

真核低分子量尿激酶原突变体基因在大肠杆菌中的高效表达

焦建伟, 俞梅敏, 茹炳根*

(北京大学生命科学学院, 蛋白质工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 通过一种融合抗栓肽的低分子量尿激酶原的突变体(DscuPA-32K)在大肠杆菌中表达的研究,进行了一系列不同条件下的实验。DscuPA-32K在菌株BL21中的表达很低,表达量仅为3%;为提高其表达量,引进一种整合稀有tRNA基因的菌株BL21-CodonPlus™-RIL,增加大肠杆菌中识别稀有密码子的tRNA的数量,DscuPA-32K的表达水平确实有了很大提高,最大表达量约占20%。结果表明,富含稀有密码子的DscuPA-32K在大肠杆菌中表达受限制的因素,完全可以由增加稀有tRNA的数量来克服。免疫印迹分析DscuPA-32K具有良好的抗原性。此表达菌株可能有利于含大肠杆菌稀有密码子的真核基因在大肠杆菌中的表达。

关键词 低分子量尿激酶原,突变体,表达,稀有密码子

中图分类号 Q71,Q786

High Expression of a Eucaryotic scuPA-32 K Mutant Gene in *E. coli*

JIAO Jian-wei, YU Mei-min, RU Bing-gen*

(National Laboratory of Protein Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract The expression of a novel urokinase mutant (DscuPA-32K) was studied which combined low molecular urokinase and antithrombolytic peptide under a series of different conditions. DscuPA-32K could not be expressed highly in BL21 strain and the expression amount accounted for 3%. In order to improve the expression level, a novel strain (BL21-CodonPlus™-RIL) carrying gene for the rare codon tRNA was applied to this expression system to increase the amount of rare tRNA. The expression level was indeed improved a lot and the highest expression amount accounted for 20%. These results showed that the limited factors could be overcome by increasing rare codon amount. Western blot analysis revealed that dscuPA-32K had good antigenicity. And the strain could be beneficial to the expression of eucaryotic gene containing *E. coli* rare codon.

Key words low molecular scuPA, mutant, expression, rare codon

单链尿激酶型纤溶酶原激活剂(Scu-PA)也称尿激酶原(p10-UK),是比较理想的溶栓剂之一。Scu-PA-32K是一种低分子量的Scu-PA,缺少EGF区和KI区,其性质与Scu-PA相似,但分子量较小,稳定性较高,在溶栓中有一定的优越性^[1]。近年来,重组的低分子量尿激酶原cDNA已在CHO细胞^[2,3],昆虫细胞^[4]等多种体系中获得表达,但表达水平都不高,并且生产成本较高。如何利用较低的成本并且提高蛋白表达量,大肠杆菌成为一种首选的用于蛋白质表达的体系。

大肠杆菌是许多外源基因表达常用的宿主菌,但有些真核基因编码的蛋白往往得不到预期的表达效果,其原因可能是大肠杆菌原核类翻译系统与真

核类的翻译系统存在着极大的差异^[5]。大肠杆菌和真核生物相比,其氨基酸密码子的使用频率不同,并且细胞内对应的tRNA量与密码子的使用频率成正比。也就是识别常用密码子的tRNA的含量相对较

收稿日期:2000-09-01,接受日期:2000-10-17

国家863高技术发展计划(No.863-10-2-09)资助项目

*联系人 Tel:(010)62751842,Fax:(010)62751842

E-mail:rulab@pku.edu.cn

焦建伟,男,1973年9月生,博士研究生

Received:September 1,2000;Acceted:October 17,2000

Supported by National High Technology "863" Program of China, No. 863-10-2-09

*Corresponding author Tel:(010)62751842,Fax:(010)62751842

E-mail:rulab@pku.edu.cn

多,识别稀有密码子的 tRNA 含量相对较少^[6]。当大肠杆菌表达外源蛋白质时,如果外源基因转录的 mRNA 中密码子的分配情况与大肠杆菌相似,则细胞能正常进行蛋白质翻译,蛋白在翻译过程中出现错误的频率减少。反之如果 mRNA 带有较多的稀有密码子,大肠杆菌内识别稀有密码子的 tRNA 量不能满足翻译过程的需要,而使外源蛋白在翻译水平上出现移码突变、翻译水平下降等障碍,从而影响基因的表达^[7]。这也就是将许多外源基因设计成大肠杆菌偏爱的密码子的原因之一。

近年来发现,大肠杆菌的稀有密码子^[8]如编码 Arg 的 AGG/AGA,Leu 的 CUA,Ile 的 AUA,Gy 的 GGA,对一些外源蛋白的表达效率产生影响。其中影响最大的是编码 Arg 密码子 AGG/AGA^[9]和 Ile 的密码子 AUA^[10],它们对外源蛋白表达的影响是近年来关于稀有密码子研究的热点之一。

