

豇豆胰蛋白酶抑制剂cDNA在大肠杆菌中的克隆与表达

刘春明 朱 祯 周兆澜 孙宝林 李向辉

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

从即将成熟的豇豆子叶中分离出总RNA, 逆转录合成cDNA第一条链。参照已知的几种Bowman-Birk型胰蛋白酶抑制剂基因序列, 设计并合成了两段寡核苷酸引物, 以单链cDNA为模板, 进行PCR扩增, 得到320bp的均一扩增产物, 克隆到pBluescript SK(+)的EcoRV位点上并转化大肠杆菌JM101。酶切图谱及DNA序列分析表明克隆到的片段含有编码完整80个aa的豇豆胰蛋白酶抑制剂结构基因和一段编码27aa的前导序列。利用限制酶NcoI对其前导序列进行缺失, 只保留成熟蛋白结构基因上游第一个ATG密码子并克隆到大肠杆菌表达载体pKK233-2中进行表达研究, 从转化细菌的提取物中检测到了外源CpTI基因表达产物对胰蛋白酶的抑制活力。

关键词 豇豆胰蛋白酶抑制剂; cDNA; PCR扩增; 基因表达

蛋白酶抑制剂是自然界中含量最为丰富的蛋白种类之一, 近年来发现丝氨酸类蛋白酶抑制剂具有天然的广谱抗虫能力^[1,2], 而受到广泛关注, 成为植物抗虫遗传工程的一个热点。到目前为止, 已有多种蛋白酶抑制剂基因被克隆^[3-6]。其中就植物抗虫的目的而言, 以豇豆来源的胰蛋白酶抑制剂(CpTI)基因最为理想。

CpTI属于Bowman-Birk型丝氨酸蛋白酶抑制剂^[3], 作用位点是胰蛋白酶的活性中心, 其杀虫机理也就在抑制其必需的消化酶活性, 并通过神经系统的反馈, 使害虫产生厌食, 最终使害虫因缺乏必需氨基酸而非正常发育或死亡。以上特点, 决定CpTI具有广谱抗虫性, 并可排除害虫通过突变对CpTI产生耐受性的可能。这两点优越于BT毒蛋白抗虫基因。

本文参照大豆Bowman-Birk型蛋白酶抑制剂基因已知的ATG起始位点^[5], 用PCR方法从豇豆子叶cDNA中扩增并克

隆了所需要的CpTI的cDNA片段, 经进一步修饰后在大肠杆菌中实现表达, 为CpTI基因的深入研究和应用打下了基础。

材料与 方法

(一)材料

1. 菌种及质粒: *E. coli* JM101, JM109由本室保存。pBluescriptSK(+)由微生物所王永力同志提供。pKK233-2购自医学科学院基础所。

2. 生化试剂: 限制酶、修饰酶及Taq DNA polymerase主要为华美公司、Boehringer及Biolabs公司产品。异硫氰酸胍、牛胰蛋白酶及底物BAEE购自Sigma公司。低熔点琼脂糖购自Pharmacia公司,³²P-dCTP购自Amersham公司。

3. 植物材料: 豇豆(*Vigna unguiculata* L.)购自美国Kmart公司。播种于室外。

本文于1991年11月7日收到。

(二) 方法

1. RNA提取: 取即将成熟的豇豆种子在无菌条件下剥出子叶, 于液氮中速冻, 按改进的异硫氰酸胍/氯化铯超离心法^[7]分离总RNA。

2. cDNA合成: 采用Pharmacia-LKB公司的cDNA合成系统, 按说明书进行。

3. PCR扩增: 引物:

P_A: 5'GATGATGGT-
GCTAAAGGTGT3'
P_B: 3'CCTACTTCTA-
CTACTCATTC5'

用微生物所ABI公司DNA合成仪合成, 产物用聚丙烯酰胺电泳纯化并脱盐, 冷冻干燥保存, 用时稀释到50pmol/μl。

以1—10μl cDNA为模板, 于100μl PCR反应体系, 加入两种引物各50pmol, dNTP各200μmol/L, DMSO 4μl, 95℃变性5min后加入3u Taq DNA Polymerase, 并覆盖一层液体石蜡。依次在93℃变性1min, 50℃复性1min, 70℃延伸2min。共进行36个循环, 最后在70℃保温10min, 取样10μl电泳检测。

