

- 15 Woods-Samuels P, Wong C, Mathias S L *et al.* *Genomics*, 1989; **4**: 290
- 16 Gitschier J. *Am J Hum Genet*, 1988; **43**: 274
- 17 Casula L, Murru S, Pecorara M *et al.* *Blood*, 1990; **75**: 662
- 18 Higuchi M, Wong C, Kochhan C *et al.* *Genomics*, 1990; **6**: 65
- 19 Higuchi M, Antonarakis S E, Kasch L *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 8307
- 20 Orita M, Iwahana H, Kanazawa H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**: 2766

转基因动物的乳腺表达

陈瑞环

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 转基因动物乳腺组织特异性表达异源基因是近年来基因工程中引人注目的途径。文章介绍了这一途径有关的乳汁蛋白基因、乳汁蛋白基因与异源基因的融合方式、重组基因的构成以及可能影响高效表达的因素。

关键词 转基因动物, 乳汁蛋白基因, 乳腺组织特异性表达

自从 Palmiter 等^[1]用小鼠金属硫蛋白-I 基因融合大鼠生长激素基因显微注射入小鼠受精卵原核中, 获得了“超级小鼠”, 并提出可以从转基因动物中获取有价值的蛋白质以来, 转基因动物的研究发展迅速。总体来看主要有两个方面: 一是试图改造动物个体的遗传性状, 如生长速率, 肉质构成, 繁殖行为等, 与传统的品种选育相比有了质的突破, 可以进行物种间遗传性状基因的直接转移; 另一是试图利用转基因动物生产目的蛋白, 与原核表达系统相比, 生产的蛋白具有充分的修饰, 作为生物反应器的转基因动物具有潜在的无限增殖的能力。由于动物在哺乳期乳腺能大量合成蛋白质, 并能不进入循环系统分泌至乳汁中, 因此选择乳腺作为特异性表达重组蛋白的器官, 能方便地收集产品而不损害动物个体, 有可能进行廉价大量生产。Gordon 等^[2]首次表明哺乳期小鼠能分泌有生物活性的人组织源性纤溶酶原激活剂(tPA)进入乳汁, 以后短短几年, 先后有利用不同的乳汁蛋白基因启动子及其调控区指导不同的目的基因在乳腺中表达并获得分泌的报道, 尤其是已有获得高效表达的转基因

羊以及首例转基因牛^[3-5]。所有这些研究令人信服地表明了乳腺特异表达的转基因动物作为商用生物反应器的可行性。

转基因动物中异源基因的组织特异性表达依赖于组织特异性表达基因的启动子及其上游调控区, 如心肌球蛋白轻链-2 (cardiac myosin light-chain-2) 基因^[6]、唾液分泌蛋白 (partid secretory protein, PSP) 基因^[7]、 $\alpha 1(I)$ 胶原 [$\alpha 1(I)$ collagen] 基因^[8]启动子分别实现了目的基因在心肌、唾液腺和产胶原组织的特异表达。乳汁蛋白基因启动子能指导异源基因在乳腺特异表达。表达构件由三部分组成: 乳汁蛋白基因 5' 端及上游区, 目的基因, 包含 PolyA 信号的基因 3' 端及下游区。目前使用的乳汁蛋白基因及其表达构件主要有以下几种。

1 乳清酸蛋白基因及其表达构件

乳清酸蛋白是一种富含半胱氨酸的酸性蛋白, 是啮齿动物乳汁中的主要蛋白, 而在其它动物如猪或反刍类动物中并未发现。小鼠乳清酸蛋白基因 (whey acidic protein gene, WAP)

