

溶菌酶基因合成及其原核表达

刘兴敏^{1,2}, 何自福¹, 李华平², 虞皓¹

(1 广东省农业科学院 植物保护研究所, 广东 广州 510640; 2 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要:根据 T4 噬菌体溶菌酶的氨基酸序列, 选用植物偏爱的密码子设计并人工合成了溶菌酶基因, 并在 N-端加上 23 个氨基酸残基的 α -淀粉酶信号肽序列和信号肽酶切位点 HQP; 用甘氨酸残基替代 C-端的酰胺; 新基因全长为 576 bp, 共编码 190 个氨基酸. 为了检测该基因生物活性, 将其克隆到原核表达载体 pET28b(+) 中, 导入宿主细菌 *E. coli* BL21(DE3) pLysS, 经 IPTG 诱导后, 宿主细菌在 2 h 内全部被溶菌酶基因的表达产物裂解, 说明该溶菌酶基因对细菌具有很强的抗性.

关键词:溶菌酶基因; 合成; 原核表达

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2007)01-0055-03

Synthesis of Lysozyme Gene and Its Expression in *Escherichia coli*

LIU Xing-min^{1,2}, HE Zi-fu¹, LI Hua-ping², YU Hao¹

(1 Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2 College of Resources and Environment, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Based on the amino acid sequence of lysozyme of bacteriophage T4, an artificial lysozyme gene was designed and synthesized with plant preferred codons. The signal sequence of barley α -amylase and HQP of the signal peptide digested site were hooked to N-terminus of the lysozyme. The acylamide of C-terminus was substituted by glycine. The complete length of the synthetic lysozyme gene was 576 bp, which encoded 190 amino acids. The gene was constructed into prokaryotic expression vector pET28b(+) and transformed into *E. coli* BL21(DE3) pLysS to detect its bioactivity. Induced by IPTG, the expression products of the lysozyme gene degraded the host bacteria *E. coli* BL21(DE3) pLysS completely within two hours. That demonstrated that the synthetic lysozyme gene had a high resistance to bacteria.

Key words: lysozyme gene; synthesis; prokaryotic expression

茄科雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 侵染引起的植物青枯病广泛分布于热带、亚热带及温带地区, 是最重要的植物细菌病害之一. 在我国长江以南尤其是华南地区, 番茄、茄子、辣椒、马铃薯和烟草等作物青枯病发生十分普遍, 每年均造成了巨大的经济损失, 已成为生产持续发展的主要限制因子. 该病害的防治措施主要有培育抗病品种、栽培防病、生物防治和抗病基因工程. 培育抗病品种是最有效的措施之一, 但目前发现的抗青枯病作物资源十分有限, 且抗性基因多与劣质基因连锁, 从而限制了抗性基因

的利用及抗病优质品种培育的进程^[1]; 而目前应用生防菌、拮抗菌等来防治青枯病的效果还不稳定、环境依赖性强^[2]. 轮作栽培是控制青枯病发生十分有效的措施, 但实际生产中常因轮作周期短或生产条件的限制而失败. 为此, 研究者把目光投向抗病基因工程. 目前, 利用抗菌肽来控制青枯病的抗病基因工程研究已取得了许多可喜的进展^[3-4]. 溶菌酶是一种作用于微生物细胞壁的水解酶, 其具有广谱抗菌活性, 不但可以水解细菌细胞壁的 β -1-4 糖苷键, 而且可水解真菌的细胞壁. 因此, 溶菌酶基因作为一种

收稿日期: 2006-01-09

作者简介: 刘兴敏(1977—), 男, 硕士; 通讯作者: 何自福(1966—), 男, 副研究员, 博士, E-mail: hezf@gdppri.com

基金项目: 广东省科技计划项目(2004B20501015); 广州市科技攻关项目(2002Z2-E0191)

重要的抗性基因已开始用于植物抗病基因工程研究^[5-7]. 本文探索了人工合成溶菌酶基因及其对细菌的抗性研究.

