

L-乳酸脱氢酶基因克隆及功能分析

李剑 唐贊 梁凤来 张心平 刘如林*

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要 构建了一株产D,L-乳酸的乳杆菌(*Lactobacillus* sp.)MD-1的基因文库。利用乳酸脱氢酶和丙酮酸裂解酶缺陷的*Escherichia coli* FMJ144作为宿主,通过互补筛选分离克隆到乳酸脱氢酶基因(*ldhL*)。核酸序列分析表明,该基因以ATG为起始密码子编码316个氨基酸残基组成的蛋白质,预测的分子量为33.84kD;5'端存在典型的启动子结构,3'端的终止子是不依赖于 ρ 因子的转录终止子。*ldhL*编码的蛋白质有3个保守区域,其中Gly13~Asp50保守区域是NADH的结合位点,Asp73~Ile100和Asn123~Arg154保守区是酶的活性部位。该*ldhL*和其他乳杆菌的*ldhL*基因和编码的氨基酸序列相似性较低,核苷酸序列相似性最高仅为64.1%,氨基酸序列相似性最高仅为68.9%,是新的L-乳酸脱氢酶基因。

关键词 乳杆菌(*Lactobacillus* sp.)MD-1, L-乳酸脱氢酶基因, 互补筛选, 功能分析

中图分类号 Q93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0725-05

乳酸在食品、医药、化工、环保等领域有广泛的用途。L-乳酸的生产及其聚合物作为可降解塑料和医用材料的研究日益深入。D-乳酸的聚合物可以用于药物的缓释技术和可降解环保农药的前体物。因此,高光学纯度的D-乳酸或L-乳酸均具有广阔的应用前景^[1]。

乳酸脱氢酶(LDH)是以NADH为辅酶,将丙酮酸经过生化反应生成乳酸,因此LDH是乳酸菌合成乳酸的关键酶。产D,L-乳酸的乳杆菌中存在L和D两种依赖NADH的LDH,分别催化丙酮酸生成L-乳酸和D-乳酸。作者筛选到一株产DL-乳酸的乳杆菌(*Lactobacillus* sp.)MD-1,能在48℃含200g/L葡萄糖的发酵液中快速生长并生产乳酸,72 h产量可达

140g/L以上。如果使乳杆菌的D-乳酸脱氢酶基因(*ldhD*)缺失,则只生产高光学纯度的L-乳酸(理论上光学纯度可达到100%),同时可以大幅提高L-乳酸产量。反之,如果使L-乳酸脱氢酶基因(*ldhL*)缺失,则生产高光学纯度的D-乳酸。

本文报道了*Lactobacillus* sp. MD-1菌株的*ldhL*序列,同时对*ldhL*及编码的蛋白质的一级结构进行了初步分析。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

本文所用的菌株和质粒见表1。质粒pJDC9、菌株*E. coli* FMJ144由Jean Delcour教授惠赠。

表1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Characteristic(s)	Source or reference
<i>Lactobacillus</i> sp. MD-1	Wild-type strain	this study
<i>E. coli</i>		
FMJ144	Δldh pflz: <i>Cam</i> ^r <i>trpR his-29(Am)</i> <i>pro-2 aryl-427 deoB arc tsx IN(rrnD-rrnE)</i> <i>lacY</i>	2
TG1	<i>suoE hsdΔ5 thiΔ(lac-proAB)F'</i> (<i>traD36</i>) <i>ProAB</i> ^r <i>lacF</i> <i>lacZΔM15</i>	3
Plasmid		
pJDC9	<i>Em</i> ^r ; <i>ldhZ</i>	4
pLZD3083	<i>Em</i> ^r ; pJDC9 with a 3.11 <i>Bam</i> H I fragment from strain MD-1	this study

Em^r, *Ap*^r and *Cm*^r indicate resistance to erythromycin, ampicillin, and chloramphenicol, respectively

