

酿酒酵母乙醇脱氢酶 2 (ADH2) 基因的克隆表达及活性验证

于孟斌, 智庆文, 徐莉, 赵创新, 陈高云, 姜永超, 刘敏

防化指挥工程学院生物防护教研室, 北京 102205

摘要: 为了从酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中克隆出乙醇脱氢酶 2 (Alcohol dehydrogenase 2, ADH2) 基因并使之在大肠杆菌中高效表达。以酿酒酵母细胞中提取的总 RNA 为模板, 通过反转录获得酿酒酵母乙醇脱氢酶 2 基因, 连接到表达载体 pTAT 上, 得到重组表达质粒 pTAT-ADH2, 将此重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 中, 重组工程菌株经 IPTG 诱导表达得到 ADH2 蛋白。将该蛋白纯化后, 在体外进行活性检测和小鼠体内进行毒理试验, 检测 ADH2 的酶活性。测序结果表明克隆的基因与 GenBank 中所报道的 *adh2* 基因序列有 90% 的同源性, 经 SDS-PAGE 电泳分析, 目的蛋白得到了有效表达, 蛋白条带扫描分析表明, 表达量占总蛋白的 50% 左右, 纯化得到的蛋白在小鼠体内进行毒理试验, 显示出一定的活性。酿酒酵母 *adh2* 基因的克隆正确, 不仅在大肠杆菌中进行了高效表达而且表现出了较好的酶活性。

关键词: 酿酒酵母, 乙醇脱氢酶 2, 克隆, 表达

Cloning, expression and evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* ADH2

Mengbin Yu, Qingwen Zhi, Li Xu, Chuangxin Zhao, Gaoyun Chen, Yongchao Jiang, and Min Liu

Laboratory of Biology Defense, Command and Engineering College of Chemical Defense, Beijing 102205, China

Abstract: In order to clone and express alcohol dehydrogenase II (ADH2) gene from *Saccharomyces cerevisiae* in *E. coli* BL21 (DE3) efficiently, we extracted the total RNA as template and obtained ADH2 gene by RT-PCR and connected ADH2 gene to pTAT plasmids to gain recombinant expression plasmid pTAT-ADH2, then transformed this recombinant expression plasmid pTAT-ADH2 into *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant was induced by IPTG to express ADH2. After purification, ADH2 activity was tested in vitro and toxicologic test was done in mouse. Sequence test showed that the acquired fragments exhibited 90% homology to ADH2 gene sequence from GenBank report. The target gene expressed efficiently and took up to approximant 50% of total protein by SDS-PAGE and band scanning analysis. The purified protein exhibited the identified activity through biochemical test and mouse toxicological test. As a result, the acquired ADH2 gene was highly homology to the published sequence and expressed at a high level in *E. coli* BL21 (DE3), more importantly, ADH2 proved to have ethanol dehydrogenase activity.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol dehydrogenase 2, clone, expression

当人体内大量摄入乙醇后, 会引起精神的麻痹, 导致自身不能自控, 容易引起突发事故。长期大量

的饮酒,会引起脂肪肝、脑神经的损伤、生殖系统萎缩导致的不育症,孕妇饮酒还会导致胚胎发育畸形、骨质疏松症以及视神经的损伤等酒精性疾病^[1-5]。乙醇的危害越来越引起人们的关注,如何解决这一普遍存在的问题,国内外专家从乙醇在体内的代谢途径和致病机理方面进行了探索,了解了乙醇的代谢机制。酿酒酵母乙醇脱氢酶 2 是酿酒酵母中重要的乙醇氧化酶,它能够将乙醇氧化成乙醛^[2],在乙醛脱氢酶的作用下转变成乙酸,最后转变成乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环。本研究克隆了酿酒酵母乙醇脱氢酶 2 基因,并在大肠杆菌中进行表达,期望能够得到有活性的 ADH2,为进一步研究乙醇的有效分解奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和载体

酿酒酵母 YS2 (二倍体) 由本实验室保存; *E. coli* BL21(DE3)和 *E. coli* DH5 α 购自天根生物科技有限公司; 克隆载体 pGEM-T 购自欣经科生物技术有限公司; 表达载体 pTAT 由本实验室保存。

