

era 基因的高表达

陈苏民

(第四军医大学生物化学教研室, 西安)

Donald, L. C.

(美国NIH/NCI-FCRF-BRI染色体生物学实验室)

为了高表达产生Era蛋白, 借助计算机从Gene Bank中寻找N端几个氨基酸序列与Era相同的蛋白质, 选其中能在大肠杆菌内高表达的 λ Ea8.5蛋白, 以其基因5'端序列替代天然era基因5'端序列, 从而赋予era基因转录物以强的翻译起始信号, 而不改变其编码的氨基酸序列。将此重组era基因置于P_L启动子下游, 构建得质粒pCE31, 引入大肠杆菌TAP106, 经诱导后大量合成Era蛋白, 且其他蛋白质的合成显著被抑制, 从而使Era的含量能超过菌体总蛋白量的80%。经简单裂菌、洗涤步骤, 就获得具有能特异结合鸟苷酸活性的、电泳单带纯的Era蛋白。

关键词 era基因; 基因高表达

1986年在测定大肠杆菌rnc基因(编码RNase III)下游核苷酸序列时发现一开放读框, 编码316个氨基酸残基, 因其编码的氨基酸序列与Ras蛋白质有相似之处, 命名为era (*E. coli* ras-like) 基因^[1]。我们已用遗传学实验证明era是大肠杆菌生存繁殖必需的基因^[2]; 用生物化学方法证明Era是一种G蛋白^[3,4]。era基因的功能还不清楚。野生型大肠杆菌中Era蛋白的含量极低, 仅能用灵敏度很高的³⁵S-蛋氨酸参入-抗体沉淀放射自显影法测知菌体内有微量的Era蛋白的存在^[5]。为研究Era的功能, 我们克隆了era基因, 使之高表达, 并纯化了Era蛋白, 报道如下。

材料和方法

(一) 质粒与菌种

era基因从质粒pSB获得, 此质粒含大肠杆菌染色体中包括整个rnc操纵子

1-kb长的EcoRI片段^[2]。表达质粒用本实验室构建含P_L启动子的pJL6^[6]。宿主菌用*E. coli* TAP106^[6]。质粒构建过程见文献^[2,5]。质粒pIT15^[7]为东京大学医学研究所中村义一和稻田利文惠赠。

(二) DNA重组

参考Maniatis等^[8]方法。

(三) 蛋白质诱导表达和纯化

细菌在含氨苄青霉素的LB液中32℃振荡培养至OD_{650nm} 0.4—0.5, 转入42℃水浴振荡一定时间。经冷却, 离心收集得菌体, 用50mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 25%蔗糖洗涤并悬浮, 加溶菌酶至0.2mg/ml, 冰上放置15min, 加入MgCl₂至8mmol/L, DNase I至10u/ml以及裂菌缓冲液(1%Nonidet P40, 0.5%脱氧胆酸钠, 0.1mol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl pH7.2, 1mmol/L EDTA), 混匀0℃放置30min, 离心10 000×g 15

本文于1990年8月11日收到。

min, 所得沉淀仔细用裂菌缓冲液洗涤 4 次, TMD 液 (50mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 5mmol/L MgCl₂, 1mmol/L DTT) 洗 2 次。洗后所得沉淀含纯 Era, 以沉淀形式 4 °C 保存。

(四) 蛋白定量

采用Bradford法^[9]。菌体总蛋白量是将菌体沉淀先在 1 % SDS 中裂菌, 以 10mol/L 尿素稀释后定量; Era 蛋白则在纯化后直接溶于 10mol/L 尿素中定量。

(五) 氨基酸序列分析

纯化的蛋白质样品溶于含 0.25% 三氟乙酸(TFA)的 6mol/L 盐酸胍中, 上经含 30% 有机溶剂 (乙腈 / 1-丙醇 2:1) 1 % TFA 平衡的 Aquapore RP-300 柱 (Pharmacia), 用 30%—80% 有机溶剂洗脱, 所得蛋白用配有 MODEL 120A PTH 分析器的 Applied Biosystem Model 470A 蛋白质序列分析仪, 以标准的 03RPPTH 程序从 N 端分析序列。

