DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.004

人淋巴毒素 cDNA克隆及顺序分析*

张津利** 朱锡华 (第三军医大学基础医学部免疫学教研室)重庆,400038

提 要 目的:克隆人淋巴毒素 cDNA并测序。方法:采用 RT-PCR技术,从 PHA/PMA活化的人 T细胞系 Jurkat细胞总 RNA中扩增人淋巴毒素 cDNA,并定向克隆于 pUC18 pUC19质粒载体,Sanger双脱氧链终止法测序。结果:RT-PCR扩增出一个541 bp的 DNA片段,限制性内切酶图谱分析和测序结果显示,该541 bp片段为编码人淋巴毒素成熟肽的 cDNA,与公布的人淋巴毒素 cDNA序列完全一致。结论:本实验成功地克隆了人淋巴毒素 cDNA,为在大肠杆菌表达人淋巴毒素并进一步研究其功能,以及淋巴毒素的开发与临床应用奠定了基础。

关键词 人淋巴毒素;RT-PCR;cDNA克隆
中图法分类号 Q523;R730.3

淋巴毒素(Lymphotoxin, LT)又称肿瘤坏死因子β(TNFβ),是淋巴细胞经抗原或有丝分裂原活化后分泌的一类细胞因子,它具有抑制肿瘤细胞和病毒感染细胞的生长或裂解它们的活性[1],其细胞毒作用与 TNFα相似,而毒副作用却低得多[2],因此被各国作为一种抗肿瘤药物加以大力开发。淋巴毒素还具有重要的免疫调节活性[1],近年发现的膜相关型淋巴毒素(MA-LT)更预示着它可能具有其自身独特的免疫调节作用[3]。因此,为了探讨淋巴毒素的临床应用价值,进一步研究 LT和 MA-LT的生物学功能,我们克隆了人淋巴毒素 cDNA。

1 材料与方法

1.1 材料

Jurkat细胞(本室),PHA(宝灵曼、德国),PMA(Sigma,美国),鼠源逆转录酶(200 u/μl, Gibco,美国),PCR引物(中科院上海细胞所),Taq DNA聚合酶、内切酶 HindⅢ, Sma I, PstI, EcoR I, RNA酶,RNA酶抑制剂,X-gal, IPTG(华美公司),内切酶 PvuⅡ, HinfI, NcoI(Promega,美国),PCR仪(PE-9600型,美国),T7 sequence kit (Pharmacia,美国),琼脂糖(国产),^{32}P-dATP(北京亚辉公司),大肠杆菌 JM109质粒 pUC18 pUC19 pBR322(本室)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 将已知人淋巴毒素基因序列输入基因库(Genebank),根据阅读框两端的相应序列及原核表达的要求大致决定引物位置,在计算机上与哺乳类基因序列比较后,选择最佳引物序列,引物1(正义)为5′-A TCC ATG GGG CTC CCT GGT GGC CTC-3′,引物2(反义)为5′-GGA AGC TTC CAA GTT CTA CAG AGC GAA GGC-3′,在引物1和引物2上分别引入单酶切位点 NcoI和 HindⅢ。

1.2.2 Jurkat细胞总 RNA提取 Jurkat细胞用 RPMI-1640完全培养基培养至细胞数达1~2×10^6/ml时,加入 PMA(50 ng/ml)/PHA(2μg/ml),24 h后收集细胞,参照文献[4]方法,用4 mol/L异硫氰酸胍溶解细胞,酚/氯仿抽提,异丙醇沉淀,溶解后用乙醇沉淀,沉淀溶于 DEPC水中,紫外分光光度法测定 RNA浓度,-20℃保存备用。

1.2.3 RT-PCR扩增 LT cDNA[5] 取 Jurkat细胞总 RNA 7.5μl(0.5μg),Oligo(dT)$_{12-18}$ 1μl(0.5μg),混匀,70℃变性10 min,依次加入:5× First strand buffer 4μl,4× dNTPs(2.5 mmol/L)4μl,DTT(0.1 mmol/L)2μl,RNA酶抑制剂(40 u/μl)0.5μl,鼠源逆转录酶(200 u/μl),37℃反应1 h,该逆转录产物直接用于下步 PCR反应。

PCR:在小管中依次加入10× 扩增缓冲液 10μl,4× dNTPs(2.5 mmol/L)8μl,引物1(100 pmol)1μl,引物2(100 pmol)1μl,逆转录产物5μl,无菌水74μl,在 PCR仪上95℃变性5 min(同时灭活逆转录酶),72℃保温中加入1μl Taq酶(3 u),开始 PCR循环:93℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1.5 min,循环30次,再于72℃延伸10 min,取10μl产物经1.5%琼脂糖电泳观察结果。

