

· 简 报 ·

人类 IL-2 cDNA 的一步法克隆

宋 彪^{1,①} 白 桦¹ 方险峰¹ 赵国华² 涂裕英¹ 黄 茹¹

(中山医科大学 1 附属第一医院皮肤科; 广州, 510080 2 病理教研室)

主题词 白细胞介素 2; DNA; 序列分析; DNA

中图分类号 Q 78

白细胞介素-2(IL-2)是一种重要的细胞因子,能调节人体免疫能力,在免疫调节机理研究、肿瘤、免疫缺陷性疾病、病毒感染性疾病的治疗等方面有重要作用。同时,IL-2是一种高效理想的免疫佐剂,可成数十倍地提高疫苗免疫效能^[1]。故成功获得IL-2 cDNA对于进一步开展这方面的工作有十分重要的应用价值。本实验利用RT-PCR法合成人类白细胞介素-2(hIL-2)cDNA,克隆到TA载体多接点质粒pCRTM II中,快速构建含hIL-2 cDNA的重组质粒pCRTM II-hIL-2,并对hIL-2 cDNA进行测序及结构分析。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和细胞株

Original TA cloning Kit(INVITROGEN公司,U.S.A.),质粒纯化试剂盒和QIAEX II Kit(QIAGEN公司,U.S.A.),RNA STAT-60试剂盒(TEL-TEST公司,U.S.A.),M-MLV RTase,dNTP,Taq酶,T4连接酶,DEPC,EcoRI, LB培养基等均购自华美及基因公司。hIL-2 cDNA引物依文献[2]自行设计,由美国斯坦福大学Beckman中心合成。Jurkett细胞株由美国斯坦福大学Beckman中心惠赠, JM109大肠杆菌株由微生物室惠赠。

1.2 RNA的提取

取 1×10^{10} /L Jurkett细胞(10% FBS的RPMI 1640培养基),加20 g/L佛波脂,2 μ mol/L inomycin刺激培养6 h(32 $^{\circ}$ C),1 500 r/min离心10 min,弃上清,沉淀加1 mL RNA STAT-60成匀浆,氯仿抽提,异丙醇沉淀,75%乙醇洗涤,获得总RNA。

1.3 RT-PCR法合成 IL-2cDNA

2 μ g RNA, Oligo dT 1 μ L(100 ng)加 DEPC H₂O至总体积 5 μ L于 65 $^{\circ}$ C 4 min,然后加 0.1 mol/L DTT 1 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 1 μ L, M-MLV RTase 0.5 μ L, 2 μ L 5 \times buffer, RNase 抑制剂 1 μ L 共 10.5 μ L于 42 $^{\circ}$ C 1 h 得到第一条 cDNA 链(ssDNA)。取上述反应液 5 μ L,加自行设计引物各 5 μ L(100 mg/L), 2.5 mmol/L dNTP 5 μ L, 50 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, dH₂O 23.0 μ L, 共 49.5 μ L。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,加 DNA Taq 0.5 μ L。按下列参数循环 30 周期: 94 $^{\circ}$ C 40 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s;再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。15 g/L 琼脂糖电泳分析产物。PCR 产物再经 QIAEX II Kit 纯化。

1.4 hIL-2 cDNA 克隆

采用 Original TA cloning Kit 提供的一步法克隆策略。纯化的 PCR 产物 2 μ L, pCRTM II 质粒(25 mg/L)25 μ L, T4 DNA 连接酶 1 μ L 混合置于 15 $^{\circ}$ C 24 h,转化感受态的 JM109 大肠杆菌,涂布在含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基上,挑选 4 株独立的氨苄青霉素抗性的阳性菌落。利用质粒纯化试剂盒快速纯化质粒。取 10 μ L 纯化的质粒加 EcoRI 1 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, ddH₂O 8 μ L 于 37 $^{\circ}$ C 反应 1.5 h。15 g/L 琼脂糖电泳。

1.5 hIL-2 cDNA 测序

hIL-2 cDNA 测序由中山医科大学达安基因中心及美国斯坦福大学 Beckman 中心协助。前者利用 M13 F primer 反向测序,后者利用 M13 R primer 及 T7 primer 双向测序。

① 现在广西南宁市陈村路 3 号广西区皮肤病防治研究所(530003)

2 结果

2.1 hIL-2 cDNA 的合成

根据 hIL-2 cDNA 全基因序列^[4], 自行设计一对引物。上游引物: 5'GCC GAA TTC ATG TAC AGG ATG CAA CTC 3'; 下游引物: 5'TTA TCA AGT TAG TGT TGA GAT GAT GCT 3', 并在上游引物 5'端含有 *Eco*R I 酶切点, 便于以后克隆操作。利用 RT-PCR 法获得的 hIL-2 cDNA 片段大小 474 bp(图 1)。

