

文章编号: 1001-411X(2001)04-0058-04

柞蚕抗菌肽 A 基因的克隆和表达

李文楚¹, 郑学勤², 黄自然¹

(1 华南农业大学蚕业服装系, 广东 广州 510642; 2 华南热带作物学院生物技术国家重点实验室, 海南 儋州 571737)

摘要: 注射大肠杆菌 *E. coli* K₁₂D₃₁ 诱导的柞蚕滞育蛹在 25 ℃温育条件下, 蛹体血淋巴可产生一系列的抗菌物质以抵御外源病菌的入侵. 本研究以脂肪体为材料, 诱导后提取组织总 RNA, 纯化 mRNA 并用 AMV 逆转录酶合成 cDNA. 设计并合成抗菌肽 A 基因(*cecA*)的引物, 通过 PCR 法扩增获得柞蚕抗菌肽基因, 克隆至 pBluescript M₁₃(+) 质粒, 获得相对分子质量 5.9×10^4 的融合蛋白表达产物, 序列分析表明柞蚕抗菌肽 A 基因及其编码的氨基酸和天蚕具有一定的同源性.

关键词: 柞蚕; 抗菌肽 A 基因; 克隆表达

中图分类号: Q786

文献标识码: A

柞蚕蛹受到微生物病原菌侵入或物理、化学因素的刺激诱导可产生免疫化学反应, 通常可分为细胞免疫和体液免疫. 首先是蛹体几丁质层对病原物的物理屏蔽作用, 其次是血液中的各种细胞如颗粒细胞等对病原物的包围、吞噬作用^[1]; 然后是诱导并合成一系列的抗菌蛋白, 溶菌酶和抗菌肽等对病原物的杀灭或抑制作用. 其中抗菌肽是一类相对分子质量约 4×10^3 的碱性分子小肽, 经研究证实对多种动、植物病原菌均具有杀灭作用^[1~3]; Dunn 等研究认为细菌侵入昆虫体内被溶菌酶溶解后分解成肽多糖能激发抗菌肽基因的表达^[4], 正常情况下, 柞蚕滞育蛹免疫基因处于封闭状态, 病原物的入侵触发基因并启动、转录 mRNA, 再翻译成抗菌物质抵制病原侵入有机体. 因此, 了解抗菌肽基因的结构功能对昆虫防御机制的研究有着重要的意义.

1 材料与方法

1.1 材料

柞蚕蛹(品种: 三三)来自河南云阳蚕种场; *E. coli* K₁₂D₃₁ 由瑞典斯德哥尔摩大学 Boman 教授馈赠, 华南农业大学蚕业服装系生物技术实验室保存. 异硫氰酸胍为华美生物工程公司产品; mRNA 纯化试剂盒, RiboClone[®] cDNA 合成试剂盒, PCR 扩增试剂盒分别购自 BRL 公司和 Promega 公司, 载体系统购自 Promega 公司.

1.2 方法

柞蚕蛹的免疫: 将柞蚕滞育蛹用 φ 为 72% 的酒精体消毒, 10 min 后每蛹注射 50 μ L *E. coli* K₁₂D₃₁ (每毫升含 1×10^5 个活菌). 免疫后的滞育蛹置于 25 ℃温育一定时间.

脂肪体 RNA 提取和 mRNA 纯化: 免疫的柞蚕蛹

温育后置 -20 ℃或液氮中保存, 用前取出并用去 RNA 酶的用具解剖脂肪体, 立即用 φ 为 1% 焦碳酸二乙酯(DEPC)生理盐水洗涤数次, 用研钵研磨组织块, 10 000 r/min 冷冻离心后吸上清液转入新离心管. 参考 Sambrook 等^[5]的方法, 改用异硫氰酸胍结合有机溶剂法抽提 RNA, 总 RNA 还可通过用 Oligo(dT) 柱层析纯化 mRNA.

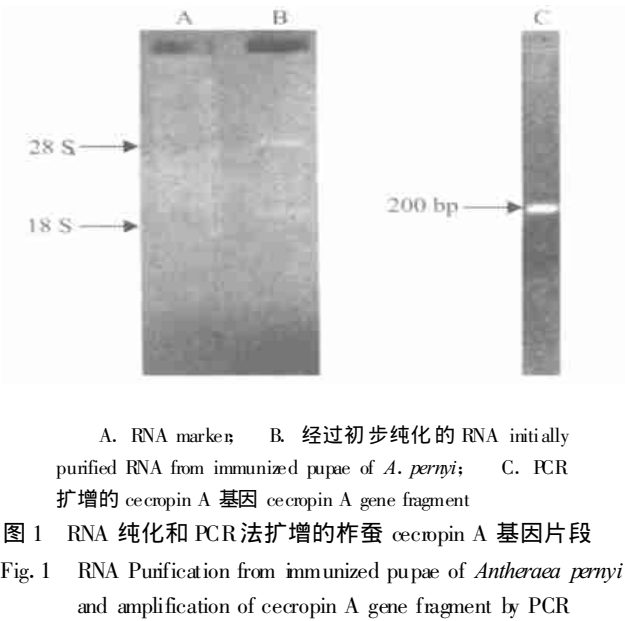
cDNA 合成和 PCR 扩增: cDNA 链的合成参照 Promega 公司 RiboClone[®] 的产品说明书进行. 根据天蚕 cecropin A 基因保守区域 DNA 设计合成 3'-GT GTCTAAACGATTCCCAATTTGTCGACCG, 5'-GGAAAT TCACCGTCAATAATTCTAGA, 筛选用的探针除上述引物外, 另选用质粒 pCB₅ 中含有合成抗菌肽 B 基因酶切片段, 分别用 ³²P 标记.

柞蚕抗菌肽基因的克隆、筛选及表达: PCR 循环分别设定 92 ℃, 55 s; 52 ℃, 50 s; 72 ℃, 1 min 扩增循环 30 次后置于 4 ℃保存. PCR 扩增产物克隆至载体 pBluescript M₁₃(+) 的 *Sma* I 酶切位点, 通过抗生素筛选和酶切鉴定, 再对克隆质粒进行 Southern blot 杂交检测. 由于该质粒是一个表达型的质粒, 其阳性重组子可用异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导表达 β -半乳糖苷酶-抗菌肽 A 蛋白复合物; 其表达蛋白可直接进行电泳鉴定或用溴化氰(CNBr)裂解后对蛋白活性进行检测.

2 实验结果

2.1 cDNA 合成

以纯化的总 RNA (图 1B) 为模板, 加入 RiboClone[®] cDNA 合成试剂, 根据其说明书合成 cDNA 第一链. 经过 φ 为 1% 琼脂糖电泳检测合成的 cDNA 呈现涂片状, 有分子量大小不同的 cDNA 合成.



ATGAATTCTCAACCTATCAATATTTTATGGATAGTATGCGGACAGACCTTCGATAGAGGGT
TTACCCATACCCAAGTTCGGTCTCATCCTAGTGAGTCGTATTACCTAACTCTCGCTCGTGT
ACACGTCGTGTACTGGGAAACCCGTGGCGTTACCCAACCTCAATCGCCTTGCAGCACATC
CCCCTTTCGGCAGCTGGGCGTAATAG

这一序列编码的蛋白质多肽的氨基酸组成如下:
MNFSTYQYFMDSMRDRPRIEGLPIPKFGLILVSRITILCVVFTRRVLGKPVALPNFNPLAAHPPFGSWA **