1.2.4 cDNA克隆[5] PCR产物经电泳洗脱法纯化,用 HindⅢ酶切,酚/氯仿抽提,乙醇沉淀。质粒 pUC19 DNA用 SmaI和 HindⅢ双酶切,同前处理。将酶切后的 PCR产物和线性化 pUC19按平/粘端连接方式连接,见图1所示,连接产物转化 E. coli JM109感受态,α-互补颜色筛选阳性克隆,质粒小量快速抽提后经酶切鉴定,阳性者命名为 pUC19-LT。

* 全军"八五"重点课题资助项目
** 张津利,男,33岁,副教授,博士

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

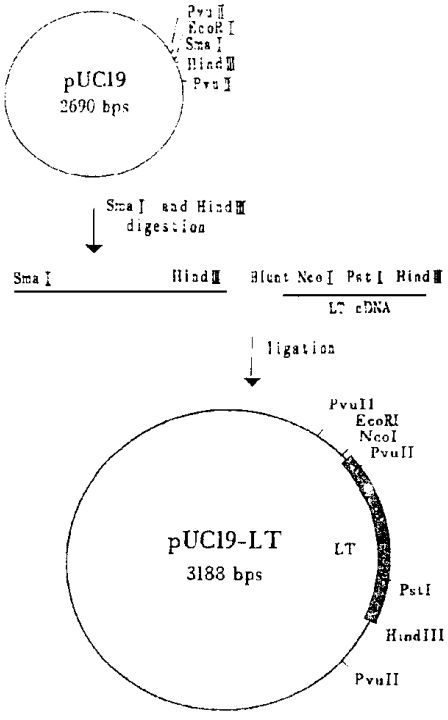


图 1 pUC19-LT克隆模式图

Fig 1 Sketch of the construction of pUC19-LT

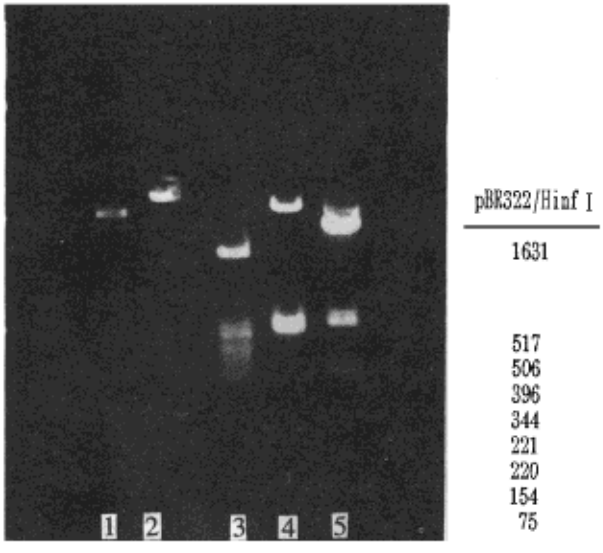


图 2 pUC19-LT限制性内切酶图谱

1. pUC19经 HindIII酶切 2. pUC19-LT经 NcoI酶切 3. pBR322/HinfI分子量标准 4. pUC19- LT经 HindIII + EcoRI酶切 5. pUC19-LT经 PvuII 酶切

Fig 2 Restriction endonuclease map of pUC19-LT

Lane 1: pUC 19 digested with HindIII; Lane 2 pUC19-LT digested with NcoI; Lane 3 pBR 322/HinfI Marker; Lane 4 pUC19-LT digested with HindIII + EcoRI; Lane 5: pUC19-LT digested with PvuII

1.2.5 序列测定[5] 按 Pharmacia T7测序试剂盒说明书进行。为了完整读取重组子插入片段全部序列,将上述插入片段以 HindIII/EcoRI双酶切下,构建于 HindIII/EcoRI双酶切的 pUC18载体,以便从两端读取 DNA序列。

