

L-乳酸脱氢酶基因克隆及功能分析

李 剑 唐 赟 梁凤来 张心平 刘如林*

(南开大学生命科学学院, 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, 通过互补筛选分离克隆到乳酸脱氢酶基因 (*ldhL*)。核酸序列分析表明, 该基因以 ATG 为起始密码子编码 316 个氨基酸残基组成的蛋白质, 预测的分子量为 33.84kD; 5' 端存在典型的启动子结构, 3' 端的终止子是不依赖于 ρ 因子的转录终止子。 *ldhL* 编码的蛋白质有 3 个保守区域, 其中 Gly13 ~ Asp50 保守区域是 NADH 的结合位点, Asp73 ~ Ile100 和 Asn123 ~ Arg154 保守区是酶的活性部位。该 *ldhL* 和其他乳杆菌的 *ldhL* 基因和编码的氨基酸序列相似性较低, 核苷酸序列相似性最高仅为 64.1%, 氨基酸序列相似性最高仅为 68.9%, 是新的 L-乳酸脱氢酶基因。

关键词 乳杆菌 (*Lactobacillus* sp.) MD-1, L-乳酸脱氢酶基因, 互补筛选, 功能分析

中图分类号 Q93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0725-05

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 DL-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, 72 h 产量可达

140g/L 以上。如果使乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶基因 (*ldhD*) 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 (*ldhL*) 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 *ldhL* 序列, 同时对 *ldhL* 及编码的蛋白质的一级结构进行了初步分析。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株与质粒

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-type strain	this study
<i>E. coli</i>		
FMJ144	Δldh ρ fl : : Cam ^r trpR his-29(Am) pro-2 ary-427 deoB arc tsx IN(rrnD-rrnE) lacY	2
TG1	suoE hsd Δ 5 thi Δ (lac-proAB) F'(traD36) ProAB ⁺ lacI ^q lacZ Δ M15	3
Plasmid		
pJDC9	Em ^r ; <i>ldhZ</i>	4
pLZD3083	Em ^r ; pJDC9 with a 3.11 BamH I fragment from strain MD-1	this study

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

收稿日期: 2004-03-08, 修回日期: 2004-05-31。

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

1.2 培养基和培养条件^[5]

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 培养基和 M9 培养基(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 250μg/mL、50μg/mL。IPTG 终浓度为 0.1μmol/L。

1.3 DNA 提取及纯化

基因组 DNA 提取及纯化参见文献[5]; 质粒提取方法参见文献[6]。

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; 连接菌株 MD-1 的基因组 DNA 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 文库。

1.5 互补筛选

E. coli FMJ144 是乳酸脱氢酶(LDH)和丙酮酸裂解酶缺陷的突变株, 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 *E. coli* FMJ144 中表达乳酸脱氢酶(LDH), *E. coli* 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 细胞涂布在含有红霉素(Em)的 M9 培养基平板上, 厌氧条件下 37℃ 培养 168h 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

蛋白质粗提物的制备: ①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。②超声波破碎细胞: 采用 YJ92-II 超声波细胞粉碎机破碎细胞, 其细胞破碎功率为 400W, 工作时间 5s, 间隔 15s, 共 10 次。③14 000r/min 离心 30min, 其上清液即蛋白粗提物。④蛋白含量用福林酚法测定^[7]。

1.7 乳酸脱氢酶的酶活及酶类型的分析

1.7.1 乳酸脱氢酶活性分析: 参见文献[5]。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。

1.7.2 乳酸脱氢酶类型分析: ①在 3mL 反应体系中分别加入 100μL 蛋白质粗提液、1.5mg 丙酮酸、12.6mg NADH 以及 2.9mL pH7.0 的磷酸缓冲液。

