DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.07.001
第26卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 7
2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

文章编号:1000-5404(2004)07-0561-04

论著

人P56蛋白及其各种缺失突变体酵母表达质粒的构建及鉴定

邓正阳[1],李淑蓉[1],王 蒙[1],王军平[1],廖 兰[2],徐建明[2],蒋建新[1],黄跃生[1],粟永萍[1] ([1]第三军医大学预防医学系全军复合伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[2]美国贝勒医学院细胞与分子生物学实验室)

提 要:目的 构建干扰素诱导蛋白P56及其各种缺失突变体的酵母表达质粒。方法 干扰素诱导HT1080,提取mRNA、RT-PCR获取P56全长及各种缺失突变体的cDNA,以酵母表达质粒pGADT7为载体,构建重组质粒。结果 诱导的HT1080中抽提出P56的mRNA、RT-PCR扩增出P56全长cDNA片段,大小与预期值一致约1 500 bp,以P56全长cDNA为模板PCR获得P56各种缺失突变体并插入pGADT7;正确构建了各种pGADT7-P56酵母表达重组质粒。这些质粒DNA测序结果与理论值一致。结论 P56全长及各种缺失突变体酵母表达质粒的成功构建,为进一步研究P56功能奠定了基础。

关键词:干扰素;P56;RT-PCR;重组质粒
中图法分类号:Q516;Q782;R394-33 文献标识码:A

Construction and identification of the yeast expressive plasmids for human P56 and varied deleted mutants

DENG Zheng-yang[1], LI Shu-rong[1], WANG Meng[1], WANG Jun-ping[1], LIAO Lan[2], XU Jian-ming[2], JIANG Jian-xin[1], HUANG Yue-sheng[1], SU Yong-ping[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; [2]Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, USA)

Abstract: Objective To construct the yeast expressive plasmids of interferon-inducible protein P56 and varied deletion mutants of P56. Methods HT1080 was induced by interferon for the extraction of P56 mRNA. P56 whole length cDNA was obtained by RT-PCR and varied P56 fragments by PCR. The yeast expressive plasmid pGADT7 was used as a carrier to construct the varied recombinant plasmids of pGADT7-P56. Results P56 mRNA was extracted from the inducible HT1080, and the P56 whole length cDNA obtained by RT-PCR was approximately 1500 bp, equal to the expected value. Varied deletion mutants of P56 were acquired by PCR and inserted into pGADT7 using the P56 whole length cDNA as their models. The varied recombinant plasmids of pGADT7-P56 were successfully constructed. The results of sequence analysis of these plasmids (cDNA clones) were consistent with their theoretical values. Conclusion The successful construction of varied yeast expressive plasmids has provided the basis for further studies of the functions of P56.

Key words: interferon; P56; RT-PCR; recombinant plasmid

干扰素是一类具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节作用的重要的细胞因子。它是通过与细胞受体结合,经信号转导,诱生出效应蛋白质来发挥其生物学作用。人体的一些细胞经干扰素诱导后可以大量的增加P56。被干扰素诱导的P56 mRNA是短暂的,但P56的细胞功能报道很少,有待进一步研究。近年来国外的研究表明,P56经病毒、双链RNA、干扰素诱导可以在人体细胞中合成[1]。我们通过酵母双杂交方法证实P56与糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)的相互作用,并对P56与GR的相互作用部位及其功能进行了探讨[2]。本研究拟以能在酵母细胞中高效表达的质粒pGADT7为载体,用RT-PCR法从经干扰素诱导的HT1080[3]细胞中合成P56蛋白;再构建pGADT7-P56全长及各种缺失突变体的重组质粒,为进一步探讨P56基因的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株及干扰素 人HT1080纤维肉瘤细胞购自武汉大学保藏中心,α-干扰素由沈阳三生制药股份有限公司生产。

1.1.2 试剂及耗材 Tripure Isolation Reagent、Agarose Gel DNA Extraction Kit(Roche公司);*Taq*酶、*Bam*HⅠ、*Xho*Ⅰ酶、pMD 18-T Vector、T4 DNA Ligase(TaKaRa公司);oligo(dT)15、dNTP和引物

