23 卷 2 期 生 物 工 程 学 报 Vol.23 No.2
2007 年 3 月 Chinese Journal of Biotechnology March 2007

人血清白蛋白基因的打靶研究
The Targeting Study of Human Serum Albumin Gene

孙世惠[1,2],周艳荣[1],陈红星[1],林艳丽[1],黄培堂[1],邓继先[1*]

SUN Shi-Hui[1,2], ZHOU Yan-Rong[2], CHEN Hong-Xing[1], LIN Yan-Li[2], HUANG Pei-Tang[2] and DENG Ji-Xian[2*]

1. 军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071
2. 军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物生物安全国家重点实验室,北京 100071
1. *Institute of Biotechnology*, *Academy of Military Medical Science*, *Beijing* 100071, *China*
2. *Institute of Microbiology and Epidemiology*, *State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity* (*Academy of Military Medical Sciences*), *Beijing* 100071, *China*

摘 要 为获得整合有人血清白蛋白(HSA)基因的猪胎儿成纤维细胞克隆,从猪基因组文库中杂交筛选得到猪血清白蛋白(PSA)基因全序列 35 kb 并克隆了人血清白蛋白 cDNA 序列,扩增猪血清白蛋白基因 5′调控序列 7.2kb 片段及第一内含子至第四内含子 2.8kb 的片段 构建了含有 *neo* 及 *tk* 正负筛选标记基因的人血清白蛋白基因打靶载体,并验证了 *neo* 基因的有效性。将线性化的打靶载体通过电击转染的方法整合到猪胎儿成纤维细胞基因组中,利用 G418 及 GANC 进行细胞克隆的抗药性筛选,PCR 及 Southern blot 鉴定抗药性细胞克隆,最终获得 3 个发生同源重组的细胞克隆。这为下一步进行体细胞核移植制备生产人血清白蛋白转基因猪奠定了基础。

关键词 基因克隆, 基因打靶, 人血清白蛋白基因

中图分类号 Q75 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2007)02-0223-06

Abstract To generate transgenic porcine which expresses human serum albumin (HSA), the HSA gene targeting vector was constructed with HSA cDNA as the gene of interestand partial porcine serum albumin (PSA) gene as homologous arms which respectively were 7.2kb 5′ regulation sequence and 2.8 kb genomic sequence from the first intron to the fourth intron. The resistant gene *neo* was inserted into intron 1 and *tk* was ligated to the 3′ end of the construct. Linearized targeting construct DNA was introduced into the fibroblast cells obtained from porcine fetus by electroporation. The positive-negative selection was performed and survival clones were screened by PCR and Southern blot. Three colonies with correct homologous recombination were obtained. Our results set a good basis for the establishment of transgenic porcine by gene target and nuclear transfer methods.

Key words clone, genetargetting, human serum albumin gene

目前制备转基因动物的方法有传统的显微注射法,精子介导法,逆转录病毒载体介导法等,但是这些方法都存在制备效率低、表达不稳定等缺点,因而在家畜中的应用受到限制。而利用基因打靶制备转基因动物可以实现外源基因的定位整合,使其自动获得内源基因所有调控序列,因而克服了随机整合所带来的"位置效应"。2000 年,McCreath 等[1]将 α 抗胰蛋白酶定位整合到绵羊胎儿成纤维细胞 α1 胶

Received: September 14, 2006; Accepted: November 20, 2006.

This work was supported by a grant from 863 Hi-tech Research and Program of China (No. 2002AA206621).

* Corresponding author. Tel: + 86-10-66948841; E-mail: dengjx56@yahoo.com.cn; shsun916@sohu.com

国家高技术研究与发展计划项目资助(No. 2002AA206621)。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

原基因座,通过体细胞核移植获得转基因克隆绵羊;赖良学等[2]利用基因打靶和核移植相结合的方法生产出敲除了 α-1,3-半乳糖苷转移酶基因的转基因猪,这些研究结果提示我们可以采用类似的方法获得生产人血清白蛋白的转基因猪。

