

# 人白细胞介素-3 基因翻译起始区的改造 提高其在大肠杆菌中的表达水平

杨立宏\* 陈常庆\*\* 高冕 苏成芝\*

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

(第四军医大学生物化学教研室 西安 710032)\*

**摘要** 为了提高人白细胞介素-3 (hIL-3) 在大肠杆菌中的表达, 在计算机辅助下, 设计合成了 PCR 突变引物, 用于改造起始密码 AUG 上下游序列, 并在不改变 5' 端氨基酸编码的前提下, 尽可能选用大肠杆菌高频使用的密码子。将经改造后的 hIL-3cDNA 和翻译起始区置于 P<sub>L</sub> 启动子之下, 转入大肠杆菌 Tap106, 经 42℃ 热诱导后, 获得表达产物, 提高表达水平近一倍, 表达量达到菌体总蛋白量的 30% 左右。表达产物经 Western blot 验证, 经 PVDF 膜转移后进行 N 端顺序分析, 证明前 15 个氨基酸正确, 产物经包涵体纯化后, 纯度提高至 80% 以上, 初步复性后能明显促进 hIL-3 依赖细胞的生长。

**关键词** 人白细胞介素-3 基因, 大肠杆菌中表达, PCR, 转录起始区

人白细胞介素-3 (Human Interleukin 3, hIL-3) 又称多功能集落刺激因子 (Multi-CSF), 能促进造血干细胞的分化和增殖, 参与机体免疫调节<sup>[1~3]</sup>。1986 年 Yang 等<sup>[4]</sup>首次克隆了 hIL-3 基因组 DNA, 揭示 hIL-3 由 152 个氨基酸组成, 其中前 19 个氨基酸为信号肽, 成熟蛋白为 133 个氨基酸, 利用基因工程方法获得 hIL-3, 作为生物应答调节剂, 在造血功能障碍等疾病的治疗上具有重要意义。大肠杆菌表达系统由于其高效、廉价, 因而广泛应用于细胞因子的表达, 但在 hIL-3 的应用中却难以进行高效表达。Vee Leen 等<sup>[5]</sup>的研究表明, 除非在 hIL-3 的 N 端融合一些细菌蛋白成分, 否则野生型 hIL-3 表达量很低。作者推测这可能由于 hIL-3 的 N 端编码序列 CG 比例较高等因素影响转译效率所致。我们曾报告将 hIL-3 基因置于 P<sub>L</sub> 启动子下游, 高效表达了 hIL-3, 表达量达菌体总蛋白的 15% 左右<sup>[6]</sup>。本文在上述工作的基础上, 通过改造位于 hIL-3 表达载体上 SD 序列之后、ATG 起始码上下游的翻译起始区序列 (Translation Initiation Region, TIR), 研究其对 hIL-3 在大肠杆菌中表达的影响, 从而进一步提高 hIL-3 在大肠杆菌中的表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 JM109 (recA1 SupE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ (lac-proAB)); Tap106 (leu dio thi galam lac U169 rpsL supE44 λ { (int-ral) ΔBamH I N::Kan<sup>r</sup>cI<sup>857</sup> [cro-bio] Δ}); 质粒 pSBHL-1; 为 hIL-3 表达质粒, 含 P<sub>L</sub> 启动子<sup>[6]</sup>; 质粒 pUCBM20; 为

\* \* 联系人。

本文于 1994 年 5 月 24 日收到。

pUC18 衍生质粒, 其多克隆酶切位点不同。

## 1.2 酶、化学试剂、同位素化合物

限制酶、T4 DNA 连接酶、Klenow 酶购自德国 Boehringer 公司、华美生物工程公司; Taq DNA 聚合酶、hIL-3 标准纯品、hIL-3 单抗试剂盒、ECL Western blot 分析试剂盒, [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dATP, [ $\alpha$ - $^{35}$ S]-dATP 购自英国 Amersham 公司; DNA 序列试剂盒为美国 USB 公司产品; 5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷 (X-gal)、异丙基- $\beta$ -D 硫代乳糖苷 (IPTG) 购自美国 Sigma 公司。

## 1.3 质粒 DNA 的制备、大肠杆菌转化、PCR 方法、SDS-PAGE 电泳、Western-blot

参照“分子克隆手册”<sup>[7]</sup>进行。

## 1.4 PVDF 膜微量蛋白测序

样品经 SDS-PAGE 电泳后, 移至电转移缓冲液 (10mmol/L, 3-环己胺基-1 丙基磺酸, pH11, 10% 甲醇) 浸泡 5min。剪取适当大小的 PVDF 膜浸于甲醇几秒钟后浸于电转移缓冲液 5min。构建电转移装置后于 50V (170~200mA) 转移 30min。取出 PVDF 膜后用甲醇浸泡几秒钟, 转至考马斯亮蓝染色液 (0.1% 考马斯亮蓝 R-250, 40% 甲醇) 染色 40s, 在脱色液 (50% 甲醇) 中脱色, 剪取目的条带于 Applied Biosystems 477A/120A 蛋白序列分析仪分析。

## 1.5 寡核苷酸引物的设计、合成及 PCR 方法

寡核苷酸引物采用固相亚磷酸法, 在 ABI 380A 型 DNA 合成仪 (美国 Applied Biosystems 公司) 上合成。合成产物经 PAGE 电泳纯化。见文献 [6] 构建的 hIL-3 表达质粒 pSBHL-1 中 hIL-3 基因起始码 ATG 上下游序列设计了用于改造翻译起始区序列的引物, 其中引物 YD2、YD3 以及与它们配对进行 PCR 反应的引物 pSB3 用于改造 AUG 上游; 引物 IL-3-11 和与其配对进行 PCR 反应的互配于 hIL-3 cDNA 3' 端引物 IL-3-2 用于改造 AUG 下游, 序列见表 1。

表 1 寡核苷酸引物的序列

Table 1 The sequence of oligonucleotides

Name	Sequence (5'→3')
	Nco I
YD2	GCCATGGTAAGTATTTCTTAATTT
	EcoR I
YD3	GGAATTCCTCCTTAATTT
	Egl I
pSB3	AAAGATCTCTCACCTAA
	Nco I * * * * *
IL-3-11	AACCATGGCACCTATGACTCAGACTACTCCGCTGAAGACAAGCT
	BamH I
IL-3-2	CGGATCCAGCTGGACGTTGGA

\* : Mutation sites

## 1.6 DNA 序列测定

5' 端突变后的 hIL-3 cDNA 克隆入 pUCBM20 质粒, 经低熔点琼脂糖回收后以质粒双链为模板, 按 Sangar 的末端终止法, 用序列测定试剂盒推荐的条件下, 测定 hIL-3 cDNA

核苷酸序列。

### 1.7 外源基因在大肠杆菌中的表达

含有构建入 hIL-3 cDNA 的表达载体的大肠杆菌于 30℃ 活化过夜后,按 1% 接种于 LB 培养液中,继续在 30℃ 摇床培养至对数生长中期,迅速转到 42℃ 摇床培养 4~6h, 5000r/min 离心 5min, 收集细菌备用。

### 1.8 生物学活性的检测

粗纯化的 hIL-3 包涵体溶于 8mol/L 脲,稀释复性后 1000r/min 离心除去沉淀,用<sup>3</sup>H-TdR 参入法在依赖 hIL-3 的 TF-1 细胞上测定<sup>[8]</sup>。

## 2 结 果

### 2.1 转录起始区 ATG 下游序列改造

以 pSBHL-1 质粒 DNA 为模板,利用 IL-3-11 和 IL-3-2 引物进行 PCR 扩增,对 hIL-3 编码顺序 5' 端进行多位点突变,使编码前 15 个氨基酸密码子中大肠杆菌使用频率较低的密码子改为高频使用密码子,并尽可能多使用 A、T 替代 G、C。突变后的 hIL-3 基因构建入 pUCBM20 的 NcoI/BamH I 位点成为 pUC-IL3-11,序列分析显示 hIL-3 编码序列及读框正确,其 N 端突变后的编码序列见图 1。

### 2.2 转录起始区 ATG 上游序列的改造及表达质粒的构建

以 hIL-3 表达质粒 pSBHL-1 DNA 为模板,以 YD2 与 pSB3、YD3 与 pSB3 为引物分别进行 PCR 反应,产物经 2% 琼脂糖电泳鉴定后,用低熔点琼脂糖回收。上述扩增的 DNA 片段含有 P<sub>L</sub> 启动子、SD 序列及改造后的 ATG 上游序列,其中 YD2 与 pSB3 扩增的 DNA 片段两端含 Bgl I/Nco I 位点,经 Bgl I/Nco I 切后与 pSBHL-1 质粒 Bgl I/Nco I 酶切后的大片段连接,成为 pSBHL-2 质粒,而 YD2 与 pSB3 扩增的 DNA 片段两端含 Bgl I/EcoR I 位点,其以 EcoR I 酶切、Klenow 酶补平/Bgl I 酶切后与 Nco I 酶切、Klenow 酶补平/Bgl I 酶切的 pSBHL-1 载体大片段连接,则成为 pBSHL-3 质粒。

pSBH-3 质粒中 EcoR I 与 Nco I 粘端补平后连接又恢复了 EcoR I 切点,其经 EcoR I 酶切、Klenow 酶补平/BamH I 酶切的 pSBHL-3 质粒 DNA 大片段后,与质粒 pUC-IL3-11 经 Nco I 酶切, Klenow 酶补平/BamH I 酶切的小片段连接,成为 pSBHL-11。

pSBH-3 质粒中 EcoR I 与 Nco I 粘端补平后连接又恢复了 EcoR I 切点,其经 EcoR I 酶切、Klenow 酶补平/BamH I 酶切的 pSBHL-3 质粒 DNA 大片段后,与质粒 pUC-IL3-11 经 Nco I 酶切, Klenow 酶补平/BamH I 酶切的小片段连接,成为 pSBHL-11。

