

一种新细胞因子基因真核表达载体的构建和鉴定

刘平,张双全,李东霞,闫晓梅,吴一凡

(南京师范大学生命科学学院,南京 210097)

[摘要] 采用 PCR 方法,以人胎盘 cDNA 文库为模板,扩增出人 B 淋巴细胞刺激因子(hBLyS),经克隆测序及纯化后,再以此 PCR 产物为模板,用 Nest-PCR 方法进一步扩增得到人 B 淋巴细胞刺激因子的胞膜外功能区域(hsBLyS)的 DNA 片段,纯化、克隆测序鉴定后,扩增并纯化质粒,经酶切、纯化后克隆到真核表达质粒 pcDNA3.1(+)中,构建成真核表达载体 pcDNA3.1(+)/hsBLyS。结果表明:用此方法制备得到的 hsBLyS 的 DNA 片段经测序鉴定与文献报道相符,构建的真核表达载体经鉴定也达到了预计的结果。

[关键词] 人 B 淋巴细胞刺激因子;PCR;Nest-PCR;人胎盘 cDNA 文库

[中图分类号] Q523; [文献标识码] A; [文章编号] 1001-4616(2001)02-0067-04

人 B 淋巴细胞刺激因子(hBLyS)是由美国 Paul A Moore 和 David M Hilbert 等^[1]于 1999 年发现的一种新的人体免疫系统的细胞因子,它属于 TNF 超家族成员之一,这种细胞因子既能活化人体内 B 淋巴细胞并刺激其分化、增殖,促进 B 淋巴细胞分泌抗体,提高机体的免疫能力;又具有 TNF 家族成员的作用,能抑杀肿瘤细胞,使之发生凋亡;对 B 细胞系的肿瘤细胞尤其有效。Moore 和 Hilbert 等认为,hsBLyS 在预防与 B 细胞相关的自身免疫、肿瘤形成和免疫缺陷等病症的发生方面有重要作用,并可对这些疾病的患者进行免疫治疗。因此,运用基因工程构建真核和原核表达载体并在相应宿主细胞中大量表达 hsBLyS 的理论意义和实践意义都是非常重大的。我们已经用基因工程的手段构建了 hsBLyS 的原核表达载体,并在原核宿主菌中获得了高效表达。

本研究采用 PCR 及 Nest-PCR 等方法,从人胎盘 cDNA 文库中(不同于 Moore 等的方法^[1])扩增出 hsBLyS 的胞膜外功能区(hsBLyS)的 DNA 片段,经测序鉴定后,用酶切、纯化、连接等重组手段构建成高效真核表达载体 pcDNA3.1(+)/hsBLyS;为 hsBLyS 的后续表达纯化及其生物学功能的研究奠定了基础。

1 材料与试剂

1.1 实验菌株和质粒

DH5 α 感受态细胞(购自 GIBCO-BRL 公司);PCR-Blunt 载体系统(购自 Invitrogen 公司);pcDNA3.1(+)质粒(本实验室自备)。

1.2 酶及实验试剂

PWO DNA 聚合酶(购自 Boehringer Mannheim);T4 DNA 连接酶(购自 Invitrogen);QINprep

收稿日期 2000-10-18

作者简介:刘平,1964—,南京师范大学生命科学学院硕士研究生,从事生物化学的学习与研究。

通讯联系人:张双全,1952—,博士,南京师范大学生命科学学院教授,从事生物化学的教学与研究。

万方数据

Plasmid Miniprep Kit; HindIII 和 EcoRV(购自 Promega 公司); GeneClean Kit; DNA marker(购自 Promega 公司); 其他试剂均为国产分析纯, DNA sequence Ki(购自 USB 公司)。

1.3 实验材料和仪器

人胎盘 cDNA 文库以及 PCR 和 Nest-PCR 引物(美国 Dr Wang 提供); PCR 仪(PE9600, PE 公司); DNA 测序仪(PE 公司)。

2 实验设计与方法

2.1 实验整体设计及预计结果

根据 Moore 等报道的 hBlyS 的 cDNA 序列(可从 GeneBank 中检索获得),在设计引物、PCR 及 Nest-PCR、克隆测序和重组克隆等方面结合我们的实验要求,从整体上预先设计一个实验思路蓝图,并预计各步结果。具体如图 1 所示。

