

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^{1,2}, 王富强^{1,2}, 郑桂珍², 戴 梦², 刘 静², 赵 颖², 任志红², 赵宝华^{1*}, 贾 茜^{1,2*}
ZHANG Yuan^{1,2}, WANG Fu-Qiang^{1,2}, ZHENG Gui-Zhen², DAI Meng², LIU Jing², ZHAO Ying², REN
Zhi-Hong², ZHAO Bao-Hua^{1*} and JIA Qian^{1,2*}

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_{gst}B*, 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_{gst}B* 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 α , 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_{gst}B*, was cloned from penicillin producing fungus *Penicillium chrysogenum* using RT-PCR. The open reading frame (ORF) of *Pc_{gst}B* 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_{gst}B* was inserted into vector pTrc99A and transformed into *Escherichia coli* DH5 α . 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^[1]。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^[2]。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 α 、 μ 、 π 、 σ 、 θ 、 ζ 、 κ 和 ω ;其他还有植物中特有的 φ 和 τ 型GST,昆虫中的 δ 和 ϵ 型,以及细菌中的 β 型GST^[3]。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^[4]。

丝状真菌产黄青霉(*Penicillium chrysogenum* Thom)是重要的 β -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(γ -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 δ -(L- α -氨基己二酰)-L-半胱氨酰-D-缬氨酸(LLD-ACV)^[5]。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^[6];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^[7-10]。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 α 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SuperScriptTM II RNase H⁻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 μ 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 μ 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 α 中。菌株DH5 α /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_{600nm}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 α /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^[11]。分别取 DH5 α /pTrc-*gstB* 和 DH5 α /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*^[12]。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。

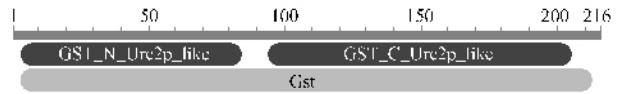


图 1 *PcGstB* 氨基酸序列保守区分析

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

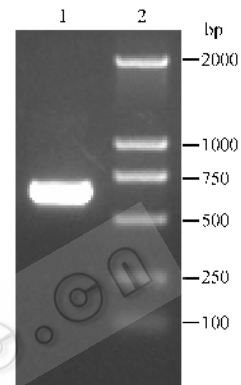


图 2 *PcgstB* 基因的 RT-PCR 结果

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

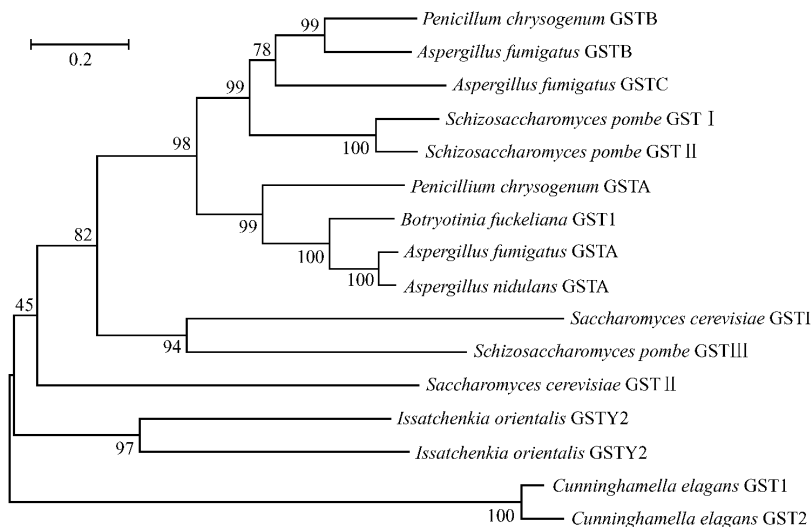


图 3 真菌 GST 的系统进化分析

GSH 的代谢与青霉素合成存在密切的关系^[5], Ferrero 等^[10]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^[12]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-cysteiny-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.