

广西黄鸡 β -防御素基因的克隆、 序列分析与组织分布

冀 君, 陈燕珊, 张祥斌, 陈俊伟, 马静云, 毕英佐, 谢青梅

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:用设计的特异性引物,采用 RT-PCR 方法扩增到广西黄鸡 β -防御素基因 gallinacin-1 (简称 Gal-1) ~ gallinacin-13 (简称 Gal-13). 通过克隆、测序获得这 13 个基因的 cDNA 核苷酸序列,并提交到 GenBank (Gal-1 ~ Gal-13 基因的注册号为:DQ858297 ~ DQ858310). 比较分析广西黄鸡 13 种 β -防御素 Gal-1 ~ Gal-13 基因分别与 GenBank 中注册的防御素基因氨基酸序列的相似性,其氨基酸的相似性均在 95.5% ~ 100% 之间. 利用 DNASTar 软件对所获得的 13 种广西黄鸡 β -防御素基因进行系统发育树分析,结果 Gal-1 与 Gal-5、Gal-12、Gal-2 在同一分支上, Gal-6、Gal-7、Gal-9、Gal-8 在同一分支上, Gal-10、Gal-11、Gal-4 在同一分支, Gal-13 独自为一分支. 同样用 RT-PCR 方法分析了广西黄鸡 β -防御素 Gal-1 ~ Gal-13 基因在不同组织中的分布,结果发现: Gal-1、Gal-2、Gal-4、Gal-5、Gal-6、Gal-7、Gal-10 的表达分布非常广泛, Gal-3、Gal-8、Gal-9、Gal-11、Gal-12、Gal-13 的分布较少.

关键词:广西黄鸡; β -防御素; gallinacin 基因; 序列分析; 组织分布

中图分类号:S859.796

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)03-0061-05

Cloning, Sequencing and Tissue Distribution of β -Defensin Gallinacin Genes in Guangxi Yellow Chicken

Ji Jun, CHEN Yan-shan, ZHANG Xiang-bin, CHEN Jun-wei, MA Jing-yun, BI Ying-zuo, XIE Qing-mei

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: With specific primers, thirteen chicken β -defensin gallinacin-1 (Gal-1) ~ gallinacin-13 (Gal-13) cDNA fragments, were amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from Guangxi Yellow chicken. All of the cDNA fragments covered the full-length of the open reading frame, with the exception of Gal-3. After being sequenced, 13 cDNA fragments were identified and deposited to GenBank™ (accession numbers DQ858297 ~ DQ858310). The results of sequence comparison with the β -defensin gene sequences published in GenBank™ indicated that amino acid similarity of the 13 chicken β -defensin genes ranged from 95.5% to 100%. Analysis by DNASTar showed that Gal-1, Gal-5, Gal-12 and Gal-2 lay at the same embranchment; Gal-6, Gal-7, Gal-9 and Gal-8 lay at the same one; Gal-10, Gal-11 and Gal-4 lay at the same one; Gal-13 lay at the embranchment independently. Different mRNA distribution of genes in different tissues, analyzed by RT-PCR, indicated that Gal-1, Gal-2, Gal-4, Gal-5, Gal-6, Gal-7 and Gal-10 were widely expressed in tissues, while Gal-3, Gal-8, Gal-11, Gal-12 and Gal-13 had limited tissue distribution.

Key words: Guangxi Yellow chicken; β -defensin; gallinacin gene; sequence analysis; tissue distribution

收稿日期:2007-08-30

作者简介:冀 君(1984—),男,硕士研究生; 通讯作者:谢青梅(1972—),女,副教授, E-mail: qmx@scau.edu.cn

基金项目:广东省科技计划项目(2004A20106001, 2007A020400006)

