

简报

人工合成人溶菌酶基因在大肠杆菌中表达

矫庆华 钱世钧 叶军 郭伟

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

利用 DNA 重组技术生产自然界不能或难以得到的多肽产品用于医药、农业、食品工业等领域, 目前在生物领域已有了很大的进展。近年来, 科学工作者经体外合成人溶菌酶基因, 经克隆、转化, 在真核、原核细胞中获得表达^[1~3]。溶菌酶能水解革兰氏阳性菌细胞壁上的 β -1, 4 糖苷键, 在内部渗透压的作用下, 细胞胀裂开^[4, 5]。它对有些革兰氏阴性菌, 如埃希氏大肠杆菌、伤寒沙门氏菌, 也有同样作用。因此此酶在食品, 特别是在医药上具有重要意义。在这篇文章中, 我们报道人工合成人溶酶的克隆和在温控启动子 P_{RP_L} 调控下在大肠杆菌中的表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: *E. coli* JM105 作为受体菌。质粒 pBV220^[6] 由张智清博士赠。含有人溶菌酶基因编码顺序的噬菌体 M13mp18-a₁^[7] 作为 PCR 扩增模板, 由本实验室构建。

1.1.2 试剂和酶: 各种限制酶购自北京协和医科大学医学科技开发公司, T4DNA 连接酶, Taq DNA 聚合酶, Klenow 大片段, 4dNTP 混合物购自美国 Promega 公司, 其它试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 受体菌的培养: 质粒的分离、重组及转化按 Sambrook 等人^[8]的方法进行。

1.2.2 多聚酶链反应(PCR): 噬菌体 M13mp18-a₁ 作为 PCR 扩增模板; 一对 PCR 引物用 ABI381A DNA 合成仪合成, 经聚丙烯酰胺凝胶(含 7mol/L 尿素)分离纯化。5'端引物 P₁: 5'-AGGAATTCATGAAAGTTTTCGAACG-3'(引物的 5'端带有人工设计的 EcoR I 酶切位点 GAATTC 及保护性碱基 AG); 3'端引物 P₂: 5'-ATGCATGCTCATTAACACCCGC-3'(引物的 5'端带有保护性碱基 TA)。在 20 μ l PCR 反应体系中含模板 DNA 660ng, 引物 P₁、P₂ 各为 1 μ mol/L, 4dNTP 200 μ mol/L, 10 \times Taq DNA 聚合酶缓冲液 2 μ l 混匀, 94 $^{\circ}$ C, 4min, 加 Taq DNA 聚合酶 1u 混匀, 加石蜡油 40 μ l, 94 $^{\circ}$ C, 40s, 45 $^{\circ}$ C, 40s, 72 $^{\circ}$ C, 1min, 5 个循环后改为 94 $^{\circ}$ C, 40s, 55 $^{\circ}$ C, 40s, 72 $^{\circ}$ C, 1min, 25 个循环, 最后一个循环 72 $^{\circ}$ C 延长到 10min, 共 30 个循环。然后加 1u Klenow 大片段, 37 $^{\circ}$ C, 30min, 70 $^{\circ}$ C, 10min, 取 2 μ l 反应物通过琼脂糖凝胶电泳观察结果。PCR 产物经酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀后溶于 TE 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl pH8.0, 0.1mmol/L EDTA)中备用。

1.2.3 PCR 产物与 pBV220 基因重组、转化: pBV220 质粒 DNA 经 BamHI 酶切后, 用 T4 噬菌体聚合酶补平 3' 端, 然后 pBV220 质粒 DNA 和上述 PCR 产物再分别经 EcoR I 酶切后在低熔点胶上回收, 按 1:5 的比例在 T4DNA 连接酶的作用下, 于 14 $^{\circ}$ C 水浴内, 约 24h, 进行重组连接, 然后转化至大肠杆菌 JM105 中, 37 $^{\circ}$ C 静止培养, 16h 观察结果。

