

研究报告

连续三步 ‘Gap-repair’ 构建小鼠 WAP—人 LF 杂合基因座

施庚寿^{1,2}, 吴晓洁¹, 熊福银¹, 周艳荣¹, 刘珠果¹, 邓继先¹, 陈红星¹

1 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

2 解放军 533 医院, 昆明 650224

摘要: 为了构建一个利用小鼠乳清酸蛋白(mWAP)基因座完整的上下游调控序列指导人乳铁蛋白(hLF)基因组序列在乳腺特异性高效表达的 mWAP-hLF 杂合基因座, 我们采用了连续三步 ‘Gap-repair’ 的方法。首先, 以 pBR322 载体作为骨架, 插入预先无痕连接在一起的 6 个同源臂, 构成能连续进行三次 gap-repair 的基因抓捕载体。然后在大肠杆菌内利用 Red 同源重组系统介导的 gap-repair 技术, 第一步从含 mWAP 基因座的细菌人工染色体(mWAP BAC)上亚克隆了 8 kb 的 mWAP 基因 3'端完整侧翼序列到抓捕载体上; 第二步, 从 hLF BAC 上亚克隆 29 kb 的从起始密码子(ATG)到终止密码子(TAA)的 hLF 基因组序列; 第三步, 从 mWAP BAC 上亚克隆 12 kb 的 mWAP 基因 5'端完整侧翼序列, 并使这三个基因片段在抓捕载体上自动无痕地连接在一起, 形成一个全长约 49 kb 的 mWAP-hLF 杂合基因座。经过 PCR 扩增、限制性内切酶消化和序列测定验证, 我们构建的这个杂合基因座, 达到了原来 mWAP 基因座中 mWAP 基因组编码序列从起始密码子到终止密码子被 hLF 基因组序列精确置换的目的。这种连续三步 gap-repair 构建杂合基因座乳腺表达载体的技术, 将为乳腺生物反应器高效表达大载体的制备提供一种全新的思路和方法。

关键词: 细菌人工染色体, Gap-repair, 乳清酸蛋白, 人乳铁蛋白

A Successive Three-step ‘Gap-repair’ Method to Generate the mWAP-hLF Hybrid Gene Locus

Gengshou Shi^{1,2}, Xiaojie Wu¹, Fuyin Xiong¹, Yanrong Zhou¹, Zhuguo Liu¹, Jixian Deng¹, and Hongxing Chen¹

1 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

2 The 533 Hospital, Kunming 650224, China

Abstract: To generate a mWAP-hLF hybrid locus that the transcription of human lactoferrin(hLF) genomic sequence is directed by the up&down stream regulatory sequence of murine whey acidic protein (mWAP) gene locus, we describe here a successive three-step ‘Gap-repair’ method. First, a gap-repair vector based on pBR322 vector backbone by inserting six joint homologous arms was constructed. Then using ‘Gap-repair’ method mediated by Red recombination system of λ -prophage in Escherichia coli, in the first step, the 8 kb 3' flanking region of the mWAP gene was subcloned from the Bacterial artificial chromosome which harbors the mWAP gene locus(mWAP BAC) into the gap-repair vector; in the second step, the 29 kb hLF genomic sequence from the ATG code to the TAA code was subcloned from the hLF BAC; in the third step, the 12 kb 5' flanking region of the mWAP gene was subcloned from the mWAP BAC. Finally, all these three DNA fragments were automatically combined together without any gap in the

Received: January 21, 2008; Accepted: June 25, 2008

Corresponding author: Hongxing Chen. Tel: +86-10-66948838; E-mail: hongxingchen@hotmail.com

gap-repair vector, and a 49 kb mWAP-hLF hybrid locus that the hLF genomic sequence was flanked by the 5' & 3' flanking region of mWAP gene locus was constructed. The result was confirmed by PCR, restriction enzyme digestion and sequencing. Our method provide a new way for the construction of large mammary-gland expression vector.

Keywords: bacterial artificial chromosome, gap-repair, whey acidic protein, lactoferrin

乳蛋白基因座长约数十到数百 kb 不等, 该区域内包含了完整的表达调控元件及基因组序列, 形成一个相对完全独立的转录调控单位。因此用乳蛋白基因座制备转基因动物乳腺生物反应器, 在基因整合时能够克服位置效应的影响, 可以获得位点非依赖和拷贝数依赖的高表达^[1]。但如何将乳蛋白基因座中完整的调控序列和外源目的蛋白基因的全部编码序列组装在一起, 实现利用乳蛋白基因完整调控序列指导外源目的蛋白基因高效表达的目的, 一直是乳腺生物反应器载体构建的一个难点。我们的设想, 是用外源目标蛋白的基因组序列, 从起始密码子到中止密码子完全置换乳蛋白基因座中乳蛋白的基因组序列, 构建杂合的基因座载体。

随着越来越多包含整个乳蛋白基因座的商业化 BACs 出现, 为转基因动物乳腺生物反应器的制备提供了方便。但用常规的酶切、连接技术对 BACs 的修饰和改构, 会非常困难。近年来发展起来的 Red 同源重组系统, 在大肠杆菌内可以很方便地对 BACs 进行快速而精确的改构。该系统由 λ 噬菌体的 *exo*, *bet* 和 *gam* 三个基因组成, 可以直接利用线性打靶 DNA 片段进行同源重组, 而且重组效率高。它最短只须用 50~60 bp 的同源臂, 就可实现 BACs 中靶基因的点突变、插入和缺失操作。此外, 如果线性打靶片段带有复制子和筛选标志, 还可以对染色体或 BACs 上的目的基因片段进行亚克隆, 从而使线性打靶片段 gap-repair, 形成一个环形质粒^[2,3]。我们称这种通过 gap-repare 方式进行的基因亚克隆为基因抓捕(Gene-retrieval)。目前文献报道一次最长可抓捕到 80 kb 的基因片段^[4]。

本研究中, 我们先构建了一个包含 6 个无痕连接同源臂的基因抓捕载体。通过连续三步基因抓捕, 成功获得一个杂合型的 mWAP-hLF 基因座, 达到将 mWAP 基因座中 mWAP 基因组序列从起始密码子到终止密码子精确地置换为 hLF 基因组序列的目的, 这将为动物乳腺生物反应器高效表达大载体的构建提供了一种崭新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体与质粒

pBR322 购自 New England Biolabs 公司; pGEM-T-Easy 购自 Promega; mWAP BAC 和 hLF BAC 购自美国国立儿童医院; 质粒 pKD46(温度敏感型, 含有受阿拉伯糖启动子调控的 *gam*, *bet* 和 *exo* 三个基因, Ap 抗性)和质粒 pET-24(Kn 抗性)由本室保存。

1.1.2 工具酶与试剂盒

Taq 酶、Pyrobest 高保真酶、各种内切酶及修饰酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 质料提取试剂盒, PCR 纯化试剂盒购自 Axygen 公司; 胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司。

1.1.3 引物

(序列见表 1, 小写序列为引物 5'端设计的酶切位点)。T1F 和 T1R, T2F 和 T2R, T5F 和 T5R, T6F 和 T6R 分别用来从 mWAP BAC 上扩增 T1, T2, T5 和 T6 四个同源臂; T3F 和 T3R, T4F 和 T4R 分别用来从 hLF BAC 上扩增 T3 和 T4 两个同源臂。扩增的同源臂长约 500 bp 左右。KF 和 KR1, KR2 用来扩增带 EM7 启动子的 Kn 抗性基因。J1F 和 J1R 用来对第一步抓捕到的 3'mWAP 基因片段进行 PCR 鉴定, J2F 和 J2R 用来对第二步抓捕到的 hLF 基因组片段进行 PCR 鉴定, J3F 和 J3R 用来对第三步抓捕到的 5'mWAP 基因片段进行 PCR 鉴定。

1.2 方法

1.2.1 基因抓捕载体 pBR322-gaprepair 的构建

在 pBR322 载体的 *Pvu* I 和 *Pst* I 酶切位点之间插入一个含 *Not* I 酶切位点的 Linker。然后以 pET-24 为模板, 用引物 KF 和 KR1 进行第一次 PCR, 扩增出 1/2EM7+Kn^r 基因; 接着以第一次 PCR 1000 倍稀释产物为模板, 用引物 KF 和 KR2 进行第二次 PCR 扩增出 EM7+Kn^r 基因。将 EM7+Kn^r 片段克隆到 pGEM-T-Easy 上, 然后用 *Not* I 将 EM7+Kn^r 片段切

