

# 基于 BAC 重组酶系统构建莱航鸡多位点基因打靶载体的研究 Construction of Vector of Multiple Loci Gene Targeting in *Leghorn chicken* Based on BAC with *Cre/lox* P System

唐冬生<sup>1,2,\*</sup>, 李 芳<sup>1</sup>, 蒋 泓<sup>1</sup>, 胡大林<sup>1</sup>, 张细权<sup>3</sup>, 李月琴<sup>2</sup>, 周天鸿<sup>2</sup>

TANG Dong-Sheng<sup>1,2,\*</sup>, LI Fang<sup>1</sup>, JIANG Hong<sup>1</sup>, HU Da-Lin<sup>1</sup>, ZHANG Xi-Quan<sup>3</sup>, LI Yue-Qin<sup>2</sup> and ZHOU Tian-Hong<sup>2</sup>

1. 佛山大学, 佛山 528000

2. 暨南大学生命科学与技术学院, 广州 510632

3. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642

1. Foshan University, Foshan 528000, China

2. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

3. College of Animal Science, Southern China Agriculture University, Guangzhou, China

**摘 要** 以莱航鸡重复的 *rDNA* 基因间的间隔序列为靶位点, 利用 BAC 重组酶系统构建含人干扰素基因的多位点基因打靶载体, 为建立莱航鸡多位点基因打靶技术获得关键材料。首先构建 BAC-TDN 筛选载体, 然后构建 pYLSV-GID 表达载体。将 BAC-TDN 筛选载体和 pYLSV-GID 表达载体共转化至大肠杆菌 NS3529 中, 通过其 *Cre* 重组酶的作用形成 BAC-TDN-VS-GID 质粒, 采用归位内切酶 *I-Sce* I 切除 pYLSV 质粒骨架, 利用接头 *LS* 使之环化, 构建成莱航鸡大容量多位点基因打靶载体 BAC-TDN-GID。每次克隆均经酶切或 PCR、测序等鉴定 DNA 片段的插入及插入方向。以该载体为材料的多位点基因打靶技术将提高基因定点整合效率, 解决外源基因不能稳定表达、安全性等部分问题, 突破了 DNA 重复序列不能作为外源基因整合靶位点的禁区。

**关键词** 基因打靶, 多位点, 载体, 细菌人工染色体, 重组酶系统, 莱航鸡, 重复序列

中图分类号 Q782 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)02-0241-05

**Abstract** Based on the sequence of BAC (Bacterial Artificial Chromosome) along with the *Cre/lox* P system, the gene-targeting vectors to multiple loci of the repetitive internal transcribed spacers between *rDNA* genes in *Leghorn chicken* were constructed. The key material of multiple loci gene targeting in vivo would be obtained.

First, the plasmid of pYLSV-TDN with *TK*, *HRDS2*, and *Neo* genes was constructed. The *TK*-*HRDS2*-*Neo* DNA fragment obtained from the plasmid of pYLSV-TDN was digested by *Not* I / *Hind* III and inserted into the upstream of the *lox* P site of BAC plasmid for obtaining the selective vector of BAC-TDN. The expression vector of pYLSV-GID with *EGFP*, *hIFN* genes, and *HRDS1* was then obtained. The plasmid of BAC-TDN-VS-GID was obtained by cotransformation of the selective vector of BAC-TDN and the expression vector of pYLSV-GID to *E. coli* NS3529 through the action of *Cre/lox* P system. The gene-targeting

Received: August 7, 2006; Accepted: November 17, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Sciences Foundation of China (No. 30470978, 30671194), and the National Natural Sciences Foundation of Guangdong (No. 04011645).

\* Corresponding author. Tel: +86-757-82810525, E-mail: tangdsh@163.com

国家自然科学基金资助项目(No.30470978, 30671194)和广东省自然科学基金资助项目(No.04011645) 中国微生物研究所联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

vector of BAC-TDN-GID to multiple loci of the ITS region in *Leghorn chicken* was obtained by cleaving the sequence of pYLVs with the homing endonuclease of I-Sce I and ligating with the linker of LS. The insertion and the insert direction of DNA fragments were identified by restriction digestion or PCR and sequencing in each clone.

The significance of the technique of gene-targeting vector to multiple loci are shown as follows. First, the targeting loci were increased to 100 ~ 300. Second, the problems of unstable expression of inserted genes were partially solved. Third, the need for safety against toxicity integration was resolved. Fourth, the forbidden zone of gene integrating on the repetitive DNA sequences was broken through.

**Key words** gene targeting, multiple loci, vector, BAC, Cre/lox P system, *Leghorn chicken*, repetitive sequence

1993年英国 Sang 博士将外源基因导入公鸡,首次获得了蛋黄中含有珍贵的人类蛋白的母鸡<sup>[1]</sup>。由于莱航鸡的繁殖周期短,产蛋量高,蛋中转基因产品具有巨大的潜在价值,因此,转基因莱航鸡是一种理想的输卵管生物反应器<sup>[2]</sup>。目前,王晓通、孙怀昌和 Jamie love 等人利用显微注射鸡胚的方法,都各自成功地获得了报告基因 *Lac Z* 和人生长素 *hGH* 等外源基因随机插入转基因鸡<sup>[3,4]</sup>。除了显微注射鸡胚以外,还出现了诸如鸡卵原始胚细胞的弹道转染法、逆转录病毒载体法、精子载体法和胚胎干细胞原始生殖细胞法等转基因鸡技术<sup>[3]</sup>。

然而,随机插入的转基因方法严重阻碍了外源基因在转基因动物体内的有效整合、稳定遗传及表达。能使基因定点整合的基因打靶技术是解决该问题的一种理想方法。但是,目前的基因打靶技术存在打靶效率低、容易受到随机插入的干扰等不足之处,作者建立的以 DNA 重复序列为靶位点的多位点基因打靶技术可解决这部分问题<sup>[5]</sup>。

本研究以莱航鸡(*Leghorn chicken*)核仁组织区 rDNA 串连重复基因(18S、5.8S 和 28S rDNA 基因)间的间隔序列为靶位点,基于 BAC(Bacterial Artificial Chromosome)重组酶系统构建含增强型绿色荧光蛋白基因和人干扰素基因的莱航鸡多位点基因打靶载体,为建立适用于莱航鸡基因定点敲入的多位点基因打靶技术获得关键材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pCTKNeo 等质粒为佛山大学分子生物学实验室保存;pEGFP 质粒为暨南大学生物化学与分子生物学实验室保存;BAC747N、pYLSV 和 pYLVS 质粒以及 NS3529 大肠杆菌菌种由华南农业大学刘耀光教授惠赠<sup>[6]</sup>;pCDNA3-*hIFN* 重组质粒为中南大学湘雅医院传染病研究室惠赠;凝胶回收试剂盒、LA Taq DNA 聚合酶、GC 缓冲液和各种限制性内切酶为 TaKaRa

公司产品。归位内切酶(Homing Endonuclease)I-Sce I 为 NewEngland Biolab 公司产品。

### 1.2 BAC-TDN 筛选载体的构建

**1.2.1 pYLSV-TDN 质粒的构建** 以莱航鸡基因组为模板,以 rDNA 基因间的间隔序列 ITS1(internal transcribed spacer, ITS)为靶位点,通过 LA Taq PCR 扩增同源重组引导序列 HRDS1(homogenous recombination direct sequence, HRDS)<sup>[7,8]</sup>。引物设计有相应的限制性内切酶位点。经 *Bam*H I / *Sal* I 双酶切后将 HRDS1 克隆到 pYLSV 质粒上,获得 pYLSV-HRDS1 质粒。然后,以 pCTKNeo 质粒为模板,扩增 TK 和 Neo 基因分别经 *Sal* I / *Hind* III 和 *Xho* I / *Bam*H I 双酶切克隆至 pYLSV-HRDS1 质粒中 HRDS1 的上下游。经酶切、测序鉴定获得 pYLSV-TK-HRDS1-Neo,即 pYLSV-TDN 质粒。

**1.2.2 BAC-TDN 筛选载体的构建** 用 *Hind* III / *Not* I 大量酶切上述 pYLSV-TDN 质粒,回收 TK-HRDS1-Neo DNA 片段,克隆到经 *Hind* III / *Not* I 酶切的 BAC747 质粒中。经 PCR、测序鉴定获得 BAC-TDN 筛选载体。

### 1.3 pYLVS-GID 表达载体的构建

为了去除 pEGFP 质粒上 pCMV 与 EGFP 编码序列间的多克隆位点,以 pEGFP 质粒为模板,通过 PCR 扩增出 pCMV 和 EGFP 编码序列的 DNA 片段,经 *Sal* I / *Pst* I 和 *Pst* I / *Hind* III 双酶切后分别克隆到 pUC18 质粒上,经 PCR 鉴定得到 pUC-pCMV-GFP 质粒。以 pUC-pCMV-GFP 质粒为模板,通过 PCR 扩增出 pCMV-GFP 的 DNA 片段,克隆到经 *Hind* III / *Sal* I 酶切的 pYLVS 质粒上,获得 pYLVS-GFP 质粒。

以莱航鸡基因组作模板,通过 PCR 扩增出同源重组引导序列 HRDS2 片段,经 *Nhe* I / *Cla* I 双酶切后将 HRDS2 克隆到 pYLVS-GFP 质粒中。经 PCR、测序鉴定获得 pYLVS-GFP-HRDS2 质粒。以 pCDNA3-*hIFN* 质粒为模板,通过 PCR 扩增出 *hIFN* 基因的 DNA 片段,通过 *Sal* I / *Nhe* I 双酶切后将

hIFN 克隆到 pYLVS-GFP-HRDS2 质粒中。经 PCR、酶切、测序鉴定获得 pYLVS-GFP-hIFN-HRDS2 ,即 pYLVS-GID 表达载体。

1.4 大容量 BAC-TDN-GID 打靶载体的构建

将 BAC-TDN 筛选载体和 pYLVS-GID 表达载体共转化入大肠杆菌 NS3529 ,通过 Cre 重组酶的作用形成 BAC-TDN-VS-GID 质粒 ,卡那霉素/氯霉素双抗筛选 ,混收菌落 ,提取质粒后转化大肠杆菌 DH10B 纯化得到 BAC-TDN-VS-GID 质粒。

通过归位内切酶 I-Sce I 切除 BAC-TDN-VS-GID 质粒中的 pYLVS 质粒骨架 ,利用接头 LS 使之环化 ,形成莱航鸡大容量多位点基因打靶载体 BAC-TDN-GID(图 1) 。去除了氯霉素抗性基因 ,可以用于 pYLSV 质粒携带其他基因进行其它目的基因的插入。

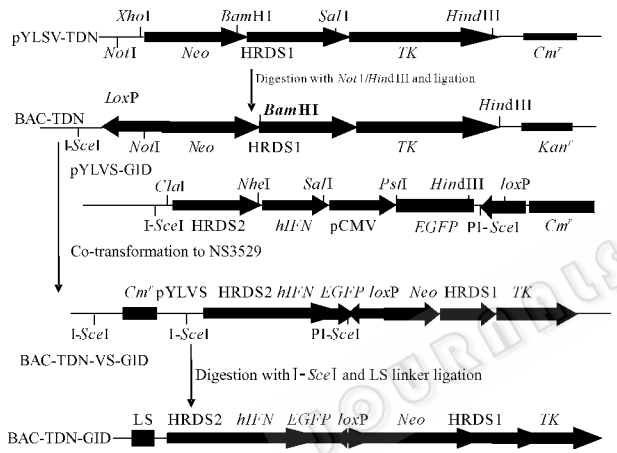


图 1 大容量 BAC-TDN-GID 打靶载体构建示意图  
Fig.1 The illustration of construction of the gene targeting vector with large capability of BAC-TDN-GID

2 结果与分析

2.1 pYLSV-TDN 质粒的鉴定

pYLSV-TDN 质粒经 Sal I /Hind III、BamH I /Sal I、Xho I /BamH I 以及 Xho I / Hind III 酶切的产

物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 ,可见大小分别约为 1800bp、1500bp、1500bp 和 4800bp 的 DNA 片段(图 2) 。结果表明 ,TK、HRDS1 和 Neo 已成功地克隆到 pYLSV 中 ,并经测序证实。

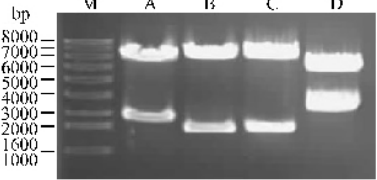


图 2 pYLSV-TDN 质粒的酶切鉴定  
Fig.2 The identification of double enzyme digestion of pYLSV-TDN

Note Lane M was the DNA marker. Lane A ,B ,C ,D were the products of double enzyme digestion of pYLSV-TDN with Sal I /Hind III、BamH I /Sal I、Xho I /BamH I and Xho I / Hind III respectively.

2.2 BAC-TDN 筛选载体的鉴定

BAC-TDN 筛选载体经 PCR 鉴定可扩增出 TK-HRDS1-Neo 大小约 4 800bp 的片段(图 3) 。测序结果表明已成功地构建出 BAC-TDN 筛选载体。

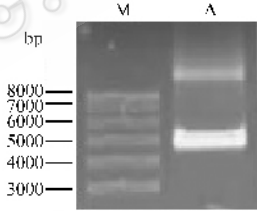


图 3 BAC-TDN 筛选载体的 PCR 鉴定  
Fig.3 The PCR identification of BAC-TDN

Note Lane M was the DNA marker. Lane A was the PCR product of the fragment of TK-HRDS1-Neo in BAC-TDN.

2.3 pYLVS-GID 表达载体的鉴定

pYLVS-GFP 质粒的 PCR 鉴定产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 ,可见大小约 1 500bp DNA 片段(图 4A) 。用 BamH I 单酶切消化质粒 pYLVS-GFP-HRDS2 ,酶切后的质粒产生 2 条带 ,一条为 pYLVS-GFP-HRDS2 质粒的大部分 ,大小约为 5 000bp ,另一条为切断的 HRDS2 片段 ,大小约为 700bp(图 4B) 。用 Nhe I /Hind III 双酶切消化质粒 pYLVS-GFP-hIFN-HRDS2 ,

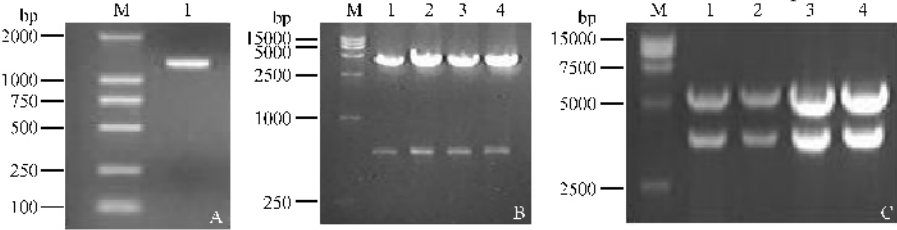


图 4 pYLVS-GID 表达载体的 PCR、酶切鉴定

Fig.4 The identification of the PCR and double enzyme digestion of pYLVS-GID  
Note Lane M was the DNA marker. Fig. 4A was the PCR identification of pYLVS-GFP ; Fig. 4B was the products of enzyme digestion of pYLVS-GFP-HRDS2 with BamH I ; Fig. 4C was the products of double enzyme digestion of pYLVS-GID with Nhe I /Hind III .



转基因鸡的价值。用莱航鸡的原始生殖细胞(PGC)进行多位点基因打靶<sup>[3]</sup>,建立一套适用于家禽的基因定点敲入的多位点基因打靶技术。其意义在于:①以 rDNA 基因的 ITS 作为靶位点,将使基因打靶的靶位点增加到 100~300 个,使基因定点整合效率提高 100~300 倍。②由于外源基因插入位点为基因间的转录序列,位于活跃的转录单位内,故可解决外源基因不能稳定表达的部分问题,该位点有望成为高效表达的靶位点。③靶位点为基因间的间隔序列,故插入外源基因不会破坏细胞的基因而导致细胞死亡或恶变,克服了毒性整合等安全性问题。④突破了 DNA 重复序列不能作为外源基因整合靶位点的禁区。

把人干扰素作为目的基因生产转基因莱航鸡,不仅可以使转基因鸡作为输卵管生物反应器从鸡蛋中提取人干扰素用于人类的疾病治疗,而且对莱航鸡有望起到抗病育种的作用。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Sang H. Transgenic chicken, methods and its potential application. *Trends Biotechnol*, 1994, **12**(10): 415-420.
- [2] Chen GH(陈国宏). Research and application foreground of chicken oviduct bioreactor. *China Poultry*(中国家禽), 2003, **25**(9): 1-4.
- [3] Wang XT(王晓通), Lou YZ(娄义洲), Wang XN(王晓娜). The producing method and the application of transgenic chicken. *World Agriculture*(世界农业) 2004, **298**(2): 48-49.
- [4] Li BQ(李碧春), Sun HC(孙怀昌), Chen GH(陈国宏), et al. Transfect of exogenous gene *in vivo* of chicken germinal disc. *Chinese Journal of Animal Science and Veterinary*(畜牧兽医学报) 2004, **35**(5): 481-486.
- [5] Tang DS(唐冬生), Shi JQ(施家琦), Tian YB(田允波), et al. The research on the techniques of multiple locus gene targeting in the somatic cell. *Journal of Foshan University*(Natural Science Edition)(佛山科学技术学院学报(自然科学版)), 2002, **20**(2): 64-68.
- [6] Li L, Liu YG, Xu XP, et al. Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(10): 5962-5967.
- [7] Tang DS, Jiang H, Zhang Y, et al. Cloning and sequencing of the complicated rDNA gene family of *Bos taurus*. *Czech Journal of Animal Science*, 2006, **51**(10): 425-428.
- [8] Wang H(王波), Tang DS(唐冬生), Jiang H(蒋泓), et al. Simple amplification of GC-rich repetitive sequences in *Bos taurus* rDNA with PCR. *Journal of Hunan Agricultural University*(湖南农业大学学报(自然科学版)), 2005, **31**(6): 602-604.
- [9] Tang DS(唐冬生), Yan X(严霞), Li F(李芳), et al. Construction of vector of multiple locus gene targeting on repetitive sequences of *Siniperca chuatsi*. *Journal of Fishery Sciences of China*(中国水产科学) 2005, **12**(4): 377-382.
- [10] Jiang H(蒋泓), Tang DS(唐冬生), Li YQ(李月琴), et al. Construction of universal vector of multiple locus gene targeting for *Bos Taurus*. *Journal of Jinan University*(Nature Science), 2006, **27**(3): 470-475.
- [11] Sylvester JE, Whiteman DA, Podolshy R, et al. The human ribosomal RNA genes: structure and organization of the complete repeating unite. *Hum Genet*, 1986, **73**: 193-198.