

人细菌透性增加蛋白 cDNA 的克隆及序列分析*

马海蓉^{1,2,4} 雷卫祺² 孙 怡² 赵民安² 丁凌陆³

(中国科学院兰州化学物理研究所 兰州 730000)¹ (中国科学院新疆理化技术研究所 乌鲁木齐 830011)²

(新疆医科大学第一附属医院 乌鲁木齐 830000)³ (中国科学院研究生院 北京 100049)⁴

摘要: 从新疆维吾尔族健康人造血干细胞中提取总 RNA, 用反转录 (reverse transcription, RT) 和降落 PCR (touchdown PCR, TD-PCR) 相结合的方法扩增人细菌透性增加蛋白 (human bactericidal/permeability-increasing protein, hBPI) 的 cDNA, 将其克隆到 pEGFP-N1 载体上并进行 DNA 序列测定。结果表明, 所克隆的 hBPI cDNA 全长为 1, 464 个碱基, 其序列与 GenBank 中另外 4 个序列进行了比对, 有两个碱基与其它 4 个序列不同: 其中第 576 位碱基其它序列为 G, 该位置碱基是 C; 第 676 位碱基其它序列为 A, 该位置碱基是 G。其中第 676 位碱基的变化导致第 185 位氨基酸由 Lys 改变为 Glu。

关键词: 人细菌透性增加蛋白, cDNA, TD-PCR, 基因克隆, DNA 序列分析

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0092-03

cDNA Cloning and Sequence Analysis of Human Bactericidal/Permeability-increasing Protein*

MA Hai-Rong^{1,2,4} LEI Wei-Qi² SUN Yi² ZHAO Min-An² DING Ling-Lu³

(Lanzhou Institute of Chemical physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)¹

(Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011)²

(The first Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000)³

(Postgraduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)⁴

Abstract: Human bactericidal/permeability-increasing protein (hBPI) cDNA was amplified by reverse transcription (RT) and touchdown PCR (TD-PCR) from blood stem cells collected from healthy human of Uygur nationality in Xinjiang Uygur Autonomous Region of China, and then was subcloned into pEGFP-N1 vector. hBPI cDNA sequence consists of 1, 464bp. Comparison with other 4 hBPI cDNA sequences registered in GenBank identified 99% homology in DNA sequence. However, there were two base substitutions (nucleotide 576G→C, nucleotide 676A→G), one of which resulted in an amino acid (residue 185 Lys→Glu).

Key words: Human bactericidal/permeability-increasing protein, cDNA, TD-PCR, Gene cloning, DNA sequence analysis

hBPI 是一种由多形核白细胞和中性粒细胞产生并贮藏的分子量约为 55kD 的阳离子蛋白, 属于脂结合蛋白家族成员, 能特异地结合革兰氏阴性菌的脂多糖结构而广泛参与机体拮抗微生物以及抗感染反应。它最初由 Weiss 和 Elsbach 等^[1] 在 1978 年从人类嗜中性粒细胞表面分离出。其分子由 456 个氨基酸残基组成, 整体形状呈现出一个双向的“回飞棒”结构^[2]。就在几年以前, hBPI 作为拮抗革兰氏阴性菌的一个天然的抗感染的分

子靶, 以其特有的中和内毒素的能力, 引起国外药业公司以及生物技术公司的极大关注。近几年的动物模型和临床研究表明, BPI 在治疗脓毒症、脓毒症休克^[3]、脑膜炎^[4]、器官移植手术^[5]等由内毒素引发的临床重症方面所具有巨大潜力。

本文以新疆维吾尔族健康人造血干细胞为材料, 通过反转录和降落 PCR 相结合的方法克隆了 hBPI 的 cDNA, 对其进行了 DNA 序列测定, 并与已发表的 hBPI cDNA 序列以及编码的氨基酸序列

* 2002 年中国科学院“百人计划”项目资助

其他作者: 陈 双³ 曹 旭² 汪汉卿^{1, **}

** 通讯作者 Tel: 0991-3835959, 0931-6125231, E-mail: caoxu@ms.xjb.ac.cn, whqwt@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-04-13, 修回日期: 2006-06-14

进行了比较。这为深入了解 hBPI 的功能及作用机制,探讨它在治疗内毒素引发的临床重症方面的广泛应用打下了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 人造血干细胞、菌株及质粒

新疆维吾尔族健康人造血干细胞由新疆医科大学第一附属医院提供。*E. coli* DH5 α 由本实验室保存。pEGFP-N1 质粒 (Kan^r) 由本所李维琪研究员惠赠。