表 1 引物序列
Table 1 Primers used in this paper

No.	Primer sequences	5' restriction site	Length of product (bp)
T1F	5'-TCAcgatcgTCTTCACTTATCTGATGTCAGCAACC-3'	<i>Pvu</i> I	
T1R	5'-TCTtacgtaCTTACGTGAGCAGAAATGACCC-3'	<i>Sna</i> B I	495
T2F	5'-TCTtacgtaGCCCCGACTCGAGCCTTGCTC-3'	<i>Sna</i> B I	
T2R	5'-ATggtaccGGTGTGTCAGGCAAGTACTG-3'	<i>Kpn</i> I	458
T3F	5'-CCggtaccATGAAACTTGCTTCTCCTCGTCCTG-3'	<i>Kpn</i> I	
T3R	5'-GAgttaacTAAGTCTCATAAAGGCTCGGTC-3'	<i>Hpa</i> I	488
T4F	5'-TAGttaacTCACACAAAGCAGGTGCTCAG-3'	<i>Hpa</i> I	
T4R	5'-TCTgccggcTGCTTACTTCTGAGGAATTCACAGGC-3'	<i>Nae</i> I	446
T5F	5'-GCAgccggcCCTGGCATCCCTG-3'	<i>Nae</i> I	
T5R	5'-CTGccccgggGCTGGGGCTGGTCTGACCTTGG-3'	<i>Sma</i> I	410
T6F	5'-CTTccccgggCAGCGCAGAGAAAAGGAAGGAAG-3'	<i>Sma</i> I	
T6R	5'-TGGcgatcgTGGTGGACATAACCACCACAGCCAGC-3'	<i>Pvu</i> I	473
KF	5'-TTAGAAAAACTCATCGAGCATCA AATG-3'	-	
KR1	5'-CAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAAT- -ACGACTCACTATAGGAGGGCCACCATGAGCCATATT- -CAACGGGAAACG-3'	-	872
KR2	5'-TACTGCAGCACGTGTTGACAATTAATCATCGGCATA- -GTATATCGGC-3'	-	891
J1F	5'-TCTGGCTCCCTTGAACACCGTAG-3'	-	
J1R	5'-CTCCCAATGCTGGCTAGTCTTCC-3'	-	1257
J2F	5'-ATCCAGACACTCAGACAGCCATC-3'	-	
J2R	5'-AAGTCCCAGCCTTAGGTAGATGC-3'	-	972
J3F	5'-AGTGAAGACAAAGGAGTATGGC-3'	-	
J3R	5'-ATCTGGACTAGGGTCCTTGAGC-3'	-	1207

下来, 连到 pBR322 载体 Linker 的 *Not* I 酶切位点, 构建成 pBR322-EM7-Kn 载体, 从而使 pBR322 载体带 Kn 抗性筛选标志。

以 mWAP BAC 为模板, 分别以 T1F 和 T1R, T2F 和 T2R, T5F 和 T5R 以及 T6F、T6R 为引物, 用 *pyrobest* 高保真酶扩增约 500bp 的同源臂 T1、T2、T5 和 T6; 以 hLF BAC 为模板, 以 T3F 和 T3R、T4F 和 T4R 为引物同样扩增同源臂 T3 和 T4。分别将这些同源臂克隆到 pGEM-T-Easy 载体上, 测序正确后, 利用同源臂两端设计的酶切位, 按同源臂 1~6 顺序依次将它们在 pGEM-T-Easy 载体上连接起来, 构建成 pGEM-T-Easy-gaprepair 载体。为达到同源臂之间的无痕连接, T1 和 T2、T3 和 T4 以及 T5 和 T6 之间利用上下 2 个同源臂之间的序列拼出的 *Sna*B I、*Hpa* I、*Sma* I 酶切位点进行无痕连接, T2 和 T3、T4 和 T5 之间利用同源本身带的 *Kpn* I 和 *Nae* I 酶切位点连接。

最后用 *Pvu* I 将已连在一起的 6 个同源臂从

pGEM-T-Easy 载体上切下来, 插入 pBR322-EM7-Kn 载体的 *Pvu* I 酶切位点, 构成基因抓捕载体 pBR322-gaprepair。

