

人铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆和在乳酸乳球菌中的表达

向 华 卫文仲 谭华荣*

郭顺星

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(中国医学科学院药用植物研究所 北京 100094)

摘 要 采用 RT-PCR 技术从人肝总 RNA 中分离扩增了 0.45kb 的人铜锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn SOD)基因的 cDNA 序列,首先克隆至大肠杆菌表达质粒 pET23b,进行了序列测定和超高表达。将 Cu/Zn SOD cDNA 亚克隆至乳酸乳球菌表达载体 pMG36e,用电穿孔法将重组质粒 pMG36esod 转化到乳酸乳球菌中,获得 Cu/Zn SOD 的组成型表达,其表达量约占乳酸乳球菌可溶性蛋白的 5% 以上,活性染色表明该工程菌表达的 Cu/Zn SOD 具有较好的酶活性。

关键词 超氧化物歧化酶,基因克隆与表达,乳酸乳球菌

中图分类号 Q933 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0006-04

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, EC1.15.1.1, 简称 SOD)是生物体防御氧化损伤的重要酶类,广泛存在于需氧生物、耐氧生物及某些厌氧微生物中^[1,2]。目前已知的 SOD 主要分为三类,即 Fe-SOD、Mn-SOD 和 Cu/Zn SOD。其中 Fe-SOD 主要存在于原核生物,Cu/Zn SOD 主要存在于包括人类在内的所有高等真核生物中,而 Mn-SOD 则在高等生物的线粒体及细菌中均有发现,三类 SOD 可能具有不同的进化祖先^[3]。SOD 的主要功能是清除体内有氧化代谢所产生的超氧自由基(O_2^-)。超氧自由基(O_2^-)被认为对各种生物大分子及其它细胞组份具有严重的损伤作用^[4],因此对 SOD 的分子生物学基础及其应用研究备受关注。SOD 的临床应用领域包括抗肿瘤发生、消炎及抗衰老等^[5],SOD 作为保健食品及化妆品的有效成分亦有广泛的应用前景。本文报道了人 Cu/Zn SOD 基因在食品级微生物乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)中的活性表达,为研制富含人 Cu/Zn SOD 的乳制品及微生态制剂奠定了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株及培养条件

乳酸乳球菌 MG1363 和质粒 pMG36e 为荷兰

Groningen 大学 J. Kok 博士赠送,其余菌株和质粒均为本室保存或本工作构建。*E. coli* JM109 用于质粒 pET23b、pMG36e 及其衍生质粒保存或扩增的标准菌株。大肠杆菌 BL21(DE3) λ pLysS 和乳酸乳球菌(*L. lactis*) MG1363 用于人 Cu/Zn SOD 基因表达的受体菌株。

大肠杆菌培养用 LB 或 NZCYM 培养基,乳酸乳球菌用 GM17 培养基。乳酸乳球菌电穿孔转化用 SGM17 培养基,有关培养基的配制参见文献[6]。氨苄青霉素使用浓度为 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 。红霉素在大肠杆菌中的使用浓度为 $150\mu\text{g}/\text{mL}$,在乳酸乳球菌中的使用浓度为 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2 人肝组织

健康人肝组织由北京红十字朝阳医院器官移植研究室惠赠, -70°C 冻存至使用。

1.3 酶和试剂

所用内切酶为 Boehringer 公司产品;T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶为华美公司产品;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG),AMV 逆转录酶为 Promega 公司产品;硝基四唑蓝(NBT)为 Sigma 化学公司产品。核黄素等为国产分析纯。

1.4 人肝总 RNA 制备及 RT-PCR 扩增

人肝总 RNA 采用异硫氰酸胍/酚/氯仿方法制备^[7]。扩增 SOD 基因的 PCR 引物按文献[8]报道

收稿日期:1999-02-01,修回日期:1999-05-14。

基金项目:国家自然科学基金(39800080)和中国博士后科学基金资助。

* 通讯联系人。

的 Cu/Zn SOD cDNA 序列设计。SOD 基因 5' 端引物 P1 5'-GACATATGGCGACGAAGGCCGTG-3' 引入了 *Nde*I 位点, 3' 端引物 P2 5'-CAGGATC-CAAGGGAATGTTTATTG-3' 引入了 *Bam*HI 位点。RNA 经 AMV 逆转录酶逆转录获得的 cDNA 用作 PCR 扩增模板, 30 个 PCR 热循环按 95℃ 1min, 52℃ 1min, 72℃ 1min 进行。

1.5 重组质粒的构建及转化

有关分子克隆, 大肠杆菌感受态制备及转化均按文献[9]方法进行, 乳酸乳球菌转化采用电穿孔转化法^[6], 电穿孔仪为 BioRad 公司 Gene Pulser, 脉冲参数为 1.25kV/mm, 25 μ F 和 200 Ω 。重组质粒构建如下: (1) pET23bsod: RT-PCR 扩增的人 Cu/Zn SOD cDNA 经 DEAE 膜回收纯化后, 用 *Nde*I 及 *Bam*HI 双酶切, 克隆至 pET23b 的相同位点, 转化 JM109, 提取质粒进行酶切鉴定。采用 ds-DNA 循环自动测序^[10]对克隆序列进行测序。正确的重组质粒转化 BL21(DE3)/pLysS 进行 SOD 表达分析。(2) pMG36esod: pET23bsod 质粒经 *Nde*I 酶切, Klenow 酶补平, 再经 *Sal*I 酶切获得人 Cu/Zn SOD 基因片段, 插入 pMG36e 的 *Sma*I 和 *Sal*I 位点, 获得重组质粒 pMG36esod, 电穿孔法转化乳酸乳球菌

MG1363 进行表达分析。

1.6 SOD 在大肠杆菌中的诱导表达

含重组质粒 pET23bsod 的大肠杆菌 BL21 (DE3)/pLysS 在 NZCYM 培养基中培养过夜, 用新鲜培养基 1:100 稀释, 继续培养至对数中期, 加 IPTG 至 0.1mmol/L, 培养 2.5h 后离心收集菌体。Cu/Zn SOD 的表达用 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 考马斯亮蓝染色进行检测^[9]。

1.7 SOD 在乳酸乳球菌中的表达及活性分析

含重组质粒 pMG36esod 的乳酸乳球菌 MG1363 在 GM17 培养基中 30℃ 静置培养过夜用新鲜培养基 1:50 稀释, 继续培养至对数后期, 离心收集菌体, 超声破碎。Cu/Zn SOD 的 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及 NBT 法活性染色按文献[11]进行。

2 结果

2.1 人 Cu/Zn SOD cDNA 的克隆及重组质粒的构建

采用 RT-PCR 技术制备了人 Cu/Zn SOD 的 cDNA, 进而构建了 SOD 在大肠杆菌中的诱导表达的重组质粒 pET23bsod 和在乳酸乳球菌中的组成型表达重组质粒 pMG36esod (图 1)。

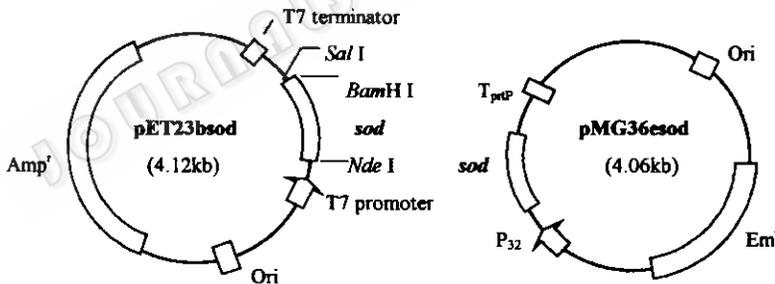


图 1 重组质粒 pET23bsod 和 pMG36esod

Fig. 1 Recombinant plasmids pET23bsod and pMG36esod

首先, SOD cDNA PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, DEAE 膜回收纯化, *Nde*I 和 *Bam*HI 双酶切, 插入 pET23b 质粒的 *Nde*I 和 *Bam*HI 位点, 经连接和转化 JM109 后获得氨苄青霉素抗性转化子。质粒 pET23bsod 酶切分析与预期完全相同 (图 2)。以 pET23bsod 为模板, T7 启动子引物 (Promega 公司产品) 为测序引物, 对克隆的 SOD 基因进行了测序分析。所测结果与文献[8]发表序列相同。

