

融合启动子调控下的 t-PA cDNA 乳腺定位表达*

李银聚¹, 程相朝¹, 赖良学², 赵君², 扈荣良², 殷震²

(1 洛阳农业高等专科学校 食品科学系, 河南 洛阳 471003;

2 解放军军需大学 兽医研究所, 吉林 长春 130062)

[摘要] 由牛 β Casein 启动子与大鼠 WAP 启动子融合构建了 t-PA cDNA 乳腺定位表达载体 pSVL- β WAP-PA, 以研究 t-PA 乳腺定位表达的调控。结果表明, 将表达载体 pSVL- β -PA, pSVL-WAP-PA 及 pSVL- β WAP-PA 分别直接注入怀孕的家兔乳腺管中, 溶圈试验显示 3 种表达载体均能在家兔乳腺中表达, 且以分娩后第 4 天的乳汁中表达水平最高, 分别为 390, 430 和 670 ng/mL。证明 0.6 kb 的牛 β Casein 上游调控序列具有一定的定位表达调控能力。融合启动子较单纯的 β Casein 或 WAP 启动子调控下的 t-PA cDNA 表达水平高。

[关键词] β Casein 基因; 乳清酸蛋白基因; t-PA cDNA; 乳腺定位表达

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)05-023-04

转基因动物研究与应用的一个重要方面是生产珍贵的药用蛋白。乳腺是人们首先和主要研究的靶组织。因此, 探索基因转移的有效途径和外源基因在乳腺中定位表达调控, 是建立乳腺生物反应器的关键。

组织型纤溶酶原激活剂 (tissue-type plasminogen activator, t-PA) 是血栓性疾病治疗上非常理想的药物。由于 t-PA 在血液、组织液等天然材料中的浓度极低, 难以大量制备。目前应用的是体外细胞培养生产的基因工程产品, 产量低, 成本高, 不能满足临床需要。自从 Gordon 等^[1]人建立 t-PA 乳腺定位表达的转基因小鼠以来, 许多国家竞相研究 t-PA 的乳腺定位表达系统, 以期得到表达量高、能够大规模生产 t-PA 的大型转基因动物。但是, 由于转基因的不可预测性, 在目前尚未能够充分了解乳蛋白基因表达及转基因对复杂调控网络的影响以前, 在泌乳量高的大动物如牛、羊上实施转基因具有很大的盲目性。因此, 国内外研究者常以小鼠为模型, 利用受精卵显微注射的方法来研究乳腺定位表达载体构件的可行性以及探讨高水平表达的机制。这种方法比较真实可靠, 但试验周期长, 表达水平因整合位点的不同差异很大。笔者将定位表达载体直接注入乳腺管中, 也能得到暂进性的表达, 这种方法操作简单, 试验周期短, 在大动物中易实施, 可用于检验乳腺定位表达载体中各构件的正确性。同时, 笔者构建了多种定位表达载体, 以研究 t-PA 乳腺定

位表达调控, 为建立高效表达 t-PA 的转基因动物作一有益的探索。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

HB 101, DH5a 受体菌; 质粒 PGEM-T- β Casein, 内含 0.6 kb 的牛 β Casein 上游调控区序列, 均由本室保存; pSVL-WAP-PA 为本室构建的定位表达载体, 内含 WAP 基因-948~+1 序列及 t-PA cDNA。

1.2 酶及试剂

工具酶分别购自 Promega 公司和华美生物工程公司, 牛凝血酶、牛纤维蛋白原购自北京生物制品检测所, 脂质体购自 Promega 公司, t-PA 标准品为 Sigma 公司产品, 其他试剂均为分析纯。

1.3 试验动物

妊娠 27 d 的青紫兰母兔。

1.4 试验方法

质粒的提取和纯化 参照文献[2], 采用碱裂解法提取并用聚乙二醇沉淀法纯化质粒。

质粒DNA的酶切分析、片段回收、连接及细菌转化 参照文献[2]方法进行。

转染液的制备 取质粒 pSVL- β -PA、pSVL- β WAP-PA 和 pSVL-WAP-PA 各 25 μ g (25 μ L)。分别加入 5 μ L 脂质体, 静置 15 min 后各加生理盐

* [收稿日期] 2001-02-07

[基金项目] 国家“863”计划资助项目 (Z21-04-03)

[作者简介] 李银聚(1965-), 男, 河南中牟人, 讲师, 硕士。主要从事生物化学教学和分子生物学及转基因动物的研究。

水 100 μL 。

家兔乳腺的基因注射 妊娠到 27 d 的母兔, 用速眠新注射液 250 μL 耳静脉注射麻醉, 用直径约 600 μm 尖部钝化的玻璃管吸取 120 μL 的转染液, 后端经乳胶管与注射器相连; 兔的乳头有多个乳头管, 逐一注射, 每管约 20 μL , 注射后稍加按摩, 依此法分别将 3 种转染液依次注入不同乳腺中。

t-PA 基因乳腺表达产物的检测 参照文献 [3], 采用琼脂糖平板溶圈法检测。14 g/L 琼脂糖, 2 mg/mL 的牛纤维蛋白原及 50 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 的牛凝血酶均以 0.1 mol/L 的 PBS (pH 7.4) 配制。取 6 mL 融溶并降温到 60 左右 14 g/L 琼脂糖, 加入 5 mL 37 预热的牛纤维蛋白原及 0.2 mL 42 预热的凝血酶, 混匀倒入 96 孔酶联板盖内, 凝固后打孔。标准对照孔分别加入 10 μL 含 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 ng 标准 t-PA 的阳性对照乳, 样品孔加入 30 μL 乳汁, 阴性对照为兔无注射基因乳头分泌乳 (30 μL), 37 饱和湿度下过夜, 观察结果。以标准

t-PA 产生的溶圈直径对标准 t-PA 量作出标准曲线, 以测定样品乳中 t-PA 含量。i

2 结果与分析

2.1 pSVL- β -PA 表达载体的构建与鉴定

将含牛 β Casein 基因上游调控序列的质粒 PGEM-T- β Casein 以 *Nco*I 酶切完全后, 加入 Klenow + dNTP, 37 作用 30 min 补平, 电泳纯化后再以 *Spe*I 酶切, 回收 0.6 kb 的 β Casein 上游调控区片段。pSVL-WAP-PA 以 *Xho*I 酶切, 加 Klenow + dNTP 补平, 电泳纯化后再以 *Spe*I 酶切, 电泳回收 6.3 kb 大片段, 并与回收的 β Casein 基因上游调控区连接, 转化 DH5 α 宿主菌。正向插入的重组表达载体经 *Hind*III 酶切后出现 3 条带 (0.4, 1.0, 5.4 kb), 与理论设计相符, 即为 pSVL- β -PA 乳腺定位表达载体。构建路线见图 1, 酶切鉴定结果如图 2。

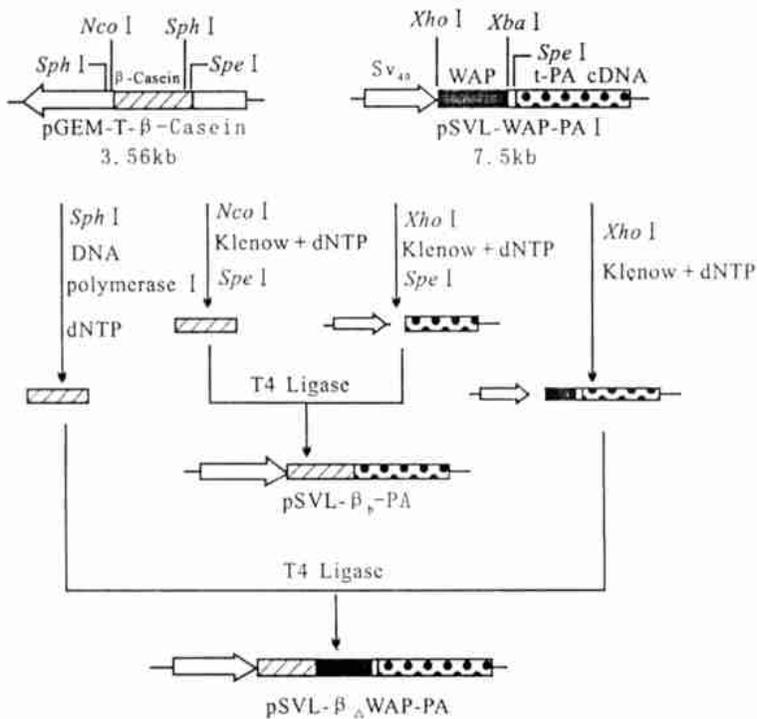


图 1 表达载体 pSVL- β -PA 和 pSVL- β WAP-PA 的构建

Fig 1 Construction of pSVL- β -PA and pSVL- β WAP-PA expression vectors



图 2 pSVL- β -PA 酶切鉴定
1. λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III marker;
2. pSVL- β -PA *Hind*III 酶切
Fig 2 Identification of pSVL- β -PA using endonuclease
1. λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III marker
2. pSVL- β -PA digested with *Hind*III

2.2 pSVL- β WAP-PA 表达载体的构建与鉴定

将质粒 pGEM-T- β Casein 以 *Sph*I 酶切完全后, 加 DNA Polymerase I + dNTP, 在 37 °C 条件下作用 30 min 切补成平端, 回收 0.6 kb 的 β Casein 基因上游调控区片段, pSVL-WAP-PA 以 *Xho*I 酶切, 加 Klenow + dNTP 补平, 回收 7.5 kb 大片段, 并与回收的 β Casein 调控区序列连接重组, 转化 DH5a 宿主菌, 经 *Eco*R I 酶切筛选, 正向插入的重组表达载体切出 5 条带 (0.5, 0.7, 1.2, 2.6, 3.2 kb), 与理论设计相符, 即为 pSVL- β WAP-PA 乳腺定位表达载体。构建路线见图 1, 酶切鉴定如图 3。



图3 pSVL- β WAP-PA 酶切鉴定

1. λ DNA/*Eco*R I + *Hind*III marker; 2 pSVL- β WAP-PA *Eco*R I 酶切

Fig 3 Identification of pSVL- β WAP-PA using endonuclease

1. λ DNA/*Eco*R I + *Hind*III marker; 2 pSVL- β WAP-PA digested with *Eco*R I

2.3 t-PA cDNA 在家兔乳腺中的定位表达

分别在分娩后第 1, 2, 4, 6, 8, 10 天取乳, 以琼脂糖平板溶圈法检测 pSVL- β -PA, pSVL- β WAP-PA 和 pSVL-WAP-PA 的表达水平, 结果见表 1。由表 1 可以看出, 融合启动子调控下的 t-PA 基因表达水平明显高于 β Casein 启动子 ($P < 0.05$) 或高于 WAP 启动子。WAP 启动子较 β Casein 启动子调控下的 t-PA 表达水平偏高, 但差异不显著。

表 1 3 种载体在家兔乳腺中的表达量

Table 1 The expression of the three vectors in rabbit milk ng/mL

时间/d Time	pSVL- β -PA	pSVL- β WAP-PA	pSVL-WAP-PA	阴性对照乳 Negative rabbit milk
1	220	360	240	80
2	300	450	280	80
4	390	670	430	50
6	340	500	410	20
8	180	340	210	10
10	200	260	170	20
\bar{x}	271.67	430	290	43.33

3 讨论

转基因动物个体表达系统的特点是表达量高,

可以规模化生产, 并能够在机体水平上研究表达生物活性物质的机制。t-PA 是心血管疾病治疗上非常理想的药物。Ebert 等^[4,5]首次利用 t-PA 基因在 WAP 启动子的控制下培育出转基因羊, 并在乳腺中表达出了 t-PA。这种方法获得的转基因动物一般具有遗传性, 表达量稳定, 但技术难度大、周期长、整合率低。利用乳腺注射方法将基因直接转移, 能得到暂时性表达, 这种方法比较简单, 在哺乳动物中易实施, 可验证乳腺定位表达载体中基因调控序列的功能正确性, 以用于转基因动物乳腺定位表达的研究。

乳蛋白的合成与分泌是受多种因素影响的调控过程, 外源基因在乳腺细胞中的特异性表达, 通常是 DNA 结合蛋白和基因 5' 侧翼序列中顺式作用元件 (cis-acting element) 特异性反应调节转录水平所致。影响转录水平的因素很多, 其中主要是顺式作用元件中的启动子、增强子及 mRNA 的剪切加工效率。WAP 和 β Casein 基因 5' 侧翼区的启动子含有乳腺因子及一些激素受体的结合位点, DNA 结合蛋白通过和这些位点的结合以调节 DNA 在乳腺中特异的转录和表达。

判断某一启动子的强弱, 主要是根据其转录水平的高低, 应当测定起始相应 mRNA 合成的效率, 但这种测定方法很难做到。通常是根据其相应蛋白产物的表达水平间接地推算出某一启动子的效率。这种方法也不能完全正确地比较不同启动子的效率。因为不同的 mRNA 含有不同的 5' 端非翻译区, 它们能影响 mRNA 的翻译效率。因此, 蛋白产物的表达水平既反映了启动子的强度, 又反映了 5' 端非翻译区的组成与长度对翻译的影响, 或者反映出两者联合的效果。

大鼠的 WAP 基因全长 2.8 kb, 其 5' 端-948~+1 序列足以指导内源基因或外源基因在动物乳腺中的特异表达。这一序列除 TATA 盒 (-30)、CAAT 盒相似序列“GAAAGTG”(-55)等^[6]典型的启动子序列外, 还有乳腺因子及一些激素(如糖皮质激素和催乳素等)受体结合位点。牛 β Casein 基因全长 8.49 kb^[7]。在定位表达的调控中, 各国学者采用的长度不同。但 0.5 kb 5' 端上游调控区和 0.5 kb 的 5' 结构基因组成的序列即可指导外源基因在乳腺中的表达^[3]。pSVL- β WAP-PA 表达载体中, 去除 ATG 的 WAP 与去除 TATA 盒的 β Casein 基因调控序列融合, 将含有激素受体及组织特异性因子结合位点的 β Casein 调控序列置于 WAP 的上游调控区, 以增加调控成分。结果显示, 融合启动子调

控下的 t-PA 基因表达水平较单纯 WAP 或 β Casein 调控下的表达水平高。说明分娩以后,孕激素水平和其他抑制因素下降或消失,导致催乳激素及其他激素的迅速释放和乳腺因子的迅速合成。融合启动子中增加了激素受体及组织特异性因子结合位点,从而强烈促进该启动子调控下的 t-PA 基因的转录和高水平蛋白产物的表达。同时,由于 pSVL- β WAP-PA 与 pSVL-WAP-PA 表达载体构件中 TA TA 盒与外源基因的位置相同,转录后有相

同的 mRNA 5' 非翻译区,说明了融合启动子的高效表达体现在转录水平上,亦即融合启动子的启动强度高于 WAP 启动子。

相比而言,牛 β Casein 启动子指导下的 t-PA cDNA 表达水平较 WAP 调控下的水平稍低,这可能与结构和调控序列不完整有关。但也说明了 0.6 kb 的牛 β Casein 上游调控序列有一定的乳腺定位表达调控能力。

[参考文献]

- [1] Gordon K, Lee E, Vitali J A, et al Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk[J]. Bio Technology, 1987, 5: 1183- 1187.
- [2] Sombrood J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版 金冬雁,黎孟枫,译 北京:科学技术出版社,1992 16- 68
- [3] 赖良学. 乳腺表达人组织型纤溶酶原激活剂的转基因小鼠建立[D]. 吉林长春:解放军农牧大学,1997.
- [4] Ebert K M, Selgrath J P, Ditullio 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]. Bio Technology, 1991, 9: 835- 838
- [5] Ebert K M, Ditullio P, Barryc A, et al Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats[J]. Bio Technology, 1994, 12: 699- 702
- [6] 岳军明,张宏权,周廷冲,等. 哺乳动物蛋白基因的表达与调控[J]. 生理科学进展,1995,26(4): 299- 304
- [7] 汪玉松,邹思湘. 乳生物化学[M]. 长春:吉林大学出版社,1995 255- 259.

Fused promoter regulating t-PA cDNA expression in mammary gland

LI Y in-ju¹, CHENG Xiang-chao¹, LA IL ang-xue²,
ZHAO Jun², HU Rong-liang², Y IN Zhen²

(1 Luoyang Agricultural College, Luoyang 471003, China; 2 The Military Veterinary Institute, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract: In order to study the expressing regulation of t-PA cDNA in mammary gland, two specific expression plasmids, pSVL- β -PA and pSVL- β WAP-PA, containing t-PA cDNA gene, were constructed by fusing with bovine β Casein promoter, respectively. The three plasmids, pSVL- β -PA, pSVL-WAP-PA and pSVL- β WAP-PA were mixed with liposome and injected directly into pregnant rabbit mammary gland duct. Fibrin clot lysis assay showed that the three plasmids could express t-PA in rabbit milk. The expression level was 390, 430 and 670 ng/mL on day 4, respectively. It occurred that 0.6 kb bovine 5' regulatory region of β Casein gene was able to direct low level expression of t-PA cDNA in mammary gland, and the expression level of t-PA cDNA regulated by fused promoter was higher than β Casein or WAP promoter. It also provides the useful information for studying the regulation of specific expression in mammary gland and the establishment of t-PA mammary gland bioreactor.

Key words: β Casein gene; WAP gene; t-PA cDNA; mammary expression