

重组 *L*-乳酸脱氢酶在大肠杆菌中的表达、纯化及活性研究*

贾江花, 沐万孟, 张涛, 江波

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡, 214122)

摘 要 乳酸脱氢酶是生物法转化苯丙酮酸为苯乳酸的一种有效的酶。实验克隆到一种新型 *L*-乳酸脱氢酶基因 *ldhL*, 来源于 *Lactobacillus plantarum* SK-2 (植物乳杆菌 SK-2), GenBank 接受号为 FJ392647。以 pET-22b (+) 为载体质粒, *E. coli* BL21(DE3) 为宿主细胞, 构建了基因重组菌, IPTG 可诱导目的蛋白的过量表达; 经亲和层析纯化的重组蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分析, 约在 37 ku 处出现显著的特征蛋白条带; 重组 LDH 的比酶活为 0.06 U/mg。

关键词 乳酸脱氢酶, 苯乳酸, 苯丙酮酸, 基因重组, 亲和层析

苯乳酸(phenyllactic acid, PLA), 也称 3-苯基乳酸或 β -苯乳酸, 即 2-羟基-3-苯基丙酸, 是近年来发现的新型天然防腐剂^[1]。苯乳酸抑菌谱宽, 能抑制多种食源性致病菌、腐败菌, 特别是能抑制真菌污染; 溶解性好, 易于在食品体系中扩散; 稳定性高, 具有宽广的 pH 范围和热稳定性, 在食品工业中具有广阔的应用前景^[2-4], 可应用于医药与化妆品行业^[5]。

本实验室前期工作中筛到 1 株可以发酵产生苯乳酸的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) SK-2。在乳酸菌等微生物中, 直接以苯丙酮酸为底物, 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的作用下, 可以有效地发酵生产苯乳酸^[6]。根据 NCBI 中已知的 *L. plantarum* WCFS1 全基因序列^[7]可知, 在植物乳杆菌中, 有 3 个乳酸脱氢酶基因(*ldhs*), 其中一个为 *ldhD*, 另外两个分别为 *ldhL1* 和 *ldhL2*。Taguchi^[8]证明 *ldhD* 的产物 *D*-乳酸脱氢酶可以转化苯丙酮酸生成苯乳酸。而关于 *ldhL1* 和 *ldhL2* 产生的 *L*-乳酸脱氢酶是否都对苯丙酮酸有活性, 目前尚未见报道。

本文以 *L. plantarum* SK-2 基因组为模板, 选取 NCBI 中已知的 *L. plantarum* WCFS1 乳酸脱氢酶基因 *ldhL2* 设计引物, 通过 PCR 扩增获得 *L. plantarum* SK-2 乳酸脱氢酶基因 *ldhL*, 以 pET-22b(+) 为载体, 构建重组质粒 pET-*ldhL*, 并在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 中成功表达了对苯丙酮酸具有生物活性的重组 *L*-LDH。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体

L. plantarum SK-2 由江南大学食品科学与技术国家重点实验室分离并保存; 转化受体菌 *E. coli* DH5 α , BL21(DE3), JM109, 购于上海生物工程公司; 克隆载体 pET-22b(+), 为中国科学技术大学生命科学学院王玉珍教授惠赠。

1.1.2 酶和试剂

T4 DNA 连接酶、pMD-19-T 简易载体、各种限制性内切酶购自大连宝生物公司; NADH(BBI)、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker (λ DNA /EcoR I + Hind III)、x-gal、IPTG、各种试剂盒、引物合成、产物测序均购自上海生物工程公司; 苯丙酮酸、苯乳酸从 Sigma 公司购买; 低分子量标准蛋白电泳样购自中科院上海生化研究所; 镍柱购自安玛西亚公司; 其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 分子克隆

1.2.1 设计扩增 *ldhL* 基因引物

上游引物: TTTGGGCATATGGATA-AGAAGCAACGC, 下游引物: GT-GAGCTCGAGTGATGCCACATTCATCATG, 为了便于克隆和连接, 上游引物 5' 设计了 *Nde* I 酶切位点, 下游引物 5' 设计了 *Xho* I 酶切位点。

1.2.2 *ldhL* PCR 扩增

PCR 反应体系 (20 μ L): 10 \times PCR Buffer 2 μ L, dNTPs (2 mmol/L) 1.6 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, 基因组模板 2 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μ L, ddH₂O 11.1 μ L。

第一作者: 硕士研究生(江波教授为通讯作者)。

* 国家自然科学基金重点项目(20436020)

