

# 转基因小鼠乳腺表达人瘦蛋白的研究

刘建忠<sup>1</sup> 熊远著<sup>1\*</sup> 李 宁<sup>2</sup>

( 华中农业大学农业部猪遗传改良开放实验室 武汉 430070 )

( 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室 北京 100094 )

关键词 转基因小鼠 乳腺 人瘦蛋白

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0090-04

利用转基因动物乳腺生产药用蛋白质是近年来研究的热点,在这方面已有不少成功的例子,展现出良好的应用前景<sup>[1,2]</sup>。本研究选择人瘦蛋白基因作为目标基因是因为其表达产物瘦蛋白能对人体内脂肪的蓄积和能量消耗进行有效的反馈调控,美国科学家已将用 *E. coli* 表达的人瘦蛋白用于人肥胖症的治疗并取得了良好的治疗效果<sup>[3]</sup>,但尚未见到利用转基因动物乳腺表达这种蛋白质的研究报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 试剂和酶类: *Not*I, *Eco*RV Klenow 为 Biolabs 公司产品, T4 DNA ligase 为 MBI 公司产品, *Eco*RI, *Hind*III, 蛋白酶 K 及 RNase 为华美生物工程公司产品, DIG 标记试剂盒为宝灵曼公司产品, Tris 及胚胎培养基成分均为 Sigma 公司产品, DNA 测序反应试剂盒为 PE 公司产品, 其它生化试剂多为国产分析纯产品。

1.1.2 质粒及菌株: 质粒 pBluescript( 克隆有人瘦蛋白基因 cDNA ), 质粒 pR( 克隆有兔乳清酸性蛋白基因终止子 ), 质粒 p2( 克隆有兔乳清酸性蛋白基因启动子及其远端上游区以及第一外显子的部分 ) 由法国科学家 Thepot 等惠赠, 宿主菌 DH5 $\alpha$  由中国农业大学农业生物技术国家重点实验室提供。

1.1.3 转基因 TE: 10mmol/L Tris·Cl( pH7.4 ) 0.1mmol/L EDTA, 用 Milli-Q 水配制。

1.1.4 实验动物: 昆明小白鼠购自国家计划生育研究所动物部。

### 1.2 试验方法

1.2.1 DNA 测序反应 参照 PE 公司 DNA 测序试剂盒说明书。

1.2.2 注射用 DNA 溶液的制备: 用 *Not*I 消化表达载体, 回收 7.5kb 片段, 溶于 TE, 调整 DNA 浓度为 2 $\mu$ g/mL, 每 mL 溶液中 DNA 的拷贝数约为 2.4 $\times 10^{11}$ 。

1.2.3 显微注射: 参照文献 [4], 每一枚原核期小鼠胚胎雄原核内注射 1~2pL。

1.2.4 小鼠尾组织 DNA 的提取: 四周龄时剪小鼠尾尖, 按常规方法提取尾组织 DNA。

1.2.5 探针的获得及其标记: 用 *Eco*RI 消化质粒 pBluescript 并回收 1.0kb 的人瘦蛋白基因 cDNA 作探针, 标记方法参照 DIG 说明书。

1.2.6 组织 DNA 的消化及 Southern 杂交: 用 *Eco*RI 完全消化 10~15 $\mu$ g 小鼠尾组织 DNA, 用于转膜及 Southern 杂交。

1.2.7 小鼠乳汁的获取: 将母鼠与仔鼠隔离 3h 以上, 腹腔注射 0.3IU 的缩宫素, 10min 之后腹腔注射 10% 巴比妥钠 (0.008mL/g 体重) 麻醉小鼠, 待完全麻醉后, 用食指与中指由乳腺根部向上捋, 反复数次, 然后捋到乳头, 乳汁便顺乳头孔流出, 助手用移液器将乳汁收集至一小离心管, 冻存于 -20 $^{\circ}$ C。

1.2.8 奶蛋白 SDS-PAGE: 参照《生物化学实验技术》<sup>[5]</sup>, 5% 的浓缩胶和 12.5% 的分离胶。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达载体的构建策略

