

# 腾冲嗜热厌氧菌 6-磷酸果糖激酶的克隆、表达及其生物活性

周传奇<sup>1</sup>, 王敬强<sup>1</sup>, 钱 忠<sup>1</sup>, 马延和<sup>2</sup>, 刘斯奇<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院北京基因组研究所 北京 101318)

(<sup>2</sup> 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 6-磷酸果糖激酶(PFK)是糖酵解途径一个关键酶。基于腾冲嗜热厌氧菌基因组中的注释,基因 TTE1816 可能是 PFK 的一种,但是,它是否确有生物活性还必须有实验数据的支持。腾冲嗜热厌氧菌在最适温度培养后,提取细菌全蛋白,并采用双向电泳将可溶性蛋白质分离,然后运用质谱鉴定若干染色斑点。实验表明,TTE1816 在高温条件下能够表达蛋白质。将 TTE1816 基因体外克隆至细菌表达载体,并在 BL-21 大肠杆菌中表达为可溶性蛋白。酶动力学实验表明,重组蛋白 TTE1816 具有 PFK 的催化活性,最适反应温度在 60℃。它还能够催化葡萄糖、果糖、甘露糖和 6-磷酸葡萄糖的磷酸化反应。另外,在高底物浓度和酶浓度的条件下,TTE1816 还表现果糖二磷酸酶的特性。结果证明,TTE1816 是腾冲嗜热厌氧菌中 PFK 家族的一个新成员。

**关键词** 腾冲嗜热厌氧菌,嗜热菌,6-磷酸果糖激酶,糖酵解

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)02-0249-06

糖酵解是原核和真核细胞中不可或缺的糖代谢途径。在该途径中,6-磷酸果糖激酶(PFK)以 ATP 作为磷酸基供体,催化 6-磷酸果糖(F-6-P)的磷酸化,生成 1,6-二磷酸果糖(F-1,6-BP)。大部分 PFK 的催化反应是非可逆的,因此这个反应是糖酵解途径的一个关键酶。根据不同的磷酸基供体,自然界存在着 3 种不同的供体依赖型的 PFK:ATP 依赖型(大部分高等真核生物和细菌的 PFK)、ADP 依赖型(部分细菌尤其是极端细菌的 PFK)和焦磷酸(P<sub>i</sub>)依赖型(部分植物和细菌的 PFK)<sup>[1]</sup>。哺乳类的真核细胞中的 PFK 的氨基酸顺序和蛋白质结构都相当保守,所以对应的底物和变构调节物也十分类似。微生物的 PFK 则完全不同,特别是一些极端细菌的 PFK 具有真核细胞 PFK 所不具备的催化特性。Ding 等<sup>[2]</sup>观察到,常见的 PFK 的变构调节剂,例如 ADP 和 PEP 等,对于海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)的 PFK 几乎没有任何调节作用。1994 年 Kengen 等<sup>[3]</sup>在猛烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)中首次发现了一种特殊的 PFK,它利用 ADP 作为磷酸基的供体并没有变构调节作用。近年来,在嗜热菌中还有若干有关 ADP-PFK 的报道<sup>[4]</sup>。另一个有趣的事实是,在一些极端细菌中,PFK 还被证实可具有逆反应的催化作用。在去硫球菌(*Desulfurococcus amylolyticus*)中,

Hansen 等<sup>[5]</sup>报道它的 PFK 在高温下催化 F-1,6-BP 转化为 F-6-P。总之,近年来的研究表明,嗜热菌中的确存在着某些具有特殊催化功能的 PFK。了解这些 PFK 的蛋白质结构,探究它们的反应动力学过程,将可能为 PFK 的工业用途开拓新的思路。

腾冲嗜热厌氧菌(*Thermoanaerobacter tengcongensis*)是发现于中国云南腾冲县热泉中的杆状革兰氏阴性厌氧菌,最适生长温度 75℃,能够在多种糖的介质中正常生长<sup>[6]</sup>。重要的是,该菌的基因组已经被解析,而且它在最适条件下的蛋白质表达谱的测定也已完成<sup>[7,8]</sup>。根据基因组数据和已报道的 PFK 家族的其他生物信息,腾冲嗜热厌氧菌基因 TTE1816 被注释为 PFK 的一种。然而,TTE1816 是否具有生物催化活性?尤其是在高温条件下是否有其蛋白质表达?其表达产物有无活性?这些问题有待于试验工作给予证实。如果 TTE1816 蛋白质确有生物活性的话,它的催化参数如何?它是否具备反应的可逆性?这些信息将可能为腾冲嗜热厌氧菌 PFK 的应用前景提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种:腾冲嗜热厌氧菌(*Thermoanaerobacter*

