

牛气管抗菌肽的原核表达、体外抗菌活性及其组织分布分析

高小艳^{1,2}, 王长法^{1*}, 刘顺德², 李秋玲¹, 杨宏军¹, 杨少华¹, 仲跻峰¹, 何洪彬^{1*}

(1. 山东省农业科学院奶牛研究中心, 济南 250100;

2. 宁夏大学农学院动物科学系动物遗传育种与繁殖实验室, 银川 750021)

摘要: 本文旨在对牛气管抗菌肽(tracheal antimicrobial peptide, TAP)基因进行原核表达, 以及研究重组蛋白的抗菌活性, 并分析 TAP 在各组织的表达分布情况, 为开展转 TAP 基因抗乳腺炎奶牛研究提供技术资料。作者采用 RT-PCR 从荷斯坦奶牛气管扩增 TAP 基因, 分析其序列后根据大肠杆菌表达系统对密码子的偏好性, 人工合成牛 TAP 基因, 构建 pET32a(+)-TAP 重组质粒; 然后转化大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导表达并纯化。对表达蛋白进行 SDS-PAGE、Western Blot 鉴定; 在线软件分析目的蛋白表达量。采用滤纸片法测定重组牛 TAP 的体外抗菌活性, 并用 RT-PCR 法分析牛各组织中 TAP 表达情况。测序结果表明, 扩增到 114 bp 目的基因片段, 可编码含 38 个氨基酸残基的成熟蛋白。SDS-PAGE 分析表达的融合蛋白相对分子质量为 24 ku, 重组蛋白以可溶性方式存在, 表达量占菌体总蛋白的 52.1%。Western Blot 检测只出现单一条带。抗菌效价分析表明 $0.115 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 重组蛋白对牛源金黄色葡萄球菌有一定的抗菌活性。TAP 基因在奶牛咽喉、肺、气管、小肠、肝、心脏及口腔黏膜中均有表达, 在鼻黏膜和舌黏膜中微量表达, 在皮肤中几乎不表达。作者成功表达了牛 TAP 基因, 重组牛 TAP 蛋白在大肠杆菌中实现高效表达, 并具有一定的抗奶牛乳腺炎致病菌的活性, 为未来培育抗乳腺炎转基因奶牛及相关基因工程产品的开发奠定了基础。

关键词: 牛气管抗菌肽; 表达; 抗菌活性; 组织分布; 乳腺炎

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)09-1166-06

Cloning, Expression of Bovine Tracheal Defensin in *E. coli* and Its Antibacterial Activity and Tissue Distribution

GAO Xiao-yan^{1,2}, WANG Chang-fa^{1*}, LIU Shun-de², LI Qiu-ling¹, YANG Hong-jun¹,
YANG Shao-hua¹, ZHONG Ji-feng¹, HE Hong-bin^{1*}

(1. Cow Research Center, Agricultural Science Academy of Shandong Province, Jinan 250100, China;

2. College of Animal Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The study was conducted to clone bovine tracheal antimicrobial peptide gene (TAP) from bovine tracheas, and recombinant bovine TAP protein was expressed in *E. coli*. Its antimicrobial activity were determined. In addition, the tissue distribution of the TAP gene in bovine was investigated. The mRNA of bovine TAP was cloned from tracheas of Holstein cow by RT-PCR. Based on the analysis of the sequence of bTAP and the codon preference in *E. coli* expression system, the bovine TAP gene was synthesized and inserted into vector pET32a(+) to construct plasmid pET32a(+)-TAP. The plasmid was expressed in *E. coli* BL21(DE3) cell by induction of IPTG. The recombinant fusion protein was purified, and determined by SDS-PAGE

收稿日期: 2010-04-29

基金项目: 转基因重大专项重大课题“抗病转基因牛新品种培育”(2008ZX08007-004); 现代农业产业技术体系建设(Nycytx-10); 山东省自然科学基金(Y2007D10); 山东省中青年科学家基金(2006BS06010)

作者简介: 高小艳(1983-), 女, 陕西榆林人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, Tel: 0531-88604132, E-mail: baixinnxu@163.com

