

牛 α S1-酪蛋白 5'调控序列驱动人 α -LA 基因与 LacZ 基因在牛乳腺上皮细胞中的表达 *

张 莉 李庆章** 陈建晖 高学军 田 雷

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 将牛 α S1-酪蛋白 5'调控序列约 1.2 kb 的片段, 连接到含 SV40 启动子调控下 β -半乳糖苷酶基因(LacZ)的 PSV 载体上, 做为启动子, 在其后连接 0.76 kb 的人 α -乳白蛋白基因(α -LA), 构建真核表达载体 α S1-LA-psv. 采用组织块接种法, 培养奶牛乳腺上皮细胞, 经传代纯化后, 对细胞接种存活率、群体倍增时间、生长曲线、形态学等生物学性状进行检测, 用免疫荧光细胞染色法对培养的奶牛乳腺上皮细胞进行角蛋白 18 鉴定, 结果表明, 成功建立奶牛乳腺上皮细胞系, 细胞传至 20 代以上时仍保持旺盛的增殖活力. 将构建的真核表达载体 α S1-LA-psv 转染奶牛乳腺上皮细胞, 培养 24~120 h 均检测到了 β -半乳糖苷酶的表达; 培养 72 h 检测到细胞中人 α -乳白蛋白的表达, 表达量约为 0.64 g/L. 实验结果表明, 建立的奶牛乳腺上皮细胞系具有外源基因表达活性, 得到的牛 α S1-酪蛋白 5'调控序列能作为启动子指导外源基因的表达, 构建的真核表达载体能在体外培养的牛乳腺上皮细胞中同时表达人 α -乳白蛋白和 β -半乳糖苷酶.

关键词 人 α -乳白蛋白基因, β -半乳糖苷酶基因, 奶牛乳腺上皮细胞, 基因表达

学科分类号 Q78, Q81

用转基因技术改善乳成分, 将为整个乳业生产带来一场变革. 牛奶及其乳清中含有大量的乳糖, 世界上 70%~90% 的成年人(尤其是亚洲和非洲人)喝牛奶后会产生乳糖不耐受. β -半乳糖苷酶可将乳清中的乳糖水解, 提高乳及乳制品的营养价值^[1], 解决乳糖不耐受患者的乳品消费问题, 同时还可去除乳清浓缩时乳糖结晶析出给乳制品加工带来的不便. 酪蛋白是哺乳动物乳蛋白的主要成分. 牛奶的 4 种酪蛋白中, α S1-酪蛋白含量最高, 约为 13 g/L^[2]. 近些年来, 国内外已应用牛 α S1-酪蛋白基因调控序列与外源基因融合进行外源基因表达, 但大多只是在小鼠或兔中表达成功^[3~7]. α -乳白蛋白是一种主要的乳清蛋白, 具有调节产乳的功能^[8], 是必需氨基酸和支链氨基酸的极好来源, 也是唯一能与金属包括钙结合的乳清蛋白成分. 另外, 它还有细胞溶解活性^[9]、诱导细胞生长抑制和细胞凋亡^[10]等多种功能. 最近研究还发现, α -乳白蛋白可通过促进色氨酸和松果体素的合成, 从而调节大脑功能, 改善睡眠, 因而在奶粉尤其是婴幼儿

奶粉中常有添加.

本研究建立了稳定的牛乳腺上皮细胞系, 将含有人 α -乳白蛋白基因与 β -半乳糖苷酶基因的真核表达载体, 转染牛乳腺上皮细胞, 使 β -半乳糖苷酶和人 α -乳白蛋白在牛乳腺上皮细胞中同时表达, 一方面降低乳糖含量, 另一方面产生人 α -乳白蛋白, 为以后制备转基因动物乳腺反应器, 生产含人 α -乳白蛋白的低乳糖转基因牛奶, 提高牛乳品质, 进行探索性研究.

1 材料与方法

1.1 材料

pGEM-T 载体、pSV-Galactosidase Control 载体和 Tfx™-20 真核转染试剂购自 Promega 公司; 牛

* 黑龙江省科学技术计划资助项目(GC05B505).

