

睾丸酮丛毛单胞菌 ATCC 11996 类固醇脱氢酶 3 α -HSD 的高效表达与纯化

肖琳^{1,2} 薛强^{2*} 邹明强² 冯叙桥¹ 韦娜^{1,2} 何田田² 孙芳芳²

(1. 沈阳农业大学 食品学院, 沈阳 110161; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100123)

摘要 利用分子克隆的方法扩增与克隆睾丸酮丛毛单胞菌 ATCC 11996 的 3 α -HSD 基因, 构建以 pET-15b 为载体的表达工程菌, IPTG 诱导蛋白表达, 通过优化表达菌的最佳表达条件得到最大表达量的目的蛋白。诱导后将工程菌裂解, 通过硫酸铵沉淀, Ni-NTA 亲和层析, 分子筛分离进行纯化, 并测定纯化后蛋白的酶活性。结果表明: 1) 克隆获得了睾丸酮丛毛单胞菌 3 α -HSD 基因并实现了异源表达; 2) 工程菌的最佳表达条件为: 37 °C 培养, 0.6 mmol/L IPTG 诱导 4 h, 培养基中 Zn²⁺ 终浓度为 0.1 mmol/L; 3) 表达工程菌裂解后用 60% 硫酸铵沉淀, 亲和层析和分子筛分离后得到了纯度高达 99% 的目的蛋白, 纯化后的蛋白保持酶活性。本试验成功克隆表达了睾丸酮丛毛单胞菌 3 α -HSD 基因, 建立了 3 α -HSD 的高效表达与纯化方法, 为相应抗体的制备与水资源中的类固醇激素检测方法的建立提供基础。

关键词 睾丸酮丛毛单胞菌; 3 α -HSD; 诱导表达; 纯化

中图分类号 R 446.1

文章编号 1007-4333(2013)01-0142-05

文献标志码 A

Effective expression and purification of 3 α -HSD protein from *Comamonas testosteroni*

XIAO Lin^{1,2}, XUE Qiang^{2*}, ZOU Ming-qiang², FENG Xu-qiao¹,
WEI Na^{1,2}, HE Tian-tian², SUN Fang-fang²

(1. College of Food, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China;

2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

Abstract 3 α -HSD gene was amplified and cloned into the expression vector pET-15b. The constructed plasmid was over expressed in the host bacterial of *E. coli* BL21 after IPTG induction. Expression of 3 α -HSD was optimized by bacterial culture temperature, concentration of IPTG and induction time. The engineering bacteria was lysed, and purified by ammonium sulfate precipitation, Ni-NTA affinity purification and molecular sieve separation. Enzymatic activity of expressed 3 α -HSD was detected. *Comamonas testosteroni* 3 α -HSD gene was cloned and expressed in the prokaryotic system. To reach the optimal expression, the recombinant *E. coli* need to be cultured at 37 °C and induced by 0.6 mmol/L IPTG for 4 h, while the medium containing 0.1 mmol/L Zn²⁺. The protein was purified through 60% ammonium sulfate precipitation, Ni-NTA affinity chromatography, and molecular sieve. A target protein with 99% purity was obtained which keeping enzyme activity. 3 α -HSD gene was cloned and highly expressed. It will build the foundation of antibody preparation and steroid detection in the water resource.

Key words *Comamonas testosteroni*; 3 α -HSD; inducing expression; purification

收稿日期: 2012-05-28

基金项目: 质检公益性行业科研专项(201110018)

第一作者: 肖琳, 硕士研究生, E-mail: xiaolin871018@163.com

通讯作者: 薛强, 副研究员, 博士, 主要从事检验检疫新方法开发研究, E-mail: xueq@caiq.gov.cn

大量研究表明,人类的生殖障碍、发育异常及某些癌症(如:乳腺癌、睾丸癌和卵巢癌等)与环境内分泌干扰物的分布水平密切相关^[1]。在众多的环境内分泌干扰物中,类固醇激素的干扰活性最强并且难以降解,可以长期存在环境中对人类造成危害,因而受到人们的重点关注。目前,检测水资源中类固醇激素的方法主要有高效液相色谱法、气相色谱法和荧光法等分析方法,而这些检测方法成本较高,检测时间长,不适宜大量快速检测^[2]。免疫学检测具有检测速度快、费用低、仪器易携、灵敏度高和选择性强等优点,被广泛应用于现场快速检测。研究发现 3 α -HSD 是睾丸酮丛毛单胞菌在以类固醇为唯一碳源时^[3],产生的一种羟基类固醇脱氢酶,也是降解类固醇的关键酶^[4]。当环境中类固醇激素增加时,睾丸酮丛毛单胞菌中 3 α -HSD 的量也随之增加,故可通过 3 α -HSD 表达量的改变计算类固醇激素的含量^[4-5]。本研究旨在制备高纯度的 3 α -HSD 抗原,为制备相应的抗体,进一步建立免疫学检测方法奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

