

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00814554.7

[51] Int. Cl.

C12N 15/90 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

A01K 67/033 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C07K 14/61 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006年9月6日

[11] 授权公告号 CN 1273605C

[51] Int. Cl. (续)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

[22] 申请日 2000.10.19 [21] 申请号 00814554.7

[30] 优先权

[32] 1999.10.19 [33] GB [31] 9924721.5

[32] 1999.11.15 [33] US [31] 60/165,508

[86] 国际申请 PCT/GB2000/004013 2000.10.19

[87] 国际公布 WO2001/029204 英 2001.4.26

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.19

[71] 专利权人 米诺斯生物系统有限公司

地址 英国柴郡

[72] 发明人 罗杰·克雷格

查拉拉姆波斯·萨瓦基斯

审查员 于保华

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 刘玥

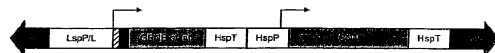
权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 8 页

[54] 发明名称

蛋白质生产系统

[57] 摘要

本发明涉及一种生产蛋白质的方法，它包括用能在昆虫的幼虫中表达所述蛋白质的非病毒表达系统转化昆虫；繁殖所述昆虫以产生幼虫；培养该幼虫；和从所述幼虫中分离所述蛋白质。这种转化借助于转座子载体可以有利地进行。



1. 一种生产蛋白质的方法，包括：
 - (a) 用能在昆虫的幼虫中表达所述蛋白质的基于转座子的表达系统转化昆虫；
 - 5 (b) 繁殖昆虫，以生产幼虫；
 - (c) 规模饲养幼虫；和
 - (d) 从规模饲养的幼虫中分离所述蛋白质。
2. 根据权利要求 1 的方法，其中，转化所述昆虫包括下列步骤：
 - a) 提供编码转座酶蛋白质的可转座的元件，所述转座酶蛋白质在
10 昆虫中是有活性的；
 - b) 通过插入编码所述的蛋白质的编码序列修饰可转座的元件；和
 - c) 用修饰的可转座元件转化目标昆虫。
3. 根据权利要求 2 的方法，其中，可转座的元件选自 Minos、mariner、Hermes, sleeping beauty 和 piggyBac。
- 15 4. 根据前面的权利要求的任一项的方法，其中，所述表达系统包括在昆虫幼虫中操作性的诱导型转录控制元件的控制下编码所述的蛋白质的编码序列。
 5. 根据权利要求 4 的方法，其中，诱导型控制系统通过四环素或雌激素调节。
- 20 6. 根据权利要求 1 - 3 的任一项的方法，其中，所述表达系统包括在昆虫幼虫中操作性的组成型转录控制元件的控制下编码所述的蛋白质的编码序列。
 7. 根据权利要求 6 的方法，其中，组成型控制元件选自细胞质肌动蛋白启动子和细胞质微管蛋白启动子。
- 25 8. 根据权利要求 7 的方法，其中，细胞质肌动蛋白启动子是 *Drosophila Act5C*。
 9. 根据权利要求 4 的方法，其中，所述诱导型表达控制序列是热激启动子。
 10. 根据权利要求 9 的方法，其中，所述热激启动子是果蝇或地中海果蝇 hsp70 启动子。
- 30 11. 根据前面的权利要求的任一项的方法，其中，所述蛋白质产品主要在脂肪体或血淋巴中聚集。

12. 根据权利要求 11 的方法，其中，幼虫血清蛋白质启动子指导蛋白质产品到血淋巴的分泌，Hsp70 启动子用于在脂肪体内表达。

13. 根据前面的权利要求的任一项的方法，其中，所述昆虫用两种或多种表达系统，或者一种包含两种或多种编码序列的表达系统转化。

14. 根据权利要求 12 的方法，其中，表达系统的保留是通过使用平衡器染色体而促进的。

15. 根据前面的权利要求的任一项的方法，其中，所述蛋白质选自酶、细胞因子、激素或蛋白质药品。

16. 根据前面的权利要求的任一项的方法，其中，所述昆虫选自 *Bactrocera oleae* (橄榄蝇)、*Bactrocera orientalis* (东方实蝇)、*Heliothis armigera* (棉铃虫)、*Trichoplusia ni* (粉纹夜蛾)、*Manduca sexta* (烟草天蛾)、*Lobesia botrana* (葡萄藤蛾)、*Anopheles gambiae* (蚊子)、*Aedes aegypti* (黄热病蚊)、*Glossina morsitans* (舌蝇)、*Simulium* sp. (黑蝇)、*Phlebotomus* sp. (沙蝇)、*Musca domestica* (家蝇)、*Drosophila melanogaster* (黑尾果蝇) 和 *Ceratitis capitata* (地中海果蝇)。

17. 根据权利要求 16 的方法，其中，所述昆虫是地中海果蝇。

18. 根据权利要求 16 的方法，其中，所述昆虫是黑尾果蝇。

19. 根据前面的权利要求的任一项的方法，其中，通过培育温度的操纵使幼虫培育同步。

蛋白质生产系统

本发明涉及在昆虫幼虫中生产蛋白质的系统。具体地，本发明包括在果蝇和地中海果蝇幼虫中生产感兴趣的蛋白质。

蛋白质生产系统是商业生物技术的主干，其中在重组生物体或细胞中生产感兴趣的多肽或蛋白质。基于大肠杆菌(E. Coli)等宿主的细菌表达的最早的系统已经与基于真核宿主的系统相结合，特别是培养的哺乳动物细胞、培养的和以完整昆虫形式存在的昆虫细胞、以及转基因哺乳动物如绵羊和山羊。

原核细胞培养系统容易维护并且操作便宜。但是，原核细胞不能进行真核蛋白质的翻译后修饰。而且，许多蛋白质不正确地折叠，要求特定的过程进行再折叠，这增加了生产成本。

对于一些用途已经描述了真核细胞培养系统。例如，哺乳动物细胞能够进行翻译后修饰，一般产生正确折叠且可溶的蛋白质。哺乳动物细胞系统的主要缺点包括需要专门的、昂贵的培养设备，以及感染的危险，感染可能导致失去整个培养物。

