

黑白花奶牛“白细胞粘附缺陷症”(LAD) 的分子生物学分析与诊断*

The Molecular and Biological Identification of “Leukocyte Adhesion Deficiency” (LAD) in Holstein Cattle

钟 诚

Zhong Cheng

(广西农业大学畜牧兽医系 南宁市秀灵路 13 号 530005)

(Dept. of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Guangxi Agricultural
University, 13 Xiuling Road, Nanning, Guangxi, 530005)

摘要 从一患白细胞粘附缺陷症(LAD)的黑白花奶牛犊的核苷酸顺序分析中,发现牛的抗原分子分化群 18 (CD₁₈)的基因密码有二处发生了点突变,一处在第 383 核苷酸上,在此处原有的腺嘌呤已被鸟嘌呤取代;另一处在第 775 核苷酸上,在此处原有的胞嘧啶被胸腺嘧啶取代了。在第 775 核苷酸的突变是静止的,因为它并没有使其相应的氨基酸顺序发生改变。在第 383 核苷酸的突变,使其在相应的氨基酸顺序中第 128 位氨基酸位置上的天门冬氨酸被甘氨酸(D128G)所替代。一种用于牛的 D128G 等位基因的快速筛选诊断方法已作了说明。在美国,在黑白花奶牛中 D128G 等位基因的携带率在公牛中占 14.1%,在母牛中占 5.8%。这一突变基因已流行于世界各地的黑白花奶牛之中。

关键词 白细胞粘附缺陷症(LAD) 点突变 黑白花奶牛犊

Abstract In the analysis of the sequence from a Holstein calf afflicted with leukocyte adhesion deficiency (LAD), two point mutations were detected within the gene encoding bovine CD₁₈: one mutation replaced adenine at the nucleotide 383 with guanine, and the other mutation replaced the cytosine at the nucleotide 775 with thymine. The mutation at the nucleotide 775 was silent, because it did not alter the deduced amino acid sequence. The mutation at the nucleotide 383 caused an aspartic acid to glycine substitution at the amino acid 128 (D128G). A method was described to rapidly screen cattle for the (D128G) allele. The carrier frequency for the (D128G) allele among Holstein cattle in the United States is 14.1% among bulls and 5.8% among cows. This mutation is prevalent among Holstein cattle throughout the world.

Key words Leukocyte adhesion deficiency (LAD), point mutation, Holstein calf

人类的白细胞粘附缺陷症(Leukocyte adhesion deficiency, 缩写 LAD),是一种常染色体隐性遗传疾病,其特征是由于决定其异型二聚物 β_2 复合体粘附分子的 DNA 分子发生了先天性点突变,在白细胞表面的异型二聚物 β_2 复合体粘附分子的表达显著降低,导致白细胞功能发生多重性的障碍^[1,2]。嗜中性白

细胞外渗,需要 β_2 复合体与内皮细胞间质的粘附分子发生交互反应,缺乏 β_2 复合体,嗜中性白细胞就不能进入组织破坏和吞噬侵入机体组织的病原体^[3,4]。因此,在临床上患者表现出反复发生的多种微生物的严重感染。分子生物学研究表明, β_2 复合体包括 LFA-1、Mac-1 和 P150、95,其中又由一共有的 β 亚单位,CD₁₈(抗原分子分化群 18)和一独特的 α 亚单位,CD_{11a}, CD_{11b}, CD_{11c} 共同组成。因为 β_2 复合体的表达要求 CD₁₁ 和 CD₁₈ 亚单位的联合作用,所以如果缺乏 CD₁₈, β_2 复合体的整体表达将会受到抑制^[3,5]。目前,在人类医学临床上,所有 LAD 患者都已被证实是由

1995-05-12 收稿。

* 本文是美、德、日、英国际合作研究项目:“牛白血球粘附缺陷症(Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency, 简称 BLAD)的流行病学和分子生物学诊断”的成果报告之一,作者是该项目的合作研究者。

于 CD₁₈ 的基因密码发生缺陷而造成的。

在兽医学方面,已有学者先后从临床诊断学和免疫学特征方面分别报道了黑白花奶牛的“粒性白血球病综合症”^[6-10],后经证实,这一疾病的病因也是因为白细胞表面 β_2 复合体表达的缺陷引起的,这与人类的 LAD 是相同的^[11]。由于目前对引起黑白花奶牛的 LAD 的基因突变的病因学尚无法确定,所以对这一疾病的诊断,包括鉴定有害的隐性基因的携带者,以及控制这一疾病,仍然是比较困难的。笔者曾于 1992 年 8 月赴美国国家农业部动物疾病防治中心,参加了有关对这一疾病的合作研究工作。本文将结合有关的工作情况,从分子生物学的角度探讨这一疾病。

