

可诱导高拷贝的正交琥珀抑制性 tRNA 筛选质粒的构建

姚东宁, 徐晓威, 于涣冰, 李尤, 李星, 高向东, 田泓*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要 为筛选获得对大肠杆菌氨酰合成酶具有高度正交性的琥珀抑制 tRNA, 建立了一种基于可诱导高拷贝质粒的筛选系统。利用乳糖操纵子对 oriL 复制子进行调控, 有 IPTG 存在时使其携带的琥珀抑制性 tRNA 大量转录。正交性不高的琥珀抑制性 tRNA 大量转录时导致宿主菌死亡, 只有携带高正交性的琥珀抑制性 tRNA 的克隆可以存活, 从而达到筛选目的。利用这一筛选质粒, 构建了琥珀抑制性 tRNA 突变文库, 并进行了筛选, 获得了与大肠杆菌氨酰 tRNA 合成酶具有高度正交性的突变体, 并利用含琥珀抑制突变的半乳糖苷酶突变体进行了验证, 证实利用可诱导高拷贝的筛选质粒可筛选出高正交性的琥珀抑制性 tRNA 突变体。

关键词 可诱导高拷贝质粒; 琥珀抑制性 tRNA; 遗传密码扩充技术

中图分类号 Q933 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2013)02-0174-05

Screening system for amber suppressor tRNA based on inducible high-copy-number plasmid

YAO Dongning, XU Xiaowei, YU Huanbing, LI You, LI Xing, GAO Xiangdong, TIAN Hong*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract To obtain amber suppressor tRNA with high orthogonality, a novel inducible high-copy-number screening plasmid was constructed. The oriL were placed under the control of Lac promoter so that IPTG could induce the plasmid replication with a high copy number. When the plasmid contained the amber suppressor tRNA with poor orthogonality, a large numbers. When the plasmid contained the amber suppressor tRNA with poor orthogonality, a large number of tRNA transcripts led to host cell death. Only the host containing the suppressor tRNA with high orthogonality could survive. With the screening system, the mutant library of amber suppressor tRNA was screened, and amber suppressor tRNA mutant with high orthogonality was obtained.

Key words inducible high-copy-number plasmid; amber suppressor tRNA; expanding genetic code

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 31200694); the Fundamental Research Funds for the Central Universities(No. JKQ2011043); and the National Fund for Fostering Talents of Basic Science(No. J0630858)

自然界存在的 64 种遗传密码分别对应着 20 种天然氨基酸和 3 个终止密码。天然蛋白质中存在的 20 种氨基酸之外的氨基酸衍生物大都是通过翻译后修饰形成的, 只有 2 种特殊氨基酸——硒代半胱氨酸和吡咯赖氨酸是在蛋白质的翻译过程中利用终止密码子插入到蛋白质中的^[1-2], 这一过程被称为天然遗传密码的扩充^[3]。根据天然遗传密码

扩充的原理, 通过对蛋白质生物合成关键元件——氨酰 tRNA 合成酶、tRNA 和 mRNA 进行改造, 使更多种类的特殊氨基酸在翻译过程中被插入到蛋白质中去, 即遗传密码扩充技术^[4-6]。

遗传密码扩充技术包括 3 个关键组成部分^[7]: 正交性氨酰 tRNA 合成酶、正交性 tRNA 及含特殊密码子的 mRNA。正交性是指抑制性

* 收稿日期 2012-09-10 *通信作者 Tel: 025-83271240 E-mail: tinahew@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 31200694); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(No. JKQ2011043); 国家基础科学人才培养基金资助项目(No. J0630858)

tRNA 能够被相应的正交性氨酰 tRNA 合成酶所识别,而不会被宿主细胞内源性氨酰 tRNA 合成酶所识别。只有当抑制性 tRNA 不被大肠杆菌内源性酪氨酸 tRNA 合成酶识别,才能保证在 UAG 密码子处引入正确的非天然氨基酸。而抑制性 tRNA 与 TyrRS 突变体的亲和力直接关系到系统对非天然氨基酸的引入效率。通常获得正交性 tRNA 的方法是在大肠杆菌中引入另一物种的 tRNA/合成酶对,来源不同种属的氨酰 tRNA 合成酶和 tRNA 不能相互识别,从而产生正交性。但这种外源性 tRNA 和大肠杆菌内源性氨酰 tRNA 合成酶的正交性不是十分严谨,会有少量外源性 tRNA 被大肠杆菌中的酪氨酸 tRNA 合成酶加载上天然酪氨酸,因而产生非天然氨基酸的引入错误。

