密码子优化的MG53蛋白的编码核苷酸序列、其重组体及其应用

技术领域

本发明属于基因工程领域/生物医药技术领域。具体而言，本发明涉及密码子优化的MG53蛋白的编码核苷酸序列、含有该序列的重组载体以及宿主细胞。本发明还涉及通过MG53蛋白基因密码子的优化提高蛋白表达量的方法及其在保护心脏、治疗细胞死亡导致的心脏疾病方面上的用途。

背景技术

MG53是骨骼肌特异性蛋白mitsugumin53，简称MG53；或TRIM72。mitsugumin53（MG53），是一种肌肉特异性tripartite motif family (TRIM)家族蛋白（该家族蛋白常含三个特定模序结构，分别称为RING，B-BOX，和卷曲结构域。它们共同作用结合在细胞不再需要的蛋白质上，将这些蛋白带上泛素标记以便降解），也是一种细胞膜修复机制的重要组成部分。

在医学应用方面，MG53治疗由细胞凋亡引起的心脏疾病的功效已被接受并成为业内前沿领域的公知。MG53能够对心脏产生保护作用，也就是说可以通过增加MG53的含量保护心脏损伤。但目前通过已知的人源野生型MG53蛋白表达基因，通过体外真核细胞蛋白表达体系无法获得更高的蛋白产量，进一步降低生产成本，成为该蛋白研究和应用于生物医药领域的瓶颈。

发明内容

本发明提供一种人源MG53基因的密码子优化核苷酸序列，SEQ ID NO :2，即人源野生型MG53的同义突变核苷酸序列（MG53mut），编码相同人源MG53蛋白。人源野生型MG53 SEQ ID NO 1。

MG53蛋白能够对心脏产生保护作用，也就是说可以通过增加MG53的蛋白含量保护心脏损伤。

但通过大量实验研究表明，通过体外人工表达人源野生型MG53的蛋白，产量一直无法

提高，无法降低生产成本，阻碍这种体外蛋白表达系统进一步应用于生物医药领域和产业化进程。

MG53 是 TRIM 家族（The superfamily of tripartite motif-containing proteins）中新发现的一个蛋白质，与其他家族成员不同，它只在骨骼肌和心肌表达。初期的研究表明，在骨骼肌和心肌中 MG53 能够作为一种结构蛋白促进细胞膜损伤的修复，同时也能够调节细胞内小泡的转运和骨骼肌细胞再生；另外在心肌中，MG53 还通过介导 Caveolin-3 与 PI3K 的结合，激活再灌注损伤救援通路（reperfusion injury salvagekinase pathway, RISK pathway），进而在心脏缺血预处理中发挥重要保护功能。本申请发明人通过大量实验摸索后，提出一种密码子优化的 MG53 基因核苷酸序列，SEQ ID NO :2，将其使用真核细胞表达载体体外表达，同等条件下可以获得比野生型 MG53 高约 30%，成为该核苷酸序列优于人源野生型 MG53 基因核苷酸序列的重要特征。

本发明还提供了一种密码子优化的 MG53 核苷酸序列体外蛋白表达方法，该方法在于，根据全基因合成方式合成 MG53mut 基因，通过分子克隆方式连接于真核表达载体上，转染入真核细胞中通过适当的培养方法来表达 MG53 蛋白。

在本发明的具体实施例中，所述的该同义突变 MG53（MG53mut）体外表达方法的过程为：

（1）全基因合成 SEQ ID NO :2 所提供的核苷酸序列 MG53mut；作为模板，使用 DNA 聚合酶，用特异性突变引物进行 PCR 反应扩增，反应产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定；

（2）通过分子克隆方式，连入通过转化大肠杆菌感受态细胞 TOP10，融解感受态 TOP10，加入处理后的 PCR 产物，冰上孵育，加入 LB，孵育，涂氨苄抗性 LB 平板，培养，挑取平板上的单菌落，DNA 测序检测得突变结果为阳性，得到 MG53mut 表达质粒；

（5）上述 MG53mut 质粒通过利用 ScreenFectA 转染细胞方式获得 MG53 蛋白。

本发明还提供了上述的 MG53mut 在制备治疗心肌细胞损伤相关疾病的药物中的用途。

上述的 MG53 突变体的用途，其中所述的治疗心肌细胞损伤的药物还包括治疗/预防心脏缺血、再灌注损伤所致疾病的药物；上述疾病进一步还包括心肌细胞缺损、心肌缺血、心脏缺血/再灌损伤、心肌梗塞、心力衰竭、心律失常、心脏破裂等的药物。

关于 MG53 在治疗心脏损伤/心肌损伤中的应用，以及其在治疗/预防心脏缺血、再灌注损伤所致疾病中的用途，可参见 200910241451.3 公开的药学实验部分的实验方法和实验数据。

