

转基因克隆奶山羊大量生产重组人的抗凝血酶 III 蛋白质(rhATIII)

邹贤刚¹, 袁三平¹, 鲜建¹, 赵雅琳¹, 李狄尔¹, 王玉阁², 郝茹², 解居伦¹, 刘身庆¹, 杜森²

1 青岛森淼生物技术研究所, 山东 266101

2 中国科学院遗传和发育生物学研究所, 北京 100080

摘要: 利用转基因克隆奶山羊乳腺生物反应器大量生产重组人的抗凝血酶 III(rhATIII)蛋白质。其中包括: 筛选出人的抗凝血酶 III 蛋白基因的 cDNA 序列; 利用山羊的 β -酪蛋白基因的启动区, 终止信号和 Enterokinase 蛋白酶酶切 DNA 序列, 构建在乳腺中特异表达 rhATIII 的表达载体。同时在转基因载体的末端连接一个新霉素筛选基因(Neomycin)。再以细胞转染、G418 筛选和体细胞核移植(动物克隆)等过程, 最后获得含有人的抗凝血酶 III 基因的转基因克隆奶山羊。我们共获得了 5 个原代转基因公羊。第一只克隆羊在出生后 78 d 死亡, 解剖表明: 羊的肺部和肾脏等器官有异常。其它克隆公羊经过与崂山种母羊交配, 得到转基因后代, 其中两个原代转基因羊的后代母羊已成熟, 所获得的奶经蛋白质电泳证明: 转基因克隆羊后代奶中含有约 60 kD 大小的 rhATIII 糖蛋白; 经 Elisa 检测表明: 在奶中含有大量活性的 rhATIII, 在来源于两个不同克隆公羊的后代母羊奶中的 rhATIII 含量分别为 0.4 mg/L 和 3 g/L。此研究证明: 转基因奶山羊可以大量地生产具有很高活性的 rhATIII。用这种方法生产的 rhATIII 通过蛋白质提纯, 制成注射剂, 将可用于人的抗凝血酶 III 缺乏症的治疗、预防血栓和重大手术过程中的止血的作用等。

关键词: 山羊, 乳腺生物反应器, 转基因, 克隆, 重组人的抗凝血酶 III(rhATIII), 胎儿成纤维细胞(FFC)

Large Scale Production of Recombinant Human Antithrombin III (rhATIII) in Transgenic Cloned Goats

Xiangang Zou¹, Sanping Yuan¹, Jian Xian¹, Yalin Zhao¹, Dier Li¹, Yuge Wang², Ru Hao², Julun Xie¹, Shenqing Liu¹, and Miao Du²

1 *Qingdao Samuels Biotechnology Research Institute, Qingdao 266101, China*

2 *Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*

Abstract: We report the production of recombinant human antithrombin III (rhATIII) in transgenic cloned goats. Human ATIII mRNA was isolated from human liver tissues, then transcribed into cDNA. The human ATIII cDNA (without the first 96 base pair sequence) and Enterokinase recognised peptide-DNA sequence were ligated to a goat beta-casein promoter and poly(A) singling se-

Received: March 10; **Accepted:** August 14, 2007

Supported by: the National 973 Project (No.2000016107) and the Qingdao Municipal Science and Technology Bureau(No.2001KNS-2N-29).

Corresponding author: Xiangang Zou. E-mail: xiangang.zou@yahoo.com.cn

国家 973 计划(No. 2000016107)和青岛市科技局科技发展计划资助(No. 2001KNS-2N-29)。

quences, neomycin selection gene was linked at the end of the poly(A) singling region. The mammary expression construct was transfected into in vitro cultured goat foetal fibroblast cells and the cells were selected with 500ug/ml G418. Five transgenic cloned goats were derived by nuclear transplantation and their transgenic status were confirmed by Southern and/or PCR analysis. The first cloned goat died at 78 day old with abnormalities in respiratory system and kidney. Two of the male cloned goats were bred to produce female offspring. Milk analysis from the transgenic lines revealed that the size of the rhATIII in milk was about 60 kD. One line could produce rhATIII at 0.4 mg/L in their milk; another line could produce rhATIII at a large scale of 3 g/L in their milk. rhATIII was also a glycoprotein, which was similar to human serum ATIII.

