

荧光假单胞菌短链脱氢酶的克隆、表达及酶学性质分析

薛群, 应向贤, 杨池, 汪钊

浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310014

摘要: 为了研究荧光假单胞菌中短链脱氢酶的生理角色和催化特性, 从荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* GIM1.49 基因组 DNA 克隆表达了一个短链脱氢酶的编码基因 *pdf*, 并分析了该基因产物的酶学性质。基因 *pdf* 全长 684 bp, 编码 227 个氨基酸, 推算分子量为 24.2 kDa。将携带短链脱氢酶基因的重组质粒 pET28b-*pdf* 转入大肠杆菌 BL21(DE3) 进行表达, 得到了 28 kDa 的表达产物。重组荧光假单胞菌短链脱氢酶 (PFD) 能氧化 4-氯-3-羟基丁酸乙酯、1-苯乙醇、苯甲醇、仲丁醇和还原 4-氯-乙酰乙酸乙酯、2-溴-苯乙酮、4-溴-苯乙酮等底物。以 4-氯-3-羟基丁酸乙酯为底物时活力最高, K_m 值为 186.40 mmol/L, V_{max} 为 89.56 U/mg。氧化 4-氯-3-羟基丁酸乙酯时, 最适反应温度和 pH 分别为 12 °C 和 10.5, 倾向于利用 NAD^+ 作辅酶; 而还原 4-氯-乙酰乙酸乙酯时, 最适温度和 pH 为 24 °C 和 8.8, 倾向于利用 NADPH 作辅酶。重组 PFD 能耐受 50% (V/V) 的甲醇等有机溶剂, Ca^{2+} (1 mmol/L) 和 EDTA (5 mmol/L) 对其酶活有一定的促进作用。上述结果表明, 重组 PFD 是一个新型的短链脱氢酶, 其代谢角色推测与卤代次级醇的氧化降解有关。

关键词: 短链脱氢酶, 荧光假单胞菌, 克隆与表达, 酶学性质

Cloning, expression and characterization of a short-chain dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*

Qun Xue, Xiangxian Ying, Chi Yang, and Zhao Wang

College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Abstract: To explore the physiological role and biocatalytic properties of short-chain dehydrogenases from *Pseudomonas fluorescens* GIM1.49, we cloned the structural gene *pdf* and characterized its over-expressed product. The length of gene *pdf* was 684 bp encoding a short-chain dehydrogenase with 227 amino acid residues and calculated molecular mass of 24.2 kDa. The recombinant plasmid pET28b-*pdf* was constructed and functionally expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), resulting in the over-production of recombinant short-chain dehydrogenase PFD with a size of 28 kDa. The enzyme could oxidize alcohols including 4-chloro-3-hydroxybutanoate ester and reduce 4-chloro-acetoacetate ester using either NAD(H) or NADP(H) as coenzyme. The enzyme showed the highest activity against 4-chloro-3-hydroxybutanoate ester as substrate, with K_m of

Received: January 19, 2011; **Accepted:** April 20, 2011

Supported by: Qianjiang Talent Program of Zhejiang Province (No. 2009R10048), Scientific Research Foundation of Zhejiang University of Technology (No. 20090172).

Corresponding author: Zhao Wang. Tel/Fax: +86-571-88320781; E-mail: hzwangzhao@163.com

浙江省钱江人才计划 (No. 2009R10048), 浙江工业大学校基金 (No. 20090172) 资助。

186.40 mmol/L and V_{max} of 89.56 U/mg. When catalyzing the oxidative reaction, its optimal temperature was 12 °C and optimal pH was 10.5, in contrast to the values of 24 °C and pH 8.8 in the reductive reaction. The enzyme had high solvent tolerance and its activity was improved by the addition of Ca^{2+} (1 mmol/L) or EDTA (5 mmol/L). These results indicated that the enzyme from *Pseudomonas fluorescens* GIM1.49 was a novel short-chain dehydrogenase and might play a role in oxidative degradation of halogenated secondary alcohols.

