

曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)sigma-型谷胱甘肽硫转移酶基因的克隆及重组表达*

余作奔 王春琳 母昌考 宋微微 李荣华

(宁波大学海洋学院 宁波 315211)

摘要 采用 EST 结合 RACE 技术进行了曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)sigma-型 GST(SmGST) 基因的克隆。结果表明, 该基因的 cDNA 全长为 838bp, 其中 5'非编码区为 73bp, 3'非编码区为 150bp, 开放阅读框为 615bp, 编码的蛋白含有 204 个氨基酸。该基因的氨基酸序列中包含 1 个典型的 GST-N 结构域和一个 GST-C 结构域, 与栉孔扇贝和长牡蛎的 sigma-型 GST 的相似度分别为 40.3%和 39.3%。将该基因的编码区重组到 pET-21(a+)载体后在大肠杆菌中得到诱导表达。重组 SmGST 的 GST 活力为(12.22± 0.92)U/mg 蛋白。

关键词 曼氏无针乌贼; 谷胱甘肽硫转移酶; 分子克隆; 重组表达

中图分类号 Q786, Q789

曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)隶属于软体动物门、头足纲, 在 20 世纪 70 年代以前是我国海洋捕捞的主要对象之一, 但由于过度捕捞及生态环境的变化, 资源处于枯竭的边缘(叶素兰等, 2008)。2004 年, 宁波大学蒋霞敏教授和王春琳教授承担的曼氏无针乌贼人工繁殖和养殖试验的研究课题取得成功(全真, 2004; 宁成, 2005); 宋微微等(2009)研究了养殖对曼氏无针乌贼群体遗传多样性的影响。在分子生物学研究方面, 曼氏无针乌贼的研究还刚处于起步阶段, 仅见蒋霞敏等(2011)构建了其肌肉 cDNA 文库, 周超等(2012)报道了曼氏无针乌贼 ALSM 基因的克隆。

谷胱甘肽硫转移酶(GST)是广泛存在动植物及微生物中的一个主要的解毒酶家族, 能催化还原型谷胱甘肽(GSH)和亲电子类化合物结合(Hayes *et al.*, 1995; Sheehan *et al.*, 2001)。哺乳动物中目前报道的 GST 主要分为 alpha-型、pi-型、mu-型、theta-型、kappa-型、zeta-型和 omega-型几种不同类型(Mannervik *et al.*,

1992; Pemble *et al.*, 1996; Board *et al.*, 1997;), 软体动物中, Delta-型(Zhao *et al.*, 2010)、omega-型(Wan *et al.*, 2009)、pi-型(Hu *et al.*, 2012)、theta-型(Rhee *et al.*, 2007)、sigma-型(Ren *et al.*, 2009)和 mu-型 GST(Rhee *et al.*, 2008)都有报道。本研究以实验室前期构建的曼氏无针乌贼全组织 cDNA 文库中筛选出的 EST 序列为基础, 通过 RACE 技术获得了曼氏无针乌贼谷胱甘肽硫转移酶基因的全长序列。采用体外重组表达技术获得了谷胱甘肽硫转移酶基因的重组表达产物, 检测了重组蛋白的活性, 以期为曼氏无针乌贼功能基因开发及抗氧化系统研究提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 曼氏无针乌贼组织 RNA 的提取及 cDNA 合成
实验用曼氏无针乌贼购自福建霞浦, 体重为 15—20g。曼氏无针乌贼活体取样获取肌肉、肝脏、性腺、眼睛等组织, 经过液氮研磨后加入 Trizol (Invitrogen

* 国家自然科学基金项目资助, 41176124 号, 41206114 号; 教育部博士点基金资助, 20103305110003 号; 浙江省自然科学基金重点项目资助, Z3110482 号; 浙江省自然科学基金项目资助, LQ12C19002 号。余作奔, E-mail: 397172407@qq.com

