

## 黔邵花猪 *BPI* 基因的 cDNA 克隆及蛋白质序列分析

魏麟<sup>1,2</sup>, 陈斌<sup>1\*</sup>, 张善文<sup>1</sup>, 宋伸<sup>2</sup>, 刘鹏<sup>2</sup>

(1. 湖南农业大学 动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2. 怀化学院 生命科学系, 湖南 怀化 418008)

**摘要:** 从猪血液总 RNA 中克隆出 *BPI* 基因, 对该基因的 cDNA 进行序列分析。结果表明: 克隆到的序列全长 1 874 bp(基因登录号为 FJ810853), 其中 1 452 bp 的开放阅读框编码 483 个氨基酸残基, 含 13.25% 的亮氨酸, 有一段 27 个氨基酸的信号肽序列。同源性分析结果显示: 猪 *BPI* 与人、牛、兔、狗、大鼠、小鼠、鲤鱼、非洲爪蟾、大西洋鲑和大黄鱼 *BPI* 分子氨基酸序列的同源性分别为 64%、74%、59%、67%、53%、51%、35%、44%、28% 和 27%。该蛋白氨基端部分和羧基端部分为 2 个明显不同的功能区, 各存在 1 个超活性结构域, 中间为胰蛋白酶水解位点, 表现出类似人 *BPI* 结构的特征。

**关键词:** 黔邵花猪; 猪 *BPI* 基因; cDNA 克隆; 蛋白质序列

中图分类号: S828; Q784 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)05-0511-06

## Cloning of *BPI* gene from Qianshao spot pig and its amino acids sequence analysis

WEI Lin<sup>1,2</sup>, CHEN Bin<sup>1\*</sup>, ZHANG Shan-wen<sup>1</sup>, SONG Shen<sup>2</sup>, LIU Peng<sup>2</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. The Department of Life Sciences in Huaihua College, Huaihua, Hunan 418008, China)

**Abstract:** Porcine bactericidal/permeability increasing protein (*BPI*) gene was cloned from porcine blood by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Sequence analysis showed that the porcine *BPI* cDNA cloned was 1 874 bp in length (GenBank accession No: FJ810853) and the open reading frame encoded 483 amino acids residues including 13.25% leucines and a signal peptide of 27 amino acids. Comparison analysis showed that homology of *BPI* amino acids sequence between porcine and that of human, cattle, rabbit, dog, rat, mouse, carp, xenopus laevis, atlantic salmon and large yellow croaker were 64%, 74%, 59%, 67%, 53%, 51%, 35%, 44%, 28% and 27%, respectively. The amino terminal and the carboxyl terminal were two distinct functional domains, and an ultra-active domain was contained in each of the terminals and between the two terminals there existed trypsin hydrolytic site, which was the common structural features of human's *BPI*.

**Key words:** Qianshao spot pig; porcine *BPI* gene; cDNA cloning; sequence analysis

杀菌/通透性增加蛋白(bactericidal/permeability increasing protein, BPI)是 1978 年 Weiss 等<sup>[1]</sup>从健康人的中性粒细胞(PMNs)中提取出来的一种蛋白质, 因其对革兰氏阴性菌具有杀伤作用, 并且能立即增

加敏感细菌细胞壁的通透性, 使正常情况下不能通过细胞壁的放线菌素 D 得以穿过细胞壁而进入菌体, 因而称之为杀菌/通透性增加蛋白。BPI 蛋白是参与中性粒细胞内非氧化抗感染防御机制的蛋白

收稿日期: 2011-05-19

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项基金项目(CARS-36); 湖南省教育厅优秀青年项目(09B078); 湖南省怀化市重点项目(20093192)

作者简介: 魏麟(1974—), 男, 湖南邵阳人, 博士研究生, 主要从事分子遗传学与动物遗传育种研究, hhweilin@163.com; \*通信作者, chenbin7586@126.com

