赛百盛公司合成 ,*dadX* 与 *alr* 基因的 PCR 反应体系和反应条件相同。PCR 反应体系(50μL) 2 × GC Buffer 25μL ,dNTP 2μL ,引物 P1 和 P2 各 1μL ,模板 DNA 1μL ,*Taq* 酶 0.5U。PCR 反应条件 94℃ 3min ; 94℃ 40s 55℃ 40s 72℃ 1min 30 个循环 72℃ 5min。

1.5 序列测定和分析

DNA 序列测定由博亚公司完成 ;引物设计用 Primer Premier 5.0 ;DNA 及蛋白序列分析采用 Dnaman 5.0。

1.6 酶活测定

1.6.1 细胞处理 :将受体菌(TG1)于 37℃摇床培养 7 ~ 9h ,离心收集细胞 ,用 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH8.5)洗涤两次以上 ,适量磷酸缓冲液悬浮 ,菌悬液用于测定酶活。

1.6.2 消旋酶活力测定参考文献 [7] ,使用 Perkin-Elmer 241 旋光仪测定旋光值变化。转化反应体系为 1mL 磷酸缓冲液 (pH8.5) :含 5% 菌体 ,2% L-丙氨酸或 3% L-丝氨酸 ,0.0001% PLP。以上转化反应液 ,于 37℃摇床反应 10min ,迅速离心 ,取上清液测定旋光值。参照以标准 L-丙氨酸或 L-丝氨酸作出的标准曲线 ,根据反应前后旋光值的变化 ,计算已转化的 L-丙氨酸或 L-丝氨酸的量。

活力单位定义 :一个活力单位(U)为在上述反应条件下 ,每分钟转化 1nmol 底物(L-丙氨酸或 L-丝氨酸)所需的酶量。

2 结果

2.1 *dadX* 和 *alr* 基因的克隆

2.1.1 *dadX* 基因的克隆 :提取 *P. putida* 200 的染色体 DNA ,以此为模板 ,使用引物对 P1/P2 ,PCR 扩增出大小为 1.1kb 的 DNA 片段 ,PCR 产物经电泳回收纯化后 ,与 pMD18-T 相连 ,转化 *E. coli* TG1。挑取转化子 ,少量提取质粒 ,用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切 ,酶切图谱与预期相符。重组质粒命名为 pCTD。

2.1.2 *alr* 基因克隆 :所用的方法与 *dadX* 基因基本相同。以引物对 P3/P4 ,PCR 扩增出大小为 1.3kb 的 DNA 片段 ,与 pMD18-T 相连 ,转化 *E. coli* TG1。挑取转化子 ,少量提取质粒 ,用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切 ,得到大小分别约为 2.7kb ,800bp 和 500bp 的 3 个片段 2.7kb 片段来自于 pMD18-T 载体 ,800bp 和 500bp 片段长度之和与预期的 1.3kb 片段大小一致 ,推测在该 PCR 产物内可能含有一个 *Bam*H I 或 *Hind* III 酶切位点。该重组质粒命名为 pCTA。

2.2 *dadX* 和 *alr* 基因序列的分析

2.2.1 *dadX* 基因序列的分析 :随机挑取 TG1/pCTD 的两个阳性克隆 ,对 pCTD 中的插入片段进行测序 ,结果一致。该核酸序列长度为 1150bp ,序列分析显示 ,含有一个 ORF(1074bp) ,起始密码子为 ATG ,终止密码子为 TGA。推测此 ORF 编码一条 357 个氨基酸的多肽 ,分子量为 38.82kDa。核苷酸序列与 *P. putida* KT2440 的 *dadX* 核苷酸序列的相似性为 92.09% ,推测氨基酸序列的同源性为 96.64%。说明插入片段是 *P. putida* 200 的 *dadX* 基因。该序列已提交 GenBank ,序列号为 DQ068776。此序列与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 鼠伤寒沙门氏

菌 (*Salmonella typhimurium*) 以及大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 DadX 丙氨酸消旋酶的核苷酸序列相似性分别为 74.98%、52.45% 和 52.12% ,推测其氨基酸序列的同源性分别为 71.99%、44.88% 和 47.37%。对结构基因上游序列进行分析,未发现有启动子结构。在 *E. coli* 中, *dadX* 和 *dadA* 基因是属于同一个操纵元下的两个基因, *dadX* 位于 *dadA* 的下游, *dadX* 前无自身启动子^[8]。在 *P. putida* 中是否具有相似的组织结构,还需要进一步验证。

