

研究快报

人脂多糖结合蛋白基因的克隆及序列测定

龙建银 刘建强¹⁾ 薛沿宁 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, 从人肝 cDNA 文库中扩增获得了 1.5 kb 的脂多糖结合蛋白 (LBP) 的全长基因。序列分析表明, 克隆的 LBP 基因编码的氨基酸序列与文献报道相同。

关键词 脂多糖结合蛋白, 基因, 克隆

学科分类号 R392-33

细菌脂多糖 (lipopolysacchride, LPS) 也称内毒素, 是革兰氏阴性菌表面的主要成分, 也是败血性休克 (septic shock) 的主要诱发因素。人们普遍认为, LPS 主要通过脂多糖结合蛋白 (LPS binding protein, LBP) 的运送, 与靶细胞中的 CD14 结合, 从而活化细胞, 使细胞产生炎症反应^[1]。可见, LBP 在败血性休克的发生中起着重要作用。

LBP 是 60 ku 的血清糖蛋白, 主要功能是促进 LPS 与 CD14 的结合。它与杀菌性通透增加蛋白 (BPI)、胆甾乙酯转移蛋白 (CETP) 及磷脂转移蛋白 (PLTP) 高度同源, 共同构成一个结合并转移磷脂的家族。cDNA^[2] 及基因组克隆^[3,4] 表明, 这些蛋白的编码基因的组织结构几乎完全一致。人 LBP 基因由 14 个外显子编码, 全长基因达 28.5 kb, cDNA 长约 1.5 kb。

在 LBP 的一级结构中, 至少存在两个独立的结构域, 分别负责结合 LPS 和 CD14。目前已经将结合 LPS 的结构域定位在 109~125 残基之间^[4], 但对结合 CD14 的结构域还没有统一认识。因此, 克隆 LBP 基因并深入研究其结构与功能的关系, 具有重要的意义。我们采用 PCR 技术从人肝 cDNA 文库中成功地扩增获得了人 LBP 基因。

1 PCR 扩增人 LBP 基因

根据文献 [2] 报道的人 LBP 基因序列,

设计合成了一对扩增引物, 其中上游引物为: 5'-GTCGACTGCACTGGGAATCTAGGA-3', 含有 *Sal* I 酶切位点; 下游引物为: 5'-AAGCTTATCAAACCTCTCATGTATTGG-3', 含有 *Hind* III 切点。采用成人肝 cDNA 文库 (Clontech 公司) 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 MgCl₂, 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 公司), 加入 100 μl 石蜡油, 94℃热变性 5 min 后进行如下循环: 95℃ 45 s, 52℃ 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 1 478 bp 的 PCR 产物, 与预计的人 LBP 基因相符 (结果未给出)。

2 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 (Promega 公司) 相连, 转化大肠杆菌 RR1 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, 分别测定了 LBP 基因 5' 和 3' 末端的部分序列。