睾丸酮丛毛单胞菌 (*Comamonas testosteroni* ATCC11996) 购自 ATCC(美国微生物菌株保藏中心),原核表达载体 pET-15b、大肠杆菌 BL21 均为本实验室保存, IPTG、氨苄青霉素均购自美国 Sigma 公司, Ni-NTA His · band Resin 试剂盒购自美国 Novagen 公司, Sephadex G100 购自美国 Amersham Pharmacia 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 重组质粒的构建及鉴定

根据 GenBank 中睾丸酮丛毛单胞菌 3 α -HSD 基因序列设计上下游引物,上游: 5'-GAGAATTCATGTCCATCATCGTGTA-3' (下划线为 *EcoR* I 酶切位点), 下游: 5'-ACAAGCTTTCAGAACTGTCGGG-3' (下划线为 *Hind* III 酶切位点), 引物由美国 Invitrogen 公司(北京)合成。利用 Tiangen 公司(北京)细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 提取睾丸酮丛毛单胞菌的基因组 DNA, PCR 扩增目的基因 3 α -HSD, 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 40 s, 60 °C 40 s, 72 °C 40 s,

30 个循环, 最后延伸 8 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 并用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(Tiagen 公司试剂盒)回收目的片段, 克隆到 pET-15b 载体中, 得到重组质粒 pET-15b-3 α -HSD, 将重组质粒进行测序验证(由上海英潍捷基贸易有限公司测序), 并将其转化到宿主菌大肠杆菌 BL21 中得到工程菌 BL21-pET15b-3 α -HSD。

1.2.2 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达与条件优化

1) 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达。将工程菌 BL21-pET15b-3 α -HSD 在含有氨苄青霉素终质量浓度为 50 mg/L 的 LB 固体培养基上划线, 置于 37 °C 恒温箱培养过夜。次日, 挑取单菌落于 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C 摇床培养过夜。按 1 : 50 的体积比取一定量的上述培养液进行扩大培养至 OD 值为 0.8 ~ 1.0, 然后向菌液中加入 1 mmol/L IPTG(异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷), 置于 37 °C 诱导 5 h, 以未加入 IPTG 的菌液做为对照组, 分别取 1 mL 菌液离心处理进行 SDS-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳), 利用考马斯亮兰染色法染色, 运用凝胶成像系统照相分析比较。

2) 诱导条件的优化。挑取上述经划线培养的单菌落于 5 mL LB 液体培养基 37 °C 振荡培养过夜后, 按 1 : 50 比例扩大培养。为使重组蛋白诱导表达量最大化, 通过对诱导温度(25、30、35、37 和 40 °C), IPTG 终浓度(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 和 1.4 mmol/L), 诱导时间(1、2、3、4、5、6 和 7 h)及在培养基中添加不同金属离子(0.1 mmol/L 的 Mg²⁺、K⁺、Fe²⁺ 和 Zn²⁺)将诱导条件进行优化^[6-7], 分别进行 SDS-PAGE, 利用考马斯亮兰染色法染色, 运用凝胶成像系统照相分析比较。

1.2.3 3 α -HSD 重组表达蛋白的纯化

1) 亲和层析纯化。按照上述优化后的培养条件进行大量培养后, 将菌液 10 000g 离心 10 min, 收集细菌沉淀, 用缓冲液(binding buffer)将菌体重悬, 进行超声破碎, 14 000g 离心 20 min 收集上清。先用不同浓度的饱和硫酸铵溶液初步纯化, 将所得沉淀用缓冲液(binding buffer)进行重悬, 再用 Ni-NTA 亲和层析试剂盒进行纯化, 具体操作步骤参照试剂盒说明书。

