

改良 3' cDNA 末端快速扩增 PCR 法筛选扇贝抗菌肽基因

梁爱玲^{1,2}, 刘勇军², 侯 敢^{1,2*}, 黄迪南^{1,2*}

1. 广东医学院 检验医学研究所, 广东 东莞 523808

2. 广东医学院 生物化学与分子生物学研究所, 广东 东莞 523808

摘要: 目的 应用改良 3' cDNA 末端快速扩增 PCR 法 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 筛选扇贝抗菌肽基因。方法 设计 M13 和 T7 启动子分别修饰的基因特异性引物 (gene special primer, GSP)、锚定引物, 提取扇贝血淋巴总 RNA 进行改良 3' RACE 和 5' RACE, 获得 cDNA 准全长序列并在 GenBank 中进行同源性比较。结果 从扇贝血淋巴中获得 3 个 cDNA 的 3' 端序列基因和 1 个准全长 cDNA (544 bp), 在 GenBank 中未发现与之高度同源的基因。结论 从扇贝血淋巴中获得的 1 个准全长 cDNA、3 个 cDNA 的 3' 端序列可能属于新基因。应用改良 3' RACE 能钓取含抗菌肽保守序列的新基因片段, 该方法可行。

关键词: 扇贝; 抗菌肽; 3' cDNA 末端快速扩增 PCR 法; 基因

中图分类号: R915; R944 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)05-0393-04

Screening for antimicrobial peptide genes in scallop by improved PCR method of rapid amplification of 3' cDNA ends

LIANG Ai-ling^{1,2}, LIU Yong-jun², HOU Gan^{1,2}, HUANG Di-nan^{1,2}

1. Institute of Laboratory of Medicine, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China

2. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China

Abstract: Objective To screen antimicrobial peptide genes from scallop with improved PCR method of 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE). **Methods** Gene special primers and anchor primers modified by promoters M13 and T7 were designed. Total RNA was extracted from scallop and amplified by improved PCR method of 3' RACE and 5' RACE to obtain the full-length cDNA of antimicrobial peptide genes. The homology of the sub-full-length cDNA sequence was blasted in GenBank. **Results** Three 3' end cDNA sequences and one sub-full-length cDNA (544 bp) were obtained. There was no similar gene in homology in GenBank. **Conclusion** One sub-full-length cDNA and three cDNAs 3' end sequences from scallop hemolymph may be new genes. It is available to use improved PCR method of RACE to screen gene fragments containing antimicrobial peptide conserved sequence.

Key words: scallop; antimicrobial peptide; PCR method of rapid amplification of 3' cDNA ends (RACE); gene

双壳贻贝抗菌肽和牡蛎抗菌肽是目前研究热点^[1-4]。贻贝抗菌肽是一类阳离子型、富含半胱氨酸的、具有抗特定微生物活性的小分子多肽, 贻贝防御素 (mytilus galloprovincialis defensins, MGDs) 是其中一类^[5]。绝大多数贝类抗菌肽是其血细胞防御体系的重要组成部分^[6]。目前多采用固相萃取、反相 HPLC 法等从其血清中直接获得贻贝抗菌肽^[2,5]。因抗菌肽的分子小, 含量少, 分离提纯难度大, 天

然资源有限, 因此利用基因工程技术对抗菌肽进行表达成为大量生产抗菌肽的有效途径。RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)、嵌套 PCR 和 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法已被广泛应用^[7]。根据已知抗菌肽的保守序列设计引物, 可以更加方便地钓取抗菌肽基因^[8-10]。中国对虾肽基因等生物抗菌肽 cDNA 成功的克隆表明利用现代分子生物技术结合基因工程方法是获得大

收稿日期: 2011-07-01

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (5011588)

作者简介: 梁爱玲, 妇产科医师, 临床检验诊断学讲师, 研究方向为海洋药物的分子生物学、肿瘤药物的基因治疗。

Tel: (0769)22896350 E-mail: tracy01class@163.com

*通讯作者 侯 敢

黄迪南

量新抗菌肽的快捷方法^[7]。本课题采用改良 3' RACE 对扇贝抗菌肽基因进行了筛选, 寻找一种新的、简便的抗菌肽基因筛选方法。

1 材料

TOP10 高效率感受态细菌、pCR4-TOPO Vector、TRIzol Reagent、Platinum Taq DNA 高保真聚合酶、RACE 试剂盒均购自 Invitrogen 公司。pGEM-T Easy Vector Systems、RNasin、Tfl DNA 聚合酶、RT System、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 均购自 Promega 公司。100 bp DNA Ladder Marker 购自华美生物工程公司和 Takara 宝生物工程(大连)有限公司。测序工作由上海生物工程有限公司完成。

2 方法和结果

2.1 改良 3'RACE 法从扇贝血淋巴筛选抗菌肽基因和序列分析

2.1.1 扩增未知基因 cDNA3'端的引物的设计 改良 3'RACE 法正向引物根据贻贝抗菌肽 MGDs 基因的保守序列设计基因特异性引物 (gene special primer, GSP), 并在 5'端修饰 M13 启动子序列 M13-GSP; 反向引物采用 5'端修饰 T7 启动子序列的简化锚定引物 T7-(dT)12N, 其中引物中下划线部分为启动子序列。

第一次 PCR 引物对中, 正向引物为 M13-MGDs 5'-ACAATTTACACAGGAGATTGAGGTG-3', RT 引物/反向引物有 3 个锚定引物 (T7-(dT)12N), 分别为锚定引物 1:

5'-ACGACTCACTATAGGGTTTTTTTTTTTTC-3',
锚定引物 2:

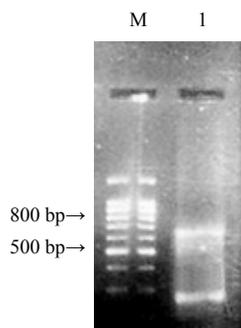
5'-ACGACTCACTATAGGGTTTTTTTTTTTG-3',
锚定引物 3:

5'-ACGACTCACTATAGGGTTTTTTTTTTTTA-3'。

第二次 PCR 引物中, 正向引物为 M13 序列

5'-ACAATTTACACAGGA-3', 反向引物为 T7 启动子序列 5'-ACGACTCACTATAGGG-3'。

2.1.2 改良 3'RACE 法扩增扇贝抗菌肽未知基因 cDNA 的 3'端序列 扇贝血淋巴总 RNA 反转录后, 以 M13-MGDs、锚定引物、M13 和 T7 引物进行改良 3' RACE 扩增, 用 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 从扇贝中扩增出 3'端长度为 200~800 bp 的基因片段, 见图 1。



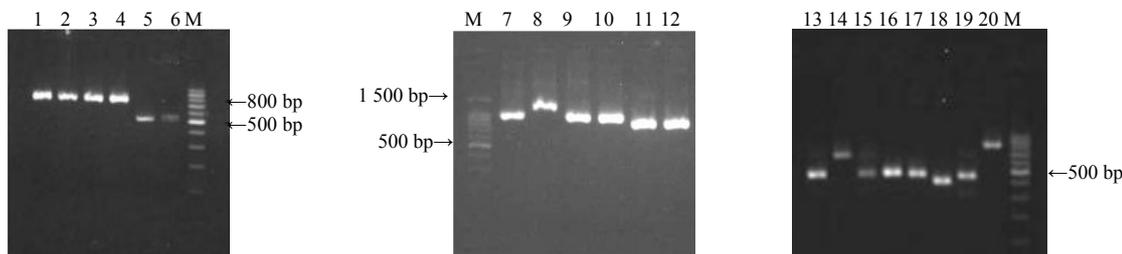
M-100 bp DNA ladder Marker 1-3'RACE products

图 1 3'RACE 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of 3'RACE products

按 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒说明将上述 3' RACE 产物电泳回收纯化。使用无菌的、低 DNA 结合力的 0.65 mL 离心管, 将纯化后的 3' RACE 产物和 pGEM-T Easy 质粒载体连接后进行转化。利用碱裂解法少量提取重组质粒, 采用 PCR 法筛选阳性克隆, 使用正向引物 5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3' 和反向引物 5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3', 取 PCR 产物长度有差异的克隆菌进行 DNA 序列分析, 结果见图 2。

琼脂糖凝胶电泳中的 4、5、11、20 号阳性克隆的插入片段序列, 即未知基因 cDNA 的 3'端序列,



M-100 bp DNA ladder Marker 1—20-PCR product of No.1—20 clone

图 2 PCR 法筛查 pGEM-T Easy 重组质粒阳性克隆琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis for screening positive clone of pGEM-T Easy recombinant plasmid by improved PCR method

长度分别为 609、254、621、699 bp，通过 BLAST 程序搜索 GenBank 核酸数据库，未发现与之高度同源的基因。

2.2 5' RACE 法扩增 5 号阳性克隆插入基因 cDNA 的 5' 端序列及序列分析

以 3' RACE 产物所在的感兴趣的 5 号克隆设计 MGDs-GSP5 5'-GTTTCAGCAAAGGGTTACCTGGA G-3'，结合 RACE 试剂盒中的自带引物进行 5' RACE，5' RACE 的具体操作步骤按试剂盒方法进行。5' RACE 扩增得到长度约 500 bp 的基因片段，见图 3。

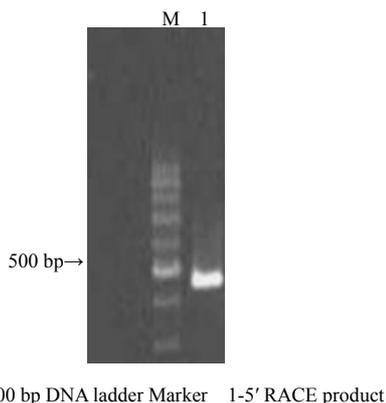


图 3 5' RACE 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of 5'RACE product

将上述 5' RACE 产物电泳回收纯化后，使用无菌的低 DNA 结合力的 0.65 mL 离心管，将纯化后的 5' RACE 产物和 pCR4-TOPO 质粒载体连接后转化到 TOP10 感受态细菌，利用碱裂解法小量提取重组质粒，PCR 法筛选阳性克隆，使用 M13 正向引物 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'和 M13 反向引物 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'，3 号阳性克隆重组质粒 PCR 产物长度在 500~700 bp，见图 4。

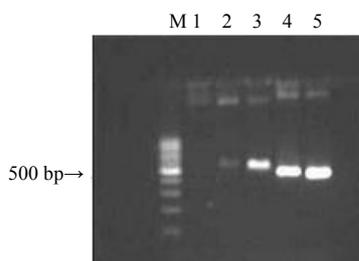


图 4 PCR 法筛查 pCR4-TOPO 重组质粒阳性克隆琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis for screening positive clone of pGEM-T Easy recombinant plasmid by improved PCR method

经测序得到它的插入片段序列，即 5 号阳性克隆插入基因 cDNA 的 5'端序列，长度为 448 bp，与其 3'端序列拼接后得到长度为 544 bp 的准全长 cDNA。5 号克隆插入基因全长 cDNA 序列通过 BLAST 程序搜索 GenBank 核酸数据库，未发现与之高度同源的基因。

3 讨论

RACE 技术能快速有效地获得低丰度 mRNA 全长 cDNA。根据已知的 cDNA 序列设计引物，利用 PCR 技术扩增 5'、3'端 cDNA，然后从两个有互相重叠序列的 5'RACE 和 3'RACE 产物中可以获得全长 cDNA，也可以分析 5'、3'端顺序，合成相应引物进行再次扩增，得到全长 cDNA^[10-11]。由于抗菌肽基因一级结构中具有保守序列的特点，据此设计 GSP，能快捷地获得新抗菌肽基因。李文楚等^[12]根据天蚕 cecropin A 设计 GSP，克隆得到与其同源性的柞蚕抗菌肽 cecropin A。Kim 等^[13]利用退火对照引物差异显示 PCR 和 5' RACE 从受到外源刺激的凤蝶幼虫体内找到与已知鳞翅类抗菌肽 cecropins 高度相似的抗菌肽 papiliocin。

本实验根据贻贝抗菌肽 MGDs 保守序列设计 GSP，从扇贝血淋巴中钓取可能与贻贝 MGDs 有较高同源性的抗菌肽基因。双壳类 MGDs 的 N-末端有 2 个保守氨基酸顺序框架(对应于 12 个及以上保守碱基序列)。一般约 10 个保守碱基序列就能满足 GSP 设计需要。因此，实验针对 MGDs 保守序列设计相应 GSP。由于经典的 RACE 方案中的锚定引物为多酶切位点-(dT)12MN，引物数量较多(3 组 12 个)^[14-15]，因此，实验采用 Liang 等^[16]mRNA 差异显示 PCR 简化了的 3 个锚定引物(dT)12N(N 为 A, C 或 G)。为提高 PCR 的特异性，本实验采用嵌套 PCR，M13 和 T7 序列作为嵌套引物。本实验采用 SuperScript III RT 逆转录酶，提高了反转录的效率；采用高保真酶进行 PCR，并挑取多个克隆，进行多次测序，以确认 PCR 反应过程中是否有碱基突变。在未构建 cDNA 文库的情况下，实验采用改良 3' RACE 和 5' RACE，在扇贝中钓取得到 3 个 3'端 cDNA 片段和 1 个未知基因准全长 cDNA。通过 BLAST 程序搜索 GenBank，未发现与之高度同源的基因。提示该未知基因可能是新基因；或根据同源保守序列克隆出的含同源序列的基因未必都与目的基因相关；或出现阳性克隆漏筛。实验结果表明，虽然通过该方法钓取到含抗菌肽保守序列的新基因

片段, 但尚未获得与 MGDs 高度同源的基因片段, 说明此筛选方案需要进一步改进。本课题组将继续深入分析本实验钓取到的基因片段, 并进行抗菌及抗肿瘤后续实验研究^[17]。

参考文献

- [1] Mitta G, Franck V, Hubert F, *et al.* Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(17): 12954-12962.
- [2] Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, *et al.* Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into plasma after bacterial challenge [J]. *J Cell Sci*, 1999, 112(23): 4233-4242.
- [3] Gueguen Y, Herpin A, Aumelas A, *et al.* Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(1): 313-323.
- [4] Seo J K, Crawford J M, Stone K L, *et al.* Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(4): 1998-2004.
- [5] Mitta G, Hubert F, Dyrzynda E A, *et al.* Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis [J]. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24(4): 381-393.
- [6] Bachere E, Gueguen Y, Gonzalez M, *et al.* Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Immunol Rev*, 2004, 198(1): 149-168.
- [7] 康翠洁, 王金星, 赵小凡, 等. 中国对虾抗菌肽成熟肽的 cDNA 克隆 [J]. 山东大学学报: 理学版, 2002, 37(6): 552-556.
- [8] 杨丽敏, 陆阳. RT-PCR 技术在中药及其活性成分作用机制研究中的应用 [J]. 中草药, 2004, 35(8): 956.
- [9] Aleksander P, Douglas S E. Gone gene fishing: how to catch novel marine [J]. *Antimicrob Trends Biotech*, 2003, 21(8): 362-369.
- [10] Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(23): 8998-9002.
- [11] Xu Q, Wang G, Yuan H, *et al.* cDNA sequence and expression analysis of an antimicrobial peptide, theromacin, in the triangle-shell pearl mussel *Hyriopsis cumingii* [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2010, 157(1): 119-126.
- [12] 李文楚, 郑学勤, 黄自然. 柞蚕抗菌肽 A 基因的克隆和表达 [J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(4): 58-61.
- [13] Kim S R, Hong M Y, Park S W, *et al.* Characterization and cDNA cloning of a cecropin-like antimicrobial peptide, papiliocin, from the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* [J]. *Mol Cells*, 2010, 29(4): 419-423.
- [14] Borson N D, Salo W L, Drewes L R. A lock-docking oligo (dT) primer for 5' and 3' RACE PCR [J]. *PCR Methods Appl*, 1992, 2(2): 144-148.
- [15] Imjongjirak C, Amparyup P, Tassanakajon A, *et al.* Molecular cloning and characterization of crustin from mud crab *Scylla paramamosain* [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(5): 841-850.
- [16] Liang P, Zhu W, Zhang X, *et al.* Differential display using one-base anchored oligo-dT primers [J]. *Nucleic Acid Res*, 1995, 22(25): 5763-5764.
- [17] 虞凤慧, 张丽芳, 李俊峰, 等. 中国林蛙皮肤抗菌肽基因的 cDNA 克隆及抗菌、抗癌和溶血活性的测定 [J]. 生物工程学报, 2009, 25; 25(1): 101-108.

《中华临床医师杂志（电子版）》2012 年度征稿、征订

《中华临床医师杂志（电子版）》是中国科技核心期刊, 半月刊, 被万方数据库、中国期刊网、维普数据库、美国化学文摘、乌利希期刊指南、波兰哥白尼索引等国内外知名数据库收录。邮发代号 80-728, 全年出刊 24 期, 定价 672 元, 2012 年度重点栏目征稿及 2012 年优惠征订详情请见中华临床医师杂志官方网站 www.clinicmed.net 的期刊动态。

欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志! 欢迎各位专家组织、推荐、撰写重点栏目论文!

地址: 北京市 100035-50 信箱 邮编: 100035 电话: (010) 62219211 传真: (010) 62222508

投稿电子邮箱: Lcdoctor@163.com 或 Lcyszz@163.com

网址: www.clinicmed.net