结构基因长 3.3kb 有 4 个外显子, 外显子 1 长 113bp, 编码 26nt 的 5' 非翻译区、信号肽及成熟乳清酸蛋白的前 10 个氨基酸; 外显子 2, 3 分别长 135bp, 165bp, 各编码一个含 6 个半胱氨酸的结构域; 外显子 4 长 146bp, 编码乳清酸蛋白的最后 4 个氨基酸、终止密码和 131bp 的相当保守的 3' 非编码区. 在 WAP 3' 下游序列存在一个特殊结构, 即为一串间隔一个 G 或 C 就有一个 T 的核苷酸序列, 这在哺乳动物其它基因中没有发现. 在 WAP -30bp 处有一不常见的“TATA”盒, 序列为“TTTAAAT”, 这在 α , γ 酪蛋白基因也有发现. 与“CAAT”盒相似的序列“CAAAGTG”位于 -55bp 处. “TATA”盒的序列第二个碱基为 T 的情况在哺乳动物基因中很少见. 这些相对特殊的特征及其在不同物种间的高同源性可能预示着相应序列在功能上的重要性^[9].

迄今用 WAP 指导异源基因乳腺表达的表表达构件见图 1.

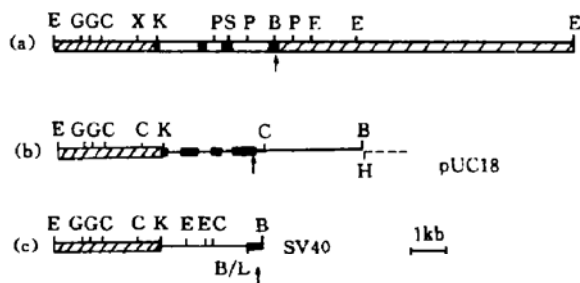


图 1 鼠乳清酸蛋白基因及其表达构件

(a) 鼠乳清酸蛋白基因 (WAP); (b) WAP 与人 ras 癌基因的融合构件; (c) WAP 与人组织源性纤溶酶原激活剂基因 (tPA) 的融合构件;

□: WAP 的侧翼序列, ■: 外显子, □: 内含子, —: 外源基因, ↑: PolyA 信号, 内切酶缩写 B: BamH I, C: Sac I, E: EcoR I, G: Bgl I, K: Kpn I, P: Pst I, X: Xho I, B/L: BamH I 与 Bcl I 的融合部位.

WAP 5' 端指导人 Ha-ras 癌基因在小鼠中表达^[10]. 表达构件含小鼠 WAP 2.5kb 5' 上游区, 33bp 转录起始后序列, 9bp 载体 polylinker, 1bp 的 BamH I linker 的碱基 (C) 及 4.9kb

的人 Ha-ras 癌基因 Sma I /BamH I 片段. 转译起密码 ATG, PolyA 加合信号及 3' 下游区均为人 Ha-ras 癌基因部分. 构建过程是将小鼠 WAP 5' 上游区的 EcoR I /Kpn I 片段克隆至 pUC 18, 以 BamH I 切开连接上加了 BamH I linker 的人 Ha-ras 癌基因 Sma I /BamH I 片段. Ha-ras 基因的 Sam I 位点位于其转译起始点上游 23bp. 7.4kb 的线性 EcoR I /Hind III 片段用于转基因. 获得了 5 只稳定整合的转基因小鼠, 其中 4 只雌性小鼠哺乳期乳腺中检测到了 WAP-ras 基因的表达 (RNA 水平), 1 只雄性小鼠中 WAP-ras 基因的表达仅见于唾液腺, 同时观察到 WAP-ras 的表达能促进癌的形成.

小鼠 WAP 指导人组织源性纤溶酶原激活剂 (tPA) 基因 cDNA 在小鼠乳腺中^[2], 指导在糖基化部位进行了突变的长效 tPA (LA tPA) 基因 cDNA 在羊乳乳腺中^[3]特异性表达并分泌. 表达构件含小鼠 WAP 2.5kb 5' 上游区、33bp 转录起始后序列、tPA 或 LA tPA cDNA 片段和 SV40 的 PolyA 信号. 构建过程是将小鼠 WAP 5' 端 EcoR I /Kpn I 片段克隆于 pUC18 连接上 2.3kb 的 tPA 或 LA tPA cDNA 部分, tPA cDNA 的 3' 端与 SV40 Bcl I /BamH I 片段融合. 5.2kb 的线性 BamH I /Hind III 片段用于转基因. 在转基因小鼠乳汁中 tPA 的表达量高达 250 μ g/ml. 在一只有完整整合的雌性转基因山羊哺乳期乳汁中 LA tPA 的含量为 3 μ g/ml, 并具有生物活性且糖基化程度较鼠细胞来源者有显著差异.

小鼠 WAP 7.4kb 的 EcoR I 片段注射至不含 WAP 的猪受精卵中, 产生的转基因猪的乳汁中小鼠乳清酸蛋白的含量达 1mg/ml, 与小鼠乳汁中乳清酸蛋白的含量相近. 这表明乳腺特异性基因表达的分子基础在小鼠和猪中保守, 且小鼠 WAP 肯定与其它乳汁蛋白基因有共同的指导基因乳腺表达的元件, 这有可能定性地改变物种的乳汁蛋白构成^[11].

2 羊 β -乳球蛋白基因及其表达构件

β -乳球蛋白为反刍类动物乳汁中的主要蛋

白并在其它动物如猪、狗、海豚等有发现,在啮齿类动物中不存在。反刍类动物中 β -乳球蛋白成熟多肽链为162个氨基酸,含5个半胱氨酸残基,其中4个与形成链内二硫键有关,另一个参与形成链间二硫键。在乳汁中 β -乳球蛋白即以稳定的二体形式存在。其可与许多疏水分子如维生素A等结合,推测 β -乳球蛋白可能参与这类分子的转运。羊 β -乳球蛋白基因(β -lactoglobulin gene, BLG)长4.9kb,含7个外显子,外显子1长136bp包括40bp的5'非编码区、编码信号肽及成熟多肽前14个氨基酸的序列,外显子2,3,4,5,6分别长140,74,111,105,42bp,外显子6编码终止信号TAG及25bp的3'非翻译区,外显子7为非编码外显子长180bp^[12]。

迄今用BLG指导异源基因在乳腺中表达的构件见图2。

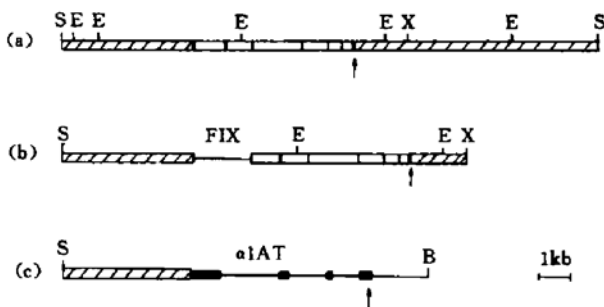


图2 羊 β -乳球蛋白基因及其表达构件

(a) 羊 β -乳球蛋白基因 (BLG); (b) BLG 与人凝血因子 IX 基因的融合构件; (c) BLG 与人 α 1抗胰蛋白酶基因的融合构件;

▨: WAP的侧翼序列, ■: 外显子, □: 内含子, —: 外源基因, ↑: PolyA信号, 内切酶缩写B: BamH I, E: EcoR I, S: Sal I, X: Xho I.

羊BLG指导人抗凝血因子 IX (anti-hemophilic factor IX , F IX) 基因cDNA^[13], 人 α 1抗胰蛋白酶(α 1-antitrypsin, α 1AT)基因^[4,14]在转基因羊^[4,15], 小鼠^[14]乳腺中获得表达并分泌。BLG-F IX 表达构件。构建过程为10.5kb的BLG Sal I/Xba I片段经Pvu II酶切后连接上补平了的1.55kb的FIX Nhe I/Hind III片段。BLG的Pvu II位点位于BLG的非编码区,

距BLG转录起始点32bp, 距BLG转译起始点8bp。F IX 的cDNA片段含有自己的转译起始密码ATG。得到的二只雌性转基因羊各含10个拷贝的BLG-F IX 融合基因, 对mRNA及蛋白的检测表明F IX 在羊哺乳期乳腺中获得了表达并在乳汁中有分泌^[13]。

BLG- α 1AT的表达构件含有4.0kb的BLG 5'端及其上游区和去除了第一个内含子的约6.5kb的 α 1AT基因。构建过程为BLG的Pvu II位点与处于 α 1AT cDNA 5'非编码区的Taq I位点融合作为 α 1AT第二个内含子中BamH I位点前80bp的序列来源, 再连接上 α 1AT基因组克隆6.5kb的BamH I片段。10.6kb的融合基因从载体Not I位点切下, 用于转基因。得到的13只转基因小鼠有5只在乳腺, 5只在唾液腺, 2只在乳腺和唾液腺有特异表达。这7只乳腺表达小鼠均分泌人 α 1AT进入乳汁, 其中有4只表达量达0.5—7mg/ml^[14]。

在得到的4只雌性转基因羊中 α 1AT的表达量均大于1mg/ml, 其中一只在哺乳初期超过60mg/ml, 哺乳过程中稳定表达量也达35mg/ml, 并且从乳汁纯化得到的 α 1AT具有充分的N-糖基化, 生物活性也与从人血浆分离者相同^[4]。高表达转基因羊的培育成功预示着利用转基因动物进行有价值蛋白的商业生产已成为现实。

以羊完整片段的BLG (16.2kb的Sal I片段, 10.5kb的Sal I/Xba I片段) 显微注射至本身不含BLG的小鼠的受精卵中, 培育的转基因小鼠在哺乳期乳腺中亦能特异性大量表达BLG^[15]。这也说明BLG基因与其它乳汁蛋白基因具有共同的调控机制, 不同乳汁蛋白基因在不同物种动物个体的表达不存在种间障碍。

3 牛 α sl酪蛋白基因及其表达构件

牛酪蛋白基因(casein gene)有4种: α sl, β , α s2, κ , 并以该相对位置分布于第六染色体上一个200kb的范围内^[16]。前三种酪蛋白基因编码钙敏感性酪蛋白 与 κ 酪蛋白在功能和结

构上有显著差别,可能属于不同进化来源.牛 α sl酪蛋白基因长17.5kb,是已知酪蛋白基因中最大的一个.该基因有19个外显子长度从24bp至385bp不等,由18个长度为90bp至1967bp不等的内含子相隔.外显子1,19分别长53,385bp为非编码区,外显子2长63bp编码15个氨基酸的信号肽及成熟肽的前二个氨基酸,转译终止密码TGA由外显子17的最后二个碱基TG和外显子18的最初一个碱基A经剪接而成.除终止信号TGA外所有编码区三联密码均不受剪接的影响.该基因的“TATA”盒序列为“TTTAAAT”,5'上游及内含子中共存在8个拷贝的反转座子(atriondactyla retroposon)序列^[17].

迄今用牛 α sl酪蛋白基因指导异源基因表达的构件见图3.

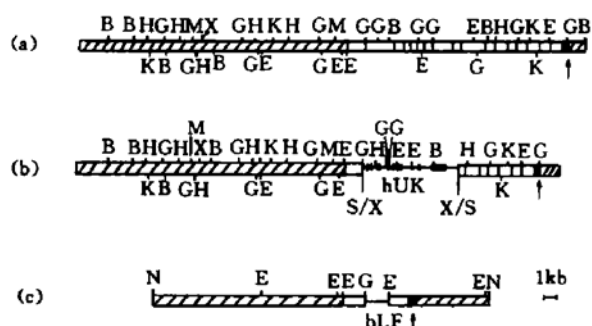


图3 牛 α sl酪蛋白基因及其表达构件

(a) 牛 α sl酪蛋白基因; (b) 牛 α sl酪蛋白基因与人尿激酶基因(hUK)的融合构件; (c) 牛 α sl酪蛋白基因与人乳铁蛋白基因(hLF)的融合构件;

□: 牛 α sl酪蛋白基因的侧翼序列, ■: 外显子, □: 内含子, —: 外源基因, ↑: PolyA信号, 内切酶缩写B: BamH I, E: EcoR I, G: Bgl I, H: Hind I, K: Kpn I, M: Sma I, N: Not I, X: Xho I, S/X: Sal I与Xho I的融合部位.

牛 α sl酪蛋白基因指导人尿激酶基因在转基因小鼠中表达^[18].表达构件包括牛 α sl酪蛋白基因21kb的5'上游区,外显子1,内含子1,外显子2的转译起始位点ATG前的部分,7.5kb的人尿激酶基因(31bp转录起始上游区至1kb的PolyA位点下游区),6.5kb的牛 α sl

酪蛋白基因的3'端(内含子12部分至外显子19)^[17]及2kb的3'下游片段.构建过程为:将牛 α sl酪蛋白基因5'端亚克隆外显子2起始处的Bgl I位点改造成BamH I位点与牛 α sl酪蛋白基因3'端及下游区亚克隆BamH I/Sal I片段融合,再将融合处的BamH I位点用人工接头改造成含有Xho I和Not I位点的序列,之后在该融合片段的5'端接上20kb的牛 α sl酪蛋白基因上游区,再利用Xho I位点插入7.5kb的人尿激酶基因的Sal I片段.39kb的融合基因片段(Cla I/Sal I)被用来转基因.得到的3只整合了融合基因转基因小鼠,部分下一代小鼠含有该融合基因,乳汁中的人尿激酶含量达1—2mg/ml.

牛 α sl酪蛋白基因与人乳铁蛋白基因(lactoferrin gene, hLF)融合转基因牛^[5].构建过程是将hLF cDNA与牛 α sl酪蛋白基因转译起始部位(外显子2)融合,3'端与牛 α sl酪蛋白基因转译终止符部位(外显子18)融合^[5,17].虽只得到完整整合的雄性转基因牛,但开创了象牛这样的大动物转基因的先例.

4 β -酪蛋白基因及其表达构件

β -酪蛋白是酪蛋白基因(casein gene)家族中最小的一个,含9个外显子,其启动区及3'端具有典型的“TATA”盒,“CAAT”盒和PolyA信号序列,并在不同种属(人、牛、羊、兔、大鼠、小鼠)间具有高度的同源性.大鼠 β -酪蛋白基因编码区长7.2kb,9个外显子大小从21bp至525bp不等.外显子1,9长40,525bp为5',3'非翻译区,外显子2长63bp编码12bp的5'非翻译区和17个氨基酸,外显子3,4,5,6,7分别长27,21,24,42,525bp,外显子8长48bp编码最后一个氨基酸,终止信号(TAA)和部分3'非翻译区.有5个糖皮质激素受体结合位序列(TGTCCT),分别位于5'上游-510bp,外显子1(26bp),外显子3(2484bp),外显子7(5051bp)和内含子7(5800bp).

利用 β -酪蛋白基因指导异源基因表达的构

件见图 4.

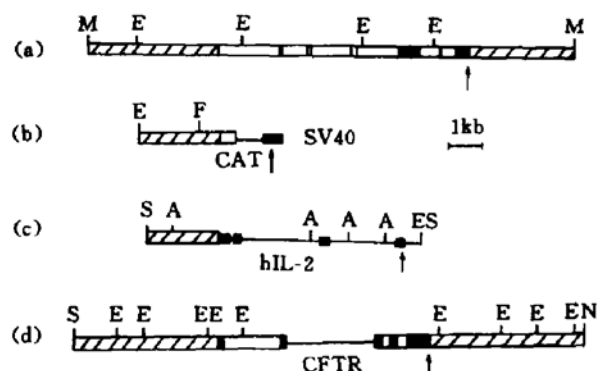


图 4 β -酪蛋白基因及其表达构件

(a) 大鼠 β -酪蛋白基因; (b) 大鼠 β -酪蛋白基因与氯霉素乙酰转移酶基因 (CAT) 的融合构件; (c) 兔 β -酪蛋白基因人白细胞介素-2 基因 (hIL-2) 的融合构件; (d) 羊 β -酪蛋白基因与人囊性纤维化跨膜电导调节因子 (CFTR) 基因的融合构件.

□: β -酪蛋白基因的侧翼序列, ■: 外显子, □: 内含子, —: 外源基因, ↑: PolyA 信号, 内切酶缩写 A: Xba I, B: BamH I, E: EcoR I, F: Hinf I, M: Sma I, N: Not I, S: Sal I.

大鼠 β -酪蛋白基因指导 CAT 基因在转基因小鼠乳腺中表达^[19]. 表达构件包含不同长度的大鼠 β -酪蛋白基因 5' 上游区 (—2300bp 或 —524bp), 外显子 1 和部分内含子 1 (+490bp), CAT 基因. 结果表明少至 0.5kb 的 5' 上游区和 0.5kb 5' 端的大鼠 β -酪蛋白基因即可指导 CAT 基因在乳腺表达.

兔 β -酪蛋白基因指导人白细胞介素-2 (hIL-2) 在转基因兔乳腺中特异性表达并分泌^[20]. hIL-2 基因组片段插在兔 β -酪蛋白基因 5' 非翻译区 (外显子 1) 内, 保留了外显子 1 内的激素受体结合位 (TGTCCT), 分泌肽、终止符、PolyA 加合信号及 3' 下游为 hIL-2 基因部分. 7.3kb 的融合基因线性片段用于转基因. 得到的 4 只雌性转基因兔乳汁中均检测到了有生物活性的 hIL-2. 但获得表达的蛋白量很低, 表达构件有待优化.

羊 β -酪蛋白基因指导人囊性纤维化跨膜电导调节因子 (cystic fibrosis transmembrane

conductance regulator, CFTR) 在转基因小鼠乳腺中特异地表达并分泌^[21]. CFTR 为一膜相关蛋白, 其基因的多处突变导致了人囊性纤维化的产生. CFTR 基因 cDNA 5' 端接在羊 β -酪蛋白基因外显子 2, 3' 端与外显子 7 相连. 表达构件含羊 β -酪蛋白基因 5' 上游约 4kb, 3' 下游约 5.1kb 的片段. 17.8kb 的融合基因片段被用来转基因. 在转基因小鼠乳汁中得到了 CFTR. CFTR 与膜有关, 当其从乳腺顶端细胞分泌出来即包被着乳汁的脂肪体, 由于脂肪体占乳汁总量的 10%, 这表明利用乳腺表达系统也可以廉价地生产 CFTR 及其它膜相关蛋白.

从以上乳汁蛋白基因及其指导异源基因的表达构件来看, 要实现乳腺特异性表达, 乳汁蛋白基因 5' 端及其上游区是先决条件, 被表达的异源基因可以是 cDNA, 也可以是基因组片段, 对异源基因编码的是何种蛋白似乎也没有限制, 维持被表达蛋白从乳腺细胞分泌的分泌肽可以是乳汁蛋白基因来源, 也可以是被表达基因来源, 3' 端及其下游区包括终止符及 PolyA 信号部分可以是乳汁蛋白基因, 也可以是被表达蛋白基因或其它来源的基因. 乳腺表达的特异性可能在于乳汁蛋白基因 5' 端及其上游区的长度. 异源基因表达效率的关键可能在于表达构件的构建方式. 不同的异源基因表达构件可能有不同的最佳组合.

由于转基因动物具有巨大的经济价值, 有关研究的细节越来越倾向于保密. 但总体来看获得乳腺特异性高效表达异源基因的依据和方法仍在探索之中. 要完善转基因动物乳腺特异性表达异源基因这一系统, 关键的问题是如何提高异源基因在转基因动物乳腺中表达的效率. 由于作为表达构件框架的乳汁蛋白基因的表达具有高度的组织、阶段特异性, 受到甾体类肽类及其它孕期发育信号等的控制, 对乳汁蛋白基因结构的研究表明它具有许多特点, 不仅有多种激素受体的结合位, 而且有特有的启动子序列, 极端保守的 5', 3' 端序列, 5' 上游及内含子中的调控序列. 因此对乳汁蛋白基因本身表达调节控制的研究有可能对提高异源

基因在乳腺中的表达效率有所帮助。

影响乳腺特性高效表达异源基因的另一个因素在于融合基因构件进入受体细胞内的行为。外源基因在受体细胞基因组的整合位置有可能影响到其表达的效率及组织特异性。由于不论采用何种基因导入方式, 异源基因均可能随机地插入受体细胞基因组的任意位置, 极易导致内源有利基因的破坏和失活, 或有害基因的激活, 外源基因的表达水平也难以预料。目前对基因定位整合的原理和方法虽有不少探讨但尚不很明了。同源重组可能是实现基因的定位整合的一条途径。DNA 的同源重组是具有相似碱基序列的 DNA 片段之间根据碱基互补原理相互配对而发生交换。影响同源重组的因素很多, 有研究表明同源重组的效率与异源基因和内源基因同源区域的大小呈正相关。因此适当长度的乳汁蛋白基因 5', 3' 端及其上下游片段可能是必要的。

利用小动物如小鼠进行转基因研究的报道比较多, 而利用大动物者则较少。这主要在于转基因过程劳动量大, 得到完整整合异源基因的转基因动物的比例很低, 利用大动物者成本太高, 然而对于乳腺表达异源基因并从乳汁获取目的蛋白的转基因动物, 要形成规模生产, 大动物如羊, 牛等更有价值。这就迫切需要改进转基因过程中的方法, 降低培育转基因动物的成本, 虽然有一些这方面的研究^[5], 但仍有待突破。

鉴于乳腺表达的转基因动物的巨大经济效益, 世界许多国家都投入了相当的资金和人力。从目前的趋势看, 到 90 年代末乳腺表达的转基因动物有可能形成一个重要的产业, 有着巨大的经济价值。我国“八五”期间也将转基因动物乳腺表达系统列为重点攻关项目, 对于缩短我国与国际先进水平的差距, 推动我国基因工程这一高技术产业的发展将起着重要作用。

参 考 文 献

- 1 Palmiter R D, Brinster R L, Trumbauer M E *et al.* *Nature*, 1982; **300**: 611
- 2 Gordon K, Lee E, Vitale J *et al.* *Bio/Technology*, 1987; **5**: 1183
- 3 Ebert K M, Selgrath J P, DiTullio P *et al.* *Bio/Technology*, 1991; **9**: 835
- 4 Wright G, Carver A, Cottom D *et al.* *Bio/Technology*, 1991; **9**: 830
- 5 Krimpenfort P, Rademaker A, Eyestone W *et al.* *Bio/Technology*, 1991; **9**: 844
- 6 Shen R Q, Goswami S K, Mascareno E *et al.* *Mol Cell Biol*, 1991; **11**: 1676
- 7 Mikkelsen T R, Brandt J, Larsen H J *et al.* *Nucl Acids Res*, 1992; **20**: 2249
- 8 Slack J L, Liska D, Bornstein P. *Mol Cell Biol*, 1991; **11**: 2066
- 9 Campbell S M, Rosen J M, Hennighausen L G *et al.* *Nucl Acids Res*, 1984; **12**: 8685
- 10 Andres A C, Schonenberger C A, Groner B *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; **84**: 1299
- 11 Wall R J, Pursel V G, Shamay A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 1696
- 12 Ali S, Clark A J. *J Mol Biol*, 1988; **199**: 415
- 13 Clark A J, Bessos H, Bishop O *et al.* *Bio/Technology*, 1989; **7**: 487
- 14 Archibald A L, McClenaghan M, Hornsey V *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**: 5178
- 15 Simons J P, McClenaghan M, Clark A J. *Nature*, 1987; **328**: 530
- 16 Threadgill D W, Womack J E. *Nucl Acids Res*, 1990; **18**: 6935
- 17 Koczan D, Hobom G, Seyfert H-M. *Nucl Acids Res*, 1991; (20): 5591
- 18 Meade H, Gates L, Lacy E *et al.* *Bio/Technology*, 1990; **8**: 443
- 19 Lee K F, DeMayo F J, Atiee S *et al.* In: Beaudet A L *et al.* eds, *Gene Transfer and Gene Therapy*. New York: Alan R Liss Inc, 1989; 67—68
- 20 Bühler T A, Bruyere T, Went D F *et al.* *Bio/Technology*, 1990; **8**: 140—143
- 21 DiTullio P, Cheng S H, Marshall J *et al.* *Bio/Technology*, 1992; **10**: 74

(China). 1994; 21 (1): 27

As a family of multifunctional cell-proliferation regulating factor, TGF- β has great potential in clinical application. Both naturally secreted and recombinantly expressed TGF- β are existed in the inactive form of latent complex. Activation of latent TGF- β complex is an important pathway of modulating the biological function of TGF- β . This review concerns on the molecular structure of both natural and recombinant latent TGF- β complexes, and their possible activation mechanisms under physiological conditions.

Key words transforming growth factor- β , latent complex, activation mechanism

Lipid Containing Protein. Pan Huazhen. (*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005*). Prog. Biochem. Biophys. (China). 1994; 21 (1): 31

Proteins anchored in membrane by fatty acids or glycosylphosphatidylinositol have been found in a wide variety of cells. Recent evidence shows that the function of these proteins widely related with immunology and signal transduction. This review summarizes the progress in the past few years concerning the structure, biosynthesis and functions of these proteins.

Key words lipid containing protein, palmitic acid, myristic acid, glycosylphosphatidylinositol, structure, biosynthesis, function

Progress in the Studies on Gene Mutations of Factor VIII. Geng Jieping, Qi Zhengwu, Chen Zhu. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). Prog. Biochem. Biophys. (China). 1994; 21 (1): 36
Human factor VIII is an important cofactor in the intrinsic blood coagulation. Hemophilia A

is the most common severe inherited bleeding disease due to the deficiency or abnormality of factor VIII. Factor VIII gene has been successfully cloned and expressed in eukaryotic cells that promotes the studies on the gene mutations of factor VIII widely and thoroughly. This article introduces the recent progress about this field, and new techniques used in researches. The study on gene abnormalities of factor VIII can be regarded as an excellent example both in depth and width for researches of the congenital diseases.

Key words coagulation factor VIII, hemophilia A, gene mutations

Gene Expression Specifically in Mammary Glands of Transgenic Animals. Chen Ruihuan. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). Prog. Biochem. Biophys. (China). 1994; 21 (1): 42

Heterogeneous genes express specifically in mammary glands of transgenic animals is established recently in gene engineering. The milk protein genes and their fusion fashions with heterogenous genes, the necessary elements and the possible factors which effect the expression of the recombinant genes in transgenic animals are introduced.

Key words milk protein genes, transgenic animals, mammary-gland-specific gene expression

Progression in p53 and Rb Gene Methylation. Yang Heping, Zhou Airu, Tang Jian. (*Department of Cardiopulmonary Endocrine, Beijing Medical University, Beijing 100083*). Prog. Biochem. Biophys. (China). 1994; 21 (1): 48
Progress in p53 and retinoblastoma (Rb) gene methylation is introduced. CpG dinucleotides are the hot spots of DNA methylation and mu-