

阚延泽,江 翱,王全禾,等. 黄鳍醛酮还原酶对大肠杆菌非生物胁迫耐受性的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(1):159-162.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.01.038

黄鳍醛酮还原酶对大肠杆菌非生物胁迫耐受性的影响

阚延泽,江 翱,王全禾,李 伟

(长江大学生命科学学院,湖北荆州 434025)

摘要:醛酮还原酶是一类依赖 NAD(P)H 的氧化还原酶,在生物体内参与了糖代谢、酮代谢和物质运输等多种生理过程。为了解黄鳍醛酮还原酶在细胞逆境胁迫中的保护作用,采用液体培养和斑点展示法,比较含黄鳍醛酮还原酶 Eakr 的重组菌株和阴性对照菌株在 NaCl、Cu²⁺ 和 H₂O₂ 等非生物胁迫下的存活率和生长活力。结果表明,含重组醛酮还原酶 Eakr 的大肠杆菌在高渗透压、重金属和氧化胁迫下的生存率显著高于阴性对照,其生存活力也大大增强。提示黄鳍醛酮还原酶 Eakr 可能参与了细胞活性氧代谢和物质运输等多种生理过程。

关键词:醛酮还原酶;非生物胁迫;存活率;耐受性

中图分类号: S188⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)01-0159-03

醛酮还原酶(aldo keto reductase, AKR)是一类通过与辅酶 NAD(P)H 结合将醛酮类物质还原为相应醇类的氧化还原酶。它包括 16 个家族,近 200 个成员,在酵母、植物、哺乳动物以及原核生物中均有报道^[1]。醛酮还原酶既参与了人类细胞对外源、内源性毒性物质的代谢过程,也导致了某些重要疾病的发生与发展^[2]。人类醛酮还原酶 AKR7A 家族的成员不仅能够抵抗活性醛类物质氧化毒害的作用^[3],而且还参与了活性氧代谢,是机体重要的防御酶^[4-5];相反,胰脏肿瘤细胞中 AKR1B10 基因被抑制后可有效抑制肿瘤细胞癌变,提示 AKR1B10 可能参与了肿瘤形成的过程^[6]。除此以外,AKRs 还可以催化视黄醛还原成视黄醇,影响生物体视觉的形成^[7],并且在维持膜电位、细胞内外渗透压平衡以及物质跨膜运输等方面扮演重要的角色^[8]。植物和微生物中发现的醛酮还原酶似乎还是机体抵抗干旱、盐胁迫和重金属等非生物胁迫的重要因子^[9-10]。目前,国内外对于鱼类醛酮还原酶功能的研究相对贫乏。代海艳等初步探讨了黄鳍醛酮还原酶的羰基解毒作用,发现该酶可有效降低丙酮醛和 2,3-丁二酮等羰基化合物的毒害作用^[11]。但对其是否参与了细胞重金属代谢、盐离子胁迫和活性氧代谢等过程尚不甚清楚。本研究拟通过对比含黄鳍醛酮还原酶 Eakr 菌株和空白质粒菌株,在高渗透压、重金属和氧化 3 种逆境胁迫处理下的存活率及生长活力差异,分析黄鳍醛酮还原酶在细胞非生物胁迫中的保护作用,为深入了解黄鳍醛酮还原酶的生物学功能提供参考资料。

1 材料与方法

收稿日期:2017-08-28

基金项目:湖北省教育厅基金(编号:Q20131206);湿地生态与农业利用教育部工程研究中心开放课题(编号:KF2015016)。

作者简介:阚延泽(1993—),男,江苏徐州人,硕士研究生,主要从事生化与分子生物学研究。E-mail:378053841@qq.com。

通信作者:李 伟,博士,副教授,主要从事鱼类分子生物学研究。E-mail:wetli@yangtzeu.edu.cn。

1.1 试验菌株与试剂

供试菌株含 pET-28a-Eakr 重组质粒 BL21 菌株和 pET-28a 空质粒 BL21 菌株,均由长江大学生物医药研究所保存。抗生素、CuSO₄、NaCl 和 H₂O₂ 等均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组蛋白的诱导表达检测 该试验于 2016—2017 年在长江大学生物医药研究所动物基因组研究室完成,将实验室保存的 pET-28a-Eakr 重组质粒阳性克隆菌株在 LB 平板(含 50 g/mL Kana)上划线,37℃ 过夜培养。在平板上挑取单菌落于 LB 液体培养基(含 50 g/mL Kana)中,37℃ 200 r/min 振荡培养。待培养 D_{600nm} 值至约 0.6 时,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG,37℃ 诱导培养 4 h。使用 12% 的 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白是否表达。

