

# 南极衣藻(*Chlamydomonas* sp. ICE-L)谷胱甘肽还原酶基因的原核表达及其条件优化\*

刘莹<sup>1</sup> 丁燊<sup>1</sup> 简纪常<sup>1</sup> 吴灶和<sup>1</sup> 缪锦来<sup>2</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室 湛江 524025;

2. 国家海洋局第一海洋研究所 海洋生物活性物质重点实验室 青岛 266061)

**摘要** 采用 RT-PCR 技术克隆南极衣藻 GR 基因 ORF 全长 cDNA, 然后经酶切、连接等步骤构建其原核表达载体; 并对其表达的诱导时间、IPTG 浓度、温度进行了优化, 以期获得较大量的酶蛋白。结果表明, 将构建的原核表达载体 pET-GR 导入大肠杆菌 BL21, 可以高效表达融合蛋白; 且表达的蛋白均以包涵体的形式存在; 经 SDS-PAGE 电泳结果显示, 获得的目的蛋白分子量为 52.2kDa, 符合预期分子量; GR 蛋白在大肠杆菌中诱导表达优化条件为, 1.0mmol/L 的 IPTG, 28 °C 诱导 3h。这些结果为进一步深入研究该基因的特性与功能奠定了基础。

**关键词** 南极衣藻 *Chlamydomonas* sp. ICE-L, 谷胱甘肽还原酶, 原核表达, 诱导条件, 冰藻  
**中图分类号** Q936, Q78

谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)是谷胱甘肽抗氧化系统的主要酶之一, 广泛存在于各种生物。改变 GR 的活性和表达能引起生物明显的生理变化, 通过 GR 的遗传转化来提高其表达, 在抗逆遗传育种中具有较大的应用前景。

严酷的极地环境造就了南极生物特殊的生物学特征, 它们可能通过分子水平上的改变, 而引起组成和生化成分含量的改变, 以适应严酷的极地环境(丁燊等, 2006; 李江等, 2010)。极地微藻具备一套有效的抗胁迫体系保护自身的光合系统、生物膜系统和酶系统, 以保证微藻细胞在极端条件下生理活动正常进行。GR 在南极冰藻适应极端环境中(低温、重金属等)具有重要的地位(Ding *et al.*, 2005; 丁燊等, 2006)。本研究在前期南极衣藻 *Chlamydomonas* sp. ICE-L 谷胱甘肽还原酶的分离纯化与基因克隆的基础上(Ding *et al.*, 2007), 构建其原核表达载体, 并转入大肠杆菌中进行表达, 优化其表达条件。期望为大量获取酶蛋白进一步研究该酶的理化性质及其应用奠定技术基础, 并从分子水平进一步了解极地生物对极端环境的适

应机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种与培养基

本实验所用南极冰藻——衣藻(*Chlamydomonas* sp. ICE-L), 由国家海洋局第一海洋研究所海洋生物活性物质重点实验室提供。其培养液采用 Provasoli 培养基(Provasoli, 1968)。

### 1.2 质粒与受体菌

质粒载体: pET-21a, 由本项目组保存。

受体菌: 大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ ; 大肠杆菌菌株 BL21(DE3)由本项目组保存。

### 1.3 主要工具酶及试剂盒

dNTPs、ExTaq 酶、rTaq 酶、Reverse Transcriptase M-MLV (Rnase H)、限制性核酸内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I、T<sub>4</sub> 连接酶、DNA Marker、蛋白质分子量标准等均购自 TaKaRa 公司; 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG) 购自上海生工; PCR 纯化试剂 QIAquick<sup>TM</sup> PCR Purification Kit 盒购自 QIAGEN 公司; Trizol 试剂购自

