

采用反向 PCR 技术优化适合毕赤酵母表达的 截短型 HPV58 型 L1 基因

马 团¹, 宇 丽¹, 李发涛², 周羽立¹

(1. 暨南大学医学院生物化学教研室, 广东 广州 510632; 2. 广州市妇婴医院检验科, 广东 广州 510180)

[摘 要] 目的: 探讨利用反向聚合酶链反应(反向 PCR)技术根据毕赤酵母偏爱密码子优化截短型人乳头瘤病毒 58 型(HPV58) L1 基因的研究。方法: 设计 PCR 引物扩增截短型 HPV58L1 目的基因, 将其克隆入毕赤酵母分泌表达载体 *pPICZαC*; 测序并对目的基因进行序列分析; 根据毕赤酵母偏爱密码子利用反向 PCR 技术设计引物对目的基因进行扩增。结果: 扩增了截短型 HPV58L1 基因并将其克隆入毕赤酵母分泌表达载体 *pPICZαC* 中; 根据毕赤酵母偏爱密码子优化了截短型 HPV58L1 基因。结论: 成功构建经密码子优化截短型 HPV58L1 基因的毕赤酵母分泌表达载体 *pPICZαC*-HPV58L1。

[关键词] 毕赤酵母; HPV58L1 基因; 反向聚合酶链反应(反向 PCR); 载体

[中图分类号] Q785 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)06-0631-05

An inverse PCR for optimization of truncated HPV type 58 L1 gene suitable for its expression in pichia pastoris

MA Tuan¹, YU Li¹, LI Fa-tao², ZHOU Yu-bing¹

(1. Department of Biochemistry, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Department of clinical laboratory, Guangzhou Women and Children's Hospital, Guangzhou 510180, China)

[Abstract] **Aim:** To study an inverse PCR applied to optimize truncated human papilloma virus(HPV) type 58 L1 gene according to pichia yeast preferred codons. **Methods:** PCR primers were designed to amplify truncated targeted HPV58L1 gene, then it was cloned into the pichia pastoris secretion expression vector *pPICZαC*; The targeted gene was sequenced, analyzed and amplified by designing primers according to pichia pastoris preferred codons in inverse PCR. **Results:** Truncated HPV58L1 gene was amplified and constructed into pichia pastoris secretion expression vector *pPICZαC*; Truncated HPV58L1 gene was optimized based on pichia pastoris preferred codons. **Conclusion:** The codon optimized recombinant secretion plasmid *pPICZαC*-HPV58L1 were constructed.

[Key words] pichia pastoris; HPV58L1; inverse polymerase chain reaction(inverse PCR); vector

[收稿日期] 2009-09-22

[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目(02190); 广东省医学科研基金项目(A2001305)

[作者简介] 马 团(1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学

通讯作者: 宇 丽, 女, 教授, 硕士生导师, Tel: 020-85220256; E-mail: doctoryuli@yahoo.com.cn

人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV) 58型在中国妇女宫颈标本中检出阳性率非常高,尤其在东南省份,与HPV16型的检出率相近。HPV L1蛋白的C端截短并不影响其病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)组装能力,而且还能增加其表达水平,并证实表达的蛋白在体外可自组装成VLP,并能诱导小鼠红细胞凝集^[1]。

酵母作为低等真核生物,具有大肠杆菌繁殖快、成本低等优点,且表达翻译修饰系统又接近高等真核生物,能够实现胞外表达,已经成功表达过百种外源蛋白,而巴斯德毕赤酵母应用得最为广泛。

密码子优化是提高目的蛋白表达的途径之一,使用酵母偏爱的密码子改造目的基因来提高其在酵母宿主中表达量的例子已经有很多,如乙型肝炎病毒S基因、植酸酶基因的密码子优化及在毕赤酵母中的高效表达等。本实验采用一种反向聚合酶链反应(inverse polymerase chain reaction, 反向PCR)技术将HPV58L1基因定点突变为毕赤酵母偏爱的密码子,为开发宫颈癌基因工程疫苗提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 菌株及质粒 HPV58基因由广州市妇婴医院检验科惠赠;pPICZαC、大肠杆菌菌株TOP10、TOP10F'和酵母菌株GS115均购自Invitrogen公司。

