

# 人乳腺组织中乳铁蛋白基因 cDNA 的克隆与序列分析

舒建洪<sup>1</sup>, 潘智芳<sup>2</sup>, 郑月茂<sup>1</sup>, 石玉强<sup>1</sup>, 张 涌<sup>1</sup>

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 潍坊医学院 生物教研室, 山东 潍坊 261041)

**[摘要]** 通过 RT-PCR 技术从人乳腺癌组织中扩增出长度为 2 259 bp 的人乳铁蛋白 cDNA, PCR 产物经凝胶回收纯化后, 克隆在 pMD 18-T 载体的 T 位点。测序结果和序列分析显示, 与 GenBank 中收录的人、小鼠、奶牛和山羊的乳铁蛋白 cDNA 序列的同源性分别为 99.73%, 82.19%, 81.79% 和 87.28%。其中与人乳铁蛋白 cDNA 序列相比, 发现有 5 个碱基等位基因间的突变而发生变异, 1 个碱基发生了未知的突变, 表明已成功的扩增、克隆了人乳铁蛋白基因 cDNA 序列, 此基因序列的 GenBank 登录号为 AY165046。

**[关键词]** 人乳铁蛋白基因; RT-PCR; 克隆; 乳腺癌

**[中图分类号]** Q781

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2006)03-0001-05

人乳铁蛋白(human lactoferrin, hLF)是一种分子质量为 76.386 ku 的铁结合蛋白, 主要存在于乳汁、唾液等分泌物中, 其中乳汁中含量最高。乳铁蛋白具有多种重要的生理功能, 可促进铁的吸收, 对胰蛋白酶及其类似的蛋白酶具有抗降解能力, 因而在肠道内能以完整的形式被吸收, 可满足胎儿在发育时期对铁的需求; 此外, 乳铁蛋白还可抑制细菌、肿瘤细胞的生长, 抵抗病毒的侵入, 调节机体的免疫能力, 刺激免疫应答而增强抗病能力<sup>[1]</sup>。人乳铁蛋白基因 cDNA 全长 2 619 bp, 其中编码框 2 135 bp, 目前已在小鼠<sup>[2]</sup>、奶牛<sup>[3]</sup>、烟草<sup>[4]</sup>等动、植物体内表达了重组的人乳铁蛋白。本研究从人乳腺癌组织中克隆人乳铁蛋白 cDNA, 并对其进行了测序、分析, 为利用转基因动物乳腺生物反应器生产 hLF, 以及研究 hLF 在抗菌和抗病毒中的作用奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 组织来源和主要试剂

人乳腺癌组织取自山东潍坊人民医院, 癌组织从患者体内取出后, 立即用 PBS 溶液冲洗掉表面血污并与周围脂肪组织分离, 剪成 1 cm<sup>3</sup> 的小块放入冻存管, 液氮中保存备用; 宿主菌 DH5 $\alpha$  为西北农林科技大学生物工程研究所分子实验室保存; 质粒

pMD 18-T Vector 购自大连宝生物工程有限公司; 限制性内切酶、T4 连接酶、DNA Marker、DNA Gel Extraction Kit 和 Plasmid Minipreps Kit 均购自 Promega 公司; TRIzol 试剂、ThermoScript<sup>TM</sup> RT-PCR System、Platinum Taq DNA 聚合酶购自 GIBICOL 公司; DEPC 为 AMRESCO 公司产品。

### 1.2 总 RNA 的提取及完整性检测

采用 TRIzol 法提取人乳腺癌组织的总 RNA, 具体方法参考试剂使用说明书。取总 RNA 9  $\mu$ L 点样进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像分析系统中观察结果并记录, 检查所提取总 RNA 的完整性。

### 1.3 特异性引物的设计及合成

参考 Rey 等<sup>[5]</sup>、Powell 等<sup>[6]</sup>发表在 GenBank 中的人乳铁蛋白 cDNA 序列, 利用 Prime Premier 5.0 软件设计 1 对引物。上游引物: 5' CAG ACC GCA GAC ATG AAA CT 3'; 下游引物: 5' GCA ATC CCC ACC TTC AGC AG 3', 由上海生物工程服务公司合成。

### 1.4 RT-PCR 反应

在 DEPC 水处理过的 PCR 反应管中依次加入 RNA (10 pg~5  $\mu$ g) 5  $\mu$ L, 下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L 和 DEPC 处理的水 4  $\mu$ L, 65  $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后立

**[收稿日期]** 2005-07-26

**[基金项目]** 国家“863”高技术项目(2001AA213081)

**[作者简介]** 舒建洪(1978—), 男, 浙江金华人, 在读博士, 主要从事动物胚胎工程和分子生物学研究。

**[通讯作者]** 张 涌(1956—), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物胚胎工程和发育生物学研究。

即放于冰上,使 RNA 和引物充分变性并解除 RNA 的二级结构。冰上操作依次加入 5×cDNA Synthesis Buffer 4 μL, DTT(0.1 mol) 1 μL, RNase OUT (40 U/μL) 1 μL, DEPC 处理的水 1 μL, dNTP Mixture (10 μmol/L) 2 μL, ThermoScript™ RT PCR System (15 U/μL) 1 μL, 反转录体系总体积 20 μL。轻轻摇匀瞬时离心后, 55 °C 反应 50 min, 85 °C 反应 5 min, 37 °C 时加入 RNase H (2 U/μL) 1 μL 并反应 20 min, 反应结束后取 2 μL 进行 PCR 扩增, 其余于 -70 °C 冰箱保存备用。在 DEPC 水处理过的 PCR 反应管中依次加入 10×High Fidelity PCR Buffer 5 μL, MgSO<sub>4</sub> (50 mmol/L) 2 μL, dNTP Mixture (10 μmol/L) 1 μL, 上游引物 (10 μmol/L) 1 μL, 下游引物 (10 μmol/L) 1 μL, Platinum Taq High Fidelity (5 U/μL) 0.2 μL, cDNA 2 μL, DEPC 处理水 37.8 μL, PCR 扩增总反应体积为 50 μL。混匀瞬间离心后进行热循环, 94 °C 反应 2 min, 然后以 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2.5 min 为 1 个循环, 循环 35 次, 72 °C 再延伸 10 min。

### 1.5 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

制备 10 g/L 的琼脂糖凝胶, 加入溴化乙锭 (EB) (20 mg/L) 至其终质量浓度为 1 mg/L。取 PCR 扩增产物 5 μL 与 6×凝胶电泳上样缓冲液 1 μL 混匀后, 点样电泳, 电压 5 V/cm, 45 min 后在凝胶成像分析系统中观察结果并记录。

### 1.6 目的片段的克隆、鉴定和序列测定

利用 DNA Gel Extraction Kit 从琼脂糖凝胶上回收并纯化 PCR 产物后, 克隆在 pMD 18-T Vector

的 T 位点, 并转化感受态大肠杆菌 DH5α, 蓝白斑法筛选阳性克隆, 具体方法参考文献[7]。用 Plasmid Minipreps Kit 提取质粒后, *Pst* I 酶切鉴定重组质粒, 并对阳性克隆进行序列测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 人乳腺癌组织总 RNA 的完整性

甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检查提取的总 RNA 的完整性, 结果如图 1。从图 1 可以清晰地看到 28 S, 18 S rRNA 两条主带以及较弱的 5 S rRNA 带, 这表明所提取的人乳腺癌组织总 RNA 纯度较高, 完整性较好, 无明显降解, 可用于 RT-PCR 反应。

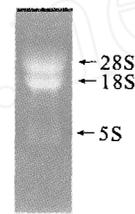


图 1 人乳腺癌组织总 RNA 的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Formaldehyde denaturalized electrophoresis of total RNA

### 2.2 人乳铁蛋白基因 cDNA 的扩增

RT-PCR 反应的电泳结果显示, 得到了 1 条特异性条带 (图 2), 与预扩增的片段大小一致, 约为 2 259 bp, 而且无非特异性条带的干扰, 扩增的特异性较强。

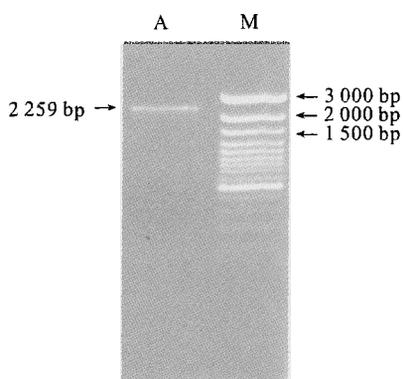


图 2 人乳铁蛋白基因 PCR 产物的电泳结果

M. 3 kb DNA marker; A. PCR 产物

Fig. 2 Electrophoresis of PCR product

M. 3 kb DNA marker; A. PCR product

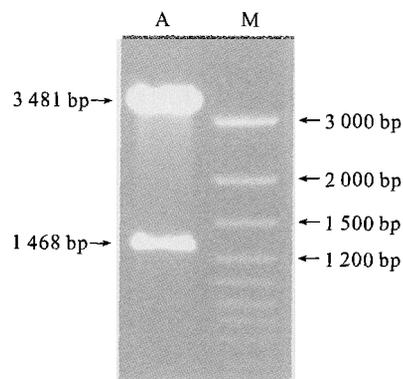


图 3 重组质粒酶切鉴定结果

M. DNA 样标; A. 重组质粒 *Pst* I 酶切分析

Fig. 3 Restriction endonuclease digestion of target fragment

M. DNA marker; A. *Pst* I endonuclease digestion

```

1   CAGACCGCAG ACATGAAACT TGTCTTCTC GTCTGCTGT TCCTCGGGGC CCTCGGACTG
61  TGTCTGGCTG GCCGTAGGAG AAGGAGTGT CAGTGGTGC CCGTATCCCA ACCCGAGGCC
121 ACAAAATGCT TCCAATGGCA AAGGAATATG AGAAGAGTGC GTGGCCCTCC TGCAGCTGC
181 ATAAAGAGAG ACTCCCCAT CCAGTGTATC CAGGCCATTG CGGAAAACAG GCCCGATGCT
241 GTGACCCTTG ATGGTGGTTT CATATACGAG GCAGGCCTGG CCCCTACAA ACTGCGACT
301 GTAGCGGCGG AAGTCTACGG GACCGAAAGA CAGCCACGAA CTCACTATTA TGCCGTGGCT
361 GTGGTGAAGA AGGGCGGCAG CTTTCAGCTG AACGAACTGC AAGGTCTGAA GTCCTGCCAC
421 ACAGGCCTTC GCAGGACCGC TGGATGGAAT GTCCTATAG GGACACTTCG TCCATTCTTG
481 AATTGGACGG GTCACCTGA GCCATTGAG GCAGCTGTGG CCAGGTTCTT CTCAGCCAGC
541 TGTGTTCCCG GTGCAGATAA AGGACAGTTC CCCAACCTGT GTCGCCTGTG TCGGGGACA
601 GGGGAAAACA AATGTGCCTT CTCCTCCAG GAACCGTACT TCAGCTACTC TGGTGCCTTC
661 AAGTGTCTGA GAGACGGGGC TGGAGACGTG GCTTTTATCA GAGAGAGCAC AGTGTGTTGAG
721 GACCTGTGAG ACGAGGCTGA AAGGGACGAG TATGAGTTAC TCTGCCAGA CAACACTCGG
781 AAGCCAGTGG ACAAGTCAA AGACTGCCAT CTGGCCGGG TCCCTTCTCA TGCCGTTGTG
841 GCACGAAGTG TGAATGGCAA GGAGGATGCC ATCTGGAATC TTCTCCGCCA GGCACAGGAA
901 AAGTTTGAA AGGACAAGTC ACCGAAATTC CAGCTCTTTG GCTCCCCTAG TGGGCAGAAA
961 GATCTGCTGT TCAAGGACTC TGCCATTGGG TTTTCGAGGG TGCCCCGAG GATAGATTCT
1021 GGGCTGTACC TTGGCTCCGG CTACTTCACT GCCATCCAGA ACTTGAGGAA AAGTGAGGAG
1081 GAAGTGGCTG CCCGGCGTGC GCGGGTCGTG TGGTGTGGG TGGGCGAGCA GGAGCTGCGC
1141 AAGTGAACC AGTGGAGTGG CTTGAGCGAA GGCAGCGTGA CCTGCTCCTC GGCCTCCACC
1201 ACAGAGGACT GCATCGCCCT GGTGCTGAAA GGAGAAGCTG ATGCCATGAG TTTGGATGGA
1261 GGATATGTGT ACACTGCAAG CAAATGTGGT TTGGTGCCTG TCCTGGCAGA GAACTACAAA
1321 TCCCAACAAA GCAGTGACCC TGATCCTAAC TGTGTGGATA GACCTGTGGA AGGATATCTT
1381 GCTGTGGCGG TGTTAGGAG ATCAGACACT AGCCTTACCT GGAACCTGT GAAAGGCAAG
1441 AAGTCCTGCC ACACCGCCGT GGACAGGACT GCAGGCTGGA ATATCCCAT GGGCCTGCTC
1501 TTCAACCAGA CGGGCTCCTG CAAATTTGAT GAATATTCA GTCAAAGCTG TGCCCTGGG
1561 TCTGACCGA GATCTAATCT CTGTGCTCTG TGTATTGGCG ACGAGCAGGG TGAGAATAAG
1621 TGGTGCCCA ACAGCAACGA GAGATACTAC GGCTACTCTG GGGCTTCCG GTGCCTGGCT
1681 GAGAATGCTG GAGACGTTGC ATTTGTGAAA GATGTCAGTG TCTTGAGAAA CACTGATGGA
1741 AATAACAATG ACGCATGGGC TAAGGATTTG AAGCTGGCAG ACTTTGCGCT GCTGTGCCTC
1801 GATGGCAAAC GGAAGCCTGT GACTGAGGCT AGAAGCTGCC ATCTTGCCAT GGCCCGAAT
1861 CATGCCGTGG TGTCTCGGAT GGATAAGGTG GAACGCCTGA AACAGGTGT GCTCCACCAA
1921 CAGGCTAAAT TTGGGAGAAA TGGATCTGAC TGCCCGGACA AGTTTGTCTT ATTCCAGTCT
1981 GAAACCAAAA ACCTTCTGTT CAATGACAAC ACTGAGTGTG TGGCCAGACT CCATGGCAAA
2041 ACAACATATG AAAAATATTT GGGACCACAG TATGTGGCAG GCATTACTAA TCTGAAAAAG
2101 TGCTCAACCT CCCCCTCCT GGAAGCCTGT GAATTCCTCA GGAAGTAAA CCGAAGAAGA
2161 TGGCCAGCT CCCCAAGAAA GCCTCAGCCA TTCCTGCCC CCAGCTCTTC TCCCAGGTG
2221 TGTGGGGCC TTGGCTCCCC TGCTGAAGGT GGGGATTGC

```

图 4 hLF cDNA 核苷酸序列

I. 翻译起始密码子; == 成熟肽第一密码子; □. 翻译终止密码子; □. 突变位点

Fig. 4 cDNA nucleotide acid sequence of human lactoferrin gene

I. at the start code translation; == as the first code of mature peptide; □. as the end code of translation; □. as variation side

### 2.3 重组质粒酶切鉴定结果

利用蓝白斑法筛选阳性克隆菌落,并酶切鉴定重组质粒。由于人乳铁蛋白基因 cDNA 序列和 pMD 18-T 载体都有单一的 *Pst* I 酶切位点,故采用 *Pst* I 做酶切鉴定,预计将得到两条特异性条带,电泳结果显示(图 3)与预计的结果一致,片段大小分别为 3 481 bp 和 1 468 bp,表明目的片段已成功的克隆在 pMD 18-T Vector 的 T 位点,而且是反方向插入 pMD 18-T 载体中。

### 2.4 人乳铁蛋白基因 cDNA 核苷酸序列分析结果

对阳性克隆进行序列测定(图 4),并利用 BLAST 软件进行同源性分析。结果表明,与 GenBank 中收录的人、小鼠、奶牛和山羊的乳铁蛋白基因 cDNA 序列的同源性分别为 99.73%,82.19%,81.79%和 87.28%。经序列分析发现,与 GenBank 中收录的人乳铁蛋白 cDNA 序列相比,有 5 个碱基等位基因间的突变而发生变异,1 个变异碱基发生了未知的突变,分别为第 100 位 G→A,导致第 30 位氨基酸 Ala→Thr;第 155 位 A→G,导致第 48 位氨基酸 Lys→Arg;第 458 位 C→T,导致第 148 位氨基酸 Thr→Ile;第 1 279 位 T→G,未导致氨基酸发生变化;第 1 752 位 G→C,导致第 580 位氨基酸 Glu→Asp;第 1 909 位发生了未知的突变 C→T,氨基酸未发生变化,此基因序列的 GenBank 登录号为 AY165046。

## 3 讨 论

人乳铁蛋白不仅是一种载铁蛋白,促进铁的吸收,而且还是人体非特异性免疫系统中的重要成员之一,具有调节人体免疫功能,促进细胞增殖,刺激免疫应答而增强机体抗病能力的功能。利用乳腺生物反应器大规模生产人类所急需的外源活性蛋白,已引起广大科研工作者和生物制药公司的瞩目,并投入了大量的精力和财力研究外源基因在乳腺细胞中高水平表达和分泌的条件,同时也成功的研究出了一批高水平表达目的基因的转基因动物。如

Wright<sup>[8]</sup>制作的转  $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶基因的转基因绵羊,外源基因在乳中的表达量高达 35 g/L;Kim 等<sup>[2]</sup>制作的转人乳铁蛋白基因的转基因小鼠,在乳中人乳铁蛋白最高表达量为 6.6 g/L。在国内,人乳铁蛋白基因在烟草<sup>[1]</sup>和小鼠乳腺癌细胞中<sup>[9]</sup>实现了表达,克隆出了小白鼠乳铁蛋白基因<sup>[10]</sup>,此类报道已经很多,但尚未见到转人乳铁蛋白基因的动物乳腺生物反应器的报道。

为制备转基因动物乳腺生物反应器、研究人乳铁蛋白在抗菌和抗病毒中的作用,本研究从人乳腺癌组织中克隆了人乳铁蛋白 cDNA 序列,片段全长 2 259 bp,包含完整的编码框序列。本研究采用一步扩增法,选择热稳定的反转录酶-ThermoScript RT,提高了反转录反应温度(55~65 °C),减少了 RNA 二级结构对反转录反应的影响,而且对引物进行层层筛选,选用 *T<sub>m</sub>* 值相接近、GC 含量较高、引物间二聚体较少的 1 对引物,从而优化了反转录反应体系,简化了实验步骤,高效率地扩增出人乳铁蛋白 cDNA。因此,当克隆某些较长基因时,应着重考虑反转录酶、反应温度和引物对 RT-PCR 反应体系的影响,而不应该一味的采用多步扩增法<sup>[1,9]</sup>,因为这样不仅费时费力而且还会增加试验设计的难度和误差,如果反转录反应体系能够得到优化,采用一步扩增法会得到满意的结果。

同源性分析和序列分析结果表明,所获的人乳铁蛋白 cDNA 与 GeneBank 中收录的人乳铁蛋白 cDNA 序列的同源性为 99.73%,发现共有 6 个差异碱基,分别为第 100,155,458,1 279,1 752 和 1 909 位,前 5 个变异碱基是由于等位基因间的突变造成的,第 6 位为未知突变。第 6 位突变位点没有导致编码氨基酸的改变,它是否为等位基因间的突变,是否是一新的基因编码框区的 SNPs(单链核苷酸多态)位点,以及人乳铁蛋白等位基因间的突变是否处在关键氨基酸位点,对蛋白质的功能是否存在影响,这些还有待于进一步的研究和证实。

### [参考文献]

- [1] Hanmsen M C. Antiviral effects of plasma and milk proteins, lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus[J]. J Infectious Diseases. 1995, 172:290-388.
- [2] Kim S J, Sohn B H, Jeong S, et al. Hige level expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice using genomic lactoferrin sequence[J]. J Biochem(Tokyo), 1999, 126(2): 320-325.
- [3] Krimpenfort P. The production of human lactoferrin in the milk of transgenic animals[J]. Canc Detect:Preview, 1993, 17:301-305.
- [4] 张大兵. 人乳铁蛋白基因在烟草中的表达及抗细菌与病毒的能力[J]. 植物生理学报, 1999, 25(3):234-243.

- [5] Rey M W, Woloshuk S L, deBoer H A, et al. Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(17):5288.
- [6] Powell M J, Ogden J E. Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(13):4013.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Manatis T, et al. *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 57.
- [8] Wright G. High level expression of active human  $\alpha$ -antitrypsin in the milk of transgenic sheep[J]. *Biotechnology*, 1991, 9:830-834.
- [9] 曹 阳, 高华颖, 余 黎, 等. 人乳铁蛋白基因克隆及细胞表达研究[J]. *遗传*, 2002, 24(1):9-14.
- [10] 汪以真, 韩菲菲, 黄海清. 小白鼠乳铁蛋白基因 cDNA 克隆及序列分析[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(2):230-231.

## Cloning and Sequence Analysis of Human Lactoferrin cDNA

SHU Jian-hong<sup>1</sup>, PAN Zhi-fang<sup>2</sup>, ZHENG Yue-mao<sup>1</sup>,  
SHI Yu-qiang<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Department of Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261041, China)

**Abstract:** Human lactoferrin (hLF) cDNA fragment about 2 259 bp nucleotide acids in length was obtained through RT-PCR from human mammary cancer tissue. The PCR product was cloned into pMD 18-T vector. The fragment was sequenced and analyzed. The gene homology of the fragment obtained in this study was 99.73%, 82.19%, 81.79%, and 87.28% respectively comparable to that of the reported lactoferrin cDNA sequence of human, mouse, cow, and goat in GenBank. The Sequence was aligned with human lactoferrin cDNA in GenBank, and the result suggested there were five allele mutation sites and one unrecognized mutation site. So the human lactoferrin cDNA was cloned successfully, and the sequence number in GenBank was AY165046.

**Key words:** human lactoferrin gene; RT-PCR; clone; mammary cancer