从质粒 pET23bsod 上将人 Cu/Zn SOD cDNA 亚克隆至乳酸乳球菌表达载体 pMG36e 中, 构建了含有人 SOD 基因的重组表达质粒 pMG36esod (图

1)。pMG36esod 的酶切鉴定结果与预期结果完全相符 (图 2)。将该质粒通过电穿孔法导入乳酸乳球菌后, 再次提取该质粒并进行了酶切分析, 结果表明该质粒在乳酸乳球菌中能稳定存在。

2.2 人 Cu/Zn SOD 基因在大肠杆菌中的高效表达

大肠杆菌 pET-表达体系是目前表达外源基因效率最高的表达系统之一。为了进一步检测所克隆的人 Cu/Zn SOD cDNA 的正确性及可表达性, 我们首先进行了该基因在大肠杆菌中的诱导表达研究。人 Cu/Zn SOD cDNA 被插入到载体 pET23b 的 T7 启动子下游 *Nde*I 位点上。宿主菌采用 *E. coli* BL21(DE3)/pLysS, 其染色体上整合有含 T7 RNA

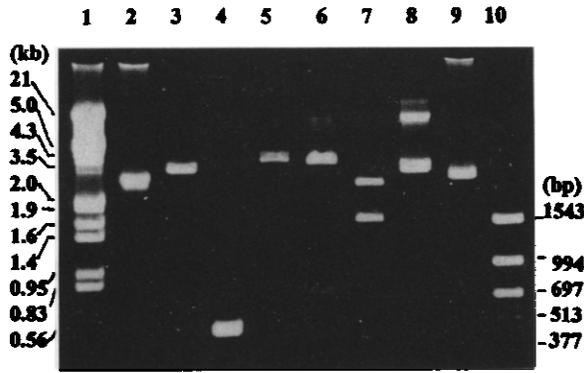


图2 重组质粒酶切的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of pET23bsod and pMG36esod digested with restriction enzymes

1. DNA size marker I; 2. pET23b; 3. pET23bsod; 4. PCR products of Cu/Zn SOD cDNA; 5. pET23bsod digested with *NdeI* and *SalI*; 6. pMG36esod digested with *EcoRI*; 7. pMG36esod digested with *HincII*; 8. pMG36esod; 9. pMG36e; 10. DNA size marker II

聚合酶基因的 λ 噬菌体 DE3 区, T7 RNA 聚合酶可经 IPTG 诱导表达。同时该菌株还含有相容性质粒 pLysS, 该质粒表达微量的 T7 溶菌酶, 可消除背景表达的 T7 RNA 聚合酶, 以控制外源基因的非诱导性表达而提高重组表达质粒的稳定性。我们将工程菌 BL21(DE3)/pLysS/pET23bsod 在非诱导条件下培养约 30 世代后, 随机选择了 50 个单菌落提取质粒并进行了酶切分析, 结果表明, pET23bsod 在 BL21(DE3)/pLysS 中可以长期稳定地存在。该工程菌株经 IPTG 诱导, 则可高效表达人 Cu/Zn SOD, 该工程菌全蛋白提取物经 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 考马斯亮蓝染色后观察到外源蛋白的超高表达, 其表观分子量约为 19kD, 与文献[12]报道的人 Cu/Zn SOD 表观分子量结果一致(图 3)。用蛋白质扫描仪对 SDS-PAGE 干胶扫描分析表明, 其表达的人 Cu/Zn SOD 可达大肠杆菌总蛋白的 50% 以上, 是迄今为止人 Cu/Zn SOD 在大肠杆菌中表达量最高的菌株之一。

