

流感病毒 A 单抗杂交瘤细胞 cDNA 文库的构建

王兴友 陈杭薇 李 兵

【摘要】目的 应用 SuperScript™ RnaseH- Reverse Transcriptase 建库试剂盒建立了流感病毒 A 单抗杂交瘤细胞 cDNA 文库。**方法** 取流感病毒 A 单抗杂交瘤细胞,进行体外培养,提取 mRNA,并将其反转录成 cDNA,与 EcoRI 接头连接后插入 pBluescript SK(+)XR 载体,体外包装后转染到 DH10B 宿主菌中,进行滴度测试及文库扩增。**结果** 构建的流感病毒 A 单抗杂交瘤细胞 cDNA 文库含 1.07×10^6 重组子,重组率 87.5%,插入片段长度约为 500~2000 bp。扩增后的文库浓度为 3.2×10^7 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。**结论** 试验结果表明,该库符合标准,所构建的流感病毒 A 单抗杂交瘤细胞 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;流感病毒;杂交瘤细胞

Construction of cDNA library from hybridoma cells with monoclonal antibody for influenza A virus WANG Xing-you, CHEN Hang-wei, LI Bing. Department of Respiratory Medicine, Beijing General Hospital of Beijing Command, Beijing 100700, China

Corresponding author: CHEN Hang-wei

【Abstract】Objective To construct A cDNA library of hybridoma cells with monoclonal antibody for influenza A virus. **Methods** The hybridoma cell was cultured in vitro. Total RNA of hybridoma cell 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 EcoRI adaptors, which were later ligated to arms of pBluescript SK(+)XR. Ligated cDNAs were packed in vitro, and then infected E. coli DH10B. Titering the plasmid and amplifying the library. **Results** The hybridoma cell cDNA library consisted of 1.07×10^6 recombinants with the length of 500-2 000 bp and the recombinating efficiency was 87.5%. The amplified library was 3.2×10^7 recombinants/ μ l in concentration and the number of negative colony was the most suitable in density after it was diluted to 10^{-6} in concentration. **Conclusions** The constructed cDNA library of hybridoma cell would be helpful to further detecting target genes and preparing gene chips etc.

【Key words】 cDNA library; Construction; Influenza; Hybridoma cell

病毒的感染过程其实就是病毒与宿主或机体相互斗争的过程,所以有关抗体制备和作用的研究历来是人们研究的一个热点。尽管有关流感病毒单抗的研究已进入基因工程时代,但较传统和经典的通过杂交瘤细胞制备单抗的过程与技术最符合感染组学研究的特点要求,因为其具有病毒感染和刺激宿主免疫反应的过程,杂交瘤细胞必然会表现出宿主与流感病毒相互作用的印迹。国内张涛等发现杂交瘤细胞提取物具有明显的抗病毒作用,并认为是该提取物中的免疫核糖核酸在传递宿主的抗病毒信息

而发挥作用^[1]。但有充分的证据表明发挥作用的可能不是免疫核糖核酸^[2],但究竟是什么物质在发挥抗病毒作用目前尚未阐明。鉴于杂交瘤细胞提取物具有肯定的抗病毒作用,我们推测单抗杂交瘤细胞不但能合成分泌相应的单克隆抗体,同时还可能合成分泌其它抗病毒物质。因此从感染组学观念出发,流感病毒单抗杂交瘤细胞基因组的研究是一个值得探索的课题。不但可以从上游“顺藤摸瓜”找到杂交瘤细胞神秘的抗病毒物质的新基因,而且可以拓展和开发其利用价值。因此,构建流感病毒单抗杂交瘤细胞 cDNA 文库具有重要的意义和广泛的应用价值。目前已有多种组织细胞被用于构建 cDNA 文库,但用流感病毒单抗杂交瘤细胞构建 cDNA 文库的研究尚未见报道。我们通过高效的 cDNA 合成技术构建了流感病毒 A 单抗杂交瘤细

基金项目:军队“十一五科技攻关项目基金”资助项目(编号:06G026)

