

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810070798.1

[51] Int. Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/28 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12Q 1/66 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 8 月 27 日

[11] 公开号 CN 101250552A

[22] 申请日 2008.3.21

[21] 申请号 200810070798.1

[71] 申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路 422 号

[72] 发明人 俞春东 赵 扬 陈 强 成 卓

[74] 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所
代理人 马应森

权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 2 页

[54] 发明名称

肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒与构建方法
及其应用

[57] 摘要

肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒与构建方法及其应用, 涉及一种基因。提供一种基于荧光素酶报告基因的肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒与构建方法及其应用。从小鼠基因组 DNA 中采用 PCR 方法扩增肿瘤坏死因子 α 基因启动子及 3' 端非翻译序列, 再克隆至质粒 pGL3 的荧光素酶报告基因两侧的克隆位点。肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的荧光素酶基因由肿瘤坏死因子 α 基因启动子及 3' 端非翻译序列驱动, 荧光素酶基因的表达水平即反映了肿瘤坏死因子 α 基因的表达水平。肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒用于检测化合物对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响。

1. 肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒, 其特征在于其核心序列为荧光素酶报告基因、肿瘤坏死因子 α 基因启动子及 3'端非翻译序列组成的重组 DNA 序列, 或者通过上述核苷酸序列中的一个或多个核苷酸的缺失、取代或增加而得到的核苷酸序列, 上述核心序列的连接顺序为: 肿瘤坏死因子 α 基因启动子-荧光素酶报告基因- 肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列。

2. 如权利要求 1 所述的肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的构建方法, 包括下列步骤:

1) 从小鼠基因组 DNA 中采用 PCR 方法扩增肿瘤坏死因子 α 基因启动子和肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列;

2) 将肿瘤坏死因子 α 基因的两个调控元件肿瘤坏死因子 α 基因启动子和肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列克隆至质粒 pGL3 的荧光素酶报告基因两侧的克隆位点, 即构建了肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒。

3. 如权利要求 2 所述的肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的构建方法, 其特征在于在步骤 1) 中, PCR 方法扩增肿瘤坏死因子 α 基因启动子和肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列的引物对包括肿瘤坏死因子 α 基因启动子的 PCR 扩增引物对和肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列的 PCR 扩增引物对;

肿瘤坏死因子 α 基因启动子的 PCR 扩增引物对为:

正向引物: 5' AAAGGTACCATTCTGTCTGCTTGTGTCTGTCTTG 3' (下划线标注的序列为限制性内切酶 *Kpn* I 的酶切位点);

反向引物: 5' GGGAAGCTTGGTGTCTTTTCTGGAGGGAGATGTG 3' (下划线标注的序列为限制性内切酶 *Hind* III 的酶切位点);

肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列 (3'-UTR) 的 PCR 扩增引物对为:

正向引物: 5' GGGTCTAGAAAGGAATGGGTGTTCATCCATTCTC 3' (下划线标注的序列为限制性内切酶 *Bam*HI 的酶切位点);

反向引物: 5' AAAGGATCCATGGATGCAGACTTCATCCCAAGAC 3' (下划线标注的序列为限制性内切酶 *Xba*I 的酶切位点)。

4. 稳定转染肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株的建立方法, 其具体步骤为:

1) 将肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒和带新霉素抗性的筛选标记质粒用 *Fugene6* 转染试剂共转染小鼠巨噬细胞株 RAW 264.7;

2) 共转染后, 将小鼠巨噬细胞株 RAW 264.7 消化后转接到细胞培养皿中, 培养液可为 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基, 含 8%~10% 的胎牛血清, 即 FBS;

3) 在培养液中加入 G418 (新霉素类似物), 终浓度为 300~400 $\mu\text{g/mL}$ 进行筛选, 筛选期间换培养液的间隔时间为 3~4 d;

4) 待克隆大小为肉眼可见时, 挑取克隆至多孔板中培养, 每个克隆转接 1 个孔, 待细胞长起后转接至另一多孔板, 每个克隆转接 2 个孔, 用于阳性克隆的筛选;

5) 培养 24 h 后, 在转接克隆的一个孔加入细菌脂多糖至终浓度为 100~200 ng/mL , 5~6 h 后用裂解液裂解细胞, 测定裂解液的荧光素酶活性: 细菌脂多糖刺激下的荧光素酶表达量比细菌脂多糖未刺激的荧光素酶表达量至少有 50 倍增大, 则表明该克隆为阳性克隆, 此克隆即为稳定转染肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株。

5. 如权利要求 4 所述的肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株的可行性验证方法, 其步骤为:

1) 细菌脂多糖刺激时间设定为 0、2、4、6、8、12 h, 每个时间点设定 3 个平行样;

2) 将报告细胞株转接至 96 孔板培养 24 h, 培养液可为 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基, 含 8~10% 胎牛血清;

3) 加入细菌脂多糖至终浓度为 100~200 ng/mL , 根据步骤 1) 的刺激时间进行处理;

4) 在设定的时间点收集培养上清液及细胞裂解液, 测定细胞裂解液的荧光素酶活性, 同时用酶联免疫反应法测定培养上清液中的肿瘤坏死因子 α 的含量, 比较两种方法所得到的结果来验证所构建的稳定转染肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株的可行性。

6. 带有肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的细胞株, 即肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株在检测化合物对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响中的应用。

7. 如权利要求 6 所述的在检测化合物对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响中的应用, 其特征在于检测地塞米松对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响的具体步骤为:

1) 地塞米松浓度设定为 0、10、25、50、100、500 nmol/L , 每个浓度设定 3 个平行样;

2) 将肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株转接至 96 孔板培养 24 h, 培养液可为 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基, 含 8~10% 胎牛血清;

