

## 谷胱甘肽合成酶系的克隆、测序及表达

沈立新 魏东芝\* 赵哲峰 张嗣良 王二力

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 生物化学研究所, 上海 200237)

关键词  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶, 谷胱甘肽合成酶

中图分类号 Q753 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0098-03

谷胱甘肽(Glutathione, GSH)是由  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSHI)及谷胱甘肽合成酶(GSHII)连续催化合成的一种巯基化合物,有维持细胞正常的还原状态、保护细胞免受重金属的侵害等重要的生理功能,在临床、食品、保健品等方面有广泛的用途,如:重金属解毒、癌症的辐射和化疗的保护、HIV 的抑制、抗氧化等。

近年来,采用 DNA 重组技术构建高 GSH 合成活性的重组菌成为 GSH 生物合成研究中的新方向。Murat<sup>[1]</sup>等成功构建了具有较高 GSH 合成活性的重组 *E. coli*。国内曾对酵母发酵过程优化及提取进行了研究<sup>[2,3]</sup>,李寅<sup>[4]</sup>等对一株重组大肠杆菌 WSH-KE(韩国仁荷大学赠)的高密度培养合成 GSH 进行了研究,培养后期,由于酶表达量的减少及酶活的降低导致胞内 GSH 的含量下降。国内尚无 GSH 高合成活性工程菌构建的报道。由于 GSH 是胞内产物及其在细胞内特殊的生理调节作用<sup>[5]</sup>,使工程菌所表达的酶在培养过程中不能充分发挥作用。采用固定化高表达、高 GSH 催化活性的工程菌既可克服上述不利之处,又利于提取及纯化。本文基于此目的,构建了含 GSHI 及 GSHII 基因的质粒 pTrec-sh,并对其在大肠杆菌中的表达进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与质粒

*E. coli* B, *E. coli* BL21(宿主菌),质粒 pUC19、pTrec99A 为本实验室保存。

### 1.2 培养基与试剂

1.2.1 培养基 LB 培养基,使用前加入 100 u/mL 氨苄青霉素。

1.2.2 试剂:限制酶、T4DNA 连接酶购自 MBI 公司,5-三磷酸-腺苷(ATP),异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷(IPTG)为 Sigma 公司分装产品,谷氨酸、甘氨酸、GSH 由华美生物工程公司购得,半胱氨酸由丽珠东风生物工程公司购得,酵母膏为英国产,其它试剂为国产分析纯。

### 1.3 实验方法

1.3.1 引物设计:按 Hiroshi<sup>[6,7]</sup>报道的序列,经微机分析,设计两对引物:

gshi 上游引物:GCTCTAGATTTTGACAG GCGGGAGG(含 *Xba*I 位点),gshi 下游引物:CCCAAGCTTGAGTATATG AAAGACG(含 *Hin*D III 位点);

gshii 上游引物:CGGGATCCAGCATCAAT ACGTTGCC(含 *Bam* HI 位点),gshii 下游引物:GCTCTAGAAACGA-GATC CTTCTCG(含 *Xba*I 位点)。

1.3.2 分子生物学操作、PCR、SDS-PAGE、琼脂糖电泳均参考文献[8]。

1.3.3 培养与诱导:于斜面挑选单菌落接入含氨苄青霉素(100 u/mL)的 LB 培养基,37℃ 培养至  $OD_{550} = 0.5$  左右,以 IPTG(0.1 mmol/L)诱导表达,具体参数随设计条件改变。

生物量的测定:取 0.5 mL 发酵液,稀释 10 倍,测定 550 nm 的  $OD$  值。

1.3.4 质粒稳定性的研究:将斜面单菌落接入不含 Ap 的 LB 培养基中 37℃ 培养 6 h 作种子,转种培养 6 h,每隔 6 h 按 1% 的量重新接种培养,同时取样,以无菌水稀释至  $10^{-5} \sim 10^{-7}$ ,取 100  $\mu$ L 涂布于不含 Ap 的 LB 平皿,以无菌牙签将单菌落分别挑至不含和含 Ap 的 LB 平皿上,统计形成的菌落。