Keywords: short-chain dehydrogenase, *Pseudomonas fluorescens*, cloning and expression, characterization

短链脱氢酶/还原酶家族 (Short-chain dehydrogenases/reductases, SDRs) 是最大的酶家族之一, 包括具有不同催化功能的氧化还原酶、异构酶和裂解酶等多个亚家族成员, 其生理功能涉及糖、醇、脂类、氨基酸、碳氢化合物、辅酶、荷尔蒙、异生物质等多种代谢^[1-2]。短链醇脱氢酶是 SDRs 中最大的亚家族, 催化醇的氧化或醛、酮的还原。假单胞菌具有降解芳香烃和长链烷烃的能力, 可应用于海水、淡水或土壤等环境中石油污染的生态修复^[3-4]。Kirschner 等^[4]研究发现荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 的一个短链醇脱氢酶能氧化 2-癸醇等长链次级醇, 是该菌烷烃降解代谢途径中的关键酶之一。此外, 荧光假单胞菌 *P. fluorescens* Pf-5 基因组信息表明含有 27 个 SDR 编码基因^[5], 而这些 SDR 基因在胞内生理代谢中所扮演的具体角色还有待解析。

短链脱氢酶也是一类在生物催化与转化上备受关注的生物催化剂。SDRs 往往具有较宽的底物谱, 其底物包括异丙醇等小分子以及糖醇、芳香醇等大分子^[6-7], 而对大分子底物的催化和转化正是当前生物化工中的难点之一。戴小燕等^[8]报道了氧化葡萄糖酸杆菌的一个短链脱氢酶能可逆地催化 D-阿拉伯糖醇氧化为 D-木酮糖。Pennacchio 等^[9]从 *Sulfolobus acidocaldarius* 中克隆表达了一个热稳定的短链脱氢酶, 该酶能氧化扁桃酸甲酯、环己醇、1-苯乙醇、1-萘醇等大分子醇。SDRs 还具有优良的立体选择性, 可用于作为药物中间体的多种手性醇的不对称合成^[10-15]。然而, 这些酶普遍活力较低, 限制了其在生物催化与转化中的进一步应用。

为了获得高活力的短链脱氢酶, 本研究从荧光

假单胞菌株 *P. fluorescens* GIM1.49 中扩增出短链脱氢酶基因 *pdf*, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中实现了功能性表达, 对其酶学性质进行了研究, 并探讨了重组荧光假单胞菌短链脱氢酶 (PFD) 的生理生化功能及应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒载体

荧光假单胞菌 (*P. fluorescens* GIM1.49) 购自广东微生物菌种保藏中心。表达载体 pET-28b、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 与 *E. coli* BL21(DE3) 均为本实验室保藏。

1.1.2 试剂

rTaq 酶购自上海申能博彩生物科技有限公司。T4 DNA 连接酶、限制性内切酶为 Fermentas 的产品。DNA marker、克隆载体 pMD-18T、基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、琼脂糖电泳试剂均购自大连 TaKaRa 公司。Ni-NTA Sefinose Kit 购自 Bio Basic INC 公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基及培养条件

大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 与 *E. coli* BL21(DE3) 采用 LB 培养基, 37 °C 下过夜培养。荧光假单胞菌采用营养肉汁培养基, 30 °C 下培养 24 h。重组克隆菌株用含 50 mg/L 氨苄青霉素、24 mg/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)、40 mg/L 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside, X-Gal) 的 LB 培养基进行筛选, 重组表达菌株用含 100 mg/L

卡那霉素 (Kanamycin, Kan) 的 LB 培养基进行筛选, 并用终浓度为 0.3 mmol/L IPTG 诱导培养。

1.1.4 引物

菌株 *P. fluorescens* GIM1.49 的 16S rDNA 序列委托上海生工生物工程有限公司测定, 测序结果表明它与 *P. fluorescens* Pf-5 的 16S rDNA 序列同源性为 100%。根据 *P. fluorescens* Pf-5 的短链脱氢酶基因 (GenBank Accession No. AAY96132.1) 设计了以下引物 F (5'-ATGTCCACGGCAAAAACC-3') 和 R (5'-TTACCAGGGGATGGTTTCG-3')。引物由上海泽衡生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 基因 *pdf* 的 PCR 扩增

挑取荧光假单胞杆菌 *P. fluorescens* GIM1.49 单菌落, 接种于营养肉汁液体培养基, 30 °C 培养至菌液 OD_{600} 约为 0.8, 参照 TaKaRa 基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取基因组 DNA, 用微量核酸蛋白测量仪检测浓度。以基因组 DNA 为模板, 寡聚核苷酸 F 和 R 为引物进行 PCR 扩增。该 PCR 扩增反应体系总体积为 50 μ L, 模板和引物加入量分别为 100 ng 和 300 ng, 采用 Ex Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa)。扩增反应条件为: 94 °C 变性 3 min; 94 °C 变性 35 s, 52 °C 复性 35 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。电泳检测 PCR 扩增产物并将目的片段回收纯化, 将其克隆到 pMD-18T simple vector, 通过氨苄青霉素抗性筛选和蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆提取质粒后用相应内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定。取酶切鉴定正确的克隆送至上海生工生物工程有限公司测序, 然后用 Blast 软件将序列与 GenBank 中的基因序列进行比对分析。

