

一种简便、快捷的胰蛋白酶抑制剂 基因的分离与克隆方法

秦新民¹, 邓智年²

(1. 广西师范大学生物系, 广西桂林 541004; 2. 广西农业科学院, 广西南宁 530007)

摘要: 从3个豇豆品种幼嫩叶片中分离出核基因组DNA, 参照已知的几种Bowman-Birk型胰蛋白酶抑制剂基因序列, 设计合成了27 bp, 且含有BamH I位点的寡核苷酸引物, 分别以3种豇豆核基因组DNA为模板, PCR扩增, 均得到长度约为340 bp的DNA片段。产物DNA片段经DNA序列分析, 结果表明三者的碱基序列相同, 与报道的胰蛋白酶抑制剂基因相比, 同源率为100%和99.7%。

关键词: 豇豆; 豇豆胰蛋白酶抑制剂基因; PCR扩增

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)05-0420-05

A simple and rapid method for separation and cloning of cowpea trypsin inhibitor gene

QIN Xin-min¹, DENG Zhi-nian²

(1. Department of Biology, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China; 2. Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: The total nuclear genomic DNA were respectively extracted from young leaf tissue of three varieties of cowpea. A 27 bp-long oligonucleotide primer with BamH I in 5 terminus was designed and synthesized by conferring the gene sequence of cowpea Bowman-Birk type trypsin inhibitor that have been known. The special DNA fragment about 340 bp was amplified through PCR by using the primer and extracted DNA as template. Moreover, the amplified bands were sequenced. The results showed that they were the same sequence. Compared the sequences with that of published CPTI cDNA, the cloned CPTI genes respectively shared 100% and 99.7% homology with published CPTI cDNA nucleotide sequence.

Key words: cowpea; cowpea trypsin inhibitor gene; polymerase chain reaction amplification

植物蛋白酶抑制剂是一类含量较为丰富, 对蛋白水解酶有抑制作用的一类小分子蛋白质, 在植物对危害昆虫及病原体侵染的防御系统中担当着重要的角色^[1]。豇豆胰蛋白酶抑制剂(Cowpea Trypsin Inhibitor, CPTI)属丝氨酸蛋白酶类, Bowman-Birk家族蛋白酶抑制剂, 具有2个抑制活性位点, 可同时

抑制胰蛋白酶和凝乳蛋白酶的活性, 对鳞翅目、鼓翅目、双翅目以及部分鞘翅目昆虫具有较强的毒杀作用。由于CPTI具有广泛的抗虫谱, 在植物抗虫基因工程中具有广泛的应用前景, 从而受到人们的关注, 相继对CPTI基因进行了克隆^[2,3]和转基因研究^[4,5]。

收稿日期: 2001-08-15

作者简介: 秦新民(1956-), 男, 广西灵川人, 博士, 研究员, 分子生物学专业, 主要从事植物分子生物学研究。

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号: 20007007); 广西师范大学博士启动基金。

本文参照几种 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制剂基因序列,以桂林当地 3 个豇豆品种(紫红,白色,花斑)为材料,进行 CPTI 基因的克隆,旨在为重要农作物的抗虫基因工程提供 CPTI 基因。

1 材料与方 法

1.1 材料

当地紫红、白色、花斑 3 个豇豆品种的幼嫩叶片。质粒 pGEM-3zf(+),大肠杆菌 DH5 α 。

1.2 方法

1.2.1 植物 DNA 的提取 参照 Mettler^[6]的方法,略作修改。取 0.5 g 叶片加入液氮研磨成粉末状,加入 500 μ L DNA 提取液,轻轻摇匀,冰浴 15 min;加入 250 μ L T₂₀E₁₀,10%SDS 至终浓度为 1%,摇匀,68 $^{\circ}$ C 水浴 15 min;加入 7.5 M NH₄Ac 275 μ L,冰上放置 40 min;10 000 rpm,4 $^{\circ}$ C,离心 25 min;取上清,加入等体积的酚/氯仿(1:1),氯仿各抽提 1 次;上清加入 1/10 体积的 3 M NaAc(pH5.2)和 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA,-20 $^{\circ}$ C 放置 30 min;10 000 rpm,4 $^{\circ}$ C,离心 10 min;去上清,倒置离心管凉干沉淀;加适量 TE 溶液溶解 DNA;然后加入 RNase A(浓度达到 50~70 μ g/mL),-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR) 为了便于克隆,在引物 5'端加入了一个 BamH I 酶切位点。上游引物:5'-CATGGATCT-GAACCACCTCGG-3'。下游引物:5'-CCTACTTC-TACTACTCATTCT-3'。在灭菌后的新 0.5 mL Eppendorf 离心管中依次加入:模板 DNA 2 μ L,10XPCR buffer 3 μ L,dNTP0.2 μ M,上游引物 50 pmol,下游引物 50 pmol,PfuDNA 聚合酶 5U,双蒸水补足至 30 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C,5 min;93 $^{\circ}$ C,1min,50 $^{\circ}$ C,1 min 30 s,70 $^{\circ}$ C,2 min(36 个循环);70 $^{\circ}$ C,10 min。PCR 扩增产物的纯化,按 PCR 产物回收试剂盒的说明方法进行。

