维普资讯 http://www.cqvip.com

人IL－3cDNA探针制备及应用*

基础医学院组胚教研室 王亚平** 王 璐 郑 敏 吴 宏 姜 蓉
中国医学科学院血液学研究所 王 勇

提 要 采用多聚酶连反应(PCR)扩增人IL－3cDNA片段，以地高辛(Digoxigenin－11－dUTP)为标记物，随机引物法标记IL－3cDNA探针。探针经斑点杂交和核酸原位杂交证明：用制备IL－3cDNA探针检测细胞IL－3mRNA表达具有特异性强，灵敏度高，使用简便，杂交结果直观，探针可较长时间保存和无放射性污染等优点。

关键词 IL－3; cDNA探针; 核酸原位杂交; 聚合酶连反应
中图分类号 R392－33

目前，IL－3的检测方法主要采用以细胞培养为基础的生物活性测定[1]。由于组织细胞体外培养易受血清中其它生物因子的干扰，其检测的特异性和灵敏性均受到限制，因而难以对实验结果进行准确评价。本文用PCR法制备了人IL－3cDNA探针，建立了在转录水平上直观检测IL－3mRNA表达的实验技术，为研究IL－3的基因表达与调控奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 **质粒与菌种** pUC18－IL－3质粒(含人IL－3cDNA全序列)和大肠杆菌JM109，由第三军医大学复合伤研究所惠赠。

1.2 **主要试剂** 限制性核酸内切酶，地高辛标记试剂盒(Boehringer Mannheim公司产品)；4×dNTP，Taq酶，PCR标记物 (Promega公司产品)；IMDM培养基 (GIBCO公司产品)；rHIL－3和马血清(军事医学科学院提供)。

1.3 **PCR引物设计** 根据Yang等[2]报道的人IL－3cDNA序列，设计一对位于IL－3cDNA编码区的寡核苷酸引物(引物由第三军医大学分子生物学教研室合成)。上游引物位于IL－3cDNA70－86bp；下游引物位于452－468bp，预计PCR产物片段大小为398bp。上游引物P1:5－CCCATGACCCCAGACCAA－3；下游引物P2:5－CTAAAAGATCCGGGAGGC－3。

1.4 **PCR扩增IL－3cDNA片段** 以pUC18－IL－3质粒的hIL－3cDNA为模板，用引物P1和引物P2扩增IL－3cDNA片段。扩增反应体系为：模板500pg，引物P1和P2各25pmol，4×dNTP50μM，Tag酶2u，总体积50μl。扩增条件：94℃90S，55℃90S，72℃60S。共进行40个循环，最后在72℃中延伸10 min。

1.5 **IL－3cDNA探针标记** PCR产物经酚氯仿抽提纯化后，以DIG－11dUTP为底物，随机引物法标记IL－3cDNA探针。标记程序参照宝灵曼公司DIG－High Prime试剂盒操作手册进行。

1.6 **地高辛标记IL－3cDNA探针的同源斑点杂交** 将pUC18－IL－3质粒倍比稀释成4管，点样在尼龙膜上，120℃干烤30min。以地高辛标记的IL－3cDNA片段为探针，进行同源斑点印迹杂交，方法参考文献[3]。同时设立对照实验：(1)只点样DNA稀释液的空白对照；(2)点样pUC18－GM－CSF质粒。

1.7 **原位杂交**

1.7.1 **细胞培养与载片制备** 骨髓基质细胞(BMSC)培养方法参考文献[4]，培养时在皿内放入血盖片使BMSC直接生长在载片上。人胸腺细胞与脾细胞的培养参照文献[5]，培养结束后经离心涂片机甩片到载玻片上。载片经4%多聚甲醛固定30min，放入70%酒精中置－20℃存放备用。

1.7.2 **杂交前处理** 杂交前载玻片经如下处理：0.1%DEPC水浸泡20min，蛋白酶K(1μg/ml)37℃消化20min，0.2%甘氨酸5min，0.2N HCL 20min，0.4%Triton X－100 5min，PBS洗片两次。

