

人乳铁蛋白 cDNA 的克隆及序列分析

程华 陈秀珠 还连栋*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 从北京正常人乳腺组织中提取总 RNA,用 RT-PCR 的方法扩增人乳铁蛋白(hLF)的 cDNA,将其克隆到 pGEM-T 载体上并进行 DNA 序列测定。结果表明,所克隆的 hLF cDNA 序列全长为 2136bp,其 DNA 序列与 GenBank 中另外 5 个 hLF cDNA 序列相比,有 2 个碱基与这 5 个序列不同:1740 位这 5 个序列是 G,本文序列是 C;1756 位这 5 个序列是 T,本文序列是 C。其中 1740 位碱基的变化导致了第 580 位氨基酸由 Glu 变为 Asp。

关键词 人乳铁蛋白, cDNA, RT-PCR, 基因克隆, DNA 序列分析

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0385-03

人乳铁蛋白(Human lactoferrin, hLF)是一种存在于乳汁、唾液等分泌物中的铁结合蛋白。其分子由一条肽链构成,呈双球状结构,分子量约 77kD^[1]。hLF 可以与多种生物大分子结合,如肝素、细胞菌多糖、人溶菌酶等^[2]。另外,在肝细胞、激活的 T 细胞、小肠细胞等类型的细胞上都发现有 hLF 的受体^[3]。对 hLF 的研究涉及到生命科学和医学的诸多领域:hLF 可与特异的 DNA 序列结合并激活其下游报告基因的转录^[4];增强自然杀伤细胞的活力及单核细胞的细胞毒性,并有调节炎症反应的作用^[5];以及在细胞周期 G1 到 S 的过渡期阻断乳腺癌细胞培养物的生长^[6]。这些都暗示 hLF 有广泛的生物学功能。

由于 hLF 在众多生命活动中的重要作用,对它的研究一直受到各国学者的广泛关注。为了深入了解 hLF 的功能及作用机制,并探索其在食品工业和医疗、保健方面的应用,本文以中国人的正常乳腺组织为材料,克隆了 hLF 的 cDNA,对其进行了 DNA 序列测定,并与已发表的 hLF cDNA 序列及其编码的氨基酸序列进行了比较。

1 材料与方法

1.1 人乳腺组织、菌株及质粒

人乳腺组织由北京大兴医院提供。*E. coli* JM109 为本实验室保存。pGEM-T 载体购自 Promega 公司。

1.2 工具酶与试剂

所用限制酶购自 TaKaRa 公司或华美公司。T4 DNA ligase 购自 Promega 公司。总 RNA 提取试剂 TRIZOL Reagent、逆转录试剂盒 Thermoscript RT-PCR System 及 Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity 均购自 GIBCO-BRL 公司。

1.3 人乳腺组织总 RNA 的提取

取 0.1g -70℃ 冻存的人乳腺组织,按照 TRIZOL[®] 的产品说明书提取总 RNA。

1.4 RT-PCR 合成 hLF cDNA

根据 Rey 等发表的 hLF cDNA 序列^[7]设计 PCR 引物。上游引物 P1:5' GACATGAACTT GTCTTC-CTCGTCTG3',下游引物 P2:5' CGTCTAGA GCTGGGCCATCTTCTTCGG3'。为了以后工作方便,在 P2 的 5' 端引入了 *Xba* I 位点。引物由上海博亚生物技术公司合成。

按照 Thermoscript RT-PCR System 试剂盒说明书,以 Oligo(dT)₂₀ 为引物合成 cDNA 第一链。取 2μL RT 反应产物,按照 Platinum *Taq* DNA Polymerase 的说明书进行 PCR 反应。其反应参数为:94℃ 预变性 2min,94℃ 变性 1min,57℃ 退火 2min,68℃ 延伸 3min,30 个循环,68℃ 再延伸 10min。

1.5 hLF cDNA 的克隆

由于本实验使用的 *Taq* 酶是高保真的,因此 PCR 产物必须先用普通的 *Taq* 酶进行 A-tailing,然

后与 pGEM-T 载体连接。连接产物转化 *E. coli* JM109, 利用 α -互补作用筛选阳性克隆。

1.6 DNA 序列分析

将酶切验证正确的克隆送 TaKaRa 公司进行 DNA 序列测定。测序结果借助 DNA 序列分析软件 DNASIS 进行分析。

2 结 果

2.1 RT-PCR 合成 hLF cDNA

以人乳腺组织总 RNA 为模板, 用 P1、P2 引物, 通过 RT-PCR 的方法扩增 hLF cDNA。为了排除 PCR 过程中 *Taq* 酶可能出现的错误, 我们选用高保真的 *Tag* 酶, 并进行两个独立的 PCR 反应。电泳检测 PCR 产物, 可见一条 2.1kb 左右的条带, 与预期产物的大小相符(图 1)。

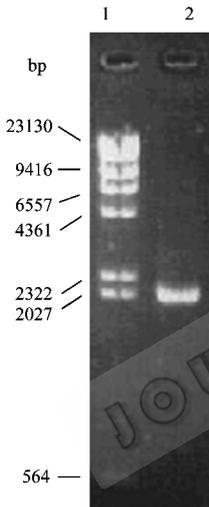


图 1 hLF cDNA PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of hLF cDNA PCR products

- 1. DNA molecular weight marker(λ DNA/*Hind*III);
- 2. RT-PCR products

2.2 hLF cDNA 的克隆及阳性克隆的筛选与鉴定

将 A-tailing 后的 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接 转化 *E. coli* JM109。挑取白色菌落, 小提质粒进行 *Pst*I 酶切分析, 结果如图 2。重组质粒 pCH101 上有 3 个 *Pst*I 位点, 其中 2 个在 hLF 基因内部, 一个在 pGEM-T 载体上。hLF cDNA 以正向方式插入 T 载体 (pCH101-1), 酶切后应该得到大小分别为 4.3kb, 0.7kb, 0.2kb 的 3 个片段; hLF cDNA 以反向方式插入 T 载体 (pCH101-2), 酶切后应该得到大小分别为 3.7kb, 1.3kb, 0.2kb 的 3 个片段。图 2 与预期相符。

2.3 hLF cDNA 的 DNA 序列分析

选取一个正向插入的克隆进行 DNA 序列测定,

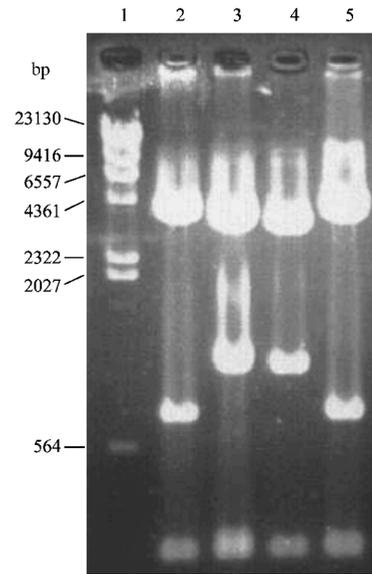


图 2 重组质粒的酶切分析

Fig.2 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmids

- 1. DNA molecular weight marker (λ DNA/*Hind*III);
- 2 5. pCH101-1/*Pst*I 3 4. pCH101-2/*Pst*I

并用 DNASIS 序列分析软件将所得到的 hLF cDNA 序列与 GenBank 中其它 5 个 hLF cDNA 序列进行比较。本文报道序列与这 5 个序列均高度同源(同源信达 99%), 只有两个碱基与这 5 个序列不同。由表 1 可以看出: 1740 位其它 5 个序列是 G, 本文序列为 C; 1756 位其它 5 个为 T, 本文序列为 C。其中

表 1 hLF cDNA 序列的同源比较

Table 1 Homology comparison of hLF cDNA sequences

	88	143	1626	1740	1756	1897
Connely. seq	A	G	T	G	T	C
Rado. seq	G	A	T	G	T	C
Powell. seq	G	A	C	G	T	T
Rey. seq	G	A	C	G	T	C
Liang. seq	G	A	C	G	T	T
Cheng. seq	A	G	T	C	C	T

1740 位的变化导致了第 580 位氨基酸由 Glu 改变为 Asp。另外, 第 88 位和 143 位碱基只有本文序列和 Connely 的序列为 A 和 G, 其它 4 个序列均为 G 和 A。这两处碱基的变化导致本文和 Connely 序列中第 30 位(Thr)和 48 位(Arg)的氨基酸不同于其它 4 个序列(30 位 Ala, 48 位 Lys)。此外, 第 1626 位碱基在 Connely、Rado 和本文的序列中均为 T, 而另外 3 个序列为 C; 第 1897 位碱基在 Powell、Liang 和本文的序列中为 T, 而其它 3 个序列则为 C。这两处差异未导致氨基酸的改变。本文序列已在 GenBank 登录, 登录号为 AF332168。

由于获得天然的 hLF 非常困难,利用 DNA 重组技术实现 hLF 的异源表达,廉价获取 hLF 一直是各国学者努力追求的一个目标。本工作为在合适的宿主中表达 hLF,以便进一步研究 hLF 的功能、作用机制及探索 hLF 在食品、医疗和保健方面的应用潜力提供了必要的基础。hLF cDNA 在原核生物中表达的研究工作正在进行。

3 讨论

本工作以采自北京大兴县的中国人正常乳腺组织为材料,用 RT-PCR 扩增人乳铁蛋白的 cDNA,并进行 DNA 序列测定。为了排除测序过程中可能出现的错误,我们对与其它序列相比差异比较集中的区域进行了双向测序。另外,为了排除 PCR 过程中 Taq 酶可能出现的错误,我们还随机挑选了从另一个独立的 PCR 反应体系中得到的阳性克隆,并对其部分测序。以上所有结果都显示我们得到的 hLF cDNA 序列确实反映了 RNA 模板的序列。

关于本文的序列与国外文献报道序列的差异,我们不认为其反映了中国人 hLF 基因的特殊性,因为中国科学院上海植物生理研究所得到的中国人 hLF cDNA 序列与 Rado 等的序列其编码区是一致的(洪孟民教授,个人通讯)。另外,我们也不认为这些差异反映了器官的特异性。表 1 中 Conneely 序列来源于前列腺, Powell、Rey、Liang 和本文的序列来源于乳腺, Rado 的序列则来源于骨髓。由此可见,序列的差异与来源并无必然联系。我们倾向于认为这些

差异是由 hLF mRNA 本身的多态性引起的。表 1 中 6 个 hLF cDNA 序列,每一个都与其它 5 个不完全相同,由此也可以看出 hLF mRNA 天然存在的多态性。

致谢:本工作得到北京友谊医院小儿科主任医师龚明敏教授和南开大学生命科学学院 96 级学生张玉华的热情帮助,并与中国科学院上海植物生理所洪孟民教授进行了有益的交流和讨论,特致谢意。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Nuijens J H ,van Berkel P H C ,Geerts M E J *et al.* Characterization of recombinant human lactoferrin secreted in milk of transgenic mice. *J Biol Chem* ,1997 **272** :8802 ~ 8807
- [2] van Berkel P H C ,Geerts M E J ,van Veen H A *et al.* N-terminal stretch Arg² ,Arg³ ,Arg⁴ ,and Arg⁵ of human lactoferrin is essential for binding to heparin ,bacterial lipopolysaccharide ,human lysozyme and DNA. *Biochem J* ,1997 **328** :145 ~ 151
- [3] Brock J. Lactoferrin : a multifunctional immunoregulatory protein? *Immunol Today* ,1995 **16** :417 ~ 419
- [4] He J ,Fumanski P. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature* ,1995 **373** :721 ~ 724
- [5] Caccavo D ,Afeltra A ,Pece S *et al.* Lactoferrin-Lipid A-lipopolysaccharide interaction :inhibition by anti-human lactoferrin monoclonal antibody AGM 10. 14. *Infection and Immunity* ,1999 **67** :4668 ~ 4672
- [6] Damiens E ,Yazidi I E ,Mazurier J *et al.* Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells. *J Cell Biochem* ,1999 **74** :486 ~ 498
- [7] Rey M W ,Woloshuk S L ,deBoer H A *et al.* Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. *Nucleic Acids Res* ,1990 **18** :5288

cDNA Cloning and Sequence Analysis of Human Lactoferrin

CHENG Hua CHEN Xiu-Zhu HUAN Lian-Dong*

(Institute of Microbiology ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 ,China)

Abstract Human lactoferrin (hLF) cDNA was amplified by RT-PCR from normal human mammary tissue obtained from Daxing County of Beijing City of China ,and then subcloned into pGEM-T vector. hLF cDNA sequence was determined ,which consists of 2136bp. Comparison with five other hLF cDNA sequences registered in GenBank shows 99% homology in DNA sequence. However ,there are two base substitutions(nucleotide 1740 G→C ,nucleotide 1756 T→C) ,one of which subsequently leads to an amino acid change(residue 580 Glu→Asp).

Key words Human lactoferrin , cDNA , RT-PCR , Gene cloning , DNA sequence analysis

Received :December 31 ,2000

This work was supported by grant from the Foundation of the Chinese Academy of Sciences(KY95-J1-331)

* Corresponding author. Tel 86-10-62554496 ,Fax 86-10-62581447 ,E-mail jlhuan@sun.im.ac.cn

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