

荷斯坦奶牛中性粒细胞 β -防御素 cDNA 的克隆与序列分析

刘双龙^{①②} 王长法^{①*} 杨宏军^① 杨少华^① 阿合买提·买买提^② 高运东^① 仲跻峰^①

(^①山东省农业科学院奶牛研究中心 济南 250100; ^②新疆农业大学动物医学学院 乌鲁木齐 830052)

摘要: 为研发牛 β -防御素生物制剂, 防治奶牛乳腺炎。根据已发表的牛 β -防御素基因序列设计一对引物。收集患乳腺炎奶牛乳静脉血液中性粒细胞, 用试剂盒提取总 RNA。经 RT-PCR 扩增牛 β -防御素 cDNA 片段, 回收纯化 PCR 产物, 连接 pMD18-T 载体, 转化感受态细胞 JM109。在含 X-Gal、Amp 及 IPTG 的 LB 平板上筛选阳性克隆, 经菌落 PCR 及双酶切鉴定后, 对目的片段进行测序。结果表明 RT-PCR 扩增出的 cDNA 片段碱基数为 189 bp, 含有一个完整的 ORF, 能编码 63 个氨基酸的多肽, 多肽中含 6 个保守半胱氨酸残基。用 Blast 程序进行检索比较, 表明扩增序列与 GenBank 中发表的 BNBD-7 编码区序列 96.3% 相同。结果成功克隆出奶牛 β -防御素家族的成员 BNBD-7 基因, 为重组牛 β -防御素的开发奠定了基础。

关键词: β -防御素; 克隆; 牛

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2007)05-101-05

The cDNA Cloning and Sequencing of β -defensin in Holstein Cow

LIU Shuang-Long^{①②} WANG Chang-Fa^{①*} YANG Hong-Jun^① YANG Shao-Hua^①
Ahemaiti·Maimaiti^② GAO Yun-Dong^① ZHONG Ji-Feng^①

(^① Research Center of Dairy Cattle, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100;

(^② College of Animal Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: A specific pair of primers were designed and synthesized according to the sequence of bovine β -Defensin gene published in GenBank. Total cellular RNA was purified from the bovine neutrophil cells with the total RNA isolation kit. Then the bovine β -defensin cDNA fragment was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). After gel purification, the RT-PCR products were inserted into the pMD18-T cloning vector. Recombinant pMD18-T BNBD-7 vector was transduced into competent cell JM109. Clones containing the DNA fragment of insert were screened on the LB agar plate with X-Gal, Amp and IPTG. Restriction enzyme digests and PCR were performed to identify the clone containing the DNA fragment of interest, then the cDNA fragment of interest was sequenced. The result showed that the obtained 189 bp DNA fragment is identical to the BNBD-7 sequence registered in the GenBank. The cDNA fragment code 63 amino acid residues, which contained the consensus sequence of six invariantly spaced cysteine residues. Compared to bovine defensin, it shared the highest identity of 96.3% with the BNBD-7. The results show that the cloning and sequencing of bovine β -Defensin gene is successful.

Key words: β -defensin; Bovine; Clone

基金项目 山东省中青年科学家基金项目(No. 2006BS06010), 山东省农科院青年基金项目(No. 2005YQ036);

* 通讯作者, E-mail: wcf1967@yahoo.com.cn;

第一作者介绍 刘双龙, 男, 硕士研究生, 主要从事分子生物学研究, E-mail: tianshi003@163.com.

收稿日期: 2007-02-08, 修回日期: 2007-07-02

防御素(defensin)是由美国科学家 Lehrer 1985 年发现并命名的,他从人的嗜中性白细胞中分离纯化得到 3 种阳离子小肽,发现其具有特殊生物学活性及功能^[1]。防御素是肽抗生素中较为重要的一种,广泛存在于植物和动物体内,参与生物体天然免疫和获得性免疫。具有较强的广谱杀菌功能,而且迄今为止尚未发现病原菌对它产生耐药性,应用前景非常广阔^[2]。

哺乳动物的防御素可根据其大小和二硫键结合方式的不同,而区分为 α 、 β 和 θ 3 种。人、猴和多种哺乳动物的 α -防御素在中性粒细胞、巨噬细胞和小肠的 Paneth 细胞中含量最丰富。 β -防御素多由上皮细胞产生,分布在宿主与环境的界面位置,构成机体抵御外界微生物侵袭的第一道屏障。 θ -防御素主要存在于灵长类体内^[3]。牛的嗜中性白细胞中也存在 β -防御素^[4],它具有短的前原序列(63~64 个氨基酸)和短的内含子(< 1.6 kb),具有 β -防御素的特征性分子结构,即在特定位置具有 6 个保守半胱氨酸残基^[5]。

奶牛乳腺炎是奶牛常见病、多发病,也是对奶业生产危害最为严重的一种疾病。注射抗生素是国内外控制奶牛乳腺炎的主要手段,但耐药菌株的出现及牛乳中抗生素的残留等问题迫使人们寻找更加有效、无残留的绿色兽药用于奶牛养殖中。防御素是中性粒细胞溶酶内的主要杀菌分子,作为来自机体自身的内源性抗菌肽,无残留,同时还具有广谱的抗微生物活性,对细菌、真菌、螺旋体、某些病毒、肿瘤细胞等均具很强的杀伤活性,是一种新型抗感染药物,代表未来抗生素发展方向^[5]。

本研究针对奶牛业生产实际需要,结合奶牛乳腺特殊免疫学原理,参考国际肽抗生素最新研究成果^[6,7]。通过分子生物学手段克隆牛中性粒细胞 β -防御素 cDNA 片段^[8-10],以便对其结构与功能进行更深入的研究。

1 材料与方法

1.1 材料 基因工程菌 JM109 本实验室保存。pMD18-T 载体、细胞总 RNA 提取试剂盒、RT-

PCR 试剂盒及各种工具酶购自宝生物工程大连有限公司,回收试剂盒购自 U-gene 公司,淋巴细胞分离液购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据已有 BNBD-7 基因序列(BC108224)以及酶切位点分析,借助计算机软件 DNA Star 和 Primer premier 5.0 进行辅助分析,设计一对引物,由上海生工生物技术有限公司合成。上游引物(P1) 5'-CGCGGATCCCAGCATGAGGCTCCATCA-3',含有 BamH I 酶切位点及起始密码子 ATG;下游引物(P2) 5'-GCGTCGACTCGCCTTCTTTTACCCTACC-3',含有 Sal I 酶切位点及终止密码子 TAG。

1.2.2 中性粒细胞分离 从本研究中心奶牛场选择患临床乳腺炎的荷斯坦奶牛,无菌采集乳静脉血,用淋巴细胞分离液分离中性粒细胞。淋巴细胞分离液 HISTOPAQUE-1077(10771)密度是 1.077,HISTOPAQUE-1119(11191)密度是 1.119。本实验联合使用 11191 与 10771 分离牛血液中的粒细胞。首先在离心管中加入 11191,然后缓缓加入 10771,再缓缓加入血液,互相之间形成清晰的液面。700 r/min 离心 30 min,液体分为 6 层,红细胞位于离心管的最底部,粒细胞位于 11191 和 10771 之间,抽取粒细胞层。

1.2.3 中性粒细胞总 RNA 提取 按 RNA Fast1000 提取试剂盒说明书提取 RNA。取大约 100 μ l 中性粒细胞,加入 RB1 液 1 ml,充分颠倒混匀直至完全溶解,室温放置 5 min。加入氯仿 200 μ l,充分颠倒,成均一糜状,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清,加入 RB2 液 350 μ l,混匀,12 000 r/min 离心 1 min,加入 500 μ l 洗液,12 000 r/min 离心 1 min,再重复此过程一次。在膜中央加入洗脱液 25 μ l,室温静置 1 min,12 000 r/min 离心 1 min,获得总 RNA。

1.2.4 RT-PCR 反应和 cDNA 的扩增^[15] cDNA 第一链的合成参照 TaKaRa RNA PCR Ki(AMV) Ver3.0 提取试剂盒说明书进行。反应体系 10 μ l,包括 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ l,120 ng/ μ l RNA 1 μ l,10 \times RT buffer 1 μ l,10 mmol/L dNTPs 1 μ l,

RNase 抑制剂 $0.25 \mu\text{l}$ $25 \mu\text{mol/L}$ 下游引物 (P2) $0.5 \mu\text{l}$ $5 \text{ U}/\mu\text{l}$ AMV $0.5 \mu\text{l}$,DEPC 水补足 $10 \mu\text{l}$ 。混匀后,室温放置 10 min 42°C 保温 1 h ,RT 产物直接用于 PCR 扩增。cDNA 扩增反应体系总体积为 $40 \mu\text{l}$,包括 $5 \times \text{PCR buffer}$ $10 \mu\text{l}$ $25 \mu\text{mol/L}$ 引物 $1 \text{ } 0.5 \mu\text{l}$,RT 产物 $10 \mu\text{l}$ $5 \text{ U}/\mu\text{l}$ Taq 酶 $0.25 \mu\text{l}$,双蒸水补足 $40 \mu\text{l}$ 。PCR 反应程序: 94°C 预变性 2 min ; 94°C 30 s , 58°C 30 s , 72°C 1 min 30 个循环 ; 72°C 10 min 。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.5 PCR 产物与 pMD18-T 载体的连接 连接反应体系 $10 \mu\text{l}$ Ligation Mix $5 \mu\text{l}$ pMD18-T 载体 $1 \mu\text{l}$,PCR 产物 $4 \mu\text{l}$,混匀后, 16°C 30 min ,连接产物直接用于转化。连接产物转化感受态细胞 JM109。

1.2.6 阳性菌落的 PCR 鉴定与酶切鉴定 挑取单个白色菌落,接种于 3 ml 含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37°C 振荡培养过夜,然后进行菌落 PCR 与抽提质粒的 *Bam*H I 及 *Sal* I 双酶切鉴定。

1.2.7 DNA 序列分析 酶切鉴定正确的质粒送上海生物技术有限公司测序, DNA 序列用 Blast 程序进行同源性检索比较。

2 结 果

2.1 RT-PCR 扩增 采患乳腺炎奶牛静脉血,分离中性粒细胞,提取总 RNA。使用总 RNA 提取试剂盒,经 RT-PCR 扩增出牛中性粒细胞 β -防御素 cDNA 片段。用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳,出现了一条约 226 bp 的 DNA 带,与预期产物长度吻合(图 1)。表明本实验成功完成总 RNA 的抽提与 β -防御素的 RT-PCR。

2.2 PCR 产物的克隆、阳性菌落的 PCR 鉴定与酶切鉴定 PCR 产物经凝胶纯化回收,与 pMD18-T 载体连接,然后转化 JM109 感受态细胞,通过蓝/白斑筛选阳性克隆。取阳性克隆过夜培养的菌液进行 PCR 鉴定与抽提质粒进行 *Bam*H I 及 *Sal* I 双酶切鉴定(图 2),分别获得约 226 bp 和 189 bp 的 DNA 条带。结果与预期的片段大小相符,证实目的片段已插入 T-载

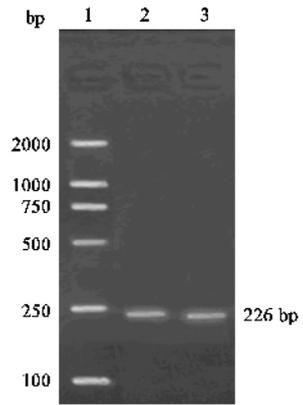


图 1 牛 β -防御素 RT-PCR 结果

Fig. 1 RT-PCR product of β -defensin of dairy cow

1. DL 2000 DNA 分子量标准;2,3. RT-PCR 产物。
1. DL 2000 DNA marker ;2,3. RT-PCR product.

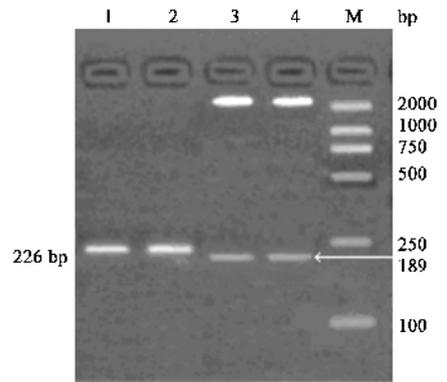


图 2 阳性菌落 PCR 和重组质粒酶切鉴定

Fig. 2 PCR and digestion identifications of recombinant plasmid

M. DL 2000 DNA 分子量标准;1,2. PCR 鉴定;
3,4. *Bam*H I、*Sal* I 双酶切鉴定。
M. DL 2000 DNA marker ;1,2. PCR identification ;
3,4. Digestion identifications with *Bam*H I 及 *Sal* I .

体。

2.3 DNA 序列分析 PCR 产物的测序结果,用 Blast 程序进行检索比较,结果表明克隆所获得的长 189 bp PCR 产物为预期的牛 β -防御素 (BNBD-7) 序列,正好是一个完整的开放阅读框 (ORF)。它与 GenBank 发表的 BNBD-7 编码区序列 96.3% 相同,序列覆盖编码区全长。推导该序列编码 63 个氨基酸,并且含有 β -防御素的

特征性分子结构,即在特定位置上有 6 个保守的半胱氨酸残基,可以确定该 cDNA 为 β -防御素家族的成员 BNBD-7(图 3)。

```

C GCG GAT CCC AGC ATG AGG CTC CAT CAT CTG CTC CTC GCA
      M   R   L   H   H   L   L   L   A
CTC CTC TTC CTG GTC CTG TCT GCT GGG TCA GGA TTT ACT
L   L   F   L   V   L   S   A   G   S   G   F   T
CAA GGA GTA AGA AAT CAT GTA ACC TGC CGT ATA AAT AGA
Q   G   V   R   N   H   V   T   C   R   I   N   R
GGC TTC TGT GTG CCG ATC AGG TGC CCT GGA CGC ACG AGA
G   F   C   V   P   I   R   C   P   G   R   T   E
CAG ATT GGC ACC TGT TTC GGG CCC CGA ATA AAA TGC TGC
Q   I   G   T   C   F   G   P   R   I   K   C   C
AGG *  TGG TAA AAG AAG GCG AGT CGA CGC
R

```

图 3 BNBD-7 cDNA 的基因测序结果及推导的氨基酸序列

Fig. 3 The nucleotide and predicted 63 amino acid sequences of BNBD-7

* 为终止密码子;与氨基酸序列对应的是 β -防御素特有的 6 个保守的半胱氨酸残基。

* Stop codon; Corresponds with amino acid sequences are six invariantly spaced cysteine residues.

2.4 奶牛 β -防御素氨基酸序列与其他动物的比较 利用 DNA Star(MegAlign)通过与其他动物的 β 防御素 cDNA 序列比较,得出牛 BNBD-7 的 cDNA 与其他动物的 β 防御素 cDNA 的同源性。与水牛(*Bubalus bubalis*, AY392452)有 85.7% 的同源性,与山羊(*Capra hircus*, DQ532360)有 86.8% 的同源性,与马(*Equus caballus*, AY170305)有 61.9% 的同源性,与驯鹿(*Rangifer tarandus*, DQ861296)有 85.2% 的同源性,与野猪(*Sus scrofa*, NM213838)有 66.7% 的同源性,与犬(*Canis familiaris*, DQ012006)有 34.4% 的同源性,与恒河猴(*Macaca mulatta*, NM001032857)有 33.9% 的同源性。比较结果显示扩增的 BNBD-7 的 cDNA 和水牛、山羊、驯鹿的 cDNA 同源性在 85.0% 以上,说明反刍动物的 β -防御素 cDNA 具有种属特异性(表 1)。

3 讨论

国内外对防御素的研究已有大量的报道,但多集中在人防御素研究方面,对畜、禽防御素基因工程方面的研究较少,仅有少量关于鸡

表 1 牛、水牛、山羊、马、驯鹿、野猪、犬、恒河猴 β -防御素氨基酸序列同源性比较

Table 1 Alignment of amino acid sequences of bovine β -defensin with *Bos taurus*, *Bubalis bubalis*, *Capra hircus*, *Equus caballus*, *Rangifer tarandus*, *Susscrofa linnaeus*, *Canis familiaris*, *Macaca mulatta*

		同源性 Percent identity (%)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Divergence	1		96.3	85.7	86.8	61.9	85.2	66.7	34.4	33.9	1 牛 <i>Bos taurus</i>
	2	3.8		86.2	86.8	63.5	85.7	66.1	33.9	32.8	2 实验牛 <i>B. taurus</i>
	3	15.9	15.2		85.4	63.0	87.5	69.3	31.7	31.8	3 水牛 <i>Bubalus bubalis</i>
	4	14.6	14.6	15.9		62.1	90.8	70.8	32.3	31.3	4 山羊 <i>Capra hircus</i>
	5	53.7	50.4	52.7	56.1		63.6	64.6	29.6	31.8	5 马 <i>Equus caballus</i>
	6	16.5	15.9	13.3	10.2	53.3		69.7	33.3	29.7	6 驯鹿 <i>Rangifer tarandus</i>
	7	44.9	46.1	40.5	39.0	52.1	41.1		33.3	31.8	7 野猪 <i>Susscrofa linnaeus</i>
	8	156.7	162.8	181.6	175.4	232.2	166.2	166.2		32.8	8 犬 <i>Canis familiaris</i>
	9	162.8	173.5	178.8	192.2	197.6	228.5	193.0	186.4		9 恒河猴 <i>Macaca mulatta</i>
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	

(*Gallus domestica*)¹²⁻¹⁴、火鸡(*Casuaris casuaris*)¹³、骆驼(*Camelus bactrianus*)¹⁵、山羊(*Capra hircus*)^{16,17}、猪(*Susscrofa domestica*)^{18,19} 的防御素在 DNA 水平上的研究,国内有关牛防御素的研究很少,将防御素应用于畜、禽临床治

疗的报道就更少。目前,尚无运用基因工程方法研制奶牛乳腺防御素的报道,因而开展奶牛乳腺防御素基因的克隆表达及其功能的研究,对于探索奶牛乳腺防御素基因工程表达的可行性,了解奶牛防御素表达调控的基本规律,探讨

利用防御素防治乳腺炎的可能性均具有重大的意义。

奶牛乳腺通过物理性屏障及细胞免疫来防御外界病原菌的感染,而嗜中性粒细胞是乳腺细胞免疫中发挥主要作用的一类细胞,防御素是中性粒细胞溶酶内的主要杀菌分子。当乳腺受到外界病原菌感染时,全身各处的嗜中性粒细胞都随血液运送到乳腺发挥作用,且中性粒细胞表达的防御素量也会显著增加。本研究针对奶牛业生产实际需要,通过分子生物学手段克隆奶牛乳腺中性粒细胞防御素基因,以便对其结构与功能进行更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Lehr R L , Lichtenstein A K , Ganz T . Defensins : antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* ,1993 ,**11** :105 ~ 128 .
- [2] Luenser K ,Ludwig A . Variability and evolution of bovine β -defensin genes. *Genes and Immun* .2005 **6**(2) :115 ~ 122 .
- [3] Radhakrishnan Y , Hamil K G , Yenugu S , et al . Identification , characterization , and evolution of a primate β -defensin gene cluster. *Genes and Immun* .2005 **6**(2) :203 ~ 210 .
- [4] Tang Y Q ,Selsted M E . Characterization of the disulfide motif in BNBD-12 ,an antimicrobial β -defensin peptide from bovine neutrophils. *Biological Chemistry* ,1993 ,**268**(9) :6 649 ~ 6 653 .
- [5] Yarus S ,Rosen J M ,Cole A M ,et al . Production of active bovine tracheal antimicrobial peptide in milk of transgenic mice. *PNAS* ,1996 **93**(24) :14 118 ~ 14 121 .
- [6] Selsted M E ,Tang Y Q ,Morris W L , et al . Purification , primary structures , and antibacterial activities of beta-defensins ,a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem* ,1996 **268**(9) :6 641 ~ 6 648 .
- [7] Swanson K ,Gorodetsky S ,Good L . Expression of a β -defensin mRNA , lingual antimicrobial peptide , in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis. *Infection and Immunity* .2004 **72**(12) :7 311 ~ 7 314 .
- [8] Ryan L K ,Rhodes J ,Bhat M ,et al . Expression of β -defensin genes in bovine alveolar macrophages. *Infection and Immunity* , 1998 **66**(2) :878 ~ 881 .
- [9] Yount N Y ,Yuan J ,Tarver A ,et al . Cloning and expression of bovine neutrophil beta-defensins. Biosynthetic profile during neutrophilic maturation and localization of mature peptide to novel cytoplasmic dense granules. *J Biol Chem* ,1999 ,**274**(37) :26 249 ~ 26 258 .
- [10] Swanson K ,Gorodetsky S ,Good L , et al . Expression of α -defensin mRNA , lingual antimicrobial peptide , in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis. *Infection and Immunity* .2004 **72**(12) :7 311 ~ 7 314 .
- [11] 萨姆布鲁克 J ,拉塞尔 D W(黄培堂等译). 分子克隆实验指南(第三版). 北京 : 科学出版社 .2002 .
- [12] Harwig S S , Swiderek K M , Kokryakov V N , et al . Gallinacins : cysteine-rich antimicrobial peptides of chicken leukocytes. *FEBS Letters* ,1994 **342**(3) :281 ~ 285 .
- [13] Evans E W ,Beach F G ,Moore K M , et al . Antimicrobial activity of chicken and turkey heterophil peptides CHP1 , CHP2 ,THP1 , and THP3. *Veterinary Microbiology* ,1995 ,**47**(3-4) :295 ~ 303 .
- [14] 张辉华 ,曹永长 ,毕英佐 . 鸡 β -防御素 cDNA 的克隆与序列分析. *中国预防兽医学报* .2004 **26**(3) :185 ~ 187 .
- [15] 杨银凤 ,唐博 ,曹贵方 . 骆驼 β -防御素 caBD-1cDNA 的克隆及序列分析. *畜牧兽医学报* .2004 ,**35**(4) :357 ~ 361 .
- [16] Zhao C ,Nguyen T ,Liu L , et al . Differential expression of caprine β -defensins in digestive and respiratory tissues. *Infection and Immunity* ,1999 **67**(11) :6 221 ~ 6 224 .
- [17] Luenser K ,Fickel J ,Ludwig A ,Evolution of caprine and ovine β -defensin. *Genes Immunogenetics* .2005 ,**57**(7) :487 ~ 498 .
- [18] Veldhuizen E J , Hendriks H G , Hogenkamp A , et al . Differential regulation of porcine beta-defensins 1 and 2 upon Salmonella infection in the intestinal epithelial cell line IPI-2I. *Veterinary Immunology and Immunopathol* ,2006 ,**114**(1-2) :94 ~ 102 .
- [19] Veldhuizen E J ,van Dijk A ,Tersteeg M H ,et al . Expression of beta-defensins pBD-1 and pBD-2 along the small intestinal tract of the pig :lack of upregulation in vivo upon Salmonella typhimurium infection. *Molecular Immunology* ,2007 ,**44**(4) :276 ~ 283 .