

使用偏爱密码子大幅度提高苯丙氨酸脱氨酶在食品级乳酸乳球菌中的表达

High-level Expression of Phenylalanine Ammonia-lyase in *Lactococcus Lactis* Via Synthesized Sequence Based on Bias Codons

陈 星^{1,2}, 高 斌^{1,2}, 贾兴元¹, 苏 畅¹, 吕月平¹, 王战勇¹, 范新萍¹, 肖 白¹, 刘敬忠^{1*}

CHEN Xing^{1,2}, GAO Bin^{1,2}, JIA Xing-Yuan¹, SU Chang¹, LÜ Yue-Ping¹, WANG Zhan-Yong¹, FAN Xin-Ping¹, XIAO Bai¹ and LIU Jing-Zhong^{1*}

1 首都医科大学附属朝阳医院基础医学研究中心, 北京 100020

2 首都医科大学 2003 级研究生, 北京 100054

1 Beijing Chaoyang Hospital Affiliate of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100020, China

2 Master Graduate of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China

摘 要 为获得苯丙氨酸脱氨酶(PAL)在食品级乳酸乳球菌中的高效表达,将欧芹 *pal* cDNA(*pal^{nat}*)及根据乳酸乳球菌偏爱密码子设计人工合成的 *pal* 基因(*pal^{nat}*)重组并转化到两种乳酸乳球菌 NICE 诱导表达系统中,测定基因工程菌表达 PAL 酶的量及活性,对比分析密码子偏爱性对乳酸乳球菌表达外源蛋白的影响。结果表明:在两种乳酸乳球菌 NICE 表达系统中,使用偏爱密码子均可显著提高 PAL 酶的表达效率,使 NZ9000/pNZ8048 表达系统表达量提高 22.23 倍, NZ3900/pNZ8149 系统提高 35.90 倍。此研究获得了安全高效表达 PAL,可用于治疗苯丙酮尿症的基因工程菌。

关键词 苯丙氨酸脱氨酶, 乳酸乳球菌, NICE 表达系统, 密码子

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)02-0187-04

Abstract To construct a safer and more efficient gene engineering *Lactococcus Lactis* for expressing phenylalanine ammonia lyase (PAL) which will be benefit for PKU therapy, *pal* cDNA of Parsly and synthesized sequence based on *Lactococcus Lactis* bias codons were recombined into two *Lactococcus Lactis* NICE systems. The activities of the expressed PAL were detected, and the effect of *Lactococcus Lactis* bias codons on the expression of exterior protein was analyzed. The results showed that the expression level of PAL was increased by using *Lactococcus Lactis* bias codons in both *Lactococcus Lactis* NICE systems. Through which several safer and more efficient strains of the gene engineering *Lactococcus Lactis* were obtained.

Key words phenylalanine ammonia-lyase, *Lactococcus Lactis*, NICE system, codon

经典型苯丙酮尿症(PKU)是由于苯丙氨酸羟化酶(PAH)基因缺陷引起肝细胞内 PAH 酶活力严重

缺乏所致的常染色体隐性遗传病。体内正常苯丙氨酸羟化反应需要一些必须的辅助因子,且脱辅基的

Received: October 12, 2005; Accepted: November 28, 2005.

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China(No.30271372).

* Corresponding author. Tel 86-10-65064135, E-mail: liujingzhong@hotmail.com

国家自然科学基金资助项目(No.30271372)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

PAH 极不稳定,单纯采用补充苯丙氨酸羟化酶的方法难以达到治疗目的。研究者们转而采用另一种极有前途的酶——苯丙氨酸脱氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)^[1],这种来源于植物或微生物的酶比较稳定,不需辅因子,可将苯丙氨酸(PHE)脱氨生成对人体无毒副作用的肉桂酸(CIN)。本研究是在我室过去研究的基础上^[2,4],期望用食品级 NICE 诱导表达载体系统(Nisin-Controlled Expression system),实现 *pal* 基因在乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, *L. lactis*)中的高效表达,在小肠吸收 PHE 之前使其脱氨转化为 cin,降低血苯丙氨酸浓度,达到有效治疗 PKU 的目的。对于同义密码子而言,不同的物种的使用频率有很大差别,因此出现了所谓的密码子的偏爱性(codon preference or bias)。外源基因尤其是来自较远物种的基因在宿主的表达会受到一定的影响^[5]。我们根据乳酸乳球菌基因组密码子的使用频率,选取偏爱密码子设计并人工合成 PAL 基因(*pal^{nat}*)构建了克隆,希望提高两种乳酸乳球菌 NICE 表达系统的 PAL 表达水平。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

JM109/pET23b-PAL 含有欧芹 *pal* cDNA 基因,由本室构建^[5];两种 NICE 表达系统均购自荷兰 NIZO 研究所。NZ9000/pNZ8048 系统带有氯霉素(Cm)抗性筛选标记,方便基因重组,且表达效率高;NZ3900/pNZ8149 系统无抗生素抗性标记,采用乳糖利用筛选方式,对人体更加安全,构建过程较为困难。

1.2 目的基因

1.2.1 利用 PCR 扩增 *pal* cDNA(*pal^{nat}*):以 pET23b-PAL 为模板,设计合成 T1、T2 引物用于扩增。T1: 5'-GAGAACGGTAACGGTGCAACTAC-3', T2: 5'-GCTCTAGAGCATGTCAGTTAAC-3'。T2 含 *Xba* I 酶切位点。

1.2.2 根据乳酸乳球菌偏爱密码子设计合成 *pal^{art}* 基因:乳酸乳球菌基因组密码子使用频率数据来自 codon usage database (<http://www.kazusa.or.jp/codon>),计算相对同义密码子使用率(relative synonymous codon usage-values, RSCU),然后用 CodonW1.3 软件进行校验。在不改变氨基酸种类及序列的基础上,全部选用偏爱密码子设计并人工合成(鼎国公司)全长 2.2kb 的 *pal* 基因(*pal^{art}*),并在其 5'端引入 *Xba* I 酶切位点。

1.3 pNZ8048-PAL^{nat}及 pNZ8048-pal^{art}的构建

*pal^{nat}*含 2 个 *Nco* I 酶切位点,与载体 pNZ8048

采用一平一粘连接;*pal^{art}*设计为只含有 5'端 1 个 *Nco* I 酶切位点,因此与载体可用两个粘端连接。*pal^{nat}*经 T4 DNA 聚合酶处理后,再用 *Xba* I 酶切,产物纯化回收。载体 pNZ8048 经 *Nco* I 酶切、DNA 聚合酶 I Klenow 大片段补平、*Xba* I 酶切后纯化回收。两片段用 T4 DNA 连接酶连接。人工合成的 *pal^{art}* 基因及载体 pNZ8048 均经 *Xba* I、*Nco* I 双酶切并纯化后,用 T4 DNA 连接酶连接。连接产物转化感受态 *E. coli* MC1061 细胞,经氯霉素抗性筛选,菌落直接 PCR 法^[7]鉴定阳性克隆菌株并提取质粒 DNA。

1.4 pNZ8149-pal^{nat}和 pNZ8149-pal^{art}的构建

基因重组方法同上,连接产物直接转化乳酸乳球菌 NZ3900。

1.5 电穿孔转化乳酸乳球菌

电穿孔用感受态 *L. lactis* 的制备均按文献[6]进行,电穿孔用 EquiBio Easyject 细胞打孔仪进行。pNZ8048-*pal^{nat}*及 pNZ8048-*pal^{art}*电转化入 NZ9000,参数设定为 2.5kV, 25 μ F, 400 Ω ,筛选培养基用 GM₁₇ + aga(+ 5 μ g/mL Cm),氯霉素抗性筛选;pNZ8149-*pal^{nat}*及 pNZ8149-*pal^{art}*电转化入 NZ3900,参数设定为 2.5kV, 25 μ F, 200 Ω ,筛选培养基用 LSA + aga(+ 5% 乳糖)。

1.6 阳性克隆筛选鉴定

菌落直接 PCR 法和 HPLC 测定产物肉桂酸法鉴定阳性菌株^[3,6]。

1.7 PAL 蛋白在乳酸乳球菌中的诱导表达及活性分析

培养菌液至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.5$ 时,加入诱导物乳链菌肽(nisin)至终浓度为 10ng/mL,继续培养 5h,细菌沉淀干燥称重后加入一定量含 PHE 的 PBS(pH = 8.0),37 $^{\circ}$ C 反应 1h^[8]。样品经 5% 高氯酸处理后, HPLC 法测定 PHE 被 PAL 脱氨后产生的产物肉桂酸含量。

