

抗菌肽 Lactoferricin 表达载体 pG-Lfn 的构建

李铁晶¹, 李景鹏¹, 周东坡^{2,*}

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030 2. 黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: Lactoferricin 是一种天然抗菌肽。本实验进行了 Lactoferricin 基因的 PCR 合成, 将其引入质粒 pGEX-6p-1, 转化 *E. coli* JM-109, 并进行 PCR 鉴定、酶切鉴定及测序, 成功构建了 Lactoferricin 基因表达载体 pG-Lfn。

关键词: Lactoferricin; 抗菌肽; 表达载体

Construction of Expressing Vector pG-Lfn of Antimicrobial Peptide Lactoferricin

LI Tie-jing¹, LI Jing-peng¹, ZHOU Dong-po^{2,*}

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

2. College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150030, China)

Abstract: Lactoferricin is a kind of natural antibacterial peptide. In this study, the gene of Lactoferricin was synthesized with PCR, and was linked with the plasmid of pGEX-6p-1, then transformed into *E. coli* JM-109. The identifications of PCR, enzymical digestion and sequencing were carried out, and the expressing vector of pG-Lfn was successfully constructed.

Key words Lactoferricin; antimicrobial peptide; expressing vector

中图分类号: Q782

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0286-05

Lactoferricin (乳铁素, Lfn) 是来自于乳铁蛋白 (lactoferrin, LF) 水解物的一种生物活性抗菌肽^[1-2]。大量研究表明 LF 和 Lfn 是多功能的蛋白质, 它们最突出的特点是天然抗菌^[3-5]。天然 LF 是一种珍贵的活性蛋白, 其分离纯化步骤繁琐, 牛 Lfn 可由 LF 水解制得。随着多肽化学合成技术日趋完善, 利用多肽自动合成仪可以准确合成一定氨基酸顺序的多肽, 但该方法合成的 Lfn 价格十分昂贵, 仅适用于实验室的小量制备。因此利用基因工程技术生产 Lfn 将具有广阔的应用前景。本实验利用 PCR 引物合成 Lactoferricin 基因, 并构建了 pG-Lfn 表达载体, 为 Lfn 基因在大肠杆菌中的表达作准备。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

菌株 *E. coli* JM-109 和质粒 pGEX-6p-1 由东北农业大学黑龙江省生命科学与生物技术重点实验室惠赠。

1.2 工具酶和试剂盒

限制性内切酶、DNA Marker、抗生素等 大连宝生物工程有限公司; T4 DNA 连接酶、Wizard Plus Minipreps DNA Purification 试剂盒 Promega 公司; 小量胶回收试剂盒 上海华舜生物工程有限公司。

1.3 引物的设计

根据 GenBank 上乳铁蛋白 N 端 13~41 残基的核苷酸序列, 应用 Primer Premier 5.0 及 Olig4.1 引物设计软件设计出两条存在互补序列的寡核苷酸引物 P1 和 P2。在两条引物的相应位置分别设计限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切位点。设计的引物序列如下:

P1 (62bp) 5' *Bam*HI

TCGC GGATCC ATCGAAGGTCGTTTCAAATGCC
GCCGTTGGCAGTGGCG TATGAAAAAACTGG 3'

P2 (60bp) 3'

ATACTTTTGTGACC CACGCGGCAGATAATGG
ACGCACGCAGCGCGCAAGATT C TAAGGC 5'

*Eco*RI

表示两条引物之间互补的部分; 表示酶切位点; 粗斜体部分表示碱基保护序列。引物合成由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.4 Lfn 基因的合成

根据文献[6], 以合成的寡核苷酸引物 P1 和 P2 的 3' 末端短互补序列退火形成小段双链, 从而互为模板, 通过 PCR 反应合成长 108bp 的基因序列——Lfn。具体操作为: 将合成的寡核苷酸引物, 配制成浓度为 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的引物工作液, 之后在 PCR 仪上完成引导合成。PCR 反应体系和反应条件如下:

收稿日期: 2006-05-30

*通讯作者

作者简介: 李铁晶 (1973-), 女, 副教授, 博士, 研究方向食品微生物及食品安全。

PCR 反应体系:

10×PCR Buffer	2.0μl
dNTP	2.0μl
Taq	1.0μl
P1	1.0μl
P2	1.0μl
ad. ddH ₂ O to	20.0μl

PCR 反应条件:

94℃	5min	
↓		
70℃	30s	} 1次循环
↓		
30℃	30s	
↓		
37℃	30s	} 20次循环
↓		
70℃	60s	
↓		
94℃	30s	} 30次循环
↓		
60℃	30s	
↓		
72℃	60s	} 30次循环
↓		
72℃	5min	
↓		
4℃	30min	

PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像系统记录电泳结果。

1.5 表达载体 pG-Lfn 的构建

对上述 PCR 产物用 1.5% 低熔点琼脂糖凝胶电泳后进行目的片段的回收, 参考上海华舜生物工程有限公司胶回收试剂盒说明进行。回收产物以 *Bam*HI 酶切、回收; 再用 *Eco*RI 酶切并回收。同时将空原核表达载体 pGEX-6p-1 质粒 DNA, 先以 *Bam*HI 单酶切, 37℃ 反应 3h 后, 用预冷的无水乙醇沉淀, 12000r/min 离心 10min, 真空吸干, 之后对 *Bam*HI 酶切产物用 *Eco*RI 酶切, 回收约 4900bp 长度的片段。

将上述两部分双酶切产物以 T₄DNA 连接酶连接。连接反应的体系和条件如下:

Ligase Buffer	4.0μl
约 110bp 长度的片段	5.0μl
约 4900bp 长度的片段	28.0μl
T ₄ DNA Ligase	3.0μl
ad. ddH ₂ O to	40.0μl

连接体系于 14℃ 下连接过夜。连接产物命名为 pG-Lfn, 之后转化 *E. coli* JM-109 感受态细胞。

1.6 表达载体 pG-Lfn 的鉴定

对筛选得到的阳性菌落扩大培养, 并提取质粒进行鉴定。

1.6.1 表达载体 pG-Lfn 的 PCR 鉴定

以回收质粒 DNA 为模板, 以特异引物 P1、P2 通过 PCR 方法对其进行鉴定。PCR 反应体系和反应条件如下, PCR 产物以 2% 琼脂糖电泳分析, 凝胶成像仪记录电泳结果。

PCR 反应体系:

10×PCR Buffer	2.5μl
dNTP	2.0μl
Taq	0.2μl
T-Lfn	0.5μl
P1	0.5μl
P2	0.5μl
ad. ddH ₂ O to	20.0μl

PCR 反应条件:

94℃	5min	
↓		
94℃	30s	} 30次循环
↓		
65℃	30s	
↓		
72℃	1min	} 30次循环
↓		
72℃	8min	
↓		
4℃	30min	

1.6.2 表达载体 pG-Lfn 的酶切鉴定

以 *Bam*HI 和 *Eco*RI 对表达载体 Lfn- pGEX-6p-1 和空表达载体 pGEX-6p-1 分别双酶切, 进行比较鉴定。酶切反应体系如下:

Buffer K	2.0μl
Lfn- pGEX-6p-1	1.0μl
<i>Bam</i> HI	0.5μl
<i>Eco</i> RI	0.5μl
ad. ddH ₂ O to	20.0μl

37℃ 反应 3h 后, 以 2% 琼脂糖凝胶电泳检验, 凝胶成像仪记录电泳结果。

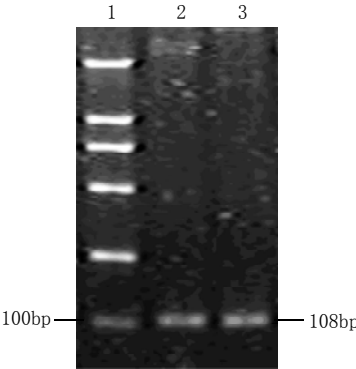
1.6.3 表达载体 pG-Lfn 的测序鉴定

由上海博亚生物技术有限公司测序, 验证 PCR 和酶切鉴定结果。

2 结果与分析

2.1 Lfn 基因 PCR 合成的鉴定

PCR 合成的产物电泳结果如图 1 所示。图 1 表明：PCR 产物大约在 108bp 处左右，可以初步证明已获得 Lfn 基因。



1. DNA 标准分子量 DL2000 (2、1、0.75、0.5、0.25、0.1kb)；2、3. LFN。

图 1 LFN 基因 PCR 合成的电泳鉴定结果
Fig.1 Identify of LFN gene after PCR synthesization

2.2 表达载体 pG-Lfn (Lfn-pGEX-6p-1) 的 PCR 鉴定

PCR 产物的电泳结果如图 2。图 2 表明：在 108bp 附近有特异性条带被扩增，证明 Lfn 基因已经成功插入到空表达载体 pGEX-6p-1 中。

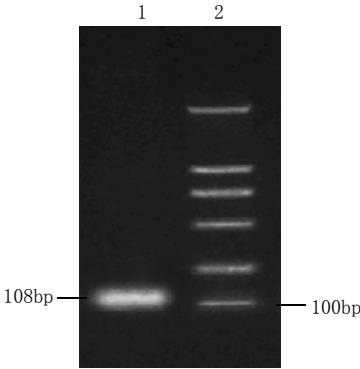
2.3 表达载体 pG-Lfn 的酶切鉴定

酶切鉴定结果如图 3。图 3 表明：从克隆载体 T-Lfn 经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切切下的 Lfn 基因 (约 108bp) 已经成功插入空表达载体 pGEX-6p-1 中。

2.4 表达载体 pG-Lfn 的测序鉴定

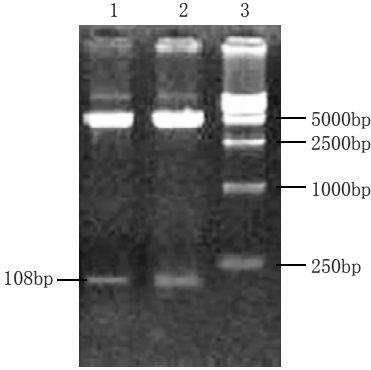
1	CTGGAAGTTC	TGTTCCAGGG	GCCCCTGGGA	TCCATCGAAG	GTCGTTTCAA	ATGCCGCCGT
61	TGGCAGTGCC	GTATGAAAAA	ACTGGGTGCG	CCGTCTATTA	CCTGCGTGCG	TCGCGCGTTC
121	TAAGAATTCC	CGGGTCGACT	CGAGCGGCCG	CATCGTGACT	GACTGACGAT	CTGCCTCGCG
181	CGTTTCGGTG	ATGACGGTGA	AAACCTCTGA	CACATGCAGC	TCCCGGAGAC	GGTCACAGCT
241	TGCTCTGTAAG	CGGATGCCGG	GAGCAGACAA	GCCCGTCAGG	GCGCGTCAGC	GGGTGTTGGC
301	GGGTGTCGGG	GCGCAGCCAT	GACCCAGTCA	CGTAGCGATA	GCGGAGTGTA	TAATTCTTGA
361	AGACGAAAGG	GCCTCGTGAT	ACGCCTATTT	TTATAGGTTA	ATGTCATGAT	AATAATGGTT
421	TCTTAGACGT	CAGGTGGCAC	TTTTCGGGGA	AATGTGCGCG	GAACCCCTAT	TTGTTTATTT
481	TTCTAAATAC	ATTCAAATAT	GTATCCGCTC	ATGAGACAAT	AACCCTGATA	AATGCTTCAA
541	TAATATTGAA	AAAGGAAGAG	TATGAGTATT	CAACATTTCC	GTGTCGCCCT	TATTCCCTTT
601	TTTGCGGCAT	TTTGCCCTTCC	TGTTTTTGCT	CACCCAGAAA	CGCTGGTGAA	AGTAAAAGAT
661	GCTGAAGATC	AGTTGGGTGC	ACGAGTGGGT	TACATCGAAC	TGGATCTCAA	CAGCGGTAAG
721	ATCCTTGAGA	GTTTTTCGCC	CGAAGAACGT	TTTCCAATGA	TGAGCACTTT	TAAAGTTCTG
781	CTATGTGGCG	CGGTATTATC	CCGTGTTGAC	GCCGGGCAAG	AGCAACTCGG	TCGCCGCATA
841	CACTATTCTC	AGAATGACTT	GGTTGAGTAC	TCACCAGTCA	CAGAAAAGCA	TCTTACGGAT
901	GGCATGACAG	TAAGAGAATT	ATGCAGTGCT	GCCATAACCA	TGAGTGATAA	CACTGCGGAC
961	CAACTTACTT	CTGACACGAT	CGGAGGACCG	AAGGAGCTAA	CCGCTTTTTT	GCACACATGG
1021	GGGATCATGT	ACTCGCCTTG	ATCGTGGCAC	CGGAGCTGAT	GAGCATACAA	CGACGAGCGT
1081	GACACACGAT	GCTGCAGCAT	GCACACGTGC	GCAACTATTA	CCTGCGACTA	CTACCTAGCT
1141	CGCACAATAA	ATAACTGATG	GAGCGATAAG	GTTGCAGGAC	CCTTCTGGGC	TCGGTCT

图 4 表达载体 pG-Lfn 测序结果
Fig.4 Sequencing result of expressing vector pG-Lfn



1. PGLFN 表达产物；2. DNA 标准分子量 DL2000。

图 2 pG-Lfn 的 PCR 鉴定结果
Fig.2 Identification of pG-Lfn by PCR



1、2. PGLFN 的 *Bam*HI/*Eco*RI 酶切产物；3. DNA 标准分子量 DL15000 (15、10、7.5、5、2.5、1.0、0.25kb)。

图 3 pG-Lfn *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切鉴定
Fig.3 Identification of restrict product of pGLFN by *Eco*RI

经 PCR 鉴定、酶切鉴定均为阳性的重组子，进行

测序结果如图4,与预计插入的序列完全吻合。表达载体 pG-Lfn 的测序图谱图5。

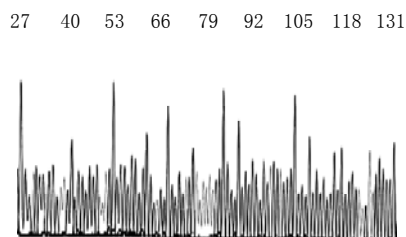


图5 表达载体 pG-Lfn 的测序图谱

Fig.5 Sequencing map of expressing vector pG-Lfn

3 讨论

3.1 引物的设计

本研究中,目的基因背景清楚,参考基因Bank的基因序列设计,实验中设计了两条3'末端部分互补的引物,使其互为模板通过PCR引导合成出一段基因序列,Lv G S^[7]和Jiang Y J^[8]利用这种方法已经成功的实现了已知序列的小片段DNA的人工合成。这两条引物及合成后基因序列如图6所示。

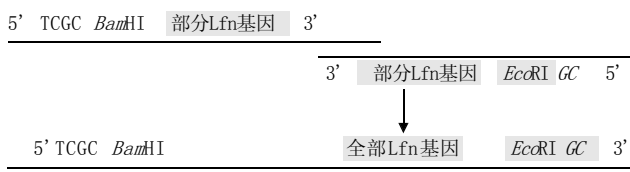


图6 两条引物基因序列示意图

Fig.6 Sketch map of gene sequence of two primers

3.2 碱基保护

由于目的基因引导合成后,需用于酶切而获得具有粘性末端的基因片段,因此在引物设计时,在BamHI和EcoRI两个酶切位点的两侧均设计了与之相应的碱基保护序列,从而保证后续的酶切及连接过程的顺利实现。

3.3 引物的大小

在引物设计时,可以将目的片段分为2段引导合成,也可以将其分成几段进行。本研究中,之所以采用这种通过设计两段互补引物并通过PCR合成目的基因的做法,所合成的引物比合成一段全基因要短,降低了由于合成长序列而容易出现的合成错误,另外也降低了合成费用。同时,作为PCR产物,很容易与T载体连接,从而方便了后续工作^[6]。而目的片段分为几个更小片段,PCR反应合成时,连接获得的产物出错率较高,因此本研究中没有采用。

3.4 目的基因的PCR合成

由于目的基因实际上是由两段具有互补序列的引物

“搭接”而成,且为保证引物的正确性,引物不宜过长,这样引物PCR反应中就出现一些问题,首先引物合成双链的退火温度较低,30℃,而这一温度与引物自身的退火温度接近,容易影响引物的正常“搭接”,并且容易产生引物二聚体。实验过程中,最初多次合成均遭失败,后采用梯度PCR法,确定最佳退火温度。为了增加目标条带的亮度,对PCR反应的条件进行了调整,即首先1个循环“搭接”,其后再次加入引物P1、P2,dNTP及酶升高退火温度,再次进行20个PCR循环。这种PCR试验设计有两大优势,第一,在第一次循环中实现目标产物“搭接”成功,但此时可能有大量的引物二聚体产生而目标产物数量极微;第二,通过再次高温PCR反应,一方面分解了已经形成的引物二聚体,另一方由于P1、P2与目的基因的高度互补性,必定是目的基因进一步扩增,并获得大量产物,而此时容易出现的问题是多次循环有可能在复制过程中出错,但经过基因测序可以防止对后来基因表达产生的影响。

3.5 表达载体 pG-Lfn 的PCR鉴定

PCR鉴定直接利用了两条引物P1、P2,而没有合成新的引物。首先是由于这两条引物具有特异性;同时二者自连和“搭接”只有在较低温度(低于30℃)退火时才可能发生,而两条引物用于PCR鉴定时其退火温度高达60℃,使二者的自连和“搭接”无法实现,因此不必再合成新引物。由于PCR鉴定,可以在后续实验作为PCR引物,进行目的片段的检验鉴定。

3.6 酶切产物的回收

实验中,在回收用于连接的约108bp的小片段(BamHI和EcoRI双酶切产物)时,由于片段太小,遇到了一定困难。通过比较不同的试剂盒,并对试剂盒说明中提供的方法进行了改进,回收得到了可用于连接的目的片段。具体可以总结为以下几点:

3.6.1 缩短热处理时间

酶切的小片段产物宜用低浓度的琼脂糖电泳(<1.5%),带有目的片段的胶块应尽量用物理方法先破碎,再加热熔化;熔化时不必按使用的时间,以胶块完全溶解为准。

3.6.2 减少小片段DNA的扩散

电泳时间不宜过长,10~15min为宜,得到目标谱带即可用于回收;同时,减少含DNA胶块在紫外灯下的暴露时间,既操作迅速也有利于目的基因片段的回收。

3.7 表达系统的选择

影响外源基因在大肠杆菌中表达的因素非常复杂,主要有载体(启动子)和宿主的选择,培养条件的控制,cDNA密码子的使用,mRNA的一级、二级结构和表达产物的后加工处理等^[9];而这些主要取决于表达载体和

宿主细胞的选择^[10]。

原核表达载体要求有一个强的启动子及其两侧的调控序列；要有SD序列；SD序列与起始密码子之间要有合适的距离；在克隆基因与启动子之间要有正确的阅读框架；外源基因下游加入不依赖 ρ 因子的转录终止子区。故选择合适的载体是目的基因得以表达的关键。本研究中表达的目标蛋白是小分子肽，由于在大肠杆菌中外源表达，大肠杆菌自身的酶系统极易使之分解，同时小分子肽又难于分离纯化；另外，表达产物对菌体本身可能产生毒性。因此必须采取融合表达策略，并且兼顾表达产物分离纯化的可行性和毒性的控制。因此本研究中使用pGEX-6p-1构建表达载体。

pGEX-6p-1：谷胱甘肽S-转移酶(GST)系统是表达、纯化和检测大肠杆菌表达外源蛋白的通用系统。它能实现外源基因的融合表达，表达水平较高^[11]。pGEX保留了*E. coli* pBR322的复制起始区域，使用了tac启动子，紧随其后的是sj26的完整序列，但种植密码子被polylinker取代，后面带终止密码子TGA。 β -内酰胺酶基因使之表现出氨苄青霉素抗性，大肠杆菌半乳糖操纵子(即lac操纵子)的片段，包括lac阻遏物基因lacI^q以及部分lacZ。GST系统将GST基因与目的基因融合，其间插入蛋白酶切位点，融合蛋白可以用GST亲和柱进行亲和层析，目标蛋白也可以用特异性的蛋白酶切割下来以获得纯品，分离纯化过程条件温和能保证目的蛋白的活性。同时GST融合表达系统比较适于表达分子量小于100kD的肽分子，表达的产物存在于细胞质中，防止分泌毒性。这些特点均表明GST系统非常适用于表达本研究中的目的蛋白^[12]。GST系统已经成功应用于分子免疫^[13]、疫苗生产^[14-15]、研究蛋白质与蛋白质^[16]以及DNA与蛋白质^[17]的相互作用中。

4 结 论

综合酶切鉴定、PCR鉴定和测序的结果，证明pG-Lfn表达载体构建成功。

参考文献：

- [1] BELLALY W, TAKASE M, WAKABASH K. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin[J]. J Applied Bacteriology, 1992, 73: 472-479.
- [2] ELASS-ROCHARD E. A peptide that show bacterial activity from bovine lactoferrin[J]. Biochem J, 1995, 312: 839-845.
- [3] AZUMAN. The effects of lactoferrin on the proliferation of rat lymphocytic cell lines[J]. Agric Biol Chem, 1989, 53: 31-35.
- [4] ELIASSEN L T, BERGE G, SVEINBJORNSSON B, et al. Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin[J]. Anti-Cancer Res, 2002, 22(5): 2703-2710.
- [5] MAEKAWA T, FUJIIHARA M, OHTSUKI K. Characterization of human lactoferricin as a potent protein kinase CK2 activator regulated by Akinase *in vitro*[J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25(1): 118-121.
- [6] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 100-120.
- [7] LV G S, HUO G C, FU X Y. Expression of milk-derived antihypertensive peptide in *Escherichia coli*[J]. J Dairy Sci, 2003, 86: 1927-1931.
- [8] JIANG Y J, LI Q Z, YAN H B, et al. Gene expression and bioactivity analysis of recombinant Beta-CPP dimer[J]. J Dairy Sci, 2004, 87: 3198-3208.
- [9] 隋广超, 胡美浩. 影响大肠杆菌中外源基因表达的因素[J]. 生物化学与生物物理学研究进展, 1994(2): 128-132.
- [10] 张春涛, 尹红章, 李秀华, 等. 嗜人类T淋巴细胞病毒I型核心蛋白P24基因的克隆与表达[J]. 中国生物制品学杂志, 2002(5): 17-13.
- [11] SMITH D B, JOHNSON K S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase [J]. Gene, 1988, 67(1): 31-40.
- [12] 程希远, 庞建新, 吴曙光, 等. 端粒酶反转录功能区基因的表达和纯化[J]. 遗传, 2002(6): 36-41.
- [13] TOYE B, ZHONG G M, PEELING R, et al. Immunologic characterization of a cloned fragment containing the species-specific epitope from the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*[J]. Infect Immun, 1990, 58(12): 3909-3913.
- [14] FIKRIG E, BARTHOLD S W, KANTOR F S, et al. Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA [J]. Science, 1990, 250: 553-556.
- [15] JOHNSON K H, O'BRIEN T D, BETSHOLTZ C, et al. Islet amyloid, islet-amyloid polypeptide, and diabetes mellitus[J]. The New England Journal of Medicine, 1989, 321(8): 513-518.
- [16] KAELEN J W G, PALLAS D C, DECAPRIO J A, et al. Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retino-blastoma gene product[J]. Cell, 1991, 64(5): 521-532.
- [17] CHITTENDEN T, LIVINGSTON D M, KAELEN W G J. The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein[J]. Cell, 1991, 65(6): 1073-1082.

学位与研究生教育中文重要期刊