

225802

- 7 Cohn G, Dembiec D, Marcus J. Anal Biochem, 1970; 34: 30
- 8 Hassan H M, Fridovich I. J Biol Chem, 1978; 253: 8148
- 9 Chance B, Sies H, Boveris A. Physiol Rev, 1979; 59: 527
- 10 Loven D P, Leeper D B, Oberley L W. Can Res, 1985; 45: 3029

The Effect of Heat Shock on the Activities of Antioxidative Enzymes in Silkworm (*Bombyx mori*). Yang Tangbin, Mei Shangyun (Department of Biology, Central China Normal University, Wuhan 430070, China).

Abstract Heat shock induced significant increase of the SOD and CAT activities in silkworm of various ages, such as at 40°C the induced SOD activity was maximal, where both

the activities of CuZn-SOD and MnSOD were also increased. After exposure at 36°C for 1h, GSH-Px activity was decreased, but it was increased at 40°C. Among the different regions of silkworm, the activities of SOD and CAT have great diversities in the order of priorities: thoracicoabdominal region, head region, posterior silk gland. Heat shock also had different influences on the activities of the antioxidative enzymes of different regions to adapt different physiological states of silkworm. The antioxidases work cooperative interaction, so that the normal physiological functions are maintained.

Key words antioxidative enzyme, heat shock response, silkworm

一种双顺反子表达载体的构建及应用的研究*

刘新平 陈苏民 陈南春 赵忠良 柴玉波 崔有宏¹⁾ 薛泳涛

(第四军医大学生物化学及分子生物学教研室, 西安 710032)

摘要 将表达载体 pEC34 中的一段寡核苷酸序列, 其中包括翻译增强子序列、SD 序列、终止码、起始码及两端的限制性内切酶位点, 插入 GST 基因后, 构建成双顺反子的表达载体. 利用此载体表达了非融合的人骨形成蛋白 2A (hBMP2A) 和人骨形成蛋白 3 (hBMP3) C 端肽段. 将第一顺反子基因 (GST 基因) 切小到原来的 1/3 时, 则位于下游的第二顺反子基因编码的蛋白质在大肠杆菌中的表达量增加一倍.

关键词 双顺反子, 人骨形成蛋白基因, 基因表达调控, 表达载体

虽然外源基因在大肠杆菌中的表达已积累了不少知识和经验, 但迄今没有一个表达载体能保证插入的外源基因都能高表达, 以往的实验经验是: 尽管使用了强转录启动子 (如 P_L、P_R、tac 等), 用 RNA 印迹能检出目的 mRNA 的存在, 却常不见目的蛋白的表达^[1]. 目前已知最关键问题是在翻译起始上. 因此人们就构建表达融合蛋白的载体来设法保证目的基因的表达, 如 pGEX-4T 等^[2], 但要去除 N 端的融合肽段常有困难或手续繁杂.

本文利用 GST 基因作第一顺反子, 将目的基因人骨形成蛋白 2A (human bone morphogenetic protein 2A, hBMP2A) 和人骨形成蛋白 (hBMP3) cDNA 的 3' 端片段分别做为第二个顺反子. 在这两个顺反子之间插入了大肠杆菌翻译增强子序列、第二个 SD 序列、第一顺反子终止码 TAA 和第二顺反子起始码 ATG

* 国家“八五”科技攻关资助项目 85-722-07.

¹⁾ 兰州军区军医学校生化教研室.

收稿日期: 1995-05-15, 修回日期: 1995-09-05

(terminal start element, TSE). 在这种双顺反子控制下 hBMP2A 和 hBMP3 分别以非融合蛋白的形式表达, 表达量占总菌体蛋白的 10% 及 15%. 当把第一顺反子 GST 基因由原来的 660 个核苷酸减小到 206 个核苷酸时, 目的蛋白的表达量相应提高一倍.

1 材料与方法

1.1 人骨形成蛋白2A cDNA 和人骨形成蛋白3-cDNA 基因为本室储存.

1.2 大肠杆菌菌株 JM109, 基因型 *recA1*、*supE44*、*endA1*、*hsdR17*、*gyrA96*、*relA1*、*thiΔ* (*lac-proAB*)、*F* [*traD36 proAB + lacI1 lacΔM15*] 由本教研室保存.

