

广东省生物工程学会 1985年学术年会论文集

*Guangdong Bioengineering Society
Selected Papers of
Annual Symposium 1985*

一九八六年五月出版

广东省生物工程学会 1985年学术年会论文集

Chemical Engineering Symposium Series
Selected Papers of
Annual Symposium 1985

— 1985 —

广东省生物工程学会首届理事名单：

理事长 *刘学高

付理事长 *邹福强 *郭宝江

秘书长 *邹福强（兼）

理事： 按姓氏笔划

*叶玉坤 田启昌 刘同昌 *林剑 *罗进贤 *范镇基 *吴进义 陈明耀 陈汉源
*利衍昌 钟秉伟 何远康 *姚汝华 *黄自然 黄鸿枢 卓铁汉 徐骏铭 *蔡尚达
陈群锋

带有*者为常务理事

鸣 谢

本论文集的出版，得到了广东省国外商品陈列中心顾问徐承芳同志、广州市科委农医处林志超付处长和茂名市外经委黄贤付主任的热情支持，并通过他们得到了广东省国外商品陈列中心、广东省土产进出口公司，茂名市外经发展公司，海南外贸总公司的大力赞助，以及本学会理事、广东省仲恺农业技术学院陈羣峯工程师的捐助特表衷心感谢。

广东省生物工程学会

一九八六年五月十五日

目 次

综述

蛋白质工程的兴起与展望	卓肇文 (1)
-------------	---------

论著

对一株耐热性重组体的初步研究	叶玉坤等 (10)
选育家蚕抗病品种的基因工程研究Ⅱ家蚕卵基因克隆株重组	
质粒DNA诱导家蚕的变异及其遗传	黄自然等 (20)
产生抗登革热Ⅰ型病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立	刘乐和等 (30)
登革热Ⅱ型病毒单克隆抗体的产生及其特性鉴定	罗瑞仙等 (36)
诱发染色体易位育成早造中熟高产水稻品种“青威1号、2号”	朝井小太郎等 (41)
诱发染色体易位培育少籽西瓜的研究	朝井小太郎等 (45)
牛胚胎移植技术的引进与实践	悉弗尔等 (49)
高赖氨酸酵母抗性突变菌株的选育	林德球等 (60)
对受温热影响的鸡新城弱毒血凝反应价(HA)与鸡胚感染滴度(EID ₅₀)及对免疫鸡产生血凝抑制抗体(HI)关系的初步探讨	王卓明 (64)
试管受精在育种上的应用——试交占1号的培育	麦鹤云等 (71)
用人 α -球蛋白基因探针对两例Hb-Bart's胎儿的双亲基因探测	郭秀芝等 (75)
热空气处理蚕蛹及蚕卵产生的生化效应	陈劲伟等 (82)
滑鼠蛇肝线粒体DNA的制备及性质测定	吴应积等 (88)
芽胞与菌体和产酶关系的研究	高永明 (95)
胡子鲶(Clarias fuscus)与蟾胡子鲶(Clarias bataachus)杂交	
种的研究Ⅰ杂交种染色体的初步研究	邱逸光等 (99)

技术交流

一种筛选产生有机酸新菌种方法的研究	郭维烈等 (104)
-------------------	------------

技术经济分析

引进胚胎移植技术的技术经济分析	谭 驰等 (107)
-----------------	------------

简报

柞蚕抗菌肽的抑菌效应	黄自然等 (113)
------------	------------

论文摘要

1.5米 ³ 喷射自吸式生物反应器生产酵母的研究	高孔荣等 (118)
家蚕品种“白皮淡”“琼山海南”酯酶同工酶E _{st} A位点的遗传	方菲芳等 (119)

蚕豆根尖细胞不同剂量率的微核效应研究·····	李淑娴(120)
重离子辐射诱发中国仓鼠卵巢传代细胞原养回复型变异的研究·····	梅曼彤等(122)
热力参数泵提取第二代果葡糖浆的研究·····	李忠等(123)
黄牛非手术胚胎移植·····	邓治铭等(124)

提交年会论文宣读的尚有:

选育家蚕抗病品种的基因工程研究: 家蚕卵DNA在大肠杆菌中无

性繁殖·····	叶志华
用免疫沉淀法分离人绒毛膜促性腺激素 β -亚单位(hcG- β)多聚核糖体·····	李向阳
恶性疟原虫单克隆抗体的保护鉴定·····	李纪良
枯草杆菌启动基因的重组和在大肠杆菌中的表达·····	王昌才
乙型肝炎病毒核心抗原表达载体的组建·····	王昌才
恶性疟原虫保护性单克隆抗体的研究·····	李英杰
培育高效菌株快速方法的研究·····	郭维烈

