

重组 NADH 氧化酶对乳酸脱氢酶乳酸氧化活性的影响

赵蕊, 霍贵成* (东北农业大学, 乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要 [目的]考察当存在其他利用 NADH 途径时, 发酵型乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)催化乳酸氧化能力的改变。[方法]PCR 扩增乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, *L. lactis*)中生成 H₂O 的 NADH 氧化酶基因 *noxE*, 将其连接至表达载体并在大肠杆菌中过量表达; 对亲和纯化的产物进行 SDS-PAGE 分析、光谱扫描和活性测定, 考察纯化产物是否具有生物学活性; 以 2,4-二硝基苯肼法测定乳酸脱氢酶的乳酸氧化活性, 考察添加 NoxE 重组蛋白对其活性的影响。[结果]重组 NoxE 蛋白是种黄素蛋白, 具明显的生物学活性, 说明 *noxE* 表达载体构建成功; 添加 NoxE 后, LDH 的乳酸氧化活性提高了 3.84 倍。[结论]在 NADH 经呼吸链代谢掉的生理条件下, LDH 催化乳酸氧化的能力会明显提高。

关键词 乳酸菌; 乳酸脱氢酶; NADH 氧化酶

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)05-01918-02

Effects of Recombinant NADH Oxidase on the Lactate Oxidation Activity of Lactate Dehydrogenase

ZHAO Rui et al (Key Laboratory of Dairy Science of Ministry of Education, Northeast Agriculture University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract [Objective] To compare the lactate oxidation activity of lactate dehydrogenase (LDH) in the presence and absence of another NADH utilization pathway. [Method] The H₂O-producing NADH oxidase gene (*noxE*) was cloned by PCR from *Lactococcus lactis* genome, ligated into the expression vector and expressed in *E. coli*. After affinity purification, the recombinant protein was analyzed by SDS-PAGE, UV-vis absorption spectrum and determination of enzyme activity. 2,4-Dinitrophenylhydrazine was used to evaluate the effect of NoxE addition on the lactate oxidation activity of LDH. [Result] NoxE was purified as a flavin protein with significant activity. When NoxE was added, the lactate oxidation activity of LDH was increased 3.84-fold. [Conclusion] The lactate oxidation capacity of LDH will be significantly increased under physical conditions where NADH can be consumed via respiration chain.

Key words Lactic acid bacteria; Lactate dehydrogenase; NADH oxidase

作为一种重要的工业微生物, *L. lactis* 被广泛用于多种干酪、酪乳、酸奶油等乳制品的生产中, 同时作为一种模式微生物, 其乳酸代谢及调控长期以来也受到了广泛关注。在发酵条件下, *L. lactis* 通过底物水平磷酸化产生 ATP, 同时生成以 L-乳酸为主的终产物。然而, 人们发现在向 *L. lactis* 有氧培养物中添加血红素后, 该菌可形成功能性电子传递链并进行有氧呼吸^[1-2]。呼吸代谢在许多方面都给菌体带来显著的益处, 如提高生物量、降低氧化应激和酸应激, 以及提高存活时间等^[1]。*L. lactis* 有氧呼吸中经常出现的一个独特的现象, 就是前期积累的乳酸可在葡萄糖近乎耗尽的情况下被消耗掉, 同时伴随着其他丙酮酸代谢产物(乙酸、联乙醚和以偶姻)的积累及 pH 的回升^[1,3-4]。由此可推断, 在这一过程中乳酸被氧化生成了丙酮酸。

在生物体中, 通常是由不依赖于 NAD 的 LDH 将乳酸氧化生成丙酮酸的^[5-7], 然而在某些条件下发酵型的依赖于 NAD 的 LDH 也能催化这一反应^[8]。为考察 *L. lactis* 中发酵型 LDH 在有氧呼吸条件下利用乳酸的能力, 前期试验中笔者构建了 *L. lactis* 发酵型 LDH 的 *E. coli* 表达菌株。考虑到 *L. lactis* 呼吸培养物具备的呼吸链能氧化 NADH 同时生成对细胞无害的水, 因此该研究通过构建生成水的 NADH 氧化酶表达菌株获得纯化的重组蛋白, 并将其用于测定 LDH 乳酸氧化活性的反应体系中模拟体内的环境, 考察有其他消耗 NADH 的代谢途径存在时, LDH 催化乳酸氧化能力的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒。*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, 由芬兰格罗宁根大学 J. Kok 教授惠赠^[9]; *L. lactis* MG1363 中 LDH 的表达菌株 *E. coli* Transetta (DE3) (pRARE, pEASYLDH4) 为东北农业大学乳品科学教育部重点实验室保存菌株; 表达菌株 *E. coli* Transetta (DE3) (pRARE) 和表达载体 pEASY-E2 购自北京全式金公司; *E. coli* JM109 感受态细胞购自博迈德生物公司。

