DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.006
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

文章编号:1000-5404(2001)06-0637-04

论著

人截断型LBP基因的克隆及其杆状病毒表达载体的构建

王晓东[1],刘友生[1],张 杰[2],高 波[2],薛沿宁[2] ([1]第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038;[2]军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850)

提 要:目的 构建人N端截断型脂多糖结合蛋白(tLBP)基因的杆状病毒表达载体,为后续的蛋白表达及其抗内毒素保护作用研究奠定基础。方法 采用PCR技术从人全长LBP基因cDNA中扩增长度为695 bp的基因片段,经pGEM-T载体亚克隆筛选和序列分析后,应用Bac-To-Bac杆状病毒表达系统,基因重组和外源基因转座分别构建转移质粒pFASTBACtLBP和穿梭质粒pBacmidtLBP。结果 经PCR、琼脂糖凝胶电泳、酶切分析及序列测定,所克隆的基因片段为700 bp左右的tLBP,并证实其目的基因重组载体发生了特异转座和病毒重组。结论 本实验成功克隆了tLBP目的基因片段并构建其杆状病毒表达载体。

关键词:截断型脂多糖结合蛋白;基因克隆;重组载体
中图法分类号:R394-33;R394.3 文献标识码:A

Cloning of human truncated lipopolysaccharide binding protein gene and construction of its baculovirus expression vector

WANG Xiao-dong, LIU You-sheng, ZHANG Jie, GAO Bo, XUE Yan-ning (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a baculovirus expression vector of human truncated lipopolysaccharide binding protein for further study on protein expression and anti-endotoxin protection. Methods A fragment of 695 bp from the amino-terminal of human LBP cDNA was cloned by using PCR. Plasmid pFASTBACtLBP and pBacmidtLBP were constructed with Bac-to-Bac baculovirus expression system respectively following subclone screening and sequencing for pGEM-T. The constructed recombinant was then identifed with PCR and agarose gel electrophoresis. Results A 700 ±bp gene fragment of tLBP was found and specific transposition and virus recombination were observed in the constructed plasmids. Conclusion The tLBP gene fragment was cloned and constructed to baculovirus expression vectors successfully.

Key words: truncated lipopolysaccharide binding protein; gene cloning; recombinant vector

研究表明,由细菌内毒素(Lipopolysaccharide,LPS)介导的细胞激活反应和活性物质释放很大程度上有赖于脂多糖结合蛋白(Lipopolysaccharide binding protein,LBP)和CD14的参与[1,2]。LBP是60×10³的血清糖蛋白,LBP基因由14个外显子编码,全长基因28.5 kb,cDNA长约1.5 kb,其结构与功能关系显示,LBP与LPS的结合位点在N末端,与CD14的结合位点在C末端,从而形成LPS-LBP-CD14三联复合物。

经适当修饰改造的截断型脂多糖结合蛋白(Truncated lipopolysaccharide binding protein, tLBP),它能更有效地结合LPS,但不能转移LPS到CD14,从而可阻止LPS-CD14的形成,进而抑制单核/巨噬细胞炎性介质和细胞因子的过度分泌[3,4]。因此,tLBP可能会提供一种新的与LPS高亲和力结合的抗感染试剂。本实验成功获得了人tLBP基因,并构建了杆状病毒真核表达载体,为后续的蛋白表达及其抗内毒素保护作用研究奠定了基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970757);全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(98M091)
作者简介:王晓东(1964-),男,四川省彭州市人,博士研究生,高级实验师,主要从事创伤后多器官损害的基础与防治方面的研究,发表论文12篇,电话:(023)68752246
收稿日期:2000-12-15;修回日期:2001-04-17

1 材料与方法

1.1 PCR扩增人tLBP基因[5]

1.1.1 引物的设计与合成 根据Schumann等[6]克隆的人LBP基因序列,设计下列引物(Sangon公司合成)。

上游引物:5'-GTCGAC TGCACTGGGAATCAAGGA-3'
Sal I
下游引物:5'-AAGCTT AATCTCTGTTGTAACTGG-3'
Hind III

1.1.2 人LBP cDNA[7] 由军事医学科学院基础所八室提供pGEMLBP质粒,载体大小3.0 kb,cDNA片段大小1.5 kb,酶切位点:*Sal* I和*Hind* III。

