

于建宁, 杨燕燕, 于峰祥, 等. 硫化物醌氧化还原酶定向表达载体的构建及细胞转染表达检测[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1): 100-105.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.01.015

## 硫化物醌氧化还原酶定向表达载体的构建及细胞转染表达检测

于建宁<sup>1</sup>, 杨燕燕<sup>2</sup>, 于峰祥<sup>3</sup>, 时小艳<sup>4</sup>, 徐小波<sup>1</sup>, 王公金<sup>1</sup>

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所/动物品种改良和繁育重点实验室, 江苏 南京 210014; 2. 青岛市植物园管理处, 山东 青岛 266071; 3. 南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095; 4. 江苏食品职业技术学院医药与健康管理系, 江苏 淮安 223003)

**摘要:** 为建立硫化物醌氧化还原酶(*SQR*)的肠道定向表达载体, 同时通过转染小鼠肠道上皮细胞确定载体的有效性, 本试验采用重叠 PCR、中间载体法、酶切连接法获得重组载体, 通过脂质体转染法将重组载体转入小鼠肠道上皮细胞, 并鉴定重组载体的特异性表达。结果显示, 成功构建了以肠脂肪酸结合蛋白质(IFABP)为启动子的 *SQR* 肠道定向表达载体 pcDNA3.1(-)-IFABP-*SQR*-GFP, 并在小鼠肠道上皮细胞中检测到表达的融合绿色荧光蛋白质(GFP)。表明 IFABP 启动子能够在肠道细胞中定向启动 *SQR* 的表达。

**关键词:** 硫化物醌氧化还原酶; 定向表达载体; 肠脂肪酸结合蛋白质; 肠上皮细胞

**中图分类号:** S634.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)01-0100-06

## Construction of directioned expression vector for sulfide-quinone reductase gene and its expression

YU Jian-ning<sup>1</sup>, YANG Yan-yan<sup>2</sup>, YU Feng-xiang<sup>3</sup>, SHI Xiao-yan<sup>4</sup>, XU Xiao-bo<sup>1</sup>, WANG Gong-jin<sup>1</sup>

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Laboratory of Animal Improvement and Reproduction, Nanjing 210014, China; 2. Qingdao Botanical Gardens Management Office, Qingdao 266071, China; 3. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 4. Department of Medical and Health Management, Jiangsu Food Science College, Huai'an 223003, China)

**Abstract:** The directed expression vector pcDNA3.1(-)-IFABP-*SQR*-GFP for sulfide-quinone reductase (*SQR*) gene were successfully constructed by means of nested PCR, intermediate vector and restriction enzyme ligation. The vector was transfected into mouse intestinal epithelial cells by lipofection for the expression of *SQR* gene. The results revealed that the expression of green fluorescent protein was detected in mouse intestinal epithelial cells, indicative of the expression of *SQR* gene initiated by the promotor of intestinal fatty acid-binding protein (IFABP).

**Key words:** sulfide-quinone reductase (*SQR*); directed expression vector; intestinal fatty acid-binding protein (IFABP); intestinal epithelial cell

收稿日期: 2014-07-24

基金项目: 农业部转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08006-004); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(10)421]

作者简介: 于建宁(1980-), 女, 山东烟台人, 博士, 副研究员, 研究方向为动物生物技术与繁殖内分泌。(Tel) 025-84390336; (E-mail) jianningyu@aliyun.com

