

中国人磷脂转运蛋白基因克隆及序列分析

马百坤, 庄一义, 李克, 吴向东

(南京军区南京总医院医学检验中心, 江苏南京 210002)

[关键词] 磷脂转运蛋白; 基因克隆; 逆转录; 聚合酶链反应; 中国人

[摘要] 为探讨中国人磷脂转运蛋白的基因结构、组成及特点, 克隆了中国人磷脂转运蛋白基因。首先提取人胎肝组织总 RNA, 以此为模板利用逆转录—聚合酶链反应法成功钓取了磷脂转运蛋白成熟肽基因片段, DNA 序列分析所得基因片段由 1 428 个碱基组成。

[中图分类号] R181.33

[文献标识码] A

Molecular Cloning and Sequencing of Chinese Phospholipid Transfer Protein Gene

MA Bai-Kun, ZHUANG Yi-Yi, LI Ke, and WU Xiang-Dong

(Center of Medical Laboratory Sciences of PLA, Jinling Hospital, Nanjing 210002, China)

[MeSH] Phospholipid Transfer Protein; Cloning; RT; PCR; Chinese

[ABSTRACT] **Aim** To identify, clone and sequence Chinese mature Phospholipid Transfer Protein (PLTP) peptide gene.

Methods Total RNA was extracted from Chinese fetal liver tissue, cDNA fragment encoding human PLTP was amplified by RT-PCR using specific primers, and then was cloned into pGEM-T vector. Inserted PLTP gene was sequenced by ABI 377 DNA Sequencer.

Results Chinese PLTP gene was successfully cloned. **Conclusion** Analytical result indicates it is 1 428 base pairs in length and has 100% nucleotide homology with that reported previously.

磷脂转运蛋白 (phospholipid transfer protein, PLTP) 是一种分子质量为 81 kDa 的脂多糖结合蛋白, 由肝、肺合成, 存在于组织和血浆中。成熟的人 PLTP 多肽由 476 个氨基酸组成, 分子质量约为 51 kDa^[1]。研究证明, PLTP 通过载体介导机制, 特异性地介导血浆脂蛋白间磷脂的转运和交换; 对从组织中转运出多余的磷脂和胆固醇起着重要的作用^[2,3]; 其影响 HDL 的大小、分布、组成和功能, 对动脉粥样硬化性心脑血管疾病的发病机理和防治具有重要的意义。我们利用逆转录—聚合酶链反应法从胎肝组织中成功钓取 PLTP 成熟肽基因片段, 为 PLTP 基础和实验研究提供重要的资料。

1 材料与方 法

1.1 质粒与菌种

受体菌 *E. coli* DH_{5α} 为军事医学科学院基础医学研究所分子遗传室保存菌种, pGEM-T 载体购自 Promega 公司。

1.2 工具酶与试剂

限制性内切酶 EcoR I、Sal I 和 T4 DNA 连接酶、

Taq DNA Polymerase、pfu DNA Polymerase、总 RNA 提取试剂盒和逆转录—聚合酶链反应试剂盒均购自 Promega 公司。DNA 纯化试剂盒购自北京博大生物技术公司。基因扩增仪为美国 PE-2400 型。

1.3 细胞总 RNA 提取

取胎肝组织, 用 Progega 公司总 RNA 提取试剂盒, 按说明书操作提取细胞总 RNA。

1.4 引物合成及逆转录—聚合酶链反应

检索 GeneBank, 以报道的人 PLTP 编码序列 CDS 为参照, 利用 Primer 5.0 软件设计聚合酶链反应引物, 引物序列为: 上游引物 (F) 5'-GGAATTCATG-GAGTTCACGCTGCAAG-3', 下游引物 (R)-5'-ACGCGTCGACGATTGAGGGCTCAGACAG-3'。用所获胎肝总 RNA 为模板, 进行逆转录—聚合酶链反应扩增, 反应条件为: 首先对 RNA 模板 94℃ 变性 2 min; 42℃ 反转录 45 min; 然后 95℃ 变性 50 s、42℃ 退火 50 s、73℃ 延伸 180 s, 进行 5 个循环; 再以 95℃ 变性 50 s、58℃ 退火 50 s、73℃ 延伸 180 s, 进行 30 个循环; 最后 73℃ 延伸 10 min。