\* 国家自然科学基金资助项目, 40876102 号, 40876107 号。刘莹, E-mail: liuying0454@163.com

通讯作者: 丁燊, E-mail: dingy@gdou.edu.cn; 简纪常, 博士, 教授, E-mail: jianjc@gdou.edu.cn

收稿日期: 2010-10-17, 收修改稿日期: 2010-12-29

Invitrogen 公司。

#### 1.4 重组质粒 pET-GR 的构建

南极衣藻谷胱甘肽还原酶基因, 简称 ICE-LGR 基因, 经 PCR 扩增后首先进行 TA 克隆, 然后将 pMD18-T/GR 阳性克隆质粒及载体 pET-21a(+) 分别用同一对酶(*Nde* I 和 *Xho* I) 进行酶切, 连接转化 *E. coli* DH-5, 筛选克隆扩大培养后提取质粒, 并进行酶切鉴定, 筛选后的阳性克隆质粒即为重组表达质粒, 命名为 pET-GR。

**1.4.1 引物的设计与 GR 基因 ORF 的扩增** 以南极衣藻 cDNA 一链为模板, 根据 GR 的克隆分析结果, 设计一对引物:

PU: 5'-GGAATTCCATATGCTCTCGCTTCGCTGC AGCGAACTAC-3' (*Nde* I),

PL: 5'-CCGCTCGAGAAGCTTGGAAGTTCCAG TGCCCAT-3' (*Xho* I),

扩增 ICE-LGR 基因。在引物的 5' 端引入 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点, 并在酶切位点前添加了合适的保护碱基。

PCR 反应体系为, 无菌水 40.5 $\mu$ l、10 $\times$ PCR buffer 5 $\mu$ l、dNTP mixture (10mmol/L) 1 $\mu$ l、PU (10 $\mu$ mol/L) 1 $\mu$ l、PL (10 $\mu$ mol/L) 1 $\mu$ l、cDNA 一链 1 $\mu$ l 和 *ExTaq* 0.5 $\mu$ l。PCR 反应条件为, 95 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 60s, 59 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 75s, 30 cycles, 循环结束后, 于 72 $^{\circ}$ C 温育 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

**1.4.2 全长克隆与测序** PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检查后, 切下目的条带, 用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收 DNA。回收产物与 pMD 18-T Vector 连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 菌斑在含有 X-gal 和 IPTG 的平板上进行蓝白斑筛选, PCR 鉴定。挑取若干白斑溶于 1ml 含氨苄的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C, 200r/min 振荡培养 5—6h, 取 1 $\mu$ l 作模板, 进行 PCR 扩增, 经鉴定得到的正确克隆用于测序, 测序工作由深圳华大基因科技有限公司完成。

**1.4.3 体外重组** 分别提取重组克隆质粒及 PET-21a(+) 质粒, *Nde* I、*Xho* I 双酶切鉴定。重组克隆质粒酶切体系为 50 $\mu$ l 体系(H Buffer 5 $\mu$ l、*Nde* I 2 $\mu$ l、*Xho* I 2 $\mu$ l、DNA 片段 21 $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 20 $\mu$ l); PET-21a(+) 质粒酶切体系为 50 $\mu$ l 体系(H Buffer 5 $\mu$ l、*Nde* I 2 $\mu$ l、*Xho* I 2 $\mu$ l、pET21a(+) 20 $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 21 $\mu$ l)。酶切于 37 $^{\circ}$ C 水浴中进行, 酶切 12—16 h, 取 5 $\mu$ l 酶切产物进行琼脂糖电泳检测。酶切后的质粒、目的片段用 QIAquick PCR Purification Kit 试剂盒进行纯化。然后按回收浓度计算连接比例进行连接构建重组质粒, 命名为 PET-GR。连接体系为, 10 $\mu$ l (T<sub>4</sub> 连接酶 1 $\mu$ l、10 $\times$ T<sub>4</sub>

buffer 1 $\mu$ l、pET-21a(+) 3 $\mu$ l、GR 回收产物 5 $\mu$ l), 反应条件, 16 $^{\circ}$ C 水浴过夜(约 8—12 h)。

