

GATA-3 基因表达质粒的构建及在大鼠脑细胞中的表达

俞 琼, 杨培增, 黄祥坤, 李 兵, 纪淑兴, 张 锐
(中山大学中山眼科中心免疫学实验室, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】构建 GATA-3 基因正义、反义重组质粒,为进一步研究 GATA-3 在 T 细胞发育分化中的作用提供基础。【方法】采用 PCR 技术扩增 GATA-3 基因,通过酶切、连接、转化等分子生物学技术,将该全长基因亚克隆至表达载体 pCDNA3,构建质粒后转染大肠杆菌,并在大肠杆菌中扩增。同时用脂质体法感染大鼠脑细胞。【结果】从大鼠脑细胞中成功地克隆出全长 1335 bp 的 GATA-3 基因,并经序列分析筛选证实 GATA-3 基因以正向、反向重组转染入载体,且在大肠杆菌中得到扩增,同时用 RT-PCR 方法检测到反义重组体对大鼠脑细胞表达该基因具有抑制作用。【结论】通过基因克隆方法成功构建了 GATA-3 基因正义、反义表达质粒,并初步证实反义 GATA-3 具有抑制细胞正常表达作用,为深入研究 GATA-3 对 T 细胞发育分化的影响奠定了基础。

关键词:基因, GATA-3; 基因表达

中图分类号: Q95

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)03-0231-03

Construction of GATA-3 Expressing Plasmid and the Expression of GATA-3 in Rat Brain Cells

YU Qiong, YANG Pei-zeng, HUANG Xiang-kun, LI Bing, JI Shu-xing, ZHANG Rui
(Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】 To establish a recombinant plasmid expressing GATA-3 or antisense GATA-3 gene for further investigation of the effects of GATA-3 on the development and differentiation of T cells. 【Methods】 We used PCR technique to amplify GATA-3 gene, and constructed expression vector pCDNA3 and transfected it, and then introduced the recombinant into the rat brain cells by the lipofectin transfection. 【Results】 GATA-3 gene with a length of 1335bp was successfully cloned from rat brain cells by PCR. It was proved by sequence determination and amplified in colibacillus. And it was determined by RT-PCR that antisense GATA-3 had the role of inhibition. 【Conclusion】 A recombinant plasmid expressing GATA-3 or antisense GATA-3 gene is successfully constructed, which lays a fundamental basis for further study of the role of GATA-3 on the differentiation of T cells.

Key words: gene, GATA-3; gene expression

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(3): 231 - 233]

GATA-3 属于 GATA 转译因子家族,该家族包含两个锌指序列 CX2CX17CX2C,能识别统一的核心序列 (A/T) GATA(A/G)。淋巴细胞中 GATA-3 仅表达于 T 细胞,它可连接存在于 T 细胞受体 $-\alpha$ 、 β 、 δ 编码基因上的 GATA 序列,并激活其转译,而在 T 细胞的发育中起重要作用^[1]。当 T 细胞发育

成熟后, GATA-3 的重要作用在于促进 CD4 + T 细胞向 Th2 细胞分化和加强 Th2 细胞因子分泌。而反义 GATA-3 可抑制所有 Th2 细胞因子基因转译,因而 GATA-3 是所有 Th2 细胞因子基因转译所必需的^[2]。为进一步研究 GATA-3 与 T 细胞之间的关系,本实验拟构建 GATA-3 正义、反义表达质粒,并

收稿日期: 2003-08-27

基金项目: 国家杰出青年基金资助项目 (39925034); 国家自然科学基金资助项目 (30171002); 广东省自然科学基金资助项目 (021819); 广东省教育厅“千百十工程”优秀人才培养基金资助项目 (9949)

作者简介: 俞 琼 (1974 -), 女, 湖北武穴人, 博士生, 医师; 杨培增, 教授, 博士生导师, 通讯作者. E-mail: ypz@gzsums.edu.cn

分别在细胞内进行转染表达,为以后探讨 GATA-3 蛋白表达、Th1 型和 Th2 型细胞因子分泌及 GATA-3 对 T 细胞发育分化的影响奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

SD 大鼠(本校医学院动物实验室提供); Trizol、真核表达载体 pCDNA3、引物 M13-48、M13-47、T7 和 Sp6、pQE30-AE 质粒、DH5 大肠杆菌(上海申友公司); RT kit、T4 Ligase、Hind III 和 Xba I (Promega 公司); Expand Long Template PCR Kit (Roche 公司); pMD18-T 载体(大连宝生物公司); 脂质体试剂盒 Lipofectamine™2000(Invitrogen 公司)。

