

产气肠杆菌 α -乙酰乳酸脱羧酶基因的克隆和表达及影响重组酶活性的因素

尹 东 曾庆华 卢大宁 黄百渠*

(东北师范大学遗传与细胞研究所 长春 130024)

李彦舫

(中国人民解放军农牧大学 长春 130062)

摘 要 用 PCR 方法从产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)中克隆出 0.9kb 的 DNA 片段,经 DNA 测序证明是 α -乙酰乳酸脱羧酶(α -acetolactate decarboxylase, α -ALDC)基因。将 α -ALDC 基因重组到质粒 pBV220 后,转化大肠杆菌,经筛选获得高效表达的重组子菌株。重组 α -ALDC 基因表达量占菌体总蛋白量的 27%。酶活检测表明重组子细胞表达的 α -ALDC 活性是产气肠杆菌的 12000 倍。另外,粗提的重组 α -ALDC 的最适 pH 为 6.5~7.0, pH 稳定范围为 5.5~8.0, 适合的温度为 35~45℃。Ba²⁺、Cd²⁺、Fe²⁺、Co²⁺、Mn²⁺、Sn²⁺ 可提高重组 α -ALDC 的活性。氨基酸修饰剂可降低其活性。

关键词 产气肠杆菌, α -乙酰乳酸脱羧酶, 基因克隆, 表达, 酶活性

分类号 Q782 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0501-06

在啤酒发酵过程中形成的 α -乙酰乳酸,如果不能充分被除去,会经非酶氧化脱羧形成有馊饭味的双乙酰,影响啤酒质量。 α -乙酰乳酸脱羧酶(α -ALDC, EC4.1.1.5)可把 α -乙酰乳酸直接降解为乙偶姻,因此在啤酒酿造中使用 α -ALDC 不仅可以降低双乙酰含量,提高啤酒质量,而且还可缩短啤酒发酵周期,提高设备利用率。1952 年 Juni^[1]研究了 α -乙酰乳酸降解的机理。后来, Loken 等^[2]从 *Aerobacter aerogenes* 中提纯了 α -ALDC。1982 年 Godtfredsen 等^[3]把从产气肠杆菌中提取 α -ALDC 用于啤酒发酵,缩短了啤酒的发酵时间。1987 年, Sone 等^[4]从产气肠杆菌中克隆到了 α -ALDC 的基因。随后, Fujii 等^[5]把 α -ALDC 基因整合到酵母基因组中,并且把其用于加快啤酒发酵取得成功。本文克隆了产气肠杆菌的 α -ALDC 基因,并在大肠杆菌中高效表达。同时研究了 pH 值、温度、二价金属离子、氨基酸修饰剂等因素对酶活性的影响,为 α -ALDC 的工业生产以及其酶学特性和酶活性机理方面的研究打下良好基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 产气肠杆菌和大肠杆菌宿主菌 DH5 α 为本所保存。表达质粒

* 联系人: Fax: 0431-5687517; e-mail: huangbq@ivy.nenu.edu.cn

收稿日期: 1998-06-08, 修回日期: 1999-01-07。

pBV220 由中国预防医学院病毒所构建^[6], 测序用质粒 pUC18 购自华美生物技术公司。

1.1.2 主要生化试剂: 酶活检测用底物前体 ethyl-2-acetoxy-2-methyl-acetoacetate 和产物乙偶姻购自 Aldrich 公司, 肌酸为 E. Merck 进口分装, α -萘酚为上海化学试剂总厂产品, 精氨酸修饰剂苯甲酸甲醛 (PGO) 和赖氨酸修饰剂磷酸吡哆醛 (PLP) 购自 Sigma 公司, 组氨酸修饰剂焦炭二乙酯 (DEP) 购自 Serva 公司。

1.2 方法

1.2.1 产气肠杆菌染色体 DNA 的提取: 参照 Yamano 等^[7]的方法进行。

1.2.2 质粒 DNA 操作、蛋白质 SDS-PAGE 电泳: 按 Sambrook 等^[8]的方法进行。

1.2.3 引物设计和 PCR 方法扩增 α -ALDC 基因: 根据 α -ALDC 的基因序列^[9], 用计算机辅助设计了两个引物, 并在引物的 5' 端分别加下 *Eco*RI 和 *Bam*HI 的识别位点。