1.2.2 感受态细胞的制备

将含有 mWAP BAC 的 DH10 β 菌和含 hLF BAC 的 DH10 β 菌制成化学感受态细胞, 然后将编码 Red 重组系统 pKD46 质粒热激转化至上述化学感受态细胞中, 在含有氨苄西林和氯霉素的平板上 30 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑单克隆转接至液体 LB 培养基中 30 $^{\circ}$ C 继续培养至 OD_{600} 为 0.20~0.25, 然后加入 1 mol/L 的 L-阿拉伯糖, 使终浓度约为 6 mmol/L, 继续培养 45 min 至 1 h, 使 OD_{600} 达到 0.40~0.50。离心收集细菌, 用 10% 灭菌甘油洗 3 次, 最后用 10% 灭菌甘油悬浮, 使感受态细胞最终浓度为 1×10^{10} cells/ μ L, 制成含有 pKD46 和 BAC 的大肠杆菌电击感受态细胞。

1.2.3 三步连续基因抓捕过程

将构建好的基因抓捕载体 pBR322-gaprepair 在

T5 和 T6 之间用 *Sma* I 切开, 脱磷后回收, 构成线性的第一步基因抓捕载体, 浓度约为 50 ng/ μ L。取 2 μ L 电击至 50 μ L 含 pKD46 及 mWAP BAC 的大肠杆菌电击感受态细胞中, 电击参数为 2.5 kV, 5 ms, 电击后立即加入 500 μ L SOC 培养液悬浮, 37 $^{\circ}$ C, 150 r/min, 复苏 1.5 h, 然后涂布于含卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后, 对长出的卡那霉素抗性克隆进行 PCR 和酶切鉴定。

将第一步基因成功抓捕后新形成的环形抓捕载体在 T3 和 T4 之间用 *Hpa* I 切开, 脱磷, 构成线性的第二步基因抓捕载体, 电击到含 pKD46 和 hLF BAC 的大肠杆菌电击感受态中, 进行第二步基因抓捕(方法同前)。

将第二步基因成功抓捕后新形成的环形抓捕载体在 T1 和 T2 之间用 *Sna*B I 切开, 脱磷, 构成线性的第三步基因抓捕载体, 电击到含 pKD46 及 mWAP BAC 电击感受态细胞中, 进行第三步基因抓捕(方法同前)。

2 结果

2.1 基因抓捕载体 pBR322-gaprepair 的鉴定

将构建好的基因抓捕载体 pBR322-gaprepair 分别用 *Sna*B I, *Hpa* I 和 *Sma* I 进行酶切鉴定, 均能切出 7.1 kb 的片段, 用 *Hind* III 能切出 770 bp, 2251 bp 和 4079 bp 三个片段, 证明基因抓捕载体 pBR322-gaprepair 已成功构建(图 1)。

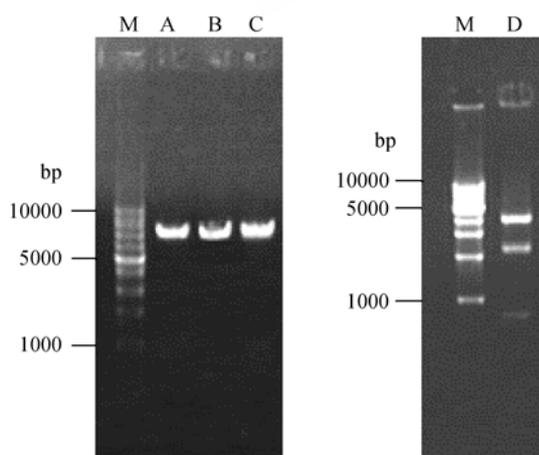


图 1 基因抓捕载体 pBR322-gaprepair PCR 和酶切鉴定
Fig. 1 Identification of pBR322-gaprepair by PCR and enzyme digestion

M: 1 kb DNA marker; A: digested with *Sna*B I; B: digested with *Hpa* I; C: digested with *Sma* I; D: digested with *Hind* III.

2.2 三步连续基因抓捕(图 2)

2.2.1 第一步基因抓捕结果

第一步基因抓捕后, 我们对长出的重组克隆用鉴定引物 J1F, J1R 进行 PCR 鉴定, 结果有 8 个重组子可扩增出约 1200bp 条带, 我们选了一个阳性克隆, 提质粒后用 *Afl* II 和 *Pci* I 进行酶切鉴定, 结果用 *Afl* II 能切出 1917 bp, 3406 bp, 8953 bp 三条带, *Pci* I 能切出 2013, 4672 bp, 7581 bp 三条带, 与酶切分析的完全一致, 证明我们已抓捕到了约 8 kb 的 mWAP 基因 3'端完整侧翼序列, 成功获得了约 14.2 kb 的 pBR322-gaprepair-3'mWAP 重组克隆(图 3)。

2.2.2 第二步基因抓捕结果

将第一步成功抓捕后的 pBR322-gaprepair-3'mWAP 重组克隆用 *Hpa* I 切开后, 构成线性的第二步基因抓捕载体, 进行第二步基因抓捕。对长出的重组克隆用鉴定引物 J2F, J2R 进行 PCR 鉴定, 结果有 6 个重组克隆可以扩增出约 1000 bp 条带。挑选阳性克隆提质粒后用 *Nhe* I 和 *Hind* III 进行酶切鉴定, 结果 *Nhe* I 能切出 1350 bp, 5010 bp, 5627 bp, 6678 bp, 7980 bp, 15276 bp 六条带, *Hind* III 能切出 770 bp, 1979 bp, 4079 bp, 4795 bp, 6153 bp, 8741 bp, 15508 bp 七条带, 与酶切分析完全一致, 证明我们已经抓捕到了约 29 kb 的 hLF 全基因组序列, 成功获得了 42 kb 的 pBR322-gaprepair-hLF-3'mWAP 重组克隆(图 4)。

2.2.3 第三步基因抓捕结果

将第二步成功抓捕后的 pBR322-gaprepair-hLF-3'mWAP 重组克隆用 *Sna*B I 切开后, 构成线性的第三步基因抓捕载体, 进行第三步基因抓捕。对长出的重组克隆用鉴定引物 J3F, J3R 进行 PCR 鉴定, 结果只有 1 个重组克隆可以扩增出约 1200 bp 条带。挑选阳性克隆提质粒后用 *Hind* III 进行酶切鉴定, 结果 *Hind* III 能切出 770 bp, 1978 bp, 4795 bp, 5954 bp, 8741 bp, 14052 bp, 15508 bp 七条带, 与酶切分析完全一致, 证明我们已经抓捕到了约 12 kb 的 mWAP 基因 5'完整侧翼序列, 成功获得了约 52 kb 的 pBR322-5'mWAP-hLF-3'mWAP 重组克隆(图 5)。用鉴定引物 J1R, J2R, J3F 分别作为测序引物, 对重组 pBR322-5'mWAP-hLF-3'mWAP 克隆进行测序验证, 每次测序长度都跨同源臂测到下一个同源臂。结果证明我们已成功地抓捕到 mWAP 基因 3'完整侧

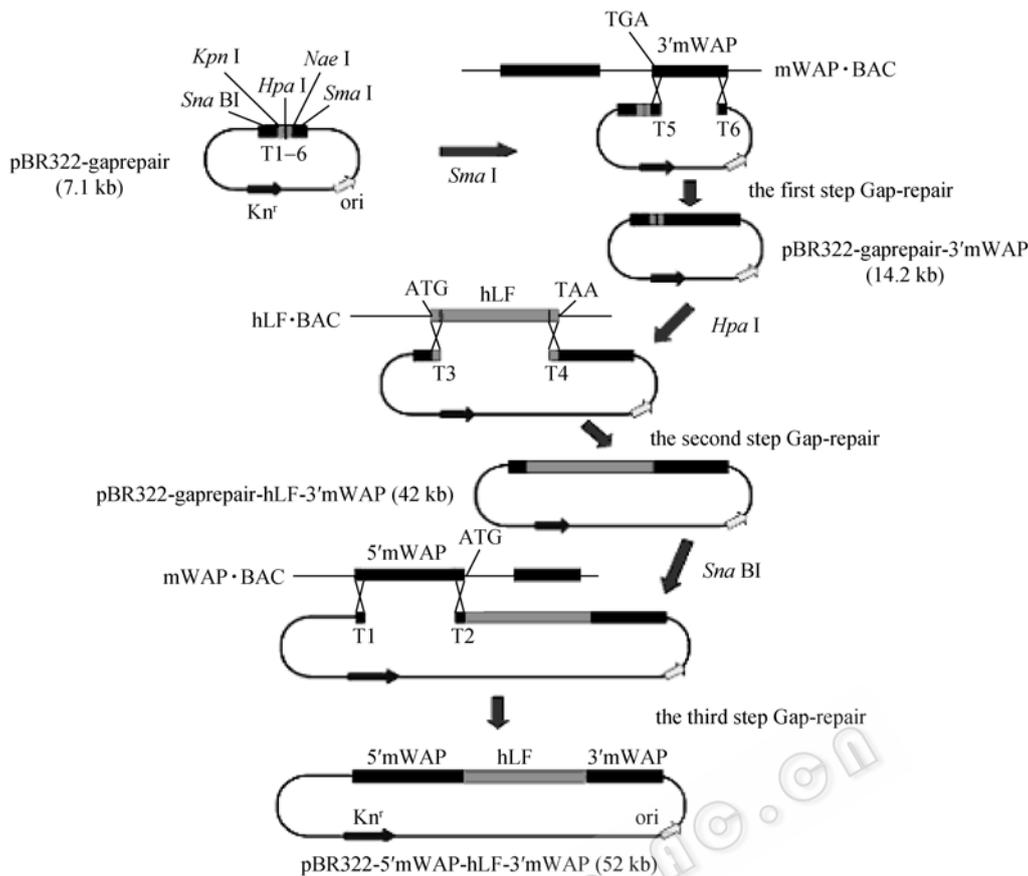


图 2 三步连续基因抓捕示意图

Fig. 2 The illustration for gene-retrieval by successively three-step

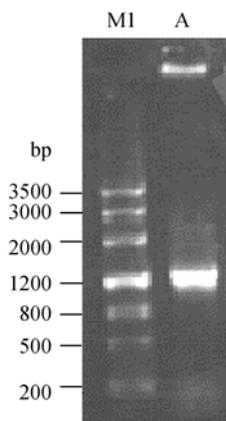


图 3 pBR322-gaprepair-3'mWAP 重组子 PCR 和酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pBR322-gaprepair-3'mWAP by PCR and enzyme digestion

M1: DNA marker III; M2: 1 kb DNA marker; A: PCR with J1; B: digested with *Afl* II; C: digested with *Pci* I.

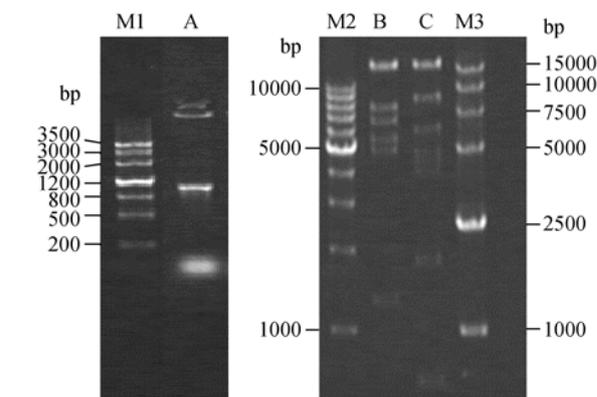
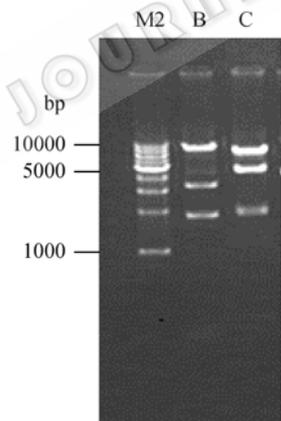


图 4 pBR322-gaprepair-hLF-3'mWAP 重组子 PCR 和酶切鉴定

Fig. 4 Identification of pBR322-gaprepair-hLF-3'mWAP by PCR and enzyme digestion

M1: DNA marker III; M2: 1kb DNA marker; M3: D15000 marker; A: PCR with J2; B: digested with *Nhe* I; C: digested with *Hind* III.

翼序列, hLF 基因全部基因组序列和 mWAP 基因 5' 完整侧翼序列, 并使它们自动无痕地连接在一起,

构成一个杂合型的小鼠 WAP—人 LF 基因座, 没有增加任何人为的碱基(图 6)。

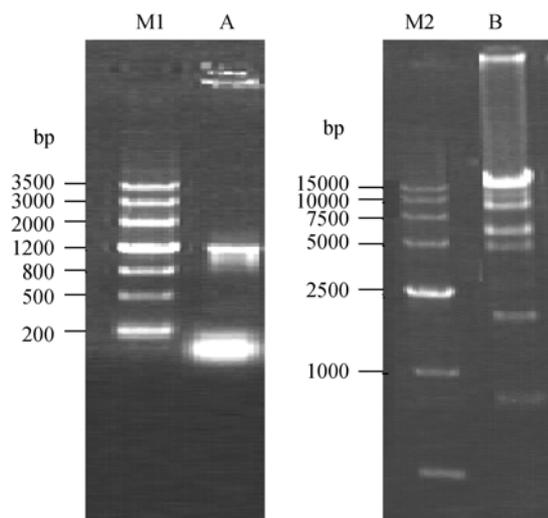


图 5 pBR322-5'mWAP-hLF-3'mWAP 重组子 PCR 和酶切鉴定

Fig. 5 Identification of pBR322-5'mWAP-hLF-3'mWAP by PCR and enzyme digestion

M1: DNA marker III; M2: D15000 marker; A: PCR with J3; B: digested with *Hind* III.

3 讨论

在转基因动物乳腺生物反应器研制中, 表达载体制备是关键的一环^[5]。以往许多研究, 由于克隆载体的限制, 构建的往往是小表达载体, 只是将乳蛋白基因主要表达调控元件和外源目的蛋白基因 cDNA 人为拼凑在一起, 调控元件不全, 缺乏内含子序列^[6], 研究认为内含子具有表达增强作用^[7]。因此, 用这种小表达载体制备的转基因动物乳腺生物反应器, 很难模拟基因表达的天然状态, 获得目的蛋白的高效表达。近年来, 一些研究直接将含有乳蛋白基因座的 BAC、YAC 进行显微注射制备乳腺生物反应器^[8,9], 或将外源目的蛋白基因的 cDNA 敲入 BAC、YAC 的乳蛋白基因座中构建 BAC、YAC 乳腺表达载体^[10]。但这样往往会在 BAC、YAC 中留有抗生素筛选标志或 FRT/loxP 位点, 而且由于 BAC、YAC 载体很大(200~300 kb), 在随后的操作中容易断裂, 显微注射困难。另外, BAC、YAC 中的大量无

关基因序列, 不仅影响转基因整合效率, 对转基因动物健康的影响也无法评估^[11]。针对这些缺陷, 我们设想构建一种只包含有乳蛋白基因完整调控序列和外源目的蛋白基因组序列的杂合基因座乳腺表达载体。

本研究分三步连续抓捕 mWAP 基因 3'侧翼片段, hLF 基因组序列和 mWAP 基因 5'侧翼片段, 并使它们自动无痕地连接起来, 构建成 mWAP-hLF 杂合基因座, 达到了原来 mWAP 基因座中 mWAP 基因组编码序列从起始密码子到终止密码子被 hLF 基因组序列精确置换的目的。在我们的研究中, 由于每次抓捕的基因片段都较大, 分别为 8 kb、29 kb 和 12 kb, 导致每次基因抓捕成功后形成的下一步基因抓捕载体越来越大, 到最后一步基因抓捕时, 抓捕载体达 42 kb。这样会大大增加基因抓捕的难度, 目前文献报道的基因抓捕载体一般都在 10 kb 以内^[12]。到第三步基因抓捕时, 我们只成功获得了一个阳性重组克隆, 但也首次证明了用这样大的载体进行基因抓捕是可行的。抓捕载体上的复制子一般采用低拷贝的复制子^[12], 我们采用的是 pBR322 的复制子, 它能控制每个细菌内有 20 个拷贝, 这样既能保证抓捕载体的稳定性和容量(能够支撑 49 kb 的外源插入片段), 也不会增加分子生物学操作的难度。抓捕载体上筛选标志的选择也很重要, 当目的抓捕片段较大, 不易抓捕时, 用卡那霉素筛选, 效果比较好。基因抓捕的难易程度除与目的抓捕片段的大小和抓捕载体有关系外, 很可能还与目的基因片段所处的位置相关。对处于基因开放区的 mWAP 基因 3'侧翼区和 hLF 基因组序列的抓捕, 相对来说比较容易, 效率分别能达 80% 和 76%(实验数据未列出)。而对 mWAP 基因 5'侧翼区的抓捕, 就比较困难。我们进行了多次实验, 优化了各种实验条件, 最终也只获得了一个阳性重组克隆。通过对 mWAP 基因 5'侧翼区序列分析, 发现在 5'侧翼区的边缘, 存在大量的 CA 重复序列, 缺少碱基 G, 而我们设计的同源臂 T1 正好处



图 6 鉴定引物在 5'mWAP-hLF-3'mWAP 杂合基因座中的位置示意图

Fig. 6 The position of primers for PCR identification

于这个部位。因此推测这部分序列形成了某种高级结构,影响基因抓捕。但 Red 同源重组是否具有位点选择性,这方面无相关的国内外文献报道,还需要进一步详细实验数据来验证。

另外,为了达到目的基因抓捕片段之间的无痕连接,保持基因本身天然状态,本研究还采用了同源臂无痕连接策略。即在抓捕同一片段的上下 2 个同源臂之间连接处,设计使它们之间的序列正好能拼接出一个单一酶切位点,如 T1 和 T2 之间, T1 以 TAC 作为 3'端结尾, T2 以 GTA 为 5'端开头,正好拼出一个 *Sna*B I 酶切位点。这样当用 *Sna*B I 切开 T1-T2 构成线性抓捕载体时,切点处就不会增加任何人为的碱基。同样, T3 和 T4 之间, T5 和 T6 之间,也用这种方法拼接出 *Hpa* I 和 *Sma* I 酶切位点。而同源臂其它部位的连接,就要利用连接点附近同源臂内本身存在的酶切位点进行连接。如利用 T2 末端的 *Kpn* I 酶切位点,将 T2 和 T3 连接起来;利用 T4 末端的 *Nae* I 酶切点,将 T4 和 T5 连接起来。此外,拼接的酶切位点的选择,要尽量选择载体和目的抓捕片段上没有的酶切位点,或者通过改变基因抓捕的先后顺序,以保证每一次酶切构成线性抓捕载体时,都是单酶切,不会将抓捕载体切碎。

本研究构建的 mWAP-hLF 杂合基因座,为乳腺生物反应器高效表达 hLF 奠定了基础。通过对抓捕载体上的复制子和筛选标志的优化改造,用这种方式构建更大的乳蛋白杂合基因座载体,是完全可以实现的。这将为乳腺生物反应器杂合基因座大载体的构建提供一种全新的设计思路和可行的技术路线。

REFERENCES

- [1] Houdebine LM. Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Res*, 2000, **9**: 305–320.
- [2] Muyrers JPP, Zhang Y, Testa G, *et al.* Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucl Acids Res*, 1999, **27**(6): 1555–1557.
- [3] Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JPP, *et al.* A new logic for DNA engineering using recombination in *E. coli*. *Nat Genet*, 1998, **20**: 123–128.
- [4] Lee EC, Yu D, Martinez de Velasco J, *et al.* A highly efficient *E. coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics*, 2001, **73**: 56–65.
- [5] Cheng HX, Yang X, Huang PT. The progress of expressing vector for mammary gland bioreactor. *Chin J Biotechnol*, 2002, **18**(2): 136–139.
陈红星, 杨晓, 黄培堂. 乳腺生物反应器制备中表达载体的发展. *生物工程学报*, 2002, **18**(2): 136–139.
- [6] Deng JX, Ling FY. Problems and stratagems for the generation of animal mammary gland bioreactors. *Lett Biotechnol*, 2003, **14**(3): 204–206, 230.
邓继先, 林福玉. 制备动物乳腺生物反应器的问题和对策. *生物技术通讯*, 2003, **14**(3): 204–206, 230.
- [7] Huang Y, Carmichael GG. The mouse histone H2a gene contains a small element that facilitates cytoplasmic accumulation of intronless gene transcripts and of unspliced HIV-1-related mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 10104–10109.
- [8] Liu Z, Zhao C, Fan B, *et al.* Variable expression of human lactoferrin gene in mice milk driven by its 90 KB upstream flanking sequences. *Anim Biotechnol*, 2004, **15**(1): 21–31.
- [9] Stinnakre MG, Soulier S, Schibler L, *et al.* Position-independent and copy-number-related expression of a goat bacterial artificial chromosome alpha-lactalbumin gene in transgenic mice. *Biochem J*, 1999, **339**: 33–36.
- [10] Fujiwara Y, Miwa M, Takahashi R, *et al.* High-level expressing YAC vector for transgenic animal bioreactors. *Mol Reprod Dev*, 1999, **52**: 414–420.
- [11] Xin YL, Deng JX. Advances in production of transgenic animals as mammary gland bioreactors and the use of artificial chromosomes. *Lett Biotechnol*, 2005, **16**(5): 556–559.
辛艳丽, 邓继先. 转基因动物乳腺生物反应器的发展概况及人工染色体在其中的应用. *生物技术通讯*, 2005, **16**(5): 556–559.
- [12] Zhang Y, Muyrers JP, Testa G, *et al.* DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(12): 1314–1317.