学术年会特邀综述报告

基因转移·····	林 剑(125)
染色体工程·····	吴进义

动态报告

生物工程的主要成就与发展动向·····	范镇基(130)
---------------------	----------

蛋白质工程的兴起与展望

中山大学生物系

卓 肇 文

一、蛋白质工程简介

蛋白质工程 (PE) 的兴起被认为是遗传工程的第二次浪潮。

为什么PE受到重视呢? 因为遗传工程得到的天然产物的性能往往还不够理想。

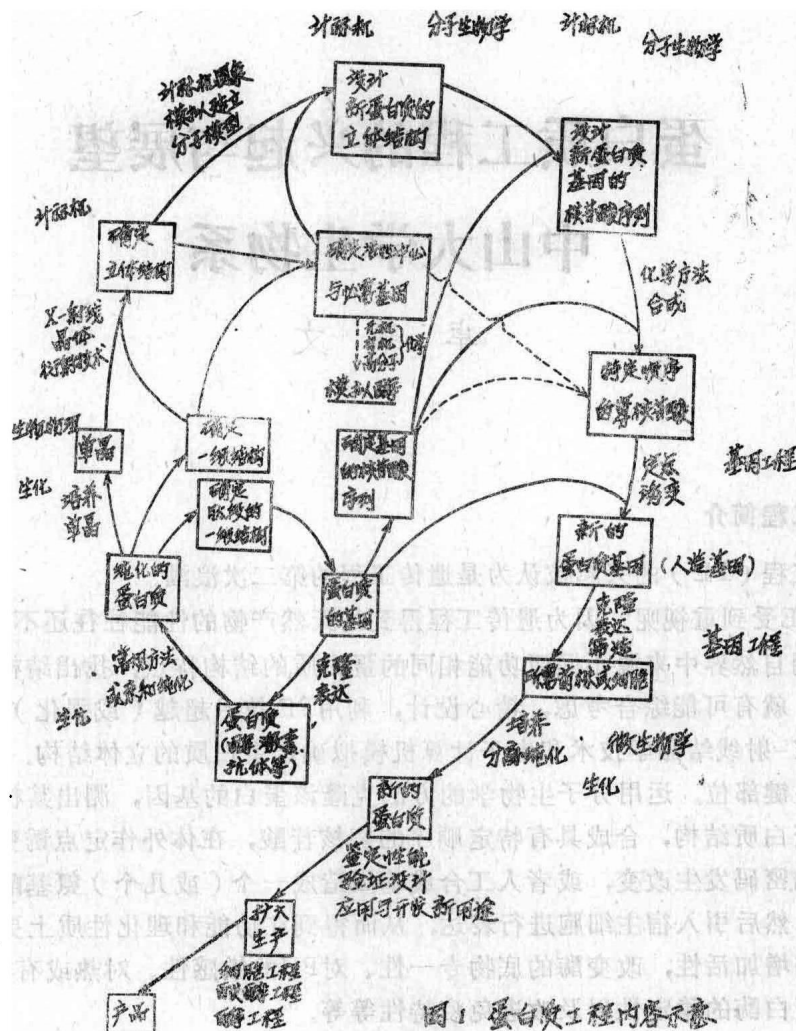
如果查明自然界中来源不同而功能相同的蛋白质的结构特点, 找出结构与功能之间关系的规律性, 就有可能综合考虑, 精心设计, 利用PE技术超越 (或强化) 进化过程。

PE应用X-射线结晶学技术和电子计算机模拟确定蛋白质的立体结构。找出影响该蛋白质功能的关键部位。运用分子生物学的方法克隆该蛋白的基因, 测出其核苷酸顺序。然后设计新的蛋白质结构, 合成具有特定顺序的寡核苷酸, 在体外作定点诱变, 使基因中的关键氨基酸的密码发生改变, 或者人工合成基因造成一个 (或几个) 氨基酸密码的插入, 缺失或改变。然后引入宿主细胞进行表达, 从而得到在功能和理化性质上更为优越的人造蛋白质。例如增加活性, 改变酶的底物专一性、对PH的敏感性、对热或有机溶剂的耐受性, 增加对蛋白酶的稳定性以及改进免疫特性等等。

二、PE的主要内容〔1—6、19—21〕

(一) PE是现代科技的会合处

PE的迅速发展与有关学科领域 (包括X-射线结晶学、分子生物学、遗传工程学、计算机图象学、生物化学、有机化学、微生物学、生物物理学等) 的工作者的密切联系, 共同努力是分不开的。从图1可以了解各个领域之间的联系。这种联系像一个巨大的环。首先是取得一种需要改造的蛋白质 (酶、激素、抗体等) 用常规或亲和纯化方法得到纯净的蛋白质, 制成单晶。而对于微量蛋白质则可以先测出部分肽段的一级结构, 用分子生物学的方法得到该蛋白质的基因, 克隆到微生物中, 表达后得到较多的蛋白质, 纯化后制成单晶。然后由X-射线结晶学家测定立体结构。分子生物学家在了解蛋白质基因的核苷酸顺序以后也可以进一步得出蛋白质的一级结构。X-射线结晶学与计算机图象模拟还可以准确地指出蛋白质分子中哪些氨基酸是表现活性所必需的, 进而设计新的蛋白质结构。一旦确定



要改变的活性部位，就可以合成具有特定顺序的寡核苷酸，采用定点诱变技术产生人造基因，克隆到微生物中，筛选所需菌株，扩大培养，分离纯化。对于人造蛋白质可以再用X-射线结晶学技术，测定它的结构。还要测定它的性质，以便对理论预测进行检验。得到有关信息以后又可以进一步设计改造蛋白质，使这个环不断运转，直至达到预定要求时为止。这是一个完整的过程。

不具备X-射线晶体衍射测定及进行计算与图象模拟工作条件的地方，也可以考虑利用国内外的已有成果和经验进行设计，合成具有特定顺序的寡核苷酸，采用定点诱变技术先做一些工作。

(二) 测定蛋白质的结构

了解蛋白质的结构需要测定氨基酸序列。有人对Edman方法作了改进，用仪器自动测定蛋白质样品的用量可以少至5—10微微克分子[7]。目前，有效的操作次数限定在60次循

环左右,所以需先用化学或酶促方法使蛋白质降解成为一组多肽片段。分别测定顺序后,利用肽段之间的重迭顺序整理出一级结构。另一种方法是测定蛋白质基因的核苷酸序列,间接得出蛋白质的一级结构。

确定立体结构的基本条件是X-射线结晶衍射技术〔1—6, 21〕。用它可以得到蛋白质分子的电子密度图。在高分辨率的条件下可以清楚地辨认二硫桥、芳香环和 α -螺旋等特性。已经测定150种左右的蛋白质,它是目前唯一的可以在原子水平上提供详细的结构信息的技术。由于制备单晶、收集和分析晶体衍射数据的方法与工具都已有了改进,确定一种新蛋白质结构所需的时间已经可以缩短到一年甚至六个月。

(三) 建立分子模型〔1、5、6、21〕

计算机图象模拟对于PE很重要。依据化学与生化原理并借助于图象分子模拟可以精确地设计蛋白质。图象模型比物理模型可以提供更多的信息并且使建立模型的工作大大简化。它能显示出包括(或不包括)氨基酸侧链的蛋白质骨架、静电表面或与溶剂接触的表面。计算机图屏可以显色、透视和真时(real time)地显示蛋白质与其配体的平移或转动,还可以模拟几个分子之间的相互作用。它可以向观察者提供从外面或里面对蛋白质分子的透视图,并且能在任一时间观看大分子的某层或某段。装备立体观察器以后,操作者在图屏前好像置身于模拟的蛋白质分子图象之中。一旦得到蛋白质或核酸的立体结构图,就可贮存在计算机内,并在需要时显示出这些分子。可以对蛋白质的不同部位进行彩色编码,并且可以模拟酶的反应,定位与计算分子距离。

使用超速计算机可以使图象模拟和计算的能力得到加强。例如用Cyber 205型超速计算机对突变的二氢叶酸还原酶进行模拟计算仅需7~8小时,而中等计算机则需1600小时。

(四) 设计蛋白质分子〔1、5、6、18、21〕

蛋白质结构包括氨基酸序列, α -螺旋, β -折迭和无序状态的分布情况以及立体结构,它们是互相关联的。设计蛋白质分子就是要在深入了解结构与功能之间关系的基础上,对决定蛋白质特性的氨基酸序列进行设计:尝试消除原来分子中的无意义结构,改变某些不理想的结构。还要将设计的新结构与原来的结构进行比较,考察设计的合理性与可靠性。

采用超速计算机进行分子图象模拟计算,能更好地为PE设计人造蛋白质的结构。因为它可以在真时内计算原来蛋白质结构由于氨基酸序列中特定位点被改变而发生的变化。

(五) 基因的修饰——人造基因

要得到新设计的蛋白质,必须得到与它的一级结构对应的DNA。用计算机控制的自动合成仪采用改进的三酯法可以很方便地合成具有特定核苷酸序列的DNA或DNA片段。这种技术上的突破将有力地推动PE的发展〔5、21〕。

合成一条在特定位点有一个或几个核苷酸被改变的寡核苷酸,用它引导天然基因变为人造基因,从而使该基因所编码的蛋白质的氨基酸序列产生预定的变化。这种过程称为“定点诱变”(“Site directed mutagenesis”)。这种方法虽然一次只能进行一个修饰,但需要合成的寡核苷酸量很小是它的优点,示意图2〔2〕。

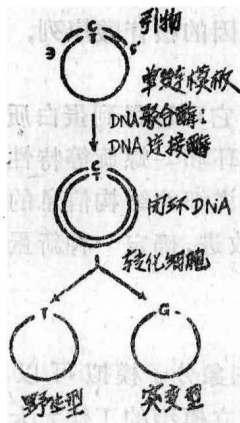


图2. 用使基因发生定点突变的方法造成突变蛋白质。合成一个短的DNA片段(约18个核苷酸), 它与基因中要失配的位点附近的核苷酸序列是互补的。为了使靶位的氨基酸改变为设计的氨基酸。将这个寡聚核苷酸片段与基因的单链样板退火粘合, 由DNA聚合酶 I 使片段延伸, 并由DNA连接酶把它连接起来。有失配的异源双链核酸分子转染大肠杆菌后, 产生突变型与野生型克隆。突变型克隆通过与已有放射性标记的引起突变的寡核苷酸选择杂交而被检出。

另一种方法是将合成的寡核苷酸按一定顺序连接成为完整的基因。此法需要大量的化学合成DNA的工作, 但也有优点。可以使受

专一的限制性内切酶作用的位点处于基因中的便于调控的位置。而且人造基因由许多寡核苷酸按特定顺序连接而成, 所以一次就能进行很多修饰。当需要使氨基酸序列有较大变化时, 最好用这种方法。

