

新型预苯酸脱氢酶基因的克隆和生物信息学分析*

Cloning and Bioinformatics Analysis of a Novel Prephenate Dehydrogenase Gene from a Soil Metagenome

赵高超,古恒森,谢雨龙,黄捷,陈高,武波,蒋承建**

ZHAO Gao-chao, GU Heng-sen, XIE Yu-long, HUANG Jie, CHEN Gao, WU Bo, JIANG Cheng-jian

(微生物及植物遗传工程教育部重点实验室,广西大学生命科学与技术学院,广西南宁 530004)
(The Key Laboratory of Ministry of Education for Microbial and Plant Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要:采用基于序列特异性直接测序策略,从所构建的碱性污染土壤宏基因组文库中分离得到一个编码预苯酸脱氢酶的新基因 *pdhE-1*,并对新基因进行生物信息学分析和保守区域特征研究。结果表明,*pdhE-1* 编码一个由 287 个氨基酸编码组成的多肽。在 DNA 水平上,该基因与来自新鞘氨醇杆菌属(*Novosphingobium* sp.)的预苯酸脱氢酶相似性较高,为 82%;在氨基酸水平上,与来自运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)的预苯酸脱氢酶序列相似性为 65%,一致性为 42%。新型预苯酸脱氢酶基因 *pdhE-1* 的克隆和生物信息学分析研究为进一步完成酶基因的功能鉴定奠定了基础。

关键词:宏基因组文库 预苯酸脱氢酶 基因 多肽

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2013)03-0239-05

Abstract: The metagenomic library technology provides an effective platform for the mining of unknown genes. A novel prephenate dehydrogenase gene designated as *pdhE-1* was cloned by sequence-based screening of a plasmid metagenomic library from uncultured alkaline-polluted microorganisms. The gene had an open reading frame of 864 base pairs and encodes a 287 amino acid polypeptide with a predicted molecular mass of about 31 kDa. The deduced amino acid sequence comparison and phylogenetic analysis indicated that *pdhE-1* and other putative prephenate dehydrogenase, were closely related. The possible ORF shares 82% identical in the level of DNA with the prephenate dehydrogenase of *Novosphingobium* sp. PP1Y and 42% identical and 65% similarity at amino acid level with the prephenate dehydrogenase of *Zymomonas mobilis* according to the BLAST program. The bioinformatic analysis above showed that the novel enzymes can be isolated from soil metagenome. The findings indicated the advantage of metagenomic library in cloning novel prephenate dehydrogenase genes through sequence-based screening using the *E. coli* host.

Key words: metagenomic library, prephenate dehydrogenase, gene, peptide

预苯酸脱氢酶(Prephenate dehydrogenase, EC 1.3.1.12)是一类在 L-酪氨酸生物合成代谢中起关

键作用的脱氢酶,其在辅酶 NAD(P)⁺的参与下,能够催化预苯酸氧化脱羧生成对羟基苯丙酮酸,对羟基苯丙酮酸通过转氨作用生成 L-酪氨酸^[1]。TyrA 蛋白家族是由 L-酪氨酸合成代谢分支途径中的脱氢酶组成^[2],是芳香族氨基酸 L-酪氨酸生物合成代谢中的关键酶,具有 2 种酶活性,而预苯酸脱氢酶活性为其中之一^[3]。芳香族氨基酸合成途径只存在于细菌、真菌和植物中,而哺乳动物体中不存在,该代谢途径

收稿日期:2013-01-30

修回日期:2013-04-10

作者简介:赵高超(1986-),男,硕士,主要从事微生物遗传学研究。

* 国家自然科学基金项目(项目编号:21262003)资助。

** 通讯作者:蒋承建(1980-),男,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事微生物基因资源开发研究。Email:jiangcj0520@gmail.com。

中特有的 TyrA 蛋白家族成员可作为研发新药的靶位点,其特异性抑制剂可被开发为新型广谱抗菌药物和除草剂^[3]。L-酪氨酸能够改善记忆和精神警觉性,控制抑郁和焦虑^[4],对于苯丙酮尿症患者,低-L-苯丙氨酸高 L-酪氨酸蛋白替代品是一个重要的膳食组成部分^[5]。此外,L-酪氨酸也是黑色素、左旋多巴和 P-羟基苯乙烯等多种高价值化合物的原料,被应用于工业生产^[6]。

