

耐放射异常球菌海藻糖合成酶基因的克隆及功能鉴定*

韦宇拓^{1,2)} 朱绮霞²⁾ 罗兆飞²⁾ 陈发忠²⁾ 李桂媛²⁾ 黄 鲲¹⁾ 黄日波¹⁾**

(¹⁾ 广西大学广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 南宁 530005;

(²⁾ 南宁中诺生物工程公司, 南宁 530003)

摘要 利用生物信息学手段, 在 GenBank 中进行氨基酸序列的同源性比较分析, 检索到来自于耐放射异常球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 基因组序列中一功能未确定的开放阅读框 (ORF), 其氨基酸序列和已报道的海藻糖合成酶的氨基酸序列有约 60% 的同源性。将这段 ORF 克隆到大肠杆菌进行表达, 并进行功能鉴定。实验表明这段 ORF 序列所编码的是一种海藻糖合成酶, 它能将麦芽糖分子转化成海藻糖分子, 以 30% 的麦芽糖为底物时能将约 65% 的麦芽糖转化成海藻糖。重组酶性质初步研究表明, 在 pH 7.0, 最佳温度 30℃ 转化麦芽糖效率最高。

关键词 耐放射异常球菌, 海藻糖合成酶, 基因克隆, 功能鉴定

学科分类号 Q78

海藻糖是一种由两个葡萄糖分子以 α, α -1-1 糖苷键连接的非还原性二糖, 广泛存在于各种微生物中^[1]。它对生物大分子和生物膜具有非特异性保护作用, 渗透压、温度等物理和化学的逆境都会引起微生物体内海藻糖的积累^[2,3]。在生物体内至少存在以下 3 种海藻糖合成酶系统^[4]: 一是由 6-磷酸海藻糖合成酶催化 UDP-葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖合成 6-磷酸海藻糖, 再在 6-磷酸海藻糖酯酶作用下生成海藻糖; 二是由麦芽糖基海藻糖合成酶作用麦芽糊精末端, 形成麦芽糖基海藻糖, 再在麦芽糖基海藻糖水解酶作用下获得单个海藻糖分子; 三是由海藻糖合成酶催化麦芽糖分子形成海藻糖分子。一种生物是否存在多种海藻糖合成系统以及如何选择海藻糖合成系统还不能确定。

本文研究利用生物信息学手段, 在 GenBank 中进行氨基酸序列的同源性比较分析发现, 耐放射异常球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 基因组序列中, 一功能未确定的开放阅读框 (ORF) 编码的氨基酸序列和已知的海藻糖合成酶氨基酸序列有 60% 的同源性, 在国际上未有关于此 ORF 功能的报道。本研究把这段 ORF 的 DNA 序列克隆到大肠杆菌进行表达, 并进行功能鉴定, 确定这段 DNA 序列为一海藻糖合成酶基因, 其编码的海藻糖合成酶能将麦芽糖转化成海藻糖。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 耐放射异常球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 菌株购自中国工业微生物保藏中心; 大肠杆菌菌株 BL21 和 JM109 由本实验室保存; 质粒 pSE380 购自 Invitrogen 公司; 限制性内切酶、LA Taq DNA 聚合酶、连接酶为 TAKARA 公司产品; 海藻糖标准样为 Sigama 公司产品; 其他试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 *Deinococcus radiodurans* 的培养及总 DNA 的提取: 将 *Deinococcus radiodurans* 接种到液体培养基中 (1% 胨, 0.5% 酵母提取物, 0.5% 葡萄糖, 0.5% NaCl, 用 NaOH 调 pH 7.4, 固体培养加 1.2% 琼脂) 30℃ 振荡培养 24 h, 然后取 1.5 ml 培养液离心收集菌体, 参照文献 [5] 提取总 DNA。

