图 1 质粒 pVITRO-FSH $\alpha\beta$  构建示意图Fig. 1 The construct process of plasmid pVITRO-FSH $\alpha\beta$ 

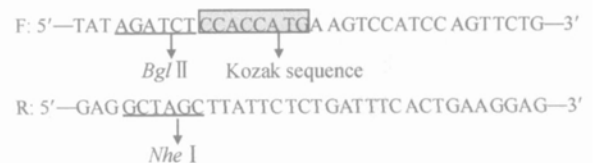
用 *Bam*H I、*Sal*I 限制性内切酶双酶切, Wizard DNA Clean-up System 对各自的酶切产物进行纯化。取纯化后的 pVITRO-2 和 FSH $\alpha$  酶切产物, 用大连宝生物 DNA 连接试剂盒进行连接反应, 操作程序参照说明书, 反应体系为: pVITRO-2 质粒 4.42  $\mu$ L (约 549 ng), FSH $\alpha$  4  $\mu$ L (约 100 ng), 加入 8.42  $\mu$ L Solution I 充分混匀, 16  $^{\circ}$ C 过夜。

CaCl<sub>2</sub> 法<sup>[12]</sup> 制备大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞, 取 200  $\mu$ L 转化的感受态细菌涂布潮霉素 B 抗性 (*hph*<sup>+</sup>) LB 低盐平板, 37  $^{\circ}$ C 恒温箱培养 12~16 h。挑取单菌落接种约 3 mL LB (潮霉素 B 抗性) 低盐培养基, 37  $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, SDS 碱裂解法提取质粒。用 *Bam*H I *Hind* III 双酶切初步鉴定, 酶切正确的质粒由大连宝生物工程有限公司进行测序。

#### 1.4 pVITRO-FSH $\alpha\beta$ 双表达载体的构建

设计在上下游引物 5' 端含有 *Bgl* II、*Nhe* I 限

制性内切酶的 FSH $\beta$  引物, 并在 ATG 起始密码子前添加 Kozak 序列:



以 pcDNA-FSH $\beta$  为模板, PCR 扩增 FSH $\beta$  基因。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45s, 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物用 Wizard DNA Clean-up System 进行回收纯化。

表达载体 pVITRO-FSH $\alpha$  和 FSH $\beta$  基因分别用 *Bgl* II、*Nhe* I 双酶切, 产生相互匹配的黏性末端, 经 DNA 连接酶连接, 构建成双表达载体 pVITRO-FSH $\alpha\beta$ 。转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细

胞, SDS 碱裂解法提取质粒, 用 *Bgl* II、*Bam*H I 酶切, 初步鉴定所构建质粒是否正确, 将酶切正确的质粒进行目的基因序列测序, 质粒测序由大连宝生物工程技术有限公司完成。

### 1.5 pVITRO-FSH $\alpha\beta$ 双表达质粒转染 CHO 细胞及稳定表达细胞筛选

1.5.1 潮霉素 B 对 CHO 细胞最小致死浓度 将贴壁生长的 CHO 细胞用胰酶消化、传代, 将稀释的细胞平均分配至 24 孔细胞培养板的 6 个孔内, 待细胞生长状态恢复后, 依次加入不同浓度的潮霉素 B: 0、50、100、200、300、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。培养 3 d 后 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  潮霉素 B 以上的 3 个孔内的细胞全部死亡, 确定 CHO 细胞的最小潮霉素 B 致死浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.5.2 pVITRO-FSH $\alpha\beta$  稳定转染 CHO 细胞 用 Roche 公司质粒提取试剂盒提质粒, 并用 Wizard DNA Clean-up System 纯化, 紫外分光光度计定量。转染前 1 d, 接种  $8 \times 10^5$  CHO 细胞至  $75 \text{ cm}^2$  细胞培养瓶中, 转染时细胞达到 50% 汇片。用 Qiagen 公司 PolyFect 转染试剂将 2.5  $\mu\text{g}$  质粒 pVITRO-FSH $\alpha\beta$  转染 CHO 细胞,  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 48 h 以后, 将细胞消化传代, 分至 24 孔培养板, 每孔细胞汇片程度要小于 25%, 用含 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  潮霉素 B 的 RPMI1640 完全培养基培养。每 3~4 d 进行换液, 清除死细胞及细胞碎片。筛选 3 周后, 观察各孔内细胞的生长情况, 将出现细胞集落的孔内的转染细胞, 用胰酶消化, 吸至含潮霉素 B 的细胞培养瓶内扩大培养。2 周后, 消化细胞, 换成无抗生素完全培养基继续培养。

