

## · 实验研究 ·

PCR 扩增 CD 23 全基因<sup>①</sup>王 斌<sup>②</sup> 黄树其

(中山医科大学免疫学教研室, 广州, 510089)

**提 要** 参照国外发表的 CD23 全基因序列, 自行设计并合成一对 DNA 引物(25 个碱基和 18 个碱基), 以 CD23 阳性细胞株 HFB d 2/3 DNA 为模板, 应用 PCR 技术, 在国内首次成功地扩增了 CD23 全基因(986 bp), 为今后克隆和表达 CD 23 基因以及进一步在基因水平上探讨 CD23 的生物学功能研究中提供了物质基础。

**关键词** 基因合成; CD23; 聚合酶链反应; 免疫球蛋白 E; Fc 受体

**中图分类号** R371; Q78

CD23 是免疫学最新研究进展之一, 自 Lawrence 等人于 1975 年发现淋巴细胞表面存在 IgE 分子的低亲和力受体以来<sup>[1]</sup>, 经大量研究表明, 淋巴细胞上的这种 IgE 低亲和力受体主要分布于激活的 B 淋巴细胞、单核巨噬细胞等细胞膜上, 1987 年首次被命名为 CD23。CD23 是一种 44 645u (45kDal) 的糖蛋白, 除了表达于细胞膜表面外, 还能脱落至细胞外液中, 成为可溶性 CD23 (sCD23), 它可被蛋白酶和/或 CD23 本身裂解为 36 708u (37kDal) 和 24 803u (25kDal) 等数种片段<sup>[2]</sup>。后者对 B 细胞具有类似 T 细胞的 B 细胞生长因子 (BCGF) 作用, 能诱导金黄色葡萄球菌 Cowan I 菌株体蛋白 (SAC) 或抗免疫球蛋白  $\mu$  重链抗体 (抗  $\mu$  抗体) 激活的 B 细胞增殖, 促进自身 B 细胞 DNA 合成及在软琼脂上集落形成, 故又被称为 B 细胞来源的 B 细胞生长因子 (B-BCGF) 和 B 细胞自身分泌激素 (autocrine)<sup>[3]</sup>。sCD23 又可进一步促进 B 细胞表面 CD23 的表达, 产生更多的 sCD23, 而形成正反馈网络。现已证明, CD23 和 sCD23 在多种疾病的致病机制中起重要作用。鉴于目前国外对 CD23 这一新领域的

研究十分活跃, 而国内研究刚起步, 仅限于 CD23 蛋白水平的研究。为此, 我们自行设计了一对引物, 应用多聚酶链式反应 (PCR) 技术, 在国内首次成功地扩增了 CD23 全基因, 经多种限制性内切酶酶切鉴定, 结果与已发表序列的酶切图谱完全相同。为进一步在基因水平研究 CD23 提供了可靠的物质基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 DNA 引物

参照国外发表的 CD23 全基因序列<sup>[4]</sup>, 应用 DNASIS 核酸分析软件, 在其编码区二侧设计一对引物 (-1~978bp, 不包括上游引物中人工设计的 7bp 附加酶切序列)。①上游引物 (Primer 1, 25 个碱基): 5'-GG (GAATTC) ATGGAGGAAGGTCAATA-3' (括号中序列为 *EcoR* I 酶切点); ②下游引物 (Primer 2, 18 个碱基): 5'-CT (GGATCC) ATGCTCAAGA-3' (括号中序列为 *Bam* H I 酶切点)。引物在中国科学院微生物研究所用 381A 型 DNA 合成仪 (Applied Biosystem) 合成。

① 国家自然科学基金和卫生部青年科学基金资助;

② 第一作者, 34 岁, 男, 讲师 (硕士); 第二作者, 进修生, 现在广州军区高等医学专科学校检验教研室

## 1.2 PCR 试剂盒

购自上海复旦大学科技开发公司。

## 1.3 HFB d2/3 和 HFB 107 细胞 DNA 提取

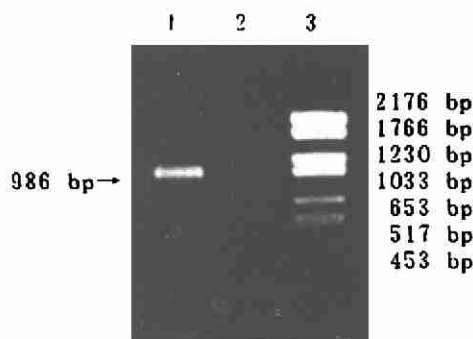
所用 CD23 阳性细胞株 HFB d2/3 和阴性细胞株 HFB 107 均由瑞士 Glaxo 分子生物学研究所 Bonnefoy 教授惠赠。经常规传代培养,取 100 万对数生长期细胞,经 SDS 和蛋白酶 K 消化后,以酚、氯仿抽提,乙醇沉淀提取核酸。

### 1. PCR 反应

参照复旦大学 PCR 试剂盒说明及华美生物工程公司编印的资料,加 HFB d2/3 及 HFB 107 核酸模板、PCR 缓冲液、DNA 引物、dNTPs 及双蒸水后,95℃变性 7min,再加耐热 Taq DNA 聚合酶 2U,反应总体积为 100 $\mu$ l。循环过程:变性:93℃,45s;退火:55℃,45s;延伸:72℃,1min,共 25 个循环。

## 2 结 果

我们以自行设计合成的 DNA 引物,以 CD23 阳性细胞株 HFB d2/3 DNA 为模板,成功地扩增了 CD23 全基因,长约 986bp(含人工设计酶切点),与理论设计相符。而在 CD23 阴性细胞株 HFB 107,未见有相同的扩增片段。PCR 结果见附图:①右边 3 为 Boehringer Mannheim M 型 DNA 分子量标记(质粒 pBR328 用限制性内切酶 *Hinf* I 消化),自大至小分别为 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220, 154bp;②左边 1 为 HFB d2/3 PCR 产物,可见一条约 986bp 的特异带;③中间 2 为 HFB 107 阴性对照。经 *Eco*R I, *Bam*H I, *Pst* I, *Bgl* I, *Bgl* I 和 *Hind* III 6 种限制性内切酶酶切分析,结果与 CD23 序列的电脑分析图谱完全相同(资料未列出),可基本确定为 CD23 基因。



附图 CD23 全基因 PCR 扩增带

1. HFB d2/3 DNA
2. HFB 107 DNA
3. Marker M (Boehringer 公司)

## 3 讨 论

CD23 是免疫学研究中的一个新热点,近年的研究结果表明,CD23 实质是 IgE Fc 受体的低亲和力受体。主要存在于激活的 B 淋巴细胞表面,与 IgE 的结合常数为  $10^7 \text{mol}^{-1}$ 。CD23 及其可溶性降解产物 sCD23 参与了 B 细胞的激活和分化,它可诱导正常 B 细胞合成 IgE,因而在变态反应患者的 B 细胞被变应原激活与 IgE 异常大量合成中有重要作用<sup>[6]</sup>。CD23 还参与了介导 IgE 依赖性 ADCC 作用,某些巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和血小板通过其表面的 CD23 与抗寄生虫特异性 IgE 抗体结合,介导 ADCC。除此以外,CD23 在多种 B 细胞异常激活和分化性疾病中有重要作用,已发现 EB 病毒转化的 B 细胞均表达 CD23<sup>[7]</sup>,并与 B 细胞体外长期传代密切相关。已有报道,慢性 B 淋巴细胞性白血病(BLL)细胞表面有 CD23 高表达<sup>[8]</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<sup>[9]</sup>和 BLL 恶性细胞增殖密切相关,抗 CD23 单克隆抗体可抑制 BLL 的体外增殖。

CD23 的基因结构目前已清楚,该基因

cDNA 全长为 963bp, 编码 321 个氨基酸。鉴于上述的研究基础和 CD23 在多种疾病中起重要作用, 作者参照已发表的 CD23 全基因序列, 用电脑辅助设计一对引物, 在国内首次成功地扩增出 986bp 的 CD23 全基因。这一成功尝试将为今后对 CD23 全基因和其各功能片段的分子克隆, 引入适当载体表达 CD23, 以及在基因水平上研究 CD23 在多种疾病致病机制和基因治疗等方面, 提供可靠的物质基础。

### 参 考 文 献

- 1 Lawrence DA, Weigle WO, Spiegelberg HL, et al. Immunoglobulins cytophilic for human lymphocytes, monocytes and neutrophils. *J Clin Invest*, 1975, 55 : 368
- 2 Letellier M, Nakajima T, Pulido CG, et al. Mechanism of formation of human IgE-binding factors (soluble CD23). II. Evidence for a receptor (Fc epsilon R I)-associated proteolytic activity. *J Exp Med*, 1990, 172 : 693
- 3 Atsushi M, Hirofumi N, Nobuaki K, et al. B cell-derived BCGF functions as autocrine growth factor(s) in normal and transformed B lymphocytes. *J Immunol*, 1986, 137 : 179
- 4 Kikutani H, Inui S, Sato R, et al. Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobulin E. *Cell*, 1986, 47 : 657
- 5 Guy GR, Gordon J. Coordinated action of IgE and a B cell-stimulatory factor on the CD23 receptor molecule upregulates B-lymphocyte growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84 : 6239
- 6 Sarfati M, Delespesse G. Possible role of human lymphocyte receptor for IgE (CD23) or its soluble fragments in the in vitro synthesis of human IgE. *J Immunol*, 1988, 141 : 2195
- 7 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 : 4101
- 8 Cuneo A, Wlodarska 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 : 192
- 9 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 : 94

(1994-04-11 收稿 1994-06-24 修回)

## AMPLIFICATION OF HUMAN CD23 GENE BY USING POLYMERASE CHAIN REACTION

Wang Bin    Huang Shuqi

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

With reference to the published sequence of the human CD23 gene, a pair of DNA primers (25 bases and 18 bases) were designed and synthesized. A 986 base pair fragment containing full CD23 cDNA gene was successfully amplified by using the polymerase chain reaction (PCR). It was the first report in the country and would promote the further research in molecular biology of CD23.

**Key words** synthetic genes; CD23; polymerase chain reaction; IgE; Fc receptor