基金项目:国家“973 项目”(2004CB719605)

\* 通讯作者。Tel:86-10-80485325 E-mail:siqiliu@genomics.org.cn

作者简介:周传奇(1979-)男,黑龙江人,硕士研究生,研究方向为腾冲嗜热菌糖代谢相关酶类及研究。E-mail:zhouchq@genomics.org.cn

收稿日期:2005-09-22 接受日期:2005-10-18 修回日期:2005-12-26

*tengcongensis*) 菌种由中国科学院微生物研究所提供。

**1.1.2 试剂:**限制酶, T4 DNA 连接酶均购于 Promega 公司, *Taq* 酶为本室制备; Western blot 所需一抗(多克隆抗体)为本室制备, 二抗(羊抗兔抗体)购于 Santa Cruz Biotechnology; 酶学活性测定试剂(ATP, 6-磷酸果糖, 6-磷酸葡萄糖, 甘露糖, 半乳糖, 磷酸烯醇式丙酮酸盐, 丙酮酸激酶, 果糖-1, 6-二磷酸盐, 磷酸葡萄糖脱氢酶等)购于 Sigma 公司; Q-Sepharose FF 阴离子柱料、紫外分光光度计 Ultraspec-3000、ECL 试剂盒、IEF 及双向电泳设备购于 Amersham pharmacia; 基质辅助激光解析飞行时间质谱仪(MODI-TOF)购于 BRUKER 公司; 液相层析串联质谱仪(LC-MS/MS)购于热电公司(Thermo Electron); 其它常规生化试剂购于北京化学试剂公司。

## 1.2 氨基酸序列同源分析

在 NCBI 数据库中采集 5 个典型的嗜热菌的 PFK, 然后应用 CLUSTAL X 软件, 以腾冲嗜热厌氧菌 PFK 为目标蛋白与其他几个 PFK 做序列匹配比较, 确定其同源性。

## 1.3 腾冲嗜热厌氧菌蛋白质的分离和鉴定

腾冲嗜热厌氧菌蛋白质的分离采用双向电泳(2-DE)法。选用 pH4~7 的 IPG 胶条(线性, 24cm), 胶条泡涨后, 每条的蛋白质上样量为 1.3mg。等电聚焦的参数为: 表面温度 20℃, 电流 50 $\mu$ A/gel, 30V 恒定电压电泳 4h, 500V、1000V、5000V 和 8000V 线性梯度电压电泳各 1h 时, 再以 8000V 恒定电压电泳至总电压伏小时达到 64000。聚焦结束后, 将聚焦的胶条进行两步平衡, 然后转移至 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(26 $\times$ 20cm)上。第二相电泳在 Ettan DALT Twelve 系统中进行。分离的蛋白质用考马斯亮兰显色。在 TTE1816 的理论等电点和分子量的 2-DE 区域切取若干胶斑点, 用胰蛋白酶将胶点中的蛋白质完全消化, 然后使用 AutoFlex-MALDI-TOF 质谱仪和 LCQ 质谱仪鉴定蛋白质。

## 1.4 TTE1816 的克隆、表达与纯化

以腾冲嗜热厌氧菌基因组 DNA 为模板, 依据 TTE1816 的基因顺序设计如下引物: 正向 5'-CGGGATCCATGAAGACGATTGGAATACTT-3'(包含一个 *Bam*H I 位点), 反向 5'-CCGCTCGAGTATAGAGAGGATTTTGCTGA-3'(包含一个 *Xho*I 位点)。利用 PCR 技术扩增 TTE1816 基因, 然后将该基因插入大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达载体 pET28a, 构建含有 His-tag 的 pET28a-TTE1816 表达载体。用 DNA 顺序测定法来确定读码框是否正确。在 1mmol/L IPTG 诱

导下, 重组 TTE1816 蛋白在大肠杆菌 BL-21 中表达。诱导后的菌体经匀浆、超声破碎和离心, 最后用 Ni-NTA 层析柱纯化带有 His-tag 的重组蛋白。SDS-PAGE 检测洗脱成分的纯度。

