

文章编号 :1009 - 038X(2003)03 - 0080 - 04

阿片生物活性肽的基因设计、化学合成及克隆

邬小兵, 乐国伟, 施用晖

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:在阿片类生物活性短肽的结构和生理特点基础之上,通过重复叠加的方法设计了此类生物活性肽基因。借助 Primer 软件,设计了 3 条引物,并通过引物延伸和 PCR 等步骤,实现了基因的人工合成并克隆至表达载体 pPIC9K。PCR 及酶切鉴定后测序,表明所合成基因已成功克隆。

关键词:阿片肽;克隆;化学合成;基因

中图分类号:Q 78

文献标识码:A

Design, Chemical Synthesis and Cloning of the Opioid Peptide Gene

WU Xiao-bing, LE Guo-wei, SHI Yong-hui

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Many bioactive peptide have potential availability in animal husbandry, but the source of these peptide is limited. It is difficult to express oligo-peptide by gene engineering. We designed the gene of these peptide by repeating its splice, and three primers under the aid of software primer 5.0. The interest gene was synthesized after extension reaction of the primers and PCR reaction, and then it was cloned into plasmid pPIC9K. The recombinant plasmid was identified by PCR reaction and by cutting with Sca I. Sequencing result showed that the gene sequence is correct.

Key words: opioid peptide; clone; chemical synthesis; gene

许多生物活性短肽具有应用于畜牧生产的潜力,由于这些肽来源有限而限制了其应用。阿片类生物活性肽具有抗腹泻、催眠、镇静和促进摄食等生理功能,应用于动物具有降低幼龄动物的腹泻率、促进动物摄食、调节睡眠和促进动物生长的潜力。阿片肽的传统生产方式为水解外源蛋白和化学合成两种方法。水解外源蛋白存在产量低、产物不确定等问题^[1]。化学合成价格昂贵,且副产物有毒,用于医药生产是可行的,但难以用于动物生产。由于阿片类生物活性肽多为短肽,直接用基因工程的方法进行生产有一定难度。根据阿片类生物活性短肽的结构和生理特点,作者设计了可表达此类生物

活性肽的基因,并人工合成和克隆。

1 材料与方法

1.1 肽片段的选定

Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Arg 为 casomorphin 片段,具有阿片活性,已有证据表明能被动物肠道吸收并进入血液。Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys 为 β -内啡肽前 9 个氨基酸,具有脑啡肽 60%~100% 的活性^[2]。

1.2 表达、检测、分离策略

小分子肽难以表达,而且检测难度大,将两基因融合,重复,使其形成相对分子质量为 5 000 左右

收稿日期 2002-09-16; 修回日期 2002-11-13.

作者简介:邬小兵(1973-)男,重庆云阳人,粮食、油脂与植物蛋白工程博士研究生。

万方数据

的蛋白质以便于表达和 SDS-PAGE 检测. 在两段之间是胰蛋白酶作用位点 Arg 和 Lys. 在动物体内及体外, 胰蛋白酶可从 Arg 和 Lys 处水解此多肽, 形成目的肽片段来发挥其生理作用. 由于此多肽为碱性, 可用阳离子交换进行分离. 最终的融合多肽如下: Arg-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile.

1.3 目的基因及引物设计

1.3.1 目的基因设计 根据毕赤酵母所喜好的高效密码子^[3]及质粒 pPIC9K 特点设计目的基因如下:

```
EcoR I
↓
CGGAA TTC AGA TAC CCA TTC CCA GGT CCA
ATC AGA TAC GGT GGT TTC ATG ACT TCC
GAG AAG TAC CCA TTC.
CCA GGT CCA ATC AGA TAC GGT GGT TTC
ATG ACT TCC GAG AAG TAC CCA TTC CCA
GGT CCA ATC TGA GT
ACT GCGG CCG CAT TCT TAT
TGA CGCC GGC GTA AGA ATA
↑      ↑
Sca I  Not I
```

为便于连接, 基因的 5'端和 3'端分别添加 *EcoR* I 和 *Not* I 位点, 为便于酶切鉴定, 在 *Not* I 位点前添加 *Sca* I 位点(用 *Sca* I 酶切重组质粒, 可出现 7 kb 和 2 kb 左右的两个条带, 而对照质粒只能被 *Sca* I 线性化, 条带大小为 9.3 kb).

1.3.2 引物设计 借助软件 Primer5.0, 设计引物如下:

引物一 F1:

```
CGGAATTCAGATACCCATTTCCAGGTCCAAT
CAGATACGGTGGTTTCATGACTTCCGACAAGTA
CCCATTTCCC
```

引物二 F2:

```
TCCGACAAGTACCCATTTCCAGGTCCAATC
AGATACGGTGGTTTCATGACTTCCGAGAAG
```

引物三 R1:

```
ATAAGAATGCGGCCGAGTACTCAGATTGG
ACCTGGGAATGGGTACTTCTCGGAAGTCATGAA
AC
```

1.4 目的基因的合成和克隆

1.4.1 试剂 试剂: Takara LA Taq 酶, dNTP, 限制性内

切酶 *EcoR* I, *Not* I, DNA 连接酶均为宝生物(大连)有限公司产品; 质粒 pPIC9K 购自 invitrogen 公司; 引物由宝生物(大连)有限公司合成; *Sca* I, PCR 标准购自华美生物工程公司; JM109 由作者所在实验室保存.

1.4.2 基因合成

1) DAN 延伸反应: 引物 F2(0.01 OD/ μ L) 5 μ L, 引物 R1(0.01 OD/ μ L) 5 μ L, 10 倍 Takara LA 缓冲液 10 μ L, dNTP 16 μ L, H₂O 63 μ L. 94 °C 变性 5 min 后, 在 10 min 内冷却至 55 °C. 加入 Takara LA Taq 酶 1 μ L, 保温 5 min. 72 °C 延伸 5 min, 此反应液为 DNA 延伸液^[4].

2) PCR 反应: 引物 F1(0.01 OD/ μ L) 1 μ L, 引物 R1(0.01 OD/ μ L) 1 μ L, DNA 延伸液 1 μ L, dNTP 10 μ L, 10 倍缓冲液 10 μ L, Taq 酶 1 μ L, H₂O 76 μ L. 94 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 保温 30 s, 共 30 个循环. 72 °C 延伸 4 min. 经乙醇沉淀后溶于 100 μ L TE 缓冲液中, 此液称为 PCR 反应溶液.

基因合成:

```
—————引物 F1
—————引物 F2
引物 R1
```

3) 基因克隆 将 PCR 反应溶液酶切(*EcoR* I, *Not* I). 用 *EcoR* I, *Not* I 酶切载体 pPIC9K, 14 °C 进行连接反应, 连接液转化大肠杆菌 JM109, 200 μ L 转化菌液铺 AMP-LB 平板, 37 °C 培养过夜.

1.4.3 阳性克隆鉴定 挑取 AMP 抗性转化子若干, 菌落进行 PCR 扩增^[5](挑单菌落于 Eppendorf 管, 加 50 μ L 0.1% Triton, 沸水浴 2 min, 取 5 μ L 裂解液进行 PCR, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环. 上游引物为 α -因子引物(5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC 3'), 下游引物为 AOX1 3'引物(5'-GCAAATGGCATTCT-GACATCC-3'). 重组质粒应出现 330 bp 条带, PCR 液 10 μ L 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳. 挑选阳性克隆子, 碱裂解法抽提质粒 DNA, 进一步用 *Sca* I 酶切鉴定. 阳性克隆送大连宝生物工程公司测序进一步鉴定.

2 实验结果

2.1 PCR 及酶切鉴定结果

经 PCR 后, 14 号菌株扩增出与理论值 330 bp 大小相同的条带(见图 1). 抽提 14 号菌株质粒 DNA, *Sca* I 酶切后, 电泳显示出 7 kb 和 2 kb 左右的条带(见图 2).

Khorana 等建立的双链的多片段连接方法,是基因合成的经典方法.因合成仪更多地采用了较长的合成片段(如 50 聚左右),从而可以减少合成片段的数目,且一次能连接成较长的双链,节省了合成的时间.另一个改进是以合成的单链为模板,再用 DNA 聚合酶复制获得双链的方法,这不仅大大节省了用于化学合成的消耗,而且也节省了纯化学合成 DNA 片段的时间. Itakura 和 Brousseau 在 1982 年就曾分别提出和尝试了以两个合成片段的 3' 末端互补并互为模板,用 DNA 聚合酶延伸得到双链的方法.随着 PCR 技术的发展,现在多采用合成

多条具有互补序列的引物,通过 PCR 反应来合成全基因序列,这种方法可一次性地得到较长的目的基因,大大节约了基因合成的时间.但由于有多条引物同时参与 PCR 反应,因此增加了引物设计的难度,尤其是具多重序列的基因,采用这种方法进行合成更加困难.

作者根据在阿片类生物活性短肽的结构和生理特点,通过重复叠加的方法设计了可表达此类生物活性肽的基因.借助 Primer 软件,设计了 3 条引物,通过引物延伸、PCR 等步骤,实现了基因的人工合成并克隆至表达载体 pPIC9K.

参考文献:

- [1] 张源淑, 陈伟华, 邹思湘. 酪蛋白源阿片物质的分离、纯化及活性鉴定[J]. 南京农业大学学报, 1999, 22(4): 81-83.
- [2] 张豁中, 温玉麟. 动物活性成分化学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1995.
- [3] 赵翔, 霍克克, 李育阳. 毕赤酵母的密码子用法分析[J]. 生物工程学报, 2000, 16(3): 308-311.
- [4] 萨母布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 孟黎枫译. 北京: 科学出版社, 1996.
- [5] 沈关心, 朱慧芬, 张悦, 等. 菌落 PCR 和质粒 PCR 对转化菌的筛选[J]. 免疫学杂志, 2000, 16(2): 149-151.
- [6] 杜雨苍. 神经肽与脑功能[M]. 上海: 上海科技教育出版社, 1998.

(责任编辑: 李春丽)

征 稿 征 订 启 事

江南大学是教育部直属的“211 工程”重点建设大学。《江南大学学报(自然科学版)》为自然科学与工程融合的科技刊物(季刊),旨在反映自然科学与工程领域最新研究成果及其应用,刊载机械工程、通信与控制工程、信息工程、化学与材料工程、纺织工程、工业设计、土木工程、数理科学以及医疗卫生等学科的科技论文。

刊物为全国公开发行人,邮发代号 28—189。热忱欢迎本校及全国各地高等院校相关专业的师生及有关科研院所和企业的人员、工程技术人员不吝赐稿,积极订阅(订购处:全国各地邮局)。

《江南大学学报(自然科学版)》编辑部