收稿日期:2004-03-08,修回日期:2004-05-31。

* 通讯作者。 Tel: 86-22-23505967; Fax: 86-22-23505967; E-mail: meor@nankai.edu.cn

1.2 培养基和培养条件^[5]

Lactobacillus sp. MD-1: 接种于 MRS 培养基中, 48℃ 培养 16h。*E. coli*: TG1 用 LB 培养基培养, FMJ144 用 LB 培养基和 M9 培养基(葡萄糖 0.4% 和酪蛋白水解物 0.2%)培养。红霉素(Em)、氯霉素(Cm)工作浓度分别为 250μg/mL、50μg/mL。IPTG 终浓度为 0.1μmol/L。

1.3 DNA 提取及纯化

基因组 DNA 提取及纯化参见文献[5]; 质粒提取方法参见文献[6]。

1.4 基因文库的构建

将 *Lactobacillus* sp. MD-1 的基因组 DNA 用 *Bam*H I 不完全消化, 得到约 2~6kb 的部分消化片段; 用 *Bam*H I 酶切 pJDC9, CIAP 去磷酸化, 回收 pJDC9; 连接菌株 MD-1 的基因组 DNA 片段和去磷酸化 pJDC9; 将重组质粒电转化到 *E. coli* FMJ144 中, 得到 *Lactobacillus* sp. MD-1 的基因组 DNA 文库。

1.5 互补筛选

E. coli FMJ144 是乳酸脱氢酶(LDH)和丙酮酸裂解酶缺陷的突变株, 在厌氧条件下不能生长。如果将带有乳酸脱氢酶基因(*ldh*)的重组质粒转入 *E. coli* FMJ144 中表达乳酸脱氢酶(LDH), *E. coli* FMJ144 将在厌氧条件下恢复生长。利用菌株 FMJ144 的这种特性, 将电转化的 *E. coli* FMJ144 细胞涂布在含有红霉素(Em)的 M9 培养基平板上, 厌氧条件下 37℃ 培养 168h 以筛选阳性克隆。提取阳性克隆的重组质粒, 进行酶切分析, 并转化到 *E. coli* FMJ144 中进行复筛; 同时进行阳性克隆的乳酸脱氢酶酶活性及类型分析。

1.6 乳酸脱氢酶粗蛋白的制备

蛋白质粗提物的制备: ①将阳性克隆接种到 M9 液体培养基中, 37℃ 静置培养 48h。然后离心收集菌体, 用 0.5mol/L 的磷酸缓冲液悬浮菌体。②超声波破碎细胞: 采用 YJ92-II 超声波细胞粉碎机破碎细胞, 其细胞破碎功率为 400W, 工作时间 5s, 间隔 15s, 共 10 次。③14 000r/min 离心 30min, 其上清液即蛋白粗提物。④蛋白含量用福林酚法测定^[7]。

1.7 乳酸脱氢酶的酶活及酶类型的分析

1.7.1 乳酸脱氢酶活性分析: 参见文献[5]。酶活单位的定义(u): 在 25℃、pH7.0 条件下, 1min 氧化 1μmol NADH 的酶量为 1 单位。

1.7.2 乳酸脱氢酶类型分析: ①在 3mL 反应体系中分别加入 100μL 蛋白质粗提液、1.5mg 丙酮酸、12.6mg NADH 以及 2.9mL pH7.0 的磷酸缓冲液。

②25℃ 水浴 30min。③用 SBA-40C 葡萄糖-乳酸生物传感器分析反应体系中反应产物乳酸的含量, 从而分析阳性克隆的粗蛋白质液中的乳酸脱氢酶的类型。SBA-40C 葡萄糖-乳酸生物传感器分析的原理: 将乳酸氧化酶固定在膜上, 该酶特异性作用于 L-乳酸, 通过生化反应: L-乳酸 + O₂ + H₂O $\xrightarrow{\text{乳酸氧化酶}}$ 丙酮酸 + H₂O₂ 得到 H₂O₂, 其中 H₂O₂ 再透过酶膜的内层与白金-银电极接触产生电流信号, 得到 L-乳酸的分析结果。

