DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.029

HLAI类抗原反意逆转录病毒载体的构建*

Construction of antisense retroviral vector for suppression of HLA class I antigens expression

赵阳兵 徐小珂 陈 瑜 赵雄飞 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆, 630038

提 要 目的: 构建 HLAI类抗原的反义逆转录病毒载体以抑制细胞该类抗原的表达。方法: 从 MBmp18/HLA-B7酶切得 HLA-B7 cDNA后转染至质粒 pGEM-3Z,在酶切得含 HLA-B7 5′端非编码区的 818bp片段后,将其反向亚克隆于逆转录病毒 pLX5N构建成 pLAHLA-B7。结果: 经鉴定证明构建的质粒中均显示有目的长度的片段,并证明为反向插入。结论: 相应反义逆转录病毒载体的建成,将有助于研究抑制移植物 HLAII类抗原的表达。

MHC抗原是组织或器官异体移植排斥反应的主要抗原系统,若能减弱或消除移植物内的该类抗原,则可望能延缓或消除异体移植后的排斥反应,使移植物能较长期地存活[1-3]。基因工程技术的发展,使人们可以对细胞的某些特性进行修饰和改变。反义技术就是一种有效的特异性地改变细胞遗传特性的方法。我们将编码 HLAI类抗原的部分 cDNA片段通过基因工程手段,定向地反向克隆于逆转录病毒载体 pLXSN,从而构建了 HLAI类抗原的反义逆转录病毒载体,为进一步在细胞内抑制 HLAI类抗原做准备。

1 材料及方法

1.1 主要试剂及来源

1.1.1 HLA-B7cDNA,克隆于 M13mp18多克隆位点 sal I/HinIII[4](Stanford University, Peter Parham's Lab惠赠)。

1.1.2 pEGM-3Z质粒(Promega)

1.1.3 pLXSN逆转录病毒载体[5](Miller教授惠赠)

1.1.4 内切酶 EcorI HpaI PvuII (Boehring Mannheim), SalI (Promage), HinfI(Biolab); BamHI hmdIII (华美生物工程公司)。

1.1.5 琼脂糖(中山生物技术公司, 92001型)

1.1.6 HLAI类抗原 PCR扩增引物序列(由上海细胞生物研究所合成)

HLA1: 5′-GACTCAGAATCTCCCCAGACGCCGAG-3′

HLA2: 5′-CTCAGTCCTCACAAGGCAGCTGTC-3′

1.2 HLA-B7亚克隆于体外表达载体 pGEM-3Z

1.2.1 HLA-B7亚克隆 用 SaI 和 HingIII将 HLA-B7 cDNA切下后定向克隆于 pGEM-3Z的多克隆位点相应酶切位点,得到 pGHLA-B

M13mp18/HLA-b7噬菌体、质粒的转染(或转化)、扩增、限制性内切酶酶切、酶切片段回收及 DNA片段连接按常规进行[6]。

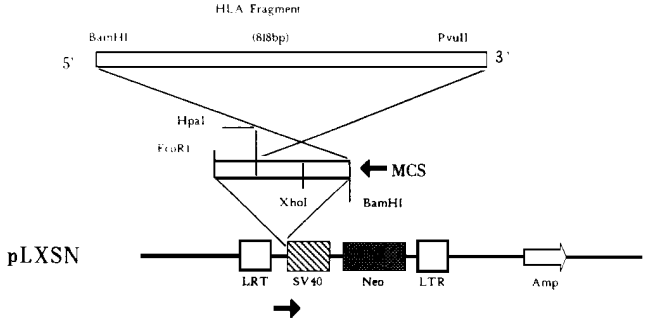
1.2.2 pGHLA-B鉴定 由于所克隆基因片段与载体的连接为不对称连接,载体自连的机率很低,因此,连接子的阳性转化子一般都是重组子。随机挑取一阳性转化菌落,少量提取质粒后,用下述方法鉴定。

1) SalI 和 HindIII联合酶切连接阳性转化质粒, pGHLA-B可得到约 2.7kb及 1.1.kb两个片段。

2) PCR扩增:用 PCR扩增待鉴定的质粒 DNA, M13mp18/HLA-7作为阳性对照, pGEM-3Z质粒为阴性对照。

1.3 反义 HLA-B亚克隆于逆转录病毒载体 pLXSN

1.3.1 反义 HLA-B逆转录病毒载体构建 pGHLA-B用 BamH 和 PvuII 联合酶切后,可行到 136bp、483bp、818bp及 2364bp四个片段,其中 818bp的片段为含 HLA-B7 5′端非编码区、第 1、2、3外显子及部分第 4外显子的 cDNA片段,该片段 5′为 BamH 切点, 3′端为 PvuII 切点,电泳洗脱法回收该片段,与经 BamH 和 HpaI联合酶切后电泳洗脱回收的 pLXSN连接,将 818bp的 HLA-B片段反向克隆于逆转录病毒载体,得到 pLAHLA-B 见附图所示。



附图 克隆策略图

* 国家自然科学基金资助项目 No. 39170745

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

1.4 pLAHLA-B7鉴定

用 EcoRI和 BamHI联合酶切后的 pLAHLA-B7得到约 5.8kb和 0.8kb的两个片断。为进一步确定 HLA基因的克隆方向,用 HinfI切割连接后的质粒,根据其限制性酶切图谱进行证实。

2 结果

2.1 鉴定 HLA-B7亚克隆于 pGEM-3Z

pGHLA-B用 SalI和 HindIII联合酶切后的质粒有两条带,一条为约 2.7kb的载体,另一条为 1.1kb的 HLA-B7cDNA片段。PCR扩增后 pGHLA-B及 M13mp18/HLA-B7均可见一约 1.1kb片段,而 pGEM-3Z扩增后无 1.1kb带。

2.2 HLA-BcDNA片段反向克隆的鉴定

pLAHLA-B用 EcoRI/BamHI酶切后见约 5.8kb的载体及约 0.8kb的 HLAcDNA片段:用 HinfI酶切后,在 533bp至 1449bp间,pLAHLA-B有 1211bp和 1225bp两条 DNA带纹,空载体无此二带纹,而若为正向插入时,则应为 618bp和 103bp。

3 结果

MHC系统是与异体移植排斥反应密切相关的抗原系统,减弱或消除移植物内的 MHC抗原,则有可能延长移植物的存活或改善移杆器官的功能。Robert等人[1]报道用抗小鼠 MHCI类抗原抗体处理过的鼠胰岛细胞异体移植后的存活时间可明显延长,移植 MHCII 类抗原不同而I 类抗原相同的胰岛细胞可存活较长时间[2];同样,无 MHCI类抗原的肾脏异体移植后的功能较 MHCI类抗原不合者有明显改善[3]。

在动物实验中,可通过基因打靶等基因工程手段来获得无 MHCI类抗原的动物,面在临床,目前可行的方法除 HLA配型外,只能用抗 HLA抗体处理来对抗 HLA抗原,但抗体与细胞的结合,有可能对组织细胞造成损害;另外,即使用抗体暂时封闭 HLA抗原,但当移植后,在一些炎性细胞因子的刺激下,其 HLA抗原的表达会明显增强。大量的抗体与细胞表面的 HLA抗原分子结合,是无法避免移植物遭受损害的。通过基因工程对移植物细胞 HLA抗原的表达进行调节,减少或消除细胞表面的 HLA分子,减轻宿主免疫系统对异体移值细胞的攻击,从而延长移植物的存活时间或改善移植器官的功能是一个值得研究的课题。

反义核酸可在细胞核和细胞浆内的转录和翻译等不同水平干扰或抑制基因的表达[7]。我们构建了 HLA I 类抗原的反义逆转录病毒载体,即将一段 HLA-B7cDNA反向克隆于逆转录病毒载体 pLXSN多克隆位点,为进一步将该反义 DNA序列整合于细胞内并产生 HLAI 类抗原 mRNA的反义 RNA,从而为观察转基因细胞 HLAI 类抗原的表达情况作准备。逆转录病毒作载体的基因转移系统,以其高效率的感染特性而成为基因治疗最有希望的手段之一。

我们在构建反义 HLA逆转录病毒载体时,首先将 HLAcDNA亚克隆于体外转录、表达载体 pGEM-3Z的多克隆位点上,然后再将部分 HLA cDNA片段反向克隆于逆转录病毒载体上,其目的有二:(1) pGEM-3Z的多克隆位点两侧分别为 SP6及 T7RNA多聚酶启动子,因此可用 T7或 SP6 RNA多聚酶从不同的方向制备正义或反义 HLA-B7 RNA,为以后进一步鉴定作准备;(2) pGEM-3Z的遗传背景资料较详细,便于选择合适的酶切片段将 HLA cDNA反向克隆于逆转录病毒载体上,目前,尚未见用基因工程的手段对人类 HLAI 类抗原基因的表达进行抑制的报道。反义 HLA逆转录病毒载体的构建只是我们在研究应用反义技术延长异体移植物存活的初步尝试,同时也为研究 类异体移植排斥反主尖提供一条新的线索。

关键词　HLA抗原;病毒转录
中图法分类号　R392.11

参考文献

1 Robert W O, Nancy L A, Peter G S *et al*. Prolongation of *in vivo* mouseislet allograft survival by modulation of MHC class I antigen. Tansplant, 1994; 57: 783
2 Morrow C E, Sutherland D E R, Stffer M W *et al*. H-2 antigen class: effect on mouse islet allografts rejection. Science, 1983; 219: 1337
3 Thomas C, STeven G, Sherif I *et al*. Improved renal function in mouse kidney allogrfts lacking MHC class I antigens. J Immunol, 1993; 151: 425
4 Ennis P D, Zemmour J, Salter R D *et al*. Rapid cloning of HLA-A, B cDNA by using the polymerase chain reaction: frequency and nature of errors produced in amplifioation. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87(7): 2833
5 Miller A D, Rosman G J. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression, Biotechniques, 1989; 7: 980
6 Sambrook J, Fritsch E T, Mauiatis T *et al*: Molicular Cloning: A Laboratary Manual. 2ed ed. Cold spring Harbor, Laboratary Press, 1989: 25~30
7 彭明晖,薛京伦,徐　钤等.基因治疗-基础与临床.北京:中国科学技术出版社,1994: 59~66

(收稿:1996-02-27;修回:1997-02-28)
(编辑　冯崇英)

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