

研究报告

人- β 干扰素结构基因的定向点突变

李亦平 沈绿萍 郭文彤 姚曼华 李载平

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

用简单而高效的“缺口双链DNA”的定向点突变方法, 将IFN- β 结构基因编码17位Cys的密码TGT改成编码Ser的AGT。变异株用合成的诱变引物作为探针来筛选, 由Hinf I 酶切电泳图谱分析及DNA顺序的测定得到证实。变异率为 11%。在大肠杆菌中表达的 IFN- $\beta_{1,117}$ 的抗病毒活力明显高于在相同宿主菌中表达的IFN- β 的抗病毒活力。

关键词 蛋白质工程; 定向点突变; 缺口双链DNA IFN- $\beta_{1,117}$

按人的意愿在蛋白质结构基因上进行定向点突变, 从而改变蛋白质的生物和理化性质被称为蛋白质工程。在国外蛋白质工程技术日趋成熟, 用定向点突变的技术研究蛋白质结构与功能的关系, 并且得到了一些生物活性或稳定性高于天然蛋白的人工蛋白。美国 Charles, C.S. 教授^[1]用定向点突变的技术将胰蛋白酶与底物结合位点上的226位Gly改成Ala, 使得胰蛋白酶对Lys残基的专一性比对Arg残基的专一性增加了20倍。Donald Straus教授^[2]用X光晶体衍射及酶动力学的研究, 提出磷酸丙糖异构酶中第165位Glu残基在催化过程中起着传递质子的作用, 而与底物或产物的结合无关。他们将165位Glu残基用定向点突变的方法改成了Asp残基, 结果Kcat降低了1500倍, 而Km变化很少, 从而验证了原假设。蛋白质工程的另一例子是Mark, D.F.教授^[3]用定向点突变的技术将IFN- β 中17位Cys改为Ser后, 不仅使在大肠杆菌中表达的IFN- $\beta_{1,117}$ 的抗病毒比活力比在相同宿主菌中表达的IFN- β 的抗病毒比活力约高10倍,

而且前者的稳定性也大大提高。前者在-70℃贮藏半年活力保持不变, 而后者在同样条件下贮藏一个月活力就明显下降。

本实验室已成功地用大肠杆菌的Tac启动子表达了IFN- β ^[4], 在此基础上, 我们采用了简单而高效的“缺口双链DNA”的定向点突变方法, 将原编码17位Cys的密码TGT改成了编码Ser的密码AGT。变异率达11%。在大肠杆菌中表达的IFN- $\beta_{1,117}$ 的抗病毒活力明显高于在相同宿主菌中表达的IFN- β 的抗病毒活力。

材料和方 法

(一) 菌种、质粒及M13噬菌体

菌种: *E. coli* JM103 (沈慰芳赠给)

质粒: pDR540 (购自P.L. Biochem Inc.), pTS3^[4]

M13噬菌体: M13mp7 (沈慰芳赠给)

本文于1986年5月30日收到。

本实验的诱变引物由钱苏雯同志合成; IFN- $\beta_{1,117}$ 基因的DNA顺序分析由李其梁同志测定; 郑仲承、孔玉英同志对本工作也给予支持和帮助, 在此一并感谢。

(二) 酶制剂及其反应条件

限制性内切酶BamH I、Pst I、Bgl II及T4DNA连接酶由本实验室工具酶组提供。DNA聚合酶(大片段酶), Hinf I购自BRL。DNA多核苷酸激酶购自北京生物物理所。碱性磷酸酯酶购自Berhinger Mannheim Inc.。

酶反应条件均按“Molecular cloning”^[6]所推荐的条件进行。

(三) 化学合成寡核苷酸片段的纯化

寡核苷酸片段在美国Applied Biosystems Inc. 出售的DNA合成仪器上合成。合成好的诱变引物进行20%丙稀酰胺, 8M尿素变性胶电泳。电泳完毕后将胶放在荧光板上, 在紫外光照射下割下所需条带, 加TE缓冲液于37℃浸泡过夜, 离心, 取上清液经破丝去胶, 酒精沉淀, 沉淀溶于TE缓冲液保存备用。

(四) M13噬菌体单链DNA的制备

M13mp7单链DNA的制备按Mark, J.-Zoller^[6]报道的方法制备。

少量制备(用作Dot blot或DNA顺序测定): 用吸管将噬菌斑吸到1.5ml 2YT中, 加15 μ l培养过夜的JM103, 在37℃培养7h, 菌液移入1.5ml离心管中, 取50 μ l上清放置在4℃留种。加200 μ l 2.5M NaCl, 20% PEG6000到剩余的噬菌体上清中, 混匀后室温放置15min, 离心收集沉淀, 噬菌体悬浮于100 μ l TE缓冲液中, 用50 μ l苯酚抽提, 取水层, 酒精沉淀DNA, 单链DNA溶在20 μ l TE中。DNA总量为2—5 μ g。

大量制备(用作模板): 将0.5ml培养过夜的JM103, 0.5ml按少量制备方法制备的噬菌体上清液加到50ml 2YT培养液中, 37℃培养7h, 按上面叙述的方法进行制备。

(五) M13mp7 双链DNA制备

M13mp7 双链DNA制备按Mark, J.-

Zoller^[6]报道的方法并作修改。按大量制备方法将0.5ml过夜JM103, 0.5ml噬菌体上清液加到50ml 2YT培养液中, 37℃培养7h后扩大到500ml 2YT培养液中再培养7—10h, 离心收集菌体, 按碱裂制备质粒DNA方法^[7]制备M13mp7双链DNA。

(六) 缺口双链DNA的构建

0.1pmol (0.5 μ g) 经BamH I酶解的线性M13mp7双链DNA, 与0.5pmol (1.25 μ g) 插入IFN- β 基因的重组M13mp7的单链DNA混合, 总体积50 μ l, 混合液最终盐浓度为150mM KCl, 10mM Tris-HCl pH7.5。混合液在100℃水浴加热5min, 然后在65℃水浴保温2h。

(七) 异源双链DNA的构建

16 μ l上述缺口双链DNA与8pmol诱变的引物(溶于4 μ l水溶液中)混合。混合液在65℃水浴中保温5min, 然后缓慢冷至室温。反应总体积为50 μ l, 反应液最终浓度为: 100mM KCl, 30mM Tris-HCl pH7.5, 15mM MgCl₂, 2mM DTT, 75 μ M ATP, 25 μ M dCTP, dTTP, dGTP。加入2单位DNA聚合酶(大片段酶), 4单位T4 DNA连接酶。混合液在25℃保温1h, 加2 μ l 0.5M EDTA pH8, 加热至65℃ 10min终止反应。然后等体积酚/氯仿(1:1)抽提, 再用100 μ l乙醚抽提3次。加热至65℃除去残留乙醚。形成的异源双链DNA用于转化(见图1)。

(八) Dot blot杂交

分别取0.01 μ g和0.05 μ g单链DNA分别点在硝酸纤维薄膜上, 于真空干燥器80℃, 1h抽干, 在10ml预杂交液(10 \times Dehardt's溶液, 6 \times SSC, 0.2% SDS)37℃杂交1h, 膜在37℃用100ml 6 \times SSC洗3次, 放射自显影4h, 膜再在逐步升高的温度下用100ml 6 \times SSC洗, 放射自显影4—12h。

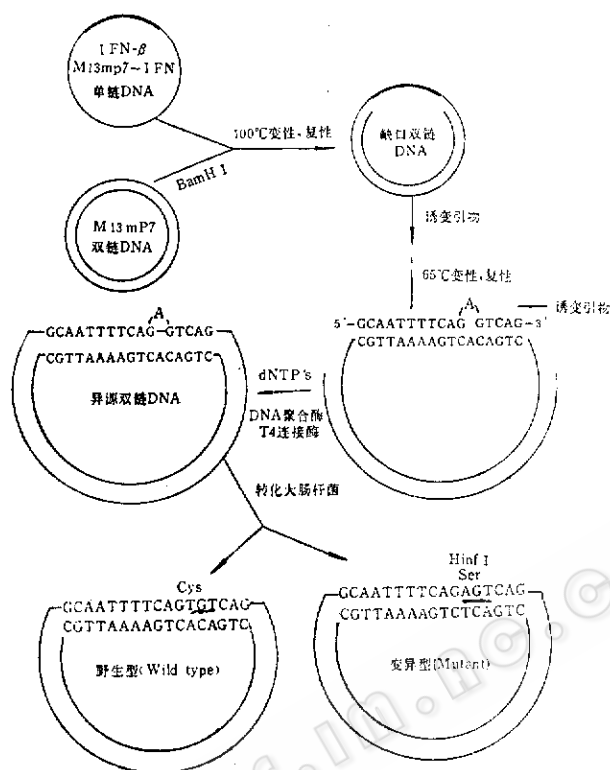


图 1 用缺口双链DNA方法进行人-β干扰素基因定向点突变示意图

Fig.1 The diagram of the site mutagenesis of human IFN-β gene using gapped duplex DNA method

(九) 大肠杆菌转化^[6]、DNA 顺序测定^[8]、E. Coli 破碎液制备^[4] IFN-β 抗病毒活力测定^[4]

均按文献报道的方法进行。

结 果

(一) IFN-β 基因的次级克隆

IFN-β 基因表达质粒 pTS3 是以大肠杆菌 Tac 启动子所控制，通过 BamHI 酶切位点将 Tac 启动子与 IFN-β 基因连接起来^[4]。为了进行定向点突变，我们首先需将 IFN-β 基因克隆到 M13mp7 载体上。先用 BamHI 酶解 pTS3 质粒，分离 IFN-β 基因。0.72kb 长的 DNA 片段除了包含了成熟 IFN-β 基因以外，还带有 0.22kb 长的

3' 端不翻译区。IFN-β 基因通过 BamHI 粘性末端与 M13mp7 载体相连接。IFN-β 基因插入到 M13mp7 双链 DNA 中有两种可能的方向。根据 IFN-β 基因的 3' 端不翻译区有一 Bgl II 酶切位点，距 M13mp7 的多接头 0.65kb 处也有一 Bgl II 酶切位点，如正向插入，Bgl II 酶切可切出 1.17kb 片段，反之则切出 0.85kb 片段，所以利用 Bgl II 酶切电泳图谱，我们筛到能与合成的诱变引物 5'-GCAATTTTC-AGAGTC-AG-3' 互补的正向插入重组子。

(二) 突变株筛选

5' 端磷酸化的诱变引物与缺口双链 DNA 复性，修复成异源双链 DNA，用于转化大肠杆菌 JM103。取经转化得到的噬菌斑 18 个，分别制备其单链 DNA，点

在硝酸纤维薄膜上。并以未经诱变的插入 IFN- β 基因重组 M13mp7 单链 DNA 作为负对照。用合成的 ^{32}P 标记的诱变引物作为探针筛选。由于诱变的引物能与突变型的重组 M13mp7 单链 DNA 完全互补, 而与野生型的重组 M13mp7 单链 DNA 有一个碱基不能互补, 由此造成了它们与 ^{32}P 标记的诱变引物杂交解离温度的区别。所以只要逐步提高洗膜温度就能将突变型与野生型区别开。按 Wallace 规律 $T_m \approx 2 \times (A$

$+T) + 4 \times (G+C)$, 杂交在野生型的重组 M13mp7 单链 DNA 上的诱变引物可能在 46°C 离去。在本实验中, 我们选择了 37°C 、 45°C 、 53°C 等四个温度分别洗膜, 洗到 49°C 时负对照的杂交点仍呈阳性, 当温度提高到 53°C 时, 负对照及 16 个样品均呈阴性, 仅剩下第 11 号和 17 号样品仍呈阳性反应 (见图 2)。我们对这二个可能是突变株的 DNA 作进一步鉴定。

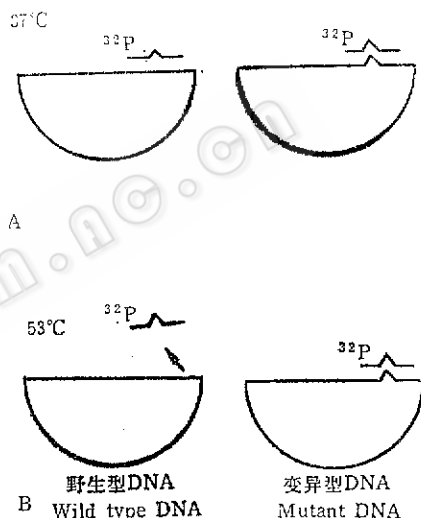
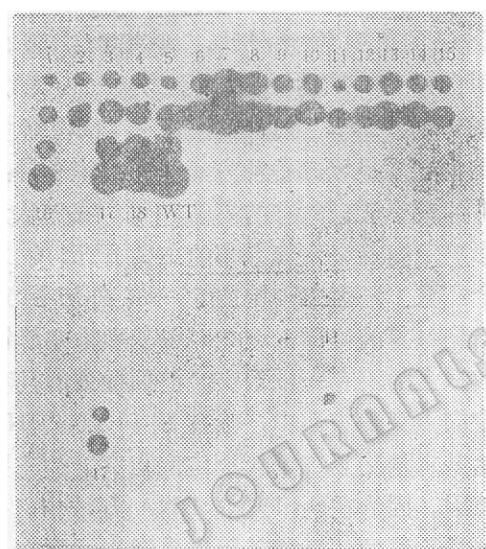


图 2 用 ^{32}P 标记的诱变引物作为探针筛选突变株

Fig.2 Screening for mutants using the ^{32}P label mutagenic oligonucleotide as the hybridization probe

A: 37°C 洗膜不能将错配的和完全互补的杂交区别, 所以野生型和变异型都呈阳性杂交

B: 53°C 洗膜只允许变异株, 仍与其完全互补的寡核苷酸结合, 所以仅 11 号和 17 号仍呈阳性杂交

A: Washing in 37°C does not discriminate between mismatched and non-mismatched hybridization, thus all wild type and mutant DNA showed positive hybridization.

B: Washing in 53°C permits binding only the perfectly matched oligonucleotide to the mutant DNA, thus only number 11, 17 showed positive hybridization

(三) 突变株的鉴定——Hinf I 酶切电泳图谱分析及 DNA 顺序测定

从诱变引物的序列 $5' \text{GCAATTTTC-AG}^{\text{AGT}}_{\text{Ser}} \text{CAG}3'$ 中可见, 由于将原序列中的 TGT 改成了 AGT 所以在原编码 17Cys 基因处多出了 1 个 GAGTC 的 Hinf I

酶切点。由于 M13mp7 酶切图谱中 Hinf I 酶识别位点有 24 个, 所以无法直接用 Hinf I 酶切来鉴定。我们用的方法是先将阳性株中的 BamH I 小片段分离出来, 再作 BamH I 小片段的 Hinf I 酶切分析。用野生株中的 BamH I 小片段作对照。从 7% (19:1) 聚丙烯酰胺胶上可见, IFN- β

的 BamH I 片段经 Hinf I 酶切后共有 336bp、197bp、167bp 三条带,而变异株的 BamH I 片段中由于在 197bp 的第 28 位碱基上新增加了一 Hinf I 酶识别位点,所以经 Hinf I 酶解会使 197bp 带消失,(197-28)的带与原 167bp 的带重叠,仅出现二条带(图版 I-1)。从而证明了由 Dot blot 杂交筛选出来的二株阳性株为变异株。

用 DNA 末端终止法作了 17 号变异株 DNA 顺序的测定,证明原编码 17 位 Cys 的 TGT 改成了编码 Ser 的 AGT(图版 I-2)。

(四) IFN- β _{...17} 基因表达载体的构建及抗病毒活力的测定

Tac 启动子在 *E.coli* JM103 中能表达 IFN- β 。我们将突变株 M13mp7 中的 IFN- β _{...17} 基因经 BamH I 酶切后,将含 IFN- β _{...17} 基因 BamH I 片段重新克隆到 pDR540 中。pDR540 的 BamH I 酶切位点的 5' 是 Tac 启动子,外源基因插入 pDR540 的 BamH I 切点有正向和反向两种,只有正向插入才有可能表达。pDR 540 BamH I 切点的 5' 端约 1.10kb 处有一 Pst I 切点,IFN- β 基因 BamH I 片段靠近 5' 端 0.15kb 处也有一 Pst I 切点。如果是正向插入,Pst I 酶解后可产生一 1.25kb DNA 片段,反之可产生一 1.67kb 的片段。我们用 Pst I 酶切电泳图谱鉴定重组子的插入方向,从而得到所需的正向插入的重组子 pTSm3 (图版 I-4)。

为了比较 IFN- β 基因和 IFN- β _{...17} 基因由 Tac 启动子控制下在 *E.coli* 中表达的活力差别,我们用插入有 IFN- β 基因的 pTS3 质粒和插有 IFN- β _{...17} 基因的 pTSm3 质粒的菌株,在相同的条件下培养菌,破碎细胞,离心除去细胞碎片的细胞破碎液用于抗病毒活力测定。结果表明在大肠杆菌中表达的 IFN- β _{...17} 的抗病毒活力要比在相同宿主菌中表达的 IFN- β

的抗病毒活力高(见图版 I-3)。IFN- β 的抗病毒活力计算见文献[4]。

讨 论

如何提高定向点突变的变异率是进行定向点突变科学家所关注的问题,近二年来不少实验室推出各种定向点突变技术:有用双循环单引物法^[9];有用增长体外合成时间(长于 18h),继而用碱性蔗糖梯度离心来富集封闭双链环状 DNA 的单引物法^[10],或用 T4 基因 32 蛋白结合单链模板的单引物法^[11];有用双引物法^[6],最近还发展了缺口双链 DNA 法^[11]。各种方法的变异率各异:有的低于 0.1%,有的高达 50%。我们认为影响定向点突变变异率的主要原因有二个:(1) 宿主细胞内 5'—3' 外切酶对错配碱基的修饰;(2) 诱变引物在单链模板上的不专一性杂交。前面提到的几种定向点突变方法中,唯有缺口双链 DNA 法基本消除了二个影响定向点突变的主要原因。因为在缺口双链 DNA 方法中,仅有被改造的一小段基因以单链形式存在,所以大大减少了诱变引物与单链模板不专一性杂交的可能性。另外,重组噬菌体的整个载体部分已被其相应的负链所互补,体外合成在诱变引物的 3' 端及负链的 3' 端同时进行,缺口补齐非常容易。缺口补齐后在 T4DNA 连接酶的作用下形成封闭环状双链 DNA,用以诱变的错配碱基从而免于 5'—3' 外切酶的修饰。缺口双链 DNA 法的另一优点是方法简单,又不需特殊的试剂。根据缺口双链 DNA 方法的简单而高效的优点,我们采用了缺口双链 DNA 方法进行 IFN- β 基因的定向点突变。变异率为 11%。我们的实验结果也说明缺口双链 DNA 法是简单而高效的。

IFN- β 中共有三个Cys, 分别位于17、31、141位上。天然的IFN- β 中31位、141位上的Cys形成S-S键, 17位不参与成键。而由基因工程的方法从大肠杆菌生产的IFN- β 的17、31、141位都可随机地在分子内及分子间参与成键, 形成许多无活性的分子内错配的单体及无活性的二聚体及多聚体。将17位Cys残基改成Ser残基后就消除了这些影响由大肠杆菌系统中表达出来的IFN- β 比活力的因素。我们的实验结果表明大肠杆菌中表达的IFN- $\beta_{1..}$ 的活力比在相同宿主菌中表达的IFN- β 高2—4倍, 这可能因为前者的表达产物中消除了分子内二硫键错配所致。我们估计后者在分离纯化过程中会不断形成二聚体及多聚体, 所以在比较两者的纯制品的比活力时差别

会更大。前者的稳定性也会比后者强得多。目前, 本实验室正在进行这方面的实验。

H. Michael Shepard 等人^[12]曾报道分离到1株141位的Cys突变为Tyr的IFN- $\beta_{1,7,141}$ 变异株。经测定, IFN- $\beta_{1,7,141}$ 变异株丧失了IFN- β 抗病毒活力。原因为IFN- β 突变成IFN- $\beta_{1,7,141}$ 位后, IFN- $\beta_{1,7,141}$ 不能形成维持IFN- β 活性结构形式所必需的二硫键。D.F. Mark的工作除了上述的实际应用价值外还说明了17位的Cys不是IFN- β 生物活性所必需的。 β 干扰素的结构与功能的关系的研究具有十分重要的实际应用价值和理论意义。我们打算在此项工作的基础上, 用定向点突变技术来研究IFN- β 的结构与功能的关系。

参 考 文 献

- [1] Charles, C.S. et al., *Science*, 228:291—297, 1985.
- [2] Donald S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:2272—2276, 1985.
- [3] Mark, D.F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:5662—5666, 1984.
- [4] 郭文彤等: 生物工程学报, 2(3):25—31, 1986.
- [5] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor press, 1982.
- [6] Mark, J. and Smith, M., *DNA*, 3:479—488, 1984.
- [7] Birnboim, H.C. and Doly, J., *Nucleic Acids Res.*, 7:1513, 1979.
- [8] Sanger, F. et al., *J. Mol. Biol.*, 143:161—178, 1980.
- [9] Gary, F.T. et al., *Nature*, 296:537—540, 1982.
- [10] Zoller, M.J. and Smith, M., *Nucleic Acids Res.*, 10:6487—6500, 1982.
- [11] Wilfried, K. et al., *Nucleic Acids Res.*, 12:9441—9456, 1984.
- [12] Shepard, H.M. et al., *Nature*, 294:563—565, 1981.

THE SITE-SPECIFIC MUTAGENESIS OF HUMAN FIBROBLAST INTERFERON GENE

Li Yiping Shen Luping Guo Wentong Yao Manhua Li Zaiping
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)

Using a simple and high efficient gapped duplex DNA approach for site-specific mutagenesis, we have made a point mutation in the human fibroblast interferon gene to change the codon TGT of cysteine-17 into a codon AGT for serine. Mutants had been screened by hybridization using the synthetic mutagenic oligonucleotide primer as the probe. The right mutant selected had been further characterized by mapping and DNA sequencing. The efficiency of mutagenesis was about 11%. The antiviral activity of IFN- β_{ser17} expressed in *E. coli* was significantly higher than that of the original IFN- β expressed in the same host strain.

Key words

Protein engineering; site-specific mutagenesis; gapped duplex DNA; IFN- β_{ser17}

图 版 说 明

1. IFN- β 和IFN- β_{ser17} 基因BamH I片段的Hinf I限制性酶切电泳图谱

Hinf I restriction pattern of BamH I fragments of IFN- β and IFN- β_{ser17} genes

(1) IFN- β BamH I + fragment + Hinf I

(2) IFN- $\beta_{ser17-11}$ BamH I fragment + Hinf I

(3) IFN- $\beta_{ser17-17}$ BamH I fragment + Hinf I

2. IFN- β_{ser17} 基因变异区的DNA顺序

The DNA sequence of the IFN- β_{ser17} gene in the region of mutation

3. 大肠杆菌表达的IFN- β_{ser17} 与IFN- β 的抗病毒活力测定

Assay of antiviral activity of IFN- β_{ser17} and IFN- β expressed in *E. coli*

(1) 病毒攻击的细胞 Virus challenged cell; (2) 正常细胞 (256u/ml) Normal cell; (3) 标准人- α 干扰素 Standard human-IFN (4) IFN- β_{ser17} ; (5) IFN- β

4. 质粒 pTSM3, pTSM4, pDR540 的限制性酶切电泳图谱

Restriction pattern of plasmids pTSM3, pTSM4 and pDR540 respectively

(1) pTSM3 (2) pTSM4 (3) pDR540

李亦平等：人- β 干扰素结构基因的定向点突变

Li Yiping et al.: The site-specific mutagenesis of human fibroblast interferon gene

图版 I

Plate I