2) 分子筛分离纯化。将亲和层析纯化后的蛋白

再经过分子筛进一步分离纯化。将 20 g Sephadex G100(Amersham Pharmacia) 葡聚糖凝胶浸泡在 400 mL 0.01 mol/L Tris-HCl(pH 7.5, 含 0.2 mol/L NaCl)缓冲液中,72 h 后将凝胶和缓冲液置于真空干燥器中抽尽空气,轻轻搅匀,然后缓慢加入到层析柱(内径 1.5 cm,长为 100 cm)中自然沉降,待胶平面不再改变后将层析柱装在蛋白纯化系统上,利用系统的压力使凝胶空隙更小,直至胶平面不再下降。经过 2~3 倍柱床体积的缓冲液冲洗使柱床稳定后,将上述经过硫酸铵沉淀、亲和层析纯化后的蛋白上样,收集目的蛋白。

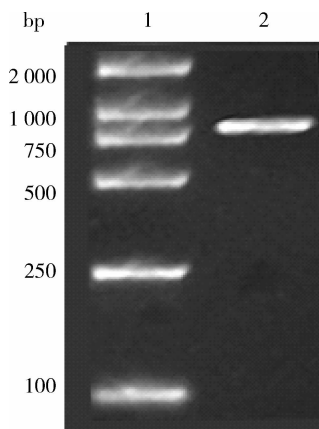
1.2.4 酶活性测定

按文献[8]测定酶活性的方法测定纯化后目的蛋白活性。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建与鉴定结果

将提取的 3α -HSD 基因组利用 PCR 进行扩增,将扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,结果如图 1 所示,得到了约 800 bp 的特异条带,与试验预期结果相符。并将重组质粒进行测序,结果显示所插入目的基因序列正确。



1. 基因 marker; 2. PCR 产物。

Lane 1. Marker; Lane 2. PCR product.

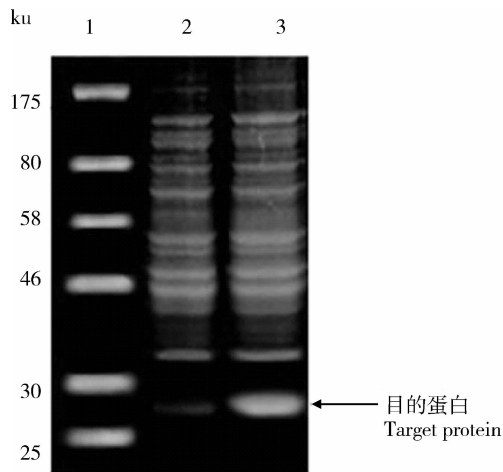
图 1 PCR 产物鉴别

Fig. 1 Identification of PCR product

2.2 重组质粒在大肠杆菌 BL21 中的诱导表达

将加入 IPTG 与未加入 IPTG 诱导培养的工程菌,经全菌蛋白提取,利用 10% SDS-PAGE 分析比较,结果如图 2 所示,加入 IPTG 诱导后,目的蛋白

的表达量明显增加。



1. 蛋白 marker; 2. 未诱导的总细菌提取物上清;
3. 5 h 诱导的细菌提取物上清。

Lane 1. Marker; Lane 2. Total cell lysate supernatant of the host bacteria without IPTG induction; Lane 3. Total cell lysate supernatant of the host bacteria with 5 h of IPTG induction.

图 2 3α -HSD 基因在大肠杆菌中的诱导表达

Fig. 2 Inducement and expression of 3α -HSD gene in *E. coli*

2.3 诱导表达条件优化结果

分别将不同温度、不同 IPTG 浓度、不同诱导时间及在培养基中添加不同金属离子的菌液处理后进行 SDS-PAGE 分析,并利用 BandsScan 软件分析蛋白表达含量,结果如图 3 所示,37 °C 培养、IPTG 浓度为 0.6 mmol/L、诱导 4 h、培养基添加 0.1 mmol/L Zn^{2+} 为最佳表达条件,蛋白表达含量的质量分数分别为 16.07%、17.89%、18.21% 和 21.20%。

