

ST-Ⅱ 信号肽基因的化学合成及克隆

静国忠 张广法 蒋美岩 刘利军

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

外源基因在原核细胞中的分泌表达仍然是很活跃的研究领域。Fujimoto 等^[1]系统地分析比较了大肠杆菌内毒素 ST-Ⅰ、ST-Ⅱ、LT-A、LT-B 信号肽在人表皮生长因子(hEGF)分泌表达中的作用指出, 由 ST-Ⅱ 信号肽组成的表达载体在大肠杆菌中能精确加工并使 hEGF 这样小的多肽成功地分泌到细胞周质及培养基中, 避免了细胞内蛋白水解酶对这种没有十分稳定构象的肽链的破坏。从这个角度讲, 带有 ST-Ⅱ 信号肽的载体可能是分泌表达一些分子量较小的多肽的好载体。为此, 我们根据 ST-Ⅱ 信号肽的氨基酸顺序合成并克隆了 ST-Ⅱ 信号肽基因。

材料与 方法

(一) 菌株、质粒及试剂

大肠杆菌 HB101 (F⁻ hsdS20, recA, ara, proA, lacY, galK, rpsL20, xyl, mtl, supE A⁻) 作为受体菌; 质粒 pBR322 作为载体; 限制酶 BamH I、Pvu I、Xho I、Kpn I、T4DNA 连接酶和 T4 多核苷酸激酶均为 BioLabs 产品, 反应条件按产品要求进行。所有的寡核苷酸合成试剂购于 ABI 公司; 氢氧化铵(25—28%) 购于北京化工厂。DNA 顺序分析试剂盒购于 BioLabs。

(二) ST-Ⅱ 信号肽基因的设计

1. 按 Sharp 等^[2]遗传密码使用频率, 对 ST-Ⅱ 信号肽的 23 个氨基酸编码的密码子尽量采用在大肠杆菌中的最佳编码。

2. 在 ST-Ⅱ 信号肽基因的 5'-端加上 BamH I 识别位点, 在其 3'-端加上 Xho I 识别位点, 当信号肽基因同 pBR322 的 BamH I -Pvu I 大片重组后产生一个独特的 Kpn I 识别位点。

3. 在 ST-Ⅱ 信号肽基因的 3'-端, 设计了 GCGC 顺序(其中 GCG 是 ST-Ⅱ 信号肽最后一个氨基酸丙氨酸的密码子), 此顺序是 Hha I /Hinc

I 的识别位点, 当用 Hha I 或 Hinc I 酶解时, 在信号肽基因的 3'-端可以分别产生 3'-突出和 5'突出的粘末端。

(三) 寡核苷酸片段的合成及纯化

将为 23 个氨基酸编码的 ST-Ⅱ 信号肽基因分成四条寡核苷酸片段: S₁, 42mer d(GATCC-ATGAAAAAAAAACAT CGCTTTCCTGCTG-GCTTCTATGT); S₂, 42mer d(TCGTTTTC-TCTATCGCTACCAACGC TTACGCGCTCG-AGGTAC); S₃, 43mer d(AACGAACATAG-AAGCCAGCAGGAAAGCGAT GTTTTTTT-TCATG); S₄, 37mer d(GTACCTCGAGCG-CGTAAGCGTTGGTAGCGATAGAGAA)。S₁ 与 S₃, S₂ 与 S₄ 互补, 两对顺序间有 5 个碱基的重叠。pBR 322 BamH I 顺时针顺序分析引物, 20mer d(CACTATCGACTACGCGATC-A)。所有的寡核苷酸片段都是用 ABI381A DNA 合成仪合成。寡核苷酸片段用氢氧化铵一步处理(55℃, 保温 17—24h) 从 CPG 支持介质上切下并去除保护基, 然后用含 7mol/L 尿素的 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Sephadex G25 凝胶进行纯化, 其纯度经 [γ -³²P]ATP 标记后进行 DNA 顺序胶电泳, 放射自显影来检测。

(四) pST-Ⅱ 重组质粒的构建

1. ST-Ⅱ 信号肽基因片段的磷酸化及退火, 磷酸化反应总体积为 30 μ l, 含 S₁、S₂、S₃、S₄ 各 1 μ g, 反应体系为 70mmol/L Tris-HCl pH7.8, 10mmol/L MgCl₂, 5mmol/L DTT, 1mmol/L ATP, T4 多核苷酸激酶 10 单位, 37℃ 保温 60min。将反应混合物加热到 90℃, 然后使其在水浴中慢慢冷却至 15℃ 退火。退火产物 S 可直接放 -20℃ 或经乙醇沉淀保存备用。

本文于 1990 年 2 月 16 日收到,

2. 载体 DNA 片段的制备：pBR 322 质粒 DNA 经 BamH I, Pvu II 限制酶酶解后, 用低熔点琼脂糖电泳法^[3]分离 pBR 322 BamH I -Pvu II 2672 bp 大片段。

