

人溶菌酶基因的合成和克隆

钱世钧 于颖 田开荣 矫庆华 孟广震

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 用固相亚磷酸胺法合成了人溶菌酶的全基因, 全长为 409bp, 它包括了编码人溶菌酶的结构基因, 起始密码子 ATG, 终止密码子 TAA、TGA, 以及两端的 Bam HI 和 Sph I 的识别顺序。整个基因分成 24 个寡聚核苷酸片段进行合成, 每个片段长度分别为 26 至 38 个核苷酸, 然后用两种方法酶促连接成完整的人溶菌酶基因。基因克隆到 M13 载体上。用点杂交和限制酶酶切分析确定阳性克隆株。用双脱氧链终止法进行序列分析, 证实所合成的人溶菌酶基因序列与设计的完全一致。

关键词 人溶菌酶, DNA 合成, 基因克隆

溶菌酶, 由于它发现较早^[1], 分子量又小, 所以在许多领域, 它往往是作为一个“模型”来研究。人溶菌酶是溶菌酶中的一种^[2], 通常情况人溶菌酶是从人奶或胎盘中少量提取获得。由于来源困难, 不能进行工业化生产。而采取 DNA 重组技术, 从细菌或酵母中生产人溶菌酶是解决人溶菌酶供需矛盾的有效途径。人溶菌酶的氨基酸组成清楚, 分子量较小, 用化学法人工合成基因, 简便、快速, 国外对此也有不少报道^[3-5]。本文报道人溶菌酶基因的化学合成、克隆及鉴别结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 噬菌体 M13mp18, 大肠杆菌 JM109、TG₁, 由本所 603 组惠赠。

1.1.2 试剂和酶: BamHI, SphI, Hind III, T4 多核苷酸激酶、T4 DNA 连接酶为美国 Promega 公司产品。DNA 序列试剂盒 (T7 Sequencing Kit) 为 Pharmacia 产品, γ -³²P-ATP 为福瑞公司产品, α -³⁵S-dATP 为 Du Pont 产品, IPTG 为 Boehringer 产品, X-gal 为 BRL 产品。LB 培养基、各种缓冲液、杂交液, SSC 等均按文献所述方法配制^[6]。其余试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 寡聚核苷酸片段的合成: 人溶菌酶基因的 24 个寡聚核苷酸片段用固相亚磷酸胺法合成, 所用仪器为美国 ABI 公司 381A DNA 合成仪。

1.2.2 寡聚核苷酸片段的纯化: 将寡聚核苷酸粗制品经 15% 聚丙烯酰胺变性胶分离, 在紫外光下, 切下含产物带的胶, 在含有 0.3mol/L NaAc, 0.01mol/L Mg(Ac)₂ 洗脱液中浸泡, 振荡过夜, 离心, 上清液进行乙醇沉淀、离心, 所得纯的寡聚核苷酸溶于水。

1.2.3 寡聚核苷酸片段的 5'-端磷酸化: 除了 L₁、U₁₂ 以外, 其余 22 个片段按每个 300

pmole 量, 根据文献所述, 分别磷酸化, 每个样品终体积为 25 μ l。

1.2.4 各片段的连接: 将已磷酸化的各片段分成三大组, A (U₁, U₂, U₃, U₄, L₁, L₂, L₃, L₄), B (U₅, U₆, U₇, U₈, L₅, L₆, L₇, L₈), C (U₉, U₁₀, U₁₁, U₁₂, L₉, L₁₀, L₁₁, L₁₂)。分别进行等浓度混合, 在 68 $^{\circ}$ C 水浴放置 10 分钟, 慢慢冷却到室温。分别取出 A, B, C 混合物各 100 μ l, 补加 30mmol/L ATP 1 μ l, 10 \times 连接酶缓冲液 2 μ l, T4 DNA 连接酶 (3u/ μ l) 5 μ l, 在 15 $^{\circ}$ C 水浴过夜, 接着乙醇沉淀、离心, 沉淀溶于 20 μ l 水中。

1.2.5 A、B、C 片段的纯化: 将上述三大片段再用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化, 把相对应的凝胶带切下, 加入洗脱液 (0.5mol/L NH₄Ac, 0.01mol/L Mg (Ac)₂, 1mmol/L EDTA, 0.1% SDS), 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜, 离心, 上清液用乙醇沉淀, 沉淀溶于 20 μ l TE 中。

