



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102660552 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 19

(21) 申请号 201110458380. X

C12Q 1/68 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 12. 30

C12Q 1/02 (2006. 01)

(73) 专利权人 西北农林科技大学

审查员 王宽

地址 712100 陕西省西安市杨凌示范区邠城
路 3 号

(72) 发明人 王华岩 魏育蕾 张军林 程祥

(74) 专利代理机构 西安吉盛专利代理有限责任
公司 61108

代理人 潘宪曾

(51) Int. Cl.

C12N 15/24 (2006. 01)

C12N 15/10 (2006. 01)

C12N 15/79 (2006. 01)

C12N 15/85 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

C12N 15/66 (2006. 01)

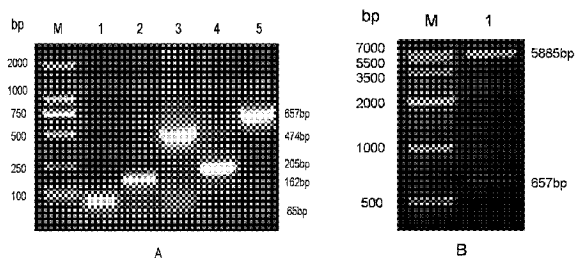
权利要求书1页 说明书11页 附图3页

(54) 发明名称

一种牛白细胞介素 32 γ 亚型的分子克隆 / 稳
转细胞系的建立及其方法

(57) 摘要

一种牛白细胞介素 32 γ 亚型的分子克隆 /
稳转细胞系的建立及方法, 将该基因在牛基因组
中定位, 并初步验证功能; 用人的 IL32 基因序列
在 NCBI 及牛基因组数据库中进行序列比对,
找出牛 IL-32 γ 的构型, 并在牛脾脏组织中进行
分子克隆, 该克隆出的基因序列已被 NCBI 收
录 (GenBank 序列号为 JQ327711, 未经公布);
然后构建一种包含该牛 IL-32 γ 的表达载体
pIRES-IL32 γ -GFP, 以及一种基于该载体的包含
牛 IL-32 γ 基因的小鼠巨噬细胞系 RAW264. 7, 验
证牛 IL-32 γ 具有诱导 IL-1 β 、IL-6、MIP2、TNF α
等细胞因子的功能。



1. 一种人工合成的牛 IL-32 γ 基因,其特征在于:所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:7 所示。
2. 一种含有权利要求 1 所述基因的真核表达载体 pIRES2-IL32 γ -GFP,其特征在于:利用 BamHI 和 SalI 酶切将所述基因克隆到表达载体 pIRES2-EGFP 上。
3. 一种含有权利要求 2 所述 pIRES2-IL32 γ -GFP 载体的小鼠巨噬细胞,其特征在于:利用脂质体转染的方法将 pIRES2-IL32 γ -GFP 载体转染到小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中。
4. 根据权利要求 3 所述的小鼠巨噬细胞,其特征在于:该小鼠巨噬细胞用于检测所述牛 IL-32 γ 基因是否可以调节 IL-1 β 、IL-6、MIP2 以及 TNF α 细胞因子的产生或表达。

一种牛白细胞介素 32 γ 亚型的分子克隆 / 稳转细胞系的建立及其方法

技术领域

[0001] 本发明属于基因克隆领域,涉及一种牛白细胞介素 32 γ 亚型的分子克隆 / 稳转细胞系的建立及其方法。

背景技术

[0002] 白细胞介素 32,原命名为细胞杀伤因子 4 型变体 (NK4)。是 Kim 等在用基因芯片研究 IL18 高诱导表达因子时,发现有一种高表达细胞因子样基因,编码炎症性细胞因子,因此命名为白细胞介素 32。

[0003] 目前研究发现,人类 IL-32 基因定位于人染色体 16p13.3 上,含有 8 个外显子,通过不同的可变剪切成 6 种构型,分别为 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 ζ ,其中 γ 型在其 N 端有一个疏水信号肽,可介导该蛋白跨膜表达。IL-32 的 6 种构型都具有生物活性,其中以 γ 构型 [Ji-Da Choi,Su-Young Bae,et al. Identification of the most active interleukin-32 isoform[J]. Immunology,2008,126 :535-542] 的生物活性最强,可能与其 N 端信号肽有一定关系。

[0004] 研究表明 IL-32 的主要作用是通过 NF- κ B [Kim SH, Han S Y, et al. Interleukin-32 : A Cytokine and Inducer of TNF α [J]. Immunity,2005,22 :131-142] 和 P38-MAPK 磷酸化途径诱导 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和趋化因子的产生。因为 IL-32 主要由 IFN- γ 诱导产生,且 IL-32mRNA 在免疫组织中的表达高于其它组织中的表达,这表明 IL-32 在固有性免疫中发挥作用 [李莉,宝福凯. 白介素 -32 及其与炎症性疾病的关系研究进展 [J]. 中国热带医学,2010,10(6)]。固有性免疫是依赖于非特异性免疫细胞的病原体识别受体的免疫,具有代表性的病原体识别受体是 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 和核苷酸结合的寡聚化结构域蛋白 (Nucleotide binding oligomerization domain protein, NOD),通过对病原体相关分子模式 (Pathogen-associated molecule patterns, PAMP, 病原体表面的保守分子) 的识别而发挥作用。IL-32 协同 NOD1 和 NOD2 配体,通过脱天蛋白酶 -1 依赖的信号通路激活 IL-1 β 和 IL-6。同时,由于 IL-32 诱导多种细胞因子的产生且与多种炎症性疾病密切相关,揭示了 IL-32 在适应性免疫应答中也发挥作用,是一种前炎症反应细胞因子,它与疾病的严重性程度有关,尤其是自身免疫性炎症性疾病。

[0005] 自从 2005 年白细胞介素 32 基因被命名以来,对于其研究主要集中于人上。直至 2010 年 10 月,才有人克隆出了牛白介素 32 的 beta 构型 [Jun Jaekal, Hyunjung Jhun, et al. Cloning and characterization of bovine interleukin-32 beta isoform[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology,2010,137 :166-171] 并且有研究猜测,小鼠中无此基因的存在。本发明通过分子克隆研究,克隆出牛白细胞介素 32 基因 gamma 亚型,并对其功能进行验证。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种牛白细胞介素 32 γ 亚型的分子克隆 / 稳转细胞系的建立及其方法,牛 IL-32 γ 基因 (GenBank 序列号为 JQ327711, 未经公布) 的表达可以提高动物机体内其他相关免疫因子的表达,并进一步提高动物免疫系统的免疫作用,且有文章报道该基因对抵抗结核杆菌有一定的效用,因此,该基因的克隆及其基本功能验证,将为解决牛结核杆菌病的转基因克隆牛提供可靠的基因选择。