1.1.2 培养基

YPD 培养基 (1% 酵母膏, 2% 蛋白胨, 1% 葡萄糖) 用于培养酿酒酵母细胞; LB 培养基 (1% 蛋白胨, 0.5% 酵母粉, 1% NaCl, pH 7.0) 用于培养大肠杆菌, 固体 LB 培养基添加 1.5% 琼脂。

1.1.3 酶和试剂

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、dNTPs 和 *EcoR* I、*Nde* I 内切酶购自大连 TaKaRa 公司; DEPC、饱和酚、氨苄青霉素、IPTG、X-gal 等试剂购自欣经科生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 *adh2* 基因的克隆

首先从酿酒酵母中提取总 RNA, 然后设计引物用 RT-PCR 的方法扩增得到 *adh2* 基因。在设计上下游引物时, 分别在正义链、反义链引入 *EcoR* I、*Nde* I 酶切位点, 引物序列如下:

正义链: 5'-GGCTCATATGGAATTCAGTTCTATTCCAGAACTC-3'; 反义链: 5'-GCGGCCGCTT

ATTTAGAAGTGTCAAC-3'。

PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 1 min, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1.5 min, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。

1.2.2 表达载体 pTAT-ADH2 的构建

将 RT-PCR 获得的 DNA 片段连接至载体 pGEM-T 上, 经酶切和测序验证后将其连接到表达载体 pTAT 上。构建过程如图 1 所示。

1.2.3 ADH2 蛋白的诱导表达

将构建好的表达载体 pTAT-ADH2 转化到大肠杆菌 BL21 中, 同时转化 pTAT 空质粒作为阴性对照。挑取能够在含有氨苄青霉素的固体培养基上生长的单菌落, 转接到含 100 μ g/mL Amp 的 LB 培养液中, 37°C 振荡培养过夜, 然后按 1:100 接种到新鲜的 LB 培养液中, 37°C 振荡培养至 A_{600} 约为 0.5 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导表达 5 h。取一定体积菌液, 8000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 用 PBS 缓冲液重悬, 分别取 15 μ L 菌液与等体积上样缓冲液混匀, 煮沸 10 min 后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

1.2.4 表达产物 ADH2 的活性检测

获得 ADH2 表达产物后, 将沉淀产物进行溶解, 通过中空纤维柱进行纯化, 根据 ADH2 蛋白分子量大小为 38.4 kDa, 选择用 20~50 kDa 的中空纤维柱对目的蛋白进行初步纯化, SDS-PAGE 检测纯化情况。

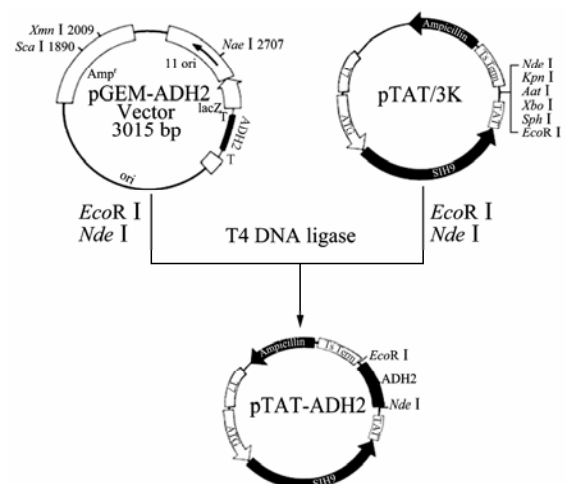


图 1 表达载体 pTAT-ADH2 的构建

Fig. 1 Construction of expression plasmid pTAT-ADH2.

