

文章编号: 1673 1689(2010)02-0271-05

牛凝乳酶全长 cDNA 的克隆及其原核表达载体的构建

张莉, 姜媛媛, 张健, 杨贞耐*

(吉林省农业科学院 农产品加工研究中心, 吉林 长春 130033)

摘要: 从小牛皱胃中提取凝乳酶(Chymosin)总 RNA, 经过 RT-PCR 获得凝乳酶 cDNA, 纯化后与 pMD-18T 载体连接, 转化大肠杆菌 JM109, 通过双酶切和序列测定, 获得了凝乳酶全长基因序列。序列测定表明, 凝乳酶全长核苷酸长度为 1 143 bp, 编码 381 个氨基酸。与 GenBank 上已发表序列 NM_180994 进行比较, 核苷酸同源性为 99.56%。将该基因片段克隆到原核表达载体 pET-22b 中, 构建重组质粒 pET-22b/Chymosin, 所获重组质粒经过酶切、测序鉴定, 证实含有目的片段, 且连接、构建正确, 为凝乳酶的进一步表达奠定了基础。

关键词: 凝乳酶; 克隆; 原核表达载体; 构建

中图分类号: Q 785

文献标识码: A

Cloning and Prokaryotic Expression Vector Construction of Bovine Chymosin

ZHANG Li, JIANG Yuan-yuan, ZHANG Jian, YANG Zhen-nai*

(Center of Agri Food Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, 130033, China)

Abstract: In this study, the total RNA of chymosin was extracted from absumum of calf and its cDNA was obtained by RT-PCR. The purified RT-PCR products and pMD-18T vector were ligated and transformed into host strain *E. coli* JM109. The full length of Chymosin gene is consist of 1 143 bp, and encodes 381 amino acids. The homology of the nucleotides with NM_180994 is 99.56%. The aim gene was expression on the prokaryotic expression vector pET-22b and a recombinant plasmid pET-22b/Chymosin was constructed successfully.

Key words: chymosin, cloning, prokaryotic expression vector, construction

凝乳酶(Chymosin)是从未断奶的小牛皱胃中提取的一种天冬氨酸蛋白酶, 其主要的生物学功能

是水解牛乳中 κ 酪蛋白的 Phe105-Met106 键, 导致牛乳凝结, 因此被广泛用于干酪制造业。随着世界

收稿日期: 2009-02-27

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA10Z306); 吉林省科技厅重点项目(20060219、20080228); 现代农业产业体系专项资金项目。

* 通信作者: 杨贞耐(1965-), 男, 江西广丰人, 博士, 研究员, 主要从事乳品工艺及生物技术方面的研究。Email:

zyang@cjaas.com

范围内干酪产量的巨增及全球性小牛短缺,使得天然凝乳酶供应不足,应用基因工程技术可以使凝乳酶基因在微生物中高效表达,从而为实现工业化生产打下良好的基础。

牛凝乳酶通常在小牛第四胃,即皱胃中合成为一个含有 381 个氨基酸的前体聚肽——凝乳酶原前体(Preprochymosin),凝乳酶原前体在分泌过程中去掉 16 个信号肽形成含有 365 个氨基酸的凝乳酶原(Prochymosin)。凝乳酶原没有活性,它在酸性 pH 下通过多步的自动催化过程,去掉 N 末端 42 个氨基酸形成有活性的含有 323 个氨基酸的蛋白质——凝乳酶成熟肽(Chymosin)。在一定条件下,凝乳酶原可以通过去除 N 末端 27 个氨基酸形成另一种酶,假凝乳酶(Pesudochymosin)。凝乳酶和假凝乳酶都具有凝乳活性。凝乳酶蛋白结构见图 1。