[0007] 本发明的技术解决方案是:

[0008] 一种克隆牛 IL-32 γ 基因的方法,其特殊之处在于:通过将人 IL-32 与牛的基因比对,分子克隆了牛 IL-32 γ 基因。

[0009] 一种整合牛 IL-32 γ 基因的真核表达载体,其特殊之处在于:包含目的基因牛 IL-32 γ 及通过 IRES 序列与其相连的 GFP 序列;包括抗性筛选基因 neo 基因。

[0010] 上述的整合牛 IL-32 γ 真核表达载体,其特征在于:该载体通过用 BamHI 和 SalI 酶切将牛 IL-32 γ 基因克隆到表达载体 pIRES2-EGFP 载体上。

[0011] 上述载体的小鼠巨噬细胞,其特征在于:其宿主细胞是小鼠巨噬细胞系 RAW264.7,通过脂质体转染的方法将目的基因牛 IL-32 γ 整合到小鼠巨噬细胞的基因组中。

[0012] 上述小鼠巨噬细胞用于检测牛 IL-32 γ 的功能,判断其是否具有调节 IL-1 β 、IL-6、MIP2 以及 TNF α 细胞因子的产生或表达。

[0013] 一种整合牛 IL-32 γ 基因的真核表达载体的构建方法,其特殊之处在于,该方法包括:

[0014] 1) 牛 IL-32 γ 基因克隆

[0015] 1.1) 根据牛 IL-32 γ 与牛 IL-32 β 序列的开放阅读框比较可知,牛 IL-32 γ 比牛 IL-32 β 多了一段序列,据此可将牛 IL-32 γ 基因根据特殊设计引物分为 3 段克隆:

[0016] i、用牛 IL-32 β cDNA 片段扩增 r1;

[0017] ii、用牛基因组扩增牛 IL-32 γ 特有片段 r2;

[0018] iii、用牛 IL-32 β cDNA 片段扩增 r3;然后将 3 片段用 PCR 方法拼接,产生一段完整序列的牛 IL-32 γ 基因;

[0019] 其中首尾两端设计分别含有 BamHI 和 SalI 酶切位点,其引物如下:

[0020] 正向引物 1F:5' -cgGGATCC ATGTGCTTCGCTAAGAGAGACC-3';

[0021] 反向引物 1R:5' -GAGCTTCTTAC CGATAACACCCTGAAAGAAGC-3';

[0022] 正向引物 2F:5' -GGGTGTTATCG GTAAGAAGCTCATTTCCACGTATAG-3';

[0023] 反向引物 2R:5' -CAAGGTTGTG CTGTGAACAGAGATGGACTTGAG-3';

[0024] 正向引物 3F:5' -CTCTGTTACAG CACAACCTTGTAGATGAATTTTTTCG-3';

[0025] 反向引物 3R:5' -tataGTCGAC TTAGACCTGGATGAGGCTTCTG-3';

[0026] 1.2) 取成体秦川黄牛脾脏中约 10mg 组织,采用 Trizol 方法提取脾脏组织中的总 RNA,利用 cDNA 试剂盒反转录成第一链 cDNA;

[0027] 1.3) 以 cDNA 为模板,用引物对 1F 和 3R,用 Taq system PCR 扩增牛 IL-32 基因,得到牛 IL-32 β ;反应条件是 94 $^{\circ}$ C 3min;94 $^{\circ}$ C 30sec;58 $^{\circ}$ C 30sec;72 $^{\circ}$ C 45sec;30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min;4 $^{\circ}$ C 保存;

[0028] 1.4) 取成体秦川黄牛脾脏中约 10mg 组织,用 BIOTAC 提取基因组试剂盒提取牛基

基因组；

[0029] 1.5) PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后，与pGEM-T Easy载体连接并转化到DH5 α 细菌，经蓝白斑筛选挑选重组子，用EcoRI酶切鉴定为阳性的质粒进行测序，测序正确的阳性克隆命名为pGEM-T-IL32并用生物学软件进行序列分析；

[0030] 1.6) 用PFU system PCR扩增r1、r2、r3片段，其中r1、r3以cDNA为模板，分别用引物对1F和1R、3F和3R，r2以牛基因组为模板，用引物2F和2R，反应条件均为94℃ 2min；94℃ 30sec；58℃ 30sec；72℃ 80sec；30个循环；72℃延伸10min；4℃保存；得到片段r1、r2、r3；然后以上述r1、r2为模板，用引物1F和2R，上述反应条件进行扩增，得到r1-2片段；再以上述r1-2、r3为模板，用引物1F和3R，上述反应条件进行扩增，得到r1-2-3片段；即为牛IL-32 γ 基因；

[0031] 1.7) PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后，用BamHI和SalI酶切，与pET-41a连接并转化到DH5 α 细菌，用BamHI和SalI酶切鉴定为阳性的质粒进行测序，测序正确的阳性克隆命名为pET-41a-IL32 γ 并用生物学软件进行序列分析；

[0032] 2) 牛IL-32 γ 真核表达载体构建

[0033] 2.1) 以pIRES2-EGFP载体为骨架，将pET-41a-IL32 γ 、pIRES2-EGFP分别用BamHI、BglIII酶切并用Klenow酶补平，再分别用SalI酶切，回收IL32 γ 基因片段和pIRES2-EGFP载体，用T4DNA连接酶连接过夜，将连接产物转化入DH5 α 细菌，用NheI和BamHI酶切筛选阳性克隆；得表达载体pIRES-IL32 γ -GFP；

[0034] 2.2) pIRES-IL32 γ -GFP载体的验证

[0035] 小鼠巨噬细胞RAW264.7用含有体积百分比为10% FBS的高糖DMEM培养液，在37℃的CO₂孵箱中常规培养；将巨噬细胞接种于24孔板，24h后更换无血清的DMEM培养液，同时准备用脂质体-2000转染重组质粒pIRES-IL32 γ -GFP，转染6h后弃去培养液，PBS冲洗3遍，48h后用荧光显微镜观察GFP的表达。

[0036] 一种利用上述pIRES-IL32 γ -GFP载体稳定转染小鼠巨噬细胞RAW264.7细胞的方法，其特殊之处在于，该方法包括：

[0037] 1) 小鼠巨噬细胞RAW264.7细胞的培养

[0038] 1.1) 在37℃解冻一管小鼠巨噬细胞RAW264.7成系细胞，离心；

[0039] 1.2) 弃去培养液，加入1ml培养液重悬细胞，所述培养液为含体积百分比10% FBS的高糖DMEM；转移至含有4ml培养液60mm培养皿，在CO₂孵箱中37℃培养；

