

网络出版时间:2022-7-28 15:48 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220727.1758.021.html

人 G6PD 在大肠埃希菌中的表达及 体外抑制剂筛选模型的建立

金科华^{1,2}, 游云悠³, 魏友煜³, 左越³, 柯志强¹, 尧青¹, 刘洁⁴

摘要 目的 表达人 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PD)并建立其体外抑制剂筛选模型。方法 设计一对 5'端分别带 *Nde* I、*Xho* I 位点的引物,PCR 扩增 G6PD cDNA。将 cDNA 和质粒 pET-28a 经 *Nde* I + *Xho* I 酶切后连接,连接产物转化大肠杆菌 Top10。将鉴定的重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3),用 0.4 mmol/L IPTG 诱导 G6PD 表达,镍离子亲和层析柱纯化 G6PD。以 6-磷酸葡萄糖(G6P)和烟酰胺腺嘌呤核苷二磷酸(NADP⁺)为 G6PD 的底物和辅因子,检测 340 nm 波长处光吸收值(A_{340})的变化,确定 G6PD 及其抑制剂脱氢表雄酮(DHEA)的最佳浓度,计算模型的可靠性指数—Z'因子。结果 构建了重组质粒 pET-28a-G6PD,重组菌 BL21(DE3)-pET-28a-G6PD 经 IPTG 诱导后,可溶性 G6PD 表达量为 2.5 mg/L,G6PD/DHEA 的最适浓度分别为 900 μ g/L、20 μ mol/L,筛选模型的 Z'因子为 0.88。结论 在大肠杆菌中表达了有活性的 G6PD,建立了可靠的体外抑制剂筛选模型。

关键词 6-磷酸葡萄糖脱氢酶;抑制剂;筛选模型

中图分类号 Q 554.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)08-1289-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.021

多数肿瘤细胞有两大代谢特征,一是通过从头合成途径合成^[1]核苷酸;二是脂肪酸合成旺盛。磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway,PPP)的中间产物 5-磷酸核糖和 NADPH 分别是核苷酸和脂肪酸合成的必须原料。抑制 PPP 可抑制肿瘤细胞 DNA 合成和脂肪酸合成,抑制肿瘤细胞的增殖。6-磷酸葡萄糖脱氢酶(glucose 6-phosphate dehydrogenase, G6PD)是 PPP 的限速酶,催化 6-磷酸葡萄糖(glucose 6-phosphate, G6P)和 NADP⁺ 转化为 6-磷酸葡

萄糖酸内酯和 NADPH(在 340 nm 波长处有特征吸收值)。高活性的 G6PD 与肿瘤发展和不良预后密切相关^[2-3],G6PD 缺失与肿瘤的生长呈负相关^[4-5]。6-氨基烟酰胺通过抑制 G6PD,诱导肿瘤细胞产生氧化性胁迫,提高肿瘤对抗癌药物和放疗的敏感性^[6-8]。脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)通过抑制 G6PD 能有效抑制肿瘤增殖^[9]。然而,DHEA 治疗非小细胞肺癌时,易导致患者产生严重的抑郁和疲倦^[10],6-氨基烟酰胺有神经毒性^[11],限制了它们在临床上的应用,故发现更多靶向 G6PD 的抑制剂具有重要意义。为此,拟在原核生物中表达人 G6PD,并建立其体外抑制剂筛选模型,为发现 G6PD 抑制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料 大肠杆菌 BL21(DE3)、质粒 pET-28a 为湖北科技学院基础医学院保存。G6PD cDNA(与 Genbank 中 NM_001360016.2 的 G6PD 序列一致)由厦门大学生命科学学院提供。DNA 聚合酶、DNA 连接试剂盒购自 TaKaRa(大连)公司。大肠杆菌 Top10 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。引物、质粒抽提试剂盒、卡那霉素(Kana)、凝胶回收试剂盒、G6P、NADP 购自上海生工生物工程有限公司。快速限制酶购自美国 Fermentas 公司,镍离子亲和层析柱购自美国 GE 公司。DHEA 购自美国 Sigma 公司。兔抗人 G6PD IgG 单克隆抗体(一抗)购自杭州 Epitomics 公司,HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(简称二抗)购自北京中杉金桥公司。