1.3.5 酶活的测定:5 mL 培养液于  $12\ 000 \times g$  离心 15 min,弃上清液,以 0.05 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液洗涤,离心后得菌体。将菌体再以同样的磷酸缓冲液 4 mL 悬浮后超声波 90 kHz 破碎 5 min,加入 GSH 前体反应液(谷氨酸、甘氨酸、半胱氨酸浓度均为 40 mmol/L,  $MgCl_2$ : 50 mmol/L, ATP: 50 mmol/L) 4 mL, 37℃ 反应 30 min,按文献[9]测定酶活。酶活单位(u)定义为每分钟催化合成 1  $\mu$ g GSH 所需的酶量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 基因 gshI、gshII 分别克隆及测序

3 mg/mL 溶菌酶裂解 *E. coli* B,提取的 DNA 按约 1000 个拷贝/ $\mu$ L 溶于 pH8.0 的 TE 中作为 PCR 的模板,利用两对引物分别扩增对应的基因,PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖电泳检测,可清晰见到大小分别为 1600 bp 和 1200 bp 左右的扩增条带,与 gshI(1668 bp)和 gshII(1191 bp)大小大致相符,见图 1。纯化的目的片段分别与 pUC19 经 *Sam*I 消化后的片

段连接 ,连接产物转化 *E. coli* BL21 ,以氨苄青霉素作抗性标记筛选转化子 ,扩增培养获得大量质粒 DNA ,酶切、电泳鉴定得到重组质粒 pUC-gshI 和 pUC-gshII。随机挑选阳性克隆 ,分别测定 gshI 的下游及 gshII 的上游部分序列 ,与文献 [ 8 9 ]报道一致。

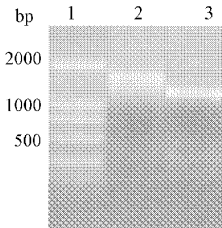


图 1 PCR 产物琼脂糖电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products

1. DNA ladder 2. gshI 3. gshII

2.2 重组质粒 pTrc-gsh 的构建

酶法合成 GSH 过程中 ,GSHII 催化的第二步是限速步骤<sup>[ 5 ]</sup> ,GSH 对 GSHI 具反馈抑制<sup>[ 7 ]</sup> ,综合考虑两因素 ,本文将 gshI 和 gshII 以 1 : 1 的拷贝比例进行重组质粒 pTrc-gsh 的构建 ,见图 2。质粒 pUC-gshII 以 *Bam*HI 和 *Xba*I 双酶切 ,低

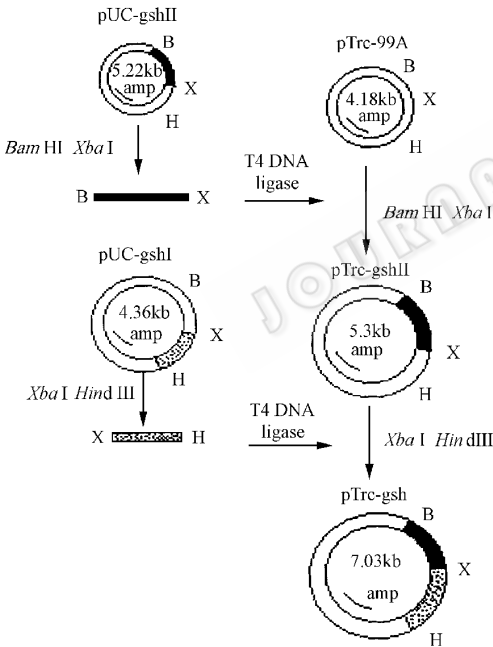


图 2 质粒 pTrc-gsh 的构建

Fig. 2 Scheme for construction of hybrid pTrc-gsh.

■ DNA fragment with gshI gene ; ■ DNA fragment with gshII gene  
□ vector plasmid pUC19 or pTrc99A Symbols B. *Bam*HI X. *Xba*I ;  
H. *Hind*III & amp. The genes for the resistance to ampicillin

熔点胶分离后与经相同酶切的表达载体 pTrc99A 连接 ,连接产物转化 *E. coli* BL21 ,转化子酶切鉴定后获得质粒 pTrc-gshII。同样地 ,质粒 pUC-gshI 以 *Xba*I、*Hind*III 双酶切后分离纯化 ,与经同样酶切的 pTrc-gshII 连接 ,得质粒 pTrc-gsh。将含表达质粒的单克隆菌株培养至  $OD_{550} = 0.5$  左右以 IPTG 诱导 3h 后进行 SDS-PAGE 分析 ,见图 3。结果表明 :

经 IPTG 诱导后可见分子量为 55kD (gshI) 及 38kD (gshII) 的诱导条带 ,凝胶自动扫描分析表明 :表达量占总蛋白的 25%。酶活测定结果表明 IPTG 诱导 3h 后 *E. coli* BL21 (pTrc-gsh) 的比活达 80u/mg ,约为对照菌的 3~4 倍。

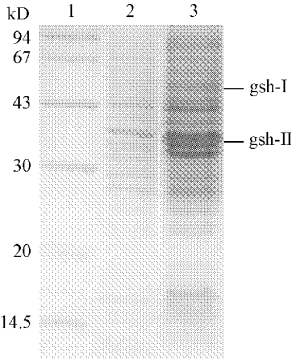


图 3 SDS-PAGE 分析图谱

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression products in *E. coli* BL21

1. Molecular weight standard marker ;  
2. Control ; 3. *E. coli* BL21( pTrc-gsh )

2.3 质粒的稳定性

质粒在不加压的情况下连续转种 8 次 ,统计在加和不加 Ap 的平皿中的菌落数 ,结果见表 1。表 1 表明 *E. coli* BL21 (pTrc-gsh) 在加和不加 Ap 的平皿上的菌落数一致 ,通过 SDS-PAGE 电泳及酶活分析 ,表达水平基本相同 ,说明质粒在 *E. coli* BL21 中是很稳定的。

表 1 工程菌连续转种后在 Ap 平皿上的菌落数

Table 1 Number of colony on the Ap-containing plates after successive passage of *E. coli* BL21( pTrc-gsh )

No. of passages	Ap( + )	Ap( - )
F1	106	106
F3	102	102
F6	100	100
F8	99	99

2.4 表达条件的优化

2.4.1 诱导时机及诱导时间 :诱导剂加入时机对外源基因表达非常重要 :加入过早 ,菌体浓度过低 ,外源蛋白表达量小 ,加入过晚 ,菌体老化 ,菌体内蛋白合成酶活力降低 ,对外源蛋白表达不利。对培养至不同  $OD_{550}$  的培养物加入诱导剂 IPTG ,诱导培养 3h 后测定比活 ,发现  $OD_{550}$  为 0.5 左右时加入 IPTG 较为合适。在上述条件下对 IPTG 诱导后不同时间的菌体比活进行测定 ,结果表明 :IPTG 诱导 3h 后比活不再增加 ,说明 IPTG 的诱导至少要持续 3h ,3h 后菌体发酵效率的提高依赖于菌体密度的增加。

2.4.2 诱导后 pH 的影响 :适合菌体生长的 pH 不一定是外源蛋白表达的最适 pH ,加入诱导剂后采用适宜的 pH 有利于外源蛋白的表达。按上述优化条件进行培养诱导后 ,调节 pH 为 5.8 6.0 6.4 6.7 7.0 7.2 ,诱导培养 ,测定比酶活 ,结果显示 :表达酶蛋白的最适 pH 为 6.7 ,低于菌体生长的最适 pH 7.0。因此诱导剂 IPTG 加入后应调 pH 至 6.7。

**2.4.3 诱导后温度的影响** 诱导后温度过高,造成外源蛋白无活性及稳定性下降,温度过低,不利于菌体的生长。为此进行诱导后不同温度对表达的影响的研究。用同样方法,加入 IPTG 后,分别于 27、30、34、37、40℃ 诱导培养,结果表明,酶蛋白表达的最适温度为 34℃,低于菌体生长的最适温度 37℃。

## 2.5 重组 *E. coli* BL21(pTrc-gsh)催化合成 GSH

为了检验构建的 *E. coli* BL21(pTrc-gsh)催化合成 GSH 的能力,以 0.3g 丙酮通透处理后的细胞催化合成 GSH,结果见图 4:反应 90min 后 GSH 的合成量达 0.98g/L,表明表达产物具有有效的 GSH 催化活力,达到本研究的初始目的。

