

医学生化

睾酮假单胞菌 3α -羟类固醇脱氢酶基因的
质粒载体构建及表达张国华¹⁾ 徐国宾^{1)*} 刘英民²⁾ 夏铁安¹⁾(¹⁾北京大学第一医院检验科, 北京 100034; ²⁾青岛市环保局崂山分局, 青岛 266101)

摘要 从土壤中分离睾酮假单胞菌, 提取其基因组 DNA, PCR 扩增 3α -羟类固醇脱氢酶 (3α -hsd) 基因, 将扩增产物用 *Nde* I / *Bam* H I 消化, 切下目的基因片段克隆到质粒 pET-15b 中构建重组 pET-15b. 将重组 pET-15b 转化入 *E. coli* DH5 α 中, 经酶谱分析和测序, 鉴定出正确的重组质粒 pET-15b. 将重组 pET-15b 转化入宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 中, 用硫代半乳糖苷 (IPTG) 进行诱导表达. 提取细菌总蛋白质进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分析并测定酶活性. 粗提物中酶活性高达 2.45×10^5 U/L. 利用重组蛋白中的 6 个组氨酸 (His) 组成的“标签”进行亲和层析, 经一步金属螯合亲和层析纯化后, 重组蛋白在 SDS-PAGE 上呈现出均一的单一条带, 回收率达 68%. 活性和纯度均较高的目的蛋白 3α -HSD 的获得, 为血清总胆汁酸酶循环法测定奠定了基础.

关键词 睾酮假单胞菌, 3α -羟类固醇脱氢酶, 重组质粒, 基因表达, 胆汁酸

学科分类号 R446.1

3α -羟类固醇脱氢酶 (3α -hydroxysteroid dehydrogenase, 3α -HSD, E. C. 1.1.1.50) 是睾酮假单胞菌分泌的多种类固醇脱氢酶的一种, 可作用于多种类固醇基质, 可逆地催化 $C_{19\sim 27}$ 类固醇 3 位羟基/酮基的氧化还原^[1]. 胆汁酸是 3α -HSD 的作用底物之一, 临床上用 3α -HSD 作为工具酶来测定人血清中的总胆汁酸 (total bile acids, TBA) 浓度. 目前, TBA 测定中所用的工具酶 3α -HSD 均从睾酮假单胞菌中直接提取而来. 天然 3α -HSD 提取工艺复杂, 为了和其他蛋白质分离, 需经过多步层析和制备性等电聚焦电泳技术来纯化^[2], 步骤繁琐, 纯化过程中伴有酶活性的丢失, 酶蛋白的得率低, 并且 3α -HSD 与 β -HSD 也难以分离, 这使得直接从细菌中分离的天然 3α -HSD 价格昂贵, 在一定程度上限制了 TBA 测定的临床推广. 本研究以 pET15b 质粒为载体建立了 3α -HSD 的原核表达系统, 并成功地表达了融合蛋白. 利用 pET15b 质粒编码重组蛋白 N 端的 His 标签经 Ni-Sepharose 柱进行亲和层析, 所得样品中 3α -HSD 的纯度较高, 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 上呈现单一的条带, 回收率达 68%. 这为血清 TBA 酶循环法测定奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和试剂

睾酮假单胞菌由本室从土壤中分离获得;

E. coli DH5 α 由北京大学第一医院卜定方教授提供; 质粒 pET-15b 由首都儿科研究所伏谨老师惠赠; PCR 引物由北京奥科公司合成; Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、*E. coli* BL21 (DE3) pLysS 由 Promega 公司生产; 硫代半乳糖苷 (IPTG)、核酸及蛋白质质量标准购自华美生物工程公司.

1.2 PCR 引物

3α -hsd 基因是定向克隆到质粒 pET-15b 的多克隆位点 *Nde* I / *Bam* H I 之间, 因此根据 3α -hsd 基因的序列, 将引物设计为: 上游序列 5'-GAGACAACATATGTCATCATCGTGATA; 下游序列 *Nde* I 切点

5'-GCCGGATCCGAGGTCAGAACTGTGTCCG. 上游 *Bam* H I 切点

游序列中含有起始密码 ATG 和 *Nde* I 酶切位点, 下游序列中含有终止密码 TGA 和 *Bam* H I 酶切位点.

1.3 目的基因的获得

培养睾酮假单胞菌后提取其基因组 DNA (Bio-Rad 试剂盒), PCR 扩增目的基因 3α -hsd. 反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s $\rightarrow$ 60℃ 30 s $\rightarrow$ 72℃ 45 s, 30 个循环, 72℃ 再延伸 5 min. 扩增

* 通讯联系人.