1.2.3 DNA 序列分析 将 PCR 产物克隆到载体 pGEM-3zf(+),转化 E. coli DH5 α ,通过菌落蓝白斑筛选和限制酶酶切鉴定,得到重组质粒 pGM-CL27。以重组质粒 pGM-CL27 的 T7/SP6 启动子序列为引物,采用双脱氧链终止法进行双向自动测序。由大连宝生生物工程公司完成。

1.2.4 大肠杆菌质粒 DNA 的提取 用碱裂解法提取质粒 DNA^[7]。

1.2.5 载体酶切产物的去磷酸化 载体 pGEM-3zf(+),用限制性内切酶 BamH I 消化,然后按文献^[7,8]的方法进行去磷酸化。

1.2.6 DNA 限制酶切反应和 DNA 片段的连接 限制性内切酶酶解,klenow 补齐末端和 DNA 片段的连接方法均按文献^[7]进行。

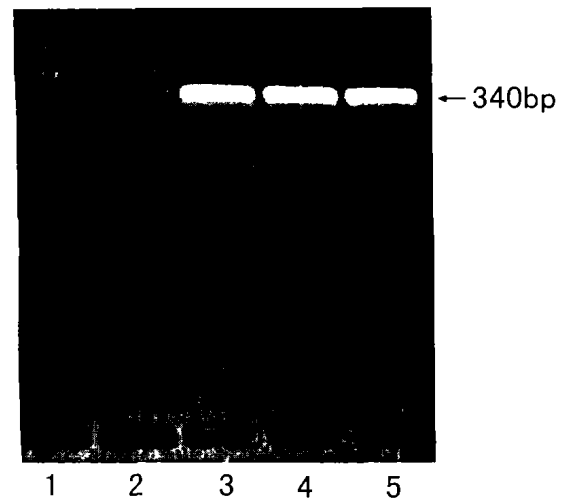


图 1 三个豇豆品种 DNA PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of three varieties cowpeas
1. DNA 分子量; 2. 对照; 3. 白色豇豆; 4. 紫红豇豆; 5. 花斑豇豆
1. DNA marker(DL-2000); 2. CK; 3. White cowpeas;
4. Purplish red cowpeas; 5. Piebald cowpeas

2 结 果

2.1 CPTI 基因 PCR 扩增

以 3 个豇豆品种 DNA 为模板,在 PCR 反应体系中,用高保真 DNA 聚合酶(pfu)来扩增。36 个循环后,取 10 μ L 样品进行琼脂凝胶电泳检测,以 DNA Marker(DL-2000)为分子量标准,结果在 340 bp 处有清晰的扩增带(图 1)。然后用 PCR 产物纯化试剂盒将 340 bp 的 DNA 扩增带进行回收,并于-20 $^{\circ}$ C 下保存。

2.2 扩增 DNA 片段的序列分析

将由 3 个豇豆品种 DNA 扩增出的 CPTI DNA 片段进行序列分析,结果表明 3 条 DNA 扩增带的碱基序列完全相同(图 2),含有编码 CPTI 成熟蛋白 80aa 碱基序列和 27aa 的前导序列。

2.3 CPTI 基因的克隆

由于合成引物 5'端均带有限制性内切酶 BamH

I.的酶切位点,用 BamH I 对回收的 PCR 扩增 DNA 片段进行酶切,使 DNA 片段两端产生 5' 突出末端。然后再用 PCR 产物试剂盒进行回收。质粒 pGEM-

3zf(+) 同样用 BamH I 酶切,经两次去磷酸化处理,回收线性载体 pGEM-3zf(+)。将 CPTI 片段与线性质粒 pGEM-3zf(+) 按 3 : 1 比例混合,用 T₄ DNA

