

中国产家蚕抗菌肽 A 基因部分序列的测定*

李建民 周开亚 张双全 戴祝英

(南京师范大学生物系, 南京 210097)

朱昌亮 叶新海

(南京医科大学基础医学院, 南京 210029)

摘要 从大肠杆菌感染的家蚕蛹提取 RNA, 用 RT-PCR 方法扩增未知抗菌肽基因片段, 经过克隆测序, 获得了蚕抗菌肽 A 基因的部分片段 164 bp, 为制备蚕抗菌肽 A 基因探针, 筛选基因文库打下了基础。

关键词 蚕抗菌肽 A 基因, 序列分析, *Bombyx mori*

学科分类号 Q939.92

动物抗菌多肽 (antibacterial peptides) 是动物 (包括人类) 产生的先天性免疫中具有重要作用的一类抗菌蛋白。家蚕和昆虫在受到微生物感染后, 能产生一系列的抗菌蛋白进入血淋巴中, 目前已确认的至少有蚕抗菌肽 (cecropins)、柞蚕素 (attacins)、溶菌酶 (lysozymes)、双翅素 (dipterocins)、防御素 (defensins)、麻蝇毒素 (sarcotoxin)、蜂毒素 (abaeicin)、杀菌素 (bactericidin) 和角毒素 (ceratotoxin) 等^[1~3]。其中蚕抗菌肽 (cecropin) 是一种重要的蚕类抗菌多肽, 也是研究的热点。

蚕抗菌肽首次是由 Hultmark 等^[3]从榨蚕 (*Hyalophora*) 中分离并测序的。随后, 在其他昆虫和蚕类中相继发现了抗菌肽的同源家族并测定部分抗菌肽的 cDNA 序列^[4~8]。中国产家蚕抗菌肽虽然早在 1986 年就测定了 CM 系列氨基酸序列^[9], 但尚无基因序列的报道。

本文通过诱导家蚕蛹, 提取总 RNA, 应用 RT-PCR 技术, 根据家蚕 CM4 的活性肽氨基酸序列和已知蚕抗菌肽的前导肽的氨基酸序列, 设计简并引物扩增蚕抗菌肽基因片段, 并通过克隆该片段, 得到了蚕抗菌肽 A 基因的部分序列。

1 材料和方法

1.1 试剂和酶

异硫氰酸胍, 购自上海伯奥生物科技公司; β -巯基乙醇, 购自 Fluka 公司; 十二烷基肌氨酸钠 (SLS), 购自 Sigma 公司; 焦碳酸二乙酯 (DEPC), 购自 Serva 公司。

PolyATtract[®] Series9600TM mRNA Isolation System 试剂盒、逆转录酶 (AMV) 均购自 Promega 公司。

1.2 受体菌和克隆载体

JM109 菌株, PinPointTM Xa1 T-质粒载体购自 Promega 公司。

1.3 家蚕

购自镇江中国蚕业研究所, 为浙农一号。

1.4 方法

1.4.1 mRNA 的提取: 取家蚕蛹, 注射对数生长期的 *E. coli* K12D31 5 μ l/只, 25℃放置 9 h 后, 取蚕蛹尾部脂肪体组织 1 g, -80℃研磨粉碎, 用异硫氰酸胍法^[10], 经氯仿、异丙醇和醋酸钠二次沉淀, 提取总 RNA, 用 PolyATtract mRNA 试剂盒从 0.5 mg 总 RNA 中纯化 mRNA。

1.4.2 反转录合成单链 cDNA: 用 1 μ g mRNA 加 20 μ l 的反应液 (50 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 1 mmol/L DTT, 5 μ mol/L Oligo d(T)₁₇, 500 μ mol/L dNTPs, 26 U RNasin, 8 U 逆转录酶 (AMV)), 42℃反应 90 min, 反转录合成第一链。反应结束后, 加 RNAase H, 37℃ 30 min 降解 RNA。

1.4.3 引物设计: 蚕抗菌肽基因所表达的蛋白质全长为 63~65 个氨基酸, 1~26 为前导肽, 27 以后的 35~37 个氨基酸为活性肽部分^[6,7]。本文作者之一张双全曾参加家蚕抗菌肽 CM4 的活性肽氨基酸序列的测定, 在对家蚕抗菌肽 CM4 和天蚕 3 种抗菌肽氨基酸序列作比较后, 发现其与天蚕 A 的同源性高达 83%^[3,5,7], 因此用天蚕基因的前导肽 R (-22) ~ V (-17) (5'-g (A/T/C/g) ATTTTITTTITTTgT-3'), 为 5' 端引物, 16 个碱基; 3' 端用 CM4 的活性部分, A27~A33 为下游引物 (5'-TT IgC ITg ICC IAT IAC IgC-3'), 20 个碱基。

* 国家自然科学基金资助项目 (39770117)。

收稿日期: 1998-09-15, 修回日期: 1999-01-19

I 为次黄嘌呤, 可和 A、T、C、G 四种碱基通配 (图 1).

1.4.4 PCR 扩增家蚕抗菌肽基因片段: 用所设计的引物, 以上述家蚕 cDNA 为模板扩增特异片段. PCR 总体积为 30 μ l, 在其中含 50 mmol/L KCl,

3 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 0.5 U Taq DNA 多聚酶, 200 nmol/L dNTPs, PCR 反应为 45 $^{\circ}C$ 退火, 70 $^{\circ}C$ 延伸 20 min, 95 $^{\circ}C$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}C$ 30 s, 55 $^{\circ}C$ 30 s、72 $^{\circ}C$ 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}C$ 延伸 20 min.

前导肽	-26	-20	-10	-1	
天蚕B	M N F S R I F F F V F A L V L A L S T V S A A P E P				
天蚕A	 C L T . . A M . N				
天蚕D	. . . T K . L L . . V . C . F . M G . . S . . . - -				
成熟肽	1	10	20	27	30
天蚕B	K W K V F K K I E K M G R N I R N G I V K A G P A I A V L G E A K A L G				
天蚕A	. . . L V . Q . . . D . . I V . Q . T Q I A K G				
天蚕D	- . N P . . E . . V . Q R V R D A V I S V . T V A Q . T . L A K G K				
家蚕CMⅣ	R . . I V . Q . . . D . . V E . V . Q . A T I				

图 1 引物设计的依据: 榨蚕抗菌肽 A, B, D^[3,5,7] 与蚕抗菌肽 CM4 的氨基酸序列的比较

1.4.5 靶 DNA 片段的回收和纯化: 用 3% 的低熔点琼脂糖凝胶电泳法回收和纯化靶 DNA 片段, 根据产物大小, 收集期待的片段作二次 PCR 扩增, 除退火温度提高至 50 $^{\circ}C$ 以上, 其他均与第一次 PCR 一致, 获得家蚕抗菌肽基因片段.

1.4.6 家蚕抗菌肽 A 基因的部分片段的克隆: 家蚕抗菌肽 A 基因的部分片段用直接 T/A 克隆法进行克隆^[11], 在 PCR 反应中, Taq DNA 聚合酶能在产物的 3' 末端随机加上不依赖于模板的 A, G, C, T, 理论上以 A 概率较大. 将该片段纯化后, 用具有 T 粘末端的 PinPoint™ X α -1 质粒载体克隆, 转化到大肠杆菌 JM109 菌株, 在含氨苄霉素 (AMP⁺) 的平板生长过夜, 挑选白斑, 用 SP6/PinPoint 引物经 PCR 扩增获取目的片段阳性克隆, 获取的阳性克隆经碱裂解法提取质粒 DNA.

1.4.7 阳性克隆序列测定: 随机取 3 个阳性克隆, 用 SP6/PinPoint 引物制备双链 DNA 目的片段, 经 Quick PCR Purification 试剂盒纯化; 用 SILVER-SEQUENCE™ DNA Sequencing System (Promega) 银染测序, 制备序列反应物, 在聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 读序^[12].

2 结 果

2.1 RNA 的提取

从脂肪体提取家蚕总 RNA, 关键在于脂肪的去除. 实验中我们曾用 RNagents[®] Total RNA

Isolation System (Promega) 试剂盒 (酸酚) 提取总 RNA, 但 A_{260}/A_{280} 比值始终不理想, 后用异硫氰酸法 (碱酚) 并加大试剂用量, 得到了纯度较高的总 RNA, $A_{260}/A_{280} = 2.0$.

2.2 目的基因片段的扩增

用家蚕 RNA 反转录合成第一链 cDNA, 用设计的两个简并引物经 PCR 得到一条很弱的 164 bp 片段, 该片段经第二次 PCR 扩增后, 得到了较强的片段.

实验中发现, 直接从单链 cDNA 扩增基因片段, 扩增产物不稳定, 我们采用先延伸, 再 PCR, 结果特异带出现比较稳定.

2.3 目的基因片段的克隆及筛选

在 T4 DNA 连接酶作用下, 该片段被插入 PinPoint™ X α -1 克隆载体上, 本文用质粒 PinPoint™ X α -1 多克隆位点上下游的测序引物 (PinPoint 测序引物 5'-CGTGACGCGGTGCAGGGCG-3' 和 SP6 测序引物 5'-CATACGATTTAGGTGACACTATAG-3') 作为 PCR 引物, 直接挑取白斑进行 PCR 反应. 反应体系为 10 μ l, 2 个测序引物各 2 pmol, 其余同前. 由于两个测序引物至 EcoRV 克隆位点的距离之和为 144 bp, 而靶 DNA 片段分别为 164 bp (按天蚕抗菌肽 cDNA 序列估计), 因而重组子克隆应扩增出 308 bp 片段 (图 2).

参 考 文 献

- 1 Boman H G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immun*, 1995, **13**: 61~ 92
- 2 Lehrer R I, Lichtenstein A K, Ganz T. Defensins-antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immun*, 1993, **11**: 105~ 108
- 3 Hultmark D H, Steiner H, Rasnitsyn T, *et al.* Insect immunity, purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem*, 1980, **106** (1): 7~ 16
- 4 Taniuchi K, Kato Y, Hirochika H, *et al.* Isolation and nucleotide sequence of cecropin B cDNA clones from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1132** (2): 206~ 209
- 5 Lidholm D A, Gudmundur H G, Lleanthis G X, *et al.* Insect immunity: cDNA clones coding for the precursor for ms of cecropins A and D antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *FEBS Letter*, 1987, **226** (1): 8~ 12
- 6 Gudmundur H G, Dan A L, Asling B, *et al.* Cloning and expression of a gene cluster encoding three antibacterial peptides in *Hyalophora cecropia*. *J Biol Chem*, 1991, **266** (18): 15510~ 11517
- 7 Van Hofsten P, Faayee L, Kockum K, *et al.* Molecular Cloning, cDNA Sequencing, and Chical synthesis of cecropia B from *Hyalophora cecropia*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82** (8): 2240~ 2243
- 8 Morishima I, Suganaka T U, Hirane H, *et al.* Isolation and structure of cecropins, inducible antibacterial peptides from the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol*, 1990, **95B** (3): 551~ 554
- 9 张双全, 屈贤铭, 戚正武 (Zhang S Q, Qu X M, Qi Z W). 昆虫免疫应答及抗菌肽应用前景. *生物化学杂志 (J Biochem)*, 1987, **3** (3): 1118~ 1120
- 10 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analy Biochem*, 1987, **162** (1): 156~ 169
- 11 王 瑛 (Wang Y). PCR 产物直接分子克隆的比较研究. *生物工程进展 (Prog Biotech)*, 1996, **16** (5): 55~ 57
- 12 王亚明 (Wang Y M). 白暨豚、江豚和虎的分子进化遗传学研究: [学位论文]. 南京: 南京师范大学研究生处, 1995

Sequencing Partial Fragment of Cecropin A cDNA in the Silkworm *Bombyx mori* From China. LI Jiar-Min, ZHOU Kai-Ya, ZHANG Shuang-Quan, DAI Zhu-Ying (*Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China*); ZHU Chang-Liang, YE Xin-Hai (*Department of Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China*).

Abstract Total RNA was prepared from fat body of the silkworm, *Bombyx mori*, 9 hours after injected by *E. coli* K12D31. Single-strand cDNA was synthesized by reverse transcription (RT). Partial fragments of cecropin A cDNA were obtained, cloned and sequenced, by PCR technique with a pair of degenerate primers designed according to the amino acid sequence of CM4 in *Bombyx mori* and cecropin A in *Hyalophora*. These laid a foundation for further research on preparation of the probes of cecropin A for screening the silkworm cDNA library.

Key words cecropin A gene, *Bombyx Mori*, cDNA sequence

(上接第 375 页, Continued from page 375)

- 3 Wang J Z, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Glycosylation of microtubule associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer dis 4 Singh T J, Grundke Iqbal I, Wu Q L, *et al.* Protein kinase C and calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylate three repeat and four-repeat tau isoforms at different rates. *Mol Cell Biochem*, 1997, **168** (1): 141~ 148
- 5 Goedert M, Jake R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J*, 1990, **9** (2): 4225~ 4230
- 6 Singh T J, Wang J Z, Novak M, *et al.* Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates tau at ser-262 but only partially inhibits its binding to microtubules. *FEBS Lett*, 1996, **387** (1): 145~ 148

Modulation of Protein Kinases on an Alzheimer-like Phosphorylation of τ . WANG Jiar-Zhi, WANG Qun, WU Qiong-Li, I. GRUNDKE-IQBAL, K. IQBAL (*Department of Pathophysiology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China*).

Abstract Abnormal phosphorylation of microtubule

associated protein τ is one of the major mechanism in Alzheimer neurofibrillary degeneration. It was found that casein kinase-1 (CK-1), cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) and glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) differentially phosphorylate human τ (τ 3L) and thus inhibit its biological activity. Moreover, the phosphorylation and inhibition of this activity of τ by GSK-3 is significantly increased if τ is prephosphorylated by PKA. Under this condition, only neglectable microtubules could be seen by electron microscopy. The data suggest that a synergistic role of PKA and GSK-3 might be involved in abnormal phosphorylation and functional inhibition of τ in Alzheimer disease.

Key words protein kinase, Alzheimer disease, τ protein, abnormal phosphorylation