

ht-PAm 基因在山羊 β -酪蛋白基因座定位整合的研究

沈 伟^{1,2} 杨正田¹ 田利源¹ 吴晓洁¹ 陈 宏² 黄培堂¹ 邓继先^{1*}

¹(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

²(西北农林科技大学,杨凌 712100)

摘 要 利用体细胞基因打靶与核移植技术制备动物乳腺生物反应器是当今转基因定位整合表达的一种新技术。分别克隆山羊的 β -酪蛋白基因 5'调控区的 6.3kb 片段,外显子 7、外显子 8 和 9 三个基因片段,并与克隆的人 tPA 突变体 cDNA 一起构建了含有 *neo* 和 *tk* 正负筛选标记基因的 β -酪蛋白基因打靶载体 P^{GBC4PA} ,并验证了 *neo* 基因、*tk* 基因以及 Cre-LoxP 系统的有效性。将线性化的 P^{GBC4PA} 通过电转染整合到山羊胎儿成纤维细胞基因组中,利用 G418 和 GANC 进行抗性细胞克隆的药物筛选,初步获得抗性细胞克隆 244 个,PCR 检测后获得阳性细胞克隆 31 个,其中初步验证 2 个细胞克隆转植基因整合位点重组后的基因序列正确,并且该细胞克隆能够有效扩增。这为下一步基因打靶体细胞核移植制备山羊乳腺生物反应器奠定了基础。

关键词 山羊,基因打靶,乳腺生物反应器, β -酪蛋白基因,ht-PAm 基因

中图分类号 Q75 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0361-05

在制备转基因动物过程中,由于外源基因在基因组中随机整合而带来的“位置效应”,使得外源基因在宿主动物体内的表达大多停留在一个较低水平,且个体间表达水平差异很大。为此,国内外学者对影响外源基因在体内表达的各种调控成分进行了大量的研究,但无法得到生物自身内源性调控元件原有功能的正常体现。而外源基因在基因组中定位整合却能较好地克服这一难题,于是许多学者已开始利用基因打靶技术进行转基因的定位整合研究^[1-6]。

将外源基因定位整合到家畜体细胞的乳蛋白基因座,通过转基因体细胞核移植制备动物乳腺生物反应器,将充分利用内源乳蛋白基因固有的高效表达调控机制^[7]。2000 年,McCreath 等首次利用无启动子载体的基因打靶技术,把 *BLG-AAT* 基因连接体定位整合到绵羊胎儿成纤维细胞的 $\alpha 1$ -原胶原基因座上,并通过体细胞核移植获得了 2 只成活的转基因克隆绵羊。*AAT* 在乳腺中的表达量达到 650 μ g/mL,而同期随机整合 *AAT* 的绵羊最高表达量为 18 μ g/mL^[2]。这些结果初步显示了基因打靶制备乳腺生物反应器的优越性。

本研究即是以山羊的 β -酪蛋白基因为靶基因构建了含有 *neo* 和 *tk* 正负筛选标记基因的打靶载体,并通过对 LoxP 位点间 *neo* 基因的有效删除,中靶细胞 *neo* 基因和 *tk* 基因的抗性筛选等试验,验证了基因打靶载体的有效性,利用电击转染获得了 *ht-PAm* 定位整合的体细胞,这为下一步基因打靶体细胞核移植制备山羊乳腺生物反应器奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体构件和质粒:通用型打靶载体 pLoxPneo 由杨晓教授惠赠,ht-PAm cDNA 由本室保存,pGEM-T 载体购自 Promega 公司。

1.1.2 工具酶与试剂盒:DNA 提取试剂盒、质粒纯化试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒等分别购自 Promega、QIAGEN 等公司,限制酶、T4DNA 连接酶、Klenow 酶、LA-Taq 酶和 Cre 重组酶等分别购自大连宝生物公司和 NEB 生物公司。

1.1.3 引物合成与基因测序:引物在本所 ABI8909 型 DNA 合成仪上合成,基因序列在本所 3100 型遗传分析仪(ABI)上完成。扩增山羊 β -酪蛋白 5'端调

收稿日期 2003-09-15,修回日期 2004-01-12。

基金项目 国家高技术发展计划(863)重大专项基金资助(No.2002AA206621)。

* 通讯作者。 Tel:86-10-66948841,66948838; E-mail:shenwei427@yahoo.com.cn; dengjx@lycos.com
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

控区的上游引物 5'-tcgtgtagaggtcaaggat gctgc-3';下游引物:5'-gattcctgtgaatgggaagatgagg-3'。扩增 ht-PAm cDNA 的上游引物:5'-atggatgc aatgaagagaggctctgc-3';下游引物:5'-tcacggctgcattgttcacgaatcc-3'。阳性细胞克隆筛选用引物,上游引物在 3'同源臂内侧的 neo 基因上:5'-gaacgagatcagcagcctctgttc-3';下游引物在 3'同源臂外侧山羊 β -酪蛋白基因侧翼序列上:5'-atggacacagccatttagatactcc-3'。

1.1.4 实验动物:关中奶山羊由西北农林科技大学实验种羊场提供。

1.1.5 细胞培养液与细胞因子:山羊胎儿成纤维细胞培养用 DMEM、FBS、PBS、丙酮酸钠、非必需氨基酸、0.25%胰蛋白酶-EDTA 和青链霉素等购自 Hyclone 公司,G418、GANC 和 LIF 等分别购自 GIBCO 和 Chemicon 等生物公司。

1.2 方法

1.2.1 pGBC5tPA 的构建:利用关中奶山羊耳组织提取基因组 DNA,进行 β -酪蛋白基因 5'调控序列的 PCR 扩增,扩增产物克隆到 pGEM-T 载体上,获得质粒 pGBC5。对 ht-PAm cDNA 进行亚克隆,并在基因的两端引入 *Cla*I 和 *Sal*I 酶切位点,获得质粒 ptPA,质粒 pGBC5 与 ptPA 利用 *Cla*I 位点进行连接,获得质粒 pGBC5tPA,其中 GBC5 的 6.3kb 片段作为打靶载体的 5'同源臂。

1.2.2 pGBC4tPA 的构建:PCR 分别扩增山羊 β -酪蛋白基因外显子 7 的 330bp 序列和外显子 8~9 的 2.4kb 序列,其中外显子 8~9 的 2.4kb 片段作为 3'同源臂。把扩增片段克隆到 pLoxPneo 中,使 *neo* 基因位于外显子 7 与外显子 8 之间。然后利用 *Xho*I 和 *Not*I 把 pGBC5tPA 定向克隆到 pLoxPneo 中,从而构建了用于定位整合的打靶载体 pGBC4tPA。载体可用 *Not*I 酶切线性化,*tk* 基因位于 3'同源臂外侧。

1.2.3 LoxP 位点的有效性检测:按照试剂盒说明,利用 Cre 重组酶体外处理质粒 pGBC4tPA,检测 LoxP 位点的有效性。

1.2.4 山羊胎儿成纤维细胞的分离与培养:手术取出妊娠 35d 的关中奶山羊胎儿,去除头与肝脏后,用胰酶消化法获得山羊胎儿成纤维细胞。培养液成分包括 DMEM、10% FBS、丙酮酸钠和非必需氨基酸等。细胞在 37°C、5% CO₂、饱和湿度情况下培养,原代细胞培养 3 d 后冷冻保存。

1.2.5 细胞的外源基因转染与阳性细胞克隆筛选及鉴定:将 0.8×10^7 细胞置于 0.4cm 内径的电击杯中,加入 10~20 μ g 线性化 pGBC4tPA 混匀,240V 和

600 μ F 条件(Bio-RAD)下电击。转染细胞分散到 96 孔板中培养 24h 后利用 G418(600 μ g/mL)和 GANC(2 μ mol/L)进行抗性细胞克隆筛选。提取抗性细胞克隆的基因组 DNA 进行 PCR 鉴定,对阳性克隆外源基因重组区域进行基因序列测定来进一步验证。

2 结果与分析

2.1 山羊 β -酪蛋白基因 5'调控序列的克隆与 pGBC5tPA 的构建

对获得的关中奶山羊 β -酪蛋白基因 5'调控序列的 6.3kb 基因片段进行 DNA 序列分析,并用 BLAST 在线软件(www.ncbi.nlm.nih.gov)对所测得的序列与国内外山羊的 β -酪蛋白序列进行了序列比较,发现本研究获得的基因序列与国内山羊的同源性在 99% 以上,与国外山羊的同源性多在 93%~98% 之间。质粒 ptPA 经基因测序验证后,与 GBC5 片段连接得到质粒 pGBC5tPA,酶切鉴定正确后进行基因连接处序列测定验证(结果未显示)。

2.2 pGBC4tPA 载体的构建与分析

PCR 扩增的山羊 β -酪蛋白基因外显子 7 的 330bp 片段和外显子 8 到 9 的 2.4kb 片段包含了内含子 7 的部分序列,把 2 个片段克隆到 pLoxPneo 中,即相当于使 *neo* 基因位于 β -酪蛋白基因内含子 7 中间。载体结构见图 1。基因连接处的测序结果正确,即 htPAm 的起始密码子与山羊 β -酪蛋白基因的 ATG 重合,未出现移码现象。打靶载体 pGBC4tPA 的酶切鉴定正确,结果见图 2:其中 *Not*I/*Xba*I 酶切载体切出 4 条带,大小分别为 8.5kb、4.1kb、3.2kb 和 2.6kb。

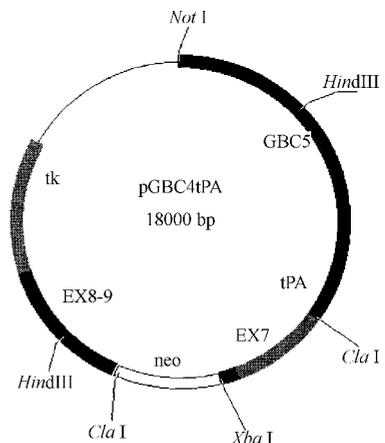


图 1 基因打靶载体 pGBC4tPA 构建示意图

Fig.1 Construction and structure of gene

targeting vector pGBC4tPA

2.3 LoxP 位点的有效性检测

利用 Cre 重组酶体外处理质粒 pGBC4tPA,能有效切下两个同向 LoxP 位点间的 neo 基因 1.8kb 序列,电泳检测结果证明 Cre-LoxP 系统是有效的。

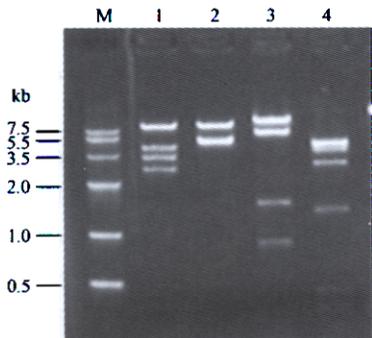


图2 pGBC4tPA 酶切鉴定结果

Fig.2 The identification of pGBC4tPA vector

M: markers; 1: *Not I / Xba I* -digested DNA fragments; 2: *Hind III* -digested DNA fragments; 3: *Hinc II* -digested DNA fragments; 4: *Nde I* -digested DNA fragments

2.4 细胞的电击转染与阳性细胞克隆筛选及鉴定

利用胰酶消化法获得了山羊胎儿成纤维细胞,当细胞生长到 80% 汇合时,消化收集细胞,以 1×10^7 细胞/mL 的密度将细胞电击转染。转染细胞(未转染细胞做对照)加压筛选 12 d 后统计抗性克隆数,结果见表 1。

表 1 基因打靶获得阳性细胞克隆的情况

Table 1 The results of gene targeting

G418 ⁺ /GANC ⁺ colonies	Positive colonies with PCR identification (%)	Surviving colonies on 6 cm plate (%)	Analysis of gene sequence (%)
244	31(12.7)	7(2.9)	2(0.8)

试验结果表明,未转染细胞在添加 G418 的情况下 9 d 全被杀死,转染细胞经筛选有抗性细胞克隆

出现(见图 3),表明 neo 基因能有效表达。在同条件下,G418/GANC 双药物筛选抗性克隆为 G418 单药物筛选抗性克隆的 19.9% (47/236),说明 tk 基因能被有效的作为负筛选标记在基因打靶中使用,其富集率为 5 倍。

细胞转染过程中,细胞在 96 孔板培养时初步获得抗性细胞克隆 244 个,对这些克隆进行了同源重组位点的 PCR 检测,有 31 个能扩增出特异的 2.6kb 条带(见图 4)。这 31 个克隆转移到 6cm 平皿后有 7 个成活,利用 DNA 序列分析初步验证有 2 个克隆外源基因定位整合区域的 DNA 序列重组正确(见图 5)。图 a 表示 3'同源臂左侧重组区域的测序结果,图 b 表示 3'同源臂右侧重组区域的测序结果。



图3 转染得到的抗性细胞克隆(1 × 100)

Fig.3 Resistant cell clones transfected by pGBC4tPA(1 × 100)

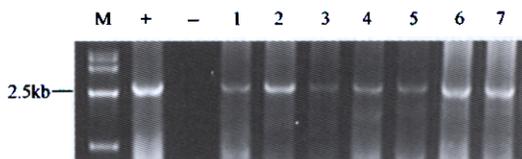


图4 打靶阳性细胞克隆 PCR 鉴定结果

Fig.4 PCR identification result of the positive cell clones

M: markers; + / - ; PCR results of control templates; 1 ~ 7: PCR results of positive cell clones



图5 阳性细胞克隆基因重组位点的基因测序图(a,b)

Fig.5 The gene sequence identification of positive cell clones(a,b)

3 讨论

基因打靶技术自上世纪 80 年代出现以来得到了国内外学者的重视,但直到 2000 年 McCreath 等人才获得首例体细胞基因打靶绵羊。至今体细胞基因打靶过程中的诸多技术瓶颈仍然困扰着众多学者。譬如,体细胞基因打靶时同源重组率非常低,而非同源重组率又非常高,转染后的体细胞传代次数极为有限,并易分化,难以用于核移植等。鉴于此,人们探索了正负标记选择、启动子诱捕和 Cre-loxP 系统等研究方法来提高同源重组的准确性和效率^[8,9]。

国内外的同期研究,在所得到的几个体细胞基因打靶动物的实验中,大多使用的无启动子载体,以便利用内源基因调控序列指导标记基因的表达,从而实现正向筛选。由于本研究的目的是使用山羊固有的 β -酪蛋白基因调控序列指导 tPA 乳腺表达,并且所用的细胞为易于核移植的胎儿成纤维细胞^[10-11]因而很难利用启动子诱捕策略,而是选用了正负筛选标记法。该方法的理论基础就是通过基因打靶,把外源基因定位敲入到目标启动子下游使其在内源调控成分的指导下有效表达。该策略弥补了外源基因调控成分不全,排列顺序不当和表达抑制的位置效应等缺陷。本研究构建的具有正负筛选标记的打靶载体,在 *neo* 基因的两侧插入 2 个同向的 LoxP 位点,以期利用 Cre-loxP 系统删除 *neo* 基因,以避免该基因的存在对 tPA 表达产生不良影响。另外,把 *neo* 基因放在 β -酪蛋白基因的第 7 内含子中,以期利用该基因自身剪切机制有效删除 LoxP 位点的残余序列。对于 LoxP 位点的有效性,周江曾对本研究利用的 pLoxpneo 质粒进行过分析,该质粒在表达 Cre 重组酶的 AM-I 菌中,2 个 LoxP 位点间的片段能被有效删除^[12]。本研究利用 Cre 重组酶在体外进行了进一步验证。

本研究由于有效的使用了负向筛选标记,因而在阳性细胞克隆的 PCR 初筛中得到了较高的阳性率。但因为中靶体细胞在体外倍增次数有限(约 20 次),估计一个细胞克隆能得到 10^6 级的细胞数,所以很难得到足够的细胞基因组 DNA 进行 Southern 杂

交鉴定。鉴于此,本研究对转植基因整合位点的同源重组区域进行了 DNA 序列分析,初步获得 2 个阳性细胞克隆,并正在进行核移植实验。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Maria J, Marg EM, Christine R. Targeted transgenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 **93**: 8804-8808
- [2] McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS *et al*. Production of gene-targeting sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*. 2000 **405**: 1066-1069
- [3] Milind S, Allan B. Genetics: targeting sheep. *Nature*. 2000 **405**: 1004-1005
- [4] Denning C, Burl S, Ainslie A *et al*. Deletion of the $\alpha 1 \beta$ galactosyl transferase (GGTAI) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nature Biotech*. 2001 **19**: 559-562
- [5] Dai YF, Vaught TD, Broone J *et al*. Targeting disruption of the alpha-1 β -galactosyl transferase gene in cloned pigs. *Nature Biotech*. 2002 **20**(3): 251-255
- [6] Lai LX, Kolber SD, Park KW *et al*. Production of alpha-1 β -GT knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. 2002 **295**: 1089-1092
- [7] Shen W(沈伟), Yang Z(杨正田), Deng JX(邓继先). Production of mammary gland bioreactor by gene targeting of somatic cells. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2003 **19**(6): 767-770
- [8] Andreas FK, Ray A, Jim M *et al*. Insertion of a foreign gene into the β -casein locus by Cre-mediated site-specific recombination. *Gene*. 1999 **227**: 21-23
- [9] Daewoong J, Abudi N, Christie D *et al*. Epigenetic regulation of gene structure and function with a cell-permeable Cre recombinase. *Nature Biotech*. 2001 **19**: 929-933
- [10] Keefer CL, Baldassarre H, Keyston R *et al*. Generation of Dwarf Goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and now transfected fetal fibroblasts and in Vitor-matured oocytes. *Biology of Reproduction* 2001 **64**: 849-856
- [11] Zou XG, Wang YG, Cheng Y *et al*. Generation of cloned goat (*Capra hircus*) from transfected foetal fibroblast cell, the effect of donor cell cycle. *Molecular Reproduction and Development*. 2002 **61**: 164-172
- [12] ZHOU Jiang(周江), CHENG Xuan(程萱), SUN Yan-Xun(孙彦洵) *et al*. Establishment of Smad2 conditional gene targeting mice based on the Cre/LoxP system. *Science in China (Series C)*(中国科学 C 辑), 2001 **31**(4): 335-342

The ht-PAM cDNA Knock-in the Goat Beta-casein Gene Locus

SHEN Wei^{1 2} YANG Zheng-Tian¹ TIAN Li-Yuan¹ WU Xiao-Jie¹

CHEN Hong² HUANG Pei-Tang¹ DENG Ji-Xian^{1 *}

¹(Institute of Biotechnology , Academy of Military Medical Science ,Beijing 100071 , China)

²(Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry ,Yangling 712100 ,China)

Abstract The production of recombinant protein is one of the major successes of biotechnology , animal cells are required to synthesize proteins with the appropriate post-translational modifications. Transgenic animal mammary gland bioreactor are being used for this purpose. Gene targeting is a more powerful method to produce mammary gland bioreactor , and nuclear transfer from cultured somatic cells provides an wonderful means of cell-mediated transgenesis. Here we describe efficient and reproducible gene targeting in goat fetal fibroblasts to place the human tissue plasminogen activator mutant (ht-PAM) cDNA at the beta-casein locus , and would produce the transgenic goat by nuclear transfer. To construct the gene targeting vector pGBC4tPA , the milk goat beta-casein genomic DNA sequence for homologous arms had been cloned firstly. The left arm was 6.3 kb fragment including goat beta-casein gene 5' flanking sequence , and the right arm was 2.4 kb fragment including beta-casein gene from exon 8 to exon 9. The ht-PAm cDNA was subcloned in the goat beta-casein gene exon 2 , and the endogenous start codon was replaced by that of ht-PAm. The bacterial neomycin(neo) gene as positive selection marker gene , was placed in the beta-casein gene intron 7 , the thymidine kinase(tk) as the negative selection marker gene , was just outside the right arm. The validity of the positive-negative selection vector(PNS) , was tested , and targeting homologous recombination(HR) were elevated to 5-fold with the negative selection marker using the drug GANC. The DNA fragment in which two LoxP sequence was deleted effectively using Cre recombinase *in vitro* . Goat fetal fibroblasts were thawed and cultured to subconfluence before transfection , about 10⁷ fibroblasts were electroporated at 240V , 600 μ F in 0.8 mL PBS buffer containing linear pGBC4tPA. transfected cells were cultured in collagen-coated 96-wellplate for 24h without selection , then added the drug G418(600 μ g/mL) and GANC(2 μ mol/L). After 12 days of selection , well separated G418^r/GANC^r clones were isolated and expanded in 24-wellplate. 244 clones were selected , and only 90 clones could grow and be tested by PCR screening for targeting. The primary result demonstrated that 31 targeting cell clones with homologous recombination events were obtained , and 2 cell clones was verified by DNA sequence analysis on the homologous recombination region.

Key words goat , gene targeting , mammary gland bioreactor , beta-casein gene , ht-pPAm gene

Received : 09-15-2003

This work was supported by a grant from the State 863 High Technology R & D project of China(No.2002AA206621).

* Corresponding author. Tel 86-10-66948841 ; E-mail shenwei427@yahoo.com.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>