

文章编号:1009-038X(2003)06-0018-04

经密码子优化的葡萄糖醛酸酶在 *E. coli* 中的表达

杜兴兰^{1,2}, 邵蔚蓝^{2*}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 南京师范大学 生命科学院, 江苏 南京 210097)

摘要: 对 α -葡萄糖醛酸酶基因(*Agua*)的稀有密码子进行了优化, 经过稀有密码子优化的基因在 *pTrc99A* 载体中由于二级结构稳定性的增加使得目的基因的表达水平比原始基因还要低. 在权衡几个载体后使用本实验室构建的热激载体 *pAT*, 可以降低 mRNA 二级结构自由能(ΔG), 得到了 α -葡萄糖醛酸酶的高表达, 结果充分说明了 mRNA 二级结构的自由能对外源基因的表达的影响.

关键词: mRNA 二级结构; 自由能; α -葡萄糖醛酸酶

中图分类号: Q 812

文献标识码: A

The Effect of mRNA Secondary Structure on α -glucuronidase Expression

DU Xing-lan^{1,2}, SHAO Wei-lan^{2*}

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: It is well known that the amount of heterogeneous proteins produced by *E. coli* cells depends on various factors, such as the copy number and stability of the expression plasmid in the cells, the efficiency of translation initiation, and the stability of the synthesized protein in *E. coli* cells. The efficiency of translation initiation in *E. coli* is determined by the stabilization of mRNA 5' end secondary structure and the frequency of rare condons' usage. In this study we optimized rare condons of α -glucuronidase, but the data showed that the expression of targeted gene is lower than that of original gene. The optimization of rare condons cause it more steady than the original gene in plasmid *pTrc99A*. After compared the free energy of several plasmids on hand we selected the heat shock plasmid *pAT* which was constructed in the lab. The free energy of the genes cloned in this plasmid is decreased greatly and the expression level of target protein is increased largely. It is concluded that the free energy of mRNA 5' end secondary structure plays a great role in the expression level of foreign gene in *E. coli*.

Key words: mRNA secondary structure; free energy; α -glucuronidase

在大肠杆菌中表达外源基因受到的影响很多, 比如表达载体的拷贝数和稳定性, 翻译起始效率以

及重组蛋白的稳定性. 翻译起始效率跟 mRNA 5' 起始端二级结构的稳定性以及稀有密码子的使用

收稿日期: 2004-02-16; 修回日期: 2004-03-09.

基金项目: 国家轻工总局 211 专项基金资助.

作者简介: 杜兴兰(1978-), 女, 山东临清人, 生物技术硕士研究生; * 通讯作者.

频率有着很大的关系^[1]。极端嗜热菌基因在大肠杆菌中的表达逐渐受到了人们的关注,海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)生长在55~90℃的海底火山口附近,最适生长温度80℃^[2]。海栖热袍菌所产生的 α -葡萄糖醛酸酶(E. C. 3. 2. 1. 139)具有很好的热稳定性,但是海栖热袍菌生长条件要求苛刻,细胞密度较低,不适合工业化生产。因此,采用基因工程技术对极端微生物的重要酶基因进行高效率地表达,一直是人们研究的热点。目前,已有研究者用葡萄糖醛酸酶基因 *AguA* 构建过基因工程菌,但其表达水平较低^[3]。本文将 α -葡萄糖醛酸酶基因克隆到载体 *pTrc99A* 和热激载体 *pAT* 中,并对翻译起始区的稀有密码子进行了优化,期望能提高表达水平。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌 *E. coli* JM109 购于 Promega (Wisconsin, WI, USA), 质粒 *pTrc99A* 购于 Novagen 公司,热激质粒 *pAT* 由作者所在实验室构建。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *NcoI*, *XhoI*, T4 DNA 连接酶和 Pyrobest DNA 聚合酶:购自宝生物工程公司;IPTG:购自华美生物工程公司;4-O-甲基葡萄糖醛酸基-D-木聚糖:购自 Sigma 公司; β -1,4-内切木聚糖酶为作者所在实验室制备。

1.1.3 PCR 引物 根据实验要求设计引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 培养基和培养条件(参照分子克隆实验指南进行) 大肠杆菌使用 LB 培养基,电转化后大肠杆菌复性用 SOC 培养基,转化子的筛选所用抗生素均为氨苄青霉素(Amp)(100 μ g/mL)。