1.5.3 稳定转染细胞鉴定与表达检测 山羊 FSH 稳定转染 CHO 细胞 PCR 鉴定: 采用哺乳动物贴壁细胞 DNA 简易提取方法<sup>[13]</sup>, 以提取转染和空转染 CHO 基因组 DNA 为模板, 用山羊 FSH $\alpha\beta$  亚基特异引物 PCR 扩增, 空转染的 CHO 基因组 DNA 作阴性对照, 鉴定山羊 FSH 基因是否稳定转染。

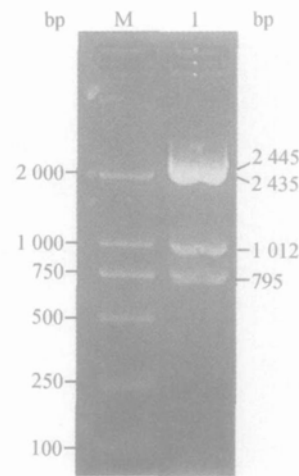
稳定转染 CHO 细胞表达产物放射免疫检测: 将稳定转染的 CHO 细胞完全培养基换成含 5% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 培养 48 h 后, 取培养上清, 12 000 g 离心 5 min, 吸取上清液, 用 FSH 放射免疫检测是否有重组山羊 FSH 表达。

## 2 结果

### 2.1 双表达载体 pVITRO-FSH $\alpha\beta$ 构建酶切鉴定

构建的 pVITRO-FSH $\alpha$  质粒用 *Bam*H I、*Hind* III

III 双酶切, pVITRO-FSH $\alpha\beta$  质粒用 *Bgl* II、*Bam*H I 酶切初步鉴定, 酶切图谱见图 2、3, 酶切鉴定正确的质粒进行目的基因测序, 结果表明插入的目的基因序列和方向完全正确。

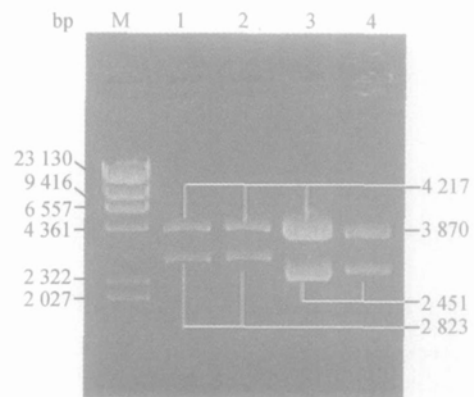


M. DNA Marker DL2000

1. pVITRO-FSH $\alpha$  digested by *Bam*H I and *Hind* III

图 2 质粒 pVITRO-FSH $\alpha$  酶切鉴定

Fig. 2 The enzymatic identification of plasmid pVITRO-FSH $\alpha$



M. DNA Marker  $\lambda$ *Hind* III digest

1, 2. pVITRO-FSH $\alpha\beta$  by *Bgl* II and *Bam*H I

3. pVITRO-FSH $\alpha$  by *Bgl* II and *Bam*H I

4. pVITRO-2 by *Bgl* II and *Bam*H I

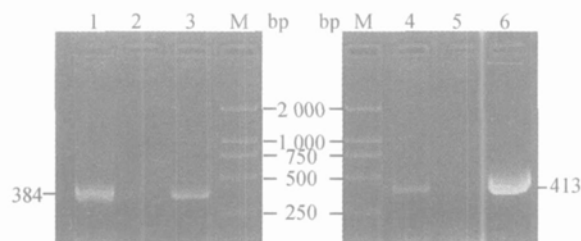
图 3 质粒 pVITRO-FSH $\alpha\beta$  酶切鉴定

Fig. 3 Identification of plasmid pVITRO-FSH $\alpha\beta$  by restriction endonucleases digestion

### 2.2 pVITRO-FSH $\alpha\beta$ 质粒稳定转染 CHO 细胞的 PCR 检测

提取转染的 CHO 细胞基因组 DNA, 分别以 FSH $\alpha\beta$  特异引物 PCR 扩增, 并以非转染的 CHO 细胞基因组 DNA 作对照, 检测 pVITRO-FSH $\alpha\beta$  质粒是否稳定转染。PCR 产物经电泳分析(见图 4),

对照组没有电泳条带, 仅在转染组出现预期条带, 说明 FSH $\alpha\beta$  基因稳定转染到 CHO 细胞内。



M. DNA Marker DL2000

1. Positive control of FSH $\alpha$ ; 2, 5. Negative control of CHO genome DNA by PCR with  $\alpha/\beta$  primers respectively; 3. The product of FSH $\alpha$  by PCR from transfected CHO; 4. The product of FSH $\beta$  by PCR from transfected CHO; 6. Positive control of FSH $\beta$

图 4 pVITRO-FSH $\alpha\beta$  稳定转染 CHO 细胞 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR identification of CHO cells stably transfected by pVITRO-FSH $\alpha\beta$

### 2.3 CHO 细胞稳定表达产物的放射免疫检测

稳定转染的 CHO 细胞用 5% 胎牛血清 RPMI1640 培养基培养, 检测培养上清 FSH 的表达, 通过 FSH 放射免疫检测, 培养上清液中有 FSH 表达, 如图 5 所示。

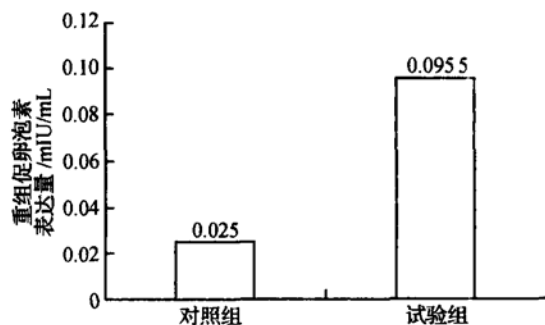


图 5 山羊重组促卵泡素稳定表达放射免疫检测结果

Fig. 5 Radioimmunoassay for stable expression of recombinant goat FSH

### 3 讨论

FSH 重组表达研究已在各种表达系统做过尝试, 如大肠杆菌、昆虫细胞、酵母、哺乳动物细胞、转基因动植物, 但 FSH 作为一种糖蛋白激素, 它仅在真核表达系统中具有糖基化修饰功能。昆虫细胞、酵母、转基因植物虽能糖基化, 但其形式与天然 FSH 不同, 易造成表达产物生物活性的降低或发生免疫反应。本研究选择 pVITRO-2 双表达质粒作

为山羊重组 FSH 的稳定表达载体, 将 FSH  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基基因同时插入此载体, 构建成双表达载体 pVITRO-FSH $\alpha\beta$ , 转染 CHO 细胞, 在潮霉素 B 抗性筛选下, 获得了稳定表达的细胞株。有研究表明, 重组人<sup>[7]</sup>、绵羊<sup>[14]</sup> FSH $\alpha$ 、 $\beta$  双表达载体转染 CHO 细胞, FSH 异二聚体得到了有效的分泌。Kato 等<sup>[15]</sup> 构建的猪 FSH $\alpha\beta$  双启动子表达载体转染昆虫细胞, 成功地表达和分泌了重组猪 FSH, 而用构建的  $\alpha$  和  $\beta$  载体转染时, 表达量很低。Nakhai 等<sup>[16]</sup> 虽然用牛  $\alpha$  和  $\beta$  载体进行重组表达, 可以产生有活性的重组牛 FSH, 但与  $\alpha\beta$  双表达载体相比, 表达产物的生物活性至少低 1%。以上各研究表明  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基的早期结合有利于二者的稳定, 将  $\alpha$ 、 $\beta$  插入同一个载体, 对于 FSH 的重组表达是有益的。哺乳动物细胞 CHO 是目前表达具有翻译后修饰蛋白质的常用宿主, 它具有准确的转录后修饰功能, 表达的糖基化蛋白质在分子结构、理化性质和生物学功能方面最接近于天然蛋白质分子, 由于建系细胞容易培养, 内源性蛋白分泌量很少, 可以用无血清、无蛋白培养基培养, 因而便于表达产物的分离纯化<sup>[17]</sup>, 但表达水平较低。本研究用 pVITRO-FSH $\alpha\beta$  双表达载体虽然得到有效表达, 但表达量不高, 因此有必要对表达系统进行优化。