1.2 工具酶与试剂

所用内切酶、T4DNA 连接酶购自 MBI Fermentas 公司。血液总 RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司。Pfu 酶购自 TIAGEN 公司。

1.3 人造血干细胞总 RNA 的提取

取人造血干细胞 50 μ L 按照 Catrimox-14TM RNA Isolation Kit 说明书提取血液总 RNA。

1.4 hBPIcDNA 的合成

根据 Gray 等人发表的 hBPI cDNA 序列设计 PCR 上下游引物。

上游引物为 P1: 5' -TCAG CTCGAGAT-
XhoI
GAGAGAGAACATGGCC-3';

下游引物为 P2: 5' -TCAGAAGCTTTCATTTAT-
HindIII
AGAC AACGTC-3'。

引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.4.1 RT 反应进行 cDNA 第一条链的合成 按照 TaKaRa RNA PCR Kit 试剂盒说明书,以 OligodT-Adaptor Primer 为引物合成 cDNA 第一链。

1.4.2 TD-PCR 反应进行双链 cDNA 的合成 取反转录产物 10 μ L 反应液为模板进行 TD-PCR 反应进行双链 cDNA 的合成。其反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 62 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 随后每个循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C, 其它条件不变,直至退火温度降到 57 $^{\circ}$ C,共 6 个循环;然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 56 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 25 个循环, 72 $^{\circ}$ C 在延伸 10min。

1.5 hBPI cDNA 的克隆

将载体 pEGFP-N1 和 hBPI cDNA 分别用 *XhoI* 和 *HindIII* 双酶切后,用 T4 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接。连接产物转化 *E. coli* DH5 α ,利用卡那霉素筛选阳性克隆。

1.6 DNA 序列分析

将酶切验证正确的克隆送上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。测定结果借助 DNAMAN 序列分析软件进行比对分析。

2 结果

2.1 人造血干细胞总 RNA 的提取

人造血干细胞抽提后的总 RNA 在 1% 琼脂糖电泳结果如图 1 所示。从图中可以看出,抽提的总 RNA 无明显的降解,直接用于后面的实验。

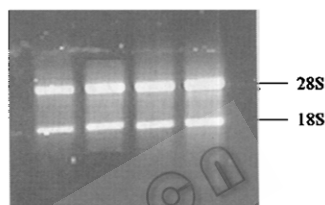


图 1 从人造血干细胞提取的总 RNA 产物琼脂糖电泳图

2.2 hBPI cDNA 的合成

以造血干细胞总 RNA 为模板,用 P1, P2 引物,通过 RT 和 TD-PCR 方法相结合的方法扩增出人 hBPI cDNA。为排除 TD-PCR 过程中 Taq 酶可能出现的错误,我们选用高保真的 Pfu 酶,并进行两个独立的 PCR 反应。电泳检测 PCR 产物为一条约 1.5kb 的条带,与预期产物大小相符(图 2)。

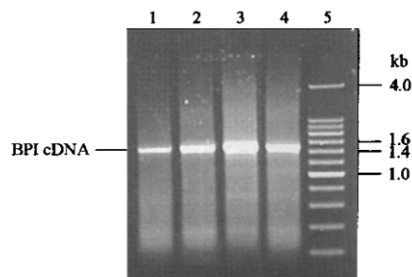


图 2 hBPI cDNA PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

1-4 hBPI cDNA 产物, 5 DNA 分子量 Marker

2.3 hBPIcDNA 的克隆及阳性克隆的筛选与鉴定

将扩增出的 BPI cDNA 经胶纯化回收,再用 *XhoI*/*HindIII* 进行双酶切,将其与经 *XhoI*/*HindIII* 双酶切的载体 pEGFP-N1 用 T4 连接酶连接,然后转化大肠杆菌 DH5 α 。转化得到的阳性克隆随机选取 4 株提质粒,酶切鉴定结果如图 3 所示。

2.4 hBPI cDNA 的 DNA 序列分析

将 2 个独立的 TD-PCR 体系重组得到的阳性克

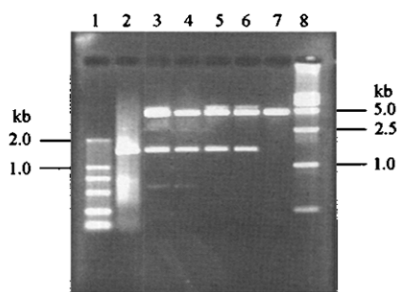


图 3 重组质粒的酶切分析

1 和 8 DNA 分子量 Marker, 2 hBPI cDNA 产物, 3~6 重组 pEG-FP-N1 载体 *XhoI*/*HindIII* 双酶切产物, 7 pEGFP-N1 空载体 *XhoI*/*HindIII* 双酶切产物