根据瓦勒-霍赫法^[6]在体外测定乙醇脱氢酶的活性, 乙醇脱氢酶在有 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化形式 (NAD^+) 存在的弱碱范围内, 催化乙醇的脱氢反应生成乙醛。在 25°C 保温过程中 NAD^+ 会变成其还原形式 NADH , 这种变化可以通过分光光度计于 340 nm 处测定吸光度增大的情况来跟踪这一反应。以蛋白复性液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L还原型谷胱甘肽, 1 mmol/L氧化型谷胱甘肽, 3.5 mol/L尿素) 为对照进行ADH2活性标定, 对照组和酶反应溶液均做3个重复样本。

取 20 只体重在 (30 ± 2) g 范围内的昆明种小鼠, 实验前禁食 12 h, 禁水 1 h, 随机分 2 组, 每组 10 只。通过尾部静脉注射将纯化后得到的 ADH2 注入小鼠体内, 同时静脉注射与 ADH2 体积相同的生理盐水作空白对照, 30 min 后, 将 200 μL 白酒通过胃部注入体内, 观察 ADH2 是否具有预防酒精中毒的作用。

2 结果与分析

2.1 *adh2* 基因的克隆

以酿酒酵母总 RNA 为模板, 利用 RT-PCR 获得了 1047 bp 左右的特异性条带, 与预期结果一致 (图 2)。将所获得 *adh2* 基因片段连接到克隆载体 pGEM-T 上, 将重组质粒转化 *E. coli* DH5 α , 在含有 Amp、X-gal、IPTG 的 LB 培养基上, 通过蓝白斑筛选出含有目的基因的白色菌落。挑取白色菌落和蓝色菌落到液体培养基 (含 Amp) 中进行少量培养, 提取质粒并进行 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切鉴定, 条带大小与预期一致, 结果见图 2。

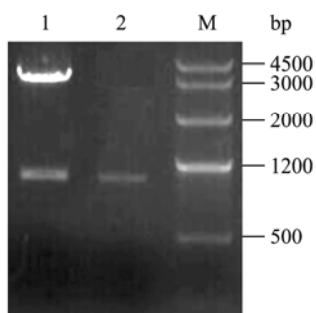


图 2 *adh2* 基因的克隆

Fig. 2 Full-length cDNA of *adh2* was obtained by RT-PCR and cloned into pGEM-T vector. 1: pGEM-T-ADH2 digested with *EcoR* I and *Not* I; 2: the cDNA of *adh2*; M: DNA marker III.

将所克隆的 *adh2* 基因进行测序, 测序结果和所报道的基因全序列 (GenBank Accession No. J01314) 有 90% 的同源性, 表明所获得的目的基因是正确的。

2.2 ADH2 蛋白的表达及纯化

将表达载体 pTAT 和克隆载体 pGEM-T-ADH2 分别用 *EcoR* I 和 *Nde* I 双酶切后, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。分别回收目的基因片段和表达载体 pTAT 片段, 用 T4 DNA 连接酶进行连接, 将连接产物转化到感受态 *E. coli* DH5 α 中, 筛选阳性克隆, 提取质粒, 经过酶切和测序分析, 确定目的基因克隆插入到表达载体中。

将鉴定正确的表达载体转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 选取阳性克隆振荡培养至 A_{600} 约为 0.5 时, 加入 IPTG 至最终浓度达 1 mmol/L, 诱导表达 5 h, 收集菌体进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 结果见图 3, 在 38.4 kDa 处有特异性蛋白带出现, 与理论分子量一致。从图中可以看出, 目的基因得到了有效表达, 蛋白条带扫描分析表明, 表达量占总蛋白的 50% 左右。

将包涵体中的目的蛋白用 8 mol/L 的尿素溶解后, 通过中空纤维柱进行过滤, 得到的纯化蛋白质通过 SDS-PAGE 电泳分析, 获得了大小和目的条带一致的蛋白, 见图 3。

2.3 酶活力的检测

通过体外活性检测发现, 在加入 ADH2 后, 反应溶液的吸光度明显增大, 说明表达纯化的 ADH2 具有一定的活性。通过瓦勒-霍赫法所给定的计算公式, ADH2 测定组与对照组之间的差异极显著 ($P < 0.001$), 得到 ADH2 酶活性为 192 U/mg。

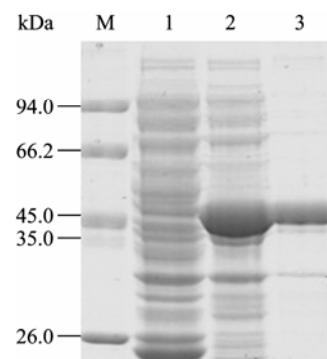


图 3 SDS-PAGE 电泳检测纯化蛋白

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified protein. M: protein marker; 1: BL21 lysate of pTAT; 2: BL21 lysate of pTAT-ADH2; 3: the purified protein.

