

# 马鹿 $\beta$ -防御素-1cDNA 全长克隆、 序列信息及表达分析

田巧珍<sup>1,2</sup>, 金鑫<sup>1,2</sup>, 张曼<sup>1,2</sup>, 蔡硕<sup>1</sup>, 刘骄<sup>1,2</sup>, 王云鹤<sup>1,2</sup>, 杨银凤<sup>1,2\*</sup>

(1. 内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010018; 2. 农业部动物疾病临床诊疗技术重点实验室, 呼和浩特 010018)

**摘要:** 为了研究马鹿  $\beta$ -防御素-1 (Red deer  $\beta$ -defensin-1, redBD-1) 基因的结构与功能, 揭示该基因的组织表达规律。本研究利用 PCR 结合 RACE (Rapid-amplification of cDNA ends) 技术从马鹿舌黏膜中克隆 redBD-1 基因的 cDNA 全长序列并对其进行了生物信息学分析, 同时采用 Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) 技术检测该基因在各组织的表达情况。结果表明, redBD-1 基因的 cDNA 全长序列为 455 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 192 bp, 编码 64 个氨基酸。生物信息学分析表明, redBD-1 蛋白的理论分子量为 6.94 ku, 有 10 个带正电荷的氨基酸残基, 无带负电荷的氨基酸残基, 理论等电点为 10.85。预测 redBD-1 蛋白有一个分泌信号肽结构, 无跨膜区, 主要在细胞外发挥生理功能; 6 个保守的半胱氨酸残基分别以 Cys1-Cys5、Cys2-Cys4 和 Cys3-Cys6 连接形成 3 个分子内二硫键; 成熟蛋白的三级结构是由  $\beta$ -折叠、延伸和无规则卷曲构成。redBD-1 基因编码的氨基酸序列同源性最高的是梅花鹿  $\beta$ -防御素 (siBD-1) 为 98.4%, 其次是水牛肠  $\beta$ -防御素 (BEED) 为 92.2%, 与人  $\beta$ -防御素-2 (HBD-2) 同源性最低仅为 35.9%。RT-qPCR 结果得出, redBD-1 在被检器官中均有表达, 在消化系统、呼吸系统以及生殖系统的大部分器官表达量较高, 肝、肾和脾等实质性器官表达量相对较低。本试验为今后深入研究防御素基因功能以及马鹿黏膜免疫系统提供理论依据。

**关键词:** 马鹿  $\beta$ -防御素-1; RACE; 基因克隆; 序列分析; 定量表达

中图分类号: S825; S813.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)02-0225-10

## The Full-length Cloning, Sequence Information and Expression Analysis of Red Deer $\beta$ -defensin-1 (*redBD-1*) cDNA

TIAN Qiao-zhen<sup>1,2</sup>, JIN Xin<sup>1,2</sup>, ZHANG Man<sup>1,2</sup>, CAI Shuo<sup>1</sup>,

LIU Jiao<sup>1,2</sup>, WANG Yun-he<sup>1,2</sup>, YANG Yin-feng<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment Technology in Animal Disease,

Ministry of Agriculture, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** This study aimed to study the gene structure and function of red deer  $\beta$ -defensin-1 (*redBD-1*) in order to better understand the gene's tissue expression pattern. The cDNA full-length sequence of *redBD-1* gene was cloned from the red deer's lingual mucous membrane adopting the technology of PCR combining with rapid-amplification of cDNA ends (RACE), the sequence was analysed by bioinformatics, and the expression of the gene in different tissues was determined by Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) technology. The results showed that the full-length sequence of *redBD-1* gene was 455 bp, and the open reading frame (ORF) was 192 bp encoding 64 amino acids. The bioinformatics analysis indicated that theoretical molecular weight of redBD-1

收稿日期: 2016-09-08

基金项目: 内蒙古教育厅人才基金

作者简介: 田巧珍 (1986-), 女, 山西忻州人, 博士生, 主要从事动物解剖组织学与黏膜免疫研究, E-mail: tianqiaozhen070@163.com

\* 通信作者: 杨银凤, 教授, 博士, 主要从事动物解剖组织学与黏膜免疫研究, Tel: 0471-4310743, E-mail: julie1986@163.com

protein was 6.94 ku containing 10 amino acid residues with positive charges without amino acid residue with negative charges, and its theoretical isoelectric point was 10.85. It could be predicted that redBD-1 protein had a secreting signal peptide structure, had no trans-membrane domain and mainly exerts the ectocellular physiological function; six conserved cysteine residues formed 3 intramolecular disulfide bonds with the connection of Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 and Cys3-Cys6; the tertiary structure of maturation protein consisted of  $\beta$ -overlap, extension and random coils. Amino acid sequence of redBD-1 showed highest similarity with that of siBD-1 (98.4%), followed with BEBD (92.2%), HBD-2 (35.9%). RT-qPCR results indicated that *redBD-1* was expressed in all detected organs, and the expression level was relatively higher in most organs of digestive system, respiratory system and reproductive system compared with a relatively lower expression level in parenchymatous organs like liver, kidney and spleen. This research could provide a theoretical basis for a better study of defensins gene functions and red deer mucosal immune system.

**Key words:** red deer  $\beta$ -defensin-1; RACE; gene cloning; sequence analysis; quantitative expression

防御素是内源性抗微生物肽中的一个大家族,哺乳动物防御素根据氨基酸空间结构和分泌部位不同划分为 3 个亚家族: $\alpha$ -防御素、 $\beta$ -防御素和  $\theta$ -防御素<sup>[1]</sup>。其中  $\beta$ -防御素是一类富含半胱氨酸的阳离子多肽,广泛分布于牛的骨髓以及人和多种动物(牛、羊、猪、骆驼、驯鹿、梅花鹿、鼠等)的胃肠道、呼吸道、泌尿生殖道、舌、牙龈、皮肤等上皮组织中<sup>[2-4]</sup>。成熟的  $\beta$ -防御素蛋白多由 38~42 个氨基酸组成,含有 6 个保守的半胱氨酸残基,分别以 Cys2-Cys4、Cys1-Cys5 和 Cys3-Cys6 的连接方式形成 3 个分子的二硫键<sup>[5]</sup>。大量资料表明, $\beta$ -防御素是专门抵御病原体的前线抗菌分子,对不同的细菌、病毒、真菌感染均有应答<sup>[6-7]</sup>。防御素不但可以抵抗病原微生物,还可以进一步发挥趋化作用,这种抗菌模式可在机体感染病原数小时内消灭病原微生物<sup>[8]</sup>。不同的防御素在特定浓度时可以选择性趋化天然免疫系统中的白细胞,通过吞噬方式来抵御和消灭入侵的病原微生物,人  $\beta$ -防御素-1(HBD-1)趋化单核细胞,HBD-2 趋化肥大细胞,HBD-3、HBD-4 可趋化巨噬细胞<sup>[8-9]</sup>。由此提示, $\beta$ -防御素在哺乳动物的天然免疫系统中扮演重要角色。迄今为止,对防御素的研究主要集中在人、鼠、家畜、家禽等物种中,但在特种经济动物领域的研究还少见报道。

