

小鼠 Binlb 基因的抗菌活性研究 及其转基因小鼠的建立

费照亮*,**,*** 徐国江** 蒋霞** 王龙** 严兰珍**

张永莲*** 王铸钢** 夏光敏* 费俭**,***,****

(* 山东大学 济南 250100)

(** 上海南方模式生物研究中心 上海 201203)

(*** 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 上海 200031)

摘要 我们在真核细胞中表达了小鼠 Binlb 基因,证实了它的抗菌活性,并进一步证明了该蛋白 C 端融合 HA 抗原决定簇后基本不影响蛋白的生物活性,为开展这一蛋白的转基因小鼠工作提供了较理想的转基因材料。同时我们利用四环素调控的基因表达系统(Tet-on 系统)分别建立了附睾专一性表达 rtTA 的转基因小鼠和由 TRE 控制的 mBinlb-HA 的转基因阳性小鼠。这项研究对于我们理解 mBinlb 在体内的生理和病理作用提供了进一步研究的基础。

关键词: 抗菌肽 Binlb 转基因小鼠

2001 年张永莲等报道^[1],在大鼠附睾组织中发现了一种和抗菌功能有关的新基因,命名为 Binlb。该基因在附睾组织头部的曲精小管的上皮细胞中表达并分泌一个含 68 个氨基酸残基的多肽,多肽序列和 Beta 防卫素(B-defensin)具有同源性。基因表达谱分析表明 Binlb 基因只在大鼠的附睾组织中表达,在大鼠附睾炎模型中,该基因的表达被急剧上调,提示该基因参与机体的炎症反应,但是该基因在上述过程中只是单纯参与杀菌的作用,还是对雄性生殖系统功能具有其他的影响目前尚无明确的研究报道。Binlb 基因在人类和小鼠中是保守的,因此为了研究 Binlb 的功能,特别是在体内的功能,我们选用小鼠的 Binlb 同源基因 mBinlb,通过构建它的真核表达载体,转染培养的哺乳动物细胞,对 mBinlb 进行了真核细胞的表达,验证了它的抗菌作用,并建立了过度表达 mBinlb 的转基因阳性小鼠,为在体内研究 mBinlb 高表达对雄性生殖系统功能的影响打下了基础。

材料与方法

1. 真核表达载体构建

根据 mBinlb 的 cDNA 全长序列设计 PCR 引物,并在上下游引物的 5'端分别加上 EcoRI 和 XbaI 切点,上游引物序列为 P1:AAGGAATTCAAAACATGAAAGTCTTGTTACTCTTTGCT,下游引物序列为 P2:AAATCTAGACTATCTTCT

GTCTTTAACAGAATA。以 mBinlb-pGEMT(mBinlb cDNA 克隆,中国科学院生物化学与细胞生物学研究所,张永莲实验室克隆)为模板进行 PCR 扩增,获得的扩增片段克隆到 pCDNA3 质粒的 EcoR I 和 Xba I 之间,并进行 DNA 测序。为了在转基因小鼠中区别内源的 mBinlb 基因表达产物和外源导入的 mBinlb 基因表达产物,我们用 PCR 方法在 mBinlb 的 C 端融合了一段 HA 的抗原序列,其下游引物 P3 为:AAATCTAGACTAAGCGTAATCCGGAACATCGTATGGGTATCTTCTGTCTTTAACAGAATA,其余 PCR 和克隆的步骤同上。常规的 DNA 重组技术按文献^[2]进行。

2. 外源基因在 COS-7 细胞中的瞬时表达

COS-7 细胞在含 5% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 完全培养基和 5% CO₂ 的条件下培养,转染前,细胞在 10cm 的细胞培养皿中长到 70% 的密度,细胞的数量约为 5×10^6 /皿,将细胞用胰蛋白酶消化,1000rpm 离心 3 分钟,用 PBS 悬浮洗涤 3 次,最后细胞用 450μl HBS 悬浮。DNA 用 QIAGEN 公司的 DNA 纯化试剂盒纯化后溶解在无菌的超纯水中,在 0.4cm 的电转杯中加入 50μl 含有 30μg mBinlb 表达载体或 pCDNA3 载体 DNA 的溶液,再加入上述的细胞悬液,混匀,静置 10 分钟。电转的条件为设定电压 230V,电容 975F (Gene Pulser II Electroporation System),电转后静置 10 分

