

人胎盘 TRA L 基因的 cDNA 克隆及序列测定^{*}

张明烽, 唐 爽, 宋红卫, 张 涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 根据 GeneBank (U 37518) 中 TRA L (肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体) 的 cDNA 序列, 设计扩增引物。采用 RT-PCR 从人胎盘中扩增出 TRA L 基因的全长 cDNA。产物纯化后连至 pGEM-T Easy 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 筛选阳性克隆菌, 酶切鉴定并进行序列测定。结果表明, 本试验成功地克隆了 TRA L 基因的 1 039 bp 全长 cDNA。

[关键词] 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (TRA L); RT-PCR; 序列测定; 人胎盘

[中图分类号] Q 786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)02-0006-03

TRA L (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRA L) 也称凋亡素 2 配体 (APO 2 ligand, APO-2L), 即与肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体^[1,2]。它是肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族的新成员, 1995 年由 Wiley 等^[1]首次克隆成功。人 TRA L 基因全长为 1 769 bp, 分子质量 32.5 ku, 为 II 型跨膜蛋白, 由胞浆区 (14 氨基酸)、跨膜区 (26 氨基酸) 和胞膜外区 (241 氨基酸) 组成, 胞膜外区有一个糖基化位点。TRA L 胞膜外区有蛋白酶作用位点, 可以从膜上剪切下来形成可溶性分子。TRA L 可诱导多种肿瘤细胞凋亡, 而对正常组织细胞无凋亡诱导作用, 且无毒副作用^[3]。因此, 基于 TRA L 分子安全、无毒副作用的特点, 其有可能用于基因治疗或成为新的抗肿瘤药物。本研究利用 TRIzol 试剂从人胎盘中提取总 RNA, 通过 RT-PCR 方法克隆了 TRA L cDNA 全长, 并进行了序列测定, 以期为进一步研究 TRA L 蛋白的抗肿瘤作用和基因治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜人胎盘组织取自陕西杨凌示范区医院, 大肠杆菌菌株 DH5 α 由西北农林科技大学生物工程研究所保存, TRIzol 试剂购自 GIBCO 公司, DEPC 购自 AMRESCO 公司, RT-PCR 试剂盒 ThermoScriptTM 为 Invitrogen 公司产品, 凝胶回收

试剂盒为 TaKaRa 公司产品, 质粒抽提试剂盒 (Wizard Plus Miniprep DNA Purification System)、pGEM-T Easy 载体、限制性内切酶 Not I 均购自 Promega 公司, PCR 引物由北京三博远志生物技术公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计 根据 Wiley 等^[1]发表的人 TRA L cDNA 序列 (Genebank U 37518) 设计上下游引物。

上游引物:

5'-GGCTGCCTGGCTGACTTACA-3';

下游引物:

5'-GTGGCTGCTCTACTCA GATTGC-3'。

1.2.2 总 RNA 的提取 采用 TRIzol 试剂提取人胎盘总 RNA。参考试剂使用说明, 将保存在液氮中的组织块直接放入研钵中, 在保持研钵中不缺少液氮的情况下迅速研磨, 研成粉末后转入 Eppendorf 离心管, 加入 TRIzol 试剂裂解 5 min, 再加入氯仿进行液相分离。转移水相至一新的离心管中, 加异丙醇沉淀, 立即弃上清液后用体积分数 75% 乙醇洗涤, 然后再用 DEPC 水重溶, 55~60℃ 温育 10 min 后立即反转录。剩余 RNA 于 -70℃ 保存。

1.2.3 RNA 的甲醛变性电泳 取总 RNA 10 μ L 进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果如图 1 所示。由图 1 可见, 利用 TRIzol 试剂从人胎盘中提取的总 RNA 完整性较好。

* [收稿日期] 2004-03-03

[基金项目] 国家“863”高技术资助项目 (2001AA 213081)

