

## 无标记转 *Fat-1* 基因真核表达载体的构建及转基因绵羊细胞系的建立

阿力玛\*, 朱和平\*, 王瑞瑶, 闫涛, 苏小虎, 李璐, 王丙萍, 那顺温都乐, 齐贵春, 周欢敏

内蒙古农业大学 生命科学学院 内蒙古自治区生物制造重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018

阿力玛, 朱和平, 王瑞瑶, 等. 无标记转 *Fat-1* 基因真核表达载体的构建及转基因绵羊细胞系的建立. 生物工程学报, 2016, 32(2): 212–221.

A LM, Zhu HP, Wang RY, et al. Construction of *Fat-1* eukaryotic expression vector of excision markers and the establishment of transgenic sheep cell lines. Chin J Biotech, 2016, 32(2): 212–221.

**摘要:** 为了建立无筛选标记基因的转 *Fat-1* 基因绵羊细胞系, 本研究将 PCR 克隆得到的 *Fat-1* 基因, 合成的 attB、Loxp 序列并克隆入 pN1-EGFP 框架载体, 得到可删除筛选标记基因的 pEGFP-N1-*Fat-1* 真核表达载体。体外转录合成 phiC31 整合酶 mRNA 并与线性化的 pEGFP-N1-*Fat-1* 载体共转染绵羊胎儿皮肤成纤维细胞, G418 筛选得到表达绿色荧光的单克隆, 再利用 pET-28a-His-NLS-TAT-Cre 质粒诱导 Cre 重组蛋白表达, 将纯化后的 Cre 穿膜肽转导表达绿色荧光的单克隆细胞, 将荧光淬灭的细胞系扩繁, 提取基因组 DNA, 进行 PCR 及测序鉴定, 得到无标记转 *Fat-1* 基因绵羊胎儿皮肤成纤维细胞系, 为生产无筛选标记基因的转基因绵羊奠定基础。

**关键词:** *Fat-1* 基因, 真核表达载体, 筛选标记, phiC31 整合酶

## Construction of *Fat-1* eukaryotic expression vector of excision markers and the establishment of transgenic sheep cell lines

Lima A\*, Heping Zhu\*, Ruiyao Wang, Tao Yan, Xiaohu Su, Lu Li, Bingping Wang, Shunwendoule Na, Guichun Qi, and Huanmin Zhou

Key Laboratory of Biological Manufacturing of Inner Mongolia Autonomous Region College of Life Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

**Abstract:** In order to establish marker-free transgenic cell lines, we cloned *Fat-1* gene, attB and Loxp sequences by PCR.

**Received:** March 27, 2015; **Accepted:** November 19, 2015

**Supported by:** Biological High-tech Project of Inner Mongolia (No. 20030301).

**Corresponding author:** Huanmin Zhou. E-mail: huanminzhou@126.com

\*These authors contributed equally to this study.

内蒙古生物高科技项目 (No. 20030301) 资助。

Then we inserted these sequences to pN1-EGFP vector and got pEGFP-N1-Fat-1 expression vector. PhiC31 integrase mRNA which was generated by *in vitro* transcription and a pEGFP-N1-Fat-1 expression vector co-electroporated into sheep fetal fibroblasts, and then we got transgenic cell lines expressing green fluorescence. Prokaryotic expression and purification of Cre recombinant protein was performed. Cre recombinant protein was transduced into stably-transfected cell colonies. We identified cell colonies by sequencing and established marker-free transgenic cell lines and eventually established marker-free transgenic cell lines which were building more safely basic for producing *Fat-1* transgenic animals.

**Keywords:** *Fat-1* gene, eukaryotic expression vector, marker gene, phiC31 integrase

1997年 Spychalla 等首次从秀丽隐杆线虫的基因组中获得 *Fat-1* 基因,并得到了 *Fat-1* 基因的 cDNA 序列,其翻译产物是  $\omega$ -3 多聚不饱和脂肪酸脱氢酶 ( $\omega$ -3 desaturase),由 402 个氨基酸组成<sup>[1]</sup>。 $\omega$ -3 多聚不饱和脂肪酸脱氢酶以  $\omega$ -6 多聚不饱和脂肪酸为优先底物,使其脱氢并转化为  $\omega$ -3 多聚不饱和脂肪酸 ( $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids)<sup>[2]</sup>。 $\omega$ -3 多聚不饱和脂肪酸为人体必需脂肪酸,具有重要的生理功能。 $\omega$ -3 和  $\omega$ -6 PUFAS 与人体健康密切相关,有研究表明  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 PUFAS 的比例对于维持细胞正常生长和稳态起着关键的作用。大量的流行病学资料显示,饮食中  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 PUFAS 比例过高,会导致机体功能障碍,引发心脑血管疾病、癌症、精神性疾病等一系列疾病的发生。但是哺乳动物自身不能合成  $\omega$ -3 PUFAS,只能从深海鱼类、植物油等少数种类的外源食物中获得,随着生活水平的提高,如何补充  $\omega$ -3 PUFAs 已经成为人类研究的热点。转基因技术的日趋成熟使利用 *Fat-1* 转基因动物生产富含  $\omega$ -3 PUFAs 的农副产品,如肉制品、蛋和奶等成为可能<sup>[3]</sup>,这对于提高人类身体素质有着积极的影响,也必将带来可观的经济效益。为此,在动物中转入 *Fat-1* 基因使其在动物体内表达具有重要的研究价值<sup>[4]</sup>。