1.1.2 主要试剂。*Ex Taq* DNA 聚合酶、DNA ligation kit 和 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司; 氯霉素 (Amresco); 氨苄青霉素 (Sigma); Ni-nitritriacetic acid agarose resin (QIAGEN); 2,4-二硝基苯肼 (DNPH) 为国产; PCR 引物在上海英骏生物技术有限公司合成。

1.1.3 主要仪器。PCR 仪 (美国 ABI 公司); 蛋白质电泳仪 (美国伯乐); DU800 分光光度计 (美国 Beckman)。

1.2 方法

1.2.1 *noxE* 表达载体的构建。根据 *L. lactis* MG1363 在 GenBank (登录号: AM406671.1) 中的基因序列信息, 使用 Primer Premier 设计引物用于扩增 *noxE* 基因。以 *L. lactis* MG1363 基因组 DNA 为模板, 分别以 5'-AAAATCGTAGT-TATCGGTACAAACCAC-3' 和 5'-TTTGGCATTCAAAGCTGCA-ACTG-3' 为上游和下游引物进行 PCR 扩增。PCR 条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 70 s, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

将 PCR 产物插入到 C 端带有 6 × His 标签的表达载体 pEASY-E2 中, 转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞。以载体特异性 T7 启动子引物和 *noxE* 的下游引物对随机挑取的阳性

基金项目 国家 863 项目 (2011AA100902); 国家自然科学基金 (31171717 和 30972131)。

作者简介 赵蕊 (1982-), 女, 山东黄县人, 博士, 从事生物化学与分子生物学研究。* 通讯作者, 教授, 博士生导师, 从事乳品科学研究, E-mail: gchuo58@yahoo.com.cn。

收稿日期 2013-01-11

转化子进行菌落 PCR,以筛选出插入方向正确的转化子。经序列测定后,将序列正确的重组质粒转化至 *E. coli* Transsetta (DE3) 表达菌株中。

1.2.2 重组蛋白的表达与纯化。在添加有 34 $\mu\text{g/ml}$ 氯霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄的 $2 \times \text{YT}$ 肉汤培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 250 r/min 条件下,对重组菌株 *E. coli* Transsetta (DE3) (pRARE, pEASYLDH4) 和 *E. coli* Transsetta (DE3) (pRARE, pEASYNOX) 分别进行震荡培养。当 OD_{600} 达 0.5 ~ 0.7 时,添加 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下继续震荡培养 4 h 进行诱导,离心收集菌体,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

经冻融处理后,向菌体沉淀中添加由 300 mmol/L NaCl、10% glycerol 和 50 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 7.0) 组成的 buffer A,重悬菌体,添加溶菌酶至 1.5 mg/ml,在室温下作用 20 min,然后经超声处理,离心去除未破碎的菌体细胞。用含 20 mmol/L 咪唑的 buffer A 平衡 Ni-NTA 亲和色谱柱,将得到的上清转至色谱柱中。用含 20 mmol/L 咪唑的 buffer A 洗脱非特异性结合的杂蛋白,最终用含 1 mol/L 咪唑的 buffer A 对带有组氨酸标签的目的蛋白进行洗脱。

1.2.3 重组蛋白的鉴定及生物学活性分析。对纯化的重组 LDH 和 NoxE 进行 SDS-PAGE 电泳,分析目的蛋白的分子量。在 300 ~ 500 nm 范围内对 NoxE 重组蛋白进行光谱扫描。为确保得到的纯化重组蛋白具有生物学活性,对两者进行酶活分析。

1.2.4 酶活性的测定。测定 NADH 氧化酶活性的反应体系含 0.15 mmol/L NADH 和 100 mmol/L Tris-maleate (pH 7.0)。反应在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下进行,通过监测添加酶溶液后反应液在 340 nm 处吸光值的变化考察酶活 [NADH 在 340 nm 处摩尔吸光系数为 6 220/(M·cm)]。

