

人 Mn-SOD 基因及其优化序列在毕赤酵母中的表达

王岁楼^{1,2}, 张国超²

(1.中国药科大学食品科学与安全系, 江苏 南京 210009; 2.郑州轻工业学院食品与生物工程系, 河南 郑州 450002)

摘 要: 提取人肝总 RNA, 通过 RT-PCR 扩增出了 Mn-SOD 相应的基因片段, 与载体相连后导入毕赤酵母中。根据酵母偏爱密码子对基因序列进行优化处理后的基因序列也导入毕赤酵母中。对这两种工程菌产 SOD 情况进行对比实验, 发现经过基因序列优化的工程菌在产酶能力上具有更大的优势, 这表明在基因序列表达中序列优化具有重要作用。

关键词: 超氧化物歧化酶; 毕赤酵母; 优化; 表达

Expression of Human Mn-superoxide Dismutase and Its Gene Codon Optimized in *Pichia pastoris*

WANG Sui-lou^{1,2}, ZHANG Guo-chao²

(1.Department of Food Science and Safety, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2.Department of Food and Biology Engineering, Zhengzhou Institute of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The total RNA of human liver was extracted and human Mn-SOD gene was amplified by RT-PCR. Manganese SOD gene was expressed in *P. pastoris* after construction of expression vector. The optimized gene codon, which is based on yeast major preference codons was also expressed in *P. pastoris*. Meanwhile, enzyme-producing abilities of the two genetic engineering strains were compared. Results showed that the optimized strain have advantage on ability of producing enzyme over the control. It can be concluded that optimization of gene sequence plays an important role in its expression.

Key words: superoxide dismutase; *Pichia pastoris*; optimization; expression

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)07-0311-05

超氧化物歧化酶(SOD)是一种广泛存在于生物体内的金属酶, 它能够有效地清除生物体内多余的氧自由基, 使之转化为分子氧或过氧化氢, 保护细胞的正常生存^[1], 因此对炎症、辐射损伤、自身免疫性疾病等均有一定临床疗效。人体内存在的超氧化物歧化酶可分为三类: 位于胞浆的 hCuZn-SOD(SOD1)、位于线粒体的 hMn-SOD(SOD2)和分泌到细胞外的 hEC-SOD(SOD3)^[2]。在 SOD 家族中, hMn-SOD 在体内具有半衰期较长、抗炎症、抗辐射及能抑制某些肿瘤细胞生长等特点使之备受重视, 但是由于 hMn-SOD 主要分布于线粒体内, 分离纯化困难, 而且正常分泌量较少, 不能够满足研究及临床的需要。因此, 如何提高 hMn-SOD 的科研及生产水平已经成为一个重要的课题。目前, 国内外已有关于 hMn-SOD 基因表达的报道, 但基本上都是在大肠杆

菌表达系统中进行, 在酵母及其它真核生物中表达的也有一定的报道。有利用毕赤酵母 GS115 的, 但表达量上不如大肠杆菌表达系统。本实验将 hMn-SOD cDNA 克隆于毕赤酵母表达载体 pPIC9k 上, 并通过同源重组整合到酵母染色体上, 实现 hMn-SOD 的分泌性表达, 同时依据当前酵母菌的偏爱密码的研究成果对全基因序列进行优化处理, 合成新的全基因序列, 克隆于毕赤酵母 GS115 中, 与原序列进行对比实验, 以期工业化生产高产率的 hMn-SOD 做进一步探索提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株 *E.coli* TG1、*P. pastoris* CS115 本实验室保存; 表达质粒 pPIC9K Inventrogen 公司; 人肝脏组织

收稿日期: 2007-09-11

基金项目: 河南省自然科学基金项目(964012300; 984033300)

作者简介: 王岁楼(1961-), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: cpuwsl@126.com

郑州大学第一附属医院。

Trozel 试剂、pUCm-T 载体、Pfu DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、*EcoR*I 酶、*Sac*I 酶 上海生工生物工程技术有限公司；碱性磷酸酶 宝生物工程(大连)有限公司；反转录试剂盒、凝胶回收试剂盒 北京天根生物公司；DNA 测序、寡核苷酸引物及全基因合成委托上海生工生物工程技术有限公司进行。

