

gsh 1 基因的克隆及其在巴斯德毕赤氏酵母中的表达^{*}

饶志明^{1**} 艾丽静^{1,2} 沈微¹ 方慧英¹ 诸葛健¹

(¹江南大学工业微生物中心和工业生物技术教育部重点实验室 江苏无锡 214036; ²齐鲁制药有限公司 济南 250100)

摘要 利用 PCR 技术克隆了来源于 *Saccharomyces cerevisiae* ALJ036 的 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸合成酶(γ -glutamyl-cysteine synthetase)编码基因 *gsh 1*, 连接多拷贝表达载体 pGAPZA, 转化 *Pichia pastoris* x-33, 构建了重组菌 *P. pastoris* x-33 (pGAPZA-*gsh 1*); 在高浓度 Zeocin 平板上筛选多拷贝阳性转化子, 并通过 PCR 进行了验证. 对阳性转化子的 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸合成酶活力进行了测定, 结果显示, 重组酵母的 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸合成酶的酶活是宿主菌的 3.0 倍, 在液体 YEPD 中重组菌 GSH 的产量为 42.2 mg/L, 是宿主菌的 1.6 倍. 图 7 表 1 参 10

关键词 *gsh 1*; 巴斯德毕赤氏酵母; 克隆; 表达

CLC TQ922.9 : Q78

Cloning and Expressing of *gsh 1* gene in *Pichia pastoris*^{*}

RAO Zhiming^{1**}, AI Lijing^{1,2}, SHEN Wei¹, FANG Huiying¹ & ZHUGE Jian¹

(¹Research Centre of Industrial Microorganisms and Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, Jiangsu, China)

(²Qilu Pharmaceutical Co., Ltd, Jinan 250100, China)

Abstract The gene encoding γ -glutamyl-cysteine synthetase (*gsh 1*) was cloned to vector pGAPZA and then transformed into *Pichia pastoris* x-33 strain after linearized by *Avr* II. Recombinants resistant to zeocin were selected and identified by PCR analysis. The selected transformants were cultivated in flasks. The activity of γ -glutamyl-cysteine synthetase in the recombinant *P. pastoris* x-33 (pGAPZA-*gsh 1*) was 98.5 U/mg protein, which was 3 times as that of the host strain, while the yield of GSH in the recombinant *P. pastoris* x-33 (pGAPZA-*gsh 1*) was 42.2 mg/L, 1.6 times as that of *P. pastoris* x-33. Fig 7, Tab 1, Ref 10

Keywords *gsh 1*; *Pichia pastoris*; cloning; expression

CLC TQ922.9 : Q78

谷胱甘肽(GSH),即 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸甘氨酸(γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine, glutathione),能有效清除掉人体内的自由基,净化人体内的环境污染,增进人体健康,在临床医药、食品工业及有关生物研究领域都有着广泛的应用前景^[1]. GSH是由前体物质L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸经 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSH I)和谷胱甘肽合成酶(GSH II)催化而合成的,其中 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶是GSH合成途径中的限速酶^[2,3].已有学者对编码 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因*gsh 1*在大肠杆菌、酿酒酵母中的表达进行了报道^[4,5],但尚未见*gsh 1*基因在巴斯德毕赤氏酵母表达的相关报道.本研究将来自酿酒酵母中的*gsh 1*基因在巴斯德毕赤氏酵母中成功进行了表达,为利用酵母工程菌生产GSH提供了新的可能途径.

收稿日期: 2006-06-13 接受日期: 2006-09-29

* 国家自然科学基金(No. 30570142),江苏省青年科技创新人才(学术带头人)基金(BK2006504),教育部长江学者和创新团队发展计划和江南大学工业生物技术教育部重点实验室开放课题(KLIB-KF-200507)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30570142), the Jiangsu Provincial Youth Sci-tech Innovation Foundation (BK2006504) (Academic Leader), the Program for Changjiang Scholars and the Innovative Research Team in University and the Open Project Program of the Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, China (KLIB-KF200507)

** 通讯作者 Corresponding author (E-mail: raozm@yahoo.com.cn)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) ALJ036、*E. coli* JM109/(*recA1*, *endA1*)本实验室保藏,毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*) x-33 菌株、pGAPZA 表达载体购自 Invitrogen 公司.