1.8 PAL 蛋白的 SDS-PAGE 检测

诱导培养后细菌超声破碎,按常规方法上样电泳^[3],以不含质粒的 *L. lactis* 为对照。

2 结果

2.1 菌落 PCR 法筛选鉴定阳性克隆

直接挑取转化子菌落, T1、T2 为引物进行 PCR 扩增,有 2.2kb 片段扩增产物的为阳性克隆。如图 1 中 31、33、39、41 号转化子即为阳性克隆。

2.2 基因工程 *L. lactis* 的诱导表达及 PAL 活性测定

基因工程 *L. lactis* 经 nisin 诱导后, 5h, OD_{600} 约

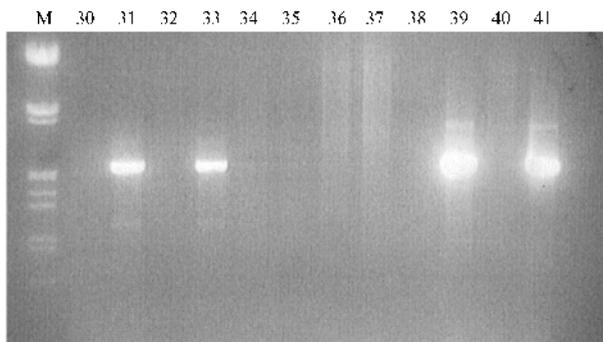


图 1 菌落 PCR 法鉴定重组阳性克隆

Fig.1 The positive clones detected by bacteria clones PCR

M : λ DNA *Hind*III + *Eco*R I ;30-41 :different clones.

为 1.6 ,可达最高表达量 ,此时收集菌体加入 10mmol/L PHE ,反应 1h 后经 HPLC 检测 ,阳性菌株代谢产物肉桂酸与其标准品的 HPLC 图谱均在 14.5min 左右出现特异波峰 ,对比吸收波峰的面积或高度可确定工程菌产物浓度即 PAL 活性 ,见图 2。

2.3 各基因工程菌 PAL 表达速率对比分析

根据国际酶学生化学会委员会规定的酶活力单位(u)^[9] ,计算各工程菌的比活力(u/g)。图 3 显示了 4 种基因工程菌 PAL 酶比活力的平均值对比 ,对于 NZ9000/pNZ8048 表达系统 ,使用偏爱密码子使表达

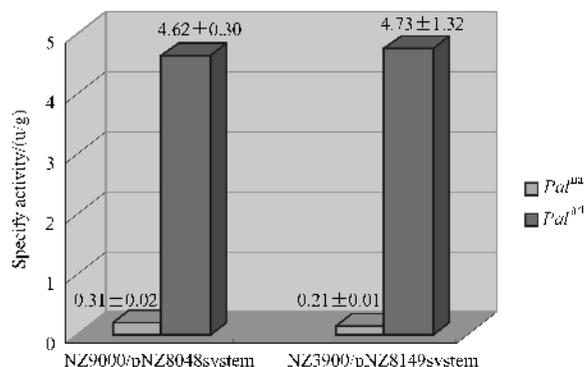


图 3 基因工程菌表达效率对比

Fig. 3 Compared with PAL enzyme specify activities of four genetic engineering strains

速率提高了约 22.23 倍 ;而对于无抗生素抗性的 NZ3900/pNZ8149 表达系统 ,则提高了 35.90 倍。

2.4 PAL 蛋白的 SDS-PAGE 检测

各菌株蛋白 SDS-PAGE 图谱见图 4 ,与不含质粒的乳酸乳球菌 (图 4-1) 相比 4 种基因工程菌在 97kD 与 66kD 之间 ,约 78kD (箭头指处) 均出现一条特异蛋白条带 ,与 PAL 蛋白分子量相符 (图 4 2~5) 。但在两种表达系统中 ,*pal*^{nat} 表达产物条带很浅 ,而 *pal*^{art} 产物条带均很浓 ,说明表达量有很大提高。

