

# 重叠区扩增法合成抗菌肽B基因\*

桑春果<sup>1</sup>, 张开春<sup>2</sup>, 张军科<sup>1</sup>

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2 北京市农林科学院 林果所, 北京 100093)

[摘要] 人工设计并合成了抗菌肽B基因的4个寡聚核苷酸片段, 通过重叠区扩增法, 扩增出了相当于抗菌肽基因全长的寡聚核苷酸片段。经克隆测序, 证明成功地实现了抗菌肽基因的人工合成、拼接和克隆。

[关键词] 重叠区扩增法; 抗菌肽; 基因合成; 基因克隆

[中图分类号] Q 785

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)01-0065-03

昆虫抗菌肽是昆虫血淋巴中产生的一类小分子肽, 当昆虫受到外界微生物的刺激时, 可大量迅速地产生。抗菌肽具有热稳定性强、抗菌谱广的特点, 可抗革兰氏阳性菌, 也可抗革兰氏阴性菌, 有些甚至对病毒和肿瘤具有抗性<sup>[1]</sup>, 抗菌肽B是已分离的众多抗菌肽中抗性较强的一种<sup>[2]</sup>。近年来, 一些动物中也发现了抗菌肽的存在。因此, 抗菌肽可用于植物及人体的抗细菌感染中, 从而使抗菌肽再次成为分子生物学的研究热点<sup>[3,4]</sup>。从昆虫中克隆或人工合成抗菌肽基因是利用的前提, 本研究报道了一种合成和克隆抗菌肽B基因的新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 基因片段合成

根据天蚕抗菌肽B的氨基酸序列<sup>[5]</sup>, 利用植物偏爱密码子设计抗菌肽B基因序列。将整个基因划分为A、B、C、D 4个片段, 由上海生物工程公司合成, 并经PAGE纯化。

### 1.2 PCR扩增

基因片段合成纯化后, 稀释成 $10\ \mu\text{mol/L}$ 备用。第1次PCR反应时, 在 $20\ \mu\text{L}$ 反应体系中, 加入A、C或B、D片段各 $2\ \mu\text{L}$ ,  $15\ \text{mmol/L}\ \text{MgCl}_2$   $2.7\ \mu\text{L}$ , Pfu DNA聚合酶 $0.5\ \mu\text{L}$ ,  $10\times\ \text{PCR Buffer}$   $2\ \mu\text{L}$ ,  $2\ \text{mmol/L}\ \text{dNTPs}$   $2\ \mu\text{L}$ , 加 $\text{H}_2\text{O}$ 补足 $20\ \mu\text{L}$ ; 第2次PCR反应时, 取第1次PCR反应液 $0.5\ \mu\text{L}$ 为模板, 加入A、D片段各 $2\ \mu\text{L}$ , 其他同第1次反应。两次PCR条件均为 $94\ ^\circ\text{C}$ ,  $1\ \text{min}$ ;  $50\ ^\circ\text{C}$ ,  $2\ \text{min}$ ;  $72\ ^\circ\text{C}$ ,  $2\ \text{min}$ , 循环35次, 最后 $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $10\ \text{min}$ ,  $4\ ^\circ\text{C}$ 保存。

循环35次, 最后 $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $10\ \text{min}$ ,  $4\ ^\circ\text{C}$ 保存。

### 1.3 扩增产物回收

PCR反应完成后, 取 $5\ \mu\text{L}$ 于质量分数15%的PAGE胶上电泳, 确认扩增是否成功, 剩余部分用异丙醇沉淀回收, 加入 $10\ \mu\text{L}\ \text{H}_2\text{O}$ 溶解备用。

### 1.4 扩增片段克隆及序列分析

回收产物经浓度标定后, 以回收片段与pUCm-T载体3:1的摩尔比加入连接体系, 其中载体用量 $50\ \text{mg}$ ,  $10\times$ 连接酶buffer  $1\ \mu\text{L}$  (购自华美公司), 连接酶 $0.5\ \mu\text{L}$  (购自华美公司),  $12\ ^\circ\text{C}$ 连接过夜。连接产物经 $65\ ^\circ\text{C}$ 灭活 $10\ \text{min}$ 后, 转化感受态细胞DH5 $\alpha$ 。经蓝白菌落筛选后, 挑取白色菌落, 以碱裂解法少量提取质粒DNA, 初步确定重组菌落后, 由上海生物工程公司测序。除特别说明外, 本研究所用试剂均为上海生物工程公司产品。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因设计

根据天蚕抗菌肽B氨基酸序列<sup>[5]</sup>, 选用植物偏爱密码子, 借助计算机设计了天蚕抗菌肽B基因的碱基序列。其结构基因部分长度 $108\ \text{bp}$ , 5端设计了Xba I、Bam H I 2个限制性内切酶位点, 加1个起始密码子ATG; 在结构基因的3端添加了2个终止密码TAA<sup>[5]</sup>, 并设计了Sac I限制性内切酶位点, 这样序列全长 $135\ \text{bp}$ , 见图1。

### 2.2 基因合成

采用重叠区扩增法合成, 基本流程见图2。

\* [收稿日期] 2001-09-17

[基金项目] 北京市科委合同项目(855130400)

[作者简介] 桑春果(1970-), 女, 河北定州人, 讲师, 在读硕士, 主要从事果树生物技术研究。



1	ATTGAAANC	CCTTTNGAGA	ATNCGAGCTC	GGTACCGTAA	TACGACTCAC	TATAGGGCGA
61	CATATGATCG	ATGATATCCC	ATGGGCGGCC	GCCTGCANAC	CAGGTCTTCT	AGAGGATCCA
121	<u>TGAAATGGAA</u>	<u>AGTCTTCAAG</u>	<u>AAAATAGAAA</u>	<u>AAATGGGTCG</u>	<u>CAACATTCGA</u>	<u>AACGGTATTG</u>
181	<u>TCAAGGCTGG</u>	<u>ACCAGCGATC</u>	<u>GCGGTTTTAG</u>	<u>GCGAAGCCAA</u>	<u>AGCGCTAGGA</u>	<u>TAATAAGAGC</u>
241	<u>TCAAGACTGG</u>	AGATCTGGAT	CCCTCGAGTC	TAGAGTCGAC	CTGCAGGCAT	GCAAGCTTGG
301	CGTAATCATG	GTCATAGCTG	TTTCCTG			

图 4 重组质粒测序结果(下划线部分为目的序列)

Fig 4 Sequence results of recombinant plasmid  
(underlined is the interesting fragment)

以上结果表明, 本研究已成功合成抗菌肽 B 基因, 为构建基因的表达载体进一步用于植物抗病基因工程奠定了基础。

### 3 讨论

重叠区扩增法最初是用来在 PCR 产物中间引入突变的一种方法<sup>[6,7]</sup>。作为 DNA 重组的方法, 该方法在缺少内切酶位点的片段中引入突变十分有效, 在 DNA、蛋白质工程方面已有应用的报道<sup>[8-10]</sup>。

目前, 随着 DNA 合成技术的不断进步, 基因合成已经成为获得已知基因的重要手段。基因合成过程中, 常规的方法是利用适宜的酶切位点进行拼接, 或采用点突变的酶切位点进行连接, 然后进行点突变修正, 但这种方法受到如目的基因缺少适宜酶切位点等限制。灵活应用重叠区扩增法可以解决该问题, 本研究用该方法成功获得了抗菌肽 B 基因, 也为应用这一方法进行其他目的基因的合成提供了新的思路。

### [参考文献]

- [1] 赵东红, 戴祝英, 周开亚. 昆虫抗菌肽的功能、作用机理与分子生物学研究新进展[J]. 生物工程进展, 1999, 19(5): 14- 18
- [2] Dan Hulmark, Christensen B, Lockey T, et al. Insect Immunity: Isolation and structure of Cecropin D and four minor antibacterial components from cecropia Pupae[J]. Eur J Biochem, 1982, 127: 207- 217.
- [3] 陈留存, 王金星. 昆虫抗菌肽研究现状[J]. 生物工程进展, 1999, 19(5): 55- 60
- [4] 贾士荣, 屈贤铭, 冯兰香, 等. 转抗菌肽基因提高马铃薯对青枯病的抗性[J]. 中国农业科学, 1998, 31(3): 5- 12
- [5] 徐 飞, 施 文, 王启松, 等. 柞蚕抗菌肽 D 基因的合成[J]. 科学通报, 1988, (21): 1656- 1659.
- [6] Higuchi R, Krummel B, Saiki R. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interaction[J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16: 7351- 7367.
- [7] Ho S, Hunt H, Horton R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction[J]. Gene, 1989, 77: 51- 59.
- [8] Horton R, Hunt H, Ho S. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension[J]. Gene, 1989, 77: 61- 68.
- [9] Davis G, Bedzyk W, Voss E. Single chain antibody encoding genes: one step construction and expression in eukaryotic cells[J]. Bio/technology, 1991, 9: 165- 169.
- [10] Kain K, Orlandi P, Lanar D. Universal promoter for gene expression without cloning: expression PCR[J]. Bio/techniques, 1991, 10: 36

## Synthesis and cloning of antibacterial peptide B (*cecropin B*) gene by overlap extension

SANG Chun-guo<sup>1</sup>, ZHANG Kai-chun<sup>2</sup>, ZHANG Jun-ke<sup>1</sup>

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Pomology and Forestry, Beijing Academy of Agriculture and Forestry, Beijing 100093, China)

**Abstract:** Designed and synthesised 4 fragments of antibacterial peptide B gene, then these fragments were combined into one expected fragment by the method of gene splicing by overlap extension (gene SOEing). The interested fragment was cloned and sequenced and showed a good result as expected

**Key words:** gene splicing by overlap extension; antibacterial peptide; gene synthesis; gene cloning