

改造稀有密码子提高 SEA 蛋白表达量

时成波 吕安国* 吴文芳 杨立泉 冯家勋** 柏学亮**

(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110015)

摘要 利用重叠 PCR 技术突变了 *sea* 基因上一个稀有密码子簇, 将此段中稀有密码子全部更换成 *E. coli* 最常用密码子, 得到 *sea^m*。将 *sea* 和 *sea^m* 分别克隆于 7ZTS 表达载体上, 并转化 JM109(DE3) 菌株。结果表明, *sea* 基因的表达十分微弱, 而 *sea^m* 基因的表达量十分高, 约占菌体总蛋白的 15%。表达产物在体内具有一定的抗肿瘤活性。

关键词 稀有密码子, 基因突变, 重叠 PCR, 表达载体

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0477-04

葡萄球菌肠毒素 A (Staphylococcal enterotoxin A, SEA) 是由产毒金葡菌分泌于胞外的一种蛋白质^[1]。它能与人或鼠抗原递呈细胞表面的 II 类主要组织相容性复合体 (MHC II) 结合, 形成 SEA-MHC II 复合物。此复合物被 T 细胞表面受体的 V β 部位特异识别, 并通过 V β 激活 T 细胞, 进而大量释放各种细胞因子^[2]。SEA 的病理效应就是由它快速激活大量 T 细胞引起的^[3]。由于 SEA 能引起人体强烈的免疫应答, 在 80 年代末人们开始研究 SEA 在肿瘤免疫治疗中的作用。小鼠体内的研究表明, SEA 具有强大的肿瘤杀伤能力^[4,5]。为降低其毒副作用, 依据肿瘤细胞表面抗原的特异性, 人们设计了 Fab-SEA 融合蛋白, 并利用 *E. coli* 工程菌表达了能特异性导向肿瘤细胞的蛋白。实验结果表明, Fab-SEA 对动物体的毒副作用大大降低^[6,7], 其中, C242Fab-SEA 已对胰腺癌病人进行了一期临床实验^[8]。

SEA 的高表达是各种 SEA 融合蛋白高表达的基础。欲提高 SEA 表达量, 改造 *sea* 基因中稀有密码子是一条可以尝试的途径。*sea* 基因结构^[9]如 Fig.1 所示, 其中标示出在 *E. coli* 表达时存在的稀有密码子。

由于 AGA 和 AGG 是最罕见的密码子, 本文拟突变 AGA(AGG)密集区的稀有密码子, 希望能提高 SEA 蛋白表达量, 为各种 SEA 融合蛋白的高效表达

奠定基础。

1	27	54
ATG AAA <u>AAA</u> ACA GCA TTT <u>ACA</u> TTA CTT TTA TTC ATT GCC GTA ACG TTG <u>ACA</u> <u>ACA</u>	81	108
55	109	135
AGT CCA CTT GTA AAT GGT AGC GAG AAA AGC GAA GAA ATA AAT GAA AAA GAT TTG	162	189
109	163	216
<u>CGA</u> AAA AAG TCT GAA TTG CAG <u>GGA</u> <u>ACA</u> GCT TTA GGC AAT CTT AAA CAA ATC TAT	243	270
163	217	270
TAT TAC AAT GAA AAA GCT AAA ACT GAA AAT AAA GAG <u>AGT</u> CAC GAT CAA TTT TTA	297	324
217	271	324
CAG CAT ACT ATA TTG TTT AAA GGC TTT TTT ACA GAT CAT <u>TGG</u> TGG TAT AAC GAT	351	378
271	325	378
TTA TTA GTA GAT TTT GAT TCA AAG GAT ATT GTT GAT AAA TAT AAA <u>GGG</u> AAA AAA	405	432
325	379	432
GTA GAC TTG TAT GGT GCT TAT TAT GGT TAT CAA TGT GCG GGT GGT <u>ACA</u> <u>CCA</u> AAC	469	496
379	433	496
AAA <u>ACA</u> GCT <u>TGT</u> ATG TAT GGT GGT GTA ACG TTA CAT GAT AAT AAT <u>CGA</u> TTG ACC	513	540
433	487	540
GAA GAG AAA AAA GTG CCG ATC AAT TTA TGG <u>CAT</u> GAC GGT AAA CAA AAT <u>ACA</u> GTA	587	614
487	541	594
CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG AAT AAG AAA AAT GTA ACT GTT CAG GAG TTG GAT	621	648
541	595	648
CTT CAA GCA <u>AGA</u> CGT TAT TTA CAG GAA AAA TAT AAT TTA TAT AAC TCT GAT GTT	675	702
595	649	702
TTT GAT <u>GGG</u> AAG GTT CAG <u>AGG</u> <u>GGA</u> TTA ATC GTG TTT CAT ACT TCT <u>ACA</u> GAA CCT	729	756
649	703	756
<u>TGG</u> GTT AAT TAC GAT TTA TTT GGT GCT CAA <u>GGA</u> CAG TAT TCA AAT <u>ACA</u> CTA TTA	774	
703	729	756
<u>AGA</u> ATA TAT <u>AGA</u> GAT AAT AAA ACG ATT AAC TCT GAA AAC ATG CAT ATT GAT ATA		
757	774	
TAT TTA TAT <u>ACA</u> <u>AGT</u> TAA		