1.8 序列测定与分析

DNA 序列测定由 TaKaRa 公司完成。DNA 序列分析采用 Artemis v5, 蛋白质序列分析采用 Dnaman 4.0 和 Clustal X 1.8 以及 NCBI 相关数据库和软件。

1.9 基因扩增

根据测序及分析结果, 设计出以下引物: 上游引物 5'-gegcg ~~cataatgttgcactctaaaacgtc-3'~~_{AdeI}-3', 下游引物 5'-~~ggatcc~~_{BamH I} ttaaaggttgtatccatgc-3'。扩增条件: 94℃ 45s, 56℃ 45s, 72℃ 90s, 30 个循环。

2 结果与讨论

2.1 *Lactobacillus* sp. MD-1 乳酸脱氢酶基因的克隆

以 *E. coli* FMJ144 作宿主、pJDC9 作载体, 构建了约有 20 万个重组质粒的基因组文库。采用电转化的方法将重组质粒转入 *E. coli* FMJ144 中, 将涂有转化产物的 M9 平板置于 37℃ 厌氧培养 168h, 在厌氧条件下筛选到 60 个阳性克隆。将阳性克隆划线在含有红霉素和氯霉素的 LB 平板上, 37℃ 厌氧培养 168h, 复筛得到 2 个阳性克隆 b 和 c。

2.2 阳性克隆的鉴定

提取阳性克隆的粗蛋白物, 以丙酮酸作底物, NADH 为辅酶测定 LDH 活力(见图 1)。结果表明, 阳性克隆 b 和 c 有明显的 LDH 活力, 活力分别为 6.4u/mg(protein) 和 4.64u/mg(protein), 其酶的比活力与菌株 MD-1 的 LDH 酶活力几乎相同; 而 *E. coli* FMJ144/pJDC9 的蛋白质粗提物的酶活力仅为 b 和 c 的 0.6%~0.7%, 说明阳性克隆 b 和 c 的重组质粒具有菌株 MD-1 完整的乳酸脱氢酶基因。将阳性克隆蛋白粗提物加入到具有丙酮酸和 NADH 的磷酸缓冲液中进行反应, 测定 LDH 的类型(见表 2)。结果表明阳性克隆 c 和菌株 MD-1 的反应液中能检测到大量的反应产物 L-乳酸。说明阳性克隆 c 具有 L-乳酸脱氢酶活力, 证明了阳性克隆 c 的重组质粒中具

有菌株 MD-1 的 *ldhL*, 其表达的 LDH 属于 L 型。将筛选得到的阳性克隆进行部分限制酶分析(图 2)。表明在阳性克隆 c 中, pJD9 的 *Bam*H I 位点插入有大小约为 3.3kb 的菌株 MD-1 基因组片段, 将此重组质粒命名为 pLZD3083。

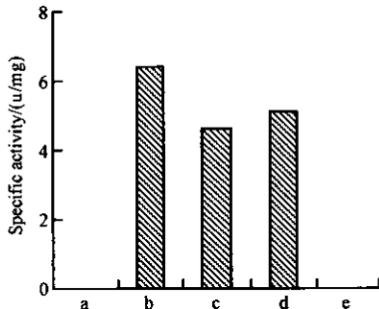


图 1 乳酸脱氢酶活性分析

Fig. 1 Analysis of LDH activity

a: blank; b and c: positive clones; d: *Lactobacillus* sp.
MD-1; e: control (*E. coli* FMJ144/pJD9)