作者单位:100700 北京军区总医院呼吸内科

通讯作者:陈杭薇

胞的 cDNA 文库,为进一步筛选目的基因、制作基因芯片等奠定了可靠的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 库细胞来源 库细胞来自本室构建的流感病毒 A 单抗杂交瘤细胞系 3B2 G5、12 G3D7、3B2 G1。取流感病毒 A 单抗杂交瘤细胞株进行复苏,再用 1640 培养基 37℃ 下培养 10 d 至旺盛生长期,开始收集细胞。

1.1.2 试剂 1640 培养基、TRIZOL 试剂盒、SuperScript™ RNase H- Reverse Transcriptase 文库构建试剂盒及 DH10B 购自 Invitrogen 公司, Oligotex mRNA midi kit、λDNA 包装蛋白购自 QIA GEN 公司, pBluescript SK(+) XR 和 T4 DNA Ligase 购自 Stratagene 公司。

1.2 方法

1.2.1 杂交瘤细胞的培养及总 RNA、mRNA 抽提 培养杂交瘤细胞至旺盛生长期,离心去除培养液后加入 TRIZOL 试剂,裂解细胞并抽提出总 RNA;采用 Oligotex mRNA midi kit 从总 RNA 中纯化出含 PolyA 的 mRNA。

1.2.2 cDNA 链的合成及连接 以 mRNA 为模板,带有 XhoI 酶切位点的 Oligod(T)₁₈ 为引物,在 SuperScript™ RNase H- Reverse Transcriptase 作用下转录出 cDNA 第一链。先以 RNase H 消化 mRNA,然后以断裂的 mRNA 作为二链合成的引物,以 cDNA 一链为模板在 DNA Polymerase I 作用下合成 cDNA 第二链。双链 cDNA 合成后,加 T4DNA 聚合酶削平双链 cDNA 末端, EcoRI Adaptor 在 T4 DNA Ligase 的作用下连接过夜。加完接头的 cDNA 双链先在 T4 PNK 的作用下进行末端磷酸化,然后经内切酶 XhoI 酶切消化后,产生 XhoI 黏性末端。

1.2.3 体外包装 以 Insert:vector = 3:1 的比例将 insert 和载体 pBluescript SK(+) XR 在 T4 DNA Ligase 的作用下连接过夜,连接体系 15 μl。所有的连接产物在转化前通过 Millipore 的膜纯化去除盐离子。电转化:取 1 μl 连接产物电转化商品感受态细胞 DH10B,37℃ 过夜培养后观察生长情况。

1.2.4 文库的扩增 按黄培堂等^[3]的方法扩增文库。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞体外培养及总 RNA 提取及其完整性分析 培养后获得 6.6×10^8 个杂交瘤细胞,提

取的总 RNA 经过紫外分光光度计进行浓度分析。RNA 浓度为 $1.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$,其吸光度 $A_{260}/A_{280} > 1.85$,1.0% 琼脂糖凝胶电泳显示 RNA 的 28S 和 18S 的亮度比例为 1.5~2.5,表明总 RNA 未降解且质量良好,可用于建库(见图 1)。

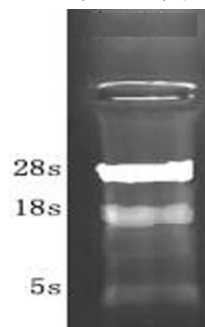


图 1 总 RNA 电泳图

2.2 文库及其鉴定 经 E. coli DH10B 菌株行滴度测试,计数阳性噬斑数,按公式(阳性噬斑数 × 稀释倍数 × 包装反应总体积) 计算得出文库的大小为 1.07×10^6 重组子,重组率为 87.5%。经 EcoRI 酶切后电泳显示 cDNA 插入片段长为 500~2000 bp (见图 2)。经 DH10B 菌株扩增后,滴定测定结果显示扩增后的文库浓度为 3.2×10^7 重组子/μl,将文库稀释到 10^{-6} 时所产生的噬斑密度最为适宜。

