

文章编号:1009-038X(2004)06-0047-04

抗菌肽基因在 *E. Coli* JM109 中的克隆表达

李启辉¹, 乐国伟¹, 施用晖¹, 王树英²

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 测试中心, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 合成 5 条 50~70 bp 的 DNA 片段, 用“片段拼凑”的方法通过三步 PCR 扩增得到目的基因, 天蚕素基因被克隆到 PUC19 载体上, 再转化大肠杆菌 JM109. 电泳分析重组质粒, 确定天蚕素基因已转化到 JM109 上. 摇床发酵转化子, IPTG 诱导表达目的肽, 最后提纯表达产物. SDS-PAGE 电泳分析表明有特异性带出现, 荧光色谱分析表明表达肽与目的肽组成一致, 最后确定天蚕素在 JM109 中得到表达. 抑菌圈活性实验表明, 表达肽具有一定抗菌活性.

关键词: PCR 扩增; 片段拼凑; 诱导 SDS-PAGE 电泳; 色谱分析

中图分类号: Q 78

文献标识码: A

Cloning and Expression of Cecropin Gene in *E. Coli* JM109

LI Qi-hui¹, LE Guo-wei¹, SHI Yong-hui¹, WANG Shu-ying²

(1. School of Food Science, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Test and Experimental Center, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Five 50~70 bp DNA fragments were synthesized first and then proceeding to 3-step PCR amplification using *fragment piecing-together* method to get the final full sequence. The fragment was cloned into vector PUC19 and then transformed into *E. Coli* JM109. Recombinant plasmids were analyzed by agarose electrophoresis. Finally, it was confirmed that the recombinant vector of interest has been transformed into *E. Coli* JM109. Transformed strain was fermented in a shaker under the induction of IPTG. SDS-PAGE electrophoresis of purified expression products contained the specific band. Analysis of fluorescence chromatography indicated the composition of target protein is consistent with the expression protein, and cecropin was confirmed being expressed in *E. Coli* JM109. Inhibition zone experiment indicated that expression peptide have substantial bioactivities.

Key words: PCR amplification; fragment piecing-together induction; SDS-PAGE electrophoresis; chromatography analysis

昆虫抗菌肽是昆虫血淋巴中产生的一类小分子肽, 一般由 20~60 个氨基酸组成. 它们具有热稳定性好, 碱性强, 抗菌谱广的特点, 一般对革兰氏阳性菌和阴性菌均有抗性, 有些甚至对病毒和肿瘤细

胞也具有抗性^[1]. 天蚕素是最早发现的抗菌肽且对革兰氏阳性菌和阴性菌都有较高的抗性. 本研究的天蚕素是通过蛋白建模方法设计的抗菌多肽.

通过 DNA 重组技术合成生物活性肽, 利用微

收稿日期: 2004-01-04; 修回日期: 2004-04-21.

作者简介: 李启辉(1977-), 男, 湖南邵阳人, 动物科学硕士研究生.

生物对活性肽进行表达,具有表达的定向性强、产品安全卫生、原料来源不限和成本低等优点,显示了 DNA 重组技术表达生产生物活性肽的优越性.目的肽可能与宿主菌存在抵制作用,这也是抗菌肽基因工程表达的一个关键问题, Bachmair 等人^[2~4]提出多肽在 *E. Coli* 中的半衰期计算方法,作者依据该理论通过在线软件 ProtParam(<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)设计的抗菌肽在 *E. Coli* 中的半衰期,结果表明其半衰期超过 10 h.为了防止被宿主菌水解,表达肽 C 端还添加了 6 个组氨酸作为保护序列.

目的基因全长 235 bp,首先设计 5 个 50~70 不等的 DNA 片断,通过逐步 PCR 扩增最终得到全基因.这样设计可以在只需修改 5 个片断中某个片断的条件下就可以快速、便利地改变对应的天蚕素氨基酸序列,为天蚕素保守序列的发现提供一种研究方法.

1 材料与方法

1.1 引物片断合成

5 条 DNA 引物片断由上海生物工程公司合成.

1.2 抗菌肽 DNA 的合成

Pfu 高保真酶购自上海生物工程公司, DNA maker、dNTP 均购自华美公司,胶回收试剂盒购自上海华舜生物有限公司.合成分为三步^[5],见图 1.

第一步:1) 延伸反应:调制 Seq2 和 Seq3 的反应体系,使 Seq2 和 Seq3 互为模板产生延伸反应.具体条件为:95 ℃保温 5 min,在 10 min 内冷却至 55 ℃,72 ℃保温 5 min,1 个循环.此为 DNA 延伸液 1. 2) PCR 扩增反应:调制 Seq1、Seq3 及 DNA 延伸液 1 的混合反应体系,使 Seq1 和 DNA 延伸模板进行延伸并 PCR 扩增. PCR 反应的条件为:94 ℃

30 s,55 ℃30 s,72 ℃30 s,30 个循环,此为 Frag1.

第二步:调制 Seq4 和 Seq5 的扩增体系,使 Seq4 和 Seq5 互为模板产生延伸反应.具体条件为:95 ℃保温 5 min,在 10 min 内冷却至 55 ℃,72 ℃保温 5 min,1 个循环,此为 DNA 延伸液 2.

第三步:调制 Frag1、延伸液 2 和 Seq5 的混合反应体系,PCR 条件为:94 ℃30 s,55 ℃30 s,72 ℃30 s,30 个循环.最终得到含 235 bp 的目的序列.

1.3 质粒构建、转化克隆

HindⅢ、EcoRI、PUC19、T₄ 连接酶、X-gal、IPTG 均购自华美公司, JM109 为作者所在实验室保存菌种.转化克隆试验操作参照文献[6].目的片断和质粒经 HindⅢ、EcoRI 消化后, T₄ 酶连接并克隆到 PUC19 上,得到重组质粒 PUC19_Cec;采用“CaCl₂感受态细胞法”把重组质粒转化到大肠杆菌 JM109 中,见图 2.

1.4 转化子的发酵表达

接种转化子于加氨苄青霉素的 LB 培养基平板上,37 ℃培养 36 h,挑取单菌落于 10 mL 加氨苄青霉素的 LB 液体培养基中(50 mL 试管),37 ℃、180 r/min 摇床振荡过夜.按体积分数 2%接种于加氨苄青霉素(100 μg/mL)的液体 SOB 培养基中,37 ℃、200 r/min 摇床发酵,当 OD₆₀₀ 达到 0.5 左右时,添加 IPTG 至终浓度达到 0.5 mmol/L,继续发酵 5 h 终止发酵.发酵液于 5 000 r/min 离心 10 min,收集菌体.

1.5 目的肽的提取、鉴定

将收集好的菌体用磷酸缓冲液(PBS)洗涤 3 次,再用 20 mL PBS 将其重悬.在冰浴条件下超声 5 min,每次间歇 5 s,超声后 12 000 r/min 离心 15 min,取沉淀.用 PBS 洗涤沉淀数次,直至 OD₂₈₀ 小于 0.05,然后 12 000 r/min 离心 10 min,沉淀即为包涵体.用 2 mol/L 的尿素洗涤包涵体以除去杂蛋白,再用 6 mol/L 的尿素溶液溶解包涵体,取上清液,上清液即含目的蛋白.

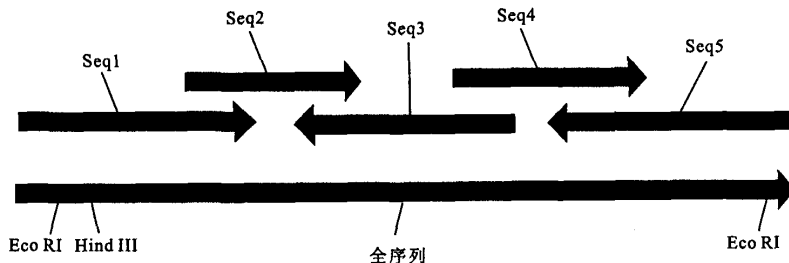


图 1 全基因 PCR 扩增流程图(Seq3 与 Seq5 为反向序列)

Fig. 1 Flow chart of full DNA PCR amplification

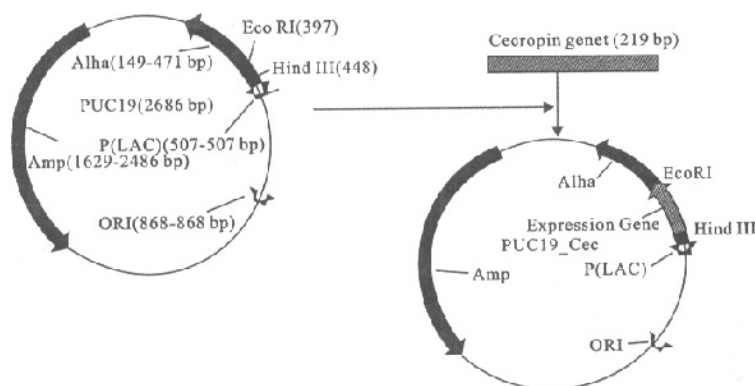


图 2 质粒构建图

Fig. 2 Vector construction chart

用相对分子质量 2 000 的透析袋透析初提液,透析完后采用 SDS-PAGE 电泳鉴定目的蛋白,3 种鉴定胶为浓缩胶、间隙胶、分离胶,其质量浓度分别为 3,10,20 g/dL。电泳后,回收胶中特异带蛋白质,用美国安捷伦液相色谱仪(型号 1100)分析其氨基酸组成,分析条件为色谱柱:4.0 mm × 125 mm C18,体积流量:1.0 mL/min,荧光检测器激发波长 340 nm,发射波长 450 nm;流动相:A 相为醋酸钠液,B 相为醋酸钠液、甲醇、乙腈混合液。

1.6 活性鉴定

采用抑菌圈法^[8]鉴定表达肽的抗菌活性。测试菌大肠杆菌 259221(*Escherichia coli* 259221)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)由无锡疾病预防控制中心提供,表达肽质量浓度为 0.5 mg/mL,抑菌活性大小以抑菌圈直径平均值(mm)表示,每次检测量为 10 μ L,并以氨苄青霉素作为对照。

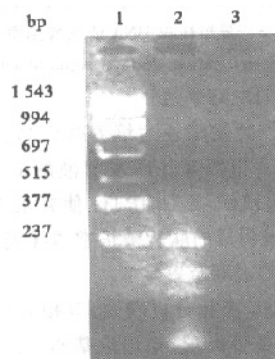
2 结果与讨论

2.1 DNA 片断的 PCR 扩增

琼脂糖凝胶电泳分析表明:通过第二和第三步反应,全序列已经扩增出来(见图 3)。但非特异性带较多,特异带 DNA 量很低,很难满足转化克隆,因此设计了两条引物:上游引物为 5'-GGCGAAT-TCATTAATGAT-3',下游引物为 5'-GCCGAAT-TCAAGCTTACCAT-3',利用这两条引物把回收后的特异带 DNA 再进行全序列扩增。扩增后琼脂糖凝胶电泳分析证明目的片断已经被大量扩增出来,见图 4。

由于 Seq4 和 Seq5 进行延伸反应只有一个循环

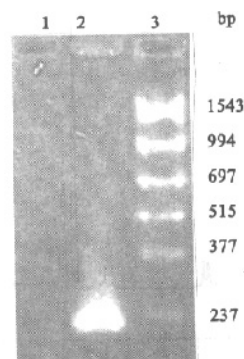
反应,无法提纯产物,导致最终反应体系复杂化,杂带较多,特异性带亮度很弱。为了得到足够多的满足转化的 DNA 量,进行全序列的扩增显得尤为重要。



1. DNA marker; 2. PCR 扩增 DNA; 3. 对照

图 3 全片段的电泳图

Fig. 3 The electrophoresis chart of full sequence



1. 对照; 2. PCR 扩增 DNA; 3. DNA marker

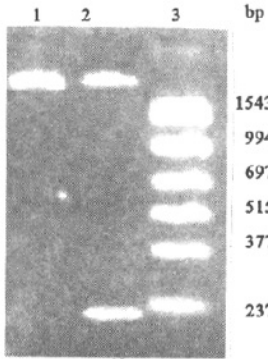
图 4 全序列扩增后的电泳图

Fig. 4 The electrophoresis chart of amplified full sequence

2.2 质粒构建、转化克隆

质粒构建见图 2。重组质粒经 HindIII 和 EcoRI

消化后,琼脂糖电泳表明有 219 bp 左右的带出现(见图 5),与理论基本一致,说明天蚕素基因已经被克隆到 PUC19 载体上.重组质粒由上海生物工程公司测序,测序结果表明克隆基因与天蚕素基因 DNA 片段序列一致.



1. 消化的原始质粒; 2. 消化的重组质粒; 3. DNA marker

图 5 重组质粒 DNA 消化检测图

Fig. 5 The verification chart of recombined plasmid

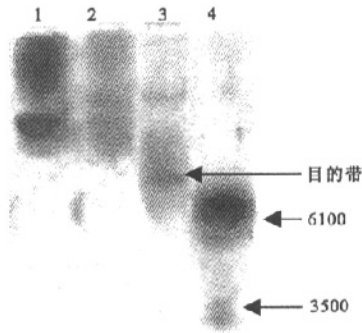
2.3 转化子的发酵表达

用 SOB 作为发酵表达培养基(加氨苄青霉素, pH 7.2), 37 °C 振荡 3 h 后发酵液的 OD₆₀₀ 值达到 0.5, 菌体生长较好. 添加 IPTG 使终浓度达到 0.5 mmol/L 时, 表明目的肽能被正常诱导表达.

2.4 目的肽的提取及鉴定

SDS-PAGE 电泳分析表明, 有相对分子质量为 7 200 左右的条带出现, 与理论基本一致(见图 6). 色谱分析表明, 氨基酸质量百分比组成与理论基本一致, 见图 7 和表 1. 因此确定表达肽与理论设计的天

蚕素抗菌肽一致.



1 为非转化子发酵提取液; 2 为转化子上清提取液; 3 为包涵体溶解液; 4 为胰岛素相对分子质量标准

图 6 SDS-PAGE 蛋白质电泳图

Fig. 6 SDS-PAGE protein electrophoresis chart

表 1 目的肽质量分数的实验值与理论值

Tab. 1 The difference between the experimental and theoretical analysis for target protein weight percentage composition

			质量分数/%		
氨基酸	理论值	实验值	氨基酸	理论值	实验值
Asp	1.59	1.62	Tyr	2.18	2.20
Glu	3.53	3.51	Val	14.10	14.08
Ser	2.53	2.55	Met	3.59	3.61
His	11.20	11.18	Phe	5.96	5.94
Gly	5.42	5.44	Ile	7.89	7.91
Thr	1.43	1.41	Leu	12.63	12.61
Ala	11.79	11.81	Lys	10.56	10.56
Arg	4.19	4.17	Pro	1.39	1.39

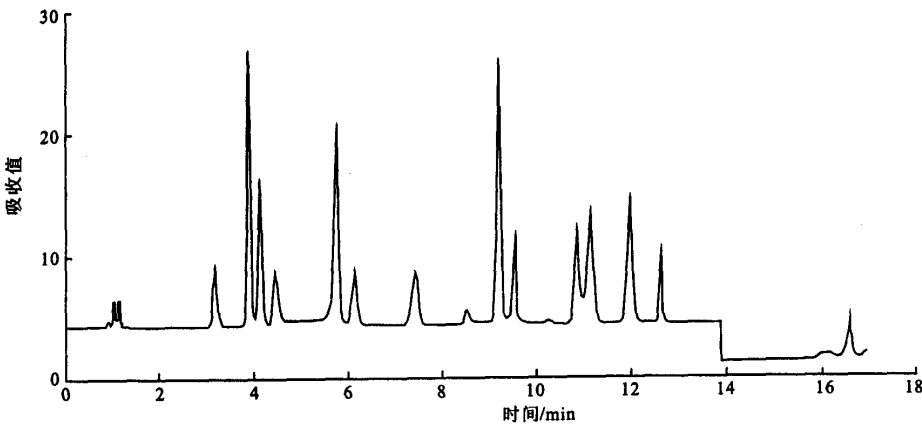


图 7 氨基酸荧光色谱分析图

Fig. 7 Analysis chart of amino acid fluorescence chromatography

2.5 活性鉴定

表达肽对几种菌的抗菌活性最大的为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 最小的是伤寒

沙门氏菌(*Salmonella typhi*), 抑菌圈大小分别为 11.3, 5.7 mm, 对其它菌的抑菌活性见表 2.

(下转第 80 页)

这一结果与各样品的乳化油稳定能力相符,说明经复配后的谷朊粉废水提取物在保持肉制品的凝胶结构,防止油水分离方面,其作用最为显著。不同的样品添加后对肉制品的各项质构性能的影响没有显著的差异,说明肉制品的质构主要取决于肌肉蛋白本身,谷朊粉废水提取物对其质构并未产生任何影响。

表 2 不同样品对肉制品得率和质构的影响

Tab. 2 The influence of different samples on the quality of ECMF

样品	得率/ %	粘性/ (kg/cm)	弹性/ cm	硬度/ (kg/cm ²)
A	75	0.893	0.9	0.235
B	69	0.911	0.9	0.244
C	78	0.878	0.9	0.229

参考文献:

- [1] 王肇慈. 粮油食品品质分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994.
- [2] Douglas S G. A rapid method for the determination of pentosans in wheat flour[J]. *Food Chemistry*,1981,7:139-145.
- [3] Izydorczyk M S, Biliaderis C G. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties[J]. *Carbohydrate Polymers*, 1995,28:33-48.
- [4] 周世英,钟丽玉. 粮食学与粮食化学[M]. 北京:中国商业出版社,1987.
- [5] Saulnier L, Peneau N, Thibault J F. Variability in grain extract viscosity and water-soluble arabinoxylan content in wheat [J]. *J Cereal Sci*,1995,22:259-264.
- [6] Lee C M. Mechanisms of Fat Dispersion in Comminuted Meat Protein Matrices[M]. New York: Elsevier,1984.

(责任编辑:朱明)

(上接第 50 页)

表 2 表达肽对几种菌的抗菌活性

Tab. 2 Antimicrobial activities of expression peptide against several bacterial

名称	G ⁺ /G ⁻	抑菌圈直径/mm
大肠杆菌 259221	G ⁻	6.1
伤寒沙门氏菌	G ⁻	5.7
枯草芽孢杆菌	G ⁺	10.6
金黄色葡萄球菌	G ⁺	11.3
苏云金杆菌	G ⁺	9.53

参考文献:

- [1] 陈留存,王金星. 昆虫抗菌肽研究现状[J]. *生物工程进展*,1999,19(5):55-60.
- [2] Bachmair A, Finley D, Varshavsky A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue[J]. *Science*, 1986,234:179-186.
- [3] Gonda D K, Bachmair A, Wunning I, et al. Universality and structure of the N-end rule[J]. *J Biol Chem*, 1989,264:16700-16712.
- [4] Tobias J W, Shrader T E, Rocap G, et al. The N-end rule in bacteria[J]. *Science*, 1991,254:1374-1377.
- [5] 邹小兵. 毕赤酵母高效表达重组阿片生物活性肽[D]. 无锡:江南大学,2003. 23-27.
- [6] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔著. 分子克隆试验手册指南[M]. 黄培堂译. 北京:科学技术出版社,2002. 55-138.
- [7] 陈义勇. 阿片活性肽的表达及其活性研究[D]. 无锡:江南大学,2003. 30-35.
- [8] 柏鸣,周立. 家蝇抗菌蛋白的部分结构信息及生物学活性[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, 18(5):633-637.

(责任编辑:李春丽)

3 结 论

1) 谷朊粉废水提取物的乳化能力与卡拉胶相当,在低质量浓度范围内其乳化能力甚至高于卡拉胶,但其乳化稳定性以及乳化油稳定性均逊于卡拉胶。卡拉胶以质量分数为 15% 的添加量与谷朊粉废水提取物进行复配后其乳化能力,乳化稳定性以及乳化油稳定性在各质量浓度下均优于卡拉胶。

2) 复配后的谷朊粉废水提取物对肉制品的得率,保持肉制品的凝胶结构,防止油水分离方面,其作用较为显著,明显优于卡拉胶;另一方面,谷朊粉废水提取物对肉制品的质构并无任何影响。因此复配后的谷朊粉废水提取物能完全替代卡拉胶作为一种新的添加剂。

3 结 论

采用“片段拼凑”的 DNA PCR 扩增方法既能缓解全基因商业合成在经费和时间上带来的不便,而且也为更好地研究抗菌蛋白的氨基酸序列的功能特征提供一种新的研究方法。在扩增出全序列后,还另外设计了两条能扩增出全序列的引物,这为得到足以克隆转化用的目的片段提供保证。天蚕素抗菌肽在大肠杆菌 JM109 中得到表达并且具有一定的抗菌活性。