

## *tPA/gGH* 双基因转染山羊乳腺上皮细胞表达分析

宋绍征<sup>1</sup>, 于康英<sup>1</sup>, 张婷<sup>2</sup>, 陆睿<sup>2</sup>, 潘生强<sup>1</sup>, 周鸣鸣<sup>1</sup>, 成勇<sup>2</sup>

1. 无锡太湖学院护理学院, 基础医学系, 无锡 214000

2. 扬州大学兽医学院, 江苏省转基因动物制药工程研究中心, 扬州 225009

**摘要:** 人组织纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, tPA)是一种被广泛应用于临床的溶栓药物。双基因共整合入生物体内能够产生协同作用, 从而提高目的基因的表达水平。但是目前, 利用 *gGH* 基因与 *tPA* 基因共整合以期提高 tPA 表达水平的相关研究较少。为筛选获得 tPA 高表达的 *tPA/gGH* 双基因整合的单克隆转基因山羊乳腺上皮细胞株, 本研究以  $\beta$ -casein 基因作为调控序列, 构建乳腺特异性表达载体 PCL25/*gGH*, 并通过电转染将 *tPA* 和 *gGH* 双基因共转染山羊乳腺上皮细胞; 通过 G418 筛选获得抗性细胞株, 经 PCR 检测获得转基因单克隆细胞株; 利用催乳素诱导 tPA 表达, 收集 48 h 后细胞诱导液进行 ELISA 和 Western blotting 检测并分析其 tPA 表达水平。结果表明, 共获得 142 株抗性单克隆细胞, 其中有 53 株 *tPA* 单基因整合细胞株, 34 株 *tPA/gGH* 双基因整合细胞株, 双基因整合率达 23.9% (34/142)。共检测出 29 株细胞能够表达 tPA, 其中单基因表达细胞为 12 株, 表达率为 22.6% (12/53); 双基因表达细胞为 17 株, 表达率为 50.0% (17/34); 且单基因细胞表达 tPA 含量为 7.5~52.0  $\mu\text{g/mL}$ , 而双基因细胞表达 tPA 含量为 40~360  $\mu\text{g/mL}$ , 明显高于单基因表达水平。本研究通过电转染的方式成功获得了 *tPA/gGH* 双基因整合的单克隆山羊乳腺上皮细胞株, 并证明双基因整合的细胞株表达 tPA 水平明显提高, 为后期制备高表达转基因山羊奠定了基础。

**关键词:** tPA; 双基因; 转基因; 山羊乳腺上皮细胞; 表达

## Expression analysis of *tPA/gGH* double genes in transfected goat mammary epithelial cells

Shaosheng Song<sup>1</sup>, Kangying Yu<sup>1</sup>, Ting Zhang<sup>2</sup>, Rui Lu<sup>2</sup>, Shengqiang Pan<sup>1</sup>,  
Mingming Zhou<sup>1</sup>, Yong Cheng<sup>2</sup>

1. School of Nursing, Wuxi Taihu University, Wuxi 214000, China

2. Jiangsu Provincial Research Center for Animal Transgenesis and Biopharming, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

**Abstract:** tPA is a thrombolytic agent widely used in clinical settings. While double gene co-integration into

收稿日期: 2019-09-24; 修回日期: 2019-11-29

基金项目: 江苏省高校自然科学基金面上项目(编号: 17KJD310004, 19KJB180030)和国家转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08008-004)资助[Supported by the Natural Science Foundation of Colleges and Universities in Jiangsu Province (Nos. 17KJD310004, 19KJB180030)

and National Major Special Projects on New Cultivation for Transgenic Organisms (No. 2014ZX08008-004)]

作者简介: 宋绍征, 博士, 讲师, 研究方向: 转基因与胚胎工程。E-mail: ssz0610@163.com

通讯作者: 成勇, 教授, 博士生导师, 研究方向: 转基因动物制药与胚胎工程。E-mail: chengyong12@yeah.net

周鸣鸣, 博士, 副教授, 研究方向: 分子医学与遗传学、基因工程。E-mail: zmm19770@126.com

DOI: 10.16288/j.yczz.19-299

网络出版时间: 2020/3/6 16:47:34

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200306.1125.005.html>

organisms can produce synergistic effects and improved expression levels of the target gene, there are few reports detailing the co-integration of the *tPA* and *gGH* genes and an increased expression level of *tPA*. In order to study this, we obtained monoclonal goat mammary epithelial cell lines with *tPA/gGH* double gene integration and we analyzed the *tPA* expression level of single and double gene integration cells. We constructed a mammary gland-specific expression vector PCL25/*gGH* by using the  $\beta$ -casein gene as the regulatory sequence. The *tPA* and *gGH* genes were co-transfected into goat mammary epithelial cells by electroporation. Resistant cell lines were screened by G418, and transgenic monoclonal cell lines were obtained by PCR detection. *tPA* expression was induced by prolactin and subsequently, the cell induction solution was assayed after 48 hours by ELISA and Western blotting. The results show that a total of 142 resistant monoclonal cells were obtained including 53 *tPA* monogenic integration cell lines and 34 *tPA/gGH* double gene integration cell lines. The rate of double gene integration was 23.9% (34/142). A total of 29 cells were detected to be able to express *tPA*, of which 12 were single-gene-expressing cells and the corresponding expression rate was 22.6% (12/53). There were 17 double-gene-expressing cells with a corresponding expression rate of 50.0% (17/34). The expression level of *tPA* in single-gene cells was 7.5-52.0  $\mu\text{g/mL}$ , while in double-gene cells was 40-360  $\mu\text{g/mL}$ , which was significantly greater than that in single-gene cells. The goat mammary epithelial cell lines with *tPA/gGH* gene integration were successfully obtained by electroporation, and we proved that the expression level of *tPA* in the double gene integration cell lines with *tPA/gGH* gene integration was significantly increased. Our findings lay the foundation for the additional study of highly expressed transgenic goats and other animals with determination of scientific and clinical utility.

