

猪 CD8 分子基因的克隆与初步鉴定

刘岗 许发芝 余为一* (安徽农业大学动物科技学院, 安徽合肥 230036)

摘要 [目的] 为了研究 CD8 分子的生物学功能。[方法] 自行设计一对引物, 从猪脾细胞中, 克隆了猪 CD8 链基因, 获得大小为 700 bp 的基因片段, 并对其进行鉴定。[结果] 结果表明, 该基因片段的核苷酸序列与已报道猪的同源性为 99.2%, 与豚鼠、人、猴子、猫和狗的同源性分别为 35.6%、55.7%、55.6%、56.4% 和 56.8%。[结论] 该研究为进一步研究 CD8 分子的生物学功能提供了依据。

关键词 猪; CD8; 克隆

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)25-07840-01

Cloning and Identification of Gene of Porcine CD8 Molecule

LIU Gang et al (College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract The objective of the study was to explore the biological functions of CD8 molecule. CD8 was a cell surface glycoprotein found in cytotoxic T lymphocytes and served a co-receptor with the TCR for T cell activation. In order to study the biological function of CD8, a gene fragment of 700 bp was cloned with a pair of specific designed primer from porcine spleen cells. The results of identification and analysis indicated that the homology with other sequence registered in Gene Bank was up to 99.2% and about 35.6%, 55.7%, 55.6%, 56.4% and 56.8% to guinea pig, human, monkey, cat and dog, respectively.

Key Words Porcine; CD8; Cloning

CD8 分子是 T 淋巴细胞表面的一种跨膜糖蛋白^[1], 主要表达在细胞毒性 T 淋巴细胞、抑制性 T 细胞、自然杀伤性细胞表面^[2-3]。它主要是由两条链(CD8 α 和 CD8 β) 构成。最近研究表明, 小鼠肠上皮 T 淋巴细胞中 CD8 α 同型二聚体可作为肠上皮组织屏障行使免疫调节的功能, 以不依赖 TCR 的方式单独与非经典的 MHC 类抗原结合, 形成小鼠肠道组织与外界环境之间的屏障^[4]。为了进一步研究猪 CD8 分子在免疫应答中的作用, 笔者克隆了该分子基因片段。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 试验猪购于安徽省某猪场。质粒由安徽农业大学动物科技学院实验室保存。各类工具酶试剂分别购自 Invitrogen、Sigma 和华美生物工程公司等。

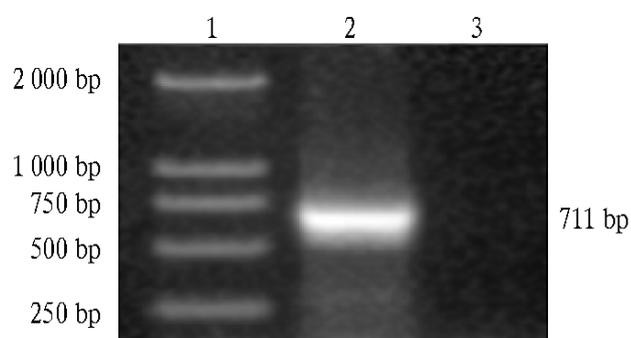
1.2 猪 IFN 基因的克隆与鉴定 猪脾脏淋巴细胞的分离和诱导培养参考《分子克隆实验指南》^[5]。猪脾脏淋巴细胞总 RNA 的抽提使用 Trizol 抽提猪脾脏淋巴细胞的总 RNA。具体操作方法参照 Invitrogen 公司说明书进行。设计一对添加有酶切位点的引物, 即上游引物 5'-GGAATTCATGGCCTCTGGTGACC GC-3 (EcoRI), 下游引物 5'-GCGTCGACTTAGATGAATCTCTCTGAAG-3 (SalI)。RT-PCR 参照反转录试剂盒说明书进行, 扩增猪 CD8 基因。PCR 扩增结束后, 取 2.0 μ l 扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶中进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 猪 CD8 基因片段的 RT-PCR 扩增及鉴定 应用自行设计的一对引物, 通过 RT-PCR 从脾细胞扩增出一个片段。在琼脂糖凝胶电泳图谱中, 该片段其大小约为 700 bp(图 1 泳道 2), 与预期的猪 CD8 基因含信号肽编码序列的片段相一致。