1.3 pEC-34 质粒为本室构建, 含翻译增强子、SD 序列及终止码、起始码后接限制性内切酶多克隆位点. 构建过程将另文发表. pGEX-4T-2 质粒购自 Pharmacia 公司.

1.4 各种限制性内切酶、工具酶购自美国 Promega 公司和中国华美公司.

2 结 果

2.1 hBMP2A 和 hBMP3 的亚克隆

hBMP2A cDNA 3' 端 567 个核苷酸和 hBMP3 cDNA 3' 端 645 个核苷酸分别克隆入 pEC34 载体中, 得到 pEC34-B2A 和 pEC34-B3 (图 1).

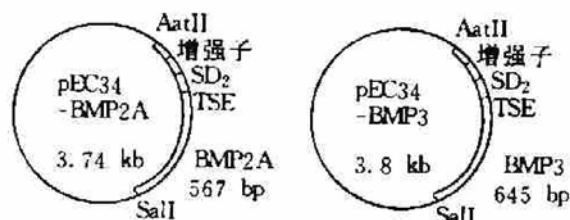


图 1 pEC34-B2A 和 pEC34-B3 质粒的结构

2.2 双顺反子表达载体的构建及表达

将亚克隆得到的 pEC34-B2A 和 pEC34-B3 分别用 Aat II 和 Sal I 双酶切下 620 bp 和 707 bp 的片段, 插入 pGEX-4T-2 质粒, 构成由 GST 基因为第一顺反子, 后接翻译增强子序列、

SD 序列、终止码、起始码 (TSE) 和分别由 hBMP2A 和 hBMP3 做为第二顺反子的双顺反子表达载体命名为 pLGB2 和 pLGB3 (图 2).