1.2 主要仪器 Eppendorf 5425 R 微量离心机(美国 eppendorf 公司);HERMLE Labortechnik GmbH Z 32 HK 离心机(德国 HERMLE 公司);TS-1000 PCR 仪、蛋白质电泳及转印系统(美国 Bio-Rad 公司);DYY-6C 电泳仪电源、DYCP-31DN 型琼脂糖水平电泳仪(北京六一生物科技股份有限公司);JY92II DN 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)

2022-04-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:90913024);湖北省大学生创新训练项目(编号:S201910927036);湖北科技学院糖尿病专项开放课题(编号:L07903/170136)

作者单位:湖北科技学院¹ 糖尿病与血管病变湖北省重点实验室、² 医学部基础医学院、³ 医学部基础医学院 2018 级卓越医师班、⁴ 医学部健康医学院,咸宁 437100

作者简介:金科华,男,博士,副教授;

刘洁,女,实验师,责任作者,E-mail: liujiejxq@126.com

司)。

1.3 PCR 扩增 G6PD cDNA 根据 G6PD cDNA 序列,设计上游引物 P1:5'-CGACATATGATGGCAGAGCAGGTGGCCCTG-3',下游引物 P2:5'-ACGCTCG-AGTCAGAGCTTGTGGGGTTTAC-3'。下划线序列分别为 *Nde* I、*Xho* I 位点。PCR 反应体系:H₂O 40.5 μl, 10 × Pyrobest Buffer 5 μl, dNTP Mixture (2.5 mmol/L each) 2 μl, P1 (10 μmol/L)、P2 (10 μmol/L) 各 1 μl, G6PD cDNA 0.25 μl (90 ng), Pyrobest DNA polymerase 0.25 μl。PCR 循环条件:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 循环 30 次;72 °C 修复延伸 10 min。将 PCR 产物进行电泳检测,并按 DNA 凝胶回收试剂盒回收。

1.4 G6PD cDNA 和 pET-28a 的酶切与回收 G6PD cDNA 酶切反应:H₂O 16 μl, cDNA 25 μl, 10 × FD Buffer 5 μl, *Nde* I 和 *Xho* I 各 2 μl, 37 °C 保温 3 h。质粒酶切反应:H₂O 42 μl, pET-28a 8 μl (800 ng), 10 × Buffer 6 μl, *Nde* I 和 *Xho* I 各 2 μl, 37 °C 保温 3 h。酶切的 cDNA 和质粒按凝胶回收试剂盒回收。

1.5 目的基因与载体的连接及转化 取 1.4 酶切的 pET-28a 和 G6PD 各 2.5 μl、DNA 连接试剂盒之 Solution I 5 μl, 混匀, 16 °C 连接 3 h。将 100 μl Top10 感受态细胞冰浴解冻,将 5 μl 连接产物加入感受态细胞,轻吸混匀,按冰浴 30 min、-42 °C 60 s、-冰浴 2 min 的程序转化,向转化后的菌液中,加入 500 μl LB 培养基,200 r/min 37 °C 活化菌体 1 h。取 100 μl 菌液,涂布于含 50 μg/ml Kana 的 LB 平板(抗性平板),筛选重组子。

1.6 重组质粒的酶切和测序鉴定 取 1.5 筛选的单菌落两个,分别接种于两支 4 ml 抗性(50 μg/ml Kana) LB, 37 °C、220 r/min 培养 10 h。取菌液 1 ml,按质粒抽提试剂盒提取质粒,记为 pG1、pG2。质粒双酶切鉴定:pG1(或 pG2,或 pET-28a) 8 μl, *Nde* I、*Xho* I 各 1 μl, 10 × FD Buffer 2 μl, H₂O 8 μl, 37 °C 酶切 2 h。将酶切产物于 1% 的琼脂糖进行电泳鉴定。委托广州英维捷基公司对酶切阳性的质粒测序。