(2) 酶及试剂 KOD-plus高保真酶为TOYOBO公司产品,内切酶Cla I、Kpn I和T4连接酶为TaKaRa公司产品,Dpn I为Fermentas公司产品,抗生素Zeocin购自Invitrogen公司,酵母提取物、胰蛋白胨购于华美生物技术公司,质粒提取试剂盒购自天根公司,DNA回收试剂盒为Omega公司产品。

1.2 方法

(1) 引物设计 根据GenBank上发表的HPV58的基因序列(序列号D90400),设计截短型HPV58 L1基因上下游引物,并在上、下游引物5'端分别引入Cla I及Kpn I酶切位点(下划线),外加保护碱基,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

上游引物: 5'-CGATCGATGTCCTGTGGCGGC-CTAGT-3'

下游引物: 5'-CGGGTACCTTTTCGTCCCAAAG-GAAACTGATCT-3'。

(2) PCR扩增与纯化 以广东地区宫颈癌组织

提取的HPV58 DNA为模板,上下游引物进行PCR反应。反应参数: 95℃ 5 min, 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 2 min,共30个循环,末次循环后72℃延伸10 min。扩增产物经体积分数为1% (质量浓度1 kg/L) 凝胶电泳检测,将目的条带切下后,用试剂盒回收纯化。

(3) 重组酵母表达载体的构建与鉴定 将纯化的HPV58L1基因片段与pPICZαC载体同时用限制性内切酶Cla I及Kpn I进行酶切,HPV58L1基因与载体按照Omega公司DNA回收试剂盒操作,回收后T4连接酶连接。将连接产物转化TOP10F'感受态细胞,在低盐LB, Zeocin抗性平板培养基中筛选培养。挑取阳性克隆,培养后小提质粒,采用Cla I及Kpn I双位点单、双酶切鉴定。选取阳性克隆,送英骏公司测序,测序引物为a-Factor和3'AOX1。

(4) 目的基因的优化策略及突变引物设计 参考NCBI上毕赤酵母密码子使用频率表和文献[2],将稀有密码子替换为酵母偏爱的密码子,同时遵循以下几个原则:①优化序列时应避免1个氨基酸1个密码子的情况,可能会产生重复的核酸序列,复杂mRNA二级结构,还有可能产生影响核糖体通过的颈环结构;②避免稀有密码子成串出现或出现在基因读码框的5'端,则会导致表达水平急剧下降。且当有2个稀有密码子相距很近时,严重影响翻译速度^[3];③起始密码子旁侧序列改造:通过RNA折叠分析可找到可能阻碍翻译正常起始的二级结构,然后利用替代密码子重新设计并调整翻译起始区及其旁侧序列,对基因进行改造^[4];④有些基因内部富含A-T序列,可在转录的过程中提前终止而导致仅产生低水平或截短的mRNA,给基因表达带来困难,因此在不改变翻译蛋白质密码子的条件下去掉A-T序列,除去mRNA中可能形成终止结构的区域,使目标蛋白得到表达^[5]。

根据以上原则分析目的基因序列,选择18个碱基突变位点(小写字母表示),共设计7对不完全互补引物,由上海英骏公司合成。

P1-1 5'-GATGTCtGTGTGgAGaCCTACTGAGGC-CACTG-3'

P1-2 5'-GTGGCCTCACTAGGtCtCCACACaGAC-ATCG-3'

P2-1 5'-GATGAATATGTGTCAaGaACAAGCAT-TTAcTATTATGCTGGCAGTTCC-3'

P2-2 5'-CTGCCAGCATAATAgTAAATGCTTGT-

tCtTGACACATATTCATCACTG-3'

P3-1 5'-GGTCATCCTTATTTgAAcAAgTTTGAT-GACACTGAAACC-3'

P3-2 5'-CAGTGTCACTCAAAcTTgTTcAAATAAG-GATGACCACTTAC-3'