1.2 仪器

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

名称	序列
上游引物	5'-CCGAATTCAAGCACAGCCTCCCGACCTGCCCTAC-3'
下游引物	5'-GCGAATTCTTACTTTTTCGAAGCCATGTATCTTTC-3'
3'AOXI	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

TC-16/H PCR 扩增仪 杭州博日科技公司；TGL-16C 离心机 上海安亭科学仪器有限公司；GL-3120 紫外透射仪 其林贝尔有限公司；751-GM 分光光度计、756MC 紫外分光光度计 上海分析仪器厂；核酸电泳成套设备 大连捷迈有限公司。

1.3 方法

1.3.1 人肝细胞总 RNA 的提取

取液氮保存的新鲜肝组织约 100mg，用液氮做破碎处理后加入 Trizol 试剂 1ml，消化 5min 后加入氯仿 200 μ l，

表 4 优化后的引物

Table 4 Primer of gene codon optimized

引物名称	引物序列
优化上游引物	5'-CCGAATTCAAGGACGACTTCGGTCTTTTCGACAAG-3'
优化下游引物	5'-GCGAATTCTTGTGTTCGCTTCTCACGTTTCTTTC-3'

表 2 密码子置换表

Table 2 Codon and replaceable codon

原密码子	优化密码子	原密码子	优化密码子
GGT, GGC, GGA, GGG	GGT	TTT, TTC	TTC
TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG	TTG	TAT, TAC	TAC
ATT, ATC, ATA	ATT	CAT, CAC	CAC
GTT, GTC, GTA, GTG	GTT	AAG, AAA	AAG
TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC	TCT	GAC, GAT	GAC
CCT, CCC, CCA, CCG	CCA	GAA, GAG	GAG
ACT, ACC, ACA, ACG	ACT	AGA, AGG	AGA
GCT, GCC, GCA, GCG	GCT		

表 3 相应的序列对比

Table 3 Contrasts of corresponding sequences

序列号	序列				
原序列 1	AAGCACAGCC	TCCCGACCT	GCCCTACGAC	TACGGCGCCC	TGGAACCTCA
优化后 1	AAGGACGACT	TCGGTCTTT	CGACAAGTTC	AAGGAGTACA	AGTTGACTGC
原序列 51	CATCAACGCG	CAGATCATGC	AGCTGCACCA	CAGCAAGCAC	CACGCGGCCT
优化后 51	TGCTTCTGTT	GGTGTTC AAG	GTGTTCTGG	TTGGGGTTGG	TTGGGTTTCA
原序列 101	ACGTGAACAA	CCTGAACGTC	ACCGAGGAGA	AGTACCAGGA	GGCGTTGGCC
优化后 101	ACGCTAAGCA	AAGAGGTCAC	TTGCAAATTG	CTGCTTTGTG	TCCAAACCAA
原序列 151	AAGGGAGATG	TTACAGCCCA	GATAGCTCTT	CAGCCTGCAC	TGAAGTTCAA
优化后 151	GACCCATTGC	AAGGTACTGA	GACTGGTTTG	ATTCCATTGT	TGGGTATTGA
原序列 201	TGGTGGTGGT	CATATCAATC	ATAGCATTTT	CTGGACAAAC	CTCAGCCCTA
优化后 201	CCCAGTTTGG	GAGCACGCTT	ACTACTTGCA	ATACCACAAG	CGTTAGAC
原序列 251	ACGGTGGTGG	AGAACCACAA	GGGGAGTTGC	TGGAAGCCAT	CAAACGTGAC
优化后 251	CAGACTACTT	GAAGGCTATT	ATTTGGAACG	TTATTAAGTG	GGAGAAGGTT
原序列 301	TTTGGTTCCT	TTGACAAGTT	TAAGGAGAAG	CTGACGGCTG	CATCTGTTGG
优化后 301	AACACTGAGA	GATACATGGC	TTGTAAGAAG	CACGCTCAAA	TTATGCAATT
原序列 351	TGTCCAAGGC	TCAGGTTGGG	GTTGGCTTGG	TTTCAATAAG	CAACGGGGAC
优化后 351	GCACCACTCT	AAGTCTCACC	ACGCTGCTTA	CGTTAACAAC	TTGAACCTGG
原序列 401	ACTTACAAAT	TGCTGCTTGT	CCAAATCAGG	ATCCACTGCA	AGGAACAACA
优化后 401	TTACTGAGGA	GAAGTACCAA	GAGGCTTTGC	CAGCTAAGGG	TGACGTTACT
原序列 451	GGCCTTATTC	CACTGCTGGG	GATTGATGTG	TGGGAGCACG	CTTACTACCT
优化后 451	GCTCAAATTG	CTGACTTGCA	ACCAGCTTTG	AAGTTCAACG	GTGGTTTGGG
原序列 501	TCAGTATAAA	AATGTCAGGC	CTGATTATCT	AAAAGCTATT	TGGAATGTAA
优化后 501	TCACATTAAC	CACTCTATTT	TCTGGACTCC	AACTTGTCT	CCAAACGGTG
原序列 551	TCAACTGGGA	GAATGTAAC	GAAAGATACA	TGGCTTGCAA	AAAGTAA
优化后 551	GTGGTGAGCC	ATACAAGGGT	GAGTTGTTGG	AGGCTATTAA	GAGATAA

