

转基因鸡生物反应器载体的构建及其表达特性分析

杨鹏翔, 王曦晨, 王宇祥, 王启贵, 李辉

东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030

摘要: 以增强型绿色荧光蛋白和萤火虫荧光素酶为报告基因, 构建了鸡卵清蛋白启动子表达载体和慢病毒载体, 以巨细胞病毒 (Cytomegalovirus, CMV) 启动子表达载体为对照, 转染或感染鸡原代输卵管上皮细胞、鸡胚成纤维细胞、鼠 3T3-L1 前脂肪细胞和牛乳腺上皮细胞, 通过荧光和酶活性检测, 旨在筛选出用于实现转基因鸡生物反应器的高效特异性表达载体。结果发现, 鸡卵清蛋白启动子表达载体转染以上 4 种细胞后 2 种标记基因均有表达, 没有表现出明显的细胞特异性, 且荧光素酶检测结果表明其在各细胞组中表达活性都低于 CMV 启动子表达载体 100 倍以上; 慢病毒载体感染以上 4 种细胞后 2 种标记基因均有表达, 在鸡输卵管上皮细胞组感染单个细胞的病毒颗粒 (Multiplicity of infection, MOI) 为 20 时绿色荧光蛋白表达量就可以达到 CMV 启动子表达载体的水平。上述结果表明, 基于卵清蛋白基因调控序列构建的表达载体无法实现外源基因的高效、特异性表达, 而慢病毒载体在表达活性和广泛性上可以用于进行鸡输卵管生物反应器的研究。

关键词: 转基因鸡生物反应器, 输卵管上皮细胞, 鸡卵清蛋白启动子表达载体, 慢病毒载体

Construction and expression characterization of transgenic chicken bioreactor vector

Pengxiang Yang, Xichen Wang, Yuxiang Wang, Qigui Wang, and Hui Li

College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: We constructed transgenic chicken bioreactor vector, driven by chicken ovalbumin promoter, lentiviral vector and cytomegalovirus (CMV) promoter control vector encoding green fluorescent protein (GFP) and luciferase (Luc) as reporter genes. The three vectors were used to transfect or infect chicken primary oviduct epithelial cells, embryo fibroblasts cells, mouse 3T3-L1 preadipocytes cells and bovine mammary epithelial cells. High efficient and specific expression vector for transgenic chicken bioreactor was determined by detecting fluorescence and luciferase activity. Reporter gene analysis showed that chicken ovalbumin promoter expression vector was not cell type-specific in these four different cells. Additionally, luciferase reporter analysis illustrated that the chicken ovalbumin promoter activity was over 100 times lower than that of the

Received: December 2, 2010; **Accepted:** April 11, 2011

Supported by: China Agriculture Research System (No. CARS-42), Program for Innovation Research Team in University of Heilongjiang Province, Program for Innovation Research Team of Northeast Agricultural University (No. CXT006).

Corresponding author: Hui Li. Tel: +86-451-55191516; E-mail: lihui@neau.edu.cn; lihui645@hotmail.com

现代农业产业技术体系专项资金 (No. CARS-42), 黑龙江省高等学校科技创新团队建设项目, 东北农业大学创新团队建设项目 (No. CXT006) 资助。

CMV promoter in four different cells. Both of these two reporter genes were expressed in those four different cells infected by lentiviral expression vectors. Similarly, the GFP reached the similar expression level in cells infected by lentivirus and cells transfected with CMV promoter plasmid vectors when the multiplicity of infection was 20. In conclusion, the transgenic chicken bioreactor vector under the control of chicken ovalbumin promoter was not highly efficient and cell type-specific. However, the efficient expression and extensiveness of lentiviral vector could be used for studying chicken oviduct bioreactor.

Keywords: transgenic chicken bioreactor, oviduct epithelial cell, ovalbumin promoter expression vector, lentiviral vector

随着人们对营养类蛋白、医用类蛋白需求量的日益增长,转基因动物的研究越来越多地集中在建立更为经济高效的生产技术平台上^[1]。最初,哺乳动物的乳腺被认为是一个很有希望的生物反应器,应用羊乳汁生产的治疗人类血凝疾病的转基因药物于2006年成功上市,为转基因动物在生物制药领域的应用开辟了道路^[2]。但家畜因世隔长、扩群慢、饲料成本高,从乳中纯化外源蛋白工艺复杂等劣势,使其成为一种低效过程。相比之下,禽类具有个体小、产蛋多、蛋白提取技术成熟,且所产生的蛋白具有与人类近似的糖基化结构等特点,使得转基因鸡输卵管生物反应器的研究成为最具有竞争力的前沿产业之一^[3]。

目前,构建用于携带外源基因的高效表达载体和良好的导入方法是禽类转基因研究的两大关键技术^[4]。因此,筛选出高效的外源基因表达载体是禽类转基因能否获得成功的首要条件。鸡输卵管的管状腺细胞具有表达和分泌卵白蛋白的强大功能和高度特异性,其中,卵清蛋白(Ovalbumin, OV)占白蛋白的55%~60%,表明该基因启动调控区的高度有效性,许多研究者因此选择该基因5'调控序列作为制备鸡输卵管生物反应器的首选调控元件^[5]。宇丽等的研究中,采用OV基因5'端1.2 kb调控序列,实现了组织特异性表达^[6]。然而,Zhu等分别用OV基因5'侧翼7.5 kb和15 kb片段构建的表达载体却未能成功实现组织特异性表达^[7]。最近,逆转录病毒其中一族的慢病毒载体因具有能够感染分裂期和静止细胞、主动整合到基因组、导入的外源基因不易沉默、能够稳定地进行种系间传递等优点被广泛

用来制备转基因鸡^[8]。McGrew等认为利用慢病毒载体制备转基因鸡,在表达效率上比目前所报道的任何其他载体高出百倍^[9],因此被认为是最有希望的禽类转基因工具。

本研究克隆了鸡卵清蛋白基因5'端1.25 kb调控序列,通过构建鸡卵清蛋白启动子表达载体、巨细胞病毒(Cytomegalovirus, CMV)启动子的对照质粒载体和慢病毒载体,采用绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)和荧光素酶(Luciferase, Luc)两种标记基因,在鸡原代输卵管上皮细胞、鸡胚成纤维细胞、鼠3T3-L1前脂肪细胞和牛乳腺上皮细胞中进行表达,利用荧光显微镜观察和酶活性统计分析载体的表达活性和细胞特异性,筛选出实现高效表达的载体,期望为转基因鸡生物反应器的制备奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

真核表达载体pcDNA3.1(+), pEGFP-C1为本实验室保存;克隆载体pMD18-T购自大连宝生物公司;荧光素酶报告基因载体pGL3-Basic、pRL-TK购自Promega公司;慢病毒颗粒购自上海英为信公司。大肠杆菌JM109、DH5 α 感受态菌种均为本实验室保存; BamH I、Xho I等各种限制性内切酶、Taq酶、T4 DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、DNA marker均购自宝生物工程(大连)有限公司。凝胶回收(小量)试剂盒、质粒(小量)抽提试剂盒购自AXYGEN生物技术有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自Promega公司。D-MEM/F-12培养

基、D-MEM 高糖培养基、I 型胶原酶、胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司; 明胶、青霉素、链霉素、Triton X-100 等购自 Sigma 公司; 优级胎牛血清购自天津灏洋生物制品有限公司; 广谱角蛋白抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; FuGENE®HD 转染试剂购自 Roche 公司。56 周龄产蛋母鸡来自于本校畜牧园区鸡饲养场; 鸡胚成纤维细胞系 DF-1 由哈尔滨兽医研究所步志高研究员馈赠; 鼠 3T3-L1 前脂肪细胞系购自中国科学院细胞库; 牛乳腺上皮细胞系由东北农业大学生命中心李庆章教授馈赠。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据 *OV* 基因序列 (GenBank Accession No. J00895) 设计引物 OVNF、OVNR, 用于扩增 *OV* 调控区。上下游引物分别引入 *Nru* I 和 *Hind* III 酶切位点。片段长度为 1 238 bp; 根据克隆载体 pEGFP-C1 基因序列 (GenBank Accession No. CVU55763) 设计引物 GFPF、GFPR, 用于扩增绿色荧光蛋白基因。上下游引物分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。片段长度为 725 bp; 根据克隆载体 pGL3-Basic 基因序列 (GenBank Accession No. U47295) 设计引物 LucF、LucR, 用于扩增萤火虫荧光素酶基因。上下游引物分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。片段长度为 1 677 bp。

1.2.2 pcDNA3.1(+) 载体的改造

根据载体图谱分析, 用限制性酶 *Pvu* II 酶切

pcDNA3.1(+) 载体, 切除其中的 *neo* 基因, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分离, 用 DNA 回收试剂盒回收 3.2 kb 片段, 自体连接后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 从阳性的重组子中获得不含 *neo* 基因的改造载体 pc^[10]。用限制性酶 *Nru* I 和 *Hind* III 双酶切载体 pc, 切除其中的 CMV 启动子, 电泳回收, 获得大小为 2.5 kb 的载体框 p。

1.2.3 卵清蛋白启动子表达载体的构建

采用设计的引物 OVNF 和 OVNR, 以鸡的基因组 DNA 为模板, 采用高保真 *Taq* DNA 聚合酶扩增目的基因, 扩增产物经 *Nru* I 和 *Hind* III 双酶切回收后, 连接到改造的表达载体 p 中。转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂板培养后, 挑取光滑单菌落接种至含氨苄青霉素的液体培养基中, 振荡培养后提取重组质粒 DNA, 然后经 PCR 扩增及酶切鉴定筛选转化子, 将初步判定阳性的重组子菌种送至上海英骏生物技术有限公司测序, 将测序正确的阳性克隆命名为 pOV。

1.2.4 包含报告基因表达载体的构建

采用设计的引物 GFPF 和 GFPR、LucF 和 LucR, 分别从 PEGFP-C1、PGL3-Basic 中扩增出 *EGFP*、*Luc* 基因序列, 扩增产物经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切回收后分别连接到卵清蛋白启动子表达载体 pOV 和真核表达载体 pcDNA3.1(+) 中, 以和 1.2.3 中相同的方法, 将测序正确的阳性克隆分别命名为 pOV-EGFP、pOV-Luc、pcDNA3.1(+)-EGFP、pcDNA3.1(+)-Luc。

1.2.5 鸡原代输卵管上皮细胞的分离和培养

将 56 周龄的产蛋母鸡断颈放血, 腹部消毒, 无菌取出输卵管膨大部分。在膨大部切取 3~5 cm 的组织, 放入装有磷酸缓冲液 (Phosphate balance solution, PBS) 的平皿中, 反复冲洗, 尽量除去鸡输卵管上皮细胞分泌的卵清蛋白和其他粘液。用小镊子小心摘取输卵管内壁的褶皱组织上皮, 用眼科剪剪碎组织, 随即转入含有 I 型胶原酶消化液的试管中进行初步消化, 于 37 °C 消化 60 min (每 5 min

表 1 本实验所用引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
OVNF	<u>CGT</u> <u>CGC</u> <u>GAC</u> CGGATAACATTTACTGGGAAGC
OVNR	CCA <u>AAGCTT</u> GGACCTTTGACGCCATAGAA
GFPF	CGGG <u>ATCC</u> CGTCGCCACCATGGTGAG
GFPR	CC <u>CTCGAG</u> GGACTTGACAGCTCGTCC
LucF	CGGG <u>ATCC</u> ATGGAAGACGCCAAAAACATA
LucR	CCG <u>CTCGA</u> GCGGTAGAAATTACCGCGCATC

The underlines indicate the restriction sites of *Nru* I, *Hind* III, *Bam*H I, *Xho* I, *Bam*H I and *Xho* I, respectively.

振荡 1 次)。消化完毕, 将消化产物分装入离心管, 1 000 r/min 离心 10 min, 除去培养液。转入含有胰酶消化液的试管中继续消化, 于 37 °C 消化 10 min (每 2 min 振荡 1 次)。加入培养液终止消化, 吸管吹打, 经 3 层无菌纱布过滤。滤液以 1 000 r/min 离心 10 min, 除去培养液, 用含 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 的 D-MEM-F12 培养液重悬细胞, 制成细胞悬液, 即为纯化前的鸡输卵管上皮细胞。将此细胞悬液铺瓶后每 5 h 进行 1 次差速贴壁, 过程为将悬液吸出, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀用含 10% FBS 的 D-MEM-F12 培养液重悬, 重新铺到新瓶中。差速贴壁 3 次以后, 即为纯化的鸡输卵管上皮细胞^[11]。将细胞记数后, 按 5×10^5 /孔 (6 孔板) 左右的密度接种, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2 天换液 1 次^[12]。

1.2.6 鸡原代输卵管上皮细胞的鉴定

每日对细胞进行形态学观察, 掌握输卵管上皮细胞的生长特性和细胞形态的差异, 待细胞贴壁且呈现出上皮细胞形态特征时, 对输卵管上皮细胞进行生物学鉴定。取普通洁净的盖玻片, 接种细胞, 制作输卵管上皮细胞爬片。待细胞长成 80% 汇合单层时, 倒掉培养液, 用预冷的 PBS 冲洗细胞 2 次。用冰浴的甲醇于 4 °C 固定 10 min。用含 0.1% 的 Triton X-100 的 PBS 溶液 (PBSTx) 冲洗细胞 3 次, 每次 5 min, 然后用干净滤纸擦掉边缘水分。用含 5% 牛血清白蛋白的 PBSTx 封闭 60 min, 用摇床轻轻摇动。去封闭液, 用 PBSTx 稀释的异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记角蛋白抗体作用 60 min。去除抗体, 用 PBSTx 冲洗细胞 3 次, 每次 5 min, 然后用干净滤纸擦掉边缘水分, 用抗荧光淬灭剂封片, 于荧光显微镜下观察角蛋白的表达^[13-14]。

1.2.7 鸡胚成纤维细胞系、鼠 3T3-L1 前脂肪细胞系、牛乳腺上皮细胞系的复苏和培养

将液氮保存的细胞放入 37 °C 的水中, 摇动冻存管, 直至融化。用 70% 酒精清洁冻存管外壁, 加入

到装有 37 °C 预温的完全培养液的离心管中, 针对各类型细胞, 在离心管中加入不同浓度 FBS 的完全培养液进行培养: 鸡胚成纤维细胞采用含 5% FBS 的 D-MEM-F12 培养液; 鼠 3T3-L1 前脂肪细胞采用含 10% FBS 的 D-MEM 高糖培养液; 牛乳腺上皮细胞采用含 20% FBS 的 D-MEM-F12 培养液。温和混匀, 反复数次, 1 000 r/min 离心 5 min 后, 弃去上清。收集细胞后, 用各细胞的完全培养液重悬, 进行细胞记数, 按 5×10^5 /孔 (6 孔板) 左右的密度接种, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2 天换液 1 次。待细胞铺满时, 即可传代。

1.2.8 质粒载体的细胞转染

将待转染的细胞接种至 6 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 70%~80% 汇合时, 按 FuGENE[®]HD Transfection Reagent (罗氏) 说明书操作。将 FuGENE[®]HD Transfection Reagent、DNA 和培养液调整到 15 °C~25 °C, 振荡混匀。将含有 GFP 报告基因的重组质粒用无血清无双抗的 DMEM 稀释质粒至 0.02 g/L; 将含有 Luc 报告基因的重组质粒分别与 phRL-TK 质粒按质量比 1:20 进行混合后, 用无血清无双抗的 DMEM 稀释质粒至 0.02 g/L。吸取 5 μL 的 HD 加入到 100 μL 含质粒的培养液中, 将混合物用枪吹打 15 次, 室温孵育 15 min。从培养箱中取出细胞, 将转染混合物加到液面以下, 摇晃培养板混匀, 48 h 后观察结果。

1.2.9 病毒颗粒的细胞转染

将待转染的细胞接种至 6 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 50%~70% 汇合时, 按照上海英为信公司慢病毒使用说明书操作。根据 MOI 值将计算好的慢病毒稀释到培养液中, 与体积比 1:20 的 phRL-TK 质粒进行混合, 加入聚凝胺至终浓度为 6~8 mg/L, 将混合物用枪吹打 15 次。弃掉细胞原培养液, 将含有慢病毒的混合物加到培养板中, 摇晃混匀, 转染后 12 h 更换成正常培养液培养细胞, 96 h 后观察结果。

1.2.10 报告基因的检测

转染 48 或 96 h 后, 将转染 *EGFP* 报告基因的细胞于荧光显微镜下观察结果; 将转染 *Luc* 报告基因的细胞按照 Promega 公司的双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书进行。用细胞裂解液充分裂解细胞。每个样品测定时, 取样品 20 μ L, 加入 100 μ L Luciferase 检测试剂, 用移液器吹打 15 次后测定 Luciferase 值。完成后, 加入 100 μ L Renilla 检测试剂, 用移液器吹打 15 次后测定 Renilla 值。

2 结果

2.1 载体构建

经 PCR 扩增后, 产物经琼脂糖凝胶电泳检测可见一条约 1.25 kb 大小的单一条带, 与预计扩增的 *OV* 调控区大小相符 (图 1)。将该产物回收后接入 pMD18-T Simple 中进行测序, 测序结果表明, 克隆的片段与 NCBI 报道的相比只有两个碱基的差别。分别是上游 422 位的碱基由 G 变成 C, 上游 667 位的碱基由 T 变成了 C, 都没有发生在已报道的调控区的关键调控元件部位。

将扩增的 *OV* 调控区片段克隆入改造的 pcDNA3.1(+) 载体, 获得鸡卵清蛋白启动子表达载体 pOV。再将重组载体 pOV 和 pcDNA3.1(+) 分别

连入 *EGFP*、*Luc* 报告基因片段, 获得带有标记基因的鸡卵清蛋白启动子表达载体 pOV-EGFP、pOV-Luc 和 CMV 启动子表达载体 pcDNA3.1(+)-EGFP 和 pcDNA3.1(+)-Luc。为了验证所构建载体的正确性, 用限制性内切酶 *Nru* I / *Hind* III 和 *Bam*H I / *Xho* I 分别双酶切载体, 经琼脂糖凝胶检测, 结果切出的 *OV* 调控区的大小约为 1.25 kb, 酶切的 *EGFP*、*Luc* 报告基因片段大小分别约为 725 bp、1 677 bp, 片段长度与预计大小相一致, 表明连接正确 (图 2~5)。

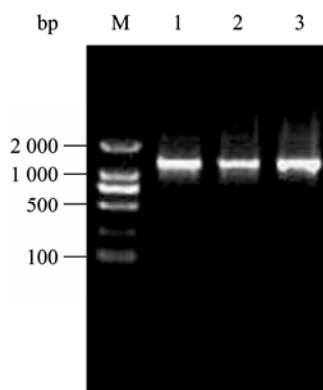


图 1 鸡卵清蛋白调控区的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR products of chicken *OV* regulatory region. M: DL2000 marker; 1-3: PCR products.

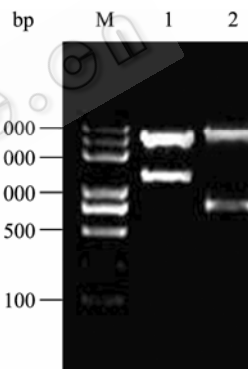


图 2 pOV-EGFP 载体的酶切鉴定
Fig. 2 Identification of pOV-EGFP by enzyme digestion. M: DL5000 marker; 1: pOV-EGFP vector digested with *Nru* I and *Hind* III; 2: pOV-EGFP vector digested with *Bam*H I and *Xho* I.

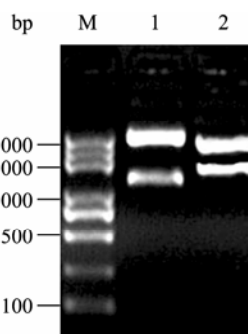


图 3 pOV-Luc 载体的酶切鉴定
Fig. 3 Identification of pOV-Luc by enzyme digestion. M: DL5000 marker; 1: pOV-Luc vector digested with *Nru* I and *Hind* III; 2: pOV-Luc vector digested with *Bam*H I and *Xho* I.

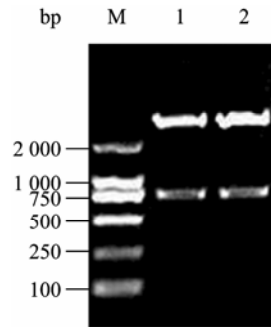


图4 pcDNA3.1(+)-EGFP 的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of pcDNA3.1(+)-EGFP by enzyme digestion. M: DL2000 marker; 1-2: pcDNA3.1(+)-EGFP vector digested with *BamH I* and *Xho I*.

2.2 卵清蛋白启动子表达载体和对照载体启动子活性比较

将 CMV 启动子表达载体 pcDNA3.1(+)-EGFP、鸡卵清蛋白启动子表达载体 pOV-EGFP 分别转染鸡胚成纤维细胞、鸡原代输卵管上皮细胞、鼠 3T3-L1 前脂肪细胞和牛乳腺上皮细胞，转染后 48 h 检测绿

色荧光蛋白的表达效果。进行 3 次以上重复，都选取实验所得结果中 EGFP 表达量较高、荧光分布均匀的图片。结果发现，转染后 pcDNA3.1(+)-EGFP 和 pOV-EGFP 在 4 种细胞中均有荧光表达 (图 6)。

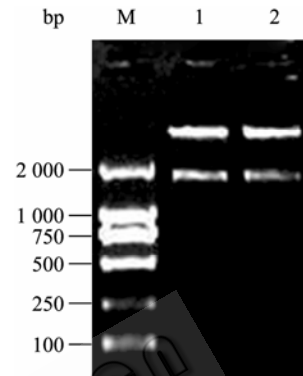


图5 pcDNA3.1(+)-Luc 的酶切鉴定结果

Fig. 5 Identification of pcDNA3.1(+)-Luc by enzyme digestion. M: DL2000 marker; 1-2: pcDNA3.1(+)-Luc vector digested with *BamH I* and *Xho I*.

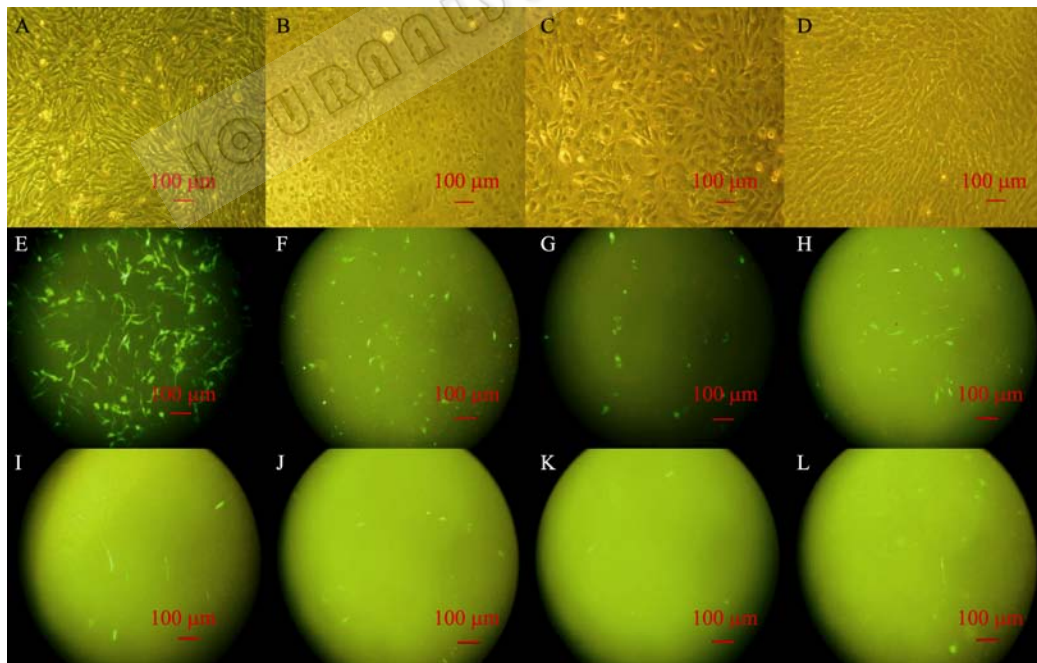


图6 pcDNA3.1(+)-EGFP、pOV-EGFP 转染细胞后 EGFP 表达效果

Fig. 6 Expression of EGFP after transfected cells with pcDNA3.1(+)-EGFP and pOV-EGFP. (A,E,I) Chicken embryo fibroblasts cells. (B,F,J) Chicken oviduct epithelial cells. (C,G,K) Mouse 3T3-L1 preadipocytes cells. (D,H,L) Bovine mammary epithelial cells. (A-D) Cells picture. (E-H) Transfected with pcDNA3.1(+)-EGFP. (I-L) Transfected with pOV-EGFP.

pcDNA3.1(+)-EGFP 在转染鸡胚成纤维细胞组中荧光表达量较高, 在其他 3 种细胞组中表达水平相当 (图 6E~H); pOV-EGFP 在转染鼠 3T3-L1 前脂肪细胞组中荧光表达量较低, 在其他 3 种细胞组中表达水平相当 (图 6I~L)。总体来看, pcDNA3.1(+)-EGFP 在转染的 4 种细胞组中荧光表达量明显高于 pOV-EGFP。

将载体 pcDNA3.1(+)-Luc 和 pOV-Luc 分别与 pHRL-TK 共转染以上 4 种细胞, 并于转染后 48 h 检测萤火虫荧光素酶表达效果。结果发现, 转染后 pcDNA3.1(+)-Luc 和 pOV-Luc 在 4 种细胞中均有荧光素酶的表达。pcDNA3.1(+)-Luc 在转染鸡胚成纤维细胞组中酶表达量较高, 较其他 3 组差异极显著 ($P < 0.01$), pOV-Luc 在转染鸡原代输卵管上皮细胞组酶表达量略高于其他组, 较鼠 3T3-L1 前脂肪细胞组和牛乳腺上皮细胞组差异显著 ($P < 0.05$), 较鸡胚成纤维细胞组差异不显著 ($P > 0.05$)。总体来看, pcDNA3.1(+)-Luc 在转染 4 种细胞组中的酶表达量都要远远高出 pOV-Luc, 在鸡胚成纤维细胞组高达 6 000 多倍, 在鸡输卵管上皮细胞组也有 473 倍 (图 7)。

2.3 慢病毒载体介导基因在不同细胞中的表达

将慢病毒 LV-GFP-Luc 分别感染鸡胚成纤维细胞、鸡原代输卵管上皮细胞、鼠 3T3-L1 前脂肪细胞和牛乳腺上皮细胞, 感染后 96 h 检测绿色荧光蛋白的表达效果。进行 3 次以上重复, 都选取实验所得结果中 EGFP 表达量较高、荧光分布均匀的图片。

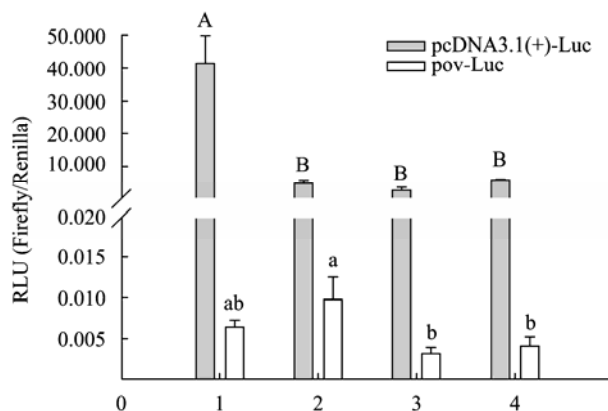


图 7 pcDNA3.1(+)-Luc、pOV-Luc 转染细胞后荧光素酶的表达 (萤火虫/海肾)

Fig. 7 Expression of Luciferase after transfected cells with pcDNA3.1(+)-EGFP and pOV-EGFP (Firefly/Renilla). RLU: relative light unit. 1: chicken embryo fibroblasts cells; 2: chicken oviduct epithelial cells; 3: mouse 3T3 preadipocytes cells; 4: bovine mammary epithelial cells. Capital-small letter means highly differ significantly (capital letter for cells transfected with pcDNA3.1(+)-Luc and small letter for cells transfected with pOV-Luc, $P < 0.01$); A-B means highly differ significantly ($P < 0.01$); a-b means differ significantly ($P < 0.05$).

结果发现, 慢病毒载体具有良好的宿主广泛性, 感染后 LV-GFP-Luc 在 4 种细胞中均有荧光表达, 但慢病毒表达效率在不同的细胞间具有差异性, 在感染鸡胚成纤维细胞组中荧光表达量略高, 在其他 3 种细胞组中表达水平相当 (图 8)。

慢病毒 LV-GFP-Luc 感染后 96 h 检测萤火虫荧光素酶活性, 结果发现, 感染后在 4 种细胞中均有荧光素酶的表达, 其中, 在感染鸡胚成纤维细胞组中酶表达量较高, 较其他 3 组差异极显著 ($P < 0.01$) (图 9)。

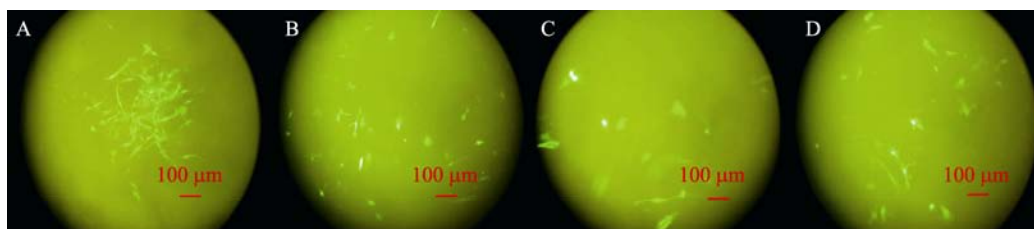


图 8 慢病毒感染细胞后绿色荧光蛋白的表达效果

Fig. 8 Expression of EGFP after infected cells with lentiviral. (A) Chicken embryo fibroblasts cells. (B) Chicken oviduct epithelial cells. (C) Mouse 3T3 preadipocytes cells. (D) Bovine mammary epithelial cells.

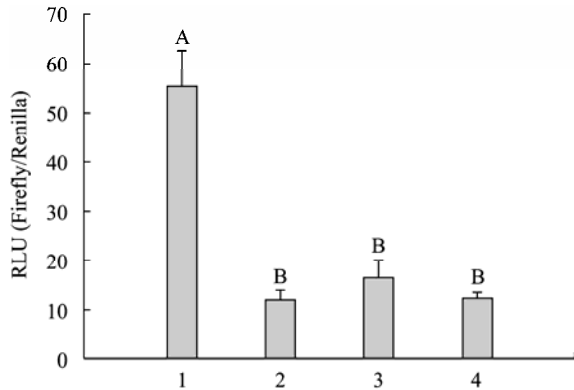


图9 慢病毒感染细胞后荧光素酶的表达 (萤火虫/海肾)
Fig. 9 Expression of luciferase after infected cells with lentiviral (Firefly/Renilla). RLU: relative light unit. 1: chicken embryo fibroblasts cells; 2: chicken oviduct epithelial cells; 3: mouse 3T3 preadipocytes cells; 4: bovine mammary epithelial cells. A-B means highly differ significantly ($P < 0.01$).

2.4 慢病毒载体启动活性分析

在培养 6~8 d 的鸡原代输卵管上皮细胞中感染慢病毒 LV-GFP-Luc, 分别将感染单个细胞的病毒颗粒 (Multiplicity of infection, MOI) 设为 5、10、20 三个对照组, 感染后 96 h 检测绿色荧光蛋白的表达效果。进行 3 次以上重复, 都选取实验所得结果中 EGFP 表达量较高、荧光分布均匀的图片。结果发现, 随着 MOI 的提高, 绿色荧光蛋白表达量也随之升高 (图 10 A~C), 与之前 2.2 中结果相比, 当 MOI 为 20 时, LV-GFP-Luc 感染鸡原代输卵管上皮细胞后荧光

的表达量达到了 pcDNA3.1(+)-EGFP 转染该细胞的表达水平 (图 10D), 远远高于 pOV-EGFP 转染该细胞的表达水平 (图 10E)。

3 讨论

制备转基因鸡输卵管生物反应器的基本方法是以组织特异性基因的调控序列指导外源基因在鸡输卵管中定位表达, 然后从转基因鸡所产的蛋中获取表达产物^[3,5]。鸡卵清蛋白基因启动子是指导外源基因高效表达的理想调控区, 该基因的一些与输卵管特异性表达相关的调控元件已经被广泛研究, 其中, 类固醇依赖的正调控序列 (SDRE) 及其下游的负调控序列 (NRE) 和转录起始位点上游处的 TATATAT 框是最为重要的调控元件^[15]。Sanders 等^[16-17]的研究结果表明, 这些元件都位于上游调控区 1 kb 以内, 说明该长度序列足以指导外源基因的高水平表达。Zhu 等^[7]分别用卵清蛋白基因 5'侧翼 7.5 kb 和 15 kb 片段以及 3'侧翼 15.5 kb 片段作为鸡输卵管组织特异性表达启动子, 以抗肿瘤的单克隆抗体和人干扰素基因为目的基因, 制作出的转基因嵌合体家鸡所产的鸡蛋蛋清中外源蛋白的含量达到了 3 mg, 不过, 未能实现组织特异性表达, 推断可能所采用的调控序列还不足以实现输卵管组织特异

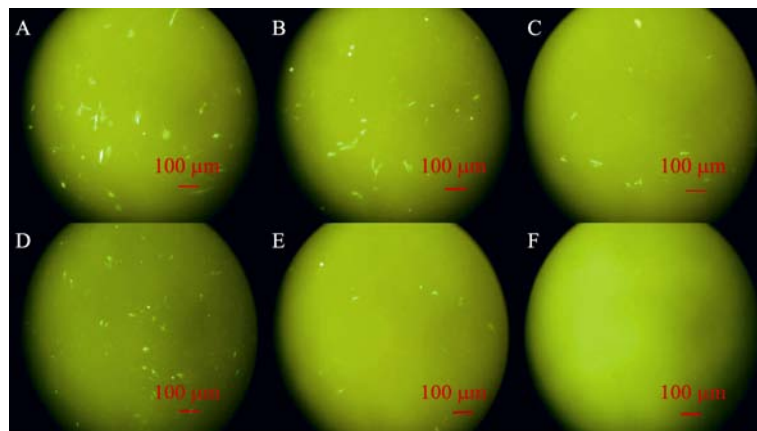


图10 鸡输卵管上皮细胞中绿色荧光蛋白的表达效果

Fig. 10 Expression of EGFP in chicken oviduct epithelial cells. (A-C) Infected with lentiviral (A: MOI=20, B: MOI=10, C: MOI=5). (D) Transfected with pcDNA3.1(+)-EGFP. (E) Transfected with pOV-EGFP. (F) Blank control.

性表达。Kwon 等^[18]缩短启动子长度至 1.35 kb 用于转基因鹌鹑, 虽然在卵白中表达重组人白细胞介素-1 受体拮抗蛋白含量仅为 88.7~233.8 pg/L, 但却保持了输卵管的组织特异性。

本研究中, 对照载体的 CMV 启动子是广泛性表达的启动子, 因此, pcDNA3.1(+)-GFP 和 pcDNA3.1(+)-Luc 在转染的 4 种细胞中都获得了表达。在鸡胚成纤维细胞组绿色荧光蛋白和荧光素酶报告基因表达量都要明显高于其他组, 可能与成纤维细胞快速的生长特性和对质粒载体的表达高效性有关。

在选用 1.25 kb 鸡卵清蛋白基因 5'侧翼区为启动子的载体转染中, pOV-EGFP 和 pOV-Luc 在 4 种细胞中也获得了表达, 没有表现出细胞特异性, 可能是所采用的调控序列没有包含所有必要的调控元件, 还不能实现输卵管组织特异性表达。转染 pOV-EGFP 在鼠 3T3-L1 前脂肪细胞组绿色荧光蛋白表达量较低; 转染 pOV-Luc 在鸡原代输卵管上皮细胞组荧光素酶的表达量与鸡胚成纤维细胞组表达量差异不显著, 与鼠 3T3-L1 前脂肪细胞组和牛乳腺上皮细胞组差异显著, 这些都可能与所构建的载体在不同细胞中的表达差异有关。同时, 卵清蛋白启动子载体在转染各细胞组中报告基因表达活性较低, 与 CMV 启动子的对照质粒载体的表达效率相差数百倍, 这与之前孙明军等^[19]所得的结果相一致, 可能是与扩增的卵清蛋白基因调控区片段没有包含其远端的增强子有关^[5]。

近年来, 应用慢病毒作为表达载体进行转基因鸡输卵管反应器方面的研究已经获得了初步成功, 在多种细胞和组织中检测到了外源基因的表达。Xu 等^[20]以增强型绿色荧光蛋白为标记基因构建复制缺陷型慢病毒载体感染不同来源、不同分化特征的细胞, 均获得了较高水平的表达。Park 等^[21]通过慢病毒载体结合显微注射和原始生殖细胞等转基因方法, 生产出的转基因鸡在多种组织中都检测到了标记基因的表达。特别是最近 Masamichi 等^[22]应用广泛表达的逆转录病毒载体生产的药用抗体在转基因鸡的血清, 所产蛋的蛋黄和蛋白中都获得了表达。

本研究中, 慢病毒在所感染的 4 种细胞 (分别来源于鸡、鼠、牛) 都获得了绿色荧光蛋白的表达, 表明其具有广泛的宿主。但在不同的细胞间表达效率具有一定的差异。在鸡胚成纤维细胞组绿色荧光蛋白的表达量略高于其他 3 个细胞组, 荧光素酶报告基因的表达量显著高于其他 3 个细胞组, 可能与该细胞所具有的增殖能力强, 对病毒耐受性好, 长期保持性状稳定等特点^[23]有关。同时, 两种报告基因所得结果的差异可能与不同报告基因的检测方法有关。目前, 获取输卵管高效特异性启动子, 并与慢病毒表达载体相结合将成为转基因鸡输卵管反应器研究的热点。

获得外源基因在鸡输卵管组织高效表达的载体是制备鸡输卵管生物反应器的首要条件。Ochiai 等^[24]采用卵清蛋白基因 5'侧翼 1.35 kb 片段和 3 种不同的病毒启动子分别构建载体, 通过基因枪的方法注射到产蛋母鸡的输卵管部位, 结果发现病毒启动子的启动效率远远高于卵清蛋白调控区。本研究中, 采用不同 MOI 的慢病毒感染鸡原代输卵管上皮细胞, 随着 MOI 的提高, GFP 表达量升高。在 MOI 为 20 时荧光表达活性就可达到携带 CMV 启动子的质粒载体水平, 远远高于携带鸡卵清蛋白启动子的表达载体水平, 与 Ochiai 等所得的结果一致。综合来看, 与鸡卵清蛋白启动子表达载体相比, 慢病毒载体的转基因效率较高, 在转基因鸡输卵管反应器的制备上具有较好的应用前景。

REFERENCES

- [1] Sun ZH, Miao XY, Zhu RL. New advances in animal transgenic technology. *Hereditas*, 2010, 32(6): 539-547. 孙振红, 苗向阳, 朱瑞良. 动物转基因新技术研究进展. *遗传*, 2010, 32(6): 539-547.
- [2] Louis MH. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2009, 32(2): 107-121.
- [3] Simon GL, Michael J, Adrian S, et al. Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discov Today*, 2005, 10(3): 191-196.

- [4] Yan HF, Wen P, Hu XG, et al. Construction vector of transgenic poultry and import method research. *Anim Husb Vet Med*, 2008, 40(11): 92–95.
燕海峰, 文平, 胡雄贵, 等. 转基因禽类载体构建与导入方法研究现状. *畜牧与兽医*, 2008, 40(11): 92–95.
- [5] Zhao YH, Zhang NH, Du LX. Expression and regulation of chicken ovalbumin. *Biotechnol*, 2004, 14(4): 82–84.
赵英会, 张念华, 杜立新. 鸡卵清蛋白表达调控. *生物技术*, 2004, 14(4): 82–84.
- [6] Yu L, Zhao J, Zhang YL, et al. Construction of the expressing vector of 5' flanking regulatory regions of the chicken ovalbumin gene and its transient expression in chicken primary oviduct cell and chicken fibroblasts cell cultures. *Chin J Vet Sci*, 2001, 21(1): 21–24.
宇丽, 赵君, 张艳玲, 等. 鸡卵清蛋白基因 5'调控序列表达载体的构建及其在鸡原代输卵管上皮细胞及鸡成纤维细胞的表达. *中国兽医学报*, 2001, 21(1): 21–24.
- [7] Zhu L, Van D, Albanese J, et al. Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(9): 1159–1169.
- [8] Man CL, Chen Y. Retrovirus and transgenic chicken. *China Biotechnol*, 2007, 27(7): 117–121.
满朝来, 陈岩. 逆转录病毒与转基因鸡. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(7): 117–121.
- [9] Michael J, Sherman A, Ellard FM, et al. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep*, 2004, 5(7): 728–733.
- [10] Gao B, Sun HC, Wang YJ, et al. Optimization and *in vivo* expression of chicken oviduct-specific expression vector. *Chin J Biotech*, 2008, 24(1): 137–141.
高波, 孙怀昌, 王永娟, 等. 鸡输卵管特异表达载体的优化及体内表达. *生物工程学报*, 2008, 24(1): 137–141.
- [11] Shan CL, Chen Y. The pre-exploration of establishing chicken oviduct bio-reactor by retrovirus[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2007.
单崇丽, 陈岩. 逆转录病毒法制备鸡输卵管生物反应器的前期探索[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2007.
- [12] Liu YB, Yu MZ, Shen XZ. The establishment of a temporary expression system in chicken oviduct epithelium. *Chin Dev Reprod Biol*, 2001, 10(1): 13–19.
- [13] Tan XW, Ma SF, Liu XY, et al. Culture, purification and ability to support mouse embryo development of oviductal epithelial cells from different species. *Acta Vet Zootech Sin*, 2006, 37(9): 878–882.
谭秀文, 马所峰, 刘新勇, 等. 不同物种输卵管上皮细胞培养、纯度检测及支持小鼠胚胎发育的能力. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(9): 878–882.
- [14] Lu LM, Li QZ, Wang CM, et al. Impact of miR-221 on mouse mammary epithelial cells and lactation. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2009, 25(5): 454–458.
陆黎敏, 李庆章, 王春梅, 等. miR-221 对小鼠乳腺上皮细胞增殖和泌乳功能的影响. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(5): 454–458.
- [15] Hyi-Man P, Sanders MM, Suzuki T, et al. An oviduct-specific and enhancer-like element resides at about -3000 in the chicken ovalbumin gene. *Biochimie*, 2006, 88(12): 1909–1914.
- [16] Sanders MM, Mcknight GS. Positive and negative regulatory elements control the steroid-responsive ovalbumin promoter. *Biochemistry*, 1982, 27(17): 6550–6557.
- [17] Haecker SA, Muramatsu T, Sensenbaugh KR, et al. Repression of the ovalbumin gene involves multiple negative elements including a ubiquitous transcriptional silencer. *Mol Endocrinol*, 1995, 9(9): 1114–1126.
- [18] Kwon SC, Choi JW, Jang HJ, et al. Production of biofunctional recombinant human interleukin 1 reporter antagonist from transgenic quail egg white. *Biol Reprod*, 2010, 82(6): 1057–1064.
- [19] Sun MJ, Zhao C, Sha J, et al. Construction and expression of the specific secretory vector in the chicken oviduct cells. *J Agric Biotechnol*, 2003, 11(1): 75–78.
孙明军, 赵晨, 沙金, 等. 鸡输卵管组织特异性分泌表达载体的构建和表达. *农业生物技术学报*, 2003, 11(1): 75–78.
- [20] Xu SY, Sun Y, Ding HM, et al. Efficient production of transgenic chickens using self-inactive HIV-based lentiviral vectors. *Acta Zool Sin*, 2009, 55(5): 383–387.
- [21] Park SH, Kim JN, Park TS, et al. CpG methylation modulates tissue-specific expression of a transgene in chickens. *Theriogenology*, 2010, 74(5): 805–816.
- [22] Masamichi K, Yoshinori K, Takuya S, et al. Production of chimeric monoclonal antibodies by genetically manipulated chickens. *J Biotechnol*, 2009, 141(1/2): 18–25.
- [23] Zhu GP, Zhou XL, Guo YF, et al. Primary culture and applications in chicken embryo fibroblasts. *Prog Vet Med*, 2010, 31(3): 112–114.
朱国坡, 周晓丽, 郭延峰, 等. 鸡胚成纤维细胞原代培养及应用. *动物医学进展*, 2010, 31(3): 112–114.
- [24] Ochiai H, Park HM, Nakamura A, et al. Synthesis of human erythropoietin *in vivo* in the oviduct of laying hens by localized *in vivo* gene transfer using electroporation. *Poult Sci*, 1998, 77(2): 299–302.