2.4 重组蛋白的纯化结果

将诱导表达后的菌液先经过不同终浓度的硫酸铵初步沉淀,再将沉淀后的蛋白依次经过亲和层析柱、分子筛分离,结果如图 4 所示,经过硫酸铵沉淀后,杂蛋白部分减少,亲和层析后仅有一条杂带,再经过分子筛分离之后只剩下目的条带,目的蛋白的纯度高达 99%,利用蛋白浓度测定试剂盒(Beyotime 公司产品)测得蛋白质质量浓度为 0.36 mg/mL。参考 Boyer 等测定酶活性的方法进行酶活性测定,测得纯化后的酶活性为 273 U/mg。由于经过一系列的纯化过程可能导致部分酶失活,故酶活性较低,与张爱华等报道一致^[9]。

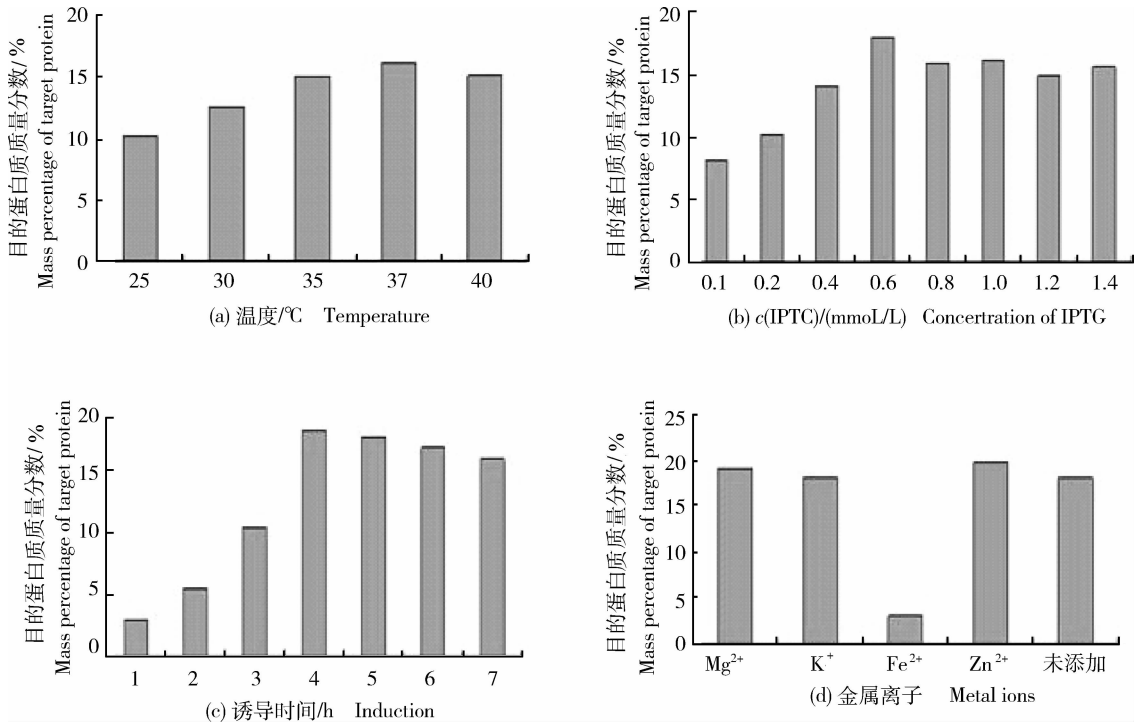
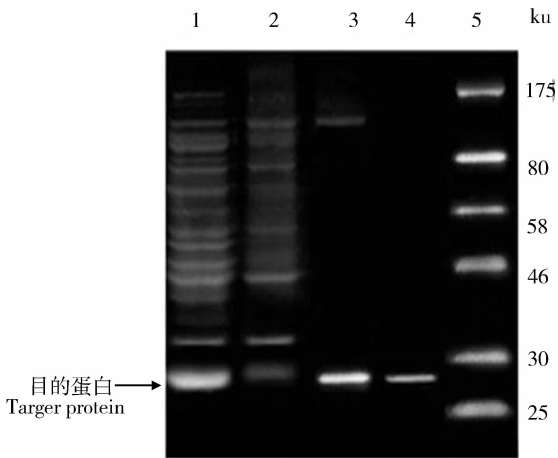


图 3 不同诱导条件对目的蛋白的影响

Fig. 3 Effect to the target protein of different induction condition



1. 总细菌; 2. 硫酸铵沉淀纯化; 3. 亲和纯化;
4. 分子筛纯化; 5. 蛋白 marker.

Lane 1. Total bacterial; Lane 2. Ammonium sulfate sedimentation;
Lane 3. Affinity chromatography;
Lane 4. Molecular sieve; Lane 5. Marker.

图 4 纯化结果

Fig. 4 Result of purification

3 讨论

睾酮从毛单胞菌是一种革兰氏阴性杆菌，偏端丛毛鞭生、运动，它是严格厌氧，非发酵的细菌^[9]。

该菌在自然界中分布非常广泛，水体、土壤、尿液、食品、唾液和肠道等都可以分离到该菌，其特点是严格好气性，不发酵，化能有机营养形细菌，很少攻击糖类，但却能在有机酸和氨基酸上很好生长^[10]。睾酮从毛单胞菌能够以甾醇类化合物如睾酮、雌二醇和雌三醇等作为生长的唯一碳源和能源，通过包含许多酶的氧化的复杂代谢途径，完全消化这类底物。而且，睾酮从毛单胞菌还能降解非类固醇类的异型物质，如杀虫剂，致癌物等^[11]。所以应用睾酮从毛单胞菌的生物降解作用从环境中降解多环芳香烃、类固醇激素等活性物质是可行的^[12-13]。睾酮从毛单胞菌降解过程中的 3 α -HSD 作为一种重要的酶，通过其作为抗原制备相应抗体，可以作为检测类固醇激素的一种生物检测方法。该方法具有高灵敏、高通量与操作简便的优点。

4 结论

本研究通过对影响蛋白表达的几个条件的优化，获得了 3 α -HSD 的最佳表达条件。通过优化纯化条件，建立了 3 α -HSD 的硫酸铵沉淀-亲和层析-分子筛分离的高效纯化方法，可以获得具有酶活性的高纯度的 3 α -HSD。本研究为进一步制备高效抗

体奠定了基础,为建立水资源中类固醇激素免疫检测方法提供了保障。

参 考 文 献

- [1] Hutchinson T H, Matthiessen P. Endocrine-disruption in wild life: Identification and ecological relevance[J]. The Science of the Total Environment, 1999, 233: 1-3
- [2] 刁昱文. 甾体激素 ELISA 检测方法研究[D]. 长春: 长春理工大学, 2006
- [3] Möbus E, Maser E. Molecular cloning, overexpression and Characterization of steroid-inducible 3α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*, a novel member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily[J]. J Biol Chem, 1998, 273(47): 30888-30896
- [4] 张国华, 丛爱日, 徐国宾, 等. 睾丸酮丛毛单胞菌的分离和鉴定及 3α -羟基脱氢酶在大肠杆菌中克隆表达[J]. 北京大学学报: 医学版, 2005, 37(2): 203-206
- [5] Skallegg B A. On the 3α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni* purification and properties[J]. Eur J Biochem, 1974, 46: 117-125
- [6] Qing Yang, Jiangqiang Xu, Min Li et al. High-level expression of a soluble snake venom enzyme, gloshebin, in *E coli* in the presence of metal ions[J]. Biotechnology Letters 2003, 25: 607-610
- [7] Georgiou G, Valax P. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli* Curr Opin[J]. Biotechnol, 1996, 7(2): 190-197
- [8] Boyer J, Baron D N, Talaly P. Purification and properties of a 3α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*[J]. Biochemistry, 1965, 4(9): 1825-1833
- [9] 张国华, 丛爱日, 徐国宾, 等. 3α -羟基类固醇脱氢酶的表达、纯化和酶学性质研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(4): 496-499
- [10] Askonas L J, Ricigliano J W, Penning T M. The kinetic mechanism catalysed by homogeneous rat liver 3α -hydroxysteroid dehydrogenase. Evidence for binary and ternary dead-end complexes containing non-steroidal anti-inflammatory drugs[J]. Biochem J, 1991, 278(Part 3): 835-841
- [11] Coulter A W, Talalay P. Studies on the microbial degradation of steroidring A[J]. BiolChem J, 1968, 243: 3228-3247
- [12] Skowasch D, Möbus E, Maser E. Identification of a novel *Comamonas testostoni* gene encoding a steroid-inducible extradihydroxylase[J]. BBRC, 2002, 294: 560-566
- [13] Sondossi M, Sylvstre M, Alunad D. Effects of chlorobrnzoate transformation on the *Pseudomonas testosteroni* biphenyl and chlorobiphenyl degradation pathway[J]. Appl Envir Microbiol, 1992, 58: 485-495

责任编辑: 苏燕