

人工合成 CRL (褶皱假丝酵母脂肪酶) 基因^{*}

贝锦龙, 王瑾雯, 王章, 龙紫新, 杨 林
(生物防治国家重点实验室 // 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 通过序列设计、合成策略设计等方法, 由 CRL 中最重要的同工酶 LIP1 的成熟多肽序列, 生成适合在毕赤酵母中表达的基因序列 *sculip* I。通过链延伸反应及 PCR 反应将 DNA 单链人工合成一段长为 1 635 bp 的 DNA 双链; 并将其克隆入质粒 pBluescript II SK (+)。PCR 鉴定及测序结果表明 *sculip* I 得到了正确的合成与克隆。还就若干长片段基因人工合成应该注意的问题进行讨论。

关键词: CRL; LIP1; *sculip* I; 人工合成
中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2003) 01-0114-03

褶皱假丝酵母 *Candida rugosa* 所产脂肪酶 CRL 是目前工业应用最广泛的脂肪酶。例如它能够选择性的拆分手性混合物, 富集单一手性化合物如 S-酮洛芬、S- 萘普生等。天然 *C. rugosa* 所产的脂肪酶主要由五种同工酶与少量的酯酶、蛋白酶组成, 其各组分所占比重受生产工艺的影响很大^[1]。CRL 中最重要的同工酶 LIP1 能够行使其在工业中应用的大部分功能, 已克隆该同工酶基因并推导得到其成熟多肽序列^[2]。本文直接以 *C. rugosa* ATCC 14830 菌株中的 LIP1 成熟多肽序列为对象, 根据毕赤酵母中密码子的使用情况, 将 LIP1 成熟多肽序列转换为相应的使用单一密码子的 DNA 序列; 并在上述序列 5' 端、3' 端及内部添加或改造若干碱基。最后人工合成该 DNA 序列 *sculip* I, 为进一步研究 LIP1 在毕赤酵母中的高效表达, 提供了基因材料。

1 实验部分

1.1 实验材料 引物、TaKaRa LA Taq 酶与 TaKaRa Ex Taq 酶等购自 takara 公司; 限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I 购自 NEB 公司; T4DNA 连接酶购自 Promega 公司。质粒 pBluescript II SK (+)、大肠杆菌菌株 *E. coli* TOP10⁺ 本实验室保存。测序由 Takara 公司完成。

1.2 实验方法与结果 根据毕赤酵母中密码子的偏爱性^[3], 按表 1, 将 LIP1 成熟多肽序列 (图 1) 转换为相应的使用单一密码子的 DNA 序列; 为避免 *Bam*HI 位点, 将上述 DNA 序列的第 120 位、第 1 437 位由 T 改为 C。在上述序列 5' 端加上部分 α 信号肽编码序列 CTCGAG (*Xho* I) AAAAGAGAG-GCTGAAGCT 以使得 LIP1 成熟肽编码序列可与毕赤

酵母表达载体上的 α 信号肽编码序列融合^[4]。将 TAA 终止密码子添加于该序列 3' 端, 在终止子后加上 TCTAGA (*Xba* I 酶切位点) 以方便克隆该基因入转移载体 pBluescript II SK (+), 最终得到序列 *sculip* I。

表 1 密码子使用表
Tab 1 Codons are used

氨基酸	F	L	I	M	V	S	C	T	A	G
密码子	TTT	TTG	ATT	ATG	GTT	TCT	TGT	ACT	CAT	CAA
氨基酸	H	Q	N	K	D	E	P	W	R	Y
密码子	AAC	AAG	GAT	GAA	CCA	TGG	GCT	GGT	AGA	TAC

APTATL ANGDTI TGLNAI I NE A FLGI PF AEPP VGNLRF KDPVPYS
GSLDGQKFTSYGPFSCMQNP EGYEENLP KAALDLVMQS KVF EAV
SPSS EDC LTI NVVRPPGT KAGANLP VMLWI FGGGF EVGGTSTFP P
AQMI TKSI AMGKPI I HVS VNY RVSSWGFL AGDEI KAEGS ANAGLK
DQRLGMQWV ADNI AAFGGDPT KVTI FGES AGSMS VMCHI LWN DGD
NIY KGKPLFRAGI MQSG AMVPSD AVDGI YGNEI F DLL ASNAGCGS
ASDKL ACLRGVSSDTLED ATNNTPGFL AYSSRLSYLP RPDGVNI
TDDMY ALVREGKY ANI PVI I GDQND EGTFFGTSSLNVT TD AQ ARE
YFKQSFVHASD AEI DTLMT AYPGDI TQGS PFDTGI LNALTPQF KR
ISAVL GDLGFTL ARRYFLNHYTGGTKYSFLS KQLSGLPVLGTFHS
NDI VFQDYLLGSGSLI YNNAFI AF ATDLD PNTAGLLVKWPEYTSS
SQSGNNLMMI NALGLYT GKNDFRT AGYDALFSNP SFFV