## 1.5 PFK 的活性测定

**1.5.1 PFK 的磷酸化反应测定:**将待测的样品与反应液(0.1mol/L Tris-HCl pH 8.0, 2.4mmol/L F-6-P, 2.5mmol/L ATP 和 12.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>)相混合, 在一定的温度下保温 20min, 然后通过 PK/LDH 的偶联方法, 在 340nm 处测定 NADH 浓度改变<sup>[9]</sup>。

**1.5.2 PFK 的脱磷酸反应测定:**将待测的样品与反应液(0.1mol/L Tris-HCl pH 8.0, 20mmol/L F-1, 6-BP, 5mmol/L ADP, 25mmol/L MgCl<sub>2</sub>)相混合, 在 60℃ 保温 2h, 然后通过 GPI/G6PDH 的偶联方法, 在 340nm 测定 NADP 浓度改变<sup>[10]</sup>。

## 1.6 重组 TTE1816 酶活特性测定

PFK 温度依赖性在 30℃~90℃ 下的测定; 离子特异性的测定分别用 12.5mmol/L 的 MnCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、NiCl<sub>2</sub> 和 ZnCl<sub>2</sub> 替换反应液中的 MgCl<sub>2</sub>; 底物特异性的测定分别用 2.4mmol/L 的 6-磷酸葡萄糖、葡萄糖、果糖和甘露糖替换反应液的 F-6-P 作为底物, 测定温度为 60℃。为了检测 TTE1816 的热稳定, 将 8 $\mu$ g 重组 TTE1816 分别在 60℃~80℃ 下水浴孵浴 30min, 60min, 90min 和 120min, 然后测定酶的活性(以未经过水浴预热的重组 TTE1816 为对照)。

## 1.7 部分纯化腾冲嗜热厌氧菌内表达的 PFK 及其活性鉴定

利用阴离子交换液相色谱法部分纯化体内表达的 PFK。将 Q-Sepharose FF 树脂平衡于 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)中, 然后把腾冲嗜热厌氧菌中提取的可溶性蛋白上柱, 用 0~1mol/L NaCl 浓度梯度洗脱, 收集洗脱液(每管 1mL), 对收集组分进行 PFK 的活性测定。

## 1.8 TTE1816 多克隆抗体的制备

约 1mg 纯化的 TTE1816 重组蛋白免疫一只新西兰家兔, 取耳血检测所产生抗体的滴度, 3 次加强后, 取全部血清制备和纯化 IgG。

## 1.9 Western blot 分析

将部分纯化的具有活性的 PFK 的洗脱组分, 分别用 12% 的 SDS-PAGE 分离, 然后电转移到 PVDF 膜上, 用 1:5000 稀释的重组 TTE1816 抗体为一抗, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体作为二抗, NBT 和 BCIP 为显色剂。

## 1.10 数据分析

应用 SIGMAPLOT 8.0 软件分析酶动力学数据。

## 2 结果

### 2.1 TTE1816 同源性全序列比对分析

TTE1816 同其他嗜热菌 PFK 全序列同源性的比较的结果显示,各个嗜热菌中的 PFK 的同源性并不十分高,TTE1816 与嗜热梭菌 *Clostridium thermocellum* PFK 为 58%,与海栖热孢菌 *Thermotoga maritima* MSB8 PFK 为 53%,与嗜热共生菌 *Symbiobacterium thermophilum* PFK 为 51%,与嗜热特莫氏菌 *Thermus thermophilus* PFK 为 51%,与嗜热链球菌 *Streptococcus thermophilus* PFK 为 55%,与嗜热脂肪芽胞杆菌 *Bacillus stearothermophilus* PFK 为 59%。然而,在 PFK 的酶活性区域,例如  $H^+$ ,  $Mg^{2+}$  和 F-6-P 结合位点,这几个 PFK 则表现为高度的保守性,其同源性达到 100%。因此,就理论分析而言,TTE1816 是一个理想的 PFK 候选蛋白质。

### 2.2 2-DE 和质谱法鉴定 TTE1816 的体内表达

将 75°C 培养的腾冲嗜热厌氧菌样品在 pH4~7 的范围内进行双向电泳(图 1-A)。胶图经考氏染色,可获得大约 330 个斑点。切割在 TTE1816 理论

