

Construction of a Lentiviral Vector Harboring Dominant-Negative Mutant of Growth Hormone Receptor for Tibet Minipigs

Junshuang Jia¹, Xiaolin Lin¹, Dong Xiao^{1,2}, Wei Liu^{2*}

¹Cancer Research Institute, Southern Medical University, Guangzhou Guangdong

²Institute of Comparative Medicine and Laboratory Animal Center, Southern Medical University, Guangzhou Guangdong

Email: catninth@163.com

Received: Aug. 3rd, 2016; accepted: Aug. 27th, 2016; published: Aug. 30th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To generate lentiviral vector harboring the dominant-negative mutant of porcine growth hormone receptor, and *in vitro* confirm the functionality of the resulting plasmid. **Methods:** Firstly, CAG promoter was amplified from pRLG3A, and subsequently subcloned into pCD550A-1 at the *Cla*I/*Bam*H I sites by In-Fusion cloning, designated pCAGGP, as verified by restriction enzyme digestion and sequencing. Secondly, the fragment of dominant-negative mutant of growth hormone receptor (dnGHR) was amplified from liver cDNA of Tibet minipig, and then inserted into pCAGGP at the multiple cloning site (MCS) by In-Fusion cloning to generate pCdnGGP, as verified by restriction enzyme digestion and sequencing. To *in vitro* confirm the functionality of the resulting plasmid (pCdnGGP), pCdnGGP was transiently transfected into 293T cells to produce lentiviruses LV-CdnGGP, and LV-CdnGGP was used to infect pig embryonic fibroblast (PEFs), followed by EGFP assay under inverted fluorescence microscope and detecting dnGHR transgene expression by RT-PCR. **Results:** Enzyme digestion and DNA sequencing demonstrated that pCdnGGP was successfully constructed. 293T cells transiently transfected with pCdnGGP and PEFs infected by LV-CdnGGP displayed the green fluorescence under inverted fluorescence microscope and the increased expression of dnGHR. **Conclusion:** The lentiviral vector harboring pig dnGHR gene was successfully constructed, which will lay a solid foundation for further research.

Keywords

Tibet Minipigs, GHR, Dominant-Negative Mutant, EGFP, Lentivirus Vector

*通讯作者。

过表达西藏小型猪GHR显负性突变体的慢病毒载体构建及其功能验证

贾俊双¹, 林晓琳¹, 肖东^{1,2}, 刘薇^{2*}

¹南方医科大学肿瘤研究所, 广东 广州

²南方医科大学比较医学研究所暨实验动物中心, 广东 广州

Email: catninth@163.com

收稿日期: 2016年8月3日; 录用日期: 2016年8月27日; 发布日期: 2016年8月30日

摘要

目的: 构建过表达西藏小型猪GHR基因显负性突变体的慢病毒载体, 并对其进行功能验证。方法: 首先以pRLG3A为模板, PCR扩增CAG启动子, In-Fusion克隆至*Cla* I/*Bam*H I双酶切的pCD550A-1载体中, 替换其EF1 α 启动子, 获得pCAGGP; 然后从西藏小型猪肝脏组织cDNA中PCR扩增GHR基因的显负性突变体片段(dnGHR); 最后将dnGHR片段插入pCAGGP多克隆位点, 最终得到过表达猪GHR显负性突变体的慢病毒载体pCdnGGP。对所构建的质粒进行测序和酶切鉴定。将所构建的pCdnGGP载体转染293T细胞, 并将包装好的慢病毒感染猪的胚胎成纤维细胞(PEFs), 倒置荧光显微镜检测GFP表达, 收集细胞并提取总RNA检测dnGHR基因在293T细胞和PEFs中的表达, 以对pCdnGGP进行体外功能验证。结果: 测序和酶切证实成功构建了pCdnGGP。pCdnGGP转染293T细胞以及病毒感染PEFs之后, 倒置荧光显微镜下可见绿色荧光, RT-PCR检测证实dnGHR在293T细胞和PEFs中均能正常表达。结论: 成功构建过表达猪GHR基因显负性突变体的慢病毒载体, 为相关后续研究打下了良好基础。

关键词

西藏小型猪, GHR, 显负性突变体, EGFP, 慢病毒载体

1. 前言

小型猪在解剖、生理生化、心血管系统、消化系统、皮肤系统、骨骼发育、营养代谢等方面与人有较大的相似性, 用小型猪作为医学实验动物模型近年来呈越来越普遍的趋势, 目前小型猪已广泛应用于心血管疾病、糖尿病、皮肤烧伤、外科、牙科、肿瘤、血液病、遗传病、营养代谢病、新药安全性评价等生物医学研究的多个方面[1]-[4]。

西藏小型猪是由南方医科大学实验动物中心顾为望教授等人于2004年由西藏自治区引种至广州培育而成的小型猪品系, 在近几年, 已基于其建立了几种转基因动物模型[5]-[7]。其具有抗感染能力强、抗逆性好、耐粗饲、体型小、被毛黑而粗的特点。其成年体重在40 kg左右, 若能培育出体型更小的微型化西藏小型猪, 将大大增加其在生物医学研究中的应用。

生长激素受体(Growth hormone receptor, GHR)是一种由单一基因编码的跨膜蛋白, 是细胞因子受体超家族成员之一。GHR在动物生长发育及新陈代谢中发挥重要作用, GHR功能缺失会导致动物生长发育迟缓[8]-[10]。显负性突变体技术是一种过表达某种蛋白的显负性突变体, 使其与正常的蛋白发生竞争性抑制, 从而实现某种蛋白功能缺失的技术。目前已有研究者通过在五指山小型猪过表达GHR基因的显负

性突变体制备了 GHR 功能缺失的转基因猪, 并发现过表达 GHR 显负性突变体的转基因五指山小型的体型较野生型猪要小[11]。

本研究拟构建过表达西藏小型猪 GHR 显负性突变体的慢病毒载体, 并对其进行功能验证, 以为制备微型化的西藏小型猪奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

2.1.1. 载体

载体 pRLG3A 由美国科学家 Manuela Martins-Green 教授惠赠[12], 慢病毒载体 pCDH-EF1-MCS-BGH-PGK-GFP-T2A-Puro (pCD550A-1) 购自 System Biosciences (SBI) 公司。慢病毒包装质粒 psPAX2 和 pMD2.G 由瑞士 Didier Trono 博士惠赠。

2.1.2. 主要试剂

Trizol 裂解液 RNAiso Plus (Code No. D9108)、逆转录试剂盒 PrimeScript[®] RT reagent Kit (Code No. DRR037A)、PCR 扩增试剂 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (Code No. DR010S)、胶回收试剂盒 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 (Code No. DV805)、DNA 克隆试剂 In-Fusion[®] HD Cloning Kit (Clontech Code No. 639633)、dNTP 和 Taq 酶等购自大连 TaKaRa 公司, 质粒小提试剂盒购自天根公司, 质粒大提试剂盒购自 QIAGEN 公司, 限制性内切酶购自大连 TaKaRa 公司; 脂质体转染剂 Lipofectamine 2000、高糖 DMEM、Opti-MEM Medium 和 DMSO 等购自 Invitrogen 公司; 培养瓶及培养板等购自 Corning 公司; 其余试剂为国产或进口化学纯或分析纯。

2.1.3. 细胞

293T 细胞来源和培养方法等参见文献[13], 西藏小型猪胚胎成纤维细胞(PEFs)的分离和培养参见文献[14]。以上细胞所用培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM。

2.2. 方法

2.2.1. 构建过表达猪 GHR 显负性突变体的慢病毒载体 pCdnGGP

首先以质粒 pRLG3A 为模板, PCR 扩增 CAG 启动子(1740 bp), In-Fusion 克隆至 *Cla* I/*Bam*HI 双酶切的 pCDH-EF1-MCS-BGH-PGK-GFP-T2A-Puro 载体(回收其中的 7980 bp 片段)中, 替换其 EF1 α 启动子, 获得 pCAG-MCS-BGH-PGK-GFP-T2A-Puro (pCAGGP) (9720 bp); 然后从西藏小型猪肝脏组织 cDNA 中 PCR 扩增 GHR 基因的显负性突变体片段(dnGHR) (GHR 基因第 1~7 号外显子, 在 7 号外显子后引入 3' -aaggaattag-5' 终止序列, 共 888 bp) [11], 克隆进 pMD18-T-simple, 获得 pMD18-dnGHR-C1; 最后, 从 pMD18-dnGHR-C1 载体中 PCR 扩增 dnGHR 片段, 插入 pCAGGP 多克隆位点, 最终得到过表达猪 GHR 显负性突变体的慢病毒载体 pCAG-dnGHR-BGH-PGK-GFP-T2A-Puro (pCdnGGP) (10,608 bp)。对每一步所构建的质粒进行测序和酶切鉴定。

2.2.2. pCdnGGP 体外功能验证

借助 Lipofectamine[™] 2000 将 pCdnGGP 和对照载体 pCD550A-1 转染入 293T 细胞, 进行慢病毒 LV-CdnGGP 和 LV-con 包装, 用包装好的慢病毒 LV-CdnGGP 和 LV-con 感染 PEFs, 慢病毒包装和感染的方法参见文献[13], 使用嘌呤霉素对感染后的细胞进行筛选, 直到筛选到 GFP 全阳性的 PEFs。在转染 48 小时和病毒感染后 96 小时以及嘌呤霉素筛选 7 天后, 倒置荧光显微镜检测 GFP 表达, 从生产慢病毒时转染了 pCdnGGP、pCD550A-1 的 293T 细胞以及嘌呤霉素筛选完成后的 LV-CdnGGP 和 LV-con 感染的

PEFs 中提取总 RNA, 进行逆转录, RT-PCR 检测细胞中 dnGHR 基因表达, 以对载体 pCdnGGP 进行体外功能验证。RT-PCR 所用的引物为 pdnGHR-F:GATCCACCCATTGGCCTCAA, pdnGHR-R:CATCTGCAT TGGGAGGTGGT, dnGHR 的 PCR 产物为 100 bp; 猪 GAPDH 引物为: pGAPDH-F: TGGCTACAGCAACA GGG, pGAPDH-R: CTGGGATGGAACTGGAAGT, 产物大小为 186 bp; 人 GHPDH 引物为: hGAPDH-F: ACCCAGAAGACTGTGGATGG, hGAPDH-R: TCTAGACGGCAGGTCAGGTC, 产物大小为 200 bp。PCR 反应中以上三对引物均设置 60°C 退火温度, 30 个循环。

3. 结果

3.1. 慢病毒表达载体 pCdnGGP 构建和鉴定

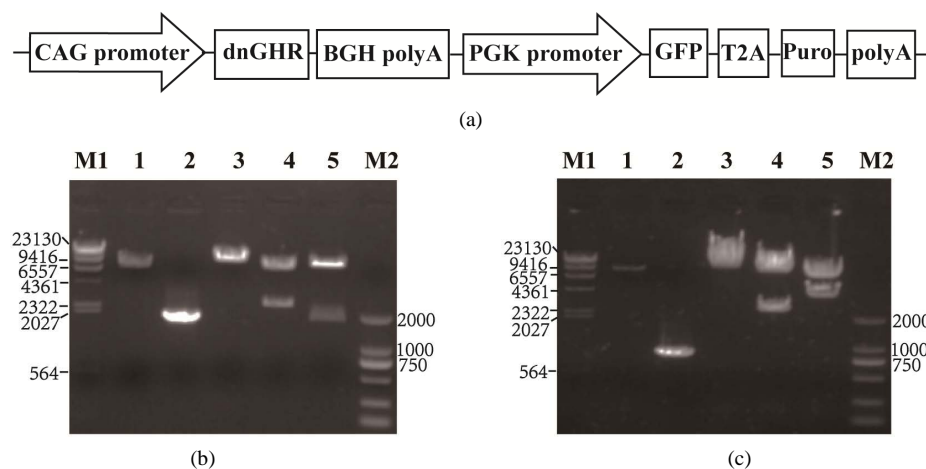
所需构建的载体 pCdnGGP 的结构示意图如图 1(a)所示, pCdnGGP 载体构建分三步进行。

3.1.1. 西藏小型猪 GHR 基因显负性突变体的扩增

从两份西藏小型猪肝脏组织 cDNA 样品中成功扩增 GHR 基因编码区(1718 bp), 并进行测序, 两个样品的测序结果一致。设计 PCR 引物将 GHR 基因编码区前 876 bp 片段(第 1~7 号外显子)扩增出来, 其中下游引物 5'端添加带有终止密码的 3'-aaggaaaattag-5'序列, PCR 产物共 888 bp, 命名为 dnGHR 片段。将 dnGHR 片段克隆进 pMD18-T-Simple, 挑取单克隆测序, 获取序列完全正确的 pMD18-dnGHR 质粒。

3.1.2. 载体 pCAGGP 构建

以质粒 pRLG3A 为模板, PCR 扩增 CAG 启动子, 取产物 5 μ l 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 出现一条带与预测值 1740 bp 相符(图 1(b); Lane 2: Insert DNA)。将此产物 In-Fusion 克隆至利用 *Cla* I 和 *Bam*HI 双酶切的 CD550A-1 (图 1(b); Lane 1: Vector DNA) (回收 7980 bp 片段作为 Vector DNA)中, 获得所构建的载体 pCAGGP。pCAGGP 经 *Bam*HI 酶切并电泳可见一条带, 其长度与理论预测值相符(图 1(b); Lane 3);



(a) Schematic illustration of pCdnGGP. CAG promoter: the CMV early enhancer/chicken β actin promoter; dnGHR: dominant negative mutant of GHR protein; PGK promoter: phosphoglycerate kinase gene promoter; GFP: green fluorescent protein; Puro: puromycin. (b) Enzyme digestion identification of pCAGGP. Lane M1: λ -Hind III digest (TAKARA); Lane M2: DL2000 Marker (TAKARA); Lane 1: Vector DNA; Lane 2: Insert DNA; Lane 3: pCAGGP-*Bam*HI; Lane 4: pCAGGP-*Nde*I; Lane 5: pCAGGP-*Sal*I/*Bam*HI. (c) Enzyme digestion identification of pCdnGGP. Lane M1: λ -Hind III digest (TAKARA); Lane M2: DL2000 Marker (TAKARA); Lane 1: Vector DNA; Lane 2: Insert DNA; Lane 3: pCdnGGP-*Xho*I; Lane 4: pCdnGGP-*Nde*I; Lane 5: pCdnGGP-*Eco*RI/*Kpn*I.

Figure 1. Schematic illustration of pCdnGGP and the resulting plasmids identified by enzyme digestion

图 1. pCdnGGP 结构示意图及载体酶切鉴定

pCAGGP 经 *Nde* I 酶切产生两条片段, 其大小与理论预测值相符(图 1(b); Lane 4); pCAGGP 经 *Sal* I 和 *Bam*H I 酶切产生的两条带亦与预测值一致(图 1(b); Lane 5)。同时, 对 pCAGGP 质粒进行测序, 结果与预期相符(结果未显示)。

3.1.3. 载体 pCdnGGP 构建

以 pMD18-dnGHR 为模板, PCR 扩增 dnGHR 片段, 取产物 1 μ l 电泳可见一条带, 与预测值 888 bp 相符(图 1(c); Lane 2: Insert DNA)。将此产物 In-Fusion 克隆至利用 *Xho* I 酶切的 pCAGGP (图 1(c); Lane 1: Vector DNA)中, 获得所构建的载体 pCdnGGP。对 pCdnGGP 质粒进行测序, 结果与预期相符(结果未显示)。pCdnGGP 经 *Xho* I 单酶切电泳可见一条带, 其长度与理论预测值 10,608 bp 相符(图 1(c); Lane 3); 经 *Nde* I 单酶切电泳可见两条带, 其长度与理论预测值 2322 bp 和 8286 bp 相符(图 1(c); Lane 4); pCdnGGP 经 *Eco*R I 和 *Kpn* I 双酶切则可产生两条带, 其大小与预测值 3636 bp 和 6972 bp 一致(图 1(c); Lane 5); 以上结果表明 pCdnGGP 构建成功。

3.2. 慢病毒包装

借助 LipofectamineTM 2000 将 pCdnGGP 和对照载体 pCD550A-1 转染入 293T 细胞后 48 小时, 倒置荧光显微镜下观察到被转染的 293T 细胞中可见绿色荧光, 证明转染成功(图 2)。

3.3. 慢病毒 LV-CdnGGP 感染 PEFs

将包装好的慢病毒 LV-CdnGGP 感染 PEFs 之后, 96 小时可见部分细胞有绿色荧光表达(图 3(a)、图 3(b)), 证明慢病毒包装成功, 之后细胞培养液中加入 2 μ g/ml 嘌呤霉素对转基因阳性的 PEFs 进行筛选, 每两天换液一次, 在筛选 7 天后可见大部分 PEFs 均带有绿色荧光(图 3(c)、图 3(d)), 筛选完成后的 PEFs 使用加入 1 μ g/ml 维持浓度嘌呤霉素的培养基进行培养。

3.4. RT-PCR 检测在 pCdnGGP 转染的 293T 细胞和 LV-CdnGGP 感染 PEFs 中 dnGHR 的表达

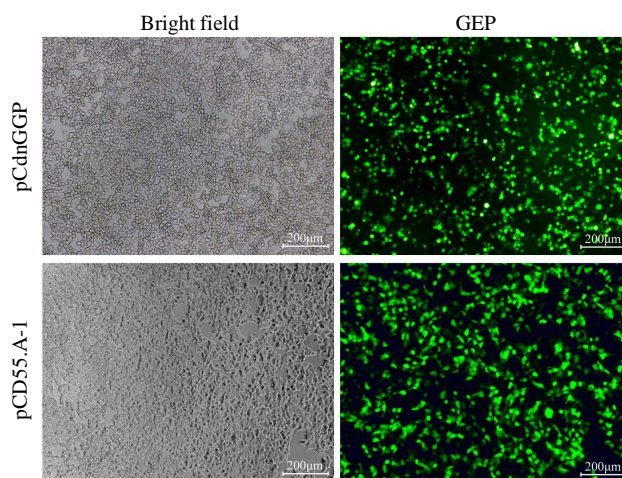
RT-PCR 结果显示, 在转染 pCdnGGP 的 293T 细胞和感染 LV-CdnGGP 的 PEFs 中, 均实现了 dnGHR 转基因的表达(图 4)。以上这些证明所构建的慢病毒载体 pCdnGGP 能在细胞中实现 dnGHR 的正常表达, 为接下来的相关研究奠定了坚实的基础。

4. 讨论

猪的 GHR 基因位于第 16 号染色体, 包含 10 个外显子, 其中 1~7 号外显子编码 GHR 胞外结构域(生长激素结合域)和跨膜结构域, 8~10 号外显子编码 GHR 胞内结构域。已有文献表明, GHR 基因敲除的小鼠和猪均会出现生长受抑制的现象, 体型较野生型小鼠和猪要小[10] [15]。同时, 也有研究者通过过表达仅含有 GHR 基因胞外结构域和跨膜结构域的突变体, 使 GHR 突变体与动物体内的生长激素结合, 从而造成野生型 GHR 功能被竞争性地抑制, 造成显性负效应, 通过此方法制备了过表达 GHR 显负性突变体的五指山小型猪, 这些转基因猪也出现生长受抑制的现象[11]。

本研究成功构建了过表达西藏小型猪 GHR 显负性突变体的慢病毒载体, 从基因层面上检测到其能实现目的转基因在 PEFs 中的过表达。接下来可以利用此慢病毒载体, 制备 GHR 功能缺失的转基因西藏小型猪, 从而创制体型更小的微型猪品系。

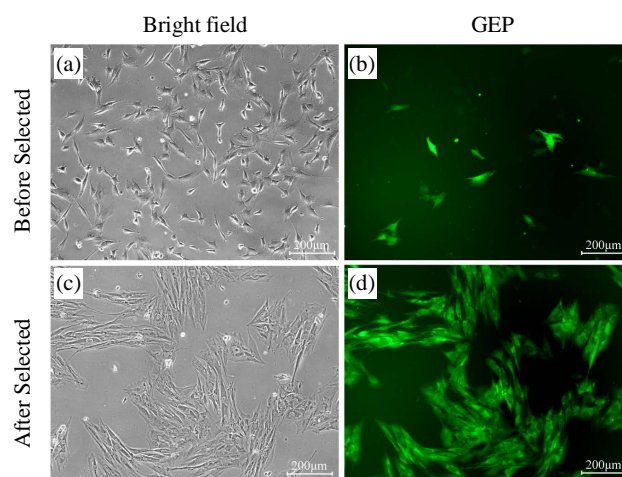
本研究构建的慢病毒载体包含 CAG 启动子调控 dnGHR 表达的元件, 同时, 在同一载体上还包含了 PGK 启动子调控报告基因 GFP 和嘌呤霉素抗性筛选基因的元件。GFP 的引入有利于通过绿色荧光来监测目的基因在转基因细胞以及在转基因动物体内的表达, 也有助于转基因猪可视化筛选和鉴定, 嘌呤霉素抗性筛选基因的设置有助于转基因阳性细胞的筛选。



48 h after transfection

Figure 2. 293T cells were transiently transfected with pCD550A-1 and pCdnGFP, respectively

图 2. pCD550A-1 和 pCdnGFP 分别瞬时转染 293T 细胞(病毒包装)



(a) and (b): 96h after LV-CdnGFP infection; (c) and (d): LV-CdnGFP-infected PEFs selected by puromycin

Figure 3. PEFs infected by lentivirus LV-CdnGFP

图 3. 慢病毒 LV-CdnGFP 感染 PEFs

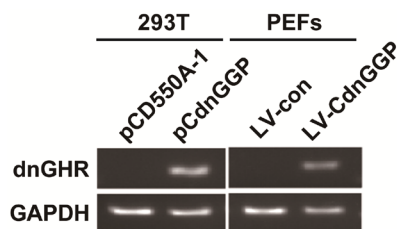


Figure 4. The expression of dnGHR transgene in 293T cells transfected with pCdnGFP and PEFs infected with LV-CdnGFP by RT-PCR

图 4. RT-PCR 检测 pCdnGFP 转染的 293T 细胞和 LV-CdnGFP 感染的 PEFs 中 dnGHR 表达

基金项目

广东省科技计划项目(2013B060300013), 构筑制作遗传工程小型猪的社会化服务支撑平台。

参考文献 (References)

- [1] 王桂花, 尹晓敏, 孙霞, 等. 国内外小型猪资源概况[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(2): 71-73.
- [2] 冯书堂. 我国小型猪资源实验化培育及开发利用[J]. 实验动物科学, 2007, 24(6): 111-118.
- [3] 罗刚, 张乐, 刘连生, 等. 我国实验用小型猪的应用研究前景[J]. 实验动物科学与管理, 2004, 21(2): 37-38.
- [4] 袁进, 顾为望. 小型猪作为人类疾病动物模型在生物医学研究中的应用[J]. 动物医学进展, 2011, 32(2): 108-111.
- [5] Yan, Q., Yang, H., Yang, D., *et al.* (2014) Production of Transgenic Pigs Over-Expressing the Antiviral Gene Mx1. *Cell Regeneration (Lond)*, **3**, 11. <http://dx.doi.org/10.1186/2045-9769-3-11>
- [6] Deng, W., Yang, D., Zhao, B., *et al.* (2011) Use of the 2A Peptide for Generation of Multi-Transgenic Pigs through a Single Round of Nuclear Transfer. *PLoS One*, **6**. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019986>
- [7] Yang, D., Wang, C.E., Zhao, B., *et al.* (2010) Expression of Huntington's Disease Protein Results in Apoptotic Neurons in the Brains of Cloned Transgenic Pigs. *Human Molecular Genetics*, **19**, 3983-3994. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq313>
- [8] Savage, M.O., Attie, K.M., David, A., *et al.* (2006) Endocrine Assessment, Molecular Characterization and Treatment of Growth Hormone Insensitivity Disorders. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, **2**, 395-407. <http://dx.doi.org/10.1038/ncpendmet0195>
- [9] David, A., Hwa, V., Metherell, L.A., *et al.* (2011) Evidence for a Continuum of Genetic, Phenotypic, and Biochemical Abnormalities in Children with Growth Hormone Insensitivity. *Endocrine Reviews*, **32**, 472-497. <http://dx.doi.org/10.1210/er.2010-0023>
- [10] Li, F., Li, Y., Liu, H., *et al.* (2014) Production of GHR Double-Allelic Knockout Bama Pig by TALENs and Hand-made Cloning. *Yi Chuan*, **36**, 903-911.
- [11] Li, F., Li, Y., Liu, H., *et al.* (2015) Transgenic Wuzhishan Minipigs Designed to Express a Dominant-Negative Porcine Growth Hormone Receptor Display Small Stature and a Perturbed Insulin/IGF-1 Pathway. *Transgenic Research*, **24**, 1029-1042. <http://dx.doi.org/10.1007/s11248-015-9912-6>
- [12] Zheng, L., Njauw, C.N. and Martins-Green, M. (2007) A hCXCR1 Transgenic Mouse Model Containing a Conditional Color-Switching System for Imaging of hCXCL8/IL-8 Functions *In Vivo*. *Journal of Leukocyte Biology*, **82**, 1247-1256. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0307141>
- [13] 贾俊双, 孙妍, 肖东, 等. 慢病毒介导的外源基因体外投递系统的建立[J]. 热带医学杂志, 2008(10): 1028-1029.
- [14] Shi, J.W., Liu, W., Zhang, T.T., *et al.* (2013) The Enforced Expression of c-Myc in Pig Fibroblasts Triggers Mesenchymal-Epithelial Transition (MET) via F-Actin Reorganization and RhoA/Rock Pathway Inactivation. *Cell Cycle*, **12**, 1119-1127. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.24164>
- [15] Lupu, F., Terwilliger, J.D., Lee, K., Segre, G.V. and Efstratiadis, A. (2001) Roles of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor 1 in Mouse Postnatal Growth. *Developmental Biology*, **229**, 141-162. <http://dx.doi.org/10.1006/dbio.2000.9975>

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>