1 材料与方法

1.1 材料

限制性内切酶、DNA marker 和 *Taq* DNA 聚合酶,均为 TaKaRa 公司产品. 原核表达载体 pET28b(+), *E. coli* JM109 和 *E. coli* BL21(DE3) pLysS,由华南农业大学植物病毒研究室保存.

1.2 溶菌酶基因的设计与合成

根据 T4-噬菌体溶菌酶的氨基酸序列^[8],选用植物偏爱的密码子,设计了溶菌酶基因. 为了使基因表达产物能分泌到胞外,在 N-端加上大麦 α -淀粉酶信号肽序列(23 个氨基酸残基)^[9],在信号肽序列后紧跟信号肽酶切位点 HQP,用甘氨酸残基替代 C-端的酰胺,用作翻译后加工的酰胺源. 因此,设计的溶菌酶含 190 个氨基酸残基,编码该溶菌酶基因全长为 576 bp;为了便于克隆,另在该基因两端分别加上 *Nco* I 和 *Bam* H I 酶切位点. 溶菌酶基因的合成由上海生工生物工程技术有限公司完成,并将该基因克隆在 pUC18 载体上.

1.3 溶菌酶基因的验证

将克隆有溶菌酶基因的重组质粒 pUC18 重新转化 *E. coli* JM109,碱裂解法^[10]提取质粒. 进行序列测定,以检测其核苷酸序列与设计的是否完全一致. 序列测定由上海博亚公司完成.

1.4 溶菌酶基因的原核表达

为了把溶菌酶基因克隆到原核表达载体 pET28b(+)上并形成正确的 ORF,根据设计并获得的溶菌酶基因核苷酸序列,在该基因的 2 端设计 1 对引物 PL 和 PR,并在引物的 5' 和 3' 端分别加上 *Eco* R I 和 *Hind* III 酶切位点,引物序列为:

PL 5' catcgaattcgatggggaagaagagccacat 3',
EcoR I

PR 5' gcgcgaagctttatcacagggtttgttacg 3'.
Hind III

将 PCR 扩增的溶菌酶基因和 pET28b(+) 分别用 *Eco* R I 和 *Hind* III 进行双酶切,酶切结束后用 Eppendorf DNA 回收试剂盒分别回收目的片断,连接、转化及重组质粒的筛选均参考 Sambrook 等^[10]的方法进行. 取 PCR 鉴定和酶切鉴定均为阳性的克隆,进行核苷酸序列测定,检查目的基因是否准确无误地插入到 pET28b(+) 上,从而获得重组的原核表达载体 pET. LZ.

挑取含 pET. LZ 的 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 单菌落,接种到 LB(含 Kan 100 μ g/mL)液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 活化过夜;按体积比 1:100 稀释转入含有 Kan 100 μ g/mL 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 下培养至 $D_{600\text{ nm}} \approx 0.6$,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,分别进行诱导表达 0.5、1.0、1.5 和 2.0 h.

1.5 溶菌酶基因原核表达产物活性测定

用抑菌圈法测定溶菌酶基因原核表达产物对茄科雷尔氏菌的抑制活性. 预先培养茄科雷尔氏菌至对数生长期,取菌液 30 μ L 与 LB 固体培养基 7 mL 在 45 $^{\circ}$ C 左右混匀后平铺于培养皿上;凝固后,把灭菌的钢圈压在培养基上. 诱导表达 2 h 的产物 12 000 r/min 离心 1 min,上清液经 0.45 μ m 的滤膜过滤. 将 100 μ L 滤液加到钢圈中,使其慢慢渗入培养基中,取出钢圈,30 $^{\circ}$ C 培养 2 d 后观察结果.