[0040] 1.3) 待小鼠巨噬细胞RAW264.7细胞密度达到70%-80%时，弃去培养液，加入2ml PBS洗涤细胞，所述PBS无Ca²⁺/Mg²⁺，弃去PBS加入质量百分比0.25%的胰酶消化细胞，待大多数细胞变圆、飘起时，用含有体积百分比10% FBS的DMEM培养液终止消化，使用移液器吹打混匀转移到离心管中，1000转离心5分钟后，弃去培养液并悬浮，按照1：3的比例传代，置于CO₂孵箱中37℃培养；

[0041] 1.4) 以此小鼠RAW264.7巨噬细胞作为转染并G418药物筛选的宿主细胞；

[0042] 2) pIRES-IL32 γ -GFP载体稳定转染小鼠巨噬细胞

[0043] 2.1) 转染前1天，将小鼠巨噬细胞RAW264.7接种至60mm培养皿；培养液为含体积百分比10% FBS、不含青霉素、链霉素的高糖DMEM；

[0044] 2.2) 当细胞汇合达到全皿的10%-15%时，按照脂质体2000说明书陈述的方法将

重组质粒 pIRES-IL32 γ -GFP 转染小鼠巨噬细胞,以 pIRES-EGF 载体作为阳性对照;

[0045] 2.3) 在转染前 1h,将培养液换为无血清、无双抗的 DMEM;将 6 μ gDNA 和 15 μ L 脂质体分别用 50 μ L Opti-MEM[®]I Reduced Serum Medium 进行稀释,室温孵育 5min,将二者混合,再在室温下孵育 20min;

[0046] 2.4) 最后将 DNA/ 脂质体混合物逐滴加至培养孔内,在体积白饭比 5% CO₂ 和饱和湿度下 37℃ 培养;

[0047] 2.5) 转染 6h 后换为含体积百分比 10% FBS 的高糖 DMEM;转染 24h 后,更换含有终浓度为 700 μ g/mL G418 的细胞培养液进行筛选;同时,以未转染的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 作为阴性对照;

[0048] 2.6) 每隔 3-4 天换液,筛选 3-4 周,直至长出阳性细胞克隆,在皿底标记克隆位置;

[0049] 2.7) 挑取克隆并逐个将阳性克隆传至 48 孔培养板,一个孔接一个克隆;培养液中 G418 含量减半;待细胞汇合达到 70 ~ 80%,胰酶消化后传至六孔培养板;以同样的方法,将六孔培养板中的细胞传至 60mm 培养皿扩增;最后将 60mm 培养皿中的细胞消化后冻存。

[0050] 3)pIRES-IL32 γ -GFP 载体稳定表达小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的鉴定

[0051] 3.1) 扩大培养 pIRES-IL32 γ -GFP 阳性小鼠巨噬细胞,提取 mRNA,反转录后并以 cDNA 为模板,PCR 鉴定 IL32 γ 基因是否整合到小鼠巨噬细胞中并稳定表达 IL32mRNA;

[0052] 3.2) 取未转染的正常小鼠巨噬细胞为阴性对照,取质粒 pIRES-IL32 γ -GFP 为阳性对照;根据引物 1F 和 2R 进行 PCR 扩增;

[0053] 3.3)PCR 反应条件是 94℃ 3min;94℃ 30sec;58℃ 30sec;72℃ 1min;30 个循环;72℃ 延伸 10min;4℃ 保存;

[0054] 3.4)PCR 产物经质量百分比 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

[0055] 上述以 G418 药物筛选是:

[0056] 1) 以 G418 药物筛选小鼠巨噬细胞,pIRES-IL32 γ -GFP 载体上含有 neo 基因,整合有该载体并表达 neo 基因的小鼠巨噬细胞能够在一定浓度的 G418 筛选时存活,未整合该载体的小鼠巨噬细胞在该浓度下死亡;需要筛选小鼠巨噬细胞的 G418 最小致死浓度;

[0057] 2) 小鼠巨噬细胞 G418 最小致死浓度的测定:

[0058] 将小鼠巨噬细胞接种 12 孔板的 6 个孔,次日换液,每孔分别加入以终浓度 100, 300, 500, 700, 900, 和 1100 μ g/mL G418 进行培养,其间每隔 3 天换液一次,培养至 3 周;当细胞培养液中的 G418 浓度等于或大于 700 μ g/mL 时,所有小鼠巨噬细胞都死亡,就 G418 对小鼠巨噬细胞的最小致死量是 700 μ g/mL。一种用上述稳定转染 pIRES-IL32 γ -GFP 载体的小鼠巨噬细胞检测细胞因子 IL-1 β 、IL-6、MIP2 以及 TNF α 表达情况的方法,其特殊之处在于,该方法包括:

[0059] 1) 将上述稳定转染 pIRES-IL32 γ -GFP 载体的小鼠巨噬细胞采用 Trizol 方法提取细胞中的总 RNA,并用 DNA 酶去除污染 DNA,再用反转录试剂盒反转录成第一链 cDNA;

[0060] 2)Real-Time PCR

[0061] 以 cDNA 为模板,用下列引物,RealTime PCR 检测小鼠 IL-1 β 、IL-6、MIP2、TNF α 等细胞因子的表达情况;反应条件是 94℃ 3min;94℃ 20sec;60℃ 30sec;40 个循环;4℃ 保存;

[0062] 引物序列如下：

[0063] 人工合成的小鼠 IL1 β 引物 F :5' -CCTGAACTCAACTGTGAAATGCC-3'

[0064] 人工合成的小鼠 IL1 β 引物 R :5' -CCAGGTCAAAGGTTTGGAAGC-3'

[0065] 人工合成的小鼠 TNF α 引物 F :5' -CGGCATGGATCTCAAAGACAAC-3'

[0066] 人工合成的小鼠 TNF α 引物 R :5' -CGGCAGAGAGGAGGTTGACTTT-3'

[0067] 人工合成的小鼠 IL6 引物 F :5' -GCCTTCTTGGGACTGATGCTG-3'

[0068] 人工合成的小鼠 IL6 引物 R :5' -CTCATTTCCACGATTTCCCAG-3' A

[0069] 人工合成的小鼠 MIP2 引物 F :5' -GTCAATGCCTGAAGACCCTGC-3'

[0070] 人工合成的小鼠 MIP2 引物 R :5' -GGCTTCAGGGTCAAGGCAAA-3'

[0071] 本发明具有以下特点：

[0072] 1、本发明通过人与牛的 DNA 序列比对，分子克隆了牛 IL-32 γ 基因 (GenBank 序列号为 JQ327711, 未经公布)。并构建了真核表达载体，该载体含有启动子 CMV, 能够实现目的基因在小鼠巨噬细胞中高效表达。

[0073] 2、本发明将牛 IL-32 γ 真核表达载体转染到小鼠巨噬细胞中，构建转基因的小鼠巨噬细胞系；经过 G418 筛选获得阳性细胞，并通过 PCR 验证目的基因 IL-32 γ 整合到小鼠巨噬细胞的基因组中，建立了 5 株稳转细胞系。