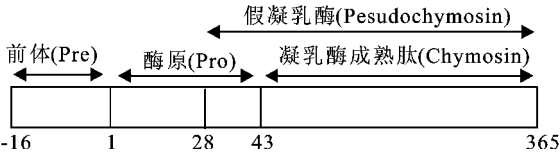


图 1 牛凝乳酶蛋白质结构

Fig. 1 Protein structure of bovine chymosin

牛凝乳酶的基因组 DNA 是由 8 个内含子分开的 9 个外显子组成^[2]。牛凝乳酶有 3 个主要的形态: A、B 和 C,凝乳酶 B 的含量最高^[3]。凝乳酶 A 和 B 只有 1 个氨基酸位置不同:凝乳酶 A 在 243 位(胃蛋白酶编码)上是 Asp,而凝乳酶 B 在这个位置是 Gly。凝乳酶 C 是凝乳酶 A 降解后,去掉 3 个残基 Asp244+Phe246 后的产物^[4]。

作者根据 GenBank 上发表的凝乳酶 B 基因(NM_180994)设计引物,从小牛皱胃中提取凝乳酶总 RNA,经过 RT-PCR 获得牛凝乳酶全长 cDNA,构建原核表达载体,为凝乳酶的工业化制备奠定基础。

1 材料与 方法

1.1 实验材料

皱胃粘膜取自未断奶的荷斯坦小牛第四胃,大肠杆菌 JM 109,表达载体 pET-22b;作者所在实验室保存。

限制性内切酶, DNA 回收试剂盒, T4 DNA 连接酶: 购于 MBI, Trizol Reagent; RT-PCR 试剂盒: 购于 Invitrogen; pMD-18T, DL2000, DL15000, Ex-Taq, dNTP: 购于 TaKaRa 公司。

1.2 仪器与设备

PCR 扩增仪: Eppendorf 公司制造; 高速冷冻离

离心机: Thermo 公司制造; 超低温冰箱: Thermo 公司制造; 电泳仪: Bio-rad 公司制造; 凝胶成像系统: Alpha 公司制造; 紫外可见分光光度计: Varian 公司制造。

1.3 实验方法

1.3.1 引物设计与合成 应用 Primer (Version 5.0) 基因分析软件, 参照 GenBank 发表的凝乳酶(NM_180994) 基因序列设计一对引物, 并且在上游引物中加入 Nco I 酶切位点, 下游引物中加入 Xho I 酶切位点。该对引物理论跨幅包括凝乳酶 CDS 序列 1 143 bp, 引物由上海生工公司合成。

Sense primer: 5' GGACCATGGATAGGTGTCTCGTGGTGCTAC 3'

Anti-sense primer: 5' ATACTCGAGGATGCTTTGGCCAGCC 3'

1.3.2 凝乳酶总 RNA 的提取 无菌采取小牛皱胃, 液氮保存。凝乳酶总 RNA 的提取按照 Invitrogen Trizol 的说明书, -70℃保存。取 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.3.3 RT-PCR 体外扩增目的基因片段

1) 合成 cDNA: 取 1 μL 提取的总 RNA 于灭菌的 0.5 mL 离心管中, 置于冰上, 再加入 DEPC 水 8 μL, 1 μL 50 μmol/L Oligo (dT)₂₀, 于 65℃水浴保温 5 min 后立即置于冰上, 加入 5×cDNA Synthesis Buffer 4 μL, 0.1 mol/L DTT 1 μL, 1 μL 40 U/μL RNase OUT™, DEPC 水 1 μL, 15 U/μL Thermoscript RT 1 μL, 混匀后于 50℃反应 60 min, 之后于 85℃反应 5 min 终止反应。加 1 μL RNase H, 37℃、20 min 去除 RNA 模板。取 2 μL 进行 PCR 反应, 剩余物于 -20℃贮存。

2) PCR 反应: 反应体系为 10×PCR Buffer Minus Mg 5 μL, 50 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL, 10 mmol/L dNTP Mix 1 μL, 20 μmol/L sense primer 0.5 μL, 20 μmol/L antisense primer 0.5 μL, 5 U/μL Platinum tag DNA polymerase 0.4 μL, cDNA 2 μL, DEPC-treated Water 39.1 μL。

