

人谷胱甘肽硫转移酶 A1 在乳酸乳球菌中的 表达及活性研究*

向 华 张亦清 卫文仲 谭华荣**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

提 要:用 RT-PCR 技术从人肝总 RNA 中分离扩增了人谷胱甘肽硫转移酶 A1 基因的 cDNA 序列,克隆至大肠杆菌表达质粒 pET23b,采用蛋白表达筛查法及 DNA 测序证明该 cDNA 序列完全正确。重组质粒 pET23bhgst 转化大肠杆菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导获得高效表达的可溶性 hGSTA1 产物,其表达量约为大肠杆菌可溶性总蛋白的 40%。将 hGSTA1 cDNA 亚克隆至乳酸乳球菌表达载体 pMG36e,电穿孔法转化乳酸乳球菌 MG1363 获得 hGSTA1 乳酸乳球菌表达株。SDS-PAGE 及 Western 杂交分析表明该菌株表达预期大小的 hGSTA1 融合蛋白,经谷胱甘肽-琼脂糖亲和层析纯化获得的 hGSTA1 蛋白具有较高的谷胱甘肽硫转移酶活性。具 hGSTA1 酶活性的乳酸乳球菌工程菌可望应用于研制防癌保健乳制品。

关键词: 谷胱甘肽硫转移酶,基因克隆表达,乳酸乳球菌

中图分类号: Q555 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2000)02-0132-38

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)是一类长期应用于食品发酵业的有益微生物,这种食品级微生物能经受胃肠液考验并在人体内存活 2-3d,其本身不攻击肠粘膜并且不引起强的免疫反应^[1]。近年来乳酸乳球菌分子生物学进展迅速,一系列乳酸乳球菌基因表达载体和受体系统逐步建立^[2]。因此,乳酸乳球菌基因工程菌在功能食品、医疗保健及微生物制剂、人工口服疫苗等领域的应用均具有诱人的前景。谷胱甘肽硫转移酶(GST)家族是真核生物最重要的解毒酶类。人谷胱甘肽硫转移酶(hGST)对于多种来源的致癌物、诱变剂、杀虫剂、环境污染物及过氧化损伤因子均具有重要的解毒作用,已有证据表明,某些 GST 活性的丧失与某些癌症的高频发生呈正相关^[3,4]。目前至少有十几种 hGST 基因被克隆并进行了结构与功能等方面的研究^[5]。人谷胱甘肽硫转移酶 A1(hGSTA1)是人肝中含量最多的 hGST 之一,具有重要的解毒功能,已在大肠杆菌中克隆和表达^[6]。本文首次报道了 hGSTA1 基因在食品级微生物乳酸乳球菌中的克隆及活性表达,这对于以乳酸乳球菌为基础的防癌保健食品或药品的研究将具有理论意义和应用前景。

1 材料和方法

1.1 人肝组织

健康人肝组织由北京红十字朝阳医院器官移植研究室惠赠, -70℃ 保存。

* 国家自然科学基金(39800080)和微生物资源国家重点实验室项目资助

** 通讯联系人

作者简介:向 华(1969-),男,四川万县人,博士,中国科学院微生物研究所博士后出站,主要从事微生物分子生物学研究。现在美国华盛顿从事博士后研究工作

收稿日期:1998-12-24,修回日期:1999-04-05

1.2 质粒、菌株及培养条件

乳酸乳球菌 MG1363 和质粒 pMG36e 为荷兰 Groningen 大学 J. Kok 博士赠送,其余菌株和质粒均为本室保存或本工作构建。其中大肠杆菌 JM109 用于质粒 pET23b, pMG36e 及其衍生质粒保存或扩增的标准菌株。大肠杆菌 BL21(DE3)(pLysS)和乳酸乳球菌 MG1363 分别用于 hGSTA1 重组表达质粒 pET23bhgst 及 pMG36ehgst 的表达菌株。