通讯作者: 母昌考, 副教授, E-mail: muchangkao@nbu.edu.cn

收稿日期: 2012-04-27, 收修改稿日期: 2012-06-25

公司), 按照试剂盒操作说明进行总 RNA 提取。cDNA 合成在 20 μ l 反应体系中进行, 其中包含: 1 μ g RNA(经 DNAase 处理), 50mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 75mmol/L KCl, 3mmol/L MgCl₂, 50mmol/L DTT, 75U Rnasin, 0.2mmol/L DNTPs, 200U M-MLV 逆转录酶(Promega)。

1.2 曼氏无针乌贼 GST 基因 EST 序列分析及全长序列获得

曼氏无针乌贼全组织 cDNA 文库为实验室前期构建, 从中发现 1 条 EST 序列(长度为 437bp)与栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 的 GST(ACF25904.1)的 5' 末端相似较高(identity 为 48%), 因此, 在该 EST 的基础上设计特异性引物(5' CTTAGCGAAGGAGTGAAGACA TA 3')与 Oligo(dT)(5' GGCCACGCGTCTGACTAGTAC T17 3')进行 3' 末端扩增。新获得的序列与该 EST 序列通过 Vector NTI Suite 8 软件进行拼接得到全长序列。

1.3 序列分析

采用 BLASTP(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)软件将翻译得到的氨基酸序列于 NCBI 上, 寻找同源蛋白序列, 所得的同源蛋白序列用 CLUSTAL W 程序进行处理, 然后运用 MEGA4.1 软件包(Kumar *et al*, 2008)的 Neighbor-joining 法进行系统树构建, Bootstrap 值为 1000。

1.4 SmGST 重组表达载体构建

根据所得到的 SmGST 的 cDNA 编码区设计特异性引物(5' CATATGGCGAAGTATACACTTAATTATT 3', 含有 *Nde* 酶切位点)和(5' CTCGAGTTAGTGGTGGT GGTGGTGGTGAAAATCGGTGACGGGA 3', 含有 *Xho* 酶切位点和 6 \times His 纯化标签)进行 GST 体外重组表达。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳纯化后连入 pMD18-T 载体, 转化 Top10F' 感受态细胞, 通过特异性 PCR 进行阳性克隆筛选。培养经测序验证后的阳性克隆进行质粒提取并 *Nde* 和 *Xho* 双酶切, 纯化后连接到 pET21(a+) 表达载体, 转化大肠杆菌 *origami*(DE3)感受态之后, 通过测序验证。

1.5 SmGST 重组蛋白纯化、复性及活性检测

确定宿主菌所表达的蛋白中含有可诱导的目的蛋白 SmGST 后, 在 200ml LB 培养基(含 100 μ g/ml 氨苄青霉素)中接入 5ml 含有重组质粒的宿主菌 *origami* (DE3), 200r/min, 37 $^{\circ}$ C 培养至 *OD*₆₀₀ 达到 0.5—0.7 时, 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导培养 4h, 然后 8000r/min 离心 2min 收集菌体。菌体加入 20ml 缓冲液 1 (50mmol/L pH 7.4 的 PBS, 含 8mol/L 尿素), 混匀, 冰浴条件下超声破碎(150W, 工作 5s 停 5s)至液体变澄清; 然后, 4 $^{\circ}$ C, 10000g 离心 30min, 收集上清。上清

经过镍琼脂糖凝胶柱亲和纯化。

纯化后的重组蛋白, 依次在含有 6、4、2、1 和 0mol/L 尿素的 50mmol/L PBS (pH 7.4)中过夜透析(4 $^{\circ}$ C)。最后, 用不含尿素的 50mmol/L PBS (pH 7.4)连续透析两次。利用 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法检测透析后所获得的纯化样品的情况。用牛血清白蛋白(BSA)为标准进行标准曲线制作, 蛋白浓度的测定参考 Bradford(1976)的方法进行。在进行测定时, 以透析结束时的透析缓冲液代替待测蛋白作为对照。重组 SmGST 活性的测定采用自南京建成购买的谷胱甘肽-S 转移酶测定试剂盒, 按照试剂盒的操作说明进行。酶活力以平均值 \pm 标准差表示, 单位为 U/mg 蛋白。

