[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl[7]
C12N 15/00
C12N 9/10 A01K 67/027
A23C 9/20

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 98808662.X

[43]公开日 2000年11月15日

[11]公开号 CN 1273602A

[22]申请日 1998.9.4 [21]申请号 98808662.X
[30]优先权
[32]1997.9.5 [33]US [31]08/925,834
[86]国际申请 PCT/US98/18383 1998.9.4
[87]国际公布 WO99/11773 英 1999.3.11
[85]进入国家阶段日期 2000.2.28
[71]申请人 艾博特公司
地址 美国伊利诺伊州
共同申请人 俄亥俄州立大学 佐治亚州大学研究基金会有限公司
[72]发明人 P·A·普里托 J·J·科普奇克
R·D·库明斯 J·M·皮尔斯
D·F·史密斯 K·W·莫雷门

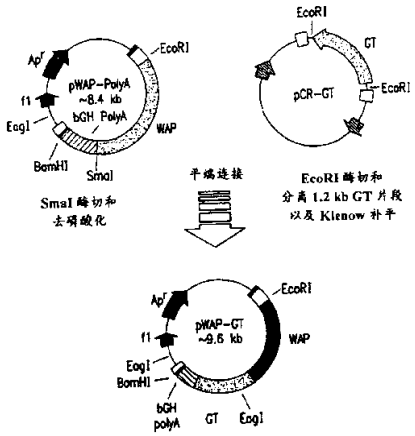
[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 谭明胜

权利要求书5页 说明书32页 附图页数26页

[54]发明名称 在其乳中生产寡糖的转基因哺乳动物

[57]摘要

本发明涉及产生在其乳中产生各种寡糖和糖缀合物的非人类转基因哺乳动物的 方法。另外,本发明涉及产生所述哺乳动物本身、所述哺乳动物所产的乳、包 含所述乳的组合物、所述乳的组分和所述乳中存在的纯化的寡糖以及糖缀合物。



ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1. 产生其体细胞和生殖细胞含有至少一种转基因的非人类转基因哺乳动物的方法，其中所述至少一种转基因的表达导致在该哺乳动物乳中产生寡糖和糖蛋白，该方法包括以下步骤:

(a) 制备至少一种转基因，所述至少一种转基因包含以可操作连接的 1)至少一种在泌乳细胞中有功能的表达调节序列，2)编码在泌乳细胞中有功能的信号序列的 DNA 序列，和 3)编码酶的 DNA 序列;

(b) 将所述至少一种转基因引入非人类哺乳动物胚中，并将所得的胚转移入雌性受体中;

(c) 鉴别至少一个雌性后代，其中所述至少一种转基因的表达导致产生至少一种酶，这种酶然后催化该哺乳动物乳中产生寡糖和糖蛋白。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述非人类转基因哺乳动物选自小鼠、大鼠、兔子、猪、山羊、绵羊和乳牛。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述至少一种酶为糖基转移酶。

4. 权利要求 3 的方法，其中所述糖基转移酶选自：岩藻糖基转移酶、半乳糖基转移酶、乙酰基转移酶、glucoronyl 转移酶、葡糖酸差向异构酶(gluconylepimerase)、唾液酸转移酶、甘露糖基转移酶、磺基转移酶、β-乙酰半乳糖胺转移酶和 N-乙酰葡糖胺转移酶。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述寡糖选自：半乳糖α1-3 半乳糖β1-4 葡萄糖、2'岩藻糖乳糖、3'岩藻糖乳糖、乳糖-N-新四糖、乳糖-N-四糖、乳糖-N-岩藻五糖、乳糖-N-岩藻五糖的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 II、乳糖-N-岩藻五糖 II 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 III、乳糖-N-岩藻五糖 III 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 IV、乳糖-N-岩藻五糖 IV 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 V、乳糖-N-岩藻五糖 V 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-二岩藻五糖 I、乳糖-N-二岩藻五糖的唾液酸化衍生物、乳糖-N-二岩藻五糖 II、乳糖-N-二岩

藻五糖 II 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-己糖、乳糖-N-己糖的岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖(tetrasaccharide) a、唾液酸四糖 a 的岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖 b、唾液酸四糖 b 的岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖 c 和唾液酸四糖 c 的岩藻糖基化衍生物。

6. 非人类转基因哺乳动物，其中该哺乳动物的基因组包含至少一种操作性连接至乳腺特异性启动子、编码酶的 DNA 序列，其中所述至少一种 DNA 序列的表达导致在该哺乳动物乳中产生寡糖和糖蛋白。

7. 权利要求 6 的非人类转基因哺乳动物，其中所述非人类哺乳动物选自小鼠、大鼠、兔子、猪、山羊、绵羊和乳牛。

8. 权利要求 6 的非人类转基因哺乳动物，其中所述酶为糖基转移酶。

9. 权利要求 8 的非人类转基因哺乳动物，其中所述糖基转移酶选自：岩藻糖基转移酶、半乳糖基转移酶、乙酰基转移酶、glucoronyl 转移酶、葡糖酸差向异构酶、唾液酸转移酶、甘露糖基转移酶、磺基转移酶、β-乙酰半乳糖胺转移酶和 N-乙酰葡糖胺转移酶。

10. 权利要求 6 的非人类转基因哺乳动物，其中所述寡糖选自：半乳糖α1-3 半乳糖β1-4 葡萄糖、2'岩藻糖乳糖、3'岩藻糖乳糖、乳糖-N-新四糖、乳糖-N-四糖、乳糖-N-岩藻五糖、乳糖-N-岩藻五糖的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 II、乳糖-N-岩藻五糖 II 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 III、乳糖-N-岩藻五糖 III 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 IV、乳糖-N-岩藻五糖 IV 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 V、乳糖-N-岩藻五糖 V 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-二岩藻五糖 I、乳糖-N-二岩藻五糖的唾液酸化衍生物、乳糖-N-二岩藻五糖 II、乳糖-N-二岩藻五糖 II 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-己糖、乳糖-N-己糖的岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖 a、唾液酸四糖 a 的岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖 b、唾液酸四糖 b 的岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖 c 和唾液酸四糖 c 的岩藻糖基化衍生物。

11. 在非人类转基因哺乳动物中产乳的方法，该方法包括以下步

骤:

(a)制备至少一种转基因，所述至少一种转基因包含以可操作连接的 1)在泌乳细胞中有功能的启动子，2)编码酶的 DNA 序列，其中所述至少一种转基因的表达导致在所述哺乳动物乳中产生寡糖和糖蛋白;

(b)将所述至少一种转基因插入所述非人类转基因哺乳动物中;

(c)挤出所述非人类转基因哺乳动物的乳，以获得所述乳，其中所述乳包含所述寡糖和糖蛋白。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述非人类转基因哺乳动物选自小鼠、大鼠、兔子、猪、山羊、绵羊和乳牛。

13. 权利要求 11 的方法，其中所述酶为糖基转移酶。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述糖基转移酶选自：岩藻糖基转移酶、半乳糖基转移酶、乙酰基转移酶、glucoronyl 转移酶、葡糖酸差向异构酶、唾液酸转移酶、甘露糖基转移酶、磺基转移酶、β-乙酰半乳糖胺转移酶或 N-乙酰葡糖胺转移酶。

15. 权利要求 11 的方法，其中所述寡糖选自：半乳糖α1-3 半乳糖β1-4 葡萄糖、2'岩藻糖乳糖、3'岩藻糖乳糖、乳糖-N-新四糖、乳糖-N-四糖、乳糖-N-岩藻五糖、乳糖-N-岩藻五糖的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 II、乳糖-N-岩藻五糖 II 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 III、乳糖-N-岩藻五糖 III 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 IV、乳糖-N-岩藻五糖 IV 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 V、乳糖-N-岩藻五糖 V 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-二岩藻五糖 I、乳糖-N-二岩藻五糖的唾液酸化衍生物、乳糖-N-二岩藻五糖 II、乳糖-N-二岩藻五糖 II 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-己糖、乳糖-N-己糖的岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖 a、唾液酸四糖 a 的岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖 b、唾液酸四糖 b 的岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖 c 和唾液酸四糖 c 的岩藻糖基化衍生物。

16. 由非人类转基因哺乳动物所产的乳，其中该非人类转基因哺乳动物的基因组包含至少一种编码酶的 DNA 序列，所述 DNA 序列操

作性地连接至启动子，其中所述至少一种DNA序列的表达导致产生寡糖和糖蛋白。

17. 权利要求 16 的乳，其中所述非人类转基因哺乳动物选自小鼠、大鼠、兔子、猪、山羊、绵羊和乳牛。

18. 权利要求 17 的乳，其中所述酶为糖基转移酶。

19. 权利要求 18 的乳，其中所述糖基转移酶选自：岩藻糖基转移酶、半乳糖基转移酶、乙酰基转移酶、glucoronyl 转移酶、葡糖酸差向异构酶、唾液酸转移酶、甘露糖基转移酶、磺基转移酶、β-乙酰半乳糖胺转移酶和 N-乙酰葡糖胺转移酶。

20. 权利要求 17 的乳，其中所述寡糖选自：半乳糖α1-3 半乳糖β1-4 葡萄糖、2'岩藻糖乳糖、3'岩藻糖乳糖、乳糖-N-新四糖、乳糖-N-四糖、乳糖-N-岩藻五糖、乳糖-N-岩藻五糖的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 II、乳糖-N-岩藻五糖 II 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 III、乳糖-N-岩藻五糖 III 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 IV、乳糖-N-岩藻五糖 IV 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 V、乳糖-N-岩藻五糖 V 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-二岩藻五糖 I、乳糖-N-二岩藻五糖的唾液酸化衍生物、乳糖-N-二岩藻五糖 II、乳糖-N-二岩藻五糖 II 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-己糖、乳糖-N-己糖的岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖 a、唾液酸四糖 a 的岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖 b、唾液酸四糖 b 的岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖 c 和唾液酸四糖 c 的岩藻糖基化衍生物。

21. 权利要求 18 的所述乳的组分，其中所述部分包含至少一种寡糖、至少一种糖蛋白或其组合。

22. 由权利要求 16 的乳纯化的寡糖或糖蛋白。

23. 营养制品，包含权利要求 18 的所述乳、权利要求 21 的所述组分或权利要求 22 的所述寡糖或糖蛋白。

24. 权利要求 23 的营养制品，其中所述制品为婴儿配制食品。

25. 权利要求 24 的营养制品，其中所述婴儿配制食品为液体或固

体形式。

26. 给患者提供营养的方法，所述方法包括给予所述患者足以实现所述营养的量的权利要求 18 的所述乳、权利要求 21 的所述组分或权利要求 22 的所述寡糖或糖蛋白。

00.02.29

说　明　书

在其乳中生产寡糖的转基因哺乳动物

本申请是 1994 年 3 月 9 日申请的未决的美国专利申请系列第 08/208,889 号、1996 年 9 月 16 日申请的未决的美国专利系列第 08/715,259 号(为 1994 年 3 月 9 日申请的放弃的美国专利申请系列第 08/209,132 号的继续)、1995 年 5 月 2 日申请的未决的美国专利申请序列第 08/434,151 号(为 1994 年 3 月 9 日申请的未决的美国专利申请系列第 08/209,132 号的分案)和 1995 年 5 月 2 日申请的未决的美国专利申请系列第 08/433,271 号(为未决的美国专利申请系列第 08/209,122 号的分案)的部分继续，所有这些专利申请均通过引用结合到本文中。

发明背景

技术领域

本发明涉及产生在其乳中产生各种寡糖的非人类转基因哺乳动物的方法。另外，本发明涉及所产生的哺乳动物、这些哺乳动物所产的乳、包含所述乳的组合物、所述乳的分级分离组分和所述纯化的寡糖以及所述乳中存在的糖蛋白。

背景信息

过去，已有数人达到在转基因哺乳动物乳中表达初级基因产物(即蛋白质)(美国专利第 5,322,775 号，Wall 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1696-1700 (1991)和 Krimpenfort, P., *Cancer Detection and Prevention* 17 (2): 301-305 (1993))。进行这种表达以在乳中产生大量的异源蛋白(Velander 等，*Sciencific American*，1997 年 1 月，第 70-74 页)。

最近，也证明了次级转基因产物(例如寡糖、糖蛋白和糖脂)的表达事实上是可能的(Prieto 等，*Journal of Biological Chemistry* 49:29515-

29519 (1995)). Prieto 等进行的实验提出了这样一个概念：采用转基因哺乳动物的乳腺作为生物反应器，而非仅仅作为替代的蛋白合成系统。

在以上文章中引用的大多数实验是通过表达异源转基因进行的。这种表达的一个原因是，转基因表达的同源基因由于与乳腺发育的内部蛋白合成相冲突而可能引起困难(Burdon 等, *Mechanisms of Development* 36: 64-67 (1991))。利用异源基因表达的另一原因是，已经进行的大多数实验设计用于产生人类生物制品。

诸如乳寡糖的次级基因产物的合成，主要取决于生乳期间糖基转移酶的表达。另外，生产这种寡糖有许多益处。例如，在用于合成寡糖的转基因系统中，仅必需催化量的糖基转移酶。此外，所述转基因的来源可以不相关，只要一种或多种所述次级基因产物是一种或多种所需次级基因产物即可。

也必须注意到，非人类哺乳动物有具有人类酶所有组分成分中相应物的多种糖基转移酶(Thurin 等, *The Journal of Biological Chemistry* 265(12): 7055-7061 (1990))。这些转移酶中的某些酶已经从非人类哺乳动物(例如小鼠)组织中克隆出来(Larsen 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8227-8231 (1989))。因此，同源糖基转移酶在非人类哺乳动物乳腺中的转基因表达，代表除用异源糖基转移酶产生寡糖外产生寡糖的一种方法。这两种酶类型的表达以及由于这类酶的作用产生的寡糖以及与其相关的糖蛋白，被认为属于本发明的范围。

将上述寡糖例如加入婴儿配制食品中，使得所述配制食品喂养的婴儿可以接受与母乳喂养婴儿相同的益处。例如，所述寡糖可以提供对致病细菌的抗性，这是可能的(Prieto 等, 见上文)。另外，这类寡糖可以加入其它组合物中，诸如加入营养补充剂或药物中。本发明的目标是产生用或者同源酶或异源酶(包括例如糖基转移酶)产生寡糖的非人类转基因哺乳动物。然后，由于这类寡糖的有益特性，可以将其加入各种组合物中。

另外，在转基因动物乳中存在寡糖和其它糖缀合物，可能导致这种动物的子代获得抵抗病毒、细菌或真菌感染或毒素的保护作用或抗性。

发明概述

本发明包括通过在哺乳期间转基因表达酶(例如糖基转移酶)而合成寡糖和糖蛋白的方法。此外，本发明也包括产生不存在于自然界的寡糖结构。可以在哺乳动物中通过转基因表达合适的目的真核或原核酶(例如糖基转移酶)，产生这类结构。因此，本发明使得能够在转基因哺乳动物的乳中产生同源、异源和新的结构。

更具体地讲，本发明包括产生其体细胞和生殖细胞含有至少一个转基因的非人类转基因哺乳动物。所述转基因的表达导致在该哺乳动物乳中产生寡糖和糖蛋白。该方法包括以下步骤: (a) 制备至少一种转基因，(b) 将所述转基因引入非人类哺乳动物胚中，并将所得的胚转移入雌性受体中，然后(c) 鉴别至少一个雌性后代。所述转基因的表达导致产生至少一种酶，这种酶然后催化该哺乳动物乳中产生寡糖和糖蛋白。每种转基因本身包括以可操作连接的至少一种在泌乳细胞中有功能的表达调节序列、编码在泌乳细胞中有功能的信号序列的 DNA 序列和编码一种酶的 DNA 序列。所述非人类转基因哺乳动物可以例如是小鼠、大鼠、兔子、猪、山羊绵羊或乳牛。所述酶可以例如是糖基转移酶，诸如岩藻糖基转移酶、半乳糖基转移酶、乙酰基转移酶、glucoronyl 转移酶、葡糖酸差向异构酶(gluconylepimerase)、唾液酸转移酶、甘露糖基转移酶、磺基转移酶、β-乙酰半乳糖胺转移酶或 N-乙酰葡糖胺转移酶。另外，所述寡糖可以例如是半乳糖α1-3 半乳糖β1-4 葡萄糖、2'岩藻糖乳糖、3'岩藻糖乳糖、乳糖-N-新四糖、乳糖-N-四糖、乳糖-N-岩藻五糖、乳糖-N-岩藻五糖的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 II、乳糖-N-岩藻五糖 II 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 III、乳糖-N-岩藻五糖 III 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 IV、乳糖-

N-岩藻五糖 IV 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 V、乳糖-N-岩藻五糖 V 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-二岩藻五糖 I、乳糖-N-二岩藻五糖 I 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-二岩藻五糖 II、乳糖-N-二岩藻五糖 II 的唾液酸化衍生物、乳糖-N-己糖、乳糖-N-己糖的岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖(tetrasaccharide) a、唾液酸四糖 a 的岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖 b、唾液酸四糖 b 的岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖 c 或唾液酸四糖 c 的岩藻糖基化衍生物。

另外，本发明包括非人类转基因哺乳动物。该哺乳动物的基因组包含至少一种操作性连接至乳腺特异性启动子、编码酶的 DNA 序列。所述 DNA 序列的表达导致在该哺乳动物乳中产生寡糖和糖蛋白。所述哺乳动物、酶和寡糖可以是上述哺乳动物、酶和寡糖。

此外，本发明包括在非人类转基因哺乳动物中产乳的方法。该方法包括(a)制备至少一种转基因，(b)将所述转基因插入所述非人类转基因哺乳动物中，和(c)挤出所述非人类转基因哺乳动物的乳，以获得所述乳。所述乳包含所述寡糖和糖蛋白。每种转基因包含操作性连接的在泌乳细胞中有功能的启动子和编码酶的 DNA 序列。每种转基因的表达导致在该哺乳动物乳中产生寡糖和糖蛋白。所述哺乳动物、酶和寡糖可以是上述哺乳动物、酶和寡糖。

此外，本发明包括由非人类转基因哺乳动物所产的乳。该非人类转基因哺乳动物的基因组包含至少一种编码酶的 DNA 序列。所述 DNA 序列操作性地连接至启动子。每种 DNA 序列的表达均导致最终产生寡糖和糖蛋白。再者，所述哺乳动物、酶和寡糖可以是上述哺乳动物、酶和寡糖。

而且，本发明还包括上述乳的分级分离组分。该分级分离组分可以包括例如由于表达所述转基因产生的一种或多种可溶性寡糖和/或糖蛋白。因此，所述乳的分级分离组分可以包含一种或多种上述组分(即寡糖或糖缀合物)或其任何组分。这种分级分离组分也可以包括在所述转基因哺乳动物乳中天然存在的寡糖和由于存在所述转基因而产

生的一种或多种寡糖和/或糖缀合物.