1.2 GATA-3 基因克隆

Trizol 法提取大鼠大脑总 RNA,按 promega 公司 RT Kit 操作说明进行,合成第一链,根据 GATA-3 序列,设计上游引物 P₁(CTA ACC CAT GCG GGT GAC CAT)和下游引物 P₂(ATG GAG GTG ACT ACG GAC CAG)。用长片段 PCR 法扩增全长 GATA-3 基因:模板 5 μL 加入 Taq 酶 5 U,P₁ 1 μL,P₂ 1 μL,总体积 50 μL,反应条件:95 °C 5 min,94 °C 10 s→56 °C 30 s→68 °C 2 min,10 个循环→94 °C 10 s→56 °C 30 s→68 °C 2 min + 5 s,25 个循环→68 °C 7 min。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3 GATA-3 基因正义反义表达质粒的构建

将 PCR 产物回收后,连接至 pMD18-T 载体,反应条件为 16 °C 8 h。将连接后的产物转化至大肠杆菌中并扩增,按质粒抽提试剂盒说明抽提质粒,量值 100 mg/L,然后应用 BigDye Mix 测序,测序结果可知目的基因已经插入 T/A 克隆,反向插入,编号为 YQ4,正向插入,编号为 YQZ3,但距离 5'端 778、779、780 位连续缺失 3 个碱基,即 AAG。对 T/A 克隆质粒和载体 pCDNA3 进行 Hind III、Xba I 21 双酶切后进行连接反应,将 GATA-3 全长基因正反向克隆至真核表达载体 pCDNA3。对重组子进行双酶切鉴定,并对酶切位点和 GATA-3 基因区分别测序。

1.4 GATA-3 重组体在大鼠脑细胞中的表达

取大鼠脑约 300 mg,制成单个细胞悬液,并调整细胞浓度为 4-8 × 10⁵ 细胞/500 μL 培养液,用脂质体法,根据脂质体试剂盒 Lipofectamine™2000

(Invitrogen 公司出品)说明书方法转染正义、反义 GATA-3 重组体,将转染后的细胞提取总 RNA,进行 RT-PCR 检测 GATA-3 mRNA 的表达。

2 结果

2.1 目的基因 PCR 扩增及电泳

扩增出的片段大小为 1 335 bp,与 GATA-3 的大小相等(图 1)。

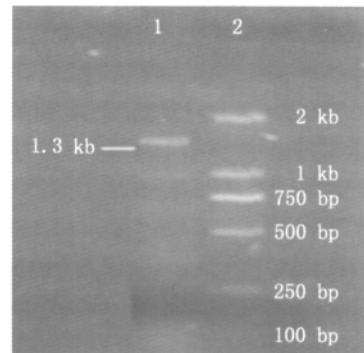


图 1 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis of RT-PCR product

Lane 1: RT-PCR product; Lane 2: marker

2.2 构建质粒的鉴定

用酶切的方法进行进一步的结果检测,空载体与含有目的片段的克隆图谱比较表明载体 pDNA3 中已成功插入所需的克隆片段(图 2)。

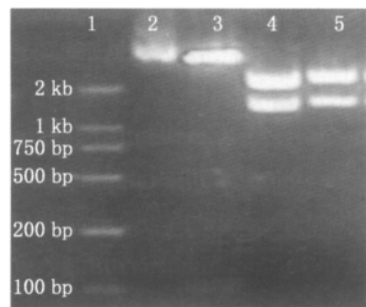


图 2 T/A 克隆酶切鉴定图谱

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid

Lane 1: marker; Lane 2: pDNA3 vector; Lane 3: pDNA3 vector/Hind III + Xba I; Lane 4: T/A clone expressing GATA-3/Hind III + Xba I; Lane 5: T/A clone expressing antisense GATA-3/Hind III + Xba I

2.3 测序

以 T7 和 Sp6 为测序引物,经测序确定目的基因正确克隆至表达载体 pCDNA3,按需要分别有正向和反向两种插入方式,正向插入克隆编号为

YQ41.4(可正确表达目的基因)。反向插入克隆编号为 YQZ3.2(不能正确表达目的基因)。正向反向各测序3次,测序编号分别为 JDS-YQ41.4. T7. ABI、JDS-YQ41.4. SP6. ABI、JDS-YQZ3.2. SP6. ABI、JDS-YQZ3.2. T7ABI、JDS-YQ41.4. YQ. ABI(为中间测序) JDS-YQZ3.2. YQABI(为中间测序)。结果表明已成功构建出含有目的片段的质粒。

2.4 GATA-3 表达鉴定

RT-PCR 产物电泳表明感染 GATA-3 基因的脑细胞扩增出 1 335 bp 片段,感染空载体则无相应产物,感染反义 GATA-3 基因的电泳产物显示弱条带,说明 GATA-3 在细胞中有表达,而反义 GATA-3 对正常细胞分泌 GATA-3 有抑制作用(图 3)。

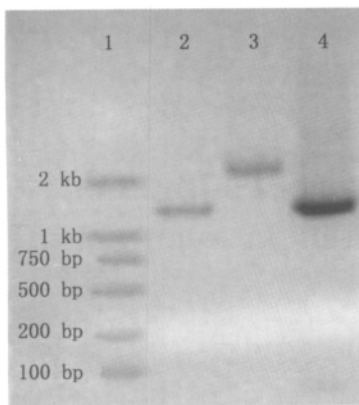


图3 GATA-3 表达鉴定

Fig. 3 Identification of GATA-3 expression

Lane 1: marker; Lane 2: antisense GATA-3; Lane 3: pCDNA3 vector; Lane 4: GATA-3

3 讨论

GATA-3 基因编码的 GATA-3 蛋白是一个多功能的转录调节因子^[3],该蛋白在胚胎期的动物各种组织中大量表达。在成年大鼠的大脑、骨髓有高表达,其次是肾,而在大鼠的脾和外周血则表达较少^[4]。因此本实验取材采用的是大鼠的脑组织,以便获取 GATA-3 基因。

在克隆所需目的基因时,发现连续缺失了3个碱基,而它们恰好编码1个氨基酸,没有对阅读框造成破坏,所以对整个目的基因的表达不会有什么影响。分析原因可能是生物个体多样性造成的,亦即我们所取的大鼠大脑的目的基因的 mRNA 可能在这一区域恰好丢失3个碱基。

GATA-3 是 Th2 细胞分化的关键转译因子^[5]。

GATA-3 的转基因和逆转录表达均可诱导 Th1 细

胞分泌 Th2 型细胞因子,同时,反义 GATA-3 和功能阴性 GATA-3 可降低 Th2 细胞克隆分泌 Th2 型细胞因子,反义 GATA-3 可抑制 Th2 克隆 D10 中所有 Th2 细胞因子基因表达^[6]。由此说明 GATA-3 在多种水平上调节 Th2 细胞表型^[2]。T 细胞受体 β 链转译性增强子中有3个与 GATA 家族高亲和力的连接位点,有助于 GATA-3 激活 TCR β 链增强子,为 GATA-3 参与 T 细胞发育提供基础^[7]。

我们采用 PCR 技术直接从大鼠大脑获得全长 GATA-3 基因,成功制备出 GATA-3 正义、反义表达质粒,并将该质粒转染给大鼠脑细胞,结果发现转染反义表达质粒能对正常鼠脑细胞有抑制作用,使其分泌 GATA-3 减少。根据实验结论,我们将进一步应用已构建的质粒,并将其转染给动物模型的脾细胞,检测转染后细胞中 GATA-3 蛋白的表达水平及其分泌的细胞因子,从而为深入阐明 GATA-3 在 T 细胞形成分化中的确切作用奠定基础。

参考文献:

- [1] Virginia S S, Perry L, Astar W. Identification and cloning of the G3B cDNA encoding a 3' segment of a protein binding to GATA-3[J]. *Gene*, 1995, 163(12): 329-30.
- [2] Henderson A J, McDougall S, Leiden J, et al. GATA elements are necessary for the activity and tissue specificity of the T-cell receptor beta-chain transcriptional enhancer[J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(6): 4286-94.
- [3] 宗永生,李智,刘克拉,等.鼻咽癌中浸润的淋巴细胞与瘤细胞凋亡的关系. *中山医科大学学报*, 2001, 21(1): 6-9.
- [4] George K M, Leonard M W, Roth M E, et al. Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene [J]. *Development*, 1994, 120(9): 2673-86.
- [5] Penix L, Weaver W M, Pang Y, et al. Two essential regulatory elements in the human interferon gamma promoter confer activation specific expression in T cells [J]. *J Exp Med*, 1993, 178(5): 1483-96.
- [6] Wei P Z, Richard A F. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells[J]. *Cell*, 1997, 89(1): 587-96.
- [7] Henderson A J, McDougall S, Leiden J, et al. GATA elements are necessary for the activity and tissue specificity of the T-cell receptor beta-chain transcriptional enhancer[J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(6): 4286-94.

(编辑 刘清海)