**Keywords:** *tPA*; double genes; transgene; goat mammary epithelial cells; expression

自20世纪以来,血栓性疾病一直是危害人类健康和生命安全的头号因素,溶栓疗法是目前临床上使用最广泛而有效的一种治疗方法<sup>[1-3]</sup>。人组织纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, *tPA*)是由血管内皮细胞合成并分泌的一种丝氨酸蛋白酶,能够高效特异地溶解血栓,是一种较好的溶栓药物<sup>[4]</sup>。1991年, Ebert等<sup>[2]</sup>首次报道了转基因山羊乳腺表达*tPA*含量为3  $\mu\text{g/mL}$ ; 2006年,徐寒梅等<sup>[5]</sup>以 $\beta$ 乳球蛋白基因为调控序列,制备的转基因山羊乳腺表达*tPA*含量为8.5  $\mu\text{g/mL}$ ;本实验室于2015年在山羊乳腺上皮细胞水平也进行了*tPA*表达研究,但其*tPA*表达水平一直相对较低<sup>[6]</sup>。山羊生长激素(goat growth hormone, *gGH*)是由垂体前叶分泌的一种蛋白质,与催乳素有着类似的结构,控制 $\alpha$ s-casein和 $\beta$ -casein的激活,具有促进乳腺生长发育及维持泌乳的作用<sup>[7,8]</sup>。

有研究证明,通过双基因共整合获得的转基因生物能够在体内同时表达两种不同的基因,而且双基因产生协同作用会促进其中一种基因表达水平的提高<sup>[9]</sup>。例如韩操等<sup>[10]</sup>通过慢病毒介导*bFGF*和*BMP-2*双基因转染兔骨髓间充质干细胞的研

究, *bFGF*和*BMP-2*蛋白表达量明显增加,促进了细胞的增殖水平。王林楠等<sup>[11]</sup>通过慢病毒介导*NEP1-40*及*NT-3*双基因转染神经干细胞, *NEP1-40*和*NT-3* mRNA相对表达量及蛋白表达量均显著高于单基因转染。陈宁等<sup>[12]</sup>将*NGF*与*BMP2*双基因转染大鼠BMSCs,双基因转染组的蛋白表达量明显高于对照组。但是,将*tPA*和*gGH*双基因共整合到生物体内以期提高*tPA*表达量的相关研究较少见报道,尤其是在山羊乳腺上皮细胞中的研究更少。

由于动物乳腺生物反应器的研制周期长、前期投资大、涉及技术难点多及乳蛋白特异性调控机制复杂等问题<sup>[13]</sup>,因此在细胞水平对其前期表达研究至关重要。山羊乳腺上皮细胞具有诱导表达功能<sup>[6]</sup>,是一种前期细胞水平验证研究的良好选择。本研究主要在前期PCL25/*tPA*乳腺特异性表达载体(以 $\beta$ -casein基因作为调控序列)的基础上,构建了PCL25/*gGH*乳腺特异性表达载体, *tPA/gGH*双基因共转染山羊乳腺上皮细胞,研究目的基因*tPA*的表达水平,为将来制备高表达转基因动物提供新思路、新方法,也为转基因动物乳腺生物反应器和转基因

育种建立新的技术途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

萨能奶山羊常规饲养于扬州大学实验农牧场,处于泌乳中后期。PCL25/tPA 乳腺特性表达载体为本实验室构建、保存(图 1A),是以  $\beta$ -casein 为调控元件、CMV 为启动子的哺乳动物表达载体,已在山羊(*Capra*)细胞、小鼠(*Mus musculus*)和兔(*Leporidae*)等得到表达验证<sup>[6,14]</sup>; *gGH* 基因由上海生工生物工程技术服务有限公司合成(两端含 *Xho* I 酶切位点);宿主菌 DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

### 1.2 引物的设计与合成

PCR 引物设计借助于 Primer Premier 5.0 软件完成,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成(表 1)。

### 1.3 PCL25/gGH 乳腺特异性表达载体的构建

应用常规分子生物学技术构建 PCL25/gGH 乳腺特异性表达载体,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成山羊生长激素(*gGH*)基因, *Xho* I 酶切 PCL25/tPA 载体,经 T4 DNA 连接酶(宝生物工程(大连)有限公司)连接基因片段,转化感受态大肠杆菌,AMP 抗性筛选,提取质粒经酶切和测序鉴定,正确的菌株命名为 PCL25/gGH。

### 1.4 山羊乳腺上皮细胞的分离、纯化

无菌手术切取大约 5 g 左右的泌乳期山羊乳腺实质组织,D-hanks'缓冲溶液反复冲洗直至干净无血

迹和乳汁,将腺泡组织剪成约 1 mm<sup>3</sup> 大小,添加 30 mL I 型胶原酶消化液(含 I 型胶原酶 200 IU/mL,透明质酸酶 100 IU/mL)振荡消化 1 h,收集悬液,300 目的筛网过滤,收集滤液离心后,用 D-hank's 离心洗涤 3 次,细胞计数并用培养液(含 DMEM/F12,购自美国 Thermo 公司;10% FBS,购自美国 Hyclone 公司;乙酸钠 5 mmol/L,转铁蛋白 5  $\mu$ g/mL,乙醇胺 0.5 mmol/L,胰岛素 10  $\mu$ g/mL,氢化可的松 5  $\mu$ g/mL,均购自美国 Sigma 公司)调整密度至  $5 \times 10^5$  个/mL 接种于六孔板中,置于 37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱内静置培养。待贴壁细胞汇合至 80%时,用 0.05%胰蛋白酶 + 0.04% EDTA 消化 2 min 后,弃去含脱壁成纤维细胞的消化液,重新加入培养液培养,重复两次可获得较纯的乳腺上皮细胞。

### 1.5 PCL25/tPA 与 PCL25/gGH 双基因共转染山羊乳腺上皮细胞

PCL25/tPA 与 PCL25/gGH 载体经 *Sal* I 和 *Not* I 双酶切而分别线性化,用 QIAGEN 试剂盒回收后溶于超纯水中,-20 °C 保存。收集对数生长期的山羊乳腺上皮细胞,用电转染液洗涤离心后重悬细胞密度至  $1 \times 10^6$  个/mL,加入 DNA 使终浓度为 20  $\mu$ g/mL,以 2.0 KV/cm,200  $\mu$ s 的条件电击一次(Multiporator 电转染仪,购自德国 Eppendorf 公司)。48 h 后加入 500  $\mu$ g/mL G418 (美国 Amresco 公司)筛选,每 2 d 换一次液,10~14 d 后挑取克隆细胞于 48 孔细胞培养板,以 200  $\mu$ g/mL G418 筛选扩增传代至 12 孔板,收集部分细胞用 DMEM/F12 + 10% DMSO + 20% FBS 的冷冻液冻存,另一部分用于后续检测。

### 1.6 PCR 检测单克隆细胞株

使用 0.05%胰蛋白酶 + 0.04% EDTA 消化吹打收集部分细胞悬液,2000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 10  $\mu$ L 细胞裂解液,重悬细胞,45°C 孵育 45 min、96°C 孵育 15 min 后可直接作为 PCR 模板,进行 *tPA* 和 *gGH* 基因整合检测,引物序列见表 1。

### 1.7 ELISA 表达检测

待 12 孔板中细胞汇集至 80%左右,弃去旧培养液,添加含 5  $\mu$ mol/L 催乳素的新鲜培养液进行诱导

表 1 PCR 扩增引物序列

Table 1 The primers sequences used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')
gGH-F	CCGCTCGAGCGGATGATGGCTGCAGGCCCCGGA
gGH-R	CCGCTCGAGCGGCTAGAAGGCACAGCTGGCTCCCCG
CMV/tPA-F	CGTGGATAGCGGTTTGA
CMV/tPA-R	GAGCCCTCCTTTGATGC

表达, 48 h 后收集细胞诱导液, 进行 ELISA 检测, 使用鼠抗 *tPA* 单克隆抗体作为一抗(sc-59721, 美国 Santa Cruz 公司)、羊抗鼠单克隆抗体 IgG-HRP 作为二抗(sc-2005, 美国 Santa Cruz 公司), 显色后酶标仪测定  $OD_{450}$  值, 并绘制标准曲线、计算 *tPA* 表达量, 比较 *tPA/gGH* 双基因整合和 *tPA* 单基因整合的山羊乳腺上皮细胞诱导表达水平。

## 1.8 Western blotting 检测

按照常规方法对细胞诱导液进行 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)<sup>[13]</sup>。使用转移缓冲液(1.93 g/L Tris, 9 g/L Glycine)将聚丙烯酰胺凝胶转移至 PVDF 膜, 250 mA, 转印 3.5 h。超纯水冲洗后, 37°C 封闭(20 mmol/L Tris, 137 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20, 10% Fetal bovine serum, pH 7.6), 2.5 h。加入一抗稀释液(1:2000 稀释, 鼠抗 *tPA* 单克隆抗体, sc-59721, 美国 Santa Cruz 公司), 37°C 孵育 2 h。TTBS (20 mmol/L Tris, 137 mmol/L NaCl, 1% Tween-20, pH 7.6)洗涤 3 次后, 加入二抗-HRP 稀释液(1:2000 稀释, 羊抗鼠单克隆抗体 IgG-HRP, sc-2005, 美国 Santa Cruz 公司)中, 37°C 孵育 2 h。取出 PVDF 膜, PBS 洗净后, 添加显色液(DAB 50 mg, 0.05 mol/L TB 100 mL, 30  $\mu$ L 30%  $H_2O_2$ , pH 7.6), 室温 15 min, 晾干后拍照、记录并保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCL25/gGH 乳腺特异性表达载体鉴定

