

# 苦瓜 MAP30 基因的密码子优化及在毕赤酵母中的表达

王 芳, 王 丽 媛, 乔 禹, 韩 旭, 丁 国 华

(哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江省高等院校植物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150025)

**摘 要:**以苦瓜为试材,采用 SDS-PAGE 和 Western-blot 的方法,研究经密码子优化后的苦瓜 MAP30(Momordica anti-HIV protein of 30 kDa)基因在新型毕赤酵母中的表达。结果表明:与未优化基因相比,优化基因在新型毕赤酵母中的表达量有所提高。pGAPH $\alpha$ 与甲醇诱导型启动子(pPIC9)相比提高了安全性,适合应用到医药领域。

**关键词:**苦瓜;MAP30;毕赤酵母;pGAPH $\alpha$ ;优化基因

**中图分类号:**S 642.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)24-0112-04

MAP30(Momordica anti-HIV protein of 30 kDa)是 Lee-Huang 等<sup>[1]</sup>首次从苦瓜种子和果实中分离得到的单

链核糖体失活蛋白。研究表明 MAP30 具有抗病毒、抗肿瘤的活性,对 HIV、疱疹病毒具有很强的抑制作用<sup>[2-3]</sup>。此外,MAP30 还可以特异的诱导肿瘤或肿瘤转化细胞的凋亡,但对正常细胞无任何毒副作用,因此具有巨大的临床应用价值<sup>[4-5]</sup>。

**第一作者简介:**王芳(1987-),女,硕士研究生,研究方向为植物分子生物学。E-mail:291392224@qq.com.

**责任作者:**丁国华(1963-),男,博士,教授,研究方向为植物分子生物学。E-mail:hsddgh@hrbnu.edu.cn.

**基金项目:**黑龙江省教育厅科研资助项目(11551142);黑龙江省高校科技创新团队研究计划资助项目;哈尔滨师范大学科技创新团队研究计划资助项目(KJTD-2011-2)。

**收稿日期:**2013-09-16

MAP30 基因的全长是 861 bp,没有内含子,能编码 286 个氨基酸。MAP30 可以在大肠杆菌表达系统中表达,其优点是可以快速大量的繁殖,但其表达产物不能正确的折叠和糖基化修饰<sup>[6]</sup>。伴随着生物技术的不断发展,甲醇营养型酵母-巴斯德毕赤酵母表达系统被广泛应用。巴斯德毕赤酵母可以在甲醇作为唯一碳源和能

## 参考文献

[1] 曾宋君,陈之林,段俊.星点木的组织培养和快速繁殖[J].植物生理通讯,2003(6):632.

[2] 李浚明,朱登云,编译.植物组织培养教程[M].北京:中国农业大学出版社,2009:25-42.

## Study on Callus Induction and Plantlet Regeneration of *Dracaena godseffiana*

GUAN Yan, LIANG Guo-ping, LI Ling, GUI Ming-chun, HUANG Feng-xiang, TIAN Hai  
(Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong, Yunnan 666100)

**Abstract:** Taking the stem segments of *Dracaena godseffiana* as explant, the callus induction and plantlet regeneration were studied, in order to select the suitable hormone combination in the process of tissue culture. The results indicated that: the optimum medium for callus induction was MS+6-BA 2.0 mg/L+TDZ 0.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 6 g/L, induction rate was 88.9%; the optimum medium for adventitious bud differentiation was MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 6 g/L, induction rate was 59.26%; The optimum medium for adventitious bud proliferating was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.8 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.2 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 6 g/L, proliferation coefficient was 1.91; The optimum medium for rooting was 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+sucrose 15 g/L+agar 6 g/L, rooting rate was 81.2%.