大肠杆菌用 LB 培养基,乳酸乳球菌用 GM17 培养基。乳酸乳球菌电穿孔转化子用 SGM17 培养基。氨苄青霉素使用浓度为 100 μ g/mL。红霉素使用浓度大肠杆菌为 150 μ g/mL,乳酸乳球菌为 5 μ g/mL。培养基配制及培养条件等同前文^[7]。

1.3 酶和试剂

所用内切酶为 Boehringer 公司产品;T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶及羊抗兔酶标二抗为华美公司产品;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)为英国 Northumbria 公司产品;还原型谷胱甘肽(GSH)、1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)及谷胱甘肽琼脂糖为 Sigma 公司产品。

1.4 人肝总 RNA 制备及 RT-PCR 扩增

人肝总 RNA 采用异硫氰酸胍/酚/氯仿方法制备^[8]。hGSTA1 引物按文献^[9]报道的 DNA 序列设计,其中 3'端引物 P1:5'CCGAATTCTCCATGACTGCGTTATTA3'引入了 EcoRI 位点,5'端引物 P2:5'TCCATATGGCAGAGAAGCCCAAGC3'引入了 NdeI 位点。RNA 经 AMV 逆转录酶作用获得 cDNA 用作 PCR 模板。25 个热循环按 95 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min 进行。

1.5 重组质粒的构建

有关分子克隆、大肠杆菌感受态制备及转化按文献^[10]操作;乳酸乳球菌转化采用电穿孔转化法^[7]。各重组质粒构建及验证如下:(1)pET23bhgst,RT-PCR 扩增的 hGSTA1 cDNA 经 DEAE 膜回收纯化后,用 NdeI 及 EcoRI 双酶切,克隆至 pET23b 的相同位点,转化 JM109,提取质粒进行酶切鉴定,并采用 Taq 酶双链 DNA 循环测序^[11]对克隆序列进行确证。(2)pMG36ehgst:质粒 pET23bhgst 经 NdeI 酶切,Klenow 酶补平,再经 SalI 酶切获得 hGSTA1 基因片段,插入 pMG36e 的 SmaI 和 SalI 位点,获得重组质粒 pMG36ehgst,电穿孔法转化乳酸乳球菌 MG1363 进行表达分析。

1.6 hGSTA1 纯化及 SDS-PAGE 分析

hGSTA1 纯化采用谷胱甘肽琼脂糖亲和层析法^[12],SDS-PAGE 按文献^[10]操作。

1.7 抗体制备及 Western 印迹杂交

将纯化后的 hGSTA1 约 50 μ g 与弗氏完全佐剂等体积混合,肌肉及皮下注射兔子。第 28d 加倍剂量,直接肌肉注射,第 35d 相同剂量再次加强免疫,第 42d 于耳静脉取血获得 hGSTA1 兔抗血清。Western 杂交基本按文献^[13]进行,提取 hGSTA1 乳酸乳球菌工程菌及大肠杆菌工程菌总蛋白经 SDS-PAGE 电泳,电转移蛋白到尼龙膜上。用适当的缓冲液洗膜,加 hGSTA1 兔抗血清杂交过夜。再用适当的缓冲液清洗后,加羊抗兔酶标二抗温育,酶促显色观察。

1.8 hGSTA1 酶活性测定

谷胱甘肽硫转移酶活性测定基本按文献^[14]方法进行,以 GSH 和 CDNB 为底物,加

适量的 hGSTA1 在 25℃ 条件下进行转化结合反应,产物可在 340nm 处测定 OD 值。

2 结果

2.1 hGSTA1 基因 RT-PCR 扩增及 cDNA 克隆

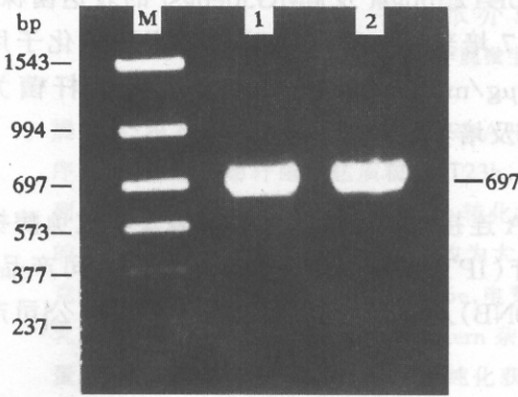


图 1 人谷胱甘肽硫转移酶 cDNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of hGSTA1 cDNA

