

人凝血 IX 因子基因乳腺组织特异性表达载体的构建 及其在奶山羊乳腺中的分泌性表达

张克忠 卢大儒 邱信芳

(复旦大学遗传学研究所 上海 200433)

黄英 黄淑贞

(上海市儿童医院医学遗传研究所 上海 200040)

血友病 B(Hemophilia B)是由于人凝血 IX 因子(hFIX)缺乏所致的一种严重出血性疾病,常规治疗方法是通过输血或输入人浓缩凝血 IX 因子来实现的,因此患者很容易被肝炎病毒甚至爱滋病毒感染。近年来,人们期望通过转基因动物乳腺表达并从乳汁中分离生产 hFIX 蛋白,以解除血友病患者的痛苦。以转基因动物的乳腺组织即乳腺生物反应器生产外源蛋白具有原核生物、酵母以及离体真核细胞生产系统所不具备的优点:生产的外源蛋白经过体内加工和修饰,特别是真核蛋白的转译后加工(如糖基化和羧基化),其生化特性、生物学活性与天然蛋白完全相同^[1];另外从乳汁中生产外源蛋白不需要复杂的工厂设备。因此开展人凝血 IX 因子乳腺生物反应器的研究具有重要的经济意义和临床应用价值。

转基因动物乳腺生物反应器的关键在于外源基因乳腺组织特异性表达载体的构建。我们利用小鼠 MAR 元件(Matrix attachment regions),牛的 β -casein 基因调控顺序, hFIX mini-gene 和 hFIX cDNA 分别构建成两种乳腺组织特异性表达载体 pMCIXm 和 pMCIX,经 SA 脂质体包埋载体 DNA 后直接转染奶山羊乳腺小叶, hFIX 蛋白在奶山羊乳汁中获得瞬间分泌性表达,最高表达量为 13.7ng/ml 乳汁。其中含 hFIX mini-gene 的表达载体在奶山羊乳汁中的表达量高于含 hFIX cDNA 的表达载体,表明 hFIX 的 intron1 能够提高该基因在活体奶山羊乳腺中的表达。A7 单抗和柠檬酸钼吸附检测表明乳汁中的 hFIX 蛋白羧基化和活性比率都在 90% 以上。以上结果肯定了载体构建的正确性,不但为研制 hFIX 蛋白乳腺生物反应器提供了有效的表达载体,同时也表明利用阳离子 SA 脂质体包埋质粒 DNA 直接转染活体动物乳腺可以作为验证乳腺表达载体构建正确性的快速检测手段。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 本研究的各种酶类均为美国 New England Biolabs 公司的产品;SA 脂质体由中国科学院上海生物化学研究所林其谁教授实验室提供;鼠抗人 IX 因子单克隆抗体 3A6 由日本奈良医学院 Yoshioka 博士赠送;鼠抗人 IX 因子单克隆抗体 A-7 由美国新墨西哥医学院 Smith 教授赠送;兔抗人 IX 因子抗血清以及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗血清购自美国 Calbiochem-Boehring 公司;IX 因子基质血浆由上海瑞金医院血液研究所提供;西北种莎能(Gessenay)奶山羊由上海医学遗传研究所奉高新技术动物试验场提供。

1.1.2 质粒 pBSMC 和 pBluescriptII KS(-)由复旦大学生物化学系黄伟达教授提供;质粒 pKG5IX 由英

国家高技术研究项目(编号 863-101-05-04-01)和上海市科委科技攻关项目(编号 955419001)资助课题。

本文于 1996 年 11 月 1 日收到。

国牛津大学 Browlee 教授赠送;质粒 pKG5i'IX 和 pCMVIX 由本室构建^[2,3]。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建:质粒 DNA 提取,酶切,连接细菌转化等基因工程操作技术均按 Sambrook 等的方法^[4]。

