

## 2 种重组真核蛋氨酸酶原核体系表达及活性比较

田腊梅, 任小丽, 胡振良, 曾红静, 田长富

(昆明医科大学生物医学工程研究中心基因与蛋白质工程研究室, 云南 昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 构建 2 种真核 L-蛋氨酸  $\gamma$ -裂解酶 (MGL1 MGL2) 的高效原核表达载体, 诱导表达及纯化, 比较活性差异. **方法** 通过分子克隆技术构建 2 种重组表达质粒 pGEX-4T-1- MGL1, pGEX-4T-1- MGL2; 重组质粒转化感受态大肠杆菌 Dh5 $\alpha$ , 诱导表达纯化蛋氨酸酶. **结果** 构建了高效表达载体 pGEX-4T-1- MGL1, pGEX-4T-1- MGL2; pGEX-4T-1- MGL1 表达的酶纯度为 82.5%, 活性为 0.505 2 IU/mg, pGEX-4T-1- MGL2 表达的酶纯度为 81.4%, 活性为 0.305 2 IU/mg. **结论** pGEX-4T-1- MGL1, pGEX-4T-1- MGL2 都能表达蛋氨酸酶; pGEX-4T-1- MGL1 表达的蛋氨酸酶纯度比较高, 酶活性比较高.

**[关键词]** 肿瘤; 蛋氨酸酶; 基因治疗

**[中图分类号]** Q782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 05 - 0011 - 04

## Expression and Activities of Two Prokaryotic Expression Vectors of Eukaryotic L-methionine $\gamma$ -lyase Genes

TIAN La - mei, REN Xiao - li, HU Zhen - liang, ZENG Hong - jing, TIAN Chang - fu

(Gene and Protein Engineering Department, Biomedical Engineering Center, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To construct two highly efficient prokaryotic expression vectors of eukaryotic L-methionine  $\gamma$ -lyase genes (MGL1 MGL2), induce their expression, purify, and compare their activities. **Methods** Two types of recombinant plasmids pGEX-4T-1- MGL1 and pGEX-4T-1- MGL2 were established by molecular cloning technique. Then the recombinant plasmids were transformed into E. coli Dh5ct to induce expression. **Results** Two types of highly efficient recombinant expression plasmids pGEX-4T-1- MGL1 and pGEX-4T-1- MGL2 were constructed successfully. Purity of metase of pGEX-4T-1- MGL1 was 82.5%, activity was 0.5052 IU/mg. Purity of metase of pGEX-4T-1- MGL2 was 81.4%, activity was 0.3052 IU/mg. **Conclusion** PGEX-4 T-1-MGL1 and pGEX-4 T-1-MGL2 can express L-methionine  $\gamma$ -lyase, and L-methionine  $\gamma$ -lyase of PGEX-4 T-1-MGL1 is purer and more active.

**[Key words]** Tumor; L-methionine  $\gamma$ -lyase; Genetic therapy

蛋氨酸是人体必须氨基酸之一, 是细胞生长、蛋白合成的必须成分. 近年来细胞实验、动物实验及临床 I 期试验均证实: 蛋氨酸消除可以强烈抑制多种肿瘤细胞的生长诱发其凋亡, 而对正常细胞生长及机体功能无明显影响<sup>[1-3]</sup>. 已有报道证实: 血液中引入 L-蛋氨酸  $\gamma$ -裂解酶可降低蛋氨酸浓度水平, 抑制肿瘤细胞的生长, 其效果优于传统

的饥饿疗法而且没有明显的毒副作用, 细胞实验已经证明 L-蛋氨酸  $\gamma$ -裂解酶对 21 种肿瘤细胞的 IC50 比正常细胞的低一个数量级<sup>[4]</sup>.