3. DNA 重组与转化：连接反应总体积为 20μl, 含 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.8, 10 mmol/L MgCl₂, 20mmol/L DTT, 1 mmol/L ATP, 退火产物 S (即 S₁、S₂、S₃、S₄ 各 0.4μg) 1.6μg, pBR322 BamH I -Pvu II 大片段 1.6μg, T4 DNA 连接酶 400 单位。16℃ 保温 8 h。重组 DNA 的转化按 Maniatis 等^[4]的方法进行, 大肠杆菌 HB101 作为受体菌, Amp^r Tc^r 的克隆作为阳性克隆被筛选, 然后用快速裂解法^[3]制备重组质粒对阳性克隆进一步筛选。

4. pST-Ⅰ 重组质粒的限制酶酶解及 ST-Ⅰ 信号肽基因的顺序分析：pST-Ⅰ 重组质粒 DNA 按 Davis 等人法^[5]分离纯化后, 分别用 BamH I、Xho I, Kpn I 酶解, 酶解产物在 1.2% 琼脂

糖凝胶上进行电泳分析。pST-Ⅰ 的 BamH I、Kpn I 双酶解产物在 5% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分析。ST-Ⅰ 信号肽基因的顺序分析, 以 pBR322 BamH I 顺时针引物为引物按照 BioLabs 所提供的方法^[6]进行。

结果与讨论

(一) 利用固相化学合成法合成了大肠杆菌热稳定内毒素 ST-Ⅰ 信号肽基因。如图 1 所示, ST-Ⅰ 信号肽由 23 个氨基酸组成, 整个基因由 69bp 组成。此基因通过 5'-端的 BamH I 粘末端及 3'-端的平端与 pBR322 BamH I -Pvu II 大片段重组成为 pST-Ⅰ 质粒。整个质粒由 2751bp 组成, 保存有 pBR322 质粒上的新青霉素抗性基因。在信号肽基因的 3' 端产生了 Xho I 及 Kpn I 单一的限制酶位点, 利用 BamH I 和 Kpn I /Xho I 可将完整的信号肽基因片段切下, 用以重组分泌表达载体。

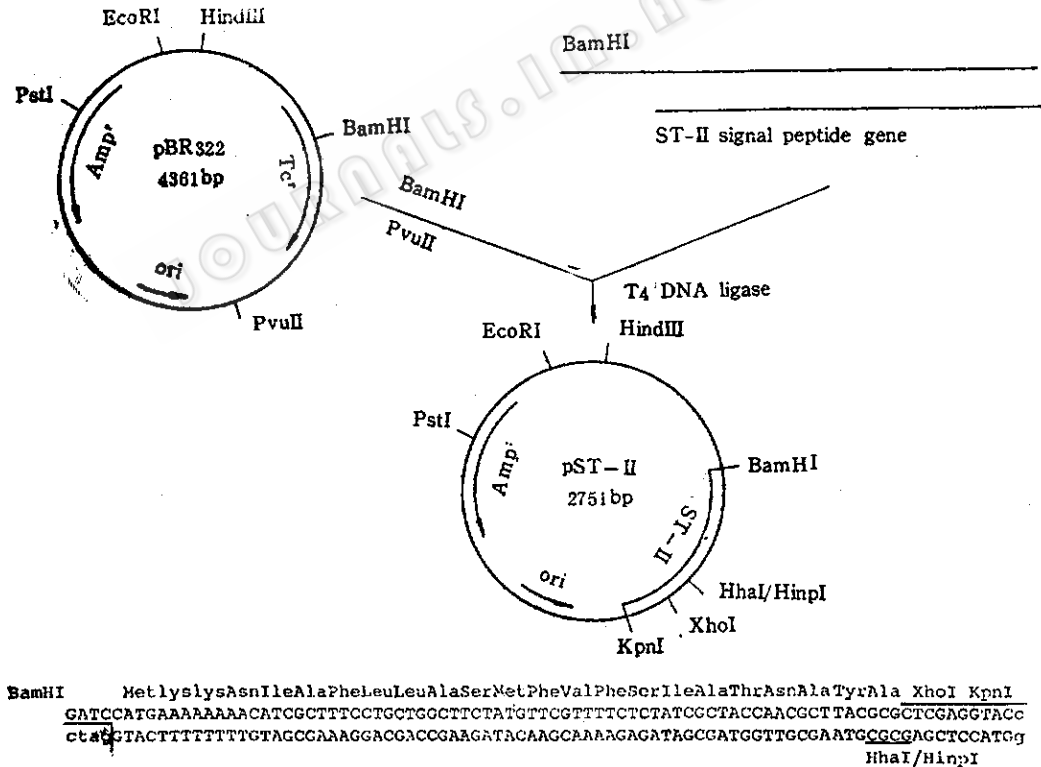


图 1 pST-Ⅰ 质粒的构建和 ST-Ⅰ 信号肽基因的核苷酸顺序

Fig. 1 Construction of pST-Ⅰ plasmid and the sequence of ST-Ⅰ signal peptide gene

