

稳定转染纤维素酶相关基因的猪胎儿成纤维细胞系的建立

黄妙容^{1,3}, 张献伟¹, 刘德武¹, 邹 娴¹, 帅 亮¹, 袁玉娟¹, 朱财林¹, 吴珍芳^{1,2*}

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642; 2. 广东省温氏集团研究院, 新兴 527400;

3. 肇庆大华农生物药品有限公司, 广东省兽用生物制品技术研究与应用企业重点实验室, 肇庆 526238)

摘 要: 旨在构建带有双筛选标记的纤维素酶基因的腮腺特异性表达载体, 筛选稳定转染该载体的猪胎儿成纤维细胞系, 为制备转纤维素酶基因的转基因克隆猪提供核供体细胞。采用 SOE-PCR 和 PCR 方法, 分别扩增获得筛选标记基因 NEO-T2A-EGFP 序列和纤维素酶相关基因的融合序列 SP-EGX-F2A-BGL1, 构建腮腺特异性表达载体 pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP, 经 PCR、酶切、测序鉴定正确后, 通过脂质体转染猪胎儿成纤维细胞, 利用 G418 抗性和绿色荧光蛋白进行稳定筛选, 并利用 PCR 和 Western blot 进行检测。结果表明, 成功构建了带双筛选标记的腮腺特异表达纤维素酶基因的表达载体, 并获得稳定转染该载体的猪胎儿成纤维细胞系。该结果为生产腮腺特异表达纤维素酶的转基因克隆猪研究奠定基础。

关键词: 双筛选标记; 纤维素酶; 2A; 猪胎儿成纤维细胞

中图分类号: S828; S814.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)04-0535-08

Establishment of Transgenic Porcine Fetal Fibroblast Cell Line Stably Transfected with Fibrolytic Enzymes Synthesis Genes

HUANG Miao-rong^{1, 3}, ZHANG Xian-wei¹, LIU De-wu¹, ZOU Xian¹,

SHUAI Liang¹, YUAN Yu-juan¹, ZHU Cai-lin¹, WU Zhen-fang^{1, 2*}

(1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Institute of Wen's Group, Guangdong Province, Xinxing 527400, China; 3. Key Laboratory

of Biotechnology R&D of Veterinary Biology Products of Guangdong Enterprise, Zhaoqing

Dahuanong Biology Medicine Co., Ltd, Zhaoqing 526238, China)

Abstract: The aim of the present study was to construct a salivary-glands-specific expression vector, which including dual screen markers gene and fibrolytic enzymes gene, and then it was transfected into porcine fetal fibroblast cells to provide fibrolytic enzymes transgenic donor cells for cloned pigs. The sequences of dual screen marker gene NEO-T2A-EGFP and fibrolytic enzyme gene SP-EGX-F2A-BGL1 were amplified by SOE-PCR and PCR, respectively, and inserted into the salivary-glands-specific expression vector to generate pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP. After identification by PCR, restrictive enzymes digestion and sequencing, the vector was transfected into porcine fetal fibroblast cells with liposome, and the stably transfected cells were screened by G418 selection and EGFP and identified by PCR and Western blot analysis. The result showed that the salivary-glands-specific expression vector with dual screen marker genes and fibrolytic enzyme genes was constructed, and the stable transgenic porcine fetal fibro-

收稿日期: 2012-07-30

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2011AA100304); 广东省自然科学基金项目(2011A020102003); 国家科技重大专项(2011ZX08006004); 粤港关键领域重点突破项目(2008A024200012)

作者简介: 黄妙容(1983-), 女, 广东潮州人, 博士, 主要从事动物克隆与转基因育种的研究, Tel: 020-85284833, E-mail: miaorongh@yahoo.com.cn

* 通信作者: 吴珍芳, 教授, E-mail: wzfemail@163.com

blast cell lines were established. The study paves the way for further research on production of cloned pig expressing fibrolytic enzymes in their salivary glands.

Key words: dual screen markers; fibrolytic enzymes; 2A; porcine fetal fibroblast cells

纤维素是植物细胞壁的主要成分,每年植物通过光合作用产生的 220 亿吨干物质中,纤维素占了 35%~50%^[1],是植物性饲料中最主要的非淀粉多糖(Non-starch polysaccharides, NSP),也是地球上最丰富、廉价的可再生资源,其降解是自然界碳循环的中心环节。纤维素的转化利用对于解决资源与环境问题有重要意义,利用纤维素酶降解纤维素生产单糖被认为是最理想的转化方式。纤维素酶是由多种酶组成的复合酶体系,包括内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶 3 大类。协同理论认为:外切酶作用于不溶性纤维表面,使形成结晶结构的纤维素长分子链开裂,长链分子末端部分发生游离,从而使纤维素易于水化;内切酶则作用于经外切酶活化的纤维素,分解其 β -1,4 键,产生纤维二糖、三糖等短链低聚糖; β -葡萄糖苷酶再将纤维二糖、三糖等分解成葡萄糖^[2-3]。在养殖业中,由于畜禽自身不能合成纤维素酶,降低了其对植物性饲料的利用率,造成了一定程度的资源浪费和环境污染^[4-6]。福寿螺(*Ampullaria crossean*)多功能纤维素酶 EGX 同时具有内切 β -1,4-葡聚糖酶、外切 β -1,4-葡聚糖酶和木聚糖酶等 3 种活性;黑曲霉 β -葡萄糖苷酶 BGL1 能够水解纤维二糖生成葡萄糖^[7-8]。

本研究拟构建腮腺特异性表达 EGX 和 BGL1 的双基因多酶活共表达载体,并将 NEO 和 EGFP 2 个筛选基因通过自剪切序列 2A 进行融合并连接到该特异性载体中,转染猪胎儿成纤维细胞,筛选稳定转染该载体的细胞系,为生产转纤维素酶基因克隆猪的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

携带腮腺分泌蛋白启动子的组织特异性表达载体 pPSP-CMV-NEO 由中国农业大学李宁院士课题组提供;克隆载体 pGEM-T-SP-EGX-2A-BGL1 为本试验前期构建;质粒 pcDNA3.1(+) 和 pT2AL200R175-CAGGS-EGFP 为本实验室保存。

限制性内切酶 *Not* I、*Xho* I、*Cla* I、*Bgl* II 和 *Asc* I 购自 Fermentas 公司;感受态细胞 *E. coli* Competent Cells DH5a、连接酶 Ligation Kit Ver. 2.0、高保真

快速 DNA 聚合酶 PrimeSTAR Max DNA Polymerase、DNA 分子量标准购自 TaKaRa;内切酶 *Asc* I、热敏磷酸酶、Phusion® 超保真 DNA 聚合酶购自 NEB; *Taq* DNA Polymerase Mix Kit 购自广州东盛生物科技有限公司;DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒 E. Z. N. A™ Gel Extraction Kit、PCR 产物回收试剂盒 E. Z. N. A™ Cycle Pure Kit、普通质粒小提试剂盒 E. Z. N. A™ Mini Plasmid Kit、无内毒素质粒小提试剂盒 E. Z. N. A™ Endo-Free Mini Plasmid Kit II、E. Z. N. A.® Tissue DNA Kit 均购自 Omega 公司。

转染试剂 lipofectimine LTX 和筛选药物 G418 为 Invitrogen 产品;FBS、DMEM、OPTI-MEM、PBS、胰酶、DMSO、双抗等为 GBICO 产品。

一抗 Mouse mAb anti-GFP antibody 和二抗 Anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated IgG 购自艾比玛特生物医药(上海)有限公司;化学发光试剂盒 ECL 购自碧云天生物技术研究所;PVDF 膜购自 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 猪胎儿成纤维细胞的分离培养 无菌条件下取出 35 日龄猪胎儿,放入含有双抗的 PBS 中,剪去头、尾、四肢,并去除内脏,剩余组织转移至新的培养皿中,加适量培养液,用眼科剪将组织剪成 1 mm³ 的小块。将剪碎的组织块转移至培养瓶,均匀平铺分布,加入少量含 20% FBS 的 DMEM,小心翻转培养瓶使有组织块的一面朝上,置于 39 °C、饱和湿度、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,6~8 h 后翻转培养瓶,让培养液浸润组织块,继续培养,每隔 2~3 d 换液 1 次。待细胞从组织块中生长出来,汇合率达到 80% 以上时进行传代或者冻存备用。

1.2.2 目的载体 pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP 的构建 为了便于稳定转染目的载体细胞系的筛选,本研究采用自剪切序列 2A 序列作为连接肽,以期在细胞中共表达 NEO 和 EGFP 2 个筛选基因并形成 2 个独立的蛋白。首先,分别以质粒 pcDNA3.1(+) 和 pT2AL200R175-CAGGS-EGFP 为模板,扩增筛选基因 NEO(去终止密码子)和 EGFP 2 个片段,根据重叠 PCR(SOE-

PCR)的原理,利用 T2A 序列将 2 个基因片段串联到一起,并通过 *EcoR* I 和 *Xba* I 2 个酶切位点与经相同酶切处理的载体 pcDNA3.1(+) 相连,构建中间载体 pcDNA-NEO-T2A-EGFP。其次,利用 *Cla* I 和 *Bgl* II 位点从中间载体 pcDNA-NEO-T2A-EGFP 中获得筛选片段 NEO-T2A-EGFP;同时将腮腺特异性表达载体 pPSP-CMV-NEO 中的 NEO 片段切除并将载体环化。接着,将筛选片段 NEO-T2A-EGFP 和去除 NEO 片段的腮腺特异性表达载体相连,构建

成 pPSP-CMV-NEO-T2A-EGFP。最后,从本实验室前期构建的克隆载体 pGEM-T-SP-EGX-2A-BGL1 上扩增纤维素酶相关基因的融合序列 SP-EGX-F2A-BGL1,通过 *Asc* I 酶切位点与带双筛选标记基因的表达载体 pPSP-CMV-NEO-T2A-EGFP 连接,构建成 pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP。所有载体构建过程均经 PCR、酶切和测序进行验证。所用到的引物如表 1 所示。

表 1 载体构建及检测所用引物

Table 1 Primers used for vectors construction and detection

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	备注 Note
EcoR I-NEO-1	ACGGAATTCGCCACCATGGGATCGGCCATTGAAAC	划线处为 <i>EcoR</i> I 酶切位点
NEO-T2A-2	CTCGACGTCACCGCATGT TAGCAGACTTCCTCTGCCCTCGAAGAA CTCGTCAAGAAGG	阴影为重叠部分
T2A-EGFP-3	ACATGCGGTGACGTCGAG GAGAATCCTGGCCCAATGGTGAGC AAGGGCGAGGAGCTGTT	阴影为重叠部分
EGFP-Xba I-4	CGGCTCTAGACTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG AGTGATCCC	划线处为 <i>Xba</i> I 酶切位点
SP0	ATATGGCGCGCCATGTTTCAAC	划线处为 <i>Asc</i> I 酶切位点
BG1	GATGAATTGGCCTACTCCCCTC	
BG2	TATAGGCGCGCCTTAGTGAACAGTAGGCAG	划线处为 <i>Asc</i> I 酶切位点
EGX1	ATGCCCTCTGGTGCTGCTGGTG	
EGX2	GCTAACATTAATGTTGACGG	
pcDNA3.1-F	GTGTACGGTGGGAGGTCT	
pcDNA3.1-R	GGAAAGGACAGTGGGAGTG	

1.2.3 细胞转染条件的优化 将继代培养的猪胎儿成纤维细胞接种于 24 孔培养板,通过对质粒和

脂质体的比例(表 2)进行优化,确定质粒转染细胞的最佳条件。每组 2 个平行。

表 2 转染质粒和脂质体比例的优化

Table 2 The proportion of plasmid DNA and liposome for transfection

项目 Item	比例 Proportion											
	1:0.5	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:0.5	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
质粒/ μg Plasmid	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	4	2	1	0.66	0.5	0.4
脂质体/ μL Liposome	0.4	0.8	1.6	2.4	3.2	4.0	2	2	2	2	2	2

1.2.4 细胞对 G418 的敏感性检测 将猪胎儿成纤维细胞正常接种于 24 孔细胞培养板,分别添加终浓度为 100、200、300、400、500、600、700 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 G418,每 2~3 d 换液 1 次,培养 2 周,以第 14 天时细胞完全死亡的 G418 浓度为筛选的最适浓度。每个浓度做 2 个平行对照。

1.2.5 稳定转染目的载体细胞系的筛选 鉴定

为阳性的重组载体菌液扩大培养,抽提无内毒素质粒,通过 *Not* I 和 *Xho* I 2 个位点进行线性化,以优化的转染条件转染猪胎儿成纤维细胞。转染后 48 h,将细胞消化下来,按 1:10 的比例接种至 96 孔板中,加入含有 G418(终浓度为 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的完全培养基进行抗性筛选,每 3 d 换液 1 次,连续筛选 3 周,并以非转染细胞做为对照。同时,利用荧

光显微镜进行荧光观察筛选。3 周后,阳性细胞克隆出现,改用含浓度为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ G418 的完全培养基进行维持培养。待阳性克隆长满 96 孔板的 1 个孔后,按照 1 : 3 进行传代,亚克隆至 24 孔板。阳性细胞扩大培养后,进行检测并冻存储用。

1.2.6 稳定转染目的载体细胞系的 PCR 鉴定

阳性细胞扩大培养后提取基因组 DNA,分别利用表 1 中的引物对 SP0 和 BG2 扩增全长融合基因 SP-EGX-F2A-BGL1,用引物对 BG1 和 BG2 扩增基因 BGL1,用引物对 EGX1 和 EGX2 扩增 EGX。同时,以非转染细胞基因组 DNA 作为阴性对照,目的载体作为阳性对照。结果通过琼脂糖凝胶电泳进行检测分析。

1.2.7 Western blot 检测

收集阳性细胞裂解产物,用 Western blot 检测标记中 2A 序列的切割效率。蛋白样品经 10% SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜,再用 5% 的脱脂奶粉进行封闭,随后进行一抗(anti-GFP)和二抗的孵育,最后根据化学发光试剂盒说明书进行化学发光反应,并通过预冷的 CCD 相机对信号进行捕获和拍照。

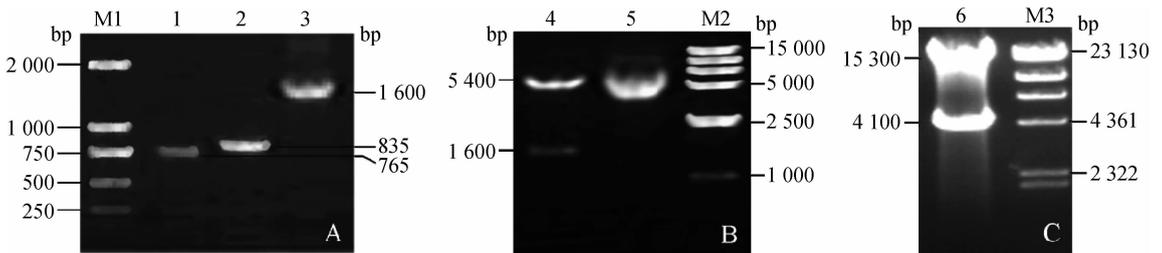
2 结果

2.1 猪胎儿成纤维细胞的分离培养

采用组织块培养法分离培养猪胎儿成纤维细胞,组织块贴壁后 3 d 左右,开始有细胞从组织块中游出,之后细胞逐渐增多并趋于汇合。待细胞汇合率达到 80% 左右时进行传代或冻存。原代培养细胞呈三角形、梭形、菱形等多种形状,体积较小,传代 2~3 次后获得纯度较高的成纤维细胞系。

2.2 目的载体 pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP 的构建

通过 SOE-PCR 方法获得 1 600 bp 的双筛选基因片段 NEO-T2A-EGFP(图 1A),与 pcDNA3.0 (+)连接,获得中间载体 pcDNA-NEO-T2A-EGFP(图 1B),筛选片段和目的基因连入特异性表达载体后构建成完整的目的载体 pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP(图 1C)。经 PCR 筛选、酶切鉴定并测序分析,连入的各个片段序列无变异,阅读框正确(图 2),可用于下游的分析工作。



A. SOE-PCR 扩增标记基因序列 NEO-T2A-EGFP; B. 中间载体 pcDNA-NEO-T2A-EGFP 双酶切鉴定; C. 目的载体 pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP 双酶切鉴定。M1. DNA 相对分子质量标准 DL2000; 1. T2A-EGFP 片段; 2. NEO-T2A 片段; 3. NEO-T2A-EGFP 片段; 4. pcDNA-NEO-T2A-EGFP 双酶切产物; 5. pcDNA3.0 (+) 双酶切产物; M2. DNA 相对分子质量标准 DL15000; 6. pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP 双酶切产物; M3. DNA 相对分子质量标准 λ -Hind III digest DNA marker

A. SOE-PCR product of NEO-T2A-EGFP; B. Identification of recombinant pcDNA-NEO-T2A-EGFP by double enzymes digestion analysis; C. Identification of vector pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP by double enzymes digestion analysis. M1. DNA marker DL2000; 1. Product of T2A-EGFP; 2. Product of NEO-T2A; 3. Product of NEO-T2A-EGFP; 4. Double enzymes digestion of pcDNA-NEO-T2A-EGFP; 5. Double enzymes digestion of pcDNA3.0(+); M2. DNA marker DL15000; 6. Double enzymes digestion of pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP; M3. λ -Hind III digest DNA marker

图 1 目的载体 pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP 的构建

Fig. 1 Construction of pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP

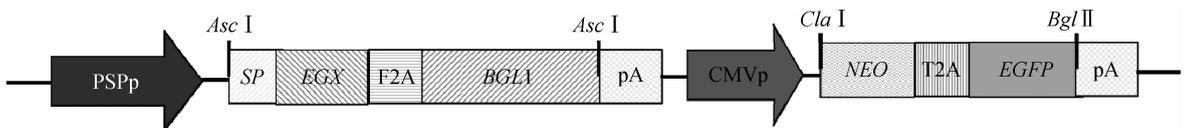


图 2 用于稳定转染的载体 pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP 图谱

Fig. 2 Map of the vector pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP for transfection

2.3 细胞转染条件的优化

通过对 *EGFP* 在细胞中表达情况的观察分析,结果表明,在质粒用量相同的条件下($0.8 \mu\text{g}$),随着脂质体用量的增加转染效率提高;当脂质体用量为 $1.6 \mu\text{L}$ 时,转染效率最高;之后,随着脂质体的增加转染效率有所增加,但细胞死亡比例明显升高,导致存活的转染细胞数目降低。在脂质体用量相同的条件下($2 \mu\text{L}$),随着质粒用量的增加转染效率明显提高;当质粒用量大于 $1 \mu\text{g}$ 时,转染后细胞死亡现象严重。由此可知,脂质体和质粒的比例为 2:1 时进行转染(24 孔板中用量为 $2 \mu\text{L}$ 和 $1 \mu\text{g}$),可获得较高的转染效率,为最优转染比例,可用于下游的转染试验。

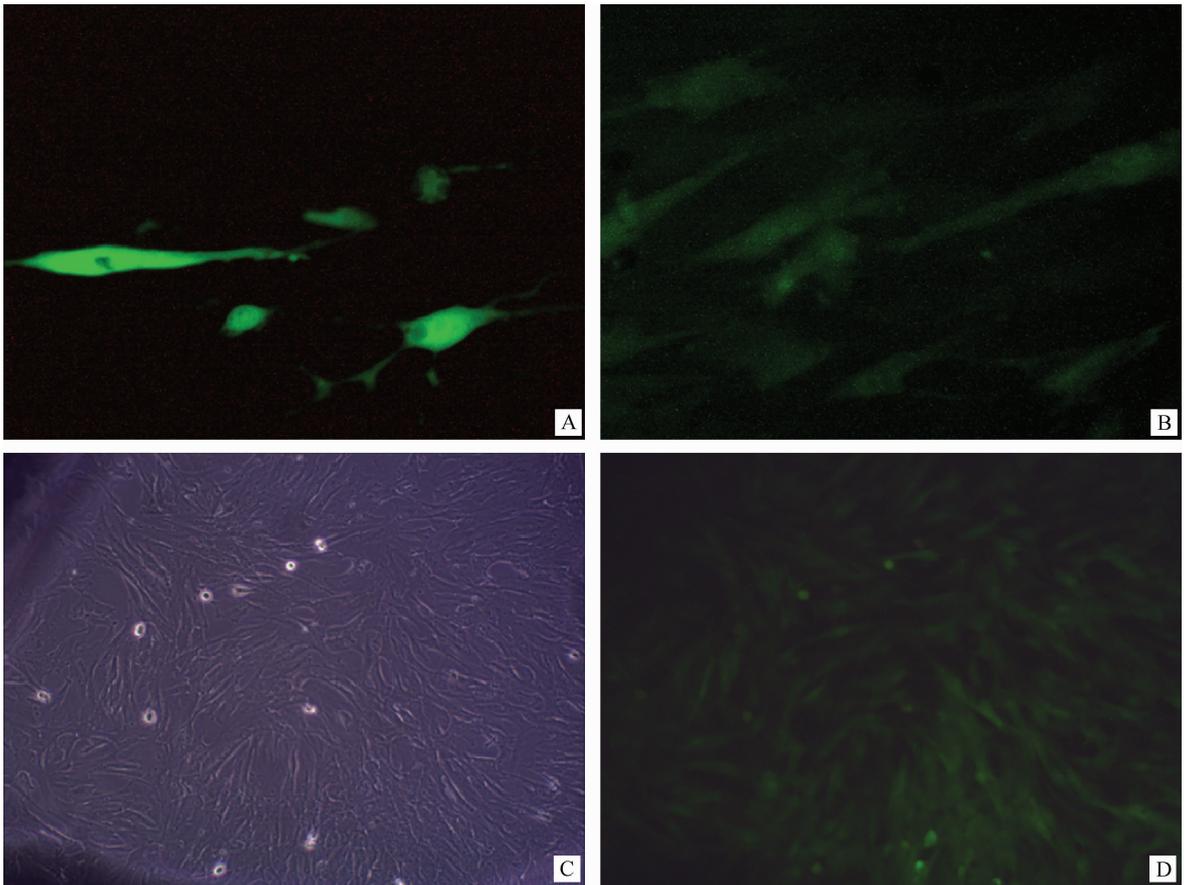
2.4 细胞对 G418 敏感性检测

经过 2 周的 G418 浓度梯度的筛选,确定 G418 对猪胎儿成纤维细胞的最小致死浓度为 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此,采用该浓度进行转基因细胞系的稳定筛选,并

以半致死浓度($200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为维持浓度进行稳定转染细胞系的维持培养。

2.5 稳定转染目的载体细胞系的筛选

以优化的转染条件进行细胞转染,24 h 后转染细胞可见明亮的绿色荧光(图 3A)。48 h 后,以终浓度为 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 G418 进行药物抗性筛选,2 周之后,对照组细胞全部死亡,而试验组细胞也有相当数量的细胞死亡。转染后 3 周左右,出现 G418 抗性细胞克隆,在荧光镜下检测,细胞发出绿色荧光(图 3B)。将阳性克隆扩大培养,并以终浓度为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 G418 进行抗性维持,最终获得稳定转染纤维素酶相关基因的转基因猪胎儿成纤维细胞系(图 3C 和 3D)。另外,在阳性细胞稳定筛选过程中,绿色荧光强度比瞬时表达时的荧光强度有所减弱,可能是因为外源基因受到宿主细胞表观遗传修饰所造成的。



A. 转染后 24 h 细胞(200 \times); B. G418 筛选 3 周后细胞(200 \times); C. 明视野下稳定转染的细胞(100 \times); D. 蓝色荧光下稳定转染的细胞(100 \times)

A. 24 h after transfection (200 \times); B. 3 weeks after selection by G418 (200 \times); C. Stably transfected cells under bright light (100 \times); D. Stably transfected cells under blue fluorescence (100 \times)

图 3 筛选基因 *EGFP* 在转染细胞中的表达

Fig. 3 Expression of marker gene *EGFP* in transfected cells

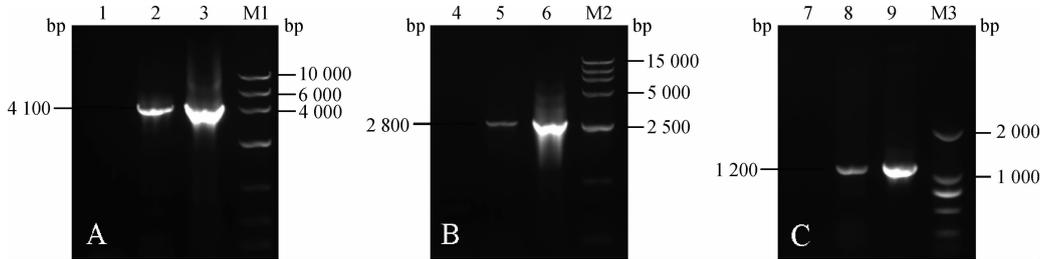
2.6 稳定转染目的载体细胞系的 PCR 检测

提取经稳定筛选的细胞系基因组 DNA, 通过 PCR 分别扩增目的基因片段 SP-EGX-F2A-BGL1、BGL1 和 EGX, 从琼脂糖凝胶电泳检测图可见, 阳性细胞基因组中能够分别扩增出 4 100、2 800 和 1 200 bp 的目的片段(图 4), 说明目的外源基因已经整合到宿主细胞基因组中。

2.7 2A 序列切割效率的 Western blot 检测

为了进一步检测筛选标记中自剪切序列 2A 序

列的切割效率, 本试验收集细胞裂解总蛋白, 用 Mouse mAb anti-GFP antibody 作为一抗进行 Western blot 检测, 结果显示, 在 27 ku 处出现了单一的目的蛋白条带, 并无多聚蛋白 NEO-T2A-EGFP 信号的存在(EGFP 蛋白大小约 27 ku, 2A 多肽大小约 2 ku, NEO 蛋白约 34 ku), 说明本试验中采用的 T2A 序列具有很高的自我切割效率, 适合用于单启动子多基因共表达系统的研究中(图 5)。

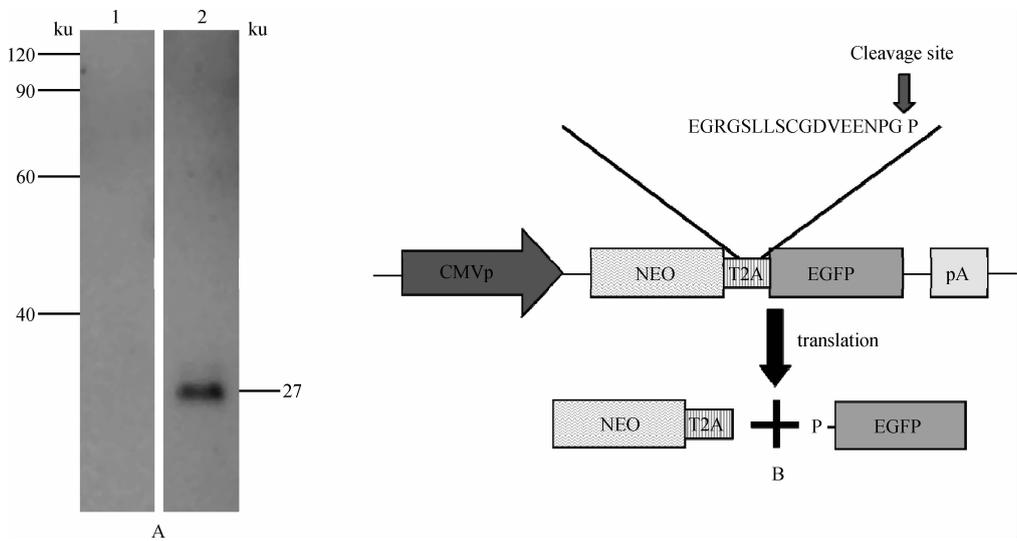


A. PCR 扩增 SP-EGX-F2A-BGL1 片段; B. PCR 扩增 BGL1; C. PCR 扩增 EGX。1, 4 和 7. 以非转染细胞为模板的阴性对照; 2, 5 和 8. 以阳性细胞为模板分别扩增全长融合基因 SP-EGX-F2A-BGL1 以及独立的 BGL1 和 EGX; 3, 6 和 9. 以质粒 pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP 为模板的阳性对照; M1. DNA 相对分子质量标准 DS10000; M2. DNA 相对分子质量标准 DL15000; M3. DNA 相对分子质量标准 DL2000

A. PCR product of SP-EGX-F2A-BGL1; B. PCR product of BGL1; C. PCR product of EGX。1, 4 and 7. Negative control using non-transfected cells as templates; 2, 5 and 8. PCR products of SP-EGX-F2A-BGL1, BGL1 and EGX using stably transfected cells as templates; 3, 6 and 9. Positive control using plasmid pPSP-SP-EGX-F2A-BGL1-CMV-NEO-T2A-EGFP as templates; M1. DNA marker DS10000; M2. DNA marker DL15000; M3. DNA marker DL2000

图 4 稳定转染细胞系的 PCR 检测

Fig. 4 Identification of stably transfected cell line by PCR analysis



A. 多聚蛋白 NEO-T2A-EGFP 在 T2A 处的完全切割; B. 2A 序列介导的多聚蛋白 NEO-T2A-EGFP 自剪切示意图。1. 非转染细胞阴性对照; 2. 稳定转染细胞

A. Complete cleavage at T2A site was determined by Western blot; B. Schematic diagram of 2A peptide-mediated cleavages of polyprotein NEO-T2A-EGFP。1. Negative control using non-transfected cells; 2. Transfected cells

图 5 2A 序列体外切割效率的 Western blot 检测

Fig. 5 Western blot analysis of cleavage efficiency of 2A peptide in vitro

3 讨 论

如何较快地获得转基因阳性细胞系已成为转基因克隆动物研究的关键技术之一,质粒的导入方法和稳定细胞系的筛选方法是其中 2 个最重要的方面。

阳离子脂质体以其操作简单而被广泛用于介导外源基因进入宿主细胞中。然而,质粒 DNA 浓度、脂质体浓度、DNA 与脂质体的比例、DNA-脂质体复合物的孵育时间以及转染时有无血清等均对转染效率有一定的影响。因此,优化各种条件,提高转染效率已成为获得转基因细胞系的前提条件。有研究报道,质粒 DNA 的大小影响 DNA 的转移效率和细胞的转染效率^[9-10]。本研究中所构建的腮腺特异性表达载体,大小接近 20 kb,片段较大导致转染效率较低,严重影响转基因细胞系的稳定筛选。通过对 DNA 与脂质体比例的优化,研究发现,在适当范围内,DNA 与脂质体的比例为 1:2 时(质量/体积),能够获得较高的转染效率;同时,过多的脂质体或者 DNA 反而导致细胞脱落、死亡,降低了转染效率。该结果与大部分文献报道的结果相类似^[11-12]。

抗性筛选和荧光观察是目前筛选细胞最常用的 2 种方法。为了提高转基因细胞系稳定筛选的准确性与可控性,本研究设计在表达载体中同时连入 *NEO* 和 *EGFP* 2 个筛选基因,通过对药物 G418 的抗性和绿色荧光对细胞进行双重筛选,避免了转基因细胞假阳性的出现。通常,协同表达多个基因的方法是利用内部核糖体进入位点(IRES)或者多个启动子,但是这些方法最大的缺点是多个基因之间的表达水平参差不齐,影响了蛋白功能的发挥,其次是片段太大,增加了载体的长度^[13-14]。而在口蹄疫病毒中发现的自剪切序列 2A 多肽,因其短小高效而被广泛应用于基因工程研究中^[15-17]。本研究中,利用 2A 序列将 *NEO* 和 *EGFP* 串联到一起,通过 1 个启动子启动 2 个基因的表达,翻译后形成 2 个独立的蛋白,从 Western blot 检测结果可见,2A 序列具有很高的自我切割活性。虽然,有研究报道 2A 序列介导的多基因共表达系统中,翻译剪切后上游蛋白 C 端携带了 2A 残基,可能会影响蛋白的功能^[18-19],但在本研究中最终获得的细胞系既具有 G418 抗性,又能发出绿色荧光,该结果说明 *NEO* 蛋白末端的 2A 残基并未对其功能造成严重影响。

在筛选稳定转染外源基因细胞系的过程中发现,绿色荧光蛋白荧光强度比瞬时转染时细胞绿色荧光强度有所减弱,这也许是外源 DNA 受到表观遗传修饰的影响造成的。外源基因能否在宿主中有

效表达,涉及到很多方面的问题,表观遗传修饰是其中的重要因素之一。目前研究较多的主要是启动子区的 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化修饰对外源基因表达调控的影响^[20-21],其次是外源基因的表观遗传修饰所导致的基因沉默^[22-26]。表观遗传修饰是可逆的,可以通过化学药物处理来提高外源基因的表达水平。有研究报道,DNA 甲基转移酶抑制剂 5-AZA-dC 和组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 可以通过调控 CMV 启动子区的 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化修饰来提高外源基因在体外培养的转基因猪成纤维细胞中的表达水平,而且 TSA 和 5-AZA-dC 的联合使用可以更有效的提高外源基因的表达^[27-28]。人们将尝试通过化学药物处理来增强 *EGFP* 的表达,以便于后续的研究工作。

单胃动物不能合成相应的消化酶来降解植物性饲料中的结构多糖,使饲料得不到充分利用,营养物质通过粪尿排泄到环境中也对环境造成了一定程度的污染。在饲料中添加酶制剂虽然可以提高饲料利用率,但也增加了饲料的生产成本。通过转基因技术,使动物体自身合成纤维素酶等非淀粉多糖酶,被认为是一种可持续的方法^[29-30]。本研究成功构建了带双筛选标记的腮腺特异性表达纤维素酶的双基因共表达载体,利用 *NEO* 和 *EGFP* 2 个标记基因进行转基因细胞系的筛选,获得稳定转染纤维素酶基因的转基因猪胎儿成纤维细胞系,如果将该细胞系应用于转基因克隆猪的生产,有望在猪腮腺中合成纤维素酶,降解纤维素。

参考文献:

- [1] LYND L R, WEIMER P J, VAN ZYL W H, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66 (3): 506-577.
- [2] SINGH A, HAYASHI K. Microbial cellulases: protein architecture, molecular properties, and biosynthesis [J]. *Adv Appl Microbiol*, 1995, 40: 1-44.
- [3] REESE E T, SIU R G, LEVINSON H S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis [J]. *J Bacteriol*, 1950, 59(4): 485-497.
- [4] JONGBLOED A W, LENIS N P. Environmental concerns about animal manure [J]. *J Anim Sci*, 1998, 76(10): 2641-2648.
- [5] SMITH V H, TILMAN G D, NEKOLA J C. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems [J]. *Environ Pollut*, 1999, 100(1-3): 179-196.

- [6] MALLIN M A, CAHOON L B. Industrialized animal production—A major source of nutrient and microbial pollution to aquatic ecosystems [J]. *Popul Environ*, 2003, 24(5): 369.
- [7] WANG J, DING M, LI Y H, et al. Isolation of a multi-functional endogenous cellulase gene from mollusc, *Ampullaria crosseana* [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2003, 35(10): 941-946.
- [8] DAN S, MARTON I, DEKEL M, et al. Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* beta-glucosidase [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(7): 4973-4980.
- [9] YIN W X, XIANG P, LI Q L. Investigations of the effect of DNA size in transient transfection assay using dual luciferase system [J]. *Anal Biochem*, 2005, 346(2): 289-294.
- [10] PATRICK K, BEATRICE C, RAVI R, et al. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(19): 3792-3798.
- [11] 关伟军, 刘长青, 娜日苏, 等. 6种荧光蛋白基因在蒙古羊成纤维细胞中的表达[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(11): 1141-1148.
- [12] TSENG W C, HASLTON F R, GIORGIO T D. Mitosis enhance transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 5(1): 53-64.
- [13] JOSTOCK T, DRAGIC Z, FANG J, et al. Combination of the 2A/furin technology with an animal component free cell line development platform process [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(4): 1517-1524.
- [14] KIM J H, LEE S R, LI L H, et al. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(4): e18556.
- [15] DENG W, YANG D, ZHAO B, et al. Use of the 2A peptide for generation of multi-transgenic pigs through a single round of nuclear transfer [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(5): e19986.
- [16] TRICHAS G, BEGBIE J, SRINIVAS S. Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice [J]. *BMC Biol*, 2008, 6: 40.
- [17] FURLER S, PATERNA J C, WEIBEL M, et al. Recombinant AAV vectors containing the foot and mouth disease virus 2A sequence confer efficient bicistronic gene expression in cultured cells and rat substantia nigra neurons [J]. *Gene Ther*, 2001, 8(11): 864-873.
- [18] LENGLER J, HOLZMÜLLER H, SALMONS B, et al. FMDV-2A sequence and protein arrangement contribute to functionality of CYP2B1-reporter fusion protein [J]. *Anal Biochem*, 2005, 343(1): 116-124.
- [19] HASEGAWA K, COWAN A B, NAKASTUJI N, et al. Efficient multicistronic expression of a transgene in human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(7): 1707-1712.
- [20] KONG Q, WU M, HUAN Y, et al. Transgene expression is associated with copy number and cytomegalovirus promoter methylation in transgenic pigs [J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(8): e6679.
- [21] BROOKS A R, HARKINS R N, WANG P, et al. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle [J]. *J Gene Med*, 2004, 6(4): 395-404.
- [22] MUTSKOV V, FELSENFELD G. Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9 [J]. *EMBO J*, 2004, 23(1): 138-149.
- [23] MATZKE M A, METTE M F, MATZKE A J. Transgene silencing by the host genome defense; implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 43(2-3): 401-415.
- [24] Morel J B, MOURRAIN P, BECLIN C, et al. DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis* [J]. *Curr Biol*, 2000, 10(24): 1591-1594.
- [25] BABINGER P, KOBL I, MAGES W, et al. A link between DNA methylation and epigenetic silencing in transgenic *Volvox carteri* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(6): 1261-1271.
- [26] CALERO-NIETO F J, BERT A G, COCKERILL P N. Transcription-dependent silencing of inducible convergent transgenes in transgenic mice [J]. *Epigenet Chromatin*, 2010, 3(1): 3.
- [27] KONG Q, WU M, WANG Z, et al. Effect of trichostatin A and 5-Aza-2'-deoxycytidine on transgene reactivation and epigenetic modification in transgenic pig fibroblast cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 355(1-2): 157-165.
- [28] 孔庆然, 朱江, 黄波, 等. TSA促进转基因猪体细胞核移植胚胎发育和外源基因表达[J]. 遗传, 2011(7): 89-96.
- [29] FONTES C M, ALI S, GILBERT H J, et al. Bacterial xylanase expression in mammalian cells and transgenic mice [J]. *J Biotechnol*, 1999, 72(1-2): 95-101.
- [30] ZHANG J X, MEIDINGER R, FORSBERG C W, et al. Expression and processing of a bacterial endoglycanase in transgenic mice [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 367(2): 317-321.