与其他药物合用具有协同作用, 有望成为新一代的抗肿瘤药物<sup>[5,6]</sup>. 本研究在 MGL1、MGL2 基因克隆的基础上<sup>[7]</sup>, 通过分子克隆技术构建 2 种 pGEX-4T-1- MGL1, pGEX-4T-1- MGL2 高效原核

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (307660287); 云南省科技厅重点基金资助项目 (2009CC022)

**[作者简介]** 田腊梅 (1986~), 女, 云南曲靖市人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤基因治疗的研究工作.

**[通讯作者]** 田长富. E-mail: tiancf@21cn.com

表达体系, 经异丙基- $\beta$ -D 硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导, 表达条件进行优化, 及对蛋氨酸酶纯化. 对比哪个基因表达更优, 实现蛋氨酸酶的原核高效表达. 作为肿瘤饥饿疗法的代表性药物, 对蛋氨酸酶的深入研究必将推动该类产物的研究, 具有重要的理论意义和重大的社会价值.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂** 酶和试剂 EcoRI、BamHI 等限制性内切酶. TaqDNA 聚合酶均为宝生物公司产品.

T4-DNA 连接酶, 质粒 DNA 快速提取试剂盒, DNA 凝胶回收试剂盒均购自 Promega 公司. 低相对分子量标准蛋白, 考马斯亮蓝 R-250, TEMED, 3-甲基-2-苯并噻唑酮脲, L-蛋氨酸均购自上海 Solarbio 公司, 5'-磷酸吡哆醛购自 Sigma 公司.

**1.1.2 菌株和质粒** 质粒 pMD19-T. 感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  均购自大连宝生物公司. 表达质粒 pGEX4T-1 由香港中文大学孔祥俊教授惠赠. 克隆在 pMD19-T 中的基因 MGL1、MGL2 为本实验室先前克隆得到<sup>[7]</sup>.

**1.1.3 主要仪器** PCR 仪, 杭州博日科技有限公司, 型号 TC-XP-G. 凝胶成像系统, 美国 BioRAD, 型号 Universal Hood II. 微量核酸蛋白定量仪, 美国 Nano Drop ND-1000UV/Vis. 超声波组织粉碎仪, 美国 SONIC VCX130.

### 1.2 方法

**1.2.1 高效重组表达子的构建** MGL1 长度为 1 191 bp, MGL2 长度为 1 197 bp, 2 者表达的蛋白氨基酸的同源性为 69%. 为了得到与表达载体相匹配的酶切位点设计相应的引物: (1) MGL1 的引物设计根据 MGL1 基因编码序列 (从起始密码 ATG 到终止密码 TAA) 自行设计引物, 上游引物 5' 端引入 BamHI 酶切位点, 下游引物 5' 端引入 EcoRI 酶切位点. 引物序列如下: 上游为: 5'TCG GAT CCA TGT CTC ACG AGA GAA TG 3', 下游引物为: 5'CCG GAA TTC TTA TAA AAG AGC GTC AAGG 3', 均由上海生工生物工程技术有限公司合成; (2) MGL2 的引物设计根据 MGL2 基因编码序列 (从起始密码 ATG 到终止密码 TAA) 自行设计引物, 上游引物 5' 端引入 BamHI 酶切位点, 下游引物 5' 端引入 XhoI 酶切位点. 引物序列如下: 上游为: 5'TTG GAT CCA TGA GTG GCC ACG CT 3', 下游引物为: 5'CGGCTC GAG TTA GAG GAC TAA GTC GAG AG 3', 均由上海生工生

物工程技术有限公司合成; (3) MGL1、MGL2 亚克隆的构建及鉴定 分别以携带 MGL1、MGL2 基因序列的 pMD19-T-MGL1 和 pMD19-T-MGL2 质粒为模板 PCR 扩增目的段 (BamHI-MGL1-EcoRI 和 BamHI-MGL2-XhoI).

pMD19-T-MGL1-1PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. 反应结束后取产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪下观察并记录结果. pMD19-T-MGL2-2PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min. 反应结束后取产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪下观察并记录结果;

(4) 高效原核表达重组子 pGEX-4T-1-MGL1 和 pGEX-4T-1-MGL2 的构建及鉴定 用 BamHI, EcoRI 大量双酶切 pMD19-T-MGL1, 胶回收目的片段 (BamHI-MGL1-EcoRI), 再与经同样酶双酶切并进行胶回收的高效原核表达载体 pGEX-4T-1 的长片段. 以摩尔数比为 3:1 的比例, 在 T4-DNA 连接酶作用下混合连接, 构建原核表达重组子 pGEX-4T-1-MGL1. 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 涂布于含氨苄抗性的琼脂平板上, 选择阳性以相应引物进行 PCR 鉴定, 条件参考 1.2.1. (3) BamHI, EcoRI 双酶切鉴定. 阳性克隆送上海生工生测序. 相似的方法构建和鉴定 pGEX-4T-1-MGL2, 酶换 BamHI 和 XhoI.

