

Bal b/c小鼠甘露聚糖结合凝集素-C基因的克隆与鉴定

甘露聚糖结合凝集素(MBL)系C型凝集素超级家族中胶凝素家族成员,是机体内一种重要的天然免疫分子。它可选择性识别并结合各种病原微生物如细菌、病毒、真菌、寄生虫表面的糖基,通过激活补体、调理吞噬而发挥天然抗感染免疫作用[1]。人类的MBL只有一种成分,而大鼠、小鼠、家兔和恒河猴体内存在2种不同形式的MBL分子,即血清型(MBL-A)和肝型(MBL-C)。小鼠作为一种重要的实验动物模型,是免疫学研究的理想工具,为了进一步在小鼠整体水平研究MBL的天然免疫功能及其机制,本实验从Bal b/c小鼠肝脏中分离出了MBL-C基因,并对其进行了序列测定分析。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和实验动物

总RNA提取试剂盒TRIzol Reagent 购自GIBCO BRL公司,反转录购自MBI公司,pCU-T载体和PCR产物纯化试剂盒购自Sangon公司。DEPC购自Fluka公司,各种限制性内切酶及DL2000 核酸相对分子质量标准均购自TaKaRa公司。雌性Balb/c小鼠,体质量18 g,由本校实验动物中心提供。核酸蛋白分析软件DNASTAR 由网上下载(<http://www.bioinfo.org.cn/software>)。

1.2 引物设计

根据Genbank数据库中小鼠MBL-C的序列(登记号NM010776),采用Primer express 5.0软件,设计1对引物。正向引物P1: 5'-CACCAGTGACCTCCCTCAGAAG-3',反向引物P2: 5'-AACTGCGGACG TCAGGAG TACC-3'。引物由Sangon公司合成。

1.3 肝细胞总RNA的提取

取Bal b/c小鼠新鲜肝组织1.0 g,加入TRIzol试剂1 ml,30 ℃反应5 min,加入氯仿0.2 ml,30 ℃反应3 min。离心后取上清,加入异丙醇0.5 ml,30 ℃反应10 min。离心后去上清,在沉淀中加入75%乙醇1.0 ml洗涤,干燥后溶解于50 μl DEPC处理水中。

1.4 反转录及RT-PCR

按反转录试剂盒提供的方法,将抽提得到的小鼠肝细胞总RNA反转录成为cDNA,以其为模板,进行PCR扩增反应。在50 μl反应体系中加入10×PCR缓冲液5 μl、25 mmol/L MgCl₂ 2 μl、10 mmol/L dNTP 2 μl、cDNA 2 μl、Taq酶1 μl(5 U)、上下游引物各100 pmol/L。扩增条件为:96 ℃预变性5 min,然后94 ℃变性60 s、55 ℃退火60 s、72 ℃延伸90 s,共进行30个循环。取5 μl PCR扩增产物在1%琼脂糖凝胶中电泳进行分析。

1.5 目的基因的克隆

采用DNA凝胶回收试剂盒,对50 μl体系中的PCR扩增产物进行回收。回收的PCR产物与pUC-T载体连接,将连接产物转化受体菌DH5α。通过α互补、蓝白斑筛选挑选重组子,利用PCR和酶切法对其进行鉴定分析。操作方法按文献[2]提供的标准方法进行。

1.6 目的基因的序列分析与测定

将经过PCR扩增及双酶切鉴定得到的重组质粒，使用通用引物T7和SP6在ABI377全自动测序仪上对其进行核苷酸的序列测定。测定结果经DNAsar核酸蛋白分析软件分析后，与Genbank中发表的小鼠MBL-C基因序列及中国汉族人MBL基因序列[3] (登记号AF360991) 进行比较分析。

2 结果

2.1 小鼠肝细胞总RNA的提取结果

使用GIBCO公司的Total RNA提取试剂盒，采用TRIzol一步法，从研磨后的1g Balb/c小鼠肝组织中，分离出了总RNA。经琼脂糖凝胶电泳观察，确认此肝组织总RNA比较纯，无明显降解(图1)。