采用异硫氰酸胍法制备了人肝总 RNA,以 hgstA1 3'端引物 P1 作逆转录引物,在 42℃ 经 AMV 逆转录酶作用合成 cDNA。取 2 μ l 逆转录产物作模板进行 PCR 扩增。为减少 PCR 反应中可能发生的碱基错配,PCR 循环参数由常规的 30 个循环减少至 25 个循环,dNTP 终浓度由常规的 0.2mmol/L 减少至 0.1mmol/L;同时采用 5 个 Eppendorf 管同时进行 PCR 扩增,以减少相同错配。结果显示 RT-PCR 获得了预期大小(697bp)的 hgstA1 扩增产物(图 1)。

hGSTA1 cDNA PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,DEAE 膜回收纯化后,用 *Nde*I 和 *Eco*RI 双酶切,插入 pET23b 质粒的 *Nde*I 和 *Eco*RI 位化,转化 JM109,采用小量抽提质粒方法筛选到有 PCR 产物插入的阳性克隆。将其中 8 个克隆提取的质粒转化 BL21(DE3) (pLysS),通过 SDS-PAGE 检测 hGSTA1 表达来筛查正确的 hGSTA1 cDNA 序列。结果表明其中 7 个克隆表达预期大小的 hGSTA1 蛋白,只有 1 个克隆可能因 PCR 引入错配碱基,未见预期大小的 hGSTA1 表达。

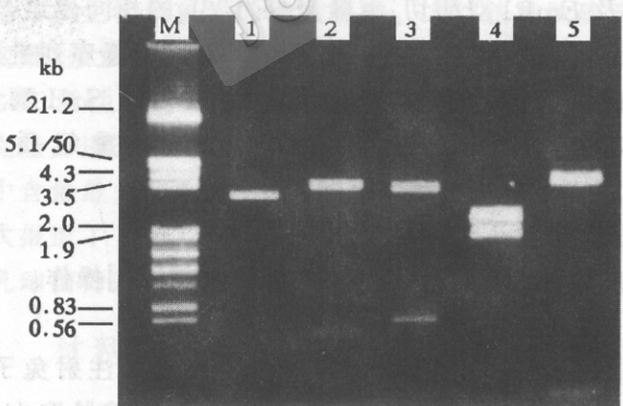


图 2 重组质粒 pET23bhgst 酶切产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of pET23bhgst digested with restriction enzyme

M. λ DNA/*Hind* III + *Eco*R I marker; 1. pET23bhgst, 2~5. pET36bhgst digested with *Pvu* II, *Bgl* II + *Sal*I, *Pst*I, *Hind* III.

质粒 pET23bhgst 酶切分析与预期完全相同(图 2)。以 pET23bhgst 为模板,T7 启动子引物及 T7 终止子引物为测序引物,采用 Taq 酶进行双链 DNA 循环测序表明,克隆的 hGSTA1 cDNA 与文献 [9]发表的序列完全相同。因此进一步用于研究其在乳酸乳球菌中的克隆表达及活性分析。

2.2 hGSTA1 在 *E. coli* 中的高效表达、纯化及抗血清制备

首先进行了 hGSTA1 在大肠杆菌 BL2(DE3)/pET23bhgst 中的诱导表达,并通过亲和层析对表达的 hGSTA1 蛋白进行了纯化(图 3)。

结果表明:hGSTA1 表达产物量约为大肠杆菌可溶性总蛋白的 40% 以上,属高效表达。

图中 A0 为阴性对照, A1、A2 和 A3 为工程菌不同克隆。同时所表达的 hGSTA1 具有良好的 GSH 底物亲和性,经 GSH 琼脂糖亲和层析可获得高质量的 hGSTA1 纯品(图 3 中 B1、B2 和 B3 分别纯化自 A1、A2 和 A3)。将纯化的 hGSTA1 蛋白免疫家兔,42d 后获得 hGSTA1 的抗血清。