马鹿(*Cervus elaphus*)是仅次于驼鹿的大型鹿类,其鹿茸产量很高,是名贵的中药材;鹿胎、鹿鞭、鹿尾等也是名贵的滋补品。人工驯养的马鹿具有极高的经济价值<sup>[10]</sup>。消化系统疾病是导致人工饲养

马鹿死亡的主要原因<sup>[11]</sup>,消化道黏膜免疫系统是抵御微生物入侵的重要屏障<sup>[12]</sup>,为了探索马鹿黏膜免疫系统的防御机制,笔者对 *redBD-1* 进行了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与主要试剂

1.1.1 试验材料 内蒙古大兴安岭北敖鲁古雅民族自治乡提供淘汰成年雌性马鹿 1 头,解剖未发现有病理变化,迅速刮取舌、食管、胃、肠等组织的黏膜,并切取肝、肺、肾、脾等实质器官组织共 36 种样品,放入液氮冷冻后-80℃超低温冰箱保存,用于总 RNA 的提取。

1.1.2 主要试剂 TaKaRa RNAiso Plus、PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、Premix Taq™、TaKaRa LA TaqDNA Polymerase、TaKaRa 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase、TaKaRa 5'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNase Plus)、DNA 凝胶回收试剂盒、PMD19-T 载体、DH5 $\alpha$  感受态细胞,以上试剂均购自大连宝生物公司。本试验所用引物均由上海生工生物工程公司合成。

### 1.2 各样品总 RNA 的提取

选取马鹿各器官样品,用液氮迅速研磨后,采取 RNAiso Plus 试剂提取总 RNA,产物于-80℃超低温冰箱保存,以备 *redBD-1* 的克隆及 RT-qPCR。

### 1.3 *redBD-1* 基因 cDNA 的克隆

#### 1.3.1 *redBD-1* 基因 cDNA 保守区段的克隆

选取舌组织总 RNA, 采用 PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒, 按其说明书进行操作, 将反转录产物于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。利用 DNASTar 软

件对 GenBank 中公布的牛  $\beta$ -防御素 (*LAP*、*TAP*、*EBD*、*BNBD-4*)、绵羊  $\beta$ -防御素 (*SBD-1*、*SBD-2*)、山羊  $\beta$ -防御素 (*GBD-1*、*GBD-2*) 的 cDNA 序列进行同源性比较后, 根据引物设计原则在这些  $\beta$ -防御素保守区设计特异性引物 P1-F/P1-R (表 1)。

表 1 用于 *redBD-1* 克隆及实时荧光定量 PCR 的引物

Table 1 Primers for *redBD-1* cloning and real-time quantitative PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
P1-F	GCCAGCATGAGGCTCCATCACCTGCTCCT
P1-R	AAC TTTGAACAAAATTTATTCTGGTTTAAATT
3-GSP-F	CTGGGTCAGGATTTACTCAAGG
3-RACE-Outer-R	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
3-RACE-Inner-R	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG
5-RACE-Outer-F	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
5-RACE-Inner-F	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG
5-GSP-R	CATTGGTCCTGGCCGTGTCTTAG
red-actin-F	CTGTGCTGTCTCTGTACGCCTCT
red-actin-R	GGGACACCGGAACCGCTCGTTGC

采用试剂盒 TaKaRa LA TaqDNA Polymerase, 以 1.3.1 中反转录得到的 cDNA 为模板, 引物 P1-F/P1-R, 进行 PCR 反应。50  $\mu\text{L}$  扩增体系: 1  $\mu\text{L}$  cDNA, 上、下游引物 ( $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ ,  $10\times$  LA Taq Buffer 5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  ( $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 4  $\mu\text{L}$ , dNTPs ( $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 8  $\mu\text{L}$ , TaKaRa LA Taq ( $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$  和 29.5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。反应条件:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 3 min, 30 个循环的扩增 ( $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s 和  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  3 min), 最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后 (图 1), 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段, 与 pMD19-T (TaKaRa) 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 经 LB/Amp 平板培养基筛选后, 通过菌落 PCR 检测阳性克隆送华大基因科技有限公司进行双向测序。测序结果经 BLAST 比对后, 确定所克隆的保守区段 cDNA 序列属于  $\beta$ -防御素基因家族。

#### 1.3.2 *redBD-1* 基因 cDNA 3'RACE 的克隆

选取舌总 RNA 为模板, 用 3'-Full RACE Kit 试剂盒提供的 PrimeScript Reverse Transcriptase、带有 3'RACE Adaptor 的 Poly(T)<sup>+</sup> 引物进行反转录反

应, 方法按照 3'-Full RACE Kit 反转录说明进行。合成的 3' Strand cDNA,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

根据已获得的 *redBD-1* 基因保守区段序列, 按照 3'-Full RACE Kit 试剂盒要求, 应用 Oligo 6 软件设计特异性引物 3-GSP-F。采用 TaKaRa LA Taq 试剂盒, 以 3' Strand cDNA 为模板, P1-F/3-RACE-Outer-R 为引物, 进行 3' Outer PCR 反应, 得到 3' 1 st PCR 产物; 以 3' 1 st PCR 产物为模板, 以 3-GSP-F/3-RACE-Inner-R 为引物, 进行 3' Inner PCR 反应, 得到 3'RACE 片段。琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1), 回收目的片段, 克隆后测序。

#### 1.3.3 *redBD-1* 基因 cDNA 5'RACE 的克隆

以舌总 RNA 为模板, 采用 5'-Full RACE Kit 试剂盒, 依次去 5' 磷酸基团、去 5' 帽子、连接 5'RACE Adaptor 处理 RNA, 最后使用 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H<sup>-</sup>)、Random 9 mers 进行反转录反应合成 5' Strand cDNA, 产物于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