另外，本发明包括从上述乳中纯化的寡糖或糖蛋白，以及包括含有所述乳、其分级分离组分、或所述寡糖和/或糖蛋白的营养制品，所有所述乳、分级分离组分、寡糖和糖蛋白已在上述进行了描述。该营养制品可以是或者液体或者固体形式的婴儿配制食品。

本发明也包括为患者提供营养的方法。该方法包括给予所述患者上述的乳、其分级分离组分或寡糖或糖蛋白，其给予量足以实现所述营养。

附图简述

图 1-6 涉及包括表达同源酶(即鼠 UDP-Galβ-D-α1,3-半乳糖基转移酶)的方法。

图 1 描述 pWAP-GT 构成物的产生.

图 2 描述半乳糖α1-3 半乳糖β1-4 葡萄糖的层析分析，这是由本发明一种方法产生的一种新的寡糖.

图 3 图示半乳糖α1-3 半乳糖β1-4 葡萄糖的荧光团辅助的糖类电泳分析(FACE).

图 4 图示掺入半乳糖α1-3 半乳糖β1-4 葡萄糖的小鼠乳的 FACE 分析.

图 5 描述用 Dionex 方法 2 分析的阴性转基因、阳性转基因和阴性对照小鼠乳寡糖分布型的实例。于 31-32 分钟洗脱出的大峰推测为所述三糖.

图 6 图示图 5 所用样品的 FACE 分析。具体地说，进行 FACE 分析，以证实图 5 中检测出的“新”峰为所述三糖。与 G3 淀粉水解物标准带同时洗脱出的带确实为所述三糖.

图 7-13 涉及包括表达异源酶(即 H-α-1,2-岩藻糖基转移酶)的方法.

图 7 描述两种兔乳样品的高 pH 阴离子交换层析(HPAEC)的寡糖

分布型。A 板为由阴性转基因动物对照获得的样品的乳寡糖分布型。该样品含有乳糖和仅痕量的 2'-岩藻糖乳糖(Fucα1-2Galβ1-4Glc)。B 板为从其基因组含有编码人 H-α1-2 岩藻糖基转移酶的转基因的哺乳兔获得的样品的分布型。该样品含有大量的 2'-岩藻糖乳糖，其乳糖浓度低于非转基因动物乳样品中存在的乳糖浓度的 1/10。C 板为得自用于产生 B 板分布型的同一样品的分布型，但 C 板的样品掺入 20 mg/升 2'-岩藻糖乳糖。

图 8 图示另一转基因兔乳样品的离子层析分布型。A 板为对照乳，B 板为 2 号转基因样品，C 板为 3 号转基因样品，而 D 板为 4 号转基因样品。仅 4 号样品(C 板)含有大量的 2'-岩藻糖乳糖(即>50 mg/L)。3 号样品(B 板)表现出其乳糖浓度显著降低。

图 9 描述用来自以下样品的α1-2 岩藻糖乳糖消化前后乳寡糖的荧光团辅助糖类电泳(FACE)：未处理的兔乳和酶控制的兔乳、转基因兔乳和真正的标准品。具体地说，1 道代表真正的 2'-岩藻糖乳糖标准品，2 道代表未处理的 5 号转基因样品，3 道代表岩藻糖苷酶处理的 5 号转基因样品，4 道代表未处理的非转基因对照样品，而 5 道代表岩藻糖苷酶处理的对照样品。6 道代表一组直链葡萄糖聚合物标准品，其中 G2 代表 2 个葡萄糖单位，而 G3 代表 3 个葡萄糖单位。

图 10 图示其它转基因兔样品的 FACE。具体地说，1 道代表真正的 2'-岩藻糖乳糖标准品，2 道代表未处理的 5 号转基因样品，3 道代表另一转基因乳样品，4 道代表 4 号转基因样品，5 道代表非转基因对照样品，6 道代表一组直链葡萄糖聚合物标准品，而 7 道代表 3 号转基因样品。

图 11 描述转基因兔乳蛋白和对照兔乳蛋白的 Ulex Europaeus 凝集素 I (UEA-1)蛋白质印迹。1 道代表非转基因对照样品，2 道代表 1 号转基因样品，3 道代表 2 号转基因样品，4 道代表第二种非转基因对照。

图 12 图示其它兔乳蛋白样品的 UEA-1 蛋白质印迹。1 道来自非转基因对照，2 道为 4 号转基因样品，3 道为 3 号转基因样品，4 道为

非转基因对照样品，而 5 道代表分子量标准。

图 13 图示分离兔乳蛋白的考马斯染色的 SDS 电泳图。1 道显示非转基因对照乳的染色蛋白，2 道为 3 号转基因样品，3 道为 4 号转基因样品，4 道为 5 号转基因样品，而 5 道显示染色的分子量标准。

图 14-16 涉及用异源生乳诱导的转基因表达来表达酶(即人类岩藻糖基转移酶 IV)的方法。

图 14 描述乳寡糖提取物的层析分布型。A 板代表对照寡糖提取物，B 板代表转基因乳寡糖提取物，而 C 板代表掺料(即 3-岩藻糖乳糖)转基因乳寡糖提取物。

图 15 描述用来分离荧光团标记的寡糖的凝胶电泳的 FACE 结果。1 道为用作分子量标准的标记的淀粉水解物，2 道为由非转基因对照动物乳获得的中性分布型，3 道为真正的 3-岩藻糖乳糖，4 道为表达 FucT-IV 的转基因动物的中性分布型，而 5 道为 4 道的同一样品，但用特定的岩藻糖苷酶消化过。

图 16 描述高 pH 阴离子交换层析后选自对照和转基因乳寡糖提取物的流分的 FACE。A 板代表转基因乳样品，而 B 板代表非转基因对照。该凝胶的 1 道代表染料，2 道代表转基因寡糖提取物(于 19.5 分钟洗脱出的流分)，3 道代表转基因寡糖提取物(于 20.0 分钟洗脱出的流分)，4 道代表转基因寡糖提取物(于 20.5 分钟洗脱出的流分)，5 道代表真正的 3-岩藻糖乳糖，6 道代表对照寡糖提取物(于 20.0 分钟洗脱出的流分)，7 道代表对照寡糖提取物(于 20.5 分分钟洗脱出的流分)，而 8 道代表所述寡聚梯(oligo ladder)标准。

图 17 和图 18 涉及在小鼠中同时转基因表达糖基转移酶。

图 17 为得自对照非转基因哺乳动物的乳寡糖分布型的层析图。

图 18 为得自表达人类 Fuc α1-2-转移酶和鼠 Galα1-3 转移酶的转基因哺乳动物的乳的层析图。

图 19-21 涉及在哺乳的小鼠乳腺中转基因表达细菌糖基转移酶的方法。

图 19 显示得自对照 L 细胞平板的酶活性测定的层析图.

图 20 和图 21 显示表达细菌 N-乙酰葡糖胺转移酶的转染 L 细胞合成的寡糖.

发明详述

如上所述，本发明涉及利用转基因技术在非人类转基因哺乳动物乳中产生一种或多种寡糖和/或糖缀合物的方法. 可以用本发明方法产生的一种寡糖(即半乳糖α1-3 半乳糖β1-4 葡萄糖)具有新的结构，从未作为游离的寡糖报道过. 按照本发明产生的这种转基因产生的寡糖和/或糖缀合物，可以加入婴儿配制食品中，或加入给予老年人或无免疫应答患者的药用营养物(medical nutritional)中. 目前描述的方法及其变化的方法的益处是，使得科学家可以常规设计转基因动物的乳寡糖分布型.

简而言之，为了产生所需的一种或多种乳寡糖，从特定的真核或原核物种中分离编码特定目的酶的 DNA 的区段. 该酶负责产生第二基因产物或乳寡糖. 分离之后，将所述 DNA 区段插入含有各种遗传组分的载体中，所述遗传组分诸如多腺甘酸化信号和启动子. 然后将该载体含有所需组分的部分插入与分离所述 DNA 区段的哺乳动物相同或不同的哺乳动物物种的胚胎的原核中. 然后将该胚胎移植到雌性受体中，让其出生. 来自所述后代的乳样品含有一种或多种目的寡糖. 也监测后代所述一种或多种寡糖的产生，并由此将编码一种或多种目的酶的一种或多种基因整合入该哺乳动物基因组中. 应该强调的是，可以将一种以上的转基因引入所述胚胎中，由此导致产生一种以上的寡糖. 因此，本发明的潜力是无限的. 以下详细描述本发明方法的每个步骤.

所述酶

最后表达的目的酶的选择基于人们希望在所述非人类转基因哺

乳动物乳中产生的一种或多种寡糖．所述可以例如是糖基转移酶．合适的糖基转移酶包括诸如α-1,2-岩藻糖基转移酶、岩藻糖基转移酶 IV 或“H”岩藻糖α-1,2-转移酶的岩藻糖基转移酶、诸如 gal α-1-3 转移酶的半乳糖基转移酶、乙酰基转移酶、glucoronyl 转移酶、葡糖基差向异构酶、唾液酸转移酶、甘露糖基转移酶、磺基转移酶、β-乙酰半乳糖胺转移酶和 N-乙酰葡糖胺转移酶．选择的酶优选半乳糖基转移酶，更优选 UDP-Gal B-D-α1,3 半乳糖基转移酶、唾液酸转移酶或诸如 FucT-III 或 FuvT-IV 的α1-3/4 岩藻糖基转移酶．

由所述转基因编码的糖基转移酶由信号序列引导，所述信号序列或者由 cDNA 或基因组 DNA 天然编码，或者用标准遗传工程技术加入所述转基因．它们可以存在于所述转基因哺乳动物生乳细胞中，可以或者锚定至生乳细胞的细胞内膜区室(例如内质网、高尔基体或分泌小泡)，或作为游离的催化性多肽存在于这类区室的腔中．通过合适的胞内定位，所述酶已经接近由生乳的乳腺细胞天然合成的糖核苷酸或其它糖供体，或可以从该动物的血流达到接近这种细胞．这些供体优选糖核苷酸．

所述糖基转移酶具有催化单糖单位从糖供体转移至诸如乳糖、其它寡糖、糖脂或糖蛋白的受体．所述糖基转移酶对于供体和受体均具有有限的或足够的特异性，可以通过将一个以上的单糖单位转移至新生的或正在延长的糖缀合物．因此，通过所述糖基转移酶的反复或迭代作用，可以合成较大的寡糖和/或多糖．所述糖基转移酶本身可以是糖蛋白或非糖基化糖蛋白，或可以有或没有额外的共翻译或翻译后修饰．

此外，重要的是注意到，根据导致产生选择的寡糖和糖蛋白的一种或多种合适的酶的选择，可以设计转基因哺乳动物的寡糖分布型．

此外，也应该注意到，本发明使得能够同时表达两种或两种以上的酶和由此相应的寡糖和糖蛋白．因此，潜在地，可以产生具有产生人乳中存在的许多寡糖的能力的非人类转基因哺乳动物，例如乳牛．

所述寡糖然后可以加入婴儿配制食品中，例如由此为所述配制食品喂养的婴儿提供母乳喂养婴儿接受的得自所述寡糖的益处。然后可以让诸如上述乳牛的哺乳动物交配(即杂交繁育)，以便获得能够在其乳中产生种类繁多的有价值寡糖的子代。

另外，本发明也包括来自无脊椎动物的酶(例如糖基转移酶)的生产。这类无脊椎动物包括例如曼氏裂体吸虫(Schistosoma mansonii)或细菌，诸如奈瑟氏球菌属(Neisseriae)的细菌。这些酶在生乳期间，可以在哺乳动物组织中以活性形式表达。

所述非人类转基因哺乳动物

从中分离出编码目的酶的 cDNA 的哺乳动物可以选自例如小鼠、大鼠、兔子、猪、山羊、绵羊、马和乳牛。然而，可以利用任何哺乳动物，只要它具有将编码目的酶的 DNA 整合入其基因组中即可。

根据是需要所述酶的异源表达还是需要同源表达，其中插入所述cDNA的胚胎可以对应于或不对应于初始从中分离所述DNA的相同物种。更具体地讲，如果人们需要例如产生人类酶，该人类酶又导致在非人类转基因哺乳动物乳中产生人类寡糖(即所述酶的异源表达)，则所用的转基因哺乳动物为诸如猪或山羊的非人类哺乳动物。然而，如果人们希望例如产生山羊酶，而所述酶又导致在山羊乳中产生至少一种寡糖(即所述酶的同源表达)，则所用的转基因哺乳动物为山羊。

关于同源表达，本发明使得人们可以合成不存在于自然界中的寡糖(诸如半乳糖α1-3 半乳糖β1-4 葡萄糖)以及所有天然存在的寡糖。此外，本发明使得人们可以分析目的基因编码的酶的合成效率。另外，由于所述酶对于该哺乳动物为“天然的”(即得自相同物种)，则降低了乳喂养的后代对所述酶的自身免疫反应或耐受的潜力。另外，由于在某些物种发现某些酶(例如糖基转移酶)，而在其它物种中没有发现这些酶，因此，采用可利用的编码同源酶的基因，可以扩大在乳中转基因合成的潜在寡糖的范围。

此外，关于同源表达，应该注意到，例如可以从生乳的乳腺以外的组织获得并克隆同源糖基转移酶。例如，通常在肝脏和其它组织中表达、但不在小鼠生乳的乳腺中表达的鼠糖基转移酶，可以通过生乳应答启动子的作用，在生乳期间表达。第二基因产物(即寡糖和糖缀合物)将存在于所述转基因小鼠的乳中。因此，在以下实施例 I 中可明显看出，合成通常不由给定哺乳动物生乳的乳腺合成的寡糖是可能的，只要正常在其它组织中表达的糖基转移酶在生乳的乳腺中转基因表达即可。

载体

最初插入所述 cDNA (编码所述酶)的实体称为载体。所述载体可以例如为细菌质粒(例如 pBR322)。如果使用细菌质粒，则它应该含有至少一种最好在生乳期间指导基因表达和蛋白合成的编码至少一种糖基转移酶的重组 DNA 序列(或者为 cDNA、基因或基因片段)和编码正确的信使 DNA 加工所需的多腺甘酸化添加位点的 DNA 序列。或者，所述可以用其它质粒、粘粒、噬菌体 DNA、病毒以及酵母、植物、哺乳动物和其它合适宿主特有的其它载体来构建。

调节编码所述酶的 cDNA、基因或基因片段表达、且操作性连接至所述 cDNA、基因或基因片段的启动子，可以例如为乳清蛋白、酪蛋白、乳清酸性蛋白(WAP)或另一生乳启动子。

所述多腺甘酸化信号可以例如为哺乳动物或病毒信号，包括例如 SV-40T 抗原、卵清蛋白或牛生长激素(bGHpdyA)的 poly-a 信号。

寡糖

可以按照本发明方法产生的寡糖包括例如半乳糖α1-3 半乳糖β1-4 葡萄糖、2'岩藻糖乳糖、3'岩藻糖乳糖、乳糖-N-新四糖、乳糖-N-四糖(例如α-乳糖-N-四糖)、乳糖-N-岩藻五糖 I 及其唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 II 及其唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 III 及其唾液酸

化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 IV 及其唾液酸化衍生物、乳糖-N-岩藻五糖 V 及其唾液酸化衍生物、乳糖-N-二岩藻五糖 I 及其唾液酸化衍生物、乳糖-N-二岩藻五糖 II 及其唾液酸化衍生物、乳糖-N-己糖及其岩藻糖基化衍生物、唾液酸四糖 a、b 和 c 及其岩藻糖基化衍生物、其它人乳寡糖或非人乳寡糖。

在所述实施例中产生半乳糖α1-3 半乳糖β1-4 葡萄糖和α1-2 岩藻糖-乳糖。前一种化合物代表通过转基因技术合成的第一种新的未描述的第二基因产物。具体地说，半乳糖α1-3 半乳糖β1-4 葡萄糖以前从未显示作为游离的寡糖存在于自然界，直至本发明为止。人们认为，该寡糖可以例如在诸如心脏、肝脏和肾脏的非人类动物器官异种移植之前，用作诱导人类对 Galα1-3 抗原耐受性的药物。

必须注意到，本发明包括由非人类转基因哺乳动物产生的含有一种或多种上述寡糖的乳。然而，另外，本发明也包括所述乳的分级分离组分以及从所述乳中分离或纯化的寡糖和糖缀合物(例如糖蛋白)。这种分级分离组分可以包括例如奶粉、脱脂乳、来自已去除乳脂或脂质的乳、可溶性糖类分级分离组分(即特定寡糖或特定寡糖结合哺乳动物天然产生的糖类)和/或特定的糖缀合物或数组糖缀合物。通过本领域技术人员已知的方法，例如蒸发、冻干、结晶、超滤、透析或层析(例如亲和层析、阴离子交换层析或凝胶排阻层析)，可以获得这类分级分离组分。

另外，本发明包括由于所述转基因表达的酶作用而修饰的糖缀合物(例如人乳蛋白和人血清蛋白)。这种糖缀合物可以是内源的或转基因表达。可以经受修饰的人乳蛋白(例如糖蛋白)的实例包括分泌性免疫球蛋白、溶菌酶、乳铁蛋白、κ-酪蛋白、α-乳清蛋白、β-乳清蛋白、乳过氧化物酶和胆盐刺激的脂酶。所述酶可以例如向所述糖蛋白加入可能天然不存在于所述糖蛋白的一个键(参见 Prieto 等，Journal of Biological Chemistry 270:29515-29519 (1995))。因此，所述糖蛋白用作所述酶的底物。

应该注意到，或者同源或者异源的糖蛋白可以在已经表达编码糖基转移酶的转基因的哺乳动物中转基因表达。因此，例如由于内源以及转基因表达的糖基转移酶的作用，可以导致直接糖基化。

通过使用以下非限制性实施例，可以说明本发明:

以下试剂和设备需要用于实施例 I 中:

试剂:

1) 500 mM 氢氧化钠和 200 mM 氢氧化钠, RICCA Chemical Company (Arlington, TX)，无碳酸盐, National Institute of Standards and Technology (NIST)-可示踪的(traceable) (Baxter Inc., McGaw Park, IL);

2) 乙酸钠, ACS 级(Sigma, St. Louis, MO);

3) FACE 试剂盒(Glyko Inc., Novato, CA);

4) Milli-Q 水(Millipore, Bedford, MA); 和

5) 硫酸 Ultrex 超纯级(Baxter).