1.7 IPTG 诱导表达 G6PD 取 pG1 10 ng,按 1.5 的方法转化 BL21(DE3) 感受态细胞,筛选单菌落。取抗性菌落 1 个,记为 BL21-pG1,接种于 4 ml 抗性

LB, 37 °C、250 r/min 培养 10 h,作母液。将母液按 1:100 平行接种 2 份于 100 ml 抗性 LB 中,37 °C、250 r/min 培养至 A₆₀₀ 为 0.6。诱导组加入 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L,对照组加等体积的无菌水。两份菌液于 37 °C、250 r/min 培养 5 h。10 000 r/min 室温离心 1 min(下称离心),去上清液,沉淀用 PBS 洗涤两次。离心,去 PBS 上清液,沉淀用 30 ml、100 mmol/L、pH7.5 Tris-HCl 重悬。按 225 W 功率、超声 2 s、停 4 s 的程序,冰浴超声重悬的沉淀 30 min。以 4 °C、13 000 r/min 离心超声处理菌体 10 min。取上清液 600 μl,与 200 μl 4 × Loading Buffer 混匀,100 °C 变性 10 min,取 20 μl 变性蛋白进行 SDS-PAGE 检测。

1.8 G6PD 的纯化 取镍离子层析珠 0.5 ml,弃去保存液,用超纯水洗涤 2 次。在 4 °C 冰箱中,将层析珠与裂解液上清液混合 30 min,流出未结合的蛋白。依次用含 20、40、80 mmol/L 咪唑的 100 mmol/L、pH7.5 Tris-HCl 洗涤层析珠。加 25 ml 洗脱液(含 200 mmol/L 咪唑的 100 mmol/L、pH7.5 Tris-HCl)洗脱 G6PD。取 600 μl 洗脱液,200 μl 4 × Loading Buffer,混匀,100 °C 加热变性 10 min, 13 000 r/min 室温离心 2 min,取上清液。按 Millipore 超滤管(截留分子量 10 ku)说明书,将洗脱液超滤浓缩至约 500 μl。用 BCA 法测定浓缩蛋白浓度。取 450 μl 浓缩蛋白与 50 μl 甘油混匀,分装后 -80 °C 保存。

1.9 Western blot 检测 G6PD 取 1.6 和 1.7 的变性蛋白样品各 10 μl,于 10% 的分离胶进行 SDS-PAGE。将分离的蛋白湿法恒压 120 V × 1 h 电转至 PVDF 膜。将 PVDF 膜浸于 5 % BSA 中,室温处理 1 h,将 1:1 000 稀释的 G6PD 一抗与 PVDF 膜 4 °C 孵育过夜。取出 PVDF 膜,用 TBST 洗涤 3 次 × 10 min。加入 1:5 000 稀释的二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次 × 10 min。用 ECL 覆盖 PVDF 膜,于 Bio-Rad 公司的 ChemiDoc XRS + 成像系统中检测条带信号。

1.10 G6PD 抑制剂体外筛选模型的建立 确定 G6PD 最佳浓度。按文献^[8]配制 G6PD 反应缓冲液(G6PD buffer, GB)。用 GB 配置 4 mmol/L G6P 和 2 mmol/L NADP,将适量的 G6P 和 NADP 等体积混匀,作为底物混合液,4 °C 避光待用。冰浴解冻 -80 °C 保存的 G6PD。向 96 孔板中的加入底物混合液 190 μl,置 Varioskan Flash 微孔板读数仪(赛默飞世

尔,美国),37℃预热10 min。每孔分别加入10 μ l 不稀释、稀释5倍、稀释25倍的G6PD(终浓度依次为22.5、4.5、0.9 μ g/ml)或10 μ l GB,混匀,每30 s测定一次 A_{340} ,测定6 min,绘制Time- A_{340} 曲线,确定最佳G6PD浓度。

确定阳性对照DHEA的最佳浓度。向96孔板中加入:底物混合液180 μ l,浓度分别为200、40、8 μ mol/L的DHEA溶液(终浓度分别为10、2、0.4 μ mol/L)或DMSO各10 μ l,最适浓度G6PD 10 μ l。按上述程序测定 A_{340} ,绘制Time- A_{340} 曲线。按文献^[12]计算模型的可靠性因子—Z'因子,确定最佳DHEA浓度。以上实验均为三次生物学重复。

1.11 统计学处理 用EXCEL 2013计算重复测定的数据的平均值、标准差。

2 结果

2.1 pET-28a-G6PD的构建 PCR产物分子量介于1 400~1 600 bp,与G6PD cDNA分子量(1 569 bp)一致(图1A),对照组无扩增产物。双酶切的pG1、pG2均产生两条带,小带分子量介于1 000~2 000 bp,与G6PD cDNA分子量相符;大带分子量与pET-28a(5 369 bp)酶切片段相符(图1B)。测序结果与G6PD cDNA序列一致。可见G6PD cDNA正确插入pET-28a质粒。

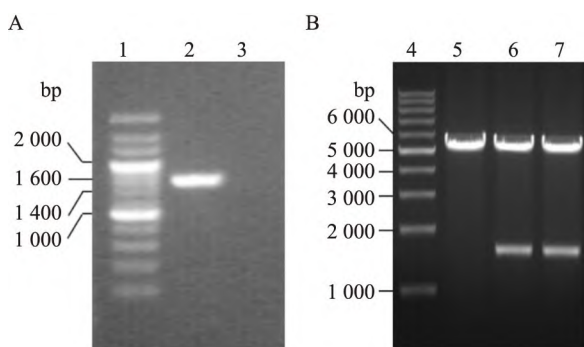


图1 pET-28a-G6PD的构建

A:PCR扩增G6PD cDNA;B:酶切鉴定重组质粒;1:200 bp DNA ladder; 2:G6PD cDNA PCR产物;3:对照; 4:1kb DNA ladder;5:pET-28a *Nde* I + *Xho* I酶切; 6:pG1 *Nde* I + *Xho* I酶切;7:pG2 *Nde* I + *Xho* I酶切

2.2 表达产物的鉴定 人G6PD分子量约58 ku,重组G6PD(recombinant G6PD, rG6PD)较之G6PD多出由载体翻译产生的29个氨基酸(分子量约3 ku),故rG6PD分子量约61 ku。由图2A可见,经IPTG诱导的BL21-pG1裂解液上清液及纯化产物有

61 ku左右蛋白条带(箭头示),与rG6PD分子量相符,未经IPTG诱导时无61 ku的条带。经quantity one软件分析,纯化的G6PD总蛋白的84%。Western blot结果提示,经IPTG诱导后,BL21-pG1裂解液上清及纯化产物均存在61 ku条带(箭头示),与rG6PD分子量相符(图2B)。浓缩的rG6PD浓度为0.5 mg/ml,可知rG6PD总量为0.25 mg,故其表达量为2.5 mg/L。

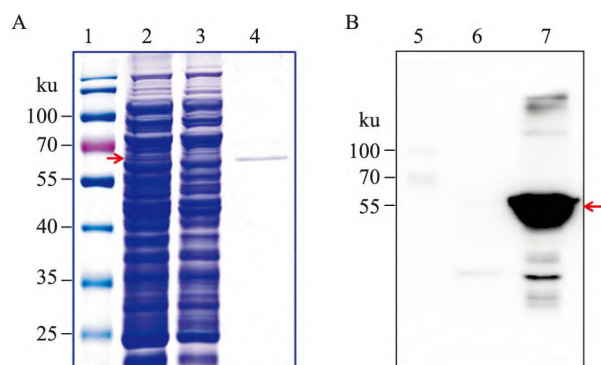


图2 鉴定G6PD表达产物

A:SDS-PAGE鉴定rG6PD;B:Western blot鉴定rG6PD; 1: protein marker; 2: BL21-pG1经0.4 mmol/L IPTG诱导后裂解液上清; 3: BL21-pG1未经IPTG诱导后裂解液上清; 4:纯化的rG6PD;5: protein marker; 6:BL21-pG1 0.4 mmol/L IPTG诱导后裂解液上清; 7:纯化的rG6PD

