

## 双筛选标记打靶载体的构建及其功能鉴定

李军华, 韩翠芹, 邓捷, 王华岩

西北农林科技大学动物医学院 陕西省干细胞工程技术研究中心 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100

**摘要:** 利用 DNA 同源重组方法 (基因打靶) 对动物基因组进行修饰是转基因研究的重要手段之一。为了构建一个高效的通用型基因打靶载体, 本研究以 pBS246 质粒为骨架, 在两个 LoxP 序列之间插入正筛选标记新霉素磷酸转移酶 (*neo*) 基因和绿色荧光蛋白 (*EGFP*) 基因; 在两个 LoxP 序列外侧分别插入两组携带“8 碱基”酶切位点的多克隆位点序列 (MCS-1 和 MCS-2) 和负筛选标记单纯疱疹病毒胸苷激酶 (*HSV-tk*) 基因, 构建成通用型基因打靶载体 pGT-V1, 并且在 C2C12 细胞中验证了载体中各个元件的功能。该载体具有如下特点: 1) 在载体中引入绿色荧光标记, 可以实时监控载体的转染效率, 而转染效率的提高为高效基因打靶提供了保证; 2) 在两个 LoxP 位点间插入绿色荧光标记, 可以直观监测打靶后遗留的筛选标记的去除情况, 并且可以通过流式细胞仪或免疫磁珠法, 将最终去除了筛选标记的阳性细胞 (即丢失绿色荧光的细胞) 分选出来, 降低筛选标记在中靶细胞中可能产生的负面影响; 3) 采用“8 碱基”酶切位点的 MCS 序列, 便于 DNA 大片的连接和重组, 极大提高了该载体的通用性。总之, 该载体优化了基因打靶的技术手段, 为有效开展基因打靶和转基因动物研究提供了新平台。

**关键词:** 同源重组, 绿色荧光标记, 打靶载体, Cre-LoxP

## Construction and functional analysis of a common gene targeting vector with double-selection markers

Junhua Li, Cuiqin Han, Jie Deng, and Huayan Wang

Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Shaanxi Center for Stem Cell Engineering and Technology, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

**Abstract:** Homologous recombination is an important technique that is used to modify mammalian genome. Here, we constructed an efficient common gene targeting vector based on the plasmid pBS246. The vector consisted two positive selection markers, neomycin resistance gene (*neo*) and enhanced green fluorescent protein gene (*EGFP*) flanked by locus of X-over P1 (LoxP) sites. Two synthesized multiple cloning sequences MCS-1 and MCS-2 that contain several “8 bp cutter” enzyme sites were placed in outside of LoxP sites. Additionally, a negative selection marker *HSV-tk* (herpes simplex virus thymidine kinase) gene was located adjacent to MCS-1 site. The constructed vector was named pGT-V1, and its functions were characterized in C2C12 cells. The vector had the following unique features: 1) *EGFP* was used to monitor instantly the transfection rate that was essential for increasing the efficiency of gene knockout (KO); 2) The *EGFP* marker located between two LoxP sites was able to be removed from KO positive cells to avoid the potential damage of selection markers to the recipient cells. The process could be monitored visually and the positive cells without selecting markers (the loss of green fluorescent cells) could be sorted out by either flow cytometry or

**Received:** March 22, 2010; **Accepted:** May 14, 2010

**Supported by:** Grants of New Transgenic Technology and Method (No. 2008X08010-001), National Major Special Project on New Varieties Cultivation for Transgenic Organisms (No. 2009ZX08007-008B).

**Corresponding author:** Huayan Wang. Tel: +86-29-87080069; E-mail: hhwang101@163.com

转基因新技术新方法研究 (No. 2008X08010-001), 转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2009ZX08007-008B) 资助。

immunomagnetic beads; 3) “8 bp cutter” restriction sites were embedded in MCS sequences, which then enhanced the versatility of this vector. In summary, the constructed plasmid optimized the vector of gene targeting and provided a new technique means for the transgenic animal research.