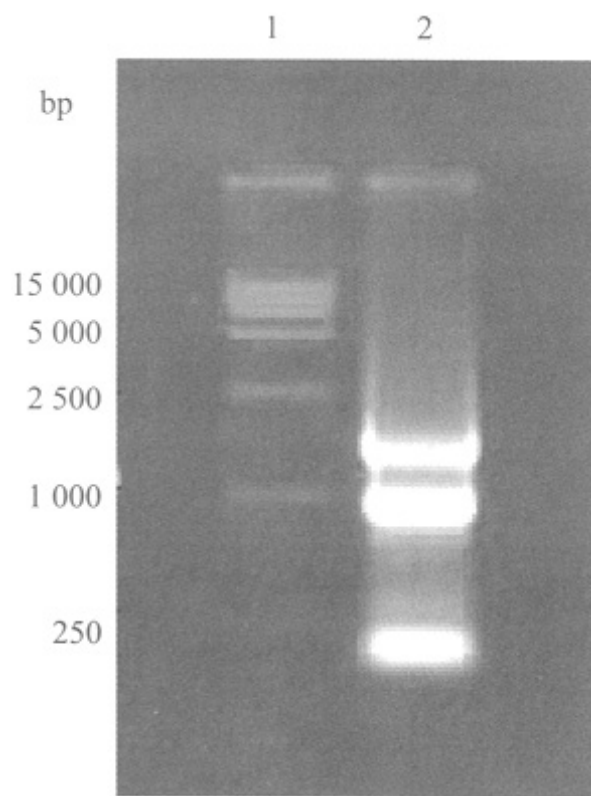


图1 从Balb/c小鼠肝组织提取的总RNA

Fig.1 Total RNA extracted from the liver cells of Balb/c mouse
Lane 1: DNA marker; Lane 2: Total RNA

2.2 小鼠MBL-C基因的RT-PCR扩增结果

以小鼠肝组织总RNA为模板，应用MBI公司的反转录cDNA合成剂试剂盒合成cDNA，以此cDNA为模板，使用设计合成的MBL特异性引物，成功地扩增出了一条长约750 bp的DNA条带，扩增产物具高度特异性，无其他非特异性扩增带存在(图2)。

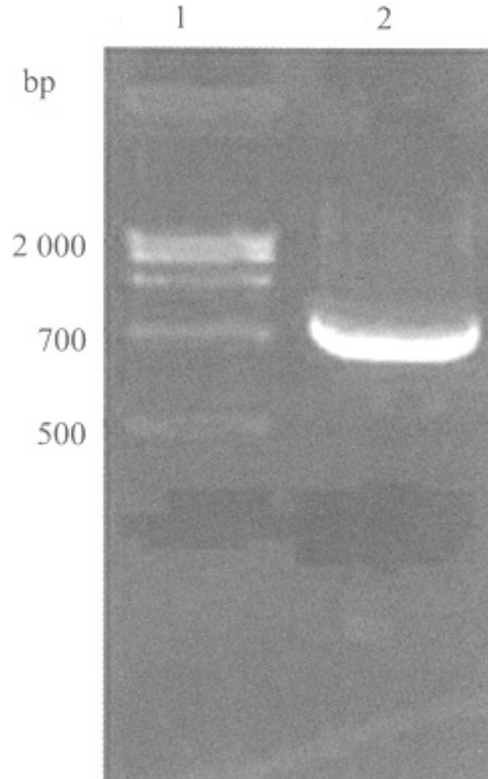


图2 RT-PCR扩增小鼠MBL-C基因cDNA

Fig.2 cDNA of mouse MBL-C amplified by RT-PCR

Lane 1: DL2000 marker; Lane 2: Amplified cDNA of mouse MBL-C gene

2.3 MBL-C基因的克隆及鉴定

目的基因经凝胶回收纯化后，采用TA克隆方法，直接将PCR产物克隆到pUC-T载体中，经 α 互补、蓝白斑筛选，筛选重组质粒，重组质粒经酶切分析和PCR扩增，鉴定为含有MBL-C目的基因的重组质粒(图3)，命名为pmMBL-C。

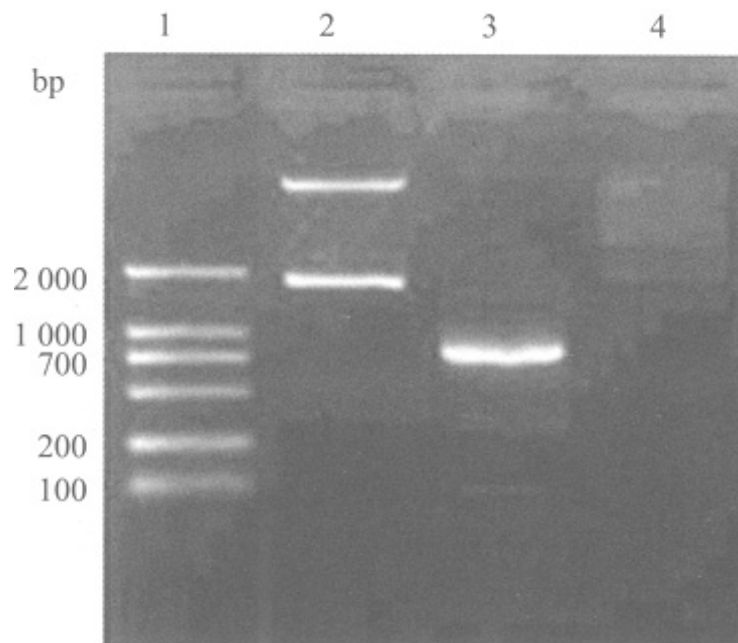


图3 小鼠MBL-C基因cDNA克隆的鉴定

Fig.3 Identification of cDNA clone of mouse MBL-C gene

Lane 1: DL2000 marker; Lane 2: pmMBL-C plasmid; Lane 3: PCR amplified product of pmMBL-C; Lane 4: pmMBL-C/Pst I

2.4 小鼠MBL-C基因的序列分析

含有目的基因的重组质粒的核苷酸序列测定结果显示, 该基因全长734 bp, 含有完整的编码区结构。经DNAsstar软件分析, 扩增得到的基因与Genbank中发表的小鼠MBL-C基因序列同源性为100%, 无任何碱基及氨基酸的变异, 证实本实验扩增得到的基因就是目的基因即小鼠MBL-C基因。进一步与汉族人MBL基因序列比较, 其同源性为71.4%(图4)。

```
Mouse ATGTCCATTTTCACATC-CT-----TCCTTCTGCTGTGTGTGGTGCAGTGGTTTATGCAGAGACCTTAACC---GAAGG
Human ATGTCCCTGTTTCCATCACTCCCTCTCCTTCTCCTGAGTATGGTGCAGCGCTCTTACTCAGAAACTGTGGCCTGTGAGGA
Mouse TGTTCAAAATTCTGCCCCG---TGGTTACCTGCAGTCTCOCAGGCCTGAATGGCTTCCCAGCCAAAGATGCCACGTGACG
Human TGCCCAAAAGACCTGCCCCGCAAGTGATTGCCTCTACCCTCOCAGGCATCAACCGCTTCCCAGCCAAAGATCCGCGTGATG
Mouse GTGCCAAGGGAGAAAAGGGA GAACCAGGTCAAGGGCTCAGAGGCTTGCAAGGCCCTCCTGGAAAAGTAGGACCTACAGGA
Human GCA CCAAGGGAGAAAAGGGG GAACCAGGCCAAGGGCTCAGAGGCTTACAGGCCCTCCTGGAAAAGTGGGGCTCAGGA
Mouse CCCCAGCGAA TCCGGGGTTAAAAGGAGCAGTGGGACCGAAAGGAGACCCTGGGACAGAGCA GAATT TGATACTAGCGA
Human AATCCAGGCC TTCTGGGTCAACAGGACCAAGGGCCAA AAAGGAGACCCTCGAAAAC TCCGATGG TGATAGTAGCCT
Mouse AAT TGATTCAGAAATTGCAGCCCTACGATCAGAGCTGAGAGCCCTGAGAAAC TGGTCTCTTCTCTCTGACTGAAAAG
Human GGC TCCCTCAGAAAAGAAA ACCTCTGCA AACAGAAATCGCAGGTATCAAAAAG TGGCTCACCTTCTCTCTGGCCAACAAG
Mouse TTGGAAAGAAGTATTTTGTGAGCAGTGTAAAAAGATGAGCCTTGACAGAGTGAAGCCCCTGTCTCCGAATTCCAGGGC
Human TTGGGAACAAGTTCTTCCTGACCAATGGTGAATAATGACCTTTGAAAAGTGAAGCCCCTGTGTGTCAAGTTCCAGGCC
Mouse TCTGTGCCACTCCCAGGAATGCTGAGGAAAACTCGGCCATCCAGAAAGTGGCCAAAAGATATTGCCTACTTGGCCATCAC
Human TCTGTGCCACCCCCAGGAATGCTGCAGAGAAATGGAGCCATTTCAGAAATCTCATCAAGGAGGAAACCTTCCCTGCGTATCAC
Mouse AGATGTGAGGGTTGAAGG-CAGTTTTGAGGATCTGACAGGAAACAGAGTCCGCTATACTAATTGGAATGATCCGGAGCCC
Human TGATGAGAAACA GAAGGGCAGTTT-GTCGATCTGACAGGAAATAGACTGACCTACACA AACTGGAACGAGGCTGAACCC
Mouse AACAAACA CGGCCGATGGGGAAGACTGTGTGGTGA TCTTGGGAAATGGCAAGTGGAAACGATGTCCCCTGCTCTGACTCTTT
Human AACAAATG CTGGTTCGATGAAGAT TGTGTATTGCTACTGAAAAATGGCCAGTGGAAATGACGTCCCCTGCTCCACTCCCA
Mouse TTGGCAATCTGTGAATTC TCTGACTGA
Human TCTGCCG TCTGTGAGTTCCCTATCTGA
```