1.1.3 PCR反应 体系:100 μl反应中含人LBP cDNA模板50 pmol,100 mmol/L Tris-HCl pH 9.0,100 mmol/L KCl,100 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$,20 mmol/L $MgSO_4$,1%Triton X-100,4种dNTP各0.25 mmol/L,上下游引物各50 pmol,5 U Taq Plus II耐热聚合酶(Sangon公司),加入50 μl消毒石蜡油。条件:94 ℃热变性5 min进行如下循环:95 ℃ 45 s,54 ℃ 45 s,72 ℃ 2 min,30个循环72 ℃延伸10 min。

1.1.4 PCR产物纯化回收 PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳,待目的DNA片段进入低熔点琼脂糖后,在紫外灯下切胶条放入1.5 ml EP管,水浴融化后应用Wizard PCR纯化试剂(Promega公司)回收DNA片段。

1.2 PCR扩增产物的克隆筛选[8]

1.2.1 重组质粒的粘端连接、转化 反应体系20 μl含

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

pGEM-T 载体 2 μl(0.1 μg), T_4DNA 连接酶 1 μl(3 U), 2× 连接酶缓冲液 10 μl(Promega 公司), tLBP 回收片段 5 μl(0.5 μg)及 H_2O 2 μl。16 ℃ 4 h。取 10 μl 连接产物加入 100 μl RRI 感受态细菌, 热休克 90 s 后, 加入不含抗生素 LB 900 μl, 37 ℃振摇 45 min, 取 200 μl 转化液涂布于 Amp^+ 琼脂平板, 37 ℃孵箱过夜。

1.2.2 pGEMtLBP 的鉴定 酶切鉴定: 从筛选平板挑取菌落, 接种于 Amp^+ LB 37 ℃振摇过夜, 收集菌液采用 Wizard 小量质粒提取试剂(Promega 公司)提取质粒。用 *Sal* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ酶切、电泳鉴定。测序鉴定: 利用 T7 和 SP6 启动子引物, 采用 ABI377 全自动 DNA 测序仪(Sangon 公司), 应用四色荧光, 双脱氧终止法进行测序。

1.3 转移质粒 pFASTBACtLBP 的构建

1.3.1 构建策略 见图 1。

1.3.2 重组转移质粒的连接、转化 分别从 pGEMtLBP、pFASTBACsCD14(军事医学院基础所八室提供, GIBCO 公司产品)酶切、低熔点胶回收 tLBP DNA 片段和 pFASTBAC 空载体。连接、转化方法同 1.2.1。

1.3.3 pFASTBACtLBP 的鉴定 PCR 扩增方法同 1.1.3, 目的基因片段大小约 700 bp。酶切鉴定方法同 1.2.2, 分别酶切出 4.8 kb 和 700 bp 大小片段。为了下游纯化方便, tLBP 下游不含终止子, 直接插入改构的带有 6× His°tag 的 pFASTBAC 载体中。

1.4 穿梭质粒 pBacmidtLBP 的构建

1.4.1 外源基因转座入 Bacmid 将 1 ng pFASTBACtLBP 重组转移质粒 DNA 与 100 μl DH10BAC(GIBCO 公司)感受态细菌混匀, 热休克 45 s 后 37 ℃振摇 6 h, 取 200 μl 涂布于含 tet, kan, gen, IPTG 和 X-gal 的平板, 37 ℃培养 24~36 h。

1.4.2 pBacmidtLBP 的鉴定

1.4.2.1 Bacmid DNA 的提取 经蓝白斑筛选挑取白色重组单菌落接种于 5 ml LB(含 tet, kan, gen)中, 37 ℃振摇 12~24 h, 取 1.5 ml 菌液于 14 000× *g* 离心 1 min, 吸尽上清。质粒提取方法同 1.2.2。轻轻将上清转入含有 0.8 ml 异丙醇的离心管中, 轻轻将离心管反复颠倒几次, 冰浴 5~10 min。室温 14 000× *g* 离心 15 min, 弃上清, 沉淀用 70%乙醇洗 1 次, 室温风干 5~10 min, 沉淀溶于 20 μl TE。采用 0.5%琼脂糖凝胶电泳, 电压 40 V, 3~4 h。