本研究以人血清白蛋白基因为目的基因,构建了含有 *neo* 和 *tk* 正负筛选标记的猪血清白蛋白基因座定点整合打靶载体,电击转染猪胎儿成纤维细胞,筛选获得了人血清白蛋白基因定位整合细胞,为下一步通过体细胞核移植制备生产人血清白蛋白的转基因猪奠定了基础。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 工具酶与试剂盒:随机引物标记试剂盒、DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、PCR 纯化试剂盒购自 Promega 公司;Pig genomeλgt11 phage library 购自 Clontech 公司;[a-32p] dCTP 购自亚辉公司;*E. coli* DH5α competent cells 和 DNA standard Marker 购自天为时代;QIAprep Spin Miniprep Kit 购自基因公司;Gel Extraction Mini Kit 购自上海华舜生物工程公司;T4 DNA polymerase 购自华美公司;Pyrobest DNA Polymerase、T4 DNA Ligase 购自 TaKaRa 公司;限制酶分别购自 Biolabs 公司和 TaKaRa 公司;引物由国家生物医学分析中心合成。

1.1.2 质粒:pGEM-7Zf 质粒、pT-BGHPolyA 质粒由军事医学科学院生物工程研究所一室保存;通用型打靶载体 ploxPneo 由林福玉博士惠赠,pGEM-T Vector 购自 Promega 公司。

1.1.3 引物合成与基因测序:引物 P1、P2 用于扩增猪血清白蛋白基因 5′端 −1342 至 +15 之间的序列,使之与 p7Zf-N52 中的 5′端调控序列片段连接为完整的 5′端调控区,作为基因打靶 5′同源臂,在 P2 的 C 端引入 *Bst*P Ⅰ 位点。P1:5′-GTGACATGGCTGACAGTTTGATTG-3′, P2:5′-AAAGGTTACCCACTTCATTGTGCCAAAGG-3′;引物 P3、P4 用于合成第一内含子至第四内含子之间的 DNA 片段,正向引物 P3:5′-GTA AGG GTA CCT GCT CGA GAG TTC GAT TTT TCT ATT GTT C-3′,反向引物 P4:5′-GGG AAG CTT GGT TCC CAA AGA GGA CAT GTT GGG GTG-3′;扩增人血清白蛋白基因 cDNA 的正向引物 P7:5′-GAA GTG GGT AAC CTT TAT TTC CCT TCT TTT TCT CTT TAG CTC GGC TTA TTC CAG GGG TGT GTT TCG TCG AG-3′,反向引物 P8:5′- GGG GTC GAC TTA TAA GCC TAA GGC AGC TTG ACT TGC AGC AAC AAG TTT TTT ACC CTC CTC GGC AAA GCA GGT C-3′;中靶细胞检测的正向引物 P404 位于 *neo* 基因上,P404:5′-CGC ATG CTC CAG ACT GCC TTG GGA AAA GC 3′,反向引物 P405 位于 3′同源臂外侧相邻的基因组序列中,P405:5′-GGA TGA ACC TAG AGA TTA TCA TAC TAA GAC-3′。

1.2 实验方法

1.2.1 5′同源臂、3′同源臂及人血清白蛋白基因 cDNA 亚克隆:取冷冻的猪肝组织按常规方法进行猪基因组 DNA 的提取,采用噬菌斑原位杂交及 PCR 交替筛选的方法获得含有猪血清白蛋白基因的 4 个基因片段克隆 p7Zf-N51,p7Zf-N52,p7Zf-N31,p7Zf-N32,对重组子进行 PCR 和酶切鉴定并进行基因的序列测定及分析。

5′同源臂的亚克隆:p7Zf-N51、p7Zf-N52 质粒中分别含有猪血清白蛋白基因 5′端调控序列的不同片段,并有部分重叠,因此通过重叠处的 *Pac* Ⅰ 位点将位于两个载体中的 5′端调控序列连接在一起,作为打靶载体的 5′端同源臂,构建的质粒命名为 pN53。

3′同源臂的亚克隆:以 p7Zf-N31 为模板,以 P3-P4 为引物,扩增第一内含子到第四内含子的片段,以此作为基因打靶 3′端同源臂,在正向引物中引入 *Xho* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ 位点,以便插入正筛选标记 *neo* 基因,将扩增的 3′同源臂克隆至 T 载体上,重构质粒命名为 pN31。

