

山羊 β -casein 位点打靶载体在乳腺上皮细胞中的表达研究

俞慧清 李志国 刘红茹 吴国祥 成国祥*

(上海转基因研究中心, 上海 201203)

摘 要 以本地山羊基因组 DNA 为模板, 通过长链 PCR 扩增出山羊 β -casein 上游包括启动子、外显子 1 及部分外显子 2 的 6.1kb 的调控序列及下游 3.3kb 的序列, 将来自质粒 pCDNA3 的 *neo* 基因以及来自质粒 pNEOZTK₂ 的 *tk* 基因, 经克隆重组后构建了本地山羊乳腺特异性定点打靶载体, 并在其中克隆入乳铁蛋白 *mini* 基因, 采用脂质体法转染小鼠乳腺上皮癌细胞系 C127, 以进行打靶载体的表达功能检测, 双夹心 ELISA 测得诱导液中乳铁蛋白表达量为 0.2 μ g/mL, Western-blot 显示重组蛋白分子量比标准品略小, 约为 76kD, 结果说明本载体能够指导外源基因在动物乳腺细胞内正确表达。

关键词 山羊 β -casein, 打靶载体, 人乳铁蛋白, C127 细胞, 表达

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)01-0021-04

利用动物乳腺生物反应器生产药物蛋白是现今转基因技术中的一个热点。通过动物乳腺生产外源蛋白, 具有成本低, 分离纯化简单, 可持续生产, 所表达的外源蛋白可进行翻译后加工, 具有天然蛋白的结构与活性等优点^[1], 传统的显微注射法制备转基因动物由于效率低, 表达不稳定而在家畜中的应用受到了限制。2000 年 6 月, McCreath 等将 α 抗胰蛋白酶定位整合到绵羊 $\alpha 1$ 胶原基因位点, 测得乳汁中的 α 抗胰蛋白酶含量为 0.65mg/mL^[2], 提示我们可以用相似的方法获得生产药物蛋白的转基因动物。应用该方法制备转基因动物, 不仅可极大地缩短育种周期, 降低成本, 而且外源基因定点整合, 其表达不受位置效应的影响。基于此, 本文通过长链 PCR 法克隆了山羊 β -casein 的调控序列, 构建了山羊 β -casein 位点定点打靶载体, 并克隆入人乳铁蛋白小基因。与此同时, 为了验证本载体的表达功能, 我们采用脂质体包裹法转染小鼠乳腺癌 C127 细胞系, 在细胞上清中检测到了人乳铁蛋白的表达, 从而说明本定点打靶载体能指导外源基因在动物乳腺组织中的表达, 是获得外源基因定点整合并稳定表达的体细胞克隆羊的前提与保证。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

本地山羊来自上海转基因中心实验牧场, Expand 20kb^{plus} PCR System 购自 Roche 公司, 引物合成及测序工作由上海生工完成, 各种工具酶均购自 NEB 公司, 人乳铁蛋白 cDNA 及质粒 pNEOZTK₂ 为本实验室保存, 质粒 pCDNA3 购自 Invitrogen, C127 细胞株购自中科院上海细胞所, Lipofectin[®] Reagent, G418, DMEM 培养基均购自 GIBCOBRL 公司, 人乳铁蛋白标准品、胰岛素 (Insulin)、催乳素 (Luteotropic Hormone)、氢化可的松 (Hydrocortisone) 均购自 SIGMA 公司, Monoclonal Mouse Anti-Human Lactoferrin 购自 INCORPORATED 公司, Rabbit Anti-Human Lactoferrin 及 Peroxidase-Conjugated Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins 购自 DAKO 公司, DAB 显色剂购自 AMRESCO 公司。

1.2 方法

1.2.1 打靶载体构建: 取山羊胚胎组织块少许, 按常规方法提取基因组 DNA, 参照 GenBank gi: 15425979 报道的序列设计三对引物 BC5' F1 TTCACGCAAAGATGGGCAC 和 BC5' R1 GTCTTGGATT-GCTTAGAAAACCC ; BC5' F2 GGAAGCTCTTAGG-

TAACATTGC 和 BC5' R2 CCTAGGCCCGGGCTCGACT-CCTGTGAATGGGAAGATGAG ;BCZ3' F1 CCTAGGCG-GATCCAGGAACAACAGCAAACAGAGG 和 BCZ3' R1 GCCATATTTCCAGT CGCAG ,用长链 PCR 法扩增山羊 β -casein 上游包含第一外显子、第一内含子和部分第二外显子的 6.1kb 的调控序列及下游包括部分第六外显子到第九外显子之间 3.3kb 的序列,在 5' 的下游和 3' 的上游分别用 PCR 设计了 *Xho* I 酶切位点,便于插入外源基因,将两端同源臂克隆到 pGEMT-EASY 载体中,再从质粒 pCDNA3 中切下正向筛选标记 *neo* 基因,插入到上下游同源臂之间,从质粒 pNEOZTK₂ 中切下负筛选标记 *tk* 基因,插入到下游同源臂之外,经一些列酶切重组后,克隆到 PH79 载体中,得到山羊 β -casein 位点定点打靶载体,具体实验方法参考文献 [3]。