转基因技术是研究基因功能最为常用和有效的方法之一<sup>[5]</sup>,转基因技术介导外源 DNA 整

合入宿主染色体基因组上以实现基因敲除 (Knock out)、基因敲入 (Knock in) 等<sup>[6]</sup>。Cre-Loxp 是目前研究最为深入的位点特异性重组系统。Cre-Loxp 系统介导的重组广泛应用于哺乳动物的遗传修饰,Cre 重组酶能够专一性地识别由 34 个碱基对的特异 Loxp 序列,使 2 个 loxP 之间的 DNA 序列发生重组<sup>[7]</sup>。如果 2 个 Loxp 位点位于一条 DNA 链上,且方向相同,Cre 重组酶能有效切除 2 个 Loxp 位点间的序列<sup>[8]</sup>。整合的 DNA 多数为单拷贝外源基因,而且目的基因为定点整合。Cre-Loxp 系统包括 3 种重组结果,这是由于 Loxp 位点的排列方式不同造成的:1) 2 个 Loxp 位点在同一条 DNA 链上,方向相反,Cre 重组酶会使 2 个 Loxp 位点间的基因序列发生倒位;2) 2 个 Loxp 位点分别位于不同的 DNA 链或染色体上,Cre 重组酶会使两条链间发生交换或者使染色体发生易位;3) 如果 2 个 Loxp 位点位于同一条 DNA 链上,方向相同,Cre 重组酶就会有效切除 2 个 Loxp 位点间的序列<sup>[9]</sup>。近年来,Cre-Loxp 系统被应用于小鼠、果蝇、斑马鱼、拟南芥、水稻等多种高等真核生物的遗传改造,实现外源基因在宿主染色体的定点整合或敲除、选择标记基因的删除<sup>[10]</sup>。

PhiC31 整合酶来源于链霉菌噬菌体,是位点特异性重组酶丝氨酸家族的一员,可催化 attB (细菌附着位点) 和 attP (噬菌体附着位点) 之间

的特异重组<sup>[11]</sup>。而且该反应是单向性的,重组之后生成 attL 和 attR 杂合位点,不能再成为 phiC31 整合酶的底物。链霉菌噬菌体 phiC31 整合酶能介导含 attB 位点的外源基因定点整合入多种真核生物基因组的假 attP 位点,可以维持外源基因的正常结构及高效表达<sup>[12]</sup>。但是有研究表明如果将 phiC31 整合酶以质粒的形式与含有 attB 位点的质粒进行共转染会导致宿主细胞染色体异常,可能会对宿主细胞基因组造成损伤。因此,本实验中我们利用 phiC31 整合酶 mRNA,一种易于降解的 phiC31 整合酶形式介导整合事件的发生。本研究立足于  $\omega$ -3 PUFAS 在疾病预防与治疗 and 饮食平衡中的重大价值,通过基因工程的手段使 *Fat-1* 基因转入绵羊基因组中,力求生产出自身可以使  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 PUFAS 的比值达到平衡的转基因绵羊。另外,利用 phiC31 整合酶 mRNA 使目的基因定点整合入绵羊基因组,而最重要的是诱导表达 Cre 穿膜肽使设计在 2 个 Loxp 位点间的 Kan<sup>+</sup> 与 EGFP 标记基因删除,提高转基因绵羊的生物安全性,为生产无筛选标记的转基因克隆绵羊提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pCAGGS 载体、pN1-EGFP 载体与绵羊胎儿皮肤成纤维细胞由内蒙古农业大学动物生物技术重点实验室保存。pET-28a-His-NLS-TAT-Cre 质粒由西北农林科技大学王凌云老师惠赠,感受态细胞 BL21 (DE3) 购自北京全式金公司。

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株、小量质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; pMD19-T 载体、限制性内切酶 *Sal* I、*Bam*H I、*Xho* I、*Not* I、T4 DNA 连接酶、LA

*Taq* DNA 聚合酶等均购自大连 TaKaRa 公司。引物合成、*attB* 基因合成、基因测序均由上海生物工程公司完成。

胎牛血清、G418、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 等均购自 Sigma 公司; 抗生素、酵母膏、蛋白胨和琼脂购自 BBI 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 EGFP、Neo-HSV-TK-PolyA 序列克隆

根据 pN1-EGFP 质粒上的 EGFP 序列设计引物,并在其上游添加 Loxp 序列及 *Age* I 酶切位点,在其下游引物添加 *Not* I 酶切位点。引物序列见表 1。

反应体系:模板 pEGFP-N1 0.2  $\mu$ L (837 ng/ $\mu$ L), EGFP 上游引物 2.5  $\mu$ L, EGFP 下游引物 2.5  $\mu$ L, 10 $\times$ 缓冲液 5  $\mu$ L, dNTPs 3  $\mu$ L, GXL DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L, 去离子水补至 50  $\mu$ L; 反应条件:94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 45 s, 59  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 5 min。