1.2.2 不同胁迫因子处理及存活率、生长活力展示 首先,用 LB 培养基将 pET-28a-Eakr 重组质粒菌株培养至 D_{600nm} 至约为 0.6 时,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 4 h。取 6 个 EP 管,各加入 1 mL 诱导后菌液,同时加入 NaCl,使 NaCl 终浓度分别为 0、50、100、150、200、250 mmol/L,37℃ 150 r/min 培养 1 h。离心收集菌体,用灭菌水洗涤菌体后,使用 1 mL 新鲜 LB 重悬。取 10 μL 菌液进行 10¹、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶……倍梯度稀释。取 50 μL 稀释后的菌液,均匀涂在 LB 平板(含 50 μg/mL Kana)上,于 37℃ 培养箱中恒温培养 12 h。选择菌落数在 500 以内的平板,用菌落分析仪进行计数。根据稀释倍数,计算不同浓度 NaCl 处理后大肠杆菌的存活个数。存活率 Sr = (非生物胁迫后菌落总数/空白对照菌落总数) × 100%。

斑点展示法表征菌落生长活力:将不同胁迫条件处理后的菌液进行 1 倍、10 倍、100 倍、1 000 倍稀释,取 5 μL 点在 LB 平板(含 50 μg/mL Kana)上,于 37℃ 培养箱中培养,12 h 后将平板放入菌落分析仪中拍照并保存。将含 pET-28a 空质粒菌株(WT)做以上相同处理,每个处理重复 3 次。

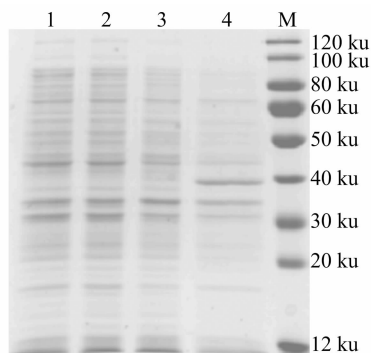
同样采用类似方法进行 CuSO₄、H₂O₂ 的液体培养和斑点形成展示。CuSO₄ 胁迫处理终浓度为 0、2、4、6、8、10 mmol/L, H₂O₂ 胁迫处理终浓度为 0、1、2、4、8、16 mmol/L。

1.2.3 数据处理与分析 采用 SPSS 20.0 进行数据处理和统计学分析,存活率均用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 检测诱导表达结果

SDS-PAGE 凝胶电泳检测结果显示,含 pET-28a-Eakr BL21 阳性菌株经诱导后可检测到分子量约为 38 ku 的特异条带,大小与预测 Eakr 分子量相符,空质粒菌株诱导后未检测到类似分子量蛋白表达。证明 Eakr 在大肠杆菌中实现了高效表达(图 1)。



1—空质粒菌株; 2—空质粒菌株诱导;
3—Eakr 重组菌株; 4—Eakr 重组菌株诱导
图1 SDS-PAGE 检测 Eakr 蛋白表达

2.2 非生物胁迫对 Eakr 表达菌生长的影响

将 Eakr 表达菌株和空白质粒菌株同时进行 NaCl 胁迫处理,通过菌落计数仪记录存活菌落数目,计算存活率并进行数据处理。高盐环境严重影响大肠杆菌的存活率,随着 NaCl 浓度的升高,空白质粒菌株的存活率显著降低,Eakr 表达菌株存活率变化较小。当 NaCl 浓度 ≥ 100 mmol/L 时,Eakr 表达菌株和空白质粒菌株存活率差异显著。当 NaCl 浓度为 250 mmol/L 时 Eakr 表达菌株的存活率约为空白质粒菌株的 20 倍(图 2)。斑点展示结果表明,不同浓度的 NaCl 胁迫对 Eakr 表达菌株生长影响较小,但对空白质粒菌株影响显著。Eakr 表达菌株的生长活力明显优于空白质粒菌株。这与 NaCl 胁迫下存活率统计结果吻合。说明 Eakr 可以提高大肠杆菌对高渗透压胁迫的耐受性(图 3)。

