

# 利用启动子缺陷型打靶载体敲除牛胎儿成纤维细胞中的 *Prnp*

朱采红<sup>1</sup>, 俞国华<sup>2,3</sup>, 李蓓<sup>1</sup>, 许媛媛<sup>2</sup>, 俞慧清<sup>2</sup>, 陈建泉<sup>2</sup>, 钱旻<sup>3</sup>, 成国祥<sup>1,2</sup>

1 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092

2 上海转基因研究中心, 上海 201210

3 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062

**摘要:** 利用启动子捕获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。敲除动物的 *Prnp* 可使其具有抵抗 Prion 病感染的能力。采用启动子捕获策略, 构建了牛 *Prnp* 启动子缺陷型打靶载体 BoPrneo, 线性化后, 再通过电穿孔转染牛胎儿成纤维细胞 BFF, 用 250 μg/mL G418 进行药物筛选, 共得到 99 个药物抗性细胞克隆。对细胞克隆进行 PCR、测序及 Southern blotting 鉴定, 结果表明, 其中的 4 个细胞克隆为中靶细胞, 说明牛胎儿成纤维细胞中的 *Prnp* 一条等位基因被成功敲除。本研究为牛 *Prnp* 的敲除提供了一种简单、安全、有效的方法。

**关键词:** 基因打靶, 启动子捕获策略, Prion 病, 牛胎儿成纤维细胞, *Prnp*

## Targeting *Prnp* in Bovine Fibroblasts by Promoter-trap Strategy

Caihong Zhu<sup>1</sup>, Guohua Yu<sup>2,3</sup>, Bei Li<sup>1</sup>, Yuanyuan Xu<sup>2</sup>, Huiqing Yu<sup>2</sup>, Jianquan Chen<sup>2</sup>, Min Qian<sup>3</sup>, and Guoxiang Cheng<sup>1,2</sup>

1 School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China

2 Shanghai Transgenic Research Center, Shanghai 201210, China

3 School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China

**Abstract:** Promoter-trap strategy for enriching targeted colonies has been usually used to elevate the gene targeting efficiency in somatic cells. Knocking out *Prnp* in animals by gene targeting can render them resistant to Prion diseases. We constructed a bovine *Prnp* promoter-less targeting vector BoPrneo, then transfected the linearized vector into the bovine fetal fibroblasts BFF through electroporation. After selecting in cell culture medium with 250 μg/mL G418, we obtained 99 drug-resistant cell colonies, 4 of them were positive for targeted events after PCR screening, and the targeted colonies were further confirmed by sequencing and Southern blotting. This suggests that one allele of *Prnp* has been successfully knocked out in bovine fetal fibroblasts. This research supplies a simple, safe and effective method to targeting bovine *Prnp*.

**Keywords:** gene targeting, promoter-trap strategy, Prion diseases, bovine fetal fibroblasts, *Prnp*

**Received:** April 16, 2008; **Accepted:** July 1, 2008

**Supported by:** Shanghai Rising-star Program (No. 07QB14022) and China Postdoctoral Science Foundation (No. 20060400174).

**Corresponding author:** Guoxiang Cheng. Tel: +86-21-58951015-200; Fax: +86-21-58951012; E-mail: chenggx@cngenen.com

上海市青年科技启明星计划项目(No. 07QB14022)和国家博士后科学基金(No. 20060400174)资助。

相对于小鼠 ES 细胞基因打靶, 体细胞基因打靶的效率要低 2 个数量级<sup>[1]</sup>, 因此常需要采取一定的策略对中靶细胞进行富集。目前主要的富集策略有启动子捕获、Poly-A 捕获、正负筛选策略(Positive-negative selection, PNS)等<sup>[2]</sup>。启动子捕获策略, 即在打靶载体上下游同源臂之间插入启动子缺陷的药物抗性基因, 细胞克隆的存活必须依赖于抗性基因的条件性表达, 当打靶载体与靶基因序列发生同源重组时, 利用靶基因的内源性启动子, 抗性基因才会被转录、表达, 细胞才能存活, 从而达到对阳性细胞克隆进行富集的目的。

Prion 病, 是一类传染性的累及人和动物的神经退行性脑病<sup>[3]</sup>, 大量研究表明, 该病的病原体是 PrP<sup>Sc</sup>——一种内源性膜锚定蛋白 PrP<sup>C</sup> 的异构体, 其发病过程中的主要事件就是 PrP<sup>Sc</sup> 诱导的 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 的转化<sup>[4]</sup>。因此, 科学家推断 PrP<sup>C</sup> 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。通过小鼠 ES 细胞基因打靶, 敲除编码小鼠 PrP<sup>C</sup> 的基因 *Prnp*, 实验结果证实了以上推断<sup>[5, 6]</sup>。而对 Prion 病的自然宿主如羊、牛等, 通过体细胞基因打靶敲除 *Prnp*, 也应能使其具有抵抗 Prion 病的能力。2004 年, 日本的 Kuroiwa 等<sup>[7]</sup>通过 PNS 策略, 成功敲除了牛的 *Prnp*, 同年, Hirata 等<sup>[8]</sup>也通过腺相关病毒载体 (adeno-associated virus, AAV), 敲除了牛胎儿成纤维细胞的 *Prnp*。2006 年, Yu 等<sup>[9]</sup>则通过启动子捕获策略, 成功敲除了山羊的 *Prnp*, 与 PNS 策略和 AAV 载体相比, 启动子捕获策略具有方法简单、效率较高、操作安全等优点。

本研究便是采用启动子捕获策略, 构建了启动子缺陷型打靶载体 BoPrPneo, 再通过电穿孔转染牛胎儿成纤维细胞, 最终获得了 4 个中靶细胞, 成功敲除了牛胎儿成纤维细胞中的一条 *Prnp* 等位基因。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

妊娠 40 d 龄的牛胎儿由上海转基因研究中心实验牧场提供; 质粒 pBSK 购自 Stratagene 公司。

LA *Taq* 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、T4 DNA 连接酶等购自 NEB 公司。

细胞培养相关试剂, 包括 Glasgow 基本培养基

(GMEM)、胎牛血清、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、非必需氨基酸、青霉素、链霉素、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购自 GIBCO 公司, 人白血病抑制因子(hLIF)购自 CHEMICON 公司, G418 购自 Invitrogen 公司, 其他试剂购自 GIBCO、Sigma 等公司。

引物合成及基因测序工作均由上海英骏生物技术有限公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 原代牛胎儿成纤维细胞的分离培养

将怀孕 40 d 的牛胎儿无菌取出, 去除脑部和内脏, PBS 洗数次, 用剪刀将其剪碎, 然后用含 0.25% 胰酶-EDTA 在 37°C 水浴中消化约 15 min。将消化后的单个细胞悬液离心, 去上清后, 将细胞团块重悬在含有 2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺, 1 mmol/L 的丙酮酸钠, 1×非必需氨基酸, 2 ng/mL bFGF, 1000 u/mL hLIF, 10%胎牛血清, 100 u/mL 的青霉素, 100 μg/mL 的链霉素的 GMEM 中, 最后将细胞悬液移入 25 cm 培养瓶中, 于 37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱内培养, 每 3~4 d 换液, 在细胞密度达到 80%左右时将其冻存, 并命名为 BFF。

#### 1.2.2 打靶载体 BoPrPneo 的构建

将 *neo* 基因的表达框架直接插入到 *Prnp* 的翻译起始位点 ATG 后, 构建启动子缺陷型打靶载体。根据 GenBank 中公布的牛 *Prnp* 序列(序列号: AJ298878)设计引物。用 PrPLf 和 PrPLr 扩增打靶载体 5'同源臂, PrPLf: 5'-ATC CCC GCG GGT CGA CCC TTA TGT CCT ATT GCC TGT ATC TC-3'; PrPLr: 5'-GCA ATC CAT CTT GTT CAA TCA TGA TGA CTT ATC TGC AAA ATA AAG-3'。其中, 在 PrPLf 的 5'端引入 *Sal* I 和 *Sac* II 用于载体线性化和连接; PrPLr 的 5'端引入 22 bp 与 *neo* 基因互补的序列用于 PCR 方法连接两个片段。用 neof 和 neor 为引物, 扩增 pcDNA3 质粒上的 *neo* 基因表达框架, neof: 5'-CTT TAT TTT GCA GAT AAG TCA TCA TGA TTG AAC AAG ATG GAT TGC-3'; neor: 5'-GAA TGC GGC CGA GTA CTC AGA CAT GAT AAG ATA CAT TGA TGA G-3'。其中在 neof 的 5'端引入 22 bp 与 5'同源臂互补的序列用于 PCR 方法连接, 在 neor 的 5'端引入 *Not* I 和 *Sca* I 用于连接。用 PrPRf 和 PrPRr 扩增打靶载体 3'同源臂, PrPRf: 5'-ATA AGA ATG CGG CCG CAC TAG TGA GCT CTT TGG CAG TGA CTA TGA GGA CC-3'; PrPRr: 5'-ATC CGC TCG AGG TCG ACT