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054201)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (G1999054201)
作者简介:邓正阳(1962-),女,重庆市人,硕士研究生,主治医师,主要从事创伤应激功能紊乱机制方面的研究。电话:(023)68752283
通信作者:粟永萍,E-mail:Suyping@yahoo.com
收稿日期:2003-09-02;修回日期:2004-01-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(上海生物工程有限公司); AMV Reverse Transcriptase (Promega 公司)。pGADT7 质粒(Clontech 公司)。重组质粒测序由上海申友生物技术有限责任公司完成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人纤维肉瘤细胞(HT1080)采用 IMDM 常规培养,细胞生长至 80%~90%密度加入 α-干扰素 1 000 U/ml,6 h 后收细胞提 RNA,按 Tripure 试剂盒说明书进行。

1.2.2 RT-PCR RT-PCR 按常规方法进行。PCR 引物根据载体 pGADT7 和从 GenBank 中获得人全长 P56 基因序列,片段大小为 1 500 bp。应用 Primer-Premier 5.0 引物设计软件,设计的一系列引物,如表 1。使序列的酶切位点 *Bam*HⅠ 和 *Xho*Ⅰ 之后各种 P56 缺失突变片段的阅读框与 pGADT7 的阅读框相吻合。反转录条件:50 ℃,30 min;99 ℃,5 min;5 ℃,5 min。PCR 条件:94 ℃,2 min;(94 ℃,30 s;58 ℃,30 s;72 ℃,120 s)×36 循环;72 ℃,5 min。产物于 1%琼脂糖凝胶上电泳鉴定纯度和分子量大小。

表 1 一系列缺失突变 P56 的引物

Tab 1 The primers of varied deletion mutants of P56

Fragment	End	Sequence
Whole length P56	5′	5′-CGGGATCCAGATCTCAGAGGAGCCCT-3′
Whole P56	3′	5′-CTCGAGCTGGGTGCCTAAGGACCTT-3′
Δ1P56	5′	5′-CGGGATCCAGATCTCAGAGGAGCCCT-3′
Δ1P56	3′	5′-CCCTCGAGATTTGCTTGGTTGTCAT-3′
Δ2P56	5′	5′-CGGGATCCAGATCTCAGAGGAGCCCT-3′
Δ2P56	3′	5′-CCCTCGAGTTCAGGGTTTTCAGGGT-3′
Δ3P56	5′	5′-CGGGATCCAGATCTCAGAGGAGCCCT-3′
Δ3P56	3′	5′-CCCTCGAGCACCTCAAATGTGGGCT-3′
Δ4P56	5′	5′-CGGGATCCCTGGGTATGCGATCTCT-3′
Δ4P56	3′	5′-CCCTCGAGTGTGCCTTGTAGCAAAG-3′
Δ5P56	5′	5′-CGGGATCCCTGGGTATGCGATCTCT-3′
Δ5P56	3′	5′-CTCGAGCTGGGTGCCTAAGGACCTT-3′
Δ6P56	5′	5′-CGGGATCCAGATAGGGCTTTGCTAC-3′
Δ6P56	3′	5′-CTCGAGCTGGGTGCCTAAGGACCTT-3′

