

简报

一种快速简便的多肽基因合成方法

于科达 陈常庆

(中国科学院上海生物工程基地, 上海)

在目前的基因合成中, 不管是大的蛋白质基因的合成^[1-4], 还是一小段基因的合成^[5-9]都是采用Khorana等所建立的双链的多片段连接方法^[10], 不过因合成仪的使用更多地采用了较长的合成片段(如50聚左右), 从而可以减少合成片段的数目和一次能连接成较长的双链, 节约了合成的时间。另一个改进的方面是以合成的单链为模板, 再用DNA聚合酶来复制得到双链的方法, 这不仅大大节省了用于化学合成的消耗, 而且也节省了纯化学合成DNA片段的时间。Itakura^[11,12]和Brousseau^[13]在1982年就曾分别提出和尝试了以两个合成片段的3'末端互补并互为模板, 用DNA聚合酶延伸得到双链的方法。我国的汤锦炎实验室^[14], 郭礼和实验室和胡美浩实验室(未发表结果)也曾利用这和方法来合38到67聚的双链。本文以天花粉胰蛋白酶抑制剂-1(TTI-1)的第3位赖氨酸取代物(Lys3-TTI-1)基因合成为例, 报道另一种以单链自身3'末端互补, 利用DNA聚合酶制备基因双链的合成方法。

实验和结果

(一) 材料

1. 质粒和菌株: 克隆质粒为pUC19, 受体菌 *E. coli* TG1 由上海药物研究所杨胜利先生赠送。

2. 培养基: LB培养基为每升含酵母提取粉5g, 胰胨和氯化钠各10g, pH7.5。平板培养基每升另加15g琼脂粉, 筛选用平板培养基含苄青霉素、X-gal和IPTG各50μg/ml。

3. 试剂: 四种脱氧核苷的氰乙基亚磷酸胺单体和保护脱氧核苷-CPG固相载体均为 Beck-

man公司产品。无水乙醇、无水二氯甲烷、无水四氢呋喃、无水2,6-二甲基吡啶和无水乙酸酐等按前文方法制备^[15]。酵母提取粉和胰胨为Oxoid产品。琼脂粉为日本进口。X-gal和IPTG为Sigma公司产品。 γ -³²P-ATP为Amersham公司产品。

4. 酶类: Klenow酶、T4 DNA连接酶、HindⅢ和BamHⅠ均为Boehringer公司产品, T4-多核苷酸激酶为本实验室自制。

(二) Lys3-天花粉胰蛋白酶抑制剂(Lys3-TTI-1)基因的合成

1. 基因顺序的设计: TTI-1是一含有3对二硫键的27肽, 其氨基酸顺序最近刚被阐明^[16], 按照该顺序化学合成的27肽也具有完全的活性^[17]。当抑制剂与胰蛋白酶作用后, 一方面胰蛋白酶的活性被抑制, 另一方面此抑制剂的Arg3-Ile4之间的肽链也大部分被切断, 成为被修饰的抑制剂, 因此本文研究的目的即试图在基因水平上将第三位的Arg用Lys取代, 以观察表达产物Lys3-TTI-1的抑制活性是否保持, 以及对修饰的稳定性是否增强。合成基因的核苷酸顺序见图1。它的设计考虑到以下几点(1)采用了在酵母中偏爱的氨基酸密码子^[18], 以期望基因在酵母体系中表达时能得到较好的产率; (2)在5'端设计有HindⅢ酶切位点和起始密码子ATG, 在3'端设计有BamHⅠ酶切位点和连续的两个终止密码子TAG和TAA; (3)为了便于下面谈到的用合成的单链经聚合酶延伸得到互补的双链并易于被限制酶酶切得到两端的粘性末端, 在BamHⅠ切点的外侧多设计了两个核苷酸, 而在基

本文于1989年8月3日收到。

5 10
CysProLysIleLeuMetProCysLysValAsnAspAspCys

ATAAGCTTATATGTGTCCAAAAATCTTGATGCCATGTAAGGTTAACGACGACTGT
TATTCGAATATAACACAGGTTTTTAGAACTACGGTACATTCCAATTGCTGCTGACA

Hind III

15 20 25 27
LeuArgGlyCysLysCysLeuSerAsnGlyTyrCysGly

TTGAGAGGTTGTAAGTGTGTTGTCCAACGGTTACTGTGGTTAGTAAGGATCCGG
AACTCTCCAACATTCACAAACAGGTTGCCAATGACACCAATCAITCCTAGGCC

图1 合成的Lys3-TTI-I基因的核苷酸顺序
Fig. 1 Nucleotide sequence of Synthetic Lys3-TTI-I gene

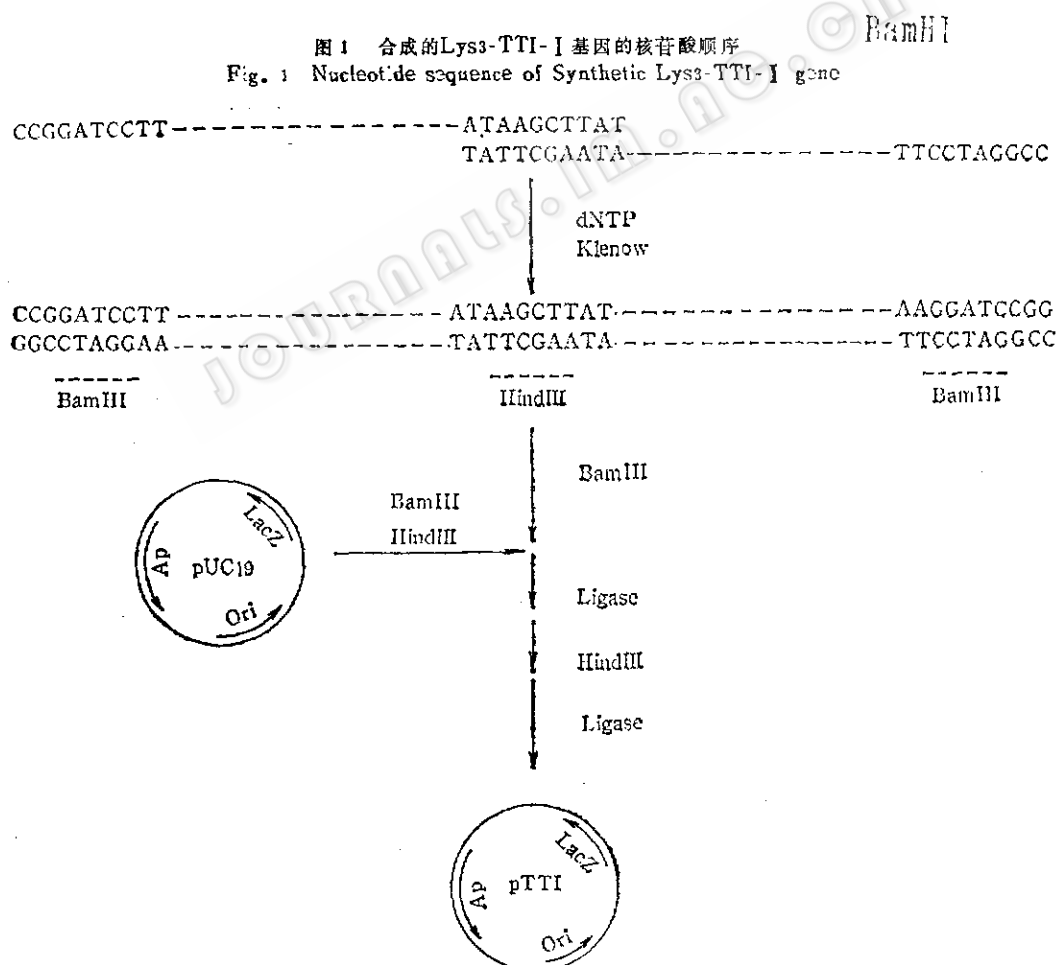


图2 Lys3-TTI-I 基因的酶促双链合成和克隆
Fig. 2 Mutually primed synthesis of Lys3-TTI-I gene homoduplex and its cloning

