

扇贝防御素基因改良 5' cDNA 末端快速扩增聚合酶链反应筛选方法的研究*

梁爱玲^{1,2}, 刘勇军², 侯 敢^{1,2△}, 黄迪南^{1,2} (广东医学院: 1. 检验医学研究所; 2. 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 5' cDNA 末端快速扩增聚合酶链反应 (RACE) 筛选扇贝抗菌肽基因, 寻找基于基因序列同源性的双壳类抗菌肽 (AMP) 的筛选方法。**方法** TRIzol 法提取扇贝血淋巴中总 RNA。根据贻贝抗菌肽的保守序列设计基因特异性简并引物, 进行改良 5' RACE 钓取可能防御素基因 cDNA 的 5' 端序列、AT 克隆、DNA 测序和同源性分析。**结果** 采用改良 5' RACE 从扇贝血淋巴 RNA 中得到多个未知基因的 cDNA 5' 端序列, 挑选 600 bp 以下的基因片段进行 AT 克隆和 DNA 测序后得到 3 个插入片段序列, 其长度分别为 257、275 和 511 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。**结论** 从扇贝血淋巴中获得的 3 个 5' 端 cDNA 序列可能属于新的基因。应用改良 5' RACE 能钓取含防御素保守序列的新基因片段, 由此表明此方案具有可行性。

【关键词】 防御素; 抗菌肽; 扇贝; cDNA 末端快速扩增聚合酶链反应; 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.10.004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)10-1160-03

Study of screening for defensin genes in scallop by improved rapid amplification of 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; 2. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China)

【Abstract】 Objective To screen AMP genes with improved 5' RACE, to find out a feasible method for screening AMP genes from scallop based on gene homology. **Methods** Total RNA was obtained from scallop hemolymph by TRIzol method. Gene specially degenerated primer was designed according to the conserved sequence of MGDs. The 5' end sequences of possible defensin genes could be fished out with improved 5' RACE and their positive clones were sequenced. The homology of sequences at 5' end was blasted in GenBank. **Results** Several unknown cDNA 5' end sequences were obtained from scallop hemolymph RNA with improved 5' RACE. The cDNA fragments under 600 bp were AT cloned and three cDNA 5' end sequences were obtained, with the lengths of 257, 275 and 511 bp, respectively. There was no similar genes in homology with these cDNA 5' end sequences in GenBank. **Conclusion** Three cDNAs 5' end sequences from scallop hemolymph could be new genes. It is available to use improved 5' RACE to screen gene fragments containing defensin conserved sequence.

【Key words】 defensin; antimicrobial peptide; scallop; RACE; gene

双壳贻贝抗菌肽和牡蛎抗菌肽是目前研究的热点^[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 (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、反相高效液相色谱法 (HPLC) 等从血清中直接获得 MGDs^[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-聚合酶链反应 (RT-PCR)、嵌套 PCR 和快速扩增 PCR (RACE) 已被广泛应用^[7]。根据已知抗菌肽的保守序列设计引物, 可以更方便地钓取抗菌肽基因^[8-10]。中国对虾抗菌肽等生物抗菌肽 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量新抗菌肽的快捷方法^[7]。本课题采用改良 5' RACE 对扇贝防御素基因进行筛选, 寻找一种新的、简便的抗菌肽基因筛选方法。

1 材料与方法

1.1 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

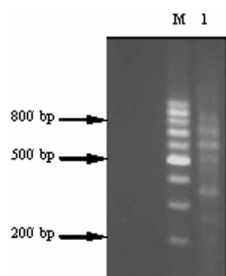
剂盒均购自 Invitrogen 公司。pGEM-T Easy Vector Systems、RNasin、Tfl DNA 聚合酶、RT System、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 均购自 Promega 公司。100 bp DNA Ladder Marker 购自华美生物工程公司和 Takara 宝生物工程公司 (大连)。测序工作由上海生物工程有限公司完成。

1.2 方法 改良 5' RACE 简并引物的设计 5' 端的序列信息在 MGDs 基因中具有高度的保守性, 通过比对已知的 MGDs 和其他物种的防御素家族抗菌肽氨基酸序列, 选择同源性高且简并性较低的氨基酸区域设计基因特异性简并引物^[11]。Anti-sense primer: MGDs 简并引物 5'-CCR CCG CAT CTA TAR CAW GTG CA-3' (R=G or A; w=T or A)。其他为 RACE 试剂盒自带引物, 如下: Sense primer: GeneRacer 5' Primer: 5'-CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA-3'; GeneRacer 5' Nested Primer: 5'-GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA-3' (26mer); GeneRacer RNA Oligo Sequence: 5'-CGA CUG GAG CAC GAG GAC ACU GAC AUG GAC UGA AGG AGU AGA AA-3'; GeneRacer Oligo dT Primer: 5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC GGC ATG ACA GTG (T)