未培养微生物在自然界土壤栖息群中占 99% 以上的资源^[7],利用宏基因组技术从土壤中提取分离纯化 DNA 构建文库分离筛选新基因,相对纯培养技术而言,是一种简捷有效的分离酶基因的方法和途径^[8]。本研究采用基于序列特异性直接测序策略,从前期实验室构建的碱性污染土壤宏基因组文库^[9]中成功分离得到一个预苯酸脱氢酶新基因 *pdhE-1*,并完成了新基因的生物信息学分析和保守区域特征研究。本工作为进一步完成新酶的功能鉴定奠定了基础,对深入挖掘未培养微生物预苯酸脱氢酶基因资源具有重要的理论和实践意义。

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器和试剂

分光光度计 UV mini-124 为 SHIMADZU 产品;恒温水浴锅 OSE-H 为天根生化科技(北京)有限公司产品;离心机为 Eppendorf 公司产品;pH 计 pH S-3C 为奥豪斯仪器(上海)有限公司产品;PCR 仪为 EDC-810 东胜创新生物科技有限公司产品。*Pst* I 和 *Hind* III 等限制性内切酶均购自 Fermentas 公司;T4DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;Pfu DNA 聚合酶购自天根生物有限公司;质粒提取试剂盒购自上海生物工程有限公司;胶回收及 PCR 产物纯化试剂盒购自 Bio Flux 公司;各种酶制剂购自 Promega 公司;实验中各种化学试剂均为国产分析纯。

1.2 菌株来源

E. coli DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3) pLacI 以及 pETBlue-2 载体和质粒载体 pGEM-3Zf(+) 等均为本实验室课题组保存。

1.3 文库来源

本研究所用的文库为课题组前期已构建的碱性污染土壤宏基因组文库^[9]。该文库以 pGEM-3Zf(+) 为克隆载体,包含大约 30000 个克隆,外源 DNA 插入片段平均大小为 3.5 kb 左右。

1.4 DNA 纯化、外源载体制备和质粒转化

质粒 DNA 的制备采用上海生物工程有限公司质粒提取试剂盒操作,DNA 纯化采用 Bio Flux 公司

的纯化试剂盒,外源载体采用 *Pst* I 和 *Hind* III 限制性内切酶进行双酶切制备,质粒 DNA 对大肠杆菌感受态细胞的转化采用 CaCl₂ 化学转化法。

1.5 酶基因分离筛选

在 LA 培养基中添加 Amp 抗生素至终浓度为 100 μ g/ml,涂板,于 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 12 h 左右,观测克隆生长情况,随机挑取大量阳性克隆送交测序,将测序后序列用 ORF Finder (Open Reading Frame Finder)软件分析 ORF(Open Reading Frame),并基于 BLAST 进行相似性搜索,同时结合 GenBank 数据库进行初步分析。

1.6 ORF 扩增和表达载体构建

本研究中 PCR 引物委托上海生物工程有限公司合成。根据生物信息学分析的序列特征,设计以下引物扩增目标 ORF:上游引物:5' -CTTCTG-CAGGAATTCGTCGCCAGGGT-3';下游引物:5'-CTGAAGCTTGCCCGCGTGATCGCTGC-3'。选择载体 pETBlue-2 上的 *Pst* I 和 *Hind* III 两个酶切位点,在上下游引物中分别引入 *Pst* I 和 *Hind* III 酶切位点(下划线部分)。PCR 仪设定运行程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 40 s,58 $^{\circ}$ C 1 min 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,共计 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min,扩增得到 850 bp 左右的 DNA 片段。用 PCR 产物纯化试剂盒纯化后,进行限制性内切酶 *Pst* I 和 *Hind* III 双酶切,然后与限制性内切酶 *Pst* I 和 *Hind* III 双酶切后的 pET-Blue-2 载体进行连接,转入大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中。通过蓝白筛选,挑取阳性克隆提取质粒,并进行限制性内切酶 *Pst* I 和 *Hind* III 双酶切及琼脂糖凝胶电泳验证,筛选得到重组质粒,送交上海生物工程有限公司测序。