1.1.2 工具酶和试剂 DNA 限制性内切酶、T₄ DNA Ligase、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker、pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司; DNA 纯化及胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒为博大泰克公司产品; Yeast extract、polypeptone 购自 England Oxoid LTD; 培养基配制参见 Invitrogen 公司操作手册. 其他试剂均为国产分析纯.

1.1.3 引物合成 引物 P₁、P₂根据 Genbank 公布的酿酒酵母 *gsh 1* 基因序列设计引物,由上海赛百盛生物有限公司合成. P₁ 5' > CGCCTCGAGATCGGACTCTTAGCTTT < 3' 为正向引物, P₂ 5' > CGCGCGGCGCTTAACATTTGCTTTCTA < 3' 为反向引物. 引物两端用下划线标出的碱基序列分别为 *Xho* I 和 *Not* I 酶切位点. 阳性转化子的 PCR 验证引物由 Invitrogen 公司设计提供: pGAP Forward: 5'-GTCCCTATTTCAATTGAA-3' 为上游引物, 3'AOX1: 5'-GCAATGGCATTCTGACATCC-3' 为下游引物.

1.2 方法

1.2.1 *gsh* 1 基因的扩增与鉴定 以酿酒酵母总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增反应: DNA 模板 1 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2 μ L, 引物 2 μ L, dNTPs 2 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, 总反应体积为 20 μ L. 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 58 $^{\circ}$ C 90 s, 72 $^{\circ}$ C 120 s, 35 个循环. 扩增产物通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.2 表达载体 pGAPZA-*gsh* 1 的构建 回收的 PCR 扩增片段与 pMD18-T 载体 16 $^{\circ}$ C 连接过夜. 转化 *E. coli* JM109, 得到 *E. coli* JM109 (pMD18-T-*gsh* 1). 重组质粒 pMD18-T-*gsh* 1 经 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切, 连接 pGAPZA, 得到重组质粒 pGAPZA-*gsh* 1, 转化 *E. coli* JM109, 得到 *E. coli* JM109 (pGAPZA-*gsh* 1), 提取重组质粒进行酶切验证.

1.2.3 酵母细胞的转化 经 *Avr* II 线性化后的 pGAPZA-*gsh* 1 电击转化酵母细胞 x-33 中. 利用含 Zeocin 的 YPD 平板进行筛选.

1.2.4 酵母基因组 DNA 的提取及转化子 PCR 鉴定 以酵母基因组 DNA 为模板, DNA 的提取参照文献[6]. 利用 Invitrogen 公司提供的引物 PCR 扩增包括部分启动子 pGAP、*gsh* 1 基因以及部分终止子 *AOX1* 序列验证阳性克隆.

1.2.5 酶活测定 取 5 mL 培养液于 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清. 用 0.05 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液洗涤菌体. 将菌体再用上述缓冲液 5 mL 悬浮后超声波 90 kHz 破碎 10 min, 加入 GSH 前体反应物质(谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸浓度均为 40 mmol/L, $MgCl_2$ 、ATP 50 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min^[4]. 用 ALLOXAN 试剂衍生化法^[7]测定酶活及谷胱甘肽含量.

1.2.6 重组酵母 *Pichia pastoris* x-33 (pGAPZA-*gsh* 1) 发酵实验 发酵: 以 YEPD 为基础培养基进行初步发酵试验, 测定重组酵母 GSH 含量. 生物量的测定: 取一定体积发酵液 3500 r/min 离心 5 min, 水洗两次, 收集菌体, 85 $^{\circ}$ C 烘干至恒重, 称量. 胞内谷胱甘肽含量分析: GSH 为胞内产物, 采用冻溶-高温水煮的方法进行细胞破碎, 离心得上清液. 利用 ALLOXAN 试剂衍生化法^[7]测定胞内 GSH 的含量. 测定原理为: GSH 在实验条件下与 ALLOXAN 试剂(四氧嘧啶)作用, 反应生成的物质在 305 nm 处紫外区有最高吸收峰.