1.2.2 重组质粒及转化子的鉴定分析 将重组表达质粒用电转化法转入大肠杆菌 JM109 后,在氨苄青霉素抗性平板上得到转化子。然后用限制性内切酶对重组质粒进行双酶切鉴定,测定酶活进一步确定基因片段的正确性。

1.2.3 分子生物学操作 质粒的制备,从琼脂糖凝胶(质量浓度均为 1.5 g/dL)提取 DNA 等操作按照 Qiagen 试剂盒使用指南进行。

1.2.4 α -葡萄糖醛酸酶的活性测定 将 *pTrc99A* 重组质粒经电转化在 JM109 中进行表达,在每一个平板上接取 3 个单菌落于 100 mL 三角瓶(装液量

为 20 mL)37℃,200 r/min 培养,在 A_{600} 到 0.6~0.7 时,加入 IPTG 终浓度为 5 mmol/L 诱导表达;pAT 重组质粒经转化后在 30℃,200 r/min 培养至 A_{600} 到 0.6~0.7 时,迅速升温到 42℃进行诱导。分别在诱导 5,6,7 h 的时候取 1 mL 菌液,12 000 r/min 离心 1 min,用 1 mL TE7.5(10 mmol/L Tris HCl,1 mmol/L EDTA)的缓冲液洗涤一次,再用 200 μ L 该缓冲液重悬。菌悬液进行超声波破碎,得到粗酶液。底物制备:带有侧枝的木聚糖溶解到浓度 2%,加入木聚糖酶在 75℃处理过夜。测定:取粗酶液 20 μ L,底物 20 μ L,加入测试温度下校正的 pH 6.2 的 100 mmol/L 邻苯-咪唑缓冲液 60 μ L,75℃反应 10 min,加入 Copper solution(Na_2SO_4 : 1.97 M; NaCl:0.68M; Na-Acetate:0.2 mol/L; CuSO_4 :20.8 mmol/L,调 pH 到 4.8)300 μ L,沸水浴中煮沸 10 min,冰水浴中冷却,然后加入 Arsenomolybdate reagent (根据 Nelson's method)200 μ L 显色,13 200 r/min 离心 2 min,取上清 450 μ L 加入 450 μ L 去离子水,混匀后在 620 nm 处测吸光值^[4,5]。

1.2.5 超声破碎技术 经缓冲液悬浮的菌液,在冰水浴中用小探头超声破碎,工作时间 4 s,间歇 2 s,重复 10 次,菌悬液由浑浊变为透光,得到粗酶液^[6]。

2 结果与分析

2.1 重组表达载体的构建

2.1.1 *pTrc99A-AguA* 的构建 使用作者所在实验室已经构建的重组质粒 *pET20b-AguA*,限制性内切酶 *NcoI*, *XhoI* 双酶切进行克隆。用 *NcoI*, *XhoI* 双酶切取 *AguA* 基因(2025bp)。 *pTrc99A-xy nb* 是本实验室构建的插入有组氨酸标签 histag 的木聚糖酶基因的重组质粒。为了使 *AguA* 基因带上 histag 标签,便于纯化,对该基因进行亚克隆。对 *pTrc99A-xy nb* 用 *NcoI*, *XhoI* 进行双酶切,取 *pTrc99A* 片段。把 *AguA* 基因克隆到 *pTrc99A* 片段中。转化后使用氨苄青霉素筛选转化子,提取质粒后使用 *NcoI*, *XhoI* 双酶切鉴定分析,最后用活性测定进一步分析重组质粒的表达。

2.1.2 *pTrc99A-AguA1* 的构建 对 *AguA* 基因进行密码子使用频率统计。将序列前端在海洋菌中使用频率大而在大肠杆菌中使用频率极低的密码子,用同义密码子替换,氨基酸序列不变。表 1 是碱基的突变情况。重组表达载体的构建见图 1。

