

正常人体淋巴细胞 cDNA 文库的构建

崔东红¹, 张伟², 姚华¹, 王国荃¹, 艾秀莲²,
王新远³, 吉军⁴, 刘开泰¹, 许素玲⁴

(1. 新疆医科大学公共卫生学院, 2. 新疆农科院微生物所基因工程实验室,
3. 新疆精神卫生中心, 4. 新疆肿瘤研究所, 乌鲁木齐市, 830054)

摘要:应用 G_{IBC}O BRL 建库试剂盒建立了正常人体淋巴细胞 cDNA 文库。取新鲜的正常人外周血, 分离出淋巴细胞, 进行体外培养, 提取总 RNA, 纯化 mRNA, 并将其反转录成 cDNA, 与 *SalI* 和 *NotI* 接头连接后插入 λ ZipLox 载体, 体外包装后转染到 Y1090 宿主菌中, 进行滴度测试及文库扩增。构建的正常人淋巴细胞 cDNA 文库含 2.6×10^6 重组子, 克隆效率为 5×10^{12} 重组子/g cDNA, 插入片段长度约为 1~5kb。扩增后的文库浓度为 3×10^7 重组子/ μ l, 将文库稀释到 10^{-6} 时所产生的噬菌斑密度最为适宜。试验结果表明, 该库符合标准, 所构建的正常人淋巴细胞 cDNA 文库为进一步筛选目的基因、制作基因芯片等提供了有效的工具。

关键词: cDNA 文库; 构建; 外周血; 淋巴细胞

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)02-0143-03

Construction of Normal Human Lymphocyte cDNA Library

CUI Dong-hong¹, ZHANG Wei², YAO Hua¹, WANG Guo-quan¹, AI Xiu-lian²,
WANG Xin-yuan³, JI Jun⁴, LIU Kai-tai¹, XU Su-lin⁴

(1. Public Health College of Xinjiang University; 2. Gene Engineering Laboratory of Microbe Institute of Xinjiang Agricultural Academy of Sciences; 3. Xinjiang Mental Health Centre, 4. Xinjiang Institute of Tumour, Urumqi, 830054, China)

Abstract: A lymphocyte cDNA library of normal human was constructed in order to obtain specific gene and prepare lymphocyte gene chips to detect the relative genes between psychiatric diseases and immunity. The lymphocyte was abstracted from fresh normal human blood and cultured *in vitro*. Total RNA of lymphocyte was extracted from the cultured cells and then mRNA was extracted further. Moreover, single-strand cDNA and double-strand cDNA were synthesized in turn. The double-strand cDNAs were ligated to *SalI* and *NotI* adaptor, which were later ligated to arms of λ ZipLox. Ligated-cDNAs were packed *in vitro*, and then infected *E. coli* Y1090. Titering the phage and amplifying the library. The lymphocyte cDNA library consisted of 2.6×10^6 recombinants with the length of 1~5kb and the cloning efficiency was 5×10^{12} recombinants/g cDNA. The amplified library was 3×10^7 recombinants/ μ l in concentration and the number of bacteriophage plaques was the most suitable in density after it was diluted to 10^{-6} in concentration. The constructed cDNA library of normal human lymphocyte would be helpful to further detecting target genes and preparing gene chips etc.

Key words: cDNA library; construction; circulation blood; lymphocyte

人类淋巴细胞基因表达谱与多种疾病相关, 是一个重要的研究领域。淋巴细胞是免疫活性细胞, 分泌

白细胞介素(IL)等多种重要的细胞因子, 其中表达的基因不仅与免疫功能有关, 而且与细胞信号转

收编日期: 2001-02-16; 修回日期: 2001-10-20

基金项目: 新疆维吾尔自治区青年医学科学基金资助课题(1999Y11)

作者简介: 崔东红(1967-), 女, 讲师, 硕士生, 专业方向: 精神病分子遗传学。电话: 0991-4828449, E-mail: cuidonghong18@263.net

导师: 姚华(1959-), 男, 教授, 专业方向: 环境与基因, 通讯地址: 新疆医科大学公共卫生学院环境卫生教研室。

导、生长发育、血细胞、神经细胞再生等有密切的关系。最近有报道表明,血细胞可以转变成脑细胞^[1],髓系来源的细胞不仅能表达神经元基因,而且能使转录作用因子 CREB 磷酸化^[2]。这一发现将不仅为淋巴细胞用于免疫相关疾病的研究,同时为研究神经、精神系统疾病提供了广阔的前景,尤其是用淋巴细胞基因表达谱研究神经、精神疾病,在取材上提供了更大的方便。

由于人体淋巴细胞与免疫、神经、精神等多系统、多功能有密切的关系。因此,正常人体外周血淋巴细胞 cDNA 文库具有广泛的应用价值。国内已构建多种组织器官的 cDNA 文库,但正常人体外周血淋巴细胞的 cDNA 文库尚未见报道。我们通过高效的 cDNA 合成技术构建了正常人外周血淋巴细胞的 cDNA 文库,并在库细胞的选择、构建方法和载体选择上都具有独特之处,尤其是选用的 λ Zap Lox 载体,不仅可以在质粒和噬菌体之间切换,而且可以插入较长的片段,将成为进一步研究的可靠基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 库细胞来源

库细胞来自一个 49 岁女献血者。经体格检查、心理测量(SCL-90、EPQ)和精神科一般检查均在正常范围内。无遗传病、精神病史。取新鲜血 200ml 分离白细胞,进而用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞。再用 1640 培养基 37℃ 下培养 10 天至旺盛生长期,获得 6.3×10^8 个细胞。

1.1.2 生化试剂

1640 培养基、总 RNA 提取 TRIzol 试剂盒、SUPERSCRIPT™ Lambda System 文库构建试剂盒购自 GIBCO BRL 公司, PolyATtract mRNA Isolation Systems Kit 试剂盒、 λ DNA 包装蛋白购自 Promega 公司, α -³²P dCTP 购自北京亚辉公司。

1.2 方法

1.2.1 淋巴细胞的培养及总 RNA、mRNA 抽提

培养淋巴细胞至旺盛生长期,离心去除培养液后加入 TRIzol 试剂,裂解细胞并抽提出总 RNA;用 PolyATtract mRNA Isolation Systems 试剂从总 RNA 中纯化出含 Poly A 的 mRNA。

1.2.2 cDNA 第一链的合成

以 3 μ g mRNA 为模板,严格按照试剂盒要求操

作。加 NotI 引物接头,反转录同位素 α -³²P dCTP 标记 cDNA 第一链,37℃,60min 合成 cDNA 第一链。用液闪仪计算闪烁次数,以跟踪 cDNA 合成的效果。

1.2.3 cDNA 第二链的合成

加 *E. coli* DNA 连接酶(10U/ μ l) 1 μ l, *E. coli* DNA 聚合酶(10U/ μ l)4 μ l, *E. coli* RNA 酶 H(2U/ μ l)1 μ l, 10mmol/L dNTP Mix 3 μ l, 16℃ 下, 2h, 合成第二链。用液闪仪测定第二链的丰度。

1.2.4 用连接酶连接

双链 cDNA 合成后,加 T4DNA 聚合酶削平双链 cDNA 末端,用 T4DNA 连接酶把 SalI 接头与钝的 cDNA 末端连接,16℃ 下反应 16h。再用 NotI 消化,然后用色谱柱层析法去除 <500bp 的小片段,然后取带有 NotI 和 SalI 末端的过柱的 cDNA 片段与 λ ZipLox 的 NotI、SalI 两臂在 4℃ 下连接过夜或室温下 3h。

1.2.5 体外包装

用 λ DNA 包装蛋白将连接好的 cDNA(20 μ g/5 μ l),室温下体外包装 3 小时。然后用 PDB 稀释至 500 μ l,从中分别取 1 μ l, 10 μ l, 100 μ l 感染对数生长期的 *E. coli* Y1090,铺平板,计算库的大小。并在上层培养基中加 0.01%(w/v)X-gal 和 2mmol/L IPTG,37℃ 培养过夜来估计重组率。为了计算插入片的平均大小,通过噬菌体感染 *E. coli* DH10B(ZIP),将噬菌体转化成质粒,挑取单斑,培养,小量提取质粒 DNA,酶切后,用琼脂糖凝胶电泳鉴定切出片段的大小。

1.2.6 文库的扩增

按文献^[3]的方法扩增文库。

2 结果

2.1 淋巴细胞体外培养及总 RNA、mRNA 的提取

培养后获得淋巴细胞 6.3×10^8 个细胞,从中提取的总 RNA 经紫外分光检测约为 1.182mg,吸光度 A_{260} /吸光度₂₈₀ > 1.8。提示所提的 RNA 没有降解,纯度较好。mRNA 浓度为 1.17 μ g/ μ l,总量为 10.02 μ g,其吸光度 A_{260} /吸光度₂₈₀ > 1.85。

2.2 cDNA 双链的合成及鉴定

测定第一链的放射性闪烁计数,通过公式计算得出单链 cDNA 的产量,其中第一链 cDNA 的产量为 0.862 μ g。将双末端粘性化的双链 dscDNA 经过柱层析(column chromatography),分离不同大小片段 cDNA 共 20 管,分别用液闪仪测定放射性同位素每分钟闪烁计数(c/min),计算得出双链 cDNA

的产量。留取大于 500bp 的试管,其双链 cDNA 产量的计算结果见表 1。

表 1 柱层析后去除 <500bp 片段后的
双链 cDNA 夜闪计数及产量

Table 1 Amount of ds cDNA without the size-fractionation (<500) counted by Cerenkov radiation