1.2.7 重组酵母传代后产 GSH 含量稳定性检测 在重组酵母生长一个周期后, 取 1 mL 菌液作为下一轮生长的种子液继续培养, 每次测定 GSH 含量及生物量, 共进行 10 轮.

2 结果

2.1 *gsh* 1 基因的 PCR 扩增结果

PCR 扩增得到 2 037 bp 的 *gsh* 1 基因(图 1). 连接 T 载体后测序, 结果显示, 本研究克隆的基因序列与已公布的酿酒酵母 *gsh* 1 基因相似性为 98.48%; 氨基酸序列相似性为 99.41%.

2.2 表达载体 pGAPZA-*gsh* 1 的构建

重组质粒 pMD18-T-*gsh* 1 经 *Xho* I 和 *Not* I 酶切, 得到 *gsh* 1 基因, 连接同样经过 *Xho* I 和 *Not* I 酶切的 pGAPZA, 酶切鉴定结果如图 2. 表达载体命名为 pGAPZA-*gsh* 1 (图 3).

2.3 重组酵母 *P. pastoris* x-33 (pGAPZA-*gsh* 1) 的筛选和鉴定

经 *Avr* II 线性化的 pGAPZA-*gsh* 1 电击转化 *P. Pastoris* x-33

感受态细胞, 获得重组转化子. 转化子点种于含浓度为 200 μ g/mL Zeocin 的 YEPD 平板上进行抗性筛选, 挑选阳性转化子以及 *P. Pastoris* x-33 对照进行 PCR 鉴定, PCR 扩增产物凝胶电泳结果见图 4. *gsh* 1 基因片段为 2 037 bp, pGAP 正向引物和 3' *AOX1* 引物在质粒 pGAPZA 的间隔距离为 275 bp, 故 PCR 扩增得到 2 300 bp 左右产物的转化子即为阳性克隆. 由于宿主酵母本身的染色体上的启动子 pGAP 和终止子 *AOX1* 来源于不同的基因, 而且这两个基因分布于染色体上的不同区域. 宿主酵母本身的染色体上并没有整合进线性化质粒 pGAPZA-*gsh* 1 的 DNA. 因此, 用 pGAP 正向引物和 3' *AOX1* 引物无法扩增出产物.

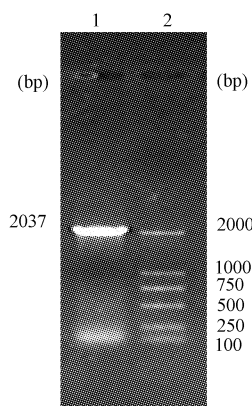


图 1 *gsh* 1 基因扩增产物结果

Fig. 1 Amplification of *gsh* 1 gene by PCR

1. *gsh* 1 基因 PCR 产物 PCR product of *gsh* 1 gene; 2. DNA marker DL 2000

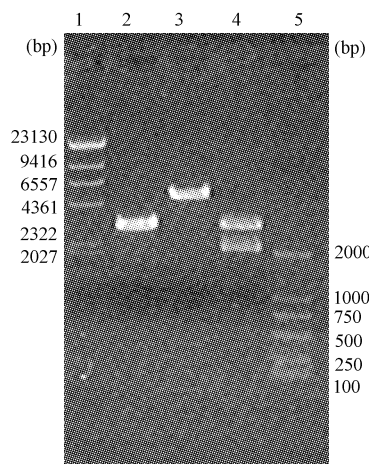


图 2 质粒 pGAPZA-*gsh* 1 的酶切验证

Fig. 2 pGAPZA-*gsh* 1 digested by *Xho* I and *Not* I

1. DNA marker λ DNA/*Hind* III; 2. pGAPZA/*Xho* I; 3. pGAPZA-*gsh* 1/*Xho* I; 4. pGAPZA-*gsh* 1/*Xho* I, *Not* I; 5. DNA marker DL2000

2.4 酶活的测定

牛血清白蛋白标准曲线如图 5.

根据图 5 蛋白质标准曲线及回归直线方程 $Y = 56.362X$ (X : 光密度值 $OD_{595\text{ nm}}$; Y : BSA 含量, μ g/mL) 得出粗酶液中粗蛋白的浓度, 结合酶活力测定, 计算出毕赤酵母胞内 GSH I 的酶活力. 酶活力以 GSH 合成能力计算即以单位质量(mg)蛋白于每分钟内所能合成的 GSH (mg) 来计算. 如图 6 所示, 重组酵母最高酶活力达到 95.8 U/mg 蛋白, 而宿主菌最高酶活力为 32.0 U/mg 蛋白, 重组菌比宿主菌高出 2.0 倍. 在发酵 35 ~ 50 h 酶活处于稳定期, 进入发酵后期, 酶活开始有所降低.

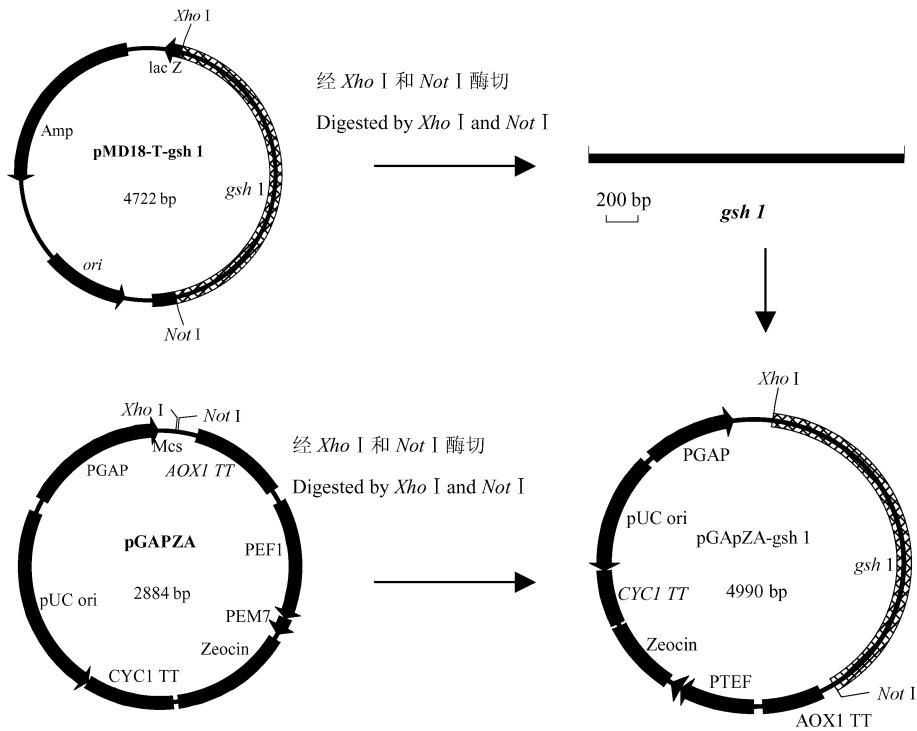


图 3 质粒 pGAPZA-*gsh 1* 的构建示意图
Fig. 3 Construction of recombinant plasmid pGAPZA-*gsh 1*

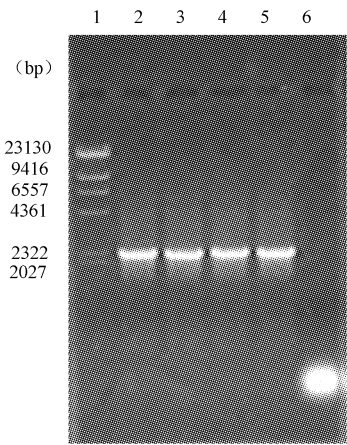


图 4 PCR 产物的凝胶电泳图
Fig. 4 Electrophoresis of PCR products

1. DNA marker DL2000; 2~5 分别为阳性转化子基因组 DNA 以 pGAP 正向引物和 3'AOX1 引物扩增产物; 6. 宿主菌基因组 DNA 以 pGAP 正向引物和 3'AOX1 引物扩增产物 1. DNA marker DL2000; 2, 3, 4 and 5. Amplified products from genomic DNA of positive transformants with primers of pGAP and 3'AOX1, respectively; 6. Amplified product from genomic DNA of host strain with primers of pGAP and 3'AOX1

2.5 重组酵母 *Pichia pastoris* x-33 (pGAPZA-*gsh 1*) 发酵试验

结果显示,在液体 YEPD 发酵培养基中,重组毕赤酵母胞内 GSH 产量为 42.2 mg/L,约是宿主菌的 1.6 倍,如图 7 所示.

2.6 重组毕赤氏酵母传代后 GSH 产量的稳定性

重组毕赤酵母在液体 YEPD 中连续经 10 轮培养,考察每一轮菌株的生长和 GSH 含量情况,结果表明,重组酵母在生长密度及 GSH 含量方面基本保持稳定,具体见表 1.

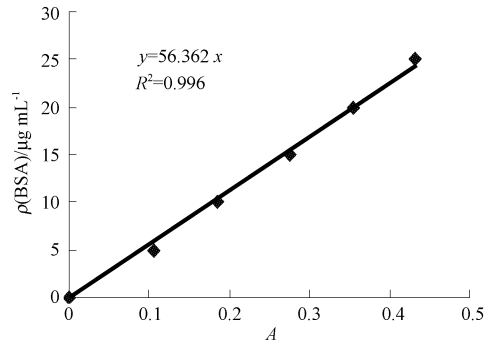


图 5 牛血清清蛋白标准曲线
Fig. 5 Standard curve of BSA

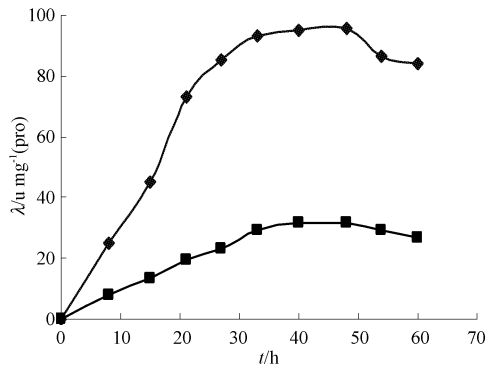


图 6 重组酵母(◆)及宿主酵母(■) GSH I 酶活力曲线
Fig. 6 GSH I enzymatic activity curve of recombinant (◆) and host yeast (■)

3 讨论

近年来,随着 GSH 在各个领域的广泛应用,其生产方法也得到了广泛的研究. GSH 的生产方法主要有溶剂萃取法、化学

表 1 重组毕赤氏酵母传代后 GSH 含量的稳定性
Table 1 GSH content of recombinant *P. pastoris* after passage

轮数 No. of generation	$\rho(\text{GSH})/\text{mg L}^{-1}$	生物量 Biomass ($\rho/\text{g L}^{-1}$)	轮数 No. of generations	$\rho(\text{GSH})/\text{mg L}^{-1}$	生物量 Biomass ($\rho/\text{g L}^{-1}$)
1	42.0	11.0	6	41.0	10.8
2	42.2	10.9	7	41.0	10.7
3	42.0	10.9	8	41.0	10.5
4	42.1	10.9	9	40.0	10.7
5	42.2	11.0	10	39.8	10.7

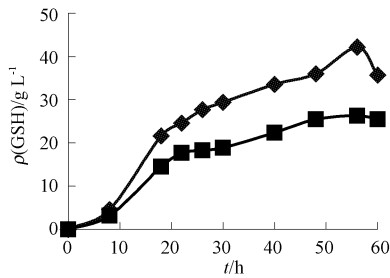


图 7 重组酵母(◆)及宿主酵母 GSH 含量积累曲线
Fig. 7 GSH content accumulation curve of recombinant (◆) and host yeast (■)

合成法、发酵法和酶转化法等. 其中发酵法生产 GSH 由于具有反应条件温和、生产成本相对低廉等优点, 因此应用较多. 但目前发酵法生产 GSH 还存在出发菌株 GSH 产量不够高等问题. 利用基因工程技术将微生物细胞中 GSH 合成的关键酶基因在合适的宿主细胞进行高表达获得高产 GSH 工程菌是解决该问题的主要策略之一. Fan 等曾将来源于酿酒酵母 GSH 合成途径的限速酶 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的编码基因 *gsh 1* 克隆到载体 pGMF 中, 并成功转化到酿酒酵母 YSF-31 中, 重组菌的 GSH 含量是宿主细胞的 1.5 倍, 达到 13.1 mg/g 干细胞重^[5]. 本研究则将酿酒酵母 *gsh 1* 基因整合到巴斯德毕赤氏酵母中, 成功构建了重组菌 *P. pastoris* x-33 (pGAPZA-*gsh 1*), 并通过 PCR 的方法对重组菌进行了验证. 对阳性转化子的 GSH 酶活力测定结果表明, 重组酵母的 GSH 酶活力得到了提高, 是宿主菌的 3.0 倍; 在液体 YEPD 中重组菌 GSH 的产量是宿主菌的 1.6 倍. 据我们初步了解, 这也是国内首次将 *gsh 1* 基因通过多拷贝表达载体 pGAPZA 成功转化到巴斯德毕赤氏酵母 *P. pastoris* x-33 中的报道. 由于毕赤氏酵母 *P. pastoris* 表达系统的表达载体 pGAPZ-A 以组成型强启动子 PGAP (三磷酸甘油醛脱氢酶启动子) 为启动子^[8], 在发酵时不需甲醇等诱导条件, 具有操作工艺简单, 表达量高, 易于实现高密度发酵等优点^[9]. 因而本研究的成功为利用工程菌生产 GSH 提供了新途径.

已有资料报道, 在 *P. pastoris* 中表达外源蛋白大约有 50% ~ 75% 的可能性获得较好的表达水平, 最大的困难就是首先要获得第一步的成功, 即可获得一定水平的表达, 取得这一阶段的成功, 通过调整已明确的各种参数来优化表达, 常可获得

较理想的表达水平^[10]. 因此本研究下一步工作即对重组菌进行发酵条件优化, 利用高密度发酵通过提高生物量的方法提高 GSH 总量, 目前该工作正在进行之中.

References

- 1 Spector D, Labarre J, Toledano MB. A genetic investigation of the essential role of glutathione. *J Biol Chem*, 2001, **276** (10): 7011 ~ 7016
- 2 Ohtake Y, Watanabe K, Tezuka H, Ogata T, Yabuuchi S, Murata K, Kimura A. The expression of the γ -glutamylcysteine synthetase gene of *Escherichia coli* B in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Boil Chem*, 1988, **52** (11): 2753 ~ 2762
- 3 Ohtake Y, Watanabe K, Tezuka H, Ogata T, Yabuuchi S, Murata K, Kimura A. Expression of the glutathione synthetase gene of *Escherichia coli* B in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng*, 1989, **68** (6): 390 ~ 394
- 4 Shen LX (沈立新), Wei DZ (魏东芝), Zhao ZF (赵哲峰), Zhang SL (张嗣良), Wang EL (王二力). Cloning and expression of the genes of glutathione synthetases. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2001, **17** (1): 98 ~ 100
- 5 Fan XY, He XP, Guo XN, Qu N, Wang C, Zhang B. Increasing glutathione formation by functional expressing of the γ -glutamylcysteine synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2004, **26** (5): 415 ~ 417
- 6 Zhou XL (周小玲), Shen W (沈微), Rao ZM (饶志明), Wang ZX (王正祥), Zhuge J (诸葛健). A rapid method for preparation of fungal chromosome DNA. *Microbiology* (微生物学通报), 2004, **31** (4): 89 ~ 92
- 7 Wang RM (王荣民), Cao XZ (曹新志), Xiao G (萧刚), Tan YB (檀亦兵), Fang J (方隽). Preliminary investigation on determination method of glutathione. *Food & Ferment Ind* (食品与发酵工业), 1992, **18** (6): 34 ~ 38
- 8 Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SL, Cregg JM. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 1997, **186**: 37 ~ 441
- 9 Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Microbiol Rev*, 2000, **24**: 45 ~ 66
- 10 Cregg JM, Cereghino JL, Shi JY, Higgins DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 2000, **16**: 23 ~ 52