P4-1 5'-CCAGATTATTTgAAgATGGCCAGTGA-ACCTTATCGG-3'

P4-2 5'-GGTTCACCTGGCCATcTTcAAATAATC-TGGATATTTGC-3'

P5-1 5'-GGATGACCTTTATATTAAgGGtTCCG-GTAATACTGCAG-3'

P5-2 5'-GCAGTATTACCGGAaCCcTTAATATA-AAGGTCATCCG-3'

P6-1 5'-GGAAGGTACATAcAAgAATGATAATT-TTAAGGAATATGTACG-3'

P6-2 5'-CCTTAAaATTATCATTcTTgTATGTAC-CTTCCTTAGTTACTTC-3'

P7-1 5'-GGAAGATCCATTAAAcAAgTAcACTTT-TTGGGAGGTAACTTAAAGG-3'

P7-2 5'-CCTCCCAAAAAGTgTAcTTgTTTAATG-GATCTTCCTTTTCTTTAGG-3'

(3) 反向 PCR 反应的循环流程

① PCR 反应利用高保真的 KOD-plus 聚合酶, 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 98 °C 变性 10 s, 60 ~ 64 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 5 min 30 s, 循环 20 次, 最后 1 次 68 °C 延伸 10 min。用体积分数为 1% (质量浓度 1 kg/L) 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

② Dpn I 酶切消化扩增产物 Dpn I 是一种可以识别甲基化位点并能酶切识别位点周围 DNA 双链的限制性内切酶。从大肠杆菌里提出的模板含有甲基化位点, 而 PCR 产物不含甲基化位点, 所以可用 Dpn I 消化掉模板, 得到含有预期突变的产物。PCR 扩增产物用 Dpn I 限制性内切酶 1 μL (10 U/μL), 37 °C 消化 4 h。用体积分数为 1% (质量浓度 1 kg/L) 琼脂糖凝胶电泳检测消化后产物。

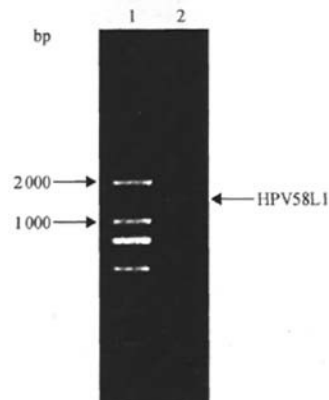
③ 按照文献[6]用氯化钙法制备并转化大肠杆菌 TOP10 的感受态细胞, 铺含抗生素的 LLB 平板培养过夜, 然后再挑单克隆摇菌、提质粒作为下一轮反应模板。

④ 重复①~③过程, 共 7 次循环。

⑤ 最后, 挑单克隆送上海英骏公司测序。

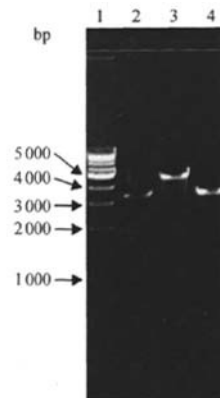
2 结果

2.1 截短型 HPV58L1 基因及重组表达载体 pPICZαC-HPV58L1 的电泳酶切鉴定 设计引物通过 PCR 扩增获得截短型 HPV58L1 基因片段 (1 400 bp) (图 1), 与理论大小一致。用限制性内切酶 Cla I、Kpn I 双酶切、单酶切空载体 pPICZαC 和重组载体 pPICZαC-HPV58L1 所得片段大小与理论值相符 (图 2)。



1: DL 2 000 Marker; 2: 截短型 HPV58L1 片段

图 1 截短型 HPV58L1 的 PCR 扩增产物

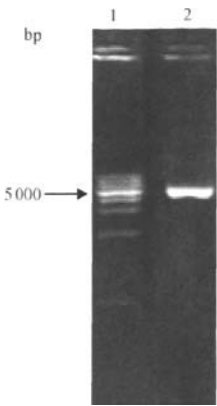


1: 1 kb DNA Marker; 2: pPICZαC-HPV58L1 双酶切 (3 600 bp 1 400 bp); 3: pPICZαC-HPV58L1 单酶切 (5 000 bp); 4: pPICZαC 单酶切 (3 600 bp)

