

基础研究 ·

615 小鼠 H-2K^k 基因 cDNA 的克隆及 序列测定和分析

李龙江 龚浩 陈俊杰 王若菡 温玉明 王昌美

摘要 目的:克隆 615 小鼠主要组织相容性复合体(MHC) 分子抗原识别基因 H-2K^k 并测序分析,为转基因治疗提供目的基因。方法:采用 RT-PCR 法从 615 小鼠肝组织总 RNA 中获得 1.4 kb 的 H-2K^k 基因 cDNA,将其定向连接至 PGEM3Z(+)载体,转化 *E. coli* JM109,限制性内切酶筛选出阳性克隆 PGEM3Z(+)-H-2K^kcDNA,末端终止法完成 H-2K^kcDNA 的全序列测定。结果:测得的 H-2K^kcDNA 序列与文献报道序列同源性高达 99%,编码 MHC 分子抗原识别部位的氨基酸残基的核苷酸序列完全相同。结论:成功克隆了 615 小鼠 MHC 分子抗原识别基因,获得了表达 MHC 功能的目的基因。

关键词 主要组织相容性复合体 基因 克隆 小鼠

The Cloning and Sequencing of H-2K^k Gene cDNA of 615 Mice

Li Longjiang, Gong Hao, Wen Yuming, et al

West China College of Stomatology, Sichuan University

Chen Junjie, Wang Ruohan

Molecular Biology Laboratory, West China College of Basic and Forensic Medicine, Sichuan University

Abstract

Objective: The purposes of this study were to clone and sequence the major histocompatibility complex type (MHC) molecular antigen recognizing gene (H-2K^k) of 615 mice, and to provide the functional gene for transgenic therapy. **Methods**: The 1.4 kb full-length fragment of H-2K^k gene complementary DNA (cDNA) was amplified from the total RNA of 615 mouse liver by using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The cDNA was inserted into PGEM3Z(+) vector directionally, and the competent *E. coli* JM109 was transformed with the ligated product. The recombinant PGEM3Z(+)-H-2K^k cDNA plasmid was obtained using restricted enzyme analysis of the transfectants. The complete sequence of 615 mouse H-2K^k cDNA was determined by using Sanger's method. **Results**: The sequences of 615 mouse H-2K^k cDNA were 99% similar with those of H-2K^k cDNA which were reported by other researchers, and the sequences encoding antigen recognizing regions (ARS) were identical with each other. **Conclusion**: The authors cloned the MHC molecular antigen recognizing gene (H-2K^k) of 615 mice successfully and got the functional gene of MHC.

Key words: H-2K^k gene major histocompatibility complex type sequence clone mice

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)编码的细胞膜表面糖蛋白在免疫反应中参与抗原加工和递呈,恶性肿瘤的MHC 类分子表达降低,导致肿瘤细胞弱抗原性和免疫逃逸。作者拟用 615 小鼠进行恶性肿瘤 MHC 转基因治疗研究,必须先获得该小鼠的 MHC 基因 cDNA,但

目前国内外尚缺乏有关研究资料。本研究应用 RT-PCR 法,从 615 小鼠肝组织总 RNA 中获得并克隆了 MHC 分子中的抗原识别基因(H-2K^k 基因) cDNA,并对它作了全序列测定和分析,为进一步的基因治疗研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂

615 小鼠(第三军医大学实验动物中心)和作为阳性对照的 C57 小鼠(四川大学华西实验动物中心)均为 6 周龄小

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 39700162)

作者单位:610041 四川大学华西口腔医学院(李龙江,龚浩,温玉明,王昌美),四川大学华西基础医学与法医学院分子生物学开放实验室(陈俊杰,王若菡)

鼠。组织细胞总 RNA 提取试剂盒购自上海华舜生物工程公司。PGEM3Z(+)载体及 *E. coli* JM109 由四川大学华西基础医学与法医学院重组 DNA 研究室提供。AMV 逆转录酶、TaqDNA 聚合酶、T4 连接酶、内切酶等试剂购自 Promega 和 Gibco 等公司。

1.2 RT-PCR 反应和产物纯化

根据小鼠 MHC 基因 mRNA 的 5 非翻译区及 3 非翻译区下游存在基因座特异性的核苷酸序列的特点,设计合成一对小鼠 K 基因座特异性引物,上游引物:5'-TAAGAATTCCTCGAATCCGACCGGTCCGAT3',下游引物:5'-TAGGGATCCGCCCTAGGICAAGATGATAAC-3'。处死动物,提取肝组织总 RNA 逆转录反应合成 cDNA 第一条链。PCR 反应体系:KCl:50 mmol/L、MgCl₂:1.5 mmol/L、Tris:10 mmol/L(pH 8.3)、明胶:0.01%、dNTP:200 μmol/L,各引物:0.5 μmol/L,逆转录产物 2 μl, TaqDNA 聚合酶 2.5 U,反应体积 40 μl,首先按 94 1 min 和 68 5 min 循环 10 个周期,补加 TaqDNA 聚合酶 2.5 U,再按 94 1 min、65 2 min 和 72 4 min 循环 25 个周期,最后 72 延伸 7 min。RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离,电洗脱回收 1.4 kb 的目的条带。

