

转录激活因子样效应物核酸酶介导的山羊β-乳球蛋白基因敲除和人乳铁蛋白基因定点整合

宋绍征^{1,2}, 朱孟敏¹, 袁玉国^{1,2}, 荣耀¹, 徐晟¹, 陈思¹, 梅琚琰¹, 成勇^{1,2}

1 扬州大学 兽医学院 江苏省转基因动物制药工程研究中心, 江苏 扬州 225009

2 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

宋绍征, 朱孟敏, 袁玉国, 等. 转录激活因子样效应物核酸酶介导的山羊β-乳球蛋白基因敲除和人乳铁蛋白基因定点整合. 生物工程学报, 2016, 32(3): 329-338.

Song SZ, Zhu MM, Yuan YG, et al. *BLG* gene knockout and *hLF* gene knock-in at *BLG* locus in goat by TALENs. Chin J Biotech, 2016, 32(3): 329-338.

摘要: 为了敲除山羊乳中致敏源β-乳球蛋白(*BLG*)基因, 同时在*BLG*基因座定点整合人乳铁蛋白(*hLF*)基因。首先针对山羊*BLG*第3外显子识别位点设计了1对特异性TALEN-3-L/R质粒对; 同时, 构建了含有1个*HSV-TK*负筛选基因的*hLF*基因打靶载体BLC14-TK。TALENs质粒对转染山羊胎儿成纤维细胞, 2 μg/mL嘌呤霉素筛选3 d, PCR扩增产物测序来验证其切割DNA活性。打靶载体BLC14-TK与TALEN-3-L/R质粒对共转染山羊胎儿成纤维细胞, 经700 μg/mL G418和2 μg/mL GCV共筛选药物抗性细胞株; 通过整合检测和同源重组检测来筛选*hLF*基因打靶细胞株; *BLG*⁻/*hLF*⁺打靶细胞株作为供核细胞进行山羊体细胞核移植。结果为: TALEN-3-L/R致突变率为25%-30%; 获得*BLG*⁻/*hLF*⁺打靶细胞6株; 共制作重构胚胎335枚, 移植受体山羊23只, B超检测到30-35 d的妊娠受体9只(妊娠率39.1%), 其中1只50日龄克隆胎儿验证为*BLG*⁻/*hLF*⁺基因型。以上结果表明获得*BLG*基因座定点整合*hLF*基因的基因打靶山羊是可行的, 为培育羊乳中含低致敏原和富含*hLF*的山羊新品系奠定了基础。

关键词: TALENs, 人乳铁蛋白, *BLG*, 基因打靶, 体细胞核移植

Received: June 28, 2015; **Accepted:** October 15, 2015

Supported by: National Major Special Projects on New Cultivation for Transgenic Organisms (No. 2011ZX08008-004), Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, Graduate Research and Innovation Projects in Yangzhou University (No. CXLX-1435).

Corresponding author: Yong Cheng. Tel: +86-514-87979348; E-mail: ssz0610@163.com

国家转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2011ZX08008-004), 江苏高校优势学科建设工程资助项目, 扬州大学研究生科研创新计划项目 (No. CXLX-1435) 资助。

网络出版时间: 2015-11-11

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20151111.1619.003.html>

***BLG* gene knockout and *hLF* gene knock-in at *BLG* locus in goat by TALENs**

Shaozheng Song^{1,2}, Mengmin Zhu¹, Yuguo Yuan^{1,2}, Yao Rong¹, Sheng Xu¹, Si Chen¹, Junyan Mei¹, and Yong Cheng^{1,2}

1 Jiangsu Provincial Research Center for Animal Transgenesis and Biopharming, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

2 Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonosis, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: To knock out β -lactoglobulin (*BLG*) gene and insert human lactoferrin (*hLF*) coding sequence at *BLG* locus of goat, the transcription activator-like effector nucleases (TALEN) mediated recombination was used to edit the *BLG* gene of goat fetal fibroblast, then as donor cells for somatic cell nuclear transfer. We designed a pair of specific plasmid TALEN-3-L/R for goat *BLG* exon III recognition sites, and BLC14-TK vector containing a negative selection gene *HSV-TK*, was used for the knock in of *hLF* gene. TALENs plasmids were transfected into the goat fetal fibroblast cells, and the cells were screened three days by 2 $\mu\text{g/mL}$ puromycin. DNA cleavage activities of cells were verified by PCR amplification and DNA production sequencing. Then, targeting vector BLC14-TK and plasmids TALEN-3-L/R were co-transfected into goat fetal fibroblasts, both 700 $\mu\text{g/mL}$ G418 and 2 $\mu\text{g/mL}$ GCV were simultaneously used to screen G418-resistant cells. Detections of integration and recombination were implemented to obtain cells with *hLF* gene site-specific integration. We chose targeting cells as donor cells for somatic cell nuclear transfer. The mutagenicity of TALEN-3-L/R was between 25% and 30%. A total of 335 reconstructed embryos with 6 BLG^-/hLF^+ targeting cell lines were transferred into 16 recipient goats. There were 9 pregnancies confirmed by ultrasound on day 30 to 35 (pregnancy rate of 39.1%), and one of 50-day-old fetus with BLG^-/hLF^+ was achieved. These results provide the basis for *hLF* gene knock-in at *BLG* locus of goat and cultivating transgenic goat of low allergens and rich hLF in the milk.

