

中国人杀菌蛋白氨基端基因的克隆和序列分析

陈 薇 黄 策 王海涛 傅 玲

俞晓峰 徐 静 杜桂鑫

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

摘要 本文报道中国人杀菌蛋白(BPI)氨基端基因 cDNA 的克隆及序列测定。采用逆转录 PCR 方法,分别从 HL-60 细胞和正常人外周血、HGV RNA 阳性献血员外周血的淋巴细胞中克隆了人 BPI 氨基端基因 BG₅₀、BG_{Nor} 和 BG_{HGV}。序列分析结果表明:BG₅₀ 与文献报道一致;BG_{Nor} 有 3 个核苷酸差异,推导有 1 个氨基酸变化;BG_{HGV} 有 3 个核苷酸差异,其中一处与 BG_{Nor} 相同,推导有 2 个氨基酸变化。由此推测中国人 BPI 氨基端基因可能具有特殊性。

关键词 人杀菌蛋白,PCR, cDNA 克隆, 序列分析

由革兰氏阴性菌(GNB)感染所致的败血症休克是目前临床患者死亡的重要原因之一,而细菌脂多糖(LPS)是造成感染过程中多器官功能衰竭及休克死亡的重要始动因子^[1]。因此,探索一种既能杀灭细菌又能中和 LPS 毒性效应的疗法,已成为当今抗细菌感染研究的热点之一。

通透性增加杀菌蛋白(Bactericidal / Permeability increasing Protein, BPI),简称杀菌蛋白,是人和其它哺乳类动物多型核白细胞(PMN)的天然成分,具有选择性对 GNB 细胞毒及中和内毒素活性的作用,对宿主无毒副作用,无免疫原性,且与某些抗生素有协同作用^[2~4],是目前很有希望应用于 GNB 感染治疗的新型抗细菌蛋白。

国外 Gray 等^[5]由人骨髓白血病细胞系(HL-60)中得到了人 BPI 的全长 cDNA 克隆,该基因编码 31 个氨基酸的信号肽和 456 个氨基酸的成熟蛋白;Gazzano-Santora 等^[6]又获得了重组人 BPI 氨基端(含信号肽序列和前 199 个氨基酸),分子量为 23ku 的蛋白片段(rBPI₂₃),且证实该片段保留了完整人天然 BPI(nBPI₅₅)的全部杀菌及中和内毒素的活性。我国对 BPI 的研究尚处起步阶段。本文报

道了通过逆转录 PCR 的方法,从 HL-60 细胞和两种外周血淋巴细胞中分别克隆了人 BPI 氨基端的基因,并对其核苷酸序列进行了分析。

1 材料与方法

1.1 细胞

HL-60 细胞由本院放射医学研究所曹菊容惠赠,在含 15% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中生长至对数生长期,离心收集细胞。

淋巴细胞是从某正常人和某献血员(HGV RNA 阳性^[7])的外周血中,用淋巴细胞分离液(天津血研所产品)分离而得。

1.2 cDNA

按照 mRNA 分离试剂盒(Invitrogen 公司产品)提供的方法,将 HL-60 细胞和淋巴细胞分别提取 mRNA,用第一链逆转录试剂盒(Gibco/BRL 公司产品),以 Oligo-d(T) 为引物,逆转录为 cDNA。

1.3 酶及其他试剂

PCR 试剂为 Perkin Elmer 公司产品,克隆

国家自然科学基金资助课题(39670043)

1997-04-24收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

T载体、XL1 - Blue 菌为 Invitrogen 公司产品, 测序所用的双链质粒提取试剂盒为 QIAGEN 公司产品, 通过 ABI 公司 DNA 序列分析仪进行序列测定; 其它酶及试剂购自华美公司。基因操作参照文献 [8]。

1.4 引物合成及 PCR 扩增条件

参照 Gray 等^[5]发表的 BPI 序列,设计合成了 3 条引物:

P1 5' - ATGAGAGAGAACATGGCC-
AGG - 3' (信号肽起始序列)

P2a 5'-CTCACTGTAAACTCCCCCT-
TCATCTG - 3' (757 - 783bp)

P3a 5' - TTATATTTTGGTCATTACT-
GGC - 3' (672 - 690bp, 插入终止密码 TAA)