在心肌细胞中过表达 MG53,能对缺氧引起的心肌细胞损伤产生保护作用。

实验方法总结：

试剂和材料：anti-Myc 抗体（Sigma-Aldrich，M4439）。如无特别说明，其他化学试剂

均来自 Sigma-Aldrich 公司。

同源同龄雄性正常血压大鼠来自北京市维通利华公司。所有动物程序和安乐死术都是按照中国北京大学动物研究委员会批准的协议来执行的，并且符合实验动物护理和使用指南（1985 年由美国国家卫生研究所修订发行，发行号为 86-23）。所有动物都维持在中国北京大学实验动物中心的一个光照/黑暗循环的温控屏障设施里，他们可自由获取食物和水。

质粒和腺病毒载体：全长的野生型 MG53 序列通过人肌肉组织中通过逆转录程序获得，而同义突变 MG53 核苷酸序列则通过全基因合成获得。分别经 BamHI 和 XhoI 两个酶（NEB）切位点嵌入 pcDNA4/TO/Myc-His B 的表达载体(来自 Invitrogen 公司)。

细胞培养，腺病毒感染和质粒转染：C2C12 成肌细胞（来自细胞资源中心，IBMS，中国医学科学院/中国协和医科大学)置于 37 摄氏度含 5％二氧化碳的细胞培养箱中，经 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM)培养，该培养基中补充有 10％牛胎儿血清(Hyclone 公司)，0.11g/L 丙酮酸钠和 1％的青霉素 - 链霉素。 当 C2C12 成肌细胞 90％密度时，我们通过腺病毒感染或质粒转染进行基因导入。之后，细胞在含有 2%的马血清的 DMEM 培养基里培养四天分化成肌管。

免疫共沉淀，免疫印迹：组织或细胞在冰上经裂解缓冲液（pH7.6的30mM的HEPES，100mM的氯化钠，0.5％NP-40，和蛋白酶抑制剂混合物）裂解10分钟，裂解物以13,000 rpm离心10分钟。免疫共沉淀和免疫印迹检测在之前已作说明。

统计方法：统计显着性检验组间差异采用单因素方差分析（ANOVA）或重复测量的方差分析，适当时候用Bonferroni 后t检验。所有P值小于0.05认为显著。数据表示为mean+s.e.m。

附图说明

序列表 1 人源（Homo sapiens）野生型 MG53 cDNA 序列

序列表 2 人源 MG53 同义突变 cDNA 序列

图 1：突变的人 MG53 （MG53mut）的 cDNA 序列和野生型 MG53 cDNA 序列的比较。

经过同义突变的人 MG53 的 cDNA 序列和野生型 MG53 cDNA 序列比较。图中 MG53mut 表示突变后的序列，MG53 代表野生型 MG53 序列，consensus 表示两者一致的序列。

图 2：人野生型 MG53 和 MG53mut 的载体质粒跑胶图。

通过细菌扩增，质粒提取后的人野生型 MG53 和 MG53mut 的载体质粒的跑胶图，用以确定质粒的浓度和纯度。

图 3：静脉注射重组 MG53 蛋白保护大鼠心脏缺血/再灌损伤。

心脏图片显示，与静脉注射 BSA 相比，静脉注射 MG53 重组蛋白能够显著减少缺血/再灌引起的心肌梗死（白色区域）。图中蓝色的是非缺血区，其他区域是缺血区，缺血区中红色的是非梗死区，白色的是梗死区。

图 4：MG53mut 比人野生型 MG53 的载体具有更高的 MG53 蛋白表达效率。

人野生型 MG53 和 MG53mut 的载体质粒转染细胞，36-48 小时后提取细胞蛋白，利用 western blot 检测 MG53 蛋白表达。

图片左侧上下两条灰色条带分别代表野生型 MG53 的细胞蛋白表达量和 GAPDH 细胞内参照物，右侧上下两条灰色条带分别代表同义突变 MG53 序列的细胞蛋白表达量和 GAPDH 细胞内参照物。

图 5：MG53mut 和人野生型 MG53 的载体表达的 MG53 蛋白都具有心肌细胞保护作用。

利用人野生型 MG53 和 MG53mut 的载体质粒转染 H9C2 心肌细胞系以后，利用 H_2O_2 造成氧化应激损伤（模拟缺血/再灌损伤）发现与对照载体（Control）相比，细胞培养基中的细胞损伤标志物（LDH）的浓度明显下降，而且 MG53mut 组的下降比野生型 MG53 组更加明显。说明两种载体表达的 MG53 都能够保护心肌细胞的氧化应激损伤，而且 MG53mut 组具有更强的保护作用。* 表示如图所示 $p<0.05$。

