

涂 枫,赵为民,曹 静,等. 木聚糖酶基因(*XynB*)肠道特异表达载体的构建及鉴定[J]. 江苏农业科学,2020,48(11):53-57.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.11.010

木聚糖酶基因(*XynB*)肠道特异表达载体的构建及鉴定

涂 枫¹, 赵为民¹, 曹 静², 方晓敏¹, 陈 哲¹

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏南京 210014; 2. 江苏农科传媒有限公司, 江苏南京 210014)

摘要:将黑曲霉属 *XynB* 基因和猪 *RELMβ* 基因核心启动子区克隆到 pcDNA3.1(-) 中, 构建携带绿色荧光和 Myc 双标记的肠道特异表达载体 pcDNA3.1-RELMβ-XynB-Myc-GFP。利用脂质体介导将载体转染人结肠癌细胞 (HT29) 和人肝癌细胞 (Bel7402), 荧光显微镜检测发现, 该载体可在 HT29 细胞特异表达绿色荧光蛋白; 对转染该表达载体的 HT29 细胞进行 RT-PCR 检测和 WB 分析, 结果表明, *XynB* 基因在 HT29 细胞中正常转录, 并且在细胞内检测到目的蛋白表达。

关键词:木聚糖酶; 特异表达载体; 抵抗素样 β 基因; WB 检测; RT-PCR 检测

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)11-0053-04

木聚糖是含量仅次于纤维素的半纤维素多糖, 作为玉米-豆粕型日粮中的主要抗营养因子, 无法被单胃动物内源性消化酶独立消化^[1]。木聚糖酶 (xylanase B, *XynB*) 可以破坏木聚糖的大分子结构, 是水解木聚糖的关键酶。黑曲霉属的木聚糖酶具有良好的耐酸性, 畜禽胃肠道温度和 pH 值对该木聚糖酶活性影响不明显, 目前木聚糖酶被作为添加剂应用于畜禽和水产饲料生产^[2]。考虑到外源性木聚糖酶降解效率和木聚糖存在的广泛性, 利用转基因技术实现木聚糖酶在动物肠道内表达, 为实现饲料中木聚糖的彻底降解提供可能。

抵抗素样 β 基因 (resistin-like molecule β, *RELMβ*) 是肠道免疫保护相关的重要候选基因, 在近端和远端结肠特异性高表达^[3]。本研究将黑曲霉属 *XynB* 基因和猪 *RELMβ* 基因核心启动子区克隆到 pcDNA3.1(-) 中, 拟构建携带绿色荧光和 Myc 双标记的肠道特异表达载体, 旨在为木聚糖酶内源性表达提供材料, 也为进一步提高饲料利用率、降低家畜粪便污染提供前期基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 pcDNA3.1(-) 质粒, 购于上海 Invitrogen 生命技术有限公司; pMD18T 质粒, 购于大连宝生物有限公司; pRSETA-XynB 质粒, 由华南农业大学动物科学学院吴珍芳教授课题组构建并惠赠, pEGFP-C3 质粒和 pMD18-RELMβ (-574 ~ +215) 质粒, 为笔者所在实验室保存; 人结肠腺癌细胞株 HT29 和人肝癌细胞株 Bel7402, 购自凯基生物(南京)公司。

1.1.2 主要试剂和工具酶 限制性内切酶 *Nhe* I、*Xho* I、*Kpn* I, Prime STAR 高保真 DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、Premix *Taq* (La *Taq* version 2.0) 酶、DH5α 感受态细胞, 均购自宝生物(大连)有限公司; 中量无内毒素质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、快速连接试剂盒 (Liga Fast™ Rapid DNA Ligation System) 购自 Promega 公司。

转染试剂盒 Lipofectamine™ LTX, 购自 Invitrogen 公司; 胰酶、PBS、DMEM(高糖)、胎牛血清 (FBS) 为 Gibco 产品; 抗 Myc 的小鼠一抗、辣根过氧化物酶偶联的羊抗小鼠二抗、Pro-light HRP 化学发光检测试剂, 均购于天根生化公司。Western Blot 相关试剂, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 显影液、定影液, 购自南京思泰乐公司。