**1.4.4 转化与鉴定** 连接产物转化入 DH5、筛选阳性克隆及进行 PCR 鉴定, 提取重组表达质粒, 对重组表达质粒进行双酶切鉴定。反应体系为: 10 $\times$ H Buffer 1 $\mu$ l、*Nde* I 1 $\mu$ l、*Xho* I 1 $\mu$ l、PET-GR 质粒 3 $\mu$ l, 加 DW2 至 10 $\mu$ l。37 $^{\circ}$ C 反应 3h, 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳观察。

#### 1.5 基因工程重组表达菌株的诱导表达

**1.5.1 重组菌的诱导表达** 将鉴定后的阳性重组质粒 PET-GR 转化大肠杆菌感受态细胞 BL21, 涂布于 LB/Amp 平板, 培养过夜。挑选生长良好的阳性单菌落, 接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 快速振荡培养后, 按照 1% 的比例接种于 3ml 含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至细菌对数生长期 ( $OD_{600nm} = 0.4—0.6$ )。加入 IPTG 使其终浓度为 1mmol/L, 在 37 $^{\circ}$ C、200r/min 诱导培养 3h 收集菌体。吸出 1ml 的菌液 5000r/min 离心 3min 收集菌体, 弃上清, 用 500 $\mu$ l 的 PBS 重悬后进行超声裂解, 工作条件为: 超声 10s, 间隔 10s, 共 15min。13000r/min 离心 10min, 吸出 15 $\mu$ l 上清备用, 剩余上清弃掉后用 15 $\mu$ l PBS 重悬沉淀, 上清以及沉淀各加入 15 $\mu$ l 2 $\times$ SDS 上样缓冲液混匀, 煮沸 5min 后, 各取 10 $\mu$ l 进行 SDS-PAGE 电泳鉴定表达蛋白。同时以未经诱导的含重组质粒 pET-GR 的 BL2(DE3) 菌体和 BL21 (DE3) 空菌体诱导前后作为阴性对照。

**1.5.2 不同条件下融合蛋白的表达** 不同温度诱导, 加入 IPTG 使其终浓度为 1mmol/L, 分别于 16 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C, 100r/min 诱导培养过夜; 不同诱导时间, 在 28 $^{\circ}$ C, 1mmol/L IPTG 浓度诱导下, 比较分别诱导 2h、3h、4h、5h 和 6h 后的差异; 不同浓度 IPTG 的诱导, 其梯度设置为 0.1、0.4、0.7 和 1mmol/L。其他诱导条件同 1.5.1。诱导培养后分别按 1.5.1 的方法进行 SDS-PAGE 电泳分析表达差异。

## 2 结果

### 2.1 ICE-LGR 基因 ORF 的扩增

ICE-LGR 基因 ORF 的 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1, 得到大小约为 1411bp 目标带, 与理论结果相符合。经测序证实为 ICE-LGR 蛋白序列, 表明扩增目标带成功。

### 2.2 质粒酶切结果

利用碱裂解法提取 pMD18-T/GR 和 pET-21a (+)

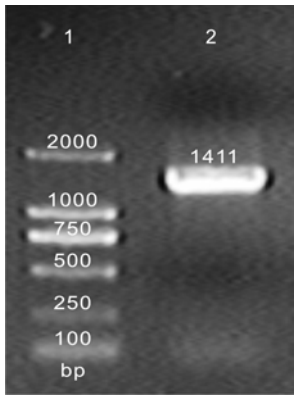


图 1 ICE-L GR 基因 ORF 的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of ICE-L GR gene's ORF

1. TAKARA DL2000; 2. GR 的 PCR 产物

重组质粒菌液 PCR 结果, 扩增片段大小与预期相符, 结合测序结果证明该重组质粒含有目的基因。为进一步确定重组质粒是否构建成功, 提取阳性克隆的质粒 pET-GR, 进行限制性内切酶 *Nde* I/*Xho* I 双酶切鉴

