

中国汉族人 IgE 重链恒定区 CH₂-CH₄cDNA 的克隆

Cloning for cDNA of constant region CH₂-CH₄ on IgE heavy chain of Han nationality in China

唐 昊¹, 陆慧琦², 韩焕兴², 修清玉^{1*}

(1. 第二军医大学长征医院呼吸内科, 上海 200003; 2. 长征医院实验诊断科)

[关键词] 免疫球蛋白 E; 重链恒定区; 基因克隆; 质粒构建

[中图分类号] R 392.33 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2006)10-1158-02

人血清中高水平的 IgE 是哮喘、过敏性鼻炎、慢性荨麻疹等过敏性疾病的标志, 而 IgE 与效应细胞上的 IgE 高亲和力受体 (Fc R₁) 结合则是这些 型变态反应的关键步骤^[1]。IgE 的重链恒定区由 4 个亚基组成, 分别记作 CH₁-CH₄, 其中 CH₃-CH₄ 是与 Fc R₁ 高亲和力结合的部位, 尤其是 CH₃ 突变研究表明它的一些残基对于 IgE 与 Fc R₁ 结合至关重要^[2]; CH₄ 并不直接与 Fc R₁ 作用, 而是作为一个“脚手架”, 使得 CH₃ 以正确的位置与 Fc R₁ 接触^[2]; CH₂ 的作用目前还有一些争议, 最近的研究^[3]证实 CH₂ 可能在稳定 IgE-Fc R₁ 复合体及阻止 IgE 从其受体上解离方面起一定作用。理论上, 应用体外表达的人源性 IgE 重链恒定区 CH₂-CH₄ 可以封闭 Fc R₁, 从而阻断过敏反应, 对于过敏性疾病的免疫治疗有着重要意义。

本研究利用分子克隆技术, 从中国汉族人的外周血淋巴细胞中克隆出 IgE CH₂-CH₄ 的 cDNA, 构建了相应的质粒表达载体, 为进一步原核表达及研究 IgE CH₂-CH₄ 的功能与活性奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株以及质粒载体 细菌菌株选用大肠杆菌 Top10, 为本实验室保存菌种; 质粒载体选用 pBAD/g A, 购自 Invitrogen 公司, 带有氨苄抗性, 属于表达载体, 可由阿拉伯糖诱导表达。

1.2 工具酶及其他试剂 DNA 限制性内切酶 *Xho*、*Hind*、*T₄*-DNA 连接酶以及 PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司, 淋巴细胞分离液 (Lymphoprep™ 分离液) 购于挪威的 axis-shield 公司, RT-PCR 试剂盒购于 Invitrogen 公司, RNA 抽提试剂盒、质粒抽提试剂盒以及胶回收试剂盒均购于华舜生物科技有限公司。

1.3 淋巴细胞的分离 选取 1 名过敏性体质志愿者 (同时患有哮喘、过敏性鼻炎以及荨麻疹), 应用流式细胞仪测得血清中 IgE 含量 > 4 000 kU/L (正常对照 < 100 kU/L), 从其肘静脉采取 EDTA 抗凝血 5 ml, 等体积的生理盐水稀释并混合均匀, 每 5 ml 稀释血缓慢加入到 5 ml 的 Lymphoprep™ 分离液中, 2 500 r/min 离心 15 min, 小心吸取中间层细胞, 转移至洁净试管中, 用生理盐水洗涤 2 次, 得到富含淋巴细胞的悬液。

1.4 总 RNA 的抽提以及 cDNA 片段的制备 将上述细胞沉淀物转移至 1.5 ml 的离心管中, 按照华舜公司的 RNA 抽提试剂盒的步骤抽提淋巴细胞的总 RNA。RT-PCR 反应体

系如下: 2 × RT-Reaction Mix 10 μl, RT-Enzyme Mix 2 μl, 样品 RNA 8 μl (600 ng), 总体积为 20 μl。反应条件: 25 10 min; 42 50 min; 85 5 min; 冰浴条件下加入 1 μl (2 U) *E. coli* RNase H; 37 20 min 后反应结束。

1.5 PCR 的引物设计及目的片段的 PCR 扩增 在 GenBank 中查到人 IgE 重链恒定区的基因序列, 所要克隆的目的片段 CH₂-CH₄ 长 1 145 bp, 根据引物设计的原则, 依据目的片段两端的核苷酸序列设计引物如下: P1 5'-ACC ACT CTC GAG TCT GCT CCA GGG ACTT CA-3 (下划线处为 *Xho* 酶切位点, 前方为保护碱基); P2 5'-GCT AGT AAG CTT TCA TTT ACC GGG ATT TAC-3 (下划线处为 *Hind* 酶切位点, 前方为保护碱基)。引物交由上海赛百盛生物公司合成。