Keywords: TALENs, human lactoferrin, *BLG*, gene targeting, somatic cell nuclear transfer

随着人类生活品质的提高,对乳品质的要求也越来越高^[1]。由于山羊乳更接近于人乳,成为牛乳过敏症患者最理想的替代乳品^[2]。 β -乳球蛋白(BLG)是山羊乳的主要过敏源之一,山羊乳可通过转基因技术进行人乳化改造,降低乳汁中过敏源和增加人乳铁蛋白(Human lactoferrin, hLF)成分,可以提高羊奶的品质和质量,使其更具消费价值^[3]。人乳铁蛋白是一种最初在人乳汁中发现的铁结合蛋白,分子量大小为 80 kDa^[4],具有广泛的抗菌活性。现在已有很多转基因动物乳腺生物反应器来生产人乳

铁蛋白的报道^[5-6],在牛^[7]和山羊^[8]中,已经成功培育出转 *hLF* 基因的克隆动物,但到目前为止还没有定点敲入 *hLF* 基因山羊的报道。

TALE (Transcription activator-like effector) 是一类转录激活因子样效应蛋白^[9],利用 TALENs 可使 DNA 双链发生断裂,引发生物体的内源性修复机制,介导同源重组或非同源末端连接,能够特异性地提高定点修饰的效率。通过 TALENs 介导的基因打靶技术,对致敏原乳蛋白基因进行敲出,同时可定点引入人源的功能蛋白,利用内源的乳腺特异性表达调控序

列,在乳腺中特异性的表达人源蛋白,实现乳汁的人乳化,改善乳汁品质和营养价值。2004年孙丽新等将人乳铁蛋白 (*hLF*) 基因在山羊 β -酪蛋白基因位点定点插入,希望在家畜乳汁中特异性地高效表达人乳铁蛋白,但最终未获得基因打靶的山羊^[10]。2007年Shen等报道了在山羊胎儿成纤维细胞中敲除山羊 β -酪蛋白基因,希望能获得降低乳过敏原性的山羊新品系^[11],但未能获得基因打靶的山羊。

本研究应用TALENs基因打靶技术,在山羊中敲除致敏原 *BLG* 基因,同时在 *BLG* 基因座定点敲入 *hLF* 基因,并通过体细胞核移植技术获得基因打靶的克隆山羊胎儿。以此验证TALENs介导下 *BLG* 基因座基因编辑;*hLF* cDNA精确整合山羊 *BLG* 基因座染色体,为精准转基因分子育种建立基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌种

TALENs质粒及试剂盒购自上海斯丹赛生物技术有限公司(CMV-SP6-TALENs Vector Set, Cat No.: 1803-015)。BLC14质粒菌种(包含山羊 *BLG* 5'调控序列、CMV增强子、*hLF* cDNA、PolyA信号、*NEO* 基因、山羊 *BLG* 3'调控序列)^[12],宿主菌为埃希氏大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α ,含有单个负筛选 *HSV-TK* 基因的质粒 *Porf-hsv1tk* (Invitrogen, 4.4 kb),均由本实验室保存。

1.1.2 引物

PCR引物设计借助于Primer Premier 5.0软件完成,引物由上海英骏生物技术有限公司和上海生工生物工程技术有限公司合成(表1)。

表1 检测所用引物

Table 1 Primers for detection

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
TALEN-3-a	TCTGGCTTCATTTGACTTC TC	729
TALEN-3-b	TTTCTCATCTCGGATTTAG GAC	
CMV+LTF1	ATGGGCGTGGATAGCGGTT TGAC	470
CMV+LTF2	CCACCATCAAGGGTCACA GCATCG	
TK1	GCAAGAAGCCACGGAAGT	780
TK2	GCCCGAAACAGGGTAAAT	
NEO-3'-a	CCGAGAAAGTATCCATC	2 391
NEO-3'-b	GGTGTTCCCAGGTCA	

1.1.3 主要试剂

DMEM/F12 (Hyclone, Cat No. D2906), FBS (Hyclone, Cat No. SH30070.03), Trypsin (Amresco, Cat No. 0458), 嘌呤霉素、M2、M16、透明质酸酶、核荧光染料 Hoechst 33342、细胞松弛素 B、6-甲基氨基蝶呤等均购自美国 Sigma 公司;各种限制性内切酶、DNA 连接酶和 DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司;TALEN 快速构建试剂盒购自上海斯丹赛生物技术有限公司。其他未说明试剂均为国产分析纯,分别购自上海药剂、上海生工生物工程有限公司、南京生兴生物有限公司。