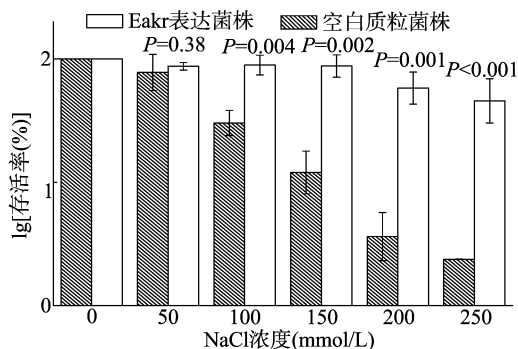


图2 NaCl 胁迫下大肠杆菌的存活率

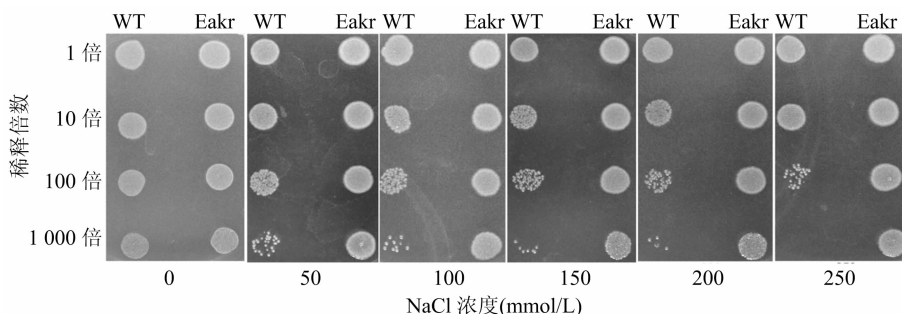


图3 NaCl 胁迫下大肠杆菌的生长活力

Cu^{2+} 胁迫试验发现,随着 Cu^{2+} 浓度的不断升高,Eakr 表达菌株和空白质粒菌株的存活率均有下降,但空白质粒菌株存活率下降得更为显著,且 Eakr 表达菌株的存活率均高于空白质粒菌株。当 Cu^{2+} 浓度 ≥ 4 mmol/L 时,Eakr 表达菌株的存活率远高于空白质粒菌株的存活率,且差异极显著。在 Cu^{2+} 浓度为 10 mmol/L 时,Eakr 表达菌株的存活率为空白质粒菌株存活率的 500 倍(图 4)。斑点展示结果进一步证实,不同浓度 Cu^{2+} 胁迫下,Eakr 表达菌株均比空白质粒菌株生长旺盛,当 Cu^{2+} 浓度 > 8 mmol/L 时,空白质粒菌株已无明显菌落,但 Eakr 表达菌株仍有部分存活,这与 Cu^{2+} 胁迫下存活率统计结果一致(图 5)。说明 Eakr 的表达可提高大肠杆菌对耐 Cu^{2+} 胁迫的耐受性。

比较 Eakr 表达菌株和空白质粒菌株在不同浓度 H_2O_2 胁迫下的存活率发现,随着 H_2O_2 浓度的不断升高,Eakr 表达菌株和空白质粒菌株的存活率均有下降,但空白质粒菌株存活率下降得更为显著,且 Eakr 表达菌株的存活率均高于空白质粒菌株。在 H_2O_2 浓度为 16 mmol/L 时,Eakr 表达菌株的存