以上一步骤反转录的 cDNA 为模板, 应用设计的引物进行 PCR 扩增, 经过摸索, 确定了最佳退火温度 (58 °C), 设计大量扩增的反应体系: 2 × Premix 100 μl; cDNA 16 μl; P1 (20 μmol/L) 8 μl; P2 (20 μmol/L) 8 μl; H₂O 68 μl, 总体积 200 μl。反应条件: 94 2 min; 94 30 s, 58 30 s, 72 60 s 共 35 个循环; 72 5 min 结束。

1.6 PCR 产物的胶回收及纯化 对上一部的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后在紫外灯下观察, 1 100 bp 处可见明亮条带, 与目的片段的预计值 1 145 bp 吻合, 对条带进行割胶回收。胶回收产物用乙醇沉淀法进行纯化。

1.7 重组质粒的构建 分别对纯化后的目的片段以及质粒载体 pBAD/g A 进行 *Xho* 和 *Hind* 双酶切, 并对酶切产物再行 1 次乙醇沉淀法纯化, 然后用 *T₄*-DNA 连接酶于 16 °C 进行连接反应, 得到连接产物。

1.8 连接产物的转化以及重组子的筛选与鉴定 先制备好 Top 10 的感受态细菌, 然后取 8 μl 连接产物转化 Top 10 感受态菌, 同时行阳性对照和阴性对照 (使用空质粒转化 Top 10 作为阳性对照; 未转化的 Top 10 作为阴性对照)。转化成功后挑取实验组平板上的 5 个单克隆菌落于 2 ml 含氨苄的 LB 培养基中, 37 °C 振荡过夜, 然后进行质粒抽提, 将抽得的质粒用 *Xho* 和 *Hind* 双酶切后电泳观察; 用合成的引物 P1 和 P2 对抽提的质粒行 PCR 反应, 反应条件同前, 反应结束后电泳观察。

[基金项目] 国家自然科学基金 (20043303). Supported by National Natural Science Foundation of China (20043303).

[作者简介] 唐 昊, 硕士生, E-mail: tanghao_0921@yahoo.com.cn

* Corresponding author.



1.9 目的片段的序列测定 将上述 5 个转化成功的重组子交给上海联合基因公司进行自动测序。

2 结果

2.1 RNA 抽提结果及 cDNA 片段的制备 抽提结束后用紫外分光光度计检测 RNA 的质量浓度和纯度, $D_{260}/D_{280} = 1.9$, 质量浓度为 67 ng/μl, 并对 RNA 行琼脂糖凝胶电泳, 以确保 RNA 的存在及含量。针对 RNA 反转录后的 cDNA, 用自行设计的引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增, 产物行琼脂糖凝胶电泳, 发现条带的分子量大小与预期值一致, 为 1 145 bp。

2.2 重组质粒的构建与鉴定 经过 PCR 扩增目的片段、胶回收、酶切、连接以及转化等步骤, 成功构建了重组质粒 pBAD-CH₂₋₄。重组质粒经双酶切鉴定正确, 可以酶切出 4 100 bp 左右的质粒以及 1 145 bp 的目的片段, 见图 1。经 PCR 鉴定亦正确, 电泳可见明亮条带, 大小也与预期值 1 145 bp 吻合, 见图 2。

