维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 0777 - 04

同种异型抗原激活并套式 PCR 法克隆人颗粒溶素 Mr 15000 与 Mr 9000 活性片段

伊正君,朱道银,杨 春,何永林,刘晔华

(重庆医科大学基础医学院微生物学与免疫学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:采用套式 PCR 克隆经同种异型抗原激活后的人细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)表达的颗粒溶素(Granulysin, GLS)Mr 15000 与 Mr 9000 活性片段的编码序列并进行序列测定与分析,为进一步表达纯化该活性片段和研究 GLS 的免疫杀伤机制奠定基础。方法:抽提经过培养并激活的健康人 CTL 淋巴细胞总 RNA,经逆转录后以套式 PCR 方法扩增出 GLS 的 Mr 15000 与 Mr 9000 活性片段的编码序列,插入 pET32a(+)载体,转化大肠杆菌 TOP10,阳性克隆经 PCR 及酶切鉴定后进行测序分析。结果:成功扩增出了包含 GLSMr 15000 与 Mr 9000 活性片段完整编码序列的 cDNA,与预期大小相同,PCR、酶切及测序鉴定证明得到了读码框正确的 pET32a - Mr 15000 与 pET32a - Mr 9000 重组子。序列分析表明 GLS 基因编码产物在第 119 位存在氨基酸多态性。结论:人天然颗粒溶素 Mr 15000 与 Mr 9000 活性片段编码序列能够通过以上方法获得和克隆并用于后续研究。

【关键词】同种异型抗原;颗粒溶素;细胞毒性 T 淋巴细胞;套式 PCR

【中国图书分类法分类号】R378.91 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 06 - 01

The cDNA cloning of human granulysin Mr 15000 and Mr 9000 active segments from CTL activated by allogenic antigen

YI Zheng jun , et al

(Department of Microbiology and Immunology, College of Basic Medical, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To clone, sequence and analyze the coding sequences of the Mr 15000 and Mr 9000 active segments of natural granulysin derived from human CTLs activated by allogenic antigen, in order to establish the basis for further purifying and investigating the immune - impairing mechanism of granulysin. Methods: The coding sequences of the Mr 15000 and Mr 9000 granulysin gene were amplified from the total RNA of activated CTLs of healthy person after reverse transcription by Nested - PCR, inserted into pET32a (+) vectors and then transformed into E. Coli TOP10, respectively. The recons were identified by PCR, endonuclease digestion and sequencing. Results: The whole coding sequences of the Mr 15000 and Mr 9000 active segments were successfully cloned as expected. The accurate pET32a - Mr 15000 and pET32a - Mr 9000 recons were obtained through Colony - PCR, endonuclease digestion and sequencing. There lied polymorphism on the 119 th amino acid of the product encoded by GLS gene. Conclusion: The coding sequences of the Mr 15000 and Mr 9000 active segments of human granulysin can be obtained and cloned by the methods mentioned above and can be used for subsequent research.

【Keywords】Allogenic antigen; Granulysin; CTL; Nested - PCR

颗粒溶素(Granulysin, GLS)是由人自然杀伤细胞(Human natural killer cells, NK)和激活的细胞毒性 T 细胞(Activated cytolytic T lymphocytes, CTL)表达的一种具有广谱杀伤病原生物和细胞裂解活性的肽类分子,有 Mr 15000 和 Mr 9000 两种形式的产物蛋白[1]。目前有关 GLS 的研究进展主要集中在三个领域,即建立在对其晶体结构的深入了解基础上的,对其杀伤靶细胞机理的研究;利用 RNA 干扰技术(RNA interfering)揭示的 GLS 与机体抗感染免疫的密切关系;以及利用其与疾病的相关性作为一种诊断指标的潜在价值[2]。GLS 的研究对于开发天

作者介绍:伊正君(1973 -),男,博士生,
主要研究方向:结核病的基因治疗与免疫治疗。

基金项目:国家自然基金项目资助(30400375)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

然、低毒、高效的新一代杀菌制剂具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌种及质粒

大肠杆菌 TOP10、Novagen 公司质粒载体 pET32a(+)皆为本室保存。

1.2 主要试剂

人外周血单个核细胞(PBMC)分离液及植物血凝素(PHA)购自第三军医大学试剂服务中心,质粒小量抽提试剂盒、PCR 产物及凝胶回收试剂盒均购自上海华舜公司,小量组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒、正常熔点琼脂糖(NMA)、限制性核酸内切酶 *Nco*I、*Bam*HI、高保真 Probest - Taq 酶、T4 DNA 连接酶、逆转录试剂盒(Ver. 3.0)、DNA - Marker DL - 2000 等均购自大连宝生物公司,RPMI 1640 培养液购自 Gibco 公司,小牛血清为杭州四季青公司产品。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中人 GLS 的 cDNA 序列,共设计合成了 6 条引物:PG1:5' - GCGCTAGCGTATCTGTGGTAAACCCAGTG - 3';PG2:5' - GCGGTACCCTTGCTTGACACTTTATTCTCG - 3';PG3:5' - GTCCATGGGCAACCCAGGTCTGGTCT - 3';PG4:5' - GCGGATCCTCAGAGGGGACCTGTAGAAG - 3';PG5:5' - GACCATGGGCCGTGACTACAGGACCT - 3';PG6:5' - TAGGATCCGTCGACGAGCTCTCACCTGAGGTCCTCACAGA - 3';其中 PG1、PG2 与 PG6 由大连宝生物公司合成,其余引物由上海生工合成。两种活性片段的引物设计中已去除了分泌肽片段。

1.4 外周血单个核细胞(PBMC)的获取与激活

首先采用 PHA 活化外周血单个核细胞中的 T 细胞,然后采用同种异型抗原诱导、刺激其中的 CTL 细胞和 NK 细胞活化,从而启动 GLS 基因的转录。方法是,无菌抽取 2 健康人静脉血 6ml,肝素抗凝。1500r/min 离心 10min,分别吸出上层血浆及白细胞层,然后用 PBS 缓冲液对倍稀释白细胞,再按 PBMC 分离液说明,常规分离外周血单个核细胞。取其中一份 PBMC 样本洗涤 2 次后以含 100ml/L 自体血浆的完全 RPMI 1640 培养液重悬,调节细胞数为 2×10^6/L,加入 PHA 使其终浓度为 200mg/L,置 37℃、50ml/L CO_2 培养箱中,培养 24h 后加入另一份样本(此样本 PBMC 经灭活处理后以含 100ml/L 灭活小牛血清的完全 RPMI 1640 培养液重悬)共同培养 48 h 后收获细胞。

1.5 GLS Mr 15000 与 Mr 9000 活性片段 cDNA 的扩增

按试剂盒说明抽提细胞总 RNA;抽提获得的总 RNA 经 10g/L 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳和比色鉴定完整性及纯度后,按逆转录试剂盒说明首先用引物 PG1、PG2 以一步法 RT - PCR 直接获得包含目标序列在内的 GLS - cDNA 全长片段。为确保序列的准确性,我们以保真度极高、具有校正活性的 Probest - Taq 酶取代试剂盒自带的 HS - Taq 进行扩增 25 个循环,然后取 RT - PCR 产物 2μl 作为模板,分别以引物 PG3 与 PG4、PG5 与 PG6 在 Probest - Taq 酶作用下再进行套式扩增,反应条件为:94℃ 预变性 4min;94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 30s,30 个循环,72℃ 延伸 8min. PCR 产物以 10g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测和分析。1.6 GLS Mr 15000 与 Mr 9000 活性片段 cDNA 的克隆

PCR 产物按回收试剂盒说明进行纯化,纯化后以 *Nco*I、*Bam*HI 双酶切、回收,再分别与同样处理并回收的 pET32a(+)载体大片段在 16℃ 连接 1h,连接产物转化大肠杆菌 TOP10,涂布于含 100mg/L 氨卞青霉素 LB 平板上,37℃ 培养过夜。

1.7 阳性克隆鉴定

分别挑氨苄青抗性单菌落,进行 PCR 鉴定,阳性克隆置 3ml 含 100mg/L 氨苄青霉素 LB 培养基中,37℃,250r/min 振摇增菌,小量抽提质粒,用 *Nco*I 与 *Bam*HI 进行双酶切鉴定。

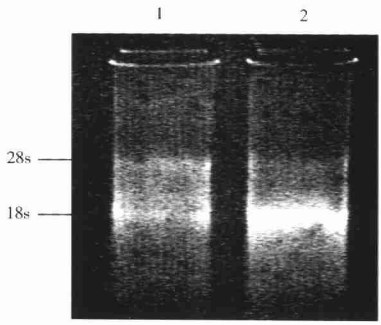
1.8 DNA 序列测定

含重组质粒的 TOP10 菌株送上海生工进行 DNA 测序,测序结果与 Genbank(登录号:NM_006433)中 GLS 的序列进行比对和分析。

2 结 果

2.1 外周血单个核细胞总 RNA 完整性和纯度鉴定

提取外周血单个核细胞总 RNA,测定 OD260nm/OD280nm 比值为 1.7 左右,10g/L 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳显示,总 RNA 的 28S 和 18S rRNA 带型较清晰,且 28S 亮度是 18S 亮度的两倍以上,表明其总 RNA 较完整(图 1)。



1) Total RNA of sample 1; 2) Total RNA of sample 2;

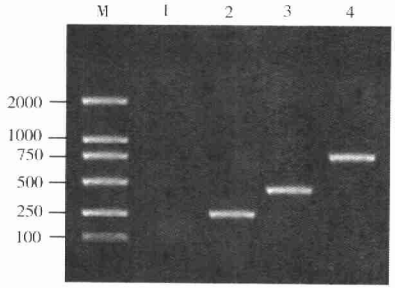
图 1 激活的外周血单个核细胞总 RNA 的 10g/L 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析

2.2 RT - PCR 及套式 PCR 的扩增结果

PCR 产物经 10g/L 琼脂糖凝胶电泳后,分别在

维普资讯 http://www.cqvip.com

约 242、411、754bp 处见到特异性目标条带，与理论预测的 GLS Mr 9000、Mr 15000 活性片段及全长 cDNA 序列大小相符(图 2)。



M) DNA Marker DL2000; 1) PCR negative control; 2) The PCR product of GLS Mr 9000 cDNA; 3) The PCR product of GLS Mr 15000 cDNA; 4) The PCR product of GLS 738 cDNA;

图 2 GLS Mr 9000 与 Mr 15000 cDNA 的套式 PCR 扩增结果

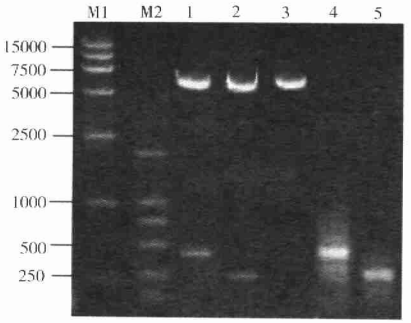
2.3 重组质粒的 PCR 及酶切鉴定

插入正确片段的重组菌落经 PCR 扩增后，琼脂糖凝胶电泳可见到与目的片段大小一致的 PCR 产物条带。分别抽提质粒双酶切后琼脂糖凝胶电泳表明：酶切后分别产生一线性空载体条带及一条与理论预测值一致的目标条带，其中 Mr 15000 为 399bp，Mr 9000 为 237bp (图 3)。

2.4 重组质粒的序列测定

两个重组质粒利用通用引物进行测序所得的结果表明插入片段大小分别为 396bp 和 222bp，且都插入载体的正确位点，与质粒自身编码的硫氧还原蛋白形成一个完整的融合蛋白开放读码框，分别编码 132 和 74 个氨基酸。与 GenBank 中公布的 GLS Mr 15000 与 Mr 9000 活性片段 cDNA 编码序列进行比对分析，我们发现 Mr 15000 编码序列在对应于完整的 GLS 蛋白第 119 位氨基酸编码序列处出现了一个由 ACC 向 ATC 的改变，其编码的氨基酸由苏氨酸(T)变为异亮氨酸(I)，在 GenBank 中查证已登录的序列，表明在此位点处确实存在多态性，因此对目的片段的生物学活性无影响。由于 Mr 9000 活性片段的 cDNA 编码序列完全包含于 Mr 15000 之中，对应于它的 SAPLIP 区，因此在相应位置也存在着同样的氨基酸多态性(图 4)。

GCCATGGGCAACCCAGGTCTGGTCTTCTCTCGTCTG



M1) DNA marker DL 15 000; M2) DNA marker DL 2 000; 1) Digestion of pET32a - Mr 15000; 2) Digestion of pET32a - Mr 9000; 3) Plasmid pET32a(+); 4) The PCR product of GLS Mr 15000; 5) The PCR product of GLS Mr 9000 cDNA;

图 3 pET32a(+)/Mr 15000 及 pET32a(+)/Mr 9000 重组质粒的 PCR 与双酶切鉴定结果

AGCCCTGAGTACTACGACCTGGCAAGAGCCCACCT
GCGTGATGAGGAGAAATCCTGCCCGTGCCTGGCCC
AGGAGGGCCCCCAGGGTGACCTGTTGACCAAAACA
CAGGAGCTGGGCCGTGACTACAGGACCTGTCTGAC
GATAGTCCAAAAACTGAAGAAGATGGTGGATAAGC
CCACCCAGAGAAGTGTTTCCAATGCTGCGACCCGG
GTGTGTAGGACGGGGAGGTCACGATGGCGCGACGT
CTGCAGAAATTTCATGAGGAGGTATCAGTCTAGAGT
TATCCAGGGCCTCGTGGCCGGAGAAACTGCCCAG
CAGATCTGTGAGGACCTCAGGTTGTGTATACCTTCT
ACAGGTCCCCTCTGAGGATCC

图 4 pET32a - Mr15000 质粒测序结果

3 讨 论

一般认为清除结核杆菌等胞内致病菌的感染主要靠人体的细胞免疫反应，可以运用结核杆菌的单一[3]或融合形式[4]的保护性抗原构建基因疫苗激发人体的 Th1 型细胞免疫反应来防治结核病。细胞毒性淋巴细胞在针对胞内感染菌的细胞免疫反应中起着关键作用，人颗粒溶素 GLS 是激活的 CTL 细胞和 NK 细胞产生的一种细胞毒性免疫效应分子，除可直接在体外高效杀伤多种靶细胞外，在穿孔素(Perforin)辅助下还可进入巨噬细胞(Macrophage)中对胞内吞噬的结核杆菌进行有效杀伤[5]，这种直

维普资讯 http://www.cqvip.com

接杀菌作用是单纯应用其它抗生素与化学药物所无法替代的。GLS 在杀伤病原生物的同时不破坏机体正常细胞[6]。正常人血液中有本底浓度(3.7 ±3.2 ng/ml)的 GLS[7],其水平与机体的细胞免疫状态直接相关,细胞免疫功能低下时体内 GLS 表达缺乏。Ogawa 等[7]认为血清 GLS 的水平是评价机体细胞免疫功能状态的新指标。结核病患者中 GLS 的产生受到选择性抑制,成功治疗后则持续回升[8]。完整的 GLS 基因编码 15 个氨基酸的分泌肽片段,而具有生物活性的 GLS 片段此分泌肽被切除,因此在构建活性片段的原核表达载体时,引物设计中应跨越此编码区。人 NK 细胞来源的 YT 细胞转染 GLS 基因后前期只能检测到 Mr 15000 活性片段的表达,随后 Mr 9000 片段才逐渐检出,因此 Pena 等[9]认为 Mr 9000 是 Mr 15000 片段的翻译后加工,但分别针对两者 N 端和 C 端的抗体不能够交互识别,提示两者在蛋白质构相与生物学功能上都存在许多差异。Wang 等[10]模拟 Mr 9000 活性片段的氨基酸序列,利用人工合成各种不同长度的肽段研究其杀伤功能,发现破坏其二硫键不影响其杀菌活性,但影响其杀细胞活性,根据研究需要,如果只合成特定长度的片段,就能保证其只杀菌而不杀伤真核细胞。这对于研制天然、高效并确保其安全性的生物杀菌新药具有重要价值。

GLS 编码基因的 GC 含量较高,通常采用 IL-2 体外激活培养的 NK 来源的细胞株 72h 后,可以得到 GLS mRNA 的转录,由于 GLS 来自激活的 CTL 细胞或 NK 细胞,而同种异型抗原可以激活 CD_8^+ T 细胞成为 CTL 细胞。我们利用同种异型抗原激活和逆转录套式 PCR 的方法,不需要培养细胞株,也不需要人 IL-12,可以快捷、方便、灵敏地直接从健康人外周血单个核细胞(PBMC)总 RNA 中扩增出 GLS Mr 15000 和 Mr 9000 的 cDNA 编码序列,并成功构建了两种活性片段的原核表达载体,测序结果表明目标片段的插入方向和读码框完全正确,从而提供了一种快速克隆 GLS 基因的新方法,同时也为后续表达与纯化 GLS 活性蛋白,并研究其免疫杀伤机制奠定了基础。

〔通讯作者:朱道银 023-68486057;yizhengjun@sohu.com〕

参 考 文 献

[1] Pena SV, Krensky, AM. Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity [J]. Semin Immunol, 1997; 9(2): 117-125.

[2] Clayberger C, Krensky AM. Granulysin [J]. Curr Opin Immunol, 2003;15(5):560-565.

[3] LUO Xu-Dong, ZHU Dao-Yin, CHEN Quan, et al. Comparison of immunogenicity of DNA vaccine encoding Mycobacterium tuberculosis Ag85B and MPT64 [J]. JFourth Mil Med Univ, 2003;24(17):1630-1631.

[4] JIANG Shan, ZHU Dao-Yin, JIANG Ying, et al. Construction of fused eukaryotic expression vector of Mycobacterium tuberculosis Ag85B and Ag85A antigens and its expression [J]. JFourth Mil Med Univ, 2003;24(21):1973-1975.

[5] Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, et al. Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes [J]. JInfect Dis, 2001;184(8):1082-1085.

[6] Stenger S, Hanson D. A, Teitelbaum R, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin [J]. Science, 1998;282(5):121-125.

[7] Ogawa K, Takamori Y, Suzuki K, et al. Granulysin in human serum as a marker of cell-mediated immunity [J]. EurJImmunol, 2003;33(7):1925-1933.

[8] Dieli F, Sireci G, Accardo-Palumbo A, et al. Selective depression of interferon-gamma and granulysin production with increase of proliferative response by Vgamma9/Vdelta2 T cells in children with tuberculosis [J]. JInfect Dis, 2002;186(12): 1835-1839.

[9] Pena S V, Hanson D A, Carr B A, et al. Processing, subcellular localization, and function of 519(Granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins [J]. JImmunol, 1997; 158(6): 2680-2688.

[10] Wang Z, Choice E, Kaspar A, et al. Bactericidal and tumoricidal activities of synthetic peptides derived from granulysin [J]. JImmunol, 2000;16(5):1486-1490.