

人恶性疟杂合多肽抗原基因化学合成及克隆

钟雄林* 陈仕荣* 裘敏燕 王昌才*

闵永浩 王启松

(复旦大学遗传所, 上海 200433)

提 要

本文报道用固相亚磷酸胺法合成人恶性疟杂合多肽抗原基因。基因全长为 216 bp, 分为 10 个寡核苷酸片段分别合成, 然后经 T4 DNA 连接酶按设计顺序连接成完整的杂合抗原基因, 重组到噬菌体 M13 mp 18 RF DNA 内, 转染大肠杆菌 JM109。用分子杂交和酶切分析筛选出重组克隆体。经序列分析, 证明所合成的人恶性疟杂合多肽抗原基因与所设计完全一致。

关键词 人恶性疟抗原基因, DNA 化学合成, 克隆

恶性疟疾在世界各地, 尤其是热带、亚热带国家, 仍然是一种严重危害人类健康的疾病, 对疟疾疫苗的研究受到一些国家和世界卫生组织的重视。近年来一些实验室已经建立恶性疟原虫红内期和子孢子期的 cDNA 库^[1-3]或 DNA 库^[4]。Patarroyo 等^[5]根据具有保护性抗原氨基酸顺序, 人工合成具有子孢子重复顺序和红内期抗原顺序的杂合多肽, 试验表明具有较好的保护性。本文报道参照 Patarroyo 等的多肽顺序, 用人工合成基因方法合成具有子孢子和裂殖子抗原杂合基因和在大肠杆菌中克隆及顺序分析的结果。

材 料 与 方 法

一、材料

1. 载体与菌株 噬菌体 M13 mp18 RF DNA 为克隆载体体系华美生物工程公司产品, 大肠杆菌 K-12 JM109 为受体菌。

2. 酶和试剂 限制性内切酶 EcoRI, Hind III 为华美公司产品, T4 DNA 核苷酸激酶、T4 DNA 连接酶为美国 BRL 公司产品。测定 DNA 序列试剂盒为瑞典 Pharmacia 公司产品。合成 DNA 寡核苷酸片段所用试剂为美

国 Applied Biosystem 公司产品, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 和 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ 为美国 Amersham 公司产品。

二、方法

1. 寡核苷酸片段合成 将整个抗原基因分成 10 个大小不同的寡核苷酸片段, 用固相亚磷酸胺法(solid-phase phosphoramidite method), 在 ABI 381A 型 DNA 合成仪(美国 Applied Biosystem 公司制造)上自动合成。

2. 合成片段的纯化 合成后载体用苯硫酚去除磷酸基团的保护基。然后在氨解瓶中加入预冷浓氨水, 置 55℃ 水浴氨解过夜。过滤去除载体、冷冻干燥。用 16% 聚丙烯酰胺凝胶(含 7mol/L 尿素)电泳纯化, 400~600V 电泳 6~10h。电泳后将凝胶放在荧光板上, 紫外灯下切出所需条带, 置 0.5mol/L NaCl 溶液中, 37℃ 浸泡过夜, 然后将浸泡液通过 Sep-Pak C-18 反相柱, 分部洗脱, 收集 60% 甲醇洗脱液, 冷冻干燥, 待用。

3. 合成片段的纯度鉴定 首先对合成片段进行同位素末端标记。在 T4 多核苷酸激酶作

* 第一军医大学, 广州 510515

用下,以 [γ - 32 P]-ATP 标记 5' 末端。标记后的样品进行 16% 聚丙烯酰胺凝胶 (7mol/L 尿素)电泳,然后进行放射自显影,观察合成片段的纯度。凡是达到电泳纯的片段即可用于连接,组装基因。

4. 基因片段的连接 为了使各片段能按设计顺序连接,除 5' 末端的两个片段 F_1 和 F_{10} 外,其余 $F_2 \sim F_9$ 各片段分别磷酸化,然后和未经磷酸化的 F_1 和 F_{10} 片段,各按 $1 \mu\text{mol/L}$ 混合,置 95°C 水浴 3min,自然冷却至室温,加入 10 单位 T4 DNA 连接酶,在 12°C 连接过夜。

5. 基因重组及克隆 载体 M13 mp18 RF DNA 用限制性内切酶 EcoRI、Hind III 切出粘性末端后,与合成基因连接。连接反应体系中含 $0.01 \mu\text{g}$ 末端磷酸化的基因, $0.1 \mu\text{g}$ 载体 M13 mp18RF DNA, 2 单位 T4 DNA 连接酶, 66mmol/L Tris-HCl(pH7.5), 5mmol/L MgCl_2 , 5mmol/L β -巯基乙醇, 1mmol/L ATP, 12°C 连接过夜,转染大肠杆菌 JM109。方法参照文献[6]进行。