2 结果

2.1 曼氏无针乌贼 GST cDNA 序列

本文采用 EST 结合 RACE 技术克隆了曼氏无针乌贼谷胱甘肽硫转移酶基因的 cDNA 全长序列(GenBank 注册号为 No.KC491175)。该基因 cDNA 全长 838bp, 其中 5' 非编码区为 73bp, 3' 非编码区为 150bp, 开放阅读框为 615bp, 编码的蛋白含有 204 个氨基酸。预测分子量为 23.15kDa, 等电点 pI 为 7.71。SMART 分析表明, 该氨基酸序列含 1 个典型的 GST-N(4—74)和 1 个 GST-C(82—190)结构域(图 1)。

```

1 GGGGGACACTGAGTTTGAAGTCGGACGAGAAAGCACTTAGCGAAGGAGTGAAGACAT
1 M A K Y T L N Y F T L K G R A E
61 ATTCATATACAATATGGCGAAGTATACACTTAATTATTTTCACGCTGAAGGGCCGAGCTGA
17 F S R I L F A A H G Q E F I D H R I E F
121 ATTTCCAGGATTCCTTTGCTGCTCATGGACAAGAATTTATCGACCATAGAATTGAGTT
37 S D W P N H K Q N M H S K A L P V L E I
181 CTCAGACTGGCCAAACCCATAAACAAAATATGCATAGTAAAGCTCTCCAGTTTTGGAAT
57 D G K I F I S Q S V A I A R Y L A H E F
241 TGATGGAAAATCTTCATATCCAGAGCGTGGCAATCGCCCGCTATCTCGCTCAGCAATT
77 G L G G K T S L E T A R I D E I A E C L
301 CGGCTTGGTGGCAAGACATCACTCGAAACAGCTCGAATTGATGAAATGCGCAATGTTT
97 Q D I F N D K V K I K F A Q E G A K E A
361 GCAAGATATCTTTAACGACAAGGTGAAAATTAATTCGCCAAGAAGGTGCAAAAAGAAGC
117 A E K N Y E K T C N R L L P F L E E I L
421 TGCAGAAAAGAATTACGAGAAAACATGCAACAGACTTTTGCATTCTGGAAGAGATTTT
137 S S N K G G D G Y F V G D S M T M A D L
481 AAGCAGCAACAAGGTGGCGACGGTACTTTGTTGGGACTCGATGACTATGGCCGATTT
157 H C F V G L E S P L K L N S D L L K P Y
541 ACATTGCTTTGTTGGACTTGAGAGTCCCCTGAAGCTTAATCTGACCTCTTGAAGCCTTA
177 P K L T A L R K R V A E S P K I A E Y L
601 CCCAAAATTAACAGCACTACGCAAAAGAGTTGCAGAATCACTAAAATGCTGAATATCT
197 K K R P V T D F *
661 AAAGAAACGTCCCGTCCCGTACCGATTTTTAGACGGTAAATACTTCTCATCCAACAGACGACCA
721 AGAAATCGTCTGCATCGTTTTATATCCATGGGTATCGCTCATACCTGAGGCTGTACGGC
781 TTGAAAATAAATTTGAAGTCTATGTGCGCTTACATAGAATTTCTTAAAAA

```

图 1 SmGST 基因 cDNA 核苷酸序列及其所编码的氨基酸
Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of SmGST

注: *为终止密码, 灰色为 GST-N 结构域, 下划线部分为 GST-C 结构域

2.2 曼氏无针乌贼 GST 基因的同源性分析结果

BLAST 分析发现, 曼氏无针乌贼 SmGST 基因与其它动物 sigma 型 GST 基因的同源性较高, 与栉孔扇贝 *Chlamys farreri* (ADF32019) 和长牡蛎 *Crassostrea gigas* (EKC38075) 的相似度分别为 40.3% 和 39.3%。

2.3 GST 系统树构建及多序列比对结果

使用 Mega4.1 软件用 Neighbor-joining 方法对不同物种来源的不同类型 GST 序列进行了系统树的构建, Bootstrap 值为 1000(图 2)。从图 2 中可以看出, 不同类型 GST 各自聚类成一个分支, SmGST 首先与 sigma-型 GST 聚类, 然后再与其它类型 GST 聚类, 表明 SmGST 应该属于 sigma-型。与其它物种的 sigma-型 GST 进行了多序列比对(图 3), 结果发现, SmGST 与其它物种的 GST-N 和 GST-C 结构域是保守的。

