

人铜锌超氧化物歧化酶基因改良及在聚球藻中表达

周赞虎^{1,2}, 张海艳¹, 刘仁海^{1*}, 章 军¹, 周可夫¹

(¹ 厦门大学生命科学院 厦门 361005)

(² 漳州出入境检验检疫局 漳州 363000)

摘 要 应用 PCR 定点突变技术把质粒 pESOD 中人铜锌超氧化物歧化酶基因(*hCu,Zn-SOD*)的 Cys¹¹¹ 密码子突变为 Ala¹¹¹ 密码子,再构建重组子,通过随机同源重组将突变后的 *hCu,Zn-SOD* 整合入聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942,并实现表达。表达产物用 SDS-PAGE、Western blot、酶活等方法测定均为阳性反应;热稳定性测定显示,*hCu,Zn-SOD* 在 80℃ 保温 30min 后仍具有 95% 的活力,耐热能力比天然 *hCu,Zn-SOD* 有了较大的提高。蛋白扫描结果显示目的蛋白占可溶性蛋白的 3.61%。

关键词 *hCu,Zn-SOD*; 定点突变; 聚球藻; 表达; 热稳定性

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)01-0147-03

铜锌超氧化物歧化酶(Copper,Zinc Superoxide Dismutase,SOD)的主要功能是清除生物体内的超氧阴离子,目前已应用于防御氧的毒性、抗辐射损伤、预防衰老以及防治炎症和肿瘤等领域已经有了广泛的应用。但目前市场上使用的 Cu,Zn-SOD 基本上是动植物来源的,但不同物种的 Cu,Zn-SOD 具有种质特异性,特别在一级结构上差异显著,通过 NCBI 比较 Cu,Zn-SOD 的编码基因(mRNA)发现:人类 Cu,Zn-SOD 编码基因和黑猩猩的 Cu,Zn-SOD 编码基因有 15 个碱基差异,和猕猴的 Cu,Zn-SOD 编码基因有 22 个碱基差异,故使用动植物来源的 Cu,Zn-SOD 存在着免疫原性等安全隐患。故近年来研究人员^[1-4] 主要把目光投向克隆和表达的人源 Cu,Zn-SOD(*hCu,Zn-SOD*)。此外自然界天然的 Cu,Zn-SOD 稳定性较差,所以在现实应用中受到很大的限制。本研究在无毒的聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 中直接表达人源 Cu,Zn-SOD(*hCu,Zn-SOD*),并进一步对 *hCu,Zn-SOD* 基因进行定点突变以提高其稳定性,为开发出一种可以直接口服、稳定而无免疫原性的新型 *hCu,Zn-SOD* 打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒:大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 由本实验室保存;聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 由中国科学院水生生物研究所提供。质粒 pESOD(内含热休克 *groESL* 启动子和 *hCu,Zn-SOD* 基因,全质粒长约 3.3kb)和 pUCMT1(内含 *rbcs* polyA 和卡那霉素(Kna)抗性基因,质粒全长 9.7kb)由本实验室构建改造并保存。

1.1.2 试剂:高保真 Pfu DNA 聚合酶购自深圳晶美生物工程

有限公司,Dpn I 酶购自河南华美生物工程有限公司,其余各种酶和生化试剂分别购自大连 TaKaRa、上海 Sangon 公司。DNA 测序引物和定点突变引物均由大连博亚公司合成。

1.2 定点突变及检测

根据 *hCu,Zn-SOD* cDNA 序列^[5] 和突变目的设计两条引物,P1:5'-CTCTCAGGAGACCATGCCATCATTTGGCCGCAC-3';P2:5'-GTGCGCCAATGATGGCATGGTCTCTCTGAGAG-3',下划线的碱基为突变位置,采用全长 PCR 快速定点突变方法^[6] 进行定点突变,PCR 反应体系总体积 50 μ L,其中无菌去离子水 41 μ L,10 \times Pfu Polymerase Buffer(含 Mg²⁺)5 μ L,20 μ mol/L P1、P2 引物各 1 μ L,pESOD 质粒 1ml(约 100ng),Pfu DNA 聚合酶 1 μ L(5U);反应条件为:反应条件为:94℃ 3min;94℃ 1min,64℃ 1min,72℃ 50s 27 个循环,72℃ 7min。扩增产物用 Dpn I 甲基化酶酶切处理除去非突变质粒,突变后的质粒直接转化感受态 *E. coli* JM101,挑取数个菌落测序,测序由上海博亚生物技术有限公司完成。测序引物为 5'-ACTCAGGTACTGGGAGTG-3'。