有人尝试过在大肠杆菌中进行表达重组尿激酶原的 cDNA^[11],但表达水平都不高。主要原因是其 cDNA 中含有较多的真核细胞偏爱的密码子,相对于大肠杆菌来说也就是稀有密码子,很难被大肠杆菌中的稀有 tRNA 识别。为了获得重组尿激酶原 cDNA 在大肠杆菌中高效表达,通过在大肠杆菌中引入能转录成稀有 tRNA 的基因,以增加大肠杆菌中稀有 tRNA 的含量,从而提高对转录产物 mRNA 中稀有密码子的识别^[12]。目前最为成熟的方法是将识别稀有密码子的 tRNA 基因整合到大肠杆菌的染色体上,构建新的表达菌株^[13](BL21-CodonPlusTM-RIL),从而达到预期的效果,该菌株整合的基因能编码 tRNAs (Arg,Ile,Leu)。通过低分子量尿激酶原突变体(融合一种抗栓肽的低分子量尿激酶原)的基因在 BL21 和 BL21-CodonPlusTM-RIL 两种菌株的表达量比较,表明低分子量尿激酶原突变体的表达产物确实在 BL21-CodonPlusTM-RIL 菌株中得到明显提高,由原来占菌体总蛋白 3% 提高到 20%,从而解决了低分子量尿激酶原突变体在大肠杆菌中表达量受限制的问题,为进一步的工作提供了有利条件。

1 材料与方法

1.1 材料

低分子量尿激酶原基因由本实验室构建;pUC19 和 IPTG 购自 Promega 公司;pET29a 和 BL21-CodonPlusTM-RIL [*hsdSgal cts857 ind1, sam7, nin5, larvUV-t7 genel, tRNA_{AGA/AGG} gene, tRNA_{AUA} gene, tRNA_{CUA} gene*]由王涛博士(Johns Hopkins University)赠送;限

制性内切酶购自 BioLab 公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 低分子量尿激酶原突变体(DscuPA-32K)构建

合成的 6 段 DNA 片段进行连接,琼脂糖凝胶电泳回收连接产物(编码一种新型的抗栓肽);将片段连接产物,ScuPA-32K 的基因片段,pUC19 载体片段进行体外连接,筛选 DscuPA-32K 重组体。然后通过 PCR 方法将重组尿激酶原基因进行扩增,将酶切产物连接到表达载体 pET29a 中。

1.3 重组尿激酶原 DscuPA-32K 在大肠杆菌中的表达

将含有低分子量尿激酶原突变体的重组质粒转化大肠杆菌,挑取单克隆菌于 37℃ 培养过夜,然后以 1:10 的比例转接到 3 ml 的培养基中,于 37℃ 生长至 A_{600} 为 0.4~0.6(约 2 h),加入 IPTG 进行诱导培养,离心收集菌体。

1.4 SDS-PAGE

参考文献[14],制备 15% 分离胶,5% 浓缩胶,50 V 恒压电泳 5 h,然后用 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.5 表达产物的抗原性测定

将进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后的凝胶取下后,在电转印装置中转印 5 h,然后将转有蛋白的硝酸纤维素膜浸泡于抗 UK 的单克隆抗体腹水中,37℃ 保温 2 h,再加入碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 溶液,37℃ 保温 1 h,最后加入 NBT 储液,BCIP 储液,室温显色 1 h。

2 结果

2.1 低分子量尿激酶原突变体基因的获得

低分子量尿激酶原突变体是嵌入了低分子量尿激酶原和抗栓肽(编码 39 个氨基酸)的重组产物,目的是得到一个既具有溶栓又具有抗栓功能的纤溶酶原激活剂。编码抗栓肽的基因由合成的 6 段 DNA 片段通过体外连接,琼脂糖凝胶电泳回收得到。将连接产物与低分子量尿激酶原,pUC19 连接后转化 DH5⁺,进行蓝白斑筛选,最后筛选到突变体。经限制性内切酶及 DNA 序列分析验证结果正确。DscuPA-32K 总共有 307 个氨基酸组成,接下来是将低分子量尿激酶原突变体克隆到表达载体 pET29a 中进行表达。已经有人通过 pET11d^[15]进行过尿激酶原表达,pET29a 是 pET 系列载体中更为完善的表达载体,SD 序列与起始密码子的距离合适,启动子为 T7 启动子,表达效率高。

2.2 低分子量尿激酶原突变体基因的表达

将上述阳性重组表达质粒转化大肠杆菌,挑取单克隆菌落培养过夜,以 1:10 比例扩大培养 2 h 后,加 IPTG 进行诱导表达.分别比较不同的宿主菌表达的差异.通过 Fig. 1 可以明显发现在不同宿主菌中,DscuPA-32K 的表达量确实存在明显差异.在 BL21-CodonPlus™-RIL 中表达的 DscuPA-32K 的蛋白清晰可见,其分子量与理论计算 36 kD 相符.而在 BL21 菌中表达的目的蛋白较低(薄层扫描显示有 3%).这个结果也同时间接证明了稀有 tRNA 基因的引入确实增加了稀有 tRNA 的量,增强了大肠杆菌对外源基因转录成的 mRNA 中密码子的识别.



