

[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 200810119120.8

[51] Int. Cl.

C40B 50/06 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 15/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年1月7日

[11] 公开号 CN 101338454A

[22] 申请日 2008.8.27

[21] 申请号 200810119120.8

[71] 申请人 中国科学技术大学

地址 230026 安徽省合肥市金寨路96号

[72] 发明人 田志刚 葛葵葵 孙 纳 魏海明

[74] 专利代理机构 北京科迪生专利代理有限责任公司

代理人 李新华 成金玉

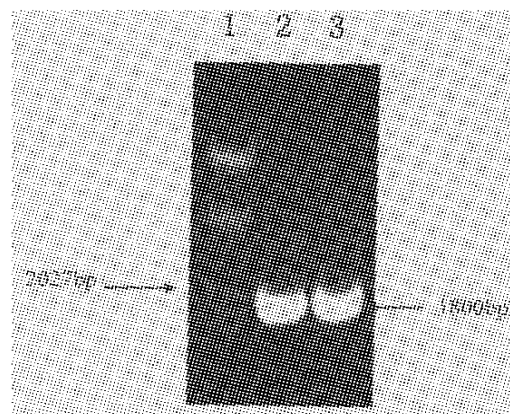
权利要求书2页 说明书4页 附图4页

[54] 发明名称

一种构建膜蛋白 cDNA 文库的方法及其应用

[57] 摘要

本发明涉及了一种构建膜蛋白 cDNA 文库方法及其应用。该方法构建了用于特异性筛选膜蛋白表达的真核表达载体 pSecTag - attR, 该表达载体可与任意带有 λ 噬菌体重组位点 attL 的 cDNA 克隆文库进行克隆重组获得 cDNA 表达文库, 转染 COS - 1 细胞后, 通过进一步免疫荧光筛选对文库中表达膜蛋白克隆进行筛选, 获得膜蛋白 cDNA 表达文库。作为该方法的应用, C57BL/6 小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白 cDNA 文库被建立, 通过对该文库进行鉴定分析, 证明该方法是一种高通量特异性筛选膜蛋白的有效方案, 为描绘特定组织细胞表面膜蛋白图谱以及研究未知膜蛋白提供了一种有力的手段。



1、一种构建膜蛋白 cDNA 文库的方法，包括以下步骤：

A：用于筛选膜蛋白的真核表达载体的构建；

B：cDNA 表达文库的构建；

C：cDNA 表达文库稳定转染入细胞，获得稳定表达该文库的细胞株；

D：表达该文库的细胞株经荧光筛选，获得膜蛋白特异的 cDNA 文库。

2、如权利要求 1 所述的构建膜蛋白 cDNA 文库的方法，其特征在于所述的用于筛选膜蛋白的真核表达载体的构建包括以下步骤：

以真核表达载体 pcDNA-DEST47 为模板，通过 PCR 扩增获得包含限制性内切酶 HindIII 与 Xho I 的酶切位点，多聚组氨酸识别位点，attR 重组位点以及自杀基因 ccdB 的基因片段的阳性克隆，PCR 获得的片段经限制性内切酶 HindIII 与 Xho I 双酶切后回收，与同样经过限制性内切酶 HindIII 与 Xho I 双酶切回收的包含有用于引导蛋白穿膜的信号肽 Igk 的分泌型载体 pSecTagB 连接，连接产物转化大肠杆菌，筛选阳性重组子获得用于筛选膜蛋白的真核表达载体 pSecTag-attR。

3、如权利要求 1 所述的构建膜蛋白 cDNA 文库的方法，其特征在于所述的大肠杆菌为感受态 DB3.1。

4、如权利要求 1 所述的构建膜蛋白 cDNA 文库的方法，其特征在于所述的膜蛋白 cDNA 表达文库是由克隆文库与上述 pSecTag-attR 表达载体经 λ 噬菌体特异性重组位点 attL 与 attR 进行 LR 重组反应获得。

5、如权利要求 1 所述的构建膜蛋白 cDNA 文库的方法，其特征在于所述的稳定表达该文库的细胞株是将该膜蛋白 cDNA 表达文库经脂质体介导转入哺乳动物细胞，经抗生素筛选获得稳定表达 cDNA 文库的细胞克隆库，细胞克隆库经抗多聚组氨酸抗体标记，流式分选细胞仪荧光筛选，获得特异性表达膜蛋白的 cDNA 文库，该文库稳定表达于该细胞。

6、如权利要求 1 所述的构建膜蛋白 cDNA 文库的方法，其特征在于所述的膜蛋白 cDNA 表达文库转入的哺乳动物细胞为 COS-1 细胞。

7、如权利要求 1 所述的构建膜蛋白 cDNA 文库的方法，其特征在于膜蛋白文库的筛选标记为抗多聚组氨酸的荧光抗体。

8、如权利要求 1 所述的构建膜蛋白 cDNA 文库的方法，其特征在于膜蛋白文库的筛选的方法为流式细胞筛选技术

9、一种用于筛选膜蛋白的真核表达载体，其特征在于该真核表达载体包含信号肽 Igk，

多聚组氨酸识别位点以及 attR 重组位点。

10、一种膜蛋白 cDNA 文库的应用，含有 attL 重组位点的小鼠肝脏淋巴细胞 cDNA 克隆文库被转入表达载体，依据上述方法，最终成功建立了小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白 cDNA 表达文库，经 RT-PCR 与流式细胞术分析鉴定，该文库具有高通量及高特异性。

一种构建膜蛋白 cDNA 文库的方法及其应用

技术领域

本发明涉及一种构建膜蛋白 cDNA 文库方法，包括用于筛选膜蛋白的真核表达载体的构建，膜蛋白在哺乳动物细胞 COS-1 表面的表达及荧光筛选；并将其应用于小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白的特异性高通量筛选。

背景技术

膜蛋白是细胞质膜的重要组成部分，在质膜发挥生物学功能的过程中发挥着至关重要的作用。例如运输蛋白，连接蛋白以及一些酶类分别在细胞的物质运输与交换，细胞骨架的构成与维持以及细胞能量的产生及信号传导中发挥着重要的作用。其中，受体蛋白作为一类功能多样的蛋白，在维持细胞生存发育中必不可少；并且在淋巴细胞发挥生物学功能的过程中有着决定性作用。

淋巴细胞是机体内一群重要的免疫细胞，在机体的免疫防御、免疫稳定与免疫监视中都发挥着重要作用。主要表现在抵抗和清除病原微生物或其它异物，清除损伤或衰老的细胞，维持其生理平衡的功能以及识别和清除体内出现的突变细胞，防止发生肿瘤。淋巴细胞表面膜蛋白受体与炎症损伤触发密切相关，对淋巴细胞表面膜受体的研究与膜蛋白谱的描绘对研究淋巴细胞功能，维持机体的免疫平衡有着重要意义。

目前，对淋巴细胞表面膜蛋白的研究有一定进展，一些新蛋白的发现极大促进了对淋巴细胞功能的研究，然而仍有大量重要功能的膜蛋白未被发现鉴定，一些重要组织（如肝脏）的淋巴细胞表面膜蛋白谱的描绘尚处于空白，其根本原因是尚无大规模高通量特异的筛选膜蛋白质的方法。

目前，对膜蛋白的筛选主要有几种方法。免疫筛选方法是寻找未知膜蛋白的常用方法（Seed B, Aruffo A. Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:3365-3369.），即利用一种蛋白的已知抗体或配体与该种蛋白的特异的相互作用对该未知蛋白进行检测鉴定。然而，由于需要利用已知的抗体和配体，使该种方案有很大的局限性。近年来，一种信号肽捕获技术被应用到膜蛋白的筛选研究中（Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. Science 1993;261:600-603.），这种技术可以特异的筛选编码信号肽的膜蛋白与分泌蛋白的 cDNA，然而大量存在的分泌型蛋

白仍然对膜蛋白的研究产生很大的干扰。目前,仍然缺乏一种高通量特异筛选膜蛋白的方法。

发明内容

本发明的目的是建立一种构建膜蛋白 cDNA 文库方法,并将其应用于小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白的特异性高通量筛选。

技术方案:

本发明构建膜蛋白 cDNA 文库的方法,包括以下步骤:

- A: 用于筛选膜蛋白的真核表达载体的构建;
- B: cDNA 表达文库的构建;
- C: cDNA 表达文库稳定转染入细胞,获得稳定表达该文库的细胞株;
- D: 表达该文库的细胞株经荧光筛选,获得膜蛋白特异的 cDNA 文库。

其中所述的用于筛选膜蛋白的真核表达载体的构建包括以下步骤:

以真核表达载体 pcDNA-DEST47 为模板,通过 PCR 扩增获得包含限制性内切酶 HindIII 与 Xho I 的酶切位点,多聚组氨酸识别位点,attR 重组位点以及自杀基因 ccdB 的基因片段的阳性克隆,PCR 获得的片段经限制性内切酶 HindIII 与 Xho I 双酶切后回收,与同样经过限制性内切酶 HindIII 与 Xho I 双酶切回收的包含有用于引导蛋白穿膜的信号肽 Igk 的分泌型载体 pSecTagB 连接,连接产物转化大肠杆菌,筛选阳性重组子获得用于筛选膜蛋白的真核表达载体 pSecTag-attR。

所述的大肠杆菌为感受态 DB3.1。

所述的膜蛋白 cDNA 表达文库是由克隆文库与上述 pSecTag-attR 表达载体经 λ 噬菌体特异性重组位点 attL 与 attR 进行 LR 重组反应获得。

所述的稳定表达该文库的细胞株是将该膜蛋白 cDNA 表达文库经脂质体介导转入哺乳动物细胞,经抗生素筛选获得稳定表达 cDNA 文库的细胞克隆库,细胞克隆库经抗多聚组氨酸抗体标记,流式分选细胞仪荧光筛选,获得特异性表达膜蛋白的 cDNA 文库,该文库稳定表达于该细胞。

所述的膜蛋白 cDNA 表达文库转入的哺乳动物细胞为 COS-1 细胞。

本发明用于筛选膜蛋白的真核表达载体包含信号肽 Igk,多聚组氨酸识别位点以及 attR 重组位点。

本发明膜蛋白 cDNA 文库的应用,含有 attL 重组位点的小鼠肝脏淋巴细胞 cDNA 克隆文库被转入表达载体,依据上述方法,最终成功建立了小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白 cDNA 表达文库,经 RT-PCR 与流式细胞术分析鉴定,该文库具有高通量及高特异性。

本发明构建膜蛋白 cDNA 文库的方法,膜蛋白文库的筛选标记为抗多聚组氨酸的荧光抗

体，膜蛋白文库的筛选的方法为流式细胞筛选技术。

有益效果

与已有方法相比，本发明提出了一种膜捕获的方法，即利用真核哺乳动物细胞作为表达载体，以 Igk 先导肽作为蛋白穿膜的信号肽，以多聚组氨酸作为荧光筛选的标记，将 cDNA 文库编码蛋白向胞外引导，当含有疏水跨膜序列的蛋白穿过细胞膜时，即被细胞膜捕获并固定于膜表面，随后这些细胞被抗多聚组氨酸抗体荧光标记，由流式分选细胞计数仪分选，从而获得了一个高特异性的膜蛋白 cDNA 文库。该文库通过抗标签蛋白抗体对膜蛋白进行筛选，而不依赖膜蛋白特异的抗体或配体分子；同时，由于分泌型蛋白不含有疏水跨膜片段，文库中可排除分泌型蛋白的干扰；大大提高了筛选效率和筛选特异性，是一种大规模高通量特异的筛选膜蛋白质的方法。

附图说明

图 1 为 attR 重组位点片段的 PCR 扩增的电泳图谱，该片段包含酶切位点，多聚组氨酸识别位点，attR 重组位点以及自杀基因 ccdB 的基因片段，泳道 1 为 DNA marker，泳道 2, 3 为两个独立的克隆。

图 2 为 pSecTag-attR 重组载体的构建流程

图 3 为小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白 cDNA 表达文库的荧光筛选过程

图 4 为小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白 cDNA 表达文库的免疫荧光染色分析，A, B, C, D 分别为未转染 COS-1 细胞，转染后细胞，第一轮流式细胞仪筛选后细胞以及第二轮筛选后细胞。

图 5 为小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白 cDNA 表达文库的 RT-PCR 分析，泳道 1-8 分别为对基因 TLR2, TLR3, TLR4, NKG2A, NKG2D, Bcl-2, Bcl-x1 及 b-actin 的 PCR 检测。

图 6 为小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白 cDNA 表达文库的流式细胞术分析

具体实施方式

实施例 1：真核表达载体 pSecTag-attR 的构建

以真核表达载体 pcDNA-DEST47 为模板，通过 PCR 扩增获得包含限制性内切酶 HindIII 与 Xho I 的酶切位点，多聚组氨酸识别位点，attR 重组位点以及自杀基因 ccdB 的基因片段，预计长度 1800bp，如图 1 所示，2, 3 位两个独立的阳性克隆。参数为：94℃ 40 秒，58℃ 30 秒，72℃ 3 分钟，循环 30 次，末次延伸 7 分钟。pSecTag-attR 重组载体的构建流程如图 2 所示：PCR 获得的片段经限制性内切酶 HindIII 与 Xho I 双酶切后回收，与同样经过限制性内切酶 HindIII 与 Xho I 双酶切回收的包含有用于引导蛋白穿膜的信号肽 Igk 的分泌型载体 pSecTagB 连接，连接产物转化大肠杆菌感受态 DB3.1，筛选阳性重组子。该表达载体具有阳性重组子委托上海英骏生物技术有限公司测序，结果与报到序列一致。

实施例 2: 小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白 cDNA 表达文库的构建及筛选

2.1 小鼠肝脏淋巴细胞总蛋白 cDNA 表达文库的构建

小鼠肝脏淋巴细胞 cDNA 克隆文库保存于含有 attL 重组位点的 pDONR207 载体中, 经 λ 噬菌体特异性重组位点 attL 与 attR 进行 LR 重组反应, 克隆文库中的基因重组进入真核表达载体 pSecTag-attR, 得到淋巴细胞总蛋白 cDNA 表达文库, 文库载体转化大肠杆菌感受态 DH5 扩增, 文库滴度达到 10^9 pfu/ml。

2.2 表达文库在 COS-1 细胞中的表达

cDNA 表达文库通过脂质体介导的方法转染至 COS-1 细胞。首先, COS-1 细胞培养在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中, 按每孔 3×10^5 细胞的量在六孔板中接种指数生长期的 COS-1 细胞, 37°C 5%CO₂ 培养细胞至约 80% 汇片。表达文库载体大量提取纯化后, 以 5ug/孔的比例由 lipofectamine 2000 接到转染至 COS-1 细胞, 48h 后进行加压筛选, 筛选抗生素 zeocin 浓度为 1000mg/L。一周后, 获得抗性的细胞被用于膜蛋白文库的荧光筛选。

2.3 小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白 cDNA 表达文库的荧光筛选

表达有小鼠肝脏淋巴细胞 cDNA 文库的 COS-1 细胞被消化, 清洗后用荧光标记的抗多聚组氨酸抗体进行孵育, 表达有膜蛋白的细胞克隆胞外端带有多聚组氨酸标签, 为荧光阳性细胞。如图 3 所示, 约有 5% 的细胞克隆表面有膜蛋白的表达, 经过流式分选细胞仪分选, 表达膜蛋白的细胞克隆阳性率达到 98% 以上。抗多聚组氨酸抗体的免疫荧光染色 (见图 4) 同样证明两轮筛选过后, 98% 以上细胞表达有跨膜蛋白。该文库是一种膜蛋白特异性的小鼠肝脏淋巴细胞 cDNA 文库。

实施例 3: 小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白 cDNA 表达文库的鉴定

3.1 小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白 cDNA 表达文库的 RT-PCR 分析

对表达有小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白 cDNA 文库的 COS-1 细胞进行扩增培养, Trizol 法提取细胞总 RNA, 逆转录后的 cDNA 用不同的检测引物进行 PCR 鉴定, 结果如图 5 所示, 所有检测的膜蛋白 (TLR2, TLR3, TLR4, NKG2A, NKG2D, Bcl-2, Bcl-x1) 均在文库中有所表达, 证明该文库具有高通量, 而非膜蛋白 β -actin 则没有表达。证明该文库具有高特异性。

3.2 小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白 cDNA 表达文库的流式细胞术分析

对表达有小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白 cDNA 文库的 COS-1 细胞进行扩增培养, 收集细胞, 大鼠血清封闭, 将 COS-1 细胞与针对小鼠淋巴细胞表面不同受体的抗体进行孵育, 如图 6 所示, 与 RT-PCR 分析结果一致, 所检测的典型淋巴细胞膜蛋白受体分子全部在文库中被检测到, 证明该文库建立的方法适用于对膜蛋白的高通量筛选。

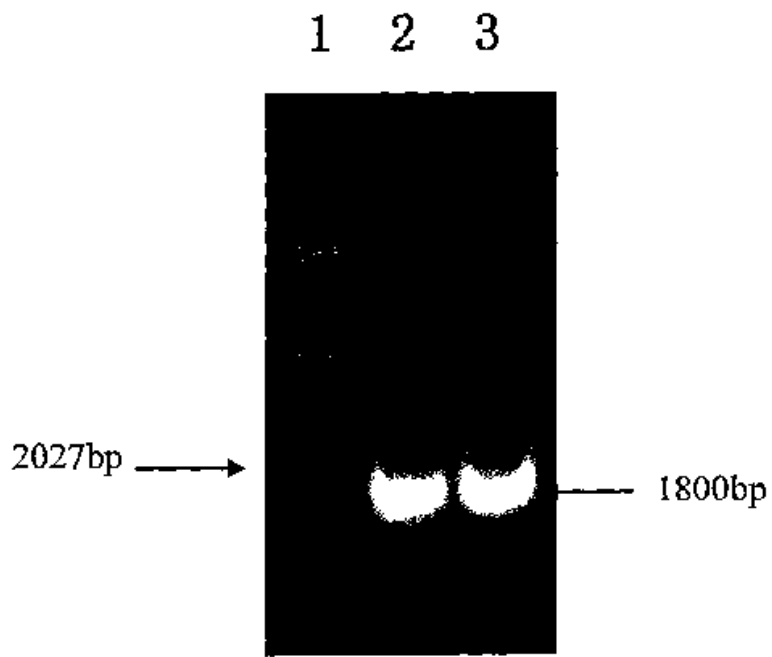


图 1

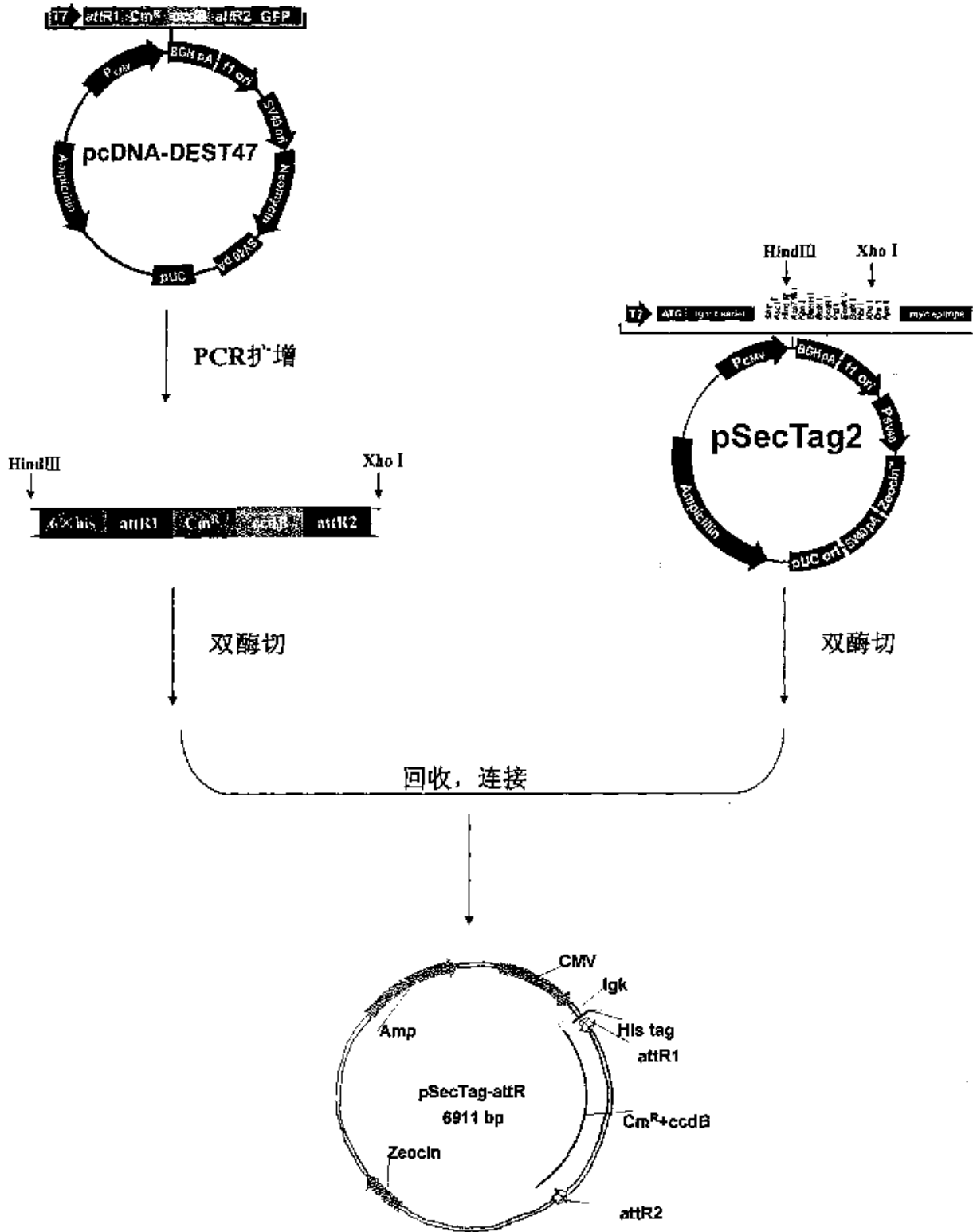


图 2

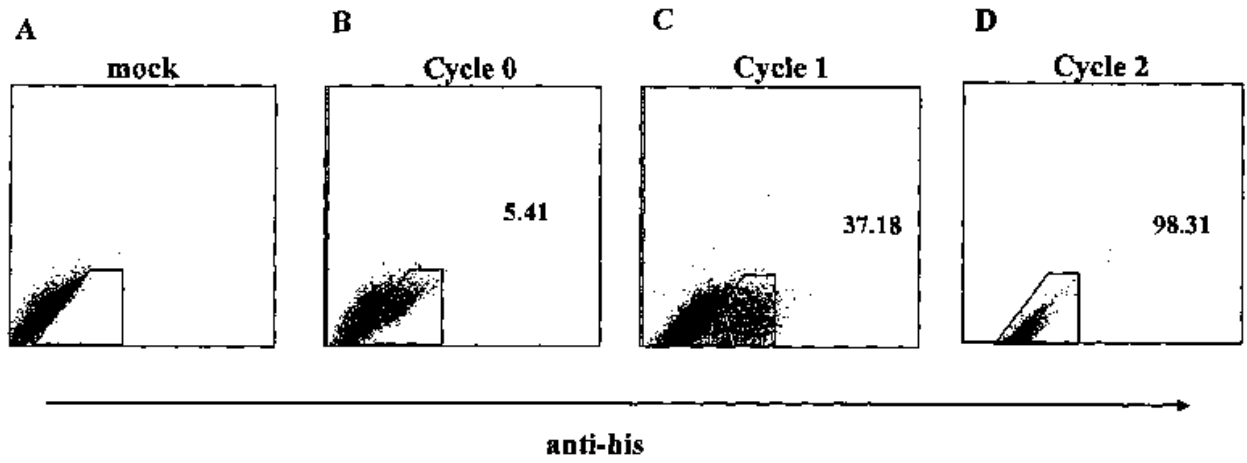


图 3

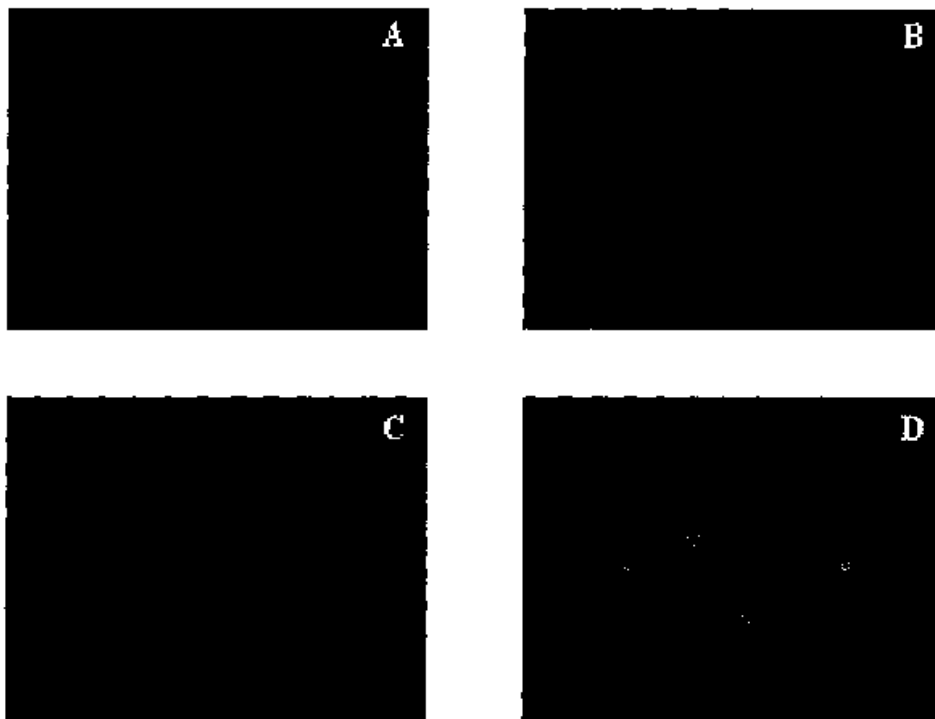


图 4

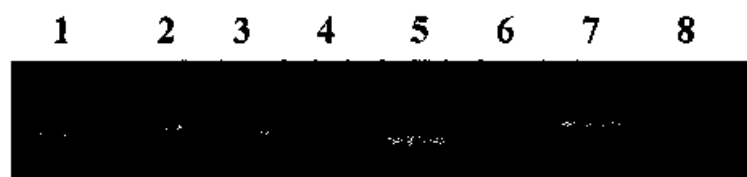


图 5

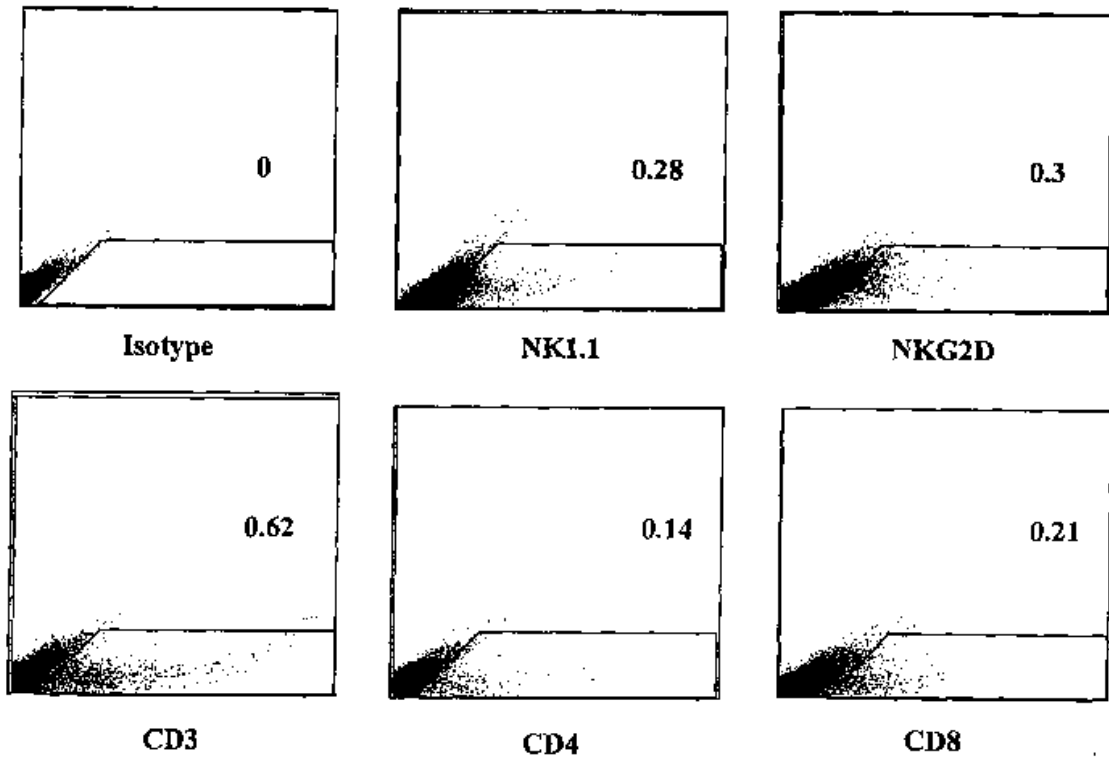


图 6

专利名称(译)	一种构建膜蛋白cDNA文库的方法及其应用		
公开(公告)号	CN101338454A	公开(公告)日	2009-01-07
申请号	CN200810119120.8	申请日	2008-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学技术大学		
申请(专利权)人(译)	中国科学技术大学		
[标]发明人	田志刚 葛葵葵 孙汭 魏海明		
发明人	田志刚 葛葵葵 孙汭 魏海明		
IPC分类号	C40B50/06 C12N15/85 C12N5/10 G01N33/53 G01N21/64 G01N15/00		
代理人(译)	李新华 成金玉		
其他公开文献	CN101338454B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及了一种构建膜蛋白cDNA文库方法及其应用。该方法构建了用于特异性筛选膜蛋白表达的真核表达载体pSecTag - attR，该表达载体可与任意带有λ噬菌体重组位点attL的cDNA克隆文库进行克隆重组获得cDNA表达文库，转染COS - 1细胞后，通过进一步免疫荧光筛选对文库中表达膜蛋白克隆进行筛选，获得膜蛋白cDNA表达文库。作为该方法的应用，C57BL/6小鼠肝脏淋巴细胞膜蛋白cDNA文库被建立，通过对该文库进行鉴定分析，证明该方法是一种高通量特异性筛选膜蛋白的有效方案，为描绘特定组织细胞表面膜蛋白图谱以及研究未知膜蛋白提供了一种有力的手段。