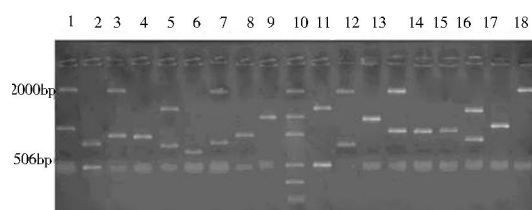


图 2 文库质粒 PCR 扩增片段

M:DNA marker, 1~18 泳道:文库质粒扩增片段

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^[4,5]。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^[6,7]。为了应用基

因表达谱芯片寻找流感病毒与机体相互作用的相关基因,建立高质量的流感病毒 A 单抗杂交瘤细胞 cDNA 文库是十分必要的。我们构建此文库主要是为我们进行流感病毒的感染组学研究奠定基础。

典型的哺乳动物细胞含有约 12 000 种不同的 mRNA 序列,其中低丰度的 mRNA < 14 拷贝/细胞⁻¹。要克隆低丰度 mRNA,可按照 Clare 的公式计算文库的大小: $N = \ln(1-P) / \ln(1-1/n)$ (N 为所需克隆数, P 为要求的概率, $1/n$ 为低丰度 mRNA 在总 mRNA 中所占的相对比例)。若要求以 99 % 的概率得到一低丰度 mRNA 的克隆,则所要求的文库克隆数为 1.7×10^5 。我们所建的文库库容为 1.07×10^6 ,已超过了这一标准,应适合于筛选目的克隆,不仅可为流感病毒与机体相互作用的基因机制的研究奠定基础,还可为挖掘和探索流感病毒单抗杂交瘤细胞的抗病毒作用提供新的线索。

新近有研究资料表明,cDNA 文库的构建除上述种种用途,还可以应用于 RNA 干扰领域^[8]。我们已经从该文库中挑取克隆,并转染 DH10B 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,可以用于后续研究。

参 考 文 献

- 1 张涛,封江南. 杂交瘤细胞核糖核酸抗病毒作用. 中国免疫学杂志,1999,15:542-544.
- 2 冯来坤,闫肃,刘景会,等. 从理论角度看免疫核糖核酸的疗效. 中国生化药物杂志,1999,20:106-107.
- 3 黄培堂,王嘉玺,朱厚础,等. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京:科学出版社,2003:909-916.
- 4 Xu ZD, Jablons DM, Gruenert DC. Expression sequence tag-specific full-length cDNA cloning: actin cDNAs. Gene, 2001, 263: 265-272.
- 5 Sims AH, Robson GD, Hoyle DC, et al. Use of expressed sequence tag analysis and cDNA microarrays of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Fungal Genetics and Biology, 2004, 41:199-212.
- 6 Christopher T, Dimitri S, Victor J, et al. Construction of a zebrafish cDNA microarray: gene expression profiling of the zebrafish during development. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 296:1134-1142.
- 7 Mishra RN, Ramesha A, Kaul T, et al. A modified cDNA subtraction to identify differentially expressed genes from plants with universal application to other eukaryotes. Anal Biochem, 2005, 345:149-157.
- 8 Cheng D, Baosheng G, Xiaoyan F, et al. Generation of variable and fixed length siRNA from a novel siRNA expression vector. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345:99-105.

(收稿日期:2007-01-23)

· 简 讯 ·

中华医学会 75 种杂志已被 2006 年度 《中国科技期刊引证报告》(核心版) 收录

中华医学会系列杂志 113 种,其中 75 种已被 2006 年度《中国科技期刊引证报告》(核心版),1652 种) 收录;2006 年并新增 7 种期刊被其核心库收录,除《中华全科医师杂志》、《国际儿科学杂志》、《国际皮肤性病学杂志》、《国际脑血管病杂志》、《国际内分泌代谢杂志》、《国际呼吸杂志》外,《肿瘤研究与临床》亦被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。中华医学会系列杂志成为该数据库的重要统计源,既是对这些期刊既往工作成绩的肯定,也是对中华医学会系列杂志大家庭的鼓励和鞭策。