1.7.3 **预杂交与杂交** 每张载片加预杂交液20μl，40℃湿盒30min，吸干预杂交液后加杂交液10－20μl(含变性后的IL－3cDNA探针，1μg/ml)，40℃湿盒过夜。

*国家自然科学基金资助课题(89670880)；重庆市中医药管理局资助课题

**男，1956－05出生，教授

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.7.4 杂交后显色 杂交后载玻片经充分漂洗,用含0.2%的羊血清封闭液封闭载玻片30min,加AKP标记的羊抗地高辛(Sheep anti-DIG-AKP)Fab片段,37℃湿盒孵育2 h。以NBT/BCIP为显色系统,37℃显色10h,核固红衬染2 min,脱水,封片,镜下观察。

1.7.5 结果判断 光镜下IL-3mRNA表达阳性细胞的胞浆中可见紫蓝色颗粒,胞核染成红色,每张载片计数200个细胞,求出表达阳性细胞百分率。反应强度根据胞浆中紫蓝色颗粒多少及颜色深浅分为强阳性(+++),阳性(++),弱阳性(+)和阴性(-)四级,分别计数为3,2,1和0分,求积分指数(积分指数=阳性细胞百分率×强度计分)。

1.7.6 对照实验 实验设立阴性对照,包括未加探针进行杂交;用RNase处理载玻片后再进行杂交,所有对照实验均为阴性。

2 结果

2.1 PCR产物鉴定 PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴乙淀(EB)染色,在紫外检测灯下可见一片段大小约为400bp的清晰条带(图1)。片段大小与引物设计时预期结果一致。

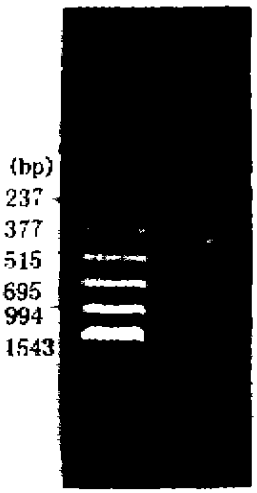


图1 琼脂糖凝胶电泳,见PCR产物大约为400bp.

2.2 IL-3cDNA探针的同源斑点杂交 将地高辛标记的IL-3cDNA探针与pUC18-IL-3质粒进行同源斑点杂交,结果显示IL-3cDNA探针能在pg水平检测出pUC18-IL-3质粒;与pUC18-GM-CSF质粒无交叉反应; 空白对照实验为阴性,提示地高辛标记的hIL-3cDNA探针具有很强特异性和极高的灵敏性。

2.3 骨髓基质细胞(BMSC)IL-3mRNA表达 在静止状态下BMSC的IL-3mRNA 表达水平较低,经IL-1诱导后BMSC的IL-3mRNA表达阳性率和强度明显提高(表1,图2,3)。

表1 骨髓基质细胞IL-3mRNA表达

	阳性率(%)	积分指数
对照组	13.2±2.5 (n=10)	0.16±0.05 (n=10)
IL-1组	37.5±8.6* (n=10)	0.47 ± 0.10* (n=10)

