

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2008)03-0259-03

人胎盘 TRAIL 基因 cDNA 的克隆和鉴定

李红梅¹, 宋天保², 于月成³, 辛晓燕³, 张明¹, 许静洪¹ (¹延安大学附属医院妇产科, 陕西延安 716000, ²西安交通大学医学院组织胚胎学教研室, 陕西西安 710061, ³第四军医大学西京医院妇产科, 陕西西安 710033)

Cloning and identification of human placenta TNF-related apoptosis-inducing ligand cDNA

Li Hong-Mei¹, SONG Tian-Bao², YU Yue-Cheng³, XIN Xiao-Yan³, ZHANG Ming¹, XU Jing-Hong¹¹Department of Obstetrics and Gynaecology, Affiliated Hospital, Yan'an University, Yan'an 716000, China, ²Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China, ³Department of Obstetrics and Gynaecology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China**【Abstract】** AIM: To clone TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) cDNA and construct its prokaryotic expression vector. **METHODS:** The total RNA was extracted from the tissue of human placenta. The target fragment was amplified by RT-PCR, and then inserted into cloning vector pMD18-T. The construct was identified by enzyme digestion and sequencing. **RESULTS:** A 1049 bp fragment was cloned by RT-PCR and was digested by endonuclease *EcoR* I and *Bam*H I. DNA sequencing showed that the cloned TRAIL gene was identical to the TRAIL sequence in the human GenBank. **CONCLUSION:** The extracellular region of TRAIL full length gene is obtained successfully, which lays a basis for its potential application to tumor immunotherapy.**【Keywords】** TNF; apoptosis; ligand; RT-PCR; sequencing; human placenta**【摘要】**目的 利用基因工程技术克隆 TRAIL 基因全长 cDNA, 并构建其原核表达载体。方法 从人胎盘中提取总 RNA, 利用 RT-PCR 技术扩增了 TRAIL, 将其连接于克隆载体 pMD18-T 中, 并通过酶切及测序鉴定载体构建的正确性。结果 应用 RT-PCR 技术和 *Bam*H I 和 *EcoR* I 双酶切成功获得 1049 bp 的目的片段, 测序分析结果表明该基因序列与报道的 TRAIL 基因片段的序列完全相同。结论 成功克隆了 TRAIL 基因的 cDNA 全长, 为其在肿瘤生物治疗中的应用奠定了基础。

收稿日期 2007-06-25; 接受日期 2007-10-15

作者简介: 李红梅, 博士, 教授, 主任医师。Tel (029) 88069258

Email ylhmqq@yahoo.com.cn

【关键词】 肿瘤坏死因子; 细胞凋亡; 配体; RT-PCR; 序列测定; 人胎盘**【中图分类号】** Q78 **【文献标识码】** A

0 引言

1995 年 Wiley 和 Pitt 首次从人的表达标签文库中发现一个与肿瘤坏死因子家族基因序列具有高度同源性的 DNA 克隆, 其表达的蛋白具有诱导细胞凋亡的功能, 因而将其命名为肿瘤坏死因子相关诱导凋亡配体 (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)^[1-2]。作为一种新的凋亡诱导配体, 肿瘤坏死因子相关诱导凋亡配体 (TRAIL) 自发现以来, 就一直倍受关注。有关 TRAIL 和 TRAIL 受体以及其信号转导通路的研究已取得很大进展, 而 TRAIL 特异性诱导肿瘤细胞凋亡的分子调控机制目前尚未阐明。作为一种特异性诱导肿瘤细胞凋亡且无明显毒副作用的分子, TRAIL 极有可能成为新的抗肿瘤制剂^[3-4]。研究表明, TRAIL 在选择性诱导肿瘤细胞凋亡的同时对正常组织没有明显细胞毒性, 并且和放疗、化疗有协同作用, 使得 TRAIL 在肿瘤的治疗上具有广阔的前景^[5-6]。我们采用 RT-PCR 方法克隆了 TRAIL 全长的基因片段, 经酶切和测序证实其正确性, 为进一步研究及临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 DH5 α 由第四军医大学西京医院妇产科实验室保存, pMD18-T 载体、*EcoR* I, *Bam*HI 内切酶、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker DL2000 购自大连 TaKaRa 公司, 胰蛋白酶 (Tryptone) 酵母提取物 (Yeast-extract) 购自英国 OXOID LTD 公司, 质粒抽提试剂盒及凝胶回收试剂盒购自安徽优晶生物工程有限公司, 反转录试剂盒购自 Fermentas 公司, PCR 引物由上海博亚生物工程有限公司合成。**1.2 方法****1.2.1 引物的设计与合成** 根据 GenBank 报道的 TRAIL 基因的序列并参照已发表的文献设计合成两条引物。上游引物 P1 序列为: 5'-GAATTCcggtgcctg-gctgacttac-3', 划线处为 *EcoR* I 的酶切位点; 下游引物