* 通讯作者: 王长法, E-mail: wcf1967@yahoo.com.cn; 何洪彬, E-mail: hongbinh@hotmail.com

and Western Blot. Antimicrobial activity of the recombinant fusion protein were measured by filter paper method. Tissues distribution of the *TAP* gene has been demonstrated in bovine by RT-PCR. The full length cDNA of bovine *TAP* was consisted of 114 bp, encoding 38 amino acid residues. Western Blot results showed that the recombinant proteins were expressed in *E. coli* with molecular weight of 24 kD, exists in soluble form and accounted for 52.1% of the whole bacteria proteins. A single band appeared in Western Blot detection. The content of $0.115 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ of the purified *TAP* protein had antibacterial activity against bovine *Sta. Aureus in vitro*. Bovine *TAP* mRNA was widely expressed in the tissues of bovine, such as throat, lungs, trachea, small intestine, liver, heart, oral mucosa, and it was micro-expressed in the nasal mucosa, lingual mucosa and almost not expressed in the skin. The results showed that bovine *TAP* protein was highly expressed in *E. coli*, and can be used for transgenic dairy cow which anti-mastitis and developing the product of genetic engineering in future.

Key words: bovine tracheal antimicrobial peptide; expression; antibacterial activity; tissue distribution; mastitis

奶牛乳腺炎通常是由病原微生物侵染引发,而其中约 50% 的乳腺炎是由金黄色葡萄球菌(以下简称金葡菌)引起^[1],其患病率之高、造成的损失之大一直困扰着世界各国奶牛业的发展。广泛使用抗生素,虽有一定临床效果,但也带来了“抗性乳”及耐药菌株等危及人类健康的公共卫生问题。因而,奶牛生产中迫切需要一种抗菌谱广且无残留的生物制剂(如抗菌肽),来防治乳腺炎。但从机体内提取或化学合成成本太高,而且活性也会受到一定的影响,因而运用基因工程技术导入抗菌肽基因使其在体外或动物体特定部位表达,研究其对乳腺炎致病菌的抗性,延长奶产品的存储时间,为开发防治乳腺炎的新生物制剂提供技术资料。抗菌肽是一类广泛存在于动植物体内并具广谱抗菌活性的阳离子多肽,与生物体的先天免疫和获得性免疫有关^[2]。目前已进入临床试验阶段的抗菌肽主要有细菌素、源于蛙马盖宁的 MSI-78 及源于猪 protegrin 的 IB-367。Diamond 等^[3]首次在牛的气管黏膜上皮细胞中发现一类 β -防御素,命名为 *TAP*^[4]。随后人们发现牛 *TAP* 具有多种抗菌功能^[5],进一步研究发现气管防御素的表达受入侵细菌、细菌产物,如 LPS 及肿瘤坏死因子 α 等调节^[6-7]。Goldman 等^[8]发现牛 *TAP* 在高盐状态下抗菌功能失活。牛 *TAP* 基因含 2 个外显子和 1 个内含子。成年牛的鼻到支气管整个呼吸道纤毛上皮中均有表达,在胎儿中无表达。Yarus 等^[9]最先研究出在乳腺中表达牛 *TAP* 的小鼠,在转基因阳性鼠的乳汁中成功表达和分离到具有抗菌活性的重组 b*TAP*,为 *TAP* 作用机制研究和基因

工程产品的开发奠定了基础^[4]。本研究拟在已有试验基础上,克隆中国荷斯坦牛 *TAP* 基因,进行原核表达,验证重组牛 *TAP* 的抗菌活性,并用 RT-PCR 的方法首次研究了 *TAP* 基因在牛组织的分布,为研制转牛 *TAP* 基因抗乳腺炎奶牛提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大肠杆菌 DH5 α 、BL21、*Staphylococcus aureus* 临床分离株、标准株 S. 305 由作者实验室保存。

pET32a(+)由作者实验室保存,Ampicillin、链霉素(SM)购自朋远生物;IPTG 购自 Promega 公司;TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司;AMV 购自大连宝生物公司;Ni-NTA 纯化试剂盒购自 Qia-gen;Anti-His tag mouse、二抗 Goat anti-mouse IgG 购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.2 PCR 扩增引物