本文于 1996 年元月 4 日收到。

1.2.4 重组 pBV-Hly 质粒在大肠杆菌中的表达及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定: 含有 pBV-Hly 质粒的 *E. coli* 过夜培养物, 按 1:50 稀释转入 LB 培养液, 30℃ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5~0.6 后, 42℃ 诱导 4h, 取 1.5ml 培养物中所得到的菌体悬浮于 50μl Laemmli 缓冲液^[9] 中, 100℃ 加热 3min 后离心 (14000r/min, 10min), 取上清液 35μl 在 15% 的 SDS-PAGE 进行电泳分析。

1.2.5 表达产物的免疫学鉴定: 用 Western Blotting 来确定表达产物, 表达产物用 SDS-PAGE 分离后, 在 Bio-Rad 电转移槽上转至硝基纤维素膜上, 免疫测试按 Promega 提供的方法进行, 抗人溶菌酶血清的制备参见文献[10]。

1.2.6 人溶菌酶的纯化及活力测定: 含有 pBV-Hly 质粒的 *E. coli* 经 28℃ 培养, 42℃ 诱导之后的培养物经离心, 细胞破碎, 酶蛋白的变性、复性之后测定其酶活力。取 3ml 以 50mmol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH6.4) 配制的溶壁微球菌 (*Micrococcus Luteus* ATCC 4698 Sigma U. S. A.) 悬浮液 (10mg/100ml), 加 1ml 酶液, 快速混匀, 倒入 1cm 光径的比色皿中, 25℃ 保温 10min, 在 450nm 读吸收值的变化。一个溶菌酶单位相当于在规定条件下于 450nm 处每分钟使吸光度降低 0.001 所需的酶量。

2 结果与讨论

2.1 PCR 和人溶菌酶表达质粒的构建

如方法中所叙述, PCR 酶切产物与载体质粒重组, 使目的基因在温控串联启动子 P_RP_L 的调控下得到表达。新构建的重组质粒经 EcoRI 和 Hind III 酶切检查形成 4 个片段, 分别为 2.72kb, 0.784kb, 0.423kb, 0.125kb, 与所预期的结果完全一致 (图 1)。

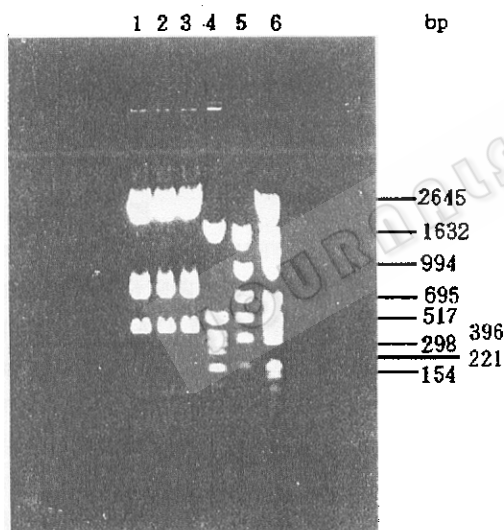


图 1 重组质粒 pBV-Hly 的酶切分析

Fig. 1 Restriction pattern of plasmid pBV-Hly

1.2.3. pBV-Hly/EcoRI + Hind III, 4. pBR322/HinfI (marker) 步确证表达产物, 我们进行了 Western Blotting 免疫印迹杂交。从图 2(B) 可以进一步证实了人溶菌酶在大肠杆菌中的表达。至此, 我们已构建了含有人溶菌酶基因的工程菌, 并命名为 JPB-Hly。该工程菌经培养、诱导, 所得菌体经破碎, 酶蛋白的变性、复性处理, 酶活力测定结果为 30 000u/L 培养液。进一步提高酶产物的表达, 可用 PCR 方法来调整表达质粒上的 SD 与基因上的 ATG 之间的距离而达到最佳表达效果, 同时也有必要进行对含有重组质粒的大肠杆菌生长的最适产酶条件进行研究。

