DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.033
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
1300 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

技术方法

文章编号:1000-5404(2003)14-1300-03

猪 Cathelicidin PMAP37 基因表达载体的构建

Construction of Cathelicidin PMAP37 gene expression vector in pig

罗 刚,魏 泓 (第三军医大学实验动物中心,重庆 400038)

提 要:目的 构建猪 Cathelicidin PMAP37 基因表达载体。方法 RT-PCR 方法扩增带有双酶切位点的 PMAP37 基因,将该基因定向插入带有相同酶切位点的融合表达质粒 PinPoint™ Xa-3 的多克隆位点构建表达载体。结果 构建的表达载体经双酶切电泳分析及插入基因片断序列分析,表明 PMAP37 基因表达载体构建成功。结论 PMAP37 基因表达载体的构建为进一步获得该基因的表达产物,研究其抗菌活性、抗菌机理打下基础。

最近的研究表明,在动物、植物基因组中存在着编码抗生素的基因,这些基因的编码产物多为几个到几十个氨基酸的短肽,称为天然抗微生物肽(Native antimicrobial peptide)或抗菌肽[1~3]。目前已有约 2 000 多种抗菌肽在多种生物体中被分离、纯化,它具有分子量低、热稳定、广谱抗菌等特点,微生物和其他一些理化因素均可诱导生物体产生抗菌肽,它是非专一性免疫应答产物。Cathelicidin 是新发现的一个抗菌肽前体大家族,这类抗菌肽存在于猪、牛、羊、人等哺乳动物中,其 N-含一高度保守的氨基酸序列,取名为 Cathelin,因此人们称之为 Cathelicidin[4]。国外已经开展对此类抗菌肽的研究,目前我国尚未有该类抗菌肽的研究报道,由于该类抗菌肽具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤特性,Cathelicidin 作为新药开发具有广阔前景。PMAP37 为编码猪 Cathelicidin 的基因,本实验拟构建猪 Cathelicidin PMAP37 基因表达载体,为后期表达产物的获得形成基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

E. coli JM109 由本校临床微生物教研室惠赠,表达质粒 PinPoint™ Xa-3 由本校微生物教研室惠赠,dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶购自华美生物工程公司,限制性核酸内切酶、T_4 DNA 连结酶等购自 Promega 公司,其它试剂均为国产分析纯。

1.2 猪骨髓总 RNA 的制备

穿刺抽取 3 头 5 月龄公猪骨髓,离心收集白细胞,加入适量 Tripure 试剂,RNA 提取方法按照 Tripure 试剂说明书中的操作步骤进行。

1.3 引物设计

根据已报道的猪 Cathelicidin PMAP37 基因的 cDNA 序列[5],应用引物设计软件,在设计上游引物 5′端引入 *Hind* Ⅲ酶切序列及三个保护碱基,在设计下游引物 5′端加入 *Bgl* Ⅱ酶切序列及保护碱基,并在 *Hind* Ⅲ酶切位点后加入 1 个起始密码子 ATG,在 *Bgl* Ⅱ酶切序列前加入 1 个终止密码子 TAA。

PBD-Ⅰ基因引物的序列如下:上游引物:5′- AACTGCAGATGCCCCAGAGGGC-3′, 下游引物:5′-CCCAAGCTTTTATTTCAATCTTTTCACCAAGCCT-3′,引物由上海基康公司合成。

1.4 RT-PCR 扩增

RT-PCR 反应条件:cDNA 第一链合成:总 RNA X μl(约 2.0 μg),$Oligo dT_{15}$ 4.5 μl,DEPC 水 Y μl,总体积 10 μl,65 ℃ 10 min;再加入 AMV(10 U/μl)1 μl,10× buffer 2 μl,0.01 mol/L DTT 0.5 μl,RNase 抑制剂 0.5 μl,DEPC 水 3 μl,42 ℃ 60 min,99 ℃ 5 min,总体积 20 μl。PCR 反应体系:cDNA 10 μl,10 mmol/L dNTPs 2 μl,引物 1.引物 2(20 μmol/L)各 2 μl,10× buffer 5 μl,25 mmol/L Mg^{2+} 4 μl,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μl)0.5 μl,ddH_2O 24.5 μl。扩增条件:94 ℃ 3 min;35 个循环:94 ℃ 30 S,52 ℃ 59 S,72 ℃ 1.5 min 1 个循环;最后 1 个循环:72 ℃ 7 min。