(六) ³⁵S-蛋氨酸标记实验

细菌在不含蛋氨酸、半胱氨酸的培养基中 32 °C 振荡培养至 OD_{600nm} 0.4, 转入

42 °C 诱导 10min, 加入 ³⁵S-蛋氨酸脉冲标记 30s, 再加入预冷的含 0.01% 非标记蛋氨酸、1 % NaN₃ 的培养液终止反应, 离心收集标记细胞, 供作十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 放射自显影分析。

(七) 核苷酸结合活性分析

蛋白质与 α-³²P-dNTP 在 50 μl 结合缓冲液 (50 mmol / L Tris-HCl pH 7.5, 5mmol/L MgCl₂, 0.1% Nonidet P40, 0.2mg/ml 牛血清白蛋白), 30 °C 振荡温育 40min, 取样点于硝酸纤维素膜上, 经 TMD 液 洗涤 4 次, 干燥后测放射性。

结 果

(一) 重组质粒中 era 基因的表达

重组的质粒及它们在 TAP106 宿主菌中经诱导后 era 基因表达的情况见图 1 和图版 I -A。在 P_L 启动子控制下, λ cII-era 融合基因 (pCE12) 预期表达出 CII-Era 融合蛋白 (分子略大于预期的 35kd 的 Era 蛋白), 天然的 era 基因 (pCE22) 则未

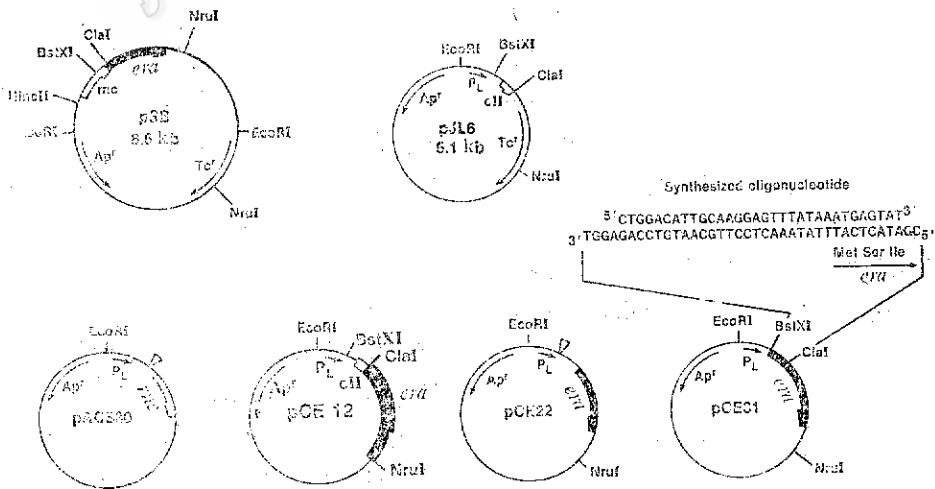


图 1 本文所用质粒
Fig.1 Plasmids used in the text

△ 为 DNA 重组时消除的酶切位点
Restriction enzyme sites vanished during DNA recombination.

见产生 Era 蛋白。这与我们用其他实验所得结果相同,即天然 *era* 在体内是与 *rnc* 基因共转录、共翻译的,单独的 *era* 基因转录物因缺乏有效的翻译起始序列而不能产生 Era 蛋白^[6]。

为获得非融合的、完整的 Era 蛋白,我们借助计算机从 Gene Bank 中寻查出与 Era 蛋白 N 端几个氨基酸序列相同的蛋白质,其中我们选取在大肠杆菌中能高表达的 λ 噬菌体 Ea8.5 蛋白^[10],按其基因 5' 端序列人工合成一段寡脱氧核苷酸替代天然 *era* 基因 5' 端序列,从而改变了这基因的翻译起始序列,却不改变其编码的氨基酸序列,由此重组得质粒 pCE31。在 TAP106 中经诱导后 pCE31 高表达出 Era 蛋白(图版 I -A5, B5)

