

## 稀有密码子对 *proUK* 基因在大肠杆菌中高表达的影响\*

蒋 岚 杨永华 龚 毅 杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

**摘 要** AGG/AGA 密码子在 *proUK* 基因中出现的频率高达 2%, 大肠杆菌中现有的编码 tRNA UCU 的 *argU* 基因不能满足 *proUK* 高表达的需要。本文研究了 *argU* 基因剂量对 *proUK* 表达的影响, 结果表明带有 *argU* 基因的中等拷贝数质粒能促进 *proUK* 基因表达。

**关键词** *argU*, 稀有密码子, *proUK*

**分类号** Q552 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0064-67

大肠杆菌是外源蛋白表达的常用宿主菌, 但有些真核外源蛋白不能得到预期的表达效果, 其原因可能是大肠杆菌本身的翻译系统不能满足需要。大肠杆菌和真核生物相比, 其氨基酸密码子的使用频率不同, 存在着一个明显的倾向性, 并且细胞内对应的 tRNA 量与密码子的使用频率成正比。常用密码子(Major codon)是指那些在高表达基因中出现的密码子, 而稀有密码子(Rare codon)是指那些低水平表达的基因中出现的密码子<sup>[3]</sup>, 当 *E. coli* 高表达外源蛋白时, 如果信息密码子的分配情况与 *E. coli* 相似, 则细胞能正常进行 tRNA 的乙酰化和蛋白翻译, 减少翻译错误出现的频率, 反之如果信使 RNA 带有稀有密码子, 则蛋白质的翻译会出现障碍, 影响基因的表达水平<sup>[1,2]</sup>, 在 *E. coli* 的 mRNA 中, AGG/AGA 出现的频率较低, 分别近似 0.14% 和 0.21%, 它们对外源蛋白表达的影响是近年来关于稀有密码子研究的热点之一<sup>[4-10]</sup>。近年来还发现其它稀有密码子如编码 Ile 的 AUA, Leu 的 CUA<sup>[11]</sup>, Lys 的 AAA 和 AAG<sup>[12]</sup>, 编码 pro 的 CCC<sup>[13]</sup> 也对一些外源蛋白的表达效率产生影响。本文研究了编码 tRNA UCU 的 *argU* 基因剂量对外源蛋白 *proUK* 表达的影响。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌种

*E. coli* DH5 $\alpha$ : *supE44*,  $\Delta$ *lac* U169( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*。 *E. coli* BL21:F<sup>-</sup> ompT r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>

#### 1.2 重组质粒

质粒 pUK-argU 从 pUK21 衍生而来, 含 *argU* 基因, 复制子类型 pMB1, 质粒拷贝数 500~700 个/细胞。质粒 pargU1 和 pargU2 从 pACYC177 衍生而来, 含 *argU* 基因, 复制子类型 p15a, 质粒拷贝数 10~12 个/细胞。质粒 pWSK-argU 从 pWSK129 衍生而来, 含

\* 国家高技术研究发展计划项目(No. 102-11-02-01)。

收稿日期: 1997-10-27, 修回日期: 1998-10-06。

*argU* 基因,复制子类型 pSC101,质粒拷贝数 < 5 个/细胞。质粒 pKK-proUK 从 pKK2332 衍生而来,含人 *proUK* 基因,复制子类型 ColEI,质粒拷贝数 10~12 个/细胞。

### 1.3 外源蛋白含量的测定

取 100μL 培养液,经 5000g × 5min 离心后弃上清,用 0.5mL 50mmol/L Tris(pH8.0) 洗涤后加 20μL loading buffer,经振荡和 3min 沸水浴后由 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)检测细胞蛋白,凝胶浓度为 12%,凝胶经考马斯亮蓝 (R250)染色,脱色后用激光扫描仪测定产物含量。

### 1.4 重组质粒稳定性的测定

单细胞生物的生长,细胞呈几何级数  $2^n$  增长,当  $n=20$  时,  $2^{20} = 1.05 \times 10^6$ ,将静止期的菌液稀释至  $10^6$ ,再将其培养至静止期,即可认为细胞已连续传代 20 次。具体测定方法:从新鲜转化平板上挑取单菌落,接种至 2mL 不含抗生素的 LB 中,37℃ 培养 24h,即得 20 代的菌液,以此类推,直至连续传代至 100 代。其中每隔 20 代统计 1 次质粒丢失情况,将上述菌液涂布于空白的 LB 板上,从中挑选 100 个单菌落分别点在空白和加抗生素的平板上,通过计数即可测得该代数的质粒稳定性。

## 2 结 果

### 2.1 质粒构建

pargU1 的 *DpnI* 位点间含有 *argU* 基因片段;pargU2 的 *BamHI*-*HindIII* 位点间含有 *argU* 基因片段。将 pargU2 650bp 的 *BamHI*-*HindIII* 片段插入 pUK21 的 *BamHI*, *HindIII* 位点间,得到 pUK-argU。pUK-argU 经 *BamHI* 和 *SmaI* 双酶切,回收 650bp 的含有 *argU* 基因片段,插入 pWSK129 的 *BamHI* 和 *EcoRV* 位点间,得到 pWSK-argU。

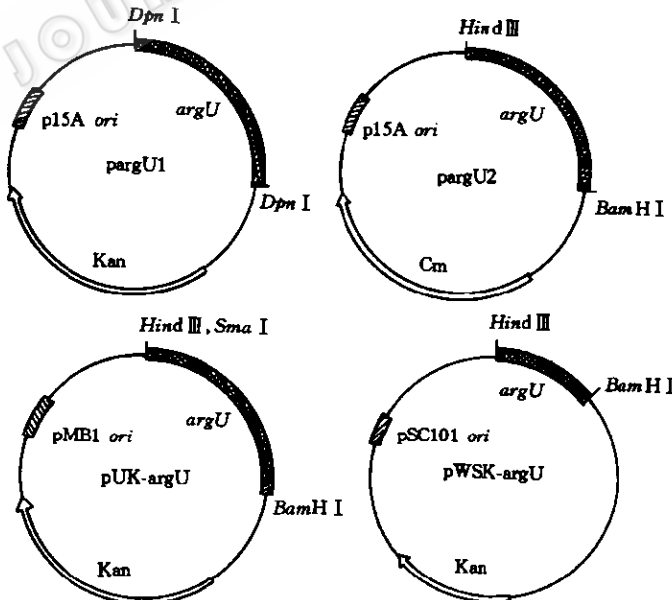
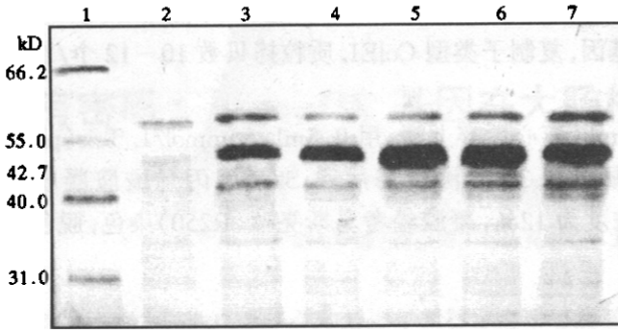


图 1 质粒图谱

Fig.1 The map of recombinant plasmid



1. Protein molecular weight 2. BL21 3. No *argU* coexpression  
4. pWSK-*argU* coexpression 5. pargU1 coexpression  
6. pargU2 coexpression 7. pUK-*argU* coexpression

Plasmid	Copy number of <i>argU</i>	<i>proUK</i> quantity in total protein/%
pKK-proUK		9.3
pUK- <i>argU</i> + pKK-proUK	500~700	17.2
pargU1 + pKK-proUK	10~12	22.4
pargU2 + pKK-proUK	10~12	20.8
pWSK- <i>argU</i> + pKK-proUK	<5	10.6

图2 不同剂量 *argU* 基因对 *proUK* 表达的影响

Fig.2 The effect of *argU* on the expression of *proUK*

pargU1 和 pargU2 以及 pSC101 复制型的低拷贝质粒 pWSK-*argU* 稳定性较好, 100 代后的细胞仍 100% 带有质粒。

### 3 讨论

真核生物来源的外源蛋白在大肠杆菌中表达时, 常常由于其带有稀有密码子而带来翻译方面的问题, 如产生移码突变和表达量下降等。通常我们可以采用以下两种措施: 用常用密码子代替稀有密码子和将稀有密码子对应的 tRNA 基因和外源基因共表达。AGG/AGA 对应的编码 tRNA UCU 的 *argU* 基因共表达已有不少成功的例子。如 L. A. Wysocki<sup>[8]</sup> 等表达的 306 个氨基酸感冒病毒蛋白和 Wang<sup>[9]</sup> 等表达的 RNA 聚合酶 II 的相关蛋白 RAP74。

人尿激酶原基因 *proUK* 含有 9 个 AGG/AGA, 占编码蛋白密码子的 2.2%, 而大肠杆菌中 AGG/AGA 出现的频率仅为 0.14%~0.21%, 只有 *proUK* 基因的 1/10, 显然会带来翻译方面的问题, 导致表达量下降。

我们将克隆在不同拷贝数载体上的 *argU* 基因转入 *proUK* 发酵菌种共表达, 考察 *proUK* 表达量是否随 *argU* 基因剂量的增加而增加, 实验结果表明, 拷贝数 < 5 (pWSK-

## 2.2 不同拷贝 *argU* 基因对 *proUK* 表达的影响

将 pKK-*proUK*, pUK-*argU* + pKK-*proUK*, pargU1 + pKK-*proUK*, pargU2 + pKK-*proUK* 和 pWSK-*argU* + pKK-*proUK* 分别转化 *E. coli* BL21, 测定不同拷贝 *argU* 基因对 *proUK* 表达的影响。蛋白电泳图和结果分析见图 2。