因下链的3'末端则有一个自身互补的10个核苷酸顺序。

2. Lys3-TTI- I 基因下链的化学合成: 基因下链的化学合成是用亚磷酸胺法, 在ABI公司380A型DNA自动合成仪上进行的。原料为4种全保护的氰乙基亚磷酸胺单体, 用0.3 μ mol起始核苷T的CPG柱, 经过107轮连续循环, 最后的总产率按切落的双对甲氧基三苯甲基浓度测定计算约为10%, 即每次连接的平均产率约为98%。合成结束后, 用浓氨水将寡核苷酸链从树脂上切下, 并洗脱去全部的保护基, 冻干后再经葡聚糖凝胶G-50柱除去小分子的杂质。根据紫外吸收(260nm)收集产物峰, 所得的粗产物即可直接用于以后的聚合酶反应。

3. Lys3-TTI- I 基因双链的合成与克隆: 取上述合成的DNA混合片段200pmol, 于70℃水浴加热5min, 缓慢冷却至20℃, 然后加入反应缓冲液, 使反应液中含有200mmol/L Tris-HCl, pH8, 2mmol/L DTT, 10mmol/L MgCl₂·7H₂O, 0.5mmol/L dNTP, 1mmol/L ATP, 0.1mg/ml牛血清白蛋白, 再加10单位的DNA聚合酶大片段(Klenow), 反应总体积20 μ l, 16℃聚合反应过夜。反应得到的DNA双链片段经BamHI单酶切后与经HindIII和BamHI双酶切处理后的质粒pUC19连接, 4℃反应过夜。然后将此连接产物再经HindIII酶切后进行连接反应。重组质粒的构建过程见图2。

4. Lys3-TTI- I 重组质粒的筛选和DNA序列测定: 将以上连接后的重组DNA加入到100 μ l经氯化钙处理过的大肠杆菌TG1感受态细胞中。在0℃水浴中30min, 然后42℃处理2min, 再加LB培养液500 μ l, 37℃保温60min, 然后再涂布在含X-gal、IPTG和Amp的培养板上进行筛选, 经37℃保温过夜培养后, 得到白色菌落即重组子约10%。随机挑取12个白色单菌落经3ml LB扩增培养后, 抽提重组质粒DNA, 然后以合成的单链片段(108聚)作为探针, 进行点杂交, 除一个克隆外, 其余的均为杂交阳性克隆。最后采用5'端标记引物的双脱氧终止法^[18]对其中

一个杂交阳性克隆进行DNA序列测定, 得到的结果与此基因的设计要求完全相符。

讨 论

本文介绍的方法对于合成30肽左右的多肽基因来说是一个值得采用的方法。本方法的基本要点如下: (1)在合成片段的5'端和3'端各有一个限制酶识别顺序, 以便在聚合酶反应完成后将二聚体双链切开; (2)合成片段的3'末端要有一个足够长度的自身互补顺序, 一般不小于8个碱基的自身互补配对; (3)要求在片段的化学合成过程中, 每一轮的连接都具有高的连接产率, 连接产率越高, 本方法所能达到的基因长度越长; (4)如果合成反应比较成功, 合成片段也可以经过纯化后再进行聚合酶延伸反应, 但如果合成反应不是非常理想时, 则往往在聚丙烯酰胺凝胶电泳后产物带的分辨比较困难, 这时采用直接进行聚合酶反应。可能会绕过这一困难。这是因为合成产物经聚合酶反应可能得到如图3所示的三种类型双链。I型为两个全长的(108聚)二聚体双链DNA片段; II型为一个全长的和一个5'末端缺失的二聚体双链片段; III型为两个5'末端缺失的二聚体双链片段。其中绝大多数是II型, I型次之, I型最少。只有I、II两种类型的双链才能被E1酶切。因此先将双链产物用E1酶切并同质粒的E1末端连接, 然后除去III型双链, 然后再用E2酶切产生E2末端。最后进行质粒的环化和转化面得到克隆基因。