在实验室原有的 PCL25/*tPA* 乳腺特异性表达载体(图 1A)基础上, 通过常规分子生物学手段, 以 *gGH* 基因置换 *tPA* 基因, 重新构建的 PCL25/*gGH* 质粒经 *Xho* I 酶切后, 分别扩增出约 670 bp 和 21 261 bp 大小的条带(图 1B), 与目标条带大小一致。

### 2.2 *tPA/gGH* 双基因整合乳腺上皮细胞分析

纯化后的未转染山羊乳腺上皮细胞生长旺盛、形态均一、细胞之间排列紧密, 其形状呈现典型的短梭状或鹅卵石状(图 2)。经筛选, 本研究共获得 142 株单克隆抗性细胞株, 进一步利用 CMV/*tPA*-F/R 引物进行 PCR 扩增, 经检测, 获得 87 株整合外源基因 *tPA* 细胞株, 能扩增出 561 bp 大小的目标条带(图 3A); 利用 *gGH*-F/R 引物对这 87 株细胞进行 *gGH* 基因整合检测, 共获得 34 株整合 *gGH* 基因的细胞株, 扩增出 670 bp 大小的目标条带(图 3B)。因此, 本研究共获得 53 株 *tPA* 单基因整合入乳腺上皮细胞的细胞株, 整合效率为 37.3% (53/142); 34 株 *tPA/gGH* 双基因整合乳腺上皮细胞株, 双基因整合效率达到 23.9% (34/142), 具体详见表 2。

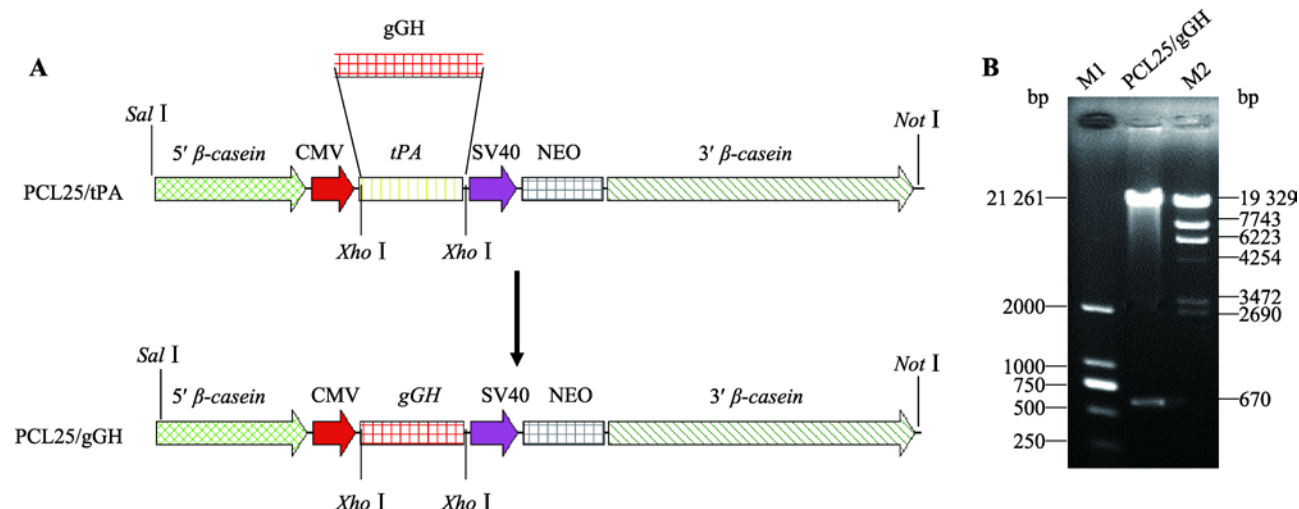


图 1 乳腺特异性表达载体 PCL25/*gGH* 构建示意图

Fig. 1 Construction of PCL25/*gGH* vector

A: PCL25/*tPA* 和 PCL25/*gGH* 载体结构示意图; B: PCL25/*gGH* 载体 *Xho*I 酶切鉴定。M1: DL2000 digest DNA Marker; M2:  $\lambda$ -EcoT14 digest DNA Marker。



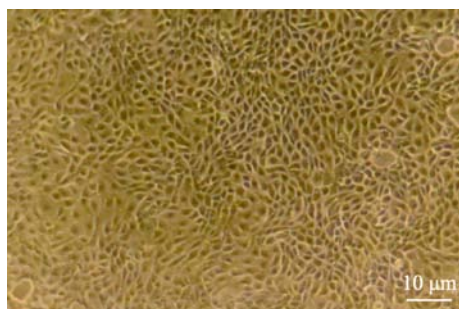


图 2 纯化后的乳腺上皮细胞

Fig. 2 Purified mammary epithelial cell clones

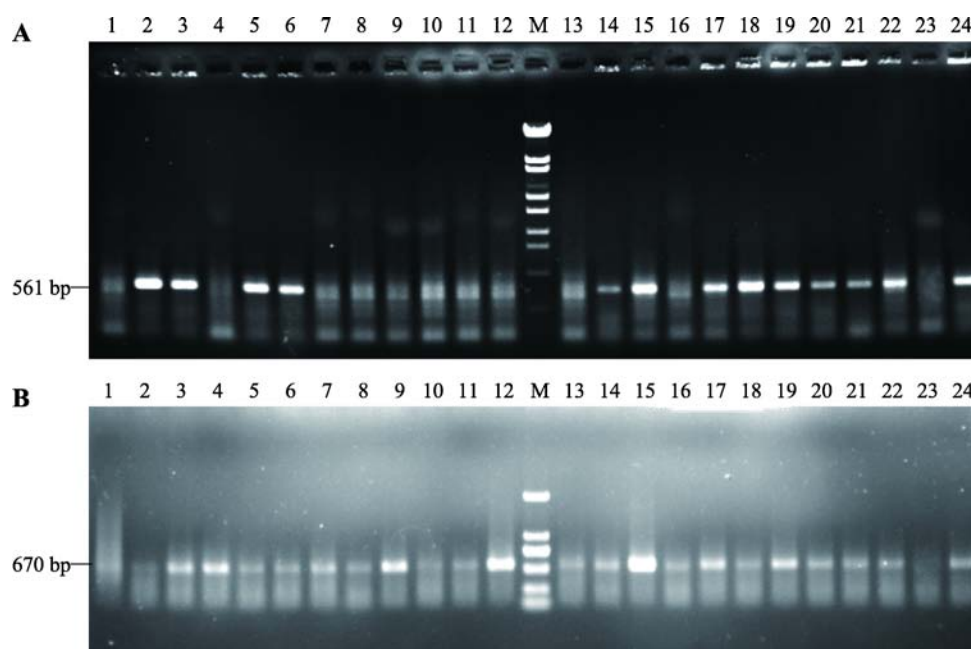
### 2.3 tPA 在单克隆细胞株中的诱导表达分析

分别对整合 *tPA* 单基因、*tPA/gGH* 双基因的山羊乳腺上皮细胞进行催乳素诱导 *tPA* 表达, 收集 48 h 后的细胞诱导液进行 ELISA 检测, 重复一次, 取平

均值。结果显示, 共有 29 株细胞能够表达 *tPA*, 表达率为 33.3% (29/87), 其中单基因表达细胞有 12 株, 表达率为 22.6% (12/53), 双基因表达细胞有 17 株, 表达率为 50.0% (17/34) (表 2)。以 *tPA* 标准品(阿替普酶)浓度( $\mu\text{g/mL}$ )作为纵坐标、 $OD_{450\text{ nm}}$  值作为横坐标, 制作相应的标准曲线(图 4), 计算乳腺细胞诱导表达 *tPA* 的水平, 其中单基因细胞表达 *tPA* 含量为 7.5~52.0  $\mu\text{g/mL}$ , 而双基因细胞表达 *tPA* 含量为 40~360  $\mu\text{g/mL}$ , 明显高于单基因整合细胞株的表达量。

### 2.4 Western blotting 对表达蛋白的鉴定

以鼠抗 *tPA* 单克隆抗体作为一抗, 利用 Western blotting 检测收集的细胞诱导液表达 *tPA* 的, 结果如图 5 所示。表达细胞诱导液和阳性对照(*tPA* 标准品)均出现约 39.0 kDa 大小的条带, 与目标蛋白

图 3 转 *tPA/gGH* 双基因山羊乳腺上皮细胞 PCR 检测结果Fig. 3 Detection of transfected *tPA/gGH* gene in goat mammary epithelial cell clones by PCR

A: 转 *tPA* 基因的 PCR 检测结果。1~22: 乳腺上皮细胞单克隆; M:  $\lambda$ -EcoT14 digest DNA Marker; 23: 阴性对照(正常细胞基因组); 24: 阳性对照(PCL25/*tPA* 质粒)。B: 转 *gGH* 基因的 PCR 检测结果。1~22: 乳腺上皮细胞单克隆; M: DL2000 digest DNA Marker; 23: 阴性对照(正常细胞基因组); 24: 阳性对照(PCL25/*gGH* 质粒)。

表 2 *tPA/gGH* 双基因转染山羊乳腺上皮细胞情况统计表Table 2 Statistical table of goat mammary epithelial cells were transfected with *tPA/gGH* double genes

细胞(142 个)	整合细胞数	整合率(%)	表达细胞数	表达率(%)	表达水平( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>tPA</i> 单基因整合	53	37.3	12	22.6	7.5~52.0
<i>tPA/gGH</i> 双基因整合	34	23.9	17	50.0	40~360

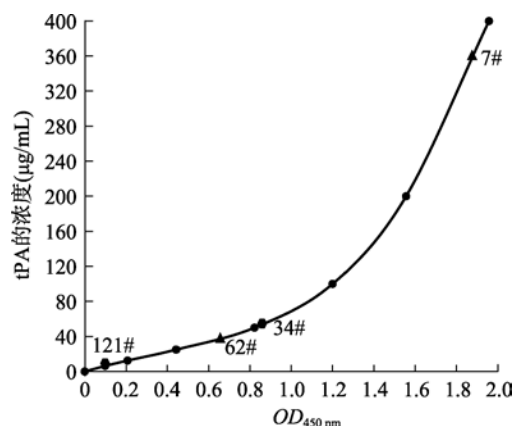


图4 转基因单克隆乳腺上皮细胞株表达 tPA 的检测结果

Fig. 4 Detection of tPA expression in transgenic monoclonal mammary epithelial cell lines

tPA 标准品的浓度分别是 0、6.25、12.5、25、50、100、200 和 400 µg/mL; 34#、121# 分别是 *tPA* 单基因整合的山羊乳腺上皮细胞株诱导表达 tPA 的最高量和最低量; 7#、62# 分别是 *tPA/gGH* 双基因整合的山羊乳腺上皮细胞株诱导表达 tPA 的最高量和最低量。

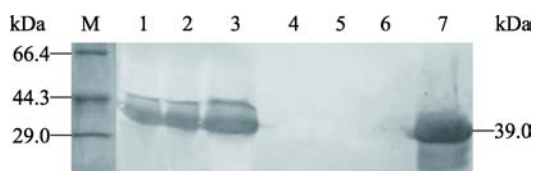


图5 转基因单克隆乳腺上皮细胞株表达 tPA 的 western blotting 检测结果

Fig. 5 Detection of tPA expression in transgenic monoclonal mammary epithelial cell lines by Western blotting

M: 蛋白分子量标准; 1~3: 表达细胞诱导液(62#、34#、7#); 4: 未表达细胞诱导液; 5: 阴性对照(未诱导); 6: 空白对照(H<sub>2</sub>O); 7: 阳性对照(tPA 标准品)。

tPA 的大小一致,而未表达细胞诱导液和阴性对照均未出现条带,这说明与 ELISA 检测结果一致,初步判断整合外源基因的山羊乳腺上皮细胞经催乳素诱导表达的蛋白为 tPA 目标蛋白。

### 3 讨论

随着人们生活水平的不断提高,饮食结构和生活习惯的不断改变,血栓疾病在我国已呈现出明显的上升趋势,并有着向中青年发展的趋势<sup>[3,15]</sup>。人组织纤溶酶原激活剂(tPA)作为一种溶栓药物,在临

床上治疗血栓类疾病发挥着重要作用<sup>[16]</sup>,但如何高效、低成本、简便地生产 tPA 一直困扰着科学界。自 20 世纪 90 年代, Wright 等<sup>[17]</sup>在羊乳腺中成功地表达了人  $\alpha$ -抗胰蛋白酶基因以来,乳腺生物反应器得到了长足的发展,为生产 tPA 类溶栓药物提供了较大的可能性。利用动物乳腺生物反应器来生产 tPA 等溶栓药物,具有产量高、成本低、翻译后修饰、生物活性高等优于其他表达系统的特点<sup>[6]</sup>。但哺乳动物乳腺表达 tPA 产量一直较低,这可能是由于 tPA 是一种非乳蛋白,而乳蛋白的特异性表达机制较复杂、基因网络涉及到多个基因及调控元件的相互作用等。因此,积极探索如何提高哺乳动物乳腺中表达外源基因 *tPA* 至关重要。

将两个基因共同整合到动物体内会产生协同作用<sup>[9,18]</sup>,其中一种基因能够促进另一种目标基因表达水平的提高,从而解决转基因动物中表达 tPA 较低的问题,获得较高的产量。近年来,双基因提高外源基因表达水平的研究已有报道,例如 Dominggues 等<sup>[19]</sup>将血红蛋白四聚体的  $\alpha$ -Hb 与  $\beta$ -Hb 两个亚基克隆到同一启动子 *trc* 的下游,实现了多基因的共表达。陈宁等<sup>[12]</sup>将 *NGF* 与 *BMP2* 双基因转染大鼠 BMSCs,使双基因转染组的目的蛋白表达量显著地提高。韩操等<sup>[10]</sup>、王林楠等<sup>[11]</sup>分别对兔骨髓间充质干细胞和神经干细胞的研究也证明了双基因转染的目标蛋白表达水平明显高于单基因。分析原因可能是生物体内基因调控网络所致,基因表达调控具有复杂性和多层次性,有的基因表达能够激活提高另一种基因的转录和表达水平<sup>[19,20]</sup>。但是,在羊乳腺上皮细胞中的研究较少见报道,尤其是关于 *tPA/gGH* 双基因转染羊乳腺上皮细胞的表达分析研究尚未见报道。

有研究证明生长激素(GH)对于  $\beta$ -casein 基因的表达具有促进作用<sup>[21,22]</sup>,能够与  $\beta$ -casein 基因的 HRE 序列结合,激活其受体并提高蛋白的特异性表达,同时 GH 还能够刺激乳腺上皮细胞的分化与增殖<sup>[23]</sup>。因此,本研究选择了山羊  $\beta$ -casein 基因作为调控序列,以本实验室前期构建且验证表达的 PCL25/tPA 乳腺特异性表达载体为基础,构建了 PCL25/gGH 表达载体。但由于动物乳腺生物反应器存在诸如研制周期长、技术繁杂、动物成本大、风险高等问题<sup>[14]</sup>,故有必要在制备转基因动物之前进行载体表达验证,

而哺乳动物细胞和小鼠是最常用的表达载体验证工具<sup>[6,13]</sup>。山羊乳腺上皮细胞虽然是一种极难培养的终末分化细胞,但由于具有诱导表达功能,可使用催乳素等诱导<sup>[6]</sup>,因此该细胞是目前应用最广泛的一种验证乳腺特异性表达载体的技术手段。而且,本研究选择的 *gGH* 基因能够促进乳腺上皮细胞的增殖,本研究结果成功获得的众多转基因细胞株也较好地证明了这一点。

本研究通过电转染山羊乳腺上皮细胞的双基因载体 PCL25/tPA 和 PCL25/*gGH* 均是以山羊  $\beta$ -casein 基因为调控序列,共获得 *tPA/gGH* 双基因整合的转基因乳腺上皮细胞 34 株(整合率 23.9%),*tPA* 单基因整合细胞 53 株(整合率 37.3%),转基因整合效率较高。催乳素诱导表达结果显示双基因整合能够明显提高转基因细胞中外源目的基因 *tPA* 的表达水平,最高表达水平达 360  $\mu\text{g/mL}$ ,而且表达率也明显高于单基因整合细胞株(50.0%/22.6%)。分析原因可能是 *gGH* 基因能够与山羊  $\beta$ -casein 基因调控序列发挥协同促进作用,从而提高外源基因 *tPA* 的表达水平。同时,由于单基因表达水平过低,部分细胞株表达 *tPA* 量极低而不易被 ELISA 检测出,当额外转入对表达具有协同促进作用的 *gGH* 基因时,使部分原先表达水平极低的细胞株表达 *tPA* 量显著提高,从而被检出来,故 *tPA/gGH* 双基因整合细胞株的表达率也明显高于 *tPA* 单基因整合细胞株。但是,基因表达涉及到整合位点、表观遗传、外源基因拷贝数、相关激素水平及基因网络等多方面的影响<sup>[13,23,24]</sup>,因此,本实验室今后还会进行深入的后续研究工作,重点阐明整合位点与基因拷贝数对 *tPA* 表达水平的影响。

综上所述,本研究成功地制备了 *tPA/gGH* 双基因整合的山羊乳腺上皮细胞株,并证明了双基因整合入山羊细胞的可行性以及在细胞水平能够高效地表达外源目的基因 *tPA*,为将来制备高表达转基因山羊及其他动物奠定了基础,也为转基因动物乳腺生物反应器和转基因育种建立新技术提供了前提保障。

## 参考文献(References):

- [1] Zhou J, Limsakun T, Yin O, Warren V, Zamora C, Atiee G, Kochan J, Pav J, Kobayashi F, Vashi V, Dishy V. First-in-human study to assess the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of an oral formulation of DS-1040, an inhibitor of the activated form of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, in healthy subjects. *J Clin Pharmacol*, 2019, 59(12): 1669–1677. [DOI]
- [2] Ebert KM, Selgrath JP, DiTullio P, Denman J, Smith TE, Memon MA, Schindler JE, Monastersky GM, Vitale JA, Gordon K. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology (NY)*, 1991, 9(9): 835–838. [DOI]
- [3] Scott DM, Ling CY, MacQueen BC, Baer VL, Gerday E, Christensen RD. Recombinant tissue plasminogen activator to restore catheter patency: efficacy and safety analysis from a multihospital NICU system. *J Perinatol*, 2017, 37(3): 291–295. [DOI]
- [4] Wysocki NA, Bambhroliya A, Ankrom C, Vahidy F, Astudillo C, Trevino A, Malazarte R, Cossey TC, Jagolino-Cole A, Savitz S, Wu TC, Sharrief A. Outcomes among patients with ischemic stroke treated with intravenous tPA (Tissue-Type Plasminogen Activator) via telemedicine. *Stroke*, 2019, 50(4): 895–900. [DOI]
- [5] Xu HM, Shen ZL, Cheng GX, Xi T, Wu WT. Transient expression of thrombolytic agent-reteplase(rPA) in the mammary glands of milk goats. *Pharm Bio*, 2006, 13(3): 166–169.  
徐寒梅, 沈子龙, 成国祥, 奚涛, 吴梧桐. 奶山羊乳腺瞬时表达溶栓药物瑞替普酶-reteplase(rPA)的研究. *药物生物技术*, 2006, 13(3): 166–169. [DOI]
- [6] Song SZ. The studies on transgenic rabbits mammary gland-specific expression of recombinant human plasminogen activator (rhPA) and pharmacodynamics [Dissertation]. Yangzhou University, 2015.  
宋绍征. 转基因兔乳腺特异性表达重组人纤溶酶原激活剂(rhPA)及其药效学研究[学位论文]. 扬州大学, 2015. [DOI]
- [7] Nishihara K, Kobayashi R, Suzuki Y, Sato K, Katoh K, Roh S. Post-prandial decrease in plasma growth hormone levels is not related to the increase in plasma insulin levels in goats. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2017, 30(12): 1696–1701. [DOI]
- [8] Li MY, Min LJ, Sun GQ, Pan QJ, Shen W, Wang GL. Polymorphism analysis of the goat growth hormone gene in the 5' regulatory sequence. *Hereditas(Beijing)*, 2004, 26(6): 831–835.  
李美玉, 闵令江, 孙国强, 潘庆杰, 沈伟, 王广莲. 山羊生长激素基因 5'调控区的多态性分析. *遗传*, 2004,



- 26(6): 831–835. [DOI]
- [9] Siddiqui HA, Asif M, Asad S, Naqvi RZ, Ajaz S, Umer N, Rauf I, Sarwar M, Arshad M, Amin I, Saeed M, Mukhtar Z, Bashir A, Mansoor S. Development and evaluation of double gene transgenic cotton lines expressing Cry toxins for protection against chewing insect pests. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1–7. [DOI]
- [10] Hao C, Wang ZD, Yan N. Effect of transfected BMP-2 and b FGF double gene lentivirus vectors on the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells in rabbit. *Prog Anat Sci*, 2019, 25(1): 25–27, 31.  
韩操, 王正东, 颜南. 慢病毒介导 bFGF 和 BMP-2 双基因转染对兔骨髓间充质干细胞增殖的影响. 解剖科学进展, 2019, 25(1): 25–27, 31. [DOI]
- [11] Wang LN, Wang L, Song YM, Liu LM, Yang X, Feng GJ, Zhou CG. Experimental study of lentivirus-mediated Nogo extracellular peptide residues 1-40 gene and neurotrophin 3 gene co-transduction in neural stem cells. *Chin J Repair Reconstr Surg*, 2018, 32(04): 420–427.  
王林楠, 汪雷, 宋跃明, 刘立岷, 杨曦, 丰干均, 周春光. 慢病毒介导 NEP1-40 及 NT-3 双基因转染神经干细胞的实验研究. 中国修复重建外科杂志, 2018, 32(4): 420–427. [DOI]
- [12] Chen N, Jiang LB, Su M, Xu W, Li CX, Wang RY, Tang JC, Bei CY. Transfected double gene pCDNA3.1-NGF-IRES-BMP2 eukaryotic plasmid and its inductive effects for osteo-genesis in rat BMSCs. *Orthopedic J China*, 2016, 24(4): 345–351.  
陈宁, 蒋林彬, 粟谋, 徐威, 李朝旭, 王锐英, 唐际存, 贝朝涌. 双基因 pCDNA 3.1-NGF-IRES-BMP2 真核质粒转染大鼠 BMSCs 诱导成骨的研究. 中国矫形外科杂志, 2016, 24(4): 345–351. [DOI]
- [13] Cheng Y. Mammary gland-specific expression of hLF cDNA driven by lactoprotein and cytomegalovirus (CMV) chimeric promoters [Dissertation]. Nanjing Agricultural University, 2007.  
成勇. 乳蛋白与 CMV 复合启动子驱动 hLFcDNA 乳腺特异性表达[学位论文]. 南京农业大学, 2007. [DOI]
- [14] Song SZ, Ge X, Cheng YB, Lu R, Zhang T, Yu BL, Ji XQ, Qi ZQ, Rong Y, Yuan YG, Cheng Y. High-level expression of a novel recombinant human plasminogen activator (rhPA) in the milk of transgenic rabbits and its thrombolytic bioactivity *in vitro*. *Mol Biol Rep*, 2016, 43(8): 775–783. [DOI]
- [15] Vandelli L, Marietta M, Trenti T, Varani M, Bigliardi G, Rosafio F, Dell'acqua ML, Picchetto L, Nichelli P, Zini A. Fibrinogen concentrate replacement in ischemic stroke patients after recombinant tissue plasminogen activator treatment. *Adv Clin Exp Med*, 2019, 28(2): 219–222. [DOI]
- [16] Grummisch JA, Jadavji NM, Smith PD. The pleiotropic effects of tissue plasminogen activator in the brain: implications for stroke recovery. *Neural Regen Res*, 2016, 11(9): 1401–1402. [DOI]
- [17] Wright G, Carver A, Cottom D, Reeves D, Scott A, Simons P, Wilmut I, Garner I, Colman A. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology (NY)*, 1991, 9(9): 830–834. [DOI]
- [18] Torres V, Barra L, Garcés F, Ordenes K, Leal-Ortiz S, Garner CC, Fernandez F, Zamorano P. A bicistronic lentiviral vector based on the 1D/2A sequence of foot-and-mouth disease virus expresses proteins stoichiometrically. *J Biotechnol*, 2010, 146(3): 138–142. [DOI]
- [19] Domingues E, Brillet T, Vasseur C, Agier V, Marden MC, Baudin-Creuzat V. Construction of a new polycistronic vector for over-expression and rapid purification of human hemoglobin. *Plasmid*, 2009, 61(1): 71–77. [DOI]
- [20] Wang ZH, Liu QJ, Zhu YP. Research on modular organization of gene regulatory network. *Hereditas (Beijing)*, 2008, 30(1): 20–27.  
王正华, 刘齐军, 朱云平. 基因调控网络的模块化组织研究. 遗传, 2008, 30(1): 20–27. [DOI]
- [21] Zhou Y, Akers RM, Jiang H. Growth hormone can induce expression of four major milk protein genes in transfected MAC-T cells. *J Dairy Sci*, 2008, 91(1): 100–108. [DOI]
- [22] Li L, He ML, Liu Y, Zhang YS. Buffering agent-induced lactose content increases via growth hormone-mediated activation of gluconeogenesis in lactating goats. *Physiol Res*, 2018, 67(2): 317–329. [DOI]
- [23] Maningat PD, Sen P, Rijnkels M, Hadsell DL, Bray MS, Haymond MW. Short-term administration of rhGH increases markers of cellular proliferation but not milk protein gene expression in normal lactating women. *Physiol Genomics*, 2011, 43(8): 381–391. [DOI]
- [24] Yang XQ, Wu ZF, Li ZC. Advances in epigenetic reprogramming of somatic cells nuclear transfer in mammals. *Hereditas(Beijing)*, 2019, 41(12): 1099–1109.  
杨旭琼, 吴珍芳, 李紫聪. 哺乳动物体细胞核移植表观遗传重编程研究进展. 遗传, 2019, 41(12): 1099–1109. [DOI]