根据 pN1-EGFP 质粒上的 Neo-HSV-TK-PolyA 序列设计引物,引物序列见表 2。

表 1 EGFP 引物序列

Table 1 The primer sequence of EGFP

Primer name	Primer sequence (5'-3')
PF	AAACCGGTATAACTTCGTATAGCAT ACATTATACGAAGTTATGGTGAGC AAGGGCGAGGAGC
PR	GGGCGGCCGCTTTACTTGTACAGC TCGTCCAT

表 2 Neo-HSV-TK-PolyA 引物序列

Table 2 The primer sequence of Neo-HSV-TK-PolyA

Primer name	Primer sequence (5'-3')
PF	AAAGGCCTATGATTGAACAAGATG GATTGC
PR	AAAGGGCCTATAACTTCGTATAAT GTATGCTATACGAAGTTATGCCGCC CCGACGTTGGCTGCG

添加 *Loxp* 序列及 *EcoO109 I* 酶切位点。反应体系与条件同 1.2.1。经过胶回收, 酶切连接, 转化得到的载体命名为 pN1-EGFP-K。

### 1.2.2 PhiC31 整合酶识别的 attB 序列的克隆

attB 序列送由上海生物工程公司合成, attB 序列连接在 pUC57 载体上, 并在其两端添加 *Ase I* 酶切位点。使用 *Ase I* 酶切 pN1-EGFP-K 及合成的 attB 序列, pN1-EGFP-K 质粒酶切体系: 10×Fast Green 缓冲液 (5 μL), pN1-EGFP-K (4 μL), *Ase I* 酶 (1 μL), 去离子水补至 50 μL。经过酶切、连接与转化, 载体命名为 pN1-EGFP-K-attB。

### 1.2.3 EGFP 启动子 CMV 序列的克隆

根据 pN1-EGFP 质粒上的 CMV 序列设计引物扩增 CMV 片段, 并在其引物上下游分别添加 *BamH I* 和 *Age I* 酶切位点, 引物序列见表 3。

PCR 反应体系: 模板 pN1-EGFP 0.2 μL (837 ng/μL), CMV 上游引物 2.5 μL, CMV 下游引物 2.5 μL, 10×缓冲液 5 μL, dNTPs 3 μL, GXL DNA 聚合酶 0.5 μL, 去离子水补至 50 μL; 反应条件: 94 °C (5 min), 94 °C (45 s), 59 °C (45 s), 72 °C (1 min), 35 个循环, 72 °C (5 min)。经过胶回收, 酶切连接, 转化得到载体 pN1-EGFP-K-attB-CMV。

### 1.2.4 *Fat-1* 基因克隆

根据 GenBank 上的 *Fat-1* 基因序列设计引物, 在其上游添加 *Hind III* 酶切位点, 下游添加 *Pst I* 酶切位点。引物序列见表 4。

表 3 CMV 引物序列

Table 3 The primer sequence of CMV

Primer name	Primer sequence (5'-3')
PF	GCCGGCGGGATCCTAGTTATTAATAG TAATC
PR	CCAAACCGGTGATCTGACGGTTCAC TAAAC

表 4 *Fat-1* 引物序列

Table 4 The primer sequence of *Fat-1*

Primer name	Primer sequence (5'-3')
PF	CAAAGCTTATGGTGGCCCATAGCAGTGA
PR	AACTGCAGCAGGTCGAGGGATCTCCATA

反应条件: 98 °C (5 min); 98 °C (1 min), 61 °C (3 min), 72 °C (3 min), 35 个循环, 72 °C (10 min), 4 °C (10 min)。将 PCR 产物及 pN1-EGFP-K-attB-CMV 用 *Hind III* 和 *Pst I* 双酶切后回收目的片段并连接转化, 菌落 PCR 及酶切鉴定正确的菌株进行测序分析。重组载体命名为 pEGFP-N1-Fat-1 (图 1)。

### 1.2.5 PhiC31 整合酶 mRNA 体外转录

根据上海生工优化合成的 phiC31 整合酶序列设计引物, 并在其上游添加 T7 启动子及 *BamH I* 酶切位点, 在其下游引物添加 *Not I* 酶切位点。经过 PCR 扩增, 胶回收, 酶切并与 pN1-EGFP 载体连接, 得到载体 pN1-EGFP-phiC31。然后利用纯化的线性 pN1-EGFP-phiC31 进行体外

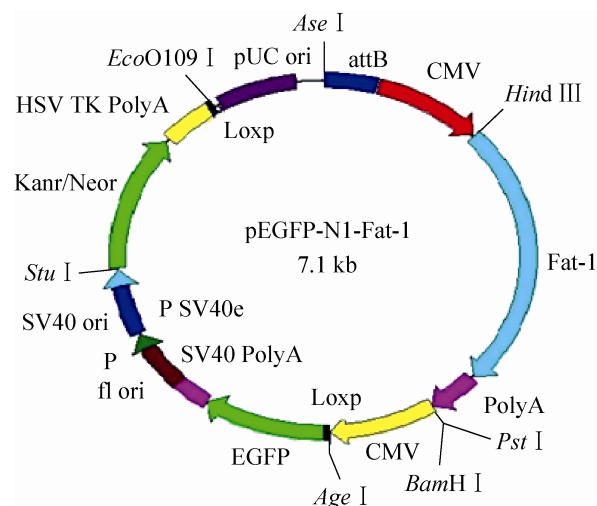


图 1 pEGFP-N1-Fat-1 质粒图谱

Fig. 1 The frame of pEGFP-N1-Fat-1 plasmid.

