

人谷胱甘肽硫转化酶基因 在链霉菌的高效表达

谭华荣 田宇清

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

谷胱甘肽硫转化酶(GST)是一个具有广泛底物专一性,与一些化学致癌物代谢有关的酶的一个家族^[1-3]。它既有谷胱甘肽硫转化酶的活性,也有过氧化物酶的活性,能使谷胱甘肽分子上的巯基(SH)与广泛的亚硝基苯类化合物结合,使这类致癌物转化成无毒的化合物^[4]。它亦能与细胞内源的一些阴离子化合物(如胆红素和亚铁血红素)结合并参与运输。在人体中,GST的缺乏常与新生儿非溶血性的胆红素积累而导致的病因有关,同时GST在保护生物体过氧化反应的损伤中也起着重要的作用^[5]。

有关GST的研究最早是以鼠肝为材料,进行了酶的提取、纯化及分子结构方面的研究^[6,7]。近年来不少科学家以人肝为材料也展开了GST的一系列研究,目前已得到了人GST基因的克隆及序列分析^[8]。GST作为癌及肿瘤的治疗药物正在迅速发展。由于链霉菌有对外源基因的宽容性及良好的基因表达分泌系统,因此本文报道了有关人的GST基因在链霉菌的克隆和表达的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌(*E. coli*) JM109,变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*) TK54及质粒 Bluescript M13⁻为本研究组收藏。大肠杆菌正选择质粒pKRV由英国John Innes研究所Buttner博士赠送。链霉菌质粒表达载体pIJ6021由在英国John Innes研究所的Erico Takano博士惠赠。

1.1.2 培养基:大肠杆菌用LB培养基,按文献[9]方法配制。链霉菌液体生长培养基(YEME),原生质体再生培养基(R2YE)及基本培养基(MM)均按文献[10]配制。

1.1.3 抗生素:羧苄青霉素(Cb, carbenicillin)贮存液浓度为50mg/ml,使用浓度为50 μ g/ml。硫链丝菌素(Thio, thiostrepton)贮存液浓度为50mg/ml,在MM中使用浓度为7 μ g/ml,在R2YE培养基中使用浓度为50 μ g/ml,上述抗生素贮存液均置-20 $^{\circ}$ C冰箱保存。

1.1.4 酶和试剂:所用限制性内切酶EcoRV、BamHI及NdeI为华美生物工程公司产品。Bg1II和T4 DNA连接酶为Boehringer公司产品。Taq DNA聚合酶为Biolabs公司产品。异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)为英国Northumbria生化公司产品。亲和层析柱用谷胱甘肽琼脂糖(Glutathione-Agarose)为Sigma化学公司产品。

1.2 方法

1.2.1 质粒DNA的提取及PCR扩增:质粒DNA提取及纯化按文献[11]方法进行。多聚酶链式反应(PCR)按常规方法进行。来自人肝细胞的mRNA,经纯化后在反转录酶的作用下得到了cDNA。根

据文献报道的序列^[8], 在 GST 结构基因的翻译起始端 (ATG) 合成了加有 NdeI 位点的 28mer 的引物 (primer I), 而在终止密码子 (TAA) 后也合成了含有 Bgl I 位点的 30mer 的序列互补引物 (primer II)。扩增时 DNA 模板的浓度为 100ng, 引物浓度分别为 20pmol, 反应循环 25 次, 反应温度及时间分别为 96℃ 1min, 55℃ 1min 及 72℃ 1min。

1.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化: 按文献 [9, 11] 方法进行。

1.2.3 链霉菌原生质体制备、再生及转化: 按文献 [10, 11] 方法进行。

1.2.4 DNA 序列分析: 按文献 [12, 13] 方法进行。

1.2.5 蛋白提取及纯化: 构建的重组质粒转化变铅青链霉菌 TK54 而得到重组菌株, 取 0.1ml 链霉菌孢子悬液涂布在含有 7μg/ml 的硫链丝菌素的 MM 平皿上, 28℃ 培养 5d 后, 收集链霉菌孢子, 并把孢子悬浮在灭菌的无离子水中, 在冰上用超声波破碎 (每次 1min, 约 5 次), 离心收集上清。得到的粗样品用 Sephadex G-150 过滤, 然后用谷胱甘肽-琼脂糖层析柱进行亲和层析。层析柱用 10mmol/L Tris-HCl, pH7.6, 0.2mol/L KCl 洗脱三次, 去掉一些非特异性结合的多肽, 再用 10mmol/L Tris-HCl (pH7.6) 除盐。最后用含有 5mmol/L 硫-己基谷胱甘肽和 2.5mmol/L 谷胱甘肽 (GSH) 的 1mmol/L Tris-HCl (pH7.6) 洗脱样品, 由此可获得纯的谷胱甘肽硫转化酶。

