

应用计算机软件辅助重组 hbFGF 基因的筛选

黄更生¹ 孙奋勇² 卜 丹³

(1 广东教育学院生物系 广州 510303 2 暨南大学生物工程研究所 广州 510632 3 广州华侨医院 广州 510630)

摘要 目的: 尝试通过计算机的辅助筛选基因重组组合, 期望能减少人工筛选的工作量并得到高表达的蛋白。方法: 从影响表达的两个因素即翻译起始区 TIR 的二级结构自由能和翻译起始区的密码子偏好性问题研究入手, 对部分核苷酸进行了突变, 利用 RNA 二级结构预测软件 DNASISv2.5 对 hbFGF 的 TIR 区起始密码子开始前 35 个核苷酸进行了分析, 筛选出预期表达量高的组合并在实验中进行验证。结果: 从 32 种突变方式中筛选出 10 条自由能绝对值最低的序列做引物, 克隆至表达载体上, 得到了两株高表达菌株。结论: 利用计算机辅助设计可以优化和筛选实验结果, 提高工作效率, 降低具体实验的工作量。

关键词: 计算机; DNASIS2.5; hbFGF; 自由能

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A

Selecting the recombinant hbFGF gene under the help of computer software

HUANG Geng-sheng¹, SUN Fen-yong², BO Dan³

1 Bio-Department, Guangdong Institute of Education, Guangzhou 510303, China;

2 Bio-engineering Institute, JNU, Guangzhou 510632, China;

3 Guangzhou Overseas Chinese Hospital, Guangzhou 510630, China

ABSTRACT: Background&Objective: We try to use softwares to cut down our workload and to have a higher protein expression. **Methods:** The free energy of the Translation Initiation Region(TIR) and the Codons preference of *E. coli* were started with. During the cloning, there are two principles of increasing the region, which is mainly decided by the content of G+C in TIR. We adjusted the content of G+C in the 35 aminophenol near the N terminal of hbFGF, then worked out the ΔG_0 with software DNASISv2.5 and screened the clones with higher expression. **Results:** Calculating by the software, we got 10 sequence from all possible combination with lower ΔG_0 and cloned them into expression cell BL21(DE3). Two of the candidates showed high express potential. **Conclusion:** Utilizing the auxiliary design of computer software can not only optimize and select experimental results but also reduce the workload of specific experiment and raise working efficiency.

Key words: Computer; DNASIS 2.5; hbFGF; Free energy

前言

碱性成纤维细胞生长因子尽管在半个世纪前就在动物组织中被发现, 对其结构和功能的具体认识还是在近二十年来随着分子生物学技术的发展而渐趋完善, 由于认识到其广泛的生物学功能和诱人的临床应用前景以及基因工程技术和蛋白质工程新技术的应用, 越来越多的实验室参与了 bFGF 的研究, 1985 年 Esho 首次测定了第一个牛 bFGF 的蛋白全序列, 1986 年 Abraham 克隆到牛和人的 bFGF 的 cDNA, 1988 年 Shimaskaiki 与 Kurokawa 同时克隆到大鼠的 cDNA, 国内亦有多家科研单位对 bFGF 的生物活性、临床表现及基因重组方面进行过很多有意义的探索^[1]。

hbFGF 在大肠杆菌中的表达其非融合蛋白目前报导的表达量都不甚理想, 我们试图从影响表达的两个因素即翻译起始区(Translation Initiation Region, TIR)的二级结构自由能和翻译起始区的密码子偏好性问题研究入手, 利用 RNA 二级结构预测软件 DNASISv2.5 对 hbFGF 的 TIR 区起始密码子开始前 35 个核苷酸进行了分析, 综合降低 G+C 含量和增加密码子偏好

性两个因素对部分核苷酸进行了突变, 按照最大可能增大 TIR 区自由能和最大可能符合大肠杆菌密码子偏好性的原则对 hbFGF 前 20 个氨基酸的 G+C 含量进行调整, 并由软件 DNASISv2.5 分析各种序列组合的自由能, 筛选出表达量最高的序列, 从各种突变方式中筛选出 10 条自由能绝对值最低的序列做引物, 克隆至表达载体上, 最终筛选出表达量最高的序列组合。由计算机软件做初步筛选, 再由人工实验的方法做具体的筛选, 可缩短实验的周期, 提高工作效率。

1 材料和方法

1.1 覆盖 hbFGF 编码区序列 TIR 区的设计

在引物设计过程中, 为提高蛋白表达量, 根据对 hbFGF 基因翻译起始区和密码子偏好性的研究, 按照最大可能增大 TIR 区自由能和最大可能符合大肠杆菌密码子偏好性的原则对 hbFGF 核酸序列的前 20 个密码子作如下调整: 对其中 4 个位点进行定向点突变, 另有 4 个位点进行随机点突变。这些突变都可能造成 TIR 二级结构变化。

