

# 转基因植物表达质粒中 SBR 基因的序列分析

蒋少云, 凌均

(中山医科大学口腔医学院口腔内科, 广东 广州 510055)

**摘要:**【目的】对转基因植物表达质粒 pROP1 中含 SBR 基因 P1 片段(184 ~ 1946 bp)进行序列测定和分析。【方法】从 *E. coli* DH5 $\alpha$  中提取质粒 pROP1, 用 PCR 测序试剂盒和 DNA 自动测序仪检测 P1 片段的序列, 并与 GenBank 上的变形链球菌表面蛋白基因序列比较, 检测其准确性。【结果】测定了 P1 片段 5' 端 616 个碱基序列和 3' 端 466 个碱基序列, 其准确性达 98%。【结论】PCR 扩增的 P1 片段 5' 端和 3' 端的 DNA 序列与变形链球菌表面蛋白 pac 基因唾液粘附区相一致, 为转基因番茄防龋疫苗的研究提供了基础资料。

**关键词:** 链球菌, 变形; 唾液粘附区; 序列分析, DNA; 龋齿/ 预防和控制

**中图分类号:** R781.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-257X(2001)01-0048-03

## Sequence Analysis of SBR Gene in Expressional Plasmid of Transgenic Plant

JIANG Shao-yun, LING Jun-qi

(Department of Oral Medicine, College of Stomatology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510055, China)

**Abstract:** 【Objective】To sequence P1 gene(184 ~ 1946 bp) including SBR gene in expressional plasmid of transgenic plant. 【Methods】pROP1 plasmid was extracted from *E. coli* DH5 $\alpha$ , P1 gene was sequenced by PCR sequence kit and DNA autosequencer and compared with surface protein gene of *Streptococcus mutans* in GenBank. 【Results】616 base pairs from 5' end and 466 base pairs from 3' end were sequenced, its accuracy is up to 98%. 【Conclusion】The sequence of P1 gene's 5' end and 3' end is consistent with DNA sequence of SBR region of *Streptococcus mutans* surface protein pac gene and may provide useful informations to construct the transgenic plant anticaries vaccine.

**Key words:** streptococcus mutans; saliva-binding region; sequence analysis, DNA; dental caries/prevention & control

龋病累及全世界 95% 以上的人群, 防龋疫苗的研制及应用是一项有效的防龋措施。可食用疫苗是目前防龋疫苗的研究方向之一。利用转基因植物作为生物反应器, 将外源基因引入植物内, 机体的免疫机理与植物 DNA 重组技术相结合, 可生产能够使人体获得特异性抗体的可食用疫苗。1991 年国外学者开始利用转基因马铃薯等植物生产疫苗来预防细菌性腹泻和病毒性疾病<sup>[1, 2]</sup>。变形链球菌表面蛋白的唾液粘附区 (saliva-binding region, SBR) 介导变形链球菌与唾液所覆盖牙面的结合, 而抗 SBR 的唾液分泌性免疫球蛋白 A (Sali-

vary IgA, SIgA) 具有保护作用, 抑制变形链球菌与牙面的结合<sup>[3]</sup>。将 SBR 基因引入植物体内生产防龋疫苗是本课题研究的目標。目前本研究组已构建 SBR 的植物表达质粒 pROP1 和 pRPB1。两种植物表达质粒中所含的 SBR 基因均是来自 PCR 扩增的同一产物, 由于可能存在错配的因素, 为确保下一步转入农杆菌载体的目的基因是变形链球菌表面蛋白唾液粘附区, 本实验对转基因植物表达质粒中 PCR 扩增的含 SBR 基因 P1 片段(184 ~ 1946 bp)进行序列测定和分析, 以及与 Internet GenBank 上的序列比较, 检测其准确性。

收稿日期: 1999-12-28

作者简介: 蒋少云(1972-), 女, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 住院医师

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和培养

pROP1(km<sup>r</sup>)由本课题组构建,转入*E. coli* DH5 $\alpha$ 菌种。取-70℃保存的菌种划线于含卡那霉素(kanamycin, km)的LB平皿上,37℃培养过夜。挑单菌落于40 mL含卡那霉素的LB液体培养基中,37℃振荡培养过夜。

### 1.2 引物

引物由上海生物工程公司合成。引物1:5' g gatccagatttgaggatttatgaaagtc 3',引物2:5' ggtac-ctcaaccagccagctttatcacc 3'。

