

文章编号:1005-8737(2000)01-0031-04

鱼生长激素基因在大肠杆菌中表达水平的研究

白俊杰, 马进, 简清, 李新辉, 罗建仁, 林文辉, 张红军

(农业部热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室,
中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380)

摘要:采用聚合酶链反应(PCR)技术对鲤和鲢生长激素 cDNA 的 5' 端和 3' 端进行定向改造。将改造后的 5 种基因分别克隆到大肠杆菌表达质粒 pBV220 进行原核表达, 以研究鱼生长激素基因在大肠杆菌中的表达水平。实验结果表明: (1) 核糖核蛋白体结合位点(SD)与起始密码子 AUG 之间的距离对鱼生长激素的表达水平有影响; (2) 鲢生长激素基因的终止密码子 UAG 可能不会有效终止该基因在大肠杆菌中翻译的进行而造成部分通读, 加入大肠杆菌强终止码 UAA 可避免通读和产生超长蛋白; (3) 对鲤和鲢生长激素 cDNA 的 5' 端和 3' 端进行相同的修饰, 但两者生长激素的表达量却有很大差异, 说明基因的密码子偏性对表达水平有影响; (4) 提高 5' 端 RNA 二级结构自由能和密码子的适配指数有利于外源基因的高效表达。

关键词:鱼生长激素; 基因改造; 表达水平; 大肠杆菌; RNA 二级结构

中图分类号:Q786; Q959.4

文献标识码:A

采用 DNA 重组技术, 使鱼生长激素(fGH)基因在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中高效表达, 可望得到大量廉价的重组 fGH, 以应用于水产养殖业。影响外源基因在原核细胞中的表达水平的因素是多方面的。目前, 一般从启动子、RNA 二级结构、密码子偏性来加以解释。系统研究外源基因在原核细胞中的表达水平的文章还很少见。李伍举等^[1]较系统地分析了影响外源基因在原核细胞中表达水平的因素, 总结出一定的规律, 但因数据来自不同实验室和不同作者, 难免存在系统上的误差。本实验以鲤和鲢 GH cDNA 为材料, 应用 PCR 方法改造后构建不同的表达质粒, 进行表达和测定表达水平, 研究鱼生长激素 cDNA 5' 端和 3' 端的修饰与原核表达水平的关系, 以及影响外源基因在原核细胞中表达水平的因素。

收稿日期: 1999-04-23

基金项目: 农业部“九五”重点渔业科技项目(渔 95-B-96-02-02-04); 中国水产科学研究院基金资助项目(95-08-01)

作者简介: 白俊杰, (1957-), 男, 福建福州人, 中国水产科学研究院珠江水产研究所研究员, 从事鱼类基因工程研究。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌种

鲤 GH cDNA 质粒 pUCGH9 由本室克隆和构建^[2]; 鲢 GH cDNA 质粒 pOPsGH 由中国科学院发育生物学研究所薛国雄研究员惠赠; 大肠杆菌表达载体 pBV220 由中国预防医学科学院病毒所馈赠, 它是一个含 P_{RPL} 启动子的原核高效表达载体^[3]; 质粒 pUC19 和大肠杆菌 DH5 α 购自华美生物工程公司。

1.2 工具酶和试剂

限制性内切酶、T₄DNA 连接酶、Klenow 片段、dNTP 及其它试剂为美国 Promega 公司和华美生物工程公司产品。PCR 扩增试剂盒 B 购自华美生物工程公司。

1.3 准备工作

质粒 DNA 制备、粘性末端补平、DNA 连接、低熔点琼脂糖回收 DNA、SDS-PAGE 等方法参照 Sambrook 等的方法^[4]。

1.4 PCR 扩增和扩增产物的克隆

PCR 引物设计参照文献[5]方法。扩增引物委托上海 Sangon 生物工程公司合成, 合成产物经 PAGE 纯化。PCR 反应在 Perkin Ectus2400 型 DNA 扩增仪上进行, 模板浓度 10 ng, 引物浓度 25 pmol。解链反应 94℃, 60 s; 退火反应 55℃, 60 s; 延伸反应 72℃, 90 s; 反应总体积 50 μ l, 25 个循环。PCR 扩增产物经酶切处理后与经酶消化过的 pUC19 混合, T₄DNA 连接酶 14℃ 反应过夜。转化大肠杆菌 DH5 α , 电泳结合酶切法筛选重组子。

