

• 药材与资源 •

大蒜鳞茎蒜氨酸酶基因克隆及其在毕赤酵母中的表达

吴晓莉, 张 婷, 边金铎, 许 健*

浙江中医药大学生命科学院, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 从大蒜鳞茎中克隆蒜氨酸酶基因, 构建蒜氨酸酶真核表达载体, 并在毕赤酵母系统中表达, 进一步探讨重组蒜氨酸酶的生物学活性。方法 利用 RT-PCR 方法克隆大蒜鳞茎蒜氨酸酶基因, 通过 pPICzaC 载体构建 pPICzaC-蒜氨酸酶真核表达质粒, 电转化法导入毕赤酵母 X-33, 筛选阳性克隆, 经甲醇诱导后取表达上清进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析。利用丙酮酸法检测重组蒜氨酸酶和提取的天然蒜氨酸酶的活性, Lowry 法测 2 种蒜氨酸酶蛋白质量, 通过比活力比较 2 种酶活性大小。结果 从大蒜内克隆出蒜氨酸酶基因, 大小为 1 500 bp, 重组蒜氨酸酶相对分子质量约为 5.5×10^4 , 存在于毕赤酵母表达上清液中。重组蒜氨酸酶比活力为 (82.09 ± 3.89) U/mg, 天然蒜氨酸酶比活力为 (176.49 ± 5.06) U/mg。结论 蒜氨酸酶基因可以在毕赤酵母表达系统中获得表达, 重组蒜氨酸酶具有酶活性, 但是其活性低于提取的天然蒜氨酸酶。

关键词: 蒜氨酸酶; 克隆; 毕赤酵母; pPICzaC 载体; RT-PCR

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)01-0143-05

Cloning of alliinase gene from garlic bulb and its expression in *Pichia pastoris*

WU Xiao-li, ZHANG Ting, BIAN Jin-duo, XU Jian

College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To clone the alliinase gene from the garlic bulb and construct the eukaryote expression plasmid for expressing the recombinant alliinase in *Pichia pastoris* system and analyzing its bioactivity. **Methods** The alliinase gene was cloned from the Zhejiang garlic bulb by RT-PCR and the eukaryote expression plasmid of alliinase was constructed with the pPICzaC vector. The recombinant plasmid was transformed into *Pichia pastoris* X-33 by eletroporation. The positive clones were screened and were induced by methanol. Supernatants after induction were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. The activities of the recombinant protein and the extracted alliinase were detected by the pyruvic acid method and compared by specific activity. The contents of the two kinds of alliinase were detected by Lowry method. **Results** The alliinase gene was successfully cloned from the garlic bulb, the length of alliinase gene was 1 500 bp, the molecule of the recombinant alliinase was about 5.5×10^4 , existed in the supernatant of *Pichia pastoris*. The specific activity of the recombinant protein was (82.09 ± 3.89) U/mg and the nature alliinase was (176.49 ± 5.06) U/mg. **Conclusion** The alliinase gene is successfully expressed in *Pichia pastoris* system. The recombinant alliinase has the activity of enzyme, but is lower than that of the extracted alliinase.

Key words: alliinase; cloning; *Pichia pastoris* (Guillierm.) Phaff; pPICzaC vector; RT-PCR

蒜氨酸酶 (alliinase, EC4.4.1.4, 1) 又名蒜氨酸裂解酶, 存在于大蒜细胞的液泡中, 而蒜氨酸存在于细胞质中, 当大蒜细胞受损时, 二者相遇发生酶解反应, 产生具有多种药理活性的大蒜素^[1]。由于大蒜素不溶于水, 且具有蒜臭味而影响其临床应用。目前, 国内外研究思路是从鲜蒜中提取蒜氨酸及蒜氨酸酶, 制成无臭无味的“蒜氨酸-蒜氨酸酶复合制剂”, 使其在体内释放大蒜素充分发挥疗效。该

研究思路改变了大蒜素给药方式, 弥补了大蒜素的不足, 但是溶液提取获得的蒜氨酸酶量较低, 且由于蒜氨酸酶不稳定, 在提取过程中, 活性容易丧失导致大蒜素生成能力降低^[2]。本研究拟用分子生物学的方法克隆蒜氨酸酶基因, 在毕赤酵母系统表达重组蒜氨酸酶蛋白, 对重组蒜氨酸酶进行活性分析, 为改进大蒜素的给药方式, 更好地发挥蒜类产品的药理学活性奠定实验基础。

收稿日期: 2011-09-15

基金项目: 浙江省教育厅课题 (Y200805242); 浙江省中医药管理局资助课题 (2010ZB026); 浙江中医药大学重点课题 (2009ZZ05); 浙江省科技厅新苗人才计划项目 (67401219); 浙江中医药大学校级课题 (17108015)

作者简介: 吴晓莉 (1975—) 女, 讲师, 硕士, 研究方向为中药有效成分筛选及现代化。Tel: (0571) 86633001 E-mail: JPWXL999@163.com

*通讯作者 许 健 Tel: (0571) 86633001 E-mail: xujian832002@163.com

1 材料

新鲜浙江白蒜鳞茎购买于当地市场。毕赤酵母 *Pichia pastoris* (Guillierm.) Phaff X-33 菌株由吉林大学药学院颜炜群教授惠赠, 大肠杆菌 DH5a、pPIC α C 载体由本实验室保存, pGEMP-T-easy 载体购自 Invitrogen 公司。Trizol 试剂、PCR 纯化试剂盒、凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒、鼠源抗 His 标签蛋白抗体, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Invitrogen 公司。Reverse Transcriptase XL 反转录酶、HS Prime Star DNA 聚合酶、限制性内切酶由 Takara 公司提供。蒜氨酸购自山西慈缘生物技术公司, 质量分数为 98%。

2 方法

2.1 引物设计

根据 Genbank 登录的蒜氨酸酶序列, 在其 ORF 框上下游设计一对引物。上游引物: 5'-GGTATAA-ATGATCTGCCTAGTGATT-3', 下游引物: 5'-CATA-CAAAGATACTCCTTACTGCC-3'。

2.2 大蒜鳞茎总 RNA 的提取及 pGEMP-T-蒜氨酸酶质粒的构建和鉴定

取新鲜大蒜鳞茎于液氮中研碎, 按照 Trizol 试剂说明书进行总 RNA 的提取并进行 RT-PCR。以合成的 cDNA 第一链为模板, 扩增蒜氨酸酶序列。PCR 参数为 94 °C、5 min, 98 °C、10 min, 55 °C、10 min, 72 °C、3 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 5 min。1% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物, PCR 产物纯化后克隆到 pGEMP-T-easy 载体。并转化至大肠杆菌 DH5a, 挑取阳性克隆于 37 °C 过夜震荡培养, 按照质粒提取试剂盒说明书提取重组质粒, 测序并进行生物学分析。

2.3 蒜氨酸酶基因亚克隆及 pPIC α C-蒜氨酸酶重组质粒的构建和鉴定

重新设计上下游引物。上游引物: CCCTCGAG-AAGAGAGAGATGATCTGCCTAGTG; 下游引物: GGAATTCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGAATG-AAAGGACGAC。分别引入 *Xho*II 和 *Eco*RI 酶切位点, 以 pGEMP-T-蒜氨酸酶为底物进行 PCR, PCR 产物和 pPIC α C 载体分别经 *Xho*II 和 *Eco*RI 双酶切进行连接构建, 重组质粒 pPIC α C-蒜氨酸酶经双酶切鉴定, 由 Takara 公司进行 DNA 测序。

2.4 pPIC α C-蒜氨酸酶重组质粒的毕赤酵母表达

取 5 mL YPD 培养基于 50 mL 锥形瓶中, 接种酵母 X-33 于 30 °C 过夜培养。取 0.1~0.2 mL 培养物接种于 500 mL 新鲜培养基中, 摇至吸光度 (A_{600})

值为 1.3~1.5。4 °C, 1 500×g, 离心 5 min, 收集细胞, 用 500 mL 冷的无菌水重悬细胞, 离心, 重悬细胞于 250 mL 无菌水中离心。用 20 mL 1 mol/L 山梨醇重悬细胞, 同上离心。用 1 mL 1 mol/L 山梨醇重悬细胞至终体积为 1.5 mL, 制备毕赤酵母 X-33 感受态细胞。

混合 80 μ L 毕赤酵母 X-33 感受态细胞与 5~20 μ g 线性化 pPIC α C-蒜氨酸酶质粒和 pPIC α C 载体, 转移至冰预冷的 0.2 cm 电转杯中, 冰上放置 5 min, 电压 1 500 V, 电击 4~10 ms, 立即加入 1 mL 冰冷 1 mol/L 的山梨醇, 取 200~600 μ L 上述内容物涂布于含 zeocin 的 MD 平板, 30 °C 培养, 直至长出单克隆菌落。从 MD 平板上挑取单克隆分别接种于 10 mL YPD 培养基中, 30 °C 震荡培养过夜, 提取酵母 DNA, 然后进行 PCR, 鉴定重组的阳性克隆。

取已鉴定的阳性克隆, 接种于 100 mL BMMY 培养基中, 28~30 °C, 250~300 r/min 震荡培养至 A_{600} 值 2.0~6.0。1 500~3 000 ×g, 室温离心 5 min, 收集细胞。将细胞重悬于原体积 1/5 至 1/10 体积的 BMMY 培养基中, 继续振荡培养。加 100% 甲醇使终体积分数为 0.5%, 每隔 12 h 取样。样品 1 500 ×g 离心 5 min。收集上清液进行检测。

2.5 重组蒜氨酸酶 SDS-PAGE 分析和 Western blotting 鉴定

以 pPIC α C 空载体表达上清为对照, 将不同时间收集的酵母表达上清进行 SDS-PAGE 电泳分析, 再将表达产物经离心浓缩后进行 Western blotting 鉴定。利用半电干转移仪将 SDS-PAGE 凝胶上的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 以 5% 脱脂奶粉封闭, 4 °C 过夜, 加入鼠源 His-tag 标签抗体 37 °C 孵育 2 h, 洗膜, 加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗, 37 °C 孵育 1 h, 经显色后观察蛋白表达情况。

2.6 重组蒜氨酸酶和天然蒜氨酸酶的活性分析

天然蒜氨酸酶的提取参照李燕等^[3]方法。取一定量大蒜 (4 °C 预冷), 加入预冷的 PBS 缓冲溶液, 10% 甘油、1 mmol/L CaCl₂, 匀浆。上清经 35% 的饱和硫酸铵进行蛋白沉淀, 4 °C, 12 000×g 离心 30 min, 取沉淀复溶后, 透析, 收集酶液。经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测纯度。Lowry 法测定溶液提取蒜氨酸酶和浓缩重组蒜氨酸酶蛋白质量。

以 3 mmol/L 的蒜氨酸为底物, 用丙酮酸法^[4]分别测定重组蒜氨酸酶和溶液提取蒜氨酸酶活性。

酶活定义为以在 35 ℃ 条件下, 产生 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 丙酮酸为 1 个活力单位 (U)。1.0 mL 酶液加 2.0 mL 底物在 35 ℃ 下反应 5 min 后, 加 3 mL 10% 三氯乙酸终止反应, 吸取 2.0 mL 反应物与 0.5 mL 2, 4-二硝基苯肼充分反应后, 加入 5 mL 0.5 mol/L NaOH 摇匀显色, 520 nm 波长测定 A 值。

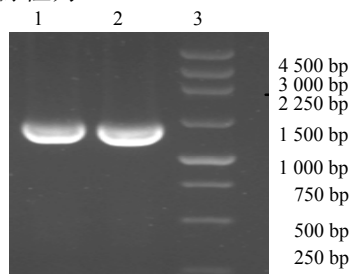
2.7 统计学处理

应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

3 结果与分析

3.1 蒜氨酸酶基因 RT-PCR 结果

根据 GenBank 登录序列, RT-PCR 产物大小预期为 1 495 bp, 图 1 所示约在 1 500 bp 可见一条明显、特异性条带, 与预期大小基本一致。克隆到 pGEMP-T-easy 载体后测序。经测序分析发现本次克隆序列比 Genbank 登录的大蒜鳞茎蒜氨酸酶核苷酸序列多了 3 个碱基“GTA”, 有 9 个位点发生了改变, 核苷酸同源率为 98.15%^[5]。



1、2-蒜氨酸酶 PCR 结果 3-250 bp DNA 梯状标记
1, 2-PCR results of alliinase 3-250 bp DNA Ladder Marker

图 1 蒜氨酸酶 PCR 产物

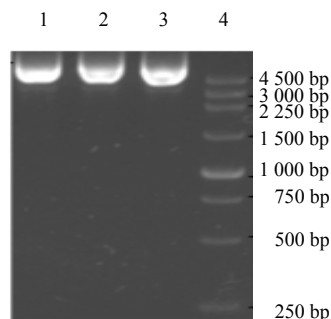
Fig. 1 PCR product of alliinase

3.2 pPlczaC-蒜氨酸酶重组质粒的鉴定

pPlczaC 载体大小为 3 600 bp 左右, 蒜氨酸酶为 1 400 bp 左右, pPlczaC-蒜氨酸酶重组质粒大小约为 5 000 bp, 在 5 000 bp 左右出现一条明亮特异性条带 (图 2), 经 *Xho*II 和 *Eco*RI 双酶切在 2 250 bp 和 3 000 bp 左右分别出现两条特异性条带 (图 3), 大小与预期基本相符, 经测序鉴定后完全正确。

3.3 蒜氨酸酶在毕赤酵母中的表达

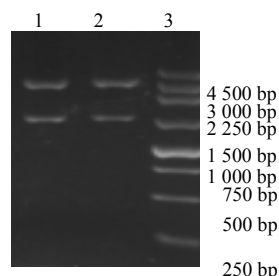
蒜氨酸酶基因大小为 1 495 bp, 其编码的目的蛋白相对分子质量约为 5.5×10^4 , 取蒜氨酸酶毕赤酵母表达上清进行 SDS-PAGE 分析, 在 $4.5 \times 10^4 \sim 6.6 \times 10^4$ 见到两条蛋白条带 (图 4、5), 而对照组 (pPlczaC 载体) 表达组在相应位置未见明显条带; 表达产物上清离心浓缩后经 Western blotting 检测,



1~3-pPlczaC-蒜氨酸酶重组质粒 PCR 结果 4-250 bp DNA 梯状标记
1~3-PCR of pPlczaC-alliinase recombinant plasmid
4-250 bp DNA Ladder Marker

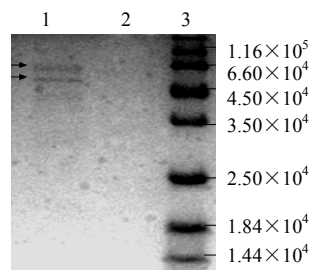
图 2 pPlczaC-蒜氨酸酶重组质粒

Fig. 2 Recombinant plasmid of pPlczaC-alliinase



1、2-pPlczaC-蒜氨酸酶重组质粒 *Xho*II/*Eco*RI 双酶切结果
3-250 bp DNA 梯状标记
1, 2-recombinant plasmid of pPlczaC-alliinase digested
by *Xho*II/*Eco*RI 3-250 bp DNA Ladder Marker

图 3 pPlczaC-蒜氨酸酶重组质粒 *Xho*II/*Eco*RI 双酶切
Fig. 3 Recombinant plasmid of pPlczaC-alliinase digested
by *Xho*II/*Eco*RI



1-pPlczaC-蒜氨酸酶表达 2-pPlczaC 空载体表达 3-Marker
1-expression of pPlczaC-alliinase 2-expression of pPlczaC empty
vector 3-Marker

图 4 重组蒜氨酸酶表达

Fig. 4 Expression of recombinant alliinase

在 5.5×10^4 左右出现一条特异性条带, 见图 6。

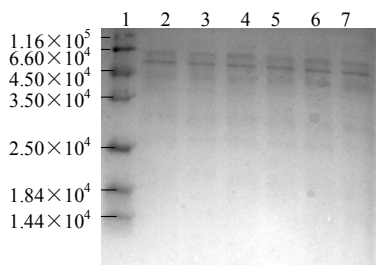
3.4 溶液提取的天然蒜氨酸酶

硫酸铵沉淀后酶液中蒜氨酸酶量较多, 但同时含有大量的杂蛋白, 透析后酶液在 $4.5 \times 10^4 \sim 6.6 \times 10^4$ 显示单一条带, 其他部位基本无条带, 说明酶液中蒜氨酸酶的纯度有所提高, 大小与预期蛋白基本

一致, 见图 7。

3.5 重组蒜氨酸酶和溶液提取大蒜蒜氨酸酶活性比较

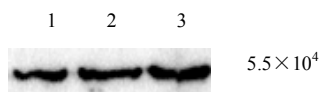
当酶的体积相同时, 重组蒜氨酸酶活性为 (103.93 ± 4.92) U, 比活力为 (82.09 ± 3.89) U/mg, 明显低于天然蒜氨酸酶活性 (185.66 ± 5.32) U 和比活力 (176.49 ± 5.06) U/mg。



1-Marker 2~7-重组蒜氨酸酶 2~7 d 内的表达
1-Marker 2~7-expression of recombinant alliinase in 2~7 d

图 5 重组蒜氨酸酶不同时间表达

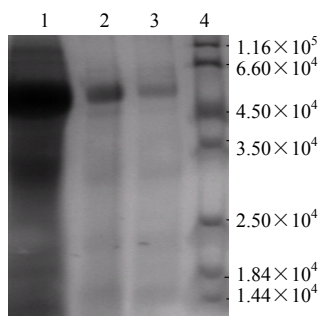
Fig. 5 Expression of recombinant alliinase in different time



1~3-重组蒜氨酸酶
1~3-recombinant alliinase

图 6 重组蒜氨酸酶 Western-blotting 分析

Fig. 6 Western-blotting analysis of recombinant alliinase



1-硫酸铵沉淀的蒜氨酸酶 2, 3-透析后的蒜氨酸酶 4-Marker
1-alliinase deposited by ammonium sulfate 2, 3-alliinase by dialysis 4-Marker

图 7 溶液提取天然蒜氨酸酶产物

Fig. 7 Product of natural alliinase extracted by solution

4 讨论

本研究根据 Genbank 登录的蒜氨酸酶序列, 在其 ORF 框上下游分别设计引物, 利用分子生物学技术克隆出浙江白蒜蒜氨酸酶基因。经生物学软件分析表明, 从浙江白蒜内克隆的蒜氨酸酶基因序列与 Genbank 登录序列相比 9 个碱基发生了突变, 由于克隆所用 HS Prime Star DNA 聚合酶为高保真酶, 9 个碱基的突变排除实验操作引起, 分析可能与大蒜

品种不同导致的基因多态性有关。

曾有报道证实克隆得到大蒜蒜氨酸酶的基因, 有的在原核细胞或真核细胞系统中进行了重组表达^[1, 6-9]。但由于大蒜品种、表达载体和表达系统的不同, 所报道的基因序列、蛋白相对分子质量及生化性质有诸多分歧。本研究选择新一代的毕赤酵母分泌表达载体 pPICZαC, 该载体具有强效可调控启动子 AOX₁ (alcohol oxidase, 醇氧化酶)、Zeocin 抗性筛选标记基因和信号肽 α-交配因子, 有利于重组质粒的筛选和分泌表达, 同时该载体的 3'端含有 6 个 His 序列, 便于目的蛋白的鉴定和分离纯化。本研究首次在毕赤酵母 X-33 中表达重组蒜氨酸酶, 但是目的蛋白表达量不高, 分析可能表达条件还需要优化, 特别是诱导剂甲醇量和诱导表达时间及外源基因特性等方面还需要进一步摸索和优化。

巴斯特毕赤酵母表达系统是目前研究最多、应用最广泛的真核表达系统之一, 它可以对表达蛋白进行糖基化、蛋白磷酸化、信号序列加工等一系列的翻译后修饰, 从而使其表达的蛋白具有生物活性, 克服了大肠杆菌表达系统不能表达结构复杂的蛋白质、表达的蛋白多形成不溶性包涵体、背景蛋白多、表达产量低等缺陷^[10]。而且该酵母菌营养要求低、生长快、表达量高, 便于工业化生产; 表达的外源蛋白可分泌到胞外, 分离纯化简便, 所分泌的糖蛋白的免疫原性较低, 更利于临床应用^[11]。采用丙酮酸标准曲线法对重组蒜氨酸酶和天然蒜氨酸酶进行酶活性分析发现, 重组蒜氨酸酶具有酶活性, 比活力为 (82.09 ± 3.89) U/mg, 低于天然蒜氨酸酶比活力 (176.49 ± 5.06) U/mg, 分析可能有两种原因: (1) 外源表达的重组蒜氨酸酶活性较天然蒜酶活性低; (2) 重组蒜氨酸酶没有经过纯化, 杂蛋白相对较高, 影响比活力。

今后的研究工作主要是提高重组蒜氨酸酶的表达量和酶活性。通过优化表达体系, 提高酶的表达量; 通过建立重组蒜氨酸酶纯化平台, 探索纯化条件, 提高纯化效果和重组蛋白纯度, 并通过生物信息学寻找重组蒜氨酸酶活性中心, 并尝试利用定点突变等技术对蒜氨酸酶活性中心进行修饰改造, 进一步提高重组蛋白活性, 为工业化生产重组蒜氨酸酶奠定实验基础。进一步以此为平台将重组蒜氨酸酶和蒜氨酸进行配伍组成“蒜氨酸酶-蒜氨酸复合制剂”, 筛选出“蒜氨酸酶-蒜氨酸复合制剂”的最佳配伍比例, 改进大蒜素的给药方式, 以现代生物技

术促进蒜类产品的现代化,更有效地发挥蒜类产品的药理学活性。

参考文献

- [1] 来庆勤,殷承慧,胡又佳,等.大蒜蒜氨酸酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达[J].医药工业杂志,2010,41(7):496-500.
- [2] 苟萍.蒜氨酸酶的研究[J].生物学通报,2004,39(8):9-10.
- [3] 李燕,王荣,李冠,等.新鲜大蒜中蒜氨酸酶的分离纯化及性质[J].植物学通报,2005,22(5):579-583.
- [4] 葛艳辉,赵俊英,闵笛,等.蒜氨酸酶动力学性质研究[J].农业科学,2008(1):141-143.
- [5] 吴晓莉,许健,张婷,等.大蒜蒜氨酸酶基因克隆与序列分析及毕赤酵母表达质粒的构建[J].吉林农业大学学报,2010,32(3):258-263.
- [6] Rabinkov A, Zhu X Z, Grafi G, et al. Alliin lyase (alliinase) from garlic (*Allium sativum*). Biochemical characterization and cDNA cloning [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1994, 48(3): 149-171.
- [7] Manabe T, Hasumi A, Sugiyama M, et al. Alliinase [S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide lyase] from *Allium tuberosum* (Chinese chive)-puication, localization, cDNA cloning and heterologous functional expression [J]. *Eur J Biochem*, 1998, 257(1): 21-30.
- [8] van Damme E J, Smeets K, Torrekens S, et al. Isolation and characterization of alliinase cDNA clones from garlic (*Allium sativum* L.) and related species [J]. *Eur J Biochem*, 1992, 209(2): 751-757.
- [9] Weik R, Franky A, Striedner G, et al. Recombinant expression of alliin lyase from garlic (*Allium sativum*) in bacteria and yeasts [J]. *Planta Med*, 1998, 64(4): 387-388.
- [10] 龙晶,杜立新.巴斯德毕赤酵母表达外源蛋白的研究进展[J].微生物学杂志,2007,27(6):72-76.
- [11] 娄瑞娟,罗利龙,张霞,等.巴斯德毕赤酵母表达系统的研究进展和前景展望[J].生物学杂志,2010,27(5):73-76.