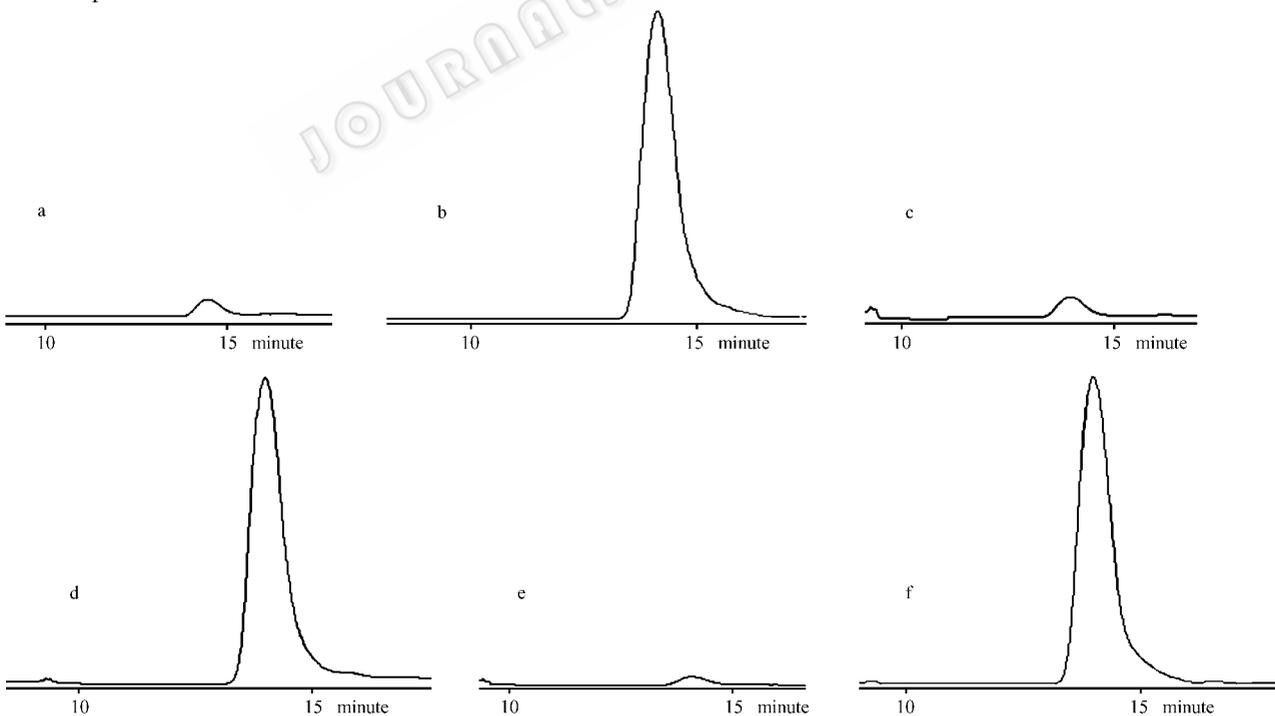


图 2 基因工程菌将 PHE 脱氨的产物 cin 的 HPLC 图谱

Fig.2 HPLC analysis of the activity of PAL expression by genetic engineering strain

a :0.2mmol/L Cinnamic acid standard ; b :6mmol/L Cinnamic acid standard ; c : NZ9000/pNZ8048-*pal*^{nat} ; d : NZ9000/pNZ8048-*pal*^{art} ; e : NZ3900/pNZ8149-*pal*^{nat} ; f : NZ3900/pNZ8149-*pal*^{art} .

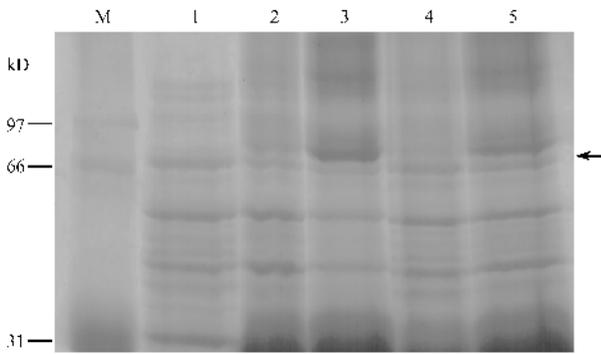


图4 基因工程菌表达产物 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression product of genetic engineering strains

1 :NZ9000 cells ; 2 :NZ9000/pNZ8048- *pal*^{mat} ; 3 :NZ9000/pNZ8048- *pal*^{art} ; 4 :NZ3900/pNZ8149- *pal*^{mat} ; 5 :NZ3900/pNZ8149- *pal*^{art} ; M : Protein size marker.