2.3 hGSTA1 在乳酸乳球菌中的组成型表达

由 pET23bhgst 经 *Nde*I 酶切, Klenow 酶补平, 再经 *Sal*I 酶切获得的 hGSTA1 目的基因片段, 插入 pMG36e 的 *Sma*I 和 *Sal*I 位点, 获得阅读框一致的可融合表达 hGST 的重组表达质粒 pMG36ehgst。该质粒既可在乳酸乳球菌中复制和表达外源基因, 也可在大肠杆菌中复制和表达外源基因。因此先在大肠杆菌 JM109 中筛选到正确的重组质粒 pMG36ehgst, 酶切鉴定后转入乳酸乳球菌中进行表达分析。pMG36ehgst 的酶切鉴定结果见图 4, 酶切图谱与预期结果完全相符。将该质粒通过电穿孔法导入乳酸乳球菌。从乳酸乳球菌中重新提取该质粒进行酶切分析图谱与图 4 亦完全一致, 未见质粒丢失及 hgstA1 基因缺失及重排现象。

pMG36ehgst 在乳酸乳球菌中表达融合型 hGSTA1 及其 Western 杂交结果见图 5。其中图 5A 为乳酸乳球菌 hGSTA1 工程菌、

大肠杆菌 hGSTA1 工程菌及相应含空载体菌株阴性对照总蛋白提取物 SDS-PAGE 结果。图 5B 示其 Western 杂交结果。结果表明: hGSTA1 可在乳酸乳球菌中获得组成型表达。由于在重组质粒 pMG36ehgst 中, hGSTA1 基因前融合有 15 个载体来源的密码子, 因此 pMG36ehgst 在乳酸乳球菌(样品 6)和大肠杆菌 JM109(样品 4)中表达的融合型 hGSTA1 的氨基端都融合有 15 个载体氨基酸, 所以比 pET23bhgst 在大肠杆菌中表达的天然型 hGSTA1(样品 2)分子量略大。pMG36ehgst 在 *E. coli* JM109(样品 4)和乳酸乳球菌 MG1363(样品 6)中表达的 hGSTA1 强度相当, 并均与 hGSTA1 抗血清呈免疫反应(图

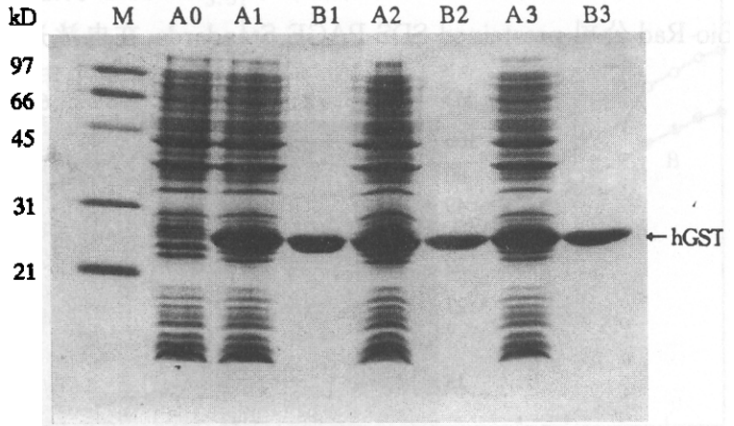


图 3 高效表达 hGSTA1 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.3 SDS-PAGE of over-expressed hGSTA1

M. Protein marker; A0. BL21(DE3) carrying pET23b; A1~3. BL21(DE3) carrying pET23bhgst; B1~3. hGSTA1 purified by affinity chromatography.