丙氨酸消旋酶属于 PLP 依赖类型。研究表明,不同种属来源的 DadX 丙氨酸消旋酶中存在着高度保守的区域。在序列的 N 端,有一个含有赖氨酸 (K) 的保守序列 [AS] V [IV] K-A [DN] A-Y-G-H-G,这几乎在所有的 DadX 氨基酸序列中都存在。在序列的 C-端,有另外一个含有酪氨酸 (Y) 的关键区域 :A-G-E-[PR] V-G-Y-G [AG] x [FY] *P. aeruginosa* 的 DadX 的蛋白结构是以同型二聚体形式存在的, N-端活性部位的赖氨酸残基 (K) 和来自另一个单体 C-端的酪氨酸残基 (Y),对于此二聚体的形成起着关键作用^[9]。同时已经证明,在嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 的丙氨酸消旋酶中,赖氨酸与 PLP 结合,在 L-丙氨酸消旋成 D-丙氨酸的过程中起催化作用。在以 D-丙氨酸为底物,进行 D-丙氨酸到 L-丙氨酸催化过程时,酪氨酸残基是活性位点形成稳定的氢键网络必需的氨基酸^[10~12]。将 *P. putida* 200 中的 DadX 氨基酸序列与上述四种来源的 DadX 比较发现,尽管它们之间的同源性存在差异,但是上述两个对酶活性极为重要的保守区域在五中来源的酶蛋白中都相当一致 (图 1)。该结果表明,不同种属的 DadX 蛋白很可能源于相同的祖先,虽然在漫长的进化过程中被不同的宿主修饰或改

变,但是决定其共有活性的局部区域还是保持了高度的保守性。

2.2.2 *alr* 基因序列的分析 随机挑取 TG1/pCTA 的两个阳性克隆,对 pCTA 中的插入片段进行测序,结果一致。该核酸序列长度为 1300bp,序列分析显示,含有一个 ORF (1230bp),起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA。推测此 ORF 编码一条 409 个氨基酸的多肽,分子量为 44.182kDa。分析此核酸序列,发现其中含有一个 *Hind*Ⅲ 酶切位点,这与 *alr* 基因扩增产物的酶切结果相符。该核苷酸序列与 *P. putida* KT2440 的 *alr* 核苷酸序列的相似性为 91.14% 推测氨基酸序列的同源性为 94.38%。说明插入片段可能是 *P. putida* 200 的 *alr* 基因。该序列已提交 GenBank,序列号为 DQ068775。此 Alr 序列与 *P. aeruginosa*、*S. typhimurium* 以及 *E. coli* 的 Alr 丙氨酸消旋酶的核苷酸序列相似性分别为 43.28%、42.64% 和 41.26%。推测其氨基酸序列的同源性分别为 22.89%、25.72% 和 26.44 %。对 *alr* 基因起始密码子 ATG 上游 60bp 左右的基因序列分析,未发现有启动子结构。

P. putida 200 的 Alr 丙氨酸消旋酶的氨基酸序列与 *P. putida* KT2440 的 Alr 氨基酸同源性较高,与同属菌 *P. aeruginosa* 的 Alr 氨基酸序列同源性非常低。但是与 DadX 相同,这五种来源的 Alr 氨基酸序列同样存在着 PLP 结合位点的保守区域 :A-V [VL] K-A [ND] A-Y-G-H-G。另一存在于 C-端的,参与催化 D-丙氨酸到 L-丙氨酸消旋作用的酪氨酸残基,在这五种菌的 Alr 氨基酸序列中都存在,但是其周围序列的保守性相对于 DadX 该区域氨基酸序列之间的保守性较低,此保守序列为 [AV] G [EN] x-V-G-Y [GD] x-T [WF] (图 2)。



图 1 *P. putida* 200 和其它种属来源的 DadX 部分氨基酸序列的比较

Fig.1 Comparison of several parts of amino acids sequences of DadX among *P. putida* 200 and other organisms



图 2 *P. putida* 200 和其它种属来源的 Alr 部分氨基酸序列的比较

Fig.2 Comparison of several parts of amino acids sequences of Alr among *P. putida* 200 and other organisms

2.3 带有 *dadX* , *alr* 基因的重组质粒的构建

为检测从 *P. putida* 200 扩增得到的 *dadX* 基因片段和 *alr* 基因片段上是否具有启动子结构 , 分别将这两个基因克隆到载体质粒 pBR322 上。质粒 pCTD 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切 , 得到大小分别为 1.1kb 和 2.7kb 的两条片段 , 电泳回收 1.1kb 的片段 , 与 pBR322 相同酶切得到的大片段相连 , 转化 *E. coli* TG1。对 TG1 转化子中的重组质粒进行酶切图谱分析 , 结果与预期一致。此重组质粒命名为 pCBD。

