

天蚕抗菌肽B基因的化学合成及克隆

谢毅 闵永洁 贾士荣¹ 唐惕² 冯兰香³ 王启松

(复旦大学遗传所, 上海)

用化学合成法, 我们设计、合成了一个以植物偏爱的遗传密码子编码的天蚕抗菌肽B基因。通过将该基因与M13mp19噬菌体载体重组、克隆; 转化大肠杆菌JM103, 杂交检测和序列测定, 得到二个与设计一致的克隆。

关键词 抗菌肽B基因; 化学合成; 克隆

抗菌肽是天蚕体内免疫系统的一种多肽, 具有很强的体内、体外杀菌作用, 且杀菌是广谱的^[1]。用基因工程手段将抗菌肽基因导入植物体内进行表达, 可望用抗菌肽杀死侵入到植物体内的病菌, 建立高效抗菌的植株, 有效地防治象马铃薯青枯病这一类由细菌导致的植物病害^[2]。

在自然界中, 各物种对遗传密码子的偏爱性是有差异的, 这种差异在生物的不同界的物种间更明显, 这对物种间基因工程的应用不利。考虑到天蚕与植物对遗传密码子的偏爱性不同, 我们利用化学合成灵活的优点, 选用植物偏爱的密码子编码设计了天蚕抗菌肽B基因, 该基因含结构基因和便于基因工程操纵的3'、5'端限制酶位点, 共153碱基对。通过将该基因分段化学合成、拼接, 再与M13噬菌体载体重组、克隆、打点杂交筛选, 我们得到了二个重组阳性克隆即M13mp19/AB-2和M13mp19/AB-5。对克隆序列检测证明, 所得基因与我们设计的完全一致。

材料与 方法

(一) 料材

1. 载体及宿主菌: M13mp19噬菌

体载体由本实验室制备; 大肠杆菌JM103为本实验室保存菌种。

2. 试剂及酶: 合成DNA寡聚核苷酸片段所用溶剂及试剂为美国Applied Biosystem公司产品; γ -³²P-ATP及 α -³²P-dATP为美国Amasham公司产品; 限制酶EcoR I、T4-DNA连接酶为华美生物工程公司产品; DNA序列测定药盒为美国Biolabs公司产品; T4DNA聚合酶I、T4DNA多聚核苷酸激酶为西德Boehringer-mannheim公司产品; 5-溴-4-氯-3-吡啶-D半乳糖苷(X-gal)、异丙基硫代 β -D-半乳糖苷(IPTG)为美国Sigma公司产品。

所用酶反应条件均采用“Molecular Cloning”书中所推荐的条件。

(二) 方法

1. 合成设计: 我们采用植物偏爱的遗传密码子^[3], 对天蚕抗菌肽B的36个氨基酸残基编码, 并在结构基因的3'、5'端分别引入基因工程操作所需限制酶切点(见图1)。为方便化学合成及基因拼接, 我们将基因分成交错相搭的10个寡聚核苷

本文于1989年1月3日收到。

1. 中国农业科学院生物工程中心, 北京。
2. 中国科学院植物生理研究所, 上海。
3. 中国农业科学院蔬菜研究所, 北京。

酸片段, 分别进行合成。

2. 寡聚核苷酸片段的合成: 寡聚核苷酸片段用固相亚磷酸法^[5]在 ABI-380-A型DNA合成仪(美国Applied Biosystem公司产品)上合成。所用脱氧核苷酸单体是保护核苷的氰乙基(CNCH₂CH₂-)亚磷酸二异丙胺, 其碱基嘌呤环和嘧啶环上的氨基保护基团: A和C为苯甲酰基; G为异丁酰基。

3. 寡聚核苷酸片段的分离、纯化、检测: 用浓氨水作用载有合成的寡聚核苷酸片段的硅胶柱, 把寡聚核苷酸片段解脱下来, 同时去除寡聚核苷酸片段上的保护基团。氨解好的样品经冰冻干燥, 再经16%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电泳完毕后将胶取下, 铺在荧光板上, 在紫外光照射下, 将样品切下, 在37℃下泡在0.5mol/L NaCl溶液中过夜。浸泡液上 C18反相柱, 脱盐、纯化。

纯化的寡聚核苷酸片段在 T4 多聚核苷酸激酶作用下, 以 γ -³²P-ATP 为磷源进行同位素标记, 取十分之一样品进行 16% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 放射自显影检测。

4. 基因的拼接: 除两个5'端片段F-1、F-6外, 其余已标记的片段在过量ATP的条件下, 加T4多聚核苷酸激酶充分磷酸化。将所有10个寡聚核苷酸片段等摩尔数混合, 退火, 加T4 DNA连接酶连接缺口。连接基因经8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 放射自显影, 再根据自显影条带从胶中切下基因样品, 在37℃下将切下样品浸泡于0.5mol/L NaCl溶液中过夜。浸泡液上 C18 反相柱脱盐、纯化。用60%甲醇将DNA洗下, 冰冻干燥。干燥的基因样品用T4多聚核苷酸激酶磷酸化。

5. 基因的克隆、转化: 用限制酶EcoR I 水解 M13mp19 载体, 再将切好的

载体与磷酸化的基因混合, 加T4 DNA连接酶连接缺口。按Messing, J^[8]的方法, 转化大肠杆菌JM103, 转化菌在含X-gal和IPTG的半固体培养基中培养, 37℃过夜。

6. Dot blot 杂交: 取出培养过夜的转化样品, 挑取无色噬菌斑感染JM103进行培养, 取培养液上清点于硝酸纤维素膜上。以³²P标记的F-1、F-6为探针进行杂交, 放射自显影检测。具体方法见文献[9]。

7. 序列测定: 取杂交阳性噬菌体上清感染JM103进行培养, 按Messing, J.^[8]的方法提取单链模板, 用双脱氧法测定基因序列。

结果与讨论

(一) 基因设计

设计的基因序列见图 1A。我们设计的基因, 其结构基因部分长度为 108 碱基对。5'端设计了EcoR I、Hind III、Bgl II、Hpa I 4个限制酶位点, 另外还加了一个起始位点ATG。在结构基因的3'端设计了Hpa I、BamH I、EcoR I, 3个限制酶位点, 另外加了两个终止位点TAG、TAA。按照我们这样的设计, 可以使其在以下两种情况下表达: 一是, 如果用Hpa I酶切出抗菌肽B基因, 这个基因就可以插入表达载体上编码基因中进行表达, 表达出的产物为抗菌肽B与其它蛋白质连在一起的融合蛋白; 二是用其它酶切下的基因插入表达载体的表达操纵子之后进行表达, 产物则是抗菌肽B本身。在基因设计中, 考虑到直接用昆虫体内提取的基因在植物体内表达时, 可能会由于昆虫和植物对遗传密码子的偏爱不同, 使基因的表达效率受到影响, 故我们选用植物偏爱的密码子编码天蚕抗菌肽B基因^[3], 为下一步

表达工作创造有利条件。

在化学合成反应中，每一步反应的效率都不可能是一百，这就限制了寡聚核苷酸的允许合成长度。因此，我们必需把基因分成若干小片段分别合成。在我们的实验中，我们把整个基因按图1B，分成 F-1, F-2, F-3, F-4, F-5, F-6, F-7, F-8, F-9, F-10 10个片段进行合成。

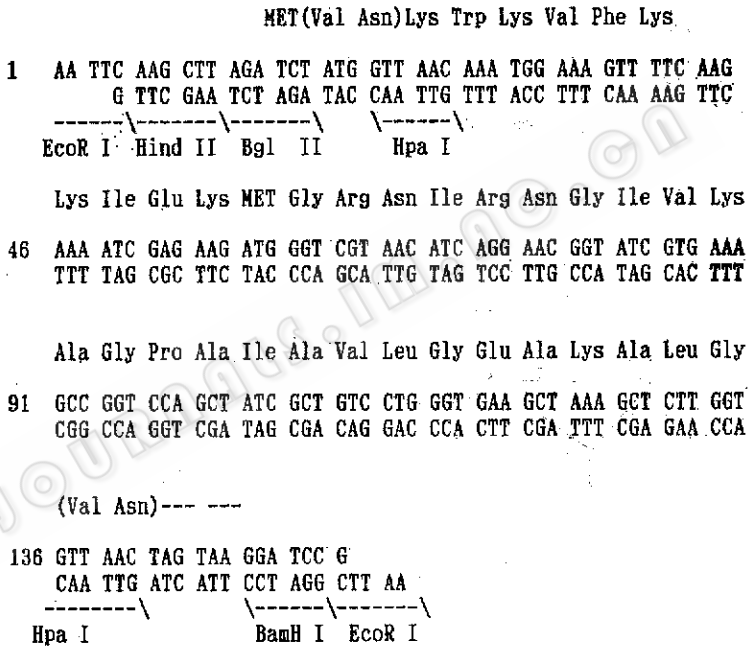
(二)片段的分离、纯化

由于化学合成的效率问题，我们得到

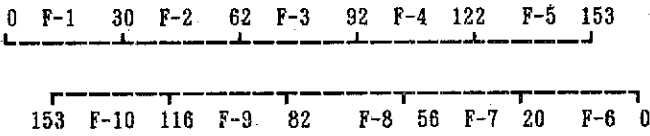
的粗产品中，必然有许多中途中止反应的寡聚核苷酸副产品，这些副产品会严重影响以后的基因拼接，故必须把合成的粗产品进行分离纯化。本实验中，10个寡聚核苷酸片段经分离纯化，放射自显影检测，证明全部样品在16%聚丙烯酰胺电泳变性胶中电泳呈单条带。样品纯度达到实验要求。

(三)基因的拼接及纯化

纯化好的片段等摩尔数混合，退火，



A



B

图1 基因的设计

Fig.1 The dissignation of the gene

A. 设计的基因全序列图
The designed sequences of a gene for cecropin B

B. 基因分段合成示意图。F-1, F-2, ……为小片段编号
The gene is divided into 10 fragments for chemically synthesizing.
F-1, F-2, …… show the fragments respectively

连接,进行12%聚丙烯酰胺凝胶电泳,放射自显影检测,结果见图版 I -A。从图可知,基因连接率约为 5%。在连接反应液内,没有连成基因的寡聚核苷酸片段含有 EcoR I 酶切位点,这些位点将与基因竞争克隆载体,干扰下一步的基因克隆。因此必须对基因连接产物进行分离、纯化。用电泳分离出连接好的基因,通过 C18柱进行纯化。这些步骤有利于提高基因克隆的效率。

(四)基因的克隆及筛选

基因拼接纯化后,经磷酸化处理,再与 M13mp19 噬菌体载体连接,形成重组 DNA(见图 2)。用重组 DNA 转化大肠杆

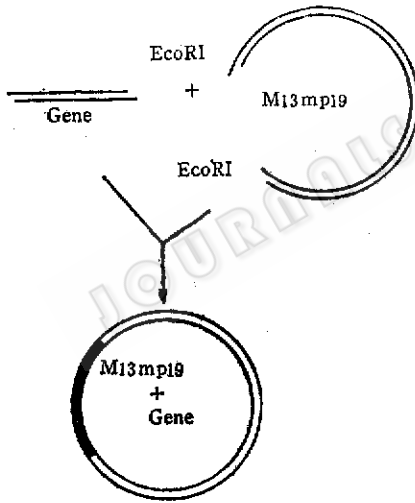


图 2 天蚕抗菌肽 B 基因克隆示意图

Fig.2 The cloning of the gene for cecropin B

菌 JM103, 转化菌置入含显色剂 X-gal 的培养基中培养。野生型的噬菌体编码有一个 β -半乳糖苷酶亚基基因, 其产物与宿主菌 JM103 中另一个 β -半乳糖苷酶亚基互补, 作用于 X-gal, 产生蓝色物质, 使野生型 M13mp19 噬菌斑呈蓝色。在重组噬菌体中, 外来基因插入到其半乳糖苷酶基因