Tel: 010-66171122-2042, E-mail: bdyjyk@mail.bjmu.edu.cn

收稿日期: 2002-07-02, 接受日期: 2002-09-10

产物为 800 bp (包括酶切位点和保护碱基) 的片段。

1.4 重组质粒 pET15b 的构建和鉴定

将纯化浓缩后的 PCR 扩增产物和质粒 pET15b 同时用 *Nde* I / *Bam* H I 双酶切, 1% 琼脂糖电泳分离, 切下正确的条带后用玻璃奶纯化, 在 T4DNA 连接酶的作用下于 16℃ 连接过夜, 转化入感受态 *E. coli* DH5α 中, 37℃ 培养过夜。从含有氨苄青霉素 (50 mg/L) 的 LB 平板上随机挑取菌落少量培养, 提取重组质粒 pET15b, 用限制性内切酶 *Nde* I / *Bam* H I、*Pst* I、*Nco* I 酶切分析, 酶切分析正确的克隆进一步用 ABI 377 自动测序仪测序加以证实。

1.5 重组蛋白的诱导表达

将序列正确的重组 pET15b 转化入感受态 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 中。从 37℃ 培养过夜的 LB 平板上挑取菌落, 转种于含有氨苄青霉素 (50 mg/L) 和氯霉素 (34 mg/L) 的 LB 培养基中。细菌生长至 $A_{600} = 0.6$ 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 诱导重组蛋白 3α-HSD 的表达。于诱导后不同时间, 取出 1 ml 培养物, 10 000 g 离心 3 min 收集细菌。超声 (3×10 s) 破碎细菌后, 16 000 g 离心 5 min, 除去沉淀。融合蛋白 3α-HSD 存在于上清液中。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和测定上清中的酶活性, 确定表达峰时。

1.6 重组蛋白 3α-HSD 的纯化

pET15b 作为载体所表达的重组蛋白在其 N 端有一 6 个 His 组成的“标签”, 可用 Ni^{2+} -Sepharose 柱进行亲和层析 (Amersham Pharmacia AKTA 蛋白纯化系统)。用含 0 ~ 0.5 mol/L 咪唑的 50 mmol/L、pH 7.4 磷酸盐缓冲液进行梯度洗脱, 将含有纯化的重组 3α-HSD 部分收集后脱盐, 进行 SDS-PAGE。测定洗脱液中的酶活性和蛋白质含量, 计算回收率。

1.7 重组 3α-HSD 的活性测定

参考文献 [1] 的方法。反应温度为 25℃, 总反应体积为 0.5 ml, 反应体系中含有: 100 mmol/L 焦磷酸钠缓冲液 (pH 11.0), 0.5 mmol/L NAD^+ , 0.2 mmol/L 雄酮, 0.5 g/L BSA。加入酶液 (1 ~ 5 μl) 启动反应, 用 1 cm 比色杯进行比色, 读取 340 nm 处的吸光度变化, 按公式计算出酶的活性。

$$\begin{aligned} \text{酶活力浓度} / \text{U} \cdot \text{L}^{-1} &= \Delta A \times 1 / \epsilon \times 10^6 \\ &\quad \times V_{\text{total}} / V_{\text{sample}} \times 1 / L \\ &= \Delta A \times 8.04 \times 10^4 \end{aligned}$$

ΔA 为每分钟的吸光度变化。

1.8 蛋白质浓度测定

采用微量双缩脲法^[3]。

2 结 果

2.1 PCR 扩增目的基因 3α-hsd

PCR 扩增后, 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳, 得到了约 800 bp 的特异条带 (图 1)。

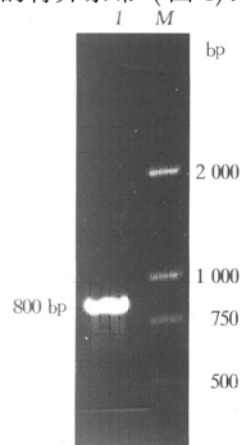


Fig. 1 Identification of PCR product

I: PCR product; M: DNA molecular mass marker.

2.2 重组 pET15b 的构建和鉴定

2.2.1 重组 pET15b 的构建: 用 *Nde* I / *Bam* H I 从 PCR 扩增产物上将 3α-hsd 基因片段切下, 与用 *Nde* I / *Bam* H I 双酶切的 pET15b 连接, 构建重组质粒 pET15b。

2.2.2 酶切图谱分析鉴定: 用限制性内切酶 *Nde* I / *Bam* H I、*Pst* I、*Nco* I 酶切重组 pET15b, 5% PAGE 后应显示如下带型。 *Nde* I / *Bam* H I: 774 bp + 5.7 kb; *Pst* I: 1 254 bp + 5.2 kb; *Nco* I: 693 bp + 5.78 kb (图 2)。pET15b 本身大小为 5.708 kb, 酶切结果说明 3α-hsd 基因已与 pET15b 重组, 经对照分析, 确定筛选出的重组 pET15b 为正向重组子。