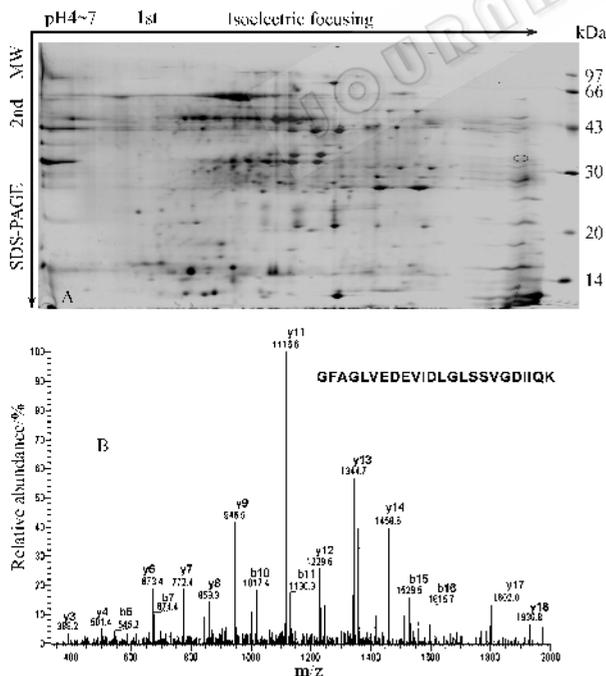


图 1 利用 2-DE 和质谱法鉴定体内表达的 TTE1816

Fig.1 Identification of TTE1816 expressed *in vivo* by 2-DE and mass spectrometry. A: 2-DE of the extracted proteins from *T. tengcongensis* on the pH 4 ~ 7 strip; B: LC-MS/MS spectrum from the parent ion 1238.632<sup>+</sup> (RT = 48.94min).

pI 和分子量附近的若干 2-DE 胶点,进行质谱分析,其中一个胶点,位于 pH 7 和分子量 35kDa 左右,所得到的质谱信号正好符合于 TTE1816 的理论预测值。用 LC-MS/MS 分析,共有 6 个肽段与 TTE1816 匹配。图 1-B 表明一个典型的 LC-MS/MS 的质谱图谱,其中与离子 1238.632<sup>+</sup> (RT = 48.94min) 的二级质谱相匹配的肽段为 GFAGLVEDEVIDLGLSSVGDIIQK。上述结果揭示,在 75°C 培养的腾冲嗜热厌氧菌中确可表达出 TTE1816 蛋白质。

### 2.3 TTE1816 的体外克隆、表达和纯化

TTE1816 基因通过常规 PCR 可成功进行体外扩增,并连接入载体 pET28a 中形成表达载体 pET28-TTE1816(图 2-A)。加入 1mmol/L 的 IPTG 到转化的 BL-21 菌中,可诱导重组的 TTE1816 表达,而且重组的 TTE1816 以可溶性形式存在于细胞胞浆内。采用 Ni-NTA 亲和液相色谱法能够纯化重组的 TTE1816。图 2-B 为纯化的 TTE1816 的 SDS-PAGE 图,它表明其纯度几近 99%,表观分子量为 37kDa。

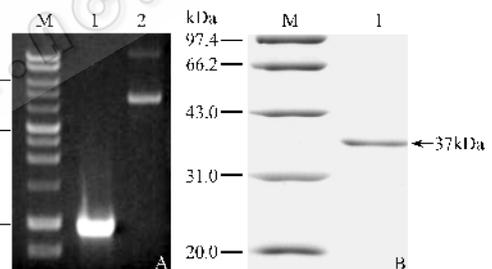


图 2 TTE1816 的体外克隆和蛋白纯化

Fig.2 Generation of the expression vector for TTE1816 and the recombinant protein of TTE1816 analyzed by 12% SDS-PAGE. A: Generation of the expression vector for TTE1816. M: DNA ladder; 1: PCR product; 2: The expression vector pET28a-TTE1816. B: The recombinant protein of TTE1816 analyzed by 12% SDS-PAGE. M: Protein ladder; 1: The purified recombinant protein of TTE1816.

### 2.4 TTE1816 的催化动力学常数以及酶反应特性

PFK 的活性测定结果显示,TTE1816 具有催化 F-6-P 磷酸化的能力。至此,TTE1816 作为 PFK 家族中一个新的成员当是无疑。在 60°C 下,以 F-6-P 为底物,以 ATP 为磷酸基供体,TTE1816 的  $K_m$  F-6-P = 3.6mmol/L,  $V_{max}$  = 14.25U。

TTE1816 酶活性的温度依赖性如图 3 所示,它的活性从 30°C 至 60°C,随着温度的升高,酶活性逐渐增强,但是从 60°C 至 90°C,随着温度的升高,酶的催化活性逐渐降低。因此,TTE1816 的最适活性温度在 60°C。值得注意的是,随着温度的升高,TTE1816 的  $K_m$  F-6-P 逐渐变大。这表明,F-6-P 与 TTE1816 的亲合程度随温度的升高而降低。不仅如

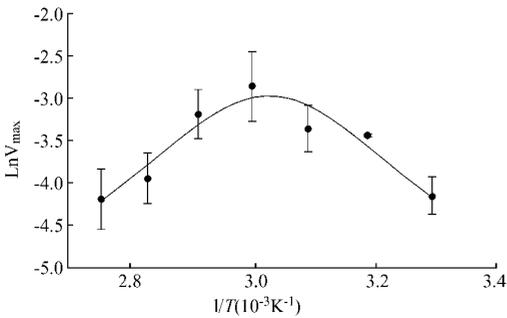


图3 TTE1816 的酶活性的最适温度曲线

Fig.3 The optimal temperature curve for enzyme activity of TTE1816 to catalyze the conversion of F-6-P to F-1,6-BP.

此,重组 TTE1816 的热稳定性也随着温度的升高而下降。将 TTE1816 在 60°C、70°C 和 80°C 条件下分别

保温,在不同时间点取样并测定酶活性。TTE1816 在 80°C 下孵浴 30min 之后,其活性便丧失;在 70°C 条件下孵浴 120min 后,其活性仍保持 60%;而在 60°C 条件下,TTE1816 则表现出较强的活性稳定性,即使在 60°C 水浴孵浴 120min 后,其活性依然不变。

酶活性测定还表明,TTE1816 不仅可以 F-6-P 为底物,而且能够催化多种单糖和磷酸化单糖的磷酸化反应,例如 6-磷酸葡萄糖、葡萄糖、果糖和甘露糖等。但是仍以催化 F-6-P 的活性最高。同时,TTE1816 的活性依赖于二价阳离子;二价阳离子中  $Mg^{2+}$  的激活作用最大, $Mn^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  也有部分激活作用(表 1)。实验表明,如果在反应体系中缺乏二价阳离子,TTE1816 便没有活性。

表 1 TTE1816 的生物化学与酶学特征参数

Table 1 The kinetic parameters of TTE1816

| Parameter  | Substrate                                  | Value           |
|--|--|-----------------|
| Apparent molecular mass of recombinant protein (kDa) |  | 37              |
| Temperature optimum(°C)                              |  | 60              |
| Apparent $K_m$ (mmol/L)                              | F-6-P (60°C)                               | 3.6             |
|  | F-1,6-BP (60°C)                            | 2.6             |
| $V_{max}$ (U, direction of F-1,6-BP formation, 60°C) | F-6-P                                      | 14.25           |
| $V_{max}$ (U, direction of F-6-P formation, 60°C)    | F-1,6-BP                                   | 0.4             |
| Cation specificity (%)                               | $Mg^{2+} > Mn^{2+} > Ca^{2+}$              | 100; 76; 7      |
| Substrate specificity (%)                            | F-6-P > G-6-P > Fructose, Mannose, Glucose | 100; 9; 7; 7; 6 |

## 2.5 TTE1816 具有逆反应的催化能力

将纯化的重组的 TTE1816 和 F-1,6-BP 混合,可检测到 F-6-P 的形成,这预示 TTE1816 可催化 F-1,6-BP 的脱磷酸反应。然而,TTE1816 催化的逆反应的  $k_{cat}$  较高,只有在酶浓度较高和反应时间较长时,才可观察到 F-6-P 的形成。在 60°C,0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 pH8.0 条件下,TTE1816 的逆反应的  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为 2.6mmol/L 和 0.4U(表 1)。

## 2.6 部分纯化腾冲嗜热厌氧菌内表达的 TTE1816 及其活性鉴定

将腾冲嗜热厌氧菌的可溶性蛋白加入到 Q-Sepharose FF 阴离子交换层析柱,然后利用 NaCl 浓度梯度将结合于柱上的蛋白质逐一洗脱下来,最后在洗脱的组分中检测 PFK 的活性。在 0.42 ~ 0.83mol/L NaCl 的浓度范围,洗脱的组分中含有较高的 PFK 活性(图 4-A)。进一步采用抗 TTE1816 的抗体,Western blot 检查所有的洗脱成分,这些含有酶活性的洗脱成分里,确含有 TTE1816(图 4-B)。因此,在 75°C 正常生长的腾冲嗜热厌氧菌中,不仅 TTE1816 能够表达,而且其表达的蛋白质产物具有

PFK 的催化活性。特别重要的是,体内部分纯化的 TTE1816 的最佳酶活性与大肠杆菌中产生的 TTE1816 颇为不同。腾冲嗜热菌体内生成的 TTE1816 在 60°C 和 75°C 条件下的催化活性基本不变。这一事实提示,TTE1816 基因在不同的细菌中的蛋白质表达产物可能具有不同的构型。

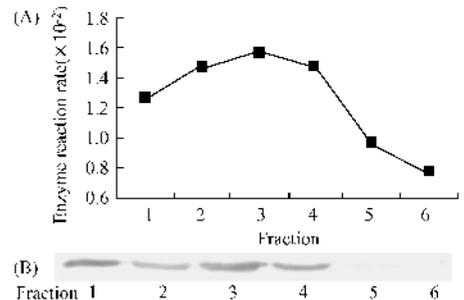


图4 腾冲嗜热厌氧菌表达的 TTE1816 的部分纯化及其 PFK 活性鉴定

Fig.4 Partial purification of TTE1816 protein expressed *in vivo* and identification of its enzyme activity as PFK. A: The PFK enzyme activity in the eluted fractions; B: Western blot to detect the TTE1816 in the eluted fractions.

### 3 讨论

对于腾冲嗜热厌氧菌基因组的生物信息学分析表明, TTE1816 可能具有 PFK 的催化活性。本文从重组蛋白质、体内表达、酶的活性测定以及免疫化学等几个角度, 全面地考察了 TTE1816 的生物学性质。结果表明, 腾冲嗜热厌氧菌的 TTE1816 是一个新型的 PFK, 能够催化 F-6-P 的磷酸化反应。不仅如此, TTE1816 还表现了酶活力最适温度下的热稳定性, 广泛的底物选择性和不常见的可逆反应的催化性。值得注意的是, TTE1816 在生物化学特性上与古细菌的嗜热菌 PFK 有很多相似之处, 这种特性在一般嗜热菌中, 尤其是真细菌中, 是不多见的。

PFK 是一个在原核和真核细胞中都存在的酶家族, 一般分为 3 个亚族: PFK A 家族大部分在哺乳类细胞、植物细胞和某些细菌细胞, 利用 ATP 和焦磷酸为磷酸基的供体, 专一地以 F-6-P 为底物, 而且它的活性受许多变构调节物的作用; PFK B 家族主要存在于细菌细胞中, 利用 ATP 为磷酸基的供体, 但有较为广泛的底物, 不仅以 6 位磷酸化的单糖为底物, 也以非磷酸化的单糖为底物, 而且它的活性不受变构调节物的作用; PFK C 家族只在细菌细胞中发现了几个, 它的特点在于利用 ADP 为磷酸基的供体<sup>[11]</sup>。有关这 3 类家族的蛋白质结构上的分析尚不多见。Schumacher 等<sup>[12]</sup>曾提出, PFK B 的家族成员中享有 DIXGAGD 的结构域, 在靠近 N-端有一双甘氨酸肽段, 有助于形成腺嘌呤结合环形结构。不过, 这种理论预测只是符合大肠杆菌和 *A. permix* 中的 PFK B 的氨基酸顺序<sup>[13]</sup>。与 PFK A 的家族的成员相比较, PFK B 家族成员中在氨基酸一级结构上的同源性甚差, 因此, 不容易从氨基酸顺序上来判断家族成员的归属。但是, 该家族在生物化学上共同性, 可作为判据之一<sup>[14]</sup>。TTE1816 的分子量只有 37kDa, 没有通常真核细胞的 PFK C-端的变构剂结合区域, 这样, 它就可能是一个非变构剂调控的 PFK。就底物利用的角度而言, TTE1816 具备底物结合的广泛性, 所以它似乎应是 PFK B 家族的一个新成员。

无论在 PFK B 还是在 PFK C 家族中, 嗜热菌的 PFK 可能具有可逆反应的催化能力。Hansen 等<sup>[5]</sup>观察到 *Desulfurococcus amylolyticus* 的 PFK 在高浓度的 F-1, 6-BP 和 ADP 条件下, 具有相当于正向反应速度十分之一的酶活性。由于该 PFK 的逆向反应的  $K_{m(F-1, 6-BP)}$  为 16.7mmol/L,  $K_{m(ADP)}$  为 0.45mmol/L, Hansen 等并不认为该逆向反应可能发生在细菌体

内, 但是对于 F-6-P 的磷酸化可能会有调节效应。在 *Thermococcus zilligii* 中, Ronimus 等<sup>[15]</sup>报道, 利用 ADP 的 PFK 也能催化逆反应。在这一逆反应中,  $K_{m(F-1, 6-BP)}$  和  $K_{m(AMP)}$  值恰与 *Desulfurococcus amylolyticus* 相反, 分别为 0.56mmol/L 和 12.5mmol/L, 而反应速度仅为正向反应的百分之一。这样看来, 它的逆向反应在体内发生的可能性也会相当的小。腾冲嗜热厌氧菌 TTE1816 表现了显著的逆向反应的能力, 不过它的动力学常数与上述两种 PFK 颇为类似, 即需要高浓度的底物 ( $K_{m(F-1, 6-BP)} = 2.6\text{mmol/L}$ ), 最高逆反应速度为正向的 1/35。可以预测, 在最适温度下, TTE1816 在腾冲嗜热厌氧菌中的逆向催化可能性已是较小的。应当指出的是, 动力学常数的计算仅仅回答了问题的一个方面, 为什么大部分 PFK 的催化行进限于正向反应, 而只有若干嗜热菌的 PFK 能具备逆向催化性? 这或许蕴含着某些尚不为人们所熟知的机理。因此, TTE1816 的逆向反应动力学和功能测定, 将是我们下一阶段的工作目标之一。

如上文所述, TTE1816 在腾冲嗜热菌和大肠杆菌中的蛋白质产物表现了不同的最适酶活性范围。重组蛋白 TTE1816 的最适酶活力温度是 60°C, 明显低于腾冲嗜热厌氧菌的最适生长温度 75°C, 而从腾冲嗜热厌氧菌体内部分纯化的 TTE1816 蛋白在 75°C 下测得的活性却与 60°C 的活性基本一致。那么究竟是什么原因造成了这些差别呢? 一般而言, 酶的最适反应温度应与细菌的最适生长温度相适。这样, 腾冲嗜热菌 TTE1816 的 PFK 应该在 75°C 维持较高的酶活性。事实上, 该菌体内合成的 TTE1816 蛋白质在 75°C 的活性确实如此。那么, 可以推测的是, 腾冲嗜热菌体内合成的 TTE1816 可能在蛋白质空间构型上与大肠杆菌中重组 TTE1816 蛋白质有所不同。这两种蛋白产物均含有稳定的酶活性位点, 所以酶催化的化学性质完全一致; 然而, 由于蛋白构型的些微差别又可能造成其热稳定的差别。另外, 在腾冲嗜热菌中产生的 TTE1816 也可能与其它的蛋白质在体内形成复合体, 这些复合体对于稳定蛋白质的结构和活性是相当重要的。当然, 这些只是一些理论上的假设, 还需要更多实验加以证实。

### 参 考 文 献

- [1] Ronimus R, de Heus E, Ruckert A, et al. Sequencing, high-level expression and phylogeny of the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from the thermophilic spirochete *Spirochaeta thermophila*. *Arch Microbiol*. 2001, 175: 308-312.  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- [ 2 ] Hansen T, Musfeldt M, Schonheit P. ATP-dependent 6-phosphofruktokinase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: characterization of an extremely thermophilic, allosterically regulated enzyme. *Arch Microbiol*, 2002, **177**: 401 – 409.
- [ 3 ] Kengen SWM, de Bok FAM, van Loo ND, *et al.* Evidence for the operation of a novel Embden-Meyerhof pathway that involves ADP-dependent kinases during sugar fermentation by *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 17537 – 17541.
- [ 4 ] Fukui T, Atomi H, Kanai T, *et al.* Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Res*, 2005, **15**, 352 – 363.
- [ 5 ] Hansen T, Schonheit P. Purification and properties of the first-identified, archaeal, 6-phosphofruktokinase, an extremely thermophilic non-allosteric enzyme, from the hyperthermophile *Desulfurococcus amylolyticus*. *Arch Microbiol*, 2000, **173**: 103 – 109.
- [ 6 ] Xue Y, Xu Y, Liu Y, *et al.* *Thermoanaerobacter tengcongensis* sp. nov., a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, **51**: 1335 – 1341.
- [ 7 ] Bao Q, Tian Y, Li W, *et al.* A complete sequence of the *T. tengcongensis* genome. *Genome Res*, 2002, **12**: 689 – 700.
- [ 8 ] Wang J, Xue Y, Feng X, *et al.* An analysis of the proteomic profile for *Thermoanaerobacter tengcongensis* under optimal culture conditions. *Proteomics*, 2004, **4**: 136 – 150.
- [ 9 ] Schroder C, Selig M, Schonheit P. Glucose fermentation to acetate, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> in the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*: involvement of the Embden-Meyerhof pathway. *Arch Microbiol*, 1994, **161**: 460 – 470.
- [ 10 ] Hansen T, Schonheit P. Purification and properties of the first-identified, archaeal, ATP-dependent 6-phosphofruktokinase, an extremely thermophilic non-allosteric enzyme, from the hyperthermophile *Desulfurococcus amylolyticus*. *Arch Microbiol*, 2000, **173**: 103 – 109.
- [ 11 ] Ronimus RS, Kawarabayasi Y, Kikuchi H, *et al.* Cloning, expression and characterisation of a Family B ATP-dependent phosphofruktokinase activity from the hyperthermophilic crenarchaeon *Aeropyrum pernix*. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, **202**: 85 – 90.
- [ 12 ] Schumacher MA, Scott DM, Mathews II, *et al.* Crystal structures of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase reveal a novel catalytic mechanism and prodrug binding. *J Mol Biol*, 2000, **298**: 875 – 893.
- [ 13 ] Ronimus RS, Morgan HW. The biochemical properties and phylogenies of phosphofruktokinases from extremophiles. *Extremophiles*, 2001, **5**: 357 – 373.
- [ 14 ] Hansen T, Schonheit P. Sequence, expression, and characterization of the first archaeal ATP-dependent 6-phosphofruktokinase, a non-allosteric enzyme related to the phosphofruktokinase-B sugar kinase family, from the hyperthermophilic crenarchaeote *Aeropyrum pernix*. *Arch Microbiol*, 2001, **177**: 62 – 69.
- [ 15 ] Ronimus RS, Koning J, Morgan HW. Purification and characterization of an ADP-dependent phosphofruktokinase from *Thermococcus zilligii*. *Extremophiles*, 1999, **3**: 121 – 129.

## Cloning, expression and characterization of the 6-phosphofruktokinase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*

ZHOU Chuan-qi<sup>1</sup>, WANG Jing-qiang<sup>1</sup>, QIAN Zhong<sup>1</sup>, MA Yan-he<sup>2</sup>, LIU Si-qi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Beijing Genomics Institute, Chinese Academy of Sciences, Beijing 101318, China)

<sup>2</sup> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract**: The enzyme of 6-phosphofruktokinase (PFK) is a key element in glycolysis, widely distributed in most eukaryote and prokaryote. Although the gene TTE1816 from *Thermoanaerobacter tengcongensis* was annotated as a PFK based upon genomic analysis, its catalytic properties have to be examined experimentally. The cells of *T. tengcongensis* were cultured at optimal temperature followed by the separation of the bacterial proteins with two-dimensional electrophoresis (2-DE). These 2-DE spots located around the theoretical values of pI and MW for TTE1816 were picked up and identified by mass spectrometry, suggesting that TTE1816 indeed expressed at such high temperature. Furthermore, TTE1816 was cloned into an expression vector and expressed soluble protein in *E. coli* BL-21 strain. The kinetic data revealed that the recombinant TTE1816 exhibited the catalysis to phosphorylate fructose-6-phosphate (F-6-P). Not only converting F-6-P to F-1,6-BP, does TTE1816 also catalyze the phosphorylation of glucose, fructose, mannose and glucose-6-phosphate (G-6-P) with optimal temperature at 60°C. Interestingly, TTE1816 is capable to catalyze the reverse reaction as a bisphosphatase for dephosphorylation of F-1,6-BP under the reaction conditions with high concentrations of enzyme as well as substrates. The data reported herein demonstrate that a new member of PFK family has been identified in *T. tengcongensis*.

**Keywords**: *Thermoanaerobacter tengcongensis*; Thermophilies; Phosphofruktokinase; Glycolysis

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719605)

\* Corresponding author. Tel 86-10-80485325; E-mail: 'siqiliu@genomics.org.cn

Received 22 September 2005/Accepted 18 October 2005/Revised 26 December 2005