2.4 小鼠体内检测 ADH2 的酶解作用

以浓度为 35 mg/mL 的 ADH2 对小鼠进行尾部静脉注射, 30 min 后, 将每只小鼠胃部灌入 200 μ L 白酒, 经过计时观察, 结果见表 1。

表 1 ADH2 昏迷中毒测定实验

Table 1 The purified ADH2 activity in coma intoxication test

<i>t</i>	Intoxication				Mortality
	1.5	8	20	30 (min)	10 (d)
A array	10	0	0	0	10
B array	0	4	4	2	2

通过表 1 可以发现: A 组中, 白酒经胃部摄入 90 s 左右, 小鼠全部昏迷; B 组中, 白酒经胃部摄入后, 有 4 只小鼠在 8 min 时昏迷, 4 只在 20 min 时昏迷, 2 只在 30 min 时昏迷。30 min 后, 对照组和 ADH2 组呈现相同的症状, 呼吸急促, 身体瘫软, 可能是乙醇氧化后产生乙醛造成的, 说明 ADH2 有延缓乙醇导致小鼠昏迷中毒的功能。

10 d 后, A 组小鼠全部死亡, B 组小鼠死亡 2 只, 说明 ADH2 在体内能够减轻乙醇对小鼠的危害。

3 讨论

酿酒酵母细胞内含有乙醇脱氢酶 1 (ADH1) 和乙醇脱氢酶 2 (ADH2) 与乙醇代谢有关的酶, 其中乙醇脱氢酶 1 (ADH1) 的作用是还原乙醛生成乙醇, 乙醇脱氢酶 2 (ADH2) 的作用是氧化乙醇生成乙醛^[7-8]。但在人体内, 不存在 ADH1, 只含有 ADH2。在人体内和酿酒酵母细胞内, ADH2 均负责将乙醇催化脱氢生成乙醛, 经乙醛脱氢酶进一步氧化成乙酸, 乙酸在乙酰辅酶 A 的参与下进一步分解成 H₂O 和 CO₂, 为生物体供给能量。而 ADH1 在酿酒酵母细胞内将乙醛合成乙醇, 生成能量物质^[9]。因此推测, 当酿酒酵母生长状态良好时, ADH1 的活性增加, 促进乙醇的生成, 当酿酒酵母细胞受到外界干扰而导致生长状态较差时, ADH2 活性增加, 代谢乙醇为自身提供能量。目前的研究多集中在人体内乙醇脱氢酶基因的多态性分析, 基因的不同会导致酒精在体内代谢速度的不同, 进而会引起不同个体对酒精耐受度的不同, 以及酒精大量摄入对人体脏器生理病变的影响^[7-8]。但是目前用基因工程的方法, 将