IL-1组:培养体系中加入重组IL-1(终浓度100u/ml)
* $P<0.01$

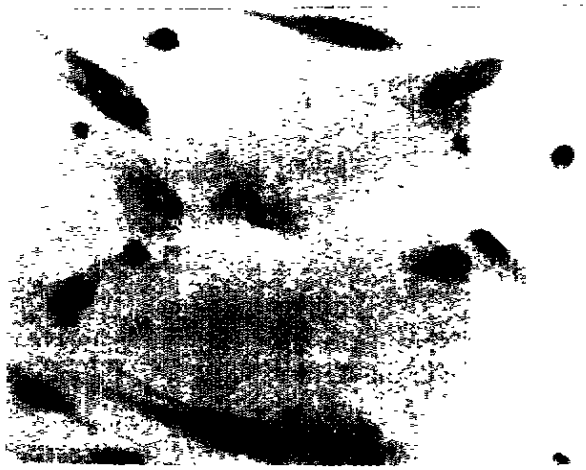


图2 正常静止状态下骨髓基质细胞的IL-3mRNA表达水平很低. ×600

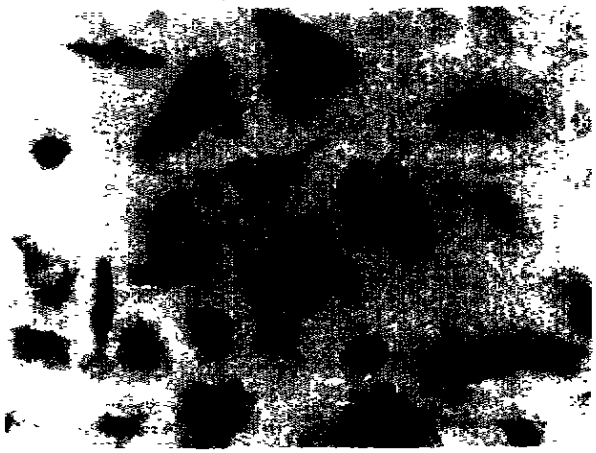


图3 经IL-1诱导后骨髓基质细胞的IL-3mRNA表达显

维普资讯 http://www.cqvip.com

著提高。×600

2.4 人胎胸腺细胞与脾细胞IL－3mRNA表达

胸腺细胞和脾细胞IL－3mRNA杂交信号为阳性，经刀豆素A诱导后其表达阳性率和强度均明显提高(表2,图4)。

表2 人胎胸腺细胞与脾细胞IL－3mRNA表达

	脾细胞		胸腺细胞	
	阳性率(%)	积分指数	阳性率(%)	积分指数
对照组	36.0±7.8	0.21±0.04	54.2±8.5	0.32±0.05
	(n=12)	(n=12)	(n=12)	(n=12)
刀豆素A组	68.2±9.2*	0.48±0.06	87.0±14.5*	0.61±0.11
	(n=12)	(n=12)	(n=12)	(n=12)

刀豆素A组：培养体系中加刀豆素A(Con A,终浓度10μg/ml)
$P<0.01$



图4 经刀豆素A刺激后，人胎脾细胞的IL—3mRNA表达显著提高。×600

3 讨论

造血生长因子(hematopoietic growth factor,HGF)及其相应受体的基因表达是研究造血调控分子生物学机理的核心问题。现代研究认为：HGF与造血细胞膜上相应的HGF受体结合、启动调控信号向核内转导、引起核内某些基因转录增殖或其它基因转录抑制，最终表现出蛋白质合成改变而导致细胞行为等变化[6]。IL－3是十分重要的早期造血调控因子，主要由激活的T细胞,NK细胞等产生，能促进髓系和淋巴系细胞的增殖与分化，又称多功能集落刺激因子(Multi－CSF)[7]。IL－3在体外能促进骨髓有核细胞(BMC)和TF－1细胞增殖，因而目前的主要方法是依据IL－3对BMC或TF－1细胞的增殖实验来检测其生物学活性[1]。该方法的缺点在于难以反应某种细胞或组织IL－3的基因转录水平，而且易受细胞培养中诸多因素，尤其是其它细胞因子的干扰，其准确性亦受到一定影响，特异性也不强。因而探讨和寻找特异性强，灵敏度高的造血生长因子基因表达的检测方法就显得十分重要。