**Key words:** *Dracaena godseffiana*; stems; callus; plant regeneration

源的培养基中快速生长,能进行蛋白加工和翻译后修饰,与其它真核表达系统相比,能更加快速容易的进行高效表达,是外源基因理想的表达系统,已有多重外源蛋白成功表达<sup>[7]</sup>。尽管巴斯德毕赤酵母表达系统优点很多,但是它的所有载体都不适用食品蛋白的表达。该研究采用的是一种新型毕赤酵母表达系统,所用的表达载体是 pGAPH $\alpha$ ,这种表达载体的启动子是三磷酸甘油醛脱氢酶的启动子(GAP),替换了毕赤酵母表达载体 pPIC9 上的 AOX 启动子,在生产和应用过程中无需甲醇诱导,同时,与 pGAPZ $\alpha$  系统相比,pGAPH $\alpha$  在转化过程中不引入抗生素基因,安全性更高<sup>[8]</sup>。为了提高外源基因在宿主细胞内的表达,该研究根据 *Pichia pastoris* 密码子的偏爱性<sup>[9]</sup>,对 MAP30 基因的密码子进行优化,以此来获得高表达量的蛋白,为 MAP30 基因的大量合成提供了新的理论依据,为医药界的发展奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试苦瓜品种为“秀玉”;大肠杆菌 JM109 和 DH5 $\alpha$  来源于北京盖宁金诺生物技术有限公司;毕赤酵母 GS115 和载体 pGAPH $\alpha$  为东北农业大学遗传学实验室李杰教授所赠;pMD18-TVector、*Xho* I、*Not* I、*Eco*R I、*Sna*B I、*Bgl* II、T4-DNA ligase、*Taq* DNA 聚合酶、RnaseA 等购自宝生物工程(大连)有限公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 MAP30 基因优化** 为了提高 MAP30 基因在毕赤酵母中的表达量,对 MAP30 基因进行了优化,在不改变氨基酸序列的前提下,按照 *Pichia pastoris* 密码子的偏爱性<sup>[9]</sup>。重建 MAP30 基因。在基因 5'端和 3'端分别加入限制性内切酶 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切位点和保护碱基,同时加入组氨酸标签位点(His-tag)。消除原序列中的终止密码子 TGA,在基因 5'端加入 Kex2 位点。设计完的基因全长 845 bp,由上海旭冠生物科技发展有限公司合成。

**1.2.2 MAP30 优化及未优化基因的 PCR 扩增** 根据优化 MAP30 基因序列设计 2 对特异引物用于基因克隆,序列如下:

F1 5'GAGAGGCTGAAGCTGACGTTAACTTC3'  
R1 5'GATGATGATGGTTAAACAACAGATTCAACC3'  
F2 5'GACCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGC3'  
*Xho* I  
R2 5'CGGGAATTCAATGATGATGATGATGA3'.  
*Eco*R I

根据 NCBI 上已公布的苦瓜 MAP30 基因序列设计的引物。序列如下:

F3 5'TACGTAATCTTCATTGGTGTTCCTGCTGCCAA3'  
*Sna*B I  
R3 5'ATGATGATGATGATGATGATTCAACAACAGATTCCCC3'  
His-tag组氨酸标签  
R4 5'GCGGCCGCTCAATGATGATGATGATG3'.  
*Not* I 组氨酸标签

用碱裂解法提取优化 MAP30 基因的质粒,以质粒为模板,以 F1 和 F2 为引物,通过 PCR 扩增优化 MAP30 基因。利用 CTAB 法从苦瓜中提取总 DNA,以总 DNA 为模板,以 F3、R3、R4 为引物,通过 2 次 PCR 扩增未优化 MAP30 基因。

**1.2.3 MAP30 基因的克隆与测序** 将优化和未优化 MAP30 基因的 PCR 产物与 pMD18-T Vector 载体连接,转化大肠杆菌 JM109。菌液 PCR 和酶切鉴定,阳性克隆送上海生工生物工程技术公司测序鉴定。

**1.2.4 重组表达载体的构建** 用 *Xho* I 和 *Eco*R I 对含有优化 MAP30 基因的质粒 pMD18-MAP30 进行双酶切。用 *Not* I 和 *Sna*B I 对含有未优化 MAP30 基因的质粒 pMD18-MAP30 进行双酶切。采用上海生工生物工程技术公司的 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收酶切产物。将回收产物直接连接到 pGAPH $\alpha$  载体,然后转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。并对重组子进行 PCR 和酶切鉴定。

**1.2.5 酵母细胞 GS115 的转化、筛选与鉴定** 提取优化和未优化基因的质粒,重组质粒经 *Bgl* II 线性化后,采用电击转化法转入 GS115 感受态细胞中,转化产物涂 MD 平板上,28℃ 培养 3 d,筛选出 His<sup>+</sup> 转化子,然后用原引物进行菌落 PCR 的验证,鉴定出含有外源基因插入的重组酵母菌,得到优化重组酵母菌 GS115/pGAPH $\alpha$ -MAP30 和未优化重组酵母菌 GS115/pGAPH $\alpha$ -MAP30。

**1.2.6 重组酵母菌表达及筛选鉴定** 将优化和未优化重组酵母菌及空 GS115 分别接种到 YPD 培养基中,28℃,培养 3 d,收集上清液。用上海生工生物公司的醋酸蛋白浓缩试剂盒对上清液中的蛋白进行浓缩。用 SDS-PAGE 对优化和未优化重组酵母菌的上清液蛋白进行分析,并用 GS115 上清液作对照。然后,进行 Western-blot 鉴定,将 SDS-PAGE 的蛋白转移到 PVDF 膜上,用 His-tag 抗体做一抗,用羊抗兔 IgG-HRP 作为二抗,用 DAB 显色液进行显色。

## 2 结果与分析

**2.1 MAP30 优化基因和未优化基因的 PCR 扩增和测序** 以优化 MAP30 基因的质粒为模板,进行 PCR 扩增。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,得到 1 条约 850 bp 左右的特异性 DNA 片段,与预期片段的大小相符(图 1)。

以苦瓜基因组 DNA 为模板,根据设计的特异引物进行 PCR 扩增。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,得到 1 条约 860 bp 左右的特异性 DNA 片段,与预期片段的大小相符(图 2)。

将优化基因和未优化基因的阳性克隆 pMD18-MAP30 重组菌液拿到上海生工进行测序,测序结果通过比对发现,经测序的优化基因序列与设计的优化基因序列同源性达 99%,经测序的未优化基因序列与已公布

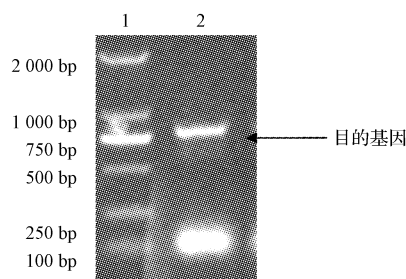


图1 优化 MAP30 基因的扩增

注:1;DNA 分子量标准 DL 2 000;2;优化 MAP30 基因的 PCR 产物。

Fig. 1 The PCR product of the optimizing MAP30 gene

Note:1;DL 2 000 marker;2;PCR product of the optimizing MAP30 gene.

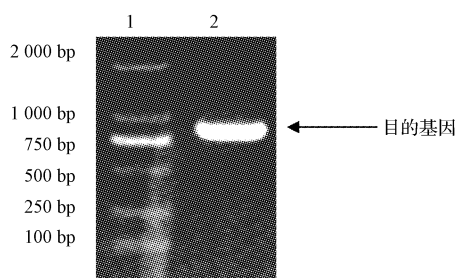


图2 未优化 MAP30 基因的扩增

注:1;DNA 分子量标准;2;未优化 MAP30 基因的 PCR 产物。

Fig. 2 The PCR product of the MAP30 gene

Note:1;DL 2 000 marker;2;PCR product of the MAP30 gene.

发表的 MAP30 序列 (Genbank S79450) 的同源性达 100%。

## 2.2 表达载体的构建

重组 MAP30/pGAPHα 质粒的酶切鉴定。双酶切如图 3 和图 4, 优化和未优化 MAP30 基因与载体 pGAPHα 连接正确。

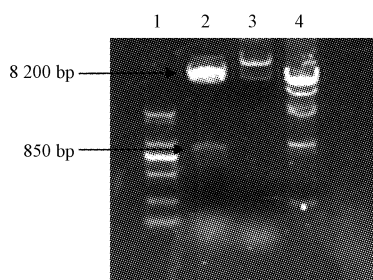


图3 优化 MAP30 基因表达载体构建酶切鉴定

注:1;DNA 分子量标准 DL 2 000;2;*EcoR* I/*Xho* I 酶切产物;3;MAP30/pGAPHα 质粒;4;DNA 分子量标准 DL 15 000。

Fig. 3 Identification of construction of expression vector containing the optimized MAP30 gene

Note:1;DL 2 000 marker;2;Recombinant plasmid digestion with *EcoR* I/*Xho* I;3;Plasmid containing pGAPHα-MAP30;4;DL 15 000 marker.

## 2.3 表达产物鉴定

### 2.3.1 SDS-PAGE 鉴定 提取优化基因和未优化基因

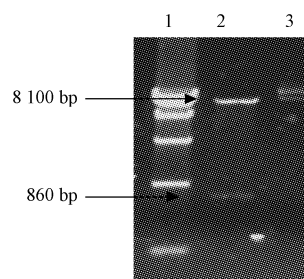


图4 未优化 MAP30 基因表达载体构建酶切鉴定

注:1;DNA 分子量标准 DL 15 000;2;*SnaB* I/*Not* I 酶切产物;3;pGAPHα-MAP30 质粒。

Fig. 4 Identification of construction of expression vector containing the MAP30 gene

Note:1;DL 15 000 marker;2;Recombinant plasmid digestion with *SnaB* I/*Not* I;3;Plasmid containing pGAPHα-MAP30.

重组酵母菌,以及 GS115 上清液蛋白,进行 SDS-PAGE 分析,由图 5 可知,优化基因和未优化基因重组酵母菌的上清液在 32 kDa 附近有目的条带出现,而且优化基因重组酵母菌上清液蛋白的表达量略高于未优化基因重组酵母菌上清液蛋白的表达量,但整体表达量都比较偏低,GS115 上清液蛋白在 32 kDa 附近没有目的条带出现。优化 MAP30 基因和未优化 MAP30 基因在毕赤酵母中成功表达并分泌到细胞外。

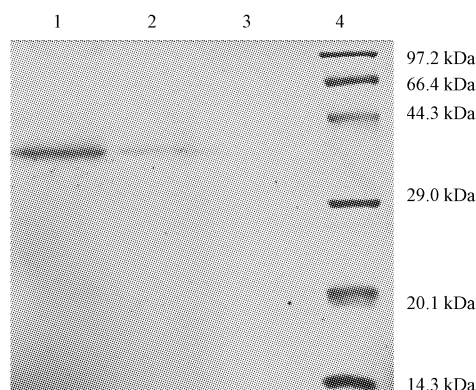


图5 表达合成的 MAP30 的 SDS-PAGE 鉴定

注:1;带有优化 MAP30 基因的 GS115 上清液蛋白;2;带有未优化 MAP30 基因的 GS115 上清液蛋白;3;GS115 上清液蛋白;4;蛋白分子量标准。

Fig. 5 Identity of MAP30 by SDS-PAGE

Note:1;The supernatant protein of GS115 with the optimizing MAP30 gene;2;The supernatant protein of GS115 with the MAP30 gene;3;The supernatant protein of GS115;4;Protein marker.

2.3.2 Western-blot 鉴定 Western-blot 鉴定结果显示,带有优化 MAP30 基因的 GS115 上清液蛋白和带有未优化 MAP30 基因的 GS115 上清液蛋白在 32 kDa 附近能于抗体结合,产生特异性条带,而 GS115 上清液没有产生(图 6)。



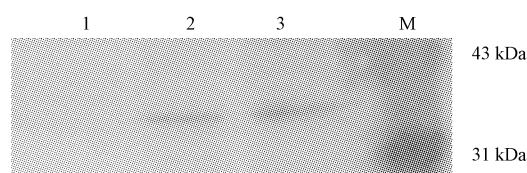


图6 表达产物的 Western-blot 鉴定

注:1:GS115 上清液蛋白;2:带有优化 MAP30 基因的 GS115 上清液蛋白;3:带有未优化 MAP30 基因的 GS115 上清液蛋白;M:预染蛋白分子质量标准。

Fig. 6 Western-blot analysis of expressed product

Note:1:The supernatant protein of GS115;2:The supernatant protein of GS115 with the optimized MAP30 gene;3:The supernatant protein of GS115 with the MAP30 gene;4:prestained protein molecular weight marker.

### 3 讨论

苦瓜 MAP30 具有很多生物活性,可抗病毒、抗肿瘤。对 HIV、疱疹病毒等有明显的抑制作用,也对肿瘤细胞有不同程度的抑制作用<sup>[10]</sup>,在临床应用领域有很大的应用价值。目前,国内外有很多对 MAP30 基因表达的研究。MAP30 基因已经在原核表达系统中获得成功表达<sup>[11]</sup>,同时 MAP30 基因在巴斯德毕赤酵母中也成功表达<sup>[12]</sup>。但无论是原核表达系统还是巴斯德毕赤酵母表达系统都存在一定的不利因素,不能应用到药品食品行业。原核表达系统虽然操作简单,但是表达产物易形成无活性的包涵体,不利于分离纯化,而且原核表达系统不能对蛋白进行翻译后修饰。在巴斯德毕赤酵母表达系统中,因需要甲醇诱导表达或者基因转化过程中引入抗生素基因而不能应用到食品医药行业。该试验采用的新型毕赤酵母表达系统,应用的表达载体是 pGAPH $\alpha$ ,它不需要甲醇诱导,也不需引入抗生素基因进行筛选,可直接应用到药品行业,增加了表达系统的安全性。

