

鸡 L-2 基因 cDNA 输卵管组织特异性 表达载体的构建与表达*

吴庭才, 李银聚, 张春杰, 程相朝

(河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003)

[摘 要] 将克隆并测序的鸡卵清蛋白基因 5 端调控序列和鸡 L-2 基因 cDNA, 以串联方式置于真核表达载体 pDNA₃ 的 CMV 启动子下游, 构建了鸡输卵管定位表达载体 pDNA₃-OVP-L2。将真核表达载体 pDNA₃-L2 和构建的输卵管定位表达载体 pDNA₃-OVP-L2 分别转染鸡输卵管上皮细胞, 激素诱导 72 h 后, 用淋巴细胞转化试验检测细胞培养液中 L-2 的表达水平及生物学活性。结果显示, 转染细胞均可表达 L-2, 且所表达的 L-2 有促进 T 淋巴细胞转化和淋巴母细胞成熟的活性; 转染 pDNA₃-OVP-L2 的输卵管上皮细胞表达产物在 1:256 稀释水平下仍具有促进 T 淋巴细胞转化和淋巴母细胞成熟的活性。转染 pDNA₃-L2 载体的输卵管上皮细胞虽有 L-2 表达, 但水平较低。

[关键词] 鸡; L-2 基因 cDNA; 输卵管定位表达; 转染

[中图分类号] S814.8; Q782

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)10-0071-04

转基因动物的一个重要作用是利用动物特定的组织器官生产外源基因的表达产物, 即构建生物反应器。由此人们首先想到的是建立哺乳动物的乳腺生物反应器和家禽的输卵管定位表达体系。这些器官可以在不损伤机体的条件下, 源源不断地生产人们预先设计的目的基因的表达产物。与哺乳动物的乳腺生物反应器相比, 对鸡输卵管定位表达体系的研究相对滞后, 其主要原因是由于鸡胚发育的特殊性。但鸡所具有的个体小、饲养密度大、产蛋多、蛋白提取纯化技术成熟等优点, 使得鸡输卵管定位表达体系的研究日益受到重视。卵清蛋白是鸡卵清中高丰度表达的蛋白, 因此许多研究者均选择用鸡卵清蛋白基因 5 端调控序列作为鸡输卵管组织定位表达体系的调控元件^[1-3]。

鸡白介素-2 (Chicken Interleukin-2, CIL-2) 是 T 淋巴细胞分泌的一种细胞因子, 具有促进 T、B 淋巴细胞增殖和分化、增强单核细胞以及 NK 细胞的杀伤活性、调节免疫反应等重要的生物学功能, 而且在转录、翻译及受体信号传导过程中也有明显作用。自 1997 年 Sundick 等^[4]首先克隆并表达出鸡 L-2 以来, 鸡 L-2 的高效表达一直是人们研究和开发的热点。本试验以洛阳土种鸡卵清蛋白基因的 5 端调控

序列作为定位表达调控元件, 将鸡 L-2 基因 cDNA 置于该调控序列下游进行定位表达, 旨在为 L-2 鸡输卵管定位表达体系的建立作有意义的探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 表达载体与质粒 pMD-OVP 和 pMD-L2 均为河南科技大学禽病研究室克隆并测序的克隆载体^[5,6], 分别是在 pMD-T 载体上插入 1.0 kb 的鸡卵清蛋白基因 5 端调控序列 (Ovalbumin Promoter, OVP) 和 0.43 kb 的鸡 L-2 cDNA 结构基因, OVP 两端分别设有 B_{am}H I 和 EcoR I 2 个酶切位点, L-2 基因 cDNA 两端分别设有 EcoR I 和 Sal I 2 个酶切位点; pDNA₃ 表达载体, 购自郑州三和金信公司。

1.1.2 工具酶和试剂 B_{am}H I, EcoR I, Sal I, HindIII, Xho I 和 Pst I 等限制性内切酶, T₄DNA 连接酶, 植物血球凝集素 (PHA), 胰蛋白酶, 均为 Sigma 公司产品; 胎牛血清及培养基 DMEM, MEM, F12, M199, 均为 GIBCO 公司产品, 购自华美生物工程公司; 刀豆蛋白 A (ConA), 购自郑州宝信生物工程公司; 牛胰岛素、雌二醇、皮质醇, 均为 Sigma 公司

* [收稿日期] 2005-02-25

[基金项目] 河南省自然科学基金项目 (0311031000)

[作者简介] 吴庭才 (1963-), 男, 河南镇平人, 副教授, 博士, 主要从事禽病及分子生物学研究。

产品,购自三和金信生物工程公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 鸡 L-2 基因 cDNA 输卵管组织特异性表达载体的构建与鉴定 将 pMD-L2 以 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切,回收 0.43 kb 的目的片段。pDNA₃ 以 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,回收 5.4 kb 的载体片段,利用 *Sal* I 和 *Xho* I 的酶切末端互相匹配的特性,将 L-2 cDNA 定向克隆到 pDNA₃ 载体上,构建真核表达载体 pDNA₃-L2。将 pMD-OVP 和 pDNA₃-L2 分别以 *Bam* H I 和 *EcoR* I 酶切,回收 1.0 kb 和 5.83 kb 的片段并作定向连接,构建输卵管组织特异性表达载体 pDNA₃-OVP-L2,重组质粒 pDNA₃-OVP-L2 以 *Bam* H I 和 *EcoR* V 双酶切。对 OVP 上游引物和 L-2 下游引物扩增鉴定。

1.2.2 输卵管上皮细胞的分离与培养 无菌条件下采取刚处死的健康初产蛋鸡输卵管壶腹膨大部约 1.5 g,去除多余脂肪组织(剩余约 1 g),置于灭菌的培养皿中,加约 50 mL F12,剪碎后转入干烤过的三角瓶中,37 ℃ 200 r/min 摇床上消化 30 min,去上清液(以去除脂肪组织)。再加入 50 mL F12,37 ℃ 200 r/min 摇床中继续消化 30 min,静置 4 min,小心吸取上清液(吸头在液面下)约 30 mL 于离心管中,加入体积分数 10% 的胎牛血清,600 r/min 离心 5 min,沉淀如上述操作洗涤 2 次后,将细胞悬于含双抗的 DMEM-F12(体积比为 1:1)混合培养液中,细胞计数应在 2×10^6 /mL 左右。

1.2.3 质粒转染输卵管上皮细胞 设 1 组空白对照组,其余 3 组分别转染 pDNA₃,pDNA₃-L2 和 pDNA₃-OVP-L2。方法为:取 6 μL (约 6 μg) 质粒 DNA 加入 54 μL DMEM-F12,同时取 18 μL 脂质体,加入 42 μL DMEM-F12,分别静置 30 min 后,将二者混合,室温下包被 45 min,然后将该混合培养液加入到盛有 3 mL 刚收获的鸡输卵管原代细胞培养液(浓度 2×10^4 /mL)的培养皿中,轻轻摇动均匀,置 41 ℃ 培养。

1.2.4 激素诱导 将上述混合培养液培养 16 h 后,依次加入雌二醇、皮质醇和胰岛素,使其终浓度分别为 0.1 μmol/L,1 μmol/L 和 50 μg/L。于 37 ℃,体积分数 5% CO₂ 条件下培养 48 h 后,取上清液,待检。

1.2.5 表达产物的检测 采用 T 淋巴细胞转化试验——形态学检查法^[7]。

(1) 营养液的配制与检测分组。取 M 199 培养基

79 mL,依次加入胎牛血清 20 mL,双抗 1 mL,用灭菌的 56 g/L NaHCO₃ 溶液调 pH 值为 7.4,抽滤后备用。设空白对照,pDNA₃,pDNA₃-L2 和 pDNA₃-OVP-L2 共 4 组。

(2) 待检上清液的倍比稀释。取被检上清液 2.5 mL 于一培养瓶中,加上述 M 199 营养液 2.5 mL,混匀后取出 2.5 mL 于另一培养瓶中,加等体积 M 199 营养液,如此依次对每组被检上清液做 1:2 至 1:256 的 8 个梯度倍比稀释,每个培养瓶加 PHA 使其终浓度为 50 μg/mL。

(3) 培养检测。无菌取健康鸡抗凝血,每组培养瓶各加 0.5 mL,混匀后置 37 ℃ 培养箱培养 72 h,每天摇混 2 次。取出后加入 37 ℃ 预温的 8.7 g/L NH₄Cl 溶液 3 mL,37 ℃ 继续孵育 20 min,加生理盐水 6 mL,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,将沉淀物均匀涂片,尤其是推片到末端时尽量无积累,厚薄力求均匀。瑞氏染色后油镜检查,检查计数时从推片的尾端开始,从左到右、从上到下观察 200 个淋巴细胞,按公式计算淋巴细胞转化率:

淋巴细胞转化率/% = [(过渡型淋巴细胞 + 淋巴母细胞)/淋巴细胞总数] × 100%

对每组细胞上清液分别进行检测,每个梯度重复 2 次,结果以 2 次的平均数计。

2 结果与分析

2.1 pDNA₃-L2 和 pDNA₃-OVP-L2 表达载体的酶切鉴定

由图 1 可知,重组真核表达载体 pDNA₃-L-2 经 *EcoR* I 和 *EcoR* V 双酶切,在约 5.4 kb 和 0.43 kb 处各得到 1 个片段,表明 pDNA₃-L-2 为重组阳性质粒。

图 2 表明,重组 pDNA₃-OVP-L-2 经 *Bam* H I 和 *EcoR* V 双酶切,能够被切出 5.4 kb 和 1.43 kb 2 个片段,同时以 OVP 上游引物和 L-2 下游引物扩增,得到了 1.43 kb 的片段,这均与理论设计相符。

2.2 转染质粒的输卵管上皮细胞培养

对转染后的输卵管上皮细胞进行培养,培养期间每天观察 2 次,可见到单个或成簇的细胞,且细胞在观测期间均生长良好。

2.3 T 淋巴细胞转化试验检测结果

由表 1 可知,pDNA₃-OVP-L2 组各稀释度的转化率明显高于对照组和 pDNA₃ 组($P < 0.01$),且过渡型细胞极少;pDNA₃-L2 组的 T 淋巴细胞转化率也明显高于对照组和 pDNA₃ 组($P < 0.01$),说

明也有一定量 L-2 的表达, pDNA₃-OV P-L 2 组总体高于 pDNA₃-L 2 组, 但在 1/16 稀释度以前差异不显著, 在 1/32 稀释度以后差异显著 ($P < 0.05$)。

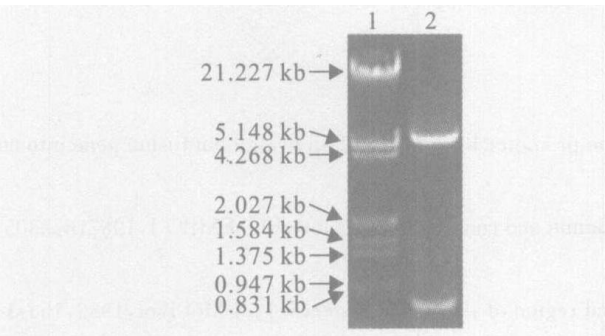


图 1 重组质粒 pDNA₃-L 2 的酶切鉴定

1. Marker DNA/EcoR I + H indIII; 2. EcoR I + EcoR V 酶切

Fig 1 Identification of pDNA₃-L 2

1. Marker DNA/EcoR I + H indIII;

2. Identified by digested with EcoR I + EcoR V

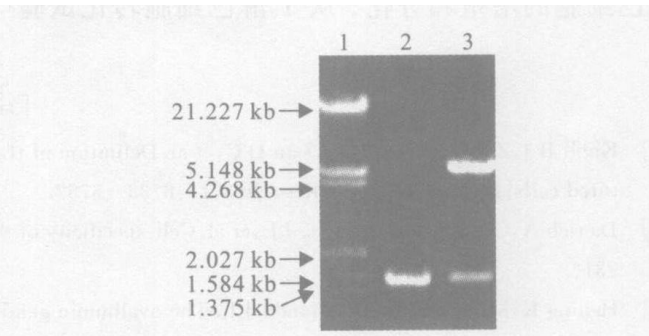


图 2 重组质粒 pDNA₃-OV P-L 2 的酶切鉴定和 PCR 鉴定

1. Marker DNA/EcoR I + H indIII; 2. PCR 鉴定;

3. BamH I + EcoR V 酶切

Fig 2 Identification of pDNA₃-OV P-L 2

1. Marker DNA/EcoR I + H indIII;

2. Identified by PCR; 3. Identified by

digested with BamH I + EcoR V

表 1 各组上清液不同稀释度 T 淋巴细胞转化率

Table 1 Ratio of T lymphocyte conversion in different dilutions of cell culture %

处理 Treatment	稀释度 Dilution							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
对照组 CK	64	70	61.5	62	64.5	66	62	67.5
pDNA ₃	70.5	67	69.5	67	73.5	67.5	66	68
pDNA ₃ -L 2	97.5	93	94.5	98.5	92.5	89	82	84.5
pDNA ₃ -OV P-L 2	97.5	100	99	98	100	98.5	96	92.5

3 讨 论

将外源基因通过转基因手段在动物体内获得高效表达, 是一个十分诱人的获得廉价目的基因表达产物的新途径。其中鸡输卵管定位表达体系格外引人注目。然而, 对于鸡输卵管定位表达体系的建立, 虽经科技工作者多年研究, 但目前尚未取得突破性进展, 其原因主要是转基因方法不够完善, 表达调控元件装配还未达到最优化的程度。

近 20 年来, 人们对卵清蛋白基因 5' 端调控序列作为基因表达调控模型, 进行了深入而广泛的研究^[1~3], 这些调控序列中, 除含有鸡卵清蛋白基因上游启动子 (Chicken ovalbumin in upstream promoter, COUP)^[8,9] 外, 还含有激素受体结合位点^[10~12]。体外培养的细胞在有激素诱导时, 外源基因表达水平可提高 10 倍以上。至于调控序列的长度, 不同研究者在选取时各有差异, 但 Park 等^[13]认为, -900~+9 bp 卵清蛋白基因 5' 端调控序列足以指导外源基因的定位表达。

本试验以河南科技大学禽病研究室洛阳土种鸡

L-2 cDNA 为目的基因, 应用所设计的位点, 在真核表达载体 pDNA₃-L 2 的目的基因上游, 插入 1.0 kb 鸡卵清蛋白基因的 5' 端调控序列, 并在体外培养的鸡输卵管上皮细胞中进行表达。从 T 淋巴细胞转化试验结果可以看出, 转染细胞培养上清液中含有生物活性的 L-2。说明 1.0 kb 鸡卵清蛋白基因 5' 端调控序列具有定位表达能力, 且 L-2 cDNA 自身的信号肽序列能使已表达的产物分泌到细胞外, 表达产物在 1/256 稀释度时仍具有促进 T 淋巴细胞增殖的能力。

真核表达载体 pDNA₃-L 2 的细胞培养上清液, 也有一定的促进 T 淋巴细胞增殖转化的能力, 这可能是由于上皮细胞摄入质粒后也能表达少量的 L-2。据此认为, 在输卵管定位表达时, 给真核表达载体加上定位表达的启动子, 表达效果较为理想。这可能是由于 2 种真核表达调控元件串联后有一定的协同效应。

在 T 淋巴细胞转化试验中发现, 对照组和 pDNA₃ 组中处于过渡态的淋巴细胞数目较多, 约占淋巴细胞总数的 14%~37% 不等, 而 pDNA₃-OV P-

IL-2 组中约占1%~4%,说明IL-2在淋巴细胞转化过程中具有促进淋巴母细胞成熟的作用。

鸡IL-2具有许多生物学功能,能够促进T、B淋巴细胞的增殖和分化。从T淋巴细胞转化试验可以

看出,本研究所构建的定位表达载体,在体外培养的输卵管上皮细胞中表达出了具有生物学功能的IL-2,为进一步构建稳定的定位表达体系和研究IL-2的生物学功能奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Knoll B J, Zarucki-Schulz T, Dean D C, et al Definition of the ovalbumin gene promoter by transfer of an ovalglobin fusion gene into cultured cells[J]. Nucleic Acids Res, 1983, 11: 6733- 6752
- [2] Dierich A, Gaub M P, Lepenne J L, et al Cell-specificity of the chicken ovalbumin and conalbumin promoter[J]. EMBO J, 1987, 6: 2305- 2312
- [3] Heiling R, Muraskowski R, Mandl J L. The ovalbumin gene family the 5' end region of the X and Y genes[J]. J Mol Biol, 1982, 156: 1- 19
- [4] Sundick R S, Gill-Dixon C. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15[J]. J Immunol, 1997, 159(2): 720- 725
- [5] 吴庭才, 李银聚, 张春杰, 等. 鸡卵清蛋白5'端调控区的克隆及其序列分析[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(10): 55- 58
- [6] 李银聚, 程相朝, 吴庭才, 等. 鸡新城疫I系疫苗诱导鸡IL-2基因转录及cDNA克隆的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(9): 69- 73
- [7] 刘玉斌, 苟仕金. 动物免疫学实验技术[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1989: 226- 229
- [8] Sagami I, Tsai S Y, Wang H, et al Identification of two factors required for transcription of the ovalbumin gene[J]. Mol Cellular Biol, 1986, 6: 4259- 4267
- [9] Wang L H, Tsai S Y, Cook R G, et al COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily[J]. Nature, 1989, 340: 163- 266
- [10] Dean D C, Knoll B J, Riser M E, et al A 5' flanking sequence essential for progesterone regulation of an ovalbumin fusion gene[J]. Nature, 1983, 305: 551- 554
- [11] Sanders M M, McKnight G S. Positive and negative regulatory element control the steroid-responsive ovalbumin promoter[J]. Biochemistry, 1988, 27: 6550- 6557
- [12] Tora L, Gaub M P, Mader S, et al Cell specific activity of a GGTCA half-palindromic oestrogen-responsive element in the chicken ovalbumin gene promoter[J]. EMBO J, 1988, 7: 3771- 3778
- [13] Park H M, Okumura J I, Muramatsu T. Modulation of transcriptional activity of the chicken ovalbumin gene promoter in primary cultures of chicken oviduct cells: effects of putative regulatory elements in the 5'-flanking region[J]. Biochemistry and Molecular Biology International, 1995, 36(4): 811- 816

Construction of chicken IL-2 cDNA oviduct-specific expression vector and its expression in oviduct-cells

WU Ting-cai, LIY in-ju, ZHANG Chun-jie, CHENG Xiang-chao

(College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: The oviduct-specific expression plasmid pDNA₃-OV P-IL 2, containing chicken IL-2 gene cDNA, was constructed by linking up CMV and chicken ovalbumin gene 5' flanking regulatory region. The three plasmids, pDNA₃, pDNA₃-IL 2 and pDNA₃-OV P-IL 2, were mixed with Liposome and transfected chicken oviduct cells. After 72 h induced by Progesterone and Glucocorticoid as well as Insuline, biological activities of IL-2 were assayed with morphological docimasia method. The results showed that the plasmids of pDNA₃-OV P-IL 2 and pDNA₃-IL 2 could express IL-2, and the IL-2 could augment T cell proliferation. The expression level of pDNA₃-OV P-IL 2 was higher than that of pDNA₃-IL 2 so that the product could augment T cell proliferation after 1:256 dilution.

Key words: chicken; IL-2 gene cDNA; oviduct-specific express; transfection