人α-乳白蛋白在转基因小鼠乳汁中的动态表达图貌*

刘思国 魏影允 胡国法 高 虹 刘思金 劳为德**
(中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100080)

摘要 利用人α-乳白蛋白基因(*hα-Lac*)探针从 8×10^5 个噬斑中筛选出两个阳性克隆, 以此构建了包含有 7.3 kb 的 *hα-lac* 的 5′调控序列、2.0 kb 的编码区和 227 bp 的牛生长激素 3′UTR 的乳腺表达框架. 通过显微注射方法获得 5 只 *hα-Lac* 转基因整合雌性小鼠. 对其中 1 只转基因表达量较高(达到 0.3 mg/mL)的小鼠的一个泌乳期中人乳白蛋白的表达过程分析表明: 转基因并不遵从小鼠内源的*α-Lac* 的表达图貌, 而是以转基因特异的方式表达, 表现为在分娩后的前 3 天转基因的表达低, 自第 4 天开始逐渐增高, 到第 13~14 天达到峰值后渐趋稳定, 并持续到泌乳期结束. 在第 2 个泌乳期中, 转基因的表达量与首次泌乳期的水平相当. 此外, 转基因表达小鼠的泌乳量较正常小鼠和非表达整合小鼠有一定的增加, 提示泌乳过程中较高浓度的α-Lac 可能引发了产乳量的增加.

关键词 α-乳白蛋白 转基因小鼠 乳腺表达

α-乳白蛋白(α-Lac)是一种主要的乳清蛋白, 存在于迄今研究过的所有哺乳动物的乳汁中. 作为乳糖合成酶的组分, α-Lac 是产乳的一个重要调节因子. 乳腺分泌性上皮细胞通过乳糖合成酶合成乳糖, 乳糖再通过渗透作用将水分泵入乳汁中. 乳糖合成酶由α-乳白蛋白和β-1,4-半乳糖苷转移酶两种蛋白组成, 能使一分子的葡萄糖和一分子的半乳糖合成乳糖. 乳腺中葡萄糖和半乳糖是不受限制的, 因此α-乳白蛋白和β-1,4-半乳糖苷转移酶很可能是乳腺合成乳糖的限制性因素. 理论上, 如果乳腺能够合成更多的乳糖, 产乳的体积应当也会有相应比例的增加. 牛*α-Lac* 转基因猪[1]和小鼠[2]表明α-Lac 的高水平表达确实引起了乳产量的增加, 小鼠后代在泌乳期的第 10 天生长速度较对照增加了 4%.

另外, 由于 90%以上的成年人群不能吸收乳糖, 因此降低乳汁中乳糖的含量, 生产更加浓缩的乳汁和更健康的营养品是乳品工业的一个重要目标. 通过转基因的方法下调α-Lac 的表达, 有可能会降低乳糖的合成量. 删除小鼠的*α-Lac* 基因后其乳汁会变得异常粘稠, 乳糖缺失, 蛋白和脂肪的浓度都有很大程度的提高[3], 这种小鼠没有表现出其他异常的性状. 通过靶向表达抗α-Lac mRNA 核酶的方法也可降低乳糖合成[4].

α-乳白蛋白除了其关键的调节产乳功能外, 作为结合钙离子的金属蛋白, 它还是一种重要的营养储备, 并兼有细胞溶解活性[5]、诱导细胞生长抑制和细胞调亡[6]等多种功能.

本实验通过乳腺特异表达人α-乳白蛋白的转基因小鼠, 分析了在一个泌乳期内人乳白蛋

2002-10-08 收稿, 2003-01-20 收修改稿
* 中国科学院知识创新工程重点资助项目(批准号: KSCX-05-01)
** 联系人, E-mail: laowd@sina.com.cn

白基因的表达以及不同泌乳期内转基因表达的稳定性等问题, 以期为此基因及其产物的研究与应用提供一些线索.

1 材料与方法

1.1 人乳白蛋白基因的分离及其乳腺特异表达构件的获得

按常规方法, 以引物 P1(5′-TCAGCGTTTCTGTCTTGGCATGACC-3′)和 P2(5′-TACTGCAGTGACCTATGGCTTCAGTGTC-3′)从正常人的总 DNA 中特异性扩增出 2.3 kb 的人乳白蛋白的全基因, 插入 pGEM-T 载体内成为 pLaPCR 质粒. 所用 DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司的 ExTaq, 反应条件为: 94℃, 3 min, 94℃, 45 s, 58℃, 45 s, 72℃, 150 s, 共 30 个循环. 以 1.6 kb 的 pLaPCR 的 *Eco*R Ⅰ酶切片段(含外显区 2 到外显区 4)为探针筛选人的基因组文库(Clonetech), 以获得的阳性克隆构建了人乳白蛋白基因的表达构件, 其流程见图 1, 最终获得的表达质粒为 pcDNA4La.

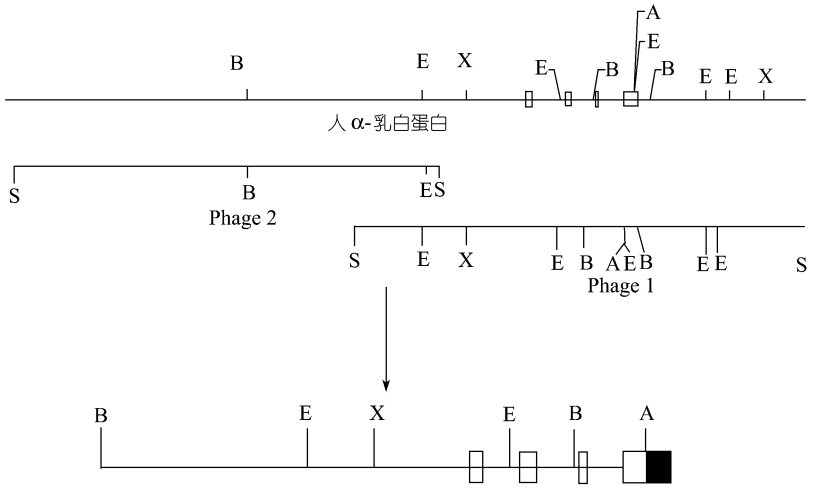

图 1 人乳白蛋白表达框架的构建流程

B 示 *Bam*H Ⅰ; E 示 *Eco*R Ⅰ; X 示 *Xho* Ⅰ; A 示 *Apa* Ⅰ; S 示 *Sal* Ⅰ; □示人乳白蛋白的 4 个外显区; ■示含牛的生长激素多聚腺苷酸的 3′非翻译区

1.2 转基因小鼠的建立

pcDNA4La 经 *Pvu* Ⅰ酶解线性化后, 进行凝胶回收, 纯化, 最后溶解于微注射缓冲液(10 mmol/L Tris/HCl pH 7.5, 0.1 mmol/L EDTA)中, 并准确调整 DNA 浓度至 4 ng/μL. 小鼠的胚胎操作及卵的原核注射方法参照文献[7]进行. 每个卵的雄原核中注射约 3 pL 的 DNA 溶液. 所用小鼠为清洁级 KM 小鼠.

1.3 转基因小鼠的鉴定

提取 G0 代转基因小鼠尾尖 DNA, 用引物 P3(5′-AATGCCGGGATTACAGGTGTG-3′)和 P4(5′-CACATTCAGGCAAAGCGATGC-3′)检测转基因的整合情况. 引物充分避开了人和小鼠乳白蛋白基因的同源区域, 选择在人特异性区域内. 扩增条件为: 94℃, 45 s, 57℃, 45 s, 72℃, 1 min, 共 30 个循环.

1.4 乳汁的获取

G0 代转基因小鼠乳汁的收集在产后第 7 天进行, 方法为: 乳样收集开始前 1 h 将母鼠与幼

鼠分开, 取乳前 1 min 腹腔内注射 5 IU 的催产素以诱导泌乳, 之后的 1~5 min 之内取乳. 取乳用设备为自制的小鼠取乳器. 将取得的乳样冻存于–20℃. 泌乳期内乳汁的连续获取方法同上, 开始取乳的时间是分娩后的第 2 天.