Fig. 1 Induced expression in different strain
 1:Standard protein marker ;2 :Bacterial sample of BL21 ;3 :Bacterial sample of BL21 (pET29a-dscuPA-32K) before induction ;4 :Bacterial sample of BL21-CodonPlus™-RIL (pET29a-dscuPA-32K) after induction ;5 :Bacterial sample of BL21 (pET29a-dscuPA-32K) after induction

随后通过摸索不同的诱导条件,以提高目的蛋白的表达量.发现采用 0.3 mmol/L 的 IPTG 诱导获得的目的蛋白最多(薄层扫描显示,dscuPA-32K 占全菌蛋白的 20%),0.1 mmol/L 的 IPTG 次之,0.5 mmol/L、0.7 mmol/L、0.9 mmol/L 条件下进行加大剂量诱导,目的蛋白的表达量不但没有得到提高,反而有下降趋势.可能是高浓度的 IPTG 对细胞有毒害作用,参见 Fig. 2.对于表达菌株诱导不同的时间,重组尿激酶原的表达水平也存在差异,通过 Fig. 3 可以发现诱导 1 h 后目的蛋白基本出现,3 h 后目的蛋白基本达到最大表达量,接下去随着诱导时间增加,诱导蛋白的表达量基本保持稳定.

2.3 表达产物的抗原性测定

为了初步验证表达产物的正确性及抗原性,进行蛋白免疫印迹分析,用抗 UK 的单克隆抗体进行检测,显色后从 Fig. 4 可以看出有一明显的蛋白杂交条带(分子量 36 kD),显示了重组蛋白具有良好的抗原性.

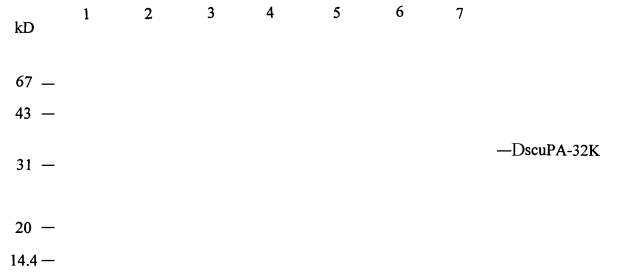


Fig. 2 Induced expression with different IPTG in BL21-CodonPlus™-RIL (pET29a-dscuPA-32K)
 1:Protein standard marker ;2 :Induction with 0.1 mmol/L ;3 :Induction with 0.2 mmol/L ;4 :Induction with 0.3 mmol/L ;5 :Induction with 0.5 mmol/L ;6 :Induction with 0.7 mmol/L ;7 :Induction with 0.9 mmol/L



Fig. 3 Induced expression for different time in BL21-CodonPlus™-RIL (pET29a-dscuPA-32K)
 1:Protein standard marker ;2 :Induced for 1 hour ;3 :Induced for 3 hours ;4 :Induced for 5 hours ;5 :Induced for 7 hours



Fig. 4 Western blot analysis of dscuPA-32K

3 讨论

许多真核基因常常很难在大肠杆菌中获得表达,其原因主要是真核基因中含有许多大肠杆菌稀有密码子,成为基因表达的限制性因素.在这种情况下,许多人尝试将全基因序列设计成大肠杆菌偏爱的密码子,或改动基因内部的一个或几个碱基(主要涉及到稀有密码子),让大肠杆菌更好地识别密码子,提高外源基因的表达.事实证明,如果不更改稀

有密码子,的确很难在大肠杆菌中表达真核尿激酶原基因^[11]。对于小基因来说,这样做很容易。但对于大基因来说,不但成本高而且工作量大。设想如果提高大肠杆菌对稀有密码子的识别几率,问题就迎刃而解。最好的方法就是在大肠杆菌的染色体中增加一段用于编码稀有 tRNA 的基因,增加大肠杆菌转录成稀有 tRNA 的量,从而提高对稀有密码子的识别,提高外源基因的表达量。