### 1.3 提取和纯化质粒

利用碱裂解法<sup>[4]</sup>提取质粒pROP1,溶于0.5 mL双蒸水中。采用Qiagen plasmid kit(Qiagen公司)纯化质粒。将Qiagen Tip 100柱用缓冲液QBT 4 mL平衡,并依靠重力将缓冲液QBT排尽。将获得的质粒加样于柱中,依靠重力将上清过柱,加入缓冲液QC 10 mL洗柱两次。加入5 mL缓冲液QF溶解洗脱柱中吸附的质粒DNA。将洗脱液加3.5 mL异丙醇充分混匀,4℃15 000 r/min(型号GS-15R,半径8 cm)离心30 min,去除上清。用2 mL 70%乙醇洗涤沉淀,室温放置至乙醇完全挥发后,用0.5 mL双蒸水溶解沉淀。-20℃保存。

### 1.4 核苷酸序列测定和比较

以上海生物工程公司合成的pac基因SBR区上下游双引物,结合纯化质粒pROP1为模板,用ABI公司荧光标记末端终止物循环测序试剂盒。在PE公司6400型PCR仪上进行测序反应。模板

用量约1 mg,引物用6 pmol。反应产物经纯化后用ABI公司310 DNA序列分析仪进行序列测定,并与Internet GenBank上根据Altschul报道<sup>[5]</sup>的变形链球菌表面蛋白pac基因、spaP基因和sr基因比较,检测PCR扩增的准确性。它们的GenBank序列号分别是:emb/X14490/SMPAC(pac基因)、emb/X17390/SMSAP(spaP基因)和emb/X53647/SMOMZSR(sr基因)。

## 2 结果

Qiagen plasmid kit获得适用于测序的高纯度pROP1质粒DNA后,应用引物对pROP1质粒中的插入片段进行测序,5'端测616个碱基对,3'端测466个碱基对(图1)。与GenBank上变形链球菌表面蛋白基因相应区域比较结果如表1。

表1 P1基因序列与pac、spaP、sr基因比较

Table 1 Comparison of the sequence of P1 gene with pac gene, spaP gene and sr gene

Sequence	5' accuracy	3' accuracy
emb/ X53647/ SMOMZSR	98%	98%
emb/ X14490/ SMPAC	98%	97%
emb/ X17390/ SMSAP	97%	98%

## 3 讨论

### 3.1 植物表达质粒中P1片段的序列分析

本课题组构建的植物表达质粒pROP1和

5' end:

```
aaattagtaaaactgtgtggtgctgttctaggaacagtagcagcagctctgtagcaggacaaaaggttttgccgatgaaacg
accactactagtgatgtagatactaaagtagtgaacacaaaactggaaatccagcgaccaatttgccagaggctcaagggagt
gcgagtaagggctgaacaaagcaaaaccaagctggagagagacaaatggtcaataccagittgaagtaacctaaactgatct
tgatcaagcagcaaaagatgctaagctgctggtgtaaatggtgccaagatgccgatgtaataaaggaactgttaaaacagctt
gaagaagcangtccaaaagaanaactgaaattaagaagattacacaaaaccaagctgaggatattaagaagacaacagat
caatataaatcggatgtagctgctcatgaggcagaagttgtaaaaatcaagctaaaaatcagggaactaaagaacagatga
aaaagatattgagcagctcataagccgagggtgaacgcattaatgctgcaaatgctgncagtaaaacagcttatgaagctnaatt
ggctcnatatcaagcagatttagcagccgt
```

3' end:

```
aatttttggtantntttgntttgaagtgctttgctaaaacgcattaitccacagcagaagccttaaggaactcccatctgtgtcaaa
gataagttcgcatttggtcaagatcatagaccaaaatttgagcagatggtctgtaagttccgctctcattttatgttttcaagttctgc
cagtgacagcttaataagaagttgttcatctctgtagccttaacttaacatggatagctctgtaaatcttttgatattggcaagaactg
cttgatacttagcaagttttgcttcagtaactcagcttagcatccgcaatgctgcttcaattgcagattttcagctgtagcgctgcaattg
cggcattattgctgctacagctgctcatagggcggcttagcatccgcaatggtctttgaaacgcgagcgagctctgtttgatagggcgg
```