人溶菌酶基因插入表达质粒的不同位置对酶蛋白的表达有很大影响, 我们曾在 BamHI 位点插入人溶菌酶基因, 但表达效果很低。后从 EcoRI 位点插入, 表达量增加, 说明表达质粒的核糖体结合位点 (SD) 与基因的起始密码子 (ATG) 之间距离对表达有影响。

在设计引物时, 将保护基 AG、TA 分别引入到 P₁、P₂ 中, 为的是使 5' 端进行酶切后产生有效的粘末端及保留 3' 端的 SphI 酶切位点。

2.2 人溶菌酶在大肠杆菌中的表达

按方法 1.2.4 中所描述那样, 样品经 SDS-PAGE 电泳后, 经考马斯亮蓝染色的结果如图 2 (A), 可以看到人溶菌酶蛋白的表达。为了进一步

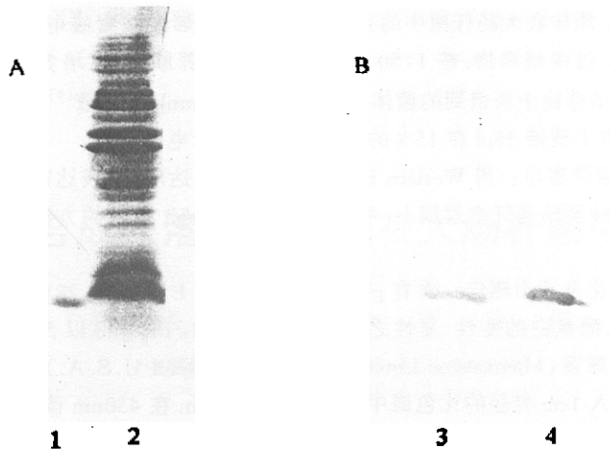


图 2 人溶菌酶表达的 SDS-PAGE 及免疫印迹分析

Fig. 2 Analysis of SDS-PAGE and immunoblot identification of human lysozyme expressed in *E. coli*

A. SDS-PAGE B. West Blotting

1. Hen egg white enzyme

2. 4. Total cellular protein from *E. coli* harboring pBV-Hly

3. Standard human lysozyme

参 考 文 献

- [1] Tsuchiya K, Tada S, Gomi K *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1992, **38**:109~114.
- [2] Hayakawa T, Toibana A, Marumoto R *et al.* Gene, 1987, **56**:53~59.
- [3] Muraki M, Jigami Y, Tanaka H *et al.* Agric Biol Chem, 1986, **50**(3):713~723.
- [4] Ruysen R, Pharmaceutical Enzymes, Properties and Assay Methods. E Storyscientia P V B A, Gent 1978.
- [5] Ruttloff H. Industrielle Enzyme Steinkopff, Darmstadt 1979.
- [6] 张智清, 姚立红, 侯云德等. 病毒学报, 1990, **6**:111~116.
- [7] 钱世钧, 于 颖, 田开荣等. 生物工程学报, 1994, **10**(1):34~38.
- [8] Sambrook J *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Laemmli U K. Nature, 1970, **227**:680~685.
- [10] 孟广震. 酶学研究技术(张树政等主编), 北京: 科学出版社, 1987, pp. 125~129.

Expression of Synthetic Human Lysozyme Gene in *Escherichia coli*

Jiao Qinghua Qian Shijun Ye Jun Guo Wei

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The human lysozyme gene has been successfully cloned and expressed in *E. coli* under the transcriptional control the bacteriophage λ P_{RP}_L promoters regulated by the temperature sensitive repressors. The foreign genetic fragment of 0.412kb was presented in the restriction pattern of plasmid pBV-Hly. The Western Blotting and activity analysis confirmed the expression of the human lysozyme gene in *E. coli*.

Key words Human lysozyme, PCR, gene cloning, expression