

含 FLP“交换盒”结构的打靶载体构建及 ES 细胞打靶研究

郑敬民 李 坚 傅继梁*

(第二军医大学医学遗传学教研室,上海 200433)

摘 要 利用小鼠 HPRT 基因组 DNA 片段和人工合成的含有 FLP 重组酶识别位点变异体 FRT 和 F₃ RT 序列的寡核苷酸,构建了针对小鼠 HPRT 基因位点的置换型打靶载体 pSP-HPRT-F-Neo-F₃。经过限制酶酶切及部分测序鉴定其结构正确后,将线性化了的打靶载体以电穿孔法导入 ES 细胞内,经 G418 和 6-TG 双药筛选和分子鉴定,得到了 2 个在 HPRT 位点整合有 FLP 重组酶“交换盒”F-Neo-F₃ 结构的双交换重组 ES 细胞克隆,为建立基于 FLP 重组酶介导的盒式交换的高效、定点转基因体系创造了条件。

关键词 基因打靶, 胚胎干细胞, HPRT, FLP 重组酶

中图分类号 Q782 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0566-04

“功能获得性”转基因是研究基因功能,建立人类疾病动物模型和发展基因疗法的有效手段。已有的转基因方法中,受精卵原核显微注射法和病毒载体转染法产生转基因动物的效率较高,但转基因的表达因整合位点和拷贝数不定而难以预料;基于同源重组的基因打靶可将转基因导入到基因组中的特定位点,但效率很低。

为了解决目前转基因方法中存在的效率和定点问题,我们设想以最近发展起来的 FLP 重组酶介导的盒式交换反应为基础,建立基于 HPRT 位点的高效、定点转基因新体系。总的策略是:通过同源重组的基因打靶先在 HPRT 位点安装上一个 FLP 重组酶进行盒式交换反应所必需的交换盒结构,以作为转基因定点整合的靶点;然后再利用 FLP 重组酶介导的盒式交换进行 HPRT 位点的高效、定点转基因。本研究构建了含有 FLP 重组酶交换盒结构的针对小鼠 HPRT 位点的打靶载体;通过基因打靶,得到了 HPRT 位点装有 FLP 交换盒结构的重组 ES 细胞克隆,为进一步利用 FLP 重组酶进行高效定点转基因创造了必要条件。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒:pMP8^[1]由 Laura H. Reid 博士赠送;pF-

RT₂NeoLacZ 和 pSP72 由本室保存;FRT(简称 F)突变体 F3RT(简称 F₃,其序列是:5'-GCTAGCGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTTCAAATAGTATAGGAAC TTCGATATC-3')由上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.2 细胞株:ES 细胞株 R1^[2]由本室保存。

1.1.3 引物:测序引物 P1、R1 和 PCR 引物 P2、R2 的结合位点分别如图 1、2 所示。其序列分别是:P1: 5'-AATTCGCCAATGACAAGACGCTG-3'; R1: 5'-TACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGCC-3'; P2: 5'-CCAGCAGGTCAGCAAAGA ACTATAGC-3'; R2: 5'-TCCCTTCATAGAGACAAGGAATGTGTCC-3'。

1.2 方 法

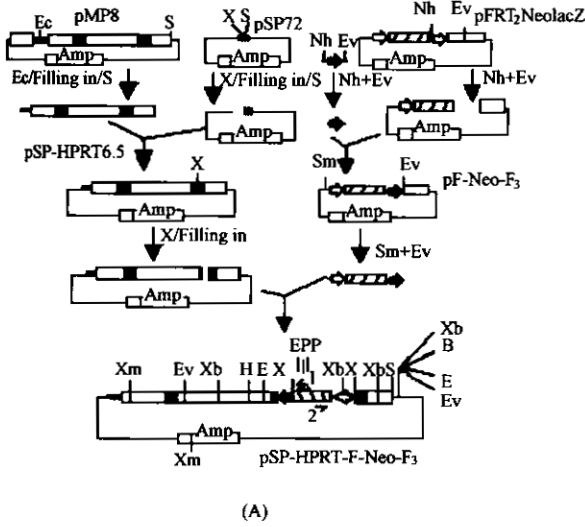
1.2.1 打靶载体 pSP-HPRT-F-Neo-F₃ 的构建:按图 1A 所示的流程构建打靶载体 pSP-HPRT-F-Neo-F₃;以 EcoT14I 和 SalI 从 pMP8 中切取 6.5kb 的含小鼠 HPRT 基因第二、三外显子的基因组片段并克隆到载体 pSP72 的 XhoI/SalI 位点,得到中间载体 pSP-HPRT6.5;将合成的 F₃RT 的两条互补链经退火、酶切后克隆到 pFRT₂NeoLacZ 的 NheI/EcoRV 位点,得中间载体 pF-Neo-F₃;以 SmaI/EcoRV 从中间载体 pF-Neo-F₃ 中切取 1.3kb 的 F-Neo-F₃ 片段,将它插入到中间载体 pSP-HPRT6.5 的 XhoI 位点,构建成打靶

收稿日期:2001-04-06,修回日期:2001-06-25。

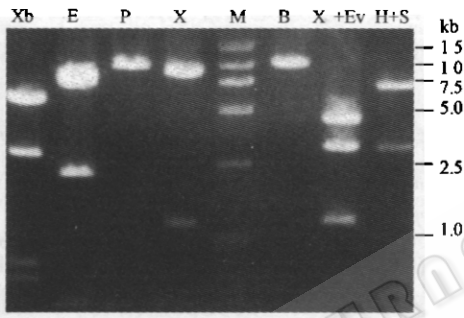
基金项目:国家自然科学基金重点项目(39830363)。

* 联系作者。Tel:86-21-25070027, E-mail:JLFu@guomai.sh.cn

载体 pSP-HPRT-F-Neo-F₃。构建成的 pSP-HPRT-F-Neo-F₃ 采用酶切和部分测序进行鉴定。



(A)



(B)

图1 打靶载体 pSP-HPRT-F-Neo-F₃ 的构建和结构鉴定
Fig.1 Construction and structural identification of pSP-HPRT-F-Neo-F₃

A. The procedure of construction of pSP-HPRT-F-Neo-F₃
 B. The result of restrictive digestion of pSP-HPRT-F-Neo-F₃
 B: BamHI E: EcoRI Ec: EcoT14I Ev: EcoRV H: HindIII
 Nh: NheI P: PstI S: SalI Sm: SmaI X: XhoI Xb: XbaI
 Xm: XmnI → F₃RT; ■ Neo; ◊ FRT < 1 Sequencing primer P1;
 2⁷ Sequencing primer R1; M: Marker DL 15000

1.2.2 ES 细胞的培养、基因转移、药物筛选和药物抗性克隆挑取:按文献[3]介绍的方法在胶原化平皿上培养 ES 细胞;并以每 1.2 × 10⁷ 个对数生长期细胞中加入约 10μg 线性化(用 XmnI 酶切 pSP-HPRT-

F-Neo-F₃,从凝胶中回收 8.6kb 线性化 DNA 片段)了的载体 DNA,在 240V、500μF 条件下以电穿孔法进行基因转移;以每个直径 10cm 平皿中接种约 2 × 10⁶ 个细胞的密度进行铺板,分别进行加药筛选或不加药培养。加药筛选皿在电穿孔后 36h 开始加 G418 (浓度为 200μg/mL),在电穿孔后第 8 天统计 G418 抗性细胞(G418^r)克隆数。然后,以 6-TG(6-Thioguanine,浓度为 2μg/mL)进行筛选。在开始加 6-TG 筛选后第 8 天统计 G418/6-TG 双药抗性(G418^r/6-TG^r)细胞克隆数。加 6-TG 后第 10 天,在显微镜下选取状态较好的 ES 细胞克隆用自制的毛细玻璃管挑取。

1.2.3 重组子的分子鉴定:将挑取的双药抗性 ES 细胞克隆在 24 孔细胞培养板中扩增为双份后,一份冻存留种,另一份制备基因组 DNA^[3]以用于分子鉴定。分子鉴定的策略是:先以 PCR 对双药抗性克隆作初步鉴定,再以基因组 Southern 杂交对 PCR 阳性克隆进行验证。如图 2 所示,PCR 引物 P2、R2 分别结合在 HPRT 基因第 3 外显子交换盒插入点的两侧;而基因组 Southern 杂交所用的探针 DNA 则为 HPRT 基因第二内含子中的一段长约 0.45kb 的片段。

2 结果

2.1 打靶载体 pSP-HPRT-F-Neo-F₃ 的结构和鉴定

pSP-HPRT-F-Neo-F₃ 由两个同源臂(4.8kb 的长臂和 1.15kb 的短臂)、正向选择 Neo 基因、Neo 基因两侧的 F 和 F₃ 以及质粒骨架组成。图 1B 所示的是对构建的 pSP-HPRT-F-Neo-F₃ 的多种限制酶酶切结果。酶切结果与预期的相吻合,进一步的以 P1、R1 为引物的测序结果亦显示打靶载体的结构与设计的一致(测序结果未显示)。

2.2 ES 细胞基因转移和药物筛选

用电穿孔法将线性化了的打靶载体 DNA 转染 4 × 10⁷ 个 ES 细胞,经药物筛选,结果如表 1 所示。我们从 4 × 10⁷ 个电穿孔细胞中得到了 126 个 G418/6-TG 双药抗性 ES 细胞克隆,从中挑取了 24 个克隆到 24 孔细胞培养板中进行扩大培养,以便作进一步的分子鉴定。

表 1 pSP-HPRT-F-Neo-F₃ 载体 DNA 向 ES 细胞中转移和药物筛选结果

Table 1 Result of electroporating pSP-HPRT-F-Neo-F₃ DNA into ES cells and drug selection

	No. of seeded cell	No. of survival clones	Frequency	No. of clones picked up
No drug added	2 × 10 ⁵	1.05 × 10 ⁵	52.5%	
G418 ^r	4 × 10 ⁷	6020	2.18 × 10 ⁻⁴	
G418 ^r /6-TG ^r	4 × 10 ⁷	126	4.5 × 10 ⁻⁶	24

2.3 重组 ES 细胞克隆的分子鉴定

2.3.1 PCR 鉴定结果:以挑取的 24 个双药物抗性 ES 细胞克隆基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析,结果如下:3 个克隆与野生型 ES 细胞一样在约 0.2kb 处有一扩增条带;19 个克隆在约 0.2kb 和约 1.5kb 处各有一扩增带;另有 2 个克隆(克隆 F4、F18)在约 1.5kb 处有一扩增带而在 0.2kb 处无扩增带(图 2(a)所示的是 PCR 扩增产物凝胶电泳的部分结果)。根据设计(见图 2),克隆 F4 和 F18 与发生了双交换的重组子情况相符。

2.3.2 基因组 Southern 杂交结果:对克隆 F4 和 F18 基因组 DNA *Bam*HI 酶切产物 Southern 杂交结果如图 2(b)所示。对照野生型 ES 细胞有一 7kb 的杂交信号带,而 F4、F18 有一约 8.3kb 的杂交信号带。以上结果分别与野生型 ES 细胞和双交换后重组 ES 细胞克隆的情况相符。证实 F4 和 F18 是发生了预期双交换的 ES 细胞克隆。

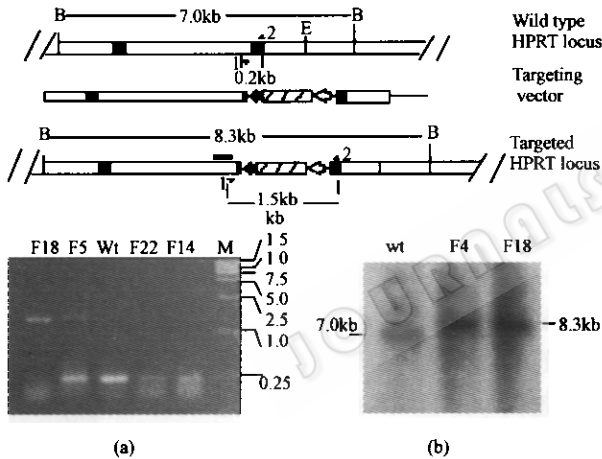


图 2 分子鉴定的策略和结果

Fig.2 Schematic representation of the strategy for molecular identification and results of PCR and Southern blotting

(a) Result of PCR; (b) Result of Southern blotting

B. *Bam*HI; M. Marker; ■ probe; ■ Neo; ◀ F₃ Rt; ◊ FRT

■ Exon; / 2 primer R2; 1⁷ primer P2; F4-F22.

Double drug resistant clone; Wt. Wild type ES cell

3 讨 论

FLP 重组酶源于啤酒酵母的 2 μ m 质粒,它能识别特异的 DNA 序列(识别位点,称为 FRT),并介导两识别位点间进行包括整合反应在内的多种位点特异性重组反应^[4]。与同源重组不同,FLP 重组酶介导的位点特异性重组反应具有效率高、位点专一性强、结果精确等优点。利用 FLP 重组酶介导的位点

特异性整合反应进行转基因的定点整合已有一定的历史^[5]。但在早期的研究中,转基因定点整合的效率并不高。这是由于 FLP 在介导整合反应的同时还介导切除反应,使得整合上去的转基因又很快被重新切除。近年来发展起来的 FLP 重组酶介导的盒式交换(Recombinase mediated cassette exchange, RMCE)策略,采用了一对 FLP 重组酶识别位点变异体,可有效地克服转基因整合后被重新切除的问题,因而具有很高的定点整合效率^[6-8]。重组酶介导的盒式交换策略的出现,为我们发展高效、定点转基因小鼠制备方法提供了新思路。

但要想利用 FLP 重组酶介导的盒式交换策略进行定点转基因,首先必须在基因组的特定位点安装上一个外源 DNA 定点整合的靶的——可被 FLP 重组酶识别的交换盒结构。在考虑交换盒的安装位置时,我们选择了次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)基因位点。这是由于:HPRT 基因是一个能在各种组织细胞中表达的持家基因;HPRT 基因的结构和功能都已很清楚;HPRT 缺陷并不妨碍小鼠的生长发育。因此,从转基因表达和对转基因遗传效应分析需要的角度来看,小鼠 HPRT 基因位点应是一个较为理想的转基因定点整合位点。

为了在 HPRT 位点安装上一个可用于 FLP 重组酶介导的盒式交换反应的交换盒结构,本项研究设计了一个由一对 FLP 重组酶识别位点变异体 FRT(简称 F)和 F3RT(简称 F3)^[7]以及选择性标记 Neo 基因构成的“交换盒”F-Neo-F3 结构;在此基础上,利用得到的小鼠 HPRT 基因组 DNA 片段构建了针对小鼠 HPRT 位点的置换型基因打靶载体 pSP-HPRT-F-Neo-F3;并通过基于同源重组的基因打靶,将交换盒结构安装到了小鼠 ES 细胞基因组的 HPRT 位点。得到的两个重组 ES 细胞克隆,既可用于在细胞水平上直接利用 FLP 重组酶介导的盒式交换反应进行高效、定点转基因,也可以先通过囊胚腔注射育种构建含 FLP 重组酶交换盒结构的转基因工程小鼠,以工程小鼠产生的受精卵作为外源 DNA 的受体进行受精卵原核显微注射,注入的外源 DNA(同样含 F 和 F3 结构)在 FLP 重组酶的介导下被定点交换到 HPRT 位点。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Laura H Reid, Edward G. Shesely, Hyung-Suk Kim, and Oliver Smithies. Cotransformation and Gene Targeting in Mouse Embryonic Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(5): 2769 ~ 2777

- [2] Nagy A, Rossant J, Nagy R *et al*. Derivation of Completely Cell Culture-Derived Mice from Early-Passage Embryonic Cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(18):8424 ~ 8430
- [3] Joyner AL. Gene Targeting: A Practical approach. London: *Oxford University Press*, 1993, pp1 ~ 50
- [4] Brain Saucer. Site-specific recombination: developments and application. *Current Opinion in Biotechnology*, 1994, **5**:521 ~ 527
- [5] Stephen O' Gorman, Daniel T Fox, Geoffrey M Wahl. Recombinase-Mediated Gene Activation and Site-Specific Integration in Mammalian cells. *Science*, 1991, **251**: 1351 ~ 1355
- [6] Jost Seibler and Jürgen Bode. Double-Reciprocal Crossover Mediated by Flp-Recombinase: A Concept and Assay. *Biochemistry*, 1997, **36**: 1740 ~ 1747
- [7] Seibler J, Schübeler Dirk, Fiering Steven *et al*. DNA cassette exchange in ES cells mediated by Flp recombinase: An efficient strategy for repeated modification of tagged loci by marker-free constructs. *Biochemistry*, 1998, **37**:6229 ~ 6234
- [8] Jürgen Bode, Thomas Schlake, Michaela Iber *et al*. The transgeneticist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes. *Biol Chem*, 2000, **381**:801 ~ 831

Construction of a Flp “Exchange Cassette” Contained Vector and Gene Targeting in Mouse ES Cell

ZHENG Jing-Min LI Jian FU Ji-Liang*

(*Department of Medical Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*)

Abstract Using the HPRT genomic DNA fragment and synthesized oligonucleotides, pSP-HPRT-F-Neo-F₃ was designed and constructed as a replacement gene targeting vector by usual molecular cloning techniques. Structure of pSP-HPRT-F-Neo-F₃ was identified by restrictive digestion analysis and partly sequencing. Then linearized pSP-HPRT-F-Neo-F₃ DNA was electroporated into ES cells, and transfected cells were screened by being cultured in medium containing 200 μ g/mL G418 and 2 μ g/mL 6-GT. Twenty-four double drug resistant clones were picked up and analyzed, among them, two clones were proved to have taken place the required recombination by PCR and southern blotting analysis.

Key words gene targeting, ES cell, HPRT, FLP recombinase

Received: April 6, 2001

This work was supported by a Grant (39830363) from Natural Science Foundation Program. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>