图 1 LIP1 成熟多肽序列

Fig 1 Sequence of mature polypeptide of LIP1

为了准确的合成这一较长的 DNA 序列 (设计后全长为 1 635 bp 左右), 制订如下合成策略 (图 2): ①设计 14 条正向引物 F1—F14 以及 13 条反向引物 R1—R13, 每条引物平均长为 80 nt, 其中 F1/ F2、F2/ F3、F3/ R13、R13/ R12、R12/ R11、R11/ F4、

^{*} 收稿日期: 2002—05—01
基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (001227)
作者简介: 贝锦龙 (1976 年生), 男, 博士研究生; 通讯联系人: 王章, E-mail: wxz@zsu.edu.cn
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

F4/F5、F5/F6、F6/R10、R10/R9、R9/R8、R8/F7、F7/F8、F8/F9、F9/R7、R7/R6、R6/R5、R5/F10、F10/F11、F11/F12、F12/R4、R4/R3、R3/F13、F13/F14、F14/R2和R2/R1, 每对引物之间各有平均 20 nt 的重复序列; ②首先由 F3/R13、F6/R10、F9/R7、F12/R4、F14/R2 共 5 对引物进行 DNA 链延伸反应, 得到 5 个短片段; ③以②的 5 个短片段为模板, 分别以 F2/R12、F5/R9、F8/R6、F11/R3、F13/R1 为引物对进行 PCR 反应, 扩增得到 5 个中等长度片段; ④以③的 5 个中等长度片段为模板, 分别以 F1/R11、F4/R8、F7/R5、F10/R3、F13/R1 为引物对进行 PCR 反应 I, 扩增得到 5 个大片段; ⑤以④的 5 个大片段为模板, 在一个反应体系中, 以 F1/R1 为引物对进行 PCR 反应, 扩增得到全长基因。

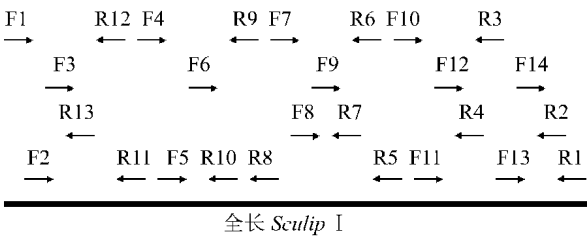


图 2 合成策略图

Fig. 2 Strategy of synthesis

使用 *Xho* I /*Xba* I 双酶切全长基因, 与同样经过 *Xho* I /*Xba* I 双酶切的 pBluescript II SK (+) 片段连接。将连接产物转化入 *E. coli* TOP10F' 菌株; PCR 鉴定重组子 (正向引物: 5'-CGCC AGGGTTTTC-CCAGTC ACGAC-3'; 反向引物: 5'-GAGCGGAT AAC AATTTC AC AC AGG-3'), PCR 产物 $w=0.8\%$ 琼脂糖凝胶电泳结果表明除 7 号外, 其他质粒均含有目的长度的插入片段 (图 3)。对 PCR 产物片段大小合适的质粒进行分段测序, 测序结果与目的序列进行比较结果表明该合成的全长人工基因 *sculip* I 与目标序列完全吻合。

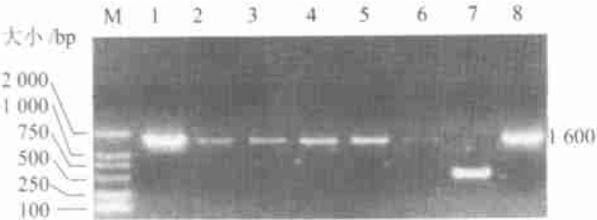


图 3 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant expression vector by PCR

M: DNA 相对分子质量标记;

1—8: 重组质粒 PCR 产物

3 讨 论

人工合成 DNA 双链技术, 是近年来获取基因的新方法之一^[9]; 它能够在短时间内 (通常 1~3

周) 完成一个基因获取的操作。现代生物技术越来越倾向于改造而非直接利用天然基因。而这种改造通常是多位点, 多区域发生的。有时为了在宿主中高效表达外源蛋白, 必须替换基因中相对于宿主而言的较为稀有的密码子; 如在本文中设计合成的基因, 为了只使用一种密码子来翻译一种氨基酸, 其最后序列与原基因的同源性只有 69%。另外, 出于实验设计的通盘考虑, 技术人员总希望基因能够具有一些性质: 如避免一些常用酶切位点, 尤其是那些与所用载体上相同的酶切位点; 本文中基因序列经过修改避免了 *Bam*HI, 以方便日后多拷贝表达质粒构建之用。或能够与载体上的功能肽相融合, 如信号肽。当然通过其他分子生物学手段也能达到上述效果, 但其操作要繁琐得多。

