



## 研究报告

### Research Report

# 肝靶向穿膜肽与家蝇天蚕素基因的融合及其分子特征分析

卢雪梅<sup>1,2</sup>, 黄演婷<sup>1,2</sup>, 金小宝<sup>1,2</sup>, 汪洁<sup>1,2</sup>, 朱家勇<sup>1,2</sup>

1 广东药学院药用生物活性物质研究所, 广州, 510006;

2 广东省生物活性药物研究重点实验室, 广州, 510006

✉ 通讯作者: zhujiy@gdpu.edu.cn; ✉ 作者

基因组学与医学生物学, 2012 年, 第 1 卷, 第 3 篇 doi: 10.5376/gmb.cn.2012.01.0003

收稿日期: 2012 年 04 月 02 日

接受日期: 2012 年 05 月 18 日

发表日期: 2012 年 06 月 29 日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2012 年第 31 卷第 3 期第 226-230 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

卢雪梅等, 2012, 肝靶向穿膜肽与家蝇天蚕素基因的融合及其分子特征分析, 基因组学与医学生物学(online) Vol.1 No.3 pp.18-22 (doi: 10.5376/gmb.cn.2012.01.0003)

引用格式(英文):

Lu et al., 2012, Construction and Molecular Characteristics of Fusion Gene HTPP-MDC, Jiyinzuxue Yu Yixue Shengwuxue (online) (Genomics and Medical Biology) Vol.1 No.3 pp.18-22 (doi: 10.5376/gmb.cn.2012.01.0003)

**摘要** 本研究利用改进 SOE-PCR 技术构建肝靶向穿膜肽(HTPP)与家蝇天蚕素(MDC)融合基因并对其分子特征进行了预测和分析。结果表明: 成功融合了 HTPP 与 MDC, 并构建了 HTPP-MDC 融合基因的克隆重组质粒 HTPP-MDC/pMD20-T。PCR 和 *Kpn* I /*Hind* III 双酶切结果显示获得与预期大小一致的基因片段, 测序结果显示获得的基因序列没有发生突变, 与预期完全一致。分子特征分析表明, 该融合基因编码 60 个氨基酸, 分子量为 6 516.2 Da, 理论等电点为 9.31, 二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋、无规则卷曲、延伸链和  $\beta$ -转角组成。研究结果为 HTPP-MDC 后续的功能研究奠定了基础, 同时也为应用 SOE-PCR 技术构建融合基因提供了有益借鉴。

**关键词** 肝靶向穿膜肽; 家蝇天蚕素; SOE-PCR; 分子特征

## Construction and Molecular Characteristics of Fusion Gene HTPP-MDC

Lu Xuemei<sup>1,2</sup>, Huang Yanting<sup>1,2</sup>, Jin Xiaobao<sup>1,2</sup>, Wang Jie<sup>1,2</sup>, Zhu Jiayong<sup>1,2</sup>

1 Institute of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, 510006;

2 Guangdong Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangzhou, 510006

✉ Corresponding author: zhujiy@gdpu.edu.cn; ✉ Authors

**Abstract** A novel fusion gene combining hepatocyte-targeted cell penetrating peptide (HTPP) with *Musca domestica* cecropin (MDC) was constructed by improved SOE-PCR. The molecular characteristics of HTPP-MDC were analyzed with bioinformatics analysis software. The results show that the fusion gene HTPP-MDC and recombinant plasmid HTPP-MDC/pMD20-T were constructed successfully. The results of PCR amplification and restriction endonuclease *Kpn* I /*Hind* III digesting show that the acquired gene fragment is as long as what have been expected. DNA sequencing confirms that the sequence of HTPP-MDC is identified with the sequences of HTPP and MDC reported in GenBank. The analysis of molecular characteristics indicates that HTPP-MDC is cationic molecule containing 60 amino acids with the theoretical PI of 9.31 and the molecular weight of 6 516.2 Da. The second structure of HTPP-MDC contains  $\alpha$ -helix, random coil, extended strand and  $\beta$ -turn. This research could provide foundation for further study on the biological activity of HTPP-MDC, and give useful reference for constructing fusion gene with SOE-PCR.

