

Virus induced Pathogenesis and Free Radicals

Injury. HAN Na, ZHANG Weidong, XU Beili, WANG Meiling, LI Xiaobing, LIU Bin (*Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China*).

Abstract To prove up production and effect of free radicals on virus induced pathogenesis, the influenza A/FM 1/1/47 (H₁N₁) was adapted to mice by nostril inoculation. The results demonstrated that the oxygen free radical levels and

xanthine oxidase activity in the lung tissues from the mice after infection by virus raised remarkably. These were positively correlated with lung tissues injury and mice mortality. The results demonstrated that oxygen free radicals may involve in influenza induced pathogenesis in mice, and may be an important factor causing tissue injury.

Key words influenza, oxygen free radicals, mice

人神经营养因子 4 基因的分子克隆及序列分析

王爱坤 刘哲伟 包怡华

(首都儿科研究所, 北京市高技术实验室, 北京 100020)

摘要 以正常人血淋巴细胞染色体 DNA 为模板, PCR 扩增出神经营养因子 4 (NT4) 编码基因. 将所得基因片段重组于噬菌体载体 M13mp18RF, 筛选得到含人 NT4 基因的克隆. 采用 Sanger 单链末端终止法测出其全部的核苷酸序列, 该序列与国外文献所报道的完全一致.

关键词 神经营养因子 4, 基因克隆, 序列分析

学科分类号 Q75

神经营养因子 4 (neurotrophin-4, NT4) 是神经营养因子超家族成员之一. 成熟的 NT4 由 130 个氨基酸残基构成, 具有广泛的生理学作用, 尤其在促进神经元的生长、发育、分化与成熟, 维持神经元的存活及促进神经损伤后的修复与再生方面发挥着重要的作用, 因而在治疗多种神经性疾患方面有潜在的应用价值. 目前, 有关中国人 NT4 基因的克隆及序列方面的工作尚未见报道, 本实验成功克隆了中国人的 NT4 完整基因, 并进行了基因序列的测定, 为今后在真核细胞系统表达能分泌的成熟 NT4 打下基础.

1 材料和方法

1.1 载体与菌株

噬菌体载体 M13mp18RF, 大肠杆菌

DH5aF' 由加拿大英属哥伦比亚大学研究中心赠送.

1.2 工具酶、引物及实验试剂

限制性内切酶及连接酶为美国 BRL 公司产品. PCR 引物及 Taq plus II 聚合酶购自上海生工生物工程公司. 上游引物为: GAGT-GAATTCGAGAGATGCTCCCTCTC, 5' 端含 EcoR I 酶切位点. 下游引物为: AGT-CAAGCTTCCTGGGCATGGGTCTCAG, 于 5' 端含 Hind III 酶切位点. T7 测序试剂盒为 Promega 公司产品. [α -³²P] dATP 购自北京福瑞公司.

1.3 淋巴细胞染色体 DNA 的制备

取一正常中国人的全血 5 ml, 参照《分

收稿日期: 1997-03-12, 修回日期: 1997-07-17

子克隆》的方法稍作修改，提取淋巴细胞染色体 DNA.

1.4 PCR 扩增目的基因

取上述制备的染色体 DNA 0.5 μg 作模板，PCR 条件：含 MgCl₂ 1.5 mmol/L，dNTP 200 μmol/L，上、下游引物各 0.4 μmol/L，Taq plus II 聚合酶 0.5 U. 94℃ 60 s，60℃ 60 s，72℃ 90 s，共 30 个循环.

1.5 PCR 产物的回收及克隆

将纯化后的 PCR 产物及载体 M13mp18 分别由 *Eco*R I，*Hind* III 联合酶切后连接，转染感受态大肠杆菌 DH5αF'，在含 X-gal，IPTG 的培养基上挑选透明噬菌斑，提取质粒以限制性内切酶筛选鉴定.

1.6 克隆基因的核苷酸序列测定

挑选三个经酶切鉴定正确的克隆，以 M13 载体的前向引物及合成的内引物，采用 Sanger 单链末端终止法测序.

2 结 果

2.1 PCR 扩增，克隆及酶切鉴定结果

PCR 产物行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳，以 pBR322/*Hinf* I 片段作标准参照，可见 PCR 产物约为 660 bp，结果与预计相符. 将初筛出的重组质粒分别用 *Apa* I，*Eco*R I，*Hind* III，*Pst* I 和 *Sma* I 等限制性内切酶鉴定. 所有阳性克隆均为同一方向插入 M13 载体 (图 1)，其联合酶切图谱与理论推算的结果完全一致

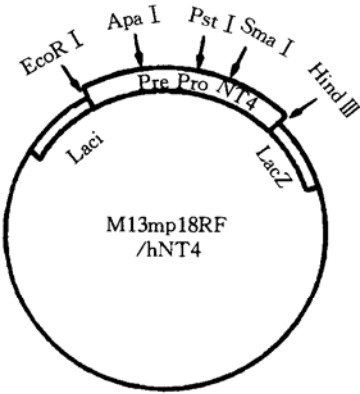


图 1 重组质粒 M13mp 18RF/hNT4

(图 2).