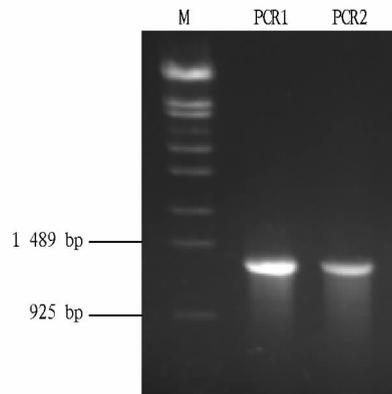
乳酸氧化活性的测定:将 0.33 ml 含 100 mmol/L Tris-maleate (pH 7.0)、1.6 mmol/L NAD 和 10 mmol/L L-乳酸钠的溶液在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下预热 3 min,添加酶液起始反应,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下继续作用 2 min,添加 0.22 ml 的 0.25 mmol/L DNPH,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 15 min,使生成的丙酮酸与 DNPH 反应,最终,向反应混合物中添加 0.66 ml 0.6 mol/L NaOH 终止反应,在室温下作用 5 min 后,于 440 nm 处记录吸光值。为消除在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 过程中生成的丙酮酸对结果产生的影响,每次试验均设置了一个阴性对照,除省去了在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 2 min 的步骤以外,其余程序与实验组相同。用已知浓度的丙酮酸钠溶液与 DNPH 在上述试验条件下反应,绘制出丙酮酸钠的浓度-吸光值标准曲线,因此根据反应测得的 OD 值就可定量生成的丙酮酸浓度,从而计算酶的活性。

当测定添加 NoxE 重组蛋白对 LDH 乳酸氧化活性的影响时,最初的 0.33 ml 反应体系中需添加 Nox 至终浓度 1 $\mu\text{mol}/(\text{ml}\cdot\text{min})$,其余操作如上所述。

1 单位(U)酶活性的定义为在上述试验条件下,每分钟催化消耗 1 μmol 底物或生成 1 μmol 产物所需要的酶量。

2 结果与分析

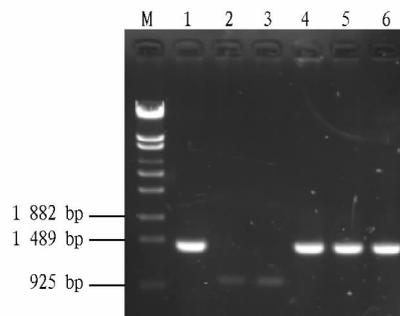
2.1 noxE 基因的 PCR 结果 经 PCR 扩增,*L. lactis* MG1363 中 *noxE* 基因的 PCR 产物大小为 1 338 bp,与预期大小相符。



注: M: λ -EcoT14 Marker; PCR1 和 PCR2: *L. lactis* MG1363 *noxE* 基因的 PCR 产物。

图 1 *noxE* 基因 PCR 产物的凝胶电泳图谱

2.2 正向插入的阳性重组子鉴定 将 *L. lactis* MG1363 *noxE* 基因的 PCR 产物与表达载体连接后转化 *Trans1-T1* 感受态细胞,从涂布的选择性平板上随机挑取 6 个菌落,用菌落 PCR 法筛选插入方向正确的重组子(图 2),发现有 4 个菌落扩增出明显的条带,大小位于 Marker 的 1 489 和 925 bp 之间,与预期大小相符。



注: M: λ -EcoT14 Marker; 1 ~ 6. 用随机挑选的菌落进行的菌落 PCR 结果。

图 2 有正确插入方向的阳性重组子的鉴定结果

2.3 NoxE 纯化产物的活性测定及扫描光谱 纯化的 NoxE 重组蛋白呈鲜亮的黄色,在 300 ~ 500 nm 处对重组蛋白进行光谱扫描,结果如图 3 所示, NoxE 重组蛋白在 370 和 440 nm 处有明显的吸收峰,表明其含有黄素组分,这与文献报道的结果相符^[10]。