上游引物: gcagaattctgtgtaatcgggtcaacattt 下游引物: gcaggatccgcccactgacgtgactgtttc
反应条件: 94℃ 1 min、50℃ 复性 1 min、72℃ 延伸 3 min, 30 个循环。

1.2.4 测序用质粒 pUCYII 和表达质粒 pBVYII 的构建: 把 PCR 产物和质粒 pUC18 分别用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切后, 再用 T4DNA 连接酶连接, 构建测序质粒 pUCYII。把经测序验证的 pUCYII 中的 α -ALDC 的基因用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 切下后连接到用相同的酶切过的 pBV220 中, 构建表达质粒 pBVYII。

1.2.5 DNA 测序按 Sanger^[10]双脱氧末端终止法进行。

1.2.6 粗提酶液制备: 将 LB 液体培养基中培养好的重组子细胞 DH5 α (pBVYII) 离心收集菌体并洗涤菌体 2 次。用通化电子设备厂产超声粉碎机破碎细胞。4℃, 10000 r/min 离心 10 min, 上清用饱和硫酸铵分级沉淀, 收集饱和度 35% ~ 75% 之间的沉淀, 0.85% NaCl 溶液溶起沉淀后用作酶活测定, 剩余的酶液 -20℃ 储存。

1.2.7 氨基酸修饰剂对重组酶的处理: 将不同浓度的精氨酸修饰剂 PGO、组氨酸修饰剂 DEP 和赖氨酸修饰剂 PLP 加入酶液中, 置于 25℃ 10 min 后检测酶活性。其中 PLP 的处理需要在黑暗中。

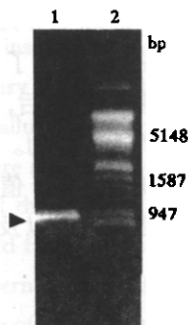


图 1 PCR 产物的琼脂糖电泳

Fig.1 Agrose gel electrophoresis of PCR product

1. PCR product (arrow); 2. λ DNA digested by *Eco*RI/*Hind*III (maker)

1.2.8 酶活检测按 Loken 等^[2]的方法进行

酶活单位定义: 一个酶活单位为 30℃, 由 α -ALDC 脱羧 α -乙酰乳酶, 每分钟产生 1 μ mol 乙偶姻的酶量。

2 结 果

2.1 α -ALDC 基因的扩增与测序

图 1 为 PCR 扩增结果, 可见扩增片段的大小约为 0.9 kb, 与 Sone 等^[9]从 *Enterobacter aerogenes* 中克隆到的 α -ALDC 基因大小相同。构建测序用质粒 pUCYII, 用 Sanger 双脱氧法测序, 结果证明得到的 PCR 产物的序列与文献^[9]报道的一致。

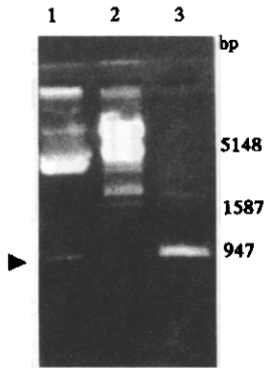


图2 pBVYII酶切片段的琼脂糖电泳

Fig.2 Agrose gel electrophoresis of restriction fragments of pBVYII

1. pBVYII digested by *EcoRI*/*Bam*HI; 2. λ DNA digested by *EcoRI*/*Hind*III (maker); 3. PCR product (the arrow shows the gene of α -ALDC)

2.2 表达质粒 pBVYII 的构建及在大肠杆菌中的表达

图2所示是构建的表达质粒 pBVYII 经 *EcoRI* 和 *Bam*HI 酶切检测结果,表明 α -ALDC 基因已连接到质粒 pBV220 中。

将构建的质粒 pBVYII 转化大肠杆菌 DH5 α , 用 DH5 α 和转化子细胞进行 SDS-PAGE 电泳,可见在经 42 $^{\circ}$ C 诱导的转化子细胞中有一条特有的带(图3),分子量约为 2.8 kD,与预计结果一致。经薄层扫描分析,重组 α -ALDC 基因表达量占菌体

