

siat7e 基因和 st3gal I 基因双表达载体的构建及其初步应用

陈小云, 张 敏, 张启龙, 王 磊, 王 栋, 蒋桃珍

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2012-08-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 04-0006-05 [中图分类号] Q785

[摘 要] 应用聚合酶链式反应(PCR)技术,从人类基因组中扩增出全长为 1011 bp 的唾液酸转移酶(siat7e 基因),并从鸡基因组中扩增出全长为 1029 bp 的 β -半乳糖苷 α -2,3-唾液酸转移酶 I (ST3GAL I) 基因。将它们分别克隆入 pMD18-T 载体中。对扩增的全长 siat7e 基因序列采用 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切后连接入 pReceiver 真核表达载体,构建 pRE-SIAT 重组表达载体,进而,对扩增的全长 st3gal I 基因采用 *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切,后连接入 pRE-SIAT 重组表达载体,构建 pRE-SIAT-ST3 重组真核表达载体。经限制性内切酶消化及 DNA 序列分析,证实构建的重组表达质粒是正确的。将构建的双基因表达载体转染 MDCK 细胞,利用荧光显微镜观察,可见细胞表达明显的绿色荧光,从而初步证实了外源基因在 MDCK 细胞中的正确表达。本研究为最终构建能够适应悬浮培养,并且对禽流感病毒更为易感的 MDCK 细胞系奠定了基础。

[关键词] siat7e 基因;st3gal I 基因;表达载体;MDCK 细胞

The Construction and Preliminary Application of Double-gene Express Vector that Express Siat7e Gene and St3gal I Gene Simultaneously

CHEN Xiao-yun, ZHANG Ming, ZHANG Qi-long, WANG Dong, JIANG Tao-zhen

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: The complete gene of sialyl transferase (siat7e gene) was amplified from human genome by polymerase chain reaction (PCR), and the complete gene of α -2,3-galactosyltransferase I (ST3GAL I) gene was amplified from chicken genome by PCR. Then the two genes were cloned into clone vector pMD18-T separately. The complete siat7e gene was ligated with express vector pReceiver by *Bam*H I/*Pst* I double digestion to construct the pRE-SIAT express vector. Then the complete st3gal I gene was ligated with express vector pRE-SIAT by *Sac* I/*Xho* I double digestion to construct the pRE-SIAT-ST3 express vector. Restriction enzyme digestion and DNA sequencing analysis suggested that the recombinant expression plasmid was correct. The double-gene express vector was transfected into MDCK cell. Detected by fluorescence microscope, the GFP was distributing in the transfected cell. So we can conclude that the foreign genes were express corrected in the MDCK cell. This study establishing foundation for the final construction of a MDCK cell line that adapt to suspension culture and more susceptible to avian influenza virus.

Key words: siat7e gene;st3gal I gene; express vector; MDCK cell

基金项目: 国家自然科学基金(项目批准号 31101817);“863”项目课题“疫苗与诊断试剂创制及工艺创新”子课题:“重大动物疫病疫苗悬浮培养关键技术研究”(2011AA10A213)

作者简介: 陈小云,博士,副研究员,从事细胞的保藏和研究工作。E-mail:caucxy@163.com

大多数连续细胞系在大规模病毒生产过程中的一个重要缺陷是由于这些细胞属于贴壁依赖性细胞,因而需要表面贴附以进行增殖。在工业化生物反应器生产中,采用微载体可以提供细胞生长表面。尽管这一方案能获得较高的病毒产率,但是,与全悬浮细胞增殖方案相比,这一方案还是显得过于繁琐。因此,构建和应用能在全悬浮条件下增殖的 MDCK 细胞系,将极大方便禽流感病毒的放大培养工艺。