根据 GenBank 上已经发表的牛 *TAP* 基因序列(GenBank 登录号:NM_174776)应用 Primer Premier 5.0 软件设计牛 *TAP* 基因引物,P1:5'-CGG-GATCCAATCCTGTAAGCTGTGTT-3' (含有 BamH I 酶切位点),P2:5'-CCAAGCTTTTACT-TCTTACGACAGCATTTT-3'(含有 Hind III 酶切位点),扩增片段为 114 bp。 β -actin 引物,P3:5'-GCACAATGAAGATCAAGATCATC-3',P4:5'-CTAACAGTCCGCCTAGAAGCA-3',扩增片段为 173 bp。

1.3 牛气管总 RNA 的提取与 RT-PCR 扩增牛 TAP 基因

采集中国荷斯坦牛气管组织 1.2 g 左右,加入适量液氮快速研磨至粉末,加入 1 mL TRIzol 混匀,按 TRIzol Reagent 试剂盒说明提取总 RNA,琼脂糖电泳检测总 RNA。

将提取的总 RNA,按试剂盒说明反转录成 cDNA。采取 10 μL RT 反应体系:2 μL MgCl_2 (25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),1 μL 10 \times RT Buffer,1 μL dNTPs(10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),0.25 μL RNase Inhibitor (40 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$),0.5 μL AMV(5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$),0.5 μL P2 (25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),RNA 1 μL ,加 RNase Free Water 至 10 μL 。RT 反应程序:30 $^\circ\text{C}$ 10 min,42 $^\circ\text{C}$ 15 min,99 $^\circ\text{C}$ 5 min,5 $^\circ\text{C}$ 5 min。RT 产物直接用于 PCR 扩增。采取 50 μL PCR 反应体系:10 μL 5 \times PCR Buffer,10 μL cDNA,0.25 μL Taq (5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$),P1(25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 P2(25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.5 μL ,加 ddH₂O 至 50 μL 。PCR 反应程序:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 2 min;94 $^\circ\text{C}$ 30 s,59 $^\circ\text{C}$ 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 30 s,30 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

将 PCR 产物连接到 pEASY-T3 载体,转化 DH5 α ,提取质粒经 BamH I 和 Hind III 双酶切后,琼脂糖凝胶电泳鉴定。鉴定为阳性的克隆菌由上海生物工程技术有限公司测序。

1.4 人工合成目的基因

由于大肠杆菌表达系统有密码子偏好性,因而人工合成目的基因时将牛 TAP 基因中甘氨酸密码子 GGA 改为大肠杆菌表达系统使用频率高的 GGC,将精氨酸密码子 AGG 和 AGA 改为 CGC 和 CGT。拟编码的氨基酸为 NPVSCVRNKGICVPIRCPGNMKQIGTCVGRAVKCCRKK。含有 6 个半胱氨酸,相对分子质量 4.12 ku。成熟肽基因片段由上海生物工程技术有限公司合成。

1.5 pET32a-TAP 在 *E. coli* BL21 中的表达

将合成的目的基因片段与 pET32a(+)-载体同时双酶切后连接,构建 pET32a(+)-TAP 重组载体。将构建好的质粒转化 *E. coli* BL21 细胞,涂于含 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 平板上,37 $^\circ\text{C}$ 培养 16 h,挑取直径 2~3 mm 的白色单菌落,接种到 5 mL LB 液体培养基中,37 $^\circ\text{C}$ 过夜振荡培养。将重组质粒进行双酶切鉴定及 PCR 鉴定。

1.6 重组 TAP 融合蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 鉴定

将重组表达质粒和空载体 pET32a(+)-分别转化宿主菌 BL21,挑取单个菌落,37 $^\circ\text{C}$ 振荡过夜培养。取培养物以 1:100 扩大培养 3 h 至 OD_{600 nm} 值达 0.6 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,继续培养。每隔 1 h 取 2 mL 菌液,离心收集菌体。分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%,SDS-PAGE 鉴定表达情况。根据表达结果来确定最佳表达条件。

1.7 重组 TAP 融合蛋白的分离纯化与 Western Blot 鉴定

30 $^\circ\text{C}$ 经 IPTG 诱导表达 5 h 后,离心收获菌体,沉淀用磷酸盐缓冲液悬浮,超声波破碎菌体,离心收集上清,按 QIAGEN 公司试剂盒说明书进行纯化,分步洗脱并用 1.5 mL 离心管分管收集目的蛋白洗脱液,对纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定。

