

乳腺生物反应器制备中表达载体的发展

陈红星* 杨 晓 黄培堂

(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

摘 要 乳腺生物反应器拥有巨大的开发价值,但开发成功的例子却寥寥可数,主要的原因是外源基因的表达量较低,达不到开发生产的要求。提高外源基因表达量的关键在于乳腺生物反应器表达载体的构建。近年来,这方面的新思路、新方法不断出现,本文对此进行了综述。

关键词 乳腺生物反应器,表达载体

中图分类号 Q789 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)02-0136-04

乳腺生物反应器,或称动物个体乳腺表达系统,将某种具有重要价值的生物活性蛋白的基因导入动物的受精卵中培养出转基因动物,使外源基因在动物的乳腺中高效表达并分泌到乳汁中,再从乳汁中提取目的基因产物。乳腺生物反应器可以看作是一个独立的个体发酵系统,与细胞发酵系统不同,它将整个动物视为一个自动发酵罐,其 pH、温度、离子强度由动物自身控制和平衡,并且这种发酵特性可以遗传,当某一群体都具有这一特性时,就可以大规模生产药用蛋白,因此人们形象地将动物生物反应器称为分子农场。乳腺生物反应器与传统的细菌、细胞发酵系统相比,几乎克服了两者的所有缺点而兼具两者的优点。转基因动物用于生产药用蛋白的产量,据已报道的例子,肺气肿治疗药物 AAT 的表达量高达每升乳汁 35g^[1]。其生产效率远非细胞发酵系统可比。生产的药用蛋白翻译后加工完全,具有高活性、低抗原性的优点。生产相同量药用蛋白的成本仅为细胞发酵系统的千分之一,费用极其低廉。

尽管乳腺生物反应器拥有巨大的开发前景,开发成功的例子却寥寥可数,利用转基因动物乳腺作为生物反应器,虽然已建立了许多模型,但获得高表达的例子却只有鼠和羊乳中表达 α -1-抗胰蛋白酶、鼠乳中表达尿激酶、以及猪乳中表达蛋白质 C 等。许多工作由于目的蛋白的表达量低,以致不具备进一步研发的潜力。

外源基因在动物乳腺中高效表达有两个前提:一是选用的调控成分要能指导目的基因在乳腺中高效、特异地表达,并且表达产物能分泌到乳汁中。乳汁中含有大量的蛋白质,理论上认为乳蛋白在乳腺中特异、高效表达并能随乳汁分泌到体外是由其特异的表达调控序列控制,因此乳蛋白基因及表达调控序列的研究成为热点。二是整合到动物染色体组

中的表达载体(调控序列+外源基因)要处于一个开放和活跃转录的状态。有时外源基因插入着丝粒这一类异染色质区时,往往就造成表达载体也处于压缩状态,转录因子根本无法接近。即使调控序列有效,外源基因也无法表达。这种现象叫作位点效应,即转基因动物基因组中表达载体插入位点的邻近序列对外源基因表达的影响。以上的两个前提都归结到表达载体如何构建,下面就表达载体构建的一些进展综述如下:

1 基于普通质粒的表达载体

对哺乳动物的染色体结构进行研究发现,哺乳动物染色体由一个个分散的、独立的染色体区域(Domain)组成,区域的两个末端被拴在核基质上,在电镜下可看到环状结构从核基质上伸出^[2]。每个区域长约几十到几百 kb,它是一个独立的结构和功能单位,区域内含有单个或多个转录单元,包括调控基因表达的所有调控成分,乳蛋白基因也以独立区域的形式存在于染色体上。对乳蛋白区域进行研究发现其中有一些重要的调控元件,这些元件可人为地分为 3 类:一类是调控基因转录的元件,包括:

启动子 乳蛋白的启动子一般位于离转录起始点数百 bp 的 5'侧翼区。

增强子 增强子在乳蛋白基因的 5'和 3'端甚至基因内都有可能,大多数情况下,增强子位于转录起始点数百 bp 的 5'侧翼区,在有些情况下可远至 10kb,如 WAP 的增强子位于 -700 ~ -800bp,牛 β -酪蛋白基因的增强子位于 -200bp 及 -1500 ~ -1600bp 处^[3]。

激素应答区 乳蛋白的表达受催乳素、胰岛素、糖皮质激素及细胞间质的诱导,一般的途径为:激素诱导→转录因子

收稿日期 2001-08-13,修回日期 2001-12-18。

基金项目 国家 863 高技术研究发展计划(No. Z21-03-01)项目资助。

* 通讯作者。 Tel 86-10-66948884, Fax 86-10-63833521, E-mail lszxz@263.net

结合到位点上→染色体结构改变→乳蛋白基因表达。糖皮质激素入胞后与受体结合并进入核内,再与乳蛋白基因上的糖皮质激素受体结合区结合,而催乳素入胞后引起 STAT5 的酪氨酸磷酸化,酪氨酸磷酸化的 STAT5 再与乳蛋白上的结合位点结合。对于乳清酸蛋白基因来说,糖皮质激素受体结合区(GRE)位于-720~-830bp处,而 STAT5 结合位点则位于转录起始点附近。糖皮质激素受体及 STAT5 与另外一些转录因子如 NF- κ B、YY1、C/EBP 相互作用控制着乳蛋白基因的开放与关闭。

第二类元件具有染色体变构和开放的功能,这类元件能使区域处于开放和活跃转录的状态,也即这些元件具有对抗位点效应的能力。这类元件主要有:

位点控制区(LCR):位点控制区是位于5'远端的调控序列,是大区域的 DNaseI 高敏区,位点控制区最初发现于 β -球蛋白中,推测乳蛋白中也有,对乳蛋白的位点控制区的搜寻正在进行中。目前对位点控制区的作用机制有一些推测,认为:位点控制区内包括有多个 DNaseI 高敏区,各个高敏区与其反式因子结合成一个单元,各个单元相互作用成一个整体,再对启动子复合物起作用,它具有染色体变构和开放功能,用于转基因载体的构建时,它可对同源或异源的启动子起作用,使转基因表达呈位点非依赖性,一般认为它具有增强子和绝缘子的双重功效^[4]。

核基质黏附区:多数核基质黏附区位于区域的两端,推测它可能与区域的独立性有关,即可能起到绝缘子的作用。研究表明,核基质黏附区具有染色体变构和开放功能。另外,核基质黏附区具有转录增强活性。它具有把区域拴在核基质上的功能,核基质内富含 RNA 聚合酶等转录因子,而核基质黏附区又具有这些转录因子的结合位点,这样就形成了一个发起转录的良好环境。可能正是由于它的转录增强功能和染色体变构和开放功能,使它成为对抗位点效应的一个有用元件^[5]。

第三类是与转录后翻译有关的元件,包括:

5'和3'非翻译区:乳蛋白的5'和3'非翻译区对于 mRNA 的加工、稳定性、翻译效率都有影响,如 β -酪蛋白的5'非翻译区能增强报告基因的表达^[6]。

PolyA 位点:决定 mRNA 的转运、稳定性。

构建表达载体时使用的外源基因的类型一般有:cDNA;基因组 DNA;微小基因。外源编码蛋白基因类型对基因的表达水平有较大的影响。分析现有的文献,使用基因组 DNA,其表达效果要比使用 cDNA 好,内含子对高水平表达是一个重要的条件。Palmiter 等采用鼠金属硫蛋白基因启动子与鼠生长激素基因构建了一个模型,采用删除内含子的方法,研究内含子对表达水平的影响,发现内含子可增强转基因的表达效率^[7]。这一结果已由众多报道证实。内含子可能通过几种不同的机制来提高表达效率。一是某些内含子包含有增强子或其他顺式调控元件,它们同某些蛋白的结合影响转录的起始和延伸;二是内含子的剪接增加了 mRNA 在核内的稳定性,导致在细胞质中积累更多的成熟 mRNA;另一种可

能性是内含子中含有一些能开放染色体结构的顺式成分。

综上所述,基于普通质粒的表达载体将以上的表达调控元件与外源基因组装在一起。用这类表达载体制备的乳腺生物反应器外源基因有高水平表达的例子,但多数研究结果表达水平只能达到微克级甚至纳克级,说明有必要探索新的表达载体构建方式。

2 基于酵母人工染色体的表达载体

基于普通质粒的表达载体常常将乳蛋白的一些调控元件人为地拼凑在一起,而这些调控元件之间的序列并非毫无作用,并且可能还有一些调控元件未被发现。限于普通质粒的容量有限,不可能将整个区域都克隆进去。为了保持表达调控序列的天然状态,减少人为的组装,就有必要利用整个区域的调控序列来表达外源基因。要克隆整个区域,就需要新的大容量的载体,这就是酵母人工染色体(YAC)。随着脉冲凝胶电泳的发展,使得 YAC 的概念得以成为现实,YAC 由三大要素构成:着丝粒、端粒、复制原点。1983 年将分离出的端粒、着丝粒、复制原点组装并导入酵母细胞,创建了第一个 YAC。随后又加入了筛选标志(neo)和外源片段插入位点。1987 年,Burke 开始用 YAC 克隆大片段人 DNA,它可插入 50~200kb 外源片段,能够包容下整个区域。

YAC 转基因动物的制备一般有两种方法:

ES 细胞转染法:用脂质体将 YAC 转入 ES 细胞,利用 YAC 左臂上的 neo 标记基因来筛选整合有 YAC 的 ES 细胞,再经由囊胚注射形成嵌合体。这种方法的缺点是很难得到完整 YAC 插入的动物,如 Jakobovits 制备的表达人 HPRT 的 YAC 转基因鼠^[8],Choi 制备的表达人免疫球蛋白重链的 YAC 转基因鼠^[9],都是采用 ES 细胞法。

显微注射法:将 YAC 注入受精卵的原核。这种方法相对来说可以得到 YAC 完整插入的转基因动物。但注射时也容易对 YAC 造成剪切,并且 YAC 溶液的粘度过大,注射较困难。这方面的例子有表达人 β -球蛋白和鼠酪氨酸激酶的 YAC 转基因鼠^[10,11]。

根据已有的例子,YAC 转基因鼠表达外源基因一般都能达到内源水平,并且基因的表达保持精确的时空特异性,显示独立转录单位内包括有完整的表达调控因素。近年来对乳蛋白独立转录单位的寻找工作正在进行中,已发现的有长约 210kb 的 α -乳白蛋白的独立转录单位,Fujiwara Y 等将人生长激素基因替代 α -乳白蛋白独立转录单位中的 α -乳白蛋白基因,构建了 YAC 表达载体,建立了转基因大鼠。大鼠乳汁中人生长激素的表达量高达 8.9mg/mL,且人生长激素的表达仅限于乳腺组织中^[12]。这些结果提示基于 YAC、利用整个乳蛋白独立转录单位的调控序列来表达外源基因将是将来的发展方向之一。

3 基于基因敲入的表达载体

随着基因打靶技术的发展,为乳腺生物反应器表达载体的构建提供了新思路,为了克服位点效应的影响,将带启动

- vector for transgenic animal bioreactors. *Mol Reprod Dev* ,1999 ,**52** (4) :414 ~ 420
- [13] Bronson S K , Plaehn E G , Kluckman K D *et al* . Single-copy transgenic mice with chosen-site integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1996 ,**93** (17) :9067 ~ 9072
- [14] Wallace H , Ansell R , Clark J *et al* . Pre-selection of integration sites imparts repeatable transgene expression. *Nucleic Acids Res* ,2000 ,**28** (6) :1455 ~ 1464
- [15] Rucker E B , Piedrahita J A *et al* . Cre-mediated recombination at the murine whey acidic protein (mWAP) locus. *Mol Reprod Dev* ,1997 ,**48** (3) :324 ~ 331
- [16] Kolb A F , Ansell R , McWhir J *et al* . Insertion of a foreign gene into the beta-casein locus by Cre-mediated site-specific recombination. *Gene* ,1999 ,**227** (1) :21 ~ 31

The Progress of Expressing Vector for Mammary Gland Bioreactor

CHEN Hong-Xing* YANG Xiao HUANG Pei-Tang

(*Institute of Biotechnology , Academy of Military Medical Science , Beijing 100071 , China*)

Abstract The mammary gland bioreactor has great commercial value ,but the examples for high level expression of foreign gene were so few that the most examples were not suitable for commercial program. The key resolution for improving the expression level of foreign gene is the construction of expression vector for mammary gland bioreactor. Nearly ,many new ideas and new methods about the construction of expression vector were presented ,the article summarized them.

Key words mammary gland bioreactor , expression vector

Received : 08-13-2001

This work was supported by a grant from the State 863 High Technology R&D Project of China (No. Z21-03-01) .

* Corresponding author. Tel 86-10-66948884 ; Fax 86-10-63833521 ; E-mail : lszxz@263.net

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