[0074] 3、用稳转牛 IL-32 γ 的小鼠巨噬细胞系进行细胞水平验证，检测 IL-1 β 、IL-6、MIP2、TNF α 等细胞因子的表达变化。

附图说明

[0075] 图 1A 是 PCR 扩增牛 IL-32 β 的结果图；

[0076] 图 1B 是 EcoRI 单酶切检测 pGEM-T-IL32 β 的结果图；

[0077] 图 2A 是 PCR 扩增牛 IL-32 γ 片段 γ 1、 γ 2、 γ 3、 γ 1-2、 γ 1-2-3 的结果图；

[0078] 图 2B 是 BamHI 和 SalI 双酶切鉴定 pET41-IL32 γ

[0079] 图 3A 是 IL-32 γ 真核细胞表达载体 pIRES-IL32 γ -GFP 的载体图谱；

[0080] 图 3B 是 NheI 和 BamHI 双酶切鉴定 pIRES-IL32 γ -GFP 载体的结果图；

[0081] 图 4 是 pIRES-IL32 γ -GFP 载体转染小鼠巨噬细胞 RAW264.7 后筛选稳定克隆免疫荧光图；

[0082] 图 5 是 pIRES-IL32 γ -GFP 载体稳定转染小鼠巨噬细胞 PCR 鉴定的结果图；

[0083] 图 6 是 Real-Time PCR 检测 IL-1 β 、IL-6、MIP2、TNF α 等细胞因子的表达。

具体实施方式

[0084] 本发明首先克隆牛 IL-32 γ 基因，然后构建牛 IL-32 γ 表达载体 pIRES-IL32 γ -GFP，通过脂质体法将外源表达载体 pIRES-IL32 γ -GFP 转染入小鼠巨噬细胞。经 G418 筛选获得阳性细胞，经 PCR 鉴定证实目的基因牛 IL-32 γ 基因整合到小鼠巨噬细胞的基因组中并稳定表达该 mRNA。将转染牛 IL-32 γ 的巨噬细胞进行功能验证，检测 IL-1 β 、IL-6、MIP2、TNF α 等细胞因子的表达情况。

[0085] 具体所涉及的试剂和材料如下：

[0086] G418, 高糖 DMEM, Trizol, 细胞转染试剂 Lipofectamine 2000 和 Opti-MEM[®]IReduced

Serum Medium 购自美国 Invitrogen 公司 ;EDTA 和 Trypsin 购自美国 Sigma 公司 ;FBS 购自 Hyclone 公司 ;细胞培养板和培养皿购自 Corning 公司 ;DNA maker 购自天根公司 ;pGEM-T Easy 载体和质粒提取试剂盒购自 Promega 公司 ;限制性核酸内切酶、Taq DNA 聚合酶、PFU DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、dNTP、Klenow 酶、和反转录试剂盒由 Fermentas 公司提供 ;基因组提取试剂盒购自 Axygene ;小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购自中南大学湘雅中心实验室。

[0087] 下面结合附图和实验作进一步详细说明。

[0088] 1、牛 IL-32 γ 基因克隆

[0089] 根据牛 IL-32 γ 与牛 IL-32 β 序列的开放阅读框比较可知,牛 IL-32 γ 比牛 IL-32 β 多了一段序列,所以可以据此将牛 IL-32 γ 基因根据特殊设计引物分为 3 段克隆 : (1)、用牛 IL-32 β cDNA 片段扩增 r1 ;(2)、用牛基因组扩增牛 IL-32 γ 特有片段 r2 ;(3)、用牛 IL-32 β cDNA 片段扩增 r3 ;然后将 3 片段用 PCR 方法拼接,产生一段完整序列的牛 IL-32 γ 基因。其中首尾两端设计分别含有 BamHI 和 SalI 酶切位点。其引物如下 : ,

[0090] 正向引物 1F :5' -c gGGATCC ATGTGCTTCGCTAAGAGAGACC-3' ;

[0091] 反向引物 1R :5' - **GAGCTTCTTAC** CGATAACACCCTGAAAGAAGC-3' ;

[0092] 正向引物 2F :5' - **GGGTGTTATCG** GTAAGAAGCTCATTTCACGTATAG-3' ;

[0093] 反向引物 2R :5' - **CAAGTTGTG** CTGTGAACAGAGATGGACTTGAG-3' ;

[0094] 正向引物 3F :5' - **CTCTGTTACAG** CACAACCTGTAGATGAATTTTTCG-3' ;

[0095] 反向引物 3R :5' -tataGTCGAC TTAGACCTGGATGAGGCTTCTG-3' ;

[0096] 下划线为酶切位点 BamHI 和 SalI,粗体为拼接序列小写字体为保护序列。引物有北京奥科公司合成。

[0097] 1.1 牛 IL-32 β 基因的合成

[0098] 取成体秦川黄牛脾脏中约 10mg 组织,采用 Trizol 方法提取脾脏组织中的总 RNA,利用 cDNA 试剂盒反转录成第一链 cDNA。以 cDNA 为模板,用引物对 1F 和 3R,用 Taq 酶扩增牛 IL-32 基因,得到牛 IL-32 β ;反应条件是 94℃ 3min ;94℃ 30sec ;58℃ 30sec ;72℃ 45sec ;30 个循环 ;72℃ 延伸 10min ;4℃ 保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,与 pGEM-T Easy 载体连接并转化到 DH5 α 细菌,经蓝白斑筛选挑选重组子,对 EcoRI 酶切鉴定为阳性的质粒进行测序,测序正确的阳性克隆命名为 pGEM-T-IL32 β 并用生物学软件进行序列分析。PCR 结果如图 1A 所示,酶切检测如图 1B 所示,泳道 1 是重组质粒 pGEM-T-IL32 β 经 EcoRI 酶切后产生 516bp 特异性条带,电泳结果与预期结果一致。测序结果通过 Blast 比对分析表明,扩增的秦川黄牛 IL-32 β 的序列与 Genbank 中 NW_001494274.1 (Bos taurus breed Hereford chromosome 25genomic scaffold) 比对得到 IL32 序列有七个碱基不同。有 5 个氨基酸不同,经氨基酸二级结构比较可知其变化对二级结构没有影响。IL32 β 基因虽然较为保守,但在不同品种间存在多态性,造成这种突变可能是种属间差异产生的一种多态现象。