1.3 连接、转化和目的克隆筛选

EcoR I 和 *BamH I* 双酶切 1.4 kb 的目的基因片段和 PGEM3Z(+)质粒,目的基因片段与 PGEM3Z(+)按摩尔比 2:1 连接,琼脂糖凝胶电泳鉴定。连接产物转化 *CaCl*₂ 法制备 *E. coli* JM109 感受态细菌,转化菌铺于含 X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂固体培养基上培养筛选。挑取白色单菌落扩大培养后,小量制备质粒;以 *EcoR I* 和 *BamH I* 双酶切小量制备的质粒,经琼脂糖凝胶电泳鉴定,具有 1.4 kb 插入片段者为阳性。取阳性克隆菌种液培养,大量制备质粒;双酶切,分离回收 1.4 kb 插入片段,用 *Pst I*、*Pvu II* 和 *Taq I* 3 种限制性内切酶对插入片段分别行单酶和两两组合的双酶切,酶切产物行琼脂糖凝胶电泳,以限制性内切酶图谱与 615 小鼠 H-2K^bcDNA 相同者为目的克隆。

1.4 全序列测定和分析

克隆质粒在 ABI377 型全自动测序仪上测序,在互联网上用 Blastn 服务器对该序列进行查询和比较。

2 结 果

RT-PCR 反应扩增后琼脂糖电泳图谱上出现一条大小在 1375 ~ 1584 bp 之间的特异性条带,如图 1 所示。RT-PCR 产物与 PGEM3Z(+)的连接产物分子量明显大于线性化的空载体(图 2)。在 LB 培养基上共选取了 4 株单菌落,制备的质粒经 *EcoR I* 和 *BamH I* 双酶切后,见克隆 No. 2 具有 1.4 kb 的插入片段(图 3)。克隆 No. 2 插入片段经 *Pst I*、*Pvu II*、*Taq I* 单酶和双酶切,各条带与 H-2K^bcDNA 酶切图

谱相符(图 4)。615 小鼠 H-2K^bcDNA 全序列的 Genbank Blastn 服务器在线查询比较发现它与接收号为 U47330 的序列具有 99% 的同源性。将 615 小鼠 H-2K^bcDNA 全序列与 Arnold 等¹测定的 B10.BR 小鼠 H-2K^b 基因全序列比较,其编码区第 148 位氨基酸由 AAC 突变为 AAA(N → K),第 157 位氨基酸 GCC 同义突变为 GCT(A → A),第 224 位氨基酸由 TGC 突变为 CGC(C → R),最后一个外显子缺失 9 个氨基酸密码子,其 3 非翻译区与后者完全一致。

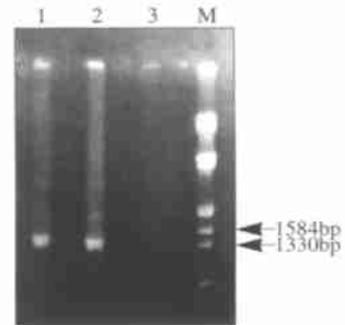


图 1 RT-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果

1:615 小鼠 RT-PCR 产物;2:C57 小鼠 RT-PCR 产物;3:空白对照;M: DNA/ *EcoR I* + *Hind III* 分子量标准

Fig 1 Products by RT-PCR(0.8% agarose electrophoresis)

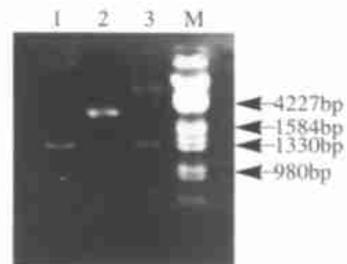


图 2 PGEM3Z(+)与目的基因的连接产物电泳结果

1:RT-PCR 产物/ *EcoR I* + *BamH I*;2:PGEM3Z(+)/ *EcoR I* + *BamH I*;3:PGEM3Z(+)与目的基因的连接产物;M: DNA/ *EcoR I* + *Hind III* 分子量标准

Fig 2 The ligated products(1.2% agarose electrophoresis)

3 讨 论

根据结构和功能,MHC 分、和 类。三类基因以紧密连锁的方式定位于染色体。研究最为详尽的 MHC 系统是人类的 MHC(人白细胞抗原, human leukocyte antigen, HLA) 和小鼠的 MHC(H-2), 1999 年已完成划时代的 HLA 全序列测定工作²。MHC 类分子对细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 识别病毒感染细胞和肿瘤细胞的内源性抗原起限制作用。细胞内抗原衍生的 8 ~ 11 个氨基酸的短肽链³ 由靶细胞表面的 MHC 分子递呈给 CTL 细

