

## 山羊 $\alpha$ -乳清蛋白乳腺特异性表达载体的构建 及核供体细胞的转染

任春环, 曹鸿国\*, 程 箫, 冯 颖, 张子军\*

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

**摘 要:** 为了构建  $\alpha$ -乳清蛋白乳腺特异性表达载体及提供山羊乳腺生物反应器  $\alpha$ -乳清蛋白核移植供体细胞, 提取乳腺组织中的总 RNA, 采用 RT-PCR 技术获得  $\alpha$ -乳清蛋白基因 cDNA, 测序酶切后连接乳腺特异性表达载体 pBC I - Neo, 并对重组载体进行酶切测序鉴定; 取重组正确的载体酶切线性化后利用脂质体介导转染至山羊胎儿成纤维细胞, 通过 G418 筛选培养转染了  $\alpha$ -乳清蛋白乳腺特异性表达载体的山羊胎儿成纤维细胞。结果显示: 经过 RT-PCR 特异性扩增克隆出  $\alpha$ -乳清蛋白基因; 克隆的基因碱基组成序列经测序与预期完全一致,  $\alpha$ -乳清蛋白基因片段正向插入乳腺特异性表达载体; 重组载体在山羊胎儿成纤维细胞中稳定转染, 转入  $\alpha$ -乳清蛋白乳腺特异性表达载体的山羊胎儿成纤维细胞生长迅速, 仍保持原有的细胞生长形态。成功构建了  $\alpha$ -乳清蛋白乳腺特异性表达载体, 获得稳定转染的山羊胎儿成纤维细胞可用于核移植。

**关键词:** 山羊;  $\alpha$ -乳清蛋白基因; 乳腺特异性表达载体; 胎儿成纤维细胞; 转染

中图分类号: S827

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)05-0735-04

### Construction of mammary specific gland expression vector and transfection of nuclear donor cells

REN Chun-huan, CAO Hong-guo, CHENG Xiao, FENG Ying, ZHANG Zi-jun

(School of Animal Sciences and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** The aim of this study was to construct a mammary gland-specific expression vector with  $\alpha$ -lactalbumin gene and provide donor cells for mammary gland bioreactor. Total RNA was extracted from goat breast tissue and cDNA of  $\alpha$ -lactalbumin gene was obtained by using RT-PCR technology. After the sequence of  $\alpha$ -lactalbumin gene was identified by enzyme digestion, it was ligated into mammary gland-specific vector of pBC I -Neo. The recombinant vector sequence was identified by the enzyme digestion, and then transfected into goat fetal fibroblast by liposome-mediated transfection. The transfected goat fetal fibroblast cells with mammary gland specific expression vector was screened by G418. As a result, the fraction of  $\alpha$ -lactalbumin gene was properly placed into a mammary gland-specific expression vector, and recombinant vector was steadily transfected into goat fetal fibroblast cells. Remaining the original morphology, the goat fetal fibroblast cells with transfected mammary gland-specific expression vector grew rapidly. In conclusion, mammary gland-specific expression vector was successfully constructed and steadily transfected goat fetal fibroblast cells for nuclear transfer were obtained.

**Key words:**  $\alpha$ -lactalbumin gene; mammary special gland expression vector; the goat fetal fibroblast cells; transfection

乳清蛋白作为乳制品中的重要营养成分几乎存在于所有哺乳动物乳汁中, 由 123 个氨基酸残基组成, 其氨基酸序列和立体结构均与溶菌酶同源, 是乳糖合酶的一个亚基<sup>[1]</sup>。乳清蛋白纯度高、氨基酸