根据已获得的 *redBD-1* 基因保守区段的序列, 按照 5'-Full RACE Kit 试剂盒要求, 应用 Oligo 6

软件设计特异性引物 5-GSP-R。采用 TaKaRa LA Taq 试剂盒:以 5' Strand cDNA 为模板,5-RACE-Outer-F/P1-R 为引物,进行 5' Outer PCR 反应,得 5' 1 st PCR 产物;再以其为模板,使用引物 5-RACE-Inner-F/5-GSP-R,进行 5' Inner PCR 反应,得到 5' RACE 片段。琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的片段,克隆后测序。

#### 1.4 *redBD-1* 基因 cDNA 全长序列的分析

将测序得到的各段 *redBD-1* 基因序列拼接成完整的 cDNA 序列,采用 NCBI 的 ORF Finder 程序分析 ORF;蛋白质理化性质预测使用 ProParam 工具(<http://web.expasy.org/protparam/>);采用 SignalP 在线服务器预测信号肽(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);用 TMHMM 程序进行跨膜区预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>);亲水性疏水性预测采用 ProtScale 程序(<http://web.expasy.org/protscale/>);二级结构的预测使用 Prabi 服务器的 Sopma 程序(<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>);运用 PredictProtein 服务器分析二硫键位置(<https://www.predictprotein.org/home>);并利用 SWISS-MODEL 软件(<https://swissmodel.expasy.org/>)进行三级结构预测;使用 DNASTAR 的 MegAlign 软件进行一些哺乳动物间  $\beta$ -防御素氨基酸序列同源性的比较。

#### 1.5 *redBD-1* 基因不同组织表达水平检测

根据 GenBank 公布的马鹿  $\beta$ actin 基因序列(登录号为 DQ233465),用 Oligo 6 软件设计特异性引物 red-actin-F 和 red-actin-R。将 1.2 中提取的马鹿各组织 RNA 样品,采用试剂盒 PrimerScript™ RT reagent Kit 逆转录合成 cDNA,方法参照其说明书。以合成的 cDNA 为模板,进行 RT-qPCR 反应,20  $\mu$ L 体系如下:SYBR Premix Ex Taq(2 $\times$ ) 10  $\mu$ L,3-GSP-F 和 5-GSP-R(10  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>)各 0.8  $\mu$ L,适当稀释的 cDNA 模板 2  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ L。同时设定内参基因 red-actin-F/red-actin-R 的对照试验。扩增程序:95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95  $^{\circ}$ C 变性 5 s,63  $^{\circ}$ C 退火 34 s,45 个循环;熔解程序:95  $^{\circ}$ C 5 s;60  $^{\circ}$ C 30 s,95  $^{\circ}$ C 15 s。每个样品的 *redBD-1* 基因和  $\beta$ actin 基因分别做 3 个重复,反应结束后根据扩增曲线的 Ct 值计算 *redBD-1* 基因的相对表达量。

#### 1.6 数据分析

每种样品重复 3 次试验。数据采用 Spss 20.0 软件进行单因素方差分析,共分为 36 组,采用 2<sup>ΔCt</sup> 平均

值±标准误的平均值(mean±mean of standard error,  $\bar{x}$ ±SEM)来计算 *redBD-1* 基因的表达水平,其中  $\Delta Ct = Ct(\textit{redBD-1}) - Ct(\beta\textit{actin})$ ,通过 *t*-检验对数据进行统计学分析, $P < 0.05$  为显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 *redBD-1* 基因的 RT-PCR 和 RACE 扩增

马鹿各样品总 RNA 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测均有 28S、18S、5S 三条带(图略),OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> 均为 1.9~2.0,表明 RNA 提取满足试验要求。舌黏膜总 RNA 经 RT-PCR 结合 RACE 的方法扩增得到的 *redBD-1* 基因各片段产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1 所示。

### 2.2 *redBD-1* 基因的 cDNA 全长序列及分析

将测序后拼接得到的 *redBD-1* 基因 cDNA 全长序列在 NCBI 上进行同源性搜索,表明该基因属于  $\beta$ -防御素基因家族。应用 ORF Finder 程序对 *redBD-1* 基因序列分析表明(图 2),该基因的 cDNA 全长序列为 455 bp,ORF 长为 192 bp(133~324 bp),共编码 64 个氨基酸,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA,5' 非翻译区(5' UTR)为 132 bp,3' 非翻译区(3' UTR)为 131 bp。

### 2.3 *redBD-1* 蛋白的生物信息学分析

2.3.1 *redBD-1* 前体蛋白理化性质分析 运用 ProtParam 软件分析 *redBD-1* 前体蛋白的基本理化性质,结果表明,分子式为 C<sub>301</sub>H<sub>510</sub>N<sub>98</sub>O<sub>74</sub>S<sub>8</sub>,分子量为 6.94 ku,理论等电点为 10.85;含有 16 种基本氨基酸(图 3),其中含量最高的为 Leucine(15.6%);有 10 个带正电荷的氨基酸残基(7 个精氨酸 Arginine-R,3 个赖氨酸 Lysine-K);没有带负电荷的氨基酸残基;280 nm 的摩尔消光系数为 375 mol $\cdot$ cm<sup>-1</sup>;该分子的平均亲水系数为 0.275。

2.3.2 *redBD-1* 前体蛋白信号肽预测及跨膜结构预测 利用 SignalP 4.0 Server 对 *redBD-1* 编码的蛋白进行信号肽的预测(图 4),从图可以看出,该蛋白的 N 端至第 24 位氨基酸之间的剪切位点分值和综合剪切分值均达到最大峰值,表明该蛋白有信号肽结构为分泌蛋白。利用 TMHMM 2.0 Server 对 *redBD-1* 编码的蛋白进行跨膜结构的预测(图 5),从图中看出其在第 4~26 位氨基酸残基左右可能为跨膜蛋白,但其可能性小于 8%,即认为其不存在跨膜蛋白。因此推测,*redBD-1* 不具有跨膜结构,在合成后通过信号肽的引导分泌到细胞外。

