

## 一个新的产黄青霉谷胱甘肽转移酶基因的克隆和鉴定

# Cloning and Characterization of a Novel Glutathione Transferase Gene from *Penicillium chrysogenum*

张 媛<sup>1,2</sup>, 王富强<sup>1,2</sup>, 郑桂珍<sup>2</sup>, 戴 梦<sup>2</sup>, 刘 静<sup>2</sup>, 赵 颖<sup>2</sup>, 任志红<sup>2</sup>, 赵宝华<sup>1\*</sup>, 贾 茜<sup>1,2\*</sup>  
ZHANG Yuan<sup>1,2</sup>, WANG Fu-Qiang<sup>1,2</sup>, ZHENG Gui-Zhen<sup>2</sup>, DAI Meng<sup>2</sup>, LIU Jing<sup>2</sup>, ZHAO Ying<sup>2</sup>, REN  
Zhi-Hong<sup>2</sup>, ZHAO Bao-Hua<sup>1\*</sup> and JIA Qian<sup>1,2\*</sup>

1 河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016

2 华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 石家庄 050015

1 College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

2 New Drug R&D Center, North China Pharmaceutical Co., Shijiazhuang 050015, China

**摘 要** 以产黄青霉(*Penicillium chrysogenum* Thom) cDNA 为模板, 克隆得到一个新的谷胱甘肽转移酶基因 *Pc<sub>gstB</sub>*, 其开放阅读框长 651bp, 编码 216 个氨基酸的蛋白质。与已知序列进行 BLASTp 比较显示, 该蛋白具有保守的 GST 结构域, 与烟曲霉 *GstB* 的序列一致性最高, 达 65%。将 *Pc<sub>gstB</sub>* 与原核表达载体 pTrc 99A 连接得到表达质粒 pTrc-*gstB*, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 经 IPTG 诱导后获得以可溶形式表达的重组 PcGstB 蛋白。以 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB) 为底物检测, 确认该蛋白具有 GST 活性。

**关键词** 谷胱甘肽转移酶, 产黄青霉, 原核表达, 活性测定

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0168-05

**Abstract** Glutathione transferases (GSTs) are a family of multifunctional proteins that mainly catalyze the conjugation of intracellular glutathione (GSH) to a wide variety of endogenous and exogenous electrophilic compounds. GSTs play important roles in stress tolerance and in the detoxification metabolism in organisms. A novel GST gene, *Pc<sub>gstB</sub>*, was cloned from penicillin producing fungus *Penicillium chrysogenum* using RT-PCR. The open reading frame (ORF) of *Pc<sub>gstB</sub>* was 651bp and encoded a peptide of 216 residues. The deduced amino acids sequence had conserved GST domain and showed 65% identity to the characterized *Aspergillus fumigatus* *gstB*. The entire ORF of *Pc<sub>gstB</sub>* was inserted into vector pTrc99A and transformed into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Recombinant PcGstB was overexpressed and its GST activity toward substrate 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) was validated.

**Key words** glutathione transferase, *Penicillium chrysogenum*, recombinant expression, enzyme assay

谷胱甘肽转移酶 (glutathione transferase, GST, EC 2.5.1.18) 是一个具有多种生理功能的同功酶家族, 存在于植物、动物和微生物等几乎所有的生物种类中, 分为胞内可溶性 GST、线粒体 GST 和微体 GST 三

Received: November 23, 2006; Accepted: December 21, 2006.

This work was supported by a grant from the National Key Sciences and Technologies R&D Program (2002BA711A16).

\* Corresponding authors. ZHAO Bao-Hua: Tel: +86-311-86268434; Fax: +86-311-86268313; E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com;

JIA Qian: Tel: +86-311-86057649; Fax: +86-311-6676507; E-mail: jiaqianzh@hotmail.com

国家科技攻关计划资助项目 (No: 2002BA7112A16)

种<sup>[1]</sup>。GST可以催化谷胱甘肽(glutathione, GSH)上的巯基-SH与生物体内源及外源的亲电子化合物(如芳烃氧化物、不饱和羰基、有机卤化物等)结合,形成更稳定、更易溶解的化合物,并将其泵出体外以达到解毒的目的<sup>[2]</sup>。另外,GST还参与体内化合物运输、细胞信号途径调控等。目前,GST的研究多集中在哺乳动物、植物、昆虫中,在动物中,GST可以加强体内有害物质的清除,保护生物体免受侵袭;在植物中,则在解除杀虫剂、除草剂毒性方面有很重要的作用。