反应条件为: 94℃预变性 5 min, 然后 94℃变性 30 s, 52℃退火 30 s, 72℃延伸 90 s, 72℃延伸 10 min, 30 次循环。产物用 0.8 g/dL 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.3.4 PCR 产物 TA 克隆 将电泳回收产物与 pMD18-T 载体进行连接反应, 16℃连接 1 h 后, 将连接产物转化 JM 109 感受态细胞, 在含有 X-gal、IPTG 和 Amp 的 LB 琼脂平板培养基上培养 12 h, 挑取白斑菌落接种于含有 Amp 的 LB 液体培养基

中, 37 ℃ 振荡培养 12~ 16 h。提取质粒, 进行酶切鉴定。选择酶切鉴定正确的质粒送上海生工公司进行序列测定。

1.3.5 表达载体的构建 将含有目的基因的质粒和 pET-22b 同时用 Nco I 和 Xho I 酶切, 分别回收后用 T4 DNA 连接酶连接, 构建重组表达质粒 pET-22b/Chymosin。再将连接产物转化 JM109 感受态细胞, 在含有 Amp 的 LB 琼脂平板培养基上培养 16 h, 挑取阳性菌落, 接种于含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 ℃ 振荡培养 12~ 16 h。按质粒提取试剂盒说明提取重组质粒, 再进行 PCR 及酶切电泳检测鉴定。选择酶切和 PCR 鉴定为重组阳性的质粒, 送上海生工公司进行序列测定, 验证重组质粒读码框的正确性。

2 结 果

2.1 凝乳酶总 RNA 鉴定

通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA, 28S、18S 和 5S 条带明亮、清晰, 因此, 提取的 RNA 可用于后续试验, 见图 2。

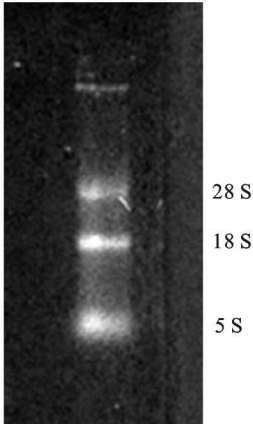


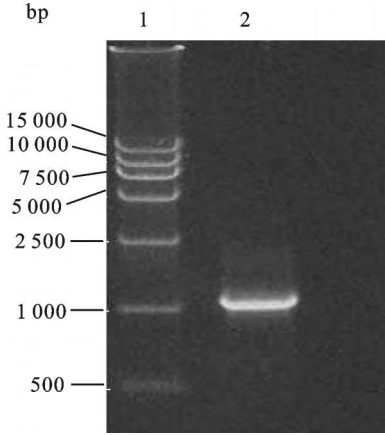
图 2 Chymosin 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of total RNA of Chymosin

2.2 RT-PCR 扩增产物鉴定

以提取的总 RNA 为模板, 使用反转录试剂盒进行 RT-PCR 反应, 琼脂糖电泳检测扩增结果见图 3, 扩增的 DNA 片段与预期大小一致, 约为 1 200 kb。

2.3 PCR 扩增产物的连接和筛选

用 DNA 回收试剂盒对凝乳酶 cDNA RT-PCR 扩增产物进行纯化回收, 然后与 pMD-18T 进行 TA



1: DL15000; 2: Chymosin cDNA RT-PCR 扩增产物
图 3 凝乳酶 cDNA RT-PCR 扩增结果

Fig. 3 The result of RT-PCR Chymosin cDNA amplification

连接, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞。蓝白筛选挑取白色菌落扩培后, 进行碱变性法提取质粒, 用 Nco I 和 Xho I 双酶切及 PCR 鉴定, 选出阳性克隆, 命名为 JM109/18T/Chymosin。