为了精确的合成片段基因, 有几点必须予以重视。首先, 在合成前一定要制订一个详细的合成策略: 由于技术的限制, 人工合成单链 DNA 的长度最多只有 120 bp 左右; 这就需要合理利用 DNA 链延伸技术、PCR 技术以最终获得全长基因。而技术应用成功的关键在于事先策略的制订, 这是最重要同时很难补救的一步。其次, 长片段 DNA 双链合成在操作过程中通常需要进行多次 PCR 反应, 如文中基因的每个位点都经过了 3 次 PCR 反应; 一旦有错配碱基摄入, 则在后继的 PCR 反应错误的位点将逐渐富集, 从而影响获取所需基因。这就对 PCR 用酶提出了较高的要求, 应尽量使用高保真带有 3'→5' 外切酶活性的 DNA 聚合酶, 以避免错配碱基的摄入。

人工合成基因可以最简洁的体现基因工程操作者的思路与技巧; 本文成功合成一条长度为 1 635 bp 使用单一密码子并加以其他改造的 LIP1 编码序列 *sculip* I, 为下一步工作的开展奠定了基础。

参考文献:

[1] GORDILLO M A, MONTESINOS J L, CASAS C. Improving lipase production from *Candida rugosa* by a biochemical engineering approach[J]. Chem Phys Lipids, 1998, 93(1-2): 131-142.

[2] LONGHI S, FUSETTI F, GRANDORI R. Cloning and nucleotide sequences of two Lip genes from *Candida cylindracea* [J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1131: 227-232.

[3] SHARP P M, TUOHY T M, MOSURSKI K R. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes[J]. Nucleic Acids Research, 1986, 14(13): 5125-5143.

[4] 贝锦龙, 陈庄, 杨林. 人工合成的黑曲霉 NRRL3135 菌株植酸酶基因在毕赤酵母系统中的高效表达[J]. 生物工程学报, 2001, 17(3): 254-258.

(下转第 118 页)

图 5 是该产物的 SEM 图, 表明粉体为球状、粒径约 30 nm、粒度分布相当均匀。

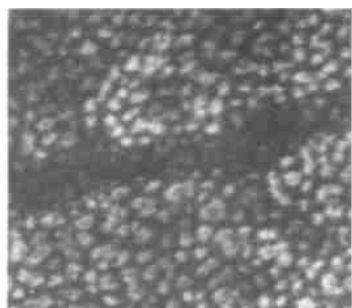


图 5 V_2O_3 粉体的 SEM 照片(1.6×10^5)

Fig 5 SEM micrograph of V_2O_3 powder

参考文献:

- [1] YETHIRAJ M. Pure and doped vanadium sesquioxide: A brief experimental review [J]. J Solid State Chem, 1990, 88: 53-69.
- [2] UEDA Y, KOSUGE K, KACHI S. Phase diagram and some physical properties of V_2O_{3+x} ($0 \leq x \leq 0.080$) [J]. J Solid State Chem, 1980, 31(2): 171-188.
- [3] TOSHIYUKI O, YASUHIRO I, KENKYU R K. Synthesis of SnO_2 , VO_2 and V_2O_3 fine particles by laser-induced vapor-phase reaction [J]. J Photopolym Sci Technol, 1997, 10(2): 211-215.
- [4] 郑臣谋, 张剑辉, 张介立, 等. 纳米二氧化钒粉体的合成 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(6): 54-56.
- [5] TKATCHENKO B D, DELAHAY G. Hydrogen temperature programmed reduction based on water analysis [J]. J Therm Anal, 1994, 41: 1141-1151.

Preparation of V_2O_3 Nano-powder under Mild Conditions

FU Qun¹, ZHANG Xin-min¹, LEI De-ming², WEI Qun³, ZHENG Chen-mou¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Department of Physics, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. Guangzhou GCI Electron-ceramics Company, Guangzhou 510310, China)

Abstract: The thermoanalysis and pyrolysis of $(NH_4)_5[(VO)_6(CO_3)_4(OH)_9] \cdot 10H_2O$ in H_2 atmosphere were studied. Pure V_2O_3 powder was obtained at 900 °C for 30 min. The particles of powder were spherical with about 30 nm in size and were more homogeneous distribution.

Key words: nano-material; vanadium sesquioxide; route of precursor

(上接第 115 页)

Artificial Synthesis of Full-length *Candida rugosa* Lipase Gene

BEI Jin-long, WANG Jin-wen, WANG Xun-zhang, LONG Qi-xin, YANG Lin

(State Key Laboratory for Biocontrol // School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: According to the mature peptide sequence of LIP1, the most important isoenzyme of CRL, *sculip* I, the gene sequence designed to be expressed in pichia pastria, was generated by methods of sequence and synthesis strategy design. 27 single-strain oligonucleotides were assembled as a 1 635 bp-length double-strains DNA after DNA strain extending and PCR reaction; the double-strains DNA was insert into plasmid pBluescript II SK (+). PCR detection, sequence analysis showed the *sculip* I was synthesized and cloned correctly. Some key points of synthesis of long double-strains DNA were also discussed.

Key words: CRL; LIP1; *sculip* I; artificial synthesis