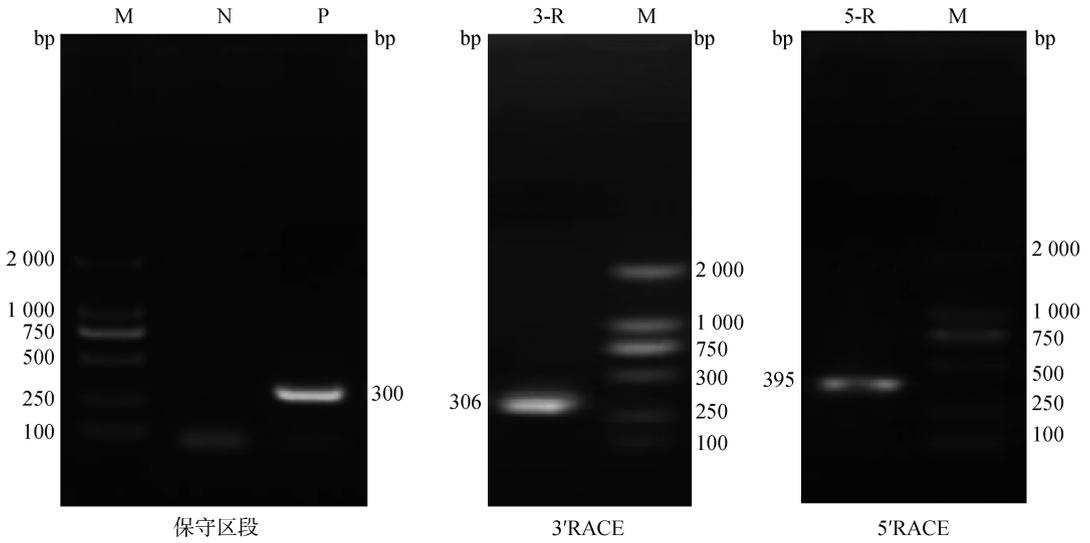


图 1 *redBD-1* 基因 RT-PCR 及 RACE 扩增的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis of RT-PCR and RACE amplification of *redBD-1* gene

N. 未加模板的阴性对照; P. 保守区段扩增产物; 3-R. 3' RACE 扩增产物; 5-R. 5' RACE 扩增产物; M. DNA 相对分子质量标准

N. Negative control without template; P. Conserved segment amplification; 3-R. 3' RACE-amplified; 5-R. 5' RACE-amplified; M. DL2000 DNA Marker

1	GAG ACT CAG TTA ACC AGT TCA TAA GAA CCA AAT CCA CAG CCA GTG CGG AAT TCC	54
55	TCC CGG AAC CTG GGA CCT TTA TAA AGC GGC AAG CGC AGC CTC TGC TCC AGC GTC	108
109	AGC CCC AGA GCT CCG GCT GCC AGC ATG AGG CTC CAT CAC CTG CTC CTC GCG CTC	162
	<u>M R L H H L L L A L</u>	10
163	CTC TTC CTG GTC CTG TCT GCT GGG TCA GGA TTT ACT CAA GGA GTA AGA AAT CCT	216
	<u>L F L V L S A G S G F T Q G V R N P</u>	28
217	CTA AGC TGC GGT AGG AAT AAA GGC GTC TGT GTG CCG ATC CGG TGC CCT GGA CAC	270
	<u>L S C G R N K G V C V P I R C P G H</u>	46
271	ATG AGA CAG ATT GGC ACT TGT CTC GGG GCC CCA GTA AAA TGC TGC AGA AGG AAG	324
	<u>M R Q I G T C L G A P V K C G R R K</u>	64
325	TAA AAG AAG ACT AAG ACA CGG CCA GGA CCA ATG CTG AGT CAG AAA CCA CAC CCT	378
	*	
379	TCA ACA GAG CAT CTA AAA TTG AAA CCA GAA TAA ATT TTG TTC AAA ATT AAA GAA	432
433	TTG CCC ACG GGA AAA AAA AAA AA	455

图 2 *redBD-1* 基因 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 The cDNA full-length sequence of *redBD-1* gene and its deduced amino acid sequence

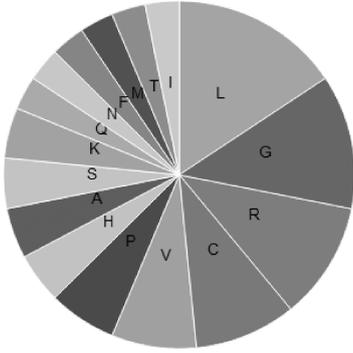
2.3.3 redBD-1 前体蛋白亲水性/疏水性分析

运用 ExPASy 服务器中 ProtScale 程序对 redBD-1 肽链的亲水性/疏水性进行分析,如图 6 所示,位于 redBD-1 前体蛋白 N 末端的信号肽区形成强的疏水

区,其中第 10 位亮氨酸(Leu)疏水性最强(最高分值 3.5);在成熟肽区,疏水氨基酸和亲水氨基酸均有分布。

2.3.4 redBD-1 前体蛋白高级结构预测

运用

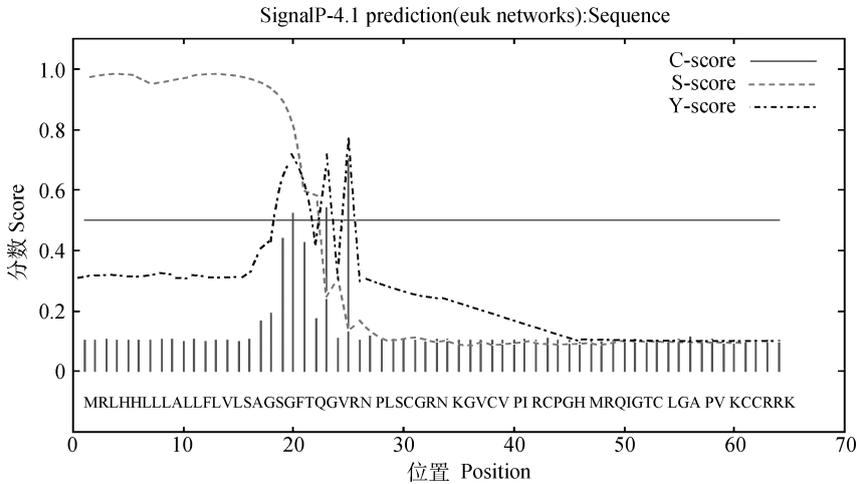


L. Leucine; G. Glycine; R. Arginine; C. Cysteine; V. Valine; P. Proline; H. Histidine; A. Alanine; S. Serine; K. Lysine; Q. Glutamine; N. Asparagine; F. Phenylalanine; M. Methionine; T. Threonine; I. Isoleucine