图 2 pPICZαC-HPV58L1 酶切鉴定电泳图

2.2 反向 PCR 扩增电泳结果

设计突变引物扩增重组质粒得到片段的大小为 5 000 bp, 与实际大小相一致 (图 3)。



1: 1 kb Marker; 2: PCR 扩增的重组质粒(5 000 bp)
图 3 反向 PCR 扩增产物电泳

2.3 突变反应产物测序结果

每次随机挑选的两个单克隆的测序结果与预期相符,突变成功率几乎达到 100%。成功替换了 18 个碱基,优化了 16 个密码子方框为突变后的碱基(图 4)。

3 讨论

宫颈癌是常见的女性恶性肿瘤之一,发病率仅次于乳腺癌。

在 1991 年 Zhou 等^[7]发现 HPV16L1 蛋白 C-末端 22 个氨基酸存在 2 个核定位序列(NLS),一位于 525-530,为 KRKKRK;另一个为位于 510-512 位

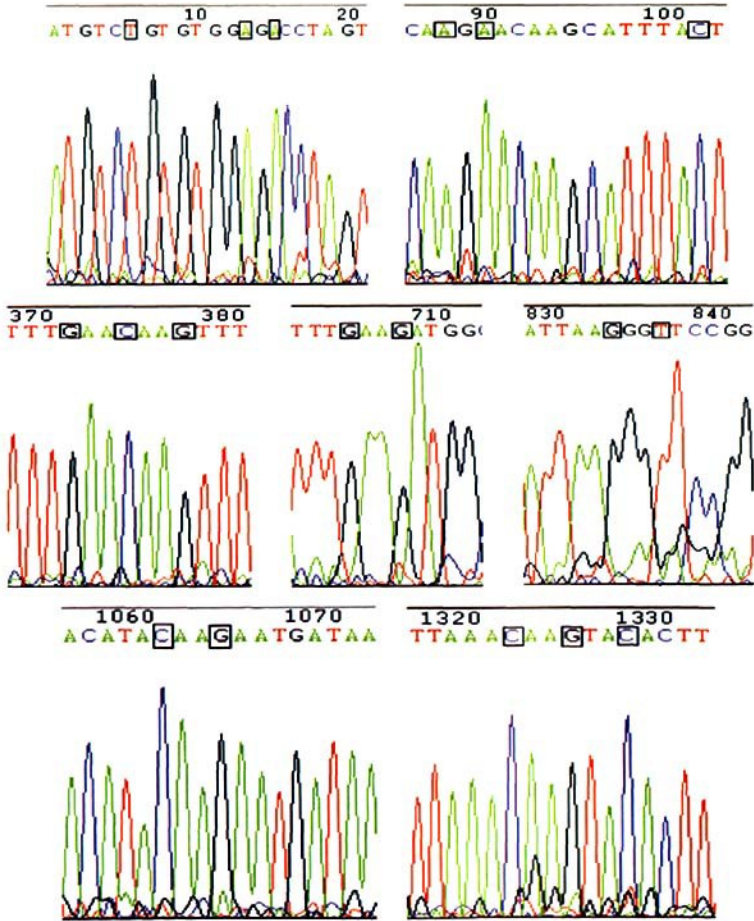


图 4 突变反应产物测序结果图

的 KRK 和 525、526 位的 KR。如果这两个 NLS 均发生缺失突变, L1 蛋白将滞留于胞浆中。对其他型别 HPV (HPV18, 33, 1, 5, 57 等) 的研究表明: 几乎所有的乳头瘤病毒含有相似的 C-末端序列。Paintsil 等^[8]的研究表明牛乳头状瘤病毒 1 型 L1 蛋白的 C-末端对于 BPV VLP 的形成并非必需的, C-末端截短 24 个氨基酸后不影响 VLP 的形成, 并且其 VLP 形成效率大大提高, 是野生型的 3 倍。上述的研究表明: HPV L1 蛋白 C-末端截短一定长度并不影响 VLP 的形成^[1]。

