

逆转录病毒介导的天蚕抗菌肽B在 奶牛乳腺中的表达

王铁东, 逢大欣, 欧阳红生
(吉林大学, 畜牧兽医学院, 长春 130062)

摘要: 为了研究天蚕抗菌肽在奶牛乳腺组织长期表达的可行性以及对大肠杆菌的抑制作用, 将天蚕抗菌肽B(cecropin B, CB)的基因序列以哺乳动物偏爱的密码子优化后, 合成了四条相互重叠的DNA片段, 通过重叠延伸PCR法获得了天蚕抗菌肽B的基因, 将其亚克隆至T载体, 测序正确后构建逆转录病毒载体pLNCX-bCP-cecB, 经过包装细胞的包装, 获得含有天蚕抗菌肽B表达框的逆转录病毒, 注射入奶牛乳腺组织, 通过琼脂板孔穴扩散法检测基因的表达及活性; 实验结果表明, 克隆的抗菌肽基因在乳腺中获得了表达, 表达产物对大肠杆菌具有抑制作用, 抑制效果可以持续至13天以上。

关键词: 抗菌肽; 天蚕素B; 乳腺; 基因表达; 逆转录病毒

中图分类号: R284.2 文献标识码: A

Retrovirus-mediated Expression of Antibacterial Peptide Cecropin B in Mammary Gland of Dairy Cow

Wang Tiedong, Pang Daxin, Ouyang Hongsheng

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062)

Abstract: We synthesized the coden-optimized gene of Cecropin B according to its natural sequence by overlap extension PCR. The gene was then cloned into the vector pMD-18T and was confirmed by DNA sequencing. In order to get the whole mammary specific expression cassette, the gene of Cecropin B was cloned into the mammary specific expression vector pIRES-Bcp-neo which contains the goat β -casein gene 5' flanking regulation sequence. The whole mammary specific expression cassette was cut down and cloned into the retrovirus vector pLNCX, so the retrovirus vector pLNCX-bCP-cecB was constructed. This vector was transfected into a packaging cell line PA317, RNA from the vector is packaged into infectious, replication-incompetent retroviral particles which was then injected directly into the lactating mammary gland of bovines. The expression and bactericidal activity was detected using inhibition zone assay for the bacteria: *E. coli* K12D31. Antibacterial Peptide Cecropin B expressed in milk possesses bactericidal activity which can last at least thirteen days.

Key words: antibacterial peptide, Cecropin B, mammary gland, gene expression, retrovirus

0 引言

抗菌肽是生物体内产生的一类对抗外源性病原体的肽类活性物质, 作为免疫防御系统的一个重要组成

部分, 原核生物、植物、动物都可以产生抗菌肽。在20世纪70年代中期, 瑞典科学家Boman等^[1]在用大肠杆菌诱导惜古比天蚕时分离得到第一种抗菌肽天蚕素

基金项目: 国家自然科学基金项目“抗菌抗炎性蛋白对奶牛乳房炎基因治疗的基础研究”(30471280)。

第一作者简介: 王铁东, 男, 1975年出生, 吉林大安人, 讲师, 研究方向为基因表达与调控。通信地址: 130062 吉林省长春市西安大路5333号吉林大学畜牧兽医学院, Tel: 0431-87963175, E-mail: tdongw@sohu.com。

通讯作者: 欧阳红生, 男, 1964年出生, 江西省彭泽县人, 教授, 研究方向为基因表达与调控。通信地址: 130062 吉林省长春市西安大路5333号吉林大学畜牧兽医学院, Tel: 0431-87963175, E-mail: tdongw@sohu.com。

收稿日期: 2009-02-06, 修回日期: 2009-03-18。

(cecropins),此后人们相继在其它昆虫、两栖类、高等植物、哺乳动物乃至人类体内均发现了抗菌肽,随着研究工作的深入,人们发现抗菌肽不仅对革兰氏阳性菌及阴性菌有很高的抗菌活力,而且对真菌^[2]、原虫^[3]、某些病毒^[4]和一些肿瘤细胞^[5]均具有较强的杀伤或灭活作用,在细菌耐药性日益严重的今天,抗菌肽成为抗菌研究领域中的热点,在医学上具有广阔的应用前景。

泌乳期的动物乳腺处于正常生理条件下,乳腺细胞的结构、乳腺中激素以及特异性转录因子水平处于机体完善的神经体液调节之下,此时如果采用合适的转染方法、恰当的转染时机,可使外源蛋白在乳腺组织中获得高水平表达,外源蛋白在哺乳动物乳腺中能够正确的修饰和折叠^[6],这使得利用动物乳腺作为生物反应器生产生物药用蛋白在制药工业上具有良好的前景,笔者利用重叠延伸PCR技术合成了天蚕抗菌肽B的基因,构建了含有天蚕抗菌肽B表达框的重组逆转录病毒,将其注射入奶牛乳腺组织,使其感染并整合到乳腺组织细胞的基因组,通过逆转录病毒介导的基因的转移,使天蚕抗菌肽B基因在奶牛乳腺中获得比较稳定的,长期的表达,为抗菌肽的分离纯化和奶牛乳腺炎的防治提供科学的数据。

1 材料与方法

1.1 生物材料

感受态细胞大肠杆菌DH5 α 由笔者实验室制备;大肠杆菌K12D31购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,含山羊 β 酪蛋白基因5'端调控序列的真核表达载体pIRES-Bcp-neo为笔者实验室构建^[7];pMD18-T克隆载体购自大连宝生物工程公司;逆转录病毒载体pLNCX购自Clontech公司。

1.2 试验试剂

各种限制性内切酶、T4DNA连接酶、T4DNA聚合酶等为NEB产品;DNA凝胶回收试剂盒为维特洁公司产品;FuGENE HD Transfection Reagent为Roche产品;其它试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.3 天蚕抗菌肽B基因的制备与克隆

选用真核细胞偏爱的密码子对GenBank收录的cecropin B基因的序列(登录号D11113)进行优化,设计cecB1、cecB2、cecB3、cecB4 4条引物,由上海生物工程公司合成。

引物序列如下:

cecB1: 5' -GAATTCCTCCCGGGATGAATTTTCGCA AAGATCCTATCCTTCGTCTTCGCTCTGGTGCTG-GCTTTGAGCATG;

cecB2: 5' -TTCAATTTTCTTGAAGATCTTCCAC

CTGGGCTCGGGAGCAGCGCTGGTCATGCT-CAAAGCCAGCAC;

cecB3: 5' -ATCTTCAAGAAAATTGAAAAAATG GGCAGGAACATTAGAGACGGCATCGTCAAAGCT-GGCCAGCT;

cecB4: 5' -TCTAGATCATTTTCCTATAGCTTTA GCGCTACCAAGGACCTCGATAGCTGGGCCAGCT TTTGAC

上述引物由上海博亚生物工程公司合成。通过3次PCR反应合成完整基因,第1次退火延伸反应:取100 mM cecB1 cecB2各20 μ l,加入dNTP使其终浓度为200 μ M、10 \times Buffer 10 μ l、Pfu DNA聚合酶1 μ l,加水补足体积至100 μ l,反应参数为:94 $^{\circ}$ C、2 min、50 $^{\circ}$ C、2 min、72 $^{\circ}$ C、2 min,延伸一次,得到产物cecB-F1R1;第2次退火延伸反应:cecB3, cecB4间退火延伸,反应体系、循环参数同前,得到产物cecB-F2R2;第3次PCR反应:取第1次,第2次PCR反应产物cecB-F1R1, cecB-F2R2各1 μ l混合,94 $^{\circ}$ C、1 min、50 $^{\circ}$ C、2 min、72 $^{\circ}$ C、1 min,循环一次后的反应产物作为模板,加入10 μ M cecB1, cecB4各1 μ l, 2.5 mM dNTP 2 μ l、10 \times Buffer 10 μ l、Pfu DNA聚合酶0.5 μ l,加水补足体积50 μ l,循环参数为94 $^{\circ}$ C、1min、50 $^{\circ}$ C、2 min、72 $^{\circ}$ C、1 min。循环25次后加入Taq DNA聚合酶0.5 μ l, 72 $^{\circ}$ C延伸10min进行PCR产物末端的加A反应。

PCR产物经2.0%琼脂糖凝胶电泳后,以DNA凝胶回收试剂盒回收目的片段,将目的片段与pMD18-T载体于16 $^{\circ}$ C过夜连接,将连接物转化感受态*E.coli* DH5 α ,涂布氨苄青霉素抗性LB琼脂平板,随机挑取菌落进行小量扩增后酶切鉴定,鉴定正确的重组质粒送上海博亚生物技术公司送上海联合基因公司测序。