1.7 DNA 序列分析、数据库查找及基因结构鉴定

利用在线蛋白质翻译工具 ExPasy (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>)进行蛋白质翻译。在 NCBI(the National Center for Biotechnology Information)Entrez 页面的蛋白质和核酸数据库在线相关软件进行序列分析比较(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。利用 BLAST 2.0 软件进行序列相似性的查找。用 Vector NTI(Informax, North Bethesda, MD, USA)中的 Align X 组件进行同源蛋白序列分析,评分矩阵为 blosum62mt2。通过推断出的氨基酸序列比较,一种编码新型延胡索酸水合酶的基因(*fumF*)得到鉴定和进一步定性研究。并以 Neighbor-Joining 计算模型为基础的 Molecular Evolutionary Genetics Analysis 4.1 (MEGA, Version 4.0)软件构建了进化树,采用引导值评估进化树的可靠

靠性为 1000 次重复验证。

1.8 核苷酸序列号

已将 *pdhE-1* 核苷酸序列递交到 GenBank 数据库中, 登录号为 JX303334。

2 结果与分析

2.1 预苯酸脱氢酶基因的克隆

本研究在碱性污染土壤宏基因组文库中采用基于序列特异性直接测序策略, 发现一个可能的阳性克隆 pGXAL10028, 其携带的外源 DNA 片段可能包含一个新的预苯酸脱氢酶基因。提取质粒 pGX-AL10028, 以其为 PCR 模板进行扩增, 扩增后 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 大小为 850 bp 左右(图略)。将 PCR 产物酶切后连接质粒 pETBlue-2, 转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆子进行质粒提取, 经 *Pst* I 和 *Hind* III 酶切电泳检测后, 送交华大基因生物公司进行测序。

2.2 pGXAL10028 外源 DNA 序列的生物信息学分析

重组载体 pGXAL10028 中的外源 DNA 片段大小为 1026 bp, 通过 ORF Finder 和 Vector NTI Advance 对外源 DNA 片段序列进行 ORF 分析, 发现存在一个可能编码 TyrA 蛋白家族中预苯酸脱氢酶(PDH)的 ORF。该 ORF 含有 861 个碱基, 可以编码一个由 287 个氨基酸组成的多肽。采用 NCBI 提供的 BLAST 工具进行序列相似性检索, 发现该 ORF 在 DNA 水平上, 与来自新鞘氨醇杆菌属(*Novosphingobium* sp.) PP1Y (GenBank: FR856862.1) 的全基因组测序序列中标注为预苯酸脱氢酶编码序列的 DNA 序列的一致性为 82%; 在氨基酸水平上, 与来自运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*) 的预苯酸脱氢酶(UniProtKB/Swiss-Prot: Q04983.2) 的相似性最高, 为 65%, 一致性为 42%。与来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 的预苯酸脱氢酶(UniProtKB/Swiss-Prot: P20692.2) 的一致性为 34%, 相似性为 53%。在 PDB 数据库中检索通过 X 射线晶体衍射和核磁共振的方法获得了空间结构信息的相似蛋白, 其中目标 ORF 与来自超嗜热风产液菌(*Aquifex aeolicus*) 的预苯酸脱氢酶(PDB: 3GGG_D) 的一致性为 36%, 相似性为 56%, 与来自变异链球菌(*Streptococcus mutans*) 的预苯酸脱氢酶(PDB: 3B1F_A) 的一致性为 35%, 相似性为 54%。基于上述分析, 将可能的新基因命名为 *pdhE-1*。