总蛋白量的 27%。

2.3 重组大肠杆菌中 α -ALDC 活力测定

取目的基因供体菌和转化子细胞的提取液,测得供体菌平均的酶活力为 0.015 u/mL,转化子细胞为 180 u/mL。转化子是供体菌的 12000 倍。

2.4 pH 值对酶活性的影响

在 pH 值 4.0 ~ 8.0 之间,以每 0.5 为一个梯度,测定了粗提重组 α -ALDC 的最适 pH 值。在 5 $^{\circ}$ C 保存 48h 后,测定了粗提重组 α -ALDC 的 pH 稳定性。重组 α -ALDC 的最适 pH 值为 6.5, pH 值稳定范围为 5.5 ~ 8.0 (图4),这与其他作者的结果相符^[2,11,12]。

2.5 温度对酶活性的影响

本文测定了不同温度下重组 α -ALDC 的活性变化。结果表明重组 α -ALDC 的活性随

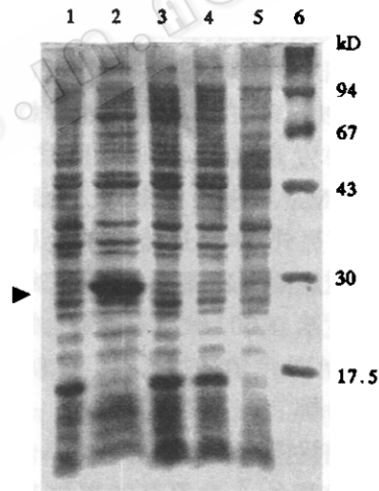


图3 DH5 α (pBVYII)表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expression product of DH5 α (pBVYII)

1. DH5 α (pBVYII) 37 $^{\circ}$ C culture; 2. DH5 α (pBVYII) 42 $^{\circ}$ C induction; 3. DH5 α (pBV220) 37 $^{\circ}$ C culture; 4. DH5 α (pBV220) 42 $^{\circ}$ C induction; 5. DH5 α host; 6. Low molecular weight protein markers. (The arrow shows expression product)

着温度的升高而增高(图 5)。不同温度下重组 α -ALDC 的稳定性情况见图 6。从图中可见,在 30℃ 以下,48 h 之内,重组 α -ALDC 的活性可保持在 50% 以上。由于酶活检测用的底物在温度较高(50℃ 以上)时会自发降解,影响酶活性测定的准确性,因此本实验中最高温度只测定到 45℃。

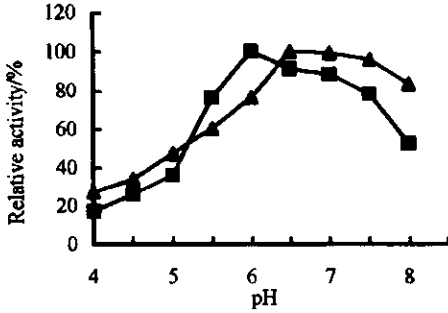


图 4 pH 值对来自 DH5 α (pBVYII)的重组 α -ALDC 活性和稳定性的影响

Fig. 4 Effects of pH on the activity and stability of α -ALDC
▲ Activity; ■ Stability

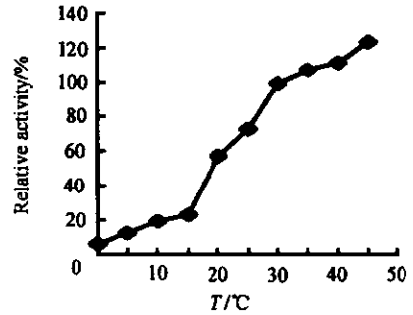


图 5 温度对来自 DH5 α (pBVYII)的重组 α -ALDC 活性的影响

Fig. 5 Effects of temperature on activity of recombinant α -ALDC

2.6 二价阳离子对酶活性的影响

用各种二价阳离子对粗提的重组 α -ALDC 进行处理(以不经二价阳离子处理的酶活力为 100%),发现其活性可被 Ba²⁺、Cd²⁺、Fe²⁺、Co²⁺、Mn²⁺、Sn²⁺等多种二价阳离子提高(图 7)。另外,本文还检测了金属螯合剂 EDTA 对重组 α -ALDC 活性的影响,结果表明 EDTA 浓度从 0.002~20 mmol/L 的范围内,随着 EDTA 浓度的增加重组 α -ALDC 的活性逐渐受到抑制。