5' > AUG GC(G→U) GC(C→U) GG(G→U) AG(U/C)¹ AU (C→U) AU(U/C)² AC(U/C)3CUG CCG GC(A/U/C/G)⁴ CU < 3

在上述序列中, 标记直线下划线的是定向点突变, 标记波浪下划线的是随机点突变。这 4 个随机突变共有 32 种组合。通过软件 DNASIS2.5 对这 32 种序列分别模拟二级结构且计算

作者简介: 黄更生, 男, 36 岁, 硕士, 助教

研究方向: 分子生物学 tel: 02034113257, E-mail: hhggs@163.com

(收稿日期: 2003-06-08 接受日期: 2006-07-10)

其TIR区的自由能值,将算得自由能值最低的10种序列由上海申友公司合成相应引物。

表1 能量最低的TIR区的 ΔG^0 (kcal/mol)

Table 1 10 sequences from all possible combination with lower ΔG^0 (kcal/mol)

顺序	位点				ΔG^0	顺序	位点				ΔG^0
	1	2	3	4			1	2	3	4	
1.	U	U	U	U	-10.5	6.	C	U	C	U	-10.9
2.	C	U	U	U	-10.5	7.	U	C	C	U	-11.0
3.	U	C	U	U	-10.5	8.	U	U	C	U	-11.7
4.	C	C	U	U	-10.5	9.	U	U	U	A	-12.6
5.	C	C	C	U	-10.5	10.	C	U	U	A	-12.6

1.2 PCR 扩增 hbFGF 基因并重组和表达

用10条引物分别扩增hbFGF基因,条件为:94℃4分钟,94℃30秒,60℃30秒,72℃30秒,共32个循环。最后72℃10分钟扩展。所得产物纯化后与pET-3C质粒同用NdeI和BamHI双酶切后连接,挑选转化在LB培养基中扩增连接成功的重组子,用QIAGEN公司的质粒抽提试剂盒抽提质粒,转化BL21(DE3)plysS载体的感受态细胞,涂于含Amp的琼脂板上37℃恒温箱过夜。

1.3 重组子的诱导表达

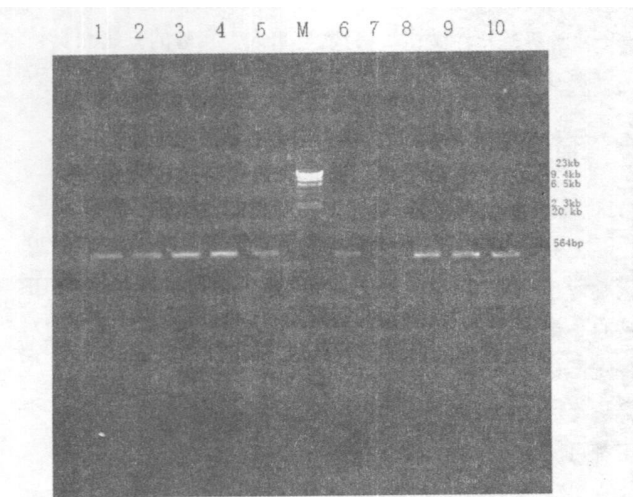
挑取10平板上的单菌落,分别接入5ml含Amp的LB培养基中,37℃摇床225r/m培养3小时至OD值约为0.3时,用1mmol/L的IPTG诱导,32℃4小时后取出离心4000g10分钟,以0.02mol/L的PBS、0.01mol/L的EDTA、0.1mol/L的NaCl溶液(PH6.7)重悬,置冰上用超声波破碎仪破碎,功率150W约30分钟。破碎液在高速低温离心机4℃18000g离心30分钟,分别收集上清与沉淀,做SDS-PAGE电泳。然后做凝胶密度扫描。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物鉴定结果