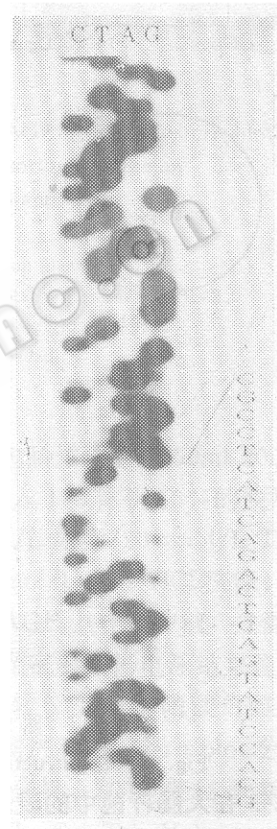


图 1 hIL-3 cDNA 5' 端突变后序列

Fig. 1 The sequence of 5' end mutations of hIL-3 cDNA

pSBHL-2、pSBHL-3和 pSBHL-11 连接后，经酶切筛选鉴定。其构建过程见图 2。

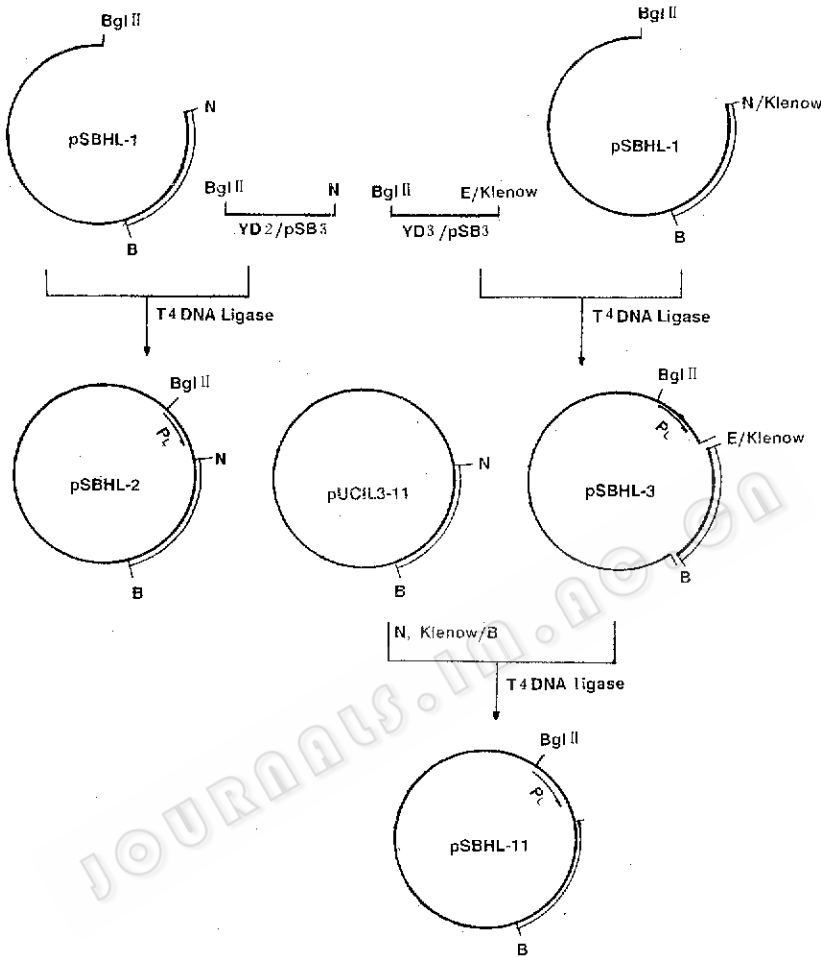


图 2 pSBHL-2、3 和 11 构建示意图

Fig. 2 Construction of the expression plasmid pSBHL-2, 3 and 11

### 2.3 hIL-3 在大肠杆菌中的表达及产物的粗纯化、鉴定

分别挑取 pSBHL-2、pSBHL-3 和 pSBHL-11 单菌落于 5ml LB 中，30℃ 振荡培养过夜，转接后进行表达，收集的表达菌，悬于 SDS-PAGE 样品缓冲液中，沸水煮沸 5min，进行 SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝染色，结果见图 3A。菌体经 42℃ 热诱导后 pSBHL-2/ Tap106 无明显表达条带，pSBHL-3/ Tap106 出现 15.1kDa 的 hIL-3 表达条带，为大肠杆菌菌体总蛋白的 15% 左右。pSBHL-11/ Tap106 hIL-3 表达量明显提高，达菌体总蛋白的 30% 左右。

将 pSBHL-11/ Tap106 表达菌，超声波破碎菌体，离心后上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳分析，表达产物在不溶部分。沉淀中的表达产物在 Tris-HCl 缓冲液或 3mol/L 尿素中不溶解，表明表达的 hIL-3 呈包涵体形式存在，这有利于产物的分离纯化。

离心收集表达的 Tap106/pSBHL-11 菌体，悬于 50ml 20mmol/L Tris-HCl (pH8.0)

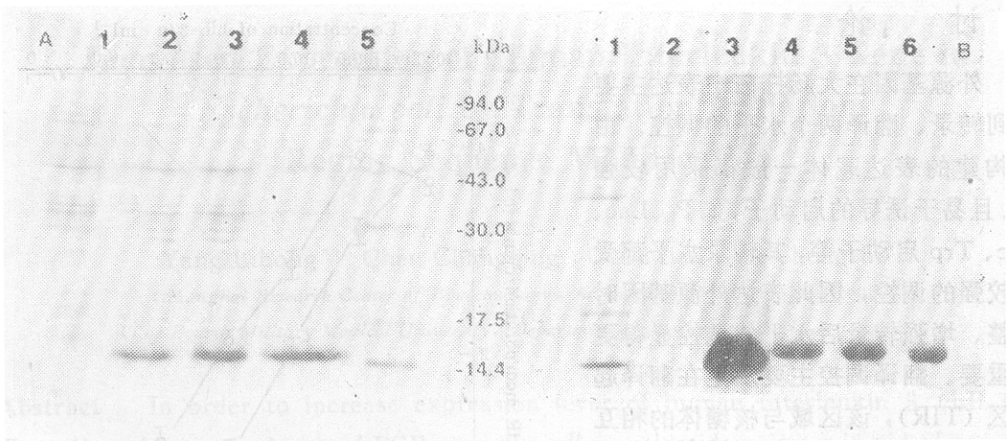


图 3 Tap106/pSBHL-2、3 和 11 表达菌及 hIL-3 粗纯品 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 分析

Fig. 3 SDS-PAGE of extracts of *E. coli* Tap106 harboring expression plasmids of hIL-3, the partially purified hIL-3 and western-blot analysis

- A. SDS-PAGE of extracts of *E. coli* Tap 106 harboring expression plasmids of hIL-3.  
 (1) Total protein of pSBHL-11/Tap106 at 30°C. (2) to (4) Total protein of pSBHL-2, pSBHL-3 and pSBHL-11/Tap106 at 42°C. (5) Protein molecular weight markers.  
 B. SDS-PAGE of the partially purified hIL-3 and Western-blot loaded  
 (1) Protein molecular weight marker. (3) Western-blot.  
 (4) 8 $\mu$ l (5) 6 $\mu$ l. (6) 4 $\mu$ l.