质之一,在机体内被称为“超级抗生素”。自 Weiss 等<sup>[1]</sup>从健康人和慢性粒细胞白血病患者 PMNs 中提取到 *BPI* 分子(n*BPI*55)后,次年 Elsbach 等<sup>[2]</sup>从兔 PMNs 中分离到 *BPI*。郑江等<sup>[3]</sup>和周红等<sup>[4]</sup>从猪 PMNs 中提取并纯化得到 *BPI*,并对其体外功能进行了研究。人和某些哺乳动物的 *BPI* 主要存在于 PMNs 细胞及细胞表面中,为 PMNs 的主要抗菌成分,占其总蛋白的 0.5%~1.0%,在中性粒细胞分化的早期阶段合成并主要储存于胞浆初级颗粒中<sup>[5]</sup>。Levy 等<sup>[6]</sup>和 Takahashi 等<sup>[7]</sup>发现,在人和小鼠的皮肤和黏膜上皮细胞中有 *BPI* 的存在,并且证明其在黏膜上皮抗感染的过程中起着重要作用。有研究<sup>[8]</sup>表明,人 *BPI* 基因氨基端独立具有 *BPI* 的全部杀菌活性和中和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)活性,LPS 结合功能区对应于基因外显子 3 区段。Klein 等<sup>[9]</sup>的研究表明,人的 *BPI* 基因与克罗恩病相关。冷伟建等<sup>[10]</sup>认为 *BPI* 基因可能与机体的易感性相关。文献<sup>[11]</sup>报道 *BPI* 基因与小儿脓毒症严重相关。笔者从黔邵花猪血液样品中提取 RNA,并克隆猪 *BPI* 基因 cDNA 全长序列,用生物信息学方法进行分析,旨在为深入研究猪 *BPI* 分子的功能提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

猪新鲜血液样品采自怀化学院生命科学系养殖场自养的健康黔邵花猪。克隆载体 pMD18-T Vector、TakaRa LA *Taq* 酶和 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司;Trizol 试剂盒、Gel Extraction Kit 试剂盒、DNA marker、*T*<sub>4</sub> DNA Ligase 均为 BBI 公司产品;IPTG、X-gal 和 Amp 均购于上海生工生物工程技术服务有限公司;琼脂糖(原装进口)购于天津博美科生物技术有限公司;菌种 DH5 $\alpha$  来自怀化学院生命科学系基因工程实验室。

### 1.2 猪总 RNA 的提取及浓度测定

按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。吸取 4  $\mu$ L 已溶解的细胞总 RNA,溶于 396  $\mu$ L DEPC 水中,用紫外分光光度计测定  $OD_{260\text{nm}}$ 、 $OD_{280\text{nm}}$  值,计算 RNA 的浓度和纯度,并于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

### 1.3 引物设计

参照 NCBI/GenBank 中登录的牛 *BPI* 基因序列(NM\_173895)及专利 *BPI* 基因序列(20040234980),应用 Oligo 6 引物设计软件在其阅读框两侧设计 1 对引物。上游引物 F:5'-acgcgggggacttatgtttc-3';下游引物 R:5'-gggtgtgtgtgaagcgcaa-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.4 cDNA 链合成与 PCR 扩增

在 0.2 mL PCR 反应管中加入如下试剂进行反转录:模板 RNA 2  $\mu$ L,dNTP Mix (10 mmol/L) 1  $\mu$ L,Oligo (dT)<sub>18</sub> (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L,RNase-free H<sub>2</sub>O 10  $\mu$ L,混匀后 65 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,迅速置于冰上;然后加入 5 $\times$ 1st Strand Synthesis Buffer 4  $\mu$ L,RNase Inhibitor (20 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L,RTase (200 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L,置微量离心机离心混匀后,42 $^{\circ}$ C 水浴反应 1 h,反应结束后置于冰上冷却 2 min;再加入 5 $\times$ 2st Strand Synthesis Buffer 30  $\mu$ L,dNTP Mix (10 mmol/L) 3  $\mu$ L,RNase-free H<sub>2</sub>O 89  $\mu$ L,*E. coli* DNA Polymerase I (20 U/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L,*E. coli* RNase H/*E. coli* DNA Ligase Mixture 2  $\mu$ L,轻轻混匀,16 $^{\circ}$ C 反应 2 h,70 $^{\circ}$ C 加热 10 min,加入 *T*<sub>4</sub> DNA Polymerase 2  $\mu$ L 轻轻混匀,37 $^{\circ}$ C 反应 10 min,加入 EDTA(0.25 mol/L) 15  $\mu$ L 和 10% SDS 溶液。反转录产物分离纯化后置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 扩增反应体系 25  $\mu$ L,其中,反转录产物 2  $\mu$ L,PCR Buffer 12.5  $\mu$ L,dNTP Mixture 4  $\mu$ L,F 和 R 引物各 1  $\mu$ L,灭菌去离子水 4.75  $\mu$ L,LA*Taq* DNA 聚合酶 0.25  $\mu$ L。PCR 的反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,35 个循环(94 $^{\circ}$ C 1 min,56 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 90 s),72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

