

组织纤溶酶原激活剂突变体 乳腺表达载体构建及在转基因鼠中表达的研究*

卢一凡 邓继先 程 萱 周 江 黄培堂

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 通过 PCR 方法从羊肝总 DNA 中获得了羊 β -乳球蛋白(BLG)基因第一和第二内含子,以羊 β -乳球蛋白基因(BLG)5'区 5kb 为调控序列,构建了乳腺表达组织纤溶酶原激活剂突变体(La-tPA)载体。对 540 枚小鼠受精卵进行显微注射,经 PCR 和 Southern blot 检测,获得 6 只整合有人 La-tPA 的转基因小鼠,整合率为 32%。同时研究了转基因在小鼠体内的表达。Northern blot 分析表明,在一些转基因鼠乳腺中表达出 La-tPA。在转基因鼠乳汁中检测出 La-tPA 的表达达 $6\mu\text{g}/\text{mL}$ 。这为未来利用转基因动物生产 La-tPA 提供依据。

关键词 La-tPA,内含子,乳腺,转基因鼠

分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0166-70

自 Gordon 等^[1]首次在哺乳期小鼠乳腺中分泌出有生物活性的人组织源性纤溶酶原激活剂(tPA)以来,先后有不同目的基因在乳腺表达并获得分泌的报道。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。尽管如此,由于转基因的不可预测性,以及建立转基因动物的高费用,在目前未能充分理解乳蛋白基因表达以及转基因对复杂调控网络的影响以前,在泌乳量高的大动物如羊、牛上实施转基因具有极大的盲目性。因此,以小鼠作为模型,研究构件的可行性以及探讨高水平表达机制仍极为重要。在提高表达水平方面,有效的调控序列是关键。羊乳球蛋白(BLG)是目前最为理想的调控序列,用其指导的抗胰蛋白酶在羊乳中已达 $30\text{mg}/\text{mL}$ ^[2]。同时,为进一步有效地提高表达水平,使用其他一些调控元件,如内含子^[3]则是十分必要的。

组织源性纤溶酶原激活剂(tPA)是血液内纤溶系统的生理激活剂。由于其与血栓基质纤维蛋白有较强的特异亲和力,能在血栓局部高效激活纤溶系统,是一种高效特异的溶血栓药物,应用前景广阔。但 tPA 在血中的半衰期很短(1~5min),难以在临床中应用。生产新型的半衰期长的突变体 tPA 则具有重要意义^[4]。采用细胞表达体系生产难以满足临床需求,利用转基因动物乳腺获取高产量 tPA,是未来 tPA 走向临床的重要一步。

本研究通过 PCR 方法获得羊乳球蛋白(BLG)的第一和第二内含子,构建了较为有效的乳腺表达载体,用显微注射法建立了组织纤溶酶原激活剂突变体(La-tPA)转基因小鼠,研究了转基因在小鼠体内表达情况。为未来利用转基因动物生产多种蛋白质提供依据。

* 国家高技术研究发展计划项目(No. 101-05-04-01)

收稿日期:1998-01-23,修回日期:1999-01-11。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌种：宿主菌 M103, pGEM 质粒, 为本室保存。羊乳球蛋白基因(BLG)调控区为本室保存。组织纤溶酶原激活剂突变体(Long acting tissue type plasminogen activator, La-tPA)质粒为刘士辉博士惠赠。

1.1.2 限制酶及主要化学试剂：限制酶, T4 连接酶等均购于中国华美生物工程公司及 Promega 公司。化学试剂 10% 乳酸钠, 透明质酸酶, 丙酮酸钠等均购自美国 Sigma 公司；牛血清白蛋白购于华美公司, 其它均为国产分析纯试剂。

1.1.3 实验动物：昆明小白鼠和昆明小鼠与 C57XBL 杂交鼠, 购自本院实验动物中心。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒 DNA 及羊肝染色体总 DNA 的提取、感受态的制备、DNA 的连接、转化、DNA 片段的回收, 按照分子克隆手册进行^[5]。序列分析按试剂盒说明书进行。

1.2.2 BLG 基因第一和第二内含子的获得：参考已发表基因组 BLG 基因序列^[6], 设计两对引物。第一内含子引物, 引物 1 5'-CCATGAAGTGCCTCCTGCTTGCCC-3', 引物 2 : 5'-TTCTGCAGCAGGATCTCCAGGTTGC-3' 第二内含子引物, 引物 1 :5'-GCAACCTG-GAGATCCTGCTGCAGA-3', 引物 2 :5'-GATCGATCTTGAACACCGCAGGGA-3' 以提取的羊肝染色体 DNA 为模板, 采用 Vent DNA 聚合酶, 按如下条件进行扩增, 94℃ 变性 30s, 60℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 45s, 反应进行 30 循环, 72℃ 保温 10min。取 10 μ L PCR 扩增产物电泳检查。

1.2.3 转基因用 DNA 的制备：质粒 DNA 酶解, 经低熔点琼脂糖电泳回收片段。用纯化试剂盒纯化, 操作按说明书进行。

1.3 转基因实验方法

1.3.1 M2 及 M16 培养液的配制, 超排卵与取卵, 按文献 7 进行。

1.3.2 受精卵的显微注射：在凹玻片上各滴上 M2 培养液和 DNA 注射液, 石蜡油覆盖。将注射针吸入适量的 DNA 液。取约 30 个受精卵于 M2 液滴中。用持卵器吸住一枚卵。将注射针针尖刺入受精卵雄原核中, 将 DNA 注入约 1pL, 见雄原核膨胀, 迅速抽出注射针, 卵注射完毕后, 转移至 M16 中, CO₂ 孵箱培养 30min。进行输卵管移植。

1.4 转基因鼠的检测

1.4.1 鼠尾 DNA 的提取：仔鼠出生 10d, 提取 DNA。按照分子克隆手册进行^[5]。

1.4.2 PCR 筛选转基因鼠：La-tPA 转基因鼠的 PCR 筛选：在 BLG 基因的调控序列—102bp 处合成第一条引物为 5'-TTCAGAAGAGGAGCCAGATCC-3', 第二条引物为 5'-GTAAGATCTGGCTCCTCTTCTGA-3', 是在 La-tPA 基因上合成一段序列。两条引物间距 202bp。PCR 筛选转基因鼠的循环条件为：94℃ 变性 15s, 60℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 45s, 72℃ 保温 10min, 反应进行 30 循环。

1.4.3 Southern 杂交鉴定转基因阳性鼠：取 20 μ g 的 DNA 用 100u BamHI 酶切, 37℃ 消化过夜, 上样电泳。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。用 0.45 μ m 的硝酸纤维素膜转膜。操作按 Fluorescein-12-dUTP 标记检测试剂盒进行。

1.4.4 Northern blot 分析转基因鼠中外源基因的表达：乳腺总 RNA 提取采用酚/氯仿一步法^[8]，Northern 杂交见文献^[5]。凝胶用 DEPC 处理水洗去甲醛。0.05mol/L NaOH 浸泡凝胶 20min。放于 20×SSC 浸泡 45min。凝胶上放置滤膜，转移 18h。滤膜于 6×SSC 浸泡 5min，凉干。80℃干烤 1h。杂交。压片-70℃ 曝光 24~48h 后冲片。

1.4.5 鼠乳中表达产物的检测：产后第 8 天，将母鼠仔鼠隔离 3h 以上。注射 846 麻醉剂。轻轻按摩乳腺。用微量加样器将乳汁吸出。加灭菌双蒸水 5 倍稀释，1000r/min 离心去乳脂。收集去脂乳检测。La-tPA 检测采用溶圈法^[4]。

2 结 果

2.1 BLG 基因第一和第二内含子的克隆

利用设计的两对引物，以提取的羊肝基因组 DNA 为模板，分别扩增出 0.9 kb 和 0.95kb 的 BLG 第一和第二内含子。将其分别克隆至 pGEM 载体的 *Sma*I 位点，经酶切鉴定证实了其正确性，命名为 P1108 和 P1023。序列分析表明其正确性。为了将两个内含子进行正确拼接，在扩增第一内含子时，所设计的逆向引物 P₂ 含有一个存在的 *Pat*I 位点，在扩增第二内含子时，所设计的正向引物 P₃ 也包含有这一 *Pst*I 位点。因此，利用 *Pst*I 位点，将两个片段进行了正确拼接，命名为 P017，克隆程序见图 1。

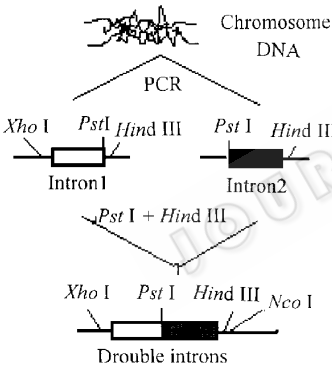


图 1 质粒 p017 克隆程序

Fig.1 Construction of plasmid p017

2.2 乳腺表达纤溶酶原激活剂突变体转基因小鼠的建立

利用所克隆出的羊乳球蛋白基因约 5kb 的 5' 调控序列和 4.2kb 的 3' 端序列，以及利用 PCR 方法克隆出的羊乳球蛋白基因第一和第二内含子，构建了转基因鼠乳腺表达纤溶酶原激活剂突变体(La-tPA)载体，命名为 pLa-tPA 用于显微注射的基因构件如图 2。用 *Mlu*I 酶切 pLa-tPA，回收 13.6kb 片段，以显微注射法将其导入小鼠受精卵雄原核中，先后注射 540 余枚受精卵，将经培养后存活的 480 枚受精卵分别移植到 32 只假孕小鼠的输卵管内，共产生 14 只仔鼠。经小鼠尾组织中提取基因组 DNA 做 PCR 检测及 Southern 杂交分析，证实为整合人 La-tPA 基因，出生鼠整合率为 32%，PCR 结果及 Southern

杂交结果见图 3 和图 4。

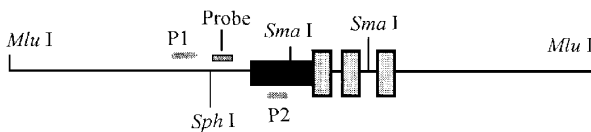


图 2 人 t-PA 基因显微注射构件

Fig.2 Microinjecting gene constructs of human t-PA

— BLG gene 5' and 3' region, ■ Human t-PA cDNA, ■ PCR primer, ■ BLG gene exon, ■ Probe

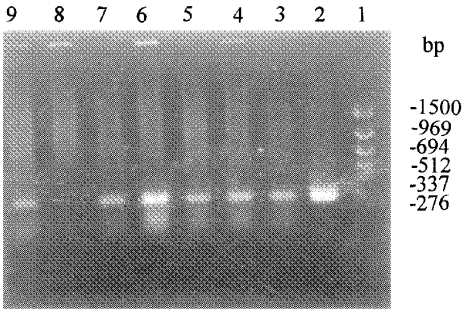


图3 La-tPA 转基因鼠的 PCR 筛选

Fig.3 Screening transgenic mice by PCR

1. PCR marker ; 2. Positive control ;
3~7. 9. Transgenic mice ; 8. No transgenic mice

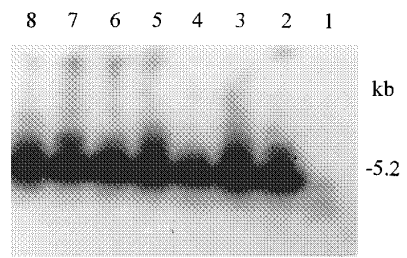


图4 La-tPA 转基因鼠的 Southern blot

Fig.4 Identification transgenic mice by Southern blot

1. Negative control ; 2. Positive control ;
3~8. Transgenic mice

2.3 La-tPA 在转基因小鼠乳腺的表达

为研究转基因鼠的表达情况,在对这些鼠进行繁殖传代的基础上,对后代雌性鼠进行了表达分析。提取泌乳鼠乳腺组织总 RNA,经 Northern blot 分析,证明在 3、4、5、6、8 号转基因鼠中检测出人 La-tPA 的表达(图略)。对乳汁进行溶圈法检测 La-tPA 的表达,表达量达 $1\sim 6\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结果见图 5。

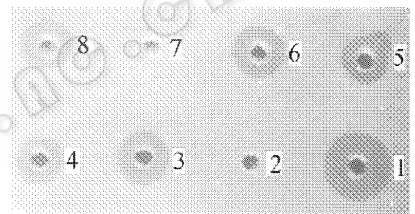


图5 乳中 La-tPA 的检测

Fig.5 Determination of La-tPA in milk

1. Positive control ; 2. Negative control
3 4 5 6 7 8 milk determination
(No expression in No. 7)

3 讨论

我们克隆了羊 BLG 基因的两个内含子,并用于表达载体的构建中。文献表明,利用基因组序列的表达效果要比用 cDNA 表达高。其中内含子起重要作用,尤其是第一和第二内含子。Palmiter 等^[9]利用鼠金属硫蛋白基因启动子与鼠 GH 基因融合,采用删除内含子的方法研究内含子对表达水平的影响,发现内含子可增强表达效率。内含子可能是通过几种不同的机制来提高表达效率的:一是某些内含子包含有增强子或其它顺式调控元件,它们同某些蛋白质作用影响转录的起始和延伸;二是内含子的剪接增加了 mRNA 在核内的稳定性,导致在细胞质中积累更多成熟的 mRNA;另一种可能性是内含子包含有这样一些序列,即能开放染色体的功能域,也许通过影响核质的成分、位置等来提高转基因的表达。内含子的这些机制虽然仍需进一步研究,但其对表达的重要作用已毋庸置疑。我们克隆的双内含子,对于表达外源基因,无论是基因组序列还是 cDNA 序列均有所裨益。

转基因的表达受许多因素的影响,尽管在所构件的基因上能考虑多种因素,但由于转基因在染色体上的整合是随机的,基因在受体细胞内的整合位置有可能影响其表达效率,由于导入的基因随机整合,极易导致内源有利基因的破坏和失活,从而导致影响或抑制外源基因的表达。因此转基因的表达仍然是难以预测的。本试验所建立的 6 只转基因鼠

有 5 只在它们或后代的乳中检测出 La-tPA 的表达,而且表达水平也分布不一致。Gordon 等^[1]指出,不同鼠之间表达水平的差异是由于整合位点的不同造成的,其表达水平竟然在个体间相差到 2000 倍。这也许是我们试验中表达水平存在差异的原因之一。目前有关随机整合的解决方法仍然不断在探索,利用同源重组达到对基因定位整合,这可能是今后实现如何高效表达外源基因的一条途径。

参 考 文 献

- [1] K. Gordon, E. Lee, J. A. Vitale *et al.* *Bio./Technology*, 1987, **5**:1183~1187.
 [2] A. S. Carver, M. A. Dalrymple, G. Wright *et al.* *Bio./Technology*, 1993, **11**:1263~1270.
 [3] 卢一凡, 邓继先, 肖成祖等. 生物化学与生物物理进展, 1995, **5**:302~306.
 [4] 刘士辉, 黄培堂, 赵庆国等. 生物工程学报, 1995, **11**:289~294.
 [5] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Manatis. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
 [6] J. P. Simons, M. McClenaghan, A. J. Clark. *Nature*. 1987, **328**:530~532.
 [7] B. Hogan, F. Costantini, E. Lacy. *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory. 1986.
 [8] P. Chomozyski, N. Sachi. *Anal. Biochem.*, 1987, **162**:125~126.
 [9] R. D. Palmiter, E. P. Sandgren, M. R. Avarbock *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**:478~482.

Construction of La-tPA Vector and Its Expression in Mammary Gland of Transgenic Mice*

Lu Yifan Deng Jixian Cheng Xuan Zhou Jiang Huang Peitang
(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract In order to utilize its introns efficiently, the first and second intron of sheep beta-lactoglobulin (BLG) gene were cloned by PCR amplification and sequenced. The vector of expression La-tPA in mammary gland of transgenic animal was constructed by using BLG gene 5' control region. Six transgenic mice were produced by microinjection method. Foreign gene integration rate was 32% in mice. Northern blot analysis and determination showed that there were La-tPA expression up to about 6 μ g/mL in transgenic mice mammary gland.

Key words La-tPA, intron, mammary, transgenic mice

* Project of Chinese National Programs for High Technology Research Development (No. 101-05-04-01).