收稿日期: 2008-12-08, 改回日期: 2009-02-27

PCR 反应条件: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 1 min, 54.3 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 90 s, 进行 35 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。琼脂糖电泳检测, 回收目的 PCR 产物用于酶切和连接。

1.2.3 与 T 载体的连接

将胶回收的目的 PCR 产物与 pMD-19-T 简易载体连接, 转化至 *E. coli* JM109 中, 根据蓝白斑筛选阳性克隆。筛选到的阳性菌命名 *E. coli* JM109[pMD-*ldhL*], 其克隆载体命名 pMD-*ldhL*。

1.2.4 与表达载体的连接

将 pMD-*ldhL* 与表达载体 pET-22b(+) 分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 连接、转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中。经氨苄抗性初步筛选后, 再通过重组质粒的酶切分析、测序, 最终鉴定阳性克隆的重组质粒, 命名为 pET-*ldhL*。将 pET-*ldhL* 转化到 BL21 (DE3) 中, 即得重组菌 *E. coli* BL21[pET-*ldhL*]。

1.3 目的基因的表达

以含质粒 pET-22b(+) 的菌株为对照, 接种 *E. coli* BL21[pET-*ldhL*] 单菌落于 3 mL 的氨苄 LB 培养液, 37 ℃ 培养过夜。以 1 % (体积分数) 的接种量接种于新鲜的 LB 培养液中, 培养至 OD_{600} 在 0.6—0.8 时, 加入 IPTG 诱导表达 6 h。取 1 mL 菌液进行 SDS-PAGE 分析。以 12 % 的凝胶作分离胶, 电泳结束后用考马斯亮蓝 R250 染色。

1.4 重组 L-LDH 的纯化^[9]

优化诱导表达条件为: 从 BL21[pET-*ldhL*] 平板上挑取单菌落于 3 mL LB 培养基中, 37 ℃ 培养过夜, 以 0.25 % (体积分数) 的接种量接入摇瓶中, 37 ℃ 培养至 $OD_{600} = 0.2 - 0.3$, 加 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 16 ℃ 培养过夜。

冷冻离心收集菌体, 超声波破碎得粗酶液, 经 0.22 μ m 的膜过滤后采用 Chelating Sepharose Fast Flow 亲和和介质填充层析柱对重组蛋白进行纯化。上柱前预先以 3 倍柱体积的结合缓冲液平衡亲和柱, 样品上柱后以洗脱缓冲液洗脱杂蛋白, 再以解吸缓冲液洗脱重组蛋白。纯化的重组蛋白用 SDS-PAGE 分析。

结合缓冲液: pH6, 20 mmol/L 磷酸钠、500 mmol/L 的 NaCl;

洗脱缓冲液: pH6, 20 mmol/L 磷酸钠、500 mmol/L 的 NaCl、50 mmol/L 咪唑;

解吸缓冲液: pH6, 20 mmol/L 磷酸钠、500 mmol/L 的 NaCl、200 mmol/L 咪唑。

1.5 酶活力的测定^[10]

根据辅酶 NADH 340 nm 吸光值的减小速度来定义酶活。酶活测定温度 30 ℃, 3.0 mL 的反应体系: pH 6.0 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液, 含 0.6 μ mol NADH, 19.6 μ mol 苯丙酮酸及适当的酶液。空白中不含 NADH。苯丙酮酸每次试验现配。每分钟减少 1 μ mol 的 NADH 所用的酶量为 1 个酶活力单位。

比酶活定义为: 每毫克酶蛋白所含的酶活单位 (U/mg)。

蛋白质浓度测定方法: 福林酚法, 以不同浓度的牛血清白蛋白 (BSA) 做标准曲线。

2 结果与分析

2.1 *ldhL* 基因的克隆及连接

以 *L. plantarum* SK-2 基因组为模板 PCR, 与 pMD-19-T 简易载体连接, 然后将 pMD-*ldhL* 与表达载体 pET-22b(+) 分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 用 T4 DNA 连接酶连接。重组质粒 pET-*ldhL* 的图谱如图 1 所示。

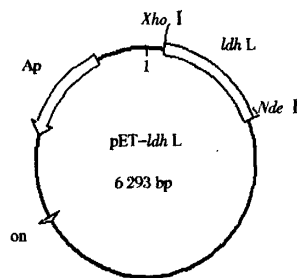
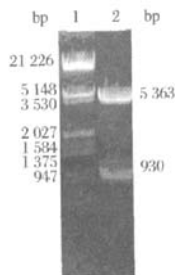


