

# 构建人 CD 23 及其反义 RNA 的逆转录病毒表达重组体<sup>①</sup>

王 斌<sup>②</sup> 曹丽萍 杨 斌 涂裕英

(中山医科大学免疫学教研室, 广州, 510089)

**提 要** 利用 CD23 cDNA 全基因克隆 pUCD976, 分别以限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切该重组质粒 DNA, 回收 1.0 kb 的 CD23 cDNA 全基因, *Hind* III 酶切后回收 3' 端 607 bp 的结合区段基因以及 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切回收 5' 端 403 bp 的调控区段基因。将各回收片段先以 Klenow 酶补平后, 插入已补平的 pZIP 逆转录病毒载体 *Bam*H I 单切点, 利用地高辛素标记的 CD23 cDNA 全基因探针, 以斑点核酸杂交筛选逆转录病毒重组体, 结合用限制性内切酶 *Bam*H I 和/或 *Bgl* II 酶切鉴定插入方向, 最终获得正、反向插入的 CD23 全基因-逆转录病毒重组体各 2 个, 反向插入 3' 端和 5' 端部分基因片段的重组体分别为 4 个和 1 个。为进行 CD23 反义 RNA 的研究和真核表达 CD23 提供了可靠的物质基础。

**主题词** 抗原, CD; RNA, 反义; 受体, IgE; 核酸杂交; 逆转录病毒科; 克隆, 分子

**中图分类号** R371; Q78

CD23(分化抗原族 cluster of differentiation, CD)因有多种重要的生物学功能而受到人们关注。现已发现它在许多疾病,特别是与 B 淋巴细胞异常激活、增殖有关的疾病的致病中起着重要作用<sup>[1,2]</sup>。鉴于目前所用逆转录病毒载体可供选用的酶切点少,除氨苄抗性外无其它筛选标志,载体本身大等缺点,使筛选工作很烦琐,尤其是在反义 RNA 技术中,插入基因片段长度常在 300~500 bp 间,用常规电泳法很难筛选出阳性克隆。为此,我们用 pUC/M13 通用引物 PCR 标记地高辛素(DIG)CD23 cDNA 全基因探针,并应用于 CD23 cDNA 全基因和其部分基因片段-逆转录病毒重组体的筛选,获得了令人满意的结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和质粒

CD23 cDNA 全基因重组质粒 pUCD976 由本室自行构建<sup>[3]</sup>。逆转录病毒载体 pZIP-neo SV(X)由本室黄曦博士提供。宿主菌 JM109 购自德国 Boehringer Mannheim 公司(简称 BM 公司)。

### 1.2 酶和试剂

限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I、*Bgl* II、*Xba* I、琼脂酶(Agarase)、DIG-11-dUTP 和 DIG 核酸标记和检测试剂盒购自德国 BM 公司, Klenow 酶和 T4 DNA 连接酶购自美国 BRL 公司, PCR 试剂盒购自上海复旦大学科技开发公司。

### 1.3 引物设计与合成

CD23 特异引物为自行设计<sup>[4]</sup>, pUC/M13 通用引物购自美国 Promega 公司。

### 1.4 PCR 标记 CD23 cDNA 探针

PCR 操作参见复旦大学 PCR 试剂盒说

① 国家自然科学基金资助课题; ② 第一作者, 1960 年出生, 男, 副教授

明。模板为 pUCD976 质粒 DNA, 反应总体积为 100  $\mu$ l, DIG-11-dUTP (1 mmol/L) 在反应液中的用量体积分数为  $\varphi=2\%$  (2  $\mu$ l/100  $\mu$ l)。

### 1.5 逆转录病毒重组体构建

以 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切重组质粒 pUCD976, Klenow 酶补平, 低熔点琼脂糖回收 CD23 全基因, 并将其插入经 Klenow 酶补平的 pZIP 载体的 *Bam*H I 单切点, 构建 CD23 全基因——逆转录病毒重组体 pZCD976。CD23 之 3' 和 5' 端部分基因片段的逆转录病毒重组体的构建同上, 以 *Hind* III 酶切回收 3' 端 607 bp 片段, *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切回收 5' 端 403 bp 片段。

### 1.6 核酸杂交筛选

以碱法小量快速制备质粒 DNA, 将提取上清置 97 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 取 10  $\mu$ l 点样至硝酸纤维素膜。杂交过程见 BM 公司 DIG 检测试剂盒说明书。探针在杂交液中的体积分数为  $\varphi=0.05\%$  (0.5 ml/L)。

### 1.7 酶切鉴定插入方向

将杂交阳性的质粒 DNA, 按常规方法以 *Bgl* I 或 *Bgl* I 和 *Bam*H I 酶切, 在溴化乙锭-琼脂糖电泳中检测片段的大小, 以确定插入方向。

## 2 结 果

### 2.1 标记探针的灵敏度和特异性检测

以 pUCD976 质粒 DNA 为阳性对照, 变性后, 点样至硝酸纤维素膜上。模板量依次为 1 ng、100 pg、10 pg 和 1 pg, 并以 1 ng 的 pUC18 空载体作阴性对照。经杂交、显色后, 可见 pUC/M13 通用引物和 CD23 特异引物标记的探针有基本相同的敏感性和特异性, 均可检出 10 pg 的 pUCD976 DNA (图 1), 与阴性对照 pUC18 载体无阳性杂交信号。

### 2.2 核酸杂交筛选 CD23 全基因——逆转录病毒重组体

从 LBA 平板挑取单个菌落, 扩增后以碱

法快速提取质粒 DNA, 将提取上清 10  $\mu$ l 变性, 点样至硝酸纤维素膜, 经杂交、显色后, 可见有 5 个杂交阳性的 CD23 全基因—pZIP 重组体 (图 2), 7 个杂交阳性的 CD23 3' 端 607 bp 的重组体和 1 个杂交阳性的 CD23 5' 端 403 bp 的重组体, 阴性对照 pZIP 空载体未见阳性杂交信号。

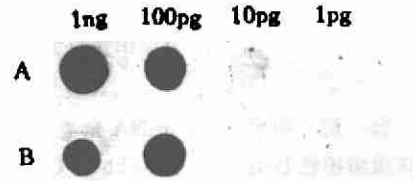


图 1 DIG-CD23 cDNA 探针敏感性检测

A1~4: 特异引物标记 CD23 探针检测; B1~4: 通用引物标记 CD23 探针检测; A5 和 B5: pUC18 阴性对照

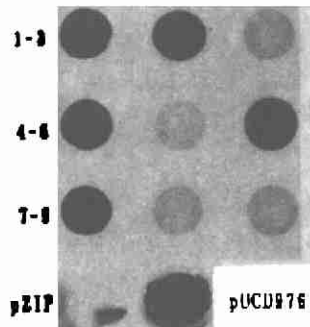


图 2 斑点核酸杂交筛选逆转录病毒重组体

### 2.3 酶切鉴定重组体插入方向

将杂交阳性克隆 DNA 以 *Bgl* I 或 *Bgl* I 和 *Bam*H I 作酶切鉴定。结果可见: ①在 CD23 全基因—pZIP 重组体 (pZCD976), 2 和 4 号克隆经 *Bgl* I 酶切可切出约 1.3 kb 的带, 6 和 7 号则可切出约 1.0 kb 的带 (图 3), 均与理论值相符。根据 CD23 全基因和 pZIP 质粒的酶切图谱可确定 2 和 4 号克隆为正向插入, 6 和 7 号则为反向插入; ②在 CD23 3' 端 607 bp 的重组体 (pZCD607C), 10、13 和 30 号克隆用 *Bgl* I 和 *Bam*H I 酶切可切出约 670 bp 的带, 而 11、22、24 和 27 号克隆则可切出约 1.25 kb 的带 (图 4), 同理可推知, 10、13 和 30 号克隆为正向插入, 11、

22、24 和 27 号克隆为反向插入;③在 CD23 5'端 403 bp 的重组体(pZCD403N),17 号克隆用 *Bgl* I 酶切可切出约 1.05 kb 的带(图 5),可推知为反向插入。

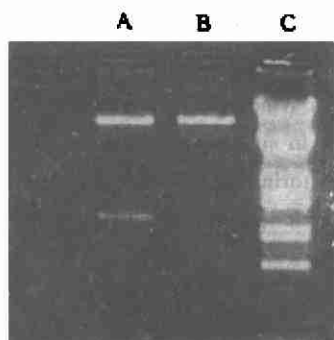


图 3 pZCD976 插入方向的酶切鉴定

A, B, C, 1, 2, 4 号克隆 DNA + *Bgl* I 酶切; D: ADNA / *Eco*R I + *Hind* III 片段长度标准; E: pZIP DNA + *Bgl* I 酶切; F, G, 6, 7 号克隆 DNA + *Bgl* I 酶切

### 3 讨 论

CD23 是免疫学研究的一个新热点,它在多种 B 淋巴细胞异常激活和增殖性疾病的致病中起重要作用,已发现 EB 病毒转化的 B 细胞均表达 CD23<sup>[5]</sup>,并与 B 细胞体外长期传代密切相关。而慢性 B 淋巴细胞性白血病(BLL)细胞表面也有 CD23 高表达<sup>[6]</sup>,BLL 患者血清和尿中 sCD23 水平可较正常人高约 500 倍,且 sCD23 与肿瘤细胞表面 CD23 表达和细胞恶性增殖密切相关,抗 CD23 单克隆抗体可抑制 BLL 的体外增殖。为了进一步明确 CD23 在上述疾病致病中的真实角色,为此类疾病的控制和进行基因治疗提供理论依据,我们在国家自然科学基金资助下,正应用逆转录病毒介导的反义 RNA 技术进行特异性阻断研究。