TCT TGG GAG ATT ATG ATT GGC-3'。其中, PrPRf 的 5'引入 *Not* I 和 *Spe* I, *Sac* I 用于连接, 在 PrPRr 的 5'端引入 *Xho* I 和 *Sal* I 用于连接和载体线性化。最终构建成的载体可用 *Sal* I 酶切线性化, 获得去除了克隆质粒 pBSK 原核序列的片段用于打靶。

### 1.2.3 打靶载体转染牛胎儿成纤维细胞

将约  $1 \times 10^7$  个处于对数生长期的牛胎儿成纤维细胞 BFF 与  $10 \mu\text{g}$  经 *Sal* I 线性化的 BoPrPneo 质粒混合, 吹匀后转移至  $0.4 \text{ cm}$  电转杯, 在  $220 \text{ V}$ ,  $950 \mu\text{F}$  条件下电穿孔。将转染过的细胞培养于不含筛选药物的 GMEM 培养液中,  $48 \text{ h}$  后, 换含有  $250 \mu\text{g/mL}$  G418 的培养液进行筛选。每  $2 \text{ d} \sim 3 \text{ d}$  更换培养液, 大约  $7 \text{ d} \sim 8 \text{ d}$  后, 可见有细胞克隆形成。将边缘清晰、生长旺盛的细胞克隆用克隆环挑取后转移至 48 孔细胞培养板中。待细胞克隆长至  $80\% \sim 90\%$  密度时, 消化、分离出一半的细胞用裂解液消化, 用于 PCR 鉴定, 其余细胞继续培养, 隔日冻存。

### 1.2.4 细胞克隆的 PCR 及测序鉴定

将待鉴定细胞用  $40 \mu\text{L}$  裂解液 [ $40 \text{ mmol/L}$  Tris/HCl (pH 8.0),  $0.9\%$  Triton X-100,  $0.9\%$  Nonidet P-40,  $0.4 \text{ mg/mL}$  proteinase K] 于  $65^\circ\text{C}$  裂解  $15 \text{ min}$ , 再于  $95^\circ\text{C}$  处理  $10 \text{ min}$  以灭活蛋白酶 K, 得到可用于 PCR 的细胞基因组 DNA。根据 GenBank 中公布的牛 *Prnp* 序列(序列号: AJ298878)设计 3 对鉴定引物: P1/P2, P1/P4, P3/P5。P1: 5'-CAG CCA GGC ATT CAG AAA CC-3'; P2: 5'-CCA CCA TGA TAT TCG GCA AG-3'; P3: 5'-CGC CTT CTT GAC GAG TTC TTC-3'; P4: 5'-CAG TTT CGG TGA AGT TCT CCC-3'; P5: 5'-CAA GGG AAG CCC AAA GTT ACC A-3'。其中, P1 位于 5'同源臂外侧, P2、P3 位于 *neo* 表达框架内, P4 位于 3'同源臂内侧, P5 位于 3'同源臂外侧。将 P1/P2, P3/P5 扩增出的 PCR 产物 TA 克隆后, 送测序, 以进一步验证同源重组的发生。

### 1.2.5 中靶细胞克隆的 Southern blotting 鉴定

取约  $10 \mu\text{g}$  中靶细胞克隆的基因组 DNA, 经 *Sac* I 酶切后在浓度为  $0.8\%$  的琼脂糖凝胶中进行电泳, 再通过毛细管法将 DNA 转移到尼龙膜上, 紫外交联法固定。以 5'同源臂作为探针,  $^{32}\text{P}$  同位素标记后与结合有基因组 DNA 的尼龙膜  $42^\circ\text{C}$  杂交过夜, 洗膜后于  $-70^\circ\text{C}$  用 X 光片曝光  $72 \text{ h}$ , 最终获得放射自显影图像。

## 2 结果

### 2.1 启动子缺陷型打靶载体的构建

牛 *Prnp* 是单拷贝基因, 含有跨越  $20 \text{ kb}$  的 3 个外显子, 其中  $794 \text{ bp}$  的编码区(Coding sequence, CDS)位于第 3 个外显子中。打靶载体 BoPrPneo 由  $2.0 \text{ kb}$  的 5'同源臂和  $4.5 \text{ kb}$  的 3'同源臂, 以及位于其中的  $1.1 \text{ kb}$  的 *neo* 基因表达框架构成(图 1)。如果打靶载体与牛 *Prnp* 发生同源重组, 则 *Prnp* 中的  $453 \text{ bp}$  的 CDS 被 *neo* 基因表达框架取代, 从而破坏了 *Prnp* 的表达, 达到敲除 *Prnp* 的目的(图 2)。