1.2.2 奶山羊的乳腺组织的转染:①挑选体重、年龄相同的奶山羊用于转染实验。1mg 纯化载体 DNA 和 SA 脂质体按 1:5 的比例混合,混合时将水溶的 DNA 慢慢加入脂质体中,室温放置 30min,使溶液呈雾状。将奶山羊乳房中乳汁排空,10ml 静脉穿刺导管吸取脂质体包埋复合物直接转染右乳房乳腺小叶,左乳房作为对照。处理结束后封闭乳头,并将奶山羊隔离。24h 以后重复转染一次。②两次转染处理后 12h 开始取奶,每天早、晚各一次。奶样放置 -70℃ 保存备测。

1.2.3 酶联免疫吸附分析法(ELISA)测定乳汁中凝血 IX 因子蛋白含量,方法参阅文献^[5]。

1.2.4 A7 单抗及柠檬酸钼吸附法检测活性 IX 因子,参阅文献^[6]。由于乳汁中 hFIX 蛋白的含量比较低,我们将乳汁中的 hFIX 蛋白浓缩后再用来检测活性 IX 因子的含量。

2 结果

2.1 乳腺组织特异性表达载体 pMCIXm 和 pMCIX 的构建

质粒 pKG5i'IX 经 BamHI 和 HindIII 部分酶切得到 2.4kb 的片段,该片段为 hFIX 小基因,其中包括 800bp 经过改造的 intron1 顺序和 HFIX 蛋白的信号肽顺序,通过克隆载体 pSK(-)的多克隆位点将该片段两端酶切位点改变为 SpeI 和 HindIII;质粒 pBSMC 经 SacI 和 SpeI 双酶切得到 2.6kb 的片段,其中包括 MAR 元件,牛 β -casein 基因启动子及其上游调控顺序,外显子 1;质粒 pCMVIX 经 SacI 和 HindIII 双酶切得到 3.6kb 的载体框架,其中包括 0.7kb SV40 的 PolyA 顺序;以上三片段连接得到含有 MAR 元件, β -casein 调控顺序,hFIX 小基因的表达载体 pMCIXm(见图 1)。

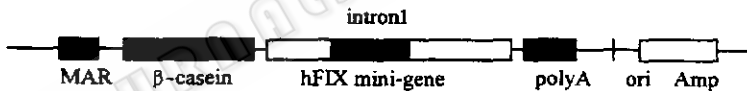


图 1 质粒载体 pMCIXm 结构简图

质粒 pKG5IX 经 BamHI 和 HindIII 双酶切得到 1.58kb 的片段,该片段为 hFIX cDNA,其中包括信号肽顺序。按照上面相同思路构建含有 MAR 元件, β -casein 调控顺序,hFIX cDNA 的表达载体 pMCIX(见图 2)。

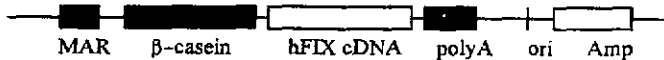


图 2 质粒载体 pMCIX 结构简图

2.2 hFIX 蛋白在羊奶中的分泌性表达

乳腺组织特异性表达载体 pMCIXm 和 pMCIX 经 SA 脂质体包埋后,分别直接转染奶山羊乳腺组织。以鼠抗人 IX 因子单克隆抗体 3A6 为一抗进行酶联免疫试验(ELISA)测定乳汁中 hFIX 蛋白的含量。转染处理后 12h hFIX 蛋白在 6 头供试奶山羊乳汁中均测得表达。取早晚两次奶样中 hFIX 蛋白表达水平的平均值作为每一天的表达水平,做成 hFIX 蛋白在乳汁中的表达曲线(图 3,图 4)。

从图 3 中可以看出,pMCIXm 载体转染奶山羊右乳房乳腺组织后第 3 天 hFIX 蛋白在乳汁中的表达水平达到最高,为 13.7ng/ml 乳汁。以后表达水平逐渐下降,可能是由于被转化乳腺细胞的代谢死亡以及奶山羊自身的免疫系统对外源蛋白产生免疫反应造成的。两周后乳汁中基本上测不到 hFIX 蛋白的表达。而对照(左乳房)奶样中人 IX 因子含量始终为 0。图 4 显示,pMCIX 载体转染乳腺组织后,第 2

天表达水平达到最高值,为 7.9ng/ml 乳汁,从第 12 天乳汁中测不到 hFIX 蛋白的表达。

2.3 乳汁中活性 hFIX 蛋白的检测

含 hFIX 蛋白的奶山羊乳汁上清经浓缩处理后,利用鼠抗人单克隆抗体 A7 的免疫反应对 hFIX 蛋白的羧基化比率进行检测,用柠檬酸钡吸附法对乳汁中活性 IX 因子蛋白的比率进行测定,结果见表 1。

表 1 奶山羊乳汁中人 IX 因子蛋白活性检测

Goat No.	Plasmid used in transfection	Concentration of hFIX /ng·ml ⁻¹	γ-glycoylation of hFIX /%	Biological activity of hFIX/%
G1	pMCIXm	13.7	92.1	90.3
G2	pMCIXm	9.0	90.4	88.3
G3	pMCIX	7.9	91.3	90.2
G4	pMCIX	7.2	90.1	89.7

从上表中可以看出,A7 法检测表明奶山羊乳汁中的 hFIX 蛋白有 90% 以上已经羧基化,柠檬酸钡吸附法测定乳汁中分泌表达的活性 hFIX 蛋白的比率平均值也在 90% 以上。

3 讨论

Lee K. F. 等人曾用大鼠 β-酪蛋白基因指导 CAT 基因在转基因小鼠乳腺中表达^[7]。实验结果表明外显子 1,部分内含子 1 和至少 0.5kb 的 5'端基因上游区即可指导 CAT 基因在乳腺中表达。本实验采用牛 β-酪蛋白(β-casein)基因 5'端包括启动子及其上游调控顺序,外显子 1 共 2.0kb 分别指导 hFIX minigene 和 cDNA 在活体奶山羊乳汁中获得表达,这说明 5'端 2.0kb 的调控顺序对于指导异源基因实现乳腺组织分泌性表达是充分的。另外从转染后 hFIX 蛋白在乳汁中的分泌表达曲线来看,含有 hFIX minigene 的表达载体中 IX 因子的表达水平明显高于含有 cDNA 的表达载体,而两个表达载体的区别在于 hFIX minigene 中含有经过改造的 intron1,这表明 intron1 的存在对于 hFIX 基因在活体乳腺组织中的分泌表达有着增强作用。

人凝血 IX 因子属维生素 K 依赖型,在翻译后需经一系列的维生素 K 依赖的修饰过程使其氨基末端的 12 个氨基酸残基在羧化酶作用下变成 γ-羧基氨基酸,羧基化的谷氨酸残基结合 Ca²⁺,才能产生有活性的 IX 因子^[8]。A7 是一种针对人凝血 IX 因子 γ-羧基化位点的一种鼠抗人单克隆抗体,是金属离子依赖性,故可用 A7 检测 IX 因子的羧基化。人的活性 IX 因子有一个特性,即能够吸附于柠檬酸钡的表面。柠檬酸钡吸附法就是利用这一特性将活性和非活性 IX 因子分开,然后用 ELISA 分别测定两者的 IX 因子蛋白的含量,得到活性 IX 因子的比率。本实验通过 A7 的免疫反应肯定了乳汁中 IX 因子的羧基化,柠檬酸钡吸附法进一步确证了乳汁中人活性凝血 IX 因子的存在。乳汁中测得的人凝血 IX 因子的活性比率在 90% 以上,这说明 hFIX 小基因和 cDNA 在活体奶山羊乳腺组织表达后,经过转译后加工-γ-羧基化能以较高比率生产活性 IX 因子蛋白。

SA 脂质体包埋表达载体后直接转染乳腺组织,然后检测乳汁中目的蛋白的表达,这一系统的建立

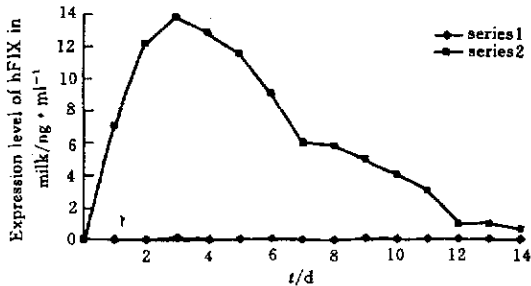


图 3 质粒 pMCIXm 转染后 hFIX 蛋白在乳汁中的分泌表达曲线 series1:对照组; series2:处理组

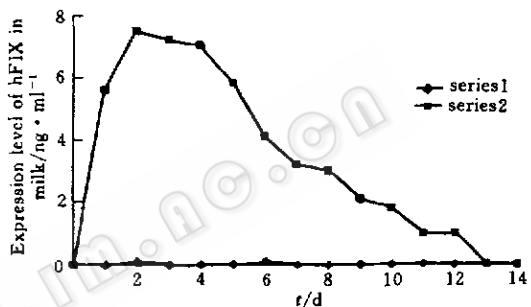


图 4 质粒 pMCIXm 转染后 hFIX 蛋白在乳汁中的分泌表达曲线 series1:对照组; series2:处理组

对于验证乳腺组织特异性表达元件的有效性,目的基因在分泌信号肽顺序,活性位点顺序等方面的完整性以及表达载体构建的合理性提供了一个快速检测系统。通过该系统检测正确的表达载体可以直接用于受精卵的显微注射,这对于减少显微注射的盲目性,提高效率,保障外源基因在转基因动物乳腺组织成功地分泌表达,缩短反应器的研制周期具有重要意义。

致 谢 复旦大学遗传学研究所薛京伦教授,上海市儿童医院医学遗传研究所曾溢滔教授参与和指导了本工作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Wilmot L., Whitelaw C B A, *Reprod Fertil Dev*, 1994, **6**:625~630.
- [2] 王 平,戴一凡,邱信芳等. *科学通报*, 1991, **36**(13):1021~1023.
- [3] Zheng Bing, Qiu Xiaoyun, Tan Min *et al.* *Cell Research*, 1997(in press).
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* *Molecular cloning*, 2nd edition, 1990, New York.
- [5] 戴一凡,薛京伦,邱信芳等. *复旦大学学报(自然科学版)*, 1990, **29**(4):413~417.
- [6] Busby T D, Kummur A, Kurachi K, *et al.* *Nature*, 1985, **316**(18):271~273.
- [7] Lee K F, DeMayo F J, Atiie S *et al.* In: Beaudet A L *et al.* Eds. *Gene Transfer and Gene Therapy*. New York, Alan R Liss Inc. 1989:67~68.
- [8] Jorgensen M J, Cantor A B, Furie B C, *et al.* *Cell*, 1987, **48**:185~191.

Construction of Mammary Gland-specific Expression Vectors for Human Clotting Factor IX and Its Secretory Expression in Goat Milk

Zhang Kezhong Lu Daru Qiu Xinfang

(*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433*)

Huang Ying Huang Shuzheng

(*Shanghai Children's Hospital, Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai 200040*)

Abstract Two expression vectors comprising of mouse matrix attachment regions(MARs), bovine β -casein gene sequence, human factor IX(hFIX) minigene and cDNA, pMCIXm and pMCIX, were constructed for the purpose of mammary gland bioreactor. An secretory expression system of hFIX protein in milk was made by using stearylamine(SA)liposome to transfect plasmid DNA into mammary gland lobule of lactating goat directly. The highest production of hFIX in goat milk was 13.7ng/ml 3 days after transfection, and the hFIX production in the goat mammary gland tansfected with pMCIXm containing hFIX minigene was obviously higher than that of transfected with pMCIX containing hFIX cDNA. Activity immuno-analysis and barium citrate absorption method showed that >90% hFIX protein in milk appeared to be γ -glycosylated and biological activity. This result confirmed the validity of the constructed vectors for further transgenic study, and this assay could also find its success in the evaluation of a foreign gene expression and secretion in the milk as a rapid detective system by using SA liposome to transfect DNA into goat mammary gland directly.

Key words Human clotting factor IX, β -casein gene, mammary gland expression