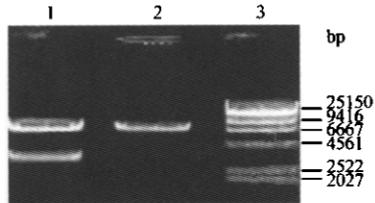


图 2 重组质粒的酶切图谱

Fig. 2 Analysis of recombinant plasmid by *Bam*H I digestion

1: positive clone c; 2: *E. coli* FMJ144/pJD9;
3: λ/Hind III DNA marker

表 2 阳性克隆的乳酸脱氢酶类型的测定

Table 2 The type of lactate dehydrogenase in positive clones

Sample	Blank	<i>E. coli</i> FMJ144 /pDC9	MD-1	Clone b	Clone c
L-lactic acid / (mg/mL)	0	0	39	0	43

2.3 L-乳酸脱氢酶基因的序列分析

将 pLZD3083 中菌株 MD-1 基因组 DNA 插入片段测序并将测出的全部序列用相关软件进行分析, 得到 2 个开放阅读框架 ORF P 和 ORF L。其中 ORF P 编码的蛋白质是一个未知蛋白, ORF L 编码 L-LDH。该 *ldhL* 核苷酸序列(中国专利申请号为 200410018706.7, GenBank Accession No. AY566287)如图 3 所示。分析表明, 菌株 MD-1 的 *ldhL* 大小约有 1260bp; 开放阅读框架编码 316 个氨基酸, 编码的蛋白质分子量约为 33.84kD, pI 值为 5.37。*ldhL* 以 172 位点的 ATG 为起始密码子, 以 1119 位点的 TAA

为终止密码子。起始密码子上游有推测的典型核糖体结合位点 GGGAGA, 位于起始密码子上游的第 6 个碱基; 该区域的中心 GGAGA 到翻译起始位点的距离是 7 个碱基, 与 *E. coli* 和 *Bacillus subtilis* 中已证实的最适距离 7~9bp 相一致^[3, 5]。*ldhL* 推测的 SD 框 GGGAGA 和 *L. plantarum* 16S rRNA (EMBL 序列号, M58827) 3' 端的 3'-UUCCUC-5' 碱基互补。从而也可以说明菌株 MD-1 和植酸乳杆菌 (*L. plantarum*) 在系统发育中亲缘关系较近^[7]。在 5' 端非编码区中还有一个推测的 -35 区 TTGGTGA, 和推测的 -10 区 TATAAT 相距 24nt, 共同构成了 *ldhL* 的启动子。在 *ldhL* 的 3' 端非编码区中存在典型的回文结构 AAAATTATTTCGACTGAAAAGTCCGGACAAAGAA-TTTT, 形成了 *ldhL* 的典型的转录终止子, 其二级结构的自由能 $\Delta G = -41.73 \text{ kcal/mol}$ 。推测的终止子具有一个 T 碱基簇, 在转录为 mRNA 后, 其 mRNA 3' 端能形成茎环状的发夹结构, 它可使 RNA 聚合酶的移动停止或减弱。在终止子反向重复序列的下游有 6~8 个 T 构成的 T 碱基簇, 因此这段终止子转录后形成的 RNA 具有与 A 对应的 6~8 个 U, 是使 RNA 聚合酶脱离模板的信号。这种典型的 3' 端终止子结构表明菌株 MD-1 的 *ldhL* 的终止子是不依赖于 Rho 蛋白质辅助因子的终止子^[8]。对乳杆菌 MD-1、干酪乳杆菌 (*L. casei*)、瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*)、植酸乳杆菌 (*L. plantarum*) 和罗伊氏乳杆菌 (*L. reuteri*) 的 *ldhL* 核苷酸序列进行比对, 结果表明菌株 MD-1 的 *ldhL* 与其他菌株 *ldhL* 的相似性为 56%、57.23%、64.12% 和 60.24%, 相似性较低。

