

经验交流

激活淋巴细胞 cDNA 单链库的构建

范灵芝¹⁾ 刘彦仿
(第四军医大学病理教研室, 西安 710032)
杨新科 候云德
(中国预防医学科学院病毒研究所, 病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100052)

摘要 介绍一种激活淋巴细胞 cDNA 单链库构建方法, 此库具有良好的模板活性. 用 PCR 法从此库中克隆了多种中国人源性的细胞因子.
关键词 淋巴细胞, 激活, PCR

目前我国市场上重组细胞因子的基因工程产品不断出现, 但是这些细胞因子 cDNA 基本都是西方人源性的, 而人种间许多细胞因子的基因序列存在一定差别, 我们目前生产的细胞因子产品主要用于国人而不是出口, 因此细胞因子人种间的差异应引起重视. 长期使用异源性的细胞因子类药物可能会因为产生抗体而降低疗效并诱发抗性及其他副反应. 基于这一现状, 有必要从中国人的细胞中克隆中国人源性的细胞因子. 为此, 我们集不同收获时间的外周血淋巴细胞 mRNA 以及经不同丝裂源激活的扁桃腺淋巴细胞 mRNA 于一体, 以 oligo-(dT)₁₅ 为引物, 用 PCR 法构建了富含淋巴因子 cDNA 的激活的中国人淋巴细胞单链库. 实践表明不仅具有良好的模板活性且具有较高的稳定性.

1 材料与方法

1.1 淋巴细胞分离

200 ml 外周血用淋巴细胞分离液分离其中的淋巴细胞. 扁桃腺用机械不锈钢网研磨滤过, 分离其中的淋巴细胞.

1.2 淋巴细胞的激活及培养

外周血淋巴细胞用 1640 培养液稀释至 2×10^6 个/ml, 分至 10 个大方瓶中, 每瓶

10 ml. 其中 5 瓶用 ConA (10 mg/L) 刺激, 另 5 瓶用 PHA (100 mg/L) 刺激, 按表 1 所设时间收获细胞.

表 1 外周血淋巴细胞刺激分组

刺激物			t/h		
ConA	3	7	12	24	72
PHA	3	7	12	24	72

扁桃腺淋巴细胞用 1640 培养液稀释至 2×10^6 个/ml, 分至 10 个大方瓶中, 每瓶 10 ml. 各用不同组合的刺激物进行刺激 (表 2), 培养 24 h 后收获细胞.

1.3 细胞总 RNA 提取及 mRNA 的分离

集同一收获时间的各组细胞于一体, 分别用异硫氰酸胍热酚法提取其总 RNA^[1], 最后集各组提取的总 RNA 于一体, 用 Sigma 公司的 oligo (dT) 纤维素亲和柱从总 RNA 中分离带 Poly (A)⁺ 的 RNA.

1.4 逆转录合成 cDNA 首链

按 Pharmacia 公司的 cDNA 合成试剂盒的

¹⁾通讯地址: 中国预防医学科学院病毒研究所病毒基因国家重点实验室, 北京 100052.
收稿日期: 1996-01-31, 修回日期: 1996-04-11

程序, 用 oligo(dT) ₁₅ 为引物, 逆转录合成 cDNA 首链, 存于- 20 ℃待用. 此即为激活的淋巴细胞 cDNA 单链库.

1.5 单链库模板活性及稳定性

先后用 9 种细胞因子 (IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、GM-CSF、G-CSF、IL-13、BDNF) 上下游引物, 用 PCR 法对单链库进行扩增, 以鉴定其模板活性及稳定性.

表 2 扁桃腺淋巴细胞刺激分组

刺激物	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TPA/ ml	1 ng	100 ng	10 μg	1 ng	100 ng	10 μg	5 ng	5 ng		
抗 CD ₃ 抗体			1/ 1000	1/ 1000	1/ 1000					
ConA/ ml							5 μg		10 μg	
PHA/ ml								50 μg		100 μg

2 结果与讨论

用 PCR 法从单链库中成功地克隆了 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、GM-CSF、IL-13 和 BDNF 8 种细胞因子 cDNA, 并均经序列分析鉴定. 从时间上看, 第一个 IL-6 cDNA 的克隆与 IL-13 cDNA 的克隆间隔为 8 个月, 与 BDNF cDNA 的克隆间隔达 10 个月. 表明此淋巴细胞单链库具有很好的模板活性和较好的稳定性.

构建富含细胞因子 cDNA 单链库的目的在于克隆多种中国人源性的细胞因子 cDNA. 因淋巴细胞是多种细胞因子产生的主要细胞, 故选用淋巴细胞作为构建此库的主体细胞, 同时为了避免淋巴细胞组成及成分的单一性, 保证文库的多样性, 我们同时用外周血和扁桃腺作为淋巴细胞来源组织. 由于多数细胞因子的表达受转录水平调控, 而且是需要经过刺激后的应答性表达而不是组成性表达, 因此激活是构建此库的必要过程. 用各种组成的丝裂原分别刺激各种淋巴细胞及其亚群, 使其产生相应细胞因子 mRNA, 并在其高峰时“捕获”这些一过性 mRNA 是成功构建此库的关键. 目前对一些基因的激活过程有些了解^[2], 但各种细胞对刺激物的要求有一定的差异, 其相应 mRNA 峰值出现时间亦不一致. 多数细胞因子 mRNA 峰值出现在刺激后 24 h 左右, 然后迅速下降. 但也有部分例外, 但多集中在 72 h

之内. 然而由于对每种细胞因子的具体激活模式并不十分清楚, 因此对刺激物的最佳组合方式、最佳剂量以及每种细胞因子 mRNA 峰值出现时间等参数就不能十分确定. 本实验在 24 h 这一时间点上设计了经不同组合刺激物刺激的几个实验组, 同时又设计了用同种刺激物不同时间点 (3、7、12、24 和 72 h) 的实验组, 以保证总 mRNA 的多样性和丰富性. 多数细胞因子 mRNA 均带 Poly (A)⁺ 尾, 本实验用 oligo(dT) 纤维素亲和层析柱纯化其 mRNA, 用逆转录酶将其反转录成 cDNA 第一条链以提高其稳定性. 实验表明此法构建的激活淋巴细胞单链库具有很好的模板活性和良好的稳定性.

参 考 文 献

1 蔡良琬. 核酸研究技术. 北京: 科学出版社, 1987. 59~60
2 Williams T M. Interleukin 2 basic biology and therapeutic use. Hematol Pathol, 1991, 5: 45~ 55

The Constrution of the First Strand cDNA Library of Activated Lymphocytes. FAN Lingzhi, LIU Yanfang (*Department of Pathology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*); YANG Xinke, HOU Yunde (*National Laboratory of Molecular Virology*)
(下转第 94 页, Continued on page 94)

- 3 Lofas S, Malmqvist M, Ronnberg I *et al.* Bioanalysis with surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators*, 1991, **B5**: 79~ 84
- 4 Bartley T D, Hunt R W, Welcher A A *et al.* B61 is a ligand for ECK receptor protein-tyrosine kinases. *Nature*, 1994, **368**: 558~ 560
- 5 Stitt T N, Conn G M, Lai B J *et al.* The anticoagulation factor protein S and its relative Gas6, are ligands for the Tyro3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*, 1995, **80**: 661~ 670
- 6 Marengere L E, Songyang Z, Gish G D *et al.* SH2 domain specificity and activity modified by a single residue. *Nature*, 1994, **369**: 502~ 505
- 7 Seth A, Stern L J, Ottenhoff T H M *et al.* Binary and ternary complexes between T-cell receptor, class II MHC and superantigen *in vitro*. *Nature*, 1994, **369**: 324~ 327
- 8 Chatellier J, Rauffer B N, Van Regenmortel M H V *et al.* Comparative interaction kinetics of two recombinant Fabs and of the corresponding antibodies directed to the coat protein of tobacoomosaic virus. *J Molecular Recognition*, 1996, **9**: 39 ~ 51
- 9 Kolbinger F, Saldanha J, Hardman N *et al.* Humanization of a mouse anti-human IgE antibody: a potential therapeutic for IgE-mediated allergies. *Protein Engineering*, 1993, **6**: 971~ 980
- 10 Daiss J L, Scalice E R. Epitope mapping on BIAcore: Theoretical and practical consideration. *Methods*, 1994, **6**: 143~ 156
- 11 Ohlin M, Owman H, Mach M *et al.* Light chain shuffling of high affinity antibody results in a driftin epitope recognition. *Molecular Immunology*, 1996, **33**: 47~ 56
- 12 Barberis A, Pearlberg J, Simkovich N *et al.* Contact with a component of the polymerase II holoenzyme suffices for gene activation. *Cell*, 1995, **81**: 359~ 368

- 13 Buckle M, Williams R M, Negroni B H. Real-time measurements of elongation by a reverse transcriptase using surface plasmon resonance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 889~ 89
- 14 Bates P J, Dosanjh H S, Kumar S *et al.* Detection and kinetic studies of triplex formation oligodeoxynucleotides using real-time biomolecular interaction analysis. *Nucleic Acids Research*, 1995, **23**: 3627~ 3632
- 15 Ciolkowski M. DNA aptamer interaction with protein. Poster presented at Science innovation, 1993, 93 Boston, MA

New Application for Biosensor: Biomolecular Interaction Analysis (BIA) Technology. SHEN Ping (*Pharmacia Biotech (China) Ltd. Beijing 100086, China*).

Abstract BIA technology (biomolecular interaction analysis) is a new concept by using newly developed biosensor technology. The interaction of biomolecular can be monitoring in real time and without the use of labels. The principles and application fields of this new technology are introduced. A series of application note for BIA technology in the next few journals will be published. Together with almost 400 publications in the scientific literature, the great value of BIA technology in research will be revealed.

Key words biosensor, BIA technology, biomolecular interaction, real time

(上接第 87 页, Continued from page 87)

and Genetic Engineering, Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052, China).

Abstract The first strand cDNA library rich in cytokine cDNAs has been prepared from mRNA derived from several groups of activated lymphocyte by reverse transcription. Several Chinese

derived cytokine cDNAs were cloned successfully by PCR. It is suggested that the first strand cDNA library could provide a good templet for PCR amplification.

Key words lymphocytes, activated, polymerase chain reaction