

新型表达载体 pEC34 试用于人 γ -干扰素基因的高表达

柴玉波 陈苏民* 赵忠良 陈南春 高 辉

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室 西安 710032)

摘 要 构建了一个新的双顺反子表达载体 pEC34, 它的第一个顺反子是已高表达的 era 基因的部分序列, 并带有原核翻译增强子。当检测 pEC34 的可用性时, 获得了人 γ -干扰素的极高表达。目的蛋白占菌体总蛋白的 85.5%, 诱导后经 SDS-PAGE 分析, 出现分子量为 15.5kDa 左右的蛋白表达带, Western blot 结果证实为人 γ -干扰素。无压力传代 30 次表达质粒仍然稳定, 表明 pEC34 可能用作真核蛋白质高表达工程菌株的载体。

关键词 双顺反子, 原核翻译增强子, 表达载体, γ -干扰素

真核基因在原核系统中表达是目前获得所需目的蛋白的一个主要途径。虽然经过几十年的研究, 对原核表达系统已比较清楚, 但表达载体还远不能满足人们的要求, 为此人们设计了各种各样的表达载体, 力求获得基因的高表达, 并尽可能满足不同基因表达的需要^[1~6]。侯云德等^[7]曾用双顺反子表达载体表达了 α D 型干扰素。我室构建了双顺反子——翻译增强子新型表达载体 pEC34, 该载体利用终止-起始双顺反子表达结构, 并在其中插入了原核翻译增强子序列, 在对该表达载体检测时, 得到了人 γ -干扰素的极高表达。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

质粒 pLB-IFN- γ 含有人 IFN- γ 基因, 由李颺赠送。大肠杆菌 TAP106 为本室贮存, 基因型: Leu⁻, bio⁻, thi⁻, galkam⁻, lacU169, rpsL⁻, supE44, N⁻, λ [(int-ral) BamHI, (cro-bio) cI857], N::kan^r。表达质粒 pEC34 由陈苏民等构建(国家发明专利申请号 96118680.1)。

1.2 主要试剂

限制酶及蛋白质标准分子量分别购自 New England Biolabs、华美生物工程公司。人 γ -干扰素单克隆抗体由李颺赠送。

1.3 DNA 重组及 Western blot

参照 Sambrook 等^[8]方法。质粒 pLB-IFN- γ 以 EcoRI-SalI 双酶切, 回收约 0.45kb 大小片段, 克隆入 pEC34 的相应位置, 转化大肠杆菌 TAP106, 得表达质粒 pEC34-IFN- γ 。

1.4 蛋白质诱导表达及电泳

自 Ap 平板挑取 pEC34-IFN- γ 单菌落, 接种于含 100 μ g/ml Ap 的 LB 培养液中 32 $^{\circ}$ C

全军“八五”攻关项目(编号 913010)资助。

* 联系负责人。

本室刘新平、王 红(解剖学教研室)也参加了本文的工作。

本文于 1996 年 10 月 31 日收到。

振荡培养,次日以 1:50 转接,32℃ 振荡培养至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$,立即转入 42℃ 水浴振荡培养,对照菌在 32℃ 继续培养,于诱导后 1, 2, 3, 4, 5, 6h 各取出 800 μ l 菌液,离心收集菌体,悬浮于 40 μ l 1x Loading buffer 中,按 Silhavy^[9]方法进行 SDS-PAGE,上样量为 2 μ l/泳道。

1.5 光密度扫描

采用 SHIMADZU 自动光密度扫描仪扫描。

1.6 稳定性检测

将 Ap 平板上的 pEC34-IFN- γ 单菌落接种于 2ml 不含 Ap 的 LB 液中,32℃ 振荡培养,每隔 12h 以 1% 转接一次,传代过程中所用培养液均不加 Ap,连续传代 30 次,划 Ap 平板,长出单菌落后,随机挑取几个单菌落,进行诱导,观察表达情况。

2 结果

2.1 重组质粒 pEC34-IFN- γ 的鉴定

γ -干扰素基因,以 EcoRI-Sal I 双酶切,切出 450bp 大小片段,克隆入 pEC34 第 2 个顺反子相应位置,得重组表达质粒 pEC34-IFN- γ ,见图 1。