2.4 GST 原核重组表达及活性测定

将 SmGST 的编码区重组到 pET21(a+) 中, 通过 IPTG 诱导表达, 利用凝胶柱纯化得到带有 6×His 标签的成熟 SmGST 蛋白(预测分子量为 23.98kDa), 蛋白 SDS-PAGE 结果如图 4 所示。从图 4 中可以看出, 所获得的纯化蛋白的分子量为 24kDa 左右, 与预测结果相符。经 GST 测定试剂盒测定, 重组 SmGST 的 GST 活力为 $(12.22 \pm 0.92)U/mg$ 蛋白。

3 讨论

谷胱甘肽硫转移酶的在细胞解毒和抗氧化防御中起着非常重要的作用(Lee *et al.*, 2007)。现有报道表明, GSTs 是一个多基因家族解毒酶, 能通过亲电中心结合催化还原型谷胱甘肽与有毒物质(比如致癌化合物)的结合而实现解毒(Hayes *et al.*, 2000)。宿主免疫系统对外源物清除

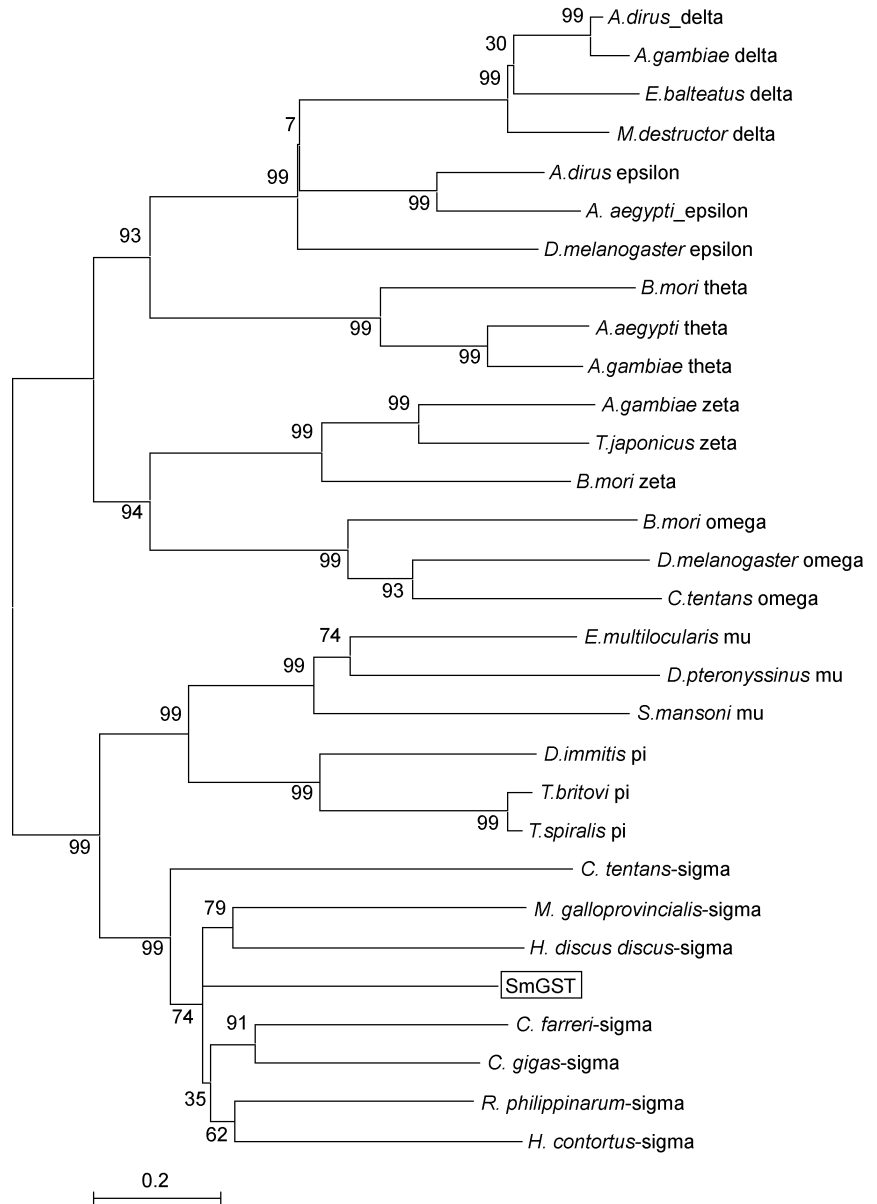


图 2 不同类型 GST 的系统树

Fig.2 Phylogenetic tree Constructed on the basis of GST from different species
注: 用于构建系统树的序列为: AAG38505 (*Anopheles dirus_delta* GST), CAB03592 (*Anopheles gambiae_delta* GST), ABG56084 (*Mayetiola destructor_delta* GST), CAH58743 (*Episyrphus balteatus_delta* GST), ABD43203 (*Anopheles dirus_epsilon* GST), NP_611323 (*Drosophila melanogaster_epsilon* GST), AAV68398 (*Aedes aegypti_epsilon* GST), AAM61889 (*Anopheles gambiae_zeta* GST), BAH24013 (*Bombyx mori_zeta* GST), ACE81250 (*Tigriopus japonicus_zeta* GST), AAV68399 (*Aedes aegypti_theta* GST), NP_001108463 (*Bombyx mori_theta* GST), AAM61893 (*Anopheles gambiae_theta* GST), CAA59739 (*Echinococcus multilocularis_mu* GST), AAX37326 (*Dermatophagoides pteronyssinus_mu* GST), XP_002578870 (*Schistosoma mansoni_mu* GST), NP_001108461 (*Bombyx mori_omega* GST), ACZ02426 (*Drosophila melanogaster_omega* GST), ACR43779 (*Chironomus tentans_omega* GST), ABA42916 (*Trichinella britovi_pi* GST), ABA42914 (*Trichinella spiralis_pi* GST), AAA21585 (*Dirofilaria immitis_pi* GST), EKC38075 (*Crassostrea gigas-sigma* GST), ADF32019 (*Chlamys farreri-sigma* GST), AFQ35983 (*Mytilus galloprovincialis-sigma* GST), ACP27597 (*Chironomus tentans-sigma* GST), AAF81283 (*Haemonchus contortus-sigma* GST), AEW46325 (*Ruditapes philippinarum-sigma* GST), ABO26604 (*Haliotis discus discus-sigma* GST)