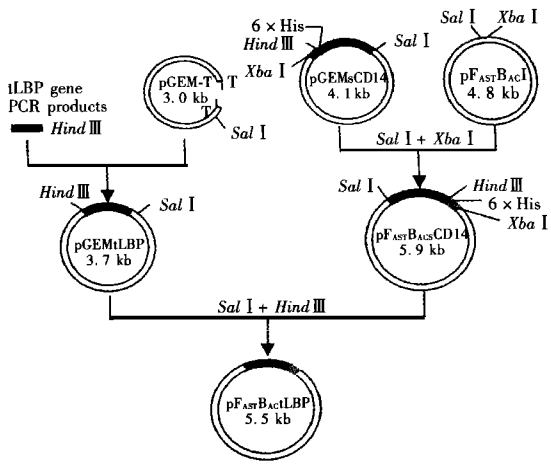


图 1 **pFASTBACtLBP 重组转移质粒的构建**

Fig 1 Construction strategy of pFASTBACtLBP recombinant plasmid

1.4.2.2 重组 Bacmid 的 PCR 鉴定 采用 pUC/M13 上下游引物、基因上下游引物以及二者交叉进行 PCR 扩增。pUC/M13 引物设计:

上游引物: 5′-CCCAG TCAGG ACGTT GTAAA ACG-3′

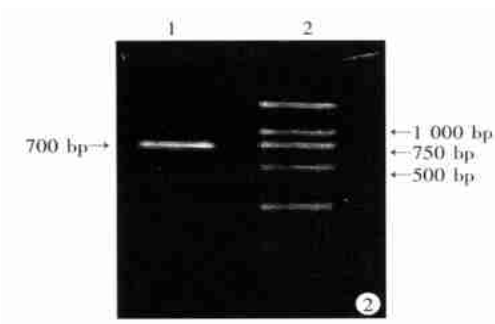
下游引物: 5′-AGCGG ATAAC AATTT CACAC AGG-3′

体系: 同 1.1.3。条件: 93 ℃, 3 min, 然后按如下条件循环 35 次: 94 ℃, 45 s; 55 ℃, 45 s; 72 ℃, 5 min。最后 72 ℃延伸 10 min, 扩增后用 0.5%琼脂糖凝胶电泳。

2 结果

2.1 tLBP 基因片段的克隆及 pGEMtLBP 的酶切鉴定

结果显示 PCR 产物与预期长度吻合, 提示扩增的 DNA 为目的片段, 见图 2。重组载体在 *Sal* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ双酶切后可见目的片段, 提示已成功插入载体, 见图 3。



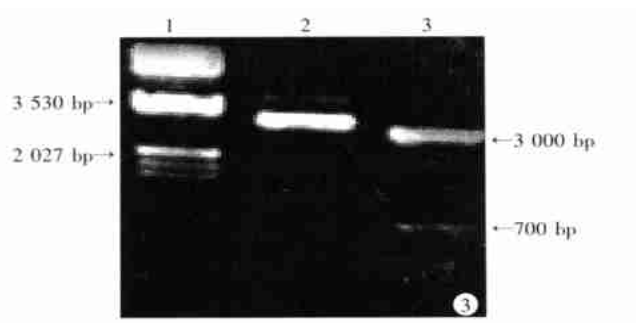


图 2 **PCR 扩增回收片段**

Fig 2 PCR analysis of gene fragment

1: PCR product; 2: DL2000 marker

图 3 **pGEMtLBP 酶切电泳**

Fig 3 Electrophoresis of enzyme cleaving pGEMtLBP

1: λDNA marker(*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ); 2: Single enzyme cleaving; 3: Double enzyme cleaving

2.2 基因片段的测序结果

测序结果显示 tLBP 序列与文献不同之处有: 同义突变 5 处, 移码突变 1 处(4 个氨基酸不同)以及 ser→leu 突变 1 处, 序列如下。

测序结果: TTA(L123) CCT(P72) GTT(V129) ACT(T130) GCC(A131)。

文献序列[6,9,10]: TTG(L123) CCC(P72) GGT(G129) TAC(Y130) TGC(C131); TCC(S132) GAC(D148) TTG(L149) CTG(L152) TCG(S179);

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

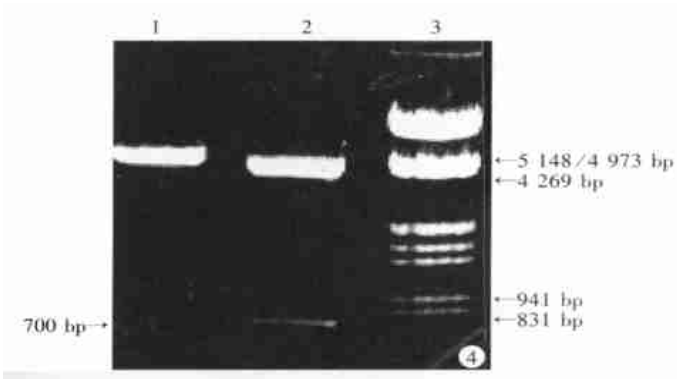
CTC(L132) GAT(D148) TCG(S149) CTC(L152) TCA(S179)。

2.3 pFASTBACtLBP 的酶切鉴定

Sal Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ双酶切分别获得载体和目的基因片段, 提示目的基因已成功插入转移质粒, 见图 4。

2.4 pBacmidtLBP 的鉴定结果

2.4.1 BacmidtLBP DNA 的凝胶电泳　　Bacmid DNA 分子量大于 135 kb, 要使用低电压和低浓度琼脂糖凝胶, 见图 5。



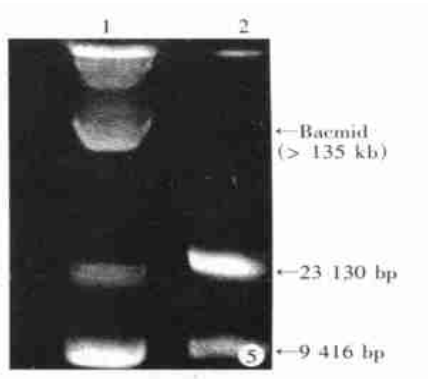


图 4　**pFASTBACtLBP** 的酶切凝胶电泳

Fig 4　Electrophoresis of enzyme cleaving pFASTBACtLBP

1: Single enzyme cleaving 2: Double enzyme clezving; 3: λDNA marker(*EcoR* Ⅰ+ *Hind* Ⅲ)

图 5　**pBacmidtLBP DNA** 的凝胶电泳

Fig 5　Electrophoresis of pBacmidtLBP DNA

1: Bacmid plasmid DNA; 2: Marker(λDNA *Hind* Ⅲ)

2.4.2 pBacmidtLBP 的 PCR 鉴定　　因 Bacmid DNA 分子量大, 不能通过限制性酶切鉴定外源基因的表达, 而 PUC/M13 扩增引物分别与 Bacmid 的 *lacZ* α-互补区内 mini-*att*Tn7 位点的两端相同, 因此, 外源基因的插入可从 PCR 产物的大小来判断, 转座了 pFASTBAC tLBP 的 Bacmid 扩增产物为 3.0 kb。表明 tLBP 基因正确插入了 Bacmid 中, 见图 6。

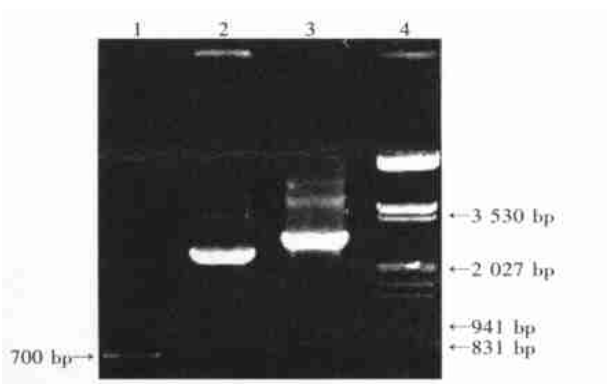


图 6　**pBacmidtLBP** 基因转座的 **PCR** 分析

Fig 6　PCR analysis of pBacmidtLBP gene transposition

1: Gene fragment; 2: Bacmid of gene transposition(pUC/M13 upstream primer+ gene downstream primer); 3: Bacmid of gene transposition (pUC/M13 upstream/downstream primer); 4: Marker(λDNA *EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ)

3 讨论

研究表明[3,4], 经适当修饰改造的 N-末端截断型脂多糖结合蛋白(tLBP)是一种基因片段长约 0.7 kb, 分子量 27×10^3, 含有亲代分子 197 个氨基酸的多肽, 在分泌至内质网时切割下 N-末端 25 个氨基酸的信号肽。该分子保留了与 LPS 作用的结合域, 发挥着与亲代分子 LBP 竞争结合 LPS 或中和 LPS 的作用, 但有关 tLBP 的确切生物学活性以及与 LPS 的中和作用仍不十分清楚。本实验成功构建了杆状病毒表达系统, 为 tLBP 在昆虫细胞表达和进一步探讨其生物学功能奠定了基础。

本实验结果显示, 我们在已获得人 LBP 全长cDNA 的基础上, 设计了扩增 tLBP 基因的引物, 成功克隆到目的基因片段, 并顺利插入杆状病毒转移载体 pFASTBAC 以及完成了目的基因的特异转座和病毒重组。序列分析结果表明, 与 Hubacek[9] 报道的基因序列比较有个别碱基发生突变, 但蛋白序列完全一致, 与 Schumm[6], Kirschning[10] 报道的基因和蛋白序列比较有个别差异, 这些结果仍需要实验进一步证实。构建转移质粒和穿梭质粒的结果显示, 通过载体提供的β-半乳糖苷酶基因互补-α, 进行蓝白斑筛选获得了重组的 Bacmid, 再转染入 sf-21 昆虫细胞, 即产生有感染力的重组病毒。这些结果为后续的蛋白表达和功能研究打下了坚实的基础。

以往研究显示[3,6], LBP 有 4 个潜在的N－连接糖基化位点, 且均采用昆虫细胞或哺乳动物细胞等真核表达系统表达重组人 LBP, 提示糖基化可能对 LBP 的生物活性有影响。因此, 我们亦采用 Bac-To-Bac 杆状病毒昆虫细胞表达系统, 该系统除了具有杆状病毒表达系统特点外, 其最大优点是能够快速地构建重组表达病毒。它主要利用辅助质粒(Helper plasmid)提供的转座功能, 通过位点特异的转座可方便地将外源基因

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

插入到杆状病毒穿梭载体 Bacmid，然后将提取的重组 Bacmid DNA 转染入昆虫细胞，即可获得含有外源基因的重组病毒用于表达目的蛋白。

为了便于表达产物的纯化，我们应用经过改构的 pFASTBAC 载体，即在基因的 C 末端引入了 6×His °tag 纯化标签（带终止密码），基因的上下游引物分别引入对应的酶切位点 *Sal* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ，且下游引物不含有终止密码子。基于在 tLBP 的 C-末端加上纯化标签而不在 N-末端，我们考虑，其一是由于 tLBP 的 N-末端有 25 个氨基酸的信号肽，表达产物要切下这段信号肽才能分泌到胞外，因而不容易引入 6×His °tag；其二是考虑到在 N-末端添加非天然的序列可能会影响 tLBP 蛋白的结构和生物学活性。

目前，围绕 LPS 诱导体内损害途径的防治研究大致包括阻断胞内信号传导、拮抗膜受体、阻断胞外 LPS 损伤效应以及中和体内 LPS 等[11,12]。由于 LBP 蛋白的 N-末端 1～197 位残基（tLBP）具有 LBP 的部分活性，且发挥着与 LBP 竞争结合 LPS 或中和 LPS 的作用。基于此点，进行 tLBP 的结构与功能探讨将对 LPS 介导的临床感染、脓毒症等疾病的基础和防治研究提供理论依据。

参考文献：

[1] Schumann R R, Lamping N, Kirschning C, *et al*. Lipopolysaccharide binding protein: its role and therapeutical potential in inflammation and sepsis[J]. Biochem Soc Trans, 1994, 22(1): 80—82.

[2] Usui M, Hanamuru N, Hayashi T, *et al*. Molecular cloning, expression and tissue distribution of canine lipopolysacchride (LPS)-binding protein [J]. Biochem Biophys Acta, 1998, 1397(2): 202—212.

[3] Han J, Mathison J C, Ulevitch R J, *et al*. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein, truncated at Ile-197, binds LPS but does not transfer LPS to CD14[J]. J Biol Chem, 1994, 269(11): 8 172—8 175.

[4] Theofan G, Horwitz A H, Willams R E, *et al*. An amino-terminal fragment of human lipopolysaccharide-binding protein retains lipid A binding but not CD14-stimulatory activity[J]. J Immunol, 1994, 152(7): 3 623—3 629.

[5] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京：中国协和医科大学出版社，1999. 456—465.

[6] Schumann R R, Leong S R, Flaggs G W, *et al*. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein[J]. Science, 1990, 249(4 795): 1 429—1 431.

[7] 龙建银，刘建强，薛沿宁，等. 人脂多糖结合蛋白基因的克隆及序列测定[J]. 生物化学与生物物理进展，1998, 25(5): 469—471.

[8] 张学敏，王宜强，沈倍奋. 靶向新基因的分子克隆策略——理论与方法[M]. 北京：军事医学科学出版社，1999. 44—50.

[9] Hubacek J A, Buchler C, Aslanidis C, *et al*. The genomic organization of the genes for human lipopolysaccharidebinding protein (LBP) and bactericidal permeability increasing protein (BPI) is highly conserved[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 236(2): 427—430.

[10] 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[J]. Genomics, 1999, 46(3): 416—425.

[11] Scott M G, Vreugdenhil A C E, Buurman W A, *et al*. Cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein[J]. J Immunol, 2000, 164(2): 549—553.

[12] Iwagaki A, Porro M, Pollack M. Influence of synthetic antiendotoxin peptides on lipopolysaccharide (LPS) recognition and LPS-induced proinflammatory cytokine responses by cells expressing membrane-bound CD14[J]. Infect Immun, 2000, 68(3): 1 655—1 663.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)06-0640-01

非手术治疗重症急性胰腺炎 17 例

Non-surgical treatment of 17 cases of severe acute pancreatitis

李正平，李占京 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所肝胆外科，重庆 400042）

我们自 1998 年 1 月至 2000 年 7 月共收治重症急性胰腺炎（Severe acute pancreatitis, SAP）17 例，均采用非手术治疗，现将结果报告如下。

1 临床资料

一般资料：17 例均符合文献[1]重症急性胰腺炎的诊断标准，男 9 例，女 8 例，年龄 23～75 岁，平均 43 岁，发病时间 3～48 h，平均 17 h。入院时出现休克 2 例，肾衰 4 例，ARDS 3 例，肠麻痹及血性腹水 14 例，黄疸 4 例，其中梗阻性黄疸 3 例，合并胆囊结石 14 例，胆总管结石 3 例，糖尿病 5 例。Bacthar CT 分级 D 级 6 例，E 级 11 例。

治疗方法：两组均采用施他宁和常规治疗。施他宁的应用方法：首次静脉推注 0.25 mg，继后用 5%葡萄糖溶液 500 ml 加施他宁 3 mg，以每分钟 8～15 滴缓慢静脉滴注，持续 3～5 d。B 组在 A 组基础上加用中药清胰汤（主要组成：大黄，芒硝，柴胡，黄芩，胡黄连，白芍，木香，延胡索，加减）治疗，每天 1 剂，约 500 ml，经胃管注入，每小时 1 次，每次 30～40 ml，注入前吸尽胃液，注入后保留 1 h，持续 3～6 d。

2 结果

17 例均治愈。治疗过程中，通常在施他宁连续治疗 3 d 左右，病情出现回转，表现为腹痛及上腹、腰背部紧缩感减轻。B 组腹痛缓解同前述外，在清胰汤治疗后数小时，肠鸣音多可出现或恢复，通常 6～24 h 可首次解出深灰色混浊稀水样大便，继后每

（下转 643 页）

作者简介：李正平（1971—），男，湖南邵阳市人，主治医师，主要从事胰腺外科方面的研究。现在解放军 477 医院一外科工作，襄樊市 441021。电话：(0710)3211449

收稿日期：2000-08-04；修回日期：2001-04-14

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net