

pCDNA3-CT 真核表达质粒的构建及其在 COS-1 细胞中的表达

俞 路, 王雅倩, 章世元, 卜祥斌, 李治学

(扬州大学 动物科学与技术学院, 浙江 扬州 225009)

摘要: 通过酶切方法自含鸡甲状旁腺素(CT)基因的克隆质粒 pGEM-T-CT 中扩增 CT 基因, 并将其克隆到真核表达载体 pCDNA3 中, 阳性克隆鉴定后, 在 PEI 作用下转染 COS-1 细胞, 通过间接免疫荧光试验(IFA)检测到了 CT 在 COS-1 中的表达。

关键词: 甲状旁腺素; 转染; IFA

中图分类号: Q813 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)增刊-0015-04

Construction of Eukaryotic Expressing Plasmid of Chicken CT Gene and Its Expression in COS-1

YU Lu, WANG Ya-qian, ZHANG Shi-yuan, BU Xiang-bin, LI Zhi-xue

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Chicken calcitonin gene was amplified from the recombinant plasmid named pGEM-T-CT by digested (*Hind* III + *Bam* HI) and cloned into pCDNA3. The recombinant plasmid was transfected into COS-1 with PEI. 72 h after transfection, the expression of CT were successfully tested by indirect immunofluorescence assay (IFA) with the antiserum of CT expressed in COS-1.

Key words: Calcitonin; Transfection; IFA

我国是世界蛋鸡养殖大国, 近年来商品蛋鸡占世界存栏量的 40%~45%, 且逐渐增加。2005 年我国蛋鸡存栏 20 亿只, 年人均鸡蛋消费 21.8 kg/人, 占世界第 3 位, 是世界平均水平的 2.1 倍^[1]。伴随产业化进程的加快, 笼养蛋鸡营养代谢病发病率也呈升高趋势, 骨质疏松症便是其中一种。笼养蛋鸡骨质疏松症(Cage layer osteoporosis, CLO)又称为笼养蛋鸡疲劳症(Fatigue of cage layers)是蛋鸡养殖业中最严重的骨骼代谢疾病, 发病率高达 16%~30%^[2], 严重影响蛋鸡生产性能。如何调控蛋鸡钙磷代谢, 预防笼养蛋鸡骨质疏松症, 延长笼养蛋鸡的产蛋周期, 提高其产蛋性能是当前蛋鸡养殖业所面临的重要课题之一^[3,4]。传统营养学多采用适当提高日粮中钙、磷含量、调整钙磷比例和添加 VD3 等方法防治 CLO, 但效果甚微。因此, 通过调控产蛋鸡相关激素或因子水平调控蛋鸡钙、磷代谢, 预防和治

疗 CLO 是近年来营养和生理研究的重要内容^[5]。

降钙素(CT)是动物体内重要的钙调节激素, 可促进骨骼再生, 抑制破骨细胞活动, 以减少骨钙入血, 降低血钙浓度^[6], 但其效应发挥受体体内甲状旁腺素(PTH)的反馈抑制, 二者始终保持动态平衡。人类医学领域已通过直接注射外源 CT 方式, 调控钙、磷代谢, 治疗骨质疏松^[7-9]。尽管这种方法有一定效果, 但昂贵的成本、密集的注射频率使其难以推广至畜禽生产中。

由于肌肉注射外源 DNA 能在动物体内表达^[10,11], 如果将适量 CT 基因表达质粒在蛋鸡肌肉部位注射, 使其不断表达产生 CT, 通过抑制破骨细胞活动, 促进骨骼再生以有效防治 CLO, 这将为人类开辟一条新的调控蛋鸡骨钙代谢、防治 CLO 的途径。禽类 CT 研究与人类医学领域相比起步较晚, 国外学者较早克隆出鸡 CT 序列, 但目前相关应用

收稿日期: 2008-01-11

作者简介: 俞路(1983-), 男, 山东滕州人, 在读硕士, 主要从事饲料资源开发利用研究。

通讯作者: 章世元(1958-), 男, 江苏姜堰人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物营养代谢调控、饲料资源开发利用研究。