1.2.2 质粒的酶切、连接、转化均按文献 [5] 进行。

1.2.3 *Deinococcus radiodurans* 海藻糖合成酶基因的克隆和表达载体 pSE380-*tres*-rd 的构建: 根据

* 国家高技术“863”计划资助项目 (2001AA214171)。

** 通讯联系人。

Tel: 0771-3235706, E-mail: riboh@public.nn.gx.cn

收稿日期: 2004-05-27, 接受日期: 2004-06-30

GenBank 中登记号为 gi | 15807030 的 CDS 序列 (以下简称 *tres-rd*) 设计以下引物. 上游引物为 5' ATACCATGGCCCAGGCACACCCGGAGTGG 3', 下游引物为 5' ACTCTGCAGTCAATTCAACCGCAGCC-AG 3', 上游引物的 5' 端设计了 *Nco* I 酶切位点, 下游引物的 5' 端设计了 *Pst* I 酶切位点, 便于连接到表达载体 pSE380 上. PCR 条件按 94℃ 预变性 2 min, 然后 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 2 min, 完成 35 个循环后 72℃ 延伸 10 min. 扩增得到 *tres-rd* 片段用试剂盒纯化后, 用 *Nco* I 和 *Pst* I 进行消化, 然后与用 *Nco* I 和 *Pst* I 酶切过的 pSE380, 载体连接, 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞, 经提取质粒酶切电泳验证, 筛选得到重组质粒命名为 pSE380-*tres-rd*.

1.2.4 重组菌的表达和表达产物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析: 将重组质粒转化到大肠杆菌菌株 BL21 中, 同时以 pSE380 载体为对照, 挑取单菌落到含氨苄青霉素 (100 mg/L) LB 培养液中, 37℃ 振荡培养至 $A_{600} = 0.6$ 时, 加 IPTG 到终浓度为 1 mmol/L 进行诱导表达, 16 h 后取 1.5 ml 培养液离心收集菌体, 加 30 μ l 水重悬菌体, 再加等体积的 2 $\times$ 蛋白质电泳上样缓冲液, 在沸水上放置 5 min, 然后 10 000 r/min 离心 1 min, 取 5 μ l 进行 SDS-PAGE 分析.

1.2.5 海藻糖的检测: 取 1.2.4 中诱导 16 h 后的培养液 1.5 ml 离心收集菌体, 用 1.5 ml 破菌缓冲液 (2 mg/L 溶菌酶, 1% Triton X-100) 重悬菌体, 在 37℃ 振荡反应 12 h, 45℃ 水浴 30 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 得上清即为获得重组酶的粗酶液. 取 300 μ l 酶液加入等量用 0.1 mol/L pH 6.5 磷酸盐缓冲液配置的 30% 麦芽糖溶液, 30℃ 反应 20 h 后, 利用 HPLC (Agilent 1100 型) 对转化的产物进行分析. 分析条件为反应样品稀释 20 倍, 进样 10 μ l, 在 30℃、压力 4.6×10^6 Pa, 流动相为乙腈: 水 (84:16).

1.2.6 重组酶性质的分析: 取 1.2.5 中获得的酶液 300 μ l 加入等量用 0.1 mol/L pH 6.5 磷酸盐缓冲液配置的 30% 麦芽糖溶液混匀, 然后置于梯度 PCR 仪中分别在不同温度 (10℃、10.9℃、13.7℃、18.1℃、22.9℃、27.6℃、32.4℃、37.1℃、41.9℃) 中反应 20 h, 然后用 HPLC 分析反应物中海藻糖占总糖的百分比, 生成海藻糖最多的温度即为酶的最佳转化温度. 取 300 μ l 酶液, 分别加入等体积用 0.1 mol/L pH 分别为

5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的磷酸盐缓冲液配置的 30% 麦芽糖溶液, 在 37℃ 反应 20 h, 然后用 HPLC 分析反应物中海藻糖占总糖的百分比, 转化生成海藻糖最多的 pH 值即为酶的最佳 pH.

2 结果和讨论

2.1 *tres-rd* 表达载体的构建

用设计的引物扩增出约 1.7 kb 的特征片段与预期的 *tres-rd* 的 1 659 bp 大小相符 (图 1). 将扩增得到的 DNA 片段回收, 用 *Nco* I 和 *Pst* I 酶切, 并用同样酶消化过的表达载体 pSE380 连接, 连接产物转化 JM109 感受态细胞, 经小量提取质粒用 *Nco* I 和 *Pst* I 双酶切、电泳鉴定. 结果表明 (图 2), 目的片段已连接到表达载体 pSE380, 重组质粒并命名为 pSE380-*tres-rd*, 并经测序验证后用于表达.

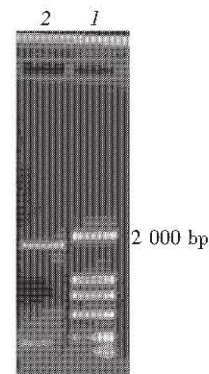


Fig. 1 Electrophoresis of PCR products of *tres-rd* gene

1: DNA marker DL2000; 2: PCR products of *tres-rd* gene.