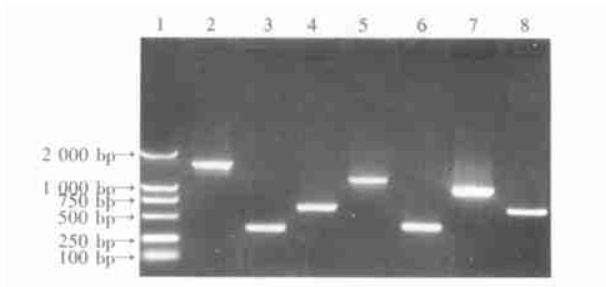
1.2.3 RT-RCR 产物在 pGADT7 上的定向克隆 P56 的 RT-RCR 产物电泳,切胶、回收纯化;再以全长 P56 cDNA 为模板扩增 P56 各种缺失突变片段。PMD 18-Vector 连接回收的 P56 片段,4 ℃冰箱过夜,转化 DH5α;铺板 LB/Amp+ 37 ℃过夜;挑单菌落于 LB 中 37 ℃,250 r/min 摇菌;提取质粒后进行 *Bam*HⅠ 和 *Xho*Ⅰ 双酶切鉴定;电泳;切胶回收酶切后的各种 P56 缺失突变片段,同时用 *Bam*HⅠ 和 *Xho*Ⅰ 酶切 pGADT7 质粒,切胶回收。用 T4 DNA 连接酶连接已用 *Bam*HⅠ 和 *Xho*Ⅰ 酶切的 P56 和 pGADT7,16 ℃,过夜。次日进行转化(方法同前),铺板 LB/Amp+倒置 37 ℃过夜;取阳性单菌落进行扩增;抽提 pGADT7- P56 各种缺失突变片段重组质粒备用。

1.2.4 重组质粒的鉴定 ①PCR 方法:用 P56 片段各自的上游引物、下游引物,样本为 pGADT7- P56 各种缺失突变片段重组质粒进行 PCR,然后电泳鉴定可见 P56 各种缺失突变片段重新出现。②酶切电泳鉴定:重组质粒 pGADT7-P56 各种缺失突变片段用 *Bam*HⅠ /*Xho*Ⅰ 双酶切,然后电泳鉴定目的片段是否插入。③插入片段 DNA 测序鉴定:双向测序,上游测序引物为 T7 启动子序列,下游测序引物为 T3 启动子序列。抽提的重组质粒寄送上海申友生物技术有限责任公司测序。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果

紫外光测定抽提的总 RNA A_{260}/A_{280} 为 1.813 2,RNA 纯度较高。RNA 浓度为 0.39 μg/ml。RT-PCR 产物经电泳后,可见清楚的 1 500 bp 的 P56 条带。全长 P56 条带的大小与 GeneBank 中检索的理论值完全一样。以全长 P56 cDNA 为模板,分别用各自的上下游引物 PCR 扩增 7 个不同长度的 P56 片段,分别为 1P56、2P56、3P56、4P56、5P56、6P56、全长 P56, P56 各种缺失突变片段 PCR 产物大小与预期值一致,如图 1。



1: DL2000 PCR markers; 2: PCR product of whole length P56 fragment (1 500 bp); 3: PCR product of 1 P56 fragment (336 bp); 4: PCR product of 2 P56 fragment (588 bp); 5: PCR product of 3 P56 fragment (1 083 bp); 6: PCR product of 4 P56 fragment (357 bp); 7: PCR product of 5 P56 fragment (909 bp); 8: PCR product of 6 P56 fragment (573 bp)

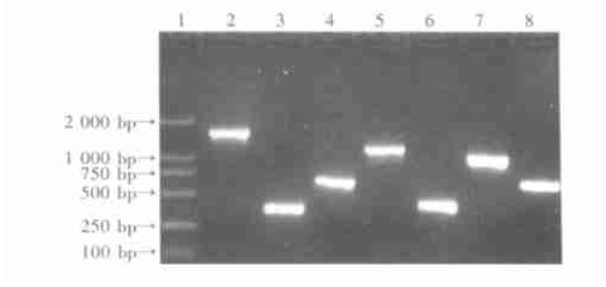
图 1 P56 各种突变体 PCR 扩增产物

Fig 1 PCR amplified products of varied deletion mutants of P56

2.2 定向克隆的结果

2.2.1 连接转化 扩增出的 P56 各种缺失突变片段 PCR 产物回收纯化、装入 T-Vector、双酶切鉴定,酶切片段与线性化 pGADT7 连接。

2.2.2 重组质粒用 PCR 方法鉴定 用 P56 片段各自的上游引物、下游引物,样本为 pGADT7-P56 各种缺失突变体重组质粒进行 PCR,然后电泳鉴定可见 P56 全长及各种缺失突变体重新出现。见图 2。