2.3 G6PD抑制剂体外筛选模型的建立

2.3.1 G6PD最佳浓度的确定 不同G6PD浓度的时间- A_{340} 曲线见图3。不加G6PD时,保温过程中 A_{340} 无变化。随G6PD浓度增大, A_{340} 升高速度加快。在测定起点,22.5、4.5、0.9 μ g/ml G6PD组 A_{340} 相同。反应0.5 min,三种G6PD浓度的 A_{340} 升高值(ΔA_{340})依次为0.202、0.015、0.010;反应0.5~1 min, ΔA_{340} 依次为0.076、0.015、0.01;反应1~1.5 min, ΔA_{340} 依次为0.028、0.015、0.01。可见22.5 μ g/ml G6PD浓度过大,最大反应速度发生在加入酶液后的30 s(甚至更短时间)内,因G6P被大量氧化,其浓度急剧降低,产物6-磷酸葡萄糖酸内酯急剧升高,导致反应速度快速下降。反应前3 min内,4.5、0.9 μ g/ml G6PD组 ΔA_{340} 分别恒定为0.015、0.010;反应3~6 min,4.5 μ g/ml G6PD组每30 s内 ΔA_{340} 逐步下降,0.9 μ g/ml G6PD组 ΔA_{340} 仍恒定为0.010。22.5 μ g/ml G6PD组无法通过 ΔA_{340} 来观测酶活力,不适合抑制剂的筛选;4.5、0.9 μ g/ml G6PD组前3 min均能通过 ΔA_{340} 的变化来观

测 G6PD 酶活力,但 0.9 $\mu\text{g/ml}$ G6PD 组 ΔA_{340} 恒定时间更长,便于操作,故稀释 25 倍是 G6PD 的最佳浓度(900 $\mu\text{g/L}$)。

2.3.2 最佳 DHEA 浓度的确定 不同 DHEA 浓度的时间 - A_{340} 曲线如图 4,随 DHEA 浓度增大, A_{340} 升高速度逐步变慢。20、2、0.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 DHEA 对 G6PD 的抑制率分别为 $(80.7 \pm 0.2)\%$, $(40.1 \pm 1.7)\%$, $(19.6 \pm 1.0)\%$;模型的 Z' 因子分别为 0.88、0.74、0.18。 Z' 因子低于 0.5 时,模型不可靠; Z' 因子越大,模型可靠性越高。可见,当 DHEA 为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, Z' 因子最符合高通量筛选要求。故 DHEA 最佳浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。

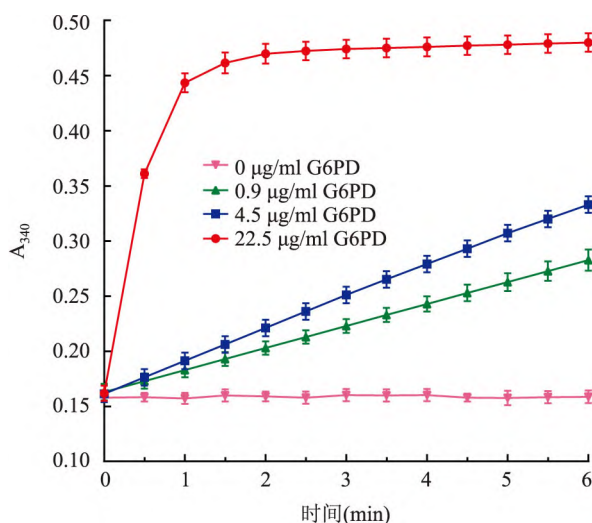


图3 不同 G6PD 浓度的时间 - A_{340} 曲线

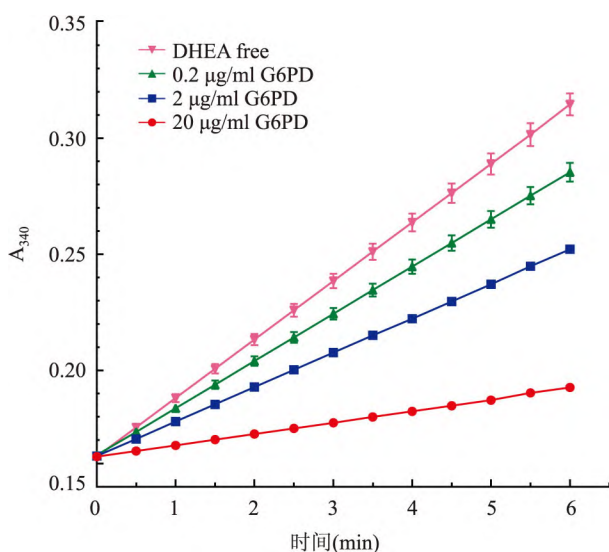


图4 不同 DHEA 浓度的时间 - A_{340} 曲线

3 讨论

本研究构建了大肠杆菌表达载体 pET-28a-G6PD,重组菌 BL21-pG1 经 0.4 mmol/L IPTG 诱导表达、镍离子亲和纯化,获得可溶性的 G6PD,产量为 2.5 mg/L。以 G6P 为底物、NADP 为辅因子、900 $\mu\text{g/L}$ G6PD 为最佳酶浓度、20 $\mu\text{mol/L}$ DHEA 为阳性对照,建立了高可信度的 G6PD 体外抑制筛选模型,为发现 G6PD 的抑制剂奠定了基础。

BL21-GPG6PD 经 IPTG 诱导后在大肠杆菌中获得了高水平表达,但主要以包涵体形式存在(SDS-PAGE 检测图未列出),可溶性蛋白产量偏低。汪自然等^[13]构建 Luk S-PV 与 GFP 融合蛋白表达载体在大肠杆菌中获得了较高水平的可溶性表达。后续拟将尝试 G6PD 与标签蛋白融合表达、延长诱导时间等措施提高可溶性 G6PD 的产量,以满足大规模抑制剂筛选对酶的需求。

G6PD 纯度为 84%,表明还存在少量杂质蛋白。杂质蛋白可能对酶促反应有一定干扰,为此拟在提高 G6PD 产量的基础上,进一步采用增加分子筛等纯化手段提高 G6PD 的纯度,尽可能降低杂质的干扰。

当底物浓度远大于酶浓度时,酶促反应速度与酶浓度成正比。理论上,22.5、4.5、0.9 $\mu\text{g/ml}$ 的 G6PD 在最大反应速度阶段, ΔA_{340} 的比例应为 25 : 5 : 1,而实际 ΔA_{340} 比例约为 202 : 15 : 10,具体原因需进一步研究。

基于体外筛选模型筛选的抑制剂,尚不能判断其在体内的毒副作用。G6PD 抑制剂筛选模型亦如此,故采用本模型筛选所得的 G6PD 抑制剂,需要进一步观测其体内的毒副作用。

参考文献

- [1] Takezawa K, Okamoto I, Tsukioka S, et al. Identification of thymidylate synthase as a potential therapeutic target for lung cancer [J]. Br J Cancer, 2010, 103(3): 354 - 61.
- [2] Barajas J M, Reyes R, Guerrero M J, et al. The role of miR-122 in the dysregulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) expression in hepatocellular cancer[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 9105.
- [3] Tang Y C, Hsiao J R, Jiang S S, et al. c-MYC-directed NRF2 drives malignant progression of head and neck cancer via glucose-6-phosphate dehydrogenase and transketolase activation[J]. Theranostics, 2021, 11(11): 5232 - 47.