中超声波破碎菌体, 离心沉淀用水洗涤, 即得包涵体。将包涵体再悬于 50ml 20mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 中, 加 100 $\mu$ g 溶菌酶, 室温搅拌 1h, 加入 1/8 体积 15% 的脱氧胆酸, 继续搅拌 1h, 除去残留的完整细胞, 离心后沉淀用 2.5mol/L 尿素/20mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 洗涤, 离心后沉淀再用 0.5% Triton X-100/20mmol/L Tris-HCl 洗涤。纯化后的包涵体溶于 8mol/L 尿素中, 取 50 $\mu$ l 加入等体积 SDS-PAGE 上样缓冲液, 煮沸 5min, 分别取 5 $\mu$ l、10 $\mu$ l、20 $\mu$ l 进行 SDS-PAGE 分析 (见图 3B), 光密度扫描电泳结果显示 hIL-3 蛋白纯度提高到 80%。剥下 SDS-PAGE 胶, 分别于电转仪上转于硝酸纤维素膜和 PVDF 膜, 转移至硝酸纤维素膜的样品用 hIL-3 单抗试剂盒进行 Western-blot 分析 (见图 3B)。转移至 PVDF 膜的样品进行 hIL-3 蛋白 N 端序列分析, 其 N 端 15 个氨基酸序列为: Met-Ala-Pro-Met-Thr-Gln-Thr-Thr-Pro-Leu-Lys-Thr-Ser-Trp-Val-Asn, 结果与文献报道及核苷酸序列推出的氨基酸序列完全一致。

#### 2.4 hIL-3 表达产物的活性测定

诱导表达 10ml Tap106/pSBHL-2、3 和 11 表达菌, 其  $OD_{600} \approx 1.0$ , 分别离心收集菌体, 加入 1ml 7mol/L 盐酸胍/50mmol/L Tris-HCl pH8.0 中, 冰浴 30min, 辅助以超声波破菌, 17000g 离心 10min, 上清用 2mol/L 盐酸胍/50mmol/L Tris-HCl pH8.0 稀释至 10ml, 分别于 TF-1 细胞<sup>3</sup>H-TdR 参入测定活性 (见图 4), 计算每毫升菌表达 hIL-3 总活力单位为 Tap106/pSBHL-2,  $1.6 \times 10^3$ u/ml; Tap106/pSBHL-3,  $2.6 \times 10^4$ u/ml; Tap106/pSBHL-11,  $5.4 \times 10^4$ u/ml。取溶于 8mol/L 尿素的粗纯化 hIL-3 包含体, Lowry's 法测定蛋白含量后进行活性测定, 其比活性为  $1.4 \times 10^6$ u/mg。

### 3 讨 论

外源基因在大肠杆菌中表达主要受到转录、翻译两个水平的调控。由于构建的表达载体一般都采用较强的、且易于诱导的启动子,如  $P_L$ 、Lac、Tac、Trp 启动子等,其转录水平都受到较强的调控,因此表达外源基因时调整、增强转录后水平的调控显得更为重要。翻译调控主要发生在翻译起始区(TIR),该区域与核糖体的相互作用是翻译调控的主要环节,该过程受起始密码子、核糖体结合部位(RBS)、它们之间的距离和 TIR 的二级结构等的影响。对 TIR 的研究表明,ATG 与 SD 顺序之间相距 7、8 个核苷酸、TIR 的次级结构不稳定,对翻译起始最为有利<sup>[9,10]</sup>。我们所构建的 pSBHL-3、pSBHL-11 表达质粒中,ATG 与 SD 序列之间相距均为 7 个核苷酸,而构建的 pSBHL-2 中为 10 个核苷酸,转化大肠杆菌后,除 pSBHL-2 外都能高效表达 hIL-3。对 TIR 二级结构分析表明,pSBHL-2 中 TIR 能形成稳定的二级结构,而 pSBHL-3、pSBHL-11 表达质粒 TIR 不能形成稳定的二级结构,因此后两者能较好的表达 hIL-3。在 pSBHL-3 和 pSBHL-11 中,后者 TIR 的二级结构自由能较高、结构较不稳定,其表达水平亦较高。以上结果都说明 SD 与 ATG 之间的距离适当,同时 TIR 的二级结构不稳定,能更有效地促进翻译的效率。

