

高原鼠兔瘦素蛋白乳腺特异表达载体的构建及细胞表达

庞礴^{1,2} 于鸿浩³ 张清泽⁴ 谢玲⁵ 付林^{1,2} 赵新全^{1*} 郭松长^{1,6*}

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 高原生物适应与进化重点实验室, 西宁 810001) (2 中国科学院大学, 北京 100049)

(3 桂林医学院生物技术学院, 桂林 541004) (4 青海民族大学生态环境与资源学院, 西宁 810007)

(5 温州医科大学药学院分子药理学研究中心, 温州 325035) (6 湖南农业大学动物科学技术学院, 长沙 410128)

摘要: 瘦素 (Leptin) 蛋白是调节机体能量代谢的关键因子之一。前期研究显示高原鼠兔 Leptin 蛋白发生了适应性进化。功能实验表明, 在温暖或寒冷条件下高原鼠兔 Leptin 通过减少食物摄取和增加能量消耗调节能量平衡, 显示了其调节适应性产热过程的潜力。本研究以高原鼠兔 Leptin cDNA 为模板扩增高原鼠兔 obese (*ob*) 基因编码区序列 504 bp, 改造并构建哺乳动物真核细胞乳腺特异表达载体 pBC1-lep, 同时通过组织块法原代培养建立奶山羊乳腺上皮细胞系, 并通过 pBC1-lep 质粒脂质体法转染及转基因细胞的筛选, 成功获得转染 Leptin 的阳性细胞。本研究为利用转基因动物实现奶山羊乳腺中特异表达高原鼠兔 Leptin 提供了一条可能的途径, 完成了乳腺特异真核表达载体的构建。

关键词: 高原鼠兔; 瘦素蛋白; 乳腺上皮细胞; 乳腺特异表达载体; pBC1

中图分类号: Q346

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050 (2019) 01-0084-10

Construction of mammary gland – specific expression vector for plateau pika (*Ochotona curzoniae*) Leptin gene and its expression in cells

PANG Bo^{1,2}, YU Honghao³, ZHANG Xuze⁴, XIE Ling⁵, FU Lin^{1,2}, ZHAO Xinquan^{1*}, GUO Songchang^{1,6*}

(1 Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

(2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(3 College of Biotechnology, Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

(4 College of Eco-Environment & Resources, Qinghai University For Nationalities, Xining 810007, China)

(5 Molecular Pharmacology Research Center, School of Pharmaceutical Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

(6 College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Leptin is one of the key factors regulating body energy homeostasis. Previous research showed that the plateau pika (*Ochotona curzoniae*) leptin gene has undergone adaptive evolution. Functional experiments revealed that pika leptin regulates energy homeostasis via reduced food intake and increased energy expenditure under both warm and cold conditions. Together, these findings suggest that leptin of the plateau pika has a potentially potent role in regulating adaptive thermogenesis. In this study, the 504 bp open-reading frame of obese (*ob*) gene was amplified from the full-length pika leptin cDNA and then cloned into a mammary gland-specific expression vector pBC1 (pBC1-lep). Meanwhile, we successfully established dairy goat mammary epithelial cell lines by primary tissue mass cell culture and transfected the modified pBC1-lep plasmid into the cultured cells with lipofectamine, and then screened for and successfully established positive cell lines transfected with leptin. These results provide a probable way for expression of the plateau pika leptin in goat mammary gland specifically by transgenic animal and complete the construction of the eukaryotic mammary gland-specific expression vector.

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目 (KSCX2-EW-J-26)

作者简介: 庞礴 (1984-), 女, 博士, 主要从事细胞生物学和动物生殖学研究. E-mail: pangbo926@sina.com

收稿日期: 2017-12-10; 修回日期: 2018-07-08

* 通讯作者, Corresponding authors, E-mail: scguoas@126.com; xqzhao@nwipb.cas.cn

Key words: Plateau pika; Leptin; Mammary epithelial cell; Mammary gland - specific expression vector; pBC1

瘦素 (Leptin) 蛋白是 obese (*ob*) 基因编码的由 167 个氨基酸组成的分泌型蛋白, 主要由白色脂肪细胞分泌, 其最重要的功能是调节能量代谢 (Zhang *et al.*, 1994), 体现为减少动物摄食, 增加动物机体活动量及能量消耗, 升高体温, 减轻体重。生活在青藏高原高寒地区的高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 由于常年暴露于低温环境下, 经过长期的进化适应, 产生了较高的基础代谢率、非颤抖性产热能力以及高的氧利用率来应对高寒低氧的极端环境 (杜继增和李庆芬, 1982; Li *et al.*, 2001)。将高原鼠兔 *ob* 基因编码区与其他物种进行比对, 发现高原鼠兔 Leptin 中有 20 个氨基酸位点为高原鼠兔所特有 (Yang *et al.*, 2006), 并且高原鼠兔 Leptin 蛋白发生了适应性进化 (Yang *et al.*, 2008)。功能实验研究表明, 在温暖或寒冷条件下高原鼠兔 Leptin 都通过减少食物摄取和增加能量消耗调节能量平衡, 显示了其调节适应性产热的更大潜力 (Yang *et al.*, 2011)。为进一步探索高原鼠兔 Leptin 的特殊性以便对其进行可能的开发应用, 利用转基因动物的方法使奶山羊乳腺中特异表达高原鼠兔 Leptin, 望成为一条高效获得高原鼠兔 Leptin 的途径。乳腺是转基因动物最理想的基因特定表达部位, 而保留有乳腺分泌特性的乳腺上皮细胞则是评价乳腺特异性表达载体合理性和有效性的理想模型。

pBC1 载体是一种商品化的哺乳动物乳腺特异性表达载体, 包含以下真核表达功能元件: 山羊 β -酪蛋白 5' 端调控区、山羊 β -酪蛋白 3' 端非翻译区、鸡 β -珠蛋白基因绝缘子, 可以指导外源基因在动物 (主要是牛、羊、猪、小鼠等) 乳腺组织中特异性表达 (Persuy *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 1992; Chung *et al.*, 1993, 1997; Young *et al.*, 1997)。但是其不带有抗性筛选标记和荧光标记, 因而在使用上具有一定的局限性。另一个真核细胞表达载体 pIRES2-EGFP 骨架上带有内部核糖体进入位点序列 (Internal ribosome entry site, IRES), IRES 元件前为外源基因插入位点, 其后连接着增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因, 可使目的基因与荧光基因同时表达且不融合。荧光表达可以间接指示目的基因的表

达。载体 pcDNA3.1 (+) 则带有新霉素抗性基因 NEO 筛选标记, 可用于转染细胞的筛选。本实验主要进行 pBC1 载体这两方面的改造, 即加入了荧光及真核细胞抗性筛选标记。

本研究将乳腺特异性表达载体的构建、奶山羊乳腺上皮细胞系的建立、外源基因转染奶山羊乳腺上皮细胞及转染细胞株的建立和鉴定等几个方面结合起来, 通过前期细胞水平的整合和表达检测, 挑选并建立阳性细胞株, 为构建分泌高原鼠兔瘦素蛋白的转基因克隆羊工作奠定理论和物质基础, 利于进一步的科学研究和实际应用。

1 研究方法

1.1 实验材料

高原鼠兔 Leptin cDNA 由青海省果洛地区采回的高原鼠兔组织中提取 RNA 后经反转录获得。载体质粒 pBC1 购自英潍捷基 (上海) 贸易有限公司 (Invitrogen)。质粒 pIRES2-GFP、pcDNA3.1 (+) 由西北农林科技大学、榆林学院陕西省绒山羊工程技术研究中心实验室馈赠。测序载体 pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司。PCR 引物的合成及载体测序均由 Invitrogen 公司完成。

1.2 高原鼠兔 Leptin 基因的克隆

参考 GenBank 数据库中高原鼠兔瘦素 (Leptin) 基因 cDNA 序列 (DQ983189) 设计特异性引物 PF 和 PR。PF: 5' - CTCGAGGCCACCATGCGGTGCGGACCCCTGTGC - 3'; PR: 5' - CTCGAGTCA GCACCCAGGGCCAATGTCCAG - 3', 下划线为限制性内切酶 *Xho* I 酶切位点序列。引物需扩出高原鼠兔 Leptin 编码区序列的同时加入插入载体时所需的 *Xho* I 酶切位点。引物工作浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3 RNA 提取、反转录及 Leptin 基因的 PCR 扩增

以 Trizol 法 (汪迁昊等, 2017) 从高原鼠兔脂肪组织中提取总 RNA, 用 cDNA 第一链合成试剂盒 (Fermentas 公司) 将 RNA 反转录成 cDNA, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。RT-PCR 方法以 cDNA 为模板, 以 PF、PR 为引物。反应体系为 100 μL : cDNA 模板 4 μL , 上、下游引物各为 4 μL , Taq DNA polymerase (TaKaRa 公司) 0.5 μL , 10 \times PCR Buffer 10 μL , dNTP Mix 8 μL , ddH₂O 69.5 μL 。

PCR 热循环反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 34 个循环, 72℃ 终延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测, 用 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver 2.0 胶回收纯化试剂盒 (TaKaRa 公司) 回收纯化目的条带, 再用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

构建 pGEM-T Easy Vector 载体 (Promega 公司), 转化重组质粒到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 混匀, 冰浴 30 min。42℃ 水浴热激 90 s, 立刻置于冰浴中 3 min, 37℃、100 r/min 左右振荡培养 45 ~ 60 min, 接种到含有 Amp、IPTG 和 X-gal 的 LB 固体培养基平板上, 37℃ 培养 12 h 左右, 挑取单个白色菌落接种到含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 37℃、200 ~ 280 r/min 左右振荡培养过夜, 获得菌液, 用菌液做 PCR 检测, 将筛选出的阳性克隆菌液测序, 正确质粒命名为 T-lep。

1.4 高原鼠兔 Leptin 基因 pBC1 真核表达载体的改造和构建

1.4.1 载体 pBC1 与目的基因 Leptin 的连接

将含目的基因的质粒 T-lep 和载体质粒 pBC1 分别用限制性内切酶 *Xho* I (Promega 公司) 进行酶切, 胶回收纯化 Leptin 片段和已线性化的载体 pBC1。利用 T4 DNA 连接酶 (Promega 公司) 对二者进行连接, 转化入 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 摇菌提取质粒, 分别进行 PCR 鉴定、酶切鉴定及 DNA 测序鉴定。将 Leptin 插入正确的载体命名为 pBC1-ob。

1.4.2 NEO-IRES-EGFP-SV40 PA 序列的插入

1.4.2.1 NEO 基因的克隆及测序鉴定

以 pcDNA3.1(+) 载体为模板, 设计特异性引物 N2 和 N3, 即 N2: 5' - GCGGCCGCCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGT - 3'; N3: 5' - GCGGCCGC CCAGACATGATAAGATACATTGATGA - 3' (下划线为 *Not* I 酶切位点), 利用 Platinum[®] Taq 高保真 DNA 聚合酶 (Invitrogen 公司) 扩增出长度为 1 504 bp 的新霉素抗性基因 NEO 及其调控序列 SV40-NEO-PolyA 片段, 两边所加酶切位点为 *Not* I, 扩增出的片段克隆到 T 载体上。PCR 反应体系为 20 μ L: 菌液 pcDNA3.1 (+) 模板 0.5 μ L, 上、下游引物各为 0.8 μ L, Platinum[®] Taq 高保真 DNA 聚合酶 0.2 μ L, 10 \times 高保真 PCR 缓冲液 2 μ L, dNTP Mix 1.6 μ L, 50 mmol/L MgSO₄ 0.8 μ L, ddH₂O 13.3 μ L。PCR 热循环反应条件: 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 1 min, 25 个循环, 68℃ 终延伸 10 min。回收纯化目的条带 SV40-NEO-PolyA, 克隆到 T 载体上, 转化并检测阳性克隆, 方法同 1.3。将筛选出的阳性克隆菌液送出测序, 正确质粒命名为 pGEM-T-NEO。

1.4.2.2 NEO-IRES-EGFP-SV40PA 序列的拼接

从质粒 pGEM-T-NEO 中扩增目的基因 NEO 和 SV40 Poly A, 从 pIRES2-EGFP 中扩增 IRES-EGFP 序列, 将 NEO、IRES-EGFP 和 SV40 PA 序列拼接后装入 pBC1 载体中。

首先, 根据 NEO-IRES-EGFP-SV40 PA 序列设计合成 PCR 引物, NEO-IRES-EGFP-SV40 PA 上游引物 5' 端加 *Not* I 酶切位点序列, SV40 PA 下游引物 5' 端加 *Not* I 酶切位点序列, 引物序列及 PCR 反应条件见表 1。

表 1 引物序列及 PCR 反应程序
Table 1 Primer sequences and PCR parameters

基因名称及片段长度 Gene name and DNA fragment	引物 (上下游引物序列) (5' - 3') Primer (upper and lower primer in turns in line) (5' - 3')	限制性酶切位点 Restriction enzymes	PCR 参数 PCR parameters
SV40-Neo (1220 bp)	P1: ATCATCGCGGCCGCCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTG P2: AGGGAGAGGGGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCCGATAG	<i>Not</i> I	94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 68℃ 90 s
IRES-EGFP (1329 bp)	P3: AGTTCCTCTGAGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACC P4: AGACTCCCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGA		94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 68℃ 90 s
PolyA (328 bp)	P5: TGTACAAGTAAGCGGGACTCTGGGGTTCCGAAATGAC P6: ATCATCGCGGCCGCAGACATGATAAGATACATTGAT GAGTTTGGAC	<i>Not</i> I	94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 68℃ 1 min
NEO-IRES-EGFP- PolyA (2827 bp)	P1 P6	<i>Not</i> I <i>Not</i> I	94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 68℃ 3.5 min

以 pGEM-T-NEO 质粒为模板扩增目的基因 NEO 序列, 以 pGEM-T-NEO 质粒为模板, P1、P2 为引物, 反应体系为 50 μ L: pGEM-T-NEO 质粒 (30 ng/ μ L) 模板 0.3 μ L, 上、下游引物各为 2 μ L, Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen 公司) (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, 50 mmol/L MgSO₄ 1 μ L, dNTP Mix 1 μ L, ddH₂O 38.2 μ L。PCR 热循环反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 30 个循环, 68 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。胶回收纯化目的条带 SV40-NEO。

以 pIRES2-EGFP 质粒为模板扩增 IRES-EGFP 序列: 以 P3、P4 为引物, 50 μ L PCR 反应体系及热循环反应条件同上。以 pGEM-T-NEO 质粒为模板扩增 PolyA 序列: 以 P5、P6 为引物, 50 μ L PCR 反应体系同上。热循环反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环, 68 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。

最后, 以 PCR 回收产物 NEO、IRES-EGFP 和 PolyA 片段为模板扩增 NEO-IRES-EGFP-PolyA 序

列, 以 P1、P6 为引物, 反应体系为 50 μ L: NEO、IRES-EGFP 和 PolyA 回收片段 (10 ng/ μ L) 模板各 0.3 μ L, 上、下游引物 P1、P6 各 2 μ L, Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen 公司) (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, 50 mmol/L MgSO₄ 1 μ L, dNTP Mix 1 μ L, ddH₂O 37 μ L。PCR 热循环反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 3.5 min, 30 个循环, 68 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳切胶回收 NEO-IRES-EGFP-PolyA 片段。

1.4.2.3 NEO-IRES-EGFP-PolyA 片段和 pBC1-ob 质粒的重组构建

将 NEO-IRES-EGFP-PolyA 片段和 pBC1-ob 质粒同时用 *Not* I (MBI 公司) 单酶切。胶回收后用 T4 DNA ligase (NEB 公司) 进行连接, 16 $^{\circ}$ C 连接 2 h, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂于具有卡那霉素抗性的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 筛选阳性克隆、摇菌、提取质粒, 并测序验证得到正确质粒, 命名为 pBC1-lep (图 1)。

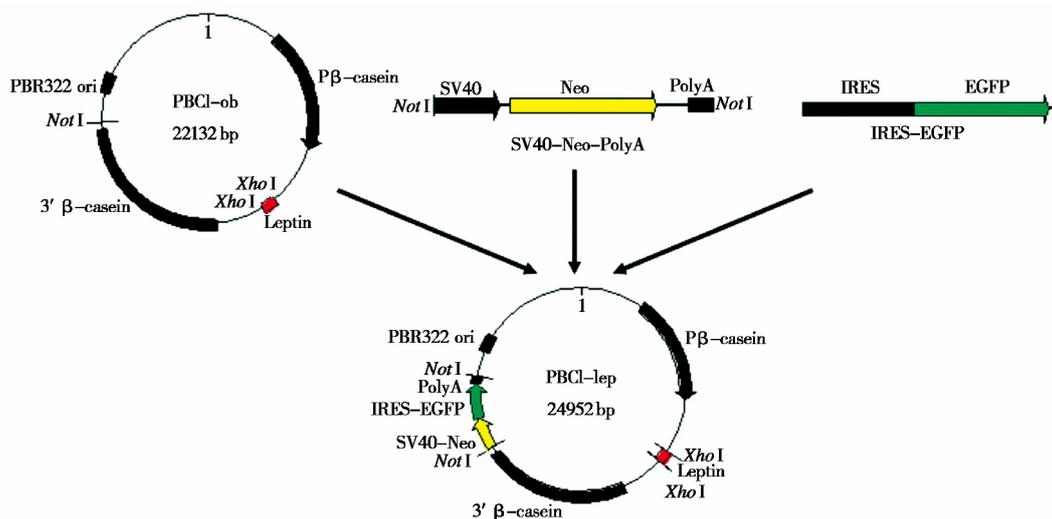


图 1 pBC1-lep 乳腺特异表达载体构建示意图

Fig. 1 Schematic illustration of the modified pBC1-lep mammary gland-specific expression vector

1.5 奶山羊乳腺上皮细胞 (Dairy goat mammary epithelial cell, GMEC) 的分离及培养

无菌手术采取泌乳期的萨能奶山羊乳腺实质组织, 用新配制的含 200 U/mL 庆大霉素的 PBS 溶液浸泡 10~15 min, 并清洗组织块 4~5 次。剥除掉可见的脂肪组织、结缔组织或坏死组织, 移入培养

皿用手术刀交叉切成约 1 mm³ 的小块。用移液管将组织块移入 15 mL 无菌离心管内静置沉淀, 去除上清液。在离心管中用 PBS 反复离心洗涤数次至上清液较澄清。取若干细胞培养瓶加入少量血清使其均匀涂布在培养面上。将组织块均匀置于涂布血清的培养瓶中, 每 25 cm² 培养瓶大约接种 20~30 块

组织。在 37.5℃、5% CO₂、相对湿度饱和的 CO₂ 培养箱中倒置培养 3~4 h, 使组织块牢固地贴附于培养皿底面。将培养瓶翻转, 缓慢加入含 15%~20% 胎牛血清的 DMEM 培养液 (Thermo 公司, Gibco) 继续培养。组织块培养 3~5 d 可以见到成纤维细胞从组织块周围游离出来, 形成生长晕。约 1 周以后换液, 一旦向外生长已形成, 用镊子将组织块取出。更换培养基直至细胞生长超过生长面积的一半时传代。差速消化法和差速贴壁法除去成纤维细胞, 分离纯化奶山羊乳腺上皮细胞, 纯化至 3 代细胞并且纯度达到 99% 以上。

1.6 pBC1-lep 质粒脂质体法转染奶山羊乳腺上皮细胞

1.6.1 转染载体的准备及细胞对 G418 的耐受性测定

配制 200 mL LB 培养基, 接种含已构建好的表达载体 pBC1-lep 质粒的菌种, 37℃ 振荡过夜, 提取质粒 DNA。用 E. Z. N. A.® Endo-Free Plasmid Mini Kit I 转染级别去内毒素质粒提取试剂盒 (Omega 公司) 从菌液中提取质粒 pBC1-lep。

选择生长均匀、形态正常的奶山羊乳腺上皮细胞消化后, 计数。取六孔细胞培养板, 向每孔中接种 1 mL 含 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞的培养液, 再补 1 mL 培养液至终体积 2 mL。在 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养至 50%~70% 汇合。分别向 1~6 孔中加入 100 mg/mL 的 G418 6 μL、8 μL、10 μL、12 μL、14 μL、16 μL, 使每孔 G418 的浓度分别为 300 μg/mL、400 μg/mL、500 μg/mL、600 μg/mL、700 μg/mL、800 μg/mL。每两天换培养液 (DMEM + 10% FBS) 一次, 并重新补加 G418。每天观察细胞的生长情况并记录。

1.6.2 pBC1-lep 质粒脂质体法转染奶山羊乳腺上皮细胞

将培养的生长状态良好的细胞按 2×10^5 分别接种到两个六孔板中, 培养 24 h, 待细胞生长达 70%~80% 汇合度时, 按照 Lipofectamine™ 转染试剂 (Invitrogen 公司) 说明书开始转染 pBC1-lep 质粒。转染结束培养 24 h 后, 用胰蛋白酶消化每孔细胞, 接种于 60 mm 培养皿中, 待长到汇合度 30% 左右时, 加入 G418 至终浓度 600 μg/mL 继续培养。每两天换培养液一次, 同时补加 G418, 并在倒置显微镜下进行观察。连续筛选两周左右, 在

显微镜下观察荧光细胞克隆, 可以观察到有明显抗性的克隆细胞株产生。此时将转染细胞的 G418 的筛选浓度降低至 200 μg/mL 继续培养。

1.7 荧光定量 PCR 验证转染细胞中 ob 基因表达

利用 qRT-PCR 对未经转染的奶山羊乳腺上皮细胞 (MEC)、转染 ob 基因的乳腺上皮细胞 (MEC-ob) 中 ob 基因表达水平进行验证。以 Trizol 法分别提取未经转染的奶山羊乳腺上皮细胞 (MEC)、转染 ob 基因的乳腺上皮细胞 (MEC-ob) 总 RNA, 测定并统一调整浓度。用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) 合成 cDNA 第一链。使用 $2 \times$ RealStar Green Fast Mixture with ROXII (GenStar, 北京) 快速反应体系, 按三步法 PCR 标准程序 95℃ 2 min 预变性, 95℃ 15 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环进行。

以 Gapdh 作为内参, ob 基因引物用 PF、PR (同 1.2)。各样品均设 3 次生物学重复, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法 (Schmittgen and Livak, 2008) 进行基因的相对表达量分析。

2 结果

2.1 高原鼠兔 Leptin 基因的克隆

高原鼠兔 Leptin 编码区序列 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测到约 500 bp 左右清晰可见的 DNA 片段, 其与预期目的片段 (504 bp) 大小基本一致, 且特异性良好 (图 2A)。转化菌液 PCR 检测其扩增片段与预计相符, 显示有插入成功的 T 载体。将该质粒的测序结果经 NCBI 数据库中 BLAST 分析表明, 所得序列为高原鼠兔 Leptin 基因的 CDS 全长编码序列, 表明克隆成功。将测序正确的质粒命名为 T-lep。

2.2 高原鼠兔 Leptin 基因 pBC1 真核表达载体的构建及重组子的鉴定

2.2.1 载体 pBC1 与目的基因 Leptin 的连接

重组质粒菌液 PCR 结果在 500 bp 左右有一条特异性条带; 经 Xho I 酶切后在 500 bp 和 21 000 bp 左右各有一条特异性条带 (500 bp 左右条带较弱), 表示重组质粒 pBC1 表达载体和插入片段 Leptin 大小均正确 (图 3A)。测序结果分析表明, 2 号重组质粒插入片段 Leptin 与 GenBank 所提交的高原鼠兔 Leptin 核酸序列一致, 说明目的片段 Leptin 与载体 pBC1 重组成功。将此重组载体命名为 pBC1-ob。

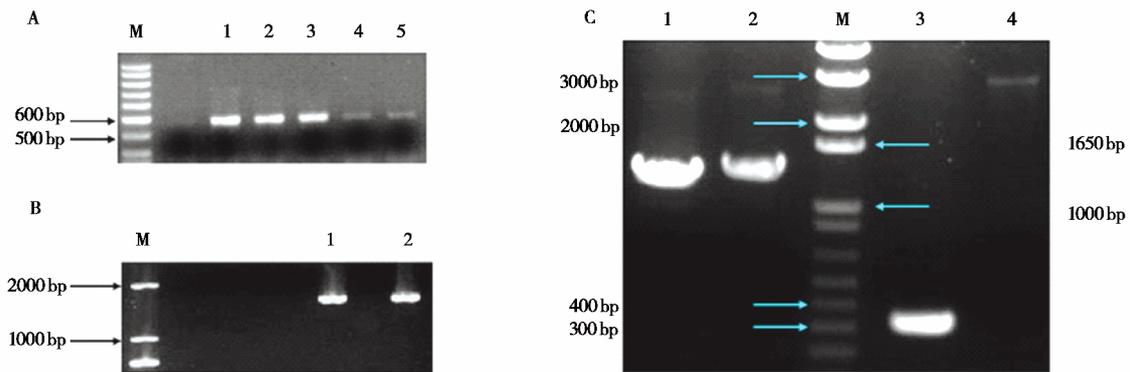


图2 pBC1-lep 乳腺特异表达载体相关 PCR 扩增电泳图. A: 高原鼠兔 Leptin 基因 PCR 扩增电泳图 (1~5 为 PCR 产物); B: pGEM-T-NEO 菌液 PCR 筛选 (1, 2 为 PCR 产物); C: NEO-IRES-EGFP-SV40 PolyA PCR 产物片段和拼接序列全长 (1: PCR 产物 NEO 片段; 2: IRES-EGFP 片段; 3: SV40-PolyA 片段; 4: NEO-IRES-EGFP-SV40 PolyA 序列)

Fig. 2 PCR amplification of pBC1-lep mammary gland-specific expression vector. A: The PCR amplification of Leptin gene in Plateau pika (1-5: PCR products); B: Screening of successful modified pGEM-T-NEO vector by PCR. (1, 2: PCR products); C: PCR fragments and splice sequence of NEO-IRES-EGFP-SV40 PolyA (1: PCR product NEO; 2: PCR product IRES-EGFP; 3: PCR product SV40-PolyA; 4: PCR product NEO-IRES-EGFP-SV40 PolyA)

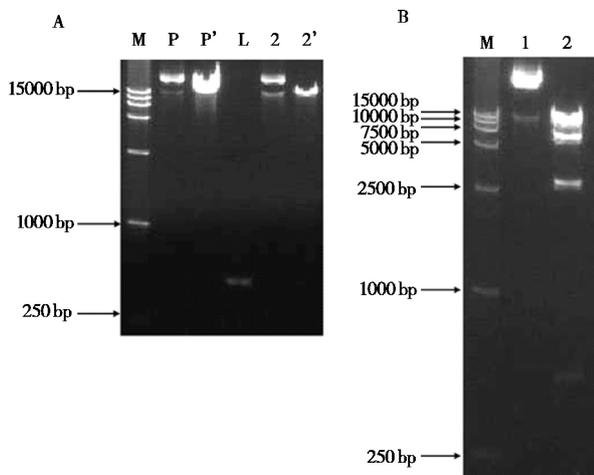


图3 重组质粒 pBC1-ob、pBC1-lep 的酶切鉴定. A: 重组质粒 pBC1-ob 的 *Xho* I 单酶切鉴定 (M: DNA 分子量标准; P: 原始质粒 pBC1 (21628 bp); P': pBC1 *Xho* I 单酶切产物; L: 目的基因 Leptin; 2: 重组质粒 pBC1-ob; 2': pBC1-ob 重组质粒 *Xho* I 单酶切产物); B: *Xho* I、*Not* I 双酶切鉴定重组质粒 pBC1-lep (1: 重组质粒 pBC1-lep; 2: 重组质粒 pBC1-lep *Xho* I、*Not* I 双酶切产物)

Fig. 3 Identification of the modified pBC1-ob and pBC1-lep vectors by restriction enzyme digestion. A: Identification of the modified pBC1-ob vector by *Xho* I restriction enzyme digestion (M: DNA marker; P: Original pBC1 vector (21628 bp); P': Products of pBC1 digested by *Xho* I; L: Target gene Leptin; 2: The modified pBC1-ob vector; 2': Products of the modified pBC1-ob vector digested by *Xho* I); B: Identification of the modified pBC1-lep vector by *Xho* I and *Not* I digestion (1: The modified pBC1-lep vector; 2: Products of pBC1-lep digested by *Xho* I and *Not* I)

2.2.2 NEO-IRES-EGFP-SV40 PA 序列的插入

将扩增出的 SV40-NEO-PolyA 片段克隆到 T 载体上, 菌液 PCR 筛选产物有单一清晰的 1 500 bp 左右条带, 符合预计片段大小(1 504 bp) (图 2B)。经测序, 均为正确插入 SV40-NEO-PolyA 序列的 T 载体。将插入正确质粒命名为 pGEM-T-NEO。

最后以 PCR 回收产物 NEO、IRES-EGFP 和 PolyA 片段为模板扩增 NEO-IRES-EGFP-PolyA 序列 (图 2C), 用 T4 DNA ligase 连接 NEO-IRES-EGFP-PolyA 片段和载体 pBC1-ob, 转化挑取阳性克隆, 并测序验证正确, 此质粒命名为 pBC1-lep (图 3B)。

2.3 奶山羊乳腺上皮细胞的体外培养

奶山羊乳腺上皮细胞纯化三代后得到纯度达 99% 以上的分泌型上皮细胞。大多数上皮细胞多呈短梭形或多角形, 细胞之间紧密相靠, 互相衔接, 连接成片, 呈蜂窝状。乳腺上皮细胞的细胞核呈圆形或椭圆形, 接触抑制的上皮细胞形态不均, 部分细胞呈长形; 部分细胞呈圆饼状, 体积较大。当上皮细胞增殖融合后可形成圆顶型结构, 呈乳头状, 称之为乳球体。乳腺上皮细胞内可产生大小不等的乳滴 (图 4)。

2.4 pBC1-lep 质粒脂质体法转染奶山羊乳腺上皮细胞

2.4.1 细胞对 G418 的耐受性测定

G418 在培养液中的筛选浓度存在着很大差异。

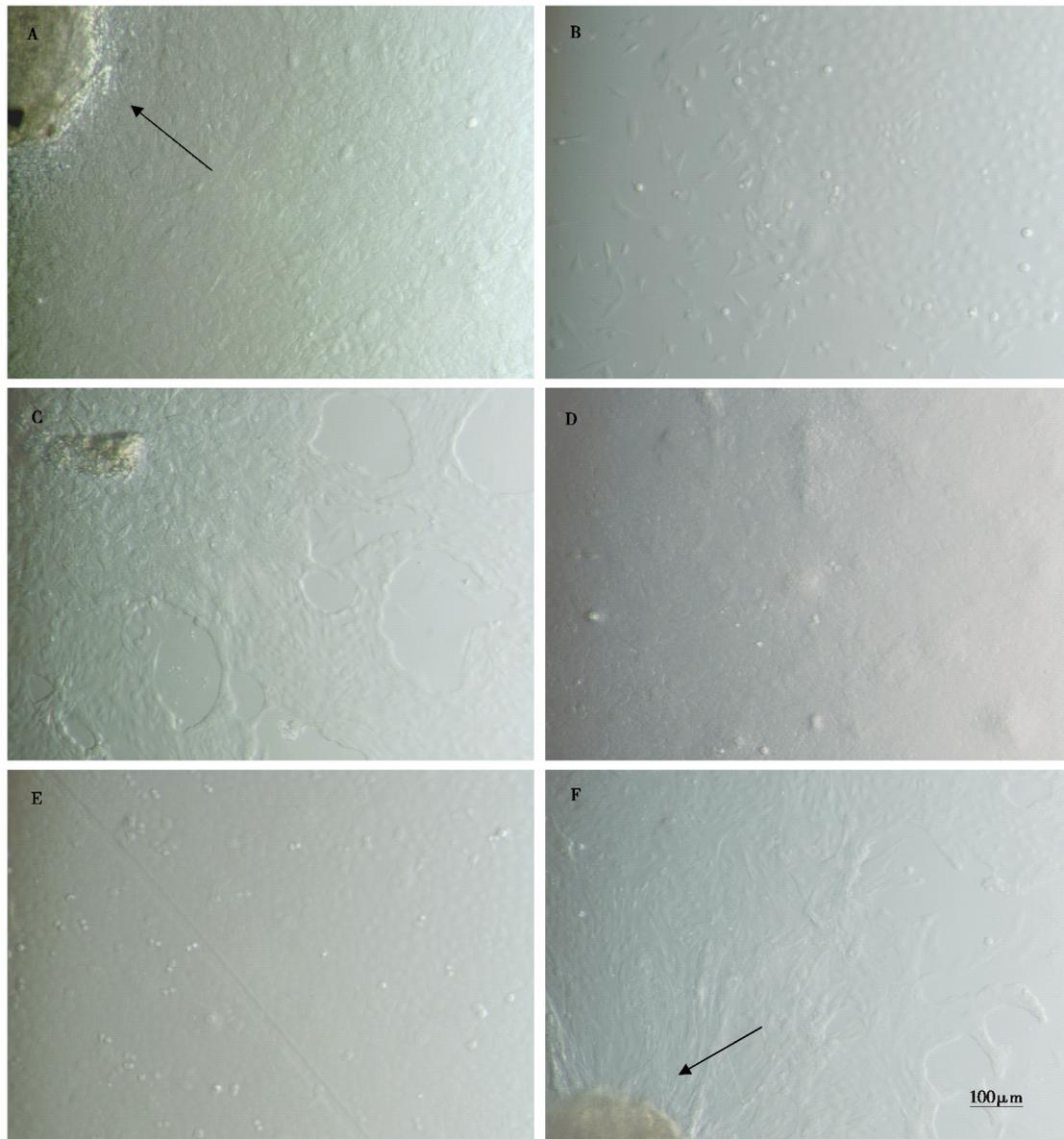


图4 原代培养的奶山羊乳腺上皮细胞 ($\times 200$)。A: 原代生长的乳腺上皮细胞; B: 成纤维细胞与上皮细胞混合生长; C: 形成空泡状的上皮细胞; D: 形成乳突状的上皮细胞; E: 蜂窝状的乳腺上皮细胞; F: 长形生长的乳腺上皮细胞。黑色箭头指示组织块。标尺为 $100\ \mu\text{m}$

Fig. 4 The cultivated dairy goat mammary epithelial cells by tissue mass cell culture ($\times 200$). A: Primary cultural dairy goat mammary epithelial cells; B: Symbiosis of fibroblast and epithelial cells; C: Epithelial cells form vacuolated structure; D: Epithelial cells form papillate structure; E: Epithelial cells form honeycomb structure; F: Epithelial cells form elongated shape. The black arrows show the tissue mass. The scale bar is $100\ \mu\text{m}$

因此在正式实验之前进行细胞耐受性的预实验是必须的。本实验结果: $700 \sim 800\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的第5天至第7天细胞全部死亡; $500 \sim 600\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的第8天至第10天细胞全部死亡; $400\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的两周后细胞全部死亡; $300\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的两周后仍有细胞存活。根据这一结果, 我们将初筛浓度定为 $600\ \mu\text{g}/\text{mL}$,

而将维持浓度定为 $400\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.4.2 pBC1-*lep* 质粒脂质体法转染奶山羊乳腺上皮细胞

2.4.2.1 G418 筛选结果

用构建好的 pBC1-*lep* 载体质粒对奶山羊乳腺上皮细胞进行脂质体转染, 经 G418 筛选后得到转

染细胞。筛选第 2 天即可见少量细胞死亡; 第 3、4 天大部分细胞开始死亡; 一周后已很少见细胞死亡, 细胞开始增殖; 两周后可在显微镜下观察到有明显细胞集落生长。用非转染细胞做的阴性对照 10 d 后细胞全部死亡, 说明转染细胞有 G418 抗性。

2.4.2.2 转染效率

由于用于转染的 pBC1-lep 载体上都带有增强型绿色荧光蛋白基因, 可用作转染细胞的筛选标记, 根据绿色荧光的表达情况直观地对转染效率做出初步判断 (图 5)。根据实验结果, 本实验所转染的 pBC1-lep 载体的细胞, 转染效率较低, 约不足 5%。

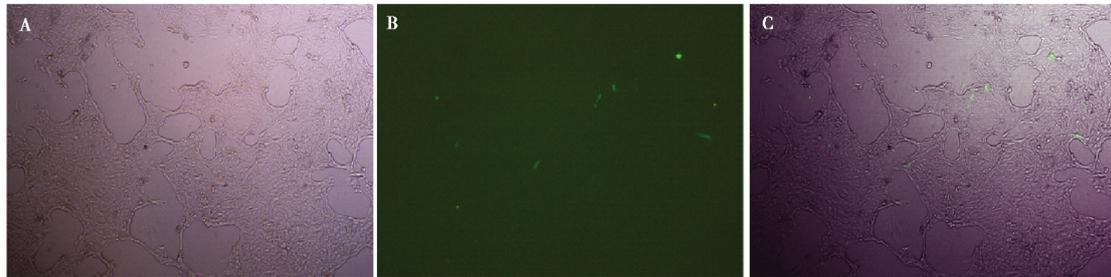


图 5 奶山羊乳腺上皮细胞转染 pBC1-lep 质粒. A 为明场, B 为荧光激发, C 为合成. 标尺为 100 μm

Fig. 5 GMECs transfected with pBC1-lep plasmid. A under bright field; B under UV light. A, B transfected by pBC1-lep. C is Merged.

The scale bar is 100 μm

2.5 荧光定量 PCR 验证转染细胞中 *ob* 基因表达

Leptin mRNA 相对表达的 qRT-PCR 检测结果显示, 与未经转染的奶山羊乳腺上皮细胞 (MEC) 组相比, 转染 *ob* 基因的乳腺上皮细胞 (MEC-ob) 中 *ob* 基因的表达水平明显增高 (图 6)。该结果表明高原鼠兔瘦素蛋白表达构件已经整合到了细胞染色体中。

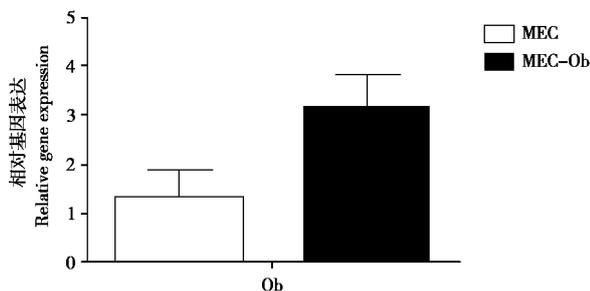


图 6 未经转染的奶山羊乳腺上皮细胞 (MEC)、转染 *ob* 基因的乳腺上皮细胞 (MEC-ob) 中高原鼠兔 *ob* 基因相对表达水平

Fig. 6 Relative expression levels of *ob* gene between the cultivated dairy goat mammary epithelial cells (MEC) and those transfected with pBC1-lep plasmid (MEC-ob)

3 讨论

青藏高原被誉为世界第三极, 是全球海拔最高的独特的地理单元。高寒、低氧、强紫外线辐射的独特高原气候环境对生活于其中的各种生物的分

布、种群结构、生存适应、进化模式等产生深刻的影响。在长期适应进化过程中, 土著动物形成了各自独特的适应机制来应对这种极端的高原环境, 以满足生存需要。高原鼠兔作为青藏高原的关键种, 对维持青藏高原生态系统平衡以及生物多样性起到重要作用, 已成为动物对青藏高原极端环境下生态适应机制研究的代表性物种。瘦素蛋白是由 *ob* 基因编码的主要由白色脂肪细胞分泌的激素, 与分布于中枢神经和外周组织中的 Leptin 受体结合, 发挥多种重要生物学功能。大量研究证实, 选择组织特异性启动子与外源目的基因构建真核表达载体并通过转基因的方法就有望使外源基因在机体特异组织中表达。此外, 随着体细胞克隆技术的不断完善, 体细胞克隆效率不断提高, 获得体细胞克隆动物的种类和数量不断增加。将利用组织特异性启动子和外源基因构建的真核表达载体转染体细胞后, 通过体细胞核移植方法, 就有可能获得组织特异表达外源基因的转基因动物。

乳腺是一个专门化的分泌腺体, 可以生产出完全活性的药用蛋白, 且产量高、活性稳定、不污染环境, 因此转基因动物乳腺生物反应器具备无可比拟的经济价值和应用前景 (朱小甫等, 2007)。许多重组蛋白都已在转基因动物乳汁中成功表达, 如人血清白蛋白、抗凝血酶 III 和人类长效组织纤溶

酶原激活物 (Denman *et al.*, 1991; Young *et al.*, 1997; Edmunds *et al.*, 1998)。pBC1 乳腺表达载体是美国 Invitrogen 公司生产的一种乳腺特异表达载体, 大小为 21 628 bp。pBC1 乳腺表达载体用山羊 β -酪蛋白启动子来启动重组蛋白的高效表达。山羊 β -酪蛋白启动子是一个组织特异表达的强启动子, 主要在乳腺上皮细胞内表达。乳蛋白的合成是在乳腺上皮细胞内完成, 这些细胞负责所有翻译后的修饰, 包括糖基化和磷酸化。糖基化和磷酸化对重组蛋白进行正确修饰是其具有生物活性的必要条件。除了强启动子外, 乳腺表达载体 pBC1 还包含外显子 (1、2、7、8 和 9) 的非编码区、内含子 (1、7 和 8)、 β -酪蛋白 3' 终止子区和双拷贝的 β -globin 隔离子, 其中内含子能增强基因的转录, β -酪蛋白 3' 终止子区则是外源基因正常转录的必要条件, 而双拷贝的 β -globin 隔离子可以减少顺式调控元件对外源基因表达的影响 (梁振鑫等, 2015)。可见, 构建一个合理和有效的乳腺表达载体需要考虑多种因素, 其中乳蛋白上游调控序列、目的基因及下游调控序列是 3 个最基本的要素。本研究将高原鼠兔 Leptin cDNA 克隆插入以山羊 β -酪蛋白基因作为调控序列的 pBC1 载体中, 构建了高原鼠兔 Leptin 基因的乳腺表达载体 pBC1-lep, 并且经改造后此载体带有增强型绿色荧光及 Neo 基因抗性筛选标记。pBC1 载体中没有提供信号肽序列, 为保证构建的载体使插入的目标基因 Leptin 能够将来顺利地分泌到可能应用到的转基因羊的乳汁中, 本研究中的 Leptin cDNA 序列前面自带了一段长约 63 bp 的信号肽序列。鉴于改造后的 pBC1 载体拥有以上优点, 有可能可作为其他外源基因在山羊乳腺中进行表达的参考载体。

由于验证表达载体在乳腺细胞中的整合表达情况, 是直接单独一种乳腺细胞经过药物筛选得到的抗性克隆集中在一起扩大培养, 这样做既缩短了扩大培养的周期又保证了转基因细胞的纯度。但是, 因实验中奶山羊乳腺上皮细胞转染 pBC1-lep 后表达效果受到体外培养的各种不确定因素的影响, 以及转染方法的选择、转染过程中参数的确定和操作细节等方面原因, 使得 pBC1-lep 载体的转染效率较低, 因而做了实时荧光定量 PCR 检测转染细胞中 *ob* 基因的表达水平。转染 *ob* 基因的乳腺上皮细胞中 *ob* 基因的相对表达水平较未经转染的

奶山羊乳腺上皮细胞明显增高, 表明高原鼠兔瘦素蛋白表达构件已经整合到了细胞染色体中。而根据 qRT-PCR 检测结果, 未经转染的奶山羊乳腺上皮细胞也有一定的 *ob* 基因的表达水平, 并且未找到适合使用的商品化的高原鼠兔瘦素蛋白抗体, 因而未做出转染细胞蛋白水平的检测。

本研究利用高原鼠兔的 Leptin 基因构建哺乳动物乳腺特异性表达载体, 并转染奶山羊乳腺上皮细胞进行转基因细胞株的筛选。但是采用脂质体转染法转染 pBC1-lep 载体, 转染效率较低, 可能是由于载体过大、转染方法的选择或其它因素造成, 如细胞密度、脂质体和 DNA 的浓度、脂质体-DNA 复合物的作用时间以及是否有其它介质成分如抗生素和血清等。由于转染效率低等原因而未作出转基因阳性细胞的蛋白水平的表达检测, 未来应对转基因细胞的激素诱导产物进行蛋白表达水平检测, 以确认结果的准确性。由于已有报道证实高原鼠兔 Leptin 基因的功能 (Yang *et al.*, 2006), 所以后期可以考虑用得到的蛋白高表达细胞株进行体细胞核移植, 生产转基因羊, 以期获得乳腺特异高表达高原鼠兔瘦素蛋白的个体。这种思路较目前较为成熟的细菌发酵获得蛋白的方法等产量要高很多, 也具有一定的学术意义。

本实验成功克隆了高原鼠兔 Leptin 基因编码区序列, 改造并构建了 pBC1-lep 乳腺特异表达载体, 正确插入了高原鼠兔 Leptin 基因; 通过原代培养成功建立了奶山羊乳腺上皮细胞系; 采用脂质体转染法将构建好的 pBC1-lep 载体转染到奶山羊乳腺上皮细胞中, 通过 G418 筛选得到了具有药物抗性的 Leptin 阳性细胞克隆并进行了实时荧光定量 PCR 鉴定, 但转染效率较低, 约不足 5%。后续相关研究有待于进一步探讨。

致谢: 感谢榆林学院陕西省绒山羊工程技术研究中心在实验条件方面给予的大力支持; 感谢中国科学院西北高原生物研究所张瑞娜博士在文章撰写方面给予的帮助。

参考文献:

- Chung J H, Bell A C, Felsenfeld G. 1997. Characterization of the chicken β -globin insulator. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 575 - 580.
- Chung J H, Whiteley M, Felsenfeld G. 1993. A 5' element of the chicken β -globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in drosophila. *Cell*, **74**:

- 505 – 514.
- Denman J, Hayes M, O' Day C, Edmunds T, Bartlett C, Hirani S, Ebert K M, Gordon K, McPherson J M. 1991. Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme. *BioTechnology*, **9**: 839 – 843.
- Du J Z, Li Q F. 1982. Effects of simulated hypoxic acclimation on organ-ism, organ and hematology in *Ochotona curzoniae* and rats. *Acta Theriologica Sinica*, **2** (1): 35 – 42. (in Chinese)
- Edmunds D, Patten S M V, Pollock J, Hanson E, Bernasconi R, Higgins E, Manavalan P, Ziomek C, Meade H, McPherson J M, Cole E S. 1998. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood*, **91**: 4561 – 4571.
- Li Q F, Sun R Y, Huang C X, Wang Z K, Li N. 2001. Cold adaptive thermogenesis in small mammals from different geographical zones of China. *Comp Biochem Phys A*, **129** (4): 949 – 961.
- Liang Z X, Yin F Q, Liu Q Y, Li L. 2015. Progress and technology in mammary gland bioreactor of transgenic animals. *China Biotechnology*, **35** (2): 92 – 98. (in Chinese)
- Persuy M A, Stinnakre M G, Printz C, Mahe M F, Mercier J C. 1992. High expression of the caprine β -casein gene in transgenic mice. *Eur J Biochem*, **205**: 887 – 893.
- Roberts B, DiTullio P, Vitale J, Hehir K, Gordon K. 1992. Cloning of the goat β -casein-encoding gene and expression in transgenic mice. *Gene*, **121**: 255 – 262.
- Schmittgen T D, Livak K J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, **3** (6): 1101 – 1108.
- Wang Q H, Liu J F, Ding Y P, Wang J L, Shao B P. 2017. Cloning of the CDS of yak Endothelin-1 gene and construction of its eukaryotic expression plasmid. *Acta Theriologica Sinica*, **37** (3): 293 – 299. (in Chinese)
- Yang J, Zhao X Q, Guo S C, Li H G, Qi D L, Wang D P, Cao J H. 2006. Leptin cDNA cloning and its mRNA expression in plateau pikas (*Ochotona curzoniae*) from different altitudes on Qinghai – Tibet Plateau. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **345** (4): 1405 – 1413.
- Yang J, Wang Z L, Zhao X Q, Wang D P, Qi D L, Xu B H, Ren Y H, Tian H F. 2008. Natural selection and adaptive evolution of leptin in the *Ochotona* family driven by the cold environmental stress. *PLoS ONE*, **3** (1): e1472.
- Yang J, Bromage T G, Zhao Q, Xu B H, Gao W L, Tian H F, Tang H J, Liu D W, Zhao X Q. 2011. Functional evolution of leptin of *Ochotona curzoniae* in adaptive thermogenesis driven by cold environmental stress. *PLoS ONE*, **6** (6): e19833.
- Young M W, Okita W B, Brown E M, Curling J M. 1997. Production of biopharmaceutical proteins in the milk of transgenic dairy animals. *BioPharm*, **10**: 34 – 38.
- Zhang Y Y, Barone M, Friedman J M, Leopold L, Maffei M, Proenca R. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **374** (6521): 425 – 432.
- Zhu X F, Qu J F, Wu X J, Fan S T, Ma Q M, Gao R. 2007. Progress in mammary gland bioreactor of transgenic animals. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, **26** (3): 50 – 52. (in Chinese)
- 朱小甫, 渠敬峰, 吴旭锦, 樊松涛, 马秋明, 高睿. 2007. 转基因动物乳腺生物反应器研究进展. *畜牧兽医杂志*, **26** (3): 50 – 52.
- 杜继增, 李庆芬. 1982. 模拟高原低氧对高原鼠兔和大鼠器官与血液若干指标的影响. *兽类学报*, **2** (1): 35 – 42.
- 汪迁昊, 刘健锋, 丁艳平, 王建林, 邵宝平. 2017. 牦牛 Endothelin-1 基因 CDS 序列克隆及其真核表达质粒构建. *兽类学报*, **37** (3): 293 – 299.
- 梁振鑫, 尹富强, 刘庆友, 李力. 2015. 转基因动物乳腺生物反应器相关技术及研究进展. *中国生物工程杂志*, **35** (2): 92 – 98.