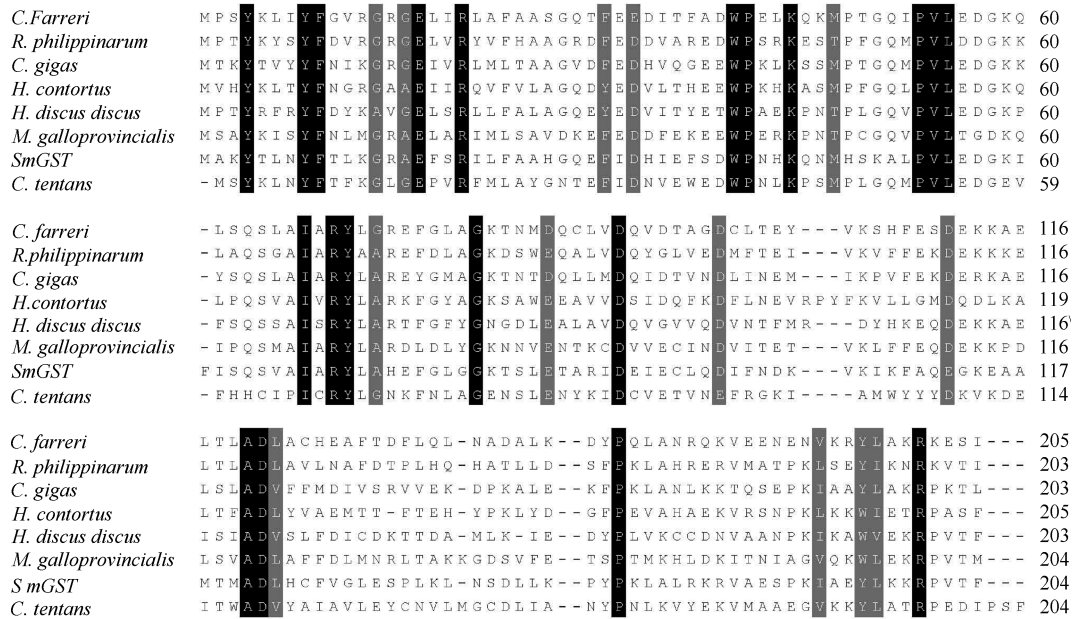


图 3 不同物种的 sigma-型 GST 多序列比对结果

Fig.3 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of the sigma-class GST from different species

注: 多序列比对所用的序列分别是: EKC38075 (*Crassostrea gigas*), ADF32019 (*Chlamys farreri*), AFQ35983 (*Mytilus galloprovincialis*), ACP27597 (*Chironomus tentans*), AAF81283 (*Haemonchus contortus*), AEW46325 (*Ruditapes philippinarum*), ABO26604 (*Haliotis discus discus*)

的过程会产生氧自由基 (Callahan *et al*, 1988), 对细胞膜有害的脂质过氧化物会随自由基反应而产生, 从细胞膜释放的脂质过氧化物分解产生有毒的活性羰基化合物。GST 有助于对脂质过氧化物及其活性羰基化合物进行解毒。

本研究获得了曼氏无针乌贼 sigma-型 GST 基因的 cDNA 序列, 推测的氨基酸序列包含 1 个典型的 GST-N 结构域和 1 个 GST-C 结构域, 同时与其它物种的 sigma-型 GST 相比, 具有较高的相似度及聚类分析结果表明 SmGST 属于 sigma-型的一个成员。本研究利用原核重组表达方法获得了重组 SmGST 蛋白, 其 GST 活力为(12.22±0.92)U/mg 蛋白。已有的研究表明, GST 活力能反映机体抗氧化能力的高低。Salvatore 等(1995)

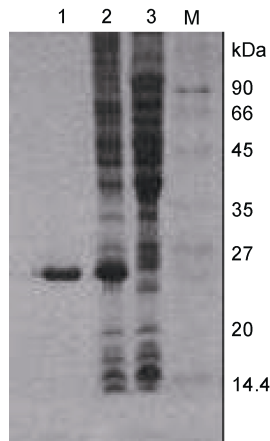


图 4 重组 SmGST 蛋白 SDS-PAGE 电泳结果
Fig.4 The SDS-PAGE result of recombinant SmGST
M: 标准分子质量 Marker; 3: 未加 IPTG 的大肠杆菌培养物(对照); 2: 添加 IPTG 诱导但未纯化的培养物; 1: 纯化后的 SmGST 重组蛋白

研究发现, 重组 GST 与天然的 GST 蛋白一样, 处于非变性状态, 具有正常的活性。另外, Lee 等(2007)也通过原核表达的方法获得了重组 GST 蛋白, 其活性为天然 GST 的 44.97%。因此, 本研究测定的重组 SmGST 蛋白的活力也可能只是其活性的部分, 但本研究为曼氏无针乌贼 sigma-型 GST 功能的进一步研究奠定了基础。

参 考 文 献

叶素兰, 吴常文, 余治平, 2008. 曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)精子形成的超微结构. 海洋与湖沼, 39: 269—275

宁 成, 2005. 宁波大学生命科学与生物工程学院专家研究曼氏无针乌贼人工繁殖. 现代渔业信息, 20: 36

全 真, 2004. 人工繁殖曼氏无针乌贼技术通过验收. 食品信息与技术, 12: 63

宋微微, 王春琳, 2009. 养殖对曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)群体遗传多样性的影响. 海洋与湖沼, 40: 590—595