图1 NdeI 和 BglII 双酶切 hbFGF 电泳结果

Fig. 1 Restriction analysis of Gene hbFGF



注:1—10 hbFGF M: 分子量marker

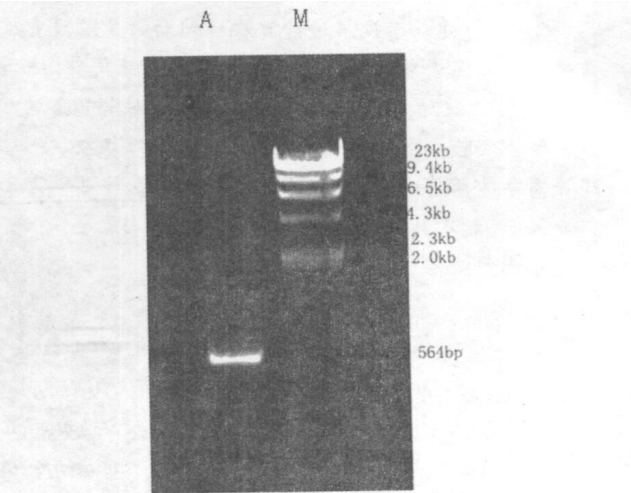
2.2 hbFGF 重组子的酶切鉴定结果

挑取连接成功的重组子克隆于5ml含Amp的培养基中培养过夜,长出的菌液离心后用QIAGEN公司的质粒抽量试剂盒

抽提质粒,用限制性内切酶NdeI和BamHI双酶切(hbFGF基因内部400bp左右处有一BamHI位点),1.2%琼脂糖电泳鉴定。

图2 NdeI 和 Bgl II 双酶切重组 pET-3c-hbFGF 电泳结果

Fig. 2 Restriction analysis of pET-3c-hbFGF

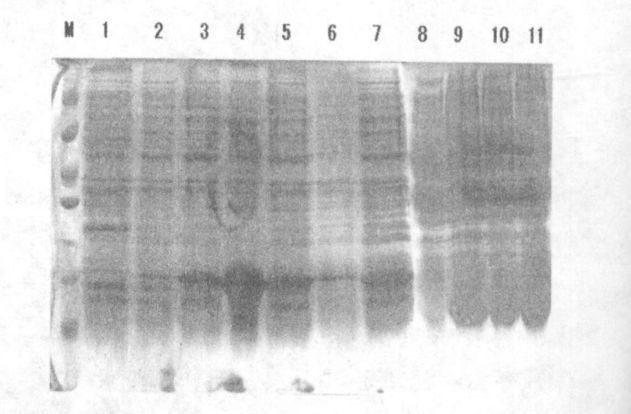


注:A为双酶切后的hbFGF基因片段,泳道M为分子量Marker—HindIII。HbFGF经NdeI和BglII双酶切后片段大小应为460bp左右,电泳显示无误

2.3 重组 hbFGF 蛋白表达结果

图3 重组 hbFGF 蛋白表达结果

Fig. 3 SDS-PAGE of BL21(DE3) cells carrying with recombinant plasmids



注:M: 蛋白质 Marker(94.7,66.2,43.0,31.0,21.0,14.4kD)

1: 未诱导的天然hbFGF对照 2—11 IPTG诱导的重组hbFGF

Notes: M: Protein Marker(94.7,66.2,43.0,31.0,21.0,14.4kD)

1: Not induced natural hbFGF control;

2—11: Recombination hbFGF induced by IPTG

3 讨论

本实验在设计过程中首先用DNASISv2.5对hbFGF的5'末端部分碱基做了分析和优化,DNASISv2.5是一个以大量实验数据为基础的综合软件,主要用于对核酸和蛋白质结构的分析预测。软件的应用是基于以下理论的:

A. 翻译起始区(TIR)对翻译顺利进行的重要性。有实验

证明如果二级结构过于稳定 mRNA 常常会形成各种各样的二级结构如发夹结构,在能量较低的情况下,这些二级结构有时会通过形成假结(pseudoknot)结构,从而形成更为复杂的三级结构,从而影响到核糖体 RNA 对 TIR 区的重要位点如 SD 区的识别。翻译起始阶段,当核糖体 16S 亚基开始识别 SD 序列并结合到 mRNA 时必须先打开发夹之类的二级结构,这个过程与反应进行的自由能有关,翻译起始区标准自由能变化(ΔG^0)过低则二级结构很难打开,翻译会因此中止,实验证明,当 TIR 区不形成二级结构时翻译的效率是最高的^[2],即二级结构对翻译顺利进行影响甚大,二级结构越不稳定,翻译起始的效率也就越高,因此二级结构的自由能对翻译起始的影响不可小觑。Maarten H 的实验证明,TIR 区 ΔG^0 降低 1.4kcal/mol 将造成翻译起始效率降低 10%。而碱基 G 和 C 因为含有三个成氢键基团,相对于 A 和 U 成键其 ΔG^0 值大于 1.4kcal/mol^[2],所以适量减少 G+C 的含量可能会升高碱基序列的自由能,使 mRNA 二级结构不稳定,翻译因而得以更顺利的进行。