** 通讯联系人.

Tel: 0451-55190999, E-mail: qingzhangli@hotmail.com

收稿日期: 2008-01-08, 接受日期: 2008-04-09

α S1-T 菌株来自本实验室; LA Taq DNA 聚合酶、菌株 JM109 购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶和 T4 连接酶购自 Fermentas 公司; 胶回收试剂盒购自上海华舜生物公司; 质粒提取试剂盒购自上海华舜生物公司和 OMEGA 公司; F12 培养基购自 Gibco BRL 公司; 角蛋白 18 抗体购自 Acris Antibodies 公司; Beta-Glo 检测系统 E2000 购自 Promega 公司; 鼠抗人 α lactalbumin 单克隆抗体 (IgM) 购自 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记兔抗鼠 IgM 二抗购自北京博奥森生物技术有限公司; ECL 发光液购自普利莱公司。

奶牛乳腺组织取自哈尔滨市屠宰场。

1.2 方法

1.2.1 牛 α S1- 酪蛋白 5' 调控序列的获取. 参照 GenBank 发表的牛 α S1- 酪蛋白基因 5' 调控序列, 利用 Primer 5.0 辅助重新设计引物, 上、下游引物 5' 端分别添加限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点. P1, 5' GGATCCCAAAGTGGACAGCTGAA 3'; P2, 5' GTCGACGGCAGACTTTTGCTTCC 3'. 以牛 α S1-T 为模板进行 PCR 扩增, 反应条件如下: 94℃ 预变性 10 min, 每循环包括 95℃ 变性 30 s, 57℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 35 个循环, 最后 1 个循环结束后再 72℃ 延伸 10 min. 扩增片段经回收纯化后与 pGEM-T 载体连接构成重组子 α S1-T-2, 转化 JM109 感受态细菌, 挑选阳性克隆, 摇菌扩增后提取质粒, 双酶切鉴定后由北京华大基因公司测序。

1.2.2 人 α -LA cDNA 的获取. 人 α -LA-cDNA(763 bp) 序列参考 GenBank NM002289 和 NM J00270 发表的人 α -LA mRNA 序列, 两边添加 *Age* I、*Sal* I 和 *Pst* I 酶切位点, 由上海旭冠生物技术公司合成(质粒 h α -LA-cDNA-T), 合成后又送由华大基因公司重新进行序列测定确定。

1.2.3 真核表达载体 α S1-LA-psv 的构建及鉴定. 将 h α -LA-cDNA-T 和 pSV 载体(含完整的 SV40 启动子及其后的 β - 半乳糖苷酶基因全序列)用 *Sal* I 和 *Pst* I 双酶切纯化回收后, 进行连接, 转化 JM109 感受态细菌, 挑选阳性克隆, 摇菌扩增后提取质粒, 双酶切鉴定后, 标为重组质粒 LA-psv. 将重组质粒 LA-psv 大量提取质粒, 将其与 α S1-T-2 分别用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切后, 纯化回收 LA-psv 载体和牛 α S1- 酪蛋白基因的 5' 调控序列, 进行连接构建重组质粒 α S1-LA-psv, 转化

JM109 感受态细菌, 挑选阳性克隆, 摇菌扩增后提取质粒, 双酶切鉴定。

1.2.4 奶牛乳腺上皮细胞的分离培养、纯化和鉴定.

a. 奶牛乳腺上皮细胞的分离培养和纯化. 无菌取泌乳后期荷斯坦奶牛乳腺组织, 将其剪成约为 1 mm³ 左右的组织块, 用吸管将组织块以适量的密度接种于铺有 0.5% 胶原活性蛋白培养瓶中, 加入 15% DF12 完全培养液, 于 CO₂ 培养箱中 37℃ 培养. 根据上皮细胞与成纤维细胞对胰蛋白酶消化敏感性不同, 在混合生长的原代或传代细胞培养物中, 用含 0.25% 胰蛋白酶的 D-Hanks 液 37℃ 消化, 在倒置显微镜下观察, 待成纤维细胞胞质回缩, 细胞间隙增大, 脱离瓶壁时, 加培养液终止消化, 将酶液倾出, 离心后得到的大部分是成纤维细胞. 经 3~5 次选择传代, 弃掉组织块, 可得到纯化的乳腺上皮细胞。