图4 小鼠MBL-C基因与汉族人MBL基因序列间的比较

Fig.4 Sequence comparison between mouse MBL-C gene and human MBL gene

3 讨论

胶凝素家族包括MBL、肺表面活性物质脱辅基蛋白A和D、胶固素、 M_r 43 000胶凝素等5个主要成员, 其共同结构特征是都有2个主要功能区, 即N端的胶原样区(CLR)和C端的凝集素区或称糖基识别域(CRD), 均在机体的天然免疫防御中发挥重要作用[4]。CRD是MBL的识别功能区, 可选择性识别多种病原体包括细菌、病毒、真

菌、寄生虫等的糖结构。CLR为MBL的效应功能区，激活补体和结合吞噬细胞表面胶凝素受体的活性定位于此区。

人MBL基因位于染色体1q11.2~1q21，长约7 kb，含4个外显子。外显子1编码信号肽序列及N端富含Cys序列，外显子2编码胶原样区，外显子3、4分别编码颈区和糖识别域。MBL基因的突变可引起免疫功能的缺损，如在人MBL基因的外显子1的第52、54、57位密码子的点突变常常引起调理吞噬缺损，导致机体发生各种病原体的反复急慢性感染[5]。此外，在肿瘤病人及AIDS患者，MBL缺损者往往预后不良[6]。

MBL对补体系统的激活无需C1q和抗体参与，而是通过几个结构和功能与C1r/C1s同源的MBL相关丝氨酸蛋白酶实现的[7]。MBL对补体的激活能直接杀菌和溶解病毒，产生的C3b和C4b可起间接调理作用[8]；MBL还能籍其CLR与吞噬细胞胶凝素受体结合，发挥直接调理功能[5]。然而，这些多是体外实验资料，MBL的体内作用如何所知甚少。目前研究发现，某些个体MBL基因的突变可引起相应血清MBL水平的下降，如人类MBL基因第1外显子中，编码第52位，54位和57位氨基酸的核苷酸发生变异可严重影响血清MBL的合成[9]，而血清MBL的浓度下降与反复感染及自身免疫性疾病的发生密切相关。相反，在MBL基因缺损的患者体内，使用重组表达的人MBL蛋白进行辅助治疗可明显改善机体的免疫状态，调节机体的免疫机能[10]。虽然MBL在天然免疫及免疫调节中的重要性越来越受到人们的关注，但是有关MBL的作用机制目前仍不明确，这些问题，均有待于在模式动物体内进行整体水平的研究加以阐明。

小鼠是免疫学研究中最常用的模式动物。小鼠的MBL基因以2种形式存在，分别是MBL-A基因和MBL-C基因。在基因结构上，这2个基因均含有外显子及内含子，其中，MBL-A基因含5个外显子而MBL-C基因则有6个外显子。比较而言，小鼠MBL-C基因在结构上与人MBL基因更为相似[11]，其N端的第1编码区有64 bp (MBL-A为46 bp)，C端的糖识别域是由单一的外显子所编码，而其N端的富含Cys区含有类似于人MBL的多个Cys残基结构，而编码MBL亚基三聚体形成的外显子区与人的MBL的相关区域也具有相似的大小。由此表明，与其他胶原凝集素基因比较，如人的肺表面活性物质脱辅基蛋白D基因，MBL基因在进化过程中的分化较早，而相对于MBL-A基因，小鼠MBL-C基因与人MBL基因保持了较高的同源性[12]，因此，本实验克隆了小鼠MBL-C基因。在整体水平深入探索小鼠MBL-C基因及其产物的结构与功能，将为进一步揭示人MBL分子的体内生物学功能奠定基础并提供借鉴。

(责任编辑：杨金星)

参考文献：

[1] Butler GS, Sim D, Tam E, et al. Mannose-binding lectin (MBL) mutants are susceptible to matrix metalloproteinase proteolysis[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(20): 17511-9.

[2] 陈政良, 朱锡华, 谢佩蓉. 中国人MBLc DNA的克隆与序列分析[J]. *免疫学杂志*, 1999, 15(2): 83-6.

Chen ZL, Zhu XH, Xie PR. Cloning and sequencing of mannose binding lectin cDNA of Chinese[J]. *Immunol J*, 1999, 15(2): 83-6.

[3] Ausubel FM, Brent K, Kingston R, et al. *Short protocols in molecular biology*[M]. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1998. 6-105.

[4] 陈政良. 哺乳类C型凝集素超家族[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1997, 24(6): 491-6.

Chen ZL. Super-family of C-type lectins. *progress of biochemistry and biophysics*[J]. 1997, 24(6): 491-6.

[5] Vang PS, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association[J]. *Mol Immunol*, 2001, 38(2-3): 133-49.

[6] Wallis R, Drickamer K. Molecular determinants of oligomer formation and complement fixation in mannose-binding proteins[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(6): 3580-9.

[7] Nonaka M, Miyazawa S. Evolution of the initiating enzymes of the complement system [J]. *Genome Biol*, 2002, 3(1): 1-5.

[8] Drickamer K, Dordal MS, Reynolds L. Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain carbohydrate-recognition domains linked to collagenous tails. Complete

primary structures and homology with pulmonary surfactant apoprotein[J]. J Biol Chem, 1986, 261(15): 6878-87.

[9] Saevarsdottir S, Vikingsdottir T, Vikingsson A, et al. Low mannose binding lectin predicts poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis. A prospective study [J]. J Rheumatol, 2001, 28(4): 728-34.

[10] Vorup-Jensen T, Sorensen ES, Jensen UB, et al. Recombinant expression of human mannan-binding lectin[J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1(4):677-87.

[11] Sastry R., Wang JS, Brown DC, et al. Characterization of murine mannose-binding protein genes Mbl1 and Mbl2 reveals features common to other collecting genes[J]. Mamm Genome, 1995, 6 (2): 103-10.

[12] Liu H, Jensen L, Hansen S, et al. Characterization and quantification of mouse mannan-binding lectins (MBL-A and MBL-C) and study of acute phase responses[J]. Scand J Immunol, 2001, 53(5): 489-97.

参考文献:

[1] Butler GS, Sim D, Tam E, et al. Mannose-binding lectin (MBL) mutants are susceptible to matrix metalloproteinase proteolysis[J]. J Biol Chem, 2002, 277(20): 17511-9.

[2] 陈政良, 朱锡华, 谢佩蓉. 中国人MBLc DNA的克隆与序列分析[J]. 免疫学杂志, 1999, 15(2): 83-6.

Chen ZL, Zhu XH, Xie PR. Cloning and sequencing of mannose binding lectin cDNA of Chinese[J]. Immunol J, 1999, 15(2): 83-6.

[3] Ausubel FM, Brent K, Kingston R, et al. Short protocols in molecular biology[M]. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1998. 6-105.

[4] 陈政良. 哺乳类C型凝集素超家族[J]. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(6): 491-6.

Chen ZL. Super-family of C-type lectins. progress of biochemistry and biophysics[J]. 1997, 24(6): 491-6.

[5] Vang PS, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association[J]. Mol Immunol, 2001, 38(2-3): 133-49.

[6] Wallis R, Drickamer K. Molecular determinants of oligomer formation and complement fixation in mannose-binding proteins[J]. J Biol Chem, 1999, 274 (6): 3580-9.

[7] Nonaka M, Miyazawa S. Evolution of the initiating enzymes of the complement system [J]. Genome Biol, 2002, 3(1): 1-5.

[8] Drickamer K, Dordal MS, Reynolds L. Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain carbohydrate-recognition domains linked to collagenous tails. Complete primary structures and homology with pulmonary surfactant apoprotein[J]. J Biol Chem, 1986, 261(15): 6878-87.

[9] Saevarsdottir S, Vikingsdottir T, Vikingsson A, et al. Low mannose binding lectin predicts poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis. A prospective study [J]. J Rheumatol, 2001, 28(4): 728-34.

[10] Vorup-Jensen T, Sorensen ES, Jensen UB, et al. Recombinant expression of human mannan-binding lectin[J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1(4):677-87.

[11] Sastry R., Wang JS, Brown DC, et al. Characterization of murine mannose-binding protein genes Mbl1 and Mbl2 reveals features common to other collecting genes[J]. Mamm

Genome, 1995, 6 (2): 103-10.

[12] Liu H, Jensen L, Hansen S, et al. Characterization and quantification of mouse mannan-binding lectins (MBL-A and MBL-C) and study of acute phase responses[J]. Scand J Immunol, 2001, 53(5): 489-97.

[回结果列表](#)