

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

刘明军¹ 李文蓉¹ 武 坚¹ 黄俊成¹ 郭志勤^{1*} 曲新勇² Paul Kroon²

¹(新疆畜牧科学院, 乌鲁木齐 830000)

²(澳大利亚昆士兰大学生化系, 布里斯班 4072)

关键词 羊乳球蛋白, 基因克隆, 绿色荧光蛋白, 乳腺细胞系, 表达

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0112-05

乳球蛋白(BLG)是反刍家畜的一种主要乳清蛋白质。将外源基因置于 BLG 5' 调控区下游, 能够控制外源基因在动物乳腺的组织特异性表达。现已清楚在 BLG 5' 端有多个乳核因子 1(NF1)和转录因子 Stat5 的识别位点, 此外还存在多个激素作用位点^[1]。具有这些调控成分的 BLG 5' 翼端(5' flanking)能够控制外源基因在乳腺的表达, 但受整合位点、外源基因结构以及转基因拷贝数及其排列方式的影响^[2]。研究表明, 仅含有 5' 调控区的乳腺表达构件, 还不能使外源基因的表达达到内源性 BLG 的表达水平, 因为在 5' 远端(2.5kb 以下)和 3' 端(3' flanking)还存在与组织特异性表达和增强表达相关的调控成分^[3]。这些调控成分尚不完全清楚, 寻找和确定这些调控成分是目前乳腺表达研究的重点之一。同时, 用尽可能完整的 5' 和 3' 端调控序列构建外源基因乳腺表达结构, 使其符合内源性 BLG 基因的表达调控模式, 是构建高效乳腺表达载体的一个重要构想。本研究分别克隆了 4.2kb 和 2.1kb BLG 5' 和 3' 端序列, 用于外源基因乳腺表达融合基因构建, 目的在于探索用 2.1kb 3' 调控区与 4.2kb 5' 调控区融合构建的表达结构在动物乳腺的表达效率。

绿色荧光蛋白是 1994 年从多管水母(*Aequorea victoria*)中发现的一种蛋白质, 由 238 个氨基酸组成, 该蛋白质在蓝光激发下可产生绿色荧光。与大部分生物发光分子不同的是, GFP 激发后发出的荧光持续时间较长, 且不需要任何其他辅助因子的作用, 因此被作为报告基因广泛用于分子生物学研究。研究表明: GFP 能在多种生物, 如细菌、粘菌、酵母、植物和哺乳动物中表达并产生荧光。这种不依赖种属表达的特性, 使其逐步用于转基因的研究。过去对 GFP 的检测主要依靠荧光显微镜观察, 因而只能进行定性分析。近两年来, 随着对 GFP 分子研究的不断深入, 可以通过测定在特定波长下的吸光度值(OD 值)来进行表达的定量分析^[4]。为了能够快速准确地对乳腺表达载体构建的合理性及其表达效率进行评价, 本文将 GFP 报告基因与所构建的 BLG 乳腺表

达结构融合后转化乳腺细胞, 通过荧光显微镜观察和荧光检测仪分析测定, 对 BLG-GFP 在乳腺细胞系的表达进行了系统的定性、定量研究, 结果表明 4.2kb 和 2.1kb BLG 5' 和 3' 调控区可以控制 GFP 在乳腺细胞得到有效表达, 为下一步该基因结构用于转基因动物乳腺表达的研究打下了基础。

1 材料与与方法

1.1 质粒、菌株和细胞

pGEM-T、pShuttle 质粒和 DH5 α 感受态细胞由澳大利亚昆士兰大学生化系提供。TD47 乳腺细胞系由澳大利亚昆士兰医学研究所提供。

1.2 酶和试剂

工具酶和试剂为 New Biolab 和 Promega 公司产品。ExtendTM Long Template PCR System 试剂盒从 Bohringer 公司订购。质粒纯化试剂盒购自德国 QIAGEN 公司, 序列分析试剂盒为 ABI 公司 BigDye 荧光测序盒。克隆及检测引物均由 Life Science 公司合成。

1.3 绵羊基因组 DNA 的提取

将 5mL 新鲜的绵羊 ACD 抗凝血冻融 2 次后, 加入等体积 PBS, 室温下 3500g 离心 15min, 细胞沉淀加入 1mL 抽提缓冲液, 按文献[5]方法提取 DNA。

1.4 BLG 5' 和 3' 调控区的 PCR 扩增和产物纯化

BLG 5' 和 3' 调控区均用 Bohringer 公司长片段 PCR 扩增试剂盒从绵羊基因组扩增获得。扩增引物根据已发表的羊 BLG 全序列设计^[6], 序列如下: 5' 端扩增引物: F1 (1-33) 5' ACGCGTCTCGACCTGCAGGTCAACGGATCTCTG 3', R1 (4324-4354) 5' GCTAGCCTGGGGTCTGCTTCTGAGCTCTG 3'。3' 端扩增引物: F2 (8707-8733) 5' GAGCTAGCCTTGGACTCCTCTGGG-GACAGACG 3', R2 (10773-10806) 5' CGCGTCCATCGTC-TAGAGACTGCTCTGCTCTGTGATAAG 3'。在 R1 和 F2 的 5' 端均引入 *Nhe*I 酶切位点。PCR 反应体系按照 Bohringer 公司大

收稿日期: 2001-06-25, 修回日期: 2001-10-29。

基金项目: 国家 863 高技术研究发展计划项目资助(No. Z21-03-03)。

* 通讯作者。Tel: 86-991-4810665; Fax: 86-991-4841417; E-mail: abt@mail.xj.cninfo.net

片段扩增试剂盒说明进行。循环条件为:93℃变性 2min 后进行以下 10 个循环扩增:93℃变性 10s,65℃退火 30s,68℃延伸 5min。10 个循环结束后,接着进行如下 20 个循环:93℃变性 10s,65℃退火 30s,68℃延伸 5min + 20 * Ns(N 为循环序数,即每次延伸时间在上次时间的基础上增加 20s)。最后,68℃延伸 7min。

扩增产物经低熔点胶回收纯化后用于下一步克隆和测序。

1.5 BLG 5' 和 3' 调控区克隆和部分序列分析

将凝胶中回收纯化的 BLG 5' 和 3' 端扩增片段按文献[7]方法与 pGEM-T 质粒连接后,转化 DH5 α 感受态细胞。转化方法如下:取 2 μ L 10 倍稀释的连接反应液,加入 40 μ L 从 -70℃ 冰箱取出并快速融化的 DH5 α 感受态细胞,混匀后立即放入冰浴的电极杯,在 1.8kV 电压下进行电脉冲转化,筛选含插入片段的重组质粒。

提取重组质粒 pBLG_{5'} 和 pBLG_{3'} DNA,用 T7 和 SP6 测序引物分别对两个重组质粒进行序列分析。

1.6 BLG 5'、3' 调控区的克隆

用 *SalI/NheI* 分别对 pShuttle 质粒和 pBLG_{5'} 进行双酶切。酶切产物用 1% 低熔点琼脂糖回收纯化 6.7kb 的 pShuttle 质粒片段和 4.2kb 的 BLG 5' 调控区。用 T4 连接酶将 4.2kb 5' BLG 与 pShuttle 质粒连接。在卡那霉素抗性平板上筛选阳性克隆,并通过 *SalI/NheI* 酶切进行鉴定。筛选出的阳性克隆 pSh-BLG_{5'} 经培养后,提取、纯化质粒 DNA,与 pBLG_{3'} 质粒一同用 *NheI/XbaI* 进行双酶切。回收纯化酶切片段,用 T4 连接酶将 BLG_{5'} 与 BLG_{3'} 进行连接并转化 DH5 α ,挑选卡那霉素抗性菌落,提取质粒 DNA 用 *SalI/XbaI* 酶切进行鉴定。

1.7 GFP 乳腺表达重组载体的构建

用下列引物对 pGFP810 质粒进行 PCR 扩增,在 2 条引物的 5' 端各添加一个 *NheI* 酶切位点。引物序列如下:GFP1 5' GCTAGCATGCTGAGCAAGGCGGAGGA G3'。GFP2 5' GCTAGCT-TATCTAGATCCGCTGGATCC 3'。PCR 按宝灵曼公司高保真 PCR 扩增试剂盒方法进行。回收纯化 768bp 扩增片段。

扩增的 GFP 基因重组克隆到 pGEM-T 载体后,用 *NheI* 将 GFP 从载体上切下并经低熔点胶回收纯化。pBLG_{5'}-BLG_{3'} 重组质粒用 *NheI* 酶切后,经小牛胰液碱性磷酸酶(CIP)进行脱磷处理,与 *NheI* 酶切的 GFP 连接。用下列引物鉴定并筛选正确连接方向的重组质粒。L1 (BLG) 5' TCCTCGTAGAG-GAAGCCACCCC 3', L2 (GFP) 5' CTGCTCGAGCTGGAC-GCGGACG 3'。

1.8 TD47 乳腺细胞系的培养传代

从液氮中取出保存的 TD47 乳腺传代细胞系,37℃ 快速融化后加入 10mL RPMI 1640 培养液(含 RPMI 1640 10mL, Herpes 20mmol/L, Na₂CO₃ 14mmol/L, L 谷氨酰胺 6mmol/L, 庆大霉素 20 μ g/mL, FCS 10%, 胰岛素 10 μ g/mL)。待细胞长满瓶壁后,用 EDTA-胰酶消化传代。

1.9 pBLG-GFP 转化 TD47 乳腺细胞系

选择生长旺盛的 TD47 乳腺细胞。待细胞长满 80% 瓶

壁时,转入 35mm 培养板(瓶底预先放入一块 15mm × 15mm 大小的灭菌载玻片,以利于转化后的显微镜观察),培养液中含有 10 μ g/mL 胰岛素和 25 μ g/mL 促乳素。分别用切除质粒的 BLG-GFP 基因和 pBLG-GFP 质粒按文献[8]方法进行细胞转化。

1.10 转化细胞的荧光显微镜观察和荧光检测仪检测

从培养 48h 的转化细胞培养皿中取出载玻片,用 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 冲洗 2 次后,在荧光显微镜下通过 FITC 滤光镜观察细胞内的荧光。同时从 pBLG-GFP 酶切片段和 pBLG-GFP 质粒转化的细胞培养皿中,各取 200 μ L 转化细胞培养液,加入 96 孔酶标板。并将荧光显微镜观察后的细胞用胰酶/EDTA 消化,离心收集细胞沉淀。沉淀用 200 μ L PBS 悬浮后,进行超声波破碎,离心去除细胞碎片,取 200 μ L 上清液加入 96 孔酶标板,与细胞培养液一同在 395nm 激发波长进行荧光检测仪(Fluorometer)检测分析。

2 结果与分析

2.1 BLG 5'、3' 调控区的 PCR 扩增

经 PCR 扩增,获得了 4.2kb BLG 5' 调控区和 2.1kb 3' 调控区,结果见图 1。

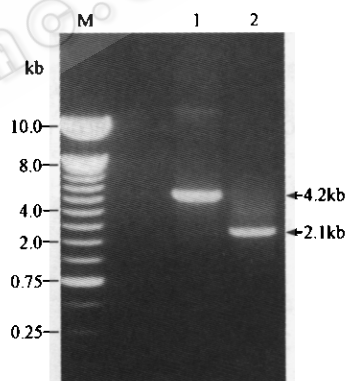


图 1 BLG 5'、3' 调控区的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification of 5' and 3' flanking of BLG

M. 1 kb marker; 1. 4.2kb 5' BLG; 2. 2.1kb 3' BLG

2.2 BLG 5' 和 3' 调控区的克隆和部分序列分析

通过白斑筛选,从 Amp^r 平板上挑选出含插入片段的阳性克隆,经酶切鉴定,获得了 pBLG_{5'} 和 pBLG_{3'} 重组质粒。用 SP6 和 T7 引物分别对 pBLG_{5'} 和 pBLG_{3'} 质粒进行序列分析,共测得 pBLG_{5'} 上游 621bp(1 ~ 621)和下游 629bp(3607 ~ 4236)序列,以及 pBLG_{3'} 上游 634bp(8707 ~ 9340)和下游 578bp(10222 ~ 10806)序列。与发表序列进行比较,所测序列与报道的一致。

2.3 BLG 5'、3' 调控区的融合

BLG 5'、3' 调控区按图 2 所示连接到 pShuttle 穿梭质粒上,构建了 pBLG_{5'}-BLG_{3'} 乳腺表达融合基因。

2.4 GFP 乳腺表达重组质粒的构建

用 GFP1 和 GFP2 引物扩增了 768bp 绿色荧光蛋白基因(图 3)并克隆到 pGEM-T 载体上,酶切后将末端为 *NheI* 的 GFP 基因与 *NheI* 酶切并经 CIP 脱磷的 pBLG_{5'}-BLG_{3'} 乳腺表

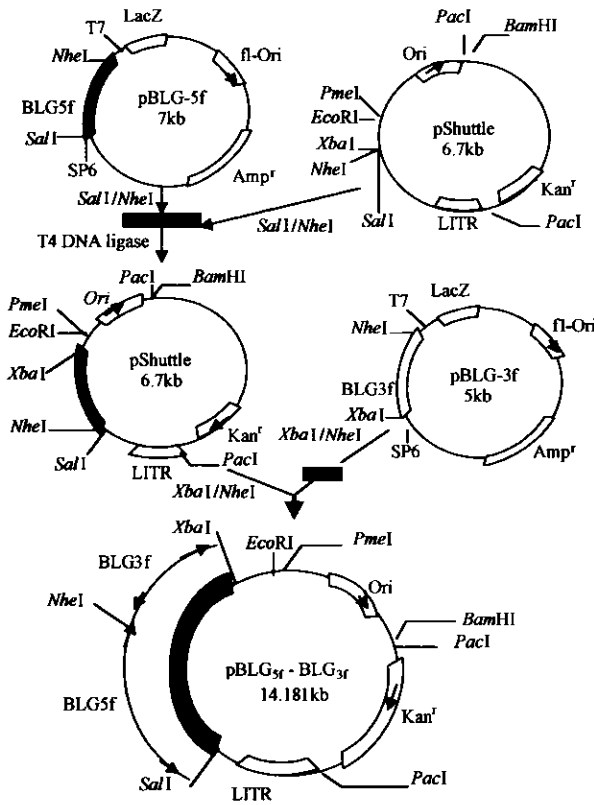


图2 pBLG_{5f}-pBLG_{3f}重组质粒构建
Fig.2 Construction of pBLG_{5f}-BLG_{3f} plasmid

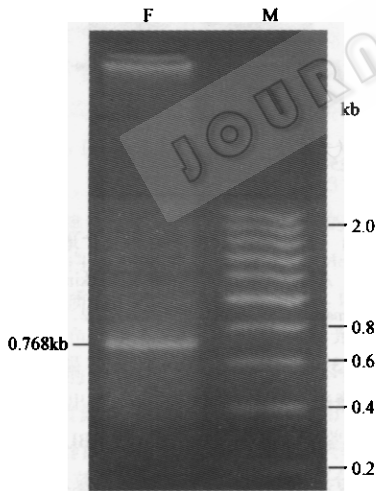


图3 GFP基因的PCR扩增结果
Fig.3 Amplification of GFP by PCR
M. 200bp marker; F. GFP gene

达载体连接,构建了 pBLG-GFP 乳腺表达融合基因。用 PCR 筛选出正确连接的阳性克隆(图 4、图 5)。

2.5 BLG-GFP 基因转化 TD47 乳腺细胞的荧光显微镜观察

转化 48h 后,在荧光显微镜下观察发现,切除质粒成分的线性化 BLG-GFP 基因转化细胞产生的荧光强度较 pBLG-GFP 质粒转化细胞产生的荧光强(图 6、图 7)。

2.6 GFP 在乳腺细胞系表达的荧光检测计检测

用荧光检测仪分别对培养液和细胞裂解产物进行

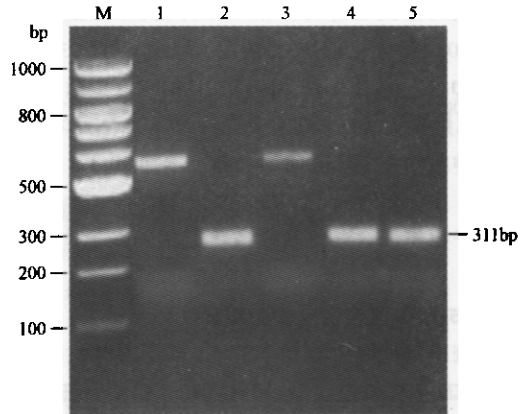


图4 pBLG-GFP 重组子连接方向的确定
Fig.4 Identification of the orientation of pBLG-GFP gene 2,4,5. The orientation of right conjunction;1,3. The orientation of reverse conjunction;M. 100bp marker

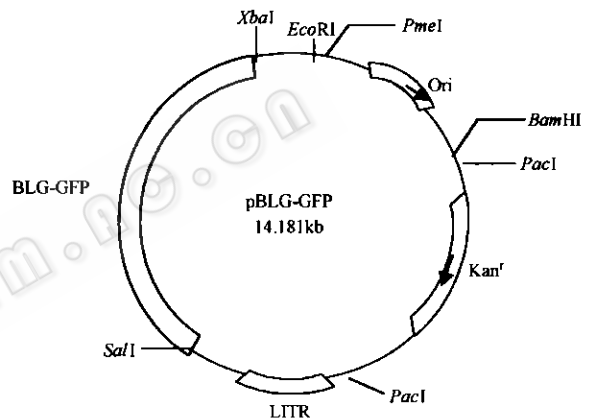


图5 pBLG-GFP 重组质粒结构
Fig.5 Structure of the recombinant plasmid of pBLG-GFP

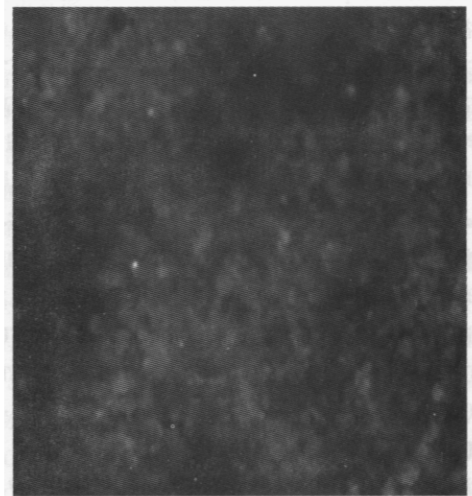


图6 BLG-GFP 质粒转化细胞的荧光显微镜观察 (x 100)
Fig.6 Expression of GFP in TD47 cell line transfected by BLG-GFP plasmid (x 100)

395nm 紫外吸收检测,结果显示在细胞培养液和细胞裂解产物中均有较强的 GFP 吸收值(图 8)。用切除质粒成分的线性化 BLG-GFP 基因和 pBLG-GFP 全质粒 DNA 转化细胞的表

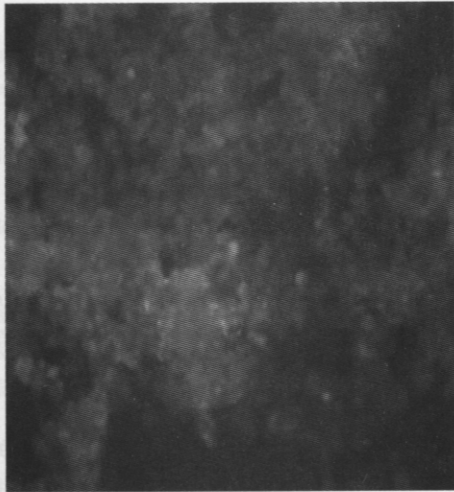


图7 线性化 BLG-GFP 基因转化细胞的荧光显微镜观察($\times 100$)

Fig.7 Expression of GFP in TD47 cell line transfected by BLG-GFP/SalI + XbaI ($\times 100$)

达效率无显著差异。细胞裂解产物的 GFP 表达量高于培养液中的 GFP。

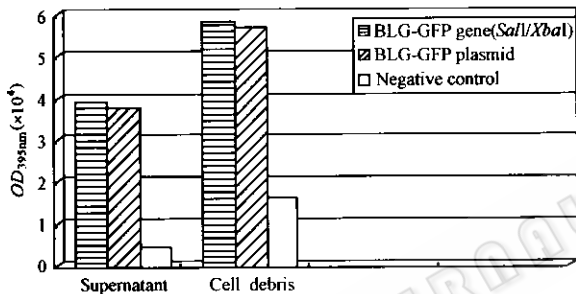


图8 两种不同 BLG-GFP 基因结构转化 TD47 乳腺细胞的荧光检测仪检测结果比较

Fig.8 Comparison of the fluorescent absorbance data between supernatant of TD47 cell culture and debris of cell pellet (The data were obtained by Fluostar fluorometer)

3 结论与讨论

根据目前对 BLG 基因结构与表达调控的研究,在所构建的 pBLG_{5'}-BLG_{3'} 乳腺表达结构中,4.2kb 的 BLG 5'调控区和 2.1kb 的 BLG 3'调控区包括了目前所发现的除内含子以外的所有 BLG 调控元件^[9]。异源基因的 5'端与 BLG 转录起始位点下游 4241 位连接,在该位点上游 4177 位点为“TATA”盒,它是转录起始所必需的^[10,11]。从理论上讲,这种融合构件与内源 BLG 基因结构类似,能够使外源基因按内源 BLG 转录方式进行转录^[12]。在该融合构件的 3'端,异源基因组或 cDNA 的 polyA 位点或 3'非翻译区与 BLG 的 3'非翻译区连接。PolyA 序列对转录后 mRNA 的稳定起重要作用,根据目前的研究,保留结构基因自身的 polyA 序列(基因组结构),会更有利于 mRNA 的稳定。因而这种融合构件与内源 BLG 基因结构相比,仅仅以异源基因组或 cDNA 代替 BLG 的结构基因部分(Transcription unit)。如果整合位点合适,该结构能够指导外源基因在乳腺进行有效表达。

细胞转染后的瞬时表达常用来评价和预测体外构建的基因表达结构在转基因动物个体水平的表达状态。对于乳腺表达,除了乳腺细胞系转染方法外,还可通过乳腺组织块转染和乳导管直接注射方法进行乳腺快速表达检测。目前绝大多数在体外和体内进行的乳腺快速表达检测,都是将所构建的乳腺表达结构转染乳腺细胞,通过免疫学方法进行检测分析,在检测时间和检测的特异性与敏感性上存在诸多不便。用荧光蛋白作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和荧光检测仪检测进行定性和定量分析,是一个快速、简便、直观的表达分析手段。

从报告基因 GFP 在乳腺细胞表达的显微镜观察和荧光检测仪检测结果,可以得出以下结论:(1)以 4.2kb 5'调控区和 2.1kb 3'调控区构建的 BLG 乳腺表达载体,能够控制 GFP 在乳腺细胞系的有效表达。说明所构建的乳腺表达结构包括了表达调控所必需的调控元件。(2)用 GFP 作为报告基因构建的乳腺表达结构可以用于乳腺表达的快速检测,确定乳腺表达载体构建的合理性。(3)对 BLG-GFP 转化的乳腺细胞进行荧光显微镜直接观察和荧光检测仪测定紫外吸收值,不仅可以为 GFP 作为报告基因进行乳腺表达快速检测提供一个直观、定性的检测手段,而且为表达效率的评价建立一个定量检测技术。弥补了过去 GFP 只能定性,不能定量的缺陷。(4)BLG-GFP 转化的乳腺细胞,在细胞水平的瞬时表达结果显示,全质粒的 BLG-GFP 与切除质粒成分的线性化 BLG-GFP 基因在表达效率上无显著差异。这与在转基因小鼠和转基因家畜上得出的结论不同。后者报道在转基因动物体内,带有质粒成分的环状结构基因的表达只有切除质粒成分的线性化基因的千分之一^[13]。

目前,尚未见用乳蛋白基因调控荧光蛋白在乳腺细胞或转基因动物体内表达的研究报道。本文所构建的 BLG-GFP 融合基因在乳腺细胞系的表达为乳腺表达的研究建立了一个新的、快速有效的表达检测分析系统,这对今后乳腺表达的研究有十分重要的应用价值。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Bruce C, Whitelaw A. Hormonal influences on β -lactoglobulin transgene expression inferred from chromatin structure. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 224: 121 ~ 125
- [2] Jeffery M R, Shi L, Brian R 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
- [3] Itamar B, Alexander F, Moshe R et al. *In vivo* and *in vitro* expression of human serum albumin genomic sequences in mammary epithelial cells with β -lactoglobulin and whey acidic protein promoters. *Mol Reprod Dev*, 1999, 52: 241 ~ 252
- [4] Sebramanian S, Srienc F. Quantitative analysis of transient gene expression in mammalian cell using GFP. *J Biotechnol*, 1996, 49: 137 ~ 151
- [5] Prusiner S B. Prion Biology and Disease. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999

- [6] Gaye P D, Hue-Delahaie J C, Mercier S *et al.* Ovine β -lactoglobulin messenger RNA: nucleotide sequence and mRNA levels during functional differentiation of the mammary gland. *Biochimie (Paris)*, 1986, **68**:1097
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989
- [8] Chesnut J D, Baytan A R, Russel M *et al.* Selective isolation of transiently transfected cells from a mammalian cell population with Vectors expressing a membrane anchored single-chain antibody. *J Immunol Methods*, 1996, **193**:17 ~ 27
- [9] Ramona N P, Josep M F, Armand S *et al.* Chromatin structure of goat and sheep β -lactoglobulin Gene differ. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **252**, 649 ~ 653
- [10] Harris S, McClenaghan J P, Simons S *et al.* Developmental regulation of the sheep β -lactoglobulin gene in the mammary gland of transgenic mice. *Dev Genet*, 1991, **12**:299
- [11] Lothar Hennighausen. The prospects for domesticating milk protein gene. *J cell Biochem*, 1992, **49**:325 ~ 332
- [12] Jean-claude M, Jean-Luc V. Structure and function of milk protein genes. *J Dairy Sci*, 1993, **76**:3079 ~ 3098
- [13] Villote J, Li S, Soudier M G *et al.* Efficient tissue-specific expression of bovine α -lactalbumin in transgenic mice. *Eur J Biochem*, 1989, **186**:43

Cloning of 5', 3' Flanking Sequence of Ovine BLG and Regulating the Expression of GFP in Mammary Gland Cell Line

LIU Ming-Jun¹ LI Wen-Rong¹ WU Jian¹ HUANG Jun-Cheng¹ GUO Zhi-Qin¹

QU Xin-Yong² Paul Kroon²

¹ (Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, China)

² (Department of Biochemistry, University of Queensland Brisbane, 4072 Australia)

Abstract 5' and 3' flanking region of ovine BLG were amplified from sheep genomic DNA according to the published whole sequence of ovine BLG and cloned to pGEM-T vector correspondently. By partially sequencing, the sequences of BLG 5' and 3' flanking were the same as that of publication completely. The recombinant structure used to direct exogenous gene especially to express in mammary gland was constructed by joining 4.2kb 5' flanking with 2.1kb 3' flanking. In order to assess the efficiency of BLG regulatory elements, green fluorescent protein (GFP) gene as a reporter was fused with BLG construct and transfected the mammary epithelial cells (TD47). Through observation under UV microscope and detection by fluorometer, it is demonstrated that the GFP has been successfully expressed in TD47 cell line. By virtue of direct observation and quantitative analysis, the BLG-GFP construct can be served as a model for the quick assessment of mammary gland expression construct.

Key words ovine beta-lactoglobulin, gene cloning, green fluorescent protein, mammary gland cell line, expression

Received: 06-25-2001

This work was supported by a grant from the State 863 High Technology R&D Project of China (No. Z21-03-03).

* Corresponding author. Tel: 86-991-4810665; Fax: 86-991-4841417; E-mail: abt@mail.xj.cnuinfo.net

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>