(二) 图 1 指出, 在 ST-Ⅰ 信号肽基因的 3'-端设计了 GCGC 顺序。由于 GCG 是信号肽最

后一个氨基酸的密码子, 当用 Hha I 或 Hinp I 限制酶酶解时, 在信号肽基因的 3'-端可分别产生

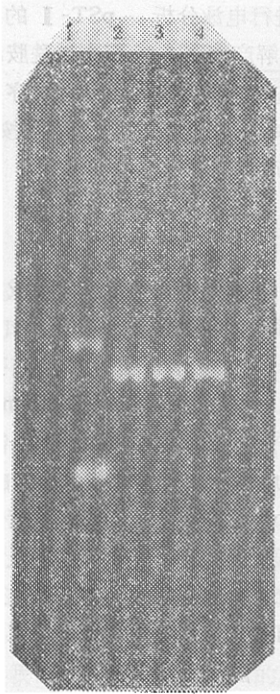


图 2 pST-I 质粒DNA的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.2 Electrophoretic analysis of plasmid pST-I on 1.2% agarose gel

1. pST-I DNA uncut;
2. BamH I ; 3.Xho I ;
4. Kpn I

3'突出 (5'GCG3') 或 5'-突出 (3'CGC5') 的粘

末端, 这样可以使具有相应粘末端的外源目的基因以正确的阅读框重组于 ST-I 信号肽基因的 3'-端。

(三) pST-I 质粒 DNA 的 BamH I、Xho I、Kpn I 的酶切图谱(图 2)指出, 三种限制酶在 pST-I 质粒上都只有一个切点; 由于 ST-I 信号肽基因片段的插入产生了两个新的酶切位点 Xho I、Kpn I, 特别是 Kpn I 位点的出现证明信号肽基因正确地重组于 pBP 322 的 BamH I - Pvu II 大片段中(图 1)。pST-I 重组质粒经 BamH I /Kpn I 双酶酶解后, 经 5% 聚丙烯酰胺

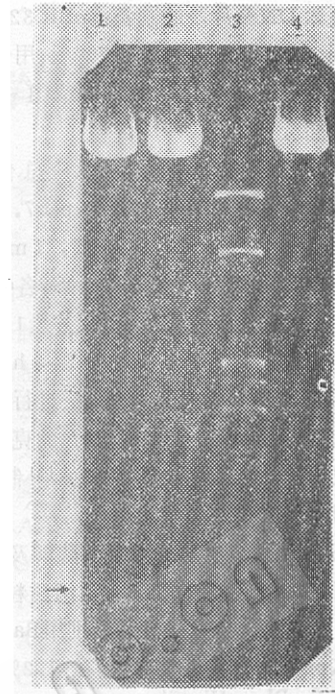


图 3 pST-I 质粒 DNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

Fig.3 Electrophoretic analysis of plasmid pST-I on 5% polyacrylamide gel

1. pST-I DNA cut with BamH I /Kpn I
- 2,4. pST-I DNA uncut
3. Sau 3 A I restricted fragments of pBR322 as molecular weight marker

凝胶电泳后可见有一条 80bp 的带(图 3), 这一结果与顺序分析的结果进一步确定了 ST-I 信号肽基因的顺序同我们的设计的相一致(图 1)。

(四) ST-I 信号肽基因的核苷酸顺序是按照 Sharp 等^[2]关于密码子使用频率的报道而设计, 对信号肽的 23 个氨基酸尽量采用最佳编码, 这一设计将提高与其相连的外源基因表达的效率。

(五) pST-I 重组质粒分子量小, 只有 2751 bp 组成, 便于在 *E. coli* 中得到高拷贝数。BamH I -Kpn I 片段中的 BamH I -Hha I /Hinc II 片段为人们提供了一个重组高效分泌表达载体的有用元件。

参 考 文 献

- [1] Fujimoto, K. et al., *Journal of Biotechnology*, 8:77-86, 1988.
- [2] Sharp, P.M. et al., *Nucleic Acid Res.*, 16(17):8207-8211, 1986.

[3] 彭秀玲, 袁汉英: 基因工程实验技术, 湖南科学技术出版社出版, 1987.

[4] Maniatis, T. et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring harbor, 1982.

[5] Davis, L.G. et al.: Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, New York, 1988.

[6] New England BioLabs, M13 Cloning and Sequencing System A Laboratory Manual, 1989.

Chemical Synthesis and Cloning of the Signal Peptide Gene of *Escherichia coli* ST-Ⅱ

Jing Guozhong Zhang Guangfa Jiang Meiyan Liu Lijun
(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

The signal peptide gene of heat-stable enterotoxin Ⅱ of *E. coli* was chemically synthesized according to codon usage in *E. coli*. A signal peptide gene cartridge plasmid pST-Ⅱ was constructed by inserting the signal peptide gene into BamH I /PvuⅡ sites of pBR322. The gene block can easily be excised and transferred to other genetic systems for construction of secretion expression vector by digestion with BamH I and Xho I /Kpn I. The GCGC sequence at 3'-end of ST-Ⅱ signal peptide gene provided Hha I /Hinf I cut sites which should be convenient for inserting target gene in frame.

Key words

Chemical synthesis; ST-Ⅱ signal peptide gene cartridge