转录, 体外转录体系: 5×转录反应缓冲液 4 μL, ATP/CTP/GTP/UTP mix 8 μL, 线性化的 pN1-EGFP-phiC31 1 μL, 转录酶混合物 2 μL, 无酶水 (DEPC) 5 μL, 充分混匀, 37 °C 保温 2 h 后对体外转录产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并纯化, 测定其浓度, -80 °C 保存备用。

### 1.2.6 PhiC31 整合酶 mRNA 与 pEGFP-N1-Fat-1 共转染

当传代 2 次的胎儿皮肤成纤维细胞生长至 70%–80% 时, 用 phiC31 整合酶 mRNA 与 pEGFP-N1-Fat-1 共转染。将 5 μg pEGFP-N1-Fat-1 质粒及 1 μg phiC31 整合酶 mRNA 与细胞混合后加入到电击杯中, 使用 BTX ECM2001 电穿孔仪 150 V 2 ms 电击一次, 室温放置 10 min, 再将细胞转移到 24 孔板中加入培养液混匀放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 次日观察细胞生长状况, 如果死细胞过多需换液, 48 h 后观察细胞表达绿色荧光的情况。阳性对照为转染的质粒 pN1-EGFP。

### 1.2.7 转基因细胞的 DNA 水平上的鉴定

经过 400 μg/mL 的 G418 培养液筛选 12 d 左右直至长出的阳性细胞克隆, 挑取单克隆扩大培养, 此时加入的 G418 浓度减半。细胞扩增后传至 24 孔板中, 直到细胞传至 60 mm 培养皿中部分提取基因组 DNA 作 PCR 鉴定, 一部分冻存。

### 1.2.8 Cre 穿膜肽切除转基因细胞中的筛选标记

用转化有 pET-28a(+)-His-NLS-TAT-Cre 质粒的大肠杆菌感受态细胞 BL21 使用 IPTG 诱导 Cre 穿膜肽表达。将细胞解冻并传代 2 次, 与 100 μg/mL 的 His-NLS-TAT-Cre 重组蛋白共孵育 4 h, 蛋白转导后用 PBS 清洗 2 次, 继续培养 3–4 d 后消化起来, 将细胞稀释到很小的浓度, 在显微镜下用灭过菌的吸管随机吸取单个细胞加入

到 96 孔板的每一个孔中进行单细胞筛选, 待细胞生长密度可以达到传代标准时在荧光显微镜下观察, 找出无绿色荧光的单克隆做标记并扩大培养, 直至培养到卡式瓶中把细胞消化起来, 一部分提取基因组作鉴定, 一部分冻存。

## 2 结果与分析

### 2.1 EGFP、Neo-HSV-TK-PolyA 序列扩增结果

根据 EGFP 及 Neo-HSV-TK-PolyA 序列的引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定在 771 bp 及 1 277 bp 处有条带, 与目的片段大小相符 (图 2)。

pN1-EGFP-K 质粒分别经过 *Age* I、*Not* I 及 *Stu* I、*Eco*O109 I 双酶切, 电泳分析显示切出大小为 771 bp 和 1 277 bp 的 DNA 片段 (图 3)。

### 2.2 AttB 序列克隆结果

将 pN1-EGFP-K-CMV-attB 质粒进行 *Ase* I 酶切, 电泳检测到 3、9 号载体切出 300 bp 左右的条带, 与 attB 片段大小吻合 (图 4), 证明 attB 片段已经连接成功。

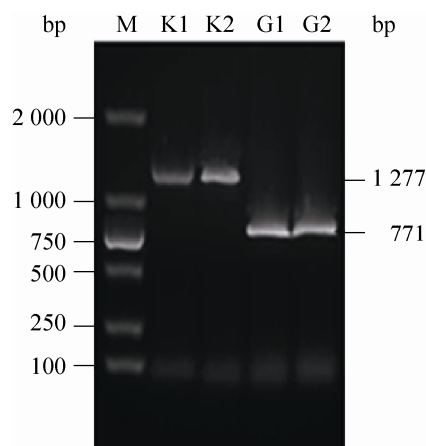


图 2 EGFP 及 Neo-HSV-TK-PolyA 的 PCR 扩增产物  
Fig. 2 PCR amplification products of EGFP and Neo-HSV-TK-PolyA.

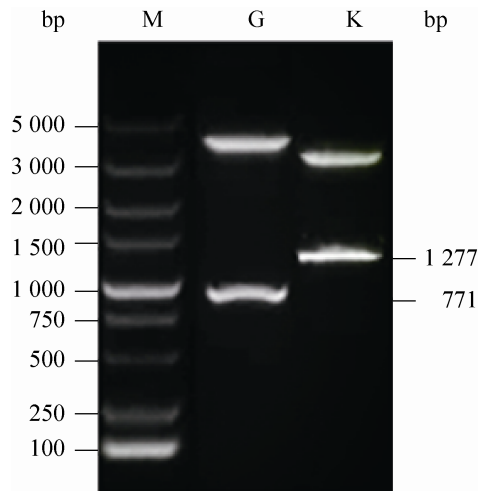


图3 pN1-EGFP-K 质粒双酶切凝胶电泳结果  
Fig. 3 Dual-restriction digestion of pN1-EGFP-K plasmid.