12000r/min 4℃离心 15min。然后取上清水相到 1.5ml EP 管中,加 500 μ l 的异丙醇,室温下静置 10min; 12000r/min 4℃离心 10min,弃去上清液。沉淀用 75% 乙醇 1.0ml 洗涤后,7500r/min 4℃离心 5min。弃去上清液,干燥沉淀 5~10min。用预热 60℃DEPC 处理水 20~30 μ l 加入干燥后的沉淀中,测 OD 值,并放入 -20℃冰箱中保存^[3]。

1.3.2 引物设计与合成

按 NCBI 上检索的 Mn-SOD 经分析,设计两个含 *EcoR* I 位点的引物:上游引物和下游引物。按 3'AOXI 引物序列合成 3'AOXI 引物,如表 1 所示。

1.3.3 优化序列并全基因合成

根据酵母菌的偏爱密码子,如表 2 所示对应关系,对原序列进行置换^[4],未在表中出现的密码子不用置换,并委托上海生工生物工程技术有限公司进行全基因合成。相应的序列对比如表 3 所示,优化后的引物如表 4 所示。

1.3.4 反转录 cDNA

按天根生物的反转录试剂盒操作说明书进行。

1.3.5 PCR 扩增

以反转录得到的 cDNA 为模板上游引物和下游引物进行 PCR。PCR 的扩增参数为:94℃ 1min; 67℃ 30s; 72℃ 1min 进行 30 个循环。

1.3.6 PCR 产物经胶回收纯化

按天根生物的凝胶回收试剂盒操作说明书进行。

1.3.7 PCR 产物克隆 T 载体并测序

按上海生工的 T 载体试剂盒操作,与 T 载体连接后转化到感受态细胞 TG1 中,涂布在 IPTG/X-gal 氨苄平板上,筛选出阳性克隆菌,测序委托上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.3.8 酵母表达质粒 pPIC9K-MnSOD 的构建

T 载体的菌株扩大培养后,用碱裂解法提取质粒,质粒经与 *EcoR* I 酶切后,电泳,凝胶回收目的片段。pPIC9K 载体经 *EcoR* I 酶切后,再将 pPIC9K 用碱性磷酸酶作去磷酸化处理,具体操作按说明书进行,最后与目的片段用 T4 连接酶连接,连接产物转化大肠杆菌 TG1 中。提取转化子的质粒用 *EcoR* I 进行酶切鉴定及用上游引物和 3'AOXI 做定向 PCR,筛选出阳性克隆。同样的方法处理全基因合成的片段,筛到阳性克隆。

1.3.9 质粒转化 *P.pastoris* 酵母细胞

转化子质粒用 *Sac*I 单酶切线性化,再通过电脉冲法转化酵母菌 GS115 中。酵母转化株经 YPD 液体培养后提取染色体^[5],用 PCR 方法验证 hMn-SOD cDNA 基因已与染色体整合。在 MM 和 MD 平板筛选出 Mut⁺ 重组菌株。将 Mut⁺ 表型的转化子分别对应地逐步增高 G418

浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3、3.5g/L)的 YPD 平板上培养,筛选出多拷贝的重组菌株。