周 超, 郭宝英, 刘慧慧等, 2012. 曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)ALSM 基因的克隆及序列分析. 海洋与湖沼, 43(4): 538—542

蒋霞敏, 王 佳, 薛良义等, 2011. 曼氏无针乌贼肌肉 cDNA 文库的构建和表达序列标签分析. 台湾海峡, 30: 357—362

Board P G, Baker R T, Chelvanayagam G *et al*, 1997. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem J*, 328(Pt 3): 929—935

- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248—254
- Callahan H L, Crouch R K, James E R, 1988. Helminth antioxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitol Today*, 4: 218—225
- Hayes J D, Pulford D J, 1995. 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*, 30: 445—600
- Hayes J D, Strange R C, 2000. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, 61: 154—166
- Hu B, Deng L, Wen C *et al*, 2012. Cloning, identification and functional characterization of a pi-class glutathione-S-transferase from the freshwater mussel *Cristaria plicata*. *Fish Shellfish Immunol*, 32: 51—60
- Kumar S, Nei M, Dudley J *et al*, 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*, 9: 299—306
- Lee Y M, Lee K W, Park H *et al*, 2007. Sequence, biochemical characteristics and expression of a novel Sigma-class of glutathione S-transferase from the intertidal copepod, *Tigriopus japonicus* with a possible role in antioxidant defense. *Chemosphere*, 69: 893—902
- Mannervik B, Awasthi Y C, Board P G *et al*, 1992. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J*, 282(Pt 1): 305—306
- Pemble S E, Wardle A F, Taylor J B, 1996. Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem J*, 319(Pt 3): 749—754
- Ren H L, Xu D D, Gopalakrishnan S *et al*, 2009. Gene cloning of a sigma class glutathione S-transferase from abalone (*Haliotis diversicolor*) and expression analysis upon bacterial challenge. *Dev Comp Immunol*, 33: 980—990
- Rhee J S, Lee Y M, Hwang D S *et al*, 2007. Molecular cloning, expression, biochemical characteristics, and biomarker potential of theta class glutathione S-transferase (GST-T) from the polychaete *Neanthes succinea*. *Aquat Toxicol*, 83: 104—115
- Rhee J S, Raisuddin S, Hwang D S *et al*, 2008. A Mu-class glutathione S-transferase (GSTM) from the rock shell *Thais clavigera*. *Comp Biochem Phys C*, 148: 195—203
- Salvatore L, Wijffels G, Sexton J L *et al*, 1995. Biochemical analysis of recombinant glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasit*, 69: 281—288
- Sheehan D, Meade G, Foley V M *et al*, 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J*, 360: 1—16
- Wan Q, Whang I, Lee J S *et al*, 2009. Novel omega glutathione S-transferases in disk abalone: characterization and protective roles against environmental stress. *Comp Biochem Phys C*, 150: 558—568
- Zhao D, Chen L, Qin C *et al*, 2010. A delta-class glutathione transferase from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: cDNA cloning, characterization and mRNA expression. *Fish Shellfish Immunol*, 29: 698—703

MOLECULAR CLONING AND RECOMBINANT EXPRESSION OF A SIGMA-LIKE GLUTATHIONE S-TRANSFERASE FROM *SEPIELLA MAINDRONI*

YU Zuo-Ben, WANG Chun-Lin, MU Chang-Kao, SONG Wei-Wei, LI Rong-Hua
(School of Marine Science of Ningbo University, Ningbo, 315211)

Abstract The sigma-like glutathione S-transferase in *Sepiella maindroni* was cloned by EST and RACE method. The full sequence was of 838bp, containing an open reading frame (ORF) of 615bp, that encoded 204 amino acid residues and a 3' untranslated region of 150bp and a 5' UTR of 73bp. The deduced amino acid sequence of this gene showed 39.3%—40.3% identity to the sequences of the sigma-class GSTs from *Chlamys farreri* and *Crassostrea gigas*. This gene was expressed in *Escherichia coli* with the pET-21(a+) vector. The GST activity of the recombinant SmGST was (12.22±0.92)U/mg protein.

Key words *Sepiella maindroni*; glutathione S-transferase; molecular cloning; recombinant expression