**1.2.2 pGEX-4T-1-MGL1, pGEX-4T-1-MGL2 的诱导表达** 将测序正确的含重组子 pGEX-4T-1-MGL1 和 pGEX-4T-1-MGL2 质粒的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  分别接种到含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 条件经优化, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD=2 左右, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导 8 h. 以未经诱导作为阴性对照.

**1.2.3 超声破碎菌体** 取 50 mL 诱导好的菌离心收集沉淀. 加入 10 mL 的 PB 液充分混匀菌液超声破碎, 功率 200 W, 超 6 s, 停 6 s, 超声 120 个循环, 离心 (10 000 r/min, 30 min) 分别收集上清和沉淀.

**1.2.4 对破碎后上清中的酶进行纯化** 用上海生工的 GST Resin 1 mL (预装重力柱) 纯化目的蛋白, 步骤如下: 用 10 倍柱体积的预冷 PB 缓冲液洗 GST 树脂; 3 mL 蛋白酶液过柱, 再重复 1 次; 以 20 倍柱体积的 PB 缓冲液冲洗; 用 10 倍柱体积的洗脱 buffer 洗脱收集目的蛋白.

**1.2.5 蛋氨酸酶活性测定** 参照文献方法<sup>[8-12]</sup>, 用

微量核酸蛋白定量仪 DN-1000 在最大吸收波长  $\lambda_{\max} = 315 \text{ nm}$  处测定  $\alpha$ -酮丁酸的吸光度值。

### 1.3 统计学处理

数据采用 SPSS 统计软件包进行统计分析, 样本用  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 重组表达载体 pGEX-4T-1-MGL1 的鉴定

通过 PCR 鉴定, 从重组表达载体上扩增出 1 191 bp 目的条带; 双酶切结果显示得到一条目的条带和 1 条线性 pGEX-4T 载体条带。以上结果说明目的基因已与表达载体实现重组。实验结果见图 1。

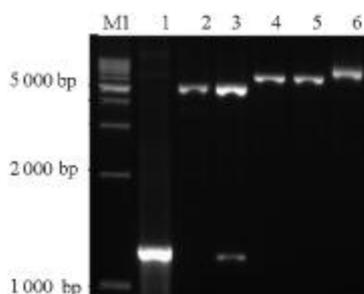


图 1 重组表达载体 pGEX-4T-1-MGL1 的鉴定

Fig. 1 The identification of recombinant expression vector pGEX-4T-1-MGL1

M1: 1 kb DNA Ladder; Lane1: PCR 扩增产 (BamHI - MGL1-EcoRI 1 191 bp); Lane2: pGEX-4T-1 原始质粒; Lane3: BamHI, EcoRI 双酶切 pGEX-4T-1-MGL1 (载体为 4 571 bp 目的片段为 1 191 bp); Lane4: BamHI 单酶切 pGEX-4T-1-MGL1 (5 771 bp); Lane5: EcoRI 单酶切 pGEX-4T-1-MGL1 (5 771 bp); Lane6: BamHI 单酶切 pGEX-4T-1 (4 580 bp)。

### 2.2 重组表达载体 pGEX-4T-1-MGL2 的鉴定

通过 PCR 鉴定, 从重组表达载体上扩增出 1 197 bp 目的条带; 双酶切结果显示得到一条目的条带和一条空线性 pGEX-4T 载体条带。以上结果说明目的基因已与表达载体实现重组。实验结果见图 2。

