BLG-LAtPA 和鼠 WAP 共注射提高 LAtPA 在转基因小鼠乳腺中的表达水平

周 江[1] 邓继先[2*] 程 萱 卢一凡 杨 晓 黄培堂[2*]
(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 为了提高长效组织纤溶酶原激活剂(LAtPA)在转基因小鼠乳腺中的表达水平,将受控于羊 β-乳球蛋白(BLG)的 LAtPA 表达载体 BLG-LAtPA 与小鼠乳清酸蛋白(WAP)基因片段进行共注射,采用此方法建立的转基因小鼠,经 PCR 筛选和 Southern 印迹鉴定,获得 3 只 LAtPA 和 WAP 共整合阳性鼠,并在阳性母鼠乳汁中检测到有溶纤活性的 LAtPA 表达,表达水平达到 10μg/mL。

关键词 组织纤溶酶原激活剂,转基因小鼠,羊 β-乳球蛋白,小鼠乳清酸蛋白
中图分类号 Q38 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)01-0064-04

转基因动物在体内表达外源基因具有其独特优势,特别是乳腺生物反应器生产重组蛋白具有高效、总体费用低、产物生物活性有保障等特点越来越受到广泛关注[1]。迄今为止,有关转基因乳腺定位表达所做的工作主要集中在研究各种乳蛋白基因启动子的功能,人们一直在寻找一种理想的乳蛋白基因启动子元件,但由于生物机体的复杂性和多样性,对有效、高水平表达的必要调控元件尚缺乏深入了解,以致多数报道的外源基因表达水平仍然不高[2]。共注射是将不同基因或不同构件同时注射到同一受精卵中而建立转基因动物的方法。1992 年,英国 Clark 等首次创立[3],他们认为不同的基因构件以首尾相连的形式共整合,在某种程度上形成一个相对独立的区域,或形成一个开放的染色体区域,这些都将有利于提高外源基因的表达水平。

组织纤溶酶原激活剂(tPA)是一种较理想的溶血栓药物,为探索用转基因动物乳腺生产 LAtPA (Longer acting tissue plasminogen activator,LAtPA)的可能性,在此之前我们曾建立了羊 β-乳球蛋白(BLG)基因启动子调控的乳腺定位表达长效 tPA 突变体的转基因小鼠,并在阳性母鼠乳汁检测到有溶纤活性的 LAtPA,但是表达水平较低,为 1~2μg/mL[4]。为进一步提高 LAtPA 在转基因鼠乳汁中的表达水平,我们将 BLG-LAtPA 和鼠乳清酸蛋白(Whey acid protein,WAP)基因进行共注射,在获得的 BLG-LAtPA 和 WAP 共整合的转基因鼠乳汁中,LAtPA 表达水平有了显著提高,达到 10μg/mL。

1 材料和方法

1.1 质粒与菌种

羊 β-乳球蛋白(BLG)基因调控的 LAtPA 表达载体 pBLG-LAtPA 为本室构建、保存;pWA 质粒包含鼠乳清酸蛋白(WAP)基因组 DNA 及其 5′和 3′端的调控序列,为本室保存[5]。

1.2 限制酶及主要化学试剂

限制酶等均购于中国华美生物工程公司及 Promega 公司。

化学试剂:60%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;其它葡萄糖、氯化钙等均为国产分析纯试剂。

孕马血清促性腺激素(PMSG)购于天津实验动物中心;人绒毛膜促性腺激素(HCG)购自上海生物制药厂;846 麻醉剂购于中国人民解放军农牧大学兽医研究所。

收稿日期:2000-06-27,修回日期:2000-10-13。
基金项目:国家高技术研究发展与计划项目资助(Z21-03-01)。
* 课题负责人及通讯作者。Tel:86-10-66948801;Fax:86-10-63833521;E-mail:Huangpt@nic.bmi.ac.cn

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

M2 及 M16 培养液的配制，按文献[6]。

1.3　实验动物

昆明白小鼠由本院实验动物中心提供。

1.4　方法

1.4.1　羊 BLG 基因 5′端扩增引物由本所合成：

引物 1：5′TGCATGCGCCTGCTGTATAA 3′

引物 2：5′CGAGCTGCAGCTGGGGTCGTG 3′

PCR 扩增的循环条件为：94℃ 变性 30s，61℃ 退火 15s，72℃ 30s。

1.4.2　质粒 DNA 的提取，感受态细胞的制备， DNA 的连接、转化，DNA 片段的回收，按照‘分子克隆实验手册’进行[7]。

1.4.3　受精卵的显微注射和移植： 持卵器拉成 80～150μm 直径的细管，烤平断口；用拉针仪拉成针尖约 1μm 直径的注射针。在凹玻片上各滴上 M2 培养液和 DNA 注射液，石蜡油覆盖。低倍镜下将注射针吸入适量的 DNA 注射液，受精卵注入 M2 液滴中。高倍镜下，注射针针尖刺入受精卵雄原核中，将 DNA 液注入约 1pL，可见雄原核膨胀，迅速抽出注射针，卵注射完毕后，立即将卵转移至 M16 培养基中，CO_2 孵箱培养 30min。将受精卵从 M16 培养液移至 M2 培养液中，再吸入移卵管中，在解剖镜下找到输卵管伞开口，将移卵管插入伞部后将卵吹入，手术完毕后缝合切口。

1.4.5　鼠尾 DNA 的提取： 仔鼠出生 10～15d，即可用于提取 DNA。按照分子克隆手册进行。

1.4.6　Southern 杂交鉴定转基因阳性鼠： 鼠尾 DNA 用 *Kpn* Ⅰ/*Bgl* Ⅱ 双酶切过夜，Southern 转印按分子克隆手册操作，杂交、洗膜温度 65℃。BLG 5′端探针用 α-^{32}PdCTP 标记。

1.4.7　阳性鼠乳汁中 tPA 活性测定： 采取母鼠乳汁，用双蒸水 10 倍稀释，离心去乳脂，采用纤维蛋白-琼脂糖-平板法测定 tPA 溶纤活性。

2　结　果

2.1　显微注射获得转基因鼠

LAtPA 表达载体 pBLG-LAtPA 用 *Mlu* Ⅰ 酶切，低熔点琼脂糖回收 10.5kb 目的片段，透析纯化稀释到 4～5μg/mL；pWAP 采用 *Eco*R Ⅰ 酶切回收 7.5kb 目的片段，纯化后稀释到 4～5μg/mL（图 1）。将上述经过处理的 BLG-LAtPA 融合基因和 WAP 基因等体积混合，经显微注射导入小鼠受精卵的雄原核中，再将注射后的受精卵移植入受体假孕母鼠的输卵管伞部，最后发育成个体，先后注射 1105 余枚受精卵，将培养存活的 809 枚卵分别移植到 36 只假孕母鼠输卵管，最后获得 61 只仔鼠，显微注射结果见表 1。

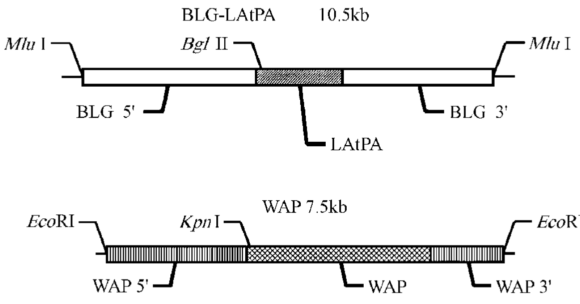

图 1　BLG-LAtPA 和 WAP 结构示意图

Fig. 1　Structures of BLG-LAtPA and WAP

表 1　显微注射结果一览表

Table 1　The results of microinjection

Selected embryos	Injected embryos	Transplanted embryos	Receptor mice	Brith mice	Possitive mice
～3000	1105	809	36	61	3

2.2　转基因鼠的 PCR 筛选和 Southern 印迹鉴定

正常小鼠基因组 DNA 中没有 BLG 基因及其调控序列，采用羊 BLG 基因 5′端引物 PCR 应扩增 240bp 目的条带。最终我们从 61 只仔鼠中获得 3 只 BLG-LAtPA 整合阳性的转基因鼠（图 2）。

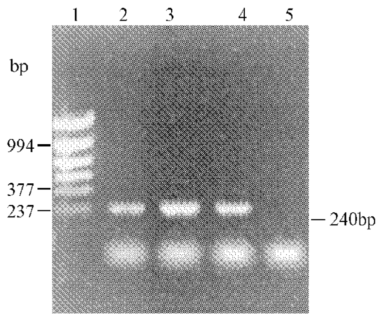

图 2　PCR 检测转基因小鼠

Fig. 2　Identification of the mouse by PCR

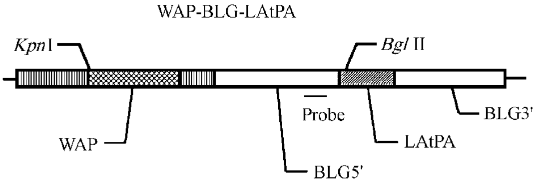

图 3　BLG-LAtPA 和 WAP 共整合示意图（Probe 示意 Southern 探针位置）

Fig. 3　The map of co-integration of BLG-LAtPA and WAP

为进一步鉴定转基因鼠、排除假阳性并确定 WAP 确实和 BLG-LAtPA 发生了共整合，我们进行

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

了 Southern 印迹杂交。如果 WAP 和 BLG-LAtPA 发生了正确的共整合，*Kpn* Ⅰ/*Bgl* Ⅱ 双酶切产生 9kb 条带(参见图 3，WAP 片段用 *Eco*RⅠ/*Kpn* Ⅰ 酶切产生 3kb 和 5kb 片段；BLG-LAtPA 片段用 *Mlu* Ⅰ/*Bgl* Ⅱ 酶切产生 4kb 和 6kb 片段)，我们用 BLG 基因 5′端 PCR 扩增的 240bp 作为探针，α-^{32}P dCTP 标记，对获得的 3 只 PCR 阳性鼠进行杂交(图 4)。结果 3 只小鼠都具有 9kb 目的条带，阴性对照无目的条带，从 Southern 杂交结果还能看出 7kb、10kb 和 12kb 条带，这表明 BLG-LAtPA 和 WAP 都是多拷贝、多方向以串联形式整合到小鼠基因组中，7kb 条带是反向 WAP 和 BLG-LAtPA 串联整合产生的，10kb 和 12kb 条带是两个 BLG-LAtPA 以正、反串联形式整合分别产生的。

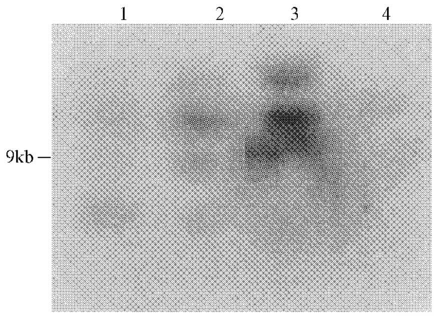

图 4 转基因鼠 Southern 鉴定结果

Fig.4 The result of Southern blot

1. 2 and 3. The positive mouse；

4. BLG-LAtPA as a 10kb marker

2.3 阳性鼠表达产物的检测

BLG-LAtPA 转基因小鼠作为一种乳腺生物反应器模型，外源的目的基因 LAtPA 表达后能分泌到乳汁中，未转基因的正常小鼠乳汁中不含 tPA。3 只阳性鼠中 1 只雄性、2 只雌性，先将阳性雄鼠与阴性雌鼠交配进行传代，在子代中再挑选阳性雌鼠进行传代以获得哺乳期的阳性雌鼠；2 只雌性的转基因阳性小鼠直接与阴性雄鼠交配后进入哺乳期。对哺乳期阳性雌鼠麻醉取乳汁 10μL，10 倍稀释，离心去乳脂，10μL 点样，采用纤维蛋白-琼脂糖-平板法测定 tPA 溶纤活性。有活性的 tPA 能激活纤溶酶原成为纤溶酶，纤溶酶能消化琼脂糖平板上的纤维蛋白，形成透明圆圈，通过对比透明圈的大小可测定 tPA 的活性。3 只阳性鼠乳清中都检测到 tPA 表达，最高达到 10μg/mL(图 5)，这也说明乳腺细胞对目的蛋白的加工正确、生产出具有生物活性的 tPA 产物。

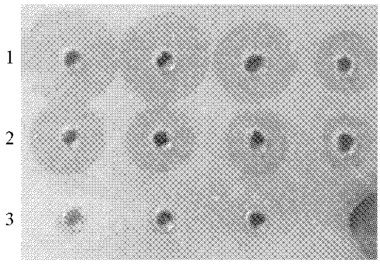

图 5 纤维蛋白-琼脂糖-平板法对 tPA 活性检测

Fig.5 Clot lysis bioassay of secreted LAtPA.

1. recombinant tPA standards；

2. samples from the positive female mouse；

3. negative mouse milk control.

3 讨 论

1987 年，Gordon 等首次利用组织纤溶酶原激活剂与小鼠乳清酸蛋白(WAP)启动子的融合基因，培育出了 37 只转基因鼠，外源性 tPA 在小鼠乳腺中得到表达[8]。我们采用羊 β-乳球蛋白基因(BLG)启动子作为调控元件，同样在小鼠乳腺中获得了具有生物活性的 LAtPA。这说明 WAP 和 BLG 都能有效地指导外源基因在乳腺表达。但我们同时也面临表达水平低下的问题，在目前对有效、高水平表达的必要调控元件尚缺乏深入了解的情况下，结合现有条件，我们考虑到 WAP 和 BLG-LAtPA 的共注射的方法简单易行，不用重新构建新的乳腺表达载体，直接共注射可获得共整合的转基因小鼠，并最终获得较好结果，tPA 表达水平 10μg/mL，较原来的 1～2μg/mL有 5 倍以上的提高。

转基因在宿主细胞内的整合与表达一直是研究的热点问题，尽管这方面的研究仍不断在进行，但迄今为止，有关外源基因整合到染色体的机制并不是很清楚。Brinster 等提出，外源 DNA 整合在染色体 DNA 的断裂处，断裂处随机发生，并且断裂可能是注入的 DNA 分子游离末端诱导的修复酶造成的，外源片段常首尾相连多拷贝整合到断裂位点。有观点认为共注射将不同基因或不同构件同时注射到同一受精卵中，不同的基因构件同样也以首尾相连的形式共整合，在某种程度上形成一个相对独立的区域，或形成一个开放的染色体区域。由于转基因的表达调控高度地受到其整合部位的影响，如果将特定的高表达水平基因与构件共注射，可以协同作用从而营救外源基因，防止整合部位染色体局部功能向邻近结构域蔓延，从而获得高表达[3,9,10]。在本研究中，共注射提高了外源 tPA 的表达水平，也不

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

排除转基因两侧的 WAP 的 5′和 3′侧翼序列中含有的顺式调控元件在转录中起的积极作用，有些顺式作用序列对有效的 RNA 加工和提高其稳定性都是十分重要的[11]。

REFERENCES（参考文献）

[1] Puresl V G，Pinkert C A，Miller K F *et al*. Genetic engineering of livestock. *Sciense*. 1989，**244**：1281～1288

[2] Bawden W S，Passey R J，Mackinly A G. The genes encoding the major specific proteins and their Use in transgenic studies and protein engineering. *Biotech Gen Eng Rev*. 1994，**12**：89～137

[3] Clark A J，Cowper A，Wallace R *et al*. Rescuing transgene expression by co-integration. *Bio/Technology*. 1992，**10**：1450～1454

[4] ZHOU J（周 江），DENG JX（邓继先），LIU H（刘 红）*et al*. Production of longer acting human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk，*Chinese Journal of Biotechnology*（生物工程学报），1998，**14**（4）：372～376

[5] LU YF（卢一凡），DENG JX（邓继先），ZHOU J（周 江）*et al*. Identification of WAP gene control region and It's regulation on LacZ gene expression in mice mammary cells，*Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*（中国生物化学与分子生物学），1998，**14**（2）：128～133

[6] Hogan B，Costantini F，Lacy E. Manipulating the mouse embryo. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1986

[7] Sambrook J，Fritsch E F，Manatis T. Molecular cloning，A laboratory manual，2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989

[8] Gordon K，Lee E，Vitale J A *et al*. Production of human plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio/Technology*. 1987，**5**：1183～1187

[9] Brinster R L，Ritchie K A，Hammer M E *et al*. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*，1985，**82**：4438～4442

[10] Grosveld F，Van Assondelft G B，Greaves D R *et al*. Position-independent high-level expression of human B-globin gene in transgenic mice. *Cell*，1987，**51**：975～985

[11] Stief A，Winter D M，Stratling WFH *et al*. A Nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature*. 1989，**341**：343～345

Co-integration of BLG-LAtPA and WAP Improved the Expression of LAtPA in Transgenic Mouse Milk

ZHOU Jiang　DENG Ji-Xian*　CHENG Xuan　LU Yi-Fan　YANG Xiao　HUANG Pei-Tang*

（*Institute of Beijing Biotechnology*，*Beijing* 100071，*China*）

Abstract　In order to improve the expression of longer acting tissue plasminogen activator in the mammary epithelium of transgenic mice，the fragment of BLG-LAtPA hydrid gene was microinjected into mouse embryos with mice whey acid protein gene. Three mouse were tested as being Co-integration of BLG-LAtPA and WAP transgene by PCR and Southern blot. Milk obtained from lactating females contains biologically active tPA，and the concentration of tPA was calculated to be about 10μg/mL.

Key words　human tissue plasminogen activator，β-lactoglobulin，transgenic mouse，whey acid protein

Received：June 27，2000

This work was supported by Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development（Z21-03-01）.

* Corresponding author. Tel：86-10-66948801；Fax：86-10-63833521；E-mail：Huangpt@nic.bmi.ac.cn

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