防御素(defensin)是家禽异嗜性细胞颗粒中的重要阳离子杀菌与细胞毒害肽,其细胞颗粒中的阳离子多肽与细胞毒害肽对其杀菌更为重要,抗菌活性研究表明它们具有广谱抗菌功能^[1-2]。在家禽的异嗜性细胞中现已纯化出很多种抗菌多肽^[3-4],从鸡 β -防御素的研究始,Harwig等^[5]和Evans等^[6]在鸡的白细胞发现4种抗菌肽,命名为“gallinacins”[Gal-1、Gal-2、Gal-3和Gal-1(α)].随着鸡基因组的公布,Lynn等^[7]采用HMM(Hidden Markov Model)搜索工具与BLAST对比法,从鸡基因组数据库中搜索到6个新的鸡 β -防御素基因。同年Xiao等^[8]也用生物信息学的方法,分析搜索到10个新的鸡 β -防御素基因,并按这10个基因的mRNA表达的位置依次将它们命名为Gal-4~Gal-13。本研究利用RT-PCR方法成功克隆出广西黄鸡 β -防御素13个cDNA片段,同时进行序列分析,发现6个防御素cDNA片段编码的防御素成熟肽片段中的氨基酸残基与GenBank中注册的相对应的防御素基因编码的氨基酸残基有差异,研究这些个别氨基酸残基的差异对防御素活性及影响机制,将有利于鸡防御素的开发利用。同时检测了13种防御素基因在鸡喉气管、肺脏、肝脏、十二指肠、肾脏、法氏囊组织中分布,为以后研究鸡防御素的结构、功能、多样性及其进化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 广西黄鸡购自广东省农科院畜牧研究所,由华南农业大学基因工程实验室饲养至1月龄。

1.1.2 菌株与质粒 大肠杆菌DH5 α 由华南农业大学基因工程实验室保存,基因型为:supE44, Δ lacU169(Φ 80, Δ lacZ Δ M15),hsdR17,recA1,endA1,gyrA96,thi-1,relA1。pMD18-T载体质粒系统为TaKaRa公司产品。

1.1.3 细胞总RNA提取试剂盒 TRIzol LS Reagent RNA提取试剂盒为GIBCORL公司产品。

1.1.4 酶类及其他试剂 AMV反转录酶(5 U/ μ L)、HRP RNA酶抑制剂(40 U/ μ L)、dNTPs(2.5 mmol/L each)、EcoR I(15 U/ μ L)、DNA marker DL2000均为TaKaRa公司产品;Blend Taq DNA聚合酶(5 U/ μ L)为Toyobo公司产品;DEPC、饱和酚为上海生工生物工程公司产品;X-gal、IPTG、EB(溴化乙锭)为宝泰克生物科技有限公司产品;E. Z. N. A. Plasmid Minipreps Kit和E. Z. N. A. Gel Extraction Kit均为Omega公司产品。

1.2 方法

1.2.1 PCR引物的设计 参照GenBank中注册的鸡 β -防御素基因Gal-1~Gal-13序列,根据PCR引物的设计原则,并借助计算机软件DNASTar进行辅助分析,设计了13对PCR引物,13对Gal-1~Gal-13引物(序列略)及引物Olig-DT16(5'-TTTTTTTTTTTTTTT-3')分别由上海基康公司与上海博亚公司合成,引物序列,分别用于13个鸡 β -防御素基因的扩增。

1.2.2 总RNA的提取 按照TRIzol LS Reagent RNA提取试剂盒使用说明书介绍的步骤,分别从鸡骨髓细胞、肝脏组织和肾脏组织中提取总RNA。

1.2.3 鸡 β -防御素基因的RT-PCR扩增 反转录(RT)反应体系:RNA 5 μ L,5 $\times$ buffer 4 μ L,dNTPs 4 μ L,RNA酶抑制剂0.5 μ L,Olig-DT16引物0.5 μ L,AMV 2 μ L,DEPC水补至20 μ L。混匀后,室温静置10 min,42 $^{\circ}$ C保温1 h,冰浴2 min,反转录产物直接用于PCR扩增。PCR反应体系为:10 $\times$ buffer 10 μ L,dNTPs 4 μ L,上下引物各1.0 μ L,cDNA 5 μ L,Blend Taq 0.5 μ L,双蒸水补至100 μ L。PCR程序:94 $^{\circ}$ C预变性3 min;94 $^{\circ}$ C 40 s,58 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,30个循环;72 $^{\circ}$ C后延伸10 min。PCR产物用0.01 g/mL的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

