

人基质细胞中新基因的获得及目的基因的克隆*

黄玉珊, 赵贵军, 吴文言, 徐安龙
(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 取连续培养的骨髓基质细胞并提取其 mRNA, 合成 cDNA 后, 收集 >400bp 的片段, 连接到真核表达载体 pcDNA3.0 上, 构建人胎儿骨髓基质细胞真核 cDNA 质粒文库, 并以 PCR 的方法从文库中扩增出编码人 IL-6、SCF 的基因序列, 随机对文库克隆进行测序, 得到了 3 个新基因 EST, 其中 2 个在 GenBank 的登录号分别为 AF244998 及 AF244999.

关键词: 骨髓基质细胞; cDNA 文库; EST; 测序

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 05-0088-03

造血基质细胞在造血细胞的生长、分化过程中的支持、调控作用是近年来血液学研究的一个热点问题. 骨髓基质细胞是体内造血微环境的重要组成部分. 研究表明基质细胞对造血细胞的增殖及分化有支持、诱导和调控的作用, 除了通过细胞与细胞间的影响外, 它们产生的多种造血因子也发挥了明显的作用, 原始造血细胞的增殖与分化严格依赖于支持层细胞的发育^[1~4], 1977 年 Dexter 等建立的骨髓基质细胞体外长期培养体系 (LTBMC) 为人们提供了研究造血基质细胞功能的体外模型^[1], 近期的研究发现脐血浆对正常人的骨髓 CFU-GM 的生长有极明显的刺激作用, 比正常人血清和 CSF 的刺激作用有比较明显差异, 因此在脐血浆应该有某种新的造血活性物质刺激造血干细胞的增生, 而且可能来源于胚胎骨髓的基质细胞. 本研究建立了长期培养的正常人胎儿骨髓中基质细胞的 cDNA 文库, 对其中的基因克隆进行了序列分析, 得到了 3 个新基因 EST, 为分离与造血有关的新基因提供了研究基础.

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 质粒 哺乳动物高效表达载体质粒 pcDNA3.0, 购自 Invitrogen 公司.

1.1.2 细胞 骨髓基质细胞由本室分离、培养、并鉴定 (结果待发表).

1.1.3 酶及主要试剂 *Not* I、*Eco* R I 购自 NEB

公司, DNA 胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司, mRNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒及 T_4 DNA 连接酶购自 Amersham Pharmacia 公司, RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自 Hyclone 公司, 其他试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 方 法

1.2.1 载体的构建 质粒 DNA 的提取、酶切参考《分子克隆》(第 2 版), 酶切片段的回收按 Qiagen 公司的 DNA 胶回收试剂盒的说明书操作.

1.2.2 感受态细胞的制备 参考 Inoue 等^[5]1990 的方法.

1.2.3 骨髓基质细胞 mRNA 的提取 按 Amersham Pharmacia 公司的 Quickprep Micro mRNA Purification Kit 的操作说明进行.

1.2.4 骨髓基质细胞 cDNA 文库的构建 按 Amersham Pharmacia 公司的 TimeSaverTM cDNA Synthesis Kit 的操作说明进行. 将加工后的 cDNA 定向连接到经 *Not* I 和 *Eco* R I 酶切的 pcDNA3.0 上, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 将转化产物分成两部分, 一部分经过扩增后, 保存于 $\varphi = 25\%$ 甘油中, 得到 cDNA 表达文库总库, 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. 另外一部分等分为 100 个亚文库, 经分别扩增后, $\varphi = 25\%$ 甘油保存, 用于下一步的序列测定和功能筛选.

1.2.5 序列测定及分析 随机挑选亚文库克隆, PEG 纯化法提取质粒 DNA. 以 T7 和 SP6 为测序引物, 采用 ABI377DNA Sequencer DNA 自动序列仪 (由大连宝生物工程有限公司提供), 正反向

* 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (970612)

收稿日期: 2000-11-28; 作者简介: 黄玉珊 (1975-), 女, 硕士研究生; 通讯联系人: 徐安龙.

