

文章编号: 1000-5862(2012)05-0542-05

# 猪蛔虫抗菌肽 Cecropin p 基因的克隆及其 原核表达载体的构建

高安键, 赵若聪, 罗伟芝, 魏鹏飞, 刘志刚\*

(深圳大学医学院过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060)

**摘要:** 从猪蛔虫提取总 RNA, 反转录成 cDNA 后分别设计引物对 Cecropin 2、Cecropin 3 和 Cecropin 4 基因进行 PCR 扩增, 分别得到带有双酶切位点的目的基因片段. 将目的基因片段与 PMD18 T 载体连接, 转化 Top10 克隆菌, 测序正确后克隆入 pET28a 表达载体, 进行双酶切和测序鉴定. 研究结果表明, 克隆得到的 Cecropin p2、Cecropin p3 和 Cecropin p4 基因均由 225 个碱基组成, 一个编码由 74 个氨基酸残基组成的开放阅读框, 其蛋白相对分子质量约为 8 kD, 等电点分别为 9.86、10.16 和 9.16. 同源性分析结果显示: 克隆所得猪蛔虫 Cecropin p2、Cecropin p3 和 Cecropin p4 与数据库 NCBI 中的猪蛔虫 Cecropin p2、Cecropin p3 和 Cecropin p4 基因同源性均为 100%, 与其它 Cecropin p 基因同源性也较高(>42%). 分子进化树显示, Cecropin p4 的分化出现最早, 其次为 Cecropin p2, Cecropin p1 和 Cecropin p3 分化得最晚. 成功克隆了猪蛔虫 Cecropin 2、Cecropin 3 和 Cecropin 4 基因, 构建了它们的原核表达载体并进行了生物信息学分析, 为其重组表达和抑菌活性鉴定等研究奠定了理论基础.

**关键词:** 猪蛔虫; Cecropin 2; Cecropin 3; Cecropin 4; 载体构建; 序列分析

**中图分类号:** Q 78

**文献标志码:** A

## 0 引言

抗菌肽是一种广泛分布于生物界的小分子抗菌活性多肽, 在依赖非获得性免疫的低等生物机体防御中发挥着极为重要的作用<sup>[1]</sup>. 通过其特殊的作用方式, 抗菌肽具有高效和广谱的抑菌活性以及低耐药性<sup>[2]</sup>, 因此具有代替传统抗生素, 成为新一代抗菌产品及药物的发展潜力.

Cecropin 是在天蚕中被发现的抗菌肽, 故被称为天蚕素<sup>[1]</sup>. 至今已发现 30 多种 Cecropin 家族抗菌肽, 其中以在昆虫中发现居多. Cecropin 具有较强的抗菌活性和较广的抑菌谱<sup>[3-4]</sup>, 并对真核细胞毒性很低<sup>[5]</sup>. 本实验从猪肠道蛔虫中成功克隆了 Cecropin p2、Cecropin p3、Cecropin p4 基因, 并对它们的基因序列进行了分析, 构建了 Cecropin-pET28a 原核表达载体, 为后续抗菌肽的表达奠定了基础, 并有助于进一步的理论研究以及在畜牧养殖业中的应用.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

猪蛔虫(取于深圳市南山区肉联屠宰场); RNA 提取试剂盒购于 Qiagen 公司; AMV First Strand cDNA Synthesis Kit 购于 BBI 公司; T 载体、Taq 酶、限制性内切酶 EcoRI、Xho I、BamHI 和 HindIII、T4 DNA 连接酶均购于 Takara 公司; 质粒 DNA 提取试剂盒和 DNA 胶纯化试剂盒购于 OMEGA 公司; 原核表达载体 pET-28a 为 Invitrogen 公司产品.