1.3 聚球藻同源整合重组载体的构建

首先用 *EcoR* I + *Xba* I 双酶切分别切下并回收 pESOD 质粒中的 *groESL* 热休克启动子和 *hCu,Zn-SOD* 基因、pUCMT1 质粒的 *rbcs* polyA 终止区和筛选标记 Kna 抗性基因(对卡那霉素具有抗性),然后用 T4 ligase 把目的片段连接起来构建 pESODT11 质粒(全长约 8.7kb),用 0.8% 琼脂糖电泳测定其分子量以确定是否构建成功。再用 *EcoR* I + *Sal* I 分别处理 *Synechococcus* sp. PCC7942 基因组 DNA 和 pESODT11 质粒,65℃ 15min 灭活酶活力。将处理后的基因组酶切片段和 pESODT11 质粒 6kb 片段(琼脂糖电泳后回收)相连,由此把聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 基因组 DNA 中的某一片段

基金项目:福建省自然科学基金(C0510004)

* 通讯作者。Tel:86-592-2180243;E-mail:renhai@xmu.edu.cn

作者简介:周赞虎(1973-),男,福建大田人,硕士,主要从事生物化学与分子生物学。E-mail:zzh_523@163.com

其他作者:徐虹¹

收稿日期:2005-06-03;接受日期:2005-10-12;修回日期:2005-11-05

和 *groESL* 启动子、*hCu*、*Zn-SOD*、*rbcS* polyA 终止区以及筛选标记 Kan 抗性基因连接形成聚球藻同源整合重组子。最终通过同源重组把整个重组子整合到聚球藻染色体上。

1.4 转基因藻株的筛选

本实验测定表明, *Synechococcus* sp. PCC7942 在 BG-11 液体培养基中和 BG-11 固体培养基上对 Kan 的基础抗性均小于 $30\mu\text{g/mL}$ 。用 $30\mu\text{g/mL}$ 的 Kan 浓度来筛选 *Synechococcus* sp. PCC7942 转基因藻株, 至野生藻全部死亡, 挑取长势较好的转基因藻落, 然后进行 PCR 检测和测序, 筛选到含目的基因的转基因藻。

1.5 SDS-PAGE 和 Western blot

试验操作参照文献^[7]。

2 结果

2.1 定点突变测序结果

将定点突变后的测序结果与 *hCu*、*Zn-SOD* mRNA 和 NCBI 的基因库比较分析得知, 定点突变后, *hCu*、*Zn-SOD* 的 Cys¹¹¹ 密码子(TGC)已突变为 Ala¹¹¹ 密码子(GCC), 其余序列和标准序列完全一致。

2.2 pESODT111 质粒鉴定

用 *EcoRI* 单切、*EcoRI* + *XbaI* 双酶切, 琼脂糖电泳鉴定发现单酶切的分子量约为 8700bp, 单一条带, 而双酶切的结果得到约 8000bp 和 700bp 条带, 和预期结果一致。

2.3 转基因藻株进行 PCR 鉴定和测序

用 *hCu*、*Zn-SOD* 首尾序列作为 PCR 特异性扩增引物进行转基因藻 PCR 扩增, 琼脂糖鉴定发现确实有 500bp 特异带, 结果见图 2, 进一步将扩增产物进行 DNA 测序, 测序引物: primer1 : 5'-GGCGCGACGAAGGCCGTG 3'; primer2 : 5'-TAATTGGGATCGCCCAAT-3'。DNASIS 分析测序结果显示扩增产物就是突变的人 *hCu*、*Zn-SOD* 序列, 证明人 *hCu*、*Zn-SOD* 基因已经转入聚球藻细胞中。

2.4 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定

将转基因藻和野生藻蛋白提取液进行 SDS-PAGE 鉴定(图 1-A)。从电泳结果发现, *Synechococcus* sp. PCC7942 野生藻和转化藻在 16kDa 位置的蛋白质图谱有明显差异, 转化藻和

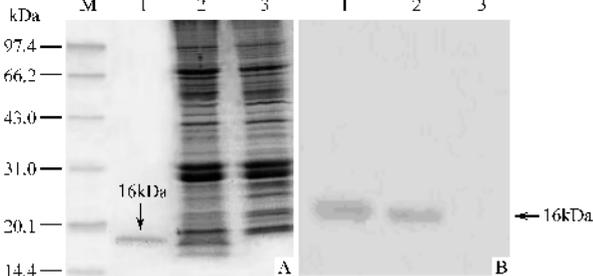


图 1 转基因藻的 SDS-PAGE(A) 和 Western blot(B)

Fig.1 SDS-PAGE(A) and Western blot(B) analysis of expression product of transformant strains

