

用单链和PCR相结合的方法合成 绿豆胰蛋白酶抑制剂基因

陈常庆 毛积芳* 张曼芳 戴金凤

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

本文报道用单链与PCR技术相结合的合成方法合成了胰蛋白酶抑制剂基因, 包括氨基酸编码顺序、起始和终止密码子, 上、下游两端的EcoR I和Pst I限制性酶识别顺序等全长共248个碱基对。合成基因的编码是参考其它植物的蛋白酶抑制剂基因的同源编码和植物基因的偏爱密码子来进行设计的。合成的基因双链经限制酶 EcoR I 和 Pst I 在两端切出粘性末端后克隆到pUC19中, 克隆基因结构的正确性经过限制酶图谱和DNA序列分析得到完全的证明。

关键词 绿豆; 胰蛋白酶抑制剂

来源于绿豆的绿豆胰蛋白酶抑制剂是一种双头的蛋白酶抑制剂, 它能与胰蛋白酶形成1:2的复合物而使胰蛋白酶丧失活力, 其化学结构已被我国的戚正武实验室阐明为由72个氨基酸组成的蛋白质^[1]。最近, 有人将胰蛋白酶抑制剂基因转移到植物(如烟草)中而得到转基因的植株, 并且证明这种转基因植株具有很好的抗虫能力^[2,3], 因而引起了人们对于在农业上应用胰蛋白酶抑制剂基因的极大的兴趣。本文报道用单链与PCR相结合的方法合成绿豆胰蛋白酶抑制剂基因的工作。

基因顺序的设计和合成战略

合成的绿豆胰蛋白酶抑制剂基因的DNA顺序见图1。这个顺序系根据其它植物的蛋白酶抑制剂基因的同源顺序^[4-11]以及植物基因密码子的高效使用频率^[12]来进行氨基酸编码, 以利于合成的基因在植物中表达。基因的全长为248个碱基对, 它包括了72个氨基酸的编码顺

序和一个起始密码子ATG和两个连续的终止密码子TAA和TAG。在基因的上游端有一个EcoR I识别顺序和四个碱基对的末端顺序, 在基因的下游端有紧接着的BamH I和Pst I识别顺序以及3个碱基的末端顺序。

基因的合成系采用单链合成的战略, 我们在前文中曾经报道了以合成寡聚DNA片段的3'末端自身互补再用DNA聚合酶进行延伸补齐以得到基因二聚体双链的方法^[13], 以及用上下两条链3'末端彼此互补后再用DNA聚合酶延伸补齐的方法^[14]。本文在合成绿豆胰蛋白酶抑制剂基因时采用了后一种方法并作了一些改进, 即先合成51聚到57聚的5个片段(F1-F5, F1-F3对应于基因的有义链, F4和F5则对应于基因的反义链)和3个在上述片段间的缺口处互补的16聚片段(F6-F8)。这些片段的顺序和在基因中的位置