1 材料和方法

1.1 黑白花奶牛牛犊 两头患病牛犊,年龄分别为 9 个月和 13 个月,购于同一奶牛场,其共有的临床症状是中度腹泻,牙周牙龈炎伴发牙龈萎缩,牙齿脱落,其中一头牛犊在口腔内和口腔周围发生溃疡,虽然连续使用高效抗菌素治疗仍无效。血象检查,两头牛犊表现出持续性的成熟嗜中性粒细胞明显的增多 ($>47.000/\mu\text{L}$, 正常值为 $<4.000/\mu\text{L}$), 两头牛犊的体重只有正常发育的牛犊体重的 60%, 经使用间接免疫荧光分析, 两头牛犊的嗜中性白细胞的 β_2 复合体正常水平的表达, 与正常牛犊相比较, 小于 2%, 因此, 确诊为牛的白细胞粘附缺陷症 (LAD)。

1.2 血液或精液样品 被检材料主要来源于美国奶牛协会, 美国国内各大型人工授精站和有关合作单位, 包括美国在内的日本、联邦德国和英国的有关大学和科研机构。此外, 还可用新鲜奶品和经福尔马林固定或用石蜡处理的组织标本作为检测材料。

1.3 Northern 印迹分析 取动物外周血液作 Northern 印迹分析, 全血样经离心和低渗溶解后, 破坏了红血球而分离出白血球, 然后再使用异硫氰酸胍 (Guaidium isothiocyanate) 分离出白血球的 RNA^[12]。先将分离出的 RNA (10 μg) 电泳到含有甲醛的 1% 琼脂糖凝胶板上, 再转移到尼龙薄膜上, 然后与用 [α -³²P] ATP 标记的牛 CD₁₈ 的互补 DNA 杂交^[13]。杂交溶液是 15% 甲酰胺/5×Denhardt's 溶液/5×SSPE (1×SSPE 内含 150 mmol NaCl/10 mmol NaH₂PO₄/1mmol EDTA, pH 7.4)/0.5% SDS (SDS 溶液含有浓度为 0.1 mg/mL 的鲑精子 DNA)。杂交在温度为 42℃ 条件下进行, 时间一昼夜。杂交完毕后, 尼龙薄膜先在温度为 25℃ 条件下, 在 6×SSPE/0.5% SDS 溶液中冲洗 2 遍, 然后在温度为 37℃ 条件

下, 在 1×SSPE/0.5% SDS 溶液中洗 2 遍。

1.4 核苷酸顺序分析 作牛 CD₁₈ 的核苷酸在核苷酸链上的顺序分析, 其主要步骤是: 先使用低聚核苷酸色谱层析法将含有多聚腺苷酸的核糖核酸 (poly (A) RNA) 进行分馏分离, 然后使用 1 μg 分离出的 RNA 与低聚核苷酸的引物进行反转录。在此使用的互补 DNA 与牛 CD₁₈ 特异性的有意义的引物, 其核苷酸序列为 5'-CCCTGCCAGTCCAGCTGGACACC-3', 和反有意义的引物, 其核苷酸序列为 5'-CCACGCCCATCATCTCTGGGGCAG-3', 在耐高温的 DNA 多聚酶存在作用下, 通过多聚酶链式反应 (PCR) 合成大量的 DNA, 增加 DNA 序列的拷贝数。然后, 再通过使用一个单引物在已合成的 DNA 拷贝中进行线性 PCR 反应, 产生单链的 DNA 分子, 最后使用牛 CD₁₈ 特异性引物对单链的 DNA 分子直接进行顺序分析^[14]。