植物生产系统可以用于蛋白质表达，并且可以获得高产量的生产。但是，转基因植物农作物难以控制，增加了基因操作材料污染环境的危险。

昆虫细胞也用于多肽表达。用于昆虫细胞中最广泛的表达系统基于杆状病毒载体。通过在强天然多角体蛋白启动子控制下，用异源基因代替杆状病毒的多角体蛋白基因而构建杆状病毒表达的载体，杆状病毒的多角体蛋白基因编码杆状病毒的主要结构蛋白。所培养的昆虫宿主细胞用重组病毒感染，如果采用适当的分泌信号，可以从细胞本身或者从培养基中回收所产生的蛋白质。但是，这些系统也存在与培养物感染以及需要专门的培养设备相关的问题。

基于生物体的表达系统避免了许多感染的缺点并且比细胞培养物更容易生长。例如，使用杆状病毒等病毒载体允许整个昆虫的感染，这对特定的生长条件只有较少的要求。大昆虫如蚕蛾提供高产量的异种蛋白质。可以根据常规提取技术从昆虫中提取蛋白质。

基于在哺乳动物如山羊和绵羊中表达感兴趣的蛋白质的技术也是

已知的；在羊乳蛋白质表达控制序列的控制下使它们在羊乳中表达。这种技术有很大的潜在优点，但是由于需要从最终产品中分离内源性哺乳动物病毒、朊病毒和蛋白质，所以是昂贵的。此外，产生和喂养大的转基因动物的成本高。

- 5 已经提出使用昆虫幼虫，粉斑夜蛾(*Trichoplusia ni*)的幼虫，用于蛋白质生产系统(Pham等人, 1999 *Biotech Bioeng* 62:175-182)。但是，这种系统仅与基于杆状病毒的病毒载体技术相结合而提出。

当蛋白质预计用于饮食或制药用途时，细菌系统和/或病毒载体是不希望的。所以，在本领域中需要一种蛋白质生产系统，它是有活力的并且是可以规模化的，像基于完整生物体的系统那样，并且不含基于病毒的载体，而且在可以控制的环境中便宜地操作。

发明概述

根据第一个方面，本发明提供一种生产感兴趣的蛋白质的方法，它包括：

- 15 (a) 转化具有能在昆虫幼虫中表达感兴趣的蛋白质的非病毒表达系统的昆虫；
(b) 使该昆虫繁殖以生产幼虫；
(c) 培养幼虫；和
(d) 从幼虫中分离感兴趣的蛋白质。

20 根据本发明的方法可以迅速生产用于研究目的的毫克量的多肽，生产用于临床和诊断用途的千克量的蛋白质，并且可能低成本地生产数千千克的工业酶，因为使用确定的培养技术可以容易地培养昆虫幼虫。

根据本发明的方法的优点是多方面的。在可控的生产环境中，使用现有技术大量饲养昆虫幼虫是可能的，并且可以非常低成本地生产多肽产品。对于完整的生物体如哺乳动物，这可以使得规定批准更容易，此时在获得批准之前必须证明没有病毒和朊病毒。而且，本发明的方法避免了与动物(包括昆虫)细胞培养相关的缺点，这些缺点包括更高的感染危险，在哺乳动物细胞培养物或转基因生产系统的情况中病毒或朊病毒污染的危险。

30 术语“蛋白质”包括单链多肽分子以及多肽复合体，其中各个组成多肽通过共价键或非共价方法连接。术语“多肽”包括长度为两个

或多个氨基酸的肽，一般具有大于5、10或20个氨基酸。

如本文所称，一种非病毒表达系统包括不基于病毒如杆状病毒的转化昆虫的任何技术。例如，非病毒表达系统包括基于自动复制质粒、整合质粒和基于转座子系统的那些表达系统。用于昆虫幼虫的优选的表达系统基于转座子。下面更详细地描述适当的转座子。

在本发明的方法中所用的表达系统包括在昆虫细胞内，特别是在昆虫幼虫内有活性的控制元件。许多昆虫控制序列，包括各种启动子，在许多不同物种中是有活性的。所以，不必使用由考虑中的昆虫获得的序列。可以使用诱导型或组成型活性序列。

10 优选地，控制序列是诱导型序列。优选的诱导型启动子是通过提高培养幼虫的温度而诱导的热激蛋白 HSP70 启动子，和四环素诱导的表达系统(Heinrich 和 Scott, PNAS 97:8229-8232, 2000)。

15 为了提高蛋白质生产量，可以使用多种表达系统。这些系统可以安排在每个系统中存在两个或多个编码序列，或者作为多种单个系统。在二者中的任一种情况下，为了在昆虫交配过程中有利于表达系统保持并传递给后代，可以使用平衡器染色体(balancer chromosome)。

20 昆虫幼虫培养的一个优点是这些培养可以同步，使得所有的幼虫同时达到相同的成熟程度。这可以通过改变培养温度来进行，因为幼虫在低温下发育更慢。例如，与 25°C 时的生长速度相比，18°C 的发育速度为其一半。

本发明的另一个优点包括蛋白质积累可以引导到脂肪体中，或者可以在适当的控制区和信号肽如幼虫血清蛋白质序列的控制下，把蛋白质分泌到血淋巴中。

25 附图简述

图 1 表示 pMiHspGFP/HspCcW 转座子的结构，它在 Hsp70 启动子的控制下表达 GFP 和白色基因。

图 2 表示质粒 pMiAct5CGFP 的结构，它在果蝇肌动蛋白 5C 基因的控制下表达 GFP。

30 图 3 表示在热激后在转基因地中海果蝇和地中海果蝇幼虫中表达 GFP。

图 4 表示在果蝇中 GFP 的组成型表达。

图 5 表示在成年果蝇中 GFP 的组成型表达。所观察的荧光是基因剂量依赖性的。

图 6 表示在果蝇幼虫中 GFP 的表达(顶部:转基因;底部:野生型)

图 7 表示在幼虫血淋巴中用于蛋白质表达的载体的结构。LspP/L
5 是果蝇或地中海果蝇血清蛋白(Drosophila or Medfly Larbal Serum Protein)(Lsp)基因的启动子,然后是 Lsp 5'非翻译前导区(带条纹的方框)和 Lsp 信号肽(黑色方框)。感兴趣的基因在框中与前导肽融合。HspP 和 HspT 分别是热激 70 基因启动子和终止子。CcW 是地中海果蝇白色基因,用作检测转化株的显性可见标记。MiL 和 MiR 是 Minos 元
10 件的末端。

图 8 是从 camelid 抗体文库中分离并在地中海果蝇幼虫中表达的抗 PERV p30 抗体克隆的预知序列。

发明详述

虽然本文所述技术一般是本领域中熟知的,具体可以参考
15 Sambrook 等人的分子克隆,实验室手册(Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989)),和 Ausubel 等人,Short Protocols in Molecular Biology(1999),第四版,John Wiley & Sons, Inc.