图 1 *sea* 基因的核苷酸序列

Fig.1 The nucleotide sequence of *sea* gene
The wave line show rare codons
The codons in box are going to be mutated

收稿日期 2001-12-10, 修回日期 2002-02-27。

基金项目 中科院沈阳应用生态研究所与屹昌科技集团合作研究项目。

* 通讯作者。 Tel 86-24-23916244 E-mail sw2fl@sina.com

** 广西大学分子遗传研究所, 研究员。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 JM109(DE3)购自于美国 promega 公司。表达载体 7ZTS,重组质粒 7ZTS-*sea* 和工程菌 JM109(DE3)-*sea* 由本室构建。

1.2 酶及其它生化试剂

限制酶 ,T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司 , DNA 柱式胶回收试剂盒购自于上海华舜生物工程公司。

1.3 *sea* 基因中稀有密码子的突变

拟突变 *sea* 基因上 232 ,233 ,235 ,236 ,238 位稀有密码子 ,欲突变结果如下 :232 ACA→ACC ;233 CTA→CTG 235 AGA→CGT 236 ATA→ATC 238 AGA→CGT。

设计 2 组 PCR 引物 ,每组各含一条带突变碱基的引物 :

第一组 :SEA F 5' ATGAATCCATATGAAAAAACA-GCATTAC 3'

Mu R 5' ACGATAGATACGTAACAGGGA-TTTGAATAC 3'

第二组 :Mu F 5' ACCCTGTTACGTATCTATCGTGA-TAATAAAC 3'

SEA R 5'GGAAGCTTCTATTAAGTGGTATAT 3'

以 7ZTS-*sea* 为模板 ,用第一组引物扩增出 715bp 大片段 ,用第二组引物扩增出 94bp 小片段。将此两片段混合 ,加入 dNTP ,Pfu ,Pfu buffer ,在 97℃ 1min 后 ,于以下条件进行 3 个循环 95℃ 1min ,50℃ 30s ,72℃ 2min。3 个循环结束后 ,向体系中加入 SEA F 和 SEA R 引物 ,在同样条件下再进行 30 个循环。电泳回收 PCR 产物。

1.4 *sea^m* 基因工程菌的构建

将 *sea^m* 基因的 PCR 产物用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切 ,酶切产物连到同样双酶切的 7ZTS 载体上 ,转化 *E. coli* DH5 α 。筛选重组质粒的转化子并提取重组质粒 ,转化 JM109(DE3) ,得到 JM109(DE3)-*sea^m* 工程菌。

1.5 *sea* 和 *sea^m* 基因在 JM109(DE3)中的表达

分别挑取 JM109(DE3)-*sea* 和 JM109(DE3)-*sea^m* 单菌落于 LB(含 Amp 50 μ g/mL)中 ,37℃ 过夜培养。次日 ,以 1% 接种量转接新鲜 LB(含 Amp 50 μ g/mL) ,当 OD_{600} 达到 0.6 ~ 0.8 时 ,1.0mmol/L 的 IPTG 诱导 ,于 32℃ 表达 10h。1mL 发酵液的菌体用双蒸水洗 1