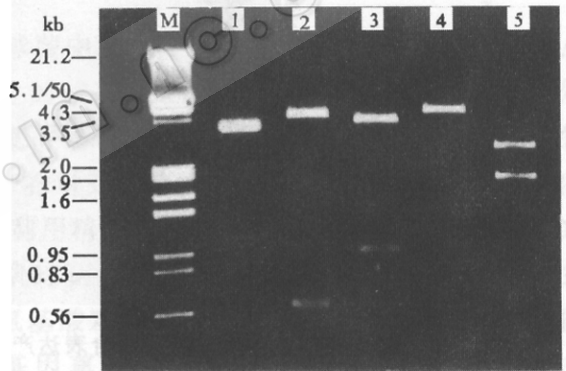


图 4 重组质粒 pMG36ehgst 酶切产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of pMG36ehgst digested with restriction enzyme

M. λ DNA/*Hind* III + *Eco*R I marker; 1. pMG36ehgst; 2~5. pMG36ehgst digested with *Pst* I, *Eco*R I, *Sal* I, *Hinc* II.

5B)。阴性对照(1、3 和 5 号样品)均无 hGSTA1 表达。图中所用蛋白质分子量标准为 Bio-Rad 公司 prestained SDS-PAGE Standards, 在电泳过程及杂交膜上均自动呈色。

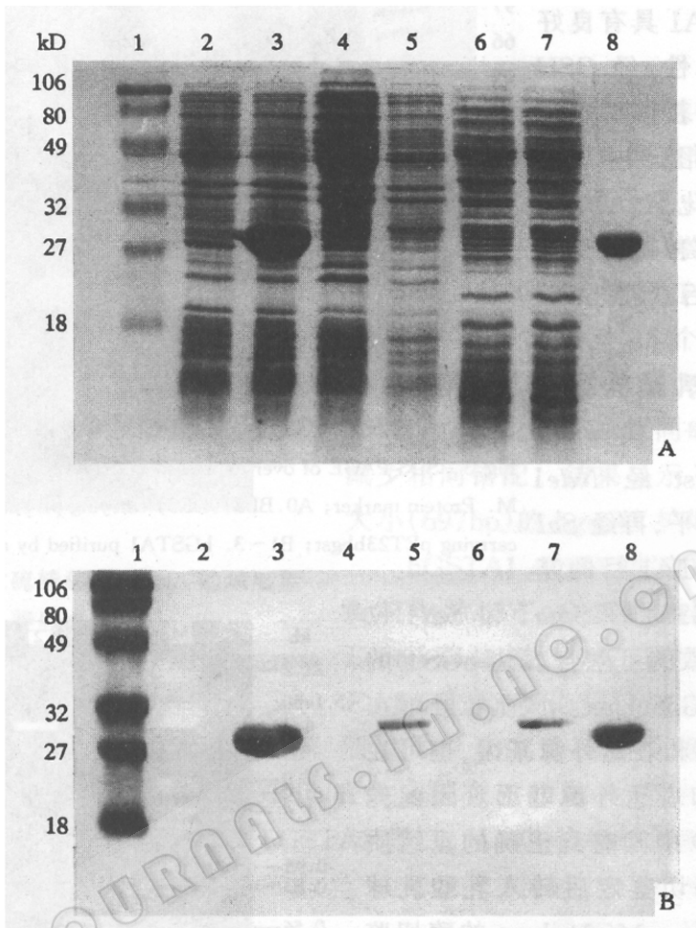


图 5 hgstA1 在乳酸乳球菌中融合表达产物的 SDS-PAGE(A)及 Western 杂交(B)结果

Fig. 5 SDS-PAGE(A) and Western blotting(B) of hGSTA1 expressed by *L. lactis*/pMG36ehgst

1. Prestained protein marker; 2. BL21(DE3)/pET23b; 3. BL21(DE3)/pET23bhgst; 4. JM109/pMG36e;
5. JM109/pMG36ehgst; 6. *L. lactis* MG1363/pMG36e; 7. *L. lactis* MG1363/pMG36ehgst;
8. hgstA1 purified from BL21(DE3)/pET23bhgst.