ATTAATAATCTGAATCAGGCCAGATTGGCTAGATACCAATTGAGCAATCCCGAGACGCC 60
-35
CTCACAGCGTATGCTCATCCTCTAAATCAAATTATTATGATGCGATTGTGAAAATCAA 120
-10 RBS
AACGACCCGTGCGATAATITATACAGATAAAAAAGATTGGAGATGATTATGTTGACT 180
M L T
CTAAACAGCTAAAGTAGCATTAATCGGTGACGGCGCGGTAGGTTCTTCATACGCC 240
L K R Q K V A L I G D G A V G S S Y A F

T L Q K T T K D G M D Q L *
ACGCTTCAAAAGACCACTAAAGACGCCATGGATCAACTTATTGAATCATCTAAACAGAT 1140
CAAAATTATTTTGACTCAAAGTCCGGACAAAGATTGGCGCGATTTTTATGGGTA 1200
CAGCACATGAACTCTAACCAACAATTATTTAAACGTTGAAAACAGCAACTAATTTC 1260

图 3 *ldhL* 的核苷酸序列及推测的氨基酸序列(部分序列)

Fig. 3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *ldhL* (GenBank Accession No. AY566287)

2.4 D-乳酸脱氢酶的氨基酸序列分析

根据 *ldhL* 推测的氨基酸序列和 GenBank 中的干酪乳杆菌、瑞士乳杆菌、植酸乳杆菌和罗伊氏乳杆菌 L-LDH 的氨基酸序列用软件 Clustal X 1.8 进行比

对(图4)。结果表明,L-LDH有3个保守区域,即Gly13~Asp50区、Asp70~Ileu100区和Asn123~Arg154区。其中Gly13~Asp50区具有典型的Gly13-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Gly-(19Xaa)-Asp50结构,这个典型的结构是所有依赖NADH的LDH所共有的保守序列,Asp50氨基酸残基决定了该L-LDH的辅酶是NADH而不是NADPH。如果Asp50发生突变,则L-LDH也能以NADPH为辅酶^[5, 9, 10]。Asp70~Ileu100区存在一个活性位点环(active site loop)Ala-Xaa-Gln-Cys-Pro,Gln85氨基酸残基能识别底物,Arg91氨基酸残基能在催化过程中极化底物,使底物羧基化^[12]。

Asn123~Arg154区中Asp150-Xaa-Xaa-Arg154结构形成了催化反应的离子交换系统^[11, 12]。此外还有His178、Asp150、Thr231、Asp179和Ala220等保守的氨基酸残基参与酶的催化反应^[12]。通过比对发现菌株MD-1的L-LDH与干酪乳杆菌、瑞士乳杆菌、植酸乳杆菌和罗伊氏乳杆菌的L-LDH相似性分别为65.33%、55.56%、68.89%和63.17%,最高仅为68.89%,并且菌株MD-1的ldhL与其他乳杆菌的相似性最高仅为64.12%,相似性也较低。因此,菌株MD-1的ldhL基因是一个新的L-乳酸脱氢酶基因。