### 2.3 重组 pGEX-4T-1-MGL1, pGEX-4T-1-MGL2 的表达, 表达量的比较及初步纯化

pGEX-4T-1-MGL1, pGEX-4T-1-MGL2 表达的都是融合蛋白, pGEX-4T-1-MGL1 表达的蛋白长度为 67 KD [41 kD (蛋氨酸酶) +26 kD (GST)]。pGEX-4T-1-MGL2 表达蛋白长度为 68.6 kD [42.6 kD (蛋氨酸酶) +26 kD (GST)]。实验结果见图 3、图 4 及表 1。

### 2.4 纯化目的蛋白酶活性单位的测定

重组子 pGEX-4T-1-MGL1 目的蛋白酶单位为 0.505 2 IU/mg, 重组子 pGEX-4T-1-MGL2 目的蛋白酶单位为 0.305 2 IU/mg [标准品为 sigma (编号为 M2570-1VL 0.2 IU/mg) 的蛋氨酸  $\gamma$ -裂解酶]。

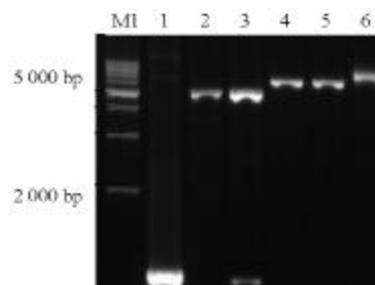


图 2 重组表达载体 pGEX-4T-1-MGL2 的鉴定

Fig. 2 The identification of recombinant expression vector pGEX-4T-1-MGL2

M1: 1 kb DNA Ladder; Lane1: PCR 扩增产 (BamHI - MGL2-EcoRI 1 197 bp); Lane2: pGEX-4T-1 原始质粒; Lane3: BamHI, XhoI 双酶切 pGEX-4T-1-MGL2 (载体为 4 556 bp 目的片段为 1 197 bp); Lane4: BamHI, 单酶切 pGEX-4T-1-MGL1 (5 777 bp); Lane5: XhoI 单酶切 pGEX-4T-1-MGL2 (5 777 bp); Lane6: BamHI 单酶切 pGEX-4T-1 (4 580 bp)。

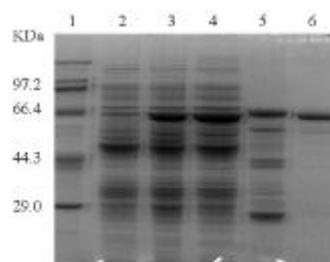


图 3 重组 pGEX-4T-1-MGL1 的表达分析

Fig. 3 The expression of recombinant pGEX-4T-1-MGL1

Lane1: Protein marker; Lane2: 未诱导的 DH5  $\alpha$ ; Lane3: 诱导 6 h; Lane4:破碎后的上清; Lane5:破碎后的沉淀; Lane6:上清过柱回收。

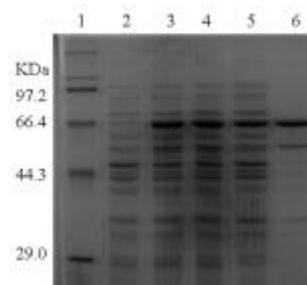


图 4 pGEX-4T-1-MGL2 的表达

Fig. 4 pGEX-4 T-1-MGL2 expression

Lane1: Protein marker; Lane2: 未诱导的 DH5  $\alpha$ ; Lane3: 诱导 6 h; Lane4:破碎后的上清; Lane5:破碎后的沉淀; Lane6:上清过柱回收。

表 1 重组子蛋白含量定量结果 (%)

Tab. 1 Quantification detection of protein content in recombinant vectors (%)

重组子 分类		各部分目的蛋白占各部分总蛋白的百分比	目的蛋白占总目的蛋白的百分比
pGEX-4T-1- MGL1	上清	19.45	25.25
	沉淀	76.27	74.75
	总蛋白	21.24	100
pGEX-4T-1- MGL2	上清	15.7	20
	沉淀	34.23	80
	总蛋白	16	100

