维普资讯 http://www.cqvip.com

137-139 (8) R733.702

B细胞活化因子B7－1cDNA的克隆及其在白血病细胞的表达*

儿科学院免疫研究室 黄贵清** 李成荣 杨锡强 蒋利萍 王莉佳

提 要 利用RT－PCR方法从EBV转化B淋巴细胞中扩增出B7－1cDNA，酶切B7－1基因和逆转录病毒载体PLXSN，连结、克隆PLB7－1 SN到大肠杆菌Mc1061，扩增纯化质粒PLB7－1SN，用PA317细胞包装病毒，NIH3T3细胞筛查病毒滴度，获得高效价的B7－1病毒上清，病毒感染人白血病细胞株K562和HL60，获得稳定表达B7－1分子的肿瘤细胞。

关键词 B7－1基因；重组；逆转录病毒载体；白血病细胞 克隆 B细胞 cDNA
中图分类号 R446.62

B7－1分子是存在于抗原提呈细胞如树突状细胞及活化B细胞膜上的糖蛋白分子，与T细胞表面受体CD28或CTLA4结合协同抗原反应能促进T细胞增殖，产生IL－2。B7－1分子又命名为共同刺激因子。本文利用分子生物学及细胞生物学方法克隆了人B7－1cDNA，并将其导入肿瘤细胞，获得稳定有效的表达。

1 材料和方法

1.1 Olig.$(dT)_{16}$，MLv－RT，dNTP，Taq酶，BamH Ⅰ，EcoR Ⅰ内切酶，Trizol均为Gibco公司产品。红白血病细胞株K562及早幼粒白血病细胞株HL60，由重医汤为学教授赠送，产EBV病毒细胞B958，NIH3T3细胞购自本校病生教研室，PA317细胞由三军医大分子生物学教研室刘昕博士赠送。

1.2 EBV－转化B淋巴细胞株的建立 常规分离健康成人外周血单个核细胞(PBMC)，取1×10^7个细胞，加入EBV病毒上清2ml培养1小时后加环胞霉素A(美国Gibco)1ug/ml，补加新鲜1640培养基8ml，转化4周后传代培养。

1.3 细胞总RNA的提取 收集EBV－B淋巴细胞5×10^6个，Trizol试剂盒提取总RNA。

1.4 寡核苷酸引物制备 根据基因Bank报道序列，计算机设计两对引物，P1，5′－GTGGAGTCTTACCCTGAAATC－3′，P2，5′－CCTAAGAATTCGAAGCCATGGGCCACACACGGAGG－3′，P3，5′－GCCTGCGGATCCTGTTATACAGGGCGTACACTTT－3′，P4，5′－AGGAGAGGGATGGCCAGCCATC－3′，分别于P2，P3，5′端合成BamH Ⅰ和EcoR Ⅰ酶切位点(划线处)。

1.5 RT－PCR扩增B7－1基因 逆转录合成互补cDNA链，以此为模板，P1，P4为外引物，条件94°C3′，55°C2′1个循环，72°C2′，94°C1′，55°C1′35个循环后72°C延伸10′，以此PCR产物为模板，以P2，P3为内引物94°C1′，62°C1′72°C1.5′，94°C30″，62°C30″，35个循环后72°C延伸10′，透析纯化B7－1基因。

1.6 逆转录病毒载体的构建 BamH Ⅰ和EcoR Ⅰ酶切B7－1基因及逆转录病毒载体LXSN，用T4连结酶连结(图1)，转染人大肠杆菌Mc1061，选取氨苄青霉抗性菌落，分别用BamH Ⅰ，EcoR Ⅰ和Sac Ⅰ酶切鉴定。