1.3.10 hMn-SOD cDNA 在 *P.pastoris* 中的诱导表达

将筛选得到的多拷贝重组菌株(GS115/pPIC9K-MnSOD Mut⁺)接种于 BMMY 中培养,至 OD₆₀₀=3~5 时离心收集菌体。菌体用 BMMY 培养基(含 800 μ mol/L 的 Mn²⁺)稀释到 OD₆₀₀=1,然后诱导培养 7d,每隔 1d 取样及补加甲醇至终浓度为 0.5%。样品离心,上清液立即加入苯甲基磺酰氟(PMSF)至 1mmol/L, -20℃保存。样品离心后取上清液经镍柱处理,再进行 SDS-PAGE 电泳分析及 SOD 酶活力测定。SOD 酶活力测定采用微量联苯三酚自氧化法。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的制备

采用 Trizol 法制备出 RNA,经凝胶电泳可见 18S、28S RNA 的清晰条带(图 1),说明抽提的肝细胞中的总 RNA 未降解,为反转录的成功创造了条件。

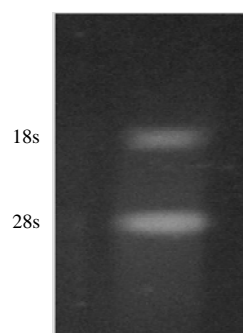


图 1 RNA 电泳结果

Fig.1 Result of RNA electrophoresis

2.2 PCR 反应

经 PCR 扩增得到 DNA 片段大小约为 600bp,与预计的大小相符,如图 2 所示。测序结果与 NCBI 报道一致。

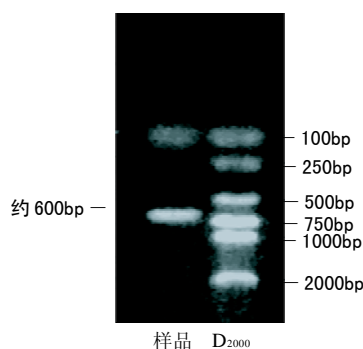


图 2 PCR 扩增结果

Fig.2 Amplification fragments of SOD

2.3 T 载体克隆和蓝白斑筛选

T 载体克隆和蓝白斑筛选到阳性菌, 测序后与原基因组比较, 没有发生突变。

2.4 酵母表达质粒 pPIC9K-MnSOD 的构建

将含 T 载体的菌株扩大培养后, 用碱裂解法提取质粒后, 再用 *EcoRI* 酶切可释放出约 600bp 的片段, 凝胶回收纯化后与 pPIC9K 相连, 同时将全基因合成的序列用 *EcoRI* 酶切后, 凝胶回收纯化后与 pPIC9K 相连, 构建了重组质粒 pPIC9K-MnSOD。此重组质粒经 *EcoRI* 酶切鉴定得到相应片段, 说明 hMn-SODcDNA 基因已经连到载体上。用上游引物、优化后的上游引物及 3'AOX1 做 PCR 验证插入方向, 可扩增出一条约 720bp 片段, 表明插入方向正确(图 3)。

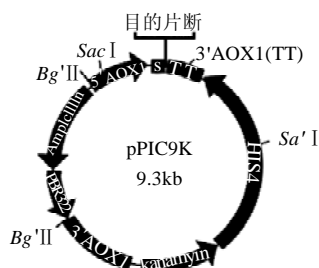


图3 重组质粒 pPIC9K-MnSOD 结构示意图

Fig.3 Structure of recombinant plasmid pPIC9K-MnSOD

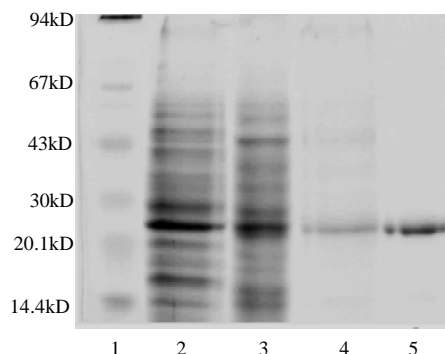
2.5 多拷贝整合转化子的筛选

酵母转化株的染色体用引物及优化后的引物进行 PCR 检测, 都得到约 600bp 大小的特异片段, 表明转化子基因组中已整合有 hMn-SODcDNA 基因。因为载体 pPIC9K 中含有抗性基因片段, 使得阳性转化子能抗 G418, 可依靠基因剂量效应, 以对 G418 的抗性水平快速筛选出相对高拷贝整合的转化子。本实验将 Mut⁺ 表型的转化子分别对应地逐步增高 G418 浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3、3.5g/L)的 YPD 平板上培养, 最后都获得了能抗 2.00g/L 的两株 G418 多拷贝重组菌株, 分别记 pPIC9K-MnSOD A 和 pPIC9K-MnSOD B。