遗传密码具有简并性, 1 个氨基酸通常由 2~6 个密码子编码, 而在每一物种中, 对于同义密码子的使用也存在偏爱性, 在高表达基因中尤为明显。产生种内密码子偏爱性的原因很多, tRNA 丰度被认为是影响最大的。在高表达基因中, 要求密码子的使用要和 tRNA 数量匹配, 尽量使用 tRNA 分子数量多的密码子, 从而加快蛋白质合成的速度^[9]。外源基因在宿主中表达时, 常常由于密码子偏向性不同导致外源蛋白表达量低或不表达。通常采取的办法是或将外源基因的稀有密码子替换为宿主偏爱的密码子, 或是增加宿主中稀有 tRNA 量, 即将外源基因与其稀有密码子对应的 tRNA 共表达。

赵翔等^[2]分析毕赤酵母的优势密码子、外源蛋白在毕赤酵母中表达时, 若外源基因中含有稀有密码子则在翻译过程中会产生瓶颈效应而影响表达。刘礼兵等^[10]通过改造奎尼酸脱氢酶基因中存在的稀有密码子的密集区, 使奎尼酸脱氢酶在大肠杆菌中得到表达; 姚斌等^[11]利用毕赤酵母表达植酸酶是通过定点突变将原始基因中编码精氨酸的 4 个毕赤酵母使用频率为 0 的密码子改造为毕赤酵母偏爱的密码子, 植酸酶标大量提高了近 37 倍。韩雪清等^[12]将野生型猪瘟病毒 E2 基因中 24 个稀有密码子替换后, E2 基因在毕赤酵母中表达水平得到了显著提高。

本实验利用反向 PCR 技术成功突变了 HPV58 L1 基因中所含的稀有密码子为酵母偏爱的密码子, 为提高 HPV58 L1 基因在毕赤酵母中的蛋白表达量提

供了实验基础。

[参考文献]

- [1] 李文生, 郑 瑾, 刘红莉, 等. 截短型人乳头瘤病毒 58 型 L1 蛋白的表达及其体外生物活性研究[J]. 生物工程学报, 2004, 20(4): 536-539.
- [2] 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): 308-311.
- [3] 时成波, 吕安国, 吴文芳, 等. 改造稀有密码子提高 SEA 蛋白表达量[J]. 生物工程学报, 2002, 18(4): 477-480.
- [4] SREEKRISHNA K, BRANKAMP R G, KROPP K E, et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Gene, 1997, 190(1): 55-62.
- [5] 李洪钊, 李亮勋, 孙强明, 等. 巴斯德毕赤酵母表达系统优化策略[J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 288-292.
- [6] 莎姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 96-99.
- [7] ZHOU J, DOORBAR J, SUN X Y, et al. Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein[J]. Virology, 1991, 185(2): 625-632.
- [8] PAINTSIL J, MULLER M, PICKEN M, et al. Carboxyl terminus of bovine papilloma-virus type-1 L1 protein is not required for capsid formation[J]. Virology, 1996, 223(1): 238-244.
- [9] 冯德江, 刘 翔, 李旭刚, 等. tRNA 丰度与基因表达的关系[J]. 中国生物工程杂志, 2002, 22(6): 4-8.
- [10] 刘礼兵, 刘 云, 何华庆, 等. qa-3 稀有密码子和 mRNA 结构改造及其在大肠杆菌中的高效表达[J]. 生物工程学报, 2006, 22(2): 199-203.
- [11] 姚 斌, 张春义, 王建华, 等. 高效表达具有生物学活性的植酸酶的毕赤酵母[J]. 中国科学(c 辑), 1998, 28(3): 237-243.
- [12] 韩雪清, 刘湘涛, 张永国, 等. 猪瘟病毒流行毒株 E2 基因密码子优化及在酵母中的高效表达[J]. 微生物学报, 2003, 43(5): 560-567.

[责任编辑:朱颖娜]