设备:

样品干燥: 所有样品和标准品均用配有冷冻蒸汽捕获器(trap) RVT4104 (Savant, Farmingdale, IL)的 Speed Vac Plus SC210A 干燥。

实施例 I

鼠 UDP-Galβ-D-α1,3 半乳糖基转移酶的表达(同源表达)

A. 质粒的制备和转基因小鼠胚胎的产生

在俄亥俄大学的爱迪生生物技术研究所(Athens, Ohio)制备基因构成物。将编码鼠 UDP-Gal:β-D-α1,3 半乳糖基转移酶的 cDNA 插入含有牛生长激素多腺甘酸化信号(bGHpolyA)和生乳应答型乳清酸性蛋白(WAP)启动子的质粒中(参见图 1). 将 EcoRI-BamHI 片段微注射入小鼠胚胎的原核中。通过尾狭线印迹(tail slot blot)检测到存在所述基因。收集哺乳雌鼠的乳，冷冻贮存于-70℃，直至运送至 Ross Labs 进行糖类

分析。

B. A 的寡糖的高效阴离子交换层析分析:

用配有以下装置的 Dionex Bio-LC 系统，分析小鼠乳寡糖标准品:

泵:	Dionex 高级梯度泵(Advanced Gradient Pump)
探测器:	配有金工作电极和 pH/参考电极的 Dionex 脉冲电化学检测器
自动加样器:	Spectrophysics Refrigerated AS3500
柱:	*方法 1*: 上接一个护罩(4 × 50 mm)的 1 根 Dionex CarboPac PA1 分析型柱(4 × 250 mm) *方法 2*: 上接一个护罩(4 × 50 mm)的 2 根 Dionex CarboPac PA1 分析型柱(每根 4 × 250 mm, 串联连接)
化学抑制:	Dionex AMMS-II Anion Micromembrance Suppression, (在检测器后、但在分部收集器之前安装, 用来中和样品), 用 Dionex AutoRegen Apparatus 和阴离子再生柱(Anion Regenerate Cartridge)通过 0.15%硫酸再生
分部收集器:	BioRad 2110 型(BioRad Inc., Hercules, CA)

所有设备均购自 Dionex, Inc. (Sunnyvale, CA)，除非另有说明。所用的洗脱剂为(A) Milli-Q 水(或相当物)、(B) 500 mM 氢氧化钠、(C) 600 mM 乙酸钠的 100 mM 氢氧化钠溶液和/或(D) 200 mM 氢氧化钠的组合，流速为 1.0 ml/min。以下表 I 有所用两种方法的洗脱剂分布型。检测器环境为以下表 II 所列的环境。注射体积为 20 μl。

样品和标准品的 Dionex 分析: 所有样品和/或标准品均不进行进一步稀释，按制备的进行分析。

00·02·28

表 I: 洗脱剂分布型

方法 1:

时间 (min)	A%	B%	C%	D%
0.0	50	0	0	50
12.0	50	0	0	50
12.1	46	0	7	47
20.0	46	0	7	47
20.1	45	0	10	45
27.0	45	0	10	45
27.1	25	0	50	25
32.0	25	0	50	25
32.1	50	0	0	50
59.0	50	0	0	50

方法 2:

时间 (min)	A%	B%	C%	D%
0.0	99	1	0	0
60.0	0	100	0	0
60.1	99	1	0	0
75.0	99	1	0	0

A=Milli-Q 水
B=500 mM NaOH
C=600 mM NaOAc/100 mM NaOH
D=200 mM NaOH

表 II: 检测器环境

积分参数	方法 1:	方法 2:
起始峰宽	50	8.0
峰阈值	0.5	25
峰面积剔除值 (peak area reject)	500	1000
PED 记录仪范围	0.100 uC	0.300 uC

00·02·28

方法 1:

波形　　积分

时间 (sec)	电势 (V)	开始 (sec)	结束 (sec)
0.00	0.40	0.30	0.50
0.50	0.40		
0.51	0.90		
0.59	0.90		
0.60	-0.30		
0.65	-0.30		

方法 2:

波形　　积分

时间 (sec)	电势 (V)	开始 (sec)	结束 (sec)
0.00	0.00	0.20	0.40
0.40	0.05		
0.41	0.75		
0.60	0.75		
0.61	-0.15		
1.00	-0.15		

C. 荧光团辅助的糖类电泳(FACE): 制备样品和标准品，用试剂盒(Glyko)并按照生产商提供的说明进行 FACE。以下是建议的电泳条件。凝胶用 FACE 成象器(Glyko)成象。

将 15 毫摩尔(7.5 μg)的合成 Gal α1-3Gal β1-4Glc 标准品重悬浮于 37.5 μl 水中，制备 200 ppm 溶液。用 36 μl 水稀释 4 μl 该溶液，并经 HPAEC 分析(参见图 2，用方法 1)。(将剩余的标准品母液分装为 5 μl 的等份，冷冻贮存以用于将来的分析)。收集流分(0.5 ml)，合并相应于标准品峰的流分，在 Speed Vac 中于室温下过夜干燥。按照生产商的说明，将所得的干燥合并物于 45℃标记 3 小时并干燥。然后将样品重悬浮于 14 μl 水中，将 2 μl (105 pmol)在 2 μl 上样缓冲液中稀释，上样至聚丙烯酰胺凝胶上。按生产商的说明进行凝胶电泳。凝胶的荧光图象示于图 3 中。

如附图简述一节中所述，图 5 显示用 HPAEC 方法 2 分析的阴性转基因、阳性转基因和阴性对照小鼠乳寡糖分布型的实例。于 31-32 分钟洗脱出的大峰推测为所述三糖。HPAEC 方法 1 产生一个非常接近所述三糖标准品洗脱出的小的人工产物峰(artifact peak)，该峰用方法 2 仍洗脱出，因此证实：检测出的“新”峰实际上为所述三糖，将来自

这些样品的寡糖提取物标记，并通过 FACE 测试。将 8 μl 所述寡糖提取物干燥，并按照试剂盒的说明进行标记。将标记的样品重悬浮于 10 μl 水中，将 2 μl 上样至凝胶上。先前标记的所述三糖标准品冷冻样品也进行电泳。该凝胶的图象示于图 6。与 G3 淀粉水解物标准品带的同时洗脱的带为所述三糖。

D. 小鼠乳的提取:

将贮存于-70℃的小鼠乳样品于室温解冻。将 100 μl 用移液管加入 500μl Eppendorf 离心管中，用 BioFuge 15 (Baxter, McGaw Park, IL)以 11000 rpm 离心 20 分钟。小心地除去脂质层，将中间层转移至第二个 500 μl 管中。加入 2 倍体积的冷(4℃)乙醇，将管制瓶涡旋混合，置于冰上至少 20 分钟。然后如前将管制瓶离心。将透明的上清液转移至第三个管制瓶中，将该提取物于中等热量下在 Speed Vac 中过夜干燥。也将蛋白沉淀干燥，分析前贮存于-70℃。将干燥的寡糖提取物重悬浮于 100 μl 水中，贮存于-70℃待分析用。由于可获得的标准品的量少，因此不能完成这整个程序；然而，其它寡糖已经过该提取方法，而没有显著的量的损失(数据未显示)。

表 III 显示测试的、根据建立者号分类的所有 WAP/GT 转基因乳的总结。在所测试的 23 个“转基因”样品(其中“转基因”用来定义在尾狭线印迹中测试为多个拷贝所述转基因阳性的小鼠)中，10 只动物，即相关种系中所有动物的 44%为所述三糖合成阳性。(请注意：鉴别为“建立者 B6SJL”的样品为阴性对照/非转基因小鼠。)

00·02·28

表 III

19	B6SJL						
12	B6SJL						
21	B6SJL						
25	B6SJL						
4	8	1	19	半合子	3061.187	阴性	3
5	8	1	20	半合子	3061.187	阴性	
3	8	1	22	半合子	3061.187	阴性	
6	8	2	13	纯合子	3147.19	阴性	
11	8	2	23	纯合子	3061.242	阴性	
1	64	0			3061.11	阴性	?
13	82	1	71	半合子	3147.23	阴性	1-2
7	98	0			3147.2	阴性	1
16	106	1	93	半合子	3147.199	阴性	1
29	106	2	61	半合子	3147.200	阴性	
8	109	1	48	半合子	3147.21	阳性	1-2
15	109	1	67	半合子	3147.24	阳性	
20	109	1	118	半合子	3147.2	阴性	
22	109	2	50	半合子	3147.2	阴性	
27	109	2	51	半合子	3147.2	阳性	
17	109	2	51	半合子	3147.2	阳性	
18	109	2	53	半合子	3147.2	阳性	
28	109	2	54	半合子	3147.2	阳性	
2	156	0			3061.187	阳性	5
9	156	0			3061.242	阳性	
10	156	1	42	半合子	3061.242	阳性	
23	156	1	100	半合子	3147.199	阴性	
26	156	2	27	半合子	3147.200	阳性	
14	193	0				未测试	1
24	193	1	120	半合子		未测试	

请注意，在表 III 中，来自同一建立者的乳样品可能是或可能不是所述三糖合成阳性；在该 DNA 中具有一个拷贝(或多个拷贝)的所述转基因不能保证所述小鼠能够合成所述三糖。(例如，参见来自与建立者 109 相关的不同动物的乳的结果)。可能这些样品含有所述三糖；然而，它的产生低于该方法的检测极限(约 10 ppm)。

E. 将三糖标准品掺入对照小鼠乳中:

将 1852 pmol 的三糖标准品在 500 μl eppendorf 离心管中干燥。加入 100 μl 对照(非转基因)小鼠乳(mouse mile)，将管制瓶的内容物充分混合。然后，将该掺料的乳样品如上所述脱脂和去蛋白。回收 45 μl 乙醇提取物，将其中 20 μl (理论上含有 820 pmol 三糖)干燥，并于 45 ℃标记 3 小时用于寡糖分析(Glyko)。干燥后，将样品重悬浮于 10 μl 水中，将 2 μl 上样至 FACE 凝胶上。图 4 为其图象。也分析未掺料的对照乳样品用于比较。

C 和 D 中的所有样品和/或标准品均不进一步稀释，按所制备的用 HPAEC 分析。

实施例 II

人类α1,2-岩藻糖基转移酶在兔子中的表达(异源表达)

与俄亥俄州 Athens 的俄亥俄大学的爱迪生生物技术研究所的 John Kopchick 博士及其同事以及波兰 Balice 的 Zootechnics Institute 的 Zdizislaw Smorage 合作，实现转基因胚胎的产生。所用的 90%的兔子为新泽西培育的，其余 10%为加州培育的。

A. 转基因合子的制备:

从 4-6 月龄超排卵雌兔收集合子。通过标准方法，即采用肌内注射的 50-100 i.u.受孕母马血清促性腺激素(PMSG)，PMSG 注射后 72 小时，静脉注射 50-100 i.u.人绒毛膜促性腺激素(HCG)，实现超排卵。HCG

00.02.28

注射后，立即使超排卵雌兔交配或用得自 5 月龄雄兔的新鲜或冷冻的精液受精。受精或交配后 20-22 小时，屠宰雌兔，通过补充 PBS 的输卵管冲洗液收集合子。冲洗后 1-2 小时，用配有 Namarski 光学镜片的倒置显微镜以及与 Da Venbrine 或 Leitz 显微操作器连接的微量加液器，向合子微注射 2-6 ng/ml 编码 2'-岩藻糖基转移酶的 DNA (即从前述质粒(Prieto 等, Journal of Biological Chemistry 270:29515-29519 (1995) 切下的线性 DNA 片段，该 DNA 片段含有包括鼠乳清酸性蛋白启动子在内的转录调节区、编码人 H-α1-2 岩藻糖基转移酶的 cDNA 和编码牛生长激素多腺苷酸化信号的序列).

B. 转基因合子的移植和乳的收集:

微注射后 1 小时，将合子经手术转移到 5-6 月龄同步假受孕受体的输卵管中。表 IV 给出了受精计划的进展报告。通过斑点印迹分析，分析所产幼畜所述 DNA 的成功转录。收集并分析来自其中两只这些动物的乳以及来自非转基因对照的乳。

表 IV: 受精进展报告

组号	受精雌兔数	受孕雌兔数	出生的活兔数	死产兔数
I	8	7	26	1
II	4	4	16	8
III	20	16	67	17
IV	20	7	**	**
合计	52	34	109	26

(**此时不能得到资料)

C. 得自幼畜的乳的制备

将来自转基因兔和对照兔的乳样品用乙醇 1:3 稀释，并运送到 Ross Laboraries (Columbus, OH)。将它们充分涡旋混合并以 10,000 rpm

离心 10 分钟．去除乙醇层，置于洁净的管制瓶中用于寡糖分析，将沉淀冷冻用于未来的蛋白分析．

D. 寡糖分布型分析:

将 50 μl 每种乙醇提取物用 50 μl 水稀释．稀释液通过预冲洗的 30,000 MWCO 滤器(Microcon, Amico, Inc., Berverly, MA)过滤，用 HPAEC 方法 1 (参见该实施例结尾的附录 I)进行分析．通过用 48 μl 水和 2 μl 1000 ppm 2'-岩藻糖乳糖稀释 50 μl 样品，并如前过滤，制备每种对照之一的掺料样品和转基因样品．也分析这些样品．第二组乳样品不进一步稀释，按接收的乳样品分析．

在其余的乙醇提取物中，将 240 μl 在 Speed Vac (Savant, Inc., Farmingdale, IL)中干燥．然后用 7% IPA 将提取物重悬浮至一定体积，并如前通过 Microcon 30,000 MWCO 过滤．将来自组 1 的 20 μl 每种样品和来自组 2 的 50 μl 每种样品干燥，并按照生产商的说明(Glyko, Inc., Novato, CA)标记过夜．然后按照生产商的说明(Glyko, Inc.)将其标记过夜．将标记样品重悬浮于 10 μl 水中．将 2 μl 每种样品上样至寡糖凝胶并电泳．

E. 岩藻糖苷酶处理:

在 2 个单独的管制瓶中，将来自组 1 的 25 μl 过滤的 IPA 稀释液与 2 个等份 1000 ppm 的 2'-岩藻糖乳糖(2'-FL)一起干燥．将样品重悬浮于 25 μl 1 × PBS pH 8.5 中．将来自 Arthrobacter oxidans 的 200 mU α1,2-岩藻糖苷酶(Tekara-Panvera, Madison, WI)的 PBS 溶液加至每一个管制瓶中．将相同体积煮沸(失活)的酶加入第二个管制瓶中．将样品于 37℃、甲苯氛围下温育过夜．将它们通过冲洗的 Centricon 10,000 MWCO 滤器(Dionex)过滤，用 950 μl 水冲洗．然后使滤液通过强阴离子交换柱 On-Guard A (Amicon)，该柱按照生产商的说明进行制备．用 200 μl 水冲洗所述样品．将收集的滤液冷冻、干燥并过夜标记用于

FACE 分析(Glyko)。将样品在 10 μl 水中稀释，将 2 μl 等份的该物质电泳和成象。

F. 糖蛋白 SDS-PAGE 和蛋白质印迹:

将蛋白沉淀解冻至室温，用冷 68%乙醇洗涤 2 次并干燥。将它们重悬浮于 2 × SDS 变性缓冲液中。样品在沸水中加热 5 分钟，以使蛋白变性，将其冷却。用 1 × SDS 缓冲液制备稀释液。将样品和预染的低分子量标准(Sigma, St. Louis, MO)上样至聚丙烯酰胺凝胶(Novex, Inc., San Diego, CA)，并在 Xcell II Mini Cell 系统(也得自 Novex)中电泳。将由此获得的凝胶转移至 PVDF 膜，用 *Ulex europaeus* 凝集素 I (UEA I) (过氧化物酶标记的, Sigma)过夜探测。用 TBS-Tween 20 洗涤后，用 DAB-过氧化氢染色溶液(Sigma)使凝胶显色。用普通的 300 dpi 计算机扫描仪扫描干燥凝胶，并将其数字化

结果如下:

图 7 有以下兔乳样品的层析寡糖分布型：对照非转基因兔乳样品、阳性转基因兔乳样品和得自一种样品的掺料阳性转基因兔乳样品。1 号转基因样品含有 2'-FL，这是通过掺料分布型证实的事实。注意到对照样品和转基因样品之间乳糖浓度的大的差异。未显示第二个转基因样品(2 号)，发现它为阴性(不含 2'-FL)。在图 9 中发现的分布型中，4 号样品(C 板)和 5 号(D 板)含有用该方法可检测量的 2'-FL。该样品表现出乳糖浓度的显著降低，而 3 号样品(B 板)没有可检测量的乳糖。

为了进一步证实存在于得自转基因动物的乳样品中的寡糖的本质，将来自对照非转基因乳和转基因乳的寡糖用α1-2 岩藻糖苷酶水解。该酶仅水解岩藻糖 1-2 键。结果示于图 9。真正的 2'-岩藻糖乳糖(2'-FL)示于 1 道，而未处理的得自转基因样品的寡糖示于 2 道。3 道显示 2 道的同一样品，但经岩藻糖苷酶处理。与真正的 2'-FL 一起迁移的带在 2 道中明显可见。该带在岩藻糖苷酶处理后消失，进一步支

持在所述转基因乳样品中存在2'-FL. 来自对照非转基因样品的寡糖在岩藻糖苷酶处理后大致没有变化(参见4道和5道).

其它乳样品的FACE寡糖分布型示于图10. 该图的2道显示自5号样品乳分离的标记寡糖. 3道显示另一转基因乳样品的寡糖. 4道显示4号样品的寡糖. 5道为来自对照非转基因动物的分布型，而7道为3号样品. 这些结果证实了图8的层析分布型，并进一步支持某些转基因乳样品无乳糖的观念.