ADH2 进行体外表达, 并进行活性研究相对比较少^[10-13]。基于此, 本实验通过 RT-PCR 法克隆得到了 *adh2* 基因, 并在大肠杆菌 BL21 中进行了高效表达, 用纯化后的目的蛋白进一步在昆明小鼠体内进行了生化药理实验, 结果表明, 和对照组相比较, 实验组昆明小鼠的酒精中毒症状明显减轻, 存活率也明显高于对照组。以上结果说明得到的 ADH2 具有一定的分解乙醇的作用, 为进一步研究通过基因工程的方法降解乙醇奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Thomasson HR, Edenberg HJ, Crabb DW, *et al.* Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men. *Am J Hum Genet*, 1991, **48**: 677-681.
- [2] Hellgren M, Stromberg P, Gallego O, *et al.* Alcohol dehydrogenase 2 is a major hepatic enzyme for human retinol metabolism. *Cell Mol Life Sci*, 2007, **64**(4): 498-505.
- [3] Zhang ZM, Liu CZ, Bian JC, *et al.* Polymorphisms of ADH2 and ALDH2 among the Han population in Luoyang China. *Hereditas*, 2002, **24**(5): 532-536.
张竹梅, 刘茶珍, 边建超, 等. 洛阳市汉族群体 ADH2 和 ALDH2 的基因多态性研究. *遗传*, 2002, **24**(5): 532-536.
- [4] Chao YC, Young TH, Tang HS. Alcoholism and alcoholic organ damage and genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes in Chinese patients. *Hepatology*, 1997, **25**(1): 112-117.
- [5] Suzuki Y, Ando F, Ohsawa I, *et al.* Association of alcohol dehydrogenase 2*1 allele with liver damage and insulin concentration in the Japanese. *J Hum Genet*, 2006, **51**: 31-37.
- [6] Stellmach B. Bestimmungsmethoden Enzyme. Beijing: China Light Industry Press, 1992: 7-8.
施特马赫 B. 酶的测定方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 7-8.
- [7] Chai YG, Oh DY, Chung EK. Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms in men with type I and type II alcoholism. *Am J Psychiatry*, 2005, **162**: 1003-1005.
- [8] Frenzer A, Butler WJ, Norton ID, *et al.* Polymorphism in alcohol-metabolizing enzymes, glutathione S-transferases and apolipoprotein E and susceptibility to alcohol-induced cirrhosis and chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, **17**(2): 177-182.

- [9] de Smidt O, du Preez JC, Albertyn J. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS Yeast Res*, 2008, **8**(7): 967–978.
- [10] Hiraki A, Matsuo K, Wakai K, *et al.* Gene-gene and gene-environment interactions between alcohol drinking habit and polymorphisms in alcohol-metabolizing enzyme genes and the risk of head and neck cancer in Japan. *Cancer Sci*, 2007, **98**(7): 1087–1091.
- [11] Lee SL, Chau GY, Yao CT, *et al.* Functional assessment of human alcohol dehydrogenase family in ethanol metabolism: significance of first-pass metabolism. *Alcohol Clin Exp Res*, 2006, **30**(7): 1132–1142.
- [12] Atsumi S, Wu TY, Eckl EM, *et al.* Engineering the isobutanol biosynthetic pathway in *Escherichia coli* by comparison of three aldehyde reductase/alcohol dehydrogenase genes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, doi: 10.1007/s00253-009-2402-6.
- [13] Ding JH, Li SP, Cao HX, *et al.* Polymorphisms of alcohol dehydrogenase-2 and aldehyde dehydrogenase-2 and esophageal cancer risk in Southeast Chinese males. *World J Gastroenterol*, 2009, **15**(19): 2395–2400.



科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

工业酶——结构、功能与应用

(应用生物技术大系)

张百良 著

978-7-03-025769-7 ¥98.00 2010年1月出版

本书第一篇介绍了以碳水化合物为底物的酶类, 着重介绍淀粉酶和纤维素酶的类型、结构和催化特性及在诸多工业领域中的应用。此外对木聚糖酶、果胶酶、糖苷酶和转糖苷酶等也有讨论。第二篇介绍了蛋白水解酶家族的 MEROPS 数据库, 之后是与工业关系密切的枯草杆菌蛋白酶、半胱氨酸型蛋白酶、金属蛋白酶等。第三篇对脂肪酶的结构和功能, 在酯工业、有机合成、生物柴油、结构脂合成中的应用等分章进行了评述。第四篇对重要性日益提高的核酸酶给予了特别关注。最后对多种重要而无法分类的酶进行了讨论, 包括氧化还原酶、植酸酶、腈水解酶、青霉素酰化酶等。

本书可作为相关专业研究生和高年级本科生的教材或参考书, 也可供从事生物化工、医药、食品等行业及其他相关技术领域的科技工作者参考阅读。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 李韶文 (010-64000849) 周文字 (010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目