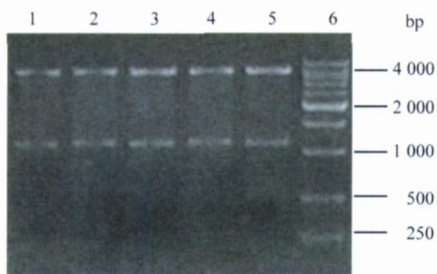


图 1 重组子双酶切鉴定电泳图

1-5: 为五个重组子双酶切后电泳结果, 均可见 4 100 bp 的质粒和 1 145 bp 的目的片段; 6: DNA Marker

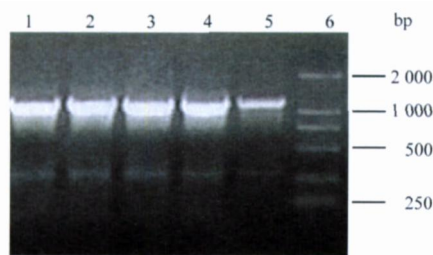


图 2 重组子 PCR 鉴定电泳图

1-5: 为五个重组子 PCR 产物的电泳结果, 均可扩增出 1 145 bp 的条带; 6: DNA Marker

2.3 DNA 的序列测定 自动测序交由上海联合基因公司进行, 从正反两个方向测序, 结果显示, 重组质粒中的目的片段 IgE_{CH₂-CH₄} 的测序结果同 GenBank 中的 IgE 重链恒定区的序列完全一致。

3 讨论

Flanagan 等^[4]最早对人 IgE 重链(即 ϵ 链)的基因进行了克隆, 并且率先报道了 IgE 重链恒定区的基因序列, 他们是将分泌 IgE 的骨髓瘤细胞系-266B1 的基因组 DNA 酶切成小片段, 建立相应的噬菌体文库, 再用 J_H 基因作为探针行 Southern 印迹检测, 筛选出含 ϵ 链的重组子。其局限性在于

标本来源于骨髓瘤细胞系而非人体淋巴细胞, 而且克隆的是基因组中相应的 DNA, 含有非编码序列, 无法表达出活性蛋白。此后 Kenten 等^[5]提取骨髓瘤细胞系-266BL 的 mRNA, 反转录成 cDNA 后再用类似的方法进行克隆和测序; Seno 等^[6]也是对骨髓瘤细胞系 U266 的 cDNA 进行了克隆, 建立了 cDNA 文库, 用特定的探针进行 Southern 印迹筛选。目前为止国内外尚无以人体内正常 B 淋巴细胞为标本的 ϵ 链克隆以及构建相应的原核表达载体。本研究则是通过分离出高血清 IgE 水平患者的外周血淋巴细胞, 提取 mRNA, 通过 RT-PCR 方法得到 ϵ 链 CH₂-CH₄ 的双链 cDNA, 构建了原核表达载体。与以前的 ϵ 链克隆相比, 由于可以借鉴以前的学者报道的基因序列, 本研究无需再建立 cDNA 文库以及进行相应的筛选, 可以根据序列设计引物, 直接扩增得到所要克隆的目的片段。与以前学者的研究不同的是, 本实验的标本来源于人外周血的淋巴细胞, 而非产 IgE 的骨髓瘤细胞系, 虽然克隆的 cDNA 序列与已报道的序列一致, 但是也可以证明, 从外周血 B 淋巴细胞中克隆的 IgE_{CH₂-CH₄} 在 cDNA 序列上与从骨髓瘤细胞系克隆没有差别, 而且中国汉族人的 IgE_{CH₂-CH₄} 序列不存在种族变异性。

无过敏体质的正常个体血清中 IgE 水平很低, 一般均低于 150 ng/ml, 血清中 IgE 水平的高低反映了血循环中分泌 IgE 的 B 细胞数量^[7], 所以本实验选取血清 IgE 水平较高患者的外周血作为实验标本, 他们的外周血中分泌 IgE 的 B 细胞也相对较多, 这样才能最大可能的获得编码 IgE 的 RNA。

本实验克隆的是中国汉族人 IgE_{CH₂-CH₄} 的 cDNA 表达载体, 可以有利于下一步制备有活性的 CH₂-CH₄ 蛋白, 为研究 IgE 与 Fc ϵ R 结合这一型变态反应重要步骤奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 王 刚, 王曾礼. 哮喘发病机制中 IgE 调控及重组人抗 IgE 单克隆抗体的应用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26: 427-430.
- [2] Vangelista L. Current progress in the understanding of IgE-Fc ϵ silonR interaction[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2003, 131: 222-233.
- [3] McDonnell JM, Calvert R, Beavil RL, et al. The structure of the IgE Cepsilon2 domain and its role in stabilizing the complex with its high-affinity receptor FcepsilonR alpha [J]. Nat Struct Biol, 2001, 8: 437-441.
- [4] Flanagan JG, Rabbitts TH. The sequence of a human immunoglobulin epsilon heavy chain constant region gene, and evidence for three non-allelic genes[J]. EMBO J, 1982, 1: 655-660.
- [5] Kenten JH, Molgaard HV, Houghton M, et al. Cloning and sequence determination of the gene for the human immunoglobulin epsilon chain expressed in a myeloma cell line [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79: 6661-6665.
- [6] Seno M, Kurokawa T, Ono Y, et al. Molecular cloning and nucleotide sequencing of human immunoglobulin epsilon chain cDNA[J]. Nucleic Acids Res, 1983, 11: 719-726.
- [7] Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, et al. The biology of IgE and the basis of allergic disease[J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 579-628.

[收稿日期] 2006-04-11

[修回日期] 2006-09-11

[本文编辑] 贾泽军