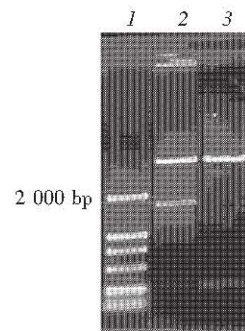


Fig. 2 Restriction enzymes digestion of recombinant plasmid

1: DNA marker DL2000; 2: Recombinant plasmid;

3: pSE 380 plasmid.

2.2 表达产物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

将重组质粒转化到大肠杆菌菌株 BL21 进行诱导表达的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析, 结果表明 (图 3), 转入重组质粒的 BL21 菌株与对照相比在 66 ku 处出现特征蛋白质带, 与核酸序列理论推算的蛋白质分子质量相符, 表明 TRES-RD 在 BL21 菌株中得到表达.

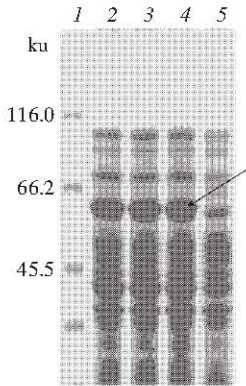


Fig. 3 Analysis of expression products by SDS-PAGE
1: Protein marker; 2, 3, 4: Total protein of *E. coli* BL21 with plasmid pSE380-*tres*-rd; 5: Total protein of *E. coli* BL21 with plasmid pSE380.

2.3 重组酶转化麦芽糖产物的分析

重组酶转化麦芽糖的产物进行 HPLC 分析结果见图 4b (2 号峰所指为海藻糖峰). 从图 4 中可以看出, 含有重组质粒 pSE380-*tres*-rd 的大肠杆菌细胞提取物能将麦芽糖转化为海藻糖, 以 30% 的麦芽糖为转化底物时, 能将约 65% 的麦芽糖转化成海藻糖, 而对照没有检测到海藻糖的产生 (图 4c), 表明 *tres*-rd 的表达产物是能直接将麦芽糖分子转化为海藻糖分子的海藻糖合成酶, 它是一个海藻糖合成酶基因.

2.4 重组酶性质的初步研究

以麦芽糖作为底物和重组酶进行反应, 然后利用 HPLC 分析反应物中海藻糖占总糖的百分比, 结果表明 (图 5), 重组酶在 30 ~ 35℃ 和 pH 在 7.0 左右生成海藻糖最多 (图 6).

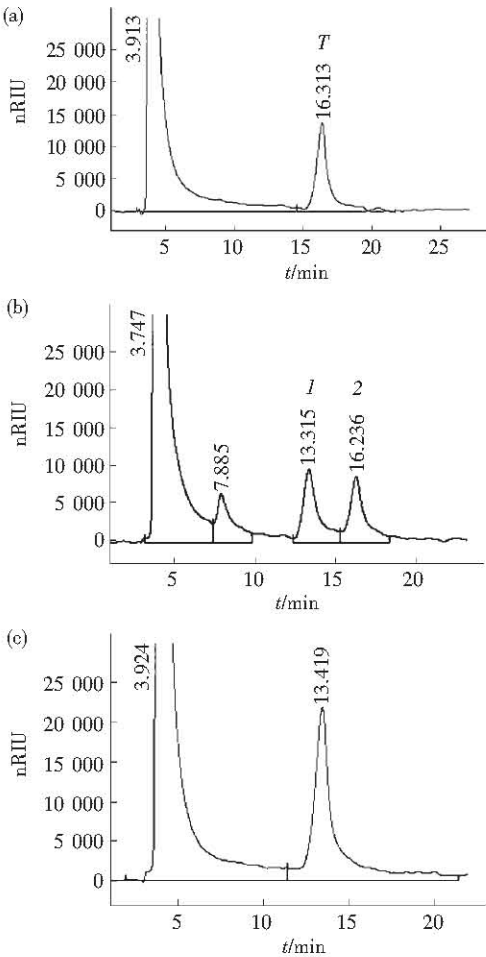


Fig. 4 HPLC analysis of 20 h enzyme reaction with 30% maltose as substrate

(a) The standard trehalose shown as peak T. (b) Reacted sample.
(c) Control sample. 1: Maltose; 2: Trehalose.