1.5 Western blot 分析及蛋白定量

用无菌双蒸水按 1∶20 稀释原乳, 取 10 μL 稀释的乳汁加入等体积的 2 × SDS 上样缓冲液(2% SDS, 10%甘油, 0.08 mol/L Tris-HCl pH 6.8, 2 mmol/L EDTA, 0.1 mol/L 二硫苏糖醇, 0.01% 溴酚蓝), 充分混匀后于 65℃加热 10 min, 取 4 μL 用 12%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 然后将蛋白转移至硝酸纤维膜(Backmen)上. 人乳白蛋白用兔抗人的α-乳白蛋白抗体(多抗血清, Sigma)检测, 二抗为辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔 IgG (Sigma), 显色试剂为 ECL 显色试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), X 线片曝光 15 min. 蛋白的定量是通过将标准人乳白蛋白作梯度稀释, 奶样也进行梯度稀释, 经过 Western blot 后, 用 Bio1D 软件对获得的杂交信号进行分析, 由此估算出乳汁中α-Lac 的含量.

2 结果

2.1 人乳白蛋白表达构件的获得

以 1.6 kb 的人乳白蛋白的编码基因为探针, 经过两轮筛选, 在 4×10^5 个噬斑中获得了一个阳性克隆 Phage 1. 经酶切鉴定及测序分析表明, 该克隆含有 2.5 kb 的 *hα-Lac* 基因的 5′端、2.0 kb 的整个编码区和约 10 kb 的 3′侧翼区, 酶切位点除了下游的一个 *Xho* Ⅰ位点发生变异外, 其他位点与 GenBank 中登录的 NT_009526 序列一致. 为了获得更长的 5′调控序列, 以 2.2 kb 的 5′端(Phage1 中 *Sal* Ⅰ加 *Xho* Ⅰ)为探针再次在约 4×10^5 个噬斑中筛得了一个阳性克隆为 Phage 2. Phage 2 不含 hα-lac 的编码区, 仅含约 13 kb 的 5′上游序列(图 1). 利用这两个克隆, 按图 1 流程, 分别将 Phage1 和 Phage2 DNA 的 *Bam*H Ⅰ-*Eco*R Ⅰ片段和 *Eco*R Ⅰ-*Xho* Ⅰ片段克隆入 pGEM-7Z 和 pGEMEX-1 载体内, 形成 pGEB 和 pMEX, 然后将 pMEX 内的 *Eco*R Ⅰ + *Apa* Ⅰ片段插入 pGEB 内, 形成 pGEX, 此质粒含有 5.8 kb 的 *hα-Lac* 的 5′上游调控序列. 再将 Phage2 中 hα-lac 的全编码区 *Xho* Ⅰ-*Apa* Ⅰ片段(缺少 polyA 位点)插入 pGEX 内, 将所获得的重组质粒中的 *Bam*H Ⅰ-*Apa* Ⅰ片段插入 pcDNAHismax-A 的 *Bgl* Ⅱ-*Apa* Ⅰ开环载体中, 形成了人α-乳白蛋白的表达框架. 该表达构件含有 7.3 kb 的 *hα-Lac* 的 5′调控序列、全部编码区和 227 bp 的牛生长激素的 3′UTR.

2.2 转基因小鼠的获得及基因的整合检测

经 *Pvu* Ⅰ线性化的 pcDNA4La 通过显微注射生下了 42 只 G0 代小鼠. 经 PCR(图 2(a))分析表明有 8 只是转基因阳性小鼠, 整合率为 19.5%(表 1). 整合小鼠生长正常, 并能正常繁育后代.

表 1　*hα-Lac* 转基因构件的小鼠转基因效率

注射胚胎总数	移植胚胎数	出生个体数	转基因个体数	整合率 a)/%	转基因效率 b)/%
526	253	42	8	19.5	1.5

a) 整合率(%) = (转基因个体数/出生个体数)×100%; b) 转基因效率(%) = (转基因个体数/注射胚胎总数) ×100%

2.3 小鼠乳汁中 hα-Lac 的检测及定量

将 G0 代转基因母鼠的乳汁用 Western blot 测定转基因的表达情况, 所获得的 5 只转基因母鼠中仅有 1 只(8 号)能够在 0.1 μL 原乳中检测到基因的表达, 表达水平差异表明了转基因整

合位置对转基因表达的影响. 定量分析(图 2(b)和表 2)表明蛋白的表达水平约为 0.3 mg/mL, 比人乳汁中的表达量(2.9 mg/mL)低, 但为小鼠内源乳白蛋白浓度的 3 倍(小鼠为 0.1 mg/mL).