### 1.5 扩增片段的克隆、测序和序列分析

所扩增片段均用 Gel Extraction Kit 试剂盒回收,与 pMD 18-T Vector 连接,转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,在 IPTG+X-gal+Amp+LB 平板上挑选白色菌落,培养过夜。用菌液 PCR 和提取质粒 2 种方法鉴定重组转化菌,然后进行序列测定。测序工作由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。采用 DNA Star 和 ExpAsy 在线蛋白质分析软件(<http://expasy.org/tools>)进行序列分析,用 Mega 4 分子进化软件进行 UPGMA 聚类分析。

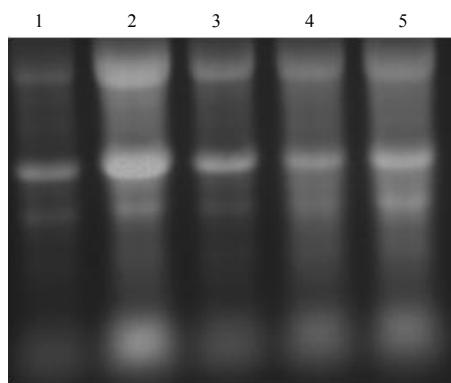
## 2 结果与分析

### 2.1 猪总 RNA 的浓度和纯度

吸取 4  $\mu\text{L}$  已溶解的细胞总 RNA, 溶于 396  $\mu\text{L}$  DEPC 水中, 用紫外分光光度计测得的  $OD_{260\text{ nm}}$  与  $OD_{280\text{ nm}}$  的比值, 约为 1.6, RNA 质量浓度为 0.78~3.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 表明 RNA 的纯度较好。

### 2.2 RNA 及 RT-PCR 产物的电泳检测结果

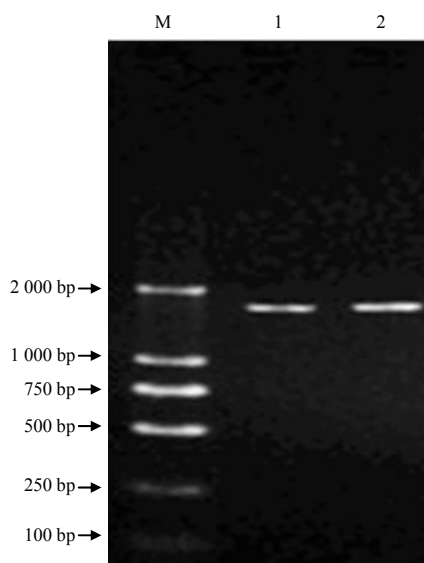
由图 1 可见, 提取的总 RNA 完整性较好, 未降解。RT-PCR 结果(图 2)显示, 扩增出 1 条约 1 850 bp 的特异性条带, 片段大小与预期结果相符。



1~5 RNA 样品。

图 1 RNA 电泳检测结果

Fig.1 Electrophoresis of RNA



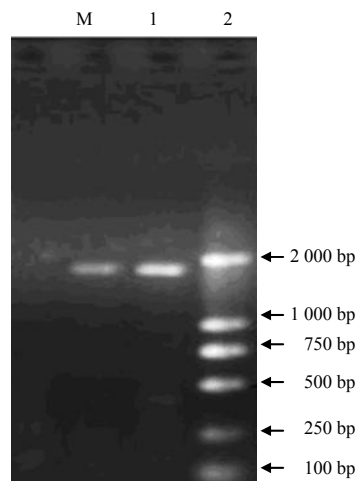
M marker; 1, 2 PCR 产物。

图 2 猪 *BPI* 基因扩增产物电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis of PCR product

