

权 利 要 求 书

1. 一种鸡肝癌细胞 TREM-B2 基因过表达稳转株的构建方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 人工合成 5' 端含有酶切位点 EcoRI 和 3' 端含有酶切位点 BamHI 并包含有 TREM-B2 cDNA 全序列信息的核苷酸序列, 命名为人工合成的含鸡 TREM-B2 核苷酸序列, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示, 含有鸡 TREM-B2 基因信息的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示, 其对应的编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示;

(2) 将慢病毒过表达质粒 pCD513B-1 与所述人工合成的含鸡 TREM-B2 核苷酸序列进行 EcoRI 和 BamHI 双酶切处理, 并通过 T4 连接酶构建 pCD513B-1-TREM-B2 重组质粒, 然后转化 Stab13 感受态细胞, 挑取单克隆菌落, 扩大培养后提取质粒, 利用基因测序法鉴定正确的 pCD513B-1-TREM-B2 重组质粒, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示;

(3) 将所述 pCD513B-1-TREM-B2 重组质粒与病毒包装质粒 pMD2.G 和 psPAX₂ 共转染至肝癌细胞中, 进行病毒包装, 通过荧光细胞的数量对病毒滴度进行监控;

(4) 病毒滴度以 MOI=5~8 感染鸡肝癌细胞时, 加入终浓度为 5~8 μ g/ml 的 polybrene 协助病毒; 将感染病毒的所述鸡肝癌细胞进行正常传代后, 加入嘌呤霉素进行筛选, 嘌呤霉素的终浓度为 2~6 μ g/ml, 每 2~3 天更换嘌呤霉素筛选培养基, 连续培养 8~10 天, 通过显微镜观察 GFP 荧光细胞比例得到稳定表达 TREM-B2 的细胞株, 然后将细胞进行冻存处理, 得到鸡肝癌细胞 TREM-B2 基因过表达稳转株;

所述步骤 (2) 中的人工合成的含鸡 TREM-B2 核苷酸序列具体地是插入到 pCD513B-1 的 EcoRI 和 BamHI 酶切位点之间;

所述的步骤 (2) 中将慢病毒包装质粒载体进行酶切的体系如下所示: 1 μ g/ μ l GV218 1.8-2.2 μ l, 10 \times NEB buffer 4.5-5.5 μ l, 100 \times BSA 0.4-0.6 μ l, EcoRI 0.8-1.2 μ l, BamHI 0.8-1.2 μ l, 余量为 ddH₂O, 以上总体积为 50 μ l;

所述的步骤(2)中将人工合成含 TREM-B2 核苷酸序列酶切的体系如下所示: 80-100 ng/ μ l 鸡 TREM-B2 15-20 μ l, 10 \times NEB buffer 4-6 μ l, 100 \times BSA 0.4-0.6 μ l, EcoRI 0.8-1.2 μ l, BamHI 0.8-1.2 μ l, 余量为 ddH₂O, 以上总体积为 50 μ l;

所述的步骤(2)中连接 pCD513B-1 酶切产物和人工合成含 TREM-B2 核苷酸序列酶切产物的连接体系如下: pCD513B-1 1.2-1.8 μ l, 人工合成的含鸡 TREM-B2 核苷酸序列 2.0-2.8 μ l, 10 \times Thermo T4 Buffer 1.5-2.5 μ l, Thermo T4 Ligase 0.4-0.6 μ l, 余量为 ddH₂O, 以上总体积为 20 μ l。

~~2、根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述的步骤(2)中连接pCD513B-1酶切产物和人工合成含TREM-B2核苷酸序列酶切产物的连接体系如下:pCD513B-1 1.2-1.8 μ l, 人工合成的含鸡 TREM-B2 核苷酸序列 2.0-2.8 μ l, 10 \times Thermo T4 Buffer 1.5-2.5 μ l, Thermo T4 Ligase 0.4-0.6 μ l, 余量为 ddH₂O, 以上总体积为 20 μ l。~~

~~3、根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述步骤(4)中的嘌呤霉素的终浓度为2~6 μ g/ml。~~

42、一种鸡 TREM-B2 的 pCD513B-1-TREM-B2 表达载体,其特征在于,其核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。