

小鼠乳清酸蛋白启动区指导人促红细胞生成素在转基因小鼠乳腺的表达

张旭晨 成国祥^④ 陈建泉^④ 成勇^④ 魏影允
姚乌兰 徐少甫^④ 劳为德

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080; ④扬州大学畜牧兽医学院, 扬州 225009)

摘要 以小鼠乳清酸蛋白基因(*mWAP*)调控区与人促红细胞生成素基因(*hEPO*)构建融合基因,经动物个体暂态表达方法确证 *hEPO* 可在乳腺特异表达后,用显微注射方法将融合基因导入小鼠受精卵,再将受精卵移植到假孕小鼠,获得 86 只 G_0 代小鼠,经 PCR-Southern blot 及 Southern blot 证实,有 58 只整合阳性小鼠,整合率为 67%,ELISA kit, dot ELISA 等方法检测小鼠 39 只,有 16 只表达阳性,乳汁中人 *hEPO* 的表达量高于 15 $\mu\text{g/mL}$.

关键词 促红细胞生成素 转基因小鼠 小鼠乳清酸蛋白启动区 乳腺

利用转基因技术研制动物乳腺生物反应器以用于蛋白质生产,其实用价值早已广为认识,一些主要乳汁蛋白质基因调控区几乎均被克隆,用以指导外源基因在动物乳腺特异表达的研究与应用^[1]. 促红细胞生成素是目前疗效、市场额、利润率最被看好的多肽药物之一,是一种调节红系祖细胞生长的激素,其高度糖基化结构有利于生物学活性的稳定,目前只限于用真核细胞培养系统生产,若能以乳腺生物反应器生产,可大大降低成本,满足社会需求. 我们以多种乳腺特异调控区与 *hEPO* 基因构建了融合基因,并通过显微注射途径获得了可表达 *hEPO* 的转基因小鼠,为在转基因山羊的应用提供依据. 本文报道以小鼠 *WAP* 基因调控框架指导 *hEPO* 在转基因小鼠乳腺表达的研究内容.

1 材料与方法

() 融合基因的构建. 质粒 *phEPO*, *pmWAP* 为本实验室克隆. 以常规亚克隆技术将小鼠乳清酸性蛋白基因 *mWAP* 5' 端上游调控区 2.6 kb 片段、3' 端 1.5 kb 片段由质粒 *pmWAP* 分离,人促红细胞生成素基因 *hEPO* 之 2.4 kb 编码区片段由质粒 *phEPO* 分离,3 片段共同连接克隆于 *pAT153* 中,构成表达载体 *pAWE*(图 1). 所用限制性内切酶、DNA 连接酶为 Amersham, Gibco BRL, Biolab, Promega, B M, SABC 公司产品.

() 表达载体有效性评价. 直接将融合基因分别对小鼠和山羊活体注射,检测其乳汁中 *hEPO* 表达情况,方法见文献[2, 3].

() 转基因小鼠的建立. 将融合基因 6.5 kb 片段以约 30 拷贝/ μL 的浓度溶解于 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH= 8.0, 1 mmol/L EDTA),每枚小鼠受精卵注射 3 μL 融合基因溶液,再将卵移植入假孕母鼠,待其产仔得到 G_0 代转基因实验小鼠. 方法见文献[4].

() 转基因整合检测. 剪取鼠尾提 DNA,方法见文献[5],以 PCR 扩增横跨 *mWAP-hEPO* 拼接点的片段,扩增产物为 1.3 kb,并以该 1.3 kb 片段为 PCR-Southern blot 探针,进行转基因的整合鉴定;以 *Kpn* iv 和 *Xho* iv 分离 1.2 kb 片段作为探针,以 *Bgl* ④和 *Xba* iv 消化 10 μg 基因组 DNA,作 Southern blot 以确认 PCR-Southern blot 的结果. PCR 引物为 P1: 5'-TGTAGCCCGGACTC-

GAGCG-3' 和 P2: 5'-GCCCTGAGCGTGAGTTCTG-3'. 由 CyberSyn 公司合成, Taq DNA 聚合酶为 Sangon 公司产品.

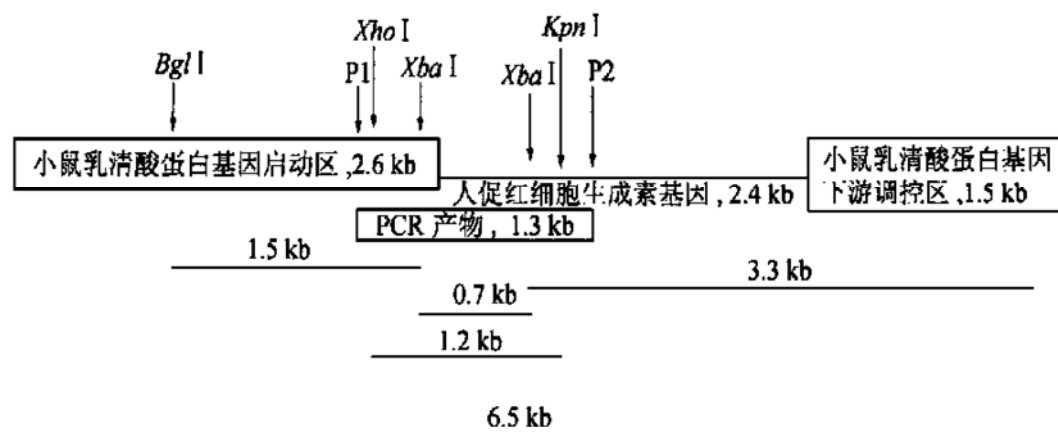


图1 表达构件 pAWE 示意图

P1, P2 为引物起点

() 转基因表达检测. 收集转基因小鼠乳汁, 离心取乳清, 采用 BM 公司 EPO ELISA 试剂盒及 dot ELISA 方法检测脱脂乳清中 hEPO 含量. dot ELISA 以碱性磷酸酶为二抗标记物, 以 Amgen 公司 hEPO 标准品作对照.

2 实验结果

2.1 表达构件的鉴定

根据 *mWAP* 基因图谱^[6] 和 *hEPO* 基因图谱^[7] 对表达载体 pAWE 进行限制性内切酶分析, 结果与图谱相符. 继尔分离融合基因 6.5 kb 片段, 分别对小鼠和山羊活体注射, 可由其乳汁中检测到 hEPO^[3], 证明该表达构件有效, 可用于转基因以指导 *hEPO* 基因在乳腺表达.

2.2 转基因的整合

获得 86 只 (42 雄, 44 雌) G_0 代小鼠, 其中以 PCR 扩增出 1.3 kb 片段, 再以内切酶 *Xba* iv 消化为 0.74, 0.33 和 0.2 kb 片段者为整合阳性; 以 *Kpn* iv 和 *Xho* iv 分离 1.2 kb 片段为探针, 以 *Bgl* ⑤和 *Xba* iv 消化基因组 DNA, Southern blot 显示 1.5 kb 和 0.7 kb 片段者可确认为整合阳性 (图 2), 共有 58 只小鼠为整合阳性, 整合率为 67% .

2.3 转基因的表达

以 BM 公司 hEPO ELISA 试剂盒及 dot ELISA 等方法检测小鼠 39 只, 表达阳性小鼠有 16 只. 有 5 只小鼠表达水平在 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上.

3 讨论

hEPO 是 166 个氨基酸组成的糖蛋白, 由第 7 与 161, 29 与 33 位的 Cys 组成 2 个二硫键, 第 24, 38, 83 位的 Asn 是糖基化位点^[7], 其初始转译产物的 N 端为 27 个氨基酸组成的分泌肽. 去糖基化会显著降低其在体内的半衰期和生物活性, 故生产上一般采用具有翻译后加工机的真核表达系统.

本研究拟通过转基因小鼠的建立, 考察 *mWAP* 基因调控区指导人促红细胞生成素基因 (*hEPO*) 在乳腺的特异表达情况, 为获得有实用价值的转基因羊提供依据. 结果表明由 *mWAP* 5' 端上游调控区 2.6 kb 片段及 3' 端 1.5 kb 片段所构成的调控框架可指导 *hEPO* 在转基因动物

乳腺中表达. 该表达构件的设计是合理的、有效的, 现已用于转基因山羊, 获得了令人满意的结果.

有关 *hEPO* 的真核细胞表达系统和转基因动物的表达研究已有一些报道, 但表达水平均较低, 这可能与所采用的基因是 *hEPO* cDNA 有关, 由 cDNA 构建的融合基因往往缺少一些必要的调节效应位点^[8]. 在我们所作的转基因小鼠和山羊中, 由相同的调控框架分别指导的 *hEPO* 与 *HBsAg* 转基因的表达水平相差甚远, *hEPO* 采用基因组 DNA, *HBsAg* 为病毒基因, 没有内含子, 相当于 cDNA, 结果 *hEPO* 比 *HBsAg* 的表达水平高出 2~3 个数量级(另文发表). *hEPO* 基因的内含子可能对转录有促进作用^[9]. 在一些构件中虽加入了内含子构成 mini gene, 但收效常不尽如人意. 可见基因组基因对于获得较高的表达水平是有利的, 这种规律具有一定的普遍性, 但也有例外^[10].

用显微注射方法将融合基因导入动物受精卵, 是获得转基因动物的最常用技术途径. 目前一些报道中所见整合率差异较大, 约在 3%~10%, 这与操作中关键环节的掌握差异有关. 本项目中 67% 的 G_0 代动物含有能整合的转基因, 在超排卵, 显微注射等重要环节有较妥当的控制(另文发表).

为获得预期的高水平表达, 在技术系统的完善方面尚有较多的发挥余地, 在调控框架中加入诸如核基质结合区之类有效的调节元件, 以及采用同源重组与体细胞核移植技术相结合的途径, 可能是未来转基因动物研究的热点.

致谢 本工作为国家“八六三”计划资助项目.

参 考 文 献

- 1 劳为德, 张旭晨. 乳腺生物反应器实用化研究. 生物工程进展, 1996, 16(4): 38~46
- 2 Lao W D, Xu S F, Cheng Y, et al. Transient expression of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and human erythropoietin (hEPO) genes in milk after direct introduction into Ewe. Science in China, 1998, 41(5): 465~472
- 3 Lao W D, Yu L. Transient expression of human growth hormone in mice milk after in vivo transfer of hGH gene. Developmental and Reproductive Biology, 1995, 4(2): 7~12
- 4 Lao W D, Liu W, Cheng G, et al. Construction of transgenic mice producing CAT to milk by co-injection of two overlapping fragments of bovine α_s1 -casein-CAT gene. Science in China, 1996, 39(6): 592~599
- 5 Hogan B, Constanini F, Lacy E. Manipulation of mouse embryo, a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986
- 6 Campbell S M, Rosen J M. Comparison of the whey acidic protein genes of the rat and mouse. Nucleic Acids Research, 1984, 12(22): 1526

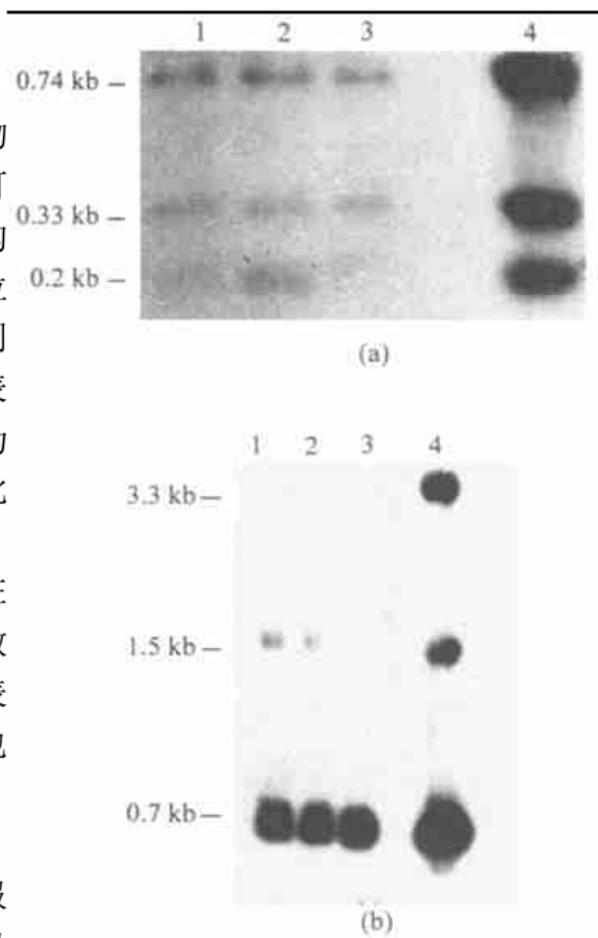


图2 G_0 代小鼠整合鉴定

(a) PCR-Southern 杂交, 所用内切酶为 *Xba* I; (b) 基因组 DNA Southern 杂交, 所用内切酶为 *Bgl* II+*Xba* I. 1~3 为转基因小鼠样品, 4 为阳性对照

8685~ 8697

- 7 Lin F K, Suggs S, Lin C H, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 7580~ 7584
- 8 Wilmut I, Whitelaw C B A. Strategies for production of pharmaceutical proteins in milk. *Reprod Fertil Dev*, 1994, 6: 625~ 630
- 9 Bawden W S, Passey R J, Mackinlay A G. The genes encoding the major milk-specific proteins and their use in transgenic studies and protein engineering. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1994, 12: 89~ 137
- 10 Velander W H, Johnasan J L, Page R L, et al. High level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 12003~ 12007

(1998-11-09 收稿, 1999_03_01 收修改稿)

蓝藻 *Anabaena* sp. strain PCC7120 中 一种可诱导的 CO_2 浓缩机制(CCM)

吴天福 宋立荣 刘永定*

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072. * 联系人)

摘要 为了探讨蓝藻 *Anabaena* sp. strain PCC7120 在外源无机碳浓度变化时, 其光合作用对 CO_2 和 HCO_3^- 的利用特性, 制备了高 CO_2 适应细胞(High- CO_2 -growing cells, HCG 细胞). *Anabaena* sp. strain PCC7120 HCG 细胞的生长速率高于 LCG 细胞(Low- CO_2 -Growing Cells), 即在空气中生长的细胞. 当 HCG 细胞从 5% CO_2 转移到空气中时, 其碳酸酐酶活性升高; 它对外源无机碳的表观光合作用亲和力明显提高, 说明它的 CCM 活性被诱导. HCG 细胞与 LCG 细胞一样, 当环境中 pH 值从 6 升高到 9 时, 对外源无机碳的表观光合作用亲和力都降低, 而对外源 CO_2 的表观光合作用亲和力则升高. 当 HCG 细胞从 5% CO_2 转移到空气中时, 作为 CCM 重要元件的羧体数目明显增加. 以上结果表明: 这种可诱导的 CCM, 为水体环境中光合自养生物无机碳利用特性的研究提供了一个很好的模型.

关键词 HCG CCM 光合作用亲和力 羧体

蓝藻作为一种水生光合自养生物, 可以主动吸收水体中溶解的无机碳(dissolved inorganic carbon, DIC), 并在体内积累高达 1 000 倍的 $\text{DIC}^{[1]}$, 然后以 CO_2 的形式供给 Rubisco 进行高效的光合作用, 这个系统被称为蓝藻的 CO_2 浓缩机制(CO_2 -concentrating mechanism, CCM). 蓝藻的 CCM 由 2 个重要元件组成: 1 个是 DIC 的运输系统, 另 1 个是羧体(carboxysome)^[2]. 一方面, 由于 CO_2 浓度升高而导致的“温室效应”和全球气候变化已引起了人们普遍的关注; 另一方面, 植物光合产率的提高也成为日趋重要的问题. 解决这两个问题的一条重要途径是: 光合自养生物如何在体内高效浓缩 CO_2 . 水体作为一个大气 CO_2 的库, 已经引起了人们极大的兴趣, 因为它对正在升高的大气 CO_2 浓度具有缓冲效应, 它可以通过“新生产量”——光合微生物产生的生物量的沉降作用, 使固定的 CO_2 下沉到水体的深层^[3]. 因此, 蓝藻的 CO_2 浓缩机制已成为近年来研究的热点. 在蓝藻 CCM 的研究中, 对单细胞蓝藻 *Synechococcus* PCC7942 高 CO_2 需求突