### 3 讨论

本实验所选的 2 种真核 L- 蛋氨酸  $\gamma$ - 裂解酶 (MGL1 MGL2) 基因是表达阴道毛滴虫的 2 种同工酶。2 种酶的单位亚基在空间和功能上可分为 3 个不同区域。(1) N- 端延伸区域；(2) PLP 结合区域；(3) C- 端区域。2 个单体亚基可以聚合成有活性的二聚体，2 个二聚体对称结合在一起形成同型四亚基聚合体酶，四聚体的形成不仅可以增加酶的稳定性，便于酶与 PLP 结合，还可以形成 4 个活性位点。两者氨基酸序列有 69% 的同源性。MGL1 和 MGL2 所含氨基酸个数不同，通过空间结构比较发现，在结构域划分和亚基组合上相似，并且在 PLP 结合域和 C- 端区域具有很高的同源性，N- 端区域的同源性低。N- 端区域在 MGL 活性酶体的形成及底物的识别发挥重要作用，MGL1 MGL2 N- 端区域的变化对酶在活性剂底物特异性差异方面产生影响<sup>[13,14]</sup>。空间结构的获得有助于加深对酶结构性质的了解，有助于了解 MGL1、MGL2 酶活性不同的机制。

#### [参考文献]

- [1] 付崑,田长富. 生物医学工程学杂志[J]. 生物医学工程学杂志,2011,28(4):839-842.
- [2] JIAN HU, NAI-KONG V. Cheung methionine depletion with recombinant methioninase: In vitro and in vivo efficacy against neuroblastoma and its synergism with chemotherapeutic drugs[J]. Int J Cancer, 2009, 124(7): 1700-1706.
- [3] MIKI K, XUM AN Z, et al. Survival efficacy of the combination of the methioninase gene and methioninase in a lung cancer orthotopic model [J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(2): 332-338.
- [4] YUYING, MINGXU XU AND ROBERT M. Hoffman. Broad selective efficacy of recombinant methioninase and polyethylene glycol-modified recombinant methioninase on cancer cells in vitro [M]. Anticancer Reserch 30, 2010: 793-798.
- [5] CELLARIER E, DURANDO X, VASSON M P, et al. Methionine dependency and cancer treatment [J]. Cancer Treat Rev, 2003, 29(6): 489-499.
- [6] YAMAMOTO N, GUPTA A, XUM, et al. Methioninase gene therapy with selenomethionine induces apoptosis in bcl-2-overproducing lung cancer cells [J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10(6): 445-450.
- [7] 林琳, 赵瑜, 付崑. 两种真核蛋氨酸裂解酶基因克隆、鉴定及分析比较[J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(4): 1-4.
- [8] 马百坤, 唐晓莹, 黄惠臣. 蛋氨酸裂解酶的基因克隆及序列分析[J]. 医学研究生学报, 2006, 19(12): 1063-1066.
- [9] MIKI K, XUM AN Z. Survival efficacy of the combination of the methioninase gene anti methioninase in a lung cancer orthotopic model [J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(2): 332-338.
- [10] TOMOAKI TAKAKURA, KENJI MITSUSHIMA, SHIGEO YAGI, et al. Assay method for antitumor L-methionine  $\gamma$ -lyase: comprehensive kinetic analysis of the complex reaction with L-methionine [J]. Analytical Biochemistry, 2004, 327(2): 233-240.
- [11] YAMAMOTO N, GUPTA A, XU M, et al. Methioninase gene therapy with selenomethionine induces apoptosis in bcl-2-overproducing lung cancer cells [J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10: 445-450.
- [12] TAN Y Y. Total  $\gamma$ -homocysteine enzymatic assay [J]. Clinical Chemistry, 2000, 46(10): 1686-1688.
- [13] ASHRAF S, EL-SAYED. Microbial L-methioninase: production, molecular characterization, and therapeutic applications [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 86: 445-467.
- [14] 夏立亮, 于源华, 薛冉, 等. L-蛋氨酸  $\gamma$ -裂解酶的研究进展[J]. 生物技术通报, 2009, (10): 70-74.

(2012-02-13 收稿)