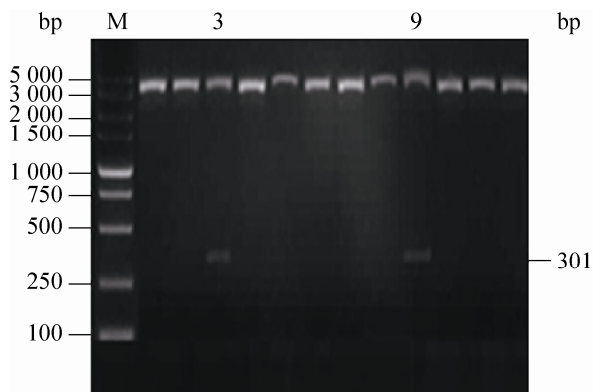


图4 pN1-EGFP-K-CMV-attB 酶切鉴定  
Fig. 4 pN1-EGFP-K-CMV-attB restriction digestion identification result.

## 2.3 EGFP 启动子 CMV 序列克隆结果

### 2.3.1 EGFP 启动子 CMV 序列扩增

以 pN1-EGFP 为模板所克隆的 CMV 片段，经琼脂糖电泳检测约 600 bp 的 DNA 片段，与目的片段大小相符（图 5）。

### 2.3.2 pN1-EGFP-K-attB-CMV 质粒酶切鉴定结果

pN1-EGFP-K-CMV 质粒经 *Bam*H I 和 *Age* I

双酶切，进行琼脂糖凝胶电泳，结果显示切出 612 bp 大小的目的条带，与预期结果相符（图 6）。

## 2.4 *Fat-1* 基因克隆结果

### 2.4.1 *Fat-1* 基因扩增结果

根据 GenBank 上的 *Fat-1* 基因序列，设计引物，PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳检测出大小约 1 800 bp 左右的目的片段，与目的基因大小吻合（图 7）。

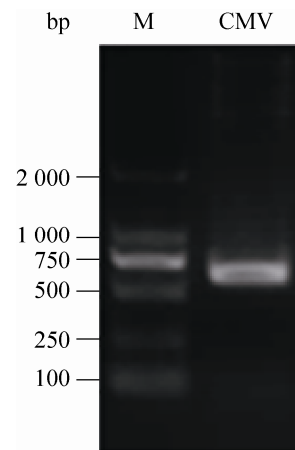


图5 EGFP 启动子 CMV 扩增结果  
Fig. 5 EGFP promoter CMV amplification result.

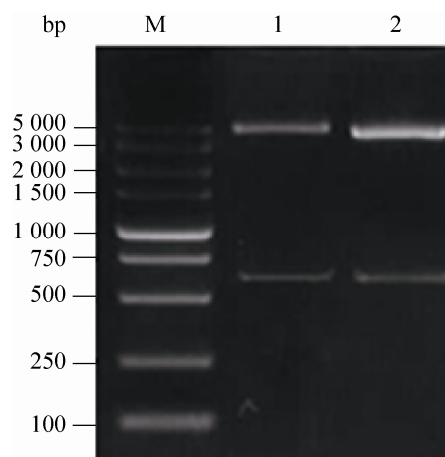


图6 pN1-EGFP-K-attB-CMV 质粒酶切鉴定  
Fig. 6 pN1-EGFP-K-attB-CMV restriction digestion identification result.

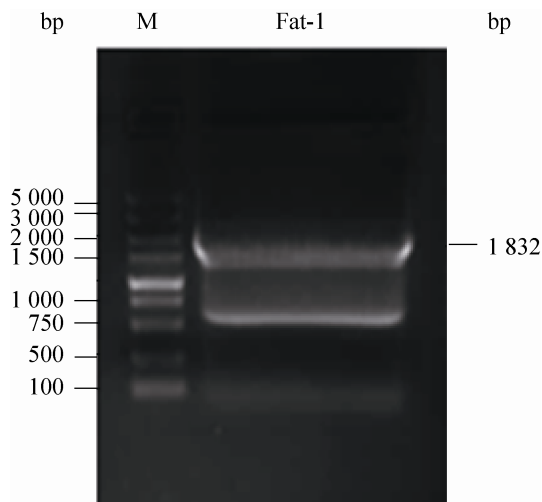


图7 *Fat-1* PCR 电泳结果

Fig. 7 *Fat-1* gene electrophoresis result.

#### 2.4.2 pEGFP-N1-Fat-1 重组质粒酶切鉴定结果

pEGFP-N1-*Fat-1* 质粒经过 *Hind* III 和 *Pst* I 双酶切, 电泳检测到 1、2、3、4 号都有切下大小 1 800 bp 左右片段 (图 8), 初步验证目的基因已连接入框架载体, 送往上海生物工程公司测序。测序结果与预期相同, 表明 pEGFP-N1-*Fat-1* 重组载体构建成功。

#### 2.5 *Fat-1* 基因的定点整合细胞转染

本实验以转染 pN1-EGFP 的细胞作为阳性对照, 将 phiC31 整合酶 mRNA 与 pEGFP-N1-*Fat-1* 质粒共转染细胞, 转染后 48 h 观察细胞转染情况。图中 A、A' 为转染 pEGFP-N1 的细胞在明场及激发光下的细胞 (IOOX), B、B' 为转染 phiC31 整合酶 mRNA 与 pEGFP-N1-*Fat-1* 质粒的细胞在明场及激发光下的细胞 (IOOX), 转染效率比较高 (图 9)。

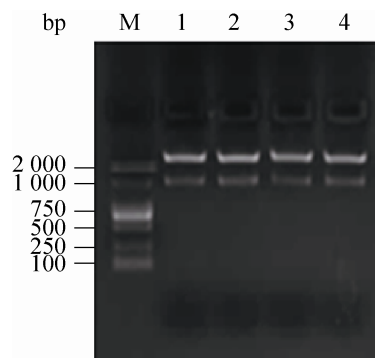


图8 pEGFP-N1-*Fat-1* 的酶切鉴定

Fig. 8 Results of enzyme digestion of recombinant plasmid of pEGFP-N1-*Fat-1*.

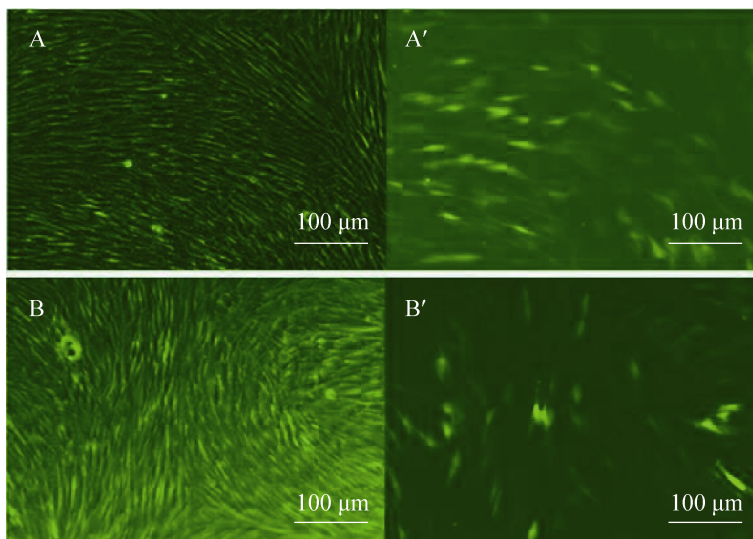


图9 细胞转染后荧光检测

Fig. 9 Fluorescence detection of the transfected cells.



## 2.6 转 *Fat-1* 基因绵羊胎儿皮肤成纤维细胞的鉴定

提取 6 个细胞系的基因组,对定点整合断裂位点 PCR 产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳,PCR 检测结果显示 1、2、4、5、6、8 号没有条带出现(图 10),表明 attB 片段没有扩增出来,而对这 6 个基因组进行 *Fat-1* 基因 PCR 扩增,出现目的条带(图 11),大小与目的基因吻合,初步判定 *Fat-1* 基因已整合入绵羊基因组中。

## 2.7 无筛选标记转 *Fat-1* 基因细胞系的鉴定

将所得到的 EGFP 与 *Fat-1* 基因 PCR 扩增产物分别进行 1%琼脂糖凝胶电泳,由电泳图可见 1、3、10、12 号扩增出 EGFP 基因(图 12),而 2、4、5、6、7、8、9、11、13、14 号没有

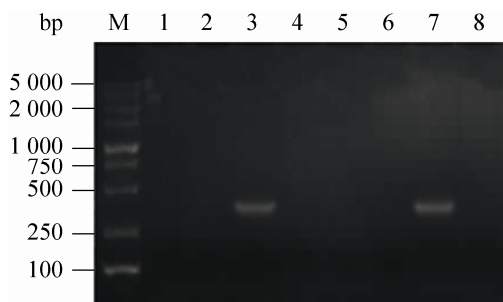


图 10 attB PCR 扩增产物凝胶电泳结果

Fig. 10 The results of PCR amplification products of attB.

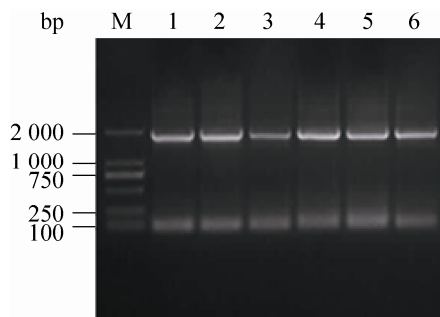


图 11 *Fat-1* 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳结果

Fig. 11 The results of PCR amplification products of *Fat-1* gene.