2.7 氨基酸修饰剂对酶活性的影响

我们用不同浓度的 3 种氨基酸修饰剂 PGO、DEP、PLP 对粗提的重组 α -ALDC 进行了修饰(以不经处理的酶的活力为 100%)。结果表明这三种氨基酸修饰剂对重组 α -ALDC 的活力的影响依次是:His>Lys>Arg(表 1)。

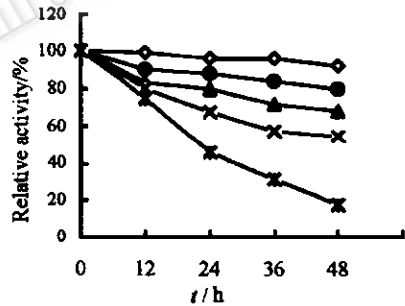


图 6 来自 DH5 α (pBVYII)的重组 α -ALDC 活性对热的稳定性

Fig. 6 Effects of temperature on stability of the recombinant α -ALDC
—◇— -5℃ —●— -10℃ —△— -20℃
—×— -30℃ —*— -40℃

表 1 氨基酸修饰剂对来自 DH5 α (pBVYII)的重组 α -ALDC 活性的影响

Table 1 Effects of certain Amino-acid modifiers on the α -ALDC activity

Concentration/(mmol·L ⁻¹)	PGO				DEP				PLP			
	100	10	1	0.1	100	10	1	0.1	20	2	0.2	0.02
Relative activity/%	85	97	100	100	19	23	80	98	36	90	92	100

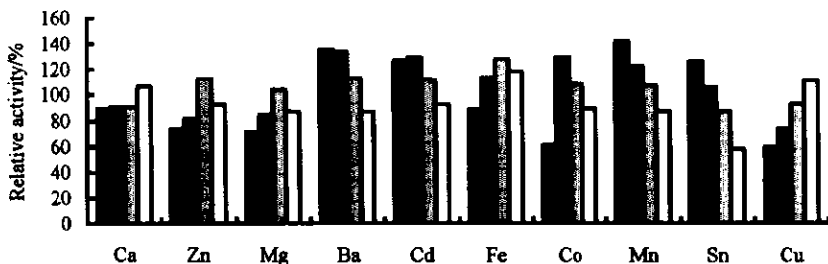


图7 二价金属离子来自 DH5 α (pBVYII) 的重组 α -ALDC 活性的影响

Fig.7 Effects of divalent cations on the recombinant α -ALDC activity

■ 1mmol/L; ▨ 0.1 mmol/L; ■ 0.01 mmol/L; □ 0.001 mmol/L

3 讨论

实验中没有能得到一个典型的倒钟形最适酶反应温度曲线图(图5),但从实验结果看,35 $^{\circ}$ C~45 $^{\circ}$ C,对酶的活性反应比较适合。Jensen^[13]等在测定来自短芽孢杆菌的 α -ALDC的温度与活性的关系时,也遇到了相同的问题,并得到一个与我们相似的曲线图。Ohshiro等^[12]和 Godtfredsen等^[14]分别研究了来自 *Brevibacterium acetylicum* 和 *Streptococcus diacetylactis*、*Lactobacillus casei* 中的 α -ALDC活性与温度的关系,发现这些酶的最适温度都是40 $^{\circ}$ C。

本实验得到的粗提重组 α -ALDC具有较好的热稳定性,在40 $^{\circ}$ C时,酶的活性半衰期基本可以达到12h,这有利于将其开发成工业用酶。Rasmussen等^[15]和 Phalip等^[11]得到的 α -ALDC在37 $^{\circ}$ C时的半衰期为15min。Ohshiro等^[12]得到的 α -ALDC热稳定性在37 $^{\circ}$ C时90min仍可保持95%以上的活性。

从金属离子对酶活性的影响来看, α -ALDC可能为金属酶。据报道从产气肠杆菌中得到的 α -ALDC活性可被 Ba^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Sn^{2+} 等抑制,并且不受EDTA影响^[2]。Ohshiro等^[12]从 *Brevibacterium acetylicum* 中得到的 α -ALDC活性可被 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 抑制,而被 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 提高。来自 *Lactobacillus casei* 的 α -ALDC活性可被多种二价阳离子激活^[15]。由此可见,来源不同的 α -ALDC对二价阳离子的需求和反应差别比较大。