### 2.2 药物抗性细胞克隆的获得及 PCR、测序鉴定

将经 *Sal* I 线性化的打靶载体 BoPrPneo 转染 BFF 成纤维细胞, 经过 G418 药物筛选后共获得 99 个抗性细胞克隆。裂解液裂解培养于 48 孔板的细胞, 得到细胞基因组 DNA 用作 PCR 模板。用 P1/P4 进行 PCR 鉴定, 中靶细胞克隆会产生 2 条带: 一条来自野生型的 *Prnp* 等位基因的  $3.0 \text{ kb}$  片段, 另一条来自于中靶的 *Prnp* 等位基因的  $3.7 \text{ kb}$  片段(图 3a); 用 P1/P2 进行 PCR 鉴定, 中靶细胞克隆会产生一条  $2.9 \text{ kb}$  片段, 未中靶或野生型无条带(图 3b); 用 P3/P5 进行 PCR 鉴定, 中靶细胞克隆会产生一条  $5.8 \text{ kb}$  片段, 未中靶或野生型无条带(图 3c)。3 组引物的 PCR 鉴定结果显示, 在获得的 99 个细胞克隆中, 4 个为中靶细胞, 打靶效率为  $4.08\%$ 。

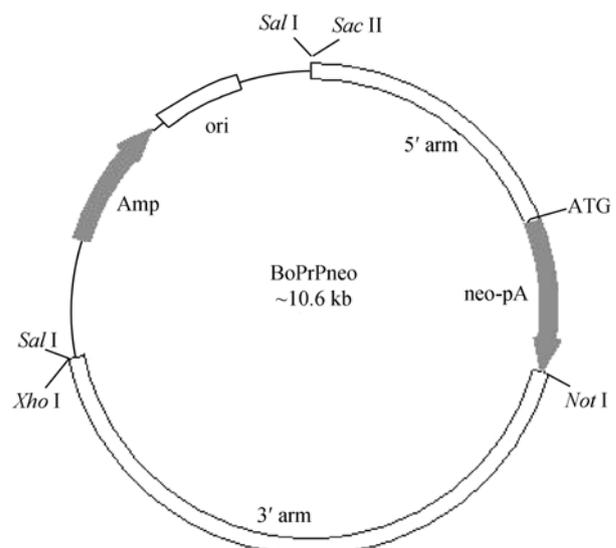


图 1 打靶载体 BoPrPneo 构建图  
Fig. 1 Structure of targeting vector BoPrPneo

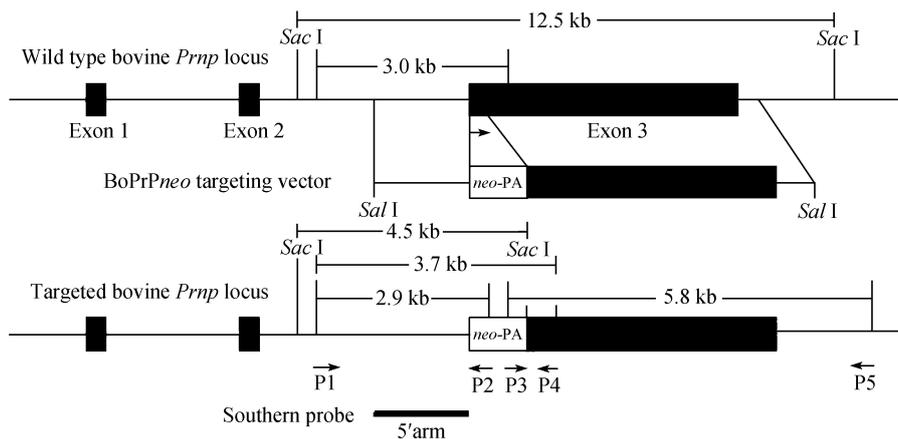


图 2 牛 *Prnp* 基因打靶示意图  
 Fig. 2 Diagram of gene targeting in bovine *Prnp*

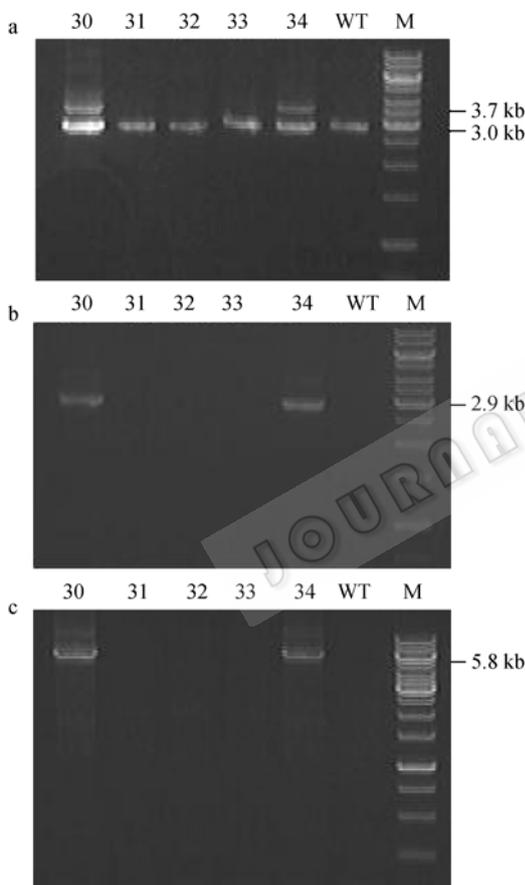


图 3 部分抗性细胞克隆 PCR 鉴定图  
 Fig. 3 PCR analysis of drug-resistant cell colonies  