### 1.2 方法

1.2.1 Cecropin p2、Cecropin p3 编码基因的获得 由 NCBI 搜索 Cecropin 基因序列, 根据其保守序列设计带有双酶切位点的引物, 送上海生工合成:

Cecropin p2:

Forward Primer5' cggatccatgattttcatatatctgttg3',

Reverse Primer5' gaagctttagattgttcttgactga3';

Cecropin p3:

收稿日期: 2012-04-01

基金项目: 国家“863”计划(2006AA100308), 深圳大学创新科研团队基金(200904)和深圳市重点实验室组建(SW201110010)资助项目.

作者简介: 刘志刚(1959-), 男, 江西南昌人, 教授, 博士生导师, 主要从事免疫学和分子生物学研究.

Forward Primer 5' cgaattcatgtttctcatgtatctgtt 3',  
Reverse Primer 5' gctcgagttataattgttcccgtac 3';  
Cecropin p4:

Forward Primer 5' cgaattcatgtttctcatgtatctgtt 3',  
Reverse Primer 5' gctcgagttataattgttcccgtac 3'.

取猪蛔虫 1 g 于液氮中充分研磨, 称取大约 100 mg, 转入 RNase Free 离心管中, 按照 Qiagen 公司试剂盒说明书进行提取. 采用 BBI 公司 AMV First Strand cDNA Synthesis Kit, 以总 RNA 为模板进行逆转录合成第 1 链. 分别加入上述引物 PCR 后回收纯化的产物, 并分别与 T 载体进行连接, 再将 T 载体转入到 *E. coli* Top 10 菌中克隆并测序.

1.2.2 Cecropin p2、Cecropin p3 和 Cecropin p4 基因序列分析 (1) 氨基酸序列的推导和分子量、等电点预测: 推导测序所得序列的相应氨基酸序列, 并对该氨基酸序列的等电点和相对分子质量利用在线程序 Compute pI/Mw tool(<http://www.expasy.org/tools/pi-t001.html>)进行评估. (2) 同源性分析: 将克隆得到的氨基酸序列与 NCBI 数据库中的 Cecropin 抗菌肽氨基酸序列进行同源分析比对. (3) 分子进化树分析: 利用 NCBI 在线程序 Cobalt 构建上述 Cecropin 抗菌肽的分子进化树.

1.2.3 Cecropin p2、Cecropin p3 基因原核表达载体的构建 提取阳性菌落质粒, 所得质粒与原核表达载体分别进行双酶切(Cecropin p2 酶切位点为 BamHI 和 HindIII, Cecropin p3 为 EcoRI 和 XhoI), 并分别将获得的基因片段与 pET28(a)的酶切产物连接, 构建重组表达质粒. 以重组质粒转化大肠杆菌 Top10, 菌落 PCR 鉴定, 提取阳性质粒, 分别进行双酶切分析, 阳性克隆进行测序鉴定.

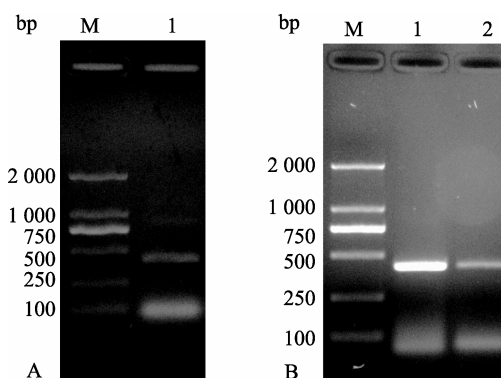
## 2 结果

### 2.1 猪蛔虫 Cecropin 4 基因的克隆

提取的猪蛔虫总 RNA 经反转录合成 cDNA 第 1 链, 然后以此为模板, 用引物进行 PCR 扩增, 扩增的产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 1.

### 2.2 序列分析与同源性分析

克隆得到的 Cecropin p2、Cecropin p3、Cecropin p4 基因均由 225 个碱基组成, 一个编码由 74 个氨基酸残基组成的开放阅读框, 其蛋白相对分子质量约为 8 kD, 等电点分别为 9.86、10.16 和 9.16(见图 2).



A-Lane M: DNA Standard Markers(DL2 000 ladder); Lane 1: RT-PCR amplification with Cecropin p2;

B-Lane M: DNA Standard Markers(DL2 000 ladder); Lane 1: RT-PCR amplification with Cecropin p3; Lane 2: RT-PCR amplification with Cecropin p4.

图 1 PCR 扩增产物琼脂糖电泳检测

同源性分析显示(见图 3): 本次实验得到的猪蛔虫 Cecropin p2 与 NCBI 中猪蛔虫 Cecropin p2 (ADY47515.1、Q5H7N6.1)同源性为 100%, 与 Cecropin p1(ADY49365.1、P14661.2)同源性为 74%, 与 Cecropin p3(Q5H7N5.1)同源性为 69%, 与 Cecropin p4(Q5H7N4.1、ADY49690.1)同源性分别为 65%、42%. 克隆得到的猪蛔虫 Cecropin p3 与 NCBI 中的猪蛔虫 Cecropin p3(Q5H7N5.1)同源性为 100%, 与 Cecropin p2 (ADY47515.1、Q5H7N6.1)同源性为 69%, 与 Cecropin p1 (ADY49365.1、P14661.2)同源性为 85%, 与 Cecropin p4(Q5H7N4.1)同源性为 67%. 克隆所得的猪蛔虫 Cecropin p4 与 NCBI 中猪蛔虫 Cecropin p4(Q5H7N4.1、ADY49690.1)同源性分别为 100%、88%, 与 Cecropin p1(ADY49365.1、P14661.2)同源性均为 67%, 与 Cecropin p2(Q5H7N6.1、ADY47515.1)同源性均为 65%, 与 Cecropin p3(Q5H7N5.1)同源性均为 67%.

分子进化树显示, Cecropin p1、Cecropin p2、Cecropin p3 汇聚成一大枝, 而 Cecropin p4 则自成一枝. 其中, Cecropin p1、Cecropin p3 又汇聚成一小枝. 提示 Cecropin p4 的分化出现最早, 其次为 Cecropin p2, Cecropin p1 和 Cecropin p3 的分化最晚(见图 4).

### 2.3 原核表达载体的构建及鉴定

经测序无误后, 将 2 种 PMD18 载体分别进行双酶切, 琼脂糖电泳分离回收后与分别同样经过双酶切的 pET-28a 载体进行 16 °C、15 h 连接, 从而构建出 Cecropin- pET-28a 重组表达载体. 转化大肠杆菌 Top10 克隆菌, 氨苄青霉素筛选后提质粒, 双酶切鉴定(见图 5), 阳性克隆进行测序鉴定.

Cecropin p2	1	atgattttcatatatotgttggtgcaaacgcggaagcagttggtcagcaaaacctac	60
		M I F I Y L L V Q T A E S S W L S K T Y	
Cecropin p2	61	aagaaactcgagaactcagcaaaaagcgcatctcagaaggcattgctatgccatac	120
		K K L E N S A K K R I S E G I A I A I Q	
Cecropin p2	121	ggtggtcgcggtgagtggttgcgtggtgcagcaggacagatttccacgcctcgag	180
		G G P R R R R F V V Q Q D T I S P R L E	
Cecropin p2	181	gtagacgagcgtcttctgcgaactcagtgcaagaacaaatctaa	225
		V D E R F L P N S V Q E Q I *	
Cecropin p3	1	atgttctcatatacctgttggtgcaaacgcgagaagcagtggtcagcaaaacgcc	60
		M F L I Y L L V Q T A E S S W L S K T A	
Cecropin p3	61	aagaaacttgagaactcagcaaaagcgcattctcgaaggcattgctatgccataag	120
		K K L E N S A K K R I S E G I A I A I K	
Cecropin p3	121	ggtggtcgcgagcagcgcggttcggttgagaggaggacgcgataccttcacattag	180
		G G S R R R R S V G E E D A I P S H I E	
Cecropin p3	181	gtgaataaattcttctgcgcaaacgcaggaaggaacacataaa	225
		V N K F F L R K P A K E H I *	
Cecropin p4	1	atgtttctcatgtatctgttggtgcaaacgcagaaagcagtggtcagcaaaacatac	60
		M F L M Y L L V Q T T E S S W L S K T Y	
Cecropin p4	61	aagaagctggagaactcggcaagaaagcgcattctcgaaggctgtgcaatgcatactg	120
		K K L E N S A K K R I S E G V A I A I L	
Cecropin p4	121	ggcggttgcgtcatcgtgcgtcagtggtgcaccaggaagaagcaccctacacgttaag	180
		G G L R H R R S V A H Q E E A S L H V K	
Cecropin p4	181	acggacgagcttcttcgcggatacagtaagggaacaattataa	225
		T D E L P S P D T V R E Q L *	

图 2 Cecropin p2、Cecropin p3、Cecropin p4 基因序列及成熟肽氨基酸推导序列

	10	20	30	40	50	60	70	80
Cecropin p2	.....	..	..	..	..	..	..	..
Cecropin p3	.....	..	..	..	..	..	..	..
Cecropin p4	.....	..	..	..	..	..	..	..
ADY49690.1	.....	..	..	..	..	..	..	..
Q5H7N4.1	.....	..	..	..	..	..	..	..
Q5H7N5.1	.....	..	..	..	..	..	..	..
P14661.2	.....	..	..	..	..	..	..	..
ADY49365.1	.....	..	..	..	..	..	..	..
Q5H7M6.1	.....	..	..	..	..	..	..	..
ADY47515.1	.....	..	..	..	..	..	..	..

图 3 Cecropin p2、Cecropin p3、Cecropin p4 基因与 NCBI 中猪蛔虫 Cecropin 基因同源性分析

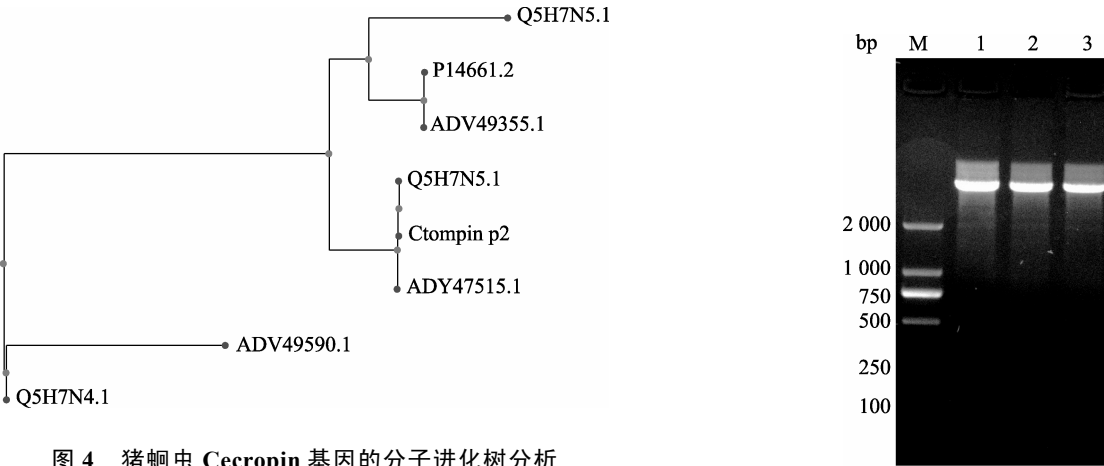


图 4 猪蛔虫 Cecropin 基因的分子进化树分析

3 讨论

目前，抗生素已在畜牧养殖业中发挥了极为重要的作用，通过减少牲畜受到病菌感染，抗生素能够促

M: DL2000 DNA Marker; Lane 1: the gene of cecropin p2; Lane 2: the gene of cecropin p3; Lane 3: the gene of cecropin p4.

图 5 cecropin-pET28a 双酶切鉴定  
进牲畜生长，降低死亡率，提高经济效益。但随着抗生素的滥用及随之而来的大量耐药性菌种的产生，使养殖业的抗感染治疗陷入了危机，且大量抗生

素在牲畜体内聚集可通过食物链对人体健康造成潜在的危害。抗菌肽作为生物体固有免疫防御体系中的一个重要环节,能够高效杀伤病菌,对抗感染。更令人惊喜的是真菌、细菌对抗菌肽的耐药性很低<sup>[9]</sup>,因此抗菌肽符合新一代抗菌制剂的要求<sup>[10-11]</sup>。作为生物活性多肽类物质,抗菌肽难以被化学合成,现在主要依靠基因工程的方法将外源抗菌肽基因转入宿主菌进行表达<sup>[12]</sup>。

猪蛔虫(*Ascaris suum*)是寄生于猪体内的线虫类寄生虫,长度可达40 cm,不能够在人体内生存。它寄生在猪的肠道内,不仅可以抵抗水解酶环境以及宿主的免疫攻击,还能抵抗宿主肠道微生物的侵袭。后来证明抗菌肽在其中扮演重要角色。Cecropin 家族抗菌肽热稳定性好、抗菌活性高,微摩尔级别的浓度就可以发挥作用<sup>[13]</sup>,已被证明对大多数革兰氏阴性细菌、真菌具有抑制作用<sup>[14]</sup>。国内已经有学者对猪蛔虫 Cecropin p1 抗菌肽进行了克隆表达<sup>[15]</sup>,而对于猪蛔虫抗菌肽 Cecropin p2、Cecropin p3 和 Cecropin p4 方面的研究暂无报道。因此,本实验以猪肠道蛔虫作为研究材料,从猪蛔虫提取总 RNA,利用分子生物学的方法分别克隆了猪蛔虫抗菌肽 Cecropin p2、Cecropin p3 和 Cecropin p4,经测序鉴定,证明成功克隆了猪蛔虫抗菌肽 Cecropin p 基因。通过生物信息学分析,本研究克隆得到的 Cecropin p2、Cecropin p3 和 Cecropin p4 基因均由225个碱基组成,编码74个氨基酸,其蛋白相对分子质量均约为8 kD,等电点分别为9.86、10.16和9.16。同源性分析结果显示:克隆所得猪蛔虫 Cecropin p2 与数据库 NCBI 中的猪蛔虫 Cecropin p2 同源性为100%,与 Cecropin p1 同源性为74%,与 Cecropin p3 同源性为69%,与 Cecropin p4 同源性分别为65%、42%。克隆得到的猪蛔虫 Cecropin p3 与 NCBI 中的猪蛔虫 Cecropin p3 同源性为100%,与 Cecropin p2 同源性为69%,与 Cecropin p1 同源性为85%,与 Cecropin p4 同源性为67%。克隆所得的猪蛔虫 Cecropin p4 与 NCBI 中猪蛔虫 Cecropin p4 同源性分别为100%、

88%,与 Cecropin p1 同源性为67%,与 Cecropin p2 同源性为65%,与 Cecropin p3 同源性为67%。以上信息进一步证明此研究所得所有克隆均为 Cecropin p 抗菌肽基因。分子进化树显示, Cecropin p1、Cecropin p2、Cecropin p3 汇聚成一大枝,而 Cecropin p4 则自成一枝。其中, Cecropin p1、Cecropin p3 又汇聚成一小枝。提示 Cecropin p4 的分化出现最早,其次为 Cecropin p2, Cecropin p1 和 Cecropin p3 的分化最晚。此外,本研究将猪蛔虫抗菌肽 Cecropin p3 个基因分别连入原核表达载体 pET-28a,经酶切和测序双重鉴定,证实成功构建了猪蛔虫抗菌肽 Cecropin p 基因的原核表达载体。为后续的猪蛔虫抗菌肽 Cecropin p 基因的表达、纯化和功能研究奠定了基础,也为畜牧养殖业的实际生产问题提供了有利的理论依据。

## 4 参考文献

- [1] Boman H G. Antibactericidal peptides: key components needed in immunity [J]. *Cell*, 1991, 65: 205-207.
- [2] Jaynes J. Lytic peptides, A magic bullet? [J]. *J Biotechnology News*, 1990, 10(1): 8-10.
- [3] Gabay J E. Ubiquitous natural antibiotics [J]. *Science*, 1994, 264(5157): 373-374.
- [4] Steiner H, Hultmark D, Engström A, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity [J]. *Nature*, 1981, 292: 246-248.
- [5] Hancock R E, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics [J]. *Trends Biotechnol*, 1998, 16(2): 82-88.
- [6] Shin S Y, Kang J H, Jang S Y, et al. Effects of the hinge region of cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12), a synthetic antimicrobial peptide, on liposomes, bacterial and tumor cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1463(2): 209-218.
- [7] Yedery R D, Reddy K V. Antimicrobial peptides as microbicidal contraceptives: prophylactics for prophylactics [J]. *Eur J Contracept Reprod Health Care*, 2005, 10(1): 32-42.
- [8] Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides an overview [J]. *Biopolymers*, 1998, 47(6): 415-433.
- [9] Zasloff M. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity [J]. *Curr Opin Immunol*, 1992, 4(1): 3-7.

- [10] 马卫明, 余锐萍, 彭芳珍, 等. 猪肠道组织中抗菌肽类物质的分离提取及部分生物学活性研究 [J]. 科学技术与工程, 2004, 4(3): 202-205.
- [11] 马卫明, 余锐萍, 胡艳欣, 等. 猪小肠抗菌肽对雏鸡的促生长作用及其机理初探 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(8): 1723-1728.
- [12] 罗伟芝, 符春荣, 邬玉兰, 等. 罗氏沼虾原肌球蛋白基因的克隆表达及变应原性鉴定 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2012, 36(4): 425-430.
- [13] Delucca A J, Bland J M, Jacks T J, et al. Fungicidal activity of cecropin A [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(2): 481-483.
- [14] Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, et al. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupa of *Hyalophora cecropina* [J]. Eur J Biochem, 1980, 106(1): 7-16.
- [15] 崔勇, 仲维霞, 孔凡红, 等. 蛔虫抗菌肽 Cecropin P1 基因在大肠埃希菌 BL21(DE3)中的表达 [J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(7): 532-551.

## The Cloning and the Construction of Expression Vector of Cecropin p from *Ascaris Suum*

GAO An-jian, ZHAO Ruo-cong, LUO Wei-zhi, WEI Peng-fei, LIU Zhi-gang\*

(Institute of Allergy and Immunology, Shenzhen University, Shenzhen Guangdong 518060, China)

**Abstract:** Extracted the RNA from *Ascaris suum* and reverse-transcribed into cDNA. Ran PCR amplification and linked to PMD18 T vector, then transformed into *E.coli* Top10 and went on sequencing. cloned the gene into pET28a expression vector and made Restriction enzymes digestion analysis. The sequencing showed the cloned Cecropin 2, Cecropin 3, Cecropin 4 genes from *Ascaris suum* all contain 225 bp encoding an open reading frame of 74 amino acids with the deduced molecular weight around 8 kD and the isoelectric point 9.86、10.16、9.16 respectively. homology analysis indicated All 3 genes are of high homology with the sequences of corresponding Cecropin p genes registered on NCBI, and the differentiation of Cecropin p4 preceded that of the others showed by phylogenic tree. The genes of Cecropin2, Cecropin3 and Cecropin4 were cloned successfully, expression vectors were constructed and the sequence analysis including Homological analysis, phylogenic tree were done, all of these has paved the way for the protein expression and the test of antimicrobial activities.

**Key words:** *ascaris suum*; Cecropin p2; Cecropin p3; Cecropin p4; cloning

(责任编辑: 刘显亮)