

苯丙氨酸脱氨酶 cDNA 在大肠杆菌中的克隆与表达

刘敬忠 向 华* 胡 维 朱章菱 祝 瑾 李氩元

(首都医科大学附属北京红十字朝阳医院 北京 100020)

摘 要 利用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术从欧芹总 RNA 分离制备了苯丙氨酸脱氨酶(PAL) cDNA,重组到质粒 pBluescript 及 pET23b 中,后者转化大肠杆菌 JM109DE3 获得 PAL 的高效表达。插入片段两端共 920bp 的测序结果与文献符合率为 99.78%。工程菌细胞裂解液用 SDS-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)分析显示在分子量 77kDa 处有一条表达很强的蛋白区带,与 PAL 亚基分子量相符,约占菌体总蛋白的 15%。用 HPLC 法检测到苯丙氨酸被 PAL 脱氨的产物肉桂酸,且该 PAL 酶活力特异性好,适于 PKU 治疗之用。

关键词 苯丙氨酸脱氨酶基因 基因表达 大肠杆菌 苯丙酮尿症
学科分类号 Q 789

经典型苯丙酮尿症(以下简称 PKU)系常染色体隐性遗传病。在我国及全世界均相当常见,发病率约为万分之一,致病基因携带者约为 1/(65~70)。致病原因是患者苯丙氨酸羟化酶(PAH)基因发生突变,使肝内缺乏有活力的 PAH,不能将苯丙氨酸转化为酪氨酸,从而造成苯丙氨酸及其有害代谢产物的大量积累,损伤患儿脑细胞正常发育而导致智力低下、呆傻。现行治疗方法是低苯丙氨酸饮食治疗,价格昂贵,服用时间长(从新生儿一查出至患儿智力发育基本成熟),且患儿难以接受和持久^[1]。有用苯丙氨酸脱氨酶(Phenylalanine ammonia lyase, PAL EC4.3.1.5)治疗 PKU 的尝试^[2,3],但均由于酶本身价格贵,用量大,成本高等原因,尚未见临床试用的报道。用外源性正常 PAH 基因进行的 PKU 基因治疗研究也尚未见到成功的报道^[4]。

本研究利用基因重组技术,将欧芹 PAL cDNA 在大肠杆菌中克隆并表达,为今后 PKU 的基因治疗研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物标本:欧芹(*Petroselinum crispum*)引种自北京市农科院蔬菜研究所。

1.1.2 菌株和质粒:DH5 α 为本实验室收藏;JM109DE3 购自 Promega 公司;pBluescript KS(+)为 Stratagene 公司产品;pET23b 为 Novagen 公司产品。

1.1.3 工具酶类及其它试剂:限制酶,AMV 逆转录酶,T4DNA 连接酶等购自 Promega

本研究由北京市自然科学基金资助。

* 联系人,现在中国科学院微生物研究所遗传室,北京 100080。

收稿日期:1997-08-14,修回日期:1998-01-20。

公司;Taq DNA 聚合酶, RNasin, DEPC, IPTG, 抗生素等购自华美公司;肉桂酸, 香豆酸等为 Sigma 公司产品。

1.1.4 引物的设计与合成:

P1: 5' TACGT cAtATGGAGAACGGTAAC 3'
Nde I

P2: 5' tac gatatC AGGAACTTGGTAACAAT 3'
EcoR V

P3: 5' CTA AGAtctCATGCATGTCAGTTAACA 3'
Bgl II

P1、P2、P3 由中国科学院微生物所合成,其中小写字母表示与发表的 PAL cDNA 序列不同的或另加的碱基。T7、T3 及 SP6 Promoter sequencing primer 等购自 Promega 公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 欧芹总 RNA 的提取: 将 1g 2 月龄欧芹幼苗带长柄的叶和须根洗净、吸干,剪成 3~5mm 小段,放在垫有湿润滤纸的培养皿中,置于超净台中室温培养 5h。其间 UV 光照数次,每次 15min。收集于 50ml DEPC 处理过的离心管中,加入 10ml D 溶液,低温下用高速分散器制成匀浆,用文献 [5] 相同方法提取总 RNA。

1.2.2 利用 RT-PCR 技术扩增欧芹 PAL cDNA: 采用引物 P1/P3 可得到 PAL cDNA 全部编码序列(记为“PAL PCR1”)。采用 P2/P3 可得到 PAL cDNA 全部编码区和 5' 非编码区(记为“PAL PCR2”)。RT-PCR 按常规方法进行 [6]。

1.2.3 构建重组质粒 pBSPAL: 回收 PAL cDNA 扩增片段“PAL PCR2”,用 EcoR V 和 Bgl II 双酶解,用部分沉淀法纯化之 [7]。将质粒 pBluescript DNA 用 EcoR V 和 BamHI 双酶切,低熔点胶回收纯化长 2.94kb 片段。将上述纯化得到的 PAL cDNA 片段及 pBluescript 载体片段按 3:1 摩尔比混合,在 T4 DNA 连接酶的作用下连接重组,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。用酶切图谱法筛查阳性克隆(记为 pBSPAL)。

1.2.4 构建表达质粒 pET23bPAL: 回收 PAL cDNA 扩增片段“PAL PCR1”,用 Nde I 和 Bgl II 双酶解。载体 pET23b 用 Nde I 和 BamHI 切开。连接、转化及酶切鉴定基本与 1.2.3 方法相同。

1.2.5 pBSPAL 及 pET23bPAL 中 PAL cDNA 片段序列的测定: 质粒 DNA 按改进的碱变性/PEG 小量法制备 [5]。用 ABD 373 型自动测序仪测序,质粒 DNA 用量约 1 μ g,测序引物为 T7、T3 及 SP6 promoter 测序引物。采用 Dye terminator 法作测序反应。

1.2.6 pET23bPAL/JM109DE3 表达系统的建立: 制备酶切及序列分析正确的重组质粒 pET23bPAL,转化 JM109DE3 感受态细胞。由于该菌株可诱导表达 T7 RNA 聚合酶,从而启动 pET23bPAL 上 T7 启动子而高效表达 PAL。

1.2.7 用 SDS-PAGE 检测表达产物 PAL,按常规方法进行 [5,6]。

1.2.8 PAL 酶活性(催化苯丙氨酸脱氨)及特异性(不催化酪氨酸脱氨)的检测 [8,9]: NZCYM 培养基设 3 个组合:①只添加酪氨酸(Tyr),②只添加苯丙氨酸(Phe),③同时添加酪氨酸和苯丙氨酸。通过 HPLC 同时检测培养基中肉桂酸(Phe 脱氨产物)和香豆酸(Tyr 脱氨产物)的生成情况。方法如下:收集 pET23bPAL/JM109DE3 培养物(经 IPTG 诱导),离心取上清 400 μ l,加 30 μ l 2mM HCl 酸化,加蒸馏水稀释 10 倍,0.45 μ m 微孔滤

膜过滤,取 20 μ l 进行 HPLC 分析。流动相为 50% 甲醇含 0.1% 乙酸,流速为 1ml/min,层析柱为 μ Bondpak C18 柱 (0.45 \times 25cm),检测波长为 313nm,波峰积分面积由计算机自动求出。设肉桂酸及香豆酸的标准对照。

2 结 果

2.1 欧芹总 RNA 的提取及 PAL cDNA 的制备

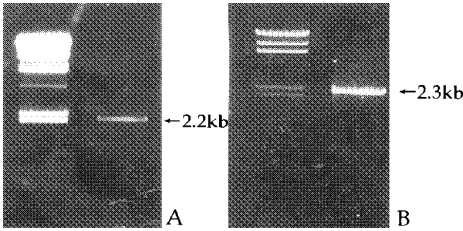


图 1 RT-PCR 分离扩增欧芹 PAL cDNA 电泳结果
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PAL cDNA amplified by RT-PCR
A. RT-PCR product I (primer P1/P3)
B. RT-PCR product χ (primer P2/P3)

2.3kb pBluescript 载体片段为 2.94kb,共计 5.26kb。用 BamHI 及 EcoRI 酶切产生一条 5.26kb 的条带。EcoRI 和 SacI 酶切均产生 3.5kb 和 1.76kb 两条带。HindIII 酶切产生 4.1kb 及 1.16kb 两条带。图 2A 中,酶切分析的电泳结果与预期结果完全符合。

2.3 pET23bPAL 酶切分析结果

在 pET23bPAL 中,插入片段 PAL 为 2.2kb, pET23b 载体片段为 4.3kb,共 6.5kb。用 NdeI 酶切获得 6.5kb 单一条带。用 SacI 酶切产生 1.9kb 和 4.6kb 两条带。图 2B 中电泳分析的结果与以上预期结果相符合。

2.4 克隆化 PAL cDNA 序列分析结果

以 pBSPAL 为模板,T3 Promoter sequencing primer 为测序引物,对该克隆化 PAL cDNA 3' 端进行了序列分析,所测 520bp 与文献报道的序列完全相同。以 pET23bPAL 为模板,T7 promoter sequencing primer 为测序引物,对克隆化 PAL cDNA 5' 端进行了序列分析,在所测 420bp 中,发现两个碱基变异,引起 CD83 CAG \rightarrow GAC Gln \rightarrow Glu

提取到的欧芹总 RNA 的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳显示 18S 带和 28S 带清晰完整无降解。测得 OD_{260nm}/OD_{280nm} 比值 > 2.0,说明纯度很好(图略)。图 1 为用 RT-PCR 技术获得的欧芹 PAL cDNA 产物的琼脂糖凝胶电泳图谱。A 中 2.2kb 系用引物对 P1、P3 所得到的 PAL 完整的编码序列;B 中 2.3kb 系用引物对 P2、P3 所得到的包括 5' 非编码区、3' 非编码区及全部编码区的片段。

2.2 pBSPAL 质粒酶切鉴定结果

在 pBSPAL 中,插入片段 PAL 为

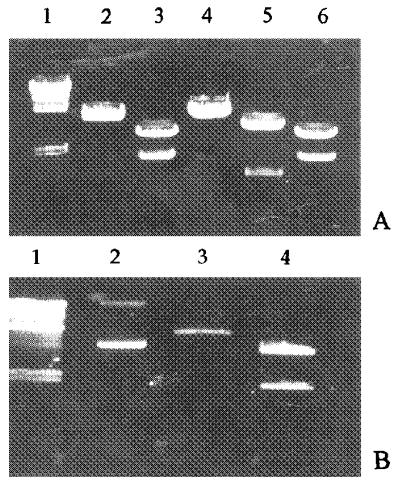


图 2 重组质粒酶切鉴定的琼脂糖凝胶电泳图
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids digested with restriction enzymes
A. Identification of plasmid pBSPAL
1. λ /HindIII 2. pBSPAL/BamHI 3. pBSPAL/EcoRI
4. pBSPAL/EcoRI ; 5. pBSPAL/HindIII 6. pBSPAL/Sac I
B. Identification of plasmid pET23bPAL
1. λ /HindIII ; 2. pET23bPAL/Nde I ; 3. pET23bPAL/Sac I

Glu) 和 CD101 GAT→GGT(Asp→Gly), 与文献报道结果的总符合率为 99.78%。

2.5 PAL cDNA 在 *E. coli* 中的表达活性及特异性

2.5.1 SDS-PAGE 电泳结果: 图 3 为含重组表达质粒 pET23bPAL 的菌株 JM109DE3 的细胞裂解液 SDS-PAGE PAL→电泳结果。与含空载体菌株相对照, 重组表达菌在分子量 77kDa 附近有明显过量表达的蛋白条带, 与理论计算的 PAL 亚单位分子量相符合。经 UVP 凝胶软件扫描分析, PAL 表达量可达菌体总蛋白量的 15% 以上。

2.5.2 克隆化 PAL 酶活性及特异性: 我们建立了能灵敏检测酪氨酸脱氨(TAL 活性)产物香豆酸(Coumaric acid)同时亦可检测苯丙氨酸脱氨产物肉桂酸(Cinnamic acid)的 HPLC 方法。图 4A 示 0.1mmol/L 标准品检测结果, 图中 A1 示检测样品只加肉桂酸, A2 示检测样品中只加香豆酸, A3 示检测样品既加香豆酸又加肉桂酸。综合以上 3 项结果可以看出, 在该 HPLC 实验条件下, 香豆酸出现双波峰(5.89 min 和 6.74min 位置), 这是由于它具有顺式和反式异构体, 此与有关文献报道相同^[8,9]。肉桂酸出峰时间较晚(12.62min), 为特

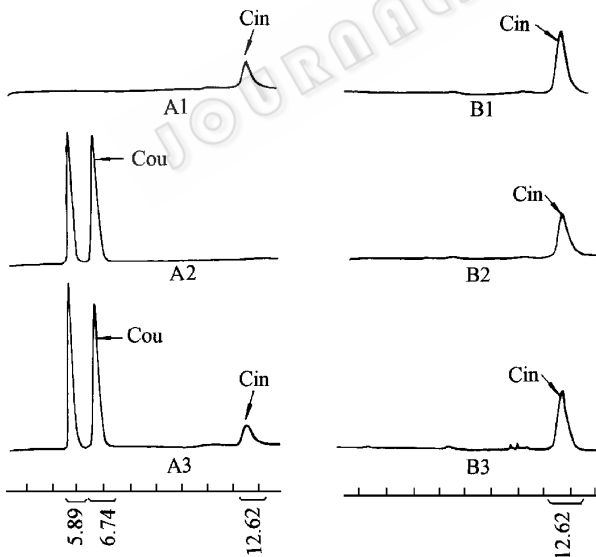


图 4 HPLC 法检测 pET23bPAL/JM109DE3 表达 PAL 酶活性和特异性结果

Fig. 4 HPLC analysis of the activity and specificity of PAL expressed by JM109DE3 (pET23bPAL)