图11比较了用UEA-I探测的1号和2号乳蛋白样品的蛋白质印迹. 阳性带仅在其中一个阳性转基因样品2道见到. 2号样品和非转基因对照均不含以α1,2键用岩藻糖糖基化的蛋白. 其它样品的蛋白质印迹示于图12. 正如预期的，4号样品含有在α-1,2位岩藻糖基化的蛋白. 然而，3号样品也含有相似修饰的蛋白. 该结果是预料之外的，因为该样品缺乏其它两种方法未检测到的可检测的2'-FL. 迄今分析的所有其它样品(包括来自小鼠的样品)均至少含有岩藻糖基化的蛋白. 与图12中所发现的相同的凝胶的考马斯染色如图13所示. 该图说明，尽管通过UEA-I在非转基因对照中没有检测到蛋白，但在该样品中存在许多蛋白. 作为对比，将3号样品和4号样品中发现的总蛋白与UEA-I印迹中检测的带进行比较. 尽管它们以几乎不可检测量的存在，但用所述凝集素强烈地检测到它们.

***

附录I: 层析条件

经高压阴离子交换层析的寡糖分析

用配有一个脉冲电化学检测器的Dionex Bio-LC系统，用带有护罩的单根分析型CarboPac PA-1柱，分析样品. 条件如下:

灵敏度: 0.200C

洗脱时间: 45分钟

峰宽: 8.0秒

峰阈值: 25.00

峰面积剔除值: 1000

样品体积: 20L

梯度程序:

0-12 分钟:	100mM NaOH
12.1-20 分钟:	42mM NaOAc 的 100mM NaOH 溶液
20.1-27 分钟:	60mM NaOAc 的 100mM NaOH 溶液
27.1-32 分钟:	300mM NaOAc 的 100mM NaOH 溶液
32.1-45 分钟:	100mM NaOH

PED 程序:

波形		积分	
时间(sec)	电势(V)	开始(sec)	结束(sec)
0.00	0.05	0.20	0.40
0.40	0.05		
0.41	0.75		
0.60	0.75		
0.61	-0.15		
1.00	-0.15		

实施例 III

人岩藻糖基转移酶 IV 在小鼠中的表达(异源表达)

先前已经在小鼠生乳的乳腺中表达了人岩藻糖基转移酶(即“H”岩藻糖α1-2-转移酶) (Prieto 等, Journal of Biological Chemistry, 270:29515-19 (1995))。其表达导致产生由该酶合成的寡糖和糖蛋白。为了证明将该系统生产第二基因产物的潜在、广泛应用, 本发明人决定在小鼠中转基因表达非人 H-岩藻糖α1-2 转移酶的糖基转移酶。一种

这种酶为岩藻糖基转移酶 IV (Kukosawa-Latallo 等, Genes and Development 4:1288-1303 (1989))。该酶存在于某些人乳样品中(Serenella 等, Glycoconjugate Journal 6:101-114 (1989)), 具有特殊价值, 因此它负责某些血液群抗原的合成(Legault 等, The Journal of Biological Chemistry 270:20987-20996 和 Ginsburg 等, Immunology of the Erythrocyt, Alan R. Liss, Inc., New York, New York)。这些血液群抗原非常重要, 因为它们在存在癌时水平升高(Orntof 等, The Journal of Biological Chemistry 271:32260-32268 (1996)), 并且与诸如炎症的胞粘连现象有关(Lowe 等, The Journal of Biological Chemistry 266:17467-17477))。人岩藻糖基转移酶 IV 的表达和 3-岩藻糖乳糖的合成如下进行:

使用以下试剂:

- 500 mM 氢氧化钠和 200 mM 氢氧化钠, RICCA Chemical Company (Arlington, TX), 无碳酸盐
- 可示踪的 NIST (Baxter Inc., McGaw Park, IL)
- 乙酸钠, ACS 级(Sigma, St. Louis, MO.)
- FACE 试剂盒(Glyko Inc., Novato, CA)
- Milli-Q 水(Millipore, Bedford, MA)
- 硫酸 Ultrex 超纯级(Baxter)

样品干燥: 所有样品和标准品均用配有冷冻蒸汽捕获器 RVT4104 (Savant, Farmingdale, IL)的 Speed Vac Plus SC210A 干燥。

A. 质粒的制备和转基因胚胎的产生:

在俄亥俄大学的爱迪生生物技术研究所(Athens, Ohio)制备基因构成物。将编码人岩藻糖基转移酶(IV)的 cDNA (即从前述质粒(Prieto 等, Journal of Biological Chemistry 270:29515-29519 (1995))切下的线性 DNA 片段, 该 DNA 片段含有包括所述乳清酸性蛋白启动子在内的转录调节区、编码人 H-α1-2 岩藻糖基转移酶的 cDNA 和编码牛生长激素多腺苷酸化信号的序列)插入含有牛生长激素多腺甘酸化信号(bGH

polyA)和生乳应答型鼠乳清酸性蛋白(WAP)启动子的质粒中．将EcoRI-BamHI 片段微注射入小鼠胚胎的原核中．通过尾狭线印迹检测到存在所述基因．收集哺乳雌鼠的乳，冷冻贮存于-70℃，直至运送至Ross Labs (Columbus, OH)进行糖类分析．获得 3 只转基因雌鼠．收集并分析得自其中 2 只雌鼠的乳。

B. 样品和标准品的 HPAEC 分析:

用配有以下装置的 Dionex Bio-LC 系统，分析小鼠乳寡糖和寡糖标准品:

泵:	Dionex 高级梯度泵
探测器:	配有金工作电极和 pH/参考电极的 Dionex 脉冲电化学检测器
自动加样器:	Spectrophysics Refrigerated AS3500
柱:	上接一个护罩(4 × 50 mm)的 2 根 Dionex CarboPac PA1 分析型柱(每根 4 × 250 mm，串联连接)
化学抑制:	Dionex AMMS-II Anion Micromembrance Suppression, (在检测器后、但在分部收集器之前安装，用来中和样品)，用 Dionex AutoRegen Apparatus 和阴离子再生柱通过 0.15%硫酸再生
分部收集器:	BioRad 2110 型(BioRad Inc., Hercules, CA)

所有设备均购自 Dionex, Inc. (Sunnyvale, CA)，除非另有说明．所用的洗脱剂为(A) Milli-Q 水(或相当物)、(B) 500 mM 氢氧化钠、(C) 600 mM 乙酸钠的 100 mM 氢氧化钠溶液和/或(D) 200 mM 氢氧化钠的组合，流速为 1.0 ml/min．以下表 V 有所用两种方法的洗脱剂分布型．检测器环境为以下表 VI 所列的环境．注射体积为 20 μl.

所有样品和/或标准品均不进行进一步稀释，按制备的进行分析. 当认为必需进一步表征时，收集流分(每个流分 0.5 分钟)并在其收集管中干燥. 然后将这些样品标记，用于 FACE 分析. 可能时，获得转基因动物和对照动物的层析图。作为初步表征步骤，将等份样品掺入 3-岩藻糖乳糖真正的标准品。以该方式证明新寡糖与真正的 3-岩藻糖乳糖共同洗脱出。

表 V: 洗脱剂分布型

A = Milli-Q 水
B = 500 mM NaOH
C = 600 mM NaOAc/100 mM NaOH
D = 200 mM NaOH

方法

时间 (min)	A%	B%	C%	D%
0.0	99	1	0	0
60.0	0	100	0	0
60.1	99	1	0	0
75.0	99	1	0	0

表 VI: 检测器环境

积分参数	方法 1:	方法 2:
起始峰宽	50	8.0
峰阈值	0.5	25
峰面积剔除值	500	1000
PED 记录仪范围	0.100 uC	0.300 uC

方法

波形　　积分

时间(sec)	电势(V)	开始(sec)	结束(sec)
0.00	0.00	0.20	0.40
0.40	0.05		
0.41	0.75		
0.60	0.75		
0.61	-0.15		
1.00	-0.15		

C. 荧光团辅助的糖类电泳(FACE):

制备样品和标准品，用试剂盒并按照生产商提供的说明(Glyko, Novalto, CA)进行 FACE。以下是建议的电泳条件。凝胶用 FACE 成象器(Glyko)成象。

如前所述，将乳寡糖提取物样品(10 μl)干燥，并于 45℃标记 3 小时用于寡糖分析(Glyko)。干燥后，将样品重悬浮于 10 μl 水中，将 2 μl 上样至聚丙烯酰胺寡糖分离胶上。用 Glyko Face Imager 获得电泳图的成象。

D. 小鼠乳的提取:

将贮存于-70℃的小鼠乳样品于室温解冻，并涡旋混合。将 50 μl 吸移至 500 μl Eppendorf 管中，加入 100 μl 冷的无水乙醇。将所得混合物涡旋混合，并用 BioFuge 15 (Baxter, McGaw Park, IL)于 4℃以 1100 rpm 离心 15 分钟。离心后，将 85 μl 透明的上清液转移至另一 500 μl 离心管中，加入 199 μl 蒸馏的去离子水。将所得混合物充分混合，将 50 μl 转移至自动加液器管制瓶中，用水 1:1 稀释，并上样至高 pH 阴离子交换层析(HPAEC)。这最后一种溶液被认为是所述乳样品的寡糖提取物。

E. 将真正的3-岩藻糖乳糖掺入对照小鼠乳中:

将50 mg/升3-岩藻糖乳糖Galβ1-4 [Fucα1-3] Glc溶液加入50 μl上述寡糖提取物中，并充分混合。然后将该掺料的乳样品直接上样层析，并与用1倍体积的水稀释的寡糖提取物比较。

F. 外切糖苷酶处理:

得自棒状杆菌属菌种(Corynebacterium sp.)和链霉菌属菌种(Streptomyces sp.)的岩藻糖苷酶(α1-3/4特异性的)购自Takara Panvera (Madison WI)。用大肠杆菌(E. coli)和所用的其它化学药品为可得到的最高纯度，均购自Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)，除非另有说明。

G. 中性和带电荷寡糖的分离:

将寡糖提取物(200 μl等份)分离为中性组分和带电荷组分，以有利于由于所述转基因编码的岩藻糖基转移酶的作用而合成的新寡糖的检测和鉴别。

通过使约20倍体积的0.002 M pH 5.4乙酸吡啶缓冲液通过一根DE-52柱(二乙基氨基乙基纤维素, Whatman, Maidstone, 英格兰)，使该柱在所述缓冲液中平衡。将所述寡糖提取物等份样品上样至该柱，使其渗透到树脂中，静置5-10分钟。然后，通过用6倍体积的同一缓冲液洗脱，洗脱出中性寡糖。将由此获得的组分干燥，并制备用于标记和荧光团辅助的糖类电泳。随后，通过用5倍体积的0.2 M乙酸吡啶缓冲液冲洗该柱，洗脱出带电荷组分。

以上方法的结果如下:

图14显示对照和转基因的乳寡糖提取物的电泳图(分别为A板和B板)。可以清楚地观察到，由用岩藻糖基转移酶FucT-IV转染的动物获得的乳产生一个峰信号，而在非转移对照动物乳中仅有痕量信号。另外，B板所示的物质掺有真正的3-岩藻糖乳糖，以确定转基因动物乳中存在的新寡糖是否确实是3-岩藻糖乳糖(C板)。该糖的洗脱进一步

与 B 板中箭头所示的真正的 3-岩藻糖乳糖单独洗脱一致.

另外，将来自对照和转基因动物的寡糖提取物分离为中性寡糖和唾液酸寡糖或带负电寡糖结构。当标记的寡糖经凝胶电泳分离时，这使得可以更加简单地成象。图 15 为用来分离标记的中性寡糖的凝胶的图象。(1 道为标记的淀粉水解物，用作分子量标准，2 道为得自非转基因对照动物乳的中性分布图，3 道为真正的 3 岩藻糖乳糖，4 道为表达 FucT-IV 的转基因动物的中性分布图，而 5 道为 4 道的同一物质，但经特异性的岩藻糖苷酶消化)。与真正的 3 岩藻糖乳糖共同迁移的带仅在得自转基因样品的分布图中清晰可见，当用特异性 3-岩藻糖苷酶处理时该带消失。另外，该物质不易被α1-2-岩藻糖苷酶水解。

为了进一步特征鉴定所述新寡糖，直接从层析流出液中收集组分。将寡糖提取物如上所述进行 HPAEC，分部收集流出液。每种组分为 0.5 分钟的流出液。在图 16 的 A 板中，用括号显示转基因乳样品的收集组分，而 B 板用括号表示非转基因对照的收集组分。将这些组分标记并经 FACE，如图 16 电泳图图象的泳道鉴别说明所示。

HPAEC 和 FACE 均表明，非转基因动物仅有痕量的与真正的 3 岩藻糖乳糖共同迁移的寡糖(5 道)。然而，由得自转基因动物乳样品的寡糖提取物得到的组分产生清晰的与 3-岩藻糖乳糖共同迁移的信号。该进一步支持 3-岩藻糖乳糖是通过所述转基因表达而合成的观念。

实施例 IV

通过两种先前建立的鼠转基因系的品种间杂交同时表达两种转基因岩藻糖基转移酶

让由生乳启动子驱动表达人岩藻糖基转移酶“H”的稳定转基因系(Prieto 等, Journal of Biological Chemistry, 270:29515-29519 (1995))的雌性小鼠，与也由生乳启动子驱动表达鼠 Gal α1-3 转移酶的稳定转基因系的雄性小鼠交配(参见实施例 I)。

利用尾部活检并用合适的杂交探针探测，评估所得后代其基因组

中所述转基因的存在．将确定为两种转基因阳性的雌鼠进一步交配，使其受孕至足月．由这些雌鼠之一获得乳，如实施例 I 和实施例 II 所述，通过高 pH 阴离子交换层析(HPAEC)确定糖类分布型．

如图 17 和图 18 观察到的，可以于 2'-岩藻糖乳糖的洗脱时间观察到一个主要信号，而准确地于合成的三糖 Gal α1-3 Galβ1-4Glc 的洗脱时间观察到一个次要信号．显示了真正标准品的洗脱位置。

具体地说，上述结果表明，为了获得产生含复杂寡糖和糖蛋白分布型的乳的转基因动物，不必从头开始并随后给小鼠胚胎注射新的糖基转移酶编码构成物．表达不同糖基转移酶的转基因动物的品种间杂交将产生由其亲代按照孟德尔遗传学遗传转移酶的动物．该又将导致相关第二基因产物的合成．

实施例 V

在小鼠生乳乳腺中转基因表达细菌糖基转移酶(即 UDP-GlcNAc:Galβ1-4)

使用得自多糖奈瑟氏球菌(Neisseria polysaccharea)的 GlcNAc 转移酶．改变编码该酶的基因的密码子偏倚，以有利于在哺乳动物基因中常见的密码子使用．“重偏倚”的基因用来转染通常用作鼠培养细胞系的鼠“L”细胞．一旦在这些哺乳动物细胞中证明活性，则将所得的编码所述 GlcNAc 转移酶的 DNA 用来制备适于在小鼠生乳期间转基因表达的构成物。

通过液相合成测定评估 GlcNAc 转移酶活性．小鼠“L”细胞(即来自一个培养皿的沉淀)重悬浮于含 1mM $CaCl_2$、20 mM 乳糖和 20 mM UDP-GlcNAC 的磷酸缓冲盐缓冲液中．将所得的混合物超声处理 5 分钟，于 37℃温育过夜．然后使所得的温育混合物通过 microcon (Amicon, Beverly, MA) centricon (10,000 AMU, MW 截留值)过滤器过滤，将滤液稀释用于 HPAEC 分析．

如实施例 I 所报道的制备寡糖提取物．图 19-21 清楚地表明，该

细菌酶成功地在哺乳动物组织中表达。

由于 N-乙酰-葡糖胺转移酶的表达，所述转基因动物乳可以含有四糖乳糖-N-新四糖(NnnT)。

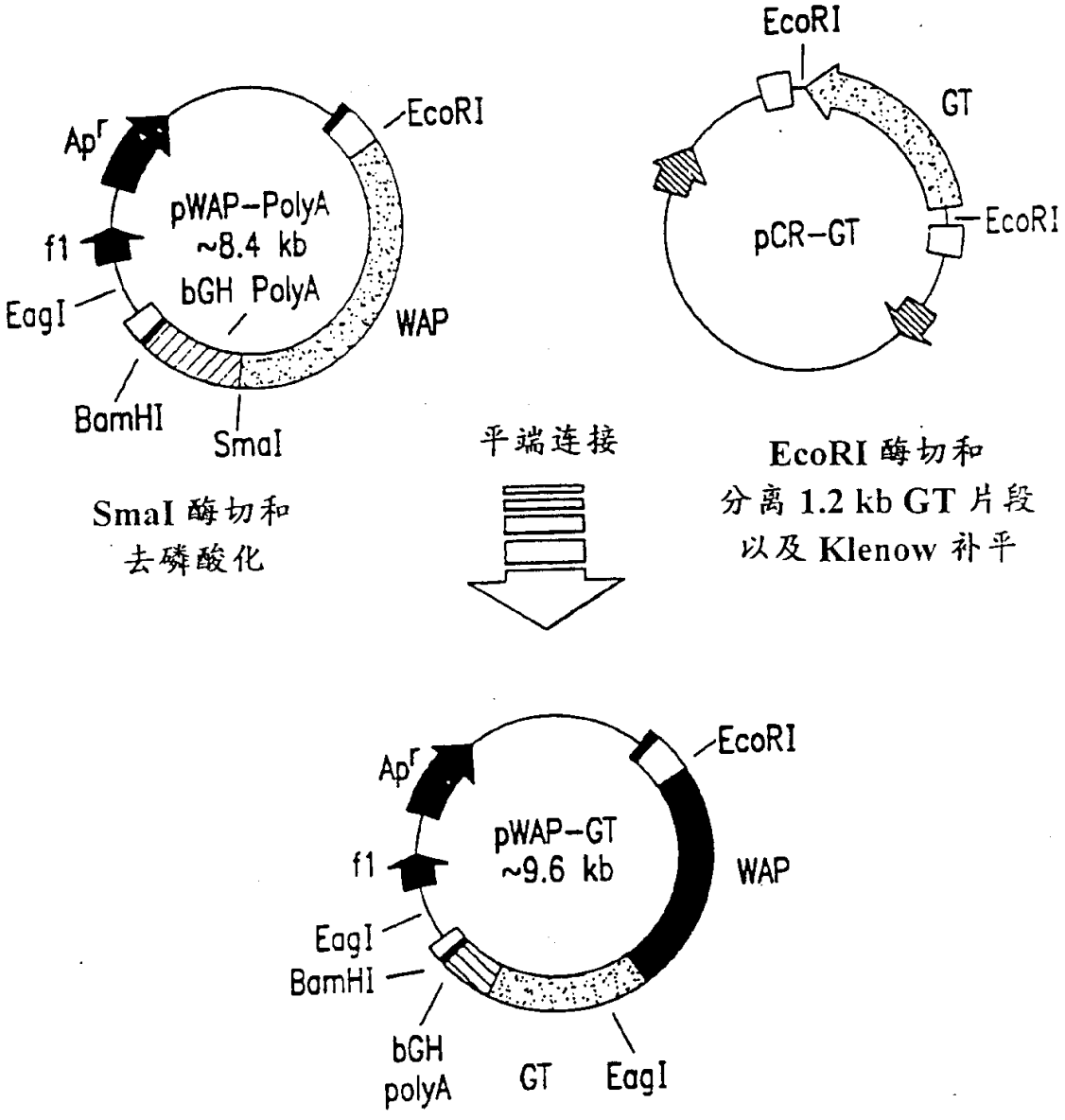

Ap^r
EcoRI
pWAP–PolyA
~8.4 kb
bGH PolyA
f1
EagI
WAP
BamHI
SmaI
SmaI 酶切和
去磷酸化
平端连接
EcoRI
GT
pCR–GT
EcoRI
EcoRI 酶切和
分离 1.2 kb GT 片段
以及 Klenow 补平
Ap^r
EcoRI
pWAP–GT
~9.6 kb
f1
WAP
EagI
BamHI
bGH
polyA
GT
EagI

图 1

00-02-28

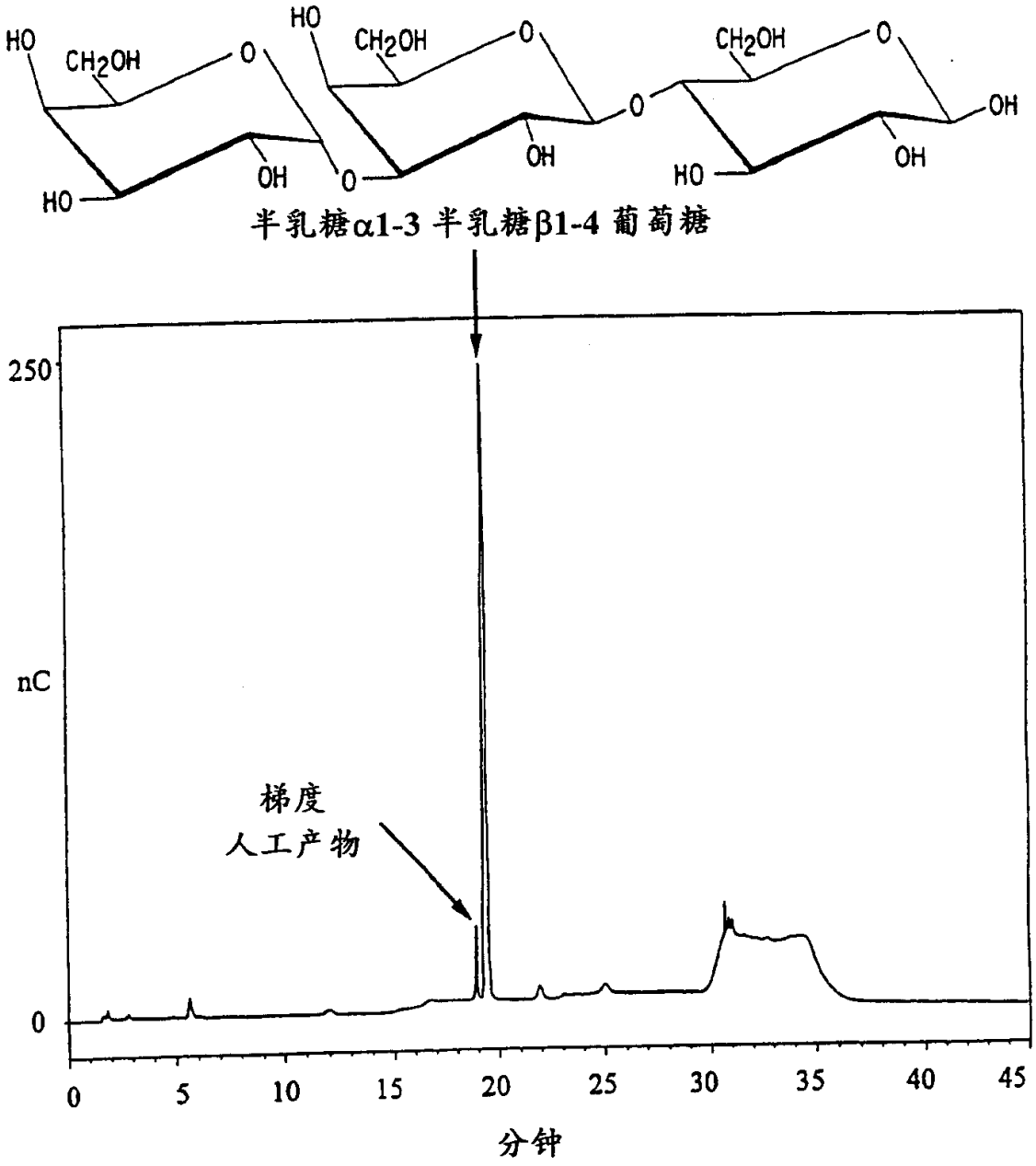


图 2

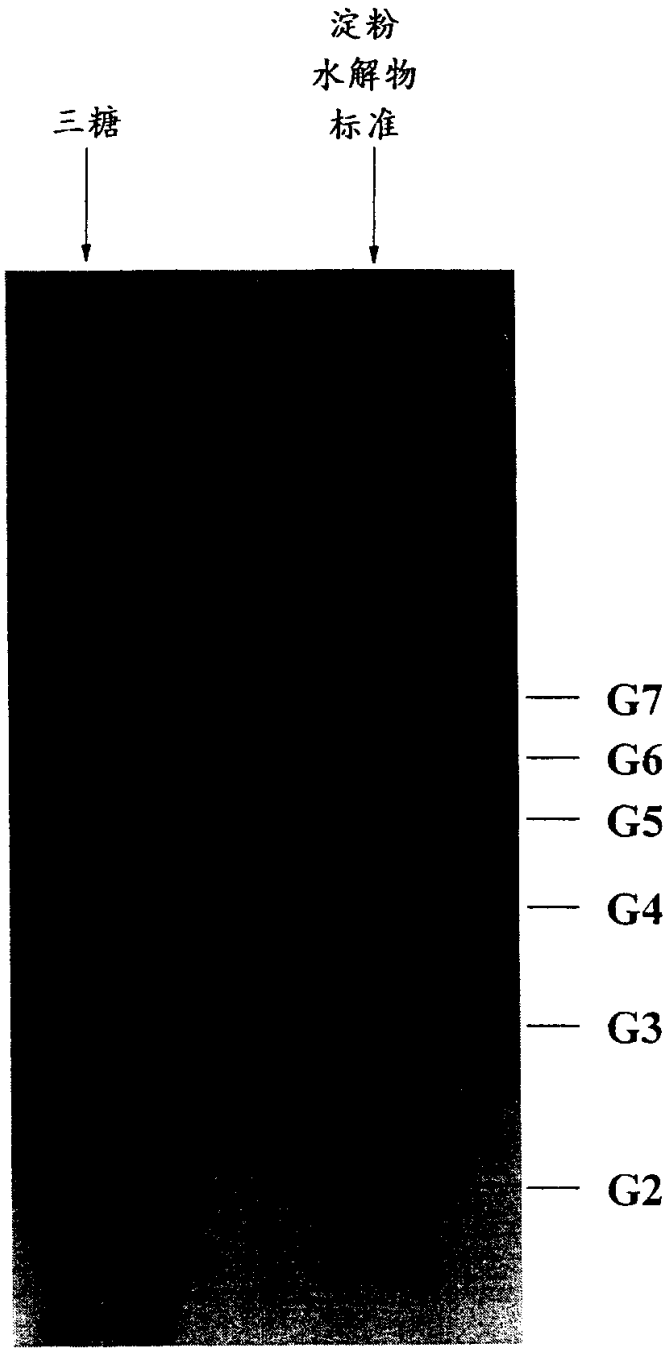


图 3

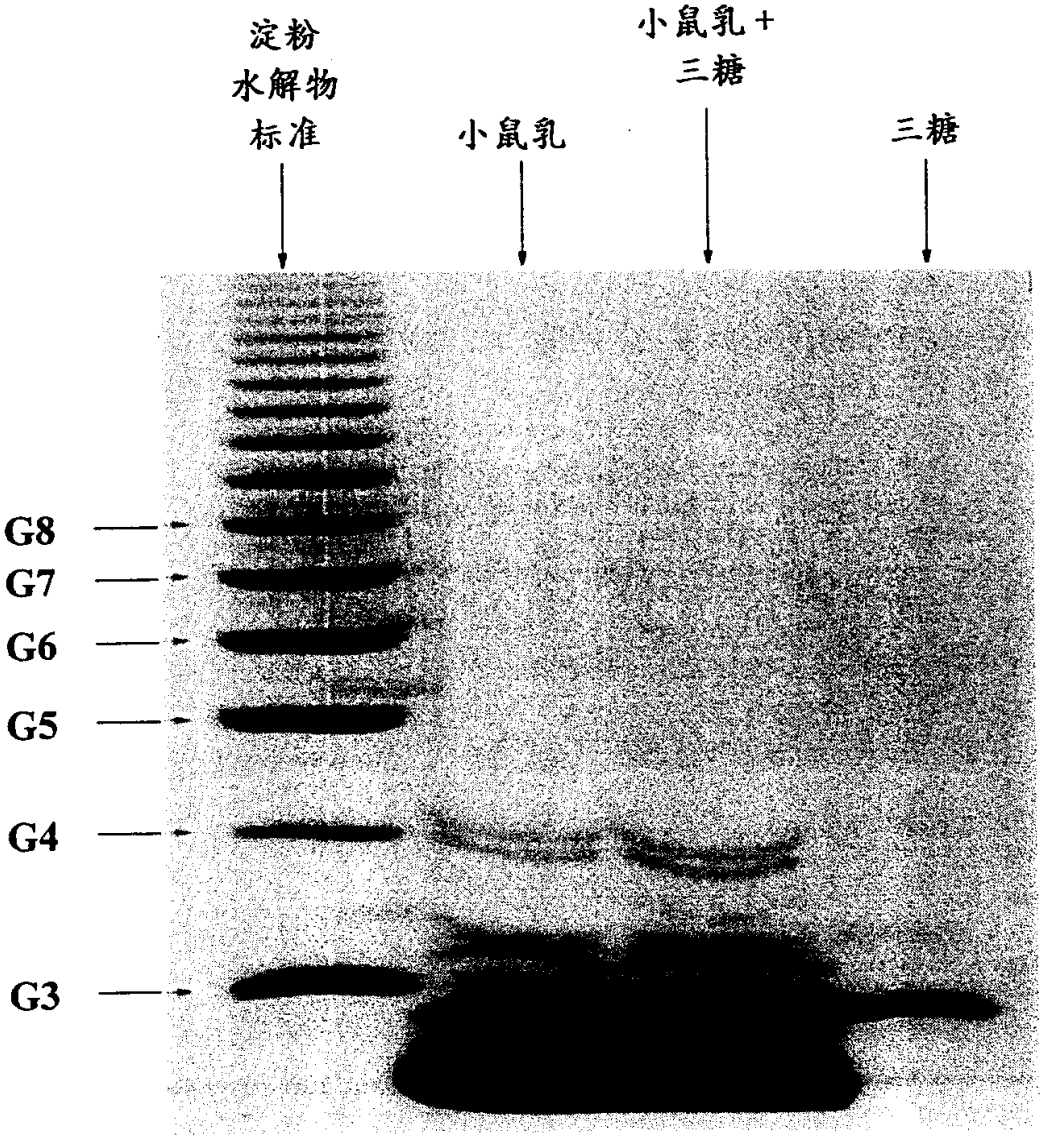


图 4

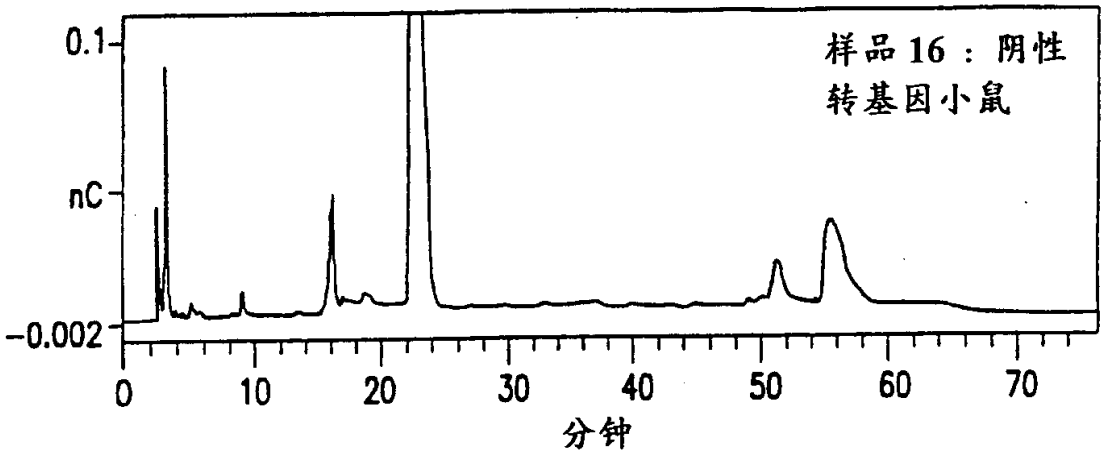

0.1
nC
-0.002
样品 16 ：阴性
转基因小鼠
0
10
20
30
40
50
60
70
分钟

图 5A

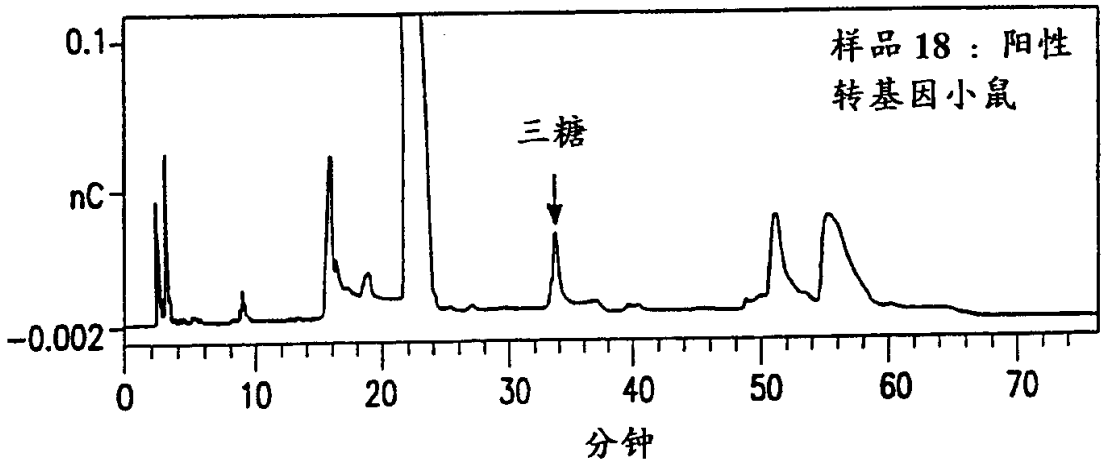

0.1
nC
-0.002
样品 18 ：阳性
转基因小鼠
三糖
0
10
20
30
40
50
60
70
分钟

图 5B

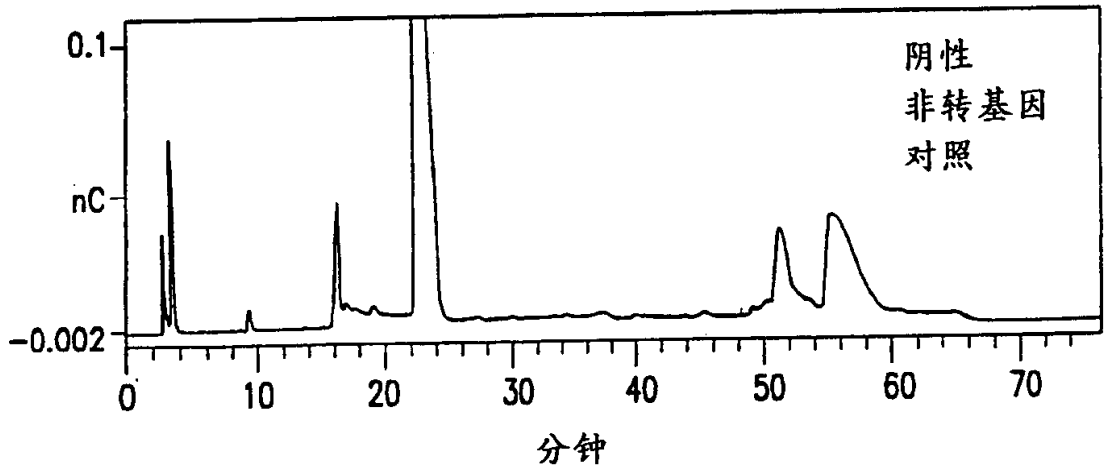

0.1
nC
-0.002
阴性
非转基因
对照
0
10
20
30
40
50
60
70
分钟

图 5C

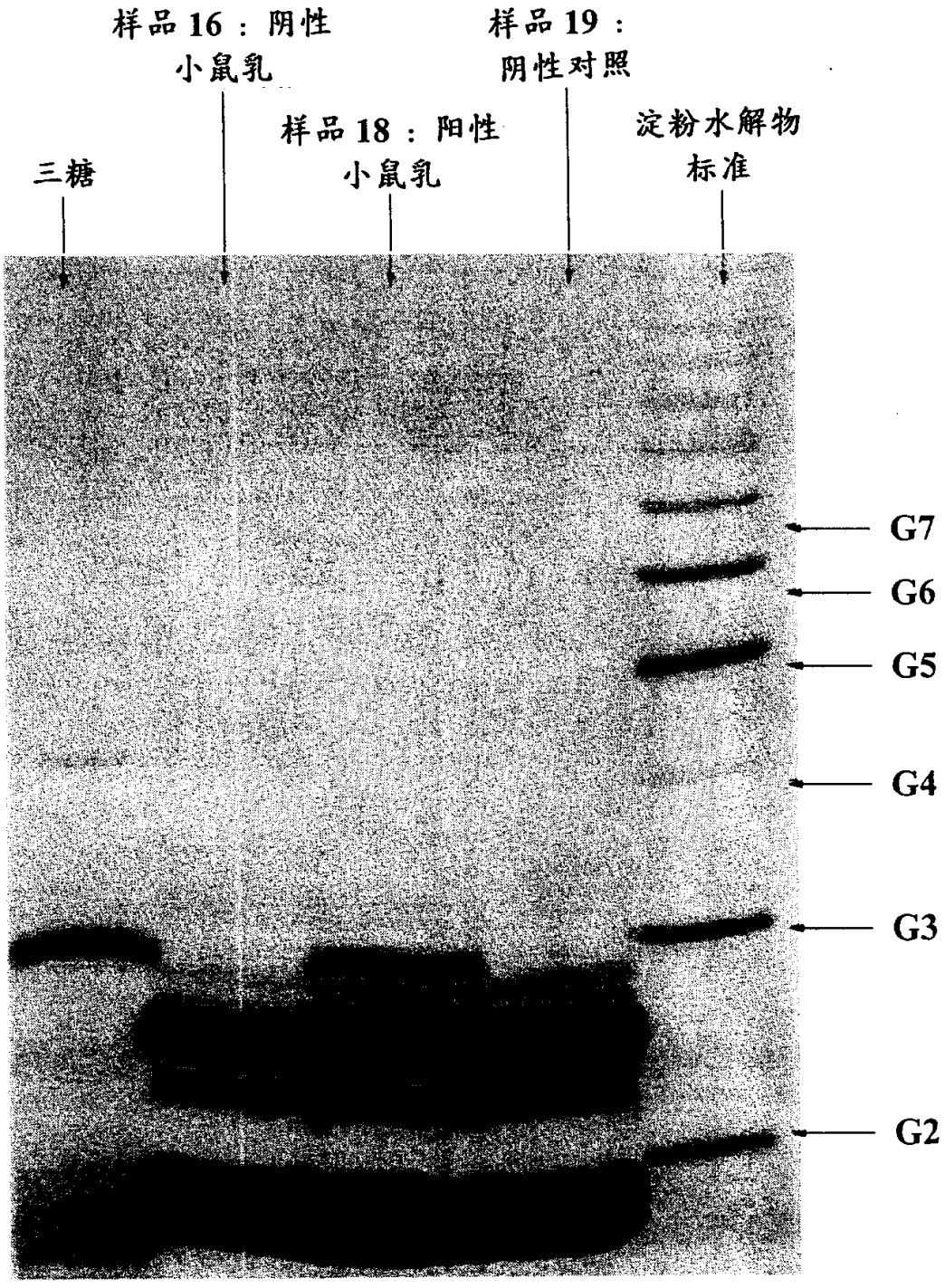


图 6

00-02-28

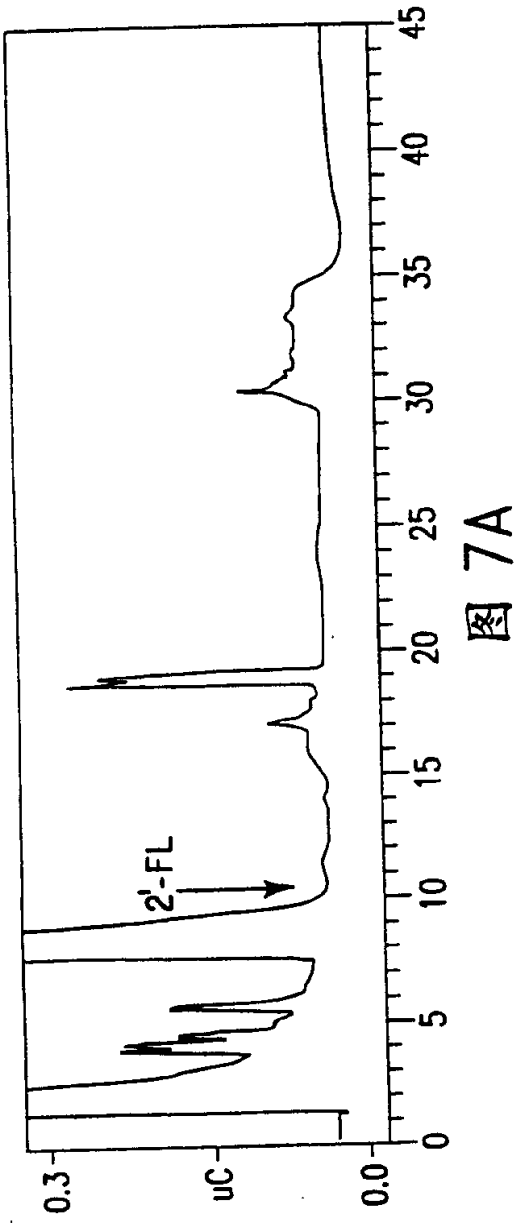


图 7A

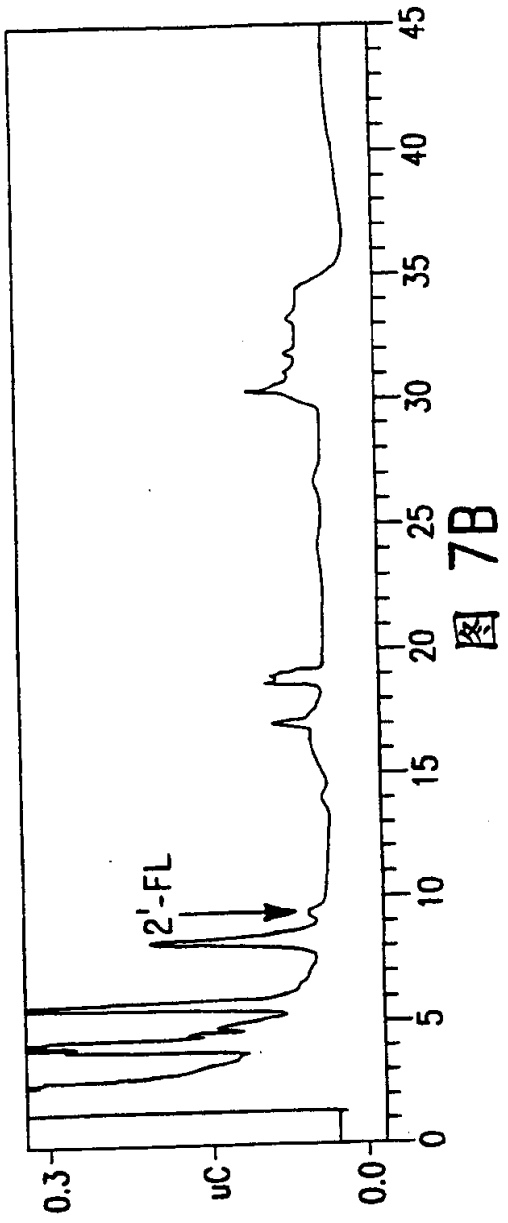


图 7B

00-02-28

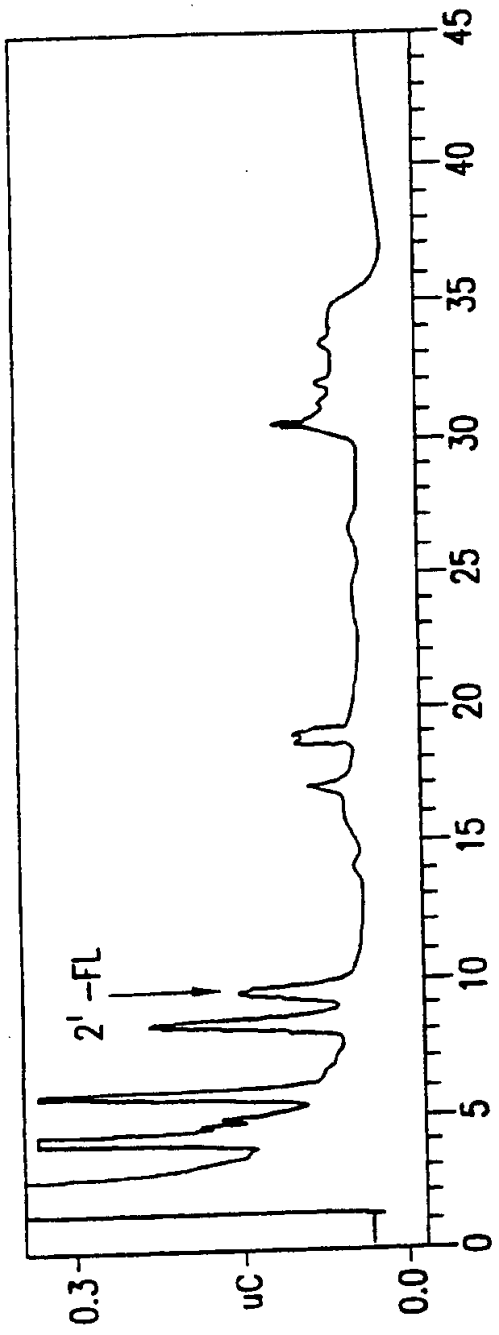


图 7C

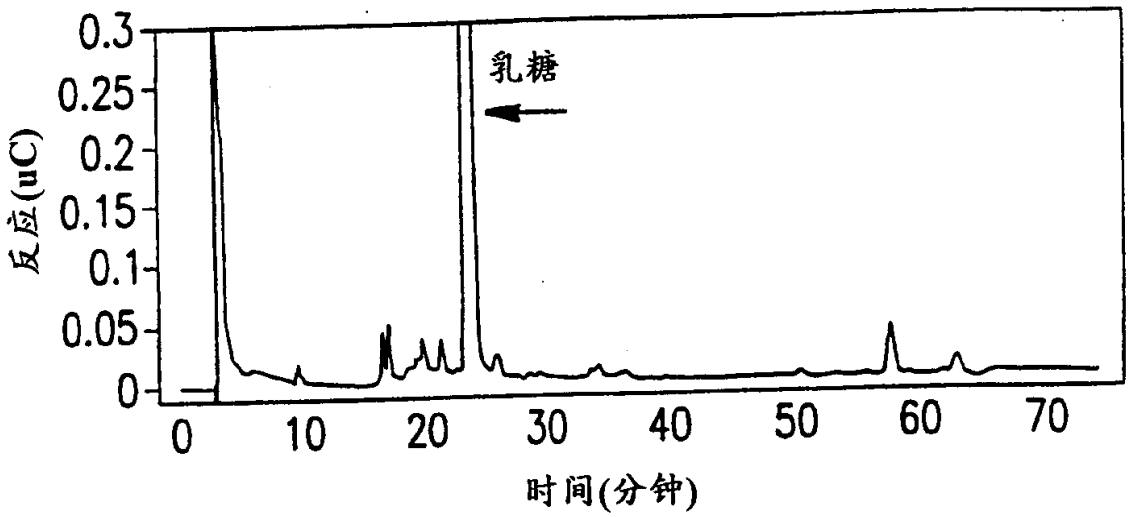

0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
反应(uC)
乳糖
0
10
20
30
40
50
60
70
时间(分钟)

图 8A

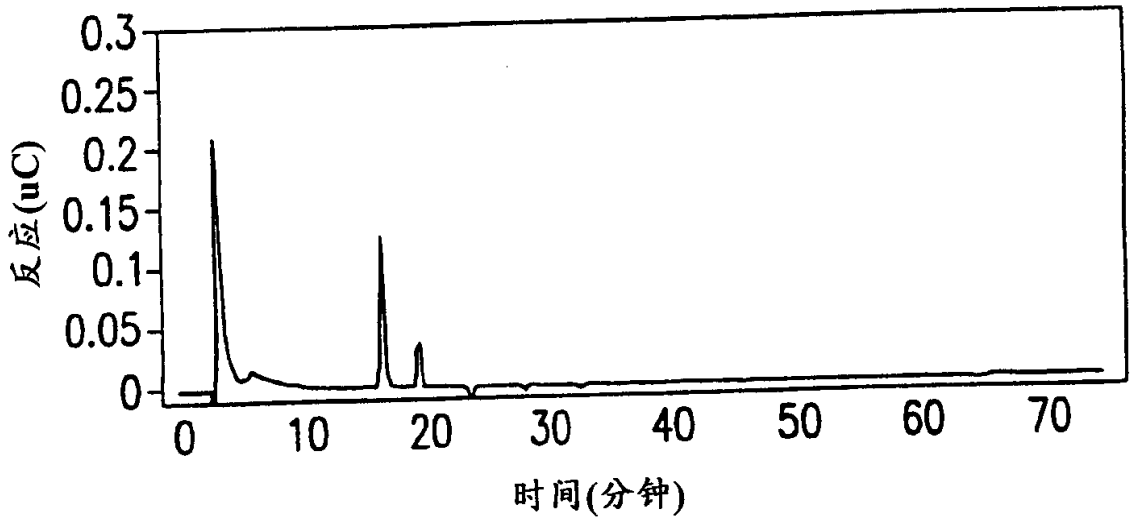

0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
反应(uC)
0
10
20
30
40
50
60
70
时间(分钟)

图 8B

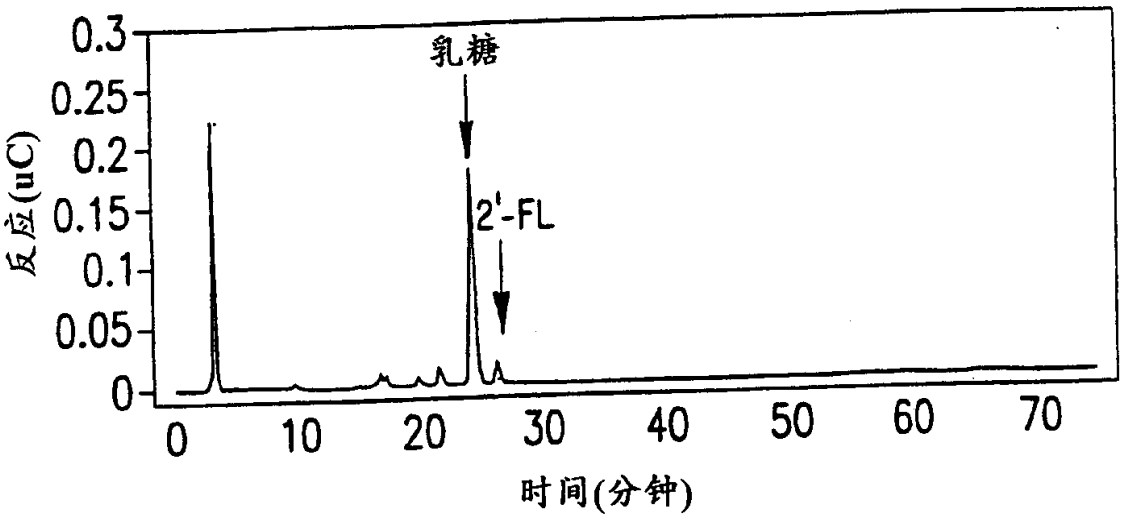

0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
反应(uC)
乳糖
2'-FL
0
10
20
30
40
50
60
70
时间(分钟)

图 8C

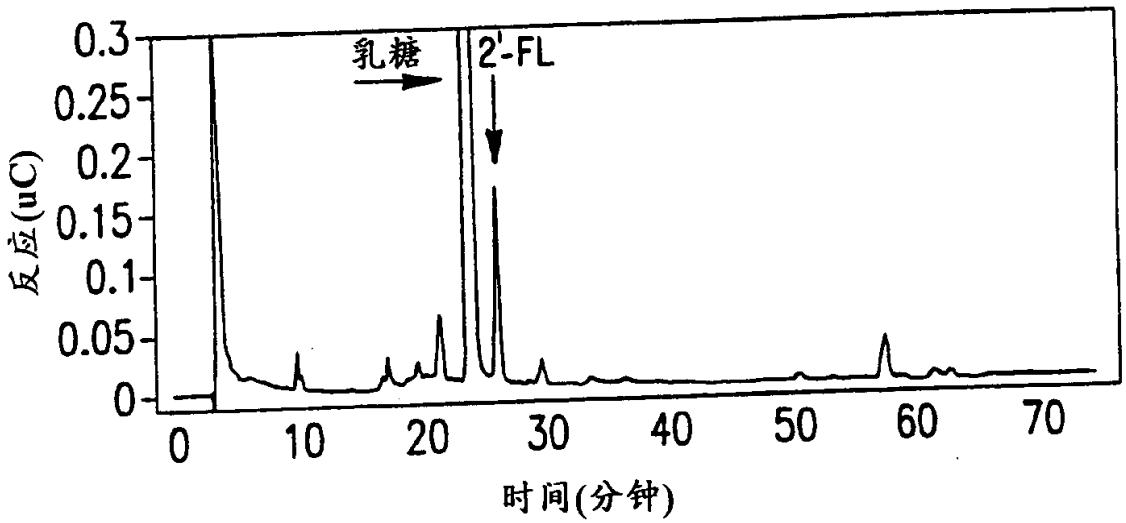

0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
反应(uC)
乳糖
2'-FL
0
10
20
30
40
50
60
70
时间(分钟)

图 8D

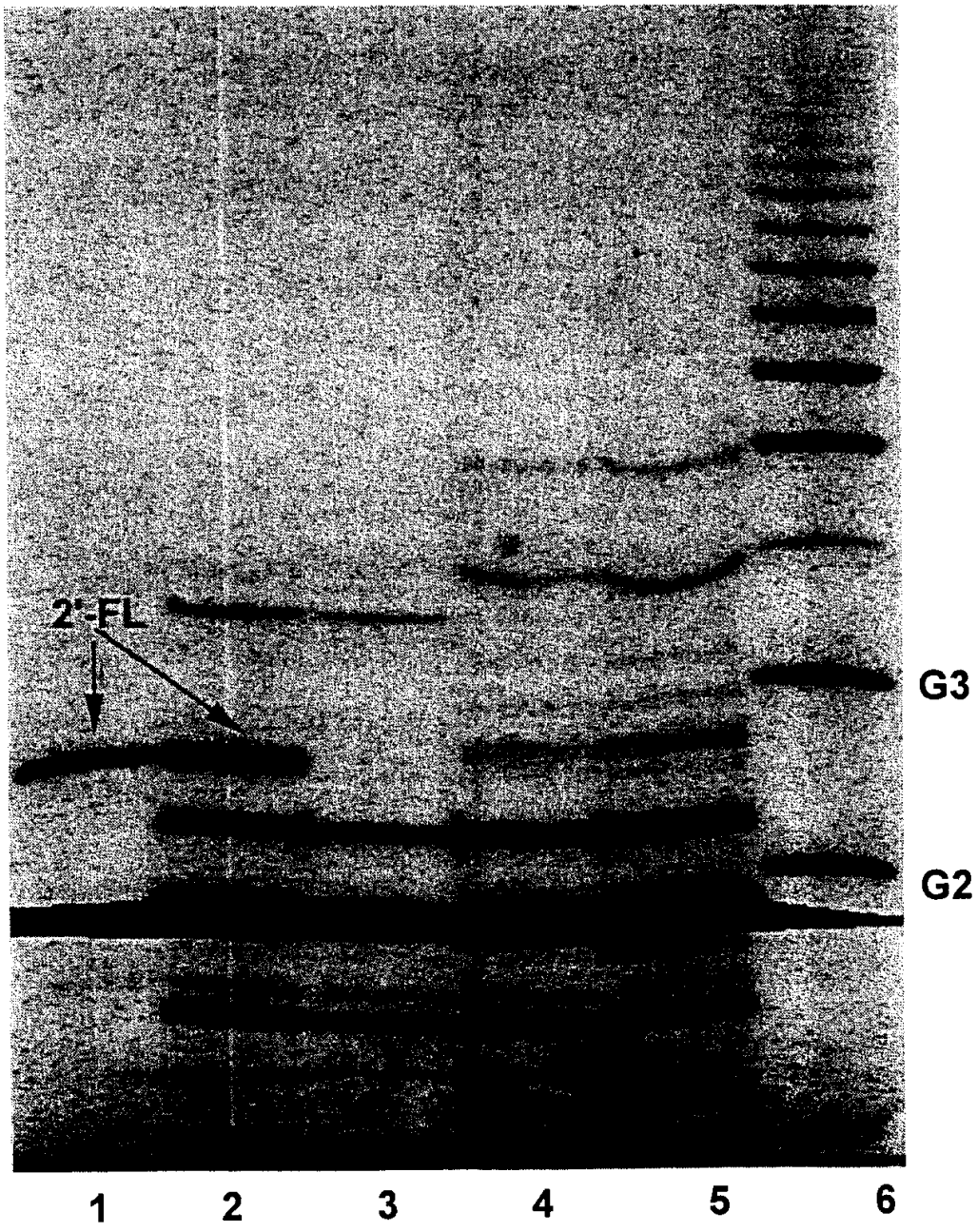


图 9

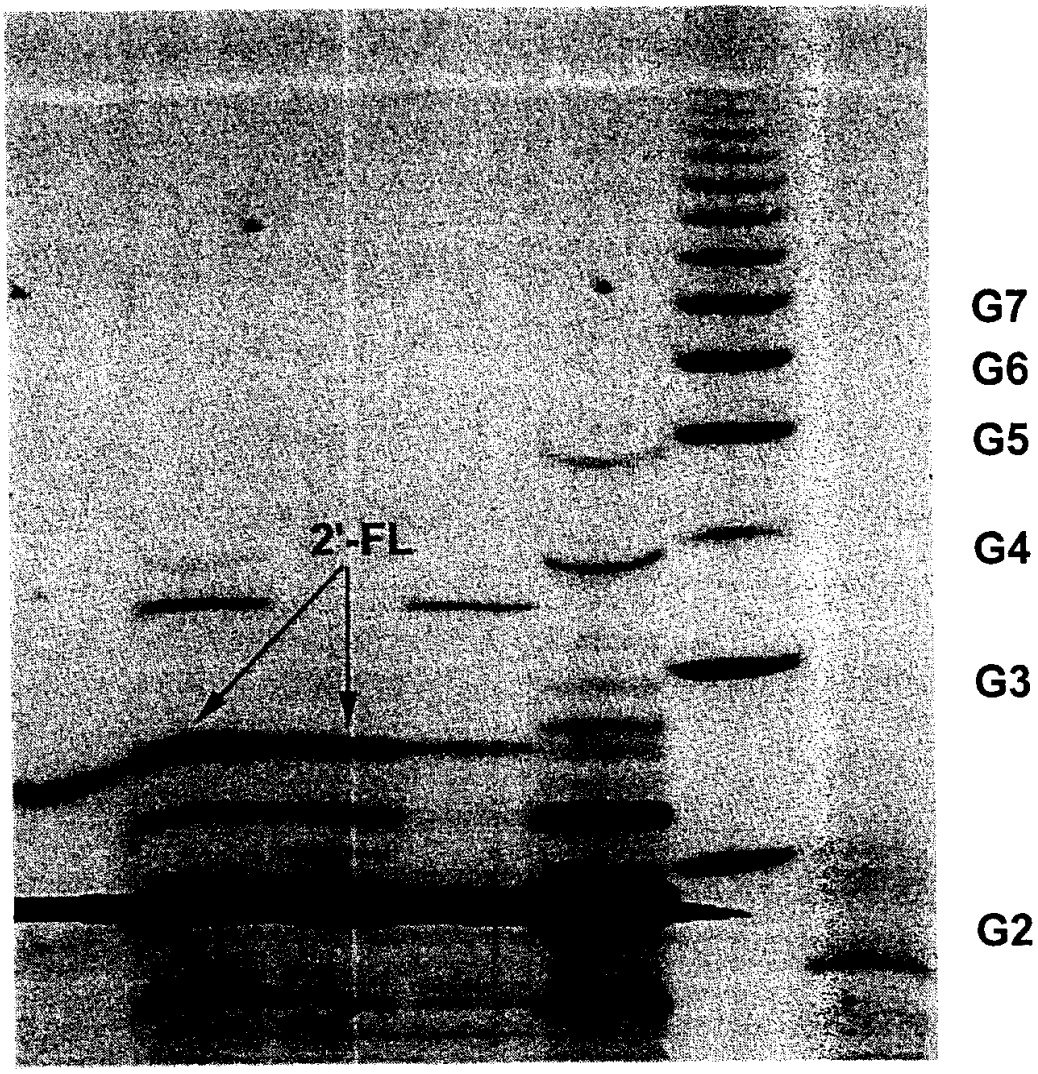


图 10

00.02.28



图 11



图 12

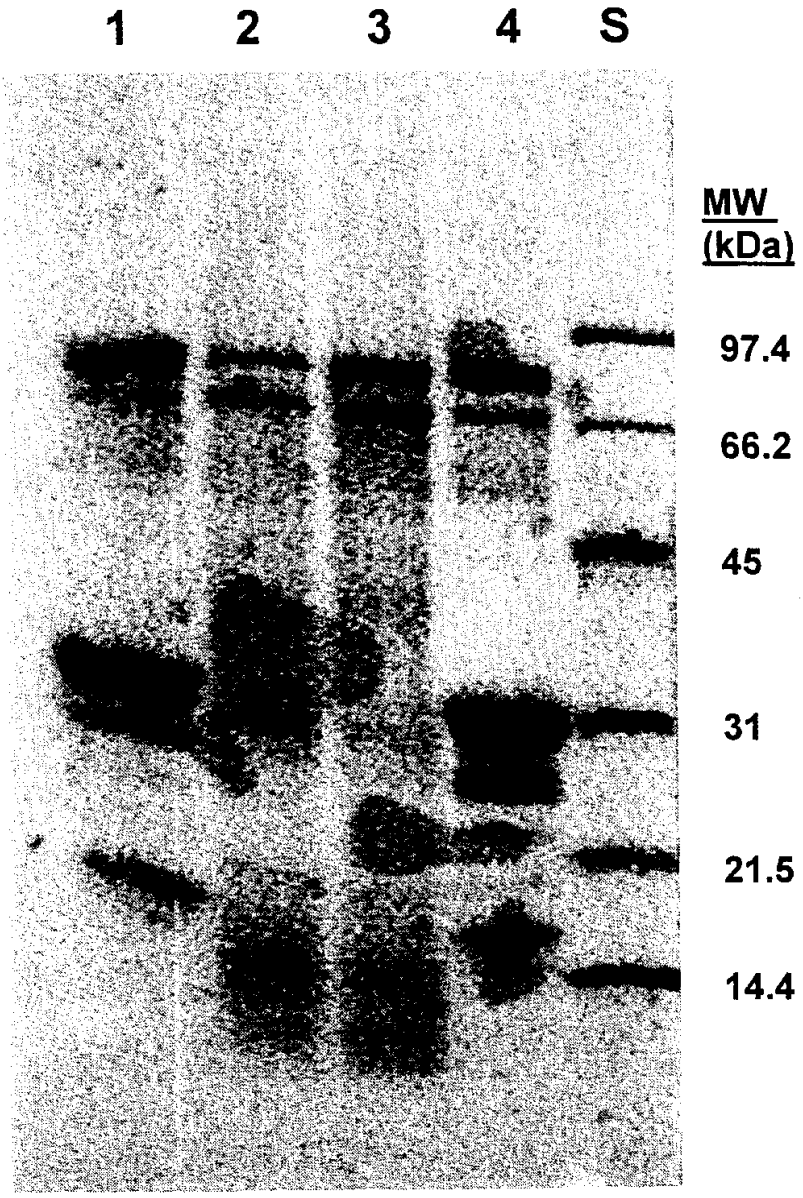


图 13

图 14A

00.02.28

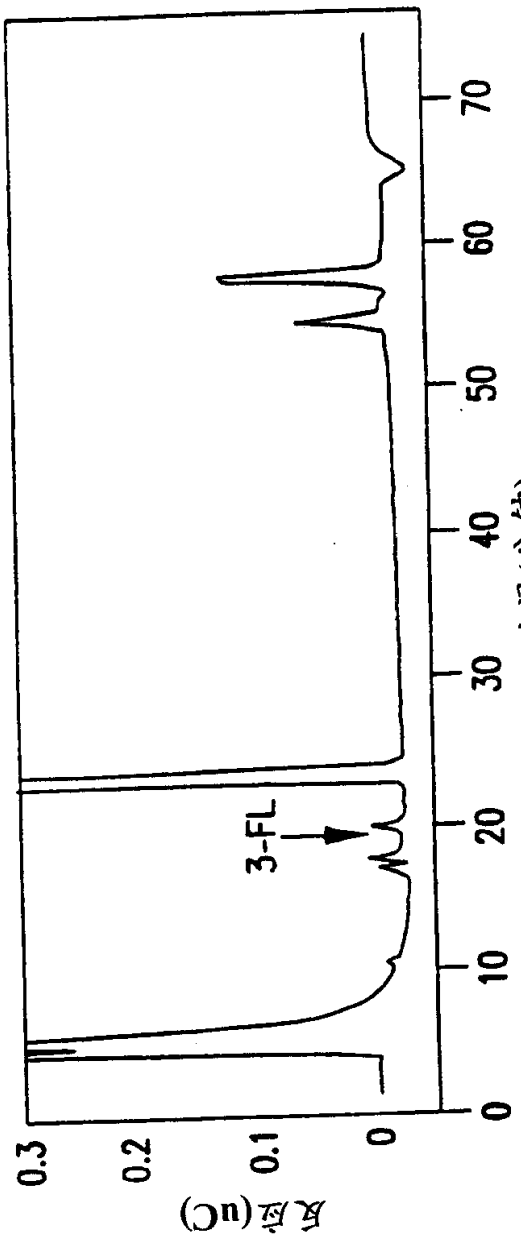


图 14B

00·02·24

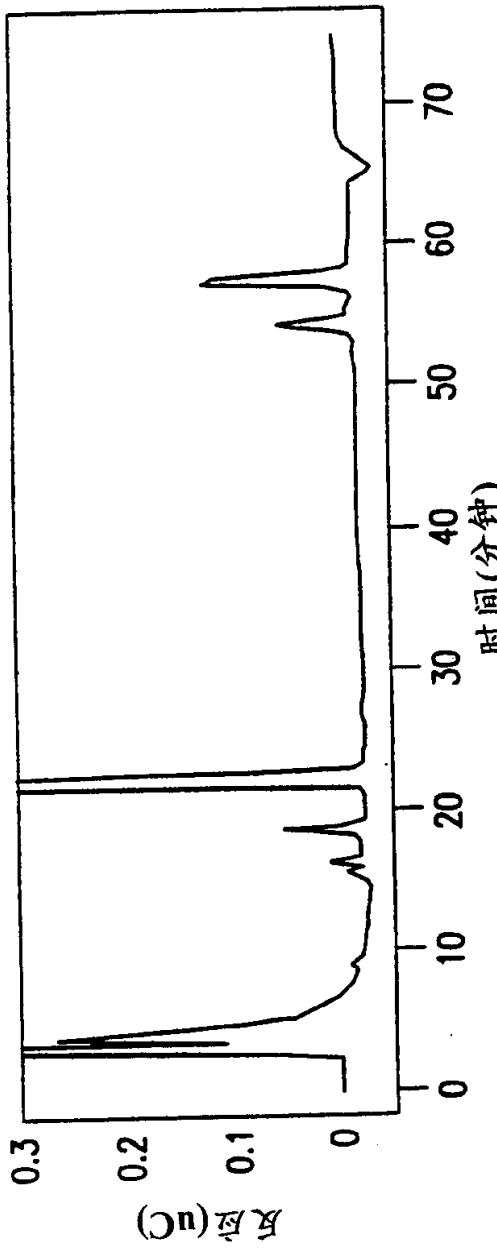


图 14C

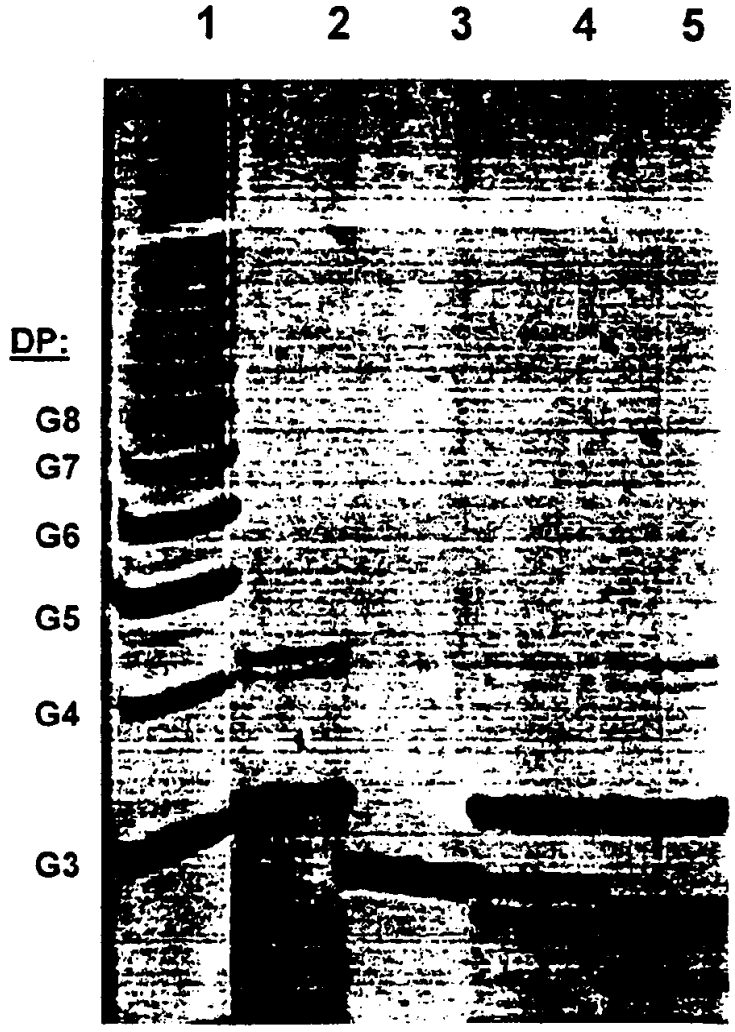


图 15

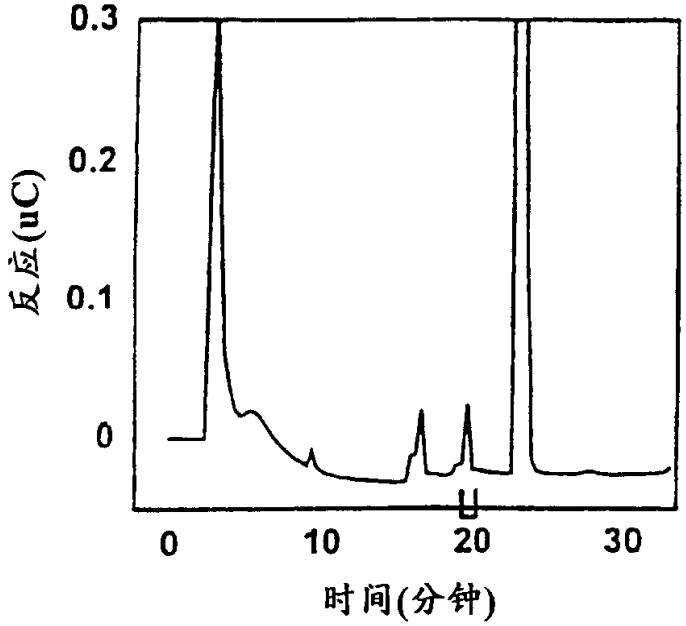


图 16A

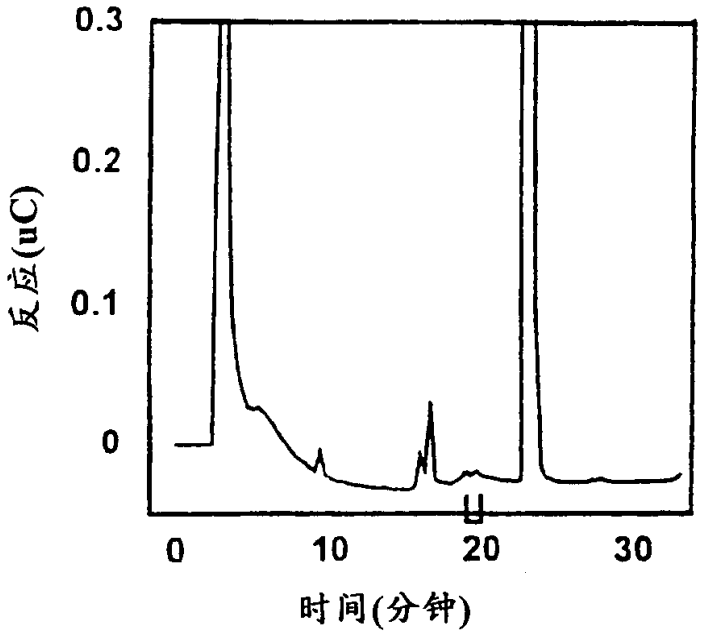


图 16B

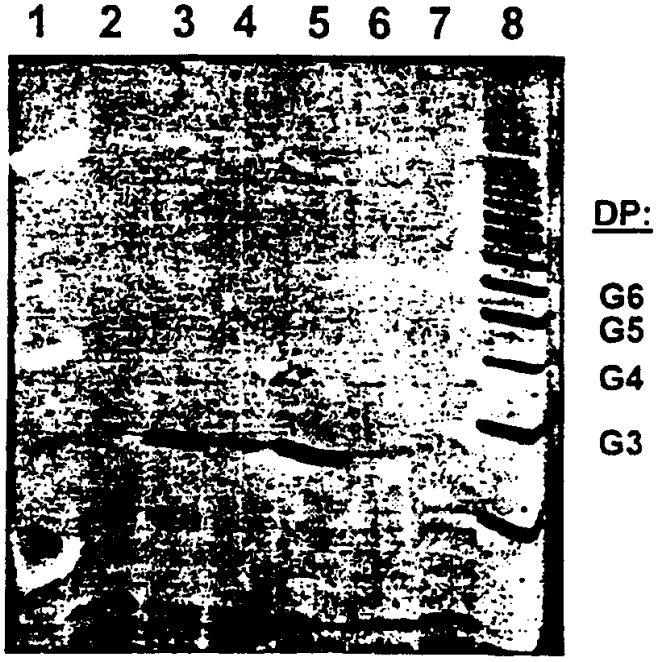


图 16C

00.02.28

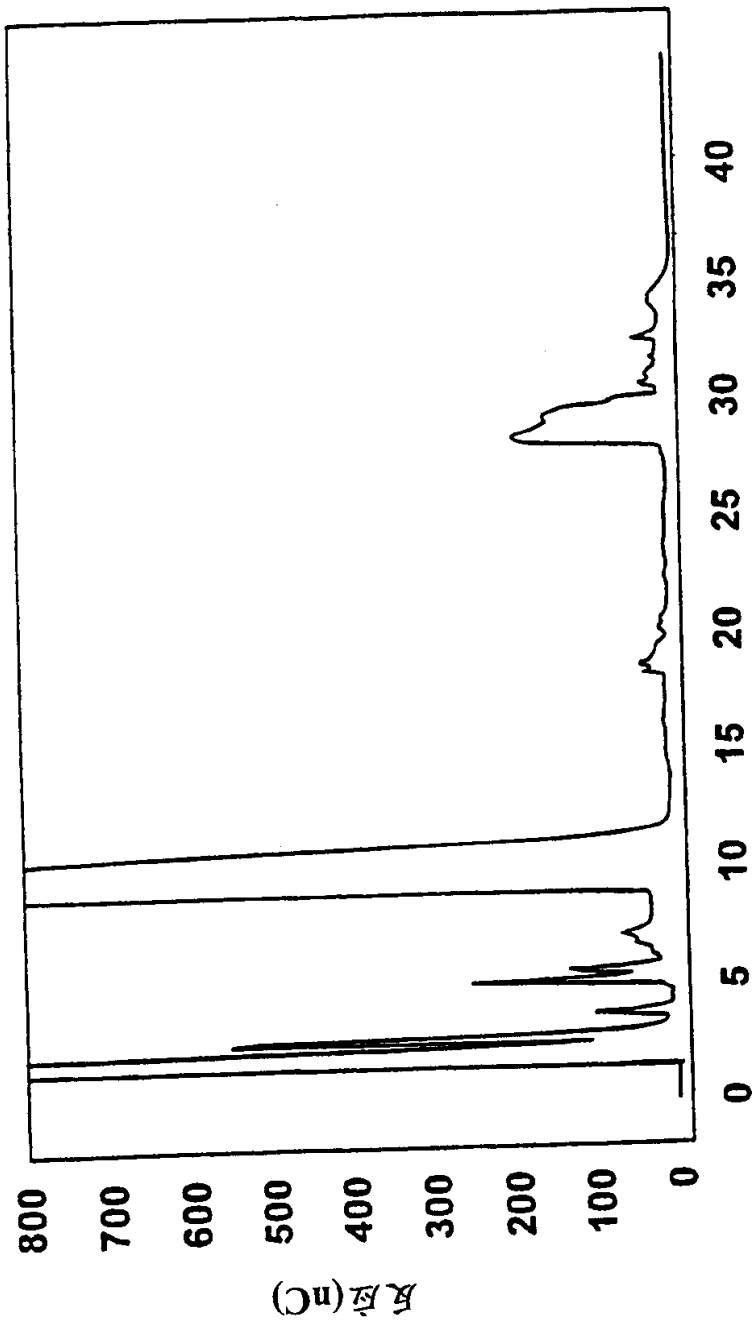


图 17

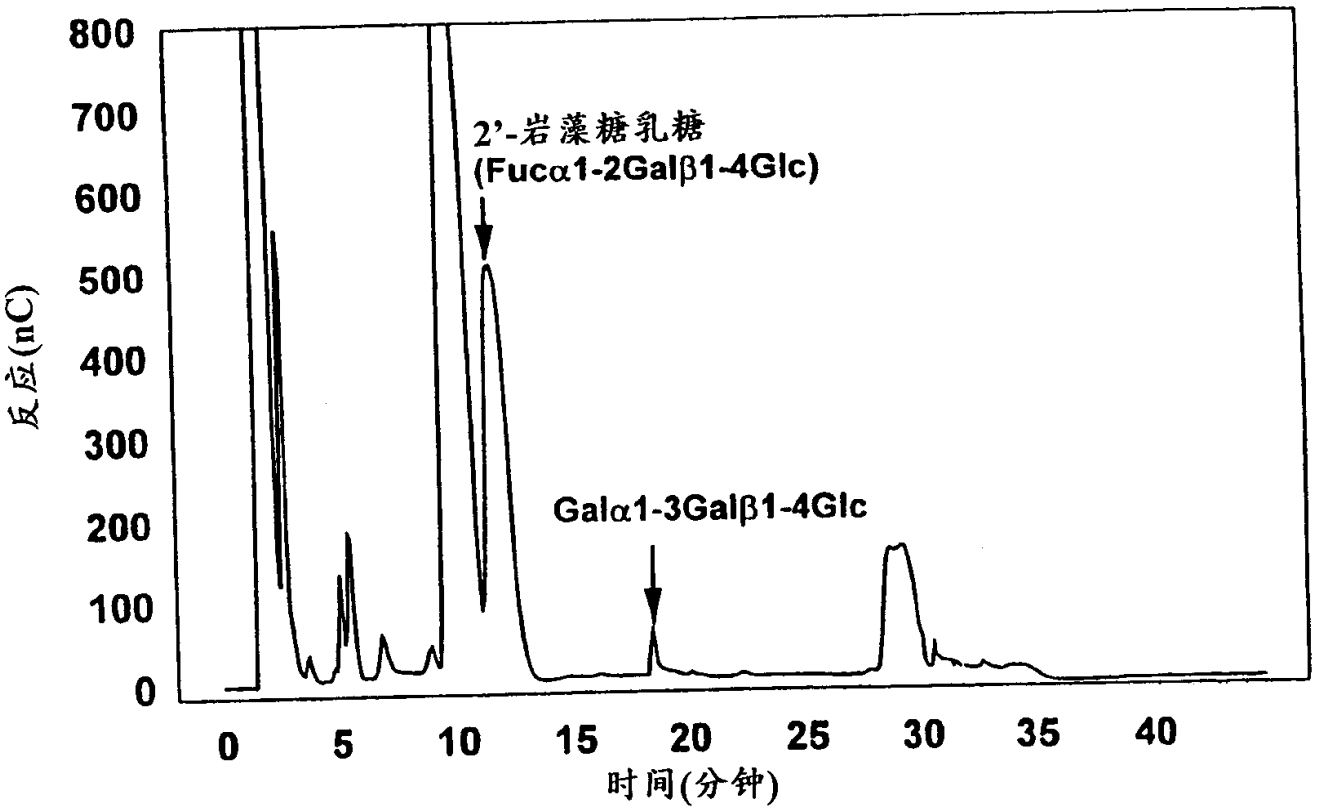

800
700
600
500
400
300
200
100
0
反应(nC)
2'-岩藻糖乳糖
(Fucα1-2Galβ1-4Glc)
Galα1-3Galβ1-4Glc
0
5
10
15
20
25
30
35
40
时间(分钟)

图 18

00-02-28

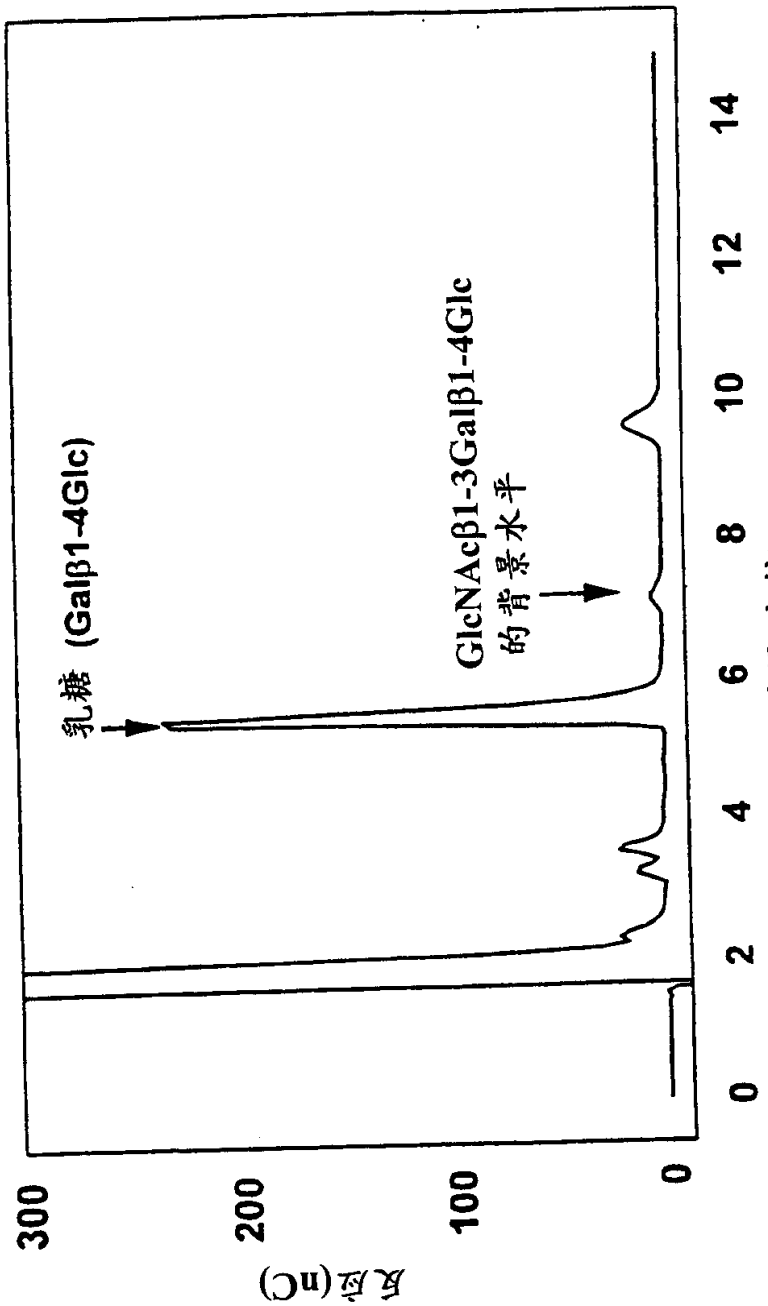

乳糖 (Galβ1-4Glc)
GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc
的背景水平
反应(nC)
300
200
100
0
0
2
4
6
8
10
12
14
时间(分钟)

图 19

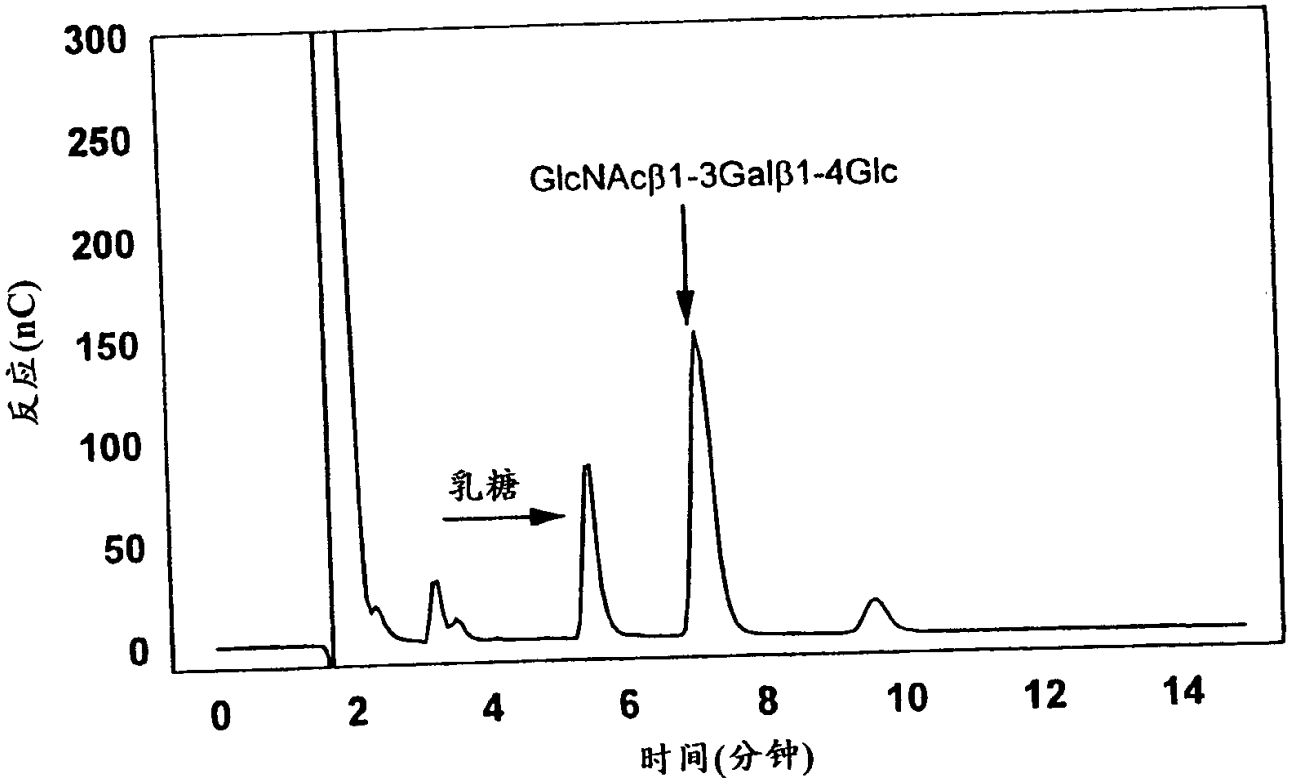

300
250
200
150
100
50
0
反应(nC)
GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc
乳糖
0
2
4
6
8
10
12
14
时间(分钟)

图 20

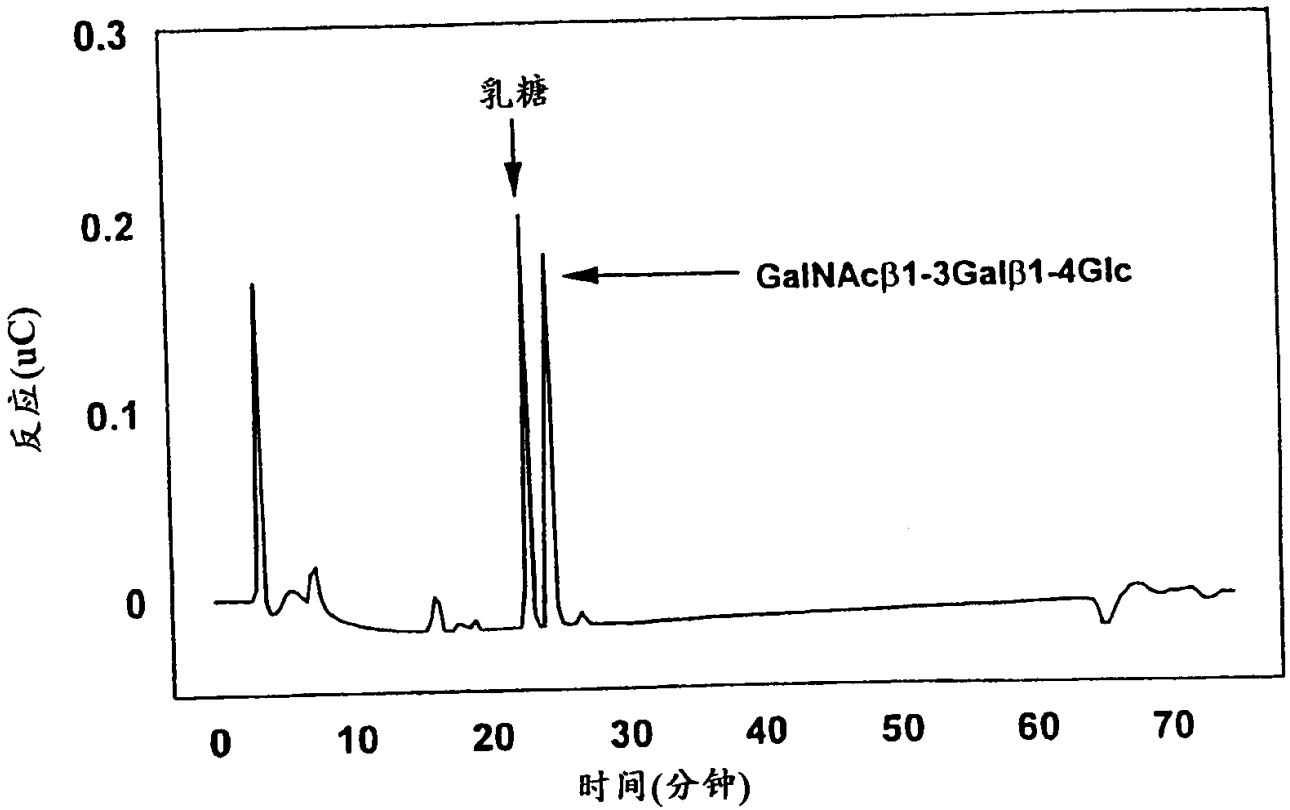

0.3
0.2
0.1
0
反应(uC)
乳糖
GalNAcβ1-3Galβ1-4Glc
0
10
20
30
40
50
60
70
时间(分钟)

图 21