牛 β-乳球蛋白基因调控序列指导组织型纤溶酶原激活剂在小鼠乳腺中的表达

陈红星 程 萱 杨 晓 邓继先 苏国富 黄培堂*

(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

摘 要 用全长 8.4kb 的牛 β-乳球蛋白基因(BLG)作为调控序列,用 1.6kb 的鸡溶菌酶 MAR 序列作为对抗转基因中位点效应的工具,构建了组织型纤溶酶原激活剂(tPA)乳腺表达载体。对 2300 枚卵进行显微注射,经 PCR 和 Southern-Blot 检测,在 170 只出生小鼠中获得 9 只整合有牛 BLG-tPA 融合基因的转基因小鼠,并在转基因小鼠乳汁中检测到 tPA 的活性,tPA 的表达水平最高达到 12μg/mL。整合在小鼠基因组中的牛 BLG-tPA 融合基因能稳定地遗传给子代。

关键词 牛 β-乳球蛋白基因,转基因小鼠,组织型纤溶酶原激活剂

中图分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)02-0135-05

1985 年 Lovell-badge 首次提出用转基因动物乳腺生产重组蛋白质,短短几年,先后有利用酪蛋白、乳球蛋白、乳清蛋白、乳清酸蛋白调控序列指导外源基因在乳腺中表达并获得分泌的报道[1~4]。所有这些研究令人信服地表明了乳腺特异表达的转基因动物作为生物反应器的可行性。用转基因动物乳腺生产重组蛋白具有产量高、费用低的特点,并且对表达产物具有翻译后修饰和加工能力。人组织型纤溶酶原激活剂对纤维蛋白有较强亲和力,可选择性溶解血栓而不引起全身出血现象,是一种理想的溶血栓药物,但它在血浆中的半衰期短,因而临床用量高达 80mg/人份。使用体外细胞表达系统难以达到中试规模,因此,我们建立乳腺定位表达 tPA 的转基因小鼠模型,探索用转基因动物乳腺生产 tPA 的可能性。制备乳腺生物反应器的前提是要有合适的调控成分,研究证明乳蛋白基因的 5′侧翼区、3′侧翼区、内含子都对外源基因的表达有影响[5]。牛 BLG 是牛乳清中的主要蛋白质,为了获得它的表达调控序列,本文克隆了 8.4kb 的全长牛 BLG 基因,包括 1.8kb 的 5′侧翼区、4.7kb 的基因组 DNA 区、1.7kb 的 3′侧翼区。为乳腺生物反应器的制备准备了表达调控序列。MAR 序列具有克服位点效应的功能,本文用 PCR 克隆了 1.6kb 的鸡溶菌酶 MAR 序列,与 5 个牛 BLG 片段及 tPA cDNA 拼成牛 BLG-tPA 表达载体并建立了相应的转基因小鼠系,转基因小鼠乳汁中 tPA 的表达量最高达到 12μg/mL,为今后建立大型动物乳腺生物反应器奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

Vent DNA 聚合酶、T-Vector kit、限制酶、DNA clean-up kit 为 promega 公司产品。M2、M16、石蜡油为 Sigma 公司产品。Taq DNA 聚合酶、凝血酶、纤维蛋白原为华美公司产品。拉针仪、显微注射仪为 Nikon 公司产品。菌株 JM109 为 promega 公司产品。昆明白小鼠由本院丰台动物中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 牛 BLG 基因及鸡溶菌酶 MAR 序列的 PCR 扩增 根据 Gen-Bank 中发表的牛 BLG 序列设计 5 对引物,分 5 段扩增,5 对引物依次为:

1:5′tgtcgaatggccgagctccctcc3′
5′tccctgcggtgttcaagatcgatgg3′

2:5′aatgagggcctgggcgccacaag3′
5′aggcagcttaccccagaggcgcc3′

3:5′cagtaaggcaggtattctgaattcgc3′
5′gcggatccagagttgggcttccag3′

收稿日期:2000-08-17,修回日期:2000-11-27。

基金项目:国家 863 高技术发展计划(Z21-03-01)。

* 联系作者。Tel:86-10-66948820;Fax:86-10-63833521;E-mail:lszxz@263.net

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

4：5′tctggaagcccaactctggatccg3′
5′aggcagcttaccccagaggcgcc3′
5：5′tgccggcgcctctggggtaagc3′
5′tgccaccgagcggcttcctgg3