图 1 pET-*ldhL* 质粒图谱

酶切鉴定、电泳验证结果见图 2。结果表明, *ldhL* 基因已经连接到 pET 质粒上。测序结果表明: *ldhL* 长度为 930 bp, NCBI Blastn 分析, 与 GenBank 中 *L. plantarum* WCFS1 基因序列的同源性为 99.78%。GenBank 接受号为 FJ392647。

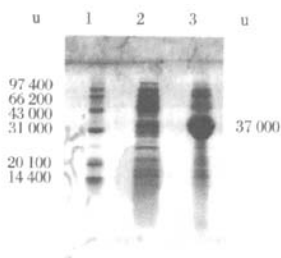


1—DNA Marker; 2—pET-*ldhL* 双酶切

图 2 pET-*ldhL* 双酶切鉴定

2.2 重组 *ldhL* 基因的诱导表达及重组 LDH 的纯化

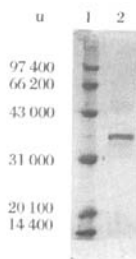
将重组质粒 pET-*ldhL* 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 株,经 IPTG 诱导后收集菌体,SDS-PAGE 电泳结果如图 3。重组菌株经诱导表达后,与对照菌株相比,约在 37 ku 处明显出现特征蛋白条带,与预期结果相符,说明诱导表达成功。^[9]



1—低分子量标准蛋白;2—对照菌株;3—37℃重组菌诱导表达

图 3 重组质粒 pET-*ldhL* 在 BL21(DE3) 中的诱导表达

用镊柱亲和层析时,洗脱缓冲液洗去杂蛋白后,含 200 mmol/L 咪唑解吸缓冲液可以将目标蛋白-重组 L-LDH 洗脱下来。纯化的重组 L-LDH 如图 4 所示。



1—低分子量标准蛋白;2—纯化后的重组 L-LDH

图 4 SDS-PAGE 电泳分析亲和层析纯化的重组 L-LDH

2.3 重组 L-LDH 酶活测定

对分离纯化的纯酶进行酶活测定。在标准测定酶活条件下,L-LDH 对苯丙酮酸可以检测到活力,表明该乳酸脱氢酶可以转化苯丙酮酸生成苯乳酸,比酶活为 0.06 U/mg。

3 讨论

在乳酸菌中,乳酸脱氢酶是转化苯丙酮酸产生苯乳酸的主要酶。而关于乳酸脱氢酶,以前对它的关注热点大都集中于丙酮酸到乳酸的这一过程中;对于乳酸脱氢酶能否催化苯丙酮酸,以及活力如何,却研究很少。Taguchi 从 *L. plantarum* ATCC 8041 克隆到 D-乳酸脱氢酶基因,长度为 999bp,并证明该基因产

物 D-乳酸脱氢酶有很宽广的底物谱,可以催化包括丙酮酸、苯丙酮酸在内的多种底物发生还原反应。而植物乳杆菌的 2 种 L-乳酸脱氢酶基因对应的 2 种酶是否都对苯丙酮酸有活性,尚未见报道。本研究采用分子生物学手段,以 *L. plantarum* SK-2 基因组为模板,根据 NCBI 中已知的 *L. plantarum* WCFS1 乳酸脱氢酶基因 *ldhL2* 设计引物,PCR 扩增 *ldhL* 基因,并将其成功转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中。重组质粒 pET-*ldhL* 测序后经 NCBI Blastn 分析,与 GenBank 中 *L. plantarum* WCFS1 *ldh2* 基因序列的同源性为 99.78%。*E. coli* BL21 [pET-*ldhL*] 经诱导表达后,SDS-PAGE 显示约在 37 ku 处明显出现特征蛋白条带,与预期结果相符。重组蛋白样品经亲和层析纯化后可达电泳纯。测定重组 L-LDH 对苯丙酮酸的活性,比酶活为 0.06 U/mg。有关植物乳杆菌 *ldhL1* 产生的 L-乳酸脱氢酶是否也可还原苯丙酮酸产生苯乳酸,本实验室正在研究中。

参考文献

- [1] Lavermicocca F Valerio, Visconti A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1):634-640.
- [2] Dieuleveux, S. Lemarinier, Guéguen M. Antimicrobial spectrum and target site of d-3-phenyllactic acid[J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 40(3): 177-183.
- [3] Dieuleveux M Guéguen. Antimicrobial effects of D-3-phenyllactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium milk and cheese[J]. Journal of Food Protection, 1998, 61(10): 1 281-1 285.
- [4] Schnürer J Magnusson. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives[J]. Trends in Food Science & Technology, 2005, 16(1-3):70-78.
- [5] 李兴峰,江波,潘蓓蕾,等. 新型生物防腐剂-苯乳酸在食品中的研究与应用[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(5):87-91.
- [6] 李兴峰,江波,潘蓓蕾,等. 苯丙氨酸及苯丙酮酸对 *Lactobacillus* sp. SK007 合成苯乳酸的影响[J]. 过程工程学报, 2007, 7(6):1 202-1 206.
- [7] Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(4):1 990-1 995.
- [8] Taguchi H, Ohta T. D-lactate dehydrogenase is a

member of the *D*-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the *D*-lactate dehydrogenase gene of *Lactobacillus plantarum* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(19), 12 588—12 594.

- [9] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验(第三版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 1 252—1 255.

- [10] Li X, Jiang Bo, Pan Beilei, et al. Purification and partial characterization of *Lactobacillus* Species SK007 lactate dehydrogenase (LDH) catalyzing phenylpyruvic acid (PPA) conversion into phenyllactic acid (PLA) [J]. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56: 2 392—2 399.

Overexpression and Purification of Phenylactic Acid Producing . Lactate Dehydrogenase Gene (*ldhL*) in *E. coli*

Jia Jianghua, Mu Wanmeng, Zhang Tao, Jiang Bo

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT Lactate dehydrogenase(LDH) is the main enzyme for biotransformation of phenylpruvatic acid (PPA) to phenyllactic acid (PLA) which is a novel antimicrobial compound. A gene, *ldhL* (GenBank FJ392647), encoding *L*-LDH from *Lactobacillus plantarum* SK-2 was cloned and over-expressed in *Escherichia coli*. The encoded polypeptide had 310 residues. There was a 99.78% similarity to LDH from *L. plantarum* WCFS1 with the exception of one amino acid. The recombinant enzyme was purified to electrophoretic homogeneity by affinity chromatography. The enzyme molecular weight was 37 ku with an activity on PPA of 0.06 U/mg after dialysis.

Key words lactate dehydrogenase, phenyllactic acid, cloning and expressing, affinity chromatography

行业动态

未来3年中国焙烤食品市场投资分析及前景预测

中国自改革开放以来,焙烤食品行业得到了较快的发展,产品的门类、花色品种、数量质量、包装装潢以及生产工艺和装备,都有了显著的提高。尤其近几年来,外国企业来华投资猛增,都看好中国市场,合资、独资发展迅速。如饼干、糕点、面包等行业,都有逐步增强的势头。

2007年,国内烘焙行业呈现出健康、快速、可持续发展的良好态势,企业规模扩大,在食品原辅料涨价的严峻时期,仍然保持了规模效益的提高;企业产品质量、卫生、安全状况得到重大改善;随着烘焙企业对技术交流、技术创新概念的深入实践,烘焙产品更加多元化,同时所带来的效益用于企业扩大再生产的投资比例也大幅度提高,既促进企业发展,又有力的推动了行业的发展。

2007年1—11月,中国糕点、面包制造行业实现累计工业总产值16,427,331.00千元,比2006年同期增长了30.69%;实现销售产值16,040,007.00千元,比2006年同期增长了27.72%;实现利润总额966,121.00千元,比2006年同期增长了77.02%。2008年1—11月,中国糕点、面包制造行业实现累计工业总产值22,461,751.00千元,比2007年同期增长了36.44%;实现销售产值22,078,233.00千元,比2007年同期增长了37.38%;实现利润总额1,402,772.00千元,比2007年同期增长了48.57%。

2007年1—11月,中国饼干及其他焙烤食品制造行业实现累计工业总产值36,617,776.00千元,比2006年同期增长了34.79%;实现销售产值36,318,403.00千元,比2006年同期增长了35.03%;实现利润总额2,678,712.00千元,比2006年同期增长了59.46%。2008年1—11月,中国饼干及其他焙烤食品制造行业实现累计工业总产值48,870,014.00千元,比2007年同期增长了38.77%;实现销售产值47,996,496.00千元,比2007年同期增长了37.72%;实现利润总额3,813,465.00千元,比2007年同期增长了41.21%。

中国焙烤食品市场空间广阔。随着经济快速发展、城市化进程加快以及全面小康社会与新农村建设的不断深入,人民生活水平将显著提高,生活方式和消费结构也将显著改变。这将给中国焙烤行业的进一步发展带来挑战和机遇。