1.2.2 重组表达质粒 pET28b-*pdf* 的构建

将电泳回收产物用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行酶切, 割胶回收, 用微量核酸蛋白测量仪检测浓度, 控制 DNA 片段摩尔数在载体摩尔数的 3~10 倍, 将目的片段与 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切的载体 pET-28b 混合, 16 °C 下 T4 DNA 连接酶连接过夜,

转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞^[16], 涂布于 LB/Kan 抗性平板培养过夜, 挑取单菌落于 50 mL LB/Kan 抗性液体培养基中, 摇床培养 12 h, 参照 TaKaRa 质粒抽提试剂盒说明书抽提质粒, 酶切验证^[16], 得到正确重组表达载体并命名为 pET28b-*pdf*。

1.2.3 基因 *pdf* 的表达

酶切鉴定正确后, 将 pET28b-*pdf* 重组质粒转化至表达宿主 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 涂布于 LB/Kan 抗性平板培养过夜。挑取阳性菌株在含卡那霉素的 LB 培养基中 37 °C、200 r/min 摇瓶培养 12 h, 作为种子液。然后按 1% 的比例接种扩大培养, 37 °C 振荡培养至光密度 (OD_{600}) 为 0.6~0.8 时, 分别降低培养温度至 24 °C、26 °C、28 °C 及 30 °C, 在不同 IPTG 终浓度和不同培养时间下分别对重组菌 *E. coli* BL21 (pET28b-*pdf*) 进行诱导培养, 确定最佳诱导表达蛋白水平。诱导条件优化实验的对照组不添加 IPTG。

1.2.4 重组酶的纯化

在 4 °C 离心收集菌体, 用 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 重悬, 经超声波破碎仪破碎细胞, 然后在 4 °C 离心 15 min。取上清液 20 μ L 按比例加入 6 \times SDS-PAGE 上样缓冲液, 重悬菌液, 煮沸 5~10 min, 进行 SDS-PAGE 检测。按照 Ni-NTA Sefinose 试剂盒的使用指南, 取菌体破碎离心后的蛋白溶液, 上样至预平衡的 Ni²⁺柱中, 依次用洗涤缓冲液 1 和洗涤缓冲液 2 洗脱去除杂蛋白, 最后用洗脱缓冲液洗脱目的蛋白。收集每一步的洗脱液, 经 SDS-PAGE 检测样品的蛋白质纯度。蛋白质浓度测定采用 Bradford 法^[17], 以牛血清蛋白为标准样。

1.2.5 重组酶酶活测定

标准氧化反应体系 (3 mL): 50 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 10.5), 1.5% 4-氯-3-羟基-丁酸乙酯, 1 mmol/L 的 NAD⁺。标准还原反应体系 (3 mL): 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.8), 1.5% 4-氯-乙酰乙酸乙酯, 0.4 mmol/L 的 NADH。酶活力测定采用分光光度法, 如无特殊说明, 在反

应体系中加入 0.45 μg 纯酶启动酶反应, 在反应温度 12 $^{\circ}\text{C}$ 下测定 340 nm 处的吸光值变化。酶活单位定义为在最适温度及 pH 下, 每分钟生产 1 μmol 的 NADH 或者 NAD^+ 所需的酶量。

1.2.6 重组酶学性质

在 50 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 10.5) 中, 分别添加 1.5% 4-氯-3-羟基-丁酸乙酯等不同底物, 检测重组 PFD 的氧化活力。在 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.8) 中, 分别加入 1.5% 4-氯-乙酰乙酸乙酯等底物, 检测重组 PFD 对不同底物的还原活力。分别以氧化 4-氯-3-羟基-丁酸乙酯和还原 4-氯-乙酰乙酸乙酯时的活力为 100%, 计算相对活力。

采用不同缓冲体系配成一系列浓度为 50 mmol/L 的缓冲液: 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液, pH 6.0~6.5; Tris-HCl 缓冲液, pH 7.0~8.8; 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液, pH 8.8~10.5; 磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液, pH 10.5~11。检测不同 pH 条件下重组 PFD 的氧化和还原活力。分别以氧化和还原酶活最高为 100%, 计算相对活力。

酶液分别于甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 10.5) 和 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.8) 中在不同的温度下测定其活性, 确定酶促氧化和还原反应的最适温度。分别以氧化和还原酶活最高为 100%, 计算相对活力。