2.4 hGSTA1 活性分析

采用亲和层析法,通过 GSH-琼脂糖制备了乳酸乳球菌表达的融合型 hGSTA1 及大肠杆菌表达的天然型 hGSTA1。制备过程显示二者均具有良好的 GSH 亲和性。hGSTA1 活性分析表明均具有较高的谷胱甘肽硫转移酶活性。以 GSH 和 CDNB 为底物,在 25℃、pH6.5 的反应条件下,一个酶活单位被定义为每分钟催化 1 μ mol 的 CDNB 与 GSH 结合生成 S-(2,4-dinitrophenyl)-GSH,后者可根据 OD₃₄₀ 的吸收值随时间进行测定^[14]。结果显示 OD₃₄₀ 的吸收值递增(图 6)。根据 hGSTA1 酶用量及每分钟 S-(2,4-dinitrophenyl)-GSH 产率,可初步计算出大肠杆菌中表达的天然型 hGSTA1 和乳酸乳球菌中表达的融合型 hGSTA1 纯化产品的酶活单位分别为 37u/mg 蛋白和 29u/mg 蛋白,与 Sigma 公司生产的人源 hGSTA1 酶活性 25~120u/mg 相当。

3 讨论

乳酸乳球菌作为一类长期应用于乳品发酵的食品级微生物,最近十多年来其遗传学及分子生物学在国内外引起了广泛关注并获得迅速发展^[2]。其一,乳酸乳球菌本身具有大量的染色体外因子如质粒和噬菌体,为其载体系统的发展提供了极好的材料。其二,乳酸乳球菌易培养,遗传操作(如电穿孔法转基因等)方法成熟简便。其三,乳酸乳球菌本身为食品级,并具有分泌蛋白质的能力,因此可望用以构建新型的食品级基因克隆表达的受体系统。乳酸乳球菌在表达异源多肽或蛋白、研制新型功能食品、药品及防癌保健品等领域具有极好的应用前景。

本研究采用 RT-PCR 技术,从健康人肝组织克隆了人 hGSTA1 基因,并在乳酸乳球菌中实现了活性表达。在 hGSTA1 cDNA 克隆过程中,考虑到 RT-PCR 过程中经常发生的碱基错配,我们采用了减少 PCR 循环次数,降低 dNTP 浓度及适当提高引物退火温度等措施。同时用诱导表达质粒 pET23b 作为最初的克隆载体,通过分析克隆基因表达产物对克隆片段的正确性进行鸟枪法筛选,然后再进行序列分析确证。结果证明该策略是利用精确度较低的国产 Taq 酶克隆功能 cDNA 正确序列的有效方案。hGSTA1 在乳酸乳球菌中呈融合表达,仍具有较好的谷胱甘肽硫转移酶活性。说明氨基端融合的 15 个氨基酸对其结构和功能影响较小。为以乳酸乳球菌为宿主菌表达有医用价值的外源基因奠定了基础。不过,目前所用的载体 pMG36e 尚含有红霉素抗性基因,不宜直接将其用于食品发酵或直接用作保健药品,因此,我们正在研制其食品级表达系统,以食品级选择标记代替该抗生素选择标记,该项工作的完成将具有广泛适用性和更直接的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Klijin N, Weerkamp A H, de Vos W M. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**:2771~2774.
- [2] 向 华,谭华荣,刘敬忠. *微生物学通报*, 1998, **25**(4):230~232.
- [3] Bell D A, Taylor J A, Paulson D F, et al. *J Natl cancer Inst*, 1993, **85**,1159~1164.
- [4] Clapper M L, Szarka C E. *Chemico-Biological Interactions*, 1998, **111~112**:377~388.
- [5] Hayes J D, Pulford D J. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1995, **30**:445~600.
- [6] Board P G, Pierce K. *Biochem J*, 1987, **248**:937~941.
- [7] 向 华,刘敬忠,胡 维,等. *微生物学报*, 1999, **39**(3):196~204.
- [8] 刘敬忠,向 华,胡 维,等. *生物工程学报*, 1998, **14**(4):384~388.
- [9] Board P G, Webb G C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**:2377~2381.
- [10] Sambrook J, Fristch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second ed, New York: Cold Spring Harbor, 1989.

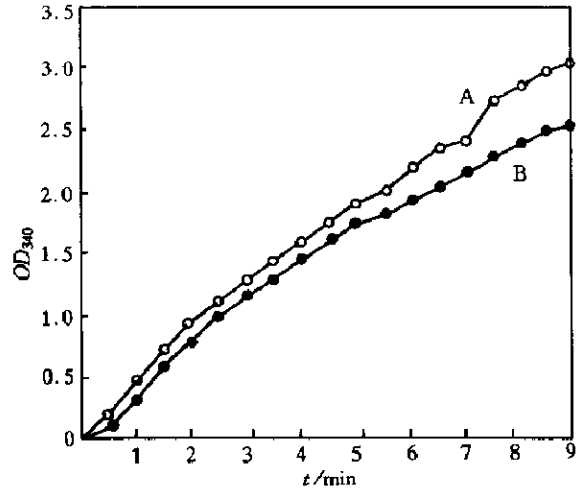


图 6 hGSTA1 酶活性分析

Fig.6 Activity analysis of hGSTA1 expressed by *E. coli* BL21(DE3)/pET23bhgst(A) and *L. lactis* MG1363/pMG36ehgst(B).

- [11] Liu Jingzhong, Xiang Hua, Zhou Yan, et al. *Genet Anal-Biomol E*, 1998, 14: 113~116.
 [12] Smith D B, Johnson K S. *Gene*, 1988, 67: 31~40.
 [13] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76, 4350~4354.
 [14] Habig W H, Jakoby W B. *Meth Enzymol*, 1981, 77, 398~405.

EXPRESSION AND ACTIVITY ANALYSIS OF THE HUMAN GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE IN *LACTOCOCCUS LACTIS* *

Xiang Hua Xhang Yiqing Wei Wenzhong Tan Huarong
 (Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: The glutathione-S-transferase A1 cDNA was amplified from human liver total RNAs by RT-PCR and was cloned into a *Escherichia coli* expression vector pET23b, then the recombinant plasmid pET23bhgst was introduced into *E. coli* BL21(DE3) and induced by IPTG, the high-level expression of hGSTA1 appeared in the *E. coli* cells. The cDNA encoding hGSTA1 was subcloned into pMG36e, a lactococcal expression vector, and introduced into *Lactococcus lactis* MG1363 by electroporation. In the positive transformants, the hGSTA1 was expressed as a fusion protein which was verified by SDS-PAGE and Western blot. The hGSTA1 from both *E. coli* and *L. lactis* was purified by affinity chromatography on glutathione-agarose and all showed enzymatic activity. The potential application of the recombinant *Lactococcus lactis* in functional food was also discussed.

Key words: Glutathione-S-transferase, Gene cloning and expression, *Lactococcus lactis*

* Project Granted by Chinese National Science fund(39800080)

“微生物好氧发酵法工业化生产丙三醇(甘油)” 荣获国家技术发明二等奖

由无锡轻工大学诸葛健教授领衔的研究室研究开发的上述课题有下列三项创新点:适于好氧发酵丙三醇的菌种的选育,从自然界分离选育获得适于好氧发酵丙三醇优良生产新菌种,产甘油假丝酵母(*Candida glycerolgenesis*),糖转化甘油率超过国际著名学者认为的 51%“理论值”达到 60%;好氧发酵法生产丙三醇的工艺参数的制定和发明了以特殊无机载体蒸馏技术与装置为主要内容的发酵丙三醇提取技术与工艺参数的确定,解决了世界发酵丙三醇工业化的最大难题。从而名列一九九九年度国家技术发明二等奖前茅(一等奖空缺)。该项目的另一特点是具有完整的独立知识产权。

诸葛健提供