2.6 表达产物的 SDS-PAGE 分析及 SOD 酶活力测定

将筛选得到的 pPIC9K-MnSOD A 和 pPIC9K - MnSOD B 分别诱导培养 7d, 每隔 1d 取样一次。用 15% SDS-PAGE 分析诱导后的上清液, 可见所诱导的重组克隆中, 除对照(未诱导)以外都有一条诱导出来的明显的异源蛋白条带, 其分子量约为 22kD(图 4), 与理论上的 hMn-SOD 大小一致。其中重组菌株诱导 4d 得到的异源蛋白条带最粗, 而优化重组菌株 5d 的异源蛋白条带最粗, 经凝胶光密度扫描分析, 此异源蛋白条带的含量分别约占分泌蛋白总量的 30%、40%。以联苯三酚法和 Folin- 酚试剂法分别测定各上清液的 SOD 酶活力及蛋白质含量^[6], 结果表明各上清液中都有 SOD 酶活力, 其

中以重组菌株诱导 4d 得到的酶比活最高, 达到 250U/mg, 优化重组菌株诱导 4d 和 5d 得到的酶活仅达到 255U/mg 和 265U/mg。



1.低分子量蛋白; 2.密码子优化后的工程菌产 SOD; 3.没有经密码子优化的工程菌产 SOD; 4.没有经密码子优化的工程菌产 SOD 纯化处理; 5.密码子优化后的工程菌产 SOD 纯化处理。

图4 SOD 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 Result of SDS-PAGE of SOD

3 讨论

hMn-SOD 是一个位于第 6 号染色体长臂 2 区 5 带 (6q25) 的由核基因编码的、分子量约为 22kD 的酶^[7], 具有活性的 hMn-SOD 蛋白最后定位于线粒体基质上。hMn-SOD 基因的表达在正常情况下表达很少, 但因细胞受到辐射、氧化、病毒感染、极端环境等因素的刺激而显著提高, 也可随机体的癌变而大幅度降低, 表明 hMn-SOD 的表达是机体是否正常的一个重要指示^[8]。因此, hMn-SOD 的重要性对机体来讲是不言而喻的。

从研究现状来看, hMn-SOD 基因工程的一些实验研究已经取得了可喜的成果, 主要是运用大肠杆菌表达系统, 也有在转入聚球藻中的报道^[9]。在大肠杆菌中表达 hMn-SOD, 虽然发酵时间短, 表达水平高, 但发酵时需用 IPTG 诱导, 成本昂贵, 且表达产物通常以包涵体形式存在于胞内, 分离纯化困难, 不利于工业化生产。利用酵母来表达 hMn-SOD, 表达水平虽较大肠杆菌低, 但可用甲醇做诱导, 成本低廉, 且表达产物可分泌到培养液, 为工业化生产和纯化提供了极大的方便^[10]。国内也有转入酵母菌的报到, 但是相对的, 转录翻译的酶量较少。外源基因的拷贝数是影响其表达量的一个重要因素。一般来讲, 整合的拷贝数越多, 表达量越高, 但不是绝对的, 有时高以 G418 抗性和低 G418 抗性对表达量并没有影响, 拷贝数多了甚至可引起表达量下降。本研究对大量的不同以 G418 抗性转化子做表达筛选时发现, 随着 G418 抗性的增加, 表达量也随着增加, 高 G418 抗性转化子的表达量明显高于低以 G418 抗性转化子。