Gal-1~Gal-7基因从骨髓细胞RNA扩增,Gal-8、Gal-9、Gal-10和Gal-13从肝脏组织RNA扩增,而Gal-11和Gal-12是从肾脏组织RNA中扩增。

1.3 PCR产物的克隆与序列分析

PCR产物经过凝胶纯化回收后,与载体pMD18-T在下列反应体系中连接:2 $\times$ buffer 5 μ L,pMD18-T 1 μ L,加尾的PCR产物3 μ L,T4连接酶1 μ L,混匀后,于4 $^{\circ}$ C过夜连接,再将连接产物转化DH5 α 感受态细胞。挑取单个的白色菌落,接种于3 mL含Amp的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C振荡培养过夜,然后进行菌落PCR,对于PCR鉴定阳性的菌落,抽提质粒进行酶切鉴定。酶切鉴定正确的质粒送上海博亚生物技术有限公司测序,对所获得的DNA序列用Blast程序进行相似性检索比较。

1.4 广西黄鸡 β -防御素基因Gal-1~Gal-13的组织分布

50只1日龄广西黄鸡饲养至30日龄,随机取10只鸡喉气管、肺脏、肝脏、十二指肠、肾脏、法氏囊组织,加入1 mL TRIzol LS冷冻匀浆,吸入至1.5 mL经DEPC水处理的灭菌微量离心管中,室温静置10 min,使组织样品充分裂解;加入200 μ L氯仿,激烈摇动15 s,室温静置5 min;4 $^{\circ}$ C,12 r/min离心15 min,取上清液于一新的1.5 mL经DEPC水处理的

灭菌微量离心管中,加入 500 μ L 异丙醇,充分混匀,室温放置 10 min;4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,沉淀用体积分数为 70% 乙醇洗涤 1 次;风干,用 10 μ L 经 DEPC 水处理的无 RNA 酶的三蒸水溶解沉淀,直接用于 RT-PCR 或 -80 $^{\circ}$ C 保存. 用 RT-PCR 方法扩增 β -防御素 Gal-1 ~ Gal-13 基因,检测各基因在喉气管、肺脏、肝脏、十二指肠、肾脏、法氏囊的分布情况.

2 结果与分析

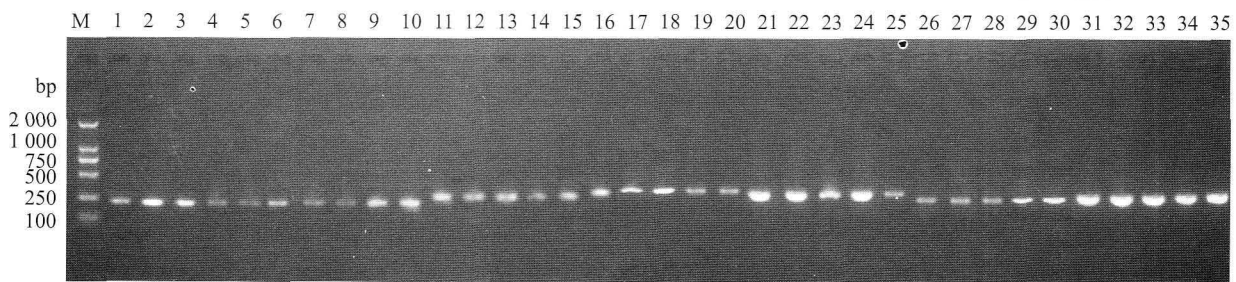
2.1 鸡 β -防御素基因的 RT-PCR 扩增

用所设计的特异性引物进行 RT-PCR,从组织

mRNA 中扩增出广西黄鸡 β -防御素基因 Gal-1 ~ Gal-13 编码区全长 cDNA,RT-PCR 产物于 0.02 g/mL 琼脂糖凝胶电泳时,可以看到与预期长度相吻合的目的电泳条带出现(图 1、图 2). PCR 产物用于克隆、测序.

2.2 鸡 β -防御素基因的序列测定

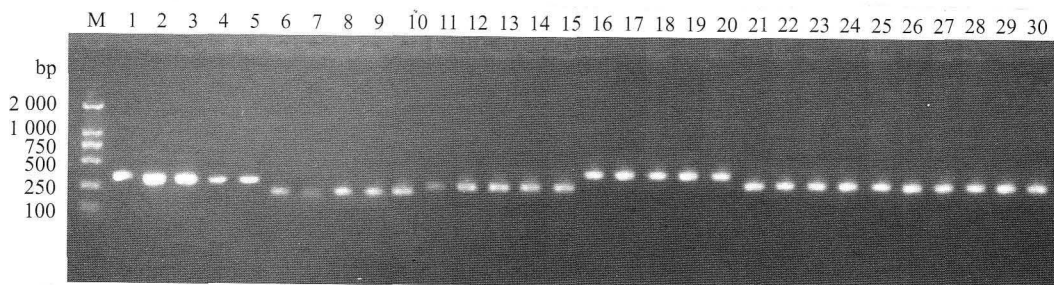
通过克隆、测序获得 13 个基因的 cDNA 核苷酸序列,并提交到 GeneBank 中获得广西黄鸡 β -防御素 Gal-1 ~ Gal-13 基因的注册号为: DQ858297 ~ DQ858310. Gal-1 的第 35、45、57 位氨基酸分别为 S、S、Y;Gal-1(α)的第 35、45、57 位氨基酸分别为 N、Y、H. 除了 Gal-3 基因,其他克隆到的序列都为编码



M: DNA marker DL2000; 1~5: Gal-1; 6~10: Gal-2; 11~15: Gal-3; 16~20: Gal-4; 21~25: Gal-5; 26~30: Gal-6; 31~35: Gal-7

图 1 广西黄鸡 β -防御素 Gal-1 ~ Gal-7 基因 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 RT-PCR product of Guangxi Yellow chicken β -defensin Gal-1 ~ Gal-7



M: DNA marker DL2000; 1~5: Gal-8; 6~10: Gal-9; 11~15: Gal-10; 16~20: Gal-11; 21~25: Gal-12; 26~30: Gal-13

图 2 广西黄鸡 β -防御素 Gal-8 ~ Gal-13 基因 RT-PCR 扩增结果

Fig. 2 RT-PCR product of Guangxi Yellow chicken β -defensin Gal-8 ~ Gal-13

区全长片段,由信号肽、前片段和成熟肽组成.

2.3 鸡 β -防御素基因核苷酸序列、氨基酸序列的比较分析

将所测定的所有鸡 β -防御素基因的核苷酸序列通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站的 BLAST 程序与 GenBank 中注册的核苷酸序列进行比较,结果发现本研究所测定的 13 个基因的核苷酸序列与 GenBank 中注册的相应核苷酸序列的相似性为 97% ~ 100%. 对所测定的鸡 β -防御素基因氨基酸序列进行相似性比较分析,结果表明: Gal-1(α) 基因氨基酸序列的相似性为 96.9% ~ 100.0%; Gal-2 氨基酸序列相似性为 96.9% ~ 100.0%; Gal-4 氨基酸序列相似性为 96.9% ~ 98.4%; Gal-5 基因氨基酸序列相似

性为 95.5% ~ 100.0%; Gal-7 基因氨基酸序列相似性为 97.0% ~ 100.0%; Gal-9 氨基酸序列相似性为 97.1% ~ 100.0%; Gal-11 氨基酸序列相似性为 99.0% ~ 100.0%; Gal-12 氨基酸序列相似性为 98.1% ~ 99.0%; Gal-13 氨基酸序列相似性为 98.1% ~ 99.0%. 利用 DNASTar 软件对本试验所测得的 13 种广西黄鸡防御素基因进行系统发育树分析,结果如图 3. 可以看出 Gal-1 与 Gal-5、Gal-12、Gal-2 在同一分支上, Gal-6、Gal-7、Gal-9、Gal-8 在同一分支上, Gal-10、Gal-11、Gal-4 在同一分支, Gal-13 独在一分支上.

2.4 鸡 β -防御素基因的序列与蛋白质结构分析

从表 1 可见. 除了 Gal-3 基因,其他克隆到的序

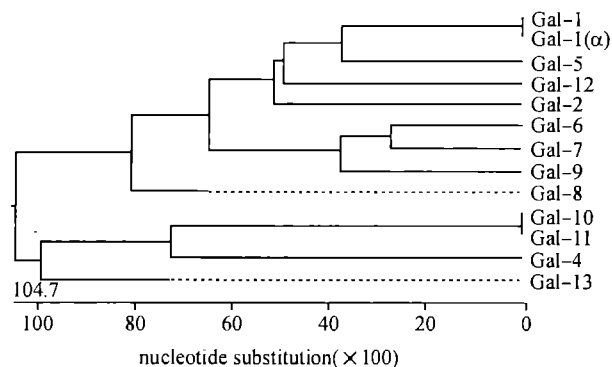
图3 广西黄鸡13种 β -防御素基因的系统发育树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree from the 13 chicken β -defensin genes of Guangxi Yellow chicken

表1 广西黄鸡 β -防御素基因的序列与蛋白质结构分析Tab. 1 Sequence and protein structure analyse of β -defensin genes of Guangxi Yellow chicken

基因 gene	核苷酸序列(bp) nucleotide sequence	前体肽氨基酸数 amino acid amount of precursor peptide	信号肽氨基酸数 amino acid amount of signal peptide	前片段氨基酸数 amino acid amount of propiece	成熟肽氨基酸数 amino acid amount of mature peptide
Gal-1	198	65	20	5	40
Gal-2	195	63	20	5	41
Gal-4	321	64	20	1	38
Gal-5	300	67	20	5	41
Gal-6	249	64	20	5	38
Gal-7	248	67	20	5	41
Gal-8	351	66	20	5	41
Gal-9	240	67	20	5	41
Gal-10	298	68	20	7	40
Gal-11	404	104	20	4	42
Gal-12	335	65	20	0	40
Gal-13	312	60	20	4	36

2.5 广西黄鸡 β -防御素基因 Gal-1 ~ Gal-13 的组织分布情况

从表2数据可以发现, Gal-1、Gal-2、Gal-4、Gal-5、Gal-6、Gal-7、Gal-10的表达分布非常广泛, Gal-3、Gal-8、Gal-9、Gal-11、Gal-12、Gal-13的分布少。

表2 广西黄鸡 β -防御素基因的组织分布情况Tab. 2 Tissue distribution of β -defensin genes of Guangxi Yellow chicken

基因 gene	肺脏 lung	肝脏 liver	喉气管 larynx and trachea	法氏囊 bursa	十二指肠 duodenum	肾脏 kidney
Gal-1	10	10	10	10	10	10
Gal-2	10	10	6	6	8	10
Gal-3	0	0	1	0	0	0
Gal-4	10	6	6	5	10	10
Gal-5	9	1	8	10	10	10
Gal-6	8	9	5	5	10	10
Gal-7	9	8	10	6	10	10
Gal-8	0	10	0	0	0	0
Gal-9	0	9	0	0	0	10
Gal-10	10	10	10	10	10	10
Gal-11	0	0	0	0	0	10
Gal-12	0	10	0	0	0	10
Gal-13	0	10	0	0	0	0

列都为编码区全长片段,由信号肽、前片段和成熟肽组成; Gal-3基因的第1~129和204~387碱基分别跟Gal-1基因的89~129和311~494碱基完全一样,它们的阅读框分别是Gal-3:6~248碱基, Gal-1:94~291碱基,它们的成熟肽片段完全不同,为了保证引物的特异性, Gal-3基因的上游引物落在了阅读框内,所扩增得到基因为第29~300位的核苷酸,编码72个氨基酸,由信号肽的后半部分12个氨基酸残基、5个氨基酸的原片段、38个氨基酸的成熟肽组成。除了Gal-3基因,其他克隆到的序列都为编码区全长片段,由信号肽、前片段和成熟肽组成。

3 讨论

防御素相对分子质量3 000~4 000,为带正电荷的阳离子多肽,具有广谱抗菌功能。国内外学者^[5-6,8-9]陆续克隆了不同品种鸡 β -防御素基因,由于鸡品种的差异,防御素的分布表达也不一致,如Higgs等^[10]从Cobb 500肉鸡中扩增的Gal-13基因序列的阅读框比Xiao等^[8]报道的在3'端少了87个碱基,由于Xiao等^[8]并未提及他们试验鸡的品种,还未能确定这种差异是否由品种差异引起的。本研究扩增到的广西黄鸡 β -防御素Gal-13基因,测序结果与Higgs等^[10]报道的完全相同。

从防御素基因在广西黄鸡的肺脏、肝脏、喉气管、法氏囊、十二指肠和肾脏6个组织中的分布表达情况可以发现, Gal-1、Gal-2、Gal-4、Gal-5、Gal-6、Gal-7、Gal-10的表达分布非常广泛, Gal-3、Gal-8、Gal-9、Gal-11、Gal-12、Gal-13的分布少。该结果与其他学者得到的试验结果并不完全一致^[1]。在所选择的6个

组织中,Brockus等^[11]在肾脏中并未检测到Gal-1基因的表达,在喉气管组织、肾脏、法氏囊中他们并未检测到Gal-2基因,Xiao等^[8]并未在肾脏中检测到Gal-4基因,Gal-5基因的表达和本试验检测结果的不同之处在肾脏、肝脏和胃肠道,Gal-6基因表达的不同之处在喉气管,Gal-7基因除了法氏囊组织与本试验检测结果相同外,其他组织均不同,Gal-8基因表达检测的结果一致,Gal-9基因Xiao等^[8]除了肝脏检测到之外,在肺脏和法氏囊也检测到了,但他们并未在肾脏中检测到。Xiao等^[8]也并未在喉气管、肾脏、胃肠道中检测到Gal-10基因,相反,他们在法氏囊组织中检测到了Gal-12,但本试验并未检测到。

本研究利用RT-PCR技术成功地克隆出广西黄鸡的 β -防御素共13个cDNA片段,丰富了鸡防御素乃至哺乳动物防御素基因资源库,为以后研究鸡防御素的结构、功能、多样性及其进化关系奠定基础,也体现了对广西黄鸡这种优质鸡保种的重要性。

参考文献:

- [1] SUGIARTO H, YU P L. Identification of three novel ostricacins: an update on the phylogenetic perspective of β -defensins[J]. *Int J Animicrob Ag*, 2006, 27:229-235.
- [2] LABADIE O W, PICMAN J, HINCKE M T. Avian antimicrobial proteins: structure, distribution and activity [J]. *World Poultry Sci*, 2007, 63:421-438.
- [3] SUGIARTO H, YU P L. Avian antimicrobial peptides: the defense role of β -defensins[J]. *Biochem Biophysica Res Commun*, 2004, 323:721-727.
- [4] ZASLOFF M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms[J]. *Nature*, 2002, 415:389-395.
- [5] HARWIG S S, SWIDEREK M, KOKRYAKOV V N, et al. Gallinacin-1: cysteine-rich antimicrobial peptides of chicken leukocytes[J]. *FEBS Lett*, 1994, 342:281-285.
- [6] EVANS E W, BEACH G G, WUNDERLICH J, et al. Isolation of antimicrobial peptides from chicken heterophils [J]. *Leuko Biolo*, 1994, 56:661-665.
- [7] LYNN D J, HIGGS R, GAINES S, et al. Bioinformatic discovery and initial characterisation of nine novel antimicrobial peptide genes in the chicken[J]. *Immunogenetics*, 2004, 56:170-177.
- [8] XIAO Y, HUGHES A L, ANDO J, et al. A genome-wide screen identifies a single beta-defensin gene cluster in the chicken: Implications for the origin and evolution of mammalian defensins[J]. *BMC Genomics*, 2004, 5:56.
- [9] 谢青梅,陈燕珊,马静云,等. 广西黄鸡 β -防御素Gal-4基因克隆和体内的诱导表达[J]. *中国兽医科学*, 2006, 36(08):428-432.
- [10] HIGGS R, LYNN D J, GAINES S, et al. The synthetic form of a novel chicken beta-defensin identified in silico is predominantly active against intestinal pathogens[J]. *Immunogenetics*, 2005, 57:90-98.
- [11] BROCKUS C W, JACKWOOD M W, HARMON B G. Characterization of beta-defensin prepropeptide mRNA from chicken and turkey bone marrow[J]. *Anim Genet*, 1998, 29:283-289.

【责任编辑 柴 焰】