2.2 引物设计

根据文献报道^[1]的 hBlyS 的 cDNA 序列,自行设计了 PCR 及 Nest-PCR 引物。PCR 引物(Primer1)是:上游引物为 5'CAAACACAGATAACAGGAAATGAT3',下游引物为 5'CATGGTGTAAAGTAGGTCACAGCA3'; Nest-PCR 引物(Primer2)是:上游引物为 5'AAGCTTATGCATCATCATCATCATCATCATGACGACGACGACAAGGCCGTTTCAGGGTCCAG3',下游引物为 5'GATATCGGTGTAAGTAGGTCACAGCAGTTT3'。在 Nest-PCR 引物(引物 2)中,上游引物中含有一个 HindIII 酶切位点,还含有一个 His-tag 序列以及一个 Enterokinase(肠激酶)酶切位点序列,以便于表达蛋白的纯化。在下游引物中含有一个 EcoRV 酶切位点。引物合成由美国 Dr Wang 完成并提供。

2.3 PCR 及 Nest-PCR

以人胎盘 cDNA 文库为模板,运用 PCR 引物(引物 1)扩增出 hBlyS 的 cDNA,PCR 条件为:94℃ 3 min 94℃ 30 s 60℃ 30 s 72℃ 1 min 35 个循环后 72℃ 10 min。纯化、电泳鉴定后,用 pCR-Blunt Vector 系统进行克隆测序鉴定。然后以此 PCR 产物为模板,用 Nest-PCR 引物(引物 2)扩增出 hBlyS(功能区)的 DNA 片段,并同时融合上 His-tag 及肠激酶位点序列。Nest-PCR 条件为 94℃ 2 min 94℃ 20 s 60℃ 30 s 72℃ 1 min 20 个循环后 72℃ 5 min;用 GeneClean Kit 纯化 Nest-PCR 产物,电泳鉴定后,然后克隆到 pCR-Blunt vector 系统中再进行测序鉴定,用 QIAGEN Kit 从上述载体中将质粒纯化出来,并用 DH5 α 扩增质粒。最后,用 QIAGEN Kit 大量纯化质粒,用 EcoRV 和 HindIII 双酶切后,再用 GeneClean Kit 纯化得到 hBlyS 的 DNA 片段(含有 His-tag 及肠激酶位点序列)。

2.4 表达质粒的构建

根据有关文献《General Guidelines and Special Information》和相关资料^[2,3]上的技术方法,将上述双酶切并纯化得到的 hBlyS 的 DNA 片段与 pcDNA3.1(+)质粒按比例混合,在 EcoRV、HindIII 及 T4 DNA 连接酶等存在下,构建成真核表达质粒 pcDNA3.1(+)/hBlyS,然后直接转化 DH5 α 进行筛选并扩增目的质粒,再用 QIAGEN Kit 大量纯化靶质粒。

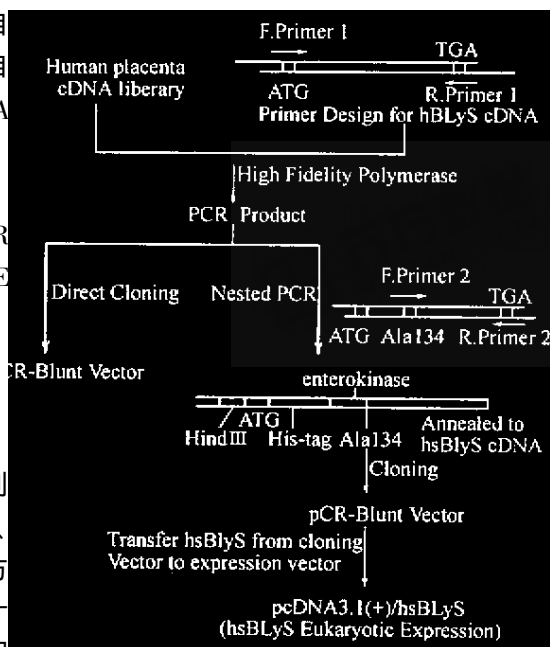


图 1 实验的整体设计思路图

2.5 构建质粒的鉴定

从上述纯化的大量构建好的质粒中取出部分,用 EcoRV 和 HindIII 双酶切后,再用 GeneClean Kit 纯化出 hsBLyS 的 DNA 片段(含有 His-tag 及肠激酶位点序列),然后用 DNA 测序试剂盒在测序仪上测序。

3 实验结果

3.1 PCR 及 Nest-PCR

用上述设计好的 2 对引物扩增得到的 PCR 产物和 Nest-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,条带大小与有关资料的报道一致。(见图 2 和图 3)。

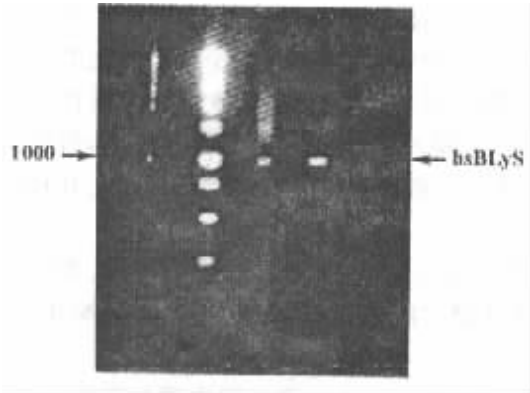


图 2 PCR 产物的电泳

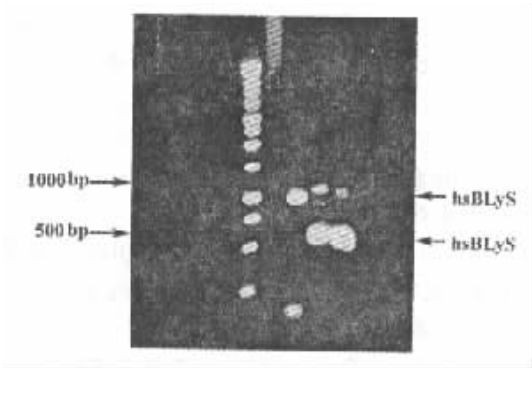


图 3 Nest-PCR 产物的电泳

3.2 真核表达质粒的构建

经酶切和连接反应构建的真核表达质粒 pcDNA3.1(+)/hsBLyS,扩增后用纯化试剂盒 QIAGEN Kit 纯化,从而得到了预计的真核表达质粒,如图 4。

3.3 构建质粒的鉴定

纯化得到的 DNA 片段(含有 His-tag 及肠激酶位点序列)经 DNA 测序仪测序后,最终结果与 Moore 等报道结果一致,如图 5。

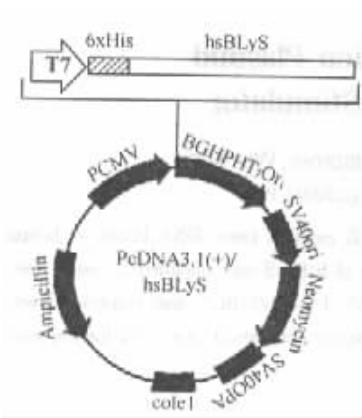


图 4 实验构建的真核表达质粒

1	AACCCANGCT	GGCTAGCGTT	TAAACTTAAG	CTTGGTACCG	AGCTCGGATC
51	CACTAGTAAC	GGCCGCCAGT	GTGCTGGAAT	TCAGGAGCTT	ATGCATCATC
101	ATCATCATCA	TGACGACGAC	GACAAGGCCG	TTCAGGGTCC	AGAAGAAACA
151	GTCACCTAAG	ACTGCTTGCA	ACTGATTGCA	GACAGTGAAA	CACCAACTAT
201	ACAAAAAGGA	TCITACACAT	TTGTTCCATG	GCTTCTCAGC	TTTAAAAGGG
251	GAAGTGCCCT	AGAAGAAAAA	GAGAATAAAA	TATTGGTCAA	AGAAACTGGT
301	TACTTTTTTA	TATATGGTCA	GGTTTTATAT	ACTGATAAGA	CCTACGCCAT
351	GGGACATCTA	ATTCAGAGGA	AGAAGGTCCA	TGCTTTTGGG	GATGAATTGA
401	GTCTGGTGAC	TTTGTTTCGA	TGTATTCAAA	ATATGCCTGA	AACACTACCC
451	AATAATTCCT	GCTATTCAGC	TGGCATTGCA	AAACTGGAAG	AAGGAGATGA
501	ACTCCAACIT	GCAATACCAA	GAGAAAAATGC	ACAAATATCA	CTGGATGGAG
551	ATGTCACATT	TTTTGGTGCA	TTGAAACTGC	TGTGACCTAC	TTACACCGAT
601	ATCCACACACA	ATGSGGGGCG	CTCKARTCIW	TAANGSCCST	TTAACCNT