图3 redBD-1前体蛋白的氨基酸组成

Fig. 3 The amino acid composition of redBD-1 precursor protein

Prabi 在线服务器的 Sopma 程序分析(图7)表明, redBD-1 前体蛋白二级结构由  $\alpha$ -螺旋、延伸、 $\beta$ -折叠及无规则卷曲4种结构组成,其各种结构所占比例分别是 26.56%、10.94%、20.31%及 42.19%,其中  $\alpha$ -螺旋主要分布在多肽链的N端;运用 Predict-Protein 服务器分析表明,6个保守的半胱氨酸残基分别以 Cys1-Cys5、Cys2-Cys4 和 Cys3-Cys6 连接,形成3个分子内二硫键(图8),进一步证明了所克隆的 redBD-1 属于  $\beta$ -防御素亚家族。去除信号肽序列后,运用 SWISS-MODEL 进行同源建模,如图9所示, redBD-1 成熟蛋白的三级结构是由  $\beta$ -折叠、延伸和无规则卷曲构成,这与二级结构预测结果一致。



C-score. 原始剪切位点的分值; S-score. 信号肽的分值; Y-score. 综合剪切位点的分值

C-score. Point value of original cleavage site; S-score. Point value of signal peptide; Y-score. Point value of comprehensive cleavage site

图4 redBD-1氨基酸序列信号肽的预测分析

Fig. 4 Prediction analysis of the signal peptide of redBD-1 amino acid sequence

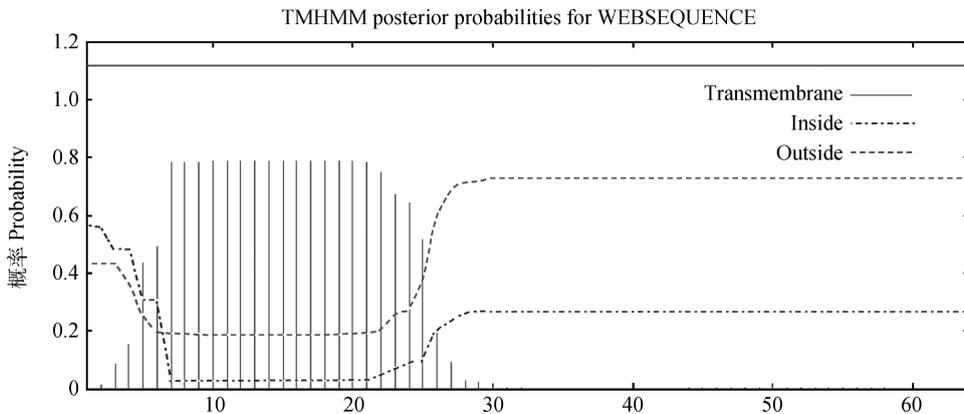


图5 redBD-1蛋白跨膜区分析

Fig. 5 Transmembrane domain analysis of redBD-1 protein

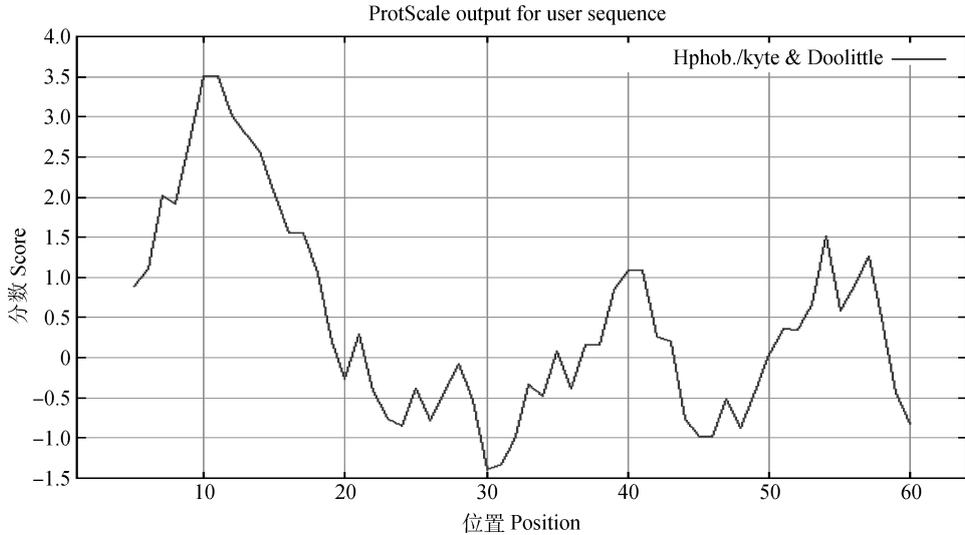


图 6 redBD-1 前体蛋白疏水性分析

Fig. 6 Hydrophobicity analysis of redBD-1 precursor protein

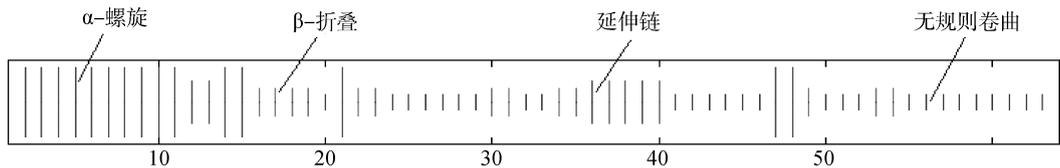


图 7 redBD-1 前体蛋白二级结构

Fig. 7 Secondary structure of redBD-1 precursor protein

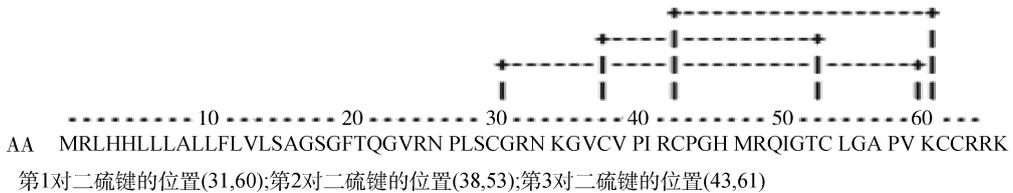


图 8 redBD-1 前体蛋白二硫键位置

Fig. 8 Disulfide bond position of redBD-1 precursor protein



图 9 redBD-1 蛋白三级结构

Fig. 9 The tertiary structure of redBD-1 protein

## 2.4 redBD-1 前体蛋白同源性及进化分析

推导的 redBD-1 氨基酸序列用 MegAlign 软件

中 Clustal V 方法与 NCBI 数据库中收集下载的 17 类哺乳动物  $\beta$ -防御素氨基酸比对,结果显示(图 10),这些氨基酸序列在特定位置均含有 6 个保守半胱氨酸残基;氨基酸序列同源性最高的是 siBD-1 为 98.4%,其次是 BEBD 为 92.2%,与 HBD-2 同源性最低仅为 35.9%。

