

# 利用动物乳腺生物反应器生产药用蛋白

刘 森 梁国栋

(中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室 北京 100052)

**摘 要** 动物乳腺生物反应器是利用动物乳腺特异性启动子调控元件指导外源基因在乳腺中特异性表达,并从转基因动物奶液中获取重组蛋白。应用动物乳腺生物反应器生产药用蛋白具有生产方式简单,产量大,蛋白能进行翻译后修饰等优点,是具有广阔前景的生物医药产业。本文仅就动物乳腺生物反应器的建立、检测、目的蛋白的分离纯化以及存在的问题等作一综述。

**关键词** 动物乳腺生物反应器,转基因动物,蛋白纯化

中图分类号 TQ93 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2000)04-0421-04

动物乳腺生物反应器(Mammary gland bioreactor)技术是指利用哺乳动物乳腺特异性表达的启动子元件构建转基因动物,指导外源基因在乳腺中表达,并从转基因动物的奶液中获取重组蛋白。1982年,Palmiter等将大鼠生长激素基因显微注射到小鼠的受精卵中,获得比普通小鼠大得多的“硕鼠”,开始了转基因动物的研究,并提出利用转基因动物生产有价值的药用蛋白<sup>[1]</sup>。这一领域的诱人前景引起生命科学界的关注。1991年,Wright等人在羊的乳腺中成功地表达了人抗胰蛋白酶基因,羊奶中抗胰蛋白酶的含量高达35g/L<sup>[2]</sup>。这一研究结果引起科学界和企业界的极大兴趣。动物乳腺生物反应器可以作为生产贵重药用蛋白的理想工具,还可以改变奶液的内源性蛋白,降低脂肪,改变哺乳动物奶液的组成成分,使其性质更接近人乳,提高奶液的应用价值<sup>[3,4]</sup>。人们相信,动物乳腺生物反应器技术将形成低投入,高产出的巨大产业,是充满生机和活力的生物高技术。目前,国家“863”计划已将动物乳腺生物反应器的研究作为重大项目进行资助,我国的动物乳腺生物反应器研制工作迅速发展起来。相信不久的将来,这一技术将产生一定的经济效益。

## 1 转基因动物乳腺生物反应器的建立、检测及目的蛋白的分离纯化

自从1982年第一只转基因小鼠出生以来,国际上转基因动物一般是采用显微注射受精卵原核(图1)的方法研制成功的。原核显微注射法用得较多而且稳定。

但应用这种方法时,由于整合的时间、位点是随机的,外源基因的整合率较低(5%),许多转基因动物不能有效地表达外源基因,导致利用原核显微注射法建立转基因动物的成本升高。近年来,人们建立了许多新的方法,如整合胚胎移植法<sup>[5]</sup>,核移植法<sup>[6]</sup>等。核移植法是将外源基因导入胚胎

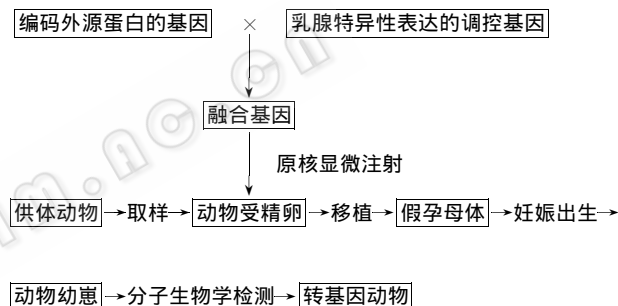


图1 原核显微注射法制备转基因动物的技术路线

Fig.1 Technical strategy of producing transgenic animal by pronuclear microinjection