人血清白蛋白基因 cDNA 序列的克隆:采集人血,按常规方法提取人基因组 RNA,并进行反转录,以 P7-P8 为引物,扩增人血清白蛋白基因编码区 1.9kb 的片段,克隆至 T-载体上,其中反向引物 P8 中引入 *Sal* Ⅰ 位点,质粒命名为 pHcDNA。

1.2.2 打靶载体的构建:用 pHcDNA 起始密码子后 *Bst*P Ⅰ 酶切位点及引入的 *Sal* Ⅰ 位点,将其连于用同样酶处理的 pN53 载体上,并进行 PCR 和酶切鉴定,质粒命名为 pN53-HA。在 pN53-HA 的 HcDNA 序列后连接 BGH polyA 信号序列,构建质粒命名为 pN53-HA-PA。

在 pN53-HA-PA 质粒的基础上,构建打靶载体 pPHA1。首先,用 *Xho* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ 双酶切 ploxp 质粒,并回收 1.8kb 的 *neo* 片段,定向连于 *Xho* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ 双酶切的 pN31 质粒中,作为正筛选标记,然后将连接在一起的 3′同源臂及 *neo* 片段连接于 pN53-HA-PA 质粒中的 BGH polyA 信号序列之后,质粒命名为

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

pN53-HA-PA-N31-neo。*Hin*dⅢ、*Not*Ⅰ双酶切 ploxp 质粒，回收 *tk* 基因片段，并连接于 3′同源臂后，作为基因打靶负筛选标记。构建的打靶载体命名为 pPHA1。载体可用 *Cla*Ⅰ酶切线性化，*tk* 基因位于 3′同源臂外侧。对载体各基因片段连接处进行序列测定。

1.2.3 猪胎儿成纤维细胞的分离和培养：手术取出妊娠 32 d 的猪胎儿，去除头和肝脏后，用胰酶消化法获得猪胎儿成纤维细胞。培养液成分为 DMEM、15% FBS、丙酮酸钠、非必需氨基酸、双抗、bFGF 等。细胞在 37℃、5% CO_2、饱和湿度情况下培养，原代细胞培养 3d 后冷冻保存。

1.2.4 电击转染猪胎儿成纤维细胞及阳性细胞克隆的筛选及鉴定：将 0.7×10^7 细胞置于 0.4cm 内径的电击杯中，加入 10～20μg 线性化 pPHA1 混匀，240V，700μF 条件进行电击，转染细胞分散到 48 孔板中，每孔细胞约为 2000 个。培养 48h 后利用 G418（300μg/mL）和 GANC（2μg/mL）进行抗性细胞克隆筛选，筛选两次后用 G418（150μg/mL）和 GANC（2μg/mL）继续筛选并进行克隆细胞的维持培养。取每个细胞克隆的部分细胞进行核型分析，将其余的细胞分为三等份，一部分用于提取抗性细胞克隆基因组 DNA 进行 PCR 及 Southern blot 鉴定；一部分冷冻保存；另一部分用于体细胞核移植。

2 实验结果与分析

2.1 猪血清白蛋白基因的克隆

通过噬菌斑原位杂交及 PCR 的交替筛选，共获得猪血清白蛋白全基因约 35kb，其中包括 15 个外显子及 14 个内含子约 19592bp，5′端调控序列约 14275bp。获得的猪血清白蛋白基因全序列已在 GenBank 登录，登录号为 AY663543。

2.2 pPHA1 打靶载体的构建

在载体的构建中选择 7.2kb 的 5′端调控序列作为基因打靶中同源臂的长臂，第一内含子至第四内含子之间 2.8kb 的片段作为基因打靶的短臂，BGHPolyA 位于目的基因人血清白蛋白 cDNA 序列之后，正筛选标记基因位于短臂中，负筛选标记位于基因打靶 3′同源臂的外侧。