1	AAACGACGGC	CAGTGAATTG	TAATACGACT	CACTATAGGG	CGAATTCGAG
51	CTCGGTACCC	<u>GGGGATCCGA</u>	TGATGGTGCT	AAAGGTGTGT	GTGCTGGTAC
		BamHI			
101	TTTTCTTGT	AGGGGTTACT	<u>ACTGCAGCCA</u>	<u>TGGATCTGAA</u>	CCACCTCGGA
			PstI	NcoI	
151	AGTAATCATC	ATGATGACTC	AAGCGATGAA	CCTTCTGAGT	CTTCAGAACC
201	ATGCTGCGAT	TCATGCATCT	GCACTAAATC	AATACCTCCT	CAATGCCATT
251	GTACAGATAT	CAGGTTGAAT	<u>TCGTGTCACT</u>	CGGCTTGCAA	ATCCTGCATG
			EcoRI		
301	TGTACACGAT	CAATGCCAGG	CAAGTGTCTG	TGCCTTGACA	TTGCTGATTI
351	CTGTTACAAA	CCTTGCAAGT	CCAGGGATGA	AGATGATGAG	TAAGAAAAAG
401	<u>GAGGATCCTC</u>	TAGAGTCGAC	CTGCAGGCAT	GCAAGCTTGA	GTATTCTATA
	BamHI				
451	GTGTCACCTA	AATAGCTTGG	CGTAATCATG	GTCATAGCTG	TTTCCTGTGT
501	GAAATTGTTA	TCCGCTCACA	ATTCCACACA	ACATACGAGC	CGGAAGCATA
551	AAGTGTAAG	CCTGGGGTGC	CTAATGAGTG	AGCTAACTCA	CATTAATTGC
601	GTTGCGCTCA	CTGCCCGCTT	TCCAGTCGGG	AAACCTGTCTG	TGCCAGCTGC
651	ATTAA				

图 2 胰蛋白酶抑制剂基因的 DNA 序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of the cowpea trypsin inhibitor gene

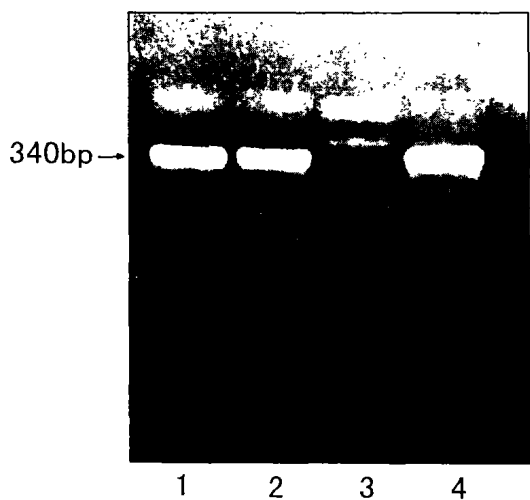


图 3 重组质粒 pGMCl27 的 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification of recombinant plasmids pGMCl27

1, 2, 4. 重组质粒 DNA; 3. DNA 分子量

1, 2, 4. DNA of recombinant plasmid; 3. DNA marker (DL-2000)

连接酶连接, 再将产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α 。通过蓝白斑选择, 挑取白色菌落进行小量快速提取

重组质粒, 质粒经 PCR 扩增, 检测到了 340 bp 的 CPTI 片段(图 3), BamH I 酶切后可得到一条 3.2 kb 的载体 DNA 带和一条 340 bp CPTI DNA 片段(图 4)。结果证明 CPTI 基因已连接到质粒 pGEM-3zf(+) 上, 获得了重组质粒 pGMCl27(图 5)。

3 讨 论

近年来, 基因克隆的方法有了长足的进展, 相继发展出一些基因克隆的新方法^[9, 10], 其中 RNA-cDNA-PCR 为最常用的方法之一。许多学者运用该方法成功的克隆到了一些生物的重要性状基因^[11~14], 该方法虽省略了分离 mRNA 的程序, 但仍需提取总 RNA。由于 RNA 易降解, 提取的实验技术要求较高, 而且烦琐。刘春明^[15], 龙立如^[16], 李江等人^[17]用 DNA 为模板, 利用特异引物进行目的基因的扩增, 相继克隆到了豌豆外源凝集素基因, 水稻 10 KD 醇溶蛋白基因和水稻几丁质酶基因。本文直接以 DNA 为模板, 利用特异引物进行目的基因

的扩增(DNA-PCR法),从3个豇豆品种DNA中扩增出了CPTI基因。所得到的3个CPTI基因经DNA序列分析,结果与刘春明等人^[3]采用RNA-cDNA-PCR克隆的CPTI基因碱基序列完全相同,含有编码27aa的前导序列(信号肽,前导肽)和80aa的编码CPTI成熟蛋白区的碱基序列,同源率为100%。而与Hilder等人^[2]报道的CPTI基因仅在前导序列中有一个碱基不同,即前导序列中倒数第5

