

# NADH 依赖型酶活性检测方法的建立

肖丽霞<sup>1,2</sup> 师明磊<sup>2</sup> 王 洋<sup>2</sup> 张 彦<sup>2</sup> 沈文龙<sup>2</sup> 李德彬<sup>2</sup> 赵玉军<sup>1\*</sup> 赵志虎<sup>2\*</sup>

(1 沈阳农业大学畜牧兽医学院 沈阳 110016 2 军事医学科学院生物工程研究所 北京 10071)

**摘要** 目的:建立一种 NADH 依赖型酶活性检测的方法。方法:将 FDH、LeuDH 串联克隆到表达载体 pET-22b(+)中,转化至 *E. coli*,并向培养液中分别添加去离子水、甲酸胺、三甲基丙酮酸,反应一段时间后,检测 NADH 的吸光度。同时通过测定氨气的产生判断 FDH 活性;通过薄层层析检测判断 LeuDH 活性;比较 NADH 吸光度测定结果与常规方法结果是否一致。结果:通过测定氨气的产生,证明 FDH 具有活性;此时 NADH 吸光度上升亦说明 FDH 具有活性;两种方法结论一致。薄层层析检测,生成叔亮氨酸,证明 LeuDH 具有活性;此时 NADH 吸光度下降亦说明 LeuDH 具有活性;两种方法结论一致。结论:通过检测菌体内部 NADH 吸光度的变化检测 NADH 依赖型酶活性的方法可行。

**关键词** FDH NADH  $\text{NAD}^+$  LeuDH

**中图分类号** Q819

检测酶活性的方法众多,但多操作繁琐。本研究意在构建一种简单的检测酶活性的方法,以检测 NADH 依赖型酶是否具有活性。

在氧化还原酶所催化的反应中,产物生成的同时会消耗一定量的辅酶,据统计约 80% 的反应需要烟酰胺腺嘌呤二核苷酸作辅酶<sup>[1]</sup>。NADH 与  $\text{NAD}^+$  分别是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的还原与氧化形式,广泛存在于所有的微生物中,是细胞能量代谢所必须的辅酶,可以作为具有代谢活性的细胞指示物<sup>[2]</sup>。NADH 是一种强荧光物质,在激发光 340nm,吸收光 460nm 处具有最大吸光度,而  $\text{NAD}^+$  的吸光度几乎为零;并且单位菌体胞内 NADH 含量恒定<sup>[3,4]</sup>。

甲酸脱氢酶(FDH)属于 D-2 羧基酸脱氢酶<sup>[5]</sup>,存在于所有的甲基营养型微生物中。根据其结构、构象、底物特异性分为几种不同的类型,其中比较重要的就是  $\text{NAD}^+$  依赖型的甲酸脱氢酶,它可将甲酸胺氧化成  $\text{CO}_2$ ,同时将  $\text{NAD}^+$  还原成 NADH。亮氨酸脱氢酶(LeuDH)广泛存在于不同种类的蜡状芽孢杆菌中,含有 14 个  $\alpha$ -螺旋,12 个  $\beta$ -折叠,能将  $\alpha$ -酮酸还原为相应的产物,同时将 NADH 氧化为  $\text{NAD}^+$ 。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

博伊丁假丝酵母(ATCC32195)、蜡状芽孢杆菌(ATCC14579),pET-22b(+)载体均由本实验室保存;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态、BL21(DE3)plysS 感受态,普通质粒小提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒均购自天根公司;NdeI、EcoRI、NcoI、SalI、XbaI、BglII、SpeI 购自 TaKaRa 公司;Triton X-100、Tris、氨苄青霉素购自 Amresco 公司;EDTA 购自 Sigma 公司; $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、HCl 购自国药集团;黑色 96 孔板、Envision 购自 Perkin Elmer 公司。硅胶板 G 购自青岛海洋化工公司;质谱仪 Q-TOF2 购自 Waters 公司。

