

中国家蚕抗菌肽基因 CBM1 全长 cDNA 序列测定及其基因结构分析

李建民^① 马志飞^① 曹勤洪^① 周开亚^② 张双全^② 戴祝英^②

(^① 南京医科大学细胞生物学与医学遗传学系 南京 210029; ^② 南京师范大学生命科学学院 南京 210097)

摘要: 用大肠杆菌感染中国家蚕 (*Bombyx mori*) 蛹, 从中提取总 RNA, 用 RT-PCR 方法获得蚕抗菌肽基因 CBM1 cDNA 部分片段并克隆测序, 以此蚕抗菌肽基因 CBM1 的部分片段, 设计特异性引物, 用 3', 5' RACE 的方法, 获得蚕抗菌肽基因 CBM1 cDNA 的全长序列; 用 PCR 的方法, 从中国家蚕蛹基因组 DNA 获得抗菌肽 CBM1 基因的 700 bp, 1 100 bp 左右的 2 个片段, 初步证实中国家蚕抗菌肽基因在单倍体染色体中至少存在 2 个拷贝。

关键词: 蚕抗菌肽; RACE PCR; 序列分析; 中国家蚕

中图分类号: Q754 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2005)05-01-07

Cloning and Sequencing of Antibacterial Peptide CBM1 in the Silkworm from China

LI Jian-Min^① MA Zhi-Fei^① CAO Qin-Hong^① ZHOU Kai-Ya^②
ZHANG Shuang-Quan^② DAI Zhu-Ying^②

(^① Department of Cell Biology and Medical Genetics, Nanjing Medical University, Nanjing 210029;

^② College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Template mRNA was prepared from fat body of chrysalis of the silkworm, *Bombyx mori*, 9 hours after injection of *E. coli*, K12D31. Partial cDNA fragments of cecropin CBM1 and cecropin CBM2 were obtained by reverse transcription PCR (RT-PCR) respectively. Gene specific primers were designed based on sequences of partial cDNA fragments of cecropins CBM1 and CBM2. A full-length sequence of cecropin CBM1 cDNA was obtained by 3' RACE and 5' RACE PCR and sequenced. With gene specific primers, three fragments of CBM1 gene were amplified from genomic DNA of the silkworm, *B. mori* from China by nested-primer PCR. They are about 700 bp, 1 100 bp and 1 600 bp in size, respectively. At least two copies of cecropin CBM1 gene about 700 bp and 1 100 bp in size have been proved.

Key words: Cecropin; RACE PCR; Sequencing analysis; The silkworm from China

近年来, 先天免疫应答 (innate immune response) 在生物学和医学界引起了广泛关注。先天免疫中, 抗菌肽是构成宿主防御病原体的第一道机体屏障, 从微生物界到多细胞的动植物界都广泛存在^[1]。抗菌肽能在宿主被感染后的极短时间内控制、延缓、甚至阻止细菌生长, 如埃及伊蚊在接受革兰阴性菌短时间后可检测

到大量抗菌分子 mRNA^[2]。动物的皮肤^[3]、口腔^[4]、肠道^[5]和生殖道^[6]等不同部位, 可维持一

基金项目 国家自然科学基金 (No. 39770117);

第一作者介绍 李建民, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 分子遗传学; E-mail: jianminli@njmu.edu.cn.

收稿日期: 2004-12-14, 修回日期: 2005-07-19

定抗菌肽浓度,使共生的自然菌落处于稳定状态^[7],填补了高度特异性的抗原抗体免疫响应的真空地带。抗菌肽的这些特性,使其成为研究热点。

昆虫具有高效的体液免疫系统,成为研究抗菌肽的首选生物。他们受细菌感染后,能快速产生特异性抗菌多肽(antibacterial peptides),比较重要的有天蚕素(cecropin)、溶菌酶(lysozyme)、蜂毒素(abaecin)和杀菌素(bactericidin)^[8~10]。蚕抗菌肽一般为33~37个氨基酸,对细菌、病毒和寄生虫都具有很强的杀伤性,并且能灭活肿瘤细胞,而对正常细胞没有毒副作用。他们的抗菌作用与其氨基酸序列密切相关,而与其空间结构可能关系不大(同一抗菌分子在去除末端不同数目的氨基酸后,仍具有抗菌活性)^[8],能通过裂解细胞生物膜结构达到杀菌目的,故不易诱导抗药菌株的产生^[11]。自从Hultmark(1980)首次从天蚕(*Hyalophora cecropia*)中分离出蚕抗菌肽并测序后,在其他昆虫和蚕类中也相继发现了蚕抗菌肽的同源家族并测定了部分抗菌肽的cDNA序列^[12~17]。中国家蚕(*Bombyx mori*)蚕抗菌肽虽然早在1986年就测定了CM系列氨基酸序列^[18],但尚无全长基因序列的报道。

本研究从大肠杆菌诱导的中国家蚕蛹总RNA反转录合成cDNA,通过3'、5'cDNA末端快速克隆法(rapid amplification cDNA ends, RACE),获得蚕抗菌肽基因CBM1(cecropin 1 of *B. mori* from China)cDNA的全长序列, GeneBank 接受号为AF303890。

根据所测CBM1的cDNA序列设计特异引物,用巢式长PCR(nested long distance PCR)的方法,扩增中国家蚕蛹基因组DNA,结合测序,初步证实中国家蚕单倍体中至少存在2个抗菌肽CBM1基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和酶 异硫氢酸胍,购自上海伯奥生物科技公司;β-巯基乙醇,购自Fluka公司;

DEPC(焦碳酸二乙酯),购自Serva公司。PolyAtract®_Series9600™ mRNA Isolation System 试剂盒、逆转录酶(AMV)、末端转移酶(TdT)、Taq DNA聚合酶均购自Promega公司。Expand™ Long Template PCR System,购自德国宝灵曼公司。

1.1.2 受体菌和克隆载体 JMI09菌株 PinPoint™ Xa-1 T-质粒载体购自Promega公司。

1.1.3 家蚕 浙农一号,购自中国农业科学院蚕业研究所。

1.2 方法

1.2.1 反转录合成单链cDNA 取家蚕蛹,注射对数生长期的*E. coli* K12D31 5 μl/只。25℃放置9 h后,取蚕蛹尾部脂肪体组织,用异硫氢酸胍法^[19]提取总RNA,用PolyAtract mRNA试剂盒从总RNA中纯化mRNA。

用1 μg mRNA反转录合成单链cDNA, 20 μl的反应液含:50 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 1 mmol/L DTT, 5 μmol/L Oligo d(T)₇, 500 μmol/L dNTPs, 26 U RNasin, 8 U 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。

1.2.2 用于扩增部分片段的简并引物设计 蚕抗菌肽基因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。因本实验室曾参加家蚕抗菌肽CM4的活性肽氨基酸序列的测定工作,所以引物的设计主要以CM4氨基酸序列为基础。通过对家蚕蚕抗菌肽CM4和天蚕3种蚕抗菌肽的比较分析,发现其与天蚕蚕抗菌肽A成熟肽的氨基酸序列同源性高达83%,故用天蚕蚕抗菌肽基因的前导肽R(-22)-V(-17)X 5'-g(A/T/C/g)ATI TTI TTI TTI gT---3'),为5'端引物CBA1,16个碱基,3'端用CM4的活性部分,A27-A33为下游引物CBA2(5'-TT IgC ITg ICC IAT IAC IgC-3'),20个碱基。I为次黄嘌呤,可和A、T、C、G 4种碱基通配。

1.2.3 PCR扩增家蚕蚕抗菌肽基因片段 用所设计的引物CBA1、CBA2,以上述的家蚕cDNA为模板扩增特异片段。PCR总体积为30

μl , 含 50 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶, 200 nmol/L dNTPs。PCR 反应为 45°C 退火, 70°C 延伸 20 min, 95°C 预变性 3 min, 95°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 40 s, 20 个循环, 72°C 延伸 20 min。

用 3% 的低熔点琼脂糖凝胶电泳回收和纯化靶 DNA 片段, 根据产物大小, 收集期待的片段作第二次 PCR 扩增, 除退火温度提高至 55°C, 其他均与第一次 PCR 一致, 获取家蚕蚕抗菌肽基因片段。

1.2.4 家蚕蚕抗菌肽 CBM1 基因的部分片段的克隆和测序 蚕抗菌肽 CBM1 基因的部分片段用直接 T/A 克隆法进行克隆。将该片段纯化后, 用具有 T 粘末端的 PinPoint™ Xa-1 质粒载体克隆, 转化到大肠杆菌 JM109 菌株, 在含氨苄青霉素 AMP⁺ 的平板上生长过夜。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。

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 试剂盒纯化后, 手工银染测序筛选再在 ABI 310 基因分析仪上测序校正。根据所测序列, 设计蚕抗菌肽 CBM1 特异性正向引物 AS1、AS2 和反向引物 AST1、AST2。

1.2.5 RACE 法测定家蚕抗菌肽基因 CBM1 cDNA 全长序列

1.2.5.1 蚕抗菌肽 cDNA 的 3'RACE 按方法 1.2.1, 用自行设计的 RACE 引物 AP1-d(T)₇ 替代 α (T)₇, 反转录合成单链 cDNA, 用接头引物 AP1 与蚕抗菌肽基因 CBM1 特异性引物 AS1 作第一次扩增, 用 AP2 与 AS2 对第一次扩增产物作第二次扩增, 获取 3' 端片段。

1.2.5.2 蚕抗菌肽 cDNA 的 5'RACE 按方法 1.2.1, 用自行设计的特异性引物 AST1, 替代 α (T)₇, 反转录合成单链 cDNA, 用 Quick PCR Purification 试剂盒纯化单链 cDNA。用 TdT 末端转移酶, 对单链 cDNA 加多聚 dAp, 乙醇沉淀产物。此产物按前述 PCR 扩增, 引物为 AP1-d(T)₇ 和 AST2, 反应条件为 50°C, 2 min, 70°C

20 min, 95°C 4 min, 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 20 个循环; 第二次扩增用 AP1 和 AST2; 第三次扩增用 AP2 与 AST2, 获取抗菌肽 CBM1 基因 cDNA 5'RACE 片段。

1.2.5.3 家蚕抗菌肽 CBM1 cDNA 全长序列的测定 将上述 3'RACE 和 5'RACE 所获片段用 T/A 法克隆, 测序。

1.3 巢式长 PCR 扩增蚕抗菌肽基因片段 据上述获得的蚕抗菌肽 CBM1 的 cDNA 序列设计引物, 用长 PCR 的方法扩增蚕抗菌肽基因。

500 ng 基因组 DNA 在 50 μl 反应体系中加入 5 μl 10 × PCR Buffer, 终浓度为 1.5 μl 25 mmol/L MgCl_2 , 1.5 μl 10 mmol/L dNTP, 2.5 U *Taq* Plus DNA 聚合酶, 引物 AS1 与 AST1 各 25 pmol。94°C 预变性 5 min, 94°C 20 s, 65°C 30 s, 68°C 5 min, 30 个循环, 68°C 延伸 7 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

用琼脂糖凝胶电泳法回收目的 DNA 片段, 用内引物 AS2/AST2 作第二次扩增, 扩增条件同上(图 1)。

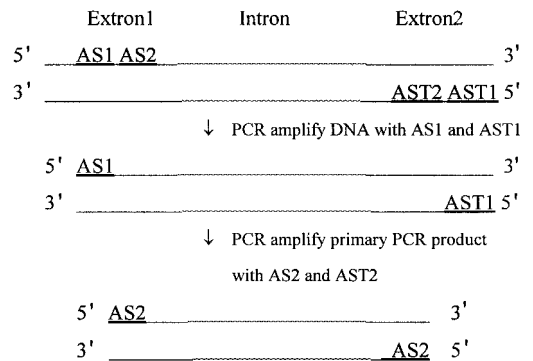


图 1 蚕抗菌肽基因分离示意图

Fig.1 Schematic diagram showing isolation of cecropin CBM1 gene

2 结果

2.1 抗菌肽基因 CBM1 部分 cDNA 序列的测定 以中国家蚕脂肪体 mRNA, 用设计的引物 CBA1 和 CBA2 经 RT-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。

在 T4 DNA 连接酶作用下,该片段被插入 PinPoint™ Xa-1 克隆载体上,本文用质粒 PinPoint™ Xa-1 多克隆位点上下游的测序引物 (PinPoint 测序引物 5'-GTGACGCGGTGCAGGGCG-3' 和 SP6 测序引物 5'-CATACGATTTAGGTGACACT ATAG-3') 作为 PCR 引物,直接挑取白斑进行

PCR 反应。反应体系为 10 μl,2 个测序引物各 2 pmol,其余同前。由于 2 个测序引物至 EcoRV 克隆位点的距离之和为 144 bp,而靶 DNA 片段为 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)。

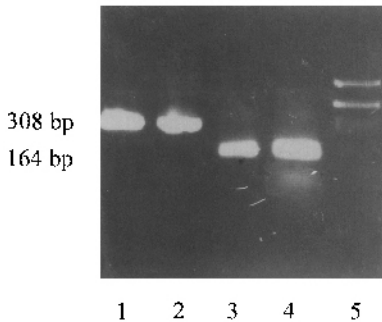


图 2 CBM1 cDNA 片段的 2.5% 琼脂糖电泳结果

Fig.2 Result of 2.5% agarose gel electrophoresis of CBM1 cDNA fragments

1 2. 经 SP6/PinPoint 引物 PCR 扩增 2 个阳性克隆获取的目的片段 308 bp ;3 4. 纯化后的 2 次 RT-PCR 扩增产物, 164 bp ;5. pGEM/ Hae III DNA 分子量标记。

1 2. Two positive aim fragments obtained by PCR through SP6/PinPoint primer, 308 bp ;3 4. The second RT-PCR amplified product after purification, 164 bp ;5. pGEM/ Hae III DNA molecular weight marker.

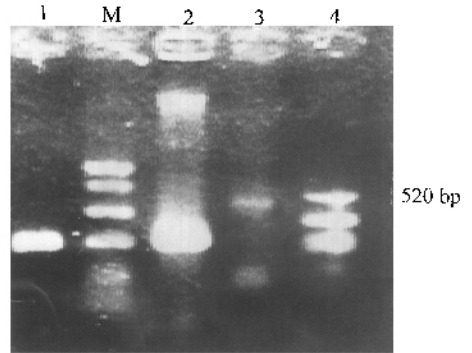


图 3 3',5' RACE PCR 产物

Fig.3 Product of 3',5' RACE by PCR

M. PCR DNA 分子量标记(50 bp,150 bp,300 bp,500 bp,750 bp,1 000 bp); 1. AP2/AST2 3' RACE PCR 产物,300 bp 2. API/AST1 3' RACE PCR 产物; 3. AP2/AS2 5' RACE PCR 产物,520 bp; 4. API/AS1 5' RACE PCR 产物。

M. PCR DNA molecular weight marker(50 bp,150 bp,300 bp,500 bp,750 bp,1 000 bp); 1. AP2/AST2 3' RACE PCR product,300 bp; 2. API/AST1 3' RACE PCR product; 3. AP2/AS2 5' RACE PCR product,520 bp; 4. API/AS1 5' RACE PCR product.

```

gcttc gaattaagct gcttagcaaa 25
M N F V R I L S F V F A L V L A L G A V
atgaactttg tccgtatctt gagcttcgtc ttcgcattgg tgttggccct cggcgcggtc 85
S A A P E P R W K L F K K I E K V G R K
agtgtcgtc ctgagcccg gtggaactc ttcaagaaaa ttgagaaagt gggacgcaaa 145
V R D G L I K A G P A I A V I G Q A K F
gttcgcgatg gattaatcaa agcgggtcca gctatagccg tcataggcca agctaaattc 205
I G K
ataggaaagt gactttatcg ttaaactcca aagacgcatt tagcttgaag catgattcta 265
aataattatg aatctcteta gtttaagcga aattagatct tattgaaact gcataaggca 325
tttcatatat gtactagatt atattatgca attctctgat tatattagta attattaata 385
aggacttacc acatcattgc catcgtcaga gtgatcaagt acacatgtgg cagaaatatt 445
tttcatgcaa tgtaattgga acttagacta ttcgtggcat aataaatcac aatcaataat 505
aacaataaaa aaaaaa
521

```

图 4 家蚕蚕抗菌肽 CBM1 cDNA 序列和氨基酸序列

Fig.4 Nucleotide sequence and amino acid sequence of CBM1 cDNA in the silkworm

3 讨论

通过中国家蚕抗菌肽 CBM1 基因序列测定,为构建家蚕抗菌肽 CBM1 蛋白质的表达提供了物质基础。值得注意的是 RT-PCR 扩增特异性基因,失败的主要原因一般有两个:一是在逆转录酶作用下没有能形成 cDNA 第一链,二是由于引物的设计错误无法扩增出特异片段。后者在通过氨基酸序列而设计的简并引物扩增中尤为重要。实验中曾设计了用 A、C、G、T 代替 I 的引物,由于单一引物浓度相对较小,因此在扩增反应中引物浓度增加了 120 倍(简并度为 1 024)才扩增出片段,且非特异片段大量增加,没能获得目的片段。用 I 代替 A、C、G、T,虽然可以降低引物浓度,但长度非常重要。小于 20 bp 的引物往往非特异扩增片段增多,给分离带来困难。而大于 30 bp 的引物虽然必要,但实际工作中可以通过改变 PCR 反应条件来提高特异性。我们在工作中先后合成了 16 对引物,仅本文报道的这对引物获得了蚕抗菌肽 CBM1 基因。

我们设计的 RACE 引物与传统 RACE 引物有一定区别。Schust(1992)认为要降低非特异扩增,接头引物必须具有两个不同区段。但这将导致反转录引物碱基数增加(高达 51 个碱基)影响反转录效率。我们仅在传统引物末端多加两个 TT,便很好地解决了接头引物所引起的非特异反应问题。因此,可以认为过长的起始引物并非必需,为提高反转录效率,引物长度应尽可能短。

PCR 扩增过程中, *Taq* DNA 聚合酶能在 PCR 产物 3' 末端加上一个 A,无需特殊处理即可用于 A/T 克隆连接。但经验表明,PCR 反应结束后,延伸 20 min,可以增加产物中含 A 突出末端产物的比率,提高链接效率。另外,对于 RACE PCR 产物等一些含 A 量高的 PCR 产物,由于在 PCR 过程中消耗了过多的 A,导致 PCR 产物中含 A 突出末端的产物减少,必须在反应结束后纯化 PCR 产物,重新加入与 PCR 一样的新反应试剂,72℃ 延伸 30 min,使含 A 突出末端

的产物增加。结果显示,不经这样处理,RACE PCR 产物的克隆往往归于失败。

蚕抗菌肽基因编码的蛋白质一般为 62~65 个氨基酸,其 cDNA 一般有两个外显子编码。第一外显子编码 32 个氨基酸(其中前 26 个为前导肽,后 8 个为成熟肽的前 8 个氨基酸);第二外显子编码 30~35 个氨基酸。蚕抗菌肽内含子大小不一,已报道的为 50~2 000 bp^[8]。我们设计的引物横跨内含子,在受大肠杆菌感染后 9 h 的家蚕中获得了蚕抗菌肽 CBM1 cDNA 的扩增片段,进一步的 RACE 扩增获得了蚕抗菌肽 CBM1 全长序列。

通过与日本家蚕蚕抗菌肽 A、B、D 的比较,发现与日本家蚕蚕抗菌肽 A 序列较相似,两者 cDNA 核苷酸 68% 同源,可编码区核苷酸同源率为 88%。两者氨基酸同源率为 97%,仅成熟肽与日本家蚕蚕抗菌肽有两个氨基酸的差别。中国家蚕活性肽的第 14 位赖氨酸(Lys)取代了日本家蚕的天冬酰胺(Asn),第 17 位的甘氨酸(Gly)取代了天冬氨酸(Asp),而与蚕抗菌肽 CM4 差别较大。

迄今为止,研究蚕抗菌肽基因结构均是利用 cDNA 探针从基因组文库筛选,该法虽可获得特异性的基因,但技术复杂。根据所测的中国国家蚕抗菌肽 CBM1 的 cDNA 序列设计特异性引物,用巢式长 PCR 的方法,对基因组 DNA 进行二次扩增,得到 750 bp 和 1 100 bp 2 个 CBM1 基因片段。由于抗菌肽基因编码区长为 126 bp,因此,我们得到的 2 个抗菌肽 CBM1 基因内含子为 588 bp(已测序,日本家蚕为 609 bp)与 980 bp 左右。抗菌肽基因一般为多拷贝基因,如天蚕单倍体中抗菌肽 B 基因至少有 2 个拷贝。从中国家蚕得到的抗菌肽 CBM1 基因显示,在中国家蚕单倍体中至少存在 2 个 CBM1 基因拷贝。

总之,中国家蚕抗菌肽 CBM1 基因序列测定和初步的基因定位,为进一步设计和筛选新型的抗菌肽打下了基础,对转基因技术的药物开发奠定了基础,也为利用中国家蚕抗菌肽 CBM1 研究其在感染治疗中的应用提供了可

能。

参 考 文 献

- [1] Bulet P, Stocklin R, Menin L. Anti-microbial peptides :from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*, 2004, **198** :169 ~ 184.
- [2] Lowenberger C. Innate immune response of aedes aegypti. *Insect Biochem Mol Biol*, 2001, **31** :219 ~ 229.
- [3] Murakami M, Ohtake T, Dorschner R A, et al. Cathelicidin anti2 microbial peptide expression in sweat , an innate defense system for the skin. *J Invest Dermatol*, 2002, **119**(5):1 090 ~ 1 095.
- [4] Mizukawan Sugiyama K, Ueno T, et al. Levels of human defensins 21, an antimicrobial peptide, in saliva of patients with oral inflammation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1999, **87**(5):539 ~ 543.
- [5] Otte J M, Kiehne K, Herzig K H. Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine. *J Gastroenterol*, 2003, **38**(8):717 ~ 726.
- [6] Madsen P O. Antibacterial therapy and prophylaxis in transurethral surgery. *Urological Research*, 1986, **14**(4):177 ~ 178.
- [7] Boman H G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Curr Biol*, 1995 (3):435 ~ 448.
- [8] Boman H G. Antibacterial peptides :basic facts and emerging concepts. *J Intern Med*, 2003, **254**(3):197 ~ 215.
- [9] Arisaka F, Kanamaru S, Leiman P, et al. The tail lysozyme complex of bacteriophage T4. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, **35**(1):16 ~ 21.
- [10] Masschalck B, Michiels C W. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Crit Rev Microbiol*, 2003, **29** :191 ~ 214.
- [11] Yeaman M R, Yount N Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological*, 2003, **55** :27 ~ 55.
- [12] Morishima I, Suginaka 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.
- [13] Gudmundur H G, Dan A L, Asling B, et al. Cloning and expression of a gene 1991 ;cluster encoding three antibacterial peptides in *Hyalophora cecropia*. *J Biol Chem*, 1991, **266**(18):11 510 ~ 11 517.
- [14] Taniai K, Kato Y, Hirochika H, et al. Isolation and nucleotide sequence of cecropin B cDNA clones from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochimica Biophysica Acta*, 1992, **1132**(2) :206 ~ 209.
- [15] Furukawa S, Taniai K, Yang J, et al. Induction of gene expression of antibacterial proteins by chitin oligomers in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol*, 1999, **9**(1):145 ~ 148.
- [16] Eggleston P, Zhao Y. Genomic organization and immune regulation of the defensin gene from the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol*, 2000, **9**(5):481 ~ 490.
- [17] Kim C H, Lee J H, Kim I, et al. Purification and cDNA cloning of a cecropin-like peptide from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Mol Cells*, 2004, **17**(2):262 ~ 266.
- [18] 张双全 屈贤铭, 戚正武. 昆虫免疫应答及抗菌肽应用前景. *生物化学杂志*, 1987, **3**(3):118 ~ 120.
- [19] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analy Biochem*, 1987, **162**(1):156 ~ 169.