(六) 以设计制造耐热酶为例[8]简要表述PE的程序, 见图3。

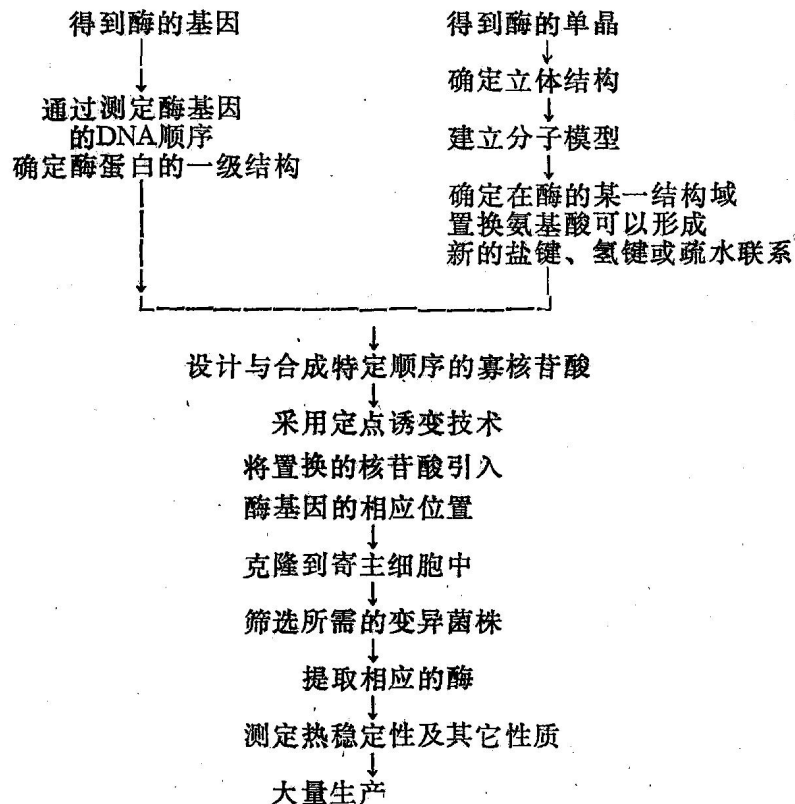


图3. 设计制造耐热酶的程序示意

三、与PE有关的一些工作

(一) 人造的降钙素 (Calcitonin) [9]

降钙素是甲状腺分泌的,由32个氨基酸组成的单链多肽激素。洛克菲勒大学的一个研究组在84年用PE技术得到人造降钙素,它在组成上与天然降钙素有60%的不同。但人造降钙素在治疗骨骼疾病(例如溶骨性病变)时胜过天然降钙素。

为了查明降钙素分子的每一部分的作用而进行理论模拟与化学合成。当阐明降钙素各部分的功能以后,就着手合成那些部分的取代物,终于合成人工降钙素。

这样就更深入了解结构与功能之间的关系。降钙素分子的主要部分折迭成为既亲水又亲脂的螺旋、当极性氨基酸残基排列在多肽链的一侧,而非极性氨基酸残基排列在另一侧时,就形成这种两性螺旋。降钙素的这种螺旋相当于结合部位,它在结构与功能上与酶的活性部位相似。有关的方法与技术可以用在人造酶上建立新的活性部位。因此被认为向人造酶迈出了一大步。

合成人造降钙素也是由于医疗上的需要。降钙素在体内调节血钙含量,维持骨骼的强度。用降钙素可治疗某些骨病。可惜天然降钙素易受消化道蛋白酶作用而失效,因此必须注射。人造降钙素能够耐受消化道蛋白酶的作用,可以口服。此外,合成人造降钙素的成本较低。

(二) “最小C肽”原胰岛素[1]

原胰岛素中的C肽起着连接作用。当原胰岛素被酶解除去C肽以后,剩下两条分离的A链和B链以二硫桥共价连接成为胰岛素。

X-射线结晶学分析表明,比人原胰岛素的C肽(35个氨基酸)短很多的肽也能弥补B链C末端与A链N末端之间的空缺(见图4)。经过预测,用DNA重组技术产生的“最小C肽”原胰岛素可以折迭成为与天然胰岛素相似的构型。Wetzel等人构建了“最小C肽”原胰岛素的基因,其中以六肽(精-精-甘-丝-赖-精)的密码代替天然C肽的密码。

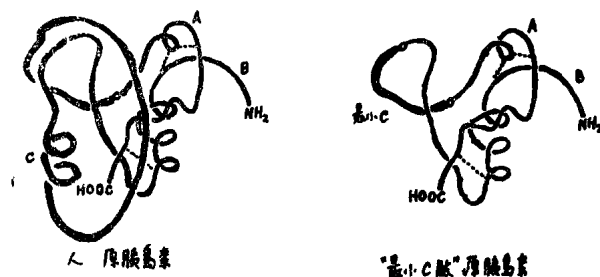


图4 天然原胰岛素和“最小C肽”原胰岛素。显示出人造原胰岛素的连结肽缩短。A链和B链的构型得自X-射线结晶学资料。连接肽的构型是示意的。“最小C肽”原胰岛素全部构型是根据重新折迭的分子在层析与放射免疫测定中的情况绘制的。

(三) 人造的 β -内啡肽[9]

β -内啡肽是脑产生的激素。有人几乎全部用D-型氨基酸合成人造的 β -内啡肽,而天然的 β -内啡肽是由L型氨基酸组成的。

(四) 制成 $\alpha_2\alpha_1$ 融合干扰素[10、16]

