

## 转基因小鼠乳腺表达人胰岛素基因的研究\*

寿思明<sup>1\*</sup> 陈 英<sup>2</sup> 朱宝利<sup>1</sup> 敖 红<sup>2</sup> 齐顺章<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(中国农业大学生物学院动物生化室 北京 100094)

<sup>2</sup>(中国农科院畜牧所生物工程室 北京 100094)

**关键词** 牛 BLG 基因启动子, 人胰岛素基因, 转基因小鼠, 暂态表达, 乳腺

**分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0248-51

转基因动物乳腺生物反应器表达和生产医用蛋白是国际上的研究热点, 目前已有很多成功的转基因动物乳腺表达出外源蛋白质<sup>[1]</sup>。在转基因动物乳腺表达的蛋白质包括凝血因子 IX、组织纤溶酶原激活物(t-PA)、 $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶原、白介素-2、蛋白质 C、超氧化物歧化酶、乳铁蛋白等等<sup>[1]</sup>。从转基因动物乳腺中表达出的外源蛋白的表达量也是较高的, 其中 1992 年 Wright 等报道的一只转  $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶原基因的绵羊, 其乳汁中  $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶原的含量高达 35g/L<sup>[2]</sup>, 可以认为转基因动物乳腺生产医药蛋白必将成为一种新的产业。1995 年我也制备出转 hGH 基因小鼠, 其乳汁中分泌出人生长激素<sup>[3]</sup>, 小鼠乳清中人生长激素含量达 420  $\mu$ g/mL。为了进一步进行这方面的研究, 我们用牛 BLG 启动子控制改造后的人胰岛素基因组基因, 进行了转基因小鼠模型的制备。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、质粒 pGEM-3ZF(-)、pUC19、pUC19/mh INS、pA28、MCF-7 细胞等均由本室提供。

1.1.2 酶及试剂: 各种试剂、DNA 限制酶、T4DNA 连接酶、RNase A、IPTG、X-gal、SDS 购自 Promega、Biolab、Sigma、华美公司等。细胞培养基 DMEM、199、小牛血清、G418、Lipofectin Reagent 等购自 GIBCO-BRL 公司。实验动物昆明白小鼠、杂交鼠购自军事医科院动物中心。人胰岛素放射免疫测定试剂盒购自北京北方免疫所。

PCR 引物: I: 5' TCCCACGTGACTGCATTAGCC 3'; 引物 II: 5' GCTTCGTCTACGAGGACAATAG 3'; Tsg DNA polymerase 为上海生工生物工程公司产品。

#### 1.2 方法

1.2.1 表达载体 pUC/BLGINS 的构建: 将改造后的人胰岛素基因组基因(用 NcoI 至 SphI 片段)克隆进质粒 pUC18 中, 然后将 BLG 启动子 0.6kb 片段克隆到胰岛素基因上端, 构建成表达载体 pUC/BLGINS(图 1)。质粒的克隆、DNA 的酶切、重组操作按普通方法进行<sup>[4,5]</sup>。

1.2.2 MCF-7 细胞(人乳腺细胞)的培养及胰岛素基因的表达: 普通 MCF-7 细胞用 50 mL 塑料培养瓶加 DMEM 培养液(10% 的小牛血清, 青链霉素), 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。胰岛素基因表达载体

\* 通讯联系人, 中国农大毕业博士生。现地址: 450052, 河南医科大学病理教研室。

本文其他作者有: 郑蕊<sup>1</sup>, 刘芃芃<sup>1</sup>, 杨国庆<sup>1</sup>, 李建凡<sup>2</sup>, 朱裕鼎<sup>2</sup>。

收稿日期: 1997-11-26, 修回日期: 1998-12-07。

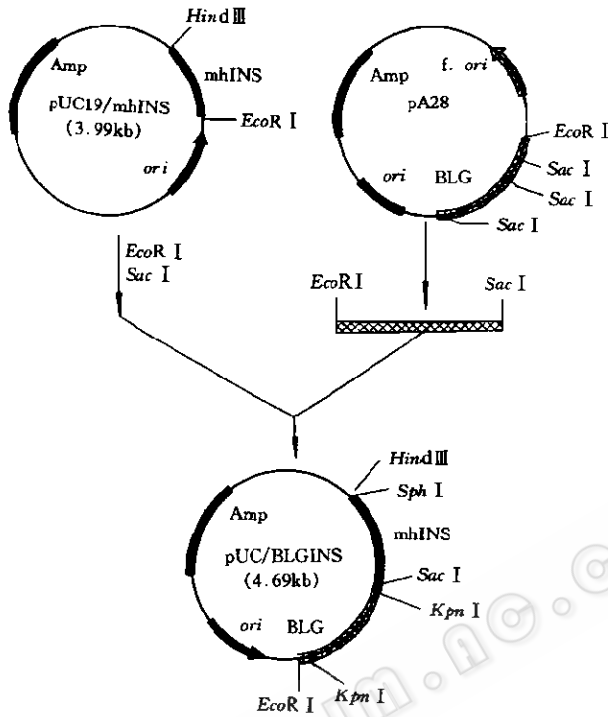


图1 表达载体 pUC/BLGINS 的构建

的转染和暂态表达:当培养瓶内 MCF-7 细胞长至 60%~80% 满瓶时,用无血清 DMEM 洗细胞 3 遍,再加入 3 mL 无血清的 DMEM。用 20 $\mu$ g 表达载体 BLGINS,按 Lipofectin 说明书的方法转染细胞,37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$  培养 6~12 h,换 5 mL DMEM 培养液(5% 的小牛血清)。每 24 h 取细胞培养液,作为 RIA 方法检测胰岛素的样品。表达 4 d 后,用 PBS 洗涤培养瓶内细胞,用 1 mL 0.01 mol/L 乙酸、0.1% 的 BSA 溶解细胞,反复冻融使细胞破碎,12 000 g 离心 10 min,取上清液作为 RIA 方法测定表达细胞的细胞内人胰岛素含量的样品。

1.2.3 人胰岛素的放免测定:样品送海军总医院免疫中心检测和按放免试剂盒说明进行测定。

1.2.4 转基因小鼠的制备及其乳汁样品的准备:用显微注射方法按文献制备转基因小鼠<sup>[6]</sup>。提取小鼠组织(尾)DNA 和用 PCR 方法鉴定转基因阳性小鼠按文献<sup>[3]</sup>进行。转基因阳性雌鼠乳汁样品按文献<sup>[3,7]</sup>制备。

## 2 结 果

### 2.1 乳腺细胞表达载体 pUC/BLGINS 的构建

利用牛 BLG 启动子 0.6 kb 片段<sup>[3]</sup>和改造的人胰岛素基因(Nco I 至 Sph I 片段,除去了基因第一个不翻译的外显子和第一个内含子),构建了乳腺细胞表达载体 pUC/BLGINS(图 1)。

### 2.2 人胰岛素基因在乳腺细胞中表达

在制备转基因动物前,为了检验表达载体 pUC/BLGINS,我们在人乳腺细胞 MCF-7 中进行了多次暂态表达。用 RIA 方法检测细胞培养液中的人胰岛素含量为:每天(6.0~118.0) $\times 10^{-6}$  IU/5 $\times 10^6$  Cell;细胞内:(7.0~96.0) $\times 10^{-6}$  IU/5 $\times 10^6$  Cell。空白对照为:(0.5~2.0) $\times 10^{-6}$  IU/5 $\times 10^6$  cell。从上面可看出,该基因在细胞中获得了表达。

### 2.3 转基因小鼠的制备与鉴定

利用表达载体 pUC/BLGINS, 将质粒中包括牛 BLG 启动子和其控制的人胰岛素基因的 DNA 片段回收, 按文献制备成注射用 DNA 溶液, 进行小鼠受精卵的显微注射制备转基因小鼠<sup>[6]</sup>。获得了 2 批新生小鼠共 65 只, 13 只死亡, 其中雌性活鼠 26 只。我们提取了新生小鼠尾组织的基因组 DNA, 用 PCR 方法检测 BLG 成分, 鉴定出 2 只转基因阳性鼠, 其中 1 只死鼠, 1 只雌性活鼠(图 2)。

### 2.4 人胰岛素基因在小鼠乳腺的表达

转基因阳性雌鼠与正常公鼠交配产仔后两周, 待其泌乳时, 取乳汁按文献制备成乳清样品<sup>[7][3]</sup>, 用 RIA 方法测定人胰岛素含量。在转基因阳性雌鼠乳清中人胰岛素含量为:  $50 \times 10^{-6}$  IU/mL, 正常空白对照小鼠乳清中测出,  $5.6 \times 10^{-6}$  IU/mL 的本底。

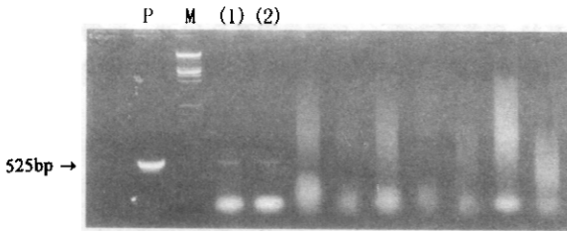


图 2 PCR 检测转基因小鼠的 DNA 电泳图

P: 520bp positive sample, M: Marker DNA/EcoRI/Hind III,  
Line(1), (2) detected positive transgenic mouse.

## 3 讨 论

本实验使用的胰岛素基因是定点突变改造过的, 将普通细胞内蛋白质加工酶 furin 识别和切割位点 Arg-X-Lys-Arg- 样序列引入胰岛素原 C 肽两端, 目的在于尝试使乳腺细胞能加工表达的人胰岛素原, 产生成熟人胰岛素, 最终在转基因小鼠乳汁中直接产生成熟的有生物学活性的人胰岛素。

根据国外发表的文献, 这样改造后的胰岛素基因在动物细胞中可直接表达出成熟有

生物学活性的胰岛素<sup>[8-9]</sup>。在转基因动物乳腺表达有生物活性的蛋白进入血液后可能对动物产生不良的生理影响。但如果外源基因在乳腺表达的特异性很好或基因表达量较低, 对某些蛋白来讲, 动物机体可能有一定的耐受性, 少量该蛋白进入血液对动物的生理代谢影响就不大。一些在转基因小鼠体内表达胰岛素的成功研究说明, 血液中少量外源胰岛素不会影响动物正常生长<sup>[10-11]</sup>, 所以我们认为建立小鼠转胰岛素基因乳腺生物反应器模型是可行的。

本实验目的之一是希望检验在转基因动物乳腺表达改造后的胰岛素基因产物是否能被加工, 产物如何。但目前我们在细胞和乳汁中的表达量都较低(ng 级水平), 仅能用 RIA 方法测定。RIA 方法的检出物包括胰岛素和胰岛素原, 不能区分胰岛素和胰岛素原。并且当前我室的技术手段也还不能区分如此少量的胰岛素和胰岛素原混合物。所以如何进一步鉴定表达产物中的成熟人胰岛素及提高该基因的表达量, 还需做进一步的研究。

**致 谢** 中国农科院畜牧所生物工程室的工作人员及研究生给本研究提供了很多条件和技术帮助, 并参加了本课题的一些工作。在此表示感谢!

## 参 考 文 献

- [1] W. S. Bawden, R. J. Passey, A. G. Mackinlay *et al.* *Biotech. & Genetic Engineering Review*, 1994, 12: 89~137.
- [2] G. Wright, A. Carver, D. Cottom *et al.* *Bio/Technology*, 1992, 9: 830~834.
- [3] 杨国庆, 戴瑾平, 朱宝利等. 中国科学(C 辑), 1996, 26(5): 463~469.
- [4] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York, Clod Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [5] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术, 北京: 高等教育出版社, 1993.

- [ 6 ] B. Hogan, F. Costantini, E. Lacy *et al.* Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [ 7 ] J. P. Simons, M. Mc Clenaghan, A. J. Clark. *Nature*, 1987, **328**: 530~532.
- [ 8 ] D. J. Groskrentz, X. M. Sliwkowski, C. M. Gorman. *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**(8): 6241~6245.
- [ 9 ] Yanagita M, Nakayama K, Takeuchi T. *FEBS Letters*, 1992, **311**(1): 55~59.
- [ 10 ] F. Bosch, A. Valera, C. Fillat *et al.* *FASEB J.*, 1994, **8**(6): 440~447.
- [ 11 ] J. L. Ottesen, P. Nilsson, J. Jami *et al.* *Diabetologia*, 1994, **37**(12): 1178~1185.

## Study on Expression of Human Insulin Gene in the Mammary Gland of Transgenic Mice

Shou Siming<sup>1</sup> Chen Ying<sup>2</sup> Zhu Baoli<sup>1</sup> Ao Hong<sup>2</sup> Qi Shunzhang<sup>1</sup> Zheng Wei<sup>1</sup>  
Liu Pengpeng<sup>1</sup> Li Jianfan<sup>2</sup> Yang Guoqing<sup>1</sup> Zhu Yuding<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Dept. of Biochemistry, College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094)

<sup>2</sup>(Dept. of Bioengineering, Institute of Animal Science, Chinese Academic of Agriculture, Beijing 100094)

**Abstract** A 0.6 kb BLG promoter and modified Human insulin genomic gene were used to construct mammary gland expression Vector, pUC/BLGINS. Transient Expression of Insulin gene within Vector pUC/BLGINS was carried out in MCF-7 cell (human mammary gland cell). The transient expressed human (pro) Insulin was measured by RIA method. The RIA result of Insulin concentration in the MCF-7 cell cultural medium was:  $(6.0 \sim 118.0) \times 10^{-6}$  IU/ $5 \times 10^{-6}$  MCF-7 cell/Day. Using the DNA fragment including BLG promoter and human insulin gene in Vector pUC/BLGINS, transgenic mice were generated by means of microinjection. So far, Two positive transgenic mice were detected from 65 new pups by PCR method. One of the positive transgenic mice was female. After two weeks of the positive transgenic female mouse produced pups, human (pro) insulin in the milk of the transgenic mice was measured by RIA method. The result was  $50 \times 10^{-6}$  IU/mL. A background of  $5.6 \times 10^{-6}$  IU/mL was detected in the milk of blank control mouse.

**Key words** BLG, human insulin gene, transgenic mice, transient expression, mammary gland