2.2.3 酶切分析正确的重组 pET15b 进一步用自动测序仪测序, 证实插入片段是正确的。

2.3 重组蛋白在 *E. coli* 中的诱导表达

含有重组 pET15b 及仅含有 pET15b (作为对照) 的菌株 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 分别经 IPTG 诱导生长 1 ~ 7 h 后, 全菌蛋白提取物经 12% SDS-PAGE 显示如图 3, 说明 26.4 ku 的目的蛋白在 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 中得到了诱导表达。测定诱导不同时间后粗提物中的蛋白质浓度和酶活性 (图 4), 结合 SDS-PAGE 结果 (图 3), 说

明诱导 5 h 后目的蛋白表达活性最高, 酶活性高达 2.45×10^5 U/L.

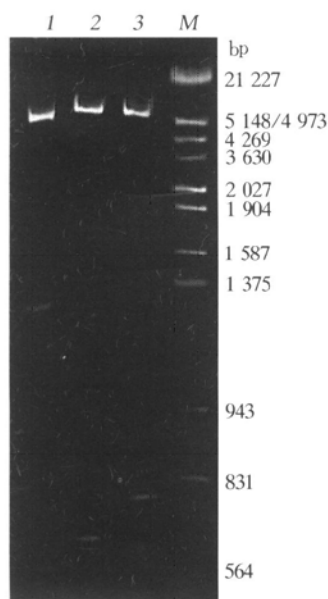


Fig. 2 Restrict analysis of recombinant pET15b

1: recombinant plasmids digested by *Pst* I (1 254 bp+ 5.2 kb); 2: recombinant plasmids digested by *Nco* I (693 bp+ 5.78 kb); 3: recombinant plasmids digested by *Nde* I / *Bam* H I (774 bp+ 5.7 kb); M: λ DNA/ (*Hind* III+ *Eco* R I) marker.

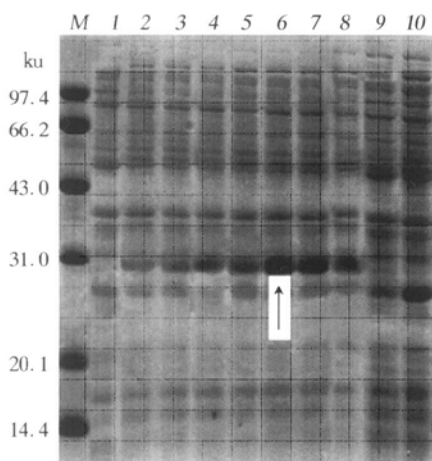


Fig. 3 Overexpression of 3 α -HSD in the host bacteria of *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

M: protein molecular mass marker; 1: total cell lysate supernatant of the host bacteria containing recombinant plasmids pET-15b without IPTG induction; 2~8: total cell lysate supernatant of the host bacteria containing recombinant plasmids pET-15b with 1~7 h of IPTG induction (the arrowhead pointed the target protein); 9: total cell lysate supernatant of the host bacteria containing plasmids pET-15b without IPTG induction; 10: total cell lysate supernatant of the host bacteria containing plasmids pET-15b with IPTG induction.

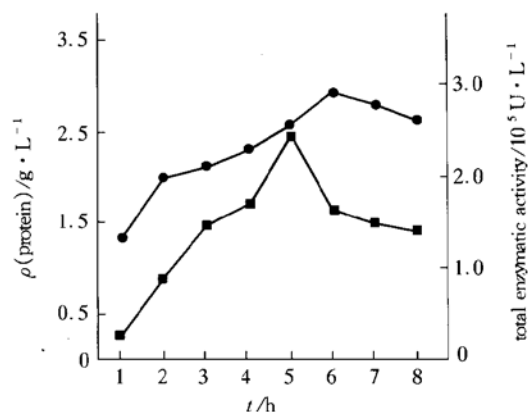


Fig. 4 The protein concentration and total enzymatic activity of the crude extracts after different time of induction

●—●: ρ (protein) / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; ■—■: total enzymatic activity / $10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.4 重组蛋白的纯化

在 Amersham Pharmacia AKTA 蛋白纯化系统上用 Ni^{2+} -Sephrose 柱对粗提物进行亲和层析后, 将含有纯化的重组 3 α -HSD 部分收集后脱盐, 进行 SDS-PAGE (图 5). 测定洗脱液中的酶活性和蛋白质含量, 洗脱液中的酶活性为 1.66×10^5 U/L, 回收率达 68%.