分别以不同浓度的反应底物 (1~300 mmol/L 浓度范围) 及不同浓度的辅酶 NAD^+ 、 NADP^+ 、 NADH 、 NADPH (0.001~1.2 mmol/L 浓度范围) 测定酶活力, 根据双倒数作图法, 求出酶的米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 。

1.2.7 有机溶剂耐受性

在标准氧化反应体系中按体积比分别为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 加入甲醇作为助溶剂, 检测重组 PFD 在有机溶剂存在条件下的酶活。以未添加甲醇时的酶活力作为 100%, 计算相对活力。

1.2.8 金属离子对酶活性的影响

在还原反应体系中分别添加不同金属离子或 EDTA, 测定酶活力, 确定金属离子及 EDTA 对酶活性的影响。以未加金属离子时的酶活力作为 100%, 计算相对活力。

2 结果

2.1 短链脱氢酶 PFD 的基因克隆及分子特征

用引物 F 和 R 经 PCR 扩增出短链脱氢酶编码基因 *pdf*, 经测序该基因长为 684 bp, 编码 227 个氨基酸, 理论计算分子量为 24.2 kDa。Blast 分析表明该基因与假单胞菌短链脱氢酶基因具有高的同源性, 其中与荧光假单胞菌 *P. fluorescens* Pf-5 的短链脱氢酶基因 (GenBank Accession No. AAY96132.1) 的氨基酸相似性为 91%。序列分析表明, 该基因编码的氨基酸序列包括 2 个高度保守的短链脱氢酶基序^[2,18]: 与辅酶 NAD(H) 或 NADP(H) 结合的氨基端 $\text{G}_{11}\text{xxxG}_{15}\text{xG}_{17}$ 基序和与催化活性相关的 $\text{Y}_{150}\text{xxxK}_{154}$ 基序, 属于短链醇脱氢酶类。通过 SWISS-MODEL 同源建模服务器对其进行 3D 结构模拟分析 (图 1), 发现该酶具有经典的短链脱氢酶三维结构^[2], 并且含有脱氢酶的特征结构: 结合辅酶 NAD(H) 或 NADP(H) 的 Rossmann 折叠。

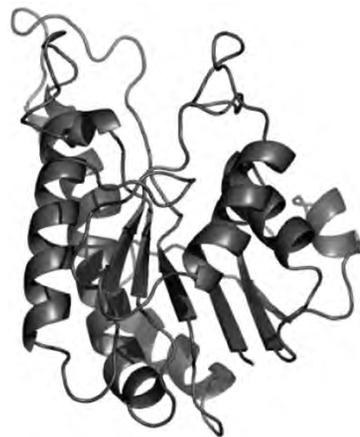


图 1 重组荧光假单胞菌短链脱氢酶的 3D 结构模拟
Fig. 1 Structural modelling of recombinant short-chain dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*.

2.2 重组 PFD 的表达与纯化

通过 *Bam*H I 和 *Hind* III 双切点将短链脱氢酶 *pdf* 基因引入表达载体 pET-28b, 构建得到重组质粒 pET28b-*pdf*。将重组质粒 pET28b-*pdf* 转化入宿主菌 *E. coli* BL21(DE3), 在 IPTG 诱导下, 携带 pET-*pdf* 的 *E. coli* BL21(DE3) 高效表达分子量约为 28 kDa 的蛋白。由于重组质粒的构建引入了外源片段, 故实际分子大小约为 28 kDa, 与预期相符。通过 IPTG 浓度、温度、时间等产酶因素优化, 得到最佳培养条件为: 37 °C 培养至 OD_{600} 为 0.6 时, 添加 0.3 mmol/L IPTG, 28 °C 诱导 8 h。重组菌经超声波破碎并离心分离, 重组酶活力 (2.10 U/mg) 出现在上清液中, 表明该重组酶在水溶液中具有较好的溶解度。利用重组质粒携带的多组氨酸标签, 表达的重组酶经 Ni^{2+} 亲和色谱纯化后经 SDS-PAGE 检测, 显示为单一条带 (图 2), 实现了重组蛋白的一步纯化。纯化后的重组酶活力为 25.65 U/mg, 经纯化前后比活力估算, 目的蛋白表达量约为细胞破碎后上清总蛋白的 8%。