②25℃ 水浴 30min。③用 SBA-40C 葡萄糖-乳酸生物传感器分析反应体系中反应产物乳酸的含量, 从而分析阳性克隆的粗蛋白质液中的乳酸脱氢酶的类型。SBA-40C 葡萄糖-乳酸生物传感器分析的原理: 将乳酸氧化酶固定在膜上, 该酶特异性作用于 L-乳酸, 通过生化反应: L-乳酸 + O₂ + H₂O $\xrightarrow{\text{乳酸氧化酶}}$ 丙酮酸 + H₂O₂ 得到 H₂O₂, 其中 H₂O₂ 再透过酶膜的内层与白金-银电极接触产生电流信号, 得到 L-乳酸的分析结果。

1.8 序列测定与分析

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 Dnaman 4.0 和 Clustal X 1.8 以及 NCBI 相关数据库和软件。

1.9 基因扩增

根据测序及分析结果, 设计出以下引物: 上游引物 5'-gcgcg $\xrightarrow{\text{HdeI}}$ catatgttgactctaaaacgtc-3', 下游引物 5'-gcg $\xrightarrow{\text{BamHI}}$ ggatcc ttaaagtgtgatccatgc-3'。扩增条件: 94℃ 45s, 56℃ 45s, 72℃ 90s, 30 个循环。

2 结果与讨论

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

以 *E. coli* FMJ144 作宿主、pJDC9 作载体, 构建了约有 20 万个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红霉素和氯霉素的 LB 平板上, 37℃ 厌氧培养 168h, 复筛得到 2 个阳性克隆 b 和 c。

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(见图 1)。结果表明, 阳性克隆 b 和 c 有明显的 LDH 活性, 活性分别为 6.4u/mg(protein) 和 4.64u/mg(protein), 其酶的比活性与菌株 MD-1 的 LDH 酶活几乎相同; 而 *E. coli* FMJ144/pJDC9 的蛋白质粗提物的酶活仅为 b 和 c 的 0.6%~0.7%, 说明阳性克隆 b 和 c 的重组质粒具有菌株 MD-1 完整的乳酸脱氢酶基因。将阳性克隆蛋白粗提物加入到具有丙酮酸和 NADH 的磷酸缓冲液中进行反应, 测定 LDH 的类型(见表 2)。结果表明阳性克隆 c 和菌株 MD-1 的反应液中能检测到大量的反应产物 L-乳酸。说明阳性克隆 c 具有 L-乳酸脱氢酶活性, 证明了阳性克隆 c 的重组质粒中具

有菌株 MD-1 的 *ldhL*, 其表达的 LDH 属于 L 型。将筛选得到的阳性克隆进行部分限制酶分析 (图 2)。表明在阳性克隆 c 中, pJDC9 的 *Bam*H I 位点插入有大小约为 3.3kb 的菌株 MD-1 基因组片段, 将此重组质粒命名为 pLZD3083。

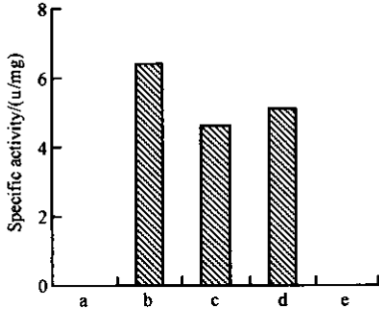


图 1 乳酸脱氢酶活性分析

Fig.1 Analysis of LDH activity

a: blank; b and c: positive clones; d: *Lactobacillus* sp. MD-1; e: control (*E. coli* FMJ144/pJDC9)

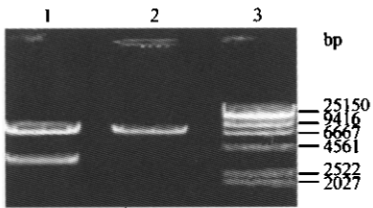


图 2 重组质粒的酶切图谱

Fig.2 Analysis of recombinant plasmid by *Bam*H I digestion

1: positive clone c; 2: *E. coli* FMJ144/pJDC9; 3: λ *Hind*III DNA marker

表 2 阳性克隆的乳酸脱氢酶类型的测定

Table 2 The type of lactate dehydrogenase in positive clones

Sample	Blank	<i>E. coli</i> FMJ144 /pJDC9	MD-1	Clone b	Clone c
L-lactic acid / (mg/mL)	0	0	39	0	43

2.3 L-乳酸脱氢酶基因的序列分析

将 pLZD3083 中菌株 MD-1 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 ORF P 和 ORF L。其中 ORF P 编码的蛋白质是一个未知蛋白质, ORF L 编码 L-LDH。该 *ldhL* 核苷酸序列 (中国专利申请号为 200410018706.7, GenBank Accession No. AY566287) 如图 3 所示。分析表明, 菌株 MD-1 的 *ldhL* 大小约有 1260bp; 开放阅读框编码 316 个氨基酸, 编码的蛋白质分子量约为 33.84kD, pI 值为 5.37。 *ldhL* 以 172 位点的 ATG 为起始密码子, 以 1119 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 GGGAGA, 位于起始密码子上游的第 6 个碱基; 该区域的中心 GGAGA 到翻译起始位点的距离是 7 个碱基, 与 *E. coli* 和 *Bacillus subtilis* 中已证实的最适距离 7~9bp 相一致^[3,5]。 *ldhL* 推测的 SD 框 GGGAGA 和 *L. plantarum* 16S rRNA (EMBL 序列号, M58827) 3' 端的 3'-UUCCUC-5' 碱基互补。从而也可以说明菌株 MD-1 和植酸乳杆菌 (*L. plantarum*) 在系统发育中亲缘关系较近^[7]。在 5' 端非编码区中还有一个推测的 -35 区 TTGGTGA, 和推测的 -10 区 TATAAT 相距 24nt, 共同构成了 *ldhL* 的启动子。在 *ldhL* 的 3' 端非编码区中存在典型的回文结构 AAAATTATTTTGACTGAAAAGTCCGGACAAAGAA-TTTT, 形成了 *ldhL* 的典型的转录终止子, 其二级结构的自由能 $\Delta G = -41.73$ kcal/mol。推测的终止子具有一个 T 碱基簇, 在转录为 mRNA 后, 其 mRNA 3' 端能形成茎环状的发夹结构, 它可使 RNA 聚合酶的移动停止或减弱。在终止子反向重复序列的下游有 6~8 个 T 构成的 T 碱基簇, 因此这段终止子转录后形成的 RNA 具有与 A 相对应的 6~8 个 U, 是使 RNA 聚合酶脱离模板的信号。这种典型的 3' 端终止子结构表明菌株 MD-1 的 *ldhL* 的终止子是不依赖于 Rho 蛋白质辅助因子的终止子^[8]。对乳杆菌 MD-1、干酪乳杆菌 (*L. casei*)、瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*)、植酸乳杆菌 (*L. plantarum*) 和罗伊氏乳杆菌 (*L. reuteri*) 的 *ldhL* 核苷酸序列进行比对, 结果表明菌株 MD-1 的 *ldhL* 与其他菌株 *ldhL* 的相似性为 56%、57.23%、64.12% 和 60.24%, 相似性较低。



图 3 *ldhL* 的核苷酸序列及推测的氨基酸序列 (部分序列)

Fig.3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *ldhL* (GenBank Accession No. AY566287)

2.4 D-乳酸脱氢酶的氨基酸序列分析

根据 *ldhL* 推测的氨基酸序列和 GenBank 中的干酪乳杆菌、瑞士乳杆菌、植酸乳杆菌和罗伊氏乳杆菌 L-LDH 的氨基酸序列用软件 Clustal X 1.8 进行比