以表达菌裂解物做 SDS-PAGE,湿转至 PVDF 膜上,将一抗 Anti-His tag mouse 稀释 1 000 倍,与膜反应 2 h,将二抗 Goat anti-mouse IgG 稀释 2 000 倍,与膜反应 2 h。通过 ECL 化学发光,显影,定影。

1.8 重组蛋白浓度的测定

按 Bradford(1976)的考马斯亮蓝方法测定融合蛋白浓度,以牛血清白蛋白作为标准。

1.9 重组 TAP 融合蛋白抑菌活性的鉴定

在无菌条件下,将不同剂量的重组蛋白 TAP 滴加到圆形滤纸片上。采用琼脂扩散法测定重组蛋白对金葡菌 S. 305 的抑菌活性。阳性对照为 0.1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的氨卞青霉素及 0.1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的链霉素,阴性对照为 Trx-tag 蛋白。取冻存的金葡菌标准株 S. 305 接种于 5 mL 营养肉汤中,37 $^\circ\text{C}$,180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 12 h。取 0.1 mL 培养液涂布于营养琼脂平板上,待菌液稍干后,把准备好的药敏片放置于培养基上,平板向上 37 $^\circ\text{C}$ 培养 1 h,然后倒置培养过夜,观察抑菌效果。

1.10 牛 TAP 基因在牛组织器官中的分布表达

分别从牛体内 10 个组织器官中提取 RNA,然后以 βactin 为内参反转录扩增 TAP 基因。

2 结果

2.1 牛 TAP 基因序列

通过 DNASTar 软件分析测序结果,发现牛 TAP 基因为 114 bp。与牛 TAP(NM_174776)相比,同源性达 100%。说明该基因为牛 TAP 基因。

2.2 SDS-PAGE 电泳检测分析

经 IPTG 诱导在 24 ku 左右处表达出了一条特异蛋白带(图 1),与预测相对分子质量一致。经优化确定目的蛋白最佳诱导条件:终浓度 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG, $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 8 h。经 BandScan 5.0 软件分析,重组蛋白表达量占菌体总蛋白的 52.1%,说明重组蛋白可以在大肠杆菌表达系统中高效表达。

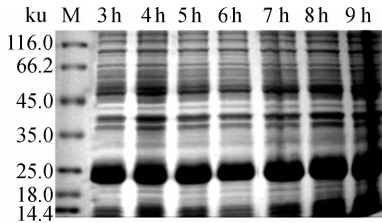
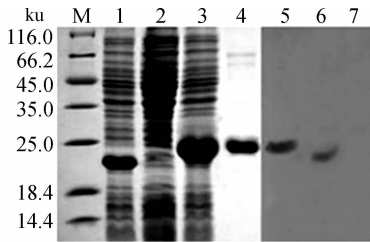


图 1 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 不同诱导时间的表达情况

Fig. 1 Expression results of different induction time at $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$

2.3 Western Blot 反应

Western Blot 检测(图 2)后泳道中仅出现一条特异条带,大小与目的蛋白一致,说明诱导出的蛋白为重组目的蛋白。质粒可以表达 20 ku 左右 TAP 蛋白及 6 个组氨酸标签,重组质粒可特异表达 24 ku 的融合蛋白,目的蛋白相对分子质量约为 4 ku。



M. 蛋白质相对分子质量标准;1. 空质粒诱导;2. 重组质粒未诱导;3. 重组质粒诱导;4. 纯化蛋白;5. Western Blot 检测;6. 阳性对照;7. 阴性对照

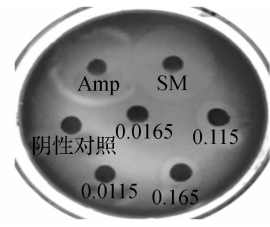
M. Protein marker;1. Induced empty vector;2. Non-induced recombinant plasmid;3. Expression products of pET32a-TAP induced by IPTG;4. Purified product;5. Western Blot test;6. Positive control;7. Negative control

图 2 重组牛 TAP 蛋白的表达、纯化与 Western Blot 检测

Fig. 2 Expression and purification of recombinant bovine TAP protein and Western Blot test

2.4 重组 TAP 融合蛋白抗菌活性的鉴定

利用 Bradford 法测得纯化的重组蛋白浓度为 $1.65 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。抑菌试验结果如图 3 所示: $0.1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素、 $0.1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 链霉素(SM)、 $0.115 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 $0.165 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 纯化的重组蛋白均对牛源乳腺炎致病菌金葡菌具有一定的抑制作用,而纯化的含有 His-tag 标签的载体蛋白没有抑制作用。说明表达的重组蛋白具有抑菌功能。



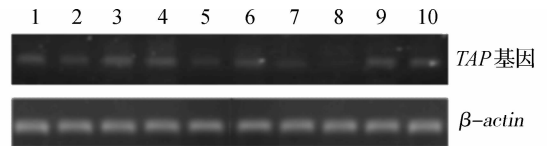
Amp= $0.1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的氨苄青霉素;SM= $0.1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的链霉素;阴性对照=含有 His tag 标签的空载体蛋白
Amp= $0.1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;SM= $0.1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;Negative control = Empty vector protein content His tag flag

图 3 不同浓度的 TAP 重组融合蛋白的活性测定

Fig. 3 Determination of activity of TAP recombinant fusion protein

2.5 牛 TAP 在组织中的表达

如图 4 所示,TAP 基因在牛咽喉、肺脏、气管、小肠、肝脏、心脏和口腔黏膜中均有表达,在鼻黏膜及舌黏膜组织有微量表达,在皮肤几乎不表达。这说明牛 TAP 基因的表达有一定的组织特异性。



1. 咽喉;2. 肺脏;3. 气管;4. 小肠;5. 鼻黏膜;6. 肝脏;7. 舌黏膜;8. 皮肤;9. 心脏;10. 口腔黏膜

1. Throat;2. Lung;3. Tracheal;4. Small intestine;5. Nasal mucosa;6. Liver;7. Lingual mucosa;8. Skin;9. Heart;10. Oral mucosa

图 4 应用 RT-PCR 检测 TAP 基因在奶牛不同组织中的表达

Fig. 4 Tissue-specific expression patterns of TAP gene assayed by RT-PCR

3 讨论

3.1 防御素是近年来发现的广泛存在于动植物体内的一类阳离子抗菌多肽,具有抗细菌、真菌、病毒和肿瘤细胞的功效^[10]。国内外对防御素的研究多集中在人防御素研究方面,有关牛防御素的研究报道较少。

在牛舌复层鳞状上皮细胞中发现了舌抗菌肽(LAP)。在肠上皮细胞中发现了肠 β 防御素并且其表达与小球隐孢子虫感染有关^[10]。同时,通过原位杂交技术证实牛乳腺上皮细胞中可表达 β 防御素^[11-12]。另据报道防御素 DEFB1、BNBD3、BNBD9 和 BNBD12 均在牛乳腺中表达^[13-14]。

3.2 牛气管抗菌肽属于 β -防御素的一种,是一类具有特殊生物学活性的小分子多肽,存在于牛大部分组织中,是宿主细胞抵抗外界病原微生物入侵的免疫防御体系的重要组成部分。已有研究证实牛气管

上皮细胞中可表达牛 TAP,且细胞因子、脂多糖、热灭活细菌和感染细菌等均可诱导牛气管上皮细胞,通过激活核因子 κ B(NF- κ B)显著增加 TAP 的 mRNA 表达量^[15-18]。Diamond 等^[19]通过质谱分析发现从牛气管中提取的抗菌肽的相对分子质量为 4 085 u,与本试验中重组蛋白相对分子质量相近。

RT-PCR 研究结果表明,牛 TAP 基因在牛体内组织器官中广泛表达。此结果与 Ouellette 等的结果相似,Ouellette 等发现防御素在非髓性细胞(nonmyeloid cell)、潘氏细胞(Paneth cell)及小肠上皮细胞中均有表达^[20]。作者发现牛 TAP 基因分布也存在组织特异性,在牛呼吸系统和消化系统中表达量较高,而在皮肤中几乎不表达,此结论和 Diamond 等^[19]最早报道结果类似,他们发现气管中 TAP 表达量高于肺部,并推测牛 TAP 主要由气管细胞产生。此外,人们推测牛 TAP 基因在不同组织表达的差异可能与其功能有一定的关系^[9],表达量与病原微生物的诱导有一定的关系^[21-22]。消化系统和呼吸系统极易接触大量病原微生物,牛 TAP 基因在消化系统和呼吸系统上述器官组织中大量表达,作者推测牛 TAP 在牛的先天气免疫方面发挥着重要的作用。