次 ,悬于 1 倍 SDS 样品加样液 ,沸水浴煮 10min ,12000g 离心 2min ,取 15 μ L 进行 15% SDS-PAGE 电泳 ,考马斯亮蓝染色 ,结果用薄层扫描仪在波长 560nm 处扫描。

1.6 肿瘤抑制实验

取 5 只体重 20g 左右的雄性 T739 小鼠 ,每只背部皮下种植 100 μ L 约 10^6 新鲜的 LA795 肿瘤细胞 (T739 小鼠和 LA795 肿瘤细胞购自天津实验动物中心)。2 只为对照组 ,3 只为实验组。肿瘤接种当天 ,实验组的小鼠背部皮下注射纯化的 *E. coli* 表达的 SEA 10mg/kg ,从第二天开始 ,每天分 2 次注射 SEA 蛋白 20 mg/kg。用 PBS 代替 SEA 蛋白 ,以相同方法处理对照组小鼠。14d 时 ,用乙醚麻醉小鼠 ,小心取出肿瘤组织 ,称重。

2 结果

2.1 *sea* 基因的突变

Sea 基因列如 Fig. 1 所示 ,其稀有密码子被标记出来。欲突变区在 694 至 714 位。以 *sea* 基因为模板 ,第一组引物扩增出 715bp 大片段 (见 Fig. 2) ,第二组引物扩增出 94bp 小片段 (见 Fig. 3)。这两个片段含有相同的突变碱基序列 ,其单链可以在突变位点处配对。局部配对的大小片段 DNA 单链经历 72℃ 延伸后就形成少量含突变碱基的 *sea* 基因 ,即 *sea^m*。以此 *sea^m* 为模板 ,利用引物 SEA F 和 SEA R 就可以扩增出大量所需基因 ,扩增结果如 Fig. 4 所示。

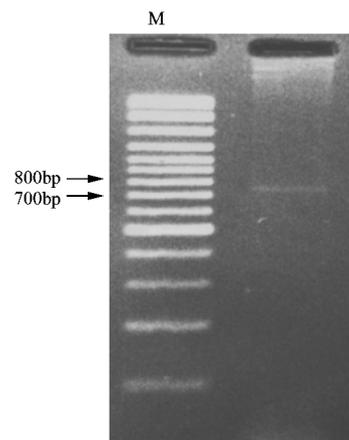


图 2 含突变位点的 *sea* 基因大片段的扩增

Fig. 2 Amplification of big fragment of *sea* gene containing mutated codons
M. 100bp marker

将 *sea^m* PCR 产物用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切 ,连到 7ZTS 载体上 ,转化 *E. coli* DH5 α ,挑选白色菌落进

行筛选,得到 7ZTS-*sea*^m 的转化子。测序结果表明突变位点正确(测序结果未列出)。突变策略及结果见图 5。

2.2 转化子细胞蛋白的 SDS-PAGE

将重组质粒 7ZTS-*sea*^m 转化 JM109(DE3),得到 JM109(DE3)-*sea*^m 转化子。在 LB 中培养, IPTG 诱导后收集细胞。其细胞全蛋白的 SDS-PAGE 结果如图 6 所示。

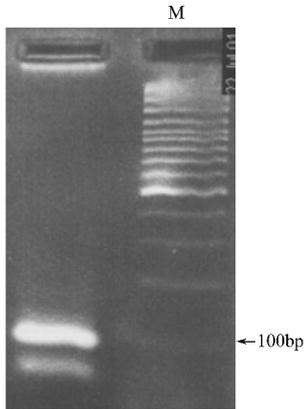


图 3 含突变位点的 *sea* 基因小片段的扩增

Fig.3 Amplification of small fragment of *sea* gene containing mutated codons
M. 100bp marker

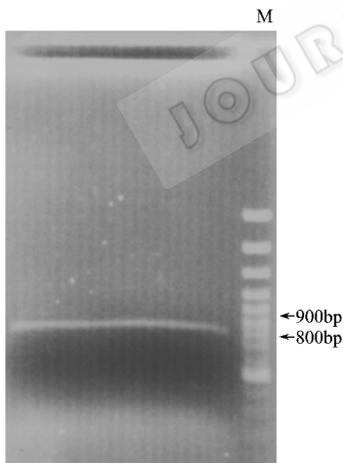


图 4 突变 *sea* 基因的扩增

Fig.4 Amplification of mutated *sea* gene containing mutated codons
M. 100bp marker