前期研究发现,外源性琥珀抑制性 tRNA 会对宿主细胞产生毒性,且这种毒性与 tRNA 的正交性密切相关^[8]。导致这种毒性的原因可能是抑制性 tRNA 与延伸终止因子竞争,导致蛋白质合成不能正常终止,产生无活性的加长蛋白,最终影响了宿主细胞的生长。由于这种毒性取决于抑制性 tRNA 与延伸终止因子同终止密码子的竞争性结合,因此,抑制性 tRNA 的拷贝数是影响其对宿主毒性的关键。据此,本研究设计了一种可通过 IPTG 诱导增加拷贝数的质粒,通过 IPTG 诱导产生高拷贝质粒,转录产生大量琥珀抑制性 tRNA,利用琥珀抑制性 tRNA 的自身毒性消除与宿主细胞正交性不高的 tRNA 突变体。

1 材 料

1.1 菌种和质粒

pMD18-T 载体(大连宝生物工程有限公司);大肠杆菌 CSH108 购自耶鲁大学菌种保藏中心。pET28a 载体及大肠杆菌 DH5 α 、DH10B 为本实验室保藏。

1.2 试 剂

DNA 限制性内切酶 *Bam*H I、*Sac* I、*Xba* I 和 *Hind* III、LA *Taq* DNA 多聚酶、PrimeSTAR® HS DNA 多聚酶、T4 DNA 连接酶(大连宝生物工程有限公司);质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根生化科技有限公司)。其余试剂均为国产市售分析纯。

1.3 仪 器

MyCycler PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);稳流稳压电泳仪(北京六一仪器厂)。

2 方 法

2.1 低拷贝控制元件的基因设计与合成

采用全基因合成法合成 F 因子复制起始点基因^[9],其序列包括 DNA 解旋酶 RepE 基因(GeneID:1263547)和 oriS 基因,基因序列两端添加限制性内切酶 *Eco* 57 和 *Bgl* I 的酶切位点。所合成的基因以 TA 克隆方式连接至 pMD18T 载体,筛选阳性克隆交南京金斯瑞生物科技有限公司测序。选取测序正确的克隆扩增后提取质粒,命名为 pT-F 备用。

2.2 高拷贝控制元件的基因设计与合成

选择噬菌体 P1 裂解复制起始点 oriL 为高拷贝复制起始点,将 oriL 的调控基因 RepL (GeneID: 2777395)置于 lac 启动子调控下。采用全基因合成法合成该序列^[9],并在基因序列两端添加限制性内切酶 *Xba* I 和 *Bgl* II 的酶切位点。所合成的基因以 TA 克隆方式连接至 pMD18T 载体,筛选阳性克隆交南京金斯瑞生物科技有限公司测序。选取测序正确的克隆扩增后提取质粒,命名为 pT-P1 备用。

2.3 可诱导高拷贝质粒的构建

以 pET28a 质粒为骨架,构建可诱导高拷贝质粒。将 pT-F 和 pET28a 质粒分别用 *Eco* 57 和 *Bgl* I 进行双酶切,电泳分离后回收 F 因子复制起始点基因片段和 pET28a 骨架片段,T4 DNA 连接酶 16 ℃过夜连接。连接子转化入大肠杆菌 DH5 α ,涂布于含卡那霉素的 LB 平板,筛选阳性克隆,进行双酶切验证,获得 pET-F 质粒。

将 pT-P1 质粒和 pET-F 分别用 *Xba* I 和 *Bgl* II 进行双酶切,电泳分离后回收高拷贝复制子基因片段和 pET-F 的骨架片段,T4 DNA 连接酶 16 ℃过夜连接。连接子转化入大肠杆菌 DH5 α ,涂布于含卡那霉素的 LB 平板,筛选阳性克隆,进行双酶切验证,获得可诱导高拷贝质粒 pET-FP1。

2.4 琥珀抑制性 tRNA 突变文库的设计与构建

根据 tRNA DB 数据库中的信息,以詹氏甲烷球菌酪氨酸 tRNA^{Tyr} 为模板,以大肠杆菌脯氨酸 tRNA 启动子 proK 控制转录,采用全基因合成法

构建琥珀抑制 tRNA 突变体。根据文献报道,选择 11 个非保守核苷酸(C16, C17, U17a, U20, C32, G37, A38, U45, U47, A59 和 U60)进行随机突变,采用 Overlap PCR 的方法构建琥珀抑制 tRNA^{Tyr} 突变文库。用 *Dra* III 和 *Hind* III 双酶切 PCR 产物,插入用 *Dra* III 和 *Hind* III 双酶切的质粒 pET-FP1 中,获得 pFP1-tRNAlib。pFP1-tRNAlib 转化入大肠杆菌 DH5 α 后接种于 LB 液体培养基扩增培养,提取质粒再次转化至大肠杆菌 DH5 α 中,涂于含氨苄抗性的 LB 平板上,随机选取 5 个阳性克隆进行测序。

2.5 琥珀抑制性 tRNA 突变文库的筛选

配制两块 LB 琼脂培养基,一组含 30 μ g/mL 卡那霉素,一组含 30 μ g/mL 卡那霉素和 1 mmol/L IPTG。将重组质粒 pFP1-tRNAlib 转化入大肠杆菌 DH5 α ,分别涂布于两组 LB 平板上,每板 200 μ L,37 °C 培养 16 h 后取出平板,进行计数。

2.6 琥珀抑制性 tRNA 突变体正交性的验证

从含卡那霉素和 IPTG 的 LB 平板上分别挑取 3 个单克隆,扩增培养后,提取质粒,将质粒中 tRNA 基因经酶切连接至 pACYC184 载体中,再重新转化入大肠杆菌 CSH108 中,转化子 37 °C 孵育 2 h,取 3 μ L 接种于含 X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上,37 °C 培养 16 h。

3 结果与讨论

3.1 拷贝控制元件的设计与合成

低拷贝控制元件包括来源于大肠杆菌 F 因子的严谨型控制的复制子 oriS 和 DNA 解旋酶 RepE 基因(Gene ID:1263547),基因序列两端添加限制性内切酶 Eco 57 和 Bgl I 的酶切位点,基因结构如图 1A 所示。oriS 属于严谨型复制子,在无诱导剂存在情况下,oriS 可控制下每个宿主细胞内质粒拷贝数为 1~5 个。

高拷贝控制元件包括噬菌体 P1 裂解复制起始点 oriL,为使拷贝数可受 IPTG 诱导,将 oriL 的调控基因 RepL(GeneID:2777395)置于 lac 启动子调控下。其基因结构如图 1B 所示。由于 P1 裂解复制起始点 oriL 的复制活性受到调控基因 RepL 的控制,而 RepL 又受到 lac 启动子的调控。无诱导剂存在情况下,没有 RepL 的表达,质粒拷贝数受 oriS 控制,处于低拷贝状态。当诱导剂 IPTG 存在时,

RepL 大量表达,从而使质粒的复制受 oriL 的调控,拷贝数增加至 100~300 个。

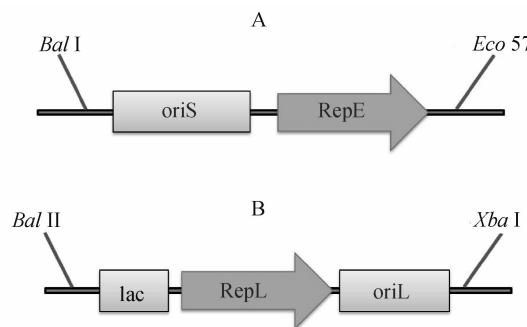


Figure 1 Construction of copy number control element

A: Low copy number control element containing oriS and RepE derived from the F factor of *Escherichia coli*; B: High copy number control element containing oriL and the RepL under the control of lac promoter

