

研究简报

通用型基因打靶载体的构建及其功能鉴定

陈兴启*, 孙达权*, 刘凤军, 贾淑玲, 张涌

西北农林科技大学动物医学院生物工程研究所, 杨凌 712100

摘要: 为了构建适合大多数基因座位点打靶的通用型基因打靶载体及打靶成功后去除正选择标记基因, 以克隆载体 pGEM-3Z 为骨架, 插入了一个正选择标记基因新霉素磷酸转移酶基因(*neo*)、两个相同的负选择标记基因单纯疱疹病毒胸苷激酶基因 *HSV-tk1* 和 *HSV-tk2*, 并在 *neo* 的两侧各添加了一个方向相同的 LoxP(locus of crossing-over (x) in P1)序列及两个不同的多克隆位点序列, 从而构建了载体 pA2T。插入的两个不同的多克隆位点序列中, *neo* 和 *HSV-tk1* 之间的多克隆位点序列有 8 个稀少的酶切位点、*neo* 和 *HSV-tk2* 之间的多克隆位点序列有 5 个稀少的酶切位点, *neo*、*HSV-tk1* 和 *HSV-tk2* 有各自独立的转录单元。脂质体法转染山羊成纤维细胞, 用遗传霉素(G418)和丙氧鸟苷(GAC)进行正负筛选, 验证了正负选择标记基因的生物活性, 证明通用型基因打靶载体 pA2T 构建成功。载体 pA2T 转化组成性表达 Cre 重组酶 (Cyclization recombination protein)的大肠杆菌 BM25.8, 检测到 LoxP 序列的生物活性, 结果表明 pA2T 中的正选基因可以被 Cre 重组酶去除。因此, 本研究所构建的通用型基因打靶载体 pA2T, 根据不同的基因座设计同源臂后, 插入到 MCS 中可直接用于不同基因座位点的打靶, 并能够在打靶成功后用 Cre 重组酶去除基因组中插入的 *neo* 基因, 为用基因打靶的方法制作转基因动物提供了便利。

关键词: 转基因动物, 通用型基因打靶载体, LoxP 序列, Cre 重组酶

Construction of Universal Vector for Gene Targeting and Analysis of Its Function

Xingqi Chen*, Daquan Sun*, Fengjun Liu, Shuling Jia, and Yong Zhang

Institute of Biotechnology, College of Animal Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

Abstract: To make a universal gene targeting vector fitting for most gene and delete positive selection gene after targeting successfully, a vector named pA2T was constructed by inserting one neomycin gene (*neo*) for positive selection and two same herpes simplex virus thymidine kinase gene *HSV-tk1* and *HSV-tk2* for negative selection into the vector of pGEM-3Z, and two locus of crossing-over (x) in P1 (LoxP) and two different multiple cloning sites (MCS) were inserted into two flanks of *neo* separately. There were eight rare cloning sites between *neo* and *HSV-tk1* and five rare cloning sites between *neo* and *HSV-tk2*, and *neo*, *HSV-tk1* and *HSV-tk2* could be translated respectively in the pA2T. Transfection of the pA2T into goat fetus fibroblast cells with Lipofectamine™ 2000 conferred resistance to geneticin (G418) and resistance to ganciclovir (GAC) in the cells, which suggested the positive and negative selectable markers could express in the cells and thus the vector pA2T could be used as a universal gene targeting vector. Transformation of the pA2T into the BM25.8 expressing Cre recombinase conferred *neo* was deleted in the pA2T, which suggested the LoxP was active. Thus, this vector can be inserted by most gene sequences as homologous sequences and positive selection gene

Received: February 26, 2008; **Accepted:** April 16, 2008

Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2004AA213072).

Corresponding author: Yong Zhang. Tel: +86-29-87080085; E-mail: zhy1956@263.com

国家高技术研究发展计划项目(“863 计划”)(No. 2004AA213072)资助。

* They are the co-first authors.

can be deleted after targeting successfully, which is very convenience for the production of transgenic animals using gene targeting method.

