DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.02.010
第22卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 2
2000年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)02-0123-03

高亲和力 IgE 受体 α 链 cDNA 的克隆及序列测定

孙仁山[1],胡川闽[2],刘荣卿,王延江[2],胡厚祥[3] (第三军医大学:[1]附属西南医院皮肤科;[2]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所;重庆 400038;[3]附属大坪医院野战外科研究所心血管内科,重庆 400042)

提 要 目的:为获得编码高亲和力 IgE 受体(Fcε R1)α 链的 cDNA 序列。方法:从正常人外周血中富集嗜碱性粒细胞,提总 RNA 进行 RT-PCR,分子克隆,用自动测序及放射自显影测序。结果:分离并鉴定了该 cDNA 重组子,在 159 密码子及 185 密码子分别发现了 CAC→CGC 与 TAT→CAT 置换。结论:建立了一个编码 Fcε R1 膜外区 α 链的 cDNA 重组子克隆,它不含引导肽序列,可能是一个来自中国人的该基因的变异体。

关键词 高亲和力 IgE 受体;α 链;分子克隆
中图法分类号 R392.13;R394-3 文献标识码 A

Molecular cloning and sequencing of alpha chain cDNA of high affinity IgE receptors from Chinese people

SUN Ren-shan, HU Chuan-min, LIU Rong-qing, WANG Yan-jiang, HU Hou-xiang (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To obtain the cDNA sequence encoding the alpha subunit of high affinity IgE receptors. Methods: Basophils were enriched in Chinese person. After the total RNA was extracted, RT-PCR and cloning were carried out. The sequence was determined with automated DNA sequencing and autoradiography. Results: The cDNA recombinant was sequenced and characterized. It had two transitions at codon 159 CAC→CGC and 185 TAT→CAT. Conclusion: One recombinant was constructed. It contains the cDNA sequence encoding for the extracellular domain of the alpha subunit without the leading peptide sequence. Therefore, it may be a variant from Chinese people.

Key words high affinity IgE receptor; alpha chain; molecular cloning

高亲和力 IgE 受体(Fcε R1),主要表达于肥大细胞及嗜碱性粒细胞表面,与过敏性炎症形成密切相关。近年发现嗜酸粒细胞、郎罕氏细胞及单核细胞也可表达这种受体,参与抗寄生虫感染、抗原提呈等病理生理活动。最近有报道[1],抗 Fcε R1 自身抗体可以激活肥大细胞和嗜碱粒细胞参与部分慢性荨麻疹的发生。Fcε R1 是一种异四聚体结构,由 1 条 α 链、1 条 β 链、2 条 γ 链构成,α 链是 IgE 的结合部位。人 α 链 cDNA 最初由国外学者克隆成功[2],而中国人该基因的结构尚未见报道。为了深入研究 Fcε R1α 链的结构与功能以及其相关细胞的激活机制,本文以 RT-PCR 方法首次克隆了中国汉族人 Fcε R1 膜外区 α 链 cDNA,并进行了测序及序列分析。

1 材料与方法

1.1 细菌菌株和质粒载体

大肠杆菌 JM109 为本室保存菌种,pUC19 质粒购自华美生物工程公司。

1.2 工具酶及其它试剂

DNA 限制性内切酶 *Hind* Ⅲ、*Bam* Ⅰ及 AMV 反转录酶均购自华美生物工程公司;T7 DNA 测序试剂盒购自 Promega 公司;^{32}P-dATP 为北京亚辉公司产品;T7 启动子测序引物 5′-ATTATGCTGAGTGATATCCCGCT-3′由中科院上海细胞所合成。质粒快速抽提试剂盒为宝灵曼公司产品。

1.3 嗜碱性粒细胞的富集[3]

选取 1 名健康献血员,该献血员无家族性遗传病史,从其肘静脉采肝素抗凝血 10 ml 与等体积 pH 7.6 Hepes-ACM 缓冲液混合,平铺于 10 ml Ficoll-Hypague(密度 1.085)的上面,离心 20 min,取中间层细胞,加入上述缓冲液 40 ml,再次离心 15 min,弃

作者简介:孙仁山(1964.10),男,河南省博爱县人,博士,主治医师,讲师,主要从事高亲和力 IgE 受体的克隆与表达方面的研究,发表论文 5 篇。电话:(023)68752278
收稿日期:1999-08-26;修回日期:1999-12-22

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

上清,制备成富含嗜碱性粒细胞的悬液。

1.4 总 DNA 提取及 cDNA 第一链合成

上述细胞沉淀物,加入 500 μl 变性液,1.6 μl β-巯基乙醇,充分混匀,然后酚氯仿抽提,该步骤所有的实验用品均事先进行去 RNase 处理。反转录按下述体系进行,$MgCl_2$(25 mmol/L)4 μl,10×buffer 2 μl,10 mmol/L 4×dNTP 2 μl,总 RNA 2μl(2 mg),oligo(dT)15 2 μl,H_2O 6.5 μl 混匀,68℃变性 5 min,室温放置 15 min 后,再加入 RNasin(40 U/μl)0.5 μl,AMV 反转录酶(50 U/μl)1 μl,42℃水浴 1 h,95℃变性 5 min,置-20℃备用。

1.5 PCR 引物设计及目的片段的扩增

按照引物设计原则,根据人 α 链 cDNA 序列,拟扩增膜外区 α 链不含信号肽的 cDNA 序列(αt),设计引物并经计算机辅助检索符合要求,由上海 Sangong 公司合成。引物序列如下:

P1,5′-ctaagcttgtccctcagaaacctaagg-3′(划线处为 *Hind* Ⅲ酶切点)

P2,5′-tcggatcctcattatagccagtac-3′(划线处为 *BamH*Ⅰ酶切点)

以上步骤反转录产物为模板进行 PCR 扩增。循环参数为 94℃ 60 s,55℃ 90 s,72℃ 60 s,35 个循环后 72℃延伸 30 min。2% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.6 重组质粒构建

PCR 扩增的目的片段经 *Hind* Ⅲ/*BamH*Ⅰ酶切后,用"V"型槽回收,然后与相应粘性末端的 pUC19 进行连接反应。

1.7 连接产物的转化及重组子的筛选和鉴定

取 5 μl 连接产物转化受体菌 JM109 的感受态细胞,挑取具有氨苄青霉素(AP)抗性的菌落于 5 ml 含 AP 的 LB 培养基中,37℃振摇过夜培养。碱裂解法小量快速提取质粒 DNA 进行双酶切鉴定。

1.8 DNA 序列测定

自动测序由北京中科院病毒所进行。手工测序按双脱氧链终止法测序试剂盒说明书进行。简述如下:用质粒抽提试剂盒提取经双酶切鉴定的重组克隆质粒,用 NaOH 进行模板变性,而后加入测序引物进行退火反应,再用^{32}P-dATP 标记,最后是终止反应。样品于 80℃变性 30 min 后,以 40 W 电泳 3 h,最后进行揭胶干胶及放射自显影。

2 结果

2.1 PCR 扩增 α 链 cDNA 片段

用自行设计的引物进行 PCR 扩增,产物经 2%的琼脂糖凝胶电泳,发现主条带的分子量大小与我们的预计值一致,约为 559 bp,见图 1。

2.2 重组质粒的构建与鉴定

PCR 产物酶切纯化后,克隆至 pUC19 质粒,命名为 pUC19/αt。PUC19/αt 经 *Hind* Ⅲ/*BamH*Ⅰ酶切后,从电泳图谱上可看到两条带,一条为 2.7 kb 的 pUC19 载体,另一条与 PCR 产物的主条带迁移距离一致,约为 559 bp,见图 1。

2.3 DNA 序列测定

为了得到正确的 cDNA 序列,自动测序从正反两个方向进行,同时进行了手工放射自显影测序。结果与基因库中的碱基序列对比,发现 159 位密码子由 CAC 置换成了 CGC,185 位密码子由 TAT 置换成了 CAT,见图 2、3。

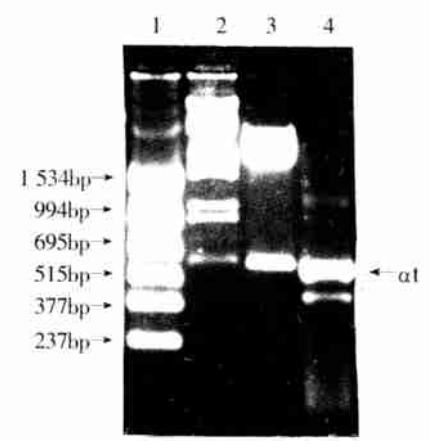


图 1 PCR 产物及重组子鉴定

Fig 1 Identification of the PCR product and the recombinant

1:PCR Markers;2:λ DNA/*Hind* Ⅲ+*EcoR* Ⅰ;3:pUC19/αt digested by *Hind* Ⅲ and *BamH* Ⅰ;4:PCR products

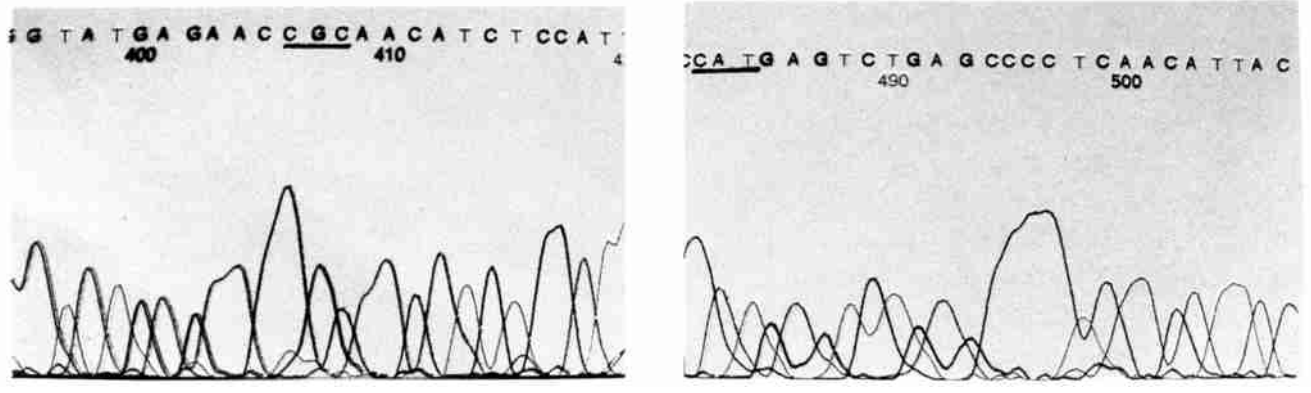


图 2 αt cDNA 的自动测序

Fig 2 Automation sequencing of αt cDNA

Upper:Codon 159 CAC→CGC transition; Lower:Codon 185 TAT→CAT transition

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

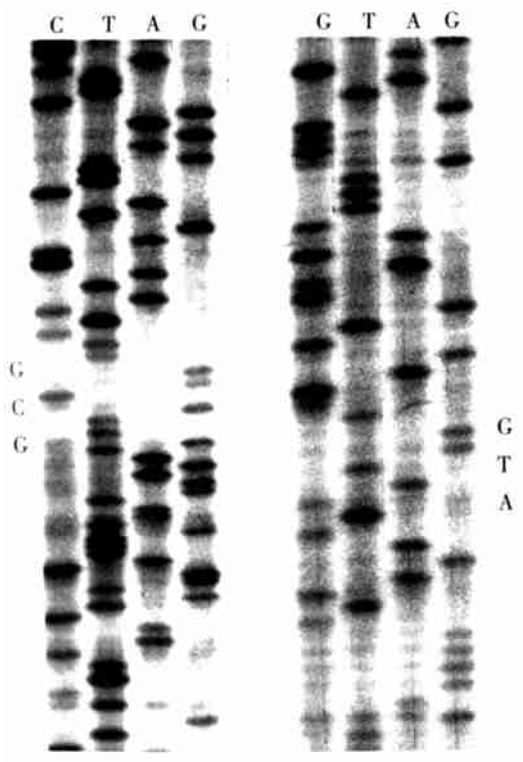


图 3　αt cDNA 的手工测序

Fig 3　Manual sequencing of αt cDNA

Left: Codon 159 GTG→GCG (ie, CAC→CGC as to the complementary strand) transition; Right: Codon 185 ATA→GTA (ie, TAT→CAT as to the complementary strand) transition

3　讨论

Fc ε R1 是介导过敏等炎症反应的重要受体, Fc ε R1 的功能主要是由结合于该受体上的 IgE 交联所启动, 近年研究[4,5] 表明, 部分慢性荨麻疹患者血清内含抗 Fc ε R1 自身抗体, 抗 Fc ε R1 的抗体与膜受体结合后, 可以直接活化效应细胞。Fc ε R1 膜外区 α 链 cDNA 的克隆成功, 为制备探针研究其体外和体内的表达及功能, 探讨过敏性疾病的发生机制及应用于疾病的诊断打下了基础。RT-PCR 能否成功的关键因素之一为模板 RNA 的丰度, 本实验的模板 RNA 为 Fc ε R1α 链 mRNA, Fc ε R1 主要表达于肥大细胞与嗜碱粒细胞表面, 本实验曾采用分离纯化正常皮肤中肥大细胞的方法, 但因步骤繁琐获得量低, 而未再采用这种方法。尽管采用外周血富集嗜碱粒细胞, 最后的富集嗜碱粒细胞溶液中, 含有其它的白细胞, 但该方法简单、可靠, 且其它细胞的掺入并不干扰目的 mRNA 丰度, 最后实验的成功证明了该方法的可行性。本实验的 PCR 循环参数经过 3 次变动, 这 3 次变动主要是退火温度的变化, 退火温度越高, 模板与引物结合的特异性越强, 愈容易扩增出特异的目的片段, 但温度太高, 有可能使引物与模板不退火。我们的实验证明上述理论的正确性, 第一次我们用 50°C 的退火温度, 几乎没有任何产物; 当退火温度提高至 55°C 时, PCR 产物为 Smear; 当提高温度至 61°C 时, 才产生出清晰的目的条带。

在手工放射自显影测序中, 模板 DNA 要求纯度高, 断裂少。为保证模板 DNA 纯度, 一般需对提取的双链 DNA 以聚乙二醇沉淀法或氯化铯梯度离心法进行纯化, 或从琼脂糖凝胶中回收双螺旋 DNA, 以避免开环和线状 DNA 的污染。本实验利用质粒抽提试剂盒提出质粒 DNA, 能够满足测序反应的需要, 步骤简单、节省时间且效果良好。实验表明, 本实验的测序反应可较好地读出 300 个核苷酸序列。在实验中, 数次测序反应表明, αt cDNA 对比 Kochan[2] 报道的 cDNA 序列存在密码子 159 位的 CAC→CGC 置换; 密码子 185 位的 TAT→CAT 的置换。所以我们认为, 本实验所获得的 αt cDNA 序列可能为来自于该基因在中国人群中的变异体或基因亚型 (Variant), 其生物学意义尚待进一步探讨。

参考文献

[1] Sabroe R A, Greaves M W. The pathogenesis of chronic idiopathic urticaria[J]. Arch Dermatol, 1997, 133(8): 1 003—1 008.

[2] Kochan J, Pettine L F, Hakimi J, *et al*. Isolation of the gene coding for the alpha subunit of the human high affinity IgE receptor[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16(8): 3 584—3 588.

[3] 顾明亮, 张学智 . 真菌过敏性哮喘患者嗜碱性粒细胞释放能力和总 IgE 的观察[J]. 山东医科大学学报, 1996, 34(4): 322—323.

[4] Ferrer M, Kinet J, Kaplan A P, *et al*. Comparative studies of functional and binding assays for IgG anti-Fc ε R1 α (α-subuntit) in chronic urticaria[J]. J Allergy clin Immunol, 1998, 101(5): 672—676.

[5] Tong L, Balakrishnan G, Kochan J P, *et al*. Assessment of autoimmunity in patients with chronic urticaria[J]. J Allergy Clin Immunol, 1997, 99(4): 461—465.

（编辑　王　红）

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