2 结果

2.1 pUC19-LT的酶切图谱

图 2为 pUC19-LT经 HindIII+ EcoRI双酶切以及 PvuII和 NcoI单酶切的酶切图谱,与图 1中的理论图谱是一致的。

2.2 序列测定结果

本实验所测 LTcDNA序列与文献[6]报道完全一致,在两引物之间为编码 LT成熟肽的 cDNA序列。图 3为序列测定结果。

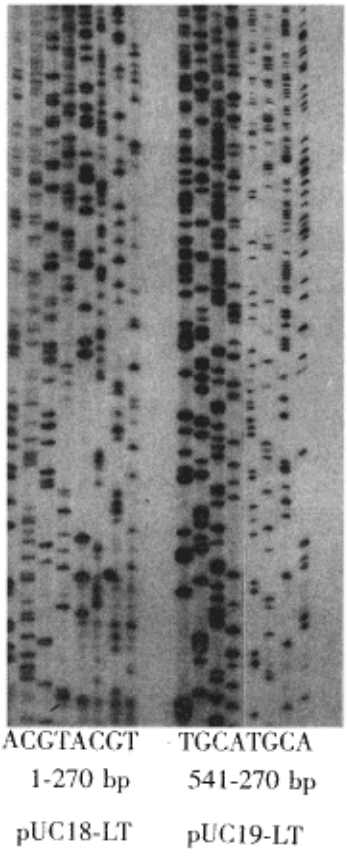


图 3 LT cDNA片段序列测定结果

Fig 3 Result of LT cDNA fragment sequence determination

3 讨论

本实验采用 RT-PCR技术,从 PHA/PMA活化的 Jurkat细胞总 RNA中扩增出人 LT cDNA,并克隆成功,其序列与文献报道的完全一致。在该 cDNA片段的两端分别引入了 NcoI和 HindIII酶切位点,不仅

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

便于后续的克隆进测序载体和表达载体,而且保证在有或无启始密码子 ATG的表达载体均可表达该基因,为在大肠杆菌表达人淋巴毒素奠定了基础。

RT-PCR技术是将逆转录反应和 PCR技术相结合的方法,通过逆转录反应得到的 cDNA单链基本不用其它处理,便可直接用于 PCR扩增反应,该法可直接得到 cDNA,对于以表达蛋白为目的的基因克隆尤为方便,这是本实验所采用技术路线的依据。就模板而言,人淋巴毒素是由淋巴细胞经抗原或有丝分裂原活化后而分泌的,其中主要是 T淋巴细胞[1]。Jurkat细胞是一株 T淋巴细胞白血病细胞,它可组成性地表达人 LT mRNA,若在丝裂原刺激下则有较高水平的 LT mRNA表达[7]。研究显示,淋巴细胞经抗原或有丝分裂原活化后, LT蛋白分泌高峰在 24~ 48 h,而 mRNA表达高峰在 8~ 30 h[1,7]。本实验选用 PMA/PHA活化 24 h的 Jurkat细胞总 RNA作为 RT-PCR的模板,正是基于以上各点而设计的。

淋巴毒素是一种具有多种免疫调节作用的细胞因子,特别是它的抗肿瘤和抗病毒活性具有潜在的药用价值。另一方面,由于 LT与 TNF-α的主要活性相似,但其作用又弱于 TNF-α,人们一直怀疑 LT并非仅是 TNF-α的一种补充,它可能具有尚未被揭示的独特功能。最新的研究表明 MA-LT(由 LT与膜蛋白 LT-β构成)的功能可能代表着 LT生物学作用的主要方面,而分泌性 LT的功能仅是其主要活性的“外围”部分[3],因此,有必要对 MA-LT的功能进行深入研究。本实验结果对于进一步研究 MA-LT和 LT的生物学功能,以及 LT的开发利用,将具有重要意义。

参考文献

1 Ruddle N H. Tumor necrosis factr (TNF-α) and lymphotoxin (TNF-β). Curr Opin Immunol, 1992, 4(3): 327

2 Qin Z H, Van Tits L J H, Buurman W A *et al*. Human lymphotoxin has at least equal antitumor activity in comparison to human tumor necrosis factor but is less toxic in mice. Blood, 1995, 85(10): 2779

3 Browning J L, Ngam-ek A, Lawton P *et al*. Lymphotoxin β, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. Cell, 1993, 72(6): 847

4 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156

5 Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. Molecular cloning- A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 16- 66, 602- 691

6 Gray P W, Aggarwal B B, Benton C V *et al*. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin. Nature (Lond), 1984, 312(5996): 724

7 Sung S S J, Bjorndohi J M, Wang C Y *et al*. Production of tumor necrosis factor/cachectin by human T cell lines and peripheral blood T lymphocytes stimulated by phorbol myristate acetate and anti-CD_3 antibody. J Exp Med, 1988, 167(3): 937

(收稿: 1997-03-03;修回: 1997-09-04)
(编辑　冯崇英)

Cloning and sequencing of cDNA of human lymphotoxin

Zhang Jinli, Zhu Xihua (Department of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To clone and sequence cDNA of human lymphotoxin (LT). Methods: After cDNA of human LT was amplified by RT-PCR from total cellular RNA of human T cell line Jurkat activated by PHA/PMA and cloned into pUC18 and pUC19 plasmids with α-complementary screening and restriction site identification, it was sequenced by Sanger's dideoxy-mediated chain termination. Results: A 541bp DNA fragment was amplified by RT-PCR and cloned into pUC18 and pUC19 plasmids. Restriction map and necteic acid squence showed that the fragment was the portion of LT cDNA encoding human LT mature protein. Conclusion: LT cDNA encoding human LT mature protein had been successfully cloned, which provides the basis for the study of expression of human LT in E. coli.

Key words human lymphotoxin; RT-PCR; cloning of cDNA

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