B. 密码子的偏好性。大多数氨基酸的密码子并不唯一,其对应 tRNA 的丰度亦有差别:采用偏好密码子的 mRNA 翻译速度要快于稀有密码子比例较高的 mRNA^[3]。偏好性可由下面网址查出 [http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Escherichia+coli+\[ghbc\]](http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Escherichia+coli+[ghbc])。DNASIS v2.5 软件计算结果虽有一定的误差,但对提高实验效率,缩小选择范围确实具有相当明显的指导意义。这一点在我们的其它实验中亦有体现。

hbFGF 在 E. coli 中表达是目前最常用的生产手段,但是非融合形式表达量很低,现在很少看到国内有超过 10% 的报导,基因在细胞中的表达很大程度上为翻译起始区(Translation Initiation Region, TIR)所决定,TIR 区域较高的 G+C 含量会形成较稳定的二级结构,阻碍转录和翻译的有效进行。关于 TIR 的范围尚无定论,Ganoza 等人认为开放性阅读框起始密码子上下游 70 个核苷酸的范围为 TIR 区域。我们统计了 bFGF 前 10 个和 20 个氨基酸编码序列中的 GC 含量分别高达 75% 和 78%,这样的基因结构显然对表达不利,必须进行适当调整,本研究将序列调整的重点放在 bFGF 蛋白 N 端前 20 个氨基酸的编码序列,前提是不改变蛋白质的编码序列,通过使用计算机软件的计算和筛选得到改造后的 G+C 含量降低为 55% 左右,并取得了较好的效果。

参考文献

- [1] 陈苏民, Court DL. 大肠杆菌中高表达重组 Em 可溶性蛋白的纯化及其生化特性[J]. 生物化学杂志, 1992, 8(1): 33—41
- [2] Zhang J, Cousens L S, Barr PJ, et al. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor, a structural homolog of interleukin 1 beta[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 3446—3450
- [3] Enkson A E, Cousens IS, Matthews BW. Refinement of the structure of human basic fibroblast growth factor at 1.6 Å resolution and analysis of presumed heparin binding sites by selenate analysis of presumed heparin binding sites by selenate substitution[J]. Protein Sci, 1993, 2: 1274—1284
- [4] 林剑, 许雁, 刘春宇. 碱性成纤维细胞生长因子[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 1993, 14(1): 99—104

(上接第 23 页)

结果表明, 40.68MHz 的 HEMF30—50mA 暴露对大鼠胃粘膜急性损伤, 呈现出有效的治疗效应, HEMF 这一作用机制与 ET-1、NO 及 SOD 无关。如文献^[1, 2, 4, 5, 10], 其机制可能仍与 HEMF 作用下产生的电磁场振荡效应, 对植物神经的调节作用, 解除胃组织内血管痉挛, 从而增加局部供血量等有关。本研究中, 血 ET-1 及 NO 水平在 HEMF 暴露 1 和 6 次后不同变化这一现象, 仍有待于进一步探究。本研究结果可为临床 HEMF 治疗学提供一点有价值的参考资料。

参考文献

- [1] 郭万学. 理疗学. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 217—234
- [2] 陈景藻. 现代物理治疗学. 北京: 人民军医出版社, 2001: 180—181
- [3] 张啸. 短波、超短波疗法对慢性胃炎的疗效观察. 中华理疗杂志, 1986, 8(4): 206—208
- [4] Macheret IeL, Korkushko OO, Chupryna HM. Using ultrahigh-frequency therapy in the treatment of chronic gastroduodenal ulcers. Lik-Sprava, 2001, 25(1): 74—6
- [5] Tsimneman IaS, Kochurova IA, Vladiminskii EV. Physiotherapeutic treatment of gastroduodenal ulcer. Klin Med Mosk, 2003, 81(7): 8—15

- [6] 丁立新. 磁场对血浆和胃粘膜内胃肠激素及胃动力效应的实验研究[J]. 生物磁学, 2006, 6(1): 34—36
- [7] 高健青. 胃病者血浆内皮素水平的临床意义. 江苏大学学报·医学版, 2003, 13(3): 217—218
- [8] 丁立新. 磁场对急性胃损伤的治疗效应及其机制的实验研究[J]. 生物磁学, 2006, 6(1): 50—52
- [9] 丁立新, 刘莉, 明旭昌, 等. 表皮生长因子和降钙素基因相关肽在电磁场治疗急性胃损伤中的作用研究[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(7): 22—23
- [10] 马高峰, 刘忠民, 何小飞, 等. 慢性胃炎患者血浆一氧化氮和内皮素水平的变化及意义. 中国冶金工业医学杂志, 1998, 15(1): 11—13
- [11] 李涛. 氧自由基与胃肠疾病研究进展. 国外医学·消化系疾病分册, 1997, 17(4): 204—207
- [12] Okada M, Niida H, Takeuchi K, et al. Role of prostaglandin deficiency in pathogenic mechanism of gastric lesions induced by indomethacin in rats. Dig Dis Sci, 1989, 34(2): 694—696
- [13] Mileva K, Georgieva B, Radicheva N. About the biological effects of high and extremely high frequency electromagnetic fields. Acta Physiol Pharmacol Bulg, 2003, 27(2—3): 89—100