通讯作者: 王公金, (E-mail) wjgphd@163.com

环境友好型养殖业是畜牧业可持续健康发展的新方向。改革开放以来, 随着中国国民经济的全面、快速发展, 人民生活水平的不断提高, 中国畜牧业取

得了空前的发展。然而,随着畜牧场规模化、集约化和机械化程度的提高,畜禽粪便已成为一个不可忽视的污染源。畜禽粪便不仅会带来水体和土壤污染,也会带来严重的空气污染。据检测,一个年出栏  $1 \times 10^5$  头的养猪场,1 h 可向大气排出近 148.0 kg 氨气( $\text{NH}_3$ )、13.5 kg 硫化氢( $\text{H}_2\text{S}$ )、24.0 kg 粉尘和  $1.4 \times 10^9$  个菌体,这些物质的污染半径可达 5 km,而尘埃和病原微生物可随风传播 30 km 以上<sup>[1-2]</sup>。如何降低这些废气排放一直是困扰大型养猪场的难题之一。目前,猪场对这些废气只能做到一定程度上的控制,不能做到真正无害化。主要采取的控制方法有吸附法、焚烧法、化学与生物除臭剂法、洗涤法及生物过滤等<sup>[3-4]</sup>,这些方法对  $\text{H}_2\text{S}$ 、 $\text{NH}_3$  等有害气体有一定的控制作用,但因成本问题或是二次污染问题而不能大规模运用。所以寻求一种经济可行的废气无害化处理方案很有必要。

硫化物醌氧化还原酶(*SQR*)广泛存在于光营养和化学营养细菌(绿菌属、莢膜杆菌属、着色菌属等)中,它是 1 条 57 000 的多肽,能够分解  $\text{H}_2\text{S}$ <sup>[5-7]</sup>。1997 年,Shütz 等从莢膜红杆菌中分离纯化出 *SQR*,并将 *SQR* 基因成功克隆于大肠杆菌中,结果显示,大肠杆菌表达的 *SQR* 具有生物酶活性<sup>[6]</sup>。且 *SQR* 降解  $\text{H}_2\text{S}$  的反应无需进入细胞内,即在细胞外进行<sup>[8]</sup>。所以利用 *SQR* 能够降解  $\text{H}_2\text{S}$  的特性,使动物肠道中存在适量的 *SQR*,从而减少粪便中  $\text{H}_2\text{S}$  的排放。综合现在的分子生物学和细胞生物学手段,可以通过转基因技术进行基因改造,获得稳定表达 *SQR* 的转基因动物,有望一定程度上解决畜禽粪便中  $\text{H}_2\text{S}$  的污染问题。

肠道脂肪酸结合蛋白质(IFABP)是一类重要的脂肪酸转运蛋白质,其特异表达于小肠上皮吸收细胞,与食物中长链脂肪酸(LCFA)的吸收、靶向运输及代谢密切相关<sup>[9-10]</sup>。肠道脂肪酸结合蛋白质启动子是 IFABP 特异表达于肠道的关键,相关研究结果显示 IFABP 启动子具有种间保守性,大鼠 IFABP 启动子能够启动人生长激素在小鼠肠道中特异表达<sup>[10]</sup>。所以本研究利用大鼠 IFABP 启动子构建 *SQR* 基因的肠道定向表达载体,并检测其在小鼠肠道细胞中的表达情况,为下一步开展减少废气排放的转基因动物新品种培育的相关研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒及菌株

模板质粒 pMD18-T-*SQR-Myc* 由江苏省农业科学院家禽研究室自行构建;载体质粒 pcDNA3.1(-)、pEGFP-C3 由南京大学模式动物研究所高翔教授实验室馈赠;中间载体质粒 pMD-18T 购自大连 TaKaRa 公司;大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  由江苏省农业科学院家禽研究室保存。

### 1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Nhe* I、*Xba* I、*Xho* I、*Kpn* I, Prime STAR 高保真 DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶均购自大连 TaKaRa 公司;去内毒素中量质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、快速连接试剂盒(Liga Fast™ Rapid DNA Ligation System)购自 Promega 公司,转染试剂 Lipofectamine™ LTX 购自 Invitrogen 公司;胰蛋白酶、青、链霉素购自 SIGMA 公司;DMEM(高糖)、胎牛血清(FBS)购自 GIBCO 公司。

### 1.3 引物设计

根据 *SQR* 基因及绿色荧光蛋白质(GFP)基因序列,设计 PCR 反应引物 P1、P2、P3 与 P4。引物 P1、P2 扩增 *SQR-Myc*,P1 带有酶切位点 *Xho* I 及保护碱基;引物 P3、P4 扩增 *GFP*,P4 带有酶切位点 *Kpn* I 及保护碱基。根据 GenBank 中大鼠 IFABP 启动子序列设计 PCR 引物 P5、P6,P5 带有酶切位点 *Nhe* I 及保护碱基,P6 带有酶切位点 *Xba* I 及保护碱基。P1~P6 序列详见表 1。

表 1 引物 P1~P6 序列

Table 1 The sequences of promoters P1 to P6

引物名称	引物序列
P1	5'-CCGCTCGAGAATGGCTCATAT-3'
P2	5'-CCTTGCTCACCATCAGATCCTCTTCTGA-3'
P3	5'-GAAGAGGATCTGATGGTGAGCAAGGG-3'
P4	5'-GGGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCCA-3'
P5	5'-CGGCTAGCACGAACATTGACTGGAGT-3'
P6	5'-GCTCTAGATACTTTCCAAGTGCCATC-3'

### 1.4 pcDNA3.1-*SQR-GFP* 重组质粒的构建

PCR 重叠延伸扩增 *SQR-GFP*:以 pMD18T-*SQR-Myc* 为初始模板,P1、P2 终浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$ ,Prime

STAR 高保真 DNA 聚合酶, 50.0  $\mu\text{l}$  体系扩增 *SQR-Myc*, 并设为模板 1, 其循环条件为 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 48  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  85 s, 共 30 个循环。以 pEGFP-C3 为初始模板, 采用 P3、P4 终浓度 1  $\mu\text{mol/L}$ , 50.0  $\mu\text{l}$  体系扩增 GFP, 设为模板 2, 其循环条件为 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 共 30 个循环。胶回收后, 等摩尔比混合模板 1 和 2 成为模板 3, 以模板 3 为模板, 用引物 P1 与 P4, 50.0  $\mu\text{l}$  体系扩增 *SQR-GFP*, 反应条件为 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 50  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 共 30 个循环。PCR 反应体系 (50.0  $\mu\text{l}$ ): 上游引物 0.5  $\mu\text{l}$ , 下游引物 0.5  $\mu\text{l}$ , DNA 1.0  $\mu\text{l}$ , Prime STAR 0.5  $\mu\text{l}$ , 5 $\times$ Buffer 10.0  $\mu\text{l}$ , dNTP 1.0  $\mu\text{l}$ , dd H<sub>2</sub>O 37.0  $\mu\text{l}$ 。

pcDNA3.1-*SQR-GFP* 重组质粒的获得: 模板 3 PCR 产物回收后用 *Xho* I 与 *Kpn* I 酶切后连接到 pcDNA3.1(-), 连接产物采用 KCM 法转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 经氨苄青霉素筛选, 用 *Xho* I 和 *Kpn* I 双酶切鉴定。筛选阳性质粒即为 pcDNA3.1-*SQR-GFP* 重组质粒。

### 1.5 *SQR* 肠道特异表达载体 pcDNA3.1(-)-IFABP-*SQR-GFP* 的构建

PCR 扩增 IFABP 启动子片段: 以提取的大鼠基因组 DNA 初始模板<sup>[11]</sup>, 采用 P5、P6 终浓度 1  $\mu\text{mol/L}$ , 使用 Prime STAR 高保真 DNA 聚合酶扩增 IFABP, 50.0  $\mu\text{l}$  体系, 循环条件为 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 48  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  85 s, 共 30 个循环。

pcDNA3.1-IFABP-*SQR-GFP* 的连接及鉴定: 将 IFABP 的 PCR 产物回收后用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Kpn* I 双酶切, 纯化回收 1 352 bp 的目的片段; 同时用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Kpn* I 双酶切 pcDNA3.1(-)-*SQR-GFP*, 将酶切回收后的 pcDNA3.1(-) 载体质粒和 IFABP 目的片段按摩尔比 1:3 于 0.2 ml 的离心管中使用 T4 DNA 连接酶 16  $^{\circ}\text{C}$  连接过夜。连接产物用 KCM 法转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 从转化子的平板上随机挑取菌落, 扩增培养后提取质粒, 酶切鉴定, 经鉴定的阳性转化子测序后保存菌液及质粒。扩大培养细菌并中量提取质粒 pcDNA3.1(-)-IFABP-*SQR-GFP*, 备用。