由于 MDCK 细胞自身的贴壁特性较强,与 BHK-21 细胞相比,采用常规的悬浮细胞驯化技术,很难直接将 MDCK 细胞驯化为适应全悬浮培养条件的细胞。并且,由于现行《中国药典》和《中国兽药典》对用于疫苗生产的传代细胞的代次范围都有较严格的规定,以防传代细胞在超过一次的代次范围后,产生致肿瘤性等安全性问题。这也限制了采用长期悬浮培养的方法,将贴壁依赖性 MDCK 细胞驯化为适应全悬浮培养细胞的策略。因此,有必要尝试采取其他更为快捷而有效的驯化方法。已有的研究表明,将控制细胞贴壁生长特性的人类 *siat7e* 基因,转染 MDCK 细胞,能够使该细胞失去贴壁依赖特性,从而适应悬浮培养环境^[1]。

此外,流感病毒通过其表面的血凝素(HA)与细胞表面唾液酸寡糖受体结合侵染宿主细胞。禽流感病毒倾向识别 $\alpha-2,3$ 连接型受体(NeuAc $\alpha-2,3$ -Gal),而人流感病毒倾向识别 $\alpha-2,6$ 连接型受体(NeuAc $\alpha-2,6$ -Gal)。目前 H5N1 和 H9N2 亚型流行株仍保持典型的 NeuAc $\alpha-2,3$ -Gal 受体结合倾向性,因此,提高 MDCK 工程细胞系表面受体丰度,有可能改进禽流感病毒分离株的生长滴度及蚀斑形成能力。

为此,本研究克隆了编码人的唾液酸转移酶 ST6GalNac V 的 *siat7e* 基因,以及鸡 β -半乳糖苷 $\alpha-2,3$ -唾液酸转移酶 I (st3gal I) 基因,并将它们构建在同一个真核表达载体,进行双基因表达,以期构建能够适应悬浮培养,并且对禽流感病毒更加易感的 MDCK 细胞系,为应用 MDCK 细胞规模化生产禽流感疫苗奠定基础,并与其他贴壁细胞的悬浮驯化提供新思路。

1 材料与方法

1.1 菌株与载体 受体菌 DH5 α 购自北京纽朴生物技术开发中心;pMD18-T 载体购自宝生物工程

有限公司。真核表达载体 pReceiver, 本室保存。

1.2 试剂 基因组提取试剂盒 QIAamp® DNA Mini Kit, QIAGEN 公司产品;Taq DNA 聚合酶、DL-2000 DNA 分子量标准、限制性内切酶 *Bam*H I、*Pst* I、*Sac* I 和 *Xho* I、IPTG、X-Gal、dNTP, 宝生物有限公司;氨苄青霉素、琼脂糖凝胶, Sigma 公司;DNA 片段玻璃奶快速纯化回收试剂盒, 博大泰克生物基因技术有限公司;质粒小量快速提取试剂盒, 北京天根生物技术公司。

1.3 人和鸡基因组 DNA 的提取 参照基因组提取试剂盒 QIAamp® DNA Mini Kit 的说明书中介绍的血液中基因组提取方法进行,并稍作修进。具体步骤如下:取 1.5 mL 血液,10000 $\times$ g 离心 2 min,弃上清;用 180 μ L 酶裂解缓冲液重悬沉淀,37 $^{\circ}$ C 作用 45 min;加 25 μ L 蛋白酶 K 和 200 μ L 缓冲液 AL, 涡旋混匀,70 $^{\circ}$ C 作用 30 min;加 200 μ L 无水乙醇,涡旋混匀后,加入 DNeasy 微型离心柱上,8000 $\times$ g 离心 1 min;将 DNeasy 微型离心柱放入一个新的 2 mL 收集管中,加入 500 μ L 缓冲液 AW2,14000 $\times$ g 离心 5 min;将 DNeasy 微型离心柱放入一个新的 1.5 mL eppendorf 管中,加入 200 μ L 缓冲液 AE,室温放置 1 min,8000 $\times$ g 离心 1 min,滤出液即为纯化后基因组 DNA 溶液。

1.4 引物设计 参考 GenBank 中已登录的 *siat7e* 基因 st3gal I 基因序列,利用 Oligo6.0 软件,自行设计并合成了 2 对引物,其中引物对 V1581U/V1581L,用于扩增 *siat7e* 基因。这对引物的扩增产物包含了完整的 *siat7e* 基因序列,并在 ORF 两端引入了便于进一步克隆的两个酶切位点 *Bam*H I 和 *Pst* I (下划线表示)。预期的扩增产物大小为 1027 bp。引物对 C0384U/C0384L,用于扩增 st3gal I 基因。这对引物的扩增产物包含了完整的 st3gal I 基因序列,并在 ORF 两端引入了便于进一步克隆的两个酶切位点 *Sac* I 和 *Xho* I (下划线表示)。预期的扩增产物大小为 1047 bp。具体引物序列如下:

V1581U: taggatccATGAAGACCCTGATGCGCCA

V1581L: aactgcagCTAGAACACAGTTTATTCTCA

C0384U: tagagctcATGGTGACCGTGCGCAAG

C0384L: aactgcagTTAGCGGCCCTTGAAGAAC

1.5 PCR 扩增 以纯化后的人和鸡基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。采用 50 μ L 反应体系:

10 × Buffer 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, 25 mmol/L 的上下游引物各 1 μ L, 模板 DNA 5 μ L, 5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, 补加灭菌超纯水至总体积 50 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 加入 Taq DNA 聚合酶; 94 $^{\circ}$ C 40 S, 52 $^{\circ}$ C 40 S, 72 $^{\circ}$ C 80 S, 共进行 31 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 8 μ L PCR 产物, 用 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 扩增结果。

1.6 PCR 产物的纯化、酶切、连接与转化 用 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 切下目的条带, 用 DNA 片段玻璃奶快速纯化回收试剂盒回收。连接时, 首先将 V1581U/ V1581L 引物对的扩增产物, 以及 C0384U/ C0384L 引物对的扩增产物, 分别与 pMD18 - T 载体连接, 在 0.5 mL eppendorf 管中加入 1 μ L pMD18 - T 载体和 4 μ L 纯化后的 PCR 产物, 再加入 5 μ L Ligation Solution I, 16 $^{\circ}$ C 反应 30 min; 取出 5 μ L, 加入与 DH5 α 感受态细胞配套的溶液 A (10 μ L) 和溶液 B (35 μ L); 加入 50 μ L 感受态细胞, 冰上放置 20 min, 再室温放置 10 min; 再加入 200 μ L LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 150 rpm 振荡 40 min; 取 200 μ L 菌液涂布于 LB / Amp + / X - Gal / IPTG 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜 (12 - 16 h), 观察菌落生长情况, 根据蓝白斑筛选重组转化菌。得到的重组质粒分别命名为 pMD18 - V1581 和 pMD18 - C0384。

1.7 重组 PCR 产物质粒的酶切及真核表达载体的构建及鉴定 将 pMD18 - V1581 质粒及重组表达载体 pReceiver, 分别用内切酶 *Bam*H I 和 *Pst* I 进行双酶切, 连接, 得到重组载体 pRE - SIAT。再将 pMD18 - C0384 质粒及构建的重组载体 pRE - SIAT 用内切酶 *Sac* I 和 *Xho* I 进行双酶切, 连接, 获得 pRE - SIAT - ST3 重组真核表达载体。转化 DH5 α 细胞, 挑取白色菌落, 经培养后采用质粒小量快速提取试剂盒提取质粒。从载体 pRE - SIAT - ST3 中选择位于插入片段两侧的两个酶切位点 *Bam*H I / *Pst* I, 以及内切酶 *Sac* I / *Xho* I 进行双酶切鉴定。将酶切鉴定的重组质粒用无菌超纯水稀释 100 倍, 取 1 μ L 为模板, 采用前述反应体系和反应条件进行 PCR 扩增。同时, 采用 PCR 上游引物作为测序引物, 对酶切和 PCR 鉴定呈阳性的重组质粒进行序列测定。由北京三博远志公司完成。

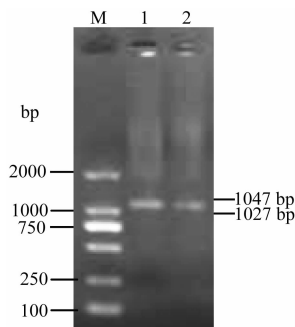
1.8 重组载体 pRE - SIAT - ST3 电转化 MDCK 细

胞 采用德国 QIAGEN 公司质粒纯化试剂盒, 提取 pRE - SIAT - ST3 质粒, 并将质粒浓度调整为 1 μ g/mL。将 MDCK 细胞扩大培养后, 胰酶消化, 离心后, 作细胞计数, 并用 BioRAD 公司的电击缓冲液, 将细胞浓度调整为 1.1×10^6 活细胞/mL。取 10 μ L 质粒, 加入 90 μ L 细胞悬液, 采用 BioRAD 电转化仪, 在 0.2 cm 电击杯中进行电击。电击条件为: 150 V, 5 ms。电击后, 立即将细胞轻柔加入到含有 5 mL 完全生长培养液的 6 孔细胞板内, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养。同时, 设立未转化的正常 MDCK 细胞对照。

1.9 转化细胞的荧光观察 将电转化的 MDCK 细胞, 在 6 孔板中培养 24 小时后, 采用 Olympus IX71 倒置荧光显微镜, 进行荧光显微镜观察。由于表达载体 pRE - SIAT - ST3 中带有 eGFP 序列, 因此, 转化后的 MDCK 细胞, 应可观察到绿色荧光。

2 结果与分析

2.1 siat7e 基因和 st3gal I 基因的扩增 在进行了 31 个循环的扩增后, 经 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳, 并与 DL - 2000 标准分子量比较, 结果表明, 得到了大小分别为 1027 bp 和 1047 bp 的 siat7e 基因和 st3gal I 基因片段 (图 1)。

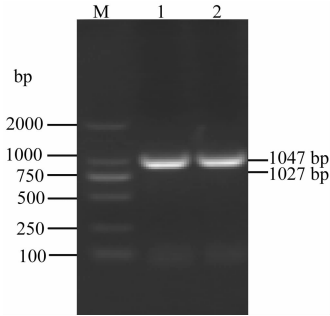


M: DL - 2000 分子量标准; 1: siat7e 基因扩增产物;

2: st3gal I 基因扩增产物

图 1 siat7e 基因和 st3gal I 基因的 PCR 扩增

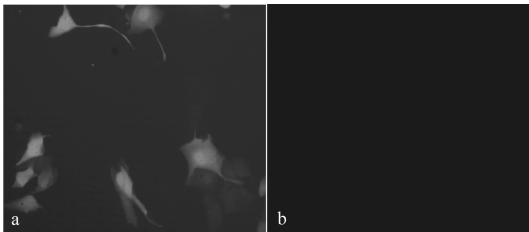
重组表达载体的鉴定 将构建的重组真核表达载体 pRE - SIAT - ST3, 分别采用两组内切酶, 即内切酶 *Bam*H I / *Pst* I 以及内切酶 *Sac* I / *Xho* I, 分别进行双酶切鉴定, 均能得到预期大小的片段。采用引物对 V1581U/ V1581L 和 C0384U/ C0384L 进行 PCR 鉴定, 得到的 PCR 产物大小, 也与预期一致 (图 2)。同时, 采用 PCR 的上游引物, 对重组载体进行序列测定, 结果表明, 序列是正确的。



M:DL-2000 分子量标准;1:siat7e 基因的 PCR 鉴定结果;
2:st3gal I 基因的 PCR 鉴定结果

图2 siat7e 基因和 st3gal I 基因的 PCR 扩增

2.3 电转化细胞的荧光显微镜观察 采用 Olympus IX71 倒置荧光显微镜,通过观察载体自带的 eGFP 荧光蛋白的表达情况,验证外源基因的表达情况。由于 eGFP 位于外源基因的 C 端,因此,从理论上讲,只有充分表达外源基因后,eGFP 才会得到表达。观察结果表明,与对照细胞相比,电转化 MDCK 细胞可见明显的绿色荧光,证明 eGFP 基因得到了有效的表达(结果见图3)。



a:转染双基因真核表达载体的 MDCK 细胞;b:正常细胞对照

图3 转染双基因真核表达载体的 MDCK 细胞的荧光观察

3 讨论

目前,工业化生产流感疫苗,已有若干细胞系可供选择。但是,一方面新近发展起来细胞系,如人 PER. C6、鸭 EB66 或鸭 AGE1. CR 细胞等,这些细胞系是为了疫苗生产而特别研制的,通常在无血清条件下悬浮培养。然而,除了 PER. C6 细胞外,对于大规模生产中的细胞生长和病毒复制仅仅进行了极少研究,背景研究资料的匮乏反过来限制了这些新细胞系的进一步应用。更为重要的是,这些细胞系都受到了严格的专利保护;另一方面,可以通过商业途径获得的贴壁细胞系,如绿猴肾细胞(Vero)或 MDCK 细胞,是当前流感疫苗生产最有希望的哺乳动物细胞系,并且多年来已对这两个细胞系进行了较为系统和详尽的研究。其中 MDCK 细胞是培养和分离流感病毒的最佳哺乳动物细胞系,

此细胞系具有感染后迅速产生流感病毒、在短时间内取得高滴度和产生的流感病毒血凝素(HA)含量高等特点,并且可用于增殖大多数流感病毒。更为重要的是,采用 MDCK 细胞培养生产的疫苗,其诱导的免疫反应,与鸡胚源疫苗一样良好^[2]。美国富道公司实验室已经将 MDCK 细胞系应用到马流感疫苗的生产中,这种流感疫苗生产工艺的转变使生产成本下降到鸡胚培养工艺的 40%,而抗原的效力却提高了 3 倍,同时消除了外源因子污染的危险。有研究者比较了在不同类型微载体上培养的 MDCK 细胞,与鸡胚之间在增殖 A 型流感病毒能力上的差异,发现在搅拌瓶培养的以 Cytodex I 为微载体的细胞,其毒价上可达 5.0×10^4 HAU/mL,而鸡胚则为 2.0×10^5 HAU/mL。根据这一数据,他们估算在固相微载体上培养的 1000 L MDCK 细胞,约等于 30000 枚鸡胚,或者说是 1 L 等于 30 枚鸡胚^[2]。

研究者通过采用 DNA 微矩阵的方法,比较了贴壁依赖性和贴壁非依赖性 Hela 细胞的转录谱,发现 siat7e(ST6GalNac V)是控制细胞贴壁程度的重要基因^[3]。通过显微评估和监测细胞在剪切流体腔中的脱壁情况,发现更高水平的 siat7e 基因转录对应于更低程度的细胞贴壁,而用 siRNA 抑制 siat7e 基因转录,能显著增强细胞的贴壁功能。siat7e 基因编码人的唾液酸转移酶 ST6GalNac V,该酶属于唾液酸转移酶 ST6GalNac 家族的成员,是一种 II 型高尔基膜蛋白,能将唾液酸从供体 CMP-Neu5Ac 转移至神经苷脂 GalNac 残基 GM1b 上,形成 GD1α^[4]。国外已有研究者将 siat7e 基因转染 MDCK 细胞,成功获得了适应悬浮培养环境的 MDCK 细胞系^[1]。

本研究构建的 siat7e 基因和 st3gal I 基因双基因真核表达载体,在转化 MDCK 细胞后,若能使 MDCK 细胞适应悬浮培养,并且对禽流感病毒更加易感,为极大地方便应用 MDCK 细胞规模化生产禽流感疫苗。目前,我们已通过本研究获得了该载体,并在将该真核表达载体电转化 MDCK 细胞后,成功观察到了外源基因 eGFP 的表达,初步证实我们构建的真核表达载体 pRE-SIAT-ST3 已成功转化至 MDCK 细胞,并得到了有效表达。下一步,我们将进一步研究载体中的两个外源基因 siat7e 基因和 st3gal I 基因的表达情况,以及转化后 MDCK 细胞的表型特征,特别是其适应悬浮培养的特性,以及对禽流感病毒的敏感性。

猪肺炎支原体体外抗菌药物敏感性试验研究

张纯萍, 沈青春, 胡海燕, 王芳, 徐士新, 宁宜宝, 高和义

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2012-10-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 04-0010-03 [中图分类号] S852.62

[摘要] 为了解猪肺炎支原体对抗菌药物的敏感性, 采用宏量肉汤稀释法对 4 株猪肺炎支原体的最小抑菌浓度 (MIC) 值进行了测定。结果表明, 猪肺炎支原体对泰妙菌素和环丙沙星最为敏感, $\text{MIC} \leq 0.03 \mu\text{g/mL}$, 其次分别为四环素类药物 (包括四环素和多西环素)、林可霉素和泰乐菌素, 而对氟苯尼考的敏感性则较差。本研究可为猪支原体肺炎的防控以及抗菌药物的合理使用提供参考。

[关键词] 猪肺炎支原体; 抗菌药物; 敏感性; 最小抑菌浓度

Study on *In vitro* Antimicrobial Susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae*

ZHANG Chun-ping, SHEN Qing-chun, HU Hai-yan, WANG Fang,

XU Shi-xin, NING Yi-bao, GAO He-yi

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to investigate the antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae*, broth macrodilution method was used to detect minimum inhibitory concentration (MIC) of four isolates in this study. Results showed that tiamulin and ciprofloxacin ($\text{MIC} \leq 0.03 \mu\text{g/mL}$) were the most susceptible to *Mycoplasma pneumoniae*, followed by tetracyclines (tetracycline and doxycycline included), lincomycin and tylosin. Reduced susceptibility to florfenicol of *M. hyopneumoniae* was observed. This study provides references for prevention and therapy of *Mycoplasma pneumoniae* of swine and appropriate use of antimicrobial drugs.

Key words: *Mycoplasma hyopneumoniae*; antimicrobial drugs; susceptibility; MIC

猪肺炎支原体是引起猪支原体肺炎 (又称猪喘气病) 的病原, 在规模化养殖场普遍存在, 给世界各

国的养猪业带来巨大危害^[1]。虽然使用疫苗可以有效地减少感染, 但是在饲料和饮水中使用抗生素

基金项目: 北京市科技新星计划 (2009B52); 863 计划课题 (2012AA101302)

作者简介: 张纯萍, 女, 副研究员, 从事细菌流行病学及其耐药性研究。E-mail: chunpingzhang@sohu.com

参考文献:

- [1] Chu C, Lugovtsev V, Golding H, et al. Conversion of MDCK cell line to suspension culture by transfecting with human siat7e gene and its application for influenza virus production [J]. PNAS 2009, 106: 14802-14807.
- [2] Tree J A, Richardson C, Fooks A R, et al. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains [J]. Vaccine, 2001, 19: 3444-3450.

- [3] Jaluria P, Betenbaugh M, Konstantopoulos K, et al. Application of microarrays to identify and characterize genes involved in attachment dependence in HeLa cells [J]. Metab Eng, 2007, 9: 241-251.
- [4] Regina Todeschini A, Hakomori S I. Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1780: 421-433.

(责任编辑: 陈希)