3.3 奶牛乳腺炎是影响世界奶牛业发展,给乳品生产造成巨大损失的一种常见多发病。引起奶牛乳腺炎的致病菌有 150 多种。其中,金葡菌是引发乳腺炎的主要致病菌之一,其流行率在 5%~50%,其导致的经济损失最大^[1, 23]。究其原因,一方面是金葡菌具有传染性;另一方面是金葡菌对治疗用的抗生素极易产生抗药性,很难彻底治愈金葡菌性乳腺炎^[23]。本试验采用可溶性蛋白纯化法对牛 TAP 重组表达蛋白进行纯化,以金葡菌作为参考来研究重组蛋白的抗菌活性,研究表明牛 TAP 重组蛋白对革兰氏阳性菌牛源乳腺炎致病菌金葡菌具有一定的抑菌效果。这与王铁东等^[24]关于牛气管抗菌肽在山羊乳腺组织内表达,并对金葡菌和大肠杆菌具有明显的抑制作用相一致。Diamond 等^[19]还发现从牛气管中提取的抗菌肽具有明显的抗大肠杆菌作用。因而,牛 TAP 基因可以作为抗乳腺炎的候选目标基因进行深入研究。Joel 等^[5]研究发现在用金葡菌诱导的牛乳腺上皮细胞中 TAP 的表达水平明显高于非诱导的,即牛 TAP 基因在牛的黏膜系统多个器官和组织中均可表达,因而在未来转基因研究过程中需加上特有标记以便检测目的基因。

3.4 运用生化及免疫学技术,可从肠黏膜和血细胞

等动物组织中提取到抗菌肽^[25]。但天然抗菌肽在动物体内含量很少,提取费用较高,限制了抗菌肽的工业化生产和在畜、禽疾病防治方面的应用。应用分子生物学技术体外表达抗菌肽,或者开发转抗菌肽基因动物或植物是目前获取抗菌肽的主要途径。但由于防御素的相对分子质量只有 3~5 ku,目前多采用融合基因表达载体来降低本底表达以减少对宿主细胞的不利影响,提高抗菌肽的表达量。此外,试验表明抗菌肽具有十分广泛的抗菌谱,哺乳动物抗菌肽除了对细菌、真菌和被膜病毒有毒杀作用外,还对支原体、衣原体、螺旋体及一些恶性肿瘤细胞有杀伤作用^[26]。因而,通过基因工程手段如何改造目的基因,使其在原核表达体系中既保持一定的抗菌活性,又获得较高水平的表达产物,是值得进一步深入研究的问题。本试验中选择缺失 lon 和 ompT 蛋白酶的大肠杆菌 *E. coli* BL21 菌株,选择具有高度抑制性和诱导性的 T7 启动子的 pET32a(+)表达体系,通过人为改造牛 TAP 基因,使其适应于原核表达系统,极大地提高了可溶性蛋白的表达水平和生物活性,重组蛋白的表达量超过菌体总蛋白的 50%。

重组蛋白实际相对分子质量约 4 ku,再加上表达载体 pET32a(+)自身表达的 109 个氨基酸的硫氧还蛋白(约 20 ku)及 6 个组氨酸标签^[27],这样在 SDS-PAGE 电泳图上表达的融合蛋白大小约 24 ku。目的蛋白与硫氧还蛋白融合表达不仅提高了表达产物的稳定性,而且由于相对分子质量增大,经 SDS-PAGE 分析时更容易鉴定。

4 结论

成功表达了牛 TAP 基因,在大肠杆菌中高效表达了重组牛 TAP 蛋白,该蛋白具有一定的抗金黄色葡萄球菌的活性。此外,还发现牛 TAP 基因分布存在组织特异性,在牛呼吸系统和消化系统中表达量较高,而在皮肤中几乎不表达。

参考文献:

- [1] TALHOT B G, LACASSE P. Progress in the development of mastitis vaccines [J]. *Livest Prod Sci*, 2005, 98(1-2):101-113.
- [2] HALL S H, YENUGU S, RADHAKRISHNAN Y, et al. Characterization and functions of beta defensins in the epididymis[J]. *Asian J Androl*, 2007, 9(4):453-462.
- [3] DIAMOND G M, ZASLOFF H, BRASSEUR M, et

- al. Tracheal antimicrobial Peptide isolation and cloning of a cDNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:3952-3956.
- [4] YOUNG H K, MICHAEL D, PETER L, et al. Cystic fibrosis, lung infections, and a human tracheal antimicrobial peptide(hTAP)[J]. *FEBS Lett*, 1997, 405(2):200-208.
- [5] JOEL E, LOPEZ M, ANGELINA G B, et al. Expression of tracheal antimicrobial peptide in bovine mammary epithelial cells[J]. *Res Vet Sci*, 2009, 87(1):59-63.
- [6] RUSSELL J P, DIAMOND G, TARVER A P, et al. Coordinate induction of two antibiotic genes in tracheal epithelial cells exposed to the inflammatory mediators lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha[J]. *Infect Immun*, 1996, 64:1565-1568.
- [7] 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, 93:5156-5160.
- [8] GOLDMAN M J, ANDERSON G M, STOLZENBERG E D, et al. Human beta defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis[J]. *Cell*, 1997, 88(4):553-560.
- [9] YARUS S, ROSEN J M, COLE A M, et al. Production of active bovine tracheal antimicrobial peptide in milk of transgenic mice[J]. *Microbiology*, 1996, 93(12):14118-14121.
- [10] KAISER V, DIAMONG G. Expression of mammalian defensin genes[J]. *J Leukoc Biol*, 2000, 68:779-784.
- [11] KERR D E, WELLNITZ O. Mammary expression of new genes to combat mastitis[J]. *J Anim Sci*, 2003, 81(3):38-47.
- [12] SCHONWETTER B S, STOLZENBERG E D, ZASLOFF M A. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation[J]. *Science*, 1995, 267:1645-1648.
- [13] 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, 6:1045-1056.
- [14] SWANSON K, GORODETSKY S, GOOD L, et al. Expression of a beta-defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis[J]. *Infect Immun*, 2004, 72:7311-7314.
- [15] GOLDAMMER T, ZERBE H, MOLENAAR A, et al. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11:174-185.
- [16] ROOSEN S, EXNER K, PAUL S, et al. Bovine beta-defensins: identification and characterization of novel bovine beta-defensin genes and their expression in mammary gland tissue[J]. *Mamm Genome*, 2004, 15:834-842.
- [17] AONO S, LI C, ZHANG G, et al. Molecular and functional characterization of bovine beta-defensin-1 [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 11(3):181-190.
- [18] STOLZENBERG E D, ANDERSON G M, ACKERMANN M R, et al. Epithelial antibiotic induced in states of disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:8686-8690.
- [19] DIAMOND G, KAISER V, RHODES J, et al. Transcriptional regulation of β -defensin gene expression in tracheal epithelial cells [J]. *Infect Immun*, 2000, 68:113-119.
- [20] OUELLETTE A J, GRECO R M, JAMES M, et al. Developmental regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin pre-cursor mRNA in mouse small intestinal crypt epithelium[J]. *J Cell Bio*, 1989, 108:1687-1695.
- [21] CAVERLY J M, DIAMOND G, GALLUP J M, et al. Coordinated expression of tracheal antimicrobial peptide and inflammatory-response elements in the lungs of neonatal calves with acute bacterial pneumonia[J]. *Infect Immun*, 2003, 71:2950-2955.
- [22] HIGGS R, LYNN D J, GAINES S, et al. The synthetic form of a novel chicken β -defensin identified in silico is predominantly active against intestinal pathogens[J]. *Immunogenetics*, 2005, 57:90-98.
- [23] MYLLY V, ASPLUND K, BROFEKLT E. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995 changes in prevalence and antimicrobial resistance [J]. *Acta Vet Scand*, 1998, 39:119-126.
- [24] 王铁东, 逢大欣, 欧阳红生. 牛气管抗菌肽在山羊乳腺组织中的表达[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(8):7-11.
- [25] 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]. *J Biol Chem*, 1993, 268:6641-6648.
- [26] TANG Y Q, SELSTED M E. Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial β -defensin peptide from bovine neutrophils[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268:6649-6653.
- [27] 张永红, 王长法, 杨少华, 等. 重组鲁西黄牛 α 干扰素融合蛋白的表达及其抗病毒活性研究[J]. *生物工程学报*, 2007, 23:730-734. (编辑 白永平)