1.5 表达载体构建

表达质粒 DNA 大量提取,按文献[6]进行。RT-PCR 扩增产物和提取质粒 DNA 分别用限制性核酸内切酶 *Hind* Ⅲ、*Bgl* Ⅱ 37 ℃过夜双酶切。酶切回收的质粒 DNA 与插入目的基因按摩尔数 1∶3 进行混合,T_4 DNA 连结酶 25 ℃连结 5 h。*E. coli* JM109 感受态细胞制备、转化、阳性重组子筛选及鉴定均参照文献[6]方法进行,猪 Cathelicidin PMAP37 基因表达载体的构建,见图 1。

1.6 DNA 序列分析

挑取菌落、提取质粒,经酶切初步鉴定后,挑取阳性克隆由上海基康生物公司完成序列分析。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G2000016106)
作者简介:罗 刚(1969—),男,四川省威远县人,硕士,讲师,主要从事动物遗传学方面的研究。电话:(023)68752053
通信作者:魏 泓,电话:(023)68752051;Email:weihong@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2002-07-08;修回日期:2002-10-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

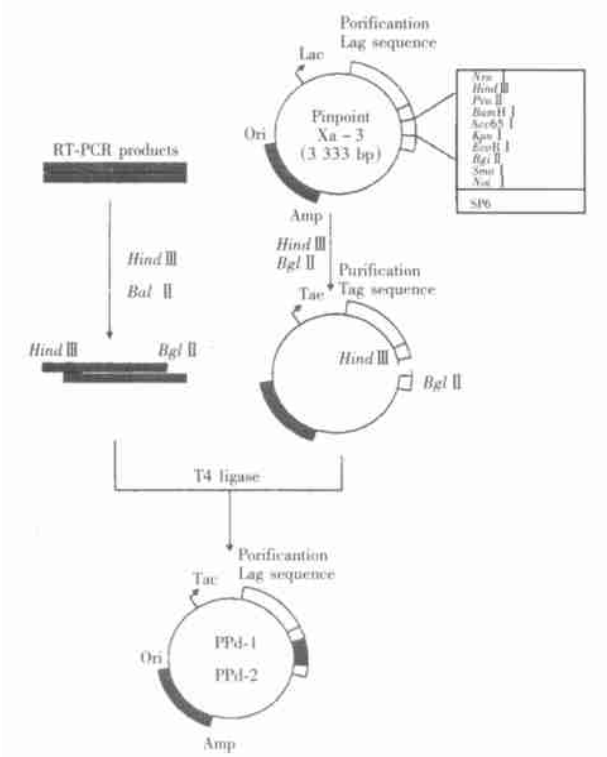


图 1　猪 **Cathelicidin PMAP37** 基因表达载体的构建图

2　结果

2.1　猪总 RNA 提取

提取的 RNA 纯度(A_{260}/A_{280})为 1.9, 且电泳后在紫外灯下见到 28S、18S、5S 3 条带。

2.2　MSP37 基因的 RT-PCR 扩增

扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 见图 2, 扩增片断约 430 bp, 与预期值相符。

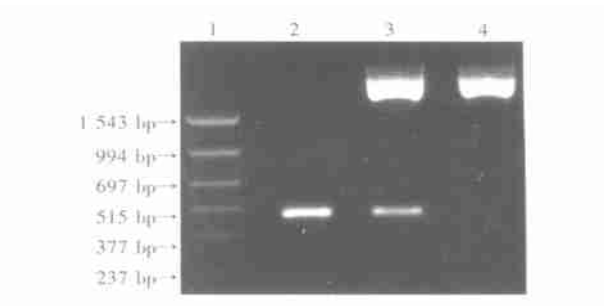


1, 5: 分子质量标准 marker; 2: 空白对照; 3, 4: RT-PCR 扩增产物

图 2　**RT-PCR** 扩增的 **PMSP37** 基因

2.3　阳性重组子质粒 DNA 的酶切

重组质粒 DNA 的酶切结果, RT-PCR 扩增的 PMAP37 基因作对照, 见图 3, 1 #菌质粒 DNA 切下 1 条约 430 bp 带, 2 #菌质粒 DNA 未切下带。初步确定 1 #菌为阳性重组子。