报道较少。国内关于鸡 CT 基因序列的克隆、测序及重组载体表达方面鲜有报道。本研究旨在通过对新扬州鸡 CT 基因克隆到真核表达载体 pCDNA3 中,并成功将含有目的基因的真核质粒按 PEI 介导转染转入 COS-1 细胞,并通过间接免疫荧光表达试验用兔抗 CT 血清检测到 CT 基因的表达。这为进一步研究鸡 CT 在蛋鸡体内的高效表达,并通过质粒接种等基因手段防治 CLO 的研究提供了可能。

1 材料和方法

1.1 材料

DH5 α 感受态大肠杆菌由扬州大学兽医学院转基因动物研究中心制备和保存, COS-1 细胞购自中科院上海细胞生物化学研究所, pGEM-T-CT 重组质粒(已转化入 JM109 细胞)由扬州大学动物科学与技术学院饲料资源开发实验室保存; pCDNA3 真核表达载体由扬州大学兽医学院转基因动物研究中心孙怀昌教授惠赠; DNA 纯化试剂盒购自 Promega 公司; *Hind* III、*Bam*H I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司; DMEM 基础培养基购自 GIBCO 公司; 荧光素标记的羊抗兔 IgG 购自华美生物工程公司; 25 kDa 多聚乙酰胺(Polyethylenimine, PEI)购自 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯试剂。兔抗 CT 抗体参照文献^[12]方法制备。

1.2 方法

1.2.1 酶切回收 CT 基因片段 将含 pGEM-T-CT 重组质粒的 JM109 感受态细胞,取 200 μ L 涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素(Amp)和 X-gal、IPTG 的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 16 h 后,挑取单个白色菌落接种于加 Amp (100 μ g/mL)的液体 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 恒温培养 12~16 h。参照文献^[12]方法提取重组质粒。从 pGEM-T-CT 重组质粒中酶切回收 CT 片段,采用 50 μ L 反应体系:灭菌三蒸水 13 μ L、10 \times K buffer 5 μ L, *Hind* III 1 μ L, *Bam*H I 1 μ L, pGEM-T-CT(20 ng/ μ L) 30 μ L。将其置于 37 $^{\circ}$ C 消化 2 h,消化产物用凝胶电泳进行检测分离,然后按照 Wizard DNA Clean-Up System 说明书提纯目的片段。纯化后取 10 μ L 测定 260 和 280 nm 波长的吸光度,计算 DNA 的浓度和纯度。

1.2.2 真核表达载体 pCDNA3-CT 的构建策略 如图所示(图 1)。

1.2.3 重组真核表达质粒的构建 参考载体使用说明,在 10 μ L 连接反应体系中依次加入如下各组分:灭菌三蒸水 4 μ L, 10 \times buffer 1 μ L, T4 连接酶 1

μ L, 切开的 pCDNA3 Vector(20 ng/ μ L) 1 μ L, CT cDNA (20 ng/ μ L) 3 μ L, 轻轻混匀后,16 $^{\circ}$ C 水浴反应 4 h, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。连接反应产物全部转移到 200 μ L 感受态细胞中,在冰上孵育 30 min,立即将细胞置于 42 $^{\circ}$ C 水浴中,放置 90 s 进行热休克,然后取出置于冰上 2 min。接着加入 1 mL LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1 h,取 150 μ L 涂于预热的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 恒温箱中过夜培养。

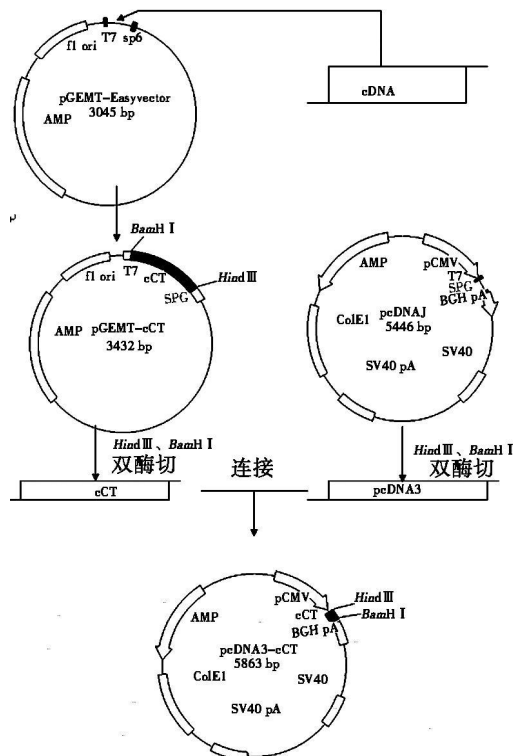


图 1 pCDNA3-CT 质粒构建策略图

Fig. 1 Construction of the plasmid from pCDNA3-CT

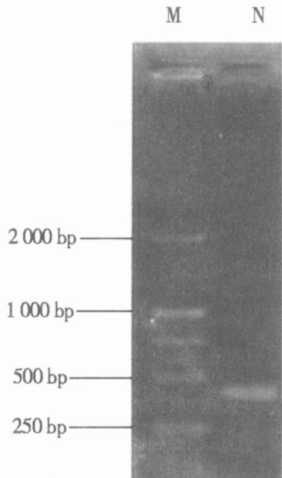
1.2.4 重组质粒的筛选与鉴定 在 LB 平板上挑选单个菌落,在含有 Amp(100 μ g/mL)的 LB 琼脂平板培养基上培养 16 h,挑取单个白色菌落接种于加 Amp 的液体 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 恒温培养 12~16 h。参照文献^[12]方法提取重组质粒,再进行 PCR 及 *Hind* III、*Bam*H I 双酶切电泳检测鉴定。PCR 扩增上游引物: 5'-CG AAGCTTATGGTCATGCTGAAGATTTC ATC-3'; 下游引物: 5'-TA GGATCCCTAGTTGTTTCC-TAGGGTTTCC-3', 采用 50 μ L 反应体系: DEPC 28 μ L, 5 \times RT-PCR Buffer 缓冲液 10 μ L, MgSO₄ (25 mmol/L) 2 μ L, dNTPs (每种浓度为 10 mmol/L) 1 μ L, 上游引物 (50 pmol/ μ L) 1 μ L; 下游引物 (50 pmol/ μ L) 1 μ L, 吹打混匀,加入逆转录酶 1 μ L, DNA 聚合酶 1 μ L, 混匀后加入模板 RNA 5 μ L。反应程序: 48 $^{\circ}$ C 45 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 68 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 40 个循环; 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 同时设立无模板的阴性对照。反应结束后,取 5 μ L

PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL)进行电泳分析,染色后于紫外灯下检测拍照。选择酶切和 PCR 鉴定为重组阳性的质粒送上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

1.2.5 阳性重组质粒转染 COS-1 细胞 重组质粒 pCDNA3-CT 的制备和纯化,按照标准的 PEG 沉淀法^[12]进行,将重组质粒 DNA 按 PEI 介导转染法转染 COS-1 细胞,步骤如下:转染前 2 d 用胰蛋白酶消化细胞,将消化后单个的细胞(约 2×10⁵ 个细胞)转移到 35 mm 的小培养皿中,加 2 mL 含 10% 犊牛血清的培养液,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。转染前,取出培养皿在倒置显微镜下观察,挑取细胞生长旺盛、形态好的培养皿,倒掉培养液,用 2 mL Hanks 液洗 2 次待用;将 5 μL 约(100 ng)重组质粒 DNA 加入到 100 μL DMEM 中,取 10 μg/μL 的 PEI 10 μL 用 DMEM 稀释成 0.1 μg/μL,分别混匀,室温静置 10 min;按 DNA:PEI 为 1:2 的比例,将含 PEI 的 DMEM 加到含质粒 DNA 的 DMEM 中,吹打混匀,室温静置 15 min;将 DNA 和 PEI 的混合物加到 35 mm 小培养皿中,再加入 500 μL 的 DMEM,放置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 3 h,接着加入完全培养基(含 10%犊牛血清)2 mL,继续培养 72 h;吸去细胞上清,将 4℃ 过夜的固定液(丙酮:乙醇/3:2)加到有细胞的小培养皿中,室温静置 2 min,然后吸去固定液,室温晾干,用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,然后加入兔抗 CT 的一抗(设 2 个稀释梯度 1:50,1:100 做对比),37℃ 放置 40 min 后吸取上清,用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,最后置于荧光显微镜下观察转染结果。

2 结果与分析

2.1 pCDNA3-CT 重组质粒的 PCR 鉴定



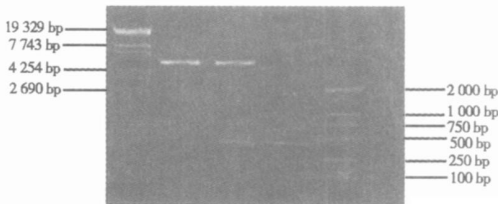
M. DNA Marker DL2000 DNA
图 2 RT-PCR 产物的鉴定

Fig. 2 Electrophoresis map for PCR product

以阳性产物为模板进行 PCR 扩增,电泳获得大约 417 bp 的条带,与已知 CT 基因片段的大小相符(图 2)。

2.2 pCDNA3-CT 重组质粒的酶切鉴定

提取重组质粒进行 PCR 反应及电泳分析,出现 1 条长约 417 bp 的特异性条带;重组质粒经 Hind III + BamH I 双酶切后电泳分析结果出现 2 条带:其中一条带为载体质粒,约 5.4 kb;另一条带为所克隆的 PTH 基因,约 417 bp(图 3)。



1. λ-EcoT141 digest; 2. 阴性对照; 3. 重组质粒
双酶切; 4. 重组质粒 PCR 产物; 5. DNA Marker DL2000

图 3 重组质粒 PCR 和酶切鉴定图

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid
by digested (Hind III+ BamH I) and PCR

2.3 pCDNA3-CT 重组质粒中 CT 基因序列测定

选择酶切和 PCR 鉴定为 CT 基因重组阳性的质粒送上海生工生物工程技术有限公司进行正反 2 个方向的序列测定,报告的核苷酸序列经分析去除两端引物中的多余碱基,得到全长 417 bp 的核苷酸序列,与 GenBank (X03012)^[13] 上发表的 CT 基因具有高度一致性,同源性的 99.8%,在阅读框内仅相差 1 个碱基,即 135 处的 G 转换成了 C,相应的引起了氨基酸的变化,第 45 位的谷氨酸转变为天冬氨酸(图 4 中加下划线处)。说明 pCDNA3-CT 质粒构建成功。从新扬州鸡腿后腺组织中克隆的 CT 基因,与 GenBank 已发表鸡 CT 基因序列进行比较,发现存在一个碱基变异,且导致氨基酸变异,说明鸡 CT 基因具有一定多态性。

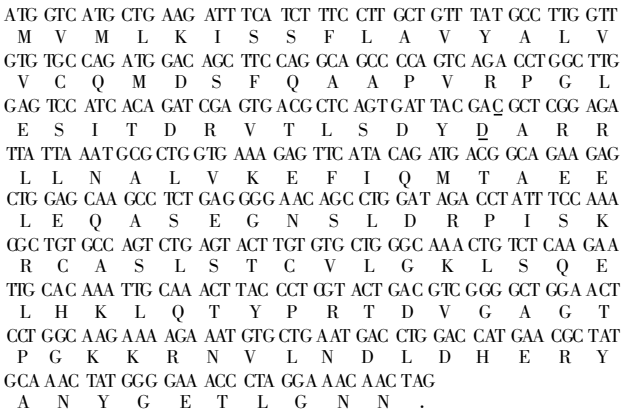


图 4 核苷酸序列及其编码的氨基酸

Fig. 4 The nucleotide sequence and deduced amino acids

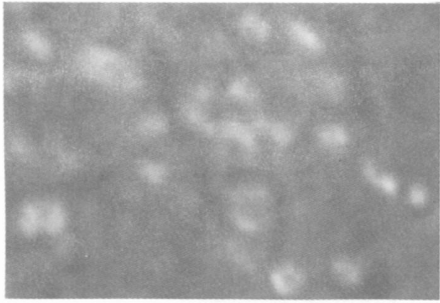


图 5 pCDNA3-CT 转染 COS-1 细胞(视角一)

Fig.5 COS-1 cells transfected with pCDNA3-CT (view 1)



图 6 pCDNA3-CT 转染 COS-1 细胞(视角二)

Fig.6 COS-1 cells transfected with pCDNA3-CT (view 2)