采用半巢式 PCR 反应,以 cDNA 为模板, P1 / P2a 为外引物进行第一轮 PCR,扩增条件为: 95℃ 预变性 180s, 94℃ 50s, 48℃ 50s, 72℃ 80s, 25 个循环后 72℃ 10min; 取反应物 1μl 为模板, P1 / P3a 为内引物扩增第二轮,退火温度为 58℃, 30 个循环,其余条件同第一轮。

2 结果

2.1 BPI 氨基端基因的克隆

PCR 产物的琼脂糖电泳表明:扩增所获得的三条 DNA 片断均为 700bp 左右,与预期结果

一致(图1)。将扩增产物纯化后,直接与T载体连接,转化大肠杆菌XL1-Blue,挑取白色菌落,用PCR快速筛选和质粒抽提酶切鉴定,证实了BPI氨基端基因克隆的正确。各取一个阳性克隆,命名为BG₆₀、BG_{Nor}和BG_{HGV},分别制备双链质粒模板用于DNA序列分析。

2.2 BPI 氨基端基因的核苷酸序列分析

用 DNA 序列分析仪分别从基因的 5' 端和 3' 端对 BG₆₀、BG_{Nor} 和 BG_{HGV} 进行双向测序。序列分析结果表明, BG₆₀ 的核苷酸序列与文献报道的一致, 而 BG_{Nor} 和 BG_{HGV} 均有 3 个核苷酸的差异 (图 3), 推导各有 1 个和 2 个氨基酸的变化 (图 2)。