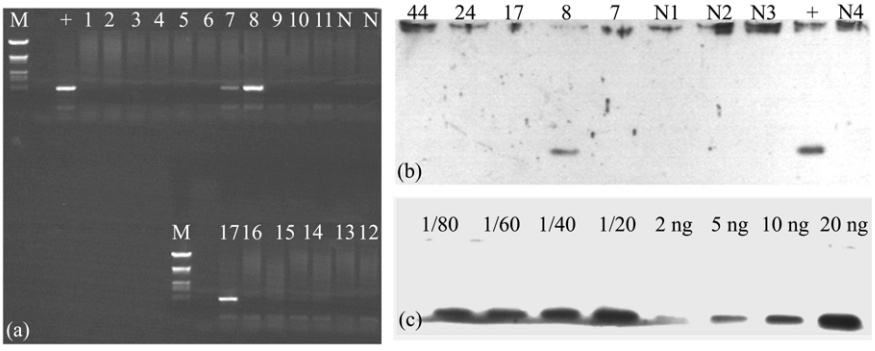

图 2 hα-Lac 转基因小鼠的整合及表达

(a) 部分 G0 代 hα-Lac 转基因小鼠 PCR 整合检测结果. M 示λDNA/*Eco*RⅠ+*Hin*dⅢ Marker; 1~17 示 G0 代小鼠; N 示正常对照; + 示阳性质粒对照. (b) G0 代转基因小鼠 Western blot 表达检测. 44, 24, 17, 8, 7 示 G0 代转基因母鼠; N1~N4 示正常小鼠对照, + 示阳性对照. (c) 8 号 G0 代乳汁中 hα-Lac 蛋白定量. 2, 5, 10 和 20 ng 示不同上样量的标准人乳白蛋白; 1/80, 1/60, 1/40 和 1/20 示将原奶稀释 20~80 倍的样品, 上样量为 2 μL

表 2 Bio1D 对图 2(c)中各杂交条带的分析结果

	20 ng	10 ng	5 ng	2 ng	1/80	1/60	1/40	1/20
亮度总和 a)	106958	40644	22695	9862	52135	62940	81016	151804

a) 此处指特定条带扫描积分

2.4 第一和二个泌乳期中 hα-Lac 表达量的比较

图 3 和表 3 示两个泌乳期内分娩后第 7 天左右的 hα-Lac 表达量的分析, 从中可以看出, 两个泌乳期内第 8 天 hα-Lac 的浓度没有大的变化.

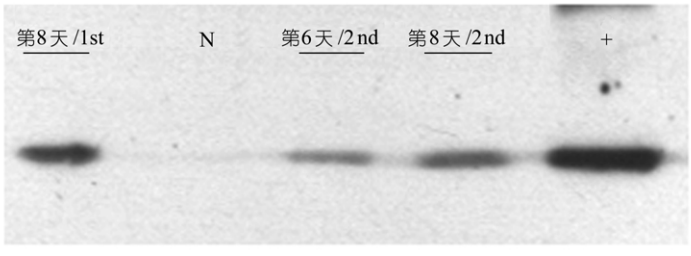

图 3 第一和二个泌乳期中 hα-Lac 表达量的比较

各泳道中的上样量均为 1/20 μL 原奶; N 示正常对照; + 示阳性对照(1/20 原奶 + 20 ng hα-Lac)

表 3 Bio1D 对图 3 各杂交条带的分析结果

	亮度总和
第 8 天/1st	48946
第 6 天/2nd	31822
第 8 天/2nd	50491

2.5 完整泌乳期内转基因的表达

图 4 是一个泌乳期中转基因表达的 Western blot 结果, 图 5 示 hα-Lac 在小鼠泌乳期内表达的动态变化. 可以看出, 转基因在泌乳的前 3 天表达量较低, 从第 4 天开始陡然上升, 至第

12~14 天后表达渐趋稳定. 这种动态的表达图貌完全不同于小鼠内源的α-乳白蛋白, 具有转基因自身的表达特性. 已知在小鼠整个泌乳期中, 乳汁中总蛋白的浓度变化先是浓度较高, 后降低并渐趋稳定, 闭乳期蛋白浓度急剧降低, 这与转基因的表达图貌也不一致.

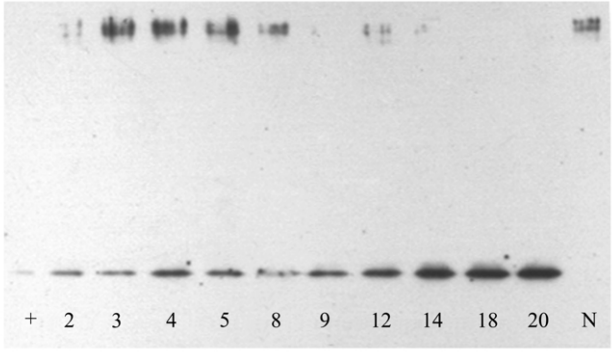

图 4　完整泌乳期中转基因表达的 Western blot 测定

+ 示阳性对照; 2~5, 8, 9, 12, 14, 18, 20 示分娩后分别于 2~5, 8, 9, 12, 14, 18, 20 d 所收集奶样; N 示正常小鼠的奶样, 奶样的上样量相当于 0.1 μL 原奶

3　讨论

α-乳白蛋白是泌乳的关键调节因子. 敲除α-乳白蛋白基因的小鼠产生的乳汁粘稠, 乳糖含量极少或缺如. 表达奶牛[2,8~10]、山羊[11]及人的乳白蛋白[3]的转基因小鼠, 泌乳体积增加, 蛋白浓度有一定程度的降低, 而乳糖浓度的变化不大. Boston 等人[2]的实验表明转基因小鼠乳汁中表达 0.5~1.5 mg/mL 的牛乳白蛋白, 乳腺的正常发育不受影响, 尽管乳汁中的蛋白浓度较对照组少 0.6%, 但其后代在泌乳期第 10 天的生长率提高了 4%, 表明乳汁中的蛋白总产量是增加的. 本实验中, hα-Lac 在转基因小鼠中的表达使乳汁中乳白蛋白含量提高了约 3 倍, 所产生的结果与上述实验相似: 泌乳量有一定程度的提高, 表现为乳汁的采集明显比对照组容易, 且获取量多, 多次采集对后续获取量无明显影响(转基因表达个体每次采集均在 100 μL 以上, 而对照组和转基因表达低的整合小鼠经多次取乳之后乳汁的采集要困难得多, 即获取量明显少).

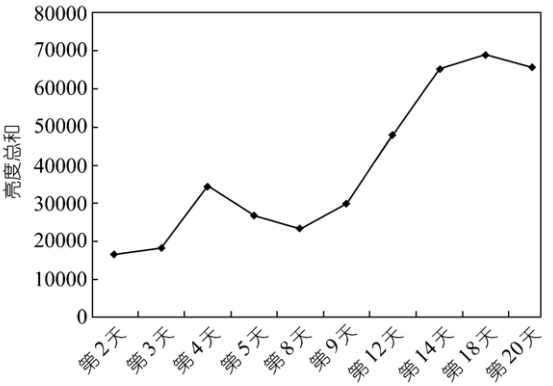

图 5　hα-Lac 在转基因小鼠泌乳期内的表达

乳腺特异的转基因表达构件在转基因动物乳腺中表达的动态图貌基本上是种属特异性的[12]. 例如, 牛酪蛋白基因(αs1-和β酪蛋白基因)在转基因小鼠中的表达以牛体内的方式进行(在泌乳起始时 mRNA 突然上升), 不同于小鼠自身的酪蛋白基因的表达图貌(α-和β-酪蛋白基因转录本的出现是在受精后第 8 天)[13]. 本实验中, hα-Lac 的表达图貌不同于小鼠内源的乳白蛋白的表达, 泌乳第 12 天后才达到峰值. 牛的乳白蛋白的表达在初乳中最高, 随后降低而维持一定的表达量[14]. 人乳白蛋白的表达图貌未见相关文献, 但猪α-乳白蛋白的表达在泌乳初期受限[14]. 转基因乳蛋白的种特异性表达图貌说明, 在调节乳蛋白表达的相关激素调控元件

及转录因子方面，不同物种间有很大的通用性，但控制转基因表达的动态过程是否与所在物种动物中的激素及反式作用因子的动态变化相关，尚需进一步研究. 由于本实验中所采用的构件不完全是人乳白蛋白的表达调控框架，其 3′调节序列采用了牛的生长激素基因的 poly A 序列，5′调控区域所包含的调控元件可能不够完整，而且构件中的原核序列未予去除，加之随机整合所产生的位置效应等问题，使得转基因的表达图貌有可能发生了变化[15]. 这种现象在利用牛乳白蛋白所产生的转基因动物中看到过，含有 2.0 kb 的 5′侧翼区，1.7 kb 的编码区和 2.7 kb 的 3′侧翼区的牛的乳白蛋白构件的转基因小鼠中，牛的乳白蛋白在分娩后第 10 和 15 天的表达量要高于第 5 天的表达量[8]，而用相似构件(除 3′侧翼区为 329 bp 外其他相同)所产生的转基因猪中，牛乳白蛋白的表达量在泌乳的第 0 和 5 天是最高的[13].

实验中转基因表达的沉默率较高(4/5)，其原因不排除是由于原核序列的存在所致. 现在一致认为原核序列在真核基因组中被识别为一种抑制基因表达的靶向序列. 因此虽然实验中所用的 hα-Lac 的 5′序列已有 7.3 kb，但仍未能获得高效表达个体(>1.0 mg/mL).

致谢 对李光三高级工程师的显微注射及小鼠胚胎操作、杜淼研究员和徐少甫研究员的有益讨论和建议，深表谢意. 感谢上海转基因中心成国祥教授惠赠人α-乳白蛋白纯品.

参 考 文 献

1 Donovan S M, Monaco M H, Bleck G T, et al. Transgenic over-expression of bovine alpha -lactalbumin and human insulin-like growth factor-I in porcine mammary gland. J Dairy Sci, 2001, 84(E. Suppl.): E216~E222
2 Boston W S, Bleck G T, Conroy J C, et al. Short communication: effects of increased expression of alpha-lactalbumin in transgenic mice on milk yield and pup growth. J Dairy Sci, 2001, 84(3): 620~622
3 Stacey A, Schnieke A, Kerr M, et al. Lactation is disrupted by alpha-lactalbumin deficiency and can be restored by human alpha-lactalbumin gene replacement in mice. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(7): 2835~2839
4 L'Huillier P J, Soulier S, Stinnakre M G, et al. Efficient and specific ribozyme-mediated reduction of bovine alpha-lactalbumin expression in double transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(13): 6698~6703
5 McKenzie H A, White F H. Studies on a trace cell lytic activity associated with alpha-lactalbumin. Biochem Int, 1987, 14(2): 347~356
6 Hakansson A, Zhivotovsky B, Orrenius S, et al. Apoptosis induced by a human milk protein. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(17): 8064~6068
7 Brigid H, Rosa B, Frank C. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994
8 Bleck G T, Bremel R D. Variation in expression of a bovine alpha-lactalbumin transgene in milk of transgenic mice. J Dairy Sci, 1994, 77(7): 1897~1904
9 Soulier S, Lepourry L, Stinnakre M G, et al. Expression of a bovine alpha-lactalbumin transgene in alpha-lactalbumin-deficient mice can rescue lactation. *In vivo* relationship between bovine alpha-lactalbumin expression content and milk composition. J Dairy Res, 1997, 64(1): 145~148
10 Jeng S Y, Bleck G T, Wheeler M B, et al. Characterization and partial purification of bovine alpha-lactalbumin and beta-casein produced in milk of transgenic mice. J Dairy Sci, 1997, 80(12): 3167~3175
11 Stinnakre M G, Soulier S, Schibler L, et al. Position-independent and copy-number-related expression of a goat bacterial artificial chromosome alpha-lactalbumin gene in transgenic mice. Biochem J, 1999, 339 (Pt 1): 33~36
12 Soulier S, Vilotte J L, Stinnakre M G, et al. Expression analysis of ruminant alpha-lactalbumin in transgenic mice: developmental regulation and general location of important cis-regulatory elements. FEBS Lett, 1992, 297(1-2): 13~18
13 Hennighausen L, Westphal C, Sankaran L, et al. Regulation of expression of genes for milk proteins. Bio/Technology, 1991, 16(65): 65~74
14 Bleck G T, White B R, Miller D J, et al. Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs. J Anim Sci, 1998, 76(12): 3072~3078
15 Chen C M, Wang C H, Wu S C, et al. Temporal and spatial expression of biologically active human factor Ⅷ in the milk of transgenic mice driven by mammary-specific bovine alpha-lactalbumin regulation sequences. Transgenic Res, 2002, 11(3): 257~268