Cin. Cinnamic acid; Cou. Coumaric acid

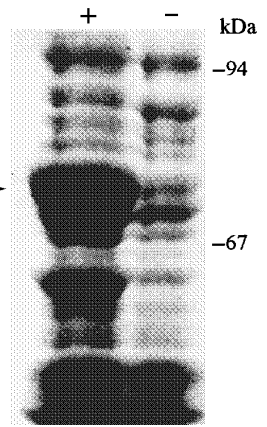


图 3 pET23bPAL 诱导表达 PAL 的 SDS-PAGE 结果

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of pET23bPAL expression product
+ pET23bPAL/JM109DE3
- pET23b/JM109DE3

异单波峰。该条件下检测香豆酸比肉桂酸更灵敏, 表现为相同浓度的肉桂酸吸收波峰的面积只有香豆酸的约 1/5, 这有利于极低的 TAL 酶活性的检出。

图 4B 显示对克隆化 PAL 特异性分析的结果。图中 B1、B2 和 B3 菌株相同, 均为 pET23bPAL/JM109DE3 培养基除均为 NZCYM 外, B1 补加 0.1mmol/L 苯丙氨酸, B2 补加 0.1mmol/L 酪氨酸, B3 同时补加 0.1mmol/L 苯丙氨酸及 0.1mmol/L 酪氨酸。结果均只检测到肉桂酸, 且均未检测到香豆酸, 说明表达的 PAL 酶的活性甚佳, 所表达的 PAL 不具有非特异的 TAL 活性。B2 中肉桂酸产量比 B1 和 B3 要低, 这与底物苯丙氨酸量较低有关。

3 讨 论

作为探索 PKU 基因治疗新途径的第一步,我们采用 RT-PCR 等技术,从双子叶植物欧芹中分离克隆了 PAL cDNA,进行了序列分析,并克隆至 *E. coli* 表达载体 pET23b 元中,在 JM109DE3 中得到了表达。进而采用能同时检测 PAL 和 TAL 两种酶反应产物即肉桂酸与香豆酸的 HPLC 技术,证明了我们获得的工程菌 pET23bPAL/JM109DE3 所表达出来的 PAL 只能使 Phe 脱氨,不使酪氨酸脱氨。即具有良好的特异性,适合用于 PKU 治疗的目的。本研究为进一步纯化制备有活性的、相对廉价的 PAL 以及 PKU 的基因治疗研究作好了准备。

致 谢 pET23b 质粒 DNA 由中国医学科学院基础所郑德先教授惠赠,pBluescript 由北京医科大学心血管疾病研究所陈光慧博士赠送。本研究部分工作参加者还有首都师范大学生物系梁 燕、朝阳医院张 鹏、肖 白、周 艳等。

参 考 文 献

- 1 吴冠云,方福德. 基因诊断技术与应用,北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1992,P. 47
- 2 Ambrus C M, Anthone S, Horvath C. Ann internal medicine, 1987, **4**: 531~537
- 3 Bourget L, Chang T M S. Biochim Biophys Acta, 1986, **883**: 432~438
- 4 Fang B, Eisensmith R C, Li H C *et al.* Gene Thera, 1994, **1**: 247~254
- 5 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术,北京:高等教育出版社,1993
- 6 Sambrook J, Fritsch F F, Maniatis T. Molecular Cloning-A laboratory manul. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 7 刘敬忠,向 华,张纪平等. 高技术通讯,1996, **6**: 37~41
- 8 Blume D E, Saunders J M. Analitical Biochem, 1981, **114**: 97~102
- 9 Scott D A. J Chromotogr Biomed Appl, 1992, **573**: 309~312

Cloning and Expression of Phenylalanine Ammonia Lyase cDNA in *Escherichia coli*

Liu Jingzhong Xiang Hua Hu Wei Zhu Zhangling Zhu Jin Li Qingyuan
(Beijing Red Cross Chaoyang Hospital, Beijing 100020)

Abstract The phenylalanine ammonia lyase (PAL) cDNA was amplified from *Petroselinum crispum* total RNA by using RT-PCR technique. The amplified 2.2kb DNA fragment was inserted into expression vector pET23b. The resulting plasmid pET23bPAL was sequenced and then transformed into *E. coli* JM109DE3. The expressed PAL protein in JM109DE3 (pET23bPAL) accounted for more than 15% of the total proteins in the recombinant *E. coli* cell. The activity and specificity of the expressed PAL was identified and tested by using HPLC technique, and showed good enough for application to enzymatic therapy of PKU.

Key words Phenylalanine ammonia lyase, gene expression, *E. coli*, PKU