## 2.5 redBD-1 在不同器官的相对表达量

数据处理后经 Spss 20.0 软件分析,结果如图 11 所示。redBD-1 基因在被检器官中均有表达,但其相对表达量在不同器官内差异显著。redBD-1 在消化系统、呼吸系统及生殖系统的大部分器官表达量较高,泌尿系统的表达量相对较低,肝、肾和脾等实质性器官的表达量较低。

GenBank 登陆号	基因名称	编码区推导的氨基酸序列	氨基酸数	Identity (%)
KT900948	redBD-1	MRLHLLLLALLFLVLSAGSGFTGGVRNPLSCGRNKGVCPVIRCPGHMRQIGTCLGAPVKCCRRK	64	---
HM588696	siBD-1	MRLHLLLLALLFLVLSAGSGFTGGVRNLSLSCGRNKGVCPVIRCPGHMRQIGTCLGAPVKCCRRK	64	98.4
DQ861296	reBD-1	MRLHLLLLALLFLVLSAASGFTGGVKTQSCCHRNGKGVCPVIRCPRSMRQIGTCLGAPVKCCRRK	64	87.5
AF000362	CowEBD	MRLHLLLLTLLFLVLSAGSGFTGGISNPLSCRLNRGICVPIRCPGNLRQIGTCLFTPSVKCCRRW	64	76.6
S76279	CowLAP	MRLHLLLLALLFLVLSAGSGFTGGVRNSQSCRNRKVICVPIRCPGSMRQIGTCLGAQVKCCRRK	64	90.6
AF014106	CowTAP	MRLHLLLLALLFLVLSAGSGFTGGVGYPSVSCRNRKVICVPIRCPGNMKQIGTCVGRAVKCCRRK	64	81.2
AF014107	BNBD-4	MRLHLLLLAVLFLVLSAGSGFTQVRNPQSCRWNMGVCIPLCRVGMRQIGTCFGPRVPCRRR	63	74.6
AY301005	BEBD	MRLHLLLLALLFLVLSAGSGFTGGVRNPQSCRNRKVICVPIRCPGNMRQIGTCLGPPVKCCRRK	64	92.2
Y17679	GBD-1	MRLHLLLLVFFLFLVLSAGSGFTGGIRSRRSCHRNGKGVCLTRCPNRMRQIGTCFGPPVKCCRRK	64	76.6
AJ009877	GBD-2	MRLHLLLLALLFLVLSAGSGFTGGIINHRSCYRNKGVCAPARCPNRMRQIGTCHGPPVKCCRRK	64	79.7
U75250	SBD-1	MRLHLLLLVFFVFLVLSAGSGFTGGVRNRLSCHRNGKGVCPVSRCPHMRQIGTCRGPVVKCCRRK	64	84.4
U75251	SBD-2	MRLHLLLLVFFVFLVLSAGSGFTGGVTDLSLSCRWKKGICVLTTRCPGTMRQIGTCFGPPVKCCRRK	64	73.4
AF031666	pBD-1	MRLHLLLLVFLMLVLLPVPGLLKNIGNSVSCLRNKGVCMGPKCAPMKQIGTCGMPQVKCCRRK	64	53.1
AY170305	hoBD-1	MRILHFLLAFLIVFLLPVPGFTAGIETSFSCSQNGGFCISPKCLPGSKQIGTCILPGSKCCRRK	64	43.8
AF06886	RBD-2	MRIHLLFSFLLVLLSPLSAFTQSIINNPITCLTKGGVCGW-PCTGGFRQIGTCGLPRVRCCKKK	63	42.9
NM_013756	MBD-3	MRIHLLFAFLVLLSPPAAFSKKNINNPVSLRKGGRWN-RCIGNTRQIGSCGVPFLLKCCRRK	63	42.9
AF155882	MBD-4	MRIHLLFTFLLVLLSPLSAFTQIINNPITGMTNGAICWG-PCPTAFRQIGNCGHFKVRCCKIR	63	36.5
AF071216	HBD-2	MRVLYLLFSFLFIFLMLPLGVVFGGIGDPTVCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCCKP	64	35.9

共有序列用灰色阴影标出;保守的半胱氨酸用斜体表示

The consensus sequences are shadowed in gray; The conservative cysteine logo in italic letters. redBD-1. Red deer  $\beta$ -defensin-1; siBD-1. Sika deer  $\beta$ -defensin-1; reBD-1. Reindeer  $\beta$ -defensin-1; CowEBD. Cow Enteric  $\beta$ -defensin-1; CowLAP. Cow lingual antimicrobial peptide; CowTAP. Cow tracheal antimicrobial peptide; BNBD-4. *Bos taurus* neutrophil  $\beta$ -defensin-4; BEBD. *Bubalus bubalis* enteric  $\beta$ -defensin preproprotein; GBD-1. Goat  $\beta$ -defensin-1; GBD-2. Goat  $\beta$ -defensin-2; SBD-1. Sheep  $\beta$ -defensin-1; SBD-2. Sheep  $\beta$ -defensin-2; pBD-1. Pig  $\beta$ -defensin-1; hoBD-1. Horse  $\beta$ -defensin-1; RBD-2. Rat  $\beta$ -defensin-2; MBD-3. Mouse  $\beta$ -defensin-3; MBD-4. Mouse  $\beta$ -defensin-4; HBD-2. Human beta-defensin-2

图 10 redBD-1 和其他物种相应  $\beta$ -防御素氨基酸序列的多重比较

Fig. 10 Multiple comparisons of  $\beta$ -defensins amino acid sequence between redBD-1 and those of other species