1.5 测序载体的构建及 PLTP 基因的序列分析

1% 琼脂糖电泳分离获得 PLTP cDNA 片段, 用 DNA 纯化试剂盒回收从胶上切下的片段。平端 DNA 片段 3' 端加尾 A, 反应条件如下: 取上述回收的平端

DNA 2 μ L 加 10 \times TaqDNA Polymerase Buffer 1 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 1 μ L, 10 mmol/L dATP 0.2 μ L, TaqDNA Polymerase 1 μ L (5 u), 加水至 10 μ L, 混匀后于 70 $^{\circ}$ C 保温 30 min。取 2 μ L 经加尾 A 的 DNA 片段与 pGEM-T 载体用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 E. coli DH5 α 感受态细胞, 用氨苄抗性筛选重组子, 提取重组质粒 DNA 并进行 EcoRI 和 SalI 双酶切鉴定。然后利用美国 ABI 377 型全自动核苷酸分析仪及其配套试剂对经酶切和聚合酶链反应鉴定的重组 T-PLTP 载体进行序列分析。

2 结果

2.1 用逆转录—聚合酶链反应法扩增磷脂转运蛋白基因

以所获的胎肝总 RNA 为模板, 用引物 F 和 R 进行逆转录—聚合酶链反应, 我们通过双退火温度的聚合酶链反应较好地解决了逆转录—聚合酶链反应扩增时产生的非特异问题, 获得了 1 460 bp 左右的 cDNA 片段(图 1, Figure)。

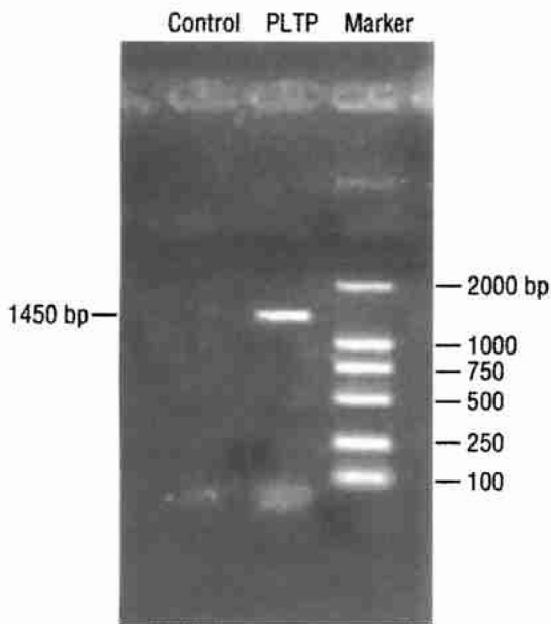


图 1. 逆转录—聚合酶链反应扩增磷脂转运蛋白基因的琼脂糖电泳分析图谱。

Figure 1. The agarose gel electrophoresis for RT-PCR product of PLTP gene.

2.2 测序载体的构建和序列分析

将获得的 cDNA 片段与 T 载体连接, 转化 E. coli DH5 α 感受态细胞, 分别挑取单菌落, 提取质粒 DNA 并进行 EcoRI、SalI 双酶切鉴定, 结果得到 1 个阳性重组

子(T-PLTP) (图 2, Figure 2)。将经酶切鉴定的阳性重组质粒进行核苷酸全自动测序, 所获 cDNA 序列测定结果见图 3 (Figure 3), 与 GeneBank 报道的序列相比完全相同。

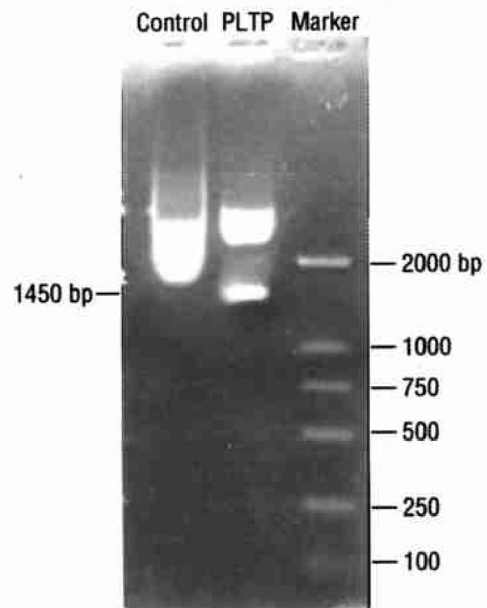


图 2. 阳性重组子质粒酶切电泳图谱。

Figure 2. Restriction pattern of the recombinant plasmid.

3 讨论

血中 HDL 的含量及其颗粒大小与心脑血管的发病率间存在着密切的负相关性^[4]。尽管其间的机理还不十分清楚, 但研究证明磷脂转运蛋白和 CETP 共同参与调节血浆中脂质的转运^[2], 修饰 HDL 的大小和组成^[3]。过去一直认为磷脂转运蛋白和 CETP 均参与脂蛋白间磷脂的交换, 直到最近, Kawano 等^[5]运用转基因手段, 从转基因动物实验中证明, 磷脂转运蛋白基因敲除小鼠完全丧失了转磷脂功能, 使血中 HDL 含量明显降低。表明在对磷脂的转运上磷脂转运蛋白功能不同于 CEPT。CEPT 主要转运甘油三酯却没有转磷脂功能; 而磷脂转运蛋白参与转运、交换脂蛋白中的磷脂, 它们之间并无功能上的相同之处。磷脂转运蛋白对从组织中转运出多余的磷脂和胆固醇起着主要的作用。所以, 对磷脂转运蛋白深入的生物学功能及作用机理研究、建立磷脂转运蛋白定量检测方法对心血管疾病的预防和治疗具有重要的价值。另外有报导显示, 人的卵巢、胎盘及睾丸等组织中也能检测到高含量的磷脂转运蛋白 mRNA, 提示磷脂转运蛋白可能在生育、胚胎发育方面有一定的调节作用^[1,6]。所以, 国外近年来对磷脂转运蛋白的研究已逐渐成为热点, 并已取得了一定的进展,

```

1 GAGTCCCAG GCTGCAAGAT CCGCGTCACC TCCAAGGCCG TGGAGCTGGT
51 GAAGCAGGAG GGGCTGCGCT TTCTGGAGCA AGAGCTGGAG ACTATCACCA
101 TTCCGGACCT GCGGGGCAAA GAAGGCCACT TCTACTACAA CATCTCTGAG
151 GTGAAGGTCA CAGAGCTGCA ACTGACATCT TCCGAGCTCG ATTTCCAGCC
201 ACAGCAGGAG CTGATGCTTC AAATCACCAA TGCCTCCTTG GGGCTGCGCT
251 TCCGGAGACA GCTGCTCTAC TGGTTCTTCT ATGATGGGGG CTACATCAAC
301 GCCTCAGCTG AGGGTGTGTC CATCCGCACT GGTCTGGAGC TCTCCCGGGA
351 TCCCGCTGGA CGGATGAAAG TGTCCAATGT CTCCTGCCAG GCCTCTGTCT
401 CCAGAATGCA CGCGGCCTTC GGGGGAACCT TCAAGAAGGT GTATGATTTT
451 CTCTCCACGT TCATCACCTC AGGGATGCGC TTCCTCCTCA ACCAGCAGAT
501 CTGCCCTGTC CTCTACCACG CAGGGACGGT CCTGCTCAAC TCCCTCCTGG
551 ACACCGTGCC TGTGCGCAGT TCTGTGGACG AGCTTGTTGG CATTGACTAT
601 TCCCTCATGA AGGATCCTGT GGCCTCCACC AGCAACCTGG ACATGGACTT
651 CCGGGGGGCC TTCTTCCCCC TGA CTGAGAG GAACTGGAGC CTCCCCAAC
701 GGGCAGTGA GCCCCAGCTG CAGGAGGAAG AGCCGATGGT GTATGTGGCC
751 TTCTCTGAGT TCTTCTCGA CTCTGCCATG GAGAGCTACT TCCGGGGCGG
801 GGCCCTGCAG CTGTTGCTGG TGGGGGACAA GGTGCCCCAC GACCTGGACA
851 TGCTGCTGAG GGCCACCTAC TTTGGGAGCA TTGTCCTGCT GAGCCCAGCA
901 GTGATTGACT CCCCATTGAA GCTGGAGCTG CGGGTCTGCG CCCCACCGCG
951 CTGCACCATC AAGCCCTCTG GCACCACCAT CTCTGTCACT GCTAGCGTCA
1001 CCATTGCCCT GGTCCACCA GACCAGCTG AGGTCCAGCT GTCCAGCATG
1051 ACTATGGACG CCCGTCTCAG GCCAAGATG GCTCTCCGGG GGAAGGCCCT
1101 GCGCAGCAG CTGGACCTGC GCAGGTCCG AATCTATTCC AACCATCTG
1151 CACTGGAGTC GCTGGCTCTG ATCCCATTAC AGGCCCTCT GAAGACCATG
1201 CTGAGATTG GGGTATGCC CATGCTCAAT GAGCGGACCT GGCCTGGGGT
1251 GCAGATCCCA CTACCTGAGG GCATCAACTT TGTGCATGAG GTGTTGACCA
1301 ACCATGCGGG ATCTCACC ATCGGGGCTG ATCTCCACTT TGCCAAAGGG
1351 CTGCGAGAGG TGATTGAGAA GAACCGGCCT GCTGATGTCA GGGCTCCAC
1401 TGCCCCACA CCGTCCACAG CAGCTGTCTG A

```

图 3. 中国人磷脂转运蛋白基因的序列分析。

Figure 3. Sequence analysis of Chinese PLTP gene.

对人磷脂转运蛋白编码基因的特点已逐步阐明并已在真核细胞中成功地克隆与表达,但临床实验方面还缺少足够有力的证据,对其功能、作用机制还缺乏深入的研究。国内至今未见磷脂转运蛋白基础及临床方面的研究报道。

我们利用逆转录一聚合酶链反应法从胎肝组织中成功钓取磷脂转运蛋白成熟肽 cDNA,并利用双退火温度的方法消除了聚合酶链反应的非特异性产物,获得了 1 428 bp 的成熟肽 cDNA 片段。DNA 序列分析所得基因片段与报导的序列没有差异^[1]。这为今后磷脂转运蛋白的体外表达、克隆及生物学功能等的进一步研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Albers, Gertrud. Functional expression of human and mouse plasma phospholipid transfer protein. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1** 258(1): 27-34
- [2] Lagrost L, Athias J. Comparative study of phospholipid transfer activities mediated by cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein. *Lipid Res*, 1994, **35**(5): 825-835
- [3] Jauhainen M, Metso J. High density lipoprotein conversion mediated by human plasma phospholipid transfer protein. *J Biol Chem*, 1993, **268**(31): 23 098-105
- [4] Huuskonen J, Ehnholm C. Phospholipid transfer protein in lipid metabolism. *Curr Opin Lipid*, 2000, **11**(3): 285-289
- [5] Kawano K, Qin SC, Lin M, et al. Cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein have nonoverlapping functions in vivo. *J Biol Chem*, 2000, **275**(38): 29 477-481
- [6] Buchter D, Behre HM. Effects of testosterone suppression in young men by the gonadotropin releasing hormone antagonist cetrorelix on plasma lipids, lipolytic enzymes, lipid transfer proteins, insulin, and leptin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1999, **107**(8): 522-529

(此文编辑 朱雯霞)