利用在线工具 ExPASy 中的 ProtParam 和

ProtScale 软件对 *pdhE-1* 进行分析, 可知 *pdhE-1* 由 287 个氨基酸残基构成, 相对分子质量为 31kDa 左右, 理论等电点为 5.52, 不稳定指数为 39.65, 平均亲水性指数为 -0.135, 总体亲疏水性不明显。利用在线工具 SignalP 4.0 Server 对 *pdhE-1* 进行信号肽预测, *pdhE-1* 序列中无明显信号肽; 利用在线工具 TMHMM Server 2.0 对 *pdhE-1* 进行跨膜结构域预测, *pdhE-1* 无明显跨膜结构; 利用在线工具 SOPMA 预测 *pdhE-1* 的二级结构, 可知 *pdhE-1* 中 α -螺旋含量为 58.62%, 无规卷曲为 31.03%, 延伸链为 6.4%, β -转角为 3.94%; 利用在线工具 ExPASy 中的 PROSITE 软件对 *pdhE-1* 进行功能域预测, 发现 *pdhE-1* 序列中存在 PS51176 保守区域, PS51176 是预苯酸脱氢酶/arogenate 脱氢酶的保守区域。

利用软件 Vector NTI Advance 对 *pdhE-1* 进行多重序列比对(图 1), 从图 1 中可看出, *pdhE-1* 与其它预苯酸脱氢酶的氨基酸序列一致性并不高, 但是与催化功能密切相关的氨基酸残基却十分保守。*pdhE-1* 具有 His147、Gly151、Thr152、Glu153、Gly156、Ser213、His214、His217、Gly242、Gly243、Arg250 和 Trp259 等预苯酸脱氢酶的保守氨基酸残基。这些保守残基分布在 Aa-PDH 结构中 $\alpha 5$ - $\alpha 13$ 和 $\beta 6$ - $\beta 8$ 之间, 构成 Aa-PDH 的核心催化区域。

2.3 系统进化树的构建

通过构建 *pdhE-1* 的系统发育进化树(图 2) 分析发现, *pdhE-1* 与 TyrA 蛋白家族中的预苯酸脱氢酶处于同一分支。据此推断, *pdhE-1* 很可能是一种新的预苯酸脱氢酶, 这个结论也有待于进一步的酶学特性分析确证。

3 讨论

基于传统培养的研究方法只能反映出土壤中的极少一部分微生物, 而大部分的微生物还不能实现实验室培养, 使得微生物资源不能够被挖掘和开发。宏基因组学伴随着基因组学和分子生物学的技术成熟而出现, 突破了传统培养的瓶颈, 促进了未培养微生物资源的开发, 为探索新功能基因提供了技术平台, 进而揭示了环境中微生物的多样性。基于未培养技术发现的新基因越来越多, Lee SW 等人从土壤宏基因组文库中克隆出一个脂肪酶新基因, 通过相似性搜索, 其序列一致性最高为 48%^[10]。Roh C 等人从未培养文库 PCR 克隆出血红素结合域的细胞色素 b(5) 新基因, 并在大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中成功地进行了克隆和表达^[11]。本研究描述的预苯酸脱氢酶新基因也是从碱性土壤宏基因组文库中克隆所得。