### 2.3 重组质粒的 PCR 鉴定结果

以提取的质粒为模板, 用上游引物 F 和下游引物 R 进行 PCR 扩增鉴定, 扩增出 1 条特异性条带, 与目的基因大小一致(图 3), 表明本试验中克隆的目的基因已成功连接。



M marker; 1, 2 PCR 产物。

图 3 重组质粒的 PCR 鉴定结果

Fig.3 Identification of the recombinant plasmid by PCR

### 2.4 猪 *BPI* 基因推导氨基酸序列的基本特征

在 ExPASy 服务器上使用 ProtParam 程序进行蛋白理化性质分析, 预测相对分子质量为 53 392.4, 理论等电点为 9.73, 分子式为  $\text{C}_{2434}\text{H}_{3870}\text{N}_{642}\text{O}_{670}\text{S}_{17}$ , 其氨基酸组成中亮氨酸的含量达 13.25%, 比其他氨基酸含量高 0.83%~9.11%, 不稳定参数为 32.37, 属于稳定蛋白, 半衰期为 30 h。用 SOSUI 程序进行分析的结果显示该蛋白的平均疏水度为 0.106。猪 *BPI* 蛋白分子结构的预测结果表明, 该蛋白可能含由 27 个氨基酸组成的信号肽(图 4, 见封三)。利用 TMHMM 程序对猪 *BPI* 进行跨膜区分析, 该蛋白为亲水蛋白, 在 12~34 位氨基酸间有 1 个跨膜区(图 5, 见封三)。用 SOPMA 程序预测其二级结构为:  $\alpha$ -螺旋 31.68%,  $\beta$ -转角 6.42%, 伸展链 27.95%, 无规卷曲 33.95%(图 6, 见封三)。用 3D-JIGSAW 预测蛋白的三级结构(图 7, 见封三)。应用 InterProScan 程序预测结构域, 结果显示猪 *BPI* 蛋白分为 2 个明显的功能区, 即氨基端部分和羧基端部分(图 8, 见封三)。利用 9aaTAD 程序预测超活性结构域, 发现在氨基端部分和羧基端部分各存在 1 个超活性结构域, 即 YNFYSMVVR 和 ELLQAVMNF(图 9)。

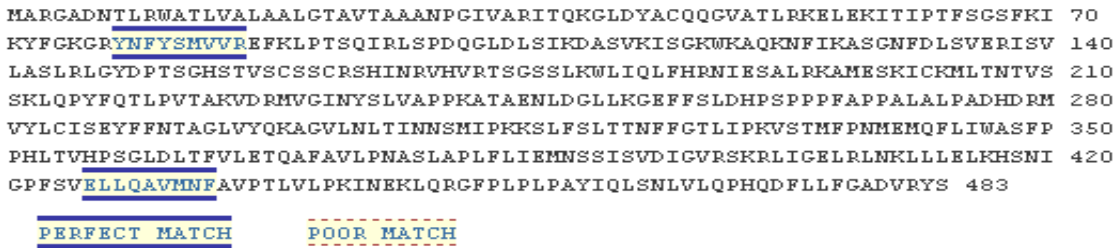


图 9 9aaTAD 程序预测猪 BPI 的超活性结构域

Fig. 9 9aaTAD prediction of nine amino acid ultra-active domain in porcine BPI

2.5 猪 BPI 基因克隆序列的测定结果

对鉴定正确的重组质粒进行测序，得到了与预期长度 1 874 bp 相符的猪 BPI 基因序列(基因登录

号为 FJ810853)。该基因含 1 个完整的 1 452 bp 的开放阅读框架(ORF)(图 10)，共编码 483 个氨基酸。



图 10 猪 BPI 基因的 cDNA 及推导的氨基酸序列

Fig. 10 Nucleotide and deduced amino acid sequence of porcine BPI cDNA

## 2.6 不同物种杀菌通透性增加蛋白的同源性比较

猪 *BPI*(FJ810853)与人(AAG42844)、牛(NP\_776320)、兔(Q28739)、狗(XP\_534417)大鼠(NP\_001004079)、小鼠(CAM23525)、鲤鱼(BAC56095)、非洲爪蟾(NP\_001086208)、大西洋鲑(NP\_001135199)、大黄鱼(ABO32254)的 *BPI* 分子氨基酸序列的同源性分别为 64%、74%、59%、67%、53%、

51%、35%、44%、28%和 27%，表明 *BPI* 蛋白在哺乳动物中具有较高的保守性。根据 *BPI* 分子的氨基酸序列，应用 Mega4 软件绘制的分子进化树显示：猪与牛、人、兔、狗的亲缘关系较近，与小鼠和大鼠的亲缘关系其次，而非哺乳动物的亲缘关系相对较远(图 11)。

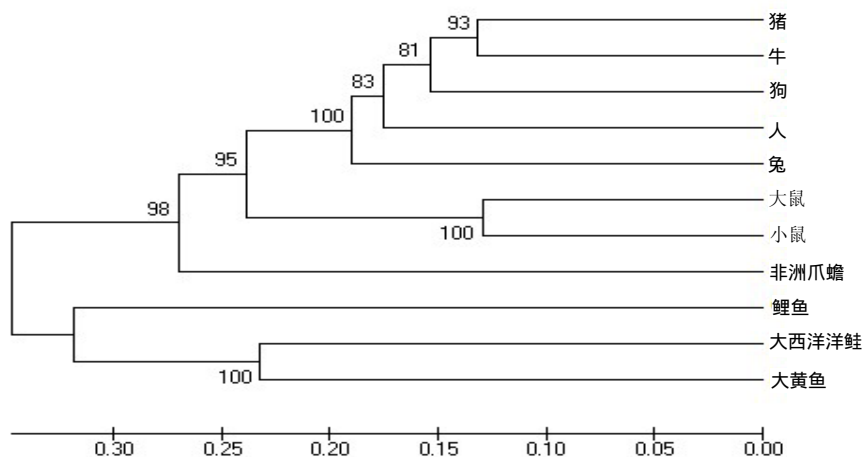


图 11 猪与其他动物的 *BPI* UPGMA 进化树

Fig.11 UPGMA tree of *BPI* from pig and other animals

## 3 结论与讨论

本研究中克隆的猪 *BPI* 基因有 1 874 bp，含 1 个完整的开放阅读框(ORF) 1 452 bp，共编码 483 个氨基酸。猪 *BPI* 具有与人 *BPI* 相似的分子结构，具有 2 个功能结构域和超活性结构域，并存在可使 *BPI* 蛋白裂解为氨基部分和羧基部分的胰蛋白酶水解位点(氨基酸编码为 LVAPPR)，由此推断，猪 *BPI* 可能具有与人 *BPI* 类似的功能。猪 *BPI* 是 1 种跨膜蛋白，这可能与其发挥识别革兰氏阴性菌病原菌，并杀死病原菌及启动机体获得免疫反应的功能有关。

革兰氏阴性菌包括大肠杆菌、沙门氏菌、肺炎杆菌等 20 余种致病微生物，其共同特点之一是细胞外膜含有脂多糖或内毒素结构。*BPI* 是中性粒细胞内的一个阳离子抗菌蛋白，在机体免疫特别是在防御革兰氏阴性菌中起重要的作用<sup>[12]</sup>。*BPI* 对所有革兰氏阴性菌均具有广泛的杀菌作用，表现在与革

兰氏阴性菌的 LPS 亲密结合，引起细胞膜改变、生长抑制和不可逆转的活性丧失<sup>[13]</sup>。人 *BPI* 基因 cDNA 编码 482 个氨基酸，包含 26 个氨基酸的信号肽和 456 个氨基酸的成熟蛋白。*BPI* 成熟蛋白经胰蛋白酶水解，可裂解相对分子质量 20 000 的氨基部分和相对分子质量 30 000 的羧基部分<sup>[14]</sup>。这两部分在杀菌过程中具有不同的生理功能：杀菌活性主要存在于氨基部分，而羧基部分起调理素作用，即促使吞噬细胞吞噬入侵的细菌<sup>[15]</sup>。

本研究中克隆得到了猪 *BPI* 基因完整的 CDs 区和 5'端与 3'端部分序列，并已在 GenBank 核酸数据库中登录(FJ810853)。通过生物信息学手段对该基因的 CDs 序列和氨基酸序列进行分析和预测，初步探明了猪 *BPI* 基因的结构特点。这对进一步在基因和分子水平探明猪 *BPI* 的分子结构、分布与功能，对阐明猪 *BPI* 在介导机体免疫反应机制中的作用和了解猪对病原体的防御反应及对炎症反应的控制具有积极意义。

## 参考文献:

- [1] Weiss J, Elsbach P, Olsson I, et al. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes[J]. *J Biol Chem*, 1978, 253(8): 2664-2672.
- [2] Elsbach P, Weiss J, Franson R C, et al. Separation and purification of a potent bactericidal/permeability increasing protein and a closely associated phospholipase A2 from rabbit polymorphonuclear leukocytes: Observations of their relationship[J]. *J Biol Chem*, 1979, 254(21): 11000-11009.
- [3] 郑江, 周红, 肖光夏, 等. 猪源杀菌性/通透性增加蛋白对烧伤大鼠绿脓杆菌菌血症的保护作用[J]. *中华创伤杂志*, 1998(6): 228-229.
- [4] 周红, 郑江, 秦孝建, 等. 抗人BPI抗体对猪源BPI体外生物活性的增强作用[J]. *第三军医大学学报*, 2002, 24(1): 76-78.
- [5] Weersink A J, van Kessel K P, van den Tol M E, et al. Human granulocytes express a 55 kDa lipopolysaccharide binding protein on the cell surface that is identical to the bactericidal/permeability-increasing protein[J]. *J Immunol*, 1993, 150(1): 253-263.
- [6] Levy O, Canny G, Serhan C N, et al. Expression of BPI (bactericidal/permeability increasing protein) in human mucosal epithelia[J]. *Bio-chem Soc Trans*, 2003, 31(4): 795-800.
- [7] Takahashi M, Horiuchi Y, Tezuka T. Presence of bactericidal/permeability increasing protein in human and rat skin[J]. *Exp Dermatol*, 2004, 13(1): 55-60.
- [8] Little R G, Kelner D N, Lim E. Functional domains of recombinant bactericidal/permeability increasing protein (rBPI23) [J]. *J Bio Chem*, 1994, 269(3): 1865-1872.
- [9] Klein W, Tromm A, Folwaczny C, et al. A polymorphism of the bactericidal/permeability increasing protein (BPI) gene is associated with Crohn's disease [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2005, 39(4): 282-283.
- [10] 冷伟建, 宋勇, 于宝军, 等. 杀菌性/通透性增加蛋白和脂多糖结合蛋白基因多态性与易感性的相关研究[J]. *医学研究生学报*, 2006, 19(6): 537-541.
- [11] Michalek J, Svetlikova P, Fedora M, et al. Bactericidal/permeability increasing protein gene variants in children with sepsis[J]. *Intensive Care Med*, 2007, 33(12): 2158-2164.
- [12] Hoffmann J A, Kafatos F C, Janeway C A, et al. Polygenetic perspectives in innate immunity[J]. *Science*, 1999, 284: 1313-1318.
- [13] Elsbach P, Weiss J. Role of the bactericidal/permeability increasing protein in host defence[J]. *Current Opinion in Immunology*, 1998, 10: 45-49.
- [14] Gray P W, Flaggs G, Leong S R, et al. Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264: 9505-9509.
- [15] Bulow E, Gullerg U, Oisson I. Structural requirements for intracellular processing and sorting of bactericidal/permeability increasing protein (BPI): Comparison with lipopolysaccharide binding protein[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2000, 68: 669-678.

责任编辑: 王赛群