[作者简介] 张明烽 (1979-), 男, 内蒙古赤峰人, 在读硕士, 主要从事哺乳动物胚胎工程和分子生物学研究。

[通讯作者] 张 涌 (1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程与发育生物学研究。



图1 总RNA的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳

Fig 1 Formaldehyde denaturalized electrophoresis of total RNA

1.2.4 RT-PCR 取 5 μ L 总 RNA, 按照 ThermoScript™ 试剂盒的操作方法, 以特异性下游引物合成 cDNA。扩增参数为: 反转录 (RT), 55 $^{\circ}$ C 5 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min。然后以 cDNA 为模板, 拟扩增 1 039 bp 产物。PCR 的条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s, 共 30 个循环。

1.2.5 PCR 产物的纯化、克隆及鉴定 PCR 产物凝胶电泳后, 按凝胶回收试剂盒的说明操作, 回收目的片段。将回收产物克隆进 pGEM-T Easy 载体中, 转化 DH5 α 涂板 (加有 X-gal IPTG、氨苄青霉素的 LB 琼脂平板), 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h, 筛选白色阳性克隆菌落, 按质粒抽提试剂盒的操作方法抽提质粒。用限制性内切酶 *Not*I 酶切鉴定。

1.2.6 cDNA 的序列测定 取阳性克隆的穿刺菌交上海生物工程公司进行序列测定。

2 结果与分析

2.1 人胎盘 TRA L 基因 cDNA 的 RT-PCR 结果

本试验用 TRIzol 试剂从人胎盘中提取总 RNA, 并以 RT-PCR 方法成功扩增出 TRA L 基因 1 039 bp 的 cDNA 全长。凝胶电泳结果见图 2。

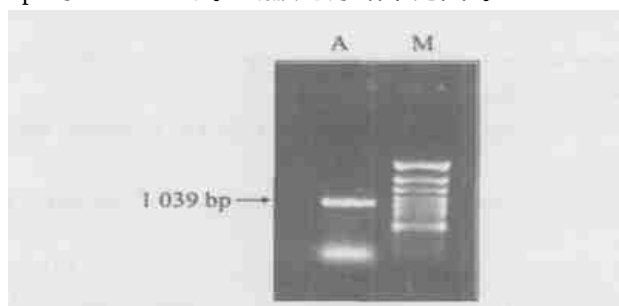


图2 PCR 产物的电泳结果

A. PCR 产物; M. DNA 样标

Fig 2 Electrophoresis of PCR product

A. PCR product; M. DNA marker

2.2 *Not*I 酶切鉴定结果

酶切产物经 0.7% Agarose 凝胶电泳后, 可见约 1 039 bp 的目的基因条带及约 3 015 bp 的载体基因, 如图 3 所示。表明目的片段已插入克隆载体。

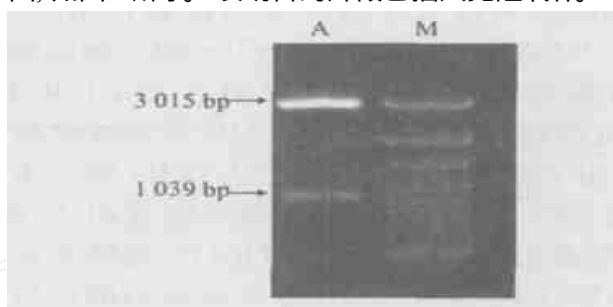


图3 目的片段的酶切分析

A. *Not*I 酶切结果; M. DNA 样标

Fig 3 Restriction endonuclease digestion of target fragment

A. *Not*I digestion; M. DNA marker

2.3 核苷酸序列测定

测序结果经 BLAST 软件分析, 与 GeneBank 中报道的 TRA L 基因有 99% 的同源性。其中第 268 和第 621 个核苷酸 (GeneBank 中的序号) 分别由 G $\rightarrow$ T, A $\rightarrow$ G。

3 讨论

TRA L 在肝、肾、小肠等组织以及外周血淋巴细胞和转化的 T、B 淋巴细胞中都有广泛表达^[4]。本研究从人胎盘中提取总 RNA 获得了 cDNA, 而目前的国内外报道中多从构建好的 cDNA 文库、外周血细胞、癌细胞系中克隆该基因。本研究结果表明, TRA L 基因的 mRNA 在胎盘中的丰度较高。

本研究用特异性引物扩增了 TRA L 基因的 1 039 bp 的全长 cDNA, 为研究 TRA L 蛋白的功能奠定了基础。而目前许多研究都集中在 TRA L 的可溶性片段 (约 500 bp) 的克隆。

TRA L 诱导细胞凋亡是通过与细胞表面的受体结合, 通过受体的胞内死亡结构域 (death domain, BD) 启动细胞凋亡途径, 从而引起细胞凋亡。迄今为止, 人们已发现了 TRA L 的 5 种特异性受体: TRA L-R1 (DR4)^[5], TRA L-R2 (DR5)^[6,7], TRA L-R3 (DcR1)^[6-8], TRA L-R4 (DcR2)^[9] 和 osteoprotegerin (OPG)^[10]。前 4 种受体已定位在染色体 8p22-21 上。其中 DR4 和 DR5 是 2 种具有完整胞质区的受体, 是 TRA L 的功能性受体, 与 TRA L 结合可引起细胞凋亡^[4-6]。而 DcR1 和 DcR2 缺少完整的胞内死亡结构域, 是 2 种缺陷性受体, 同 TRA L 结合后不能传递凋亡信号。OPG 是一种分泌型糖蛋

白,是TNF超家族成员,在体内具有抑制破骨细胞发生,增加骨骼密度的作用。OPG能够抑制TRAIL诱导的Jurkat细胞凋亡;TRAIL也能阻断其对破骨细胞发生的抑制作用。可见,OPG与TRAIL是相互调节的^[11]。同一种细胞膜上如果既表达DR4和DR5,又表达DcR1和DcR2时,后者就可竞争性抑制TRAIL诱导细胞凋亡的功能。由于肿瘤细胞表面不表达DcR1和DcR2,而只表达DR4和DR5;但在正常细胞表面,DcR1和DcR2却有广泛表达。所以,TRAIL能够选择性地杀伤肿瘤细胞,但TRAIL分子具体的凋亡信号传导机制尚未完全明了^[11]。

基于TRAIL基因能显著引起肿瘤细胞凋亡而对正常细胞无影响^[3],它将对肿瘤的靶向性和治疗

性集于一体,有可能成为肿瘤基因治疗中较为理想的治疗基因和新一代广谱抗癌药物。最近研究还发现^[12],TRAIL与化疗药物或放疗有协同杀伤肿瘤细胞的作用。已证明TRAIL可以杀伤多种肿瘤细胞,如白血病细胞、乳腺癌细胞、结直肠肿瘤细胞、黑色素瘤细胞、恶性胶质瘤细胞及HIV患者的淋巴细胞等^[13-15]。但有报道认为^[16],TRAIL虽然对正常大鼠、小鼠及猕猴的肝细胞无毒副作用,但对正常人的肝细胞具有诱导凋亡的作用。但Ozoren等^[17]发现,caspase-9的抑制剂Z-LEHD-FMK可以保护正常人的肝细胞,而不影响TRAIL对一些肿瘤细胞的杀伤作用。因此,TRAIL基因对治疗肿瘤有着良好的应用前景。

[参考文献]