人IL－3cDNA于1986年克隆成功，它由674bp组成，编码152个氨基酸，其中前19个氨基酸是信号肽，成熟的IL－3由133个氨基酸分子组成，为28KDa的糖蛋白[2]。组织细胞核酸分子原位杂交不仅能检测IL－3的基因表达，同时能直观地观察IL－3mRNA在组织与细胞内的定位、分布与半定量。原位杂交的关键在核酸探针的制备。常规cDNA探针制备是通过质粒转化细菌，细菌培养扩增质粒，溶解细菌提取质粒，质粒酶切，电泳分离纯化cDNA片段、片段回收与探针标记等，可见经典方法比较繁锁。用PCR方法制备探针则有以下优点：(1)所需材料简单、只需引物及模板，较易准备，而且可在扩增探针的同时进行标记物掺入，使探针制备与标记一次完成；(2)可控制探针长度，探针长度是影响原位杂交结果的关键因素之一，300bp左右是探针的理想长度[8]。长探针不易进入细胞或细胞核内，因而杂交信号弱；短探针能产生较强信号，但其解链温度值低，易产生较高本底，而PCR法制备探针能较好控制探针的长度。(3)探针特异性高、只要对PCR引物加以选择，就可制备任一区段的特异性序列的探针。本文通过PCR方法制备出人IL－3cDNA探针，其长度约为400bp，经同源斑点杂交证实IL－3cDNA探针具有地高辛掺入率高，特异性强，灵敏度高等优点，适合用于原位杂交。原位杂交结果显示：骨髓基质细胞，人胎脾细胞和胸腺细胞IL－3mRNA阳性表达细胞的胞浆中可见紫蓝色颗粒的杂交信号，经IL－1或刀豆蛋白A诱导后IL－3mRNA表达明显提高，通过计

维普资讯 http://www.cqvip.com

算阳性率和表达强度可检测某一细胞IL－3的转录水平。阴性对照组(未加探针进行杂交;用RNase处理载玻片后再杂交)中各组细胞均无阳性颗粒出现。研究结果表明:PCR法制备的hIL－3cDNA探针用于原位杂交具有操作简便,杂交结果直观,评价准确,同时探针能长期保存和避免放射性污染等优点。

研究为探讨IL－3在组织细胞中的表达及调控奠定了实验技术。应用原位杂交技术能从载片上直接观察细胞与组织的IL－3mRNA表达,若与免疫细胞化学技术结合后,同时可检测IL－3的蛋白表达水平,从而能从基因转录和蛋白表达水平研究IL－3的表达与调控。

参 考 文 献

1.Lange B, et al. Blood 1987;70:192
2.Yang YC,et al. Cell 1986;47:3
3.张贺秋,等. 中国应用生理学杂志 1994:10(2):125
4.王 勇,等. 中华血液学杂志 1995;16(12):648
5.王亚平,等. 重庆医科大学学报 996;校庆特刊 7
6.Lopez AF, et al. Proc Natl Acad Sci U S.A 1987:84:2761
7.Stephanie S,et al. Annu Rev cell Dev Biol 1996;12:91
8.Moench TR, et al. J Virol Methods 1985;11:119

(收稿日期 1999－02－01)

Preparation and application of human IL－3cDNA probe

Wang Yaping, et al
Department of histology and embryology, college of basic medical sciences

By using the techniques of polymerase chain reaction(PCR),human IL－3cDNA probe was prepared with pUC 18－ IL－ 3 plasmid, labeled with digoxigenin－11dUTP and identified with dot blot. We detected the expression of IL－3 mRNA in murine bone marrow stromal cells, human fetal thymocytes and splenic cells by nucleic acid in situ hybridization. The results indicated that the prepared IL－3cDNA probe can provide the sensitivity and simplicity of handling needed to replace radioactiassays.

KEY WORDS IL－3; cDNA probe; In situ hybridization; PCR

肝纤维化和慢性肾功能不全患者血清Ⅳ型胶原浓度测定

基础医学院病理生理教研室 沈 宜* 范维珂
第二临床学院消化内科 何 松
临床学院内科 兰 帆

提 要 用双抗体夹心法建立人血清Ⅳ型胶原的ELISA检测法,方法快速、稳定,灵敏度为16ng/ml,批内变异系数为8.52%,批间变异系数为9.23%,回收率为95.28%,与间质胶原无交叉反应。测定110例健康成人血清Ⅳ型胶原浓度均值是34.36±19.41ng/ml。临床应用于96例肝纤维化及30例慢性肾功能不全患者血清Ⅳ型胶原浓度测定,其均值明显高于正常人浓度,有显著差异。

关键词 Ⅳ型胶原; 肝纤维化; 慢性肾功能不全
中图分类号 R575.2; R692.6

* 女,1963－11出生,讲师