在该研究中,SDS-PAGE 和 Western-blot 分析显示,优化 MAP30 基因和未优化 MAP30 基因在这种新型毕赤酵母表达系统中成功表达,并分泌到培养基中。在整个分泌表达过程中不需要甲醇诱导和抗性基因的筛选,与其它 MAP30 表达研究相比增加了安全性,有期望应用到医药领域。

## Codon Optimization and Expression of MAP30 in *Pichia pastoris* Expression System

WANG Fang, WANG Li-yuan, QIAO Yu, HAN Xu, DING Guo-hua

(Key Laboratory of Plant Biology of Heilongjiang Province, College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

**Abstract:** Taking *Momordica charantia* as experimental material, the codon optimized MAP30 gene of *Momordica charantia* in *Pichia pastoris* expression was studied by SDS-PAGE and Western-blot. The results showed that the expression quantity of the optimized MAP30 gene was increased slightly in the neotype *Pichia pastoris* expression system. pGAPH $\alpha$  vector composed of GAP promotor was safer than pPIC9 composed of AOX promotor. It is supposed that the new way should be used in medical field.

**Key words:** *Momordica charantia*; MAP30; *Pichia pastoris*; pGAPH $\alpha$ ; optimized gene

为了使 MAP30 表达量更高,该研究将 MAP30 基因序列进行了优化,经 SDS-PAGE 分析显示,优化 MAP30 基因表达量略高于未优化 MAP30 基因,说明对 MAP30 基因优化可以提高 MAP30 的表达量,但提高的效果不显著,其原因尚未清楚,可能由于优化基因中 AT 含量过高导致转录翻译提前终止<sup>[13]</sup>。对 MAP30 基因的优化有待改进。

### 参考文献

- [1] Lee-Huang S, Huang P L, Nara P L, et al. MAP 30: a new inhibitor of HIV-1 infection and replication [J]. FEBS Lett, 1990, 272: 12-15.
- [2] Lee-Huang S, Huang P L, A S Bourinbaier, et al. Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 and GAP31 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 8818-8822.
- [3] Bourinbaier A S, Lee-Huang S. The activity of plant-derived antiretroviral protein MAP30 and GAP31 against herpes simplex virus *in vitro* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 219(3): 923-929.
- [4] Arazi T, Lee-Huang P, Huang P L, et al. Production of antiviral and antitumor proteins MAP30 and GAP31 in cucurbits using the plant virus vector ZYMV-AGII [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 292(2): 441-448.
- [5] Sun Y, Huang P L, Li J J, et al. MAP30 modulates the expression profile of viral and cellular genes for proliferation and apoptosis in AIDS-related lymphoma cell infected with Kaposi's sarcoma-associated virus [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287(4): 983-994.
- [6] Zhang Y L, Chen S S, Yang K G, et al. Functional expression, purification, and characterization of human Flt3 ligand in the *Pichia pastoris* system [J]. Protein Expression and Purification, 2005, 422: 46-254.
- [7] Gregg J M, Cereghio J L, Shi J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* [J]. Mol Biotechnol, 2000, 16: 23-53.
- [8] 宋庆凤, 暴立娟, 李杰. 新型毕赤酵母分泌表达载体的构建与功能验证 [J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(7): 55-59.
- [9] 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.
- [10] 孟延发, 孟雪琴, 张雪梅, 等. 苦瓜籽核糖体失活蛋白的基本性质研究 [J]. 兰州大学学报, 2000, 36(4): 80-87.
- [11] 张黎黎, 丁倩, 詹金彪. 苦瓜核糖体失活蛋白 MAP30 的原核表达和生物活性研究 [J]. 浙江大学学报, 2010, 39(3): 264-271.
- [12] 朱振洪, 杨威威, 葛立军, 等. MAP30 全长基因的克隆及在巴斯德毕赤酵母中的高效表达研究 [J]. 中国医药生物技术, 2010, 5(2): 110-116.
- [13] Sharp P M, Tuohy T M, Mosurski K R. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes [J]. Nucleic Acids Res, 1986, 14(13): 5125-5143.