3) 吸掉培养液, 加入含不同地塞米松浓度的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基, 含 8~10% 胎牛血清, 同时加入细菌脂多糖至终浓度为 100~200 ng/mL ;

4) 5~6 h 后, 测定细胞裂解液的荧光素酶活性, 该活性即代表肿瘤坏死因子 α 基因的表达水平, 同时用酶联免疫反应法测定培养上清液中的肿瘤坏死因子 α 的含量, 比较两种方法

的测定结果。

8. 如权利要求 6 所述的在检测化合物对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响中的应用, 其特征在于检测大黄素对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响的具体步骤为:

1) 大黄素浓度设定为 0、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$, 每个浓度设定 3 个平行样;

2) 将肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株转接至 96 孔板培养 24 h, 培养液可为 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基, 含 8~10% 胎牛血清;

3) 吸掉培养液, 加入含不同大黄素浓度的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基, 含 8~10% 胎牛血清, 同时加入细菌脂多糖至终浓度为 100~200 ng/mL;

4) 5~6 h 后, 测定细胞裂解液的荧光素酶活性, 该活性即代表肿瘤坏死因子 α 基因的表达水平, 同时用酶联免疫反应法测定培养上清液中的肿瘤坏死因子 α 的含量, 比较两种方法的测定结果。

肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒与构建方法及其应用

技术领域

本发明涉及一种基因，尤其是涉及一种基于荧光素酶（luciferase）报告基因的肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的构建及其应用。

背景技术

肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是一种具有重要生理功能的细胞因子。肿瘤坏死因子 α 主要由巨噬细胞产生，产生细胞还包括淋巴细胞、自然杀伤细胞、内皮细胞、成纤维细胞、星形胶质细胞、表皮细胞和平滑肌细胞等。肿瘤坏死因子 α 具有广泛的生物学活性，例如：参与炎症反应和免疫应答；抗肿瘤；参与内毒素性休克、动脉硬化、静脉血栓形成和脉管炎等病理过程；引起恶液质。

在医学临床诊断、科学研究等领域，常常需要测定肿瘤坏死因子 α 基因的表达水平。肿瘤坏死因子 α 的传统检测方法基于酶联免疫反应法（Enzyme linked immunosorbent assays, ELISA），其缺点在于过程繁琐、检测操作耗时长、试剂价格昂贵（eBioscience TNF α ELISA 检测试剂盒；Mouse TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha, TNF-alpha, TNF- α) ELISA Ready-SET-Go! CAT#: 88-7324-88)。肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒可有效反映肿瘤坏死因子 α 基因的表达水平（Beutler B, Brown T. A CAT Reporter Construct Allows Ultrasensitive Estimation of TNF Synthesis, and Suggests that the TNF Gene has been Silenced in Non-macrophage Cell Lines. J. Clin. Invest, 1991, 87: 1336-1344），目前常用的肿瘤坏死因子 α 基因的报告基因为氯霉素乙酰基转移酶（chloramphenicol acetyltransferase, CAT）基因，氯霉素乙酰基转移酶的传统检测方法需要使用放射性标记的化合物（J. 萨姆布鲁克，DW 拉塞尔著，黄培堂等译，分子克隆实验指南（第三版），北京：科学出版社，2002，1354-1355），而使用 ELISA 的新方法的缺点上面已有叙述（叶平，方红，周新，等，非诺贝特和吡格列酮对心肌细胞肿瘤坏死因子- α 表达的影响及机制，中国药理学杂志，2004，39（4）：258-261）。

发明内容

本发明旨在提供一种基于荧光素酶（luciferase）报告基因的肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒。

本发明的另一目的在于提供一种肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的构建方法。

本发明的另一目的是应用带有肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的细胞株（即肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株）检测化合物对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响。

本发明所述的肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒构建自商品化质粒 pGL3，即将肿瘤坏死因子 α 基因的两个调控元件肿瘤坏死因子 α 基因启动子（promoter）和肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列（3'-UTR）插入质粒 pGL3 所含的荧光素酶（luciferase）报告基因两侧。构建完成的肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒所含的荧光素酶报告基因的表达由肿瘤坏死因子 α 基因的两个调控元件调控，将肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒稳定转染入细胞后，化合物对荧光素酶报告基因表达的影响即代表该化合物对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响。

可有效反映肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的核心序列为荧光素酶（luciferase）报告基因、肿瘤坏死因子 α 基因启动子（promoter）及 3'端非翻译序列（3'-UTR）组成的重组 DNA 序列，或者通过上述核苷酸序列中的一个或多个核苷酸的缺失、取代或增加而得到的核苷酸序列；可有效反映肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的核心序列的连接顺序为：肿瘤坏死因子 α 基因启动子（promoter）-荧光素酶报告基因- 肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列（3'-UTR）。

本发明所述的肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的构建方法包括下列步骤：

1) 从小鼠基因组 DNA 中采用 PCR 方法扩增肿瘤坏死因子 α 基因启动子和肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列；

2) 将肿瘤坏死因子 α 基因的两个调控元件肿瘤坏死因子 α 基因启动子和肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列克隆至质粒 pGL3 的荧光素酶报告基因两侧的克隆位点，即构建了肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒。

上述构建好的肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的荧光素酶报告基因由肿瘤坏死因子 α 基因启动子和肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列驱动，因此，荧光素酶基因的表达水平即反映了肿瘤坏死因子 α 基因的表达水平。

在步骤 1) 中，PCR 方法扩增肿瘤坏死因子 α 基因启动子和肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列的引物对包括肿瘤坏死因子 α 基因启动子的 PCR 扩增引物对和肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列的 PCR 扩增引物对。

