

水蛭素的全基因合成及克隆

许长蔼, 张要武, 向开军, 李爱华

(天津市农业生物工程研究中心, 天津 300192)

摘要: 报道了水蛭素全基因的合成及克隆。根据已知水蛭素氨基酸序列及酵母菌体内蛋白质表达特性, 设计了水蛭素的全基因序列, 采用化学合成及酶学相结合的方法, 合成了该基因片段, 并逐段克隆至载体 pBS 上, 得到全长水蛭素基因。序列测定表明, 克隆后 DNA 顺序同原设计序列。

关键词: 水蛭素; 基因; 合成; 克隆

中图分类号: Q 781; R 973⁺. 2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000- 7091(2000)04- 0058- 04

水蛭素是水生动物水蛭体内的一种低分子蛋白质(多肽), 它是至今发现的凝血酶特异而且有效的天然抑制剂, 副作用很小, 且不需要辅助因子, 是理想的抗凝血天然药物^[1]。由于水蛭体内含量极微, 价格相当昂贵, 难以得到普遍应用, 国外从 80 年代初开始, 利用化学合成或从 cDNA 文库中采用多聚酶链反应(PCR), 已经获得了水蛭素的结构基因, 且引入了大肠杆菌、酵母菌、昆虫细胞以及植物种子等, 并有高效表达, 但尚未进入临床应用阶段^[2~ 5]。我国这方面的工作也已开始, 但仍处于实验室阶段。根据已知水蛭素氨基酸序列及酵母蛋白质表达的特性, 我们设计了水蛭素全基因序列, 采用化学合成及酶学相结合的方法获得了该基因, 并将其克隆至载体上。转化后的重组产物有一定的活性。

1 材料和方法

1.1 材料

菌种和质粒列于表 1。化学试剂及酶制剂购自 TBD 生物技术公司(其中有国产、进口分装药品等)。大肠杆菌采用 LB 培养基培养, 必要时添加抗生素, Ap 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 大肠杆菌采用 LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$, 培养过夜, 液体培养时, 需震荡 150 r/min。

1.2.2 基本分子生物学方法 感受

态细胞的制备, 质粒的转化、提取, DNA 的酶解、连接, 电泳方法以及 Klenow 片段填补反

表 1 所用菌种和质粒

菌种和质粒	特性	来 源
<i>E. coli</i> XL1- Blue		Stratagene 公司
pBS SK	Ap ^r	Stratagene 公司
pBSH1	Ap ^r	本工作
pBSH2	Ap ^r	本工作
pBSH3	Ap ^r	本工作

