

人 RS21-C6 基因的克隆及其原核表达*

张 君 李 燕 田 甜 陈慰峰**

北京大学基础医学院免疫学系, 北京 100083

摘要 从小鼠胸腺细胞克隆的新基因 RS21-C6 的 cDNA 648 bp 与人表达序列标签 (EST) 数据库进行同源性比较, 得到 71 个 EST 片段, 通过 EST 拼接获得一致性序列, 经设计引物, 并采用 RT-PCR 方法, 从人新生儿脐带血单个核细胞、肝脏、淋巴结及 Jurkat 细胞系 cDNA 中扩增出一 700 bp 的片段, 利用快速扩增 cDNA 末端 (RACE) 方法, 扩增其 5' 和 3' 端序列, 得到此基因的全长序列 (1118 bp), 其中包含一个 513 bp 的开放阅读框, 编码 170 个氨基酸. 该基因在核酸水平与小鼠基因的同源性为 83%, 其演绎蛋白水平的一致性为 75%, 相似性为 83%. 此基因的 GenBank 登录号为 AF210430. 此外, 已成功表达此基因的谷胱甘肽巯基转移酶 (GST)-RS21-C6 融合蛋白, 其表达量占总菌体蛋白的 32.5%.

关键词 EST RS21-C6 基因克隆 表达

胸腺前体细胞从骨髓迁至胸腺, 在胸腺内与胸腺基质细胞相互作用, 经历阳性和阴性选择, 才能发育成熟为功能成熟的具有自身限制性的 T 细胞. 我们多年来一直致力于研究胸腺基质细胞在胸腺细胞发育成熟中的作用, 在以往的研究中发现: 小鼠胸腺早期 T 细胞株 C320^[1] 在与小鼠胸腺基质细胞系 MTEC1^[2] 共育前, 表型为 CD3⁻ TCR⁻; 与基质细胞共育后, 71.49% 表型分化为 CD3⁺ TCR⁺, 6.36% 转变为 CD3⁺ TCR⁻. 抗胸腺基质细胞单克隆抗体 (mAb) RS21-C6 能显著抑制基质细胞诱导的 C320 细胞株表达 TCR, CD3 分子^[3]. 通过建立 C320, MTEC1 细胞 cDNA 文库, 并利用 RS21-C6 mAb 筛选出的小鼠 RS21-C6 mAb 识别分子的编码基因为 RS21-C6 基因¹⁾ (GenBank 登录号: AF110764), 其编码蛋白与诱导 TCR/CD3 表达相关.

本研究在上述研究基础上, 通过生物信息学和分子克隆技术克隆了包括全部编码区在内的与小鼠 RS21-C6 基因同源的人类基因, 并在原核体系中成功地表达了其融合蛋白, 为进一步阐明此分子的功能打下基础.

1 材料和方法

1.1 材料

人急性淋巴性白血病细胞系 Jurkat 购自美国 ATCC. Advantage RT-for-PCR Kit, Smart RACE

2001-01-10 收稿, 2001-03-20 收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划资助项目 (G1999053904)

** 联系人, E-mail: wfchen@public.bta.net.cn

1) 王 宏. 小鼠胸腺细胞发育相关分子特性研究及编码基因克隆. 北京医科大学博士学位论文, 1999

cDNA Amplification kit 购自 Clontech 公司, pGEM-T Easy 克隆载体购自 Promega 公司, pGEX-4T-2 表达载体由美国 NIH 的田兰博士惠赠。

1.2 EST 拼接及 RT-PCR

在 NCBI GenBank 数据库中, 利用 Blast N 检索 dbEST 数据库. 将 EST 数据库检索到的与小鼠 RS21-C6 基因具有高度同源性的 EST 序列拼接成人同源基因序列. 根据拼接的人同源基因相对保守序列区合成引物, 上游引物序列为: 5' AGCGGTGGCGGCATGTCTGTG 3'; 下游引物为: 5' TGGGAGAACAACACCAGGAGGCTACCTTC 3'. 利用 Trizol total RNA Isolation system 试剂盒, 提取人新生儿脐带血单个核细胞、肝脏、淋巴结及 Jurkat 细胞系总 RNA, 再经 Advantage RT-for-PCR Kit 逆转录合成 cDNA, 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为 94℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 进行 30 个循环. 扩增产物克隆到 pGEM-T Easy 载体中, 通过 *EcoR* I 酶切, 得到阳性克隆片断, 利用 ABI 公司的 377 全自动测序仪, 进行 DNA 序列分析. 所测得的全长序列通过 pSORTII 服务器 (<http://psort.nibb.ac.jp>) 进行编码蛋白的定位预测, 通过 Gene Runner 软件, Exspasy 服务器 (<http://www.exspasy.ch>) 上蛋白分析软件对编码蛋白的性质进行初步预测.

1.3 5'RACE 和 3'RACE

按照 Clontech 公司说明书, 合成高质量的 cDNA 模板. 5'-RACE 特异性引物为 5' GCTGGGTAGCGTCGCCGGTTGATGTC 3', 3'-RACE 特异性引物为 5' CTCGGAATCTCCTCCTCGGCCITGGTTGG 3'. PCR 条件为: 94℃ 5 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 5 s, 70℃ 10 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 5 s, 68℃ 10 s, 72℃ 3 min, 25 个循环. 扩增所得的片段同上进行克隆测序.

1.4 pGEX-4T-2/HRS21-C6 融合蛋白表达质粒的构建及诱导表达

为构建表达载体的需要, 设计了 PCR 引物 5' CGGGATCCATGTCTGTGGCCG 3' 和 5' CGGAATTCCTAGGTTGAGGCTCTGGC 3'. 在上游引物 5' 端引入了 *Bam*H I 酶切位点, 在下游引物 5' 端引入 *Eco*R I 酶切位点, 以人新生儿脐带血单个核细胞 cDNA 为模板, 利用此对引物进行扩增, 将扩增产物以 *Bam*H I, *Eco*R I 双酶切后, 与以同样双酶切并经胶回收的 pGEX-4T-2 载体连接并转化细菌^[4]. 融合蛋白的表达按文献[5]的方法进行, 表达蛋白的分析采用 SDS-PAGE.

2 结果和讨论

2.1 人 RS21-C6 基因全长序列的获得

根据我室克隆并公布的小鼠 RS21-C6 基因的 cDNA 序列, 在国际互联网 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 上利用 Blast N 检索 nr 数据库, 未发现人的同源序列; 再检索 dbEST 数据库, 发现有 71 个长度不一的与小鼠 RS21-C6 基因高度同源的人 EST 序列, 经 EST 拼接, 得到 1 个一致性的片段. 设计此序列的特异性 PCR 引物, 以人新生儿脐带血单个核细胞、肝脏、及 Jurkat 细胞系 cDNA 为模板进行扩增, 扩增产物约为 700 bp (图 1), 将该片段进行 DNA 序列分析, 测序结果与预期的序列完全一致; 又经 5'-RACE 扩增出 1 个约 500 bp 片段 (图 2(a)), 经 3'-RACE 扩增出 1 个约 1 kb 片段 (图 2(b)), 测序后将序列拼接获得人 RS21-C6 基因的全长核苷酸序列 (图 3), 通过 GenBank Bankit 登录并被接受, 登录号为 AF210430.

通过 Gene Runner, Exspasy, pSORTII 等工具对人 RS21-C6 基因进行分析, 其全长 1118 bp, 包含一 513 bp 开放阅读框, 编码 170 个氨基酸. 编码蛋白 pI: 4.85, 理论分子量为 18.5 ku. 在编

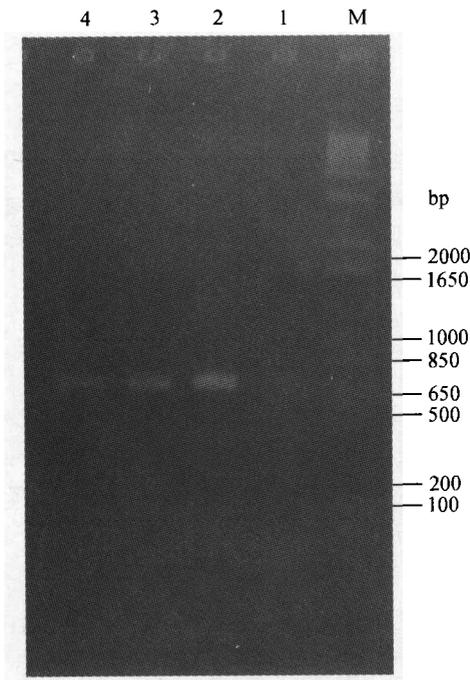


图 1 RT-PCR 扩增结果

M 示 1 kb plus DNA 标志;1 示 Jurkat 细胞系;2 示人脐带血单个核细胞;3 示肝脏;4 示淋巴结

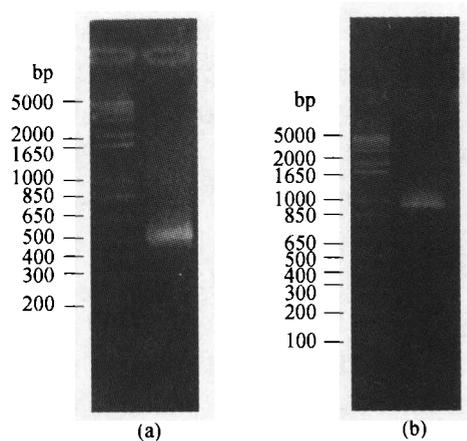


图 2 RACE 结果

(a) 5'RACE; (b) 3'RACE

码区上游即第 19 位有一框内的终止密码子 TGA, 在序列的第 1067 位有 polyA 加尾信号. 编码蛋白无信号肽, 无跨膜区, 无糖基化位点. Motif 分析其具有 2 个豆蔻酸化位点, 3 个 PKC 磷酸化位点和 5 个 CK2 磷酸化位点, 1 个 cAMP 磷酸化位点, 通过 pSORTII 分析其最大可能为胞浆蛋白. 该基因在核酸水平与小鼠基因同源率为 83% (图 4), 在演绎蛋白水平一致性为 75%, 相似性为 83%.

2.2 人 RS21-C6 基因编码蛋白的原核表达

经双酶切鉴定的阳性克隆用 pGEX-4T-2 载体通用引物测序证实完全无误后, 诱导表达. SDS-PAGE 电泳显示 (图 5) pGEX-4T-2 空载体经 IPTG 诱导后表达 29 ku 的 GST, pGEX-4T-2/HRS21-C6 经 IPTG 诱导后表达分子量与理论值相符 (约 47.5 ku) 的融合蛋白, 融合蛋白随诱导时间延长表达量增加, 光密度扫描显示融合蛋白在 6 h 表达量占总菌体蛋白的 32.5%.

2.3 讨论

TCR 基因的重排和分子表达后与 CD3 分子以复合体的形式表达于细胞表面是早期 TN 细胞分化发育的关键步骤. 目前, 介导早期 T 细胞 TCR 及 CD3 基因活化及分子表达的机理还不清楚. IL-7 曾被认为有这种作用, 但又有人提出其作用仅在于维持 TN (CD4⁻ CD8⁻ CD3⁻) 胸腺细胞的存活和增殖^[6]. TN 阶段细胞分化表达 TCR/CD3 的过程只限于在胸腺内完成, 即可能是在与胸腺微环境基质细胞相互作用下诱导完成的. 经研究两类细胞相互作用的生物学效应, 进而分析诱导 TN 细胞分化的相关分子, 是研究 T 细胞发育的重要课题^[7,8].

```

1 -GGGCTCGTGGGTTTTCCGTGAAGTCGCGGTGCAGCGGTGGCGGCATGTCTGTGCCGGTGGGAGATTG - 70
- M S V A G G E I
71 -GTGGGGACACGGGGGAGGACACTGCTGCTCCGGCCGTTGAGCTTCAGCCCGAGCCACGCTCGA - 140
-R G D T G G E D T A A P G R F S F S P E P T L E
141 -GGAGATCCGCCGCTCCATGCTGAGTTTGCCTGCGAAGCAGACTGGGAACAGTTCCATCAGCCTCGGAAT - 210
-D I R R L H A E F A A E R D W E Q F H Q P R N
211 -CTCCTCCTGGCCTTGTTGGGAASTGGGGAGCTGBCAGAAGCTTTTCAGTGGAAAACCGATGGGGAAC - 280
- L L L A L V G E V G E L A E L F Q W K T D G E P
281 -CTGGCCCCAAGGCTGGTCCCCAGGGAAACGGGCAGCCCTTCAAGAGGAGCTTAGTGACGCTCCTCATCTA - 350
- G P Q G W S P R E R A A L Q E E L S D V L I Y
351 -CCTGGTGGCATTAGCAGCCCGCTGCGGTGTGGATCTGCCGCTAGCAGTGCTCCAAAAATGGACATCAAC - 420
- L V A L A A R C R V D L P L A V L S K M D I N
421 -CGGCGACCTACCCAGCCCATCTGCGCCGCGAGCTTCCCGCAAGTATACAGAATTGCCCATGGGGCCA - 490
- R R R Y P A H L A R S S S R K Y T E L P H G A
491 -TCTGTGAAGACCAGGCTGTGGGCGCTGCGGACATTCCTGTGACTCCACAGGCGAGACCTCAACCTAGAA - 560
-I S E D Q A V G P A D I P C D S T G Q T S T *
561 -AGATGGCCACAGGACTTGCAACTCAGGGTGGTGTCTGAAGAGCAGAGBTGGCCTGGCCCTGGAGCCTTT - 630
631 -TTCTAGTCTTTTCAGAAATAGATCATGGGCGCTGAGGCGCTCCACTTCTTGAGGTCTGAGGCCACGACGCTC - 700
701 -TAGAAGGTAGCCTCCTGGTGTGTTTCTCCAGTAAAAATGGTTTTGGGCGATAACTTCTAGATTATTCCT - 770
771 -GGATGGCCAGGGAGGCTCTGCTGTCTCAGCAGGTGATGACGGGGTACCAGGGGTGCCTGTGAGACCATT - 840
841 -CTCGTGTTCCTGTTGTACSTTTTGCCCTGCAGGGCAGAGAGATCTGGTTTCTAGCAAAATCCCAGTAGG - 910
911 -ATGTGATGTAAGTTCCTTCCCGCTCTTAGAGATTGAAGGCTGTAAGAGTCCAGATGGTGGAGCCAGGCTG - 980
981 -TCTGGGTTCAAATGCCATCTTTGACACTTGCAAGCTAAATGACATTACTCAAATTAATCGTTCTGCACCT 1050
1051 -CAGCTTCTGTCTATCAAAAAAAAGAATAGTACCTGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA - 1118
    
```

图 3 人 RS21-C6 基因全长核苷酸序列及其编码氨基酸序列
* 代表终止密码子;下划线部分为加尾信号

小鼠
人

```

1 M S T A G D G E R G T V G Q E D S A A A R P F R F S P E P T
1 M S V A G G E I R G D T G G E D T A A P G R F S F S P E P T

31 L E D I R R L H A E F A A E R D W E Q F H Q P R N L L L A L
31 L E D I R R L H A E F A A E R D W E Q F H Q P R N L L L A L

61 V G E V G E L A E L F Q W K S D T E P G P Q A W P P K E R A
61 V G E V G E L A E L F Q W K T D G E P G P Q G W S P R E R A

91 A L Q E E L S D V L I Y L V A L A A R C H V D L P Q A V I S
91 A L Q E E L S D V L I Y L V A L A A R C R V D L P L A V L S

121 K M D T N R Q R Y P V H L S R G S A C K Y T D L P R G T I S

151 E N Q A V G A G D P A S E L R D Q A S T
151 E D Q A V G P A D I P C D S T G Q T S T
    
```

图 4 小鼠 RS21-C6 基因与人 RS21-C6 基因编码蛋白氨基酸序列比较
阴影表示氨基酸序列完全一致

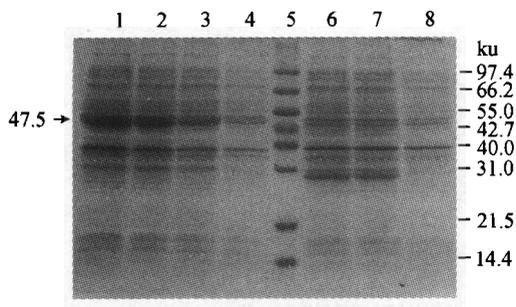


图 5 人 RS21-C6 基因编码蛋白的原核表达

1~3 示 pGEX-4T-2/HRS21-C6 诱导后 6, 4, 2 h 表达的蛋白; 4 示 pGEX-4T-2/HRS21-C6 诱导前; 5 示分子量标志; 6, 7 示 pGEX-4T-2 经 IPGT 诱导后 4, 2 h 表达的 GST; 8 示 pGEX-4T-2 诱导前

我们通过 RS21-C6mAb 筛选文库得到小鼠 RS21-C6mAb 识别分子编码基因, 经 GenBank 搜寻, 未发现其任何同源基因, 证实其可能为参与诱导早期 T 细胞系表达 TCR/CD3 复合物的新分子, 与 GenBank 人 EST 库比较, 意外地发现了大量同源 EST. EST 拼接为近年来因生物信息学不断发展而产生的新基因克隆的一种快速方法. 但其拼接结果需要实验证实. 本研究即利用 EST 拼接和分子克隆技术快速获得了小鼠 RS21-C6mAb 识别分子人同源基因, 同时我们还通过了此方法得到了大鼠同源基因(另文发表), 这进一步提示此基因在生物长期进化中的保守性及其生物功能的重要性. 因小鼠 RS21-C6 基因编码蛋白参与诱导早

期 T 细胞株的 TCR/CD3 分子表达, 人 RS21-C6 基因编码蛋白也有可能发挥同样的作用, 通过原核表达体系成功表达的编码蛋白为进一步研究其功能提供了工具.

参 考 文 献

- 1 陈慰峰, 等. 一株存在有逆转录病毒的肿瘤性小鼠早期 T 细胞株的建立及鉴定. 实验生物学报, 1987, 20: 213
- 2 舒石庄, 等. 八株小鼠胸腺基质细胞系的建立及鉴定. 北京医科大学学报, 1993, 25: 237
- 3 余青, 等. 小鼠胸腺基质细胞诱导早期 T 细胞株分化的研究. 科学通报, 1998, 43(13): 1422
- 4 Sambrook J, et al. Molecular Cloning. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 5
- 5 Smith D B, et al. Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. Gene, 1988, 67: 31
- 6 Akashi K, et al. Role of interleukin-7 in T-cell development from hepatopoietic stem cells. Immunol Review, 1998, 165: 13
- 7 Fehling H J, et al. Crucial role of the pre-T cell receptor α gene in development of $\alpha\beta$ but not $\gamma\delta$ T cells. Nature, 1995, 375: 795
- 8 Takeuchi T, et al. Characterization of a 50 ku surface membrane protein on thymic stromal cells as an important factor for early T cell development. Int Immunol, 1995, 7: 583