

网络出版时间:2012-07-18 10:44

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120718.1044.018.html>

猪 *MSTN* 基因双筛选标记打靶载体的构建及其功能鉴定

王向鹏¹, 肖一红², 刘园园¹, 杜永坤¹, 马玉萍¹, 周恩民¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院 兽医免疫学研究所, 陕西 杨凌 712100; 2 山东农业大学 动物医学院, 山东 泰安 271018)

[摘要] **【目的】**利用正负筛选策略,构建猪肌肉生长抑素(Myostatin, *MSTN*)基因的双筛选标记打靶载体。**【方法】**以猪胎儿成纤维细胞 DNA 为模板,PCR 扩增 *MSTN* 基因同源长、短臂;采用 PCR 和 Overlap PCR 扩增打靶载体正筛选标记嘌呤霉素和绿色荧光蛋白基因及负筛选标记单纯疱疹病毒胸苷激酶基因。以 pUC57 载体为骨架载体,在其多克隆位点连接一段包括 Frt 序列在内的酶切位点的多克隆位点序列,在 2 个 Frt 序列之间连接正筛选标记嘌呤霉素基因和绿色荧光蛋白基因,在 Frt 序列两侧分别连接 5.7 和 1.9 kb 的 *MSTN* 基因同源长、短臂;在同源短臂后连接负筛选标记单纯疱疹病毒胸苷激酶基因,将目的片段与载体定向连接克隆。用脂质体法将打靶载体转染猪肾细胞(PK15 细胞),用嘌呤霉素和丙氧鸟苷进行正负筛选,验证正负筛选标记基因的功能。**【结果】**成功克隆了猪 *MSTN* 基因同源长、短臂及正筛选嘌呤霉素和绿色荧光蛋白基因及负筛选单纯疱疹病毒胸苷激酶基因,构建了猪 *MSTN* 基因双筛选标记打靶载体,打靶载体长 14 kb。在打靶载体转染的 PK15 细胞中,正负筛选标记基因均有生物学活性。**【结论】**成功构建了猪 *MSTN* 基因双筛选标记打靶载体。

[关键词] 同源重组;基因打靶;猪肌肉生长抑素基因;双筛选标记

[中图分类号] S813.3;Q782

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)08-0047-07

Construction and functional analysis of a pig myostatin gene targeting vector containing double-selection markers

WANG Xiang-peng¹, XIAO Yi-hong², LIU Yuan-yuan¹,
DU Yong-kun¹, MA Yu-ping¹, ZHOU En-min¹

(1 Veterinary Immunology Institute, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China)

Abstract: **【Objective】**A pig myostatin (*MSTN*) gene targeting vector containing double-selection markers was constructed based on the positive-negative selection strategy. **【Method】**The *MSTN* gene homologous long arm and short arm were cloned in the genome of pig fetus fibroblasts cells by PCR method. The positive selection cassette puromycin(Puro) and enhanced green fluorescent protein(EGFP) genes and the negative selection cassette thymidine kinase(TK) gene were cloned by PCR and Overlap PCR. A set of cassettes and plasmids was used for creating the targeting vector. A positive selection marker cassette (PGK-Puro-EGFP) including the eukaryotic promoter to permit consecutive selection for recombination and allow positive selection of puromycin resistant transfectants in mammalian cells was flanked by two Frt

* [收稿日期] 2011-12-08

[基金项目] 国家“863”高技术研究与发展计划项目(2009AA10Z111);国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08009-147B)

[作者简介] 王向鹏(1985—),男,河南洛阳人,在读博士,主要从事猪 iPS 细胞及其基因打靶研究。

E-mail: wangxiangpeng2003@126.com

[通信作者] 周恩民(1957—),男,山东潍坊人,教授,博士,博士生导师,主要从事转基因动物研究。

E-mail: zhoulm@nwsuaf.edu.cn

sequences. EF1 α - herpes simplex virus thymidine kinase (TK) minigene was used as the negative selection marker. The homologous long arm with a length of 5.7 kb amplified from pig embryonic fibroblast cell genomic DNA was placed before the first Frt sequence. The homologous short arm with a length of 1.9 kb was cloned between the positive and negative selection cassettes. The plasmid was transfected into PK15 cells with X-tremeGene HP DNA transfection reagent to evaluate the positive and negative selection markers function. 【Result】 The homologous long arm and short arm together with the Puro and EGFP and TK gene were successfully cloned. The presence of the correct inserts in the targeting vector with the full length of 14 kb was verified by DNA sequencing. Meanwhile, the PK15 cells conferred resistance to puromycin(Puro) and ganciclovir(GAC), which suggested the positive and negative selection markers could expressed in the cells. 【Conclusion】 A pig myostatin(MSTN) gene targeting vector containing double-selection markers was constructed.

Key words: homologous recombination; gene targeting; MSTN gene of pig; double-selection

肌肉生长抑素(Myostatin, MSTN)基因是转化生长因子 β (TGF- β)超家族的一个重要成员,其主要功能是对骨骼肌细胞的发育和分化起负调控作用^[1]。牛、小鼠和犬的 MSTN 基因缺失或突变会引起其骨骼肌质量显著增加^[2-4]。通过人工诱变方法,使 MSTN 基因缺失,可以使机体有活性的 MSTN 蛋白表达量降低,阻断抑制肌肉生长的信号通路或者减弱其信号传导强度,获得肌肉含量增加的动物。因此,培育 MSTN 基因缺失猪,有可能降低猪的脂肪含量,提高其瘦肉率。

基因打靶是在同源重组和胚胎干细胞技术基础上建立起来的一种对基因进行定点敲除的技术,该技术可将外源基因定点整合到靶细胞基因组的一个特定位点上,达到对细胞基因组进行定点修饰的目的,最终改变生物体的遗传性状^[5]。典型的置换型“正负筛选”基因打靶载体一般由同源长臂、正筛选基因、同源短臂和负筛选基因 4 个主要元件组成。其中同源长、短臂分别指一段与靶基因序列一致的 DNA 片段;正筛选基因通常是新霉素磷酸转移酶抗性基因、嘌呤霉素抗性基因或潮霉素 B 抗性基因等,位于同源区内,其在随机整合和同源重组中均可以正常表达;负筛选基因一般选用单纯疱疹病毒胸苷激酶基因,其位于同源重组区之外,在同源重组时,负筛选基因被切除。通常正、负筛选基因置于靶细胞中有活性的启动子下表达,在正筛选基因两侧各添加 1 个相同的 loxP 或 Frt 序列,以便于在打靶成功后将正筛选基因通过 Cre 酶或 Flpe 酶去除。传统的 MSTN 基因打靶载体正筛选基因只有 1 个抗生素筛选标记^[6-9],而抗生素筛选并不能完全杀死阴性细胞,所以仅通过抗生素筛选的细胞存在假阳性的可能。为了克服传统 MSTN 基因打靶载体的

不足,本研究以 pUC57 载体为骨架载体,在正筛选基因后边插入了绿色荧光蛋白(EGFP)基因序列,在打靶时通过靶细胞中绿色荧光的变化监测细胞的筛选情况,构建了一个含双筛选标记的 MSTN 基因打靶载体,并对载体构建方法进行了优化,旨在为有效地开展猪 MSTN 基因打靶提供平台。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 载体 pUC57、pCAGGS-Flpe、pTG4671、pTKL1-CMV-Puro-EGFP、pTRIP-EF1 α -Neo、5'-PTK-3' 及大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞和猪胎儿成纤维细胞、猪肾细胞(PK15 细胞)均由西北农林科技大学兽医免疫学研究所保存。pJET1.2 平末端克隆载体,购自 Fermentas 公司。

1.1.2 工具酶和试剂 各种限制性核酸内切酶及 T4 DNA 连接酶,购自 NEB 公司;In-Fusion HD 克隆试剂盒,购自 Clontech 公司;PrimeSTAR HS DNA Polymerase、DNA Marker 以及 PCR 相关试剂,购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒和凝胶回收试剂盒,购自 Omega 公司;哺乳动物细胞 DNA 提取试剂盒,购自 Fermentas 公司;嘌呤霉素,购自 Novagen 公司;丙氧鸟苷(GAC),购自 Sigma-aldrich 公司;转染试剂 X-tremeGene HP DNA transfection reagent,购自 Roche 公司。

1.1.3 引物的设计与合成 猪 MSTN 基因位于猪第 15 号染色体上,根据 GenBank 发表的猪 MSTN 基因序列(GenBank 号:NC_010457.3),用 Primer Premier 5.0 软件设计扩增猪 MSTN 基因打靶载体同源长、短臂的引物 F1/F2 和 F3/F4。根据载体上的 PGK 启动子序列、Puro-EGFP-PolyA 基因序

列、EF1 α 启动子序列和 *TK-PolyA* 基因序列,用 F5/F6、F7/F8、F9/F10 和 F11/F12。引物由生工生物(上海)有限公司合成。本试验所需引物见表 1。