M. Marker 1. *hCu*、*Zn-SOD* 2. Transformant strains 3. *Synechococcus* sp. PCC7942.

hCu、*Zn-SOD* 一样, 在 16kDa 处有明显的条带, 而野生藻在此处基本看不到条带, 提示转基因藻可能表达了人 *hCu*、*Zn-SOD* 基因。利用凝胶成像系统扫描分析图 3-A 中的特异带, 分析得知此蛋白含量占可溶性蛋白的 3.61%。

图 1-B 结果表明, 转化藻表达的蛋白质和 *hCu*、*Zn-SOD* 一样, 可以和绵羊红细胞抗人 *hCu*、*Zn-SOD* 抗体产生特异性条带, 而野生藻没有出现特异性杂交带。说明人 *hCu*、*Zn-SOD* 已在转基因聚球藻中获得表达。

2.5 酶活性测定^[8]

聚球藻在 42℃ 中热诱导 30min, 然后超声破碎, 离心取其上清液, 连苯三酚自氧化法测定上清液的 *hCu*、*Zn-SOD* 活性, 结果如下: 野生藻的 SOD 酶活为 30.29 ± 0.86 U/mL 藻液(藻液 $OD_{730} = 1.5$), 转基因藻 SOD 酶活为 35.40 ± 1.03 U/mL 藻液(藻液 $OD_{730} = 1.5$), 酶活增加 16.87%, 差异显著($p < 0.01$), 证明人 *hCu*、*Zn-SOD* 已在转基因 *Synechococcus* sp. PCC7942 藻里得到表达。

2.6 稳定性测定

2.6.1 热稳定性: 以室温(25℃)的酶活力为标准酶活力(100%), 80℃ 热处理, 以 10min 为一个时间单位连续测定 6 组。从图 2 可以看到, 在 80℃ 热处理转基因聚球藻表达的 *hCu*、*Zn-SOD* 30min 后, 还有 95.26% 的酶活力, 与已有文献报道 *hCu*、*Zn-SOD* 在 80℃ 保温 10min 残余的酶活为 89.71%^[9] 相比, 本研究表达的经过改造的重组人 *hCu*、*Zn-SOD* 在热稳定上有所提高。另外, 从图 2 中还可看出, 在 80℃ 热处理前 20min 内, *hCu*、*Zn-SOD* 的酶活力反而比 25℃ 时的酶活力增加, 说明此 *hCu*、*Zn-SOD* 的最适温度要高于 25℃。

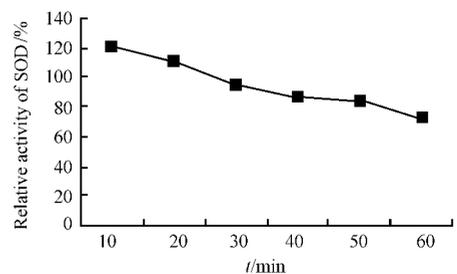


图 2 重组 *hCu*、*Zn-SOD* 在 80℃ 热稳定性变化图

Fig.2 The heat solidity of the recombinant *hCu*、*Zn-SOD*

2.6.2 遗传稳定性: 在含卡那霉素 $50\mu\text{g/mL}$ 的 BG-11 培养基中连续传代培养 3 个月, 取部分藻重复 2.3 节中的 PCR 鉴定, 结果和最初的鉴定一致, 说明通过同源整合整合到聚球藻染色体上的 *hCu*、*Zn-SOD* 能够长期稳定地存在藻体内。

3 讨论

由于多种因素影响, 尤其是其种质特异性以及在体内停留时间短(通常只有 6~10min), 使得天然的动物 *hCu*、*Zn-SOD* 的广泛应用受到很大限制。Kanematsu^[10] 等对 *hCu*、*Zn-SOD* 的 Cys⁶ 进行盒式突变, 改造成 Ala⁶, 在大肠杆菌中表达后, 表达产物经纯化后鉴定和自然的 *hCu*、*Zn-SOD* 活性是一致的, 而且 T_m 值提高了 10℃。所以通过改变 *hCu*、*Zn-SOD* 的 Cys 基

因来增加其稳定性是可行的。由崔玉敏^[11]和袁勤生^[12]等研究表明:Cu,Zn-SOD不但可以在模拟小鼠胃肠环境具有很高的残存活力,而且可以透过主动脉内皮细胞的细胞膜进入胞内,小鼠灌胃Cu,Zn-SOD实验证明:血红细胞内Cu,Zn-SOD活性随剂量上升显示峰形升高。所以hCu,Zn-SOD是适合于作为口服药物的。