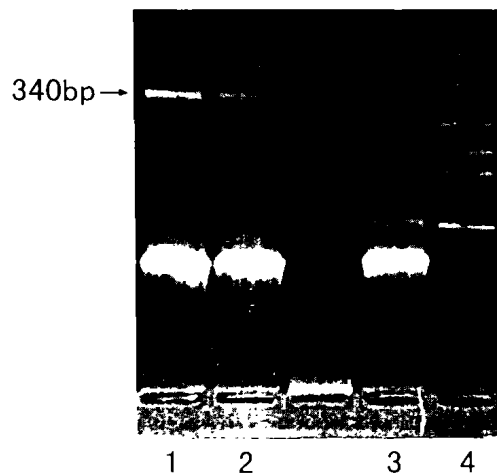


图4 重组质粒pGMCL27的酶切鉴定

Fig. 4 Identification recombinant plasmid by digestion
1. 2. 重组质粒经Hind III消化; 3. 重组质粒DNA; 4. DNA2分子量
1, 2. Digestion of recombinant plasmids by Hind III; 3. DNA of recombinant plasmid; 4. DNA marker (DL-2000)

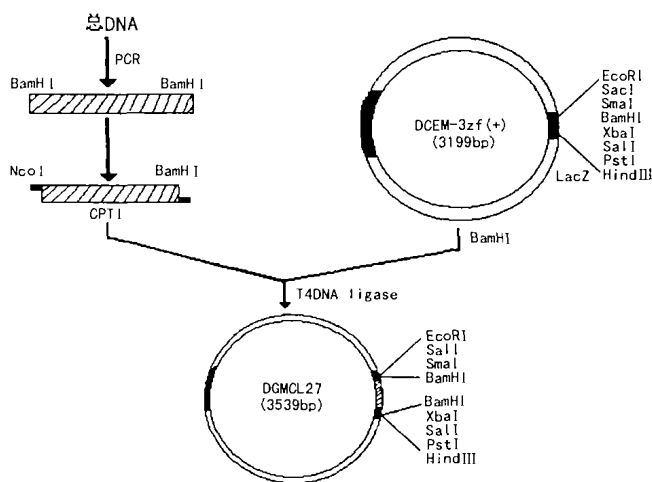


图5 质粒pGMCL27的构建

Fig. 5 Construction of plasmid pGMCL27

个三联体密码为CTG,而不是TTG,但两者编码的氨基酸都是亮氨酸。碱基序列的同源性达到99.7%。上述结果证明采用DNA-PCR方法与RNA-cDNA-PCR方法得到的CPTI基因是一致的,

但DNA-PCR方法克隆基因省去了提取RNA和反转录等步骤,具有简便、快速、费用低的特点,可为其他基因的克隆提供参考。

DNA提取现有许多简易方法,产物虽然可以用于PCR扩增反应的模板,但要从其中扩增出某一特定的目的基因并用于克隆时,其纯度则达不到要求,从而影响目的基因的扩增得率。故采用DNA-PCR方法扩增目的基因时,应将模板DNA进行纯化。本文采用苯酚-氯仿-异戊醇-核糖核酸酶法提取的模板DNA,其纯度和片段长度均可满足要求。

利用DNA-PCR法进行扩增和克隆目的基因另一个值得注意的问题是Taq DNA聚合酶的运用。Taq DNA聚合酶主要用于保真度要求不高的DNA扩增,它具有很强的DNA聚合能力,其DNA延伸速度在已知高温嗜热DNA聚合酶中是最高的。但是,Taq DNA聚合酶无3'→5'外切酶活性,因此在DNA扩增时没有校正功能。如仅以Taq DNA聚合酶来扩增目的基因,碱基的错误掺入率是相当高的。Pfu DNA聚合酶具有3'→5'外切酶的活性,能纠正DNA扩增过程中产生的错误,是目前所有高温DNA聚合酶中出错率最低的^[18]。在基因克隆中,由于对DNA扩增产物的正确率要求特别高,所以在利用DNA-PCR方法进行基因克隆时应选Pfu DNA聚合酶,以确保扩增产物DNA的正确性。

本实验得到广西大学生物技术实验中心黄日波博士和冯家勤博士的大力帮助,谨此致谢。

参考文献:

- [1] 周兆澜,朱 祯. 植物抗虫基因工程研究进展[J]. 生物工程进展, 1994, 14(4): 18-24.
- [2] Hilder V A, Richard E B B, Reda A S, et al. Protein and cDNA sequence of Bowman-Birk trypsin inhibitor from Cowpea[J]. *Plant Mol. Bio.*, 1989, 13: 701-710.
- [3] 刘春明,朱 祯,周兆澜,等. 豇豆胰蛋白酶抑制剂cDNA在大肠杆菌中的克隆与表达[J]. 生物工程学报, 1993, 9(2): 152-157.
- [4] 刘春明,朱 祯,周兆澜,等. 豇豆胰蛋白酶抑制剂抗虫转基因烟草的获得[J]. 科学通报, 1992, (18): 1694-1697.
- [5] Hilder V A, Angharan N R G, Suzanne E S H. et al.

- A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco[J]. *Nature*, 1987, **300**(12): 160-163.
- [6] Mettler A J. A simple and rapid method for minipreparation of DNA from tissue culture plant cell [J]. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1987, (5): 346-349.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T M. (eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [C]. 2ed. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbort, New York. 1998. 19-21.
- [8] 彭秀玲, 袁汉英, 谢毅, 等. 基因工程实验技术 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998. 89.
- [9] 潘映红, 张杰, 黄大昉. 几种微生物杀虫蛋白基因研究进展[J]. *生物技术通报*, 1999, **2**: 1-4.
- [10] 李捷, 印莉萍, 刘维仲. 示差扣除杂交法及其在分子生物学中的应用[J]. *生物技术通报*, 1999, **3**: 9-14.
- [11] 李鲜, 朱本忠, 罗云波. 番茄果实中 NEVER-RIPE 基因的克隆及其反义表达载体的构建[J]. *农业生物技术学报*, 2001, **4**: 371-373.
- [12] 冯洁, 何礼远, 袁风华. 马铃薯 32KD 抗菌蛋白的 cDNA 分子克隆研究[J]. *农业生物技术学报*, 1999, **1**: 37-40.
- [13] 陈海旭, 胡泰山, 王新, 等. 抗菌肽 Dipterin cDNA 的克隆及在 *E. coli* 中的融合表达[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, **2**: 182-184.
- [14] Joshi L, St Leger RJ, Roberts DW. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1B) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential dipay-RT-PCR [J]. *Gene*, 1997, **197**: 1-8.
- [15] 刘春明, 于占洋, 朱祯, 等. 豌豆外源凝集素基因的克隆及序列分析[J]. *遗传学报*, 1995, **4**: 302-306.
- [16] 龙立如, 谢明, 翟礼嘉, 等. 水稻富硫 10KD 醇溶蛋白基因的克隆和序列分析比较[J]. *植物学报*, 1995, **7**: 507-513.
- [17] 李江, 胡学军, 苏乔, 等. 水稻几丁质酶基因的克隆及序列分析[J]. *农业生物技术学报*, 1998, **4**: 382-388.
- [18] 陶生策, 张治平, 张先恩. PCR 技术研究进展[J]. *生物工程进展*, 2001, **4**: 26-29.

(上接第 419 页 Continue from page 419)

14(1): 34-39.

业出版社, 1999. 40.

[20] 王金生. 分子植物病理学[M]. 北京: 中国农

图版说明

图版缩写词: EN-内果皮; I-异细胞; ICS-胞间隙; L-皮孔; P-周皮; PC-薄壁细胞; SC-石细胞; SE-刺毛; SU-栓质层; TR-横条薄壁细胞; TU-瘤状突; V-维管束。

图版 I: 龙眼果皮显微结构($\times 250$) 1~2. 水涨龙眼; 3~4. 赤壳龙眼; 5. 福眼龙眼; 6~7. 普明庵龙眼; 8. 蕉眼龙眼; 9. 红核子龙眼; 10~11. 油潭本龙眼; 12~13. 乌龙岭龙眼; 14~15. 凤梨味龙眼; 16~17. 东壁龙眼。

Explanation of Plate

Abbreviations used on all figures: EN-Endocarp; I-Idioblast; ICS-Intercellular space; L-Lenticel; P-Periderm; PC-Parenchyma cell; SC-Stone cell; SE-Seta; SU-Suberin layer; TR-Trabecula parenchyma cell; TU-Tumor shape projecting; V-Vascular bundle.

Plate I: Microstructure of longan fruit pericarp ($\times 250$) 1~2. Shuizhang; 3~4. Chike; 5. Fuyan; 6~7. Pumingan; 8. Jiaoyan; 9. Honghezi; 10~11. Youtanben; 12~13. Wulongling; 14~15. Fengliwei; 16~17. Dongbi.