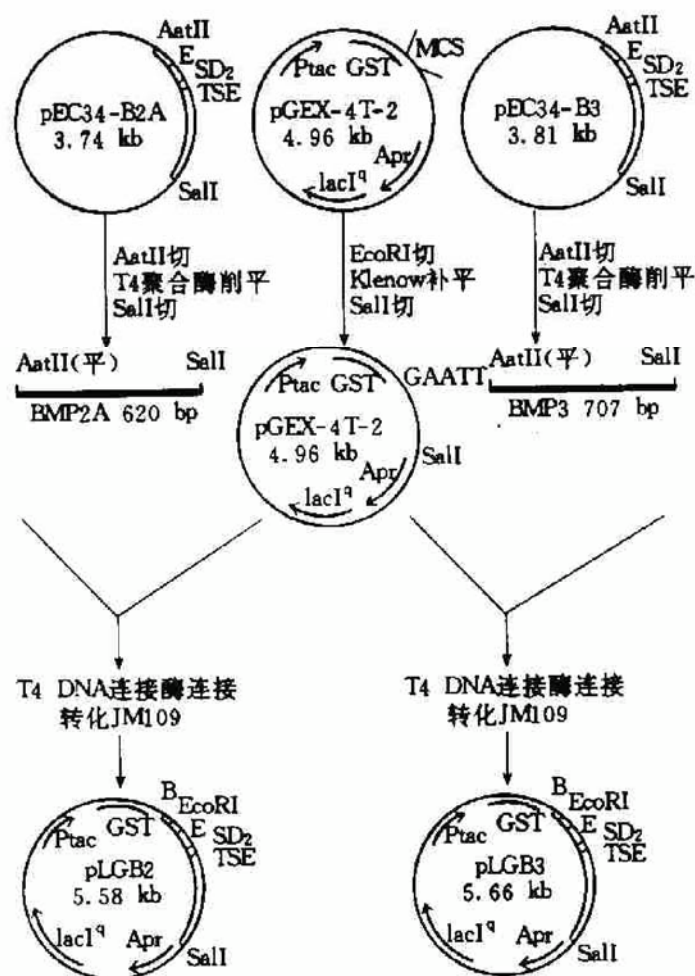


图 2 pLGB2 和 pLGB3 双顺反子表达载体的构建

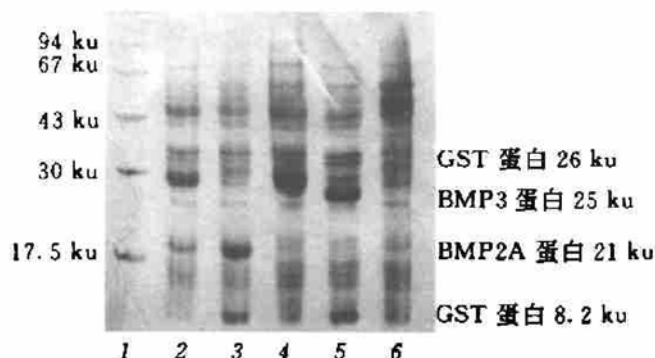


图 3 12% SDS-PAGE 图谱

1: 蛋白质分子量标准; 2: pLGB2, 表达 GST 蛋白 26 ku 和 BMP2A 蛋白 21 ku; 3: pLGB2, 表达 GST 蛋白 8.2 ku 和 BMP2A 蛋白 21 ku; 4: pLGB3, 表达 GST 蛋白 26 ku 和 BMP3 蛋白 25 ku; 5: pLGB3, 表达 GST 蛋白 8.2 ku 和 BMP3 蛋白 25 ku; 6: JM109.

转化入 JM109, 37℃ LB 培养基中培养到对数期 $A_{260} = 0.6 \sim 1.0$ 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L IPTG 诱导 3~4 h, 作 12.5% SDS-PAGE, hBMP2A 和 hBMP3 分别表达出 21 ku 和 25 ku 蛋白带, 表达量占菌体总蛋白的 10% 和 15% (图 3 中 2 和 4)。

2.3 GST 基因大小影响第二顺反子表达量

用 *Bal*I 和 *Hind*III 双酶切分别除去 pLGB2 和 pLGB3 中 GST 基因 (第一顺反子) 编码 C 端肽段的 455 bp (图 4), 使 GST 基因从 660 bp (编码 26 ku 的蛋白质) 缩小到 206 bp (编码 8.2 ku 的蛋白质) 分别构建得 pSGB2 和 pSGB3。转化 JM109, 经 IPTG 诱导后, 位于小 GST 基因后的第二顺反子基因 (hBMP2A 和 hBMP3) 表达的 21 ku 和 25 ku 蛋白量都明显增多, 分别占总菌体蛋白的 23% 和 25%, 比 pLB2 和 pLB3 表达者提高一倍 (图 3 中的 3 和 5)。

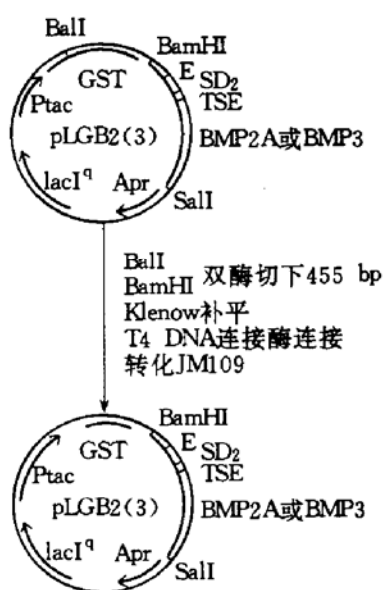
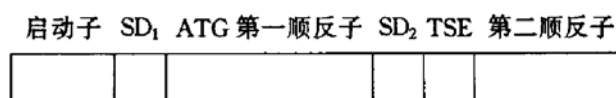


图 4 pSGB2 和 pSGB3 (小 GST 基因) 表达载体的构建

3 讨 论

利用双顺反子的形式在大肠杆菌中表达非融合形式的外源基因, 设计是在已证实能高表达的基因下游放置第二个 SD 序列和终止起始序列 (TSE), 在其后面接上目的基因, 当第一个基因翻译以后, 核糖体并不脱落, 接着翻

译第二个基因, 因此如果第一个基因能高表达, 则第二个基因也能跟着高表达。一般设计如下所示:



但也有许多情况, 第一基因能有效地表达而第二个基因却不能表达, 其中 TSE 是一个重要因素。TSE 可有多种形式, 如重叠形 TAATG、间隔形 TAAAATG^[3]、TAA-CATATG^[4]等, 都有成功的报道。我们在设计 TSE 时曾参考了 Ito^[3] 的报道, 采用 TAAAATG 构建了 3 种第二顺反子基因, 都没有得到表达。当我们把 TSE 改变为 TAATATATG, 并在 SD₂ 的上游设计了一个翻译增强子序列时^[5], hBMP2A 和 hBMP3 cDNA 基因在第二顺反子的位置上分别获得 10% 及 15% 的表达。这表达究竟是由于改变了 TSE 的形式还是增加了翻译增强子序列的结果, 还难下结论, 但当我们采用第一种 TSE 形式时 (TAAAATG), 克隆在其下游的 3 种 BMP 基因都没有表达, 却都表达了第一个顺反子基因 (GST), 这说明在 TAAAATG 的形式中, GST 基因能终止, 但不能起始下游基因 (结果未显示)。当把 TSE 的形式改变为 TAATATATG 时, 第二顺反子基因得以表达, 说明这种形式既终止了 GST 基因又起始了下游基因。

翻译增强子序列的功能是与核糖体 16 S rRNA 第 460 左右的碱基形成一个新的碱基相互作用关系, 从而促进翻译起始物的形成, 人工将翻译增强子中的 9 bp 序列放在 Lac Z 基因的 SD 序列上游, 或放在翻译起始码 ATG 下游都同样有作用。这段序列称为翻译增强子 (translational enhancer)^[5]。本实验还不能说明翻译增强子在表达中的作用。

我们还试验了第一顺反子大小对第二顺反子基因表达量的影响, 因为 GST 基因编码

26 ku的蛋白质而且表达量很高(>30%),此时大肠杆菌中由于相应翻译因子的缺乏对其他基因的翻译会有一定的抑制^[6],从而减少了作为第二顺反子目的蛋白的产量.当我们把GST基因从660 bp 缩少到206 bp 时,hBMP2A 和 hBMP3 的表达量分别提高一倍.因此我们认为第一顺反子基因最好要小一些,这样有利于提高目的蛋白的产量,也有利于其后目的蛋白的分离.我们设计的这种双顺反子表达形式是否适用于其他外源基因,还有待于更多的应用来证实,但至少对翻译增强子和TSE序列联合应用于双顺反子载体的构建提供了一个成功的借鉴.

参 考 文 献

- 1 刘新平, 陈南春, 陈苏民. 生物化学杂志, 1991; 7 (1): 8
- 2 Smith D B, Johnson K S. Genl, 1988; 67: 31
- 3 Ito W, Kurosawa Y. Gene, 1992; 118: 87
- 4 Ferrin M, Terranova K D, Schreiber M P *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 1937
- 5 Peter O L, Shaikat H R. J Biol Chem, 1992; 264: 16973
- 6 Liu J, Albers M W, Chen C M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 2304

Construction and Application of A Dicistronic Expression Vector. Liu Xinping, Chen Sumin,

Chen Nanchun, Zhao Zhongliang, Chai Yubo, Cui Youhong, Xue Yongtao (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Fourth Military Medical University, Xian 710032, China*).

Abstract A dicistronic expression vector in *E. coli* has been constructed. The vector contains glutathione S-transferase (GST) gene as the first cistron, followed successively with translational enhancer, SD sequence, stop codon, start codon and multiple restriction enzyme sites for cloning (MCS). 3'-terminal fragments of human bone morphogenetic protein (hBMP) gene 2A and 3 were inserted into the MCS respectively. After induction, unfused hBMP2A and hBMP3 expressed and occupied 10% and 15% of the total cell protein respectively. The GST gene in the plasmids were further shortened from 660 bp to 206 bp. The expression level of hBMP2A and hBMP3 were double by the plasmids containing short GST gene as compared to that of the corresponding plasmids with large GST gene.

Key words dicistron, human bone morphogenetic protein gene, gene expression regulation, expression vector

超氧化物歧化酶模拟化合物的生物活性研究*

廖展如 扶惠华¹⁾ 田廷亮¹⁾ 蔡汉临 刘宛乔

(华中师范大学化学系, 武汉 430070)

摘要 根据天然超氧化物歧化酶(SOD)活性部位结构合成了含苯并咪唑的5种配体及其32种分别含Cu(II)、Fe(III)、Mn(II)、Co(II)的模拟化合物.经光谱、电化学测试证明这些化合物具有拟SOD活性,其50%抑制率浓度(IC₅₀)为10⁻⁶~10⁻⁸ mol·L⁻¹,催化超氧离子自由基(O₂⁻)歧化

*国家自然科学基金、湖北省自然科学基金和南京大学配位化学国家重点实验室基金资助.

¹⁾华中师范大学生物系. 收稿日期: 1995-05-29, 修回日期: 1995-09-11