DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.05.020

人嗜酸性细胞趋化素基因 cDNA的分离及序列分析

时凤丽* 邹民吉** 王嘉玺** 府伟灵 (第三军医大学附属西南医院检验科基因诊断和治疗中心) 重庆, 400038

提 要 目的: 分离编码人嗜酸性细胞趋化素(hEot)的基因 cDNA,并将它克隆至质粒 pUC18中进行核苷酸序列分析。方法: 采用 TNFα 刺激人肺上皮细胞提取总 RNA,利用 RT-PCR方法获得了 hEot的 cDNA,并将其定向插入 pUC18载体中进行核苷酸序列。结果: DNA序列分析表明分离的 hEot cDNA的序列与文献报道的完全一致。结论: 本研究获得了序列正确的 hEot基因 cDNA,为下一步的研究打下基础。

关键词 人嗜酸性细胞趋化素; RT-PCR;基因;序列

中图法分类号 R329.2; R394-3

1993年在致敏原刺激的豚鼠支气管肺泡灌洗液中鉴定出一种嗜酸性细胞趋化物,命名为嗜酸性细胞趋化素(Eotaxin, Eot)[1]。1996年人嗜酸性细胞趋化素(hEot)也得到克隆[2~4]。Eot是一种高度特异性的嗜酸性细胞趋化因子,它主要存在于呼吸道上皮细胞及肠道上皮细胞中[2,5]。Eot的存在有助于解释一些炎症部位嗜酸性细胞的高度选择性聚集,进一步解释哮喘及其它疾病的发生机制。目前国内尚未见到对 Eot的研究报道,我们利用逆转录 PCR获得了 hEot cDNA,并构建载体对其序列测定,测序结果与文献报道的完全一致。这将有利于进一步详尽研究其生物学活性。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

质粒 pUC18购自华美公司; *E. coli* DH5α 系由军事医学科学院三所三室保存。

1.2 细胞及培养基

人肺上皮细胞 A549由军科院五所苑锡同老师惠赠。RPMI 1640培养基购自 GIBCO公司,小牛血清为北京军区军马所产品。LB培养基按文献配制。

1.3 工具酶及试剂

*EcoR*Ⅰ、*Bam HI*购自华美, T4连接酶购自 Promega公司。DNA分子量标准 pBR322/MspⅠ、λDNA/HindⅢ购自华美生物工程公司。TNFα 为北京邦定公司产品。DEPC为 Sigma公司产品。RT-PCR试剂盒购自 Promega公司。DNA快速回收试剂盒购自北京原平公司。

1.4 细胞培养

参照文献[6]稍做改进。培养基为 RPMI 1640,当细胞密度达到 1× 10^5/ml,用 TNF-α 刺激,终浓度为 20μg/ml,刺激后 4 h收获细胞。

1.5 细胞总 RNA提取

按改进的 RNA提取法[7]提取细胞总 RNA。

1.6 引物的合成

根据文献报道的 hEot cDNA序列,设计一对特异性引物,在上游引物加 *EcoR*Ⅰ的酶切位点,下游引物加 *Bam HI*的酶切位点。为以后的表达工作,又在两者 5′端分别加有起始密码子 ATG和终止密码子 TAA,并且为了保持 SD序列与 ATG的距离以及提高引物的 AT含量,在 P1中 ATG和 SD之间又加入了两个 A,为了使两引物的 Tm值相似,将 P1中第一位的密码子 GGG换成 GGA

P1: 5′-GGAATTCAAATGGGACCAGCTTCTGTCCCAACC-3′;

P2: 5′-CGGGATCCTTATGGCTTTGGAGTTGGAGATTT-3′

引物由上海生工生物工程公司合成, PAGE纯化。

1.7 目的基因的分离

取 2μg总 RNA扩增 hEot基因的编码区片段。反应混合物首先于 48℃反应 45 min进行逆转录,然后 94℃变性 2 min,接着进入循环, 94℃变性 30 s, 52℃退火 30 s, 68℃延伸 40 s,共循环 35次,最后一次循环 68℃再延伸 5 min。反应完毕取 5μl反应产物用 2%琼脂糖凝胶进行电泳分析。PCR产物经酚、酚-氯仿、氯仿抽提,乙醇沉淀, TE溶解,紫外鉴定及定量, -20℃保存备用。

