维普资讯 http://www.cqvip.c

文章编号:0253 - 3626(2005)01 - 0102 - 02

人 LIF 基因的克隆及其真核表达载体的构建

李芳菲 , 刘永刚 , 彭 彦 , 王建伟 , 王亚平

(重庆医科大学基础医学院,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:克隆白血病抑制因子(LIF)基因,测定其序列,构建带 LIF 基因的真核表达载体。方法:通过逆转录 - 聚合酶链式反应(RT - PCR)方法从正常妊娠的子宫蜕膜组织中克隆 LIF 基因,与 T 载体连接,再酶切 T - LIF 载体,获得 LIF 基因,然后将其与质粒 PCDNA3.1(+)连接,构建 PCDNA3.1(+) - LIF 真核表达载体。结果:经酶切和 DNA 测序证明 LIF 基因序列正确,载体构建成功。结论:成功克隆了 LIF 基因,构建了 PCDNA3.1(+) - LIF 真核表达载体,为 LIF 在相应真核细胞内表达及 LIF 蛋白的分离纯化奠定了基础。

【关键词】白血病抑制因子;RT - PCR;基因克隆;真核表达

【中国图书分类法分类号】R392.114 【文献标识码】A 【收稿日期】2004 - 10 - 18

The clone of human LIF gene and construction of its eukaryotic expression vector

LI Fangfei , et al

(*Department of Internal Medicine , College of Basic Medicine , Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To clone LIF gene for the construction of mammalian expression vector PCDNA3.1(+) - LIF. *Methods*: LIF gene was cloned from pregnant uterine decidua tissues by using RT - PCR method, the gene was ligated with T - vector, then LIF gene was excised from T - LIF plasmid and inserted into PCDNA3.1(+) to construct eukaryotic expression vector consisting of LIF gene. *Results*: LIF gene sequence and vector were verified correctly by enzyme digestion, sequence analysis. *Conclusion*: The successful clone of LIF gene and the construction of its mammalian expression vector has been obtained. The results have provided basis for the further studies on LIF.

【Key words】LIF; RT - PCR; Gene clone; Mammalian expression

白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF)是 IL - 6 家族中的一员,实验证明[1],LIF 对维持胚胎干细胞(Embryonic stemcells, ES cells)的未分化状态具有重要作用。LIF 重组蛋白亦是 ES 细胞常规培养体系中的必要因子[2]。将带 LIF 基因的表达载体转染进真核细胞中并带入 ES 细胞培养体系将避免向培养基中添加外源性 LIF 蛋白。本实验从正常人组织中克隆得到 LIF 基因,并构建带 LIF 基因的真核表达载体,将为 LIF 基因在真核细胞中表达奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌株

质粒 PMD18 - T 购自 TaKaRa 公司,质粒 PCDNA3.1(+)、大肠杆菌 DH5α 由本室保存。

1.1.2 工具酶及其他试剂

AMV 逆转录酶、耐热 DNA 聚合酶、RNA 酶抑制剂、限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ、*Xho* Ⅰ、T4DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司,Trizol、Marker(DGL2000)购自鼎国生物公司,质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自上海华舜公司,DEPC 购自 Sigma 公司。

1.1.3 引物设计与合成

根据 LIF 基因全长序列[3]设计引物,5'端引入酶切位点,起始密码子前加 Kozak 结构以增强表达。由大连宝生物公司合成。

引物 1:5' - CGGAATTCCGGCCACCATGAAGGTCTTGGCGGCAGG - 3'

引物 2:5' - CCGCTCGAGCGGAGCACACTTCAAGACCTCCTGCTA - 3'

1.2 方法

作者简介:李芳菲(1979 -)女,博士生,主要研究方向:干细胞生物学

基金项目:重庆医科大学青年基金项目(N0121418251)

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.1 取材

所用器材均经 DEPC 过夜处理。正常妊娠的子宫蜕膜取自人工流产术中刮取蜕膜组织，立即投入液氮中保存待用。

1.2.2 总 RNA 提取

用 Trizol 试剂提取 RNA，凝胶电泳分析，判断 RNA 无降解。

1.2.3 RT－PCR

取 RNA1μl 进行逆转录反应合成 cDNA 第一链，逆转录反应条件：30℃ 10min，40℃ 30min，99℃ 5min。取逆转录反应产物 10μl，用上述根据 LIF 基因全长序列设计的引物进行 PCR 反应，反应体系 50μl，反应条件为：94℃ 预变性 5min，94℃ 30s，60℃ 30s，72℃ 1min 循环 30 次，72℃ 延伸 10min。取 PCR 产物 5μl 进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 带 LIF 基因的真核表达载体的构建

取 PCR 产物 40μl 进行凝胶电泳，胶回收扩增得到的特异性 DNA 片段，用 T4DNA 连接酶将其与 PMD18－T 载体连接，获得重组子 PMD18－T－LIF。再将 PMD18－T－LIF 经 *EcoR* Ⅰ、*Xho* Ⅰ 双酶切后胶回收，同时将质粒 PCDNA3.1(＋)用 *EcoR* Ⅰ、*Xho* Ⅰ 酶切后回收，胶回收片段与胶回收的线性化 PCDNA3.1(＋)载体经 T4DNA 连接酶连接形成真核表达载体 PCDNA3.1(＋)－LIF。*EcoR* Ⅰ、*Xho* Ⅰ 双酶切、PCR 反应鉴定、DNA 测序。

2 结 果

2.1 总 RNA 提取

用提取的 RNA5μl 电泳，可见 28S，18S 两条带清晰(见图 1)，分光光度法测定 OD260/OD280＝1.850，表明 RNA 无明显降解且有较高纯度。

2.2 LIF 基因的克隆

RT－PCR 扩增 LIF 基因得到 657bp 的特异性产物(见图 2)。

2.3 真核表达载体 PCDNA3.1(＋)－LIF 的构建及鉴定

PMD18－T 和 PCDNA3.1(＋)载体本身大小分别为 2.7kb 和 5.4kb。将 LIF 基因克隆到 PMD18－T 载体上得到的质粒为 3.3kb，将其连接到 PCDNA3.1(＋)上得到的质粒大小为 6.1kb。将质粒 PCDNA3.1(＋)－LIF 以 *EcoR* Ⅰ、*Xho* Ⅰ 双酶切后得到 657bp 和 5.4kb 两个片段，以 PCDNA3.1(＋)－LIF 为模板进行 PCR 反应得到大小为 657bp 的特异性片段(见图 2)。将 PCDNA3.1(＋)－LIF 送大连宝生物公司对插入部分进行测序，证实真核表达载体的方向及序列正确。



图 1 总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳

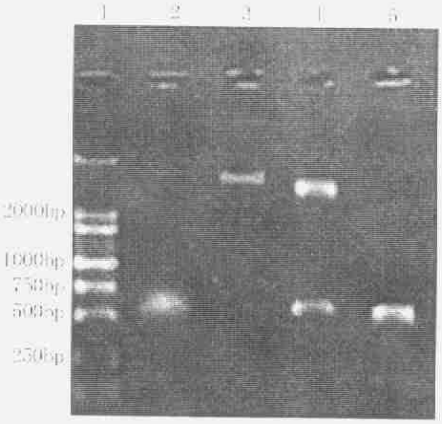


图 2 RT－PCR 产物及 PCDNA3.1(＋)－LIF 的鉴定

1：DGL2000 Marker。 2：LIF 基因 RT－PCR 扩增产物，大小为 657bp 3：PCDNA3.1(＋)－LIF 真核表达质粒，6.1kb 4：PCDNA3.1(－)－LIF 经 *EcoR* Ⅰ、*Xho* Ⅰ 双酶切 5：以 PCDNA3.1(＋)－LIF 为模板的 PCR 产物

3 讨 论

20 世纪 60 年代末，研究者发现了一种能促进小鼠白血病 M1 细胞分化并抑制其生长的诱导因子，命名为 D 因子。Hilton 等人 1988 年从小鼠 Krebs－2 腹水瘤细胞的条件培养液中分离得到 LIF，并证明 LIF 与 D 因子为同一物质。同年，Smith 等发现 LIF 具有抑制鼠胚胎干细胞分化的作用[4]。此后深入研究发现了 LIF 的广泛生物学功能[5]。LIF－LIFR/gp130－Jak－Stat3 是目前已知的维持 ES 细胞未分化状态的主要信号通路，LIF 与 LIFR 受体复合物结合后活化 Stat3，激活转录。此外 LIF 可能协同 IL－3 促进造血干细胞进入细胞周期、刺激巨核细胞集落形成；促进骨的重吸收；参与调节肝细胞中急性期反应蛋白的形成；促进乙酰胆碱的合成和胆碱神经元的分化和成(下转第 107 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

鉴 PEI 治疗的成熟经验，采用旁侧孔穿刺针，B 超实时监视定向穿刺注射以及利用最新的影像学检查手段，发现残存肿瘤组织，对提高肝癌 PSI 疗效也有很大的帮助[6~9]。

因此，稀硫酸对细胞灭活能力强，毒副作用小，有望成为肝癌局部消融治疗的一种新型肿瘤细胞灭活物质。

参 考 文 献

[1] Livraghi T. Percutaneous ethanol injection in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 2001;48(1):20 - 24.

[2] Livraghi T, Benedini V, Lazzaroni S, et al. Long term results of single session percutaneous ethanol injection in patents with large hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 1998;83(1):48 - 57.

[3] 安家驹，译. 公害与毒物[M]. 北京：化学工业出版社，1981;311.

[4] Meloni F, Lazzaroni S, Livraghi T. Percutaneous ethanol injection: single session treatment[J]. Eur J Ultrasound, 2001;13(2):107 - 115.

[5] Livraghi T, Giorgio A, Marin G, et al. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long - term results of percutaneous ethanol injection[J]. Radiology, 1995;197(1):101 - 108.

[6] Choi D, Lim HK, Kim SH, et al. Hepatocellular carcinoma treated with percutaneous radio - frequency ablation: usefulness of power Doppler US with a microbubble contrast agent in evaluation therapeutic response - - preliminary results[J]. Radiology, 2000;217:558 - 563.

[7] Kazumits K, Tsutomu N, Takeshi I, et al. Power Doppler sonography: Evaluation of hepatocellular carcinoma after treatment with transarterial embolization or percutaneous ethanol injection therapy[J]. AJR, 2000;174:337 - 341.

[8] Vogl TJ, Mack MG, Roggan A, et al. Internally cooled power laser for MR - guided interstitial laser - induced thermotherapy of liver lesions: initial clinical results[J]. Radiology, 1998;209:381 - 385.

[9] Chen RC, Chen WT, Liao LY, et al. Intravenous contrast - enhanced Doppler sonography and intra - arterial carbon dioxide - enhanced sonography in the assessment of hepatocellular carcinoma vascularity before and after treatment[J]. Acta Radiol, 2002;43(4):411 - 414.

(上接第 103 页)熟；参与胚胎发育的调控，子宫内膜 LIF 表达缺陷时胚胎不能着床。

人 LIF 基因定位于第 11 号染色体，由 3 个外显子和 2 个内含子组成，基因编码区高度保守。成熟的 LIF 蛋白高度糖基化，分子内部二硫键对于维持 LIF 分子的结构和生物学活性可能起重要作用。在原核系统中表达真核蛋白存在许多困难，影响蛋白质二硫键形成、糖基化等，降低活性，而利用真核表达系统将确保蛋白质修饰，为了获得具有生物活性的 LIF 蛋白，构建其哺乳动物细胞表达系统是十分必要的。真核表达质粒 PCDNA3.1(+)含有高效增强子 SV40，这是一类能促进基因转录活性的顺式调控元件，并且在多克隆位点前有基因启动结构 T7PcMV，具有 Amp 和 Neo 基因，可在原核和真核系统中进行筛选，建立稳定表达目的基因的哺乳动物细胞系。因此把 LIF 基因插入 PCDNA3.1(+)得到的重组质粒将利于转染和表达。

本实验通过 RT - PCR 的方法克隆 LIF 基因，包含起始密码子和终止密码子，含有信号肽编码区，构建含 LIF 基因的真核表达载体，将有利于研究其多方面的生物学作用。为进一步探讨人 LIF 基因在哺乳动物细胞中的高效表达、获得重组人 LIF 蛋白及含 LIF 因子的条件培养基奠定基础。

参 考 文 献

[1] Viswanathan S, Benatar T, Rose - John S, et al. Ligand/Receptor Signaling Threshold(LIST) Model Accounts for gpl30 - Mediated Embryonic Stem Cell Self - Renewal Responses to LIF and HIL - 6[J]. Stem Cells, Mar 2002;20:119 - 138.

[2] Thomson JA, Joseph Itskovitz - Eldor, Sander S, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts [J]. Science, Nov 1998;282:1145 - 1147.

[3] Wright, LS, Li J, Cald well MA, et al. Gene expression in human neural stem cells: effects of leukemia inhibitory factor [J]. Neurochem, 2003;86(1):179 - 195.

[4] Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides[J]. Nature, Dec 1988;336(6200):688 - 690.

[5] Kurzrock R, Estrov Z, Wetzler M, et al. LIF: not just a leukemia inhibitory factor[J]. Endocr. Rev., Aug 1991;12:208 - 217.