

研究快报

人 CD14 基因的克隆及序列测定

龙建银 薛沿宁 孙 蕾 王会信

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 采用 PCR 技术, 从佛波酯乙醇刺激的 HL-60 细胞基因组 DNA 中扩增获得了 1.1 kb 的人 CD14 基因. 序列分析表明, 有四个碱基发生了突变, 其中两处为首次报道.

关键词 CD14, 脂多糖, 基因克隆

学科分类号 Q78

细菌脂多糖 (LPS) 是革兰氏阴性菌表面的主要成分之一, 也是革兰氏阴性菌引起的炎症反应和败血症的主要致病因素. 由于败血症具有很高的死亡率, 而目前还未找到控制这一疾病的有效方法, 因此确定 LPS 的作用机理, 特别是它的细胞受体, 对于实现针对性的治疗, 即专一阻断 LPS 的作用具有重要意义.

CD14 最初是作为白细胞表面分化抗原被发现的, 后来的研究证实 CD14 是 LPS 的细胞受体, 在由革兰氏阴性菌引起的炎症反应和败血症中起重要的信号传递作用^[1]. CD14 这一功能的发现, 为弄清 LPS 作用机理奠定了基础, 也为败血症的治疗开辟了道路. 通过阻断 LPS 与 CD14 的结合或 CD14 与可能存在的结合蛋白的作用, 从而实现抑制 LPS 引起的信号, 成为近年来人们探索治疗败血症的努力方向之一^[2,3]. 我们采用 PCR 技术, 从 HL-60 细胞的基因组 DNA 中克隆了人 CD14 基因, 为下一步寻找 LPS 的拮抗药物以及寻找与 CD14 结合的信号传递蛋白奠定了基础.

人 CD14 基因由两个外显子编码, 其中第一个外显子只含起始密码子 ATG^[4], 因此可采用 PCR 技术从基因组 DNA 中扩增 CD14 基因. 通过佛波酯乙醇 (PMA) 刺激, 可使人白血病细胞 HL-60 诱导 CD14 基因的表达^[5].

1 PMA 刺激的 HL-60 基因组 DNA 的提取

基本参照 Simmons 等的方法^[5]进行. 将悬浮培养的 HL-60 细胞 (RPMI 1640, 10% 小牛血清) 分散至 $1 \times 10^5/\text{ml}$, 加入 PMA 至 50 mg/L, 37℃ 诱导培养 48 h 后, 收获细胞, 用蛋白酶 K-酚-氯仿法提取细胞基因组 DNA.

2 PCR 扩增人 CD14 基因

根据文献报道的人 CD14 基因的序列^[4,5], 设计了一对扩增引物, 其中上游引物为: 5'-ATCGATGGAGCGCGCTCCTGCTTGT-3', 下游引物为: 5'-AAGCTTCTGTCTTG-GATCTTAGGG-3'. 以基因组 DNA 作为扩增模板, 100 μl 反应体系中含 1 μg 模板, 1 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 500 mmol/L KCl, 1% Triton X-100, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 四种 dNTP 各 0.2 mmol/L, 上下游引物各 50 pmol, 2.5 U TaqPlus II 耐热聚合酶 (上海 Sangon 产品). 加入 100 μl 石蜡油, 94℃ 热变性 5 min 后进行如下循环: 95℃ 45 s, 65℃ 45 s, 72℃ 2 min, 30 个循环后 72℃ 延伸 10 min. 电泳结果表明, 我们获得了大小为 1.1 kb 的 PCR 产物, 与预计的人 CD14 基因相符.

3 PCR 扩增产物的亚克隆及序列鉴定

PCR 产物经低熔点胶纯化后, 与 pGEM-T 载体相连, 转化大肠杆菌 RR I 宿主感受态. 经 PCR 筛选、酶切分析, 对重组质粒进行了鉴定. 采用 ABI 373A 型 DNA 自动测序仪, 利用 T7 启动子引物和 SP6 启动子引物, 从两个方向测定了重组质粒的序列.

序列分析表明, 我们克隆的人 CD14 基因与文献报道有四个碱基的不同 (图 1). 具体

而言, 230 及 560 位碱基的突变与文献报道相符; 而 141 位及 909 位碱基的突变为首次报道. 141 位碱基的突变为无义突变, 909 位碱基的突变造成氨基酸由 Asp 变成 Glu, 对整个分子的结构不会有很大影响. 由于 CD14 N 端 152 残基具备了其结合 LPS 并传导信号的能力, 我们所克隆的人 CD14 基因应能表达具有生理功能的 CD14. 有关 CD14 拮抗剂及结合蛋白的筛选工作正在进行中.

测定序列: GAG (E28) GCC (A58) TGC (C168) GAG (E184)
参考文献[4]: GAA (E28) GCC (A58) TAC (C168) GAT (D184)
参考文献[5]: GAA (E28) GGC (A58) TGC (C168) GAT (D184)

图 1 克隆的人 CD14 基因与文献不同之处
氨基酸编码以去除信号肽的成熟蛋白为准.

参 考 文 献

CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. Blood, 1989, 73 (1): 284~ 289

1 Wright S D, Ramos R A, Tobias P S *et al.* CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 1990, **249** (4975): 1431~ 1433

2 Haziot A, Ferrero E, Kontgen F *et al.* Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity*, 1996, **4** (4): 407 ~ 414

3 Pollack M, Ohl C A. Endotoxin-based molecular strategies for the prevention and treatment of gram-negative sepsis and septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996, **216** (1): 275~ 297

4 Ferrero E, Goyert S M. Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14. *Nucleic Acids Res*, 1988, **15** (9): 4173

5 Simmons D L, Tan S, Tenen D G *et al.* Monocyte antigen

Cloning and Sequencing of Human CD14 Gene.
LONG Jian-yin, XUE Yan-ning, SUN Lei, WANG Hu-xin (*Beijing Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China*).
Abstract Human CD14 gene was cloned from genomic DNA of PMA-stimulated HL-60 cells by PCR. Sequencing result showed that it is identical to the reported human CD14 gene except four bases, among which two new mutations were identified.
Key words CD14, lipopolysaccharide, gene cloning