a	-MASITDKDHQKVILVGDGAVGSSYAYAMVLQGIAQEIGIVDIFKDKTKGDA1DLSNALP	59
b	-MA--REEKPRKVILVGDGAVGSTFAFSMVQQGIAEELGI1DIAKEHVEGDA1DLADATP	57
c	-MS--SMPNHQKVVLVGDGAVGSSYAFAMAQQGIAEEFV1VDVKDRKGDA1DLEHAQA	57
d	MLT----LKRQKVAL1GDGAVGSSYAFAMMQQGLGEEFV1VDVKERTVGDALDLEDAQV	56
e	-MS---KNHQKVVLVGDGQVGSAAYALVQQGLAELAIVNLSKEQAEQGDA1DLEDATV	55
	: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
a	FTSPKKIYSAEYSDAKADLVVITAGAPQKPGETRRLDVKNLKLKSIVDP1VDSGFNG	119
b	WTSPKNIYAADYPDCDKADLVVITAGAPQKPGETRRLDVKNLKLSSIVEPVVYESGFEQ	117
c	FTAPKKIYSGEYSDCDKADLVVITAGAPQKPGESRRLDVKNNLNLLSSIVEPVVDSGFQD	117
d	FTSPKHVYSGDYKDCQDADLA1ITAGAPQKPGETRRLDVKNLKLIMKAI1TPLVDSGFKG	116
e	FTAPKQVYQADHIACADADLVVICAGAAQPKGETRRLDVGNLNEIMKQITKS1MATGFQDG	115
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
a	IFLVAANPVDILTYATWKLSGFPKNRVCGSTSLLDTARFRQSIAEMVNVDARSVHAYIMG	179
b	IPLVVANPVDILTHATWRMSGFPKDVRV1GSGTSLLDTGRLQKV1GKMEVDPSSVNAWLG	177
c	IFLVAANPVDILTYATWKPSGFPKDVRV1GSGTSLLDSSRLRVALGKQFNVDPRSVDAYIMG	177
d	IIVVAANPVDILTYAAQKFSGFPKDVRVFGSGTSLLSARLRLVALGKQLNLPQSI1DAYILG	176
e	ILLLATNPVDVLYAVQK1ISGLPASRV1SSGTSLLSARLRLALAKLGVSPLDISANVMA	175
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
a	EHGDTTEFPVWSHANIGGTIAEWWKAHPEIKEDKLVKMFEDVRDAAYE1IKLKGTAFYGI	239
b	EHGDTTEPAWSYNNVAGVKVADWVKAH-NMPESKLEDIHQEYKDMAYDI1INKKGATFYGI	236
c	EHGDESEFAAYSTAT1GTRPVDRVAKEQ-GVSDDEDLAKLEDGVRNKAYDI1INKKGATFYGI	236
d	EHGDESEFAAYSAARVGGEFPFLDVAKRA-GLSDDDLATIEDQVRHKAYEI1NRKGATFYGV	235
e	EHGDESEFAAYSSATVGCKPLLQICEEQ-GISNDELLKIEDDVRHKAYEI1NRKGATFYGV	234
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
a	ATALARISKAILNDENAVLPLSVYMDGQYGLNDIY1GTPAVINRNCIQNILEIPLTDHEE	299
b	GTASAMIAKAILNDEHRVLPPLSPVMDGEYGLHDHLIGTPAVVGRKGLEQVIEMPLSDKEQ	296
c	GTALMRISKAILRDENAVLPVGAYMDGQYGLNDIY1GTPAVIGGTGLKQIIIESPLSADEL	296
d	ATCLMRISRAILHDENTILPVGAPMNGEYGLNDVY1GSPAVVNGSGIAKVI1EVPLNDKEK	295
e	ATCLMRITRAILRDENAVLPVGAY1DGEYGIKDNYLGPavinASGISKVIEVPLNERES	294
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
a	ESMQKSASQLKKVLTDFAFKNDIETRQ-----	326
b	ELMTASADQLKKVMDKAFKETGVVRQ-----	323
c	KKMQDCATLKKVLNDGLAELENK-----	320
d	AAMKASAETLQKTTKDGMDQL-----	316
e	EAMTKSAEALKKIATDGMTKVGLVNYLIK-----	323
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

图4 氨基酸序列比对(采用Clustal X 1.8分析)

Fig. 4 Comparison (Clustal X 1.8) of amino acid sequence on L-LDH

a: *L. casei* (AAA25245); b: *L. helveticus* (CAB03618); c: *L. plantarum* (CAA50277);
d: *Lactobacillus* sp. MD-1; e: *L. reuteri* (AAI03944); * identical amino acid

REFERENCES(参考文献)

- [1] Bustos G, Moldes AB, Alonso L et al. Optimization of D-lactic acid production by *Lactobacillus corniformis* using response surface methodology. *Food Microbiology*, 2004, 21: 143~148
[2] Fairoz Mat-Jan, Kiswar Y Alam, David P Clark. Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J Bacteriol*, 1989, 171(1):342~348

