

# 溶葡萄球菌素基因乳腺特异表达载体的构建与检测及转基因核供体细胞的制备

上官陶<sup>1</sup>, 张勃伟<sup>1</sup>, 孙薇薇<sup>2</sup>, 黄欣<sup>1</sup>, 张涌<sup>1, 2\*</sup>

(1. 西北农林科技大学生物工程研究所, 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学动医学院, 杨凌 712100)

**摘要:** 本研究旨在构建溶葡萄球菌素基因牛乳腺特异表达载体(pEPB), 转染牛胎儿成纤维细胞, 为制备溶葡萄球菌素基因的转基因克隆牛提供核供体细胞。本研究以 pEGFP-C1 为载体骨架, 通过 PCR 扩增牛 2.6 kb 的  $\beta$ -酪蛋白 5' 调控区及 0.6 kb 的 3' 侧翼区 (poly A) 序列作为调控序列, 制备成含有绿色荧光和新霉素筛选标记的牛乳腺特异表达载体, 经 PCR 和酶切鉴定正确后, 用转染试剂 FuGene HD 反复转染牛 pEPB 乳腺上皮细胞 3~5 次, 用催乳素诱导后, 经免疫荧光分析, 检测目的蛋白的表达。然后, 用电转染法转染牛胎儿成纤维细胞, 经 G418 筛选得到阳性细胞后, 把阳性细胞扩大培养并提取其基因组, 因为溶葡萄球菌素基因是外源基因, 经 PCR 及 Southern blot 检测来确定目的基因是否已经整合到细胞的基因组上。结果表明, 溶葡萄球菌素基因在牛乳腺细胞中得到了表达, 并整合到牛胎儿成纤维细胞的基因组中, 得到了转溶葡萄球菌素基因的核供体细胞。结果显示, 本研究所获得的转基因牛胎儿成纤维细胞可作为体细胞核移植的供体细胞进行转基因克隆牛研究。

**关键词:** 溶葡萄球菌素基因; 乳腺特异表达; 牛乳腺上皮细胞; 牛胎儿成纤维细胞; 转基因核供体细胞

中图分类号: S813.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)10-1374-06

## Construction of Lysostaphin Mammary-specific Expression Vector and Transfection of Somatic Cells to Provide Transgenic Donor Cell for SCNT

SHANGGUAN Tao<sup>1</sup>, ZHANG Bo-wei<sup>1</sup>, SUN Wei-wei<sup>2</sup>, HUANG Xin<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>1, 2\*</sup>

(1. Institute of Biological Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, China;

2. College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** The purpose of this study was to prepare lysostaphin transgenic donor cells for somatic cell nuclear transfer by constructing mammary-specific expression vector and transfecting bovine fetal fibroblasts. In this study, pEGFP-C1 was used as the vector backbone, 2.6 kb 5' regulatory region of and 0.6 kb 3' flanking region of bovine  $\beta$ -casein were used as regulatory regions, the mammary gland-specific expression vector pEPB was constructed, which included neomycin resistant gene and EGFP reporter gene. After identified by PCR and restrictive enzyme digestion, the pEPB was transfected into the bovine mammary epithelial cells through FuGene HD for 3-5 times, the transgenic cells were detected by immunofluorescence analysis after induced by prolactin ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). And then, the plasmid pEPB was transfected into the bovine fetal fibroblast cells by electroporation, positive cells were screened by G418 selection and determined by PCR and Southern blot. The results showed that the lysostaphin gene was expressed in bovine mammary gland epithelial cells and integrated into bovine fetal fibroblasts genome. The results indicate that the lysostaphin transgenic fibroblast cells obtained may be competent for bovine transgenic cloning.