2.3 重组酶酶学性质

2.3.1 底物特异性

在醇的氧化反应 (12 °C) 中, 重组 PFD 能氧化 4-氯-3-羟基-丁酸乙酯、仲丁醇、1-苯乙醇、环己醇

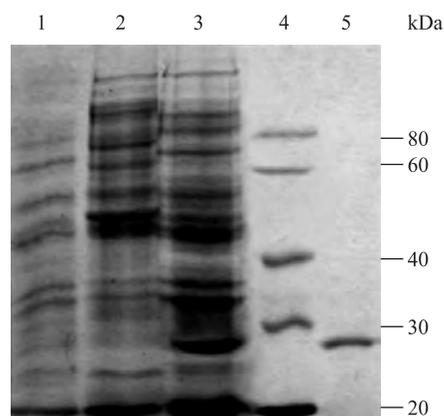


图 2 重组荧光假单胞菌短链脱氢酶的 SDS-PAGE 分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant short-chain dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. 1: *E. coli* BL21; 2: *E. coli* BL21 with pET28b; 3: *E. coli* BL21 with pET28b-*pdf* and IPTG; 4: protein ruler; 5: purified recombinant PFD after nickel affinity chromatography.

等次级醇, 但不能氧化 3-羟基丁酸乙酯、扁桃酸甲酯、乳酸乙酯等 (表 1)。当 4-氯-3-羟基-丁酸乙酯作为底物时氧化活力最高 (25.65 U/mg), 为最适底物。与之相对应的, 在酮的还原反应 (24 °C) 中, 重组 PFD 对 4-氯-乙酰乙酸乙酯的还原活力最高, 为 7.25 U/mg。重组 PFD 对初级醇苯甲醇也有较低的活力。

表 1 重组荧光短链脱氢酶的底物特异性

Table 1 Substrate specificity of recombinant short-chain dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*

Alcohols	Relative activity (%)	Ketones	Relative activity (%)
Ethyl-4-chloro-3-hydroxybutyrate	100.0	Ethyl 4-chloroacetoacetate	100.0
Ethyl-3-hydroxybutyrate	0.0	Ethyl acetoacetate	0.0
Isopropanol	0.0	Ethyl 4,4,4-trifluoroacetoacetate	0.0
1-butanol	0.0	Acetophenone	0.0
2-butanol	4.7	2-bromoacetophenone	12.5
1,3-butanediol	0.0	4-bromoacetophenone	12.5
Cyclohexanol	3.3	2,2,2-trifluoroacetophenone	15.0
Phenyl methanol	1.8		
1-phenylethanol	4.1		
Methyl mandelate	0.0		
Ethyl lactate	0.0		

2.3.2 最适 pH 和最适温度

采用不同 pH 值的缓冲体系,分别测定酶反应初速度,确定重组 PFD 的最适 pH 值。当以 4-氯-3-羟基-丁酸乙酯为氧化底物时,酶活力在 pH 7.0~10.5 之间随着碱性增强而增大, pH 值为 10.5 时酶活力最大,随着 pH 值的进一步升高,酶活力迅速下降,但 pH 为 11 时仍有 45% 左右的相对酶活力(图 3)。而以 4-氯-乙酰乙酸乙酯为还原底物时,最适 pH 比氧化反应时低,为 pH 8.8。

在最适 pH 条件下,测定不同温度下重组 PFD 的氧化与还原反应初速度,研究温度对酶活力的影响。结果如图 4 所示,当氧化 4-氯-3-羟基-丁酸乙酯时,酶活力在 12 °C 达到最大值,然后随着温度的升高而降低。低温对重组酶的氧化活力影响并不明显,在 4 °C 时 PFD 相对酶活力为 76%,具有嗜冷酶的催化特征。重组 PFD 催化还原反应时最适温度为 24 °C,高于其催化氧化反应时的最适温度。

2.3.3 动力学常数

重组 PFD 既可以利用辅酶 NAD(H),也可以 NADP(H)为辅酶(表 2)。在醇的氧化反应中,PFD 对 NAD⁺的 K_m 为 0.09 mmol/L, K_{cat}/K_m 为

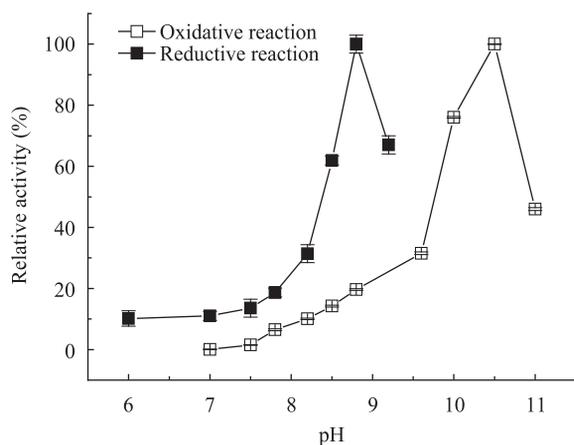


图 3 不同 pH 对重组荧光短链脱氢酶活力的影响

Fig. 3 Effect of pH on activity of recombinant short-chain dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*.