No.	Cerenkov 计数 (cpm)	cDNA 产量 (ng)	cDNA 浓度 (ng/ μ l)
8	5923	44.14	1.298
9	11650	86.81	2.553
1017	14661	109.25	2.953
11	13988	104.23	3.417
12	13231	98.59	2.858
13	10450	77.88	2.512

去除 1~7 和 14~20 管 <500bp 片段后,8~13 管合成的 cDNA 总量为 416.67ng,沉淀纯化后用于连接。

2.3 文库及其鉴定

经 *E. coli* Y1090 菌株行滴度测试,计数阳性噬斑数,按公式(阳性噬斑数 \times 稀释倍数 \times 包装反应总体积)计算得出文库的大小为 2.6×10^6 重组子,克隆效率为 5×10^{12} 重组子/g cDNA。经 *NotI/SalI* 酶切后电泳显示 cDNA 插入片段长为 1~5kb(图 1)。经 Y1090 菌株扩增后,滴定测定结果显示扩增后的文库浓度为 3×10^7 重组子/ μ l,将文库稀释到 10^{-6} 时所产生的噬菌斑密度最为适宜。

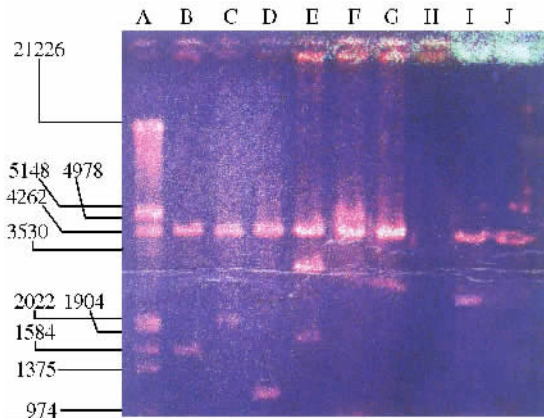


图 1 插入 λ ZipLox 载体 cDNA 大小分析

A. λ DNA/*HindIII*+*EcoRI* 标准分子(bp);
B~J. 分别经 *NotI* 和 *SalI* 酶切的 9 个重组子。

Fig. 1 Analysis of size-fractionated cDNA inserted the λ ZipLox vector

A. λ DNA / *HindIII*+*EcoRI* Marker(bp);

B~J, the 9 recombinants digested by *NotI* and *SalI* enzymes respectively.

3 讨 论

采用分子克隆技术,构建不同组织的 cDNA 文库,然后用适当的探针从中筛选分离目的基因,是获取新基因的重要手段。cDNA 分子不含内含子序列和调控序列,且与蛋白质的氨基酸序列具有对应性,因此,构建 cDNA 文库是筛选新基因、分离已知基因、揭示某些因素对基因表达的影响的基础。尤其是目前正蓬勃发展起来的基因芯片技术更离不开 cDNA 文库这一基础平台。将正常组织或细胞的 cDNA 文库中的大量的基因经 PCR 扩增测序后点在经特殊处理的载玻片上,制作成基因芯片,然后将两种组织或细胞的 RNA 或 mRNA 与芯片杂交,通过计算机扫描及相应软件分析,已经成为发现差异表达基因及新基因的有效途径。为了应用基因表达谱芯片寻找精神分裂症的相关基因,建立高质量的人体血液淋巴细胞 cDNA 文库是十分必要的。我们构建此文库主要是为了研究精神分裂症的相关基因,近年来,许多研究发现精神分裂症存在免疫功能异常^[4],可能存在细胞因子(IL-2、6、8 等)介导的免疫功能障碍^[5],有免疫激活现象,与其自身免疫假说相符^[6]。我们已经从该文库中挑取克隆,并转染 Y1090 菌株扩增后提取质粒 DNA,琼脂糖凝胶电泳结果表明,本文库符合标准,是有效的。

参 考 文 献 (References):

- [1] Eva Mezey, Karen J Chandross, Gyongyi Harta. Turning Blood into Brain; Cells Bearing Neuronal Antigens Generated *in vivo* from Bone Marrow[J]. *Science*, 2000, 290: 1779~1782.
- [2] Timothy R. Brazelton, Fabio M V Rossi, Gilmor I Keshet. From Marrow to Brain; Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice[J]. *Science*, 2000, 290: 1775~1779.
- [3] 金冬雁,黎孟枫译. 分子克隆实验指南 第二版[M]. 北京: 科学出版社, 1998, 399, 448.
- [4] 张向阳,周东丰. 精神分裂症的免疫学研究进展[J]. 国外医学精神病学分册, 1995, 22(2): 74.
- [5] 张向阳,周东丰,沈渔邨,等. 精神分裂症白细胞介素 2、6、8 与精神病理的关系 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 1999, 25(6): 346~348.
- [6] Noy S, Achiron A, Laor N. Schizophrenia and Autoimmunity—A Possible Etiological Mechanism? [J]. *Neuropsychobiology*, 1994, 30(4): 157.