

牛朊蛋白基因 *prnp* 敲除载体的构建及真核细胞转染

张海林, 程胖, 兰杰, 宋永利, 张涌

西北农林科技大学动物医学院 农业部动物生殖生理与胚胎工程重点实验室, 杨凌 712100

摘要: 利用正负筛选策略 (Positive-negative selection, PNS) 对中靶细胞进行富集是提高体细胞基因打靶效率常用的策略之一。将动物的朊蛋白基因 *prnp* 敲除, 使其不能表达朊蛋白 (传染性海绵状脑病的致病蛋白), 从而使其具有抵抗 Prion 病感染的 ability。本研究采用正负筛选策略, 构建了牛 *prnp* 基因的双等位基因敲除载体, 经内切酶 *Sac* II 线性化后, 再通过电穿孔转染牛胎儿成纤维细胞, 分别用 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418、200 nmol/mL Ganciclovir (GCV) 进行正负药物筛选, 最终获得了 176 个药物抗性细胞克隆, 进一步采用 PCR、测序、间接免疫荧光试验及 Western blotting 试验对细胞克隆进行鉴定, 结果表明, 其中的 9 个细胞克隆为中靶细胞, 证明牛 *prnp* 基因被成功敲除。本研究为牛 *prnp* 的敲除提供了可行性依据, 并为体细胞核移植生产敲除朊蛋白基因的转基因动物提供供体细胞。

关键词: 基因打靶, 正负筛选策略, 朊蛋白, 牛胎儿成纤维细胞, *prnp*, 间接免疫荧光, Western blotting

Construction of *prnp* gene knockout vector and its transfection in eukaryotic cell

Hailin Zhang, Pang Cheng, Jie Lan, Yongli Song, and Yong Zhang

Key Laboratory of Animal Reproductive Physiology & Embryo Technology, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China

Abstract: It is one of the frequently utilized strategies for positive-negative selection to elevate the gene targeting efficiency in somatic cells by enriching targeted colonies. Knocking out *prnp* in animals by gene targeting can prevent it from expressing Prion protein (Pathogenic protein of transmissible spongiform encephalopathy), which enables it to resist infection of Prion. We constructed a bovine *prnp* biallelic targeting vector via the positive-negative selection strategy, and transfected the linearized vector into the bovine fetal fibroblasts through electroporation. Then, we selected cells in cell culture medium with G418 under a concentration of 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ followed by Ganciclovir (GCV) under a concentration of 200 nmol/mL . In the end, we successfully obtained 176 cell clones. All these clones were identified by means of sequencing, immunofluorescence and western blotting, respectively, confirming that there existed 9 positive cell clones. The results showed that the bovine *prnp* gene was successfully knocked out. Conclusively, we provide an effective way to knockout bovine *prnp* gene, which could serve as the basis for producing prion protein gene knockout transgenic cloned cattle.

Keywords: gene targeting, positive-negative selection strategy, Prion protein, bovine fetal fibroblasts, *prnp*, immunofluorescence, Western blotting

Received: September 18, 2009; **Accepted:** January 11, 2010

Supported by: Cultivation of New Varieties of Transgenic Disease-resistant Cattle (No. 2008ZX08007-004).

Corresponding author: Yong Zhang. Tel: +86-29-87080085; E-mail: zhangyong1956js@163.com

抗病转基因牛新品种培育 (No. 2008ZX08007-004) 资助。

基因敲除又称基因打靶 (Gene targeting) 技术, 是通过外源 DNA 与染色体 DNA 之间的同源重组, 精细地定点修饰和改造基因 DNA 片段的技术。它是在胚胎干细胞技术和同源重组技术的基础上发展起来的, 最早应用于小鼠上。基因打靶过程中, 打靶载体和打靶位点之间的重组是一个非常复杂的过程。在哺乳动物中, 随机重组的频率远远高于同源重组的频率, 是同源重组的 30~40 000 倍, 可见载体和打靶位点之间的重组大部分为非同源重组^[1]。因此, 为了富集同源重组事件, 人们相继建立了不同的基因打靶筛选策略, 目前主要的富集策略有正负筛选策略 (Positive-negative selection, PNS)、启动子捕获、Poly-A 捕获等^[2]。正负筛选策略 (PNS) 是目前应用较广泛的一种策略, 同源重组时, 只有载体的同源区以内部分发生重组, 同源区以外部分将被切除。随机整合时, 是在载体的两端将整个载体连入染色体。置换型载体含有正负选择基因各一, 正选择基因多为 *neo* 基因, 位于同源区内, 其在随机整合和同源重组中均可正常表达; 负选择基因在靶基因同源区之外, 位于载体的 3' 末端, 常用 *HSV-tk* 基因, 在同源重组时, *tk* 基因将被切除而丢失, 相反在随机整合时, 所有的序列均保留 (包括 *tk*), 胸苷激酶蛋白 (TK) 可使无毒的丙氧鸟苷 (GANC) 转变为毒性核苷酸, 从而杀死细胞, 因而可用丙氧鸟苷筛选排除随机整合的细胞株。故同源重组时, 对 G418 和 GANC 都有抗性; 随机整合时, 对 G418 有抗性, 但对 GANC 敏感, 细胞将被杀死, 无整合的细胞将被 G418 杀死^[3]。用 G418 作正筛选, 选出含有 *neo* 基因的细胞株, 再用丙氧鸟苷作负筛选淘汰含有 *tk* 基因的细胞株, 保留未含有 *tk* 基因的同源重组细胞株, 从而筛选出中靶细胞, 达到对阳性细胞进行富集的目的。