可溶性GST的三级结构多为球状二聚体,亚基分子量介于23~29kD,每个亚基的多肽链形成两个结构域:N-末端为GSH结合位点;C-末端为亲电子物质结合位点,决定其底物的特性。根据它们的底物特异性、对抑制剂的敏感性、免疫学特性和氨基酸序列相似性,GST被分为许多亚型:哺乳动物中的可溶性GST可分为8种 $\alpha$ 、 $\mu$ 、 $\pi$ 、 $\sigma$ 、 $\theta$ 、 $\zeta$ 、 $\kappa$ 和 $\omega$ ;其他还有植物中特有的 $\varphi$ 和 $\tau$ 型GST,昆虫中的 $\delta$ 和 $\epsilon$ 型,以及细菌中的 $\beta$ 型GST<sup>[3]</sup>。在真菌中GST的研究相对还很少,且已经鉴别的真菌GST与已有的亚型都不相同<sup>[4]</sup>。

丝状真菌产黄青霉(*Penicillium chrysogenum* Thom)是重要的 $\beta$ -内酰胺类抗生素——青霉素的工业生产菌,具有重要的商业价值。许多研究表明,产黄青霉中GSH的代谢可能与青霉素的合成密切相关。首先,GSH( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine)在结构上类似于青霉素生物合成途径中的关键中间体 $\delta$ -(L- $\alpha$ -氨基己二酰)-L-半胱氨酰-D-缬氨酸(LLD-ACV)<sup>[5]</sup>。高浓度的GSH会抑制青霉素生物合成过程中关键酶的活性,从而影响青霉素的合成<sup>[6]</sup>;另一方面,GSH可能参与了青霉素G的合成前体苯乙酸(phenylacetate acid, PAA)的活化或降解过程<sup>[7-10]</sup>。但GSH在青霉素合成中的具体作用机制仍有待进一步研究。

*P. chrysogenum*中GSH代谢的相关基因的研究,对揭示GSH与青霉素合成的关系,提高苯乙酸的利用效率及青霉素的产量具有重要的意义。本研究从*P. chrysogenum*中克隆了一个新的GST基因,并通过原核表达确认了其编码蛋白的活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株:*P. chrysogenum* Wis54-1255,大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 由本室保存。

1.1.2 载体与试剂:原核表达载体pTrc 99A为Pharmacia公司产品,克隆载体pGEM-T购自Promega公司。各种限制性内切酶、T4 DNA连接酶、Taq酶、dNTP、随机引物(Random Hexamers)购自Promega公司,连接试剂盒DNA Ligation Kit Ver2.0购自TaKaRa, DNA凝胶回收试剂盒EZ-10 spin column DNA Gel Extraction kit购自BIO BASIC公司,反转录酶SuperScript<sup>TM</sup> II RNase H<sup>-</sup>为Invitrogen公司产品,1-Chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)购自Sigma公司,低分子量蛋白标准LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis购自Amersham Biosciences。

### 1.2 方法

1.2.1 *P. chrysogenum* RNA提取:*P. chrysogenum* Wis54-1255总RNA采用Trizol试剂(Invitrogen公司)按说明书提取,经RQ1 RNase-free DNase(Promega公司)处理去除DNA污染。取2 $\mu$ g总RNA用于第一链cDNA的合成。

1.2.2 *P. chrysogenum* *gstB*全长cDNA的克隆:根据前期的工作结果,设计了一对引物扩增*P. chrysogenum* *gstB*的全长cDNA。上游引物P1:5'-CCATGGAATCTCTCAAACCTATCA-3',下游引物P2:5'-GTCGACTTAGCGCCCGCACAAGC-3'。分别引入Nco I、Sal I的酶切位点。以*P. chrysogenum* Wis54-1255的cDNA作为模板进行PCR扩增目的基因片段。反应体系50 $\mu$ L,扩增条件为94 $^{\circ}$ C预变性5min,94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min,共35个循环,再72 $^{\circ}$ C延伸10min。目的基因片段经0.8%的琼脂糖凝胶电泳分离、回收,连入pGEM-T,经测序确认,得到质粒pGEMT-*gstB*。