1.5 重组鲤和鲑 GH cDNA 大肠杆菌表达质粒的构建

酶切 5 种改造后的鲤和鲑质粒, 低熔点琼脂糖法回收 fGH cDNA 片段, 用 T₄DNA 连接酶将回收片段定向插入 pBV220, 构建大肠杆菌表达质粒, 转化大肠杆菌 DH5 α , 电泳酶切法筛选重组子。

1.6 重组鱼 GH 的表达及 SDS-PAGE 检测

含重组 fGH cDNA 质粒的菌株于 Amp LB 培养基中 30℃ 培养过夜, 次日按 1:50 扩大培养至 A_{600nm} 为 0.3~0.4, 立既转到热诱导温度 42℃ 继续培养 3 h, 离心收集菌体, SDS-PAGE 分析。用岛津 CS-930 双波长薄层扫描仪测定表达蛋白的含量(考马斯亮蓝染色, 波长 570 nm)。

1.7 表达载体中外源基因有关数据分析

外源基因 RNA 二级结构能量测定、5' 端密码子适配指数和大肠杆菌相对稀有密码子的计算由军事医学科学院基础医学研究所吴加金高级工程师帮助分析。具体方法见文献[6]。

2 结果与讨论

2.1 鲤和鲑 GH cDNA 的改造和克隆

为了对鲤和鲑 GH cDNA 的 5' 端和 3' 端进行不同目的修饰, 设计了 6 种 PCR 扩增引物:

P1 5' — CGCGGATCCATGATAGAAAAC-CAACGGCTCT—3'

P2 5' — CGGAATTCATGGAAAACCAACG-GCTCT—3'

P3 5' — CGGAATTCATGGACAACCAGCG-GCTGT—3'

P4 5' — CGCGGATCCCCGTCCTACAGAGT-GCAGTTG—3'

P5 5' — CGCGGAACCTTACTACAGAGT-GCAGTTG—3'

P6 5' — CGCGGAACCTTACTACAGGGT-

GCAGTTG—3'

P1、P2 和 P3 是 5' 端引物, P1 和 P2 除了与编码鲑 GH 成熟肽前 6 个氨基酸碱基的正链序列一致的碱基外还加入 1 个翻译的起始密码子 ATG。P1 加入了 1 个 BamHI 的识别位点; P2 加入了 1 个 EcoRI 的识别位点。P3 除了与编码鲤 GH 成熟肽前 6 个氨基酸碱基的正链序列一致的碱基外也加入 1 个翻译的起始密码子 ATG。P4、P5 和 P6 是终止引物, P4 和 P5 是编码鲑 3' 的引物, P6 是编码鲤 3' 的引物。它们都含 1 个终止码 TAG 和 1 个 BamHI 识别位点。P5 和 P6 在原有的终止码 TAG 后面多加了 1 个强终止码 TAA。分别用 P1 和 P4, P2 和 P4, P2 和 P5 做引物, 鲑 cDNA 质粒 pOPsGH 为模板, 经 PCR 扩增均得到约 590bp 的扩增片段, P1 和 P4 为引物的 PCR 扩增片段经 BamHI 酶切回收, 与 BamHI 酶切的 pUC19 连接, 经电泳法筛选得到重组子 pUCGH5。经 BamHI 酶切鉴定有一约 590bp 的插入片段。用引物 P2 和 P4, P2 和 P5 扩增的片段分别克隆到 pUC19 中得到重组子 pUCGH16 和 pUCGH8。分别以 P3、P6 和 P2, P5 为引物, 鲤 cDNA 质粒 pUCGH9 为模板, 经 PCR 扩增后将扩增片段分别克隆到 pUC19 中, 得到重组子 pUCGHI 和 pUCGHII。

