

转人乳铁蛋白基因山羊乳腺上皮细胞的体外诱导表达

张玉玲¹, 张晶晶², 刘凤军¹, 张涌^{3*} (1. 河南科技大学动物科技学院, 河南洛阳 471003; 2. 包头医学院生物化学与分子生物学教研室, 内蒙古包头 014040; 3. 西北农林科技大学生物工程研究所, 陕西杨凌 712100)

摘要 [目的]为了探索山羊乳腺上皮细胞体外诱导表达的技术体系, 评价乳腺特异性载体效率及外源蛋白在细胞水平的表达情况。[方法]用含 5 mg/L 胰岛素、5 mg/L 催乳素、1 mg/L 氢化可的松的 DMEM/F12 培养液对转染人乳铁蛋白基因的山羊乳腺上皮细胞进行体外诱导培养, 每 6 h 收集 1 次上清液。上清液浓缩后分别用 SDS-PAGE 和 Western blot 检测外源蛋白的表达情况。[结果]诱导培养液中有目的蛋白表达, 分子量约为 42 kD。[结论]该研究所用的山羊乳腺细胞诱导表达方法能够诱导山羊乳腺上皮细胞表达外源基因, 这为人乳铁蛋白基因的异源表达与乳腺生物反应器的研究奠定了基础。

关键词 乳腺细胞; 诱导表达; 乳腺生物反应器; 人乳铁蛋白; 山羊

中图分类号 S821 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)32-15743-03

Induced Expression in vitro of Goat Mammary Gland Epithelial Cell of Transgenic Human Lactoferrin

ZHANG Yu-ling et al (College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003)

Abstract [Objective] The aim was to explore the technical system of induced expression in vitro of goat mammary gland epithelial cell, and evaluate expression situation of mammary gland specific vector efficiency and foreign protein at the cell level. [Method] Goat mammary gland epithelial cell by human lactoferrin gene transfection was carried out induction culture in vitro using DMEM/F12 culture medium with 5 mg/L insulin, 5 mg/L prolactin and 1 mg/L hydrocortisone, and collected supernatant per 6 hours. Using SDS-PAGE and Western blotting to detect expression situation of foreign protein after supernatant concentrated. [Result] There was target protein expression in the induced culture medium, and molecular weight was about 42 KD. [Conclusion] Used induced expression method of goat mammary gland cell in the study can induce goat mammary gland epithelial cell to express foreign gene, it lays a foundation for researching heterologous expression of human lactoferrin gene and mammary gland bioreactor.

Key words Mammary gland cell; Induced expression; Mammary gland bioreactor; Human lactoferrin; Goat

转基因动物已成为当今生命科学界一个发展最快、最热门的领域。转基因动物技术在生物制药^[1]、建立动物模型^[2]、生产移植器官^[3]、动物抗病育种^[4]等许多方面都具有广泛的应用价值。其中,最引人注目的是将转基因动物技术应用于乳腺生物反应器,将具有临床应用价值的药用蛋白基因通过转基因技术使其在家畜的乳腺中表达,与传统的制药技术相比,该技术具有产量高、易提纯、活性好等诸多优点。但就目前而言,该技术的研究水平与其产生巨大的社会、经济效益之间仍存在相当的距离。主要原因在于目前的转基因动物制作技术难以控制转基因在宿主染色体中的行为、无法控制转基因表达的频率和水平等,其生产效率偏低、成本过高。近年来随着哺乳动物核移植技术的发展,一种新的转基因动物制作方法——转基因克隆动物技术显示出越来越明显的优势。转基因克隆动物技术是转基因动物技术与克隆动物技术的有机结合,它是动物体细胞为受体,将目的基因转入动物体细胞,再以这些体细胞为核供体进行动物克隆。迄今已在牛^[5]、山羊^[6]、绵羊^[7]和猪^[3]等多种动物上取得成功。

体细胞核移植技术用于制作乳腺反应器成功的关键技术在于构建合理有效的乳腺特异表达载体,使目的基因在乳汁中得到分泌并高效表达。然而,如何筛选载体,前人研究主要有乳腺原代细胞培养^[8]、乳腺组织瞬时表达^[9]、尾静脉注射^[10]等方法。上述方法虽然都在活体上验证了表达载体的效能,但无法验证外源基因在经长时间转染、筛选等体外

操作后的遗传稳定性。因此,假设对供体细胞在细胞水平进行诱导,使其进入泌乳状态,再从其细胞培养液中提取目的蛋白,进而检测其含量、活性、安全性等指标,这样不但可以把验证载体的效能及遗传稳定性提前到细胞水平,而且能降低制作乳腺生物反应器的成本和时间。

据此,该研究选择转染人乳铁蛋白(hLF)基因的阳性山羊乳腺上皮细胞单克隆株,以胰岛素、催乳素、氢化可的松对细胞进行诱导表达,收集诱导后的细胞培养液,超滤离心浓缩后,以 SDS-PAGE 和 Western blot 检测目的蛋白的表达。旨在探索山羊乳腺上皮细胞体外诱导表达的技术体系,为体细胞核移植法制作乳腺生物反应器提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 兔抗人乳铁蛋白多克隆抗体购自 BioDesign 公司;羊抗兔二抗购自北京博奥森生物技术有限公司,细胞培养物购自 Gibco 公司,催乳素购自 Peprotech 公司;其他试剂除特殊注明外均购自 Sigma 公司(St. Louis, MO, USA)。引物及 PCR 试剂盒由宝生物工程(大连)有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 试验设计。试验分为 3 组:第 1 组为未加激素诱导的转人乳铁蛋白基因细胞培养液(CK₁);第 2 组为激素诱导后的转人乳铁蛋白基因细胞的培养液(试验组);第 3 组为未转人乳铁蛋白基因细胞的培养液(CK₂)。

1.2.2 hLF 在山羊乳腺上皮细胞中的诱导表达及浓缩处理。试验组:选择 PCR 阳性克隆细胞(转人乳铁蛋白基因山羊乳腺上皮细胞),大量繁殖后,待细胞长至平皿的 80%~90% 时弃去上清,加入含胰岛素(5 μg/ml)、催乳素(5 μg/ml)、氢化可的松(1 μg/ml)的培养基 D/F12 进行诱导培养,每隔 6 h 收集 1 次上清。将收集的上清液装入 30 kD 的超滤离心管

基金项目 河南科技大学博士启动基金项目。
作者简介 张玉玲(1977-),女,蒙古族,内蒙古赤峰人,博士,讲师,从事动物胚胎工程和转基因研究。E-mail: zhangyulings@yahoo.com.cn。* 通讯作者。
收稿日期 2009-08-17

中,1 000 r/min 离心 10 ~ 15 min 后,收集滤膜上面的液体, -20 ℃ 保存。对照组:未转人乳铁蛋白基因的山羊乳腺上皮细胞和未加激素诱导的转人乳铁蛋白基因山羊乳腺上皮细胞的处理方法除不加激素诱导培养外,其余处理方法同试验组细胞。

1.2.3 诱导产物的检测。

1.2.3.1 SDS - 聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳。 操作程序^[11]:安装玻璃板,然后配置 15 ml 浓度为 10% 的 Tris-甘氨酸 SDS-PAGE 凝胶电泳分离胶所用溶液,配方为:水 5.9 ml + 30% 丙烯酰胺溶液 5.0 ml + 1.5 mol/L Tris (pH 值 8.8) 3.8 ml + 10% SDS 0.15 ml + 10% 过硫酸铵 0.15 ml + TEMED 0.006 ml。然后迅速灌注到两玻璃板中间,分离胶聚合完全后(大约 1 h),配置 5 ml 浓度为 5% 的 Tris - 甘氨酸 SDS - PAGE 凝胶电泳积层胶所用溶液,配方为:水 3.4 ml + 30% 丙烯酰胺溶液 0.83 ml + 1.0 mol/L Tris (pH 值 6.8) 0.63 ml + 10% SDS 0.05 ml + 10% 过硫酸铵 0.05 ml + TEMED 0.005 ml。在已聚合的分离胶上灌注积层胶,插入 Teflon 梳子,放置于室温下。

当积层胶聚合完成后,小心移出梳子,把凝胶固定于电泳装置上,上下槽各加入 Tris-甘氨酸电泳缓冲液,配方为:25 mmol/L Tris + 250 mmol/L 甘氨酸(电泳级,pH 值 8.3) + 0.1% SDS。

样品处理:把蛋白样品置于 1 × SDS 凝胶加样缓冲液中,配方为:50 mmol/L Tris · Cl (pH 值 6.8) + 100 mmol/L 二硫苏糖醇 + 2% SDS + 0.1% 溴酚蓝 + 10% 甘油。在 100 ℃ 加热 3 min,使蛋白质变性。

加样:用微量加样器每个样品加 15 μl,加完后在每个样品孔中加上等体积的 1 × SDS 凝胶加样缓冲液。

加样完成后,将电泳装置与电源相接,积层胶上所加电压为 8 V/cm,当样品前沿进入分离胶后,将电压提高至 15 V/cm,继续电泳直至溴酚蓝到达分离胶底部,然后关闭电源。从电泳装置上卸下玻璃板,将凝胶取出。

考马斯亮蓝染色:在 90 ml 甲醇:水(1:1, V/V) 和 10 ml 冰乙酸的混合液中溶解 0.25 g 考马斯亮蓝,用滤纸过滤除去颗粒物质。用至少 5 倍体积的染液浸泡凝胶,放在平台上缓慢摇动染色 2 ~ 3 h。

脱色:将凝胶置于不加染料的甲醇 - 乙酸溶液中,平缓摇动 4 ~ 8 h,中间更换脱色液 3 ~ 4 次。

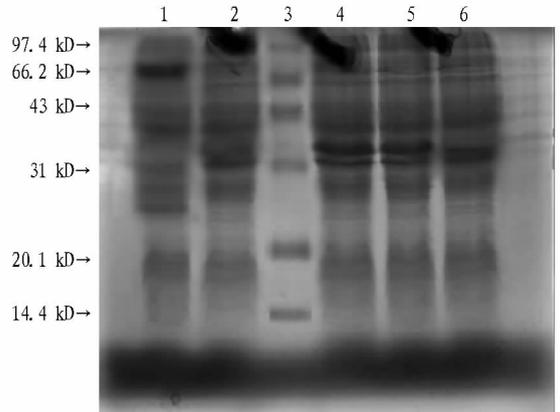
拍照:将脱色完的凝胶拍照,保存。

1.2.3.2 Western blot 检测。 当 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳结束后,凝胶用蒸馏水漂洗 1 遍,再用转移缓冲液漂洗 1 遍。剪取 1 张与凝胶面积相同的 PVDF 滤膜,在滤膜的左下角用铅笔作一标记,先将滤膜用甲醇浸泡 2 ~ 3 s,再用去离子水浸泡滤膜 1 ~ 2 min 以洗去甲醇,最后用转移缓冲液浸泡滤膜 10 min。安装转移装置。按凝胶面积 0.65 mA/cm² 电流转移 90 min。转移结束后,将 PVDF 膜浸入 20 ml 封闭液(5% 脱脂奶粉)中,室温轻轻摇动,封闭 1 h。用 PBS 轻轻摇动洗膜 3 次,每次 10 min。将 PVDF 膜浸入 10 ml 用封闭液稀释的兔抗人乳铁蛋白单克隆抗体溶液中,室温轻轻摇动温育 1.5 h。用 PBS 轻轻摇动洗膜 3 次,每次 10 min,将 PVDF 膜浸入 10 ml 用封闭液

稀释的羊抗兔抗体溶液中,室温轻轻摇动温育 1.5 h。用 PBS 轻轻摇动洗膜 3 次,每次 10 min。将 PVDF 膜浸入 5 ml 碱性磷酸酶生色底物溶液中,轻轻摇动,观察反应过程,当蛋白条带显现时,终止反应。室温干燥 PVDF 膜,拍照。

2 结果与分析

2.1 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果 由图 1 可见,激素诱导的转染人乳铁蛋白的山羊乳腺上皮细胞培养液(第 4、5 泳道)中多出 1 个条带,分子量介于 31 ~ 43 kD。而未加激素诱导的转人乳铁蛋白基因细胞培养液(第 2 泳道)和未转人乳铁蛋白基因细胞的培养液(第 6 泳道)中没有特异性条带。结果说明经激素诱导后的转人乳铁蛋白基因的山羊乳腺上皮细胞分泌表达了人乳铁蛋白,分子量介于 31 ~ 43 kD 之间。



注:第 1 泳道为人乳铁蛋白标准品,分子量介于 66 ~ 97 kD 之间;第 2 泳道为未加激素诱导的转人乳铁蛋白基因细胞培养液(CK₁);第 3 泳道为 Marker;第 4、5 泳道为激素诱导后的转人乳铁蛋白基因细胞的培养液(试验组);第 6 泳道为未转人乳铁蛋白基因细胞的培养液(CK₂)。

Note: 1. Standard sample of human lactoferrin, molar weight 66 - 97 kD; 2. Cell culture medium of transgenic human lactoferrin without hormone induction (CK₁); 3. Marker; 4 - 5. Cell culture medium of transgenic human lactoferrin with hormone induction (test group); 6. Cell culture medium of not transgenic human lactoferrin (CK₂).

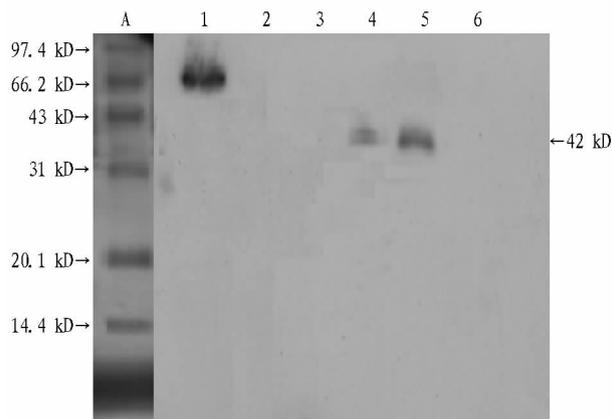
图 1 表达产物 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 1 SDS-PAGE results of expression products

2.2 Western blot 结果 由图 2 可见,激素诱导的转染人乳铁蛋白的山羊乳腺上皮细胞培养液(第 4、5 泳道)中有特异性条带出现,大小介于 31 ~ 43 kD,约为 42 kD。而未加激素诱导的转人乳铁蛋白基因细胞培养液(第 2、3 泳道)和未转人乳铁蛋白基因细胞的培养液(第 6 泳道)中没有特异性条带。结果说明经激素诱导后的转人乳铁蛋白基因的山羊乳腺上皮细胞分泌表达了人乳铁蛋白,分子量约为 42 kD。

3 讨论

该试验结果显示,转人乳铁蛋白基因山羊乳腺上皮细胞经该试验条件下的激素组合诱导,能够分泌人乳铁蛋白,这为人乳铁蛋白基因的异源表达与乳腺生物反应器的研究奠定了基础。人乳铁蛋白标准品的分子量为 76 kD,该研究表达出的重组蛋白分子量为 42 kD,分子量明显小于天然人乳铁蛋白,这可能与外源基因的插入及基因重组、蛋白质加工



注: A 为蛋白标准分子量 Marker; 第 1 泳道为人乳铁蛋白标准品, 分子量介于 66~97 kD 之间; 第 2, 3 泳道为未加激素诱导的转入乳铁蛋白基因细胞培养液 (CK₁); 第 4, 5 泳道为激素诱导后的转入乳铁蛋白基因细胞的培养液 (试验组); 第 6 泳道为未转入乳铁蛋白基因细胞的培养液 (CK₂)。

Note: A. Standard protein Marker; 1. Standard sample of human lactoferrin, molar weight 66~97 kD; 2-3. Cell culture medium of transgenic human lactoferrin without hormone induction (CK₁); 4-5. Cell culture medium of transgenic human lactoferrin with hormone induction (test group); 6. Cell culture medium of not transgenic human lactoferrin (CK₂).

图 2 表达产物 Western blot 检测结果

Fig. 2 Results of Western blotting analysis of expression products

等复杂过程有关。乳铁蛋白 N 端 (1~338) 与 C 端 (339~692) 2 个球状结构的相应位置上有 37% (125 个) 的氨基酸完全相同, Bullen 等^[12]认为乳铁蛋白是在 50 亿年前由编码分子质量为 40 kD 蛋白的基因重复形成了目前的结构。另外, 载体进入细胞后, 在整合到基因组 DNA 的过程中, 通过重组交换使基因变小, 也可能受细胞内核酸酶的作用使外源基因被切断, 从而表达产物分子量变小, 同时表达产物在加工及分泌、运输过程中, 受到蛋白酶的作用而降解, 特别是在异种细胞内表达, 作为异体蛋白很容易被细胞内防御蛋白酶系统识别并降解。另外, 乳腺细胞分泌活动受激素的影响, 细胞表达与个体表达存在较大的差异, 体外培养的细胞作为非常态细胞, 蛋白质的表达可能与机体组织细胞有所不同, 由此导致表达的重组蛋白分子量变小。类似现象在其他学者的研究也有报道, 曹阳等得到的 34 kD 重组人乳铁蛋白具有抑制大肠杆菌生长的作用, 而且比人乳铁蛋白标准品抑菌

作用还强^[13]; Mitra 和 Zhang 将重组的人乳铁蛋白基因导入烟草愈伤组织中, Western 印记分析表明, 转化烟草愈伤组织表达的重组人乳铁蛋白分子质量为 48 kD, 具备乳铁蛋白的抗菌活性, 他们认为可能是重组的乳铁蛋白在烟草中没有得到正确的折叠, 非折叠区域被降解而导致重组蛋白分子量变小^[14]。张大兵等将重组的人乳铁蛋白基因导入到烟草中, Northern 印记分析得到了 2.2 kb 的 RNA 条带, Western 印记分析表明转化烟草表达的重组人乳铁蛋白分子量为 50 kD, 并具有抗菌、抗 TMV 病毒活性, 认为是重组蛋白受到降解所致^[15]。乳铁蛋白抑菌作用是通过破坏细胞膜、改变细胞的渗透压及铁离子的争夺而杀死或抑制菌体^[12], 因此, 即便是分子量变小, 只要功能区存在仍然具有杀菌的作用。该试验中所获 42 kD 的重组人乳铁蛋白活性有待进一步研究。

参考文献

- [1] KUROIWA Y, KASINATHAN P, CHOI Y J, et al. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin [J]. *Nat Biotech*, 2002, 20: 889-894.
- [2] ADAMS D J, BIGGS P J, COX J, et al. Mutagenic insertion and chromosome engineering resource (MICER) [J]. *Nature Genet*, 2004, 36: 867-871.
- [3] LAI L X, SIMONDS D K, PARK K W, et al. Production of alpha-1,3-galactosyl transferase knockout pigs by nuclear transfer cloning [J]. *Science*, 2002, 295: 1089-1092.
- [4] KANG J X, WANG J D, WU L, et al. Fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acid [J]. *Nature*, 2004, 427: 504-505.
- [5] POLEJAEVA I A, CAMPBELL K H. New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis [J]. *Theriogenology*, 2000, 53 (1): 117-126.
- [6] HOUEBINE L M. Transgenic animal bioreactors [J]. *Transgenic Res*, 2000, 9(4/5): 305-320.
- [7] 连正兴, 张磊, 刘兆凉, 等. 整合 mATT 基因转基因山羊的获得 [J]. *遗传学报*, 2001, 28(8): 716-721.
- [8] 杨国庆, 戴蕴平, 朱宝利, 等. 牛 BLG 基因 5' 调控成分的克隆和制备乳腺生物反应器研究 [J]. *中国科学 C 辑*, 1996, 26(5): 463-469.
- [9] 邱信芳, 张克忠, 卢大儒, 等. 人凝血 IX 因子乳腺生物反应器的研制 [J]. *复旦学报: 自然科学版*, 1998, 37(4): 365-371.
- [10] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯. *分子克隆实验指南* [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 55-56.
- [11] 张克忠, 崇松, 陈立, 等. 人凝血 IX 因子乳腺特异性表达载体在离体细胞和小鼠乳腺组织中表达的初步研究 [J]. *复旦学报: 自然科学版*, 1998, 37(4): 527-530.
- [12] BULLEN J J, GRIFFITHS Y E. Iron and infection. *Molecular, physiological and clinical aspects* [M]. John Wiley & Sons, Chichester, 1987.
- [13] 曹阳, 李庆伟, 袁晓东, 等. 人乳铁蛋白基因克隆及表达载体构建 [J]. *大连理工大学学报*, 2000, 40(6): 696-700.
- [14] MITRA A, ZHANG Z. Expression of a human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein(s) [J]. *Plant Physiol*, 1994, 106(3): 977-981.
- [15] 张大兵, 张景六, 王宗阳, 等. 人乳铁蛋白基因在烟草中的表达及抗细菌与病毒的能力 [J]. *植物生理学报*, 1999, 25(3): 234-243.

(上接第 15721 页)

- [2] 冯秀娟, 陈大建, 李忠生, 等. 蟾酥的化学成分及其临床应用 [J]. *中兽医学杂志*, 2007(3): 36.
- [3] 张薇, 徐利峰, 张懿中. 花背蟾蜍耳后腺分泌物中化学成分的研究 [J]. *沈阳药学院学报*, 1992, 9(2): 98-102.
- [4] 唐易全, 华家桢, 田盛海, 等. 我国产华西大蟾蜍皮肤中阿瑞那蟾蜍精的分离、结构鉴定和生物活性 [J]. *中国药学杂志*, 1990, 25(3): 138-139.

- [5] 杨立宏, 豁中, 张冰, 等. 中华大蟾蜍皮化学成分的研究 [J]. *药学报*, 1992, 27(9): 679-683.
- [6] 金向群, 张薇, 张懿中. 蟾蜍化学及药理研究的进展 [J]. *沈阳药学院学报*, 1989, 6(3): 204-211.
- [7] 王加连. 蟾蜍的药用价值及人工养殖研究 [J]. *江苏农业科学*, 2009(1): 240.
- [8] 将建月, 将张林. 果园套养蟾蜍效益高 [J]. *饲料与畜牧*, 2004(1): 36.
- [9] 郭文华. 养蟾蜍出租给菜农灭虫 [J]. *养殖技术顾问*, 2003(6): 47.