本文于1991年12月20日收到。

* 现在西安市第四军医大学生物化学教研室。

本文为国家生物高技术基金资助项目。

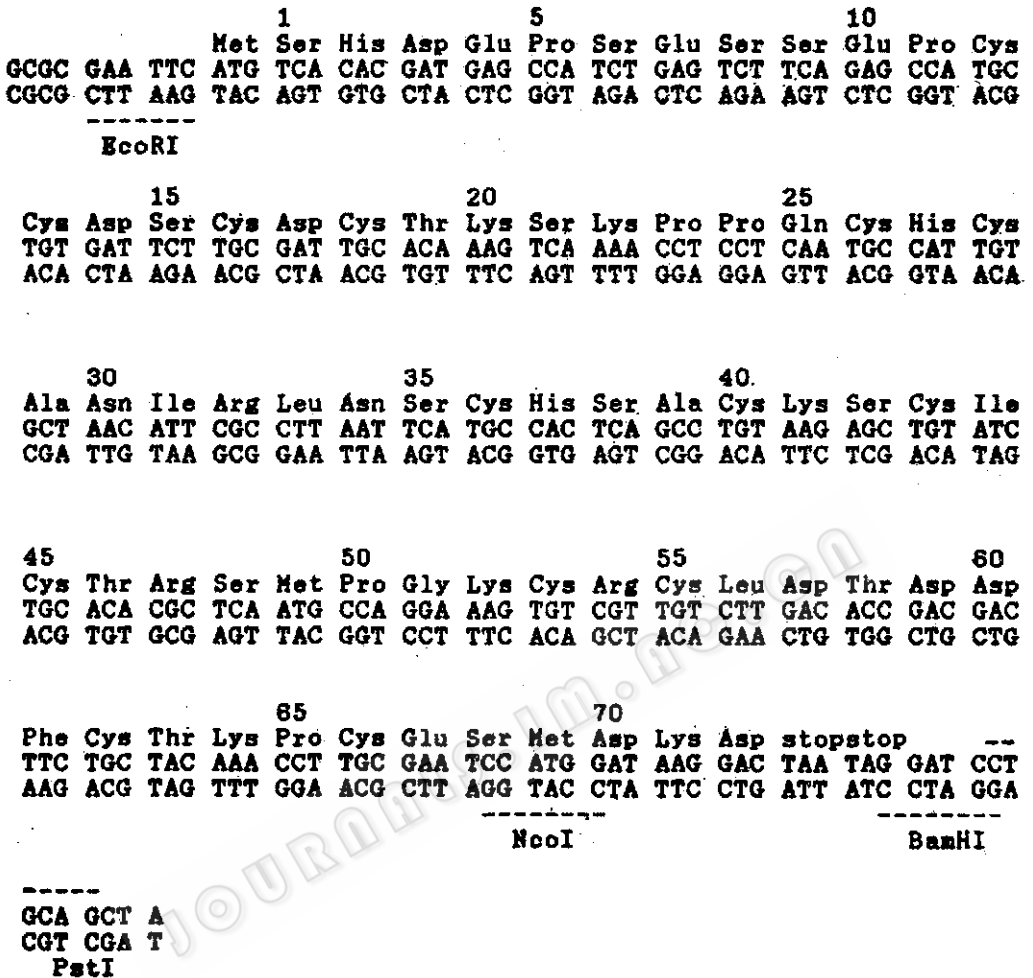


图 1 合成的绿豆胰蛋白酶抑制剂基因的DNA顺序

Fig.1 The sequence of the synthetic mung bean trypsin inhibitor gene

见图 2。将F1、F2和F3在“补钉”片段F6、F7存在下以及F4和F5在“补钉”片段F8存在下，用T4DNA连接酶分别连接成一个163聚的有义链和一个110聚的反义链，两者在3'末端能有25个碱基对的彼此互补，这两个大片段经聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化后按等分子比例混合退火，以实现两者的3'末端彼此互补，再用DNA中温聚合酶在65℃延伸补齐成为248个碱基对的DNA双链。最后，双链用EcoR I和PstI双酶切并克隆到pUC19质粒中，经过筛

选、酶切图谱分析和DNA顺序分析即可得到克隆的合成基因(图3)。

为了进一步简化基因合成的方法，我们在多片段单链战略的基础上，又发展了多片段的单链合成与PCR扩增相结合的方法。即在F1、F2和F3以及F4和F5连接之后，不经分离，直接加入过量的F1和F5为引物进行PCR扩增，然后用琼脂糖凝胶电泳将产物带分离出来，再经EcoRI和PstI双酶切并克隆到pUC19中而得到克隆的合成基因。

