

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0287-03

人类 TAP2 基因克隆及真核表达质粒的构建

王 兰¹, 李殿俊¹, 吕雪莹¹, 杨秋霞¹, 谷金宇², 刘 玉¹(1. 哈尔滨医科大学免疫教研室, 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科, 哈尔滨 150086)

抗原处理相关转运体(transporter associated with antigen processing, TAP)属于 ABC(ATP-binding cassette)超家族成员,由 TAP1(75 kD)和 TAP2(71 kD)形成异二聚体,负责抗原肽从胞浆到内质网的转运,在 MHC I 类分子的抗原处理及提呈过程中发挥重要作用。TAP 结构和功能障碍将导致细胞表面 MHC I 类分子表达缺陷,这成为肿瘤细胞、病毒感染细胞逃逸免疫监视的重要机制^[1]。Seliger 等^[2]指出,与自身正常组织相比,TAP 下调或缺失在所有被分析的肿瘤类型中发生频率为 10% ~ 84%,在转移瘤中更为显著,因此克隆 TAP1, TAP2 基因对研究 TAP 分子的生物学功能具有重要意义。本实验从 B 淋巴母细胞系(B-LCL)中成功地克隆出 TAP2 基因片段,并构建其真核表达质粒 pcDNA3. 1/V5-His-TOPO-TAP2, 为真核细胞表达 TAP2 分子以及研究其功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂、引物等

人类 B-LCL 为校本生物教研室惠赠。Fetal bovine serum 和 RMPI-1640 干粉(Hyclone); TRIzol 试剂, ThermoScript™ RT-PCR System, pcDNA3. 1/V5-His-TOPO TA Expression Kit 及 Platinum Pfx DNA polymerase(Invitrogen); Concert™ Rapid Gel Extraction System(Gibco); MiniBEST Plasmid Purification Kit 及 TAP2 引物(TaKaRa); Taq DNA Polymerase(Promega); IFN- γ (晶美公司产品)。

1.2 B 细胞培养及总 RNA 的提取

将 B-LCL 培养于含 20% 胎牛血清的 RMPI-1640 培养液中,在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养至对数生长期,经细胞计数调整细胞浓度为 2×10^6 /ml 后,加入 IFN- γ 并使之在培养液中的终浓度为 100 U/ml,作用 24 h 后,采用 TRIzol 试剂提取总 RNA。

1.3 TAP2 基因的扩增

根据已发表的 TAP2 基因序列^[3],利用 GeneRunner 软件,自行设计引物。上游引物: 5'-TAGCGAGGT-TGGGAGAGACG-3'; 下游引物: 5'-CTCCTCATCAC-CAG CAAAGC-3'。取 3 μ g 总 RNA,以 oligo(dT)₂₀ 为引物,按 ThermoScript™ RT-PCR System 试剂盒说明进

行。PCR 条件: 94℃ 2 min 后,按下述参数循环 35 次: 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 68℃ 3 min, 再于 68℃ 延伸 10 min。

1.4 重组表达质粒

pcDNA3. 1/V5-His-TOPO-TAP2 的构建: 按 Concert™ Rapid Gel Extraction System 试剂盒说明书进行。纯化产物加尾后与 TOPO vector 连接,重组体转化大肠杆菌 TOP10,筛选 Amp 抗性克隆

1.5 重组表达载体的 PCR 鉴定

挑取白色菌落,接种于含 Amp 的 LB 培养液中振荡过夜。以变性菌液为模板,用 TAP2 引物扩增 PCR 鉴定重组质粒(参数同上)。按照 MiniBEST Plasmid Purification Kit 说明书提取阳性克隆质粒。将提取的质粒用表达载体的 T7 引物和 TAP2 下游引物扩增 PCR 从而鉴定目的基因的插入方向,反应条件同上。

1.6 测序分析

将送检菌液做穿刺培养,由博亚生物有限公司进行序列分析。

2 结果与讨论

2.1 人类 TAP2 cDNA 的扩增

提取 B-LCL 总 RNA,电泳结果可见 28 s, 18 s, 5 s 3 条带。紫外分光光度计分析, $A_{260}/A_{280} = 1.9$ 。经 RT-PCR 扩增获得 2 000 bp 以上片段,其电泳结果见(图 1)。

图 1 RT-PCR 产物电泳

1: DL2 000 marker; 2: RT-PCR 产物(> 2 446 bp)

2.2 重组表达质粒 pcDNA3.1/V5-His-TOPO-TAP2 的构建

提取质粒后,电泳结果如(图2)所示,片段大小同预计的大小相一致(5 523 bp + 2 446 bp)。重组表达质粒命名为 pcDNA3.1 / V5-His-TOPO-TAP2。

2.3 鉴定 TAP2 插入方向

将提取的6个质粒用表达载体上游引物 T7 和 TAP2 下游引物做 PCR,电泳证实其中4个可见2 000 bp 以上片段,说明这4个重组质粒的 TAP2 目的基因为正向插入。

图2 重组质粒 pcDNA3.1/V5-His-TOPO-TAP2 电泳
1~6:pcDNA3.1/V5-His-TOPO-TAP2;M:DL15000 marker

2.4 pcDNA3.1/V5-His-TOPO-TAP2 的序列分析

测序结果进一步证实克隆的基因片段插入方向正确,TAP2 基因的核苷酸序列与 GeneBank 的完全一致。

部分核苷酸序列见(图3)。

目前研究发现,TAP2 表达缺陷与组织细胞的恶性转化相互关联,TAP2 的低表达常预示着肿瘤临床进程加快和预后不良。因此,我们克隆 TAP2 基因并构建重组表达载体,为进一步探讨 TAP 缺陷表达模式的特征、TAP 在细胞免疫应答中的作用及其在肿瘤基因治疗中的应用打下基础。

Schiffer^[4]等研究表明,TAP2 的表达可以被某些细胞因子(如 IFN- γ , TNF- α)和脂多糖等诱导,因此我们将人 B-LCL 用 IFN- γ 处理,以期获得 TAP2 mRNA 水平的高表达。由于扩增片段较长,我们采用“高保真”的 Pfx 酶,该酶具有 3'-5' 核酸外切酶活性,并且对于 G + C 含量较高的片段还提供了 Enhancer Solution,在通常的 PCR 条件下,扩增效率明显提高且错配率很低,从而进一步保证了 PCR 扩增反应中的特异性和忠实性。此外,我们所用的 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 是一种新型高效线性 TA 载体,活化的载体两端结合了 TOPO 酶,减少了自身环化,使重组率高达 95% 以上。此载体携带可在真核细胞与原核细胞内自主复制的信号以及便于筛选的标记物,因此一方面我们将其作为原核生物的克隆载体转化大肠杆菌,另一方面也可作为表达载体便于今后 TAP2 基因在真核生物中的表达。基因测序结果证实上述方法的有效性和正确性,这不仅为 TAP2 蛋白功能的研究提供方便,也为其他相关基因的克隆提供方法学的依据。

图3 人类 TAP2 基因的部分序列

[关键词] 抗原处理相关转运体-2(TAP2); 基因克隆; 序列分析; 真核表达载体

[中图分类号] Q785

[文献标识码] A

[参考文献]

- [1] Lankat-Buttgereit B, Tampe R. The transporter associated with antigen processing: Function and implications in human diseases [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82 (1): 187-204.
- [2] Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth [J]. *Immunol Today*, 2000, 21 (9): 455-464.
- [3] Powis SH, Mockridge I, Kelly A, *et al.* Polymorphism in a second

ABC transporter gene located within the class II region of the human major histocompatibility complex [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89 (4): 1463-1467.