 a: PCR products of P1/P4; b: PCR products of P1/P2; c: PCR products of P3/P5. No. 30 and No. 34 are positive cell colonies.  
 M: 1kb DNA ladder

为进一步验证 PCR 鉴定为阳性的细胞克隆确实发生了同源重组, 将 P1/P2、P3/P5 PCR 产物 TA 克隆后送测序, 结果表明, 打靶载体 BoPrPneo 与牛 *Prnp* 位点重组后的接头处序列与预期相符, 进一步证明

了同源重组事件的发生。

### 2.3 中靶细胞克隆的 Southern blotting 鉴定

为了更进一步证明中靶细胞确实发生了同源重组, 我们以 PCR 鉴定为阳性的 30 号细胞克隆为例, 用 Southern blotting 进行验证。用 *Sac* I 分别酶切未转染的 BFF 细胞和 30 号中靶细胞的基因组 DNA, 以 5'同源臂作为探针进行杂交。由于原先在打靶载体中引入了一个 *Sac* I 位点, 若发生了同源重组, 将会出现 2 条条带: 一条带为野生型 *Prnp* 等位基因的 12.5 kb 的片段, 另一条带为中靶的 *Prnp* 等位基因的 4.5 kb 的片段, 而未转染的 BFF 细胞只有一条的 12.5 kb 的野生型条带(图 4)。Southern blotting 结果进一步证明了 PCR 鉴定为阳性的 30 号细胞克隆为正确的同源重组克隆。

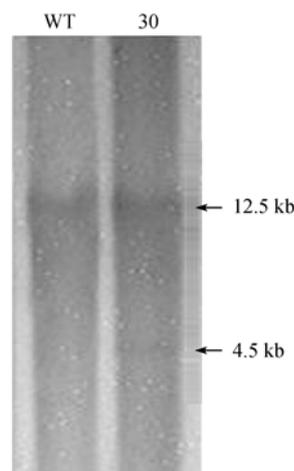


图 4 30 号中靶细胞克隆的 Southern blotting 鉴定图  
 Fig. 4 Southern blotting analysis of No. 30 positive cell colony