6. 分子杂交试验 按 Kafatos 等方法^[7]进行斑点杂交。探针采用 5' 末端标记的寡核苷酸 F_1 、 F_6 片段。

7. 酶切分析 将杂交强阳性的重组子,抽提双链 DNA,用 EcoRI 和 Hind III 双酶切后,进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

8. 序列分析 用双脱氧末端终止法进行序列分析。具体操作按 Pharmacia LKB, T7 polyomerase kit 方法进行。

结果与讨论

一、基因的设计与合成

我们参考 Patarroyo^[5] 等人工合成含有孢子期和裂殖子期抗原决定簇的杂合多肽,将氨基酸序列翻译成 DNA 序列(见图 1)。并选择大肠杆菌中偏爱的密码子,在基因的 5' 端设计了三个限制性内切酶位点 EcoRI、Kpn I、Spe I。3' 端设计了四个限制性内切酶位点 NheI、BamHI、Pst I、Hind III 及一个终止信号 TAA。通过计算机对所设计的基因进行分析,消除基因

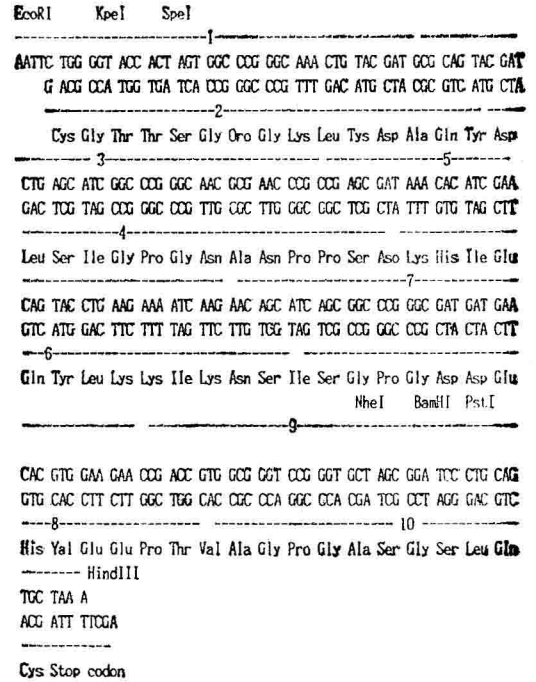


图 1 人恶性疟杂合多肽抗原基因设计

Fig. 1 Human *P. falciparum* hybrid peptide antigen gene design

内部的重复顺序,回文结构以及不必要的限制性内切酶位点。在化学合成中,每一步的反应效率都不会是百分之百的,这就限制了寡聚核苷酸的允许合成长度。因此,必须把基因分成若干小片段分别合成。我们将基因分成 10 个片段 ($F_1 \sim F_{10}$)。采用固相亚磷酸胺法合成,所用脱氧核苷酸单体是氰乙基亚磷酸二异丙基胺核苷酸。在 DNA 合成仪上自动合成。

二、基因片段的分离纯化

由于化学合成的效率问题,我们得到的粗

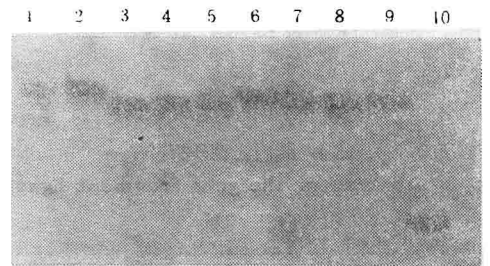


图 2 合成片段的纯化结果

Fig. 2 Purification of the synthetic fragment

产品中,必然有一些中途终止反应的寡聚核苷酸副产品,这些副产品严重影响以后的基因拼接,故必须进行分离纯化。我们将 10 个寡核苷酸片段经分离纯化后,放射自显影结果如图 2。

从图 2 可见 $F_1 \sim F_6$, $F_8 \sim F_{10}$ 在 16% 聚丙烯酰胺凝胶电泳图中,呈单条带型。证明这 9 个样品的纯度达到实验要求。而 F_7 出现二条带,我们将其重新进行了分离纯化,达到了单一条带后才用于基因拼接。 F_{10} 片段在合成时因试剂不够,只合成了 24 个寡核苷酸链,剩余的 18 个核苷酸另合成为 F_{11} 片段。

三、基因片段的连接

为了使合成的基因片段在连接过程中能按设计顺序连接,首先将 $F_2 \sim F_9$ 各片段分别磷酸化,而 F_1 和 F_{10} 不经磷酸化。然后取上述 10 个片段各取 $1 \mu\text{mol/L}$ 混合退火,在 T4 DNA 连接酶作用下连接 24h。次日取少量连接物,作 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,以酵母 tRNA 为分子量标准。电泳后进行放射自显影,结果见图 3。结果表明连接成完整基因的

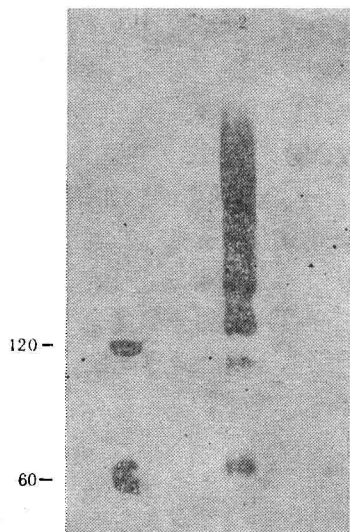


图 3 基因连接分析

Fig. 3 Analysis of the gene fragment ligation

- (1) 酵母 tRNA
Yeast tRNA
- (2) 连接物
Ligated samples

效率约为 15% 左右,可用于与载体连接。因为

我们设计基因时,两头是不同的粘性末端,只有连接成完整的基因时,才能跟具有相同粘性末端的载体连接。因此未连接好的寡核苷酸片段是不会与基因竞争载体而干扰重组效率。

四、基因重组及克隆筛选

连接好的基因经磷酸化后与载体 M13 mp 18RF DNA 重组连接,转染大肠杆菌 JM109。用 X-gal 筛选重组体。结果在含有 X-gal 和 IPTG 的 LB 平板中得到一批白色噬菌斑。提取 24 个白色噬菌斑和 8 个蓝色噬菌斑单链 DNA,以 5' 末端标记的 F_1 和 F_6 片段为探针进行斑点杂交试验。结果见图 4。图中可见有

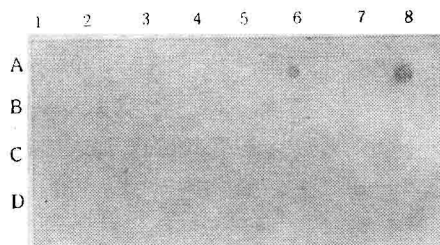


图 4 斑点杂交结果

Fig. 4 Result of spot-hybridization.

- A, B, C: 白色噬菌斑
A, B, C: white plaques
- D: 蓝色噬菌斑
D: blue plaques

两个强阳性杂交斑点,而蓝色噬菌斑则未见有杂交斑点。阳性噬菌斑分别命名为 HPF-6 和 HPF-8。将 HPF-6 提取双链 DNA,用 EcoR I 和 Hind III 酶切回收,并经 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。结果见图 5。从图 5 可见在标准分子量的 240bp 和 170bp 之间,有一条约 216 bp 左右的条带,与所设计的基因大小相符。

五、克隆 DNA 序列分析

为了更进一步证实该酶切回收的片段即为所设计的基因,和基因片段在连接过程中有无错配现象及个别核苷酸的错误。我们取 HPF-6 用双脱氧链终止法进行 DNA 序列分析,结果见图 6。证明与所设计的基因完全一致。

六、小结

以上结果表明我们已克隆得到人工合成的包含有恶性疟裂殖子多肽、子孢子表面重复顺序、子孢子辅助 T 细胞抗原决定簇和环状细胞

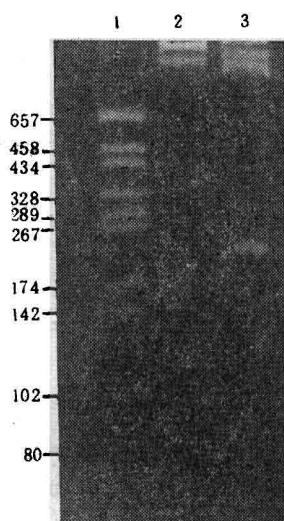


图5 酶切分析

Fig. 5 Analysis of the recombinant and restricted fragment

- (1) 标准分子量 Standard molecular marker;
(2) HPF-6;
(3) HPF-6/EcoRI-HindIII

表面抗原的杂合抗原基因。为开辟用人工方法合成多价复合疫苗提供依据和可能性。最近我们已将该基因与表达载体重组并在大肠杆菌中得到了表达。对该表达产物的生物学活性我们正在进行研究。