		1		60
PdhE-1	(1)	-----MPSLRPVIVGGGQMCRLFEKMTLSGYQWR-----		ILEQHDWDR
Prephenate dehydrogenase(ZP_10361182.1)	(1)	-----MSFAHVAIIGLGLQGGSIGLAVRELLPDTRTSGYDLSFAHRARAVARGLVERVCDTA		
Prephenate dehydrogenase(YP_004533373.1)	(1)	-----MSFEKVAIIGLGLQGGSIGLATQEFLEPEVQITGFDLDPATRARAERGLVHQVCEIP		
Prephenate dehydrogenase(ZP_09192545.1)	(1)	-----MSFEKVAIIGLGLQGGSIGLATQEFLEPEVQITGFDLDPATRARAERGLVHQVCEIP		
Cyclohexadienyl dehydrogenase(YP_495977.1)	(1)	-----MTGASFGQVTVIGLGLLGGSIGHAVQAVLPQTTVVGYDADPDVREARGLGLAHRIDEA		
Prephenate dehydrogenase(YP_004833346.1)	(1)	-----MPFTRVAIIGLGLIGSSLARARASMETVIRVITGIDMDPAVRDTRARRLDLDDVTDHA		
Consensus	(1)	-----MSF KVAIIGLGLQGGSIGLAVREFLPEV TSGYDLDPA RARA RGLVH VCDTA		
		61		120
PdhE-1	(43)	ADIVADAGMVIIVSVPIHVTQEVIGKLPPLPKDCTIVDLASVKEFVARVLAALPQVAVI		
Prephenate dehydrogenase(ZP_10361182.1)	(58)	AEAVADADLVIFCVPPGAMGLAGEQVRHALPAGCLVSDVGSQKQAVAKALGEALPDHLVI		
Prephenate dehydrogenase(YP_004533373.1)	(58)	AEAVRDADLVIFCVPPGVMGEAAQVVDALREDALISDVGSCKQSIATALREALPDHYVI		
Prephenate dehydrogenase(ZP_09192545.1)	(58)	AEAVRDADLVIFCVPPGVMGEAAQVVDALREDALISDVGSCKQSIATALREALPDHYVI		
Cyclohexadienyl dehydrogenase(YP_495977.1)	(61)	GEAAIGSDLVIFCVPPGAMGAAAAAALPGLSVEALVSDVGSQKATVAAAALQALPGHHVI		
Prephenate dehydrogenase(YP_004833346.1)	(58)	AAVSDADLVILCVPPGALGAVAAELAEVADAVSDVGSQKSLVAAQALPQRAVVI		
Consensus	(61)	AEAVADADLVIFCVPPGVMG AAA VRPALP DALVSDVGSQKQSVAAALAEALPGHYVI		

		121		180
PdhE-1	(102)	PAHPVAGTERSGPDSGFASLFRNRWCIITPPADADPAKLEALSALWQLTGAKVEIMDARH		
Prephenate dehydrogenase(ZP_10361182.1)	(118)	PAHPVAGTENSQPDAGFAHLFRNRWCIITPPAKVDMVQLSRLVAFWEALGANVEIMTPEH		
Prephenate dehydrogenase(YP_004533373.1)	(118)	PAHPVAGTENSQPDAGFAHLFRNRWCIITPPHTDVLKLSQLVEFWEALGANVEIMDAQH		
Prephenate dehydrogenase(ZP_09192545.1)	(118)	PAHPVAGTENSQPDAGFAHLFRNRWCIITPPHTDVLKLSQLVEFWEALGANVEIMDAQH		
Cyclohexadienyl dehydrogenase(YP_495977.1)	(121)	PAHPVAGTERSGPEAGFAALFRNRWCIITPPADADPVLARLVAFWEALGARVETMDADH		
Prephenate dehydrogenase(YP_004833346.1)	(118)	PAHPVAGTENSQPEAGFATLFGRWCIITPPEDADPLAVERVAFAWRRLGADVELMDAAH		
Consensus	(121)	PAHPVAGTENSQPDAGFAHLFRNRWCIITPPEDADPVKLSRLVAFWEALGANVEIMDA H		
		181		240
PdhE-1	(162)	HDLVLAVTSHLPHLIAYTIVGTASDLEGVTESEVIKYSAGGFRDFTRIAASDPTMWRDVF		
Prephenate dehydrogenase(ZP_10361182.1)	(178)	HDLVLAVTSHLPHLIAYTIVGTASDLEDTVQGEVIKYSAGGFRDFTRIAASDPTMWRDVF		
Prephenate dehydrogenase(YP_004533373.1)	(178)	HDLVLAVTSHLPHLIAYTIVGTASDLEDVTQSEVIKYSAGGFRDFTRIAASDPTMWRDVF		
Prephenate dehydrogenase(ZP_09192545.1)	(178)	HDLVLAVTSHLPHLIAYTIVGTASDLEDVTQSEVIKYSAGGFRDFTRIAASDPTMWRDVF		
Cyclohexadienyl dehydrogenase(YP_495977.1)	(181)	HDKVLAVTSHLPHLIAYTIVGTASDLEQVTQSEVIKYSAGGFRDFTRIAASDPTMWRDVF		
Prephenate dehydrogenase(YP_004833346.1)	(178)	HDLVLAVTSHLPHLIAYTIVGTASDLEDVTRSEVIKYSAGGFRDFTRIAASDPTMWRDVF		
Consensus	(181)	HDLVLAVTSHLPHLIAYTIVGTASDLEDVTQSEVIKYSAGGFRDFTRIAASDPTMWRDVF		

		241		300
PdhE-1	(222)	LSNRDAVLDMLQRFTEDLTALQRAIRVGDGQQLFDHFTRTRAIRRSIIEEGQDDARPDPFG		
Prephenate dehydrogenase(ZP_10361182.1)	(238)	LSNKEAVLTMLQRFTEDLTALQRAIRVGDGDTLNFHFRTRATRRSIIIEEGQDDARADPFG		
Prephenate dehydrogenase(YP_004533373.1)	(238)	LTNKEAVLTMLQRFTEDLTALQRAIRVGDGDLFDFEQFARTRAIRRSIIIEEGQDDSRPDPFG		
Prephenate dehydrogenase(ZP_09192545.1)	(238)	LTNKEAVLTMLQRFTEDLTALQRAIRVGDGDLFDFEQFARTRAIRRSIIIEEGQDDSRPDPFG		
Cyclohexadienyl dehydrogenase(YP_495977.1)	(241)	LTNREAVLEMLQRFTEDLTALQRAIRKGDGAFDLDFHFRTRAIRRGIIEEGQDDARPDPFG		
Prephenate dehydrogenase(YP_004833346.1)	(238)	LNRREAVLEMLQRFTEDLTALQRAIRVGDGDMFLDFHFRTRAIRRSIIIEEGQDDAARPDPFG		
Consensus	(241)	LTNKEAVLTMLQRFTEDLTALQRAIRVGDGDLFDFHFRTRAIRRSIIEEGQDDARPDPFG		
		*		*
		301		317
PdhE-1	(282)	RSDHGG-----		
Prephenate dehydrogenase(ZP_10361182.1)	(298)	RGDHDAGE-----		
Prephenate dehydrogenase(YP_004533373.1)	(298)	RGDHENGTKKI-----		
Prephenate dehydrogenase(ZP_09192545.1)	(298)	RGDHENGTKKI-----		
Cyclohexadienyl dehydrogenase(YP_495977.1)	(301)	RSDHNGDGGGGGGGPEA		
Prephenate dehydrogenase(YP_004833346.1)	(298)	RHHA-----		
Consensus	(301)	RGDHEGG		

图 1 pdhE-1 的多重序列分析结果

Fig. 1 The analysis result of multiple sequence alignment of pdhE-1

注:高度保守氨基酸残基用“*”标注。Note:Conserved and highly similar residues are indicated by“*”.

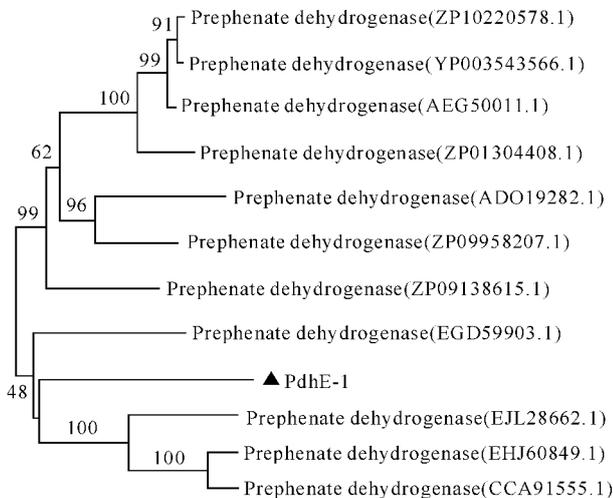


图 2 pdhE-1 的系统发育进化树

Fig. 2 The construction of phylogenetic tree of pdhE-1

在 *Aquifex aeolicus*、变异链球菌和流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*) 等纯培养细菌中,鲜见有关来自于环境未培养微生物新型预苯酸脱氢酶的研究。本文描述的预苯酸脱氢酶基于 Blast 相似性搜索分析知其氨基酸层次上与现有数据库中的基因存在着较低的一致性和相似性,基于生物信息学分析能预测其编码多肽的部分理化性质数据,可为后续实验提供理论参考。后续研究将围绕该预苯酸脱氢酶新基因在大肠杆菌系统中的过量表达等展开,完成新基因的功能鉴定,结合同源建模探索预苯酸脱氢酶基因结构与功能之间的关系,进而揭示该酶的催化机理。

4 结论

本研究采用基于序列特异性直接测序策略分离得到了一个编码预苯酸脱氢酶的新基因 *pdhE-1*。

目前国际上有关预苯酸脱氢酶的研究主要集中

多种序列分析比较结果揭示了 PdhE-1 蛋白与其它预苯酸脱氢酶的氨基酸序列一致性不高,但是与催化功能密切相关的氨基酸残基却十分保守。系统发育进化树分析结果表明 PdhE-1 与 TyrA 蛋白家族中的预苯酸脱氢酶处于同一分支,但是与家族中其他成员之间的进化距离非常远。新型预苯酸脱氢酶基因 *pdhE-1* 的克隆和生物信息学分析研究为进一步完成酶基因的功能鉴定奠定了基础。

参考文献:

[1] Carol B, Terrence D, Kaitlyn H. Cohesion group approach for evolutionary analysis of tyra, a protein family with wide-ranging substrate specificities[J]. Microbiol Mol Biol, 2008, 72(1): 13-53.

[2] Song J, Bonner C, Wolinsky M, et al. The TyrA family of aromatic -pathway dehydrogenases in phylogenetic context[J]. BMC Biol, 2005, 3: 13.

[3] Ku H K, Park S R, Yang I, et al. Expression and functional characterization of prephenate dehydrogenase from *Streptococcus mutans* [J]. Process Biochem, 2010, 45(4): 607-612.

[4] O'Brien C, Mahoney C, Tharion WJ, et al. Dietary tyrosine benefits cognitive and psychomotor performance during body cooling[J]. Physiol Behav, 2007, 90(2-3): 301-307.

[5] Neri D F, Wiegmann D, Stanny R R, et al. The effects of tyrosine on cognitive performance during extended wakefulness[J]. Aviat Space Environ Med, 1995, 66(4): 313-319.

[6] Bonuccelli U, Del Dotto P. New pharmacologic horizons in the treatment of Parkinson disease[J]. Neurology, 2006, 67(7 Suppl 2): 30-38.

[7] Cowan D A, Arslanoglu A, Burton S G, et al. Metagenomics, gene discovery and the ideal biocatalyst[J]. Biochem Soc Trans, 2004, 32(Pt 2): 298-302.

[8] Lorenz P, Eck J. Metagenomics and industrial applications[J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(6): 510-516.

[9] Jiang C, Wu B. Molecular cloning and functional characterization of a novel decarboxylase from uncultured microorganisms[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 357(2): 421-426.

[10] Lee S W, Won K, Lim H K. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 65(6): 720-726.

[11] Roh C, Villatte F, Kim B G, et al. Screening and purification for novel cytochrome b(5) from uncultured environmental micro-organisms[J]. Lett Appl Microbiol, 2007, 44(5): 475-480.

(责任编辑: 陈小玲)

(上接第 238 页 Continue from page 238)

[26] MathWorks Inc. MatLab -The language of technical computing (version 6. 1. 0. 450, release 12. 1, 1984-2001) [CP]. 2001.

[27] Yan S, Wu G. Correlating dynamic amino acid properties with success rate of crystallization of proteins from *Bacteroides Vulgatus* [J]. Cryst Res Tech, 2012, 47: 511-516.

[28] Yan S, Wu G. Possible random mechanism in crystalli-

zation evidenced in proteins from *Plasmodium Falciparum* [J]. Cryst Growth Des, 2011, 11: 4198-4204.

[29] Yan S, Wu G. Randomness in crystallization of proteins from *Staphylococcus Aureus* [J]. Protein Pept Lett, 2012, 19: 784-789.

(责任编辑: 陈小玲)