细胞核中,通过显微操作,将此细胞核移植到去掉细胞核的成熟卵中,经体外培养后,再移植到假孕母体的输卵管或子宫内,发育成个体。传统的显微注射法是先注射DNA,然后将DNA整合到基因组中,这样整合的效率低,而核移植法是先体外整合外源基因,再进行显微注射。减少了注射的盲目性。资料表明,应用核移植技术建立的转基因羊比用经典的显微注射技术成功率高2.5倍<sup>[6]</sup>。这一方法是构建转基因动物策略的重大突破,可广泛用于转基因动物研究<sup>[7]</sup>。整合胚胎移植法是将目的基因注射到受精卵中,经体外培养,挑选整合有目的基因的胚胎进行移植,同时改进胚胎移植技术,减少对受精卵的损伤,使受孕率明显提高。应用整合胚胎移植法建立的转基因羊比用经典的显微注射技术成功率提高十几倍<sup>[5]</sup>。在转基因动物研究领域显示出诱人的前景。

### 1.1 构建表达载体

**1.1.1 基因调控序列:**建立动物乳腺生物反应器首先要保证目的蛋白在动物乳腺的特异性表达,这就要求表达载体的启动子调控元件应选用动物乳蛋白的基因启动子元件。目前,用于转基因动物乳腺定位表达的调控元件主要有以下

四类：

第一类  $\beta$ -乳球蛋白(BLG)基因调控元件。Simons 等将绵羊的 BLG 基因转入小鼠,绵羊的  $\beta$ -乳球蛋白在小鼠乳腺中特异性表达,其奶液中含量可达  $23\text{g/L}^{[8]}$ 。

第二类 酪蛋白基因调控序列。常用牛  $\alpha S_1$ -酪蛋白基因和羊  $\beta$ -酪蛋白基因的调控序列。如  $\alpha S_1$ -酪蛋白基因调控序列指导的人白介素-2 基因已在转基因兔奶液中成功表达<sup>[9]</sup>。

第三类 乳清酸蛋白(WAP)基因调控序列。WAP 是啮齿类动物奶液中的主要蛋白质,在家畜奶液中没有 WAP 的存在,但 WAP 基因调控序列可以指导外源基因在家畜奶液中表达<sup>[10]</sup>。

第四类 乳清白蛋白基因调控序列。

第三类和第四类可以指导外源基因的表达,但乳腺表达的特异性及表达量都不如第一类和第二类。

1.1.2 目的基因的选择：由于动物乳腺生物反应器的研制周期长,前期投入大,外源基因的整合机制尚不明,选择目的基因,构建表达载体时应注意:首先考虑那些正常情况下浓度低,翻译后修饰复杂,其它表达体系难以表达或表达量低,而临床应用前景广阔的蛋白基因,在构建表达载体时,基因组结构的表达效率要高于 cDNA 结构<sup>[2,41]</sup>,所以要首先选择完整的基因结构,基因下游 3' 端调控区对基因的表达也很重要,一些末端结构对 mRNA 本身在胞内的稳定起决定性作用。

选择好适当的目的基因和启动子调控元件后,进行体外基因操作,构建融合基因,即可转入受精卵,整合到宿主染色体并在乳腺中特异性表达。

## 1.2 转基因动物乳腺生物反应器的鉴定

转基因动物乳腺生物反应器建立后尚需进一步鉴定。可分别从 DNA、RNA 及表达的目的蛋白等不同水平进行检测。

1.2.1 DNA 水平的检测：检查动物体内是否有外源基因的存在,以判明是否是转基因动物。可用聚合酶链反应(PCR)、斑点杂交(Dot blotting)、Southern 印迹分析等多种方法进行检测。在这些实验中,模板只需按常规方法提取动物组织的 DNA 即可,而引物、探针须非常特异,要根据启动子调控序列和目的基因序列精心设计。

1.2.2 RNA 水平的检测：可用 Northern 印迹分析及 RNA 酶保护性实验进行分析,进一步从 RNA 水平鉴定外源基因的转录情况。这两种方法的关键是设计特异性的 mRNA 探针。

1.2.3 目的蛋白的检测：建立动物乳腺生物反应器的最终目的是得到有活性的外源蛋白,因此,对目的蛋白的检测非常重要。检测方法主要有：

SDS 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)。它具有敏感直观的特点,结合凝胶密度扫描仪能对蛋白进行定量检测。但若目的蛋白分子量与奶液中主要蛋白的分子量一致时,则 SDS-PAGE 难以定量目的蛋白。

酶联免疫吸附实验(ELISA)。它是一种灵敏度和特异度都较高的免疫学方法,能对目的蛋白进行定性或定量检测。但由于奶液中含多种大量的蛋白,可能影响对目的蛋白检测的灵敏度,而对于一些目的蛋白来说,其抗体可能与奶蛋白和(或)脂类反应,造成假阳性<sup>[10]</sup>,应注意设立严格的对照。

Western 印迹分析。应用目的蛋白的特异性抗体,从混杂抗原中检测出目的抗原(蛋白)。具有凝胶电泳分辨率高和固相免疫测定的特异敏感等优点。

目的蛋白生物活性的检测。获取有生物活性的目的蛋白是建立动物乳腺生物反应器的最终目的,所以蛋白的生物活性检测至关重要。由于表达的目的蛋白不同,其生物活性千差万别,应根据具体的蛋白采取不同的活性检测方法。如纤维蛋白-琼脂糖-平板法用于测定组织纤溶酶原激活剂(tPA)的活性,细胞病变抑制实验测定干扰素的活性等。其它检测方法还有等电聚焦、间接荧光染色<sup>[12]</sup>等。

## 1.3 转基因动物奶液中目的蛋白的分离与纯化

动物乳腺生物反应器技术仅有十几年的历史,从转基因动物奶液中分离纯化目的蛋白的研究更为短暂,国内外均无成熟的纯化技术。哺乳动物奶液中成分复杂,不仅包括蛋白质、糖类、脂肪、维生素、矿物质,还可能有细菌、病毒及动物组织脱落的碎片等。奶液中蛋白含量高,种类繁多。这给目的蛋白的分离与纯化带来困难。从有关文献来看,其基本纯化路线如下(图 2)：

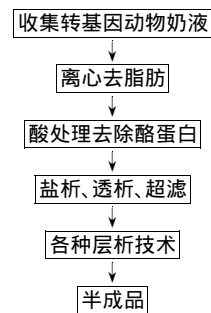


图 2 从转基因动物奶液中纯化目的蛋白的技术路线

Fig. 2 Technical strategy of purifying target protein from transgenic milk

1989 年,Clark 等在转基因绵羊奶液中表达了人抗凝血因子 IX,并用单克隆抗体亲和层析技术进行分离纯化<sup>[13]</sup>。随后,许多单位对此进行了研究(表 1)。

从奶液中分离纯化目的蛋白一般用常规的层析技术,但难以应用于大规模生产。双水相体系分配具有处理量大,设备简单,操作方便,条件温和等优点,具有良好的工业开发前景。

## 2 利用动物乳腺生物反应器技术生产药用蛋白的优越性

表 1 从转基因动物奶液中分离纯化目的蛋白

Table 1 Separation and purification of target protein from transgenic milk

目的蛋白	纯化技术	转基因动物	纯化特点	资料来源
凝血因子 IX	免疫亲和层析	转基因绵羊	特异性高,但产率较低 (2.0%~2.5%)	Clark 等 <sup>[13]</sup>
$\alpha_1$ -抗胰蛋白酶	离子交换层析,染料亲和层析,凝胶过滤层析	转基因绵羊	联合多种层析方法,产品纯度>95%	Wright 等 <sup>[2]</sup>
$\alpha_1$ -抗胰蛋白酶	双水相体系分配和离子交换层析	转基因绵羊	纯度高达 99%,但要求目的蛋白浓度高	Wright 等 <sup>[14]</sup>
$\alpha_1$ -抗胰蛋白酶	双水相体系分配	转基因绵羊	适用于大规模提纯,要求目的蛋白浓度高	Harris 等 <sup>[15]</sup>
纤溶酶原活性因子	免疫亲和层析,疏水作用层析	转基因山羊	特异性好,纯度高,产率>25%,纯度>98%	Denman 等 <sup>[16]</sup>
活性蛋白 C	免疫亲和层析	转基因猪	特异性好	Van Cott 等 <sup>[17]</sup>
活性蛋白 C	固定化金属亲和层析	转基因动物	高效,迅速	Dalton 等 <sup>[18]</sup>
凝血因子 VIII	免疫珠吸附法	转基因猪	特异性高	Paleyanda 等 <sup>[10]</sup>
凝血因子 IX 和蛋白 C Zr(2+)选择性沉淀法		转基因动物	产品纯度高>95%	Degener 等 <sup>[19]</sup>

的技术已经成熟,但存在不同程度的缺陷,如以大肠杆菌表达外源基因时,形成包涵体,不能折叠成正确的立体结构而丧失应有的生物活性,原核细胞系不能进行真核蛋白的加工,哺乳动物细胞系则难以提高细胞密度。而且这些表达系统对培养基和培养设施要求甚高,分离纯化步骤繁杂,对生产建设投资要求高。利用转基因动物的乳腺组织生产药用蛋白与上述方法相比,具有很大的优势:

首先,这种蛋白表达体系简单,一旦建立转基因动物乳腺生物反应器,只要简单地饲养好动物,利用动物乳腺的高表达能力,即可源源不断地得到贵重的药物蛋白。

其次,动物乳腺的表达可进行翻译后修饰,如信号肽切除,蛋白的糖基化<sup>[20]</sup>, $\beta$ -羟基化<sup>[14]</sup>及 $\beta$ -羧基化<sup>[21]</sup>等,生产的外源蛋白具有生物活性和稳定性。

第三,转基因动物乳腺反应器的生产过程是一个畜牧业过程,饲养费用低廉,对环境没有污染,有广阔的发展前景。因此,利用乳腺专一性表达的生物反应器生产药用蛋白,具有其它表达系统不可替代的优越性。

### 3 问题与展望

尽管转基因动物乳腺生物反应器给人们展示了美好的前景,但迄今为止商品化的产品屈指可数。动物乳腺生物反应器的研制周期长,前期投资大,涉及的技术领域较多,尚有许多问题需要解决。

#### 3.1 目的基因在宿主染色体的整合问题

包括目的基因的整合位点,拷贝数,对宿主染色体的影

响,对目的基因本身的影响,整合的详细机理等。

#### 3.2 目的基因在动物乳腺中特异性表达问题

乳腺特异性表达载体一般是选择乳蛋白的基因表达调控元件,但同样的基因调控元件在不同的种系中差别很大。这可能与外源基因的类型,宿主的遗传背景,基因的插入位点以及各种启动子调控因子结合位点的突变等有关。

#### 3.3 目的蛋白的翻译后修饰问题

转基因动物能够对外源蛋白进行翻译后修饰,但用于制备动物乳腺生物反应器的大牲畜毕竟是自然界长期进化的结果,机体的保护系统会对一切外源性物质产生排斥作用。如可能出现蛋白水解过程<sup>[10,22]</sup>, $\alpha$ -羧基化不充分<sup>[23,24]</sup>,糖基化形式与人类不同<sup>[16,25]</sup>等等。

#### 3.4 从动物奶液中分离、纯化目的蛋白问题

动物奶液中蛋白多种多样,总量高达 40~60g/L。而目的蛋白在奶液中的表达量变化很大,每升奶液中目的蛋白量从数微克到数十克不等。有时表达的蛋白以不完全修饰的多肽形式存在。奶液中可能含有细菌、病毒等微生物。这些问题都会给目的蛋白的检测及分离纯化带来困难。

尽管利用动物乳腺生物反应器生产目的蛋白遇到许多困难,但这种新型的药物生产技术的美好前景吸引着众多研究者和投资者,它已成为生物技术领域发展的重要方向。转基因动物乳腺生物反应器生产的人抗凝血酶 III 和人抗 $\alpha$ -胰蛋白酶已进行 III 期临床试验。随着基础研究的深入,转基因动物乳腺生物反应器将按照人们的意愿生产贵重的药用蛋白,形成全新的生物医药产业。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Palmiter R D ,Brinster R L ,Hammer R E *et al.* *Nature* .1982 ,**300** :611~615
- [ 2 ] Wright G ,Carver A ,Cotton D *et al.* *Bio/Technology* .1991 ,**9** :830~834
- [ 3 ] Wall R J ,Kerr D E ,Bondioli K R. *J Dairy Sci* ,1997 ,**80**( 9 ) :2213~2214
- [ 4 ] Pintado B ,Gutierrez-Adan A. *Reprod Nutr Dev* ,1999 ,**39**( 5~6 ) :535~544
- [ 5 ] 曾溢滔 . 转基因动物与医药产业 ,上海 :上海教育出版社 ,1999
- [ 6 ] Schnieke A E ,Kind A J ,Ritchie W A *et al.* *Science* ,1997 ,**278**( 19 ) :2130~2133
- [ 7 ] Brink M F ,Bishop M D ,Pieper F R. *Theriogenology* ,2000 ,**53**( 1 ) :139~148
- [ 8 ] Simons J P ,Mccienaghan M ,Clark A J. *Nature* ,1987 ,**328** :530~532
- [ 9 ] Buhler T ,Bruyere T B ,Went D F *et al.* *Bio/Technology* ,1990 ,**8** :140~143
- [ 10 ] Paleyanda R K ,Velandar W H ,Lee T K *et al.* *Nat Biotechnol* ,1997 ,**15** :971~975
- [ 11 ] Whitelaw C B ,Archibald A L ,Harris S *et al.* *Transgenic Res* ,1991 ,**1**( 1 ) :3~13
- [ 12 ] Manzke O ,Tesch H ,Diehl V *et al.* *J Immunol Methods* ,1997 ,**208**( 1 ) :65~73
- [ 13 ] Clark A J ,Bessos H ,Bishop J O *et al.* *Bio/Technology* ,1989 ,**7** :487~492
- [ 14 ] Wright G ,Binicda A ,Udell M. *J Chem Tech Biotechnol* ,1994 ,**59** :110
- [ 15 ] Harris D P ,Andrens A T ,Wright G *et al.* *Bioseparation* ,1997 ,**7**( 1 ) :31~37
- [ 16 ] Denman J ,Hayes M ,Oday C *et al.* *Bio/Technology* ,1991 ,**9** :839~843
- [ 17 ] Van Cott K E ,Williams B ,Velandar W H *et al.* *J Mol Recognit* ,1996 ,**9**( 5~6 ) :407~414
- [ 18 ] Dalton J C ,Bruley D F ,Kang K A *et al.* *Adv Exp Med Biol* ,1997 ,**411** :419~428
- [ 19 ] Degener A ,Belew M ,Velandar W H *et al.* *J Chromatography* ,1998 ,**13** :125~137
- [ 20 ] Ebert K M ,Selgrath J P ,DiTullio P *et al.* *Bio/Technology* ,1989 ,**9** :835~838
- [ 21 ] Valander W H ,Johnson J L ,Page R L *et al.* *Proc Natl Acad Sci ,USA* ,1992 ,**89** :12003~12007
- [ 22 ] Lee T ,Drohan W N ,Lubon H. *J Biochem* ,1995 ,**118** :81~87
- [ 23 ] Drohan W N ,Zhang D W ,Paleyanda R K *et al.* *Transgenic Res* ,1994 ,**3** :355~364
- [ 24 ] Subramanian A ,Paleyanda R K ,Lubon H *et al.* *Ann N Y Acad Sci* ,1996 ,**782** :87~96
- [ 25 ] Edmunds T ,Van Patten S M ,Pollock J *et al.* *Blood* ,1998 ,**91**( 12 ) :4561~4571

## Production of Pharmaceutical Proteins with Mammary Gland Bioreactor

LIU Sen LIANG Guo-Dong

( National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering ,Institute of Virology ,Beijing 100052 )

**Abstract** Mammary gland bioreactor is a useful biological system which expresses foreign genes in the mammary gland and produces functional pharmaceutical proteins in milk. This production route is appealing for its advantages, such as the simplicity of access to the expressed protein, the high production of the mammary gland, the capabilities to perform translational modifications. As an alternative of cell culture systems, it is a new biotechnology. The article reviews some aspects on generation and characterization of mammary gland bioreactor, separation and purification of foreign protein from milk and some questions that need to be answered on the route.

**Key words** Mammary gland bioreactor, transgenic animal, protein purification