

文章编号:1673-1689(2006)04-0109-04

多重 PCR 合成天蚕素基因及其在 *E. Coli* 中的克隆

韩晋辉¹, 施用晖³, 吕文平², 乐国伟³, 翟培¹

(1. 教育部食品科学与安全重点实验室; 2. 教育部工业生物技术重点实验室; 3. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要:天蚕素抗菌肽是食品领域中研究最多的昆虫抗菌多肽。通过对 62 种天蚕素低级结构的研究,设计出 4 条全新抗菌肽序列。应用多重 PCR 方法合成设计多肽的全基因序列,酶切 PCR 扩增产物和克隆载体 puc19,构建重组质粒并将其转化到大肠杆菌中。测序结果表明目的片段已经成功克隆到宿主菌 JM109 中。

关键词:多重 PCR; 天蚕素; 抗菌肽; 克隆

中图分类号:Q 78

文献标识码: A

Synthesis and Clone of Cecropins' Gene in *E. coli*

HAN Jin-hui¹, SHI Yong-hui³, LV Wen-ping², LE Guo-wei³, ZHAI pei¹

(1. Key Laboratory of Food Science and Safety Ministry of Education, 2. Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, 3. School of Food Science and Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Cecropins is a group of insect antibacterial peptide, which is generally researched in food science. By utilizing bioinformatics we studied sixty-two cecropins and designed four cecropins-like polypeptides. The four polypeptides were reverse-translated into 202bp gene based on *Escherichia coli* bias codons. Objective: synthesizing and cloning the antibacterial peptides' gene. Methods: utilizing multiple PCR, we synthesized total genes of design polypeptides, constructed recombinant plasmid and transformed to *E. coli*. Result: genes of four design polypeptides had been successfully cloned into PUC19 through the verification of both agarose gel electrophoresis and genetic sequencing for recombinant vector.

Key words: multiple PCR; cecropins; antimicrobial peptides; clone

天蚕素(Cecropins)也称杀菌肽,它对细菌、真菌和肿瘤细胞均有较强的杀伤、杀灭作用。由于其具有安全无毒害等优良特性,在食品领域中有着广阔的应用前景。

天蚕素与目前广泛使用的抗生素相比,抗菌谱和抗菌效果都有待进一步提高。随着对天蚕素结

构、功能和杀菌机理的不断了解,人们开始通过构效关系对其结构进行改造。期望得到更加高效、低毒的抗菌肽。1987 年 Jaynes 等人以天然抗菌肽 Cecropin B 为蓝本,在保持原位置极性的前提下,通过氨基酸置换对抗菌肽分子重新设计,所得抗菌肽不仅活性增强,而且作用范围也拓宽了^[1]。Bo-

收稿日期:2005-10-20; 修回日期:2006-02-22.

基金项目:国家科技部(2001DEA20022)资助课题.

作者简介:韩晋辉(1979-),男,山西吕梁人,生物技术硕士研究生.

man 研究小组通过将天蚕素(Cecropins A)N 端 1~7 氨基酸与蜂毒素(Melittin)N 端 5~12 氨基酸杂合,所得杂合肽 CAM 不仅抗菌活性大幅提高,而且溶血性也消失^[2]。通过重新设计抗菌肽分子来提高抗菌活性已经成为抗菌肽研究的一个重要方法。

作者所在研究室以 62 种天蚕素类抗菌肽为研究对象,通过生物信息学、分子力学等方法全新设计了 4 条抗菌肽^[3]。本研究将设计好的抗菌肽序列按照大肠杆菌偏好密码子反翻译为核酸序列,并将其分成 5 条两两互补的短片段;应用多重 PCR 技术合成全基因,并将其克隆到大肠杆菌中。

1 材料和方法

1.1 材料

菌种:大肠杆菌 JM109、克隆载体 PUC19 由作者所在教研室保存;合成基因片段由上海生物工程有限公司合成;限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Taq* DNA 聚合酶、DNA clean kit 试剂盒等购自上海华美生物公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因设计 以大肠杆菌表达外源基因密码子的偏好为原则设计基因片段^[4]。4 条设计抗菌肽的 N 端和 C 端序列一致,而中间两段螺旋区域组成不同,因此将基因分为 5 个片段。4 条多肽 DNA 序列中 seq1、seq3*、seq5* 都相同,而 Seq2 与 Seqinsert-2、Seq4 与 Seqinsert-4 有所差别。它们的组成见表 1(注:* 为反向互补序列)设计多肽基因全长 202bp,包括:ORF(开放阅读框)、限制性内切酶位点。

表 1 4 条设计多肽的序列差异

Tab.1 Differences between four polypeptides

抗菌肽	序 列
CecA	seq1-seq2-seq3*-seq4-seq5*
CecB	seq1-seq2-seq3*-seq insert-4-seq5*
CecC	seq1-seq insert-2-seq3*-seq insert-4-seq5*
CecD	seq1-seq insert-2-seq3*-seq 4-seq5*

1.2.2 多重 PCR 扩增基因全长 基因全长扩增示意图见图 1。

1)首先 Seq3 与 Seq2 互为模板进行延伸反应,得到延伸液 1。反应体系:seq2、seq3、dNTP 各 1 μ L,10 $\times$ Tag Buffer 5 μ L,Tag 酶 0.5 μ L,双蒸水 41.5 μ L。条件为:95 $^{\circ}$ C 保温 5 min,在 55 $^{\circ}$ C 保温 10 min,72 $^{\circ}$ C 保温 5 min,1 个循环。

2)延伸液 1 再与 Seq1 互为模板通过 PCR 扩增得到更长的一段序列 Frag1,反应体系:延伸液 1、seq1、seq3、dNTP 各 1 μ L,10 $\times$ Tag Buffer 5 μ L,Tag 酶 0.5 μ L,双蒸水 40.5 μ L。条件为:94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环。

3)另一方面,Seq4 与 Seq5 互为模板产生一个延伸序列 Frag2。反应体系:seq4、seq5、dNTP 各 1 μ L,10 $\times$ Tag Buffer 5 μ L,Tag 酶 0.5 μ L,双蒸水 41.5 μ L。PCR 条件为:95 $^{\circ}$ C 保温 5 min,55 $^{\circ}$ C 保温 10 min,72 $^{\circ}$ C 保温 5 min,1 个循环。

4)Frag1 和 Frag2 互为模板通过 PCR 扩增反应产生目的基因序列,反应体系:Frag1、Frag2、seq5、dNTP 各 1 μ L,10 $\times$ Tag Buffer 5 μ L,Tag 酶 0.5 μ L,双蒸水 40.5 μ L。PCR 条件为:94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环^[5]。

1.2.3 PCR 接入限制性酶切位点 用 primer 引物设计软件分别设计含有 *Hind* III 和 *EcoR* I 的上下游引物,为目的片段接入限制性内切酶位点。

上游引物:5' GGCCC AAGC TTAATGGTTA-
ATTTTTCTCG3'
Hind III

下游引物:5' CG GAATTC TTAACCATTAGC-
CAAAGCAGC3'
EcoR I

反应条件为:94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环。

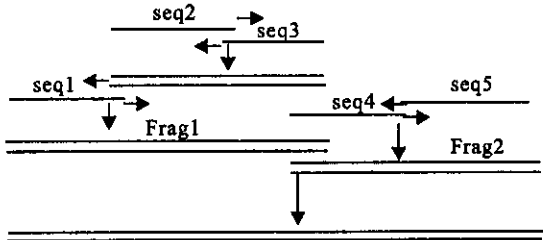


图 1 5 个片断的扩增示意图

Fig.1 Five fragments amplification plot

1.2.4 质粒构建、转化克隆 目的片段和 puc19 质粒经限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切。反应体系为:10 $\times$ buffer 2 μ L;BSA 2 μ L;*EcoR* I 2 μ L;*Hind* III 2 μ L;PCR 产物或质粒 12 μ L。反应条件:37 $^{\circ}$ C 过夜酶切。酶切产物用 DNA clean kit 试剂盒清洗,除去引物及小于 100 bp 的小片段。用 T4 连接酶将酶切产物连接,构建重组质粒 puc19-Cec。反应体系:reaction buffer 1 μ L;T4 ligase 1 μ L;酶切质粒 3 μ L;酶切 PCR 产物 5 μ L。反应条件:4 $^{\circ}$ C 反应 20 h 以上。

重组质粒转化感受态大肠杆菌 JM109 后得到基因工程菌 JM109-puc-Cec。

1.2.5 重组质粒鉴定 用含有氨苄青霉素的 LB

平板和 PCR 分析,筛选出含重组子的菌落。puc19 质粒上含有氨苄青霉素抗性选择标记和 lac *Z'*_a 结构基因。用含有氨苄青霉素的 LB 平板或 a 互补都可以筛选重组质粒。利用 PCR 技术对重组质粒鉴定。方法如下:挑取 LB 平板阳性克隆到 2 mL 液体培养基,37 ℃ 过夜培养,然后以培养液为模板做 PCR 检测分析。

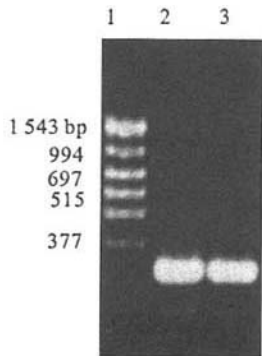
利用 PCR 技术对重组子鉴定的反应体系为:10×Taq 酶 buffer 5 μL,dNTP 1 μL,工程菌菌液 1 μL,引物 1 1 μL,引物 2 1 μL,Taq 酶 0.5 μL,双蒸水 40.5 μL。反应条件:94 ℃ 5 min,1 个循环;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 10 min,1 个循环。

1.2.6 克隆基因测序分析 工程菌 JM109-puc19-Cec 由上海基康生物公司测序。

2 结果与讨论

2.1 基因合成

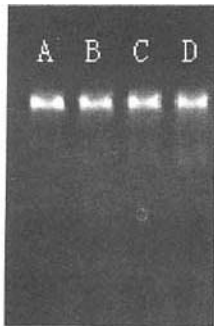
前 3 个片段扩增后琼脂糖凝胶电泳分析见图 1,4 条设计抗菌肽全基因扩增后琼脂糖凝胶电泳分析见图 3。PCR 扩增产物经 PCR 清洗试剂盒清洗,除去小片段后即可直接用于酶切和连接反应。



1. Markers; 2. Frag1 (Seq1+Seq2+Seq3); 3. Frag1' (Seq1+Seq insert2+Seq3)

图 2 片段 Frag1 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 The electrophoresis chart of Frag1



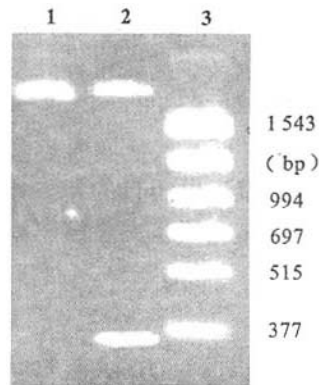
A. CecA; B. CecB; C. CecC; D. CecD

图 3 全基因扩增后琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 The electrophoresis chart of full sequence

2.2 基因克隆与重组子鉴定

在含氨苄青霉素、X-gal、IPTG 的 LB 平板上挑取白色菌落,抽提质粒。用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒,琼脂糖凝胶电泳分析见图 4。用 PCR 对重组子鉴定电泳图见图 5。



1. 酶切重组质粒 2. 重组质粒 3. Marker

图 4 双酶切重组质粒电泳图

Fig. 4 The electrophoresis chart of recombinant plasmid



A. CecA; B. CecB; C. CecC; D. CecD

图 5 PCR 对重组子鉴定电泳图

Fig. 5 The electrophoresis chart of recon

从琼脂糖凝胶电泳分析可以看出目的片段已经成功克隆到质粒载体中。经测序以后序列比对,测序结果与原设计也完全一致。

实验结果表明,我们已经成功地利用多重 PCR 合成设计抗菌肽的全基因,并克隆了该基因。

3 结 论

蛋白分子经过理论设计以后,还需要通过合成工作将其付诸于实现。目前最多采用化学合成方法,但是化学合成方法受到现有多方面技术条件的限制。基因工程的迅速发展为人工合成多肽开辟了广阔的前景。PCR 技术是基因工程的一项重要技术,它的发展为基因合成提供了快速经济的途径。采用互为模板的 PCR 扩增方法可以大大节约全基因合成时的费用,为更好地研究抗菌肽氨基酸

序列的功能特征提供新的研究方法。事实上,这种方法也适用于其它蛋白功能特征的研究。

本工作在原序列基因设计时没有加入限制性酶切位点,主要是基于两个方面的考虑:(1)用多重 PCR 扩增全基因,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。用重新设计的引物可以大大增加扩增条带的特异性。(2)在原序列中没有设计限制性内切酶位点可以使实验更加灵活。通过简单的 PCR 扩增就可以为目的片断接入不同的限制性酶切位点,这将为全基因尝试不同表达载体提

供方便。重组子的鉴定有多种方法,利用 PCR 技术鉴定重组子不仅快捷方便,而且准确性也很高,是一种非常值得推广的方法。但 PCR 容易被污染,所以在重组子鉴定时最好以双蒸水为模板设置空白对照。

基因的成功克隆为多肽表达奠定了基础,本实验计划将抗菌肽基因以融合蛋白的方式在大肠杆菌中表达,融合蛋白分离纯化后经溴化氰定点切割,除去担体蛋白后得到目的片断,最终通过对 4 条设计多肽抗菌活性的比较,研究其构效关系。有关 4 条抗菌肽基因的表达及活性研究将另文报道。

参考文献:

[1] Jaynes J M, Xanthopoulos K G, Destéfano-Beltrán L, et al. Increasing bacterial disease resistance in plants utilizing anti-bacterial genes from insects[J]. **Bioassays**,1987, 6: 263—270.

[2] Boman HG, Wade D, Boman IA, et al. Antibacterial antimalarial properties of peptide that are cecropin-mellitin hybrids [J]. **FEBS Lett**, 1989,259:103—106.

[3] 李启辉. 以天蚕素为基础的抗菌肽设计及其基因表达[D]. 无锡:江南大学, 2004.

[4] Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases[J]. **Nucl Acids Res**,2000, 28, 292.

[5] 邬小兵. 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.

[6] J. 萨姆布鲁克,D. W. 拉塞尔. 分子克隆试验手册指南(上册)[M]3 版. 黄培堂译. 北京:科学技术出版社, 2002:55—138.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第 58 页)

而茚三酮显色洗脱后效果较好,适合比色。比色时,最佳吸收波长为 510 nm,最佳洗脱时间为 30 min,当所点组氨酸含量在 2 ~12 μg 范围内时呈现较好的线性。

4) 以 Pauly 试剂和茚三酮试剂纸层析显色,茚三酮显色-分光光度法来测定 L-组氨酸易于实现、精密度较好,适合在菌种选育过程中定性、定量测定发酵液中的 L-组氨酸。

参考文献:

[1] Kisumi M, Nakanishi N. L-Histidine production by histidiase-less regulatory mutants of *Serratia marcescens* constructed by transduction [J]. **Appl Envi Micro**, 1977, 34(5): 465—472.

[2] Macpherson H T. The basic amino-acid content of proterins [J]. **Biochem J**, 1946, 40: 470—481.

[3] Derkos-Sojak V, Korajlija J, Vladimir Delic. Histidine production by a regulatory mutant of *Streptomyces coelicolor* [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1977,34(6):621—625.

[4] 卢发,张伟国. 纸层析—分光光度法测定发酵液中 L-丝氨酸和甘氨酸的含量[J]. **食品与发酵工业**. 2005, 31(3):119—121.

[5] 李进,张伟国. 纸层析—分光光度法测定发酵液中 L-异亮氨酸[J]. **无锡轻工大学学报(食品与生物技术)**,2005,24(1):95—98.

[6] Araki K, Kato F, Arai Y, et al. Histidine Production by auxotrophic histidine analog-resistant mutants of *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Agr Biol Chem**, 1974, 38(1): 189—194.

[7] 潘军华,张星元. 比色法快速测定发酵液中组氨酸[J]. **无锡轻工大学学报(食品与生物技术)**,2002,21(3):254—258.

[8] Ames B N. The biosynthesis of histidine in *neurospora crassa* [D]. USA: California Institute of Technology, 1953.

[9] 林妙佳,蒙绮芳,周锡梁. 组氨酸生产中间控制方法的研究[J]. **氨基酸和生物资源**,2001,23(4):28—31.

(责任编辑:杨 萌)