DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.036
第25卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 10
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

文章编号:1000-5404(2003)10-0921-02

技术方法

人β防御素-2基因的合成及其真核表达载体的构建

Synthesis of human β defensin-2 gene and construction of its expression vector

雷 撼,钱桂生,黄桂君,吴国明 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 合成人β防御素-2(Human β-defensin-2, hBD-2)基因并构建其真核表达载体,为hBD-2基因的转染和表达奠定基础。方法 根据GenBank中的hBD-2结构基因序列,设计合成了3条长度为82 bp的长寡聚核苷酸引物(H1、H2、H3),用PCR延伸扩增的方法进行全长为211 bp的基因合成;PCR产物经双酶切后,克隆入真核表达载体pLXSN并导入细菌扩增。结果 PCR产物和重组载体经凝胶电泳及测序分析,证实合成的基因与原序列一致,并成功克隆到真核表达载体pLXSN上。结论 用PCR延伸扩增法合成基因,能方便快捷地获得目的基因片段,提高了基因合成的准确性,为基因的转染和表达提供了帮助。

内源性抗生素肽(Endogenous antibiotic peptides,简称抗菌肽)是近年来天然免疫研究的重要进展,其中富含Cys残基的碱性抗菌肽被命名为防御素(Defensin)。防御素有很广的抗菌谱,目前已报道的人防御素共有两类10种,α防御素主要参与全身和小肠的防御功能,β防御素则在保护上皮细胞和粘膜免受感染起着屏障防御作用。研究表明,人β防御素-2(Human β-defensin-2, hBD-2)在肺部粘膜防御上比其他防御素起着更重要的作用[1]。本研究拟通过人工合成hBD-2基因并构建其真核表达载体,为hBD-2基因的转染和表达以及抗菌治疗的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体及宿主菌 真核表达载体pLXSN及质粒扩增宿主细菌-2大肠杆菌X-2blue为我所保存。

1.1.2 试剂及酶 限制性内切酶*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ、T4 DNA连接酶等为美国Sigma公司产品,基因扩增所用PCR试剂、高保真聚合酶及PCR产物纯化试剂盒为Promega公司产品。其它化学试剂为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与基因合成 根据文献GenBank中hBD-2基因的核苷酸序列设计合成出3个PCR引物用于hBD-2基因的合成,大小均为82 bp,编号为H1、H2、H3,在H2的5′端包含起始密码子ATG并引入酶切位点*Eco*RⅠ和2个保护性碱基,在H3的5′端包含终止密码子TGA并引入酶切位点*Bam*HⅠ和2个保护性碱基,以方便基因的克隆和载体构建,然后进行PCR。

H1: 5′-GGT, GTT, TTT, GGT, GGT, ATA, GGC, GAT, CCT, GTT, ACC, TGC, CTT, AAG, AGT, GGA, GCC, ATA, TGT, CAT, CCA, GTC, TTT, TGC, CCT, AGA, AGG, T-23′

H2: 5′-GTG, AAT, TCA, TGA, GGG, TCT, TGT, ATC, TCC, TCT, TCT, CGT, TCC, TCT, TCA, TAT, TCC, TGA, TGC, CTC, TTC, CAG, GTG, TTT, TTG, GTG, GTA, T-23′

H3: 5′AAG, GAT, CCT, CAT, GGC, TTT, TTG, CAG, CAT, TTT, GTT, CCA, GGG, AGA, CCA, CAG, GTG, CCA, ATT, TGT, TTA, TAC, CTT, CTA, GGG, CAA, AAG, A-23′

以上引物合成委托上海基康生物技术有限公司进行合成,并经PAGE纯化。PCR反应在美国MJ公司的PTC-200 DNA扩增仪上进行。反应体积50μl(10× Buffer 5μl、dNTP 40 pmol、H1为10 pmol、H2、H3各100 pmol、高保真聚合酶2单位、加水补足)。反应条件:94 ℃ 45 s; 60 ℃ 30 s; 72 ℃ 40 s, 35个循环;72 ℃延伸5 min。产物用2% agarose凝胶电泳检验。

1.2.2 基因克隆和表达载体构建

1.2.2.1 PCR产物的回收、纯化 先将PCR产物在2%琼脂糖凝胶上行条形梳电泳,切下含目的条带的凝胶,然后用V型槽电泳回收,按照PCR产物纯化试剂盒说明书步骤进行纯化。

1.2.2.2 将纯化的PCR产物、质粒pLXSN用*Eco*RⅠ和*Bam*HⅠ双酶切,然后在T4连接酶作用下进行连接反应以构成真核表达载体pLXSN-2hBD-2,电穿孔法将连接产物转化感受态大肠杆菌X-2blue,接种于含氨苄西林的LB培养板,挑选阳性菌落进行扩增。碱裂解法提取质粒并进行酶切,2% agarose凝胶电泳鉴定。

1.2.3 序列测定 构建载体插入目的基因的测序鉴定由上海基康生物技术有限公司进行序列测定。

2 结果

2.1 基因设计与合成

hBD-2基因编码hBD-2的结构基因全长为195个碱基对,根据该结构基因序列设计了3条引物H1、H2、H3,其中H1与

作者简介:雷 撼(1965—),男,重庆市合川县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事基因转染方面的研究。电话:(023)68755320

收稿日期:2003-01-17;修回日期:2003-04-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

H2、H1 与H3之间均有长度为 17 bp的互补片段，其 PCR 延伸扩增的方法如图 1。

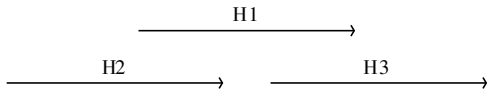
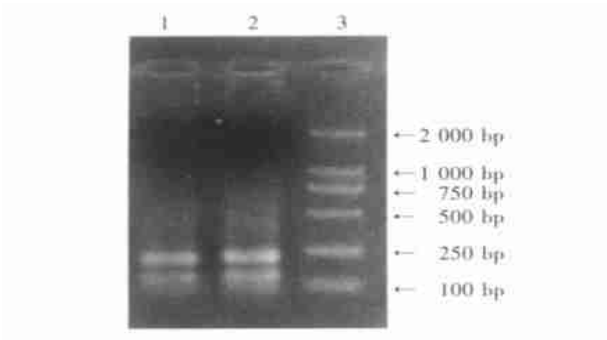


图 1 PCR延伸扩增法合成 hBD-2 基因

PCR 扩增时 3 个引物同时加入，反应从 H1 开始，以 H1 为模板，H3 为引物进行扩增；接着以 H2 为引物，H1 和 H3 的扩增产物作为模板，进行第 2次扩增，这样完成了 PCR 反应的第一循环，获得一个全长的 DNA 双链。经过 35 个循环，就可获得一定量的合成 hBD-2 基因。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳，在大约 211 bp处可见到一条十分明晰的 DNA 带，大小与预计相符合，但在前方也有另一条带，大小在 100 bp 左右，可能是剩余的引物、引物二聚体等，结果见图 2。

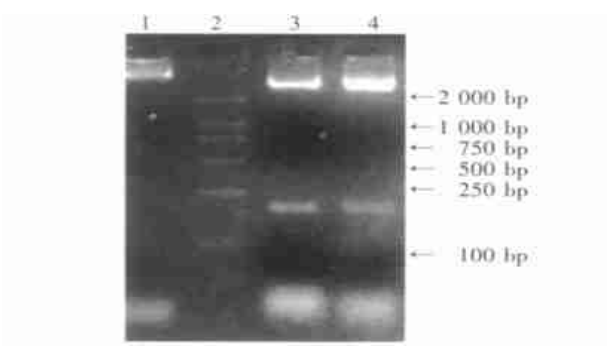


1，2：PCR product；3：DL2000 DNA maker

图 2 PCR产物的电泳分析

2.2 真核表达载体 pLXSN-hBD2 的构建

PCR 基因合成产物用 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶切后，与相同酶切的质粒 pLXSN 载体连接，电穿孔法转化大肠杆菌菌株 X-2blue，筛选出阳性重组质粒并行双酶切鉴定，2% 琼脂糖凝胶电泳显示获得 205 bp 的插入片段，表明已成功构建真核表达载体 pLXSN-2hBD2，见图 3。



1：pLXSN-2hBD-2；2：DL2000 DNA marker；3 4：pLXSN-2hBD-2 digested with *Bam*HⅠ/*Eco*RⅠ

图 3 重组载体 pLXSN-2hBD-2 的酶切结果

2.3 合成的 hBD-2 基因序列测定

抽提阳性质粒进行测序分析，结果与原序列比较显示：合成基因片段与设计的序列完全一致，为 hBD-2 基因。

3 讨论

细菌对传统抗生素的耐药已成为严重的全球性问题，因此，发展新的高科技抗微生物战略势在必行。hBD-2 是 Harder 在 1997 年首先发现的，它广泛表达于包括气管在内的各种粘膜细胞和上皮组织，在治疗粘膜感染特别是呼吸道感染性疾病中具有广泛的应用前景[1~3]。但 hBD-2 在自然条件下表达水平极低或不表达，需要经微生物、前炎症细胞因子诱导才能表达并上调。因此，通过构建 hBD-2 基因的真核表达载体，使机体表达内源性 hBD-2，是发挥其药理性抗菌治疗作用的一个有效途径。

由于 hBD-2 编码蛋白的结构基因比较小，全长为 195 bp，因此用人工合成的方法比较容易得到。以前，在人工合成基因时采用化学方法，不但繁琐，而且核苷酸出现错配的机会也多。本研究采用的是 PCR 延伸扩增法[4]，先设计合成 3 条大的引物，其两端包含起始密码子和终止密码子，并引入与质粒载体相同的酶切位点保护性碱基，3 条引物之间有 17 bp 相互匹配；PCR 扩增时从中间开始，3 条引物互为模板和引物，通过连续的 PCR 反应向两端延伸，使基因合成工作一次性完成。对于合成小的基因来说，该方法经济、简便，核苷酸出现错配的几率大大减少。接下来采用双酶切定向克隆技术构建重组 pLXSN-hBD-2 真核表达载体，经电泳和测序分析，证实目的基因片段插入正确，基因序列与 GenBank 中 hBD-2 的序列完全相同，说明人工合成 hBD-2 基因并构建其重组 pLXSN-hBD-2 真核表达载体成功，可供进一步实验使用。

关键词：人β 防御素-2；基因合成；PCR 延伸扩增方法；真核表达载体

中图法分类号：R394-33 文献标识码：B

参考文献：

[1] Tomita T, Hitomi S, Nagase T. Effect of ions on antibacterial activity of human beta defensin 2[J]. Microbiol Immunol, 2000, 44(9): 749—254.

[2] Harder J, Bartels J, Christophers E. A peptide antibiotic from skin[J]. Nature, 1997, 387(7): 861.

[3] Tsutsumi 2I Y, Nagaoka I. NF-2kappaB-2mediated transcriptional regulation of human beta-2 defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation[J]. J Leukoc Biol, 2002, 71(1): 154—262.

[4] 熊爱生，彭日荷，陈建民，等. 透明颤菌血红蛋白(VHb)基因合成及原核生物中的效应[J]. 上海农业学报，2000，16(3)：19—24

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net