4. 质粒提取、纯化、重组及分析、细菌转化: 均参照文献[7,8]。

5. 菌落原位杂交: 参照文献[8]。探针标记采用Pharmacia-LKB公司oligo labelling系统, 按厂家推荐条件进行。

6. DNA序列分析: 采用Boehringer Mannheim公司M₁₃ DNA克隆系统, 首先将CpTI片段亚克隆到M13mp18中, 提取单链DNA, 利用ABI公司370A型DNA顺序仪及荧光标记方法进行序列分析, 方法均采用各公司推荐程序。

7. CpTI活性检测: 待测菌株接种于含50μg/μl Ap的2×YT培养基中37℃振荡培养过夜, 转接0.5ml至50ml含Ap

的2×YT中, 至对数期加IPTG至1mmol/L, 持续培养8h后, 收集菌体并溶于5ml提取缓冲液(50mmol/L Tris-HCl pH9.5, 1mmol/L DTT)中, 超声波裂解, 离心去沉淀, 上清用饱和(NH₄)₂SO₄沉淀, 溶于5ml提取缓冲液, 对50mmol/L Tris-HCl pH9.5透析, 并用PEG法^[8]浓缩。

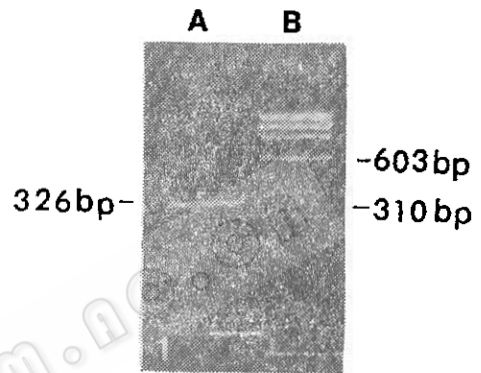


图 1 PCR产物分析

Fig.1 Analysis of the PCR products by agarose gel electrophoresis
A. CpTI cDNA amplified products,
B. ϕ X174 + HaeIII

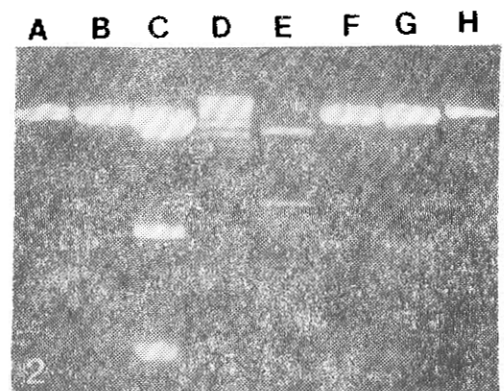


图 2 pBlueL3 cDNA克隆片段分析

Fig.2 Agarose gel analysis of the cloned cDNA fragment in pBlueL3
A. pBlueL3 + NcoI, B. pBlueL3 + NcoI + PstI
C. pBlueL3 + SalI + BamHI, D. Sppl + EcoRI
E. pBR322 + HinfI, F. pBlueL3 + EcoRI
G. pBlueL3 + PstI, H. pBlueL3 + EcoRV

