

## 人促红细胞生成素在转基因小鼠乳汁中表达<sup>\*</sup>

潘 玲<sup>1</sup> 徐 冲<sup>4</sup> 李光三<sup>2</sup> 杜 森<sup>2</sup>  
劳为德<sup>2</sup> 陈常庆<sup>3</sup>

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031) (中国科学院发育生物学研究所 北京 100070)  
(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233) (中国科学技术大学生物系 合肥 230026)

**摘 要** 将山羊的  $\beta$  乳球蛋白启动子连接人促红细胞生成素基因, 构建转基因表达载体。通过显微注射的方法转基因小鼠。经 PCR 斑点杂交和 Southern 杂交检测验证, 获得 4 只转基因阳性小鼠, 其中 3 只母鼠哺乳期收集乳汁, 经 Epo-ELISA 检测为阳性。对 4 组转基因阳性小鼠的部分子代母鼠, 经 PCR 和 Southern 杂交分析, 又鉴定出 6 只获得遗传的阳性  $G_1$  代母鼠以 Dot-ELISA 的方法检测, 其中两只  $G_1$  代母鼠乳汁中的 Epo 含量为  $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 。实验证实 867bp 的  $\beta$  乳球蛋白启动子可以指导人促红细胞生成素在小鼠乳汁中表达。

**关键词** 山羊  $\beta$  乳球蛋白启动子 人促红细胞生成素 乳腺表达 转基因小鼠

**分类号** Q26 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0028-34

自从 Gordon 等人于 1987 年首次报道采用转基因方法从哺乳期小鼠中分泌得到有生物活性的人组织纤溶酶原激活剂(tPA)<sup>[1]</sup>以后, 引起人们对利用转基因动物的乳腺表达生产目的蛋白的极大兴趣, 很快就出现了转基因兔、转基因羊、转基因牛和转基因猪<sup>[2~5]</sup>。由于动物在哺乳期, 乳腺能大量合成蛋白质并分泌到乳汁中, 因而可以通过转基因动物的乳腺表达并从乳汁中分离得到目的蛋白, 实现廉价的大规模生产。

人促红细胞生成素(简称 Epo)是一种红细胞造血刺激因子。它能刺激人的红系造血干细胞的增殖分化, 调节和维持血液红细胞生理水平。在胎儿期, Epo 主要由肝脏分泌, 成人期由肾脏的肾小球旁器分泌, 受血液中氧分压及氯化钴的调节。在医学临床, 它具有重要价值。主要用于肾性贫血、再障、感染性贫血等。由于天然 Epo 量微极难提取, 大肠杆菌表达系统又无法完成它的糖基化加工, 目前国内外均采用 CHO 细胞表达生产 Epo, 但是细胞表达的成本比较昂贵, 而用转基因动物生产 Epo, 可能是一条十分理想的途径。我们将构建的 pGEM-7z(+)- $\beta$ -LG-Epo 表达载体转基因小鼠, 经 PCR 扩增、斑点杂交和 Southern 杂交检测证实, 有 4 只转基因阳性小鼠。其中 3 只母鼠在哺乳期, 采集乳汁, 用 Epo-ELISA 检测为阳性。又从部分  $G_1$  代母鼠中筛出 6 只获得遗传的小鼠, 经 Dot-ELISA 检测, 其中两只母鼠乳汁中 Epo 含量为  $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 。实验证实 867bp 的山羊  $\beta$ -LG 启动子可以指导外源基因在转基因小鼠乳汁中表达。

<sup>\*</sup> 国家“八·五”羊个体表达基金资助(No. 85-722-06-03)。

收稿日期: 1997-11-03, 修回日期: 1998-07-13。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒:**菌种 Charon 4A Epo 购自美国 ATCC,它含有 19kb 的 *Eco*RI 片段,带有完整的 Epo 基因。提取的噬菌体 DNA 经 *Eco*RI, *Hind*III, *Bam*HI 分别酶切鉴定,证明与 ATCC 提供的鉴定图谱相符。

pGEM-7z(+) 购自中国华美公司。pGEM-3zf(+), JM109 由本实验室提供。pGEM-3zf(+)  $\beta$ -LG 质粒自己构建<sup>[6]</sup>。

**1.1.2 限制酶:**T4 多核苷酸激酶, T4DNA 连接酶等购自美国 Promega 公司, DNA 序列试剂盒购自美国 USB 公司,  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP 购自英国 Amersham 公司, Sephaglas Band Prep 试剂盒为 Pharmacia 公司的产品。细胞培养试剂和 Epo-ELISA 试剂盒, 均购自 Boehringer Mannheim 公司。

**1.1.3 动物:**昆明种小白鼠由中科院发育所动物房提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 转基因表达载体 pGEM-3zf(+)  $\beta$ -LG-Epo 的构建:**重组 DNA 操作, 参照《分子克隆》<sup>[7]</sup>。将 Charon 4A Epo DNA 分别以 *Hind*III, *Bam*HI 酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳回收 5.4kb 的 *Hind*III/*Bam*HI 片段, 插入 pGEM-7z(+) 载体, 得到 pGEM-7z(+)Epo1, 为了在 Epo 信号肽前面直接连接山羊  $\beta$ -LG 启动子, 我们将 pGEM-7zf(+)Epo 用 *Sca*I/*Bam*HI 双酶切得到信号肽上游 600bp 被删除的 4.8kb Epo 片段, 然后通过 2 个 34 聚的合成接头片段重新补齐被删去信号肽 N 端 6 个氨基酸的编码顺序, 并且增加 *Hind*III 顺序, 接头片段的碱基序列为 5' TCG AAG CTT ATG GGG GTG CAC GGT GAG TAC TAA C 3'(F1) 和 5' GTT AGT ACT CAC CGT GCA CCC CCA TAA GCT TCG A 3'(F2)。分别取 F1 和 F2 片段各 0.2OD(18 $\mu$ L) 加入 2 $\mu$ L 10 $\times$  酶切缓冲液于微量离心管中, 置 85 $^{\circ}$ C 水浴 5min, 自然冷却至 28 $^{\circ}$ C, 用 *Hind*III 和 *Sca*I 切出粘性末端, 另外, 将 pGEM-7z(+) 用 *Hind*III 和 *Bam*HI 切开, 并与上面得到的 4.8kbEpo 基因和接头片段一起进行 3 片段连接, 经克隆筛选得到 pGEM-7z(+)Epo2。

将 pGEM3zf(+)  $\beta$ -LG 用 *Bam*HI 酶切, Klenow 酶补平, 再以 *Eco*RI 酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收 867bp 的  $\beta$ -LG 片段, 插入 pGEM-7zf(+)Epo-2 质粒的 Poly linker 的 *Eco*RI, *Cla*I 位点构建成 pGEM-7z(+)  $\beta$ -LG Epo-2。

**1.2.2 转基因小鼠的制备和 DNA 检测:**酶切转基因目的片段用 Sephaglass Band Prep kit 回收。DNA 稀释液溶解, 定量为 1~3 $\mu$ g/mL。转基因小鼠操作依《小鼠胚胎操作实验方法》<sup>[8]</sup>。转基因小鼠 4 周龄时作耳朵标记剪取鼠尾 2cm, 按《分子克隆》<sup>[7]</sup>方法提取组织 DNA。采用 PCR 斑点杂交和 Southern 杂交方法进行转目的基因的检测。引物的设计是选用山羊  $\beta$ -LG 启动子的上游序列作为 PCR 检测的正向引物(引物 1: 5' ACC AGA ATTCCC GCT GCT CCT GAG 3'), 而反向引物则选择在编码 Epo 信号肽第 3 个氨基酸及部分第一内含子基因的互补序列(引物 2: 5' AGC CCG CGA GTA CTC ACC GTG CAC 3') 扩增出的片段大小为 870bp 左右。PCR 操作依 Saiki 方法<sup>[9]</sup>。

由于小鼠 DNA 没有  $\beta$ -LG 基因, 故采用 867bp 的  $\beta$ -LG 启动子片段作为探针进行斑

点杂交检测。在筛选  $G_0$  代转基因阳性小鼠时,PCR 样品的电泳区带不够清晰,因而在 PCR 电泳之后,先转移到尼龙膜上,再用  $\beta$ -LG 启动子片段作为探针进行杂交检测,获得较好的结果。

**1.2.3 转基因小鼠的乳汁 Epo 检测:**经鉴定的转基因阳性小鼠于 6 周龄时,分别与正常雄鼠或母鼠交配,21d 以后产幼鼠。母鼠分别于哺乳期的第 3、5、7 天取奶样,先将母鼠与幼鼠隔离 3h,腹腔注射催产素  $0.1\text{u}/20\mu\text{L}$ 。1h 以后,麻醉母鼠,轻轻按摩母鼠的乳腺,取奶样约  $50\sim 100\mu\text{L}$ , $-70^\circ\text{C}$  冻存。收集的乳汁样品进行 1:1 稀释,采用 Epo-ELISA 检测试剂盒并按照试剂盒说明书所提供的方法,进行 Epo 检测操作。Dot-ELISA 测定,依《单克隆抗体技术手册》<sup>[10]</sup>,由南京大学生化系帮助测定。

## 2 实验结果

### 2.1 转基因表达载体 pGEM-7zf(+)β-LG Epo-2 的构建

由上述方法得到的 pGEM-7zf(+)Epo-1 经 Sanger 的双脱氧末端终止法测序,结果与国外文献发表的人 Epo 基因组的核苷酸序列的相应片段无任何差异<sup>[11]</sup>。说明我们采用的人 Epo 基因完全正确。pGEM-7zf(+)Epo-2 的测序也证实 *Hind*III 位点移到 Epo 基因的信号肽上游,与原设计完全相符。

pGEM-7zf(+)β-LG-Epo2 质粒,由于 β-LG 基因片段 *Bam*HI 补平,再与补平的 *Cla*I 相连,则恢复了 *Bam*HI 位点,故构建的 β-LGEpo2 质粒, *Eco*RI, *Bam*HI 双酶切,仍可切出 0.87kb *Eco*RI/*Bam*HI 片段。 *Sca*I 酶切可以切出近 2kb 的 *Sca*I 片段。 *Kpn*I 位点位于 Epo 基因内是质粒中的单一酶切位点, *Eco*RI 和 *Kpn*I 可以切出的片段 1.5kb(见图 1)。它说明 pGEM-7zf(+)β-LG Epo-2 构建正确,符合设计要求。

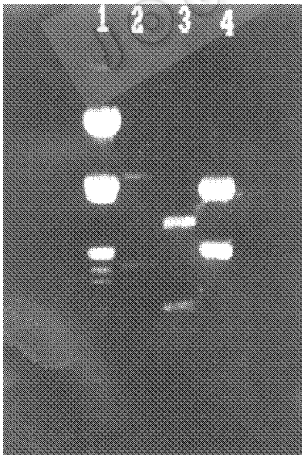


图 1 重组质粒 pGEM-7zf(+)β-LG-Epo-2 限制酶消化的琼脂糖电泳照片

Fig.1 Restriction analysis of pGEM-7zf(+)β-LG-Epo-2

1.  $\lambda$ DNA/*Eco*RI + *Hind*III
2. pGEM-7zf(+)β-LG-Epo2/*Eco*RI + *Kpn*I
3. pGEM-7zf(+)β-LG-Epo2/*Eco*RI + *Bam*HI
4. pGEM-7zf(+)β-LG-Epo2/*Sca*I

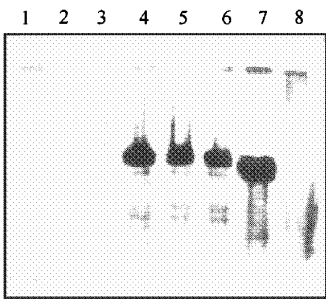


图 2  $G_0$  代组织 DNA Southern 杂交

Fig.2 DNA Southern result of  $G_0$  transgenic mice  
1. DNA of normal mice as control sample 2. BE3  
3. BE6 4. BE1 5. BE2 6. BEb 7. pGEM-7zf(+)β-LG-Epo2 digested by *Eco*RI (8.6kb fragment)  
8.  $\lambda$ DNA *Eco*RI, *Hind*III (not shown)

Note Southern blot of mouse genetic tail DNA from six  $G_0$  transgenic mice and one control digested with *Kpn*I, the plasmid pGEM-7zf(+)β-LG Epo-2 as injected 8.6kb fragment digested with *Eco*RI, hybridized with 867kb β-LG probe. Some of them reveals the expected

2.2 转基因小鼠的制备

pGEM-7z( + ) $\beta$ -LG Epo2 经 *Eco*RI 酶切成线性后回收 ,用 DNA 稀释液溶解。再以显微注射法导入受精卵的原核。一共注射了 447 个受精卵细胞。出生的小鼠 ,经 PCR ,斑点杂交分析 ,获得 7 只初步鉴定为阳性的小鼠 3 只母鼠 4 只雄鼠。并进一步 Southern 杂交分析( 见图 2 )。由于 DE8 8 周龄时病死 ,保留的 DNA 降解。BEa 挤奶时 ,麻醉致死 ,保留的 DNA 亦降解 ,所以 Southern 检测仅作了 5 份样品。样品用 *Kpn*I 酶切 ( 此酶是注射片段中的单一位点 ) ,并将 pGEM-7z( + ) $\beta$ -LG Epo-2 酶切成线性作对照 ,结果 BE1 , BE2 ,BEb 出现与注射基因片段相近大小的杂交目的片段。其中 BE3 和 BE6 ,未见杂交区带 ,故 PCR 和斑点杂交结果可能为假阳性 ,而且对其子代进行 PCR 分析 ,亦为阳性结果 ,排除 BE3 ,BE6 为转基因阳性小鼠。BEa 虽然没有 Southern 杂交结果 ,但对其子代进行 PCR 和 Southern 杂交分析检出为阳性 ,推论 BEa 应为转基因阳性小鼠。由于 BE8 无法获得肯定结论 ,故认为一共获得 4 只  $G_0$  代转基因阳性小鼠( BE1 ,BE2 ,BEa 和 BEb 见表 1 )

表 1  $G_0$  代小鼠 DNA 检测结果

Table 1 The DNA detection of  $G_0$  transgenic mice

| Transgenic mice with positive PCR analysis | Sex | Dot blot | Southern | Note                                    |
|--------------------------------------------|-----|----------|----------|-----------------------------------------|
| BE1                                        | ♀   | +        | +        |                                         |
| BE2                                        | ♂   | +        | +        |                                         |
| BE3                                        | ♂   | +        | -        |                                         |
| BE6                                        | ♂   | +        | -        |                                         |
| BE8                                        | ♂   | +        | Not done |                                         |
| BEa                                        | ♀   | +        | Not done | DNA analysis founder line show positive |
| BEb                                        | ♀   | +        | +        |                                         |

将 4 只转基因阳性小鼠的子代 ,作部分母鼠的 PCR 和 Southern 检测 ,以便筛选出遗传获得  $\beta$ -LG Epo 基因小鼠。再进行交配 ,以获得乳汁作 Epo 表达分析。结果如表 2。

表 2  $G_1$  代小鼠的 PCR 和 Southern 检测结果

Table 2 Identification with PCR and Southern of  $G_1$  transgenic mice

| Mice | Founder number | No.( ♂ ) | No.( ♀ ) | PCR number | PCR positive number | Southern positive number |
|------|----------------|----------|----------|------------|---------------------|--------------------------|
| BE1  | 4              | 1        | 3        | 3          | 2                   | 2                        |
| BE2  | 12             | 6        | 6        | 3          | 1                   | 1                        |
| BEa  | 9              | 4        | 5        | 3          | 2                   | 2                        |
| BEb  | 8              | 5        | 3        | 3          | 1                   | 1                        |

首先对  $G_1$  代母鼠 PCR 检测 ,PCR 样品电泳扩增带不够清晰 ,所以选出可见明显 867bp PCR 扩增区带的样品 ,再次电泳 ,并转移到尼龙膜 ,以 pGEM-7z( + ) $\beta$ -LG 经 *Bam*HI/*Eco*RI 双酶切所得的 867bp 片段为探针 ,进行杂交。结果均为阳性( 见图 3 )。再将这个 6 只  $G_1$  代母鼠的 DNA 样品作 Southern 分析 ,亦均为阳性 ,从 Southern 杂交图片上 ,可以观察杂交区带 ,拷贝数存在显著差异 ,未作进一步拷贝数分析( 见图 4 ) ,说明整合的  $\beta$ -LG Epo 基因可通过生殖细胞遗传给下一代。

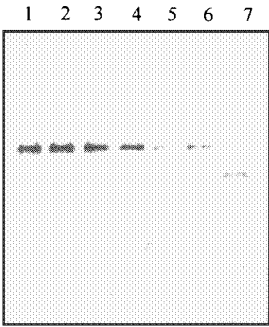


图 3  $G_1$  代转基因母鼠的 PCR 检测

Fig.3 The PCR result of  $G_1$  female mice

1~6.  $G_1$  female mice 7. pGEM7z(+)HaeIII marker

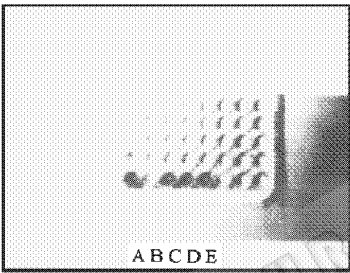


图 5 Epo-ELISA 检测显色结果

Fig.5 The result of the milk samples detected by Epo-ELISA

- A. 50pg of Epo as standard ;
- B. The milk of normal mice ;
- C. The milk of BEa ;
- D. The milk of BEb ;
- E. The milk of BE1

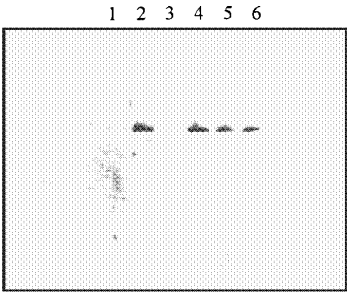


图 4  $G_1$  代母鼠 Southern 杂交

Fig.4 Southern analysis of  $G_1$  female mice

1 3. The progeny of BEa respectively 2. The progeny of BEb  
4 5. The progeny of BE1 respectively 6. The progeny of BE2  
DNA/EcoRI + HindIII marker not shown

Note Same as figure 5 Southern blot of mouse genomic tail DNA from six  $G_1$  transgenic mice ,the 8.6kb band indentified by the probe is indicated.

2.3 转基因小鼠的乳汁 Epo 检测分析

对 BE1 ,BE4 ,BEb 母鼠分别与正常雄鼠交配以后 ,于哺乳期 10d 以内挤乳作 Epo-ELISA 分析 ,均为阳性结果(见图 5) 。BEa ,BEb 母鼠第一次挤乳时 ,麻醉致死。BE1 奶样难取 ,仅作一次 Epo-ELISA 检测分析。从 Epo-ELISA 检测的颜色反应结果观察 ,BEa ,BEb ,BE1 乳汁中均含有 Epo 蛋白 ,1h 以后观察酶标板 ,BE1 样品颜色深蓝。

6 只  $G_1$  代母鼠与正常雄鼠交配 ,产仔以后 ,挤乳测定 Epo 含量。其中 BEa 的两只  $G_1$  代母鼠的乳汁量收集过少 ,无法测定。仅 BE1 的两只  $G_1$  代母鼠乳汁 Epo 含量达 0.5 $\mu$ g/mL ,其余为阴性。它说明导入的  $\beta$ -LG Epo 基因不仅能在小鼠乳腺组织中特异性表达 ,而且能稳定遗传给  $G_1$  代。

3 讨 论

近年将外源基因导入动物胚胎 ,并建立转基因动物已成为研究生物发育 ,细胞分化 ,基因功能和表达调控的重要分子生物学技术。转基因动物的关键之一是外源基因的表达 ,尤其是组织特异性的表达 ,所以首先面临的是选择合适的启动子及调控序列和需要表达的外源基因。

在转基因动物乳腺表达领域  $\beta$  乳球蛋白基因是引人瞩目的 ,80 年代末 ,美国爱丁堡动物遗传生理研究所采用  $\beta$  乳球蛋白的启动子及调控序列表达人组织纤溶激活酶原和人第九凝血因子 (2.3) ,前者获得满意的结果。相继 ,世界许多研究所开展了对  $\beta$  乳球蛋白基因的研究 ,乳蛋白基因含有一些组织特异性元件 ,如乳腺因子 (Mammary gland factor) ,

它与催乳素应答,参与乳腺的发育和哺乳期的调控<sup>[12]</sup>。不同的乳蛋白基因的 5'侧还有一些高度保守序列,称为“milk box”<sup>[13]</sup>。Watson 等证实,绵羊  $\beta$  乳球蛋白基因有乳蛋白结合因子(Milk protein binding factor)的亲合区,位于 -406 至 -166bp 以内,如果除掉这段序列, $\beta$  乳球蛋白的转基因鼠的表达量急剧下降,说明它是高水平组织特异性的表达的基本元件<sup>[14]</sup>。Whitelaw 等进一步证实  $\beta$ -LG 的启动子 5'侧区存在强的组织特异性 DNAaseI 高敏位点,-406 的 5'侧区序列足以有效指导基因在乳腺中表达<sup>[15]</sup>。我们采用 PCR 方法从中国山羊组织 DNA 扩增出 867bp 的  $\beta$  乳球蛋白基因片段,经计算机分析发现它与绵羊的  $\beta$  乳球蛋白基因的同源性达 94.6%<sup>[6]</sup>,将它与人促红细胞生成素基因组 DNA 连接,构建表达载体获得人促红细胞生成素在转基因小鼠乳汁中表达的结果,也证实了 867bp 的山羊  $\beta$  乳球蛋白基因含有基本组织特异性调控元件。

转基因小鼠可以将遗传信息传给子代,4 只转基因阳性的  $G_1$  代小鼠,均获得 Southern 鉴定阳性的子代小鼠,并且 BE1 的  $G_1$  代小鼠乳汁 Epo 定量可达  $0.5\mu\text{g/mL}$ 。由于样品采集冻存时间较长,另外两只小鼠的乳汁未测出 Epo 活性的原因尚不清楚。实验中观察到转基因小鼠中,雄性小鼠经过几次交配仍不育。BE1 小鼠,妊娠 4 次均流产或死胎,第 5 次交配,才产下 4 只幼仔,转基因对小鼠生理的影响,还需进一步实验观察。

转基因动物乳腺表达药用蛋白,还需注意异位表达的问题,有人曾经观察到小鼠乳酸蛋白和羊  $\beta$ -LG 启动子指导外源基因能在唾液腺血液、骨髓肌等表达,认为这是整合基因的位置效应的结果<sup>[16]</sup>,在转基因家畜生产药用蛋白时,如凝血因子、人促红细胞生成素等,也会对动物带来生理损害。

影响转基因动物的表达水平因素很多,为了提高表达,我们在山羊  $\beta$  乳球蛋白基因的克隆和载体构建等方面仍需作更多的努力。

## 参 考 文 献

- [1] K. Gordon, E. Lee, J. A. Vitale *et al.* *Biotechnology*, 1987, **5**: 1183~1187.
- [2] T. Bihler, Th. Bruyere, D. F. Went *et al.* *Biotechnology*, 1987, **8**: 140~143.
- [3] G. Wright, A. Carver, D. Cottom *et al.* *Biotechnology*, 1991, **9**: 830~834.
- [4] P. Krimgenfort, A. Rademarkers, W. Eyestone *et al.* *Biotechnology*, 1991, **9**: 844~847.
- [5] W. H. Velander, J. L. Johnson, R. L. Page *et al.* *Proc Natl. Acad. Sci* 89, 12003~12007.
- [6] 潘 玲, 陈建军, 陈常庆. *生物工程学报*, 1997, **13**: 132~137.
- [7] J. Sambrook, E. F. Fritsh, T. Maniatis, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [8] B. Hogan, F. Constantini, E. Lacy *et al.* *Manipulation of the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1986.
- [9] P. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel. *Science*, 1988, **239**: 487~491.
- [10] Heddy Zela 著, 田宗安等译. *单克隆抗体技术手册*, 南京: 南京大学出版社, 1991.
- [11] S. Lee-Huang. *Proc Natl Acad. Sci* 81, 2708~2712.
- [12] J. Demmer, J. G. Burdon, J. Djiane *et al.* *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1995, **107**: 113~121.
- [13] L. Hall, D. C. Emery, M. S. Davies *et al.* *Biochemistry J.*, 1987, **242**: 735~742.
- [14] C. J. Watson, K. E. Gordon, M. Robertson *et al.* *中国科学报*, 1991, 19: 602~604. <http://journals.im.ac.cn>

- [ 15 ] CBA. Whitelow ,Harries ,Me M. Clenagham. *Biochemistry J.* ,1992 ,286 31~39.  
[ 16 ] A. Carver G. Wright D. Cottom. *Cytotechnology* ,1992 9 :77~84.

## Human Erythropoietin Expressed in the Milk of Transgenic Mice<sup>\*</sup>

Pan Ling<sup>1</sup> Xu Chong<sup>4</sup> Li Guangsan<sup>2</sup> Du Miao<sup>2</sup> Lao Weide<sup>2</sup> Chen Changqing<sup>3</sup>

<sup>1</sup>( Shanghai Institute of cell Biology ,The Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 200031 )

<sup>2</sup>( Institute of Development of Biology ,The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100070 )

<sup>3</sup>( Shanghai Research Center of Biotechnology ,The Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 200233 )

<sup>4</sup>( Department of Biology ,USTC ,Hefei 230026 )

**Abstract** The hybrid gene construct is composed of the 5' regulatory region of the goat  $\beta$ -lactoglobulin(  $\beta$ -LG ) and human erythropoietin genomic DNA sequences. After the gene transfer into mouse by microinjection of DNA into fertilized eggs ,the 4 transgenic mouse were identified by PCR ,dot-blot and Southern hybridization. The expression of Epo was detected in the milk of 3 nursing transgenic females of them by Epo-ELISA analysis. The 4 transgenic mice produced offspring ,part females of them were analysed by PCR and Southern hybridization 6 females were demonstrated carrying the transferred gene. Only two of them ,Epo expressed at 0.5 $\mu$ g/mL in the milk detected by Dot-ELISA. Our results show that 867 bp of goat  $\beta$ -LG could direct Epo expressed exclusively in the mammary gland of transgenic mice.

**Key words** Promoter of goat  $\beta$ -LG ,erythropoietin expression in mammary gland ,transgenic mice

\* Supported by Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development( No. 85-722-06-03 ).