据研究, 基因工程巴斯德毕赤酵母可以用来表达人源的糖蛋白, 其翻译后修饰与天然的糖蛋白相似, 这将是未来糖蛋白重组表达的一个方向<sup>[18, 19]</sup>。此外转基因动物乳腺生物反应器, 无论是在表达产物正确的翻译后修饰, 还是重组产物的表达量方面都拥有很大的优势, 也可以用来表达重组 FSH。本研究成功构建了山羊 FSH $\alpha\beta$  双表达载体 pVITRO-FSH $\alpha\beta$ , 并转染 CHO 细胞, 获得了分泌山羊 FSH 的稳定表达细胞, 但对于重组的 FSH 生物活性检测以及重组产物的纯化尚需做进一步的研究。

### 参考文献:

- [1] 张忠诚. 家畜繁殖学[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2000. 41.
- [2] Rose M P, Gaines Das R E, Balen A H. Definition and measurement of follicle stimulating hormone[J]. Endocrine Reviews, 2000, 21(1): 5~ 22.
- [3] Boze H, Céline L, Patrick C, et al. High-level secretory production of recombinant porcine follicle stimulating hormone by pichia pastoris[J]. Process Biochemistry, 2001, 36: 907~ 913.

- [4] Coulibaly S, Besenfelder U, Miller I, et al. Expression and characterization of functional recombinant bovine follicle-stimulating hormone (boFSH $\alpha/\beta$ ) produced in the milk of transgenic rabbits[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2002, 63(3): 300~308.
- [5] Dirnberger D, Steinkellner H, Abdennebi L, et al. Secretion of biologically active glycoforms of bovine follicle stimulating hormone in plants[J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 4 570~ 4 579.
- [6] Fidler A E, Lun S, Young W, et al. Expression and secretion of a biologically active glycoprotein hormone, ovine follicle stimulating hormone, by *Pichia pastoris* [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 1998, 21: 327~ 336.
- [7] Keene J L, Matzuk M M, Otani T, et al. Expression of biologically active human follitropin in Chinese hamster ovary cells[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(9): 4 769~ 4 775.
- [8] 范俊, 邓晓惠. 卵泡刺激素研究进展[J]. *生殖与避孕*, 1998, 18(2): 122~ 125.
- [9] 丁家桐, 张军强, 孙怀昌, 等. 山羊促卵泡素(FSH) $\alpha$ 和 $\beta$ 亚单位cDNA的克隆与序列分析[J]. *农业生物技术学报*, 2003, 11(4): 432~ 434.
- [10] Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15: 8 125~ 8 148.
- [11] Kozak M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes[J]. *Gene*, 1999, 234: 187~ 208.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 黄培堂等译. 北京: 科学技术出版社, 2002.
- [13] Laird P W, Zijderveld A, Linders K, et al. Simplified mammalian DNA isolation procedure [J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(15): 4 293.
- [14] Moutford P S, Brandon M R, Adams T E. Expression and characterization of biologically active ovine FSH from mammalian cell lines [J]. *J Mol Endocrinol*, 1994, 12(1): 71~ 83.
- [15] Kato Y, Sato I, Ihara T, et al. Expression and purification of biologically active porcine follicle-stimulating hormone in insect cells bearing a baculovirus vector [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 1998, 20: 55~ 65.
- [16] Nakhai B, Sridhar P, Pal R, et al. Over-expression and characterization of recombinant beta subunit of the human chorionic gonadotropin hormone synthesized in insect cells infected with a genetically engineered baculovirus[J]. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 1992, 29: 315~ 321.
- [17] 申烨华, 耿信笃. CHO细胞表达系统研究新进展[J]. *生物工程进展*, 2000, 20(4): 23~ 25.
- [18] Hamilton S R, Bobroicz P, Bobrowicz B, et al. Production of complex human glycoproteins in yeast[J]. *Science*, 2003, 30: 1 244~ 1 246.
- [19] Service R F. Yeast engineered to produce sugared human proteins[J]. *Science*, 2003, 301: 1 171.

### Construction and Stable Expression of Eukaryotic Expression Vector pVITRO-FSH $\alpha\beta$ of Goat Follicle-stimulating Hormone in Chinese Hamster Ovary Cells(CHO)

WANG Jian-wu, CHEN Xiur-ping, YAN Zheng-jie, DING Jia-tong\*

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** The dual expression vector pVITRO-FSH $\alpha\beta$  was successfully constructed on the basis of cloning of goat FSH  $\alpha$  &  $\beta$  and transient expression. The plasmids were transfected into Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, and stable expressing cells were acquired by screening of Hygromycin B. These results would make preparations for producing recombinant hormone.

**Key words:** goat follicle-stimulating hormone; dual expression vector; CHO; stable expression

\* Corresponding author