2.3 人 Cu/Zn SOD 在乳酸乳球菌中的组成型表达及活性检测

乳酸乳球菌表达载体 pMG36e 含有乳酸乳球菌染色体来源的强启动子 P32, 可组成型表达外源基因。我们将乳酸乳球菌工程菌 MG1363/pMG36esod 蛋白提取物进行了 15% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及考马斯亮蓝染色, 结果表明, 该工程菌可组成型表达人 Cu/Zn SOD, 其表达量约为乳酸乳球菌可溶性蛋白的 5% 以上(图 4A)。由于重组质粒 pMG36esod 表达的人 Cu/Zn SOD 的 N 端融合有 15

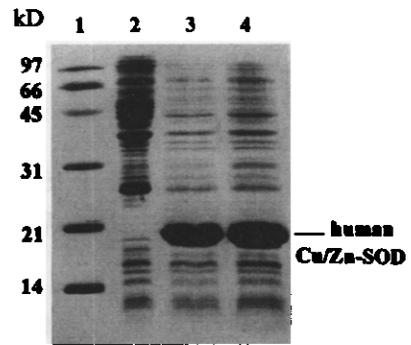


图3 人 Cu/Zn SOD 基因在大肠杆菌中表达的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 3 SDS-PAGE of high-level expression of human Cu/Zn SOD gene in *E. coli*

1. Protein size marker (in kD);
2. Extracts from BL21(DE3)/pLysS/pET23b;
3~4. Extracts from BL21(DE3)/pLysS/pET23bsod

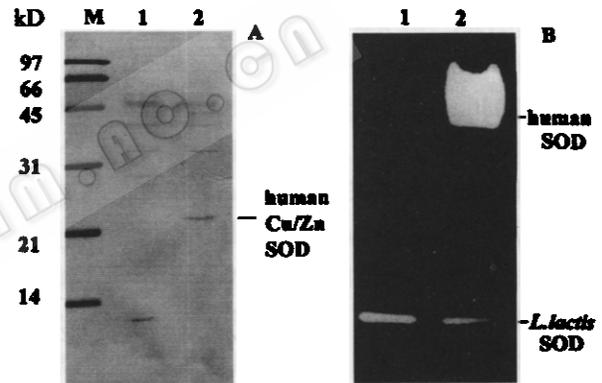


图4 人 Cu/Zn SOD 在乳酸乳球菌中表达(A)及活性检测(B)

Fig. 4 SDS-PAGE(A) and activity analysis(B) of human Cu/Zn SOD expressed in *Lactococcus lactis*

M. Protein size marker (in kD);
1. Cell-free extracts from *Lactococcus lactis* MG1363/pMG36e;
2. Cell-free extracts from *Lactococcus lactis* MG1363/pMG36esod

个载体来源的氨基酸, 其分子量比 pET23bsod 在大肠杆菌中表达的天然型 SOD 略大。为了检测乳酸乳球菌工程菌所表达的人 Cu/Zn SOD 的酶活性, 我们将该工程菌培养物经超声破碎, 离心去除菌碎片后, 取其上清进行了 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SOD 活性染色, 并用含空载体 pMG36e 的乳酸乳球菌 MG136 为阴性对照。结果表明, 阴性对照菌株只能表达一种乳酸乳球菌本身的 SOD, 其电泳迁移率较快, 表达量较低, 与文献[13]报道的结果相同。而乳酸乳球菌工程菌 MG1363/pMG36esod 除表达该乳酸乳球菌自身的 SOD 外, 还表达大量的外源性人 Cu/Zn SOD, 其电泳迁移慢, 活性染色结

果表明所表达的人 Cu/Zn SOD 具有明显的 SOD 酶活性(图 4B),由图 4B 可以看出,工程菌所表达的人 SOD 酶活性可达其内源性 SOD 活性的 10 倍左右。