瑞士的Biogen公司以线状质体的两端连接 α 干扰素的变异亚群分子的部分基因序列,得到由 α_2 干扰素N末端的一半和 α_1 干扰素C末端的另一半连接起来形成的 $\alpha_2\alpha_1$ 融合干扰素。它的抗病活性提高,而且对人、鼠、牛的细胞都有效。

(五) 人造的 β -干扰素和白细胞介素Ⅱ[4、19]

Cetus公司的科学家们用多核苷酸定点诱变的方法分别将 β -干扰素和白细胞介素Ⅱ中的一个半胱氨酸残基变成丝氨酸残基,不影响生物活性并且增加了稳定性。人造的 β -干扰素在低温保存半年还不降低活性,为临床使用创造了条件。

(六) 人造的酪氨酰tRNA合成酶[2]

英国皇家理工学院的Fersht和剑桥分子生物学实验室的Winter将该酶的第51位苏氨酸变成脯氨酸,使酶活性提高25倍。这主要是由于对ATP的亲合力增强。

(七) 耐热的T₄溶菌酶[2]

大量事实表明把二硫桥引入蛋白质结构可能增加热稳定性。有人设计将T₄溶菌酶的第3位Ile变为Cys,使Cys 3与Cys97之间可以形成二硫键,结果氧化后的T₄溶菌酶(Cys 3),就有这个二硫键。它的活性与天然酶相同,但在温度提高时稳定性显著增加。

这些成果都显示出PE有巨大潜力和光辉前景。

(八) 生物芯片(biochips的)研制

有人预言生物芯片中元件为分子大小,组装密度可以比硅芯片增加几个数量级。这有可能引起计算机设计与制造方面的重大变革。

新工艺的研究过程中还必须解决许多困难的问题,其中主要是选择材料和设计芯片元件。有人认为生物高分子,尤其是蛋白质,将是分子大小的芯片的基础结构。还有人认为基因工程构建的微生物将能合成芯片元件甚至整块芯片[11]。但也有人认为电子线路的分子将与天然的完全不同[12]。未来的分子芯片必将是“巧夺天工”的。下面介绍一些有关的工作与设想:

1、关于薄膜电子学图型

Kevin ulmer(Genex公司)曾提出一种构建芯片衬底的设想[13]。用大的蛋白质分子在固体上形成平面结晶作为光刻蚀的掩模,这些大的蛋白质分子由亚基组成。用基因工程技术使亚基具有很强的边缘亲和性并且具有可被光分解的键。在未被蛋白质复盖的位置上涂以导电的(或绝缘的)材料,然后除去蛋白质。这样衬底表面就留下一一种整齐的象岛屿一样的图型(见图5)。

图5 分子光刻蚀术。大的蛋白质分子沉积在硅晶上，留下一种整齐的空位(A)图型，而空位再用导电的(或绝缘的)材料填满。先解除去蛋白质以后，已填满的A位的整齐阵列形成一种用于装配线路的，像岛屿一样的图型。下图：用重组DNA技术造成蛋白质亚基，它们组合在一起像拼板玩具。(原文引自《生物体系中的非线性电动力学》(英文)，Lawrence编、1984年版)。

Gentronic公司的实验室也采用薄膜沉积技术，在1978年获得两项专利，将单层或多层蛋白质沉积成阵列，构成微图型。他们的目的在于开发一种在非生物材料表面上将分子组织起来的方法。

2、关于分子线路的装配[12、13]

James McAlear和John Wehrung (Gentronic公司)与J.Hanker(北卡罗林那大学)合作改进在单层蛋白质上沉积银导线的技术。这种方法在构建生物分子装置方面展现出一些希望。他们将聚赖氨酸涂在玻璃上，然后在聚赖氨酸上再沉积一薄层聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)。电子束刻蚀术借助于计算机操纵的电子束描绘图型，使这种复合物对电子束曝光。曝光后的图型在无水乙醇中显露出聚赖氨酸的游离氨基，一种银染料就在它上面沉积形成银导线。这种直接沉积导体的方法可以广泛用于各种酶和蛋白质。它也可用于大分子的局部装配，局部装配图型的位置借助于光刻蚀时已曝光的区域而被确定。

3、关于用生物材料作支持物[13]

设计用于局部装配程序的蛋白质大分子可能起结构上而不是功能上的作用。以生物高分子为支持物，将分子大小的导体与功能元件连接到它上面去。

K.Ulmer认为基因工程技术有可能生产“大量”的超纯原料。

4、关于局部装配的方式

已经有人提出几种有趣的局部装配程序，其中一种是Gentronix公司的James McAlear和John Wehrung提出的Moleton(见图6)[13]。

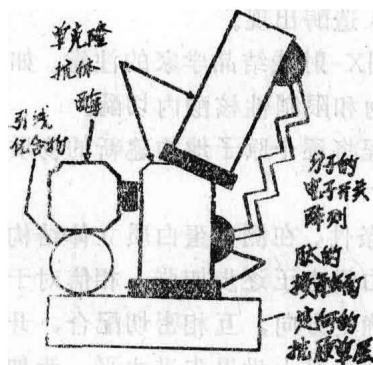


图6 分子的局部装配。Moleton是一种立体结构组织的模型。在固体表面沉积的抗原具有“粘性点”，单克隆抗体可以结合上去。抗体为结合分子的电子元件(导线、开关、电路与引线)而形成支架。

