

人 α -乳清蛋白基因的克隆及其在转基因小鼠中高效表达*

于舒洋 曹更生 樊宝良 李 宁** 段颖莉 戴蕴平 王莉莉

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 从粘粒文库中筛选出人 α -乳清蛋白基因, 构建 9.5 kb 的转基因表达载体. 利用显微注射的方法获得 68 只 F_0 代小鼠, 经 PCR 检测和 DNA 印迹分析证实有 8 只小鼠 (4 ♂, 4 ♀) 为整合人 α -乳清蛋白基因的转基因阳性小鼠, 整合率为 11.7%, 整合拷贝数在 1 至 8 之间. 利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测和蛋白质印迹分析, 4 只雌性 F_0 代转基因阳性小鼠全部表达了人 α -乳清蛋白. 放射免疫测定法测定, 含量分别为 0.62 g/L、0.48 g/L、0.56 g/L、3.21 g/L; 同时测定 F_0 代 50 号转基因小鼠的后代阳性母鼠 (50-2 号) 乳样中人 α -乳清蛋白含量也达到 1.03 g/L, 证明由原代转基因小鼠遗传给后代的人 α -乳清蛋白基因亦获得了稳定的表达. 所构建的人 α -乳清蛋白转基因载体具有结构较小, 表达量高, 可以稳定遗传等优点. 为利用人 α -乳清蛋白基因改善牛乳成分和品质奠定了基础.

关键词 人 α -乳清蛋白, 转基因小鼠, 表达

学科分类号 Q78

α -乳清蛋白是一种小分子质量 (14.2 ku) 的酸性钙结合蛋白, 几乎存在于所有的哺乳动物乳汁中. 它不但是哺育后代所必需的蛋白质, 同时作为调节亚基与半乳糖苷转移酶相互作用来催化乳糖的合成^[1,2]. 最近研究发现 α -乳清蛋白的不同折叠突变体还具有杀菌和诱导肿瘤细胞凋亡的功能^[3,4]. α -乳清蛋白作为乳品中重要的营养成分, 其蛋白质效率、净蛋白质利用率都高于酪蛋白, 是一种极易消化吸收的蛋白质.

随着人们生活水平的提高, 牛乳成为人们饮食结构中重要的组成部分. 西方工业国家中, 人体所需的 30% 蛋白质是由牛乳提供的, 同时牛乳又是儿童和婴幼儿食品中人乳的替代品. 比较人乳和牛乳蛋白质的氨基酸组成可以发现, 牛乳中参与婴幼儿重要生理活动的色氨酸和半胱氨酸含量明显低于人乳中的含量, 而造成这一结果的主要原因是牛乳中 α -乳清蛋白的含量比较低. 因此, 利用乳腺生物反应器改善牛乳品质, 生产含有大量人 α -乳清蛋白的牛乳将会产生巨大的经济效益.

克隆技术的日趋成熟, 不仅使动物转基因技术得到了更充分的发展和补充, 也使利用乳腺生物反应器大规模生产各种重要的功能蛋白更加现实. 采用基因组 DNA 作为目的基因制作转基因动物, 要比 cDNA 序列获得更高效率的表达^[5], 但过大片段又不便于基因操作, 因此获得高效表达的小结构转基因载体有着重要的意义. 我们构建了包含完整人

α -乳清蛋白基因 9.5 kb 的转基因结构, 并在转基因小鼠中进行了表达验证和分析, 为下一步制作转基因牛奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物为昆明白种小鼠. 限制性内切酶、DNA 连接酶及主要试剂分别购自 Promega, TakaRa, Biolabs, SABC 等公司.

人 α -乳清蛋白纯品购自 Sigma 公司. 兔抗人 α -乳清蛋白抗血清购自美国 Nordic Immunological Laboratories. 高保真 *Taq* 酶购自 Roch 公司.