对(图 4)。结果表明, L-LDH 有 3 个保守区域, 即 Gly13 ~ Asp50 区、Asp70 ~ Ileu100 区和 Asn123 ~ Arg154 区。其中 Gly13 ~ Asp50 区具有典型的 Gly13-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Gly-(19Xaa)-Asp50 结构, 这个典型的结构是所有依赖 NADH 的 LDH 所共有的保守序列, Asp50 氨基酸残基决定了该 L-LDH 的辅酶是 NADH 而不是 NADPH。如果 Asp50 发生突变, 则 L-LDH 也能以 NADPH 为辅酶^[5, 9, 10]。Asp70 ~ Ileu100 区存在一个活性位点环(active site loop)Ala-Xaa-Gln-Cys-Pro, Gln85 氨基酸残基能识别底物, Arg91 氨基酸残基能在催化过程中极化底物, 使底物羧基化^[12]。

Asn123 ~ Arg154 区中 Asp150-Xaa-Xaa-Arg154 结构形成了催化反应的离子交换系统^[11, 12]。此外还有 His178、Asp150、Thr231、Asp179 和 Ala220 等保守的氨基酸残基参与酶的催化反应^[12]。通过比对发现菌株 MD-1 的 L-LDH 与干酪乳杆菌、瑞士乳杆菌、植酸乳杆菌和罗伊氏乳杆菌的 L-LDH 相似性分别为 65.33%、55.56%、68.89% 和 63.17%, 最高仅为 68.89%, 并且菌株 MD-1 的 *ldhL* 与其他乳杆菌的相似性最高仅为 64.12%, 相似性也较低。因此, 菌株 MD-1 的 *ldhL* 基因是一个新的 L-乳酸脱氢酶基因。

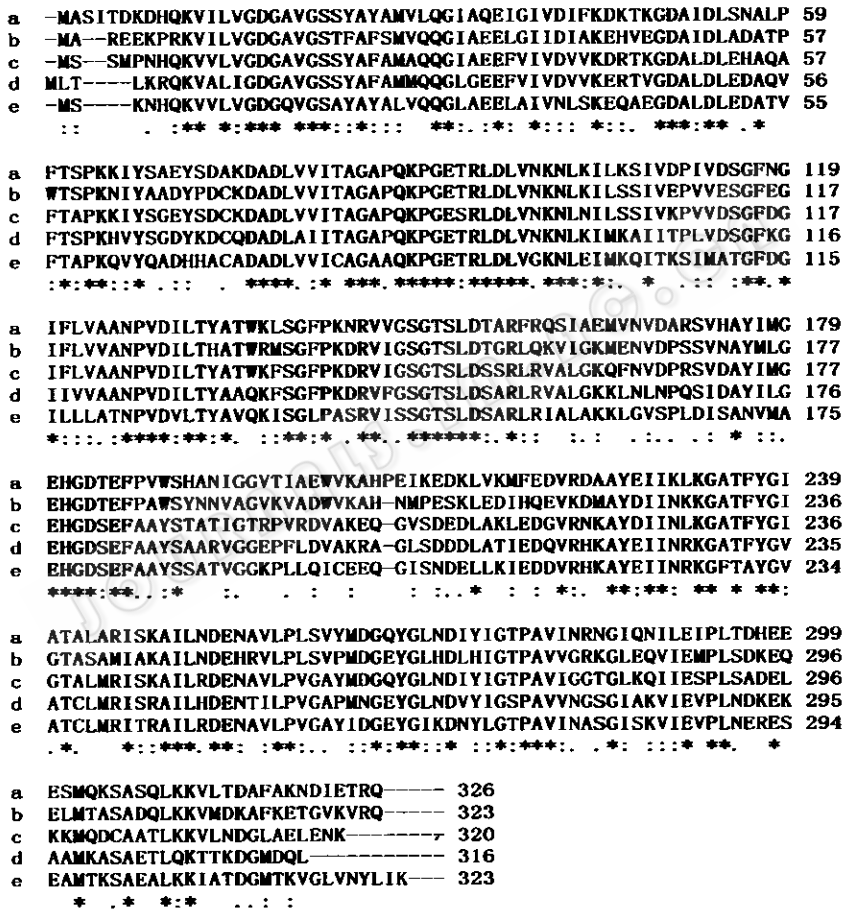


图 4 氨基酸序列比对(采用 Clustal X 1.8 分析)