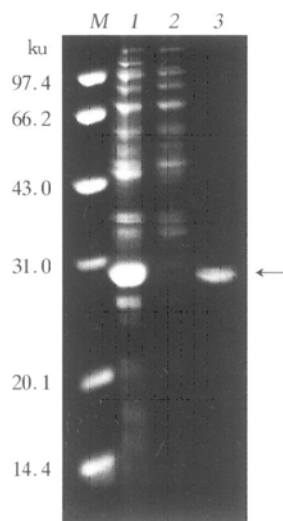


Fig. 5 Overexpression and purification of the fusion protein 3 α -HSD

M: protein molecular mass marker; 1: total cell lysate supernatant of the host bacteria containing recombinant plasmids pET-15b with 5 h of IPTG induction; 2: sample load flowthrough; 3: 3 α -HSD with His tag eluted from Ni^{2+} -Sephrose column (the arrowhead pointed the target protein).

3 讨 论

本研究中, PCR 扩增目的基因时使用的是

TaqDNA 聚合酶, 由于其缺乏 3' → 5' 外切酶活性, 扩增反应中有万分之一左右的错掺率. 经过在 GenBank 中进行序列比较发现, PCR 扩增产物与 Mobus 等^[4]报道的序列除第 45 位碱基不同外, 其余序列相同, 但发生突变的密码子仍编码甘氨酸, 因此, 表达的重组蛋白应该与天然 3 α -HSD 的氨基酸序列相同. 实验中, 含有目的基因 3 α -hsd 的重组 pET15b 在宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 中经 IPTG 诱导后表达一分子质量约 29 ku 的融合蛋白, 与理论计算值相似. 并且, 融合蛋白也表现出天然 3 α -HSD 的酶活性, 可催化雄酮 (3 α -羟类固醇) 脱氢. 因此, 表达的重组蛋白经纯化后可作为血清总胆汁酸 (TBA) 测定的工具酶, 为血清 TBA 酶循环法测定的建立奠定了基础.

参 考 文 献

- 1 Boyer J, Baron D N, Talaly P. Purification and properties of a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. *Biochemistry*, 1965, **4** (19): 1825~ 1833
- 2 Skalhogg B A. On the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni* purification and properties. *Eur J Biochem*, 1974, **46** (1): 117~ 125
- 3 Xu G B, Jiao L L, Zhu L H, *et al.* Application of an improved biuret method to the determination of total protein in urine and cerebrospinal fluid without concentration step by use of Hitachi 7170 Auto Analyzer. *J Clin Lab Analysis*, 2001, **15** (4): 161~ 164
- 4 Mobus E, Maser E. Molecular cloning, overexpression, and characterization of steroid inducible 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase: carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*, a novel member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *J Biol Chem*, 1998, **273** (47): 30888~ 30896

Construction and Overexpression of The Plasmid Vector of 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase From *Comamonas testosteroni*

ZHANG Guo-Hua¹⁾, XU Guo-Bin^{1)*}, LIU Ying-Min²⁾, XIA Tie-An¹⁾

¹⁾ Department of Laboratory Medical Science, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China;

²⁾ Environment Protection Agency, Qingdao 266101, China)

Abstract The 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase gene (3 α -hsd) from *Comamonas testosteroni* was amplified by PCR from the genomic DNA of *Comamonas testosteroni*. It was cut out from PCR product by the digestion of the restriction enzymes *Nde* I / *Bam* H I and was cloned to plasmid pET-15b again. The recombinant plasmids pET-15b with proper orientation were identified by the analysis of restriction enzymes and DNA sequencing. Then the host bacteria containing recombinant plasmids pET-15b with proper orientation grew with IPTG induction. The total cell lysate of the host bacteria was extracted for SDS-PAGE and the determination of its enzymatic activity. Afterwards the recombinant protein with an N-terminal His tag sequence was purified by affinity chromatography on a Ni²⁺-Sepharose column. The recombinant plasmid pET-15b with proper orientation containing the 3 α -hsd gene was selected and the fusion protein was overexpressed in the host bacteria of *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. The enzymatic activity of the crude extracts was up to 2.45 × 10⁵ U/L. The fusion protein could be purified in one step using metal chelate chromatography to homogeneity as judged by SDS-PAGE. And the recovery rate was about 68%. The above work has laid a necessary foundation for the construction of an enzymatic cycling method to determine the serum total bile acids.

Key words *Comamonas testosteroni*, 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase, recombinant plasmids, gene expression, bile acids

* Corresponding author. Tel: 86-10-66171122-2042, E-mail: bdyjyk@mail.bjmu.edu.cn

Received: July 2, 2002 Accepted: September 10, 2002