本研究通过改变hCu,Zn-SOD基因中的Cys111密码子为Ala密码子,把非活性中心第111位活跃的Cys转换成相对惰性的Ala,并且选择无毒的聚球藻*Synechococcus* sp. PCC7942作为表达宿主,通过构建聚球藻随机整合同源重组载体,使其在工程藻里表达改良后的hCu,Zn-SOD,最后通过SDS-PAGE、Western blot以及酶活鉴定等,证明hCu,Zn-SOD已经在聚球藻*Synechococcus* sp. PCC7942里表达,表达量为占藻体可溶性蛋白的3.61%,并且具有相应酶活;从热稳定性实验结果来看,80℃处理30min,残存的活力达95.26%,比天然的hCu,Zn-SOD的稳定性有了一定的提高。这为开发可以直接口服、在体内比较稳定和无免疫原性的Cu,Zn-SOD奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 施惠娟,范立强,魏东芝,等.人铜锌超氧化物歧化酶cDNA的克隆、测序及表达.生物化学与生物物理学报,1999,31(1):16-18.
- [2] 贺华君,施惠娟,邱存平,等.中枢神经系统靶向性Cu/Zn-SOD的构建和表达.生物化学与生物物理学报,2001,33(3):281-285.

- [3] 卫文仲,向华,谭华荣.人铜锌超氧化物歧化酶基因在乳酸乳球菌中的食品级表达.微生物学报,2003,43(3):347-353.
- [4] 陈春,陈瑞端,刘树滔,等.hCuZn-SOD基因的克隆、表达及其产物的初步纯化和表征.福州大学学报,2004,32(6):763-768.
- [5] Hallewell RA, Masiarz FR, Najarian RC. Human Cu/Zn superoxide dismutase cDNA: isolation of clones synthesising high levels of active or inactive enzyme from an expression library. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13: 2017-2034.
- [6] 董宇清,于昕,赵进东.一种简易的利用Pfu-DNA聚合酶进行反向长距离PCR获得定点突变的方法.植物学报,2000,42(5):539-541.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南.金冬雁,黎孟枫等译.第二版.北京:科学出版社,1996.
- [8] 谢卫华,姚菊芳,袁勤生.邻苯三酚氧化法测定SOD活性.医药工业,1988,19(5):217-219.
- [9] 高俊杰,夏文超,袁勤生.重组人铜锌SOD的部分理化性质研究.药物生物技术,2003,10(1):43-47.
- [10] Kanematsu S, Takeshima Y, Hagiwara H. Chemically-synthesized gene encoding modified human superoxide dismutase: its construction, expression and properties of the product. *Free Radic Res Commun*, 1991, 12-13 (Pt 2): 829-836.
- [11] 崔玉敏,张炳然,袁勤生. SOD在模拟小鼠胃肠道环境中的稳定性研究.中国生化药物杂志,1994,15(2):82-84.
- [12] 袁勤生,崔玉敏,张炳然.口服SOD的稳定性及吸收途径研究.药物生物技术,1994,1(1):24-29.

Sited-directed mutagenesis of hCu,Zn-SOD gene and its expression in *Synechococcus* sp. PCC7942

ZHOU Zan-hu^{1,2}, ZHANG Hai-yan¹, LIU Ren-hai^{1*}, ZHANG Jun¹, ZHOU Ke-fu¹

(¹ School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

(² Zhangzhou Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Zhangzhou 363000, China)

Abstract: The Cys¹¹¹ genetic code of human copper/zinc superoxide dismutase (hCu,Zn-SOD) gene in the pESOD plamid was mutated into the Ala¹¹¹ code with site-directed mutagenesis, and then the plamid pESOD^{T111} which contained groESL promoter, mutated hCu,Zn-SOD gene, rbcS-polyA terminator and reporter gene(Kan^r) was constructed and transduced into *Synechococcus* sp. PCC7942 with homologous recombination platform. The results of PCR and DNA sequence analysis showed that the target nucleotide had been genetically integrated into genome DNA of the host cell. SDS-PAGE, Western blot and Pyrogallol autoxidation assay confirmed that the transformant strains expressed the mutated hCu,Zn-SOD protein. And the level of the mutated hCu,Zn-SOD protein reached a value of 3.61% of the total soluble protein. Furthermore, the transformants still retained 95% activities of SOD after 30 minutes at 80℃ environment, it indicated that the mutated hCu,Zn-SOD protein could endure higher temperature than the natural one.

Keywords: hCu,Zn-SOD; Sited-directed mutagenesis; *Synechococcus* sp. PCC7942; Expression; Hot stability

* Corresponding author. Tel: 86-592-2180243; E-mail: renhai@xmu.edu.cn

Other author: XU Hong¹

Received 3 June 2005/Accepted 12 October 2005/Revised 5 November 2005