参 考 文 献

- 1 Kemp D J *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80(12): 3787
- 2 Enea V *et al. Science*, 1984; 225: 628
- 3 程勤等. 生物工程学报, 1989; 5(2): 92
- 4 Guntaka R V *et al. Nucleic Acids Res*, 1985; 13(6): 1965
- 5 Patarroyo M E *et al. Nature*, 1988; 332: 158
- 6 侯云德主编. 病毒基因工程的原理与方法. 北京: 人民卫生出版社, 1985; 153

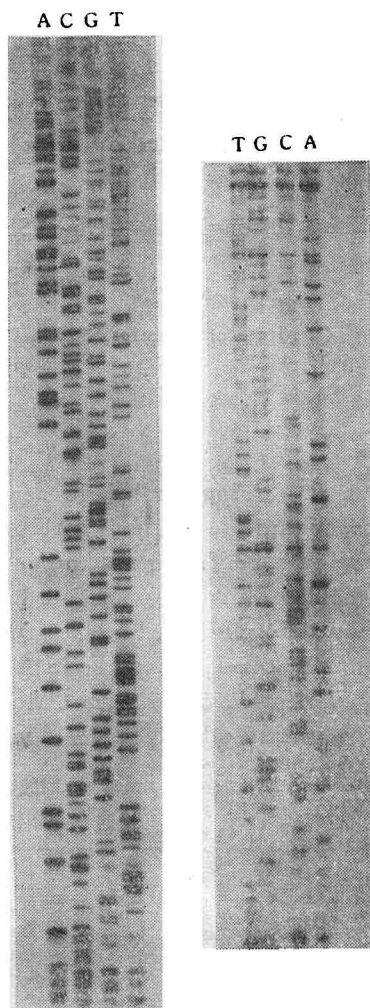


图6 DNA 序列分析

Fig. 6 DNA sequence analysis

- 7 Kafatos F C *et al. Nucleic Acids Res*, 1979; 7:1541

[本文于 1990 年 5 月 10 日收到, 1991 年 1 月 24 日修回]

CHEMICAL SYNTHESIS AND CLONING OF HUMAN *PLASMODIUM FALCIPARUM* HYBRID PEPTIDE ANTIGEN GENE

Zhong Xionglin* Chen Shirong* Qiu Minyan Wang Changcai*
Min Yongjie Wang Qisong

(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433; *First Medical College
PLA, Guangzhou 510515)

ABSTRACT

Human *P. falciparum* hybrid peptide antigen gene has been synthesized by the solid-phase phosphoramidite method with ABI381A DNA synthesizer. The gene is 216bp in length and divided into 10 fragments to synthesis. All synthetic fragments were annealed and ligated with T4 DNA ligase. The product of synthetic gene was recombined with phage M13 mp18 vector and transfected to *E. coli* JM109. The recombinants were screened by spot hybridization with ³²P-label synthetic fragment. The sequence of synthetic gene was analysed by dideoxynucleotide chain termination method. The results showed that synthesized human *P. falciparum* hybrid antigen gene was identical with the designed one.

Key words Humans *P. falciparum* hybrid peptide antigen gene, DNA chemical synthesis, cloning

(Continued from page 293)

REGULATION OF THE ACTIVITY OF BOVINE BRAIN 63kD PDE ISOZYME BY PHOSPHORYLATION AND DEPHOSPHORYLATION

Zhang Guangyi

(Department of Biochemistry, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002)

ABSTRACT

In this paper the regulation of the activity of bovine brain 63kD PDE isozyme by phosphorylation and dephosphorylation was studied. The experimental results are as follows: 1. The 63kD PDE isozyme was phosphorylated by the purified bovine brain Ca²⁺/CaM-PK II in the presence of Ca²⁺ and CaM, the maximal phosphate incorporation was 1mol/mol subunit of the 63kD PDE isozyme. 2. The phosphorylated 63kD PDE isozyme was dephosphorylated by calcineurin in the presence of Ni²⁺ and CaM. 3. The AC₅₀ for Ca²⁺ of the phosphorylated form of the 63kD PDE isozyme was higher than that of the nonphosphorylated form of the 63kD PDE isozyme.

Key words phosphorylation, dephosphorylation, bovine brain 63kD PDE isozyme, bovine brain Ca²⁺/CaM-PK II, calcineurin