P2 序列为:5'-GGATCCtttttggtgtggtgctctac-3', 划线处为 *Bam*H I 的酶切位点。

1.2.2 胎盘组织中总 RNA 提取 采用 Trizol 一步法提取人胎盘组织中总 RNA。称取 100 mg 新鲜人胎盘组织, 加入 1 mL Trizol 匀浆, 裂解 5 min。加入氯仿进行液相分离。取上层水相, 转至另一离心管中。加异丙醇沉淀, 离心 10 min 后弃上清, RNA 沉淀于管底。加 700 mL/L 乙醇洗涤, 温和震荡离心管, 悬浮沉淀。再次离心 5 min; 尽量弃上清, 37℃ 干燥后, 溶于 DEPC 水中。取其中 2 μ L 溶液紫外分光光度计定量, 其余贮存于 -80℃ 待用。

1.2.3 RT-PCR 取 5 μ L 总 RNA, 按 Fermentas 试剂盒的说明进行操作。扩增参数为: 70℃ 水浴 5 min, 37℃ 水浴 5 min, 42℃ 水浴 60 min, 70℃ 水浴 15 min, 冰浴待用。然后以 cDNA 为模板, PCR 反应条件为: 95℃ 变性 3 min 后, 按 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min 的顺序循环 30 次, 再于 72℃ 延伸 7 min。取 PCR 产物 5 μ L 在含溴化乙啶的 10 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳。

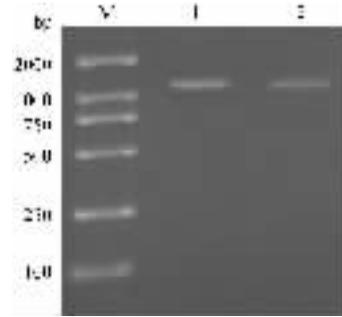
1.2.4 PCR 产物的纯化、克隆与鉴定 PCR 扩增产物电泳结束后, 在紫外检测仪下切取所需大小的凝胶片段, 按凝胶回收试剂盒操作说明第一次回收目的片段。将回收产物用 *Eco*RI 和 *Bam*H I 内切酶进行双酶切, 第二次回收目的凝胶片段, 酶切产物在含溴化乙啶的 10 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳, 缓冲液为 0.5 \times TBE, 电泳结束后, 在紫外检测仪下切取目标片段, 第三次回收。取凝胶回收纯化的 PCR 产物 4 μ L 加入 pMD-18T 载体 1 μ L, Ligation Solution I 5 μ L, 16℃ 连接过夜。连接产物转化感受态细菌 DH5 α , 然后将连接产物涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的固体 LB 培养基平板中, 37℃ 培养过夜。挑取单菌落加入 5 mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的液体 LB 培养基试管中, 37℃ 培养过夜。采用质粒抽提试剂盒进行质粒抽提, 对质粒进行 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切鉴定, 鉴定阳性的载体送大连 TAKARA 公司测序。将测序证实完全正确的序列命名为 pMD18-T-TRAIL, 保存菌种。

2 结果

2.1 TRAIL 基因的克隆 提取胎盘组织总 RNA, 反转录合成 cDNA 第一链, 以此为模板进行 PCR, PCR 产物的大小约为 1049 bp (图 1), 无杂带、特异性良好, 与我们所设计的相吻合, 克隆后片段大小与 PCR 产物大小吻合。

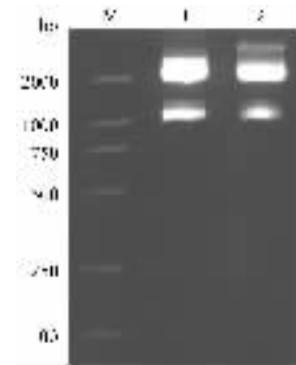
2.2 TRAIL 基因重组载体的酶切鉴定 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切含有 TRAIL 基因的 pMD18-T 载

体, 获得大小为 1049 bp 的目的片段(图 2), 表明含有 TRAIL 基因的克隆载体构建成功。



M: DNA marker (DL2000); 1 2: PCR product.

图 1 TRAIL 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析



M: DNA marker (DL2000); 1 2: pMD18-T-TRAIL/*Bam*HI + *Eco*RI.