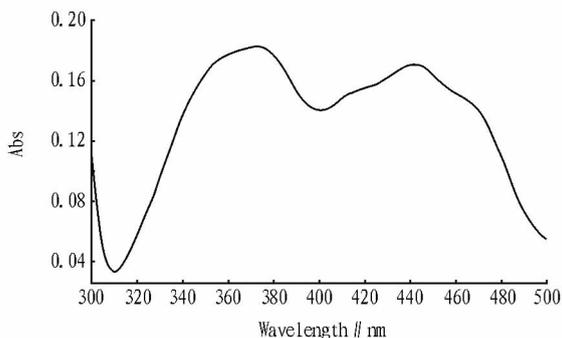


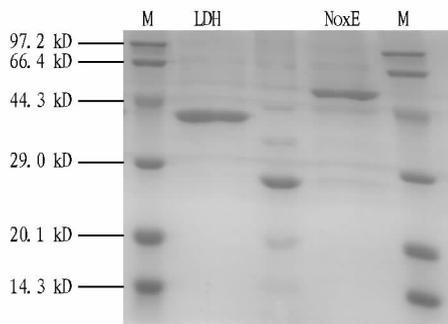
图 3 重组 NoxE 的光谱扫描结果

- [17] BNOUHAM M, MERHFOUR F Z, ZIYYAT A, et al. Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica* [J]. *Fitoterapia*, 2003, 74 (7/8): 677–681.
- [18] RAU O, WURGLICS M, DINGERMANN T, et al. Screening of herbal extracts for activation of the human peroxisome proliferators-activated receptor [J]. *Pharmazie*, 2006, 61 (11): 952–956.
- [19] GOLALIPOUR M J, KHORI V. The protective activity of *Urtica dioica* leaves on blood glucose concentration and beta-cells in streptozotocin-diabetic rats [J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2007, 10 (8): 1200–1204.
- [20] NAMAZI N, TARIQHAT A, BAHRAMI A. The effect of hydro alcoholic nettle (*Urtica dioica*) extract on oxidative stress in patients with type 2 diabetes; a randomized double-blind clinical trial [J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2012, 15 (2): 98–102.
- [21] SAID O, FULDER S, KHALIL K, et al. Maintaining a physiological blood glucose level with 'glucoselevel', a combination of four anti-diabetes plants used in the traditional arab herbal medicine [J]. *Evid Based Complement*

- Alternar Med*, 2008, 5 (4): 421–428.
- [22] BNOUHAM M, MERHFOUR F Z, ZIYYAR A, et al. Antidiabetic effect of some medicinal plants of Oriental Morocco in neonatal non-insulin-dependent diabetes mellitus rats [J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2010, 29 (10): 865–871.
- [23] 李仲昆, 尹为民, 王崇静, 等. 粗根苧麻提取物对环磷酰胺所致小鼠免疫功能低下保护作用的实验观察 [J]. *中成药*, 2011, 33 (5): 882–884.
- [24] JAHANAHSI M, GOLALIPOUR M J, AFSHAR M. The effect of *Urtica dioica* extract on the number of astrocytes in the dentate gyrus of diabetic rats [J]. *Folia Morohol*, 2009, 68 (2): 93–97.
- [25] OZKOL H, MUSA D, TULUCE Y, et al. Ameliorative influence of *Urtica dioica* L against cisplatin-induced toxicity in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma [J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 2011, 34: 1–7.
- [26] GOLALIPOUR M J, GHAFARI S, AFSHAR M. Protective role of *Urtica dioica* L. (*Urticaceae*) extract on hepatocytes changes in STZ diabetic Wistar rats [J]. *Turkish Journal of Gastroenterol*, 2010, 21 (3): 262–269.

(上接第 1919 页)

2.4 SDS-PAGE 分析重组蛋白 对 LDH 和 NoxE 重组蛋白进行 SDS/PAGE 分析, 结果如图 4 所示, LDH 的表观分子量为 37.24 kD, 与理论分子量 37.15 kD 相符; NoxE 的表观分子量为 48.10 kD, 与理论值 48.71 kD 也较为一致。



注: M 为蛋白 Marker。

图 4 对 LDH 和 NoxE 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

2.5 LDH 和 NoxE 重组蛋白活性分析 NoxE 催化 NADH 氧化活性为 (35.88 ± 0.82) U/mg。这证实该试验中的 NoxE 重组蛋白成功表达, 具有显著的生物学活性。利用 DNPH 法测定生成的丙酮酸含量, 发现 LDH 在没有外源 NADH 氧化途径下的乳酸氧化活性为 (9.54 ± 1.72) U/mg, 而添加了 NoxE 氧化酶后, 其乳酸氧化活性提高到 (36.67 ± 1.85) U/mg, 是未添加 NoxE 测定活性的 3.84 倍。这说明在 NADH 可被有效代谢的情况下, LDH 催化乳酸氧化活性明显提高。

3 结论与讨论

发酵型 LDH 催化的反应为: $\text{NADH} + \text{丙酮酸} \leftrightarrow \text{NAD} + \text{乳酸}$ 。通常人们认为这种 LDH 主要催化丙酮酸还原反应而不适宜催化其逆反应, 因为这类 LDH 对乳酸和 NAD 的亲合性远低于对正反应底物的亲合性^[11]。诚然, 在发酵条件下细胞内其他利用 NADH 的途径非常有限, LDH 只能催化丙酮酸还原反应。然而, 相对于一成不变的体外测定酶活体系而言, 细胞内的生理条件可能是不同的, 甚至是不断发生变化的, 因此体外试验得到的结果并不总能真实地反应出酶在体内的实际活性。在有氧呼吸条件下, 呼吸链的 NADH 脱氢酶

可催化 $\text{NADH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD} + \text{H}_2\text{O}$ 反应, 这会促使 LDH 催化的反应平衡移动, 使反应朝向利于乳酸氧化的方向进行。

不单如此, 丙酮酸作为其他酶作用的底物也可被代谢掉, 这势必会对 LDH 催化乳酸氧化有进一步的促进作用。为全面评估 LDH 在体内催化乳酸氧化的能力, 还需进行更系统深入的研究。该研究为研究酶在生物体内的作用提供了新思路, 也为研究 LDH 在 *L. lactis* 细胞内催化乳酸氧化的能力研究建立了一定的基础。

参考文献

- [1] DUWAT P, SOURICE S, CESSÉLIN B, et al. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183 (15): 4509–4516.
- [2] SIJPESTEIJN A K. Induction of cytochrome formation and stimulation of oxidative dissimilation by hemin in *Streptococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* [J]. *Antonie Leeuwenhoek*, 1970, 36 (1): 335–348.
- [3] KOEBMANN B, BLANK L M, SOLEM C, et al. Increased biomass yield of *Lactococcus lactis* during energetically limited growth and respiratory conditions [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2008, 50 (1): 25–33.
- [4] LAN C Q, ODDONE G, MILLS D A, et al. Kinetics of *Lactococcus lactis* growth and metabolite formation under aerobic and anaerobic conditions in the presence or absence of hemin [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 95 (6): 1070–1080.
- [5] CHAO G, TIANYI J, PEIPEI D, et al. NAD-Independent L-Lactate Dehydrogenase Is Required for L-Lactate Utilization in *Pseudomonas stutzeri* SDM [J]. *PLoS One*, 2012, 7: 36519.
- [6] SEKI M, IIDA K, SAITO M, et al. Hydrogen peroxide production in *Streptococcus pyogenes*: involvement of lactate oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186 (7): 2046–2051.
- [7] PINCHUK G E, RODIONOV D A, YANG C, et al. Genomic reconstruction of *Shewanella oneidensis* MR-1 metabolism reveals a previously uncharacterized machinery for lactate utilization [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (8): 2874–2879.
- [8] GOFFIN P, LORQUET F, KLEEREBEZEM M, et al. Major role of NAD-dependent lactate dehydrogenases in aerobic lactate utilization in *Lactobacillus plantarum* during early stationary phase [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186 (19): 6661–6666.
- [9] WEGMANN U, O'CONNELL-MOTHERWAY M, ZOMER A, et al. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 [J]. *J Bacteriol*, 2007, 189 (8): 3256–3270.
- [10] TACHON S, CHAMBELLON E, YVON M. Identification of a Conserved Sequence in Flavoproteins Essential for the Correct Conformation and Activity of the NADH Oxidase NoxE of *Lactococcus lactis* [J]. *J Bacteriol*, 2011, 193 (12): 3000–3008.
- [11] VANNIEL E W J, PALMFELDT J, MARTIN R, et al. Reappraisal of the regulation of Lactococcal L-lactate dehydrogenase [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70 (3): 1843–1846.