构建的 hIL-3 表达质粒 pSBHL-11 中,对 hIL-3 编码序列 5' 端(ATG 下游)进行了大量的突变,即  $GCT^6 \rightarrow GCA^6$  (Ala)、 $CCC^9 \rightarrow CCT^9$  (Pro)、 $ACC^{12} \rightarrow ACT^{12}$  (Thr)、 $ACA^{18} \rightarrow ACT^{18}$  (Thr)、 $ACG^{21} \rightarrow ACT^{21}$  (Thr)、 $CCC^{24} \rightarrow CCG^{24}$  (Pro)、 $T^{25}TG \rightarrow C^{25}TG$  (Ieu),不仅大量引入了 AT,降低了 TIR 二级结构的稳定性,而且大大提高了翻译起始阶段密码子的使用频率(如 GCA 较 GCT 提高了 2 倍、CCT 较 CCC 提高了 8 倍),使其 hIL-3 表达水平明显提高。上述结果说明外源基因,特别是真核基因在大肠杆菌中表达时,翻译起始阶段密码子的使用频率极为重要,使用大肠杆菌高频使用密码子可使翻译动力学趋于优化,易于提高其翻译水平。

**致 谢** 本工作得到中国科学院上海生物化学研究所徐来根、第四军医大学免疫教研室黄传书、金伯泉等同志的热心帮助,在此一并致谢。

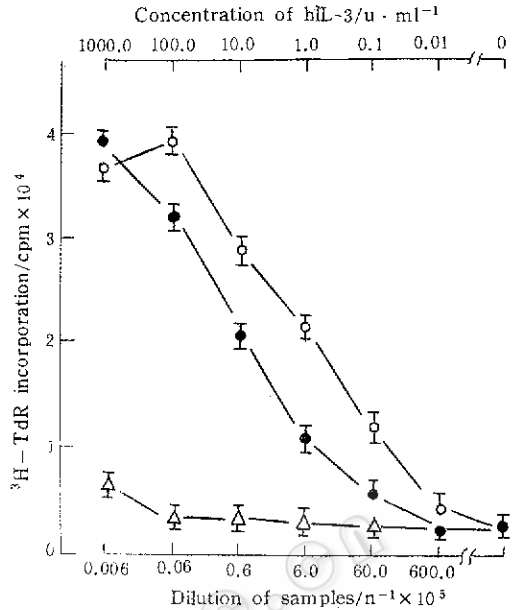


图 4 Tap106/pSBHL-11 表达产物对 TF-1 细胞的刺激曲线

Fig. 4 Stimulation of TF-1 cell proliferation by expression product of Tap 106/pSBHL-11

- Expression product of Tap 106/pSBHL-11
- △ Extract product of Tap 106
- Purified rhIL-3 (Amersham product)

## Increased Expression of Human Interleukin 3 Gene in *Escherichia coli* by Translation Initiation Region Sequence Modification

Yang Lihong\* Chen Changqing Gao Mian Su Chengzhi\*

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai 200233)

(The Fourth Military Medical University, Department of Biochemistry, Xi'an, 710032)\*

**Abstract** In order to increase expression lever of human interleukin 3 (hIL3) in *E. coli*, this paper designed PCR mutation oligonucleotide primers in aid of computer and synthesized it. These primers were used to modify the translation initiation region sequence at two sides of AUG initiation codon, simultaneously to modify some codons into preferred codons for *E. coli*, but not to change amino acid sequence. After it was modified, the hIL 3 gene was cloned into expressed plasmid at the down stream of P<sub>L</sub> promoter and transfected into *E. coli* Tap 106. SDS-PAGE analysis revealed that expression of modified hIL 3 was raised up to about 30% of total cell protein, twice as much that of wild type. Western-blot and N terminal 15 amino acid analysis showed that this recombinant protein was consistent with the natural hIL 3. By the isolation of inclusion bodies, hIL 3 could be obtained with purify of more than 80%, After refolding inclusion bodies, it was able to obviously stimulate proliferation of hIL 3 dependent cell TF-1.

**Key words** Human interleukin 3 gene, expression in *E. coli*, PCR, translation initiation region