Keywords: transgenic animals, universal gene targeting vector, LoxP sequence, Cre recombinase

转基因动物在基因功能研究、人类疾病模型建立、乳腺生物反应器的研制及家畜的转基因育种等研究领域都有重要的意义^[1-6]。克隆羊多莉的诞生^[7], 使以体细胞为遗传操作单元的转基因细胞制作结合体细胞核移植技术生产转基因动物成为可能, 其中供核转基因细胞的制作中转基因载体的构建是其关键步骤之一。目前应用于转基因细胞制作的载体主要有病毒载体、普通质粒载体及基因打靶载体。其中病毒载体因其高效的感染性受到许多学者的青睐, 但病毒载体存在插入位点的不可预测性和承载外源基因长度有限的问题; 普通质粒载体虽然有较大的承载量, 但存在整合效率低和多拷贝插入的缺陷; 而基因打靶载体可对细胞进行单拷贝基因定位修饰, 并且能够稳定的遗传。迄今为止用基因打靶的方法已经生产出了转基因牛、羊、鼠^[2, 6-8]。基因打靶技术的关键步骤之一是基因打靶载体的构建, Mansoor等^[9]提出的正负筛选基因打靶策略能很好的筛选打靶成功的细胞克隆, 正选标记基因用于筛选阳性克隆, 负选标记基因通过排除假阳性进一步富集阳性克隆。对于不同的基因打靶位点, 分别构建打靶载体涉及骨架载体的选择、正负选基因的连接及鉴定、多克隆的设计、同源臂的插入等烦琐的过程。虽然出现了带有正负选基因及多克隆位点序列的通用型基因打靶载体^[10], 但是酶切位点太少限制了这些载体的应用范围。

现行用基因打靶方法生产的转基因动物基因组中, 都整合有正选择标记基因新霉素磷酸转移酶基因(*neo*)^[2, 6-8, 11], *neo*的存在会影响中靶细胞及转基因动物个体的生长和正常生理状况, 同时增加了后期研究工作的影响因素。LoxP(Locus of crossing-over(x) in P1)序列由 2 个 13 bp 的反向重复序列和 1 个 8 bp 的间隔区域构成。Cre 重组酶(Cyclization recombination protein)是一种位点特异性重组酶, 它能使 2 个同向 LoxP 之间的序列删除或重排^[12], 是由 Sternberg 等^[13]于 1981 年从 P1 噬菌体中发现, 属于 λ Int 酶超基因家族。由于 Cre 重组酶的表达可以进行精确的时空调控, 所以, Cre/LoxP 系统在基因打

靶研究工作中有越来越多的应用^[14, 15]。

本研究以克隆载体 pEGM-3Z 为骨架, 在其多克隆位点中插入了 1 个正选择标记 *neo*、2 个负选择标记 *HSV-tk1* 和 *HSV-tk2*, 并在 *neo* 的两侧各添加了一个方向相同的 LoxP 序列, 从而构建了载体 pA2T, 载体中包含有 2 个含有稀少酶切位点的多克隆位点, 并对此载体中的正负选择标记基因及 Loxp 序列的生物活性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

pGEM-Teasy 载体和 pGEM-3Z 载体购自 Promega 公司, pMCIneoployA 载体购自 Stratagene 公司, pORF-HSVtk 载体购自 Invivogen 公司, 大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BM25.8 由本室保存。

1.1.2 工具酶和试剂

各种内切酶购自 MBI 公司, 质粒提取试剂盒和凝胶回收试剂盒购自 Promega 公司, T4 DNA 连接酶、Klenow Fragment 和 CIAP 购自 TaKaRa 公司, G418 购自 Invitrogen 公司, GAC 购自 Invivogen 公司, DMEM 和 DMEM/F12 购自 Invitrogen 公司, Lipofectamine TM2000 购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 合成和测序

引物合成与测序在 Invitrogen 公司, 多克隆位点序列在上海捷瑞公司合成。

1.1.4 山羊成纤维细胞

由本室冻存。

1.2 载体的构建

1.2.1 pGT 和 pTK 的构建

Not I、*Swa* I 双酶切载体 pORFHSV-tk, 胶回收包括启动子及 polyA 序列的单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(*HSV-tk*), Klenow Fragment 补平后克隆入 *Sma* I 单酶切的载体 pGEM-3Z, 分别用 *Bam*HI、*Sal*I、*Pst*I、*Nhe*I/*Nco*I 酶切载体, 鉴定阳性克隆 pGT。设计引物 Ptk1(5'-3'): GGCCGCAATAAAATCTTTATTT 及 Ptk2(5'-3'): AAATGGATCTACCACATTTGTAGAG

G, 以 pORFHSV-tk 为模板扩增包括启动子及 polyA 序列的 *HSV-tk*, 凝胶回收 PCR 产物并克隆入载体 pGEM-Teasy 中, 分别 *Pst* I、*Not* I 用酶切载体, 鉴定阳性克隆 pTK。

1.2.2 pGN 的构建

合成一段含 *Xba* I、*Sgs* I、*Bpu*1120 I、*Bsp*1407 I、*Nhe* I、*Eco*R I、*Not* I、*Xho* I、*Bam*H I、*Sal* I、*Bsu*15 II、*Bst*1107 I、*Pf*123 II、*Spe* I、*Pst* I、*Sac* II、*Xba* I 酶切位点的多克隆位点序列, 其中 *Xho* I 和 *Sal* I 两侧各有一段方向相同的 *LoxP*(5'-ATAACTTCGTATAGCATA CATTATACGAAGTTAT-3'), 合成的序列位于载体 pGH 上。*Xho* I、*Sal* I 双酶切载体 pMCIneoA 凝胶回收包括启动子及 polyA 序列的 *neo*, 克隆入已用相应酶切的 pGH 中, *Xho* I、*Sal* I 双酶切鉴定阳性克隆 pGN。

1.2.3 pA2T 的构建

Spe I、*Sac* II 分别双酶切载体 pTK 和 pGN, 分别凝胶回收 pTK 中的包括启动子及 polyA 序列的 *HSV-tk* 和 pGN 中的长片段, 连接 2 个回收片段, *Spe* I、*Sac* II 双酶切鉴定阳性克隆载体 pAT。*Xba* I 分别单酶切载体 pGT 和载体 pAT, 凝胶回收酶切载体 pGT 并用 *CIAP* 去除 5'端磷酸基团, 凝胶回收酶切载体 pAT 中长片段, T4 DNA 连接酶连接 2 个回收片段, 分别用 *Sac* II、*Sfi* I、*Kpn* I、*Bam*H I 酶切鉴定阳性克隆 pA2T, 测序验证。

1.3 细胞转染和相关检测

1.3.1 遗传霉素(G418)和丙氧鸟苷(GAC)筛选浓度测定

第 4 代山羊成纤维细胞分别加入浓度梯度的 G418 和 GAC 筛选 1 周, 统计 G418 的最大致死浓度和 GAC 的最小致死浓度。

1.3.2 质粒转染

将 pA2T 按照 LipofectamineTM2000 使用说明书转染山羊第 4 代成纤维细胞。

1.3.3 质粒的抗药性检测

把转染的细胞分为 A、B、C、D、E、F 六组, 按照测定的 G418 的最大致死浓度和 GAC 的最小致死浓度进行药物筛选, A 组为正常生长对照组, B 组为转染载体后培养液中加入 G418 筛选组, C 组为转染载体后 G418 和 GAC 筛选组, D 组为转染载体后 GAC 筛选组, E 组为转染载体后正常培养组, F 组是不转染载体加入负选药物组。转染载体 24 h 后各组

分别加入相应浓度药物, 1 周内观察筛选结果。

1.4 pA2T 转化大肠杆菌 BM25.8

将载体 pA2T 转化组成性表达 Cre 酶的大肠杆菌 BM25.8, 提取 BM25.8 中质粒命名为 pA2T2, *Bam*H I 分别酶切 pA2T 和 pA2T2 凝胶电泳, 电泳检测, 比较两载体的酶切结果。用引物 Pneo1(5'-3'): CCAGGTCCACTTCGCATATTAAGGT 及 Pneo2(5'-3'): CGGATCCCCTCAGAAGAACTCGTCA, 分别以 pA2T2 和 pA2T 为模板进行 PCR 扩增, 电泳检测。

2 结果与分析

2.1 通用型基因打靶载体酶切鉴定及分析

2.1.1 载体 pGT 和载体 pTK 酶切鉴定及分析

HSV-tk 编码的蛋白产物以丙氧鸟苷(GAC)为底物, 将其代谢成对细胞有毒性的物质, 使细胞死亡, 而细胞中胸苷激酶基因编码的蛋白不能代谢 GAC, 根据这一原理基因打靶载体选用单纯疱疹病毒胸苷激酶基因做为负选择标记基因, 插入到同源序列的一侧用于排除随机插入的细胞克隆^[9]。当打靶载体随机整合到细胞的基因组上时, *HSV-tk* 也被整合到细胞的基因组上, 细胞就不能在含有 GAC 的药物培养基中存活; 当打靶载体通过同源重组整合到细胞基因组中, *HSV-tk* 被去除, 细胞得以在含有正负药物筛选的培养基中存活。本试验分别用酶切和 PCR 的方法构建了含有一个 *HSV-tk* 的载体 pGT 和载体 pTK, 便于后续工作中加入到打靶载体中。根据 *HSV-tk* 基因上的酶切位点和 pGEM-3Z 本身上的酶切位点酶切鉴定载体 pGT(图 1)和载体 pTK(图 2), 根据片段长度确定 pGT 和 pTK 连接成功。

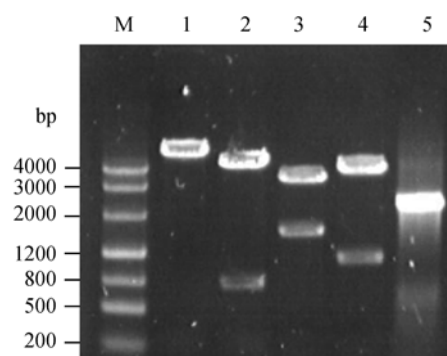


图 1 质粒 pGT 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pGT plasmid

M: molecular weight marker; 1~4: the plasmid was digested with *Bam*H I, *Sal* I, *Pst* I, *Nhe* I/*Nco* I, respectively; 6: PCR fragment of tk

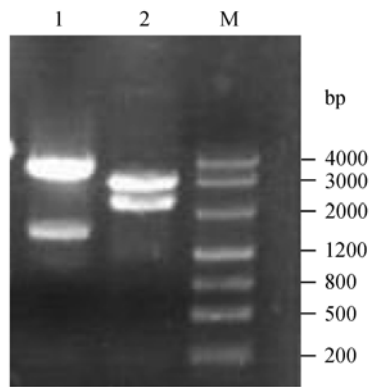


图2 质粒 pTK 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pTK plasmid by enzyme digestion
M: molecular weight marker; 1, 2: the plasmid was digested with *Pst* I, *Not* I respectively

2.1.2 pGN 酶切鉴定及分析

基因打靶过程也是同源重组的过程, 同源臂序列插入到打靶载体中是打靶载体构建的关键, 因此打靶载体中要有合适的酶切位点适合于同源臂序列的插入, 通用型打靶载体中应有足够多的酶切位点适合为同源臂的插入^[9]。pGH 上合成的多克隆位点序列中含有多个酶切位点, 便于不同序列作为同源臂插入。*neo* 编码的产物新霉素磷酸转移酶能分解遗传霉素(G418), 将 G418 代谢成对细胞无毒性的物质, 使细胞在 G418 筛选培养基下存活, 而正常细胞无 *neo* 基因不能在含有 G418 的培养基中生存, 根据这一原理基因打靶载体构建时 *neo* 基因作为正选择标记基因, 通过 G418 筛选检测以判定打靶载体是否整合到细胞的基因组中^[10]。打靶载体中正选择标记基因 *neo* 位于 2 个同源臂之间, 因此 *neo* 基因两侧应各有一段 MCS 便于同源臂的插入。本研究用酶切的方法将 *neo* 基因克隆入载体 pGH 中构建成载体 pGN, 根据酶切鉴定结果确定 pGN 连接正确, 载体 pGN 中 *neo* 基因的两侧各有一段 MCS, 便于后续工作中同源臂的插入。另外, 本研究在合成序列时包含有 2 个同向的 LoxP 序列, pGH 加入 *neo* 后, 2 个同向的 LoxP 序列刚好位于 *neo* 的两侧, 便于在基因打靶成功后用 Cre/LoxP 系统去除 *neo*。

2.1.3 载体 pA2T 酶切鉴定及分析

基因打靶载体的正负筛选策略可以最大程度的获得中靶细胞, 研究表明打靶载体中 2 个负选择标记基因 *HSV-tk* 比一个更能排除假阳性^[10]。本试验酶切载体 pGT、pTK 及 pGN, 分别获得正负选标记基

因, 连接后构建成载体 pA2T, 酶切鉴定载体 pA2T (图 3), 确定连接正确, 经测序进一步得到证实。构建的载体 pA2T (图 4) 含有一个正选择标记基因 *neo* 和 2 个相同的负选择标记基因 *HSV-tk1* 和 *HSV-tk2*, *neo*、*HSV-tk1* 及 *neo* 和 *HSV-tk2* 之间各有一段 MCS, 分别含有 8 个和 5 个稀少的酶切位点, 可用于同源臂序列的插入, *neo*、*HSV-tk1* 和 *HSV-tk2* 有各自独立的转录单元。

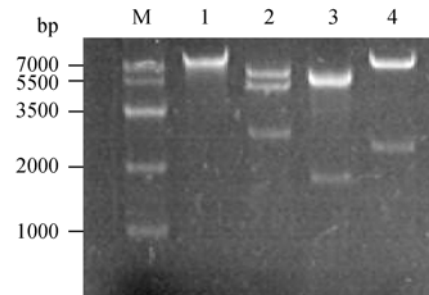


图3 质粒 pA2T 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pA2T plasmid by enzyme digestion
M: molecular weight marker; 1~4: the plasmid was digested with *Sac* II, *Sfi* I, *Kpn* I, and *Bam*HI respectively

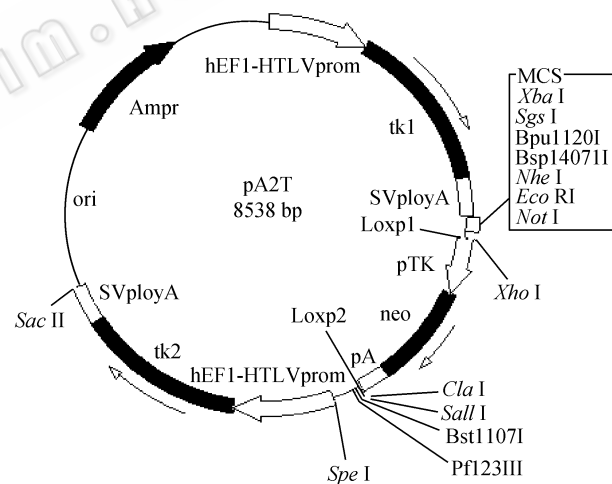


图4 质粒的 pA2T 图谱

Fig. 4 Map of universal gene targeting vector pA2T

2.2 转染山羊成纤维细胞及正负选基因活性检测

2.2.1 G418 最大致死浓度和 GAC 最小致死浓度的确定

虽然只有细胞中存在 *neo* 时, 细胞才能分解 G418 使其免受毒害, 但在较低浓度下细胞也能生长, 为排除细胞本身的适应性造成的假阳性, 有必要测定 G418 的最大致死浓度, 以确定基因打靶过程中 G418 的筛选浓度。哺乳动物细胞中虽然不存在

HSV-tk, 但是 GAC 在较高浓度条件下能改变细胞膜的通透性, 从而导致细胞死亡, 因此很有必要测定 GAC 的最小致死浓度以确定基因打靶过程中 GAC 的筛选浓度。本试验筛选 1 w 后, 确定山羊成纤维细胞 G418 的最大致死浓度是 400 $\mu\text{g/mL}$, GAC 的最小致死浓度是 4 $\mu\text{mol/mL}$ 。

2.2.2 药物筛选及基因活性分析

山羊成纤维细胞转染 pA2T 24 h 后, 各组分别进行筛选, 1 周内观察筛选结果(图 5), B 组细胞转染 pA2T 后在 G418 筛选下, 第 3 天发现有部分细胞存活, G418 浓度减半(200 $\mu\text{g/mL}$)后继续培养又长满, 说明 pA2T 中 *neo* 在表达, D 组细胞转染 pA2T 后在 GAC 筛选下有部分死亡, 说明 pA2T 中 *HSV-tk* 可能在表达, C 组细胞转染 pA2T 后在 G418 和 GAC 双重药物筛选下全部死亡, 进一步证明 pA2T 中的 *neo* 和 *HSV-tk* 都在表达, A 组、E 组、F 组生长正常, 说明 B 组、C 组、D 组的实验结果不是假阳性现象, 根据正负筛选的原理及实验结果证明 pA2T 中的正负选择标记基因都能表达, pA2T 可以用作通用型基因打靶载体。

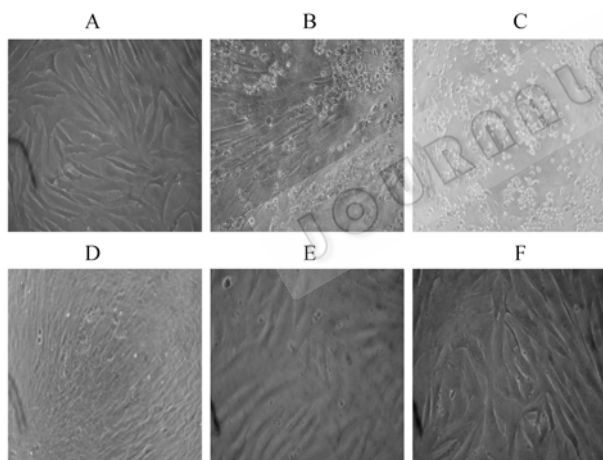


图 5 载体 pA2T 转染山羊成细胞后不同处理组的细胞生长情况

Fig. 5 Growth of goat fetus fibroblast cells after transfection of plasmid pA2T in different groups

A: negative group without transfection; B: selection with G418 after transfection; C: selection with G418+GAC after transfection; D: selection with GAC after transfection; E: without selection after transfection; F: selection with GAC without transfection

2.3 LoxP 序列生物活性分析

Cre 重组酶能介导 2 个 LoxP 位点之间的序列发生特异性重组, 使 2 个 LoxP 位点之间的序列重排或删除^[11]。本研究所构建的载体 pA2T 中, 正选标记基

因 *neo* 两侧各有 1 个 LoxP 序列, *Bam*H I 分别酶切 pA2T2 与 pA2T 的电泳图谱确定 pA2T2 比 pA2T 短 1200 bp(图 6), PCR 比较进一步确定 pA2T2 没有 *neo*(图 6)。以上结果证明 pA2T 在转化组成性表达 Cre 重组酶的 BM25.8 后, *neo* 被删除, 说明 Loxp 序列存在生物活性, 这表明在用 pA2T 进行基因打靶成功后, 可以用 Cre/LoxP 系统去除正选标记基因 *neo*。

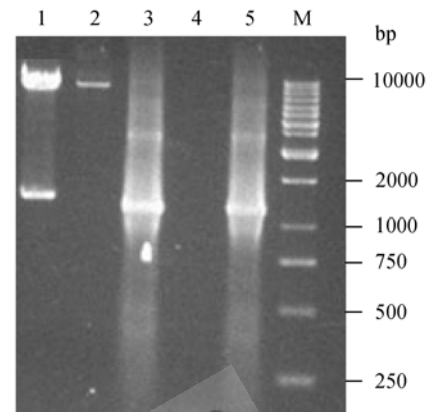


图 6 Loxp 序列的生物活性鉴定

Fig. 6 Identification of the activity of Loxp sequences

1: pA2T was digested with *Bam*H I; 2: pA2T2 was digested with *Bam*H I; 3, 5: *neo* fragment was amplified from pA2T; 4: no fragment was amplified from pA2T2; M: molecular weight marker

3 讨论

对于不同的基因打靶位点打靶时, 如果分别构建打靶载体涉及骨架载体的选择、正负选基因的连接及鉴定、多克隆的设计、同源臂的插入等烦琐的过程, 因此在正负筛选策略基础上构建的通用型基因打靶载体为基因打靶研究工作提供了方便。在利用通用型基因打靶载体进行基因打靶研究工作中, 需要有合适的酶切位点满足同源臂插入, 选择的酶切位点同源臂中不能存在, 因此通用型基因打靶载体中应有足够多的, 并且在基因组中出现频率较低的酶切位点作为其多克隆位点, 满足不同基因座位点作为同源臂插入。本研究构建的通用型基因打靶载体 pA2T 中, *neo* 和 *HSV-tk1* 之间有 8 个酶切位点, *neo* 和 *HSV-tk2* 之间有 5 个酶切位点, 并且这些酶切位点在基因组中出现的频率较低, 可以满足大多数基因座位点构建同源臂插入。虽然正负筛选的策略可以最大可能性的聚集中靶细胞, 但打靶成功的细胞基因组中整合有正选择标记基因 *neo*, 这势必影响后续的研究工作, 目前在基因打靶的研究工作中

都存在正选择标记基因 *neo* 的干扰^[2, 6-8, 11], 因此本研究在 *neo* 的两侧各添加了一个同向的 LoxP 序列, 并且证实这两个 LoxP 序列存在生物活性, 能在打靶成功后用 Cre/LoxP 系统排除 *neo* 干扰。

所以, 本研究所构建的通用型基因打靶载体 pA2T, 几乎所有的基因设计同源臂后, 插入到 MCS 可直接用于基因打靶的研究, 并能够在打靶成功后用 Cre 重组酶去除基因组中插入 *neo* 基因。

REFERENCES

- [1] Clark AJ, Burl S, Denning C, *et al.* Gene targeting in livestock: a preview. *Transgenic Res*, 2000, **9**(4-5): 263-275.
- [2] Evans MJ, Carlton MBL, Russ AP. Gene trapping and functional genomics. *Trends Genet*, 1997, **13**(9): 370-374.
- [3] Bedell MA, Jenkins NA, Copeland NG. Mouse models of human disease. Part I: Techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes Dev*, 1997, **11**(1): 1-10.
- [4] Bedell MA, Jenkins NA, Copeland NG. Mouse models of human disease. Part II: Recent progress and future directions. *Genes Dev*, 1997, **11**(1): 11-43.
- [5] McCreath KJ, Howcroft J, Campbell K, *et al.* Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, **405**(6790): 1066-1069.
- [6] Denning C, Priddle H. New frontiers in gene targeting and cloning: success, application and challenges in domestic animals and human embryonic stem cells. *Reproduction*, 2003, **126**(1): 1-11.
- [7] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385** (6619): 810-813.
- [8] Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, *et al.* Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotech*, 1998, **16**(7): 642-646.
- [9] Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-driven stem cells: A general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, 1988, **336**: 6179.
- [10] Shyam SC, Michael MG. Construction of a new universal vector for insertional mutagenesis by homologous recombination. *Gene*, 1992, **120**(2): 281-285.
- [11] Grobet L, Martin LJR, Poncelet D, *et al.* A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet*, 1997, **17**(1): 71-74.
- [12] Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 2000, **26**(2): 99-109.
- [13] Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination I: Recombination between LoxP sites. *J Mol Biol*, 1981, **150**(4): 467-486.
- [14] Lakso M, Sauer B, Mosinger B, *et al.* Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(15): 6232-6236.
- [15] Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, *et al.* Conditional gene targeting. *J Clin Invest*, 1996, **98**(3): 600-603.

Journal of Animal Science and Biotechnology