细胞,使之激活并分泌穿孔素,最终杀死病毒感染细胞或肿瘤细胞。近年来的研究发现恶性肿瘤中存在MHC 类分子表达下降的现象。这是导致恶性肿瘤弱抗原性和逃避机体免疫监视的原因之一⁴。作者克隆615小鼠H-2K^kcDNA拟用615小鼠进行恶性肿瘤的MHC 转基因治疗研究。小鼠H-2位于第17号染色体,其 类基因分别位于K、D/L、Qa2.3和TLa 4个基因座上,这些基因编码分子量为45kd的重链。重链与分子量为12kd的₂微球蛋白轻链结合形成异二聚体蛋白行使功能。重链分为1、2和33个胞外结构域以及跨膜区和胞内区。K、D/L基因座上的等位基因具有高度的多态性,以适应其行使免疫识别功能,其多态性主要表现在1和2区。



图3 克隆No.1~4的 *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切产物(1.2%琼脂糖凝胶电泳)

M: DNA/ *EcoRI* + *HindIII* 分子量标准;1、3、5、7:克隆No.1~4;2、4、6、8:克隆No.1~4/ *EcoRI* + *BamHI*

图3 The plasmid from clone No.1~4 digested by *EcoRI* and *BamHI* (1.2% agarose electrophoresis)

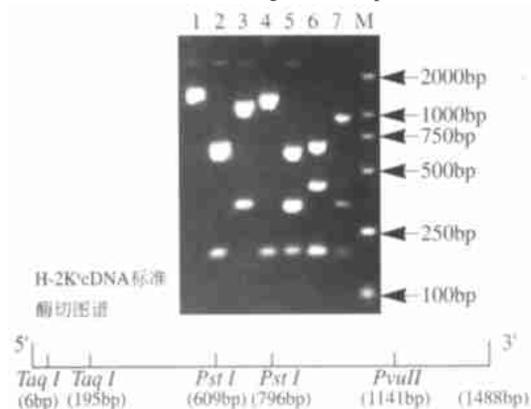


图4 克隆No.2插入片段的限制性内切酶图谱

1:克隆No.2; 2:克隆No.2/ *PstI*; 3:克隆No.2/ *PvuII*; 4:克隆No.2/ *TaqI*; 5:克隆No.2/ *PstI* + *PvuII*; 6:克隆No.2/ *PstI* + *TaqI*; 7:克隆No.2/ *PvuII* + *TaqI*; M:DL 2000 Ladder 分子量标准

图4 The restriction map of the insertions in the plasmid from clone No.2

615小鼠是中国自己培育的近交系小鼠,为实验肿瘤学的良好研究对象,已于1985年被国际小

鼠标准遗传命名委员会承认为国际标准近交系小鼠⁵。何球藻等⁶应用血清学方法鉴定该鼠的H-2单体型为k,但未见任何615小鼠H-2基因克隆的报道。将RT-PCR法克隆的615小鼠H-2K^kcDNA的序列与Arnold等¹测定的B10.BR小鼠H-2K^k基因序列相比较以及在Blastn服务器上查询均显示:615小鼠H-2K^kcDNA与其它已测序的小鼠H-2K^kcDNA具有99%的同源性,点突变部位均不位于MHC分子的抗原识别位点处。说明用RT-PCR法克隆的615小鼠H-2K^kcDNA的全序列正确,但不构成是新的H-2K^k表型。第八外显子缺失9个氨基酸密码子可能是不同的mRNA剪辑方式引起。

MHC编码区序列具有极高的同源性,如果利用编码序列设计RT-PCR引物,只能得到杂乱无章的嵌合体分子。在小鼠H-2 mRNA的5'非翻译区和3'非翻译区下游部位存在基因座特异性的核苷酸序列,可用于引物设计。作者用RT-PCR法克隆的615小鼠H-2K^kcDNA经测序和查询证明其忠实性值得信赖。用RT-PCR法克隆MHC基因cDNA省去常规克隆cDNA必须进行的cDNA文库构建、特异性探针杂交筛选等繁琐工作,却能达到同样效果,该方法在MHC研究中值得推广。

参考文献

- 1 Arnold B, Burgert HG, Archibald AL, et al. Complete nucleotide sequence of murine H-2K^k gene: Comparison of three H-2K locus alleles. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12 (24): 9473 ~ 9487
- 2 The MHC Sequencing Consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 1999, 401 (6756): 921 ~ 923
- 3 Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, et al. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature*, 1991, 353 (6342): 326 ~ 329
- 4 Appleman LJ, Frey AB. Tumor antigens encoded by oncogenes and the impact of oncogenes upon the immune response. *Cell Immunol*, 1996, 170 (1): 1 ~ 10
- 5 褚建新,李肇玫主编. 615近交系小鼠及其在实验肿瘤研究中的应用. 北京:人民卫生出版社, 1989: 55 ~ 107
- 6 何球藻,董玮,郑秀娟,等. 国内培育的几株近交系小鼠的H-2鉴定. *上海免疫学杂志*, 1981, 1 (1): 5 ~ 7

(2001-08-31 收稿,2002-05-31 修回)

(本文编辑 王 晴)