Fig.4 Comparison (Clustal X 1.8) of amino acid sequence on L-LDH

a: *L. casei* (AAA25245); b: *L. helveticus*(CAB03618); c: *L. plantarum*(CAA50277);
 d: *Lactobacillus* sp. MD-1; e: *L. reuteri* (AAL03944); * identical amino acid

REFERENCES(参考文献)

[1] Bustos G, Moldes AB, Alonso L et al. Optimization of D-lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. *Food Microbiology*, 2004, 21: 143 - 148

[2] Fairouz Mat-Jan, Kiswar Y Alam, David P Clark. Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J Bacteriol*, 1989, 171(1):342 - 348

[3] Thlerry Ferain, Dominique Garnyn, Nathalie Bernard et al. *Lactobacillus plantarum* *ldhL* gene: overexpression and deletion. *J Bacteriol*, 1994, 176(3):596 - 601

[4] Chen Jau-Der, 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] Nathalie Bernard, Thierry Ferain, Dominique Garnyn et al. Cloning

- of a lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by complementation in *Escherichia coli*. *FEBS*, 1991, **290**:61 - 64
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [7] Dominique Garmyn, Thierry Ferain, Nathalie Bernard *et al.* Cloning, nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *Pediococcus acidilactici* L-(+)-lactate dehydrogenase. *Gene*, 1995, **61** (1):266 - 272
- [8] Chen SF(陈三凤)、Liu DB(刘德彪). *Modern Microbiology Genetics(现代微生物遗传学)*. Beijing: Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2003
- [9] Nathalie Bernard, Keyji Johnsen, Holbrook J John *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
- [10] Llanos RM, Hillier AJ, Davidson BE. Cloning, nucleotide sequence, expression and chromosomal location of *ldh*, the gene encoding L-(+)-lactate dehydrogenase, from *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 6956 - 6964
- [11] Sunil Kochhar, Peter E Hunziker, 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
- [12] Dale B Wigley, Steven J Gamblin, Johan P Turkenburg *et al.* Structure of a ternary complex of an allosteric lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 2.5Å resolution. *J Mol Biol*, 1992, **223**: 317 - 335

Cloning and Function Analysis of L-lactate Dehydrogenase Gene from *Lactobacillus* sp. MD-1

LI Jian TANG Yun LIANG Feng-Lai ZHANG Xin-Ping LIU Ru-Lin*

(Life College, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract It was constructed that a genomic DNA library from *Lactobacillus* sp. MD-1 yielding D,L-lactic acid. The gene encoding L-lactate dehydrogenase (L-LDH) was cloned from the genomic library of strain MD-1 by complementation in *E. coli* FMJ144 which was lactate dehydrogenase and pyruvate-formate lyase double defective mutant. The nucleotide sequence of the *ldhL* gene predicted a protein of 316 amino acid starting with ATG. The putative molecular weight of the L-LDH amino acid sequence was 33.84kD. A putative typical promoter (-35 and -10 boxes) had been observed in the 5' noncoding region. An rho-independent transcriptional terminator has been observed in the 3' noncoding region. Three highly conserved regions (Gly13 ~ Asp50, Asp73 ~ Ileu100 and Asn123 ~ Arg154) with several conserved residues had been identified. Gly13 ~ Asp50 was NADH-binding site domain. Asp73 ~ Ileu100 and Asn123 ~ Arg154 were reported to be the active site domains. The *ldhL* and the L-LDH of *Lactobacillus* sp. MD-1 showed the low identity and similarity with other *Lactobacilli*, and the highest percentage were 61.9% and 68.9% respectively. All the above indicated this gene is a novel *ldhL*.

Key words *Lactobacillus* sp. MD-1, L-lactate dehydrogenase gene, complementation, function analysis