

猪细胞因子 cDNA 表达文库的构建及其基因的克隆鉴定

夏小慧^{1,2}, 景志忠^{1*}, 王勤², 窦永喜¹

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室/甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 兰州 730046; 2. 兰州大学生命科学学院, 兰州 730000)

摘要: 为克隆和研究猪细胞因子及相关基因, 应用建库试剂盒成功构建了猪细胞因子 cDNA 表达文库。采取健康猪外周血及淋巴结, 分离单个核细胞, 经 LPS+PHA 联合刺激不同时间后, 提取总 RNA。将各组样品混合, 分离纯化 mRNA。反转录合成 cDNA 第一链和第二链, 与 *EcoRI* 和 *Hind* III 接头连接。酶切和过柱分级分离后, 与 λ Screen 载体连接, 经体外包装转染 *E. coli* ER1647 宿主菌, 进行文库容量测定和扩增。以扩增文库的 DNA 为模板, 利用已知基因引物克隆猪 IL-2 和 IL-4 的 cDNA 并进行测序。结果表明, 成功构建了猪细胞因子 cDNA 文库, 文库原始库容量为 8×10^5 , 插入片段在 300~2 000 bp, 扩增得到特定的 IL-2 和 IL-4 基因, 说明文库质量高、代表性强, 为进一步从文库中筛选未知细胞因子及相关基因提供了有效的工具。

关键词: 细胞因子; cDNA 文库; 基因克隆

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)04-0352-04

Construction of cDNA Expression Library of Porcine Cytokine and Cloning of Related Genes

XIA Xiao-hui^{1,2}, JING Zhi-zhong^{1*}, WANG Qin², DOU Yong-xi¹

(1. Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China; 2. School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: In order to clone and study the cytokine and related genes of porcine, a cDNA library of porcine cytokine was constructed. The mononuclear cells were isolated from the peripheral blood and lymph nodes of healthy porcine and were stimulated by PHA+LPS at different time. The total RNA were extracted and the mRNA were isolated. Single-strand cDNA and double-strand cDNA were synthesized from mRNA, then ligated to directional *EcoRI* and *Hind* III linkers. cDNA were ligated into λ Screen vector after size fractionating by gel filtration and packaged *in vitro*. The cloning efficiency was evaluated and the length of the cDNA fragment was assayed by PCR. Using the amplified library as template DNA, 2 pair primers were designed according to the sequence of the porcine IL2 and IL4, then the gene were amplified by PCR. The results demonstrated that a cDNA library of porcine cytokine has been constructed and the IL2 and IL4 gene were amplified successfully. The titer of the cDNA library was 8×10^5 pfu/mL and the length of inserts was about 300~2 000 bp. It is helpful in the further study on screening novel cytokine and

收稿日期: 2005-07-22

基金项目: 农业结构调整重大技术研究专项(04-10-03B); 国家高技术发展规划(2003AA241111)

作者简介: 夏小慧(1973-), 女, 甘肃临洮人, 硕士生, 主要从事免疫化学研究

* 通讯作者: 景志忠, 副研究员, 主要从事预防兽医学分子生物学与免疫学研究。Tel: 0931-8342716

related genes.

Key words: cytokine; cDNA library; gene cloning

细胞因子(Cytokines)是由淋巴细胞、单核巨噬细胞以及内皮细胞和成纤维细胞等多种细胞分泌的能调节细胞多种功能的小分子多肽,根据其功能的差异可分为白介素(IL)、干扰素(IFN)、集落刺激因子(CSF)、肿瘤坏死因子(TNF)、转化生长因子(TGF)、趋化因子等家族。在机体免疫应答过程中,细胞因子对细胞间的相互作用、细胞的生长和分化有重要的调节作用。20世纪80年代以来,由于基因工程、细胞工程的飞速发展,不仅克隆了一些已知的细胞因子的cDNA,而且发现了许多新的细胞因子,并对各种细胞因子进行了大量的研究,已成为当今基础免疫学和临床免疫学研究中一个十分活跃

的领域。新基因的获得有许多方法,其中cDNA表达文库法在新功能基因的发现中起到了非常重要的作用,并证明是一种简单易行的高通量的筛选、克隆功能基因的策略,甚至能够筛选出单拷贝mRNA表达的基因^[1]。虽然真核生物的基因组十分庞大,但由其mRNA获得的cDNA的种类相对较少,其结构也相对简单且不含内含子,因此从cDNA文库中筛选和克隆目的基因较为容易。最初发现的一些细胞因子大部分都是从cDNA文库中克隆的。Lefevre和Dijkmans分别以人的IFN cDNA为探针从猪细胞cDNA文库中率先克隆到猪IFN- α 和IFN- γ 基因;IL-18最早是用简并的核苷酸引物从小鼠肝细胞cDNA文库中克隆得到,并以此设计探针从人肝细胞cDNA文库中克隆出人IL-18 cDNA;同样,以人IL-20编码区作探针,在小鼠皮肤cDNA文库中成功克隆了小鼠IL-20的cDNA^[2]。

近几年猪细胞因子的研究报道很多,但主要集中于对已知基因的克隆及功能研究^[3,4],未见有正常或刺激后猪细胞因子cDNA文库构建的报道。本研究根据细胞因子的分泌特点,经有丝分裂原刺激活化外周血和淋巴结单个核细胞,构建高质量的cDNA表达文库,为进一步筛选克隆目的基因奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

Trizol Reagent、1640培养液购自Invitrogen公司;PolyAtract mRNA Isolation System 购自

promega公司;Orient Express Oligo(dT) cDNA library Construction System(λ Screen)购自Novagen公司;LPS、PHA购自Sigma公司;pMD18 T载体、EcoRI、HindIII、T₄DNA连接酶、PCR试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒、DNA Marker(DL 2000)均购自大连宝生物公司,SM试剂配方:每升含20 mL 5 mol/L NaCl, 10 mL 1 mol/L MgSO₄, 50 mL 1 mol/L Tris-HCl(pH 7.5), 5 mL 2%明胶,自行配制。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 单个核细胞的刺激诱导

无菌采取新鲜猪腹股沟淋巴结和颈静脉外周血,用淋巴细胞分离液分离制备单个核细胞,用1640完全培养液调整细胞浓度至 1×10^7 /mL,培养1 h后,分LPS(2 μ g/mL) + PHA(5 μ g/mL)和LPS(5 μ g/mL) + PHA(7 μ g/mL) 2个组诱导刺激,每组在诱导2、4、8、12、24、48、72 h后收集细胞,用于提取RNA^[5]。

1.3 cDNA文库的构建

用Trizol Reagent提取单个核细胞总RNA,各组总RNA合并后加入RNase抑制剂,用生物素化的Oligo(dT)亲和层析法分离纯化mRNA。按Orient Express Oligo(dT) cDNA library Construction System试剂盒说明进行文库构建:以纯化的mRNA为模板反转录合成cDNA第一链,然后PCR扩增为双链cDNA。用T₄DNA聚合酶补平cDNA末端,与EcoRI、HindIII定向接头连接后,再分别用EcoRI和HindIII酶切消化,凝胶过滤法除去多余的接头和小于300 bp的cDNA片段。乙醇沉淀法回收大于300 bp的cDNA片段,用T₄DNA连接酶与载体 λ Screen 16℃连接过夜,然后将连接产物体外包装为具有感染性的 λ 噬菌体颗粒。

1.4 文库容量的测定与扩增

用SM将100 μ L包装产物分别按1:1 000、1:10 000倍数进行稀释,取100 μ L稀释的噬菌体溶液和100 μ L过夜培养的宿主菌ER1647,37℃静置吸附20 min后,加入到40℃左右的3 mL顶层琼脂糖中,混合后马上倒入LB平板上,37℃过夜培养12~18 h,观察统计噬菌斑,计算文库容量,公式为文库滴度(pfu/mL) = 噬菌斑数 \times 稀释倍数 \times 10。

文库扩增时,用 1×10^5 原始文库噬菌体克隆数

在 150 mm 平板上铺板,37 ℃ 培养至噬菌斑长满后(约 6 h),加入 10 mL SM 洗液 4 ℃ 过夜,收集所有洗脱液,氯仿抽提,收集上清,测定文库滴度,加 DMSO 至终浓度为 7%,分装后,-70 ℃ 保存备用。

1.5 文库中 cDNA 片段长度的 PCR 鉴定

根据 λ Screen 载体多克隆位点两端序列设计一对通用引物。上游:5'-CGA ACG CGA GCA CAT GGA CA-3' 下游:5'-GCT ACT TAT TGC TGA GCG GT -3',建立如下 PCR 反应体系:10×PCR buffer 5 μ L;MgSO₄ (25 mmol/L) 3 μ L;dNTPs (100 mmol/L) 1 μ L;上、下游引物各 0.5 μ L;TaqDNA 聚合酶 0.5 μ L;文库模板 1 μ L;灭菌水加至 50 μ L。扩增参数:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 50 s,54 ℃ 60 s,72 ℃ 2 min,30 个循环;最后 72 ℃ 再延伸 10 min。取 5 μ L 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,初步估计文库中所插入 cDNA 片段的大小。

1.6 文库中特定目的基因的克隆与鉴定

猪 IL-2 和 IL-4 基因引物由本实验室陈国华硕士提供。其序列如下,IL-2 上游引物:5'-AAG ATG CAG CTC TTG TGT TGC- 3',下游引物:5'-TCA AGT CAG TGT TGA GTA GAT GCT -3';IL-4 上游引物:5'-GCT CTA TTT ATG GGT GTC AC -3',下游引物:5'-GAG ATT CAA CAC TTT GAG TAT TT-3'。PCR 反应体系同通用引物扩增体系。扩增参数:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 50 s,48 ℃ 40 s(IL-2)/54 ℃ 40 s(IL-4),72 ℃ 2 min,30 个循环;最后 72 ℃ 再延伸 10 min。将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,切下目的带,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 DNA 片段,与 pMD18-T 载体连接,转化 JM109 感受态细胞,涂布于有 X-gal 和 IPTG 的 Amp⁺ LB 平板上。过夜培养,挑白色菌斑,接种于 LB 培养基中。提质粒,用 *Eco*RI 和 *Hind*III 进行酶切和 PCR 鉴定后,送上海生工生物工程公司测序。

2 结果

2.1 单个核细胞刺激诱导效果

经 LPS+PHA 联合刺激后,单个核细胞的数量和形态都发生了变化,其中形态的变化更为明显,表现为细胞核物质增多,体积增大,有些单核/巨噬细胞出现了伪足。随着培养时间的增长,死亡的细胞数量也有所增加,见图 1、图 2。

2.2 总 RNA 的质量鉴定

分离提取的总 RNA A_{260}/A_{280} 为 2.05,浓度为

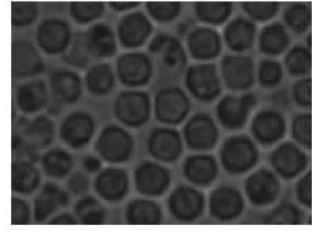


图 1 未刺激的单个核细胞形态

Fig. 1 Morphology of mononuclear cells

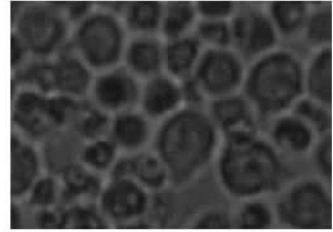


图 2 刺激后的单个核细胞

Fig. 2 Morphology of mononuclear cells stimulated by PHA and LPS

995.6 μ g/mL,总 RNA 产量为 721.8 μ g,表明所提 RNA 含量大,纯度高。

2.3 cDNA 表达文库容量及插入片段长度分析

经 10^{-3} 稀释的包装产物 100 μ L 转染宿主菌 ER1647,计算得原始文库容量为 8×10^5 。通用引物扩增鉴定文库插入 cDNA 片段电泳结果见图 3,表明插入片段集中在 300~2 000 bp 间。



1. 通用引物扩增条带;M. DNA 分子质量标准

1. The amplified results with common primer; M. DL2000 DNA Marker

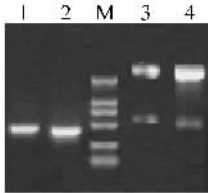
图 3 通用引物 PCR 扩增 cDNA 表达文库

Fig. 3 Electrophoretic analysis of cDNA expression library amplified by PCR with common primer

2.4 目的基因的克隆、鉴定与序列分析

对重组质粒 pMD18-T-IL2 和 pMD18-T-IL4 的 PCR 鉴定及 *Eco*RI+*Hind*III 酶切鉴定结果见图 4,得到了与目的基因大小一致的片段。初步证明克隆

到了目的基因,并成功插入到 pMD18-T 载体。进一步进行 DNA 测序,经 DNAstar 分析,IL-2 基因的开放阅读框为 465 bp,IL-4 基因的开放阅读框为 402 bp,与 GenBank 上登录的 IL-2 基因(A56750)和 IL-4 基因(A68330)cDNA 序列比较,发现其同源性分别为 99.1%和 99.3%,其中 IL-2 基因仅 46 位 C 变为 A,48 位 C 变为 A,461 位 C 变为 A;IL-4 基因 7 位 C 变为 G,48 位 A 变为 T,66 位 C 变为 T。证明所克隆基因为全长的 IL-2 和 IL-4 基因 cDNA。



1. pMD 18T-IL-2 的 PCR 鉴定;2. pMD18 T-IL4 的 PCR 鉴定;3. pMD18T-IL2 的酶切鉴定;4. pMD18T-IL4 的酶切鉴定;M. DNA 分子质量标准

1. PCR identification of pMD18T-IL2;2. PCR identification of pMD18T-IL4;3. pMD18T-IL2 digested by *EcoR* I+*Hind* III;4. pMD18T-IL4 digested by *EcoR* I+*Hind* III; M. DL2000 DNA Marker

图 4 IL-2 和 IL-4 重组质粒的 PCR 和酶切鉴定

Fig. 4 Identification of the recombinant plasmid by PCR and enzyme digestion

3 讨论

3.1 用淋巴细胞分离液通过密度梯度离心即可得到单个核细胞群,其中包括 T、B 淋巴细胞和单核/巨噬细胞,能分泌绝大多数的细胞因子。细胞因子基因一般处于沉默状态,只有在机体需要时或受刺激后才能应激性表达,是一种短暂的自我调节性分子,且不同的细胞因子在刺激后的不同时间段表达,即其表达具有时空性。PHA 是一个 T 细胞特异性的有丝分裂原,能刺激 T 细胞活化,而 LPS 一方面是 B 淋巴细胞特异的有丝分裂原,同时也是单核/巨噬细胞直接的刺激剂。体外刺激培养的淋巴细胞可以模拟特异性抗原刺激,转化为淋巴母细胞,合成并释放出多种细胞因子^[6]。选用 PHA 和 LPS 联合刺激,在不同培养时段收集细胞提取 RNA,一方面可提高细胞因子 mRNA 的种类和丰度,同时降低细胞其他成分 mRNA 的比例,这是一个高质量 cDNA 文库具有多样性和代表性的前提条件,对细胞因子文库的构建尤为重要。同时,收集的单个核细胞群来源于外周血和淋巴结,代表了不同成熟阶段及不同特征的

单个核细胞,进一步增加了所建文库的多样性。

3.2 cDNA 文库的容量、插入外源片段的全长性和方向性是衡量 cDNA 表达文库质量高低的重要参数^[7]。笔者选用的 Novagen 公司的 cDNA 表达文库构建试剂盒具有快速、高效、定向构建文库的性能,其文库主要适用于免疫学和核酸探针杂交高通量筛选,同时也适于 PCR 技术克隆扩增。一般来说,当一个 cDNA 文库的容量为 $4.6 \times 10^4 \sim 4.6 \times 10^5$ 时,能得到目的克隆的概率可达 99%,从而能筛选出低丰富的 cDNA 分子^[8]。本研究所构建的文库容量为 8×10^5 ,且插入的片段主要在 300~2 000 bp,在理论上完全满足克隆任何全长细胞因子基因的需要。

3.3 cDNA 表达文库包含了特定组织在某一时期表达的完整 mRNA 信息,分子内不含内含子序列和调控序列,而且与蛋白质的氨基酸序列具有对应性。因此,构建 cDNA 表达文库是克隆已知基因特别是发现新基因的主要手段和途径,这对研究机体细胞基因组的转录表达特征具有重要意义。笔者用已知细胞因子基因的引物,从构建的 cDNA 表达文库中成功地克隆到猪 IL-2 和 IL-4 cDNA 片段,测序分析表明得到了全长的 IL-2 和 IL-4 基因,证明该表达文库质量高,具有一定代表性和多样性,为从文库中高通量地筛选和发现未知细胞因子或其他相关分子奠定了基础。

参考文献:

- [1] Weaver R F. Molecular Biology [M]. Beijing: Science Press, 2004. 75.
- [2] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 北京:科学出版社, 2001. 133~163.
- [3] 景志忠,窦永喜,侯俊琳,等. 猪 IL-18 基因的克隆及序列分析[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(7): 3~7.
- [4] 韦祖樟,黄伟坚. 广西巴马小型猪 IFN- γ 基因的克隆和序列分析[J]. 动物医学进展, 2005, 26(1): 59~61.
- [5] Kuo C T, Leiden J M. Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function[J]. Annu Rev Immunol, 1999, 17: 149~187.
- [6] 卢强,丰培金,李莲瑞,等. 有丝分裂原刺激的鲤鱼外周血白细胞 cDNA 文库的构建[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(6): 568~570.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 费里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京:科学出版社, 2002. 860~864.
- [8] 景志忠,郭爱疆,海岗,等. 猪带绦虫六钩蚴 cDNA 文库的构建及免疫基因的筛选与克隆[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(4): 391~396.