1.4 乳腺组织特异性表达载体构建

以*EcoRI*和*XbaI*双酶切重组质粒pT-cecB,回收200 bp的天蚕素B基因片段,以*EcoRI*和*XbaI*双酶切含有山羊 β 酪蛋白基因5'端调控序列的真核表达载体pIRES-bCP-neo,回收4.0 kb的载体片段,将二者相连,构建乳腺组织特异性表达质粒pBcp-cecB,构建路线见图1。

1.5 重组抗菌肽逆转录病毒载体的构建

以*NruI*和*XhoI*双酶切中间载体pBcp-cecB,回收含有山羊 β 酪蛋白基因5'端调控序列的天蚕抗菌肽B完整表达框;以*BamHI*和*ClaI*双酶切逆转录病毒载体pLNCX后回收载体大片段,平端连接二片段,粘性末端补平、连接、转化与质粒DNA的小量与大量制备方法参照文献[8],酶切鉴定后命名为pLNCX-bCP-cecB。

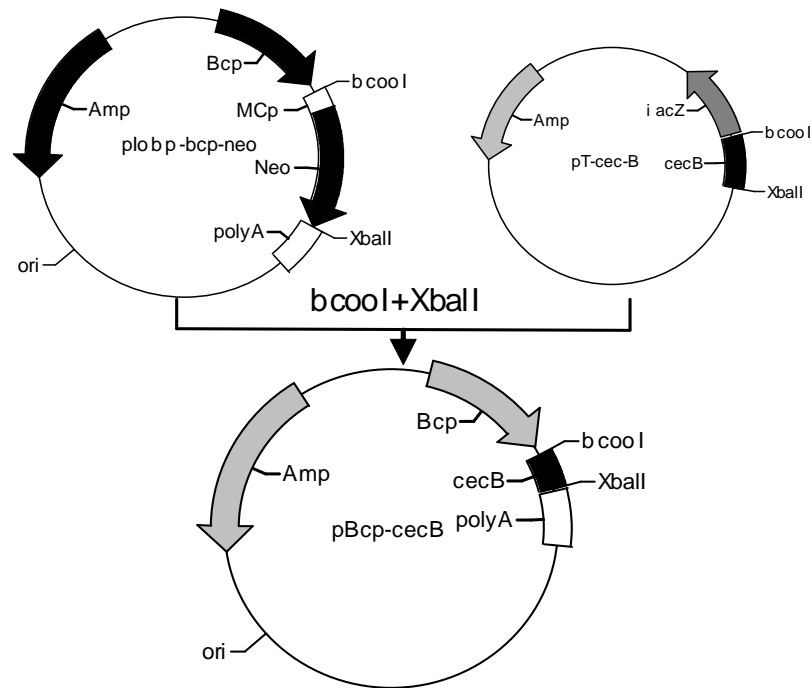


图1 天蚕抗菌肽B乳腺组织特异性表达载体pbCP-cecB的构建

1.6 重组逆转录病毒的包装

将 5×10^5 个PA317细胞接种于6孔细胞培养板中,待细胞密度达80%~90%时,用Roche FuGENE HD转染试剂将载体pLNCX-bCP-cecB转染PA317细胞。转染后24 h,细胞用含有700 $\mu\text{g/ml}$ G418,10%血清的DMEM进行1:5传代培养,每3天换液一次,抗性克隆出现后将其扩大培养后收获培养上清,低速离心去掉细胞碎片,用0.45 μm 的醋酸纤维素膜过滤,滤液80 $^\circ\text{C}$ 冻存备用。

1.7 逆转录病毒感染乳腺组织

选择泌乳状态良好的黑白花奶牛为受试动物,取方法1.6中制备的病毒培养液以生理盐水稀释至20 ml,乳头消毒后用注射器直接注入其乳腺组织,边注射边按摩,每24 h采奶样3 ml留检。

1.8 牛奶中的表达产物的活性测定

采用琼脂板孔穴扩散法检测注射逆转录病毒24 h后奶样中表达的抗菌肽对大肠杆菌的抑制活性,取处于的对数生长期的大肠杆菌50 μl 加入经高压灭菌并冷却到42 $^\circ\text{C}$ 的含1%琼脂糖的50 ml LB培养基中后迅速混匀制板,打孔,每孔加入奶样25 μl ,37 $^\circ\text{C}$ 过夜培养,设注射病毒前的奶样为对照。