1: 分子质量标准 marker; 2: RT-PCR 扩增产物; 3: 1 #菌质粒 DNA *Hind* Ⅲ/*Bgl* Ⅱ 双酶切; 4: 2 #菌质粒 DNA *Hind* Ⅲ/*Bgl* Ⅱ 双酶切

图 3　重组质粒的限制性酶切分析

2.4　PMAP37 基因的序列测定

将 1 #菌落进行 DNA 测序。采用 SP6 通用引物测定, SP6 测序引物结合基因 3′端, 故得出的结果为重组 DNA 的互补链。PMAP37 基因与 GenBank 公布的该基因序列比较后发现, 二者在 50、128 位碱基不同, 分别被 A、G 所替代, 基因序列同源性达 99.5%。表明我们已成功克隆了猪 PMAP37 基因, 目前我们正在对该基因在 *E. coli* JM109 中的表达进行研究, 结果将在以后进行报道。

3　讨论

Cathelicidin 是近年来发现的存在于哺乳动物体内的一类阳离子抗菌多肽, 国外已经开展对此类抗菌肽的研究, 目前我国尚未出现该类抗菌肽的研究报道, 由于它具有抗细菌、真菌、病毒、肿瘤细胞的功效。因此, 它作为抗感染药物及畜禽饲料添加剂具有很大潜力。鉴于其在哺乳动物体内的含量少, 此外化学合成 Cathelicidin 成本又太高, 故利用基因重组技术克隆表达 Cathelicidin 基因是一条获取抗菌肽的有效途径。虽然抗菌肽基因在原核体系、真核体系中表达均获得成功, 但仍存在一些问题: 抗菌肽分子小, 易被宿主菌中的蛋白酶降解, 而且表达产物对细菌等宿主有害, 影响了基因的表达水平。因此本实验选用融合表达质粒 PinPoint TMXa-3, 以融合蛋白形式在大肠杆菌中表达 PMAP37 基因, 融合蛋白无抗菌活性, 防止 PMAP37 基因的表达产物对宿主菌造成损伤, 从而提高了目的基因的表达水平。此外, 该质粒带有 SP6 测序引物结合位点, 可直接进行测序, 省缺了亚克隆测序等繁琐工作, 直接用于表达分析。它含有 T7 噬菌体启动子及乳糖和色氨酸杂合启动子(tac), 经 IPTG 诱导后可以使克隆基因产生大量的 mRNA, 利于提高其蛋白表达量。将 PCR 产物克隆到载体中有下列一些方法: 平末端连结法, 同聚物接尾连结法, 粘性末端连接法。粘性末端连结法可防止载体自身环化, 连结效率高。本实验采

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

用这种方法获得了较高的连结效率。猪 PMAP37 基因表达载体的成功构建为进一步获得其表达产物，研究其抗菌活性、抗菌机制打下基础。

关键词：抗菌肽；猪 Cathelicidin PMAP37 基因；表达载体
中图法分类号：Q782 文献标识码：B

参考文献：

[1] Bals R, Wang X, Meegaulla R L, *et al*. Mouse β-defensin 3 is an inducible antimicrobial peptide expressed in the epithelia of multiple organs[J]. Infect Immun, 1999, 67(7): 3542—3547.
[2] Hutter K M, Brezinski-Caliguri D J, Mahoney M M, *et al*. Antimicrobial peptide expression is developmentally regulated in the ovine gastrointestinal tract[J]. J Nutr, 1998, 128(2): 297—299.
[3] Fulton C, Anderson G M, Zasloff M, *et al*. Expression of natural peptide antibiotics in human skin[J]. Lancet, 1997, 350(9093): 1750—1755.
[4] Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain[J]. FEBS Lett, 1995, 374(1): 1—5.
[5] Tossi A, Scocchi M, Zanetti M, *et al*. PMAP-37, a novel antibacterial peptide from pig myeloid cells. cDNA cloning, chemical. Synthesis and activity[J]. Eur J Biochem, 1995, 228(3): 941—946.
[6] Sambrook J M. Molecalar Cloning[M]. Cold Spring Harbor Laboratary Press, 1989. 70—76.

（编辑 冷怀明）

技术方法

文章编号：1000-5404(2003)14-1302-02

Cardiotoxin 肌损伤模型的形态学观察

Morphological observation of muscle injury model induced by cardiotoxin injection in mice

张 勇[1]，邹仲敏[1]，郭朝华[1]，周进明[1]，王 劲[1]，范文辉[2]，罗成基[1]，程天民[1]（第三军医大学：[1] 预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所；[2] 附属西南医院神经内科，重庆 400038）

提 要：目的 建立由 Cardiotoxin 所致的肌损伤模型并了解损伤部位自然修复的情况，为研究肌损伤的再生及修复作用奠定基础。方法 将 Cardiotoxin 按 8 μg/g 体质量局部注入 SCID 小鼠股四头肌中，分别观察不同时相点（24 h、7 d、2 周、4 周和 6 周）损伤部位的病理改变。结果 注射 24 h 后可见肌细胞变性坏死，胞浆内有空泡形成；7 d 后肌纤维发生明显断裂，变性坏死加重，并出现钙化；2 周后变性坏死钙化加重达到顶峰；4 周后变性坏死钙化依然存在，但已可见部分肌纤维再生；6 周后变性坏死已不明显，钙化仍存在，肌细胞大部分再生。结论 成功地建立了 Cardiotoxin 所致的肌损伤模型，该模型稳定、简便、易控制，且重复性好。

各种创伤、神经源性和肌源性肌病（如进行性肌营养不良症）所致的肌损伤一直是影响人们生活的疾病之一，肌损伤促愈一直是人们关注的研究领域。为找出肌损伤有效和合理的防治措施，必须首先建立一种稳定简便的肌损伤模型。为此我们进行了以下实验。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Cardiotoxin(Sigma)；75％乙醇；无菌剪刀；甲醛溶液。

1.2 实验动物

SCID 小鼠购自第三军医大学实验动物中心，6～8 周龄，雌性 12 只。饲养于一级动物室并带有空气过滤装置和置于层流柜内的塑料笼内。笼具、垫料、饲料、饮水均高压消毒，饮水酸化，pH 值 3.0，饮水中加抗生素：新霉素：1 g/L，多粘菌素 B：100 U/L，乳酸环丙沙星：0.1 g/L，饲养至药物注射后 6 周。

1.3 实验方法

参照文献[2,3]，选取雄性 SCID 小鼠，6～8 周龄，称质量，股四头肌处鼠毛 75％酒精皮肤消毒，按 8 μg/g 将 Cardiotoxin 局部注射入股四头肌，分别在注射后 24 h、7 d、2 周、4 周、6 周颈椎脱臼处死小鼠，完整分离出股四头肌，浸入 10％甲醛溶液中固定，常规病理包埋切片染色。

2 结果

正常肌细胞亦即肌纤维，光镜下可见其形态细长，肌细胞核为扁椭圆形，每个肌纤维有许多细胞核，位于肌纤维的周边，紧靠肌膜的内表面。注射 Cardiotoxin 后 24 h 可见肌细胞变性坏死，胞浆内有空泡形成，见图 1；7 d 后肌纤维发生明显断裂，变性坏死加重，并出现钙化，见图 2；2 周后变性坏死钙化加重达到顶峰，见图 3；4 周后变性坏死钙化依然存在，但已可见部分肌纤维再生，见图 4；6 周后变性坏死已不明显，钙化仍存在，肌细胞大部分再生。

基金项目：国家重点基础研究发展规划资助项目（"973"项目）（G1999054205）
作者简介：张 勇（1967—），男，四川省武胜县人，博士，主治医师，讲师，主要从事干细胞基础研究方面的研究，发表论文 8 篇。电话：(023)68754007-7309
收稿日期：2002-05-20；修回日期：2002-06-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net