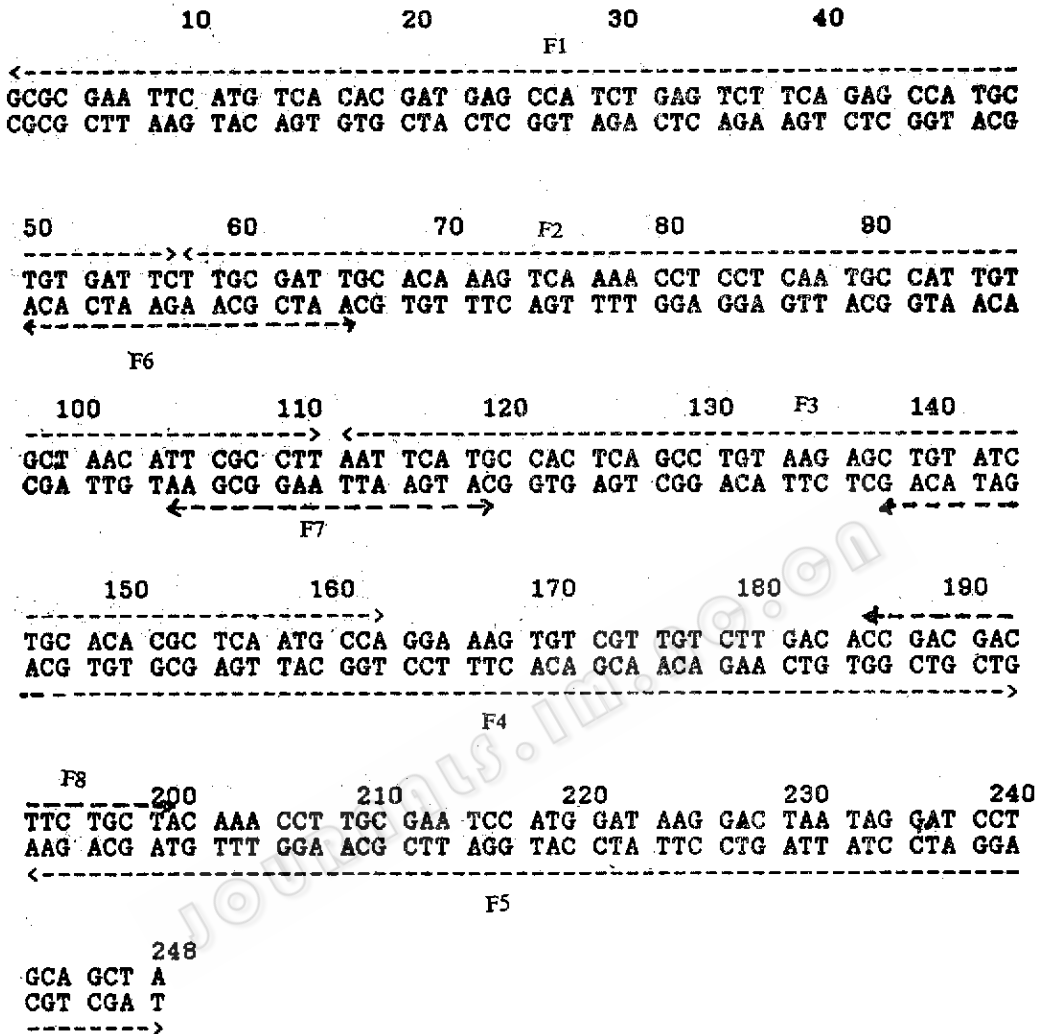


图 2 化学合成的片段及其DNA顺序

Fig.2 The sequence of the synthetic oligodeoxynucleotides

实验部分

(一)试剂与材料

限制酶EccoR I、BamHI、PstI和T4 DNA连接酶均为Boehringer产品；中温DNA聚合酶为中国科学院生物化学所叶盛钰副研究员赠送；高温DNA聚合酶(FD, Taq)为复旦大学遗传所产品；T4

多核苷酸激酶为本实验室自制。

酵母抽提粉和Tryptone为Oxoid公司产品；X-gal为Sigma产品； $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP为Amersham公司产品；pUC19质粒为本实验室自己制备；丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺(Bis)、琼脂糖和低熔点琼脂糖均为Bio-Rad产品。

