

人 TRAIL 基因 cDNA 的克隆及其在 COS-7 细胞中的表达

刘孟珉 萨其拉 胡致远 钱会南 鱼咏涛 贺福初

(北京放射医学研究所 北京 100850)

关键词 人 TRAIL, 反转录聚合酶链反应, cDNA 克隆, 表达, 凋亡

分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0113-03

TRAIL(TNF-related apoptosis inducing ligand)是最近克隆的肿瘤坏死因子(TNF)家族的新成员,由于它的蛋白质结构和生物学效应类似于 FAS/APO-1L,因此,也被称为 APO-2L。在低浓度下,TRAIL 能迅速地诱导多种肿瘤细胞系的凋亡,而对正常组织细胞无凋亡诱导作用,是一种有希望用于肿瘤治疗的生物调节剂^[1-3]。TRAIL 对肿瘤细胞的凋亡诱导作用不依赖于 Fas/Apo-1 和 TNF 受体,而是通过其它途径诱导凋亡的。最近,TRAIL 的 5 个受体相继被克隆,它们分别被称为 DR4(Death receptor-4),DR5,TRID(TRAIL Receptor without an intracellular domain)或 DcR1(Decoy receptor 1),TRUNDD(TRAIL Receptor with a truncated death domain)或 DcR2 以及 OPG(Osteoprotegerin)^[4-8]。

我们利用反转录聚合酶链反应从人急性早幼粒白血病细胞系 HL-60 细胞总 RNA 中扩增出人 TRAIL 基因编码区 cDNA 序列,并构建了其重组表达质粒,证实了所克隆的全长人 TRAIL 基因编码区 cDNA 能表达出使人单核细胞性白血病细胞系 U937 细胞发生凋亡的活性蛋白。

1 材料与方 法

1.1 菌种、细胞株及质粒

本实验所用 *E. coli* JM109、COS-7 细胞株为本实验室保存,pGEM-T 购自 Promega 公司,pcDNA3 由 California Institute of Technology Dr M Y Liu 惠赠。

1.2 酶类及主要试剂

DNA 限制酶 *Hind* III、*Bam* HI 购自华美生物工程公司;T4DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、总 RNA 抽提试剂盒、RT-PCR 和 PCR 产物回收及质粒纯化、T7 测序试剂盒等购自 Promega 公司;Lipofectin、DMEM 培养基、RPMI1640 培养基购自 GIBCO 公司; α -³²PdATP 购自北京福瑞生物工程公司。

1.3 人急性早幼粒白血病细胞系 HL-60 细胞的培养与总 RNA 的提取

人急性早幼粒白血病细胞系 HL-60 在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基,37℃,5% CO₂ 条件下培养。按

Promega 公司 RNAagents™ 总 RNA 提取系统操作指南从培养细胞中分离总 RNA,溶于无菌水。

1.4 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)

根据 Wiley SR 等^[1]发表的人 TRAIL cDNA 序列设计引物,上游引物为 5'-CAAGCTTATGGCTATGATGGAGGTCC-3',含 *Hind* III 酶切位点,下游引物为 5'-CGGATCCTTAGC-CAACTAAAAAGGCC-3',含 *Bam* HI 酶切位点(引物由上海生工生物工程公司合成)。RT-PCR 采用 Promega 公司 GeneAmp^R RNA PCR kit mRNA 反转录模板为 1 μ g,在 PE480 扩增仪上扩增,扩增参数为:反转录(RT)—42℃ 1h,95℃ 5min.; PCR—94℃ 45s,55℃ 1min,72℃ 1~5min,循环 35 次,72℃ 延伸 7min。

1.5 重组质粒 pGEM-hTRAIL 的构建和鉴定

将 PCR 产物直接克隆进 pGEM-T 载体中,以常规氯化钙法转化 JM109,用 PCR 方法和酶切分析的方法鉴定重组子。

1.6 序列测定

利用 Wizard Plus Minipreps DNA Purification System 提取质粒,分别以通用顺序引物 T7 和 SP6,T7DNA 聚合酶序列分析试剂盒直接进行重组质粒的双链 DNA 测序。

1.7 重组表达质粒 pcDNA3-hTRAIL 的构建和鉴定

用 *Hind* III 和 *Bam* HI 双酶切 pGEM-hTRAIL 质粒 DNA 回收目的片段,将其定向克隆至经 *Hind* III 和 *Bam* HI 双酶切的 pcDNA3 真核表达载体上,以常规氯化钙法转化 JM109 感受态细胞,用 PCR 方法初步和酶切分析方法鉴定重组子。

1.8 pcDNA3-hTRAIL 质粒在 COS-7 细胞中的表达

细胞转染用 Lipofectin 法,将 5 μ g 质粒 DNA 和 10 μ L 脂质体分别溶于不含血清的 DMEM 中,混匀,室温放置 15min,转染 COS-7 细胞,36h 后收集上清。

1.9 表达产物诱导 U937 细胞发生凋亡的测试

将转染上清以 25% 和 50% 的比例加入 RPMI1640 培养的上清中,每 12h 台盼蓝染色,光镜下计数活细胞数,

油镜下观察凋亡细胞形态,流式细胞仪检测凋亡时相和凋亡率。

2 结果与讨论

2.1 人 TRAIL 基因 cDNA 的 RT-PCR 结果

以急性早幼粒白血病细胞系 HL-60 细胞总 RNA 为模板,经 RT-PCR 扩增出一特异性条带,位置相当于 846bp,与预期的大小一致(图 1)。

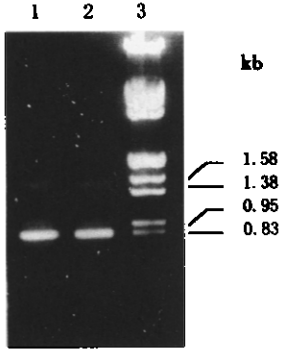


图 1 RT-PCR 产物 hTRAIL cDNA 的电泳鉴定
1~2. RT-PCR product
3. λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III Marker

2.2 PCR 产物克隆及重组质粒序列测定结果

电泳回收的 PCR 产物与 pGEM-T 载体的连接产物转化感受态 *E. coli* JM109 后,用 PCR 方法和酶切分析的方法鉴定转化子,结果表明,它是含插入片段的重组质粒 pGEM-hTRAIL。DNA 序列分析证明与已报道的基因序列一致。

2.3 人 hTRAIL 真核表达质粒的构建

构建方案见图 2。对经序列测定确证的 pGEM-hTRAIL 质粒 DNA 用 *Hind* III 和 *Bam*HI 双酶切,常规低熔点琼脂糖法回收目的片段,将其定向克隆至真核表达载体 pcDNA3,

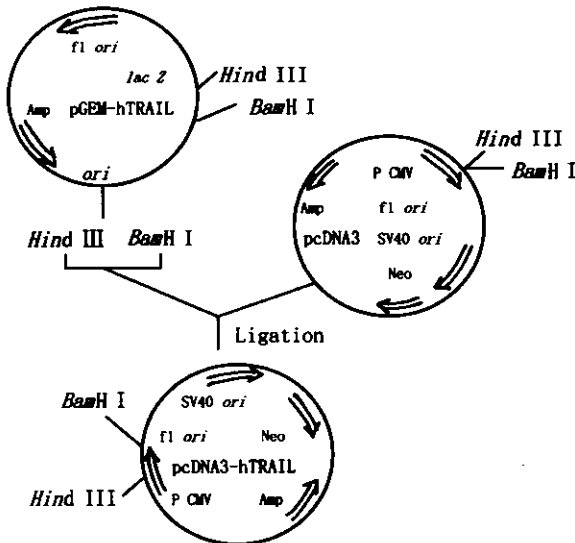


图 2 重组表达质粒 pcDNA3hTRAIL 的构建图

PCR 方法和酶切方法鉴定重组子。结果表明,用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切经 PCR 方法鉴定的阳性重组子 DNA,获得预期大小的 DNA 片段(846bp),此鉴定质粒被命名为 pcDNA3-hTRAIL(图 3)。

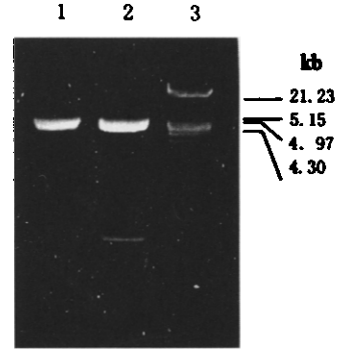


图 3 pcDNA3-hTRAIL 限制酶酶切鉴定
1. pcDNA3-hTRAIL plasmid; 2. pcDNA3-hTRAIL/*Hind* III + *Bam*H I; 3. λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III Marker

2.4 人 TRAIL 的表达与诱导 U937 细胞凋亡的测试

pcDNA3-hTRAIL 重组质粒转染 COS-7 细胞,36h 后,分别收集上清和细胞裂解液,以检测能否诱导 U937 细胞发生凋亡。结果表明,细胞裂解液不能诱导 U937 细胞发生凋亡,因此,不含具有生物活性的表达产物;而在 U937 细胞中分别按 25% 和 50% 的比例添加转染上清液,从 48h 开始,即能抑制 U937 细胞的生长和活力(图 4),光镜下细胞形态显示为细胞脱水浓缩成单个,体积缩小,胞膜完整,内含高度浓缩核染色质的胞核,其染色质浓缩至核膜下成新月状;油镜下见凋亡细胞膜起泡(Blebbing),核染色质浓缩,有的小泡脱落形成凋亡小体(Apoptotic bodies)。流式细胞仪分别在 48h、72h、96h 明显出现凋亡特有的 AP 峰(分别占 13.7%、15.7%、50.5%)(图 5)。

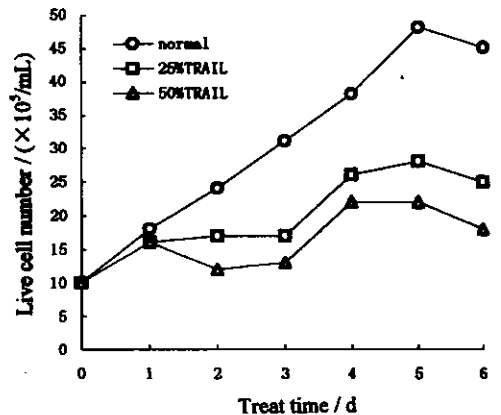


图 4 在 TRAIL 作用下 U937 细胞的生长曲线

综上所述,我们成功地克隆出人 TRAIL 编码区全长 cDNA,并通过序列分析与瞬时表达的活性鉴定加以确证;进而为其后续基因工程研究和基因组结构的研究奠定了基础。

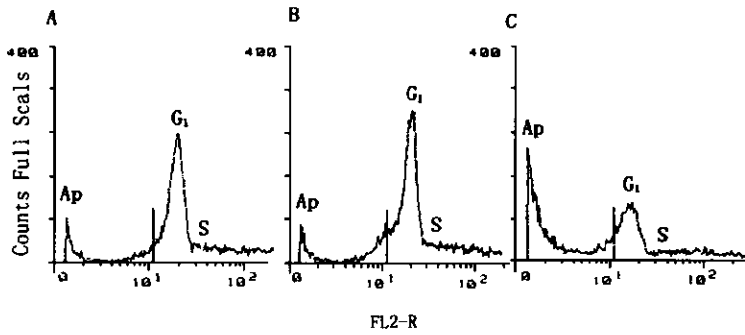


图5 TRAIL 处理 U937 细胞的流式细胞分析
A. TRAIL 48h; B. TRAIL 72h; C. TRAIL 96h

参 考 文 献

- [1] Wiley S R, Schooley K, Smolak P J *et al.* *Immunity*, 1995, 3(6):673~682
- [2] Pitti R M, Marsters S A, Ruppert S *et al.* *J Biol Chem*, 1996, 271(22):12687~12690
- [3] Griffith T S, Chin W A, Jackson G C *et al.* *J Immunol*, 1998, 161:2833~2840
- [4] Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan *et al.* *Science*, 1997, 276:111~113
- [5] Pan G, Ni J, Wei Y F *et al.* *Science*, 1997, 277:815~817
- [6] Sheridan J P, Marsters S A, Pitti R M *et al.* *Science*, 1997, 277:818~821
- [7] Pan G, Ni J, Yu G *et al.* *FEBS lett*, 1998, 424:41~45
- [8] Emery J G, McDonnell P, Burke M B *et al.* *J Biol Chem*, 1998, 273:14363~14367

Cloning of Human TRAIL cDNA and Its Expression in COS-7 Cells

LIU Meng-min SA Qi-la HU Zhi-yuan QIAN Hui-nan YU Yong-tao HE Fu-chu
(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

Abstract The human TRAIL cDNA was amplified with the total RNA from the human acute promyelocytic leukemia cell line HL-60 by means of RT-PCR, and was cloned into the pGEM-T vector. The DNA sequence analysis showed that it was consistent with the published sequence. Then, the insert of human TRAIL cDNA was subcloned into the mammalian expression vector pcDNA3. The hybrid plasmid pcDNA3-hTRAIL was transformed into COS-7 cells, and transiently expressed in the COS-7 cells. The activity of the expressed product could induce apoptosis in U937 cell line.

Key words Human TRAIL, RT-PCR, cDNA cloning, expression, apoptosis