(二) pCE31 高表达产生 Era 蛋白的定量观测

图 2 为 42°C 诱导 1—5 h 期间 TAP106 (pCE31) 的 SDS-PAGE 图谱,可见菌体中 Era 蛋白含量不断升高。蛋白定量(图 2)表明 42°C 诱导 1 h Era 蛋白占菌体总蛋白量的 28%, 2 h 达 55%, 5 h 高达 80% 以上。诱导期间总蛋白量的增加主要来源于 Era 蛋白的增加,而其他蛋白质含量变化不大。诱导 3 h 后,经诱导的细菌总蛋白量反而超出未诱导(始终在 32°C 生长)者。超薄切片电镜观察可见经诱导的菌体明显增大,几乎所有的细菌内都存在有包涵体(图 3),用免疫电镜技术可见 Era 蛋白分布在包涵体内,但更集中在包涵体中(文中未图示)。

(三) 诱导后 TAP106 (pCE31) 合成蛋白质的情况

³⁵S- 蛋氨酸 30 秒参入后作全菌体蛋白质 SDS-PAGE 放射自显影分析(图版 I -C),可见 42°C 诱导仅 10 min 含 pCE31 的细菌就突出地合成 Era (35kd),而其它蛋白

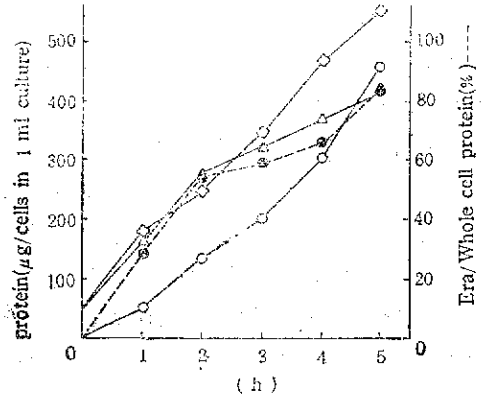


图 2 TAP106(pCE31) 经诱导不同时间后菌体中蛋白质含量的变化

Fig.2 Increasing in quantity of protein in TAP106(pCE31) cell after induction for various time

- △: Cells at 32°C, whole cell proteins
- : Cells at 42°C, whole cell protein
- : Era protein
- : Cells at 42°C, the ratio of Era/whole cell protein

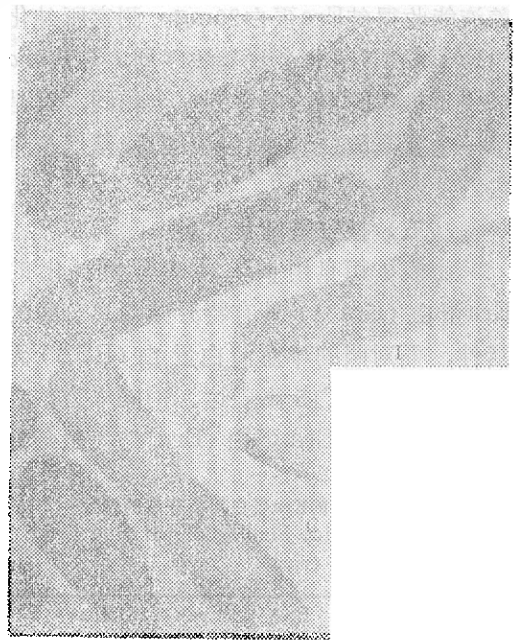


图 3 TAP106(pCE31) 在 32°C 生长(C)及经 42°C 诱导后(I)的电子显微照片

Fig.3 Electromicroscopic photograph of TAP106 grown at 32°C (C) and induced at 42°C (I) 50000 ×