1.5 DNA 检测诊断 检测第 383 核苷酸的突变, 是采用从血液样品、精液、乳品和已被固定的组织标本中分离出整组基因的 DNA 进行的。直接使用全血样品进行分析诊断的步骤是: 将已用 EDTA 抗凝的血液 250 μL 加入 1 mL 0.01 mol 磷酸钠溶液 (pH 7.2), 把红血球作低渗溶解处理, 然后进行连续 2 次的离心 (10 000 r/min), 沉淀的白血球颗粒用 1 mL 10 mmol 磷酸钠 (pH 7.2) / 3 mmol KCl/140 mmol NaCl 混合液冲洗 1 次后, 重新溶解在 10 μL , 0.1 mol NaOH/2 mol NaCl 混合液中, 在温度为 95℃ 条件下热处理 2 min, 再次离心 (10 000 r/min, 10 min), 将含有 DNA 的上清液分离后, 加入 25 μL 的无菌蒸馏水稀释。将 0.3 μL DNA 加入 20 μL -PCR 反应管内, 反应管内再加入 1×PCR 缓冲液, 0.2 mmol dNTPs, 0.5 单位 Ampli Taq 多聚酶, 4 pmol 有意义引物, 其核苷酸序列为 5'-TCCGGAGGGCCAAGGGCTA-3', 和反有意义引物, 其核苷酸序列为 5'-GAGTAGGAGAGGTCCATCAGGTAGTACAGG-3'。反应管需保持放置在碎冰片内, 直至放入 PCR 反应器上。在进行 PCR 反应时, 将 PCR 反应管放入 PCR 反应器上, 作 35 循环扩充 (94℃, 15 s; 69℃, 20 s)。PCR 反应结束后, 再将已扩充的反应物进行限制性内切酶的消化反应。分别用 10 μL 反应物加 4 单位 Taq I, 在温度为 65℃ 条件下, 消化 90 min, 用 10 μL 反应物加入 4 单位 Hae III, 在温度 37℃ 条件下, 消化 90 min。待消化反应结束后, 将消化反应产物放入内含有着色剂三溴乙锭 (ethidium bromide) 的 4% 琼脂糖凝胶板上进行电泳分析。

2 结果与分析

2.1 Northern 印迹分析,是将琼脂糖凝胶电泳印迹分析的高分辨力与核酸杂交的高灵敏度相结合的一项新技术,它分离转移的是单链 RNA 分子。RNA 经变性电泳分离,转移到尼龙薄膜上固定后,再与用 [$\alpha^{32}\text{P}$] ATP 放射性标记的牛 CD₁₈ 互补 DNA 进行杂交,然后用放射自显影技术检测杂交分子。在本试验中,作分析用的 RNA 来源于一头正常母牛的白血球和一头经确诊为 LAD 患者的牛犊的白血球,结果为图 1 所示。Northern 印迹分析表明,与正常母牛 CD₁₈ 的转录相比较,患病牛犊的 CD₁₈ 的转录,无论在印迹斑点大小和水平上,都是无显著性差异的,因此,可以排除了遗传基因有大片段缺失和在转录方面发生障碍的可能性。

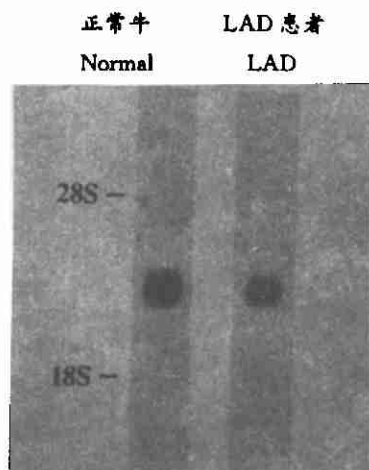


图 1 Northern 印迹分析
Fig. 1 Northern blot analysis

2.2 在本核苷酸顺序分析试验中,分析材料来源于一正常的母牛,作为空白对照。这头母牛在遗传学上是纯型合子,即在同源染色体的相应位置上具有相同的等位基因的合子,是由两个基因型相同的性细胞结合产生的合子而由此产生的个体。同时选用一头已被确诊为 LAD 患者的牛犊也是纯型合子。此外,还同时选用了另一头牛犊的父母,它们产下的牛犊也已被确诊为 LAD 患者,它们都是异型合子。如图 2 所示,与正常牛相比较,患 LAD 病牛犊在整个 CD₁₈ 密码区的核苷酸顺序中,有两处发生了点突变,第一处突变发生在第 383 核苷酸上,在此处原有的腺嘌呤核苷酸 (A) 被鸟嘌呤核苷酸 (G) 取代了,第二处点突变发生在第 775 核苷酸上,在此处原有的胞嘧啶核苷酸 (C) 已被胸腺嘧啶核苷酸 (T) 取代了 (图 2A 和 B 的箭头所示)。在图 2 中同时可见,作为隐性基因携带者的两头成年牛 (牛犊是患 LAD 病的双亲) 是异型