收稿日期: 1999- 01- 27

作者简介: 许长蔼(1966-), 男, 副研究员, 硕士, 主要从事生物技术研究工作。

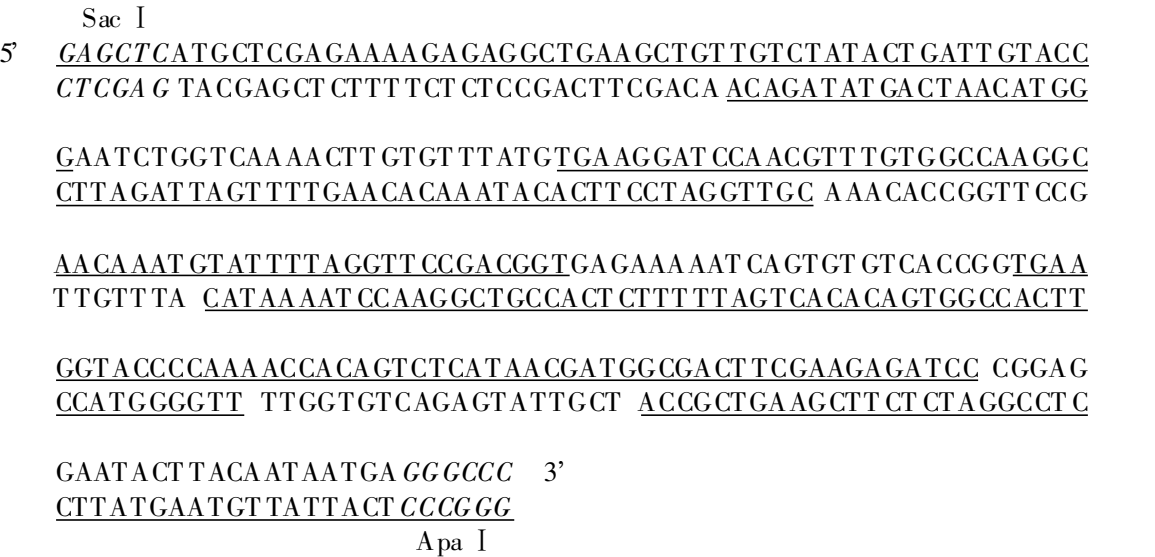
应, 琼脂糖凝胶 DNA 片段回收等均按参考文献〔6〕的方法进行。

1.2.3 引物合成及 DNA 序列测定 引物合成采用磷酸酰胺三酯方法, 由 DNA 序列合成仪合成。DNA 序列测定以 pBS 序列 5' GGAAACAG- CTATGACCATG 3' 为引物, 采用 Sanger 双脱氧末端终止法, 由核酸自动序列分析仪进行测序。

2 结果与分析

2.1 水蛭素基因的设计

水蛭素是由 65 个氨基酸组成的活性多肽, 将氨基酸解译为相应的密码子时, 尽量选用酵母菌偏爱的密码子, 为了便于克隆和表达, N 端前面加了必须的碱基顺序, 包括限制性酶切位点 Sac I 和 Xho I, C 端加了两个终止密码子和一个 Apa I 位点, 整个序列由 240 个碱基对组成(图 1)。序列合成分 6 个寡聚核苷酸片段进行, 其中两个片段中有 20 个碱基可以配对, 其余部分, 由 Klenow 片段按 5' 至 3' 顺序填平, 形成三个双链 DNA 片段。之后, 利用水蛭素基因内的限制性酶切位点 BamH I 和 Kpn I, 进行连接。



下划线部分为化学合成的寡聚核苷酸序列

图 1 合成的水蛭素 DNA 序列

2.2 基因的连接及克隆

水蛭素全基因的连接及克隆战略如图 2 所示。经化学合成的 6 个片段, 每两个在 45 ℃下退火配对, 得到 3 段带有 3' 粘性末端的片段, 然后由 Klenow 片段进行填补, 得到 3 段完整的 DNA 片段。之后, 首先根据片段 1 两端的限制性酶切位点 Sac I 和 BamH I, 克隆至载体 pBS 相应的酶切位点之间, 在有 IPTG 和 X- gal 情况下筛选白色菌落, 并进行质粒 DNA 鉴定, 得到质粒 pBSH1; 然后把片段 2 克隆至 pBSH1 的 BamH I 和 Kpn I 之间, 筛选正确克隆, 得到质粒 pBSH2; 再用 Sac I 和 Kpn I 酶切质粒 pBSH2, 从凝胶中分离纯化 170 bp 的片段, 同

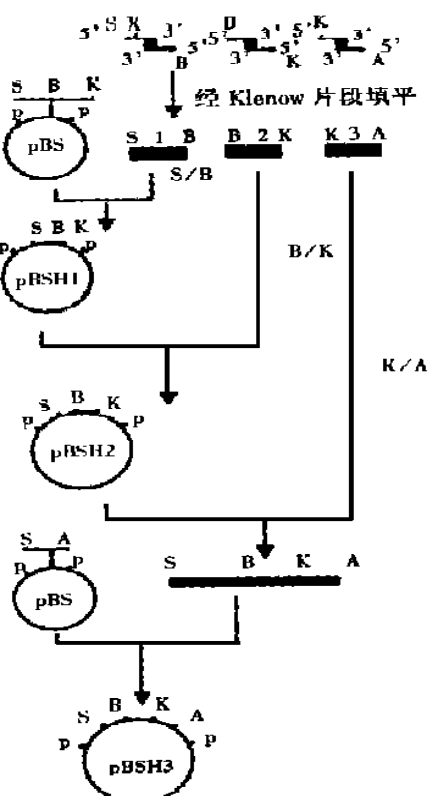
时用 Kpn I 和 Apa I 酶切片段 3, 连接上述酶切片段, 得到 240 bp 长的 Sac I 和 Apa I 片段, 将此片段克隆至 pBS 相应的酶切位点之间, 得到质粒 pBSH 3, 即完整的水蛭素全基因克隆。