细胞全蛋白电泳结果表明,在 JM109(DE3)中 *sea*^m 基因的表达量比 *sea* 基因表达量明显提高。薄层扫描显示, *sea*^m 的表达产物占细胞总蛋白的 15% (扫描图未列出)。

2.3 SEA 对小鼠肿瘤重量的影响

注射 SEA 蛋白的实验组与注射 PBS 的对照组

相比,小鼠肿瘤的重量明显降低,如 Table1 所示。统计分析 (*t*-test)表明,两个组的肿瘤重量差异较显著 ($P < 0.05$)。

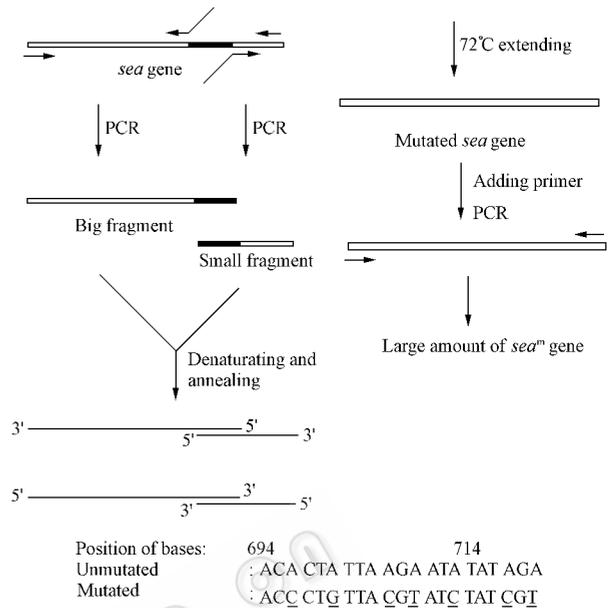


图 5 *sea* 基因突变策略及结果

Fig.5 The strategy and result of mutation of *sea* gene
The black box (from 694 to 714 base) is mutated region

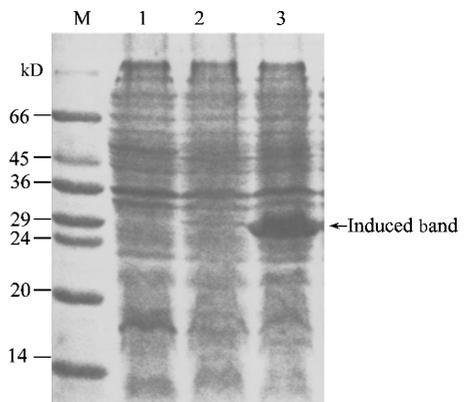


图 6 细胞全蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.6 SDS-PAGE of total cell proteins
1. JM109(DE3); 2. JM109(DE3)-*sea* ; 3. JM109(DE3)-*sea*^m

表 1 SEA 对 T739 小鼠肿瘤重量的影响
Table 1 The effect of SEA on the tumor weight of T739 mice bearing tumor

Groups	Number of animals	Weight of tumors/g
Control	2	2.5535 ± 0.3215
Experiment	3	1.3147 ± 0.2682

** Indicates significance at 0.01

3 讨论

由于遗传密码子的简并性,每一个氨基酸都由

多种密码子来编码。然而,大肠杆菌对编码同一氨基酸的各种密码子使用频率并不相同,甚至相差很大^[10]。稀有密码子的存在大大降低了蛋白质合成的速率,使蛋白表达量降低,甚至使蛋白合成中途停止^[11,12]。在众多稀有密码子当中,编码精氨酸的 AGG 和 AGA 是使用频率最低的两种。当有两个 AGA 相距很近时,严重影响翻译进程^[13]。本文对 *sea* 基因突变位点的选择正基于此。*sea* 基因中 694~714 碱基之间存在较多的稀有密码子,尤其是两个编码精氨酸的 AGA 只相距 6 个碱基,估计这种排列方式可能会妨碍 *sea* 基因的表达。应用高使用频率的 ACC,CTG,CGT,ATC 代替 ACA,CTA,AGA,ATA,可能会大大改善表达效果。本项工作结果证实了我们的设想。

