

副干酪乳杆菌乳酸脱氢酶的生物信息学分析

赵婷¹, 姚雯轶², 王立梅^{2,*}

(1. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123;

2. 常熟理工学院发酵工程技术研究中心, 苏州市食品生物技术重点实验室, 江苏 常熟 215500)

摘要:目的: 分析和预测副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)基因及其编码蛋白的结构和特性, 以指导其生物学功能的实验研究。方法: 利用美国国家生物技术信息中心(NCBI)和瑞士生物信息学研究所的蛋白分析专家系统(ExPASy)中有关基因和蛋白的序列和结构信息分析的各种工具, 结合其他生物信息学分析软件, 如 ClustalX、VMD, 从数据库中得到乳酸脱氢酶基因, 分析、预测该基因编码的蛋白理化性质、翻译后的修饰位点、拓扑结构、二级结构、三级结构和功能域。并与其他微生物的乳酸脱氢酶蛋白序列进行比对, 得出它们的保守序列。结果: 该基因编码 335 个氨基酸, 其蛋白理论分子质量为 36608.8u, 预测该蛋白有 3 个跨膜区。与干酪乳杆菌的乳酸脱氢酶进化关系最近。结论: 应用生物信息方法可预测得到副干酪乳杆菌的乳酸脱氢酶的结构与功能方面的信息。

关键词: 副干酪乳杆菌; 乳酸脱氢酶; 生物信息学

Bioinformatic Analysis of Genes Encoding Lactate Dehydrogenase from *Lactobacillus paracasei*

ZHAO Ting¹, YAO Wen-yi², WANG Li-mei^{2,*}

(1. School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China;

2. Key Laboratory of Food and Biotechnology, Center of Fermentation Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

Abstract: Objective: To analyze and predict the structure and characteristics of lactate dehydrogenase from *Lactobacillus paracasei* for guiding experimental studies of its biological functions and application. Methods: Bioinformatic tools provided by the NCBI website and ExPasy as well as bioinformatic software packages such as ClustalX and VMD were used to identify sequence encoding LDH protein from database. The characteristics including physical-chemical characteristics, post-translational modification sites, topological structure, secondary structures, tertiary structure and domains of the deduced protein were analyzed. The sequences encoding LDH from *Lactobacillus paracasei* and other microorganisms were compared to obtain the conserved sequence. Results: The gene codes for 335 amino acids were achieved. The theoretical molecular weight of the deduced protein was 36608.8 u. The encoding protein was elucidated to have 3 trans-membrane regions. Through the comparison of amino acid sequences, LDH from *Lactobacillus paracasei* had high homology with LDH from *Lactobacillus casei*. Conclusion The structure of *ldh* gene and LDH protein from *Lactobacillus paracasei* can be bioinformatically analyzed and predicted.

Key words: *Lactobacillus paracasei*; lactate dehydrogenase; bioinformatics

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0250-04

苯乳酸(phenyllactic acid, PLA)又称 3- 苯基乳酸, 是一些重要的化学合成物前体, 并广泛应用于医药、化工、生物合成等领域。近几年来, 它作为一种新型的抑菌剂又受到食品行业的广泛关注, 苯乳酸抑菌谱宽, 能抑制多种食源性致病菌、腐败菌、特别是能抑制真菌的污染。溶解性好, pH 值范围广, 热稳定性高, 在食品工业中具有广阔的应用前景^[1-4]。

在乳酸菌等微生物中, 直接以苯基丙酮酸为底物, 在乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的作用下, 可以有效地发酵生成苯乳酸^[5]。副干酪乳杆菌 *Lactobacillus paracasei*W2 是本实验室在自然界中分离纯化得到的, 并在摇瓶中对其合成苯乳酸的培养基和培养条件进行优化^[6], 使其可以将底物苯基丙酮酸高效转化生成苯乳酸, 关于副干酪乳杆菌的乳酸脱氢酶的研究目前尚未见报道。

收稿日期: 2011-06-19

基金项目: 江苏省科学技术厅农业科技支撑计划项目(BE2008391); 常熟市科学技术局农业科技攻关项目(CN200921)

作者简介: 赵婷(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与功能性食品。E-mail: 527815536@qq.com

* 通信作者: 王立梅(1964—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: wlmqb@126.com