WT: untransfected wild type BFF; 30: No. 30 PCR positive cell colony

### 3 讨论

体细胞基因打靶的各种富集策略中, PNS 在一定程度上减少了随机整合的发生, 提高了同源重组效率, 但是当负筛选基因被破坏或表达产物活性不高时, 随机整合的细胞也能存活。研究发现, 相对于简单的正筛选, PNS 在体细胞基因打靶中的富集效率只有 2~5 倍<sup>[10]</sup>, 不能充分满足体细胞打靶研究。启动子捕获策略则是利用靶基因的启动子对药物抗性基因进行调控, 当打靶载体与靶基因发生同源重组时, 抗性基因才会表达, 细胞才能存活。而发生随机整合时, 整合到基因组中的药物抗性基因由于没有启动子调控而不能表达, 细胞仍旧对筛选药物敏感而不能存活。相对于简单的正筛选, 启动子捕获策略的富集效率可达 100~500 倍<sup>[10]</sup>, 而当靶基因启动子调控的药物抗性基因表达水平和药物筛选压力得到优化后, 其富集效率可高达 1000~5000 倍<sup>[10]</sup>。因此, 启动子捕获是体细胞基因打靶研究中一种十分有效的富集策略<sup>[11]</sup>。值得注意的是, 启动子捕获策略的应用依赖于靶基因的表达, 因此, 它只能应用于转录活性位点的打靶, 如成纤维细胞中的 *Prnp*、*GGTA1* 等, 而对沉默基因位点如 *IGHM*、 $\beta$ -casein 等则不适用。而且, 由于不同靶基因启动子活性不同, 由其调控的抗性基因表达水平有异, 药物的筛选压力也需与之相匹配。

在设计打靶载体时, 我们选择删除第 3 外显子中部分序列以破坏牛 *Prnp* 的表达框, 达到敲除 *Prnp* 的目的, 保留了第 3 外显子的剪切受体位点, 避免了删除此剪切受体位点后, 位于 *Prnp* 下游 16 kb 处 *Prnd* 基因的异常表达导致的动物共济失调及 Purkinje 细胞的死亡<sup>[12]</sup>。

通过采用启动子捕获策略成功敲除了牛胎儿成纤维细胞中的 *Prnp*, 与其他实验室采用的 PNS<sup>[7]</sup>、AAV 介导<sup>[8]</sup>等策略敲除牛 *Prnp* 相比, 启动子捕获策略获得了较高的打靶效率, 而且其操作简单易行, 没有携带病毒的风险。因此, 启动子捕获为牛 *Prnp* 等活性位点的基因打靶提供了另一种简单、安全、有效的方法。

鉴定为阳性的细胞中 *Prnp* 的一条等位基因被成功敲除, 此细胞可用作供核细胞, 通过核移植技

术制备 *Prnp* 单基因敲除的克隆牛, 再通过自然繁育或第 2 轮基因打靶<sup>[13]</sup>敲除 *Prnp* 另一条等位基因, 最终获得 PrP<sup>c</sup> 缺失的牛。缺失了 PrP<sup>c</sup> 的转基因牛不会携带疯牛病病原体, 可进一步用于乳腺生物反应器等应用研究, 也可作为 Prion 病发病机理、治疗及 PrP<sup>c</sup> 生理功能等基础研究的大动物模型。

### REFERENCES

- [1] Thomson AJ, Marques MM, McWhir J. Gene targeting in livestock. *Reprod Suppl*, 2003, **61**: 495-508.
- [2] Sorrell DA, Kolb AF. Targeted modification of mammalian genomes. *Biotechnol Adv*, 2005, **23**(7-8): 431-469.
- [3] Zhu CH, Yu GH, Li B, et al. Progress in mammal Prion disease research. *Chin J Zoon*, 2007, **23**(11): 1156-1159. 朱采红, 俞国华, 李蓓, 等. 哺乳动物 Prion 病研究新进展. 中国人兽共患病学报, 2007, **23**(11): 1156-1159.
- [4] Aguzzi A, Heikenwalder M. Pathogenesis of prion disease: current status and future outlook. *Nat Rev Microbiol*, 2006, **4**(10): 765-775.
- [5] Bueler H, Fischer M, Lang Y, et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, 1992, **356**(6370): 577-582.
- [6] Mallucci GR, White MD, Farmer M, et al. Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice. *Neuron*, 2007, **53**(3): 325-335.
- [7] Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H, et al. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. *Nat Genet*, 2004, **36**(7): 775-780.
- [8] Hirata RK, Xu C, Dong R, et al. Efficient PRNP gene targeting in bovine fibroblasts by adeno-associated virus vectors. *Cloning Stem Cells*, 2004, **6**(1): 31-36.
- [9] 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.
- [10] Sedivy JM, Dutriaux A. Gene targeting and somatic cell genetics—a rebirth or a coming of age? *Trends Genet*, 1999, **15**(3): 88-90.
- [11] Wang B, Zhou JF. Specific genetic modifications of domestic animals by gene targeting and animal cloning. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, **1**: 103.
- [12] Moore RC, Lee IY, Silverman GL, et al. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol*, 1999, **292**(4): 797-817.
- [13] Richt JA, Kasinathan P, Hamir AN, et al. Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol*, 2007, **25**(1): 132-138.