[0099] 1.2 牛 IL-32 γ 基因的合成

[0100] 用 PFU system PCR 扩增 r1、r2、r3 片段,其中 r1、r3 以 cDNA 为模板,分别用引物对 1F 和 1R、3F 和 3R, r2 以牛基因组为模板,用引物 2F 和 2R,反应条件均为 94℃,2min ;94℃ 30sec ;58℃ 30sec ;72℃ 80sec ;30 个循环 ;72℃ 延伸 10min ;4℃ 保存 ;得到片段 r1、r2、r3 ;然后以上述 r1、r2 为模板,用引物 1F 和 2R,上述反应条件进行扩增,得到 r1-2 片段 ;

再以上述 r1-2、r3 为模板,用引物 1F 和 3R,上述反应条件进行扩增,得到 r1-2-3 片段;即为牛 IL-32 γ 基因;PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,用 BamHI 和 Sal I 酶切,与 pET-41a 连接并转化到 DH5 α 细菌,用 BamHI 和 SalI 酶切鉴定为阳性的质粒进行测序,测序正确的阳性克隆命名为 pET-41a-IL32 γ 并用生物学软件进行序列分析;

[0101] PCR 结果如图 3、4、5 所示,pET-41a-IL32 γ 酶切检测如图 6 所示,泳道 1 是重组质粒 pET-41a-IL32 γ 经酶切后产生 657bp 特异性条带,电泳结果与预期结果一致。

[0102] 2、牛 IL-32 γ 真核表达载体的结构及其构建

[0103] 2. 1pIRES-IL32 γ -GFP 的构建

[0104] 含有 IL-32 γ 基因和启动子 (CMV) 以及抗性筛选基因 (Neo) 的 pIRES2-EGFP 载体。筛选基因 (Neo) 用来筛选含有该载体的重组细胞,进而检测细胞因子诱导效率。

[0105] 以 pIRES2-EGFP 载体为骨架,将 pET-41a-IL32 γ 、pIRES2-EGFP 分别用 BamHI、BglIII 酶切并用 Klenow 酶补平,再分别用 SalI 酶切,回收 IL32 γ 基因片段和 pIRES2-EGFP 载体,用 T4DNA 连接酶连接过夜,将连接产物转化入 DH5 α 细菌,用 NheI 和 BamHI 酶切鉴定阳性克隆;得表达载体 pIRES-IL32 γ -GFP (如图 6)。

[0106] 2. 2pIRES-IL32 γ -GFP 载体的验证

[0107] 小鼠巨噬细胞 RAW264. 7 用含有 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液,在 37℃ 的 CO₂ 孵箱中常规培养。将巨噬细胞接种于 24 孔板,24h 后更换无血清的 DMEM 培养液,同时准备用脂质体-2000 转染重组质粒 pIRES-IL32 γ -GFP (具体方法按脂质体-2000 说明书进行),转染 48h 后照相,pIRES-IL32 γ -GFP 转染小鼠巨噬细胞有效。

[0108] 3. pIRES-IL32 γ -GFP 稳定转染小鼠巨噬细胞 RAW264. 7

[0109] 3. 1 小鼠巨噬细胞 RAW264. 7 的培养

[0110] 在 37℃ 解冻一管小鼠巨噬细胞 RAW264. 7 成系细胞,离心。弃去培养液,加入 1ml 培养液 (含 10% FBS 的高糖 DMEM) 重悬细胞,转移至含有 4ml 培养液 60mm 培养皿,在 CO₂ 孵箱中 37℃ 培养。待牛成纤维细胞密度达到 70% -80% 时,弃去培养液,加入 2ml PBS 无 Ca²⁺/Mg²⁺ 洗涤细胞,弃去 PBS,加入 0. 25% 的胰酶消化细胞,待大多数细胞变圆、飘起时,用含有 10% FBS 的 DMEM 培养液终止消化,使用移液器吹打混匀转移到离心管中,1000 转离心 5 分钟后,弃去培养液并悬浮,按照 1 : 3 的比例传代,置于 CO₂ 孵箱中 37℃ 培养。取传代 2-3 次的巨噬细胞作为转染的宿主细胞。

[0111] 本发明以 G418 药物筛选巨噬细胞,由于 pIRES-IL32 γ -GFP 载体上含有 neo 基因,因此整合有该载体并表达 neo 基因的巨噬细胞能够在一定浓度的 G418 筛选时存活,而未整合该载体的巨噬细胞在该浓度下死亡。因此需要筛选正常巨噬细胞的 G418 最小致死浓度。

[0112] 小鼠巨噬细胞 G418 最小致死浓度的测定:将小鼠巨噬细胞接种 12 孔板的 6 个孔,次日换液,每孔分别加入以终浓度 100, 300, 500, 700, 900 和 1100 μ g/mL G418 进行培养,其间每隔 3 天换液一次,培养至 3 周。当细胞培养液中的 G418 浓度等于或大于 700 μ g/mL 时,所有巨噬细胞都死亡,就 G418 对牛皮肤成纤维细胞的最小致死量是 700 μ g/mL。

[0113] 3. 2pIRES-IL32 γ -GFP 载体稳定转染小鼠巨噬细胞

[0114] 转染前 1 天,将小鼠巨噬细胞接种至 60mm 培养皿。培养液为含 10% FBS、不含青霉素、链霉素的高糖 DMEM。当细胞汇合达到全皿的 10% -15% 时,按照脂质体 2000 说明书陈述的方法将重组质粒 pIRES-IL32 γ -GFP 转染小鼠巨噬细胞,以 pIRES-EGFP 载体作为阳

性对照。在转染前 1h, 将培养液换为无血清、无双抗的 DMEM。将 6 μ g DNA 和 15 μ L 脂质体分别用 500 μ L Opti-MEM[®] Reduced Serum Medium 进行稀释, 室温孵育 5min, 将二者混合, 再在室温下孵育 20min。最后将 DNA/ 脂质体混合物逐滴加至培养孔内, 在 5% CO₂ 和饱和湿度下 37°C 培养。转染 6h 后换为含 10% FBS 的高糖 DMEM。转染 24h 后, 更换含有终浓度为 700 μ g/mL G418 的细胞培养液进行筛选; 同时, 以未转染的小鼠巨噬细胞作为阴性对照。每隔 3-4 天换液, 筛选 3-4 周, 直至长出阳性细胞克隆, 用记号笔在皿底标记克隆位置。挑取克隆并逐个将阳性克隆传至 48 孔培养板, 一个孔接一个克隆。此后培养液中 G418 含量减半 (400 μ g/mL)。待细胞达到 70 ~ 80% 汇合时, 胰酶消化后传至六孔培养板。以同样的方法, 将六孔培养板中的细胞传至 60mm 培养皿扩增。最后将 60mm 培养皿中的细胞消化后冻存。

[0115] 本发明筛选的阳性细胞都是稳定转染 pIRES-IL32 γ -GFP 载体的小鼠巨噬细胞。载体整合到细胞的基因组上, 随着细胞 DNA 的复制而复制。在稳定转染的过程中, pIRES-IL32 γ -GFP 载体携带的 CMV 启动子, IL32 γ 基因和 neo 基因等元件会整合到宿主细胞的基因组中, 通过 G418 筛选 3 周后达到稳定转染的目的, 表现为筛选的细胞呈 G418 抗性。

[0116] 以上通过稳定转染筛选整合有 pIRES-IL32 γ -GFP 载体细胞, 得到含有 IL32- γ 基因的小鼠巨噬细胞。

[0117] 3. 3pIRES-IL32 γ -GFP 载体稳定转染小鼠巨噬细胞表达基因情况的鉴定扩大培养 pIRES-IL32 γ -GFP 阳性小鼠巨噬细胞, 提取 RNA 并进行反转录, 以此 cDNA 为模板, PCR 鉴定 IL32 γ 基因是否在小鼠巨噬细胞中表达; 取未转染质粒的正常小鼠巨噬细胞为阴性对照, 取质粒 pIRES-IL32 γ -GFP 为阳性对照。PCR 扩增引物对为 1F 和 2R。

[0118] PCR 反应条件是 94°C 3min; 94°C 30sec; 60°C 30sec; 72°C 50sec; 30 个循环; 72°C 延伸 10min; 4°C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。检测结果如图 5 所示, 其中泳道 M 为 DNA marker, 泳道 1 是阴性对照, 泳道 2-4 为稳定转染 pIRES-IL32 γ -GFP 的小鼠巨噬细胞, 泳道 5 为阳性对照。结果表明, pIRES-IL32 γ -GFP 载体在宿主细胞小鼠巨噬细胞中稳定表达 IL32mRNA。

[0119] 4、以稳定转染 pIRES-IL32 γ -GFP 载体的小鼠巨噬细胞检测 IL-1 β 、IL-6、MIP2、TNF α 等细胞因子的表达

[0120] 以未转染的小鼠巨噬细胞为阴性对照组, 以 pIRES-IL32 γ -GFP 载体的小鼠巨噬细胞为样品组, 以稳定转染人 pIRES-IL32 γ -GFP 载体的小鼠巨噬细胞为阳性对照组, 将此 3 组样品提取 RNA 并进行反转录, 以此 cDNA 为模板, 进行 Real-TimePCR, 检测 IL-1 β 、IL-6、TNF α 、MIP2 等细胞因子的表达变化情况。结果表明, IL-1 β 、TNF α 、MIP2 的表达量较阴性对照上升, IL-6 的表达下降, 但其趋势均与阳性对照一致。

[0121] 核苷酸序列表

[0122] <110> 西北农林科技大学

[0123] <120> 一种牛白细胞介素 32 γ 亚型的分子克隆 / 稳转细胞系的建立及其方法

[0124] <140>

[0125] <141>

[0126] <160>1

- [0127] <210>1
[0128] <211>30
[0129] <212>DNA
[0130] <213> 人工合成的牛 IL32 γ 引物 1F
[0131] <400>1
[0132] cgggatccat gtgcttcgct aagagagacc 30
[0133] <210>2
[0134] <211>32
[0135] <212>DNA
[0136] <213> 人工合成的牛 IL32 γ 引物 1R
[0137] <400>2
[0138] gagcttctta ccgataacac cctgaaagaa gc 32
[0139] <210>3
[0140] <211>36
[0141] <212>DNA
[0142] <213> 人工合成的牛 IL32 γ 引物 2F
[0143] <400>3
[0144] ggggtgttate ggtaagaagc tcatttccac gtatag 36
[0145] <210>4
[0146] <211>33
[0147] <212>DNA
[0148] <213> 人工合成的牛 IL32 γ 引物 2R
[0149] <400>4
[0150] caaggttgtg ctgtgaacag agatggactt gag 33
[0151] <210>5
[0152] <211>37
[0153] <212>DNA
[0154] <213> 人工合成的牛 IL32 γ 引物 3F
[0155] <400>5
[0156] ctctgttcac agcacaacct tgtagatgaa tttttcg 37
[0157] <210>6
[0158] <211>32
[0159] <212>DNA
[0160] <213> 人工合成的牛 IL32 γ 引物 2R
[0161] <400>6
[0162] tatagtcgac ttagacctgg atgaggcttc tg 32
[0163] <210>7
[0164] <211>657
[0165] <212>DNA

- [0166] <213> 人工合成的牛 IL32 γ 基因
- [0167] <400>7
- [0168] atgtgcttcg ctaagagaga cccacgtgtc ctggcttctt tcagggtgtt atcggtaaga 60
- [0169] agctcatttc cacgtatagc tggggttcag gaggcctggg ttctgctggg tgaagctgag 120
- [0170] aacattctgg cccacttggg acccagcaga gagaagaacc gagattcttt tactcaagtc 180
- [0171] catctctgtt cacagcaca cctttagat gaatttttcg atacaatgga aatgaacca 240
- [0172] gaaggagcac aggtggagge agtcctagca gagactaagg agaaattcat caaggacgcc 300
- [0173] tttaaagtca tggataatca cattcaagag aacagtcccg aaaccctgaa ggagtccagt 360
- [0174] cccttgcttc aggaagcaca gcaagaagta cgctgcagaa tccagagacg ctccgtcgcc 420
- [0175] acctctctgg aggtccagaa tccggaagag agcatctggg ccagagccct gcggcagttc 480
- [0176] ttgggcattc tgcagagttt cctgtccggg tgtcgggatg cgctcacctg gctgtgggag 540
- [0177] aaggccgcgg cctgcctaca ggccgtctgc agtgcggtgg aggccctctg ggaagtgtc 600
- [0178] acggatttct gctcctttgt tgggcagctc ttatgcagaa gcctcatcca ggtctaa 660
- [0179] <210>8
- [0180] <211>23
- [0181] <212>DNA
- [0182] <213> 人工合成的小鼠 IL1 β 引物 F
- [0183] <400>8
- [0184] cctgaactca actgtgaaat gcc
- [0185] 23
- [0186] <210>9
- [0187] <211>21
- [0188] <212>DNA
- [0189] <213> 人工合成的小鼠 IL1 β 引物 R
- [0190] <400>9
- [0191] ccaggtcaaa ggtttggaag c
- [0192] 21
- [0193] <210>10
- [0194] <211>21
- [0195] <212>DNA
- [0196] <213> 人工合成的小鼠 IL6 引物 F
- [0197] <400>10
- [0198] gccttcttgg gactgatgct g
- [0199] 21
- [0200] <210>11
- [0201] <211>22
- [0202] <212>DNA
- [0203] <213> 人工合成的小鼠 IL6 引物 R
- [0204] <400>11