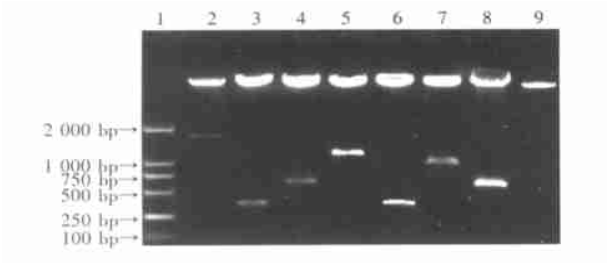
1: DL2000 PCR markers; 2: pGADT7-whole length P56 (1 500 bp); 3: pGADT7-1P56 (336 bp); 4: pGADT7-2P56 (588 bp); 5: pGADT7-3P56 (1 083 bp); 6: pGADT7-4P56 (357 bp); 7: pGADT7-5P56 (909 bp); 8: pGADT7-6P56 (573 bp)

图 2 重组质粒 PCR 鉴定

Fig 2 Identification of the PCR products of recombinant plasmid

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2.3　重组质粒酶切鉴定结果　　用内切酶 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 同时酶切重组质粒 pGADT7-P56 各种缺失突变体。酶切产物电泳, 结果可见相应的位置出现相应大小的条带, 与 P56 全长和各种突变体的大小相符, 见图 3。



1: DL2000 PCR markers; 2: pGADT7-whole length P56/*Bam*HⅠ + *Xho*Ⅰ (8.0 kb+1.500 kb); 3: pGADT7-1P56/*Bam*HⅠ + *Xho*Ⅰ (8.0 kb+0.336 kb); 4: pGADT7-2P56/*Bam*HⅠ + *Xho*Ⅰ (8.0 kb+0.588 kb); 5: pGADT7-3P56/*Bam*HⅠ + *Xho*Ⅰ (8.0 kb+1.083 kb); 6: pGADT7-4P56 /*Bam*HⅠ + *Xho*Ⅰ (8.0 kb+0.357 kb); 7: pGADT7-5P56 /*Bam*HⅠ + *Xho*Ⅰ (8.0 kb+0.909 kB); 8: pGADT7-6P56/*Bam*HⅠ + *Xho*Ⅰ (8.0 kb + 0.573 kb); 9: pGADT7/*Bam*HⅠ + *Xho*Ⅰ (8.0 kb)

图 3　重组质粒双酶切鉴定

Fig 3　Identification of the recombinant plasmid after restriction analysis

2.2.4　重组质粒测序结果　　P56 全长及其各种突变体重组质粒上游以 T7 引物, 下游以 T3 引物为测序引物, 送由上海申友生物技术有限责任公司测序, 测序结果与理论值完全一致。

3　讨论

干扰素(IFN)通过诱导细胞表达多种蛋白质而发挥多种生物学效应[4,5], 是一类具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节作用的蛋白质, 也是最早发现、最早基因克隆化和最早被批准应用于临床治疗的细胞因子, 临床上广泛用于治疗肿瘤和增生性疾病及病毒感染如肝炎、SARS 等[6]。有文献报道它的抗病毒作用在于预先阻断病毒的 RNA 和 DNA 的复制; 抗肿瘤作用在于限制肿瘤细胞的繁殖; 免疫调节作用表现在使用后人体内的相应抗体增多。除上述功能外, IFN 系统也作为研究哺乳动物信号转导和转录调节的模式系统, IFN 结合到相应受体并启动级联系统, 包括酪氨酸的 JAK 家族和转录因子的 STAT 家族, 其引起 IFN 刺激基因(ISGs)的转录诱导。