因为 *alr* 基因中含有 *Hind* III 酶切位点 , 而且在该 PCR 产物终止密码子 TGA 的下游存在一个 *Bam*H I 酶切位点 , 所以质粒 pCTA 用 *Bam*H I 酶切 , 得到大小分别为 1.3kb 和 2.7kb 的两条片段 , 电泳回收 1.3kb 的片段 , 与 pBR322 的相同酶切得到的大片段相连 , 转化 *E. coli* TG1。对 TG1 转化子中的重组质粒进行酶切图谱分析 , 结果与预期一致。此重组质粒命名为 pCBA。

2.4 *DadX* 和 *Alr* 的消旋酶活性

如同 *E. coli* , *S. typhimurium* 一样 , 在 *P. putida* 中克隆到两种丙氨酸消旋酶基因 , *dadX* 和 *alr*。分别用 pMD18-T pBR322 构建带有 *dadX* 或 *alr* 基因的四种转化子 , 并对转化子进行了酶活测定。表 2 为酶活测定结果。

表 2 不同重组菌株的氨基酸消旋酶活性

Table 2 Amino acid racemase activities of different strains

<i>E. coli</i> strain	Racemase activity/(U/mg wet cell)	
	L-alanine	L-serine
TG1	ND	ND
TG1/pMD18-T	ND	ND
TG1/pBR322	ND	ND
TG1/pCTD	200	ND
TG1/pCTA	111	270
TG1/pCBD	ND	ND
TG1/pCBA	97	230

ND :Not detectable.

在 *lacZ* 启动子的控制下 , *dadX* 和 *alr* 在大肠杆菌中都得到表达 , 进一步证明了 , 克隆的片段分别是 *dadX* 和 *alr* 基因。TG1/pCTA 菌对 L-丝氨酸有很高的活性 , 对丙氨酸的活性仅是其对丝氨酸活性的 40% , *S. typhimurium* 的 *Alr* 丙氨酸消旋酶同时也催化丝氨酸消旋 , 但对丝氨酸的活性只是丙氨酸的 15%^[4]。说明 *P. putida* 200 的 *Alr* 消旋酶具有独特的性质。而 TG1/pCTD 只对丙氨酸具有活力 , 与文献报道一致^[3]。

重组菌 TG1/pCBD 不能作用底物 L-丙氨酸 , 表

明在 *dadX* 基因的上游不含有启动子结构。而 pCBA 在 TG1 中的表达不依赖于外源启动子 , 重组菌对 L-丙氨酸和 L-丝氨酸都具有消旋作用 , 表明在 *alr* 结构基因的上游含有启动子结构 , 其结构可能不够典型。

3 讨论

目前只在 *E. coli*、*B. subtilis*、*P. aeruginosa* 和 *V. cholerae* 中发现同时存在两种丙氨酸消旋酶 , 在其它一些细菌中只含有一种丙氨酸消旋酶^[1]。为什么一种菌内同时含有这两个功能类似的基因 , 而且这两种基因之间是否存在着某种联系 , 现在还不清楚。同一种菌内 , *Alr* 和 *DadX* 氨基酸之间的同源性并不明显大于不同种菌的 *Alr* 或 *DadX* 氨基酸之间的同源性。

本工作首次从功能上确定 *P. putida*200 具有 *DadX* 和 *Alr* 两种丙氨酸消旋酶 , 阐明了其基因序列并推测出酶蛋白的氨基酸序列。序列分析表明 , *DadX* 和 *Alr* 氨基酸序列都含有与催化功能密切相关的氨基酸保守序列。 *DadX* 和 *alr* 基因编码的与催化功能相关的氨基酸保守区序列与 *P. putida* KT2440 完全相同 , 但与 *S. typhimurium* , *E. coli* 的保守序列比较 , 两个与底物结合的关键氨基酸残基 K 和 Y 附近的氨基酸残基略有差异。这种差异是否会引起酶的蛋白活性部位的空间结构发生变化 , 从而使底物的特异性发生了改变 , 需要进一步的理论分析和实验验证。

alr 基因序列起始密码子 ATG 上游 60bp 左右的序列为“ ATCGAACTCAAACACACCTGCGTCTGCTA AGCGGCAGACACCACTAACAACAAGAGAAATCACC ” , 用启动子分析软件 Promoter Prediction 对这段序列进行启动子分析 , 未发现启动子结构。但是本实验结果表明 , 克隆到不含有启动子的质粒 pBR322 上的 *alr* 基因 , 能够在 *E. coli* TG1 中表达 , 说明这段 *alr* 基因序列含有自身启动子结构 , 其结构可能不够典型 , 对该启动子序列的精确分析还有待进行进一步实验。

对 *P. putida* 中的两种丙氨酸消旋酶进行纯化 , 研究其性质和在细胞中的定位 , 可以为深入阐明它们的机制提供更多的信息。这方面的工作正在进行中。

致谢 本实验工作得到本所 2003 级博士研究生程海荣同学的大力帮助 , 特此致谢 !