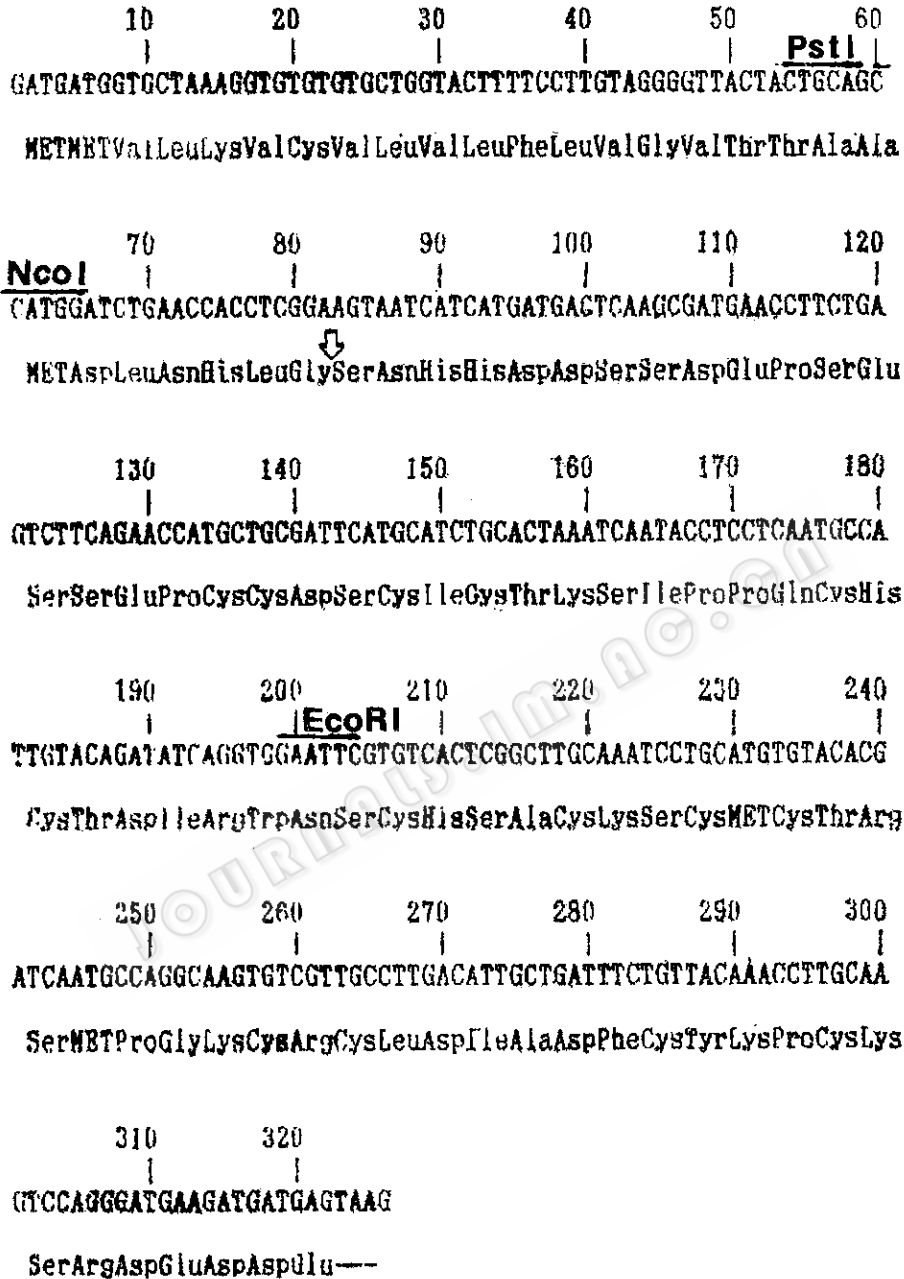


图 3 pBlueL3中克隆的CpTI cDNA碱基序列

Fig. 3 The nucleotide sequence of CpTI cDNA insert in pBlueL3

CpTI活性检测参照文献〔9〕,取10 μ l菌体蛋白提取物与1 μ g胰蛋白酶在25 $^{\circ}$ C保温15min后,加入底物BAEE,利用岛津UV-160分光光度计在254nm处进行时间扫描。