表 1 本试验中的 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for PCR

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence
F1	TTCTCTGCTCCCAGACCTTAC
F2	TCCAGTCCCATCCAAAAGCTTCA
F3	CGACAGTATATGAACTAAAAGAGAG
F4	CCTCCTCTATTAGATTGAGTCAC
F5	AATTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGG
F6	GTACTCGGTCCCATATGGTTGTGGAAGGCCCGGAGATGAGGAAGA
F7	TCTTCCTCATCTCCGGGCCTTCCACAACCATGGGACCGAGTAC
F8	TTTCCGCCTCAGAAGCCATAGAGCCCAT
F9	ATCCTTTTTCGTGAGGCTCCGATGCCCGTC
F10	TAAACCCGCAGTAGCGTGGGCATGATCCTGTGTCTTGGCGGCAAACC
F11	GGTTTGCCGCCAGAACACAGGATCATGCCACGCTACTGCGGGTTTA
F12	CCTCAGAAGCCATAGAGCCCACCGCAT

1.2 猪 *MSTN* 基因双筛选标记打靶载体的构建

1.2.1 打靶载体同源长、短臂的克隆 猪 *MSTN* 基因打靶载体同源长臂长度为 5 713 bp,包括全部的 exon1、exon2 和部分 exon3,使用引物 F1/F2;同源短臂长度为 1 909 bp,扩增片段位于 exon3 之后,使用引物 F3/F4。

用 Fermentas 公司的哺乳动物细胞 DNA 提取试剂盒提取猪胎儿成纤维细胞基因组 DNA,备用。以猪胎儿成纤维细胞基因组 DNA 为反应模板,PCR 扩增猪 *MSTN* 基因打靶载体同源长臂,反应体系为 50 μ L:模板 DNA 3 μ L, 5 $\times$ PCR buffer 10 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物(F1/F2)各 1 μ L, 5 U/ μ L DNA 聚合酶 0.5 μ L, 用 ddH₂O 补至 50 μ L。同时设立无模板阴性对照。PCR 程序为:98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 6 min, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。猪 *MSTN* 基因打靶载体同源短臂 PCR 反应体系和反应程序同上,使用引物为 F3/F4,同时设立无模板阴性对照。反应结束后,取 PCR 产物用 8 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳,将产物回收后连接到 pJET1.2 载体,交生工生物(上海)有限公司测序,对测序结果进行分析。

1.2.2 打靶载体正筛选标记嘌呤霉素和绿色荧光蛋白基因的克隆 用引物 F5/F6 从 pTG4671 载体扩增 PGK 启动子,用引物 F7/F8 从 pTKL1-CMV-Puro-EGFP 质粒扩增 *Puro-EGFP-PolyA* 基因,其中引物 F6 和 F7 为反向互补序列。扩增 PGK 启动子和 *Puro-EGFP-PolyA* 基因的 PCR 反应体系及反应程序同 1.2.1。将扩增的 PGK 片段和 *Puro-EGFP-PolyA* 片段通过 Overlap PCR 进行融合扩增,使用引物为 F5 和 F8,扩增片段长度为 2 169

bp。Overlap PCR 反应体系为 50 μ L:模板 PGK 片段和 *Puro-EGFP-PolyA* 片段各 2 μ L, 5 $\times$ PCR buffer 10 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物(F5/F8)各 1 μ L, 5 U/ μ L DNA 聚合酶 0.5 μ L, 用 ddH₂O 补至 50 μ L。同时设立无模板阴性对照。PCR 程序为:98 $^{\circ}$ C 10 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将扩增后产物连接到 pJET1.2 载体,交生工生物(上海)有限公司测序,对测序结果进行分析。

1.2.3 打靶载体负筛选标记基因的克隆 用引物 F9/F10 从 pTRIP-EF1 α -Neo 质粒上扩增 EF1 α 启动子,用引物 F11/F12 从 5'-PTK-3'载体上扩增 *TK-PolyA* 基因,引物 F10 和 F11 为反向互补序列。扩增 EF1 α 启动子和 *TK-PolyA* 基因的 PCR 反应体系及程序同 1.2.1。将扩增的 EF1 α 启动子片段和 TK-PolyA 基因片段通过 Overlap PCR 进行融合扩增,使用引物为 F9 和 F12,扩增片段长 1 505 bp。Overlap PCR 反应体系和反应程序同 1.2.2。将扩增后产物连接到 pJET1.2 载体,交生工生物(上海)有限公司测序,对测序结果进行分析。

1.2.4 打靶载体 linker 的设计与合成 根据打靶载体同源长、短臂及正、负筛选基因和骨架载体 pUC57 限制性核酸内切酶的序列,设计并合成一段包括多克隆位点和 Frt 序列在内的 linker,其组成为 *Bam*H I -*Asi*s I -*Mlu*3 I -*Frt*-*Bsu*36 I -*Nsi* I -*Frt*-*Asc* I -*Pac* I -*Nhe* I -*Hind* III。将合成的 linker 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后连接到 pUC57 载体多克隆位点处。

1.2.5 打靶载体各个元件的连接 通过 PCR 在负筛选基因上游引入 *Nhe* I 酶切位点,下游引入

Pme I 和 *Hind*Ⅲ 酶切位点,下游引入 *Pme* I 酶切位点的目的是便于在打靶载体构建成功后通过 *Pme* I 对载体进行线性化。将负筛选基因通过 *Nhe* I 和 *Hind*Ⅲ 酶切后,用 T4 DNA 连接酶连接至同样经 *Nhe* I 和 *Hind*Ⅲ 酶切过的 Puc57 载体上,构建载体 Puc57-NS。

将正筛选基因通过 PCR 反应在其上、下游分别引入 *Bsu*36 I 和 *Nsi* I 酶切位点。将正筛选标记基因通过 *Bsu*36 I 和 *Nsi* I 酶切后,用 T4 DNA 连接酶连接至同样经 *Bsu*36 I 和 *Nsi* I 酶切的 Puc57-NS 载体上,构建载体 Puc57-NS-PS。Puc57-NS-PS 载体正筛选基因两侧各有 1 个 *Frt* 序列。

通过 PCR 在同源短臂基因上、下游分别引入 *Asc* I 和 *Pac* I 酶切位点。用 *Asc* I 和 *Pac* I 酶切同源短臂后用 T4 DNA 连接酶连接至同样经 *Asc* I 和 *Pac* I 酶切的 Puc57-NS-PS 载体上,构建载体 Puc57-NS-PS-SA。

将 Puc57-NS-PS-SA 载体用 *Mlu* I 酶进行线性化,采用 PCR 反应在同源长臂上、下游分别引入 15 个与 Puc57-NS-PS-SA 载体经 *Mlu* I 酶切后所产生的粘性末端 5'端相同的碱基。用 In-fusion HD 克隆试剂盒将同源长臂通过同源重组方法连接至 Puc57-NS-PS-SA 载体,构建载体 Puc57-NS-PS-SA-LA,将构建好的载体用 *Pme* I 内切酶进行鉴定。

1.3 猪 *MSTN* 基因双筛选标记打靶载体功能的验证

1.3.1 嘌呤霉素和丙氧鸟苷(GAC)最佳筛选浓度的测定 用含体积分数 10%胎牛血清的 DMEM 培

养基培养 PK15 细胞,在培养基中加入不同质量浓度的嘌呤霉素(1,3,5,7,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和不同浓度的 GAC(3,5 $\mu\text{mol}/\text{L}$),筛选嘌呤霉素和 GAC 的最佳浓度。

1.3.2 质粒转染及抗药性检测 将猪 *MSTN* 基因载体用 *Pme* I 核酸内切酶进行线性化,用 XtremeGene HP DNA transfection reagent(脂质体法)将其转染至 PK15 细胞中,培养 48 h 后分为 3 组:嘌呤霉素筛选组、GAC 筛选组和先用嘌呤霉素再用 GAC 筛选组,同时设正常细胞组、未转染嘌呤霉素筛选组和未转染 GAC 筛选组细胞作为对照。

1.3.3 *Flpe*-*Frt* 系统功能的验证 为了验证构建的打靶载体上 *Flpe*-*Frt* 元件的功能,将编码 *Flpe* 重组酶的质粒 pCAGGS-*Flpe*,转染至经过嘌呤霉素和 GAC 筛选的细胞,48 h 后观察转染前后绿色荧光细胞比例的变化。

2 结果与分析

2.1 猪 *MSTN* 基因双筛选标记打靶载体的构建与鉴定

2.1.1 打靶载体同源长、短臂的克隆与序列分析 以猪胎儿成纤维细胞基因组 DNA 为模板,PCR 扩增获得了猪 *MSTN* 基因打靶载体同源长臂(5 713 bp)和同源短臂(1 909 bp)的片段(图 1)。将目的片段与 pJET1.2 测序载体连接后测序,结果与 GenBank 参考序列(GenBank 号:NC_010457.3)的同源性为 99.67%。

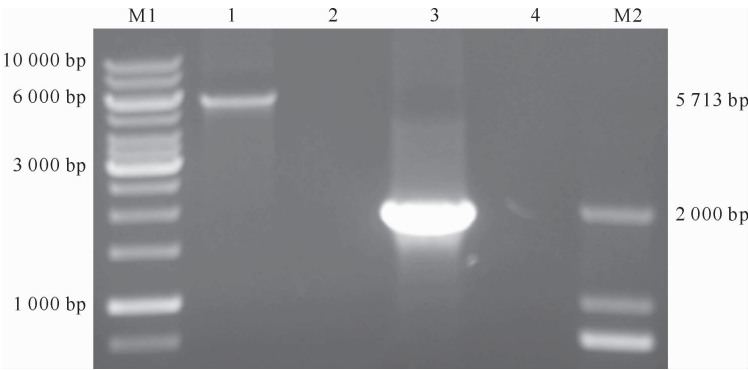


图 1 猪 *MSTN* 基因打靶载体同源长、短臂的 PCR 扩增结果

M1. 1 kb DNA Marker;1. 同源长臂;2. 同源长臂阴性对照;3. 同源短臂;4. 同源短臂阴性对照;M2. DL 2 000 Marker

Fig.1 Results of homologous long and short arms of *MSTN* gene targeting vector by PCR

M1. 1 kb DNA marker;1. Homologous long arm;2. Homologous long arm negative control;3. Homologous short arm;4. Homologous short arm negative control;M2. DL 2 000 DNA Marker

2.1.2 正、负筛选基因的克隆与序列分析 分别以 pTG4671、pTKL1-CMV-Puro/EGFP、pTRIP-EF1 α -Neo 和 5'-PTK-3'质粒为模板,扩增 PGK 启动子、

Puro-EGFP-*PolyA* 基因、EF1 α 启动子和 *TK*-*polyA* 基因,目的片段长度分别为 525,1 688,271 和 1 281 bp(图 2),与预期结果完全一致。

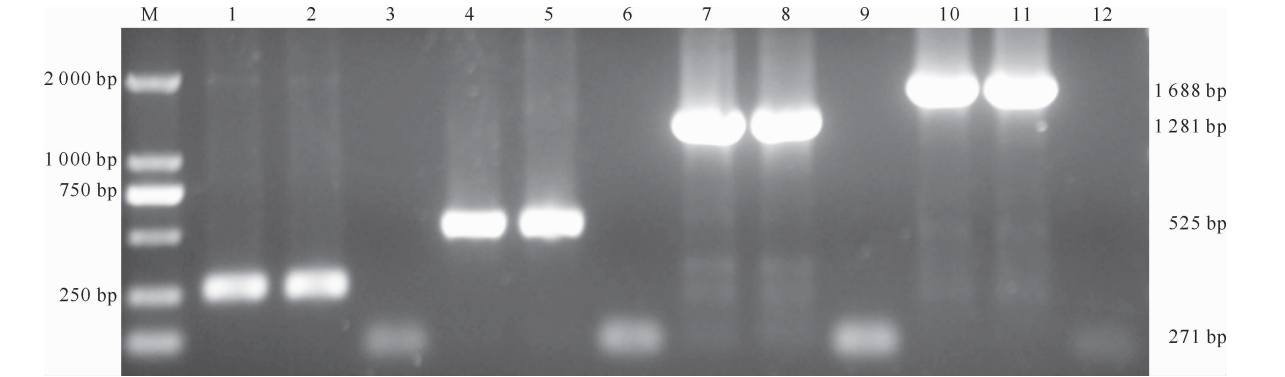


图 2 EF1 α 启动子、PGK 启动子、*TK-PolyA* 基因、*Puro-EGFP-PolyA* 基因的 PCR 扩增结果

M, DL 2 000 DNA Marker;1-2. EF1 α 启动子;3. EF1 α 启动子阴性对照;4-5. PGK 启动子;6. PGK 启动子阴性对照;
7-8. *TK-PolyA* 基因;9. *TK-PolyA* 基因阴性对照;10-11. *Puro-EGFP-PolyA* 基因;12. *Puro-EGFP-PolyA* 基因阴性对照

Fig. 2 Results of EF1 α promoter,PGK promoter,*TK-PolyA* gene and *Puro-EGFP-PolyA* gene by PCR

M, DL 2 000 DNA Marker;1-2. EF1 α promoter;3. EF1 α promoter negative control;4-5. PGK promoter;6. PGK promoter negative control;
7-8. *TK-PolyA* gene;9. *TK-PolyA* gene negative control;10-11. *Puro-EGFP-PolyA* gene;12. *Puro-EGFP-PolyA* gene negative control

2. 1. 3 融合基因 *PGK-Puro-EGFP-PolyA* 和 *EF1 α -TK-PolyA* 的 PCR 扩增与序列分析 以 PGK 和 *Puro-EGFP-PolyA* 片段为模板,以 F5 和 F8 为引物,通过 Overlap PCR 扩增获得了 2 169 bp 的 *PGK-Puro-EGFP-polyA* 片段(图 3)。以 EF1 α 和 *TK-PolyA* 片段为模板,以 F9 和 F12 为引物,通过 Overlap PCR 扩增获得了 1 505 bp 的 *EF1 α -TK-polyA* 片段。将目的片段与 pJET1. 2 载体连接后测序,结果与预期结果完全一致。

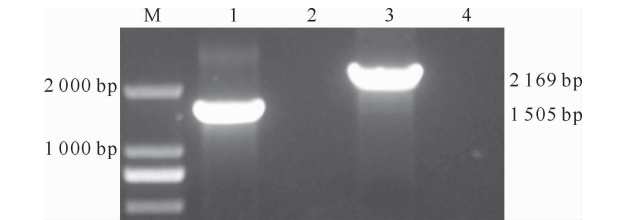


图 3 *EF1 α -TK-PolyA* 和 *PGK-Puro-EGFP-PolyA* 融合基因的 Overlap PCR 扩增结果

M, DL 2 000 DNA Marker;1. *EF1 α -TK-PolyA* 片段;
2. *EF1 α -TK-PolyA* 片段阴性对照;
3. *PGK-Puro-EGFP-PolyA* 片段;
4. *PGK-Puro-EGFP-PolyA* 片段阴性对照

Fig. 3 Results of *EF1 α -TK-PolyA* and *PGK-Puro-EGFP-PolyA* cassettes by overlap PCR

M, DL 2 000 DNA Marker;1. *EF1 α -TK-PolyA* cassette;
2. *EF1 α -TK-PolyA* cassette negative control;
3. *PGK-Puro-EGFP-PolyA* cassette;
4. *PGK-Puro-EGFP-PolyA* cassette negative control

2. 1. 4 打靶载体各个元件的连接 将猪 *MSTN* 基因双筛选标记打靶载体进行 *Pme* I 酶切鉴定,获得了 14 000 bp 的片段(图 4),与预期结果相符,表明

猪 *MSTN* 基因双筛选标记打靶载体构建成功。

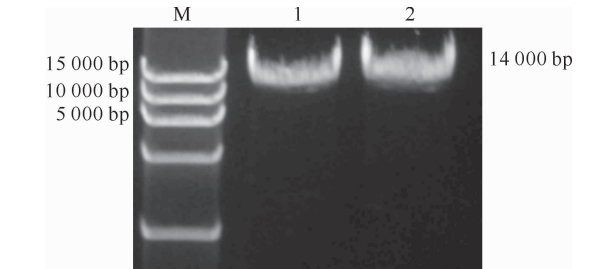


图 4 猪 *MSTN* 基因双筛选标记打靶载体 Puc57-NS-PS-SA-LA 的鉴定

M, DL 15 000 DNA Marker;1-2. 猪 *MSTN* 基因双筛选标记打靶载体 Puc57-NS-PS-SA-LA

Fig. 4 Identification of pig *MSTN* gene double selection targeting vector Puc57-NS-PS-SA-LA

M, DL 15 000 DNA Marker;
1-2. Pig *MSTN* genedouble selection targeting vector

2. 2 猪 *MSTN* 基因双筛选标记打靶载体功能的验证

2. 2. 1 嘌呤霉素和 GAC 最佳浓度的确定 当嘌呤霉素质量浓度 $<5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,PK15 细胞仅有部分死亡;当其质量浓度 $\geq 5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,PK15 细胞全部死亡;所以嘌呤霉素的最佳质量浓度为 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。当 GAC 的浓度为 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,PK15 细胞全部死亡;当其浓度为 $3\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,部分细胞仍能存活,所以 GAC 的最佳浓度为 $3\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。

2. 2. 2 正负筛选标记基因抗药性的检测 转染 Puc57-NS-PS-SA-LA 载体的 PK15 细胞经嘌呤霉素、GAC 筛选 48 h 后,正常组细胞生长良好(图 5A);未转染打靶载体细胞在加入嘌呤霉素后全部死亡(图 5B),转染打靶载体嘌呤霉素筛选组仍有

5%左右的细胞存活(图 5C),说明打靶载体中嘌呤霉素基因已表达;未转染细胞 GAC 筛选组仅有少部分细胞死亡(图 5D),转染打靶载体 GAC 筛选组大部分细胞死亡(图 5E),说明打靶载体中 TK 基因能正常表达;转染打靶载体的 PK15 细胞依次经嘌呤霉素和 GAC 筛选后有细胞死亡,但仍有部分细胞存活(图 5F),表明所构建的打靶载体标记基因均能表达。根据打靶载体正负筛选的原理和以上试验结果,证明所构建的打靶载体标记基因均能表达,该载体可以作为基因打靶载体。

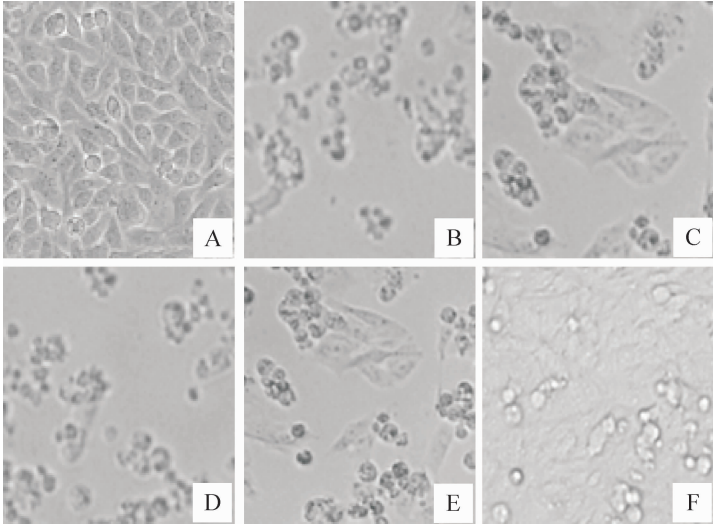


图 5 猪 *MSTN* 双筛选标记打靶载体 Puc57-NS-PS-SA-LA 转染 PK15 细胞对嘌呤霉素和 GAC 抗性的检测(200×)
A. 正常 PK15 细胞;B. 嘌呤霉素筛选的未转染细胞;C. 嘌呤霉素筛选的转染细胞;D. GAC 筛选的未转染细胞;
E. GAC 筛选的转染细胞;F. 先用嘌呤霉素再用 GAC 筛选的转染细胞
Fig. 5 Growth of PK15 cells selection by Puro and GAC after transfection of the gene targeting vector Puc57-NS-PS-SA-LA (200×)

A. Normal PK15 cells;B. Selection with puromycin without transfection;C. Selection with puromycin after transfection;
D. Selection with GAC without transfection;E. Selection with GAC after transfection;F. Selection with puromycin and GAC after transfection

2.2.3 荧光标记及 Flpe-Frt 功能的检测 在荧光显微镜下观察经过正负筛选的细胞,约有 80%的细胞可见到绿色荧光(图 6A);将编码 Flpe 重组酶的质粒转染到细胞中,对比未转染 Flpe 重组酶的细胞

可知,转染 Flpe 重组酶的细胞有一定数量的细胞丢失了绿色荧光(图 6B),说明位于 Frt 区间的正筛选标记基因已经被 Flpe 酶除去。

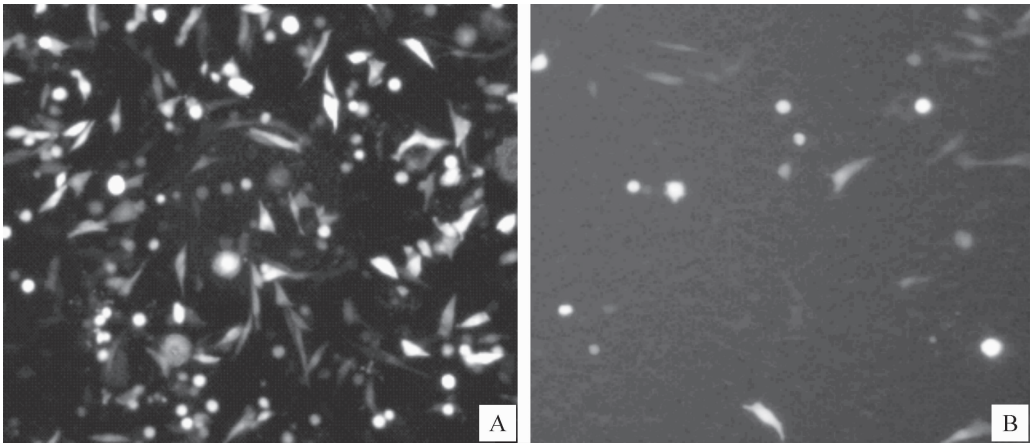


图 6 猪 *MSTN* 双筛选标记打靶载体 Puc57-NS-PS-SA-LA Flpe-Frt 系统的功能验证(200×)
A. 打靶载体转染的 PK15 细胞;B. 转染 pCAGGS-Flpe 的稳定筛选 PK15 细胞
Fig. 6 Analysis the Flpe-Frt function of pig *MSTN* gene double selection vector Puc57-NS-PS-SA-LA (200×)
A. Gene targeting vector stable-transfected PK15 cells;B. Stable-transfected PK15 cells transfected with pCAGGS-Flpe

3 讨 论

制备基因敲除动物的过程中,基因打靶载体的构建是非常重要和关键的一个环节。构建置换型打靶载体时,需要克隆打靶基因的同源臂,其长度为 5~10 kb^[10],一般认为,同源臂越长打靶效率越高^[11]。构建打靶载体时一般选择 pLoxp 或 pFrt 载体作为骨架载体。目前,有通用型基因打靶载体的报道^[8,12],其主要策略是在骨架载体上插入稀有酶切位点以便于同源臂的插入。本研究根据猪 *MSTN* 基因同源臂和正负筛选基因序列以及骨架载体的序列,选择合成了适合构建 *MSTN* 基因的酶切位点和 2 个 Frt 序列的 linker,将合成的 linker 直接亚克隆至 pUC57 载体,使得在构建 *MSTN* 基因打靶载体时将不受骨架载体上酶切位点不足的限制,可以直接将打靶载体元件克隆至骨架载体中。本研究在亚克隆正筛选基因、负筛选基因和同源短臂时,目的基因和载体的连接效率均可达到 70% 以上。在连接同源长臂时,本试验先通过 *Asi*s I 和 *Mlu* I 酶切位点连接,但效率比较低,改用 In-fusion 同源重组技术^[13-14]后,连接效率达到了 60%。可知 In-fusion 同源重组技术的使用,提高了连接效率,节约了载体构建时间,为大片段的连接提供了新方法。

打靶载体正筛选基因目前一般选择新霉素磷酸转移酶(G418)抗性基因,而 G418 一般需要 1 周才能筛选出阳性细胞。本试验在构建猪 *MSTN* 打靶载体时选择了嘌呤霉素作为正筛选基因,采用嘌呤霉素最快可以在 2 d 内筛选出阳性细胞,极大地提高了筛选效率。Cadiñanos 等^[15]在构建诱导型 PiggyBac 转座子载体时,在嘌呤霉素基因后直接连接了 *TK* 基因,该载体对嘌呤霉素和 *TK* 基因的表达及表达产物功能均无影响。本研究参照 Cadiñanos 的方法,将 *EGFP* 基因连接在嘌呤霉素基因后,同样也不影响嘌呤霉素和 *EGFP* 的功能,这尚属首次报道。

在打靶载体启动子选择上,本试验分别选择了 PGK 启动子和 EF1 α 启动子作为正负筛选基因的启动子,这 2 个启动子在干细胞和成纤维细胞中均有活性,所以构建的载体可以直接转染至干细胞或成纤维细胞中进行筛选。

总之,本研究在总结其他关于猪 *MSTN* 基因打靶载体的基础上,构建了 *MSTN* 基因双筛选标记打靶载体,并在 PK15 细胞中对其主要功能进行了验

证,在打靶载体构建过程中使用了 In-fusion 同源重组技术,优化了基因打靶的技术手段,提高了打靶载体构建的效率。该载体的成功构建为有效开展猪 *MSTN* 基因打靶提供了平台,对其他基因打靶载体的构建也有重要的参考价值。

[参考文献]

- [1] Langley B, Thomas M, Bishop A, et al. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulation MyoD expression [J]. J Biol Chem, 2002, 277(51): 49831-49840.
- [2] McPherron A C, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(23): 12457-12461.
- [3] McPherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member [J]. Nature, 1997, 387(6628): 83-90.
- [4] Mosher D S, Quiqnon P, Bustamante C D, et al. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs [J]. Plos Genetics, 2007, 3(5): e79.
- [5] Müller U. Ten years of gene targeting: Targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis [J]. Mech Dev, 1999, 82(1/2): 3-21.
- [6] 李景芬, 于 浩, 袁 野, 等. 同源重组敲除 *MSTN* 基因的猪胎儿成纤维细胞的构建 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(8): 2972-2977.
Li J F, Yu H, Yuan Y, et al. Construction of *MSTN* knock-out porcine fetal fibroblast [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(8): 2972-2977. (in Chinese)
- [7] 李鸿辉, 冯 冲, 王 宁, 等. Myostatin 基因打靶载体的构建及猪胎儿成纤维细胞 *Myostatin* 基因的敲除 [J]. 生物技术通讯, 2010, 21(5): 699-704.
Li H H, Feng C, Wang N, et al. Construction of a myostatin gene-targeting vector and *Myostatin* gene knockout of porcine fetal fibroblasts cells [J]. Letters in Biotechnology, 2010, 21(5): 699-704. (in Chinese)
- [8] 陈兴启, 孙达权, 刘凤军, 等. 通用型基因打靶载体的构建及其功能鉴定 [J]. 生物工程学报, 2008, 24(10): 1818-1823.
Chen X Q, Sun D Q, Liu F J, et al. Construction of universal vector for gene targeting and analysis of its function [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(10): 1818-1823. (in Chinese)
- [9] 刘永刚, 华 松, 兰 杰, 等. 基因打靶定点突变秦川牛 *MSTN* 基因 [J]. 生物工程学报, 2010, 26(3): 410-416.
Liu Y G, Hua S, Lan J, et al. Site-directed mutagenesis of *MSTN* gene by gene targeting in Qinchuan cattle [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(3): 410-416. (in Chinese)
- [10] Meek S, Buehr M, Sutherland L, et al. Efficient gene targeting by homologous recombination in rat embryonic stem cells [J]. Plos One, 2010, 5(12): e14225.