1.2.6 抗体制备: 将纯化后的约 60μg GST 注射到兔子体内, 60d 后从兔子中获得了 GST 的免疫抗血清。

1.2.7 Western 印迹杂交: 基本上按文献 [14] 方法进行。在大肠杆菌中高效表达后的 GST, 经总蛋白提取及 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后, 电转移蛋白带到尼龙膜上。用适当的缓冲液洗膜, 加抗血清杂交过夜。膜再用适当的缓冲液清洗后, 加羊抗兔二抗进行结合反应并通过染色观察。

1.2.8 GST 酶活测定: 按文献 [15] 方法进行。以还原谷胱甘肽 (GSH) 和 1-氯-2, 4-二硝基苯 (CDNB) 为底物, 加适量的 GST 在 25℃ 条件下进行转化结合反应, 产物可在 340nm 处测定 OD 值。

2 结果和讨论

2.1 PCR 扩增及序列分析

从人肝细胞中提取了 mRNA, 以纯化后的 mRNA 为模板在反转录酶的作用下, 合成了 cDNA。以 cDNA 为模板, 用合成的两引物通过 PCR 技术扩增了 GST 基因。纯化后的 DNA 被亚克隆到 EcoRV 酶切的 pKRV 质粒上。然后再克隆到 Bluescript M13⁻ 质粒上, 用 Taq DNA 聚合酶进行了碱变性后的双链测序 (图略)。序列分析表明 PCR 扩增的 GST 基因无误, 所加的 NdeI 和 Bgl I 两个限制性内切酶位点都是正确的。

2.2 GST 基因的诱导表达

经序列分析验证后的约 0.75kb 的 GST 基因被亚克隆到 NdeI 和 Bgl I 酶切的质粒 pIJ6021 上, 并转化变铅青链霉菌 TK54, 以卡那霉素为抗性标记得到了转化重组菌株。经质粒 DNA 的提取, 限制性内切酶酶切, 证明重组质粒的结构是正确的。该质粒被命名为 pIJ4486。含有重组质粒 pIJ4486 的变铅青链霉菌 TK54, 经硫链丝菌素诱导后, 收集的链霉菌孢子进行了总蛋白的提取及 GST 的纯化。用 12% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 经染色和脱色后可以清楚地看到总蛋白中的 GST 带, 其表达量约为可溶性蛋白总量的 15% (图 1), 以标准的蛋白分子量为对照, 可知 GST 的分子量约为 25ku (图 1)。

以纯化后的谷胱甘肽转化酶为抗原, 免疫家兔后得到抗血清。从变铅青链霉菌 TK54/pIJ6021 (载体自身), TK54/pIJ4486 (载体中插入有 GST 基因) 分离提取的总蛋白以及来源于 Sigma 公司的人的 GST 分别与得到的抗血清进行 Western 印迹杂交, 来自 TK54/pIJ4486 的蛋白以及来自 Sigma 公司的人的 GST 杂交后给出了强的阳性杂交信号, 而来自 TK54/pIJ6021 的蛋白杂交后的相同位置未见杂交信号 (图 2)。结果表明 GST 确在链霉菌中得到了高效表达, 并有生物活性。

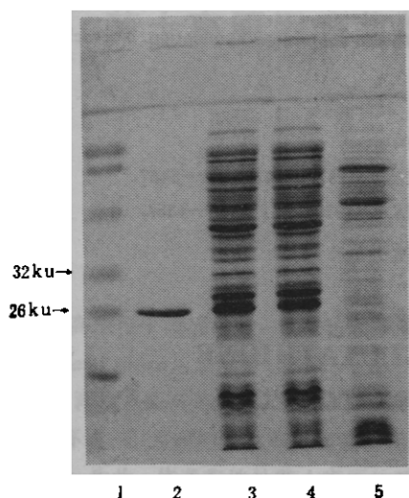


图1 GST 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

1. 标准蛋白分子量;
2. 纯化后的 GST;
3. 蛋白提取物来自 TK54/pIJ4486 (1mmol/L IPTG 诱导);
4. 蛋白提取物来自 TK54/pIJ4486 (0.1mmol/L IPTG 诱导);
5. 蛋白提取物来自 TK54/pIJ6021 (1mmol/L IPTG 诱导)。