**Keywords** Hepatocyte-targeted cell penetrating peptide; *Musca domestica* cecropin; SOE-PCR; Molecular characteristics

肝靶向穿膜肽(hepatocyte-targeted cell penetrating peptide, HTPP)来源于恶性疟原虫环孢子蛋白。研究发现HTPP可特异性结合肝细胞表面的受体, 与人肝癌细胞HepG 2具有高亲和力(80 nmol/L) (Garcia

et al., 2006; Suarez et al., 2001)。HTPP还能够有效穿透肝细胞膜, 介导环孢子蛋白进入肝细胞内部, 实现细胞亚定位(De Koning-Ward et al., 2009)。

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMP)是一类小



分子多肽, 产生于生物免疫系统用于抵抗外界病原体感染。研究显示AMP可通过阻断病毒粘附侵入 (Andersen et al., 2004), 抑制病毒DNA复制(Wachinger et al., 1998), 以及刺激机体免疫反应(Jenssen, 2009) 等机制发挥抗病毒作用。

如能将肝靶向穿膜肽(HTPP)与抗菌肽(AMP)二者融合, 构建的融合多肽将利用HTPP靶向肝脏, 进入肝细胞内直接发挥抗乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)作用, 有望成为新型靶向抗HBV药物, 对降低HBV感染引起的发病率和死亡率具有重大意义。

本研究利用改进 SOE-PCR 技术构建 HTPP 与来源于家蝇的抗菌肽天蚕素(*Musca domestica* cecropin, MDC)融合基因, 并用相关生物信息学方法对其推导的氨基酸序列进行预测和分析, 试图为融合基因的基因工程表达及其生物活性研究奠定基础。

## 1 结果与分析

### 1.1 融合基因的构建和鉴定

利用SOE-PCR方法, 以设计的4条引物进行扩增得到片段HM1、HM2大小分别为82 bp、154 bp, 最后拼接的全长HTPP-MDC基因片段大小约为220 bp。结果显示每轮PCR产物的大小与预期相符, 无非特异性条带出现(图1)。

回收获得的全长目的片段并克隆入pMD20-T载体后, 进行PCR和*Kpn* I /*Hind* III双酶切鉴定, 结果显示PCR扩增和酶切后的基因片段与预期片段大小一致(图2)。测序结果表明该基因序列与预期完全一致, 没有突变发生。以上结果表明已成功构建HTPP-MDC融合基因。

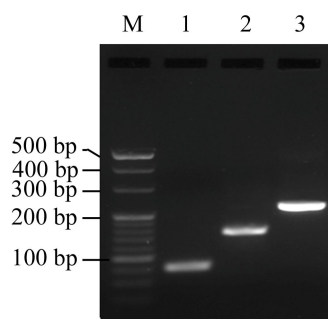


图1 HTPP-MDC融合基因的SOE-PCR扩增  
 注: M: DNA Marker; 1~3: HM1, HM2和HTPP-MDC PCR扩增产物

Figure 1 SOE-PCR amplification of HTPP-MDC fusion gene  
 Note: M: DNA Marker; 1~3: PCR products of HM1, HM2 and HTPP-MDC

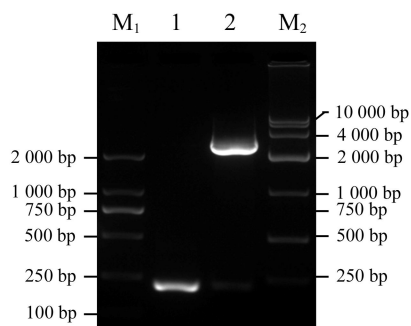


图2 重组质粒 HTPP-MDC/pMD20-T PCR 及酶切鉴定  
 注: M: DNA Marker; 1:重组质粒的 PCR 鉴定; 2:重组质粒经*Kpn* I, *Hind* III双酶切

Figure 2 Identification of recombinant plasmid HTPP-MDC/pMD20-T by PCR amplification and restriction enzyme digesting  
 Note: M: DNA Marker; 1: PCR identification of recombinant plasmid; 2: recombinant plasmid digested by *Kpn* I and *Hind* III

### 1.2 HTPP-MDC 的分子特征分析

ProtParam 分析结果显示 HTPP-MDC 基因编码蛋白含 60 个氨基酸, 其中碱性氨基酸(Arg +Lys) 10 个, 酸性氨基酸(Asp+Glu) 8 个, 含量最丰富的氨基酸包括 Gly (11.7%)、Asn (10.0%)、Lys (10.0%); 其分子量为 6 516.2 Da, 理论等电点为 9.31, 分子式为  $C_{274}H_{459}N_{91}O_{93}$ ; 蛋白的脂溶性指数为 76.50, GRAVY 指数为-0.985, 不稳定指数为 24.77; 在大肠杆菌内的半衰期大于 10 小时, 在体外有机体内的半衰期为 3 min, 在体外哺乳动物网状细胞中的估计半衰期为 1.4 h。