2.2 鲑、鲤 GH 大肠杆菌表达质粒的构建及鉴定

pUCGH5 经 BamHI 酶切, 电泳回收 590bp 片段, 与 EcoRI 和 BamHI 双酶切的质粒 pBV220 连接, 经 Klenow 大片段补齐后连接, 转化 DH5 α 筛选重组子, 用 SalI 酶切, 寻找正向插入的重组子 pBVGH11。pUGH8、pUGH16 和 pUCGHI、pUCGHII 经 EcoRI 和 BamHI 酶切, 电泳回收 590bp 片段, 分别定向插入 pBV220 多克隆位点 EcoRI 和 BamHI 之间, 筛选得到的重组子经 EcoRI 和 BamHI 酶切证实有插入子。将有外加终止子 TAA 的鲑表达质粒命名为 pBVGH18, 将没有外加终止子的鲑质粒命名为 pBVGH24。将 pUCGHI 来源的鲤表达质粒命名为 pBVGHI, 将 pUCGHII 来源的鲤表达质粒命名为 pBVGHII。

2.3 重组 fGH cDNA 的表达与 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 结果表明, 经 42℃ 诱导后 pBVGH18 菌株在分子量约 21 000 Dalton 处有 1 条特异蛋白带, 与天然鲑生长激素的分子量相符, 扫描结果测得特异蛋白约占细胞总蛋白的 10%。pBVGH24 菌株在分子量约 25 000 和 21 000 Dalton 处

有 2 条特异蛋白带, 含量分别为 6% 和 7%。这可能是鲑 GH cDNA 原有终止码的终止效率不高, 导致翻译时部分通读, 而多克隆位点后面有 1 个强终止信号^[3], 避免了继续通读, 所以产生了比 21 000 多几百个 Dalton 的另 1 条特异蛋白带。而 pBVGH11 菌株经诱导后在 21 000 和 25 000 Dalton 未发现特异蛋白带, 也可能是由于表达量很低无法测到。分析原因, 估计是质粒 pBVGH11 中 SD 序列与 ATG 之间碱基数不合适所致, pBVGH11 SD 序列与 ATG 之间的碱基数为 9, 而 pBVGH18 和 pBVGH24 的 SD 序列与 ATG 之间的碱基数只有 5。鲤 GH 表达载体 pBVGHI 和 pBVGHII 的表达量分别为 29.2% 和 32.3%。

2.4 5 种 fGH 表达载体的表达水平与有关参数的关系

对 5 种 fGH 表达载体进行 RNA 二级结构自由

能、5' 端密码子适配指数、外源基因相对大肠杆菌稀有碱基数计算。结果(表 1)可见: 表达产量与 5' 端和 3' 端二级结构能量有关, 二级结构能量的提高有利于表达量的提高。pBVGH11 和 pBVGH24 3' 端条件一样, 仅在 5' 端多了 4 个碱基, 导致 5' 端密码子适配指数下降较大。这可能是 pBVGH11 没有测到表达产物的原因之一。pBVGH18 和 pBVGHII 用的是相同的 3' 和 5' 引物来分别扩增鲑和鲤的 GH 成熟肽序列, 在 3' 端和 5' 端十几个碱基完全一样的情况下表达产量却有 3 倍之差, 这可能与外源基因的大肠杆菌稀有密码子分布有关。pBVGH18 中有 18 个大肠杆菌稀有碱基, 其中 2 个稀有密码子相连出现 2 次; pBVGHII 有 13 个稀有密码子, 2 个稀有密码子相连出现 1 次。这可能是 pBVGH18 和 pBVGHcII 表达量有差别的原因。

