

人胰岛素原基因在转基因小鼠乳汁中的表达

黄俊成, 史洪才, 李文蓉, 武 坚, 杨冬梅, 郭志勤

(新疆畜牧科学院 农业部畜牧兽医生物技术重点开放实验室, 乌鲁木齐 830000)

TQ467-32

Q786

[摘 要] 将构建的绵羊 β -乳球蛋白基因(BLG)调控人胰岛素原基因的重组基因通过显微注射生产转基因小鼠。共移植888枚注射BLG-胰岛素原基因的小鼠卵, 移植受体31只, 怀孕14只, 产仔53只。PCR检测51只, 有5只为阳性, 并均为雌性, 其中2只小鼠泌乳, 经放免检测小鼠乳汁中人胰岛素原的质量浓度分别为37.44 mg/L和39.99 mg/L。另外3只异常消瘦而不孕, 其中1只极度衰竭而死亡。

[关键词] 人胰岛素原基因; 转基因小鼠; 基因表达; 乳汁

糖尿病 动物生物工程

[中图分类号] Q786 **[文献标识码]** A

人胰岛素(insulin)是由A和B两条多肽链组成的蛋白质激素, A链由21个氨基酸残基组成, B链由30个氨基酸残基组成, 共有3个二硫键, 在体内其A链的N端和B链的C端通过C肽(由31个氨基酸残基组成)连接成胰岛素原(proinsulin)。

糖尿病是一种高发的老年性疾病, 胰岛素是治疗糖尿病的特效药, 因此有很大的需求市场。目前, 市场上销售的胰岛素主要是动物脏器的提取品, 基因工程产品的产量和质量还不能令人满意, 因而可通过动物乳腺生物反应器来生产稀有的、用其他方法不易得到的、有生物活性的多种药用蛋白质。到目前为止, 已在动物乳腺中表达的人类蛋白质主要有 α -1-抗胰蛋白酶^[1]、血红蛋白^[2]、纤维蛋白原^[3]、 α -乳清蛋白^[4]、红细胞生成素^[5]、 γ -干扰素^[6]、乳铁蛋白^[7]、转糖酶^[8]、组织纤溶酶原激活物^[9]、血清白蛋白^[10]、超氧化物歧化酶^[11]、凝血因子VII^[12]、 α_1 -蛋白酶抑制剂^[13]等。当前阻碍动物乳腺生物反应器产业化的主要问题是外源基因能否在动物乳腺稳定、高效地表达。本研究将绵羊 β -乳球蛋白基因(调控基因)和人胰岛素原基因(结构基因)组成的基因构件, 通过显微注射生产乳汁中表达人胰岛素原的转基因小鼠, 以检测基因构件的表达效率, 为进一步生产转基因家畜奠定基础。

1 材料和方法

1.1 外源基因

调控基因是绵羊 β -乳球蛋白基因, 其大小为10 807 bp(其中包含4.2 kb的5'调控序列, 2.4 kb的3'调控序列, 7个外显子及其内含子的全部序列); 目的基因是人胰岛素原基因, 其大小为1 118 bp(其中包含信号肽, A肽, B肽, C肽的编码序列及其内含子序列), 将人胰岛素原基因插入绵羊乳球蛋白基因的第二个外显子下游, 整个融合基因的总长约

[收稿日期] 1999-08-09
[基金项目] 国家863计划资助项目(Z 21-03-03)
[作者简介] 黄俊成(1968-), 男, 副研究员, 硕士。

为 12 kb。所用基因由新疆新科力生物技术研究所构建。

1.2 试验动物

试验小鼠为父系 BALB/C 鼠与母系昆明白小鼠杂交产生的 F₁ 代鼠, 产后饲养 1~2 月, 体重 20 g 左右。小鼠饲养室照明与黑暗时间分别为 14, 10 h。

1.2.1 供体的处理 试验小鼠腹腔注射 PMSG(天津动物中心, 批号 9204) 10 μmol/min, 46~48 h 后注射 hCG(宁波激素制品厂, 批号 970106) 10 μmol/min, 并按 1:1 放入公鼠笼。第 2 天挑选出有阴道栓的小鼠做供体。

1.2.2 受体鼠的准备 挑选性成熟的、体重在 25 g 左右的母鼠, 在供体鼠注射 hCG 的同时, 按 1:1 放入结扎公鼠笼, 第 2 天挑选出有阴道栓的小鼠做受体。

1.3 受精卵的注射与移植

在体视镜下, 将集卵皿中的卵用移卵管移入注射用载玻片上的 M2 培养液(SIGMA, M7167)中, 于微分干涉相差倒置显微镜(LEICA DM IRB)下观察卵, 并将外源基因(2 mg/L)注入原核中。将注射好的卵移回培养皿观察, 挑选成活的注射卵由伞口移入受体输卵管^[14]。

1.4 整合检测

1.4.1 尾组织 DNA 的提取 取 0.5~1.0 cm 的小鼠尾巴, 经组织消化液(10 mmol/L Tris, Cl, pH8.0, 100 mmol/L EDTA, pH8.0, 20 mg/L 胰 RNA 酶, 质量分数 0.5% 十二烷基硫酸钠(SDS), 0.1 μg/L 蛋白酶 K), 先 37℃ 保温 1 h, 然后 55℃ 过夜消化, 再加入等体积的饱和苯酚, 氯仿提取 DNA, 无水乙醇沉淀 DNA, 最后溶解在 100 μL 无菌水中^[15]。

1.4.2 PCR 检测 PCR 反应体系为 50 μL(10X buffer 5 μL, 10 mmol/L dNTP 4 μL, Tag 酶 20 μmol/min, 引物各 20 pmol, H₂O 32.4 μL, 样品 DNA 4 μL)于 PE480PCR 扩增仪上扩增, 条件为: 94℃ 5 min, 然后 94℃ 45 s, 58℃ 45 s, 72℃ 90 s 进行 35 个循环, 最后在 72℃ 延伸 7 min。扩增产物于质量分数 2% 的琼脂糖凝胶上电泳检测是否有 1 300 bp 阳性扩增带。

1.5 表达检测

1.5.1 乳样收集 在哺乳期的第 12 天, 将母鼠与仔鼠分开 3 h, 然后按每 10 g 体重 0.1 mL 腹腔注射 10 g/L 的异戊巴比妥钠, 并同时腹腔注射 1 μmol/min 的缩宫素注射液(上海禾丰制药有限公司 980501), 0.5 h 后收集乳汁做 10 倍的稀释后进行放免检测^[16]。

1.5.2 放免检测 小鼠乳样经离心脱脂后, 采用北京北方生物技术研究所生产的“胰岛素放射免疫分析测定盒”(RH-042-50), 通过 SN-682 放射免疫 γ 计数器(上海核福光电仪器公司)检测小鼠乳样中的胰岛素原含量(放免检测由兰州军区乌鲁木齐总医院核医学科承担)。

2 结果与讨论

2.1 转基因鼠的生产情况

共移植 888 枚注射了 BLG-胰岛素原基因的小鼠卵, 移植受体 31 只, 怀孕 14 只, 产仔 53 只。检测 51 只, 其中 5 只为阳性, 阳性鼠数分别占移植卵数、产仔数的 0.56% 和 9.4%。

2.2 PCR 检测结果

引物选择位于 BLG 基因 4 204~4 226 碱基对处(23 bp)和人胰岛素原基因 3 506~3 483 碱基对处(24 bp)的序列,其中 P1:5'-CAC TCC CTG CAG AGC TCA GAA GC -3'; P2:5'-GAT GCT GGT ACA GCA TTG TTC CAC -3'。扩增片段约 1 300 bp。PCR 检测 51 只试验小鼠,有 5 只小鼠有阳性扩增带(见图 1),且均为雌性小鼠。

2.3 放免检测结果

转基因小鼠中有两只泌乳,经放免检测乳汁中人胰岛素原的质量浓度分别为 37.44 mg/L 和 39.99 mg/L,将对照鼠与阳性鼠的检测结果进行 Students *t* 检验,差异极显著($P < 0.01$)。由于该放免检测是利用均相竞争抑制原理,采用非饱和(顺序饱和)法,样品中的胰岛素原与限量的抗体预先反应一段时间,加入标记抗原,以竞争结合剩余的抗体结合位点。当样品中胰岛素原含量高时,剩余抗体结合位点较少,与抗体结合的标记抗原相应减少。用分离剂分离出抗原-抗体复合物,测定结合物中的放射性,因标记抗原的结合量与样品中胰岛素原含量成函数关系,故可以计算出样品中胰岛素原浓度。但由于小鼠的胰岛素原与人胰岛素原有相似的抗原性,用放免检测无法将两者区分开,因而不能精确定量人胰岛素原在小鼠乳汁中的含量。

转基因小鼠中有 3 只异常消瘦而不能怀孕,其中 1 只极度衰竭而死亡。这可能是由于外源基因的随机整合插入而抑制小鼠正常的生长发育造成的。



图 1 BLG-胰岛素原基因检测结果

[参考文献]

- [1] Wright G, Carver A S, Cottom D, et al. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep[J]. *Bio/Technology*, 1991, 9: 830-834.
- [2] Sharma A, Martin M J, Okabe J F, et al. An isologous porcine promoter permits high level expression of human hemoglobin in transgenic swine[J]. *Bio/Technology*, 1994, 12: 55-59.
- [3] Butler S P, Van Cott K, Subtumanian A, et al. Current progress in the production of recombinant human fibrinogen in the milk of transgenic animals[J]. *Thromb Haemost*, 1997, 78(1): 537-542.
- [4] 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[J]. *Mol Reprod Dev*, 1997, 47(2): 157-163.
- [5] Korhonen V P, Tolvanen M, Hyttinen J M, et al. Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits[J]. *Eur J Biochem*, 1997, 15: 245(2): 482-489.
- [6] Dobrovolsky V N, Lagutin O V, Vinogradova T V, et al. Human gamma-interferon expression in the mammary gland of transgenic mice[J]. *FEBS Lett*, 1993, 15: 319(1-2): 181-184.
- [7] Platenburg G J, Kootwijk E P, Kooiman P M, et al. Expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice

- [J]. *Transgenic Res*, 1994, 3(2): 99-108.
- [8] Prieto P A, Mukerji P, Kelder B, et al. Remodeling of mouse milk glycoconjugates by transgenic expression of a human glycosyltransferase[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(49): 29515-29519.
- [9] Ebert K M, Selgrath J P, Di Tullio P, et al. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression[J]. *Biotechnology*, 1991, 9(9): 835-838.
- [10] Shani M, Barash I, Nathan M, et al. Expression of human serum albumin in the milk of transgenic mice[J]. *Transgenic Res*, 1992, 1(5): 195-208.
- [11] Hansson L, Edlund M, Edlund A, et al. Expression and characterization of biologically active human extracellular superoxide dismutase in milk of transgenic mice[J]. *J Biol Chem*, 1994, 18(269(7)): 5358-5363.
- [12] Niemann H, Halter R, Carnwath J W, et al. Expression of human blood clotting factor VII in the mammary gland of transgenic sheep[J]. *Transgenic Res*, 1999, 8(3): 237-247.
- [13] Degryse E, De Santi M M, Dietrich M, et al. A human SP-C promoter fragment targets alpha 1-proteinase inhibitor gene expression to lung alveolar type I cells in transgenic mice[J]. *Transgenic Res*, 1996, 5(2): 139-143.
- [14] Hogan B, Beddington R, Costantini F, et al. *Manipulating the Mouse Embryo*[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 173-178.
- [15] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993. 315-318.
- [16] Devinoy E, Thepot D, Stinnakre M G, et al. High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland[J]. *Transgenic Res*, 1994, 3: 79-89.

Expression of human proinsulin gene in milk of transgenic mice

HUANG Jun-cheng, SHI Hong-cai, LI Wen-rong,
WU Jian, YANG Dong-mei, GUO Zhi-qin

(Key Laboratory of Animal & Veterinary Biotechnology, Ministry of Agriculture,
Xinjiang Academy of Animal Sciences, Urumqi 830000, China)

Abstract: The recombinant gene containing human proinsulin gene driven by ovine β -lactoglobulin gene was microinjected into the pronucleus of mouse zygotes. A total of 888 eggs injected were transferred into 31 recipients, of which 14 recipients were pregnant and produced 53 pups, and there were 5 transgenic female mice in 51 pups screened by PCR. Milk samples, collected from two lactating transgenic mice, contained 37.44 mg/L and 39.99 mg/L human proinsulin respectively by radioimmunoassay. Other three transgenic mice were too weak to be pregnant, of which one was dead.

Key words: Human proinsulin gene; transgenic mice; gene expression