

潮霉素和新霉素抗性基因转基因小鼠的建立及其表达研究

Generation of Transgenic Mice for Hygromycin and Neomycin Resistance Genes and Studies on Transgene Expression

党素英^{1,2}, 麻孙恺¹, 孙霞¹, 严兰珍¹, 王铸钢^{1,2*}

DANG Su-Ying^{1,2}, MA Sun-Kai¹, SUN Xia¹, YAN Lan-Zhen¹ and WANG Zhu-Gang^{1,2*}

1. 上海南方模式生物研究中心, 上海 201203

2. 上海第二医科大学医学遗传学教研室, 上海 200025

1. Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 201203, China

2. Department of Medical Genetics, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China

摘 要 建立潮霉素(hygromycin, hyg)和新霉素(neomycin, neo)抗性基因转基因小鼠系, 以获得两种抗性基因同时表达的小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs), 为条件性基因剔除或小鼠胚胎干细胞克隆的筛选创造条件。将 pTK-hyg^R-pA, PGK-neo^R-pA 两个转录单元分别克隆至 pBluescript 载体中获得 hyg^R-neo^R 双抗性基因表达质粒, 以 Kpn I 和 Xba I 双酶切, 回收 4245bp 串联基因片段, 经显微注射获得 Hyg^R-neo^R 转基因小鼠。PCR 及 Southern blot 鉴定转基因小鼠基因型; RT-PCR 检测 hyg^R、neo^R 基因在转基因阳性小鼠组织及 MEFs 中的表达。经显微注射共获得 7 只转基因阳性小鼠(Founders, G0 代), 经交配繁育, 建立了 6 个转基因小鼠系。RT-PCR 检测其中 5 个转基因阳性小鼠系 F1 代杂合子成年雌性小鼠肝脏、卵巢组织中 hyg^R、neo^R 基因的表达, 发现 hn30, hn33, hn66 和 hn67 系阳性小鼠的 1 种或 2 种组织中有 hyg^R、neo^R 的表达; RT-PCR 检测发现 hyg 和 neo 抗性基因在从 hn30 和 hn66 系分离培养的 MEFs 中表达。通过显微注射, 建立了表达 hyg-neo 抗性基因的转基因小鼠系, 转基因表达检测发现两个转基因小鼠系的胚胎成纤维细胞中表达双抗性基因。

关键词 潮霉素抗性基因, 新霉素抗性基因, 转基因小鼠, 小鼠胚胎成纤维细胞

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)01-0159-04

Abstract To generate transgenic mice in which both hygromycin (hyg) and neomycin (neo) resistance genes are expressed in murine fibroblast cells (MEFs), which are required for conditional gene knock-out and screening of drug resistant ES cell clones. To construct Hyg^R-neo^R expression vector, pTK-hyg^R-pA and PGK-neo^R-pA were cloned into pBluescript vector. DNA fragments of tandem genes (4245bp) were prepared by Kpn I and Xba I digestion and transgene was microinjected into pronucleus of zygotes to generate transgenic mice. Transgenic mice were identified by PCR and Southern blot; expression of hyg^R and neo^R gene transcripts were detected by RT-PCR. 7 founder mice carrying hyg-neo resistant genes were obtained and 6 transgenic mouse lines were successfully established. The hyg^R and neo^R gene transcripts were detected in the liver and/or ovary of

Received: May 20, 2004; Accepted: July 7, 2004

This work was supported by National Funds for Outstanding Young Scientists (No. 39925023), National Program for Hi-tech Research and Development(No. 2001AA216081), the Foundation of Science & Technology Development of Shanghai Municipal Government(No. 99JC14029, 99XD14005).

* Corresponding author. Tel: 86-21-64457997; E-mail: zhugangw@vip.163.com

国家杰出青年科学基金项目(No 39925023), 国家高技术研究发展计划项目(No 2001AA216081), 上海市科技发展基金项目(No 99JC14029, 99XD14005)。

transgenic mice from hn30, hn33, hn66 and hn67 mouse lines. In MEFs isolated from the mice of line hn66 and hn30, expression of hyg and neo resistant genes was also detectable. Transgenic mouse lines expressing two anti-drug genes have been established. The hyg and neo resistant gene transcripts were detected in the MEFs of two transgenic mouse lines.