**Key words:** lysostaphin gene; mammary-specific expression; bovine mammary epithelial cells;

收稿日期: 2010-11-16

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项“抗病转基因新品种培育”(2008ZX08007)

作者简介: 上官陶(1986-), 男, 硕士, 山西翼城人, 主要从事动物克隆与转基因技术方面的研究, E-mail: shangtaott@126.com

\* 通讯作者: 张涌(1956-), 教授, E-mail: shgs2002@126.com

bovine fetal fibroblasts; transgenic nuclear donor cells

乳房炎是影响奶牛业发展的主要疾病之一<sup>[1]</sup>,给奶牛业带来了巨大的经济损失,乳房炎多数是由病原微生物引起的,葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是引起奶牛乳房炎的主要致病菌之一。目前,治疗奶牛乳房炎主要以抗生素治疗为主,但长期使用抗生素会使细菌产生耐药性,使药物的抗菌能力下降甚至失效,所以寻求一种新的,有效的治疗乳房炎的药物迫在眉睫<sup>[2-5]</sup>。

溶葡萄球菌素(Lysostaphin)最早是由 Schindler 等人于 1964 年从模仿葡萄球菌 *Staphylococcus simulans* NRRLB-2628 株的培养物中发现并分离的一种含有  $Zn^{2+}$  的金属蛋白酶,属肽酶家族 M23,具有内切酶活性,能够特异性裂解金黄色葡萄球菌细胞壁肽聚糖的“五肽甘酰胺”(水解第 2 与第 3 个甘氨酸形成的肽键)而杀灭金黄色葡萄球菌且不易产生耐药性,已经成为治疗葡萄球菌属细菌引发感染的特效药物<sup>[6-7]</sup>。因此,通过转基因技术使具有抑菌活性的溶葡萄球菌素基因在奶牛乳腺组织中特异表达,既是一种有效的提高奶牛预防乳房炎的方法,也是一种培育转抗病基因新品种的有效策略<sup>[8]</sup>。

本研究以 pEGFP-C1 为载体骨架,以牛  $\beta$ -酪蛋白的部分序列作为牛乳腺特异启动子,构建了含有溶葡萄球菌素基因,以绿色荧光及新霉素作为筛选标记的牛乳腺特异表达载体(pEPB),转染牛乳腺上皮细胞和胎儿成纤维细胞后,经 G418 筛选,得到转溶葡萄球菌素基因的牛胎儿成纤维细胞,经过 PCR、免疫荧光和 Southern blot 分析得到了转溶葡

萄球菌素基因的核供体细胞,为通过体细胞核移植技术制备转抗病基因新品种做了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 试验试剂 *Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司, G418、DMEM 培养基、DMEM/F12 培养基、胎牛血清、催乳素、电转液均购自 Gibco 公司, FuGene HD 细胞转染试剂购自 Roche 公司,细胞培养板和培养皿为 Corning 公司产品,溶葡萄球菌素基因的成熟肽序列由 TaKaRa 公司合成,免疫荧光分析抗体稀释液、封闭液均为天根生物技术有限公司产品;质粒提取试剂盒、细胞基因组提取试剂盒、凝胶电泳回收试剂盒购自上海生工生物技术有限公司。

1.1.2 细胞和菌株的来源 试验中用到的牛胎儿成纤维细胞和牛乳腺上皮细胞、DH5 $\alpha$  菌株等均由实验室保存。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 特异表达载体 pEPB 的构建、检测与纯化

溶葡萄球菌素基因牛乳腺特异表达载体 pEPB 是以 pEGFP-C1 为骨架,从本实验室保存的含有牛  $\beta$ -酪蛋白基因全序列(NCBI 登陆序列号: X14711)的载体中经 PCR 扩增获得牛  $\beta$ -乳球蛋白的 5'端启动子和非翻译区(包括第一外显子和第一内含子部分序列)和 3'端非翻译区。试验中用到的引物见表 1。

表 1 试验中用到的引物

Table 1 Primers used in the study

引物名称 Name of primers	引物序列(5'-3') Sequence	引物长度/bp Length	限制性内切酶 Restrict enzyme	扩增片段 Segments amplified
上游正义链	GCCTCGAGTGAGAAAAGGAAATGTTGAATGG	32	<i>Xho</i> I	$\beta$ -酪蛋白 5'端调控区
上游反义链	GCGGATCCGGTACCATGCGCTAATGTTATCTCCCCTTTG	38	<i>Bam</i> H I, <i>Acc</i> 65 I	
下游正义链	GCGGTACCAATGATTCCAAGTAAGCCGATG	30	<i>Acc</i> 65I	$\beta$ -酪蛋白 3'端调控区
下游反义链	CGACGCGTTCCAATTTTAATTTTCCACAGC	30	<i>Mlu</i> I	
正义链	GGGATCCATGGCGACCGGTCCCACACC	28	<i>Bam</i> H I	人生长激素信号
反义链	GGGATCCTCACTTTATAGTTCCCCAAAGAAC- ACCTAAAGTATG	42	<i>Bam</i> H I	肽加溶葡萄球菌素 基因成熟肽序列
探针 1	TGGTCAAATAATCGGTTGGTCTG	23	-	Southern blot 探针
探针 2	CCAAACATGACCGTCTTGTTC	23	-	

PCR 总体系为 25  $\mu\text{L}$ : 10 $\times$ LA PCR buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP 混合物(2.5 mol  $\cdot$  L $^{-1}$ ) 4  $\mu\text{L}$ , LA Taq 聚合酶 0.3  $\mu\text{L}$ , 引物(10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各 2  $\mu\text{L}$ , 模板 1  $\mu\text{L}$ , ddH $_2$ O 13.2  $\mu\text{L}$ 。反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  2.5 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。用以指导溶葡萄球菌素基因在牛乳腺细胞中表达。以溶葡萄球菌素基因成熟肽前端加入人生长激素信号肽的序列作为目的基因进行 PCR 扩增, PCR 总体系为 25  $\mu\text{L}$ : 10 $\times$ pfu PCR buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP 混合物(2.5 mol  $\cdot$  L $^{-1}$ ) 4  $\mu\text{L}$ , pfu Taq 聚合酶 0.3  $\mu\text{L}$ , 引物(10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各 2  $\mu\text{L}$ , 模板 1  $\mu\text{L}$ , ddH $_2$ O 13.2  $\mu\text{L}$ 。反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 65  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  2.5 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。

将 PCR 产物克隆到 pMD19-T 中, 通过连接, 并转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌后, 挑取单克隆细菌扩大培养, 将 1 mL 菌液送华大基因测序, 将测序正确菌液进行质粒提取。提取的质粒经限制性内切酶酶切, 聚丙烯酰胺凝胶回收和 T4 连接酶连接, 构建成溶葡萄球菌素基因的牛乳腺特异表达载体 pEPB。用 pEPB 转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌, 提取质粒经酶切、PCR 鉴定及再次送华大基因测序正确, 保证无突变后, 选取测序正确的菌液扩大培养, 用去内毒素质粒提取试剂盒提取质粒, 经测定质粒浓度为 1 208.6 ng  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$ , OD $_{260}$ /OD $_{280}$  为 1.807 6, 说明质粒较纯, 可以用于细胞转染。

1.2.2 牛乳腺上皮细胞和牛胎儿成纤维细胞的培养 把实验室冻存的高产奶牛乳腺上皮细胞和牛胎儿成纤维细胞解冻, 从液氮中分别取一管胎牛成纤维细胞和牛乳腺上皮细胞于 38  $^{\circ}\text{C}$  解冻后, 加适量细胞培养液 1 000 r  $\cdot$  min $^{-1}$  离心 5 min, 弃上清, 加 3 mL 新鲜培养液悬浮细胞接种于培养皿中置于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5.0% CO $_2$  浓度的培养箱中培养。当培养皿中细胞密度达到 90% 以上时, 对细胞进行传代培养, 选择细胞浓度达到 80%~90% 的 1~3 代细胞用于转染。

1.2.3 G418 最小致死浓度的测定 因为 pEPB 载体上包含有 G418 抗性基因 *neo*, 所以本研究首先要确定正常细胞 G418 的最小致死浓度, 并将其作为后续试验的筛选浓度。在体外培养的牛胎儿成纤维细胞培养液中加入浓度梯度的 G418, 筛选 1 周后观察, 牛胎儿成纤维细胞的培养液中 G418 的浓度  $\geq 600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 显微镜观察可见细胞全部死亡, 所以 G418 对牛胎儿成纤维细胞的最小致死浓

度确定为 600  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.4 转染牛乳腺上皮细胞 选取细胞生长浓度在 80%~90% 的牛乳腺上皮细胞, 按照 FuGene HD 转染试剂盒操作, 脂质体与质粒的体积质量比为 8 : 2, 用 opti-DMEM 将转染试剂的总体积补至 100  $\mu\text{L}$ , 加入到更换了培养液的细胞培养皿中, 24 h 后, 再用 FuGene HD 转染试剂重复转染, 重复该步骤 3~5 次并更换新的培养基后, 放入 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5.0% CO $_2$  浓度的培养箱中进行培养。

1.2.5 电转染牛胎儿成纤维细胞及单克隆细胞的筛选与扩大培养 选取细胞浓度达到 90% 以上的牛胎儿成纤维细胞, 经胰酶消化, 1 000 r  $\cdot$  min $^{-1}$  离心 3 min 后, 弃上层培养液, 用无血清 opti-DMEM 重悬细胞, 洗涤 2~3 次, 将细胞转移到含有 75% 的电转液和 25% opti-DMEM 的电转杯中, 冰上放置 10 min, 进行电转染, 电转程序为: 960 V, 间隔 99  $\mu\text{s}$ , 电击 10 次。电转后, 电转杯置于冰上 10 min, 把细胞转到已加入新鲜培养液的培养皿中进行培养, 电转染后培养的成纤维细胞在 12~24 h 后, 在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达, 更换培养液, 加入 600  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 G418 进行筛选。1 周后, 当对照组全部死亡, 将 G418 浓度减半继续培养, 用酶消化法挑取单克隆细胞转移到 G418 浓度减半的培养液中继续培养直到细胞铺满皿底, 胰酶消化细胞至不含 G418 的正常培养液中扩大培养。

1.2.6 免疫荧光分析检测溶葡萄球菌素在牛乳腺上皮细胞中的表达 对 FuGene 转染后的牛乳腺上皮细胞进行扩大培养, 在细胞培养液中加入催乳素诱导 24~48 h, 对扩大培养的细胞进行免疫荧光分析, 鉴定目的蛋白的表达情况。

1.2.7 核供体细胞的 PCR 鉴定 提取牛胎儿成纤维单克隆细胞的基因组, 以其为模板进行 PCR, 扩增目的基因, 阴性对照为没有转染的牛胎儿成纤维细胞基因组, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.8 Southern blot 检测目的基因是否整合到阳性细胞的基因组中 提取牛胎儿成纤维单克隆细胞的基因组, 根据目的基因的序列设计探针引物(表 1)。用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶对基因组进行双酶切, 酶切体系为: 总体系 50  $\mu\text{L}$ , *Kpn* I 和 *Bam*H I 各 1  $\mu\text{L}$ , 10~12 h 后各补加 0.5  $\mu\text{L}$ ; 单克隆细胞的基因组 20  $\mu\text{g}$ ; 限制性内切酶 10 $\times$ Buffer 为 5  $\mu\text{L}$ ; 用 ddH $_2$ O 补至 50  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  酶切。没有转染的牛胎儿成纤维细胞基因组为阴性对照, 酶切体

系同上。同时将转染的载体质粒做酶切,用于检测探针是否正确。Southern blot 检测方法按照分子克隆(第二版)和 Roche DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒进行操作。

## 2 结果

### 2.1 牛乳腺特异表达载体的构建、检测与纯化

本试验成功构建了溶葡萄球菌素基因牛乳腺特异表达载体,图 1 显示为载体图谱。经过 *Xho* I 和 *Mlu* I 双酶切及 PCR 鉴定,图 2 显示得到与预期一致的目的条带,证实载体构建成功。

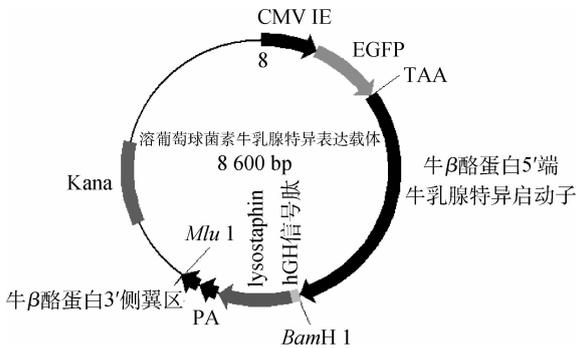
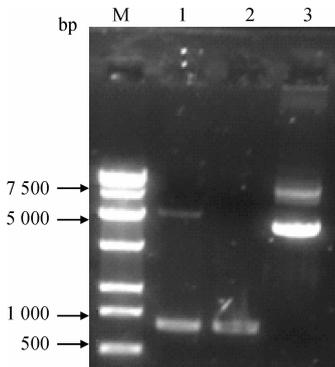


图 1 载体 pEPB 图谱  
Fig. 1 Map of vector pEPB



M. DNA 相对分子质量标准;1. pEPB 载体用 *Xho* I 和 *Mlu* I 双酶切鉴定;2. 以 pEPB 载体为模板的 PCR 鉴定;3. pEPB 质粒

M. DNA ladder; 1. Double digestion of pEPB vector with *Xho* I and *Mlu* I; 2. PCR fragment of lysostaphin; 3. Plasmid of pEPB vector

### 图 2 pEPB 载体的双酶切和 PCR 检测

Fig. 2 Identification of the pEPB vector by double digestion and PCR

### 2.2 细胞转染与筛选

对转染的牛乳腺上皮细胞和胎儿成纤维细胞,

在转染后 12~24 h 观察绿色荧光蛋白的表达情况,可以清楚的看到部分细胞有绿色荧光,图 3 所示为转染后的牛乳腺上皮细胞绿色荧光的表达情况,图 4 显示为牛胎儿成纤维细胞在转染后 12~24 h 的绿色荧光蛋白的表达情况。

对有绿色荧光蛋白表达的细胞更换新的培养液,牛乳腺上皮细胞直接更换不含有 G418 药物的培养液。牛胎儿成纤维细胞的培养液中加入终浓度为  $600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 G418 进行筛选,1 周后,当对照组全部死亡后,将 G418 浓度减半继续培养,至有单克隆细胞样细胞出现,用克隆环和酶消化法挑取单克隆细胞,转移到不含 G418 药物的培养液中继续培养,直到细胞铺满皿底,通过细胞传代继续扩大培养。图 5a、5b 分别显示为扩大培养的阳性单克隆牛胎儿成纤维细胞及绿色荧光蛋白的表达情况。

### 2.3 免疫荧光分析检测溶葡萄球菌素基因在牛乳腺上皮细胞中的表达

取转染后扩大培养的牛乳腺上皮细胞,将细胞培养液中加入催乳素培养 24~48 h 后,经细胞的免疫荧光分析(图 6)表明,溶葡萄球菌素能够在牛乳腺上皮细胞中表达。

### 2.4 单克隆核供体细胞 PCR 鉴定

取转染筛选后扩大培养的有绿色荧光蛋白表达的牛胎儿成纤维细胞,提取细胞基因组 DNA,并以其为模板,以未转染的牛胎儿成纤维细胞基因组作为阴性对照,用 PCR 的方法扩增目的基因,PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,如图 7 所示,获得了与预期结果一致的 850 bp 左右的条带,由于溶葡萄球菌素基因在牛的基因组中是不存在的,因此该 PCR 的结果可以初步说明目的基因已经整合到了牛胎儿成纤维细胞的基因组中。

### 2.5 Southern blot 检测

按照分子克隆(第 2 版)和 Roche DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒的方法对牛胎儿成纤维单克隆细胞基因组、没有转染的牛胎儿成纤维细胞基因组和转染的载体质粒的酶切产物进行 Southern blot 检测,结果如图 8 所示,只有在转染的载体质粒和牛胎儿成纤维单克隆细胞的基因组的泳道中有特异条带,说明 Southern blot 的探针制备是成功的,证明溶葡萄球菌素基因已经整合到了牛胎儿成纤维细胞的基因组中,试验得到的单克隆细胞可以用于后期制备转溶葡萄球菌素基因动物的核供体细胞。

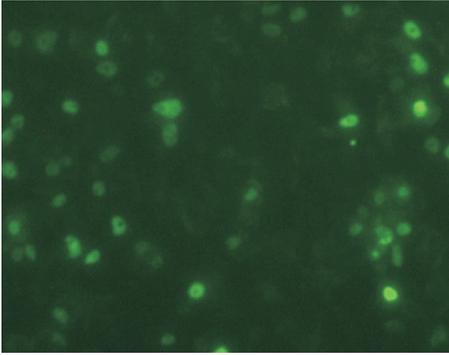


图 3 牛乳腺上皮细胞在转染后绿色荧光的表达(100×)  
Fig. 3 The expression of green fluorescence(EGF) protein of bovine mammary epithelial cells after transfection(100×)

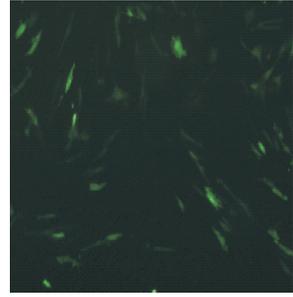
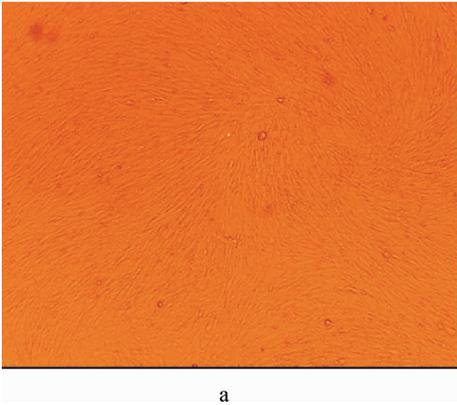
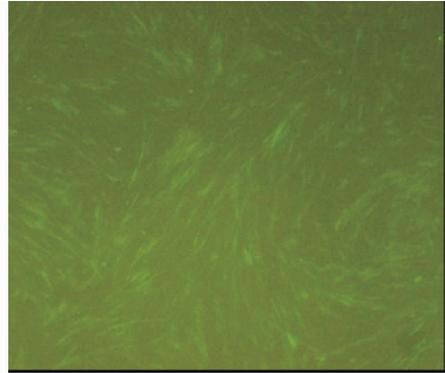


图 4 牛胎儿成纤维细胞在转染后绿色荧光蛋白的表达(100×)  
Fig. 4 The expression of EGF protein of bovine fetal fibroblasts after transfection(100×)



a



b

a. 扩大培养的单克隆细胞; b. 单克隆细胞绿色荧光的表达  
a. Expanded monoclonal cells; b. The EGF expression in monoclonal cells

图 5 扩大培养的单克隆细胞及绿色荧光的表达(100×)  
Fig. 5 Expanded monoclonal cells and the EGF expression in monoclonal cells(100×)

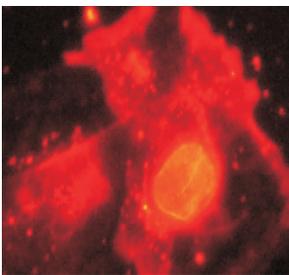
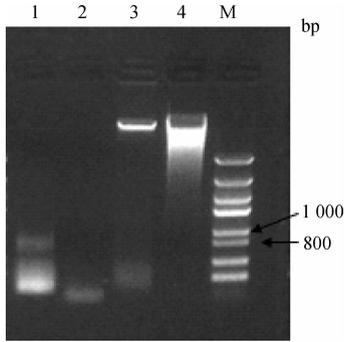


图 6 免疫荧光分析溶葡萄球菌素在阳性乳腺上皮细胞中的表达  
Fig. 6 Immunohistochemical analysis of the expression of lysostaphin in positive mammary epithelial cells (400×)

### 3 讨论

β-酪蛋白是动物乳汁中主要的蛋白质,在泌乳激素的刺激下,该蛋白的基因具有很强的表达活

性,其调控成分能够指导靶基因在乳腺组织中高效表达。已有诸多学者以 β-酪蛋白基因作为乳腺特异启动子制备了相应的转基因动物,并在转基因动物的乳汁中鉴定出具有很高活性的目的蛋白或因子<sup>[9-11]</sup>。本研究使用的 β-酪蛋白乳腺特异启动子包括 β-酪蛋白基因 2.2 kb 的 5' 调控区(含 1.7 kb 的上游调控序列以及 5' 非翻译区中的第一外显子和部分第一内含子)及 0.6 kb 的 3' 端调控区(包含 CSN2 基因最后 1 个内含子的小部分、最后 1 个不翻译的外显子及 150 bp 的侧翼区),3' 调控区主要包含 polyA 加尾信号及控制转录终止的 G/T 簇,这些序列结构对 mRNA 的转录、在细胞质内的稳定性及介导其翻译调控起到重要的作用。该载体中的 β-酪蛋白基因的调控功能已在前人的研究中得到了证实<sup>[12-15]</sup>,因此可以用来调控外源基因的表达。

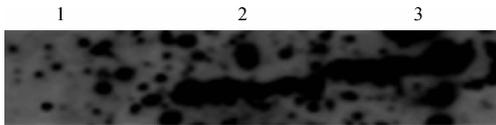


1. 以转基因细胞为模板;2. 以未转染细胞为模板;3. 未转染细胞基因组;4. 转基因细胞的基因组;M. DNA 相对分子质量标准

1. Transgenic cells genome as template; 2. Negative control, non-transgenic cells genome as template; 3. Negative control, non-transgenic cells genome; 4. Transgenic cells genome; M. DNA Ladder

图 7 转基因细胞的 PCR 鉴定

Fig. 7 Identification of transgenic cells by PCR



1. 阴性牛胎儿成纤维细胞基因组的 Southern blot 检测; 2. 载体质粒的 Southern blot 检测;3. 单克隆细胞基因组的 Southern blot 检测

1. Negative control, identification of non-transgenic cells genome by Southern blot; 2. Identification of vector plasmids by Southern blot; 3. Identification of the monoclonal cells genome by Southern blot

图 8 Southern blot 检测

Fig. 8 Identification of the integration of lysostaphin gene in transgenic cells by Southern blot

通过取催乳素诱导后的牛乳腺上皮细胞进行免疫荧光分析(图 6)证实,人生长激素信号肽能够有效的引导目的蛋白分泌到细胞外。通过提取阳性细胞的基因组,并以该基因组为模板,以未转染的牛胎儿成纤维细胞的基因组为阴性对照进行 PCR 及 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析(图 7),初步判断得到了转溶葡萄球菌素基因的阳性细胞。经过对牛胎儿成纤维阳性细胞基因组、没有转染的牛胎儿成纤维细胞基因组和转染的载体质粒的酶切产物进行 Southern blot 检测(图 8)发现,在阳性细胞基因组泳道中得到了特异的条带,与预期结果一致,证明溶葡萄球菌素基因已经整合到了牛胎儿成纤维细胞的基因组中,试验得到的单克隆细胞可以用于后期制备转溶葡萄球菌素基因动物的核供体细胞。

## 4 结 论

本研究成功获得了生长旺盛,形态良好的转溶葡

萄球菌素基因的牛胎儿成纤维细胞作为制备转基因动物的核供体细胞,为制备转抗溶葡萄球菌素基因的动物做了准备。然而,基因表达调控本身的复杂性以及外源基因在动物基因组中整合的随机性和表达的不确定性,溶葡萄球菌素基因将来能否在转基因动物的乳腺组织中正确表达,并有效的发挥其预防奶牛乳房炎发生的作用还需后续试验的进一步研究。

## 参考文献:

- [1] 黄青山,贾敏,吴聪明,等. 重组溶葡萄球菌酶对奶牛乳房炎和子宫内膜炎常见病原菌的体外杀菌试验[J]. 中国兽药杂志,2007,41(8):41-47.
- [2] 孙怀昌,于峰,苏建华,等. 人溶菌酶基因治疗奶牛乳腺炎的初步研究[J]. 畜牧兽医学报,2004,35(2):227-232.
- [3] 杨龙骐,沈永恕,彭义,等. 奶牛乳房炎防治研究进展[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报,2001,21(2):178-181.
- [4] 母安雄,胡松华. 奶牛乳房炎抗生素防治失败原因探讨[J]. 中国兽医杂志,2002,(2):18-20.
- [5] 寨鸿瑞,田甜,朱伟,等. 奶牛乳房炎研究进展[J]. 贵州农业科学,2009,37(8):132-134.
- [6] MICHAEL W, ROBERTO L. Lysostaphin treatment of experimental methicillin-resistant taphylococcus aureus aortic valve endocarditis[J]. AAC,1998,6:1355-1360.
- [7] 杨信怡,游雪甫,蒋建东,等. 溶葡萄球菌酶的抗菌活性研究进展[J]. 中国新药杂志,2005,14(9):1113-1117.
- [8] WALSH S, SHAH A, MOND J. Improved Pharmacokinetics and educed atibody ractivity of Lysostaphin cnjugated to polyethylene glycol[J]. AAC,2003,10:554-558.
- [9] 吴燕,伍素华,罗向东,等. 重组溶葡萄球菌蛋白的原核表达、纯化及生物学活性研究[J]. 第三军医大学学报,2007,29(11):1060-1062.
- [10] RECSEI P, GRUSS A, NOVICK R. Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from Staphylococcus simulans[J]. PANS, 1987,84(5):1127-1131.
- [11] 黄赞,颜景斌,黄纓,等. 山羊β-酪蛋白基因启动子指导的转基因小鼠乳汁高效表达人凝血因子 IX [J]. 遗传学报,2002,29(3):206-211.
- [12] 田甜,寨鸿瑞,陈玉珍,等. 奶牛β-酪蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 贵州农业科学,2009,37(8):129-131.
- [13] 邹贤刚,袁三平,鲜建,等. 转基因克隆奶山羊大量生产重组人的抗凝血酶Ⅲ蛋白质(rhATⅢ)[J]. 生物工程学报,2008,24(1):117-123.
- [14] 马晶晶,王勇胜,何小宁,等. 牛胎儿成纤维细胞β-防御素(hBD3)基因转染及转基因克隆胚制备[J]. 农业生物技术学报,2010,18(4):707-712.
- [15] 曹访,宋成义,吴晗,等. 人乳铁蛋白乳腺特异性表达载体的构建[J]. 安徽农业科学,2008,36(9):3535-3537.