隆随机各选出一株进行测序。2 株阳性克隆得到的测序结果完全相同。将此序列与 GenBank 中其它 4 个 hBPIcDNA 序列进行比较, 本文报导序列与这 4 个序列均有高度同源 (同源性达 99.9%), 只有 2 个碱基与这 4 个序列不同。由表 1 可以看出, 第 576 位碱基其它序列为 G, 本文是 C; 第 676 位碱基其它序列为 A, 本文是 G (其碱基数以 Gray 的序列为基准)。其中第 676 位碱基的变化导致 Gray 的序列第 185 位氨基酸由 Lys 改变为 Glu, 而第 576 位碱基的变化不改变氨基酸的编码。另外, 第 77 位碱基 Gray 和本文的序列为 T, 而其余的 3 个序列均为 C。这一位点碱基的变化使信号肽中的 (-16) 位氨基酸为 Ala, 而不同于 Gray 在该位置的 Val。此外, Strausbery 提供的 sequence 1 在第 43 位的碱基为 T, 它在信号肽 (-27) 位的氨基酸为 Ser, 而其它序列的氨基酸为 Met; Strausbery 提供的 sequence 2 在 607 位的碱基是 T, 而其它 4 个序列该位置的碱基为 A; Xu 提供的序列在第 54 位、93 位和 1093 位的碱基均为 T, 其碱基对应的氨基酸分别为 Gly, Leu 和 Pro; 而其它序列在这 3 个位置的碱基均为 C, 对应的氨基酸分别为 Gly, Leu 和 Ser。本文序列已在 GenBank 登录, 登录号为 DQ414688。

表 1 hBPIcDNA 序列的同源性比较

	43	54	77	93	576	607	676	1093
Gray, sequence	A	C	T	C	G	A	A	C
Ma, sequence	A	C	T	C	C	A	G	C
Strausbery, sequence 1	T	C	C	C	G	A	A	C

续表 1

Strausbery, sequence 2	A	C	C	C	G	T	A	C
Xu, sequence	A	T	C	T	G	A	A	T

由于得到天然的 hBPI 非常困难, 利用 DNA 重组技术进行 hBPI 的异源表达, 获取廉价的 hBPI 是国外学者追求的目标。本工作为在合适的宿主中表达并进一步对其功能和作用机制进行研究打下了基础。

3 讨论

由于 BPI 在健康人外周血白细胞中以成熟的蛋白质形式存在, 几乎没有 BPI mRNA, 所以不能用反转录的方法将其克隆出 (结果未显示), 本文以新疆维吾尔族健康人造血干细胞为材料得到了满意的结果; 另一方面, 由于用普通的 PCR 方法无法找到合适的扩增条件得到 BPIcDNA 产物, 本文采用 RT 和 TD-PCR 相结合的方法成功地得到了 BPI cDNA。TD-PCR 是一种体外扩增非常灵敏的方法。在这种方法中, 设计多循环反应的程序以使相连循环的退火温度越来越低。由于开始的退火温度选择为高于估计的 T_m 值, 随着循环的进行, 退火温度逐渐降到 T_m 值, 并最终低于这个水平。这个策略有利于确保第一个引物-模板杂交事件发生在最互补的反应物之间^[6]。进而, 对得到的 BPI cDNA 进行了 DNA 序列测定和分析。为了排除扩增过程中出现的错误, 在实验中使用了高保真性的 Pfu DNA 聚合酶; 同时挑选了来自两个独立的 PCR 体系得到的克隆进行测序, 得到的结果是一致的。

参考文献

- [1] Weiss J, Elsbach P, Olsson I, et al. *J Biol Chem*, 1978, 253 (8): 2664 ~ 2672.
- [2] Beamer L J, Carroll S F, Eisenberg D. *Science*, 1997, 276 (5320): 1861 ~ 1864.
- [3] Von der Mohlen M A M, Kimmings A N, Wedel N I, et al. *J Infect Dis*, 1995, 172 (1): 144 ~ 151.
- [4] Giroir B P, Quint P A, Barton P, et al. *Lancet*, 1997, 3509 (9): 1439 ~ 1443.
- [5] Wiewer M J, Meijer C, Sietses C, et al. *Ann Surg*, 2000, 232 (2): 208 ~ 215.
- [6] 黄培堂, 俞炜源, 陈添弥. PCR 技术实验指南. 北京: 科学出版社, 2003.