图 2 重组质粒 pMD18-T-TRAIL 的双酶切鉴定

2.3 TRAIL 基因的序列分析 以定向克隆入 pMD18-T 载体中的 TRAIL 基因的 PCR 产物转化 *E. coli* DH5 α , 挑取均含有目的基因片段的 5 个菌落, 取其中 1 个菌落做序列测定证实, 所得序列的结果联网到 NCBI 进行同源性分析。核酸序列与质粒 pMD18-T-TRAIL 中的 TRAIL 序列同源性为 99.69%, 发现有两个碱基突变。在 NCBI 的 ORF finder 中, 服务器分析开放阅读框架, 翻译成 281 个氨基酸序列, 进行同源性分析, 同源性为 100%。说明测序结果中的两个碱基突变为同义突变, 外源 TRAIL 基因可以正确表达。

3 讨论

TRAIL 为肿瘤坏死因子(TNF)超家族的新成员。人的 TRAIL 基因编码一种 M_r 32 500 的 II 型跨膜蛋白, 该蛋白由 281 个氨基酸残基组成。其氨基端位于胞外区, 可形成同源二聚体与相应的膜受体结合, 介导信号转导入细胞内, 引起细胞凋亡。研究发现, TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡主要通过与其受体结合发挥作用。随着研究的深入, 后来相继发现了与 TRAIL

结合的受体共有 5 种,它们的功能也渐趋清楚^[7-8]。其 5 种受体为:两种死亡受体即 DR4 (death receptor 4)和 DR5 (death receptor 5);两种诱骗受体即 DcR1 (decoy receptor 1)和 DcR2 (decoy receptor 2);一种可溶性受体骨保护素(osteoprotegerin, OPG),是调节骨密度有关的受体(regulating bone density receptor)。DR4 和 DR5 具有 TNF 受体超家族其它成员类似的胞浆死亡结构域(plasmic death domain),其与 TRAIL 特异结合后可通过死亡结构域激发和传导细胞凋亡信号,激活 caspase 蛋白酶级联反应,导致细胞死亡^[9-10]。

肿瘤治疗一直是治疗性细胞凋亡干预的重要应用领域。TNF 和 FasL 或 Fas 单克隆抗体很早就被用于肿瘤的治疗。它们在体外都能诱导肿瘤细胞迅速凋亡,有效杀伤肿瘤细胞,但皆因严重的毒副作用,其中主要是对机体正常细胞的杀伤作用,限制了它们的临床应用。TRAIL 能有效杀伤肿瘤细胞,但其 mRNA 在组织中的广泛分布提示它对正常组织细胞可能没有毒性。研究提示,正常组织细胞因具有 TRAIL 诱骗受体(decoy receptor),能逃避 TRAIL 的攻击,而肿瘤细胞不具有这一保护性受体,不能抵御 TRAIL 的杀伤作用^[11]。由于 TRAIL 诱导凋亡机制不同于 TNF,因此对其抗肿瘤作用价值的评价就显得十分重要。

【参考文献】

[1] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis

[J]. *Immunity*, 1995, 3(6): 673-682.

[2] Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(22): 12687-12690.

[3] Gruss HJ. Molecular structural and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily[J]. *Int J Clin Lab Res*, 1996, 26(3): 143-159.

[4] Shi J, Zheng D, Man K, et al. TRAIL: A potential agent for cancer therapy[J]. *Curr Mol Med*, 2003, 3(8): 727-736.

[5] Wu XX, Ogawa O, Kakehi Y, et al. TRAIL and chemotherapeutic drugs in cancer therapy[J]. *Vitam Horm*, 2004, 67: 365-383.

[6] Tomek S, Horak P, Priblil, et al. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in ovarian cancer cell lines is overcome by co-treatment with cytotoxic drugs[J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 94(1): 107-114.

[7] Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology[J]. *Cell*, 2001, 104(4): 487-501.

[8] Emery JG, McDonnell P, Burke MB, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(23): 14363-14367.

[9] Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, et al. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5[J]. *Immunity*, 2000, 12(6): 611-620.

[10] Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, et al. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2[J]. *Immunity*, 2000, 12(6): 599-609.

[11] Sheridan JP, Marster SA, Pitti RM, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors[J]. *Science*, 1997, 277(5327): 818-821.

编辑 王雪萍

欢迎投稿 欢迎订阅

《第四军医大学学报》是国内外公开征稿和发行的高级综合性医学学术期刊,曾荣获首届国家期刊奖,第二届国家期刊奖提名奖,百种中国杰出学术期刊,全国高校优秀期刊和陕西省编辑出版优秀期刊,是中国各大检索系统源期刊,《中文核心期刊要目总览》收入期刊,美国化学文摘(CA),俄罗斯文摘杂志(AJ)和哥白尼索引(IC)源期刊。本刊主要刊载基础医学、临床医学、预防医学、军事医学、口腔医学、航空航天医学、中医中药学、生物医学工程学方面的研究原著、研究快报、经验交流、病例报告、综述和述评等各类学术性中文文稿。

地址 (710033) 西安市长乐西路 169 号

电话 (029) 84774674, 84773456, 84773804, 84773814

传真 (029) 84774499

http://journal.fmmu.edu.cn

Email: edjfmumu@fmmu.edu.cn