

牛乳腺直接注射重组质粒 表达人 G-CSF 的研究

王 贵

(吉林农业大学农业职业师范学院 长春 130118)

卢一凡 邓继先 田

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

以乳清酸蛋白(WAP)基因5区为调控序列,人基因组G-CSF基因为目的片段,构建成转基因动物乳腺表达载体,将其直接注射到泌乳牛乳腺,在乳汁中表达出人G-CSF。表明乳腺直接注射质粒的方法可以作为暂时性的一种表达系统,对开发新的重组蛋白生产体系有一定指导意义。

关键词:直接注射 乳腺表达 G-CSF

前 言

用细菌以及哺乳动物细胞来生产重组蛋白由来已久,但其产量低以及产物不能或不全能进行翻译后修饰等不足限制其发展,探索新的生产体系一直在进行。近年来,基因治疗已取得惊人进展,已有多种有效的载体和方法用于体内的基因转移,包括病毒载体、脂质体法、微粒轰击法以及直接注射法^[1],为建立新的重组蛋白表达体系提出了设想。本试验以人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)基因为目的片段,以鼠乳清酸蛋白(WAP)基因的5区做调控序列构建了乳腺表达质粒,采用乳腺直接注射质粒DNA的方法,探讨了利用乳腺生产重组蛋白的可能性。

材 料 与 方 法

材料 质粒与菌种:宿主菌JM103、pUC19质粒,由本室保存。含有全长乳清酸蛋白(WAP)基因组基因的质粒pWAP-4,由作者亚克隆获得^[2]。含有人基因组G-CSF基因的质粒pGG2,由作者自行克隆获得。

限制性内切酶及化学、生物学试剂:限制性内切酶及T4DNA连接酶、T4DNA聚合酶等购于华美生物公司及Promega公司。化学试剂均为国产分析级产品。⁻³²P-dATP购于亚辉生物技术公司。人G-CSF检测试剂盒购于华美生物工程公司。

实验动物:泌乳量正常的荷斯坦奶牛。

方法 质粒的提取、感受态制备、DNA连接与转化、酶切分析:按文献[3]进行。

⁻³²P标记探针及菌落原位杂交:按标记试剂盒说明书操作。

质粒直接注射奶牛乳腺:质粒DNA的注射分为两组:A组为空白对照,注射PBS(pH7.

此文于1996年11月24日收到。

5)。B 组为试验组,注射含 G-CSF 基因的表达质粒。注射部位位于腹股沟两侧的乳腺。将针在酒精灯上灼烧以消毒,注射时将针压于皮肤。注射深度为 2~4cm,4 个乳房各注射 1 针,在同一部位连续注射 3 天。注射剂量:A 组—注射 PBS 100 μ l/次;B 组—注射表达质粒 100 μ l(60~70 μ g)/次。

乳汁的采集:从注射第 3 天开始,每天取样 3 次。连续取样 3 天。乳汁中人 G-CSF 的检测按试剂盒说明书进行。

结 果

(一) WAP 调控序列控制下的人 G-CSF 基因组基因表达载体的构建 *

在 WAP 基因的第 1 外显子上的起始密码子 ATG 前存在有单一的 *Kpn* I 位点,因此可以利用其作为外源基因的插入位点。为了回收目的片段,用 *Eco*R 和 *Hind* III 双酶切质粒 pGG-2,回收 1.5kb 的 G-CSF 基因全长片段,溶于 20 μ l TE,加绿豆核酸酶 3~5U,30 反应 0.5h,削平粘末端,加 0.5mmol/L SDS 终止反应。经乙醇沉淀后,取 1 μ l 与用 *Kpn* I 消化质粒 pWAP-4 并经绿豆核酸酶处理的含 WAP 基因的载体进行连接反应。转化宿主菌 JM103,采用菌落原位杂交方法,以 G-CSF cDNA 为探针,筛选出 18 个阳性克隆。随机挑选作酶切分析。表达质粒 pWGG 构建如图 1。

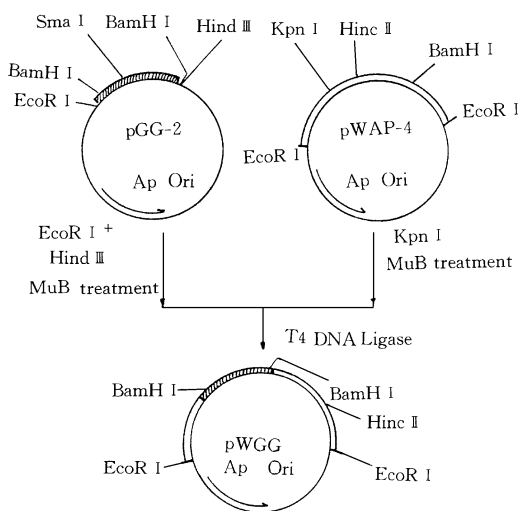


图 1 重组质粒 pWGG 的构建

Fig. 1 Construction of plasmid pWGG

在 G-CSF 基因的第 1 个内含子中存在有 1 个 *Bam*H I 位点,而在该基因的后面的载体多克隆位点上存在有 1 个 *Bam*H I 位点。因此,当以 *Bam*H I 酶切时,应切出近 1.5kb 的片段。由于在 WAP 全长基因的第 4 外显子上存在有单一的 *Bam*H I 位点,故应出现近 3kb 的 WAP 片段。因此,用 *Bam*H I 酶切即可以确定出外源基因的插入。