2.4 克隆质粒测序

将上述阳性克隆质粒送上海生工, 进行正反两个防线的序列测定, 报告的核苷酸序列为 1 257 bp, 除去两端引物中的多余碱基, 得到全长为 1 143 bp 的核苷酸序列, 含有一个完整的阅读框, 编码 381 个氨基酸, 见图 4。此序列已经提交到 GenBank, 收录号为 FJ768675。与 GenBank 数据库中凝乳酶基因 NM_180994 序列进行比对分析, 核苷酸同源性为 99.56%。结果显示有 5 个碱基变异, 第 44 bp (以 ATG 为 1 计) 由 A→G, 第 431 bp 由 A→G, 第 687 bp 由 A→G, 第 816 bp 由 T→C, 第 1 007 bp 由 A→G, 其编码的氨基酸序列中有 1 个不一致, 第 229 位氨基酸由 N (Asn)→D (Asp) (见粗体下划线)。

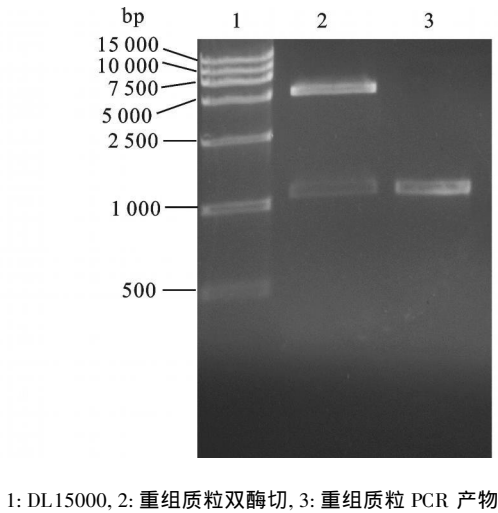
2.5 重组质粒的构建

将 18T/Chymosin 及表达载体 pET-22b 经 Nco I 和 Xho I 双酶切后, 纯化回收后构建重组质粒, 转化 JM109 后挑选白色菌落, 提取质粒后酶切及 PCR 扩增, 经琼脂糖电泳鉴定在约 1 200 bp 处有特异条带, 经 Nco I 和 Xho I 双酶切后电泳出现两条带, 其中一条为载体质粒, 约 5 500 bp, 另一条带为所克隆的 Chymosin 基因片段, 约 1 200 bp, 见图 5。测序结果表明, 该转化菌的质粒中确实含有目的基因片段, 且读码框正确, 重组质粒 pET-22b/Chymosin 构建成功。

1 ATGAGGTGCTCTCGTGGTGCTACTTGTGTCTTCGCTCTCTCCCAAGGCGCTGAGATCACC
1 M R C L V V L L A V F A L S Q G A E I T
61 AGGATCCCTCTGTACAAAGGCAAGTCTCTGAGGAAGGCGCTGAAGGAGCATGGGCTTCTG
21 R I P L Y K G K S L R K A L K H G L L
121 GAGGACTTCCTGCAGAAACAGCAGTATGGCATCAGCAGCAAGTACTCCGGCTTCGGGGAG
41 E D F L Q K Q Q Y G I S S K Y S G F G E
181 GTGGCCAGCGTGCCCTGACCAACTACCTGGATAGTCAGTACTTTGGGAAGATCTACCTC
61 V A S V P L T N Y L D S Q Y F G K D P R L
241 GGGACCCCGCCCCAGGAGTTCACCGTGCTGTTTGACACTGGCTCCTCTGACTTCTGGGTA
81 G T P P Q E F T V L F D T G S S D F W V
301 CCCTCTATCTACTGCAAGAGCAATGCCTGCAAAAACCACCAGCGCTTCGACCCGAGAAAAG
101 P S I Y C K S N A C K N H Q R F D P R K
361 TCGTCCACCTTCCAGAACCTGGGCAAGCCCTGTCTATCCACTACGGGACAGGCAGCATG
121 S S T F Q N L G K P L S I H Y G T G S M
421 CAGGGCATCCTGGGCTATGACACCGTCACTGTCTCCAACATTGTGGACATCCAGCAGACA
141 Q G I L G Y D T V T V T V S N I V D I Q Q T
481 GTAGCCCTGAGCACCCAGGAGCCCGGGACGTCTTACCTATGCGCAATTCCAGCGGATC
161 V G L S T Q E P G D V F T Y A E F D G I
541 CTGGGGATGGCCTACCCCTCGCTCGCCTCAGAGTACTCGATACCCGTGTTTGACAACATG
181 L G M A Y P S L A S E Y S I P V F D N M
601 ATGAACAGGCACCTGGTGGCCCAAGACCTGTTCTCGGTTTACATGGACAGGAATGGCCAG
201 M N R H L V A Q D L F S V Y M D R N G Q
661 GAGAGCATGCTCAGCTGGGGGCCATCGACCCGCTCTACTACACAGGGTCCCTGCACTGG
221 E S M L T L G A I D P S Y Y T G S L H W
721 GTAGCCCTGAGCAGTGCAGTACTGGCAGTTCACTGTGGACAGTGTACCATCAGCGGT
241 V P V T V Q Q Y W Q F T V D S V T I S G
781 GTGGTTGTGGCCTGTGAGGGTGGCTGTGAGGCCATCTGGACACGGGCACCTCCAAGCTG
261 V V V A C E G G C Q A I L D T G T S K L
841 GTCGGGCCCAGCAGCGACATCCTCAACATCCAGCAGGCCATTGGAGCCACACAGAACCAG
281 V G P S S D I L N I Q Q A I G A T Q N Q
901 TACGGTGAGTTTGACATCGACTGCGACAACCTGAGCTACATGCCCACTGTGGTCTTTGAG
301 Y G E F D I D C D N L S Y M P T V V F E
961 ATCAATGGCAAAATGTACCCACTGACCCCTCCGCCTATACCAGCCAGGACCAGGGCTTC
321 I N G K M Y P L T P S A Y T S A Q T Q G F
1021 TGTACCAGTGGCTTCCAGAGTGAAAATCATTCCAGAAATGGATCCTGGGGGATGTTTTTC
341 C T S G F Q S E N H S Q K W I L G D V F
1081 ATCCGAGAGTATTACAGCGTCTTTGACAGGGCCAACAACCTCGTGGGGCTGGCCAAAGCC
361 I R E Y Y S V F D R A N N L V G L A K A
1141 ATC
381 I

图 4 重组凝乳酶的核苷酸序列及其编码的氨基酸

Fig. 4 The nucleotide sequence and deduced amino acids of recombinant chymosin



1: DL15000, 2: 重组质粒双酶切, 3: 重组质粒 PCR 产物

图 5 重组表达质粒 PCR 和酶切鉴定图

Fig. 5 Identification of recombinant plasmid by digested (Nco I+ Xho I) and PCR

3 结 语

作者所研究的凝乳酶 B 基因, 经过比对, 发现

克隆的凝乳酶基因与 GenBank 上 NM_180994 核苷酸序列有 5 个碱基变异, 但其中有 4 个变异的碱基并不影响编码的氨基酸, 所以氨基酸序列只有 229 位的 Asn(N) 突变为 Asp(D)。

通过比对分析发现, 本研究得到的凝乳酶氨基酸序列与目的序列 NM_180994 相差一个氨基酸 (箭头指示处), 但是与 Protein Data Bank 上登录的凝乳酶蛋白质结构 4CMS 的氨基酸序列完全一致^[5], 见图 6。通过进一步分析 GenBank 上登录的凝乳酶 A 和 C 的氨基酸序列^[6-7], 根据 Danley 等人 (1988) 对凝乳酶的描述, 凝乳酶 A、B 和 C 在此位点的氨基酸序列应该是一致的。进而与另外两种反刍动物, 绵羊^[8] 及骆驼^[9] 的凝乳酶氨基酸序列进行比对, 发现其第 229 位上的氨基酸序列与本研

究所得到的氨基酸序列一致, 所以不能确定此位点是否为突变, 有可能是 GenBank 上登录的 NM_180994 序列有误。通过以上分析可以判断, 不论此位点是否为突变, 对凝乳酶的功能没有影响, 克隆的凝乳酶基因可用于下一步的实验。