Key words hygromycin resistant gene, neomycin resistant gene, transgenic mice, murine fibroblast cells

胚胎干细胞 (Embryonic Stem Cell, ES 细胞) 的培养通常需要饲养层细胞, 小鼠的胚胎成纤维细胞 (murine embryonic fibroblasts, MEFs) 是一种较常用的饲养层细胞, MEFs 不仅提供 ES 细胞增殖所需要的底物, 同时产生 LIF (白细胞抑制因子), 抑制 ES 细胞分化^[1]。在基因打靶等操作过程中通常需要在 ES 细胞培养基中加入药物进行克隆筛选, 所以也就必须先获得相应的抗药性 MEFs 才能进行 ES 细胞药物抵抗性克隆筛选。目前用于制备 MEFs 的带有单个抗药性基因如抗新霉素 (neomycin resistance, neo^R), 抗潮霉素 (hygromycin resistance, hyg^R), 抗嘌呤霉素 (puromycin resistance, $puro^R$)^[2-4] 的小鼠系已建立。然而随着基因打靶技术的发展, 许多实验中需要对 ES 细胞进行顺序的两种或几种药物筛选, 这就需要带有两种或两种以上抗药性基因的 MEFs。本研究利用受精卵原核显微注射技术建立 hyg^R - neo^R 转基因小鼠系, 以期获得在胚胎成纤维细胞中稳定表达双抗性基因的小鼠品系。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 Xpnt 由本室保存。杂交一代小鼠 (CBA × C57BL/6J)、转基因小鼠在 SPF 级动物房饲养。

1.2 Hyg^R - neo^R 双抗性基因表达载体的构建

质粒 pCEP4 (Invitrogen) 以 *Xru* I 和 *Sal* I 酶切回收 1.99kb 片段 (pTK-hygromycin^R-pA), 将其克隆至 pUC19 载体的 *Sma* I 和 *Sal* I 位点间, 再以 *Kpn* I 和 *Sal* I 将克隆至 pUC19 载体中的 pTK-hygromycin^R-pA 片段酶切回收后插入到 pBluescript SK 载体的 *Kpn* I 和 *Sal* I 位点间; 以 *Sal* I 和 *Xba* I 将 Xpnt 载体中的 PGK- neo^R -pA 片段 (2.3kb) 酶切回收后插入到 pBluescript SK 载体的 *Sal* I 和 *Xba* I 位点间, 经限制酶谱分析, pTK-hygromycin^R-pA、PGK- neo^R -pA 两个转录单元串联插入到 pBluescript SK 载体的 *Kpn* I 和 *Xba* I 位点间, 二者间有 500bp 的隔离子 (spacer), 完成 Hyg^R - neo^R 双抗性基因表达载体的构建。以 *Kpn* I 和 *Xba* I 线性化后, 回收 4245bp 串联基因片段用于显微注射。

1.3 转基因操作

取超排的雌性杂交一代 (CBA × C57BL/6J) 小鼠受精卵, 将纯化的 DNA (用 TE 缓冲液稀释至 5ng/ μ L) 经显微操作注射到受精卵的雄原核中, 再将注射后的卵植入 0.5d 假孕鼠的输卵管, 每只假孕鼠单侧输卵管移植 25 枚卵。

1.4 小鼠基因组 DNA 的提取

经过显微注射后出生的小鼠在 3 周龄时剪取鼠尾 0.5 ~ 1cm, 加 500 μ L 裂解液及 50 μ L 蛋白酶 K (10mg/mL), 56℃ 消化过夜。离心取上清, 无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤, 稍晾干后溶解于 200 μ L 纯水中。

1.5 PCR 鉴定转基因阳性鼠

经 DNA star 软件分析, 共选取两对引物用于转基因阳性鼠鉴定。引物 a: 5'-GCGGCTGCATACGCTTGATC-3', b: 5'-CCT-CAGAAGAACTCGTCAAG-3', 引物 a、b 序列分别位于 neo^R 基因编码区 371-390bp 和 781-800bp, 据此应扩增出大小为 430bp 的片段, 反应条件: 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 30s, 35 个循环。c: 5'-CCTGCTTCATCCCCGTGG-3', d: 5'-AGTTAGCCTC-CCCCATCTC-3', 引物 c、d 序列分别位于 hsv-tk promoter 5' 端和 Hygromycin^R 基因编码区 3' 端, 应扩增出 1.3kb 的条带, 反应条件为 94℃ 30s, 65℃ 30s, 72℃ 90s, 35 个循环。

1.6 Southern 杂交

取 DNA 30 μ L (约 10 μ g), 限制性内切酶 (*Eco*R V) 消化过夜后, 0.8% 琼脂糖电泳, 转膜后杂交。鉴定所用探针为经测序证实序列正确的引物 a、b 的扩增产物 (430bp)。

1.7 RT-PCR 检测转基因阳性小鼠系 Hygromycin^R、 neo^R 基因的表达

取每一系 (稳定传代的) F1 代杂合子成年雌性小鼠肝脏、卵巢组织, 按 Trizol 试剂 (Invitrogen Inc) 说明书提取组织总 RNA, RQ1 DNase (Promega) 处理后, 取 1 μ g 按 RNA PCR KIT (TaKaRa) 说明书进行反转录 (随机引物引导 cDNA 第一链合成)。以两对引物进行反转录 PCR 分别检测 Hygromycin^R、 neo^R 基因表达。引物 e: 5'-TCTCGATGAGCTGATGCTTTGGG-3', f: 5'-GCTTCTGCGGCGGATTTGTGTAC-3', 引物 e、f 序列分别位于 Hygromycin^R 基因编码区 531bp-554bp 和 916-939bp, 应扩增出大小为 408bp 的序列; 引物 g: 5'-CCTGCTCGGTGC-CCTGAATGAA-3', h: 5'-CGGCTAGCCAACGCTATGTCT-3' 引物 g、h 序列分别位于 neo^R 基因编码区 165-187bp 和 664-686bp, 应扩增出大小为 521bp 的序列。引物 e、f 和引物 g、h 反应条件均为 94℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 30s, 35 个循环。

1.8 转基因阳性小鼠系 MEFs 的制备及 Hygromycin^R、 neo^R 基因表达检测

每一系 (稳定传代的) F1 代杂合子成年雌性小鼠与 CBA × C57BL/6J 雌鼠交配, 见栓后 13.5d 取出胚胎, 去除内脏, 取下头部裂解制备 DNA, PCR 鉴定基因型 (方法同前); 身体余下部分剪碎后以 0.5% trypsin 消化后, MEFs 接种在 DMEM 培养基 (GIBCO, 含 10% FBS, Glutamin, 抗生素) 中。根据基因型鉴定结果分别以 Trizol 试剂 (Invitrogen Inc) 裂解阳性及阴性 MEFs 制备 RNA, RT-PCR 检测 Hygromycin^R、 neo^R 基因表达 (方法同前)。剩余 MEFs 传代冻存备抗药性检测。

2 结果

2.1 转基因质粒

分别含 hsv-TK、PGK1 强启动子和 polyA 加尾信号及相应

抗药基因编码区序列的 pTK-hygromycin^R-pA、PGK-neo^R-pA 两个转录单元串联插入到 pBluescript SK 载体的 Kpn I 和 Xba I 位点间,二者间有 500bp 的隔离子 (spacer),构建完成的质粒经酶切和测序鉴定完全正确(图 1)。

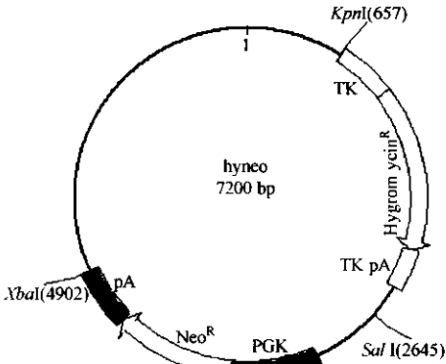


图 1 Hyg^R-neo^R 转基因质粒

Fig.1 Construction of Hyg^R-neo^R transgene

TK:TK promoter; Hygromycin^R: Hygromycin resistance gene;
TK pA:TK polyadenylation signal; PGK: PGK promoter;
neo^R: neomycin resistance gene; pA: polyadenylation signal

2.2 转基因阳性鼠鉴定

实验中共获得了 590 枚显微注射受精卵,将其分别移植到 26 只假孕母鼠的输卵管中,其中 17 只母鼠怀孕,移植成功率为 65.38%,共计出生仔鼠 107 只,以 PCR 方法鉴定共获得 hygromycin^R-neo^R 转基因阳性鼠 7 只,阳性率为 6.54%,分别标记为 hn15, hn30, hn33, hn36, hn66, hn67, hn93。对这些阳性鼠的基因组 DNA 进行 Southern 鉴定的结果与 PCR 一致(图 2)。

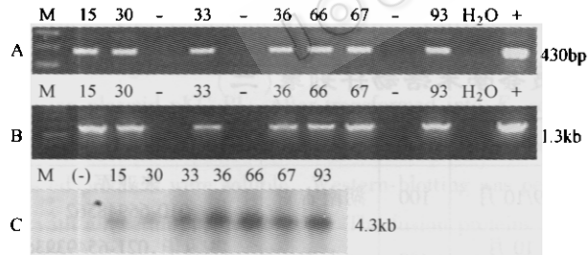


图 2 hygR-neoR 转基因阳性鼠鉴定

Fig.2 Identification of Hyg^R-neo^R transgenic mice

A: PCR product amplified with primer a & b;
B: PCR product amplified with primer c & d;

C:Southern blot shows transgene with expected size.

2.3 转基因小鼠建系

在建系过程中, hn36 无阳性后代, hn93 G₀ 代生出阳性后代较晚,其余 G₀ 代小鼠均已成功建系。

2.4 Hygromycin^R、neo^R 基因表达检测

RT-PCR 检测稳定传代的五个小鼠系 F1 代杂合子成年雌性小鼠肝脏、卵巢组织中两种基因的表达,在 hn30、hn33、hn66、hn67 四个系中一种或两种组织中 Hygromycin^R、neo^R 表达呈阳性,其中 hn30、hn66 系小鼠卵巢组织、hn33 系小鼠肝

脏 Hygromycin^R、neo^R 基因表达程度最高,其余组织及 hn15 系两种组织 Hygromycin^R、neo^R 基因呈弱表达或未检测到表达(图 3)。RT-PCR 检测结果显示 Hygromycin^R 和 neo^R 两种基因表达趋势一致。

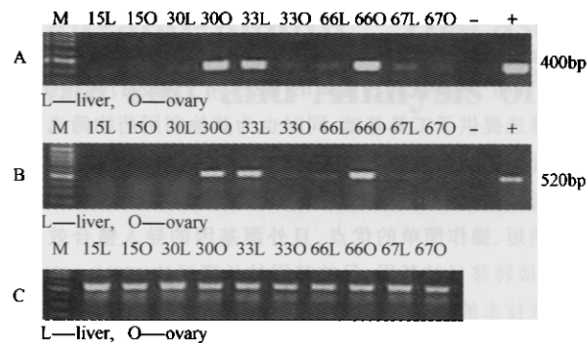


图 3 转基因阳性小鼠系 Hygromycin^R、neo^R 基因表达检测

Fig.3 Expression of Hyg^R-neo^R in liver and ovary tissues of transgenic mice

A: Hygromycin^R transcripts were detected by RT-PCR.

The size of positive band was 400bp in the gel.

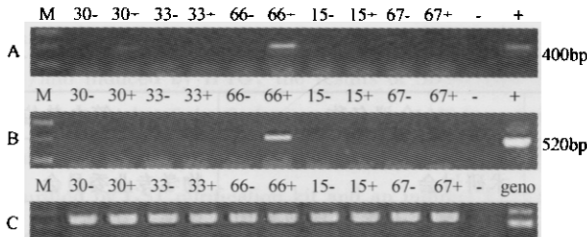
B: neo^R transcripts were detected by RT-PCR.

The size of positive band was 520bp in the gel.

C:β-actin transcripts were detected by RT-PCR as control.

2.5 转基因阳性小鼠系 MEFs 中 Hygromycin^R、neo^R 基因表达的检测

稳定传代的五个小鼠系中,按方法 1.8 制备 MEFs, RT-PCR 检测可见 hn66、hn30 两系基因型阳性的 MEFs 中有 Hygromycin^R、neo^R 基因表达条带出现,其中 hn66 系基因型阳性的 MEFs 中 Hygromycin^R、neo^R 基因表达程度较高,其余三系 RT-PCR 检测 Hygromycin^R、neo^R 基因表达未见阳性表达条带。



30-: MEFs isolated from wild type mice;
30+: MEFs isolated from hn30 transgenic mice.

图 4 转基因阳性小鼠系 MEFs 中 Hygromycin^R、neo^R 基因表达检测

Fig.4 Expression of Hyg^R-neo^R transgene in MEFs of transgenic mice

A: Hygromycin^R transcripts with expected size

400 bp were detected by RT-PCR;

B: neo^R transcripts with expected size

520 bp were detected by RT-PCR;

C:β-actin transcripts were detected by RT-PCR as control.

3 讨论

目前已有的带有两种和两种以上抗药性基因的遗传修饰小鼠主要是通过以下两种方式获得的:基因打靶^[5];已有单抗药性转基因小鼠之间,或单抗药性转基因小鼠与双抗药

性转基因小鼠之间经过几次交配获得的^[6]。然而这两种方法所需的实验周期长、研究费用较高。本研究利用转基因技术,将 pTK-hygromycin^R-pA, PGK-neo^R-pA 两个串联转录单元整合到小鼠基因组,获得了 Hygromycin^R、neo^R 双抗性基因表达阳性的转基因小鼠系,且在转基因阳性小鼠 MEFs 中检测到 Hygromycin^R、neo^R 双抗性基因的表达,为制备携带 Hygromycin^R、neo^R 两种抗药性基因的 MEFs 用于基因打靶中 ES 细胞的筛选提供了工具基础,同时也为其他利用药物筛选的实验研究提供了良好的工具。

与基因打靶技术相比,DNA 雄原核的显微注射具有实验周期短、操作简单的优点,且外源基因的导入整合效率较高,直接转移目的基因,目的基因的长度可达 100kb。本研究利用该技术的特点,将两种抗药性基因串联整合入小鼠基因组内,使转基因小鼠系同时具备两种抗药性特质,且两种抗药性基因的表达趋势一致,互不干扰,实验证明这是一种简便、快速、经济、实用的建立具两种(或以上)外源基因表达特性的转基因策略。

转基因动物外源基因的表达受多种因素的影响,目的基因的设计、载体的选择、启动子的选择、外源基因的整合位点及整合的拷贝数等都会影响转基因的表达水平及其组织特异性。本研究选择了经研究证实整合入基因组后表达水平较高且稳定的两个完整转录单元 Ptk-hygromycin^R-pA 和 PGK-neo^R-pA,两种目的基因分别选用组织表达谱广泛的两种强启动子 hsv-TK promoter 和 PGK promoter,两个转录单元间加一个间隔序列以保证两种基因都能高表达且互不干扰。实验结果表明,Hygromycin^R、neo^R 两种抗药性基因在转基因小鼠系中的表达比率较高(五个转基因阳性小鼠系中有四个小鼠系检测到不同程度的外源基因表达)。而各个转基因阳

性小鼠系及同一系各组织间两种抗药性基因表达的差异可能是由于外源基因的整合位点不同所造成的。

致 谢:感谢徐国江老师、匡颖、王龙、池俊等对本研究的帮助。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Robertson EJ. In Robertson EJ ed. Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cell: A Practical Approach. IRL Press, Oxford, 1987, pp. 71 - 112
- [2] Johnson KA, Lerner CPDi, Lacio LC *et al.* Transgenic mice for the preparation of hygromycin-resistant primary embryonic fibroblast feeder layers for embryonic stem cell selections. *Nucleic Acids Res.* 1995, **23**(7): 1273 - 1275
- [3] Tucker KL, Beard C, Dausman J *et al.* Germ-line passage is required for establishment of methylation and expression patterns of imprinted but not of nonimprinted genes. *Genes Dev.* 1996, **10**(8): 1008 - 1020
- [4] Zijlstra M, Li E, Sajjadi F *et al.* Germ-line transmission of a disrupted beta 2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*, 1989, **342**(6248): 435 - 438
- [5] Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE *et al.* Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 1982, **300**(5893): 611 - 615
- [6] Tucker KL, Wang YK, Dausman J *et al.* A transgenic mouse strain expressing four drug-selectable marker genes. *Nucleic Acids Res.* 1997, **25**(18): 3745 - 3746