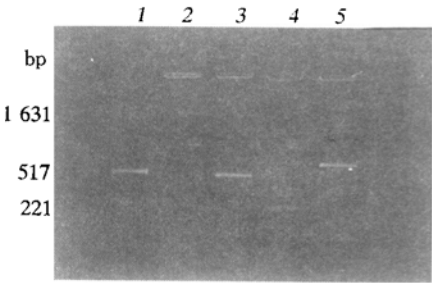


图 2 重组质粒 M13mp 18RF/hNT4 的联合酶切鉴定图谱

1: 标准分子质量对照 (pBR322/*Hinf* I); 2: *Eco*R I + *Hind* III + M13/hNT4; 3: *Eco*RI + *Pst* I + M13/hNT4; 4: *Hind* III + *Sma* I + M13/hNT4; 5: *Apa* I + *Hind* III + M13/hNT4.

2.2 克隆基因的序列测定结果

放射自显影后读片 (图 3)，所测出的全部 633 bp 的核苷酸序列与文献 [1] 报道的完全一致 (图 4).



图 3 部分放射自显影测序结果

- 80

Met Leu Pro Leu Pro Ser Cys Ser Leu Pro Ile Leu Leu Leu Phe Leu Leu Pro Ser Val

ATG CTC CCT CTC CCC TCATGCTCC CTC CCC ATC CTC CTC CTT TTC CTC CTC CCC AGT GTG

- 60

Pro Ile Glu Ser Gln Pro Pro Pro Ser Thr Leu Pro Pro Phe Leu Ala Pro Glu Trp Asp

CCA ATT GAGTCC CAA CCC CCA CCC TCA ACATTG CCC CCT TTT CTG GCC CCT GAGTGG GAC

- 40

Leu Leu Ser Pro Arg Val Val Leu Ser Arg Gly Ala Pro Ala Gly Pro Pro Leu Leu Phe

CTT CTC TCC CCC CGA GTAGTC CTGTCT AGGGGT GCC CCT GCT GGG CCC CCT CTG CTC TTC

- 20

Leu Leu Glu Ala Gly Ala Phe Arg Glu Ser Ala Gly Ala Pro Ala Asn Arg Ser Arg Arg

CTG CTG GAG GCT GGGGCC TTT CGG GAG TCA GCA GGT GCC CCG GCC AAC CGC AGCCGG CGT

+ 1

Gly Val Ser Glu Thr Ala Pro Ala Ser Arg Arg Gly Glu Leu Ala Val Cys Asp Ala Val

GGG GTG AGC GAA ACT GCA CCA GCG AGT CGT CGG GGT GAG CTG GCT GTGTGC GAT GCA GTC

+ 30

Ser Gly Trp Val Thr Asp Arg Arg Thr Ala Val Asp Leu Arg Gly Arg Glu Val Glu Val

AGT GGCTGG CTG ACA GACCGC CGG ACC GCT GTG GACTTG CGT GGG CGC GAG GTGGAG GTG

+ 50

Leu Gly Glu Val Pro Ala Ala Gly Gly Ser Pro Leu Arg Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Arg

TTG GGC GAG GTG CCT GCA GCT GCGGGC AGT CCC CTC CGC CAG TAC TTCTTT GAA ACC CGC

+ 70

Cys Lys Ala Asp Asn Ala Glu Glu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys Arg Gly

TGC AAGGCT GAT AACGCT GAG GAAGGT GGCCCG GGGGCA GGT GGA GGG GGCTGCCGG GGA

+ 90

Val Asp Arg Arg His Trp Val Ser Glu Cys Lys Ala Lys Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu

GTG GACAGG AGG CACTGGGTATCT GAGTGCAAG GCC AAG CAGTCC TAT GTG CGG GCA TTG

+ 110

Thr Ala Asp Ala Gln Gly Arg Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val

ACC GCT GAT GCC CAGGGCCGT GTGGGCTGGCGA TGGATT CGA ATT GACACT GCCTGC GTC

+ 130

Cys Thr Leu Leu Ser Arg Thr Gly Arg Ala End

TGC ACA CTC CTC AGCCGG ACT GGCCGG GCCTGA

图 4 克隆的中国人神经营养因子 4 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

- 1~ - 80: NT4 前序列 (prepro sequence); + 1~ + 130: NT4 成熟段序列 (mature sequence);
- 63~ - 80: NT4 信号肽序列 (signal peptide sequence).

3 讨 论

人类的 NT4 基因定位于第 19 号染色体. 虽然其长前体编码基因目前仍不清楚, 但其短前体的编码基因则由单一外显子编码^[1], 可以很容易地通过 PCR 将其完整地扩增出来用以表达. NT4 的成熟段序列内有六个高度保守的半胱氨酸, 形成三个链内二硫键. 推测其前导序列在成熟 NT4 的折叠、加工、运输及二聚体化方面发挥着重要作用, 可能与成熟 NT4 的生物学活性紧密相关^[2]. 前导序列中的信号肽有助于将 NT4 分泌至真核细胞外, 表达产物具有较高的生物学活性^[1]. 因此, 本实验克隆了含前导序列的 NT4 完整基因, 为今后在真核细胞系统表达可分泌的成熟

NT4 创造了有利的条件. 从我们所克隆的 NT4 基因序列来看, 无论是前导序列还是成熟段序列均与国外文献所报道的完全一致, 提示不同人种的 NT4 基因可能是相同的.

参 考 文 献

1 Nancy Y P, Carlos F I, Steven H N *et al.* Mammalian neurotrophin 4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 3060~ 3064

2 Maisonnier P C, Michelle M, Nancy Y P *et al.* Human and rat brain derived neurotrophic factor and neurotrophin 3: gene structure, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics*, 1991, **10**: 558~ 568

(下转第 187 页, Continued on page 187)

增和噬菌体 DNA 的分离纯化; 并用 *EcoR* I 限制性内切酶对所提取的噬菌体 DNA 进行了酶切、电泳, 可见到有 cDNA 插入片段释放 (图 1). 图 1 中酶切所用的噬菌体 DNA 的量系从约 1 ml 的 LB 液扩裂解液分离纯化而来. 结果表明, 用本方法分离纯化所得的噬菌体 DNA 不仅纯净, 用合适的限制性内切酶消化即可得到目的 DNA 片段, 用于下一步亚克隆操作或其他实验, 而且方法稳定, 得率较高. 对于 1 ml 有较高滴度 ($> 10^{11}$ pfu/ml) 的液扩裂解液, 可分离得到 2~ 3 μ g 的噬菌体 DNA (图 1).

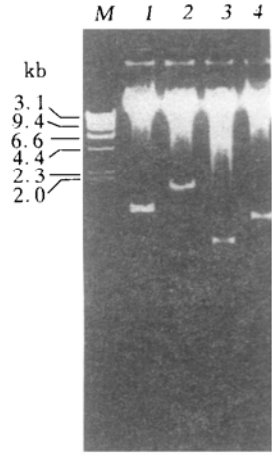


图 1 人胎盘 cDNA 文库 (λ gt11 载体) 噬菌体 DNA *EcoR* I 酶切后琼脂糖凝胶电泳图
M: λ DNA 分子质量标准 (*Hind* III 酶切); 1~ 4: 四个不同的 cDNA 克隆 (*EcoR* I 酶切).

本文介绍的噬菌体 DNA 的抽提方法, 不同于常用的噬菌体 DNA 纯化的标准方法^[1], 需要用 DNase 处理噬菌体裂解液和超离心; 也有别于文献 [2] 报道的方法, 省去了用醋酸钾冰浴去除 SDS 和 88 $^{\circ}$ C 温育灭活蛋白酶 K

这两步, 具有快速简便的特点, 从聚乙二醇沉淀噬菌体颗粒到分离得到纯净的噬菌体 DNA, 整个过程仅需约 3 h. 另外, 本方法的绝大部分操作都在 Eppendorf 管中进行, 实验操作还具有简便省力、效率高的特点. 所以该方法尤其适用于对多个 cDNA 克隆同时进行噬菌体 DNA 的纯化工作, 对于 cDNA 文库筛选, 特别是在基因组研究中具有一定的应用价值.

参 考 文 献

1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2. 60~ 2. 67
2 Zagursky R J, Baumeister K, Lomax N *et al.* Rapid and easy sequencing of large linear double-stranded DNA an supercoiled plasmid DNA. *Gene Anal Tech*, 1985, 2 (1): 89~ 94

Rapid Extraction of Phage DNA. QIN Wen-xin, WAN Da-fang, ZHAO Xi-r-tai, JIANG Hu-r-qiu, GU Jian-ren (*National Laboratory for Oncogenes and Related Genes, Shanghai Cancer Institute, Shanghai 200032, China*).

Abstract A purification method for phage DNA is introduced. Phage particles are precipitated by polyethylene glycol (PEG), then purified by DEAE-cellulose DE52 and extracted by phenol. This modified method is more convenient, rapid and economical than the traditional method of phage DNA purification and can obtain phage DNA with high purity.

Key words phage DNA, extraction, polyethylene glycol (PEG), DEAE-cellulose DE52

(上接第 185 页, Continued from page 185)
Molecular Cloning and Sequencing of Neurotrophin-4 Gene from Chinese. WANG A-r-kun, LIU Zhe-wei, BAO Y-r-hua (*Beijing Municipal High-tech Laboratory, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China*).
Abstract With the chromosomal DNA of human blood lymphocytes as template,

neurotrophin-4 coding genes were amplified by PCR and recombined into phage vector M13, which were sequenced by using Sanger's single-stranded DNA terminal termination method. The sequence of the cloned gene is completely the same as that reported in the literature.
Key words neurotrophin-4, gene cloning, DNA sequencing