

山羊 FSH 类似物基因构建及其表达

孙雪萍¹, 严正杰², 杨欢利¹, 刘燕杰¹, 丁家桐^{1*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 南京医科大学第一附属医院, 南京 210029)

摘要: 以 HCG β 亚基羧基末端延长肽 CTP 基因为连接序列, 重组山羊 FSH α 和 β 亚基基因, 获得单链 gFSH β -CTP- α , 克隆入表达载体 pVITRO, 测序后转染 CHO 细胞。结果表明, 成功完成了单链山羊 FSH 类似物表达载体的构建, 并得到稳定表达的 CHO 细胞株, 其表达量为 0.120 mIU/mL, 为进一步研究 CTP 结构与功能的关系, 以及长效 FSH 制剂的研制奠定了分子基础。

关键词: 山羊促卵泡素; 单链; CHO; 稳定表达

中图分类号: S826.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)12-1250-04

Construction and Expression of Goat Follicle-stimulating Hormone Analogous Gene

SUN Xue-ping¹, YAN Zheng-jie², YANG Huan-li¹, LIU Yan-jie¹, DING Jia-tong^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology,

Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. The First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: The single strand gFSH β -CTP- α gene was successfully constructed by the combination of the C-terminal peptide (CTP) of carboxyl-terminal region of human chorionic gonadotropin with the goat FSH α -subunit and β -subunit genes. The gene was subcloned into expression vector pVITRO and transfected into Chinese Hamster Ovary (CHO) cells after gene sequencing. The results show that FSH analogous gene expression vector was successfully constructed, the CHO cells expressed gFSH β -CTP- α were acquired and the quantity of expression is 0.120 mIU/mL. These results would lay the molecular foundation for studying the relation between structure and function of CTP and the production of long-acting FSH.

Key words: goat follicular stimulation hormone; single strand; CHO; stable expression

促卵泡素 (Follicular stimulating hormone, FSH) 是由动物脑垂体前叶分泌的糖蛋白类激素。具有调节机体的生长、性成熟和生殖等作用。在动物生殖过程中 FSH 与 LH 协同作用可促使雄性动物生精上皮发育和精子成熟, 并可促使雌性动物卵泡成熟、抑制卵泡闭锁、诱导芳香酶活性、刺激颗粒细胞增生及诱导 LH 和 PRL 受体产生^[1]。FSH 无论是在畜牧生产还是在人类不育症治疗上均有重要应用价值。

在同一物种中, FSH 和绒毛膜促性腺激素 (Chorionic gonadotropin, CG) 都是由相同的 α 亚基和各自特异性的 β 亚基组成, 两者由非共价键连接, 单独的 α 或 β 亚基不具有生物活性, 唯以非共价键连接的异二聚体形式才表现出激素的全部生物活性^[2]。相对说来, FSH 的半衰期较短, CG 的半衰期较长。研究发现, 人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 的 β 亚基存在的羧基末端延长肽 (CTP), 可以延长 HCG 在体内的半衰期^[3]。此外, 在研究 FSH 和其他糖蛋

收稿日期: 2005-12-09

基金项目: 江苏省自然科学基金资助 (BK2005050)

作者简介: 孙雪萍 (1978-), 江苏人, 硕士生, 主要从事动物生殖调控应用与研究

* 通讯作者: 丁家桐, Tel: 0514-7979309; E-mail: jtding@yzu.edu.cn

白激素结构功能过程中,由于基因突变常导致亚基之间无法形成非共价键结合,而失去生物活性。Sugahara 以 CTP 序列为连接桥,采用基因融合的方法,将 FSH β 亚基羧基末端与 α 亚氨基基末端融合,使 FSH 二聚体转变为一条单链,解决了这一难题。试验证明 FSH 从天然异二聚体转变为单链结构后,生物学特性没有明显变化^[4]。

本研究应用基因重组技术,构建含重组 FSH (gFSH) β -CTP- α 基因的真核表达载体。在此基础上转染中国仓鼠卵巢细胞(Chinese Hamster Ovary Cells, CHO)筛选出稳定表达的细胞株,为重组山羊长效 gFSH 制剂的研制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒、菌株、细胞株 真核表达载体 pcDNA-gFSH α 、pVITRO-gFSH β -CTP 由本实验室构建^[5~7],大肠杆菌 DH5 α 、CHO 细胞由本实验室保存;pVITRO 双表达载体购自美国 InvitroGen 公司。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶、高保真聚合酶、DNA Ligation Kit Ver. 2、Agarose Gel DNA Purification Kit、DNA Marker 购自大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司;Wizard DNA Clean-up System 购自 Promega 公司;PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成;梭华-Sofast 基因转染试剂购自厦门太阳马公司。胎牛血清购自杭州四季青公司,潮霉素 B (Hygromycin B)购自上海生工生物工程有限公司,RPMI1640 培养基购自 Sigma 公司。

1.2 方 法

1.2.1 单链 gFSH β -CTP- α 基因的构建

1.2.1.1 引物设计:根据 gFSH α 的 cDNA 序列设计扩增 gFSH α 亚基的上游引物 1 和下游引物 2,根据 gFSH β -CTP 的 cDNA 序列设计扩增 gFSH β -CTP 序列的上游引物 3 和下游引物 4,引物 2 和引物 3 有 17 个碱基互补。

引物序列如下:

引物 1: 5'-TCAGTGAAATCAGAGAATGGAT-TACTACAG-3';

引物 2: 5'-CGCCTCGAGTTAAGATTTGT-GATAATAACA-3';

引物 3: 5'-TAT AGATCT CCACCATG GAAGTC-CATCCAGTTCTG-3';

引物 4: 5'-ATAGCTAGCTTATTGTGGGAG-GATCGGGGTG-3';

引物 2、3 分别引入 *Xho*I、*Bgl* II 酶切位点,引物 3 在上游引物的 ATG 起始密码子前加入 Kozak 序列,提高基因的翻译效率^[8]。

1.2.1.2 PCR 重叠延伸法扩增 gFSH β -CTP- α :以 pVITRO-gFSH β -CTP 为模板,扩增 gFSH β -CTP,条件为 95 °C 预变性 3 min;95 °C 1 min,56 °C 30 s,72 °C 45 s,30 次循环;72 °C 延伸 5 min。以 pcDNA-gFSH α 为模板扩增 gFSH α ,条件为 94 °C 预变性 3 min;94 °C 45 s,59.5 °C 30 s,72 °C 45 s,30 次循环;72 °C 延伸 5 min。用 Agarose Gel DNA Purification Kit 回收上述 PCR 产物。

以 gFSH β -CTP 和 gFSH α 为模板,PCR 拼接扩增融合片断 gFSH β -CTP- α ,条件为 94 °C 3 min;94 °C 45 s,59.5 °C 30 s,72 °C 45 s,30 次循环;72 °C 1 min。产物用 Agarose Gel DNA Purification Kit 回收。

1.2.2 真核表达载体 pVITRO-gFSH β -CTP- α 的构建 抽提质粒 pVITRO,纯化后用限制性内切酶 *Xho*I、*Bgl* II 分别对 pVITRO 和 FSH β -CTP- α 进行双酶切,用 DNA Ligation Kit 16 °C 连接 30 min 后转化至大肠杆菌 DH5 α ,涂潮霉素 B 平板,37 °C 培养 14~16h,挑取单菌落小提质粒,*Hind* III 酶切鉴定。将质粒送上海博亚生物公司测序。

1.2.3 pVITRO-gFSH β -CTP- α 双表达质粒转染 CHO 细胞及稳定表达细胞筛选 按梭华-Sofast 基因转染试剂使用说明进行转染,pVITRO 空质粒作为对照,每 3~4 d 进行换液。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。

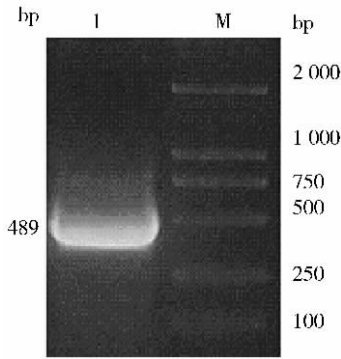
1.2.4 稳定转染细胞鉴定与表达检测

1.2.4.1 gFSH 稳定转染 CHO 细胞的 PCR 鉴定:采用哺乳动物贴壁细胞 DNA 简易提取方法^[9],以提取转染和空转染 CHO 基因组 DNA 为模板,用 gFSH α 、 β 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 gFSH 基因是否稳定转染。