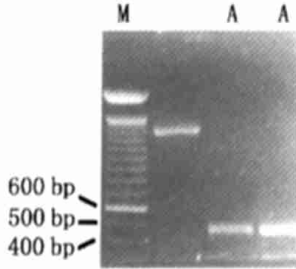


图 1 RT-PCR 扩增 hIL-2 cDNA 琼脂电泳

Fig. 1 Agrose gel electrophoretogram of hIL-2 cDNA amplification with RT-PCR

M: mark A: hIL-2 cDNA

2.2 hIL-2 cDNA 克隆

克隆 hIL-2 cDNA 的重组质粒经 *Eco*R I 酶切以后, 可得 480 bp 左右 hIL-2 cDNA 片段(图 2)。

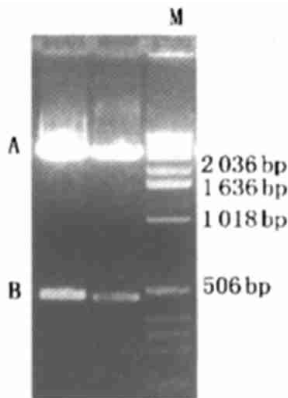


图 2 重组质粒 pCRTMII-hIL-2 经 *Eco*R I 酶切以后琼脂电泳

Fig. 2 Agrose gel electrophoretogram of recombinated plasmid pCRTMII-hIL-2 after digested by *Eco*R I

M: mark A: 质粒 pCRTMII 片段 B: hIL-2 cDNA

2.3 hIL-2 cDNA 测序

中山医科大学达安基因中心及美国斯坦福大学 Beckman 中心测的基因序列完全一致, 且与 Taniguchi 等^[2]报道序列比较, 也完全一致。

3 讨论

IL-2 是 CD4(+)T 淋巴细胞分泌的一种重要的细胞因子。IL-2 是 T 细胞生长因子, 能刺激并维持 T 淋巴细胞在体外长期持续增殖。IL-2 还能活化 CD8(+)T 细胞及 NK 细胞活性, 刺激和加强它们的细胞毒作用、杀肿瘤细胞及异物细胞活性, 并促其产生 INF、TGF 等细胞因子, 在肿瘤基因治疗方面起重要作用。近年来, 随着免疫治疗的研究进展, 免疫佐剂的研究引起人们越来越多的兴趣。IL-2 作为一种高效理想的细胞因子佐剂更具有很大的应用价值^[3,4]。

Taq 酶有不依赖于模板的活性, 就是在 PCR 产物的 3'末端加上单个腺嘌呤核苷酸(A)。pCRTM II 质粒是一种 TA 载体, 商品化的质粒呈线状, 游离端带有单个胸腺嘧啶核苷酸(T)。通过 AT 配对, 在 T4 连接酶作用下, 可将 PCR 产物直接连到载体质粒上, 而不需经酶切反应。

本实验成功地构建了 hIL-2 cDNA 重组质粒。该质粒有广泛用途: 克隆到表达载体质粒, 然后转化到大肠杆菌, 可表达 IL-2, 纯化后可用于实验研究或临床, 或转移至逆转录病毒中, 可对肿瘤患者开展 IL-2 基因治疗^[5]; 也可通过将 IL-2 基因与疫苗蛋白基因融合制备融合蛋白, 获得高效疫苗。

参 考 文 献

- 1 Hazama M, Mayumi-Aono A, Asakawa N, *et al*. Adjuvant-independent enhanced immune responses to recombinant herpes simplex virus type 1 glycoprotein D by fusion with biologically active interleukin-2. *Vaccine*, 1993, 11(6): 629
- 2 Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, *et al*. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature*, 1983, 302(24): 305
- 3 Harvill E T, Fleming J M, Morrison S L. In vivo properties of an IgG3-IL-2 fusion protein. *J Immunol*, 1996, 157(7): 3165
- 4 Pighetti G M, Sordillo L M. Enhanced antigen-specific responses in bovine mammary glands following administration of interleukin-2. *J Dairy Sci*, 1995, 78(3): 528
- 5 章小平, 曹雪涛, 王建莉, 等. 人白细胞介素 2 重组逆转录病毒载体的构建与表达. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1996, 3(3): 186

(1998-12-22 收稿 1999-08-24 修回)