

北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP 基因结构与表达特征研究

刘长青^{1, 2}, 郭保³, 刘帅^{1, 4}, 包阿东^{1, 4}, 陆涛峰¹, 刘洪坤¹, 关伟军^{1*}, 马月辉^{1*}

1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094;
2. 蚌埠医学院生物科学系, 蚌埠 233000;
3. 蚌埠医学院检验系, 蚌埠 233030;
4. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018

摘要: 提取北京油鸡心、肝、脾、肺、肾、脑、腿肌与胸肌等不同组织的总RNA, 利用RT-PCR方法检测 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白基因($\alpha 1$ -AGP)mRNA的差异表达。将 $\alpha 1$ -AGP基因完整开放阅读框定向插入pEGFP-C1, 构建带有GFP报告基因的重组表达载体pEGFP- $\alpha 1$ -AGP, 将其导入北京油鸡体外培养细胞中, 并进行G418药物筛选和克隆化培养。结果表明: $\alpha 1$ -AGP基因开放阅读框长度为612 bp, 编码203个氨基酸, 在北京油鸡肝、肺、腿肌和胸肌中有表达; 转染后24、48和72 h, pEGFP- $\alpha 1$ -AGP转染率在31.3%~47.6%之间, 绿色荧光主要集中在细胞核中, 随着表达量的增加, 绿色荧光在细胞核中聚集成团块状或颗粒状, 经药物筛选和克隆化培养, 获得表达pEGFP- $\alpha 1$ -AGP融合蛋白的阳性克隆细胞株, 利用RT-PCR与Western blot检测确认pEGFP- $\alpha 1$ -AGP已整合到北京油鸡成纤维细胞的基因组中, 在优化的条件下, 阳性细胞凋亡率、形态、生长与增殖状况与对照组比较差异不显著 ($P>0.05$)。

关键词: 北京油鸡; $\alpha 1$ -酸性糖蛋白基因; 荧光蛋白; 成纤维细胞; 亚细胞定位

Characterization of expression of $\alpha 1$ -acid glycoprotein gene in Beijing fatty chicken (*Gallus gallus*)

LIU Chang-Qing^{1,2}, Guo Yu³, LIU Shuai^{1,4}, BAO A-Dong^{1,4}, LU Tao-Feng¹, LIU Hong-Kun¹, GUAN Wei-Jun¹, MA Yue-Hui¹

1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;
2. Bioscience Department, Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China;
3. Department of laboratory medicine, Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China;
4. College of Animal Science and Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

Abstract: The specific expression of $\alpha 1$ -AGP gene in eight different tissues of Beijing fatty chicken was investigated by RT-PCR. The full-length cDNA of $\alpha 1$ -AGP was inserted into pEGFP-C1 multi-cloning sites to construct recombinant eukaryotic expression vector pEGFP- $\alpha 1$ -AGP. The lipofectin method was used to transfect the pEGFP- $\alpha 1$ -AGP into Beijing fatty chicken fibroblast cells. The open reading frame of Beijing fatty chicken $\alpha 1$ -AGP gene was 612 base pairs in length, which was expressed higher in liver and lung than in muscle. This gene did not express in heart and kidney. The expression efficiency ranged from 31.3% to 47.6% 24, 48, and 72 h after transformation. The green fluorescence mainly concentrated in the nucleus. With the increase of the expression of green fluorescence, granula was observed in the nucleus. RT-PCR and Western blotting analyses showed that pEGFP- $\alpha 1$ -AGP had been integrated into the genome of Beijing chicken fibroblast cell with normal expression level. In optimized condition, there was no significant effect ($P>0.05$) on apoptosis ratio, positive cell shape, growth and reduplication state comparing with the control group. This research establishes the foundation for further function research of $\alpha 1$ -AGP gene and application in transgenic animal cloning.

收稿日期: 2008-11-30; 修回日期: 2009-03-17

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863计划)项目(编号: 2006AA10Z198, 2007AA10Z170)资助

作者简介: 刘长青(1978-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 分子细胞生物学。Tel: 010-62819590; E-mail: lcq7813@126.com

通讯作者: 关伟军(1966-)男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物细胞分子生物学。Tel: 010-62815992; E-mail: wjguan86@iascaas.net.cn

马月辉(1964-)男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传资源保护。Tel: 010-62813463; E-mail: yuehui_ma@263.net

Keywords: Beijing fatty chicken; α_1 -acid glycoprotein; fluorescent protein; fibroblast cell; subcellular location

鸡卵糖蛋白与兔和人的 α_1 -酸性糖蛋白(α_1 -AGP)氨基酸序列有 31%~33%的同源性, Sadakane等^[1]认为鸡卵糖蛋白就是 α_1 -酸性糖蛋白。 α_1 -AGP属于Lipocalin 家族, 该家族是一个种类繁多的家族, 主要是由存在于脊椎动物、无脊椎动物、植物和细菌中的细胞外蛋白组成^[2]。Lipocalin家族的蛋白质以前只被认为是转运蛋白, 转运一些小的疏水性分子, 像类固醇、后胆色素类、视黄素类和脂类; 而现在认为其具有多种重要的功能, 例如: 参与细胞增长与细胞代谢的调节, 细胞表面受体的结合, 神经的增长与再生, 免疫反应的调节, 嗅觉的感受, 保护色, 生物膜的起源与修复等^[3]。 α_1 -AGP在大多数动物血浆中含量低, 但在炎症反应中, 血浆 α_1 -AGP含量显著增加^[4], α_1 -AGP在肝脏中合成, 受体内多种激素(尤其是性激素)的调节, 其中雌激素能抑制 α_1 -AGP合成。

α_1 -AGP是多种碱性药物(如普萘洛尔、阿米替林、奎尼丁等)的主要结合蛋白。 α_1 -AGP氨基酸序列存在一定程度的变化, 与药物结合率不同, 影响治疗效果^[5, 6]。Li 等^[7]用固定化 α_1 -AGP手性色谱柱分离了环己巴比妥、安息香、戊巴比妥、异环磷酰胺和环磷酰胺等, 并认为 α_1 -AGP与凝血、免疫及组织修复等有关。本研究克隆了北京油鸡 α_1 -AGP基因, 比较了 α_1 -AGP在北京油鸡心、肝、脾、肺、肾、脑、腿肌和胸肌等组织中的差异表达, 并通过构建真核表达载体pEGFP- α_1 -AGP在北京油鸡成纤维细胞中进行表达, 确定了 α_1 -AGP在细胞中的分布及亚细胞定位, G418 抗性筛选和克隆化培养获得阳性细胞株, 为进一步的功能研究及其在转基因动物克隆中开发利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 北京油鸡

7 日龄北京油鸡鸡胚、30 日龄北京油鸡种鸡取自中国农业科学院北京畜牧兽医研究所种鸡养殖场。

1.1.2 质粒与菌株

pEGFP-C1 载体为 Clontech 公司产品, pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司, 大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。

1.1.3 主要试剂

RNA 提取 Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司; QIAquick Gel Extraction kit 凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司, M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司; EcoR I、BamH I 内切核酸酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; 鼠抗 GFP 抗体购自北京百威胜公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的抽提与 cDNA 合成、纯化

取新鲜北京油鸡心、肝、脾、肺、肾、脑、腿肌与胸肌等不同组织 100 mg, 按照 Invitrogen 公司 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 利用紫外分光光度计及 RNA 甲醛变性凝胶电泳对 RNA 的质量进行检测分析。同时使用了 Oligo(dT)₁₈ 和随机引物, 所以保证了 cDNA 合成的完整性^[8]。

1.2.2 北京油鸡 α_1 -AGP 基因的克隆

对鸡输卵管(AB085851)^[1]、人(X02544)^[9]、小鼠(BC012725)^[4]、兔(X58727)^[10]、猪(M35990)^[11]的 α_1 -AGP 基因 cDNA 序列进行多序列对位分析, 利用 Primer 5 软件设计特异性引物 α_1 -AGP-F1 与 α_1 -AGP-F2 (表 1)。利用引物 α_1 -AGP-F1 与 cDNA 接头 RA 引物扩增北京油鸡 α_1 -AGP 的 cDNA 全序列, 然后取 1 μ L 扩增产物, 再用 α_1 -AGP-F2 和 RA 引物进行巢式 PCR, 回收 DNA 片段, 连接到 pGEM-T Easy 载体上, 转化感受态 DH5 α , 重复测定 5 个克隆的序列, 没有发现碱基的差异。

表 1 用于 $\alpha 1$ -AGP 基因扩增与表达引物及反应条件

引物名称	引物序列 (5' -3')	片段大小 (bp)	复性温度 (°C)
$\alpha 1$ -AGP-F1	TCTGATCTAGACCTGCAGGCTC	836	56
$\alpha 1$ -AGP-F2	CAATGCTGGCCTTCCTTGTCCTC		
RA	CTGATCTAGACCTGCAGGCTC		
GAPDH F1	TGACGTGCAGCAGGAACAC	491	52
GAPDH R1	CAGTTGGTGGTGCACGATG		
$\alpha 1$ -AGP F3	GAATTCTATGCTGGCCTTCCTTGTCCTC	628	55
$\alpha 1$ -AGP R1	GGATCCTCACCCCAACTGTGGCTCTGCTC		

1.2.3 北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP 基因在体内的表达研究与真核表达载体的构建

提取北京油鸡心、肝、脾、肺、肾、脑、腿肌和胸肌等 8 种组织的总 RNA，反转录 cDNA 作为 RT-PCR 的模板。引物 GAPDH F1 和 GAPDH R1 扩增 GAPDH 作为 RT-PCR 内参照，调整各样品模板浓度。在相同模板量的前提下，用 $\alpha 1$ -AGP 特异性引物 $\alpha 1$ -AGP F3/ $\alpha 1$ -AGP R1 对样品进行扩增，检测 $\alpha 1$ -AGP 在不同组织中的表达。设计引物时为方便真核表达载体的构建，在起始密码子 ATG 前面，加入了 *EcoR* I 酶切位点 GAATTC，终止密码前面加入了 *Bam*H I 酶切位点 GGATCC。将 $\alpha 1$ -AGP 基因编码区序列 *EcoR* I 与 *Bam*H I 双酶切后，定向插入脱磷酸化处理 pEGFP-C1 载体，构建融合表达载体 pEGFP- $\alpha 1$ -AGP，转化感受态 DH5 α ，测序鉴定插入 DNA 片段的基因序列及插入方向。

1.2.4 外源基因表达靶细胞的培养

取北京油鸡 7 日龄胚胎，采用组织块贴壁培养法进行培养、传代和冻存^[12-14]，建立其成纤维细胞系，为外源基因的表达提供靶细胞。

1.2.5 脂质体介导法转染成纤维细胞及 $\alpha 1$ -AGP 的亚细胞分布

采用脂质体介导法^[15]，将融合表达载体 pEGFP- $\alpha 1$ -AGP 转入北京油鸡体外培养成纤维细胞中以探讨脂质体和 DNA 量对转染效率的影响。按照 2.0 μ g DNA 和 6.0 μ L 脂质体优化后的条件对体外培养靶细胞进行转染，转染后 48 h，通过在高倍镜下观测荧光强度来确定融合蛋白在细胞中的分布，将细胞按 1:4 密度传代，继续培养至细胞密度达 70%~80% 融合，更换浓度 800 μ g/mL 的 G418 全培养液进行筛选，每 3 d 换一次培养液，约 10 d 后，对照细胞大部死亡，观察每孔中细胞克隆的形成数及荧光表达强度。G418 培养液浓度换为 300 μ g/mL 继续筛选培养，筛选 3~4 周，可见明显的抗性细胞集落，用少量胰酶消化转移至含有细胞筛选培养液的 24 孔培养板，长满后转入 6 孔板中，获得稳定表达 pEGFP- $\alpha 1$ -AGP 成纤维细胞株。

1.2.6 Western blotting 与 RT-PCR 检测融合蛋白表达

收获单层克隆化阳性细胞，胰蛋白酶消化后用 PBS 收集至离心管，3 000 r/min 离心 5 min，充分吸去 PBS，并加入适量裂解液 NP-40 裂解细胞，按 Bradford 法测量细胞总蛋白浓度。取 20 μ L 对照（空载体表达产物）与目的产物于 12% 的 SDS-PAGE 电泳，电泳后将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转移至 PVDF 膜，室温封闭 2 h，加入鼠抗 GFP 抗体 1:1000 的一抗溶液，4°C 2 h。加入二抗溶液（HRP 标记的羊抗鼠 IgG 1:400），37°C 1 h，DAB 显色后与 Marker 进行比对鉴定纯化产物。从挑选扩大培养的 $\alpha 1$ -AGP 阳性表达细胞培养物提取基因组 DNA 与总 RNA^[16]，进行 PCR 扩增检测外源基因表达及整合情况，利用 GAPDH 作为 RT-PCR 内参。

1.2.7 数据统计与分析

转染后，分别在 24、48 和 72 h 用激光共聚焦显微镜观察各试验组细胞，每孔挑 10 个视野拍照，统计每个视野中总细胞数和阳性细胞数，计算转染效率。通过绿色荧光的分布和亮度来判断 $\alpha 1$ -AGP 在细胞中的亚细胞定位与表达量。利用 MEGA3 软件将核苷酸序列逆翻译成的氨基酸序列，DNASTar

的 Clustal W 程序进行氨基酸序列多重比对分析，使用蛋白质专家分析系统（<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>）进行蛋白理化特性预测。

2 结果与分析

2.1 北京油鸡不同组织、器官总 RNA 的提取与成纤维细胞的培养

分别抽提北京油鸡心、肝、脾、肺、肾、脑、腿肌与胸肌的总RNA，经紫外分光光度计测定， OD_{260}/OD_{280} 值为 1.95~2.00 之间，甲醛变性电泳显示 18S 和 28S 的条带清晰，总RNA很少降解。成功构建了北京油鸡成纤维细胞系（图 1），细胞冻存个体数达 22 个，冻存细胞支数达 151 支，每支细胞含量为 $3\sim 5\times 10^6$ 细胞/mL，为外源基因在细胞中的表达提供了良好的体外培养靶细胞。

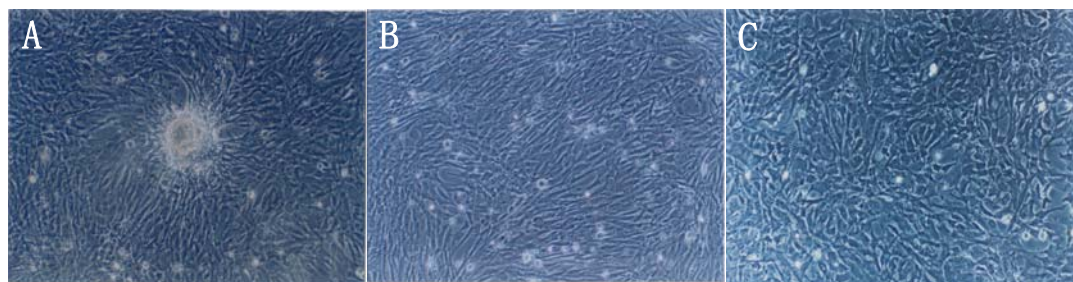


图 1 北京油鸡成纤维细胞的培养

A: 北京油鸡原代培养细胞；B: 北京油鸡继代培养细胞；C: 北京油鸡复苏后细胞。

2.2 北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP 基因体内表达情况

在同等模板的前提下，用特异引物（ $\alpha 1$ -AGP F3、 $\alpha 1$ -AGP R1）对样品进行扩增，检测北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP 基因不同组织差异表达情况（图 2A, B）。结果发现， $\alpha 1$ -AGP 仅在北京油鸡肝、肺、腿肌和胸肌中有表达，其中肝脏和肺表达量较高，腿肌和胸肌中表达量较少，而心、脾、肾和脑中未见分布，可见 $\alpha 1$ -AGP 为组织特异性表达。

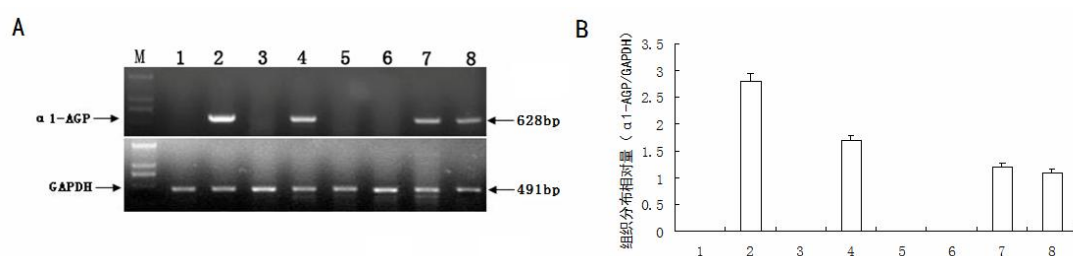


图 2 北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP 在 8 种组织中的差异表达分布图

A: 北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP 在 8 种组织中的差异表达，内参 GAPDH 扩增产物作对照。M: DL2000 DNA Marker; B: $\alpha 1$ -AGP 在 8 种组织表达量比较。1: 心，2: 肝，3: 脾，4: 肺，5: 肾，6: 脑，7: 腿肌，8: 胸肌。

2.3 北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP 基因序列分析

根据测序北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP 基因核苷酸序列，利用 NCBI 与 DNASTAR 软件提供的 ORF 进行开放阅读框的判定，推导出其对应的氨基酸序列，发现与家兔 $\alpha 1$ -AGP 的同源性为 33.3%，与小鼠的同源性为 23.1%，与人和猪 $\alpha 1$ -AGP 的同源性分别为 32.3% 和 31.6%。北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP 基因开放阅读框由 612 个核苷酸组成，编码 203 个氨基酸，估计分子量 22.3 kDa，cDNA 5'端有 43 个核苷酸的非翻译区，3'有 149 个核苷酸非翻译区。另外，在 3'非翻译区距离 Poly A 尾 16 核苷酸处，出现大多数真核生物共有的 AATAAA 转录终止信号。大多数分泌蛋白 N 末端具有十多个氨基酸残基的疏水肽段，我们认为北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP 苏氨酸前 20 个氨基酸为信号肽（<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 分

析结果相同), 与人、小鼠 18 个氨基酸的信号肽不同, 信号肽后面 183 个氨基酸为成熟蛋白 (图 3)。

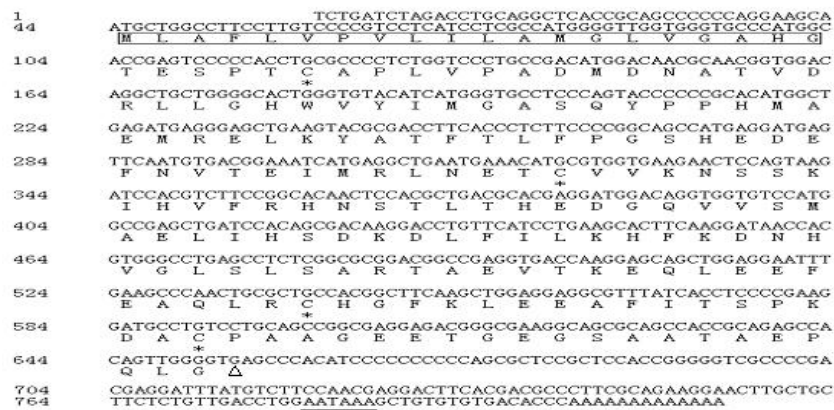


图 3 北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP 基因核苷酸与推导的氨基酸序列

方框中的序列为信号肽序列, 下划线为可能的转录终止信号, 星号标明了 4 个可能形成二硫键的半胱氨酸。

2.4 $\alpha 1$ -AGP 基因组结构分析

将北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP cDNA 核苷酸在 NCBI 服务器鸡基因组中做 Blast 分析, 发现鸡 $\alpha 1$ -AGP 基因长度大约 3 kb 左右, 具有 6 个外显子, 与人类、老鼠和家兔一致。外显子的长度、在 cDNA 序列上的位置以及内含子和外显子临界核苷酸序列见表 2。所有的 5'供体剪接点为相同的 GT 核苷酸, 3'受体剪接点为相同的 AG 核苷酸, 外显子长度介于 69~144 bp, 内含子的长度为 77~1246 bp 范围。

表 2 北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP 核苷酸序列内含子与外显子长度及其临界核苷酸序列

外显子	cDNA位置*	长度(bp)	受体剪接点	供体剪接点	内含子	长度(bp)
1	1-166	166		GACAGG/GTAAGT	1	97
2	167-310	144	CGGCAG/CTGCTG	AGGCTG/GTAAGG	2	1 246
3	311-379	69	CCCCAG/AATGAA	ACGCAC/GTAAAG	3	82
4	380-481	102	TTCCAG/GAGGAT	CTCTCG/GTGAGC	4	98
5	482-583	102	CTGCAG/GCGCGG	CCGAAG/GTATGG	5	77
6	584-814	231	CCCCAG/GATGCC			

* cDNA 位置参照 AY584568 $\alpha 1$ -AGP cDNA 序列。

2.5 蛋白功能位点分析

北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP 基因编码 203 个氨基酸, 等电点 pI 为 5.11。SMART 服务器分析发现 41~183 氨基酸含有典型 Lipocalin (pfam00061) 结构。根据 PROSITE 数据库分析结果表明, 36(NATV)、82(NVTE)、90(NETC)、97(NSSK)、107(NSTL)位上存在 5 个潜在的天冬酰胺糖基化位点, 在 98(SSK)、126(SDK)、146(SAR)、178(APK)位上具有 4 个 PKC 磷酸化位点, 在 76(SHED)、111(THED)、119(SMAE)、126(SDKD)、178(SPKD)具有 5 个 CK2 磷酸化位点, 并且 126 与 178 位既是其 PKC 磷酸化位点又是 CK2 磷酸化位点 (图 4)。

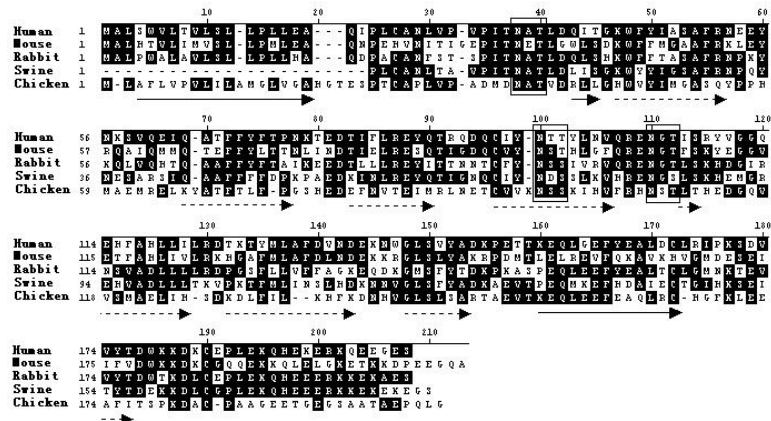


图4 不同物种 $\alpha 1$ -AGP 基因氨基酸序列多重比对分析

实线箭头代表北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP 基因的 α -螺旋链，虚线箭头代表 β -折叠链。

2.6 北京油鸡 $\alpha 1$ -AG 三级结构分析

以Lipocalin家族蛋白质数据文件 1ew3_A 和 2a2u_B 为模型，在Swiss-Model蛋白质模型服务器上利用Promod II 程序，构建北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP的三级结构模型，该模型将使得 $\alpha 1$ -AGP单体活性位点及结构研究更加简单。如图 5A所示：北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP包含有 3 条 α 螺旋，8 条 β 折叠（A-H）形成的折叠桶和连接 8 条 β 折叠的 7 条发夹环状结构（L1-L7）。利用Swiss-Pdb Viewer3.7b2 软件分析所示， $\alpha 1$ -AGP由 8 条反向平行的 β -折叠围成的圆锥形桶与N-末段和C-末段都形成一条长的 α 螺旋构成（图 5B）。H链与N-末段的 3_{10} -螺旋在结构上距离非常近，H链的Arg148 残基与N-末段的 3_{10} -螺旋的主链羰基形成几个H键，将 β 折叠桶的两端连接在一起。北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP具有 3 个结构保守基元：第一个位于第二条 β 链和其前面的 α 链上；第二个位于第六条和第七条 β 链（F链和G链）以及连接它们的环状结构L6；第三个位于第八条 β 链（H链）的一部分和C-末段 α 螺旋的一部分以及连接它们的环状结构。北京油鸡 3 个保守的特征基元可能起到稳定蛋白质结构、辅助维持 β 桶的折叠作用，也可能在引导 β 折叠桶的形成与作为蛋白质识别位点起到关键作用。

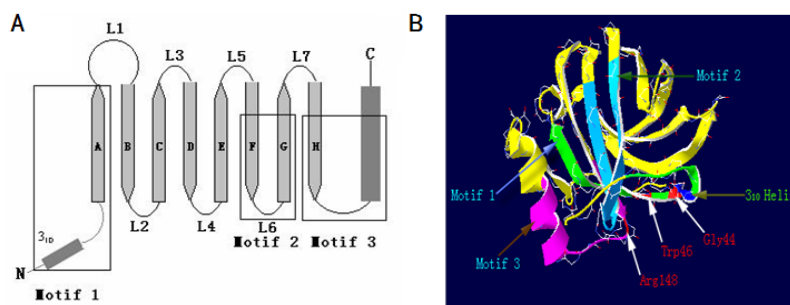


图5 北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP 蛋白折叠三级结构模型图

A: 北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP结构示意图。主链结构包括 8 条反向平行的 β -折叠（箭头A~H），N-末段的 3_{10} -螺旋和C-末段的 α -螺旋，3 个保守基元用方框表示出来。B: 北京油鸡 $\alpha 1$ -AGP蛋白三级结构模型图。3 个保守的基元用不同颜色表示。 3_{10} 螺旋用蓝色表示，与 3_{10} 螺旋形成H键的Gly44, Trp46 和Arg148 用红色表示。

2.7 $\alpha 1$ -AGP 在转染细胞中表达及亚细胞定位

转染后初期，部分细胞有皱缩，极少数细胞崩解死亡，转染12 h后，可见发淡绿色荧光的细胞，24 h后，阳性细胞明显增多（图6A）；48~72 h左右阳性细胞最多，荧光强度增强，多为明亮的绿色荧光，少数发出弱荧光，pEGFP- $\alpha 1$ -AGP转染率在31.3%~47.6%之间。转染pEGFP-C1、pEGFP- $\alpha 1$ -AGP 组的细胞活率（台盼蓝阴性细胞）分别为98.2%和96.4%，与未转染的对照组98.6%无显著差异

($P>0.05$)。转染pEGFP-C1、pEGFP- α 1-AGP组凋亡率分别仅为1.75%和1.90%，该情况与未转染的对照组1.20%的细胞凋亡率相比，可能属正常凋亡现象。

采用荧光共聚焦显微镜观察绿色荧光在北京油鸡成纤维细胞中的分布，以确定 α 1-AGP-GFP 融合蛋白在细胞中的分布。结果发现，在转染空载体 pEGFP-C1 的阳性对照组中，绿色荧光均匀的分布于整个细胞，呈弥散分布（图 6D），说明仅有 GFP 表达；而在转染融合基因 pEGFP- α 1-AGP 的细胞中，转染 24 h 后，开始出现绿色荧光，细胞核内绿色荧光较强，而细胞质中绿色荧光较弱（图 6E），在转染 48 h 后，绿色荧光更加集中于细胞核（图 6：F、G），说明 α 1-AGP-GFP 融合蛋白多分布于北京油鸡成纤维细胞的细胞核内，而且表达量高时，在细胞核中聚集成团块状或颗粒状。

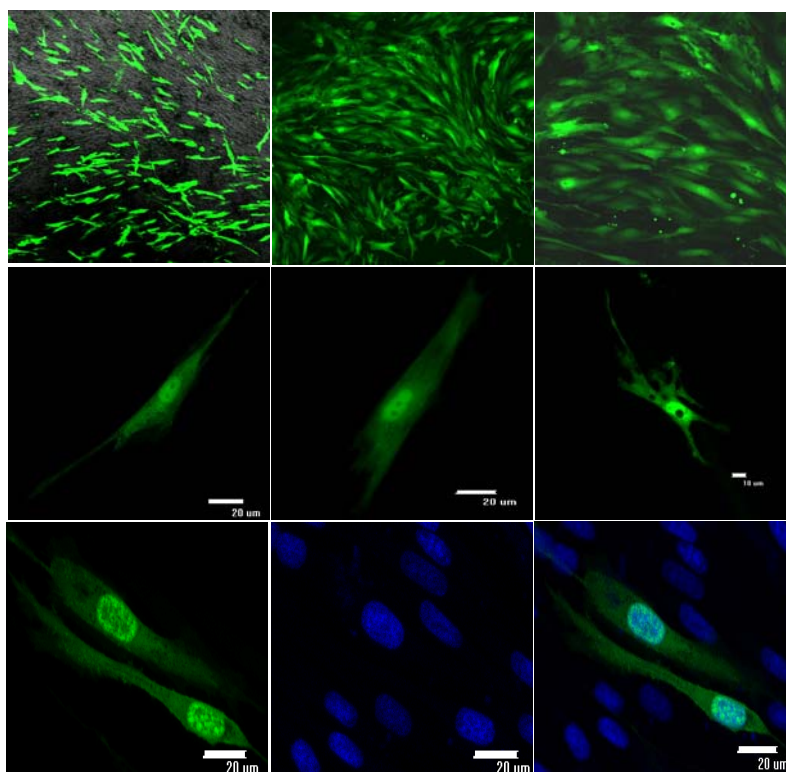


图6 α 1-AGP融合蛋白在转染细胞中的亚细胞定位

A: pEGFP- α 1-AGP在成纤维细胞中的表达；B、C: pEGFP- α 1-AGP阳性细胞株集落；D: pEGFP-C1在细胞中均匀分布；E、F、G: pEGFP- α 1-AG在细胞中多分布于细胞核内(488 nm激发)；H: DAPI对转染绿色荧光蛋白细胞进行细胞核染色（405 nm激发）；I: G、H两个图片在共聚焦显微镜的结合图。

2.8 pEGFP- α 1-AGP表达单克隆阳性细胞株的建立与鉴定

转染24 h内，pEGFP- α 1-AGP开始在北京油鸡成纤维细胞中大量表达，48 h后，表达荧光蛋白基因的细胞达到最多，将细胞以1: 4 的比例传代，传代3~4 h待细胞贴壁后,开始用最小致死量800 μ g/mL的G418全培养基进行药物抗性筛选，筛选3~4周后,获得多个阳性细胞克隆集落。我们通过扩大培养，得到表达pEGFP- α 1-AGP融合蛋白基因的北京油鸡成纤维细胞株（图6：B、C）。

利用设计荧光蛋白基因特异引物,对提取的阳性细胞基因组DNA及RNA反转录获得的cDNA第一链进行扩增,获得了716 bp 左右的片段,与设计的引物预期扩增的片段大小正好相符,从基因组与RNA水平上证实了荧光蛋白基因在北京油鸡成纤维细胞中能够正常的表达。利用GFP单克隆抗体检测 pEGFP- α 1-AGP重组融合蛋白的表达情况。结果显示，在北京油鸡成纤维细胞中表达的重组融合蛋白能特异性结合GFP单克隆抗体，融合蛋白在51 kDa处具有明显的条带，转染空载体pEGFP-C1的阳性对照组的GFP蛋白在29 kDa处显带（图7B）。

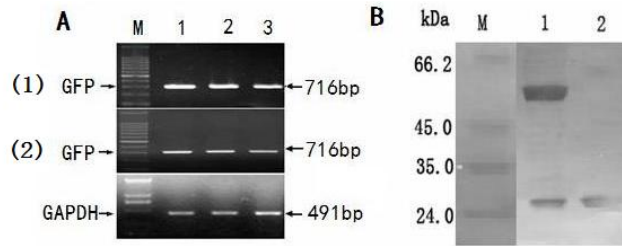


图7 pEGFP- α 1-AGP表达单克隆阳性细胞株的RT-PCR与Western blot鉴定

A: (1) (2) 分别为细胞株基因组DNA、RT-PCR的GFP基因的扩增检测, 1、2、3为每组同时进行3次相同的实验; B: Western blot 鉴定pEGFP- α 1-AGP重组融合蛋白的表达. 1:pEGFP- α 1-AGP重组融合蛋白WB检测; 2:空载体pEGFP-C1的阳性对照组。

3 讨论

3.1 北京油鸡 α 1-酸性糖蛋白结构与功能分析

α 1-酸性糖蛋白以天冬酰胺的酰胺基为糖类结合点, 糖类结合位点的三肽序列为Asn-X-Ser/Thr, 形成N-糖苷键型。通过<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>预测北京油鸡 α 1-AGP存在5个潜在的天冬酰胺糖基化位点, 与人^[17]、猪、小鼠相同, 而与兔子6个糖基化位点不同, 但各物种在北京油鸡36、90、97三位点都有天冬酰胺糖基化结合位点。北京油鸡 α 1-AGP在26-166和93-183位4个Cys间形成2个二硫键, 与人、猪和兔在数量和位置上都相同。北京油鸡 α 1-AGP的5个天冬酰胺糖基化结合位点, 4个PKC磷酸化位点和CK2磷酸化位点都位于N末端或中间区段, 这也许说明北京油鸡 α 1-AGP的N末端和中间区段与其活性功能和结构的稳定性都是至关重要的。

3.2 影响 pEGFP- α 1-AGP 转染表达的各种因素

质粒DNA浓度、脂质体浓度、脂质体-DNA复合物的孵育时间、细胞生长状态以及血清均对转染率有直接影响。随着脂质体量的增加, 融合蛋白的表达效率在提高, 但脂质体由于带有很强正电荷, 对细胞亦有毒性, 浓度过高同样会引起细胞形态和功能异常, 甚至坏死。这一结果与钱锋等^[18]和李扬^[19]对Vero细胞和牛胎儿成纤维细胞的研究结果一致。当DNA浓度过高时, 细胞脱落或死亡, 这一结论与Tseng^[20]对Hela细胞研究的结论一致。脂质体-DNA复合物孵育时间过长, 细胞由于长时间处于营养不足状态, 转染效率降低, 甚至死亡; 转染过程中, 血清中含有带负电荷的蛋白质, 可结合带正电荷的脂质, 从而降低脂质体与DNA形成复合物的能力, 使转染率降低^[17]。作为真核细胞转染方法, 脂质体法比病毒载体法更简单、更安全, 而且不限制所携带DNA的大小^[21,22]。

实验中, 我们发现生长增殖快的细胞转化效率更高, 所以选用生长状态良好的细胞进行转化实验, 可能由于正处于生长较为旺盛的时期, 包括荧光蛋白在内的蛋白质合成较为活跃, 因而荧光蛋白表达量较高。王海等用电穿孔法转化绵羊胎儿成纤维细胞认为对数期细胞转化效率是平台期细胞的两倍多, 认为细胞处于有丝分裂期更易感受外源DNA^[23]。

3.3 pEGFP- α 1-AGP 在细胞中的定位

采用激光共聚焦显微镜观察绿色荧光在北京油鸡成纤维细胞中的分布, 以确定 α 1-AGP-GFP融合蛋白在细胞中的分布。在转染空载体pEGFP-C1的阳性对照组中, 绿色荧光均匀的分布于整个细胞, 呈弥散分布, 说明仅有GFP表达; 而在转染融合基因pEGFP- α 1-AGP的细胞中, 转染24h后, 北京油鸡成纤维细胞中开始出现绿色荧光, 细胞核内绿色荧光较强, 而细胞质中绿色荧光较弱, 在转染48h后, 绿色荧光更加集中于细胞核, 说明融合蛋白多分布于细胞核内。

可见处于增殖、不同分裂时期的转染细胞, 而且转染细胞的生长和增殖与对照组没有明显的差异, 说明在一定范围内转染细胞不受外源基因影响, 另外, 在GFP转染其他肿瘤细胞系和人成纤维细胞系的研究中, 也发现大部分GFP的阳性克隆细胞对细胞本身的倍增时间没有影响。细胞核是储存和

复制遗传信息的场所,在一定程度上控制着整个细胞的生命活动,本研究用GFP作为报告基因来确定 $\alpha 1$ -AGP主要分布于细胞核中,为我们进一步进行 $\alpha 1$ -AGP基因的功能研究提供了线索和思路。

3.4 北京油鸡成纤维细胞 pEGFP- $\alpha 1$ -AGP 阳性细胞株的建立

在阳性细胞抗性筛选的过程中,有少部分细胞虽然没有观察到荧光的表达,但在药物抗性筛选过程中一直能够存活,可能是由于细胞内存在相关的限制性内切酶类,将转入细胞内的荧光蛋白基因编码区随机切开,使之不能正常表达,但抗性基因部分却没有破坏,使其具有抗药性却不表达荧光,只有整合到基因组上的外源基因才不会随着细胞的减数分裂而丢失。能观察到荧光表达,并不能证实荧光蛋白基因已经整合到细胞基因组染色体上,必须进行克隆化培养。因此,荧光蛋白基因转染稳定表达,荧光强度高的细胞组,转染 48 h 后,采用有限稀释法对阳性细胞进行稀释培养, G418 抗性筛选 3~4 周,可见明显的抗性细胞集落,再转入新培养板中培养,获得稳定表达 pEGFP- $\alpha 1$ -AGP 阳性表达成纤维细胞株。并通过 RT-PCR 与 Western blot 证实了荧光蛋白基因已经整合进北京油鸡成纤维细胞基因组中,获得正常的表达。

成纤维细胞由于取材方便、生长快,转基因效率高和易形成单克隆等特点,成为转基因动物克隆核供体的优势细胞。建立成纤维细胞体外培养模式是转基因动物克隆生产的前提,但在细胞单克隆时,由于细胞经稀释和筛选,细胞密度很低,而且体细胞较肿瘤细胞和转化细胞系形成克隆慢,本实验采用对数生长期条件下培养细胞进行抗性筛选,建立了转基因成纤维细胞体外培养及筛选模式。另一方面绿色荧光蛋白EGFP作为报告基因,可根据荧光强度直接反应外源基因的表达量,可作为选择转基因细胞有用而可靠的标志,为转基因动物克隆中选择外源基因高表达的供核细胞,可大大提高转基因动物的生产效率。

参考文献 (References):

- [1] Sadakane Y, Matsunaga H, Nakagomi K, Hatanaka Y, Haginaka J. Protein domain of chicken α_1 -Acid glycoprotein is responsible for chiral recognition. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 295(3): 587-590.
- [2] Frenette Charron JF, Breton G, Badawi M, Sarhan F. Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 2002, 517(1-3): 129-132.
- [3] Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, 1996, 318(1): 1-14.
- [4] George A, Recca J, Taylor M. Nucleotide sequence of rat $\alpha 1$ -acid glycoprotein messenger RNA. *J Biol Chem*, 1981, 256(21): 11199-11202.
- [5] Herve F, Gomas E, Duche CJ. Evidence for differences in the binding of drugs to the two main genetic variants of human $\alpha 1$ -acid glycoprotein. *J Clin Pharmacol*, 1993, 36(3): 241-249.
- [6] 李金恒, 李勇, 许劲秋, 庄一义, 蔡明虹, 宫剑滨. 健康男性成人血清 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白浓度及其与年龄的相互关系. *临床检验杂志*, 1999, 17(5): 41-43.
- [7] Li S, Loyd DK. Direct chiral separation by capillary electrophoresis using capillaries packed with an $\alpha 1$ -acid glycoprotein chiral stationary phase. *Anal Chem*, 1993, 65(1): 3684-3690.
- [8] 杨官品, 刘永健, 孙雪, 沈怀舜, 许璞, 张学成. 条斑紫菜丝状孢子体 cDNA 文库构建及抗病相关基因鉴定. *青岛海洋大学学报(自然科学版)*, 2003, 33(1): 47-52.
- [9] Schnimid K, Kaufmann H, Isemura S, Bauer F, Emura J, Motoyama T, Ishiguro M, Nanno S. Structure of 1-acid glycoprotein. The complete amino acid sequence, multiple amino acid substitutions, and homology with the immunoglobulins. *Biochemistry*, 1973, 12(14): 2711-2724.
- [10] Ray BK, Ray A. Molecular cloning and nucleotide sequence of complementary DNA encoding rabbit alpha 1-acid glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 178(2): 507-513.
- [11] Stone RT, Maurer RA. Cloning and developmental regulation of alpha-1-acid glycoprotein in swine. *Dev Genet*, 1987, 8(4): 295-304.
- [12] Zhou XM, Ma YH, Guan WJ, Zhao DM. Establishment and identification of Debao pony ear marginal tissue fibroblast

- cell line. *Asian Australas J Anim Sci*, 2004, 17(10): 1338-1343.
- [13] Freshney RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 4th edn. New York: Wiley-Liss, 2000, 149-175.
- [14] 关伟军, 马月辉, 周雪雁, 刘桂林, 刘学东. 太行黑山羊成纤维细胞系建立与生物学特性研究. 中国农业科技导报, 2005, 7(5): 25-33.
- [15] Tsuchiya R, Yoshiki F, Kudo Y, Morita M. Cell type-selective expression of green fluorescent protein and the calcium indicating protein, yellow cameleon, in rat cortical primary cultures. *Brain Res*, 2002, 956(2): 221-229.
- [16] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南. 黄培堂等译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2001, 87-99.
- [17] Treuheit MJ, Costello CE, Halsall HB. Analysis of the five glycosylation sites of human alpha 1-acid glycoprotein. *Biochem J*, 1992, 283 (1): 105-112.
- [18] 钱锋, 肖成祖. 影响非洲绿猴肾细胞脂质体转染效率的因素. 生物技术通报, 1998, (5): 31-35.
- [19] 李扬, 吴凯峰, 郭旭东, 郭继彤, 旭日干. 脂质体介导外源基因体外转染牛胎儿成纤维细胞条件的优化. 遗传, 2002, 24(6): 653-665.
- [20] Tseng WC, Haselton FR, Giorgio TD. Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 5(1): 53-64.
- [21] Gill DR, Southern KW, Moford KA, Seddon T, Huang L, Sorgi F, Thomson A, MacVinish LJ, Ratcliff R, Bilton D, Lane DJ, Littlewood JM, Webb AK, Middleton PG, Colledge WH, Cuthbert AW, Evans MJ, Higgins CF, Hyde SC. A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther*, 1997, 4(3): 199-209.
- [22] Escρίου V, Carrière M, Bussone F, Wils P, Scherman D. Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer. *J Gene Med*, 2001, 3(2): 179-187.
- [23] 王海, 陆泉枝, 连正兴, 李宁, 吴常信. 电穿孔导入绿色荧光蛋白基因于绵羊胎儿成纤维细胞研究. 中国畜牧杂志, 2004, 40(2): 5-8.