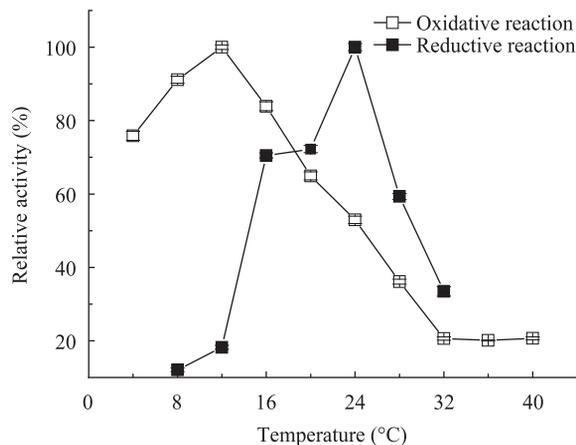


图 4 不同温度对重组荧光短链脱氢酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on activity of recombinant short-chain dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*.

1.99×10^5 (L/s·mol), 分别是辅酶 NADP⁺的 0.5 和 2.37 倍,因此氧化反应时的辅酶依赖性更倾向于 NAD⁺。而在还原反应的过程中,PFD 表现得更倾向于依赖辅酶 NADPH,其 K_{cat}/K_m 为 2.02×10^4 (L/s·mol),是 NADH 的 2 倍。在相同的酶量 (0.45 μg) 和反应温度 (12 °C) 下,重组 PFD 对 4-氯-3-羟基-丁酸乙酯的 K_m 是 4-氯-乙酰乙酸乙酯的 1.74 倍,而该酶氧化 4-氯-3-羟基-丁酸乙酯时的催化效率却是还原 4-氯-乙酰乙酸乙酯时的 14.25 倍,推测 4-氯-3-羟基-丁酸乙酯更可能是该酶在胞内的生理底物。

2.3.4 有机溶剂耐受性

长链脂肪醇或芳香醇在水溶液中的溶解度较低,添加适当的有机溶剂作助溶剂,有利于提高底物浓度。选用甲醇作为助溶剂,以未加甲醇时的酶活力为 100% 计算相对酶活,结果如图 5 所示。当甲醇含量在 10%~60% 范围时,都能有效提高酶活力,其中含量为 20% 时,促进作用最大,是未加甲醇时的 1.8 倍。当甲醇含量达到 80% 时,相对酶活力还有 68%。反应体系中添加 50% (V/V) 的二甲基亚砜和乙腈时,重组 PFD 的相对酶活力分别为 68% 和 22%,说明 PFD 具有良好的溶剂耐受性。

表 2 重组荧光短链脱氢酶的酶动力学常数

Table 2 Kinetic parameters of recombinant short-chain dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*

Substrate	K_m (mmol/L)	V_{max} (U/mg)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m (L/s·mol)
Ethyl-4-chloro-3-hydroxybutyrate	186.40	89.56	41.73	2.24×10^2
Ethyl 4-chloroacetoacetate	106.93	3.58	1.68	1.57×10^1
NAD ⁺	0.09	38.38	17.89	1.99×10^5
NADP ⁺	0.18	32.44	15.09	8.38×10^4
NADH	0.10	2.28	1.06	1.03×10^4
NADPH	0.23	9.89	4.61	2.02×10^4

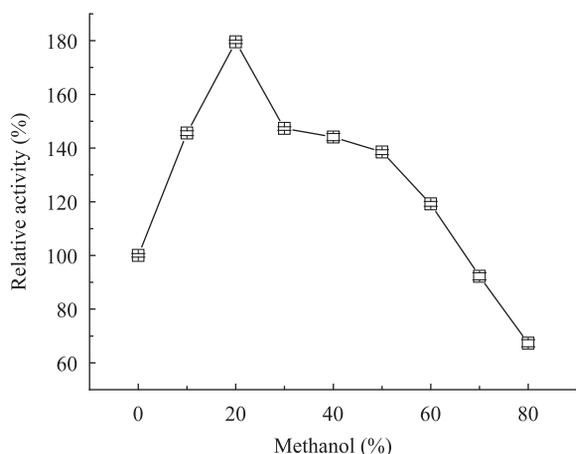


图 5 不同甲醇浓度对重组荧光短链脱氢酶活力的影响

Fig. 5 Effect of methanol concentration on activity of recombinant short-chain dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*.

2.3.5 金属盐离子对重组 PFD 活力的影响

由于二价金属离子在强碱性条件下容易形成沉淀析出, 因而选用最适反应 pH 相对弱碱性的还原反应体系测定酶活, 确定金属盐离子对重组 PFD 活力的影响。由表 3 可知 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 对重组 PFD 酶活有一定的抑制作用, 而较低浓度的 Ca^{2+} 对重组 PFD 酶活有少量的促进作用。此外, 低浓度的乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, 1 mmol/L) 不抑制酶活力, 较高浓度的 EDTA 甚至对酶活力有促进作用, 这可能与 EDTA 去除具有抑制作用的金属离子有关。

表 3 金属盐离子对重组荧光短链脱氢酶活力的影响

Table 3 Effect of metal ions on activity of recombinant short-chain dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*

Compounds	Concentration (mmol/L)	Relative activity (%)
None	0	100
NaCl	10	48
$MgCl_2$	1	52
$MnCl_2$	1	80
$ZnCl_2$	1	44
$CaCl_2$	1	128
	5	116
	10	52
EDTA	1	108
	5	156
	10	112

3 讨论

荧光假单胞菌含有 27 个 SDR 编码基因^[5], 是筛选和研究短链脱氢酶的一个良好酶源。荧光假单胞菌 SDR 编码基因数量众多, 在胞内往往不会全部表达或表达活力很低, 通过基因克隆并在大肠杆菌中实现高效表达, 并利用 His-tag 作为纯化标签高效纯化重组酶, 是一个较为高效地研究短链脱氢酶的策略。荧光假单胞最适生长温度在 25 °C~30 °C, 也能在 4 °C 生长, 本研究获得的重组 PFD 具有嗜冷酶的催化特征, 说明荧光假单胞菌也可作为嗜冷酶的筛选来源。

荧光假单胞具有降解长链烷烃的能力, 可应用于海水等低温环境下石油污染的生态修复^[3-4]。重组

PFD 以 4-氯-3-羟基丁酸乙酯为最适底物,但不能氧化 3-羟基丁酸乙酯。在低温环境 (12 °C) 下,重组 PFD 氧化 4-氯-3-羟基丁酸乙酯时的催化效率是还原 4-氯-乙酰乙酸乙酯时的 14.25 倍;在 24 °C 下,对 4-氯-3-羟基丁酸乙酯的氧化活力仍然是对 4-氯-乙酰乙酸乙酯还原活力的 1.87 倍,推测该酶在胞内的代谢角色与卤代次级醇的氧化降解有关。与嗜热微生物相比,关于嗜冷微生物的分子生物学信息相对较为缺乏,基因 *pfd* 的研究对理解荧光假单胞菌的代谢有参考意义。

本实验中,在 IPTG 诱导下,携带 pET-*pfd* 的 *E. coli* BL21(DE3) 表达分子量约为 28 kDa 的蛋白。由于重组质粒的构建引入了外源片段,故实际分子大小约为 28 kDa,与预期相符。源自氧化葡萄糖酸杆菌的短链脱氢酶 ArDH 催化氧化反应和还原反应的最适温度相同^[6],而重组 PFD 的最适氧化温度低于最适还原温度,具有这种特性的短链脱氢酶尚未见报道。作为一个新型生物催化剂,重组 PFD 以 4-氯-3-羟基丁酸乙酯为底物时的 V_{\max} 为 89.56 U/mg,比迄今为止报道的大多数细菌短链脱氢酶活力要高^[4,7-14]。其最适氧化温度为 12 °C,属于嗜冷酶,丰富了生物催化剂的选择;与嗜热酶相比,低温反应有助于减少外源能量的消耗。辅酶高效再生是氧化还原酶在实际应用中的瓶颈之一^[19],重组 PFD 能耐受高浓度的有机溶剂,使通过添加高浓度的小分子醇利用共底物再生辅酶策略成为可能,并可提高难溶底物在反应体系中的浓度。重组 PFD 能还原 4-氯-乙酰乙酸乙酯,反应产物是 4-氯-3-羟基丁酸乙酯,而手性纯的 4-氯-3-羟基丁酸乙酯是合成他汀类药物和肉碱等的手性中间体。重组 PFD 的立体选择性目前正研究中,通过后续的蛋白质工程改造,有助于构建一个在手性醇不对称合成上具有竞争力的生物催化剂^[20-21]。

REFERENCES

[1] Jörnvall H, Persson B, Krook M, et al. Short-chain

dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochem*, 1995, 34: 6013-6030.