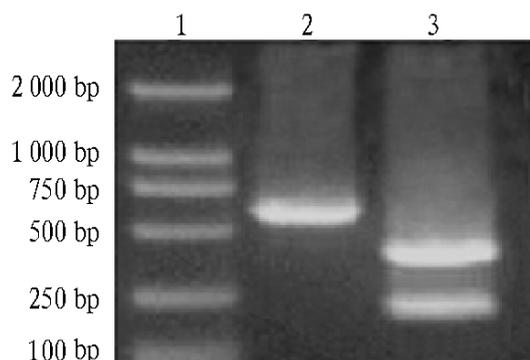
2.2 猪 CD8 基因片段的酶切鉴定 CD8 基因在 241 bp 处有一个 TaqI 酶切位点。PCR 的酶切产物在琼脂糖凝胶电泳图谱中, CD8 基因酶切形成的两条 DNA 片段大小分别约为 470 和 241 bp(图 2 泳道 3), 两者总长度约为 711 bp, 与预期酶

切结果相符。



注: 1. DL 2000 Marker; 2. PCR products; 3. Negative control.

图1 CD8 α 的 PCR 产物鉴定



注: 1. DNA Marker DL 2000; 2. Products of RT-PCR; 3. Products of RT-PCR/TaqI.

图2 CD8 基因 RT-PCR 扩增产物及其酶切鉴定结果

2.3 猪 CD8 基因的测序鉴定 对猪 CD8 基因进行了测序鉴定, 发现所克隆的猪 CD8 基因与 GenBank 登录的猪 CD8 基因(登录号: AY517855) 的同源性高达 99.2%。

3 讨论

该研究确定的猪 CD8 基因开放阅读框长 711 bp, 编码 237 个氨基酸的猪 CD8 前体蛋白。氨基酸同源性的比较发现, 猪与豚鼠、人、猴子、猫、狗 CD8 蛋白的氨基酸同源性分别为 35.6%、55.7%、55.6%、56.4% 和 56.8%, 且人和各种动物 CD8 分子氨基酸序列的差异主要表现在胞外区, 而胞浆区相对保守。

参考文献

- [1] PARK CS, YANG Y F. Reversible CD8 expression induced by common cytokine receptor chain dependent cytokines in a cloned CD4⁺T_H1 cell line[J]. International Immunology, 2002, 4: 259 - 266.
- [2] GIBOTTE R, BHANDoola A. CD8 coreceptor extinction in signaled CD4⁺CD8⁺ thymocytes: Coordinate roles for both transcriptional and posttranscriptional

基金项目 国家自然科学基金项目(30671537)。

作者简介 刘岗(1980-), 男, 安徽阜阳人, 硕士研究生, 研究方向: 动物病毒学及免疫学。* 通讯作者。

收稿日期 2007-05-08

(下转第 7848 页)

(上接第7840 页)

tional regulatory mechanisms in developing thymocytes[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20:3852-3859.

- [3] EVA J, ROOSA S. Rat peripheral CD4⁺ CD8⁺ T lymphocytes are partially immunocompetent thymus-derived cells that undergo post-thymic maturation to become functionally mature CD4⁺ T lymphocytes[J]. *Journal of Immunology*,

2002, 168:5005-5013.

- [4] ZHANG X L, ZHAO S. CD8 expression up to the double-positive CD8^{low} intermediate stage of thymic differentiation is sufficient for development of peripheral functional cytotoxic T lymphocytes[J]. *Exp Med*, 2001, 194:685-693.
- [5] J 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科技出版社, 1992.