IFN 诱导蛋白家族包括人类 P54、P56、P58 和 P60; 小鼠 P54、P56 和 P60; 但尚不知其大多数特殊的生化和细胞功能。上个世纪 70 年代末, 几位研究者分别观察到 P56 是人、小鼠和鸡细胞经干扰素处理后诱导的最为丰富的蛋白质[7~10]; 双链 RNA 和病毒也诱导其合成。但 P56 的细胞功能报道很少, 有待进一步研究。Chebath 等[9]对 P56 蛋白进行了分子克隆和部分测序; Wathelet 等[11]克隆了 P56 蛋白的全长 cDNA 并测定其序列。Guo 等[10]研究了编码 P56 的 mRNA 的转录调节, 未经 IFN 处理细胞未检测到 P56mRNA, 但 IFN 处理后快速诱导产生 P56 mRNA, 且 mRNA 水平非常高[6,11~13]。由于 IFN 处理细胞 P56 急剧升高, 由此推测其有重要功能, 但通过检测蛋白的初级结构未得到任何功能线索。因此, 2000 年, Guo 等[10]以 P56 蛋白为诱饵, 通过酵母双杂交技术筛选到 Int-6/P48, 翻译起始因子 eIF-3 的 P48 亚单位与 Int6 相同, P56 通过与 eIF-3 相互作用, 引起特异的和剂量依赖的翻译抑制。P56 存在时, 体内外的蛋白合成被抑制, 因此揭示了哺乳动物细胞中存在一条新的翻译调节通路。P56-eIF-3 通路不需要活化子, P56 的诱导合成足以激发这一抑制通路, 该通路可能是经常观察到的 IFN 对细胞生长抑制作用的主要贡献者。

我们的研究证实人体细胞 HT1080 经干扰素处理后呈急剧升高的变化。我们推测 P56 可能是参与人体重要生命活动的蛋白, 具有重要的细胞功能。P56 与其它蛋白相互作用机制一直是一个引人注目的领域, 进展缓慢, 国内外少见文献报道。本研究所证实了 P56 与糖皮质激素受体(GR)有相互作用。本实验中我们成功的获取 P56 全长及其各种缺失突变体, 并且构建成功 P56 全长及 P56 各种缺失突变体重组酵母表达质粒。它将对参与细胞生命活动的两个重要分子 IFN 和 P56 的许多功能活动作进一步的阐释, 对下一步研究 P56 在人体内的作用奠定了基础, 具有重要的理论意义和临床指导作用。

参考文献:

[1] Bandyopadhyay S K, Leonard G T Jr, Bandyopadhyay T, *et al*. Transcriptional induction by double-stranded RNA is mediated by interferon-stimulated response elements without activation of interferon-stimulated gene factor 3 [J]. J Biol Chem, 1995, 270(33): 19624－19629.

[2] 李淑蓉, 粟永萍, 程天民, 等. 糖皮质激素受体配体结合区的克隆及酵母双杂交诱饵载体的构建和表达[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(12): 1446－1448.

[3] Rasheed S, Nelson Rees W A, Toth E M, *et al*. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080)[J]. Cancer, 1974, 33(4): 1027－1033.

[4] Der S D, Zhou A, Williams B R G, *et al*. Identification of genes differentially regulated by interferon α, β or γ using oligonucleotide arrays[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(26): 15623－15628.

[5] Knight E Jr, Korant B D. Fibroblast interferon induces synthesis of four proteins in human fibroblast cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(4): 1824－1827.

[6] Geiss G, Jin G, Guo J, *et al*. A comprehensive view of regulation of gene expression by double-stranded RNA-mediated cell signaling[J]. J Biol Chem, 2001, 276(32): 30178－30182.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[7] Gupta S L, Rubin B Y, Holmes S L. Interferon action: Induction of specific proteins in mouse and human cells by homologous interferons[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10): 4817—4821.
[8] Peters K L, Smith H L, Stark G R, *et al*. IRF-3-dependent, NFKappa B- and JNK-independent activation of the 561 and IFN-beta genes in response to double-stranded RNA[J]. Proc Nalt Acad Sci USA, 2002, 99(9): 6322—6327.
[9] Chebath J, Merlin G, Metz R, *et al*. Interferon-induced 56, 000 Mr protein and its mRNA in human cells: Molecular cloning and partial sequence of the cDNA[J]. Nucleic Acids Res, 1983, 11(5): 1213—1226.
[10] Guo J, Hui D J, Merrick W C, *et al*. A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3[J]. EMBO J, 2000, 19(2): 6891—6899.
[11] Wathelet M G, Clauss I M, Content J, *et al*. The IFI-56K and IFI-54K interferon-inducible human genes belong to the same gene family[J]. FEBS Lett, 1988, 231(1): 164—171.
[12] Guo J, Peters K L, Sen G C. Induction of the human protein P56 by interferon, double-stranded RNA, or virus infection[J]. Virology, 2000, 267(2): 209—219.
[13] Guo J, Sen G C. Characterization of the interaction between the interferon-induced protein P56 and the Int6 protein encoded by a locus of insertion of the mouse mammary tumor virus[J]. J Virol, 2000, 74(4): 1892—1899.