质合成受到明显的抑制(与含 pCE22 或不合质粒的细菌比较)。pACS30 诱导后能高表达 RNase III 蛋白^[5](图中可见有相应于 RNase III 的 25kd 的蛋白显影带),但细菌其他蛋白质的合成并没有显著下降。质粒 pIT15 与 pCE31 的差别仅在它们所含的 *era* 基因上第 23 位的 G=C 突变为 A=T, 导致所编码的第 8 位氨基酸由半胱氨酸变为酪氨酸^[7], 此 pIT15 能与 pCE31 同样程度地高表达出突变的 Era 蛋白。TAP106 (pIT15) 诱导后也突出地合成 Era 蛋白, 其他蛋白质的合成同样处于低水平(图版 I-C)。

(四) Era 蛋白的纯化

从图版 I-B 可见, 诱导 4h 后的 TAP106 (pCE31) 经裂菌、洗涤等简单步骤(见方法)就能得到 SDS-PAGE 单带纯的 Era 蛋白, 即使电泳时加载过量样品、或用银染色都看不到杂蛋白的污染。每 100ml 菌培养液能收得纯 Era 蛋白 20mg。测定所纯化的 Era 蛋白 N 端 40 个氨基酸序列, 与从 *era* 基因所推得的蛋白质序列完全相同, 只是第一个氨基酸(起始的蛋氨酸)残基已被除去。

(五) 核苷酸结合试验

由表 1 可见由 pCE31 表达而纯化的 Era 蛋白 (Era^{wt}) 具有特异结合鸟苷酸的活性, 而对照的牛血清白蛋白 (BSA) 无此活性。由 pIT15 高表达、用同样方法纯化所得的突变 Era 蛋白 (Era^{ts}), 虽与野

生型 Era^{wt} 仅有一个氨基酸残基的差别, 其活性却显著降低。

讨 论

我们曾将野生型 *era* 基因插入带各种启动子的表达质粒中, 都得不到高表达。野生型大肠杆菌中, *era* 的表达处于很低的水平。我们的研究表明: *era* 的转录物缺乏有效的翻译起始序列, 它是靠与 *rnc* 基因一起转录、翻译而共表达的^[5]。翻译起始的强度不仅取决于 Shine-Dalgarno (SD) 序列和起始码, 而且与 SD 序列上游和起始码下游的序列密切相关, 围绕 ATG 上 20 个 bp、下 10 个 bp 间的序列影响最大^[11-14]。为保证能高表达产生 Era 蛋白, 我们借助计算机去选得已知能高表达的、且其头几个氨基酸序列与 Era 相同的蛋白质, 用其基因 5' 端的核酸序列去替代天然的 *era* 基因 5' 端序列, 而不改变 Era 蛋白的氨基酸序列, 却给予 *era*-mRNA 一个强的翻译起始信号。用这方法获得了成功, 使菌体内 Era 蛋白含量高达总蛋白量的 80% 以上。这方法将会用于其他基因的高表达非融合蛋白上。

从图版 I-C 和图版 I-B 5 都可以看到在 Era 高表达同时, 细菌其他蛋白质的产生显著下降。这至少有两种可能的原因: (1) 细菌内多拷贝质粒, 诱导后在强启动子 P_L 的作用下, 转录产生大量具有强翻译启动信号的 *era*-mRNA, 吸引了大量的核糖体去合成 Era 蛋白, 造成核糖体和翻译合成因子的陷阱, 阻碍了其他蛋白质的合成。TAP106 (pIT15) 诱导后合成突变的 Era 蛋白也有同样的情形; (2) 产生的 Era 蛋白可能具有抑制其他蛋白质合成的作用。pACS30 能高表达产生 RNase III 蛋白, 抑制其他蛋白质合成的作用并不明

表 1 纯化的 Era 蛋白与核苷酸的结合

Table 1: Nucleotide binding of purified Era protein (cpm)

α - ³² P-NTP	BSA	Era ^{wt}	Era ^{ts}
dGTP	3	21 731	2 098
CTP	0	832	119
UTP	0	14	23
ATP	9	1 605	260
GTP	0	44 596	1 421