图1 pROP1质粒中插入片段5'端和3'端的碱基对序列

Fig. 1 The sequence of 5' end and 3' end of gene inserted in pROP1 plasmid

pRPB1 中插入的目的基因是同一片段, 是由 PCR 扩增含变形链球菌 pac 基因的唾液粘附区 (saliva-binding region, SBR) 的 P1 片段, 插入广谱中介质粒构建而成。PCR 是一种选择性体外扩增 DNA 或 RNA 片段的方法, 其特异性是由两个人工合成的引物序列决定的。许多因素可影响 PCR 技术, 如模板核酸的浓度、引物的设计、耐热 Taq DNA 聚合酶的浓度、三磷酸脱氧核苷酸的浓度以及温度循环系数等, 因此在实验条件不能达到最佳配制时常会出现非特异性扩增和错误掺入的情况。这将对以后的基因克隆及表达分析造成一定的难度, 因而有必要对 PCR 扩增的片段进行测序分析。本实验只需测定一个质粒中的插入片段。

实验中的目的基因长约 1.76 kb, 用一般的测序分析法难以检测到如此长的片段。为了了解所获得的 pROP1 和 pRPB1 质粒中插入片段的构成情况, 本研究应用双端引物结合纯化的质粒 pROP1 为模板, 采用四标记单泳道法, 通过 DNA 自动测序仪对插入片段的上下游区进行序列测定。DNA 序列分析技术是一个包括 DNA 样品制备及碱基分析、信息处理的多阶段过程。本研究所用的自动测序仪将凝胶电泳、初始信息的收集及碱基的阅读等步骤自动化, 保证了测序反应可连续高速地进行。用标记单泳道法将 4 种不同荧光标记物分别标记 4 个反应的引物, 4 个反应分别进行, 产物合并在一个泳道中电泳分离。每个反应的产物可由特定的荧光标记加以区分, 使 DNA 的测序通过检测荧光条带的顺序来确定。

### 3.2 插入片段与变形链球菌表面蛋白基因相应区域的比较分析

龋病是一种细菌感染性疾病, 发病广泛。变形链球菌是导致人类龋病的主要致病菌。龋病发病过程包括变形链球菌对牙面唾液获得性膜的非特异性和特异性的粘附过程, 即主要是非蔗糖依赖性粘附过程和蔗糖依赖性粘附过程。变形链球菌在牙面产酸, 使牙齿脱矿导致龋病的发生。变形链球菌对牙面最初粘附过程被认为是由变形链球菌表面蛋白(Pac)介导的, 其表面蛋白具有抗原性。变形链球菌表面蛋白基因被称为 pac 基因<sup>[6]</sup>、spaP 基因<sup>[7]</sup>和 sr 基因<sup>[8]</sup>。前两者是变形链球菌血清 c 型的表面蛋白基因, 后者是变形链球菌血清 f 型的表

面蛋白基因。口腔变形链球菌属的表面蛋白基因唾液粘附区具有高度同源性<sup>[7]</sup>, 因而 P1 片段与不同血清型变形链球菌的表面蛋白唾液粘附区进行比较具有重要意义。本实验测定了 SBR 基因上游区 616 个碱基对和下游区 466 个碱基对, 分别与 Internet 上 GenBank 公认的变形链球菌表面蛋白相同位点的基因进行同源性比较, 结果显示 PCR 的准确性达 98% 左右。说明 PCR 扩增的含 SBR 区的 P1 片段能与原基因的相同位点吻合, 为下一步转化农杆菌以及构建转基因植株提供了基础资料。

### 参考文献:

- [1] Thanavala Y, Yang Y F, Lyons P, *et al*. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(8): 3358.
- [2] Arakawa T, Chong D K, Langridge W H. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(3): 292.
- [3] Hajishengallis G, Koga T, Russell M W. Affinity and specificity of the interactions between *Streptococcus mutans* antigen I/II and salivary components [J]. *J Dent Res* 1994, 73(9): 1493.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning* [M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 26.
- [5] Altschul S F, Thoma L M, Alejandro A S *et al*. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Res* 1997, 25(17): 3389.
- [6] Koga T, Okahashi N, Takahashi T, *et al*. Surface hydrophobicity adherence and aggregation of cell surface protein antigen of streptococcus mutans serotype c [J]. *Infect Immun*, 1990, 58(2): 289.
- [7] Ma J K, Kelly C G, Munro G, *et al*. Conservation of the gene encoding streptococcal antigen I/II in oral streptococci [J]. *Infect Immun*, 1991, 59(8): 2686.
- [8] Ogier J A, Wachsmann D, Scholler M, *et al*. Molecular characterization of the gene sr of the saliva interacting protein from streptococcus mutans OMZ175 [J]. *Arch Oral Biol*, 1990, 35(suppl): 25s.

(编辑 刘清海)