广西科学 1995 年 5 月 第 2 卷第 2 期

合子,同时,在第 383 核苷酸和第 775 核苷酸上发生点突变。富于戏剧性的是,在第 383 核苷酸发生点突变后,由这一 DNA 片段所控制合成蛋白质的氨基酸序列发生了相应的改变,在氨基酸序列中第 128 位氨基酸位置上,天门冬氨酸 (其三联密码为 GAC) 被甘氨酸 (其三联密码为 GGC) 替代了 (D128G)。但是,在第 775 核苷酸上发生突变后,由其控制合成蛋白质的氨基酸序列并没有发生任何改变,所以,这一点突变是静止的。

正常牛 LAD 患者 D128G 携带者

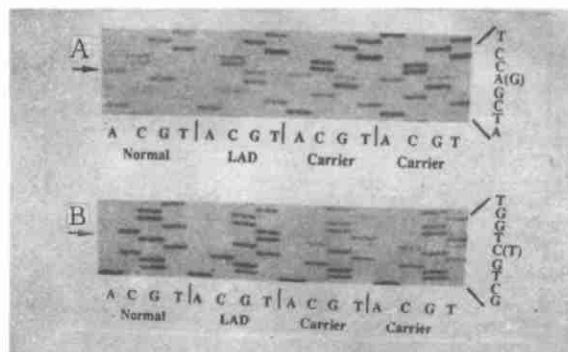


图 2 序列分析图示在第 383 核苷酸 (箭头 A) 和第 775 核苷酸 (箭头 B) 的点突变

Fig. 2 Sequence autoradiograph showing the point mutation at nucleotide 383 (arrow A) and at nucleotide 775 (arrow B)

2.3 在 DNA 检测诊断中,整组基因的 DNA 经使用与接近于第 383 核苷酸区域十分特异性的引物进行 PCR 反应扩充后,再经限制性内切酶 Taq I 和 Hae III 消化,结果是让这两种内切酶特异性的切断正常和发生了突变后的等位基因,这可由示意图 3 说明。其中,正常牛的整组基因的 DNA 经 Hae III 消化后,可产生 9-和 49-bp 片段,经 Taq I 消化后,可产生 26-和 32-bp 片段,从隐性基因携带者 (D128G) 分离出的整组基因的 DNA 经 Hae III 消化后,可产生 9-、19-、30-和 49-bp 片段,经 Taq I 消化后,可产生 26-、32-和 58-bp 片段,而从患 LAD 病牛分离出的整组基因的 DNA,经 Hae III 消化后,可产生 9-、19-和 30bp 片段,但不被 Taq I 消化。经内切酶消化后,由于 DNA 分子片段大小不一,经电泳分离可产生不同的图谱,如图 4 所示。特别值得一提的是,使用上述检测方法,笔者和其他同事还对 12 例由康耐尔大学兽医学院提供的病理材料进行了检测,这些病理材料是已用福尔马林固定的组织标本,保存时间最短的为 1 年,最长的已有 16 年。经查实,这 12 例牛犊生前的主要临床症状是患呼吸道疾病,腹泻、食欲不振和

发育不良,血象检查中,成熟的嗜中性粒细胞数超过 40 000/ μ L 变动范围为 41 000~320 000/ μ L,经多方治疗无效而死亡。在使用文本介绍的 DNA 检测诊断方法后,证实所有被检材料均是 LAD 阳性结果,即这 12 头牛犊均死于 LAD。

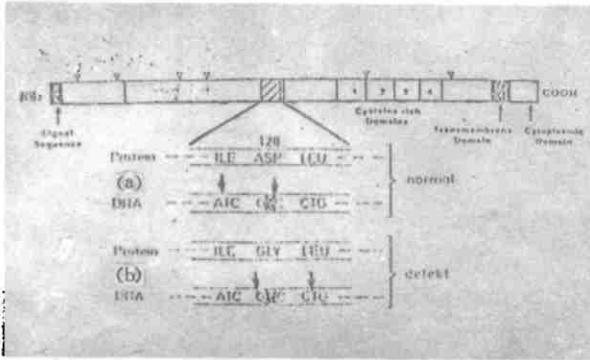


图 3 图示产生牛 LAD 的牛 CD_{11c} 基因发生突变的位置(黑斑点)和 Taq I (箭头 a), Hae II (箭头 b) 分别特异性的切断正常和突变后的等位基因的位置。

