

## 反向 PCR 方法克隆腾冲嗜酸两面菌的分子伴侣基因\*

马 晴<sup>1</sup> 张渝英<sup>2</sup> \* \*(北京师范大学生命科学学院 北京 100875)<sup>1</sup> (中国科学院微生物研究所 北京 100080)<sup>2</sup>

**摘要:** 根据已知的 *Sulfolobus* 属的分子伴侣基因, 设计简并引物, 用 PCR 的方法从腾冲嗜酸两面菌 (*Acidianus tengchongensis*) 基因组 DNA 中分别克隆到了分子伴侣  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基的约 500bp 的基因片段。以它们为探针进行 Southern 杂交, 确定了合适的限制性内切酶。以确定的限制性内切酶消化的基因组 DNA 环化物为模板, 进行反向 PCR 反应, 引物的延伸方向由已知序列出发沿环化分子向未知区域进行, 扩增产物经测序表明为  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基基因。根据所得序列分别设计两对引物进行 PCR, 测序结果表明得到了  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基的完整基因。

**关键词:** 腾冲嗜酸两面菌, 反向 PCR, 分子伴侣

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2645 (2005) 04-0112-04

Cloning of Chaperonin Gene from *Acidianus tengchongensis* Using Inverse PCR Method \*MA Qing<sup>1</sup> ZHANG Yu-Ying<sup>2</sup> \* \*(Life Science Institute, Beijing Normal University, Beijing 100875)<sup>1</sup>(Institute of Microbiology, Chinese Academe of Sciences, Beijing 100080)<sup>2</sup>

**Abstract:** DNA fragments of  $\alpha$  subunit and  $\beta$  subunit were amplified by PCR from the genome of *Acidianus tengchongensis* with the degenerated primers designed from the consensus amino acid sequence of *Sulfolobus* chaperonins. The two DNA fragments about 500bp were used as probe for southern hybridization to determine the suitable restriction endonuclease. Restriction endonuclease digested genomic DNA was circularized by self-ligation, and complete sequences of  $\alpha$  subunit and  $\beta$  subunit were obtained by inverse PCR. The primers oriented in the reversed direction of the usual orientation to amplify the DNA sequence that flank the known region. The complete genes of  $\alpha$  subunit and  $\beta$  subunit were PCR amplified from genomic DNA using two pairs primers.

**Key words:** *Acidianus tengchongensis*, Inverse PCR, Chaperonin

分子伴侣 (Molecular chaperone), 其中许多也称为热休克蛋白 (heat-shock proteins, hsp) 或应激蛋白 (stress-shock protein), 是一类在体内能够帮助多肽折叠和非共价组装, 但并不参与成熟蛋白质组成的蛋白质<sup>[1]</sup>。这类蛋白质在生理条件及应激条件下的生物学功能是分子生物学家、生物化学家研究的重点之一。近 10 年来, 由于分子伴侣及折叠酶的深入研究, 对蛋白质的折叠机理的研究有了很大的进展。由于分子伴侣在细胞生命活动的各个层次上的重要作用, 而其本身的表达调控和性质行为又与一些疾病密切相关, 对它们的研究为在生物进化及适应环境方面都提供了理论依据, 因此在医学、提高基因工程及蛋白质工程产物等方面具有重要的理论意义和潜在的应用前景。chaperonin 是分子伴侣中的一类, 又称为 Hsp60。Chaperonin 广泛存在于古细菌、细菌和真核生物中, 根据序列和结构上的差异, 可分为两个亚类, 亚类 I 存在于细菌和

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 3997003)

\* \* 通讯作者 Tel: 010-62626769, E-mail: zhangyy@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2004-10-25, 修回日期: 2004-11-16

真核生物的线粒体、叶绿体中,亚类II存在于古细菌和真核生物的胞质中<sup>[2]</sup>。

嗜热古菌在系统发育树中具有最深的分支,属于最古老的类群。*Acidianus tengchongensis* 是1982年钟惠芳等在云南腾冲热泉分离得到极端嗜酸嗜热古菌<sup>[3]</sup>,后来何正国等又用分子生物学的方法对其分类地位进行研究,确定它为 *Acidianus* 的一个新种<sup>[4]</sup>。它能够在好氧 80℃ 和 pH2.5 条件下氧化硫元素为硫酸而获得能量进行自养生长,因此它在冶金、环保、酶工业等方面可能有重要的应用前景,目前 *Acidianus* 属的菌株中 chaperonins 的基因等方面的研究还未见报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种: *Acidianus tengchongensis* 由中国科学院微生物研究所李雅芹研究员惠赠, DH5 $\alpha$  为本实验室保存。

1.1.2 质粒: pGEM-T Easy Vector kit 为 Promega 公司产品。

1.1.3 酶及化学试剂: 限制性内切酶为宝生公司产品; Taq 酶和 T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品; Nick Translation System 购自 Promega 公司;  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP 是北京亚辉生物医学工程公司的产品; 其它试剂均为进口或国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 *Acidianus tengchongensis* 的培养方法参照文献 [5]。

1.2.2 *Acidianus tengchongensis* 基因组 DNA 的提取参照文献 [6]。

1.2.3 PCR 及产物的纯化与连接、感受态细胞的制备与连接产物的转化、重组质粒的筛选参照文献 [7] 进行, 测序工作由上海生工完成, 所用仪器为 ABI PRISM 377 型 DNA 自动测序仪。

1.2.4 Southern 杂交: 利用不同的限制性内切酶对基因组 DNA 进行完全酶切, DNA 片段的转移和杂交参照文献 [7] 进行, DNA 探针用 Nick Translation System 的 Kit 标记。

1.2.5 反向 PCR: 通过 Southern 杂交确定合适的限制性内切酶后, 常规方法消化总 DNA。取大约 200ng 消化了的总 DNA 进行自身环化连接反应。体系中的总 DNA 浓度为 1~2ng/ $\mu$ L, T4 DNA 连接酶的浓度为 0.08U/ $\mu$ L, 于 10℃~12℃ 保温 24~48h 后可作为反向 PCR 的模板。反向 PCR 体系共 50 $\mu$ L, 内含: 一对终浓度为 2 pmol/L 的反向引物, 5~10 ng 环化的 DNA, dNTP 终浓度为 0.2 pmol/L, 2.5U Taq 酶。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Acidianus tengchongensis* 的 chaperonin 部分基因的获得

在本研究开始时, 已有一些古细菌的分子伴侣基因序列的报道, 基于古细菌分子伴侣的进化树<sup>[8]</sup> 和何正国博士提供的基于 16S rDNA 的进化树<sup>[7]</sup>, 分析对比同源序列, 设计 PCR 简并引物。二者的正向引物相同为 P1 {5'-GA (C, T) AAG GAA GTT GTC CAT CCT GGA AT-3'},  $\alpha$  和  $\beta$  反向引物分别为 P2 {5'-TTT TA (G, T) CTA GT (G, A) AAG AAG GAG T-3'} 和 P3 {5'-GCT CTT TCT GTC TCA TC (A, T) AC (A, T) ACT CT-3'}。以 P1/P2 和 P1/P3 分别进行 PCR, 得到约为 500bp 片段, 纯化后与 pGEM T-easy 连接。测序结果表明分别获得了约 500bp 的  $\alpha$  和  $\beta$  亚基基因的片段 (见图 1)。其可作为探针及设计反向 PCR 引物的依据。

Alpha	GACAAGGAAGTTGTCCATCCTGGAATGCCAAGAAGAGTAGAGAAAAGCTAAGATAGCTGTT
Beta	GACAAGGAAGTTGTCCATCCTGGAATGCCAAAAAGACTTGAATAATGCTAAAAATAGCTTTA
Alpha	TTAGATGCCTCATTAGAAGTAGAGAAAGCCTGAAATATCTGCAAAAAATAAGCATAACTACT
Beta	ATAGATGCATCATTAGAAGTAGAAAAACCAGAACTTGATGCAGAAATAAGAATAAATGAT
←—— FX2	
Alpha	CCAGATATAATAAAGGCATTCCTTGATGAGGAAGCTAAGTATTTGAAAACATGCTAGAC
Beta	CCAACACAAAATGCAGAAATTTCTAGATGAAGAAGAAAATCTGATTAAGAAAAAGTAGAT
Alpha	AAACTAGCTTCAATAGGAGCTAACGTACTTATATGCCAAAAAGGAATAGATGATATAGCT
Beta	AAAAATTTAGCAACAGGAGCAAAATGTTATAATATGCCAAAAAGGAATCGATGAAGTAGCT
Alpha	CAACACTTCTTGCCAAAAAGAGGAATTTAGCAGTAAGAAGACTTAAGAGATCTGATATA
Beta	CAGTCATATTTAGCTAAAAAGGAGTATTAGCAGTAAGAAGAGCTAAGAAGAGCGATTTA
Alpha	GAGAAATTAGAAAAAGCATTAGGAGCTAGAATAACAAGTAGTATAAAGGACCGCTACACAG
Beta	GAGAAATTAGCTAGAGCTACAGCGGCTAGAGTAGTATCAAAATATAGACGAAATCTCAGAG
Alpha	AAGATTTTAGGTTATGCAGACTTAGTAGAAGAAAAGAAAGTAGCTAATGATAAAATCGTA
Beta	CAAGATTTAGCATATGCATCATTAAATTGAGGAAAGAAAAGTAGGAGAAGATAAAATGCTA
FX1 →	
Alpha	TTTATTGAAGGAGCAAGAATCCTAAAAGCCGTAAATATATTGCTAAGAGGTTCAAATGAT
Beta	TTTGTAGAAGGAGCAAGAATCCAAAATCTATAAGCATATTAATTAGAGGAGGATTAGAA
Alpha	ATGCCGTTAGATGAGGCTGAGAGGAGTATAAAT
Beta	AGAGTAGTTGATGAGACAGAAAGAGCA

图 1 α 和 β 基因的部分序列

## 2.2 限制性内切酶的选择

为了获得含有 *chaperonin* 全基因并适合进行反向 PCR 的 DNA 模板, 必须选择合适的限制性内切酶消化基因组 DNA。电泳后将其转移到硝酸纤维素膜上, 利用上述已得到的 α 和 β 基因片段作为探针, 分别进行杂交。Southern 杂交结果表明, *Bam*HI 和 *Kpn*I 酶切的片段分别为 3.0 和 4.5kb 含有 α 亚基基因, *Eco*RI 和 *Eco*RV 酶切消化产生约 4kb 的片段, 含有 β 亚基基因。

## 2.3 反向引物的设计

根据所得 α 和 β 基因的部分序列, 设计一对简并引物, FX1 和 FX2, 用于反向 PCR。引物 FX1 和 FX2 的位置如图 1 中所示。

FX1 5' - AGA AAA GTA GG (A, T) (G, A) A (A, T) GAT AAA ATG GTA - 3';

FX2 5' - TT (T, C) TCT ACT TCT AAT GA (T, G) GCA TCT A - 3'。

## 2.4 α 基因全序列的获取

根据 Southern 杂交结果, 选用 *Bam*HI 和 *Kpn*I 酶切片段的环化物作为模板时, 没能得到 PCR 产物。改用 *Pst*I 酶切后环化物作为模板进行反向 PCR, 反应条件为 94℃ 1min; 94℃ 1min; 53℃ 1min, 72℃ 2min, 30 个循环; 72℃ 10min, 得到了约 1.2kb 的 DNA 片段 (图 2, 通道 1), 连到 pGEM-T easy 后测序发现, N 端

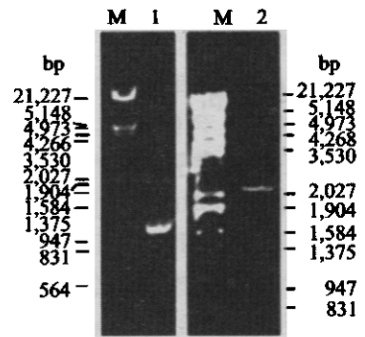


图 2 α 基因反向 PCR 产物的分析

- 1 *Pst*I 酶切基因组 DNA 环化后的反向 PCR 产物,
  - 2 *Stu*I 酶切基因组 DNA 环化后的反向 PCR 产物,
- M λDNA/*Eco*RI + *Hind*III

序列是完整的, C 端序列却不完整。对已测得的序列分析后发现, 从 N 端起第 308 位有 *StuI* 的酶切位点, 推测如果在基因的下流还有 *StuI* 的酶切位点, 则可以得到较短的容易获得 PCR 产物的环化模板。以 *StuI* 完全酶切基因组 DNA, 环化后作为模板。经 PCR 得到了约 2kb 的 DNA 片段 (图 2, 通道 2), 将 PCR 产物克隆到 pGEM-T Easy 后进行序列分析, 结果表明得到了  $\alpha$  基因的靠近 C 端的序列。据此结果重新设计一对引物, 以基因组 DNA 为模板进行 PCR。PCR 产物如图 3 通道 1 所示, 测序结果表明得到了完整的  $\alpha$  亚基的基因 (GeneBank 接受号为: AY254173)。

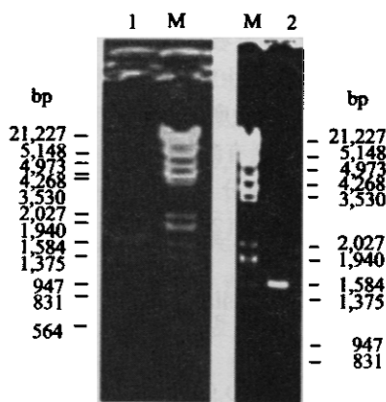


图 3 PCR 扩增的产物分析  
1  $\alpha$  基因, 2  $\beta$  基因, M  $\lambda$ DNA/  
*EcoRI* + *HindIII*

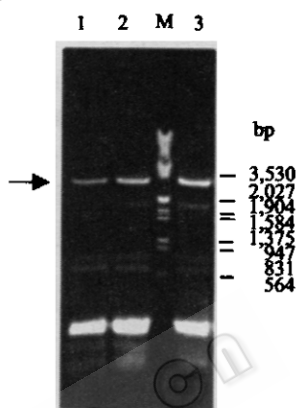


图 4 不同退火温度时  $\beta$  基因反向 PCR 产物分析  
1 退火温度为 53℃, 2 退火温度为 51℃,  
3 退火温度为 49℃, M  $\lambda$ DNA/*EcoRI* + *HindIII*

## 2.5 $\beta$ 基因全序列的获取

根据 Southern 杂交结果, *EcoRI* 和 *EcoRV* 酶切消化产生约 4kb 的片段, 用 *EcoRI* 酶切基因组 DNA 后环化产物作为模板, PCR 反应条件为 94℃ 1min; 94℃ 1min, 53℃、51℃或 49℃ 1min, 72℃ 4min, 30 个循环; 72℃ 10min。得到的 PCR 产物条带较多 (图 4), 回收约 3kb (箭头所指) 的 DNA 片段, 补齐后, 插入 pBluescript II KS (-) 的 *EcoRV* 位点。经测序测定结果, 最后得到了  $\beta$  基因的全序列。依此结果重新设计一对引物, 以基因组 DNA 为模板进行 PCR。PCR 产物如图 3 通道 2 所示, 测序结果表明得到了完整的  $\beta$  亚基的基因 (GenBank 接受号为: AY223856)。

在本研究中, 采用反向 PCR 的方法克隆了 *Acidianus tengchongensis* 分子伴侣的  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚基。这是 *Acidianus* 属中第一个克隆的 chaperonin 基因。以往文献上报道的获得古细菌 chaperonin 基因的方法都是从构建基因组文库, 再用核心区作为探针筛选文库, 得到全基因, 相比而言反向 PCR 的方法工作量要低得多。新克隆的基因与已经报道的 chaperonin 基因有很好的同源性。

## 参考文献

- [1] Ellis R J. Cell Stress Chaperones, 1996, 1: 155 ~ 160.
- [2] Lund P A, Large A T, Kapatai G. Biochemical Society Transaction, 2003, 31 (3): 681 ~ 685.
- [3] 钟惠芳, 陈秀珠, 李雅芹, 等. 微生物学报, 1982, 22 (1): 1 ~ 7.
- [4] 何正国, 李雅芹, 周培瑾. 微生物学报, 2001, 41 (3): 259 ~ 263.
- [5] He Z, Li Y, Zhou P, et al. FEMS Microbiol Letters, 2000, 193: 217 ~ 221.
- [6] Laurer G, Kristjansson J K, Langworthy T A, et al. Syst Appl Microbiol, 1986, 8: 100 ~ 105.
- [7] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T 著 (金冬雁等译). 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1982.
- [8] Archibald J, Logsdon J, Doolittle J. Curr Biol, 1999, 91: 1053 ~ 1056.