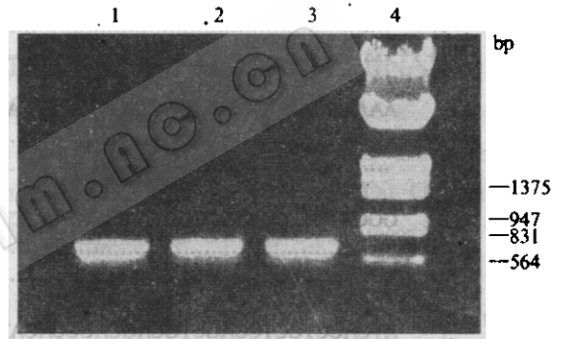


图1 PCR扩增的人杀菌蛋白氨基端基因片段

1. BG₁₀; 2. BG_{Nov}; 3. BG_{HGV}; 4. DNA Marker

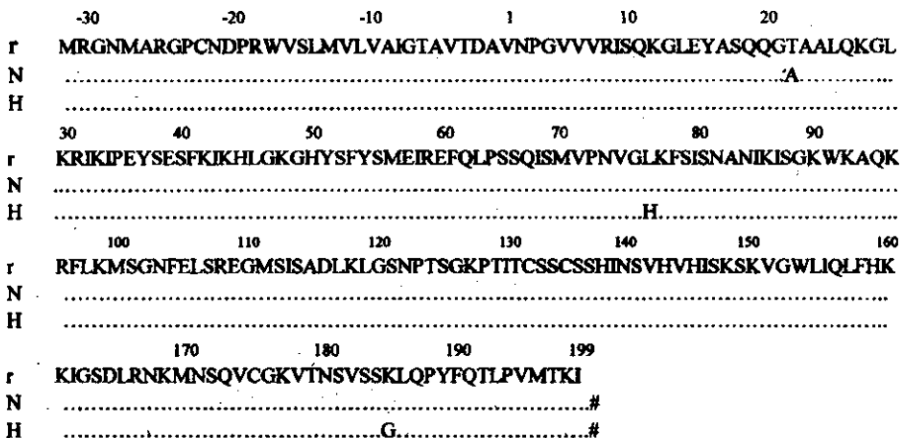


图2 中国人杀菌蛋白氨基端基因cDNA序列和推导的氨基酸序列及与文献报道序列的比较

r: 文献报道的序列; N: 正常人的序列; H: HGV RNA阳性人的序列

r	ATGAGAGAGAACATGGCCAGGGGCCCTTGCAACGCGCCGAGATGGGTGTCCCTGATGGTG	60
N	
H	
r	CTCGTCGCCATAGGCACCGCGGTGACAGCGGCCGTCAACCTGGCGTCGTGGTCAGGATC	120
N	
H	
r	TCCCAGAAGGGCCTGGACTACGCCAGCCAGCAGGGGACGGCCGCTCTGCAGAAGGAGCTG	180
NG.....	
H	
r	AAGAGGATCAAGATTCTGACTACTCAGACAGCTTTAAGATCAAGCATCTTGGGAAGGGG	240
N	
H	
r	CATTATAGCTTCTACAGCATGGACATCCGTGAATTCCAGCTTCCCAGTCCCAGATAAGC	300
N	
H	
r	ATGGTGCCCAATGTGGGCCTTAAGTTCTCCATCAGCAACGCCAATATCAAGATCAGCGGG	360
N	
HA.....	
r	AAATGGAAAGCACAAAAGAGATTCTTAAATGAGCGGCAATTTTGACCTGAGCATAGAA	420
N	
H	
r	GGCATGTCCATTTCGGCTGATCTGAAGCTGGGCAGTAACCCACGTCAGGCAAGCCCAACC	480
NG.....	
H	
r	ATCAOCTGCTCCAGCTGCAGCAGCCACATCAACAGTGTCCACGTGCACATCTCAAAGAGC	540
N	
H	
r	AAAGTCGGGTGGCTGATCCAACTCTTCCACAAAAAATTGAGTCTGCGCTTCGAAACAAG	600
NG.....	
HG.....	
r	ATGAACAGCCAGGTCTGCGAGAAAGTGACCAATTCTGTATCCTCCAAGCTGCAACCTTAT	660
N	
HG.....	
r	TTCCAGACTCTGCCAGTAATGACCAAAATA	720
NTAA	
HTAA	

图3 cDNA序列

3 讨论

从正常人外周血和 HGV RNA 阳性献血员外周血中克隆的人 BPI 氨基端基因, 其核苷酸序列与文献报道有所差异, 可能有两方面的原因: 一是在 PCR 反应中发生了突变, 二是存在

基因特殊性。在目前 PCR 条件下, Taq DNA 聚合酶的平均错误掺入率仅为 5×10^{-6} [9], 本实验扩增片段为 700bp, 其中有三个核苷酸变异, 占基因长度的 0.4%, 远高于平均突变率, 特别是同样方法条件下, BG₆₀ 的基因序列未发生变异, 且 BG_{Nor} 和 BG_{HGV} 核苷酸变异有一处相同,

提示核苷酸的差异因 PCR 突变的可能性很小,最有可能是因为中国人 BPI 氨基端基因存在特殊性。这种特殊性的遗传学意义以及对人 BPI 生物学活性的影响等,有待进一步研究。

查 CMCC(中文生物医学期刊数据库, 1994.1~1997.4), 未见有关 BPI 的研究报道。本工作为我国开展相关研究打下了基础。

参 考 文 献

- [1] Horison D C, Ryan J L. *Annu Rev Med*, 1987, **38**: 417~432.
- [2] Wiss J, Elsbach P, Olson I *et al.* *J Biol Chem*, 1978, **253**:2664~2672.
- [3] Elsbach P, Weiss J, Franson R C *et al.* *J Biol Chem*, 1979, **254**:11000~11009.
- [4] Elsbach P, Weiss J. *Infect - Agent - Dis*, 1995, **4**(2): 102~109.
- [5] Gray P W, Flaggs G, Leong S R *et al.* *J Biol Chem*, 1989, **264**:9505~9509.
- [6] Gazzano - Santoro H, Parent J B, Grinna L *et al.* 1992, *Infect Immun*, **60**(11):4754~4761.
- [7] 周育森, 陈 薇, 赵秋敏等. 军事医学科学院院刊, 1996, **20**(4): 249~253.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* *Molecular cloning, A Laboratory Manual*(2nd.), Cold Spring Harbor Press, 1989.
- [9] 林万明, 杨瑞德, 黄尚志等. PCR 技术操作和应用指南, 北京: 人民军医出版社, 1993.

cDNA CLONING AND SEQUENCING OF THE N - TERMINAL GENE OF BPI FROM CHINESE

Chen Wei Huang Ce Wang Haitao Fu Ling Yu Xiaofeng Xu Jing Du Guixin

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract The genes, named BG₆₀, BG_{Nor} and BG_{HGV}, encoding human N - terminal of bactericidal / permeability increasing protein (BPI) were cloned by RP - PCR method using mRNA templates isolated from HL - 60 cells and peripheral blood lymphocytes of a normal person and a blood donor with hepatitis G virus(HGV) RNA. The results of DNA sequencing showed that the BG₆₀ had the same sequence as that reported, but both BG_{Nor} and BG_{HGV} had three nucleotide substitutions, which resulted in one and two amino acid variations respectively. The results suggested that N - terminal gene of BPI exists diversity.

Key words BPI PT - PCR, cDNA cloning, Sequencing