[2] Kavanagh KL, Jörnvall H, Persson B, et al. The SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(24): 3895-3906.

[3] Anderson SM, Johnsen K, Sørensen J, et al. *Pseudomonas frederiksbergensis* sp. nov., isolated from soil at a coal gasification site. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50(6): 1957-1964.

[4] Kirschner A, Altenbuchner J, Bornscheuer U T. Design of a secondary alcohol degradation pathway from *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 in an engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(5): 1095-1101.

[5] Paulsen IT, Press CM, Ravel J, et al. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(7): 873-878.

[6] Nüss D, Goettig P, Magler I, et al. Crystal structure of the NADP-dependent mannitol dehydrogenase from *Cladosporium herbarum*: implications for oligomerisation and catalysis. *Biochimie*, 2010, 92(8): 985-993.

[7] Polizzi KM, Moore DA, Bommarius AS. A short-chain dehydrogenase/reductase from *Vibrio vulnificus* with both blue fluorescence and oxidoreductase activity. *Chem Commun*, 2007(18): 1843-1845.

[8] Dai XY, Shen XB, Zhu HY, et al. Short-chain D-arabitol dehydrogenase from *gluconobacter oxydans* NH-10. *China Biotechnol*, 2010, 30(11): 39-43.

戴小燕, 沈晓波, 朱宏阳, 等. *Gluconobacter oxydans* NH-10 中短链 D-阿拉伯糖醇脱氢酶的研究. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(11): 39-43.

[9] Pennacchio A, Giordano A, Pucci B, et al. Biochemical characterization of a recombinant short-chain NAD(H)-dependent dehydrogenase/reductase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Extremophiles*, 2010, 14(2): 193-204.

[10] Hildebrandt P, Riermeier T, Altenbuchner J, et al. Efficient resolution of prostereogenic arylaliphatic ketones using a recombinant alcohol dehydrogenases from *Pseudomonas fluorescens*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, 12(8): 1207-1210.

[11] Hildebrandt P, Musidłowska A, Bornscheuer UT, et al. Cloning, functional expression and biochemical characterization of a stereoselective alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* DSM50106. *Appl*

Microbiol Biotechnol, 2002, 59(4/5): 483-487.

[12] Stekhanova TN, Mardanov AV, Bezsudnova EY, et al. Characterization of a thermostable short-chain alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sibiricus*. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(12): 4096-4098.

[13] Rocha-Martin J, Vega DE, Cabrera Z, et al. Purification, immobilization and stabilization of a highly enantioselective alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB27 cloned in *E. coli*. Process Biochem, 2009, 44(9): 1004-1012.

[14] Kataoba M, Nakamura Y, Urano N, et al. A novel NADP⁺-dependent L-1-amino-2-propanol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* MAK154: a promising enzyme for the production of double chiral aminoalcohols. Lett Appl Microbiol, 2006, 43(4): 430-435.

[15] Sliwa DA, Krishnakumar AM, Peters JW, et al. Molecular basis for enantioselectivity in the (*R*)- and (*S*)-hydroxypropyl-thioethanesulfonate dehydrogenases, a unique pair of stereoselective short-chain dehydrogenases/reductases involved in aliphatic epoxide carboxylation. Biochem, 2010, 49(16): 3487-3498.

[16] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72(1/2): 248-254.

[18] Filling C, Berndt KD, Benach J, et al. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. J Biol Chem, 2002, 277(28): 25677-25684.

[19] Huisman GW, Liang J, Krebber A. Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases. Curr Opin Chem Biol, 2010, 14(2): 122-129.

[20] Katzberg M, Skorupa-Parachin N, Gorwa-Grauslund M, et al. Engineering cofactor preference of ketone reducing biocatalysts: a mutagenesis study on a γ -diketone reductase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* serving as an example. Int J Mol Sci, 2010, 11(4): 1735-1758.

[21] Zhang H, Lountos GT, Ching CB, et al. Engineering of glycerol dehydrogenase for improved activity towards 1,3-butanediol. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 88(1): 117-124.



广 告 索 引

企 业	版 位	企 业	版 位
GE Healthcare 公司	封 底	生物谷网站	内 页
宝生物工程（大连）有限公司	封 二	艾本德（上海）国际贸易有限公司	内 页
北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司	封 三	镇江东方生物工程公司	内 页
安琪酵母股份有限公司	内 页		