DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.015
第25卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 6
498 2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)06-0498-03

人BAFF cDNA的克隆及原核表达载体的构建

高会广,何凤田,李蓉芬,陈 珊,唐 蓓,彭家和,陈 敏,周度金 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 克隆人BAFF(B cell activating factor belonging to the TNF family)全长及128~285片段的cDNA并构建其原核表达载体,为表达和检测其生物学活性做准备。方法 提取HL-60细胞总RNA,经RT-PCR扩增编码人BAFF全长及128~285氨基酸残基的cDNA序列,并将其克隆至载体pUC18和pUC19进行序列测定,然后构建于新型原核表达载体pQE-80L中。结果 RT-PCR扩增得到了858 bp和477 bp的DNA片段,序列分析与GenBank中报道的编码BAFF全长及128~285氨基酸残基的cDNA序列完全一致。结论 BAFF cDNA的克隆及其原核表达载体的构建,为进一步表达和检测其生物学活性奠定了基础。

关键词:BAFF;RT-PCR;克隆;序列分析
中图法分类号:R394-33;R394.3 文献标识码:A

Cloning of human BAFF cDNAs and the construction of their prokaryotic expression vector

GAO Hui-guang, HE Feng-tian, LI Rong-fen, CHEN Shan, TANG Bei, PENG Jia-he, CHEN Min, ZHOU Du-jin (Department of Biochemistry &Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone human BAFF cDNAs and construct their prokaryotic expression vector for expressing and examining their activity. Methods The total RNA was extracted from HL-60 and cDNAs were amplified to encode human BAFF full length and 128—285 amino acid resides by using RT-PCR and ligated into vectors pUC18 and pUC19 for sequence analysis. Then the identified cDNAs were ligated into the new type of prokaryotic expression vector pQE-80L. Results The acquired DNA fragments by RT-PCR amplification 858 bp and 477 bp cDNA were completely the same as the sequence reported in GenBank. Conclusion Cloning of BAFF cDNA and the construction of its prokaryotic expression vector have provided fundamental proof for expressing BAFF and examining its biological activity.

Key words: BAFF; RT-PCR; clone; sequence analysis

BAFF也称为THANK(TNF homologue that activates apoptosis, NF-KB and JNK)、TALL-1(TNF- and apoptosis ligand-related leukocyte expressed ligand 1)、BLyS(B-lymphocyte stimulator)、zTNF4等[1]。它是TNF家族的一个新成员,于1999年首先由Mukhopadhyay等[2]克隆成功。BAFF主要表达于髓样单核细胞系[3],有膜结合型和可溶性两种形式,二者均可诱导B淋巴细胞的增生、分化及存活延长,并可引起免疫球蛋白大量生成,在自身免疫性疾病的发病中起着重要的作用[4];最近,还发现其参与了T细胞的活化与应答[5]。

由于其具有很强的B淋巴细胞刺激功能和T细胞的活化功能,并且由于其抗体及可溶性受体可以阻断BAFF的作用,因此,针对某些免疫功能低下疾病及某些自身免疫性疾病,可以BAFF及其受体为作用靶点来设计和实施治疗方案。本实验以人急性早幼粒白血病细胞系HL-60细胞总RNA为材料,扩增出人BAFF全长及胞外区128~285片段的cDNA序列,并将其克隆于载体pUC18和pUC19进行测序,随后构建于高效表达载体pQE-80L,从而为进一步利用大肠杆菌表达BAFF及检测其生物学活性创造了条件。

1 材料与方法

1.1 材料

HL-60细胞系由重庆医科大学病理生理学教研室提供;质粒pUC-18、pUC-19购自华美公司,pQE-80L由本室保存;RPMI1640培养基及Tripure RNA提取试剂为Roche公司产品;PCR引物由上海生工公司合成;RT-PCR试剂盒及PCR纯化试剂盒为Promega公司产品;限制性内切酶*Eco*RⅠ、*Sal*Ⅰ、*Kpn*Ⅰ和*Hind*Ⅲ购自大连宝生物公司。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271228)
作者简介:高会广(1973—),男,山东省沂南县人,硕士研究生,讲师,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。电话:(023)68752261
通信作者:何凤田,电话:(023)68752262
收稿日期:2002-04-16;修回日期:2002-05-20

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

1.2　方法

1.2.1　HL-60 细胞的培养　　在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中, 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。