Fig. 3 Schematic of the point mutation in bovine CD_{11c}-Gene caused bovine LAD (black) and Taq I (arrow a) and Hae II (arrow b) cut specifically the normal and mutant alleles, respectively

正常牛	D128G 携带者	LAD 患者
Normal	D128G carrier	LAD

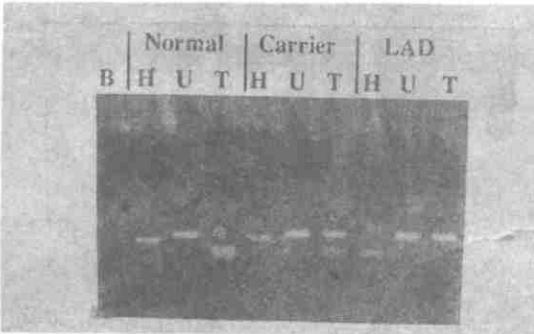


图 4 正常牛、D128G 携带者和 LAD 患者的整组 DNA 经扩增和酶消化后产生的琼脂糖凝胶电泳图。B——空白对照, H——Hae II, U——未消化处理的整组基因的 DNA, T——Taq I。

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of amplified DNA from normal, carrier and LAD cattle following restriction enzyme digestion. (B —— blank; H —— Hae II; U —— undigested; T —— Taq I.)

3 讨论

本文叙述的 3 种实验方法,确定了黑白花奶牛患 LAD 是由于其有关的基因发生了点突变而引起的。目前,已公开报道经临床诊断和 DNA 检测的 LAD

患者都是纯型合子,点突变的位置是在氨基酸序列的第 128 个氨基酸上 (D128G)。因此,可以推论,至少在黑白花奶牛中, D128G 点突变是造成该品种牛患 LAD 病症的主要原因。但是,目前还不可能排除在黑白花奶牛中,不存在其它的 LAD 等位基因的可能性。所以,如果一旦确定有 LAD 患牛不是纯型合子,即不是 D128G 发生了点突变,就可以说明还有其它等位基因发生突变的可能性,就值得作进一步的研究。

如果使用间接免疫荧光方法对牛的 LAD 进行诊断,其结果是只能对纯型合子的患 LAD 病牛进行诊断,而无法对异型合子的隐性基因 (D128G) 携带者进行诊断。经过实际运用证明,本文介绍的 DNA 检测诊断方法,是同时可对纯型合子和异型合子进行诊断的方法,它具有快速、准确的特点,特别适合于大批量样品的检测。美国农业部动物疾病防治中心使用上述 DNA 检测诊断方法,对全美大部份的黑白花奶牛进行了大规模的普查。据美有关方面统计,对 2025 头用于人工授精的种公牛检查表明, D128G 等位基因的携带率为 14.1%,其中具有优异的产乳性能的 100 头种公牛的携带率为 17.1%,数以千计的由这些种公牛繁育出的后代已遍及世界各地。对 1 559 头成年高产母牛进行检查的结果表明, D128G 等位基因的携带率为 5.8%。由上述普查结果作谨慎的估计,在全美境内黑白花奶牛的牛犊在出生时, LAD 的发生率在 0.2% 以上。由此可见, LAD 在美国黑白花奶牛中已很普遍了。目前,许多具有相同表现型的 LAD 牛犊已在日本和欧洲各地发现,所以这一疾病已经蔓延到了全世界。除了 LAD 这一遗传性疾病存在于黑白花奶牛这一高产奶牛品种以外,近年来还发现了其它遗传性疾病^[15,16]。尿苷单磷酸合成酶缺乏 (deficiency of uridine monophosphate synthase) 在美国已被确诊,产生这一疾病的有害基因的携带率在公牛中约 7%,在母牛中约 2%。瓜氨酸血症 (citrullinemia) 已被证实普遍存在于澳大利亚的奶牛中,但这一疾病在美国却极少发生,相比之下, LAD 这一疾病的危害性大于其它的遗传病。