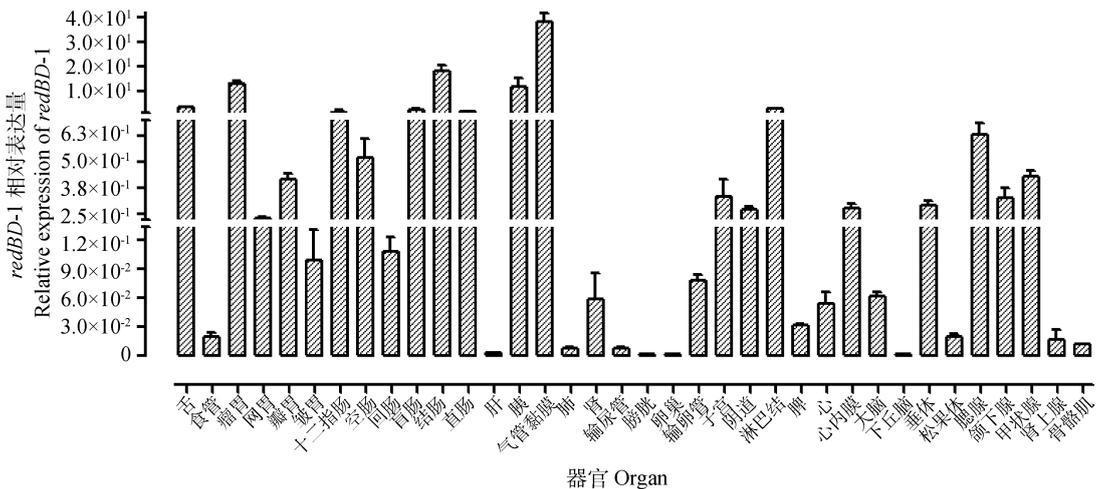


图 11 redBD-1 相对表达量

Fig. 11 Relative expression levels of redBD-1

### 3 讨论

#### 3.1 redBD-1 生物信息学分析

本研究采用 RT-PCR 结合 RACE 的方法成功克隆得到 redBD-1 基因的 cDNA 全序列长为 455 bp。经序列分析表明,该基因 5' UTR 为 132 bp、ORF 为 192 bp、3' UTR 为 131 bp,共编码 64 个氨

基酸,内含 6 个特定位置保守的半胱氨酸残基,分别以 Cys1-Cys5、Cys2-Cys4 和 Cys3-Cys6 的连接方式形成 3 对二硫键,这是  $\beta$ -防御素的基本结构单元<sup>[3,13-14]</sup>。redBD-1 氨基酸序列 N 末端的 24 个氨基酸是信号肽序列,且组成信号肽的氨基酸形成一个明显的疏水区域,这种疏水性的氨基酸组成容易与脂膜结合,对信号肽引导防御素前体蛋白通过脂

膜是有利的<sup>[15-16]</sup>。在成熟肽区域既表现亲水性又表现亲脂性,防御素的两亲性结构及其阳离子性质有助于插入到带负电荷的病原体的磷脂膜诱导膜去极化<sup>[17]</sup>,并且破坏细胞壁的完整性<sup>[18]</sup>,从而杀伤微生物。高级结构预测显示, $\alpha$ -螺旋主要分布在多肽链 N 端的信号肽区, $\beta$ -折叠片层结构位于成熟肽区域。 $\alpha$ -螺旋与信号肽的跨膜功能有关<sup>[19]</sup>, $\beta$ -折叠使小分子防御素紧密联结,形成相对稳定的化学结构,使其能够在胃肠道、呼吸道等富含吞噬溶酶体的环境中仍能保持生物学活性<sup>[13,20]</sup>。S. Yenugu 等<sup>[21]</sup>研究发现,防御素的空间构象在发挥其免疫作用的过程中起到关键作用。因此推测,redBD-1 同其他  $\beta$ -防御素家族成员一样具有免疫功能。

### 3.2 redBD-1 同源性分析

同源性分析得知,redBD-1 与 siBD-1<sup>[3]</sup>、BEED<sup>[22]</sup>、reBD-1<sup>[2]</sup>等同源性较高,与 pBD-1<sup>[23]</sup>、hoBD-1<sup>[24]</sup>、HBD-2<sup>[25]</sup>等相对较低,这说明反刍动物之间的  $\beta$ -防御素同源性较高,反刍动物与猪、马、鼠等的  $\beta$ -防御素同源性较低。鉴于哺乳动物间都存在  $\beta$ -防御素但同源性差异较大现象,很多学者用达尔文进化的理论来解释,物种之间感染的病原不同,从而导致一些基因发生有益于自身的显著突变来抵御外界病原体,进而导致物种间同源性差异较大<sup>[26]</sup>。redBD-1 与家牛的 3 种  $\beta$ -防御素相比,LAP 同源性最高,这可能由于 redBD-1 和 LAP 都来源于舌组织。

### 3.3 redBD-1 表达特性分析

$\beta$ -防御素这种小分子抗菌肽在哺乳动物体内广泛表达。杨银凤等<sup>[2,27]</sup>发现, $\beta$ -防御素在雌性骆驼、驯鹿呼吸道、胃肠道、生殖道各组织中均有表达。盛金良等<sup>[28]</sup>研究表明,SBD-1 在绵羊的整个消化道和呼吸道均有分布。唐博等<sup>[29]</sup>研究表明,在蒙古绵羊雌性生殖道内均有 SBD-1 表达。本研究结果表明,在被检马鹿的消化、呼吸、泌尿、生殖系统均有 redBD-1 基因的表达,且存在组织差异性,这种表达模式与反刍动物基本一致;但是其在消化系统内表达丰度最高,出现这种结果可能与胃肠道定殖有大量的微生物有关;试验同时发现,redBD-1 基因在肝、肾、脾等实质性器官和腺体内均有表达,提示  $\beta$ -防御素在发挥先天性免疫作用<sup>[30]</sup>的同时还可能存在着其他生物学功能,但是具体生物学功能有待进一步研究发现。

## 4 结 论

本研究采用 PCR 结合 RACE 的方法成功获得了 redBD-1 基因的 cDNA 全长序列,该基因编码的蛋白有信号肽无跨膜区,属于分泌蛋白,具有  $\beta$ -折叠片层结构。redBD-1 基因编码的氨基酸序列与梅花鹿、驯鹿、牛羊等反刍动物的同源性较高。redBD-1 基因在被检器官中均有表达,且在消化系统、呼吸系统及生殖系统的表达量较高,表明 redBD-1 基因在黏膜免疫中占主导地位,本研究将为今后探索防御素基因功能以及马鹿黏膜免疫系统提供理论基础。