3 讨 论

超氧化物歧化酶(SOD)由于其重要的抗氧化能力,目前已在化妆品、食品及保健品等领域获得应用,并在一些疾病(如肿瘤、炎症及自身免疫疾病等)的治疗中显示了良好的应用前景^[14,15]。基因工程表达人源 SOD 是其中一项最重要的内容。但是,目前人源 SOD 的基因克隆与表达仍主要采用传统的大肠杆菌^[8,12],其表达产物需经过复杂的分离纯化

才能达到食品医药标准。

本文首次进行了人 Cu/Zn SOD 在食品级微生物乳酸乳球菌中的克隆和表达,其表达产物有可能不经过传统的纯化工艺而直接应用于食品及化妆品领域,发挥其抗氧化、抗衰老等保健或护肤功能。若将该乳酸乳球菌 SOD 工程菌以食品级选择标记取代目前的抗生素抗性选择标记,还有可能直接用于乳品发酵,用以生产功能食品,其 SOD 酶活性不仅可防止乳制品中的脂质过氧化反应,将其口服至胃肠道,对于胃肠道炎症疾病的防治亦将具有保健功能。本工作的完成为人 Cu/Zn SOD 在功能食品、保健品及化妆品等领域的广泛应用创造了条件。

参 考 文 献

- [1] McCord J M, Keele J B, Fridovich I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, **68**: 1024~1027
- [2] Hewitt J, Morris J G. *FEBS Lett*, 1975, **50**: 315~318
- [3] Steinman H M. In *Superoxide Dismutase*, Oberley LW ed. (CRC, Boca Raton, FL), Vol. 1, pp. 11~68
- [4] Bannister J V, Bannister W H, Rotilio G. *Crit Rev Biochem*, 1987, **22**: 111~180
- [5] Moody C S, Hassan H M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79**: 2855~2859
- [6] 向 华, 刘敬忠, 胡 维等. *微生物学报*, 1999, **39**(3): 196~204
- [7] 刘敬忠, 向 华, 胡 维等. *生物工程学报*, 1998, **14**(4): 384~388
- [8] Hallewell R A, Masiarz F R, Najarian R C *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1985, **13**: 2017~2034
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second ed., New York: Cold Spring Harbor, 1989
- [10] Liu Jingzhong, Xiang Hua, Zhou Yan *et al.* *Genet Anal Biomol Eng*, 1998, **14**: 113~116
- [11] Beauchamp C, Fridovich I. *Anal Biochem*, 1971, **44**: 276~287
- [12] Hartman J R, Celler T, Yavin Z *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 7142~7146
- [13] Rog D G, Klaenhammer T R, Hassan H M. *Mol Gen Genet*, 1993, **239**: 33~40
- [14] 陈淮杨, 刘望夷. *生物化学与生物物理进展*, 1996, **23**(5): 408~413
- [15] 袁勤生, 王志友, 翁清清等. *中国药学杂志*, 1989, **24**(7): 387~395

Cloning and Expression of Human Cu/Zn Superoxide Dismutase Gene in *Lactococcus lactis*

¹XIANG Hua ¹WEI Wen-zhong ¹TAN Hua-rong ²GUO Shun-xing

¹(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

²(Institute of Medical Plant, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094)

Abstract The cDNA encoding human Cu/Zn SOD was amplified by RT-PCR using the total RNA of human liver as the template and was cloned into an *E. coli* expression vector pET23b. After the DNA sequence was determined, the recombinant plasmid pET23bsod was introduced into *E. coli* BL21(DE3) pLysS. SDS-PAGE analysis revealed that the recombinant *E. coli* expressed the predicted 19 kDa human Cu/Zn SOD, and its amount was over 50% of total proteins. The Cu/Zn SOD cDNA was then subcloned into a lactococcal expression vector pMG36e, and resulting pMG36esod was introduced into *L. lactis* MG1363 by electroporation. The human Cu/Zn-SOD was expressed up to 5% of the soluble proteins, and the enzymatic activity was also observed by SOD activity dyeing.

Key words Cu/Zn-SOD, gene cloning and expression, *Lactococcus lactis*