1.2.6 人溶菌酶基因的连接: 用两种方法进行人溶菌酶基因的连接。第一种方法, 将纯化后的 A、B、C 三大片段各 10 μ l 加入 T4 DNA 连接酶 2 μ l, 缓冲液 4 μ l, 总体积补足到 40 μ l, 16 $^{\circ}$ C 水浴过夜, 再进行乙醇沉淀, 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化, 将相对应带切下, 缓冲液抽提, 乙醇沉淀, 溶于水中, 待与载体连接。第二种方法, 将纯化的 A、B、C 三大片段混合, 在 90 $^{\circ}$ C 放置 3 分钟, 慢慢冷却到 37 $^{\circ}$ C, 然后在室温放置 30 分钟, 加入 T4 连接酶及缓冲液, 在 8 $^{\circ}$ C 放置 48 小时, 待与载体连接。

1.2.7 合成基因的克隆: 将 SphI 和 BamHI 酶切的 M13mp18 质粒, 经电泳纯化, 溶于水中, 按 1:10, 1:5 摩尔比例分别与上述两种方法所得的全基因在 T4 连接酶作用下进行连接, 8 $^{\circ}$ C, 过夜。

将重组质粒转到受体菌 TG₁ 上, 在含有 X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上培养, 挑选出白色噬菌斑。

1.2.8 点杂交: 以寡核苷酸 U₆ 和 U₁₀ 作为探针, 用 γ -³²P-ATP 进行同位素标记, 通过 Sephadex G-50 柱分离出已标记的寡核苷酸。在放有硝酸纤维素膜的点样器孔上加入 5 μ l 经浓缩的含重组质粒的噬菌体上清液和对照样品, 抽真空 30—60 分钟, 取出膜, 再在 80 $^{\circ}$ C 烘箱放置 1.5 小时, 取出滤膜, 放在杂交袋, 加入杂交液, 封好, 42 $^{\circ}$ C 水浴振荡 2 小时, 再在杂交袋加入标记探针, 42 $^{\circ}$ C 振荡过夜, 取出膜, 用 2 \times SSC, 0.5% SDS 在室温下洗两次, 用 2 \times SSC, 0.1% SDS 在 37 $^{\circ}$ C、42 $^{\circ}$ C 各洗一次, 将膜进行放射自显影。

1.2.9 DND 序列分析: 按双脱氧链终止法进行序列分析。

2 结果与讨论

2.1 人溶菌酶基因的实验设计

人溶菌酶由 130 个氨基酸组成, 在基因设计中主要根据以下几点: (a) 参照文献所报道的⁽⁷⁻⁹⁾ 选用能高效表达的大肠杆菌所偏爱的简并密码子。 (b) 在结构基因 5' 端加上起始密码子 ATG, 3' 端加上两个终止密码子 TAA, TGA, 同时在两端设置了 BamHI 和 SphI 酶切位点, 便于基因能连在合适的质粒上。 (c) 通过计算机辅助检索, 在结构基因里, 设置了 PstI 酶切位点, 排除了 6 个以上核苷酸重复序列的可能性。 (d) 考虑到整个基因较长, 将全基因分成三大段, 每一大段由上下链各 4 个寡核苷酸片段组成, 每个寡核苷酸长短在 26—38 个核苷酸之间。正负链连接片段之间互补区至少在 25 个以上, 相