LAD 患牛出生后,生长发育极差,其中绝大多数将会在 1 年内死亡,只有极少数可以存活到 2 年左右,但由于生长发育极差,这些幸存到 2 年左右的奶牛没有繁殖和哺育的能力,据美有关方面的统计,在美境内约拥有 10 000 000 头乳用牛,其中 80% 是黑白花奶牛。因此,每年大约有 16 000 头牛犊出生时就患有 LAD,每头牛犊造成的平均经济损失是 300 美元。仅此一项,美国奶牛业每年的损失可达 5 000 000

美元左右。因此,目前在美國畜牧业中,LAD这一遗传病是造成最严重损失的动物疾病。在经过大规模的普查之后,美国奶牛协会已从1993年开始,采取了必要的措施,严格控制种公牛的使用,首选正常的种公牛作繁殖使用,筛选D128G基因携带者,对D128G携带者或者是十分谨慎的使用,或者是淘汰不用。所以可以预见,在不远的将来,在美国奶牛业中,LAD的发生率将会显著下降。

致谢

笔者在撰写此文过程中,得到了美国农业部动物疾病防治中心的营养代谢疾病与免疫学研究室主任、研究员马克·格里博士(MARCUS E. KEHRLI, JR. Ph. D.)的热情指导和帮助。广西遗传学会理事、广西农业大学教授唐纪良博士审阅了本文,在此深表谢意!

参考文献

- 1 Anderson D C, Schmalstieg F C, Finegold M J et al. The severe and moderate phenotypes of heritable Mac - 1, LFA - 1 deficiency: their quantitation definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis.* 1985, 152: 668~689.
- 2 Arnaout M A. leukocyte adhesion molecules deficiency: Its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. *Immunol Rev.* 1990, 114. 145~180.
- 3 Arnaout M A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood.* 1990, 75: 1037~1050.
- 4 Von Andrian U H, Chambers J D, McEvoy L M et al. Two - step model of leukocyte - endothelial cell interaction in inflammation; Distinct roles for LECAM - 1 and the leukocyte β_2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991, 88: 7538~7542.
- 5 Kishimoto T K, Hollander N, Roberts T M et al. Heterogeneous mutations in the β subunit common to the LFA - 1,

- Mac - 1, and P150, 95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency. *Cell.* 1987, 50: 193~202.
- 6 Hagemoser W A, Roth J A, Loeffstedt J et al. Granulocytopenia in a Holstein heifer. *J Am Vet Med Assoc.* 1983, 183: 1093~1094.
- 7 Kishimoto T K, O'Connor K, Springer T A. Leukocyte adhesion deficiency. *J Biol Chem.* 1989, 264: 3588~3595.
- 8 Stoeber M, Kuczka A, Pohlenz J. Bovine leukocytopenia - Adhaesions - Defizienz (BLAD=Hagemoser - Takanashi - Syndrom); Klinische, pathologische - anatomische und - histologische Befunde. *Dtsch Tieraeztl Wochenschr.* 1991, 98: 443~451.
- 9 Nagahata H, Noda H, Takahashi, K et al. Bovine granulocytopenia syndrome; Neutrophil dysfunction in Holstein - Friesian calves. *J Vet Med.* A34: 445~451.
- 10 Takahashi K, Miyagawa K, Abe S et al. Bovine granulocytopenia syndrome of Holstein - Friesian calves and heifers. *Jpn J Vet Sci.* 1987, 49: 733~736.
- 11 Kehrl M E Jr, Schmalstieg F C, Anderson D C et al. Molecular definition of the bovine granulocytopenia syndrome; Identification of deficiency of the Mac - 1 (CD11b/CD18) glycoprotein. *Am J Vet Res.* 1990, 51: 1826~1836.
- 12 Chomczynski P, Sacchi N. Single - Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol - chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987, 162: 156~159.
- 13 Feinberg A P, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1983, 132: 6~13.
- 14 Allard M W, Ellsworth D L, Honeycutt R L. The production of single - stranded DNA suitable for sequencing using the polymerase chain reaction. *Bio Techniques.* 1991, 10: 24~26.
- 15 Robinson J L, Dombrowski D B, Harpestad G W et al. Detection and prevalence of UMP synthase deficiency among dairy cattle. *J Hered.* 1984, 75: 277~280.
- 16 Dennis J A, Healy P J, Beaudet A L et al. Molecular definition of bovine argininosuccinate synthetase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989, 86: 7947~7951.

(责任编辑:莫鼎新、邓大玉)