1.2.2　细胞总 RNA 的提取　　采用 Tripure 试剂盒提取细胞总 RNA, 操作严格按说明书进行。

1.2.3　RT-PCR 扩增人 BAFF cDNA　　根据 GenBank 中编码人 BAFF 全长及 128～285 氨基酸残基的 cDNA 序列, 设计特异引物, 上游引物分别为 5′-GCG AAT TCA TGG ATG ACT CCA CAG-3′(划线部分为 *EcoR* Ⅰ 酶切位点), 5′-GCG GGT ACC AAC AGC AGA AAT AAG G-3′(划线部分为 *Kpn* Ⅰ 酶切位点), 下游引物分别为 5′-GCG TCG ACT CAC AGC AGT TTC AAT G-3′(划线部分为 *Sal* Ⅰ 酶切位点), 5′-GCG AAG CTT TCA CAG CAG TTT CAA AC-3′(划线部分为 *Hind* Ⅲ的酶切位点)。RT-PCR 按试剂盒说明进行: RNA 1 μg/5 μl, 5× 反应 buffer 10 μl, 上、下游引物各 2 μl, dNTP 1 μl, AMV 反转录酶 1 μl(5 U), Tfl DNA 聚合酶 1 μl(5 U), 25 mmol/L $MgSO_4$ 2 μl, ddH_2O 26 μl, 总体积为 50 μl, 48 ℃ 45min; 94 ℃预变性 2 min, 然后 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 1 min, 68 ℃ 2 min, 40 个循环, 最后 68 ℃延伸 7 min。

1.2.4　扩增产物的鉴定　　分别取 5 μl RT-PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶扫描仪下观察并记录结果。

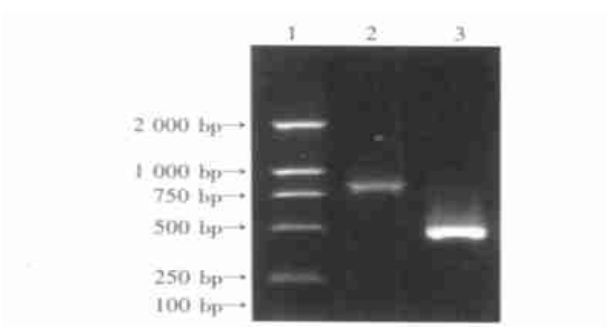
1.2.5　序列测定　　PCR 产物及载体 pUC-18 和 pUC-19 经酶切后分别采用纯化试剂盒进行回收, 按常规连接条件于 16 ℃ 连接 12 h, 分别取 5 μl 连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 经蓝白筛选获得阳性重组子, 继而提取质粒, 经 *EcoR* Ⅰ + *Sal* Ⅰ 或 *Hind* Ⅲ+ *Kpn* Ⅰ 进行酶切鉴定。序列测定由上海生工公司完成。

1.2.6　原核表达载体的构建　　将 pUC19/BAFF 全长和 pUC19/BAFF 128～285 分别进行酶切, 回收目的片段并连接于表达载体 pQE-80L 中, 经蓝白筛选获得阳性重组子, 最后经酶切鉴定, 得到原核表达载体 pQE80L/BAFF 全长和 pQE80L/BAFF 128～285。

2　结果

2.1　RT-PCR 扩增 BAFF 全长及 128～285 的 cDNA

扩增产物行电泳后, 可见清晰条带, 片段大小分别约为 860 bp 和 480 bp, 见图 1。



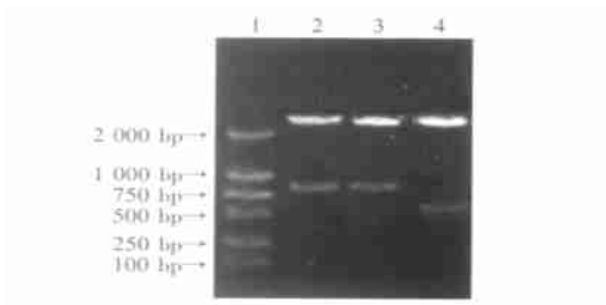
1: DNA marker DL2000; 2: BAFF full length cDNA amplified by RT-PCR; 3: BAFF 128～285 cDNA amplified by RT-PCR

图 1　RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1　Map of RT-PCR product in agarose gel electrophoresis

2.2　阳性重组子的筛选

阳性重组子 pUC18/BAFF、pUC19/BAFF 和 pUC19/BAFF128-285 经酶切后, 分别可见约为 860、860、480 bp 大小的目的片段, 见图 2。



1: DNA marker; 2: Recombinant pUC18/BAFF full length vector/ *Eco* RI + *Sal* I; 3: Recombinant pUC19/BAFF full length vector/ *Eco* RI + *Sal* I; 4: Recombinant pUC19/BAFF 128～285 vector/ *Kpn* I + *Hind* III

图 2　重组质粒的酶切鉴定

Fig 2　Restriction map of recombinant vector

2.3　序列测定

所获针对 BAFF 全长的 cDNA 序列如下:

```
                ATGGA   TACTCCACAG   AAAGGGAGCA   GTCAGGCCTT   ACTTCTTGCC
TTAAGAAAAG  AGAAGAAATG   AAACTGAAGG   AGTGTGTTTC   CATCCTCCCA   CGCAAGGAAA
GCCCCTCTGT   CCGATCCTCC   AAAGACGGAA   AGCTGCTGGC   TGCAACCTTG   CTGCTGGCAC
TGCTGTCTTG   CTGCCTCACG   GTGGTGTCTT   TCTACCAGGT   GGCCGCCCTG   CAAGGGGACC
TGGCCAGCCT   CCGGGCAGAG   CTGCAGGGCC   ACCACGCGGA   GAAGCTGCCA   GCAGGAGCAG
GAGCCCCAAA   GGCCGGCTTG   GAGGAAGCTC   CAGCTGTCAC   CGCGGGACTG   AAAATCTTTG
AACCACCAGC   TCCAGGAGAA   GGCAACTCCA   GTCAGAACAG   CAGAAATAAG   CGTGCCGTTC
AGGGTCCAGA   AGAAACAGTC   ACTCAAGACT   GCTTGCAACT   GATTGCAGAC   AGTGAAACAC
CAACTATACA   AAAAGGATCT   TACACATTTG   TTCCATGGCT   TCTCAGCTTT   AAAAGCGGAA
GTGCCCTAGA   AGAAAAAGAG   AATAAAATAT   TGGTCAAAGA   AACTGGTTAC   TTTTTTATAT
ATGGTCAGGT   TTTATATACT   GATAAGACCT   ACGCCATGGG   ACATCTAATT   CAGAGGAAGA
AGGTCCATGT   CTTTGGGGAT   GAATTGAGTC   TGGTGACTTT   GTTTCGATGT   ATTCAAAATA
TGCCTGAAAC   ACTACCCAAT   AATTCCTGCT   ATTCAGCTGG   CATTGCAAAA   CTGGAAGAAG
GAGATGAACT   CCAACTTGCA   ATACCAAGAG   AAAATGCACA   AATATCACTG   GATGGAGATG
TCACATTTTT   TGGTGCATTG   AAACTGCTGT   GA
```

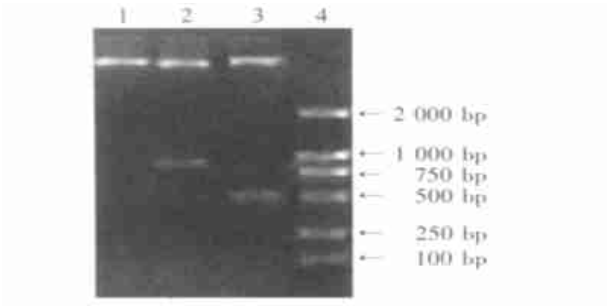
所获针对 BAFF128～285 氨基酸的 cDNA 序列如下:

```
                AACAG   CAGAAATAAG   CGTGCCGTTC   AGGGTCCAGA   AGAAACAGTC
ACTCAAGACT   GCTTGCAACT   GATTGCAGAC   AGTGAAACAC   CAACTATACA   AAAAGGATCT
TACACATTTG   TTCCATGGCT   TCTCAGCTTT   AAAAGCGGAA   GTGCCCTAGA   AGAAAAAGAG
AATAAAATAT   TGGTCAAAGA   AACTGGTTAC   TTTTTTATAT   ATGGTCAGGT   TTTATATACT
GATAAGACCT   ACGCCATGGG   ACATCTAATT   CAGAGGAAGA   AGGTCCATGT   CTTTGGGGAT
GAATTGAGTC   TGGTGACTTT   GTTTCGATGT   ATTCAAAATA   TGCCTGAAAC   ACTACCCAAT
AATTCCTGCT   ATTCAGCTGG   CATTGCAAAA   CTGGAAGAAG   GAGATGAACT   CCAACTTACA
ATACCAAGAG   AAAATGCACA   AATATCACTG   GATGGAGATG   TCACATTTTT   TGGTGCATTG
AAACTGCTGT   GA
```

2.4　重组原核表达载体的构建

pQE-80L/BAFF 和 pQE-80L/BAFF 128～285 经酶切后, 分别可见约为 860 和 480 bp 大小的目的片段, 见图 3, 表明重组原核表达载体构建成功。

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



1: pQE-80L/*Kpn* Ⅰ + *Hind* Ⅱ; 2: pQE-80L/BAFF/*Eco*R Ⅰ + *Sal* Ⅰ; 3: pQE-80L/BAFF128/*Kpn* Ⅰ + *Hind* Ⅲ; 4: DNA marker DL2000

图3 重组原核表达载体的酶切鉴定

Fig 3 Restriction map of recombinant prokaryotic expression vectors

3 讨论

人BAFF分子是由285个氨基酸组成的Ⅱ型跨膜蛋白,N末端在胞内无信号肽,C末端为胞外区,其中47~73氨基酸为跨膜区,74~285氨基酸为胞外区,133~285氨基酸为其发挥功能的主要区域。BAFF128~285位氨基酸残基区域含有与受体结合的结构域,其融合蛋白可以三聚体的形式发挥与全长BAFF一致的作用[6],在体外它们可以刺激B淋巴细胞的增生,诱导免疫球蛋白的产生,BAFF缺陷动物会出现成熟B细胞数目减少[7],而过度表达BAFF的动物则表现出成熟B细胞增生和自身免疫性疾病。因此,所获BAFF,可为自身免疫性疾病和免疫缺陷疾病的治疗奠定物质基础。本实验以人急性早幼粒白血病细胞系HL-60细胞总RNA为材料,经RT-PCR扩增出BAFF全长及BAFF128~285的cDNA序列,并构建了其原核表达载体,为进一步制备BAFF和研究BAFF在自身免疫性疾病等方面的作用创造了条件。

另外,我们所采用的原核表达载体pQE-80L是一种高效表达载体,该载体表达的目的蛋白量可达细胞蛋白总量的50%,表达蛋白的N端带有6×His-tag,便于纯化和检测。为此,本研究选择了该载体进行BAFF的表达。

参考文献:

[1] Wu Y, Bressette D, Carrell J A, *et al*. Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLyS[J]. J Biol Chem, 2000, 275(45): 34478-34485.

[2] Mukhopadhyay A, Ni J, Zhai Y, *et al*. Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, α TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaβ, and c-jun NH_2-terminal kinase[J]. J Biol Chem, 1999, 274(23): 15978-15981.

[3] Nardelli B, Belvedere O, Roschke W, *et al*. Synthesis and release of B lymphocyte stimulator from myeloid cells[J]. J Immmunol, 2001, 166(1): 6-10.

[4] Zhang J, Viktor R, Kevin P B, *et al*. Cutting Edge: A Role for B Lymphocyte Stimulator in Systemic Lupus Erythematosis[J]. J Immunol, 2001, 166(1): 6-10.

[5] Huard B, Schneider P, Mauri D, *et al*. T cell costimulation by the TNF ligand BAFF[J]. J Immunol, 2001, 167(11): 6225-6231.

[6] Schneider P, MacKay F, Steiner V, *et al*. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. J Exp Med 1999, 189(11): 1747-1756

[7] Batten M, Groom J, Cachero T G, *et al*. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes[J]. J Exp Med, 2000, 192(10): 1453-1466.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)06-0500-01

3例Dieulafoy病内镜下的诊断和治疗

Diagnosis and therapy of 3 cases of Dieulafoy's disease under endoscopy

李向红, 杨仕明, 杨建民, 王振华, 房殿春 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心, 重庆 400038)

病例1 男, 59岁, 因"反复间歇性黑便9年, 再发4 d"入院。1992年因黑便行胃镜检查, 诊断为壶腹部溃疡伴出血, 经治疗后好转。4 d前再次出现柏油样大便, 不伴腹痛、反酸等症状, 病前无饮酒及口服非甾体类药物病史。胃镜检查, 发现壶腹部前壁小弯侧可见一线性瘢痕, 粘膜聚集征明显, 无活动性出血, 胃腔内有中等量咖啡样液体, 胃窦小弯侧可见少量鲜红色血液呈搏动性涌出, 出血点周围粘膜正常, 未见溃疡及糜烂, 考虑为Dieulafoy病, 行内镜下钛夹夹闭术, 生理盐水冲洗出血部位, 未见活动性出血后退镜。

病例2 男, 39岁, 因"反复间歇性黑便13年, 再发2 d"入院。因黑便行胃镜检查, 未发现异常, 考虑急性胃粘膜病变可能性大, 经制酸、止血治疗后好转。入院前2 d再次出现不明原因的黑便, 不伴有反酸、嗳气、腹痛, 无饮酒及服药史。胃镜示胃窦前壁小弯侧见暗红色血液覆盖, 生理盐水冲洗后, 可见较多鲜红色血液流出, 无明显的搏动性, 考虑Dieulafoy病内镜下

(下转504页)

作者简介: 李向红(1970-), 女, 湖南省岳阳县人, 主管护师, 主要从事消化内镜护理方面的研究。电话: (023)68754678

收稿日期: 2003-01-06; 修回日期: 2003-02-20

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