

# 奶牛乳腺组织中 NF- $\kappa$ B 基因的克隆

陶金忠<sup>1,2</sup>, 张勇, 张进隆<sup>3</sup>, 杨永新, 赵兴绪\*

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州 730070; 2. 宁夏大学农学院, 宁夏银川 750021; 3. 甘肃畜牧工程职业技术学院, 甘肃武威 733006)

**摘要** [目的] 探索 NF- $\kappa$ B 基因在奶牛发生乳房炎时的表达情况。[方法] 通过对患乳房炎奶牛的乳腺组织中 NF- $\kappa$ B 基因进行扩增, 经 TOP10 菌转化到 T 载体上, 进行菌液验证, 对菌液呈阳性的进行测序。[结果] 通过测序得到 235 bp 的基因片段, 进行比对发现, 与 NF- $\kappa$ B1 基因的 848 ~ 1 083 bp 片段一致。[结论] 在发生乳房炎时, 奶牛的乳腺组织中 NF- $\kappa$ B 基因有表达。

**关键词** 奶牛; 乳腺组织; NF- $\kappa$ B 基因; 克隆

中图分类号 S814.8 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)12-04874-02

## Clone of NF- $\kappa$ B Gene in Mammary Tissue of Dairy Cattle

TAO Jin-zhong et al (College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070)

**Abstract** [Objective] The research aimed to discuss the expression of NF- $\kappa$ B in dairy cattle with mastitis. [Method] Total RNA was extracted from mammary gland tissue of Holstein cattles with mastitis. NF- $\kappa$ B gene was cloned using RT-PCR technology, the results of RT-PCR were transformed into E. coli TOP10, and positive E. coli TOP10 was sequenced. [Result] The 235 bp gene segment was acquired. The comparison analysis revealed that they were consistent with submitted genes NF- $\kappa$ B1 in 848 - 1 083 bp segments. [Conclusion] NF- $\kappa$ B gene was expressed in the mammary gland tissue of dairy cattle with mastitis.

**Key words** Dairy cattle; Mammary gland tissue; NF- $\kappa$ B gene; Clone

NF- $\kappa$ B 是一种具有多项转录调节作用的转录因子, 广泛存在于各种细胞中, 是多信号转导途径的汇聚点。它不仅参与介导免疫应答、炎症反应、病毒复制、细胞凋亡和增殖等多种基因的表达调控, 而且与很多炎性相关疾病的发病机制有密切关系<sup>[1-2]</sup>。

奶牛乳房炎是奶牛产业的一大顽疾, 能引起乳房炎的病原微生物有 150 多种, 而且环境、营养、气候等条件都能影响乳房的健康<sup>[3]</sup>。为此, 笔者对患乳房炎奶牛乳腺组织中 NF- $\kappa$ B 基因进行扩增, 研究其在乳腺中的表达, 旨在为以后乳房炎候选基因研究奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 样品采集** 从宁夏奶牛养殖基地应用兰州乳房炎诊断液进行检测, 选择患乳房炎的奶牛 21 头, 采集奶牛乳腺组织, 添加放入液氮中带回实验室。

**1.2 工具酶、试剂与仪器** *Ti*rzd 和 pGEMT PCR 产物克隆试剂盒购自天根生物有限公司; One-step RT-PCR Kit 购自杭州博日科技有限公司; B 型微量 DNA 片段快速回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司。E832 BoNeer 电泳仪, MYCYCLER<sup>TM</sup> thermal cycler (BioRad USA), MYGerie32 Thermal Block (Boneer)。

**1.3 引物** 引用 DNAMAN 设计引物, 由大连宝生物合成, 合成的量为 2 OD (上游引物: GCT GGA CCC AAGGAC ATG; 下游引物: TGG TCT GCT GCAGAG CTG)。

**1.4 方法** 从液氮中取出 0.1 g 患乳房炎奶牛的乳腺组织, 应用 *Ti*rzd 提取乳腺中的总 RNA。取 1.0  $\mu$ l 进行 RT-PCR 反应, 反应体系总体积为 25  $\mu$ l。反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 8 min。反应结束后取 5.0  $\mu$ l PCR 产物在 20.0

g/L 琼脂糖/EB 凝胶上电泳检测。纯化的 PCR 产物与 pGMT Easy 载体连接, 热激法转化大肠杆菌 TOP 10 感受态细胞, 蓝白斑筛选阳性克隆, PCR 检测合格后送上海生工生物技术有限公司测序。

## 2 结果与分析

**2.1 RNA 电泳图** 提取的 RNA 经紫外分光光度计测出  $A_{260}/A_{280}$  为 1.85。取 4.0  $\mu$ l RNA 在 1% 的琼脂糖 EB 电泳, 在 160 V 下电泳 5 min, 电泳图如图 1 所示。由图 1 可知, RNA 电泳图上 28 S 和 18 S 条带清晰, 比例适合, 说明在 RNA 的提取过程中没有降解, 可以进行后续试验。

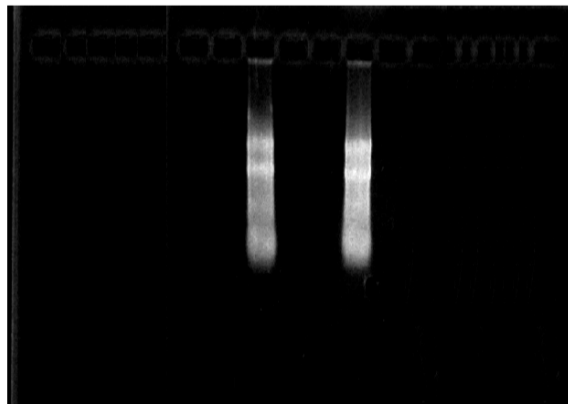


图1 RNA 电泳图

Fig.1 RNA electrophoretogram

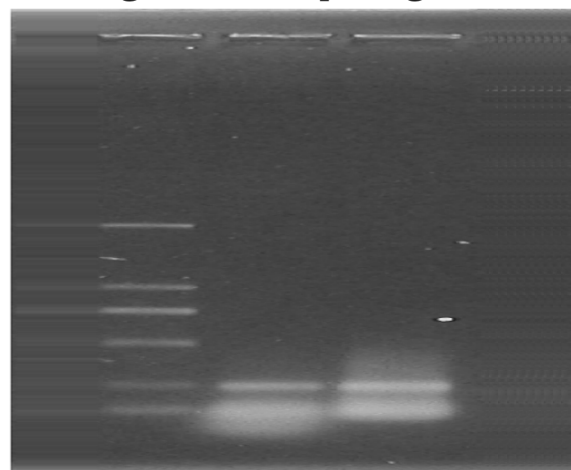


图2 NF- $\kappa$ B RT-PCR 电泳图片

Fig.2 NF- $\kappa$ B RT-PCR electrophoretogram

**2.2 RT-PCR 电泳图** 在最佳退火温度 56  $^{\circ}$ C 和引物浓度 4.00  $\mu$ mol/L 条件下, 以上述提取的 mRNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 得到含有牛编 NF- $\kappa$ B 基因片段大小在 200 ~ 250 bp

基金项目 国际科技合作计划项目: 奶牛乳房炎抗性的功能基因组学及蛋白组学研究(2005DFA30720)。

作者简介 陶金忠(1977-), 男, 甘肃天水人, 博士, 讲师, 从事动物生理生理方面的研究。\* 通讯作者, 博士生导师, 教授。

收稿日期 2008-01-28

的 PCR 产物。

**2.3 测序结果** 对送出去的菌液用 pGEMT 的通用引物进行测序,测得的序列除去引物两端的部分,就是所要的序列。将所得序列和 NF- $\kappa$ B 基因进行比较,发现 NF- $\kappa$ B 片段为 235 bp。

将测序得到的序列和已注册的 NF- $\kappa$ B1 基因比较发现,它与 NF- $\kappa$ B1 基因同源性高,和 NF- $\kappa$ B1 基因的 848 ~1 083 bp 叶片段一致(图3)。

+848

```
GCTGGACCCAAGGACATGGTGGTCGGCTTCGCAAACCTGGGTATACTTCATGTGACAAAGAA
*****
AAAAGTATTTGAAACACTGGAAGCAGCAATGACAGAGCGGTGATAAGGGGCTATAATCCTG
*****
GACTCTTGGTGCACCCCTGACCTTGCCTATTTGCAAGCAGAAGGTGGAGGGACCGGCAGCTG
*****
GGAGATCGGAAAAGAGCTAATCCGCCAAGCAGCTCTGCAGCAGACCA +1083 bp
*****
```

