

分子伴侣 SecB 基因和人淋巴毒素基因在大肠杆菌中的共表达

周颖 张青 殷长传* 宋大新 陈永青**

(复旦大学微生物学系和遗传研究所* 上海 200433)

分子伴侣(Chaperone)是细胞内催化及维持其他蛋白质正确构象的一类蛋白质分子^[1,2]。研究表明,分子伴侣参与细胞内许多蛋白质的折叠、聚合以及跨膜运输^[3,4],通过瞬时稳定其他蛋白质折叠中间体,阻止了蛋白中间体的聚集,帮助其形成正确构象^[5,6]。SecB 是一个胞质酸性蛋白,单体分子量为 17kDa,在体内以 4~6 个相同亚基组成的寡聚体形式存在。它在大肠杆菌中参与蛋白质分泌系统,纯化后进行离体试验表明,它可以阻止抗蛋白酶的 pre-MBP 的出现,能稳定地结合前体蛋白,使其处于适合运输的构型^[7],它的作用是使蛋白质可以在正确折叠前跨过细胞膜,运输到细胞周质中。SecB 通过与前体蛋白结合,从而阻止前体蛋白由于不正确折叠发生的聚集,属于分子伴侣家族的成员。

分子伴侣的这些特性使得它们在基因工程中具有广阔的应用前景。外源蛋白在大肠杆菌中高表达时往往形成无活性的包涵体,包涵体大多是蛋白质在过量表达过程中不正确折叠形成的^[8],正确构象的形成需要在体外进行变性和复性。蛋白质的复性过程十分复杂,在方法上缺少一定的规律可循,特别是分子量较大以及二硫键较多的分子,复性更加困难,有的甚至根本难以复性。分子伴侣可以促进其它蛋白质的正确折叠,设想在基因工程中如果将分子伴侣基因与外源蛋白基因共存表达,可能会有效地促进外源蛋白形成正确的构象,提高其活性,减少包涵体的形成,对基因工程下游的处理带来很大方便。根据这个思路,我们将克隆的 SecB 基因与重组人淋巴毒素(Lymphotoxin,简称 LT)基因在同一个大肠杆菌细胞中共存表达,来研究分子伴侣 SecB 对外源基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 酶和试剂

限制酶及 T4 DNA 连接酶等工具酶均购自美国 Promega 公司;ATP,DTT 购自北京原平公司,其余试剂均为国产分析纯产品。

1.2 质粒及菌株

带有 SecB 基因的克隆质粒 pAK330^[9]由美国 Tufts 大学 Carol A. Kumamoto 教授惠赠;质粒 pA-cYc184 为 Bio-Labs 公司产品;带有 LT 基因的表达质粒 pRSETC-LT 由复旦大学遗传所李昌本教授惠赠;大肠杆菌 HB101[*supE44**hsd20*(*r_B⁻ m_B⁻)* *recA13**ara-14**proA2**lacY1galK2**rpsL20**xy1-5**mtl-1*]用作基因克隆受体菌,为本实验室保存;大肠杆菌 BL21(DE3)[*hsdSgal*(*λ**Its857**ind1* *Sam7nin5**lacUV5-T71*)]用作基因表达受体菌,为本实验室保存。

1.3 基因工程的一般操作

有关质粒 DNA 的抽提,酶切,连接,转化等基因工程一般操作均按 Sambrook 等方法^[10]进行。

1.4 SDS-PAGE 和蛋白质浓度的测定

不连续变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)采用 Lammile 系统^[11],分离胶浓度 12.5%,电泳后用考马斯亮蓝 R-250 染色。蛋白质浓度测定采用 Bradford 方法^[12],以小牛血清白蛋白(BSA)作为标准。

国家自然科学基金资助项目,基金编号 39370387。

** 联系作者。

本文于 1996 年 9 月 19 日收到。

1.5 SecB 表达载体与 LT 表达载体的共转化

采用 CaCl_2 转化方法,在氨苄青霉素(Ap)和氯霉素(Cm)双抗平板上筛选转化子。

1.6 菌体的诱导表达

表达菌株接种于 2ml LB(含相应抗生素, Ap 终浓度为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$, Cm 终浓度为 $25\mu\text{g}/\text{ml}$)中, 37°C 振荡培养过夜,以 1%接种量转接于 50ml LB 中, 37°C 振荡培养 3~4 天至 OD_{590} 约为 0.6~1.0 时,加入 IPTG 至终浓度为 $0.7\text{mmol}/\text{L}$, 37°C 继续培养,于诱导后 2、4、6、8、10h 取样。