肿瘤坏死因子 α 基因启动子的 PCR 扩增引物对为：

正向引物：5' AAAGGTACCATTCTGTCTGCTTGTGTCTGTCTTG 3'（下划线标注的序列为限制性内切酶 *Kpn* I 的酶切位点）；

反向引物：5' GGGAAAGCTTGGTGTCTTTTCTGGAGGGAGATGTG 3'（下划线标注的序

列为限制性内切酶 *Hind* III 的酶切位点)。

肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列 (3'-UTR) 的 PCR 扩增引物对为:

正向引物: 5'GGGTCTAGAAGGGAATGGGTGTTTCATCCATTCTC 3' (下划线标注的序列为限制性内切酶 *Bam*HI 的酶切位点);

反向引物: 5'AAAGGATCCATGGATGCAGACTTCATCCCAAGAC 3' (下划线标注的序列为限制性内切酶 *Xba*I 的酶切位点)。

以下给出稳定转染肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株的建立方法, 其具体步骤为:

1) 将肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒和带新霉素抗性的筛选标记质粒用 Fugene6 转染试剂共转染小鼠巨噬细胞株 RAW 264.7;

2) 共转染后, 将小鼠巨噬细胞株 RAW 264.7 消化后转接到细胞培养皿中, 培养液可为 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM) (含 8%~10% 的胎牛血清, 即 FBS);

3) 在培养液中加入 G418 (新霉素类似物) (终浓度为 300~400 μ g/mL) 进行筛选; 筛选期间换培养液的间隔时间为 3~4 d;

4) 待克隆大小为肉眼可见时, 挑取克隆至多孔板中培养, 每个克隆转接 1 个孔, 待细胞长起后转接至另一多孔板, 每个克隆转接 2 个孔, 用于阳性克隆的筛选;

5) 培养 24 h 后, 在转接克隆的一个孔加入细菌脂多糖 (LPS) 至终浓度为 100~200 ng/mL, 5~6 h 后用裂解液裂解细胞, 测定裂解液的荧光素酶活性: 细菌脂多糖刺激下的荧光素酶表达量比细菌脂多糖未刺激的荧光素酶表达量至少有 50 倍增大, 则表明该克隆为阳性克隆, 此克隆即为稳定转染肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株。

上述所得的肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株需进行可行性验证, 即在细菌脂多糖 (LPS) 刺激的不同时间点测定肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株的裂解液的荧光素酶活性, 同时用酶联免疫反应法 (ELISA) 测定上清液中的肿瘤坏死因子 α 的含量, 根据比较两种方法的结果来判断此报告细胞株的可行性, 其步骤为:

1) 细菌脂多糖刺激时间设定为 0、2、4、6、8、12 h, 每个时间点设定 3 个平行样;

2) 将报告细胞株转接至 96 孔板培养 24 h, 培养液可为 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (含 8~10% 胎牛血清);

3) 加入细菌脂多糖至终浓度为 100~200 ng/mL, 根据步骤 1) 的刺激时间进行处理;

4) 在设定的时间点收集培养上清液及细胞裂解液, 测定细胞裂解液的荧光素酶活性, 同时用酶联免疫反应法测定培养上清液中的肿瘤坏死因子 α 的含量, 比较两种方法所得到的结

果来验证所构建的稳定转染肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株的可行性。

可应用肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株检测化合物对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响。例如，应用肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株检测地塞米松（DEX）和大黄素（emodin）对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响。

检测地塞米松（DEX）对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响的具体步骤为：

1) 地塞米松浓度设定为 0、10、25、50、100、500 nmol/L，每个浓度设定 3 个平行样。

2) 将肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株转接至 96 孔板培养 24 h，培养液可为 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基（含 8~10% 胎牛血清）。

3) 吸掉培养液，加入含不同地塞米松（DEX）浓度的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基（含 8~10% 胎牛血清），同时加入细菌脂多糖（LPS）至终浓度为 100~200 ng/mL。

4) 5~6 h 后，测定细胞裂解液的荧光素酶活性，该活性即代表肿瘤坏死因子 α 基因的表达水平，同时用酶联免疫反应法测定培养上清液中的肿瘤坏死因子 α 的含量，比较两种方法的测定结果。

检测大黄素（emodin）对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响的具体步骤为：

1) 大黄素浓度设定为 0、25、50、100 μ mol/L，每个浓度设定 3 个平行样。

2) 将肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株转接至 96 孔板培养 24 h，培养液可为 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基（含 8~10% 胎牛血清）。

3) 吸掉培养液，加入含不同大黄素浓度的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基（含 8~10% 胎牛血清），同时加入细菌脂多糖至终浓度为 100~200 ng/mL。

4) 5~6 h 后，测定细胞裂解液的荧光素酶活性，该活性即代表肿瘤坏死因子 α 基因的表达水平，同时用酶联免疫反应法测定培养上清液中的肿瘤坏死因子 α 的含量，比较两种方法的测定结果。

肿瘤坏死因子 α 的传统测量方法采用酶联免疫反应法（ELISA），另外，至于采用报告基因的方法已见报道的为氯霉素乙酰基转移酶报告基因，这两种方法都存在如说明书背景技术中阐明的多种缺点，本发明采用荧光素酶报告基因的突出优点为：检测方便、灵敏度高、不使用放射性标记的化合物；经过本发明列举的可行性验证及关于检测化合物对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响的具体应用表明本发明公开的肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒及肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株都具有优良的应用效果。

附图说明

图 1 为肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒结构图。

图 2 为用肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株检测细菌脂多糖 (LPS) 刺激时间对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响的结果。在图 2 中, 横坐标为时间 (h), 纵坐标为荧光素酶活性。

图 3 为利用肿瘤坏死因子 α ELISA 检测试剂盒检测细菌脂多糖 (LPS) 刺激时间对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响的结果。在图 3 中, 横坐标为时间 (h), 纵坐标为肿瘤坏死因子 α (pg/mL)。