1.8 重组测序载体的构建

载体 pUC18和 RT-PCR产物均用 *EcoR*Ⅰ、*Bam HI*酶切,然后用 DNA快速回收试剂盒从琼脂糖凝胶快速纯化回收 DNA片段,将回收后的 pUC18/*EcoR*Ⅰ+ *Bam HI*和 PCR产物/*EcoR*Ⅰ+ *Bam HI*进行 14℃过夜连接;二者的比例依回收后的浓度而定,原则是 PCR产物: pUC18(摩尔比)= 3∶1。

1.9 连接产物的转化及重组子的筛选和鉴定

取 5μl连接产物转化受体菌 *E. coli* DH5α 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。

1.10 DNA序列分析

碱裂解法大量抽提经双酶切鉴定的重组克隆的质粒,通过

* 时凤丽,女, 34岁,主管技师,硕士研究生

** 军事医学科学院基础医学研究所 北京, 100850

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

自动测序仪进行序列分析。

2 结果

2.1 hEot cDNA的扩增

逆转录 PCR的结果进行琼脂糖凝胶电泳分析发现在 245 bp左右有一条带,位于 pBR322/MspI第 5条带处,大小与预计相符,见图 1

2.2 重组质粒的构建及酶切鉴定

重组质粒的构建,见图 2 将 RT-PCR产物经 *EcoRI*/*BamHI*双酶切后,定向插入经同样双酶切的 pUC18载体中,获得的重组质粒命名为 pUC-hEot 经 *EcoRI*/*BamHI*双酶切后的重组质粒酶切电泳图谱,见图 3 双酶切后产生的片段为大小约定的 240 bp的片段。

2.3 hEot基因片段的序列分析

把从人肺上皮细胞 A549中扩增得到的 hEot基因片段克隆至 pUC18中,大量抽提重组质粒 pUC-hEot,全自动测序仪进行序列分析,结果表明基因序列与文献报道的完全一致。图 4为目的基因的序列分析结果。

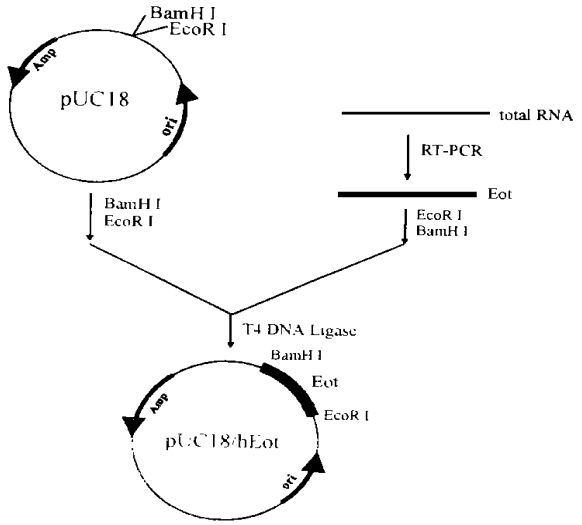


图 2 重组质粒 **pUC-hEot**的构建示意图

Fig 2 The scheme for construction of the recombinant plasmid pUC-hEot

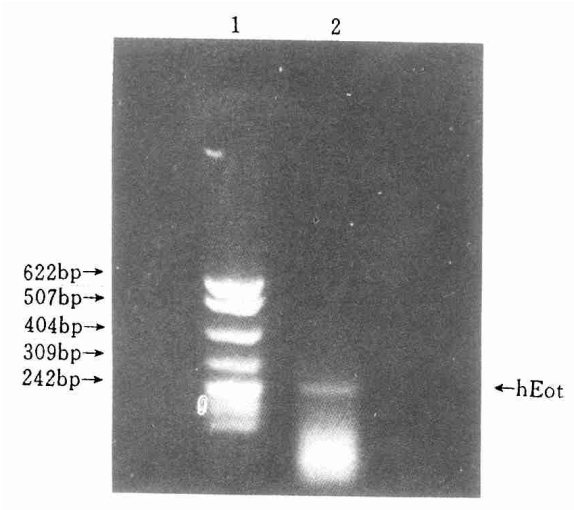


图 1 琼脂糖凝胶电泳分析 **RT-PCR**反应产物

Fig 1 Identification of the RT-PCR product by DNA agarose gel electrophoresis

1. pBR322/Msp I 2. RT-PCR product

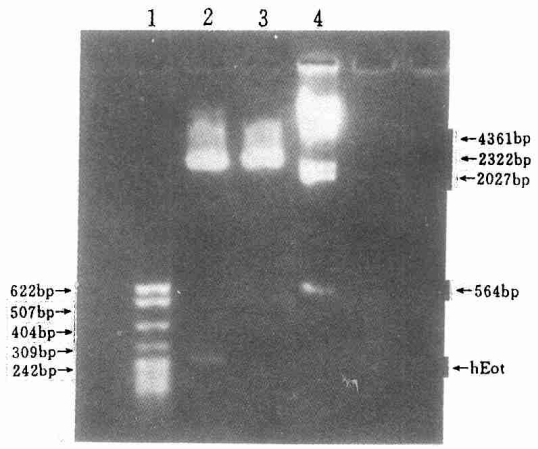


图 3 重组质粒 **pUC-hEot**的双酶切鉴定图谱

Fig 3 Double restriction map of recombinant plasmid pUC-hEot

1. pBR322/Msp I 2. pUC-hEot/*EcoRI*+ *BamHI*
3. pUC18/*EcoRI*+ *BamHI* 4. λ DNA/HindIII

hEot基因 cDNA编码区的核苷酸序列和氨基酸序列如下:

```
GGG CCA GCT TCT GTC CCA ACC ACC TGC TGC TTT AAC CTG GCC AAT AGG AAG
  G   P   A   S   V   P   T   T   C   C   F   N   L   A   N   R   K
ATA CCC CTT CAG CGA CTA GAG AGC TAC AGG AGA ATC ACC AGT GGC AAA TGT
  I   P   L   Q   R   L   E   S   Y   R   R   I   T   S   G   K   C
CCC CAG AAA GCT GTG ATC TTC AAG ACC AAA CTG GCC AAG GAT ATC TGT GCC
  P   Q   K   A   V   I   F   K   T   K   L   A   K   D   I   C   A
GAC CCC AAG AAG AAG TGG GTG CAG GAT TCC ATG AAG TAT CTG GAC CAA AAA
  D   P   K   K   K   W   V   Q   D   S   M   K   Y   L   D   Q   K
TCT CCA ACT CCA AAG CCA TAA
  S   P   T   P   K   P   *
```

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

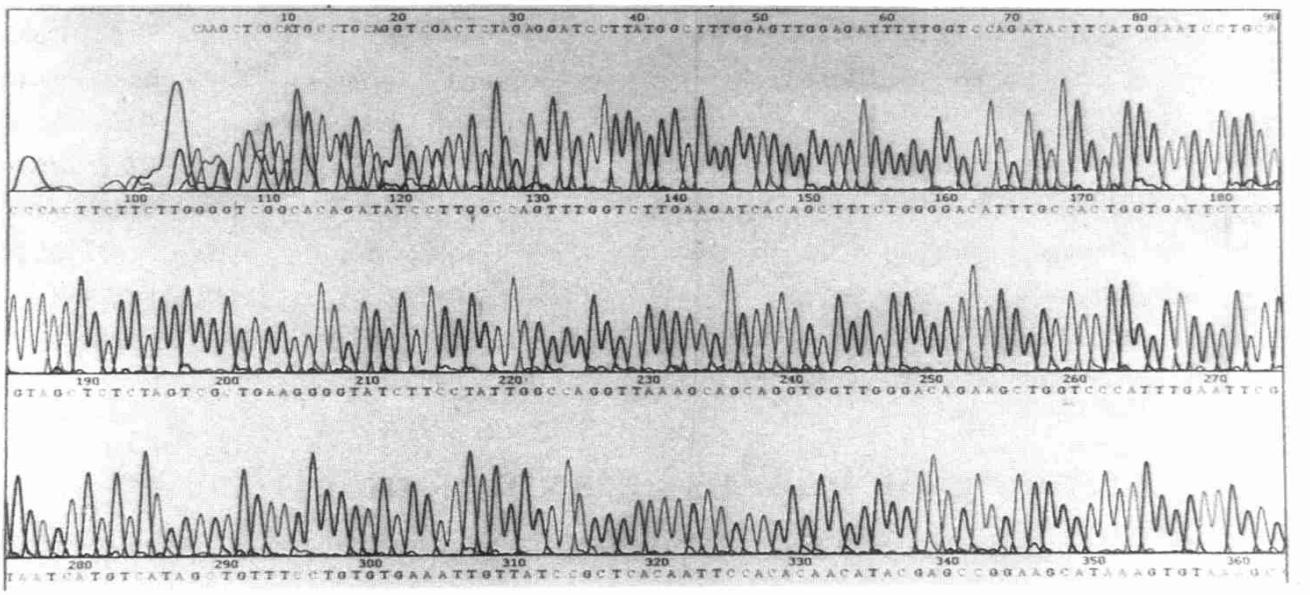


图 4　hEot基因 cDNA的序列分析

Fig 4　The DNA sequence of hEot gene cDNA without the leading peptide sequence

3　讨论

嗜酸性细胞趋化素 (Eot)是一种高度选择性趋化嗜酸性细胞的趋化因子,属于β或 CC趋化因子[2]。1996年 hEot基因被克隆,人成熟 Eot分子量为 8.4×10^3u,由 74个氨基酸残基组成[2~4]。迄今对它的功能及在疾病中的作用尚不完全清楚。对 Eot的受体的研究发现它是 CC趋化因子受体家族中的第三个受体即 CCR3[3,8,9],只在嗜酸性细胞表达。而 Eot是唯一的一个只与一个受体结合的 CC趋化因子,即只与 CCR3结合,而此受体在配体结合上明显地缺少选择性。由于 Eot受体表达的限制,Eot的活性就局限于嗜酸性细胞,因此,Eot具有高度特异性地趋化嗜酸性细胞的作用。推测人 Eot是变态反应性哮喘、肠道蠕虫感染等疾病的重要炎性介质,对疾病的发生、发展可能起重要作用。因此,对 Eot结构和功能的深入研究将进一步阐明一些疾病的发生机制,为预防和治疗奠定基础。

国外对 Eot结构和功能的研究也才刚刚起步,国内尚无文献报道。本研究根据国外报道的人 Eot基因序列,设计并合成了特异性引物 P1和 P2,在两者 5′端分别加有起始密码子 ATG和终止密码子 TAA以及 *EcoR I*、*Bam HI* 限制性酶切位点,并且为了保持 SD序列与 ATG的距离以及提高引物的 AT含量,在 P1中 ATG和 SD之间又加入了两个 A,为了使两引物的 Tm值相似,将 P1中第一位的密码子 GGG换成 GCA。由于上述在引物设计方面的优化,使 PCR反应更特异、更灵敏,并使目的基因的鉴别变得较简便,也为下一步的研究工作打下基础。

趋化因子是高度诱导型基因[3]。采用 RT-PCR技术,经过细胞因子 TNFα刺激从人肺上皮细胞 A549中获得特异的 hEot cDNA,并进行序列分析得到证实。为以后 hEot cDNA高效表达载体的构建和高效表达奠定基础。以上工作对 Eot蛋白功能的研究将进一步揭示它的生物学活性,并有可能成为一种重要的细胞因子而应用于临床。

参考文献

1 Griffiths Johnson D A, Collins P D, Rossi A G, *et al*. The chemokine, eotaxin, activates guinea-pig eosinophils *in vitro* and causes their accumulation into the lung *in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 197(3): 1167

2 Ponath P D, Qin S, Ringler D J, *et al*. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin, expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. J Clin Invest, 1996, 97(3): 604

3 Kitaura M, Nkajima T, Imai T, *et al*. Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. J Biol Chem, 1996, 271(13): 7725

4 Garcia Zepeda E A, Rothenberg M E, Ownbey R T, *et al*. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue

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

eosinophilia. Nat Med, 1996, 2(4): 449
5 Ganzalo J A, Jia G Q, Aguirre V, *et al*. Mouse eotaxin expression parallels eosinophil accumulation during lung allergic inflammation but it is not restricted to a Th2-type response. Immunity, 1996, 4(1): 1
6 Lilly C M, Nakamura H, Kesselman H, *et al*. Expression of eotaxon by human lung epithelial cells, induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. J Clin Invest, 1997, 99(7): 1767
7 Duan J B, Cai X, Zhou L M, *et al*. Single-step method of total RNA isolation by sodium dodecyl sulfate/phenol extraction from cultured cells. Analytical Biochem, 1997, 251(2): 291
8 Daugherty B L, Siciliano S J, DeMartino J A, *et al*. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. J Exp Med, 1996, 183(5): 2349
9 Ponath P D, Qin S, Post T W, *et al*. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. J Exp Med, 1996, 183(6): 2437

(收稿: 1998-12-07;修回: 1999-03-20)
(编辑 汪勤俭)

Isolation and sequencing of human eotaxin gene cDNA

Shi Fengli, Zou Minji, Wang Jiaxi, Fu Weiling (Department of Laboratory technology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To isolate and sequence the human eotaxin gene cDNA. **Methods**: hEot cDNA was amplified by RT-PCR from total RNA extracted from TNF-α-activated human lung epithelial cells A549. The cDNA encoding hEot was inserted into the plasmid pUC18 and sequenced. **Results**: DNA sequence analysis showed that the sequence of hEot cDNA was the same as that of reported. **Conclusion**: A confirmed hEot gene cDNA is obtained.

Key words human eotaxin; RT-PCR; RNA; gene; sequence

(上接354页)

2 结果

两组疗效比较见表1,实验组成功率均优于对照组($P < 0.05$)。

表 1 实验组与对照组疗效比较

	牙髓炎组		尖周炎组	
	实验组	对照组	实验组	对照组
成功	85(94.4%)*	69(84.1%)	71(91.0%)*	41(78.8%)
失败	5(5.6%)	13(15.9%)	7(9.0%)	11(21.2%)

*: $P < 0.05$与对照组比较

3 讨论

儿童乳牙髓角高,髓腔大,极易因龋坏发展成牙髓炎甚至尖周炎。因儿童处于生长发育阶段,随恒牙的萌出,乳牙牙根不断吸收。倘若进行根管治疗,器械易通过根尖刺伤牙胚,影响恒牙的萌出。因此乳牙牙髓炎一般采用干髓治疗,而尖周炎则采用变异干髓治疗。在干髓治疗中,根髓未能完全失活,干髓剂不能使其固化,往往是干髓治疗失败的主要原因。同时由于干髓剂主要含砷和醛,具有刺激性和毒性。据免疫学观点,干髓剂可作为抗原,引起尖周组织的免疫反应[1]。此外,药物有效含量的降低,也可能导致治疗失败。据报道,在普通条件下不易保存干髓剂,在患牙内,甲醛含量一周后为2/3~4/5,3周后只有一半,两月后仅存1/5。因此其作用的持久性值得怀疑。

在感染牙髓及尖周组织中,需氧菌、兼性厌氧菌和专性厌氧菌共存,而以厌氧菌占多数[2]。而碘仿对厌氧菌和需氧菌均有效,还有防腐镇痛刺激性小的特点,同时作用持久,特别适用于脓性分泌物多,严重感染根管的消毒。据报道,碘仿在髓腔中存放10年后有效率仅丧失20%。以碘灭糊剂作空管药物放于乳磨牙根管口治疗牙髓炎,尖周炎,作用缓和,无刺激性,通过药物的扩散和毛吸作用,达到控制根尖周组织感染的目的。

本结果表明,碘灭糊剂空管治疗乳磨牙牙髓炎、尖周炎疗效优于传统干髓术,值得推广应用。

关键词 碘灭糊剂;空管;乳磨牙
中图法分类号 R781.4

参考文献

1 张举之 主编.口腔内科学.第3版.北京:人民出版社,1995.156~158
2 许丽华,薛 毅,史俊南,等.产黑色素类杆菌群在牙髓坏死和根尖周疾病中的意义.现代口腔医学杂志,1995,9(1):7

(收稿: 1998-10-22;修回: 1999-03-27)
(编辑 汪勤俭)

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