1.2 转基因表达载体的构建

根据 GenBank 序列 (X05153) 设计引物. F1 (上游): 5'GAGTGATGCTTCCATTTCAG 3', F2 (下游): 5'CAGAGATGTACAGGATCTGC 3'. 扩增人 α -乳清蛋白基因 5'端非编码区与第一内含子之间 (包含第一外显子) 的 790 bp 片段 (图 1), 反应条件: 94℃ 3min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环, 72℃ 7 min. 利用这对引物从

* 国家高技术“863”计划资助项目 (2002AA206111).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62893323, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

收稿日期: 2003-08-05, 接受日期: 2003-09-28

粘粒文库中筛选出含有人 α -乳清蛋白基因的克隆^[6] (命名为 phLa1). 利用 *Not* I 和 *Nde* I 双酶切阳性克隆, 回收 8.5 kb 的片段, 与 pGME-5Zf 载体相连, 得亚克隆 phLa2. 将末端测序结果与已知序列比较分析, 发现这个克隆缺少包括部分第二内含子至第四外显子在内的大约 1 kb 的片段. 为获得完整的 α -乳清蛋白基因, 以人基因组 DNA 为模板扩增得到其 3'端缺少的片段. 设计引物 F4, F5, 同时在引物 5'端分别添加一个酶切位点 (F4 *Bgl* II, F5 *Not* I) 和一个保护碱基 T. F4 (上游): 5'-TAGATCTAGGGGTTAGGGGAAGT-3', F5 (下游): 5'-TGCGGCCGCATTGAGTTGGTACAGACAGT-3'. 反

应条件: 94℃ 3 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环, 72℃ 7 min. F4 位于基因下游 1 375 bp 处, F5 位于基因下游 2 521 bp 处, 扩增 1 146 bp 的片段 (图 1). 将人 α -乳清蛋白基因 3'端的 PCR 扩增产物与 pGEM-T 载体相连, 得到克隆 phLa3, 用 *Bgl* II 和 *Not* I 酶切该克隆, 回收 1.1 kb 的片段, 并将此片段与 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切过的 phLa2 片段相连, 即得到人 α -乳清蛋白全基因克隆 phLa4, 酶切及测序鉴定其正确性. 我们所构建的 phLa4 载体含人 α -乳清蛋白基因共 9 459 bp, 其中包括 6.9 kb 的 5'侧翼区和 159 bp 的 3'侧翼区. 其结构模式如图 1.

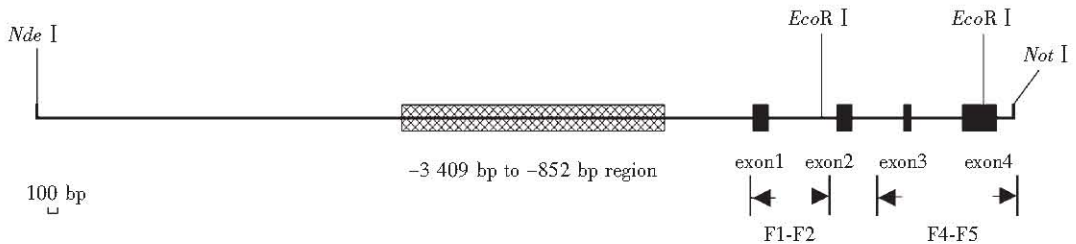


Fig. 1 Structure map of the 9.5 kb phLa4 insert

1.3 制备转基因小鼠

利用 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切 phLa4 质粒回收 9.5 kb 的 DNA 片段, 透析纯化并稀释至 2 μ g/L 的浓度注射受精卵的雄原核, 然后移植于同期发情的假孕母鼠的输卵管中.

1.4 目的基因整合的鉴定

取 3 周龄小鼠的尾巴组织样, 提取基因组 DNA. 两对引物 (F1-F2 和 F4-F5) 做 PCR 检测. 用 *Eco*R I 消化基因组, 以 α -³²P-dCTP 标记、利用 *Eco*R I 单酶切 phLa4 质粒所得 α -乳清蛋白基因 1 561 bp 的 DNA 片段做探针, 对 PCR 检测的阳性个体进行 DNA 印迹分析, 进一步确证基因整合情况, 并利用阳性质粒按比例设浓度梯度对照 (分别设为 1、5、10 拷贝), 利用 AlphaimagerV5.5 软件根据杂交信号计算阳性个体的整合拷贝数.

1.5 阳性转基因小鼠传代研究

将阳性小鼠与正常的非转基因小鼠配种获得 F₁ 代小鼠, 两对引物 (F1-F2 和 F4-F5) 对后代小鼠做 PCR 检测, 验证此转基因结构遗传稳定性.

1.6 α -乳清蛋白在转基因小鼠乳汁中表达分析

在阳性转基因母鼠产后 1 周内取乳样. 将 50 号转基因公鼠的一个后代阳性母鼠 (50-2) 与正常的非转基因小鼠配种, 获取乳样, 用以检测目的基因在阳性公鼠后代中的表达. 利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析全乳及乳清样品, 蛋白质印迹法检测人 α -乳清蛋白在小鼠乳汁中表达, 放射免疫测定法测定其含量, 方法参考文献 [7].