（编辑 张大春）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)07-0564-02

54例子宫肌瘤保留子宫改良手术治疗分析

Therapeutic analysis of 54 cases of hysteromyoma uterus treated by modified surgical method

程 湘，李 真，杨 鹰，钟序素，林桂兰 （第三军医大学新桥医院妇产科，重庆 400037）

子宫肌瘤是妇科常见病，对于较大的肌瘤目前的治疗仍以手术为主。以往多数医生和患者均采用子宫切除术。近年来随着健康保健意识的增强，有越来越多的患者要求保留子宫，保留其内分泌功能，因而保留子宫手术的人数明显增加。我院自2002年5月后对子宫肌瘤切除术进行了改进，减少了术中出血，术后患者恢复顺利，效果好。至2003年3月共对子宫肌瘤患者进行了保留子宫的改良手术54例，进行总结分析。

1 资料和方法

1.1 资料来源

2002年5月至2003年3月因子宫肌瘤在第三军医大学新桥医院妇产科进行保留子宫手术治疗者54例为改良组。年龄27～50岁，均已生育过。其中40岁以下35人，41～45岁14人，46岁以上5人。临床症状中月经紊乱、腹痛、贫血、肌瘤大于2月孕的例数分别为40、10、7和22人。单发性肌瘤20人，多发性肌瘤34人。选2001年9月至2002年4月在我院按常规方法手术的子宫肌瘤44例为对照组。年龄29～50岁，40例已生育过，4例未生育过。其中40岁以下25人，41～45岁16人，46岁以上3人。临床症状中月经紊乱、腹痛、贫血、肌瘤大于2月孕的例数分别为30、8、4和17人。单发性肌瘤18人，多发性肌瘤26人。

1.2 手术方式的改进

常规方法行肌瘤切除术，即打开腹腔探察后在阔韧带上打洞，用导尿管在子宫峡部水平扎住子宫血管，切开肌壁进行肌瘤剥出手术。我们对手术方法进行了改进，即打开腹腔探察后，暴露子宫于切口下，在子宫峡部水平，用14号导尿管将卵巢固有韧带、输卵管峡部、子宫动静脉一起扎住，阻断子宫的全部血供。切开肌壁剥出肌瘤，用2-0可吸收线缝合子宫肌壁，用4-0可吸收线缝合浅肌层和浆膜层。静脉快速滴入催产素10 U后放开导尿管，于子宫切口上注射蛋白胶止血防粘连，继续静滴催产素（500 ml葡萄糖液加20 U催产素）同时逐层关腹。

1.3 统计学分析

采用 t 检验。

2 结果

2.1 手术情况

常规方法开腹后，对照组患者剥出肌瘤和缝合子宫的时间为20～100 min，平均为（46±8.90）min，出血量为40～600 ml，平均为（220±24.80）ml。改良组患者剥出肌瘤和缝合子宫的时间为10～70 min，平均为（28±6.70）min，出血量为10～40 ml，平均（24±3.60）ml。全部患者手术过程很顺利。多发性肌瘤中肌瘤数目为2～25个。其中包括1例双子宫的多发性肌瘤，肌瘤数目多达17个。

（下转568页）

作者简介：程 湘（1963－），女，重庆市人，博士，副主任医师，副教授 主要从事妇科肿瘤，女性内分泌失调及心理咨询方面的研究，发表论文10篇。电话：（023）65215190

收稿日期：2003-09-05；修回日期：2004-03-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net