柱形图内三种柱形表示： 未填充柱形为空载体转染H9C2心肌细胞对照组，斜线填充柱形为野生型MG53组，黑色填充柱形为同义突变MG53组。纵坐标为培养基内LDH浓度（U/ml），左侧和右侧三条柱状值分别为未营造缺氧环境下和使用200μM H_2O_2 20小时所营造缺氧环境下的培养基LDH浓度值。

具体实施方案：

1. MG53的克隆，野生型和同义突变表达载体的构建。

人肌肉组织利用TRIZOL法提取人肌肉组织的总RNA：

1) 100毫克组织样本加1毫升的TRIzol试剂，匀浆组织；
2) 室温放置15分钟，加入0.2mL的氯仿，混匀，室温静置3分钟；
3) 离心12000g 15分钟，取上层液相；
4) 加入0.5mL异丙醇，在4度12000g离心10分钟，弃上清，75%乙醇洗RNA；
5) 晾干后溶解RNA并测定浓度。

野生型MG53总RNA的逆转录过程

利用提取的总RNA做逆转录，合成cDNA。利用OligodT作为引物，利用逆转录酶进行逆转录反应，得到cDNA文库。

野生型MG53cDNA序列的分子克隆过程

以合成的cDNA文库做模板，利用特异性引物，通过PCR方法获得MG53的编码序列：

PCR程序：变形温度，98度 3min，循环过程98度 30sec，65度 30sec，72度 90sec，30个循环，72度 5min延伸后4度保存。获得野生型MG53序列（序列SEQ ID NO:1）

使用引物序列为，

上游引物：5’-ata ggatcc gccacc atgtcggctgcgcccggcct-3’；

下游引物：5’-ata ctcgag ac ggcctcggcgccttcgggacc-3’；携带有BamHI 和 XhoI酶切位点。

PCR产物利用BamHI和XhoI双酶切，同时利用同样的双酶切处理空载体质粒pcDNA4/TO/myc-HisB，胶回收并利用T4连接酶将PCR产物连接入载体。测序验证序列正确。

利用软件分析MG53编码区DNA序列，设计同义突变编码序列，全基因合成的方式来获得突变序列MG53mut（SEQ ID NO:2）。PCR产物利用BamHI和XhoI双酶切，同时利用同样的双酶切处理空载体质粒pcDNA4/TO/myc-HisB，胶回收并利用T4连接酶将PCR产物连接入载体。测序验证序列正确。

大提质粒，琼脂糖凝胶验证质粒质量与浓度。

100mL LB培养基（1g蛋白胨，0.5g酵母提取物，1g NaCl，NaOH调pH至7.5）扩增转化质粒的TOP10细菌，离心收集细菌，加入5mL裂解液I（50mM葡萄糖，25mM Tris-HCl（pH8.0），1mM EDTA），漩涡震荡，加入新配制的碱液（200mM NaOH, 1% SDS），放置5分钟，加入冰冷的5ml 7.5M醋酸铵(pH7.6)，离心取上清，加入9mL异丙醇沉淀，弃上清，再用5ml的2M醋酸铵（pH7.4）溶解沉淀，再离心取上清，加5mL异丙醇沉淀，酚氯仿抽提，乙醇沉淀，得到质粒DNA。

利用1%琼脂糖凝胶电泳检测质粒纯度与浓度，结果如图2。 .

2. MG53重组蛋白心脏保护作用。

（1）利用HEK293T细胞表达MG53和MG53mut蛋白。

HEK293T细胞，培养在15cm培养皿中，密度达到80%，利用脂质体（ScreenFect A，IncellarTM）将构建好的人MG53野生型和同义突变的表达质粒转染细胞，具体方法如下：

以DMEM给293T细胞换液，将100uL ScreenFect A与2000uL dilution buffer混合；同时将30ug质粒与2000uL dilution buffer混合；5分钟后将两者混合均匀，室温放置30分钟；均匀滴加

入换液后的细胞培养皿中；四小时后给细胞换成正常培养基（10% FBS的DMEM）。转染36-48小时后裂解细胞，以相应抗体进行western Blot检测蛋白水平。48小时后，每盘细胞用1mL Co-IP buffer（30mM HEPES， pH7.5， 100mM NaCl， 1mM EDTA， 0.5% NP40， protease inhibitor（Roche，04693132001,1片/50mL buffer））裂解细胞。利用蛋白带有的myc标签来纯化蛋白。具体步骤如下：

首先利用冰冷的PBS洗anti-myc的beads（E6654-1mL，Sigma），洗涤3次，以冷的Co-IP buffer洗beads1次。将beads与裂解液混合，4C° 混合3小时，之后将磁珠以Co-IP buffer洗5次，尽量去除上清，利用0.1M 甘氨酸（pH2.8）洗脱蛋白，洗脱液以NaCl（浓度）和Tris-Cl（浓度）（pH8.0)中和洗脱液。蛋白-80℃保存备用。取少量蛋白制样，同时取BSA做对照，跑SDS-PAGE胶，经考马斯亮蓝染色验证浓度与纯度。

（2）大鼠心肌梗塞模型的建立和评价

大鼠（北京市维通利华公司，SD大鼠，200克体重）利用30mg/kg戊巴比妥钠麻醉后，气管插管，第四肋间开胸，打开心包，暴露心脏。穿线活结结扎大鼠左前降支冠状动脉45分钟，而后放开，开始再灌。

对于MG53治疗组，在缺血前5分钟和再灌前1分钟，分别静脉注射3mg/kg的MG53蛋白。

再灌48小时以后，利用30mg/kg戊巴比妥钠麻醉大鼠，开胸，取下心脏，主动脉插管，逆向灌流生理盐水冲洗心脏。而后从开始穿线结扎冠状动脉的位置重新结扎冠状动脉，灌流Alcian blue染料，染色的部分就是非缺血区，未染色的部分是缺血区。而后把心脏横切成5-6个薄片，1% TTC溶液37摄氏度染色15分钟，白色的部分就是梗塞区。

结论：静脉注射重组MG53蛋白保护大鼠心脏缺血/再灌损伤，结果见图3。

3. MG53和MG53mut表达载体的转染和表达检测。

HEK293T细胞培养在60mm培养皿中，密度达到80%，利用脂质体（ScreenFect A；Incellar^{TM}）将构建好的人MG53野生型和同义突变的表达质粒转染细胞，具体方法如下：以DMEM给293T细胞换液，将10uL ScreenFect A与200uL dilution buffer混合；同时将3ug质粒与200 uL dilution buffer混合；5分钟后将两者混合均匀，室温放置30分钟；均匀滴加入换液后的细胞培养皿中；四小时后给细胞换成正常培养基（10% FBS的DMEM）。转染36-48小时后裂解细胞，以anti-myc抗体进行western Blot检测蛋白水平，同时利用GAPDH抗体做WB检测蛋白上样量的情况。结果见图4，转同样量的质粒，MG53mut比WT序列的质粒表达量提高很多，接近30%。

4. H9C2心肌细胞系缺氧和细胞损伤检测。

H9C2心肌细胞培养在6孔板中，细胞生长达到80%的时候转染质粒：Control组转染pcDNA4/TO/myc-HisB；human MG53 WT组：转染野生型MG53质粒；human MG53 Mut：同义突变的MG53质粒。转染方法同上。30小时后，换新鲜培养基，加入200uM的H_2O_2，刺激细胞。20小时后，取40uL培养基，利用LDH检测试剂盒检测培养基中的LDH含量（乳酸脱氢酶测定试剂盒，LDH0360，上海景源医疗器械有限公司），结果见图5。

权 利 要 求 书

1. 一种 DNA 分子，核苷酸序列编码野生型人源 MG53 蛋白,其特征及核苷酸序列不同于野生型的人源 MG53 编码序列。

2. 如权利要求 1 所述的 DNA 分子，其特征在于该 DNA 分子为核苷酸序列为 SEQ ID NO :2。

3. 如权利要求 2 所述的 DNA 分子，其特征在于核苷酸序列 SEQ ID NO:2 的任意位点发生一个或多个同义突变。

4. 一种重组载体，其中含有权利要求 1-3 任意一项的核苷酸序列。

5. 权利要求 4 所述的重组载体，其特征在于重组载体为动物表达载体。

6. 如权利要求 5 所述的重组载体，其特征在于动物表达载体可以为腺病毒载体。

7. 权利要求 6 的重组载体，其特征在于该重组载体为 pcDNA4/TO 系列载体或 pcDNA4 系列载体。

8. 权利要求 7 的重组载体，其特征在于该重组载体为 pcDNA4/TO/myc-HisB 载体。

9. 一种宿主细胞，其中含有权利要求 4-8 所述的 DNA 分子任一的重组载体。

10. 权利要求 9 的宿主细胞，其为动物细胞。

11. 如权利要求 10 所述的宿主细胞，其为 HEK293T。

12. 一种提高野生型 MG53 蛋白表达量的方法，该方法包括在适合表达的条件下培养权利要求 9 -11 任意一项的宿主细胞并获得野生型人源 MG53 蛋白。

13. 权利要求 1-3 的 DNA 分子在制备心肌损伤的药物中的用途。

14. 如权利要求 13 所述的用途，其特征在于，所述药物包括治疗与心肌细胞损伤相关的疾病的药物，该疾病包括心肌缺血、心脏缺血/再灌损伤、心肌梗塞、心力衰竭、心律失常、心脏破裂的药物。

15. 权利要求 4-8 之一的重组载体在制备心肌损伤的药物中的用途。

16. 权利要求 12 方法获得的野生型人源 MG53 蛋白在制备心肌损伤的药物中的用途。