这种模型不是作为一种装置，而是作为一种组织方式。这种模型用单克隆抗体(或它的片段)作为高度专一的局部装配单位，以便得到一种立体阵列。分子的电子开关使一个抗体与另一个抗体连接，因而使结构内部

有可能传递信息，引线化合物是信息的通道或出口处。有可能在溶液中装配亚基，因为每个专一的位置随机地与其它专一位置结合，这种结构将像晶体那样生长。由于酶或抗体结合部位的精确符合，所以装配是自行校正的。Ulmer曾提出生物工程技术将能设计定做蛋白质作为催化剂在代谢中生产电子学上用的分子，有人认为可能设计与合成一种“计算

机的染色体组”(“Computer genome”),它可以直接生产分子线路[13]。

5、85年东京大学的T.Akaike试制生物电子元件模型获得进展。元件构成如下:把氧化铜与二氧化锡掺在一起,用含谷氨酸的多聚氨基酸复盖,然后浸入含细胞色素C的液体中。加电压时元件性能改变,更易于传递电流,细胞色素C中的铁随电压改变而被氧化或被还原。同时产生颜色变化。这种元件可以传递电信号,也能作为光电装置的显示元件[14]。

据报道,用化学处理方法使细胞色素C稳定,然后把它固定到硅片上,当一定波长的光照射时,它就摄取电子,停止照射时,它又放出电子,使硅片发生电流变化。微生物产生的一种蛋白质(细菌视紫红质)可以作为生物电子开关,而ATP合成酶则可以作为能量供给源。把这些装置组合起来,就能形成本体的大部分是由生物材料制作的生物芯片。

四、展望

发展PE需要较多的人力和财力上的投资。例如美国的Genex公司已用一百五十万美元建立PE实验室,并得到为期五年的保证金一千六百五十万美元。集中研究如何令人满意地改变蛋白质的结构与功能。

PE研究开展以后必将逐步掌握对蛋白质的结构与功能进行设计的一般规律。这样就能减少以后进行PE所需的工作量。

开展PE工作应该尽可能选择有应用价值的蛋白质作为研究对象。例如:

医药方面:免疫球蛋白的结构已经确定,又有很多DNA顺序的信息可供利用,而且单克隆抗体工作也有进展。采用PE技术有可能使免疫球蛋白更适于做亲和纯化的试剂或治疗药物[5]。将抗体和毒性肽的基因融合起来有可能创造出能自动对准靶细胞的抗癌药物[5、7]。

工业方面:葡萄糖异构酶、 α -淀粉酶和青霉素酰化酶分别是高果糖浆工业和抗菌素工业中用量很大的酶。它们的 α -碳骨架已确定、许多性质也已经清楚。如果用PE技术改进酶活力、耐热性以及底物的亲和力,预计有很大的经济效益。这三种酶仅在美国每年就有几千万美元的市场[4、5]。可以预计不久将会有性能优异的人造酶出现。

此外,DNA阻遏物和限制性内切酶EcoRI的结构正受到X-射线结晶学家的注意。如果设计改变它们的专一识别位点,就可能造出一批新的阻遏物和限制性核酸内切酶。

PE还是通向更普遍的分子工程的重要步骤,而分子工程将逐个原子地构建新的物质,例如生物电子元件等[11—15]。

PE研究在北京、上海等地已经具有一定的技术条件,在测定蛋白质立体结构,合成核酸与寡核苷酸等方面做了不少出色的工作。我省的力量也正逐步加强。相信对于这个具有很大潜力的新生长点,只要毫不犹豫地抓住时机,确定方向,互相密切配合,开展工作,大力协同,就一定能较快地创造条件,做出成果,迎头赶上世界先进水平,为加速我国的“四化”作出贡献。

参考文献

- [1] Rastetter, W.H., Trends Biotechnol, 1 (3) : 80—84, 1984
- [2] Lowe, D.M., Laboratory Practice, May, 21—22, 1985
- [3] Maugh, T.H., Science, 223 : 269—271, 1984
- [4] 陆德如: 遗传工程, (4) : 1—2, 1984
- [5] 罗贵明: 生物科学动态, (3) : 1—6, 1985
- [6] Pramik, M.J. 同上, (3) : 26—28, 1985
- [7] Abelson, P.H., Science, 219: 612, 1983
- [8] Wasserman, B.P., Food Technol., 78 (2) : 87, 1984
- [9] Genetic Engineering and Biotechnology Monitor, (11) : 44—45, 1985
- [10] 遗传工程, (4) : 69, 1984
- [11] 同[9], (9) : 45—46, 1984
- [12] Haddon, R.C. and Lamola, A.A., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 82 : 1874—1878, 1985
- [13] Jennifer Van Brunt, Bio/Technol, 3 (3) : 209—215, 1985
- [14] Technocart, 8 (8) : 87, 1985
- [15] Drexler, K.E., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 78 : 5275—5278, 1981
- [16] 日经八"イ才广夕 : P.6, 1984, 5, 21.
- [17] Vitetta, E.S., et al, Science, 219 : 644, 1984
- [18] 铃木三男: 遗传工程, (4) : 6—8, 1984
- [19] 郭礼和: 生物工程学报, 1 (1) : 15—16, 1985
- [20] 孟广震: 同上, 1 (2) : 7—8, 1985
- [21] Ulmer, K.E., Science, 219 : 666—671, 1983

Protein Engineering : Rise and Prospects

Zhuo Zhao—Wen

(Zhong Shan Univ., Dept.of Biol.)