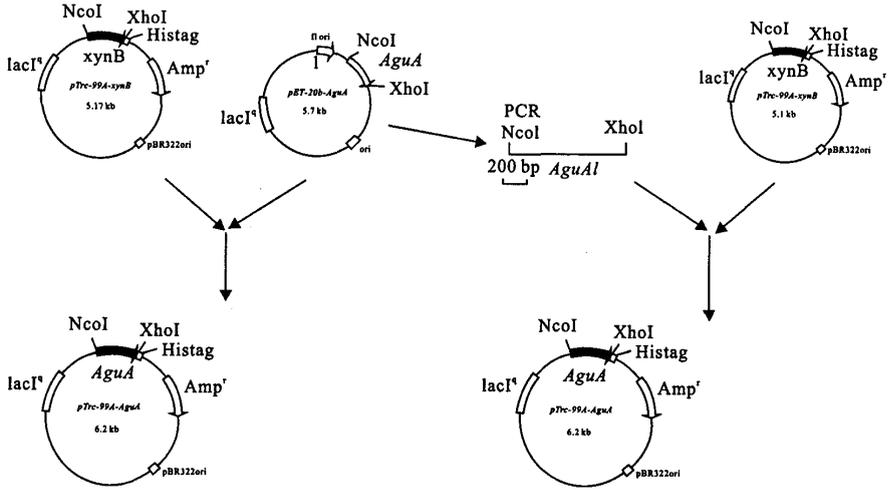


图 1 重组表达载体的构建示意图

Fig. 1 Construction of plasmid *pTrc99A-Agu* and *pTrc99A-Agu1*

表 1 5'端稀有密码子替换

Tab. 1 Codon substitution at 5' end

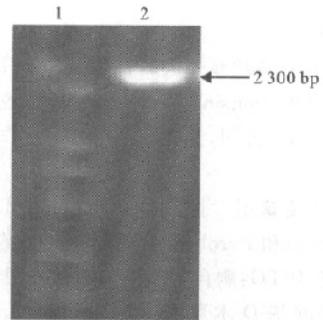
所编码的氨基酸	原始密码子	优选密码子
Arg	AGG	CGT
Glu	GAG	GAA
Arg	AGA	CGT
Leu	TTA	CGT

突变引物序列:

1# 5'-CCCATGGACTACCGTATGTGCTGGC
TGGAATACCGTGGTCTGCCAGCTGATGTCGC
C-3' (*NcoI* 酶切位点);
2# 5'-CCGCTCGAGCGGATATATCTTTCTTC
CCTT-3' (*XhoI* 酶切位点).

引物中黑斜体是改变的碱基, 黑体是酶切位点, 下划线部分是与原始序列完全配对的没有突变的碱基. 根据合成的引物, 以本实验室构建的质粒 *pET20b-AguA* 为模板做 PCR. 将 PCR 产物割胶回收, 用 *NcoI* 和 *XhoI* 双酶切后割胶回收纯化, 克隆到 *pTrc99a(NcoI, XhoI)* 片段, 酶切鉴定质粒片段的大小, 测定活性进一步确定表达.

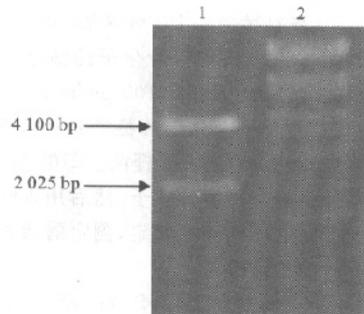
2.1.3 *pAT-AguA*, *pAT-AguA1* 的构建 同时用 *NcoI*, *XhoI* 双酶切载体 *pAT*, *pTrc99a-AguA* 和 *pTrc99a-AguA1*, 取 *pAT(NcoI, XhoI)* 片段和 *AguA, AguA1(NcoI, XhoI)* 片段; 用 *T4 Ligase* 连接后转化 JM109, 挑取单菌落, 得到 *pAT-AguA*, *pAT-AguA1* 阳性克隆.



1. DNA Marker DL2,000(2kb,1kb); 2. plasmid *pAT(NcoI, XhoI)*

图 2 *pAT* 载体电泳图

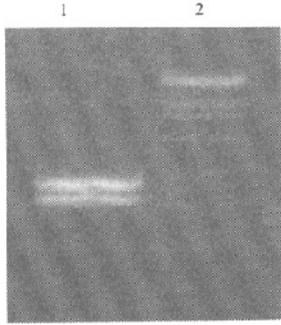
Fig. 2 Plasmid *pAT*



1. *pTrc99A-Agu* 的 *NcoI, XhoI* 双酶切产物; 2. λ -EcoT14 I digest

图 3 *pTrc99A-AguA* 电泳图

Fig. 3 Double digests of *pTrc99A-Agu* with *NcoI* and *XhoI*



1. *pTrc99A-Agu* 的 *NcoI*, *XhoI* 双酶切产物; 2. λ -*EcoT14 I* digest

图 4 *pAT-AguA* 电泳图

Fig. 4 Double digests of *pAT-Agu* with *NcoI* and *XhoI*

2.2 mRNA 二级结构的计算机分析

在 *pTrc99A* 载体中, 转录起始位点为 +1, 从 -10 起始的 90 个碱基序列。本实验室构建的质粒 *pAT* 定义转录起始位点为 +1, 取 -10 开始的 90 个碱基进行预测, 预测程序是 ZUKER 的在线预测 mRNA 二级结构最小自由能的程序^[6]。由于 *pAT* 是热诱导质粒, 诱导表达在 42℃, 预测的是 42℃ 下的自由能^[7,8]。将 *pTrc99A-AguA* 和 *pAT-AguA* 的下划线部分换成突变部分就得到 *pTrc99A-AguA1*, *pAT-AguA1*, 自由能见表 2。

在 *pTrc99A-AguA* 中 -10-+80 序列:

5'-TATAATGTGT GGAATTGTGAGCGGATA
ACAATTTACACAGGAAACAGACC
ATGGACTACAGGATGTGCTGGCTGGAGTAC
AGAGGTTTA-3'

质粒 *pAT-Agu* 中 -10-+80 序列:

5'-TCCCATGATC CAATGACCTGTTAACCGA
AGGAAGGAGATATACCC
ATGGACTACAGGATGTGCTGGCTGGAGTAC
AGAGGTTTACCA-3'

在 *pTrc99A-AguA1* 中 -10-+80 序列:

5'-TATAATGTGT GGAATTGTGAGCGGATA
ACAATTTACACAGGAAACAGACC
ATGGACTACCGTATGTGCTGGCTGGAATACC
GTGGTCTG -3'

质粒 *pAT-Agu1* 中 -10-+80 序列:

5'-TCCCATGATC CAATGACCTGTTAACCGA
AGGAAGGAGATATACCC
ATGGACTACCGTATGTGCTGGCTGGAATAC
CCGTGGTCTGCCA-3'

表 2 重组质粒的最小自由能

Tab. 2 Free energy of recombinant plasmid

基因	<i>pTrc99A</i> (37℃) g/(kJ/M)	<i>pAT</i> (42℃) g/(kJ/M)
<i>AguA</i>	-16.56	-16.56
<i>AguA1</i>	-26.50	-16.12

2.3 α -葡萄糖醛酸酶的表达

将重组质粒 *pTrc99A-AguA*, *pTrc99A-AguA1*, *pAT-AguA*, *pAT-AguA1* 经电转化, 在 JM109 中表达, 每个质粒挑取 3 个单菌落培养, 在相应条件下诱导。每个菌落测酶活时有 3 个平行样, 3 个菌落得到的吸光度取最大值, 为该重组蛋白的相对酶活。由于取样量相同, 用同样的 TE7.5 悬浮, 菌体浓度不同, 相对表达量用吸光度与 A_{600} 的比值表示。定义 *pTrc99A-AguA* 的相对表达量为 1.0。

基因 *AguA* 在 *pTrc99A* 中表达水平比较低, *AguA1* 是经过稀有密码子优化的基因, 从表 3 中可以看出 *pTrc99A-AguA1* 的表达水平比 *pTrc99A-AguA* 要低 60%。在热诱导质粒中 *pAT-AguA* 表达水平提高很多, 是 *pTrc99A-AguA* 的 16.65 倍, 经过优化的基因 *AguA1* 在 *pAT* 载体中表达量是 *AguA* 的 1.55 倍, 比在 *pTrc99A* 中表达水平提高 69 倍。

表 3 重组质粒的表达水平

Tab. 3 The expression level of recombinant plasmids

质粒	吸光度/ A_{600}	相对 酶活	自由能/ (kJ/M)
<i>pTrc99A-AguA</i>	1.59	1.0	-16.56
<i>pTrc99A-AguA1</i>	0.60	0.37	-26.50
<i>pAT-AguA</i>	26.48	16.65	-16.56
<i>pAT-AguA1</i>	41.11	25.85	-16.12

3 讨论

α -葡萄糖醛酸酶基因在大肠杆菌中表达水平很低, 翻译起始区的稀有密码子对外源基因在大肠杆菌中的表达水平有很大影响^[9]。分析发现 α -葡萄糖醛酸酶基因使用了大量的大肠杆菌的极端稀有密码子, 基因 *AguA* 在宿主 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 中的表达量比在普通的 JM109 中表达有很大提高(数据未列出), 说明极端稀有密码子的使用限制了该基因的表达。对翻译起始区的稀有密码子进行优化, 得到基因 *AguA1*, 理论上优化后的基因 *pTrc99A-AguA1* 应该比原始基因 *pTrc99A-AguA*

表达量要高,结果发现在 *pTrc99A* 载体中,*AguA1* 的表达水平比原始基因 *AguA* 低 60%。有研究表明转录起始区 mRNA 二级结构的稳定性对翻译起始效率有着较大影响,对转录起始位点进行在线预测,质粒 *pTrc99A-AguA* 翻译起始区二级结构的自由能为 -16.56kJ/M , *pTrc99A-AguA1* 的自由能为 -26.50kJ/M 。优化后的二级结构比原始基因的二级结构稳定了许多,说明重组质粒 *pTrc99A-AguA1* 表达水平的降低是由于转录起始区二级结构的稳定性增加降低了翻译起始效率。

根据电脑分析了本实验室的质粒发现目的基因在本实验室构建的热诱导载体 *pAT* 中的自由能最小,并且 *pAT-AguA* 和 *pAT-AguA1* 的转录起始位点 mRNA 二级结构自由能相差很小,分别为 -16.59 和 -16.12kJ/M ,自由能均比在 *pTrc99A* 载体中的要低 1/2 左右。表达水平见表 3,可以看出

目的基因在 *pAT* 中的表达均有很大的提高,并且优化基因的表达水平是原始基因的 1.55 倍,与在载体 *pTrc99A* 中的表达水平相比较可以得出:1) 稀有密码子的优化在不改变二级结构自由能的情况下可以提高外源基因在大肠杆菌中的表达水平;2) 转录起始区 mRNA 二级结构的稳定性对翻译起始效率有着较大影响,从而影响到外源基因的表达水平。在对稀有密码子优化时要权衡转录起始区的 mRNA 的二级结构的稳定性,如果 mRNA 二级结构更加稳定会抵消稀有密码子优化提高的表达,得不到期望的效果。

本实验把基因 *AguA* 基因在 *pTrc99A* 和 *pAT* 载体中表达证明了 mRNA 5'端二级结构的稳定性对嗜热菌在大肠杆菌中的表达有很大的影响,并且通过翻译起始区稀有密码子的优化提高了 α -葡萄糖醛酸酶的表达。

参考文献:

- [1] Shigenobu Kimura, Takashi Iyanagi. High-level expression of porcine liver cytochrome P-450 reductase catalytic domain in *Escherichia coli* by modulating the predicted local secondary structure of mRNA[J]. *J Biochem*, 2003,134: 403-413.
- [2] Huber R, Thomas A L, Helmut K, et al. *Thermotoga maritima* sp. Nov. represent a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C[J]. *Arch Microbiol*, 1986, 144:324-333.
- [3] 薛业敏,毛忠贵,刘海丽. α -葡萄糖醛酸酶的研究进展[J]. *林产化学与工业*, 2002,22(4):75-79.
- [4] Milner Y, Avigad G. A Copper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses[J]. *Carbohydr Res*, 1967,4:359-361.
- [5] Ruile P, Winterhalter C, Liebl W. Isolation and analysis of a gene encoding α -glucuronidase, an enzyme with a novel primary structure involved in the breakdown of Xylan[J]. *Mol Microbiol*, 1997,23:267-279.
- [6] 董晖,周雁. mRNA 二级结构对重组人白血病抑制因子(rhLIF)在大肠杆菌中表达的影响[J]. *复旦学报*, 1999,38(5): 497-505.
- [7] Miyo Terao Morita, Yoshiyuki Tanaka, Takashi S Kodama, et al. Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor[J]. *Genes and Development*, 1999,13:655-665.
- [8] Miyo Morita, Masaaki Kanemori, Hideki Yanagi, et al. Heat-induced synthesis of sigma32 in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of rpoH mRNA secondary structure[J]. *J Bacteriology*, 1999,181(2):401-410.
- [9] 时成波,吕安国. 改造稀有密码子提高 SEA 蛋白表达量[J]. *生物工程学报*, 2002,18(4):477-480.

(责任编辑:杨萌)