b. 奶牛乳腺上皮细胞生物性状的检测. 观察细胞每天生长情况, 记录奶牛乳腺上皮细胞的生长特性和细胞形态差异, 检测乳腺上皮细胞的生物学性状. 细胞形态学观察、生长曲线、细胞接种存活率、细胞群体倍增时间、细胞的冻存和复苏方法均参考佟慧丽等的操作^[1]。

c. 奶牛乳腺上皮细胞的鉴定. 应用免疫荧光细胞染色法, 使用激光共聚焦显微镜对纯化后的牛乳腺上皮细胞角蛋白 18 的表达进行检测。

1.2.5 细胞转染及表达产物的检测.

a. 细胞转染. 把第 6~8 代奶牛乳腺上皮细胞以 2×10⁴/cm² 的浓度接种 12 孔培养板, 待细胞 80% 连生时, 按照 Tfx™-20 说明书上的方法将重组质粒 α S1-LA-psv 转染奶牛乳腺上皮细胞。

b. 细胞原位染色法检测 β - 半乳糖苷酶. 转染后 48 h 的细胞吸去培养液, 用 PBS 洗 2 次, 用固定液(3% 甲醛)4℃ 固定 5 min. 去掉固定液, 用 PBS 洗 3 次, 加染色液(用 40 mmol/L 柠檬酸 / 磷酸钠缓冲液配制, 1 g/L X-gal, 5 mmol/L 铁氰化钾, 5 mmol/L 亚铁氰化钾, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂) 37℃ 作用 16 h, 同时用未转染质粒的细胞作对照, 倒置显微镜下观察结果。

c. 转染细胞中乳糖含量变化的液相检测. 分别取转染后 24、48、72、96、120、144 h 的细胞破碎液, 0.22 μ m 滤膜过滤后, 使用高效液相色谱对转染各个时期细胞内的乳糖含量变化情况进行检

测. 每个时期做 3 个平行样品, 分别以未转染质粒的同时期细胞作空白对照. HPLC 的检测条件: 色谱柱, 十八烷基硅烷键合硅胶, 4.6 mm×250 mm; 柱温, 室温; 紫外检测波长, 195 nm; 流动相, 5%的乙腈; 流速, 恒流 0.6 ml/min; 进样体积, 10 μ l. 分别以浓度为 0.1 g/L、0.15 g/L、0.25 g/L、0.5 g/L、1 g/L、2.5 g/L、5 g/L 的乳糖标准品进行 HPLC, 以乳糖浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标作乳糖标准曲线. 细胞样品与乳糖标准品采用完全相同的 HPLC 检测条件.

d. β -半乳糖苷酶的含量检测. 分别取转染后 24、48、72、96、120、144 h 的细胞培养液和细胞裂解液进行检测, 每个时期做 3 个平行样品. 分别以未转染质粒的同时期细胞做空白对照. 按照 Beta-Glo E2000 检测系统说明书配制反应液, 用酶标仪 420 nm 进行检测, 同等条件下做标准曲线.

e. 人 α -LA 蛋白的 Western blot 检测. 取转染后 72 h 的细胞裂解液, 加入等量的 2×SDS 上样缓冲液备用. SDS-PAGE 后, 切取 17~11 ku 之间部分, 20 V 转膜 17 min; 5%的脱脂奶粉封闭 1 h 后, 按 1:600 比例加入一抗, 室温混匀后, 4℃过夜; TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; 按 1:2 000 的比例加入二抗, 37℃作用 1 h; TBST 洗膜 3 次, 每次 6 min; 加入 ECL 发光液作用 2~3 min, 曝光 1~3 min, 显影 30~50 s; 水洗后, 定影. 扫描仪扫描后, Image-Pro Plus 5.0 分析蛋白质区带, 估算蛋白质表达量. 同时切取 34~43 ku 之间部分做 GAPDH 内参(36 ku), 20 V 转膜 50 min, 检测.