SEA 本身是一种毒蛋白,其直接作用于人体会产生很大的毒副作用。对 SEA 蛋白的改造,尤其是具有导向作用的 SEA 融合蛋白的制造将大大改善其药学性质。而具有抗肿瘤活性的 SEA 蛋白的高表达为各种 SEA 融合蛋白的表达奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

[1] Bergdoll M S, Staphylococcal intoxications. In Riemann H and Bryan F I (ed), Foodborn infections and intoxications. Academic Press. Inc New York, 1979, pp. 443 ~ 493

[2] Fleischer B, Schrezenmeier H. T lymphocyte activation by staphylococcal enterotoxins: role of class II molecules and T cell surface structure. *Cell Immunol*, 1989, **120**(1): 92 ~ 101

[3] Philippa Marrack, John Kappler. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*, 1990, **148**: 705 ~ 711

[4] Shecheglovitova ON. Non-specific antitumoral activity of staphylococcal enterotoxins. *Eksp Onkol*, 1987, **9**(1): 28 ~ 30

[5] Kalland T, Dohlsten M, Lind P. Monoclonal antibodies and superantigens: a novel therapeutic approach. *Med Oncol Tumor Pharmacother*, 1993, **10**(1~2): 37 ~ 47

[6] Mikael. Dohlsten, Lars. Abrahmsen, PerBjork, Monoclonal antibody-superantigen fusion proteins: Tumor specific agents for T-cell-based tumor therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **191**: 8945 ~ 8949

[7] Kalland T, Dohlsten M, Lind P. Monoclonal antibodies and superantigens: a novel therapeutic approach. *Oncol Tumor Pharmacother*, 1993, **10**(1~2): 37 ~ 47

[8] Alpaugh R K, Schultz J, McAleer C. Superantigen-targeted therapy: phase I escalating repeat dose trial of the fusion protein PNU-214565 in patients with advanced gastrointestinal malignancies. *Clin Cancer Res*, 1998, **4**(8): 1903 ~ 1914

[9] Marsha J, Betley, John J Mekalanos. Nucleotide Sequence of the Type A staphylococcal enterotoxin. *Gene J Bacteriol*, 1988, **170**: 34 ~ 43

[10] Sharp P M, Devine K M. Codon usage and gene expression level in *Dictyostelium discoideum*: highly expressed genes do 'prefer' optimal codons. *Nucleic Acids Res*, 1989, **11**: 5029 ~ 5039

[11] Brinkmann U, Mattes R E, Bucke L P. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene*, 1989, **21**: 109 ~ 114

[12] Spanjaard R A, Chen K, van Duin J. Frameshift suppression at tandem AGA and AGG codons by cloned tRNA genes: assigning a codon to argU tRNA and T4 tRNA(Arg). *Nucleic Acids Res*, 1990, **11**: 5031 ~ 5036

[13] Spanjaard R A, van Duin J. Translation of the sequence AGG-AGG yields 50% ribosomal frameshift. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, **85**(21): 7967 ~ 7971

The Changes of Rare Cordons Increase Expression Level of SEA

SHI Cheng-Bo¹ LU An-Guo¹ WU Wen-Fang¹ YANG Li-Quan¹ FENG Jia-Xun² BAI Xue-Liang²

¹(ShenYang Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Science, ShenYang 110015, China)

²(Institute of molecular genetics GuangXi university, NanNing 530006, China)

Abstract The rare codons of a fragment in staphylococcal enterotoxin A gene were turned into the most high usage frequency codons in *E. coli* by overlap PCR technique. Genes of *sea* and *sea^m* were cloned into 7ZIS expression vector and transformed into JM109(DE3), respectively. The result shows that expression level of *sea* gene was very low, but the expression level of *sea^m* was as high as 15% of total cell proteins. The expression product shows activity of antitumor *in vivo*.

Key words expression vector, overlap PCR, gene mutation, rare codons

Received: 12-10-2001

This work was supported by Grant from Eternal Technology Group Ltd.

* Corresponding author. Tel: 86-24-23916244; E-mail: w2fl@sina.com