参 考 文 献

- [1] Yoshimura T, Esaki N. Amino acid racemases : Functions and mechanisms. *J Biosci Bioeng*, 2003, **96** (2) :103 – 109.
- [2] Inagaki K, Tanizawa K, Badet B, *et al.* Thermostable alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* : Molecular cloning of gene, enzyme purification, and characterization. *Biochemistry*, 1986, **25** :3268 – 3274.
- [3] Wasserman SA, Daub E, Grisafi P, *et al.* Catabolic Alanine Racemase from *Salmonella typhimurium* : DNA Sequence, Enzyme Purification, and Characterization. *Biochemistry*, 1984, **23** :5182 – 5187.
- [4] Esaki N, Walsh CT. Biosynthetic alanine racemase of *Salmonella typhimurium* : purification and characterization of the enzyme encoded by the *alr* gene. *Biochemistry*, 1986, **25** :3261 – 3267.
- [5] LeMagueres P, Im H, Dvorak A, *et al.* Crystal structure at 1.45 Å resolution of alanine racemase from a pathogenic bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, contains both internal and external aldimine forms. *Biochemistry*, 2003, **42** :14752 – 14761.
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京 : 科学出版社, 1992.
- [7] Young-Hee L, Yokoigawa K, Esaki N, *et al.* A new amino acid racemase with threonine α -epimerase activity from *Pseudomonas putida* : Purification and characterization. *J Bacteriol*, 1993, **175** (13) :4213 – 4217.
- [8] Wild J, Hennig J, Lobočka M, *et al.* Identification of the *dadX* gene coding for the predominant isozyme of alanine racemase in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet*, 1985, **198** :315 – 322.
- [9] Strych U, Benedik MJ. Mutant analysis shows that alanine racemase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* are dimeric. *J Bacteriol*, 2002, **184** (15) :4321 – 4325.
- [10] Watanabe A, Kurokawa Y, Yoshimura T, *et al.* Role of tyrosine 265 of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Biochem*, 1999, **125** :987 – 990.
- [11] Watanabe A, Kurokawa Y, Yoshimura T, *et al.* Role of lysine 39 of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* that binds pyridoxal 5'-phosphate. Chemical rescue studies of lys39 \rightarrow ala mutant. *J Biol Chem*, 1999, **274** :4189 – 4194.
- [12] Watanabe A, Yoshimura T, Mikami B, *et al.* Tyrosine 265 of alanine racemase serves as a base abstracting α -hydrogen from L-alanine : the counterpart residue to lysine 39 specific to D-alanine. *J Biochem*, 1999, **126** :781 – 786.

Cloning, sequence analysis and expression of alanine racemase gene in *Pseudomonas putida*CAO Qin^{1,2}, ZHAO Zhi¹, ZHANG Ying-zi¹, WANG Yu¹, DING Jiu-yuan^{1*}⁽¹⁾ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)⁽²⁾ Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract : Two distinct alanine racemase genes from *Pseudomonas putida* 200 were cloned and sequenced. DadX encodes a peptide of 357 amino acids with a calculated molecular weight of 38.82kDa. The putative product of *alr* gene is a peptide of 409 amino acids with molecular weight of 44.182kDa. A homology comparison revealed identities of 96.64%, 71.99%, 44.88% and 47.37% of the DadX alanine racemase to those from *P. putida* KT2440, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, respectively. The amino acids sequence deduced from *alr* gene showed the homologies of 94.38%, 22.89%, 25.72% and 26.44% to those from the microorganisms above, respectively. Two motifs believed essential to the enzyme activity are found both in DadX and Alr, such as pyridoxal-5'-phosphate binding site. Both *dadX* and *alr* were expressed in *E. coli* TG1. Neither alanine racemase activity or serine racemase activity was detected in the host strain. Only alanine racemase activity was found in *E. coli* TG1/pCTD. But both *E. coli* TG1/pCTA and TG1/pCBA exhibit activity toward L-alanine and L-serine. Transcription of *alr* gene in *E. coli* is independent from extraneous promoter, a result confirmed by the significant enzyme activity observed in the *E. coli* TG1/pCBA, which indicates the presence of a possible promoter upstream the structure gene.

Keywords : *Pseudomonas putida* ; Alanine racemase ; Serine racemase

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-10-62554588 ; E-mail : dingjy@sun.im.ac.cn