注:其中 94~111 是 His-tag 序列;112~123 是 EK 酶切位点序列;

28~33 是 HindIII 位点;598~603 是 EcoRV 位点

图 5 构建到真核表达质粒中的目的 DNA 片段的序列

3.4 构建质粒的鉴定

将构建好的表达质粒用质粒纯化试剂盒 QIAGEN Spin Kit 纯化出来,再用 EcoRV、HindIII 双酶切,然后用 GeneClean Kit 将 hBLyS 的 DNA 片段纯化出来,进行测序鉴定(测序结果略)。结果表明,克隆到真核表达质粒中的 DNA 片段是我们所需要的 DNA 片段以及必要的核酸酶、蛋白酶切位点和 His-tag 序列。

4 讨论

(1) hBLyS 是人体内免疫系统的一个新的 B 淋巴细胞刺激因子,对免疫功能低下或缺陷的人有免疫治疗作用。它属于 TNF 超家族,又具有 B 淋巴细胞刺激因子的生物学功能;因此, hBLyS 既不同于已发现的 TNF 家族的成员,又不同于已知的所有能激活 B 淋巴细胞的细胞因子,它的分子构象及其刺激 B 淋巴细胞使其分化、增殖和引起 B 细胞系肿瘤细胞凋亡的分子机制及信号途径都还处于未知阶段。所以,运用基因工程人工大量制备其功能区,为研究这种新的细胞因子的生物学功能和作用机理以及将来运用于临床和医药业奠定了基础,其理论意义和实践意义也是十分重大的。

(2) 本实验采用 2 次 PCR 把 hBLyS 的胞膜外功能区对应的 DNA 片段扩增出来。在第一次 PCR 后,得到的混合产物并不进行纯化而是直接用于第二次的 Nest-PCR,这样,可以减少工序,节省花费,而且效果也很好。

(3) 本实验中应用 QIAGEN Spin Kit 纯化质粒,既可以尽可能的将细胞中质粒都提取出来,又比单纯用琼脂糖凝胶电泳纯化质粒的方法所得到的质粒纯度更高。

[参考文献]

- [1] Paul A. Moore, Ornella Belvedere, David M. Hilbert, *et al.* BlyS: Member of the Tumor Necrosis Family and B Lymphocyte Stimulator[J]. *Science*, 1999, 285: 260—263.
- [2] 蔓尼阿蒂斯, 萨姆布鲁克, 费里奇, 金冬雁, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第二版. 纽约冷泉港实验室, 1989. 35—56.
- [3] F 奥斯伯, R 布伦特, R E 金斯顿, D D 穆尔, 等. 颜子颖, 王海林, 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998.

Construction of Eukaryotic Expression Plasmid of a Novel Human B Lymphocyte Stimulator

Liu Ping, Zhang Shuangquan, Li Dongxia, Yan Xiaomei, Wu Yifan

(Academy of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, PRC)

Abstract Human B Lymphocyte Stimulator (hBLyS) was amplified by using PCR methods from cDNA library of human placenta. After purifying and sequencing, the DNA fragment of functional domain of hBLyS was amplified by using Nest-PCR methods from the PCR product. The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1(+)-hBLyS was constructed with reconstruction experiment after purifying and identifying of hBLyS fragment. The experimental result shows that the sequence of the PCR product is coincident with the report of Moore et al.

Key words hBLyS, PCR, Nest-PCR, human placenta, cDNA library

[责任编辑: 孙德泉]