进行序列测定. 序列分析使用 BLAST2.0, 见 www.ncbi.nlm.nih.gov.

1.2.6 目的基因的克隆 取 2 μ L 文库 DNA 为模板, 上下游引物分别为:

SCF: 5' - CGGGATCCATGAAGAAGACACAAACTTGA - 3'

5' - GCTCTAGAAATTTACACTTCTTGAAACTCTCT - 3'

IL-6: 5' - AACTCCTTCTCCACAAGC - 3'

5' - TGGACTGCAGGAAGTCTCT - 3'

扩增条件 94 $^{\circ}$ C 1 min, 62 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 15 min 进行扩增.

2 结 果

2.1 骨髓基质细胞的培养

这是一个来源于正常人胎儿骨髓的原代细胞系. 细胞以 PRMI1640 加 $\varphi = 20\%$ 的胎牛血清培养, 可加入促生长剂 10^{-6} 的 Hydrocortison. 大约平均每 10 ~ 14 d 传代一次, 培养至大约 1×10^7 个新鲜细胞^[6].

2.2 骨髓基质细胞 mRNA 的提取及 cDNA 文库的建立

新鲜细胞以胰酶消化成单个细胞后直接用 Pharmacia 公司的 mRNA 试剂盒提取细胞 mRNA, 按 Pharmacia 公司的 TimeSaverTM cDNA Synthesis Kit 的操作说明进行 cDNA 文库的建立, 估计得到的文库的大小约为 1.5×10^5 . 因为连接反应中加入了 PEG 溶液, 因此不能用电转化的方法转化宿主菌, 而我们采用的 Mn^{2+} 法制备的感受态细胞具有高效的转化效率, 比单纯的 $CaCl_2$ 法的转化率高约一倍. 文库的克隆子 PCR 结果见图 1, 可见文库的重组率达 95%, 插入片段从 500 bp 到 3 ~ 4 kb 不等, 平均长度 1.4 kb, 文库克隆片段大的小的都有, 质量比较好.

2.3 文库测序及序列的分析

随机挑选文库中的单菌落克隆, 纯化后送去测序, 约测了 10 余个序列, 将序列进行 Blast 分析, 发现有 3 个与基因库中序列有较大不同的序列, 其中两个将克隆子序列测完后登录在 GenBank, 登录号分别为 AF244998 及 AF244999.

2.4 目的基因的克隆

某些目的基因如 IL-6 及 SCF 等也在文库中以 PCR 的方法得到了扩增, 见图 2. SCF 是造血过程中的一个重要调控造血因子, 我们得到了全长的 cDNA 序列, 测序结果与已有的序列一致, 可用于表达, 进行重组蛋白的研究.

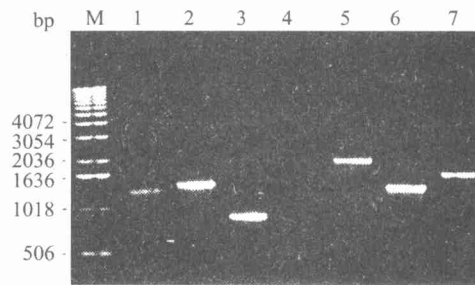


图 1 骨髓基质细胞 cDNA 文库克隆子 PCR 分析

Fig.1 PCR analysis of various clones of stromal cell cDNA library

1 1 kb DNA 相对分子质量标记;
2~7 文库中的不同克隆子 PCR 分析

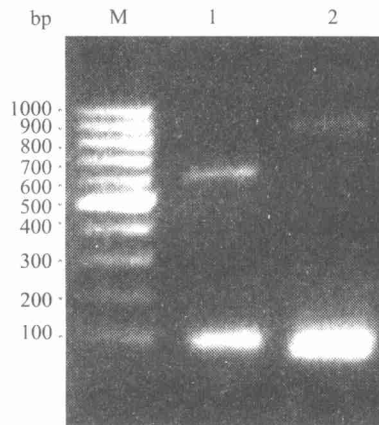


图 2 文库特异基因的 PCR 分析

Fig.2 The PCR analysis of SCF gene from library

M 100 bp DNA 相对分子质量标记
1 IL-6; 2 SCF

3 讨 论

造血组织包含造血实质细胞和造血间质成分. 造血间质中的造血基质细胞对造血细胞的增殖及分化有支持、诱导和调控的作用. 我们的研究发现脐血浆对正常人的骨髓 CFU-GM 的生长有极明显的刺激作用, 与正常人血清和 CSF 比较有明显差异, 因此在脐血浆应该有某种新的造血活性物质促进造血干细胞的增生, 而且可能来源于胚胎骨髓的基质细胞. 因此本研究建立了来源于正常人胎骨髓的基质细胞. 并利用高效真核表达载体建立了其 cDNA 文库, 由于新的细胞因子的含量极微, 可以采用功能筛选的方法筛选新的细胞因子.

现今人类基因组的测序已告一段落, 大规模的 cDNA 测序 (即 EST 计划, 指从 cDNA 文库中

随机挑选克隆子进行部分序列测定, 并获得大量正在表达的遗传信息, 不仅可以检测到许多已知基因, 更可以发现许多新的未知基因) 正日渐受到人们的关注. 而这项技术的关键是高质量的 cDNA 文库的构建. 本实验利用高效的质粒转化方法, 建立了人胎儿骨髓基质细胞的表达 cDNA 文库. 文库的容量基本达到要求. 随机挑选 cDNA 文库的克隆子进行 PCR 鉴定及酶切鉴定, 文库的重组率达 95%, 插入片段从 500 bp 到 3 ~ 4 kb 不等, 平均长度为 1.4 kb, 说明所建文库的质量高. 同时本研究对文库中的克隆进行了随机的测序, 共测了 10 个克隆, 发现了 3 个新的基因片段, 与 GenBank 中其他序列相比, 相似性很低, 其中 2 个在 GenBank 中的登录号为 AF244998 及 AF244999, 表明从 cDNA 文库中得到新基因的几率高. 但序列分析表明, 这 2 个基因并不完整, 5' 端应该还有一段序列, 以后的研究应着重于基因全长的获取, 包括 cDNA 末端快速扩增法 - 5'RACE、文库的杂交筛选及计算机杂交等方法得到完整的基因以及进行基因功能的研究, 包

括 gene knock-out 等.

参考文献:

- [1] 裴雪涛. 基质参与造血调控的分子基础[J]. 实验血液学杂志, 1994, 2(3): 213 - 217.
- [2] 宋增璇. 造血微环境中的调节网络[J]. 中国实验血液学杂志, 1993, 1(1): 1 - 4.
- [3] KREBSBACH P H, KUZNETSOV S A, BIANCO P, et al. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1999, 10(2): 165 - 181.
- [4] GREENGER J S. Expression of hematopoietic growth factor receptors on early hematopoietic precursors: detection and regulation[J]. Curr Opin Hematol, 2000, 7(3): 161 - 167.
- [5] INOUE H, NOJIMA H, OKAYAMA H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmid[J]. Gene, 1990, 96: 23 - 28.
- [6] MCNIECE I K, BERTONCELLO I, STEWART F M, et al. Stromal cell cultures were established and maintained according to a modified method[J]. J Cell Cloning, 1990, 8: 146 - 149.

Obtaining of Three New ESTs from Human Fetal Bone Marrow Stromal Cells cDNA Expression Library and Screening of Target Genes

HUANG Yu-shan, ZHAO Gui-jun, WU Wen-yan, XU An-long

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: mRNA were isolated from continuously cultured human fetal bone marrow stromal cells and transcribed into cDNA. Fragments (> 400 bp) were obtained through sizesep 400 columns, then ligated into eukaryon expression plasmid pcDNA3.0. Three new ESTs were found through sequencing 15 library clones, they are quite differently from the sequences in GenBank. Maybe those genes are stromal specific genes. Full length cDNA encoding human stem cell factor and IL-6 were amplified by PCR using this library as templates.

Keywords: bone marrow stromal cells; cDNA library; EST; sequencing