基因片段连接处测序结果正确（图略）；打靶载体的酶切鉴定结果正确，结果见图 2：当用 *Cla*Ⅰ/*Sal*Ⅰ双酶切 pPHA1，切出 9110 bp 及 10073 bp 的条带，电泳图可见一条 10kb 左右的条带（见 4，5）；又因 *tk* 片段末端有一个 *Kpn*Ⅰ位点，所以用 *Kpn*Ⅰ酶切鉴定时，当 *tk* 正向连入时，切出 2 条 7.5kb 左右的条带及两条小带，反向连接时除两条小带外，还切出 5.5kb 和 10kb 左右的两条带（见图 2）。酶切鉴定正确后进行基因连接处序列验证（测序结果图略）。

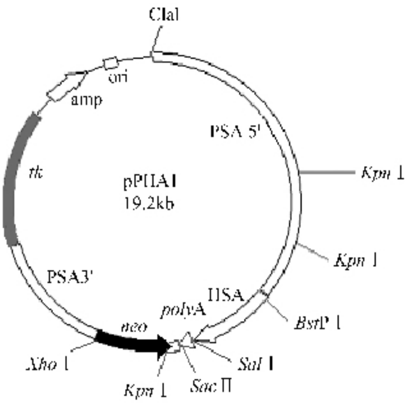

图 1 基因打靶载体 pPHA1 构建图

Fig. 1 Structure of gene targeting vector pPHA1

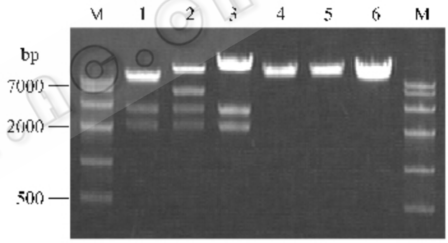

图 2 打靶载体 pPHA1 酶切鉴定结果

Fig. 2 The identification of pPHA1 vector

1～3：pPHA1（*Kpn*Ⅰ）；4～6：pPHA1（*Cla*Ⅰ/*Sal*Ⅰ）；
1～2：pPHA1（*Kpn*Ⅰ），*tk* inserted in different direction；
3：pN53-HA-PA（*Kpn*Ⅰ）；
6：pN53-HA-PA（*Cla*Ⅰ/*Sal*Ⅰ）.

2.3 细胞电击转染与阳性细胞克隆的筛选及鉴定

利用胰酶消化法获得猪胎儿成纤维细胞，当细胞生长至 70% 汇合时，消化收集细胞，以 10^7 细胞/mL 密度电击转染，转染后加压进行正负筛选，15d 后统计抗性细胞克隆数，共 126 个；在逐级扩大培养过程中，仅有少量克隆能够扩至 6 孔板及小培养瓶中并生长良好（图 3）。对生长状态良好的细胞克隆进行核型分析，有 38 条染色体（图 4），分别提取这些细胞克隆基因组 DNA 进行 PCR 及 Southern blot 鉴定。以抗药性细胞克隆基因组 DNA 为模板，用一对引物 P7/P8 进行目的基因 HcDNA 的 PCR 扩增，图示有 6 个克隆扩增出了 1.8kb 的目的条带（见图 5）；用跨过 3′同源臂的一对引物 P404/P405 进行 Long PCR 扩增，其中 P404 位于 *neo* 基因上，P405 位于 3′同源臂外侧相邻的基因组序列中，结果显示有 5 个克隆扩增出目的条带（图 6）；分别回收 PCR 产物，亚克隆至载体中并进行序列测定，其中 3 个结果

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

测序正确(图 7),为发生了同源重组的克隆;此外,进行 Southern blot 鉴定:用 *Eco*RⅤ/*Cla*Ⅰ双酶切细胞基因组 DNA,其中 3′同源臂外侧的 *Eco*RⅤ位点位于猪血清白蛋白基因组上,以 3′同源臂中的一段 500bp 左右的片段为探针进行杂交(见图 8),发生同源重组的细胞克隆切出 4kb 和 10.4kb 的条带,从图可见 2、8、9 号克隆扩增出目的条带(见图 9),与 PCR 结果一致,说明这三个细胞克隆为发生了同源重组的目的克隆。

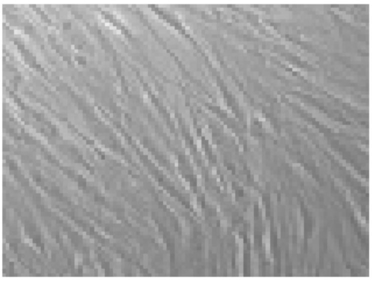

图 3 转染得到抗性细胞克隆(1×40)

Fig.3 Resistant cell clones transfected by pPHA1(1×40)

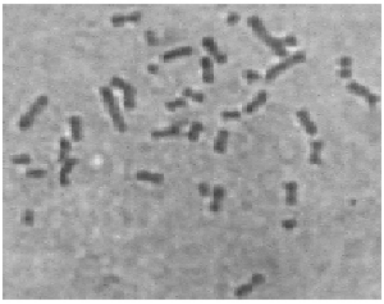

图 4 抗性细胞克隆核型分析(1×40)

Fig.4 Karyotype of cell clones(1×40)

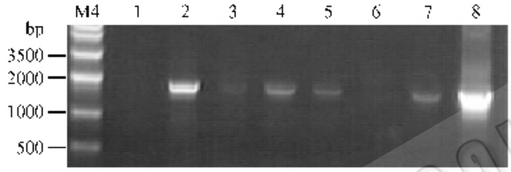

图 5 抗性细胞克隆 PCR 部分鉴定结果(P7/P8)

Fig.5 The identification of resistant cell clones-1

2-5,7-8:positive cell clones.

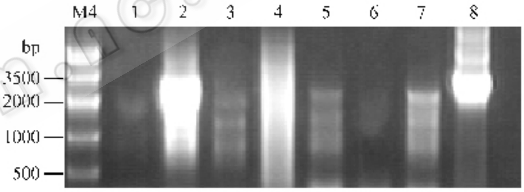

图 6 抗性细胞克隆 PCR 部分鉴定结果(P404/P405)

Fig.6 The identification of resistant cell clones-2

2,4,5,7-8:positive cell clones.

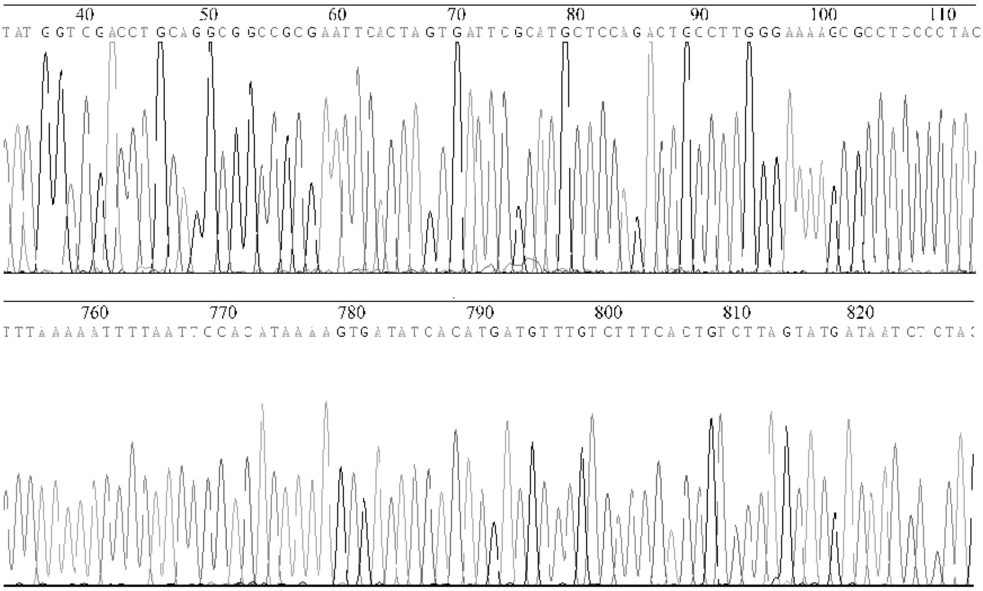

图 7 P404+P405 Long PCR 产物部分测序结果

Fig.7 Results of Long PCR (P404+P405)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