24-3'。

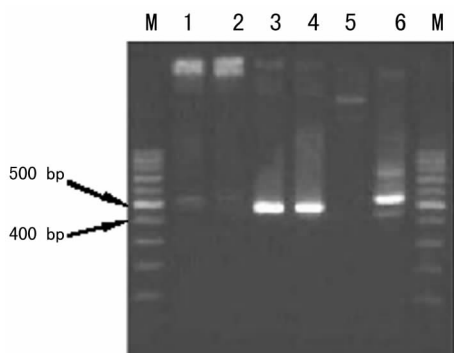
2 结 果

2.1 扇贝血淋巴防御素基因的改良 5'RACE 筛选 从湛江市海产品批发市场购买活扇贝,将扇贝双壳轻轻撬开,用大量的三蒸水冲洗贝体上残留的海水和异物,然后用新华滤纸吸干贝体中残留的水,横割闭壳肌,用 2 cm³ 注射器和 5 号针头从闭壳肌血窦中吸取血淋巴,收集贝血淋巴液约 10 mL,4 ℃,800×g 离心 15 min,弃上清液,收集沉淀于 1.5 mL 焦碳酸二乙酯处理的 EP 管,TRIzol 法提取血淋巴总 RNA [2,5]。根据 RACE 试剂盒说明书进行 mRNA 去 5'-P 和去帽处理,处理后的 mRNA 与 RNA Oligo 进行连接,最后进行 mRNA 反转录。反转录后得到的 cDNA 利用 MGDs 简并引物进行嵌套 PCR 扩增,得到其 5' 序列。第 1 次 PCR 使用 GeneRacer 5' Primer (10 μmol/L) 和 MGDs 简并引物 (20 μmol/L) 各 3 μL,退火条件为 55 ℃ 30 s,3 个循环后,68 ℃ 30 s,30 个循环。第 2 次 PCR 使用 GeneRacer 5' Nested Primer (10 μmol/L) 和 MGDs 简并引物 (20 μmol/L) 各 1 μL,退火条件为 68 ℃ 30 s,30 个循环。用 MGDs 基因特异性简并引物进行 5'RACE,在扇贝中钓取得到数个特异的基因片段 (图 1)。



注:M 为 100 bp DNA ladder Marker;1 为 5' RACE products。

图 1 5' RACE 产物琼脂糖凝胶电泳图



注:M 为 100 bp DNA ladder Marker;1~6 为 PCR product of NO. 1~6 clone。

图 2 PCR 法筛选 pCR4-TOPO 重组质粒阳性克隆电泳结果

2.2 改良 5' RACE 得到的未知基因片段的克隆筛选 挑取长度在 600 bp 以下的 3 个基因片段进行下一步的克隆和 DNA 序列分析。用无菌的低 DNA 结合力的 0.65 mL 离心管,按 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒说明书进行改良 5' RACE 产物的纯化。将纯化后的 5' RACE 产物和 pCR4-TOPO 或 pGEM-T Easy 质粒载体连接后进行转化。利用碱裂解法小量提取重组质粒,采用 PCR 筛选阳性克隆,pGEM-T Easy 重组质粒使用正向引物 5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3' 和反向引物 5'-TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C-3';pCR4-TOPO 重组质粒使用 T7 5'-ACG ACT CAC TAT AGG G-3' 和 M13 Reverse 5'-CAG GAA

ACA GCT ATG AC-3'。PCR 筛选 pCR4-TOPO 重组质粒 (图 2),其中 3、4 号阳性克隆的重组质粒 PCR 产物长度在 400~500 bp 之间。PCR 筛选 pGEM-T Easy 重组质粒,其中 7 号阳性克隆重组质粒 PCR 产物长度在 700~800 bp 之间。

2.3 改良 5' RACE 得到的未知基因片段 DNA 序列分析 取 PCR 产物长度有差异的克隆菌送上海生物工程有限公司测序。pCR4-TOPO 重组质粒和 pGEM-T Easy 重组质粒分别使用上海生物工程有限公司提供的 T3 引物和 SP6 通用引物将目的基因正向测序。测序后得到 3、4 和 7 号阳性克隆的插入片段序列,其长度分别为 257、275 和 511 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。

3 讨 论

RACE 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 扩增 5'、3' 端 cDNA,然后从 2 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' 和 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,能快速获得新抗菌肽基因。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。简并引物的出现是由于遗传密码具有简并性,这样可以根据氨基酸的保守序列反推到 DNA 水平设计引物。5' 端的序列信息在 MGDs 基因中具有高度的保守性,因此通过 5' 端的序列信息可以更快发现最可能与 MGDs 具有同源性的基因。通过比对已知的 MGDs 和其他物种的防御素家族抗菌肽氨基酸序列,选择同源性高且简并性较低的氨基酸区域设计基因特异性简并引物,进行 5'RACE,为快速鉴定候选防御素基因提供了新的尝试和途径 [14]。改良 RACE 将简并引物和 RACE 联合使用,可扩增出已知序列两端的未知区域的序列。简并引物的应用增大了得到目的基因的机会;cDNA 的 5' 端序列可以直接得到,有助于更快找到开放阅读框架,有利于进一步克隆筛选。

本实验利用改良 5' RACE 设计 MGDs 基因特异性简并引物直接扩增得到扇贝中多个未知基因 cDNA 的 5' 末端序列。挑选了部分基因片段进行克隆及 DNA 序列分析,得到 3 个长度分别为 257、275 和 511 bp 的扇贝未知基因 5' 端序列,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。因此,这些 cDNA 片段也可能是新的基因序列。和 RACE 一样,简并 PCR 也有一定的局限性。由于简并引物特异性较低,因此出现非特异性条带的机会增加,本次实验中 5' RACE 产物中的 400 bp 条带就是非特异性扩增产生的条带,最终也需要对每个可疑的阳性 PCR 产物进行克隆测序证实,这样也增加了阳性克隆的漏筛率。双壳种类中根据同源性进行抗菌肽筛选确实存在一定的难度,这可能与保守序列结构的复杂性有一定的关系 [13]。

实验结果表明,通过该方法能钓取含防御素保守序列的新基因片段,然而,本实验尚未获得与 MGDs 具高度同源的基因片段,由此说明此筛选方案需要进一步改善。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 [15]。

参考文献

[1] Mitta G, Franck V, Hubert F, et al. Involvement of Myti-

- lins 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 JK, Crawford JM, Stone KL, 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, Dyrynda EA, et al. MytilinB 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] 王徕城, 王金星, 王来元, 等. 家蝇防御素基因的 cDNA 克隆及序列分析[J]. 动物学报, 2003, 49(3):408-413.
- [9] Patrzykat A, Douglas SE. Gone gene fishing: how to catch novel marine [J]. Trends Biotechnol, 2003, 21(8):362-369.
- [10] Frohman MA, Dush MK, Martin GR. 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 SR, Hong MY, Park SW, 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] 王洪振, 周晓馥, 宋朝霞, 等. 简并 PCR 技术及其在基因克隆中的应用[J]. 遗传, 2003, 25(2):201-204.
- [15] 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(1):101-108.

(收稿日期:2011-12-18)

(上接第 1159 页)

液铁浓度增高通常见于 Neu 气道炎症反应为主的囊性纤维化和支气管扩张等^[12]。本研究结果显示, 虽然 Asthma 组的痰 Neu 比例较健康对照组高, 但差异无统计学意义。而 Asthma 组的铁浓度则显著高于健康对照组和其他两种疾病组, 由此提示铁不仅在 Neu 炎症反应, 在 Eos 炎症反应中亦可能扮演了一定的角色。

本研究发现, EB 患者痰液中锌、铜、铁的含量处于正常范围, 其水平与 Asthma 组差异有统计学意义, 该差异与二者的 Eos 炎症反应程度存在一定的相关性。微量元素在 EB 与哮喘的病理生理差异中所起的具体作用需要更加深入的后续研究。

参考文献

- [1] Gibson PG, Denburg J, Dolovich J, et al. Chronic cough: eosinophilic bronchitis without asthma[J]. Lancet, 1989, 1(8651):1346-1348.
- [2] 王学彧, 朱宝玉. 慢性阻塞性肺疾病缓解期患者血清微量元素变化及意义[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(7):853-856.
- [3] 李琳琳. 儿童感染性疾病与微量元素关系的探讨[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(21):1850-1851.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 咳嗽的诊断与治疗指南(2009)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2009, 32(6):407-413.
- [5] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗及教育和管理方案)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31(3):177-185.
- [6] 罗炜, 王慧, 陈如冲. 单一浓度法与梯度浓度法高渗盐水雾化诱导痰的成功率与安全性比较[J]. 广东医学, 2010, 31(24):3193-3195.
- [7] 程靖, 刘贤. 变应性鼻炎、哮喘与成人血微量元素的循证医学研究[J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2004, 12(2):53-56.
- [8] Murgia C, Lang CJ, Truong-Tran AQ, et al. Zinc and its specific transporters as potential targets in airway disease [J]. Curr Drug Targets, 2006, 7(5):607-627.
- [9] 罗炜, 赖克方, 陈如冲, 等. 嗜酸性粒细胞性支气管炎患者气道炎症细胞及介质特征的探讨[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(9):626.
- [10] Jayaram L, Chunilal S, Pickering S, et al. Sputum zinc concentration and clinical outcome in older asthmatics [J]. Respirology, 2011, 16(3):459-466.
- [11] Truong-Tran AQ, Ruffin RE, Foster PS, et al. Altered zinc homeostasis and caspase-3 activity in murine allergic airway inflammation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 27(3):286-296.
- [12] Reid DW, Lam QT, Schneider H, et al. Airway iron and iron-regulatory cytokines in cystic brosis [J]. Eur Respir J, 2004, 24(2):286-291.

(收稿日期:2012-01-10)