表 1 5 种 fGH cDNA 在 pBV220 中的表达水平和有关参数的关系

Table 1 Relationships between some facts and expression levels of 5 kinds of fGH cDNA pBV220 vectors in *E. coli*

质粒名称 Name	5' 端自由能 kJ 5' free energy	3' 自由能/kJ 3' free energy	适配系数 Adaptation index	稀有碱基 Rare codes	表达量/% Production
pBVGH11	-49.34	-109.56	0.084	18	0
pBVGH24	-40.56	-100.78	0.268	18	7and8
pBVGH18	-40.56	-100.76	0.268	18	10
pBVGHI	-37.22	-66.49	0.161	13	29.2
pBVGHII	-26.35	-66.49	0.262	13	32.3

外源基因在大肠杆菌中表达水平受多种因素影响^[6], 如启动子强度、载体性质、表达类型、RNA 二级结构、密码子偏性、终止密码等因素。本实验再次证明 SD 序列和起始密码子 ATG 之间的距离对基因的表达水平影响较大, 有实验证实^[7], 在同一启动子带动下 SD 顺序与 ATG 距离仅改变 1 个碱基数, 表达水平可相差 500 倍以上。为了提高外源基因的表达水平, 选用合适的终止密码子也是很有必要, 它能避免通读, 保证翻译及时终止, 不致产生超长蛋白。在构建表达质粒时, 如果也考虑外源基因的 RNA 二级结构能量、AUG 的位置及其附近的构象、密码子的适配指数、减少大肠杆菌稀有密码子的使用等, 将有利于提高外源基因的表达量。

参考文献:

- [1] 李伍举, 吴加金. pBV220 载体中外源基因表达水平定量分析[J]. 病毒学报, 1997, 13: 126-133.
- [2] 白俊杰, 马进, 等. 鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 生长激素基因克隆及原核表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15: 409-412.
- [3] 张智清, 姚立红, 侯云德. 含 PRPL 启动子的原核高效表达载体的构建及其应用[J]. 病毒学报, 1990, 6: 111-116.
- [4] Sambrook J, et al. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- [5] 白俊杰, 简清, 等. 鲑鱼生长激素 cDNA 在大肠杆菌中的表达及表达产物对罗非鱼促生长作用[J]. 农业生物技术学报, 1998, 6: 343-346.
- [6] 吴加金, 李伍举, 王嘉玺. 影响外源基因在原核中表达水平因素分析[J]. 生物工程学报, 1997, 12(增刊): 92-96.
- [7] 卢圣栋, 等. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993.

[1] 李伍举, 吴加金. pBV220 载体中外源基因表达水平定量分析

Study on modification of fish GH cDNA and its expression in *Escherichia coli*

BAI Jun-jie, MA Jin, JIAN Qing, LI Xin-hui, LOU Jian-ren, LIN Wen-hui, ZHANG Hong-jun

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Lab. of Tropical and Subtropical Fish Breeding and Cultivation Ministry of Agriculture, Guangzhou 510380, China)

Abstract: In order to study the expression level of fish growth hormone (fGH) in *Escherichia coli*, common carp and salmon GH cDNA's 5' ends and 3' ends were modified by using polymerase chain reaction (PCR) methods. Five of modified fGH cDNAs were cloned to *E. coli* expression vector pBV220. The experiments showed that the distance between SD sequence and initiator AUG is concerned with fGH expression level; salmon GH cDNA's stop codon UAG may not stop *E. coli*'s translation effectively, but the strong stop codon UAA of *E. coli* added can avoid expression of super long proteins; although carp GH and salmon GH cDNA's 5' and 3' ends are modified with the same sequences, the expression levels of the 2 fish GH are quite different, showing that the number and distribution of rare codon in fGH genes may affect expression level of fGH in *E. coli*; the free energy of RNA 5' ends and local codon adaptation index also affect gene expression.

Key words: fish growth hormone; gene modification; expression level; *Escherichia coli*; RNA secondary structure