### 参考文献 (References):

- [1] LEHRER R I, GANZ T. Defensins of vertebrate animals[J]. *Curr Opin Immunol*, 2002, 14(1): 96-102.
- [2] YANG Y F, WANG C Y, ZHAO Y F, et al. Reindeer  $\beta$ -defensin-1: Full-length cDNA cloning and tissue expression [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 131(1-2): 137-139.
- [3] YANG Y F, JING L, LI T, et al. A new Beta defensin from sika deer: molecular cloning and sequence characterization[J]. *Anim Biotechnol*, 2011, 22(2): 64-70.
- [4] BÖHLING A, HAGGE S O, ROES S, et al. Lipid-specific membrane activity of human beta-defensin-3 [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(17): 5663-5670.
- [5] CAMPOPIANO D J, CLARKE D J, POLFER N C, et al. Structure-activity relationships in defensin dimers: a novel link between beta-defensin tertiary structure and antimicrobial activity[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 48671-48679.
- [6] MORRISON G, KILANOWSKI F, DAVIDSON D, et al. Characterization of the mouse beta defensin 1, Defb1, mutant mouse model [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(6):3053-3060.
- [7] HERRERA R, MORRIS M, ROSBE K, et al. Human beta-defensins 2 and -3 coinfect with human immunodeficiency virus via heparan sulfate proteoglycans and reduce infectivity of intracellular virions in tonsil epithelial cells[J]. *Virology*, 2016, 487:172-187.
- [8] MCDERMOTT A M. Defensins and other antimicrobial peptides at the ocular surface[J]. *Ocul Surf*, 2004, 2(4):229-247.
- [9] BARONI A, DONNARUMMA G, PAOLETTI I, et al. Antimicrobial human beta-defensin-2 stimulates migration, proliferation and tube formation of human umbilical vein endothelial cells[J]. *Peptides*, 2009,

- 30(2): 267-272.
- [10] 杨福合. 中国鹿产业发展战略研究[D]. 长春: 吉林大学, 2012.  
YANG F H. Chinese deer industry development strategy research[D]. Changchun: Jilin University, 2012. (in Chinese)
- [11] 李 灵, 吐尔逊·吐拉洪, 陶贺寿, 等. 家养天山马鹿死亡原因调查[J]. 中国兽医杂志, 2001, 37(8): 25-27.  
LI L, TUERXUN T L H, TAO H S, et al. Investigation on death causes of domestic red deer[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2001, 37(8): 25-27. (in Chinese)
- [12] MONTILLA N A, BLAS M P, SANTALLA M L, et al. Mucosal immune system; A brief review[J]. *Immunology*, 2004, 23(2): 207-216.
- [13] GANZ T. Defensins; antimicrobial peptides of innate immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(9): 710-720.
- [14] XIN A, ZHAO Y, YU H, et al. Soluble fusion expression, characterization and localization of human beta-defensin 6[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(1): 149-155.
- [15] RAPOPORT T A. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes[J]. *Nature*, 2007, 450(7170): 663-669.
- [16] VON HEIJINE G. Life and death of a signal peptide [J]. *Nature*, 1998, 396(6707): 111-113.
- [17] BOULANGER N, BULET P, LOWENBERGER C. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites[J]. *Trends Parasitol*, 2006, 22(6): 262-268.
- [18] BROGDEN K A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(3): 238-250.
- [19] BLOM N, SICHERITZ-PONTÉN T, GUPTA R, et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence[J]. *Proteomics*, 2004, 4(6): 1633-1649.
- [20] LEHRER R I. Primate defensins[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2(9): 727-738.
- [21] YENUGU S, HAMIL K G, RADHAKRISHNAN Y, et al. The androgen-regulated epididymal sperm-binding protein, human beta-defensin 118 (DEFB118) (formerly ESC42), is an antimicrobial beta-defensin[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(7): 3165-3173.
- [22] DAS D K, SHARMA B, MITRA A, et al. Molecular cloning and characterization of beta-defensin cDNA expressed in distal ileum of buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. *DNA Seq*, 2005, 16(1): 16-20.
- [23] ZHANG G, WU H, SHI J, et al. Molecular cloning and tissue expression of porcine beta-defensin-1 [J]. *FEBS Lett*, 1998, 424(1-2): 37-40.
- [24] DAVIS E G, SANG Y, BLECHA F. Equine beta-defensin-1; full-length cDNA sequence and tissue expression [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 99(1-2): 127-132.
- [25] DIAMOND G, KAISER V, RHODES J, et al. Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(1): 113-119.
- [26] 周财源, 蔺利娟, 韩宗玺, 等. 鹅  $\beta$ -防御素基因克隆与生物学特性的初步分析[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(8): 1193-1200.  
ZHOU C Y, LIN L J, HAN Z X, et al. Cloning and initial characterization of goose avian  $\beta$ -defensin [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42(8): 1193-1200. (in Chinese).
- [27] 杨银凤, 唐 博, 余兴邦, 等.  $\beta$ -防御素 caBD-1 mRNA 在骆驼组织器官中的表达[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(11): 3-6.  
YANG Y F, TANG B, YU X B, et al. Examination of expression of camel  $\beta$ -defensin caBD-1 mRNA in tissues [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2004, 34(11): 3-6. (in Chinese)
- [28] 盛金良, 陈创夫, 杨 霞, 等. 绵羊防御素 (sBD1) mRNA 在不同发育阶段的组织分布和定量分析[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(1): 20-25.  
SHENG J L, CHEN C F, YANG X, et al. Distribution and quantitative assay of sheep  $\beta$ -defensin-1 mRNA in differently developmental stages [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2009, 40(1): 20-25. (in Chinese)
- [29] 唐 博, 曹贵方, 吕东媛, 等. 蒙古绵羊雌性生殖道  $\beta$ -防御素 (sBD-1) 的序列分析及组织表达[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(8): 987-990.  
TANG B, CAN G F, LÜ D Y, et al. Sequence analysis and tissues expression of sBD-1 of Mongolia sheep in female reproductive tract [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2008, 28(8): 987-990. (in Chinese)
- [30] SCHAUBER J, GALLO R L. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122(2): 261-266.