朊蛋白 (Prion protein) 是动物传染性海绵状脑病的致病蛋白, 是由 *prnp* 基因编码的一种糖蛋白。牛的传染性海绵状脑病 (BSE) 俗称疯牛病, 是一种严重危害人类健康和世界经济的发展的传染性疾病。疯牛病 1986 年首次在英国发现, 随后大面积爆发, 到目前为止, 已经有 24 个国家先后报道发现疯牛病^[3]。因此, 这一疾病引起了世界许多课题组的关注和研

究, 其中, 应用基因工程技术生产对疯牛病具有抵抗能力的“超级牛”成为研究的一个最大热点。大量研究表明, 该病的病原体是 PrP^{sc}——一种内源性膜锚定蛋白 PrP^c (由 *prnp* 基因编码) 的异构体, 其发病过程中的主要事件就是 PrP^{sc} 诱导的 PrP^c 向 PrP^{sc} 的转化^[4]。因此, 科学家推断 PrP^c 缺失的动物因缺乏转化的底物而可能具有抵抗 Prion 病的能力。

本研究旨在利用 Cre-Loxp 重组系统的原理^[5]构建奶牛朊蛋白基因 *prnp* 敲除载体, 再通过电穿孔的方法转染牛胎儿成纤维细胞, 经正反双向筛选最终获得阳性细胞克隆, 为体细胞核移植生产敲除朊蛋白基因的转基因动物提供供体细胞。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

打靶载体 PA2T、牛胎儿成纤维细胞, 菌株 DH5 α 均为本实验室保存。EX Taq 酶、pMD20-T Vector、DNA 连接试剂盒购自 TaKaRa 公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司, 各种限制性内切酶购自 MBI 公司, B 型小量质粒提取试剂盒购自北京博大泰克公司, 无内毒素质粒大量提取试剂盒及多种 DNA marker 购自 Tiangen 公司, 其中 1 kb DNA marker 购自 MBI 公司。

细胞培养相关试剂: 基本培养基 (DMEM)、胎牛血清、胰蛋白酶、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、非必需氨基酸、青霉素、链霉素均购自 Gibco 公司, G418 购自 Invitrogen 公司, 其他试剂购自 Sigma 等公司。

引物由上海捷瑞生物技术有限公司合成, 基因测序工作由南京金思特生物技术有限公司完成。

1.2 基因组 DNA 的提取

无菌制备荷斯坦奶牛抗凝血, 从中提取基因组 DNA, 按 TIANGEN 公司的血液/细胞组织基因组提取试剂盒说明书进行操作。

1.3 *prnp* 基因打靶载体 PBONP 的构建

1.3.1 3'同源臂和 5'同源臂的 PCR 扩增及克隆

分别设计上、下游引物 (模板序列 GenBank Accession No. AJ 298878) 如下: 3'同源臂引物 short1: 5'-atcgatTAATCTTTACCAGGTTGGGGGAGGG-3' (31 bp), 下划线部分表示 *Cla* I 限制性内切酶识别位

点。Short2: 5'-actagtCCTGGCAAGAATACTGGAG TGGGTT-3'(31 bp)。下划线部分表示 *Spe* I 限制性内切酶识别位点。5'同源臂引物 long1:5'-ggcgcgcc TTGGACTAAAGTCAATGTATGTGGC-3'(33 bp), 下划线部分表示 *sgs* I 限制性内切酶识别, Long2: 5'-gcgccgcCTAGAACTCTGCCTATTGGGTTGT-3'(33 bp), 下划线部分表示 *Not* I 限制性内切酶识别位点。均为 25 μ L 反应体系: 上下游引物各 1 μ L, 模板 DNA 2 μ L, EX *Taq* 酶 12.5 μ L, 高压灭菌 ddH₂O 8.5 μ L。3'同源臂扩增反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环。5'同源臂扩增反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 35 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min, 30 个循环。将 PCR 产物回收, 连接到 pMD20-T Vevtor 载体上, 转化感受态细胞 DH5 α , 抽提质粒, 经酶切及测序鉴定 3'、5'同源臂插入正确的克隆分别称为 pMD20-T-3prnp 和 pMD20-T-5prnp。

1.3.2 3'、5'同源臂插入打靶载体 PA2T

将测序正确的克隆的质粒 pMD20-T-3prnp 与打靶载体 PA2T 同时用 *Cla* I、*Spe* I 双酶切, 分别回收 1727 bp 的 3'同源臂和 8538 bp 的骨架载体片段, 按照摩尔比 3:1 的比例 16 $^{\circ}$ C 经 T4 DNA 连接酶连接过夜, 转化 DH5 α , 提取质粒, 酶切、PCR 鉴定, 3'同源臂序列插入正确的克隆称为 PA2Tprnps。

将测序正确的克隆的质粒 pMD20-T-5prnp 与质粒 PA2Tprnps 同时用 *sgs* I、*Not* I 双酶切, 分别回收 3860 bp 的 5'同源臂和 10265 bp 的线性 PA2Tprnps 片段, 按照摩尔比 3:1 的比例 16 $^{\circ}$ C 经 T4 DNA 连接酶连接过夜, 转化 DH5 α , 提取质粒, 酶切、PCR 鉴定 5'同源臂序列插入正确的克隆称为 PBONP。

1.3.3 基因操作

PCR 产物回收、连接反应、细菌转化、质粒提取、酶切鉴定等技术参照相关试剂盒说明书进行。

1.4 打靶载体转染牛胎儿成纤维细胞

1.4.1 转染与细胞筛选

牛胎儿成纤维细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的饱和湿度下培养。待细胞生长至 70%~80% 时按照电穿孔的操

作说明书进行经 *Sac* II 线性化的空质粒和打靶载体的转染。转染 48 h 后用含 600 μ g/mL 的 Geneticin 的细胞培养液进行培养, 当细胞长满 70% 时进行传代, 一直培养 7 d; 再用含 300 μ g/mL 的 Geneticin 和 200 nmol/mL 的 GV 细胞培养液替代 600 μ g/mL 的 Geneticin 的细胞培养液进行筛选, 每日更换培养液清除死亡的细胞, 当筛选 7 d 后 3 d 更换 1 次细胞培养液, 直至细胞皿 70% 长满阳性转染细胞, 传代和冻存, 用于后续检测。

1.4.2 细胞单克隆培养

牛胎儿成纤维细胞在 24 孔板中培养至 40%, 用 5 mg/mL 丝裂霉素 C 处理 2 h, 去除含丝裂霉素 C 的细胞培养液后用 PBS 清洗 6 次, 再用细胞培养液清洗 2 次, 确保完全去除丝裂霉素 C; 用显微操作仪挑取单个细胞放于用丝裂霉素 C 处理过的培养的细胞中培养, 用新鲜的细胞培养液培养, 3 d 更换一次细胞培养液直至皿底 80% 长满细胞, 传代, 用含 300 μ g/mL 的 Geneticin 和 100 nmol/mL 的 GV 细胞培养液替代细胞培养液培养, 杀死基因没有定点整合的细胞, 得到中靶的纯克隆株。

1.5 阳性细胞克隆的鉴定

1.5.1 阳性细胞克隆的 PCR 及测序鉴定

按照基因组提取试剂盒说明书从待鉴定细胞中提取细胞基因 DNA, 根据 GenBank 中公布的牛 *prnp* 序列 (Accession No. AJ298878) 设计鉴定引物: check1:5'-CCTGGCAAGAATACTGGAGTGGG-3'; check2:5'-TCAATCCGTAGCGATCAAGGAAG-3'。其中 check1 位于 3'同源臂外侧, check2 位于 *neo* 表达框架内。反应体系同上; 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min40 s, 30 个循环。将 PCR 产物回收, 连接到 pMD20-T Vevtor 载体上, 转化感受态细胞 DH5 α , 抽提质粒, 进行酶切, PCR 及测序鉴定。

1.5.2 阳性细胞克隆的间接免疫荧光实验鉴定

将筛选出的单克隆细胞接种于 6 孔板, 待细胞长满载玻片的 80% 时将细胞爬片从 6 孔培养板中取出, 37 $^{\circ}$ C 下用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 经洗涤和 3% H₂O₂ 阻断后, 用 1%

BSA-PBST 封闭 20 min, 加入 1:200 稀释的小鼠抗牛 P6488 单克隆抗体, 4°C 反应过夜。PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入 1:100 稀释的 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 荧光抗体, 37°C 孵育 1 h (避光), PBST 充分洗涤后, 50% 甘油封片, 荧光显微镜下观察并照相。以未转染的细胞为对照。

1.5.3 阳性细胞克隆的 Western blotting 鉴定

将筛选出的单克隆细胞胰酶消化, 预冷的 PBS 洗涤 2 次, 加入细胞裂解液 (150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 5 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 1 mmol/L PMSF), 冰浴上裂解细胞 30 min, 15 000 r/min 离心 10 min, 收获上清液, 采用 Bradford 法测定蛋白含量, 进行 SDS-PAGE 后, 电转移至硝酸纤维素 (NC) 膜上, PBST (含 0.01% Tween20 的 PBS) 洗涤后, 于封闭液 (含 5% 脱脂奶粉的 PBST) 中 4°C 过夜。加入小鼠抗牛 P6488 单克隆抗体, 室温孵育 2 h, 经 PBST 洗涤加入 HRP-羊抗小鼠 IgG, 室温孵育 2 h, PBST 洗涤后, 二氨基联苯二胺 (DAB) 显色、成像。

2 结果

2.1 奶牛朊蛋白基因 prnp 敲除载体的构建

2.1.1 质粒 pMD20-T-3prnp 的构建

以牛基因组 DNA 为模板扩增的 3' 同源臂长 1727 bp (图 1A), 直接将 PCR 得到的目的片段连入打靶载体中需要进行大量的 PCR 产物, 因此, 采用 T 载体克隆的方法以获得足够的 3' 同源臂片段。

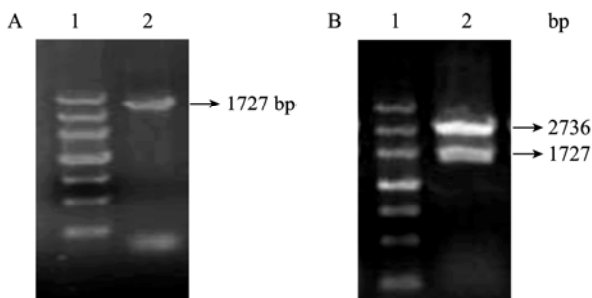


图 1 3'同源臂的 PCR 和酶切鉴定

Fig. 1 PCR and restriction endonuclease digestion of 3' homologous arm. (A) 1: DNA marker DL2000; 2: 3' homologous arm. (B) 1: DNA marker III; 2: pMD20-T-3prnp digested with *Spe I/Cla I*.

pMD20-T-3prnp 全长 4463 bp, 用 3' 同源臂两端的酶切位点 *Cla I* 和 *Spe I* 进行双酶切将获得 1727 bp 的 3' 同源臂片段和 2736 bp 的 pMD20-T 载体片段 (图 1B)。对 pMD20-T-3prnp 进行测序, 结果表明插入片段为 3' 同源臂。

2.1.2 质粒 pMD20-T-5prnp 的构建

以牛基因组 DNA 为模板扩增的 5' 同源臂长 3860 bp (图 2A), 同上, 同样采用 T 载体克隆的方法以获得足够的 5' 同源臂片段。

pMD20-T-5prnp 全长 6596 bp, 用 5' 同源臂两端的酶切位点 *Sgs I* 和 *Not I* 进行双酶切将获得 3860 bp 的 5' 同源臂片段和 2736 bp 的 pMD20-T 载体片段 (图 2B)。对 pMD20-T-5prnp 进行测序, 结果表明插入片段为 5' 同源臂。

2.1.3 质粒 PA2T-prnps 的构建

将质粒 pMD20-T-3prnp 经过 *Cla I/Spe I* 双酶切后, 回收 3' 同源臂后将其连接到经过 *Cla I/Spe I* 双酶切的 PA2T 载体上, 构建成为 PA2T-prnps, 大小为 10 265 bp。用 *Cla I/Spe I* 双酶切可获得 1727 bp 的 3' 同源臂片段和 8538 bp 的 PA2T 载体片段 (图 3A), 以 PA2T-prnps 为模板, short1 和 short2 为上下游引物可扩增出大小为 1727 bp 的条带 (图 3B)。

2.1.4 打靶载体的构建

将质粒 pMD20-T-5prnp 经过 *Sgs I/Not I* 双酶切后, 回收 5' 同源臂并将其连接到经过 *Sgs I/Not I* 双酶切的 PA2T-prnps 载体上, 构建成为敲除载体, 称为 PBNP, 全长 14 125 bp。将该质粒用 *Sac II* 单

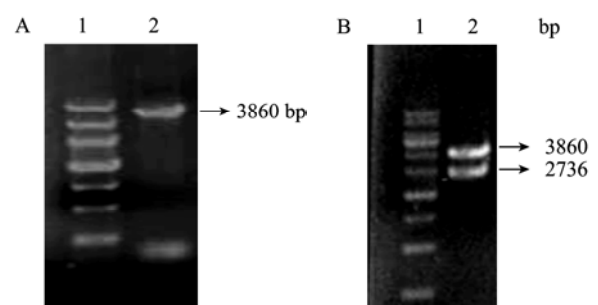


图 2 5'同源臂的 PCR 和酶切鉴定

Fig. 2 PCR and restriction endonuclease digestion of 5' homologous. (A) 1: DNA marker III; 2: 5' homologous arm. (B) 1: 1 kb DNA marker (MBI); 2: pMD20-T-5prnp digested with *Sgs I/Not I*.

酶切可获得 14 125 bp 的片段 (图 4A), 用 *Sgs I* / *Not I* 双酶切后可获得 3860 bp 的 5'同源臂片段和 10 265 bp 的 PA2T-prnps 载体片段 (图 4B)。

以 PBONP 质粒为模版, long1 和 long2 为上下游引物可扩增出大小为 3860 bp 的条带(图 4C), short1 和 short2 为上下游引物可扩增出大小为 1727 bp 的条带 (图 4D)。

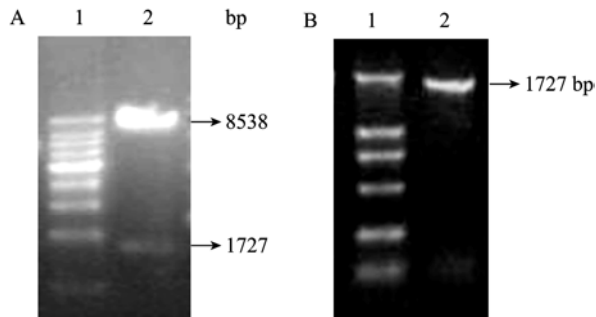


图 3 重组质粒 PA2T-prnps 的 PCR 及酶切鉴定

Fig. 3 PCR and restriction endonuclease digestion of recombinant plasmid PA2T-prnps. (A) 1: 1 kb DNA ladder; 2: PA2T-prnps digested with *Spe I*/*Cla I*. (B) 1: DNA marker DL2000; 2: 3' homologous arm.

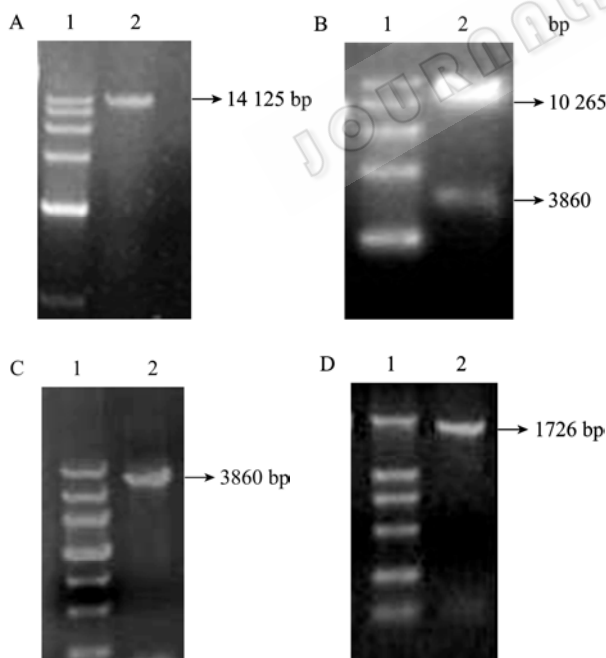


图 4 打靶载体 PBONP 的酶切和 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR and restriction endonuclease digestion of targeting vector PBONP. (A) 1: DNA marker DL15 000; 2: PBONP digested with *Sac II*. (B) 1: DNA marker DL15 000; 2: PBONP digested with *Sgs I*/*Not I*. (C) 1: DNA marker III; 2: 5' homologous arm. (D) 1: DNA marker DL2000(DONGSHENG BIOTECH); 2: 3' homologous arm.

2.1.5 同源重组示意图(5A)及打靶载体整体框架图 (5B)

2.2 打靶载体的细胞转染和细胞筛选

2.2.1 细胞转染和初步筛选

图 6A 为经 *Sac II* 线性化的基因打靶载体 PBONP 转染牛胎儿成纤维细胞后用 600 μ g/mL 的 Genticin 的细胞培养液培养 10 d 后的情况; 图 6B 为经

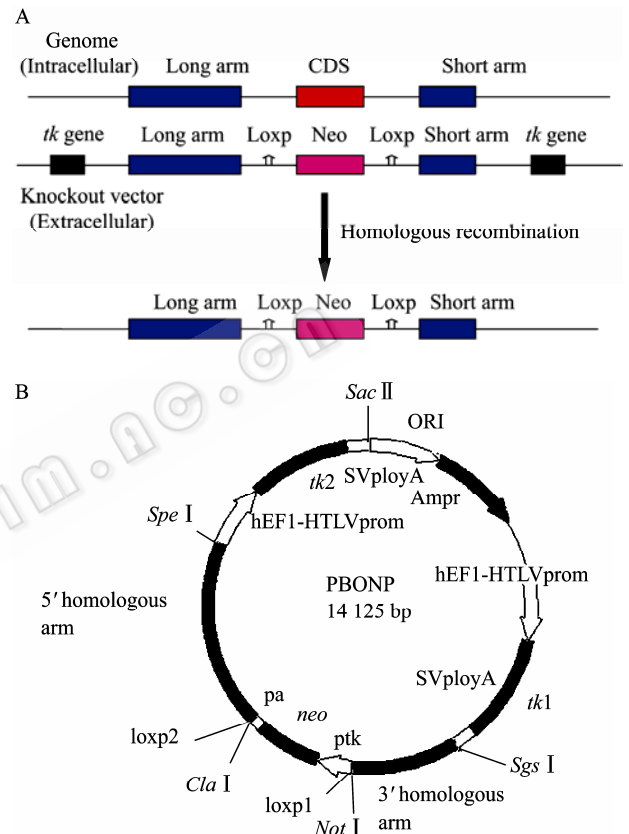


图 5 同源重组示意图及打靶载体框架图

Fig. 5 Schematic diagram of homologous recombination region and targeting vector diagram. (A) Schematic diagram of homologous recombination region. (B) Targeting vector diagram.

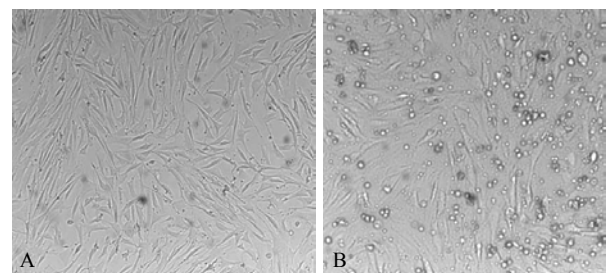


图 6 细胞筛选液培养液培养牛胎儿成纤维细胞

Fig. 6 Bovine fetal fibroblasts cultured by Genticin cell nutrient solution. (A) BFFs transfected by PBONP cultured by selective solution containing Genticin. (B) BFFs selected by Genticin cultured by selective solution containing GCV.

Genticin 正向筛选后的细胞用 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Genticin 和 200 nmol/L 的 GVC 细胞培养液进行筛选 7 d 后的情形, 可见, 最终转染的细胞在筛选液中存活并增殖。

2.2.2 PBONP 的细胞单克隆培养结果

如图 7 所示, 单个转染打靶载体的细胞通过培养体系单克隆培养后, 细胞增殖, 一段时间后, 饲养层细胞衰老死亡, 经多次洗脱后洗去饲养层, 留下了单克隆扩增的细胞克隆株。经过 12 次大批量的电穿孔转染实验, 一共得到 176 个药物抗性细胞克隆, 分别将每个单克隆细胞挑出来进行扩大培养用于后续检测。

2.3 阳性细胞克隆的鉴定

2.3.1 单克隆细胞的 PCR 鉴定

分别从筛选出的单克隆细胞和未转染的细胞中提取基因组 DNA, 以其为模板, 以 check1、check2 为上下游引物分别进行 PCR 扩增。以阳性细胞基因扩增的产物长度为 2594 bp, 应为 3'同源臂、Loxp、PA 和前部分 *neo* 的连接片段。PCR 产物经回收、连接到 pMD20-T Vector、转化感受态细胞 DH5 α 、质粒抽提、进行酶切及测序鉴定后, 结果显示: 176 个细胞克隆中有 9 个在同等条件下扩增出目的带, 而以未转染细胞的基因组为模板在其他条件都一样的情况下扩增不出条带 (图 8), 且 PCR 产物经测序鉴定正确, 由此初步证实这 9 个细胞克隆为阳性细胞克隆。

2.3.2 阳性细胞克隆的间接免疫荧光实验鉴定

将筛选出的 9 个细胞进行免疫荧光实验, 以未转染的细胞作为对照。如图 9 所示: 经过筛选的细胞均不发荧光, 因为发生了同源重组的细胞中 *prnp* 基因的 CDS 区已被 *neo* 序列所取代, 即细胞中的朊蛋

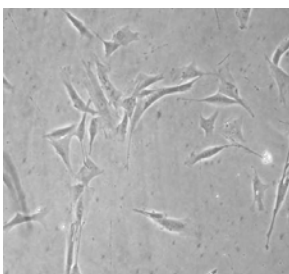


图 7 单细胞培养时单个细胞增殖的结果

Fig. 7 Result of single cell mitochysis in monoclonal culture.

白被敲除, 不能进行抗原抗体反应, 所以就没有荧光产生, 反之, 对照组产生荧光 (图 9)。进一步证实这 9 个克隆为阳性细胞克隆。

2.3.3 阳性细胞克隆的 Western blotting 鉴定

将筛选出 9 个单克隆细胞和未转染的细胞用胰酶消化, 预冷的 PBS 洗涤 2 次, 加入细胞裂解液, 冰浴上裂解细胞 30 min, 经离心收获上清, 进行 SDS-PAGE 后转膜、抗体孵育、显色、成像, 结果如图 10 所示: 9 个阳性细胞样 (1 号) 均没有出现目的蛋白带 (31 kDa) 而 2 号未转染细胞样有, 原因同 2.3.2 中所述, 证明了所得到的阳性细胞均发生了正确的同源重组。

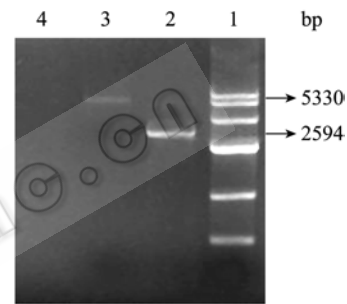


图 8 单克隆细胞的 PCR 鉴定结果

Fig. 8 Identification of positive cell clone by PCR. 1: DNA marker IV; 2: PCR gene product amplified as a template with positive cells; 3: result of single-enzyme digestion; 4: PCR gene product amplified as a template with cells transfected with empty vector.

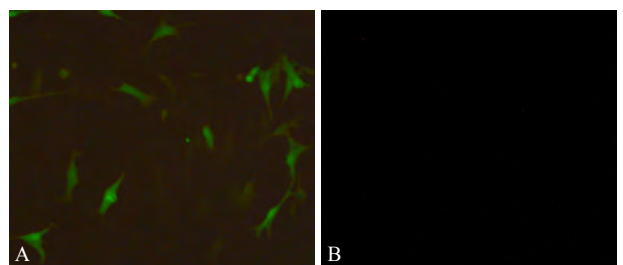


图 9 免疫荧光试验鉴定阳性细胞克隆

Fig. 9 Immunofluorescence assay of the positive cells. (A) Immunofluorescence test of non-transfected cells. (B) Immunofluorescence test of selected cells.

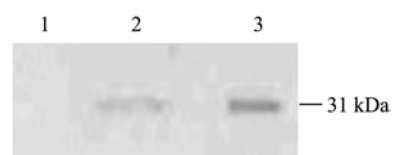


图 10 阳性细胞的 Western blotting 鉴定结果

Fig. 10 Western blotting results of the positive cells. 1: Western blotting of selected cells; 2: Western blotting of non-transfected cells; 3: standard *prnp* protein.

3 讨论

疯牛病是一种慢性的、致死性的中枢神经系统退行性疾病。1997年, Bruce等^[10]的研究证实, 食用感染过疯牛病的病牛的内脏、脊髓等可以使人感染上类似疯牛病的脑病 vCJD, 这些脑病统称 Prion 疾病。在传染性朊病毒病中, 外源性 PrPsc 在侵染机体后, 首先与锚附在细胞表面的内源性 PrPc 的 C 端第 3 个螺旋位点同源性特定 AA 相结合, 形成杂合二聚体(Heterodimer), 然后, 在“X 蛋白”^[6-7]和盐酸胍、硫酸黏多糖、金属离子、脂类分子、BCL-2 等蛋白质折叠因子及氧自由基^[8]等作用下, 以 PrPsc 为模板, 自动催化以 α 螺旋为主的 PrPc 转变成以 β 折叠为主的 PrPsc。这种“策反”式复制是一种瀑布型指数式增殖过程^[9], 即一个分子 PrPsc 产生出 2 个分子 PrPsc, 2 个 PrPsc 再去结合 2 个 PrPc, 共产生出 4 个 PrPsc, 如此周而复始。因此, 利用基因打靶技术将 *prnp* 敲除, 生产对疯牛病具有抗性的转基因动物具有重大的意义。

1993年, Bueller等^[11]首先利用基因打靶技术获得了 *prnp*^{-/-} 的小鼠, 并且发现这些小鼠没有明显的发育和表型异常。随后, Bueller等^[11]、Prusiner等^[12]的研究表明, 这种 *prnp* 基因敲除或者缺失的小鼠都对 Prion 疾病的发生具有抗性。再后来, 人们就尝试利用基因敲除技术来剔除大家畜基因组 *prnp* 基因。2006年, 上海转基因研究中心的 Yu 等^[13]利用基因敲除技术成功获得了 5 只 *prnp*^{-/+} 的山羊, 经过 mRNA 和蛋白水平的检测, *prnp* 基因的表达都有明显的下调, 这些山羊并没有出现发育和表型的异常, 而且都已经存活了 3 个月以上。本实验室已经建立了稳定、高效的牛体细胞核移植技术平台, 所以希望在此基础上, 尝试利用基因敲除技术生产 *prnp* 基因敲除克隆牛。

牛 *prnp* 是单拷贝基因, 含有 3 个外显子和 2 个内含子, 其中 795 bp 的编码区 (Coding sequence, CDS) 位于第 3 个外显子中。本实验以通用型打靶载体 PA2T 为基本骨架成功构建打靶载体 PBONP, 它由 3.86 kb 的 5'同源臂和 1.727 kb 的 3'同源臂, 以及位于其中的 *neo* 基因表达框架构成。载体中同时含有

neo 正筛选标记基因和 *tk* 负筛选标记基因, 为筛选阳性细胞奠定基础; 先后用 G418 和 GV 进行正负筛选, 结果获得了大量的单克隆细胞, 由此证实了 PNS 法是一种简便、易行、有效的富集阳性细胞的方法。一旦打靶载体与牛 *prnp* 基因发生同源重组, 则 *prnp* 的 CDS 序列被 *neo* 基因表达框架取代, 致使 *prnp* 基因不能表达, 达到敲除 *prnp* 的目的。经过后续的 PCR、免疫荧光和 Western blotting 鉴定, 证实了培养的 176 个单克隆细胞中有 9 个是发生了同源重组的阳性细胞, 也就是中靶效率大约为 5%。将经鉴定的阳性细胞于液氮中冷冻保存, 交给胚胎移植组作为核移植的供体细胞。然而, 转基因随着细胞传代次数的增多, 可能会影响供体细胞的遗传学以及表观遗传学状态, 进而影响细胞核重编程以及以后在转基因动物个体水平上的表达, 这些都有待于进一步研究。

REFERENCES

- [1] Yang X, Huang PT, Huang CF. Gene Targeting. Beijing: Science Press, 2003: 18.
杨晓, 黄培堂, 黄翠芬. 基因打靶技术. 北京: 科学出版社, 2003: 18.
- [2] Sorrell DA, Kolb AF. Targeted modification of mammalian genomes. *Biotechnol Adv*, 2005, **23**(7/8): 431-469.
- [3] Yang XQ, Liu D, Han YG. The principle of gene targeting and its application. *Anim Sci Abroad*, 2001, **28**(5): 31.
杨秀芹, 刘娣, 韩玉刚. 动物基因打靶技术的原理与应用. 国外畜牧科技, 2001, **28**(5): 31.
- [4] Qin YC, Lü XW, Li JG, et al. Mad cow disease research and our prevention and control system dynamics. *Feed Ind*, 2006, **27**(1): 2-6.
秦玉昌, 吕小文, 李军国, 等. 疯牛病的研究动态和我国防控体系建设. 饲料工业, 2006, **27**(1): 2-6.
- [5] Li DX, Ma JY, Cao YC. Characteristic and application in antibody research of Cre-Loxp recombination system. *Biotechnol Bull*, 2008: 1.
- [6] Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 13363-13383.
- [7] Telling GC, Scott M, Mastrianni J, et al. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*, 1995, **83** (1): 79-90.

- [8] Yang CM. The organic brain degenerative diseases. *Chemical J*, 2002, **23**(2): 243–250.
扬池明. 脑神经退行性疾病中的有机化学. 高等学校化学学报, 2002, **23**(2): 243–250.
- [9] Borchelt DR, Scott M, Taraboulos A, *et al.* Scrpie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol*, 1990, **110**(3): 743–752.
- [10] Bruce ME, Will RG, Ironside JW. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 1997, **389**: 498–501.
- [11] Bueler H, Aguzz IA, Saile RA, *et al.* Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 1993, **73**: 1339–1347.
- [12] Prusiner SB, Groth D, Serban A, *et al.* A blation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 10608–10612.
- [13] Yu G, Chen J, Yu H, *et al.* Functional disruption of the prion protein gene in cloned goats. *J Gen Virol*, 2006, **87**(Pt4): 1019–1027.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

工业酶——结构、功能与应用

(应用生物技术大系)

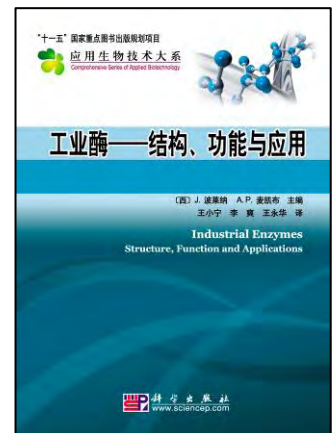
[西] J. 波莱纳 A. P. 麦凯布 主编 王小宁 李爽 王永华 译

978-7-03-025769-7 ¥98.00 2010年1月出版

内容简介

本书第一篇介绍了以碳水化合物为底物的酶类，着重介绍淀粉酶和纤维素酶的类型、结构和催化特性及在诸多工业领域中的应用。此外对木聚糖酶、果胶酶、糖苷酶和转糖苷酶等也有讨论。第二篇介绍了蛋白水解酶家族的 MEROPS 数据库，之后是与工业关系密切的枯草杆菌蛋白酶、半胱氨酸型蛋白酶、金属蛋白酶等。第三篇对脂肪酶的结构和功能，在酯工业、有机合成、生物柴油、结构脂合成中的应用等分章进行了评述。第四篇对重要性日益提高的核酸酶给予了特别关注。最后对多种重要而无法分类的酶进行了讨论，包括氧化还原酶、植酸酶、腈水解酶、青霉素酰化酶等。

本书可作为相关专业研究生和高年级本科生的教材或参考书，也可供从事生物化工、医药、食品等行业及其他相关技术领域的科技工作者参考阅读。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 李韶文 (010-64000849) 周文宇 (010-64031535)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目