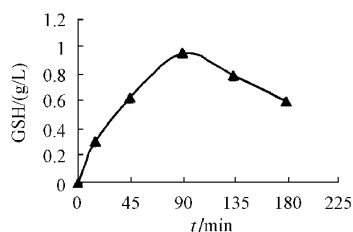


图 4 工程菌催化合成 GSH

Fig. 4 Enzymatic synthesis of GSH with acetone-treated cells of the genetic engineered strain

近年来,随着人们对 GSH 用途广泛深入的认识,其需求量日益增加。我国 GSH 基本上靠进口,尚无工业化生产的报道,构建高 GSH 合成活性的工程菌为今后的生产奠定了基础。本试验成功地构建了同时表达 GSH 合成酶系的两个酶的质粒 pTrc-gsh,并在 *E. coli* BL21 中得到表达,且具有较高的 GSH 催化活性,但 GSHI 表达量相对较低,影响了 GSH 的催化活力。要进一步提高 GSH 的催化活性,必需进一步协调、提高 GSHI 和 GSHII 的表达量之比及表达量,同时保证所表达的酶蛋白不形成包含体,具有催化活性,该工作与

该工程菌催化合成 GSH 的研究正在进行之中。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Murata K, Miya T, Gushima H *et al.* Cloning and amplification of a gene for glutathione synthetase in *E. coli* B, *Agric Biol Chem*, 1983, **47**: 1381~1383
- [2] LI Y (李寅), CHEN J (陈坚), ZHOU N (周楠迪) *et al.* The effect of environmental conditions and glucose feeding strategy on glutathione (GSH) production, *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1998, **14**(2): 147~152
- [3] ZHUO ZH W (卓肇文), ZHOU J X (周金鑫), ZHANG X X (张孝慈) *et al.* Production Crystal of Reduced Glutathione from yeast by a developed method, *Chinese Journal of Amino Acids* (氨基酸杂志), 1988, **3**: 6~9
- [4] LI Y (李寅), CHEN J (陈坚), LUN S Y (伦世仪) *et al.* Production of glutathione by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli*, *Chinese Journal of Pharmaceuticals* (中国医药工业杂志), 1999, **30**(1): 1~2
- [5] Apontowell P, and Berends W. Glutathione biosynthesis in *Escherichia coli* K12 properties of the enzyme and regulation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1975, **399**: 1~9
- [6] Kunihiro Watanabe *et al.* The nucleotide sequence of the gene for  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase of *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Research*, 1986, **14**(11): 4393~4400
- [7] Hiroshi Gushima *et al.* Complete nucleotide sequence of the *E. coli* glutathione synthetase gsh-ii, *Nucleic Acids Research*, 1984, **12**(24): 9299~9307
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] ZHAO X (赵旭东), WEI D (魏东芝), YU J (俞俊棠) *et al.* A Method for rapid determination of reduced glutathione in presence of cysteine, *Huadong Ligong Daxue Xuebao* (华东理工大学学报), 1999, **5**: 474~476

## Cloning and Expression of the Genes of Glutathione Synthetases

SHEN LI-Xin WEI Dong-Zhi\* ZHAO Zhe-Feng ZHANG Si-Liang WANG Er-Li

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Institute of Biochemistry,  
East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract** The genes (gsh-I, gsh-II) for  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetase (GSH-I) and glutathione synthetase (GSH-II) from *Escherichia coli* B were amplified by PCR and then subcloned into plasmid pUC19 respectively. The DNA fragments harboring gshII and gsh I were inserted into plasmid pTrc99A one by one to get a hybrid plasmid pTrc-gsh. *E. coli* BL21 was transformed by pTrc-gsh for expression of the related enzymes. Analysis of SDS-PAGE showed that the expected products were expressed. *E. coli* BL21(pTrc-gsh) were incubated at 37℃ and pH 7.2 to  $OD_{550} = 0.5$ . The conditions were then switched to 34℃ and pH 6.7 after the addition of 0.1mmol/L IPTG. The expressed products were up to 25% of the total protein of the bacteria. Acetone-treated cells of the engineered strain could synthesize GSH efficiently.

**Key words**  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase, glutathione synthetase

Received July 19, 2000

\* Corresponding author. Tel 86-21-64252981; Fax 86-21-64250068; E-mail: lzhwei@ecust.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn