

动物乳腺生物反应器研究进展^{*}

舒建洪¹, 刘 津², 胡先春³, 杨瑞锋¹, 张 涌¹

(1 西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100;

2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

3 广东省兽药工程技术研发中心, 广东 广州 510507)

[摘 要] 针对利用动物乳腺生物反应器技术生产重组蛋白, 具有生产效率高和经济效益明显的特点。综述了制备乳腺生物反应器时表达载体构建和基因转移两个关键环节的研究现状, 并就基因打靶和体细胞克隆技术的结合探讨了乳腺生物反应器的发展趋势。

[关键词] 乳腺生物反应器; 表达载体; 转基因; 基因打靶; 体细胞克隆

[中图分类号] Q753

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)12-0149-05

乳腺生物反应器是转基因动物技术的重要分支, 核心内容是利用乳蛋白基因的乳腺特异性调控成分驱动外源基因在动物乳腺中的高效表达, 以期从乳汁中源源不断地获得大量外源蛋白。1985 年, Lovell-Badge^[1]首次提出用转基因动物乳腺生产重组蛋白的思路。1987 年, Gordon^[2]以人组织纤溶酶原激活剂(tPA)与小鼠乳清酸蛋白基因启动区构建融合表达结构, 制作出了首例乳腺生物反应器小鼠模型。在此后的十多年里, 生产人 α 1-抗胰蛋白酶^[3]、人尿激酶^[4]、人凝血因子^[5]及人乳铁蛋白^[6]的转基因牛相继问世。实践证明, 乳腺生物反应器生产的外源蛋白种类广泛, 从小分子肽到大分子复杂蛋白质, 从生物活性酶到抗体、病毒抗原蛋白均可有效生产。从目前的研究成果看, 与传统的原核系统及细胞发酵系统相比, 动物乳腺生产的重组蛋白产品具有以下特点: (1) 生物活性高, 无污染。动物乳腺作为一个完善的“分子农场”, 可对重组蛋白进行完全的翻译后加工, 包括糖基化、磷酸化和羧基化等, 从而保证产品的高生物活性, 并且不易产生抗药性。(2) 纯化简单。现已建立了完整的分离和纯化乳中重组蛋白的生产程序, 用常规方法除去酪蛋白后将乳清分级沉淀, 再用常规的层析技术即可分离纯化。(3) 产量高, 成本低。外源基因在动物乳腺的表达量可达每升几克到几十克, 小群转基因大家畜的产量即可满足全世界市场的需求。一旦获得

有高效表达的祖代个体, 其遗传性即可保证维持生产的低成本。总之, 动物乳腺生物反应器已成为生物技术领域发展的尖端方向, 具有广阔的开发前景。针对这一现状, 本研究对其研究进展进行了综述, 以为动物乳腺生物反应器的深入研究提供资料。

1 动物乳腺生物反应器的研究现状

1.1 表达载体的构建

1.1.1 调控序列 制备乳腺生物反应器的关键是保证目的蛋白特异性在乳腺中的高效表达, 传统表达载体都是选用某种乳蛋白基因的调控序列作为启动子元件。目前, 已经克隆并用作构建载体的乳蛋白基因主要有 β -乳球蛋白(BLG)基因、 α S1-酪蛋白基因、 β -酪蛋白基因、乳清酸蛋白(WAP)以及乳清白蛋白基因。后 2 种基因的调控区虽可以指导外源基因表达, 但乳腺表达的特异性及效率均不及前 3 种^[7]。这些基因的调控区主要包括启动子区、增强子序列和其他众多转录、翻译相关元件。实际使用中, 反刍动物一般采用同一物种的启动子, 并以 BLG 使用较多; 家兔、猪和鼠类则采用 WAP。另外, 乳蛋白基因调控序列可以混用, 比如用 α S1-酪蛋白 5 调控区与 β -酪蛋白 3 端调控元件仍可以构建有效的表达载体。而且大量研究^[8]发现, 增加乳蛋白基因 5 端调控区的长度及使用其第一、第二内含子, 往往可获得高效表达的机会, 这可能是由于

* [收稿日期] 2003-11-16

[基金项目] 国家“863”高技术资助项目(2001AA213081)

[作者简介] 舒建洪(1978-), 男, 浙江金华人, 在读博士, 主要从事胚胎工程和分子生物学研究。

[通讯作者] 张 涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程与发育生物学研究。

E-mail: zhangyl@public.xa.sn.cn

5 远端及内含子中含有增强子或顺式作用元件,甚至是含有可对抗位置效应的位点控制区(LCR)或基质结合区(MAR)^[9]。

以乳蛋白调控区构建的普通质粒表达载体属于基础性表达载体,机械地将调控元件与外源基因组装在一起,人工雕琢痕迹很重,尽管偶尔可获得较高水平的表达,但绝大多数表达水平只能达到微克或毫克级。在表达载体上引入鸡溶菌酶等基因的 MAR 或与之共注射,可从某种程度上消除位置依赖性,但是这种方法只是将表达构件“绝缘”在染色体的独立区域,并未达到定点整合的结果^[10]。整体上看,这类质粒载体制作出乳腺生物反应器的效率很低,基本无法形成商品化的规模。近几年来,酵母人工染色体(YAC)技术得到了较大发展,其可将目的基因替换成乳蛋白基因的独立转录单位,而后将乳蛋白整个区域组装成 YAC 并转染 ES 细胞,或直接注入受精卵的原核去制作转基因动物。YAC 法可保证表达调控序列的天然状态,克服了质粒表达载体存在位置效应这一最致命的弱点。Fujiwara 等^[11]以人生长激素基因替代人 α 乳白蛋白的结构基因部分,以之构建成 YAC 表达载体,制作出转基因大鼠,乳腺中高效表达了人生长激素(0.25~8.9 mg/mL)。尽管 YAC 法中基因的表达保持了精确的时空性^[1215],但现在还没有成功使用 YAC 法制作转基因大家畜的例子,且整个技术体系还不成熟,仍需改进和完善。

1.1.2 目的基因 十多年来,已有数种高价值的产品在大动物乳汁中生产出来,于小鼠乳腺中获得表达的产品更是多达数百种。从国际大公司开发的情况可以看出,高经济价值的医用蛋白和营养蛋白是重要的研发对象,如 AT-、AAT、蛋白 C、乳铁蛋白、乳糖酶等都已进入了三期或二期临床试验阶段^[16]。选择目的基因应当首先考虑那些正常情况下来源困难或浓度低,其他表达系统难以生产且临床应用前景广阔的蛋白基因。可以预见,由于细胞工程和基因治疗技术的发展,细胞因子类产品将不会通过动物乳腺反应器生产,而用途更广、需求量更大的治疗性抗体、营养蛋白和工程酶将成为制备乳腺生物反应器的首选靶蛋白。另外,若能建立起稳定的转基因家畜群,以乳腺反应器生产基因工程疫苗,不仅生产效率可观,而且可直接以乳汁进行临床免疫,达到方便快捷的目的。值得一提的是,利用乳腺生物反应器生产的“新奇牛奶(novel milk)”已经问世。2003 年,Brophy 等^[17]通过共转染和嘌呤霉

素筛选向牛胎儿成纤维细胞引入 β -酪蛋白基因和 κ -酪蛋白基因的多量拷贝,而后进行核移植生产出了 8 头转基因奶牛,其所产奶中酪蛋白总量较普通奶高 30%,总蛋白量也提高了 13%。这种奶的蛋白和钙含量提高,热稳定性增强而乳糜颗粒变小,其营养价值更高,也更适于奶酪生产。对奶成分的改造方法还有:(1)调整酪蛋白基因。如引入酪蛋白磷酸化位点、蛋白酶裂解位点,去除 β -酪蛋白纤溶酶水解位点;(2)引入功能性蛋白,例如溶菌酶、乳铁蛋白等。这些工作都将使牛奶更具利用价值。未来 10 年,人工改造奶将占据世界市场每年 400 亿美元的相当份额,澳大利亚和新西兰政府已经斥巨资开始了这项前景广阔的研究^[18]。

1.2 基因转移技术

1.2.1 显微注射法 此法由 Gordon 等^[19]于 1980 年建立,即将表达载体(线状或环化)直接注射到受精卵原核内部。通过此法已经产生了转基因小鼠、兔、猪、绵羊、山羊和奶牛,但是转基因效率也是逐次降低,奶牛的效率更是低到了 0.5%以下。这是由于奶牛繁殖率低,尽管超排可以获得较多胚胎,但是卵母细胞的体外成熟和体外受精以及早期胚胎的体外培养技术仍未达到令人满意的程度;并且大动物胚胎胞浆含有大量泡状颗粒,影响透光性,不易显微操作。实践证明,此法对大马哈鱼和另外一些鱼类十分有效(并不是全部),而对于大家畜还需要建立更多的转基因系以供传代和研究,以期找到提高效率的合适策略^[20]。

1.2.2 配子介导法 使用较多的是精子载体技术,即将精子(或精子头)和目的基因共孵育后,进行体内或体外受精^[21]。采用此法需提高精子质膜通透性,因此要采用电激、冷冻,甚至是去污剂处理,但精子质膜易被破坏而导致精子大量失活,而且插入的目的 DNA 也会发生降解,因此这种方法的效率并不比传统的显微注射高,试验结果也很不一致。处于 M 期的卵母细胞核膜会发生分解,出现一个短暂的核膜分解期,这为外源基因的整合提供了可能。目前,采用将目的基因转染的精子或整合的逆转录病毒注射到 M 期卵母细胞质的方法,已经制作出转基因小鼠、猴和牛^[2224],用这种方法整合的目的基因不但有序稳定,而且拷贝数和插入位点相对固定,产生后代的纯合个体多。尤其是后一种方法,是能反复转导外源基因到鸡体内的唯一方法,但其携带外源基因能力较差,并且病毒颗粒LTR与基因启动子之间可能存在互扰^[20]。

1.2.3 核移植介导法 1997 年底,英国 Roslin 研究所和 PPL 公司通过克隆转基因体细胞,获得了 6 只整合 neo 或 neo 和 F-IX 基因绵羊,这标志着核移植介导的转基因技术成功问世^[25]。理论上讲,外源基因转染的细胞在体外筛选培养后,通过核移植技术生产的转基因动物 100 % 为阳性个体,但实际上生产效率大约只有 2.5 %。成年动物体细胞经过长期体外培养,会出现染色体丢失、异常甲基化等现象,用作核移植时效率很差,用此法获得成功的例子均使用了胎儿成纤维细胞为供核细胞,以最大限度地克服这一缺陷。显然,成熟的供核细胞培养技术对此法来说十分关键,若想获得普遍成功,就必须将细胞培养技术改善得更为合理成熟。另外,对一些高繁殖的动物来说(小鼠、兔、猪),显微注射法仍保持着优越性^[26]。

2 基因打靶与体细胞克隆结合是乳腺生物反应器的发展趋势

2.1 基因打靶实现目的基因的定点整合

利用同源重组原理的基因打靶技术,能够将目的基因定位整合于乳蛋白(或其他合适的)基因座,充分利用天然乳蛋白固有的高效表达调控机制,克服拷贝数依赖性和随机整合的位置效应,保证目的基因在乳腺中的特异性表达,并可能取得与乳蛋白一致的表达水平。基因打靶的前提是构建合理的打靶载体,通常的打靶载体分为插入型载体和置换性载体,区别在于载体与靶基因组同源序列双链断裂位点的位置不同;20 世纪 90 年代又出现了“Hit and Run”和“Tag and Exchange”两种新的打靶策略^[27]。但无论是哪种方法,其所依赖的同源重组是一个稀有事件,其在胚胎干细胞中发生的频率比体细胞中高 3 000 倍^[28],而小鼠基因打靶之所以应用较广泛,也是因为其胚胎干细胞建系及胚胎重建技术较为完善。目前大家畜的胚胎干细胞建系进展缓慢,以其进行基因打靶制作乳腺生物反应器还无法实现。另外,以上 4 种打靶策略均为完全基因敲除,导入的外源筛选基因片断可能会对内源性调控造成致命干扰,从而影响基因 DNA 功能的变化,在胚胎发育的早期就将靶基因敲除置换,亦无法反映出基因受到的特定调控作用。

2.2 条件性重组体系与核移植技术的巧妙结合

条件性同源重组技术中,独特的 DNA 序列可在重组酶的作用下发生高效重组,从而将打靶事件限定在特定的细胞形态和特定的生命周期,实现时

空双向的调节。常用的 2 种条件性重组体系是 Cre-LoxP 系统和 FL P-frt 系统,基本原理是在 Cre 或 FL P 重组酶作用下,相应地敲除靶基因 LoxP 位点或 frt 位点间特定的 DNA 片断;当在靶染色体上引入 LoxP 位点或 frt 位点后,含有相应序列的构件在重组酶 Cre 或 FL P 作用下插入靶位点,即实现了基因的条件性定点整合^[29]。

由以上讨论可以想象,以条件性重组体系对大家畜体细胞进行打靶,将目的基因整合到合适的基因座后,通过体细胞核移植技术生产转基因动物,将是一种很巧妙的方法。首先,条件性基因打靶可以保证目的基因在乳腺的特异性高效表达,并且可以进行激素、调节因子的诱导性生产,通过筛选培养,可 100 % 保证供核细胞对目的基因的整合。其次,从现有成果看,体细胞克隆技术生产转基因动物的成功率已经超过了显微注射等常规技术^[8],并且克隆技术可以缩短生产周期,并可以选择性克隆雌性细胞。两项技术的结合,基本突破了动物转基因技术的发展屏障而又具有明显的生产优势,是未来动物乳腺反应器发展的必然趋势。2000 年,英国 PPL 公司将人 AAT 基因定点整合到胎儿成纤维细胞的 $\alpha 1$ 原胶原 (Procollagen) 基因座位,而后用转基因细胞进行核移植,生产出世界首例基因打靶绵羊,其乳中 AAT 蛋白含量达到了 650 mg/L,远高于显微注射法 18 mg/L 的水平^[30];据《Science》2002 年 2 月报道,赖良学等^[31]用核移植方法获得了 4 头敲除了 $\alpha 1, 3$ -半乳糖苷酶基因的克隆猪。这两项最近的研究成果虽然并不完全采用“条件打靶-体细胞克隆”方法,但都是以体细胞核移植技术为支持平台,通过基因打靶(敲除)于细胞水平上操作处理的结果,其成功经验预示着这项技术的良好发展前景。

各种抑制内源基因表达策略如三级螺旋法、反义 RNA 法 (RNA 干涉法) 和翻译抑制蛋白法^[20, 32, 33]的出现,在某些层次上也为乳腺生物反应器的研究提供了思路。这些方法只要转入一个抑制基因(或一段抑制核酸序列),即可以特异性、精确而灵活地抑制某种内源基因的表达,但方法体系还远未成熟到应用于大家畜转基因技术的程度,而只是比较有发展潜质的基因治疗技术。

3 问题及展望

目前,生产实践中动物乳腺生物反应器的应用已崭露头角,但这项技术还存在着众多问题,首先是研发周期长、前期投资大及技术难度高等,导致所有

产品都未商品化;其次,有关转基因动物的基础理论研究还比较薄弱;另外,乳腺生物反应器的异位表达和表达产物的泄露问题也需要各种新技术来解决;最后,人们出于对转基因产品安全性以及转基因技术所涉及的伦理道德问题的考虑,对转基因产品接受程度不高,这在一定程度上阻碍了乳腺生物反应器的发展。

乳腺生物反应器这项技术还需要在众多方面加

以改进,尤其是转基因动物生产效率低和基因表达受“位置效应”影响这两大技术瓶颈^[34]。虽然核移植与基因打靶技术相结合可消除转基因技术的发展屏障,但这两项高新技术还未完全成熟,尚存在着许多缺陷^[35,36]。然而,成功的实例^[30,31]证明,这两项技术正在不断完善和完美对接,最终将会为乳腺生物反应器的商品化铺平道路,并造福于人类。

[参考文献]

- [1] Badge L, Bygrave A E, Bradley A, et al. Transformation of embryonic stem cells with the human type- collagen gene and its expression in chimeric mice[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1985, 50:707 - 711.
- [2] Gordon K, Lee E, Vitale J, et al. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk[J]. Biotechnology, 1987, 5:1183 - 1187.
- [3] Wright G, Carver A, Cottom D, et al. High expression of active human α 1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep[J]. Biotechnology, 1991, 9: 830 - 834.
- [4] Meade H, Gates L, Lacy E, et al. Bovine α s1-casein gene sequence direct high level expression of human urokinase in mouse milk[J]. Biotechnology, 1990, 300:511 - 515.
- [5] Mikko U O, Hyttinen J M, Korhonen V P, et al. Bovine α s1-casein gene sequence direct high level expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the milk of transgenic mice[J]. Transgenic Research, 1997, 6:75 - 84.
- [6] Van Berkel P H, Welling M M, Geerts M, et al. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows[J]. Biotechnology, 2002, 20:484 - 487.
- [7] 刘 森, 梁国栋. 利用动物乳腺生物反应器生产药用蛋白[J]. 生物工程学报, 2000, 16(4):421 - 424.
- [8] 苟克勉, 安晓荣, 田见晖, 等. 动物乳腺生物反应器的现状和趋势[J]. 生物工程学报, 2002, 18(2):144 - 148.
- [9] Whitelaw C, Grollis, Accornero P, et al. Matrix attachment region regulates basal beta-lactobulbin transgene expression[J]. Gene, 2000, 244:73 - 80.
- [10] Jeffery M R, Shi L, Brian R, et al. The mammary gland as a bioreactor: factors regulating the efficient expression of milk protein-based transgenes [J]. Am J Clin Nutr, 1996, 63:627 - 632.
- [11] Fujiwara Y, Miwa M, Takahasbi R, et al. High-level expressing YAC vector for transgenic animal bioreactors[J]. Mol Reprod Dev, 1999, 52(4): 414 - 420.
- [12] Jakobovits A, Moore A L, Green L L, et al. Germ-line transmission and expression of a human-derived yeast artificial chromosome[J]. Nature, 1993, 36(6417):255 - 258.
- [13] Choi T k, Hollenbach P W, Pearson B E, et al. Transgenic mice containing a human heavy chain immunoglobulin gene fragment cloned in a yeast artificial chromosome[J]. Nat Genet, 1993, 4(2):117 - 123.
- [14] Peterson K R, Clegg C H, Huxley C, et al. Transgenic mice containing a 248-KB yeast artificial chromosome carrying the human beta-globin locus display proper development control of human globin gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(16):7593 - 7597.
- [15] Strauss W M, Dausman J, Beard C, et al. Germ line transmission of a yeast artificial chromosome spanning the murine alpha 1 () collagen locus [J]. Science, 1993, 259(5103):1904 - 1907.
- [16] 陈永福. 转基因动物[M]. 北京:科学出版社, 2002.
- [17] Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, et al. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of casein and casein[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21:157 - 162.
- [18] Karatzas C N. Designer milk from transgenic clones[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21:138 - 139.
- [19] Gordon J W, Seangos G A, Diane J, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1980, 77:7380 - 7384.
- [20] Houdebine L M. Animal transgenesis: recent data and perspectives[J]. Biochimie, 2002, 84:1137 - 1141.
- [21] Perry A C F, Wakayama T, Kishikawa H. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection[J]. Science, 1999, 284:1180 - 1183.
- [22] Nagano M, Brinster C J, Orwing K E. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98:13090 - 13095.
- [23] Chan A W, Chong K Y, Martinovich C, et al. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer in mature oocytes[J]. Science, 2001, 291:309 - 312.
- [24] Chan A W, Homan E J, Ballou L U. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95:14028 - 14033.
- [25] Schnieke A E, Kind A J, Ritchie W A, et al. Human factor transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts[J].

- Science,1997,278:2130 - 2133.
- [26] Houdebine L M. Transgenic animal bioreactors[J]. Transgenic Res,2000,9:305 - 320.
- [27] 李湘萍,徐慰倬,李 宁. 动物基因敲除研究的现状与展望[J]. 遗传,2003,25(1):81 - 88.
- [28] Piedrahita J A. Targeted modification of the domestic animal genome[J]. Theriogenology,2000,53:105 - 106.
- [29] 杨 晓,黄培堂,黄翠芬. 基因打靶技术[M]. 北京:科学出版社,2002.
- [30] McCreath K J,Howcroft J,Campbell K H,et al. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells[J]. Nature,2000,405:1066 - 1069.
- [31] Lai L,Kolber-Simonds D,Park K W,et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning[J]. Science,2002,295:1089 - 1092.
- [32] Upegui-Gonzalez L C,Francois J C,Ly A. The approach of triple helix formation in control of gene expression and the treatment of tumors expressing IGF- [J]. Adv Exp Med Biol,2000,465:319 - 332.
- [33] Timmons L,Fire A. Specific interference by ingested dsRNA[J]. Nature,1998,395:854.
- [34] 卢一凡,邓继先,肖成祖. 转基因动物乳腺定位表达重组蛋白质的研究现状(下)[J]. 高技术通讯,1998,(2):59 - 62.
- [35] 林福玉,邓继先,杨 晓,等. 基因打靶方法制备乳腺生物反应器[J]. 中国生物工程杂志,2003,(2):1 - 5.
- [36] 刘红全,戴继勋,于文功,等. 基因打靶技术的研究进展[J]. 遗传,2002,24(6):707 - 711.

Research progress on mammary gland bioreactor

SHU Jian-hong¹, LIU Jin², HU Xian-chun³, YANG Rui-feng¹, ZHANG Yong¹

(1 Institute of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Center of Animal Medicine Engineering and Development, Guangzhou, Guangdong 510507, China)

Abstract: The mammary gland bioreactor is an efficient and novel technique to produce functional proteins, which has great commercial value. The article reviews the current status of construction of expression vector and ways of gene transfer, the two key procedures in mammary gland bioreactor. Moreover, the article discusses the prospect of mammary gland bioreactor based on the conjunction of gene targeting and somatic cloning.

Key words: mammary gland bioreactor; expression vector; transgene; gene targeting; somatic cloning

(上接第 148 页)

Review of nutrient source studies on *Gastrodia elata* Bl. growth up

HUANG Hai-ying, LIANG Zong-suo, WANG Wei-ling

(College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This paper reviewed the research development on nutrition of *Gastrodia elata* Bl. from the germination nutrition of seeds, the nutrition growth, the nutrition at reproduction stage and the secondary nutrition. It was suggested that there are three ways for *G. elata* to get nutrition at germinating stage: to digest the hyphae of invading *Mycena osmundicola*, to consume its own storage nutrients, to absorb nutrient in solution. The main nutritional resource of the growth of *G. elata* depends on assimilating the *Mycena hyphae*. When *G. elata* enters the reproduction stage, it supplies the massive carbohydrates, which *G. elata* block stem stored. The secondary nutritional resource of *G. elata* is organic and the inorganic nutrients in its surrounding environment which can be used during the vegetative growth and the reproduction growth stage. No matter how nitrogen, phosphorus, potassium enters *G. elata* block stem, they are the secondary nutritional resources and will influence *G. elata* physiological activity.

Key words: *G. elata*; source of nutrition; *Mycena osmundicola*; *Armiliariella mellea*