低分子量尿激酶原突变体基因是真核基因,从密码子构成可以看出含有较多大肠杆菌的稀有密码子。统计分析 dscuPA-32K 中 AGG/AGA、CUA、AUA 密码子的相对利用频率分别为 0.42、0.1 和 0.14,分别高于上述密码子在大肠杆菌中相对利用频率^[16] 0.01~0.02、0.01、0.04。而且 dscuPA-32K 含有两个连续的 AGG 密码子,更降低了蛋白的翻译效率。本实验中采用的 BL21-CondonPlusTM-RIL 菌株由于整合了编码 tRNAs(Arg, Ile, Leu)的基因,增加了大肠杆菌中识别稀有密码子的 tRNA 的能力,克服了蛋白翻译中的密码子限制因素。实验结果证明,通过在重组菌(BL21-CondonPlusTM-RIL)中表达一种低分子量重组尿激酶原突变体的基因,表达量可得到明显提高。

这种通过特定重组菌提高真核基因表达的方法,可能会对大部分的真核基因在原核中的高效表达提供有利帮助,并且在很大程度上降低成本,提高效率。

参考文献 (References)

- 1 Foster T M, Dormish J J, Narahari U, Meyer J D, Vrkljan M, Henkin J, Porter W R, Staack H, Carpenter J F, Manning M C. Thermal stability of low molecular weight urokinase during heat treatment: Effect of salts, sugars and tween 80. *Internat J Pharm*, 1996, **134**: 193 ~ 201
- 2 焦建伟,徐长法. GHRP-scu-PA-32K 突变体的构建、表达及纯化产物的部分性质研究. 北京大学学报(自然科学版)(Jiao Jianwei, Xu Chang-fa. Construction, expression and partial characterization of GHRP-scu-PA-32K. *Acta Sci Natur Univ Pekinesis*), 2000, **36**: 203 ~ 208
- 3 张彦斌,徐长法. 凝血酶激活的单链尿激酶型纤溶酶原激活剂的构建、表达、纯化和性质研究. 中国生物化学与分子生物学报(Zhang Yan-bin, Xu Chang-fa. Construction, expression, purification and characterization of a thrombin-activated single chain urokinase-type plasminogen activator. *Chin J Biochem Mol Biol*), 1999, **15**(3): 403 ~ 408
- 4 孙迎庆,郭雁,李令媛,茹炳根. RGDs-尿激酶原嵌合体的构建与表达. 中国生物化学与分子生物学报(Sun Ying-qing, Guo Yan, Li Ling-yuan, Ru Bing-gen. Construction and expression of RGDs prourokinase. *Chin J Biochem Mol Biol*), 1999, **15**(2): 189 ~ 193
- 5 Makrides S C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *E. coli*. *Microbiol Rev*, 1996, **60**: 512 ~ 538
- 6 Wada K N, Wada Y, Ishibashi F, Gobjori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**: 2111 ~ 2118
- 7 Schwartz R, Curran J F. Analyses of frameshifting at UUU-pyrimidine sites. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 2005 ~ 2011
- 8 Kane J F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, **6**: 494 ~ 500
- 9 Wakagi T, Oshima T, Imamura H, Matsuzawa H. Cloning of the gene for inorganic pyrophosphatase from a thermophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7, and overproduction of the enzyme by coexpression of tRNA for arginine rare codon. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, **62**: 2408 ~ 2414
- 10 Del Tito BJ Jr, Ward J M, Hodgson J, Gershater CJ, Edwards H, Wysocki L A, Watson F A, Sathe G, Kane J F. Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1995, **177**: 7086 ~ 7091
- 11 Holmes W E, Pennica D, Blaber M, Rey M W, Guenzler W A, Steffens G J, Heyneker H L. Cloning and expression of the gene for pro-urokinase in *Escherichia coli*. *Bio/Technology*, 1985, **3**: 923 ~ 929
- 12 Hill A M, Cane D E, Mau C J D, West C A. High level expression of *Ricinus communis* casein synthase in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Arch Biochem Biophys*, 1996, **336**: 283 ~ 289
- 13 Greener A, Callahan M, Jerpseth B. An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. *Mol Biotech*, 1997, **7**: 189 ~ 195
- 14 Laemmli U K. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680 ~ 685
- 15 彭贵洪,马忠,薛宇鸣,陈于红,朱德熙. T7 启动子作用下人尿激酶原 cDNA 在大肠杆菌中的高效表达及分离纯化. 生物工程学报(Peng Gui-hong, Ma Zhong, Xue Yu-ming, Chen Yu-hong, Zhu De-xu. High level expression in *Escherichia coli* and purification of human proUK cDNA. *Chin J Biotechnol*), 1997, **13**: 362 ~ 367
- 16 李宏,罗辽复. 基因表达水平与同义密码子使用关系的初步研究. 生物物理学报(Li Hong, Luo Liao-fu. The relations of gene expression level and synonymous codon usage. *Acta Biophys Sin*), 1995, **11**: 237 ~ 244