根据 Gen-Bank 中发表的鸡溶菌酶 MAR 序列合成 1 对引物扩增：

5′ggcttcctatgcgtgctcagaaaac3′
5′ggccacaccagagcctacacctg3′

PCR 条件为：94℃ 4min，94℃ 30s，68℃ 1min，72℃ 1min，30 循环，72℃ 10min，4℃ 保存。

1.2.2 牛 BLG-tPA 表达载体的构建及鉴定：将 MAR、f1、tPA cDNA、f2、f3、f4、f5 7 个片段按顺序拼成牛 BLG-tPA 表达载体，使 tPA cDNA 位于牛 BLG 基因起始 ATG 之前。

1.2.3 显微注射获得转基因小鼠[6]：7 周龄公鼠 60 只，30 只作正常公鼠，30 只结扎作结扎公鼠。10u 的 PMSG 和 10u 的 HCG 隔天注射后的母鼠与正常公鼠交配制备供体鼠，同时用母鼠与结扎公鼠交配制备受体鼠，上午 10：00 杀供体鼠取卵，培养到下午 2：00 注射，注射完后将卵移植到受体鼠中发育成小鼠。

1.2.4 转基因小鼠的检测：合成一对引物用于转基因小鼠的 PCR 检测，引物序列为：

5′gcggatccagagttgggcttccag3′
5′ggctcagcactgttctccatgcag3′

引物扩增牛 BLG 上第三内含子与第四外显子之间 300bp 片段。见图 1。PCR 条件为：94℃ 4min；94℃ 30s；68℃ 30s，70℃ 30s；30cycles；72℃ 10min；4℃ 保存。PCR 阳性的小鼠使用 Southern blot 进一步鉴定，使用 *Bgl* II 酶切小鼠 DNA，以 f3 和 f4 为模板标记探针。

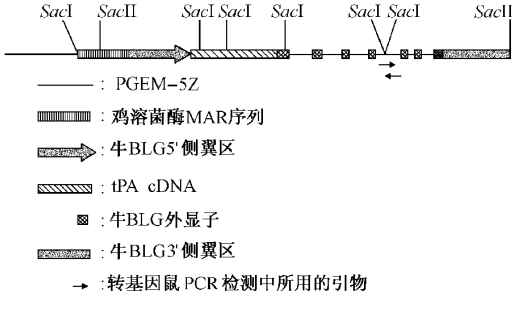

图 1 牛 BLG-tPA 表达载体示意图

Fig. 1 The sketch map of the bovine BLG-tPA expression vector

1.2.5 转基因小鼠乳汁中 tPA 含量的测定：采取母鼠乳汁，离心去除乳脂，采用纤维蛋白原-琼脂糖-平板法测定 tPA 溶纤活性[7]。

2 结 果

2.1 牛 BLG-tPA 表达载体的构建及鉴定

为了获得制备乳腺生物反应器所需的调控序列，我们以牛染色体 DNA 为模板，分 5 段扩增出了全长 8.4kb 的牛 BLG 基因（从 5′端到 3′端按顺序依次为 1.8kb 的扩增片段 1（f1）、1.8kb 的 f2、1.5kb 的 f3、1.4kb 的 f4、2.3kb 的 f5），以鸡染色体 DNA 为模板，扩增出了 1.6kb 的鸡溶菌酶 MAR 序列。扩增出的各个片段克隆到 T 载体上，经酶切及测序鉴定证明正确。

用 *Sal* I、*Bam* HI 切下 f3，同样用 *Sal* I、*Bam* HI 切开 f4，连接得到 f34。用 *Sal* I、*Eco* RI 切下 f34 片段，同样用 *Sal* I、*Eco* RI 切开 f2，连接得到 f234。用 *Nar* I 切下 f234 片段，同样 *Nar* I 切开 f5，连接得到 f2345。用 *Bam* HI、*Pvu* II 切下 1.8kb 的牛 BLG 5′侧翼区 f1 片段（包括启动子部分）并削平，用 *Kpn* I 切开 tPA 质粒并削平，连接得到 fltPA，用 *Sal* I、*Mlu* I 切下鸡溶酶 MAR 并补平，用 *Hin* dⅢ切开 fltPA 并补平，连接得到 MARfltPA。用 *Sal* I、*Xho* I 切下 MARfltPA 片段，同样用 *Sal* I、*Mlu* I 切开 f2345，由于 *Xho* I 与 *Mlu* I 是同尾酶，连接得到牛 BLG-tPA 表达载体，见图 1。对牛 BLG-tPA 表达载体使用 *Sac* I、*Sac* II 酶切鉴定。*Sac* I 切出：46bp、481bp、1354bp、2850bp、2924bp、7250bp 6 个片段，其中 46bp 难以观察，2850bp 和 2924bp 难以区分，因而预计只能看到 4 个片段。*Sac* II 切出：3000bp、12000bp 2 个片段，其中 3000bp 片段为原核载体序列，12000bp 片段为显微注射片段。酶切结果正确，见图 2。

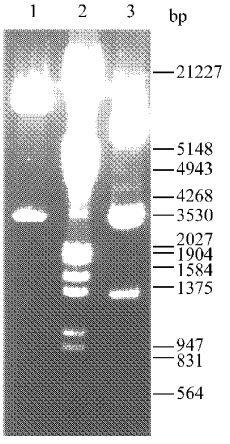

图 2 牛 BLG-tPA 表达载体酶切鉴定图

Fig. 2 The identification of bovine BLG-tPA expression vector by restriction enzyme digestion

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.2　显微注射

通过显微注射，共获得 9 只 founder 转基因小鼠，以下列表总结显微注射的过程。

表 1　tPA 转基因小鼠的建立

Table 1　The establishment of tPA transgenic mice

	The transferred embryos	The birthed mice	The transgenic mice	The raito of transgenic mice
The first phase	1800	146	2	1.4%
the second phase	550	24	7	30.0%

转基因小鼠的制备过程可以分成两个阶段，第一阶段由于处于技术的摸索时期，转基因小鼠的阳性率仅为 1.4%，经过不断地改进，阳性率增长到 30%。

2.3　转基因小鼠的检测

PCR 检测方法具有简单、快速的优点，缺点是容易产生假阳性。假阳性主要是由于扩增出了内源性片段。由于小鼠体内没有 β-乳球蛋白基因，所以我们用 PCR 扩增牛 BLG 上 300bp 片段的方法来初步筛选出生的 170 只子代鼠，结果显示其中有 9 只为 founder 转基因小鼠，见图 3。

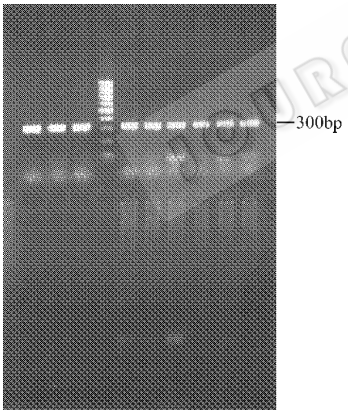

图 3　九只 founder 转基因小鼠的 PCR 鉴定

Fig. 3　The PCR identification of nine founder transgenic mice

为了确证 PCR 的结果，我们对 9 只 PCR 阳性鼠做进一步的 Southern blot 鉴定，选用 *Bgl* II 酶切小鼠 DNA，在整个注射片段（由 MAR f1 tPA f2 f3 f4 f5 7 个片段组成，长约 12000bp）中仅有一个 *Bgl* II 位点。位于第 3500bp 处，我们以 f3 和 f4 部分为模板标记探针，如果转基因鼠系为单拷贝整合，则杂交后会出现一条未知大小的条带，这个条带从注射片段中的 *Bgl* II 位点到小鼠染色体 DNA 上的 *Bgl* II 位点，长度应大于 8500bp。如果为多拷贝整合，则除了以上所说的未知带外，尚还有一条 12000bp 的条带，也即整个插入的注射片段（图 4）。我们的 Southern blot 结果显示 9 只 PCR 阳性结果的小鼠确实是 founder 转基因鼠，证明 PCR 的方法是准确可靠的，而且 9 只转基因鼠全部为多拷贝，因为它们都出现了多拷贝的特征带-12000bp 的注射片段。从另一个方面说，我们的注射片段是完整地插入鼠染色体 DNA 中的，并未发生打断事件。Southern blot 的结果还显示各个 founder 插入的拷贝数不同。结果见图 5。

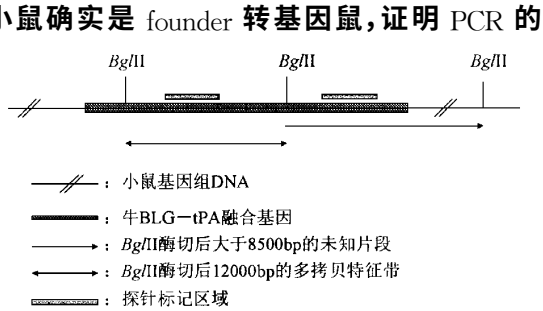

图 4　牛 BLG-tPA 融合基因在小鼠基因组中的整合示意图

Fig. 4　The shetch map of the bovine BLG-tPA fusion gene integrated into the mouse genome

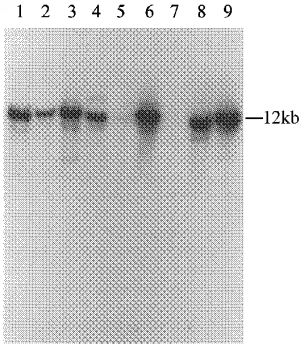

图 5　各转基因小鼠的 Southern blot 鉴定

Fig. 5　The Southern blot identification of eight transgenic mice

2.4　转基因鼠系的建立

在获得的 9 只 founder 转基因小鼠中，有 7 只能稳定地将整合的牛 BLG-tPA 融合基因遗传给后代，经过 3 代杂交筛选，已获得转基因纯合的小鼠。有 2 只 founder 转基因小鼠无法将整合的融合基因遗传给后代，估计它们是嵌合体。

2.5　转基因小鼠乳汁中 tPA 含量的测定

使用溶圈法测定鼠乳中 tPA 的含量，发现各个转基因小鼠系乳汁中 tPA 的含量差异较大，其中以 31(5)转基因小鼠系 tPA 的表达量最高，测活结果显示 50 倍稀释的鼠乳样品与 5 倍稀释的标准样品溶解圈直径相同，标准的浓度为 1.25μg/mL，因此判断 31(5)鼠系 tPA 的表达量为 12.5μg/mL，结果

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

见图 6。表 2 总结了各个转基因小鼠系的表达情况。

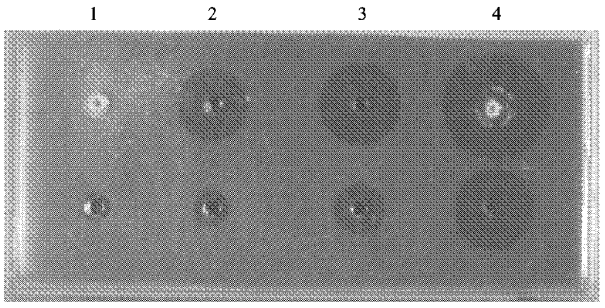

图 6 31(5)转基因小鼠乳汁中 tPA 含量的测定

Fig. 6 The quantification of tPA in the milk of 31(5) transgenic mice

表 2 各转基因鼠系 tPA 的表达量

Table 2 The tPA expression level of seven transgenic lines

Transgenic mouse line	tPA expression level (μg/mL)
31(5)	12.500
57(5)	0.078
62(1)	<0.078
75(1)	undetectable
77(3)	undetectable
80(1)	undetectable
80(2)	7.300

从表中可以看出 7 个转基因小鼠系中 tPA 的表达量最高达 12.500μg/mL，而最低则检测不到，这个结果显示出位点效应的影响，也说明本文中的鸡溶菌酶 MAR 序列显然并未起到对抗位点效应的功能。

3 讨 论

牛 BLG 基因相对于其他乳蛋白基因来说，开发利用较晚，有关的研究报道较少。1999 年 Hyttinen JM 报道牛 BLG 基因在小鼠中高效表达，表达量达 1mg/mL。使用的牛 BLG 基因包括 1.8kb 的 5′侧翼区、4.7kb 的基因组 DNA 区、1.9kb 的 3′侧翼区[8]。国内杨国庆利用 650bp 的牛 BLG 基因启动子在小鼠中表达人生长激素基因，表达量达到 0.5mg/mL。以上的例子说明在 8.4kb 的牛 BLG 基因中应已包含有足够的表达调控序列。虽然小鼠中并没有乳球蛋白基因，但从 Hyttinen 的结果看，可能由于乳蛋白表达调控的保守性，牛 BLG 基因在小鼠中依然能表达。综上所述，选用 8.4kb 的牛 BLG 基因作为制备乳腺生物反应器的调控元件是可行的。

本实验室周江等曾利用羊 BLG 4kb 的 5′侧翼区和 4.5kb 的 3′侧翼区指导 tPA cDNA 的表达，表达量达到 1.5μg/mL[9]。卢一凡等利用羊 BLG 5kb 的 5′侧翼区、4.2kb 的 3′侧翼区以及第一、第二内含子指导 tPA cDNA 的表达，表达量达到 6.0μg/mL[10]。我们利用 8.4kb 的牛 BLG 基因的调控序列指导 tPA cDNA 在小鼠乳腺中获得表达，并且表达产物能分泌到乳汁中，各个转基因鼠系中 tPA 的表达量最高达 12.5μg/mL，在旧有工作的基础上使 tPA 的表达量获得了较大的提升，但与国外水平相比依然有较大差距[11]。虽然现在已有很多报道表明一个种系的乳蛋白可以在另一个种系中表达，但种系的差别很可能会影响到表达载体的表达能力。我们所构建的载体已用于转基因牛的研究。

REFERENCES(参考文献)

[1] Swanson ME, Martin MJ, O′ Donnell JK *et al*. Production of functional human hemoglobin in transgenic swine, *Bio/technology*, 1992, **10**: 557～559

[2] Ebert KM, Selgrath JP, DiTullio P *et al*. Transgenic production of a variant of human tissure-type plasminogen activactor in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression, *Bio/technology*, 1991, **9**: 835～838

[3] Wright G, Carver A, Cottom D *et al*. High level expression of active alphal-antitrypsin in the milk of transgenic sheep, *Bio/technology*, 1991, **9**: 830～834

[4] Hyttinen JM, Peura T, Tolvanen M *et al*. Generation of transgenic dairy cattle from transgenic analyzed and sexed embryos produced *in vitro*, *Bio/technology*, 1994, **12**: 606～608

[5] Palmiter RD, Sandgren EP, Avarbock MR *et al*. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 478～482

[6] TIAN X L(田小利), CHEN L Y(陈兰英), HUO Y L(扈荣良) *et al*. The principle, technology and application of transgenic animals, Changchun: Jilin Science and Technology Press(吉林科学技术出版社), 1995, pp. 103～112

[7] HAN S W(韩素文), YU W Y(俞炜源), XIAO C Z(肖成祖) *et al*. The study on the fibrin lysozyme activator secreted by the cultured cell, *Bulletin of the academy of military medical sciences*(军事医学科学院院刊), 1987, **2**: 101～107

[8] Hyttinen JM, Korhonen VP, Hiltunen MO *et al*. High level expression of bovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice, *J Biotechnol*, 1999, **61**(3): 191～198

[9] ZHOU J(周江), DENG J X(邓继先), LIU H(刘红) *et al*. The expression of tPA in the mammary gland of transgenic mice, *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1998, **14**(4): 372～376

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

[10] LU Y F(卢一凡), DENG J X(邓继先), CHENG X(程萱) *et al*. *The establishment of the mutant tissure plasminogen activator transgenic mice*, *Life science research* (生命科学研究), 1999, **3**(1): 75～78

[11] Pittus CW, Hennighausen L, Lee E *et al*. A milk protein gene promoter directs the expression of human tissure plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice, *Proc Natl ACad Sci USA*, 1988, **85**: 5874～5878

The Expression of tPA Directed by the Bovine BLG Regulatory Elements in the Mammary Gland of Transgenic Mice

CHEN Hong-Xing　CHEN Xuan　YANG Xiao　DENG Ji-Xian　SU Guo-Fu　HUANG Pei-Tang

(*Institute of Biotechnology*, *Academy of Military Medical Sciences*, *Beijing* 100071, *China*)

Abstract　In order to get the regulatory elements which are essential for generating mammary gland bioreactors, the whole 8.4kb bovine BLG gene was obtained by PCR amplification. The 1.6kb chicken lysozyme matrix attachment region (MAR) was used to overcome position effects. The bovine BLG-tPA expression vector was constructed and the BLG-tPA fusion gene was introduced into fertilized eggs of mice by microinjection to generate transgenic mouse. 170 offsprings were obtained, of which 9 were proved to be transgenic mice based on PCR and Southern-blot analysis. The tPA expression level amounted to 12μg/mL in the milk of mice. The bovine BLG-tPA fusion gene integrated in the founders was inheritable.

Key words　bovine beta-lactoglobulin, transgenic mouse, tPA

Received: August 17, 2000

This work was supported by grant from National 863 High Technology R&D Projcect of China (Z21-03-01)

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948820; Fax: 86-10-63833521; E-mail: szxx@263.net

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn