

驯鹿 β -防御素 reBD-1 cDNA 的克隆及序列分析

杨银凤¹, 赵艳芳², 余兴帮³, 郝永峰¹

(1. 内蒙古农业大学动物胚胎与发育生物学研究室, 呼和浩特 010018; 2. 呼伦贝尔市鄂温克旗农牧业局, 鄂温克旗 021000; 3. 呼伦贝尔市兽医站, 海拉尔 021008)

摘要: 从驯鹿舌黏膜上皮组织中提取总 RNA, 采用 RT-PCR 技术扩增出 reBD-1 的 cDNA, 并重组到 pBluescript T 载体, 经限制性内切酶谱分析和 DNA 序列测定, 证实所克隆的 reBD-1 的 cDNA 为 β -防御素, 因为该 cDNA 包含由 192 个碱基组成的开放读码框 (ORF), 该 ORF 编码 64 个氨基酸残基的前原防御素, 该前原防御素含有 β -防御素特征性结构即 6 个在特定位置上的保守半胱氨酸残基。驯鹿 β -防御素属首次发现, 为更好地了解驯鹿黏膜防御机制有很大的帮助。

关键词: β -防御素; 驯鹿; cDNA

中图分类号: S825.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)08-0740-05

The cDNA Cloning and Sequencing of Reindeer β -defensin reBD-1

YANG Yin-feng¹, ZHAO Yan-fang², YU Xing-bang³, HAO Yong-feng¹

(1. *Laboratory of Animal Embryo and Developmental Biology, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China*; 2. *Ewenke Bureau of Agriculture and Animal Husbandry, Ewenke 012000, China*; 3. *Hulunbeier Prefectural Station of Veterinary Medicine, Hailaer 021008, China*)

Abstract: Total RNA was extracted from the tongue epithelia of a reindeer and the cDNA encoding reindeer β -defensin (reBD-1) was amplified by the reverse transcription PCR (RT-PCR). The purified RT-PCR product was cloned in pBluescript T vector. The results of restriction endonuclease pattern analysis of recombinant plasmid and DNA sequencing demonstrated that the reBD-1 is belong to the family of β -defensin because the cDNA contain a open reading frame (ORF) of 192 bases which encoded a 64 amino acid prepro-peptide and the prepro-peptide contained the β -defensin consensus sequence of six invariantly spaced cysteine residues. The reBD-1 is the first β -defensin found in reindeers. This finding of the reindeer β -defensin facilitate a better understanding of mucosal defense mechanisms in reindeers.

Key words: β -defensin; reindeer; cDNA

内源性抗微生物肽是生物体内先天性免疫的重要组成部分, 在植物及整个动物界 (包括昆虫、被囊动物、两栖类、鸟类、哺乳动物) 普遍存在, 且具有广谱的抗微生物活性^[1,2], 因此已成为目前的研究热点。

β -防御素是一类新发现的富含半胱氨酸的抗微

生物肽, 其分子内含有由 6 个半胱氨酸残基形成的 3 对二硫键, 在哺乳动物和鸟类的上皮组织和白细胞内均发现有 β -防御素存在^[3]。第 1 个 β -防御素是从牛的气管黏膜上皮中发现的, 并命名为 TAP (Tracheal Antimicrobial Peptide)^[4], 接下来分别又在牛的舌、肠道和噬中性粒细胞、绵羊及山羊的胃

收稿日期: 2005-09-02

基金项目: 内蒙古农业大学博士启动基金 (BJ04-2); 内蒙古自然科学基金 (200508010520)

作者简介: 杨银凤 (1963-), 女, 呼和浩特人, 博士, 副教授, 主要从事动物解剖与组织胚胎学、发育生物学的教学及研究工作。E-mail: julie1963@163.com; Tel: 0471-4309690

肠道以及骆驼体内均发现有 β -防御素的存在,分别命名为 LAP(Lingual Antimicrobial Peptide)^[5,6]、EBD(Enteric Beta-Defensin)^[7]、BNBD1~13(Bovine Neutrophils Beta-Defensin 1~13)^[8]、sBD(Sheep Beta-Defensin)^[9]、GBD(Goat Beta-Defensin)^[10]、caBD-1(Camel Beta-Defensin-1)^[11]。根据 β -防御素肽的长短及基因结构的相似性,可将 β -防御素分为三类。其中 TAP、LAP、EBD、BNBD-1~13、sBD-1、sBD-2 属于第一类,这一类 β -防御素肽具有短的前原序列(63-64 aa)和短的内含子(< 1.6 kb),而且在氨基酸和核苷酸序列上具有很高的相似性。研究表明这一类 β -防御素在炎症诱导介质如脂多糖和肿瘤坏死因子作用下表达量增加即呈诱导性表达^[6,12]。驯鹿是主要以苔藓、石蕊为主食的反刍动物,它们的消化道黏膜免疫发生了一些适应性变化。为了进一步阐明驯鹿黏膜防御机制,笔者进行了驯鹿防御素的研究。

由于牛、羊等反刍动物的防御素在氨基酸和核苷酸序列上具有很高的相似性,因此,本研究利用这些反刍动物 β -防御素 cDNA 的保守序列来确认驯鹿的 β -防御素。在具有先天性免疫功能的上皮组织中,舌是最具有抵抗力的,因为在咀嚼过程中舌易于被损伤,但它很少受感染,所以首先选择驯鹿的舌作为组织原料来检测驯鹿防御素的表达。

1 材料与方法

1.1 试验动物及其组织

一头残疾驯鹿(右后肢缺失)由内蒙古大兴安岭北敖鲁古雅民族自治乡提供。驯鹿屠宰后立刻刮取驯鹿舌上皮组织,马上冻入液氮中,备用。

1.2 试剂

DNA Marker 为 DL2000 和 DL15000、限制性内切酶 *EcoRI* 和 *Hind III*、PCR 产物纯化试剂盒购自大连宝生物公司;质粒提取试剂盒、pBluescript T 载体购自上海生工生物工程公司;琼脂糖、总 RNA 提取试剂盒、一步法反转录 PCR 试剂盒购自 Promega 公司。

1.3 PCR 引物的设计及合成

根据 GenBank 中反刍动物 β -防御素—牛的 β -防御素(LAP、TAP、EBD、BNBD-4)和羊的 β -防御素(sBD-1、sBD-2)的基因序列,利用计算机软件 DNASTAR 进行基因序列的同源性比较得出这些 β -防御素 cDNA 序列的保守区,根据该 cDNA 保守区

和引物设计原则设计一对 PCR 引物。上游引物(Primer 1)序列为:5' - GCCAGCATGAGGCTC-CATCAC CTGCTCCT - 3';下游引物(Primer 2)序列为:5' - AACTTTGAACAAAATTTAT-TCTGGTTTAAATT-3'。引物由上海生工生物工程公司合成。

1.4 驯鹿舌上皮组织总 RNA 的提取

采用 Promega 公司的总 RNA 提取试剂盒,按其说明进行。最后用无 RNase 去离子水溶解 RNA 沉淀,-70℃保存备用。

1.5 RT-PCR 反应

RT-PCR 反应液的组成:8 μ L 总 RNA(约 800ng 总 RNA),10 μ L 5 \times 反应缓冲液,2 μ L 25 mmol/L MgCl₂,1 μ L dNTP,1 μ L AMV 反转酶(5 u/ μ L),1 μ L DNA *Taq* 酶(5 U/ μ L),50 pmol 上游引物,50 pmol 下游引物,加无 RNase 去离子水至 50 μ L。另外设一个阴性对照,即在 RT-PCR 反应液中不加反转录酶 AMV,以排除 RT-PCR 产物是基因组 DNA 的扩增产物。RT-PCR 反应条件为:48℃保温 45 min,使 RNA 逆转录为 cDNA;94℃预变性 2 min;然后进行 40 个 PCR 循环:90℃30 s,55℃退火 1 min,68℃延伸 2 min;最后 68℃延伸 7 min。

1.6 reBD-1 基因 cDNA 的克隆及重组质粒的筛选和鉴定

按 PCR 产物纯化试剂盒先行 RT-PCR 扩增产物纯化,然后用 T4 DNA 连接酶将纯化的 reBD-1 基因 cDNA 片段与 pBluescript T 载体连接,连接反应产物转化宿主菌 JM109 感受态细胞,涂布含氨苄青霉素和 X-Gal 的 LB 选择平板。从转化平板挑取白色菌落,用质粒提取试剂盒提取质粒。用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *Hind III* 对质粒 DNA 作酶切鉴定。

1.7 DNA 序列测定

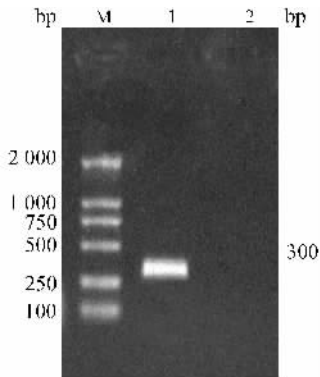
将酶切鉴定正确的质粒送上海生工生物工程公司进行序列测定。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增

为了验证 β -防御素在驯鹿舌上皮组织内的可能表达,我们根据反刍动物 β -防御素 cDNA 的保守区设计并合成了一对引物,通过 RT-PCR 技术获得其产物,经 1.2%琼脂糖凝胶电泳检查为约 300 bp 的

一条带,阴性对照即不加反转录酶 AMV 的无扩增产物(见图 1),说明该扩增产物是以 mRNA 为模板扩增出来的。

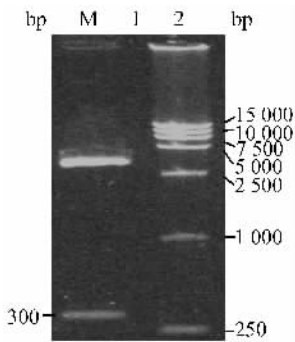


M. DL2000 DNA marker; 1. RT-PCR 产物; 2. 未加反转录酶 AMV 的阴性对照

1. Product of RT-PCR; 2. Negative control without AMV

图 1 reBD-1 cDNA RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Electrophoresis analysis of reBD-1 cDNA RT-PCR product



M. DL15000 DNA marker; 1. *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切

1. pBluescript-reBD-1 digested with *EcoRI* 和 *HindIII*

图 2 重组质粒 pBluescript-reBD-1 限制性酶切分析

Fig. 2 Restriction endonuclease pattern analysis of the recombinant plasmid pBluescript-reBD-1

2.2 reBD-1 基因 cDNA 的克隆及重组质粒的筛选和鉴定

在 PCR 反应体系中, *Taq* DNA 聚合酶常在扩增的 PCR 产物 dsDNA 每条链的 3' 末端多加上一个非模板依赖的 dA 碱基, 使平端连接极为困难, 解决这一难题的有效方法之一是构建 T 载体。pBluescript T 载体(分子量为 2 961 bp) 系统用 *Eco321* 切割 pBluescript T 载体, 并在 dsDNA 平端的 3' 再加上一个 dT 碱基, 一方面阻止其自身环化,

另一方面通过 AT 配对, 即可将载体与 PCR 产物直接连接。pBluescript T 载体具有 *Ampr* 抗性基因, 其多克隆位点在 *LacZ* 基因编码区内, 通过 α -互补原理, 可进行蓝白菌落筛选。连接产物转化大肠杆菌 JM109 后, 在含氨苄青霉素和 IPTG-*Xgal* 的选择平板上, 筛选白色菌落, 提取质粒, 经限制性内切酶 *EcoRI* 和 *HindIII* 酶切图谱分析证实, 含有插入的目的片段(见图 2)。

2.3 PCR 产物的序列分析

经酶切鉴定正确的质粒送上海生工生物工程公司进行 DNA 序列测定, 其测序结果及通过 DNAsar(Lasergene5.01) 进行蛋白质氨基酸序列预测结果见图 3。reBD-1 基因的 cDNA 序列测定结果是 300 bp, 其中包含 192 bp 的开放读码框(ORF), 该 ORF 所编码的氨基酸序列中含有 β -防御素的特征性分子结构即在特定位置上的 6 个保守半胱氨酸残基(C), 可以确定该 cDNA 为 β -防御素家族的成员, 并命名为 reBD-1(reindeer β -defensin-1)。

| | |
|---|-----|
| GCC AGC ATG AGG CTC CAT CAC CTG CTC CTC GCG CTC CTC TTC GTG | 45 |
| M R L H H L L L A L L F V | 13 |
| GTC CTG TGT GCT GCG TCC GGA TTT ACT CAA GGA GTA AAA ACT CCT | 90 |
| V L S A A S G F T Q G V K T P | 28 |
| CAA AGC TGC CAT AGG AAT AAA GGC GTC TGT GTG CCG ATC AGG TGC | 135 |
| Q S C H R N K G V C V P I R C | 43 |
| CCT AGA AGA CTG AGA CAG ATT GGC ACC TGT CTC GGG GCC CCA GTA | 180 |
| P R R L R Q I G T C L G A P V | 58 |
| AAA TGC TGC AGA AGA AAG TAA AAG AAG ATG AAG ACA CGG CCG GGA | 225 |
| K C C R R K * | 64 |
| CTG ATG GGG AGT CAG AAA CTG CAC CCT TCA ACA CAG CAT CTA AAA | 270 |
| TTT AAA CCA GAA TAA ATT TTG TTC AAA GTT | 300 |

* 终止密码子 * Stop codon

图 3 reBD-1 cDNA 的核苷酸序列及 64 个氨基酸组成的前原防御素肽

Fig. 3 Nucleotide and predicted 64 amino acid sequences of reBD-1

2.4 reBD-1 的 cDNA 与其它动物的 β -防御素 cDNA 的比较

通过 DNAsar(Lasergene5.01) 比较得出驯鹿 β -防御素 reBD-1cDNA 与牛的 β -防御素 LAP、TAP、BNBD-4、EBD 的 cDNA 分别享有 87%、84.6%、83.3%、81.3% 的同源性, reBD-1cDNA 与绵羊的 β -防御素 sBD-1、sBD-2 的 cDNA 享有 88.7%、84.3% 的同源性, 与猪的 β -防御素 pBD-1、骆驼的 β -防御素 caBD-1 的 cDNA 分别享有 59.7%、66.7% 的同源性。reBD-1cDNA 与牛、羊、猪的 β -防御素一样含有由 192bp 组成的开放读码框(ORF), 该 ORF 编码 64 个氨基酸的前原驯鹿 β -防

- [2] Ganz T, Lehrer R I. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia [J]. *Semin Hematol*, 1997, 34: 343~354.
- [3] Lehrer R I, Ganz T. Endogenous vertebrate antibiotics: defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1996, 797: 228~239.
- [4] Diamond G, Zaslo M, Eck H, *et al.* Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 3 952~3 956.
- [5] Diamond G, Jones D E, Bevins C L. Airway epithelial cells are the site of expression of a mammalian antimicrobial peptide gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 4 596~4 600.
- [6] Schonwetter B S, Stolzenberg E D, Zaslo M A. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation [J]. *Science*, 1995, 267: 1 645~1 648.
- [7] Tarver A P, Clark D P, Diamond G, *et al.* Enteric beta-defensin: molecular cloning and characterization of a gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with *Cryptosporidium parvum* infection [J]. *Infect Immun*, 1998, 66(3): 1 045~1 056.
- [8] Selsted M E, Tang Y, Morris W L, *et al.* Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 6 641~6 648.
- [9] Huttner K M, Brezinski-Caliguri D J, Mahoney M M, *et al.* Antimicrobial peptide expression is developmentally regulated in the ovine gastrointestinal tract [J]. *J Nutr*, 1998, 128: 297S~299S.
- [10] Zhao C, Nguyen T, Liu L, *et al.* Differential expression of caprine β -defensins in digestive and respiratory tissues [J]. *Infect Immun*, 1999, 67(11): 6 221~6 224.
- [11] 杨银凤, 唐博, 曹贵方. 骆驼 β -防御素 cDNA 的克隆和序列分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2004, 35(4): 357~361.
- [12] Diamond G, Russell J P, Bevins C L. Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 5 156~5 160.
- [13] Ganz T, Lehrer R I. Defensins [J]. *Pharmaxil Ther*, 1995, 66: 191~205.
- [14] Medzhitov R, Janeway C A. Innate immunity impact: on the adaptive immune response [J]. *Curr Opin Immunol*, 1997, 9: 4~11.

动物疫情速递

克罗地亚发生猪瘟

2006年7月20日克罗地亚向OIE报告了古典猪瘟疫情,起始日期不详,于2006年7月19日确认,病原为古典型猪瘟病毒。Vukovarsko srijemska县的Borovo镇和Vukovar镇的2个小型家庭猪场发生2起家猪猪瘟,共有18头易感动物(6例病例和死亡)。诊断由设在萨格勒布的克罗地亚兽医研究所用ELISA方法完成。采取的控制措施:扑杀、检疫、国内限制移动、筛选、区域化和疫区消毒。

秘鲁发生炭疽

秘鲁农业部于2006年7月13日向OIE报告了炭疽疫情。疫区位于兰巴耶克省奇克拉约市蒙塞富县一个从事牛奶生产的小农场,疫情始于2006年7月9日,并于同日得到确认,属临床病例,病原是炭疽杆菌。病畜为牛,疑似感染动物13头,1例病例已死亡并销毁,该病例为1头7月龄的小牛。诊断方法包括尸检和实验室检验。实验室诊断在动物卫生诊断中心进行,手段为培养分离、生化及敏感性试验,结果为阳性。疫情来源尚不清楚。秘鲁采取的措施有部分检疫、扑杀、国内限制移动、区域化、免疫接种和疫区消毒。已对兰巴耶克省1371头牛、19头骆驼、109只绵羊和67头猪用减毒Sterne株进行了免疫。未发现新的疑似病例,疫情检测仍在进行。