

从 Raji 细胞克隆 IL-10 基因

陈其新¹, 劳风学², 李明¹ (1. 河南农业大学, 河南郑州 450002; 2. 北京市医药器械学校, 北京 100012)

摘要 [目的] 探索一种简便可行的白细胞介素 10(IL-10) 基因的克隆方法。[方法] 以人 Burkitt's 淋巴瘤细胞系 Raji 细胞为材料, 提取培养的 Raji 细胞中的总 RNA。根据 GenBank 中人 IL-10 基因序列设计 1 对特异性引物, 用 RT-PCR 方法扩增人 IL-10 基因的编码 cDNA。回收目的片段, 将其与 pMD18-T 载体连接并转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5, 构建该基因的重组质粒。重组质粒经 PCR 和双酶切鉴定后进行测序。[结果] 以骨髓细胞组织总 RNA 为模板进行 RT-PCR, 可从 Raji 细胞中获得了预期的约 550 bp 特异性条带。成功构建了 IL-10 基因的重组质粒, PCR 扩增和双酶切的鉴定结果说明该插入片段可能为 IL-10 cDNA。从获得的阳性克隆中挑选 1 个菌落来分析重组质粒的插入 DNA 片段序列。序列分析结果证实其与报道的 IL-10 基因的序列一致。[结论] 该研究为 IL-10 的重组表达及其生物学活性分析奠定了基础。

关键词 IL-10; Raji; 克隆; 序列分析

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)36-11764-02

Study on the Cloning of IL-10 Gene in Human Raji Cells

CHEN Q-xin et al (Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract [Objective] The aim of the research was to discuss a simple and feasible method of cloning human interleukin 10(IL-10) gene. [Method] With Raji cells of human Burkitt's lymphoma cell line as materials, total RNA was extracted from the cultured Raji cells. A pair of specific primers was designed according to the sequence of human IL-10 gene and the coded cDNA of human IL-10 gene was amplified by the method of RT-PCR. After being reclaimed, the target fragments were connected with pMD18-T vector and transformed into competent cell DH5 of Escherichia coli to construct the recombinant plasmid of this gene. The recombinant plasmid was identified by PCR and double-enzyme digestion and sequenced. [Result] With total RNA of bone marrow cell tissue as template, RT-PCR was conducted and about 550 bp specific band was obtained from Raji cells. The recombinant plasmid of IL-10 gene was successfully constructed. The identification results of PCR amplification and double-enzyme digestion indicated that this inserted fragment was IL-10 cDNA possibly. One colony was selected from the obtained positive clones to analyze the inserted DNA fragment sequence of the recombinant plasmid. The results of the sequence analysis proved that it was accordant with the sequence of the reported IL-10 gene. [Conclusion] This research laid the foundation for the recombinant expression of IL-10 and the analysis of its biological activity.

Key words IL-10 gene; Raji cell; Cloning; Sequence analysis

白细胞介素 10 (IL-10) 是人体多种细胞产生的重要免疫调节因子, 具有广泛的生物学活性, 其主要的生物学功能是限制和终止炎症反应, 调节多种免疫细胞的分化和增殖, 同时具有调理免疫刺激以及清除感染和非感染颗粒的作用^[1-2]。IL-10 蛋白前体由 178 个氨基酸残基组成, 分子量 (M) 约为 18 kD, 其成熟蛋白含有 160 个氨基酸。目前国内外都已有克隆人 IL-10 基因并进行重组表达的报道, 但这些研究中获取 IL-10 基因的方法都存在相对繁琐或是取材不便的缺点^[3-5]。因此, 笔者以医学实验室常用的人 Burkitt's 淋巴瘤细胞系 Raji 细胞为材料, 旨在探索一种简便可行的人 IL-10 基因克隆方法, 为 IL-10 的重组表达及其生物学活性分析奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 人 B 淋巴细胞白血病 Raji 细胞株由实验室保存; Raji 培养液 RPM-1640、灭活胎牛血清均购自 Gibco 公司; 限制性内切酶、TRIzol RNA 提取试剂盒、一步法逆转录试剂盒 (Takara one step RNA PCR kit)、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、pMD18-T 载体均由 Takara 宝生物工程 (大连) 有限公司提供; 大肠杆菌 DH5 感受态细胞、DNA 分子量标准、PCR 及 DNA 回收试剂盒等均购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 其他常规化学试剂为进口或国产分析纯, 购自北京鼎国生物技术有限公司; 寡聚核苷酸引物由北京三博远志公司合成。

1.2 细胞培养及总 RNA 提取 用含 10% 胎牛血清的 RPM-1640 培养液传代培养, 实验时取处于对数生长期的细胞提取

总 RNA。离心收集约 10^7 个 Raji 细胞, 用预冷灭菌的 PBS 洗涤沉淀, 以 TRIzol RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 细胞总 RNA 提取方法参照试剂盒说明书进行。

1.3 引物设计与合成 根据 GenBank 中登录的人 IL-10 序列 (NM000572), 用 Oligo 6 软件设计 1 对引物。为便于以后的克隆表达, 在引物的末端设计了酶切位点, 并加了保护碱基。上游引物 ILP1: 5'-GCGGGATCCATGCACAGCTCAGCACTGCTC-TG3', 添加有 Bam H 酶切位点; 下游引物 ILP2: 5'-CGCGTGCACCTTATCAGTTTCGTATCTTCATTGTCATGTIAG-3', 添加有 Sal I 酶切位点。

1.4 RT-PCR 按下列组成在 PCR 反应管中调制反应液: 10 × core step RNA PCR buffer 5 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 10 μl, 10 mmol/L dNTP 5 μl, RNAase inhibitor (40 U/ml) 1 μl, AMV-Optimized Taq 1 μl, AMV RTase XL (5 U/ml) 1 μl, ILP1 (20 μM) 1 μl, ILP2 (20 μM) 1 μl, RNA 10 μl, RNAase free dH₂O 15 μl, 总体积 50 μl。反应条件为: 50 °C 30 min, 预变性 94 °C 2 min, 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 最后延伸 72 °C 10 min。反应结束后, 取反应液 5 μl 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 鉴定反应产物。

1.5 PCR 扩增产物的克隆与鉴定 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳, 用 DNA 凝胶纯化试剂盒回收 PCR 产物。将回收的目的片段与载体 pMD18-T 在 T4 DNA 连接酶作用下连接, 将连接产物命名为 pMD18-T-IL10。连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5, 涂抹于含氨苄青霉素、x-gal、IPTG 的 LB 琼脂平板, 37 °C 培养 16 h。选取白色菌斑 5~10 个, 用碱裂解法快速提取质粒^[6]。先以 ILP1 和 ILP2 为引物, 对提取的质粒进行 PCR 扩增; 然后选取部分质粒, 用 Bam H I / Sal I 双酶切。PCR 产物和双酶切产物均进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 筛选出含

基金项目 河南省教育厅自然科学基金项目 (2007230003); 河南省科技攻关项目 (052403011)。

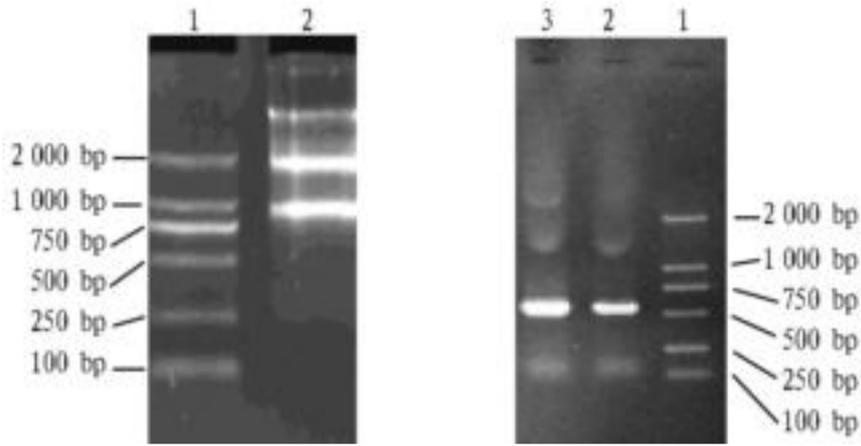
作者简介 陈其新 (1965-), 男, 甘肃景泰人, 博士后, 副教授, 从事动物遗传繁殖研究。

收稿日期 2007-07-19

D pMD18-T-IL10G 的阳性转化子。最后选择 1 个克隆,送交上海生工生物技术公司测序。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取 从 Rji 细胞提取的总 RNA 可看到明显的 28S rRNA、18S rRNA、5S rRNA 3 条带(图 1)。



注:1 为 DL2000 marker;2 为 RNA。 注:1 为 DL2000 marker; 2~3 为 RT-PCR product。

图1 总 RNA 琼脂糖电泳 图2 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

2.2 RT-PCR 以骨髓细胞组织总 RNA 为模板,进行 RT-PCR,对 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析,可见约 550 bp 特异性条带,与预期 DNA 片段大小相符(图 2)。

2.3 pMD18-T-IL10 的 PCR 和酶切鉴定 将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,回收提纯后克隆至 pMD18-T 载体,根据蓝白斑筛选阳性克隆,分别用 PCR 扩增以及 Bam HI/ Sal I 双酶切

入 DNA 片段序列,证实与国内外文献报道的 IL-10 基因的序列一致(图 5)。从插入位点分析来看,预先设计的上、下游酶切位点等重要部件都完好无损。

| | | |
|--------------|--|-----|
| pMD18-T-IL10 | ATTGCGGGATCCATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTGGCC | 40 |
| NM000572 | ATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTGGCC | 28 |
| Consensus | atgcacagctcagcaactgctctgtggcc | |
| pMD18-T-IL10 | TGGTCCTCCTGACTGGGGTGAGGGCCAGCCAGGCCAGGG | 80 |
| NM000572 | TGGTCCTCCTGACTGGGGTGAGGGCCAGCCAGGCCAGGG | 68 |
| Consensus | tggctcctcctgactggggtgaggccagccagggcaggg | |
| pMD18-T-IL10 | CACCCAGTCTGAGAACAGCTGCACCCACTTCCCAGGCAAC | 120 |
| NM000572 | CACCCAGTCTGAGAACAGCTGCACCCACTTCCCAGGCAAC | 108 |
| Consensus | caccagctctgagaacagctgcaccacttcccaggcaac | |
| pMD18-T-IL10 | CTGCCTAACATGCTTCGAGATCTCCGAGATGCCTTCAGCA | 160 |
| NM000572 | CTGCCTAACATGCTTCGAGATCTCCGAGATGCCTTCAGCA | 148 |
| Consensus | ctgcctaacatgcttcgagatctccgagatgccttcagca | |
| pMD18-T-IL10 | GAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATCAGCTGGACAA | 200 |
| NM000572 | GAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATCAGCTGGACAA | 188 |
| Consensus | gagtgaagactttctttcaaatgaaggatcagctggacaa | |
| pMD18-T-IL10 | CTTGTGTGTTAAAGGAGTCCTTGTCTGGAGGACTTTAAGGGT | 240 |
| NM000572 | CTTGTGTGTTAAAGGAGTCCTTGTCTGGAGGACTTTAAGGGT | 228 |
| Consensus | cttgtgtgtaaaggagtcttgtctggaggactttaagggt | |
| pMD18-T-IL10 | TACCTGGGTTGCCAAGCCTTGTCTGAGATGATCCAGTTTT | 280 |
| NM000572 | TACCTGGGTTGCCAAGCCTTGTCTGAGATGATCCAGTTTT | 268 |
| Consensus | tacctgggttgccaagccttgtctgagatgatccagtttt | |
| pMD18-T-IL10 | ACCTGGAGGAGGTGATGCCCAAGCTGAGAACCAAGACCC | 320 |
| NM000572 | ACCTGGAGGAGGTGATGCCCAAGCTGAGAACCAAGACCC | 208 |
| Consensus | acctggaggaggtgatgcccagctgagaaccaagacct | |
| pMD18-T-IL10 | AGACATCAAGCCGCATGTGAACCTCCCTGGGGGAGAACCTG | 360 |
| NM000572 | AGACATCAAGCCGCATGTGAACCTCCCTGGGGGAGAACCTG | 348 |
| Consensus | agacatcaaggcgcattgtaactccctgggggagaacctg | |
| pMD18-T-IL10 | AAGACCCTCAGGCTGAGGCTACGGCCGCTGTCATCGATTTT | 400 |
| NM000572 | AAGACCCTCAGGCTGAGGCTACGGCCGCTGTCATCGATTTT | 388 |
| Consensus | aagaccctcaggctgaggctacggccgctgtcatcgatttt | |
| pMD18-T-IL10 | TTCCCTGTGAAAACAAGAGCAAGGCCGTTGGAGCAGGTGAA | 440 |
| NM000572 | TTCCCTGTGAAAACAAGAGCAAGGCCGTTGGAGCAGGTGAA | 428 |
| Consensus | ttccctgtgaaaacaagagcaaggccgtggagcaggtgaa | |
| pMD18-T-IL10 | GAATGCCTTTAATAAGCTCCAAGAGAAAGGCATCTACAAA | 480 |
| NM000572 | GAATGCCTTTAATAAGCTCCAAGAGAAAGGCATCTACAAA | 468 |
| Consensus | gaatgcctttaataagctccaagagaaaggcatctacaaa | |
| pMD18-T-IL10 | GCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCATCAACTACATAGAAG | 520 |
| NM000572 | GCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCATCAACTACATAGAAG | 508 |
| Consensus | gccatgagtgagtttgacatcttcatcaactacatagaag | |
| pMD18-T-IL10 | CCTACATGACAATGAAGATACGAAACTGATAAGTCCGACG | 559 |
| NM000572 | CCTACATGACAATGAAGATACGAAACTGA..... | 537 |
| Consensus | cctacatgacaatgaagatacgaaactgataagtcgacg | |

图5 测序克隆插入序列与 GenBank 中公布的人 IL-10 CDS 序列对比

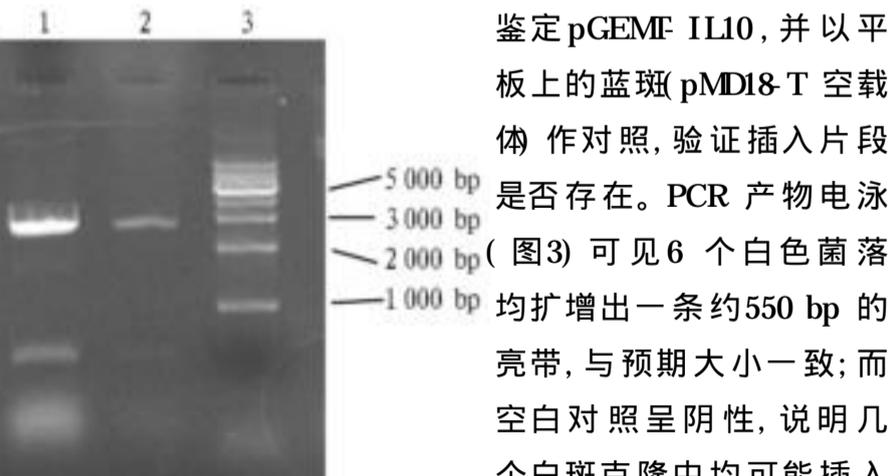
3 讨论

IL-10 是一个通过调节髓来源细胞而发挥对免疫和炎症反应重要影响的多功能细胞因子。IL-10 可通过抑制 Th 细胞的增殖和 IL-2、IFN- γ 、白三烯等细胞因子的产生^[1-2],从而抑制 Th 型免疫应答;IL-10 还可与 IL-3 和 IL-4 协同刺激未成熟肥大细胞的增殖,是 B 细胞有效的增殖和分化因子。此外,IL-10 可与 TGF- β 共同作用,通过抑制一氧化氮(NO)的产生而干扰 IFN- γ 对巨噬细胞(M ϕ)的活化,抑制 NK 细胞产生 IFN- γ 。由于 IL-10 具有很强的抗炎作用,因此认为它在病理情况下可能是一种有效的抗炎物质,可被用于治疗几种与 Th 细胞因子有关的免疫性疾病。

目前获取 IL-10 基因的方法基本都是以外周血或脾脏为材料,提取总 RNA,经 RT-PCR 获得目的基因^[3-5]。在以外周

(下转第 11781 页)

2.4 序列分析结果 在 PCR 扩增、双酶切鉴定得到的阳性克隆中挑选 1 个菌落,制备甘油菌,送上海生工生物技术公司,以 M3+/M3- 引物进行序列测定。分析重组质粒的插入片段可能为 IL-10 cDNA。



注:1~2 为克隆号;3 为 DNA Marker。 图4 pMD18-T-IL10 克隆 Bam HI/ Sal I 双酶切鉴定

鉴定 pGEMF-IL10,并以平板上的蓝斑(pMD18-T 空载体)作对照,验证插入片段是否存在。PCR 产物电泳(图 3)可见 6 个白色菌落均扩增出一条约 550 bp 的亮带,与预期大小一致;而空白对照呈阴性,说明几个白斑克隆中均可能插入外源基因,PCR 结果非污染所致。经 Bam HI/ Sal I 双酶切后,DNA 电泳可见约 540 bp 的酶切带(图 4),同预期的结果一致,进一步证明该插入片段可能为 IL-10 cDNA。

- 0.613 8^{*}), 稻米的胶稠度与垩白粒率和垩白度呈显著负相关(- 0.648 6^{*}, - 0.564 6^{*}), 其他稻米品质性状间无显著相关性。说明稻米垩白粒率越高的品种, 其垩白度也越高, 而其整精米率和胶稠度却越低。

表2 湖南省14个水稻新品种产量构成因子间的相关系数

| 性状 | 单位面积有效穗数 | 穗长 | 总粒数 | 结实率 |
|-------|-------------------------|----------------------|-----------|---------|
| 穗长 | - 0.919 4 ^{**} | | | |
| 每穗总粒数 | - 0.765 6 ^{**} | 0.614 9 [*] | | |
| 结实率 | - 0.143 0 | 0.199 4 | - 0.164 9 | |
| 千粒重 | - 0.352 7 | 0.519 1 | - 0.268 8 | 0.398 1 |

注: ** 表示达1% 极显著水平, * 表示达5% 显著水平, 下同。

表3 湖南省14个水稻新品种稻米品质性状间的相关系数

| 性状 | 整精米率 | 长宽比 | 垩白粒率 | 垩白度 | 胶稠度 |
|--------|------------------------|-----------|------------------------|------------------------|-----------|
| 长宽比 | - 0.263 1 | | | | |
| 垩白粒率 | - 0.624 9 [*] | - 0.426 9 | | | |
| 垩白度 | - 0.613 8 [*] | - 0.2179 | 0.861 1 ^{**} | | |
| 胶稠度 | 0.327 6 | 0.222 9 | - 0.648 6 [*] | - 0.564 6 [*] | |
| 直链淀粉含量 | - 0.242 5 | - 0.306 5 | 0.479 0 | 0.301 9 | - 0.416 7 |

2.3 产量构成因子与稻米品质性状间的相关性 由表4可见, 穗长与稻米胶稠度呈显著正相关(0.5363^{*}), 穗总粒数与米整精米率呈显著正相关(0.5921^{*}), 其他产量构成因子与稻米品质性状间无显著相关性。说明穗长越长的品种, 其稻米胶稠度越高; 穗总粒数越多的品种, 其稻米整精米率越高。

表4 湖南省14个水稻新品种产量构成因子与稻米品质性状间的相关系数

| 性状 | 整精米率 | 长宽比 | 垩白粒率 | 垩白度 | 胶稠度 | 直链淀粉含量 |
|------|----------------------|-----------|-----------|-----------|----------------------|-----------|
| 有效穗数 | - 0.321 8 | 0.253 4 | 0.216 6 | 0.335 5 | - 0.392 8 | - 0.208 3 |
| 穗长 | 0.361 2 | - 0.036 2 | - 0.470 5 | - 0.495 5 | 0.536 3 [*] | 0.096 1 |
| 穗总粒数 | 0.592 1 [*] | - 0.511 6 | - 0.131 0 | - 0.268 1 | 0.104 6 | 0.151 1 |
| 结实率 | - 0.448 4 | - 0.151 8 | 0.232 7 | 0.247 2 | 0.287 1 | 0.092 6 |
| 千粒重 | - 0.295 0 | 0.375 9 | - 0.232 6 | - 0.273 1 | 0.461 5 | - 0.004 4 |

(上接第11765页)

血为材料的方法中, 一般是先用淋巴细胞分离液或采用常规密度梯度法从血液中分离单个核细胞进行体外培养, 提取RNA 前还需加脂多糖或刀豆蛋白等抗原刺激培养, 以诱导目的基因表达, 方法相对比较繁琐。而以脾脏为材料克隆目的基因的方法往往受限于组织材料不容易获得。与外周血单个核细胞和脾淋巴组织不同, 一些淋巴瘤细胞组成性地表达包括IL-10 在内的细胞因子^[7-8], 且有较高的丰度。因此, 以它们为材料, 采用RT-PCR 获得IL-10 等细胞因子基因, 具有简便易行的优点。该研究从B 淋巴瘤细胞 Raji 中扩增出了IL-10 基因, 经分析比对与 GenBank 中登录的相应序列完全一致。IL-10 基因的克隆为进一步进行克隆表达提供了基础。

参考文献

[1] MOORE K W, DE WAAL MALEFYT R, COFFMAN R L, et al. Interleukin 10

3 结论与讨论

稻米品质是一个综合性状, 它涉及到碾米品质、外观品质、蒸煮食味品质和营养品质等方面的多项指标^[12]。通过对湖南省14 个水稻新品种产量构成因子与稻米品质性状相关性的分析, 发现在产量因子中, 单位面积有效穗数、穗长和穗总粒数间的关系密切, 单位面积有效穗数越少、穗长越长, 穗总粒数越多; 在品质性状中, 整精米率、胶稠度、垩白粒率和垩白度间的关系密切, 整精米率和胶稠度均随着垩白粒率和垩白度降低而提高。在产量因子与品质性状间, 穗长和穗总粒数与整精米率和胶稠度关系密切, 随着穗长和穗总粒数的增加, 整精米率和胶稠度随之提高。因此, 在育种过程中, 可将单位面积有效穗数、穗长和穗总粒数作为选育高碾米品质(整精米率)、外观品质(垩白粒率和垩白度)和蒸煮品质(胶稠度)水稻新品种的依据。

参考文献

- [1] 陈烈臣, 徐庆国, 陈爱纯. 湖南优质稻米产业化发展现状及对策[J]. 作物研究, 2003, 17(4): 166-169.
- [2] 彭灵佳, 肖层林. 杂交水稻稻米品质遗传与育种研究进展[J]. 作物研究, 2006, 20(5): 405-408.
- [3] 罗玉坤, 朱智伟, 金连登, 等. 从普查结果看我国水稻品种品质的现状[J]. 中国稻米, 2002(1): 5-9.
- [4] 罗玉坤, 朱智伟, 陈能, 等. 中国主要稻米的粒型及其品质特性[J]. 中国水稻科学, 2004, 18(2): 135-139.
- [5] 刘卉琳, 周美兰. 灌浆期环境因素对稻米垩白及品质形成的影响[J]. 作物研究, 2006, 20(5): 393-396.
- [6] 朱洪霞, 王正银, 董燕, 等. 肥料对稻米品质的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2007(1): 9-12.
- [7] 夏加发, 李泽福, 陈多璞, 等. 安徽省优质稻米品质性状的相关性研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(23): 6081-6084.
- [8] 王丹英, 章秀福, 朱智伟, 等. 食用稻米品质性状间的相关性分析[J]. 作物学报, 2005, 31(8): 1086-1091.
- [9] 任鄞胜, 汪秀志, 肖培村, 等. 杂交水稻稻米品质性状的相关及聚类分析[J]. 中国水稻科学, 2004, 18(2): 130-134.
- [10] 黄利兴, 张以华, 雷上平, 等. 籼型三系杂交晚稻稻米品质性状杂种优势的遗传分析[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, 35(5): 449-455.
- [11] 历艳志, 马建, 沙录, 等. 北方粳稻稻米品质性状的遗传效应分析[J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29(1): 7-10.
- [12] 黄文章, 赵正武, 严明建, 等. 稻米品质性状的变异性研究[J]. 西南农业学报, 2005, 18(6): 871-873.

and the interleukin 10 receptor[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19(4): 683-765.

- [2] 任大宾, 孙仁宇. 白介素10 的抗炎功能及其分子机制[J]. 国外医学: 呼吸系统分册, 2005, 25(3): 175-178.
- [3] 孙杰, 李伯安, 戚扬, 等. 人IL-10 基因的克隆表达及表达产物活性的初步鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(3): 220-223.
- [4] 孙世波, 邵升, 张新宇. 人白细胞介素-10 基因的克隆与逆转录病毒载体的构建[J]. 中华实验外科杂志, 2006(9): 1064-1066.
- [5] 杨红, 罗少洪, 彭立胜, 等. 人白细胞介素10 的克隆及分泌表达[J]. 广东药学院学报, 2003(1): 48-50.
- [6] 萨姆布鲁克J, 拉塞尔D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 俞源, 陈添弥, 译. 北京: 科学出版社, 2003.
- [7] STHNKE J W, BAREKZI E, HAGMAN J, et al. Functional analysis of 571 IL-10 promoter polymorphisms reveals a repressor element controlled by sp1[J]. J Immunol, 2004, 173: 3215-3222.
- [8] ROZANGELA VERLENGA, RENATA GORJAO, CARLA CRISTINE KANUN FRE, et al. Gens regulated by arachidonic and oleic acids in Raji cells[J]. Lipids, 2003, 38: 1157-1165.