

人乳铁蛋白基因乳腺特异性表达载体的构建及转染研究^{*}

张晶晶, 刘凤军, 彭淑英, 宋红卫, 张 涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 构建了携带人乳铁蛋白(LTF)基因、绿色荧光蛋白(GFP)基因的乳腺特异性表达载体(pEBL), 用脂质体法转染泌乳期莎能奶山羊乳腺上皮细胞, 转染后于荧光显微镜下观察 GFP 表达情况。用 G418 对转染细胞进行筛选, 获得抗性细胞克隆, 并对转染细胞进行 PCR 检测。结果显示, pEBL 构建成功, 转染 6 h 后可观察到细胞有 GFP 表达, PCR 检测阳性克隆细胞转有 LTF 基因。表明 pEBL 载体已转染山羊乳腺上皮细胞, 为进一步建立基因动物乳腺生物反应器奠定了基础。

[关键词] 山羊乳腺上皮细胞; 人乳铁蛋白; 绿色荧光蛋白; 特异性载体

[中图分类号] Q 782

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)01-0029-04

Construction and identification of the mammary gland special expression vector for human lactoferritin

ZHANG Jing-jing, LIU Feng-jun, PENG Shu-ying, SONG Hong-wei, ZHANG Yong

(Institute of Bioengineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The mammary gland special expression vector pEBL containing green fluorescence protein (GFP) and human lactoferritin (LTF) was constructed and transfected into goat mammary epithelial cells (GMEC) by liposome. Clones were screened by G418 and were identified by PCR. The GFP expressed cells were detected in 6 hours after transfection, PCR result showed that LTF gene was expressed in transfected cells. The vector pEBL was transfected successfully and efficiently. This lays a solid foundation for constructing transgenic animals and its mammary gland bioreactor.

Key words: goat mammary epithelial cell; human lactoferritin; GFP; special vector

利用体细胞核移植技术生产转基因动物, 是当前动物生物技术领域的研究热点, 并已在牛^[1]、山羊^[2]、绵羊^[3]等动物上取得成功。尤其令人鼓舞的是, 采用该技术已获得了基因打靶的转基因绵羊^[4], 显示出了其广阔的应用前景。

乳腺生物反应器是一种利用转基因技术获得药物蛋白的动物个体表达系统, 其核心内容是通过各种转基因技术, 将乳腺组织特异性启动子驱动的某一种或几种具有重要生物活性的外源基因, 在动物

乳腺组织中高效表达, 从而在乳腺中生产药用重组蛋白。1987 年 Gordon^[5]等首次利用小鼠乳腺, 生产出人类医用蛋白质——人组织纤溶酶原激活剂(tPA), 成功研制出首例转基因动物乳腺生物反应器小鼠模型, 此后世界各国争相开展乳腺生物反应器研究。尽管动物乳腺生物反应器有着巨大的前景, 但是现在构建的许多动物模型中获得高效表达、成功开发的例子却很少, 许多工作由于外源基因表达量低而缺乏进一步研发的价值, 外源基因在乳腺组

^{*} [收稿日期] 2006-03-10

[基金项目] 国家“863”计划项目(2001AA 213081)

[作者简介] 张晶晶(1980-), 女, 陕西铜川人, 在读硕士, 主要从事动物胚胎工程研究。E-mail: zhangjj80@yahoo.com.cn

[通讯作者] 张 涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程和发育生物学研究。

织中的高效表达已成为一个技术瓶颈。因此,构建能够高效表达目的蛋白的乳腺表达载体,对乳腺生物反应器研究有重要的意义。基于此,本试验构建了以山羊 β 乳球蛋白(BLG)为调控序列,以绿色荧光蛋白为报告基因的表达式载体,并克隆了人乳铁蛋白基因,为实现人乳铁蛋白在乳腺中的表达奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体及细胞 含有 β 乳球蛋白基因的载体 pBLG, 含有人乳铁蛋白基因的载体 pLTF, 载体 pEGFP-C₁, 莎能奶山羊乳腺上皮细胞和 *E. coli* DH5 α 菌株, 均为西北农林科技大学生物工程学院所构建、保存。

1.1.2 试剂 内切酶 *Ase* I, *Nhe* I; *Sal* I 购自 MBI 公司; *Bam* H I 购自 Invitrogen 公司; 质粒纯化试剂盒 Wizard[®] Pure Ffection Plasmid DNA Purification System 购自 Promega 公司; 脂质体 L IPO-FECTAM NE2000 和 G418 购自 Invitrogen 公司; 培养基 DM EM 购自 Gibco 公司。其他试剂均为国产或进口分析纯级。

1.1.3 引物 设计的 PCR 引物包含乳球蛋白的 5' 端调控序列和乳铁蛋白 cDNA 的 3' 端。引物序列为: 下游引物, 5' AAT CCC CAC CTT CAG CAG-3'; 上游引物, 5' CAG ACC GCA GAC ATG AAA CT-3'。PCR 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成, 预期扩增片段长度为 2 259 bp。

1.2 载体 pEBL 的构建及酶切鉴定

用 *Ase* I 和 *Nhe* I 双酶切载体 pEGFP-C₁ 去掉其原有启动子 CMV, 然后用相同的酶切载体 pBLG, 回收目的片段 β 乳球蛋白基因 blg, 与去掉 CMV 的 pEGFP-C₁ 相连(插入到 CMV 的位置)。将连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑筛选获得阳性质粒 pEB。用 *Sal* I 和 *Bam* H I 双酶切 pLTF, 回收目的片段人乳铁蛋白 LTF, 定向克隆入载体 pEB 的多克隆位点, 使人乳铁蛋白基因与绿色荧光蛋白进行融合, 构建表达式载体 pEBL, 并对其进行 *Ase* I + *Nhe* I 和 *Sal* I + *Bam* H I 双酶切鉴定。

1.3 转染质粒 pEBL 的提取和纯化

用试剂盒 Wizard[®] Pure Ffection Plasmid DNA Purification System 提取和纯化质粒 pEBL, -20℃ 保存, 用于细胞转染。

1.4 山羊乳腺上皮细胞的制备

从液氮中取出山羊乳腺上皮细胞, 立即投入 37

~ 40℃ 温水中快速晃动, 直至冻存液完全溶解。将细胞冻存液移入离心管, 加入约 5 mL 培养液, 用吸管轻轻吹匀, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 向沉淀中加入培养液, 用吸管轻轻吹打均匀, 将细胞悬液移入培养皿中, 培养备用。转染前 1 d, 用胰酶消化细胞并计数, 挑取生长旺盛、形态好的细胞传代接种于 24 孔培养板, 细胞接种密度约为 1.0×10^5 /孔, 待细胞铺满培养皿底的 70%~80% 时, 改用无血清、无抗生素的 DM EM 培养基洗涤细胞 2 次, 即为备用细胞。

1.5 山羊乳腺上皮细胞的转染

将山羊乳腺上皮细胞接种于 24 孔培养板中, 每孔用 500 μ L 体积分数 10% 胎牛血清、无抗生素的 DM EM 培养基进行培养, 待次日完全贴壁后除去含血清培养基, 加入无血清、无抗生素的 DM EM 培养基, 按 L IPO-FECTAM NE 2000 说明书进行转染, 脂质体(μ L)与质粒(μ g)的比例为 3:2。细胞培养 24 h 后弃去混合液, 加入体积分数 10% 胎牛血清、不含抗生素的 DM EM 培养基继续, 待细胞长满后进行传代。转染结束后, 在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况。

1.6 转染后山羊乳腺上皮细胞的 G418 筛选及 PCR 检测

转染后的山羊乳腺上皮细胞用含 400 μ L/mL G418 的培养液进行筛选培养, 每 3 d 更换 1 次培养液, 观察细胞生长情况。一周后, 换为含 200 μ L/mL G418 的培养液进行低浓度维持筛选, 10 d 后可观察到抗性细胞克隆。选取荧光表达较强的细胞用有限稀释法稀释培养, 扩增细胞。提取细胞基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。PCR 反应体系为 50 μ L: 10 $\times$ 缓冲液 5 μ L, dNTP (各 0.5 mmol/L) 4 μ L, 上下游引物各 5 μ L, 模板约 100 ng, *Taq* 酶 1 μ L (5 U/ μ L), 补加 ddH₂O 至 50 μ L。反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72℃ 保持 7 min。取 20 μ L PCR 产物进行 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 载体 pEBL 的酶切鉴定

由图 1 可知, 质粒 pEBL 经 *Ase* I 和 *Nhe* I 双酶切后得到 2 200 bp 的 BLG 基因, 经 *Sal* I 和 *Bam* H I 双酶切后得到的长度为 2 259 bp LTF 基因, 均与预期结果相符。

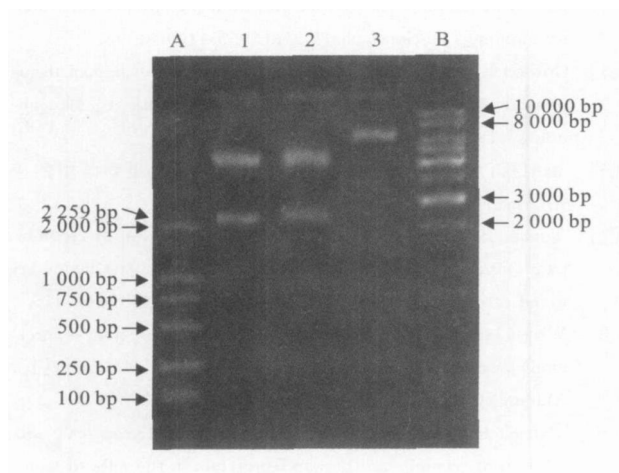


图 1 载体 pEBL 酶切鉴定图

A. 2 000 bp DNA 标样; 1. *Ase* I + *Nhe* I 双酶切产物;
2. *Sal* I + *Bam* H I 双酶切产物; 3. pEBL; B. 10 000 bp DNA 标样

Fig 1 Identification of vector pEBL digested with restriction enzymes

A. 2 000 bp DNA Marker; 1. pEBL/*Ase* I + *Nhe* I;
2. pEBL/*Sal* I + *Bam* H I; 3. pEBL; B. 10 000 bp DNA Marker

2.2 转染山羊乳腺上皮细胞的绿色荧光检测

转染后 6 h 在倒置荧光显微镜下观察, 结果显示山羊乳腺上皮细胞发出绿色荧光 (见图 2), 说明绿色荧光蛋白基因已经在山羊乳腺上皮细胞中表达, 载体 pEBL 已成功转入山羊乳腺上皮细胞并在其中表达。

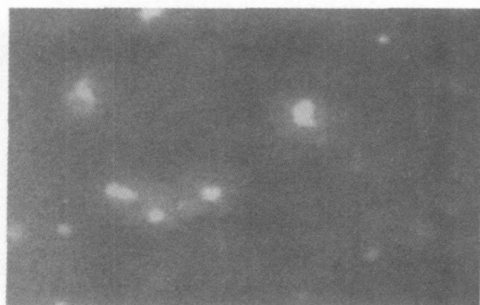


图 2 转染山羊乳腺上皮细胞的荧光照片 ($\times 100$)

Fig 2 GFP expression of transfected goat mammary epithelial cell ($\times 100$)

2.3 转染山羊乳腺上皮细胞的 PCR 检测

转染山羊乳腺上皮细胞的 PCR 检测结果见图 3。由图 3 可知, 扩增出长度约为 2 259 bp 的片段, 与本实验所转染的载体 pEBL 中的人乳铁蛋白基因 (2 259 bp) 片段长度相同, 说明载体 pEBL 已转入山羊乳腺上皮细胞中。

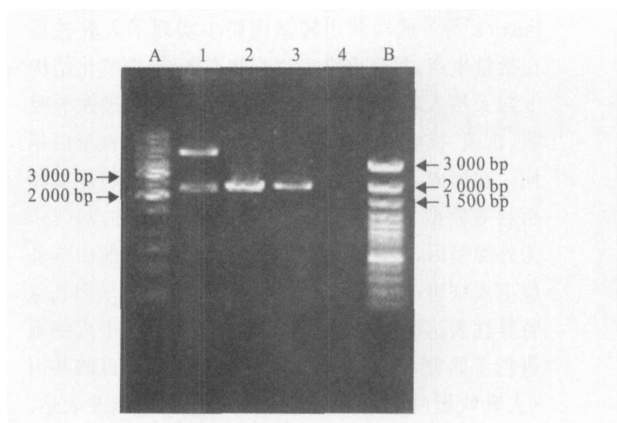


图 3 转染山羊乳腺上皮细胞的 PCR 电泳结果

A. 10 000 bp DNA 标样; 1. 载体 pEBL *Sal* I 和 *Bam* H I 双酶切产物; 2, 3. 转染后的细胞株; 4. 未转染的细胞 (阴性对照); B. 3 000 bp DNA 标样

Fig 3 Electrophoresis result of transferred cells LTF-PCR

A. 1 kb DNA Marker; 1. pEBL/*Sal* I + *Bam* H I; 2, 3. Transfected cells; 4. Negative control; B. 3 000 bp DNA Ladder

3 讨论

本试验采用阳离子型脂质体介导法, 将质粒 pEBL 成功转染到山羊乳腺上皮细胞。由于转染效率受培养细胞生长密度的影响较大, 因此保持统一标准的细胞接种程序在实验中是必要的。转染细胞最好处在对数生长期, 而且理想状态为在转染时细胞生长至铺满皿底的 70% ~ 90%。在转染过程中, 血清通常会降低脂质体/DNA 复合物的转化效力, 因此, 本实验在转染时采用无血清培养基。培养基的量也不宜添加过多, 以刚好覆盖培养皿中的细胞为宜。

本试验获得了抗 G418 的山羊乳腺上皮细胞克隆, 说明采用的载体和转染方法是正确的。本试验用 GFP 基因作为标记基因, 其可以与目的基因 (*LTF*) 一起表达, 形成融合蛋白, 因而采用这种方法可以直观动态地观察目的蛋白的表达情况。研究表明, GFP 或其突变体对寄主细胞生长发育没有明显影响^[6], 本试验结果也证实了这一点, 获得的 GFP 阳性细胞生长形态未发生改变。本研究通过对抗性基因 *neo* 和报告基因 *GFP* 的筛选和纯化, 得到阳性山羊乳腺上皮细胞克隆, 为下一步通过核移植方法制作转基因动物奠定了基础。

Tom an 等^[7]、Clark^[8]分别利用鼠和牛的乳腺生物反应器表达了人乳铁蛋白, 表达产物与来自母乳中的乳铁蛋白相同, 活性相似, 但表达水平较低。

Patrick 等^[9]成功利用转基因奶牛实现了人乳铁蛋白批量生产, 尽管重组表达产物在 N-端糖基化结构上与天然人乳铁蛋白有轻微差异, 但在促进铁的吸收、抗菌、抗病毒和免疫活性上与天然人乳铁蛋白相同。在国内, 目前此方面的研究仅限于小鼠、昆虫和植物等模型上^[10-13], 尚未见到以人乳铁蛋白基因作为外源基因, 构建表达载体、转染体外培养的山羊乳腺上皮细胞的报道。本试验对人乳铁蛋白基因乳腺特异性表达载体的构建及其转染山羊乳腺上皮细胞进行了研究, 结果表明所构建的载体可将目的基因(人乳铁蛋白基因)转入山羊乳腺上皮细胞并表达, 但本试验未对表达蛋白的功能进行检测, 今后的工作还需对其进行进一步的研究, 从而为转基因动物的生产奠定基础。

[参考文献]

- [1] Polejaeva IA, Campbell KH. New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis[J]. *Theriogenology*, 2000, 53(1): 117-126
- [2] Houdebine L M. Transgenic animal bioreactors[J]. *Transgenic Res*, 2000, 9(4-5): 305-320
- [3] McCreath K J, Howcroft J, Campbell K H, et al. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells[J]. *Nature*, 2000, 405(6790): 1066-1069
- [4] Lai L, Kolber-Simonds D, Park K W, et al. Production of alpha-1, 3 galactosyl transferase knockout pigs by nuclear transfer cloning[J]. *Science*, 2002, 295(5557): 1089-1092
- [5] Gordon K, Lee E, Vitale J A, et al. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk[J]. *Biotechnology*, 1987, 24: 425-428
- [6] 张阳德, 廖允军. 绿色荧光蛋白及其在细胞生物学中的应用[J]. *中国现代医学杂志*, 2001, 11(5): 34-37.
- [7] Toman P D, Pieper F, Sakai N, et al. Production of recombinant human type 1 procollagen homotrimer in the mammary gland of transgenic mice[J]. *Transgenic Res*, 1999, 8(6): 415
- [8] Wrig Clark A J. The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant protein[J]. *Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1998, 3(3): 337-350
- [9] Patrick H C, Welling M M, Geerts M, et al. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cow[J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(5): 484-495
- [10] 曹阳, 高华颖, 于黎, 等. 人乳铁蛋白基因克隆及细胞表达研究[J]. *遗传*, 2002, 24(1): 9-14
- [11] 俞慧清, 李志国, 刘红茹, 等. 山羊 β casein 位点打靶载体在乳腺上皮细胞中的表达研究[J]. *生物工程学报*, 2004, 20(1): 21-24
- [12] Matra A, Zhang Z Y. Expression of human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein[J]. *Plant Physiology*, 1994, 106: 977-981
- [13] Zagulski T, Lipinski P, agulska A Z, et al. Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection *in vitro*[J]. *Br J Exp Pathol*, 1989, 70(6): 697-704