实验结果

(一) 豇豆胰蛋白酶抑制剂cDNA的合成、扩增及克隆

从豇豆即将成熟的子叶中用异硫氰酸胍/CsCl超离心法提取总RNA, 取5 μ g总RNA作模板, 以oligo(dT)₁₂₋₁₈为引物, 利用Murine反转录酶合成ss-cDNA。酚/氯仿抽提, 1/4 v10mmol/L NH₄Ac及2.5v无水乙醇沉淀后, 溶于50 μ l TE中。取10 μ l ss-cDNA为模板, 利用所合成的两个引物在100 μ l体系中进行PCR扩增。36循环后, 取10 μ l样品用2%的琼脂糖凝胶电泳分析, 以 Φ X174的Hae III酶解片段为分子量标准, 在320bp处有清晰的扩增条带(图1)。由凝胶中纯化出扩增产物, 分别用klenow酶及T4 DNA polymerase补平末端, 克隆到pBluescriptSK(+)的EcoRV位点中, 转化大肠杆菌JM101。转化子用MacConkey培养基筛选。用Klenow酶及T4 DNA polymerase处理的两组, 白色菌落出现频率相似, 都接近10%。由Klenow酶处理过的转化子中随机挑选5个菌落快速提质粒酶切鉴定, 其中3号与6号为所期望的插入方向。对3号(pBlueL3)做详细的酶切图谱分析(图2), 初步确认插入片段为豇豆胰蛋白酶抑制剂cDNA。

(二) 克隆片段的序列分析

将pBlueL3中的克隆片段用BamHI和SalI切下克隆到M13mp18相应位点。经序列分析, 其编码CpTI成熟蛋白的碱基序列与Hilder报道的一致, 前导序列中有一个碱基差异, 即倒数第五个三连体密码为CTG, 而不同于Hilder所报道的TTG, 但两者编码的都是亮氨酸(图3)。有趣的是, 大豆同源基因的相应位点也是CTG。虽然我们的这一结果经过了反复验证, 尚不能排除PCR反应过程中错误掺入的可能。

(三) 豇豆胰蛋白酶抑制剂表达质粒的构建

pBlueL3用NcoI-PstI切下含有编码7aa前导序列及80aa成熟蛋白的CpTI cDNA。低熔点琼脂糖电泳回收后, 克隆到pKK233-2 NcoI-PstI位点。通过菌落原位杂交及重组质粒的酶切分析, 得到CpTI的大肠杆菌表达质粒pKK-CpTIL7。CpTI cDNA位于tac启动子下游, 从启动子的SD序列到ATG起始密码间有8个碱基对(图4)。

(四) 豇豆胰蛋白酶抑制剂在大肠杆菌中的表达

将上述表达质粒转化大肠杆菌



图4 CpTI cDNA在pKK-CpTIL7中的连接顺序

Fig.4 DNA sequence of the CpTI cDNA junction in pKK-CpTIL7

JM109, 得到的菌株经37 $^{\circ}$ C培养, IPTG诱导后, 超声波裂解、离心, 上清液用饱和(NH₄)₂SO₄沉淀。沉淀的菌体蛋白重新溶于提取缓冲液, 透析和浓缩后, 取样测胰蛋白酶抑制剂活力。其中JM109/pKK-CpTIL7以JM109/pKK233-2为对照, 检测到对胰蛋白酶的抑制

活力(图5)。

图5中, A为加入对照JM109/pKK233-2菌体蛋白后的胰蛋白酶活力曲线; B为加入样品JM109/pKK-CpTIL7菌体蛋白后的胰蛋白酶活力曲线。即后一体系中胰蛋白酶对底物BAEE的分解效率明显降低, 如果以JM109/pKK233-2为标准,

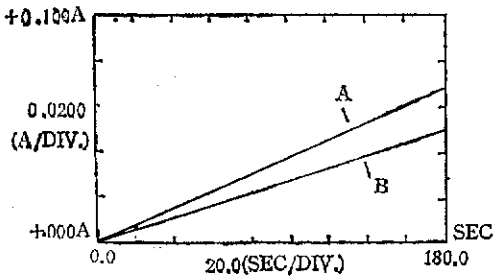


图 5 JM109/pKK-CpTIL7 表达产物
对胰蛋白酶的抑制作用

Fig.5 The Inhibition of trypsin by the
extract of JM109/pKK-CpTIL7

10 μ l JM109/pKK-CpTIL7 蛋白粗提物
(相当于100 μ l菌液)中胰蛋白酶抑制
剂活力为:

$$\frac{(\Delta OD_{254} \text{ 标准} - \Delta OD_{254} \text{ 样品})}{\Delta OD_{254} \text{ 标准}} = 26\%$$

讨 论

本文成功地运用RNA-cDNA-PCR方
法克隆了豇豆CpTI cDNA, 简化了分离
特定cDNA的程序。另外, 在进行PCR
扩增同时, 实际上已经对CpTI cDNA序
列进行了定点缺失, 去除了部分5'端前导
序列及3'端非编码区序列, 说明PCR技
术可有效地用于基因的定位缺失研究, 甚
至无需经过特定的克隆步骤。

Hilder所报道的CpTI cDNA前导序

列中, 含有几处ATG密码, 其上游的序列
都不完全符合通常的植物基因翻译起始区
要求^[10], 因此难以确定真正的起始位点
及前导序列的功能。本文对其前导序列进
行了缺失, 只保留最后一个ATG密码, 构
建成pKK-CpTIL7转化*E. coli* JM109,
其表达产物依然表现出对胰蛋白酶的抑制
活力。这一结果符合X-射线衍射方法对
Bowman-Birk型抑制剂的分析, 即这类
抑制剂的成熟蛋白N末端氨基酸的修饰对
抑制剂与胰蛋白酶之间相互作用的影响不
大^[11]。

根据胰蛋白酶抑制试验结果, 菌体蛋
白所含外源抑制剂活力并不高, 随后以细
菌提取物掺入人工饵料进行的抗虫饲喂试
验, 其作用也不明显。这一结果是预料之
中的, 与BT毒蛋白不同^[12,13], CpTI所
需要的抗虫有效浓度较高, 一般表达量要
高于0.4%可溶蛋白浓度才具有抗虫作
用^[2]; 实验中使用的tac启动子强度不够
理想, 因此CpTI基因的转录水平较低;
同时, 细菌转译系统对于变偶密码子的偏
爱与真核系统有所不同, 以及作为植物基
因的转录和转译产物在原核细胞内不稳
定, 都将影响CpTI在细菌细胞内的水平^[6]。
但是与BT基因相反, CpTI作为豇豆的一
种贮藏蛋白, 在植物细胞内则能够高效
表达。目前我们已利用根农杆菌转化系
统成功地将该基因导入烟草, 转基因植
株表现出明显的抗虫能力^[14]。

参 考 文 献

- [1] Ryan, C., *Bio. Essays*, 10:20-23, 1989.
- [2] Hilder, V.A., *Nature*, 300:160-163, 1987.
- [3] Hilder, V.A., *Plant Mol. Bio.*, 13:701-710, 1989.
- [4] Peyachoknagul, S., *Plant Mol. Bio.*, 12:51-59, 1989.
- [5] Hammand, R. W., *J. Bio. Chem.*, 259:9883-9890, 1984.
- [6] Karl, J.K. et al., *Protein Expression and Purification*, 3:41-49, 1992.
- [7] Ausubel, F.M., *Current Protocols in Molecular Biology*, 1987.
- [8] Maniatis, et al., *Molecular Cloning* (2nd. edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, 1989.

- [9] 蒋传葵: 工具酶的活力测定, 上海科技出版社, 1982.
[10] Lutke HA., *EMBO J.*, 6:43-48, 1987.
[11] Suzuki A., *J. Biochem.*, 101:267-274, 1987.
[12] 田颖川等: 生物工程学报, 5(1):11-18, 1989.
[13] 郭三堆等: 生物工程学报, 7(1):54-61, 1991.
[14] 刘春明等: 科学通报, 37(18):1425-1428, 1992.

cDNA Cloning and Expression of Cowpea Trypsin Inhibitor in *Escherichia coli*

Liu Chunming Zhu Zhen Zhou Zhaolan Sun Baolin Li Xianghui
(*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101*)

Total RNA was isolated from cowpea cotyledons as they were approaching maturity. Single stranded cDNA was synthesized by the reverse transcriptase. A 320bp fragment was amplified and cloned by polymerase chains reaction. DNA sequence analysis indicated that the cloned fragment containing the entire coding sequence for 80aa CpTI mature protein and a 5' coding sequence for 27aa leader. The leader sequence was partially deleted and the remaining CpTI cDNA fragment was cloned into *E. coli* expression vector pKK233-2 to study its expression. The trypsin inhibitor activity was detected in the extracts of transformed bacteria.

Key words: Cowpea trypsin inhibitor; cDNA; PCR; gene expression