2.3 水蛭素全基因克隆的鉴定

将上面获得的克隆(含质粒 pBSH 3), 进行质粒提取, 用 Sac I 及 Apa I 双酶切电泳显示有 240 bp 的片段(图 3)。为进一步验证该克隆的正确性, 以 pBS 序列 5' GGAAACAGCTATGACCATG 3' 为引物, 进行 pBSH 3 插入片段的序列分析, 测序结果同原设计顺序, 表明质粒 pBSH 3 含有 240 bp 的水蛭素全基因序列。

3 讨论

水蛭素是迄今发现的凝血酶特异而有效的天然抑制剂。现代分子生物学的发展, 使得水蛭素基因的克隆、重组得以实现。本合成方法充分利用了基因内部自身的限制性酶切位点, 简化了克隆程序, 而且成本低廉。另外, 我们已经将该基因克隆至一酵母表达载体上, 结构基因前连有一段酵母菌 α 因子顺序, 以利于水蛭素基因的表达及产物分离(该结果将另文发表)。本试验结果为实现水蛭素的产业化生产奠定了基础, 将具有广泛的社会效益及经济效益。



S: Sac I ; X: Xho I ; B: BamH I ; K: Kpn I ; A: Apa I ; P: Pvu II

图 2 pBSH3 克隆战略图

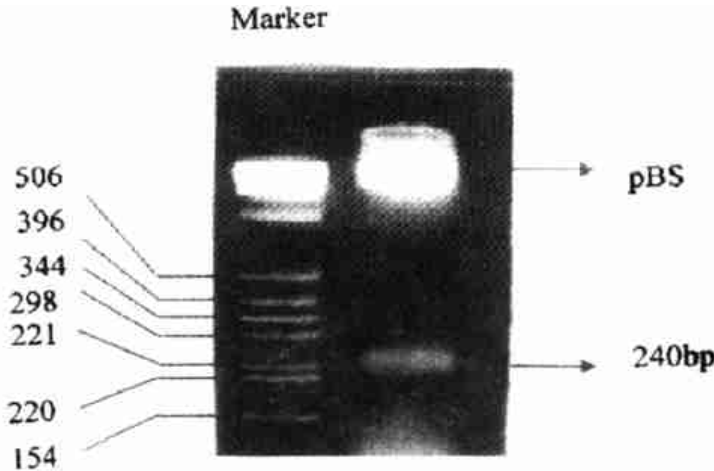


图 3 pBSH3 酶切图谱

参考文献:

- [1] Sawyer R T. Thrombolytics and anticoagulants from leeches[J]. Bio Technology, 1991, 9: 513.
- [2] Harvey R P, Degryse E, Stefani L, *et al.* Cloning and expression of a cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the bloodsucking leech *Hirudo medicinalis*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83: 1084.
- [3] Parmenter D L. Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning[J]. Plant Mol Biol, 1995, 29(6) : 1167.
- [4] Loison G, Findeli A, Bernard S, *et al.* Expression and secretion in *S. cerevisiae* of biologically active leech hirudin[J]. Biotechnology, 1987, 6: 72.
- [5] Benatti L, Scacheri E, Bishop D H, *et al.* Secretion of biologically active leech hirudin from baculovirus infected insect cells[J]. Gene, 1991, 101: 255.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* Molecular cloning, a laboratory manual[M]. New york: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd ed. 1989.

Synthesis and Cloning of Hirudin Gene

XU Chang-ai, ZHANG Yao-wu, XIANG Kai-jun, LI Ai-hua

(Tianjin Agricultural Bioengineering Research Centre, Tianjin 300192, China)

Abstract: A 240- bp DNA fragment coding for the hirudin was chemically and enzymically synthesized. The sequence was derived from the amino acid sequence of the hirudin peptide, which is consistent with the request of yeast gene expression. The sythesis involved preparation of six long oligodeoxyribonucleotides. After annealing, filling by Klenow fragment, three formed fragments were cloned into pBS sequentially, and an intact hirudin gene was obtained. The DNA sequence of the cloned fragment identified by sequencing was the same as the designed sequence of hirudin gene.

Key Words: Hirudin; Gene; Sythesis; Cloning