### 1.6 小鼠肠道上皮细胞分离及原代培养

使用组织块培养法进行分离培养小鼠肠上皮细胞: ①无菌条件下 PBS 液清洗小肠 3 次, 剔除肠系膜, 将小肠移至培养皿中, 用 PBS 液将小肠内腔冲洗干净。用眼科剪刀纵向剖开肠管, 先用 PBS 液反

复清洗, 再用无血清的 DMEM/F12 清洗 3 次。清洗液中的抗生素为培养液中的 3 倍; ②将肠管剪成肉眼可见的大碎片, 用无血清的 DMEM/F12 清洗, 静置 1~2 min 使碎片自然沉降, 弃去上清液, 将肠组织剪成小于 1 mm<sup>3</sup> 的碎片, 再转移至 50 ml 的离心管中加无血清 DMEM/F12, 用移液管反复吹打, 1 000 r/min 离心 7 min; ③如上反复清洗组织块直至上清液澄清; ④用含 5% FBS 的 DMEM/F12 悬浮组织块并取适量种植于培养皿或培养瓶中。⑤培养 24 h 后换液, 继续培养。

### 1.7 小鼠胎儿成纤维细胞的分离及原代培养

将怀孕 12~14 d 的母鼠断颈处死, 取子宫中的胎儿。去掉头、四肢及内脏后, 用剪刀剪碎, 放入 0.25% 的胰蛋白酶中, 37  $^{\circ}\text{C}$  消化 10~20 min。加入含 10% (体积比) 犊牛血清的 DMEM/F12 终止消化, 机械吹打使细胞分散。取少量细胞悬液进行细胞计数后, 向悬液中加入含 10% 犊牛血清的 DMEM/F12, 使终浓度为 1 ml  $5\times 10^5\sim 8\times 10^5$  个。96 孔培养板每孔中加入 200  $\mu\text{l}$  悬液, 于 37.5  $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub>, 100% 湿度培养箱内培养。待细胞长成单层时换液, 以后隔天换半液。待细胞长到 100% 汇合时进行传代, 继续培养。

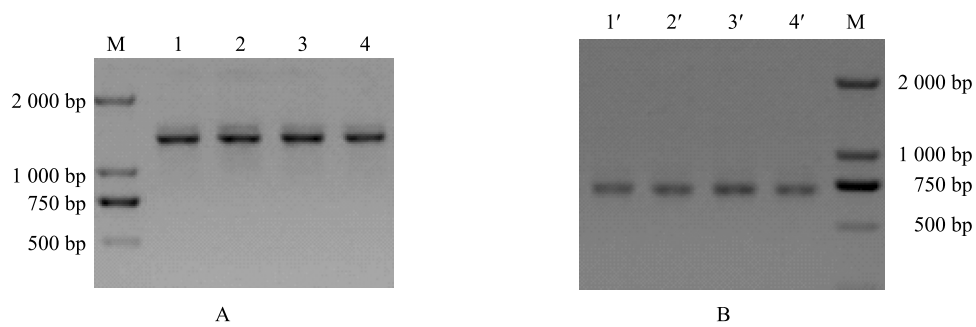
### 1.8 脂质体法转染小鼠肠道上皮细胞及成纤维细胞

转染体系如下: A 管中 100  $\mu\text{l}$  无血清 opti DMEM 培养基加入 3  $\mu\text{l}$  脂质体, 缓慢吹打 40 次, 吹打过程中注意避免气泡的产生。B 管中 100  $\mu\text{l}$  无血清培养基加 1  $\mu\text{g}$  重组质粒, 吹打数次使之混合均匀, 避免气泡产生。A、B 管静置 5 min 后将 B 管里的液体缓慢逐滴加入 A 管中, 缓慢吹打 40 次使之混合均匀, 吹打过程中避免产生气泡, 静置 30 min 后滴加到细胞培养板中, 轻晃培养皿使混合均匀, 置培养箱 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 4~6 h, 换成含 10% FBS 和 1% 双抗的完全培养基。转染 48 h 后于荧光显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 pcDNA3.1-*SQR-GFP* 重组质粒的构建

以 pMD18T-*SQR-Myc* 质粒为模板, 使用引物 P1、P2, 扩增 *SQR* 片段, 大小为 1 334 bp (图 1A)。以质粒 pEGFP-C3 为模板, 使用引物 P3、P4, 扩增 *GFP* 片段, 大小为 744 bp (图 1B)。

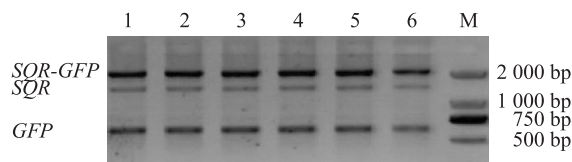


A: *SQR*; B: *GFP*。M: DL2000 marker; 1~4: *SQR* 基因扩增条带的 4 个重复样品; 1'~4': *GFP* 扩增条带的 4 个重复样品。

图 1 PCR 扩增 *SQR*、*GFP* 片段电泳图

Fig. 1 Profiling of *SQR* and *GFP* fragments amplified by PCR

以上述扩增产物 *SQR* 片段及 *GFP* 片段为模板, 用引物为 P1 和 P4, 采用重叠 PCR 方法将两种组件融合, 得到 *SQR-GFP* 片段, 该融合片段的大小为 2 048 bp (图 2)。

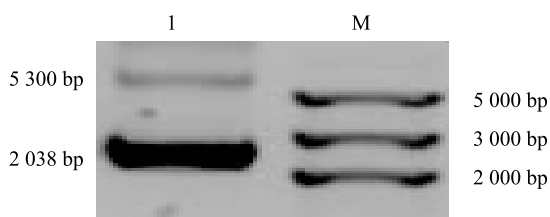


M: DL2000 marker; 1~6: *SQR-GFP* 扩增条带。

图 2 *SQR-GFP* 扩增片段电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of *SQR-GFP* fragment amplified by PCR

将构建好的 pcDNA3. 1-*SQR-GFP* 重组质粒用限制性内切酶 *Xho* I、*Kpn* I 双酶切, 酶切产物电泳可见大小为 2 038 bp 和 5 300 bp 的条带, 与基因图谱相符 (图 3)。



M: Marker; 1: pcDNA3. 1-*SQR-GFP* 双酶切电泳条带。

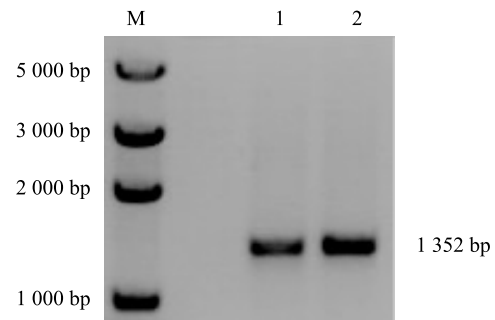
图 3 pcDNA3. 1-*SQR-GFP* 酶切鉴定

Fig. 3 Restriction enzyme digestion of pcDNA3. 1-*SQR-GFP*

## 2.2 *SQR* 肠道特异表达载体的构建

以大鼠基因组 DNA 为模板, 使用引物 P5、P6,

扩增 IFABP 片段, 大小为 1 352 bp (图 4)。



M: DL5000 marker; 1~2: IFABP 扩增条带。

图 4 IFABP 扩增片段电泳图

Fig. 4 Profiling of PCR products of IFABP

将重组质粒 pcDNA3. 1 (-)-IFABP-*SQR-GFP* 用限制性内切酶 *Nhe* I、*Xba* I 双酶切, 酶切产物电泳可见大小为 1 352 bp 和约 7 400 bp 的两条带, 与插入的目的片段和载体大小一致 (图 5)。

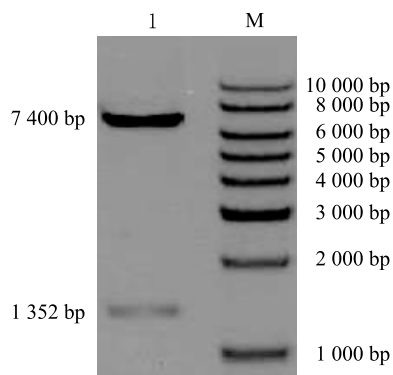
## 2.3 *SQR* 在肠道细胞中的特异表达

特异表达载体质粒 pcDNA3. 1-IFABP-*SQR-GFP* 分别感染小鼠肠道上皮细胞及成纤维细胞 48 h 后, 显微镜下观察荧光 (图 6)。图 6A 和图 6B 显示肠上皮细胞中表达的 GFP 荧光蛋白质, 而图 6C 和图 6D 中小鼠成纤维细胞中无绿色荧光蛋白质表达。可见, pcDNA3. 1-IFABP-*SQR-GFP* 在小鼠肠道上皮细胞中具有一定的表达特异性。

## 3 讨论

在转基因动物相关研究中, 构建合适的载体是重要的前提, 本研究通过大鼠基因组扩增肠道脂肪



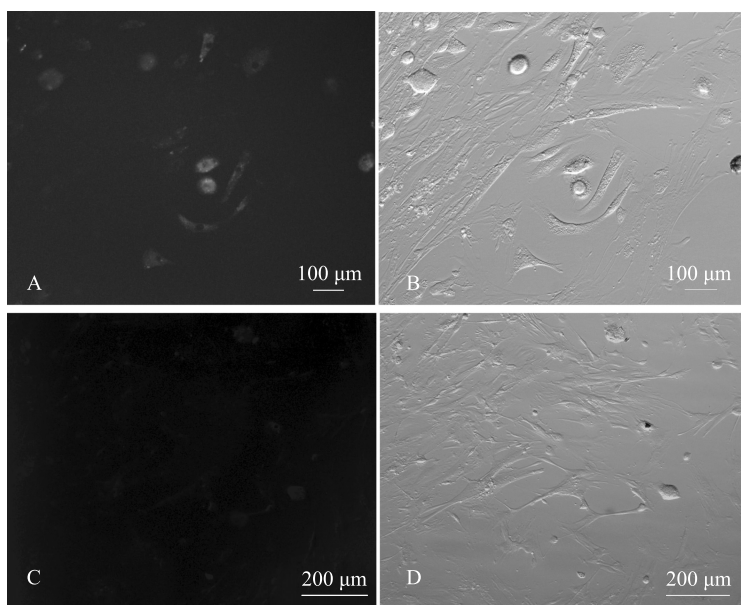


M: Marker; 1: pcDNA3.1-IFABP-SQR-GFP 双酶切电泳条带。

图 5 pcDNA3.1-IFABP-SQR-GFP 酶切鉴定

Fig. 5 Restriction enzyme digestion of pcDNA3.1-IFABP-SQR-GFP

酸结合蛋白质基因的启动子,期望该基因启动子在小鼠肠道上皮细胞中能够特异启动目的硫化物-醌氧化还原酶 (*SQR*) 基因的表达。研究表明,肠道脂肪酸结合蛋白质 (IFABP) 特异表达于小肠上皮细胞<sup>[9-10]</sup>, IFABP 启动子是 IFABP 特异表达于肠道的关键,相关研究结果表明 IFABP 启动子具有种间保守性。David 等<sup>[10]</sup> 研究表明,大鼠 IFABP 启动子能够启动人生长激素在小鼠肠道中特异表达,表达范围从十二指肠到末端结肠,其中在十二指肠,近端空肠,远端空肠及回肠的表达量与 IFABP 本身表达量无明显差异。同样,本研究结果表明,大鼠 IFABP 启动子能够启动 *SQR* 在小鼠肠道上皮中特异表达。以上结果都说明 IFABP 启动子能够启动目的基因在小鼠肠道细胞中的特异表达。



A: 表达绿色荧光蛋白质阳性小鼠肠上皮细胞; B: 与 A 同视野光镜下小鼠肠上皮细胞; C: 470 nm 光波激发下小鼠成纤维细胞; D: 与 C 同视野光镜下小鼠成纤维细胞。

图 6 pcDNA3.1-IFABP-SQR-GFP 转染 48 h 的荧光检测

Fig. 6 Fluorescence detection for cells transfected with pcDNA3.1-IFABP-SQR-GFP for 48 h

由于 IFABP 启动子插入位置在真核表达载体 pcDNA3.1 的多克隆位点,处于载体本身 CMV 启动子下游,故有可能发生 CMV 启动子启动 *SQR* 表达的情况,但添加的 IFABP 启动子序列,分别在 IFABP 的 154 ~ 156 碱基处均有 TAA 碱基序列,因此在理论上排除了 CMV 启动子引发 *SQR* 表达的可能性,

即原 CMV 启动子不会发挥启动作用,因此本试验采用脂质体转染法直接将 pcDNA3.1-IFABP-SQR-GFP 载体转染细胞进行鉴定。

本试验中,脂质体转染后 GFP 的表达效率并不高,原因可能是转染的原代小肠上皮细胞增殖很慢,且老化速度快,造成转染效率低下。另一方面可能

是 IFABP 启动子的启动效率不高,高效的表达效率还需要其他元件例如增强子等。因此下一步试验应该从提高表达效率方面进行深入研究,为获得高效表达 *SQR* 的特异表达载体作有力准备。

#### 参考文献:

- [1] 杨运松.太湖县规模养猪对环境的污染及防治策略[J].畜牧兽医杂志,2013,32(2):64-68.
- [2] 李怀旺.加强养殖业粪污治理走可持续健康发展之路[J].四川畜牧兽医,2010,234(4):10-11.
- [3] 李金秀.养殖场气味的产生及其控制技术[J].农业工程学报,2001,17(5):78-81.
- [4] 鲁聪达,杨继隆,高发兴.畜禽废物的无害化资源化处理技术[J].浙江工业大学学报,2003,31(2):192-196.
- [5] SHAHAK Y, ARIELI B, PADAN E, et al. Sulfide quinone reductase (*SQR*) activity in *Chlorobium* [J]. FEBS Lett, 1992, 299(2):127-130.
- [6] SHÜTZ M, SHAHAK Y, PANDAN E, et al. Sulfide-quinone reductase from *Rhodobacter capsulatus*[J]. J Biol Chem, 1997, 272(15):9890-9894.
- [7] REINARTZ M, TSCHAPE J, BRUSER T, et al. Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum* [J]. Arch Microbiol, 1998, 170(1):59-68.
- [8] SCHÜTZ M, MALDENER I, GRIESBECK C, et al. Sulfide-quinone reductase from *Rhodobacter capsulatus*: requirement for growth, periplasmic localization, and extension of gene sequence analysis [J]. J Bacteriol, 1999, 181(20):6516-6523.
- [9] GREEN R P, COHN S M, SACCHETTINI J C, et al. The mouse intestinal fatty acid binding protein gene: nucleotide sequence, pattern of developmental and regional expression, and proposed structure of its protein product [J]. DNA Cell Biol, 1992, 11(1):31-41.
- [10] DAVID A, SWEETSER S M. Transgenic mice containing intestinal fatty acid-binding protein-human growth hormone fusion genes exhibit correct regional and cell-specific expression of the reporter gene in their small intestine [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85:9611-9615.
- [11] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 3版. 北京:科学出版社, 2002.

(责任编辑:袁 伟)