$10\times$ T4 DNA多核苷酸激酶缓冲液：
0.5mol/L Tris-HCl(pH7.6)，0.1mol/L

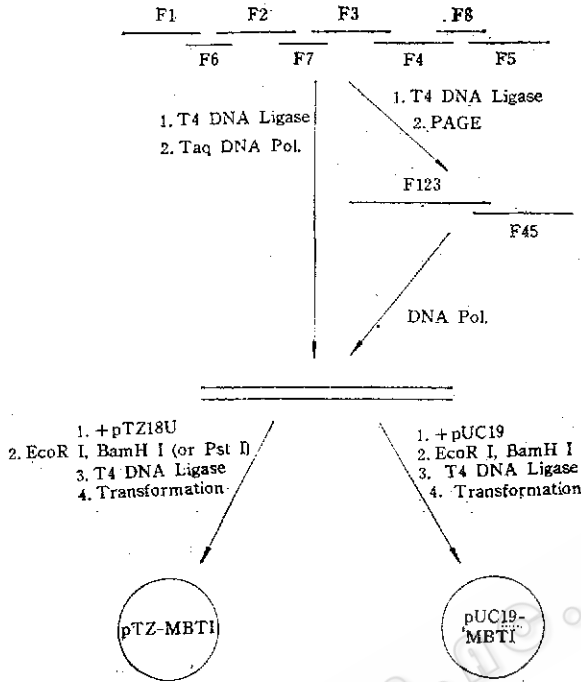


图 3 绿豆胰蛋白酶抑制剂基因的合成与克隆

Fig.3 Synthesis and cloning of the mung bean trypsin inhibitor gene

MgCl₂·6H₂O, 50mmol/L二硫基苏糖醇(DTT), 1mmol/L精脒(spermidine), 1mmol/L EDTA。

10×T4DNA连接酶缓冲液的配制：
0.5mol/L Tris-HCl(pH7.4), 0.1mol/L MgCl₂·6H₂O, 0.1mol/L二硫基苏糖醇(DTT), 10mmol/L ATP, 1mg/ml牛血清白蛋白(BSA)。

10×DNA聚合酶缓冲液的配制：
100 mmol / L Tris-HCl (pH 8.8), 10mmol/L二硫基苏糖醇(DTT), 50mmol/L MgCl₂·6H₂O dATP, dTTP, dCTP, dGTP各2.5mmol/L。

10×TE缓冲液的配制：10mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1mmol/L EDTA (pH8.0)。

寡聚DNA片段是在ABI-381型DNA合成仪上合成的，产物经55℃浓氨水氨解

腺保护基后再用10% (F1—F5) 或20% (F6—F8) 聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化，纯化后的产品经5'末端³²P标记，再通过聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为纯品。

感受态细胞的制备：将宿主菌(JM83或JM103)接种于5ml LB中，37℃培养过夜。次日按1:100接种于40ml LB中，继续37℃培养至OD_{600nm} = 0.4。取出放置冰浴10 min, 5000r/min离心10 min, 将细菌沉淀再悬浮于15ml预冷的TC (100mmol/L Tris, 50mmol/L CaCl₂)缓冲液中，冰浴放置备用。

DNA序列分析系采用以5'-³²P标记的寡聚DNA为引物的双脱氧链终止法^[15]。

(二)实验方法和结果

1. 单链战略合成DNA双链

(1) F1、F2和F3以及F4、F5的连接：

取一定量F3片段,用T4多核苷酸激酶和 γ - 32 P-ATP进行部分5'末端标记,然后,追加ATP进行5'末端全部磷酸化反应,取F3重5倍的F2片段同样用T4 DNA激酶进行5'末端磷酸化反应。酚、氯仿各抽提一次,合并,乙醇沉淀,抽干待用。

取F1、F6、F7片段加于上述抽干片段中,使各片段间的克分子比为F3:F7:F2:F6:F1=1:2:5:6:10。加入连接缓冲液,95℃变性后缓慢冷却至室温,加入T4 DNA连接酶,10℃—14℃反应24h。经10%变性PAGE电泳,X光片进行放射自显影观察连接效果,连接物163聚DNA片段约占总反应标记片段的50%左右(图版I-A)。

F4和F5的连接与上相似,F4:F8:F5的克分子比=1:3:10。F4也经 γ - 32 P-ATP和ATP进行5'端标记,连接产物110聚DNA片段占总反应标记片段的60%—70%左右。

将上述连接物163聚和110聚分别从变性PAGE胶中切下,捣碎后浸泡于TE缓冲液中24h,Sephadex G-50柱去盐,洗脱物按同位素标记物计数收集,抽干待用。

(2) 连接片段的聚合反应:163聚和110聚连接物在聚合缓冲液中退火,加入四种dNTP和中温DNA聚合酶,65℃聚合反应1h。聚合产物经用10%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳证实(见图版I-B)。