1.7 B7－1基因测序 分别于载体LXSNEco-

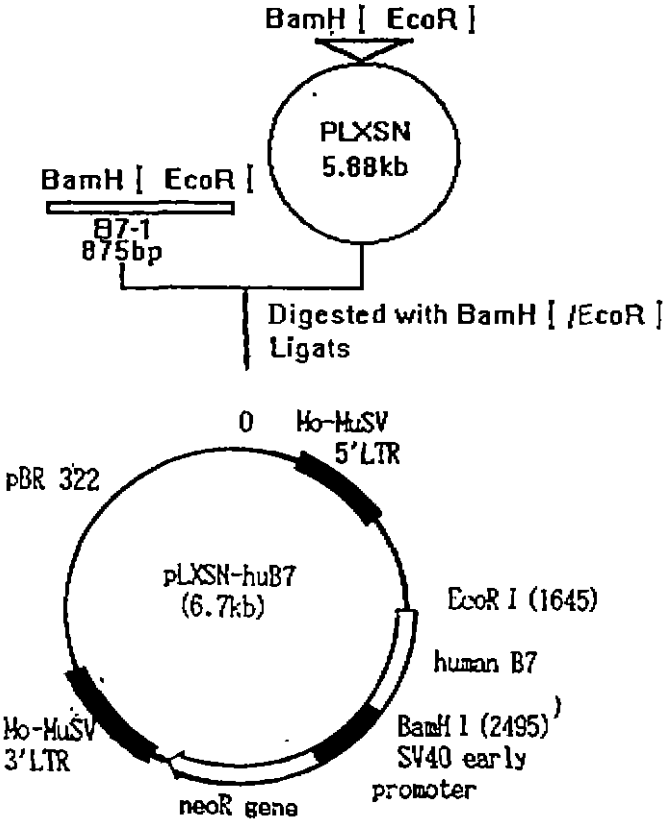


图1 B7－1－逆转录病毒载体构建示意图

* 本课题受国家自然科学基金资助，编号:39470733

** 女，1966－5出生，副教授

维普资讯 http://www.cqvip.com

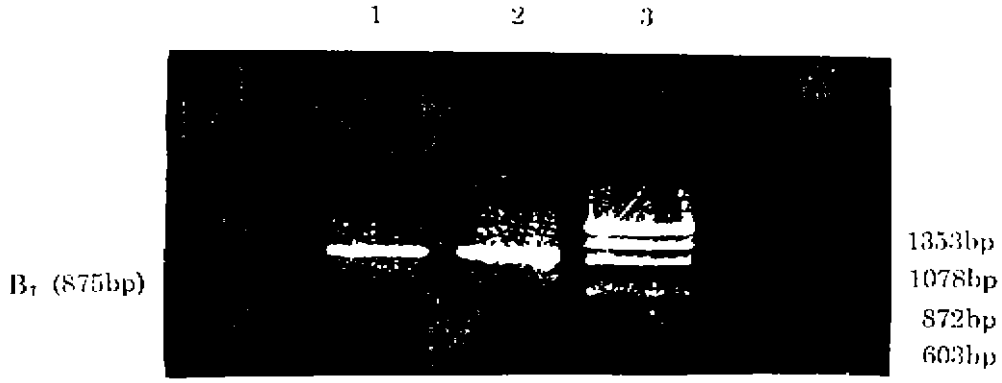


图2 B7－1 PCR产物电泳图
1.从EBV转化B淋巴细胞扩增的B7－1 PCR产物 2.从B7－1转染K562细胞扩增的B7－1 PCR产物 3.φX174 marker

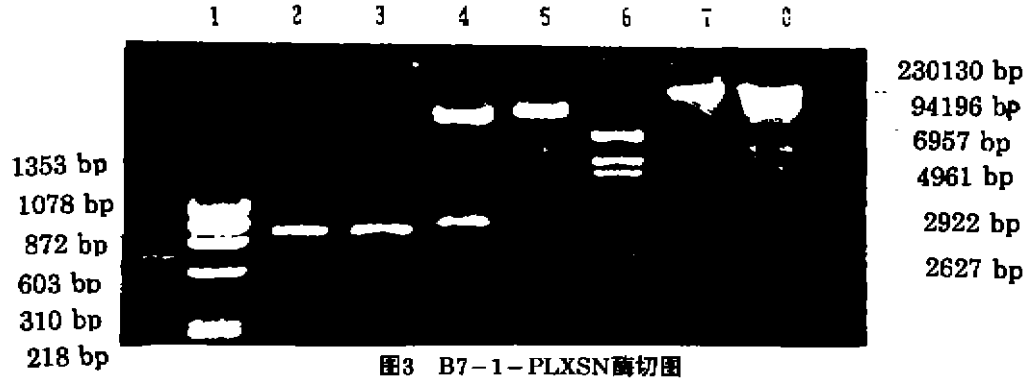


图3 B7－1－PLXSN酶切图
1.φX174 marker
2.B7－1 PCR product from B7－1－PLXSN
3.B7－1 PCR product from EBV－B cells
4.B7－1－PLXSN digested with EcoR Ⅰ and BamH Ⅰ
5.B7－PLXSN digested with BamH Ⅰ
6.B7－1－PLXSN digested with Sac Ⅰ
7.B7－1－PLXSN not digested
8.λ DNA/Hind Ⅲ markdr

R Ⅰ(1645bp)，BamH Ⅰ(2495bp)位点上下合成一对引物，P5,5′－CCC.CCT.TGA.ACCTCCTCGTTP6,5′－GGG CGGGACTATGGTTGCTG－3，采用双脱氧测序法，全自动测序仪ABIPrism377自动测序。

1.8 病毒包装及滴度检测 常规传代培养PA317细胞用磷酸钙沉淀法[1]转染PLB7－1SN和对照载体PLXSN于PA317，病毒上清感染NIH3T3细胞，8天后计数克隆细胞数，得滴度为2×10^5CFU/ml的PA317阳性克隆细胞，扩增后收集上清。

1.9 感染肿瘤细胞 用B7－1病毒上清2ml感染早幼粒白血病细胞株HL60和红白血病细胞K562，获抗G418的阳性克隆株B7－1HL60，HL60－neo(空载体)，B7－1K562和K562－neo，RT－PCR方法检测B7－1mRNA表达。

2 结果

2.1 B7－1cDNA的扩增 电泳结果显示在900bp位置前有一DNA条带，与预期的875bp基本

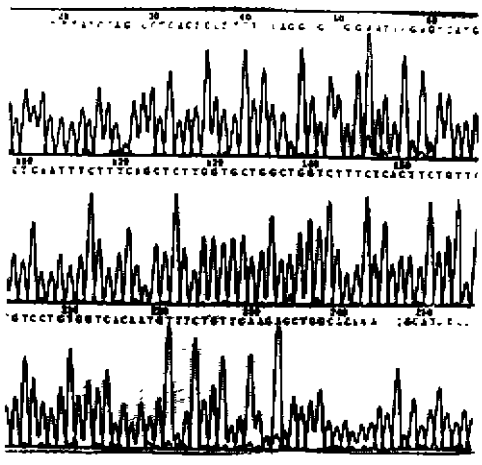


图4 部份B7－1基因序列图谱
显示通过RT－PCR所获的B7－1基因与报导一致

维普资讯 http://www.cqvip.com

相符(图2)。

2.2 重组体B7－1－PLXSN，分别用BamH Ⅰ，EcoR Ⅰ及Sac Ⅰ酶切，电泳观察，BamH Ⅰ消化后得一条带，显示质粒环已打开，BamH Ⅰ，EcoR Ⅰ消化后得载体(5.8kb)及B7－1基因(875bp)两条带，重组体有两个Sac Ⅰ酶切位点，用其酶切后得三条带，分别为1.7kb，1.9kb，3.1kb(图3)。

2.3 PLB7－1SN测序结果，说明B7－1基因与Freeman[2]报道一致(图4)。

2.4 RT－PCR方法从B7－1 PA317和B7－1 HL60，B7－1K562扩增出B7－1基因，其大小与克隆前相同(图2)，从空载体及野生型肿瘤细胞不能扩增出B7－1基因。

3 讨 论

1992年底，Linsly等报道了B7－1在体内的抗肿瘤作用，随后另外几位作者也报道了相似结果[3]从此对B7－1的研究与日俱增。随着免疫学理论的进展，肿瘤免疫机制的研究也越来越深入，现在普遍接受的"双信号学说"为肿瘤免疫治疗提供了依据，而B7－1分子是强有力的信号之一，现在国内外学者均在致力于将B7－1基因用于人类肿瘤的治疗[4,5]。我们采用巢式PCR方法从EBV－B淋巴细胞中扩增出B7－1cDNA，由于B细胞B7－1 mRNA丰度较低，逆转录后的第一条cDNA链数量有限，第一轮PCR产物电泳图上仅有模糊条带，第二轮PCR后条带清晰。所克隆的四个独立的B7－1－PLXSN克隆，酶切分析结果一致，取一个克隆大规模扩增后，其B7－1DNA序列与Freeman等报道的一致。转染重组质粒B7－1－PLXSN至包装病毒细胞PA317，获滴度较高的病毒上清，以其感染白血病细胞株HL60及K562，筛选出抗G418的肿瘤细胞，通过RT－PCR从B7－1阳性肿瘤细胞中扩增出B7－1基因，而从空载体及野生型肿瘤细胞中不能扩增出B7－1基因，为我们进一步研究B7－1基因对肿瘤细胞的治疗作用打下了基础。

参 考 文 献

1.Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular Cloning, A Laboratory Manual,ed,Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989;P321
2.Gordon J., Freeman A., Freeman J.,et al. The Journal of Immunology, 1989;143:2714
3.Chenl A.,Brady W.A.,Cell, 1992;257:792
4.Guo Y., Wu M., Chen H., Science, 1994;263:518
5.Thomas F.G., Renauld J.C. and Aline V.P., et al. The Journal of Immunology, 1995;154:5637

(收稿日期 1997－07－09)

Cloning of B7－1 cDNA and its expression on leukemia cells

Huang Guiqing, et al
Immunology laboratory, College of Pediatrics

B7－1 cDNA was obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT－PCR) and recombined to retroviral vector PLXSN. Calcium phosphate－DNA precipation was used to transfect PLB7SN into packaging cells PA317. Human leukemia cells K562 and HL60 were infected with higher titer of virus. B7－1 gene expression was confirmed by PCR.

KEY WORDS B7－1; Recombinant; Retroviral vector; Leukemia