hMn-SOD 在毕赤酵母中的表达量约占分泌蛋白总量的 30% 左右, 相对于某些外源蛋白在大肠杆菌中的表达量达到 50% 来说偏低^[11]。其原因可能是, hMn-SOD 基因中的部分密码子对毕赤酵母而言是稀有密码子, 在基因表达的过程中因为使用频率低效的原因, 表达量过低。本实验从工程菌入手, 对基因片段和基因的宿主菌做了深入的研究, 对其稀有密码子的问题做了认真的分析。从现有的报道可以得知, 在生物体 61 个遗传密码中只有 15 个为毕赤酵母所特别偏好, 在酵母中表达量较高的基因往往大量采用酵母所偏好的密码子。因此, 能将 hMn-SOD 基因中的密码子突变为毕赤酵母所偏好的密码子, 就提高表达量。因此我们的课题以此为研究重点, 依据毕赤酵母的密码子偏爱性, 对整个基因组进行了彻底的优化, 并进行了全基因序列的合成。实验中, 经过优化的基因序列其中表达量约占分泌蛋白总量的 40% 左右, 相对原基因片段来讲表达量有所提高, 但其酶活并没有提高反而下降, 可能是其在快速产酶过程中空间结构来不及形成便产生了大量的包涵体所致。因此, 如何在产量提高的基础上, 提高其酶活又成为一个新的研究课题。不过从课题的研究进展来看, 对密码子进行优化后再进行基因表达将成为构建工程菌的一个重要手段。

Pichia 重组菌株根据 AOX1 基因的完整与否可分为 Mut⁺(methanol utilization plus)和 Mut^s(methanol utilization, low)两种表型, 外源蛋白在哪种表型的表达量更高, 需要作进一步验证。凌敏等^[10]报道比较 Mut⁺和 Mut^s分泌 SOD 酶的量及活性, 发现并无明显区别。不过由于 Mut^s表达高峰的时间过于漫长(6~8d), 不经济, 因此本研究也选择了 GS115 的 Mut⁺型作为宿主, 经甲醇诱导培养 4d 后, SOD 酶的表达量达到最大, 时间并不太长, 而且工程菌稳定, 适于实验室研究。

hMn-SOD 基因在毕赤酵母中的表达除了受到基因整合绝对数量及偏爱密码子的影响外, 还要受培养条件如通气量、培养基、温度、培养基 pH 值、甲醇^[12]含量等多方面因素的影响。

参考文献:

- [1] WU G H, WILEN R W, ROBERTSON A J, et al. Isolation, chromosomal localization, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic Copper/Zinc superoxide dismutase genes in wheat[J]. *Plant Physiology*, 1999, 120: 513-520.
- [2] NOZIK-GRAYCK E, DIETERLE C S, PIANTADOSI C A, et al. Secretion of extracellular superoxide dismutase in neonatal lungs[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279: 977-984.
- [3] MUKHOPADHYAY S, DAS S K, MUKHERJEE S. Expression of Mn-superoxide dismutase gene in nontumorigenic and tumorigenic human mammary epithelial cells[J]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(4): 195-202.
- [4] 赵翔, 霍克克, 李育阳. 毕赤酵母的密码子用法分析[J]. *生物工程学报*, 2000, 16(3): 308-312.
- [5] 周小玲, 沈微, 饶志明, 等. 一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(4): 89-92.
- [6] KIM T S, JUNG Y, NA B K, et al. Molecular cloning and expression of Cu/Zn-containing superoxide dismutase from *Fasciola hepatica*[J]. *Infection and Immunity*, 2000(1): 3941-3948.
- [7] QUINT P, REUTZEL R, MIKULSK R, et al. Crystal structure of nitrated human manganese superoxide dismutase: mechanism of inactivation[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, 40: 453-458.
- [8] 陈坚, 林庚金, 程建, 等. 锰型超氧化物歧化酶基因转染抑制 SGC7901 胃癌细胞增殖的机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(12): 1386-1389.
- [9] 周赞虎, 张海艳, 刘仁海, 等. 人铜锌超氧化物歧化酶基因改良及在聚球藻中表达[J]. *微生物学报*, 2006, 46(1): 147-149.
- [10] 凌敏, 赖祥进, 谢科. 人 Mn-SOD cDNA 的克隆及其在巴斯德毕赤酵母中的表达[J]. *生物工程学报*, 2005, 21(3): 478-481.
- [11] 于平. 巴斯德毕赤酵母表达系统研究进展[J]. *工业微生物*, 2005, 35(3): 50-55.
- [12] 刘红, 潘红春, 蔡绍哲, 等. 发酵条件对毕赤酵母表达重组人干扰素 ω 糖基化的影响[J]. *生物工程学报*, 2005, 21(1): 107-113.