

葡激酶基因的初级克隆和表达

王家驹 司穰东 戈宝榛 朱素娟

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

葡激酶(Staphylokinase)是由金黄色葡萄球菌产生的胞外酶,它类似尿激酶(Urokinase)和链激酶(Streptokinase),有可能作为治疗血栓的药物。为了进一步开展对葡激酶溶原转换的基础工作和应用的研究,我们进行了葡激酶基因的克隆现报道如下:

材料和方法

(一) 材料

1. 菌种:金黄色葡萄球菌 1157、1157(α) 见文献[1],大肠杆菌C600(thr^- , leu^- , B1)为本实验室保种

2. 培养基和培养条件:参照文献[1]。

3. 主要生化试剂:限制酶系 Boehringer Mannheim公司产品, T4连接酶系BRL产品。

(二) 实验方法

1. 供体DNA制备:溶原菌 1577(α)经丝裂霉素C诱导得噬菌体 α ,其血清型为F,按文献[2]抽取其DNA。

2. 载体及其连接:以质粒 pBR322 为载体,经限制酶 Hind III 酶切和 Hind III 酶切的 α DNA混合,鸟枪法连接,参照文献[2]转化到大肠杆菌C600感受态细胞中。

3. 杂种质粒筛选:选取对四环素(Tc)敏感的,氨苄青霉素(Ap)抗性转化子,进一步检查葡激酶产生能力。

4. 葡激酶活性检查:将转化子接种到含人血浆平板上[3],37℃培养过夜,观察待检菌落周围的溶解血纤维蛋白的透明圈。

5. 转化子质粒抽提:参照文献[2]。

结果和讨论

(一) 葡激酶溶原性转换噬菌体 α DNA 的酶切

噬菌体 α DNA经不同限制酶酶切后,电泳分离,其主要带如图版 I-A所示,经 Acc I 酶切

有10条片段带, Ava I 有9条, EcoR I 有12条, Hae III 有5条和Hind III 有10条。

(二) 酶切片段和质粒pBR322连接转化

α DNA经限制酶Hind III 酶切后和用Hind III 酶切的质粒 pBR322连接(见材料和方法)置冰箱 16h, 取样电泳观察连接效果。经连接,质粒pBR322 载体分子量增加了。连接物转化到感受态大肠杆菌C600中,以含氨苄青霉素平板(终浓度为 50 μ g/ml)为筛选平板,选取对 Ap 抗性,对Tc敏感的转化子,进一步作葡激酶(SaK)活性检查。

(三) 转化子质粒提取及鉴定

快速法提取转化子的质粒,电泳表明有三种杂种质粒其分子量有不同程度地增加(图版 I-B),将提取的杂种质粒经 Hind III 酶切电泳,和 α DNA 酶切电泳比较(图版 I-C),杂种质粒经酶切后出现两条核酸带,一条为原有质粒pBR322的,另一条增加的为供体DNA连接上的片段带,从对照Hind III 酶切的 α DNA 电泳图型,表明其连接上的杂种质粒是 α DNA Hind III 酶切的第3、5、7片段。

(四) 转化子的葡激酶活力检查

三株含有 α DNA Hind III 酶切3、5和7片段带的杂种子,和另一株 pBR322转化子,直接接种于人血浆平板或接种于有利葡激酶产生的液体培养基中,37℃摇床培养过夜,取0.2ml置于人血浆平板上的牛津杯中,保温过夜,次日观察溶解血纤维蛋白的透明圈(见图1),表明含有Hind III 酶切 α DNA 第5片段的转化子,具有表达 SaK 活力,其分子量相当于 2.8kb。葡激酶分子量据文献报道[4]为 13000—15000道尔顿,因此我们所克隆到的 DNA 片段还有一部分是载体基因组的邻近部位,尚需进一步分离和纯化。

本文于1990年7月16日收到,

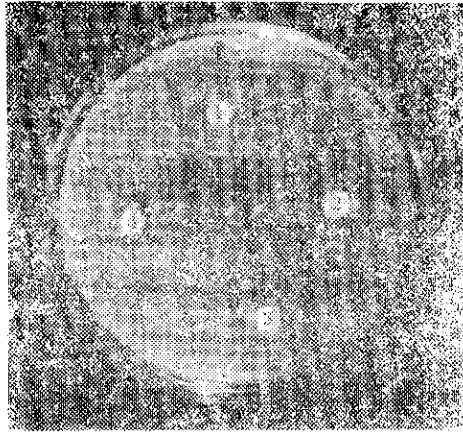


图 1 热处理的人血浆平板观察溶血纤维蛋白作用

1. 转化子 I (质粒含 α DNA Hind III-7)
2. 转化子 II (质粒含 α DNA Hind III-3)
3. 质粒 pBR322 的转化子
4. 转化子 III (质粒含 α DNA Hind III-5)

参 考 文 献

- [1] 王家驹等, 病毒学报, 7:65, 1985.
- [2] Maniatis, I. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Laboratory, p.75, 1982.
- [3] Kondo, I. et al., Infect. Immun., 18:266, 1977.
- [4] Daniel, L.K. & Reddy, K.N.N., Fibrinolysis, CRC press p.34, 1980.

Primary Cloning and Expression of the Staphylokinase Gene

Wang Jiaxun Shi Zhidong Ge Baozhen Zhu Sujuan

(Laboratory of Bacteriophage, Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

Staphylokinase (Sak) gene from DNA of lysogenic conversion phage α has been cloned using vector pBR322 plasmid which had been digested with Hind III. The transformant obtained the ability to produce Sak. DNA was extracted from recombinants and digested with Hind III, it was found by agarose gel electrophoresis that the Sak gene was located on the 2.8 kb. Hind III digestion fragment of α DNA.

Key words

Primary cloning; staphylokinase gene