



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102778570 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 05

(21) 申请号 201210185198. 6

(22) 申请日 2012. 06. 05

(73) 专利权人 海南大学

地址 570228 海南省海口市人民大道 58 号

(72) 发明人 杜丽 王凤阳 焦寒伟 雷明

(74) 专利代理机构 西安弘理专利事务所 61214

代理人 罗笛

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101227922 A, 2008. 07. 23,

US 5705398 A, 1998. 01. 06,

WO 9820347 A1, 1998. 05. 14,

张葵. CD14 的研究进展及临床意义. 《临床检验杂志》. 2003, 第 21 卷 (第 6 期), 367-368.

Ming Lei et al.. siRNA targeting mCD14 inhibits TNF- α , MIP-2, and IL-6 secretion and NO production from LPS-induced RAW264. 7 cells. 《Applied Microbiology and Biotechnology》. 2011, 第 92 卷 (第 1 期), 115-124.

审查员 李进进

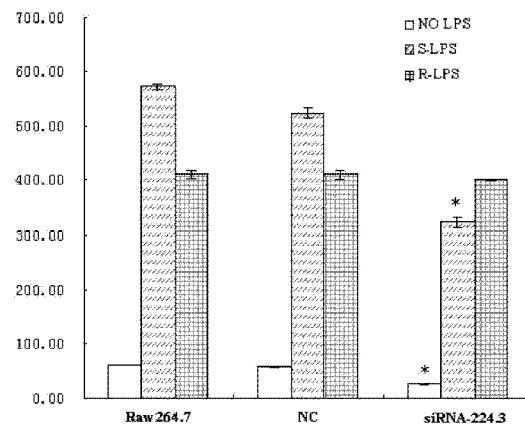
权利要求书3页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

一种鉴别平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种鉴别平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖的方法, 首先合成能有效干扰小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子 (siRNA-224. 3) 及阴性对照 siRNA-NC, 并制备成重组慢病毒; 其次, 将慢病毒感染小鼠巨噬细胞 RAW264. 7, 并用嘌呤霉素筛选出阳性克隆, 构建稳定细胞系 siRNA-224. 3、siRNA-NC; 最后, 应用酶联免疫吸附实验检测分别用平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖刺激条件下表达该小干扰核糖核酸分子的小鼠单核巨噬细胞稳定细胞系细胞上清中的一氧化氮、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6, 通过比较其差异, 实现鉴别平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖。本发明的方法相比现有技术更加方便, 准确性更高。



1. 一种鉴别平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖的方法,其特征在于,该方法按照以下步骤具体实施:

步骤 1、根据膜结合型白细胞分化抗原 14 基因的序列,按照小干扰核糖核酸分子设计的基本原则,合成一对针对膜结合型白细胞分化抗原 14 的小干扰核糖核酸分子 siRNA-224.3;

所述的小干扰核糖核酸分子 siRNA-224.3 的基因序列是:

gggcaguuca cugauauuat t;

步骤 2、将合成好的 siRNA-224.3 包装慢病毒载体

2.1) 制备寡核苷酸:在 Lentivirus-shRNA 模板中的 loop 结构选用 TTCAAGAGA;在正义链模板的 5' 端添加 T,与 Hpa I 酶切后形成的粘端互补;在反义链模板的 5' 端添加 AGCT,与 Xho I 酶切后形成的粘端互补;T4 连接酶连接而成重组载体;

2.2) 对 Lentivirus-shRNA 模板退火,参照表 1 配置退火体系:

表 1 Lentivirus-shRNA 模板的退火体系

组分	体积 (u1)
10 倍 T4 DNA 连接酶缓冲液	5
正义链 (100uM)	5
反义链 (100uM)	5
水	35
总体积	50

退火条件是:93-95 °C 时为 5-6min;83-85 °C 时为 5-6min;73-75 °C 时为 5-6min;68-70 °C 时为 5-6min;4 °C -5 °C 的环境中保存;将得到的退火产物稀释 50-52 倍至终浓度为 200-220nM,用于连接反应;

2.3) 构建 Lentivirus-shRNA 载体,参照表 2 配置连接体系:

表 2 Lentivirus-shRNA 载体的连接体系

组分	体积 (u1)
10 倍 T4 DNA 连接酶缓冲液	2
XhoI+Hpa I 酶切后的慢病毒载体	1
模板 (100nM)	1
T4 DNA 连接酶 (5 weissU/u1)	1
水	15

总体积	20
-----	----

在 22°C 环境中静置 1h 后, 转化 DH5 α ;

2. 4) 转染重组质粒以及制备病毒液

293T 细胞常规培养于 10% 的 FBS+DMEM, 37°C, 5% 的 CO₂ 环境条件中; 在转染前一天按 3×10^6 cell/皿 的密度接种 293T 细胞于 10cm 细胞培养皿中, 使转染时细胞密度能达到 90% -95%, 每皿加 9ml 的 10% FBS+DMEM, 37°C, 5% 的 CO₂ 环境中培养过夜;

2. 4. 1) 转染前 2h 将 6 皿细胞进行换液, 10% FBS+DMEM, 每皿 5ml ;

2. 4. 2) 取 2 个无菌的 1. 5ml 的 EP 管, 分别加入 500ul 的无血清 DMEM, 并标记为①、②号管 ;

2. 4. 3) 往①号管中加入穿梭质粒 pGLV-U6-EGFP-shRNA-224 共 40ug, 包装质粒, PG-P1-VSVG、PG-P2-REV 以及 PG-P3-RRE 三者共 42ug, 总计 82ug, 将两者混匀 ; 往②号管中加入 $65 \times 6 = 390$ ul 的转染试剂 RNAi-mate, 混匀, 室温静止 5min ;

2. 4. 4) 5min 后, 将②号管液体缓慢的加入到①号管中, 并轻轻的混匀, 室温静止 20min ;

2. 4. 5) 在 20min 期间, 将各皿 293T 细胞的上清液弃掉, 并用预热的 PBS 洗两遍, 用移液器吸头吸去剩余液体, 然后每皿细胞加入 5ml 预热的 DMEM 培养基 ;

2. 4. 6) 20min 后, 将①号管内的混合液平均分到各皿细胞中, 然后放入 37°C, 5% 的 CO₂ 培养箱中 ;

2. 4. 7) 转染 6h 后, 将各皿细胞上清液吸掉, 加入 10ml 新鲜的 10% FBS+DMEM, 然后放入 37°C, 5% 的 CO₂ 培养箱, 培养 72h ;

2. 4. 8) 转染 72h 后, 将 6 个 10cm 的细胞培养皿细胞上清液共 60ml 全部吸到两个 50ml 离心管中, 然后进行低速离心, 离心转速 1800-1850rpm, 离心时间 3-3. 5min ;

2. 4. 9) 低速离心后, 取上清液经 0. 45um 的过滤器过滤 ;

2. 4. 10) 过滤后, 取 15ml 病毒液到纯化管内进行高速离心, 离心转速 8000-8200rpm, 离心时间 16-18min ;

2. 4. 11) 去除底部的废液, 将剩余病毒液加入到超滤管内进行第二次高速离心, 离心转速 8000-8200rpm, 离心时间 20-22min ; 离心到上清液到 1ml, 即病毒纯化液 1ml, 分装 5 管, 每管 200ul, -80°C 条件保存 ;

步骤 3、慢病毒感染小鼠巨噬细胞 RAW264. 7 细胞, 构建稳定细胞系, 具体步骤是 :

3. 1) 感染前一天用完全培养基将 $0. 5 \times 10^5$ 个细胞 / 孔铺于 24 孔板 ;

3. 2) 移去细胞培养液, 以 MOI = 10, 加入稀释后的病毒液 0. 5ml, 在 37°C、5% 的 CO₂ 条件下过夜 ;

3. 3) 24h 后移去细胞培养液, 每孔加入 0. 5ml 的完全培养液, 在 37°C、5% 的 CO₂ 条件下过夜 ;

3. 4) RAW264. 7 细胞感染 96h 后, 加入终浓度为 1-1. 1ug/ml 的嘌呤霉素筛选, 24h 后换完全培养基, 根据细胞状态换液, 直至单克隆形成, 并在显微镜下挑取各阳性克隆扩增培养 ;

步骤 4、采用实时荧光定量聚合酶链式反应技术检测稳定细胞系信使核糖核酸的表达

水平;采用蛋白质印迹检测稳定细胞系蛋白表达水平,具体步骤是:

4.1) 收集细胞用于总 RNA 提取:吸出培养液,用磷酸盐缓冲液洗涤细胞 2 次,加 1ml 的 Trizol 反复吹打细胞后收集液体,

设计引物采用膜结合型白细胞分化抗原 14:上游引物为:5' -AAC TCG CTC AAT CTG TCT TTC AC-3' ,

下游引物为:5' -GCT CAT CTG GGC TAG GGT TC-3' ;

甘油醛-3-磷酸脱氢酶:

上游引物为:5' -TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3' ,

下游引物为:5' -CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA-3' ,

根据核糖核酸提取试剂盒说明书分提取总核糖核酸;使用第一链试剂盒合成互补脱氧核糖核酸;采用 ABI-7500 系统,使用荧光定量聚合酶链式反应试剂盒,利用比较 CT 法来测定膜结合型白细胞分化抗原 14 的表达水平;

电泳完毕后进行蛋白质印迹,其中的

一抗为:兔抗膜结合型白细胞分化抗原 14 多克隆抗体,1:300 倍稀释,兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶单抗,1:1000 倍稀释;

二抗为:辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白 G,1:3000 倍稀释;

4.2) 收集蛋白进行蛋白质印迹检测稳定细胞系蛋白表达水平,具体步骤包括:洗掉培养基,用磷酸盐缓冲液洗涤细胞 2 次,加入 0.25%胰酶-0.02% EDTA 消化 3min,再加入 1ml 的完全培养基终止消化,吹打细胞使其从壁上脱落;

在 1000-1050rpm 条件下离心细胞,弃上清液,磷酸盐缓冲液重悬细胞,再次离心弃上清液后,加入一定量的 IP 裂解液,其中含千分之一的蛋白酶抑制剂 PMSF 在冰上裂解细胞,反复吹打;

在 12000-12500rpm 条件下离心取上清液;

利用二喹林甲酸蛋白测定试剂盒测定总蛋白浓度,将总蛋白等量上样,在 12%的分离胶的浓度下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳完毕后进行蛋白质印迹;

步骤 5、分别用 S-LPS 和 R-LPS800ng 刺激细胞系,收集细胞培养上清液,Elisa 检测细胞因子 NO、TNF- α 和 IL-6,具体步骤如下:

5.1) 将 RAW264.7、siRNA-224.3 细胞系和 siRNA-NC 细胞系用无双抗培养基以 2×10^5 个细胞/孔铺于两块 12 孔板,在 37°C、5%的 CO₂ 条件过夜;

5.2) 在两块 12 孔板分别加入 800ng 的 S-LPS 和 800ng 的 R-LPS,轻轻摇匀后,在 37°C、5%的 CO₂ 条件下培养 6-6.5 小时,收集细胞培养上清液;

5.3) 根据试剂盒说明书,检测细胞因子一氧化氮、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6,

NO LPS 组即阴性对照组为:RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3;S-LPS 刺激组:RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3 分别用 S-LPS 刺激;R-LPS 刺激组:RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3 分别用 R-LPS 刺激,

分别用 S-LPS 和 R-LPS 刺激之后收集上清,通过与对照组的 siRNA-NC、RAW264.7 进行比较,稳定细胞系 siRNA-224 的 S-LPS 处理组上清中分泌的 NO、TNF- α 和 IL-6 降低差异显著,而稳定细胞系 siRNA-224 的 R-LPS 处理组上清中分泌的 NO、TNF- α 和 IL-6 降低无显著性差异,以此能够明确鉴别出 S-LPS 和 R-LPS 两种不同类型的脂多糖,即成。

一种鉴别平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术应用技术领域,涉及一种鉴别平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖的方法。

背景技术

[0002] 白细胞分化抗原 14(cluster of differentiation antigen, CD14) 是一种存在于单核细胞、巨噬细胞等细胞表面的分化抗原,为体内介导脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 生物效应的重要受体之一。白细胞分化抗原 14(CD14) 包括膜结合型白细胞分化抗原 14(membrane bound CD14, mCD14) 和可溶性白细胞分化抗原 14(soluble CD14, sCD14) 两种形式;膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) 是分子量为 55 千道尔顿 (KD) 的糖蛋白,其 C-末端借助糖基磷脂酰肌醇 (glucose phosphatidylinositol, GPI) 结构锚附于细胞膜表面;可溶性白细胞分化抗原 14(sCD14) 分子有 49KD 和 55KD 两种形式,缺乏糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚。膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) 是由含有白细胞分化抗原 14(CD14) 基因的单核细胞、巨噬细胞,自行转录、翻译蛋白质多肽链,在高尔基复合体内糖化后,其羧基端再与磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 结合,并由磷脂酰肌醇的磷脂部分与细胞膜连接。生理条件下,膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) 主要表达于成熟的单核巨噬细胞,微弱表达于中性粒细胞、肾小球膜细胞、乳房细胞和 B 细胞, mCD14 介导脂多糖对这些细胞的激活作用。

[0003] 内毒素是革兰氏阴性菌细胞外膜的组成部分,其主要成分为脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS),脂多糖一旦进入体内,将诱导机体产生多种炎症介质的反应,导致机体的严重损伤。脂多糖是一类特殊类型的磷脂,对哺乳类动物具有广泛的生物学作用。根据化学结构,可以将脂多糖分为两大类,即光滑型脂多糖 (Smooth Form LPS, S-LPS) 和粗糙型脂多糖 (Rough Form LPS, R-LPS)。这两类脂多糖在化学结构、实验室制备及生物学活性等方面具有显著差别。建立鉴别光滑型脂多糖 (S-LPS) 与粗糙型脂多糖 (R-LPS) 的方法,最终可以应用于临床细菌感染性疾病的诊断和治疗

[0004] 在革兰氏阴性细菌引起的炎症反应过程中,脂多糖受体起着关键作用,是脂多糖作用的重要门户。白细胞分化抗原 14(CD14) 被认为是脂多糖信号转导中最重要脂多糖受体,白细胞分化抗原 14 在介导脂多糖激活靶细胞及炎症反应中起关键作用;研究表明,通过抑制白细胞分化抗原 14 破坏脂多糖所激活的靶细胞炎症反应是一个可行的治疗方法。

[0005] 核糖核酸干扰 (RNA interference, RNAi) 是指由特定双链核糖核酸 (double stranded RNA, dsRNA) 引发同源信使核糖核酸 (messenger RNA, mRNA) 降解的转录后基因静默机制。这类特定双链核糖核酸被裂解成小(干扰)核糖核酸分子 (siRNAs),并能导致同源信使核糖核酸 (mRNA) 在核糖核酸诱导的静默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 作用下降解。核糖核酸干扰 (RNAi, Ribonucleic acid interference) RNA 是目前简单而高效地阻断哺乳动物细胞内特异基因表达的最有效方法之一,可达到基因敲除效

果,且安全性好。但对于核糖核酸干扰 (RNAi) 来说,并不是所有针对靶基因信使核糖核酸 (mRNA) 序列随机合成的小核糖核酸分子 (siRNAs) 都能引起有效的基因沉默,干扰靶序列的选择对干扰效率的影响是至关重要的。因此,对能有效抑制特异基因表达的小核糖核酸分子 (siRNAs) 的筛选是应用核糖核酸干扰 (RNAi) 技术进行基因功能、基因治疗等相关研究的重要基础。

[0006] 酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性,酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性,又保留酶的活性。在测定时,受检标本 (测定其中的抗体或抗原) 与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体,也通过反应而结合在固相载体上。此时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化成为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高,间接地放大了免疫反应的结果,使测定方法达到很高的敏感度。

[0007] 对于平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖的区别检测方法,现有技术的化学鉴别方法如酚-水法、苯酚-氯仿-石油醚法,均存在着步骤繁琐,准确率不够理想的不足。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种鉴别平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖的方法,解决了现有技术的化学鉴别方法步骤繁琐,准确率不够理想的问题。

[0009] 本发明采用的技术方案是,一种鉴别平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖的方法,按照以下步骤具体实施:

[0010] 步骤 1、根据膜结合型白细胞分化抗原 14 基因的序列,按照小干扰核糖核酸分子设计的基本原则,合成一对针对膜结合型白细胞分化抗原 14 的小干扰核糖核酸分子 siRNA-224.3;

[0011] 步骤 2、将合成好的 siRNA-224.3 包装慢病毒载体

[0012] 2.1) 制备寡核苷酸:在 Lentivirus-shRNA 模板中的 loop 结构选用 TTCAAGAGA;在正义链模板的 5' 端添加 T,与 Hpa I 酶切后形成的粘端互补;在反义链模板的 5' 端添加 AGCT,与 Xho I 酶切后形成的粘端互补;T4 连接酶连接而成重组载体;

[0013] 2.2) 对 Lentivirus-shDNA 模板退火,参照表 1,配置退火体系:

[0014] 表 1 Lentivirus-shDNA 模板的退火体系

[0015]

组分	体积 (u1)
10 倍短发夹 DNA 退火缓冲液	5
正义链 (100uM)	5
反义链 (100uM)	5

水	35
总体积	50

[0016] 退火条件是:93-95° C 时为 5-6min;83-85° C 时为 5-6min;73-75° C 时为 5-6min;68-70° C 时为 5-6min;4° C-5° C 的环境中保存;将得到的退火产物稀释 50-52 倍至终浓度为 200-220nM,用于连接反应;

[0017] 2.3) 构建 Lentivirus-shRNA 载体,参照表 2 配置连接体系:

[0018] 表 2Lentivirus-shRNA 载体的连接体系

[0019]

组分	体积 (u1)
10 倍 T4DNA 连接酶缓冲液	2
XhoI+Hpa I 酶切后的慢病毒载体	1
模板 (100nM)	1
T4DNA 连接酶 (5weissU/u1)	1
水	15
总体积	20

[0020] 在 22°C 环境中静置 1h 后,转化 DH5 α ;

[0021] 2.4) 转染重组质粒以及制备病毒液

[0022] 293T 细胞常规培养于 10% 的 FBS+DMEM,37°C,5% 的 CO₂ 环境条件中;在转染前一天按 3×10⁶cell/ 皿的密度接种 293T 细胞于 10cm dish 中,使转染时细胞密度能达到 90%-95%,每皿加 9ml 的 10%FBS+DMEM,37°C,5% 的 CO₂ 环境中培养过夜;

[0023] 2.4.1) 转染前 2h 将 6 皿细胞进行换液,10%FBS+DMEM,每皿 5ml ;

[0024] 2.4.2)取 2 个无菌的 1.5ml 的 EP 管,分别加入 500u1 的无血清 DMEM,并标记为①、②号管;

[0025] 2.4.3) 往①号管中加入穿梭质粒 pGLV-U6-EGFP-shRNA-224 共 40ug,包装质粒,PG-P1-VSVG、PG-P2-REV 以及 PG-P3-RRE 三者共 42ug,总计 82ug,将两者混匀;往②号管中加入 65×6=390u1 的转染试剂 RNAi-mate,混匀,室温静止 5min ;

[0026] 2.4.4) 5min 后,将②号管液体缓慢的加入到①号管中,并轻轻的混匀,室温静止 20min ;

[0027] 2.4.5)在 20min 期间,将各皿 293T 细胞的上清液弃掉,并用预热的 PBS 洗两遍,用 tip 头吸去剩余液体,然后每皿细胞加入 5ml 预热的 DMEM 培养基;

[0028] 2.4.6)20min 后,将①号管内的混合液平均分到各皿细胞中,然后放入 37°C,5% 的 CO₂ 培养箱中;

[0029] 2.4.7) 转染 6h 后,将各皿细胞上清液吸掉,加入 10ml 新鲜的 10%FBS+DMEM,然后

放入 37℃, 5% 的 CO₂ 培养箱, 培养 72h ;

[0030] 2. 4. 8) 转染 72h 后, 将 6 个 10cm 的 dish 细胞上清液共 60ml 全部吸到两个 50ml 离心管中, 然后进行低速离心, 离心转速 1800-1850rpm, 离心时间 3-3. 5min ;

[0031] 2. 4. 9) 低速离心后, 取上清液经 0. 45um 的过滤器过滤 ;

[0032] 2. 4. 10) 过滤后, 取 15ml 病毒液到纯化管内进行高速离心, 离心转速 8000-8200rpm, 离心时间 16-18min ;

[0033] 2. 4. 11) 去除底部的废液, 将剩余病毒液加入到超滤管内进行第二次高速离心, 离心转速 8000-8200rpm, 离心时间 20-22min ; 离心到上清液到 1ml, 即病毒纯化液 1ml, 分装 5 管, 每管 200ul, -80℃ 条件保存 ;

[0034] 步骤 3、慢病毒感染小鼠巨噬细胞 RAW264. 7 细胞, 构建稳定细胞系, 具体步骤是 :

[0035] 3. 1) 感染前一天用完全培养基将 $0. 5 \times 10^5$ 个细胞 / 孔铺于 24 孔板 ;

[0036] 3. 2) 移去细胞培养液, 以 MOI=10, 加入稀释后的病毒液 0. 5ml, 在 37℃、5% 的 CO₂ 条件下过夜 ;

[0037] 3. 3) 24h 后移去细胞培养液, 每孔加入 0. 5ml 的完全培养液, 在 37℃、5% 的 CO₂ 条件下过夜 ;

[0038] 3. 4) RAW264. 7 细胞感染 96h 后, 加入终浓度为 1-1. 1ug/ml 的嘌呤霉素筛选, 24h 后换完全培养基, 根据细胞状态换液, 直至单克隆形成, 并在显微镜下挑取各阳性克隆扩增培养 ;

[0039] 步骤 4、采用实时荧光定量聚合酶链式反应技术检测稳定细胞系信使核糖核酸的表达水平 ; 采用蛋白质印迹检测稳定细胞系蛋白表达水平, 具体步骤是 :

[0040] 4. 1) 收集细胞用于总 RNA 提取 : 吸出培养液, 用磷酸盐缓冲液洗涤细胞 2 次, 加 1ml 的 Trizol 反复吹打细胞后收集液体, 设计引物采用上海生工相应的合成物品 ;

[0041] 根据核糖核酸提取试剂盒说明书分提取总核糖核酸 ; 使用第一链试剂盒合成互补脱氧核糖核酸 ; 采用 ABI-7500 系统, 使用荧光定量聚合酶链式反应试剂盒, 利用比较 CT 法来测定膜结合型白细胞分化抗原 14 的表达水平 ;

[0042] 4. 2) 收集蛋白进行蛋白质印迹检测稳定细胞系蛋白表达水平, 具体步骤是 :

[0043] 洗掉培养基, 用磷酸盐缓冲液洗涤细胞 2 次, 加入 0. 25% 胰酶 -0. 02% EDTA 消化 3min, 再加入 1ml 的完全培养基终止消化, 吹打细胞使其从壁上脱落 ; 在 1000-1050rpm 条件下离心细胞, 弃上清液, 磷酸盐缓冲液重悬细胞, 再次离心弃上清液后, 加入一定量的 IP 裂解液, 其中含千分之一的蛋白酶抑制剂 PMSF 在冰上裂解细胞, 反复吹打 ; 在 12000-12500rpm 条件下离心取上清液 ; 利用二喹林甲酸蛋白测定试剂盒测定总蛋白浓度, 将总蛋白等量上样, 在 12% 的分离胶的浓度下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳完毕后进行蛋白质印迹 ;

[0044] 步骤 5、分别用 S-LPS 和 R-LPS800ng 刺激细胞系, 收集细胞培养上清液, Elisa 检测细胞因子 NO、TNF- α 和 IL-6, 具体步骤如下 :

[0045] 5. 1) 将 RAW264. 7、siRNA-224. 3 细胞系和 siRNA-NC 细胞系用无双抗培养基以 2×10^5 个细胞 / 孔铺于两块 12 孔板, 在 37℃、5% 的 CO₂ 条件下过夜 ;

[0046] 5. 2) 在两块 12 孔板分别加入 800ng 的 S-LPS 和 800ng 的 R-LPS, 轻轻摇匀后, 在 37℃、5% 的 CO₂ 条件下培养 6-6. 5 小时, 收集细胞培养上清液 ;

[0047] 5.3) 根据试剂盒说明书,检测细胞因子一氧化氮、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6, NO LPS 组即阴性对照组为:RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3;S-LPS 刺激组:RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3 分别用 S-LPS 刺激;R-LPS 刺激组:RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3 分别用 R-LPS 刺激,即成。

[0048] 本发明的有益效果是,根据膜结合型白细胞分化抗原 14 基因的序列,设计具有特异性的 siRNA-224.3,并包装慢病毒载体,高效感染小鼠巨噬细胞,克服了用转染试剂时的低效率,从而快速构建好稳定细胞系。然后,应用酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测分别用平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖刺激条件下表达该小干扰核糖核酸分子的小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)稳定细胞系细胞上清中的一氧化氮(nitrogenmonoxide,NO)、肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6),通过比较其差异,鉴别平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖。相比于现有的化学鉴别方法(酚-水法、苯酚-氯仿-石油醚法)更为简单准确,从而为平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖区别研究及脂多糖的功能分析提供依据。

附图说明

[0049] 图 1 是本发明方法中的慢病毒载体包装流程图;

[0050] 图 2 是本发明方法稳定细胞系建立之后,通过实时荧光定量聚合酶链式反应(real time PCR)检测转染小干扰核糖核酸分子(siRNAs)后,膜结合型白细胞分化抗原 14 信使核糖核酸(mRNA)的表达水平图;

[0051] 图 3 是本发明方法中的 Western-blot 检测其蛋白水平图;

[0052] 图 4 是本发明方法中的 RAW264.7、siRNA-NC 稳定细胞系、siRNA-224.3 稳定细胞系分别用 S-LPS 和 R-LPS 刺激后收集细胞培养上清,Elisa 检测细胞因子 NO 的表达水平图;

[0053] 图 5 是本发明方法中的 RAW264.7、siRNA-NC 稳定细胞系、siRNA-224.3 稳定细胞系分别用 S-LPS 和 R-LPS 刺激后收集细胞培养上清,Elisa 检测细胞因子 TNF- α 的表达水平图;

[0054] 图 6 是本发明方法中的 RAW264.7、siRNA-NC 稳定细胞系、siRNA-224.3 稳定细胞系分别用 S-LPS 和 R-LPS 刺激后收集细胞培养上清,Elisa 检测细胞因子 IL-6 的表达水平图。

具体实施方式

[0055] 实施例 1

[0056] 本发明是一种能快速鉴别平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖的方法,按照以下步骤具体实施:

[0057] 步骤 1、根据膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14)基因的序列,按照小干扰核糖核酸分子(siRNA)设计的基本原则,合成一对针对膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14)的小干扰核糖核酸分子(siRNA-224.3),siRNA 序列见附件中的序列表 <400>1,可以选择通过上海吉玛技术有限公司进行具体技术操作;

[0058] 步骤 2、将合成好的 siRNA-224.3 包装慢病毒载体

[0059] 2.1)Oligo Design (制备寡核苷酸):在 Lentivirus-shRNA 模板中的 loop 结构选

用了 TTCAAGAGA, 以避免形成终止信号 ; 在正义链模板的 5' 端添加了 T, 与 Hpa I 酶切后形成的粘端互补 ; 在反义链模板的 5' 端添加了 AGCT, 与 Xho I 酶切后形成的粘端互补 ; T4 连接酶连接而成重组载体 ;

[0060] 如图 1, 是慢病毒载体包装流程图, 即将 siRNA-224.3 转化为 shRNA 后, loop 结构选用了 TTCAAGAGA, 在正义链模板的 5' 端添加了 T, 与 HpaI 酶切后形成的粘端互补 ; 在反义链模板的 5' 端添加了 AGCT, 与 Xho I 酶切后形成的粘端互补。

[0061] 2.2) 对 Lentivirus-shDNA 模板退火, 参照表 1, 配置退火体系 :

[0062] 表 1Lentivirus-shDNA 模板的退火体系

[0063]

组分	体积 (u1)
10 倍短发夹 DNA 退火缓冲液	5
正义链 (100uM)	5
反义链 (100uM)	5
水	35
总体积	50

[0064] 条件是 :95° C 时为 5min ;85° C 时为 5min ;75° C 时为 5min ;70° C 时为 5min ;5° C 的环境中保存 ; 将得到的退火产物稀释 50 倍至终浓度为 200nM, 用于连接反应 ;

[0065] 2.3) 构建 Lentivirus-shRNA 载体, 参照表 2 配置连接体系 :

[0066] 表 2Lentivirus-shRNA 载体的连接体系

[0067]

组分	体积 (u1)
10 倍 T4DNA 连接酶缓冲液	2
XhoI+Hpa I 酶切后的慢病毒载体	1
模板 (100nM)	1
T4DNA 连接酶 (5weissU/u1)	1
水	15
总体积	20

[0068] 在 22°C 环境中静置 1h 后, 转化 DH5 α ;

[0069] 2.4) 转染重组质粒以及制备病毒液

[0070] 293T 细胞常规培养于 10% 的 FBS+DMEM, 37°C, 5% 的 CO₂ 环境条件中 ; 在转染前一天按 3×10^6 cell/ 皿 的密度接种 293T 细胞于 10cm dish 中, 使转染时细胞密度能达到 95%, 每

皿加 9ml 的 10%FBS+DMEM, 37°C, 5% 的 CO₂ 环境中培养过夜;

[0071] 2.4.1) 转染前 2h 将 6 皿细胞进行换液, 10%FBS+DMEM, 每皿 5ml;

[0072] 2.4.2) 取 2 个无菌的 1.5ml 的 EP 管, 分别加入 500ul 的无血清 DMEM, 并标记为①、②号管;

[0073] 2.4.3) 往①号管中加入穿梭质粒 pGLV-U6-EGFP-shRNA-224 共 40ug, 包装质粒 (PG-P1-VSVG、PG-P2-REV and PG-P3-RRE) 共 42ug, 总计 82ug, 将两者混匀; 往②号管中加入 65×6=390ul 的转染试剂 RNAi-mate, 混匀, 室温静置 5min;

[0074] 2.4.4) 5min 后, 将②号管液体缓慢的加入到①号管中, 并轻轻的混匀, 室温静置 20min;

[0075] 2.4.5) 在 20min 期间, 将各皿 293T 细胞的上清液弃掉, 并用预热的 PBS 洗两遍, 用 tip 头吸去剩余液体, 然后每皿细胞加入 5ml 预热的 DMEM 培养基;

[0076] 2.4.6) 20min 后, 将①号管内的混合液平均分到各皿细胞中 (注意要逐滴的加入到细胞中), 然后放入 37°C, 5% 的 CO₂ 培养箱中;

[0077] 2.4.7) 转染 6h 后, 将各皿细胞上清液吸掉, 加入 10ml 新鲜的 10%FBS+DMEM, 然后放入 37°C, 5% 的 CO₂ 培养箱, 培养 72h;

[0078] 2.4.8) 转染 72h 后, 将 6 个 10cm 的 dish 细胞上清液 (共 60ml) 全部吸到两个 50ml 离心管中, 然后进行低速离心, 离心转速 1800rpm, 离心时间 3min;

[0079] 2.4.9) 低速离心后, 取上清液经 0.45um 的过滤器过滤;

[0080] 2.4.10) 过滤后, 取 15ml 病毒液到纯化管内进行高速离心, 离心转速 8000rpm, 离心时间 18min;

[0081] 2.4.11) 去除底部的废液, 将剩余病毒液加入到超滤管内进行第二次高速离心, 离心转速 8000rpm, 离心时间 20min; 离心到上清液到 1ml, 即病毒纯化液 1ml, 分装 5 管, 每管 200ul, -80°C 条件保存;

[0082] 步骤 3、慢病毒感染小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞, 构建稳定细胞系, 具体步骤是:

[0083] 3.1) 感染前一天用完全培养基将 0.5×10^5 个细胞 / 孔铺于 24 孔板;

[0084] 3.2) 移去细胞培养液, 以 MOI=10 (infected at an MOI of 10), 加入稀释后的病毒液 0.5ml, 在 37°C、5% 的 CO₂ 条件下过夜;

[0085] 3.3) 24h 后移去细胞培养液, 每孔加入 0.5ml 的完全培养液, 在 37°C、5% 的 CO₂ 条件下过夜;

[0086] 3.4) RAW264.7 细胞感染 96h 后, 加入终浓度为 1ug/ml 的嘌呤霉素 (puro) 筛选, 24h 后换完全培养基, 根据细胞状态换液, 直至单克隆形成, 并在显微镜下挑取各阳性克隆扩增培养;

[0087] 步骤 4、采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (real time PCR) 技术检测稳定细胞系信使核糖核酸 (mRNA) 的表达水平; 采用蛋白质印迹 (western blot) 检测稳定细胞系蛋白表达水平, 具体步骤是:

[0088] 4.1) 收集细胞用于总 RNA 提取: 吸出培养液, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞 2 次, 加 1ml 的 Trizol 反复吹打细胞后收集液体, 设计引物采用上海生工相应的合成物品;

[0089] 膜结合型白细胞分化抗原 14 (mCD14):

[0090] 上游引物为: 5' -AAC TCG CTC AAT CTG TCT TTCAC-3' ,

[0091] 下游引物为 :5' -GCT CAT CTG GGC TAG GGT TC-3' ;

[0092] 甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH) :

[0093] 上游引物为 :5' -TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3' ,

[0094] 下游引物为 :5' -CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA-3' ,

[0095] 根据核糖核酸提取试剂盒 (PureLink™ RNA Mini Kit) 说明书分提取总核糖核酸 (RNA) ;使用第一链试剂盒 (M-MLV first strand Kit) 合成互补脱氧核糖核酸 (DNA) ;采用 ABI-7500 系统,使用荧光定量聚合酶链式反应试剂盒 (**Platinum®SYBR®**Green qPCR SuperMix-UDG Kit),利用比较 CT 法来测定膜结合型白细胞分化抗原 14 的 (mCD14) 表达水平,结果见图 2 所示,表明 siRNA-224.3 稳定细胞系与阴性细胞 RAW264.7、siRNA-NC 相比,siRNA-224.3 稳定细胞系中小鼠膜结合型白细胞分化抗原 14mRNA 水平被抑制 95% ;

[0096] 4.2)收集蛋白进行蛋白质印迹 (western blot) 检测稳定细胞系蛋白表达水平,具体步骤是 :

[0097] 洗掉培养基,用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞 2 次,加入 0.25% 胰酶 -0.02%EDTA 消化 3min,再加入 1ml 的完全培养基终止消化,吹打细胞使其从壁上脱落 ;在 1000rpm 条件下离心细胞,弃上清液,磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬细胞,再次离心弃上清液后,加入一定量的 IP 裂解液(含千分之一的蛋白酶抑制剂 PMSF) 在冰上裂解细胞,反复吹打 ;在 12000rpm 条件下离心取上清液 ;利用二喹林甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白测定试剂盒测定总蛋白浓度,将总蛋白等量上样,在 12% 的分离胶的浓度下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),电泳完毕后进行蛋白质印迹 (western blot),

[0098] 一抗为 :兔抗膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) 多克隆抗体 (rabbit polyclonal anti-mCD14,1:300 倍稀释),兔抗甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (GAPDH) 单抗 (GAPDH rabbit mAb,1:1000 倍稀释),

[0099] 二抗为 :辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG) (HRP labeled goat anti-rabbit IgG,1:3000 倍稀释)。

[0100] 结果见图 3 所示,表明 siRNA-224.3 稳定细胞系与阴性细胞 RAW264.7、siRNA-NC 相比,siRNA-224.3 稳定细胞系中小鼠膜结合型白细胞分化抗原 14 蛋白水平被抑制 90% ;

[0101] 步骤 5、分别用 S-LPS(E. coli 011:B4) 和 R-LPS (来源于沙门氏菌属)800ng 刺激细胞系,收集细胞培养上清液,Elisa 检测细胞因子 NO、TNF- α 和 IL-6,具体步骤如下 :

[0102] 5.1) 将 RAW264.7、siRNA-224.3 细胞系和 siRNA-NC 细胞系用无双抗培养基以 2×10^5 个细胞 / 孔铺于两块 12 孔板,在 37°C、5% 的 CO₂ 条件下过夜 ;

[0103] 5.2) 在两块 12 孔板分别加入 800ng 的 S-LPS 和 800ng 的 R-LPS,轻轻摇匀后,在 37°C、5% 的 CO₂ 条件下培养 6 小时,收集细胞培养上清液 ;

[0104] 5.3) 根据试剂盒说明书,检测细胞因子一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 6 (IL-6),结果见图 4、图 5、图 6,横坐标为 RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3 NO LPS 组, S-LPS 刺激组, R-LPS 刺激组 ;纵坐标为细胞培养上清中一氧化氮 (NO)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 6 (IL-6) 的含量。NO LPS 组即阴性对照组为 :RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3 ;S-LPS 刺激组 :RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3 分别用 S-LPS 刺激 ;R-LPS 刺激组 :RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3 分别用 R-LPS 刺激。其中,S-LPS 组与 R-LPS 组中三种细胞因子都升高,但 S-LPS 组中 siRNA-224.3 的细胞因子

显著降低, R-LPS 组中 siRNA-224.3 细胞因子变化无差异。由此说明, CD14 是与 S-LPS 结合, 从而得到结论, 本发明方法利用 siRNA-224.3 细胞系能更加方便、准确地鉴别出 S-LPS 与 R-LPS。

[0105] 实施例 2

[0106] 根据实施例 1 的步骤, 按照以下具体参数实施:

[0107] 步骤 1、根据膜结合型白细胞分化抗原 14 基因的序列, 按照小干扰核糖核酸分子设计的基本原则, 合成一对针对膜结合型白细胞分化抗原 14 的小干扰核糖核酸分子 siRNA-224.3;

[0108] 步骤 2、将合成好的 siRNA-224.3 包装慢病毒载体

[0109] 2.1) 制备寡核苷酸: 在 Lentivirus-shRNA 模板中的 loop 结构选用 TTCAAGAGA; 在正义链模板的 5' 端添加 T, 与 Hpa I 酶切后形成的粘端互补; 在反义链模板的 5' 端添加 AGCT, 与 Xho I 酶切后形成的粘端互补; T4 连接酶连接而成重组载体;

[0110] 2.2) 对 Lentivirus-shDNA 模板退火, 参照表 1 配置退火体系,

[0111] 退火条件是: 94° C 时为 5min; 84° C 时为 6min; 74° C 时为 6min; 69° C 时为 5min; 4° C 的环境中保存; 将得到的退火产物稀释 51 倍至终浓度为 210nM, 用于连接反应;

[0112] 2.3) 构建 Lentivirus-shRNA 载体, 参照表 2 配置连接体系,

[0113] 在 22°C 环境中静置 1h 后, 转化 DH5 α ;

[0114] 2.4) 转染重组质粒以及制备病毒液

[0115] 293T 细胞常规培养于 10% 的 FBS+DMEM, 37°C, 5% 的 CO₂ 环境条件中; 在转染前一天按 3×10⁶ cell/皿的密度接种 293T 细胞于 10cm dish 中, 使转染时细胞密度能达到 93%, 每皿加 9ml 的 10%FBS+DMEM, 37°C, 5% 的 CO₂ 环境中培养过夜;

[0116] 2.4.1) 转染前 2h 将 6 皿细胞进行换液, 10%FBS+DMEM, 每皿 5ml;

[0117] 2.4.2) 取 2 个无菌的 1.5ml 的 EP 管, 分别加入 500ul 的无血清 DMEM, 并标记为①、②号管;

[0118] 2.4.3) 往①号管中加入穿梭质粒 pGLV-U6-EGFP-shRNA-224 共 40ug, 包装质粒, PG-P1-VSVG、PG-P2-REV 以及 PG-P3-RRE 三者共 42ug, 总计 82ug, 将两者混匀; 往②号管中加入 65×6=390ul 的转染试剂 RNAi-mate, 混匀, 室温静置 5min;

[0119] 2.4.4) 5min 后, 将②号管液体缓慢的加入到①号管中, 并轻轻的混匀, 室温静置 20min;

[0120] 2.4.5) 在 20min 期间, 将各皿 293T 细胞的上清液弃掉, 并用预热的 PBS 洗两遍, 用 tip 头吸去剩余液体, 然后每皿细胞加入 5ml 预热的 DMEM 培养基;

[0121] 2.4.6) 20min 后, 将①号管内的混合液平均分到各皿细胞中, 然后放入 37°C, 5% 的 CO₂ 培养箱中;

[0122] 2.4.7) 转染 6h 后, 将各皿细胞上清液吸掉, 加入 10ml 新鲜的 10%FBS+DMEM, 然后放入 37°C, 5% 的 CO₂ 培养箱, 培养 72h;

[0123] 2.4.8) 转染 72h 后, 将 6 个 10cm 的 dish 细胞上清液共 60ml 全部吸到两个 50ml 离心管中, 然后进行低速离心, 离心转速 1850rpm, 时间 3min;

[0124] 2.4.9) 低速离心后, 取上清液经 0.45um 的过滤器过滤;

[0125] 2.4.10) 过滤后, 取 15ml 病毒液到纯化管内进行高速离心, 离心转速 8200rpm, 离

心时间 18min；

[0126] 2.4.11) 去除底部的废液,将剩余病毒液加入到超滤管内进行第二次高速离心,离心转速 8200rpm,离心时间 20min;离心到上清液到 1ml,即病毒纯化液 1ml,分装 5 管,每管 200ul, -80℃ 条件保存;

[0127] 步骤 3、慢病毒感染小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞,构建稳定细胞系,具体步骤是:

[0128] 3.1) 感染前一天用完全培养基将 0.5×10^5 个细胞 / 孔铺于 24 孔板;

[0129] 3.2) 移去细胞培养液,以 MOI=10,加入稀释后的病毒液 0.5ml,在 37℃、5% 的 CO₂ 条件下过夜;

[0130] 3.3) 24h 后移去细胞培养液,每孔加入 0.5ml 的完全培养液,在 37℃、5% 的 CO₂ 条件下过夜;

[0131] 3.4) RAW264.7 细胞感染 96h 后,加入终浓度为 1.05ug/ml 的嘌呤霉素筛选,24h 后换完全培养基,根据细胞状态换液,直至单克隆形成,并在显微镜下挑取各阳性克隆扩增培养;

[0132] 步骤 4、采用实时荧光定量聚合酶链式反应技术检测稳定细胞系信使核糖核酸的表达水平;采用蛋白质印迹检测稳定细胞系蛋白表达水平,具体步骤是:

[0133] 4.1) 收集细胞用于总 RNA 提取:吸出培养液,用磷酸盐缓冲液洗涤细胞 2 次,加 1ml 的 Trizol 反复吹打细胞后收集液体,设计引物采用上海生工相应的合成物品;

[0134] 根据核糖核酸提取试剂盒说明书分提取总核糖核酸;使用第一链试剂盒合成互补脱氧核糖核酸;采用 ABI-7500 系统,使用荧光定量聚合酶链式反应试剂盒,利用比较 CT 法来测定膜结合型白细胞分化抗原 14 的表达水平;

[0135] 4.2) 收集蛋白进行蛋白质印迹检测稳定细胞系蛋白表达水平,具体步骤是:

[0136] 洗掉培养基,用磷酸盐缓冲液洗涤细胞 2 次,加入 0.25% 胰酶 +0.02% EDTA 消化 3min,再加入 1ml 的完全培养基终止消化,吹打细胞使其从壁上脱落;在 1050rpm 条件下离心细胞,弃上清液,磷酸盐缓冲液重悬细胞,再次离心弃上清液后,加入一定量的 IP 裂解液,其中含千分之一的蛋白酶抑制剂 PMSF 在冰上裂解细胞,反复吹打;在 12500rpm 条件下离心取上清液;利用二喹林甲酸蛋白测定试剂盒测定总蛋白浓度,将总蛋白等量上样,在 12% 的分离胶的浓度下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳完毕后进行蛋白质印迹;

[0137] 步骤 5、分别用 S-LPS 和 R-LPS 800ng 刺激细胞系,收集细胞培养上清液,Elisa 检测细胞因子 NO、TNF- α 和 IL-6,具体步骤如下:

[0138] 5.1) 将 RAW264.7、siRNA-224.3 细胞系和 siRNA-NC 细胞系用无双抗培养基以 2×10^5 个细胞 / 孔铺于两块 12 孔板,在 37℃、5% 的 CO₂ 条件下过夜;

[0139] 5.2) 在两块 12 孔板分别加入 800ng 的 S-LPS 和 800ng 的 R-LPS,轻轻摇匀后,在 37℃、5% 的 CO₂ 条件下培养 6.5 小时,收集细胞培养上清液;

[0140] 5.3) 根据试剂盒说明书,检测细胞因子一氧化氮、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6, NO LPS 组即阴性对照组为:RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3;S-LPS 刺激组:RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3 分别用 S-LPS 刺激;R-LPS 刺激组:RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3 分别用 R-LPS 刺激,即成。

[0141] 其中,S-LPS 组与 R-LPS 组中三种细胞因子都升高,但 S-LPS 组中 siRNA-224.3 的细胞因子显著降低,R-LPS 组中 siRNA-224.3 细胞因子变化无差异。由此说明,CD14 是与

S-LPS 结合,从而得到结论,本发明方法利用 siRNA-224.3 细胞系能更加方便、准确地鉴别出 S-LPS 与 R-LPS。

[0142] 实施例 3

[0143] 按照实施例 1 的步骤,采用以下具体参数实施:

[0144] 步骤 1、根据膜结合型白细胞分化抗原 14 基因的序列,按照小干扰核糖核酸分子设计的基本原则,合成一对针对膜结合型白细胞分化抗原 14 的小干扰核糖核酸分子 siRNA-224.3;

[0145] 步骤 2、将合成好的 siRNA-224.3 包装慢病毒载体

[0146] 2.1) 制备寡核苷酸:在 Lentivirus-shRNA 模板中的 loop 结构选用 TTCAAGAGA;在正义链模板的 5' 端添加 T,与 Hpa I 酶切后形成的粘端互补;在反义链模板的 5' 端添加 AGCT,与 Xho I 酶切后形成的粘端互补;T4 连接酶连接而成重组载体;

[0147] 2.2) 对 Lentivirus-shDNA 模板退火,参照表 1 配置退火体系,

[0148] 退火条件是:93-95° C 时为 5-6min;83-85° C 时为 5-6min;73-75° C 时为 5-6min;68-70° C 时为 5-6min;4° C-5° C 的环境中保存;将得到的退火产物稀释 50-52 倍至终浓度为 200-220nM,用于连接反应;

[0149] 2.3) 构建 Lentivirus-shRNA 载体,参照表 2 配置连接体系,

[0150] 在 22°C 环境中静置 1h 后,转化 DH5 α ;

[0151] 2.4) 转染重组质粒以及制备病毒液

[0152] 293T 细胞常规培养于 10% 的 FBS+DMEM,37°C,5% 的 CO₂ 环境条件中;在转染前一天按 3×10⁶ cell/皿的密度接种 293T 细胞于 10cm dish 中,使转染时细胞密度能达到 90%,每皿加 9ml 的 10%FBS+DMEM,37°C,5% 的 CO₂ 环境中培养过夜;

[0153] 2.4.1) 转染前 2h 将 6 皿细胞进行换液,10%FBS+DMEM,每皿 5ml;

[0154] 2.4.2) 取 2 个无菌的 1.5ml 的 EP 管,分别加入 500ul 的无血清 DMEM,并标记为①、②号管;

[0155] 2.4.3) 往①号管中加入穿梭质粒 pGLV-U6-EGFP-shRNA-224 共 40ug,包装质粒,PG-P1-VSVG、PG-P2-REV 以及 PG-P3-RRE 三者共 42ug,总计 82ug,将两者混匀;往②号管中加入 65×6=390ul 的转染试剂 RNAi-mate,混匀,室温静置 5min;

[0156] 2.4.4) 5min 后,将②号管液体缓慢的加入到①号管中,并轻轻的混匀,室温静置 20min;

[0157] 2.4.5) 在 20min 期间,将各皿 293T 细胞的上清液弃掉,并用预热的 PBS 洗两遍,用 tip 头吸去剩余液体,然后每皿细胞加入 5ml 预热的 DMEM 培养基;

[0158] 2.4.6) 20min 后,将①号管内的混合液平均分到各皿细胞中,然后放入 37°C,5% 的 CO₂ 培养箱中;

[0159] 2.4.7) 转染 6h 后,将各皿细胞上清液吸掉,加入 10ml 新鲜的 10%FBS+DMEM,然后放入 37°C,5% 的 CO₂ 培养箱,培养 72h;

[0160] 2.4.8) 转染 72h 后,将 6 个 10cm 的 dish 细胞上清液共 60ml 全部吸到两个 50ml 离心管中,然后进行低速离心,离心转速 1840rpm,离心时间 3min;

[0161] 2.4.9) 低速离心后,取上清液经 0.45um 的过滤器过滤;

[0162] 2.4.10) 过滤后,取 15ml 病毒液到纯化管内进行高速离心,离心转速 8100rpm,离

心时间 17min；

[0163] 2.4.11) 去除底部的废液,将剩余病毒液加入到超滤管内进行第二次高速离心,离心转速 8100rpm,离心时间 21min;离心到上清液到 1ml,即病毒纯化液 1ml,分装 5 管,每管 200ul, -80℃ 条件保存;

[0164] 步骤 3、慢病毒感染小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞,构建稳定细胞系,具体步骤是:

[0165] 3.1) 感染前一天用完全培养基将 0.5×10^5 个细胞 / 孔铺于 24 孔板;

[0166] 3.2) 移去细胞培养液,以 MOI=10,加入稀释后的病毒液 0.5ml,在 37℃、5% 的 CO₂ 条件下过夜;

[0167] 3.3) 24h 后移去细胞培养液,每孔加入 0.5ml 的完全培养液,在 37℃、5% 的 CO₂ 条件下过夜;

[0168] 3.4) RAW264.7 细胞感染 96h 后,加入终浓度为 1.1ug/ml 的嘌呤霉素筛选,24h 后换完全培养基,根据细胞状态换液,直至单克隆形成,并在显微镜下挑取各阳性克隆扩增培养;

[0169] 步骤 4、采用实时荧光定量聚合酶链式反应技术检测稳定细胞系信使核糖核酸的表达水平;采用蛋白质印迹检测稳定细胞系蛋白表达水平,具体步骤是:

[0170] 4.1) 收集细胞用于总 RNA 提取:吸出培养液,用磷酸盐缓冲液洗涤细胞 2 次,加 1ml 的 Trizol 反复吹打细胞后收集液体,设计引物采用上海生工相应的合成物品;

[0171] 根据核糖核酸提取试剂盒说明书分提取总核糖核酸;使用第一链试剂盒合成互补脱氧核糖核酸;采用 ABI-7500 系统,使用荧光定量聚合酶链式反应试剂盒,利用比较 CT 法来测定膜结合型白细胞分化抗原 14 的表达水平;

[0172] 4.2) 收集蛋白进行蛋白质印迹检测稳定细胞系蛋白表达水平,具体步骤是:

[0173] 洗掉培养基,用磷酸盐缓冲液洗涤细胞 2 次,加入 0.25% 胰酶 +0.02%EDTA 消化 3min,再加入 1ml 的完全培养基终止消化,吹打细胞使其从壁上脱落;在 1030rpm 条件下离心细胞,弃上清液,磷酸盐缓冲液重悬细胞,再次离心弃上清液后,加入一定量的 IP 裂解液,其中含千分之一的蛋白酶抑制剂 PMSF 在冰上裂解细胞,反复吹打;在 12200rpm 条件下离心取上清液;利用二喹林甲酸蛋白测定试剂盒测定总蛋白浓度,将总蛋白等量上样,在 12% 的分离胶的浓度下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳完毕后进行蛋白质印迹;

[0174] 步骤 5、分别用 S-LPS 和 R-LPS800ng 刺激细胞系,收集细胞培养上清液,Elisa 检测细胞因子 NO、TNF- α 和 IL-6,具体步骤如下:

[0175] 5.1) 将 RAW264.7、siRNA-224.3 细胞系和 siRNA-NC 细胞系用无双抗培养基以 2×10^5 个细胞 / 孔铺于两块 12 孔板,在 37℃、5% 的 CO₂ 条件下过夜;

[0176] 5.2) 在两块 12 孔板分别加入 800ng 的 S-LPS 和 800ng 的 R-LPS,轻轻摇匀后,在 37℃、5% 的 CO₂ 条件下培养 6.25 小时,收集细胞培养上清液;

[0177] 5.3) 根据试剂盒说明书,检测细胞因子一氧化氮、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6, NO LPS 组即阴性对照组为:RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3;S-LPS 刺激组:RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3 分别用 S-LPS 刺激;R-LPS 刺激组:RAW264.7、siRNA-NC、siRNA-224.3 分别用 R-LPS 刺激,即成。

[0178] 其中,S-LPS 组与 R-LPS 组中三种细胞因子都升高,但 S-LPS 组中 siRNA-224.3 的细胞因子显著降低,R-LPS 组中 siRNA-224.3 细胞因子变化无差异。由此说明,CD14 是与

S-LPS 结合,从而得到结论,本发明方法利用 siRNA-224.3 细胞系能更加方便、准确地鉴别出 S-LPS 与 R-LPS。

[0179] 综上所述,本发明鉴别平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖的方法,首先,合成能有效干扰小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子 (siRNA-224.3) 及阴性对照 siRNA-NC,并制备成重组慢病毒;其次,将慢病毒感染小鼠巨噬细胞 RAW264.7,并用嘌呤霉素筛选出阳性克隆,构建稳定细胞系 siRNA-224.3、siRNA-NC;最后,应用酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay,ELISA) 检测分别用平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激条件下表达该小干扰核糖核酸分子的小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7) 稳定细胞系细胞上清中的一氧化氮 (nitrogenmonoxide, NO)、肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6),通过比较其差异,实现鉴别平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖,相比现有方法,更加方便、准确。

[0180] 附录

[0181] 计算机可读基因序列表 1

[0182]

[0183] <110> 王凤阳

[0184] <120> 抑制小鼠膜结合型白细胞分化抗原 14 基因表达的小核糖核酸分子

[0185] <160>1

[0186] <210>1

[0187] <211>21

[0188] <212>RNA

[0189] <213> 小鼠

[0190] <400>1

[0191] gggcaguuca cugauauuatt 21

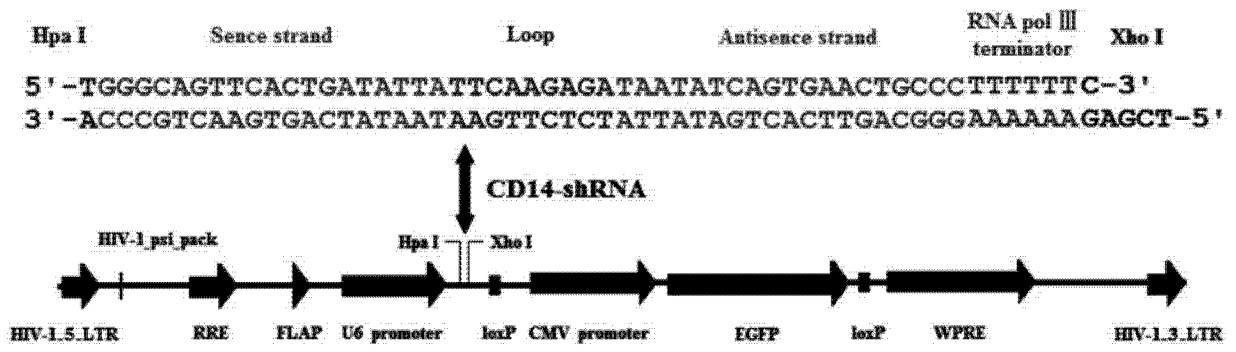


图 1

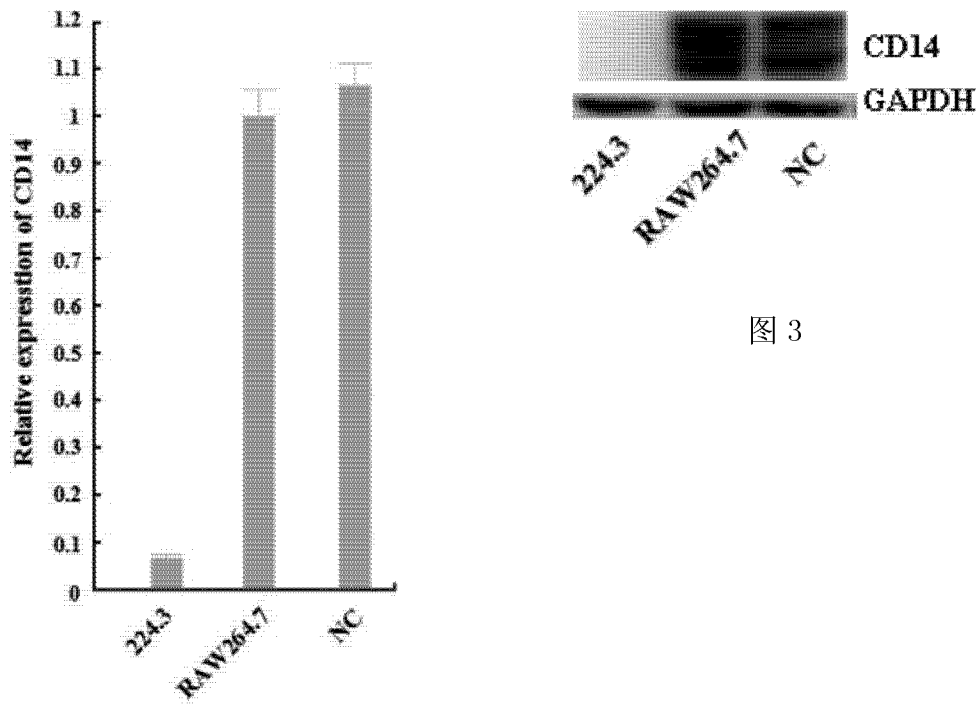


图 3

图 2

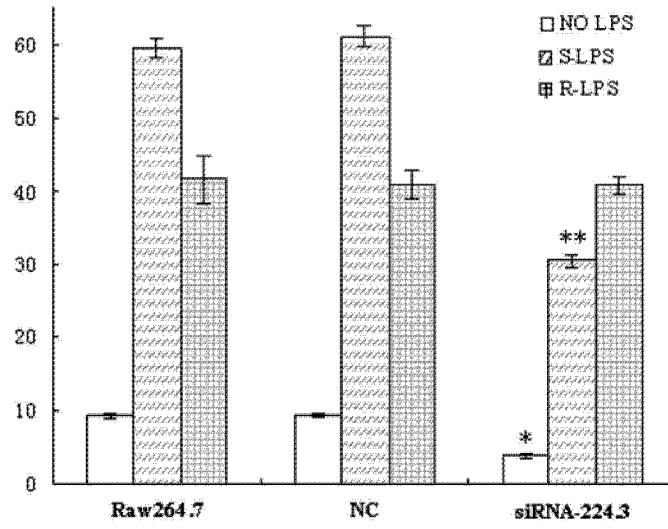


图 4

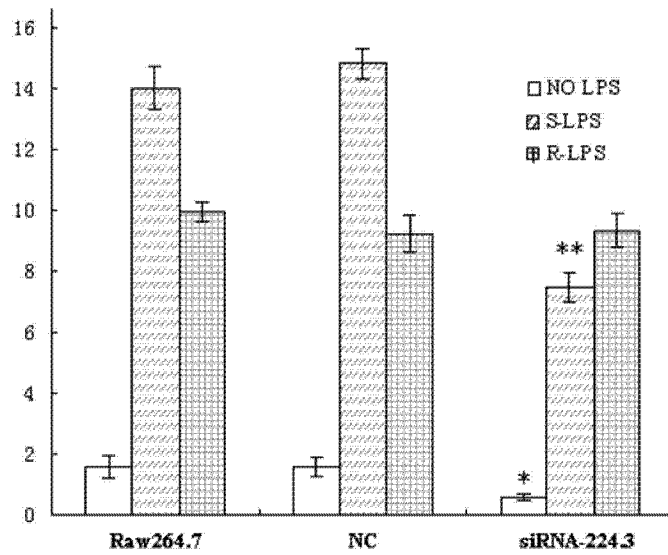


图 5

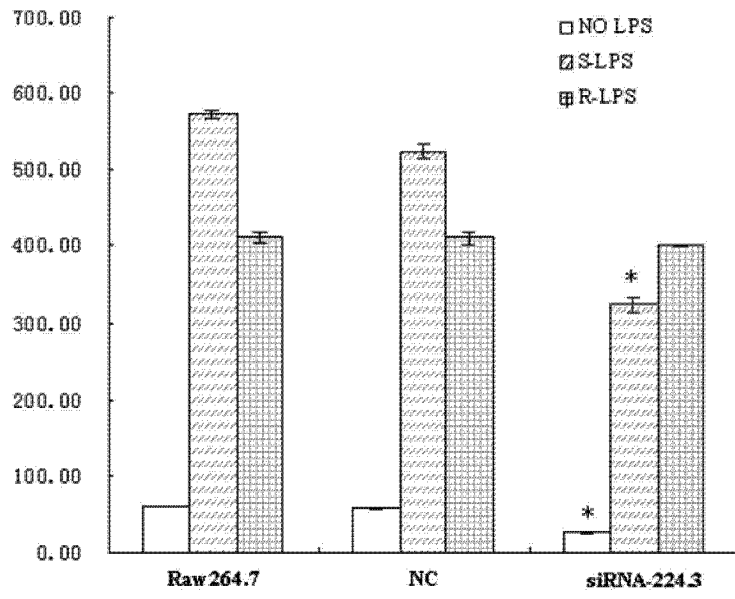


图 6

专利名称(译)	一种鉴别平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖的方法		
公开(公告)号	CN102778570B	公开(公告)日	2014-11-05
申请号	CN201210185198.6	申请日	2012-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	海南大学		
申请(专利权)人(译)	海南大学		
当前申请(专利权)人(译)	海南大学		
[标]发明人	杜丽 王凤阳 焦寒伟 雷明		
发明人	杜丽 王凤阳 焦寒伟 雷明		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
代理人(译)	罗笛		
审查员(译)	李进进		
其他公开文献	CN102778570A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
 本发明公开了一种鉴别平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖的方法，首先合成能有效干扰小鼠mCD14基因表达的小干扰核糖核酸分子(siRNA-224.3)及阴性对照siRNA-NC，并制备成重组慢病毒；其次，将慢病毒感染小鼠巨噬细胞RAW264.7，并用嘌呤霉素筛选出阳性克隆，构建稳定细胞系siRNA-224.3、siRNA-NC；最后，应用酶联免疫吸附实验检测分别用平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖刺激条件下表达该小干扰核糖核酸分子的小鼠单核巨噬细胞稳定细胞系细胞上清中的一氧化氮、肿瘤坏死因子α和白细胞介素6，通过比较其差异，实现鉴别平滑型脂多糖和粗糙型脂多糖。本发明的方法相比现有技术更加方便，准确性更高。