2 结 果

2.1 转基因小鼠 α -乳清蛋白基因的整合

对 68 只 F₀ 代小鼠进行 PCR 检测获得 8 只阳性小鼠 (图 2) (其中 11、24、28、50 号为公鼠, 37、46、57 和 58 为母鼠), 整合率为 11.7%. 因 11、24 号早期病死, 所以对其余 6 只及 50 号公鼠的后代阳性母鼠 50-2 号小鼠进行 DNA 印迹分析 (图 3), 对 PCR 检测结果进行进一步确证. 依据 DNA 印迹结果确定整合拷贝数, 50 号整合拷贝数为 8, 其余 5 只阳性个体均为单拷贝整合 (表 1).

Table 1 Analysis of human α -lactalbumin transgenic mice

DNA	Number	Sex	Copy No.	ρ (α -lactalbumin) / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	No. of transgenic/total offspring
phLa4	11	♂	—	—	—
	24	♂	—	—	—
	28	♂	1	—	1/10
	37	♀	1	0.62	1/11
	50	♂	8	—	0/3
	46	♀	1	0.48	8/11
	57	♀	1	0.90	2/9
	58	♀	1	3.21	2/16
	50-2	♀	1	1.03	2/3

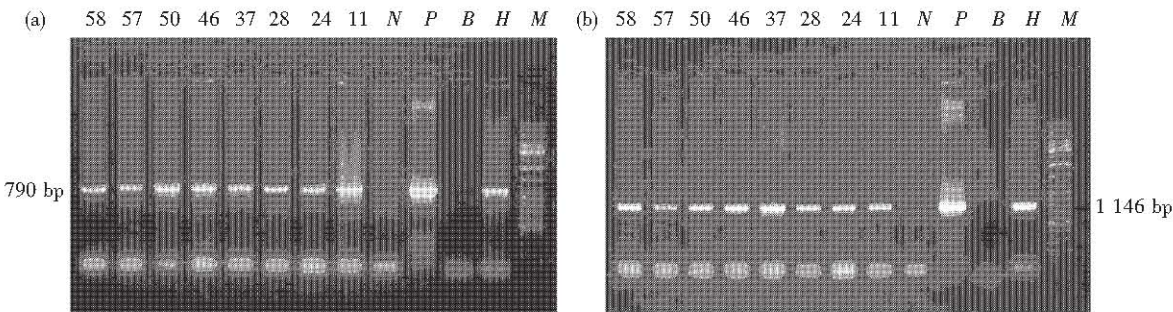


Fig. 2 PCR analysis of human α -lactalbumin transgenic mice

(a) result of primers F1-F2, (b) result of primers F4-F5. M: DNA molecular marker; H: human DNA; P: positive control; B: blank; N: negative control; 11, 24, 28, 37, 46, 50, 57, 58: transgenic mice DNA.

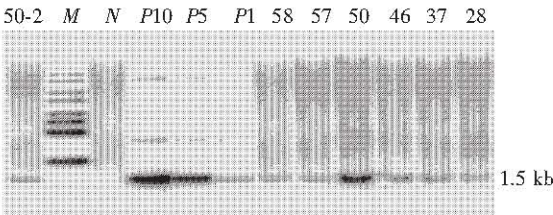


Fig. 3 Southern blot analysis of human α -lactalbumin transgenic mice

M: DNA molecular marker, P10: 10copy positive controls; P5: 5 copy positive controls; P1: 1 copy positive controls; N: negative control; 28, 37, 46, 50, 57, 58, 50-2: transgenic mice DNA.

2.2 阳性转基因小鼠遗传特性

将整合阳性小鼠与健康的野生型小鼠配种进行传代研究, 对后代小鼠进行 PCR 检测. 因 11 号、24 号早期病死而无后代, 其余 6 只结果如下: 28 号的 10 只后代中有 1 只为阳性; 37 号 11 只后代中 1 只阳性; 46 号 3 只后代无阳性, 50 号 11 只后代中有 8 只阳性, 57 号 9 只后代中有 2 只阳性, 58 号 16 只后代中有 2 只为阳性, F₁ 代小鼠 50-2 号 3 只后代中 2 只阳性 (表 1). 因 50 号整合拷贝数较高, 外源基因可能分别整合到几条非同源染色

体上, 因此其后代中阳性率较高. 传代研究表明此结构可以获得较为稳定的遗传.

2.3 转基因小鼠乳汁中 α -乳清蛋白的表达

利用 SDS-PAGE 分析 F₀ 代转基因阳性母鼠全乳及乳清样品, 在全部转基因阳性母鼠全乳和乳清中都存在一条与 α -乳清蛋白纯品相一致的条带, 而野生型母鼠的全乳样品中则不具有这个条带 (图 4). 蛋白质印迹分析进一步证实了外源基因在 4 只 F₀ 代整合阳性母鼠乳样中全部获得高效表达 (图 5), 放射免疫测定含量分别为 0.62 g/L、0.48 g/L、0.56 g/L、3.21 g/L, 同时放射免疫测

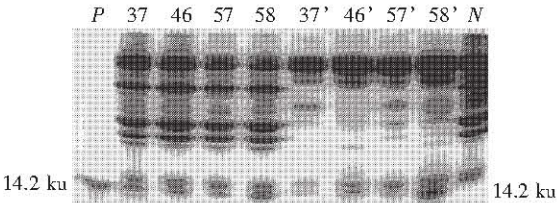


Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the milk and whey of the founder

P: α -lactalbumin; 37, 46, 57, 58: milk of transgenic mice; 37', 46', 57', 58': whey of transgenic mice; N: milk of wildtype mouse.

定 F₀ 代 50 号公鼠的后代阳性母鼠 50-2 号乳汁中含量为 1.03 g/L, 证明由原代转基因公鼠遗传给后代的人 α -乳清蛋白基因获得了稳定的表达。

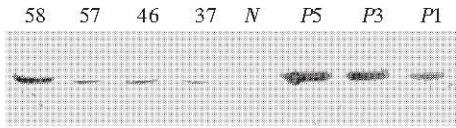


Fig. 5 Western blot analysis of the milk of the transgenic mice

P5: 5 μ g α -lactalbumin; P3: 3 μ g α -lactalbumin; P1: 1 μ g α -lactalbumin; 37, 46, 57, 58: milk of transgenic mice; N: milk of wildtype mouse.

3 讨 论

在动物乳腺生物反应器的开发中, 能够使外源基因获得不受位置效应影响的高效表达是至关重要的。日本的 Fujiwara 等^[8]认为, 包含 50 kb 的 5'侧翼区和 50 kb 的 3'侧翼区的人 α -乳清蛋白基因可以获得不受位置效应影响的稳定表达, 但是只含有 20 kb 的 5'和 20kb 的 3'侧翼区转基因表达会受到位置效应的影响^[9]。Fujiwara 等^[9,10]采用含有完整的 5'侧翼区和 0.5 kb 的 3'侧翼区的人 α -乳清蛋白基因结构制作转基因大鼠, 没有获得表达, 认为可能是 3'侧翼区长度不够的原因。本实验采用包含 6.9 kb 的 5'侧翼区和 159 bp 的 3'侧翼区的全长 9.5 kb 人 α -乳清蛋白基因建立转基因小鼠模型, 在获得的 4 只 F₀ 代及一只 F₁ 代转基因阳性母鼠乳汁中全部检测到了人 α -乳清蛋白, 其中 58 号鼠表达量达到 3.01 g/L, 超过了该蛋白质在人乳中 2.80 g/L 的含量, 其他个体的表达量也均达到了克级。DNA 印迹分析显示这 5 只母鼠均只整合了 1 个拷贝的外源基因, 表达量上虽有所差异, 但表达水平基本上稳定, 这说明此结构的表达受到位置效应的影响较小, 且仅含有 159 bp 的 3'侧翼区的结构并不会显著降低人 α -乳清蛋白基因的表达水平。最新研究表明, 人 α -乳清蛋白基因的不受位置效应影响的稳定表达与 -3 409 bp 至 -852 bp 的 2.5 kb 区域密切相关, 但此区域却不被认为是一个隔离子, 而很可能是一个位置控制区 (LCR), 尚有待于进一步证实^[10]。本研究构建的结构包含了完整的这个 5'区域, 但 3'侧翼区只有 159 bp, 在转基因小鼠中获得较好的表达。由此可见, 对于人

α -乳清蛋白基因的表达, 足够长的 5'侧翼区是必不可少的, 而 3'侧翼区长度并不是影响表达的关键。这也是对人 α -乳清蛋白基因表达调控机制更进一步的认识。

将人 α -乳清蛋白高效表达于牛的乳腺, 是利用乳腺生物反应器生产人乳牛乳的重要组成部分。本研究侧重于获得一个便于基因操作且高效表达的人 α -乳清蛋白转基因载体, 继而开展转基因大动物乳腺生物反应器的研制。转基因小鼠模型的建立及分析表明, 所构建的转基因载体具有结构较小, 表达量较高, 可以稳定遗传给后代且在后代中亦能获得高效表达等优点, 为利用人 α -乳清蛋白基因改善牛乳成份和品质奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Stinnakre M G, Vilotte J L, Soulier S, *et al.* Creation and phenotypic analysis of α -lactalbumin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (14): 6544 ~ 6548
- 2 Stacey A, Schnieke A, Kerr M, *et al.* Lactation is disrupted by α -lactalbumin deficiency and can be restored by human α -lactalbumin gene replacement in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (7): 2835 ~ 2839
- 3 Svensson M, Sabharwal H, Svanborg C, *et al.* Molecular characterization of alpha-lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells. *J Biol Chem*, 1999, **274** (10): 6388 ~ 6396
- 4 Hakansson A, Svensson M, Mossberg A K, *et al.* A folding variant of alpha-lactalbumin with bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 2000, **35** (3): 589 ~ 600
- 5 Huang Y, Huang Y, Huang Z, *et al.* High expression of human serum albumin in milk of transgenic mice directed by the goat b-casein gene promoter region. *Chinese Science Bulletin*, 2001, **46** (7): 582 ~ 586
- 6 曹更生, 李 宁, 赵要风, 等. 用一种改进的粘粒文库筛选方法克隆人 α -乳清蛋白基因. *农业生物技术学报*, 2000, **8** (2): 169 ~ 172
- 7 Cao G S, Li N, Zhao Y F, *et al.* *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2000, **8** (2): 169 ~ 172
- 8 金礼春, 张豪一, 曹伟丽. 转铁蛋白放射免疫分析方法的建立, *放射免疫学杂志*, 2002, **15** (2): 75 ~ 76
- 9 Jin L C, Zhang H Y, Cao W L. *Journal of Radicalization and Immunology*, 2002, **15** (2): 75 ~ 76
- 10 Fujiwara Y, Miwa M, Takahashi R, *et al.* Position-independent and high-level expression of human alpha-lactalbumin in the milk of transgenic rats carrying a 210-kb YAC DNA. *Mol Reprod Dev*, 1997, **47** (2): 157 ~ 163
- 9 Fujiwara Y, Takahashi R I, Miwa M, *et al.* Analysis of control elements for position-independent expression of human alpha-lactalbumin YAC. *Mol Reprod Dev*, 1999, **54** (1): 17 ~ 23
- 10 Fujiwara Y, Takahashi R I, Hirabayashi M, *et al.* Analysis of the flanking regions of the human alpha-lactalbumin gene responsible for position-effect independent expression. *Gene*, 2003, **305** (1): 71 ~ 78

The Cloning of Human α -Lactalbumin Gene and High-level Expression in Milk of Transgenic Mice *

YU Shu-Yang, CAO Geng-Sheng, FAN Bao-Liang,

LI Ning **, DUAN Ying-Li, DAI Yun-Ping, WANG Li-Li

(China Agriculture University, State Key Laboratory of Agrobiotechnology, Beijing 100094, China)

Abstract The transgenic expression vector was constructed by using 9.5kb α -lactalbumin genomic fragment cloned from human cosmid library. Eight transgenic mice (4 ♂, 4 ♀) were detected by PCR and Southern blot analysis from 68 F₀ mice produced through microinjection. The copy number ranges from 1 to 8, and the integration rate is 11.7%. Human α -lactalbumin have been detected in milk samples of the four founder female transgenic mice by SDS-PAGE gel electrophoresis and Western blotting, and the concentrations of the human α -lactalbumin are quantified to be 0.62g/L, 0.48g/L, 0.56g/L, 3.21g/L respectively by radioimmunoassay (RIA) method. Meanwhile, one offspring of the No. 50 male transgenic mice has also expressed the human α -lactalbumin, and the concentration is 1.03 g/L in the milk. The transgenic construct herewith has the characterization of a high-level expression and stable inheritance. A foundation has been provided for improving the quality of cow milk thorough transgenesis of human α -lactalbumin.

Key words human α -lactalbumin, transgenic mice, expression

* This work was supported by a grant from State 863 High Technology R&D project of China Research & Development Program "863" (2002AA206111).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62893323, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

Received: August 5, 2003 Accepted: September 28, 2003