2 结 果

2.1 真核表达载体的构建及鉴定

以提取的牛 α S1-T 质粒为模板, 用新引物重新进行 PCR 扩增牛 α S1-酪蛋白 5'调控序列, 扩增出 1.2 kb 的片段与预期大小 1.208 kb 一致, 经测序确定为预期片段.

h α -LA-cDNA-T 和 pSV 载体(含完整的 SV40 启动子及其后的 β -半乳糖苷酶基因全片段)双酶切连接后得到重组质粒 LA-psv, 双酶切鉴定结果表明得到 0.76 kb 的 h α -LA-cDNA 片段和 6.81 kb 的 pSV 载体片段(图 1), 与预期相符.

将重组质粒 LA-psv 与 α S1-T-2 双酶切连接后得到重组质粒 α S1-LA-psv, 双酶切得到 1.2 kb 的牛 α S1-酪蛋白 5'调控序列片段和 7.56 kb 的 pSV 载体片段(图 2), 与预期相符.

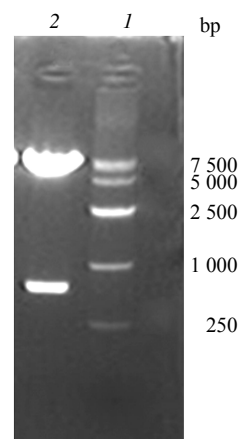


Fig. 1 Identification of recombinant LA-psv digested with enzymes

1: DNA marker VI; 2: Productions of LA-psv digested with enzymes, 0.76 kb and 6.81 kb.

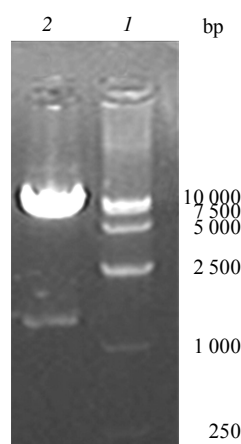


Fig. 2 Identification of recombinant α S1-LA-psv digested with enzymes

1: DNA marker VI; 2: Productions of α S1-LA-psv digested with enzymes, 1.2 kb and 7.56 kb.

2.2 奶牛乳腺上皮细胞的纯化和鉴定

无菌取泌乳后期荷斯坦奶牛乳腺组织, 采用组织块培养法分离培养成功后, 经纯化除去成纤维细胞得到纯化的牛乳腺上皮细胞(图 3a). 用免疫荧光细胞染色法检测角蛋白 18 的表达, 使用激光共聚焦显微镜观察染色结果(图 3b), 同时用本实验室纯化的成纤维细胞作阴性对照(图 3c). 图 3 中红色的为 PI 标记的细胞核, 绿色的为 FITC 标记的角蛋白 18, 结果说明, 纯化得到的细胞是乳腺上皮细胞.

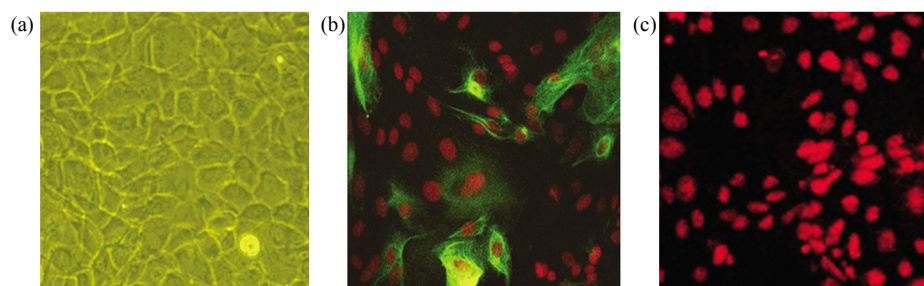


Fig. 3 Purification and identification of bovine mammary epithelial cells

(a) Purified bovine mammary epithelial cells (400 $\times$). (b) Cytokeratin 18 expression in bovine mammary epithelial cells (400 $\times$). (c) Negative control of fibroblast (400 $\times$).

另外, 绘制的奶牛乳腺上皮细胞生长曲线呈明显的“S”型, 符合细胞生物学的生长规律. 细胞接种存活率结果表明, 细胞贴壁率及存活率在 24 h 内逐渐升高, 达到最高值 92% 以上, 说明细胞的生存及贴壁能力较强. 随着天数的增加, 培养的细胞群体倍增时间逐渐减少; 培养到第 168 h 时细胞群体倍增时间达到最短 28.97 h, 表明此时细胞增殖能力最强; 随后细胞倍增时间逐渐增加. 对不同代数奶牛乳腺上皮细胞反复进行冻存, 复苏 24 h 后, 用 CASY 细胞活力分析仪检测细胞存活率, 冻存复苏后检测到细胞活力均达 89% 以上, 细胞接种率达 92% 以上.

2.3 细胞转染及表达产物的检测

2.3.1 细胞原位染色检测 β -半乳糖苷酶. 转染 48 h 的细胞, 3% 甲醛固定后, X-gal 细胞原位染色, 用未转染的细胞作对照, 倒置显微镜下观察结果见图 4. 经转染的乳腺上皮细胞, 因有 β -半乳糖苷酶的表达而使底物 X-gal 分解产生蓝色沉淀, 而未转染的乳腺上皮细胞则基本没有蓝色沉淀产生, 说明构建的载体能在奶牛乳腺上皮细胞中表达 β -半乳糖苷酶.

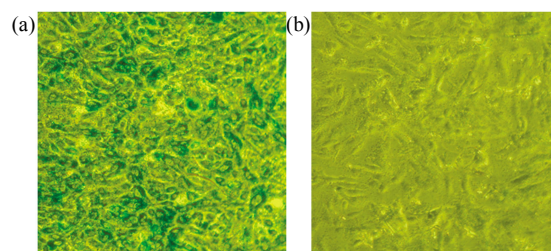


Fig. 4 In situ staining of bovine mammary epithelial cells

(a) Situ staining of bovine mammary epithelial cells transfected by α S1-LA-psv (200 $\times$). (b) Negative control of bovine mammary epithelial cells without transfection (200 $\times$).

2.3.2 表达细胞中乳糖含量的液相检测. 使用 HPLC 对转染后 24、48、72、96、120、144 h 的细胞破碎液中的乳糖含量进行检测, 每个时期测 3 个平行样品, 以未转染质粒的同期细胞做空白对照, 由标准曲线方程求出转染后各个时期和对应空白对照的乳糖含量, 见表 1. 由结果可见, 与未转染质粒对照组细胞相比, 转染 24 h 乳糖含量变化不大, 转染 48~144 h 乳糖含量显著减少 ($P < 0.05$), 且在 48 h 与 72 h 乳糖的减少量最多, 说明 β -半乳糖苷酶在 48 h 开始高水平表达, 持续至 72 h, 之后降低, 但 144 h 仍有表达.

Table 1 Lactose content changes in transfected cells in different period

	g/L					
Transfection time	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
Negative control	1.269 $\pm$ 0.023 ^{a/a}	0.708 $\pm$ 0.041 ^{b/a}	0.633 $\pm$ 0.014 ^{c/a}	0.396 $\pm$ 0.018 ^{d/a}	0.354 $\pm$ 0.018 ^{d/a}	0.354 $\pm$ 0.016 ^{d/a}
Transfected cells	1.265 $\pm$ 0.014 ^{a/a}	0.267 $\pm$ 0.037 ^{b/b}	0.184 $\pm$ 0.023 ^{c/b}	0.271 $\pm$ 0.018 ^{b/b}	0.267 $\pm$ 0.029 ^{b/b}	0.196 $\pm$ 0.034 ^{c/b}

Significantly different between a, b, c and d, $P < 0.05$, $n=3$. The letter "a", "b", "c" or "d" before "/" stand for the content comparison among different period in cells. The letter behind "/" stand for the content comparison between in negative control cells and in transfected cells.

2.3.3 β -半乳糖苷酶含量检测. 用 β -半乳糖苷酶标准品按照 E2000 说明书做出 β -半乳糖苷酶标准曲线. 同等条件下以未转染质粒的同时期细胞作空白对照调零, 检测转染后 24、48、72、96、120、144 h 的细胞培养液和细胞裂解液的 β -半乳糖苷酶活性, 每个时期测 3 个平行样品, 结果取平均值, 由 β -半乳糖苷酶标准曲线方程求出各时期的 β -半乳糖苷酶含量, 见表 2. 由结果可见, 在细胞裂解

液中, 转染后 24 h 就可以检测到 lacZ 基因的表达, 转染 72 h 表达量最高, 之后表达水平有逐渐降低的趋势, 144 h 降到最低, 基本检测不到. 在细胞培养液中, 转染后 24 h 也可以检测到 lacZ 基因的表达, 但表达量明显低于细胞破碎液, 之后表达水平有逐渐升高的趋势, 48 h 达到最高, 随后开始降低, 144 h 也是降到基本检测不到酶的活性. 结果可见细胞表达的 β -半乳糖苷酶是分泌性蛋白.

Table 2 β -Galactosidase expression content in transfected cells in different period

Transfection time	10 ⁻⁴ U					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
Cell lysate	0.322 ± 0.041 ^{bca}	1.945 ± 0.267 ^{a/a}	2.191 ± 0.390 ^{a/a}	0.405 ± 0.164 ^{b/a}	0.466 ± 0.082 ^{b/a}	0.000 ± 0.000 ^{ca}
Culture liquid	0.179 ± 0.062 ^{db}	0.610 ± 0.144 ^{ab}	0.466 ± 0.103 ^{abb}	0.281 ± 0.041 ^{cd}	0.363 ± 0.124 ^{bca}	0.000 ± 0.000 ^{ca}

Significantly different between a, b, c, d and e, $P < 0.05$, $n = 3$. The letter "a", "b", "c", "d" or "e" before "/" stand for the content comparison among different period in transfected cell lysate and culture liquid. The letter behind "/" stand for the content comparison between in cell lysate and in culture liquid.

2.3.4 人 α -LA 蛋白的 Western blot 检测. 转染 72 h 的细胞裂解液 Western blot 方法检测人 α -LA 蛋白表达, GAPDH 作内参, 扫描仪扫描结果后

(图 5), 用 Image-Pro Plus 5.0 分析蛋白质区带, 估算得转染 72 h 的细胞中人 α -LA 蛋白的表达量约为 0.64 g/L.

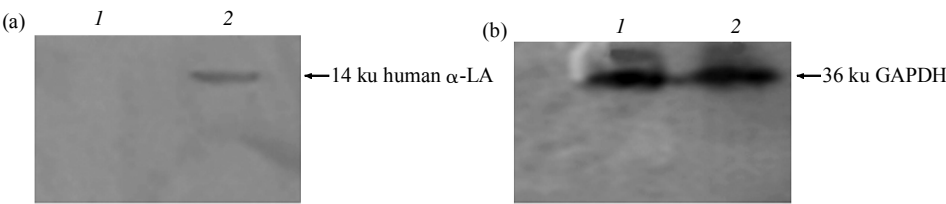


Fig. 5 Detected human α -LA gene expression of 72 h period in transfected cells

1: Negative cells control; 2: Transfected cells.

3 讨 论

用转基因技术改变乳成分来提高乳的营养价值和加工特性, 包括提高乳中高价值成分的浓度、消除乳中不理想成分、生产人乳中的一些成分, 已日益成为乳腺生物反应器研究的热点方向. 乳腺上皮细胞具有合成和分泌乳汁的特殊功能, 是制作乳腺生物反应器的靶细胞, 因此可以利用体外培养的、能合成和分泌乳蛋白的乳腺上皮细胞来检测特异性表达载体的功能, 具有方便、快捷且真实反映乳腺

在体内表达水平的功能^[12]. 虽然国外已有报道存在稳定的牛乳腺上皮细胞系, 但是一直没有商品出售. 国内虽然对奶牛乳腺上皮细胞的培养也进行了一些探索研究^[13~17], 但体外培养的细胞传代次数有限, 没有获得可以稳定传代培养的奶牛乳腺上皮细胞系. 本研究采用组织块接种法成功培养了奶牛乳腺上皮细胞(方法与彭新荣等^[17]培养牛乳腺上皮细胞的方法基本相同), 建立了稳定的奶牛乳腺上皮细胞系, 并以其为基础, 进行了 β -半乳糖苷酶基因和人 α -乳白蛋白基因的真核表达研究, 结果产生了 β -半乳糖苷酶和人 α -乳白蛋白, 表明培养的

奶牛乳腺上皮细胞能够很好地表达外源基因, 可用于进行相关的表达研究.

另外, 据估计牛酪蛋白基因座位存在座位控制区域(locus control region), 因而使得酪蛋白基因可以成为一个完全独立的表达单位^[18]. 据文献报道, 只要酪蛋白基因启动区包括了-500~+500 的区域, 一般就能够进行高水平的乳腺特异性表达^[19]. 本研究用牛 α S1- 酪蛋白基因-2~-1197 位置的片段, 来调控人 α - 乳白蛋白在奶牛乳腺上皮细胞中的表达, 结果证明牛 α S1- 酪蛋白基因 5'端 1 195 bp 序列可以指导外源基因在奶牛乳腺上皮细胞中表达.

参 考 文 献

- Burvall A, Asp N G, Bosson A *et al.* Storage of lactose-hydrolysed dried milk: effect of water activity on the protein nutritional value. *J Dairy Res*, 1978, **45**(3): 381~389
- Mercier J C, Vilotte J L. Structure and function of milk protein genes. *Dairy Sci*, 1993, **76**(10): 3079~3098
- Meade H, Gates L, Lacy E, *et al.* Bovine alpha S1-casein gene sequences direct high level expression of active human urokinase in mouse milk. *Biotechnology*, 1990, **8**(5): 443~446
- Riego E, Limonta J, Aguilar A, *et al.* Production of transgenic mice and rabbits that carry and express the human tissue plasminogen activator cDNA under the control of a bovine alpha S1 casein promoter. *Theriogenology*, 1993, **39**(5): 1173~1185
- Zakharova E S, Prvzhkova M V, Kibardin A V, *et al.* Transcription and mRNA splicing of the human lactoferrin gene controlled by the regulatory region of the bovine alpha S1 casein gene in the mammary gland of transgenic mice and in mouse embryonic stem cells. *Genetika*, 2005, **41**(3): 299~306
- 张靖溥, 劳为德, 成 勇, 等. 牛 α 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. *生物工程学报*, 1997, **13**(2): 154~159
Zhang J P, Lao W D, Cheng Y, *et al.* *Chin J Biotechnology*, 1997, **13**(2): 154~159
- 谭晓红, 程 莹, 周 江, 等. 牛 α S1- 酪蛋白基因序列指导 htpA 突变体小基因在小鼠乳腺中的表达. *遗传学报*, 2001, **28**(5): 405~410
Tan X H, Cheng X, Zhou J, *et al.* *Acta Genetica Sinica*, 2001, **28**(5): 405~410
- 刘思国, 魏影允, 胡国法, 等. 人 α - 乳白蛋白在转基因小鼠乳汁中动态表达图貌. *中国科学(C 辑)*, 2003, **33**(4): 317~322
Liu S G, Wei Y Y, Hu G F, *et al.* *Sci Chin(Series C)*, 2003, **33**(4): 317~322
- McKenzie H A, White F H, Stinnakre M G, *et al.* Studies on a trace cell lytic activity associated with alpha-lactalbumin. *Biochem Int*, 1987, **14**(2): 347~356
- Hakansson A, Zhivotovsky B, Orrenius S, *et al.* Apoptosis induced by a human milk protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(17): 8064~8068
- 佟慧丽, 尹德云, 高学军, 等. 奶山羊乳腺上皮细胞系的建立. *中国科技论文在线*, 2007-05-06
Tong H L, Yin D Y, Gao X J, *et al.* Establishment of Dairy Goat Mammary Gland Epithelial Cell Line. <http://www.paper.edu.cn>, 2007-05-06
- 徐曼妮, 厉曙光, 赵建阳, 等. 乳腺生物反应器表达载体的检测方法. *生物技术通报*, 2003, **5**: 23~26
Xu M N, Li S G, Zhao J Y, *et al.* *Biotechnol Bull*, 2003, **5**: 23~26
- 王 亨, 韩 超, 邱昌伟, 等. 体外培养奶牛乳腺上皮细胞的形态学观察. *中国兽医杂志*, 2007, **43**(6): 15~17
Wang H, Hang C, Qiu W C, *et al.* *Chin J Veterinary Medicine*, 2007, **43**(6): 15~17
- 杜 娟, 狄和双, 王根林. 奶牛乳腺上皮细胞系的建立及高温对细胞超微结构的影响. *生物工程学报*, 2007, **23**(3): 471~476
Du J, Di H S, Wang G L. *Chin J Biotechnology*, 2007, **23**(3): 471~476
- 多曙光, 吴应积, 罗奋华, 等. 牛乳腺上皮细胞的分离培养及其生物学特性. *动物学研究*, 2006, **27**(3): 299~305
Duo S G, Wu Y J, Luo F H, *et al.* *Zoological Research*, 2006, **27**(3): 299~305
- 崔立莉, 卜登攀, 王加启, 等. 奶牛乳腺上皮细胞体外培养体系的建立. *新疆农业科学*, 2006, **43**(5): 394~398
Cui L L, Bu D P, Wang J Q, *et al.* *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2006, **43**(5): 394~398
- 彭新荣, 郑月茂, 张 勇. 体外培养的牛乳腺上皮细胞形态研究. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2005, **33**(1): 13~17
Peng X R, Zheng Y M, Zhang Y. *J Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*, 2005, **33**(1): 13~17
- Martin P, Grosclaude F. Improvement of milk protein quality by gene technology. *Livestock Production Sci*, 1993, **35**(2): 95~115
- 李 宁, 吴常信, 陈永福. 牛 α S1- 酪蛋白基因启动区的克隆和序列分析. *遗传*, 1997, **19**(1): 4~8
Li N, Wu C, Chen Y F. *Hereditas*, 1997, **19**(1): 4~8

Expression of LacZ and Human α -LA Regulated by 5' Flanking Sequence of Bovine α S1 Casein in Bovine Mammary Epithelial Cells*

ZHANG Li, LI Qing-Zhang**, CHEN Jian-Hui, GAO Xue-Jun, TIAN Lei

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract The 1.2 kb region of 5' flanking sequence of bovine casein gene and human alpha lactalbumin gene was combined with the PSV vector which has SV40 promotor and β -galactosidase gene (LacZ gene). The expression vector α S1-LA-psv was successfully constructed. Bovine mammary epithelial cell was cultured. The biological characters including survival rate of cells inoculation, doubling time of cell population growth curve and morphology were detected after passaged and purified. And the cell line was identified by the tissue-special expression of cytokeratin 18. The normal cultured dairy bovine mammary epithelial cell line was set up. The cells could still have a good behavior of proliferation after passaged 20 times. The cells were transfected with the eukaryotic expression vector α S1-LA-psv and the activity of β -galactosidase was detected after transfected from 24 h to 120 h. Human alpha lactalbumin was detected at 72 h after transfected too. The production of human alpha lactalbumin was 0.64 g/L approximately. The results indicate that the bovine mammary epithelial cell line have the ability of expressing exogenous gene, the 5' flanking sequence of bovine α S1 casein gene has the effect of regulating gene expression specifically and the vector α S1-LA-psv which was constructed can coexpress alpha lactalbumin and β -galactosidase.

Key words human α -LA, β -LacZ, bovine mammary epithelial cells, gene expression

*This work was supported by a grant from Science and Technology Project Foundation of Heilongjiang Province(GC05B505).

**Corresponding author.

Tel: 86-451-55190999, E-mail: qingzhangli@hotmail.com

Received: January 8, 2008 Accepted: April 9, 2008