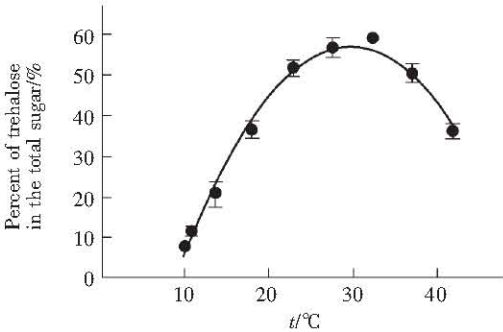


Fig. 5 Effect of temperature on conversion rate
The data were taken from three times experiment.

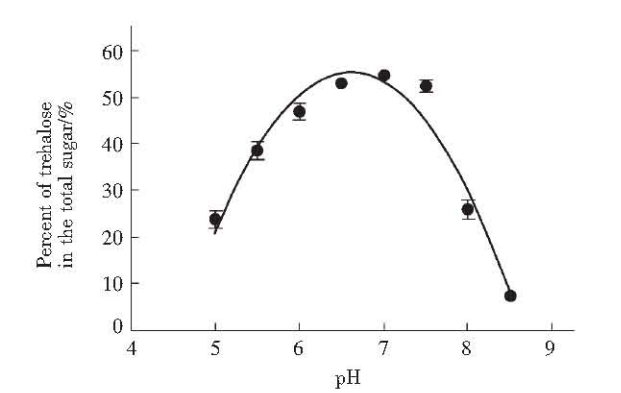


Fig. 6 Effect of pH on conversion rate
The data were taken from three times experiment.

2.5 *tres-rd* 基因同源性分析

经过实验验证，来源于耐放射异常球菌的 ORF (gi | 15807030) 是一种新的海藻糖酶合成酶基因，其编码产物能直接将麦芽糖分子转化成海藻糖分子，它的核酸序列同源性和已报道海藻糖酶基因的同源性都比较低，在 GenBank 中进行核酸序列的 Blast 检索分析，没有检索到海藻糖合成酶基因。利用 gi | 15807030 的氨基酸序列在 GenBank 中进行 Blast 同源性比较分析，结果表明，在 GenBank 中检索到同源性较高的氨基酸序列，是一些功能未确定的蛋白质、糖苷酶、海藻糖合成酶、α 淀粉酶家族蛋白的氨基酸序列，但它们的同源性都在 60% 以下，同源性最高的是来自 *Burkholderia cepacia* 糖苷酶 (Glycosidases gi | 46324159) 和来自 *Streptomyces coelicolor* A3 (2) 的一段功能未确

定，推测是海藻糖酶的氨基酸序列 (gi | 21225609)，同源性都是 57% (图 7)。本研究用相同的实验，把来自 *Streptomyces coelicolor* A3 (2) 推测为海藻糖 gi | 21225609 的 CDS 序列克隆到大肠杆菌进行表达，研究发现，耐放射异常球菌的 gi | 15807030 和 *Streptomyces coelicolor* A3 (2) 的 gi | 21225609 功能不相同，gi | 21225609 不能将麦芽糖分子转化成海藻糖分子，其具体功能还在进一步研究中。在 <http://prodes.toulouse.inra.fr> 站点上进行氨基酸序列的同源保守区分析，gi | 15807030 和海藻糖酶、糖苷酶、淀粉酶在氨基酸序列中存在多个同源保守区 (图 8 中的红色区域)，最长保守氨基酸序列为 FLRNHDELTLEMVTD 15 个氨基酸，这可能和它们都是作用于糖苷键有关，但是这些酶是否由同一种酶进化而来，它们如何对不同底物的糖苷键产生特异专一性都未能确定。这说明氨基酸序列的差异不是这些酶功能差异的主要原因，因此要准确地确定这些酶的功能必需要经过实验的验证分析。有研究报道海藻糖酶、糖苷酶、淀粉酶这些同源保守区与 α 淀粉酶家族酶的催化活性及底物结合位点相关^[6,7]，推测它们有着相同的二级结构或相似的三级结构。因此深入了解海藻糖酶的三级结构，比较这些酶在三级结构上的差异，并进一步了解海藻糖合成酶作用底物生成海藻糖过程中的催化分子机理，对解释海藻糖生成过程中 α, α1-6 和 α, α1-1 糖苷键转换过程的能量偶联机理有着深远的意义，目前我们研究小组正在进行这方面的研究。