在此基础上,进行了插入方向的鉴定。在插入的 G-CSF 片段的后面,带有多克隆位点的

Hinc 位点,而在 G-CSF 基因内不存在该位点。WAP 的第 2 外显子末端存在有 *Hinc* 位点,故在插入方向正确的情况下,应切出约 1.5kb 的片段,反之则应切出近 3kb 的片段。以 WAP 全长基因为对照,同时用 *Hinc* 酶切,结果获得 1 个插入方向正确的重组质粒,命名为 pWGG,其酶切鉴定如图 2。

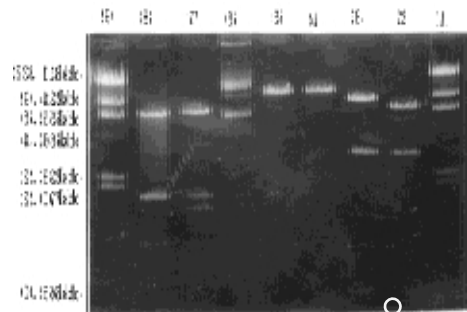


图 2 重组质粒 pWGG 的酶切鉴定
Fig. 2 Plasmid pWGG identification by enzyme digest

1. DNA/ *Hind* Marker 2. pWGG *EamH* digest 3. pWGG *EcoR* digest 4. pWGG *Kpn* digest 5. pWGG *Sma* digest 6. pWGG plasmid DNA 7. pWGG *Hinc* digest 8. pWAP-4 plasmid digest 9. DNA/ *Hind* Marker

(二) WAP 基因调控序列控制下的重组质粒在奶牛乳腺的表达

采用碱裂解法大量提取表达质粒 pWGG,经聚乙二醇纯化后,经 70 %乙醇消毒,无菌吹干之后,溶于 TE(pH 8.0)中,以微量注射器注射 100μl (60 ~ 70μg)/ 次于奶牛乳腺,收取乳样进行检测,结果见表 1。

表 1 pWGG 质粒直接注射牛乳腺的表达

Table 1 Expression of human G-CSF by injecting plasmid pWGG into cow mammary

质粒	试验牛(头)	表达牛(头)	表达水平(平均)
Plasmid	Number of test cow	Number of expression cow	Level of experssion level (Mean)
pWGG	1	1	404 μg/ ml
pWGG	1	1	732 μg/ ml
pWGG	1	1	528 μg/ ml
PBS	1	1	未检测到 Not found

从表 1 中可以看出,在注射 PBS 的空白对照中未能检测出表达人 G-CSF,而在含有完整人 G-CSF 基因的表达载体 pWGG 中,对 3 头奶牛注射,均检测出人 G-CSF 有表达。

讨 论

最为简单的真核细胞表达载体应既含有原核基因的复制位点,以便在细菌中进行扩增,又带有能在真核细胞中进行表达的真核转录单位。真核转录单位由真核基因调控序列与结构基因组成。在原核质粒中插入一个完整的哺乳动物细胞转录单位,便可组成一个简单的真核表达载体。由于这种载体没有真核复制位点,因此转染后的 DNA 不会在真核细胞中扩增,而是在其中低水平地表达相应的蛋白质。我们利用小鼠的乳清酸蛋白(WAP)的调控序列,构建

了真核表达载体,将其直接注入奶牛的乳腺,获得了表达。

将外源基因直接注入动物体内,是近年来发展起来的以实现治疗疾病为目的的一种新技术,它是基因治疗中体外转导方法的一种发展。1990年 Wolff 等首次报道将带有目的基因的质粒直接注射小鼠骨骼肌中,获得外源基因在骨骼肌细胞内的表达^[4]。此后,众多学者研究表明了这一方法的可行性^[5,6]。

在我们的试验中,借鉴基因治疗中的质粒直接注射方法,试验结果证明了这一方法的可行性。这对未来利用乳腺表达重组蛋白的应用有一定的指导意义。

在我们的试验中,仅仅在注射后第3天时取样检测,尚没有测定何时表达量最高,以及在乳腺的表达可以持续多长时间。目前的试验已证明,采用直接注射质粒DNA,质粒DNA以非整合状态存在^[6],因此表达的时间受到一定限制,而对于获得重组蛋白来说,选择最佳表达时间无疑也具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Akira K, Emi N, Abe A et al. Humoral and cellular immunity to an encoded protein induced by direct DNA injection. *Human Gene Therapy*, 1994, 5:1355 ~ 1339
- 2 卢一凡,邓继先,肖成祖,马清钧. 乳清酸蛋白(WAP)基因调控序列的鉴定及在小鼠乳腺表达 LacZ 基因的研究. *生物化学杂志*, 1998, 待发表
- 3 Sambrook J, Fritsch EF, Manatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 4 Wolff JA, Malone PW. Direct gene transfer into mouse muscle *in vitro*. *Science*, 1990, 247:1465 ~ 1468
- 5 Takahashi I, Mizaho S, Uchigiki C et al. Immunization of mice by injection with a recombinant retrovirus vector containing human factor IX for production of monoclonal antibody against IX. *Hybirdirua*, 1994, 13:65 ~ 68
- 6 Wells DJ, Goldspink G. Age and sex influence expression of plasmid DNA directly injected into mouse skeletal muscle. *FEBS Lett*, 1992, 306:203 ~ 205

STUDY ON HUMAN G-CSF EXPRESSION BY INJECTING PLASMID INTO COW MAMMARY

Wang Gui

(Jilin Agricultural University, Changchun 130018)

Lu Yifan Deng Jixian Tian Chai

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medicine, Beijing 100071)

ABSTRACT

Expression plasmid with whey acid protein (WAP) gene 5 as a control region and human G-CSF gene as a target was constructed. This plasmid was injected into cow mammary by injector. The results showed that there were 732 μ g/ml human G-CSF in cow milk. It is suggested that this method might be used as a new system to produce recombinant protein in future.

Key words: Injection, mammary, expression, G-CSF