[0205] ctcatttcca cgatttccca ga
[0206] 22
[0207] <210>12
[0208] <211>22
[0209] <212>DNA
[0210] <213> 人工合成的小鼠 IL6 引物 F
[0211] <400>12
[0212] cggcatggat ctcaaagaca ac
[0213] 22
[0214] <210>13
[0215] <211>22
[0216] <212>DNA
[0217] <213> 人工合成的牛 IL32 γ 引物 2R
[0218] <400>13
[0219] cggcagagag gaggttgact tt
[0220] 22
[0221] <210>14
[0222] <211>21
[0223] <212>DNA
[0224] <213> 人工合成的小鼠 IL6 引物 F
[0225] <400>14
[0226] gtcaatgcct gaagaccctg c
[0227] 21
[0228] <210>15
[0229] <211>20
[0230] <212>DNA
[0231] <213> 人工合成的牛 IL32 γ 引物 2R
[0232] <400>15
[0233] ggcttcaggg tcaaggcaaa
[0234] 20

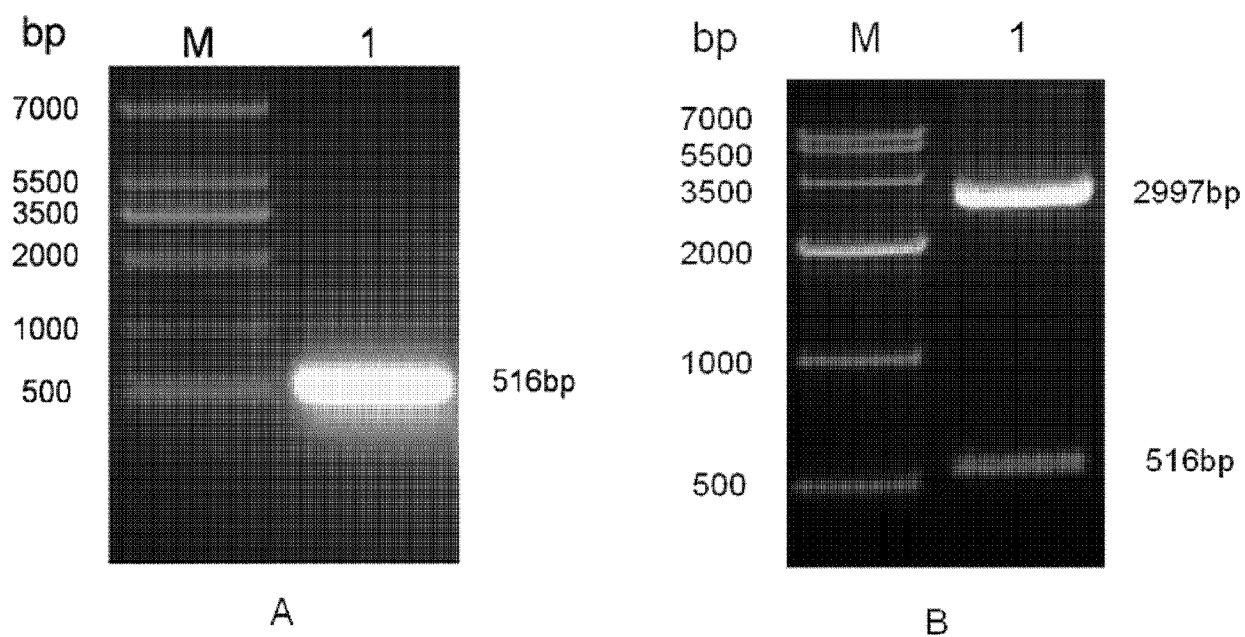


图 1

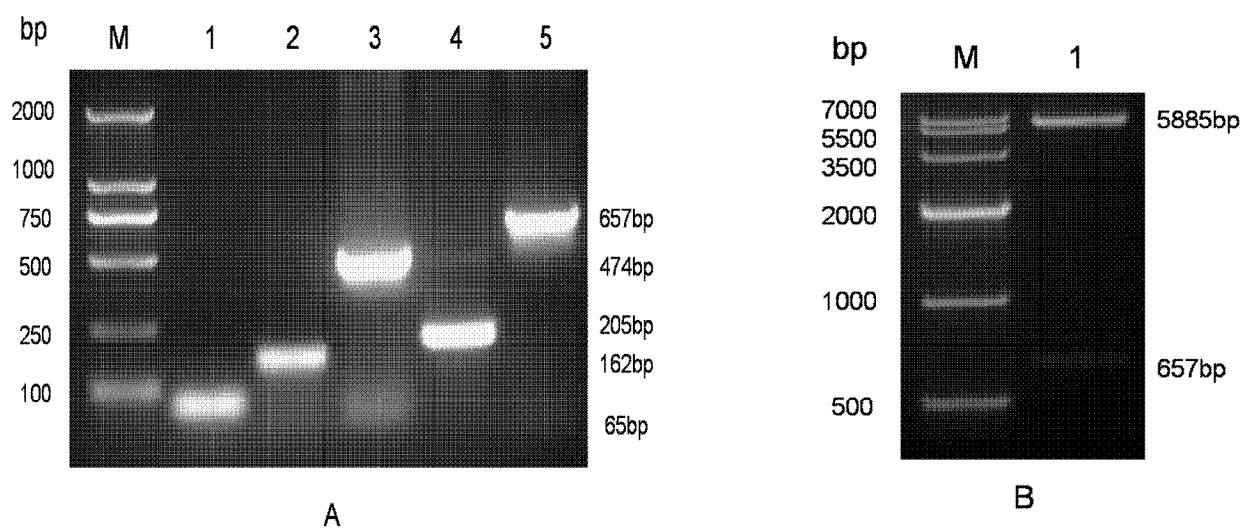


图 2

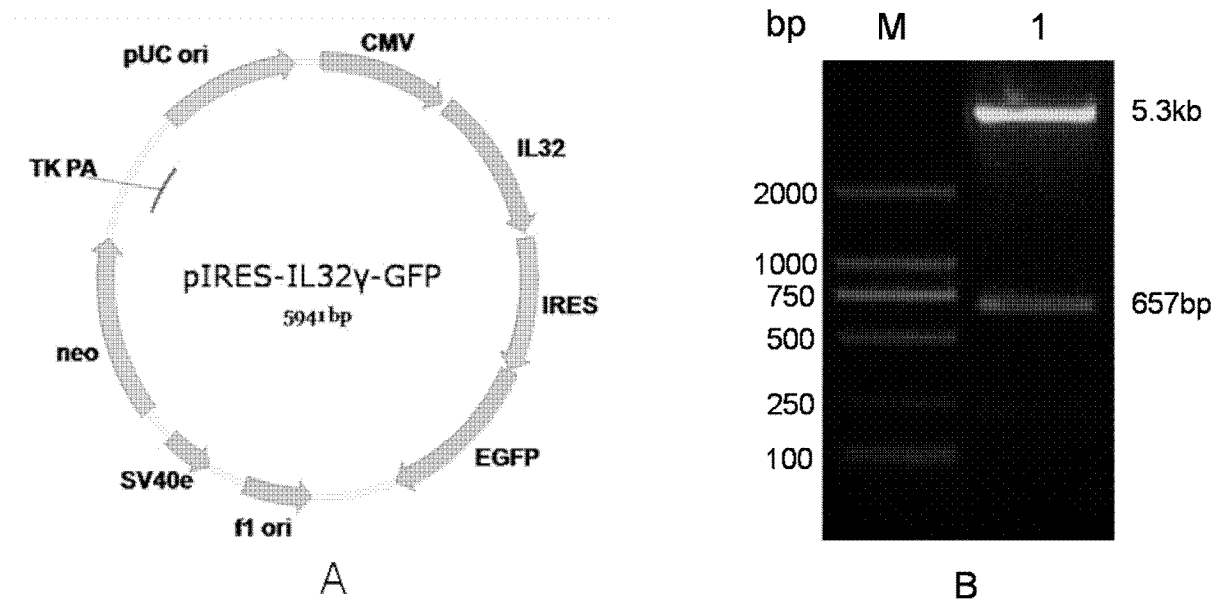


图 3

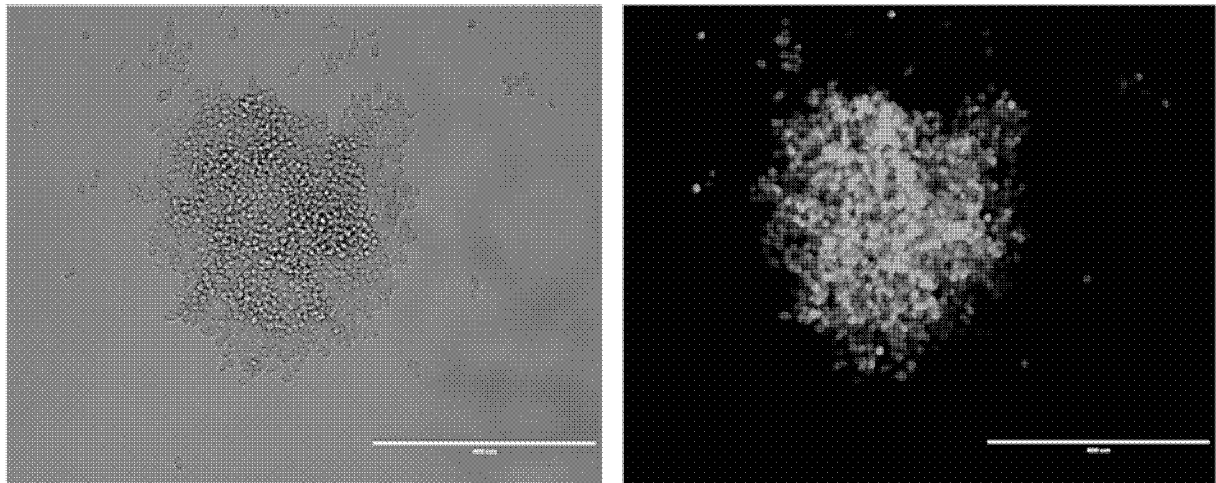


图 4

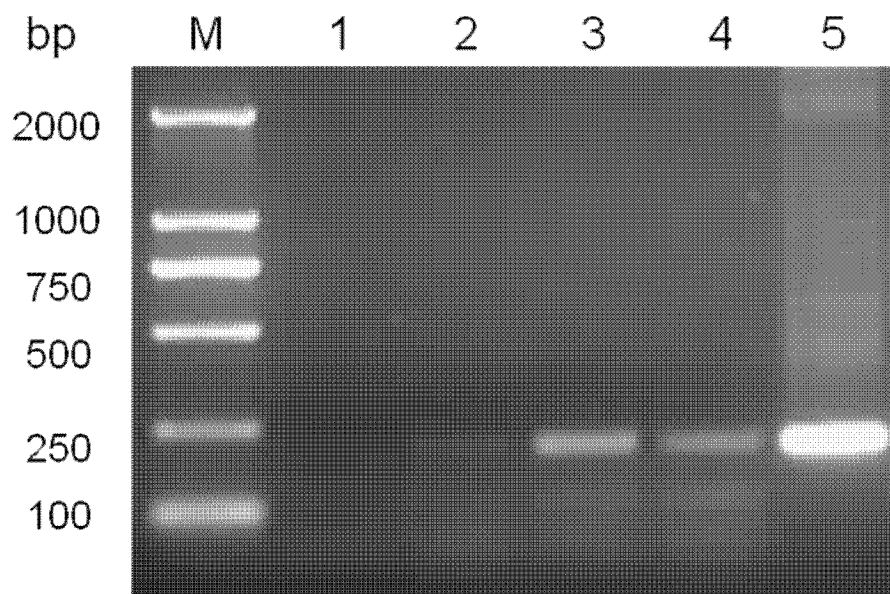


图 5

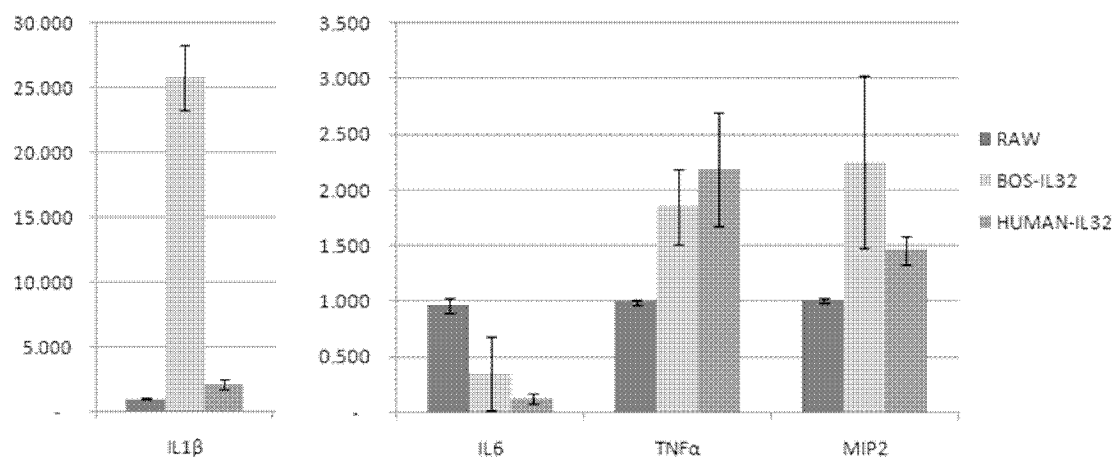


图 6