Sequences producing significant alignments:				Score	E
				(bits)	Value
gi 15807030	ref NP_295759.1	trehalose synthase, putative [...	1148	0.0	
gi 46324159	ref ZP_00224521.1	COG0366: Glycosidases [Burkh...	651	0.0	
gi 45548444	ref ZP_00188476.1	COG0366: Glycosidases [Rubro...	651	0.0	
gi 21225609	ref NP_631388.1	putative trehalose synthase. [...	651	0.0	
gi 45548443	ref ZP_00188475.1	COG0366: Glycosidases [Rubro...	649	0.0	
gi 22967525	ref ZP_00015118.1	COG0366: Glycosidases [Rhodo...	649	0.0	
gi 8250620	emb CAA04601.2	putative trehalose synthase [Str...	647	0.0	
gi 45548435	ref ZP_00188467.1	COG0366: Glycosidases [Rubro...	646	0.0	
gi 21223801	ref NP_629580.1	putative trehalose synthase [S...	646	0.0	
gi 45548441	ref ZP_00188473.1	COG0366: Glycosidases [Rubro...	646	0.0	
gi 45548437	ref ZP_00188469.1	COG0366: Glycosidases [Rubro...	646	0.0	
gi 45548439	ref ZP_00188471.1	COG0366: Glycosidases [Rubro...	646	0.0	
gi 21229612	ref NP_635529.1	trehalose synthase [Xanthomona...	645	0.0	
gi 45548433	ref ZP_00188465.1	COG0366: Glycosidases [Rubro...	644	0.0	
gi 21240929	ref NP_640511.1	trehalose synthase [Xanthomona...	644	0.0	
gi 46313908	ref ZP_00214496.1	COG0366: Glycosidases [Burkh...	643	0.0	
gi 45517565	ref ZP_00169116.1	COG0366: Glycosidases [Ralst...	643	0.0	
gi 45548431	ref ZP_00188463.1	COG0366: Glycosidases [Rubro...	642	0.0	
gi 23063523	ref ZP_00088254.1	COG0366: Glycosidases [Pseud...	642	0.0	
gi 29829345	ref NP_823979.1	putative trehalose synthase [S...	641	0.0	
gi 46193236	ref ZP_00207621.1	COG0366: Glycosidases [Rhodo...	640	0.0	
gi 29833938	ref NP_828572.1	putative trehalose synthase [S...	637	0.0	
gi 28869947	ref NP_792566.1	alpha amylase family protein [...	636	0.0	