本文 2003 年 3 月 3 日收到,2003 年 5 月 5 日接受。

感谢 Kichiya Suzuki 博士对附睾专一性启动子方面提供的帮助,感谢麻孙恺老师以及范小华、盛雁、孙汉堂、徐引芳、蔡蕾、蔡有庆等在实验过程中提供了方便。这项工作受到中国科学院知识创新工程重要方向项目的支持。

**** 通讯作者。E-mail:jfei@sibs.ac.cn

钟,然后转移到10cm的培养皿中,加入10ml培养基。第二天换新鲜的培养基,至细胞培养到72小时,收取细胞和细胞培养液,并将培养液上清3000rpm离心去除脱落的细胞和细胞碎片。以上培养液中不含有抗生素。细胞培养及DNA转染按文献操作^[2]。

3. RT-PCR 分析

细胞总RNA的抽提按照TRIZOL试剂(Invitrogen)的说明书进行,并用Promega M-MLV RT试剂盒进行反转录。PCR引物为上述的P1和P2。用不经反转录的RNA为模板作为PCR的阴性对照。以 β -actin作为内参引物,所用引物序列为BA1: AACGAGCGGTTCCGATGCCCTGAG BA2: TGTCGCCTTCACCGTTCCAGTT。

4. 抗菌活性分析

取生长对数期的大肠杆菌DH5 α 培养液,稀释到约为 5×10^6 活菌/ml的浓度(以下称菌液)。取5 μ l菌液加到95 μ l由方法2所获得的细胞培养上清液中,混匀37 $^{\circ}$ C过夜。为便于菌落的计数,阴性对照组(指转染pCDNA3载体DNA的COS-7细胞培养上清液的抗菌活性)稀释5000倍,实验组(指转染mBinlb表达载体的COS-7细胞培养上清液的抗菌活性)稀释100倍,每个LB平板涂布100 μ l稀释液,每个实验重复3次。

5. 转基因小鼠的构建

外源mBinlb转基因小鼠的表达方案采用四环素调控表达的策略,选用Clontech公司的Tet-on系统,分别构建附睾专一性启动子驱动的表达rtTA蛋白的转基因小鼠品系和由rtTA专一性识别的TRE启动子序列驱动的表达mBinlb蛋白的转基因小鼠品系,通过杂交上述两个品系的小鼠,最后获得可由四环素调控的附睾专一性过度表达mBinlb的转基因小鼠。设计mBinlb上游引物P4: AAGAAGCTTAAAA-CATGAAAGTCTTGTACTCTTTGCT,在其5'端加上Hind III的位点,以P4,P3为引物获得C端带有HA抗原决定簇的mBinlb编码序列,mBinlb-HA,以Hind III和Xba I两个位点克隆到pTRE2载体中,获得mBinlb-HA的表达质粒;用5kb的小鼠附睾专一性表达基因ME的启动子序列ME-RABP^[3]取代pTET-on的CMV启动子序列,获得rtTA的表达质粒。上述两个质粒线性化后,分别显微注射到小鼠受精卵的原核中,并移植到假孕小鼠的子宫中继续发育,产生转基因小鼠。显微注射参考文献^[4]。

6. 小鼠基因组DNA的提取

待小鼠3周龄后剪取0.5-1cm鼠尾,加500 μ l裂解液(尿素4mol/L, EDTA 10mmol/L, Sarkoyl 0.5%, Tris/HCl (pH8.0) 0.1mmol/L, NaCl 0.2mol/L)及50 μ l蛋白酶K(10mg/ml,上海生工Amresco分装,M0240-1),56 $^{\circ}$ C消化过夜。离心取上清,无水乙醇沉淀,70%乙醇洗涤,稍晾干后溶解于200 μ l纯水中。

7. PCR 鉴定转基因阳性鼠

取制备好的小鼠基因组DNA 1-5 μ l,用PCR方法检测导入基因的存在状况。mBinlb-HA转基因鼠的PCR鉴定引

物与构建时所用引物相同;rtTA转基因鼠的PCR鉴定引物根据rtTA的编码序列设计,上游引物P5: CCACCT-GACGTCTAAGAAAC,下游引物P6: TCTGGGCGAGTT-TACGGGTT。PCR产物片段经测序证明。

8. Southern 杂交

取小鼠基因组DNA 30 μ l(约为12 μ g),限制性内切酶(鉴定mBinlb-HA转基因鼠用EcoR I,鉴定rtTA转基因鼠用BamH I)消化过夜后,0.8%琼脂糖电泳,转膜后杂交。mBinlb-HA转基因鼠鉴定所用探针为PCR鉴定时的产物片段,鉴定rtTA转基因小鼠的探针为PCR鉴定时的产物片段。探针用Biolabs的非放射性标记试剂盒标记。

结 果

1. mBinlb 基因的表达及其抗菌活性的测定

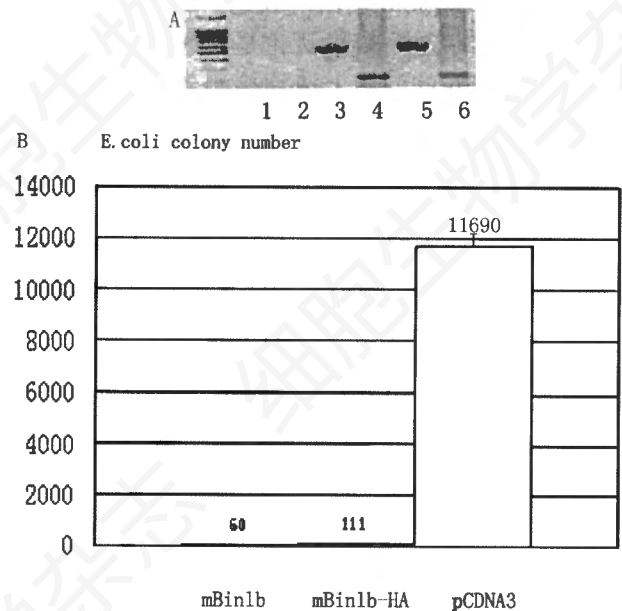


图1 mBinlb和mBinlb-HA抗菌活性的检测

A: RT-PCR检测mBinlb和mBinlb-HA表达载体在转染COS-7细胞后的表达结果,泳道1,2,4,6的PCR引物为P1和P2,泳道1的模板为转染pCDNA3-mBinlb和pCDNA3-mBinlb-HA的COS-7细胞总RNA混合物,泳道2为转染pCDNA3的COS-7细胞总RNA的反转录产物,泳道4,6的模板分别为转染pCDNA3-mBinlb和pCDNA3-mBinlb-HA的COS-7细胞总RNA反转录的产物;泳道3,5的PCR引物为BA1和BA2,泳道3,5的模板分别对应泳道4,6的模板;内参阳性条带的大小为550bp,mBinlb-HA和mBinlb条带为210bp。

B: mBinlb和mBinlb-HA表达载体转染细胞上清的抑菌效果,从左至右依次为pCDNA3-mBinlb, pCDNA3-mBinlb-HA, pCDNA3转染细胞上清对大肠杆菌的抑菌作用,纵坐标为经过稀释倍数校正后的菌落数。

以 mBinlb 的 cDNA 克隆为模板分别用设计的引物 P1/P2 和 P1/P3 进行 PCR, 获得 mBinlb 的完整编码序列和 C 端带有 HA 的 Binlb 融合蛋白编码序列 mBinlb-HA, 将上述扩增片段用 EcoR I 和 Xba I 酶切后, 电泳回收, 克隆到 pCDNA3 的 EcoR I 和 Xba I 位点之间, 获得相应的 mBinlb 和 mBinlb-HA 的真核表达质粒, 分别命名为 pCDNA3-mBinlb 的 pCDNA3-mBinlb-HA。获得的克隆经过酶切鉴定和 DNA 测序分析, 表明克隆正确, 并且没有引入突变。将 pCDNA3-mBinlb 和 pCDNA3-mBinlb-HA 质粒分别转染 COS-7 细胞, 培养 72h 后, 收集细胞培养上清用于抗菌活性的测定, 细胞用于提取 RNA 进行 RT-PCR 的分析, RT-PCR 的结果表明, 转染了 mBinlb 和 mBinlb-HA 表达质粒后, 在 COS-7 细胞中均检测到了 mBinlb 基因的表达。对于细胞培养上清的抗菌活性分析表明, 无论是表达 mBinlb 还是表达 mBinlb-HA 的细胞上清均检测到了明显的抗菌活性(图 1)。

2. 附睾专一性表达 rtTA 基因的转基因小鼠的建立

为了建立在附睾组织中专一性表达, 并且外源基因的开关可受药物控制的转基因小鼠, 我们选用

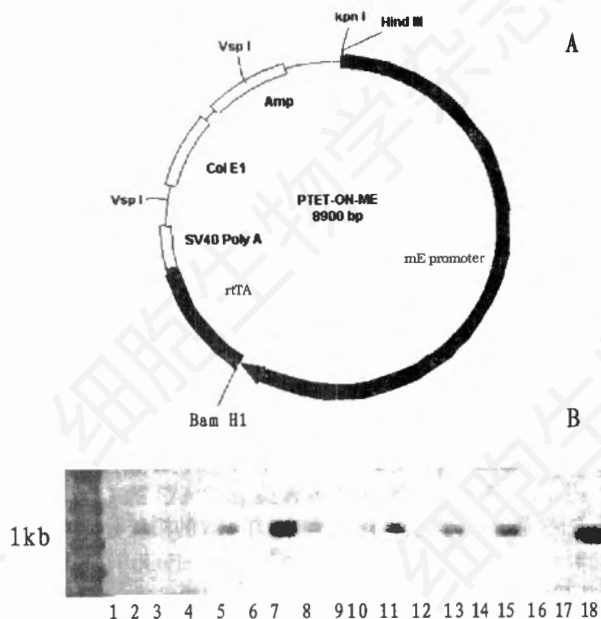


图 2 附睾专一性表达 rtTA 基因质粒的构建及其转基因小鼠的建立

A: rtTA 表达质粒图谱, 启动子为附睾专一表达基因 mE-RABP 的启动子; B: Southern 杂交鉴定 F₀ 代转基因阳性小鼠(建立者), 1-17 号为 PCR 鉴定阳性小鼠, 其中 1, 2, 5, 7, 8, 11, 13, 15 同时也为 Southern 杂交阳性, 18 号泳道为阳性对照质粒。

了附睾专一性表达基因 mE-RABP 的启动子来控制四环素激活转录因子 rtTA 的表达, 表达质粒的构建见图 2A, 质粒用 Vsp I, /Kpn I 进行双酶切线性化后, 通过凝胶电泳纯化获得用于转基因的 DNA 片段, 共注射 560 个受精卵, 移植 22 只假孕小鼠, 13 只小鼠怀孕, 出生 58 只小鼠, 抽提鼠尾 DNA, 用 PCR 和 Southern Blot 进行鉴定, 共获得 8 只两者鉴定都为阳性的转基因小鼠, 转基因小鼠的阳性鉴定结果见图 2B。

3. mBinlb-HA 转基因小鼠的建立

为了区分内源性和转基因表达的 mBinlb, 我们对转基因的 mBinlb 的 C 端融合了 HA 抗原决定簇, 以后可以用 HA 的抗体进行检测转入基因的表达。根据实验结果 1 的内容, mBinlb 的 C 端融合 HA 后基本不影响它的抗菌活性。mBinlb-HA 的表达由响应四环素激活转录因子的启动子(TRE)控制, 表达质粒的构建见图 3A, 质粒用 ApaLI 进行酶切线性化后经过凝胶电泳回收纯化, 纯化的 DNA 进行小鼠

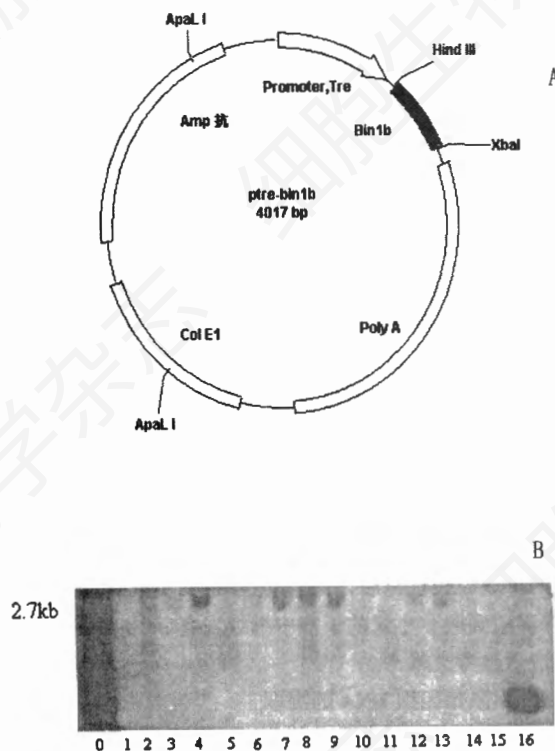


图 3 mBinlb-HA 表达质粒的构建和转基因小鼠的建立

A: mBinlb-HA 表达质粒图谱, 启动子为四环素激活的启动子 TRE。

B: Southern 杂交鉴定 F₀ 代转基因阳性小鼠(建立者), 1-15 号为 PCR 鉴定阳性小鼠, 其中, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 12, 13 同时也为 Southern 杂交阳性, 16 号泳道为阳性对照质粒。

受精卵原核注射,共注射 569 个受精卵,移植 24 只假孕小鼠,16 只小鼠怀孕,出生 117 只小鼠,剪取鼠尾尖端约 0.5cm 部分,提取 DNA,用 PCR 和 Southern Blot 进行鉴定,共获得 8 只转基因阳性的小鼠(图 3B)。

讨 论

抗菌肽是动植物中普遍存在的一种具有抗菌活性的物质^[5]不同的抗菌肽可能还具有抗寄生虫、病毒、真菌、癌细胞的作用。本文所研究的 Binlb^[1]是在哺乳动物雄性生殖系统中发现的第一个抗菌肽,它属于 β -defensin 中的一种。基因表达分析表明,该基因只在附睾组织中表达,且主要表达在附睾的头部,尽管该基因首先是在大鼠中发现的,但是在人、猴子和小鼠中均有同源的基因。Yasuhiro 等^[6]的实验证明它在小鼠中也是在附睾头部专一性表达。由于这一蛋白表达的部位和精子成熟有关联,因此引起人们广泛的注意,并探讨是否可以作为男用避孕药的靶点,然而到目前为止,该基因在体内的正常生理作用仍然是不清楚的。研究表明,在附睾炎发生时,Binlb 基因表达被明显上调,同时附睾炎能引发不育等症状,Binlb 在这一过程中究竟起什么作用? Binlb 大量地在附睾中表达是否会影响精子的成熟? 为了回答这些问题,我们期望通过建立在附睾组织中过度表达 Binlb 的转基因小鼠,来研究附睾中过量存在的 Binlb 对小鼠雄性生殖功能的影响。我们在本文的工作中首先对 Binlb 在小鼠中的同源基因 mBinlb 进行了真核细胞的表达,并证明了它在抗菌活性,为了进一步利用转基因小鼠研究它在体内的功能,便于跟踪导入基因的表达,我们构建了 mBinlb C 端融合了含 9 个氨基酸残基的 HA 抗原决定簇,研究表明,融合蛋白仍然保留了 mBinlb 的抗菌活性,这一研究说明 C 端的结构可能没有参与 mBinlb 的抗菌活性。我们利用 Tet-on 系统^[2]和附睾专一表达基因 mE-RABP 的 5kb 的启动子^[3]来精确调控转入基因的表达。mE-RABP 基因启动子的专一性已被转基因小鼠实验所证实^[3],我们利用这一启动子来控制转基因小鼠中 rtTA 的表达,这样的一个小鼠品系不仅可以用于本实验的目的,并且该小鼠也将是一种工具小鼠,用于其他的涉及到附睾专一表达基因的研究。在 mBinlb-HA 的转基因小鼠中,该基因的表达受控于 TRE 启动子,该启动子在有 rtTA 和四环素(或四环素衍生物)同时存

在下可以表达其下游的基因。通过本文叙述的工作,我们已获得了上述两种转基因阳性小鼠,分别获得 8 只转基因阳性的建立者(founder),目前正在繁殖和育种过程中,在它们的子代中已获得可遗传的转基因阳性的小鼠,下一步将这两种小鼠杂交获得 rtTA 和 mBinlb-HA 双阳性的转基因小鼠,即可以用四环素或其衍生物诱导 mBinlb-HA 在附睾中过量表达,用于研究 mBinlb 在体内的生理和病理作用。

在本实验中,我们采用了 PCR 和 Southern 杂交的方法来筛选和鉴定转基因阳性的小鼠,PCR 具有简便和快速的优势,但会有假阳性和假阴性的发生,用 Southern Blot 对 PCR 阳性的小鼠进行进一步地核实,将使得我们的结果更为可信。从结果上分析,PCR 鉴定阳性的小鼠,Southern Blot 仍可能为阴性,即使 Southern Blot 阳性的,在相同条件下信号却也强弱有别,这可能的原因是不同转基因品系中转入的基因拷贝数目不同,另外非放射性标记的方法可能在灵敏度方面也不如同位素的方法。

由于有些抗菌肽是组织专一性表达的^[7-9],现在不清楚为什么这些抗菌肽只在某些组织中表达,而且有些抗菌肽具有细菌真菌多种抗性^[10],更有意思的是有的抗菌肽还具有杀灭病毒和癌细胞的作用^[13,14],鉴于以上原因有必要进一步探究 mBinlb 是否还具有未知的生理功能。我们的工作为阐明 mBinlb 的体内功能提供了很好的基础,进一步的表型分析正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Li P, et al., 2001, *Science*, **291**:1783-1785.
- [2] [美]J. 萨姆布鲁克 D. W. 拉塞尔等著,黄培堂等译,分子克隆实验指南,第三版,2002 年.
- [3] Lareyre J-J, et al., 1999, *J. Biol. Chem.* **274**(12):8282-8290.
- [4] 卢圣栋等,现代分子生物学实验技术,高等教育出版社,1993 年.
- [5] 孙超等,2000,中国药理学通报,6(6):605-609.
- [6] Yamaguchi Y. et al., 2002, *J. of Immunology*, **169**:2516-2523.
- [7] Tzou P., et al., 2000, *Immunity*, **13**:737-748.
- [8] Susan H., et al., 2002, *J. of Andrology*, September/October, 585-597.
- [9] Vizioli J. et al., 2001, *PNAS*, **98**(22):12630-12635.
- [10] Zhang L., et al., 2002, *Science*, **298**:995-1000.
- [11] Zambrano NR., et al., 1999, *J Urol*, **162**:1246-1258.
- [12] Young AN., et al., 2001, *Am J Pathol*, **158**:1639-1651.
- [13] Berg WJ., 2000, *Semin Oncol*, **27**:234-239.
- [14] Biragyn A., et al., 2002, *Science*, **298**:PP 1025-1029.

STUDY ON THE ANTI-MICROBIAL ACTIVITY OF MOUSE BIN1B AND CONSTRUCTION OF THE TRANSGENIC MICE WITH BIN1B OVER-EXPRESSION IN EPIDIDYMIS

FEI Zhao Liang^{*,**,*} XU Guo Jiang^{**} JIANG Xia^{**} WANG Long^{**} YAN Lan Zheng^{**}

ZHANG Yong Lian^{***} WANG Zhu Gang^{**} XIA Guang Ming^{*} FEI Jian^{**,***,****}

(* Shandong University, Jinan 250100 China)

(** Shanghai Research Center for Biomodel Organism, Shanghai 201203 China)

***Institute of Biochemistry and Cell Biology, SIBS, CAS, Shanghai 200031 China)

ABSTRACT The cDNA of mouse Bin1b homolog(mBin1b) protein was subcloned into expression vector of pCDNA3 and transiently expressed in COS-7 cells. The expression of mBin1b in COS-7 cells was identified by RT-PCR. The anti-microbial activity of the transfected cell culture supernatant was confirmed by plating on growth media. Adding a HA tag to the C-terminus of mBin1b (mBin1b-HA) resulted in the same anti-microbial activity as the mBin1b protein. This result indicated that anti-microbial activity was not located at the C terminus of mBin1b. To study the function of mBin1b in vivo, the Tet-on gene expression regulation system was used to construct transgenic mice. Two lines of transgenic mice were obtained, one in which the mBin1b-HA cDNA was under the control of the TRE promoter, and the other with rtTA specifically expressed using the promoter of the mE-RABP gene in the epididymis. Crossing the two transgenic lines will produce inducible over-expression of mBin1b specifically in epididymis. This research will provide a useful mice model to study the function of mBin1b in vivo.

Key words: Antimicrobial peptide Bin1b Transgenic mice

We thank Dr. Kichiya Suzuki for providing the mE-RABP gene promoter DNA. This study was supported by Chinese Academy of Sciences.

**** Corresponding author. E-mail: jfei@sibs.ac.cn

一种新的精子结合蛋白 HBRP 在原核表达及其活性研究

罗 阳^{*} 宗志宏^{**} 于秉治^{**}

(中国医科大学^{*} 卫生部细胞生物学重点实验室医学基因组学研究室^{**} 生物化学教研室 沈阳 110001)

摘 要 为了发现和研究牛精浆(bovine seminal plasma, BSP)蛋白及其相关蛋白在受精及受精卵发育中的重要作用,我们克隆了人类生殖相关新基因 HBRP(Human BSP-Related Proteins),本文通过基因重组技术,构建了 GST-HBRP 融合蛋白表达质粒,在大肠杆菌中获得大量表达,并检测了该蛋白对 PKC 活性的影响。

关键词: HBRP 原核表达 GST-融合蛋白 PKC 活性

我们首先在人生殖系统睾丸组织中发现并克隆了一个与牛精浆(bovine seminal plasma, BSP)蛋白相关基因的 cDNA 序列(登录号为 AF27914)^[1],其开放阅读框架(open reading frame, ORF)编码了一个含 223 个氨基酸残基的蛋白质,氨基酸序列中含有四个纤连蛋白 II 结构域,与 BSP 蛋白在结构上具有一定的相似性,称其为人 BSP 相关蛋白(Human BSP-Related Proteins, HBRP),预测该蛋白是与 BSP

蛋白功能相关的精子结合蛋白。本文通过基因重组技术,构建了 GST-HBRP 融合蛋白表达质粒,并在大肠杆菌中大量获得表达蛋白,由于本室在前期研

本文 2003 年 4 月 21 日收到,5 月 29 日接受。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(No. G1999055900-2)及国家自然科学基金资助项目(No. 39730460)。

* 联系人。E-mail: luoyangji@sina.com