本实验通过生物信息学的方法对NCBI中已知的*Lactobacillus paracasei* 乳酸脱氢酶基因及其编码的蛋白结构和特征进行全面的分析比较^[7], 以指导*Lactobacillus paracasei*W2 后续目的基因的克隆表达, 生物学功能的初步研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

通过美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站搜索*Lactobacillus paracasei* 的 *ldh* 基因核酸序列, GeneBank 中登录号为 ATCC 25302。

1.2 方 法

1.2.1 LDH 的 Blast 比 对 分 析

通过美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站局部比 对搜索工具(Blast)程序, 将*L.paracasei* 的LDH氨基酸序列 与数据库中的序列进行对比分析, 分析其保守功能域。

1.2.2 LDH 的理化性质

通过瑞士生物信息学研究所的蛋白分析专家系统 (ExPASy)预测 LDH 蛋白质的理化性质。

1.2.3 LDH 二级结构的分析

对 *ldh* 基因编码蛋白的各级结构进行数据库搜索及 预测。预测 LDH 蛋白一级结构中的各个修饰位点和亚细 胞定位; 预测氨基酸序列的跨膜区和拓扑结构; 预测 LDH 活性位点。

1.2.4 LDH 多序列比 对

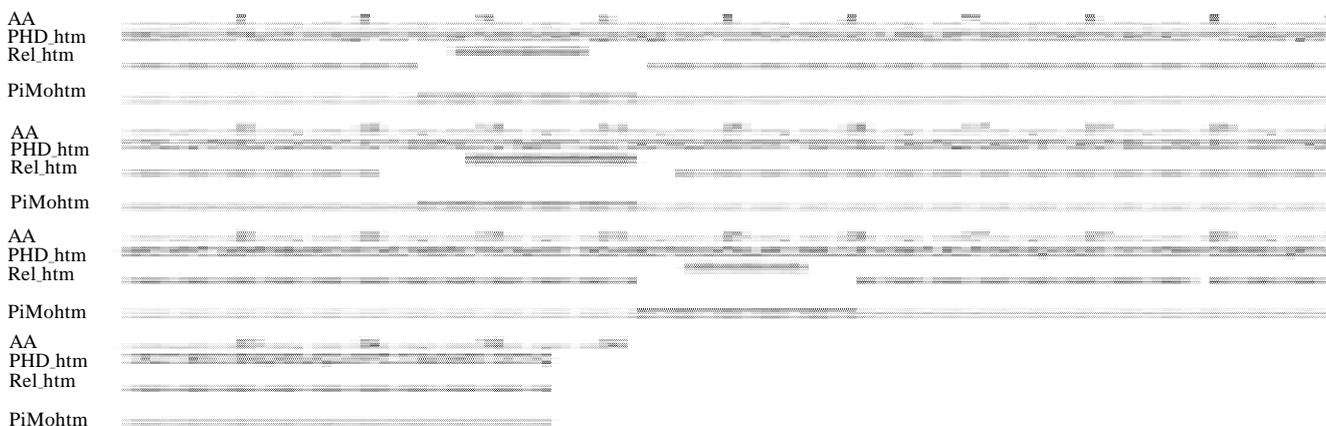
利用 Clustal X 对 *L. paracasei* 和其他物种的 LDH 进 行多序列比对。

1.2.5 LDH 三级结构的分析

利用 VMD 软件模拟 LDH 空间结构, 显示其活性中心^[8]。

2 结果与分 析

2.1 Blast 的 分 析 结 果

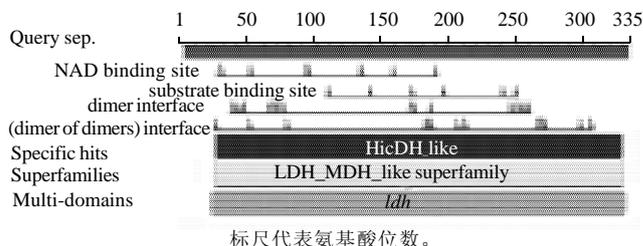


AA.氨基酸; PHD_htm.神经网络跨膜螺旋预测; Rel_htm.预测的可靠性指数, 最低为 0, 最高为 9, * 表示可靠性 很高; PiMohtm.神经网络拓扑学预测; i.膜内; o.膜外; T.跨膜螺旋; M.跨膜区; 数字表示氨基酸位数。

图 2 *L. paracasei* 的 LDH 拓扑结构、二级结构图

Fig.2 Topological and secondary structures of *L. paracasei* LDH

L.paracasei 的 *ldh* 基因序列编码的氨基酸序列与 GeneBank 中 *Lactobacillus casei* 的 *ldh* 同源性分值最高, 一致性达 99%。通过 Rpsblast 分析, 发现有完整的 LDH 的保守结构域(aa₉~aa₃₂₄), 如图 1 所示。



标尺代表氨基酸位数。

图 1 预测的 *L.casei*W2 的 *ldh* 保守功能域

Fig.1 Prediction of conserved domain of *ldh* gene from *Lactobacillus paracasei*

2.2 LDH 蛋白的理化性质

由 ExPASy 分析得出, *L.paracasei* 的 LDH 理论分 子质量是 36608.8u, 等电点为 5.34。该蛋白在波长 280nm 处的摩尔消光系数为 32890L/(mol·cm), 质量 浓度 0.1g/100mL 时吸光度为 0.898。其成熟肽 N 端为甲 硫氨酸时, 在哺乳动物网状红细胞体外表达的半衰期为 30h, 在酵母和大肠埃希氏菌中表达的半衰期分别大于 20h 和 10h。在溶液中的不稳定指数为 30.10, 低于阈值 40, 在溶液中性质稳定。疏水指数为 99.88, 疏水性较高。

2.3 LDH 翻译后的修饰位点、亚细胞定位的预测

特定位点分析结果显示: LDH 含有 8 个潜在的酪蛋 白激酶 II(CK2)磷酸化位点; 4 个潜在的蛋白激酶 C(PKC) 磷酸化位点; 4 个潜在的肉豆蔻基位点。LDH 没有分泌 信号肽序列, 没有过氧化酶体、溶酶体等定位序列。

2.4 LDH 的拓扑结构和二级结构分析

由 Predict Protein 分析得出该蛋白不含有半胱氨酸。 Htm 预测结果表明(图 2), 该蛋白有 3 个跨膜区, Sec 预 测 α 螺旋(H)、 β 折叠(E)和无规卷曲(L)的比例是 42.99: 18.81:38.21。

2.5 *L.paracasei* 的 LDH 模拟三维结构

Scanprosite 分析结果如图 3 所示, 副干酪乳杆菌的 LDH 活性位点在 aa₁₈₇~aa₁₉₃ 上, 由 MGEHGDT 7 个氨基酸组成, 此结构与 LDH 活性直接相关, 是 LDH 与底物结合并发挥催化作用的部位。利用 VMD 软件模拟 LDH 的空间结构, 显示了其所含有的 3 种二级结构在空间中的位置与走向, 7 个关键氨基酸在空间结构上的位置非常靠近, 构成酶的活性中心。

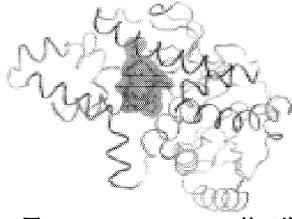


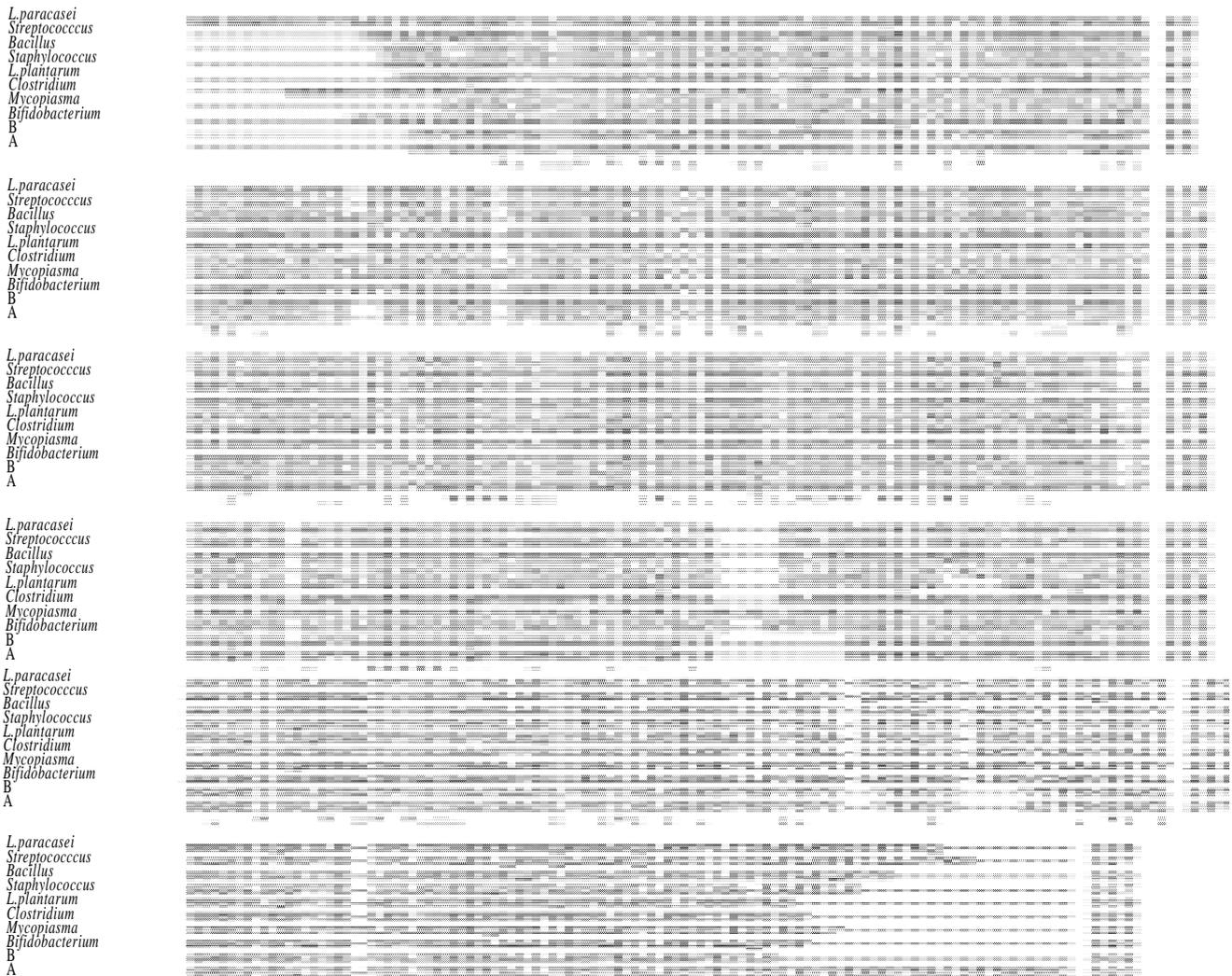
图 3 *L.paracasei* LDH 的三维结构图

Fig.3 Tertiary structure of *Lactobacillus paracasei* LDH

2.6 副干酪乳杆菌 LDH 与其他物种 LDH 的比较和分子进化树的构建

将副干酪乳杆菌 LDH 与其他物种 LDH (*Rhizopus oryzae* LDHA 和 LDHB、*Streptococcus suis* ST3、*Bacillus subtilis* BSn5、*L.plantarum*、*Mycoplasma suis*、*Clostridium botulinum*、*Bifidobacterium bifidum*、*Staphylococcus aureus* 的 LDH) 氨基酸序列进行多重序列比对, 结果如图 4、5 所示。发现 LDH 的保守区域位于各物种 LDH 氨基酸序列的中部, 关键氨基酸都处在其中。

分子进化树显示 10 类 LDH 大致分为 3 个亚类: *L.paracasei*、*Streptococcus suis*、*Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus* 和 *L.plantarum*; *Bifidobacterium bifidum*、*Mycoplasma suis*、*Rhizopus oryzae* LDHA 和 LDHB; *Clostridium botulinum*。其中 *L.paracasei* 与 *Streptococcus suis* 进化关系最近。



*.所有物种共有的保守位点; 数字表示氨基酸位数。

图 4 *L.paracasei* 与其他物种 LDH 氨基酸序列比对

Fig.4 Multiple sequence alignments of LDH from *Lactobacillus paracasei* and others

