

山羊 BLG 基因 5 调控序列克隆及其 调控 GFP 基因细胞的表达*

宋红卫, 郑月茂, 张明烽, 唐 爽, 张 涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 通过 PCR 扩增出 2.2 kb 的山羊 β 乳球蛋白基因 5 端的调控序列, 包括第一外显子和第一内含子。测序结果表明, 该序列与 GenBank 中登录序列相比, 同源率为 99.5%。用其替代表达载体 pEGFP-c1 上原来的启动子 CMV, 指导报告基因绿色荧光蛋白(GFP)在山羊乳腺细胞中的瞬时表达, 结果发现该调控序列可以有效指导报告基因的表达, 从而初步验证了所克隆的山羊乳球蛋白(BLG)基因表达调控序列的有效性。表明克隆的调控序列可用于乳腺生物反应器的研究。

[关键词] 山羊; β 乳球蛋白基因; GFP 基因

[中图分类号] Q 785; Q 786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)05-0012-03

乳腺作为一种重要的生物反应器用于生产外源蛋白时, 具有成本低、分离纯化简单、产量高、不易被污染、不污染环境及可持续生产等特点, 特别是表达的外源蛋白可以进行翻译后加工, 具有天然蛋白的结构和活性^[1-3], 因而成为当前研究的热点。乳球蛋白(BLG)是反刍家畜乳汁中主要的乳清蛋白质, 对 5 端的调控序列研究^[4]表明, 转录单位上游 0.8 kb 的区域是高效、特异性表达所必需的, 而且 -460 区和 -149 区缺失不影响表达, 将外源基因置于乳球蛋白基因 5 端调控区的下游, 能够控制外源基因在动物乳腺组织中的特异性表达。现在已经清楚 BLG 基因 5 端调控区有多个乳核因子 1 和转录因子 Stat5 的识别位点, 此外还存在多个激素作用位点^[5]。具有这些调控成分的 BLG 基因 5 端调控序列, 能够控制外源基因在乳腺的表达, 这是构建高效特异乳腺表达载体的基础。

绿色荧光蛋白(GFP)是从多管水母中发现的一种蛋白质, 可在蓝光激发下产生绿色荧光。研究^[6]表明, GFP 基因可在哺乳动物细胞中表达并产生荧光, 而且对细胞无毒性作用。为了快速检测乳腺表达载体的合理性, 本研究克隆了 BLG 基因 5 端 2.2 kb 调控序列, 并将其置于 GFP 报告基因上游构建载体转化体外培养的山羊乳腺细胞作瞬时表达, 以

确定其是否可以控制 GFP 基因的表达, 为该调控区进一步用于乳腺生物反应器研究奠定基础^[7]。

1 材料与方法

1.1 材 料

质粒 pEGFP-c1, 菌株 DH5 α 及山羊乳腺上皮细胞均由本实验室保存; pMD-18T 载体, LA *Taq* 酶和 T₄DNA 连接酶购自大连宝生物公司; 各种限制性内切酶购自 MBI 公司; DNA 凝胶回收试剂盒为杭州维特洁公司产品; 质粒抽提试剂盒 (Wizard Plus Miniprep DNA Purification System) 购自 Promega 公司; 阳离子脂质体购自 Invitrogen 公司。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计 根据发表的山羊 BLG 基因序列 (GenBank 登陆号: Z33881) 设计引物。其中 F₁ 5 端添加 *Ase*I 位点, S₁ 5 端添加 *Nhe*I 位点。引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。

F1: cgATTAA TCTGCCTCCCTGTTCA CACA TGC;

S1: ggCTA GCGGACCTTGA GTTGCACTCCG。

1.2.2 山羊基因组 DNA 的提取 在 30 mL 淋巴细胞分离液上小心加入 20 mL 山羊血, 2 000 r/min 离心 15 min。吸取分层处灰白色的淋巴细胞, 5 000 r/min 离心 5 min 后收集细胞, 加入 1 mL 哺乳动物

* [收稿日期] 2004-12-14

[基金项目] 国家“863”高新技术研究与发展计划项目(2001AA 213081)

[作者简介] 宋红卫(1979-), 男, 陕西凤翔人, 在读硕士, 主要从事胚胎工程和分子生物学研究。

[通讯作者] 张 涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事胚胎工程与发育生物学研究。

细胞裂解液, 37 °C 静置 1 h, 加入蛋白酶 K 到终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 °C 温浴 3 h, 然后用酚抽提 3 次, 上清液中加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, 吸出 DNA 后用体积分数 75% 乙醇洗 3 次, 烘干后加 500 μL TE 溶解。

1.2.3 山羊 BLG (β -lactoglobulin) 基因 5 调控序列 PCR 扩增及产物纯化 本试验拟扩增 2 200 bp 5 端调控序列, 包括第一外显子和部分第一内含子。反应体系如下: 5 μL 10 \times LA PCR buffer, 4 μL dNTP (2.5 mmol/L), 模板 1 μL , F1 和 S1 各 1 μL , LA Taq 0.5 μL , 加灭菌水至 50 μL 。94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。预期目的片段大小为 2 263 bp, 扩增产物经凝胶电泳纯化后用于下一步克隆和测序。

1.2.4 扩增片段的克隆 回收纯化的扩增片段按操作手册与 pMD-18T 质粒连接后, 转化 DH5 α 感受态细胞, 涂板 (加有 X-gal, IPTG 和氨苄青霉素的 LB 琼脂平板), 37 °C 培养 16 h, 筛选白色阳性克隆菌落。提取重组质粒, 用 *Ase*I 和 *Nhe*I 酶切鉴定, 记作 pBLG, 送交上海生物工程公司测序。

1.2.5 GFP 乳腺表达载体构建 分别用 *Ase*I 和 *Nhe*I 双酶切载体 pEGFP-c1 和 pBLG 并回收目的片段, 然后用 T4DNA 连接酶连接构建载体。载体用 *Ase*I 和 *Nhe*I 双酶切鉴定。

1.2.6 山羊乳腺上皮细胞的体外培养 从液氮罐中取出冷冻保存的山羊乳腺上皮细胞, 37 °C 快速复苏后加入 5 mL DMEM/F12 培养液 (含 D/F12 5 mL, FBS 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, EGF 10 ng/mL, IF γ 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 待细胞长满平皿后, 用 2.5 g/L 胰酶消化后备用。

1.2.7 pBLG-GFP 转化山羊乳腺细胞 将密度为

1×10^5 的细胞接种于 24 孔板中, 培养 24 h 后, 待细胞约长满培养皿底部面积的 80% 后, 用 pBLG-GFP 质粒转染细胞, 48 h 后在荧光显微镜下观察报告基因的表达。

2 结果与分析

2.1 山羊 BLG 基因 5 调控序列的 PCR 扩增

PCR 扩增获得了 2 263 bp 的目的片段 (图 1)。

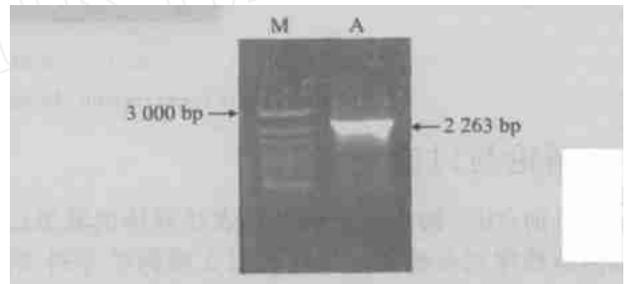


图 1 PCR 产物的电泳结果

A. PCR 产物; M. DNA marker

Fig 1 Electrophoresis of PCR product

A. PCR product; M. DNA marker

2.2 目的片段的克隆与测序

通过白斑筛选阳性克隆, 得到了 pBLG 重组质粒, 酶切鉴定结果见图 2。测序分析表明, 目的片段序列与发表序列一致, 同源性达 99.5%。

2.3 GFP 基因乳腺表达载体的构建

用 *Ase*I 和 *Nhe*I 双酶切 pBLG-GFP 乳腺表达载体, 结果见图 3。图 3 表明, 克隆的 BLG 基因 5 调控序列已连接在 GFP 上游。

2.4 pBLG-GFP 转化乳腺细胞后荧光显微镜观察结果

由图 4 可知, 转化细胞的细胞质中有报告基因 GFP 表达, 并且分泌到了细胞外。

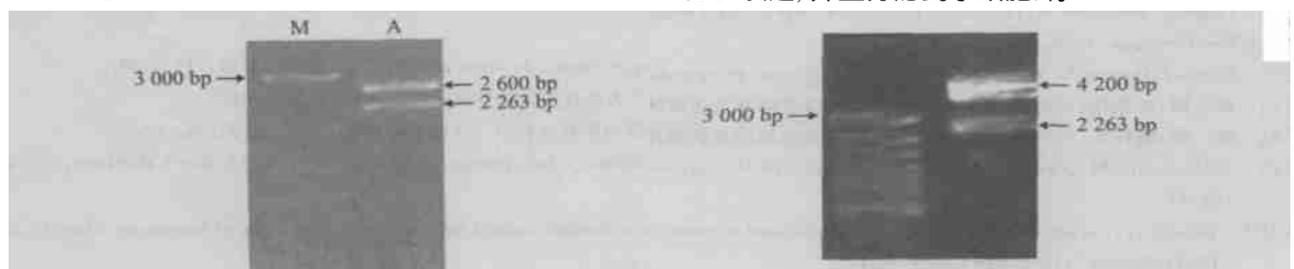


图 2 pBLG 目的片段酶切电泳结果

A. 双酶切产物; M. DNA marker

Fig 2 Restriction endonuclease digestion of target fragment

A. *Ase*I and *Nhe*I digestion; M. DNA marker

图 3 pBLG-GFP 双酶切分析

A. 双酶切产物; M. DNA marker

Fig 3 The digested DNA fragments of *Ase*I and *Nhe*I

A. Fragments; M. DNA marker

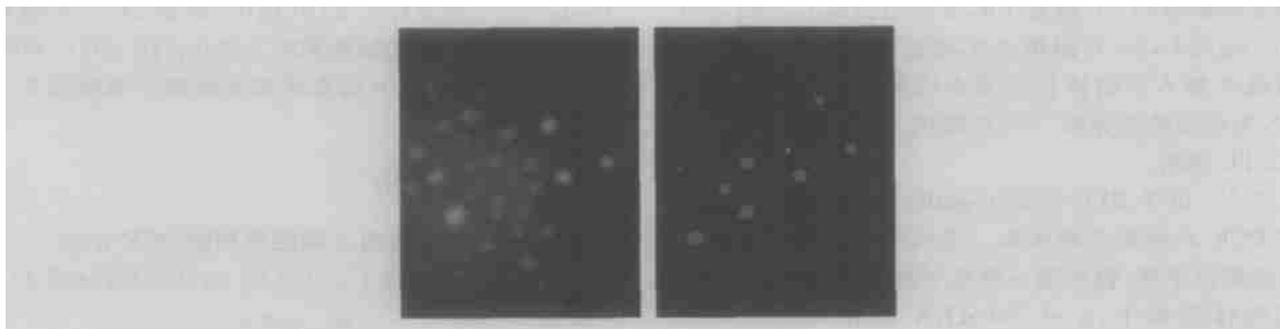


图 4 荧光显微镜检测 GFP 表达

Fig 4 GFP expression through observation under UV microscope

3 结论与讨论

目前,用于构建乳腺特异性表达载体的乳蛋白基因调控序列有乳清酸蛋白基因 5 端调控序列、乳球蛋白基因 5 端调控序列和酪蛋白基因 5 端调控序列。乳球蛋白基因普遍存在于哺乳动物中,其上游调控序列作为乳腺特异性启动子受到研究者的关注^[8,9]。在目前文献^[10]报道的乳腺特异表达载体中,用绵羊 BLG 基因调控区构建的载体表达水平最高,原代转基因绵羊的表达水平达 60 g/L。本试验克隆的山羊 BLG 基因 5 端的调控序列包含乳蛋白结合因子(MPBF)、糖皮质激素受体和核因子等转录因子结合位点,另外还包括第一外显子和第一内含子

的部分序列。从理论上讲,它可以指导外源基因在乳腺中有效表达,能够使外源基因按内源 BLG 基因转录方式进行转录。因此,如果整合位点合适,该结构应该能够指导外源基因在乳腺中的表达。

细胞转染后的瞬时表达常用来评价和预测体外构建的外源基因表达结构的合理性。以 GFP 为报告基因构建的乳腺表达结构,可以直接通过荧光显微镜观察,是一个较好的评价方法,具有快速、简便和直观的优点。

本试验通过检测报告基因 GFP 在山羊体外培养乳腺细胞中的表达,证明此载体可以指导 GFP 基因的表达。因此克隆的调控序列可以构建乳腺特异表达载体,用于指导外源基因在乳腺中的表达。

[参考文献]

- [1] 劳为德,张旭晨. 乳腺生物反应器实用化研究——现状与问题[J]. 生物工程进展, 1996, 16(4): 38- 45.
- [2] 薛京伦,卢大儒. 乳腺反应器的研究现状[J]. 生物技术通报, 1998, (3): 17- 20.
- [3] 田小利,陈兰英,扈荣良. 转基因动物原理技术与应用[M]. 长春:吉林科学技术出版社, 1995.
- [4] 刘明军,李文蓉,武 坚,等. 羊 BLG 基因 5 和 3 调控区克隆及其调控 GFP 基因在乳腺细胞的表达[J]. 生物工程学报, 2002, 18(1): 112- 116.
- [5] Bruce C,Whitelaw A. Homonal influences on β lactoglobulin transgene expression inferred from chromatin structure[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 224: 121- 125.
- [6] Sheen J,Hwang S,Nivay, et al Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cell[J]. Plant, 1995, 8(5): 777- 784.
- [7] 曹 阳,李庆伟,袁晓东,等. 人乳铁蛋白基因克隆及表达载体构建[J]. 大连理工大学学报, 2000, 40(6): 697- 701.
- [8] 陈 刚,施伟庆,吴梅娟,等. 奶山羊- 乳球蛋白基因及其调控区的克隆和序列分析[J]. 江苏农业研究, 2001, 22(2): 58- 62.
- [9] Jean-claude M, Jean-Luc V. Efficient tissue-specific expression of bovine α -lactalbumin in transgenic mice[J]. Eur J Biochem, 1989, 186: 43.
- [10] Wright G,Carver A,Cotton D, et al High level expression of active human α -1-anti trypsin in the milk of transgenic sheep[J]. Biotechnology, 1991, 9(9): 830- 834.

(下转第 18 页)

- [12] Pearce M, Farrace M G, Piacentini M, et al. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote PGCs survival by suppressing programmed cell death (apoptosis) [J]. *Development*, 1993, 118(4): 1089- 1094

The isolation and cultivation of goat primordial germ cells

YANG Ji-jian, GE Xiu-guo, DOU Zhong-yong

(Shaanxi Branch of National Stem Cells Engineering & Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 30- 50 dpc (days postcoitum) Guanzhong goats fetus were selected to isolate the PGCs by isolating the mouse PGCs. Three methods were taken in the experiment: first, PGCs were cultured on the STO feeders; second, PGCs were co-cultured with the GEF; third, PGCs were co-cultured with the GSCs. The results indicated that EG cells were all able to gain in the three ways. And, PGCs co-cultured with GSCs were cultured for 6 passages, PGCs on STO were cultured for 4 passages, but PGCs co-cultured with GEF were lost in the third passage.

Key words: goat; primordial germ cells; embryonic stem cell

(上接第 14 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)05-0012-EA

Cloning of 5' flanking sequence of goat BLG and regulating the expression of GFP in cell

SONG Hong-wei, ZHENG Yue-mao, ZHANG Ming-feng, TANG Shuang, ZHANG Yong

(Institute of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 5' flanking region of goat BLG was amplified from goat genomic DNA according to the published whole sequence of goat BLG and cloned to pMD-18t vector correspondently. By sequencing, the amplified sequence was the same as 99% as publication, with which replaced previous promoter CMV cloned in pEGFP-c1 expressional vector and transfected the cultured mammary cell *in vivo*. Through observation under UV microscope, it showed that GFP had been successfully expressed in mammary gland cell. Then, the cloned sequence can be served for the study of mammary gland expression construct.

Key words: goat; β -lactoglobulin gene; green fluorescent protein gene