

UHS-拟蜘蛛拖丝蛋白基因转染 小鼠成纤维细胞及其鉴定

王春生¹ 李晶¹ 宁方勇^{1,2} 张秋婷¹ 梁洋¹ 朴善花¹ 安铁洙^{1*}

(1. 东北林业大学 生命科学学院 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 东北农业大学 动物科技学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:为了获得转拟蜘蛛拖丝蛋白基因 2S 的阳性小鼠成纤维细胞,本研究将前期工作中人工合成的拟蜘蛛拖丝蛋白基因 2S 和克隆获得的小鼠超高硫角蛋白启动子(UHS)与带有 IRES 序列和 GFP 报告基因的表达载体连接,构建真核表达载体 UHS-2S-pIRES2-EGFP;将 UHS-2S-pIRES2-EGFP 线性化后,采用脂质体法转染小鼠皮肤成纤维细胞,通过 G418 筛选获得 neo 基因抗性阳性细胞。结果表明:(1)成功构建 UHS-2S-pIRES2-EGFP;(2)转基因细胞的最佳 G418 筛选浓度为 400 μg/mL;(3)筛选获得呈梭形的转基因细胞,对其进行传代培养时,细胞增殖缓慢,细胞未呈现正常细胞的“S”型的生长曲线;(4)PCR 检测结果显示,UHS-2S-pIRES2-EGFP 载体已经整合到 G418 抗性细胞的基因组中。

关键词:蜘蛛拖丝蛋白基因二聚体;超高硫角蛋白启动子;真核表达载体;小鼠成纤维细胞;转基因
中图分类号:Q781 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2011)06-1202-04

Identification of Transgenic Mouse Fibroblasts with UHS-Polymerized Spider Dragline Silk Protein Gene(2S)

WANG Chun-sheng¹, LI Jing¹, NING Fang-yong^{1,2},
ZHANG Qiu-ting¹, LIANG Yang¹, PIAO Shan-hua¹, AN Tie-zhu^{1*}

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to obtain transgenic mouse fibroblast cell line, UHS promoter and polymerized spider dragline silk protein gene(2S) were linked with eukaryotic expression vector pIRES2-EGFP successively, and UHS-2S-pIRES2-EGFP was obtained. Mouse fibroblasts were transfected with the linear plasmid by cationic liposome method and G418-resistant cells were cultured. After PCR identified, transgenic cell line with 2S was established. The G418 positive cells were detected, and the results were as follows. 1) UHS-2S-pIRES2-EGFP was constructed successfully. 2) The feasible concentration of G418 was 400 μg/mL in medium. 3) The transgenic cell morphology was similar to normal fibroblast, but the cell growth curve was not of “S” shape, cells proliferated slowly. 4) PCR results showed that the constructed vector was integrated into mouse genome.

Key words: polymerized spider dragline silk protein gene(2S); ultra-high sulfur keratin(UHS) promoter; mouse fibroblast; eukaryotic expression vector; transgene

收稿日期:2011-07-16 修回日期:2011-09-25

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30771538、31000990)和国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08008-004B)

作者简介:王春生(1979—),男,讲师,博士,主要从事动物体细胞重编程研究, E-mail: wangchunsheng79@163.com;

* 通讯作者:安铁洙,教授,博士生导师, E-mail: antiezhu@tom.com。

蜘蛛拖丝具有其他任何纤维无可比拟的抗拉和较高弹性的力学特性^[1]。如果建立获取大量蜘蛛拖丝有效方法,就能广泛应用于生物医学、军事等领域。以往,许多学者试图采用转基因方法通过哺乳动物乳腺或植物获取蜘蛛拖丝蛋白,但均未能获得理想的效果。本研究以小鼠为对象,采用转基因的方法,利用小鼠超高硫角蛋白启动子(UHS)、蜘蛛拖丝蛋白基因二聚体2S和pIRES2-EGFP表达载体,构建真核表达载体并转染小鼠成纤维细胞,观察其在细胞基因组中的整合状况,为建立通过体细胞核移植获得被毛特异表达蜘蛛拖丝蛋白的转基因鼠及其它动物的相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