Fig. 7 Blast of the amino sequence of gi | 15807030 in GenBank

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100													
gi115807030	MTQAHP					S	F	LS	RT	Q	G	G	K	FP	TSR	LKN	CL	L	M	P	L	D		
gi146324159	MHKREDSLDYVRRQAFASVAPAGTARARRARRRREPALSTDDPL					D	I	VH	KS	Y	S	N	I	FP	IMK	IAE	TI	L	F	P	R	D		
gi121229612	MNAVYALQADAEQSAVYADQ-L					D	I	VH	KS	F	S	D	I	FA	ISK	IAE	TI	L	F	P	R	D		
gi128869947	NAKKPDRATFIKQPL					D	I	VH	KS	F	A	N	I	FA	IEK	IAA	TI	L	F	P	R	D		
gi121225609	MTVNEPVPDTFEDTPAGDRHPD					R	-	VL	RS	Q	S	G	I	LK	TAK	LQW	CL	P	F	K	L	G		
Consensus	hp.					.	.	v.	rs	q	s	g	i	fp	t.k	l..	cl	i	f	p	i	d		
	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200													
gi115807030	A	RG	HP	L	TLD	FKVFLRE	A	L	G	L	T	S	AA	RGPTLPD	SPNEYH	S	EGKE	ADT	T	V	L	EQ		
gi146324159	A	RG	HP	Y	TLA	VRRFIRE	A	I	A	L	I	D	RA	RAK---	P	ST--HR	S	TDTK	AGT	L	T	H	PV	
gi121229612	A	MA	HP	Y	TIA	FEQLVAQ	A	I	T	L	I	D	RA	NAP---	A	SP--ER	S	TQQE	EGT	C	K	M	PV	
gi128869947	S	RD	HS	Y	THA	AKRFIAQ	K	L	S	L	I	D	KA	NAK---	P	SK--AR	S	TQKQ	DGT	L	T	M	PV	
gi121225609	S	TA	LP	F	OLA	FVEFVDA	Q	M	I	F	M	D	ES	KNP---	D	P--YG	A	DDTR	ADA	V	A	H	PV	
Consensus	a	r.	hp	.	tla	f..f...	a	.	.	l	.	d	a	..p...	d	sp..y.	s	d..	adt	.	.	.	pv	
	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300													
gi115807030	A	K	AS	K	VEELHGAAR	L	L	F	V	IERE	SC	ET	EI	KGF	AMV	R	GRL	Q	VVE					
gi146324159	A	Q	SH	A	VREVIQVMR	L	I	L	L	VERE	NN	ET	AI	KRI	ATI	A	NRM	Q	VQE					
gi121229612	A	Q	SH	A	LESVLEVMR	R	V	L	L	IERE	NN	ET	AI	KRI	ATI	A	DRM	H	TQQ					
gi128869947	A	Q	SH	H	LDVAVLEVMR	L	I	L	L	IERD	NN	EI	QV	KRI	AEI	A	DRM	Q	TQL					
gi121225609	R	Q	SH	A	QEELHAAKL	L	V	Y	L	YAEI	NC	AS	AF	KRV	REI	A	DTV	Q	VVD					
Consensus	a	q	sh	a	ee.l.a.r	l	.	.	l	iere	nc	et	ai	kr.	a.i	a	dr.	q	vv.					
	301	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400													
gi115807030	TEA---EP	F	C	N	V	L	SLKK	UTSS	R	GRL	KLPSEF	CT	D	AF	YHA	P	A	MKI	V	P	L	N		
gi146324159	NE---D	C	A	H	L	I	SIAS	URFP	L	RQT	ALAPSN	AV	S	DL	MQT	S	R	ARL	L	P	M	R		
gi121229612	QNA---D	C	A	H	L	M	AIAR	URFP	T	RQT	EIPETC	AI	S	DY	MQT	S	R	ARL	L	P	L	R		
gi128869947	DSKGPQDG	C	A	H	L	M	ALAQ	URFP	T	RQT	EIPENC	AI	R	DY	MNY	A	R	ARL	L	P	V	R		
gi121225609	DYS-TGGG	C	A	H	V	I	AVRR	SKYP	S	AKI	ALPSGC	GI	E	DY	YAE	K	P	MKA	I	T	L	N		
Consensus	d	c	a	h	v	.	a..r	dr.p	.	..t	..ips.c	..i	.	dy	ga.	..	mri	.	.	p	i	n		
	401	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500													
gi115807030	RR	LNTV	A	S	IL	1	LG	P	G	NAGTSG	1H	SDCFF	P	QDPV	GRV	SULQUPS	K	IA	QLEL					
gi146324159	RR	INSL	S	T	VI	L	IH	G	G	SSURNG	RA	ELLVL	P	MGSL	UAI	AQTRUPH	N	IK	ILAT					
gi121229612	RR	MTSL	T	T	VL	1	IH	G	G	SIURNG	RA	AALVL	P	MDPL	QAV	AQIRUQH	T	IK	VLSV					
gi128869947	RR	LNSH	S	T	TL	1	IY	G	G	SIURNG	RA	ASLVL	P	MDPM	QSV	SUERUPH	N	NR	MLAV					
gi121225609	DQ	FTAL	A	S	IL	1	IW	G	A	TPURNA	IC	GRLYL	A	MDPV	QVT	ASHMSPS	H	IK	MLLI					
Consensus	rr	..n.l	a	s	il	i	i.	g	g	..drng	ta	..l.l	p	ndpv	q.v	aq..dps	.	tr	..le.					
	501	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600													
gi115807030	RAHPH	AH	DLIF	IETG	PHI	T	QYDG	----	TL	I	S	FAGNA	HGL	AP	V	RA	TLSGASPL	V	T	NGQ	PVYH	KYD	YHLR	N
gi146324159	RATQV	GR	IIRL	LRPE	RKV	L	ELDG	----	P	V	C	A	LSRAS	AVE	SE	A	RV	ENTSDSPF	P	-	QLT	LLIFPPYG	Wf-Y	SEHGR
gi121229612	KRYQH	GR	IIRL	LYPG	RRH	L	CYQD	----	T	V	C	A	LSHTL	AVE	SE	E	RV	DTIGGGSF	P	-	RLT	LLIYPPYG	YAF-Q	VSEGT
gi128869947	KQKQH	GR	ILKML	SPS	RRH	T	EYAPDGHS	----	V	V	C	A	VSSAH	AAE	SG	A	TV	ENLGGSAF	P	-	QLN	LLILPPYG	YH-L	ATENQ
gi121225609	KQNP	GL	IYIEL	PSS	PAV	L	EYED	----	V	V	C	N	FARFA	PTE	RE	A	RH	ELFGGVR	A	-	ELP	LLILGGHG	YH-R	TRVAS
Consensus	k..p	a	g.	tlftl...	pa.	l	ey.....	.	v	c	.	fa..a	a.e	.	e	a	r.	el.ggs.f	..	l.	lft.g.yg	ywfr		

Fig. 8 Alignment of amino acid sequence of gi1 15807030 and other amino acid sequence of trehalose synthase, glycosidases and alpha-amylase family protein from GenBank run on web site <http://prodes.toulouse.inra.fr>

Red: The best conserved regions. The accession number of the sequence are gi1 15807030: putativetrehalose synthase (*Deinococcus radiodurans*), gi1 46324159: glycosidases (*Burkholderia cepacia*), gi1 21225609: putative trehalose synthase (*Streptomyces coelicolor* A3 (2)), gi1 21229612: trehalose synthase (*Xanthomonas campestris*), gi1 28869947: alpha-amylase family protein (*Pseudomonas syringae* pv).

参 考 文 献

- Nishimoto T, Nakano M, Nakada T, *et al.* Purification and properties of a novel enzyme trehalose synthase from *Pimelobacter* sp. R48. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, **60** (4): 640 ~ 644
- Silva Z, Alarico S, Nobre A, *et al.* Osmotic adaptation of *Thermus thermophilus* RQ-1: lesson from a mutant deficient in synthesis of trehalose. *J Bacteriol*, 2003, **185** (20): 5943 ~ 5952
- Ribeiro M J, Leao L S, Morais P B, *et al.* Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999, **75** (2): 245 ~ 251
- Alan D, Elbein, Pan Y T, *et al.* New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 2003, **13**: 17 ~ 27
- Sambrook J, W Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. New York: Cold Spring Harbor press, 2001. 1.1 ~ 1.125
- Jespersen H M, MacGregor E A, Sierks M R, *et al.* Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochem J*, 1991, **280** (Pt 1): 51 ~ 55
- Matsuura Y, Kusunoki M, Harada W, *et al.* Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J Biochem (Tokyo)*, 1984, **95** (3): 697 ~ 702

Cloning and Identification of a Gene Encoding Novel Trehalose Synthase From *Deinococcus radiodurans* *

WEI Yu-Tuo^{1,2)}, ZHU Qi-Xia²⁾, LUO Zhao-Fei²⁾,

CHEN Fa-Zhong²⁾, LI Gui-Yuan²⁾, HUANG Kun¹⁾, HUANG Ri-Bo¹⁾ **

(¹⁾ Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning 530004, China;

²⁾ Sinozyme Biotech Co. Ltd, Nanning 530004, China)

Abstract An open reading frame (ORF) was annotated as putative trehalose synthase in *Deinococcus radiodurans* sequenced genome, which has been found in GenBank database through amino homology blast base on combination of bioinformatics. Blasting against the database indicates that amino acid sequence of this ORF has less than 60% homology with the reported terhalose synthases. The function, which was identified by expressing this ORF in *Escherichia coli*, proves this ORF is a novel trehalose synthase gene. Using the 30% maltose as substrate, about 65% maltose can be converted into trehalose by this enzyme. Recombinant enzyme showed optimal activity at pH 7.0 and 30°C when it converts maltose into trehalose.

Key words *Deinococcus radiodurans*, terhalose synthases, cloning, identified function

* This work was supported by a grant from The State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA214171).

** Corresponding author. Tel: 86-771-3235706, E-mail: riboh@public.nn.gx.cn

Received: May 27, 2004 Accepted: June 30, 2004

更 正

由于作者疏忽,本刊2004年第8期第688页刊登的“心肌特异性新蛋白激酶p93和peroxiredoxin 3的相互作用”一文的脚注,第一作者冯艳的工作单位“上海同济医科大学病理教研室”应为“上海同济大学基础医学院病理教研室”,特此更正.