1.2.4.2 稳定转染 CHO 细胞表达产物的放射免疫检测: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 48h 后,取培养上清,高速离心,吸取上清液,用 gFSH 放射免疫检测是否有重组 gFSH 表达。

2 结果

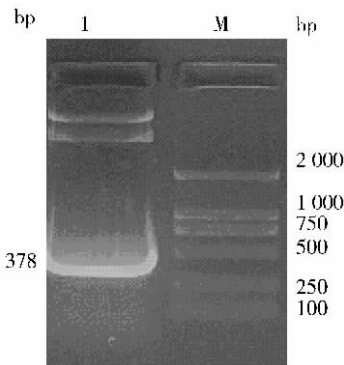
2.1 将 PCR 扩增的产物电泳,得到的条带与预期目的条带相符,见图 1、图 2 和图 3。



M. DNA marker DL2000; 1. Amplified FSH β -CTP

图 1 PCR 扩增的 FSH β -CTP 产物

Fig. 1 The product of FSH β -CTP by PCR

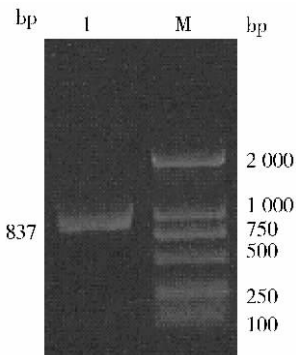


M. DNA marker DL2000;

1. Amplified FSH α gene

图 2 PCR 扩增的 FSH α 产物

Fig. 2 The product of FSH α by PCR



M. DNA maker DL2000

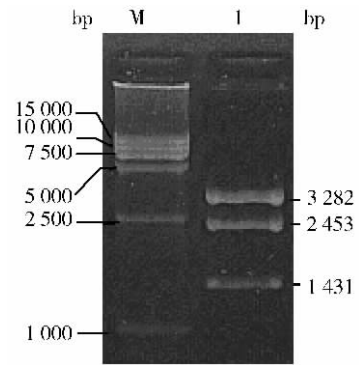
1. Amplified FSH β -CTP- α gene

图 3 PCR 扩增出的单链 FSH β -CTP- α 基因

Fig. 3 The product of single strand FSH β -CTP- α gene

2.2 双表达载体的酶切

用 *Hind* III 酶切 pVITROFSH β -CTP- α 后应得到大小分别为 3 282、2 435、1 431 的片断。电泳条带位置与预期结果相符,见图 4。



M. DNA Marker DL 15000

1. Three bands 3 282、2 435、1 431 of pVITRO FSH β -CTP- α digested by *Hind* III

图 4 pVITRO FSH β -CTP- α 的 *Hind* III 酶切

Fig. 4 The graph of pVITRO FSH β -CTP- α digested by *Hind* III

2.3 测序

测序结果进一步证明插入的目的基因序列和方向完全正确。

2.4 pVITRO FSH β -CTP- α 质粒稳定转染 CHO 细胞的 PCR 检测

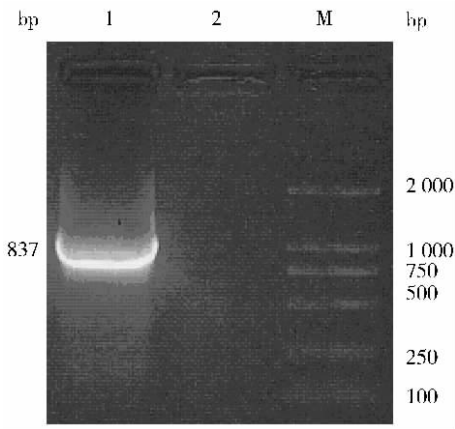
提取转染的 CHO 细胞基因组 DNA,用 FSH β -CTP- α 特异引物 PCR 扩增,并以未转染的 CHO 细胞基因组 DNA 作对照,检测 pVITRO FSH β -CTP- α 质粒是否稳定转染。PCR 产物电泳分析出现预期条带,将 PCR 产物测序,进一步证明 FSH β -CTP- α 基因稳定转染到 CHO 细胞内,见图 5。

2.5 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,见图 6。

3 讨论

目前单链 FSH 类似物的研究都集中于人,而山羊单链 FSH 类似物的研究国内外尚未见文献报道。本研究应用基因重叠法,通过 2 次 PCR 扩增反应,获得含有 CTP 序列的单链 FSH 基因,将 FSH β -CTP- α 单链克隆至双表达载体 pVITRO,经测序证实所获得的单链基因序列与 FSH α 、 β 亚基以及 CTP 的 cDNA



M. DNA marker DL2000;

1. Amplified FSH β -CTP- α ; 2. Control

图 5 pVITRO FSH β -CTP- α 稳定转染 CHO 细胞 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR identification of CHO cells stably transfected by pVITRO FSH β -CTP- α

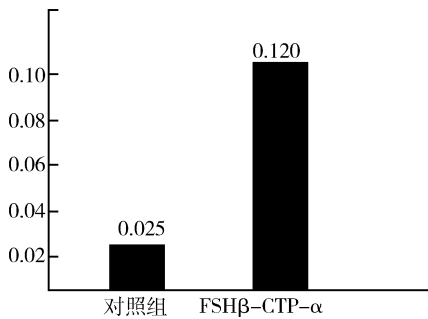


图 6 FSH β -CTP- α 稳定表达放射免疫检测

Fig. 6 Radioimmunoassay for stable expression of FSH β -CTP- α

序列完全相符。将双表达载体 pVITRO FSH β -CTP- α 转染 CHO 细胞,提取转染的 CHO 细胞基因组 DNA, PCR 产物凝胶电泳和测序鉴定,证实获得稳定转染的 CHO 细胞株。对 CHO 细胞的培养上清进行放射免疫测定,结果显示对照组 FSH 的表达量约为 0.025 mIU/mL(可能是培养基血清中含有的量);而试验组 FSH 的表达量约为 0.120 mIU/mL,高于对照组近 5 倍。其表达量亦高于王建武、严正杰等采用相同表达载体及转染方法所得到的异二聚体形式的 FSH 的表达量(0.095 5 mIU/mL)和 FSH-CTP 的表达量(0.105 mIU/mL)^[6,7]。由此,进一步说明 FSH β -CTP- α 不存在因异二聚体形式的组装而形成的分泌限速步骤。此外,Sugahara 也证实了 CTP 结构的存在不影响 FSH-CTP 受体结合和信号传导,也不会影响基因的表达^[10]。

按照 Klein 在恒河猴上进行的单链 FSH-CTP 的药物动力学和药效学研究结果,表明这种新型促性腺激素产品的半衰期将比天然 FSH 长 2~4 倍且安全有效^[11]。本研究成功获得了单链 FSH 基因,为人工合成 FSH 制剂奠定了分子基础,但 CHO 细胞的表达水平还比较低,同时大规模培养细胞也存在困难,因此通过细胞培养获得高纯度的 FSH 很不现实,有必要探索其他高效表达系统。

参考文献:

- [1] McLachlan R I, Wreford N G, O'Donnell L, *et al.* The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH[J]. *Endocrinol*, 1996, 148:1~9.
- [2] Ryan R J, Charlesworth M C, McCormick D J, *et al.* The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationships[J]. *FASEB*, 1988, 2: 2 661~2 669.
- [3] Vicenta G C, Irving B. Novel recombinant gonadotropins[J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2001,12(2):72.
- [4] Sugahara T, Grootenhuis P D, Sato A, *et al.* Expression of biologically active fusion genes encoding the common α subunit and either the HCG β or FSH β subunits: role of a linker sequence[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1996,125:71~77.
- [5] 丁家桐,张军强,孙怀昌,等.山羊促卵泡素 α 和 β 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.
- [6] 王建武,陈秀萍,严正杰,等.山羊 FSH 真核表达载体 pVITRO-FSH $\alpha\beta$ 构建及在 CHO 细胞内稳定表达[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(11):1 130~1 134.
- [7] 严正杰,孙雪萍,丁家桐.长效山羊促卵泡素类似物的真核表达载体的构建及其在 CHO 细胞内的稳定表达[J]. *生物技术通讯*, 2005,16(4):381~383.
- [8] Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1987,15:8 125~8 148.
- [9] 张维铭. *现代分子生物学实验手册*[M]. 北京:科学出版社,2003.
- [10] 严正杰,孙雪萍,丁家桐.重组促卵泡素及长效类似物的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2005,32 (5):12~14.
- [11] Klein J, Lobe L. Development and characterization of a long-acting recombinant hFSH agonist [J]. *Human Reproduction*, 2003,18(1): 50~56.