## 2.3 拷贝数对 *argU* 重组质粒稳定性的影响

载体质粒的拷贝数对重组质粒的稳定性影响较大(图 3)。我们将不同复制子的带 *argU* 基因的质粒进行比较, 结果以 pMB1 复制型的高拷贝重组质粒 pUK-*argU* 的稳定性最差, 40 代时质粒已基本全部脱落; 而以 p15A 复制型的中等拷贝质粒

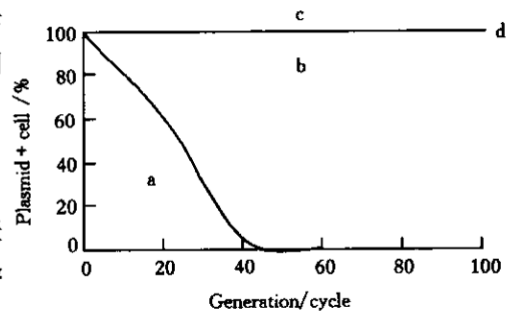


图3 质粒拷贝数对稳定性的影响

Fig.3 Effect of copy number on recombinant plasmid stability

*argU*), 10~12(*pargU1*, *pargU2*)和 500~700(*pUK-argU*)的 *argU* 基因均能提高 *proUK* 的表达量。但其中以拷贝数为 10~12 的 *pargU1* 和 *pargU2* 为最高。

由于 *proUK* 含有大量的 AGG/AGA, 拷贝数 < 5 的 *argU* 基因可能由于剂量不足不能完全解决翻译方面出现的问题; 而高拷贝的 *pUK-argU* 由于其稳定性较差而影响了 *argU* 的作用。这是由于高拷贝质粒在细胞分裂时, 质粒的分配是随机的, 导致了相当数量细胞的质粒拷贝数减少, 而拷贝数的降低是导致随机型分配的质粒不稳定的主要原因。另外, 高拷贝质粒容易在质粒间进行同源重组, 产生多聚体, 而且多聚体上复制起始位点的增加, 使多聚体比单倍体质粒更具复制优势, 而多聚体含量的增高, 更易引起质粒分配的不均一, 使子代中质粒丢失的细胞大大增加。因此克隆在高拷贝质粒 *pUK21* 上的 *argU* 基因不能发挥预想的作用。综上所述, *argU* 基因用的中等拷贝数质粒表达既能避免低拷贝质粒的基因剂量不足又能克服高拷贝质粒的不稳定性, 能促进 *proUK* 基因表达。

### 参 考 文 献

- [1] Zhang S., G. Zubay, E. Goldman. *Gene*, 1991, **105**:61~72.
- [2] K. Wada, Y. Wada, F. Ishibashi *et al.* *Nucleic Acid Res.*, 1992, **20**:2111~2118.
- [3] F. Bagnoli, P. Lio. *J. Theor Biol.*, 1995, **173**:271~281.
- [4] R. A., Spanjaard J. Van Duin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 1998, **85**:7967~7971.
- [5] U., Brinkmann R. E. Mattes P. Buckel. *Gene*, 1989, **85**:109~114.
- [6] R. A. Spanjaard, K. Chen, J. R. Walk *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**:5031~5036.
- [7] G. M. Garcia. *Cell*, 1986, **45**:453~459.
- [8] L. A. Wysocki, A. Shatzman *FASEB J.*, 1994, **8**(suppl 7), A1305.
- [9] B. Q. Wang. *Protein Eng. Purif.*, 1994, **5**:476~485.
- [10] J. F. Kane, B. W. Violand, D. F. Curran *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 1993, **20**:6707~6710.
- [11] E. Goldman, A. H. Roseberg, G. Zubay *et al.* *J. Mol. Biol.*, 1995, **245**:467~473.
- [12] J. Sibly E. Goldman *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 1993, **90**:2315~2319.
- [13] F. Vilbois, P. Caspers, M. D. Prada *et al.* *Eur. J. Biochem.*, 1994, **222**:377~386.

## The Rare Coden Effects the Overexpression of Human *proUK* Gene in *Escherichia coli*\*

Jiang Lan Yang Yonghua Gong Yi Yang Shengli

(Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

**Abstract** The usage frequency of coden AGG and AGA in human *proUK* gene is reached to 2%, which causes the amount of tRNA<sub>Acu</sub> from chromosomal *argU* gene to be limit factor for translation of *proUK* mRNA, This paper reports the relationship between *argU* gene doses and *proUK* mRNA translational efficiency. The results indicated that a kind of mid-copy number plasmid with the *argU* gene can increase the expression of the *proUK* gene.

**Key words** *argU*, rare coden, *proUK*

\* Supported by Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 102-11-02-01).