扩增出 EGFP 片段,初步断定为筛选标记已去除。取 2、4、5、6、7、8、9、11、13、14 号基因组进行 *Fat-1* 基因的 PCR 扩增发现 10 个样品都扩增出目的基因(图 13),初步判定这些是切除标记基因并转入 *Fat-1* 基因的细胞系。

## 3 讨论

多不饱和脂肪酸为人体必需脂肪酸,具有重要的生理功能。摄入高水平的  $\omega$ -3PUFAS 可以促进婴幼儿大脑、视网膜和神经系统的发育,还可以降低心血管疾病和炎症的发生<sup>[13]</sup>。哺乳动物体内缺乏  $\Delta$ 12 以上的脂肪酸脱氢酶不能直接

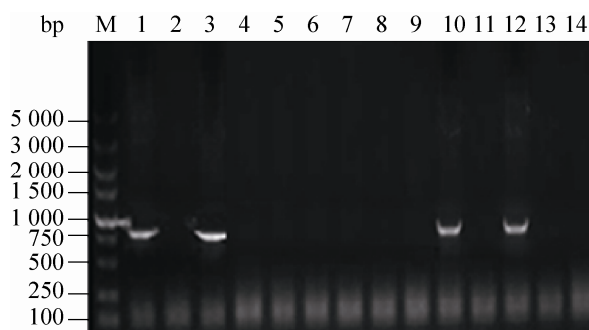


图 12 EGFP 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳结果

Fig. 12 The results of PCR amplification products of EGFP gene.

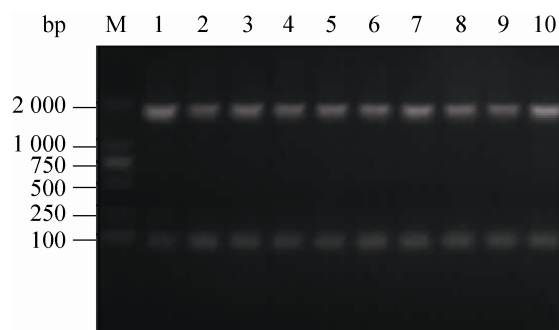


图 13 *Fat-1* 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳结果

Fig. 13 The results of PCR amplification products of *Fat-1* gene.



合成  $\omega$ -3 及  $\omega$ -6 PUFAS, 只能从食物中获取<sup>[14]</sup>。因此本研究构建转入 *Fat-1* 基因的真核表达载体, 为以后使其转入动物基因组中生产出可以自身合成多聚不饱和脂肪酸的转基因家畜。

PhiC31 整合酶是来源于链霉菌属噬菌体的重组酶, 它可以将带有 attB 的转基因质粒定点地整合入哺乳动物基因组假 attP 位点。phiC31 整合酶介导的位点特异性整合较随机整合与病毒载体系统安全的多, 是生产转基因动物的理想工具<sup>[15]</sup>。有研究表明, 当 phiC31 整合酶以质粒的形式与载体共同转染细胞后, 对这些细胞进行检测发现细胞核型分析异常, phiC31 整合酶持续表达会影响转基因细胞的生长与后期动物的发育。因此本研究使用一种快速的易于降解的 phiC31 整合酶 mRNA 的形式与携带目的基因的质粒共转染细胞, 因为 mRNA 易于降解, 因此本实验中用到的仪器等都经过了处理, 构建的含有 phiC31 整合酶基因的载体由上海生物工程公司合成, 其功能已有研究证实比较可靠。phiC31 整合酶介导的位点特异性整合远离内源基因的转录起始位点和与癌症有关的基因, 这就使其避免了基因表达紊乱。因此 phiC31 整合酶介导的重组反应安全性比较高<sup>[16]</sup>。

自 20 世纪 80 年代以来, 生物安全问题已引起世界各地的热议, 2000 年 5 月《卡塔赫纳生物安全议定书》出炉<sup>[17]</sup>。该书意在解决转基因生物安全的问题。此后, 各国研究组织与机构开始关注转基因动物的安全性问题, 政府也出台了相应的法律法规来管理和规范转基因动物产品的研究与应用<sup>[18]</sup>。目前, 转基因食品安全在我国引发人们的热议, 转基因家畜研究是一个重要的领域, 因此研究降低转基因家畜安全隐患是一个关键性的问题, 而转基因生产时大都

会使用筛选标记基因, 这些标记基因的使用和残留会引起转基因生物环境与产品的安全性<sup>[19]</sup>, 因此本实验中构建的载体带有两个同向的 Loxp 位点, 而且 EGFP 基因与 Neo-HSV-TK-PolyA 基因都在两个 Loxp 位点之间, 如果后期需要可以使构建好的载体与 Cre 酶共同转染删除 EGFP 基因和 Neo-HSV-TK-PolyA 基因<sup>[20]</sup>。而且本实验中构建的 pEGFP-N1-Fat-1 载体含有 attB 位点, 它可以识别动物基因组上的假 attP 位点并在 phiC31 整合酶的介导下使目的基因定点整合入哺乳动物基因组中<sup>[21]</sup>。因此本文中构建的真核表达载体为无选择标记的安全转基因技术研究提供基础, 特别是在将来利用本研究的结果实施选择标记的删除, 从而获得无选择标记的供体细胞, 通过体细胞核移植技术生产无选择标记基因的转基因个体。这将推动转基因动物育种技术向前迈出重要的一步。

## REFERENCES

- [1] Ruxton CH, Reed SC, Simpson MJ, et al. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet*, 2004, 17(5): 449-459.
- [2] Wu X, Ouyang HS, Duan B, et al. Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids. *Transgenic Res*, 2012, 21(3): 537-543.
- [3] Yao QH, Zhang XC, Fu T, et al.  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids inhibit the proliferation of the lung adenocarcinoma cell line A549 *in vitro*. *Mol Med Rep*, 2014, 9(2): 401-406 .
- [4] De Carlo F, Witte TR, Hardman WE, et al. Omega-3 eicosapentaenoic acid decreases CD133 colon cancer stem-like cell marker expression while increasing sensitivity to chemotherapy. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e69760.
- [5] Powell BC, Walker SK, Bawden CS, et al. Transgenic sheep and wool growth: possibilities

- and current status. *Reprod Fertil Dev*, 1994, 6(5): 615–623.
- [6] Lan C, Ren LN, Wu M, et al. Deletion of marker gene in transgenic goat by Cre/LoxP system. *Chin J Biotech*, 2013, 29(12): 1847–1854 (in Chinese).  
兰翀, 任丽娜, 吴敏, 等. 利用 Cre/LoxP 系统删除转基因山羊体内的选择标记基因. *生物工程学报*, 2013, 29(12): 1847–1854.
- [7] Zhao Y, Yu T, Xing SC. Application of Cre/lox site-specific recombination system in transgenic plants. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2010, 26(2): 95–103 (in Chinese).  
赵妍, 余涛, 邢少辰. Cre/lox 位点特异重组系统在转基因植物中的应用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, 26(2): 95–103.
- [8] Wang ZR, Liu XM, Zhou JR, et al. Efficacy evaluation of Cre-LoxP recombinase system to delete the endogenous selectable marker gene. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2014, 30(2): 194–201 (in Chinese).  
王志蕊, 刘西梅, 周荆荣, 等. Cre-LoxP 重组系统删除内源性选择标记基因的效能评价. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(2): 194–201.
- [9] Lu JJ, Maddison LA, Chen WB.  $\phi$ C31 integrase induces efficient site-specific excision in zebrafish. *Transg Res*, 2011, 20(1): 183–189.
- [10] Li L, Guo R, Chang XS, et al. Generation of islet  $\beta$  cell-specific Cre recombinase targeting vector by homologous recombination in bacteria. *Acad J Sec Milit Med Univ*, 2014, 35(2): 185–190 (in Chinese).  
李玲, 国蓉, 常绪生, 等. 利用细菌内同源重组技术构建胰岛  $\beta$  细胞特异性表达 Cre 重组酶的基因敲入打靶载体. *第二军医大学学报*, 2014, 35(2): 185–190.
- [11] Kempe K, Rubtsova M, Berger C, et al. Transgene excision from wheat chromosomes by phage  $\phi$ C31 integrase. *Plant Mol Biol*, 2010, 72(6): 673–687.
- [12] Bi YX, Liu XM, Hua ZD, et al. Site-specific modification of pig genome mediated by  $\Phi$ C31 integrase. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2014, 30(2): 187–193 (in Chinese).  
毕延震, 刘西梅, 华再东, 等.  $\Phi$ C31 整合酶介导猪基因组定点修饰的探讨. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(2): 187–193.
- [13] Benbrook CM, Butler G, Latif MA, et al. Organic production enhances milk nutritional quality by shifting fatty acid composition: a United States-wide, 18-month study. *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e82429.
- [14] Lister JA. Transgene excision in zebrafish using the  $\phi$ C31 integrase. *Genesis*, 2010, 48(2): 137–143.
- [15] Allen BG, Weeks DL. Transgenic *Xenopus laevis* embryos can be generated using  $\phi$ C31 integrase. *Nat Methods*, 2005, 2(12): 975–979.
- [16] Zou LT. Study the gene inversion and deletion mediated by phage *phi*C31/*att* site-specific recombinant system[D]. Chongqing: Southwest University, 2014 (in Chinese).  
邹丽婷. 噬菌体 *phi*C31/*att* 位点重组系统介导的基因倒位和删除研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [17] Wang ZP, Zhang SZ. Safety of transgenic animal food. *J Anhui Agri Sci*, 2007, 35(19): 5868–5869 (in Chinese).  
王正鹏, 张树珍. 转基因动物食品的安全性. *安徽农业科学*, 2007, 35(19): 5868–5869.
- [18] Wang L, Li XL. Ethical dilemmas of safety of genetically modified food in China. *J Anhui Agri Sci*, 2014, 42(33): 1854–1856 (in Chinese).  
王磊, 李晓兰. 我国转基因食品安全的伦理困境. *安徽农业科学*, 2014, 42(33): 11854–11856.
- [19] Pandey SN, Lee YC, Yokota T, et al. Morpholino treatment improves muscle function and pathology of *Pitx1* transgenic mice. *Mol Ther*, 2014, 22(2): 390–396.
- [20] Smith MC, Brown WR, McEwan AR, et al. Site-specific recombination by  $\phi$ C31 integrase and other large serine recombinases. *Biochem Soc Trans*, 2010, 38(2): 388–394.
- [21] Chavez CL, Calos MP. Therapeutic applications of the  $\Phi$ C31 integrase system. *Curr Gene Ther*, 2011, 11(5): 375–381.

(本文责编 陈宏宇)