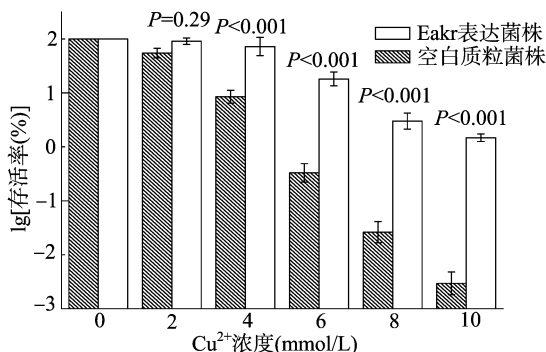
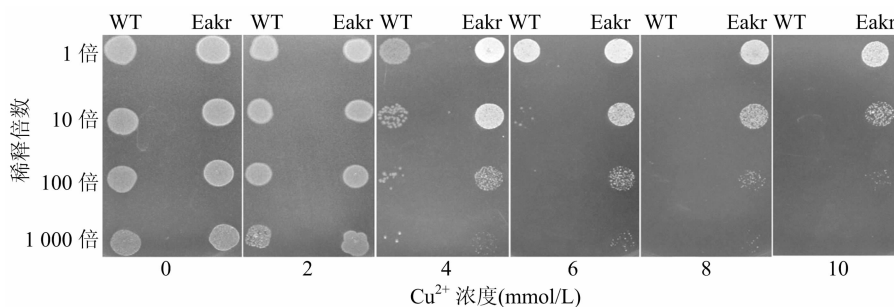
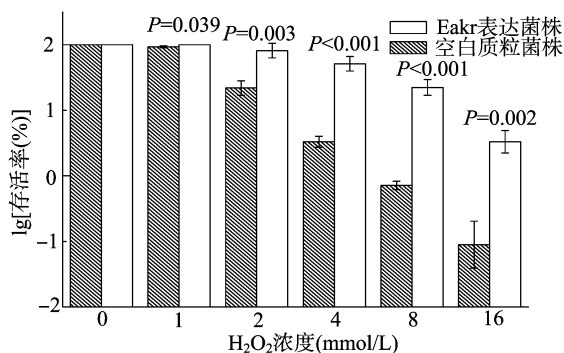
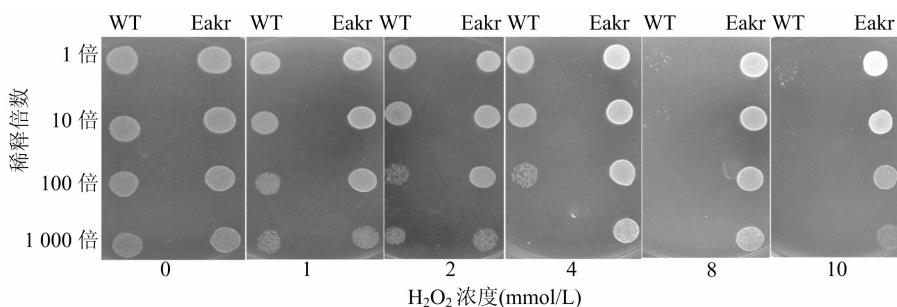


图4 Cu^{2+} 胁迫下大肠杆菌的存活率

活率为空白质粒菌株存活率的 40 倍(图 6)。Eakr 表达菌株和空白质粒菌株在培养基上的生长状态也存在明显差异,在不同浓度 H_2O_2 下 Eakr 表达菌株均比空白质粒菌株生长茂盛,在 H_2O_2 浓度 ≥ 8 mmol/L 时空白质粒菌株已无明显菌落,但 Eakr 表达菌株的菌落基本完整(图 7)。说明 Eakr 的表达可以显著提高大肠杆菌对氧化胁迫的耐受性。

图5 Cu^{2+} 胁迫下大肠杆菌的生长活力图6 H_2O_2 胁迫下大肠杆菌的存活率图7 H_2O_2 胁迫下大肠杆菌的生长活力

的耐受性^[9]；醛酮还原酶 AKR17A1 在大肠杆菌中表达，显著提高了大肠杆菌对镉、砷、干旱、盐及高温等非生物胁迫下的耐受性^[17]，以上研究均显示，醛酮还原酶在细胞非生物胁迫中起到关键保护作用。笔者的研究结果也证实，重组黄鳍醛酮还原酶 Eakr 赋予重组大肠杆菌较强的抗高渗透压、氧化胁迫及重金属伤害的能力。在 Eakr 的保护下，大肠杆菌在 NaCl、 Cu^{2+} 和 H_2O_2 胁迫中的生存率分别提高了 20、500、40 倍。这些结果提示，黄鳍体内的醛酮还原酶可能也是一种重要的机体抵御胁迫危害的保护酶。但 Eakr 在生物体内的具体作用及调控机制尚不明确，需要进一步深入研究。笔者的研究为鱼类醛酮还原酶的生物学功能研究提供了参考资料。

参考文献：

- [1] Ellis E M. Microbial aldo - keto reductases[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 216(2): 123 - 131.
- [2] Penning T M. The aldo - keto reductases (AKRs): Overview[J]. Chemico - Biological Interactions, 2015, 234: 236 - 246.
- [3] Lyon R C, Li D, Mcgarvie G, et al. Aldo - keto reductases mediate constitutive and inducible protection against aldehyde toxicity in human neuroblastoma SH - SY5Y cells [J]. Neurochemistry

3 讨论和结论

醛酮还原酶广泛分布于原核和真核生物中，具有多种生物学功能^[12]。大部分 AKR 都能以醛类物质作为底物^[13]，是一类重要的解毒酶^[14]。人类肝脏 AKR7A 可以代谢黄曲霉素等强致癌物质，在肝脏抗氧化过程中起到关键作用^[4]；蓝藻醛酮还原酶基因 AKR3G1 能够催化还原脂质氧化过程中产生的有毒羰基化合物^[15]；野生大麦表达外源基因拟南芥 AKR4C9 时，可以显著提高对重金属铬和盐胁迫的耐受性^[16]；同时在大肠杆菌中表达醛酮还原酶基因 ALDRXV4，显著提高了对高盐、高渗透压、重金属和醛类物质等非生物胁迫环境下

International, 2013, 62(1): 113 - 121.

- [4] Li D, Ferrari M, Ellis E M. Human aldo - keto reductase AKR7A2 protects against the cytotoxicity and mutagenicity of reactive aldehydes and lowers intracellular reactive oxygen species in hamster V79 - 4 cells[J]. Chemico - Biological Interactions, 2012, 195(1): 25 - 34.
- [5] Li D, Ellis E M. Aldo - keto reductase 7A5 (AKR7A5) attenuates oxidative stress and reactive aldehyde toxicity in V79 - 4 cells[J]. Toxicology in Vitro, 2014, 28(4): 707 - 714.
- [6] Zhang W, Li H, Yang Y, et al. Knockdown or inhibition of aldo - keto reductase 1B10 inhibits pancreatic carcinoma growth via modulating Kras - E - cadherin pathway[J]. Cancer Letters, 2014, 355(2): 273 - 280.
- [7] Ruiz F X, Moro A, Gallego O, et al. Human and rodent aldo - keto reductases from the AKR1B subfamily and their specificity with retinaldehyde[J]. Chemico - Biological Interactions, 2011, 191(1/2/3): 199 - 205.
- [8] Weng J, Cao Y, Moss N, et al. Modulation of voltage - dependent Shaker family potassium channels by an aldo - keto reductase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(22): 15194 - 15200.
- [9] Kumar D, Singh P, Yusuf M A, et al. The *Xerophyta viscosa* aldose reductase (ALDRXV4) confers enhanced drought and salinity

石洪玥,陆颖,卢正义,等.不同盐度下5种中草药对2种水产动物致病菌的抑菌效果比较[J].江苏农业科学,2019,47(1):162-165.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.01.039

不同盐度下5种中草药对2种水产动物致病菌的抑菌效果比较

石洪玥¹,陆颖¹,卢正义²,王庆奎¹,孙学亮¹

(1.天津市水产生态及养殖重点实验室/天津农学院水产学院,天津300384;2.天津市晨辉饲料有限公司,天津301800)

摘要:采用牛津杯法比较不同盐度(0、1%、2%、3%、4%)下五倍子、石榴皮、诃子、黄芩、乌梅5种中草药对迟缓爱德华氏菌和嗜水气单胞菌的抑菌效果,测定了最小抑菌浓度。结果表明,5种中草药对迟缓爱德华氏菌和嗜水气单胞菌都有不同程度的抑菌效果,其中黄芩和五倍子抑菌作用较强,乌梅抑菌作用较差,而诃子和石榴皮的抑菌作用一般,但石榴皮对嗜水气单胞菌的抑菌作用较为明显。不同盐度下,5种中草药对这2种致病菌的最小抑菌浓度(MIC)有差异。高盐度时,5种中草药对迟缓爱德华氏菌的MIC较低,均 ≤ 25 mg/mL,抑菌效果较好;而低盐度时,各个中草药MIC均在25 mg/mL及以上,抑菌效果较差。在盐度为0时,5种中草药对嗜水气单胞菌的MIC最低,抑菌效果最好。

关键词:盐度;中草药;迟缓爱德华氏菌;嗜水气单胞菌抑菌;抑菌效果

中图分类号:S942;S941.42 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)01-0162-04

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)是2种常见的水产动物致病菌,引起水产动物大量死亡,对水产产业造成重大威胁^[1-5]。目前,对于各种水产动物致病菌的防御多采用抗生素和化学药物,但抗生素和化学药物长时间使用具有诸多弊端,如增强致病菌的耐药

性、造成养殖动物体内药物残留量日趋增多、使养殖水环境受到污染、引起过敏反应等,这些都导致抗生素和化学药物的使用受到限制^[6-7]。

近年来,越来越多的中草药被用于防治细菌性传染病。中草药作为一种天然药物,可直接作用于细菌等微生物的结构和代谢而发挥其抗菌作用。研究表明,许多中草药具有明显的杀菌抑菌作用,并具有无抗药性、无残留及不会引起药源性等疾病等优点^[8-10]。开展抗菌中草药的筛选和应用研究对于动物细菌性疾病的防治具有重要意义^[11]。

目前,关于中草药对水产动物致病菌的抑菌、杀菌研究报道较多^[12-17],但中草药在不同盐度下的抑菌、杀菌作用未见报道。鉴于水体盐度对中草药的抑菌效果影响较大^[6],因此研究中草药在不同盐度下的抑菌效果,更具指导意义。本试验在现有报道的基础上^[6-9,11-15],筛选出五倍子(*Rhus chinensis*)、乌梅(*Scutellaria baicalensis*)、石榴皮(*Terminalia*

收稿日期:2017-09-12

基金项目:天津市应用基础与前沿技术研究计划(重点项目)(编号:15JCZDJC33600、15JCZDJC34000);天津市水产产业技术体系创新团队(编号:ITTFRS2017004、ITTFRS2017003);天津市种业科技重大专项(编号:16ZXZYN00120)。

作者简介:石洪玥(1986—),女,辽宁本溪人,硕士,实验师,主要从事水产养殖研究。Tel:(022)23787855;E-mail:youyan_shy@126.com。

通信作者:王庆奎,博士,副教授,主要从事水产养殖研究。Tel:(022)23781299;E-mail:wangqk@tjau.edu.cn。

tolerance to transgenic tobacco plants by scavenging methylglyoxal and reducing the membrane damage[J]. Molecular Biotechnology,2013,54(2):292-303.

[10]Éva C, Solti Á, Oszvald M, et al. Improved reactive aldehyde, salt and cadmium tolerance of transgenic barley due to the expression of aldo-keto reductase genes[J]. Acta Physiologiae Plantarum,2016,38(4):1-10.

[11]代海艳,江翱,李伟.黄芩醛还原酶的羧基解毒作用初探[J].江苏农业科学,2017,45(1):150-152.

[12]Jez J M, Penning T M. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update[J]. Chemico-Biological Interactions,2001,130-132:499-525.

[13]Barski O A, Tipparaju S M, Bhatnagar A. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification[J]. Drug Metabolism Reviews,2008,40(4):553-624.

[14]Mindnich R D, Penning T M. Aldo-keto reductase (AKR) superfamily:genomics and annotation[J]. Human Genomics,2009,3(4):362-370.

[15]Hintzpeter J, Martin H J, Maser E. Reduction of lipid peroxidation products and advanced glycation end-product precursors by cyanobacterial aldo-keto reductase AKR3G1-a founding member of the AKR3G subfamily[J]. FASEB Journal,2015,29(1):263-273.

[16]Éva C, Tóth G, Oszvald, et al. Overproduction of an *Arabidopsis* aldo-keto reductase increases barley tolerance to oxidative and cadmium stress by an *in vivo* reactive aldehyde detoxification[J]. Plant Growth Regulation,2014,74(1):55-63.

[17]Agrawal C, Sen S, Yadav S, et al. A novel Aldo-Keto reductase (AKR17A1) of *Anabaena* sp. PCC 7120 degrades the rice field herbicide butachlor and confers tolerance to abiotic stresses in *E. coli*[J]. PLoS One,2015,10(9):e0137744.