2 结果与分析

2.1 天蚕抗菌肽B基因的合成和亚克隆

以重叠延伸PCR法获得完整的DNA片段,PCR扩增后,经2%琼脂糖凝胶电泳,在大约200 bp处可见到一条十分明晰的DNA带,大小与预计相符合(图

2),凝胶回收PCR产物后克隆到pMD18-T载体,重组质粒用BamHI和XbaI酶切鉴定,结果如图3所示:双酶切后出现200 bp特异条带,与克隆入的片段大小相符,测序结果进一步证明,人工合成的天蚕抗菌肽B基因的核苷酸序列与设计相同。

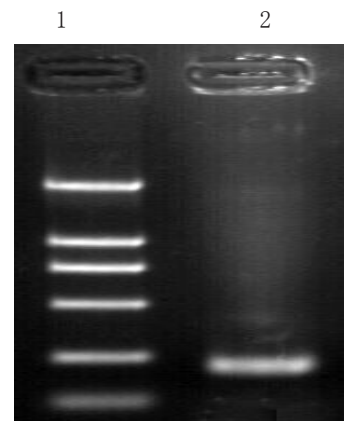


图2 天蚕抗菌肽B基因2%琼脂糖凝胶电泳
1.DNA Marker DL2000; 2.PCR产物图

2.2 乳腺组织特异性表达载体的鉴定

将抗菌肽基因片段从中间载体pT-cecB切下回收后克隆到乳腺特异性载体pIRES-bCP-neo的多克隆位点上,构建抗菌肽乳腺组织特异性表达载体构建pbCP-cecB;将含有酪蛋白启动子的抗菌肽基因表达框切下,克隆到逆转录病毒载体中,构建重组逆转录病毒载体,重组载体的酶切鉴定结果见图4,鉴定正确的载体测序后命名为pLNCX-bCP-cecB。

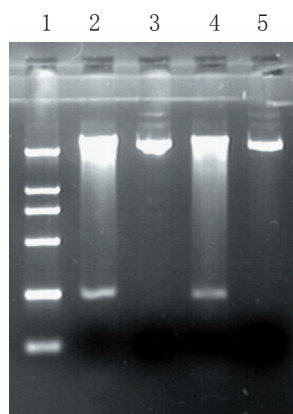


图3 重组质粒的酶切鉴定

1. DNA Marker DL2000; 2. 重组质粒1的酶切产物;
3. 重组质粒1; 4. 重组质粒2的酶切产物; 5. 重组质粒2

2.3 天蚕抗菌肽B重组逆转录病毒的包装

重组逆转录病毒载体转染包装细胞PA317后,在G418(700 $\mu\text{g}/\text{ml}$)筛选条件下10天左右长出细胞克隆,将细胞克隆扩大培养,收集培养上清置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.4 抗菌肽在奶牛乳腺组织的持续表达及抑菌活性

注射病毒前收集奶牛奶样留做对照,取注射后

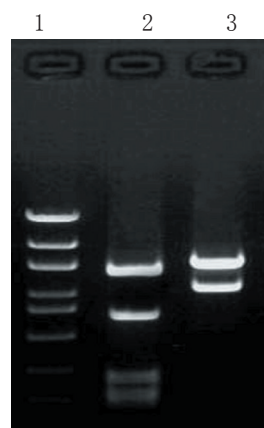


图4 重组载体酶切产物的鉴定结果

1. DNA Marker 2. 重组载体pbCP-cccB的酶切产物
3. 重组载体pLNCX-bCP-cccB的酶切产物

1, 3, 5, 7, 9, 11, 13天的奶牛乳汁,然后用琼脂孔穴扩散法检测(每孔加样量为 $25\text{ }\mu\text{l}$)乳汁中抗菌肽的抑菌活性,以大肠杆菌 $\text{K}_{12}\text{D}_{31}$ 为测试菌,结果(图5)表明,所有受试奶牛注射前奶样均无抑菌圈,逆转录病毒注射后奶样即出现明显抑菌圈,一直持续至第13天以上。

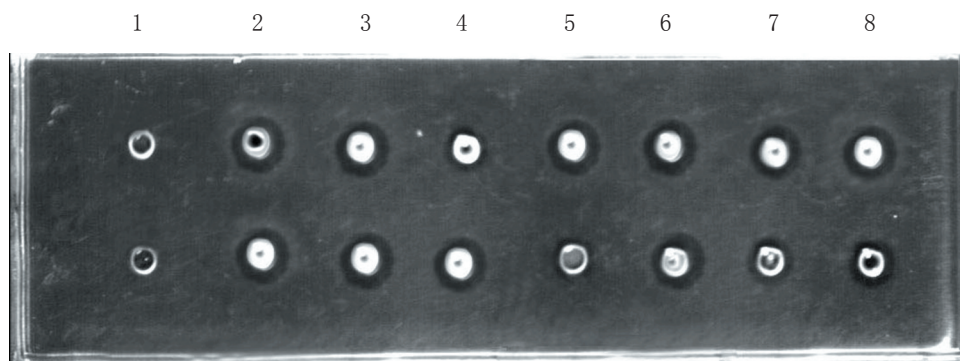


图5 重组逆转录病毒感染泌乳期奶牛乳腺后不同时间奶样抑菌结果

1为注射病毒前奶样;2-8依次为1注射后第1、3、5、7、9、11、13天的奶样对大肠杆菌的抑制结果。

3 讨论

天蚕抗菌肽B的基因较短,对于这类较短的基因,化学合成是较为常用的手段,可以避免使用PCR方法时产生的碱基突变,而且可以很方便的对基因进行优化,但由于成本和技术的的原因,化学合成长片段时会出现碱基的错误,为了解决这一问题,笔者采用重叠延伸PCR技术先合成4个相互有重叠互补部分的较小的寡核苷酸片段,之后利用DNA聚合酶的延伸特性,通过重叠延伸PCR反应,得到了完整的天蚕抗菌肽B基因片段,较好地解决了这一问题。

在众多的抗菌肽中,天蚕抗菌肽B的抗菌活力较为明确,此类抗菌肽分子量约为 4 kDa ,对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有强的抗菌活性,在抗菌浓度下,

对真核细胞无破坏作用, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 30 min 仍保持一定的活性,而且还具有不易被胰蛋白酶和胃蛋白酶水解,分子量低、耐碱性强、热稳定、水溶性好和广谱抗菌等特点^[9],但是由于此类抗菌肽是一类小分子多肽,从昆虫中分离的工艺复杂,产量低,费用高,以人工方法合成成本更高,使其应用受到局限,因此,通过基因工程方法生产重组抗菌肽具有重要意义;乳腺作为生产抗菌肽的反应器来表达抗菌肽可避免用工程菌表达所遇到的各种问题,能够生产出具有完全生物活性的药用蛋白^[10],在笔者以前的实验中曾将抗菌肽乳腺组织特异性表达载体直接注射乳腺组织的来表达抗菌肽,实验结果显示,注射重组质粒后抗菌肽基因在乳腺虽然能够表达但持续时间较短,为了解决这一问题,笔

者构建了含有抗菌肽基因表达构件的逆转录病毒病毒,通过重组逆转录病毒的介导,将抗菌肽基因整合到乳腺组织细胞基因组中,检测结果表明,表达产物的活性持续至第13天仍未降低,实现了较持续的表达,这为探索奶牛乳腺炎的防治方法提供了科学数据,为建立转基因动物利用乳腺生物反应器生产抗菌肽奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] Boman HG, Nilsson-Faye I, Paul K, et al. Insect immunity I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynfhia* Pupae [J]. *Infect Immun*, 1974, 10(1): 36-145.
- [2] Ganz T, rayner JR, Valore EV, et al. The structure of the rabbit macrophage defensin genes and their organ-specific expression[J]. *J Immunol*. 1989 Aug 15;143(4):1358-65.
- [3] Jaynes JM, Burton CA, Barr SB, et al. In vitro cytotoxic effect of novel lytic peptides on plasmodium falciparum and trypanosoma cruzi[J]. *FASEB J*. 1988 Oct;2(13):2878-83.
- [4] Daher KA, Selsted EM, Lehrer RI, et al. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins[J]. *J Virol*. 1986 Dec;60(3): 1068-74.
- [5] Weber G, Chamorro CI, Granath F, et al. Human antimicrobial protein hCAP18/LL-37 promotes a metastatic phenotype in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*. 2009 Jan 30;11(1):R6.
- [6] Clark AJ. The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1998 Jul;3(3):337-50.
- [7] Xu Q, Hu RL, Zhang SF, et al. Construction of base expression vector directed by goat β -casein promoter and its transient expression in mammary glands[J]. *Chin J Vet Sci*, 2003, 23:576-580.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 黄培堂, 译. 北京: 科学技术出版社, 2002:606-610.
- [9] Steiner H, Andreu D, Merrifield RB. Binding and action of cecropin and cecropin analogues: antibacterial peptides from insects[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1998, 939: 260-268.
- [10] Bösze Z, Baranyi M, Whitelaw CB. Producing recombinant human milk proteins in the milk of livestock species[J]. *Adv Exp Med Biol*. 2008, 606:357-93.