**Keywords:** homologous recombination, green fluorescent protein gene, gene targeting vector, Cre-LoxP

基因打靶技术是建立在上世纪 80 年代基因同源重组和胚胎干细胞技术基础上的, 它将外源基因定点整合到靶细胞基因组的某一特定位点上, 或对某一靶位点进行定点突变, 以达到对细胞基因组进行定点修饰的目的, 最终改变生物的遗传特性<sup>[1]</sup>。1981 年 Martin<sup>[2]</sup>和 Evans 等<sup>[3]</sup>成功建立了小鼠胚胎干细胞系 (ES 细胞), 使得基因打靶技术能够实际应用于转基因动物研究中。1985 年, Smithies 等<sup>[4]</sup>首次利用同源重组方法将一段外源质粒插入到人染色体  $\beta$ -globin 位点上, 从而最早在哺乳动物细胞中实现了同源重组。1988 年, Capecchi 等运用“正负筛选”策略, 将 2 个筛选标记基因 *neo* 和 *HSV-tk* 装到打靶载体上, 使中靶细胞的效率比仅使用单一正筛选标记提高了 3~10 倍<sup>[5]</sup>。传统的基因打靶将靶基因在细胞或动物体中的活性完全去除, 很容易导致细胞的死亡或胚胎早期发育缺陷。因此, Gu 等<sup>[6]</sup>将 Cre-LoxP 基因元件引入到打靶载体上, 把在特定发育阶段或特定组织细胞中表达 Cre 酶的转基因小鼠, 与在基因组中引入 LoxP 锚定序列的小鼠交配, 使子代鼠中特定组织细胞中的靶基因被去除。这种具有时空调控特性的条件基因去除技术为研究重要功能基因在组织器官发育、生理过程以及疾病发生中的作用提供了有效的研究手段。

基因打靶技术已经成功运用于转基因羊<sup>[7]</sup>、牛<sup>[8]</sup>、猪<sup>[9]</sup>等实验研究上。但是, 目前国内外常用的打靶载体都或多或少的存在一些缺陷, 例如, 有的载体中引入一种抗药基因作为正筛选标记, 但并没有设计好中靶细胞筛选完成后将筛选标记去除的步骤, 结果导致中靶细胞中永久携带正筛选标记, 这可能是造成体细胞克隆效率低下和克隆动物流产率、畸胎率较高的一个原因。还有一些打靶载体在抗药基因两端加入了 LoxP 序列, 打靶完成后通过 Cre-LoxP 系统去除中靶细胞中的正筛选标记, 但是他们忽略了一个重要问题: 如何有效地将去除正筛选

标记的中靶细胞筛选出来? 因为转染的效率无法达到 100%, Cre 酶的工作效率也无法达到 100%。为克服上述不足, 有必要构建一个更为完善的基因打靶载体。本研究在 2 个 LoxP 序列之间插入 *neo* 作为正筛选标记的同时, 再插入 *EGFP* 序列, 这样基因打靶完成后, 通过观察绿色荧光的变化, 就可以实时监测中靶细胞的筛选情况。最重要的是, 可以通过流式细胞仪或免疫磁珠法将去除筛选标记的中靶细胞筛选出来。因此, 本研究对动物转基因研究具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

成肌细胞 C2C12、大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、TOP10 由本中心保存; pIRES-*neo*、pEGFP-C1 载体购自 Clontech 公司; pBS246、pBS185 载体和转染试剂 Lipofectamine TM2000 购自 Invitrogen 公司; pORF-HSV1tk 载体购自 InvivoGen 公司; 限制性内切酶购自 MBI 公司; T4 DNA 连接酶、Klenow 大片段、T4 DNA 磷酸激酶、DNA marker 等购自 TaKaRa 公司; G418、DMEM 干粉 (高糖)、胎牛血清购自 Gibco 公司; 丙氧鸟苷 (GAC) 购自 Sigma 公司; DNA 片段快速回收试剂盒购自 BioDev-tech 公司; 小量质粒抽提试剂盒购自 Vigrous 公司。

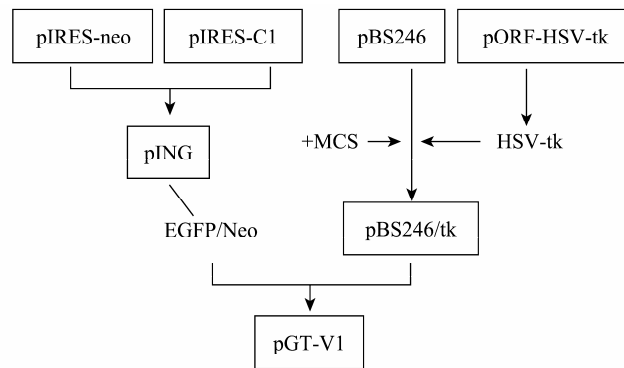
### 1.2 载体的构建

#### 1.2.1 载体构建的技术路线图

载体构建经过 3 个大的步骤, 具体技术路线见图 1。

#### 1.2.2 构建过渡载体 pING

将载体 pEGFP-C1 经 *Nhe* I 单酶切和 Klenow 补平后再用 *Bgl* II 单酶切, 并通过凝胶电泳回收 *EGFP* 片段, 然后将其插入到经 *Eco*RV 和 *Bam*H I 双酶切的 pIRES-*neo* 中, 得到 pING 载体, 并分别用 *Bgl* II 和 *Kpn* I 进行单酶切鉴定。



MCS1:AATTC GCCCGGGC CCTCAGC AGCGCT GCGCGCC GCTNAGC GCGWCC GCTAGC  
*EcoRI Srf I BbvCI Afe I Asc I Blp I Kfl I Bmt I*  
MCS2:CTAGT TTAATTAA GGCCGGCC GACTTAGTC CCTNAGG ACCGGT GTTTAAAC  
*Spe I Pac I Fse I Pst I Bst361 Age I Pme I*

图1 载体构建流程图

Fig. 1 Flow diagram of vector construction.

### 1.2.3 构建过渡载体 pBS246/tk

分别合成2段含多个“8碱基”酶切位点的DNA小片段, MCS-1 (5'-3'): AATTCGCCCGGGCCCTCAGCAGCGCTGGCGCGCCGCTAAGCGGGTCCCCTAGC和MCS-2 (5'-3'): CTAGTTAATTAAGGCCGCGCGACTTAGTCCTGAGGACCGGTGTTTAAACCA。将2个片段分别插入到pBS246载体的*EcoRI*位点(MCS-1)和*Spe I/Nde I*位点(MCS-2)处,得到pBS246/MCS。然后用*EcoRI*单酶切pBS246/MCS,经Klenow补平后,再用*Not I*单酶切,凝胶回收线性化的pBS246/MCS; *Not I/Swa I/Ase I*三酶切pORF-HSV1tk,凝胶回收含有启动子及polyA序列的*HSV-tk*片段,最后将*HSV-tk*序列克隆到线性化的pBS246/MCS中,构建成pBS246/tk载体。分别用*Sma I*、*Pst I*单酶切,以及*Pac I*和*Asc I*双酶切进行鉴定。

### 1.2.4 构建通用打靶载体 pGT-V1

*Xho I*单酶切pING,经Klenow补平后再用*Nru I*单酶切,电泳回收EGFP/IRES/neo目的片段。将目的片段连接到经*BamH I*单切及Klenow补平后的pBS246/tk载体上,构建完成pGT-V1载体。分别用*Kpn I*和*Spe I*单酶切进行鉴定。

## 1.3 载体相关元件的功能检测

### 1.3.1 细胞培养及药物筛选浓度测定

小鼠成肌细胞C2C12在含10%胎牛血清的

H-DMEM培养基中培养,培养条件为37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度。待细胞生长至70%~80%满时,将C2C12细胞接种到24孔细胞培养板上,分别加入不同浓度的G418和GAC筛选1周,统计G418和GAC的最低致死浓度。

### 1.3.2 质粒转染及其抗药性检测

用*Not I*位点将pGT-V1载体线性化,然后通过电穿孔方法将pGT-V1导入C2C12细胞。转染24h后在荧光显微镜下观察绿色荧光,并在培养基中加入最低致死浓度的G418进行药物筛选,以未转染质粒的C2C12细胞作为阴性对照组,2~3周内观察细胞抗药的结果。挑选抗G418的细胞克隆,再在培养液中加入筛选浓度的GAC,对中靶细胞进行负筛选。同时,以未转染质粒的C2C12细胞作为阴性对照组,1周内观察结果。

### 1.3.3 Cre-LoxP系统的功能验证

质粒pBS185带有*Cre*基因,通过电穿孔法将10 μg pBS185质粒导入带有G418抗性的10<sup>6</sup>细胞中。同时,以相同体积的超纯水转染作为阴性对照,24h后荧光显微镜下观察电转染前后绿色荧光细胞比例的变化。然后通过流式细胞仪分选EGFP阳性和阴性细胞,计算*Cre*酶对LoxP序列进行剪切、重组的效率。考虑到电转染效率无法达到100%,所以对已转染过1次的细胞待重新贴壁后,进行第2

次电转染, 以便进一步检测 Cre-LoxP 元件的功能。另外, 为在基因组水平上进一步检测 Cre-LoxP 系统的功能, 在阳性细胞中导入 Cre 酶后, 提取基因组 DNA, 并以未转染 Cre 酶的阳性细胞作为对照, 通过半定量 PCR 验证转染 Cre 酶后细胞基因组上的 *EGFP* 含量变化。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 50 s, 30 个循环 (*GAPDH*: 27 个循环); 72°C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离检测, 然后通过全自动凝胶成像分析仪 Gene genius 扫描, 目的片段与内参的光密度之比作为目的片段的相对光密度值, 通过 EXCEL 软件对实验结果进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 载体酶切鉴定及分析

#### 2.1.1 *pING* 的鉴定

将目的基因 *EGFP* 序列克隆到载体 pIRES-neo 中, 得到 pING 阳性质粒 (图 2A)。pING 经 *Bgl*II 酶切得到 1 937 bp 和 3 839 bp 两个片段, 经 *Kpn*I 酶

切得到 1 565 bp 和 4 411 bp 两个片段。电泳结果与设计相符 (图 2a), 证明 pING 载体构建正确。

#### 2.1.2 *pBS246/tk* 的鉴定

将合成的多克隆位点序列 MCS-1 插入到 pBS246 的 *Eco*R I 位点处, MCS-2 插入到 *Spe*I /*Nde*I 位点间, 构建完成 pBS246/MCS。最后, 将包括启动子及 ployA 序列的 *HSV-tk* 克隆入 pBS246/MCS, 构建完成 pBS246/tk (图 2B)。用 *Sma*I 和 *Pst*I 单酶切 pBS246/tk 质粒分别得到 4 484 bp、44 bp 和 2 328 bp、2 200 bp 片段; 用 *Pac*I 和 *Asc*I 双酶切得到 4 300 bp 和 228 bp 两个片段 (图 2b), 这些结果均与设计相符, 证明 pBS246/tk 载体构建正确。

#### 2.1.3 *pGT-V1* 的鉴定

通过平末端连接的方法, 将带有 *EGFP*/*IRES*/*neo* 的基因片段克隆到 pBS246/tk 中, 构建完成 pGT-V1 (图 2C)。用 *Kpn*I 单酶切 pGT-V1 质粒得到 3 764 bp、1 716 bp 和 1 565 bp 三个片段, 用 *Spe*I 单酶切得到 3 496 bp、2 130 bp 和 1 419 bp 三个片段 (图 2c), 结果均与设计相符。

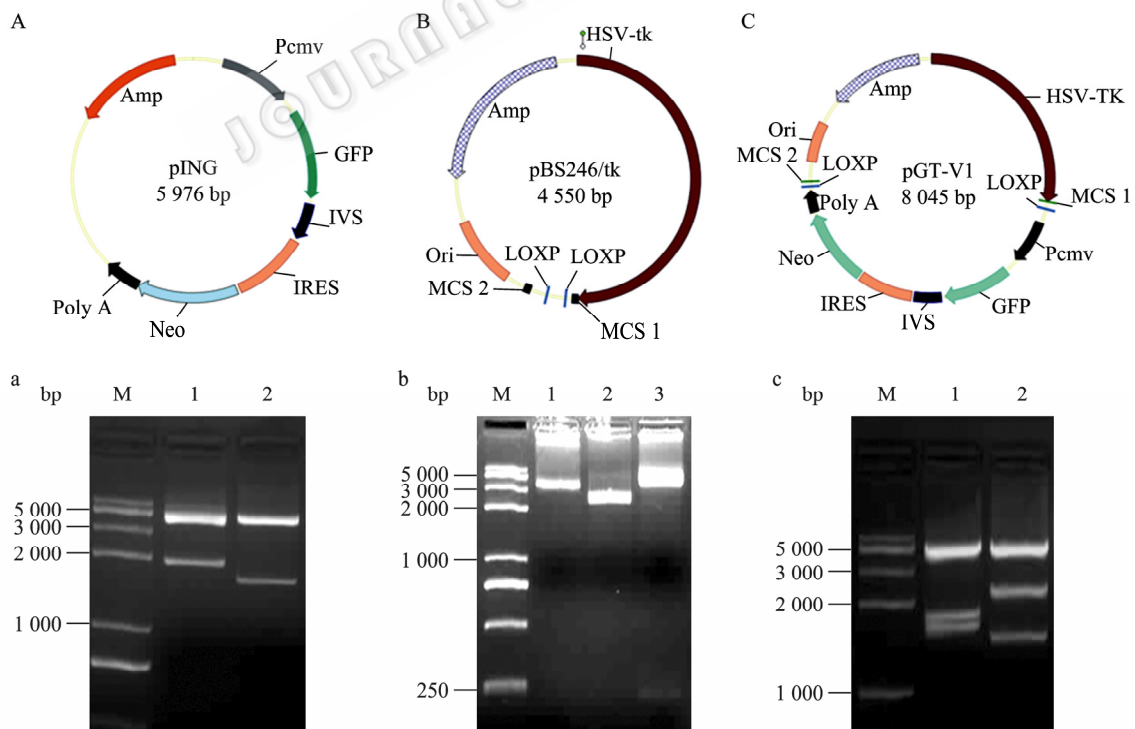


图 2 重组质粒结构示意图及酶切鉴定

Fig. 2 Schematic of recombinant plasmids and the enzyme mappings. (A) Structure of pING. (a) pING digested by enzymes. 1: *Bgl*II digestion; 2: *Kpn*I digestion. (B) Structure of pBS246/tk. (b) pBS246/tk digested by enzymes. 1: *Sma*I digestion; 2: *Pst*I digestion; 3: *Pac*I /*Asc*I double-digestions. (C) Structure of pGT-V1. (c) pGT-V1 digested by enzymes. 1: *Kpn*I digestion; 2: *Spe*I digestion. M: molecular weight marker.

## 2.2 pGT-V1 载体的功能验证

### 2.2.1 G418 和 GAC 最低致死浓度测定

经过 1 周的浓度梯度筛选, C2C12 细胞用 G418 处理的最小致死浓度是 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 因此, 采用 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 浓度用于筛选。C2C12 细胞用 6  $\mu\text{mol}/\text{L}$  GAC 处理后全部致死, 而在用 4  $\mu\text{mol}/\text{L}$  GAC 时大部分细胞仍能存活, 所以 GAC 的筛选浓度定为 4  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

### 2.2.2 荧光标记和正负筛选标记功能的检测

采用电穿孔方法将 pGT-V1 导入 C2C12 细胞, 对照组细胞不加质粒以同样条件电转染。转染 24 h 后, 在荧光显微镜下观察, 实验组有 30% 左右的细胞发绿色荧光 (图 3A), 而对照组没有观察到绿色荧光 (图 3B)。随后, 在培养液中加入 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 进行药物抗性筛选, 每 2 天换液 1 次。7~10 d 左右, 对照组细胞几乎全部死亡, 而实验组也有相当数量的细胞死亡, 然后将 G418 的浓度减为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 继续筛选。3 周后, 培养皿中出现 G418 抗性细胞克隆。将 G418 抗性细胞扩增培养, 在荧光镜下检测发现, 视野内观察的细胞都发绿色荧光 (图 3C), 证明成功筛选出稳定转染 pGT-V1 的细胞株。

在检测负筛选标记基因时, 将转染 pGT-V1 的阳性细胞培养在 4  $\mu\text{mol}/\text{L}$  GAC 的培养液中, 经过 4~5 d 的生长, 实验组细胞全部死亡 (图 3D1), 而未转染 pGT-V1 的对照组细胞仍然存活 (图 3D2)。此结果证明 *HSV-tk* 整合到细胞染色体基因组上, 并能正常表达导致细胞死亡。

### 2.2.3 Cre-LoxP 功能的检测

为验证 pGT-V1 载体上的 Cre-LoxP 基因元件是否有功能, 我们将带有 Cre 酶的质粒 pBS185 (10  $\mu\text{g}$ ) 通过电穿孔法导入 *EGFP* 阳性的细胞中。转染 24 h 后, 荧光镜下观察绿色荧光细胞比例的变化。对比未转染 Cre 酶的 *EGFP* 阳性细胞组 (图 4A), 转染了 Cre 酶的细胞组中有一定比例的细胞丢失了绿色荧光 (图 4B), 表明这些中靶细胞内位于 LoxP 区间的药物筛选标记和 *EGFP* 基因已被 Cre 酶清除。为定量分析 Cre 酶去除 LoxP 片段的效率, 我们采用流式细胞仪对 Cre 酶处理的细胞进行了定量检测。以未转染的 C2C12 细胞作为阴性对照 (图 4C1), 稳定转

染的 *EGFP* 阳性细胞经流式仪定量检测后发现, 有 83.4% 的细胞为 *EGFP* 阳性, 16.6% 的细胞为 *EGFP* 阴性 (图 4C2)。而经过 Cre 酶处理后的 *EGFP* 阳性细胞组, 有 61.2% 的细胞为 *EGFP* 阳性, 38.8% 的细胞为 *EGFP* 阴性。与未经 Cre 酶处理的组比较, 丢失绿色荧光的细胞数增加了 22.2% (图 4C3)。由于电转染效率达不到 100%, 从而影响了 Cre 酶去除 LoxP 片段的效率。因此, 我们对第 1 次转染的细胞又进行了 1 次电转染, 经第 2 次 Cre 酶处理后, 丢失绿色荧光的细胞比率提高到 59.9% (图 4C4)。以上结果表明, 经过 Cre 酶处理后, 约 1/2 的 *EGFP* 阳性细胞去掉了 LoxP 片段。在基因组水平上通过半定量 PCR 实验证明, 与对照组相比, Cre 酶处理的 *EGFP* 阳性细胞组内, *EGFP* 基因的含量明显减少 (图 4D)。以上结果表明, 通过对 *EGFP* 的监控, 证明了 Cre 酶能有效地将 LoxP 位点间的打靶筛选标记基因从靶细胞的基因组中去除。

## 3 讨论

对染色体 DNA 进行修饰有多种手段, 如病毒载体转染<sup>[10]</sup>、转座子方法<sup>[11]</sup>、锌指核酸酶方法<sup>[12]</sup>等, 但目前普遍采用的主要还是基因打靶方法。基因打靶的策略主要有正负筛选标记法、启动子或 PolyA 捕获法、标记靶基因融合法、锌指核酸酶法等<sup>[13-14]</sup>。上述方法各有其特点, 但也存在一些问题, 例如, 对某基因座进行定点敲除, 必须要在打靶载体上连入相应的同源臂, 而同源臂自身往往带有多个酶切位点, 这就为同源臂克隆入打靶载体带来了极大的困难。许多商品化和自建的打靶载体, 要么缺少多克隆位点, 要么载体上的多克隆位点都是常见的酶切位点, 往往会与同源臂自身所带的酶切位点相同, 这就给长、短臂 DNA 片段的连接重组带来了困难。其次, 一方面许多打靶载体缺少必要的筛选标记, 给打靶后的阳性细胞筛选带来困难。另一方面一些带有正/负筛选标记的打靶载体, 不能有效去除打靶后在中靶细胞内遗留的筛选标记, 因为携带某些筛选标记有可能会影响中靶细胞的正常生理功能, 或影响体细胞胚胎克隆效率。最重要的是, 在大动物细胞的基因打靶研究上, 许多携带 Cre-LoxP 系统的

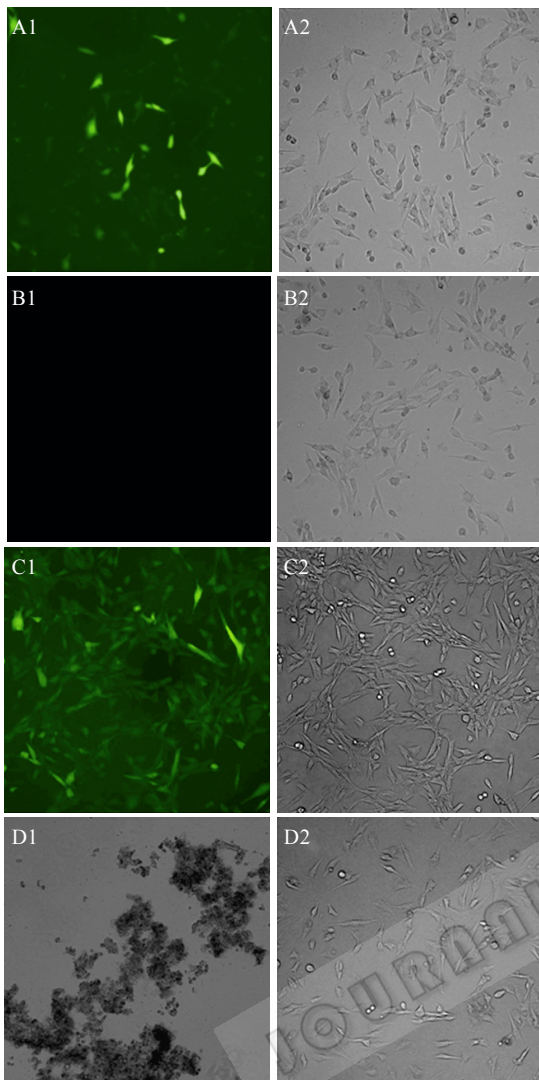
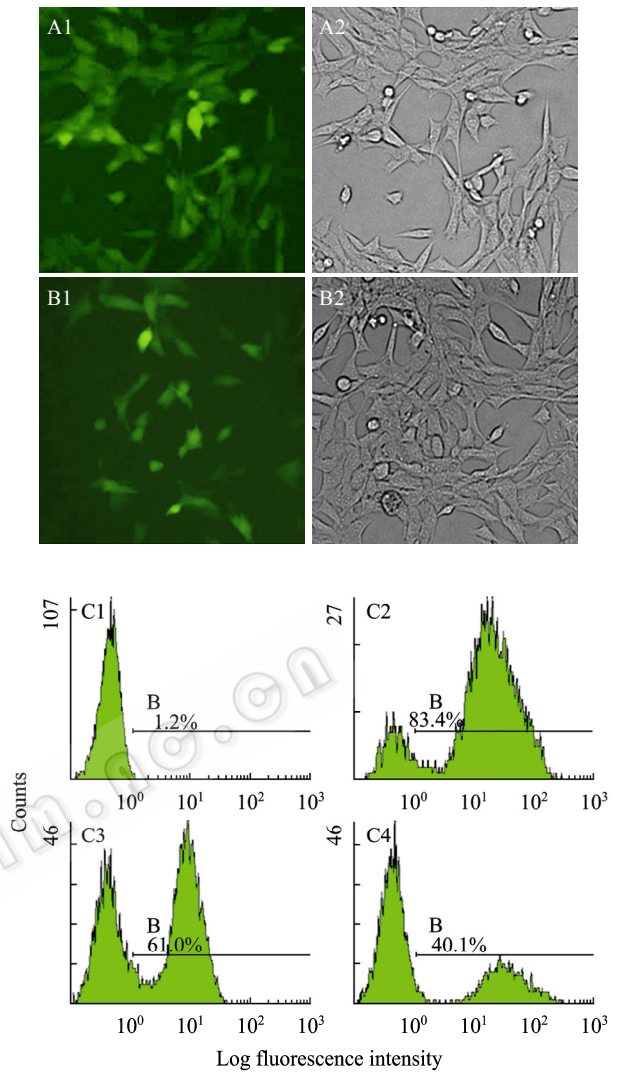


图 3 荧光及正负筛选标记基因的检测

Fig. 3 Fluorescence detection and anti-drugs selection. (A) C2C12 cells transfected with pGT-V1 (24 h). 1: fluorescence; 2: phase contract. (B) C2C12 cells without transfection. (C) The positive clones selected by G418. 1: fluorescence; 2: phase contract. (D) G418 resistant cells selected by GAC (5 days). 1: cells selected by GAC; 2: C2C12 cells without transfection.

打靶载体, 由于缺乏有效的筛选手段, 无法筛选出去除筛选标记的阳性细胞克隆, 从而未能发挥 Cre-LoxP 系统应有的功能, 为转基因研究带来极大不便。鉴于以上问题, 我们在总结前人经验的基础上, 设计构建了一个带有 *neo/HSV-tk* 正负筛选标记和绿色荧光筛选标记的双筛选标记打靶载体。该载体转染受体细胞后, 一方面通过 *neo* 和 *HSV-tk* 的正负筛选可以有效地富集阳性细胞克隆, 另一方面, 通过将绿色荧光标记与 Cre-LoxP 系统相结合, 构成



D

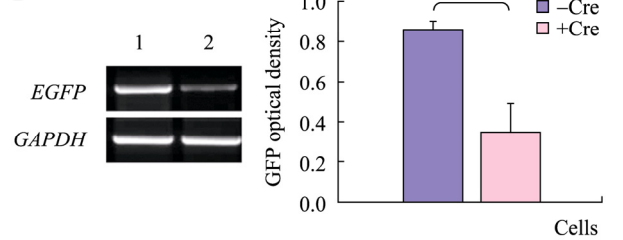


图 4 Cre-LoxP 系统功能验证

Fig. 4 Cre-LoxP function analysis. (A) The pGT-V1 stable-transfected cells. 1: fluorescence; 2: phase contract. (B) The pGT-V1 stable-transfected cells were transfected with plasmid pBS185 that contains Cre gene. 1: fluorescence; 2: phase contract. (C) The flow cytometry analysis of Cre treated cells. 1: C2C12 cells as the negative control; 2: pGT-V1 stable-transfected cells; 3: Cre treatment for once; 4: Cre treatment for twice. (D) Semi-quantitative PCR determination of *EGFP* gene content. 1: pGT-V1 stable-transfected cells without Cre treatment; 2: pGT-V1 stable-transfected cells with Cre treatment.

一个基因打靶筛选标记去除监测系统, 这个系统既可以监测打靶后期 *neo* 等筛选标记的去除情况, 又可以利用绿色荧光标记有效地将去除筛选标记的阳性细胞筛选出来, 完善了基因打靶技术。

在实验过程中我们发现, 在阳性克隆筛选完成后, 通过荧光显微镜观察, 视野内的细胞全部发出绿色荧光 (图 3C), 但是通过流式细胞仪进行定量检测却发现, 只有 83.4% 的细胞为 *EGFP* 阳性 (图 4C2)。这提示我们, 通常通过抗药性筛选得到的阳性克隆很可能是不纯的, 有部分细胞克隆是假阳性的。我们构建的载体 pGT-V1 就很好地克服了这种弊端, 阳性克隆筛选完成后, 可以利用绿色荧光通过流式细胞仪进行初步分选, 避免了假阳性造成的干扰。另外, 在对 Cre-LoxP 系统的功能进行验证的实验中, 我们发现经过 Cre 酶处理后的 *EGFP* 阳性细胞组, 有 61.2% 的细胞为 *EGFP* 阳性, 38.8% 的细胞为 *EGFP* 阴性。与未经 Cre 酶处理的组相比, 丢失绿色荧光的细胞数增加了 22.2% (图 4C3)。这提示我们: 如果没有 *EGFP* 的荧光标记进行实时监测, 很难保证 Cre 酶去除 LoxP 片段的效率, 从而导致最终得到的标记基因去除的阳性细胞少之又少。由于电转染效率达不到 100%, 因此会影响 Cre 酶去除 LoxP 片段的效率。于是, 我们对第 1 次转染的细胞又进行了 1 次电转染, 经第 2 次 Cre 酶处理后, 丢失绿色荧光的细胞比率提高到 59.9% (图 4C4), 证明了我们构建的基因打靶载体能够精确监测 Cre-LoxP 系统的工作效率。但是, 由于质粒稳定转染会出现多拷贝随机整合的情况, 筛选完成后在中靶细胞基因组上能出现多个 LoxP 位点, 通过 Cre 介导的剪切重组会出现多种情况。这与在载体中连入同源臂后进行基因打靶后只会整合单拷贝的载体还是有所不同的。

在该载体中引入了“8 碱基”酶切位点组成的 2 个多克隆位点元件: MCS-1 和 MCS-2。理论上计算“8 碱基”酶切位点在 DNA 序列中出现的机率是“6 碱基”酶切位点的 1/16, 平均在 5~6 kb 长度上才有可能出现一个“8 碱基”酶位点, 因此解决了在打靶片段与载体连接时出现的酶切位点冲突的困扰, 极大地方便了打靶同源臂的连接。目前国内外将打

靶载体导入受体细胞所采用的方法主要是脂质体转染和电穿孔法, 这 2 种方法都存在一个转染效率的问题, 要想提高基因打靶的效率, 首先要提高载体转染的效率。利用载体中引入的绿色荧光标记可以直观地估计每次转染的效率, 不断地摸索转染条件, 提高转染效率, 从而保证了基因打靶的效率。最后, 在基因打靶完成后的筛选过程中, 通过观察绿色荧光我们可以实时监测中靶细胞的筛选情况, 对阳性克隆的筛选进度有了直观的了解, 有效地避免了常规筛选存在的盲目性和不可预知性。另外, 本研究是以小鼠的成肌细胞 C2C12 作为细胞模型对抗药性元件进行验证的, 由于不同物种和类型的细胞对药物的敏感性是不同的, 所以在对大动物进行体细胞的基因打靶研究时, G418 和 GAC 的筛选浓度还需要重新进行测定。

总之, 本研究在总结传统打靶载体的基础上, 设计了双筛选标记, 使基因打靶技术更加完善, 并且具有广泛应用价值, 为动物遗传育种和转基因动物克隆研究提供新的技术手段。

## REFERENCES

- [1] Müller U. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev*, 1999, **82**(1/2): 3–21.
- [2] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**(12): 7634–7638.
- [3] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, **292**(5819): 154–156.
- [4] Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, *et al.* Insertion of DNA sequences into the human chromosomal  $\beta$ -globin locus by homologous recombination. *Nature*, 1985, **317**(6034): 230–234.
- [5] Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, 1988, **336**(6197): 348–352.
- [6] Gu H, Marth JD, Orban PC, *et al.* Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 1994, **265**(5168): 103–106.

- [7] McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS, *et al.* Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, **405**(6790): 1066–1069.
- [8] Sendai Y, Sawada T, Urakawa M, *et al.* alpha1,3-Galactosyltransferase-gene knockout in cattle using a single targeting vector with loxP sequences and cre-expressing adenovirus. *Transplantation*, 2006, **81**(5): 760–766.
- [9] Lai LX, Kolber-Simonds D, Park KW, *et al.* Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, **295**(5557): 1089–1092.
- [10] Chapman SC, Lawson A, Macarthur WC, *et al.* Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector. *Development*, 2005, **132**(5): 935–940.
- [11] Brune W. Random transposon mutagenesis of large DNA molecules in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol*, 2002, **182**: 165–171.
- [12] Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, *et al.* Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**(1): 289–297.
- [13] García-Otín AL, Guillou F. Mammalian genome targeting using site-specific recombinases. *Front Biosci*, 2006, **11**: 1108–1136.
- [14] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, *et al.* Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 2009, **325**(5939): 433.



## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 生物工程上游技术实验手册

“十一五”国家重点图书出版规划项目

应用生物技术大系

田长恩 主编

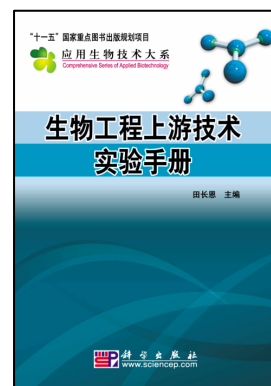
开本: B5 营销分类: 生物科学 装帧: 平装

ISBN 978-7-03-029405-0 ¥ 30.00 2010年11月出版

#### 内容简介

本书将分子生物学实验、基因工程实验以及微生物遗传育种实验等多门实验课程有机地统一成一体, 整合出若干个不同层次的实验, 形成了一个较为完整的实验技术体系, 既能节约教学成本, 又能使学生更加系统地掌握实验的基本技术和理解基本原理, 还能使本实验技术更加接近本学科的前沿。内容包括菌种的理化诱变、工程菌的培养和保藏、基因组 DNA 和 RNA 的分离纯化、质粒 DNA 的制备、基因克隆、表达载体构建、遗传转化和转化子的筛选、表达蛋白的检测等。所开设的实验主要为基础性实验, 学生通过实验熟悉实验的基本原理, 掌握实验的基本技术。在此基础上, 再开设综合性实验, 侧重于培养学生的综合能力和创新能力。

本书可以作为大专院校开设生物工程上游技术实验、分子生物学实验或基因工程实验等课程的教材或参考用书, 也可以作为研究生和初级科研工作者分子生物学实验技术的参考用书。



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: 周文字 (010-64031535)

网上订购: [www.dangdang.com](http://www.dangdang.com) [www.joy.com](http://www.joy.com) [www.amazon.cn](http://www.amazon.cn) [www.beifabook.com](http://www.beifabook.com)

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