中, 破坏了该基因的蛋白产物, 故重组噬菌体形成的噬菌斑是无色的。我们从转化出的无色噬菌斑中挑取了 12 个斑, 分别感染宿主菌 JM103 进行培养。用 Dot blotting 杂交检测, 结果见图 3。2、5 两个样品为杂交阳性, 命名为 M13mp19/AB-2, M13mp19/AB-5。用限制酶 EcoR I 切两个阳性样品的双链 DNA, 经 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 结果见图版 I -C。克隆

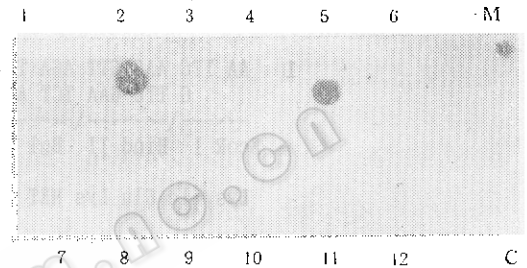


图 3 Dot blot 杂交

Fig.3 Dot Blotting assay 12 colorless plaques were picked up. Then hybridized with the Dotblotting assay. The sample 2 and 5 show the positive results. C, stands for a control; M, for the marker

中酶切下的基因片段大小与设计的一致。由于化学合成的基因在克隆过程中, 常有序列发生突变及被宿主修饰的情况, 所以必须对克隆基因的序列进行检测。

(五)序列测定

提取 M13mp19/AB-2、M13mp19/AB-5 的单链 DNA 作模板, 用 DNA 双脱氧法测序结果证明 M13mp19/AB-2 及 M13mp19/AB-5 中克隆的天蚕抗菌肽 B 基因序列与设计的完全一致, 前者为正向克隆, 后者为反向克隆, 图版 I -B 显示了测定出的 M13mp19/AB-2 中克隆的基因的测序结果。

参 考 文 献

- [1] 唐向辉, 屈贤铭: 生物化学与生物物理进展, (3): 8—12, 1986.
 [2] 罗宗爵: 作物病理学, 台湾商务印馆, 1970.
 [3] Takeo, M. et al.: *Nucleic Acids Research*, 14(1)151—197, supplement, 1986.
 [4] Boman, H. G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(8):2240—2243.
 [5] Wetzell, R. et al.: *Biochemistry*, 19:6098, 1980.
 [6] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
 [7] 施文等: 科技通报, 3(3):49—51, 1987.
 [8] Messing, J.: *Methods in Enzymology*, Vol. 101, Academic Press, pp.20—78, 1983.
 [9] 施文等: 科技通报, 30(20):1583—1585, 1988.

CHEMICAL SYNTHESIS AND CLONING OF A GENE FOR CECROPIN B

Xie Yi Min Yongjie Jia Shirong, Tang Ti,
Feng Lanxian Wang Qisong

(*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai*)

The cecropin B is one sort of peptides existing in the body of *Hyalophra cecropin*. It can kill bacterial. We have attempted to transform such a gene to plants. A 153 bp DNA encoding cecropin B and containing appreciate restriction enzyme sites for plasmid insertion, stop codon at 3' end was chemical synthesized. The synthesis involved the preparation of 10 oligonucleotides and enzymatic ligation. After a ligation of synthetic gene to phage vector M13 mp19 and transformation to JM103 strain, the clones containing the anticipated gene sequence was obtained by hybridization. The accuracy of sequence was confirmed by DNA sequencing.

Key words

Cecropin B gene; chemical synthesis; cloning

图版说明 Explanation of plate I

A. The autoradiography of the synthetic gene: Electrophoresis of synthetic gene on the 12% polyacrylamide gel, autoradiography at -70°C . a, The band of assembled gene, bellow the band is the uncompleted assembled gene; b, standard molecular weight marker (tRNA) which can be seen under UV light

B. The sequence analysis of the gene inserted in the M13mp19/AB-2

C. Check the M13mp19/AB-2, M13mp19/AB-5 by restrict enzyme. The arrow shows the the band of the cecropin B gene