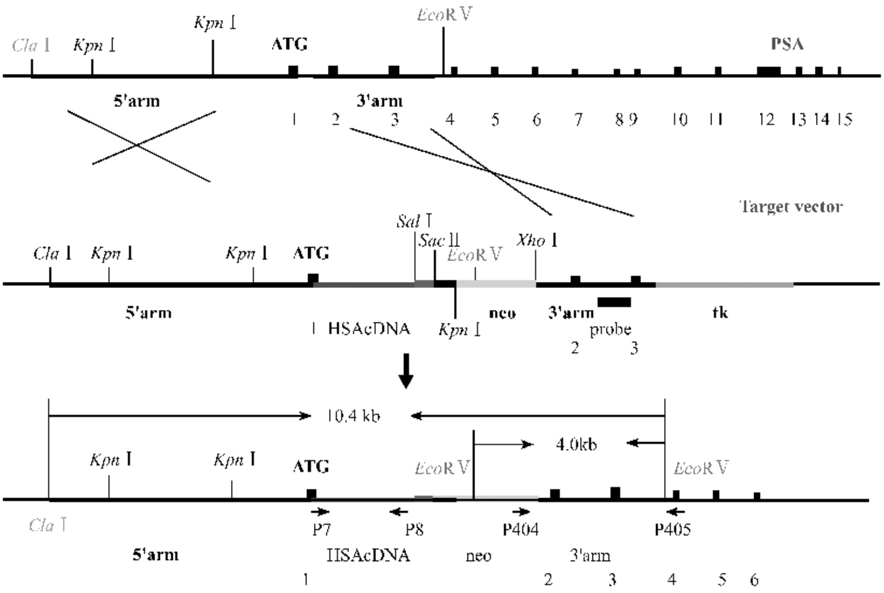

图 8　同源重组过程示意图

Fig.8　Diagram of homologous recombination

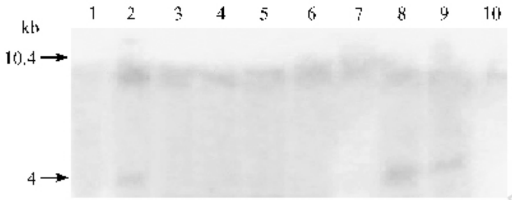

图 9　抗性细胞克隆 Southern blot 鉴定结果
2,8,9 号为中靶细胞

Fig.9　Southern blot of resistant cell clones

3　讨论

转基因动物生物反应器是生产重组蛋白的发展方向，有多家实验室开展了以转基因动物表达重组人血清白蛋白研究，但是存在表达水平低等问题，分析原因是由于导入的外源基因均为随机整合，因此受整合位置、表达调控元件等因素造成的影响[4,5]。尽管研究者在载体表达调控元件(如启动子、增强子、核基质结合区和位点控制区等)以及目的基因结构(插入提高表达的重要内含子或者采用全基因组序列)等方面进行了大量的探索研究，但与机体内源性基因表达量相比，仍然存在较大差距。

克服外源基因低表达最有效的策略是“定位整合(也称基因打靶)”，即利用基因打靶技术将目的基因定位整合在内源性高表达基因调控区的下游，这样既克服了随机整合所带来的“位置效应”，又简化了载体构建中调控元件的配置组成，而且还能显著提高目的基因表达水平[6,7]。本研究构建了血清白蛋白基因打靶载体，利用同源重组的原理将人血清白蛋白基因定位整合到猪胎儿成纤维细胞血清白蛋白基因座，使人血清白蛋白基因自动获得猪白蛋白基因所有的表达调控元件，避免位置效应对人白蛋白基因表达的影响。

本研究采用猪胎儿成纤维细胞进行体细胞基因打靶，是因为目前还没有成功分离大动物的 ES 细胞，但已有多个实验室利用胎儿成纤维细胞进行体细胞打靶获得成功[1,2,8]。但是利用体细胞进行基因打靶仍存在许多问题，如体细胞打靶同源重组的频率比 ES 细胞低两个数量级，且非同源重组的频率非常高；其次，体细胞在转染后传代次数有限、易分化等。因此，除了优化胎儿成纤维细胞的培养条件外[9]，如何提高体细胞基因打靶的效率就集中在对中靶体细胞的筛选和富集这一关键环节。目前采用的提高打靶效率的方法有无启动子筛选法、无 PolyA 筛选法、正负筛选法、PCR 筛选法、Cre-LoxP 系统的应用等。在国内外报道的转基因大型动物研究中，大多采用无启动子筛选法，以便利用内源基因的调控序列指导 *neo* 基因的表达[8]。而本研究中由于血清白蛋白基因是在肝脏组织中特异性表达，而在成纤维细胞中此基因并不表达，因此本实验利用猪胎儿成纤维细胞作为靶细胞时无法使用无启动子筛选法，而是采用了正负筛选的方法。

研究表明，打靶载体同源臂的长度对基因打靶的效率影响很大[10,11]，大多数载体同源臂的长臂在 5～8kb 之间，短臂在 0.5～2kb 之间。本实验从猪的基因组文库中筛选了 7.2kb 的 5′调控区作为基因打靶同源臂的长臂，2.8kb 的基因片段作为基因打靶

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

的短臂,目的是既便于 PCR 的筛选又提高了同源重组的效率。另有资料表明[12],在基因的内含子中尤其是第一或第二内含子中可能含有增强子序列并对目的基因的表达起正调控作用,因此本研究选择猪血清白蛋白第一内含子至第四内含子之间约 2.8kb 的基因片段作为基因打靶 3′同源臂,目的是通过保留猪血清白蛋白基因的前几个内含子,提高转录水平,进而提高目的基因的表达水平。

由于正筛选标记基因 *neo* 的存在对目的基因的表达有一定影响[13],因此本研究构建的含有正负筛选标记基因打靶载体中,在 *neo* 基因的两侧引入两个同向的 LoxP 序列,以期利用 Cre-LoxP 系统有效删除 *neo* 基因;另一方面,将正筛选标记插入 3′同源臂近 5′端的内含子中,目的在于在基因的转录过程中能够将 *neo* 基因连同内含子一起剪切掉[14],避免后期在转基因动物中由于 *neo* 基因的表达而影响了目的基因的表达。

通过对抗性细胞克隆的筛选、PCR 扩增、PCR 产物的序列测定和 Southern blot 鉴定,表明我们已经获得发生了同源重组的阳性细胞克隆,目前正在进行体细胞核移植试验。

REFERENCES(参考文献)

[1] McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, *et al*. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, **405**:1066-1069.

[2] Lai Liangxue, Kolber-Simonds, Donna, *et al*. Production of [alpha]-1,3-Galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, **295**:1089-1092.

[3] Sun SH(孙世惠), Zhou YR(周艳荣), Lu JS(卢建申), *et al*. Molecular cloning of porcine serum albumin and the study of 5′ regulation sequence. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*(军事医学科学院院刊), 2005, **29**(2):101-104.

[4] Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, *et al*. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**:4438.

[5] Al-Shawi R, Kinnaird J, Burke J, *et al*. Expression of a foreign gene in a line of transgenic mice is modulated by a chromosomal position effect. *Molec Cell Biol*, 1990, **10**:1192.

[6] Sirah KB, Elizabeth GP, Kimbergly DK, *et al*. Single-copy transgenic mice with chosensite integration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**:9067-9072.

[7] Maria J, Marg EM, Chistine R, *et al*. Targeted transgenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**:8804-8808.

[8] Yifan D, Todd D Vaught, *et al*. Targeted disruption of the [alpha]-1,3-Galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnology*, 2002, **20**:251-255.

[9] Zhu H, Tamot B, Quinton M, *et al*. Influence of tissue origins and external microenvironment on porcine foetal fibroblast growth, proliferative life span and genome stability. *Cell Prolif*, 2004, **37**:255-266.

[10] Homas KR, Capecchi MR. Site-directed mutgenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cell. *Cells*, 1987, **512**:503-512.

[11] Asty P, Ramirez-Solis R, Krumlauf R, *et al*. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 1991, **11**:5586-5591.

[12] Rinster RL, Allen JM, Behringer RR, *et al*. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**:836.

[13] Fiering S, Epner E, Robinson K, *et al*. Targeted deletion of 5′ HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev*, 1995, **9**(18):2203-2313.

[14] Sun SH(孙世惠), Zhou YR(周艳荣), Chen HX(陈红星), *et al*. The excision study of positive selective gene neo in the transcription. *Letters in Biotechnology*(生物技术通讯), 2006, **17**(6):101-104.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn