

# 荧光假单胞菌 TM5-2 中 D-型氨基酸脱氢酶的鉴定和表达

徐书景<sup>1</sup> 鞠建松<sup>1,2\*</sup> 马延和<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>陕西科技大学生命科学与工程学院 西安 710021)

(<sup>2</sup>中国科学院微生物研究所 北京 100101)

**摘 要:** 从荧光假单胞菌 TM5-2 中得到一个含丙氨酸消旋酶基因的 DNA 片段(8.8kb), 相邻的一个开读框(ORF)与甘氨酸/D-型氨基酸氧化酶基因相似。该 ORF 经过克隆、表达, 并没有检测到甘氨酸/D-型氨基酸氧化酶的活性, 推导而得的氨基酸序列与 D-型氨基酸脱氢酶序列比较发现, ORF 含有 D-型氨基酸脱氢酶的所有重要的保守序列。经 TTC 培养基鉴定, 其具有 D-型氨基酸脱氢酶的活性, 并对一系列 D-型氨基酸有作用, 最佳作用底物是 D-组氨酸。

**关键词:** 甘氨酸/D-型氨基酸氧化酶; D-型氨基酸脱氢酶; TTC 培养基

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)04-0634-05

真细菌的细胞壁肽聚糖是由 D-丙氨酸和 D-谷氨酸等多种氨基酸组成的, 而一些细菌的缩氨酸抗菌素也含有 D-型氨基酸, 一些游离 D-型氨基酸, 如 D-丙氨酸, D-谷氨酸和 D-天门冬氨酸等大量存在于真细菌中。D-型氨基酸的代谢作用目前已经基本被确定<sup>[1]</sup>, 一系列特殊的酶参与着 D-氨基酸代谢, 例如: 甘氨酸氧化酶和 D-型氨基酸脱氢酶, 等等。

甘氨酸氧化酶[Glycine oxidase(GO), EC 1.4.3.19]是枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)全基因组解析后发现的一个黄素酶<sup>[2]</sup>。该酶作用于多种胺类, 如肌氨酸、N-乙烷甘氨酸和 D-型氨基酸, 并与 D-型氨基酸氧化酶和肌氨酸氧化酶部分共享底物特异性。甘氨酸氧化酶催化胺的初级和二级氧化脱氨基作用释放  $\alpha$ -酮酸、氨和过氧化氢。

D-型氨基酸脱氢酶(D-amino acid dehydrogenase, EC 1.4.99.1)是细菌膜蛋白<sup>[6,11]</sup>, 催化一系列 D-型氨基酸氧化生成相关的亚氨基酸, 再水解为  $\alpha$ -酮酸和氨。目前已从大量的细菌中检测出膜联 D-型氨基酸脱氢酶的活性, 包括铜绿假单胞菌、鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌等, 但时至今日, 成功表达并纯化此酶蛋白的报道还很少。

本课题组在从基因组未完全解读的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) TM5-2 基因组文库中筛选丙氨酸消旋酶基因(alanine racemase, *dadX*)时获得一个长 8.8kb 的基因片段<sup>[3,4]</sup>, 与基因 *dadX* 临近的一个开读框(Open reading frame, ORF)是一个假定

的甘氨酸/D-型氨基酸氧化酶的基因片段(图 1)。我们检索了其他 4 个假单胞菌属菌株: 荧光假单胞菌(*P. fluorescens* LBW<sup>[5]</sup>)、丁香假单胞杆菌(*Pseudomonas syringae*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* KT2440)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* PA01)的基因结构后发现, 4 个菌株均存在相同的基因片段<sup>[3]</sup>。在 *P. fluorescens* LBW 和 *P. syringae* 菌中该基因被命名为假定的甘氨酸/D-型氨基酸氧化酶, 而在菌株 KT2440 和 PA01 中, 则被解码为 D-型氨基酸脱氢酶<sup>[6]</sup>。比较其氨基酸序列发现, 这些基因之间有着非常高的同源性, 其与 TM5-2 的相似率分别是 92%、87%、90% 和 84%<sup>[3]</sup>。具有如此高的同源性却解码为不同的酶, 因此本文试图解析该基因以确定其到底解码为哪类酶。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种、质粒:** 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH12S 和缺陷型菌株 EC1012(*dadA*<sup>-</sup>) (此菌株不能利用 L-丙氨酸或 D-丙氨酸作为细胞生长的碳源)用于基因克隆<sup>[6]</sup>, MB2795(*alr::frit, dadX::frit*)是 D-丙氨酸缺陷型菌株<sup>[7]</sup>, BL21(DE3)用于基因表达, 荧光假单胞菌(*P. fluorescens* TM5-2)由日本德岛大学横井川教授惠赠, 该菌株生长于 30℃ LB 营养液中; 必要时添加氨苄青霉素(Sigma)的量为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 表达质粒载体 pET22k(+)来自 Novagen(Germany),

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(20060400109) 陕西科技大学科研启动基金项目(BJ05-10)

作者简介: 徐书景(1974), 女, 河北石家庄人, 讲师, 硕士, 主要从事基因与蛋白工程方面的研究。E-mail: xushujing@sust.edu.cn

\* 通讯作者。Tel: 86-10-64807578; E-mail: jujianong@126.com

收稿日期: 2007-03-07 接受日期: 2007-04-13 修回日期: 2007-05-16

克隆质粒载体 pUC18、p3T 来自 Mo Bi Tec, Goettingen, Germany<sup>[8]</sup>。

**1.1.2 培养基:** ① LB 营养液: 每升水含胰蛋白胨 10g, 酵母浸膏 5g, 氯化钠 5g; ② TTC (2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride) 培养基<sup>[9]</sup>: 每升水含琼脂 15g,  $K_2HPO_4$  7g,  $KH_2PO_4$  3g,  $MgSO_4$  100mg, 蛋白胨 2g, 2.5% TTC 溶液 1mL, 以及 2.5mmol/L L-alanine 或 D-alanine 作为反应底物。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 实验所用的限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均为 TaKaRa 公司产品; *Taq* DNA polymerase 和 dNTP 购自北京天根生化科技有限公司; 氨苄青霉素和各种 L-或 D-型氨基酸为 Sigma 公司产品; 蛋白纯化试剂购自 Qiagen 公司; 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成; 其它化学试剂均为分析纯。PCR 扩增仪、电转化仪和 SDS-PAGE 凝胶电泳仪购自 Bio-Rad 公司; 核酸凝胶电泳及成像系统购自北京君意东方电泳设备有限公司; 超声破碎仪为美国 SONICS&MATERIALS 公司产品。

## 1.2 基因文库的建立

TM5-2 菌的染色体 DNAs 根据 Aquapure Genomic DNA Isolation Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 试剂盒的说明提取获得。1 $\mu$ g 染色体 DNAs 经单一限制性核酸内切酶消化, 酶切片段与载体 pUC18 连接后, 经电转化 (GenePulser, Bio-Rad) (2.5kV, 200 $\Omega$ , 25 $\mu$ F) 插入选择菌株 MB2795 中, 培养于含氨苄青霉素的 LB + agar 培养基上。质粒由 Quantum Prep Plasmid Miniprep kit (Bio-Rad) 试剂盒提取。

## 1.3 PCR 反应条件、核酸和氨基酸序列分析

PCR 反应条件: 85 $^{\circ}C$  5min, 95 $^{\circ}C$  45s, 54 $^{\circ}C$  1min, 72 $^{\circ}C$  2min, 25 个循环。核酸序列分析所用引物为通用引物 M13-47 和 Rv-M, 核酸序列由 ABI 3100Avant DNA sequencer (Applied Biosystems) 测定分析。氨基酸序列由 Model 492-Protein Sequencer (Applied Biosystems) 测定分析。

## 1.4 甘氨酸/D-型氨基酸氧化酶活性测定

目的基因片段连接到质粒载体 pET22b(+) 上, 转入宿主细菌 BL21(DE3) 中过夜培养, 预培养的菌液 (0.10mL) 转入 10mL 含有氨苄青霉素和诱导剂 IPTG (isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside, 终浓度 1mmol/L) 的新鲜培养液中 28 $^{\circ}C$  生长 7h, 收集细胞, 悬浮于 50mmol/L Kpi 缓冲溶液 (pH 7.0), 超声破碎至溶液清亮。反应体系溶液含: 200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mg/mL TOOS, 0.1 mg/mL 4-aminoantipyrine, 2 units peroxidase, 100 mmol/L 甘氨酸

或 D-型丙氨酸为反应底物, 细胞破碎上清液作为粗酶参与反应<sup>[10]</sup>, 反应在 37 $^{\circ}C$  下进行, 根据反应产物在 550 nm 下的吸光度高低判断酶活性的有无。

## 1.5 D-氨基酸脱氢酶的鉴定

利用添加了适当抗生素和 D-或 L-alanine 的 TTC 培养基, 观察菌落颜色变化。存在生物物质 TTC 的情况下, 如果菌落呈红色, 则表示插入的基因片段具有 D-氨基酸脱氢酶的活性, 反之, 则没有。

## 1.6 D-氨基酸脱氢酶基因克隆和表达

目的基因经过 PCR 扩增, 其引物为 dadA1: 5'-CATATGCGAGTTATGCTATTGGGT-3' 和 dadB1: 5'-CTCGAGTTGCTGAGCTGGCGCTGGA-3', 下划线分别为 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点, 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离, 由试剂盒 E. Z. N. A. Gel Extration kit 提纯, 通过 TA 克隆技术连接到载体 p3T 上构建质粒 p3TdadA1。该质粒被 *Nde* I 和 *Hind* III 消化后, 连接到载体 pET-22b(+), 构建质粒 pETdadA1。质粒 pETdadA1 转入宿主 BL21(DE3) 经 IPTG 诱导培养 4h, 收集细胞, 悬浮于 4mL 细胞溶解液 (50mmol/L  $NaH_2PO_4$ , pH 8.0; 300mmol/L NaCl 和 10mmol/L imidazole) 中, 超声破碎数次至溶液清亮。高速离心分离除去细胞碎片, 上清液与 1mL 50% Ni-NTA 原液 (Qiagen) 在 4 $^{\circ}C$  充分混匀 (1h), 洗涤液 (50mmol/L  $NaH_2PO_4$ , pH 8.0; 300mmol/L NaCl 和 20mmol/L imidazole) 洗涤 3 次, 将未吸附在 Ni-NTA 柱上的蛋白质洗去; 柱上吸附的蛋白质由洗提液 (50mmol/L  $NaH_2PO_4$ , pH 8.0; 300mmol/L NaCl 和 250mmol/L imidazole) 洗提 4 次。蛋白质的纯度由 SDS-PAGE 电泳法检测。

## 1.7 D-氨基酸脱氢酶活性测定<sup>[11]</sup>

IPTG 诱导培养后收集的细胞悬浮于 20mmol/L Tris-Cl (pH 8.0) 溶液中, 超声破碎至溶液清亮, 该破碎液作为粗酶参与反应。反应体系为 20mmol/L D-alanine, 50 $\mu$ mol/L 2,6-dichloroindophenol (DCIP), 100mmol/L Tris-Cl, 5 $\mu$ mol/L FAD, 反应体积为 1mL, 测定其吸光度 ( $OD_{600}$ ) 以  $\Delta A$  表明吸光度变化值。

## 2 结果和分析

### 2.1 基因文库的筛选和核酸序列分析

经限制内切酶 *Hind* III, *Pst* I 和 *Eco* R I 消化处理的 DNA 片段与质粒连接后, 转入缺陷型菌株 MB2795, 在添加氨苄青霉素培养基上分别长出 2 个、4 个和 29 个克隆菌落。这些重组体菌落经过



氨基酸脱氢酶为膜联蛋白<sup>[6,11]</sup>,即使在提取液中添加了 1% Tween 20 或 1% Triton X-100,该蛋白质仍然只存在于非溶解部分,因而未能成功提取该蛋白质。细胞裂解液(lysate)和非溶解部分(pre)均在 46kDa 处有非常明显的条带(图 4),这与根据核苷酸序列计算的理论值相符(46 kDa)。为了证实非溶解部分蛋白质为 D-氨基酸脱氢酶蛋白,本实验测定了该蛋白的 N-端氨基酸序列,其 N-端序列为 MNMRVMVLGGGV,与由核苷酸序列转录而得的氨基酸序列完全一致(图 3)。

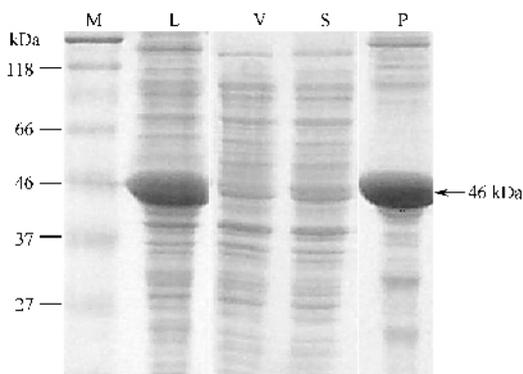


图 4 D-氨基酸脱氢酶在 BL21(DE3)中表达后各组分 SDS-PAGE 结果

Fig.4 Profile of SDS-PAGE for pETdadA1 expression. M, V, L, S, P stands for protein marker, cell lysate of vector, cell lysate of pETdadA1, supernatant of pETdadA1 and precipitate of pETdadA1, respectively.

## 2.6 D-氨基酸脱氢酶的活性

以一系列 D-型氨基酸为反应底物,DCIP 为电子受体,测定酶的活性。TM5-2 菌中 D-氨基酸脱氢酶对底物 D-型丙氨酸的活性为 24 mU/mg,以此为基准(100%),计算其它 D-型氨基酸的相对活性。结果表明(表 1),其最佳底物为 D-histidine(127%),与

表 1 TM5-2 菌中 D-氨基酸脱氢酶活性与铜绿假单胞菌 PA01 以及 *E. coli* B 中同源基因活性相比较

Table 1 Comparison the substrate specificity of

Substrate	Activity of <i>P. f</i> TM5-2 (mU/mg)	Relative activity %		
		<i>P. fluorescens</i> TM5-2	<i>P. aeruginosa</i> PA01	<i>E. coli</i> B
D-Alanine	24 ± 0.2	100	100	100
D-Histidine	30 ± 0.3	127	25	-
D-Serine	20 ± 0.2	83	15	29
D-Valine	14 ± 0.2	57	6	11
D-Asparagine	12 ± 0.1	52	52	-
D-Phenylalanine	13 ± 0.2	52	41	100
D-Tryptophan	5 ± 0.1	16	1	5
D-Leucine	11 ± 0.2	41		
D-Isoleucine	8 ± 0.1	31		
D-Lysine	12 ± 0.2	48		

Specific activity: 24 mU/mg (D-alanine); electron acceptor: 2,6-dichloroindophenol (DCIP).

文献记载的铜绿假单胞菌 PA01 以及 *E. coli* B 中同源基因活性最佳底物为 D-alanine 有所不同<sup>[1,12]</sup>。

## 3 结论

假单胞菌中基因 *dadX* 附近的基因构成是高度保守的,D-氨基酸脱氢酶位于 *dadX* 基因附近,此外还存在着亮氨酸应答调控蛋白(Lrp),假定的 YigF 家族转录抑制子,细胞色素 c5 等<sup>[3]</sup>。这一系列蛋白中,D-氨基酸脱氢酶与 D-丙氨酸代谢有关,在大肠杆菌中 D-氨基酸脱氢酶(*dadA*)和降解型丙氨酸消旋酶(*dadX*)彼此相邻并构成一个操纵子<sup>[6]</sup>,而在荧光假单胞菌 TM5-2 中该 ORF 被注释为假定的甘氨酸氧化酶。本文经过克隆、表达并测定酶活性发现该基因并不具有甘氨酸氧化酶的活性,进一步研究发现,该基因包含 D-氨基酸脱氢酶中所有重要的保守氨基酸残基,经 TTC 培养基鉴定发现该基因具有 D-氨基酸脱氢酶的活性,可以确定该基因为 D-氨基酸脱氢酶基因。该酶作用于一系列 D-型氨基酸,最佳作用底物是 D-型组氨酸,与有关文献报道有所不同。本实验还成功构建了 D-氨基酸脱氢酶基因(*dadA*)缺陷菌株,但是该缺陷菌株对氨基酸降解的活性与野生型相比并没有明显差异(数据未公布),可能是野生菌株中还存在着其他相似功能的酶蛋白,也就是说 D-氨基酸脱氢酶并不是参与氨基酸代谢的最主要酶蛋白。

D-型氨基酸脱氢酶(D-amino acid dehydrogenase)是细菌中一种膜联酶蛋白<sup>[6,11]</sup>,目前已在铜绿假单胞菌、荧光假单胞菌、鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌等许多细菌中检测到膜联 D-氨基酸脱氢酶的活性,但是迄今为止,只有极少有关提取该酶的研究报导。本实验中,我们成功地表达了该酶蛋白,只是在纯化酶蛋白时,尽管我们试了多种提取方法,遗憾的是仍然未能成功,今后我们将继续摸索此酶的提纯方法。

致谢 感谢日本高知大学大西浩平教授对本实验的大力指导和热心帮助。

## 参考文献

- [1] Olsiewski PJ, Kaczorowski GJ, Walsh C. Purification and properties of D-amino acid dehydrogenase, an inducible membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme from *Escherichia coli* B. *The Journal of biological chemistry*, 1980, **255**(10):4487-4494.
- [2] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*,

- [ 3 ] Ju J, Yokoigawa K, Misono H, *et al.* Cloning of alanine racemase genes from *Pseudomonas fluorescens* strains and oligomerization states of gene products expressed in *Escherichia coli*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2005, **100**(4) 409–417.
- [ 4 ] Yokoigawa K, Kawai H, Endo K, *et al.* Thermolabile alanine racemase from a psychrotroph, *Pseudomonas fluorescens*: purification and properties. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1993, **57**(1) 93–97.
- [ 5 ] Watanabe K, Katsuhara M, Nakao H, *et al.* Detection and molecular analysis of plant- and insect-associated bacteria harboring aconitate isomerase involved in biosynthesis of trans-aconitic acid as antifeedant in brown planthoppers. *Current microbiology*, 1997, **35**(2) 97–102.
- [ 6 ] Lobočka M, Hennig J, Wild J, *et al.* Organization and expression of the *Escherichia coli* K-12 *dad* operon encoding the smaller subunit of D-amino acid dehydrogenase and the catabolic alanine racemase. *Journal of bacteriology*, 1994, **176**(5) 1500–1510.
- [ 7 ] Strych U, Penland RL, Jimenez M, *et al.* Characterization of the alanine racemases from two mycobacteria. *FEMS microbiology letters*, 2001, **196**(2) 93–98.
- [ 8 ] Ohnishi K, Okuta A, Ju J, *et al.* Molecular breeding of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase for enhanced resistance to 3-chlorocatechol. *Journal of biochemistry*, 2004, **135**(3) 305–317.
- [ 9 ] Bochner BR, Savageau MA. Generalized indicator plate for genetic, metabolic, and taxonomic studies with microorganisms. *Applied and environmental microbiology*, 1977, **33**(2) 434–444.
- [ 10 ] Ju J, Misono H, Ohnishi K. Directed evolution of bacterial alanine racemases with higher expression level. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2005, **100**(3) 246–254.
- [ 11 ] Satomura T, Kawakami R, Sakuraba H, *et al.* Dye-linked D-proline dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum* is a novel FAD-dependent amino acid dehydrogenase. *The Journal of biological chemistry*, 2002, **277**(15) 12861–12867.
- [ 12 ] Magor AM, Venables WA. Solubilization, purification and characterization of D-alanine dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and effects of solubilization on its properties. *Biochimie*, 1987, **69**(1) 63–69.

## Identification and expression a D-amino acid dehydrogenase gene from *Pseudomonas fluorescens* TM5-2

XU Shu-jing<sup>1</sup>, JU Jian-song<sup>1,2\*</sup>, MA Yan-he<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Life College of Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

(<sup>2</sup> Institute of Micrology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** : In the previous study we have isolated DNA fragment containing an alanine racemase gene (*dadX*) from *Pseudomonas fluorescens* TM5-2. Adjacent to *dadX* one ORF similar to a putative glycine/D-amino acid oxidase gene have been found. The same gene organization is found in several *Pseudomonas* species. Here, author would characterize this ORF to determine what kind of enzyme this gene encodes.

DNA fragment containing gene encoding putative glycine/D-amino acid oxidase was cloned into the expression vector. Firstly oxidase activity in cell lysates prepared from the recombinant cells was measured, however, neither glycine nor D-alanine were oxidized judging from hydrogen peroxide formation. Secondly when the amino acid sequence deduced from the oxidase gene was compared to dye-linked D-amino acid dehydrogenases, all the important residues including FAD-binding motif were conserved. This gene was transformed and checked on TTC plate, it showed some activities of D-amino acid dehydrogenase. D-amino acid dehydrogenase activity was also detected when D-alanine and DCIP were used. The best substrate of this enzyme is D-histidine, which is different from some reports. Author will be in progress to purify the dehydrogenase and determine enzyme characteristics.

**Keywords** : glycine/D-amino acid oxidase ;D-amino acid dehydrogenase ;TTC plate