的质粒, 电泳显示质粒提取效果良好后, 进行酶切试验。TA 克隆重组质粒及提取的 pET21a 空质粒经 *Nde* I/*Xho* I 双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳分析结果与理论结果相符合(图 2A、B), 证明酶切位点正确、pMD18-T 与 GR 重组成功。

**2.3 菌落 PCR 筛选阳性克隆与重组质粒酶切结果**

通过菌落 PCR 筛选阳性克隆和测序, 鉴定质粒中是否含有目的基因的插入片段。图 3 为 pET-GR

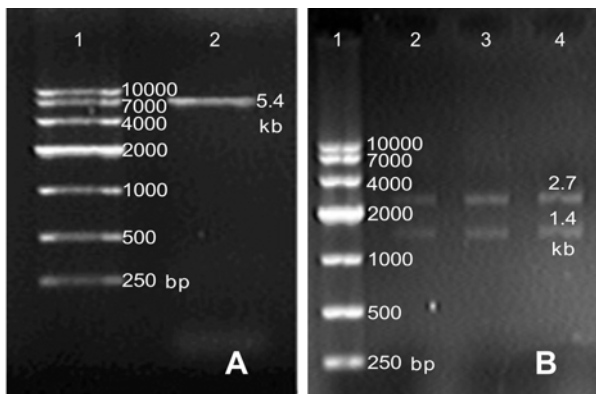


图 2 质粒双酶切(*Nde* I 和 *Xho* I)结果

Fig.2 The results of double enzymatic digestion of plasmid with *Nde* I and *Xho* I

A1. TAKARA DL10000; A2. pET-21 质粒酶切; B1. TAKARA DL10000; B2—B4. pMD18-T/GR 酶切

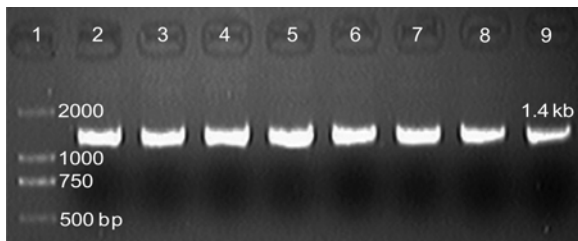


图 3 重组质粒 pET21-GR 的菌落 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pET21-GR by colony PCR

1. TAKARA DL2000; 2—9. 阳性克隆的 PCR 产物

定, 可以得到了正确的重组子(图 4)。

**2.4 表达产物的鉴定**

将构建的 pET-GR 质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导, 成功表达分子量约 52.2kDa 的融合蛋白(图 5)。而阴性对照组与未诱导组, 在诱导组相应的蛋白条带处并无蛋白表达, 结果与预期相符, 说明目的蛋白成功表达。

**2.5 GR 蛋白在大肠杆菌中表达条件的优化**

不同温度诱导 GR 表达的 SDS-PAGE 结果见图 6 上。结果表明, 在一定温度范围内随诱导温度的提高, 重组蛋白的表达量增高, 最佳诱导温度为 28℃, 超过 28℃表达量反而降低, 而且不同温度诱导所表达的蛋白均以包涵体的形式存在。不同诱导时间的 SDS-PAGE 结果(图 6 中)显示, 在 2h 以内重组蛋白没有明显表达条带, 在 3h 时开始出现蛋白表达带, 而当诱导时间在 4h 以上时, 重组蛋白的表达量与诱导 3h 的表达量相当, 因此优化的诱导时间为 3h。经不同浓度的 IPTG 进行诱导, 结果表明, 不同浓度的 IPTG 均能诱导重组蛋白的表达, 但从表达量上看, 1.0mmol/L IPTG 诱导的融合蛋白相对表达量大(图 6 下), 因此 1.0mmol/L IPTG 为最优的诱导浓度。

通过对诱导温度、时间、IPTG 浓度的评估, 最终确定 GR 蛋白在大肠杆菌中诱导表达的最优条件为: 1.0mmol/L IPTG, 28℃ 诱导 3h。

通过对诱导温度、时间、IPTG 浓度的评估, 最终确定 GR 蛋白在大肠杆菌中诱导表达的最优条件为: 1.0mmol/L IPTG, 28℃ 诱导 3h。

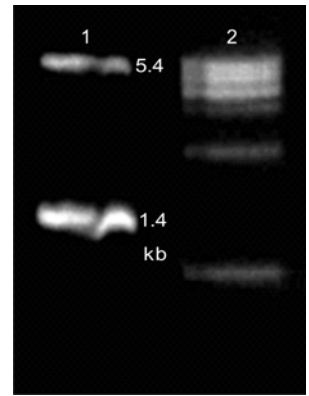


图 4 重组质粒 pET21-GR 酶切分析

Fig.4 Enzymatic digestion analysis of recombinant plasmid pET21-GR

1. 重组质粒酶切结果; 2. 全式金 1kb DNA ladder (条带组成 1、2、3、4、5、6、8、10kb)

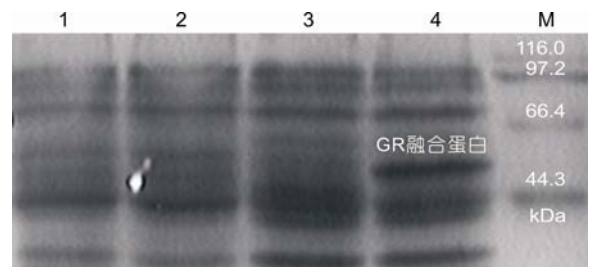


图 5 GR 在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of GR expressed in *E. coli* 1、2. pET21a 诱导前、后; 3、4. pET-GR 诱导前、后; M. 蛋白质分子量标准

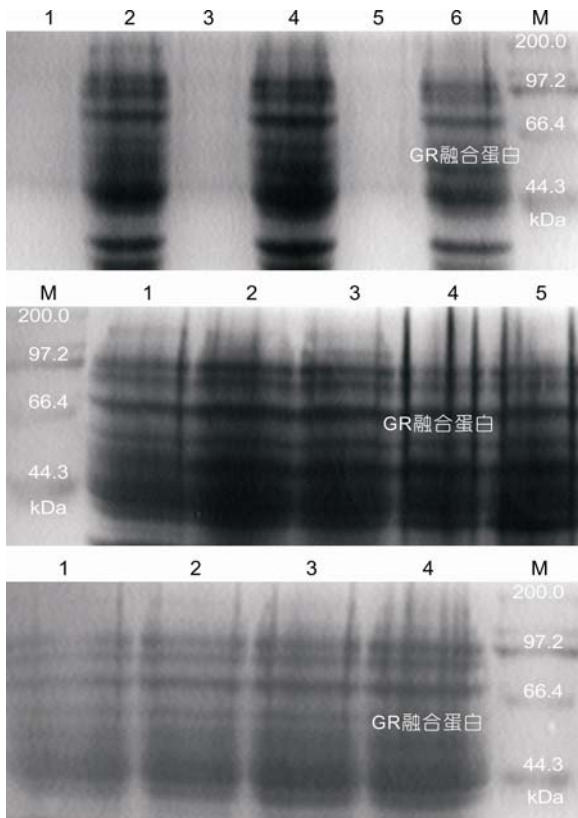


图6 重组菌在不同条件下GR诱导表达的SDS-PAGE分析  
Fig.6 SDS-PAGE analysis of induced expression of GR in recombinant bacteria at different conditions  
上: 不同温度(1. 16℃上清; 2. 16℃沉淀; 3. 28℃上清; 4. 28℃沉淀; 5. 37℃上清; 6. 37℃沉淀; M: 蛋白质分子量标准); 中: 不同时间(1. 2h; 2. 3h; 3. 4h; 4. 5h; 5. 6h); 下: 不同IPTG浓度(1. 0.1mmol/L; 2. 0.4mmol/L; 3. 0.7mmol/L; 4. 1.0mmol/L)。蛋白质分子量标准(6.5kDa, 14.3kDa, 20.1kDa, 29.0kDa, 44.3kDa, 66.4kDa, 97.2kDa, 116kDa, 200kDa, 其中前4个小分子蛋白在图中未显示)

### 3 讨论

由于大肠杆菌易于培养、繁殖快、表达量高、成本低、易纯化、遗传背景清楚等,所以原核表达系统目前被广泛采用,成为高效表达研究的首选体系,其中BL21是应用最广的宿主菌。目前商业化的原核载体很多,但载体的表达与目的基因的特性有较大的关系,不一定越新的载体就一定更适合任一目的基因的表达。有研究从表达量、可溶性、活性等方面衡量,认为pGEX 4-T-1等系统表达的融合蛋白不稳定,在表达的过程中有降解发生(张嵘,2006)<sup>1)</sup>。在本研究

中选中了pET21a原核表达载体,将南极衣藻*Chlamydomonas* sp. ICE-LGR基因的全长克隆到该载体上,导入大肠杆菌BL21(DE3)中表达表达效果好、产物稳定(图5)。说明pET21a载体适合该酶的表达,受体细胞大肠杆菌BL21的选用是正确的。

对连接至表达载体的序列经PCR、酶切与测序验证后表明其序列正确,无碱基突变(图3、图4)。将转化pET-GR质粒的大肠杆菌BL21(DE3),经IPTG诱导后成功表达分子量约52.2kDa的融合蛋白(图5),其分子量与预期相符。分子量大小与本课题组及其他研究的结果接近,经分离纯化分析ICE-LGR亚基的表观分子量为54.6kDa(Ding *et al*, 2007),牛脑GR的分子量为55kDa(Gutterer *et al*, 1999),大肠杆菌的为52kDa(Pigiet *et al*, 1977)。说明前期工作克隆得到的ICE-LGR的cDNA及其大肠杆菌中的诱导表达是正确的。

原核表达的不同诱导条件在很大程度上影响目的蛋白的得率,故目的蛋白的诱导表达条件优化是非常重要的。本研究对诱导温度、诱导剂浓度以及诱导时间等表达条件进行了优化。诱导剂IPTG在融合蛋白的表达中起着至关重要的作用。加入一定剂量的IPTG后阻遏蛋白不能与操纵基因结合,外源基因大量表达,但高浓度的IPTG的诱导会阻碍蛋白的表达(Patnaik, 2001)。IPTG虽然对细胞没有毒害作用,但可以通过改变培养基的酸碱度,而抑制细菌生长(Sakamoto *et al*, 1996)。在本试验中,IPTG浓度为1.0mmol/L时GR表达量最大(图6),验证了其浓度过高将抑制表达。作者还发现,GR表达的最适IPTG浓度相对较高,可能与表达GR的受体细胞对培养基酸碱度的高适应能力有关,保证细菌能维持正常生长,从而提高表达量。诱导时间的差异也会导致表达量的不同,一般诱导3—6h表达量较大,而在6h后,表达量下降。本试验中,当GR诱导时间在4h以上时,重组蛋白的表达量与诱导3h的表达量相当,说明长时间的诱导并不能进一步提高蛋白的表达量。

### 4 结论

本研究对ICE-LGR基因的原核表达、表达条件的优化进行了探讨,为日后深入研究南极衣藻

1) 张 嵘, 2006. 石斑鱼虹彩病毒(SGIV)胸苷激酶基因克隆、表达及其分子特征分析. 广州: 中山大学硕士学位论文, 32—50

*Chlamydomonas* sp. ICE-L GR 蛋白的功能研究与应用研究奠定了基础, 为通过南极微藻 GR 的遗传转化进行生物的抗逆遗传育种提供了新依据与新途径。在进一步的研究中, 需要对以包涵体形式表达的蛋白产物进行大量提取、纯化、三维结构、活性检测、功能鉴定及表达调控等方面进行深入研究。

### 参 考 文 献

- 丁 燊, 缪锦来, 王全富等, 2006. 温度对南极衣藻 ICE-L(*Chlamydomonas* sp. ICE-L)谷胱甘肽含量及其相关酶活性的影响. 海洋与湖沼, 37(2): 154—161
- 李 江, 沈继红, 何培青等, 2010. 环境因子对南极菌 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 多糖合成关键酶 UGD 基因表达的影响. 海洋与湖沼, 41(6): 824—828
- Ding Y, Miao J, Wang Q *et al*, 2005. Effect of Cd on GSH and GSH-related enzymes of *Chlamydomonas* sp. ICE-L existing in Antarctic ice. J Environ Sci, 17(4): 667—671
- Ding Y, Miao J, Wang Q *et al*, 2007. Purification and characterization of a psychrophilic glutathione reductase from Antarctic ice microalgae *Chlamydomonas* sp. Strain ICE-L. Polar Biol, 31: 23—30
- Gutterer J M, Ralf D, Johannes H, 1999. Purification of glutathione reductase from bovine brain, generation of an antiserum, and immunocytochemical localization of the enzyme in neural cells. J Neurochem, 73(4): 1422—1430
- Patnaik P R, 2001. Investigation of induction effect on the steady state performance of a continuous for recombinant  $\beta$ -galactosidase. Process Biochemistry, 36(11): 1069—1074
- Pigiet V P, Conley R R, 1977. Purification of thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutathione reductase by affinity chromatography. J Bio Chem, 252(18): 6367—6372
- Provasoli L, 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Watanabe A, Hattori A ed. Cultures and Collections. Proc US-Japan Conf, Hakone, Japan, 63—75
- Sakamoto S, Terada L, Lee Y C *et al*, 1996. Efficient production of thermus protease aqualysin 1 in *Escherichia coli*: effects of cloned gene structure and two-stage culture. Appl Microbiol Biotechnol, 45(1—2): 94—101

## PROKARYOTIC EXPRESSION AND ITS CONDITIONAL OPTIMIZATION OF GLUTATHIONE REDUCTASE GENE OF ANTARCTIC *CHLAMYDOMONAS* SP. ICE-L

LIU Ying<sup>1</sup>, DING Yu<sup>1</sup>, JIAN Ji-Chang<sup>1</sup>, WU Zao-He<sup>1</sup>, MIAO Jin-Lai<sup>2</sup>

(1. Guangdong Provincial Key Lab of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals; Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524025; 2. Key Lab of Marine Bioactive Substances, First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, 266061)

**Abstract** Glutathione reductase (GR) is an important antioxidative enzyme in organisms. In order to construct prokaryotic expression vector and to study the recombinant gene expression in *Escherichia coli*, complete gene of *Chlamydomonas* sp. ICE-L GR ORF was cloned by the RT-PCR method followed by restriction enzymes cutting, connection. The induced time, IPTG concentration and temperature of prokaryotic expression were optimized using SDS-PAGE. The results showed that a recombinant of prokaryotic expression vector pET-GR was constructed successfully, and ICE GR protein in inclusion body can express effectively after the expression vector pET-GR was transformed to *E. coli* BL21. The SDS-PAGE results indicated that the molecular weight (52.2kDa) of the target protein was similar to the theoretic molecular weight. The optimal expression condition was set as 1.0mmol/L IPTG, induced temperature 28°C, and induced time 3 hours. These results are expected to lay a foundation for further studies on the properties and function of this gene.

**Key words** Antarctic *Chlamydomonas* sp. ICE-L, Glutathione reductase (GR), Prokaryotic expression, Induced condition, Ice algae