根据质粒载体的酶切图谱及有关文献, 设计构建表达载体的策略, 见图 1。

### 2.2 人瘦蛋白基因( cDNA )序列的测定

本研究所用的人瘦蛋白基因是由国外学者惠赠的, 该片段对我们来说是未知的, 通过 ABI377 DNA 测序仪测定, 其序列见右侧:

测序结果表明, 该序列包含人瘦蛋白基因 cDNA 第一外显子的 9bp, 完整的第二外显子 (172bp) 和部分第三外显子, 包含了人瘦蛋白基因完整的编码序列。

### 2.3 表达载体的物理图谱

表达载体的物理图谱见图 2。

### 2.4 始祖转基因小鼠的检测

经过显微注射后出生的小鼠, 4 周龄时剪耳号剪尾尖, 并用常规方法提取尾组织 DNA。用 *Eco*RI 消化总组织

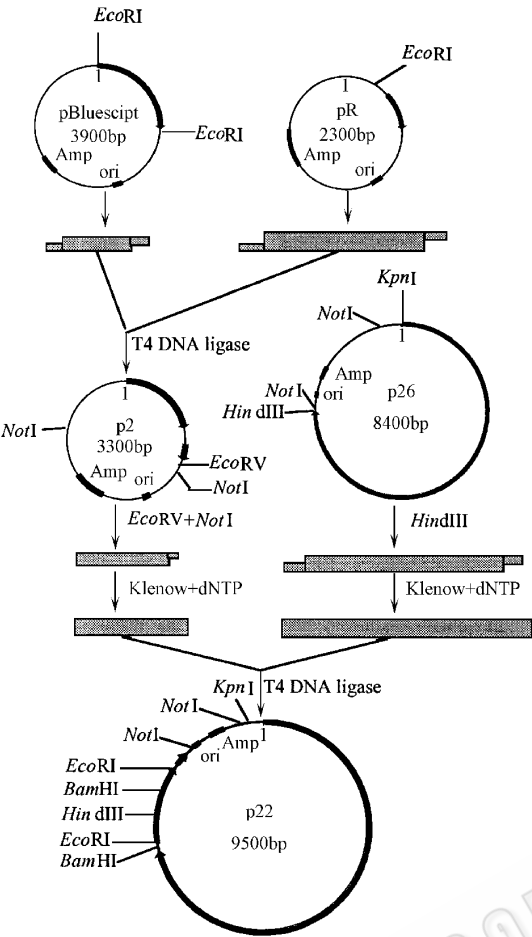


图 1 表达载体的构建策略

Fig. 1 Strategy for the construction of expression vector

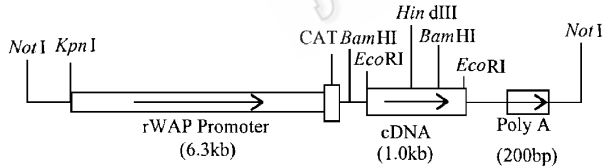


图 2 表达载体的物理图谱

Fig. 2 The physical map of the DNA used for microinjection

DNA 用 DIG 标记的人瘦蛋白基因 cDNA 为探讨,与 48 只小鼠的尾组织 DNA 进行杂交,用于杂交的组织 DNA 的量为 10~15 $\mu$ g,其中 2<sup>#</sup>与 C<sub>3</sub> 2 只小鼠在 1.0kb 处出现明显的杂交带,结果十分稳定。更为幸运的是获得的 2 只转基因小鼠均为母鼠,从而便于直接分析产仔后的乳汁,Southern 杂交结果见图 3。

2.5 人瘦蛋白在转基因小鼠乳腺中的表达

将奶样用水稀释 3 倍后于沸水中煮沸 3~5min,冷却后加入等量的上样缓冲液。5% 的浓缩胶,12.5% 的分离胶。用于 SDS-PAGE 的奶样均为 0.7 $\mu$ L,开始电泳时的电压为 66V,电泳过程中对电压不作任何调整。当溴酚蓝电泳至距凝胶底端 1cm 时终止电泳,取出凝胶经考马斯亮蓝 R<sub>250</sub> 染色、充分脱色后的结果见图 4。

1 ggttgcaag g cccaagaagc ccatactggg aaggaaaatg

第一外显子 (9bp)

翻译起始密码子(ATG)

41 cattggggaa ccctgtgccg attctgtgg ctttggccct  
81 atcttttcta tgtccaagct gtgccatcc aaaaagtcca  
121 agatgacacc aaaacctca tcaagacaat tgcaccagg  
161 atcaatgaca ttacacac gcagtcagtc tctccaac

第二外显子, 10~181(172bp)

201 agaaagtcac cggtttggac ttattctctg ggctccaccc  
241 catctgacc ttatccaaga tggaccagac actggcagtc  
281 taccaacaga tctcaccag tatgccttcc agaaacgtga  
321 tccaatatc caacgacctg gagaacctcc gggatcttct  
361 tcacgtgctg gccttctcta agagctgcca cttgccctgg  
401 gccagtggcc tggagacctt ggacagcctg ggggggtgtcc

蛋白质的编码序列, 38~541, 共计 504bp

441 tggaagcttc aggtactcc acagaggtgg tggccctgag  
481 caggctgcag ggtctctgc aggacatgct gtggcagctg  
521 gacctcagcc ctgggtgctg aggccttgaa ggtcactctt

翻译终止密码子 (TGA)

561 cctgcaagga ctacgttaag ggaaggaact ctggcttcca  
601 ggtatctcca ggattgaaga gcattgcatg gacaccctt  
641 atccaggact ctgtcaattt cctgactcc tctaagccac  
681 tcttccaaag gcataagacc ctaagcctcc ttttcttga  
721 aaccaaagat atatacacag gatcctattc tcaccaggaa  
761 ggggggtccac ccagcaaaga gtggggtgca tctgggatcc  
801 ccaccaaggt ctcagccat caacaagagt tgacttgtcc  
841 cctcttgacc catctcccc tactgaatg cctcaatgtg  
881 accaggggtg atttcagaga gggcagaggg gtaggcagag  
921 cctttggatg accagaacaa ggttcctctt gagaatcttt t

部分第三外显子 (编码序列的部分及部分 3'非翻译区)

以上结果表明,两只转基因小鼠奶样与对照小鼠奶样相比均多出一条带,其分子量约为 16kD,与报道的人瘦蛋白的分子量接近。据此我们初步认为人瘦蛋白基因在获得的 2 只转基因小鼠的乳腺中均得到表达。

3 结论与讨论

乳清酸性蛋白是小鼠、大鼠和兔泌乳期间乳汁中主要的蛋白质,其合成和分泌受糖皮质激素、促乳素以及细胞与细胞之间、细胞与胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)之间互作的调节。免乳清酸性蛋白在所报道的啮齿动物乳汁中是最高的,每 mL 乳汁中乳清酸性蛋白的含量高达 136mg,说明其表达是非常活跃的,用该调控元件可确保该启动子在

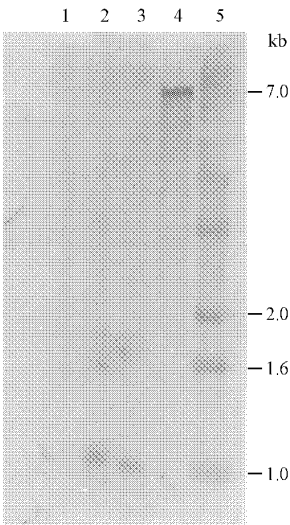


图 3 C<sub>3</sub> 与 2<sup>#</sup> 小鼠与人瘦蛋白基因 cDNA 的 Southern 杂交结果

Fig. 3 The Southern blotting result of C<sub>3</sub> and 2<sup>#</sup> mice with DIG labeled human leptin gene as probe

1. Negative control ; 2. Southern blotting result of C<sub>3</sub> transgenic mouse ;  
3. Southern blotting result of 2<sup>#</sup> transgenic mouse ;  
4. Positive control ; 5. 1kb ladder markers

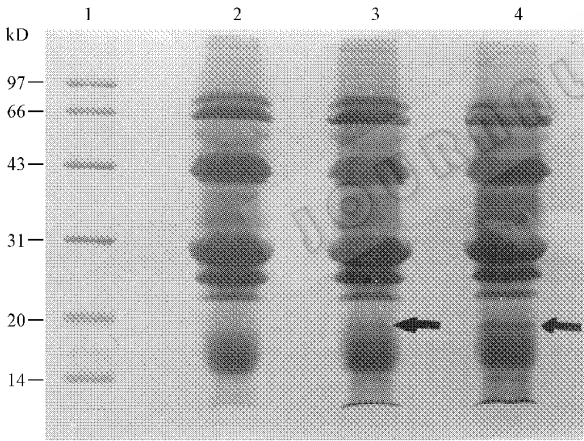


图 4 转基因小鼠奶样的 SDS-PAGE 结果

Fig. 4 The SDS-PAGE results of transgenic mice milk  
(The sample volume of milk for SDS-PAGE was 0.7μL , and the voltage was 66V)

1. Protein molecular weight markers ;  
2. The SDS-PAGE result of the negative control ;  
3. The SDS-PAGE result of 2<sup>#</sup> transgenic mouse ;  
4. The SDS-PAGE result of C<sub>3</sub> transgenic mouse.

转录过程中能被宿主 RNA 聚合酶识别并启动转录 ,其强的终止子可确保 RNA 聚合酶集中力量转录表达基因而不去转录其它无关序列。此外 ,强的终止子所产生的 mRNA 较为稳定 ,便于随后翻译出蛋白质。本研究中所使用的启动子为 -6300bp~ +28bp 的兔乳清酸性蛋白基因上游调控区 ,该基因的翻译起始位点位于 +47bp 处 ,也就是说该序列未包

含兔乳清酸性蛋白翻译的起始密码子 ,序列为 :

```
-81 tgaggcctcg ccaacctggc acccctccag gctcctcctc
ctgctccaac ctttaaatgc atcccggggc cccagaacac
TATA 样 Box
catccgacac ctgcctgctg cccaccac ca gcct (ac
转录起始位点 CAT +28
cacc tgccaccatg cggtgtctca)---(human leptin
翻译起始密码子 ATG
gene) ATG-----TGA----- Poly(A)
翻译起始密码子 ATG 翻译终止密码子 TGA 加尾信号
```

Devinoy 等<sup>[6]</sup>将位于 rWAP 基因第 28 位的 cagcct 序列定点突变为 aagcct 就产生了一个 HindⅢ 的酶切位点 ,这一位点是以 rWAP 基因启动子构建融合表达载体的一个比较理想的酶切位点 ,已有两篇报道<sup>[6,7]</sup>在构建表达载体时使用了该位点并获得了较高的表达效果。以上分析表明我们所构建的融合表达载体具备一个良好表达载体应具备的全部特征 ,整合后可望有良好的表达。奶样的 SDS-PAGE 结果证实我们对表达载体所作的分析是有道理的 ,在本次研究中 ,人瘦蛋白在转基因小鼠乳汁中的含量保守估计为 1~2mg/mL ,依据之一是用考马斯亮蓝 R<sub>250</sub> 染色出现清楚的条带所要求的蛋白质的量至少为 2.5μg<sup>[5]</sup> ,而在实验中奶样的上样量仅为 0.7μL。从 SDS-PAGE 结果我们能够大致看出两只始祖转基因小鼠表达转基因的水平有差别 ,其原因可能与转基因整合的拷贝数有关 ,也可能与转基因在宿主染色体上整合的位置有关。值得一提的是所构建的表达载体在两只始祖转基因小鼠的乳腺中均得到表达 ,而未出现位点效应 ,与 Theopt 等<sup>[7]</sup>人的报道结果一致。在 Theopt 等<sup>[7]</sup>的研究中 ,含该调控序列的 8 只转牛生长激素基因小鼠中牛生长激素基因都得到有效表达 ,表达量最低的为 1mg/mL ,最高的 16mg/mL。这表明由 rWAP 上游序列驱动的下游基因的表达可能不受位点效应的影响。

由于购买不到检测人瘦蛋白的抗体 ,本研究未能完成表达产物的 Western 杂交。值得说明的是本研究很可能是国内外通过转基因动物乳腺表达人瘦蛋白的首例试验。目前我们正通过多种渠道筹措资金 ,希望能进一步完善这项研究 ,并希望最终能将该动物模型应用到转基因大动物上。

REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Christine J W , Katrina E G , Morag R *et al.* Interaction of DNA-binding proteins with a milk protein gene promoter *in vitro* : identification of a mammary gland-specific factor. *Nucleic Acids Research* ,1991 ,**19** 6603~6610  
[ 2 ] Clark A J , Ali S , Archibald A L *et al.* The molecular manipulation of milk composition. *Genome* ,1989 **31** 950~955  
[ 3 ] Jeffrey M F , Jeffrey L H. Leptin and the regulation of body

[ 4 ] Brigid H. Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory manual. New York Cold Spring Laboratory. 1986 2<sup>nd</sup> edition.

[ 5 ] Zhou S W( 周顺伍 ). Laboratory Techniques for Biochemistry( 生物化学实验技术 ). Beijing Beijing Agricultural University Press ( 北京农业大学出版社 ),1991 ,1st edition.

[ 6 ] Devinoy , Malienou-N 'Gassa D , Thepot D *et al.* . Hormone responsive elements within the upstream sequences of the rabbit whey acidic protein ( WAP ) gene direct chloramphenicol acetyl transferase( CAT ) reporter gene expression in transfected rabbit mammary cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* ,1991 , **81** :185~193

[ 7 ] Thepot D , Eve D , Marie-louise *et al.* . Rabbit whey acidic protein gene upstream region controls high-level expression of bovine growth hormone in the mammary gland of transgenic mice. *Molecular Reproduction and Development* . 1995 **42** 261~267

## A Study on the Expression of Human Leptin in the Mammary Glands of Transgenic Mice

LIU Jian-Zhong<sup>1</sup> XIONG Yuan-Zhu<sup>1\*</sup> LI Ning<sup>2</sup>

<sup>1</sup>( Key Lab. for Pig Genetics and Improvement of Chinese Agricultural Ministry , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 ,China )

<sup>2</sup>( National Key Lab. for Agro-biotechnology , China Agricultural University , Beijing 100094 ,China )

**Abstract** Human leptin expressed by *E. coli* had been used to treat human obesity in American and scientists had achieved good effects , the researchers here wanted to know whether human leptin can be expressed in the mammary glands of transgenic animas. In this study , human leptin gene about 1.0kb , the terminator of rabbit whey acid protein gene ( rWAP ) about 0.2kb and the promoter including the distal upstream region and part of the first exon of rWAP gene about 6.3kb were used to construct a expression vector. Before we did the subclonings , the sequences of the human leptin gene were sequenced by ABI377 DNA Sequencer , the results showed that the fragment of human leptin gene included the last nine base pairs of the first exon , the complete sequences of the second exon( 172bp ) and parts of the third exon( including part of the encoding sequences and part of the 3' untranslated region ). The final expression vector was digested with *Not* I and a fragment of 7.5kb was collected and dissolved in TE( 10 mmol/L Tris·Cl pH7.4 0.1mmol/L EDTA ) for later microinjection. The concentration of DNA was about 2μg/mL , the copy number in 1mL was about  $2.4 \times 10^{11}$  , every 1 to 2pL of the prepared DNA solution was microinjected into the mouse embryos at pronucleus stage. After standard microinjection procedures , 48 live mice were obtained. The tails of the mice were cut( about 0.1g ) at four weeks of age , genomic DNA was extracted and digested completely with *Eco*RI , two were confirmed to be transgenic mice( both were female ) by Southern hybridization using DIG labeled human leptin gene as probe , transgenic rate among the mice born was about 4 % ( 2/48 ). The two female transgenic mice( 2<sup>#</sup> and C<sub>3</sub> ) were mated with nontransgenic male mice. The two founder transgenic mice were segregated with their baby mice for at least three hours at the fifth day after parturition and were milked by intraperitoneal injection of 0.3 IU of oxytocin and udder massage. SDS-PAGE was used to analyze whether there were expression of human leptin in the milk of the two founder transgenic mice with the milk of nontransgenic mouse at fifth day after parturition as control. SDS-PAGE results showed that compared with the control there was a new band in both of the founder transgenic mice milk , and its molecular weight was about 16 kD , which was quite similar with that of the human leptin. The researchers estimated that the expression level of this protein in the milk of the transgenic mice was about 1~2mg/mL.

**Key words** transgenic mice , mammary glands , human leptin