图 4 为用肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株检测地塞米松对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响的结果。在图 4 中, 横坐标为地塞米松 (nmol/L), 纵坐标为荧光素酶活性 (%)。

图 5 为用肿瘤坏死因子 α ELISA 检测试剂盒检测地塞米松对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响的结果。在图 5 中, 横坐标为地塞米松 (nmol/L), 纵坐标为肿瘤坏死因子 α (%)。

图 6 为利用肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株检测大黄素 (emodin) 对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响的结果。在图 6 中, 横坐标为大黄素 (μ mol/L), 纵坐标为荧光素酶活性 (%)。

图 7 为用肿瘤坏死因子 α ELISA 检测试剂盒检测大黄素对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响的结果。在图 7 中, 横坐标为大黄素 (μ mol/L), 纵坐标为肿瘤坏死因子 α (%)。

具体实施方式

实施例 1

构建肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒, 具体步骤为:

1) 从小鼠基因组 DNA 中采用 PCR 方法扩增肿瘤坏死因子 α 基因启动子 (promoter) 及 3'端非翻译序列 (3'-UTR);

2) 将肿瘤坏死因子 α 基因启动子 (promoter) 及 3'端非翻译序列 (3'-UTR) 克隆至质粒 pGL3 的荧光素酶基因两侧的克隆位点。

上述构建好的肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的荧光素酶基因由肿瘤坏死因子 α 基因启动子 (promoter) 及 3'端非翻译序列 (3'-UTR) 驱动, 因此, 荧光素酶基因的表达水平即反映了肿瘤坏死因子 α 基因的表达水平。

在步骤 1) 中, 利用 PCR 方法扩增肿瘤坏死因子 α 基因启动子 (promoter) 及 3'端非翻译序列 (3'-UTR), 它们的碱基序列全长分别为 1323 bp 及 807 bp, 其中所用引物对的碱基序列如下所示。

肿瘤坏死因子 α 基因启动子 (promoter) 的 PCR 扩增引物对:

正向引物: 5' AAAGGTACCAATTCTGTCTGCTTGTGTCTGTCTTG 3' (下划线标注的序列为限制性内切酶 *Kpn* I 的酶切位点);

反向引物：5' GGGAAGCTTGGTGTCTTTTCTGGAGGGAGATGTG 3'（下划线标注的序列为限制性内切酶 *Hind* III 的酶切位点）。

肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列（3'-UTR）的 PCR 扩增引物对：

正向引物：5'GGGTCTAGAAGGGAATGGGTGTTTCATCCATTCTC 3'（下划线标注的序列为限制性内切酶 *Bam*H I 的酶切位点）；

反向引物：5'AAAGGATCCATGGATGCAGACTTCATCCCAAGAC 3'（下划线标注的序列为限制性内切酶 *Xba* I 的酶切位点）。

PCR 反应体系（20 μ L）如下：10 $\times$ 反应缓冲液 2 μ L，正向引物 100 ng，反向引物 100 ng，10 mmol/L dNTP 1.5 μ L，模板 DNA 1 ng，Taq DNA 聚合酶 1 μ L，灭菌超纯水补至 20 μ L。上述各组份混匀后，将 PCR 管置于 PCR 仪中，启动反应程序。

扩增肿瘤坏死因子 α 基因启动子（promoter）的 PCR 反应程序如下：

①预变性，95 $^{\circ}$ C、5 min。

②变性，94 $^{\circ}$ C、1 min；复性，61 $^{\circ}$ C、1 min；延伸，72 $^{\circ}$ C、2 min；步骤②共进行 35 个循环。

③反应延续，72 $^{\circ}$ C、7 min。

④样品保存，4 $^{\circ}$ C。

扩增肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列（3'-UTR）的 PCR 反应程序如下：

①预变性，95 $^{\circ}$ C、5 min。

②变性，94 $^{\circ}$ C、1 min；复性，61 $^{\circ}$ C、1 min；延伸，72 $^{\circ}$ C、1.5 min；步骤②共进行 35 个循环。

③反应延续，72 $^{\circ}$ C、7 min。

④样品保存，4 $^{\circ}$ C。

待反应结束，进行琼脂糖凝胶电泳检测，检测后使用 DNA 片段纯化试剂盒（TaKaRa: DNA Fragment Purification Kit(Ver2.0), Code No. DV807A）纯化上述 PCR 扩增产物，具体步骤参照试剂盒说明书。

PCR 扩增出来的肿瘤坏死因子 α 基因启动子（promoter）的碱基序列全长为 1323 bp，具体如下所示：

attctgtctg cttgtgtctg tcttgcggtg ggggagaaac ttctgtgtct ctttaaggag	60
tggagcaggg gacagaggcc tcagttgggtc catgggatcc gggcagagca aagagacatg	120
aggagcaggg agctcccaga gacatggttg attcacggga gtgaggcagc ttaactgccg	180
gaggagaccc aaaggatgag ctagggagat ccatccaagg gtggagagag atgaggggttc	240
tggggagaag tgactccact ggaggggtggg agagtgttta ggagtgggag ggtgggggag	300

```

gggaatcctt ggaagaccgg ggagtcatac ggattgggag aaatcctgga agcaggggctg 360
tgggacctaa atgtctgagt tgatgtaccg cagtcaagat atggcagagg ctccgtggaa 420
aactcacttg ggagcagggg cccaaagcag cagcctgagc tcatgatcag agtgaaagga 480
gaaggcttgt gaggtccgtg aattcccagg gctgagttca ttccctctgg ggctgccccca 540
tactcatccc attaccccc ccaccagccc tcccaaagcc catgcacact tcccaactct 600
caagctgctc tgccttcagc cacttcctcc aagaactcaa acagggggct ttccctcctc 660
aatatcatgt ctccccctt atgcacccag ctttcagaag cccccccca tgctaagttc 720
tcccccatgg atgtcccatt tagaaatcaa aaggaaatag acacaggcat ggtctttcta 780
caaagaaaca gacaatgatt agctctggag gacagagaag aaatgggttt cagttctcag 840
ggtcctatac aacacacaca cacacacaca cacacacaca caccctcctg 900
attggcccca gattgccaca gaatcctggg ggggacgacg gggaggagat tccttgatgc 960
ctgggtgtcc ccaactttcc aaaccctctg ccccgcgat ggagaagaaa ccgagacaga 1020
ggtgtagggc cactaccgct tcctccacat gagatcatgg ttttctccac caaggaagtt 1080
ttccgagggg tgaatgagag cttttccccg ccctcttccc caagggctat aaaggcggcc 1140
gtctgcacag ccagccagca gaagctccct cagcgaggac agcaagggac tagccaggag 1200
ggagaacaga aactccagaa catcttgga atagctccca gaaaagcaag cagccaacca 1260
ggcaggttct gtccctttca ctactggcc caaggcgcca catctccctc cagaaaagac 1320
acc 1323

```

PCR 扩增出来的肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列 (3'-UTR) 的碱基序列全长为 807

bp, 具体如下所示:

```

agggaaatggg tgttcatcca ttctctaccc agccccact ctgaccctt tactctgacc 60
cctttattgt ctactcctca gagccccag tctgtatcct tctaacttag aaaggggatt 120
atggctcagg gtccaactct gtgctcagag ctttcaacaa ctactcagaa acacaagatg 180
ctgggacagt gacctggact gtgggcctct catgcaccac catcaaggac tcaaatgggc 240
tttccgaatt cactggagtc tcgaatgtcc attcctgagt tctgcaaagg gagagtggtc 300
aggttgctc tgtctcagaa tgaggctgga taagatctca ggccctccta ccttcagacc 360
tttccagatt cttccctgag gtgcaatgcc aagccttctt cacagagcca gccccctca 420
atttatattt gcacttatta tttattattt atttattatt tatttatttg cttatgaatg 480
tatttacttg gaaggccggg gtgtcctgga ggaccagtg tgggaagctg tcttcagaca 540
gacatgtttt ctgtgaaaac ggagctgagc tgtccccacc tggcctctct accttggtgc 600
ctcctctttt gcttaatgtt taaaacaaaa tatttatcta acccaattgt ctaataaacg 660
ctgatttggt gaccaggctg tcgtacatc actgaccctc ttgccccacg ggagccgtga 720
ctgtaatcgc ctacgggtcaa ttgagaaaaa taaagatcgc ttggaaaaga aatgtgattt 780
ctgtcttggg atgaagtctg catccat 807

```

在步骤 2) 中, 质粒 pGL3、肿瘤坏死因子 α 基因启动子 (promoter) 及肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列 (3'-UTR) 的双酶切及连接, 报告质粒的转化、小量提取及鉴定等步骤均参照《分子克隆实验指南》(第三版) (J. 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔著, 黄培堂等译, 分子克隆实验指南 (第三版), 北京: 科学出版社, 2002) 进行。最后, 双酶切鉴定及后续的提交英骏生物技术有限公司进行的测序鉴定表明本发明成功获得了肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒 (参见图 1, “pGL3-TNFPro-UTR” 为根据质粒命名规则命名的肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的名称, “6630bp” 表示肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的碱基序列全长为 6630bp;

“TNF- α promoter”表示肿瘤坏死因子 α 基因启动子；“luciferase”表示荧光素酶报告基因；“TNF- α 3’-UTR”表示肿瘤坏死因子 α 基因 3’端非翻译序列；“*Kpn* I、*Hind* III、*Xba* I、*Bam*HI、*Bgl* II”表示限制性内切酶识别位点，其中，显示为黑体字的限制性内切酶识别位点为本发明在构建肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒时使用的位点。).

构建稳定转染肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株。具体方法为：

1) 将肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒和筛选标记质粒 pCR 3.1 (新霉素抗性) 用 Fugene6 转染试剂共转染小鼠巨噬细胞株 RAW264.7。

2) 共转染后，将细胞消化后转接到细胞培养皿中，培养液可为 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM) (含 8~10% 胎牛血清)。

3) 在培养液中加入 G418 (新霉素类似物) (终浓度为 300~400 $\mu\text{g/mL}$) 进行筛选；筛选期间换培养液的间隔时间为 3~4 d；

4) 待克隆大小为肉眼可见时，挑取克隆至多孔板中培养，每个克隆转接 1 个孔，待细胞长起后转接至另一多孔板，每个克隆转接 2 个孔，用于阳性克隆的筛选；

5) 培养 24 h 后，在转接克隆的一个孔加入细菌脂多糖 (LPS) 至终浓度为 100~200 ng/mL ，5~6 h 后用裂解液裂解细胞，测定裂解液的荧光素酶活性：细菌脂多糖 (LPS) 刺激下的荧光素酶表达量比细菌脂多糖 (LPS) 未刺激的荧光素酶表达量至少有 50 倍增大，则表明该克隆为阳性克隆，此克隆即为稳定转染肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株。

上述所得的稳定转染肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株需进行可行性验证，即在细菌脂多糖 (LPS) 刺激的不同时间点测定肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株的裂解液的荧光素酶活性，同时用酶联免疫反应法 (ELISA) 测定上清液中的肿瘤坏死因子 α 的含量，根据比较两种方法的结果来判断此报告细胞株的可行性，其步骤为：

1) 细菌脂多糖 (LPS) 刺激时间设定为 0、2、4、6、8、12 h，每个时间点设定 3 个平行样；

2) 将肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株转接至 96 孔板培养 24 h，培养液可为 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM) (含 8~10% 胎牛血清)；

3) 加入细菌脂多糖 (LPS) 至终浓度为 100~200 ng/mL ，根据步骤 1) 的刺激时间进行处理；

4) 在设定的时间点收集培养上清液及细胞裂解液，测定细胞裂解液的荧光素酶活性，同

时用酶联免疫反应法（ELISA）测定培养上清液中的肿瘤坏死因子 α 的含量，比较两种方法所得到的结果来验证所构建的肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株的可行性。肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株的可行性验证的结果见图 2 和图 3。

可应用肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株检测化合物对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响，例如检测地塞米松（DEX）对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响，其具体步骤为：

1) 地塞米松（DEX）浓度设定为 0、10、25、50、100、500 nmol/L，每个浓度设定 3 个平行样。

2) 将肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株转接至 96 孔板培养 24 h，培养液可为 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基（DMEM）（含 8~10% 胎牛血清）。

3) 吸掉培养液，加入含不同地塞米松（DEX）浓度的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基（DMEM）（含 8~10% 胎牛血清），同时加入细菌脂多糖（LPS）至终浓度为 100~200 ng/mL。

4) 5~6 h 后，测定细胞裂解液的荧光素酶活性，该活性即代表肿瘤坏死因子 α 基因的表达水平，同时用酶联免疫反应法（ELISA）测定培养上清液中的肿瘤坏死因子 α 的含量，比较两种方法的测定结果。地塞米松（DEX）对肿瘤坏死因子 α 基因的表达水平的影响见图 4 和图 5。

实施例 2

实施例 2 与实施例 1 的不同之处在于实施例 2 应用肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株检测大黄素（emodin）对肿瘤坏死因子 α 基因的表达水平的影响，其具体步骤为：

1) 大黄素（emodin）浓度设定为 0、25、50、100 μ mol/L，每个浓度设定 3 个平行样。

2) 将肿瘤坏死因子 α 基因报告细胞株转接至 96 孔板培养 24 h，培养液可为 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基（DMEM）（含 8~10% 胎牛血清）。

3) 吸掉培养液，加入含不同大黄素（emodin）浓度的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基（DMEM）（含 8~10% 胎牛血清），同时加入细菌脂多糖（LPS）至终浓度为 100~200 ng/mL。

4) 5~6 h 后，测定细胞裂解液的荧光素酶活性，该活性即代表肿瘤坏死因子 α 基因的表达水平，同时用酶联免疫反应法（ELISA）测定培养上清液中的肿瘤坏死因子 α 的含量，比较两种方法的测定结果。大黄素（emodin）对肿瘤坏死因子 α 基因的表达水平的影响见图 6 和图 7。

序列表

PCR 方法扩增肿瘤坏死因子 α 基因启动子和肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列的引物对包括肿瘤坏死因子 α 基因启动子的 PCR 扩增引物对和肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列的 PCR 扩增引物对。

肿瘤坏死因子 α 基因启动子的 PCR 扩增引物对为：

正向引物：5' AAAGGTACCATTCTGTCTGCTTGTGTCTGTCTTG 3'（下划线标注的序列为限制性内切酶 *Kpn* I 的酶切位点）；

反向引物：5' GGGAAGCTTGGTGTCTTTTCTGGAGGGAGATGTG 3'（下划线标注的序列为限制性内切酶 *Hind* III 的酶切位点）。

肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列（3'-UTR）的 PCR 扩增引物对为：

正向引物：5' GGGTCTAGAAGGGAATGGGTGTTTCATCCATTCTC 3'（下划线标注的序列为限制性内切酶 *Bam*HI 的酶切位点）；

反向引物：5' AAAGGATCCATGGATGCAGACTTCATCCCAAGAC 3'（下划线标注的序列为限制性内切酶 *Xba*I 的酶切位点）。

PCR 扩增出来的肿瘤坏死因子 α 基因启动子（promoter）的碱基序列全长为 1323 bp，具体如下所示：

```

attctgtctg cttgtgtctg tcttgcggtg ggggagaaac ttctggtct ctttaaggag      60
tggagcaggg gacagaggcc tcagttggtc catgggatcc gggcagagca aagagacatg      120
aggagcaggc agctcccaga gacatggttg attcacggga gtgaggcagc ttaactgccg      180
gaggagaccc aaaggatgag ctagggagat ccatccaagg gtggagagag atgagggttc      240
tggggagaag tgactccact ggaggggtggg agagtgttta ggagtgggag ggtgggggag      300
gggaatcctt ggaagaccgg ggagtcatac ggattgggag aaatcctgga agcagggtctg      360
tgggacctaa atgtctgagt tgatgtaccg cagtcaagat atggcagagg ctccgtggaa      420
aactcacttg ggagcaggga cccaaagcag cagcctgagc tcatgatcag agtgaaagga      480
gaaggcttgt gaggtccgtg aattcccagg gctgagttca ttccctctgg ggctgccccca      540
tactcatccc attaccccc ccaccagccc tcccaaagcc catgcacact tcccaactct      600
caagctgctc tgccttcagc cacttcctcc aagaactcaa acagggggct ttccctcctc      660
aatatcatgt ctccccctt atgcacccag ctttcagaag cccccccca tgctaagtct      720
tcccccatgg atgtcccatt tagaaatcaa aaggaaatag acacaggcat ggtctttcta      780
caaagaaaca gacaatgatt agctctggag gacagagaag aaatgggttt cagtctctcag      840
ggtcctatac aacacacaca cacacacaca cacacacaca caccctcctg      900
attggcccca gattgccaca gaatcctggt ggggacgacg gggaggagat tccttgatgc      960
ctgggtgtcc ccaactttcc aaaccctctg ccccgcgat ggagaagaaa ccgagacaga      1020
ggtgtagggc cactaccgct tcctccacat gagatcatgg ttttctccac caaggaagtt      1080
ttccgagggg tgaatgagag cttttccccc ccctcttccc caagggtat aaaggcggcc      1140

```

```

gtctgcacag ccagccagca gaagctccct cagcgaggac agcaaggag tagccaggag 1200
ggagaacaga aactccagaa catcttggaa atagctccca gaaaagcaag cagccaacca 1260
ggcaggttct gtccctttca ctactggcc caaggcgcca catctccctc cagaaaagac 1320
acc 1323

```

PCR 扩增出来的肿瘤坏死因子 α 基因 3'端非翻译序列 (3'-UTR) 的碱基序列全长为 807

bp, 具体如下所示:

```

agggaatggg tgttcatcca ttctctaccc agccccact ctgacccctt tactctgacc 60
cctttattgt ctactcctca gagccccag tctgtatcct tctaacttag aaaggggatt 120
atggctcagg gtccaactct gtgctcagag ctttcaacaa ctactcagaa acacaagatg 180
ctgggacagt gacctggact gtgggcctct catgcaccac catcaaggac tcaaattgggc 240
tttccgaatt cactggagtc tcgaatgtcc attcctgagt tctgcaaagg gagagtggtc 300
aggttgcctc tgtctcagaa tgaggctgga taagatctca ggccttccta ccttcagacc 360
tttccagatt cttccctgag gtgcaatgcc aagccttcct cacagagcca gccccctca 420
atztatattt gcacttatta ttattatttt atttattatt tatttatttg cttatgaatg 480
tatttacttg gaaggccggg gtgtcctgga ggaccagtg tgggaagctg tcttcagaca 540
gacatgtttt ctgtgaaaac ggagctgagc tgtccccacc tggcctctct accttgttgc 600
ctcctctttt gcttaatgtt taaaacaaaa tatttatcta acccaattgt ctttaataacg 660
ctgatttggg gaccaggctg tcgtacatc actgaccctc ttgccccacg ggagccgtga 720
ctgtaatcgc ctacgggtcaa ttgagaaaaa taaagatcgc ttggaaaaga aatgtgattt 780
ctgtcttggg atgaagtctg catccat 807

```

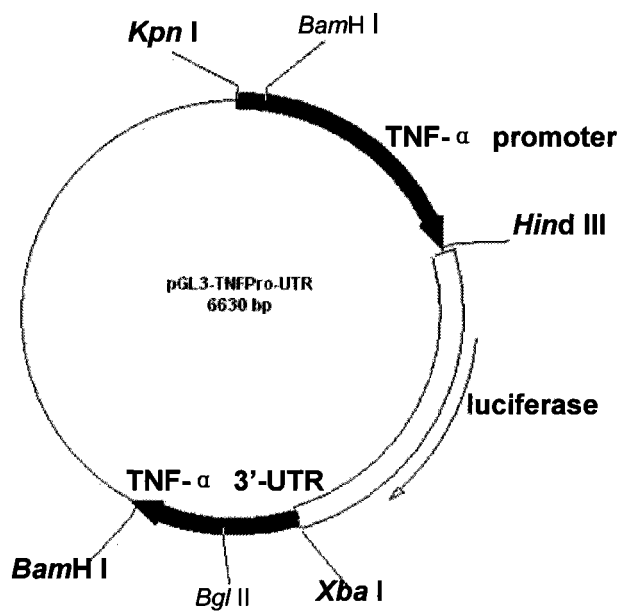


图 1

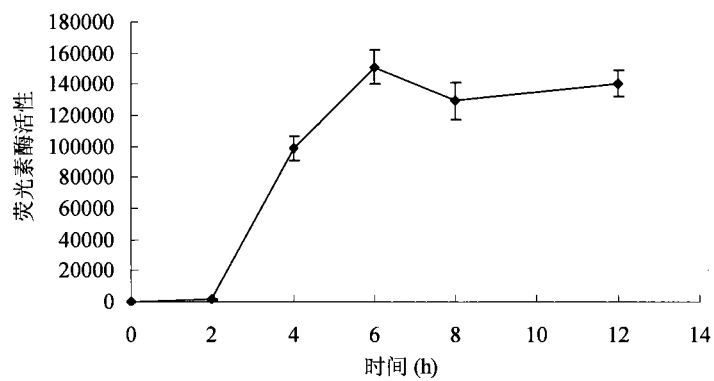


图 2

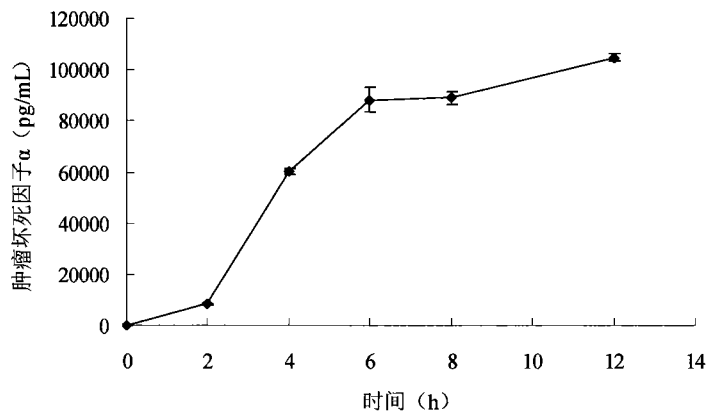


图 3

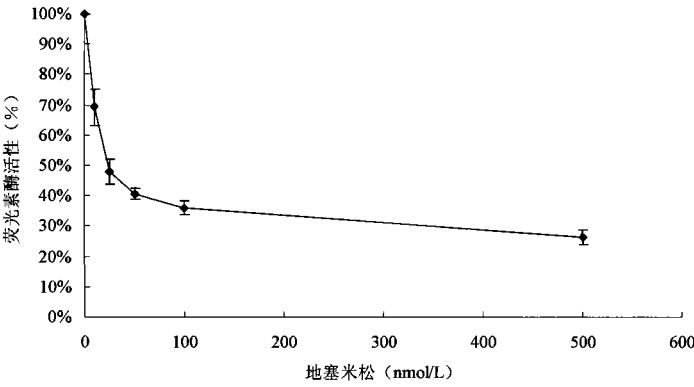


图 4

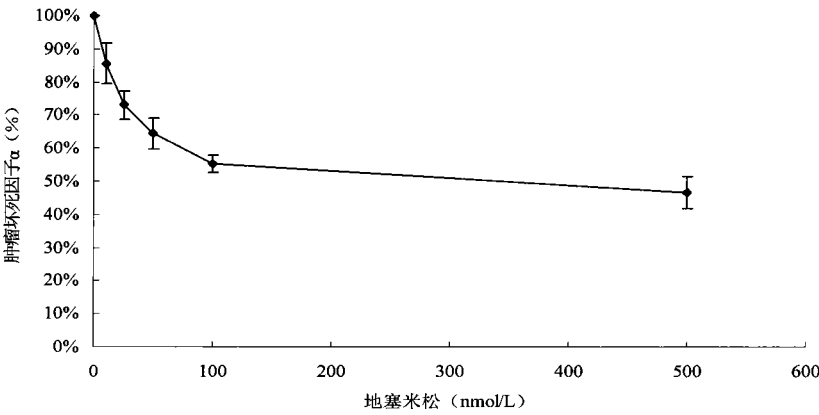


图 5

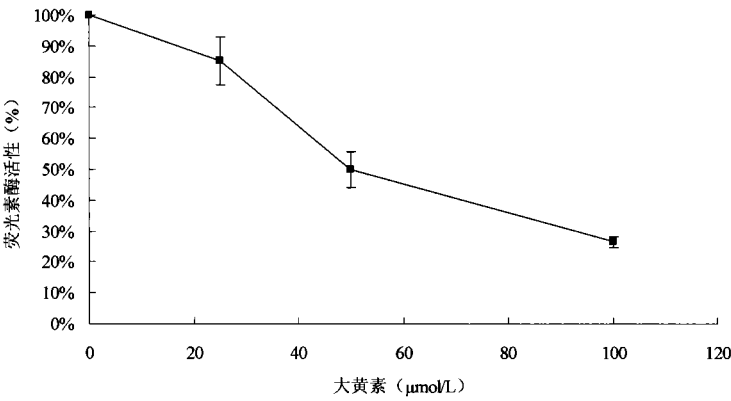


图 6

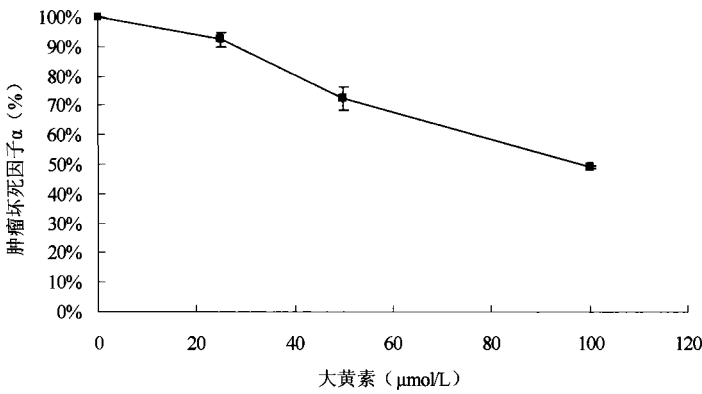


图 7

专利名称(译)	肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒与构建方法及其应用		
公开(公告)号	CN101250552A	公开(公告)日	2008-08-27
申请号	CN200810070798.1	申请日	2008-03-21
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学		
申请(专利权)人(译)	厦门大学		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学		
[标]发明人	俞春东 赵扬 陈强 成卓		
发明人	俞春东 赵扬 陈强 成卓		
IPC分类号	C12N15/85 C12N15/28 C12N5/10 C12Q1/66 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒与构建方法及其应用，涉及一种基因。提供一种基于荧光素酶报告基因的肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒与构建方法及其应用。从小鼠基因组DNA中采用PCR方法扩增肿瘤坏死因子 α 基因启动子及3'端非翻译序列，再克隆至质粒pGL3的荧光素酶报告基因两侧的克隆位点。肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒的荧光素酶基因由肿瘤坏死因子 α 基因启动子及3'端非翻译序列驱动，荧光素酶基因的表达水平即反映了肿瘤坏死因子 α 基因的表达水平。肿瘤坏死因子 α 基因的报告质粒用于检测化合物对肿瘤坏死因子 α 基因表达水平的影响。

```

attctgtctg cttgtgtctg tcttgcttg ggggagaaac ttctgggtct cttaaggag   60
tggagcaggg gacagagggc tcagttggtc catggatcc gggcagagca aagagacatg   120
aggagcaggg agctcccaga gacatgggtg attcagggga gtgaggcagc ttaactgccg   180
gaggagaccc aaaggatgag ctaggagagat ccataccaag gtggagagag atgaggggtc   240
tggggagaag tgactccact ggaggggtgg agagtgttta ggaatggag ggtgggggag   300

```