*VspI*和*NdeI*(NEB公司),*BglIII*和*Sall*限制性内切酶(TaKaRa公司),*AlwNI*(Fermentas),T4 Ligase(TaKaRa公司),转染试剂Lipofectamine 2000(invitrogen公司),pIRES2-EGFP载体(实验室自存)。

蜘蛛拖丝蛋白基因2S。采用研究室王春生等^[2]构建含有蜘蛛拖丝蛋白基因二聚体的PUC57-2S质粒。

UHS启动子:采用李昊等^[3]克隆的在皮肤组织中具有特异表达活性的小鼠超高硫角蛋白启动子。

1.2 试验方法

1.2.1 CMV-2S-pIRES2-EGFP载体的构建 用*Sall*和*BglIII*双酶切pIRES2-EGFP载体,回收产物大片段;用*BglIII*和*Sall*大量酶切PUC57-2S,回收含2S小片段;用T4 Ligase将回收的2个片段进行连接,然后转化DH5 α 感受态细胞并提取质粒DNA,鉴定(PCR、酶切和测序)正确后命名为CMV-2S-pIRES2-EGFP。

1.2.2 UHS-拖丝蛋白真核表达载体的构建 用*VspI*和*NdeI*双酶切UHS-GFP质粒并回收获得约700 bp的片段;用*VspI*和*NdeI*双酶切CMV-2S-pIRES2-EGFP,回收大片段。用T4 Ligase将获得2个片段进行连接,获得UHS-2S-pIRES2-EGFP。用*AlwNI*单酶切对UHS-2S-pIRES2-EGFP进行线性化。

1.3 小鼠成纤维细胞的转染与鉴定

1.3.1 成纤维细胞原代和传代培养 采用常规方法^[4],利用妊娠13.5 d的ICR小鼠(SCXK-J-2007-0003;SYXK-J-2007-029011)胎鼠皮肤获取成纤维细胞,并用每孔含500 μ L培养液(含10%胎牛血清、1%青-链霉素、1%谷氨酰胺和1%非必需氨基酸的DMEM液)的24孔培养板置于CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95%空气,100%湿度)中进行原代和传代培养。

1.3.2 G418浓度的筛选 当经上述传代培养的小鼠成纤维细胞达到80%汇合时,向培养孔中以50, 100, 200, 400, 600, 800和1 000 μ g/mL的终浓度分别添加G418,并置于二氧化碳培养箱中培养,每隔48 h用含有相应G418浓度的培养液更换原培养液,并观察增殖情况和细胞的形态,以筛选G418的最佳浓度。

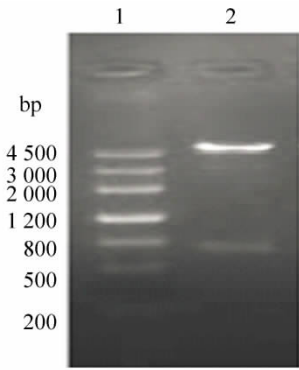
1.3.3 成纤维细胞的转染与筛选 (1) UHS-2S-pIRES2-EGFP转染。用0.05%的胰酶对传代培养的小鼠成纤维细胞进行消化,传至24孔培养板的孔中细胞(0.5×10^5 个/孔)。当培养的细胞达到50%~60%汇合时,更换为无抗生素的培养基,12 h后采用脂质体法,将0.8 μ g线性化质粒UHS-2S-pIRES2-EGFP导入培养孔中。12 h后去除原培养液,再添加含有抗生素的培养液进行续培养。(2) 阳性细胞的筛选。将经上述转染的小鼠成纤维细胞,在续培养后的第48 h,添加筛选的最佳G418浓度(400 μ g/mL)进行阳性细胞筛选。将获得转基因阳性细胞进行传代培养和鉴定。

1.3.4 转基因细胞株的鉴定 将上述获得G418筛选阳性细胞,通过传代培养观察其细胞形态、生长特性。此外,根据基因组DNA提取试剂盒说明,提取阳性细胞的基因组DNA。根据UHS-2S-pIRES2-EGFP载体序列设计的引物(上游引物US-1: CGTCTGTAGCGACCCTTT;下游US-2: CGTTGTGGCTGTG-TAGTT)对细胞基因组进行PCR检测。

2 结果分析

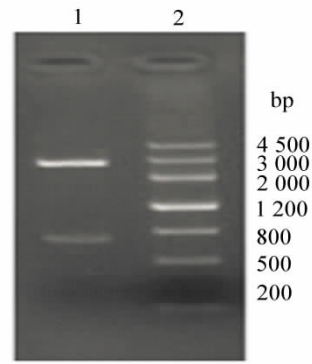
2.1 CMV-2S-pIRES2-EGFP表达载体的鉴定

用*Sall*和*BglIII*双酶切pIRES2-EGFP质粒后,获得约5 300 bp的CMV-pIRES2-EGFP条带(图1),回收大片段;用*Sall*和*BglIII*双酶切PUC57-2S,获得与2S的理论片段大小一致的约700 bp的2S片段



1: MarkerIII; 2: 酶切产物。
图1 pIRES2-EGFP 酶切鉴定

Fig. 1 The enzyme identification of pIRES2-EGFP



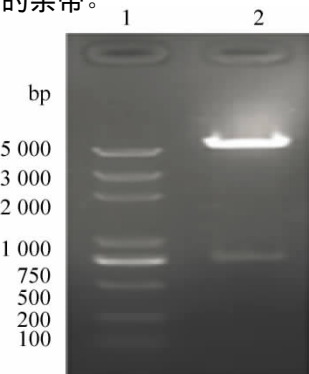
1: 酶切产物; 2: MarkerIII。
图2 PUC57-2S 酶切鉴定

Fig. 2 The enzyme identification of PUC57-2S

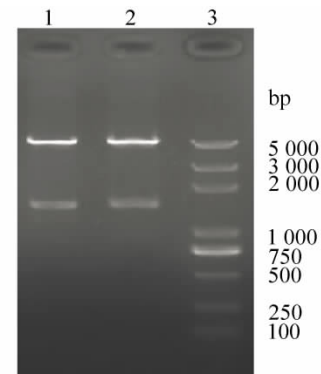
(图2)。将回收得到的 CMV-pIRES2-EGFP 与蜘蛛拖丝蛋白基因二聚体(2S)相连接构建的表达载体 CMV-2S-pIRES2-EGFP, 利用 *Sall* 和 *BglII* 双酶切鉴定, 可获得与理论值相符约 5 300 bp 和 750 bp 的条带(图3)。

2.2 UHS-2S-pIRES2-EGFP 表达载体的鉴定

利用 CMV-2S-pIRES2-EGFP 和 UHS-GFP 构建的 UHS-2S-pIRES2-EGFP, 分别用 *HindIII* 和 *Sall* 酶切后, 如图4所示分别获得与理论值(分别为 1 417 bp、4 715 bp 和 1 451 bp、4 681 bp) 相符的约 1 500 bp 和 5 000 bp 的条带。



1: DL5000; 2: 酶切产物。
图3 CMV-2S-pIRES2-EGFP 鉴定
Fig. 3 The enzyme identification of CMV-2S-pIRES2-EGFP



1. *HindIII* 酶切; 2. *Sall* 酶切; 3. DL5000。
图4 UHS-2S-pIRES2-EGFP 的酶切鉴定
Fig. 4 The enzyme identification of UHS-2S-pIRES2-EGFP

2.3 转基因阳性细胞的最适 G418 筛选浓度

将小鼠传至 3-5 代的成纤维细胞, 分别用含有 50、100、200、400、600、800 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 的合成培养液进行培养。其结果, 如图5所示, G418 为 600、800 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 培养的细胞死亡速度较快(9~10 d 全部死亡); 与其相比, 当 G418 浓度较低(200、100 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 时, 细胞死亡缓慢(15~22 d 全部死亡)。G418 浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞经培养后到第 11 天能达到全部死亡, 因此以该浓度作为筛选 *neo* 基因抗性细胞的适宜浓度。

2.4 转基因阳性细胞的生物学特点

当将线性化的 UHS-2S-pIRES2-EGFP 质粒转染成纤维细胞(图6)后, 用 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 培养液进行筛选, 其结果, 筛选获得呈梭形的转基因细胞(图7), 对其进行传代培养时, 细胞增殖缓慢, 细胞未呈现正常细胞的“S”型的生长曲线。

2.5 转基因细胞的 PCR 鉴定

转染 UHS-2S-pIRES-EGFP, G418 筛选后, 收集小鼠成纤维细胞, 提取基因组, 利用特异性引物(US-1、US-2)进行 PCR 检测, 如图8可得到约 700 bp 目的条带, 而正常小鼠基因组则未显示条带。

3 讨 论

自 Xu 等^[5] 克隆获得蜘蛛拖丝蛋白基因核心序列 Spidroin1 以来, 国内外学者采用基因工程等技术, 探讨通过植物(烟草或马铃薯)^[6-7]、微生物(大肠杆菌)^[8] 及动物(家蚕)^[9] 等获取蜘蛛丝蛋白的方法。但是, 这些方法仍存在所表达的丝蛋白缺

乏分子取向和表达系统不稳定且效率低等不足, 更重要的是无法模拟蜘蛛丝的纤维化过程。迄今为止, 尚未见到在哺乳动物毛囊或被毛中表达蜘蛛丝蛋白基因的报道。随着体细胞核移植技术和体细胞诱导重编程研究的不断完善, 采用拟蜘蛛丝蛋白基因转染体细胞及其体细胞核移植, 通过动物被毛获得拖丝蛋白变得可能。

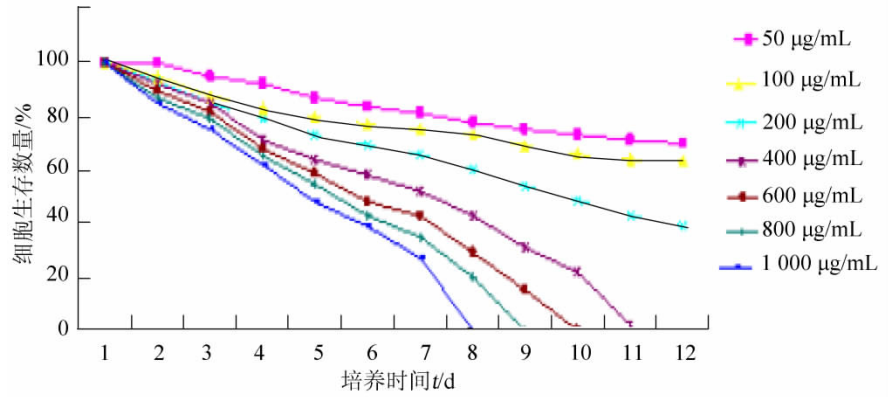


图 5 不同 G418 浓度培养的小鼠成纤维细胞存活率
Fig. 5 The survival percentage of mouse fibroblast in different G418 concentrations

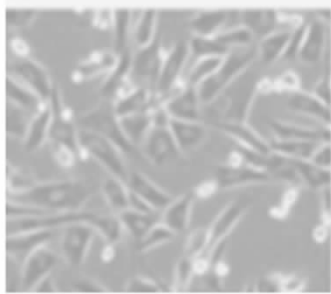


图 6 传代培养的小鼠成纤维细胞(×100)
Fig. 6 Subculture normal mouse fibroblasts

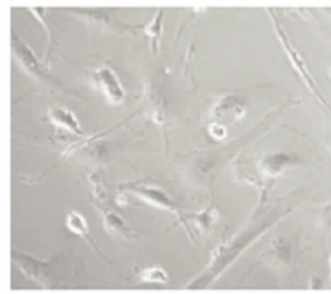
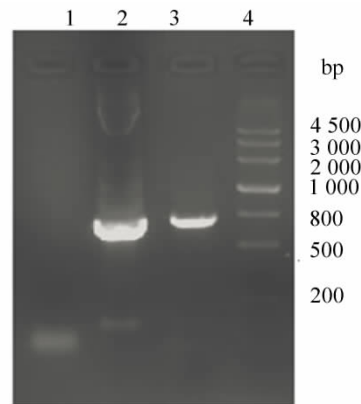


图 7 传代培养的转基因阳性细胞(×100)
Fig. 7 G418-resistant cells after subculture

Palmiter 等^[10] 获得能够在肝脏中特异表达人生长激素的转基因鼠。另据 Wang^[11] 等报道, 利用人角蛋白启动子(K14)在转基因小鼠的毛囊特异表达人生长激素。此外, Pelletier 等^[12] 研究证实, 核糖体进入位点 IRES (internal ribozyme entry site, 能和核糖体结合并诱发翻译起始的调控元件) 连接选择标记基因和报告基因 mRNA, 在哺乳动物细胞中可有效表达两种蛋白, 而非融合蛋白。本研究中, 利用李昊等^[3] 克隆的能够在小鼠皮肤中具有表达活性的超高硫角蛋白基因启动子(UHS)与王春生等^[2] 人工合成的蜘蛛拖丝蛋白基因二聚体 2S 结合带有 IRES 序列启动报告基因(GFP)的 pIRES2-EGFP 载体, 构建了真核表达载体 UHS-2S-pIRES2-EGFP(图 4)。该表达载体经体细胞转染后便于阳性细胞筛选, 并且具有基因表达检测简便和在皮肤上特异表达的特点。能否利用该载体通过原核注射法, 获得被毛上特异表达蜘蛛拖丝蛋白的转基因鼠, 有待于进一步研究。

Wakayama 等^[13] 首次获得体细胞核移植小鼠以来, 小鼠体细胞核移植技术获得不断发展。Oktay 等^[14] 利用体细胞核移植技术获得了抗弓形虫的转基因克隆鼠。表明, 如果将外源基因转染小鼠体细胞



1. 阴性对照; 2. 载体阳性对照;
3. 转基因细胞 PCR 产物; 4. Marker III。
图 8 转基因细胞的 PCR 鉴定

Fig. 8 PCR identification of G418-resistant

表明, 如果将外源基因转染小鼠体细胞
(下转第 1235 页)

- [5]李茂业,林华峰,刘苏,等. 提高布氏白僵菌产孢量的培养基及培养条件研究[J]. 生物技术通报, 2009(S1): 380-383.
- [6]程国华,舒静,丁克坚. 球孢白僵菌营养需求及培件研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(5): 365-368.
- [7]农向群,涂雄兵,张泽华,等. 绿僵菌 R8-4 菌株大量培养固相阶段的条件[J]. 中国生物防治, 2007, 23(3): 228-232.
- [8]孙明,任巧云,关贵全,等. 对蜂致病性球孢白僵菌培养条件的优化[J]. 微生物学通报, 2011, 38(7): 1022-1030.
- [9]Zhi W B, Deng Q Y, Song J G et al. One-step purification of α -amylase from the cultivation supernatant of recombinant *Bacillus subtilis* by high-speed counter-current chromatography with aqueous polymer two-phase systems[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1070(1-2): 215-219.
- [10]Socolovschi C, Doudier B, Pages F, et al. Ticks and human tick-borne diseases in Africa[J]. Médecine Tropicale, 2008, 68(2): 119-133.
- [11]Zhan J X, Burns A M, Liu M X. Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum* [J]. Journal of Natural Products, 2007, 70: 227-232.
- [12]唐启义,冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 488-491.
- [13]谢翎,陈红梅,樊美珍,等. 利用大米固态发酵生产球孢白僵菌的工艺优化[J]. 食品与发酵工业, 2007, 238: 85-88.
- [14]胡加付,李农昌,樊美珍,等. 白僵菌固态发酵试验研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32: 20-25.
- [15]Kang S W, Lee S H, Yoon C S et al. Conidia production by *Beauveria bassiana* (for the biocontrol of a diamond-back moth) during solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor[J]. Biotechnol Lett, 2005, 27: 135-139.
- [16]张丽靖. 球孢白僵菌孢子粉生产、制剂和贮存技术的改进及其淀粉酶特性测定[D]. 杭州: 浙江大学, 2003.

(上接第 1205 页)

后再经细胞核移植就能获得转基因克隆小鼠。本研究采用脂质体法分别转染了 UHS-2S-pIRES2-EGFP 并通过筛选获得的最佳 G418 浓度(图 5)进行了筛选,其结果获得转基因阳性细胞(图 7),PCR 检测显示在小鼠成纤维细胞基因组中整合有 UHS-2S-pIRES2-EGFP(图 8)。采用该细胞通过体细胞核移植能否获得被毛中表达拖丝蛋白的转基因鼠有待于探讨。

参考文献:

- [1]Tirrell D A. Putting a new spin on spider silk[J]. Science, 1996, 271: 39-40.
- [2]王春生,原璐,罗芳,等. 拟蜘蛛拖丝蛋白基因人工合成及其原核表达[J]. 四川动物, 2010, 29(2): 184-188.
- [3]李昊,王春生,宁方勇,等. 小鼠超高硫角蛋白基因启动子的克隆及其表达活性分析[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(6): 471-474.
- [4]薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 128-472.
- [5]Xu M, Lewis R V. Structure of a protein super fiber: spider dragline silk[J]. Proc Natl Acad Sci, 1990, 87: 7120-7124.
- [6]Scheller J, Guhrs K H, Grosse F, et al. Production of spider silk proteins in tobacco and potato[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19: 573-577.
- [7]Arcidiacono S, Mello C, Kaplan D, et al. Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49(1): 31-38.
- [8]田保中,汪生鹏,王建南,等. 类蜘蛛丝素蛋白 SPF198 在毕赤酵母中的分泌表达[J]. 蚕业科学, 2006, 32(2): 276-279.
- [9]Rima Menassa, Hong Zhu, Costas N. et al. Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: Accumulation and field production[J]. Plant Biotechnology Journal, 2004, 2: 431-438.
- [10]Palmiter R D, Norstedt G, Gelinias R E et al. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice[J]. Science, 1983, 222: 809-814.
- [11]Wang Xiaoming, Zinkel Sandra, Polonsky Kenneth, et al. Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: Prospects for gene therapy[J]. PNAS, 1997, 94(1): 219-226.
- [12]Pelletier J, Flynn M E, Kaplan G et al. Mutational analysis of upstream AUG codons of poliovirus RNA[J]. J Virol, 1988, 62(12): 4486-4492.
- [13]Wakayama T, Perry A C F, Zuccott M et al. Full-term development of mice fromenucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei[J]. Nature, 1998, 394: 369-374.
- [14]Oktay Kirak, Eva-Maria Frickel, Gijbert M Grotenbreg et al. Transnuclear mice with predefined T cell receptor specificities against *Toxoplasma gondii* obtained via SCNT[J]. Science, 2010, 328(5975): 243-248.