Lederer等^[16]和 Laursen^[17]指出在乙酰乙酸脱羧酶中,Lys对酶的活性起着关键作用,Svenden^[18]根据这一观点推测Lys也对 α -ALDC活性十分重要,并且建议通过对来自短芽孢杆菌的 α -ALDC中的Lys的遗传密码子进行碱基诱变来研究 α -ALDC的酶活机理。我们通过对His、Lys、Arg的氨基酸诱变实验,认为His可能对 α -ALDC的活性起更为关键的作用。

参 考 文 献

- [1] E. Juni. *J. Biol. Chem.*, 1952, **195**: 715~726.
- [2] J. P. Loken, F. C. Stormer. *Eur. J. Biochem.*, 1970, **14**: 133~137.
- [3] S. E. Godtfredsen, M. Ottesen. *Carlsberg Res Commun*, 1982, **47**: 93~102.

- [4] H. Sone, T. Fujii, K. Kondo *et al.* *J. Biotechnol.*, 1987, **5**:87~91.
- [5] T. Fujii, K. Kondo, F. Shimizu *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**:997~1003.
- [6] 张智清, 姚立红, 侯云德. 病毒学报, 1990, **6**(2):111~116.
- [7] S. Yamano, J. Tanaka, T. Inoue *J. Biotech.*, 1994, **32**:165~171.
- [8] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition*, Cold Spring Laboratory, NY, 1989.
- [9] H. Sone, T. Fujii, K. Kondo *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, **54**:38~47.
- [10] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1977, **74**:5463.
- [11] V. Phalip, C. Monnet, P. Schmitt *et al.* *FEBS Letters*, 1994, **351**:95~99.
- [12] T. Ohshiro, K. Aisaka, T. Uwajima *Agric. Biol. Chem.*, 1989, **53**:1913~1918.
- [13] B. R. Jensen, I. Svendsen, M. Ottesen. In: *Proc 21st EBC Congress, Madrid, 1987*, 393~400.
- [14] S. E. Godtfredsen, A. M. Rasmussen, M. Ottesen *et al.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1984, **20**:23~28.
- [15] A. M. Rasmussen, R. M. Gibson, S. E. Gogtfredsen *et al.* *Carlsberg. Res. Commun.*, 1985, **50**:93~102.
- [16] F. Lederer, S. M. Coutts, R. A. Laursen *et al.* *Biochemistry*, 1966, **5**:823~833.
- [17] R. A. Laursen, F. H. Westheimer *J. Amer. Chem. Soc.*, 1966, **88**:3426~3430.
- [18] I. Svendsen, B. R. Jensen, M. Ottesen *Carlsberg. Res. Commun.*, 1989, **54**:157~163.

Cloning and Expression of α -acetolactate Decarboxylase Gene for *Enterobacter aerogenes* and Factors Influencing the Activity of the Recombinant Enzyme

Yin Dong Zeng Qinghua Lu Daning Huang Baiqu

(*Institute of Genetics and Cytology, Northeast Normal University, Changchun 130024*)

Li Yanfang

(*Changchun University of Agriculture and Animal Sciences of the Chinese People's Liberation Army, Changchun 130062*)

Abstract α -acetolactate decarboxylase (α -ALDC) gene was cloned from *E. aerogenes* by PCR amplification. The gene was inserted into the vector pBV220 to construct an expression plasmid pBVY II, and high level of expression of α -ALDC in *E. coli* DH5 α was observed. The expressed α -ALDC accounted for 27% of the total protein in the recombinant *E. coli* cell. The α -ALDC activity of recombinant bacterium was 12000-fold higher than that of *E. aerogenes*. In addition, the partially purified α -ALDC was optimal activity at pH 6.5~7.0 and at a temperature of 35~45 $^{\circ}$ C. Its activity was stability at pH5.5~8.0. Ba $^{2+}$, Cd $^{2+}$, Fe $^{2+}$, Co $^{2+}$, Mn $^{2+}$ and Sn $^{2+}$ had a stimulatory effect on the enzyme activity. Aminoacid modifiers could inhibit differently its activity.

Key words *Enterobacter aerogenes*, α -acetolactate decarboxylase gene cloning, expression, activity of enzyme