

# 人乳铁蛋白 cDNA 基因乳腺表达载体的构建与鉴定

孟立<sup>1</sup>, 张艳丽<sup>1</sup>, 许欣<sup>1</sup>, 王子玉<sup>1</sup>, 闫益波<sup>1</sup>, 庞训胜<sup>1</sup>, 钟部帅<sup>1</sup>, 黄荣<sup>1</sup>, 宋洋<sup>1</sup>,  
王金玉<sup>2</sup>, 王锋<sup>1</sup>

1 南京农业大学动物胚胎工程技术中心, 南京 210095

2 扬州大学动物科技学院, 扬州 225009

**摘要:** 为了构建人乳铁蛋白基因 (*hLF*) 的乳腺表达载体并验证其在乳腺细胞中的表达情况, 本载体以山羊  $\beta$ -casein 基因上游包括启动子、外显子 1、内含子 1、部分外显子 2 作为 5'端调控序列, 下游包括部分外显子 7、内含子 7、外显子 8、内含子 8、外显子 9 及 3'部分基因组片段作为 3'端调控序列, 长度分别为 6.2 kb 和 7.1 kb, 将 *hLF* 基因 (目的基因) 和 *Neo* 基因 (筛选标记) 分别插入到 5'端调控序列和 3'端调控序列的下游, 构建成 pBC1-hLF-Neo 载体, 其全长为 25.348 kb。为了检测该载体的生物学功能, 用脂质体介导法将其分别导入到山羊乳腺上皮细胞 GMC 和小鼠乳腺癌细胞株 C127 中进行表达验证, 经 G418 抗性筛选 8~10 d, 得到了药物抗性细胞克隆, 经催乳素、胰岛素及氢化可的松诱导培养, 通过 RT-PCR、Western blotting 以及重组 *hLF* 抑菌圈试验表明, 山羊  $\beta$ -casein 基因启动子驱动的 *hLF* 基因能够在 C127 和 GMC 乳腺上皮细胞中转录翻译, 且重组 *hLF* 具有抑制大肠杆菌生长的生物活性, 这为下一步建立稳定整合 *hLF* 基因奶山羊胎儿成纤维细胞系奠定了基础。

**关键词:** *hLF*, pBC1-hLF-Neo, GMC 细胞, C127 细胞, 生物学功能

## Construction and identification of mammary expressional vector for cDNA of human lactoferrin

Li Meng<sup>1</sup>, Yanli Zhang<sup>1</sup>, Xin Xu<sup>1</sup>, Ziyu Wang<sup>1</sup>, Yibo Yan<sup>1</sup>, Xunsheng Pang<sup>1</sup>, Bushuai Zhong<sup>1</sup>,  
Rong Huang<sup>1</sup>, Yang Song<sup>1</sup>, Jinyu Wang<sup>2</sup>, and Feng Wang<sup>1</sup>

1 Center of Animal Embryo Engineering and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2 College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

**Abstract:** The aim of this study was to construct a mammary gland-specific expressional vector pBC1-hLF-Neo for Human Lactoferrin (*hLF*) gene and then investigate its expression in the mammary gland epithelium cells. The constructed vector contained the 6.2 kb long 5' flank regulation region including promoter, other elements and the 7.1 kb long 3' flank regulation region including

**Received:** June 3, 2010; **Accepted:** September 25, 2010

**Supported by:** National Major Special Program of Breeding of Transgenic Organisms New Variety (No. 2008ZX08008-004), The Opening Project of Animal Reproduction and Molecular Design Laboratory of Jiangsu Province (No. YDKT0801).

**Corresponding author:** Feng Wang. Tel: +86-25-84395381; Fax: +86-25-84395314; E-mail: caeet@njau.edu.cn

国家“转基因生物新品种培育”重大专项 (No. 2008ZX08008-004), 江苏省动物繁育与分子设计实验室开放课题 (No. YDKT0801) 资助。

transcriptional ending signal of a goat's  $\beta$ -casein gene. A cassette of *Neo* gene was also inserted into the vector which gave a total length of 26.736 kb identified by restriction fragment analysis and partial DNA sequencing. The results revealed that the structure of the final constructed vector accords with the designed plasmid map. In order to analyze the bioactivity of the vector, we transfected the lined vector DNA into the dairy goat's mammary gland epithelium cells and C127 cells of a mouse's mammary epithelium by Lipofectamine. After selection with G418 for 8–10 days, G418-resistant clones were obtained. PCR analysis demonstrated that *hLF* gene cassette had been integrated into the genomic DNA of G418-resistant clones. After proliferation culture, the two kinds of transgenic cells were cultured in serum-free DMEM-F12 medium with prolactin, insulin and hydrocortisone- a medium capable of inducing recombinant hLF expression. RT-PCR, Western blotting and anti-bacteria bioactivity experiments demonstrated that the constructed mammary gland specific vector pBC1-hLF-Neo possessed the desirable bioactivity to efficiently express and could secrete hLF in both mammary gland cells and have the effect of *E. coli* proliferation inhibition. Paramount to everything, this study laid a firm foundation for preparing the *hLF* gene transgenic goat fetal-derived fibroblast cells.

**Keywords:** human lactoferrin, pBC1-hLF-Neo, GMC cells, C127 cells, biological function

人乳铁蛋白是一种具有高级空间结构的糖蛋白<sup>[1]</sup>, 具有广泛的生物学作用。大量体内外试验表明: hLF 不仅在肠道铁离子<sup>[2]</sup>的吸收以及抵抗细菌<sup>[3]</sup>、病毒<sup>[4]</sup>、真菌、单细胞生物<sup>[5]</sup>等方面发挥重要作用, 而且在调节炎症反应<sup>[6]</sup>、调控基因表达<sup>[7]</sup>及促进骨骼生长方面<sup>[8]</sup>也具有重要功能。因此, hLF 在疾病防治<sup>[9]</sup>、营养补充<sup>[10]</sup>、食物或药品的贮藏等<sup>[11]</sup>方面具有广阔的应用前景, 已成为近几年来研究的热点之一。人乳铁蛋白转基因奶羊不但可用于生产重组人乳铁蛋白, 而且可以改变羊奶的营养成分, 使其品质更接近于人乳, 从而可以提高羊奶的应用价值<sup>[12]</sup>。

制备转人乳铁蛋白基因奶山羊的第一步是构建 *hLF* 乳腺表达载体, 构建一个合理和有效的乳腺表达载体需要考虑多种因素, 其中乳蛋白上游调控序列、目的基因及下游调控序列是其中 3 个最基本的要素。本研究将 *hLF* cDNA 克隆入以山羊  $\beta$ -酪蛋白基因作为调控序列的 pBC1 载体中, 构建了 *hLF* 基因的乳腺表达载体 pBC1-hLF-Neo, 此载体可以作为其他外源基因在动物乳腺中进行表达的通用载体。并将此表达载体利用脂质体包裹的方法分别转入到山羊乳腺上皮细胞和小鼠乳腺上皮细胞中, 并在细胞中表达出了具有免疫和生物活性的重组人乳铁蛋白, 这为下一步制备稳定表达重组人乳铁蛋白的转基因克隆山羊奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及主要试剂

*hLF* cDNA<sup>[12]</sup>由上海转基因中心惠赠; 质粒 pBC1 由扬州大学成勇教授惠赠; C127 细胞系为本实验室保存; PCR 引物的合成及载体测序均由上海英骏公司完成; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 TOP10 菌株系本实验室保存。所有的工具酶和高保真 DNA 聚合酶购自 NEB 公司; LA *Taq* 聚合酶、RNAiso Plus、pMD19-T 载体均购自 TaKaRa 公司; DNA 纯化试剂盒、Wizard DNA 纯化系统 (A7280)、逆转录酶 AMV 购自 Promega 公司; Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 和 Lipofectamine<sup>TM</sup> LTX、DMEM-F12、胎牛血清 (FBS)、G418、pcDNA3.1(-) 购自 Invitrogen 公司; 基因组提取试剂盒购自 TIANGEN 生物公司; 表皮生长因子 (EGF)、胰岛素、催乳素、氢化可的松均购自 Sigma 公司; 人乳铁蛋白单克隆抗体购自 Abcam 公司; Western blotting 试验常规试剂购自南京凯基生物技术有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 *hLF* 乳腺表达载体的构建及酶切鉴定

设计并合成一对特异性引物, 利用 Phusion 高保真聚合酶扩增 *hLF* 的 cDNA, 在上下游引物两端分别引入 *Xho* I 单酶切位点, 长度为 2 136 bp, 将其克隆到 pMD19-T 载体上测序保存。用 *Xho* I 分别酶切

pBC1 和 PMD19-T-hLF, 使用热敏磷酸酶将酶切后的 pBC1 去磷酸化后, 将 pBC1 和 *hLF* 通过 T4 DNA 连接酶连接, 通过菌液 PCR 和酶切鉴定得到正确重组质粒命名为 pBC1-hLF。

设计并合成一对特异性引物 P3/P4, 扩增新霉素抗性基因 *Neo* 及其调控序列, 以 pcDNA3.1 为模板, 利用高保真聚合酶 Phusion 扩增出长度为 1 613 bp 的 SV40-Neo-PolyA 的片段, 两边酶切位点为 *Not* I, 扩增出的片段克隆到 PMD19-T 载体上, 测序正确后, 连接到 pBC1-hLF 载体上的 *Not* I 酶切位点处, 鉴定方向, 测序, 正确重组质粒命名为 pBC1-hLF-Neo, 以上过程所用引物见表 1, 载体构建过程详见图 1。

1.2.2 山羊乳腺上皮细胞的制备及原代培养

无菌采取泌乳期的关中奶山羊乳腺组织, 用 PBS 培养液洗数次, 剥除其他组织后, 将乳腺组织剪成 1 mm<sup>3</sup> 小块, 均匀放置直径 60 cm 培养皿中, 在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 和饱和湿度的培养箱中进行培养, 等组织块贴壁后, 加入 1 mL 的培养液 (DMEM-F12+10% FBS+10 ng/mL EGF+1% 胰岛素+100 U/mL 青霉素+100 μg/mL 链霉素), 第 2 天补加 3 mL 培养液,

以后每隔 3 天换 1 次液。传代 2~3 次, 除去成纤维细胞, 以获得山羊乳腺上皮细胞。C127 细胞培养液同上。

1.2.3 山羊乳腺上皮细胞 GMC 和小鼠乳腺上皮细胞 C127 细胞的转染与筛选

将生长状态良好的 GMC 和 C127 细胞按 2×10<sup>5</sup> 分别接种于六孔板, 培养 24 h, 待细胞生长至 80%~90% 汇合后, 按照 Lipofectamine™ 转染试剂说明书转染 pBC1-hLF-Neo 载体。转染 48 h 后, 用胰蛋白酶消化每孔细胞, 接种于 60 mm 培养皿中, 分别加入 G418 至终浓度 500 μg/mL, 继续培养, 每 3 天换液 1 次, 8~10 d 后, 将两种细胞的 G418 抗性细胞克隆扩大培养、冷冻保存备用。

1.2.4 外源基因的整合鉴定

收集扩大培养的 G418 抗性 GMC 和 C127 细胞, 分别提取基因组 DNA, 设计两对引物 (表 1) P7/P8 和 P9/P10 检测 *hLF* 转录盒子 (5′β-酪蛋白+*hLF*+3′β-酪蛋白) 是否整合到两种细胞基因组 DNA 中。引物 P7 和 P8 分别取自 5′端 β-酪蛋白调控序列和 *hLF* 基因序列, 引物 P9/P10 分别取自 *hLF* 序列和 3′端 β-酪蛋白调控序列。

表 1 引物序列及 PCR 反应程序

Table 1 Primer sequences and PCR parameters

Gene name and DNA fragment	Primer (upper and lower primer in turns in line) (5′-3′)	Restriction enzymes	PCR parameters
hLF cDNA (2 133 bp)	P1: CCGCTCGAGATGAAACTTGTCTTCCTCGTCCT	<i>Xho</i> I	98 ℃ 20 s 65 ℃
	P2: CCGCTCGAGTTACTTCCTGAGGAATTCACAGG	<i>Xho</i> I	30 s 72 ℃ 2 min
SV40-Neo-PolyA (1 613 bp)	P3: GCGGCCGCTGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGA	<i>Not</i> I	98 ℃ 20 s 63 ℃
	P4: GCGGCCGCACACTTTATGCTTCCGGCTCGT	<i>Not</i> I	30 s 72 ℃ 90 s
pBC1-Neo (1 687 bp)	P5: GCAGCACTTTACAGCATCA		95 ℃ 30 s 61 ℃
	P6: ACACTTTATGCTTCCGGCTCGT		30 s 72 ℃ 2 min
pBC1-hLF- I (1 981 bp)	P7: GGGGACTGGGCAAGAGAAACTGAC		95 ℃ 30 s 65 ℃
	P8: GCCCACC GCACACCACACG		30 s 72 ℃ 2 min
pBC1-hLF- II (3 260 bp)	P9: AGCGGCGGAAGTCTACG		95 ℃ 30 s 55 ℃
	P10: AAGTTGCCATATTCCAGTCG		30 s 72 ℃ 2 min
β-actin (404 bp)	P11: GGACTTCGAGCACGAGATGG		95 ℃ 30 s 62 ℃
	P12: ACATCTGCTGGAAGGTGGAC		30 s 72 ℃ 30 s
GAPDH (194 bp)	P13: GATTGTCAGCAATGCCTCCT		94 ℃ 30 s 65 ℃
	P14: AAGCAGGGATGATGTTCTGG		30 s 72 ℃ 30 s
RT-PCR primers (2 067 bp)	P15: AGGAGTGTTCA GTGGTGCGCCG		94 ℃ 30 s 65 ℃
	P16: TTA CTTCCTGAGGAATTCACAGG		30 s 72 ℃ 2 min

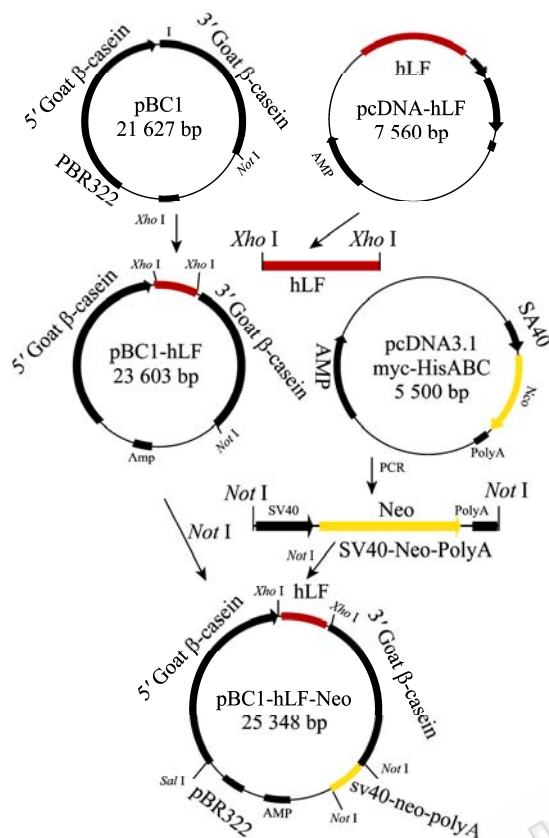


图1 pBC1-hLF-Neo 载体构建示意图

Fig. 1 Construction of the pBC1-hLF-Neo mammary specific expression vector.

### 1.2.5 阳性细胞的激素诱导培养

将转基因 GMC 细胞和转基因 C127 细胞分别铺板,待细胞长至平皿 80% 时弃上清,分别加入诱导培养液 (DMEM-F12+10  $\mu$ g/mL 胰岛素+5  $\mu$ g/mL 催乳素+10  $\mu$ g/mL 氢化可的松) 进行诱导培养,每隔 6 h 收集 1 次细胞上清,连续收集 12 次。选择非转基因的 GMC 细胞和 C127 细胞作为阴性对照。

### 1.2.6 RT-PCR 检测目的基因 hLF 在 mRNA 水平上的表达情况

提取诱导培养的细胞总 RNA,以 1  $\mu$ g 总 RNA 为模板反转录合成 cDNA 的第一条链,后以 cDNA 为模板,使用引物 P15/P16 检测转基因细胞诱导培养后是否有 hLF 基因在 mRNA 水平的表达,同时用山羊内参基因 GAPDH 和小鼠  $\beta$ -actin 基因作为内参对照。

### 1.2.7 Western blotting 检测 hLF 蛋白分泌情况

将收集到的细胞上清进行浓缩,进行 12% SDS-PAGE 电泳后转到正电荷尼龙膜 (PVDF),在封闭液中封闭 2 h 后,在 4  $^{\circ}$ C 环境中和一抗 Anti-Human Lactoferrin 孵育过夜,一抗浓度为 1:1 000 稀释,后与二抗 (1:1 000) 孵育 1 h,洗膜, ECL 化学发光,胶片曝光显影。详细操作步骤见文献[13]。

### 1.2.8 细胞上清中重组人乳铁蛋白的抑菌试验

取 10 mL 转基因细胞上清液置于冻干机中冻干处理后,然后溶解于细胞培养液中,离心除去杂质后备用。将 DH5 $\alpha$  菌株接种于无菌 LB 液体培养基中于 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 12~14 h, OD 值为 1.4~1.6 为宜。取一定量的菌体均匀地平铺于无菌 LB 琼脂固体培养板上,待其凝固后,将直径为 6 mm 的无菌滤纸片均匀地放于琼脂板上,分别滴加 20  $\mu$ L 转基因细胞的上清液样品滴于滤纸片上,后用封口膜将培养板封口后置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中过夜,观察抑菌圈的大小。试验中,以非转基因细胞上清液、细胞培养液作为阴性对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳腺特异性表达载体 pBC1-hLF-Neo 的鉴定

经过 Xho I 单酶切得到了 23.215 kb+2.133 kb 的酶切片段,经过 Not I 单酶切得到了 23.669 kb+1.613 kb 的片段,酶切鉴定结果见图 2A;通过 PCR 反应,使用引物 P7/P8 和 P3/P4,分别得到了大小为 1 981 bp (包含了载体和 hLF 的部分序列) 和 1 687 bp (包含了载体和 Sv40-Neo-poly 的部分序列) 的目的片段,PCR 鉴定结果见图 2B。pBC1 载体与目的片段的连接处测序结果如图 2C 和 2D 所示。证明所构建的载体结构完全正确。

### 2.2 山羊乳腺上皮细胞 GMC 和 C127 细胞的培养

乳腺组织块培养 7~10 d 后左右周围开始出现乳腺上皮细胞,细胞沿小组织块周围向外生长。随后长出成纤维细胞。根据乳腺上皮细胞和成纤维细胞对消化酶敏感性的不同,可将二者分离。经过 2~3 次传代培养可得到纯化的山羊乳腺上皮细胞 (图 3)。

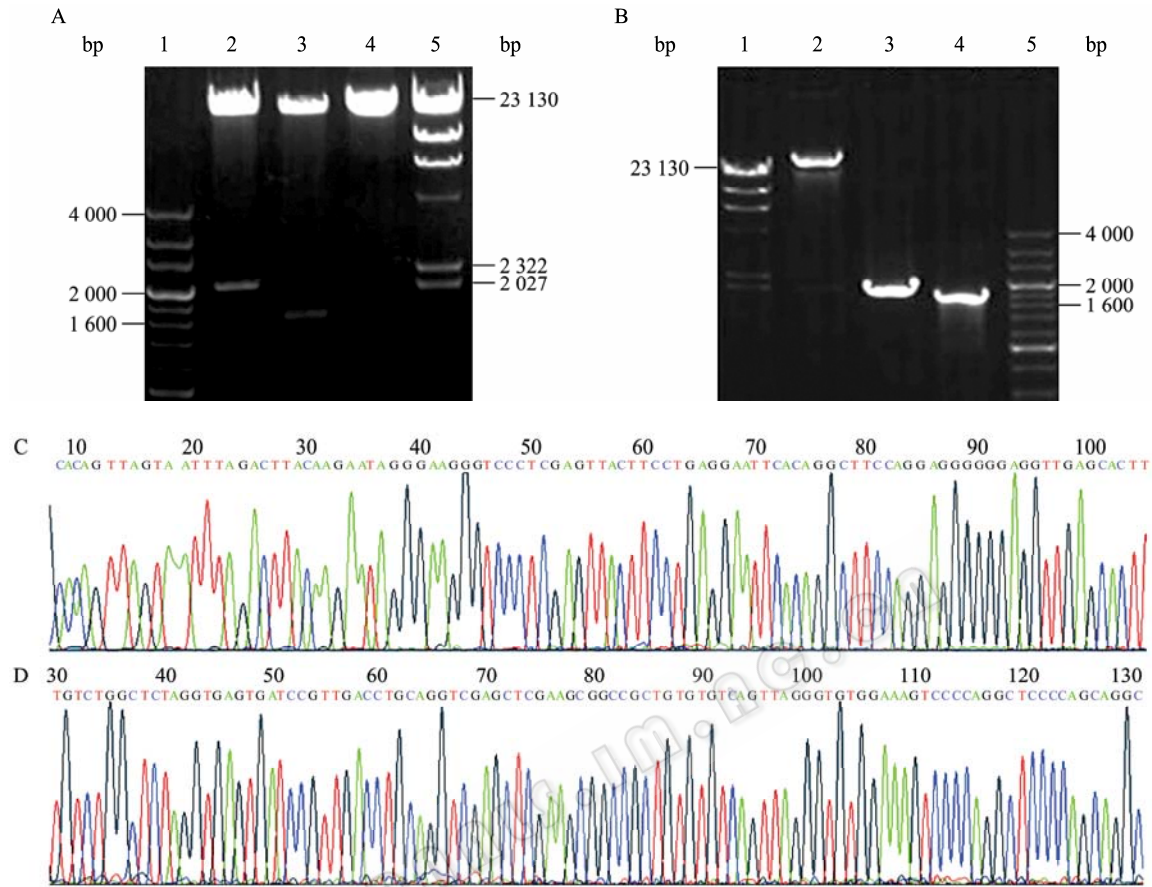


图 2 载体 pBC1-hLF-Neo 酶切鉴定, 插入方向鉴定电泳图和部分连接处测序结果

Fig. 2 Identification of vector pBC1-hLF-Neo by enzyme digestion, PCR amplification and partial sequencing. (A) Identification of vector pBC1-hLF-Neo by enzyme digestion. 1: 200 bp marker; 2: product digested by *Xho* I; 3: product digested by *Not* I; 4: pBC1-hLF-Neo plasmid; 5:  $\lambda$ -Hind III marker. (B) Identification of vector pBC1-hLF-Neo by PCR amplification. 1, 5:  $\lambda$ -Hind III marker and 200 bp DNA marker, respectively; 2: The plasmid pBC1-hLF-Neo; 3: the product with the primer P7/P8; 4: the product with the primer P5/P6. (C) DNA chromatogram of the sequence at the linking position between 3' goat  $\beta$ -casein gene promoter and the *hLF* gene coding sequence. (D) DNA chromatogram of the sequence at the linking position between 3' goat  $\beta$ -casein gene promoter and the *Neo* gene coding sequence.

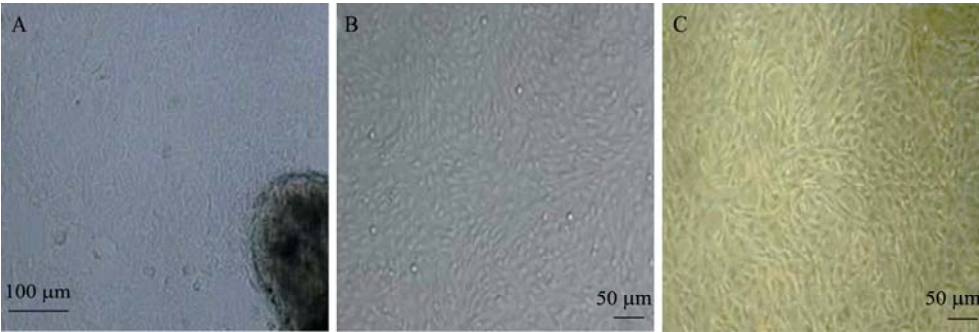


图 3 培养的山羊乳腺上皮细胞和小鼠乳腺上皮细胞

Fig. 3 The cultivated goat mammary epithelium cells and C127 cells. (A) Primary cultural goat mammary epithelium cells on 13th day. (B) Purified goat Mammary epithelium cells. (C) C127 cells.



### 2.3 乳腺上皮细胞的转染及目的基因的整合

乳腺表达载体 pBC1-hLF-Neo 分别转染两种乳腺上皮细胞后, 经过 G418 筛选 8~10 d 后获得了抗性细胞克隆。由于本试验目的是检测 hLF 的表达情况及验证所构建载体是否有效, 故在本试验中并未对这两种乳腺细胞抗性单克隆进行分离纯化, 而是分别将一种细胞的抗性单克隆收集在一起, 将培养液中的 G418 筛选浓度减半成维持浓度 250 ng/ $\mu$ L, 对抗性克隆集中扩大培养。提取细胞基因组 DNA, PCR 扩增 hLF 转录表达盒, 未转染细胞无目的条带, 而 G418 抗性细胞则有目的条带 (图 4), 表明 hLF 转录表达盒已经完整地整合到这两种细胞的基因组 DNA 中。

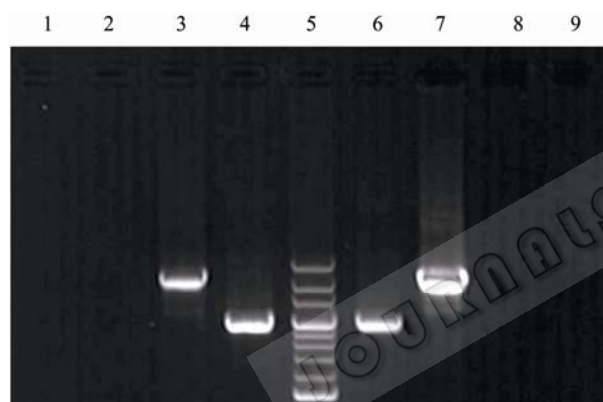


图 4 药物抗性细胞 PCR 鉴定结果

Fig. 4 PCR analysis of drug-resistant cell colonies. 1-2: PCR products of GMC cells as negative control; 3-4: PCR products of G418-resistant GMC cells by P9/P10 and P7/P8, individually; 5: 200 bp DNA marker; 6-7: PCR products of G418-resistant C127 cells by P7/P8 and P9/P10, individually; 8-9: PCR products of C127 cells as negative control.

### 2.4 RT-PCR 检测 hLF 基因在转基因细胞中的表达

RT-PCR 结果如图 5 所示, 在图 5A 中, 细胞为 GMC, 内参基因为山羊 *GAPDH* 基因, 模板分别为经过激素诱导培养的非转基因细胞和转基因细胞的 RNA 及反转录成的 cDNA。以 RNA 为模板进行 PCR 没有扩增出条带, 证明提取的总 RNA 中没有细胞基因组 DNA 的污染; 以激素诱导培养过的非转基因细胞的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增也不能得到条

带, 但是以激素诱导培养过的转基因细胞的 cDNA 作为模板, 则可以得到长度为 2 067 bp 的目的条带。图 5B 中细胞为 C127, 内参基因选择为小鼠  $\beta$ -actin 基因, 结果与前者相似。从而证明 hLF 基因已经稳定整合进了两种转基因细胞的基因组 DNA 中且都能进行 RNA 水平上的转录表达, 且在两种细胞中的表达结果一致。

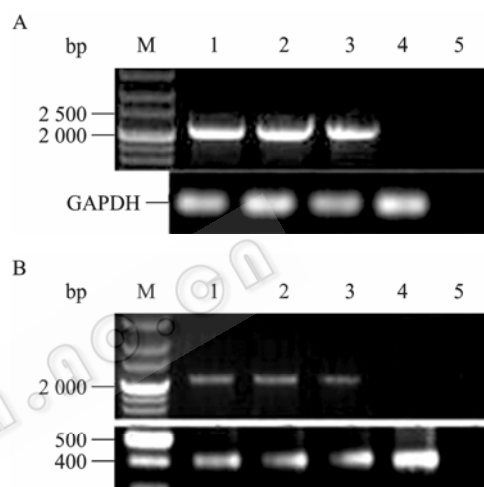


图 5 两种转基因细胞中的 hLF 基因 mRNA 表达检测

Fig. 5 RT-PCR analysis of recombinant hLF transcription in two kinds of transgenic cells. (A) GMC cell. (B) C127 cell. M: 200 bp DNA marker. 1-3: PCR with cDNA samples of the transgenic cells on induction at 24, 48, and 72 h; 4: PCR with cDNA samples of the non-transgenic cells by induction; 5: PCR with RNA samples of the transgenic cells by induction.

### 2.5 Western blotting 检测转基因细胞分泌目的蛋白

收集诱导培养的两转基因细胞上清液, 经 Western blotting 检测, 在 73 kDa 处都有特异性条带形成, 而未转染细胞无条带 (图 6), 表明转基因细胞经激素诱导后, 山羊  $\beta$ -酪蛋白基因启动子驱动的 hLF cDNA 基因能够转录翻译成 hLF 蛋白, 而且能进行翻译后加工形成糖蛋白分泌到细胞外; 同时也说明了 hLF 在两种转基因细胞的蛋白翻译、加工成熟、分泌到胞外的修饰过程和调节机制是一致的。

### 2.6 重组人乳铁蛋白的生物活性检测

抑菌圈试验可以检测重组目的蛋白是否具有生物活性, 本试验结果如图 7 所示, 在滴有两种转基

因乳腺上皮细胞液的滤纸片外可以看到明显的抑菌圈, 但是山羊乳腺上皮细胞的抑菌圈直径明显大于小鼠乳腺上皮细胞, 原因可能与 *hLF* 基因在细胞基因组中的整合位置有关<sup>[14]</sup>。而在滴有非转基因细胞液和普通细胞培养液的滤纸上则没有观察到抑菌圈。这说明转基因乳腺上皮细胞所表达的重组人乳铁蛋白具有抑制大肠杆菌生长的生物学功能。进一步说明了载体具有完整的生物学功能。

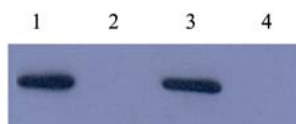


图6 Western blotting 检测重组 *hLF* 在细胞上清中的分泌  
Fig. 6 *hLF* protein secretion detected by Western blotting. M: protein marker; 1: supernatant of induction culture of the transgenic goat mammary epithelium cells at 48 h; 2: supernatant of induction culture of the normal mammary epithelium cells at 48 h, negative control; 3: supernatant of induction culture of the transgenic C127 cells at 48 h; 4: supernatant of induction culture of the normal C127 cells at 48 h, negative control.

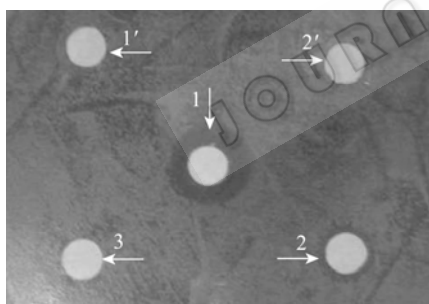


图7 重组 *hLF* 大肠杆菌抑菌环试验

Fig. 7 Anti-bacteria bioactivity of recombinant *hLF* expressed by transferred cells. 1: 20  $\mu$ L medium supernatant cultivating goat mammary epithelium transfected cells. 1': 20  $\mu$ L medium supernatant cultivating non-transfected cells; 2: 20  $\mu$ L medium supernatant cultivating transfected C127 cells; 2': 20  $\mu$ L medium supernatant cultivating non-transfected C127 cells; 3: 20  $\mu$ L normal cell cultivating medium as negative control.

### 3 讨论

本研究中使用的基础载体为 pBC1<sup>[15-16]</sup>, 该载体是一种乳腺特异性表达载体, 包含了以下真核表达功能元件: 山羊  $\beta$  酪蛋白 5'端调控区、山羊  $\beta$  酪蛋

白 3'端非翻译区、鸡的  $\beta$ -珠蛋白基因绝缘子。山羊酪蛋白 5'端调控区长达 6.2 kb, 含有  $\beta$  酪蛋白的启动子能使 *hLF* cDNA 在乳腺上皮细胞中表达, 而其含有的基因组成分 (部分内含子、外显子) 能有效提高目的蛋白的表达水平; 山羊  $\beta$  酪蛋白 3'端调控序列长达 7.1 kb, 其内含子可以提高外源基因的表达水平, 其 3'端非翻译区, 决定翻译终止并参与 *hLF* mRNA 多聚腺苷酸化; 鸡的珠蛋白基因绝缘子可在表达载体随机整合入动物基因组时, 有效地减少插入位点附近调控元件对 *hLF* 表达的影响。但是, pBC1 载体中没有提供信号肽序列, 为保证 *hLF* 能够顺利地分泌到转基因奶山羊的乳汁中, 本研究中的 *hLF* cDNA 序列前面自带了一段长约 57 bp 的信号肽序列。鉴于此载体拥有以上优点, 可以作为其他外源基因在山羊乳腺中进行表达的通用载体, 使用时只需将目的基因把 *hLF* 基因替换掉即可。

将构建好的载体 pBC1-*hLF*-Neo 分别转染到了山羊乳腺上皮细胞和小鼠乳腺上皮细胞系中, 筛选分别得到了具有药物抗性的细胞克隆, 使用引物 P7/P8、P9/P10 对药物抗性的细胞克隆进行 PCR 鉴定, 结果证明 *hLF* 及其转录表达盒已经成功地整合到了乳腺细胞的基因组中。由于本试验的目的是验证表达载体在乳腺细胞中的表达情况, 而不是为生产转基因动物提供核供体细胞, 所以不需要对单个 G418 抗性克隆进行扩大培养, 而是直接将单独一种乳腺细胞经过药物筛选得到的抗性克隆集中在一起扩大培养, 这样做既缩短了扩大培养的周期又保证了转基因细胞的纯度。

乳腺上皮细胞合成乳蛋白需要合适的激素诱导, 影响乳腺上皮细胞泌乳的激素种类很多, 但主要是催乳素、肾上腺糖皮质激素及胰岛素这 3 种激素<sup>[17]</sup>, 激素通过特异性受体识别与胞内信号传导来调控靶基因的转录表达。为了鉴定目的基因 *hLF* 在转基因细胞中的表达情况, 分别在这 2 种细胞培养液中添加了胰岛素、催乳素、氢化可的松, 对细胞进行诱导培养, 培养 24、48、72 h 后, 收集培养液

上清, 使用 RT-PCR 和 Western blotting 检测了 *hLF* 基因 mRNA 和蛋白表达水平, 结果证明两种转基因细胞所合成的 *hLF* 都可以分泌到细胞上清中, 并且表达的目的蛋白分子量大小一致, 为 73 kDa 左右, 小于 *hLF* 标准蛋白的分子量 77 kDa; 通过抑菌圈试验表明重组 *hLF* 具有抑制大肠杆菌生长的作用, 说明了重组 *hLF* 拥有完整的生物功能区; 曹阳等在小鼠 MA3782 细胞表达了分子量为 34 kDa 的重组 *hLF*<sup>[18]</sup>, Lin 等将构建的山羊  $\beta$ -酪蛋白为 5'端调控序列表达载体转入山羊乳腺上皮细胞中得到了分子量为 42 kDa 的 *hLF*<sup>[14]</sup>, 都比本研究所获得的蛋白分子量要小; 可能原因是外源目的基因整合到细胞染色体中时, 由于受到细胞内核酸酶等影响, 使得表达产物在加工、分泌和运送到胞外过程中受到影响, 有可能导致重组 *hLF* 没有得到正确的折叠或者非折叠区域被降解从而导致分子量变小。Van Berkel 等以牛  $\alpha$ S1 调控序列指导 *hLF* 在转基因牛体内表达融合蛋白的分子量较标准 *hLF* 小 1~2 kDa<sup>[19]</sup>; 李宁等以含有完整 *hLF* 基因的长度为 150 kb 左右细菌人工染色体 (BAC) 作为载体在转基因牛体内生产了重组 *hLF*, 分子量较标准 *hLF* 小 1~2 kDa 左右<sup>[20]</sup>。这些结果均与本试验研究相似, 研究表明重组蛋白的糖基化过程是受宿主和表达位点共同决定的, 重组糖基化蛋白实际分子量大小随着宿主个体不同而有所差别<sup>[18]</sup>。

本研究发现小鼠乳腺上皮细胞 C127 和正常山羊乳腺上皮细胞 GMC 相比, 在 *hLF* 基因 mRNA 的转录表达及蛋白翻译后的修饰过程没有差异; 因山羊原代乳腺上皮细胞制备过程繁琐, 乳腺细胞体外分化培养的难度大、表达效果受到体外培养的各种不确定因素的影响; 而使用小鼠乳腺上皮细胞 C127 则可克服这一缺点, 能够避免每次试验培养原代细胞的麻烦, 从而消除因细胞问题引起的试验误差, 使试验结果一致。

总之, 本研究证明了所构建的乳腺特异性表达载体 pBC1-*hLF*-Neo 的结构完全正确, 具有完整的

生物活性, 可以有效地在山羊乳腺上皮细胞和小鼠乳腺上皮细胞表达和分泌 *hLF*; 此外, 本试验证明了 C127 细胞和 GMC 细胞在检测 *hLF* 基因表达方面没有差异, 可以用于验证外源基因的乳腺特异性表达载体在乳腺细胞中表达情况。

## REFERENCES

- [1] Waarts BL, Onwuchekwa JC, Smit JM, et al. Antiviral activity of human lactoferrin: inhibition of alphavirus interaction with heparin sulfate. *Virology*, 2005, 333(2): 284-292.
- [2] Lonnerdal B, Bryant A. Absorption of iron from recombinant human lactoferrin in young US women. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83(2): 305-309.
- [3] Varadhachary A, Wolf JS, Petrak K, et al. Oral lactoferrin inhibits growth of established tumors and potentiates conventional chemotherapy. *Int J Cancer*, 2004, 111(3): 398-403.
- [4] Berlov MN, Korableva ES, Andreeva YV, et al. Lactoferrin from canine neutrophils: isolation and physicochemical and antimicrobial properties. *Biochemistry*, 2007, 72(4): 445-451.
- [5] Wilk KM, Hwang SA, Actor JK. Lactoferrin modulation of antigen-presenting-cell response to BCG infection. *Postepy Hig Med Dosw*, 2007, 61(1): 277-282.
- [6] Yuan YG, Ding GL, Cheng Y, et al. Production of cloned goats by transfer of nuclei from transfected caprine mammary gland epithelial cells. *Chin J Biotech*, 2009, 25(8): 1138-1143.
- [7] Naot D, Grey A, Reid IR, et al. Lactoferrin-a novel bone growthfactor. *Clin Med Res*, 2005, 3: 93-101.
- [8] Saidi VH, Eslahpazir J, Carbonneil C, et al. Differential modulation of human lactoferrin activity against both R5 and X4-HIV-1 adsorption on epithelial cells and dendritic cells by natural antibodies. *J Immunol*, 2006, 177(20): 5540-5549.
- [9] Wolf JS, Li G, Varadhachary A, et al. Oral lactoferrin results in T cell- dependent tumor inhibition of head and neck squamous cell carcinoma in vivo. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(5): 1601-1610.



- [10] Paesano R, Torcia F, Berlutti V, et al. Oral administration of lactoferrin increases hemoglobin and total serum iron in pregnant women. *Biochem Cell Biol*, 2006, 84(3): 377–380.
- [11] Liang QW, Richardson T. Expression and characterization of human lactoferrin in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*, 1993, 41(10): 1800–1807.
- [12] Zhang J, Li L, Cai Y, et al. Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats. *Protein Expr Purif*, 2008, 57: 127–135.
- [13] Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [14] Zhao MT, Lin H, Liu FJ, et al. Efficiency of human lactoferrin transgenic donor cell preparation for SCNT. *Theriogenology*, 2009, 71: 376–384.
- [15] He ZY, Yu SL, Li N, et al. Maternally transmitted milk containing recombinant human catalase provides protection against oxidation for mouse offspring during lactation. *Free Radical BIO MED*, 2008, 45: 1135–114.
- [16] Zhang YL, Wan YJ, Wang F, et al. Production of dairy goat embryos, by nuclear transfer, transgenic for human acid  $\beta$ -glucosidase. *Theriogenology*, 2010, 73(5): 681–690.
- [17] Robert E, Rhoads, Ewa GN. Translational regulation of milk protein synthesis at secretory activation. *J Mammary Gland Bio Neoplasia*, 2007, 12: 283–292.
- [18] Cao Y, Gao HY, Yu L, et al. Studies of the clone and cell expression of human lactoferrin gene. *Hereditas*, 2002, 24(1): 9–14.
- 曹阳, 高华颖, 于黎, 等. 人乳铁蛋白基因克隆及细胞表达研究. *遗传*, 2002, 24(1): 9–14.
- [19] Van Berkel PH, Welling MM, Geerts M, et al. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5): 484–487.
- [20] Yang PH, Wang JW, Li N, et al. Cattle mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for large-scale production of functional human Lactoferrin. *PLoS One*, 2008, 3(10): e3453.

## 默克集团收购中国本土公司北京清大天一科技有限公司



2011年1月6日, 德国默克集团宣布以100%股份全额收购北京清大天一科技有限公司。

医药化学品解决方案业务全球负责人傅海博博士说道:“此次成功收购使得默克集团能快速而直接地进入中国生物制药行业细胞培养细分市场, 清大天一优秀的管理团队、高品质的产品和服务拉近了默克与中国本土客户的距离。这些优势将提升默克密理博业务在生物制药领域的竞争力, 为中国市场的上游客户提供更安全、更便捷的产品和服务, 提升他们在生物制药方面的生产能力。”

清大天一科技有限公司是中国生物制药行业领先的细胞培养基、生物反应器和细胞大规模培养技术服务的供应商。公司总部坐落於北京市昌平区, 目前拥有员工80余名。

默克化工技术(上海)有限公司

200040 上海市南京西路1468号中欣大厦40楼

企业传讯部 电话: +86 21 3222 4788; 传真: +86 21 6249 6124

www.merck.de