GST→

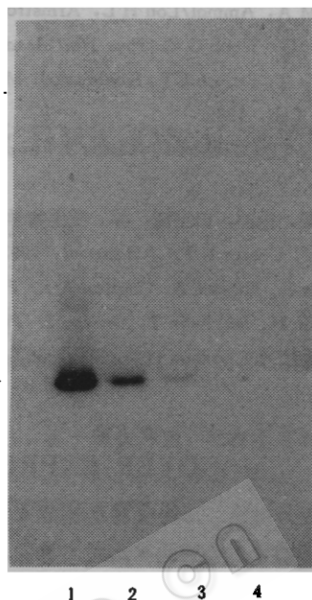


图2 GST 的 Western 印迹杂交

1. GST 来自 Sigma 公司;
2. GST 来自 TK54/pIJ4486;
3. GST 来自 Sigma 公司 (稀释 100 倍);
4. 蛋白提取物来自 TK54/pIJ6021。

纯化后的 GST 以谷胱甘肽 (GSH) 和 1-氯-2, 4-二硝基苯 (CDNB) 为底物, 通过转化结合进行了酶活的初步测定。在 25℃, pH6.5 的反应条件下, 一个酶活单位是每分钟 1μmol 的 CDBN 与 GSH 的结合。根据 OD₃₄₀ 的吸收值, 可初步计算出酶活单位 (14μ/mg 蛋白)。

从上述试验结果可以看出, 人谷胱甘肽硫转化酶能在链霉菌中高效表达, 且有生物活性。某些在大肠杆菌中高效表达的基因产物, 一般以包涵体的形式存在。虽然包涵体在蛋白纯化中提供了方便, 但这种不溶性蛋白不具有生物活性。而同样的基因在链霉菌中表达时, 大部分基因产物是可溶性蛋白。如与链霉菌分化有关的 *whiG* 在大肠杆菌中表达时其产物——σ^{whiG} 全是不溶性的蛋白, 而当其在链霉菌中表达时是可溶性的蛋白, 这表明链霉菌这个系统具有潜在的发展意义。

参 考 文 献

- [1] Chasseaud L F. *Advance in Cancer Research*, 1979, **29**: 175—274.
- [2] Stockman P L, Beckett G J, Hayes J D. *Biochem J*, 1985, **227**: 257—465.
- [3] Evans C G, Bodell W J, Tokuda K *et al.* *J Cancer Research*, 1987, **47**: 2525—2530.
- [4] Habig W H, Pabst M J, Jakobg W B. *J Biol Chem*, 1974, **249**: 7130—7139.
- [5] Board P G, Pierce K. *Biochem J*, 1987, **248**: 937—941.
- [6] Gillham B. *Biochem J*, 1973, **135**: 797—804.

- [7] Sesay M A, Aamodt/Lon H L, Armstrong R N. *J Mol Biol*, 1987, **197**: 377—378.
- [8] Board P G, Webb G C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 2377—2381.
- [9] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab, 1982.
- [10] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al*. *Genetic Manipulation of John Innes Foundation*. Norwich, England, 1985.
- [11] 谭华荣, 徐冲, 田宇清, 等. *微生物学报*, 1994, **34** (5): 339—344.
- [12] Tan H, Chater K F. *J Bacteriol*, 1993, **175** (4): 933—940.
- [13] Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**: 5463—5467.
- [14] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 4350—4354.
- [15] Hayes J D, Clarkson H D. *Biochem J*, 1982, **207**: 459—470.

OVER-EXPRESSION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE IN *STREPTOMYCES*

Tan Huarong Tian Yuqing

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract mRNA was isolated and purified from human liver, and it was also used as templet for cDNA synthesis under the existence of reverse transcriptase. Two primers were designed and synthesized according to GST gene sequence which has been reported, GST gene was obtained using cDNA as templet and PCR technique. The sequencing result indicated that the GST gene is reliable, it was subcloned into NdeI and Bgl I sites of plasmid pIJ6021, and then introduced into *Streptomyces lividans* TK54. Proteins were isolated from transformants (TK54/pIJ4486 and TK54/pIJ6021) respectively, SDS-PAGE result showed that the GST over-expressed and its yield is about 15% in soluble proteins in *Streptomyces*.

Key words Glutathione S-transferase, *Streptomyces*, Over-expression