收稿日期: 2012-02-03

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08006-007B)。

作者简介: 任春环, 女, 实验师。E-mail: renchunhuan@ahau.edu.cn

\* 通讯作者: 曹鸿国, 男, 博士, 副教授。E-mail: caohongguo@ahau.edu.cn  
张子军, 男, 博士, 副教授。

配比恰当、易被人体消化吸收,含有生物活性的蛋白质和多肽。Walzem 等的报告表明乳清蛋白参与了调节免疫系统、防癌、增强抗氧化保护、增加细胞和血浆谷胱甘肽水平<sup>[2]</sup>。最近研究发现  $\alpha$ -乳清蛋白的不同折叠突变体,还具有杀菌和诱导肿瘤细胞凋亡的功能<sup>[3-4]</sup>。因此,乳清蛋白是保健食品中最具前景产品。Wheele 等将牛的  $\alpha$ -乳清蛋白基因转到猪体内后,显著提高了仔猪存活率,产后初期母猪的泌乳量提高了 20%~50%,说明  $\alpha$ -乳清蛋白还具有提高泌乳量的作用<sup>[5]</sup>。 $\alpha$ -乳清蛋白作为乳品中重要的营养成分,其蛋白质效率、净蛋白质利用率都高于酪蛋白,是一种极易消化吸收的蛋白质。由于小鼠  $\alpha$ -乳清蛋白基因好获得,而且与人、羊和牛同源性都很高,可作为具有生物活性的蛋白质。山羊的妊娠周期较牛短 3 个月,而产奶量较绵羊高 2~3 倍。并且山羊对疾病的抵抗力较强,羊病的发生率显著低于牛和绵羊<sup>[6]</sup>。因此,山羊乳腺是较为理想的生物反应器。

本研究构建含有  $\alpha$ -乳清蛋白基因的乳腺特异表达载体 pBCI-Neo-Lact。将 pBCI-Neo-Lac 质粒酶切回收线性片段,采用脂质体转染方式转染山羊胎儿成纤维细胞 (goat fetal fibroblasts cells, gFFC),通过 G418 筛选培养获得携带该乳腺表达载体的阳性山羊胎儿成纤维体细胞。为进一步生产转基因羊体细胞克隆制备核供体细胞,也为乳腺表达载体在其他细胞中的表达提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

载体 pBCI-Neo 由青岛农业大学沈伟教授馈赠;大肠杆菌 *DH5 $\alpha$*  购自北京全式金生物技术有限公司; Trizol 试剂、Lipofectamine2000 脂质体转染试剂购自 Invitrogen 公司; RT-PCR Kit 购自 Promega 公司; pMD19-T 载体、*Taq* DNA 聚合酶和蛋白质 Marker 标准均购自大连宝生物工程有限公司 (TaKaRa 公司); 限制性内切酶 *Xho* I、*Sa*L I、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; DNA Marker 标准购自上海捷瑞生物工程有限公司; 质粒抽提试剂盒购自 QIAGEN 公司; 凝胶纯化回收试剂盒购自北京天根科技生化有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计与合成** 根据 GenBank 的小鼠  $\alpha$ -lactalbumin 的序列 (序列号为: MGC:78177 IMAGE:3670536) 设计合成引物,引物序列为:上游 5'-AGTCTCGAGGCCACCATGATGCATTTTCGTT

CTTTG-3'; 下游 5'-AAACTCGAGTCAGGGCTTC TCACAACGCCAC-3', 引物 5'端分别加入 *Xho* I 酶切位点 (下划线部分)。引物由上海生物工程技术有限公司合成。

**1.2.2 总 RNA 提取及 RT-PCR 扩增** 按照说明书采用 Trizol 一步法提取小鼠乳腺组织中的总 RNA。取 2  $\mu$ g 的 RNA 用 M-MLV 反转录酶反转录成 cDNA 作为模板,进行 PCR 扩增  $\alpha$ -lactalbumin 基因。反应体系:10 $\times$ buffer 2  $\mu$ L, 2.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> dNTP 0.8  $\mu$ L, 引物各 0.4  $\mu$ L, 5 U $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup> *Taq* 酶 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 15.2  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, 计 20  $\mu$ L 反应体系。扩增条件 94 $^{\circ}$ C 30 s 变性; 94 $^{\circ}$ C 30 s 变性; 55 $^{\circ}$ C 30 s 退火, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min 延伸, 循环 30 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min。PCR 扩增产物电泳后, 用试剂盒回收目的片段。

**1.2.3 PCR 产物的克隆及测序** 将回收的 460 bp DNA 片段与 pMD18-T 载体连接, 转化 *DH5 $\alpha$*  感受态细胞, 次日挑选单菌落进行摇菌培养, 提取质粒 DNA, 然后用 *Xho* I 进行酶切菌落 PCR 鉴定。将鉴定正确的重组质粒送上海生工生物工程公司进行测序, 测序正确的重组质粒命名为 pMD18-Lact。

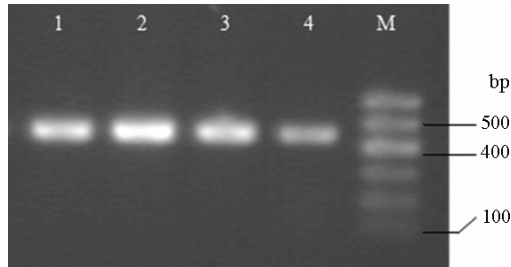
**1.2.4 pBCI-N-Lact 重组质粒的构建与鉴定** 用 *Sa*L I、*Xho* I 分别酶切 pBCI-N 和 pMD18-Lact DNA 凝胶回收试剂盒回收酶切片段。将回收片段按目的基因和载体浓度为 1:1, 反应体系 10  $\mu$ L, 在 T4 连接酶作用下 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 连接产物转化 *DH5 $\alpha$*  感受态菌。经蓝白筛选后, 挑取阳性克隆菌落, 摇菌提取质粒, 酶切鉴定连接方向并测序鉴定, 鉴定引物 (510 bp) 上游 5'-ACGCTGTTTCCTCATC TTCCCATTCAC-3', 下游 5'-AAACTCGAGTCAG GGCTTCTCACAACGCCAC-3' 扩增产物克隆送上海生物工程技术有限公司进行 DNA 测序, 将完全正确的质粒命名为 pBCI-N-Lact。用 QIAGEN mini-prep 试剂盒大量提取质粒, -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

**1.2.5 pBCI-N-Lact 重组质粒转染与阳性细胞克隆的筛选** 取原代的山羊胎儿成纤维细胞, 待细胞传代培养生长至 80% 汇合时用脂质体 lipofectamin\_2000 转染, 转染细胞分散到 96 孔板中培养 24 h 后利用 G418 (800 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>) 进行抗性细胞克隆筛选 7 d, 然后用 G418 (200 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>) 扩增克隆。3 d 以后挑取克隆分为两部分扩增培养, 一部分冻存, 另一部分转移至 24 孔细胞培养板培养, 细胞 100% 汇合时提取基因组 DNA, 在 neo 基因设计引物进行 PCR 检测。山羊胎儿成纤维细胞培养环境条件为 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 和饱和湿度。

## 2 结果与分析

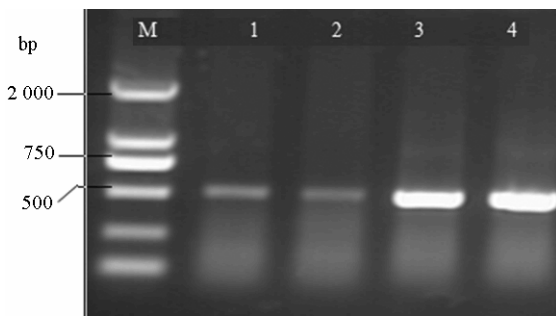
### 2.1 *Lact* 基因的 RT-PCR 扩增

以总 RNA 为模板 oligod(T) 进行反转录, 以 *Lact* 基因的上下游引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析得到约 460 bp 的条带, 与预期大小 (469 bp) 一致 (图 1)。



M. DNA Marker 600; 1-4 为 *Lact* 基因 PCR 扩增产物  
M. DNA Marker 600; 1-4. PCR products of *Lact* gene

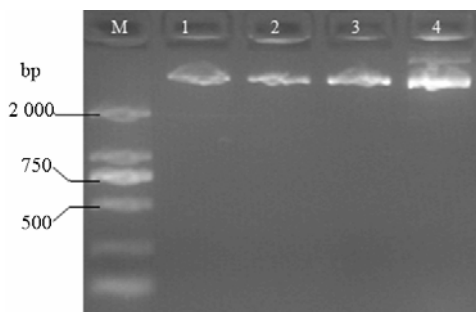
图 1 *Lact* 基因 PCR 扩增产物  
Figure 1 PCR products of *Lact* gene



M. DNA Marker 2000; 1-4 为 pBCI-N-Lac 的菌液 PCR 扩增产物

M. DNA Marker 2000; 1-4. PCR products of plasmid pBCI-N-Lact's bacterium

图 2 重组质粒 pBCI-N-Lact 的菌液 PCR 扩增产物  
Figure 2 PCR products of plasmid pBCI-N-Lact in bacterium



M. DNA Marker 2000; 1-2. *Sal* I 单酶切, 19.8 kb; 3-4. *Xho* I 单酶切, 19.8 kb

M. DNA Marker 2000; 1-2. digested with *Sal* I, 19.8 kb; 3-4. digested with *Xho* I 19.8 kb

图 3 pBCI-N-Lact *Sal* I 及 *Xho* I 的单酶切鉴定  
Figure 3 Identification of pBCI-N-Lact by *Sal* I, *Xho* I enzyme digestion, respectively

### 2.2 重组质粒 pBCI-N-Lact 的构建与鉴定

重组质粒 pBCI-N-Lact 的菌液, 经鉴定引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析得到约 500 bp 的条带, 与预期大小 (496 bp) 一致 (图 2)。将鉴定引物扩增片段 (3、4 泳道), 纯化回收进行 DNA 测序。其测序编码序列与 GenBank 的小鼠 *Lact* 基因的序列相符。重组质粒 pBCI-N-Lact 分别经 *Sa*L I、*Xho* I 单酶切后, 均出现 1 条酶切片段大小与预期值相符 (图 3)。

### 2.3 细胞的外源基因转染与阳性细胞克隆的筛选

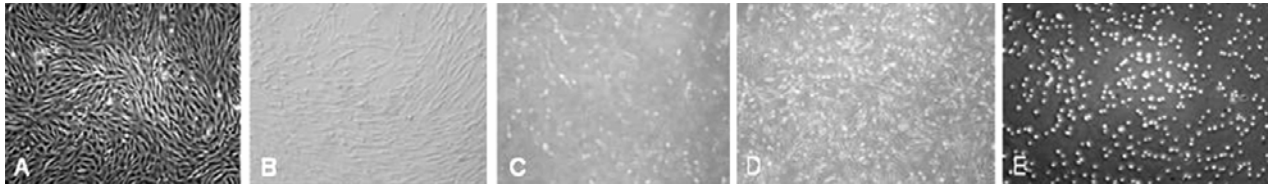
外源基因转染细胞后, 筛选后 10 d 左右出现的抗性细胞克隆见图 4。采用脂质体转染方法将 pBCI-N-Lact 转染山羊胎儿成纤维细胞, 采用 G418 进行筛选, 筛选浓度开始为  $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 剂量逐渐减少至  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 直至筛选出稳定表达 pBCI-N-Lact 的细胞。由于山羊胎儿成纤维细胞传代次数有限, 且整个转染筛选过程都对细胞产生不利影响, 最终只得到 10 个有效扩增细胞克隆。因胎儿成纤维细胞传代次数有限, 每个细胞克隆扩增到极限时所提取的 DNA 量也不足以进行 southern blot 检测, 因此只在 *neo* 基因设计引物进行了 PCR 检测 (见图 5), 均获得 496 bp 的片段。表明筛选得到了阳性细胞克隆。

## 3 讨论

应用动物乳腺生物反应器生产药用蛋白是生物高技术领域研究的热点, 构建在乳腺细胞中高效表达外源基因的载体是制备动物乳腺生物反应器成败的关键。乳蛋白基因和目的基因的表达调控序列是构建乳腺特异性表达载体的重要元件, 它们的选用及不同的组合决定着载体的表达性能<sup>[7]</sup>。 $\beta$ -乳球蛋白基因 5'端调控序列是一种启动效率较高的启动子, 深受广大学者的关注, 已有多种基因在该启动子的调控下, 在牛、羊等哺乳动物的乳腺中得到了表达<sup>[8-9]</sup>, 总体效率较高。曹阳等构建了山羊  $\beta$ -乳球蛋白基因 5'端调控序列启动的人乳铁蛋白基因乳腺特异表达载体, 并进行了细胞表达研究, 人乳铁蛋白基因 cDNA 序列在小鼠乳腺癌细胞中得到了表达, 并且较金属硫蛋白基因启动子启动的人乳铁蛋白基因在幼鼠肾细胞中的表达量要高<sup>[10]</sup>, 也比牛  $\beta$ -乳球蛋白基因 5'端调控序列启动的人生长素基因在原代山羊乳腺上皮细胞中的表达最高<sup>[11]</sup>。郑月茂等构建了山羊  $\beta$ -乳球蛋白基因 5'端调控序列启动的人乳铁蛋白基因乳腺特异表达载体, 并进行了细胞表达研究, 人乳铁蛋白基因 cDNA 序列在山羊乳

腺细胞中得到了表达<sup>[12]</sup>。本研究构建了山羊  $\beta$ -乳球蛋白基因 5'端调控序列启动的小鼠乳清蛋白基因乳腺特异表达载体, 并进行了细胞表达研究, 小鼠乳清蛋白基因 cDNA 序列在山羊胎儿成纤维细胞中得到了表达。转基因动物的研究表明, 目的基因采用基因组序列比采用 cDNA 序列的表达效率高, 内含子的存在可能会增强基因的表达。然而, 在实

际的操作中, 真核基因的基因组序列往往过于庞大而不便操作, 而且基于普通质粒载体的容载量也不允许。因此, 本研究采用了 cDNA 作为  $\alpha$ -乳清蛋白的表达构件,  $\alpha$ -乳清蛋白基因 cDNA 插入位点为载体中唯一的 *Xho* I 酶切位点。构建的乳腺特异性表达载体中有 *neo* (新霉素抗性基因), 通过其利用 G418 可以进行细胞筛选。

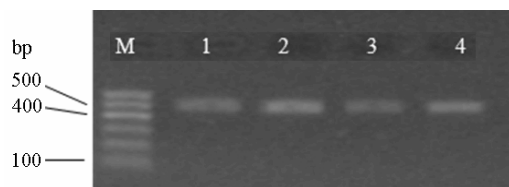


A. 细胞转染前状态; B. 细胞转染后状态; C. 转然后换液; D. 换液后细胞增殖生长; E 消化后细胞

A. before cells transfection; B. after cells transfection; C. changed medium after cells transfection; D. cell growth after changing medium; E, digested cells

图 4 山羊胎儿成纤维细胞转染过程

Figure 4 The transfected process of goat fetal fibroblasts



M. DNA Marker 600; 1-4. 克隆细胞 PCR 扩增产物

M. DNA Marker 600; 1-4. PCR products of the cell clone

图 5 克隆细胞 PCR 扩增产物

Figure 5 PCR products of the cell clone

本研究成功构建小鼠  $\alpha$ -乳清蛋白基因乳腺特异性表达载体 pBCI-Neo-Lact, 以脂质体介导法转染至山羊胎儿成纤维细胞, 通过荧光显微镜、G418 筛选和 PCR 检测其在山羊胎儿成纤维细胞中的表达, 成功获得阳性的转基因细胞克隆。为进一步制作转基因羊提供了高效的表达载体及优秀的核供体细胞。

## 参考文献:

- [1] Krissansen G W. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications [J]. *J Am Coll Nutr.*, 2007, 26(6): 713S-723S.
- [2] Walzem R L, Dillard C J, German J B, et al. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 2002, 42(4): 353-375.
- [3] Svensson M, Sabharwal H, Svanborg C, et al. Molecular characterization of a lpha- lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (10): 6388-6396.
- [4] Hakansson A, Svensson M, Mossberg A K, et al. A folding variant of alpha-lactalbumin with bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Mol Microbiol*, 2000, 35(3): 589-600.
- [5] Wheeler M B, Bleck G T, Donovan S M. Transgenic alteration of sow milk to improve piglet growth and health[J]. *Reprod Suppl*, 2001; 58: 313-24.
- [6] 杨正田, 兰国成, 沈伟, 等. t-PA 突变体山羊乳腺表达载体构建及转染细胞的核移植试验[J]. *生物技术通讯*, 2004, 15(5): 433-466.
- [7] 乔贵林, 赵君, 赖良学, 等. 牛 BLG/tPA 和牛 as1/ tPA 酪蛋白/tPA 基因在家兔乳腺中的暂时表达[J]. *中国兽医学报*, 2001, 21(6): 576-578.
- [8] 薛京伦, 卢大儒. 乳腺生物反应器的研究现状[J]. *生物技术通报*, 1998(3): 17-20.
- [9] 卢一凡, 邓继先, 肖成祖, 等. 转基因动物乳腺定位表达重组蛋白的研究现状[J]. *高技术通讯*, 1998(1): 54-57; (2): 59-62.
- [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] Kathryn M S, Thomas A R, Walter D F, et al. Expression of cloned human lactoferrin in baby-hamster kidney cells[J]. *Biochem J*, 1991, 276: 349-35.
- [12] 郑月茂. 转基因山羊乳腺上皮细胞系建立与转基因克隆胚发育[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.