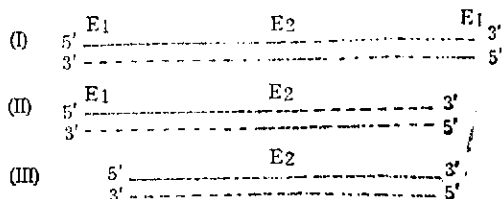


图3 未纯化的合成单链经聚合酶延伸反应后的各类双链DNA片段

Fig. 3 Three types of double-stranded DNA formed by mutually primed synthesis with unpurified synthetic oligonucleotide

参 考 文 献

[1] Edge, N.D. et al.; *Nature*, 292: 756-762, 1981.

- [2] Edge, M.D. et al., *Nucleic Acids Res.*, 11: 6419—6435, 1983.
- [3] Ferretti, I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83: 599—603, 1986.
- [4] Bell, L.D. et al., *Gene*, 63: 155—163, 1988.
- [5] Itakura, K. et al., *Science*, 198: 1058—1063, 1977.
- [6] Crea et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5765—5769, 1978.
- [7] Goeddel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 106—110, 1979.
- [8] Batchikova, N.Y. et al., *Bioorganic Chem(USSR)*, 14: 621—630, 1988.
- [9] Urdea, M.S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 7461—7465, 1983.
- [10] Khorana, H.G., *Science*, 203: 614—625, 1979.
- [11] Itakura, K., *Trends in Biochemical Sciences*, pp. 442—445, 1982.
- [12] John J. Rossi et al., *J. Biol. Chem.*, 257: 9226—9229, 1982.
- [13] Brousseau, R. et al., *Gene*, 17: 279—289, 1982.
- [14] 曹义祥等, 生物工程学报, 4(4):292—297, 1988.
- [15] 汤锦炎等, 中国科学B辑, (12): 1105, 1983.
- [16] 钱岳伟等, 中国科学B辑, (9):934—939, 1989.
- [17] Bennetzen, J.L. and Hall, B.D., *J. Biol. Chem.*, 257: 3026—3031, 1982.
- [18] 蒋志伟 等, 生物化学与生物物理学报, 20: 218—222, 1988.

A Rapid and Simple Method for the Synthesis of Peptide Gene

Gan Keda Chen Changqing

(Shanghai Centre of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai)

A rapid and simple method for the synthesis of peptide gene was described through the synthesis of Lys3-trichosanthes trypsin inhibitor-I (Lys3-TTI-I) gene as an example. The TTI-I is a new trypsin inhibitor purified from *Trichosanthes* and composed of 27 amino acid residues with three pairs of disulfide bonds. A 108 nucleotide fragment was synthesized by a DNA synthesizer. This synthetic 108 mer is negative strand of Lys3-TTI-I gene including the coding region, the initiation codon ATG and the double stop codon TAG TAA. It also has a BamHI recognition sequence on the 5' end and a 10-nucleotide palindromic sequence encompassing a HindIII cleavage site on the 3' end, so that it can be directly converted to double-stranded homoduplex form by mutually primed extension with Klenow fragment. The double-stranded homoduplex was successively cleaved by BamHI and HindIII and then cloned into plasmid pUC19. Finally, through screening bacterial colonies the cloned gene was obtained and the DNA sequence was proved to be correct by dideoxy DNA sequencing with 5'-labeled oligonucleotide primers.

Key words

Gene synthesis, *Trichosanthes* trypsin inhibitor gene; mutually primed extension