- [3] Thierry Ferain, Dominique Garmyn, Nathalie Bernard et al. *Lactobacillus plantarum* ldh gene: overexpression and deletion. *J Bacteriol*, 1994, 176(3):596~601
[4] Chen Jau-Der, Donald A Morrison. Construction and properties of a new insertion vector, pJDC9, that is protected by transcriptional terminators and useful for cloning of DNA from *Streptococcus pneumoniae*. *Gene*, 1988, 64:155~164
[5] Nathalie Bernard, Thierry Ferain, Dominique Garmyn et al. Cloning

- of a lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by complementation in *Escherichia coli*. *FEBS*, 1991, 290:61 - 64
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [7] Dominique Garmyn, Thierry Ferain, Nathalie Bernard *et al.* Cloning, nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *Pediococcus acidilactici* L-(+)-lactate dehydrogenase. *Gene*, 1995, 61 (1):266 - 272
- [8] Chen SF(陈三凤)、Liu DB(刘德彪). Modern Microbiology Genetics(现代微生物遗传学). Beijing: Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2003
- [9] Nathalie Bernard, Keyji Johnsen, Holbrook J John *et al.* D175 Discriminates between NADH and NADPH in the coenzyme binding site of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* D-lactate dehydro-
- nase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1995, 208(3): 895 - 900
- [10] Llanos RM, Hillier AJ, Davidson BE. Cloning, nucleotide sequence, expression and chromosomal location of *ldh*, the gene encoding L-(+)-lactate dehydrogenase, from *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 1992, 174: 6956 - 6964
- [11] Sunil Kochhar, Peter E Hunziker, Phaik Leong-Morgenthaler *et al.* Evolutionary relationship of NAD⁺-dependent D-lactate dehydrogenase: comparison of primary structure of 2-hydroxy acid dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1992, 184(1): 60 - 66
- [12] Dale B Wigley, Steven J Gamblin, Johan P Turkenburg *et al.* Structure of a ternary complex of an allosteric lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol*, 1992, 223: 317 - 335

Cloning and Function Analysis of L-lactate Dehydrogenase Gene from *Lactobacillus* sp. MD-1

LI Jian TANG Yun LIANG Feng-Lai ZHANG Xin-Ping LIU Ru-Lin*

(Life College, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract It was constructed that a genomic DNA library from *Lactobacillus* sp. MD-1 yielding D,L-lactic acid. The gene encoding L-lactate dehydrogenase (L-LDH) was cloned from the genomic library of strain MD-1 by complementation in *E. coli* FMJ144 which was lactate dehydrogenase and pyruvate-formate lyase double defective mutant. The nucleotide sequence of the *ldhL* gene predicted a protein of 316 amino acid starting with ATG. The putative molecular weight of the L-LDH amino acid sequence was 33.84kD. A putative typical promoter (-35 and -10 boxes) had been observed in the 5' noncoding region. An rho-independent transcriptional terminator has been observed in the 3' noncoding region. Three highly conserved regions (Gly13 ~ Asp50, Asp73 ~ Ileu100 and Asn123 ~ Arg154) with several conserved residues had been identified. Gly13 ~ Asp50 was NADH-binding site domain. Asp73 ~ Ileu100 and Asn123 ~ Arg154 were reported to be the active site domains. The *ldhL* and the L-LDH of *Lactobacillus* sp. MD-1 showed the low identity and similarity with other *Lactobacilli*, and the highest percentage were 61.9% and 68.9% respectively. All the above indicated this gene is a novel *ldhL*.

Key words *Lactobacillus* sp. MD-1, L-lactate dehydrogenase gene, complementation, function analysis

Received: 03-08-2004

* Corresponding author. Tel: 86-22-23505967; Fax: 86-22-23505967; E-mail: meor@nankai.edu.cn