1.7 可溶性 LT 粗品的制备

菌体发酵液, 4°C 、5000r/min 离心 5min, 弃上清。沉淀悬于等体积超声波裂解液($50\text{mmol}/\text{L}$ Tris-Cl, pH 8.0, 5%甘油, $1\text{mmol}/\text{L}$ EDTA, $100\text{mmol}/\text{L}$ KCl, $10\text{mmol}/\text{L}$ β -巯基乙醇), 超声波处理后, $12000\text{r}/\text{min}$ 离心 15min, 收集上清, 用于体外抗肿瘤活性的测定。

1.8 体外抗肿瘤活性的测定

以培养的小鼠成纤维母细胞瘤细胞系(L929), 测定淋巴毒素的细胞毒性, L929 用含 10%小牛血清的 PRMI1640 培养基传代培养, 测活时将 L929 细胞配成 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 细胞悬液, 取 $100\mu\text{l}$ 接种 96 孔板, 每孔加 $100\mu\text{l}$ 不同稀释度的样品和丝裂霉素 C($0.5\mu\text{g}/\text{ml}$), 37°C 培养 48~72h。镜检观察细胞的存活情况。杀死 50% 细胞时所用样品稀释度的倒数即为此样品的活性单位数。

2 结果与讨论

2.1 SecB 基因的亚克隆

SecB 基因已克隆在质粒 pAK330 上, pAK330 为 pBR322 的衍生质粒, 全长 3.9kb, 带有氨苄青霉素抗性, SecB 基因插入其 BamHI-BalI 位点之间。质粒 pAcYc184 全长 4.2kb, 带有质粒 p15A 的复制起始点, 使得它能与带有 ColE1 复制起始点的载体, 如 pBR322、pUC19 共存, 并带有氯霉素及四环素抗性标记。利用 SecB 基因上游载体上的 HindIII 及下游载体上的 puV II 位点, 经双酶切, 把 secB 基因克隆入 pAcYc184 的 HindIII-EcoRV 间, 同时使得 pAcYc184 的 Tc 抗性基因失活。转化大肠杆菌 HB101, 通过 Tc 抗性基因失活筛选重组子, 并进行酶切鉴定。

2.2 质粒 pAcYc184-SecB 与质粒 pRSETC-LT 共转化大肠杆菌 BL21(DE3)

抽提 pAcYc184-secB 质粒, 转化已带有 pRSETC-LT 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3), 在氨苄青霉素及氯霉素双抗平板上筛选共存转化子。快速抽提共存转化子质粒, 并利用在 pAcYc184-secB 和 pRSETC-LT 上共有的单酶切位点 HindIII 进行酶切鉴定。

2.3 质粒 pAcYc184-SecB 与质粒 pRSETC-LT 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的共表达

含质粒 pAcYc184-SecB 和 pRSETC-LT 的大肠杆菌经过 IPTG 诱导, 两个质粒上的基因均进行转录和翻译, SDS-PAGE 电泳表明, 在共存质粒的菌株中可溶性蛋白的种类比仅含有 pRSETC-LT 质粒的菌株明显增多, 但 LT 的表达量在两者中相近。

2.4 SecB 基因表达对重组人淋巴毒素可溶性表达的影响

上清样品进行体外抗肿瘤活性测定的结果见图 1, 阴性对照组包括不经 IPTG 诱导的样品和只含质粒 pAcYc184-SecB 的样品, 其活性均小于 $10^2\text{u}/\text{ml}$ 。在诱导后 2h, 共存菌株(LT+SecB)样品的活性与只含有 LT 表达载体菌株(LT)的样品活性相差不大;但在 4h, 后者的活性就达到最高值, 前者的活性却无显著提高, 这种情况一直持续到诱导后 6h;在诱导后 8h, (LT+SecB)样品的活性达到最高值, 并且比 LT 样品的活性最高值提高 50%, 此时 LT 样品的活性已经下降, 此后, 由于蛋白发生降解, 两者的活性均呈下降趋势。

一般认为, SecB 蛋白的功能是与底物蛋白结合, 稳定其特定的构型, 同时阻断其折叠过程^[13]。如在蛋白质运输过程中, SecB 能与分泌蛋白的前体结合, 使之维持在一种适合运输的构型, 即既不能折叠成最终的稳定状态, 也不能发生聚集。我们的实验结果显示共存菌株的活性提高近 50%, 产生这种现

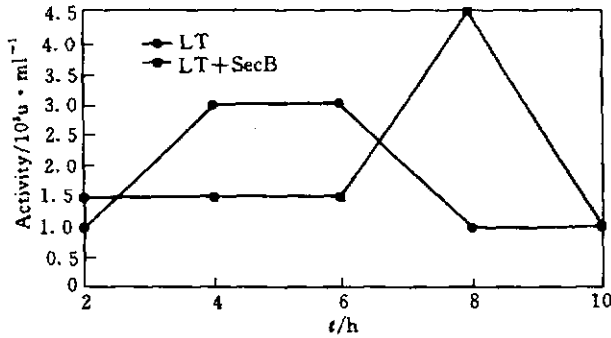


图1 大肠杆菌 BL21 (DE3) (pAcYC184-SecB + pRSETC-LT) 或 BL21(DE3)(pRSETC-LT)破菌上清中体外抗肿瘤活性

