

研究简报

抗菌肽 AD 基因的合成*

郑青¹⁾ 鲍时翔²⁾ 姚汝华

苏智慧

(华南理工大学生物工程系, 广州 510641)

(生命志研究馆, 日本)

黄自然

(华南农业大学蚕桑系, 广州 510642)

郑学勤 王宇光

(中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室, 儋州 571737)

摘要 设计并合成了一种新型抗菌肽基因, 合成的抗菌肽 (cecropin) AD 基因全长 140 个碱基对, 克隆于 pCRTM2.1 载体上, 经 DNA 序列分析证实, 合成的 cecropin AD 基因的碱基序列与设计序列完全一致.

关键词 抗菌肽, 基因, 合成

学科分类号 Q78

昆虫抗菌肽是昆虫体内经外界刺激诱导而产生的一类无细胞免疫物质, 具有广谱抗菌活性, 并且已发现其中有些种类具有抗肿瘤、病毒能力^[1,2]. 在开发新型抗感染、抗肿瘤药物方面具有很大潜力; 在农业上, 通过将抗菌肽基因导入农作物选育抗病品种也有良好的前景. 抗菌肽 (cecropin) AD 是人工设计的由 cecropin A 的 N 端 1~11 片段和 cecropin D 的 C 端 12~37 片段组成的杂合肽, 据测定, 化学合成的抗菌肽 AD, 其杀菌活性和抗菌谱都明显高于天然抗菌肽 (杀菌活性是抗菌肽 D 的 5~55 倍, 对枯草杆菌的活性是抗菌肽 A 的 6 倍)^[3], 在抗菌肽作用机理研究和临床应用上具有重要意义. 我们以抗菌肽 AD 的氨基酸序列为基础, 选用酵母高表达基因常用密码设计并合成了抗菌肽 AD 基因, 以期在酵母中实现高效表达.

1 材料和方法

1.1 主要材料

PCRTM2.1 载体和 *E. coli* JM103 由苏智慧博士惠赠. DNA 寡聚核苷酸合成试剂及溶剂、

DNA 测序试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, TaqDNA 聚合酶、限制性核酸内切酶、X-gal、IPTG 等购自 Promega 公司.

1.2 Cecropin AD 基因设计

根据 cecropin AD 的氨基酸序列, 选用酵母中高表达基因常用密码^[4], 设计 cecropin AD 基因的碱基序列, 再借助 DNA 分析软件对其中部分密码子进行修改调整, 消除不合适的密码子串联组织、限制性核酸内切酶位点和潜在的二级结构.

1.3 基因合成

长度分别为 82 和 78 个碱基的两个基因片段 F₁、F₂ 用 DNA 自动合成仪合成. 以 F₁、F₂ 互为模板与引物进行 PCR 扩增, 合成 cecropin AD 全基因. PCR 反应条件: F₁、F₂ 各 1 μl (25 pmol), dNTP2.5 μl (25 pmol/μl), 10×PCR 反应缓冲液 5 μl, H₂O 39.5 μl, Taq DNA 聚合酶 1 μl, 按 52℃ 60 s, 72℃ 60 s,

* 广东省自然科学基金资助项目 (950404).

¹⁾ 华南农业大学蚕桑系, 广州 510642.

²⁾ 稿件联系人.

收稿日期: 1997-02-24, 修回日期: 1997-07-23

94℃ 30 s 进行 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min.

1.4 基因克隆

PCR 产物与载体连接反应, *E. coli* JM103 感受态细胞制备、转化, 质粒制备、酶切鉴定参照文献 [5] 方法进行.

1.5 DNA 序列分析

对克隆到 pCRTM2.1 上的 cecropin AD 基因的序列测定按 ABI 377DNA 自动测序仪和 DNA 测序试剂盒说明书进行.

2 结 果

2.1 基因设计

最终设计的 cecropin AD 基因的碱基序列如图 1 所示. 基因全长 140 个碱基对, 包括 37 个氨基酸的编码序列和起始密码子及终止密码子, 在基因的上游端设有 BamH I 识别序列, 下游端设有 EcoR I 和 Sal I 识别序列, 以便于插入不同表达载体中.

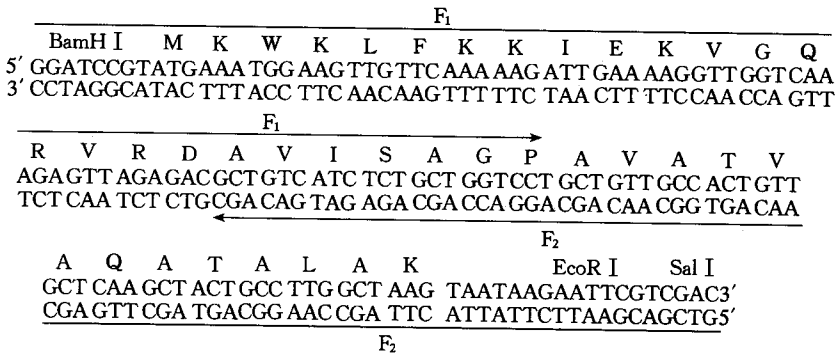


图 1 设计的 cecropin AD 基因碱基序列

2.2 Cecropin AD 基因合成和克隆

Cecropin AD 基因合成采用基因片段合成与 PCR 技术结合方案, 首先由 DNA 自动合成仪化学合成 3' 端部分互补的两个基因片段 F₁、F₂, 将两片段按等比例混合, 互为引物、模板进行 PCR 扩增, 延伸补齐成为 140 个碱基长度的 DNA 双链. PCR 反应进行至最后一步时在 72℃ 延伸反应 10 min, 使 PCR 产物均带上 3' 单 A 核苷酸尾. 基因克隆采用 PCR 产物 T-A 互补直接克隆法, 克隆载体为含 3' 单 T 核苷酸尾的线性化质粒载体 pCRTM2.1. 在 T4 DNA 连接酶作用下, pCRTM2.1 载体质粒与含 3' 端单 A 核苷酸尾的 PCR 产物直接进行连接反应, 反应产物转化受体菌 *E. coli* JM103, 在含氨苄青霉素和 X-gal/IPTG 的 LB 平板上选白色菌落, 提取质粒进行酶切鉴定, 筛选出含重组质粒的菌落. 重组 pCRTM2.1 质粒经 BamH I、Sal I 双切, 2% 凝胶电泳出现

约 134 bp 片段, 与预期相符 (图 2).

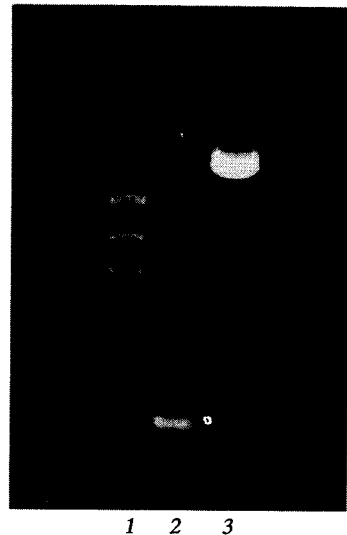


图 2 重组 pCRTM2.1 质粒酶切凝胶电泳图谱

1: PCR 标准 (1 543, 994, 695, 515, 377, 237 bp), 2: PCR 产物, 3: 重组 pCRTM2.1 质粒/BamH I, Sal I.

2.3 Cecropin AD 基因序列分析

用 ABI 377A DNA 自动测序仪对克隆到 pCR™2.1 上的 cecropin AD 基因进行序列测定, 结果表明其碱基序列与设计序列完全一致. 以上工作表明, 我们已成功合成了 cecropin AD 基因. 目前, 我们正在对该基因在酵母中的表达进行研究, 结果将在以后进一步报道.

参 考 文 献

1 Jaynes J M , Catherine A , Burton C A *et al.* *In vitro* cytotoxic effect of novel lytic peptides on plasmodium falciparum and trypanosoma cruzi. *FASEB J*, 1988, **2** (13): 2878~2883
2 黄自然, 郑庭辉, 屈贤铭等. 柞蚕抗菌肽的抑菌效应. *科学通报*, 1986, **13** (2): 1107~ 1109
3 Fink J, Boman A, Boman H G *et al.* Design, synthesis and antibacterial activity of Cecropin-like model peptides. *Int J Pept Prot Res.* 1989. **33** (6): 412~ 421
4 阎隆飞, 张玉麟. *分子生物学*. 北京: 北京农业大学出版社, 1993. 265~ 274
5 Sambrook J M , Fritsch E F , Maniatis T . *Molecular Cloning*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 70~ 76

Synthesis of Cecropin AD Gene. ZHENG Qing, BAO Shi-xiang, YAO Ru-hua (*Department of Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China*); SU Zhi-hui (*Biohistory Research Hall, Japan*); HUANG Zi-ran (*Department of Sericulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*); ZHENG Xue-qin, WANG Yu-guang (*National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China*).

Abstract A novel hybrid cecropin AD gene was synthesized. The synthetic cecropin AD gene is 140 by in length. It was cloned into the pCR™2.1 vector. It was confirmed that the DNA sequence of the synthetic cecropin AD gene was identical with that of the designed gene by DNA sequencing.

Key words cecropin, gene, synthesis

病毒感染致病与自由基的损伤

韩 娜 张卫东 徐贝力 王美岭 李晓冰 刘 斌

(山东省医学科学院基础医学研究所, 济南 250062)

摘要 以流感病毒 A/FM1/1/47 (H₁N₁) 鼠适应株, 鼻腔内接种感染小鼠为模型, 探讨了病毒感染过程中, 自由基的产生以及在致病过程中的作用. 结果表明, 感染病毒的小鼠肺组织中氧自由基水平和黄嘌呤氧化酶活性显著升高, 并与肺组织损伤和死亡率之间呈正相关. 提示, 氧自由基参与了病毒感染小鼠的致病过程, 是造成组织损伤的重要因素.

关键词 流感病毒, 氧自由基, 小鼠

学科分类号 Q505

氧自由基和某些氧化剂在防御微生物的入侵中起了重要作用^[1]. 细菌、病毒或其他微生物侵入机体可诱导炎症反应, 急性和慢性反应的重要成分为吞噬细胞. 一旦吞噬的异物被辨认, 吞噬细胞即出现呼吸爆发, 表现为氧消耗增加, 磷酸戊糖途径代谢增高和氧自由基等

代谢物产生. 这些代谢物是一类高活性的杀菌物质, 它们还能逸出细胞外. 如果吞噬细胞过度积聚, 呼吸爆发的活性过强, 可引起组织损伤, 成为致病的因素. 目前认为病毒感染机体

收稿日期: 1997-03-03, 修回日期: 1997-07-23