- [1] Wiley S R, Schooley K, Smolak P J, et al Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. *Immunity*, 1995, 3 (6): 673
- [2] Pitti R M, Marsters S A, 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- 12692
- [3] Straler J, Moller P. Expression and function of death receptors and their natural ligands in the intestine[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 915: 162- 170
- [4] Snell V, Clodi K, Zhao S, et al Activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in haematological malignancies[J]. *Br J Haematol*, 1997, 99 (3): 618- 624
- [5] Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan A M. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL[J]. *Science*, 1997, 276(5309): 111- 113
- [6] Pan G, Ni J, Wei Y F. An antagonist decoy receptor and a death domain containing receptor for TRAIL[J]. *Science*, 1997, 277 (5327): 815- 818
- [7] Sheridan J P, Marsters S A, Pitti R M. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors[J]. *Science*, 1997, 277(5327): 818- 821
- [8] Mongkolsapaya J, Cowper A E, Xu X N. Lymphocyte inhibitor of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand): a new receptor protecting lymphocytes death ligand TRAIL[J]. *Immunity*, 1998, 160(1): 3- 6
- [9] Degli Expositis M, Dougall W C, Smolak P J. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-KappaB and protects against TRAIL mediated apoptosis, yet remains an incomplete death domain[J]. *Immunity*, 1997, 7(6): 813- 820
- [10] Emery J G, McDonnell P, Burke K C. Osteoprotegerin is receptor for the cytotoxic ligand TRAIL[J]. *Biol Chem*, 1998, 273 (23): 14363- 14367
- [11] Simonet W S, Lacey D L, Dunstan C R, et al Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density[J]. *Cell*, 1997, 89 (2): 309- 319
- [12] Aouf S, Hammann A, Wotawa A, et al Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated caspase-8 activation and apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(4): 1645- 1651
- [13] Thomas W D, Hersey P. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells[J]. *Immunity*, 1998, 161(5): 2195- 2200
- [14] Griffith T S, Chin W A, Jackson G C. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cell[J]. *Immunity*, 1998, 161 (6): 2833- 2840
- [15] Rieger J, Naumann U, Glaser T. Apo2 ligand: a novel lethal weapon against malignant glioma[J]. *FEBS Lett*, 1998, 427(1): 124- 128
- [16] Jo M, Kim T H, Seol D W, et al Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand[J]. *Nat Med*, 2000, 6(5): 564- 567
- [17] Ozoren N, Kim K, Burns T F, et al The caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(22): 6265- 6269

(下转第13页)

Cloning and sequencing of Human Bone Morphogenetic Protein 2

HUA Song¹, JIA Zhan-sheng², WU Hao¹, HU Ben-quan², YANG Rui-feng¹, ZHONG Yong¹

(1 Institute of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Shaanxi, Xi'an 710000, China)

Abstract: In order to clone the human bone morphogenetic protein 2 (hBM P-2), a pair of primers were designed based on the coding sequence of hBM P-2 derived from the GeneBanks (NM 001200). The total RNA was extracted from the tissue of human placenta. The target fragment was amplified by RT-PCR, then inserted into cloning vector pMD18-T and transformed into *E. coli* strain JM 109. The result of double restriction endonuclease digestion and the sequencing indicated that the fragment cloned was correct compared with the sequence deposited in GeneBanks, and the homology was 99.9%. Cloning of hBM P-2 gene gives a basis for further expression study.

Key words: hBM P-2; RT-PCR; cloning

(上接第8 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)02-0006-EA

Cloning and sequencing of cDNA of TRAIL from human placenta

ZHANG Ming-feng, TANG Shuang, SONG Hong-wei, ZHANG Yong

(Institute of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: According to the cDNA sequence of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) derived from the Genebank (U 37518), a pair of primers were designed. RT-PCR was applied to amplify the whole cDNA of TRAIL gene. The DNA fragment was cloned into pGEM-T Easy vector and transformed into *E. coli* DH5 α host bacteria. Not I endonuclease digestion and sequencing of selected positive cloned bacteria were conducted. Result showed the whole 1 039 bp cDNA of TRAIL was successfully cloned.

Key words: TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL); RT-PCR; sequencing; human placenta