象的一个可能原因是 SecB 能够促进蛋白质的正确折叠,它的抗折叠作用也许有效阻止了蛋白中间体的聚集。但也可能正是由于 SecB 的抗折叠作用,从而使达到活性最高值所需的诱导时间被延滞。这同时说明,SecB 与底物蛋白的结合,并不是永久地阻断底物蛋白的折叠,在不能进行运输时,也能够使其折叠成为一具有稳定四级结构的构型。

对于 SecB 蛋白如何识别底物蛋白并与其结合,存在着两种观点。由于 SecB 在蛋白质运输过程中具有很重要的作用,有人认为它通过信号肽从而与底物蛋白结合^[14]。但另一种观点认为,SecB 并不是识别底物蛋白的特定序列从而与底物蛋白结合,它们之间的结合能力在很大程度上取决于底物蛋白的折叠速度及其它的某些结构特性^[15]。我们的实验结果显然支持后一种观点,在大肠杆菌中过量表达的 LT 蛋白,正是由于它的折叠速度或其它结构特性,被分子伴侣 SecB 识别并与其结合。

分子伴侣 SecB 能够增加外源基因的可溶性表达,这样我们就可以比较简单地获得具有生物活性的目标蛋白分子,而无需复杂的体外复性过程。我们所提供的这条技术路线,在基因工程实际应用中具有一定的价值,同时对于深入研究细胞中蛋白质靶向(Protein Targeting)的遗传学研究^[16]具有重要意义。

致谢 复旦大学分析测试中心任庆广老师在体外抗肿瘤活性测试方面提供帮助,复旦大学遗传学研究所李昌本教授对本研究提出了许多重要的建议,特此一并热忱感谢。

参 考 文 献

- [1] Ostermann J, Horowich A L, Neupert W *et al.* Nature, 1988, 341: 125~132.
- [2] Bochkareva E S, Lissin N M, Girshovich A S *et al.* Nature, 1988, 336: 254~257.
- [3] Jorg, M, Thomas L, Raina B *et al.* Nature, 1991, 352: 36~42.
- [4] Johannes B, Marion S, Miriam F *et al.* Biochemistry, 1991, 30: 1586~1591.
- [5] Choithia C. Ann Rev, Biochem. 1990, 59: 1007~1013.
- [6] Elena S B, Nicolai M L, Gregory C F *et al.* J Biol Chem, 1992, 267: 6796~6800.
- [7] David N C, Vytas A B, Judith B W *et al.* Cell, 1988, 53: 273~283.
- [8] Schein C H. Bio/Technology, 1989, 7: 1141~1149.
- [9] Kumamoto C A, Nault A K. Gene, 1989, 75: 167~175.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Laemmli U K. Nature, 1970, 127: 680~686.

- [12] Bradford M M. *Anal. Biochem.*, 1976, 72:241.
[13] Kumamoto C A. *Mol Micro*, 1991, 5: 19~22.
[14] Gannon P M., Kumamoto C A. *J Biol Chem*, 1993, 268: 1590~1595.
[15] Lecker S, Lill R, Ziegelhoffer T *et al.* *EMBO J*, 1989, 8: 2703~2709.
[16] 陈永青, 盛祖嘉. 中国的遗传学研究. 1993-1994. 中国遗传学会编, 1995, 355~356.

Coexpression of Chaperion SecB and Human Lymphotoxin in *Escherichia coli*

Zhou Ying Zhang Qing Yin Changchuan Song Daxin Chen Yongqing
(*Department of Microbiology, Fudan University, Shanghai 200433*)

Abstract SecB is a 17kDa cytosolic chaperone protein that is required for efficient export of particular protein in *Escherichia coli*. The function of SecB is to bind precursors and stabilize the pre-folded conformation. SecB has a direct role in controlling the rate of precursors folding to their interaction with membrane components. In this paper the SecB gene was cloned into plasmid pAcYc184-SecB, which can be coexisted with plasmids having ColE1 origin. The plasmid pAcYc184-SecB was then transformed into *E. coli* strain harboring a high-expression vector of human lymphotoxin gene. By measuring the anti-tumor activity in the soluble components of cells, we found the highest activity was raised about 50% and the induction time for reaching the highest activity was delayed.

Key words Chaperone, SecB, lymphotoxin, coexpression, cytotoxicity