Abstract

Briefly reviewed on Protein engineering(PE). Described the procedures, methods, ideas and successful results involving in PE With 21 refs

对一株耐热性重组体的初步研究

叶玉坤 唐小任 張耀琳 盛光阳

(广东省微生物研究所)

提要 以一株中度嗜热菌A₄₋₃为供体,大肠杆菌的PBR322/HB101为载体/受体系统,用“鸟枪法”获得了带耐热性的转化子,这些转化子在55°C以上到70°C高温下均能存活,但不增殖。当置于37°C下则能恢复正常生长。比较供体菌、受体菌、耐热和不耐热两类转化子的生化特性表明,耐热性转化子与供体菌的性状较相似,不耐热转化子与受体菌的性状较相似。进而,以试验获得的耐热性重组体作为受体细胞以构建新的载体/受体系统。结果表明,PBR322质粒不能转入,PGR71质粒和PUB110质粒都能转入,但只有PGR71质粒转入后所得的转化子仍保持耐热性,PUB110质粒转入后所得的转化子却失去耐热性。

前 言

目前,在发酵工业上所用的生产菌株大多不耐高温。因此,杂菌污染以及由于降温所需的动力消耗是发酵工业生产中急待解决的问题,这尤以南方的夏季更为严重。自然界存在的高温微生物虽然能在高温下生长繁殖,但往往生长能力弱,缺乏有用的代谢产物[11][12]。我们通过DNA体外重组技术试图把嗜热菌的耐热遗传物质转移到大肠杆菌,使它成为耐热的宿主细胞。但最近的一些遗传工程菌生产试验表明,用大肠杆菌为宿主细胞所克隆的基因容易丢失,且生长较慢,不适于发酵工业上的应用[5]。而通常用于发酵工业的枯草杆菌,虽然有产生热源,没有外膜,抽提产物方便,并能分泌很多有用的胞外酶等优点,但在分子克隆中亦存在两个问题,一是转录机制比大肠杆菌复杂得多,外源基因难以表达,二是克隆在枯草杆菌中的外源DNA不稳定,克隆在大肠杆菌的枯草杆菌DNA也不稳定[2][3][4][6]。所以,寻求理想的宿主细胞已成为微生物育种新技术急待解决的问题。我们已获得的耐热性重组体具有生长速度快、耐热等优点,如能构建新的载体/受体系统,无疑对工业微生物的遗传工程育种将会有很大的实际意义。

材料和方法

菌种和培养 以中度嗜热菌A₄₋₃(来源于本所高温细菌研究组)为供体菌,从广东温泉分离获得,用A培养基(0.8%旦白胨、0.4%牛肉膏PH7.2)培养。经试验,该菌对以下抗生素均无抗药性:Ap(30ug/ml)、Tc(20ug/ml)、Sm(100ug/ml)、Km(20ug/ml)、

Nm (5 ug/ml)、Cm (10ug/ml)。生长最适温度为55°C, 45°C以下不能生长, 70°C生长微弱。受体菌为大肠杆菌HB101在LB培养基 (1 % 旦白胨、0.5 % 氯化钠、0.5 % 酵母汁和0.2 % 氯化镁PH7.0), 37°C下培养。PGR71是穿梭于大肠杆菌和枯草杆菌的质粒。两者均由美国加州大学戴维丝分校R、H、Dai博士赠给。枯草杆菌质粒PUB110 (由美国哈佛大学Losick, R实验室获得)。大肠杆菌802 (PBR322) 由北京微生物所提供。

总DNA及质粒DNA的提取 中度嗜热菌A₄₋₃的总DNA是按M、Zasloff (1978) 方法提取[10]。PBR322质粒DNA是按J、F、Morrow (1977) 法抽取[7]。PUB110质粒DNA的提取, 则先用0.25M蔗糖悬浮菌体, 加溶菌酶至最终浓度为2 mg/ml, 置10°C下20分钟, 加0.25MEDTA后再过5分钟, 然后加入等体积的0.5 % TritonX-100, 室温下放置15分钟, 12,000转/分离心除去细胞碎片及染色体DNA, 上清液按常规法用酚提取, 酒精沉淀。PGR71质粒DNA的提取, 用50mMTE缓冲液 (PH为8) 悬浮菌体, 摇匀后, 加溶菌酶 (溶解于10mM Tris-Hcl)使最终浓度为3 mg/ml, 轻轻振摇数次, 在室温下静置15分钟, 按常规法用酚提取, 酒精沉淀等。

体外重组和转化 用限制性核酸内切酶Pst I或BamHI酶解, 细菌碱性磷酸酯酶去质粒的自我环化, T₄ DNA连接酶连结, 12°C下反应16小时。重组DNA分子按S、N、Cohen等人的方法转化到经0.1M氯化钙处理的大肠杆菌感受态细胞中[1]。