1.1.4 实验动物

萨能奶山羊购自杭州彩洋牧业有限公司,实验用白羊来自扬大联环药业基因工程有限公司实验羊场。

1.2 方法

1.2.1 BLC14-TK 打靶载体构建

含有单个负筛选 *HSV-TK* 基因的质粒

Porf-hsv1tk 经 *Xho* I 酶切线性化, 纯化后用 Klenow 酶补平末端。质粒 BLC14 经 *Sal* I + *Not* I 酶切并回收 10 600 bp 的片段, 用 Klenow 酶补平末端; 末端补平的 Porf-hsv1tk 片段与补平的 BLC14 片段连接获得打靶载体 BLC14-TK。

1.2.2 TALENs 核酸蛋白表达载体的构建

对于奶山羊基因组中 *BLG* 基因座的序列进行 TALENs 的设计, 奶山羊 *BLG* 基因序列 (NCBI ,emb|Z33881.1| ,8 088 bp) 来自 Nucleotide 数据库。根据 TALENs 核酸酶 TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 在线软件, 其网址为 “https://tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/talen”。

TALEN 的识别位点位于山羊 *BLG* 第 3 外显子 转录起始位点下游, 其中 L 臂 :3 959–3 974; R 臂 :3 992–4 008; spacer 长度为 17 bp, 见表 2。

1.2.3 山羊胎儿成纤维细胞的分离、培养

无菌手术取约 35 日龄山羊胎儿, D-Hank's 洗涤 2 次, 去除头、四肢、内脏后, 将剩余部分组织剪碎成约 1 mm³ 大小, D-Hank's 洗涤 3 次; 加入 5 mL 消化液 (0.05% 胰酶+0.04% EDTA), 移液管反复吹打消化 15 min; 待溶液浑浊后, 静置 1 min, 取上层浑浊液于另一洁净离心管, D-Hank's 液离心洗涤 2 次, 细胞计数并用培养液 (含 DMEM/F12+10% FBS) 调整密度至 5×10⁵ 个/mL 接种于六孔板中, 置 CO₂ 培养箱中, 37 °C、5% CO₂、饱和湿度下静置培养。剩余未消化组织重复上述步骤再次消化, 直至组织块基本消失。

表 2 TALENs 识别位点

Table 2 Recognition sequence of TALENs

Name	Recognition sequence (5'–3')
TALEN-3-L	TGTGCTCAGAAGAAGAT
TALEN-3-R	TGAACACCGCAGGGATCT

1.2.4 TALENs 特异性位点致突变活性检验

收集对数生长期山羊胎儿成纤维细胞, 用电转染液洗涤离心后重悬细胞密度至 1×10⁶ 个/mL。TALEN-3-L/R 质粒经 QIAGEN 试剂盒纯化后溶于超纯水中, 细胞悬液中等比例加入 TALEN-3-L/R 质粒, 使其总浓度至 10 μg/mL, 在 2 mm 间隙电极杯中, 以 1.5 kV/cm、200 μs 的条件电击 2 次, 静置 5 min, 转移到正常的培养液 (DMEM/F12+10% FBS) 中, 接种到 6 孔细胞培养板上, 置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度下的 CO₂ 培养箱内培养。24 h 后加入 2 μg/mL 嘌呤霉素筛选, 隔天换液 1 次, 同时设置正常未转染的细胞作对照; 3–4 d 后待对照细胞全部死亡后, 换正常培养液继续培养 10–15 d 后, 观察存活细胞。

待细胞汇合至 80% 左右时, 收集存活细胞, 提取 DNA, 进行 PCR 检测, 引物分别为 TALEN-3-a/b, 序列详见 1.1.2 的表 1, PCR 扩增产物经上海华大基因科技有限公司进行测序。

1.2.5 hLF 基因打靶细胞系的建立

打靶载体 BLC14-TK 经 *Not* I 酶切而线性化, 使用 QIAGEN 胶回收试剂盒回收长度为 15 kb 的 DNA 片段, 溶解于无菌超纯水中, 与 TALEN-3-L/R 共转染山羊胎儿成纤维细胞, 基因浓度均为 10 μg/mL, 转染方法同 1.2.4, 同时设置正常未转染的细胞作对照。

转染 36 h 后, 在培养液中添加 G418 (700 μg/mL) 和 GCV (2 μg/mL) 继续筛选培养; 筛选培养 10–14 d 后, 即正常细胞对照组全部死亡时, 挑取单克隆细胞株以正常培养液 (DMEM/F12+10% FBS) 扩大培养, 收集细胞, 其中 1/2 冻存 (DMEM/F12 + 10% DMSO + 20% FBS) 以作体细胞核移植供核细胞, 另 1/2 提取 DNA 以作 PCR 检测。

以单克隆细胞株 DNA 为模板, 应用 CMV+LTF1/2 引物进行人乳铁蛋白整合检测, 应用 TK1/2 引物进行 TK 基因检测, NEO-3'-a/b 引物进行靶位点同源重组检测, 引物序列见 1.1.2 的表 1。

1.2.6 体细胞核移植试验羊的准备

正常成年雌性白山羊为供质羊, 于发情后第 9-13 天开始注射 FSH, 连续 3 d, 每天 2 次, 总剂量 240-300 IU。第 4 天注射氯前列烯醇 1 mL (0.1 mg), 第 5 天注射 LHRH 50 μ g。寄母羊同步发情。

1.2.7 核移植、融合与激活

冷冻细胞于 37 $^{\circ}$ C 复苏后, 贴壁细胞生长至 80% 更换为 0.5% FBS 培养液中饥饿培养 48 h, 细胞悬浮于 M2 培养液备用。卵母细胞置于 5 μ g/mL Hoechst33342 和 7.5 μ g/mL CB 的 M2 中处理 30 min, 在荧光显微镜下去除细胞核与第一极体, 并移入供核细胞。

重构卵在 M16 培养液中培养 30 min 后进行融合 (融合液: 0.3 mmol/L 甘露醇+0.05 mmol/L 氯化钙+0.1 mmol/L 硫酸镁+3% BSA), 条件为 1.2 kV/cm、40 μ s、2 个脉冲。融合后在 M16 中培养 30 min 后观察, 未融合卵按上述条件重复 1 次。

融合卵在 M16 中培养 5 h 后开始激活 (M16 培养液+5 μ mol/L 离子霉素+7.5 μ g/mL CB), 精确控制 5 min; 然后在含 2 mmol/L 6-DMAP 和 7.5 μ g/mL CB 的 M16 中培养 5 h, 最后移至 M16 培养液中直到胚胎移植^[13-15]。

1.2.8 胚胎移植与妊娠检查

激活后的重构卵在 M16 培养中培养 (5% CO₂, 38 $^{\circ}$ C), 挑取排出“第二极体”的胚胎 (单细胞), 通过手术法移入同步发情寄母山羊的输卵管, 每只受体移植 5-20 枚胚胎, 在胚胎移植后 30-35 d 进行 B 超检查, 妊娠羊单饲养, 常规管理。

1.2.9 克隆胎儿鉴定

无菌手术剖宫产取出 50 日龄克隆胎儿, 并获得细胞系, 应用跨 NEO 基因和山羊 BLG-3' 调控区外侧的 NEO-3'-a/b 引物 PCR 扩增, PCR 产物测序, DNASTar 软件分析测序比对结果, 进行基因打靶鉴定。

2 结果与分析

2.1 打靶载体 BLC14-TK 的构建

将 HSV-TK 基因片段与线性化的 BLC14 片段连接, 构建了 BLC14-TK 打靶载体, 其结构见图 1。

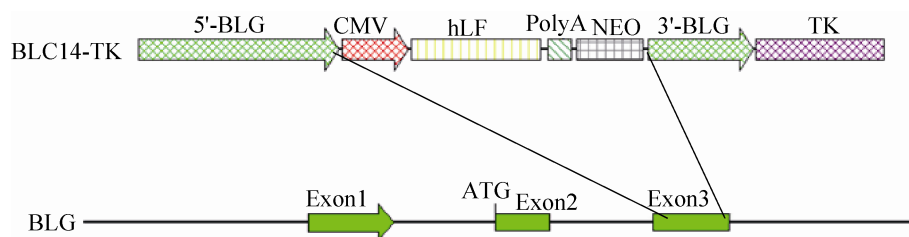


图 1 BLC14-TK 打靶载体结构示意图

Fig. 1 The structure diagram of BLC14-TK targeting vector. BLG: goat β -lactoglobulin promoter; CMV: human cytomegalovirus immediate early promoter; hLF: human lactoferrin cDNA; PolyA: SV40early mRNA polyadenylation; Neo: neomycin resistance gene; TK: herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) gene.

2.2 胎儿成纤维细胞的培养

利用胰蛋白酶消化得到的原代胎儿成纤维细胞通常较小, 胎儿成纤维细胞是一种贴壁细胞, 通常呈梭形长条状。细胞群呈涡旋状或者不规则排列, 细胞密度过大时成纤维细胞会呈细长条状, 细胞群会呈现肉眼可见的白色群落。典型的胎儿成纤维细胞如图 2 所示。

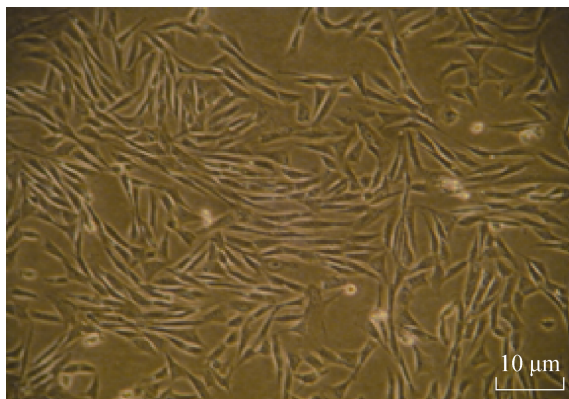


图 2 原代胎儿成纤维细胞 (100×)

Fig. 2 P₀ generation of fetal fibroblast cells (100×).

2.3 TALENs 活性细胞 PCR 检测和测序结果

TALENs-3-L/R 质粒转染胎儿成纤维细胞后获得了嘌呤抗性细胞, 以提取细胞 DNA 为模板 PCR 扩增, 产物经测序进一步验证了突变细

胞系, 见图 3。从图上箭头所示处开始出现重叠套峰, 此处位于山羊 *BLG* 基因第 3 外显子 (TALENs-3-L/R 识别位点)。根据重叠套峰的情况, 可初步确定 TALEN-3-L/R 质粒对在胎儿成纤维细胞中切割基因组 DNA 双链的致突变活性为 25%–30% 之间。

2.4 人乳铁蛋白基因打靶细胞系的验证

打靶载体 BLC14-TK 与 TALEN-3-L/R 质粒对共转染山羊胎儿成纤维细胞 2×10^7 个, 经 G418 和 GCV 筛选获得 34 株药物抗性细胞。

hLF 基因整合检测, 获得 32 株转人乳蛋白基因细胞, PCR 产物大小均为 470 bp (图 4)。

通过对 *HSV-TK* 基因检测从反面验证同源臂重组的可能性, 经 PCR 引物 TK1/2 对基因打靶细胞株 DNA 进行 PCR 扩增, 产物大小为 780 bp (图 5), 有 6 株未检测到 *TK* 基因。初步证明这 6 株细胞为同源重组细胞株, 分别命名为 T-1、T-2、T-3、T-4、T-5、T-6。

经跨 *NEO* 基因和山羊 *BLG*-3' 外侧的 PCR 引物 NEO-3'-a/b 对上述 6 株细胞进一步进行同源重组检测, 扩增产物大小为 2 391 bp, 证明该 6 株细胞均为打靶细胞株 (图 6)。

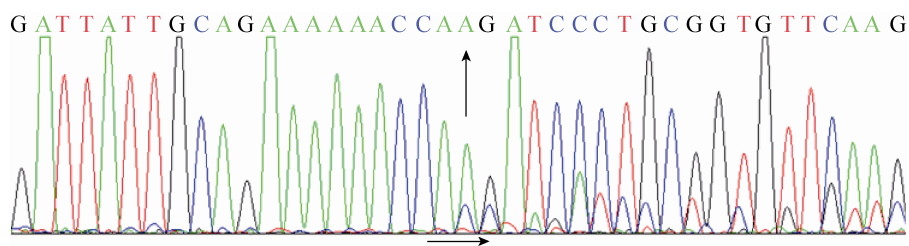


图 3 TALEN-3-L/R PCR 活性产物测序峰图

Fig. 3 The sequencing peak diagram of TALEN-3-L/R PCR products.

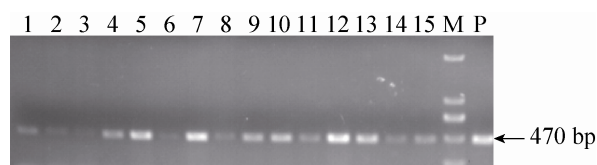


图4 部分 *hLF* 整合检测 PCR 图

Fig. 4 *hLF* transgenic integration analysis of PCR. M: DL-2000 DNA marker; P: BLC14-TK; vector1-15: transfected cell samples.

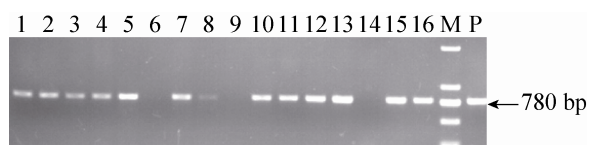


图5 部分转 *hLF* 基因细胞株的 *TK* 基因检测 PCR 图

Fig. 5 PCR detection of the *TK* gene. M: DL-2000 DNA marker; P: BLC14-TK; vector1-16: transfected cell samples.

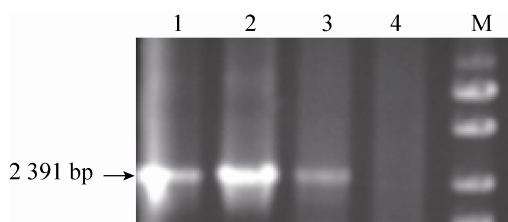


图6 部分 PCR 检测转 *hLF* 基因细胞株同源臂重组
Fig. 6 Homologous recombination detection of *hLF* transgenic cells by PCR. M: λ -*Eco*T14 I digest DNA marker; 1-4: transfected cell samples.

2.5 克隆胚的发育情况

如表 3 所示, 共获得 430 枚去核卵, 融合后获得 352 枚重构卵, 融合率为 81.9%; 激活后的 335 枚重构胚胎短暂培养后移入 23 只同步发情受体山羊输卵管中, 在移植后的 30-35 d 进行 B 超诊断, 9 只怀孕, 妊娠率为 39.1%。手术剖宫产获取 1 只 50 日龄胎儿 (T-4) 胎儿和 B 超检查见图 7 和 8, 测序比对结果如图 9 所示,

表 3 细胞核移植生产克隆胎儿统计

Table 3 Details of production of cloned fetuses by nuclear transfer

Donor cells	Embryo transfer	Receptors	30-35 d pregnancy (%)
T-1	63	4	1 (25.0)
T-2	28	2	2 (100.0)
T-3	84	5	0 (0)
T-4	36	3	2 (66.7)
T-5	29	2	1 (50.0)
T-6	95	7	3 (42.9)
Total	335	23	9 (39.1)

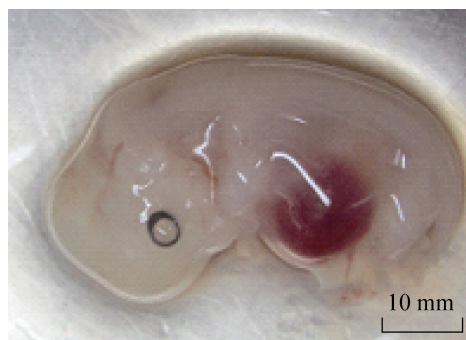


图7 *BLG*⁻/*hLF*⁺基因型克隆胎儿照片

Fig. 7 The photo of cloned fetus with *BLG*⁻/*hLF*⁺.

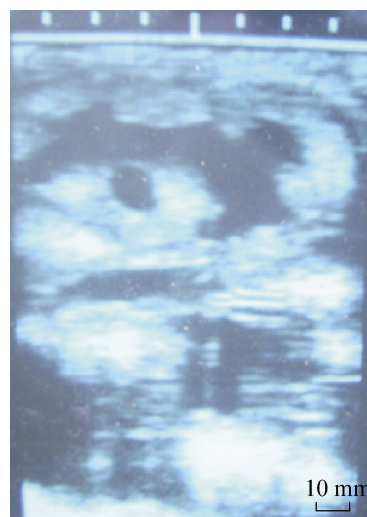


图8 B 超检查妊娠图

Fig. 8 The pregnancy by B-ultrasound.

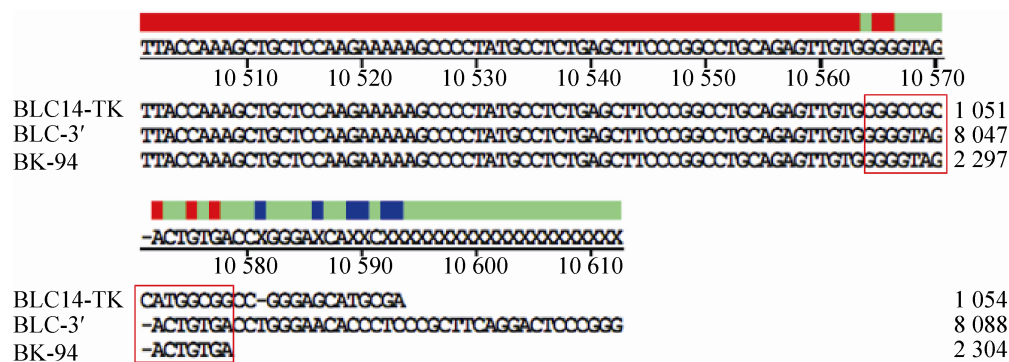


图9 BK-94 打靶胎儿同源臂测序对比结果图

Fig. 9 Sequence homology result of BK-94 targeting fetus.

BK-94#胎儿与 *BLG*-3'下游具有同源序列 (方框所示), 充分证明该胎儿为 *BLG* 基因座打靶胎儿, 并建立细胞系。

3 讨论

本研究应用定向 *BLG* 基因座的基因置换和TALEN介导的基因打靶技术, 获得了 *BLG*⁻/*hLF*⁺靶向性修饰细胞系及胎儿, 在国内外尚未见报道^[5-6]。动物基因打靶技术可以对家畜遗传基因进行精确修饰, 使家畜转基因育种的随机性转变为可控性, 有利于单一性状的改良, 降低了外源基因漂移和丢失的可能性, 也降低了动物转基因育种的难度。在乳汁中添加人乳铁蛋白等功能成分, 减少或去除致敏原, 是乳产品人乳化改造重要途径^[3,16]。

早期有关基因打靶研究报道是应用长片段同源臂作为打靶载体获得的, 不仅其效率低, 而且检测和筛选繁琐, 并且导致后期基因打靶动物克隆的困难。2004年, 孙丽新等^[10]将 *hLF* 基因在山羊 β -酪蛋白基因位点定点插入的研究, Shen等^[11]将人纤溶酶原激活物 (*htPam*) 基因在山羊 β -酪蛋白基因定点插入的研究,

Marques等^[17]在 $\alpha 1(I)$ 原骨胶原 (*COL1A1*) 基因的3'非翻译区引入人 *alpHa-1-antitrypsin* (*hAAT*) 基因的研究, 张学明等^[18]在 β 酪蛋白基因位点敲入 *gdnf* 基因的研究, 但是均没有获得基因打靶动物个体。本研究中主要使用TALENs能够明显地提高打靶效率, 主要是对山羊 β -乳球蛋白 (*BLG*) 基因进行敲除, 同时定点整合 *hLF* 基因, 成功地获得了6株 *BLG*⁻/*hLF*⁺基因打靶细胞株, 结果显示其基因打靶效率得到明显提高。

TALEN是近年来发展起来基因编辑技术, 前几年在微生物、植物和小鼠胚胎干细胞中有较多应用报道^[19-21], 在大家畜及动物体细胞中应用尚未见报道, 本研究证实了TALEN能够介导对靶向基因敲入和敲出。从34株药物抗性细胞株中有6株为打靶细胞株 (效率高达17.6%), 远远高于经典基因打靶的效率^[22-23]。此外, 本实验室保存的BLC14乳腺特异性表达载体含有 *hLF* 基因、CMV增强子及山羊 *BLG* 调控区, 其稳定表达能力在小鼠、山羊乳腺上皮细胞以及成体转基因山羊乳腺中已经得到了验证^[12,15,24-25]。

本研究在山羊 *BLG* 基因座的第 3 外显子上设计了 TALENs 的识别位点, 左右臂长度分别为 16 bp、17 bp, spacer 长度为 17 bp, TALENs 作用时 Fok I 酶会形成一个异源二聚体的结构。研究表明, 这种 TALENs 在 *BLG* 基因座上的定点切割效应同时会催化打靶载体 (BLC14-TK) 在宿主动物染色体 *BLG* 基因座上的同源重组事件, TALENs 的这一作用在国内外也鲜有报道。

本试验还表明, TALEN 左臂的载体存在嘌呤霉素抗性基因有利于中靶细胞的早期筛选, 因为嘌呤霉素筛选可以杀死几乎所有的正常细胞 (非转基因的细胞), 在此基础上进行 *NEO*⁺ 和 *GCV* 筛选, 减少或消除了假阳性细胞的残留, 这样极大地提高了细胞筛选的效率, 更有利于细胞的聚集。这一结果虽然目前仅在 *BLG* 基因座和胎儿成纤维细胞上获得成功, 但从试验原理来看, 在其他基因座及细胞系基因打靶研究中应该也具有借鉴作用。

总之, 本研究共获得 6 株 *hLF* 基因打靶细胞作为供核细胞, 制备重构胚移植 23 只受体, 30–35 d B 超检测到妊娠受体 9 只, 获得 1 只 50 日龄打靶胎儿, 并建立细胞系。这些结果表明 TALENs 介导和编辑的基因打靶胎儿成纤维细胞在去核山羊卵母细胞中具有恢复发育全能性和发育成个体的能力, 同时山羊 *BLG* 基因的部分敲除和 *hLF* 基因敲入未影响胚胎早期的发育。但 9 只受体均未出生羔羊的结果似乎提示中靶细胞对胎儿中后期的发育有一定干扰或影响, 但体细胞克隆出现中后期胎儿停止发育也是比较公认的因素^[13,23], 因此, 相关后续研究有必要继续进行。

REFERENCES

- [1] Sackesen C, Assa'ad A, Baena-Cagnani C, et al. Cow's milk allergy as a global challenge. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2011, 11(3): 243–248.
- [2] Park YW. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Rumin Res*, 1994, 14(2): 151–159.
- [3] Sabikhi L. Designer milk. *Adv Food Nutr Res*, 2007, 53: 161–198.
- [4] Nuijens JH, Van Berkel PHC, Schanbacher FL. Structure and biological actions of lactoferrin. *J Mamm Gland Biol Neopl*, 1996, 1(3): 285–295.
- [5] Li Y, Li HJ, Han LQ, et al. Optimization of purifying method for lactoferrin. *Chem Bioeng*, 2007, 24(11): 38–40 (in Chinese).
李岩, 李宏基, 韩立强, 等. 乳铁蛋白纯化方法的优化. *化学与生物工程*, 2007, 24(11): 38–40.
- [6] Yang F, Chen YZ, Zhang JX. Lactoferrin Production in mammary gland bioreactor. *Acad J Guangdong Coll Pharm*, 2001, 17(2): 123–124 (in Chinese).
杨帆, 陈燕忠, 张纪兴. 利用乳腺生物反应器生产人乳铁蛋白. *广东药学院学报*, 2001, 17(2): 123–124.
- [7] Yu T, Guo CD, Wang JW, et al. Comprehensive characterization of the site-specific N-glycosylation of wild-type and recombinant human lactoferrin expressed in the milk of transgenic cloned cattle. *Glycobiology*, 2011, 21(2): 206–224.
- [8] Han ZS, Li QW, Zhang ZY, et al. High-level expression of human lactoferrin in the milk of goats by using replication-defective adenoviral vectors. *Protein Expr Purif*, 2007, 53(1): 225–231.
- [9] Bonas U, Stall RE, Staskawicz B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet*, 1989, 218(1): 127–136.
- [10] Sun LX. The production of gene-targeting at gef β -casein gene locus with human lactoferrin gene and analysis of gene integrate site[D]. Shanghai: East China Normal University, 2004 (in Chinese).
孙丽新. *hLF* 基因打靶山羊胎儿成纤维细胞株的建立及其整合位点的分析[D]. 上海: 华东师范大学, 2004.
- [11] Shen W, Lan GC, Yang XY, et al. Targeting the

- exogenous *htPAm* gene on goat somatic cell *beta-casein* locus for transgenic goat production. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(4): 428–434.
- [12] Cheng Y, An LY, Yuan YG, et al. Hybrid expression cassettes consisting of a milk protein promoter and a cytomegalovirus enhancer significantly increase mammary-specific expression of human lactoferrin in transgenic mice. *Mol Reprod Dev*, 2012, 79(8): 573–585.
- [13] Cheng Y, Wang YG, Luo JP, et al. Cloned goats produced from the somatic cells of an adult transgenic goat. *Chin J Biotech*, 2002, 18(1): 79–83 (in Chinese).
成勇, 王玉阁, 罗金平, 等. 由成年转基因山羊体细胞而来的克隆山羊. *生物工程学报*, 2002, 18(1): 79–83.
- [14] An LY, Yuan YG, Yu BL, et al. Cloning goat producing human lactoferrin with genetically modified donor cells selected by single or dual markers. *Chin J Biotech*, 2012, 28(12): 1482–1491 (in Chinese).
安礼友, 袁玉国, 于宝利, 等. 单、双标记基因筛选的转入乳铁蛋白基因供核细胞生产克隆山羊效率的比较. *生物工程学报*, 2012, 28(12): 1482–1491.
- [15] An LY, Yuan YG, Yu BL, et al. Generation of human lactoferrin transgenic cloned goats using donor cells with dual markers and a modified selection procedure. *Theriogenology*, 2012, 78(6): 1303–1311.
- [16] Nowak-Wegrzyn A. New perspectives for use of native and engineered recombinant food proteins in treatment of food allergy. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2007, 27(1): 105–127.
- [17] Marques MM, Thomson AJ, McCreath KJ, et al. Conventional gene targeting protocols lead to loss of targeted cells when applied to a silent gene locus in primary fibroblasts. *J Biotechnol*, 2006, 125(2): 185–193.
- [18] Zhang XM. Human *gdnf* gene knock-in at *beta-casein* locus in bovine fetal fibroblast cells and production of gene-targeted blastocysts by SCNT[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2009 (in Chinese).
张学明. 人 *gdnf* 在牛胎儿成纤维细胞 *beta-casein* 基因座的定位整合及基因打靶克隆囊胚的制作[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2009.
- [19] Li T, Huang S, Jiang WZ, et al. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(1): 359–372.
- [20] Miller JC, Tan S, Wang J, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143–148.
- [21] Mahfouz MM, Li LX, Fang XY, et al. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(6): 2623–2628.
- [22] Zhang Y, Zhang F, Li XH, et al. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiol*, 2013, 161(1): 20–27.
- [23] An LY. Human α -LA gene knock-in at BLG locus in goat fibroblast cells and production of gene targeted goats by SCNT[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2012 (in Chinese).
安礼友. 人 α -LA 在山羊胎儿成纤维细胞 BLG 基因座的定点整合及基因打靶克隆山羊的制备[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- [24] Yuan YG, An LY, Yu BL, et al. Construction of mammary gland specific vector for expression of human lactoferrin. *Acad J Yangzhou Univ: Agric Life Sci Ed*, 2011, 32(3): 6–10 (in Chinese).
袁玉国, 安礼友, 于宝利, 等. 人乳铁蛋白乳腺特异性表达载体的构建及其功能的验证. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2011, 32(3): 6–10.
- [25] Cheng Y. Mammary gland-specific expression of hLF cDNA driven by lactoprotein and cytomegalovirus (CMV) chimeric promoters[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007 (in Chinese).
成勇. 乳蛋白与 CMV 复合启动子驱动 hLF cDNA 乳腺特异性表达[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.

(本文责编 陈宏宇)