注:上行为 NF- $\kappa$ B1 基因序列,下行为测序序列。

图3 NF- $\kappa$ B1 基因序列与测序序列比较结果

Fig 3 Comparison result between NF- $\kappa$ B1 gene sequence and its detected sequence

### 3 结论与讨论

典型的 NF- $\kappa$ B 是由 p50 和 p65 亚基形成的异二聚体,在静息状态下,NF- $\kappa$ B 与 B 抑制蛋白 I $\kappa$ Bs 结合形成三聚体,以无活性方式存在于胞质中。当细胞受到多种信号(如 LPS 等)刺激时,I $\kappa$ Bs 发生磷酸化并降解,NF- $\kappa$ B 移位进入胞核内,与靶基因结合,启动相关基因转录。已证实,NF- $\kappa$ B 可高效诱导多种细胞因子(如 TNF- $\alpha$ , IL-6 等)、黏附分子(如 ICAM1, VCAM1 等)、趋化因子和急性期反应蛋白的表达,同时对参与炎症反应放大与延续(即级联瀑布效应)的多种表达也具有重要的调控作用。

**3.1 NF- $\kappa$ B 与炎症** 在奶牛发生乳房炎时,乳房局部细菌大量繁殖,大量繁殖的细菌及其代谢产物刺激乳房,导致炎症因子如 TLR4、TNF- $\alpha$ 、IL-1 等表达量增加,由于它们的表达量的增加,激活 NF- $\kappa$ B 信号通路,使 NF- $\kappa$ B 表达增加<sup>[4]</sup>,而这一通路又能诱导炎性细胞因子和趋化因子的表达,启动 TNF- $\alpha$ 、IL-1、细胞黏附分子和环氧合酶-2 等基因转录,导致 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等促炎因子大量产生,引发炎症反应。同时,NF- $\kappa$ B 表达的增加可以调节 L 选择素的表达,使 PMN 的迁出加快<sup>[5-7]</sup>。

**3.2 乳房炎与凋亡** 在奶牛上,乳腺上皮细胞的大量凋亡是乳腺退化的重要特征<sup>[8-9]</sup>。鼠的动物模型中情况也是这样<sup>[10]</sup>。在鼠的动物模型中,与细胞周期进行和捕捉有关的基因,受到前细胞凋亡基因的共同诱导。肿瘤阻遏蛋白、p53 的激活在调解各种退化反应的基因的表达中扮演关键角色。NF- $\kappa$ B 的激活速度很快,在泌乳后 24 h 能看见明显的变化<sup>[11]</sup>。在乳腺细胞培养模型系统中,NF- $\kappa$ B 的激活在 30 min 内就能观察到<sup>[12]</sup>。

NF- $\kappa$ B 的活化可促进多种凋亡抑制基因的转录<sup>[13]</sup>,从而在细胞凋亡中发挥关键的作用<sup>[14]</sup>。I $\kappa$ B(inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase)复合物的活化是 NF- $\kappa$ B 信号通路的关键和焦点<sup>[15]</sup>。NF- $\kappa$ B 对人 PMN 的凋亡发挥关键的抗凋亡保护作用,NF- $\kappa$ B 也能抑制牛 PMN 凋亡<sup>[14]</sup>。核转录因子 NF- $\kappa$ B 可抑制 TNF- $\alpha$  诱导的细胞凋亡。同时,NF- $\kappa$ B 对 caspase-8 有直接阻断作用,而由此抑制一系列 caspases 的活化是其抗细胞

凋亡的重要机制<sup>[16-18]</sup>。

NF- $\kappa$ B 在肝脏炎症损伤、再生和凋亡等方面均有重要作用,且病理损伤程度越强其表达程度越高。TNF- $\alpha$  等多种炎症因子可使 NF- $\kappa$ B 的活性持续存在,诱导细胞内 NF- $\kappa$ B 的激活,使其从胞质转位于细胞核,通过多种途径抑制肝细胞凋亡,最终导致胶原合成的增加而发展为纤维化<sup>[19]</sup>。

大量表达的 NF- $\kappa$ B 促进细胞因子的表达,使 PMN 迁移到乳腺局部,加重炎症。另一方面,激活的 NF- $\kappa$ B 可促进多种凋亡抑制基因的转录,使 PMN 在乳腺组织中的寿命延长,而增加 PMN 在乳汁中对病原体的杀伤和吞噬作用。该研究通过对患乳房炎奶牛乳腺组织中 NF- $\kappa$ B 的扩增发现,得到的序列与 NF- $\kappa$ B1 的部分序列同源性很高。证明 NF- $\kappa$ B 在患乳房炎奶牛的乳腺组织中有表达,说明在发生乳房炎时,NF- $\kappa$ B 在乳腺局部发挥重要的作用。

### 参考文献

- [1] SEBENIST, FRANZOSO, BROWN. Structure, regulation and function of NF- $\kappa$ B [J]. *Annu Rev Cell Bd*, 1994, 10: 405 - 455.
- [2] WHITESIDE, EH NAT, RICE, et al. I $\kappa$ B $\epsilon$ , a novel member of the I $\kappa$ B family, controls RelA and cRel NF- $\kappa$ B activity [J]. *Embo J*, 1997, 16: 1413 - 1426.
- [3] 曹随忠, 李宏滨, 王爱华, 等. 抑制性消减杂交构建奶牛乳房炎抗性相关 cDNA 文库 [J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(6): 526 - 530.
- [4] BOULANGER, BUREAU, MELOTTE, et al. Increased nuclear factor- $\kappa$ B activity in milk cells of mastitis affected cows [J]. *J Dairy Sci*, 2003, 86: 1259 - 1267.
- [5] SANDERSEN, BUREAU, TURLEJ, et al. p65 Homodimer activity in distal airway cells determines lung dysfunction in equine heaves [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2001, 80: 315 - 326.
- [6] SCHULTE, GRASSL, PREGER, et al. *Yersinia enterocolitica* invasion protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers [J]. *FASEB J*, 2000, 14: 1471 - 1484.
- [7] BAGGIOLINI, DEWALD, MOSER. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines [J]. *Adv Immunol*, 1994, 55: 97 - 179.
- [8] WILDE, ADDEY, II, et al. Programmed cell death in bovine mammary tissue during lactation and involution [J]. *Exp Physiol*, 1997, 82: 943 - 953.
- [9] CAPUCO, AKERS. Mammary involution in dairy animals [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1999, 4: 137 - 144.
- [10] JERRY, DICKINSON, ROBERTS, et al. Regulation of apoptosis during mammary involution by the p53 tumor suppressor gene [J]. *J Dairy Sci*, 2002, 85: 1103 - 1110.
- [11] BRANTLEY, YULL, MRACKE, et al. Dynamic expression and activity of NF- $\kappa$ B during post-natal mammary gland morphogenesis [J]. *Mech Dev*, 2000, 97: 149 - 155.
- [12] CLARKSON, HEELEY, CHAPMAN, et al. NF- $\kappa$ B inhibits apoptosis in murine mammary epithelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 12737 - 12742.
- [13] 王碧飞, 许韩师, 刘恩波, 等. 核因子 $\kappa$ B 活性对 BXS 狼疮小鼠脾脏自发性生发中心形成的影响 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2006, 10(9): 534 - 537.
- [14] NOEBAERT, DUCHATEAU, MEYER. NF- $\kappa$ B inhibition accelerates apoptosis of bovine neutrophils [J]. *Vet Res*, 2005, 36: 229 - 240.
- [15] ROTTENBERG, SCHMUCKI-MAURER, GRIMM, et al. Characterization of the bovine I $\kappa$ B kinases (IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ ), the regulatory subunit NEMO and their substrate I $\kappa$ B $\alpha$  [J]. *Cere*, 2002, 299(1/2): 293 - 300.
- [16] 王文亮. 细胞凋亡研究进展 [J]. *肝脏杂志*, 2005, 17(6): 603 - 606.
- [17] HTZGERALD, MEADE, MCEVOY, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) increases nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2007, 116: 59 - 68.
- [18] VARELA, STANGLE CASTOR, SHOEMAKER, et al. TNF $\alpha$  induces NF- $\kappa$ B p50 in association with the growth and morphogenesis of normal and transformed rat mammary epithelial cells [J]. *J Cell Physiol*, 2001, 188: 120 - 131.
- [19] 袁淑芳, 张跃新, 单鑫. 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、Caspase-3、核因子 $\kappa$ B mRNA 在病毒性肝炎中的表达与肝细胞凋亡 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2006, 14(2): 129 - 131.