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体 pcDNA3.1-XynB-Myc 的构建 以原核载体 pRSETA-XynB 为模板, 根据

收稿日期: 2019-07-24

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31872338); 国家生猪现代产业技术体系项目(编号: CARS-35); 江苏省农业重大新品种创制项目(编号: PZCZ201733)。

作者简介: 涂枫(1989—), 男, 江苏南京人, 主要从事猪育种研究。

E-mail: 530538145@qq.com。

通信作者: 陈哲, 副研究员, 主要从事畜禽繁殖和环境控制研究。

E-mail: chenzzju@163.com。

XynB 基因序列,设计 PCR 引物 P1F/P1R(表 1),其中 5'端引物 P1F 带有 *Xho* I 酶切位点(CTCGAG)及其保护碱基,5'端引物 P1R 末端引入 *Myc* - Tag 序列,带有 *Kpn* I 酶切位点(GGTACC)及其保护碱基。PCR 产物与 pMD18T 载体连接,构建克隆质粒 pMD18 - *XynB* - *Myc*,转化大肠杆菌 DH5 α ,进行蓝白斑筛选,阳性质粒采用限制性内切酶酶切鉴定并送测序验证。将 pcDNA3.1(-)载体和 pMD18 - *XynB* - *Myc* 重组质粒分别用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Kpn* I 双酶切,纯化回收载体 pcDNA3.1(-)和目的片段 *XynB* - *Myc*,利用 T4 连接酶将纯化回收后的 *XynB* - *Myc* 目的片段连接到线性化的 pcDNA3.1(-)载体,构建 *XynB* 真核表达载体 pcDNA3.1 - *XynB* - *Myc*,连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,经过蓝白斑筛选,挑取阳性转化子经过 LB 液体培养基扩大培养后少量提取质粒,进行酶切鉴定。

1.2.2 pcDNA3.1 - *XynB* - *Myc* - GFP 的构建 根据质粒 pcDNA3.1 - *XynB* - *Myc* 设计 PCR 引物 P1F/P2R(表 1),P1F 引物 5'端带有酶切位点 *Xho* I,P2R 引物 5'端序列与 GFP 序列 5'末端互补。PCR 条件:98 ℃ 5 min,98 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s;30 个循环;72 ℃ 10 min,扩增的 *XynB* - *Myc* 片段大小为 682 bp。以 pEGFP - C3 序列为模板,设计 PCR 反应引物 P3F/P3R(表 1),P3F 的 5'端序列与 *XynB* - *Myc* 序列 3'末端一致,引物 P3R 的 5'端带有酶切位点 *Kpn* I。扩增程序:98 ℃ 5 min,98 ℃ 30 s,62 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 10 min,扩增的片段大小为 768 bp。

以上述扩增产物 *XynB* - *Myc* 片段及 GFP 片段为模板,使用引物为 P1F 和 P3R,采用重叠 PCR 方法将 2 种组件融合,获得 *XynB* - *Myc* - GFP 融合片段(1 398 bp),扩增的程序:98 ℃ 4 min;98 ℃ 10 s,52 ℃ 10 s,72 ℃ 130 s,30 个循环;72 ℃ 10 min。扩增的片段大小为 1 398 bp。

利用 T₄ 连接酶将 *XynB* - *Myc* - GFP 纯化后融合片段与 pMD18T 连接,得到中间载体 pMD18T - *XynB* - *Myc* - GFP,双酶切鉴定。采用 *Xho* I 和 *Kpn* I 对 pMD18T - *XynB* - *Myc* - GFP 进行双酶切,回收得到 *XynB* - *Myc* - GFP 片段,克隆至 pcDNA3.1(-)相应的酶切位点,获得重组载体 pcDNA3.1 - *XynB* - *Myc* - GFP,并进行双酶切鉴定。

1.2.3 猪 *RELM β* 基因启动子指导的肠道特异表达载体构建 利用 *Nhe* I 和 *Xho* I 对 pMD18 - *RELM β*

(-574 ~ +215) 和 pcDNA3.1 - *XynB* - *Myc* - GFP 进行双酶切,凝胶回收目的片段,将 *RELM β* 核心启动子片段克隆到 pcDNA3.1 - *XynB* - *Myc* - GFP 相应的酶切位点,获得重组载体 pcDNA3.1 - *RELM β* - *XynB* - *Myc* - GFP,酶切鉴定载体。

1.2.4 *XynB* 在 HT29 细胞的特异表达 HT29 细胞接种于细胞培养孔中,采用脂质体介导转染 pcDNA3.1 - *RELM β* - *XynB* - *Myc* - GFP 重组载体,转染 12 h 后在倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况并拍照。

1.2.5 *XynB* 基因在 HT29 细胞中的表达鉴定 将稳定转染重组表达载体的 HT29 细胞系复苏,以培养 48 h 后的细胞总蛋白进行 Western - blot 试验,选择 *Myc* 抗体检测目的蛋白 *XynB* 在细胞中的表达。收集培养 4 d 的转基因 HT29 细胞系、同代正常培养 HT29 细胞和空载体转染的 HT29 细胞抽提 RNA,经过 DNase 处理后,通过 RT - PCR 检测其转录情况,设计引物扩增 *XynB* - GFP 基因片段部分序列,跨内含子 β - action 内参引物检测用于排除模板 DNA 污染(表 1)。

2 结果与分析

2.1 真核表达载体 pcDNA3.1 - *XynB* - *Myc* 的构建

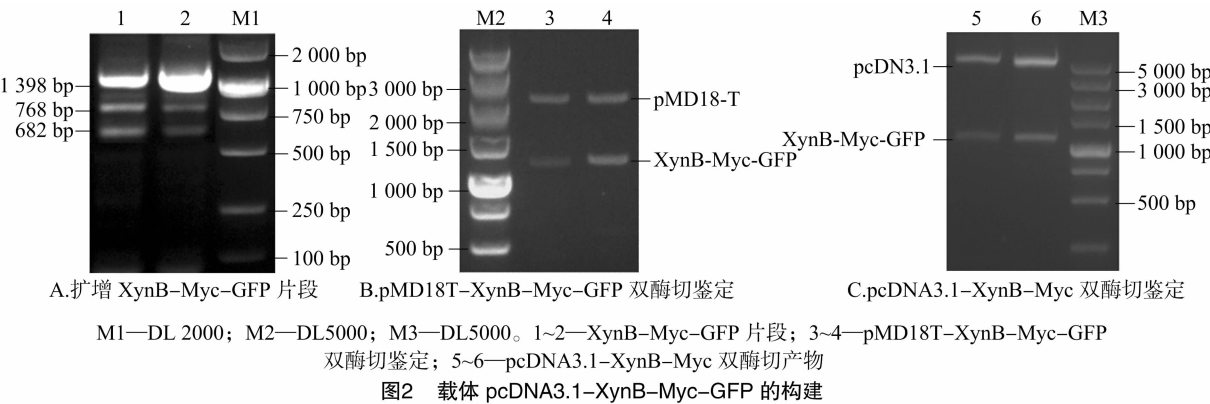
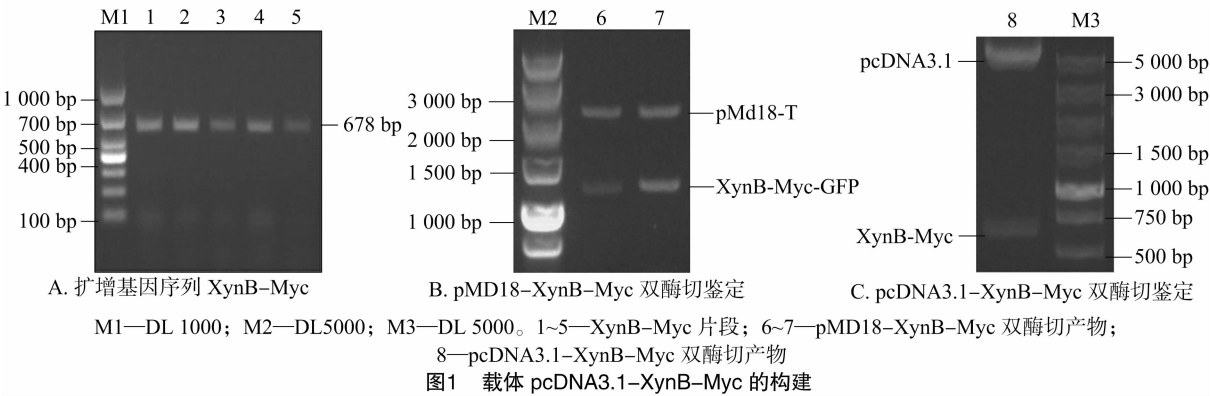
以原核载体 pRSETA - *XynB* 为模板,PCR 扩增获得目的基因片段 *XynB* - *Myc*,大小为 678 bp(图 1 - A)。双酶切鉴定显示,*XynB* - *Myc* 成功连接到 pMD18T 载体中(图 1 - B)。重组载体 pcDNA3.1 - *XynB* - *Myc* 经双酶切,获得 2 条条带,与预期相符(图 1 - C),表明 *XynB* - *Myc* 成功插入到表达载体 pcDNA3.1 中。

2.2 载体 pcDNA3.1 - *XynB* - *Myc* - GFP 的构建

扩增的 *XynB* - *Myc* 片段大小为 682 bp,以 pEGFP - C3 为模板,扩增的 GFP 片段大小为 768 bp,*XynB* - *Myc* 片段及 GFP 片段为模板,重叠 PCR 获得 *XynB* - *Myc* - GFP 融合片段,大小为 1 398 bp,酶切产物电泳检测符合预期大小(图 2 - A)。双酶切鉴定显示,*XynB* - *Myc* - GFP 成功连接到 pMD18T 载体中(图 2 - B)。构建的 pcDNA3.1 - *XynB* - *Myc* - GFP 表达载体 *Xho* I 和 *Kpn* I 双酶切后,凝胶电泳检测,观察到大小符合预期的目的连接片段和空质粒片段(图 2 - C),表明 *XynB* - *Myc* - GFP 片段成功克隆到 pcDNA3.1 载体。

表 1 载体构建及检测所用引物

引物名称	引物序列(5'→3')	备注
PIF	CCGCTCGAGGCCACCATGTTTCAACT	划线处为 <i>Xho</i> I 酶切位点
PIR	GGGGTACCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTCTTCCTGAACAGTGATGGA	划线处为 <i>Kpn</i> I 酶切位点,斜体序列为 Myc - Tag 序列
P2R	CCTTGCTCACCATAGATCCTCTTCT	划线处与 <i>GFP</i> 基因片段互补
P3F	GAAGAGGATCTGATGGTGAGCAAGGG	划线处与 <i>XynB</i> - <i>Myc</i> 基因片段互补
P3R	GGGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCCA	划线处为 <i>Kpn</i> I 酶切位点
P4F	TGCTGAGCAAGGGCGAGGAG	
P4R	CAGGGCGGACTGGGTGCTCA	
XynB - F	GCTACCCGTACCAATGCT	扩增 XynB - GFP 部分片段
GFP - R	TGCTGCCAAAACAACTC	
<i>action</i> - F	GGACTTCGAGCAGGAGATGG	扩增内参 β - <i>action</i>
<i>action</i> - R	GCACCGTGTGGCGTAGAGG	



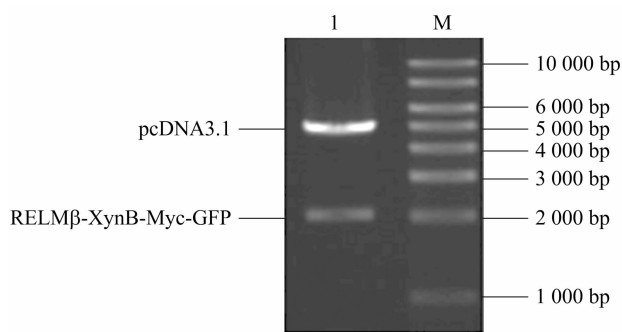
2.3 肠道特异表达载体 pcDNA3. 1 - RELM β - XynB - Myc - GFP 构建

在前期的研究中,对猪 *RELM β* 基因表达特性及启动子活性进行了分析,选择核心启动子区域 (- 574 ~ + 215) 作为肠道特异性启动子,克隆至表达载体内。构建的 pcDNA3. 1 - RELM β - XynB - Myc - GFP 载体双酶切后凝胶电泳检测,观察到大小约为 2 000 bp 的目的连接片段和空质粒片段,表

明 RELM β 启动子片段成功插入到 pcDNA3. 1 - XynB - Myc - GFP 载体中(图 3)。

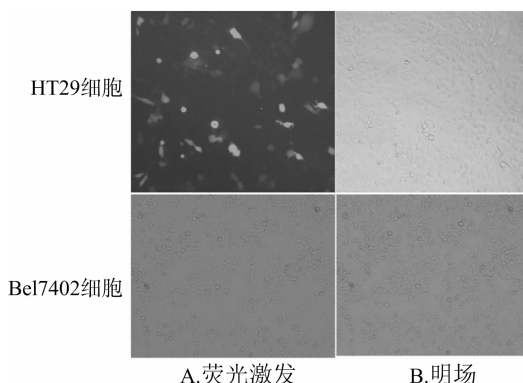
2.4 XynB 在 HT29 细胞中的特异表达

采用脂质体法,将重组表达载体 pcDNA3. 1 - RELM β - XynB - Myc - GFP 转染体外培养的 HT29 细胞,培养 12 h 时,通过荧光显微镜可以观察到融合表达的绿色荧光蛋白,而在 Bel7402 细胞转染重组表达载体 12 h 未观察到绿色荧光蛋白表达(图

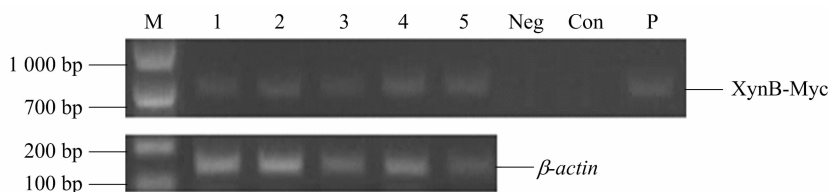


M—DL10000; 1—pcDNA3.1-RELM β -XynB-Myc-GFP 双酶切
图3 表达载体 pcDNA3.1-RELM β -XynB-Myc-GFP 双酶切鉴定

4)。结果表明,构建的肠道特异表达载体能够指导 *XynB* 基因在肠道细胞特异表达。



A. 荧光激发 B. 明场
图4 转染细胞荧光检查(100 \times)

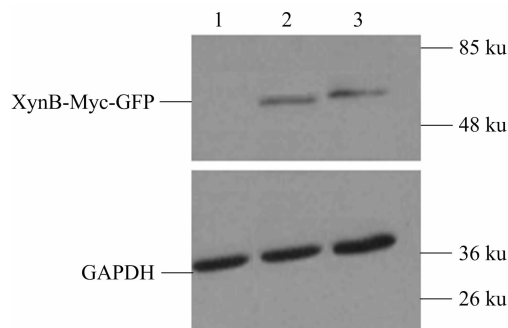


第 1 行和第 2 行分别为扩增 *XynB*-Myc 片段和内参 β -actin 检测; M—DL1000;
1~5—阳性细胞为模板扩增; Neg—转染 pcDNA3.1(-)载体细胞为模板的阴性对照;
Con—空白转染组阴性对照; P—以质粒 pcDNA3.1-RELM β -XynB-Myc-GFP 为模板扩增阳性对照
图6 稳定转染细胞系的 RT-PCR 检测

蛋白(β -lactoglobulin, BLG)是反刍动物最主要的乳清蛋白,利用 *BLG* 基因启动子和 5'端调控序列构建的融合 α -抗胰蛋白酶、降钙素和人血清白蛋白等转基因动物均实现目的基因在乳汁的表达^[4-6],在目前科研中广泛用来指导外源基因在乳汁中的表达。腮腺分泌蛋白(parotid secretory protein, PSP)是唾液中特异性高表达的一种蛋白,猪 *PSP* 基因是研制猪腮腺转基因生物反应器及进行转基因育种研究的最佳候选基因^[7-8],绵羊毛囊角蛋白关联蛋白(keratin-associated protein 6.1, KAP6.1)基因已被证实绵羊毛囊中特异表达^[9],针对这一特点,已用绵羊 KAP6.1 启动子构建了一系列毛囊特异表

2.5 *XynB* 基因在 HT29 细胞表达鉴定

由图 5 可知,转 *XynB* 基因的 HT29 细胞蛋白中含有目的蛋白,大小约为 50 ku,阴性对照组未检测到目的蛋白。



1—非转染细胞阴性对照; 2~3—稳定转染细胞

图5 *XynB* 蛋白在 HT29 细胞的 Western-blot 检测

提取 RNA 为模板,进行 RT-PCR 检测,由图 6 可知,转基因 HT29 细胞内正常转录合成 *XynB* 酶 mRNA 序列。跨内含子引物扩增 β -actin 基因显示无内含子片段扩增,排除了 DNA 污染可能。

3 讨论

天然的启动子数量众多且各具特点,进行基因重组体外表达研究时,研究者通常采用导入特异启动子来实现目的基因的组织特异性表达。 β -乳球

达载体^[10-11]。

RELM β 基因已被证实在啮齿动物和人的肠道组织特异表达^[3]。研究表明,*RELM β* 基因启动子区包含多个肠上皮特异性转录调控因子,而启动子区(-574 ~ +215)片段是核心区域,包含有关键顺式作用元件^[12]。本研究构建的表达载体 pcDNA3.1-*RELM β* -*XynB*-Myc-GFP 在肠道特异表达启动子 *RELM β* 调控下,可有效指导 *XynB* 在肠细胞系 HT29 特异表达;下一步将利用体外细胞培养试验,测定构建的重组载体真核表达分泌和酶活性,以及分泌的 *XynB* 酶稳定性、最适 pH 值等,为运用转基因技术实现 *XynB* 内源性表达提供重要材料。

邢冰,董诚明,魏硕,等. 怀菊转录组中 SSR 位点信息分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(11):57-60.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.11.011

怀菊转录组中 SSR 位点信息分析

邢冰¹,董诚明^{1,2},魏硕³,李曼¹,李询¹

(1. 河南中医药大学药学院,河南郑州 450046; 2. 呼吸疾病河南省协同创新中心,河南郑州 450046; 3. 四川大学,四川成都 610000)

摘要:以转录组测序数据为基础,利用 MISA 软件对简单重复序列(simple sequence repeat,简称 SSR)进行检测及分析,分析怀菊转录组中的 SSR 位点信息,并设计 SSR 引物,为后期 SSR 标记的开发和物种遗传多样性检测等提供参考。结果表明,共检测到 8 553 个 SSR 位点,它们分布在 7 369 条 Unigene 中,出现频率为 2.83%,SSR 位点的发生频率为 2.44%;其中单核苷酸重复基序最多、其次为三核苷酸重复基序。怀菊转录组基序长度主要集中于 12~19 bp,多具有中等多态性。对 SSR 序列设计引物,共得到 25 662 对引物可供今后使用。总之,怀菊 SSR 位点类型丰富,具有良好的多态性潜力及可开发性。

关键词:怀菊;SSR;位点信息;转录组

中图分类号: S567.23+9.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)11-0057-04

怀菊为菊科植物菊(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)的干燥头状花序^[1],栽培及药用历史悠久,研究表明,经过长期的自然环境改变和人工干预,

怀菊种质可能发生了变异与分化,品质下降^[2]。目前关于怀菊的研究主要集中于人工栽培、组织培养、质量评价等方面,对于其种质资源和分子标记辅助育种的研究尚少^[3-6]。因此,对于怀菊品种鉴别及遗传多样性的研究具有重要意义。

简单重复序列(simple sequence repeat,简称 SSR)是指由 1~6 个核苷酸为重复单位组成的简单串联重复序列。简单重复序列能反映出物种间高度的等位基因多样性,不同物种的重复次数、基

收稿日期:2019-09-20

基金项目:2016 年度中央引导地方科技发展专项资金“河南道地大宗药材种质评价及集约化种植与示范”。

作者简介:邢冰(1995—),女,河南郑州人,硕士研究生,主要从事药用植物研究。E-mail: xingbingywwz@163.com。

通信作者:董诚明,教授,主要从事药用植物研究。E-mail: dcm371@hactcm.edu.cn。

参考文献:

- [1] Liu W C, Kim I H. Effects of dietary xylanase supplementation on performance and functional digestive parameters in broilers fed wheat-based diets[J]. Poultry Science, 2017, 96(3): 566-573.
- [2] 聂国兴,王修启,明红,等. 黑曲霉产木聚糖酶稳定性的研究[J]. 华北农学报, 2004, 19(1): 112-115.
- [3] Stepan C M, Bailey S T, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes[J]. Nature, 2001, 409(6818): 307-312.
- [4] Archibald A L, McClenaghan M, Hornsey V, et al. High-level expression of biologically active human alpha 1-antitrypsin in the milk of transgenic mice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990, 87(13): 5178-5182.
- [5] Niavarani A, Dehghanizadeh S, Zeinali S, et al. Development of transgenic mice expressing calcitonin as a β -lactoglobulin fusion protein in mammary gland[J]. Transgenic Research, 2005, 14(5): 719-727.
- [6] Barash I, Faerman A, Ratovitsky T, et al. Ectopic expression of β -lactoglobulin/human serum albumin fusion genes in transgenic mice;

hormonal regulation and in situ localization[J]. Transgenic Research, 1994, 3(3): 141-151.

- [7] Yin H F, Fan B L, Yang B, et al. Cloning of pig parotid secretory protein gene upstream promoter and the establishment of a transgenic mouse model expressing bacterial phytase for agricultural phosphorus pollution control[J]. Journal of Animal Science, 2006, 84(3): 513-519.
- [8] 张献伟,张冠冠,吴珍芳,等. 木聚糖酶-甘露聚糖酶融合酶基因 Linker 优化及其在猪肾 pK15 细胞中共表达[J]. 中国农业科学, 2013, 46(22): 4774-4783.
- [9] Powell B C. The keratin protein and genes of wool and hair[J]. Wool Technology and Sheep Breeding, 1996, 44(2): 100-118.
- [10] 王春生,安铁洙,白秀娟,等. 绵羊毛发育角蛋白结合蛋白启动子的克隆与活性分析[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(2): 137-139, 145.
- [11] 郭旭东,尹俊,杨东山,等. IGF-1 毛囊特异表达载体的构建以及转染绒毛羊胎儿成纤维细胞的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(10): 1460-1467.
- [12] 陈哲,雷明明,于建宁,等. 猪 *RELMB* 基因启动子区克隆及序列分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1060-1064.