3 讨论

目前国际基因治疗 PKU 方案主要是将 *pah* cDNA 用腺病毒或逆转录病毒载体导入小鼠肝细胞,使肝细胞表达 PAH 活性达到治疗目的,已在动物实验取得较好效果^[10],但存在表达时间短、抗原性强、疗效有性别差异等不足,难以临床应用。对于将 *pal* 基因转入食品级基因工程乳酸乳球菌中使其表达有活性的 PAL 这一基因治疗的新途径,其优点是对人体安全性好,使用方便,免疫原性低,可降低患者经济负担等。本室已利用几个乳酸乳球菌载体系统成功构建基因工程菌^[2-4,6],尚需解决的问题是采用食品级表达系统和提高表达量以达到临床应用的目的。本研究选用的 NZ3900/pNZ8149 是近年来国际上先进的乳酸乳球菌食品级表达系统,质粒 pNZ8149 以 LacF 基因取代了常用的抗生素抗性基因作为筛选标记,其宿主菌 NZ3900 已删除 lacF 基因,因此只有含 pNZ8149 质粒时才可在以乳糖为唯一碳源的培养基(LSA)上生长。这在基因重组时虽增加了难度,但避免了抗生素抗性基因的水平转移,更加安全,符合临床应用的标准。

迄今关于用乳酸乳球菌表达系统对外源基因表达能力的研究甚少。但对大肠杆菌载体系统的研究表明,原核生物对异源蛋白的表达主要与质粒拷贝数、质粒稳定性、mRNA 结构、基因密码子偏爱性、蛋白质二级结构和宿主菌的生长状态等多种因素有关。我们发现欧芹的 cDNA 中存在不少连续分布或散在的稀有密码子,可能出现由于 tRNA 丰度等原因导致正在翻译的核糖体运动暂停,造成翻译提前

终止和目标蛋白的低产率。本研究选用偏爱密码子设计合成了 *pal*^{art} 基因,在 2 个 *L. lactis* 表达系统与 *pal*^{mat} 的表达量进行了对比,结果均显示,使用偏爱密码子可以显著提高表达效率,证明了该方法的有效性。在 pNZ8149 载体系统, *pal*^{art} 表达量比 *pal*^{mat} 有大幅度提高,这可能与细胞的生长速率或宿主菌的品系影响了 mRNA 的稳定性有关。

本研究首次采用全基因合成技术研究了密码子偏爱性对 *L. lactis* 表达外源蛋白的影响,为今后食品级 *L. lactis* 基因工程菌的构建和应用提供了有效的方法。我们所构建的 NZ3900/pNZ8149- *pal*^{art} 不仅表达量高,活性强,且无抗生素抗性,为利用基因工程菌治疗经典型 PKU 的临床应用开拓了前景。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Christinen N, Sarkissian Z, Zhongqi Shao, Francoise Blain *et al.* A different approach to treatment of phenylketonuria: Phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, **96**: 2339 - 2344
- [2] Liu JZ (刘敬忠), Xiang H (向华), Hu W (胡维) *et al.* Cloning and expression of phenylalanine ammonia lyase cDNA in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1998, **14**(4): 384 - 388
- [3] Liu JZ, Jia XY, Zhang J *et al.* Study on a novel strategy to treatment of phenylketonuria. *Art, Cell, Blood Subs, and Immob. Biotech*, 2000, **30**(4): 243 - 257
- [4] Zhang X (张晶), Liu JZ (刘敬忠), Tan SZ (谭淑珍) *et al.* The progressive study on gene therapy for hyperphenylalaninemia rats. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2002, **18**(6): 713 - 717
- [5] Akashi H. Gene expression and molecular evolution. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, **11**(6): 660 - 666
- [6] Xiang H, Liu JZ, Hu W *et al.* Expression in *Lactococcus lactis* of catalytically active phenylalanine ammonia-lyase from parsley. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999, **39**(3): 196 - 220
- [7] Wells JM, Willson PW, Le page RWF. Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *J Appl Bacter*, 1993, **74**: 629 - 636
- [8] Evans CT, Hanna K, Conrad D *et al.* Production of phenylalanine ammonia-lyase (PAL): isolation and evaluation of yeast strains suitable for commercial production of L-phenylalanine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, **25**: 406 - 414
- [9] Yu Hong *et al.* Experimental technology of medical biochemistry and molecular biology. Wuhan University publishing company 2003
- [10] Oh HJ, Park ES, Kang S *et al.* Long-term enzymatic and phenotypic correction in the phenylketonuria mouse model by adeno-associated virus vector-mediated gene transfer. *Pediatric Research*,