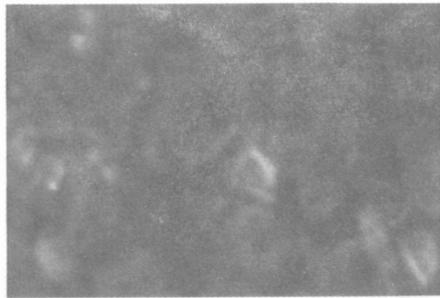


图 7 pCDNA3-CT 转染 COS-1 细胞(稀释度 1:100)

Fig.7 COS-1 cells transfected with pCDNA3-CT
(dilution rate 1:100)

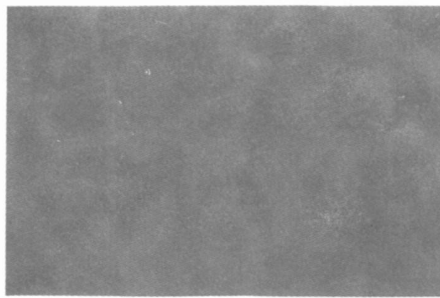


图 8 未被转染的 COS-1 细胞荧光检测结果

Fig.8 COS-1 cells untransfected with pCDNA3-CT

2.4 重组质粒在 COS-1 细胞中的表达

经荧光显微镜观察,被 pCDNA3-CT 重组质粒转染的 COS-1 细胞,一抗血清稀释度 1:50 组可见明显的荧光亮点(图 5, 6 为同一细胞培养皿中选取不同角度拍摄的结果),被 pCDNA3-CT 重组质粒转染的 COS-1 细胞则无荧光(图 8),说明 pCDNA3-CT 重

组质粒在 COS-1 细胞中能正常有效地表达,自制的兔抗鸡 CT 血清效价较低。

3 结论

本研究结果表明, pCDNA3-CT 重组质粒构建成功且其可在 COS-1 真核细胞中表达,为进一步研究防治 CLO 及禽类钙营养代谢相关疾病奠定了基础。

参考文献:

- [1] 俞 路,王雅倩,章世元,等. 稳定同位素技术在蛋鸡钙营养研究中的应用探讨[J]. 中国饲料, 2008(1): 37—40.
- [2] 周振雷,邓益锋,陈鹏峰,等. 骨疏康对蛋鸡骨代谢的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2006 37(12): 1345—1348.
- [3] Whitehead C C, Fleming R H. Osteoporosis in cage layers [J]. Poult Sci, 2000, 79(7): 1033—1041.
- [4] Webster A B. Welfare implications of avian osteoporosis [J]. Poult Sci, 2004, 83(2): 184—192.
- [5] 俞 路,王雅倩,章世元. 鸡钙营养代谢及基因调控研究进展[J]. 饲料研究, 2007(7): 25—32.
- [6] 陈 杰. 家畜生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 373—377.
- [7] 肖 丽. 降钙素治疗骨质疏松症骨质量病变的研究[J]. 长春医学, 2006 4(1): 27—29.
- [8] Wang Ye-ming, Zeng Bing-fang, Li Xiao-lin. Recombinant human calcitonin in myoblasts promotes the proliferation and differentiation of rat osteoblasts [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2007, 41(11): 8385—8387.
- [9] 赵法章,韩雪松,苏凤荣,等. 应用鲑鱼降钙素及物理疗法联合治疗原发性骨质疏松症[J]. 中国骨质疏松杂志, 2007, 13(4): 281—283.
- [10] Wolff J A, Malone R W, William P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo [J]. Science, 1990, 247: 1465—1468.
- [11] 陈志辉,赵 平,吴淑梅,等. 携带 HCV 核心蛋白原核表达质粒与真核表达质粒的减毒伤寒沙门菌诱导小鼠免疫应答之比较[J]. 生物工程学报, 2007, 23(5): 862—866.
- [12] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning A Laboratory Manual [M]. Third Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2002: 19—27, 518—522.
- [13] Lasmoles F, Jullienne A, Day F, et al. Elucidation of the nucleotide sequence of chicken calcitonin mRNA: direct evidence for the expression of a lower vertebrate [J]. EMBO J, 1985 4(10): 2603—2607.