(3) 聚合双链DNA片段的克隆:pUC19载体和上述的聚合双链DNA片段经EcoRI和BamHI双酶切后,4℃进行连接反应过夜。按常规连接物转化JM83感受态细胞,用含氨苄青霉素和X-gal的平板筛选白色转化菌落作以后进一步的筛选鉴定。

(4) 阳性转化菌的筛选和鉴定:用快

速抽提质粒法^[14]提取转化菌质粒,并经EcoRI和BamHI双酶切,切下小片段与标准分子量片段比较,发现转化子1、6、7和10号菌质粒含有234聚大小的外源片段。

6号菌质粒经DNA序列分析测定所含外源基因完全符合原设计的绿豆胰蛋白酶抑制剂的序列。

2. 用PCR扩增方法制备绿豆胰蛋白酶抑制剂基因

(1) 片段的5'末端磷酸化:在片段F2(120pmol, 2 μ l)+F3(30pmol, 1 μ l)和F4(30pmol, 3 μ l)两组反应中分别加入10mmol/L ATP(1 μ l),10 \times 激酶缓冲液1 μ l和2单位多核苷酸激酶(1 μ l),加重蒸水到总体积为10 μ l。37℃反应2h,反应完毕后,用1:1 Tris饱和酚和氯仿/异戊醇(24:1)抽提2次,乙醇沉淀,抽干待用。

(2) 片段的连接:在上述F2+F3反应产物中加F1 3 μ l(300pmol)、F6 1.7 μ l(180pmol)、F7 0.6 μ l(60pmol)和10 \times 连接缓冲液1 μ l,使各片段的克分子比为F3:F7:F2:F6:F1=1:2:4:6:10。在抽干的F4片段中加入F5 1.2 μ l(120pmol)、F8 0.6 μ l(60pmol)和10 \times 连接缓冲液1 μ l,使各片段的分子比为F4:F8:F5=1:2:4。然后100℃变性2min,自然冷却至室温。在两组反应中各加入1 μ l连接酶(IU),10mmol/L ATP 1 μ l,再加重蒸水至反应体积为10 μ l,4℃反应7天。

(3) PCR反应:在上述F1+F2+F3和F4+F5两组反应后的溶液中各取1 μ l,合并,再补加入引物片段(F1和F5)各0.2 μ l(25pmol),10mmol/L dNTPs 8 μ l,10 \times PCR缓冲液8 μ l,加重蒸水至总体积为80 μ l,先92℃变性30s,冷至45℃。加入Taq酶0.5 μ l(2.5单位),然后按照,48℃退火60s,68℃聚合60s,92℃变性

25s的步骤进行30个循环,在最后一次聚合反应完成后取出10 μ l,进行8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,用pGEM-7zf(+)-DNA-Hae III作分子量对照,电泳时间为2.5h,电压在100V左右,电泳完毕后在紫外灯下观察PCR产物带,结果见图版I-C。

(4) PCR产物的低熔点琼脂糖凝胶电泳分离:剩余的70 μ l全部走含有EB的1%琼脂糖凝胶电泳,电压100V,约半个多小时。将凝胶置于紫外灯下观察,产物片段已经分开。将产物带前紧靠着的胶用手术刀片割去一长方块,填上低熔点胶,再次电泳,待产物带完全进入低熔点胶后,在紫外灯下挖出所需的低熔点胶样品,加入2倍体积TE缓冲液,置65 $^{\circ}$ C水浴中(约10min)融化,再加等体积Tris饱和酚、酚/氯仿、氯仿后各抽提一次,上清乙醇沉淀,抽干备用。

3. 用PCR扩增产物的克隆。在上述纯化后的PCR扩增产物中,加入质粒pTZ18U(2 μ g),10 \times 中盐浓度缓冲液4 μ l,2 μ l EcoR I (10u),2 μ l BamH I (10u),加重蒸水至总体积为40 μ l,37 $^{\circ}$ C反应2h。乙醇沉淀,抽干。加入2 μ l 10 \times 连接缓冲液(含1mmol/L ATP),T4 DNA连接酶1 μ l(5u)加重蒸水至总体积为20 μ l,4 $^{\circ}$ C反应24h。取出三分之一的样品,加入200 μ l JM103感受态细胞,冰浴30min,37 $^{\circ}$ C 5min,加入1ml LB,37 $^{\circ}$ C 1h。取50 μ l及200 μ l分别涂板,进行平板筛选(含氨苄青霉素和X-gal板),选出白色菌落,用快速抽提法提取转化质粒,经EcoR I

和BamH I双酶切后,进行8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,并用标准分子量片段作对照,发现转化子12号菌含有预期长度的234bp片段。其电泳位置与前面用中温酶所得的产物相同(图版I-C)。12号质粒经过序列测定所含外源基因序列完全正确。用EcoR I和Pst I代替EcoR I和BamH I进行PCR扩增片段的双酶切克隆也得到同样结果。

讨 论

由于DNA自动合成仪的问世,寡聚DNA的合成已经成为实验室中的常规技术,但为了应用于构建大的基因,DNA片段的合成与分离纯化仍然是一个费钱和耗时的工作。因此,基因合成的单链战术便日益引起了人们的注意^[9]。本文发表的将单链战术以及与PCR相结合的方法将为人们提供一个基因合成的通用方法,这个方法对于合成一个200—300碱基对长度的基因克隆片段是完全适用的。它的特点是,经济、简便而且快速。以本文所合成的248个碱基对的绿豆胰蛋白酶抑制剂基因为例,合成了8个片段共321个碱基数,占248个碱基对的64.7%,即节省了35.7%的合成量。克隆前的每个合成步骤与效率都可用同位素标记的片段进行追踪检查,但不需要进行连接片段的分离而可直接进行PCR扩增。由于PCR扩增能得到大量的合成双链,克隆和转化的效率也较高,因而比文献上已有的单链合成法具有更大的优点。

参 考 文 献

- [1] Zhang, Y. S. et al., *Scientia sinica*, 15: 268—277, 1982.
[2] Russell Jounson, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 816: 9671—9675, 1989.
[3] Hilder, V. A. et al., *Nature* 300: 160—163, 1987.
[4] Hilder, V. A. et al., *Plant Molecular Biology*, 13: 701—710, 1989.
[5] Abe, K. et al., *J. Biol. Chem.*, 262: 16793—16797, 1987.
[6] Joudrier, P. E. et al., *Plant Mol. Biol.*, 10: 35—42, 1987.
[7] Lee, J. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83: 7277—7281, 1986.
[8] Sánchez-Serrano, J. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 203: 15—20, 1986.
[9] Graham, J. S. et al., *J. Biol. Chem.*, 260: 6555—6560, 1985.
[10] Graham, J. S. et al., *J. Biol. Chem.*, 260: 6561—6564, 1985.
[11] Cleveland, T. E. et al., *Plant Mol. Biol.*, 8: 199—207, 1987.
[12] Marrey, E. E. et al., *Nucleic Acids Res.*, 17(2): 277—498, 1989.
[13] 干科达、陈常庆: 生物工程学报, 7(2): 180—183, 1991.
[14] 干科达等: 生物化学杂志, 7(1): 41—46, 1991.
[15] 蒋志伟等: 生物化学生物物理学报, 20(2): 218—222, 1988.

Synthesis of Mung Bean Trypsin Inhibitor by the Combination of the Single Stranded Method and PCR