### 1.2 培养基

LB 培养基:1%胰蛋白酶,1% NaCl,0.5% 酵母浸出粉。

### 1.3 细胞裂解液与薄层层析展层剂配方

细胞裂解液:100mmol/L Tris-HCl,10mmol/L EDTA,0.05% Triton X-100,pH8.0。

展层剂:60% 正丁醇,25% 水,15%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ 。

### 1.4 引物设计与片段扩增

分别提取博伊丁假丝酵母(ATCC32195)与蜡状芽孢杆菌(ATCC14579)基因组,设计引物扩增 FDH 与 LeuDH。引物序列见表 1。

收稿日期:2011-12-09 修回日期:2012-02-18

\* 通讯作者,电子信箱:yujun1119211@163.com

表 1 研究中所用引物及其序列  
Table 1 Primer used in the study and its sequence

Primer	Sequence(5'-3')	RECs
FDH-FP	AAACATATGAAGATCGTTTCTAGTCTT	NdeI
FDH-RP	AAAGAATTCTTATTTCTTATCGTGTACCGT	EcoR I
LeuDh-FP	AAACCATGGAGGAGATATACATATGACATTAGAAATCTTCGAA	NcoI
LeuDh-RP	AAAGTCGACTTAGCG ACG GCTAATAATAT	SalI

RECs: Restriction enzyme cutting site

1.5 酶切连接及鉴定

取 PCR 产物 FDH 与 LeuDh 经相应的酶切后,分别与经过相同的酶处理的载体 pET-22b(+)连接,转化至 BL21(DE3)plysS 感受态,用氨苄青霉素筛选获得阳性克隆 pET/FDH-22b(+),pET/LeuDh-22b(+).

取质粒 pET/FDH-22b(+),pET/LeuDh-22b(+ ) 分别经相应的酶切处理,获得载体与目的片段,连接,转化至 BL21(DE3)plysS 感受态,用氨苄青霉素筛选获得阳性克隆 pET/FDH/LeuDh-22b(+).

1.6 诱导表达

按 1% 接菌,29℃、200r/min 振荡培养 1h,加 IPTG 终浓度为 0.5mmol/L,诱导 20h,低温 5000r/min 离心收集菌体,用去离子水悬浮菌体。向其中加入 MgCl<sub>2</sub>(终浓度 1mmol/L),并分别加入去离子水、三甲基丙酮酸或 4,4-二甲基-2-酮戊酸钠(终浓度 0.1mol/L)、甲酰胺(终浓度 0.8mol/L,pH7.15),终体积为 1ml。30℃ 反应 10h,5000r/min 离心 10min,取上清进行薄层层析、质谱鉴定;取沉淀用于测定 NADH 的吸光度。

1.7 薄层层析及质谱样品制备

用枪头(最大量程 2.5μl)吸取上清,轻轻接触已活化好的硅胶板薄层表面点样。两样品之间的距离为 1cm,加样后原点扩散直径不超过 2mm,待样品干后再重复点样,重复 4 次。随后将薄层板点样端侵入展层剂中,待展层剂扩散到离薄板顶端 1cm 时,取出薄层板,吹风机吹干,喷洒印三酮,热风吹干,即可显出各层斑点。

上清交由军事医学科学院仪器中心的质谱室工作人员进行质谱分析,根据质子峰值判断有无目的产物。

1.8 NADH 吸光度测量样品制备

取沉淀,加入 1.2ml 细胞裂解液,振荡悬浮沉淀。30% 功率超声,超 5s 停 5s,共 5min,12000r/min 离心 15min 取上清 100μl 置于黑色 96 孔板中,在激发光 340nm,吸收光 460nm 的条件下测量样品的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 酶切鉴定成功获得目的质粒

