

表 1 抗体重链 可变区基因及各片段的序列

V _H	5' PCR引物 GGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGCACTG TCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAGTATCTATTATAGTGGGAGCACCTACTACAACCC GTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA AGCTGAGCTCTGTGACCGCCGACACACGGCTGTGTATTACTGTGGAGA 297
N	<u>CATC</u> 301
D	<u>ATTACGATTTTGGAGTGGTATTATAC</u> 329
N	<u>GGCGC</u> 334
J _H	<u>ACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3'</u> 387

下面划线部分标出三个超变区 (CDR), CDR3 包括 N₁D₁N 片段及 J_H 片段的一部分。

湿因子(自身抗体)的 V_H 片段。这些结果说明产生克隆 104-A6 的 B 细胞和 CD5⁺B 细胞有共同的特点。结合 FACS 分析结果,这类细胞很可能代表第三种人 B 细胞世系,相应于小鼠 B-1b 细胞。我们将进一步测定其它细胞株分泌的多反应性抗体可变区基因序列,并研究这类细胞在人 B 细胞库中的分布情况。

development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 3320

- 2 Kasaian MT, Ikematsu H, Casali P. Identification and analysis of a novel human surface CD5⁺B lymphocyte subset producing natural antibodies. *J Immunol*, 1992; 148: 2690
- 3 季永铺,叶敏,孙佩芳. 体外诱发抗体生成过程中淋巴细胞的变化. *实验生物学报*, 1991; 24(4): 333

参 考 文 献

1 Kantor A B, Stall A M, Adam S *et al.* Differential

人白血病抑制因子基因 cDNA 的克隆及分析

涂 强 王永俊 李文 谢宝树 朱元晓¹⁾ 阎玉河²⁾ 余竞源 兰 兰 林万明

(空军总医院临床分子生物学研究中心,北京 100036)

关键词 人,白血病抑制因子,基因克隆

白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 是 80 年代初发现的一种新的细胞因子。它能不可逆地抑制白血病细胞增殖,并诱导其分化^[1],同时它还能在没有明显毒副作用的情况下在体内或体外直接刺激巨核血小板系统生成,增加外周血血小板数量,并协同其

他因子促进正常造血^[2]。因此,它在白血病、血小板减少症以及其他造血系统低下病症的治疗中有广阔的应用前景。目前国外还开展了 LIF

1) 军事医学科学院基础医学研究所;

2) 河南省农业科学院畜牧兽医研究所。

收稿日期: 1992-09-24 修回日期: 1992-11-18

大动物实验及临床前期准备,而国内尚无 LIF 基因克隆、表达及功能方面的研究。

为了克隆 LIF cDNA,我们应用正常人抗凝外周血,用淋巴细胞分离液密度梯度离心分离出单个核细胞,在含 20% 新生牛血清、 10^{-8} mol/L TPA 和 $2\mu\text{g/ml}$ PHA 的 1640 培养基中培养 20h,用 EDTA 回收细胞。应用 Chomczynski 的方法^[3]提取细胞总 RNA。取 $1\mu\text{g}$ RNA 为模板,oligo(dT) 为引物,用 M-MLV 反转录酶 42°C 合成 cDNA 第一链。以合成的 31mer 和 32mer 寡核苷酸为上下游引物扩增 LIF cDNA,PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳和 EB 染色,扩增条带大小为 550bp,与原设计相符。将扩增的 LIF cDNA 插入 pUC18 的 EcoRI、BamHI 位点,转化大肠杆菌 JM103。在含 X-gal 的培养基上挑选白色菌落,用质粒提取酶切电泳法进一步筛选,发现了 3 个菌落质粒分子量大于阴性对照(蓝菌落)。用 EcoRI 和 BamHI 双酶切后出现两条带,其中一条为 pUC18 载体、另一条为 550bp 的 LIF cDNA。此质粒按 Pharmacia T₄ 核酸序列测定试剂盒说明书,以阳性克隆质粒双链为模板,对克隆片段全序列进行了分析。结果表明此片段对应的氨基酸序列与文献报道完全一致^[4],表明克隆的片段系人 LIF 基因 cDNA。

本文应用反转录 PCR 技术成功地克隆出了人 LIF 基因 cDNA,证明反转录 PCR 技术是细胞因子基因克隆的一种快捷有效的途

径。本研究中反转录 PCR 的关键在于以下两点: a. 总 RNA 的质量: 人外周血淋巴细胞在一定条件下可以表达 LIF, 用 PHA 和 TPA 共同诱导 20h 使 LIF 的 mRNA 达最高值。 b. 引物的选择: 反转录引物包括 oligo(dT) 和随机引物,只有应用 oligo(dT) 才能扩增出特异条带。由于 LIF cDNA 两端 GC 含量过高,我们利用简并性原理,在不改变氨基酸序列的前提下,选用了大肠杆菌偏爱的密码子,同时利用计算机辅助设计上下游引物,使其符合 PCR 要求。

由于 LIF 具有直接刺激血小板造血、协同促进其他系造血,并具有抑制髓系白血病细胞增殖等多方面的作用,而且 LIF 的 mRNA 在不同白血病中的转录水平有明显差异,因此,人 LIF cDNA 的克隆为白血病鉴别诊断和白血病及血系统生成低下病症的治疗提供了新途径。

参 考 文 献

- 1 Tomida M, Yamamoto Y Y, Hozumi M. Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L 929 cells *J Biol Chem*, 1984; 259: 10978
- 2 Metcalf D. The leukemia inhibitory factor (LIF). *Inter J Cell Cloning*, 1991; 9: 95
- 3 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem*, 1987; 162: 156
- 4 Moreau J F, Donaldson D D, Bennett F *et al*. Leukaemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature*, 1988; 336: 690

信息服务

具有止鼾、安眠之功效的消鼾枕

该产品为北京市星火技术研究所研制开发的最新科技成果,产品根据人体睡眠时呼吸系统的生理要求,在多次止鼾实验基础上开发设计的,具有设计独特、造型巧妙、使用方便等特点。打鼾者使用本产品不论何种睡姿均可达到理想的止鼾、安眠效果,同时无鼾声者使用本产品可安神调息、消除疲劳、调整睡姿。

生产本产品不需专用厂房及设备,主要原料为泡

沫塑料和一般枕套布。每只成本约 5 元,参考售价 15 元。适于缝纫制品、保健用品厂及广大乡镇企业、个体户生产。本所备有样品及全套技术资料、产品图纸等,费用面议。

[100024 北京 867 信箱 20816 组 郭静峰

电话: 5762127, 5762194]