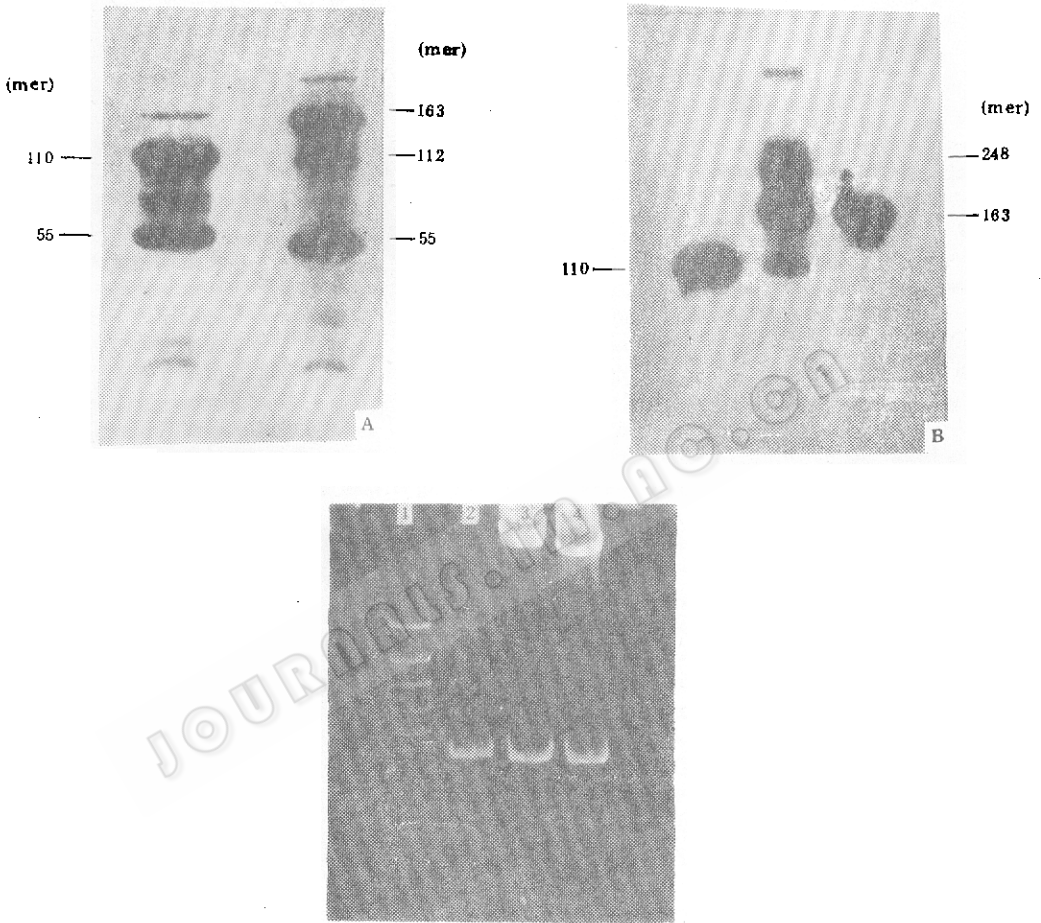
Chen Changqing Mao Jifang Zhang Manfang Dai Jinfong
(Shanghai Research Center of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai 200233)

This paper using the synthesis of mung bean trypsin inhibitor gene as an example, presented a new method for gene synthesis. The principle of the method was based on the combination of the single strand strategy and the PCR technique. The synthesis was very simple, convenient and rapid.

The mung bean trypsin inhibitor is a protein composed of 72 amino acid residues. Its amino acid sequence has been determined, but the DNA sequence of gene still unknown. The synthetic mung bean trypsin inhibitor gene was 248 bp in length. It contains the encoded sequence, the start and stop codons, the restriction sites of EcoR I and BamH I at both ends. The codon selection of the synthetic gene was carried out according to the codon usage of other plant protease inhibitor gene or plant gene. The synthetic double stranded DNA was digest with EcoR I and BamH I or Pst I first, then cloned into plasmid pUC19. The synthetic gene was proved to be correct by the restriction map and the sequence analysis using the dideoxy-mediated chain termination method.

Key words Mung bean, trypsin inhibitor

Chen Changqing et al.: Synthesis of mung bean trypsin inhibitor
by the combination of the single stranded method and PCR



A,B. 合成片段的酶促连接和酶促聚合延伸

The ligation of synthetic fragments by T4 DNA ligase and the extension of ligation products by DNA polymerase

- A. The ligation products of F1 + F2 + F3 (right) and F4 + F5 (left)
B. The complementary extension of F123 (163mer) and F45 (110mer)
C. PCR合成产物和克隆基因酶切片段的 3% 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR product and the restriction digestion of pTZ-MBTI and pUC19-MBTI

1. DNA marker pGEM-7zf(+)-Hae III
2. PCR product
3. Enzyme digestion of pTZ-MBTI by EcoRI and BamHI
4. Enzyme digestion of pUC19-MBTI