耐热性重组体HA48原生质体的制备及质粒的转化 在细胞生长至对数生长期, 收集菌体, 用无菌水洗一次, 用等量的0.1M巯基乙醇、0.1M碳酸氢钠悬浮菌体, 在37°C下保温半小时, 离心, 用无菌水洗一次, 加入蜗牛酶液和SMMP, 37°C下保温1小时, 用SMMP洗两次, 再悬浮在SMMP中备用。质粒DNA溶于50ulTE缓冲液中加50ul 2 × SMM, 加入0.5ml HA48的原生质体, 立即加15ml 40 % PEG (W/V), 混和2分钟后, 加5ml SMMP稀释PEG, 离心, 把混合物悬浮在1 ml SMMP中, 30°C下轻轻振摇2小时, 然后涂布在HTSM再生平板上[8]。

凝胶电泳和分子杂交 电泳是在55×65×4 mm的微型琼脂糖板状凝胶上进行, 100伏, 10分钟。凝胶变性处理后, 用Southern法转移至硝基纤维纸上[9], 在65°C下预杂胶6小时, 预杂交在盛有30ml 含1 × Denhart's, 3 × SSC, 0.5 % SDS溶液的玻璃皿中进行。然后, 加入缺口翻译以³²P标记的A₄₋₃DNA探针 (1.6 × 10⁷ Cpm) 在65°C下继续杂交反应18小时以上。然后洗去非特异性的杂交DNA, 在x光片上放射自显影。

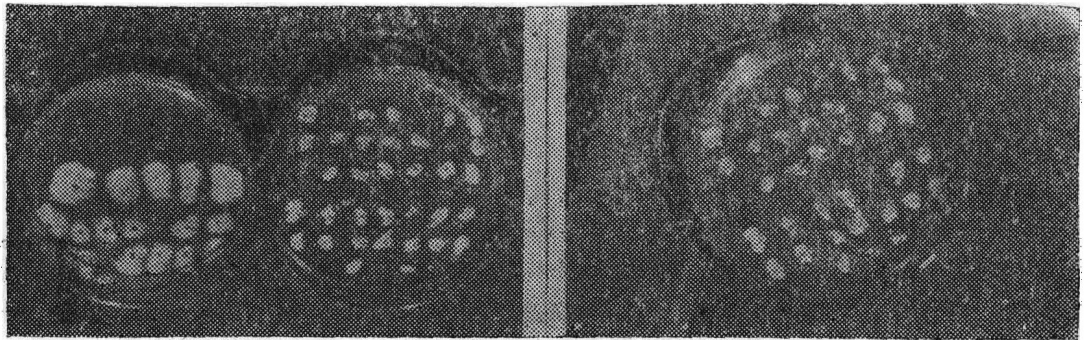
生理生化特性的检定 < 1 > 水解淀粉能力, 在1 % 淀粉-By培养基琼脂平板上划十字接种, 视有否透明圈产生。< 2 > 分解乳糖能力, 是用远滕氏培养基加乳糖和复红溶液, 平板培养。< 3 > 甲基红颜色反应, 在克拉尔克氏培养基中培养72小时, 加5滴甲基红液。

SDS (十二烷基磺酸钠) 及AO (吡啶橙) 的抑制试验, 取一白金耳被测试的菌种接于盛有10ml培养液的25ml试管中, 37°C下培养6小时, 细胞浓度约为5 - 10 × 10⁸, 再把培养液稀释至10⁻⁵, 以0.1ml的接种量分别接种于2 ml含有不同浓度: 0.5 %, 0.1 %, 0.05 % 的SDS及10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150mg/ml AO的培养液中, 37°C下培养过夜, 以培养液能变混浊的最高浓度作为试验所采用的浓度。经SDS或AO处理后的培养液, 涂布在LB或选择平板上, 37°C下培养, 计算其菌落数, 同时, 以不加SDS或AO的培养

液作对照。

结 果

用限制性内切酶BamHI或PstI酶解 A_{4-3} 的总DNA, 以PBR322/HB101为载体/受体系统作转化试验, 获得了 $Ap^R Tc^S$ 和 $Tc^R Ap^S$ 两类型的转化子。如图1所示, $Tc^R Ap^S$ 的转化子都是小菌落, 且不耐热。 $Ap^R Tc^S$ 的转化子有一部分是小菌落的, 也不能耐热。但有一部分大菌落的转化子培养在 55°C 下, 经8—12小时都未见生长, 但转置在 37°C 下培养, 却能恢复正常生长。此类转化子, 我们定名为耐热性重组体。



A

B

C

图1 耐热与不耐热克隆株的形态比较

A、 $Ap^R Tc^S$ 转化子, 大菌落, 耐热

B、 $Ap^R Tc^S$ 转化子, 小菌落, 不耐热

C、 $Tc^R Ap^S$ 转化子, 小菌落, 不耐热

为了验证在AP选择平板上长出的大菌落是否确是耐热, 我们随机选择一株, 取名HA48, 同时与供体菌 A_{4-3} , 受体菌HB101作比较, 把上述菌株分别在 50°C , 60°C , 70°C 下液体培养12小时, 然后再转置在 37°C 下振荡培养。结果如图2所示, HB101不能恢复生长, HA48能恢复正常生长。有趣的是, 中度嗜热菌 A_{4-3} 在 45°C 以下的温度本来是不能生长的, 但经高温培养后, 即使转置到 37°C 的温度下也能继续生长。