

## 牛 $\alpha$ -S1-酪蛋白-乙肝病毒表面抗原融合基因 在转基因羊中的表达

张靖溥 劳为德

(中国科学院发育生物学研究所 北京 100080)

成勇 成国祥 徐少甫

(扬州大学农学院 扬州 225009)

**摘要** 利用 DNA 重组技术, 将牛  $\alpha$ -S1 酪蛋白调控区基因 (16kb 的片段) 与乙肝表面抗原基因拼接, 构建了融合基因表达构件:  $\lambda$ 106。构件经转基因技术转入山羊受精卵。待受精卵发育至成熟个体并分娩、泌乳, ELISA 检测其乳汁中的 HBsAg, 证明所构建的牛  $\alpha$ -S1 酪蛋白基因表达构件是可以在羊乳腺中表达乙肝表面抗原基因, 并将其表达产物分泌到乳汁中。

**关键词** 转基因动物, 牛  $\alpha$ -S1 酪蛋白基因, 乙肝表面抗原基因, 基因表达框架

转基因动物作为一种生物反应器, 在生物技术领域中的应用已日益受到重视。利用动物乳腺做为外源目的基因的表达场所, 其产物的表达除主要依赖于乳汁蛋白调控基因的指导外, 还受到各发育阶段如孕期、哺乳期中各种发育信号的调控, 因此具有组织特异性和发育阶段特异性; 且这种外源基因的表达既不影响动物本身的生长发育, 又便于对表达产物的收集和纯化。Simons JP 等<sup>[1]</sup>于 1987 年首次报道将绵羊  $\beta$ -乳球蛋白基因在小鼠乳腺中表达成功; 之后, 一些具有重要医用或经济价值的蛋白基因如人  $\alpha$ 1 抗胰蛋白酶基因 ( $\alpha$ -AT)<sup>[2,3]</sup>、人组织型纤溶酶原激活因子 (tPA)<sup>[4-7]</sup>、人凝血因子 IX (FIX)<sup>[8]</sup>、人可溶性 CD4<sup>[9]</sup>、人尿激酶<sup>[10]</sup>和人乳铁蛋白<sup>[11]</sup>等分别在小鼠、家兔、羊和牛等哺乳动物乳腺中获得表达; 但在大型家畜乳腺中表达外源基因的报道国内还未曾见。由于酪蛋白是乳腺表达的主要蛋白<sup>[12]</sup>, 利用酪蛋白基因表达框架指导外源基因的表达, 既能保证目的基因特异地在乳腺中表达, 又可在乳汁中获得高产量的目的基因产物。为此, 我们选择了牛  $\alpha$ -S1-酪蛋白 (Bovine  $\alpha$ -S1 casein) 基因及两端侧翼调控序列进行研究。首先得到了含有牛  $\alpha$ -S1 酪蛋白基因转录起始点包括上游 8kb 区域的约 14kb 长的 5'端  $\lambda$ AA1 克隆<sup>[13]</sup>和含有牛  $\alpha$ -S1-酪蛋白基因终止符和 polyA 加成信号的约 14kb 的 3'端  $\lambda$ AZ1 克隆<sup>[14]</sup>; 在此基础上, 以乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 基因为报告基因, 将牛  $\alpha$ -S1-酪蛋白基因表达调控框架与 HBsAg 基因构建在一起, 对牛  $\alpha$ -S1 酪蛋白调控基因

国家“八、五”攻关项目。

参加此项工作的还有张旭晨、王杏龙、孙长美和吴维芬等同志。

本文于 1996 年 4 月 5 日收到。

指导的外源基因在羊乳腺中的表达进行了探索, 本文报道初步的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

基因及其载体: 乙肝病毒 (HBV) 基因组 DNA<sup>[15]</sup>pWR 13-HBV/ayw 由中国科学院上海生物化学研究所李载平教授惠赠; 牛  $\alpha$ -S1-酪蛋白 5' 端基因序列 pAT 153-SB<sub>11</sub> (11kb)<sup>[13]</sup>和牛  $\alpha$ -S1-酪蛋白 3' 端基因序列 pUC19-AZ<sub>8,7</sub> (8.7kb)<sup>[14]</sup>为本室克隆; 质粒 pUC19、pBluescriptKS、pAT 153和 EMBL3 为本室自存; 用 PCR 法在牛  $\alpha$ -S1 酪蛋白第二内含子 3' 端拼接信号后加上含 Bgl II、Xho I 和 BamH I 三个内切酶位点的 500bp PCR 产物 (nt. 2967-3467<sup>[16]</sup>), 克隆, 得 pBluescriptKS-PCR<sub>500</sub>质粒。

菌株: *E. coli* LE392、DH5 $\alpha$ 、JM109 等均为本室自存。

试剂: 随机引物标记试剂盒为 Bio-Rad 公司产品;  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 为 Du Pond 公司产品; T4 DNA 连接酶、限制酶、PCR Kit 为华美生物工程公司产品; 乙肝表面抗原 ELISA 试剂盒为上海实业科华生物技术有限公司产品; HBsAg 标准品: Adr 型血源疫苗为卫生部上海生物制品研究所产品, Adw 型基因重组疫苗为美国 Merck Dohme 公司产品; DEAE-纤维素 DE32 为 Whatman 公司产品。其余化学试剂均为国产分析纯。

实验羊: 扬州白山羊。

### 1.2 方法

1.2.1 基因操作: 质粒和  $\lambda$  噬菌体 DNA 的提取及一般基因操作按照文献 [17] 进行。Southern blot: 以含前 HBsAg 基因 (preS1、preS2) 和主要 HBsAg 基因 (S) 的约 2.3kb HBsAg 基因片段<sup>[15]</sup> (经 BamH I 切为 910、770、590bp 的三片段) 为探针; 用  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 随机引物法标记探针。

PCR: primer3382 为酪蛋白 PCR500 序列 3' 端 19mer<sup>[16]</sup>: 5'-ACATGTGCCTTGTGATATT-3'; primer741 为 HBsAg 基因 741-759nt 序列<sup>[15]</sup>: 5'-CCCAATACCACATCATCC-3', PCR 产物为 1180bp 片段。循环条件: 98 $^{\circ}$ C 10min, 58 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环。

1.2.2 pWR13-HBV/ayw 质粒中的 Sal I 位点的消除和中间质粒的构建: HBsAg 基因 Bgl II-Hind III 片段含有 Sal I 内切酶位点, 为不影响最终构件以 Sal I 位点取出, 应首先消除拼接片段内的 Sal I 位点。利用 Sal I 位点和 Xho I 位点在各自内切酶作用后形成相同的粘性末端, 连接后两位点同时消失的原理, 将 pWR13-HBV/ayw 经 Bgl II 和 Sal I 双酶切得到的 2.3kb 片段与经 Bgl II 和 Xho I 双酶切的 pAT153-SB<sub>11</sub> 含载体部分片段相连接, 由此得到 pAT153-SG-ayw。将已消除 Sal I 位点的 HBsAg 基因片段从 pAT153-SG-ayw 质粒上用 Bgl II 和 Hind III 双酶切出, 插入到 pBluescriptKS-PCR<sub>500</sub>质粒, 得到 pBluescriptKS-PCR<sub>500</sub>-ayw 质粒。

1.2.3 牛  $\alpha$ -S1-酪蛋白表达框架的构建及鉴定: 按构建图 (图 1) 分离有关基因片段, 并进行基因操作。为避免具相同粘端基因片段的混合连接, 将有关片段先分段连接后再合并连接; 经转染、粗筛后, 构件最终由内切酶谱、Southern blot 和 PCR 鉴定。

1.2.4 转基因羊的产生: 将构建到的  $\lambda$ 106 构件经 Sal I 内切酶和碱性磷酸酶处理后,

由电泳分离出完整的表达框架 18.7kb 片段；用 DEAE-纤维柱进一步纯化、定量，作为注射基因。

用性成熟的白山羊分别作为供、受体，由前列腺素 (PGF<sub>22</sub>) 同步发情；供体羊由促卵泡激素 (FSH) 促使超排，于发情时和公羊交配两次并注射促卵泡释放激素 (LRH)；定时回收原核期卵。

将供试基因用 TE 缓冲液 (0.8mmol/L Tris·HCl, 0.25 mmol/L EDTA, pH7.4) 稀释 (DNA 浓度 1 $\mu$ g/ml) 后注入雄原核；移入同步发情受体的输卵管，经妊娠、分娩产出 G<sub>0</sub> 代转基因羊；整合检测阳性的雌羊于性成熟后和正常公羊交配，产羔后取乳汁于 -40 $^{\circ}$ C 冻存，备做 HBsAg 的检测。

**1.2.5 乳汁中 HBsAg 的检测：**用于进行 HBsAg 检测的乳汁在检测前让其自然解冻，并经 11 000 r/min 离心除去上层脂肪；ELISA 法检测 HBsAg，具体操作见试剂盒说明书；取脱脂乳汁进行检测，并同时设阳性 (HBsAg 标准品) 和阴性对照，当样品测定值和阴性对照值之比 (P/N) >2 时，判为阳性。

## 2 结 果

### 2.1 HBV/ayw 基因拼接位点的改造

pWR13-HBV/ayw 质粒经 Bgl II 和 Sal I 双酶切得到的 2.3kb 片段 [含前 HBsAg 基因 (preS1、preS2) 和主要 HBsAg 基因 (S)]，与经 Bgl II 和 Xho I 双酶切的 pAT153-SB<sub>11</sub> 含载体片段相连接，得到 pAT153-SG-ayw 质粒。经内切酶鉴定，Sal I 位点已消除。

为便于 HBsAg 基因读码框在 5' 端酪蛋白分泌肽基因的读码框后面正确衔接并与酪蛋白 3' 端基因拼接，将 HBsAg 基因序列以 Bgl II 和 Hind III 位点插入到质粒 pBluescriptKS-PCR<sub>500</sub> 中，得到的 pBluescriptKS-PCR<sub>500</sub>-ayw 质粒。经酶切鉴定，HBsAg 基因片段已拼入正确位置。

### 2.2 牛 $\alpha$ -S1-酪蛋白表达框架与 HBV/ayw 表面抗原基因的拼接

选择牛  $\alpha$ -S1-酪蛋白基因 5' 端 11.5kb 的片段 [含转录起始点及起始点上游约 8kb、起始点下游约 3.5kb 的基因片段，后者含有酪蛋白的第一外显子 (非翻译区) 和第二外显子 (酪蛋白分泌肽)] 为 5' 端调控区；牛  $\alpha$ -S1 酪蛋白基因 3' 端含有 polyA 加成信号的 4.5kb 基因片段为 3' 端调控区；外源基因 HBsAg 的长度 2.3 kb，按构建路线 (图 1) 和方法进行构建，得到一阳性克隆- $\lambda$ 106 构件。鉴定：用跨酪蛋白基因 5' 端序列和 HBsAg 基因拼接位点的一对引物 P3382 和 P741 作 PCR 鉴定，可得预期产物 1180bp 片段 (图 2, a)；用 BamHI 酶切鉴定可见 910、770、590 和 560bp 四条特征带 (图 2, b)；用 Sal I 酶切可见 18.7kb 的插入片段和 9kb、20kb 两条 EMBL3 臂 (图略)；Southern blot 鉴定，HBsAg 基因被 BamH I 切成的三条带：910、770 和 590bp 均可呈 HBsAg 序列阳性反应 (图 2, c)；证明  $\lambda$ 106 构件拼接正确。

### 2.3 表达检测

ELISA 法检测发现，G<sub>0</sub> 代转基因羊的乳汁样品，HBsAg 阳性率为 44% (7/16 只)；在少数 G<sub>1</sub> 代小羊的唾液和血液也检测到 HBsAg 基因的表达产物，分别为 17%

(6/34) 和 6% (2/34)。对 G0 代转基因羊进行追踪检测，除其中一只因死亡无法追踪外，其余 6 只阳性羊在产第二胎后，所泌乳的乳汁仍为 HBsAg 阳性；而作为对照的 9 只阴性羊，再次检测仍为阴性；提示构建框架已正确表达，且表达性能稳定。

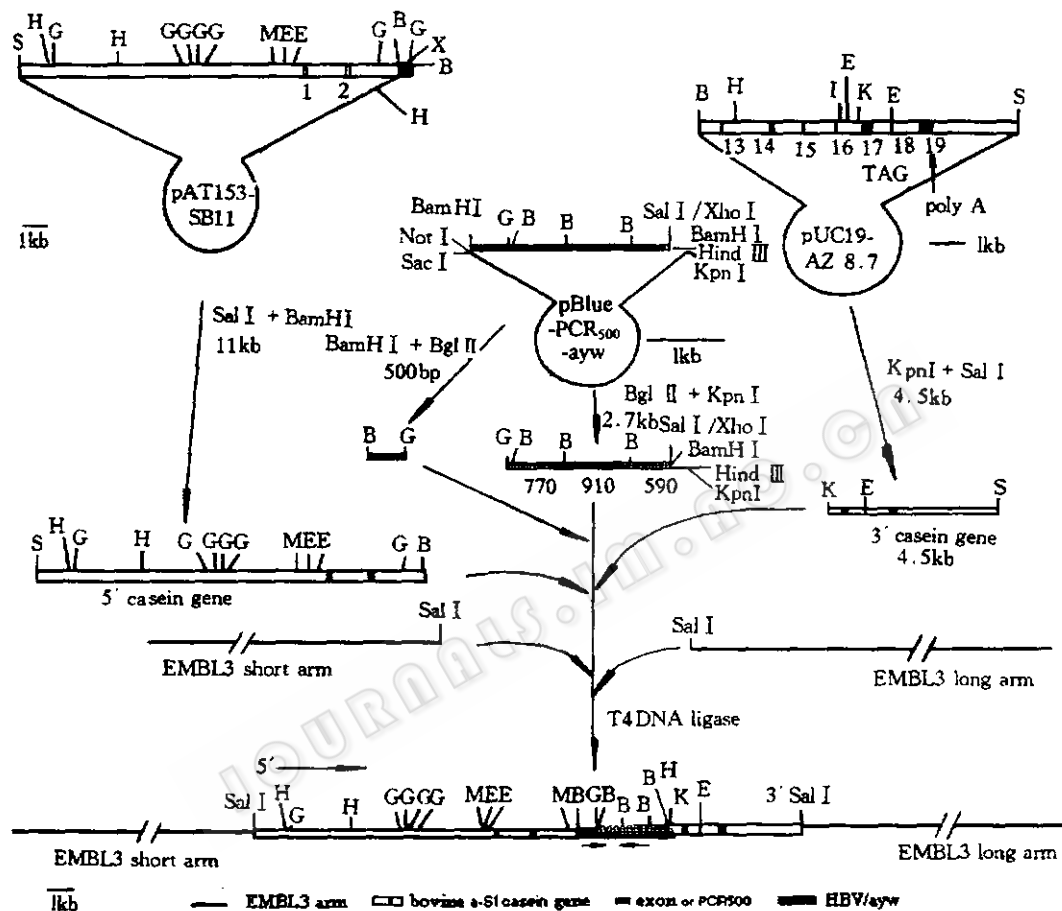


图 1  $\lambda$ 106 构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of gene expression construction for HBsAg gene directed by bovine  $\alpha$ -S1 casein gene:  $\lambda$ 106

S: Sal I H: Hind III G: Bgl II M: Sma I E: EcoR I K: Kpn I

— —: PCR primers p3382 and p741

### 3 讨论

牛  $\alpha$ -S1-酪蛋白基因除两端侧翼区外，由 19 个外显子和 18 个内含子组成<sup>[16]</sup>。我们选择的 5' 端序列包括一些激素结合区、乳汁蛋白结合因子 (MPBF) 结合区、近端启动区、5' 非编码区、信号肽和对表达可能有促进作用的第一、第二内含子<sup>[11, 16]</sup>；为使 HBsAg 基因读码框架与酪蛋白基因的读码框架相吻合并能分泌到乳汁中，在第二内含

子 3' 端用 PCR 定点突变法加上了 Bgl II、Xho I、BamH I 位点, 并根据 HBV/ayw 序列选择 Bgl II 位点进行拼接。3' 端酪蛋白基因调控区选择从第 16 个含子内 Kpn I 位点

起, 至含 polyA 加成信号的 4.5kb 基因片段, 一是为了利用 Kpn I 位点进行拼接; 二是因为 3' 端酪蛋白内含子序列的拼接对外源基因在乳腺中的高效表达可能具有潜在的促进作用<sup>[11,16]</sup>; 其中含有的酪蛋白第 18、第 19 外显子为 3' 端非编码序列, 可能与 mRNA 的稳定性和翻译水平有关<sup>[16]</sup>; 第 17 外显子虽然是编码序列<sup>[16]</sup>, 但插入的 HBsAg 基因本身含有终止符和 poly A 信号, 故第 17 外显子不会影响 HBsAg mRNA 的翻译。插入的 HBsAg 基因包括前 HBsAg 基因 (preS1 和 PreS2) 和主要 HBsAg 基因以及病毒本身的终止密码子和 polyA 加成信号, 防止酪蛋白 3' 端编码序列对 HBsAg 翻译的干扰。

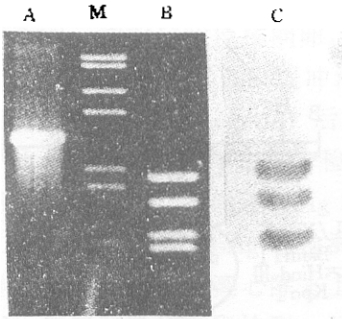


图 2  $\lambda 106$  基因构件的鉴定

Fig. 2 Identification for the gene construct of  $\lambda 106$

A. PCR result of  $\lambda 106$  construct on 0.7% agarose gel.

The primers are p3382 and p741.  $\lambda 106$  PCR product is 1180bp.

M: DNA marker,  $\lambda$ /EcoR I + Hind III

B.  $\lambda 106$  DNA cut by BamH I Shows the specific bands: 910、770、590 and 560bp.

C. Southern blot result. Probe: HBsAg gene was labelled with random primer-sand  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP. HBsAg bands of 910、700、590bp for m  $\lambda 106$  were hybridized.

实验结果显示, 牛  $\alpha s1$  酪蛋白乳腺表达框架- $\lambda 106$  构件是可以表达预期产物的。关于表达特异性问题, 虽然表达产物主要发现在乳汁中, 但在 G1 代个别唾液和血液样品中也可少量检出, 这与一些文献报道<sup>[3,6,18,19]</sup>相似: 在乳腺表达构件的转基因动物中, 产物除主要在乳腺表达外, 在舌、唾液、肾、脑、皮肤、血清等组织中也有低水平表达。其原因可能是在转基因过程中, 外源基因引入受精卵后, 发生的随机整合带来的位置效应所致。

转基因构件的特异表达有赖于构件在受体染色体上的整合位点和调控元件的完善。酪蛋白基因序列是成簇存在的, 其在染色体上的跨度约 200kb, 且调控机制相当复杂<sup>[16]</sup>。我们的表达框架和目前文献中提到的表达构件一样, 都只能是含有指导外源基因特异表达的必要序列和部份促进特异表达的基因序列。完善基因表达框架和降低随机整合影响的研究目前仍在进行, 但牛  $\alpha s1$  酪蛋白乳腺表达框架的成功构建与在转基因山羊乳腺的成功表达, 预示我国的乳腺生物反应器研究已取得可喜的进步, 并为进入实用化阶段打下了良好的基础。

## 参 考 文 献

- [1] Simons J P, McClenaghan M, Clark A J. Nature, 1987, 328: 530~532.
- [2] Wright G, Carver A, Cottom D *et al.* Bio/Technology, 1991, 9: 830~834.
- [3] Archibald A L, McClenaghan M, Hornsey V *et al.* PNAS, 1990, 87: 5178~5182.
- [4] Gordon K, Lee E, Vitale J A *et al.* Bio/Technology, 1987, 5: 1183~1187.
- [5] Ebert K M, Selgrath J P, DiTullio P *et al.* Bio/Technology, 1991, 9: 835~838.
- [6] Pittus C W, Hennighausen L, Lee E *et al.* PNAS, 1988, 85: 5874~5878.

- [7] Ebert K M, Ditullio P, Barry C A *et al.* *Bio/Technology*, 1994, **12**: 699~702.
- [8] Clark A J, Bessosh H, Bishop J O *et al.* *Bio/Technology*, 1989, **7**: 487~492.
- [9] Yu S H, Deen K C, Lee E *et al.* *Mol Biol Med*, 1989, **6**: 255~261.
- [10] Meade H, Gates L, Lacy E *et al.* *Bio/Technology*, 1990, **8**: 443~446.
- [11] Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone W *et al.* *Bio/Technology*, 1991, **9**: 844~847.
- [12] Jeness R, *J Dairy Res*, 1979, **46**: 197.
- [13] 陈瑞环, 汪波, 张玉芝等. *生物工程学报*, 1992, **8** (3): 281~226.
- [14] 陈瑞环, 汪波, 张玉芝等. *生物工程学报*, 1992, **8** (4): 324~333.
- [15] Ono Y, Onda H, Sasada R *et al.* *Nuc Acids Res*, 1983, **11**: 1747~1757.
- [16] Koczan D, Hobom G, Seyfert H M *et al.* *Nuc Acids Res*, 1991, **19**: 5591~5596.
- [17] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [18] Lee L Y, Rosen J M. *Mol Endocrinol*, 1988, **2**: 431~443.
- [19] Roberts B, DiTullio P, Vitale J *et al.* *Gene*, 1992, **121**: 255~262.

## Expressive Construction of HBsAg Gene Directed by Bovine $\alpha$ -S1 Casein Control Sequence in Transgenic Goats

Zhang Jingpu Lao Weide

(*Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Cheng Yong Cheng Guoxiang Xu Shaofu

(*Agriculture College, YANGZHOU University, Yangzhou 225009*)

**Abstract** An expressive construct of hepatitis B surface antigen gene,  $\lambda$ 106, directed by bovine  $\alpha$ -S1 casein control sequence (16kb fragment) was constructed successfully, using DNA recombination technique. The gene construct was induced into goat fertilized eggs with transgene technique. The product of the HBsAg expression in milk in G0 transgene goats was assayed with ELISA. The results show that the expression construct  $\lambda$ 106 is available.

**Key words** Transgenic animal, bovine  $\alpha$ -S1 casein gene, hepatitis B virus surface antigen (HBsAg), gene expression construct