用 ProtScale Server 进行亲水性/疏水性预测, 结果显示 HTPP-MDC 中亲水氨基酸数量大于疏水氨基酸, 且主要位于多肽链的 N 端(图 3)。

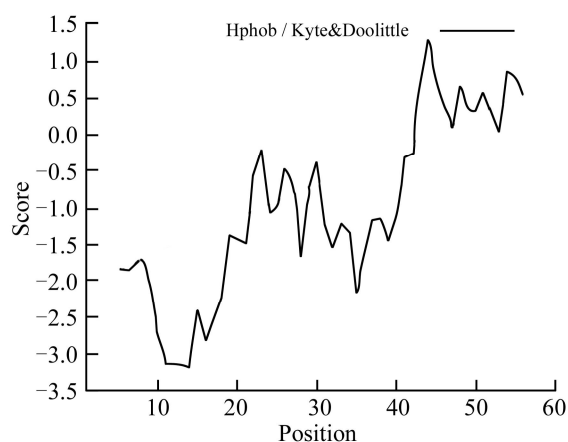


图3 HTPP-MDC 亲水性/疏水性预测结果  
 Figure 3 Hydrophilicity/Hydrophobicity prediction result of ProtScale for HTPP-MDC



SignalP 3.0 Server 分析 HTPP-MDC 的信号肽分析图谱如图 4 所示。由分析结果可知,HTPP-MDC 中不存在信号肽序列,这与之前融合基因构建的设想完全一致。

利用 PSORT II Prediction 蛋白质亚细胞定位分析软件对 HTPP-MDC 进行预测,结果显示其在各细胞器分布比例为:细胞核 65.2%、细胞质 17.4%、线粒体 17.4%,这证实了 HTPP-MDC 编码蛋白属于胞质蛋白。

用 NPS@对 HTPP-MDC 基因编码蛋白的二级结构进行预测(图 5),结果显示在 HTPP-MDC 氨基酸序列中, $\alpha$ -螺旋、无规则卷曲、延伸链和 $\beta$ -转角各为 37、14、7 和 2 处,分别占总二级结构的 61.67%、23.33%、11.67%和 3.33%。由此可推测,HTPP-MDC 中主要结构元件是 $\alpha$ -螺旋,其次为无规则卷曲和延伸链。

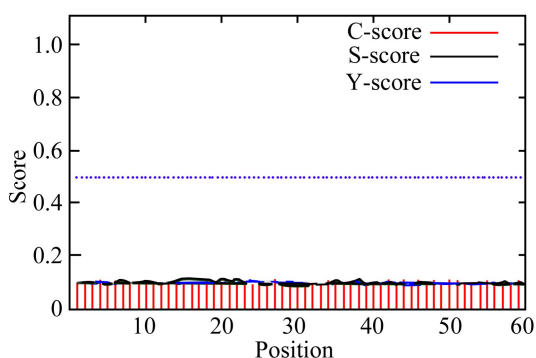


图 4 SignalP 3.0 Server 的神经网络(NN)分析 HTPP-MDC  
Figure 4 Analysis of HTPP-MDC with neural networks (NN) of SignalP 3.0 Server

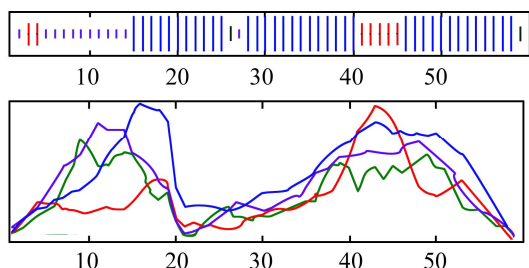


图 5 HTPP-MDC 的 $\alpha$ -螺旋, $\beta$ -转角,延伸链和无规则卷曲的位置分布  
Figure 5 Distribution of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -turn, extended strand and random coil of NPS@ for HTPP-MDC

## 2 讨论

HBV 主要在肝细胞内寄生和复制,可导致急性慢性乙型肝炎发生,甚至引起肝硬化和肝癌,危害极大。目前临床上用于 HBV 感染的抗病毒药物虽具有一定疗效,但也存在着用药剂量大、疗效不够理想、毒副作用大等问题。将可特异结合肝细胞

表面受体的 HTPP 与具有多重抗病毒机制的抗菌肽融合,有望成为特异性好、用药量少、毒副作用小的新型高效靶向抗 HBV 药物。本研究利用基因重组技术构建融合基因,试图为获得一定量的 HTPP-MDC 进行后续的功能研究奠定基础。

目前融合基因的构建方法主要有限制内切酶法和重叠延伸 PCR (gene splicing by overlap extension PCR, SOE-PCR) 技术。SOE-PCR 技术简便易行,不需要限制性内切酶消化和连接酶处理就可实现任意两个目的基因的连接和扩增,克服了因设计限制性内切酶位点而引入不必要的氨基酸残基的缺点,保证了目的蛋白的真实性和完整性(谷铁军等, 2010)。本研究对传统的 SOE-PCR 方法进行了改进,通过三个反应步骤(图 6)成功地构建了融合基因。在应用改进 SOE-PCR 技术快速、准确地进行基因融合时,须注意以下几点:

(1)在传统的 SOE-PCR 步骤中加入一步:即在不加引物的情况下,将等摩尔的各片段混合先进行 10 个循环,这种方法可减少非特异性条带的产生,提高产物的特异性。

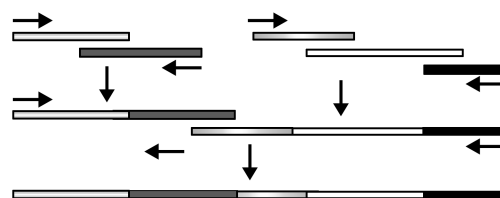


图 6 HTPP-MDC 融合基因构建方法  
Figure 6 Diagram of the construction of HTPP-MDC

(2)选择保真性能和扩增效率均高的 DNA 聚合酶。应用普通的 DNA 聚合酶进行扩增时,PCR 产物的 3 末端会产生 poly A 尾,将阻止互补区域退火以后的延伸反应,并且容易造成移码、错配和突变等,无法得到全长的融合产物,因此扩增过程中必须采用具有 5'~3'聚合酶和 3'~5'外切酶的活性的高保真聚合酶。但传统高保真聚合酶在扩增效率上,一直难以令人满意,本研究使用的为 Prime-STAR HS DNA Polymerase (TaKaRa 公司),极大地提高了 SOE-PCR 反应的效率与准确性。本研究对现有 SOE-PCR 技术的改进之处也在于考虑到下一步的 TA 克隆,直接在最后一轮 PCR 反应液中加入普通 Taq 酶 72°C 延伸 20 min 为融合基因加上 Poly A 尾,不用再一次进行 PCR 反应,同时也减少了突变的发生。

(3)合理设计引物序列。首先应综合考虑碱基的



合成成本和连续反应的次数, 寡聚核苷酸链的长度应适宜, 过长不利于合成、过短则增加成本和反应次数。我们经过数次重复试验发现引物长度为 55~59 bp 时, 在引物合成成本和扩增效率上的性价比是最高的。其次是引物间重叠区域的长度和选择, 现有 SOE-PCR 技术中相邻引物间的重叠区域一般为 25~30 个碱基, 我们在实验中通过综合考虑引物的  $T_m$  值和重叠区的碱基序列等因素, 设计的重叠区域短至 15~16 bp 均获得了有效的扩增。

(4) 高质量的模板。由于每轮 PCR 产物作为下一轮 PCR 反应的模板, 所以 PCR 产物应进行纯化, 以免给后面的反应带来不良后果。同时在回收过程中尽量避免 EB 及紫外对模板造成的损伤: 如用于回收产物的凝胶中应减少 EB 的加入量(低于 0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 另外切胶过程中应尽量减少紫外线照射时间。

获得的融合基因经测序验证与预期完全一致, 在合成过程中没有产生突变。随后我们利用生物信息学软件对融合基因推导的氨基酸序列进行了预测和分析, 结果表明 HTPP-MDC 为阳离子多肽、结构稳定、具有亲水性, 二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋、无规则卷曲、延伸链和  $\beta$ -转角组成, 与融合前亲本肽的二级结构基本一致, 在一定程度上说明融合多肽保持了与天然多肽类似的空间构象。HTPP-MDC 有望开发成新型肝靶向抗 HBV 药物, 成功构建融合多肽并对其分子特征进行了预测和分析, 为 HTPP-MDC 的功能研究和开发利用提供了物质基础和理论依据, 同时也为应用 SOE-PCR 技术快速、准确地构建融合基因提供有益借鉴。

### 3 材料与方法

#### 3.1 实验材料

*Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$ 、MDC/pMD20-T 质粒为本实验室保存。pMD20-T 载体, *rTaq* DNA Polymerase, 高保真酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase, DNA 分子量标准, 限制性内切酶 *Kpn* I、*Hind* III 购自 TaKaRa 公司; TIANpure Midi Plasmid Kit 和 TIANgel Midi Purification Kit 为北京 TIANGEN 公司产品; 其他化学试剂为国产或进口分析纯。

#### 3.2 引物设计

设计 4 条寡核苷酸引物, 其中 H1、M1 为与目的基因同向部分的引物, H2、M2 为与目的基因互补部分的引物, M1 和 M2 用于从 MDC/pMD 20-T 质粒中扩增 MDC 片段。H1 与 H2、H2 与 M1 之间

分别有 16 bp 的重叠互补区。外侧上游引物 H1 中包含 *Kpn* I 酶切位点, 外侧下游引物 M2 中设计了终止密码子和 *Hind* III 酶切位点, 各引物在目的基因中的位置如图 6 所示。引物设计如下(划线部分为酶切位点, 斜体为重叠 DNA 序列部分, 粗体为终止密码子):

H1: 5'-CGGGGTACCGACGACGACGACAAG  
AATAGTCGTTCACTTG-3';

H2: 5'-GTAATTTCTCGTTGTCTTCGTTATTTTC  
CATCATCATTTTCTCCAAGTGAACGACTATT-3';

M1: 5'-GACAACGAGAAATTACGTGGATGGTTG  
AAAAAAAT-3';

M2: 5'-CCCAAGCTTATTAGTTACCCCTTAAT  
GTGGCGGCA-3';

#### 3.3 SOE-PCR 法构建融合基因

将整条序列分成两段(HM1, HM2), 首先分别 PCR 扩增出这两段序列, 然后用一轮 PCR 进行拼接, 最后扩增全长目的基因序列。

HM1 的扩增: 将上述合成的引物 H1 和 H2 进行链延伸反应, 扩增体系如下: 13.75  $\mu\text{L}$  Sterile H<sub>2</sub>O, 2.0  $\mu\text{L}$  dNTP Mixture (2.5 mmol/L each), 5.0  $\mu\text{L}$  5 $\times$ PrimeSTAR Buffer, 2.0  $\mu\text{L}$  H1 Primer (10  $\mu\text{M}/\text{L}$ ), 2.0  $\mu\text{L}$  H2 Primer (10  $\mu\text{M}/\text{L}$ ), 0.25  $\mu\text{L}$  PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 units/ $\mu\text{L}$ )。扩增条件为: 98 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 68 $^{\circ}\text{C}$  40 s, 循环 30 次。

HM2 的扩增: 以 pMD 20-T/MDC 质粒为模板, M1 和 M2 为引物进行 PCR 反应, 扩增体系如下: 14.75  $\mu\text{L}$  Sterile H<sub>2</sub>O, 2.0  $\mu\text{L}$  dNTP Mixture (2.5 mmol/L each), 5.0  $\mu\text{L}$  5 $\times$ PrimeSTAR Buffer, 1.0  $\mu\text{L}$  M1 Primer (10  $\mu\text{M}/\text{L}$ ), 1.0  $\mu\text{L}$  M2 Primer (10  $\mu\text{M}/\text{L}$ ), 1.0  $\mu\text{L}$  pMD 20-T/MDC Plasmid, 0.25  $\mu\text{L}$  PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 units/ $\mu\text{L}$ )。扩增条件为: 98 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 68 $^{\circ}\text{C}$  40 s, 循环 30 次。

全长目的基因的拼接与扩增: 第一轮以上一步 PCR 扩增获得的 HM1 和 HM2 互为模板进行链延伸反应, 扩增体系如下: 5.0  $\mu\text{L}$  5 $\times$ PrimeSTAR Buffer, 2.0  $\mu\text{L}$  dNTP Mixture (2.5 mmol/L each), 15.75  $\mu\text{L}$  Sterile H<sub>2</sub>O, 1.0  $\mu\text{L}$  HM1, 1.0  $\mu\text{L}$  HM2, 0.25  $\mu\text{L}$  PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 units/ $\mu\text{L}$ )。扩增条件为: 98 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 68 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 循环 10 次。第二轮向 PCR 管内分别加入 1.0  $\mu\text{L}$  的外引物 H1 和 M2 大量扩增。扩增条件为: 98 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 68 $^{\circ}\text{C}$  40 s, 循环 30 次。第三轮向 PCR 管内加入 0.125  $\mu\text{L}$  的 *rTaq*



DNA Polymerase (5 units/ $\mu$ L), 72°C 延伸 20 min, 为融合基因加上 Poly A 尾, 以利于下一步的 TA 克隆。用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 凝胶成像系统观察并拍照。

### 3.4 重组质粒 HTPP-MDC/pMD20-T 的构建及鉴定

用 TIANgel Midi Purification Kit 回收目的片段后, 与 pMD20-T 载体连接构建重组质粒 HTPP-MDC/pMD20-T, 转化 *E. coli* DH5a 感受态细胞进行蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆培养后进行菌落 PCR 鉴定。取初步鉴定为阳性的克隆菌液, 用 TIANpure Midi Plasmid Kit 抽提质粒, 抽提的质粒用限制性内切酶 *Kpn* I、*Hind* III 进行双酶切鉴定, 并委托 Invitrogen 公司进行 DNA 测序分析。

### 3.5 融合基因的分子特征分析

利用互联网上的在线工具对获得的融合基因编码蛋白进行分析。用蛋白质基本性质分析工具 ProtParam Tool (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 对 HTPP-MDC 基因编码蛋白的分子量、氨基酸序列组成和等电点等理化性质进行分析; 用疏水性分析软件 ProtScale 程序 (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 分析其亲水性/疏水性; 用 SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 分析其是否存在信号肽, 用 PSORT II Prediction (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) 对其亚细胞定位进行预测分析, 用 sopma ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopma.pl](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)) 预测其二级结构和折叠类型。

### 作者贡献

卢雪梅完成了主要实验操作和文章初稿的写作; 黄演婷和汪洁协助细菌培养和质粒提取; 金小宝和朱家勇负责文章的修改、审阅和完善。

### 致谢

本研究由国家自然科学基金(30671832)资助。感谢褚夫江博士对本文的指导。

### 参考文献

- Andersen J.H., Jenssen H., Sandvik K., and Gutteberg T.J., 2004, Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface, *Journal of Medical Virology*, 74(2): 262-271
- De Koning-Ward T.F., Gilson P.R., Boddey J.A., Rug M., Smith B.J., Papenfuss A.T., Sanders P.R., Lundie R.J., Maier A.G., Cowman A.F., and Crabb B.S., 2009, A newly discovered protein export machine in malaria parasites, *Nature*, 459(7249): 945-949
- Garcia J.E., Puentes A., and Patarroyo M.E., 2006, Developmental biology of sporozoite-host interactions in *Plasmodium falciparum* malaria: implications for vaccine design, *Clinical Microbiology Reviews*, 19(4): 686-707
- Gu T.J., Zhang F.Y., Duan Y., Wei W., Jiang C.L., Wu Y.G., and Kong W., 2010, Synthesis of Anti-Rabies ScFv Fragment Gene Fv 57 by SOE-PCR, *ShengWu JiShu (Biotechnology)*, 21(3): 36-39 (谷铁军, 张凤羽, 段冶, 卫巍, 姜春来, 吴永革, 孔维, 2010, SOE-PCR 法合成狂犬病毒单链抗体基因 Fv57, *生物技术*, 21(3): 36-39)
- Jenssen H., 2009, Therapeutic approaches using host defence peptides to tackle herpes virus infections, *Viruses*, 1(3): 939-964
- Suarez J.E., Urquiza M., Puentes A., Garcia J.E., Curtidor H., Ocampo M., Lopez R., Rodriguez L.E., Vera R., Cubillos M., Torres M.H., and Patarroyo M.E., 2001, *Plasmodium falciparum* circumsporozoite (CS) protein peptides specifically bind to HepG2 cells, *Vaccine*, 19(31): 4487-4495
- Wachinger M., Kleinschmidt A., Winder D., Von Pechmann N., Ludvigsen A., Neumann M., Holle R., Salmons B., Erfle V., and Brack-Werner R., 1998, Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression, *Journal of General Virology*, 79(Pt 4): 731-740