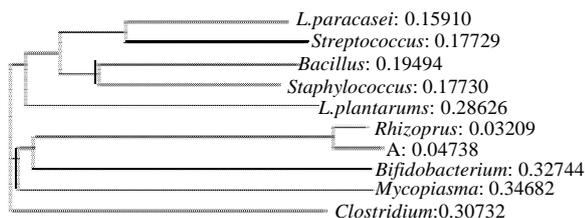


图5 LDH的进化系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree based on the sequence of LDH-encoding genes

3 讨 论

生物信息学作为一门新的学科领域,它是把基因组DNA序列信息分析作为源头,在获得蛋白质编码区的信息后进行蛋白质空间结构模拟和预测,如各种亚细胞的定位信号、翻译后的修饰位点、功能域等,此外对蛋白质的理化性质包括等电点、分子量、半衰期、疏水性、稳定性等的分析,以及其空间结构的预测,有助于采取合理的克隆和表达策略,选用适合的表达载体,获得有活性的重组蛋白,是研究蛋白质功能的基础,依据特定蛋白质的功能进行必要的设计,避免实验的盲目性^[9-14]。

本实验对NCBI中已知的*L.paracasei*的LDH进行了生物信息学分析。经NCBI网站Blast在线分析,*L.paracasei*的乳酸脱氢酶氨基酸序列与GenBank中其他物种的乳酸脱氢酶同源性可达到60%以上并且含有完整的LDH保守功能域,该蛋白的分子量理论预测值是36608.8u,预测等电点为5.34。

保守功能域的分析、*L.paracasei*的LDH与其他物种的LDH的氨基酸比对结果显示,在它们的氨基酸序列中部为酶活性区域,序列比较保守,关键氨基酸位点保守,因此LDH还是一个研究物种进化理想的分子指标,既包含了决定其基本结构和功能的高度保守的氨基酸,同时也体现了与种系进化相一致的变异性,在分

子学上有重要的应用价值^[15];*L.paracasei*的LDH活性位点为aa₁₈₇~aa₁₉₃,由MGEHGDT 7个氨基酸组成,此结构与LDH活性直接相关,是LDH与底物结合并发挥催化作用的部位。

参 考 文 献:

- [1] 李德茂,李从发,刘四新,等. 3-苯基乳酸的研究进展[J]. 药物生物技术, 2004, 11(5): 344-347.
- [2] GUÉGUEN D M. 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): 1281-1285.
- [3] DIEULEVEUX V, LEMARINIER S, GUÉGUEN M. Antimicrobial spectrum and target site of *d*-3-phenyllactic acid[J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 40(3): 177-183.
- [4] MAGNUSSON S J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives [J]. Trends in Food Science & Technology, 2005, 16(1/3): 70-80.
- [5] 李兴峰,江波,潘蓓蕾,等. 苯丙酮酸及苯丙酮酸对 *Lactobacillus* sp. SK007 合成苯乳酸的影响[J]. 过程工程学报, 2007, 7(6): 1202-1206.
- [6] 李兴峰,江波,潘蓓蕾,等. 产苯乳酸的乳酸菌分离筛选及菌种鉴定 [J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(2): 1-4.
- [7] 欧阳平. 生物信息数据库与序列分析[J]. 生物学通报, 2007, 42(1): 24-25.
- [8] 王禄山,高培基. 生物信息学应用技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 161-164.
- [9] 殷志祥. 蛋白质结构预测方法的研究进展[J]. 计算机工程与应用, 2004, 40(20): 54-57.
- [10] BAKER D. Protein structure prediction and structural genomics[J]. Science, 2001, 294: 93-96.
- [11] PEARSON W R. Searching protein sequence libraries: comparison of the sensitivity and selectivity of the Smith-Waterman and FASTA algorithms[J]. Genomics, 1991, 11: 635-650.
- [12] PAZOS F, STEMBERG M J. Automated prediction of protein function and detection of functional sites from structure[J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101: 14754-14759.
- [13] SIEW N, FISCHER D. Convergent evolutions of protein structure prediction and computer chess tournaments: CASP, Kasparov and CAFASP[J]. IBM Sys J, 2001, 40: 410-425.
- [14] BENSON D A, KARSCH-MIZRACHI I, LIPMAN D J, et al. GenBank [J]. Nucl Acids Res, 2003, 31(1): 23-27.
- [15] 申萍香,黄艳,黄江,等. 生物信息学分析亚洲牛带绦虫乳酸脱氢酶基因及蛋白的结构与特性[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(8): 722-727.