3.2 可诱导高拷贝质粒的构建

以 pET28a 质粒为骨架,构建可诱导高拷贝质粒,构建流程如图 2 所示。

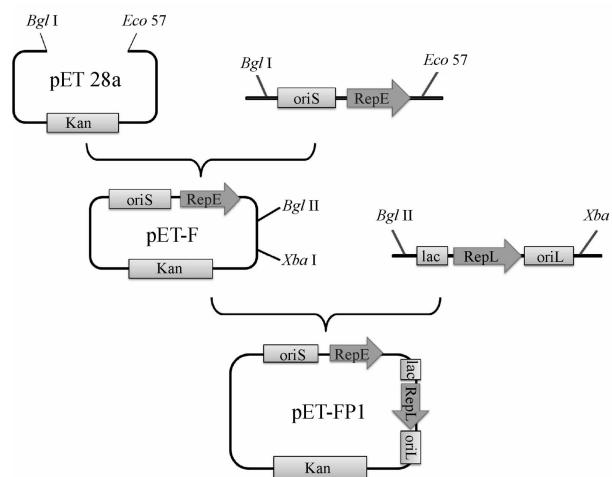


Figure 2 Construction of the inducible copy number plasmid pET-FP1

pET-F 质粒酶切检测结果如图 3A 所示。pET-F 质粒大小约为 4.7 kb,用 Eco 57 和 Bgl I 双酶切 pET-F 后,可以看见大小约为 3.7 kb 的载体片段和 1 kb 的基因片段,证实 F 因子复制起始点基因已正确插入载体中。pET-FP1 质粒酶切检测结果如图 3B 所示,pET-FP1 质粒大小约为 5.8 kb,用 Xba I 和 Bgl II 双酶切后可见大小约为 4.7 kb 的载体片段和 1.1 kb 的基因片段,证实所设计的目的基因已正确插入载体中。

3.3 琥珀抑制性 tRNA 突变文库的设计与构建

根据文献报道及 tRNA 序列比对分析,以詹氏甲烷球菌酪氨酸 tRNA^{Tyr} 为模板,选择 11 个非保守

碱基(C16, C17, U17a, U20, C32, G37, A38, U45, U47, A59 和 U60)为突变位点, 构建琥珀抑制性 tRNA 突变文库。

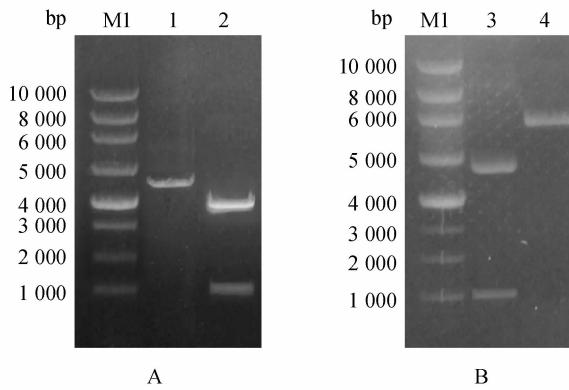


Figure 3 Restriction endonuclease analyze of pET-F vector (A) and pET-FP1 vector(B)

M1:DNA marker; 1:pET-F vector; 2:pET-F vector digested by Eco57 and Bgl I; 3:pET-FP1 vector digested by Xba I and Bgl II; 4:pET-FP1 vector

根据所选择的随机突变位点设计简并引物,采用 overlap PCR 的方法构建琥珀抑制 tRNA^{Tyr}突变文库, 并连接至可诱导高拷贝质粒 pET-FP1 中。*Dra* III 和 *Hind* III 双酶切检测结果如图 4 所示, pFP1-tRNA 质粒大小约为 6 kb, 用 *Dra* III 和 *Hind* III 双酶切后有两条带, 大小约为 5.5 kb 的载体片段和 450 bp 的 tRNA 片段, 证实 tRNA 片段已正确连接至载体上。

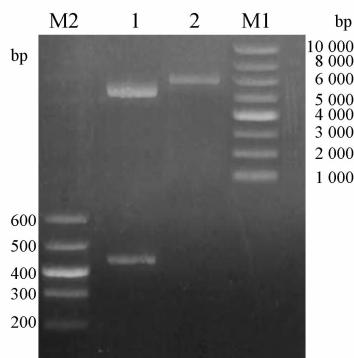


Figure 4 Restriction endonuclease analyze of pFP1-tRNA
1:FP1-tRNA vector digested by *Dra* III and *Hind* III; 2:pFP1-tRNA vector; M1 and M2:DNA marker

pFP1-tRNAlib 扩增后测序结果见表 1。测序结果显示, 5 个阳性克隆在预期突变位点的突变都不相同, 较好的保留了突变的随机性, 证实 tRNA 突变文库构建成功。

Table 1 Sequence convergence of suppressor tRNA mutants

Site	16	17	17a	20	32	37	38	45	47	59	60
Wt	C	C	T	T	C	G	A	T	T	A	T
1	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	T
2	A	G	G	A	C	T	T	G	A	A	T
3	C	T	T	G	A	C	C	T	G	A	C
4	T	G	C	A	T	T	C	G	G	C	A
5	T	A	T	C	G	G	G	A	T	T	G

3.4 琥珀抑制性 tRNA 突变文库的筛选

琥珀抑制性 tRNA 突变文库的筛选结果显示, 添加了 1 mmol/L IPTG 的培养皿内生长的菌落较少, 而不添加 IPTG 的培养皿内菌落生长密集, 表明在 IPTG 的诱导下, 重组质粒 pFP1-tRNA 的拷贝数增加, 从而使 tRNA 的丰度大大增加, 导致宿主菌生长受到抑制。

琥珀抑制性 tRNA 对宿主菌生长抑制的现象已有文献报道。Liebman 等^[10] 报道含有琥珀抑制性 tRNA 的酵母中在天然培养基中生长缓慢, 去除琥珀抑制性 tRNA 后又恢复正常生长。更重要的是, 琥珀抑制性 tRNA 对宿主菌的生长抑制作用具有种属特异性。Pettersson^[11] 证明了铜绿假单胞菌色氨酸琥珀抑制性 tRNA(tRNA^{Trp})对铜绿假单胞菌有毒性但对大肠杆菌没有, 这主要是因为铜绿假单胞菌酪氨酸琥珀抑制性 tRNA(tRNA^{Trp})不会被大肠杆菌的氨酰-tRNA 合成酶 aaRS 氨酰化。本课题组在前期研究中也发现, 含有正交性较差的琥珀抑制性 tRNA 的大肠杆菌生成缓慢, 当这种琥珀抑制性 tRNA 负载于高拷贝质粒中时, 大肠杆菌生长则完全被抑制。

在可诱导高拷贝质粒的筛选系统中, 正交性差的 tRNA 突变体可以被大肠杆菌内源性氨酰 tRNA 合成酶识别, 使该琥珀抑制性 tRNA 突变体携带上某种氨基酸, 在合成菌体蛋白的过程中, 将这种氨基酸插入到琥珀终止密码子的位置, 从而使得菌体蛋白的合成不能正常终止, 产生无用的加长蛋白, 从而导致宿主细胞死亡; 只有那些不能被大肠杆菌内源性氨酰 tRNA 合成酶所识别的 tRNA 突变体, 即正交性好的 tRNA, 不会对宿主菌产生毒性, 使得宿主菌可以存活下来, 在平板上形成菌落。因此, 在含 IPTG 的平板上形成菌落的宿主菌所含 tRNA 突变体均为高正交性 tRNA 突变体。

3.5 琥珀抑制性 tRNA 突变体正交性的验证

大肠杆菌 CSH108 基因组内含有一个突变的

半乳糖苷酶基因,该基因第8位发生琥珀突变,因此该菌株可以用来评价琥珀抑制性tRNA突变体的正交性^[12]。如果宿主细胞内存在可以被大肠杆菌内源性氨酰tRNA合成酶氨酰化的琥珀抑制性tRNA,即存在正交性不高的tRNA突变体,则半乳糖苷酶基因内的琥珀突变被抑制,表达出完整的半乳糖苷酶,在含有X-gal和IPTG的平板上形成蓝色菌落。而高正交性的tRNA突变体,由于不能被氨酰tRNA合成酶氨酰化,因而不能产生琥珀抑制作用,在含有X-gal和IPTG的平板上最终形成白色菌落。

筛选前后琥珀抑制性tRNA突变体转化入大肠杆菌CSH108后,在含有X-gal和IPTG的LB琼脂平板上形成的不同颜色的菌落(图5)。经IPTG筛选后的tRNA突变体,转化入CSH108菌株后,均形成白色菌落,证明该tRNA与大肠杆菌内源性氨酰合成酶正交性较高。而未经筛选的tRNA突变体,形成了深浅不同的蓝色菌落,表明这些tRNA突变体可以不同程度的被大肠杆菌内源性氨酰合成酶氨酰化,表达了全长的β-半乳糖苷酶,从而形成蓝色菌落。

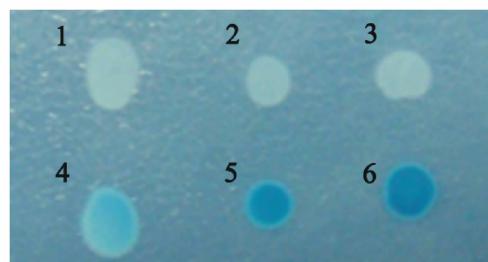


Figure 5 Blue-White CSH108 bacterial colony containing selected (1-3) or non-selected (4-6) amber suppressor tRNA on LB plate containing X-gal and IPTG

4 结论

本研究建立了一种基于可诱导高拷贝质粒的筛选系统,该系统含有两种复制起始控制元件,其中高拷贝复制起始元件的调控基因RepL收到乳糖操纵子lac的调控,从而实现用IPTG诱导质粒拷贝数增加。高拷贝质粒大量转录琥珀抑制性tRNA时,只有携带高正交性的琥珀抑制

性tRNA的克隆可以存活下来。利用这一筛选质粒,本研究构建了琥珀抑制性tRNA突变文库并进行了筛选,利用含琥珀抑制突变的半乳糖苷酶突变体进行了验证,证实筛选获得的琥珀抑制性tRNA突变体均与大肠杆菌氨酰tRNA合成酶具有高度正交性。

本研究所建立的方法利用了琥珀抑制性tRNA自身对宿主菌的抑制作用,不需要额外的毒性基因作为筛选标记,筛选方法简便直接,并可扩展应用于不同种属来源的琥珀抑制性tRNA的筛选。

参 考 文 献

- [1] Bock A, Forchhammer K, Heider J, et al. Selenocysteine: the 21st amino acid [J]. *Mol Microbiol*, 1991, **5**(3): 515-520.
- [2] Srinivasan G, James CM, Krzycki JA. Pyrrolysine encoded by UAG in archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA [J]. *Science*, 2002, **296**(5 572): 1 459-1 462.
- [3] Wang L, Schultz PG. Expanding the genetic code [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2005, **44**(1): 34-66.
- [4] Hamano-Takaku F, Iwama T, Saito-Yano S, et al. A mutant *Escherichia coli* tyrosyl-tRNA synthetase utilizes the unnatural amino acid azatyrosine more efficiently than tyrosine [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(51): 40 324-40 328.
- [5] Wang L, Brock A, Herberich B, et al. Expanding the genetic code of *Escherichia coli* [J]. *Science*, 2001, **292**(5 516): 498-500.
- [6] Chin JW, Cropp TA, Anderson JC, et al. An expanded eukaryotic genetic code [J]. *Science*, 2003, **301**(5 635): 964-967.
- [7] Chen PR, Groff D, Guo J, et al. A facile system for encoding unnatural amino acids in mammalian cells [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, **48**(22): 4 052-4 055.
- [8] Song X, Sun J, Tian Y, et al. Gold nanoparticles combined with highly expressed amber suppressor tRNA: a future antibacterial agent [J]. *Irn J Med Hypotheses Ideas*, 2010, **4**(1): 6-10.
- [9] Xiong AS, Yao QH, Peng RH, et al. PCR-based accurate synthesis of long DNA sequences [J]. *Nat Protoc*, 2006, **1**(2): 791-797.
- [10] Lieberman SW, Sherman F. Inhibition of growth by amber suppressors in yeast [J]. *Genetics*, 1976, **82**(2): 233-249.
- [11] Pettersson BMF. *tRNA Gene Structures in Bacteria* [D]. Uppsala: Uppsala University, 2009: 39-41.
- [12] Hughes RA, Ellington AD. Rational design of an orthogonal tryptophanyl nonsense suppressor tRNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38**(19): 6 813-6 830.