- [4] Schiffer R, Baron J, Dagtekin G, *et al.* Differential regulation of the expression of transporters associated with antigen processing, TAP1 and TAP2, by cytokines and lipopolysaccharide in primary human macrophages [J]. *Inflamm Res*, 2002, 51 (8): 403-408.

[收稿日期] 2003 - 06 - 17

[修回日期] 2003 - 09 - 25

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0291-01

用 NF-IL-6 表达质粒脂质体复合物对裸鼠荷人结肠癌的系统性基因治疗实验初报

孙 丽, 傅蓓蓓, 刘定干 (中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

人白介素 6 核转录因子 (NF-IL-6, 又称 C/EBP β) 是一个重要的免疫调控因子; 它和肿瘤有着密切的关系。

1991 年, 我组曾发现 NF - IL-6 RNA 的 3' 非翻译区 (3'UTR) 具有抗癌基因样功能。我组也发现, NF-IL-6 编码区在小鼠骨髓瘤细胞系中的表达诱导其凋亡; NF-IL-6 基因没有细胞转化能力; 用 NF-IL-6 编码区转染小鼠腹腔居留巨噬细胞, 能显著增强其抗肿瘤细胞毒活性。因此, 我们认为, NF-IL-6 是一个与细胞正常表型的维护密切相关的基因; 有可能 NF-IL-6 对肿瘤进行基因治疗。

几年以来, 我们进行了大量的基因治疗实验, 基本上证实了上述看法。

我们用人结肠癌 CW-2 细胞注射 Balb/c nu/nu 裸小鼠建立了人结肠癌的裸小鼠模型。向每只鼠背部皮下注射 1 点, 8×10^6 /L CW-2 细胞, 饲养数天, 选取肿瘤大小为约 40 mm³ 的荷瘤鼠进行实验。

将质粒 pCN 和脂质体 (自制, 由 1, 2-二油酰氧基丙烷-3-三甲铵和胆固醇组成) 混合, 尾静脉注射荷瘤裸小鼠, 每鼠注射质粒 100 μ g。注射后 4, 8, 24, 48 h, 用 Northern 杂交检查心、肝、脾、肺、肾和肿瘤中的 NF-IL-6 RNA。结果显示, 注射后 NF-IL-6 在肺和肝中高表达达至 48 h 以上; NF-IL-6 在肾、心和肿瘤中的表达量大

体相当, 约为肺中的 1/4 至 1/3。这些事实提示该复合物可能首先被吞噬细胞所吞噬。

将荷瘤鼠分为 6 组, 每组 10 只, 分别注射: NF-IL-6 质粒-脂质体复合物 (实验组); 不含 NF-IL-6 基因的对照质粒脂质体复合物; 空脂质体; NF-IL-6 裸质粒; 5% 葡萄糖; 不注射。每 3 天 1 次, 每次质粒 100 μ g, 连续 8 次, 然后观察至注射后 2 个月。结果显示, 实验组荷瘤鼠 2 个月内瘤体积增长不到 2 倍。而不注射和注射葡萄糖的对照, 2 个月内瘤体积增长了 20 倍以上。有趣的是, 部分对照肿瘤 (注射裸质粒的; 注射空质粒-脂质体复合物的) 的生长也受到了抑制, 但程度较小。这可能表示, 除 NF-IL-6 对瘤的直接抑制外, 脂质体和裸 DNA 对裸小鼠残存的免疫细胞 (巨噬细胞、NK 细胞等) 的激活所引起的肿瘤抑制, 也起了一定作用。

致谢 刘峰和张金梅负责日常饲养裸小鼠, 梁迁参加了部分工作, 特此一并致谢。

[关键词] NF-IL-6; 癌; 基因治疗

[中图分类号] R730.59

[文献标识码] D

[基金项目] 本工作受上海-SK 集团研究和发基金及中科院-上海市浦东新区高新技术种子资金的资助

[通讯作者] 刘定干