1.2.3 PcGstB氨基酸序列的分子进化分析:从GenBank数据库中调出已经鉴定的真菌GST的氨基酸序列,用ClustW软件将已知序列与PcGstB进行多重比对,然后用MEGA软件构建系统进化树。

1.2.4 Pc*gstB*基因的原核表达:将质粒pGEMT-*gstB*用Nco I和Sal I双酶切,回收目的片段连接入用同样酶切的表达载体pTrc 99A,得到重组表达质粒pTrc-*gstB*,转入宿主菌*E. coli* DH5 $\alpha$ 中。菌株DH5 $\alpha$ /pTrc-*gstB*在LB培养基中于37 $^{\circ}$ C培养过夜,以1%的接种量转接到新鲜LB培养基中,在37 $^{\circ}$ C培养至A<sub>600nm</sub>为0.4~0.6,加入IPTG至终浓度为0.5mmol/L,37 $^{\circ}$ C诱导目的蛋白表达约4h。取1mL菌液离心收集菌体,变性处理后,进行SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色后观察结果。同时以转入空白质粒的大肠杆菌DH5 $\alpha$ /pTrc 99A作对照。

菌体重悬于 10 倍体积的 buffer A(50mmol/L Tris-HCl, 0.5mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl, 5% glycerol, pH7.5)中,超声破碎菌体后离心,以确定目的蛋白在菌体细胞中的存在形式。

**1.2.5 PcGstB 酶活性分析** :GST 活性采用分光光度法,以 CDNB 和还原型 GSH 为底物进行测定<sup>[11]</sup>。分别取 DH5 $\alpha$ /pTrc-*gstB* 和 DH5 $\alpha$ /pTrc99A 各 1g 湿菌体,加入 10 倍体积的 buffer A,超声破碎菌体,离心,取 1mL 上清用于酶活检测。在 3mL 反应体系中包括:0.1mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.5),1.0mmol/L CDNB,1.0mmol/L GSH。30 $^{\circ}$ C 反应 30min,检测 340nm 处的吸光值的变化,以吸光值的增加表示 GST 的活性。同时以不加上清的反应液作为空白对照。

## 2 结果

### 2.1 *P. chrysogenum* *gstB* 全长 cDNA 的克隆

在前期的研究中,利用简并引物 PCR 以及基因组文库的筛选,首次从产黄青霉中克隆鉴别了一个 GST 编码基因 *PcgstA*<sup>[12]</sup>。同时,我们对基因组文库杂交筛选得到的多个阳性克隆进行了序列分析,在 *pcg48* 号克隆中发现一个 651bp 的开放阅读框(open-reading frame),编码 216 个氨基酸的蛋白质。BLASTp 的结果显示其氨基酸序列具有保守的 GST 功能域(图 1),与烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*) *GstB* (AAX07318)序列的一致性达到 65%。

为了得到该基因的完整 cDNA 序列,根据其基因组序列设计了一对引物 P1/P2,以 *P. chrysogenum* Wis54-1255 cDNA 为模板进行 RT-PCR,得到大小约

0.65kb 的目的产物(图 2)将其克隆到载体 pGEM-T 上,经序列测定,与预期相符。该基因定名为 *PcgstB*,序列已经提交到 GenBank,收录号为 EF123038。

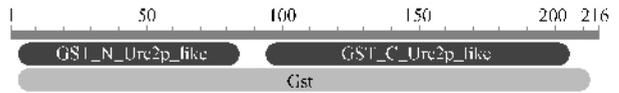


图 1 PcGstB 氨基酸序列保守区分析

Fig.1 Conserved domain analysis of the deduced amino acids sequence of PcGstB

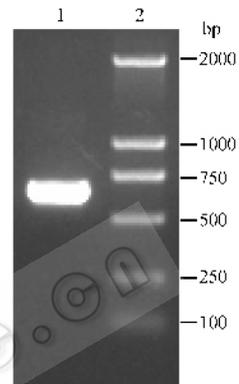


图 2 *PcgstB* 基因的 RT-PCR 结果

Fig.2 RT-PCR product of *PcgstB* gene

1: PCR amplified *PcgstB* gene; 2: DNA marker DL2000.

### 2.2 *PcgstB* 基因的生物信息分析

将 *PcGstB* 的序列与已经鉴定的真菌 GST 进行了比较。氨基酸序列的分子进化分析显示(图 3),丝状真菌的 GST 之间以及与裂殖酵母 GST I、II 存在较显著的同源性,其中,*PcGstB* 与烟曲霉中的 *AfGstH* (AAX07318),*AfGstC* (AAX07319)的序列一致

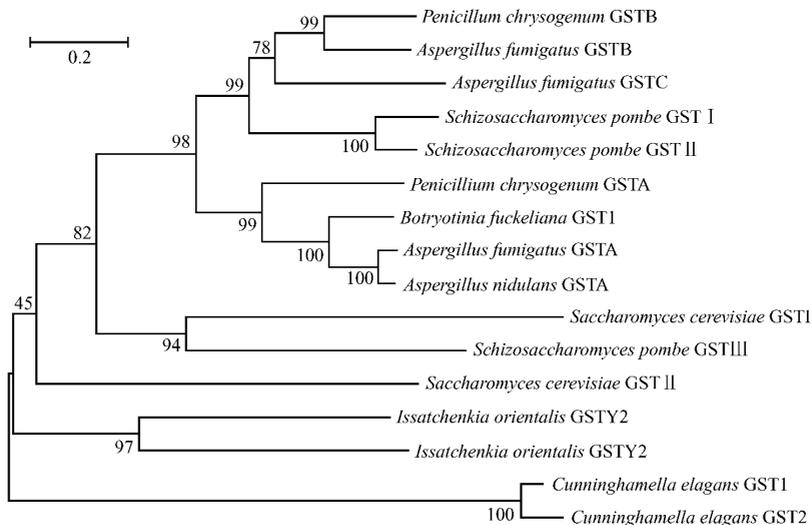


图 3 真菌 GST 的系统进化分析

性最高,分别为 65% 和 52%,与裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) Gst I (Q9Y7Q2) \ Gst II (O59827) 的同源性分别为 43% 和 44%。这四个 GST 的编码基因都不含内含子。而其他 4 个丝状真菌 GST, BfGst1 (*Botryotinia fuckeliana*, AAG43132) \ AfGstA (*Aspergillus fumigatus*, AAX07321) \ AnGstA (*Aspergillus nidulans*, AAM48104) 和 PcGstA (*Penicillium chrysogenum*, ABE73180) 的编码基因都含有 2 个内含子,其氨基酸序列与 PcGstB 的一致性分别为 43%、44%、43% 和 37%。而那些从 *Saccharomyces cerevisiae*<sup>[13]</sup>、*Issatchenkia orientalis*<sup>[14]</sup> 和 *Cunninghamella elagans*<sup>[15,16]</sup> 等真菌中分离的 GST 则与之关系较远。

### 2.3 PcGstB 的原核表达与重组蛋白的活性测定

为了验证 Pc *gstB* 基因编码蛋白的功能,构建了 Pc *gstB* 的原核表达载体。将 Pc *gstB* 完整的编码区用 *Nco* I 和 *Sal* I 从 pGEMT-*gstB* 载体切下,连入经同样酶切的表达载体 pTrc 99A,得到 pTrc-*gstB* (图 4)。

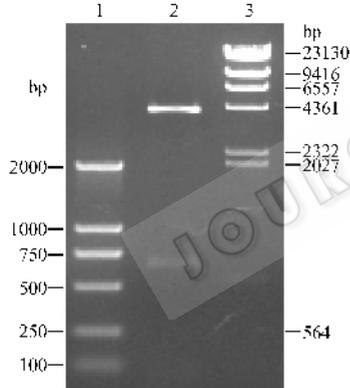


图 4 pTrc-*gstB* 质粒的酶切图谱

Fig. 4 The identification of recombinant plasmid pTrc-*gstB*

1 : DL2000 DNA marker ; 2 : Recombinant plasmid of pTrc-*gstB* digested by *Nco* I and *Sal* I ; 3 :  $\lambda$ -*Hind* III DNA marker.

将 pTrc-*gstB* 转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , IPTG 诱导 4 h 收集菌体,同时以转入 pTrc 99A 空质粒的菌体作对照。SDS-PAGE 检测显示(图 5),经 IPTG 诱导的 DH5 $\alpha$ /pTrc-*gstB* 菌株在分子量约为 28kD 处有明显的蛋白表达条带,与预期的 PcGstB 分子量基本一致。菌体超声破碎离心后,未见沉淀,说明重组 PcGstB 蛋白主要以可溶形式存在于细胞中。

GST 可以催化 CDNB 与 GSH 反应,其产物在 340nm 处有特征吸收,可用分光光度法检测。基于该原理,按照 Habig 的方法<sup>[14]</sup>,分别对经 IPTG 诱导的 DH5 $\alpha$ /pTrc-*gstB* 和 DH5 $\alpha$ /pTrc99A 菌体破碎后的

上清液进行了 GST 活性检测。结果在含有 pTrc-*gstB* 质粒的菌体上清中,检测到了明显的 GST 活性(表 1),证明 Pc *gstB* 编码的蛋白质属于 GST 家族。

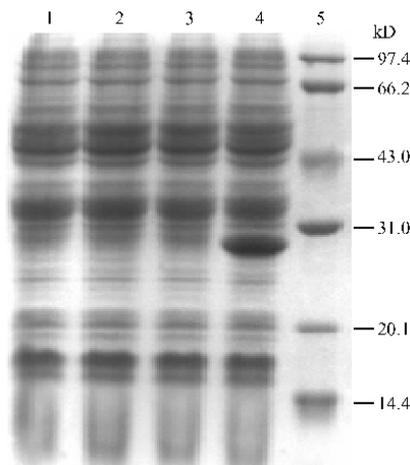


图 5 SDS-PAGE 分析重组 PcGstB 蛋白在大肠杆菌中的表达

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant protein in *E. coli*

1 : the total proteins of DH5 $\alpha$ /pTrc99A without induction ; 2 : the total proteins of DH5 $\alpha$ /pTrc99A induced by IPTG ; 3 : the total proteins of DH5 $\alpha$ /pTrc-*gstB* without induction ; 4 : the total proteins of DH5 $\alpha$ /pTrc-*gstB* induced by IPTG ; 5 : low molecular weight protein markers.

表 1 重组 PcGstB 蛋白的活性检测

Table 1 Analysis of recombinant PcGstB

Sample	$\Delta A_{340}/\text{min}$
Supernatant of DH5 $\alpha$ /pTrc99A	0.0006
Supernatant of DH5 $\alpha$ /pTrc- <i>gstB</i>	0.0253

## 3 讨论

青霉素的工业化生产与临床应用堪称是近代生物技术领域最辉煌的例子<sup>[17]</sup>。由于其重要的商业价值,60 多年来,各大制药公司在青霉素菌种改良上投入的巨大精力,使菌种生产能力提高了近千倍,同时形成了完整的传统育种技术体系。但是,随着产量的提高,菌种的遗传负荷越来越大,建立在经验基础上的随机诱变和大规模筛选育种方法的局限性越来越明显。以分子生物学和基因工程为代表的现代生物技术的发展,尤其是对生物合成过程中关键基因的克隆与研究,为青霉素生产菌的改造提供了更加直接、有效的方法。

苯乙酸作为青霉素 G 工业生产的侧链前体,在生产成本中占有很大比重,提高苯乙酸的利用率是菌种改良的重要研究内容<sup>[18]</sup>。Pc *chrysogenum* 中

GSH 的代谢与青霉素合成存在密切的关系<sup>[5]</sup>, Ferrero 等<sup>[10]</sup>曾经提出了一个由 GST 介导的苯乙酸的活化途径,但没有分子生物学的证据。我们在前期的研究中<sup>[12]</sup>从 *P. chrysogenum* 中首次克隆得到一个 GST 编码基因 *PcgstA*,其表达水平明显受到苯乙酸的抑制,显示该基因与苯乙酸代谢存在一定的关系。

本研究从 *P. chrysogenum* 中克隆得到另一个 GST 基因 *PcgstB*,并在大肠杆菌中进行了原核表达。以 CDNB 做为底物进行活性检测,证明了重组 PcGstB 蛋白具有 GST 活性,属于 GST 家族。但氨基酸序列比较,PcGstB 与 PcGstA 的一致性只有 37%,而与 *A. fumigatus* 中的 GstB 序列的一致性高达 65%。系统进化分析显示了 PcGstB 与 PcGstA 及其他真菌 GST 的关系(图 3)。GST 是一个庞大的家族,对 *PcgstB* 表达的进一步研究和更多 *P. chrysogenum* GST 基因的克隆将为深入研究 GST 与 GSH、苯乙酸代谢的关系及其在青霉素生物合成中的作用奠定了基础。

目前,在真菌特别是丝状真菌中,克隆的 GST 基因还相对较少,有限的真菌 GST 也与其他物种的 GST 差别较大,随着分子生物学及微生物基因组研究的发展,越来越多的真菌 GST 基因的鉴别与研究必然加深我们对 GST 进化的认识。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Oakley AJ. Glutathione transferases: new functions. *Curr Opin Struct Biol* 2005, **15**( 6 ): 716 – 723.
- [ 2 ] Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995, **30**( 6 ): 445 – 600.
- [ 3 ] Sheehan D, Meade G, Foley VM, et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 2001, **360**( Pt 1 ): 1 – 16.
- [ 4 ] McGoldrick S, O'Sullivan SM, Sheehan D. Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. *FEMS Microbiol Lett* 2005, **242**( 1 ): 1 – 12.
- [ 5 ] van de Kamp M, Driessen AJ, Konings WN. Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotic biosynthesis by filamentous fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999, **75**( 1 – 2 ): 41 – 78.
- [ 6 ] Ramos FR, Lopez-Nieto MJ, Martin JF. Isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts delta(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N. *Antimicrob Agents Chemother* 1985, **27**( 3 ): 380 – 387.
- [ 7 ] Emri T, Leiter E, Farkas E, et al. Penicillin productivity and glutathione-dependent detoxification of phenylacetic and phenoxyacetic acids in *Penicillium chrysogenum*. *J Basic Microbiol* 2001, **41**( 2 ): 67 – 73.
- [ 8 ] Emri T, Olah B, Sami L, et al. Does the detoxification of penicillin side-chain precursors depend on microsomal monooxygenase and glutathione S-transferase in *Penicillium chrysogenum*? *J Basic Microbiol* 2003, **43**( 4 ): 287 – 300.
- [ 9 ] Emri T, Pócsi I, Szentimay A. Phenoxyacetic acid induces glutathione-dependent detoxification and depletes the glutathione pool in *Penicillium chrysogenum*. *J Basic Microbiol* 1997, **37**( 3 ): 181 – 186.
- [ 10 ] Ferrero MA, Reglero A, Martin-Villacorta J, et al. Biosynthesis of benzylpenicillin ( G ), phenoxymethylpenicillin ( V ) and octanoylpenicillin ( K ) from glutathione S-derivatives. *J Antibiot (Tokyo)* 1990, **43**( 6 ): 684 – 691.
- [ 11 ] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974, **249**( 22 ): 7130 – 7139.
- [ 12 ] Wang FQ(王富强), Zheng GZ(郑桂珍), Zhao Y(赵颖), et al. Molecular cloning and characterization of a glutathione S-transferase gene repressed by phenylacetic acid from *Penicillium chrysogenum*. *Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展)* 2006, **33**( 12 ): 1223 – 1230.
- [ 13 ] Choi JH, Lou W, Vancura A. A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1998, **273**( 45 ): 29915 – 29922.
- [ 14 ] Tamaki H, Yamamoto K, Kumagai H. Expression of two glutathione S-transferase genes in the yeast *Issatchenkia orientalis* is induced by *o*-dinitrobenzene during cell growth arrest. *J Bacteriol* 1999, **181**( 9 ): 2958 – 2962.
- [ 15 ] Cha CJ, Coles BF, Cerniglia CE. Purification and characterization of a glutathione S-transferase from the fungus *Cunninghamella elegans*. *FEMS Microbiol Lett* 2001, **203**( 2 ): 257 – 261.
- [ 16 ] Cha CJ, Kim SJ, Kim YH, et al. Molecular cloning, expression and characterization of a novel class glutathione S-transferase from the fungus *Cunninghamella elegans*. *Biochem J* 2002, **368**( Pt 2 ): 589 – 595.
- [ 17 ] Elander RP. Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, **61**( 5 – 6 ): 385 – 392.
- [ 18 ] Penalva MA, Rowlands RT, Turner G. The optimization of penicillin biosynthesis in fungi. *Trends Biotechnol* 1998, **16**( 11 ): 483 – 489.