显。Era⁺结合核苷酸的活性比 Era^w低得多, 诱导后 pIT15 大量产生 Era⁺ 时其他蛋白质合成同样显著下降, 有可能 Era 结合鸟苷酸和抑制蛋白质合成的活性并不在同一个结构域中, Era⁺ 所突变的氨基酸正在所推测 Era 结合鸟苷酸活性所在的 N 端区域内^[1], 且半胱氨酸突变为酪氨酸可能消除掉分子内的一对二硫键, 从而不利于活性区空间结构的维系。最近日本东京大学医学研究所中村义一等去除 *era* 基因为 C 端编码的序列, 则它高表达时抑制其他蛋白质合成的现象消失(私人通信), 这提示: Era 蛋白 C 端序列可能含有能抑制其他蛋白质合成的活性域, Era 的功能可能与控制蛋白质的合成有关, 对此

还需要进一步实验证明。但正常大肠杆菌中 Era 的含量很低^[5], 若使其含量升高细菌就不能生存(例如我们将 *era* 基因放在 *lac* 启动子后引入大肠杆菌时), 因此只能用控制严紧的 P_L 启动子来高表达产生 Era 蛋白。

诱导 TAP106(pCE31)后, 由于大量产生 Era 蛋白, 而其他蛋白质的合成又大幅度下降, 使菌体中 Era 的含量可高达总蛋白量的 80% 以上, 这就方便了 Era 蛋白的纯化。这样所得的纯 Era 蛋白虽然具有活性, 但活性不高。一般从包涵体纯化的蛋白质, 常要经过复性才能具有良好的活性。我们在高表达了 Era 的基础上, 已解决了它的复性问题, 将另文报道。

参 考 文 献

- [1] Ahnn, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:8849—8853, 1986.
- [2] Takiff, H. E. et al.: *J. Bacteriol.*, 171:2581—2590, 1989.
- [3] Chen, S.M. et al.: *Meeting on Molecular Genetics of Bacteria and Phages*, Cold Spring Harbor Lab, New York, p.33, 1988.
- [4] March, P. E. et al.: *Oncology*, 2:539—544, 1988.
- [5] 陈苏民, Court, D. L.: *生物化学杂志*, (印刷中).
- [6] Lautenberger, J. A.: *Gene*, 42: 49—57, 1983.
- [7] Inada, T. et al.: *J. Bacteriol.*, 171:5017—5024, 1989.
- [8] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab, New York, 1982.
- [9] Bradford, M.: *Anal Biochem.*, 72:248—254, 1976.
- [10] Hendrix, X. et al.: *LAMDA II*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p.602, 1983.
- [11] Coleman, R. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 181:139—143, 1985.
- [12] Gold, L. et al.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 35:365—403, 1981.
- [13] Looman, A. C. et al.: *EMBO J.*, 6:2489—2492, 1987.
- [14] Stanssens, P. et al.: *Gene*, 36:211—223, 1985.

Overexpression of the *era* Gene

Chen Sumin

(Department of Biochemistry, The Fourth Military Medical University, Xian)