邻两段双链 DNA 之间互补序列有 4—8 个碱基。整个设计方案见图 1。

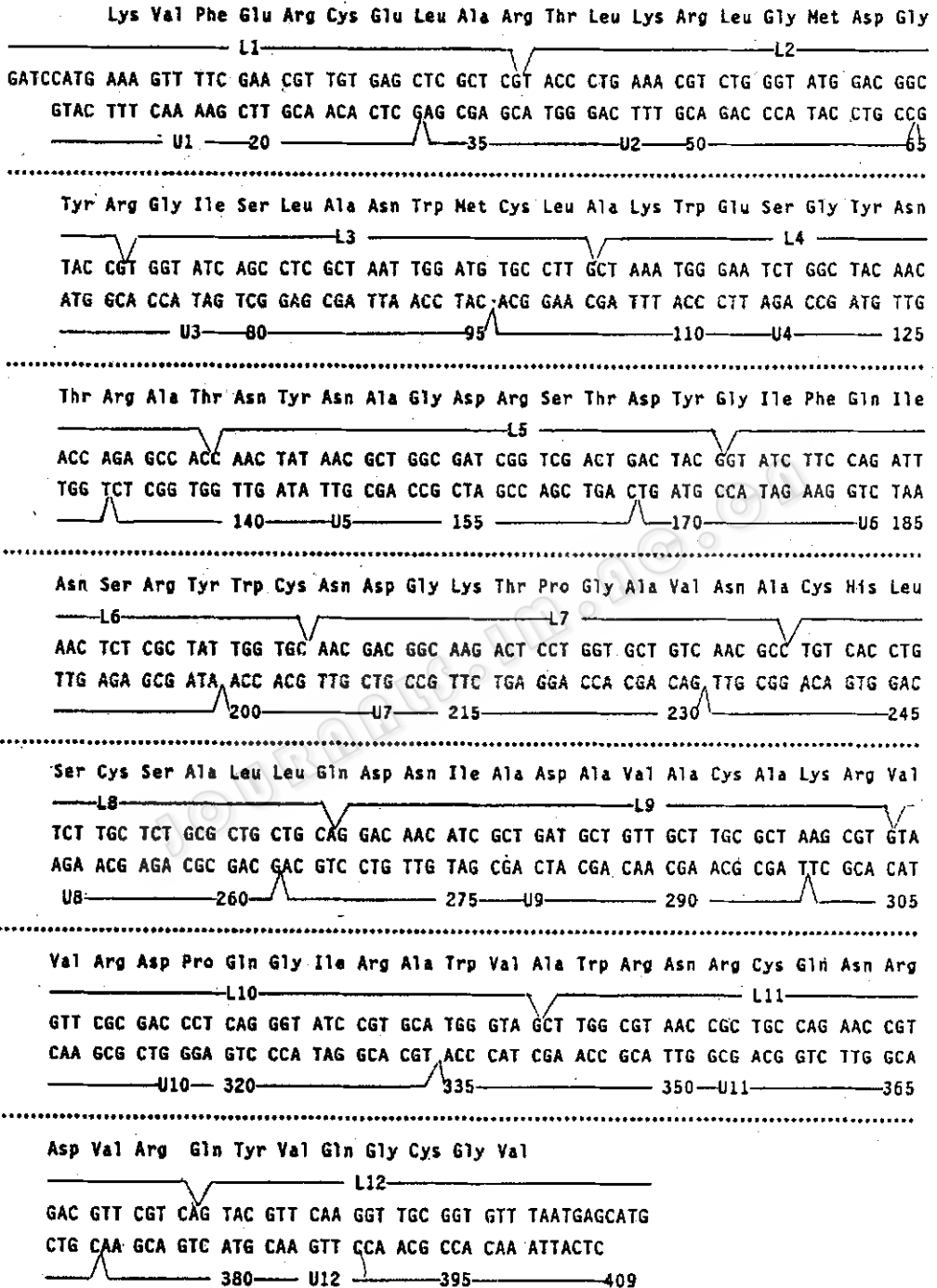


图 1 人溶菌酶和它的基因合成设计图

Fig. 1 Primary structure of human lysozyme and designed sequence of its synthetic gene

2.2 寡核苷酸片段的化学合成、纯化、鉴别

根据设计要求,利用 ABI 公司 381A DNA 合成仪,合成 24 个寡核苷酸,按方法中所述进行纯化,取每个少量样品分别用 γ - ^{32}P -ATP 进行 5' 端标记,在 15% 聚丙烯酰胺变性胶上电泳,所得放射自显影结果见图版 I-A,从结果看,各个片段都呈现出一条带,说明样品较纯。从相对位置看,除个别外,(如 L_9 , L_{11} , U_9),大多数与设计的寡核苷酸片段大小相吻合。这种个别寡核苷酸片段在电泳图谱相对位置的差别,可能是由于寡核苷酸碱基的组成、排列顺序等原因引起。

2.3 人溶菌酶基因的构建和克隆

除了基因两侧 5' 端的 L_1 , U_{12} 两个片段以外,其余 22 个片段都按方法中所述进行 5' 端磷酸化。然后按照设计要求,将所有寡核苷酸片段分成三大组进行退火、连接,最后成三个片段 DNA A、B、C。由于考虑到退火条件、各寡核苷酸的浓度差别、互相干扰等原因,所以分子间配对不可能完全,在电泳后就会呈现出许多带,为此,需要从凝胶上切下所需的 DNA 片段大小的带,按方法中所述进行纯化。

纯化了的 A、B、C,再按“方法中”所述进行全基因连接。按连接第一种方法所得产物进行电泳,在紫外光下,从 400bp 处切下凝胶带,进行纯化。

将两种连接方法所得产物分别与 BamH I 和 Sph I 酶切的载体 M13 (mp18) 进行连接,并转化在 TG_1 上,在含有 X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上,按第一种连接方法转化所得的平板中挑选出 6 个白色噬菌斑,命名为 b_4 , b_5 , b_6 , b_7 , b_8 , b_9 ,按第二种连接方法转化所得的平板中挑选出 3 个白色噬菌斑,命名为 a_1 , a_2 , a_3 。

2.4 重组质粒的分析

2.4.1 点杂交:从挑选出的 9 个噬菌斑,制备单链 DNA,用 U_6 和 U_{10} 寡核苷酸片段作为探针进行 5' 端标记,按“方法所述”进行点杂交,结果见图版 I-B,从图中可看出,其中 6 个样品 a_1 , a_3 , b_4 , b_5 , b_6 , b_7 为阳性,呈现明显的杂交斑点。阳性噬菌斑占总数的 66%。

2.4.2 限制酶酶切:从点杂交中呈现出阳性的 6 个重组质粒,制备 RF DNA,用 BamH I 和 SphI 进行酶切,并在 1% 琼脂糖凝胶上电泳(见图版 I-D)。从电泳图谱看,在 400bp 处有一明显带,而这正是人溶菌酶基因大小。

2.4.3 DNA 序列分析:在序列分析时,除了试剂盒中所带有的引物以外,还采用了自己合成的寡核苷酸 U_6 作为另一引物。对 6 个重组体都进行了序列分析。其中 a_1 , a_3 , b_4 , b_5 的序列与设计完全一致(图版 I-C),证实目的基因已在 TG_1 中克隆成功。而 b_6 , b_7 在个别碱基上出现差错,这是由于寡核苷酸合成还是连接或转化过程中的问题,还有待以后进一步探讨。

致谢 本所技术室合成寡核苷酸;本所钟耀明同志、上海细胞所张懋弧同志协助计算机分析;叶军同志参加部分工作,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Fleming A. Proc Roy Soc, London, Ser B 1922, 93 : 306—317.
 [2] Jigami Y *et al.* Gene, 1986, 43 : 273—279.
 [3] Muraki M *et al.* Agric Biol Chem, 1986, 50 (3) : 713—723.
 [4] Hayakawa, T *et al.* Gene, 1987, 56 : 53—59.
 [5] Baetselier A De *et al.* Meded Fac Landbouwe Rijksuniv Gent, 1988, 53 (46) : 2135—2141.
 [6] Sambrook J *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual (second edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 [7] Grantham R *et al.* Nucleic Acid Res, 1981, 9 (1) : r43—r74.
 [8] Tanaka S *et al.* Nucleic Acid Res, 1983, 11 (6) : 1703—1723.
 [9] Winnacker E L. From Gene to Clones, VCH Verlagsgesellschaft, 1987, pp. 276—279.

Synthesis and cloning of the Human Lysozyme gene

Qian Shijun Yu Ying Tian Kairong Jiao Qinghua Meng Guangzhen

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract A Human lysozyme gene has been chemically synthesized by solid-phase phosphoramidite method. The synthetic gene consisted of 409 bp contains the structural gene coding for human lysozyme, a start signal ATG and BamH I restriction site at 5' end, and two stop signal TAA TGA and Sph I restriction site at 3'. Whole gene was divided into 24 fragments with chain lengths of 26—38, which was prepared respectively. The oligonucleotides were joined to form DNA duplexes, human lysozyme gene, by two methods of ligation. The synthetic gene was cloned into vector M13. The positive colonies were confirmed by dot-blot hybridization and analysis by restriction enzymes. The DNA sequence of the cloned human lysozyme gene was proved to be correct by M13 dideoxynucleotide chain termination method.

Key words Human lysozyme, DNA synthesis, gene cloning

图版说明

Explanation of plate

A. Autoradiograph pattern of oligonucleotides in the electrophoresis of a 15% denaturing polyacrylamide gel L₁ (37), L₂ (33), L₃ (31), L₄ (35), L₅ (35), L₆ (32), L₇ (33), L₈ (29), L₉ (38), L₁₀ (36), L₁₁ (37), L₁₂ (33), U₁ (26), U₂ (34), U₃ (31), U₄ (34), U₅ (36), U₆ (32), U₇ (33), U₈ (31), U₉ (36), U₁₀ (35), U₁₁ (37), U₁₂ (36)

Numer in parenthesis is the length (mer) of oligonucleotides

- B. The restriction enzyme mapping of the recombinant plasmid
 C. DNA sequence analysis of synthetic gene of human lysozyme
 D. The identification of the recombined colonies by dot blot hybridization