- [4] Cunquero-Tomas A J, Avila-Andrade C D, Milara J, et al. Safe neoadjuvant trastuzumab-based treatment in HER2 + inflammatory early breast cancer in a glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient postmenopausal woman: A case report and review of the literature[J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2020, 26(2): 492–5.
- [5] Pes G M, Errigo A, Soro S, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency reduces susceptibility to cancer of endodermal origin[J]. *Acta Oncol*, 2019, 58(9): 1205–11.
- [6] Sharma P K, Varshney R. 2-Deoxy-D-glucose and 6-aminonicotinamide-mediated Nrf2 down regulation leads to radiosensitization of malignant cells via abrogation of GSH-mediated defense[J]. *Free Radic Res*, 2012, 46(12): 1446–57.
- [7] Sharma P K, Dwarakanath B S, Varshney R. Radiosensitization by 2-deoxy-D-glucose and 6-aminonicotinamide involves activation of redox sensitive ASK1-JNK/p38MAPK signaling in head and neck cancer cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(7): 1500–13.
- [8] Hong W, Cai P, Xu C, et al. Inhibition of Glucose-6-Phosphate dehydrogenase reverses cisplatin resistance in lung cancer cells *via* the redox system[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:43.
- [9] Matsuzaki Y, Honda A. Dehydroepiandrosterone and its derivatives: potentially novel anti-proliferative and chemopreventive agents[J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(26): 3411–21.
- [10] Fang Y H, Hsieh M J, Hung M S, et al. Low concentrations of dehydroepiandrosterone sulfate are associated with depression and fatigue in patients with non-small-cell lung cancer after chemotherapy[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2020, 16:2103–9.
- [11] Penkowa M, Quintana A, Carrasco J, et al. Metallothionein prevents neurodegeneration and central nervous system cell death after treatment with gliotoxin 6-aminonicotinamide[J]. *J Neurosci Res*, 2004, 77(1): 35–53.
- [12] Zhang J-H, Chung T D Y, Oldenburg K R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays[J]. *J Biomol Screening*, 1999, 4(2): 67–73.
- [13] 汪自然, 常文娇, 戴媛媛, 等. 金黄色葡萄球菌 LukS-PV-GFP 融合蛋白的载体构建及表达纯化[J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(12):1903–7.

Express human G6PD in *E. coli* and develop its inhibitor screening assay *in vitro*

Jin Kehua^{1,2}, You Yunyou³, Wei Youyu³, Zuo Yue³, Ke Zhiqiang¹, Yao Qing¹, Liu Jie⁴

(¹Hubei Key Laboratory of Diabetes and Angiopathy, ²School of Basic Medical Sciences, Xianning Medical College, ³2018 Excellent Physician Class of School of Basic Medical Sciences, Xianning Medical College, ⁴School of Medicine and Health Sciences, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100)

Abstract Objective To express human glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and establish its inhibitor screening model *in vitro*. **Methods** G6PD cDNA was amplified by PCR with a couple of primers flanked with *Nde* I and *Xho* I site at their 5' terminals, respectively. G6PD cDNA and pET-28a plasmids were digested by *Nde* I and *Xho* I, and then linked. The linked products were transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) Top10. Recombinant plasmids were identified and transformed into *E. coli* BL21 (DE3), the expression of G6PD was induced by 0.4 mmol/L IPTG, recombinant G6PD was purified by Ni²⁺ affinity column. Glucose 6-phosphate and NADP⁺ were used as substrate and coenzyme of G6PD, respectively. G6PD's activity was observed by the shift of A₃₄₀ of NADPH. The model was optimized to give the greatest performing concentration of G6PD and dehydroepiandrosterone (G6PD's inhibitor). **Results** Recombinant plasmid pET-28a-G6PD was constructed, soluble G6PD was expressed in BL21 (DE3) with a yield of 2.5 mg/L *via* the induction of IPTG. The optimum G6PD concentration was 900 µg/L. The high Z' score of 0.88 was achieved using 20 µmol/L DHEA as positive control. **Conclusion** Active G6PD is expressed in *E. coli*, and this assay is highly suitable for screening of G6PD inhibitor *in vitro*.

Key words 6-phosphate dehydrogenase; inhibitor; screening assay