转座子

转座子是能够在物种的基因组内从一个位置“跳跃”或易位到另
20 一个位置的基因元件。它们广泛分布在动物中,包括昆虫。

由于由元件本身编码的,或者由其它方法提供的转座酶蛋白质的活性,转座子在它们的宿主物种内是有活性的,所述其它方法例如注入转座酶编码的 mRNA、使用编码转座酶的第二种编码序列或加入转座酶蛋白质本身。转座机制的理解的进展已经导致基于可用于基因转移
25 的转座子的基因工具的开发。

可以使用在需要的昆虫中有活性的任何可转座元件。但是,优选的可转座元件选自 Minos、mariner、Hermes、Sleeping Beauty 和 piggyBac.

Minos 是一种在地中海果蝇中有活性的可转座元件。它在美国专利
30 5,840,865 中描述,在此引入其完整内容作为参考。在前述美国专利中描述了使用 Minos 来转化昆虫。

Mariner 是最初从果蝇中分离的转座子,但是后来在数种无脊椎

和脊椎动物中发现。在国际专利申请 WO 99/09817 中描述了使用 mariner 来转化生物体。

Hermes 来源于普通的家蝇。在美国专利 5,614,398 中描述了它在产生转基因昆虫中的用途，在此引入其完整内容作为参考。

- 5 PiggyBac 是来源于杆状病毒宿主粉纹夜蛾的转座子。Handler 等人 (1998) PNAS (USA) 95:7520-5 描述了它对地中海果蝇的种系转化的用途。

基因转移通过已证明的转座子介导的种系转化来进行。所选择的转座子是 Minos，已经证明它作为地中海果蝇 (Loukeris 等人, 1995 年) 和果蝇中的基因转移载体起作用。在地中海果蝇中起作用的其它转座子如 piggyBac (McCombs 等人, 1998 年)，可以用作替代物。在文献 (Loukeris 等人, 1995 年) 中详细描述了地中海果蝇转化方法。简言之，将含有由侧翼为两个转座子末端的感兴趣基因组成 (如红细胞生成素、加上适当的调节 DNA 序列) 的转座子的环状质粒 DNA 与转座酶来源 (表达转座酶的质粒、体外合成的编码转座酶的 mRNA、或转座酶蛋白质本身) 一起注射到囊胚前期的地中海果蝇胚胎中。在早期的胚胎中，转座酶与转座子末端相互作用并且催化转座子的切除以及在随机位置上的重新整合到染色体中。通常，为了促进转基因苍蝇的检测，“标记基因”如赋予显性的、可见的或者可选择的表型的基因也被包括在转座子中。使用标记基因表型在注射后的苍蝇的后代中检测到转基因的苍蝇，然后杂交到纯合性。数种这些种属，每一种包含在基因组的不同位置的插入，可以在涉及几百个卵的注射的每个转化实验中生产。

多个插入

为了增加表达的水平，可以通过品种间杂交不同的转基因株来构造含有多个插入的株。这个过程可以使用平衡器染色体来促进。平衡器染色体含有数个重叠的翻转，一个或多个隐性致死因子突变和至少一个显性可见突变。这些染色体抑制重组并可以用来保持和操纵携带数种突变基因的染色体。已经描述了地中海果蝇平衡器染色体 FiM 1。通过在 5 号染色体的大区域内抑制重组，可以用来构建携带数种转座子插入的 5 号染色体。

昆虫和启动子的选择

许多昆虫幼虫适合于在本发明中使用，包括 *Bactrocera oleae* (油

橄榄蝇 (*olive fly*))、*Bactrocera orientalis* (桔实蝇)、*Heliothis armigera* (棉铃虫)、*Trichoplusani* (粉纹夜蛾)、*Manduca Sexta* (烟草天蛾)、*Lobesia botrana* (葡萄藤蛾)、*Anopheles gambiae* (蚊子)、*Aedes aegypti* (黄热病蚊子)、*Glossina morsitans* (舌蝇)、*Simulium* sp. (黑蝇)、*Phlebotomus* sp. (沙蝇)、*Musca domestica* (家蝇) 和 *Ceratitis capitata* (地中海果蝇) 中的任一种。但是, 优选的是地中海果蝇。

优选地, 所用的启动子是强启动子。可以使用两类供选择的启动子: 诱导型和组成型启动子。

10 诱导型启动子包括例如热激启动子。优选地, 热激启动子是昆虫热激启动子, 例如黑尾果蝇 (*Drosophila melanogaster*) hsp 70 启动子, 它能驱动基因在异种生物体中的表达, 异种生物体包括地中海果蝇。本发明还包括使用地中海果蝇 hsp 70 启动子 (Papadimitriou 等人, (1998), *Insect Mol Biol* 7:279 - 90)。供选择的系统可以
15 基于用抗生素四环素的诱导 (Heinrich 和 Scott, *PNAS* 97:8229 - 8232, 2000)。

热激启动子通过提高培养地中海果蝇的条件温度来诱导。例如, 在 23 - 25°C, hsp70 启动子处于低活性或者根本没有活性。这使得昆虫幼虫发育而没有由生产异种蛋白质诱导的应激。然而, 在更高的温度, 如 37 - 42°C, hsp70 启动子被诱导并且高水平地表达异种蛋白质。
20

诱导型启动子可以基于已知的诱导型基因控制元件来构建。例如, 可以通过结合反应于药物或激素的元件来构造诱导型启动子, 所述药物或激素可以在食物中用药。在一种优选的实施方案中, 可以使用人的雌激素效应元件 (ERE) 来调节感兴趣的蛋白质的表达, 只要昆虫
25 被表达人体雌激素受体的第二种编码序列转化。

组成型启动子也可以用来在昆虫幼虫中表达感兴趣的蛋白质和/或其它要求的蛋白质。例如, 组成型启动子可以是细胞质肌动蛋白启动子。黑尾果蝇细胞质肌动蛋白启动子已经被克隆 (Act5C) 并且在蚊子
30 中是高度活跃的 (Huynh 和 Zieler, (1999), *J. Mol. Biol.* 288:13 - 20)。细胞质肌动蛋白基因及其启动子和可以从其它昆虫包括地中海果蝇中分离。

其它实例包括细胞质微管蛋白启动子，例如地中海果蝇细胞质微管蛋白启动子。

可以使用控制分泌的多肽的启动子，任选与适当的信号序列一起使用，来引导蛋白质到血淋巴的分泌。例如，可以使用幼虫血清蛋白质启动子 (Benes 等人, (1995) Mol. Gen. Genet. 249 (5): 545 - 56).

幼虫的饲养

地中海果蝇的大量饲养技术已经高度发达。现存的大量饲养设备每周生产 10 亿只苍蝇。这些苍蝇用于通过不能繁殖的昆虫技术进行地中海果蝇害虫控制：在蛹阶段通过暴露于辐射使它们不能繁殖，然后在现场释放。

在 25°C，地中海果蝇的生命周期约为 25 天，雌性通常产 100 - 200 个卵。作为所有完全变态的昆虫，地中海果蝇有四个不同的发育阶段：胚胎 (持续约 2 天)、幼虫 (约 8 天)、蛹 (约 10 天) 和成虫。在成虫寿命的 4 - 6 天内完成性成熟。恰好在蛹化前，每个幼虫质量约为 10 mg，含有约 200 毫克蛋白质。

对于蛋白质生产，通过合适的温度变化方案，在不同时间开始的幼虫培养可以同步进行。这是可能的，因为生长速度取决于环境温度；在 18°C，幼虫生长速度降低约 50%。

对于实验室规模的生产，使用更小的昆虫如果蝇是优选的。虽然每个幼虫生产较少的蛋白质，但是，生命周期短，可以迅速建立生产。例如，果蝇的生命周期 12 天，1 毫克幼虫每次生产 20 微克蛋白质。

仅仅为了举例说明，在下列实施例中描述本发明。

实施例

实施例 1: 在地中海果蝇和果蝇幼虫中生产 GFP

已经在地中海果蝇、地中海实蝇中以及实蝇黑尾果蝇中表达了来自水母 *Aequoria victoria* 编码绿色荧光蛋白的基因。在其基因组中含有单一或多个 Minos/GFP 转座子插入的转基因果蝇和地中海果蝇幼虫、蛹和成虫表现出 GFP 特征荧光。使用两种 GFP 构建体，一种具有诱导型启动子 (果蝇 Hsp70)，一种具有组成型启动子 (果蝇肌动蛋白 5C 启动子)。具有 Hsp70/GFP 基因的果蝇和地中海果蝇幼虫在通常的饲养温度 (22°C) 下呈现低水平的荧光，在较高的温度 (39°C) 下暴露 1 小时后呈现增高的荧光。具有肌动蛋白 5C/GFP 基因的果蝇幼虫呈现组成型

高水平的 GFP 荧光。GFP 如果不是在果蝇和地中海果蝇的所有组织中表达，也会在大部分组织中表达。使用免疫印迹测定在转基因昆虫中也检测到 GFP 蛋白质。数种转基因系的比较表明，GFP 表达量取决于转基因的整合位置和在基因组中存在的转基因拷贝数量。

5 材料和方法

蝇和 DNA 注入：将果蝇 yw 株和地中海实蝇 A71 株，wi 基因为纯合的白眼株用于所有的实验中，蝇在标准条件下在 22°C 饲养。使用如前所述的囊胚前期的胚胎进行转座子质粒与辅助质粒表达转座酶一起的 DNA 注入 (Loukeris 等人, 1995, Science (科学))。

10 质粒构建和 DNA 分析：

质粒 pMiHsp70/GFP 通过以适当的方向向质粒 pHSS6Hsp70PT 的多个克隆位点插入含有 GFP 基因的 PCR 扩增片断而构建。质粒 pHSS6Hsp70PT 含有以适当的方向排列的启动子和 3' mRNA 尾——黑尾果蝇的 Hsp70 基因的聚腺苷酸化信号(下文称为‘终止子’)。启动子和终止子通过多个克隆位点分开。为了提高 mRNA 的稳定性，Hsp70 启动子还含有 Hsp70 mRNA 的 5' 非翻译前导序列。启动子/GFP/终止子盒然后作为 NotI 片断克隆到含有地中海果蝇白色基因的野生型 cDNA 的 Minos 载体中、(Loukeris 等人, 1995, Science (科学))。白色基因用作检测转化体的主要可见基因标记 (Loukeris 等人, 1995, Science (科学))。PMiHspGFP/HspCcW 转座子的结构表示在图 1 中。

质粒 pMiAct5CGFP (图 2) 包含含有 Actin5C 基因的启动子的黑尾果蝇 2kb 片断下游的 GFP 基因，它编码了普通表达的细胞质肌动蛋白。质粒 pMiAct5CGFP 不含白色基因作为主要标记，用这种质粒产生的转化体仅以 GFP 的表达鉴别(见下文)。

25 在典型的转基因实验中，转座子质粒 DNA 与辅助质粒 DNA 的混合物被共同注射到眼睛颜色突变为白色的纯合果蝇或地中海果蝇的囊胚前期产卵后 0-1 小时的胚胎中。为了检测转基因的地中海果蝇，来自被注射胚胎的蝇 (G0 代) 通过与受体株回交来繁殖，并且分别检验它们的后代在幼虫阶段表达白色基因 (用 pMiHspGFP/HspCcW 注射的蝇) 或
30 GFP (用 pMiAct5CGFP 注射的蝇)。白色的表达由于眼睛颜色从白色变成有色 (从浅黄到野生型红色变化) 可以检测。GFP 的表达可以在使用标准表面荧光显微术在 39°C 每隔 1 天进行的两次连续的 1 小时热处理后的

幼虫组织中检测 GFP 特异性荧光来监测。

各个转基因幼虫 (G1 代) 通过与受体株回交来繁殖, 白色或 GFP-表达后代 (G2) 种间杂交产生纯合后代 (G3)。眼睛颜色的强度或 GFP 荧光的强度取决于基因剂量。所以通过下列这些表型在 G3 后代中检测纯合个体。使推定的纯合 G3 进行种间杂交, 并用 DNA 印迹分析它们的后代, 以确定它们是否含有单一或多个插入。通过这种过程确立了用于单一插入的纯合株。

GFP 在果蝇和地中海果蝇幼虫中的热诱导型表达

与未转基因的幼虫相比, 在 22 - 24°C 的标准温度生长的对 MiHspGFP/HspCcW 转座子的插入为纯合的转基因果蝇和地中海果蝇幼虫呈现出低的 GFP 荧光水平, 但是可以检测到。在热激后荧光急剧增强 (图 3)。

GFP 在果蝇中的组成型表达

与未转移基因的成虫蝇 (图 4) 和幼虫 (图 6) 相比, 在 22 - 24°C 的标准温度生长的 MiAct5CGFP 转座子的插入为纯合的转基因果蝇同型结合表现出高的 GFP 荧光水平。该荧光水平是基因剂量依赖性的 (图 5)。

在超过 1000 只用 MiAct5CGFP 注射的 G0 的后代中检测到没有 GFP 表达的地中海果蝇。我们推断, 果蝇肌动蛋白 5C 启动子在地中海果蝇中是一种弱启动子, 并且在地中海果蝇中必须使用同源的肌动蛋白启动子, 以获得高含量的异种蛋白的组成型表达。

对于 GFP 表达, 将数种对 MiAct5CGFP 为纯合的果蝇转基因系相互比较。虽然所有的系表现高荧光水平, 但是可以检测到强度方面的各系特有的差异。

25 实施例 2: 人生长激素在地中海果蝇幼虫中的生产

对于 Hsp70 热激基因, 在黑尾果蝇启动子的下游克隆编码 hGH 的 cDNA 序列。Hsp70 启动子还包含 Hsp70 mRNA 的 5' 非翻译前导序列, 以提高 mRNA 稳定性。黑尾果蝇 Hsp70 的 3' 非翻译含有聚腺苷酸化信号, 它在 hGH 编码序列的下游克隆。在也含有标记构建体的 Minos 载体中插入该构建体。该标记构建体由被黑尾果蝇 Hsp770 启动子驱动的来自 *Aequoria victoria* 的绿色荧光蛋白质 (GFP) 基因组成, 并含有 Hsp70 的 3' 区。这种标记给予转基因生物体可见的基因型 (GFP 荧光),

并用于在胚胎、幼虫或成虫阶段检测转基因的地中海果蝇。所以，完全的转座子的总体结构为：

Minos 左反向重复-hGH 表达构建体-GFP 标记表达构建体-Minos 右反向重复。

5 在 BlueScript 载体中在大肠杆菌中构建转座子。

编码 Minos 转座酶的体外合成 mRNA 在转基因实验中用作转座酶来源。使用含有从噬菌体 T7 启动子和市售 T7 RNA 聚合酶在下游克隆的转座酶基因的表达载体质粒作为模板体外合成 mRNA。通过从表达 Minos 转座酶的转基因黑尾果蝇得到的 Minos mRNA 的反向转录，获得了完全未间断的编码 Minos 转座酶的 DNA 序列。

含有转座子的质粒 DNA 与 Minos 转座酶 mRNA 一起共同注射到囊胚前期(产卵后 0-1 小时)胚胎中。在文献中(Loukeris 等人, 1995 年)已经描述了地中海果蝇胚胎处理和注射的条件。在这些条件下, 预计由注射后的胚胎衍生的能繁殖的蝇的 10 - 20%能产生转基因后代。为了检测转基因的地中海果蝇, 由注射后的胚胎(G0 代)衍生的蝇与受体株回交来繁殖, 并且单个检测它们的后代 GFP 表在幼虫阶段的 GFP 表达可以使用标准表面荧光显微术 39°C 下每隔 1 天进行的在两次连续的 1 小时热处理后的幼虫组织中检测 GFP 特异性荧光来完成。

通过回交到受体株中培养个体转基因幼虫(G1), 并使个体 GFP 表达后代(G2)杂交, 以产生纯合的后代(G3)。纯合的 G3 个体通过定量表面荧光显微术测量 GFP 表达可以检测。建立单一插入为纯合的株。

在这些转基因株中, 转基因表达的量不仅取决于启动子和诱导条件, 而且取决于转基因插入点。对于 hGH 表达水平, 测试了数种独立获得的株(即从不同 G0 蝇衍生的株), 并且表现最高水平的株在分子和细胞遗传水平上进一步体现其特征。分子鉴定由 DNA 分析和转基因的克隆和测序组成, 后两种是对于最终用于蛋白质生产株的。细胞遗传鉴定通过在唾腺多线染色体上原位杂交, 以确定插入的染色体点而完成。

为了构建有多个插入的株, 在不同株的成员间进行适当的杂交。这些杂交的后代进行品种间杂交, 并使用 GFP 作为标记重获多个纯合个体。取决于插入的染色体位置, 携带平衡器染色体的株可以用来促进这些构建。需要 3 - 4 代来构建具有多个插入的稳定株。

根据已建立的程序进行幼虫的大规模喂养。用半干食物喂养幼虫，这些半干食物由添加酵母的糠碱 (bran base) 组成。通过合适的温度变化使幼虫生长同步，并将第三龄期幼虫在 39-41°C 处理最大诱导转基因所需的时间。使第三龄期晚期的幼虫离开食物，寻找蛹化的地点。这种行为用于在规模喂养设备中从规模蝇生产的食物中收获幼虫；它还可以用于收获不用食物的幼虫以便进行蛋白生产和纯化。

地中海果蝇幼虫用冷冻盐水洗涤，然后在蛋白酶抑制剂的存在下均质化。根据标准方法从均质化物中提纯 hGH。

实施例 3: 在地中海幼虫中生产 camelid 抗体

设计用于在幼虫血淋巴中表达蛋白质的载体表示在图 7 中。Lsp/L 是果蝇或地中海果蝇幼虫血清蛋白质 (Lsp) 基因的启动子 (Benes 等人, (1995), Mol. Gen. Genet. 249(5):545-56), 然后是 Lsp 5' 非翻译前导序列 (条形框) 和 Lsp 信号肽 (黑框)。感兴趣的基因, 在这种情况下是 camelid 抗体基因, 在框中融合到前导肽中。HspP 和 HspT 分别是热激 70 基因启动子和终止子。CcW 是地中海果蝇白色基因, 用作检测转化体的显性可见标记。MiL 和 MiR 是 Minos 元件的末端。

从噬菌体表达库 (Unilever) 分离 camelid 抗体。该抗体对于猪逆转录病毒 PERV (猪内源性逆转录病毒) 是特异的并且识别 PERV gag 蛋白质 (病毒核心蛋白质) 的 p30 成分。p30 克隆在表达载体 pHEN1 中表达, 以便获得筛选抗体库的抗原, 因此选择抗体克隆。在本实验中所用的抗体的预知序列和翻译在图 8 中列出。

与实施例 1 一样, 由白色基因表达鉴别转基因蝇。在转基因蝇幼虫的血淋巴中检测抗体的表达。

通过均质化幼虫提取物并由蛋白 A 柱层析纯化抗体。免疫球蛋白在 pH 为 8.6 时结合到蛋白 A, 并在 pH 为 4.3 时从柱中洗脱。因此, 通过降低蛋白 A 柱的 pH 值完成了洗脱。蛋白 A 琼脂糖 (0.25g; Sigma) 在三氨基甲烷盐酸缓冲的盐水 (0.05M 三氨基甲烷盐酸缓冲液, 0.15M NaCl, pH 值为 8.6) 中溶胀, 然后装入柱 (柱床体积为 1 毫升)。通过加入稀释 NaOH 溶液把培养物上清液调节到 pH 值为 8.6, 然后在 4°C 用 600 g 离心 30 分钟。在装载样品后, 蛋白 A 柱用 pH 值为 8.6 的三氨基甲烷盐酸缓冲盐水洗涤, 直到没有蛋白质从柱中洗脱。然后, 用 PBS (0.05 M 磷酸盐/0.15 M NaCl, pH 值为 7.0)、柠檬酸盐缓冲液 (0.05

M 柠檬酸盐/0.15 M NaCl, pH 值为 5.5) 和醋酸盐缓冲液 (0.05 M 醋酸盐/0.15 M NaCl, pH 值为 4.3) 逐步洗脱, 直到洗脱出抗体。收集对应于 A280 峰的部分, 在 0.01xPBS 中渗析, 冻干, 在 500 微升 PBS 中重新溶解, 并在 -70°C 储存。通过 SDS/PAGE 分析蛋白质峰的纯度。通过用甘氨酸缓冲液 (0.05 M 甘氨酸/HCl/0.15 M NaCl, pH 值为 2.3) 洗涤, 然后用三氨基甲烷盐酸缓冲液 (pH 值为 8.6, 含有 0.02% 的 NaN₃) 洗涤再生所述柱。

使用如上所生产的固定化的 p30 抗原和标记的鼠科抗 camelid 单克隆抗体进行 ELISA 测定。因此证实了从 PERV p30 的地中海果蝇洗脱的抗体的特异性。

实施例 4: 在地中海果蝇幼虫中人 α -葡萄糖苷酶的生产

构建根据实施例 1 的热诱导型转座子表达系统, 使用人 α -葡萄糖苷酶基因 (GenBank GI:182907) 代替 GFP 基因。

与实施例 1 一样, 转座子质粒 DNA 和辅助质粒 DNA 的混合物被共同注射到用于眼睛颜色突变为白色的纯合果蝇或地中海果蝇的囊胚前期 (产卵后 0 - 1 小时) 的胚胎中。为了检测转基因地中海果蝇, 由来自被注射胚胎的蝇 (G0 代) 通过回交到受体株繁殖, 在幼虫阶段分别检测后代中白色基因的表达。在眼睛颜色从白色变成有色 (从浅黄变成野生型红色) 时, 可以检测白色基因的表达。

通过回交到受体株繁殖个体转基因幼虫 (G1), 并使个体白色基因后代 (G2) 杂交, 以产生纯合后代 (G3)。眼睛颜色的强度取决于基因剂量。所以, 在 G3 后代中, 通过下列这些表型检测纯合的个体。使推定的纯合 G3 个体杂交, 并且对它们的后代进行 DNA 印迹分析, 以确定它们是含有单一的插入, 还是含有多个插入。单一插入的纯合株通过这种方法建立。

α -葡萄糖苷酶在果蝇和地中海果蝇幼虫中的热诱导型表达

根据 Umaphysivam 等人, Clin Chem 2000 46(9):1318-25 的免疫定量法所评估的, 与在脂垫中的未转基因幼虫相比, 在 22 - 24°C 的标准温度下生长的对 MiHsp α -葡萄糖苷酶/HspCcW 转座子的插入为纯合子的转基因果蝇和地中海果蝇幼虫表现出低但可以检测 α -葡萄糖苷酶量。 α -葡萄糖苷酶在热激后明显增加。

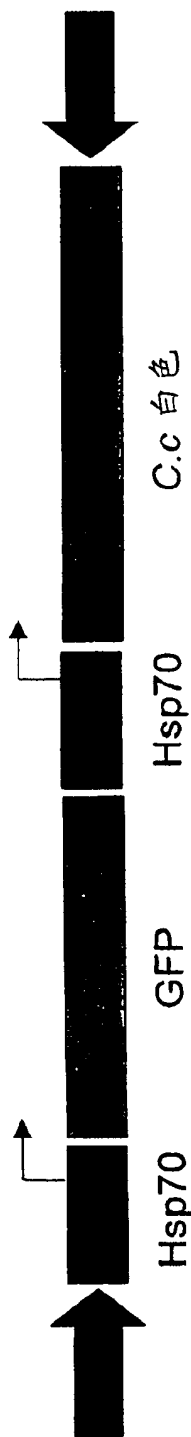


图 1

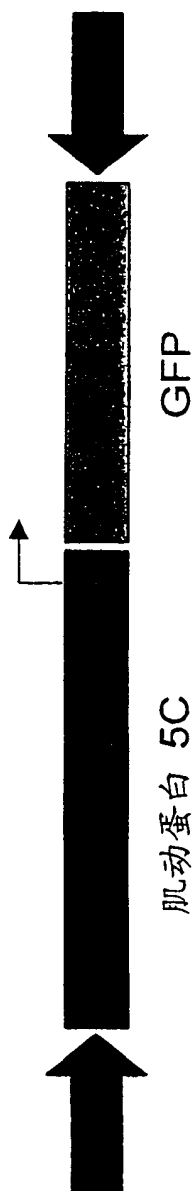
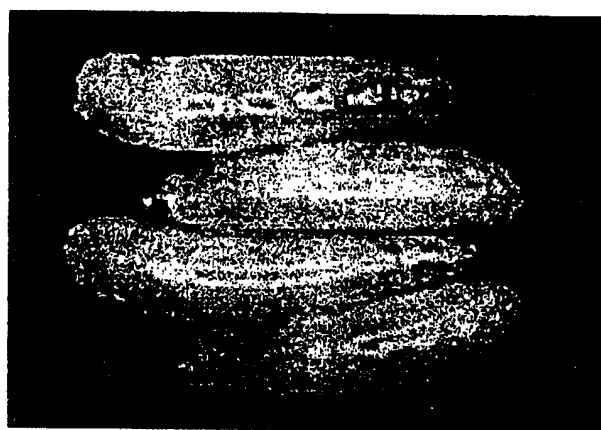
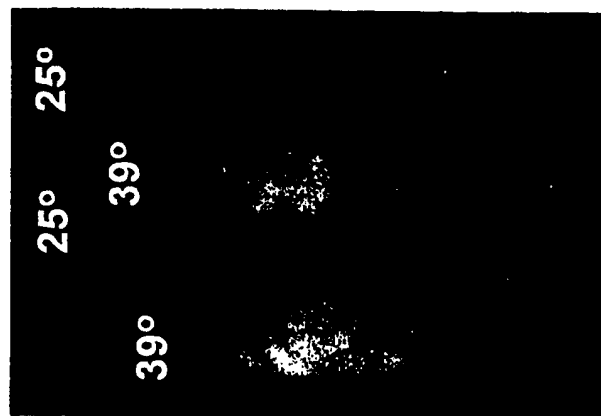


图 2



第二龄期幼虫

地中海果蝇成虫

图 3



4
图

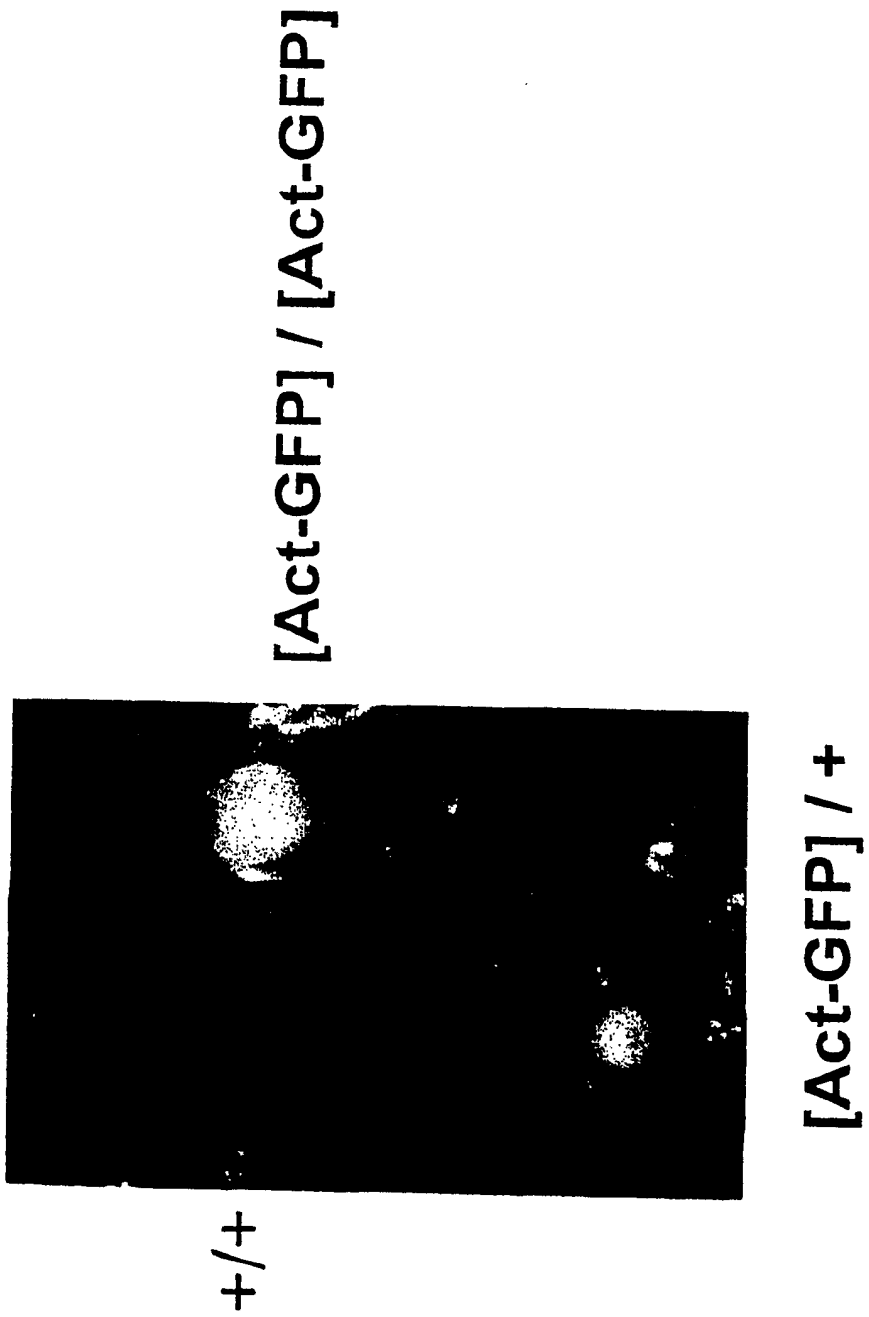
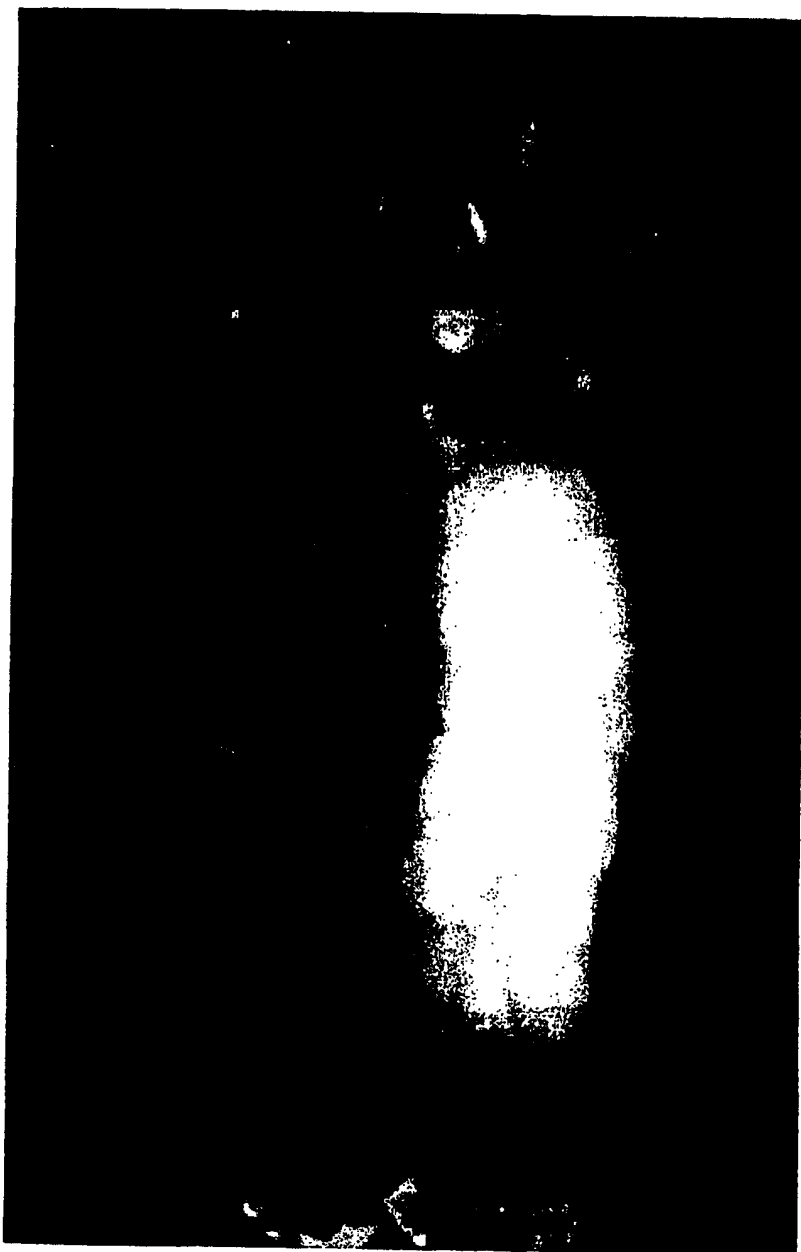


图 5



6



蛋白质在幼虫白淋巴中表达的载体。LspP/L是果蝇或地中海果蝇幼虫血清蛋白(Lsp)基因, 然后是Lsp 5'未翻译前导(条纹框)和Lsp信号肽(黑框)。感兴趣的基因在框架中融合到引导肽中。HspP和HspT分别是热激70基因启动子和终止子。CcW是地中海果蝇白色基因, 用作检测转化体显性可见标记。MiL和MiR是Minos元件的末端。

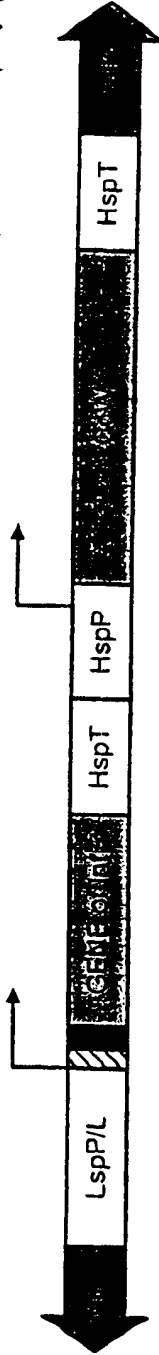


图 7

4G3.txt(1-660) 的翻译
通用编码

```

1 AAATTCTATTTC AAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA
1 K F Y F K E T V I M K Y L L P T A A A G
1 N S I S R R Q S * * N T Y C L R Q P L D
1 I L F Q G D S H N E I P I A Y G S R W I

61 TTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGA
21 L L L L A A Q P A M A Q V Q L Q E S G G
21 C Y Y S R P S R P W P R C S C R S P G E
21 V I T R G P A G H G P G A A A G V R G R

121 GGCTCGGTGCAGCCTGGGGGTTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGTCTCTGGACTCAGCCCG
41 G S V Q P G G S L R L S C V V S G L T P
41 A R C S L G V L * D S P V * S L D S R R
41 L G A A W G F S E T L L C S L W T H A G

181 GGCTATGATTCCATAGGCTGGTTCGCCAGGCCAGGGGAGGAGCGCGAGGGAGTCTCT
61 G Y D S I G W F R Q A P G K E R E G V S
61 A M I P * A G S A R P Q G R S A R E S L
61 L * F H R L V P P G P R E G A R G S L C

241 GCTATTAGTCTCGGCGGGGTGCCACTTACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTACC
81 A I S L G G G A T Y Y A D S V K G R F T
81 L L V S A A V P L T M Q T P * R A A S P
81 Y * S R R R C H L L C R L R E G P L H H

301 ATCTCCAAAAACAACGCCAAGACGACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAACCCTGAC
101 I S K N N A K T T V Y L Q M N S L N P D
101 S P K T T P R R R C I C K * T A * T L T
101 L Q K Q R Q D D G V S A N E Q P E P * R

361 GACACGGCCGTTTATTACTGTGCTGCCATGGGGAGGTGGAGGGCGCCGTACTGGGGCCAG
121 D T A V Y Y C A A M G R W R A P Y W G Q
121 T R P F I T V L P W G G G G R R T G A R
121 H G R L L L C C H G E V E G A V L G P G

421 GGGACCCTGGTCACGGTCTCCTCAGCGCACCACAGCGAAGACCCAGCTCCGCGGGCCGCC
141 G T L V T V S S A H H S E D P S S A A A
141 G P W S R S P Q R T T A K T P A P R P P
141 D P G H G L L S A P Q R R P Q L R G R P

481 CATCACCATCACCATCAGGGGCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT
161 H H H H H H G A A E Q K L I S E E D L N
161 I T I T I T G P Q N K N S S Q K R I * M
161 S P S P S R G R R T K T H L R R G S E W

541 GGGCCGCATAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAACCTCATACAGAAAATTCATTTACT
181 G A A * T V E S C L A K P H T E N S F T
181 G P H R L L K V V * Q N L I Q K I H L L
181 G R I D C * K L F S K T S Y R K F I Y *

601 AACGTCTGGAAAGCGACAAAACCTTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGGCTGTCTCTCGA

```

图 8