2 结果与分析

2.1 溶菌酶基因的设计及合成结果

采用植物偏爱的密码子,设计并人工合成了溶菌酶基因,该基因全长为 576 bp,编码 190 个氨基酸(图 1). 序列测定结果显示,合成的溶菌酶基因序列与设计的序列完全一致.

```

1  CGATCGGGAAGAAGAGCCACATTTCTGCTTCTCGCTGCTGCTGCTTCTGTTTGGCGGGTTG
   M G K K S H I C C F S L L L L L L F A G L
61  GCATCGGCCATCAGCCAATGAACATCTCGAATGCTGCGTATCGATGAACGCTGCTGCT
   A S G H Q P M N I F E M L R I D E R L R
121 CTGAAGATCTACAAAGATACCGAAGGTTACTACACCATCGGTATCGGTACCTGCTGACC
   L K I Y K D T E G Y Y T I G I G H L L T
181 AAGAGCCGAGCTGAACCGCGCGGAGAAAGCGAGCTGATAAAGCGATCGGTGTAAGTGC
   K S P S L N A A K S E L D K A I G R N C
241 AACGGTGTGATCACCAGAGATGAAGCGGAAAGTGTTCAGCAGGATGTCGACGCGCG
   N G V I T K D E A E K L F N Q D V D A A
301 GTTCGTGATCTGCTGCTAAGCGGAAAGTGAACCGGTTTACGATAGCCTGGATGCGGTT
   V R G I L R N A K L K P V Y D S L D A V
361 CGTCGTTGCGGCTTATCAACATGGTTTTCAGATGCGGTGAACCGGTTGTCGGGTTTC
   R R C A L I N M V F Q M G E T G V A G F
421 ACCAACAGCCTGCGTATGCTGACGAGAACGTTGGGATGAAGCGCGGTTAACCTGGCG
   T N S L R M L Q Q K R W D E A A V N L A
481 AATCTATCTGTACACACGACCCGACCGTGGCAACGTTTATCACCACCTTCGCT
   K S I W Y N Q T P N R A K R V I T T F R
541 ACCGGTACCTGGGATGCGTACAAAACCTGCGATAAGGATCC
   T G T W D A V K N L
  
```

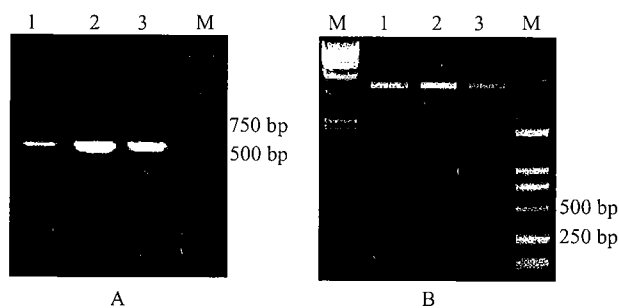
下划线为 *Nco* I 和 *Bam* H I 酶切位点,加框为起始密码子和终止密码子 Digesting sites of *Nco* I and *Bam* H I were underlined, start codon and stop codon were framed

图 1 设计及合成的溶菌酶基因序列

Fig. 1 The sequence of lysozyme gene designed and synthesized artificially

2.2 溶菌酶基因原核表达载体构建

2.2.1 重组原核表达载体的鉴定结果 在平板上分别挑选 3 个白色菌落进行培养,用碱裂解法抽提质粒. PCR 鉴定结果显示(图 2A),这 3 个质粒分别能扩增出 598 bp 的特异带. *Eco* R I 和 *Hind* III 双酶切鉴定结果显示(图 2B),这 3 个质粒也能分别被酶切出 576 bp 的特异片段,与预期的结果一致. 说明这些重组质粒均含有目的基因.



A: PCR 鉴定; B: 酶切鉴定; M: DNA marker; 1~3: 待鉴定的克隆;
A: identification by PCR; B: identification by *EcoR* I and *Hind* III; M: DNA marker; 1-3: different clones

图2 重组原核表达载体 PCR 和酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant expressing plasmids by *EcoR* I/*Hind* III digesting and PCR

2.2.2 重组质粒序列测定结果 对上述3个克隆进行序列测定,结果显示,其碱基序列与设计的序列完全一致,并形成正确的 ORF,表明溶菌酶基因已成功地克隆到原核表达载体 pET28b(+)上。