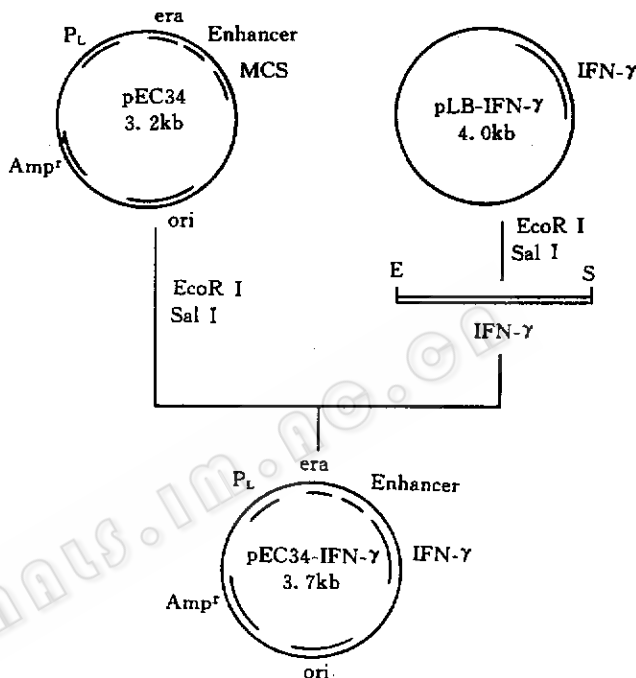


图 1 表达质粒 pEC34-IFN- γ 构建流程图

Fig.1 Construction of expression plasmid pEC34-IFN- γ

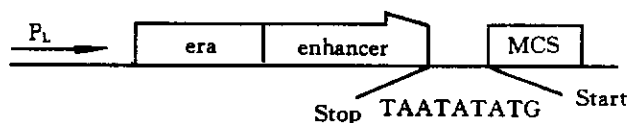


图 2 pEC34 表达载体局部简图

Fig.2 Partial region of expression vector pEC34

era: the first cistron; enhancer: prokaryotic translational enhancer including SD sequence of the second cistron; MCS: multiple clone site

表达质粒 pEC34-IFN- γ 42℃ 诱导后,与 32℃ 未诱导 pEC34-IFN- γ 相比,在 15.5kDa 左右出现一条新的深染的蛋白带,与目的产物 γ -干扰素分子量大小相符。观察不同诱导时间对表达的影响,可以发现,诱导 1h 后即有 γ -干扰素的高表达,诱导 3h 达到最高,以后略有下降,到 6h 仍有较高表达,见图 3。表明最佳诱导时间为 3h。以抗人 γ -干扰素单克

2.2 表达产物的鉴定

2.2.1 表达质粒 pEC34-IFN- γ 的表达及 Western blot: pEC34 为一含翻译增强子的双顺反子表达载体,由启动能力较强的 λP_L 启动子控制其下游基因的表达,并受 c1857 温敏调控。pEC34 表达载体局部简图如下(图 2)。

隆抗体作 Western blot 分析,结果仅此新的表达带杂交信号阳性,而 32℃ 未诱导菌以及菌体其它蛋白带均无阳性信号,表明此 15.5kDa 表达带即为人 γ -干扰素,见图 4。

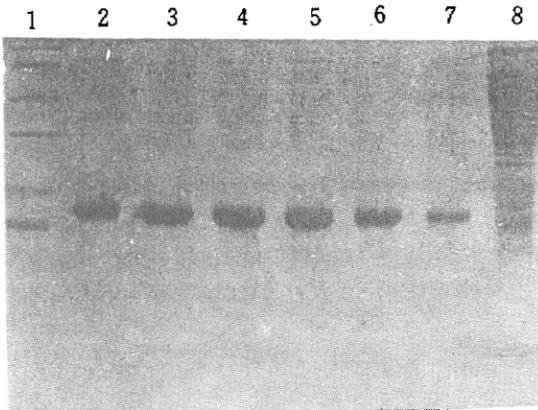


图 3 不同诱导时间 γ -干扰素的表达结果

Fig.3 IFN- γ expression in variant induction period

1. Low molecular protein marker 94, 67, 43, 21, 14.4kDa
2~7. Induction at 42℃ for 1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours
8. Uninduced pEC34-IFN- γ control

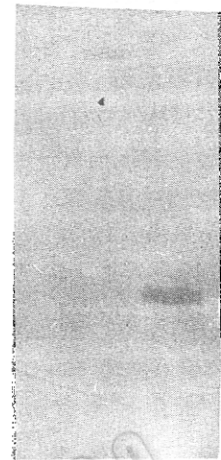


图 4 诱导表达蛋白电泳的 hIFN- γ Western blotting 结果

Fig.4 hIFN- γ Western blotting of the PAGE gel

2.2.2 表达分析:以岛津自动光密度扫描仪扫描,结果显示目的蛋白表达量最高时占菌体总蛋白的 85.5%,见图 5。菌体裂菌后,离心,分别取上清和沉淀作 SDS-PAGE,结果显示表达蛋白存在于沉淀中,表明此表达产物以包涵体形式存在。

2.2.3 稳定性分析:无压力传代 30 次,划 Ap 平板,随机挑取其中 5 个克隆,结果均有 γ -干扰素的高表达,见图 6。说明此表达质粒在传代 30 次后仍然稳定。

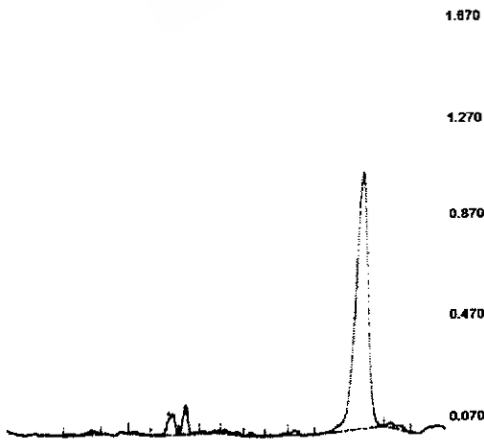


图 5 诱导表达蛋白图谱光密度扫描结果

Fig.5 Density scanning of the expression protein map

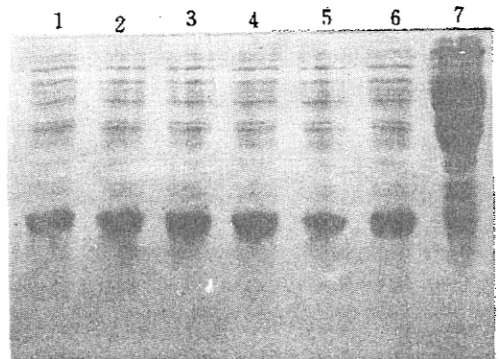


图 6 传代后 γ -干扰素表达结果

Fig.6 Expression of hINF- γ after 30 generations

1~6. Induction at 42℃ for 3 hours after 30 generations

7. Uninduced control after 30 generations

3 讨 论

一个外源基因能否在大肠杆菌中表达,受许多因素影响。尽管使用了强的启动子,但经常发现虽然基因已转录为 mRNA,却无目的蛋白表达,可见翻译起始在原核表达中有着举足轻重的作用。因此,我们构建的表达载体 pEC34 就是从改善翻译效率入手的。

陈苏民等^[10]首次在大肠杆菌表达系统中高表达了大肠杆菌 era 基因, Era 蛋白超过菌体总蛋白量的 80%,但真核基因在大肠杆菌表达系统中表达,超过 80% 以上的报道极少。我室构建的新型表达载体 pEC34,利用已高表达的 era 基因翻译起始序列,结合双顺反子结构和原核翻译增强子^[4~6]构建而成,表达的 γ -干扰素为 Western blot 所证实。表达质粒 pEC34-IFN- γ 经无压力传代 30 次,仍然稳定,证明此表达载体表达效率较高,适合于作为工程菌进行生产。

pEC34 对其它真核基因表达的适用性以及有关此表达载体相应的表达规律,正在进一步探讨中。

参 考 文 献

- [1] Schoner B E, Belagaje R M, Schoner R G. Methods Enzymol. 1990, 185:94~103.
- [2] Wataru I, Kurosawa Y. Gene. 1992, 118:87~91.
- [3] Olins P O, Rangwala S H. J Biol Chem. 1989, 264(29):16973~16976.
- [4] Olins P O, Dovine C S, Ranglawala S H et al. Gene. 1988, 73:227~235.
- [5] Olins P O, Ranglawala S H. Methods Enzymol. 1990, 185:115~119.
- [6] Gallie D R, Kado C I. Proc Natl Acad Sci USA. 1989, 86:129~132.
- [7] 侯云德,林建新,周建华等.病毒学报,1985,1(4):295~302.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab, New York. 1989.
- [9] Silharay T J. Experiments With Gene Fusion. Cold Spring Harbor Lab. New York. 1984.
- [10] 陈苏民, Donald L C. 生物工程学报, 1991, 7(3):201~206.

Overproduction of Human IFN- γ in *Escherichia coli* by Novel Expression Vector pEC34

Chai Yubo Chen Sumin Zhao Zhongliang Chen Nanchun Gao Hui Liu Xinping Wang Hong*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology*, Department of Anatomy, The 4th Military Medical University, Xi'an 710032)

Abstract A novel two-cistron expression vector, pEC34, which contained partial era gene sequences as the first cistron and combined with prokaryotic translational enhancer, was constructed. By using pEC34/TAP106 system human IFN- γ was highly expressed in *Escherichia coli*. After induction, a 15.5kDa new protein band appeared in SDS-PAGE. The target protein occupied 85.5% of the total bacterial protein and western blotting confirmed it was hIFN- γ . The expression plasmid is stability after 30 generation. It suggested that the pEC34 as vector for eukaryotic gene expression is possible.

Key words Two-cistron, translational enhancer, expression vector, human IFN- γ