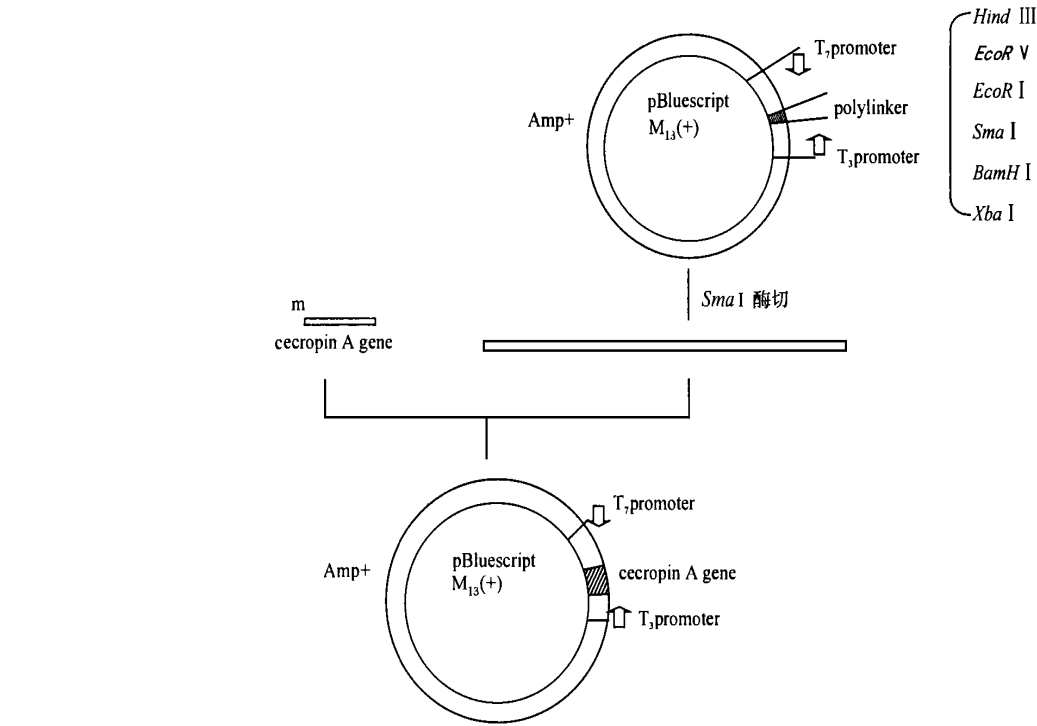


图 2 柞蚕抗菌肽 A 基因的克隆策略

Fig. 2 Clone strategy of cecropin A gene from immunized *A. pernyi*

用上述测定的 DNA 序列, 推测其基因结构及其阅读框架(图 3)

2.4 IPTG 对重组质粒融合蛋白的诱导表达

如上克隆策略, 柞蚕抗菌肽 A 基因克隆到可表达的重组质粒, 只要用 IPTG 即可诱导重组融合蛋白

2.2 PCR 扩增产物

总 RNA 或纯化后的 mRNA 用 PCR 扩增试剂盒进行 PCR 循环, 得到的 PCR 产物如图 1C. 根据分子量标准(λ DNA/*Hind* III 片段)测定, PCR 扩增的抗菌肽 cecropin A 基因长度约 200~250 bp.

2.3 柞蚕抗菌肽 A 基因的克隆策略

先将载体质粒 pBluescript M13(+)用 *Sma* I 进行酶切, 得到线性质粒 pBS, 再将柞蚕抗菌肽 cecropin A 基因片段和线性质粒分别磷酸化, 产生平头末端后用 T4 DNA 连接酶在较低温(4~10 °C)下连接, 得到的质粒经过筛选, 获得携带柞蚕 cecropin A 基因片段的阳性重组子.

其克隆策略如图 2. 重组质粒经抗生素筛选, 获得若干重组克隆菌落, 经扩大培养再用 Southern blot 筛选, 阳性重组质粒纯化后用 ABI 370A 序列分析仪对柞蚕 cecropin A 基因进行序列测定, 结果如下:

β -半乳糖苷酶外源基因的表达. 本实验结果证明, 克隆柞蚕抗菌肽 A 基因的重组质粒在相对分子质量 5.9×10^4 处出现新的蛋白带, 据此分析柞蚕抗菌肽 A 基因编码的 Preprocecropin A 相对分子质量约 $7 \times 10^3 \sim 7.2 \times 10^3$ (图 4). 用 SDS-PAGE 测定的相对分子质量与氨基酸序列计算的结果一致.

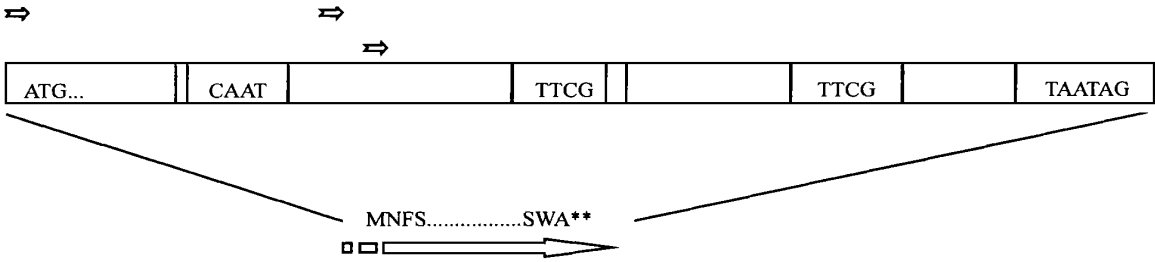
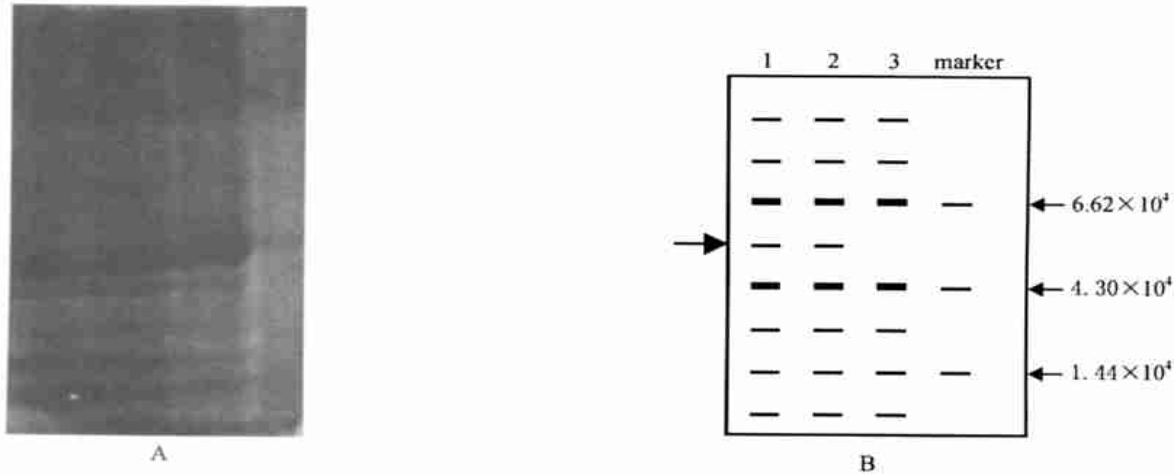


图 3 柞蚕抗菌肽 A 基因结构及阅读框架(ORF)

Fig. 3 Gene structure of cecropin A and its open reading frame(ORF)



1, 2 是重组质粒蛋白; 3 空载质粒; 4 蛋白质 marker; 箭头指向为重组质粒 pBS-柞蚕 cecropin A 基因融合蛋白
1, 2 fusion protein of recombinant plasmid; 3 protein of vector; 4 protein marker; Arrow indicates fusion protein expression of pBS- cecropin A recombinant plasmid induced by IPTG

图 4 IPTG 诱导表达重组质粒 pBS-柞蚕 cecropin A 融合蛋白 SDS-PAGE (A)及由此绘制的电泳模式图(B)

Fig. 4 SDS-PAGE of fusion protein expression of pBS- cecropin A recombinant plasmid induced by IPTG (A)and its model pattern of SDS-PAGE (B)

3 讨论

柞蚕滞育蛹经 *E. coli* K₁₂D₃₁ 诱导而产生一系列的抗菌物质, 其诱导源是非专一性的, 任何物理因素、化学物质、菌体等均可刺激、诱导抗菌物质的形成, 这样构成了柞蚕免疫体系的完整性和复杂性. 一方面, 环境因素的变化引起柞蚕体内一系列免疫反应, 以抵抗外源物质的入侵, 使柞蚕可以在野外具有较强的生存能力, 在生物进化过程中具备愈来愈多的优良性状和特征; 另一方面, 化学物质(包括 DDT、马拉硫磷、除虫菊酯等)在除虫的同时, 存活个体的抗性基因可能被诱导表达, 为昆虫的杀虫剂田间毒理提出了新的课题^[9].

本文克隆了柞蚕抗菌肽 cecropin A 基因, 并对其基因序列进行了克隆分析, 从基因结构来看, 该基因编码的天蚕抗菌肽 cecropin A 具有一定的同源性, 基

因结构中, 都具备 CAAT 和 TTCG 结构, 而这些是昆虫抗菌肽基因的重要单元. 抗菌肽基因结构中两个 α -螺旋之间起转折作用的氨基酸丙-甘-脯在柞蚕抗菌肽中为丙-亮-脯, 但是氨基酸的带电性质大都相同, 对生物活性不产生影响. 蛋白质分子链的亲水性和疏水性也完全相同. 用计算机软件 DNAsis 模拟抗菌肽的二级结构, 展示柞蚕抗菌肽 cecropin A 和天蚕抗菌肽 cecropin A、B 有一定的相似性, 都有 α -螺旋和 β -折叠, 但并不完全相同. 所以, 对柞蚕抗菌肽 cecropin A 基因表达产物活性的测定十分重要.

用 IPTG 诱导该重组质粒的表达, 获得 β -半乳糖苷酶和柞蚕抗菌肽的融合蛋白表达产物, 其相对分子质量为 5.9×10^4 , 其中 β -半乳糖苷酶相对分子质量为 5.2×10^4 , 这与计算机推导的柞蚕抗菌肽 cecropin A 基因前体物相对分子质量 7×10^3 是吻合的.

进一步的生物活性测定具有一定难度, 可考虑

用 CNBr 裂解法从 β -半乳糖苷酶和柞蚕抗菌肽的融合蛋白表达产物中裂解得到柞蚕抗菌肽基因 cecropin A 的前体物,但还需要对前体物进行氨基端的成熟化及修饰后加工等,是今后工作的努力方向.

参考文献

[1] 黄自然,周 奇,卢蕴良,等.注射大肠杆菌诱导柞蚕蛹血淋巴产生抗菌物质的某些特征[J].蚕业科学,1982,8 (4): 227—229.
[2] 李文楚,张家明,温刘发,等.柞蚕抗菌肽对热带作物病原菌的抑杀作用[J].热带作物学报,1994,15(1): 97—101.

[3] 周永富,饶军华,李文楚,等.家蝇免疫血淋巴对几种动、植物病原菌的抑菌作用[J].昆虫天敌,1997,19(1): 15—20.
[4] DUNN P E, DAI W, KANOST M R et al. Soluble peptidoglycan fragments stimulate antibacterial protein synthesis by fat body from larvae of *Manduca sexta*[J]. Dev Comp Immunol, 1985, 9: 559—68.
[5] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆: 实验指南 [M]. 金冬雁,黎孟枫,等译.北京:科学出版社,1989. 343—388.
[6] 张 然,陈濂生,张宗炳.蜚蠊灭菌肽的诱导及初步分离分析[J].昆虫学报,1990,33(1): 7—12.

Cloning of Cecropin A Gene from Chinese Oak Silk Moth, *Antheraea pernyi* and Its Expression by IPTG Induction

LI Wen-dun¹, ZHENG Xue-qin², HUANG Zi-ran¹

(1 Dept. of Seric. & Fash., South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Natl. Key Lab. of Biol. Tech., South China Tropic. Crop College, Danzhou 571737, China)

Abstract: A series of antibacterial substances were induced in the hemolymph of the diapausing pupae of Chinese Oak Silk moth, *Antheraea pernyi*, when injected with *E. coli* and incubated at 25 °C for several days. Fat body from immunized pupae was used as a typical material in the research. Total RNA were extracted from the tissue of immunized pupae and mRNA were purified. The first strand cDNA were synthesized by AMV reverse transcriptase. Subsequently, PCR were applied to amplificate cecropin A gene according to designed primer and the first strand of cDNA. The cecropin gene was cloned into *Sma* I site of plasmid M13(+) and expressed by IPTG induction. 5.9×10^4 cecropin A and β -galactase fusion protein were obtained on the gel of SDS-PAGE. Sequence determination showed that certain homology of cecropin A gene from *A. pernyi* compared with that from *Hyalophora cecropia*.

Key words: *Antheraea pernyi*; cecropin A gene; clone and expression

【责任编辑 周志红】