¹⁾ 第一军医大学护理系实习生, 广州 510010。

收稿日期: 1998-04-06, 修回日期: 1998-06-04

- 25	1	35
文献[4]:	MGALARALPSILLALLLTSTPEALGANPGLVARITDKGLQYAAQEGLLALQSELLRITLP	
文献[3]:	MGALARALPSILLALLLTSTPEALGANPGLVARITDKGLQYAAQEGLLALQSELLRITLP	
文献[2]:	MGALARALPSILLALLLTSTPEALGANPGLVARITDKGLQYAAQEGLLALQSELLRITLP	
实测:	MGALARALPSILLALLLTSTPEALGANPGLVARITDKGLQYAAQEGLLALQSELLRITLP	95
	DFTGDLRIPHVGRGRYEFHSLNIHSCCELLHSALRPVPGQGLSLSISDSSIRVQGRWKVRK	
	DFTGDLRIPHVGRGRYEFHSL K IHSCCELLHSALRPVPGQGLSLSISDSSIRVQGRWKVRK	
	DFTGDLRIPHVGRGRYEFHSLNIHSCCELLHSALRPVPGQGLSLSISDSSIRVQGRWKVRK	
	DFTGDLRIPHVGRGRYEFHSLNIHSCCELLHSALRPVPGQGLSLSISDSSIRVQGRWKVRK	155
	SFFKLQGSFDSVKGISISVNLLLGSESSGRPTVTASSCSSDIADVEVDMS GDLGWLLNL	
	SFFKLQ G FFDSVKGISISVNLLLGSESSGRPTVTASSCSSDIADVEVDMS GDLGWLLNL	
	SFFKLQGSFDSVKGISISVNLLLGSESSGRPT G YCL SCSSDIADVEVDMS GDSGWLLNL	
	SFFKLQGSFDSVKGISISVNLLLGSESSGRPTVTASSCSSDIADVEVDMS GDLGWLLNL	215
	FHNQIESKFQKVLESRICEMIQKSVSSDLQPYLQTLPTTTEIDSFADIDYS LVEAPRATA	
	FHNQIESKFQKVLESRICEMIQKSVSSDLQPYLQTLPTTTEIDSFADIDYS LVEAPRATA	
	FHNQIESKFQKVLESRICEMIQKSVSSDLQPYLQTLPTTTEIDSFADIDYS LVEAPRATA	
	FHNQIESKFQKVLESRICEMIQKSVSSDLQPYLQTLPTTTEIDSFADIDYS LVEAPRATA	275
	QMLEVMFKGEIFHRNHRSPVTLLAAVMSLPEEHNMVYFAISDYVFNTASLVYHEEGYLN	
	QMLEVMFKGEIFHRNHSSPVTLLAAVMSLPEEHNMVYFAISDYVFNTASLVYHEEGYLN	
	QMLEVMFKGEIFHRNHRSPVTLLAA A ---EEHNKMVYFAISDYVFNTASLVYHEEGYLN	
	QMLEVMFKGEIFHRNHRSPVTLLAAVMSLPEEHNMVYFAISDYVFNTASLVYHEEGYLN	335
	FSITDDMIPPDSNIRLTTKSFRPFVPRLARLYPNMNLELQGSVPSAPLLN FSPGNLSVDP	
	FSITDDMIPPDSNIRLTTKSFRPFVPRLARLYPNMNLELQGSVPSAPLLN FSPGNLSVDP	
	FSITDDMIPPDSNIRLTTKSFRPFVPRLARLYPNMNLELQGSVPSAPLLN FSPGNLSVDP	
	FSITDDMIPPDSNIRLTTKSFRPFVPRLARLYPNMNLELQGSVPSAPLLN FSPGNLSVDP	395
	YMEIDAFVLLPSSSKEPVFRLSVATNVSATLTFNTSKITGFLKPGKVVELKESKVGLFN	
	YMEIDAFV HL PSSSKEPVFRLSVATNVSATLTFNTSKITGFLKPGKVVELKESKVGLFN	
	YMEIDAFVLLPSSSKEPVFRLSVATNVSATLTFNT SKITGFLKPGKVVELKESKVGLFN	
	YMEIDAFVLLPSSSKEPVFRLSVATNVSATLTFNTSKITGFLKPGKVVELKESKVGLFN	455
	AELLEALLNYYILNTLYPKFNDKLAEGFPLPLLKRVQLYDLGLQIHKDFLFLGANVQYMR	
	AELLEALLNYYILNT F YPKFNDKLAEGFPLPLLKRVQLYDLGLQIHKDFLFLGANVQYMR	
	AELLEALLNYYILNTLYPKFNDKLAEGFPLPLLKRVQLYDLGLQIHKDFLFLGANVQYMR	
	AELLEALLNYYILNTLYPKFNDKLAEGFPLPLLKRVQLYDLGLQIHKDFLFLGANVQYMR	
V	456	
V	456	
V	451	
V	456	

图1 克隆的人 LBP 基因对应的氨基酸序列与文献比较
斜体黑字代表与其他序列不同残基, 注意文献 [2] 的序列少四个残基.

随后采用 *Hinc* II 和 *Hind* III 双酶切, 将 1.0 kb 的 LBP 基因片段克隆至 pBluescript M13 (+) 载体的相应位点, 经 *Eco*RV 酶切, 回收 3.4 kb 的载体片段后再自身环化, 形成含有人 LBP 基因中间部分的重组质粒. 利用 T3 启动子引物和 T7 启动子引物, 从正反两个方向测定了这一区域的序列.

3 克隆的 LBP 序列与文献的比较

序列分析结果表明, 与最早报道的 LBP 基因^[2]比较, 克隆的 LBP 基因的 5' 和 3' 末端的序列一致, 但中间区域的序列有一些移码突变和缺失突变. 与最近发表的 LBP 基因组 DNA 克隆的序列^[3,4]比较时则发现, 所测序列只是个别碱基发生了突变. 采用 Goldkey 序列分析软件, 进一步对比分析了克隆的 LBP 基因的翻译产物与文献报道的异同 (图 1).

不难发现, 文献中关于 LBP 基因的序列有一些差异, 从一级结构而言, 最早发表的序列^[2]有 4 个残基的缺失突变. 我们所克隆的 LBP 基因编码的蛋白序列与 Hubacek 等^[4]的结果完全一致; 与 Kirschning 等^[3]的序列则有 5 个残基的不同, 这 5 处残基的不同都是他们首次报道, 未经进一步证实. 这从另一侧面证实了序列测定的正确性. LBP 基因的成功克隆为我们下一步的工作打下了较好的基础. 有关

LBP 结构与功能关系的深入研究正在进行中.

参 考 文 献

- 1 Mayeux P R. Pathobiology of lipopolysaccharide. *J Toxicology Environ Health*, 1997, **51** (5): 415~435
- 2 Schumann R R, Leong S R, Flaggs G W *et al.* Structure and function of lipopolysacchride binding protein. *Science*, 1990, **249** (4975): 1429~1431
- 3 Kirschning C J, Au-Young J, Lamping N *et al.* Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins. *Genomics*, 1997, **46** (3): 416~425
- 4 Hubacek J A, Buchler C, Aslanidis C *et al.* The genomic organization of the genes for human lipopolysaccharide binding protein (LBP) and bactericidal permeability increasing protein (BPI) is highly conserved. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **236** (2): 427~430

Cloning and Sequencing of Human Lipopolysacchride Binding Protein Gene.

LONG Jian-yin, LIU Jian-qiang, XUE Yanning, WANG Hu-xin (*Beijing Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Human lipopolysaccharide binding protein (LBP) gene was cloned from a human liver cDNA library by PCR. Sequencing result showed that the amino acid sequence coded by this gene is identical to that of the latest reported human LBP.

Key words lipopolysaccharide binding protein, gene, cloning