

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,同源率均较低,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: 0001-6209(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>hsdΔ5</i> , <i>thi</i> , Δ [<i>lac-proAB</i>] ⁺ [F ⁺ <i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^H , <i>lacDΔM15</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 , tet ^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 TGTCGC-3'; P3: 5'-TAGGATCCATCGAA CTCAAAC ACACCTGCGTC-3'; P4: 5'-CGAAGCTTTGGCAATTC 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 (50 μ L): 2 \times GC Buffer 25 μ L, dNTP 2 μ L, 引物 P1 和 P2 各 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, *Taq* 酶 0.5U。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 40s, 55 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 1mmol 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

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%^[41]。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“ATCGAACTCAAACACACCTGCGTCTGCTAAGCGGCAGACACCACTAACAACAAGAGAAATCACC”, 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 1.45Å 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 alpha-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