PCR 扩增获得 FDH、LeuDh,经酶切、克隆、转化、酶切鉴定证明构建成功。如图 1。

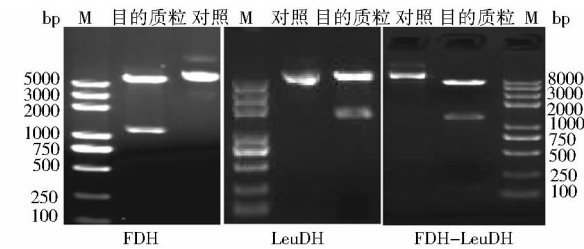


图 1 酶切鉴定目的质粒图

Fig. 1 Graph of digestion verification target plasmids

2.2 薄层层析、质谱验证 LeuDh 具有活性

三甲基丙酮酸与 4,4-二甲基-2-酮戊酸钠均属于 α-酮酸,在 LeuDh 作用下,分别被还原为叔亮氨酸与 γ-甲基左旋亮氨酸。由于标准品 γ-甲基左旋亮氨酸不易获得,因此,在薄层层析实验中,叔亮氨酸标准品做阳性对照。叔亮氨酸比 γ-甲基左旋亮氨酸少一个甲基,因此其极性强于 γ-甲基左旋亮氨酸,在展层剂中扩散速度比 γ-甲基左旋亮氨酸慢。由薄层层析结果(图 2b)可知底物三甲基丙酮酸被还原为叔亮氨酸;加入底物 4,4-二甲基-2-酮戊酸钠的样品中有扩散速度大于叔亮氨酸的氨基酸即 γ-甲基左旋亮氨酸生成(图 2a);两次实验结果均证明 LeuDh 具有活性。

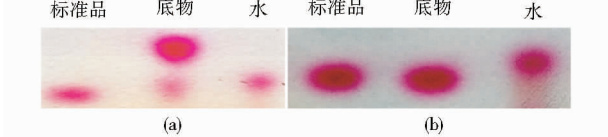


图 2 薄层层析鉴定 LeuDh 活性

Fig. 2 Identify active of LeuDh using thin layer chromatography

(a) Substrate: 4, 4-dimethyl-2-oxopentanoic acid sodium  
(b) Substrate: trimethyl pyruvic acid

$\gamma$ -甲基左旋亮氨酸, 分子量为 145.2, 其质子峰值为 146.2。由样品的质谱图 (图 3) 可知, 存在峰值

146.5 的离子峰, 这与  $\gamma$ -甲基左旋亮氨酸质子峰值相差 0.3, 在误差允许范围之内, 再次证明 LeuDH 具有活性。

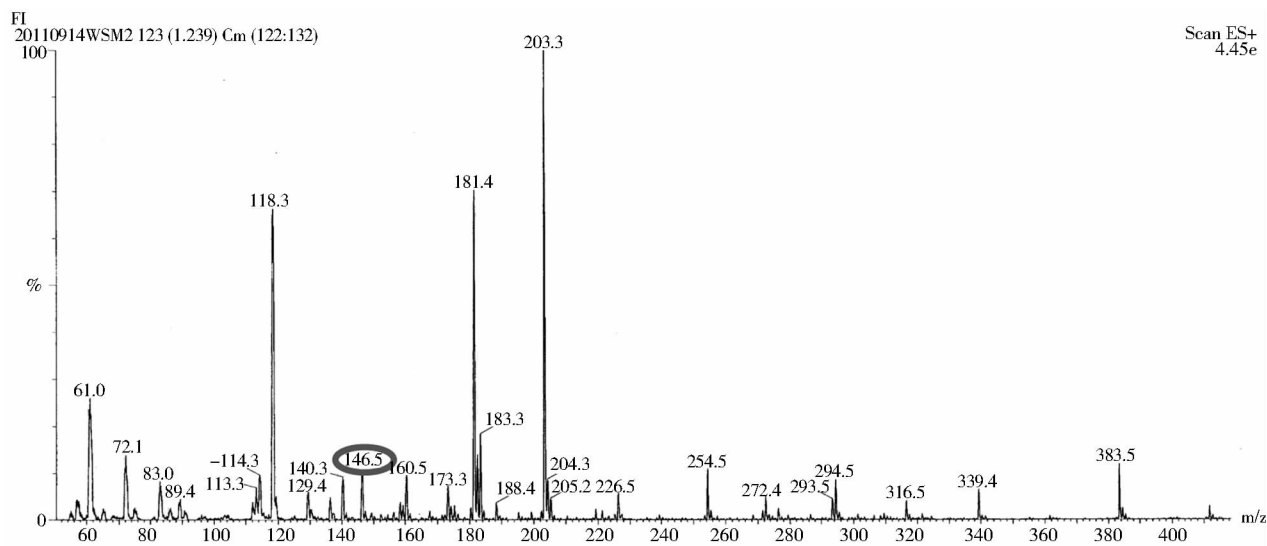


图 3 质谱检测 LeuDH 活性

Fig. 3 Identify active of LeuDH using mass spectrum

### 2.3 刺激性气体 $\text{NH}_3$ 的产生证明 FDH 具有活性

在含有 FDH 的样品中加入甲酸胺, 反应一段时间后可闻到氨气特有的刺激性气味, pH 试纸检测, 呈碱性, 证明该气体为氨气, 进而证明 FDH 具有活性。

### 2.4 通过测定 NADH 吸光度检测酶活性体系可行

2.4.1 甲酸胺、三甲基丙酮酸对 NADH 吸光值影响不大 为了检验甲酸胺与三甲基丙酮酸是否干扰吸光度, 进行如下实验。向含空载体的菌体中分别加入去离子水、甲酸胺、三甲基丙酮酸, 测量其吸光度 (图 4)。加入甲酸胺或加入三甲基丙酮酸与加入去离子水相比, 吸光度没有明显变化, 说明甲酸胺、三甲基丙酮酸对 NADH 吸光值无明显影响。

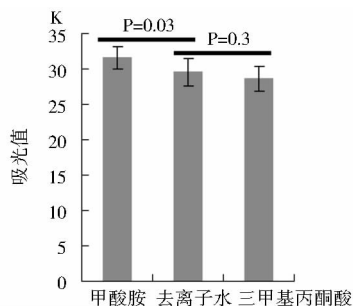


图 4 NADH 吸光值

Fig. 4 Absorbance of NADH

2.4.2 测量吸光度推测 FDH、LeuDH 有活性 在激发

光 340nm, 发射光 460nm 条件下, 利用 Envision 测量菌体内部 NADH 吸光度。

在 FDH 与 LeuDH 参与的酶促催化反应中, 均涉及到  $\text{NAD}^+$  与 NADH 之间的转化。例如, 在 FDH 催化甲酸胺的酶促反应中, 底物甲酸胺被氧化成  $\text{CO}_2$  和  $\text{NH}_3$ , 同时将  $\text{NAD}^+$  还原为 NADH; 在 LeuDH 催化三甲基丙酮酸的酶促反应中, 底物三甲基丙酮酸被还原为叔亮氨酸, 同时将 NADH 氧化为  $\text{NAD}^+$ 。实验结果证明: 在同时含有 FDH 与 LeuDH 的样品中加入甲酸胺后, 由于 FDH 将  $\text{NAD}^+$  转化为 NADH, 因此吸光度升高显著; 反之, 加入三甲基丙酮酸后, 由于 LeuDH 又将 NADH 转化为  $\text{NAD}^+$ , 因此吸光度又明显下降 (图 5)。

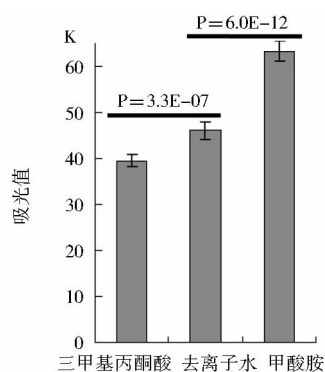


图 5 NADH 吸光值

Fig. 5 Absorbance of NADH

通过测量菌体内部 NADH 的吸光度,得出的结论与用其它方法验证的结果一致。因此,通过测量菌体内部 NADH 吸光度的变化,判断菌体内部 NADH 与  $\text{NAD}^+$  的转化情况,进而判断相关酶的活性的方法可行。

该方法适用于所有 NADH 参与的酶促反应,既简单又经济,尤其是其中的一些双底物反应,可以同时检测两种酶的活性。

### 参考文献

- [ 1 ] 黄志铭, 刘铭, 王宝光, 等. 甲酸脱氢酶用于辅酶 NADH 再生的研究进展. 过程工程学报, 2006, 6(6): 1011-1016.  
Huang Z M, Liu M, Wang B G, et al. Formate dehydrogenase and its application in cofactor NADH regeneration. Journal of Process Engineering, 2006, 6(6): 1011-1016.
- [ 2 ] Olek R A, Autosiewicz J, Caulini G C. Effect of NADH on the redox state of human hemoglobin. Clinica Chimica Acta, 2002, 324: 129-134.
- [ 3 ] Wimpenny J W, Firth A. Levels of nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. J Bacteriol, 1972, 111(1): 24-32.
- [ 4 ] Kasimova M R, Grigienė J, Krab K, et al. The free NADH concentration is kept constant in plant mitochondria under different metabolic conditions. Plant Cell, 2006, 18(3): 688-698.
- [ 5 ] Mika Jormakka, Bernadett Byme, So Lwata. Formate dehydrogenase – A versatile enzyme in changing environments. J Curr Opin, Struct Biol, 2003, 13: 418-423.
- [ 6 ] 梅册霞, 王静雪, 林洪, 等. 细菌荧光素酶体外发光体系的建立及应用于 NADH 定量检测. 微生物学报, 2009, 49(9): 1223-1228.  
Mei C X, Wang J X, Lin H, et al. Quantitative detection of NADH by in vitro bacterial luciferase bioluminescent. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(9): 1223-1228.
- [ 7 ] 李达, 伦永志, 周士胜.  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  代谢机制研究进展. 生物技术通讯, 2010, 21(1): 98-102.  
Li D, Lun Y Z, Zhou S S. Recent progress of  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  metabolism. Letters in Biotechnology, 2010, 21(1): 98-102.
- [ 8 ] 卿三红, 方柏山. NADH 氧化酶的研究进展. 华侨大学学报, 2011, 32(5): 554-559.  
Qing S H, Fang B S. Progress in the application research of NADH oxidase. Journal of Huaqiao University, 2011, 32(5): 554-559.
- [ 9 ] Jansch A, Freiding S, Behr J, et al. Contribution of the NADH-oxidase (Nox) to the aerobic life of *Lactobacillus* *franciscensis* DSM20451<sup>T</sup>. Food Microbiology, 2011, 28(1): 29-37.
- [ 10 ] 李建, 陈可泉, 黄秀梅, 等. 厌氧发酵有机酸体系中  $\text{NAD}^+$  和 NADH 测定方法的建立. 食品科技, 2008, 33(12): 254-257.  
Li J, Chen K Q, Huang X M, et al. Establishment of the determination of  $\text{NAD}^+$  and NADH in the anaerobic fermentation of organic acids. Food Science and Technology, 2008, 33(12): 254-257.

## An Efficient and Economic Method for Detecting the Activity of NADH Dependent Enzyme

XIAO Li-xia<sup>1,2</sup> SHI Ming-lei<sup>2</sup> WANG Yang<sup>2</sup> ZHANG Yan<sup>2</sup> SHEN Wen-long<sup>2</sup>  
LI De-bin<sup>2</sup> ZHAO Yu-jun<sup>1</sup> ZHAO Zhi-hu<sup>2</sup>

(1 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110016, China)

(2 Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

**Abstract** Objective: To establish a NADH depending enzyme activity detection method. Methods: FDH and LeuDH were co-expressed in *E. coli* and appropriate substrate was added; the FDH activity was measured by  $\text{NH}_3$  production and the LeuDH activity measured by TLC analysis, which were also detected by measuring the NADH absorbance. The results from both methods were compared. Results: Both  $\text{NH}_3$  production and the NADH absorbance detection proved FDH activity; at the same time, tertiary leucine production and the NADH absorbance detection proved LeuDH activity. Conclusion: The detection of NADH absorbance changes could be employed in measuring the absorbance of NADH.

**Key words** FDH NADH  $\text{NAD}^+$  LeuDH