2.3 溶菌酶基因在原核表达系统中诱导表达结果

在含 pET. LZ 的 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 中加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L,进行诱导表达。1.5 h 时,试管中培养液开始变得比对照(未加 IPTG)明显透明,说明宿主细菌开始被裂解;2 h 后,培养液变得完全透明(与未接种的培养液基本一样透明),肉眼可看见试管底部有沉淀物,是被裂解掉的细菌细胞碎片,说明宿主细菌全部被裂解掉;而没有加 IPTG 的对照,其宿主细菌大量繁殖生长,培养液十分混浊。这说明,经 IPTG 诱导后,溶菌酶基因表达的产物可以裂解宿主细菌。

2.4 溶菌酶基因原核表达产物对茄科雷尔氏菌抑制活性的检测结果

抑菌圈试验结果显示,30 ℃ 下培养 2 d 的茄科雷尔氏菌平板上,100 μL 诱导表达 2 h 的产物抑菌圈不太明显,与对照相似。

3 讨论

本研究人工设计并合成了植物偏爱的密码子的溶菌酶基因,并通过原核表达系统证明其表达产物对细菌具有较强的裂解活性,这为下一步利用该基因来开展抗植物细菌病害基因工程研究奠定了初步基础。

茄科青枯病是由茄科雷尔氏菌侵染引起的一种系统性维管束细菌病害。病原细菌由伤口侵入植物组织后在维管束内繁殖并扩散,而胞内合成的溶菌酶由于不能接触到细菌,不能起到杀菌作用,细胞破裂后又可能造成溶菌酶的降解。本研究以植物偏爱

的密码子,并将大麦 α-淀粉酶的信号肽基因序列与溶菌酶基因连接在一起构成嵌合基因,可以指导溶菌酶基因的表达产物分泌到细胞外,有利于提高它在组织中的积累量和在细胞间隙的浓度,从而抑制侵入到植物体内的茄科雷尔氏菌繁殖与扩散。

本研究克隆的溶菌酶基因在原核表达系统中经诱导表达 2 h 后,其表达产物可将宿主细菌全部裂解掉,使之产生“自杀”现象,说明该基因表达产物对细菌具有很强的抑制活性;但在茄科雷尔氏菌平板上未产生明显的抑菌圈。究其原因,我们认为可能是因为溶菌酶基因还未来得及大量表达,即将宿主细菌完全裂解掉,使其产物浓度较低,难以在平板上表现出明显的抑菌圈。我们正准备将该基因克隆到酵母表达系统中,进一步研究该基因表达产物的生物活性。

参考文献:

- [1] 番茄新品种选育技术专题组. 广东番茄青枯病的病原及其抗病性鉴定方法[C]//李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展. 北京:科学出版社, 1995: 263-266.
- [2] 葛红莲, 赵红六, 郭坚华. 辣椒青枯病拮抗细菌的筛选及其鉴定[J]. 周口师范学院学报, 2004, 21(2): 71-75.
- [3] 贾士荣, 屈贤铭, 冯兰香, 等. 转抗菌肽基因提高马铃薯对青枯病的抗性[J]. 中国农业科学, 1998, 31(3): 5-12.
- [4] 黄大年, 朱冰, 杨炜, 等. 抗菌肽 B 基因导入水稻及转基因植株的鉴定[J]. 中国科学: C 辑, 1997, 27(1): 55-63.
- [5] TRUDE L J, POTVIN C, ASSELIN A. Expression of active hen egg white lysozyme in transgenic tobacco [J]. Plant Science, 1992, 87: 55-56.
- [6] 王冰山, 窦道龙, 张永强, 等. 人溶菌酶基因在烟草中的表达[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(4): 338-342.
- [7] 许明辉, 李云成, 李进斌, 等. 转溶菌酶基因水稻稻瘟病抗谱分析[J]. 中国农业科学, 2003, 36(4): 387-392.
- [8] MILLER E S, KUTTER E, MOSIG G, et al. Bacteriophage T4 genome [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67(1): 86-156.
- [9] KNOX C A P, SONTAYANON B, CHANDRA G R, et al. Structure and organization of two divergent alpha-amylase genes from barley [J]. Plant Mol Biol, 1987, 9(1): 3-17.
- [10] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

【责任编辑 周志红】