1.2.2 乳铁蛋白 mini 基因克隆入打靶载体 在乳铁蛋白 cDNA 中克隆入内含子 2、3,并在 mini 基因两端设有 *Xho* I 位点,克隆到 pGEMT-EASY 载体中,*Xho* I 单酶切后连入同样经 *Xho* I 单酶切并经脱磷处理的线性化山羊 β -casein 乳腺特异性定点打靶载体中,得到人乳铁蛋白的山羊 β -casein 位点定点打靶载体 pBC-tk-neo-hlf,具体结构见图 1,具体实验方法参考文献 [3]。

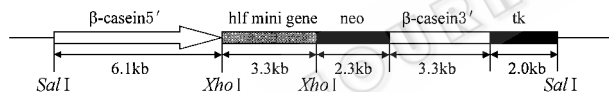


图 1 山羊 β -casein 位点打靶载体 pBC-tk-neo-hlf 的构建图

Fig.1 Structure of the goat β -casein targeting vector

1.2.3 细胞转染 用 QIAGEN 胶回收试剂盒回收以 *Sal* I 酶线性化 DNA,C127 细胞以 10% DMEM 培养数日,取生长状态良好的细胞,消化后以 5×10^5 个/mL 培养基接种于 60mm 平皿中,加入 4mL 培养基,次日待其处于对数生长期时转染。取 A、B 两管,A 管中加入 200 μ L 无血清培养基,5 μ gDNA,10 μ L plus 室温静置 15min,B 管中加入 200 μ L 无血清培养基和 10 μ L Lipofectin 室温静置 15min,混合 A、B 两管再静置 15min 后加入无血清细胞上清中,其余具体方法参照 Lipofectin[®] Reagent 说明书。

1.2.4 转染细胞筛选及整合检测 细胞转染 2 天后加入浓度为 0.5mg/mL 的 G418 筛选 2 周,将细胞克隆消化后,抽提基因组 DNA,分别在 5' 同源臂设计上游引物 PBCF CTGCTCTAATCCCAGAATCT,在乳铁蛋白 mini 基因上设计下游引物 HLFR TGTCT-GATCTCCTAACCACC,反应程序 94 $^{\circ}$ C 3min,94 $^{\circ}$ C 30s,

61 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 1.5min,72 $^{\circ}$ C 7min,共 30 个循环。

1.2.5 转染细胞诱导表达 将筛选后的细胞铺板,待细胞长至平皿的 80% 时弃去上清,加入含胰岛素 (10mg/mL) 催乳素 (1mg/mL) 氢化可的松 (15mg/mL) 的无血清 DMEM 培养基进行诱导培养,48h 后收集上清。

1.2.6 表达蛋白检测 双夹心 ELISA 检测。以 3 μ g/mL 的人乳铁蛋白单抗包被酶标板,1% BSA 封闭,乳铁标准品倍比稀释后作两个平行梯度,同时加入诱导细胞上清,作用后,加入兔抗人乳铁蛋白多抗作用后洗涤,再加入酶标二抗,显色后在酶标仪上读取 OD₄₉₀ 值,制作标准曲线,计算目的蛋白表达量。Western-blot 检测,回收细胞上清经 30kD 滤膜超滤浓缩 50 倍,进行 SDS-PAGE 电泳,半干法转至硝酸纤维素膜上,进行蛋白印迹检测,具体方法参考文献 [3],一抗以 1:1000 稀释,二抗以 1:2000 稀释,DAB 显色后拍照。

2 结 果

2.1 打靶载体鉴定

载体构建完成后用不同的酶切鉴定,得到如图 2 所示的图谱。1 为 *Xho* I 酶切质粒后得到 3.3kb 的乳铁蛋白小基因,2 为 *Sal* I 酶切质粒后得到包括同源臂、功能基因、筛选标志在内的 17kb 的条带,3 为 *Not* I、*Kpn* I 双酶切质粒后得到 2kb 的 *tk*,与预期相符合。同时对载体与片段的连接处进行测序,验证了连接反应的正确性。

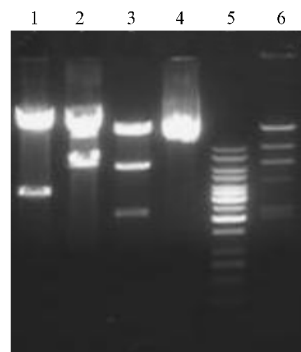


图 2 酶切鉴定山羊 β -casein 位点打靶载体

Fig.2 Restriction endonuclease digestion of goat β -casein targeting vector

1 pbc-tk-neo-hlf/*Xho* I ; 2 pbc-tk-neo-hlf/*Sal* I
3 pbc-tk-neo-hlf(*Not* I + *Kpn* I) 4 plasmid gene
5 1kb marker; 6 2DNA/*Hind* III marker

2.2 聚合酶链式反应检测打靶载体

在 C127 细胞中的随机整合结果见图 3。1 为阳

性对照 ,以质粒为模板扩增出分子量为 1.5kb 条带 , 2 为 1kb marker ,3 为转染细胞经 PCR 扩增出 1.5kb 条带 ,4 为未转染细胞 PCR 结果。

2.3 表达蛋白检测结果

经双夹心 ELISA 检测 ,制定相应的标准曲线后测得 C127 细胞中乳铁蛋白的表达量为 0.2 μ g/mL。

Western-blot 结果见图 4。1 为正常 C127 细胞上清浓缩后的细胞 Western 结果 ,2 为转染细胞表达蛋白的 Western 结果 ,3 为乳铁蛋白标准品。

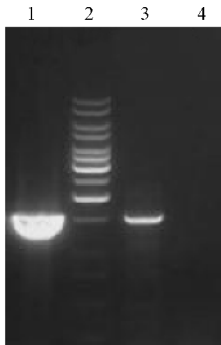


图 3 转染细胞 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of transfected cell PCR products
1 :positive control ;2 :1kb marker
3 :PCR products ;4 :negative control

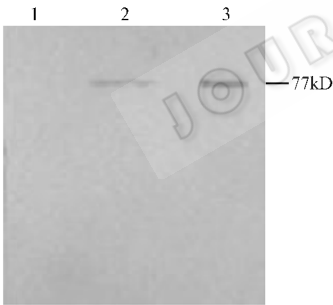


图 4 转染细胞表达产物蛋白印迹分析

Fig.4 Western-blotting results of transfected cells espresion

1 :normal cells control
2 :transfected cells expression products
3 :human lactoferrin standard control

3 讨 论

大量研究表明 ,组织特异性调控原件 ,可以指导任何基因在特定的组织中进行表达 ,以动物乳腺作为靶组织表达转基因产物 ,最重要的因素之一就是选择较好的功能完整的调控元件 ,决定乳蛋白基因特异表达的顺式元件集中在近端转录起始位点附近及远端的部分区段^[4] , β -酪蛋白作为酪蛋白家族的一个成员 ,在乳蛋白成份中占有重要的比例 ,Ebert

等曾用山羊 β -casein 5'端 6.2kb 和 3'端 7.1kb 组成的调控元件指导人组织纤溶酶激活剂在转基因羊中获得了 2 ~ 3mg/mL 的表达量^[5] ,黄赞等利用山羊 β -酪蛋白调控序列指导凝血因子 IX 的表达获得了表达量达 52.9mg/L 的转基因小鼠^[6] ,但由显微注射而获得的转基因动物个体表达水平参差不齐 ,常需从较多转基因动物中才能筛选到一个高表达个体^[7] ,有的甚至不表达 ,其中位置效应起了很大作用。因此 ,基因打靶由于定点整合而成了首选之策 ,本研究构建打靶载体的目的便在于此。大动物的打靶由于无法获得相应的 ES 细胞而一直难以实现 ,而今利用打靶载体在同基因型山羊胚胎成纤维细胞中的打靶 ,可获得定点整合的胚胎细胞 ,通过核移植技术得到外源基因定点整合的山羊(未发表资料)。

家畜乳腺生物反应器的研制周期较长 ,难度较大 ,需要进行载体功能的验证以了解实验的可行性 ,传统的利用转基因小鼠来验证载体功能的方法受到一系列条件的限制。采用细胞转染的方法相对来说就简单得多 ,山羊乳腺上皮细胞的制作较繁琐 ,体外生长条件苛刻 ,很难传代 ,转染后诱导表达量低^[8] ,检测较困难。C127 是来源于小鼠乳腺上皮的癌化细胞系 ,在体外培养不需要胶原 ,采用小鼠乳腺癌细胞系 C127 进行表达载体功能验证可获得省时省力 ,事半功倍的效果 ,本文首次将乳腺特异性表达载体转染 C127 细胞 ,获得随机整合的细胞克隆 ,加入激素诱导后在细胞上清中检测到了分泌的乳铁蛋白 ,这足以说明我们所构建的打靶载体能够在乳腺组织中获得有效的表达 ,由目的蛋白的免疫印迹图可知 ,所表达的重组蛋白分子量较标准品略小一点 ,几乎看不出差异 ,Mitra 等曾在烟草中表达了分子量为 48kD 的重组人乳铁蛋白^[9] ,曹阳等用乳铁蛋白转染鼠 MA3782 细胞表达了分子量为 34kD 的乳铁蛋白^[10] ,都比我们所获得的蛋白分子量要小 ,可能原因是重组的乳铁蛋白没有得到正确的折叠或非折叠区被降解而导致蛋白分子量变小 ,我们的打靶载体在 C127 细胞中整合、转录、翻译 ,再经细胞的后加工后得到了分子量较 77kD 略小的重组蛋白 ,而牛 α S1 调控序列指导人乳铁蛋白在转基因牛体内表达融合蛋白的分子量较人乳铁蛋白小 1 ~ 2kD^[11] ,与我们的结果相似 ,这说明外源基因在 C127 细胞内翻译后加工过程与正常乳腺细胞无差异 ,完全可以用于乳腺特异性表达载体的表达检测。

REFERENCES(参考文献)

- gland bioreactor in industrialization——achievements and questions. *Progress in Biotechnology*(生物工程进展),1996 **4**(16) 38–46
- [2] McCreath K J ,Howeroft J *et al.* . Production of gene targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 2000 **405** :1066–1069
- [3] Sambrook J ,Fritsh EF ,Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*. 2nd ed ,New york :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989
- [4] Rosen J M ,Lis ,Rauht B *et al.* .The mammary gland as a bioreactor : factors regulating the efficient expression of milk protein-based transgenes AM. *J Clin Nutr* ,1996 **63** :627–632
- [5] Ebert KM ,Ditullio P ,Barry CA *et al.* .Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats. *BioTechnology* ,1994 **12** :699–702
- [6] Huang Z(黄赞) ,Yan JH(颜景斌) ,Huang Y(黄纓) *et al.* .High expression of human FIX in transgenic mice directed by goat β -casein gene promoter. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报) ,2002 **29**(3) 206–211
- [7] Uusi-oukari M ,Hyttinen JM ,Korhonen VP *et al.* .Bovine α -s1-casein gene sequences direct high level expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the milk of transgenic mice. *Transgenic Res* ,1997 **6** :75–84
- [8] Yang GQ(杨国庆) ,Dai YP(戴蕴平) ,Zhu BL(朱宝利) *et al.* . Clone of 5' regulatory fragment of bovine BLG gene and Studies of animal mammary gland reactor. *Science in China . Series C[中国科学(C 辑)]* ,1996 **26**(5) :463–469
- [9] Matra A ,Zhang ZY. Expression of human lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection *in vivo* . *Plant Physiol* ,1994 **106** :977–981
- [10] Cao Y(曹阳) ,Gao HY(高华颖) ,Yu IQ(于黎) *et al.* .Studies of the clone and cell expression of human lactoferritin gene. *Hereditas(遗传)* ,2002 **24**(1) 9–14
- [11] van Berkel PH ,Welling MM ,Geerts M *et al.* .Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nature Biotechnology* ,2002 **20**(5) :484–487

Expression of Goat β -casein Gene Targeting Vector in Mammary Gland Cell

YU Hui-Qing LI Zhi-Guo LIU Hong-Ru WU Guo-Xiang CHENG Guo-Xiang*

(Shanghai Transgenic Research Center , Shanghai 201203 , China)

Abstract The study of mammary gland bioreactor is in the ascendant. In order to generate transgenic goats of well-controlled expression of exogenic genes , we constructed a human lactoferrin (hLF) gene targeting vector containing promoter , exon 1 , intron1 and some of exon 2 (about 6.1kb fragment) and exon 6 ~ 9 (about 3.3kb fragment) of the goat beta-casein gene as well as hLF minigene , *neo* gene inserted into them and tk gene ligated to the 3'end of the construct. The 9.4kb goat genomic sequences as homologous arms were initially amplified by PCR with local goat tissue DNA. The expression vector was named pBC-tk-neo-hlf. Then the recombinant plasmid pBC-tk-neo-hlf containing hLF minigene was transfected into mice mammary tumor cell line C127 by liposome , cell clones were selected with G418. After proliferating , the transfected cells were induced with insulin , luteotropic hormone and hydrocortisone. The result of Western-blotting analysis showed that the transfected cells can secrete hLF protein , and the recombinant protein expressed in cultured cell supernatant has the similar molecular weight as the native protein. The expression level detected by ELISA was 0.2 μ g/mL. This result indicated that the targeting vector could efficiently direct the expression of hLF in mammary cells and it confirmed the validity of the constructed vector. At the same time , C127 cell line proved to be useful for evaluating the regulation of a foreign gene expression in mammary gland specific expression vector.

Key words goat β -casein , targeting-vector , human lactoferrin , C127 cell line , expression