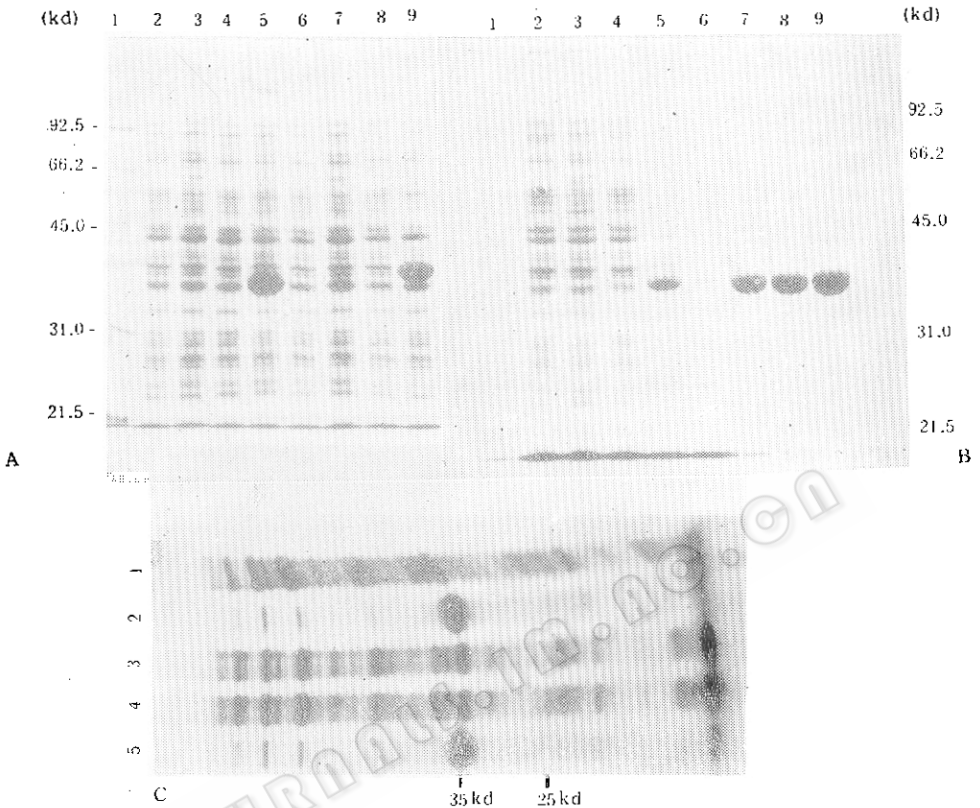
Donald, L. C.

(Laboratory of Chromosome Biology, NIH/NCI-FCRF-BRI, Frederick, MD, USA)

For overproduction of Era protein, λ *ea8.5* gene have been chosen from gene bank because of *Ea8.5* protein has sequence of several amino acids of its N-terminal identical to that of Era and it can be highly expressed in *E. coli*. 5' end sequences of *era* gene was substituted by synthetic oligonucleotide which sequence is identical to that of 5' end of *ea8.5* gene, so that endowed the transcripts of *era* gene with strong translational initiation signal and without changing the amino acid sequence of its translational product. Plasmid pCE31, which harbors the recombinated *era* gene under the control of P_L promoter could express very high levels of Era protein and other cellular protein synthesis was nearly shutoff during the period of induction, resulting Era constituted over 80% of total cell protein, Electrophoretic pure Era protein with specific guanine nucleotide-binding activity was obtained by simple procedure including lyzing the cells and washing the pellet of the lysate.

Key words

era gene; gene overexpression



A. 不同质粒在大肠杆菌TAP106中的蛋白质表达

Expression of proteins by plasmids in *E. coli* TAP106

细菌在32°C生长(C)或在42°C中诱导2h(I)后,全菌体供作SDS-PAGE,考马斯蓝染色。

Bacterial cells grown at 32°C(C) or induced at 42°C(I) for 2h were subjected to SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining

1. Marker of protein molecular weights(Bio-Rad); 2. pJL6(C); 3. pJL6(I); 4. pCE31(C); 5. pCE31(I); 6. pCE22(C); 7. pCE22(I); 8. pCE12(C); 9. pCE12(I)

B. Era蛋白纯化过程的SDS-PAGE分析

Analysis of the procedure for purifying Era protein by SDS-PAGE

1. Protein molecular weight markers;

2,3. TAP106(pJL6) grown at 32°C and induced at 42°C for 2h, respectively;

4,5. TAP106(pCE31) grown at 32°C and induced at 42°C for 2h, respectively;

6,7. The cell lysate supernatant and pellet of TAP106(pCE31) after induction, respectively;

8,9. Purified Era protein

C. 含不同质粒的大肠杆菌TAP106的蛋白质合成

The synthesis of proteins in *E. coli* TAP106 bearing various plasmids

细菌转入42°C诱导10min后,用³⁵S-蛋氨酸脉冲标记30秒,供作SDS-PAGE放射自显影

Bacterial cells were induced at 42°C for 10 min followed pulse labelling with ³⁵S-methionine for 30sec. and then subjected to SDS-PAGE and autoradiography.

1. pJL6; 2. pCE31; 3. pCE22; 4. pACS30; 5. pIT15