反义 RNA 技术是近年来研究基因表达调控的新领域,是特异阻断目的基因翻译的最有效手段之一,目前最常用的方法是以逆转录病毒作载体。鉴于现有逆转录病毒载体有种种前述的缺点,给构建逆转录病毒重组体,尤其是在筛选阳性克隆时带来困难。为此,我们采用了核酸杂交结合限制性内切酶鉴定的方法,在国内外首先成功地构建了可用于表达 CD23 分子和表达 CD23 反义 RNA 的逆转录病毒重组体。我们体会到,应用通用引物 PCR 标记 CD23 cDNA 探针有多方面优点,它操作简单,获得探针量大,标记效率高,适用范围广,它可用于任何插入 pUC 和 M13 载体多克隆位点的外源目的基因的探针标记。而用核酸杂交筛选逆转录病毒重组体具有可靠、正确、快速、简便等特点,尤其适合于大规模筛选,它与限制性内切酶联合使用于筛选和鉴定逆转录病毒重组体是一种较实用的方法。

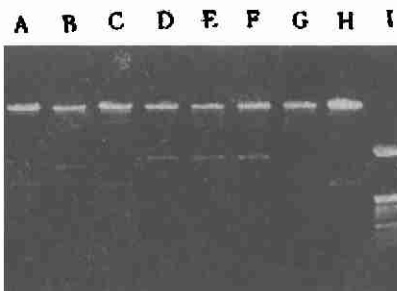


图 4 pZCD607C 插入方向的酶切鉴定

A~G, 10, 11, 13, 22, 24, 27, 30 克隆 DNA + *Bgl* I 和 *Bam*H I 酶切; H, pZIP DNA + *Bgl* I 和 *Bam*H I 酶切; I, pBR322/*Hinf* I 片段长度标准

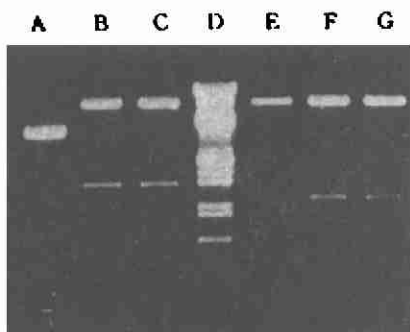


图 5 pZCD403N 插入方向的酶切鉴定

A, 17 号克隆 DNA + *Bgl* I 酶切; B, pZIP DNA + *Bgl* I 酶切; C: ADNA/*Eco*R I + *Hind* III 片段长度标准

## 参 考 文 献

- 1 Lacy J, Rudnick H. Transcriptional regulation of human IgE receptor (FceR I/CD23) by EBV: identification of EBV responsive regulatory elements in intron I. *J Immunol*, 1992, 148(5): 1554
- 2 Sarfati M, Bron D, Lagneaux L, *et al.* Elevation of IgE-binding factors in serum of patients with B cell derived chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1988, 71(1): 94
- 3 王 斌,曹丽萍,杨 斌,等. 人 CD23 基因的亚克隆与部分序列测定. *中国免疫学杂志*, 1995, 11(6): 328
- 4 王 斌,黄树其. PCR 扩增 CD23 全基因. *中山医科大学学报*, 1994, 15(4): 246
- 5 Wang F, Kikutani H, Tsang SC, *et al.* Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivates a cis-acting CD23 DNA element. *J Virol*, 1991, 65(8): 4101
- 6 Cuneo A, Wiodarska I, Aly MS, *et al.* Non-radioactive in situ hybridization for the detection and monitoring of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol*, 1992, 81(2): 192

(1995-10-23 收稿 1996-03-07 修回)

## CONSTRUCTION OF RETROVIRUS RECOMBINANTS FOR EXPRESSING HUMAN CD23 AND ITS ANTISENSE RNA

Wang Bin   Cao Liping   Yang Bin   Tu Yuying

(Department of Immunology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

The digoxigenin-CD23 cDNA probe was labelled by universal primer directed PCR with pUCD976 plasmid DNA as the template and digoxigenin-11-dUTP as the substrate. The probe then was used to screen the positive CD23 cDNA-retrovirus recombinants by nucleic hybridization. Five positive colonies were found. The inserted direction of CD23 gene in the recombinant plasmid was determined with *Bgl* I cutting. At last, two recombinants with straight and reverse insertion respectively were obtained.

**Subject headings**   antigens, CD; RNA, antisense; receptor, IgE; nucleic acid hybridization; retroviridae; cloning, molecular