Keywords: goat, mammary bio-reactor, transgenesis, nuclear transfer, rhATIII, foetal fibroblast cell(FFC)

抗凝血酶III(ATIII)在人体中主要由肝脏合成,是存在于血浆中的一种重要的抗凝血因子,它是抗凝血酶活性的主要承担者(60%~70%),同时也是血浆中存在的重要的丝氨酸蛋白酶抑制剂。其主要功能是灭活凝血酶,如与凝血酶Xa及XIa结合;并且在维持血液生理性凝血与抗凝血平衡中起着重要的作用。血浆中ATIII正常含量为:140~200 mg/L^[1,2]。而在一些疾病中人体中ATIII的含量少于正常水平:a)遗传性抗凝血酶III缺乏症;b)获得性抗凝血酶III缺乏症;c)抗凝血酶III丢失增多:如肾脏疾病;d)抗凝血酶III消耗增多:如各种原因所造成的血液凝固性增高,抗凝血酶III中和活化的凝血因子,以致消耗增加;e)最重要的是:ATIII的先天性或后天获得性缺乏症可能导致的其他疾病:如:由于血栓的形成,而引起脑血栓或心肌梗塞等等非常严重的疾病。因此,ATIII在临床上,有预防和治疗急、慢性血栓形成的作用,对治疗抗凝血酶缺乏症有显著效果。

目前市场有从人体血浆中直接提取的人抗凝血酶III蛋白的注射针剂,也有用细胞作为表达载体在体外合成的重组人抗凝血酶III蛋白质(recombinant human antithrombinIII, rhATIII)^[3]。世界上第一个利用转基因动物乳腺生物反应器生产的基因工程蛋白质——rhATIII(商品名: ATryn®, GTC生物治疗公司, 美国)于2006年6月通过欧洲医药评价署人用医药产品委员会(EMA)的上市评估,同年8月获得欧洲委员会的上市许可,并可能在2007年开始在欧洲市场上销售^[4]。这也证明利用哺乳动物乳腺生物反应器生产rhATIII的可行性和市场价值。

本研究采用体细胞核移植技术(Wilmot *et al*, 1997^[4])来获得转有人的抗凝血酶III(ATIII)蛋白基因的崂山奶山羊,与美国GTC生物技术公司采用的原核注射法获得转基因动物的技术相比^[5],大动物转基因体细胞的克隆有以下的优点:获得转基因动物

的效率,资金投入少;更重要的是,可以先对体外培养的细胞进行遗传改造,如转基因的整合及检测,甚至可以监测转基因在细胞内的表达量,然后再进行克隆,获得转基因克隆动物。

崂山奶山羊是我国的高产奶山羊之一,产奶量高,产奶期长,相当于1/3头奶牛的产奶量,而且山羊的研究周期短,饲养管理费用低,是乳腺生物反应器的主要研究对象之一。我国已开展了一些乳腺生物反应器方面的研究工作^[6-14],小鼠乳腺生物反应器中表达人凝血因子IX^[8],获得含有人组织型纤溶酶原激活剂基因的基因打靶山羊细胞株^[9],还没有类似利用动物乳腺生物反应器生产rhATIII的研究。本文报道了用崂山奶山羊生产rhATIII的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

E. coli DH5⁻, pUC19, pNEOflox-8 本研究所保存, SuperScript II Reverse Transcriptase, PCR SuperMix High Fidelity, pCR2.1-TOPO, 购自Invitrogen公司。

1.1.2 细胞和胚胎培养基

DMEMF-12(1:1)细胞培养基, 购自Invitrogen公司, 胎牛血清(FCS), M16 和M2, 购自Sigma公司。

1.1.3 抗体和其他试剂

人血浆ATIII蛋白质标准品, 抗人ATIII抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗人ATIII抗体, 购自US Biological公司; Lipofectamine, 购自Invitrogen公司; Ionomycin和6-DMAP购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 ATIII功能基因的获得

人的抗凝血酶III基因的cDNA序列: 根据已公开的人的ATIII的cDNA顺序(GenBank: X68793), 从人肝细胞获得mRNA, 转录成cDNA, 通过PCR扩增

获得 1.4KB 的人 AT III 基因的 cDNA(PCR 引物为: 5'-TTTATGTATTCCAATGTGATAGG-3'; 5'-TTTTTACTTAACACAAGGGTTGG-3)。PCR 产物连接在 pCR2.1-TOPO 上, 进行 DNA 序列分析(Sigma-Genosys)。将 DNA 顺序分析正确的 ATIII 质粒进行 PCR 克隆去除 ATIII 的分泌信号肽部分(碱基序列 1~96), 并在引物前加入 1 个唯一的酶切位点(XhoI) 和一个 Enterokinase 蛋白质酶切 DNA 序列(PCR 引物为: 5'-TTTCTCGAGGACGACGACACAAGCACGGGAGCCCTGTGG-3'; 5'-TTTCTCGAGTTACTTAACACAAGGGTTGG-3)。hATIII 基因和 Neomycin 筛选基因连接到奶山羊 β -酪蛋白基因 DNA 载体上。

1.2.2 奶山羊 β -酪蛋白基因载体

用已知的绵羊的 β -酪蛋白基因片段为探针, 从崂山奶山羊的基因组文库中分离出 β -酪蛋白基因^[15], 并用 PCR 方法去除 β -酪蛋白基因的部分第二外显子与第七外显子及其之间的 DNA 序列, 建立一个唯一的 Xho I 酶切位点, 然后将人的抗凝血酶 III 基因连接在 β -酪蛋白基因的 Xho I 上, 筛选基因连接在 β -酪蛋白基因的 P(A) 序列后面^[16](见图 1)。



图 1 山羊 β -酪蛋白基因(A)和乳腺表达载体(B)

Fig. 1 Goat-casein gene(A) and mammary expression vector(B) 1~9: indicate exons of goat β -casein; ATIII is the DNA sequences of human antithrombin III (AA: 32-464); Neo: Neomycin gene; 2' and 7' represent part of exon 2 and exon 7

1.2.3 胎儿成纤维细胞的培养、转化和筛选

从 30 至 45 d 胎龄的崂山奶山羊中分离出成纤维细胞, 分离的细胞培养在 DMEM-F12(1:1) 含有 10% 胎牛血清(FCS)和抗菌素的培养基中。细胞系首先进行性别鉴定^[17,18], 选用雄性细胞系进行细胞转化。根据 Invitrogen 公司的脂质体(Lipofectamine)转化胎儿成纤维细胞的方法, 将 1~3 mg 的 ATIII 转基因载体与 Lipofectamine 混合, 然后在 24-或 6-孔细胞培养板上与胎儿成纤维细胞共培养 4~6 h, 500 mg/mL 的 G418 筛选 13~15 d, 选择生长状况好, 细胞多的细胞株,

进一步培养, 一部分细胞保存待用, 一部分细胞用于制备 DNA 样品, PCR 分析^[10-14]。

1.2.4 转基因细胞的细胞核移植、分析和转基因克隆后代的扩繁

山羊经同期发情和超排处理, 获得体内成熟的卵母细胞和寄母羊。阳性转基因细胞在 DMEM-F12 含 0.5% FCS 的培养基中(饥饿)培养 2~5 d 后, 在 M2 中移入去核卵母细胞的卵周隙内, 用电刺激的方法将供核细胞与去核卵母细胞融合, 体外培养 4 h 后, 用 5 μ mol/L 离子霉素(Ionomycin)激活 5 min, 再在含有 2 mmol/L 的 6-二甲基苯胺嘌呤(6-DMAP)培养基中培养 5 h。最后, 克隆胚胎移入 M16 中培养; 第二天, 克隆胚胎移入寄母羊输卵管中。寄母羊怀孕, 产出克隆母羊羔, 用 Southern 和 PCR 检测克隆后代的转基因^[10-14]。

转基因克隆羊与崂山奶山羊种羊交配, 获得转 hATIII 基因的后代, 转基因后代母羊, 再进行交配、产子, 获得转基因羊奶。

DNA 的制备和转基因分析: 将培养的细胞和少量克隆羊的组织转入 DNA 裂解液(含有蛋白酶 K)中, 在 55 $^{\circ}$ C 水浴锅中过夜, 然后加入两倍的纯酒精, 混匀, 离心; 用 70% 的酒精洗 DNA 一次, 自然干燥, 然后加入适量的 TE(Tris-EDTA)溶液, 待 DNA 全部溶解后, 放入 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱中。用 Pst I 酶消化 DNA 溶液过夜, 在 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 然后将 DNA 转入纤维膜中, 用 ³²P 标记探针进行杂交。获得 DNA 的 Southern 图片。用引物, 对细胞和克隆羊的 DNA 进行 PCR 扩增(PCR 引物是: 5'-TACCGCTGTTGTGATTGCTGGC-3'; 5'-GAGGGGAGGTGAAGGTTTTC-3), 获得 PCR 产物, 凝胶电泳, 拍照。

1.2.5 奶样的前期处理

收集含有 ATIII 基因羊的奶, 保存在 -20 $^{\circ}$ C 以下的冰箱中待用。不同时间收集的奶样, 放入 -4 $^{\circ}$ C 或室温中化冻, 几个样品混合均匀, 转入离心管中, 低温高速(5000 g)离心 15 min, 取出脱脂奶样品, 分装, 低温保存^[19]。

1.2.6 rhATIII 的分子量大小的检测-奶样变性蛋白质电泳

奶中 ATIII 的分子量大小的检测是将脱脂的转 ATIII 的奶样, 正常对照奶样和美国生物公司(货号:

A2298-24, US Biological)的人血清ATIII蛋白质标准品,分别按一定比例与蛋白质样品加样液稀释,加入蛋白质凝胶的孔中,采用Invitrogen的蛋白质凝胶跑胶系统, (XCell Surelock™ Mini-Cell, Invitrogen),在电压 200V下电泳 60 min,然后蛋白质胶经过洗涤,固定, Coomassie蓝R-250 染色,脱色,拍摄照片。根据标准蛋白质分子量和与空白对照比较,获得奶中ATIII蛋白质的分子量大小。

1.2.7 rhATIII 的活性检测 - 酶联免疫吸附(Elisa)方法

人血清的ATIII蛋白质(货号: A2298-24)为标准品,抗人ATIII抗体(货号: A2298-17A)为酶标板的包埋抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗人ATIII抗体(货号: A2298-18)为检测抗体,用酶联免疫吸附法(ELISA)对转ATIII基因的羊奶进行检测^[2]。

2 结果

2.1 乳腺生物反应器的基因表达载体

重组人 ATIII 乳腺生物反应器的基因表达载体由山羊 α -酪蛋白基因的启动区和 PolyA 信号所组成,其中人 ATIII 的 cDNA 序列(表达 rhATIII 的 33~462 氨基酸)连接在山羊 α -酪蛋白基因的第二外显子上,并且在人的 ATIII 基因前段,加一个 Enterokinase 蛋白酶酶切(酶切识别序列 DDDDK)的 DNA 序列和 α -酪蛋白分泌多肽序列(MKVLILACLVALAIAL, 见图 5)。筛选基因(新霉素基因、Neomycin)连接在 α -酪蛋白基因的表达框架的 PolyA 信号之后。表达载体经 DNA 序列分析,确定其 DNA 序列、表达框架和元件(见图 1)。

2.2 ATIII 转基因克隆奶山羊的获得

雄性崂山奶山羊的成纤维细胞,在体外培养情况下,进行细胞转化。我们共获得 23 个阳性细胞株,经 PCR 检测,所有的阳性细胞株都含有 ATIII 转基因。选用生长状况好的阳性细胞进行细胞核移植(动物克隆)。我们共进行了三批转 ATIII 基因的克隆工作,供核细胞与去核卵母细胞的融合率为 81%~91%,移植胚胎的出生率只有 1%~2%。共获得了 5 只克隆羊羔,经过 Southern 或 PCR 检测,5 只原代克隆羊都是含有 ATIII 基因的转基因羊(见表 1 和图 2),由于这 5 只克隆羊是来源于 5 个不同的细胞株,所以 5 只转基因克隆羊的转基因拷贝数和转基因整合位点

都不一致。因此,5 只转基因克隆羊需要分别地交配、繁殖、建立相应的群体(转基因系)。但第一只克隆羊(A-01)在出生后 78 d 死亡,解剖表明:这只羊的肺部和肾脏发育不全;A-05 和 A-08 原代转基因克隆羊的转基因后代母羊已成熟,经交配怀孕,产出小羊羔,搜集到奶样品。其余两只原代克隆羊的繁殖工作正在进行中。

表 1 三次转基因克隆结果核效率
Table 1 Transgenic cloning efficiency

Type of Donor Cell	FC	FC	FC
No. Oocytes	132	174	145
No. Cell-Oocyte Complexes	109(83)	159(91)	117(81)
No. Embryos fused	83(76)	138(87)	110(76)
No. Embryos Transferred	83(100)	134(97)	108(98)
No. Offspring	1(1.2)	2(1.5)	2(1.8)
No. Cloned Goats Alive	0(0)	2(100)	2(100)

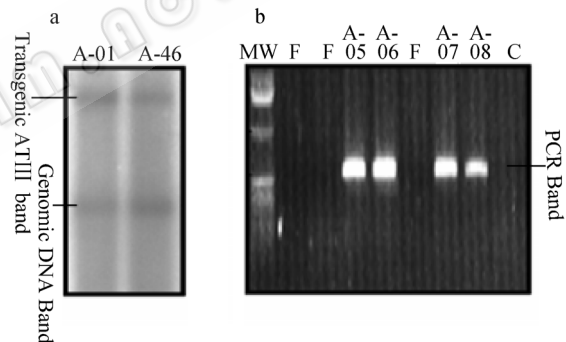


图 2 原代转基因克隆羊的ATIII转基因大的Southern(a)和PCR(b)检测

Fig. 2 Southern (a) or PCR (b) analysis of transgenic cloned goats

A-01, A-05, A-06, A-07 and A-08: cloned goat DNAs; A-46: donor cell (for cloned goat A-01) DNA; MW: Molecular weight marker; F: foster-mother DNAs; C: negative control

2.3 山羊乳腺生物反应器生产的 rhATIII 蛋白质的大小

在变性的情况下,奶样蛋白质凝胶电泳,蛋白质蓝 R-250 染色,获得蛋白质电泳照片(见图 3);美国生物公司的血清抗凝血酶 III 蛋白质(标准品)的分子量是 58 kD,是一个糖蛋白;山羊乳腺生物反应器生产的含有酪蛋白分泌肽的 rhATIII 的分子量大约是 60 kD(见图 3, A-25 羊的奶样中 rhATIII 带,箭头所示),其中含有 2 kD 的酪蛋白分泌肽,在提纯的过程中,可以用 Enterokinase 蛋白酶将这 2 kD 的酪蛋

白分泌肽去除, 获得完全与人血清中一致的 rhATIII(58 kD)。这也表明乳腺生物反应器生产的 rhATIII 也是一个糖蛋白质, 其原因是: 人的 432 个氨基酸(32~462)的 ATIII 蛋白质在没有糖基的情况下的理论大小是: 49 kD, 由于乳腺生物反应器生产的 rhATIII 在乳腺中与糖基结合, 再加上酪蛋白的分泌肽 2 kD, 因此, rhATIII 的分子量是 60 kD。

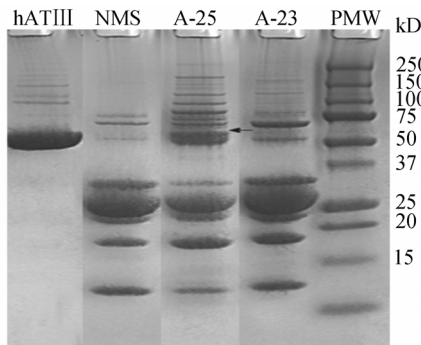


图 3 转基因克隆羊的后代奶中的 rhATIII 蛋白质的分子量
Fig. 3 Molecular weight analysis of rhATIII in milk produced by transgenic goats

hATIII: human serum ATIII; NMS: normal milk sample; A-25: milk sample of goat (A-25) derived from transgenic cloned goat (A-08); A-23: milk sample of goat (A-23) derived from transgenic cloned goat (A-05); PMW: protein molecular weight (Bio-Rad, 161-0373); Arrow points to the rhATIII band

2.4 山羊乳腺生物反应器生产的 rhATIII 蛋白质的活性

用酶联免疫吸附(Elisa)方法对两只克隆原代羊(A-05 和 A-08)的后代的奶中 rhATIII 的含量检测结果是: A-05 后代羊(A-23)奶中的 rhATIII 含量为 0.4 mg/L; A-08 后代羊(A-25)奶中的 rhATIII 含量为 3 g/L (见图 4), A-25 属于高产转基因羊。其他两只 ATIII 原代克隆转基因的后代, 正在繁殖中。

3 讨论

人的抗凝血酶III基因位于 1 号染色体, 有 15 kb 的碱基序列, 含有 7 个外显子, 主要在肝脏中合成^[20], 从人血清中分离的ATIII是一个只有 432 个氨基酸(33~464 氨基酸)的功能蛋白。根据这一特点, 我们构建的ATIII基因表达载体只含有ATIII蛋白质中 33~464 氨基酸的cDNA序列^[21], 并采用了乳腺细胞的β-酪蛋白基因的分泌肽, 提高合成蛋白质从乳腺细胞分泌出的能力; 同时在奶中合成的rhATIII, 有

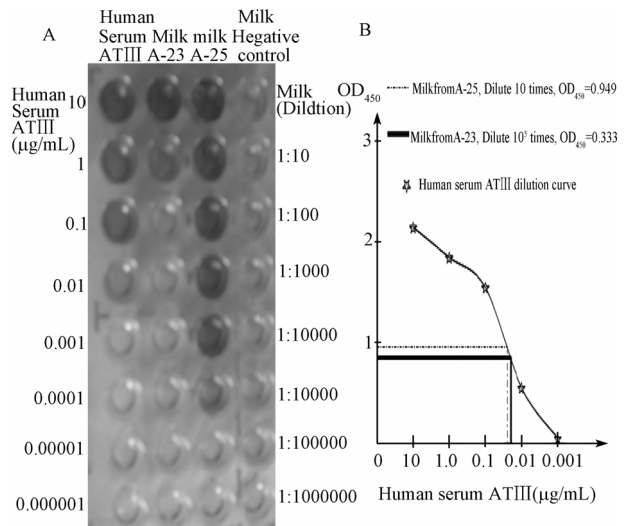


图 4 转基因克隆羊的后代奶中的 rhATIII 的活性分析
Fig. 4 ELISA analysis of rhATIII in milk produced by transgenic goats

A: ELISA plate of rhATIII in milk; B: rhATIII in milk compared with human serum ATIII in different dilution. By calculation, rhATIII produced in A-23 is 0.4 mg/L; rhATIII produced in A-25 is 3 g/L.

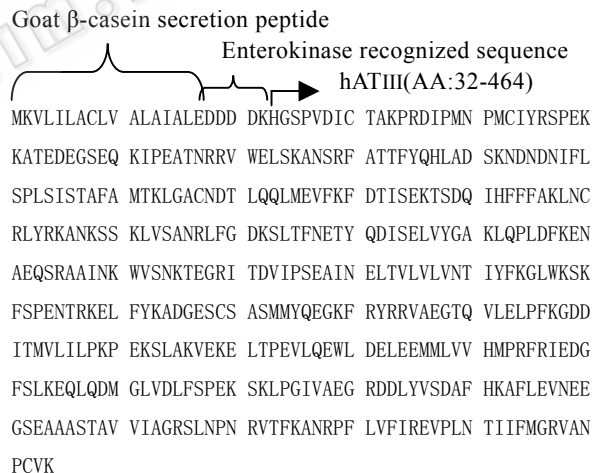


图 5 rhATIII 的氨基酸序列:
Fig. 5 Amino acids (AA) of rhATIII in milk produced by transgenic goats

一段蛋白酶酶切系列(DDDK), 在提纯过程中, 可以用 Enterokinase 蛋白酶完全去除 β-酪蛋白分泌肽, 获得与从人血清中提取的 ATIII 氨基酸序列一致的 rhATIII。这样可以提高 rhATIII 的活性和减少 rhATIII 的负作用。

一头转基因克隆羊后代(A-25)的奶中 rhATIII 的含量为 3 g/L, 这一结果达到大规模生产的要求, 并且 rhATIII 蛋白质的大小与预期一致, 是与人体血浆

相似的糖蛋白。这是细菌培养生产所不能达到的。

本研究与美国 GTC 生物治疗公司用于生产 rhATIII 的方法[5]有着关键的区别: 1、本研究生产的 rhATIII 只是抗凝血酶 III 蛋白质的成熟部分(即功能部分: 氨基酸 33~464), GTC 生物治疗公司生产的 rhATIII 是抗凝血酶 III 原, 含有抗凝血酶 III 蛋白质的信号肽部分(氨基酸 1~32)和成熟功能部分(氨基酸 33~464), 不可能在体外将信号肽去除; 2、本研究是将重组人的抗凝血酶 III 蛋白质表达载体首先转入体外培养的山羊成纤维细胞中, 然后再用体细胞核移植技术(克隆技术)获得含有人的抗凝血酶 III 蛋白质基因的转基因动物, GTC 生物治疗公司是将重组人的抗凝血酶 III 蛋白质表达载体直接注射到山羊受精卵的原核中(原核注射法), 所获得含有人的抗凝血酶 III 蛋白质基因的转基因动物, 而原核注射法的成本高, 周期长; 3、本研究表达的蛋白质中含有一个 Enterokinase 蛋白质酶切序列(DDDK), 可将分泌多肽和重组人的抗凝血酶 III 蛋白质(功能部分)分开, 获得与人血清中完全一致的 rhATIII, 增强了 rhATIII 的活性和治疗功能。

血浆中的 ATIII 的含量大约为 140~200 mg/L^[2]。现在, 大量使用的 ATIII 蛋白质注射液是从人的血清中提取来的, 这一方法的缺点是, 需要大量的血液来源, 即供血者; 而且, 供血者个体的疾病会得以传播, 这是人体血液制品的最大缺点; 人血清的 ATIII 含量低, 提纯的成本高。山羊乳腺生物反应器生产的 rhATIII 与从人血清中提取的 ATIII 的分子量, 活性一致, 都是糖蛋白质; 欧洲医药评价署人用医药产品委员会(EMEA)对 GTC 生物治疗公司生产的 rhATIII 蛋白质进行了上市评估, 获得欧洲委员会的在欧洲上市许可证, 并可能于 2007 年在欧洲市场上销售。他们也在向美国食品和药物管理局(FDA)申请在美国上市[3], 这些都证明利用哺乳动物乳腺生物反应器生产 rhATIII 的可行性和市场价值。我国还没有同类产品, 我们在转基因羊的制备和基因载体的构建上与美国 GTC 生物治疗公司有着本质的区别, 我们也申请了相关的用哺乳动物生物反应器生产 rhATIII 的专利。下一步, 我们的工作重点是 rhATIII 的提纯, 毒理试验、动物试验、人体试验和规模化的大量生产 rhATIII 蛋白质。

REFERENCES

- [1] Zhao XY, Liu WS, Zhao XW. Evaluation of AT-III, PAI-1 in diabetic nephropathy type 2. *Journal of Preclinical Medicine College of Shandong Medical University*, 2000, **14**(2): 74-77.
赵晓云, 刘文淑, 赵秀稳. 抗凝血酶 III、纤溶酶原激活剂抑制剂-1 在 2 型糖尿病肾病中的作用. *山东医大基础医学院学报*, 2000, **14**(2): 74-77.
- [2] Edmunds T, Van Patten J, Pollock E, et al. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood*, 1998, **91**(12): 4561-4571.
- [3] Zettlmeissl G, Conradt HS, Nimtz M, et al. Characterization of recombinant human antithrombin III synthesized in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 1989, **264**(35): 21153-21159.
- [4] GTC Biotherapeutics, Inc. ATryn® Receives chmp recommendation to grant market authorization. <http://www.transgenics.com/pressrel-eases/pr060206.html>. 2006, 2 June
- [5] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385**(6619): 810-813.
- [6] Zhang L, Jiang M, Lei Z, et al. Development of goat embryos reconstituted with somatic cells: the effect of cell-cycle coordination between transferred nucleus and recipient oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 2004, **50**(6): 661-666.
- [7] Lan G, Chang Z, Luo M, et al. Production of cloned goats by nuclear transfer of cumulus cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 2006, **73**(7): 834-840.
- [8] Hung Z, Yan JB, Huang Y, et al. High expression of human FIX (hFIX) in transgenic mice directed by goat β -casein gene promoter. *Acta Genetica Sinica*, 2002, **29**(3): 206-211.
黄赞, 颜景斌, 黄纓, 等. 山羊 β -酪蛋白基因启动子指导的转基因小鼠乳汁高效表达人凝血因子 IX. *遗传学报*, 2002, **29**(3): 206-211.
- [9] Shen W, Lan G, Yang X, et al. Targeting the exogenous hPam gene on goat somatic cell beta-casein locus for transgenic goat production. *Molecular Reproduction and Development*. 2007, **74**(4): 428-434.
- [10] Wang YG, Zou XG, Cheng GX, et al. Cloned goats (*Capra hircus*) derived from foetal fibroblast cells. *Chinese Science Bulletin*, 1999, **44**(21): 2319-2323.
王玉阁, 邹贤刚, 成国祥, 等. 由胎儿成纤维细胞而来的克隆山羊. *科学通报*, 1999, **44**(21): 2319-2323.
- [11] Zou XG, Tan JH, Yang ZM, et al. Mammalian cloning and

- its application prospects. *Progress in Biotechnology*, 2000, **20**(5): 5–10.
- 邹贤刚, 谭景和, 杨增明, 等. 哺乳动物克隆及其应用前景. *生物工程进展*, 2000, **20**(5): 5–10.
- [12] Cheng Y, Wang YG, Luo JP, *et al.* Cloned goats produced from adult fibroblast cells. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2002, **18**(1): 79–83.
- 成勇, 王玉阁, 罗金平, 等. 由成年转基因山羊体细胞而来的克隆山羊. *生物工程学报*, 2002, **18**(1): 79–83.
- [13] Zou X, Cheng Y, Wang Y, *et al.* Production of cloned goats from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei or fused with cumulus cell. *Cloning*, 2001, **3**(1): 31–38.
- [14] Zou X, Wang Y, Cheng Y, *et al.* Generation of cloned goats (*Capra hircus*) from transfected foetal fibroblast cells, the effect of donor cell cycle. *Molecular Reproduction and Development*, 2002, **61**(2): 164–172.
- [15] Wang Q, Chen MY, Ren ZR, *et al.* Molecular Cloning and Sequence Analysis of Goat β -casein gene. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, **19**(1): 17–23.
- 王强, 陈美珏, 任兆瑞, 等. 山羊 β 酪蛋白基因克隆及序列分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, **19**(1): 17–23.
- [16] Persuy M, Legrain S, Printz C, *et al.* High-level, stage- and mammary-tissue-specific expression of a caprine kappa-casein-encoding minigene driven by a beta-casein promoter in transgenic mice. *Gene*, 1995, **165**(2): 291–296.
- [17] Phua AC, Abdullah RB, Mohamed Z. A PCR-based sex determination method for possible application in caprine gender selection by simultaneous amplification of the Sry and Aml-X genes. *Journal of Reproduction and Development*, 2003, **49**(4): 307–311.
- [18] Aasen E, Medrano JF. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology (N Y)*, 1990, **8**(12): 1279–1281.
- [19] Baruah GL, Belfort G. Purification of monoclonal antibodies derived from transgenic goat milk by ultrafiltration. *Biotechnology Progress*, 2004, **5**; **87**(3): 274–285.
- [20] Grundy CB, Thomas F, Millar DS, *et al.* Recurrent deletion in the human antithrombin III gene. *Blood*, 1991, **78**(4): 1027–1032.
- [21] SBock SC, Wion KL, Vehar GA, *et al.* Cloning and expression of the cDNA for human antithrombin III. *Nucleic Acids Research*, 1982, **10**(24): 8113–8125.

《生物工程学报》英文版简介

为了加快期刊的国际化进程, 扩大国际交流, 本刊与国际知名的爱思唯尔出版公司(Elsevier)达成协议, 合作出版英文电子版《Chinese Journal of Biotechnology》, 该刊与中文版同步, 月刊。出版后置于爱思唯尔庞大的 ScienceDirect 网络出版平台上, 我刊网址: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722075>。

爱思唯尔是国际著名的出版公司, 《Cell》等知名杂志便出自该公司。ScienceDirect 是爱思唯尔建立的最全面的服务于多学科研究型图书馆的电子数据库。研究人员通过它能在在线访问超过 1800 种期刊和 400 万篇电子版全文。《生物工程学报》英文版借助这个庞大而成熟的平台, 将可以大大地提高文章的浏览量, 扩大期刊及作者在国内外的影响, 提高文章的被引频次。同时, 出版英文电子版将可克服与国外文字沟通的障碍, 使作者的科研成果能在第一时间为国际同行所了解。

本刊的栏目有综述、研究报告、研究简报和技术与方法等, 范围包括基因工程、细胞工程、酶工程、蛋白质工程、发酵工程、生化工程、代谢工程、组织工程、生物制药、生物芯片、生物反应器及生物信息学等, 涉及生物技术各个领域, 非常欢迎广大科研人员踊跃投稿。直接投英文稿件而被录用的, 也将同时发表在中文印刷版上。本刊将增加英文稿件的刊出量, 并邀请国外专家对录用英文稿件进行英文润色, 部分优质稿件将参考专家意见予以优先发表。英文版不再另收版面费。

具体做法是: 每期从中文版中精选出 5~10 篇稿件译成英文, 凡具备以下条件之一者即可入选: 1. 在理论方面有新发现或新见解。2. 在应用方面取得新进展, 达到新水平。3. 在技术方面建立新方法或改进已有的方法。选中后通知作者译成英文, 经编辑部审核送爱思唯尔出版公司进行文字加工, 再返回作者进行内容确证。

投稿时请注意以下事项: 1. 稿件撰写时, 应力求叙述清楚, 避免语法错误和用词不当。2. 突出创新点, 用具体材料、数据加以说明与论证。3. 加强图表注释, 使读者在不读正文的情况下能正确理解图表的涵义。

欲了解更详细的信息, 请关注我们网页的更新或联络编辑部:

电话: 010-64807509; 传真: 010-64807327

E-mail: cjb@im.ac.cn