

绒山羊细菌人工染色体重组及细胞转染系统

黄甜^{1,2}, 曹忠洋^{1,2}, 杨耀辉^{1,2}, 曹更生^{1,2}

1 河南大学 生命科学院, 河南 开封 475004

2 河南大学 生物工程研究所, 河南 开封 475004

黄甜, 曹忠洋, 杨耀辉, 等. 绒山羊细菌人工染色体重组及细胞转染系统. 生物工程学报, 2016, 32(3): 317–328.

Huang T, Cao ZY, Yang YH, et al. Cashmere goat bacterial artificial chromosome recombination and cell transfection system. Chin J Biotech, 2016, 32(3): 317–328.

摘 要: 绒山羊 (Cashmere goat) 是一类以生产山羊绒为主的山羊品种, 因其绒毛纤细有光泽、轻盈、保暖而备受青睐。绒山羊角蛋白关联蛋白 (Keratin associated protein, KAP) 和骨形态发生蛋白 (Bone morphogenetic protein, BMP) 在羊绒纤维毛囊细胞的增殖和分化过程中起重要作用。为了提高山羊绒的产量和品质, 对包含 *kap6.3*, *kap8.1* 和 *bmp4* 基因的细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC) 进行研究。首先采用同源重组的方法对 BAC 进行修饰, 其次将哺乳动物密码子优化过的 Tol2 转座子加入 BAC 中, 最后采用 Amaxa Nucleofector 核转染技术将修饰过的 BAC 转入绒山羊成纤维细胞。结果表明成功构建了含有目的基因的 BAC-Tol2 载体。载体上包含 UBC 启动元件的 *egfp* 标记基因和真核筛选抗性 *neo* 基因, 并且载体的两端加有 *loxP* 元件, 为转染细胞后标记和抗性基因的去除作准备。载体转染细胞效率达到 1%–6%, 最高可达 10%。成功获得了外源整合 *kap6.3*、*kap8.1* 和 *bmp4* 基因的细胞株, 为以后克隆绒山羊作准备。研究表明, 在 BAC 的修饰中应用 Tol2 转座子系统增加了电转染后的整合率, 提高了 BAC 无错重组的效率和精确性。

关键词: 绒山羊, 细菌人工染色体 (BAC), Tol2 转座子, 电转染

Received: June 24, 2015; **Accepted:** August 31, 2015

Supported by: Transgenic Major Projects (No. 2011zx08008-002), National Natural Science Foundation of China (No. 31271597).

Corresponding author: Gengsheng Cao. Tel: +86-371-23858418; E-mail: gscao@henu.edu.cn

转基因重大专项 (No. 2011zx08008-002), 国家自然科学基金 (No. 31271597) 资助。

网络出版时间: 2015-09-17

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150917.1559.004.html>

Cashmere goat bacterial artificial chromosome recombination and cell transfection system

Tian Huang^{1,2}, Zhongyang Cao^{1,2}, Yaohui Yang^{1,2}, and Gengsheng Cao^{1,2}

¹ School of Life Science, Henan University, Kaifeng 475004, Henan, China

² Institute of Bioengineering, Henan University, Kaifeng 475004, Henan, China

Abstract: The Cashmere goat is mainly used to produce cashmere, which is very popular for its delicate fiber, luscious softness and natural excellent warm property. Keratin associated protein (KAP) and bone morphogenetic protein (BMP) of the Cashmere goat play an important role in the proliferation and development of cashmere fiber follicle cells. Bacterial artificial chromosome containing *kap6.3*, *kap8.1* and *bmp4* genes were used to increase the production and quality of Cashmere. First, we constructed bacterial artificial chromosomes by homology recombination. Then Tol2 transposon was inserted into bacterial artificial chromosomes that were then transfected into Cashmere goat fibroblasts by Amaxa Nucleofector technology according to the manufacture's instructions. We successfully constructed the BAC-Tol2 vectors containing target genes. Each vector contained *egfp* report gene with UBC promoter, Neomycin resistant gene for cell screening and two *loxP* elements for resistance removing after transfected into cells. The bacterial artificial chromosome-Tol2 vectors showed a high efficiency of transfection that can reach 1% to 6% with a highest efficiency of 10%. We also obtained Cashmere goat fibroblasts integrated exogenous genes (*kap6.3*, *kap8.1* and *bmp4*) preparing for the clone of Cashmere goat in the future. Our research demonstrates that the insertion of Tol2 transposons into bacterial artificial chromosomes improves the transfection efficiency and accuracy of bacterial artificial chromosome error-free recombination.

Keywords: Cashmere goat, bacterial artificial chromosome, Tol2 transposon, electric transfection

绒山羊的羊绒具有纤细、柔软、保暖等多种优良性状，所以用途广泛并具有较高的经济价值，但其产量一直不高。角蛋白 (Keratin) 及其关联蛋白 (KAPs) 是羊绒的主要结构蛋白，它们决定了绒毛的基本特性^[1]。KAPs 蛋白根据氨基酸的组成可进一步分为高硫氨酸 KAP、超高硫氨酸 KAP 和高甘氨酸-酪氨酸 KAP。高甘氨酸-酪氨酸 (HGT) KAP 是由 *kap6-8* 基因家族编码^[2-4]，它们都位于绒山羊的 1 号染色体上^[5]。Jin 等研究表明高甘氨酸-酪氨酸 KAP 与羊毛的特性有很大的关系^[6-8]。Parsons 等发现 *kap6* 和 *kap8* 这两个基因位点与羊毛的产量和纤维直径具有直接的相关性^[9]。同时 Zhao 等也证明了 *kap8.1* 基因与羊绒细度具有重要的相关性^[10]。

在不同地区和不同的品系中，绒山羊羊绒的特质有着显著的变化，这是由于角蛋白基因表达水平不同造成的^[11]。因此从分子水平研究 KAPs 的基因是用来控制羊绒纤维细度和提高质量的一个重要手段。毛囊是毛纤维的“发源地”，它的性状和组织结构决定着毛纤维的品质和产量。骨形态发生蛋白 (BMPs) 是转化生长因子 (TGF-β) 超家族成员之一^[12]，是毛囊发育所涉及的重要信号分子。其中 *bmp4* 基因在绒山羊皮肤次级毛囊休止期高表达，而在兴盛期低表达，因此它是调节山羊绒周期性生长的重要因子^[13]。

细菌人工染色体 (BAC) 可以容纳较大的克隆片段，包括基因上下游的调控元件，这样可以有效地防止位置效应。但是插入片段过大

时不易操作,而且拷贝数较低。Tol2 转座子作为基因转移的载体,可以携带长达 11 kb 的 DNA 片段,而且不会降低转座效率^[14]。目前 Tol2 转座系统已用于将外源 DNA 导入斑马鱼的生殖细胞中^[15-16],以及用显微注射的方法将含有 Tol2 转座子的供体质粒和转座酶 mRNA 共注射入爪蟾的二细胞胚胎中^[17]。此外也有研究表明在人和小鼠体细胞中,经过哺乳动物密码子优化的 Tol2 转座子的转座效率要比 SB (Sleeping beauty) 转座子高^[18]。为了改善羊绒的品质并提高绒山羊的产绒量,我们对包含绒山羊品种优良基因的 BAC 进行修饰,使用 Tol2 转座系统增加目的基因的整合率和整合的精确性,并采用电转染方法提高转染效率,为克隆绒山羊做准备。

1 材料与方法

1.1 菌种、载体和细胞

菌株:大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 及 TOP10 为本实验室保存。

质粒载体:pGEM-3zf、pGEM-7zf、pABRG 由本实验室构建。Tol2 转座质粒(含有末端反向重复序列 L200、R150 和原核抗性筛选基因 *Amp*⁺)、pcDNA3.1-TP 是由生工生物工程(上海)股份有限公司在 pcDNA 的基础上合成的含有 Tol2 转座酶编码基因的质粒。pMD-19T 载体购自 TaKaRa 公司。

BAC:169D05、706H15、572K17 由内蒙古农业大学提供;绒山羊成纤维细胞第二代:由内蒙古农业大学国家动物转基因技术研究中心提供。

1.2 主要试剂

实验所用限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。KOD-Plus DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司。质

粒小提试剂盒购自 OMEGA 公司。去内毒素质粒大提试剂盒购自北京康为世纪公司。BAC 磁珠小提试剂盒购自河南惠尔纳米科技有限公司。BAC 去内毒素大提试剂盒 NucleoBond BAC100 购自 MACHEREY-NAGEL 公司。Amaya[®] Nucleofector II Kit for Primary Mammalian Fibroblasts 电转染试剂盒购自 Thermo 公司。DMEM/F12 培养基为 Gibco 进口分装。标准胎牛血清为 Hyclone 进口分装。引物使用 Primer 6.0 软件设计,基因测序及引物合成由北京金唯智生物技术公司完成。本实验所用引物见表 1。

1.3 方法

1.3.1 构建 LoxP-EGFP-Neo 载体

首先对 pPB-UBC-EGFP 质粒进行 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切得到带有 *egfp* 基因及真核表达调控元件的完整片段:UBC-EGFP-polyA,与 *Xho* I (*Xho* I 和 *Sal* I 是同尾酶)单酶切的 PGL3-contro 载体连接,构建新的 PGL3-EGFP 质粒。然后用 *Bgl* II 和 *Kpn* I 双酶切 PGL3-EGFP 质粒,得到带有 *Bgl* II 和 *Kpn* I 酶切位点的 UBC-EGFP-ployA 片段,并连接到被 *Bgl* II 和 *Kpn* I 双酶切的 7zf-mcs 载体上(这个载体是由 Promega 公司的原载体进行多克隆位点改造后的载体),构建新的载体 7zf-EGFP。最后再使用 *Bgl* II 和 *Not* I 双酶切 7zf-EGFP 载体,得到带有 *Bgl* II 和 *Not* I 粘性末端的 UBC-EGFP-ployA 片段,与被 *Bam*H I (*Bam*H I 和 *Bgl* II 是同尾酶)和 *Not* I 双酶切的 LoxP-Neo 的骨架载体连接,构建新的 LoxP-EGFP-Neo 载体(图 1),并进行 PCR 鉴定和 *Xho* I 酶切鉴定。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primer

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Length (bp)
KAP8.1-F	ATACTGAGGAAATTCATTCCCTGC	199
KAP8.1-R	GCCCCAGAGCCGTTGTAG	
KAP6.3-F	GCTCAAGTGACACCTATACTCTCC	306
KAP6.3-R	CAGAACTGGAAAATTGGAGGGT	
BMP4-F	GCGAGCCATGCTAGTTTGATACC	314
BMP4-R	GTGGAAGCTCCTCACGGTGTG	
EGFP -F	ATGGTGAGCAAGGGCGAG	751
EGFP-R	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	
Homology-F1	ACATGTCGTCGTAACCTGTAGAACGGAGTAACCTCGG TGTGCGGTTGTATCCCTGCTCGAGCCGGGCCCAAGTG	1 516
Homology-R1	TTAACGTGCCGGCAGGCCTGGGTAACCAGGTATTTT GTCCACATAACCGATTATGATCCTCTAGATCAGATCT	
Tol2-F	TCTGGCTAGAATCTTACTTGAG	591
Tol2-R	GACTTCCATTGTTTCATTCCAC	
pBAC-EGFP-F	TTCCGTTCTTCTTCGTCATA	529
pBAC-EGFP-R	ATGTCCTTCTGCTGATACTG	

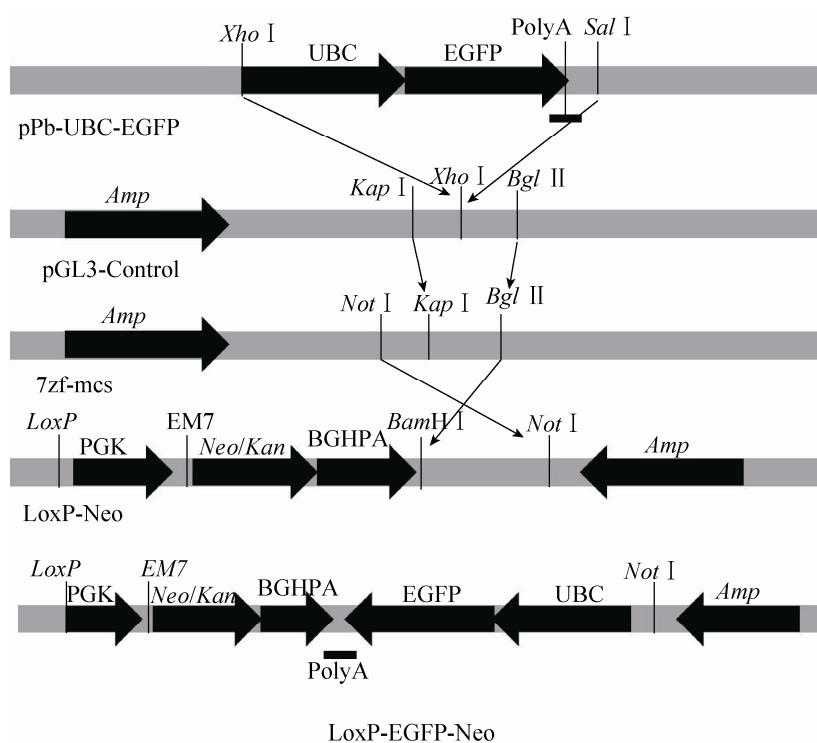


图 1 LoxP-EGFP-Neo 载体构建流程图

Fig. 1 Construction of LoxP-EGFP-Neo vector.

1.3.2 BAC 克隆的鉴定与第一次重组

BAC 的载体骨架为 pCC1BAC, 在 *Hind* 克隆位点处携带有目的基因的基因组。3 个绒山羊的 BAC 克隆分别为 169D05、706H15、572K17, 对应的基因分别为 *kap6.3*、*kap8.1*、*bmp4*, 其基因序列经过 PCR 扩增并测序比对后确定为绒山羊基因。我们以含有 Tol2 转座子的质粒为模板, 设计同源臂引物 Homo-F1 和 Homo-R1, 并进行 PCR 扩增转座子的 L200-*Amp*⁺-R150 片段, 使用电转染方法将其转到带有 pABRG 质粒的 BAC 感受态细胞中, 在 BAC 骨架 pCC1BAC 上插入 L200-*Amp*⁺-R150, 构建 pCC1BAC-Tol2 载体 (图 2)。分别使用 Homo-F1、Homo-R1 引物和 Tol2-F1、Tol2-R1 引物进行 PCR 鉴定 (引物位置如图 2 所示)。

1.3.3 BAC 第二次重组

分别在 *LoxP*-EGFP-Neo 载体的上下游设计同源引物 Homo-R2 和 Homo-F2 并进行 PCR 扩

增, 将得到的片段通过电转染转到含有 pCC1BAC-Tol2 载体的感受态细胞中, 得到重组质粒 pCC1BAC-Tol2-EGFP, 分别是含有 *kap6.3*、*kap8.1* 和 *bmp4* 基因的载体 169D05-Tol2-EGFP、706H15-Tol2-EGFP、572K17-Tol2-EGFP (图 3)。为了验证 Tol2 转座子的转座效率, 我们使用相同的方法构建了不含 Tol2 转座子的质粒即 pCC1BAC-EGFP 载体 (图 4)。载体构建完成后使用 PCR 和测序进行鉴定。

1.3.4 细胞转染与筛选

重组完成后的 BAC 用 MACHEREY-NAGEL 试剂盒提取后测定浓度备用。因为电转染使用的是绒山羊的成纤维细胞, 所以其传代次数不能太多, 我们在转染前两天对细胞进行复苏, 传代一次进行电转染, 以防止对后续的克隆动物实验产生影响。选取细胞融合为 70%–80%, 细胞数目为 0.5×10^6 – 1×10^6 时进行转染。转染时同时加入 pcDNA3.1-TP 质粒。在细胞转染 24 h

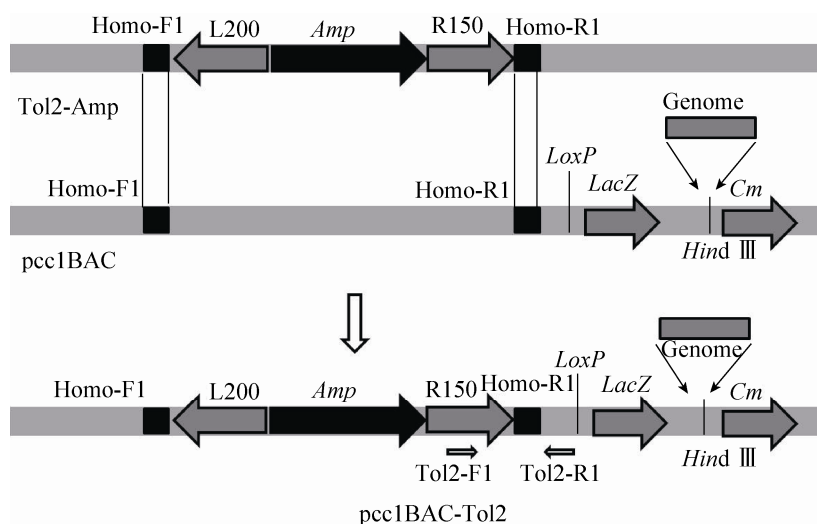


图 2 pCC1BAC-Tol2 载体构建流程图

Fig. 2 Construction of pCC1BAC-Tol2 vector.

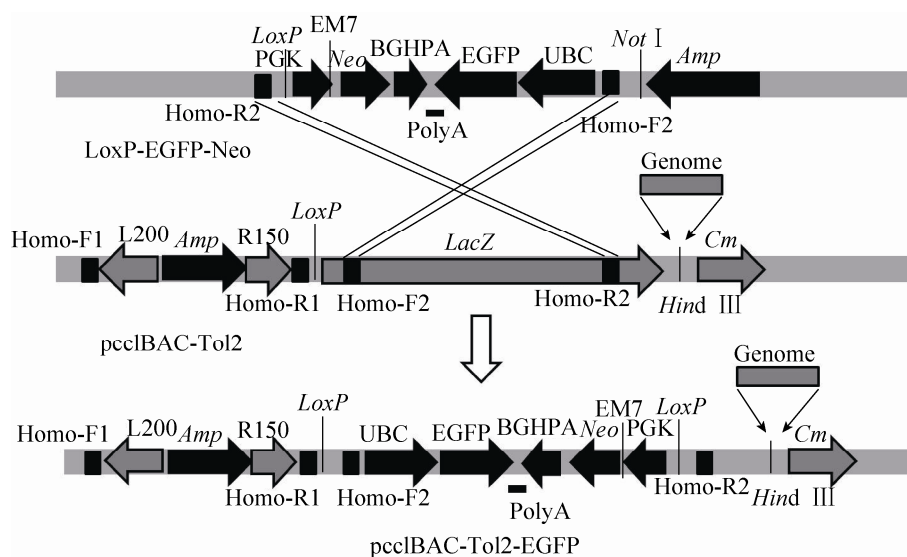


图3 pCC1BAC-Tol2-EGFP 载体构建流程

Fig. 3 Construction of pCC1BAC-Tol2-EGFP vectors.

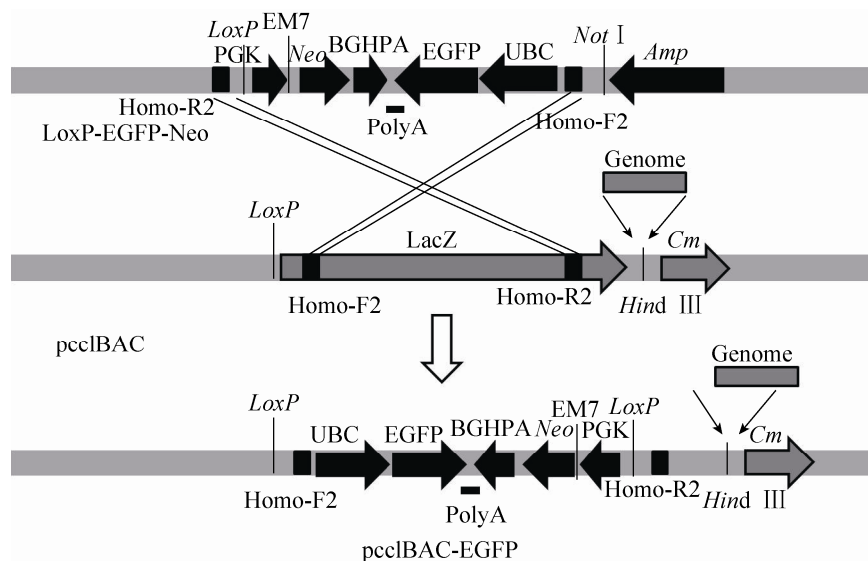


图4 无 Tol2 转座子 pCC1BAC-EGFP 载体构建流程图

Fig. 4 Construction of pCC1BAC-EGFP vector less Tol2 transposon.

后更换新鲜培养基观测荧光信号。细胞生长到一定时候加入 400 $\mu\text{g/mL}$ 新霉素进行筛选。待克隆岛孤立出现后停止加药继续培养，等到克

隆点长到一定大小的时候进行单克隆挑取。根据加入新霉素筛选后荧光细胞数和转染前细胞数计算转染效率。

1.3.5 标记基因的去除与重组效率鉴定

本实验构建载体时在遗传标记基因 (*egfp*) 和抗性基因 (*neo*) 的两端插入了两个方向相同的 *loxP* 位点, 在挑取单克隆后利用电转染的方法转染含有 Cre 酶编码基因的质粒 (转染约 400 ng), 利用 Cre-*LoxP* 系统去除遗传标记基因 (*egfp*) 和抗性基因 (*neo*)。经过 Cre-*LoxP* 系统处理后的细胞在 6 孔板上培养后用胰酶消化, 收集细胞提取基因组并做 PCR 鉴定重组效率。

2 结果与分析

2.1 载体鉴定

2.1.1 UBC-EGFP-ployA 载体鉴定

载体构建完成后进行了 PCR 鉴定、酶切鉴定和测序鉴定。首先挑取单克隆进行菌体 PCR 扩增 *egfp* 基因, 扩增片段大小为 751 bp (图 5A), 测序证明结果正确。然后取阳性克隆 1 提质粒并用 *Xho* I 进行酶切, 酶切后片段大小分别为 2 930 bp 和 4 390 bp (图 5B)。结果表明 PCR 和酶切结果正确, 载体构建成功。

2.1.2 pCC1BAC-Tol2 载体鉴定

首先我们使用同源臂引物 Homo-F1、Homo-R1 进行菌体 PCR 扩增 Tol2 转座子。如图 6 所示, 扩增产物片段大小为 1 516 bp。其中

2、3、26 号的菌体 PCR 结果条带较弱, 其余全部为阳性。然后我们使用 Tol2-F1、Tol2-R1 作为引物对阳性克隆进行 PCR 验证重组是否成功, 如图 7 所示, PCR 片段大小为 591 bp, 与预期结果一致。同时我们对 PCR 产物进行测序, 测序结果与载体序列一致, 结果表明第一次重组成功。

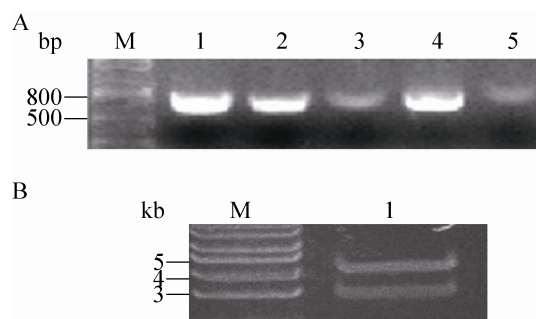


图 5 LoxP-EGFP-Neo 载体 PCR 和酶切鉴定

Fig. 5 Identification of LoxP-EGFP-Neo vector. (A) PCR amplification of *egfp* gene. 1, 2, 4: positive clones; 3: false positive clone; 5: negative control. (B) *Xho* I enzyme digestion of LoxP-EGFP-Neo. M: DNA marker.

2.1.3 pCC1BAC-Tol2-EGFP 载体鉴定

第二次重组之后, 我们首先使用 Tol2-F1、Tol2-R1 引物来鉴定第一次重组后的效果是否存在。如图 8 所示, 扩增产物片段大小为 591 bp, 除了 8 号和 12 号之外其余均为阳性克隆。

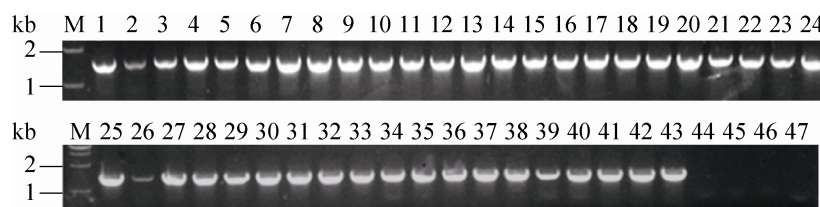


图 6 pCC1BAC-Tol2 载体 Tol2 转座子菌体 PCR 鉴定

Fig. 6 PCR amplification of Tol2 transposon in pCC1BAC-Tol2 vector. M: DNA marker. 1–8: PCR products of Tol2 transposon using 706H15-Tol2 vector as template; 9–24: PCR products of Tol2 transposon using 169D05-Tol2 vector as template; 25–43: PCR products of Tol2 transposon using 572K17-Tol2 vector as template; 44–46: negative control using BAC 706H15, 169D05 and 572K17 as templates; 47: negative control using double-distilled water as template.

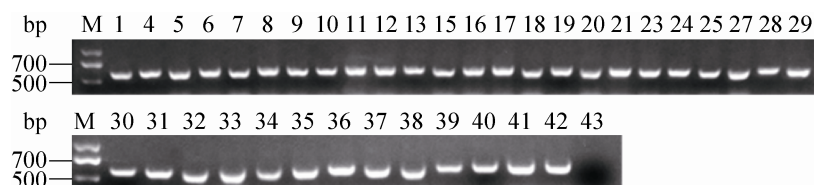


图 7 pCC1BAC-Tol2 载体菌体 PCR 鉴定

Fig. 7 PCR amplification of pCC1BAC-Tol2 vectors using Tol2F1 and Tol2R1 primers. M: DNA marker. 1–8: PCR products of 706H15-Tol2 vector as template; 9–24: PCR products of 169D05-Tol2 vector as template; 25–42: PCR products of 572K17-Tol2 vector as template; 43: negative control.

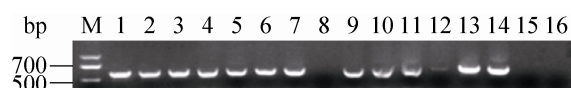


图 8 第二次重组跨 Tol2 转座子和 BAC 骨架的菌体 PCR 鉴定

Fig. 8 PCR amplification of the second recombination products using Tol2-F1 and Tol2-R1 primers. M: DNA marker. 1–4: PCR products of 706H15-Tol2-EGFP vector as template; 5–9: PCR products of 169D05-Tol2-EGFP vector as template; 10–13: PCR products of 572K17-Tol2-EGFP vector as template; 14: positive control using construct of first recombination as template; 15: negative control using BAC as template; 16: negative control using double-distilled water as template.

然后我们在第一次鉴定的基础上选取阳性克隆菌落为模板，分别在 BAC 骨架和 UBC 启动子上设计上下游引物 pBAC-EGFP-F 和 pBAC-EGFP-R，进行进一步的 PCR 鉴定和测序。如图 9 所示，扩增产物片段大小为 529 bp，除 9 号外其他均是阳性克隆。然后对 PCR 产物进行测序，结果与同源重组后的序列基本相同，这表明第二次重组成功。

2.1.4 无 Tol2 转座子的 pCC1BAC-EGFP 载体 (阴性对照) 鉴定

对于不含 Tol2 转座子的 BAC 重组质粒，

利用引物 pBAC-EGFP-F、pBAC-EGFP-R 进行 PCR 鉴定。如图 10 所示，片段大小为 529 bp。对其中的阳性克隆进行测序，结果与载体序列一致。

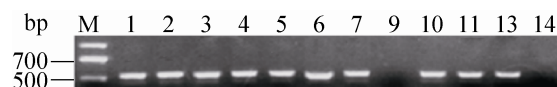


图 9 pCC1BAC-Tol2-EGFP 载体菌体 PCR 鉴定

Fig. 9 PCR amplification of the pCC1BAC-Tol2-EGFP vectors using pBAC-EGFP-F and pBAC-EGFP-R primers. M: DNA marker. 1–4: PCR products of 706H15-Tol2-EGFP vector as template; 5–7, 9: PCR products of 169D05-Tol2-EGFP vector as template; 10–11, 13: PCR products of 572K17-Tol2-EGFP vector as template; 14: negative control using double-distilled water as template.

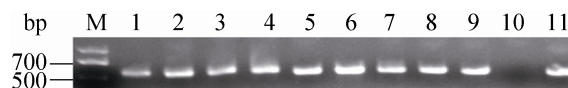


图 10 菌体 PCR 鉴定无 Tol2 转座子的 pCC1BAC-EGFP 载体

Fig. 10 PCR amplification of pCC1BAC-EGFP vector less Tol2 transposon. M: DNA marker. 1–9: positive clones; 10: negative control; 11: positive control using construct of second recombination as template.

2.2 绒山羊成纤维细胞的转染、筛选与鉴定

2.2.1 细胞转染与筛选

电转染后在倒置荧光显微镜下观察细胞，都出现荧光，但荧光出现的时间不同。转染 706H15-Tol2-EGFP 质粒的细胞在转染 48 h 后即出现荧光，转染 572K17-Tol2-EGFP 和 169D05-Tol2-EGFP 质粒的细胞荧光出现的较晚，但荧光细胞数目较多 (图 11)。然后我们使用 400 $\mu\text{g/mL}$ 的新霉素进行抗性筛选，并挑取单克隆继续培养 (图 12A–C)。经过计算，不同批次转染效率达到 1%–6%，最高可达 10%。单克隆培养一段时间后，我们利用电转染的方法将包含 Cre 酶基因的质粒转入细胞，然后在倒

置显微镜下观察，荧光基本消失 (图 12D)。在本实验中所有的 BAC 电转染实验都进行了无转座重组酶的对照组实验，而且转染后没有荧光出现。

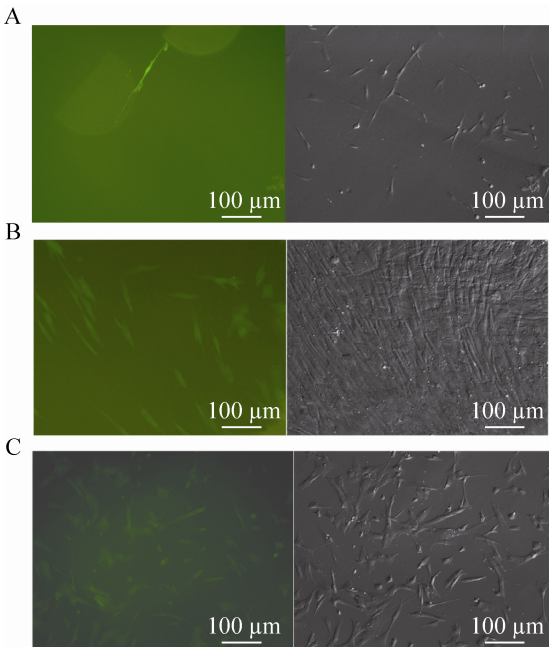


图 11 细胞转染后荧光检测
Fig. 11 Detection of cell fluorescence after transfected with 706H15-Tol2-EGFP (*kap8.1* gene) constructs (A), 572K17-Tol2-EGFP (*bmp4* gene) constructs (B) and 169D05-Tol2-EGFP (*kap6.3* gene) constructs (C). Scale bars=100 μm .

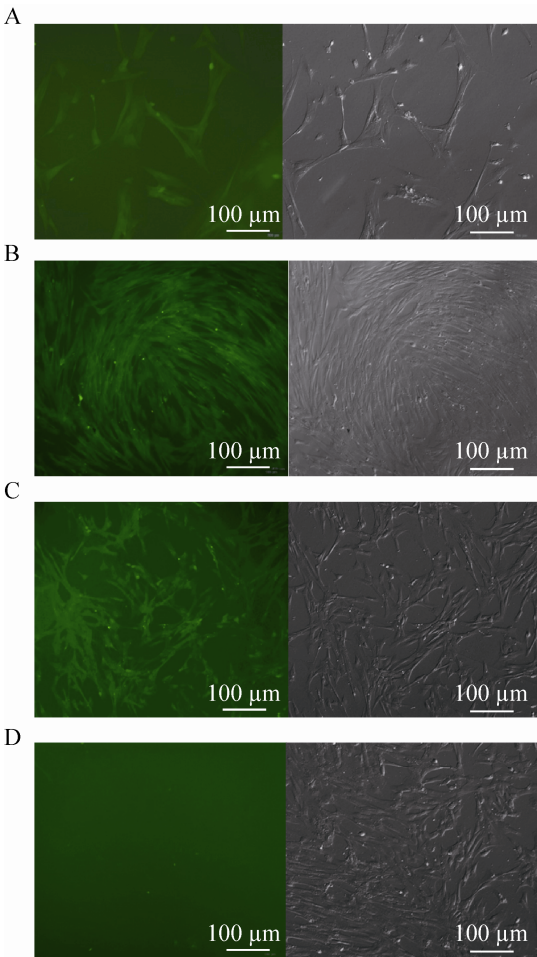


图 12 新霉素抗性筛选后细胞荧光检测
Fig. 12 Detection of cell fluorescence after screened with neomycin. (A) 706H15-Tol2-EGFP. (B) 572K17-Tol2-EGFP. (C) 169D05-Tol2-EGFP. (D) Cells transfected with Cre plasmid. Scale bars=100 μm .

2.2.2 阳性细胞克隆鉴定

我们把经过 Cre-LoxP 系统处理后的细胞收集后提取基因组做 PCR 鉴定。首先对目的基因

作鉴定, 分别是 *kap8.1*、*kap6.3* 和 *bmp4* 基因。如图 13A 所示, 目的基因 *kap8.1* 扩增产物是 199 bp。图 13B 中目的基因 *kap6.3* 扩增产物为 314 bp, *bmp4* 扩增产物为 306 bp。

在转染时, 我们把表达转座酶 (TP 蛋白) 的质粒 pcDNA3.1-TP 同时转入细胞, 表达的 TP 蛋白和转入的 BAC 质粒相互作用, 将 Tol2 转座子左右两端的 L200 和 R150 序列与 BAC 携带的目的基因融合并整合到基因组上, 因此中间的原核抗性基因 *amp^r* 被删除, 所以我们使用同源臂引物 Homo-F1/ R1 对细胞基因组进行 PCR 鉴定。如图 14 所示, 如果 TP 蛋白没有发挥作用, 扩增产物应为 1 576 bp。

3 讨论

在 BAC 的重组过程中我们选用了 2012 年 Bird 等提出的一种新的重组体系即 pABRG, 它

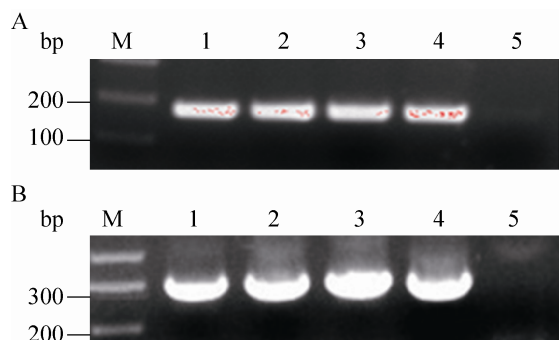


图 13 目的基因鉴定

Fig. 13 Identification of target genes by genomic PCR. M: DNA marker. (A) 1–2: PCR amplification of *kap8.1* gene using cell genome after transfected with 706H15-Tol2-EGFP vector; 3–4: positive control using BAC as template; 5: negative control. (B) 1: PCR amplification of *kap6.3* gene using cell genome after transfected with 169D05-Tol2-EGFP vector; 2: PCR amplification of *bmp4* gene using cell genome after transfected with 572K17-Tol2-EGF vector; 3–4: positive control of targets genes; 5: negative control.

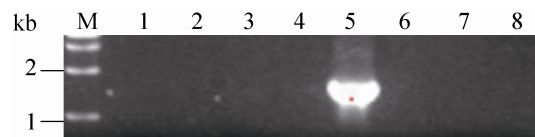


图 14 细胞基因组 *amp^r* 基因鉴定

Fig. 14 Identification of *amp^r* gene by genomic PCR. 1–4: PCR amplification of *amp^r* gene using cell genome after transfected with 706H15-Tol2-EGFP vector (line 1,2), 169D05-Tol2-EGFP vector (line 3), and 572K17-Tol2-EGF vector (line 4), respectively; 5: PCR amplification of *amp^r* gene using pCC1BAC-Tol2-EGFP vector as positive control; 6: negative control of BAC as template; 7: negative control of cells not transfected with pcDNA3.1-TP plasmid; 8: negative control using double-distilled water as template.

只包括依赖阿拉伯糖诱导的 Red β 和鼠李糖诱导的 Red γ 两种蛋白, 可以有效地减少 BAC 质粒内部的重组, 保证了 BAC 质粒的完整性, 同时在定向位点诱变效率上比其他方法如 pkD46、sw102 等高出一个数量级^[19]。但是这种重组体系需要两种不同的糖来进行诱导, 对糖的加入时间和加入量都需要有严格的要求, 并且加入前后温度变化也都需要严格的控制, 这提高了制备电转感受态细胞的难度。到目前为止 PiggyBac (PB) 转座子已经广泛地应用于哺乳动物细胞, 但是其转座效率较低^[20-21]。睡美人 (SB) 转座子在介导转基因时, 基因转移效率会随转座酶的过量表达而降低^[22]。Tol2 转座子目前在哺乳动物中应用得较少, 但是在小鼠和人的体细胞中, Tol2 转座子的转座效率比睡美人 (SB) 转座子高^[18]。我们首次在绒山羊成纤维细胞中应用 Tol2 转座子, 并且取得了成功。

细胞转染方法包括脂质体转染、病毒介导的转染、显微注射和电转染等, 但是很少有报道使用电转染方法来转染 BAC, 因为电转染

BAC 的效率很低, 当 BAC 达到 200 kb 时其电转染的效率不到 1%, 所以一般对 BAC 的转染都是应用显微注射的方法^[23-24]。但是显微注射对设备和技术的要求很高, 一般实验室很难达到要求, 而且一次处理细胞数量不能太多。我们通过在 BAC 中应用 Tol2 转座子系统, 增加了电转染后的整合率, 提高了转染效率。

本文成功地构建了含有目的基因的 BAC-Tol2-EGFP 载体, 载体上包含 Tol2 转座子, 提高了目的基因的整合效率, 同时载体上携带有 UBC 启动子的 *egfp* 标记基因和真核抗性筛选基因 *neo*, 并且载体的两端分别加入 *loxP* 元件, 使得细胞转染后可以将标记和抗性基因去除。转染效率最高可达 10%。此外我们也获得了整合有山羊绒角蛋白关联蛋白 (*kap8.1*、*kap6.3*) 和骨形态发生蛋白相关基因和 (*bmp4*) 的绒山羊成纤维细胞株, 为绒山羊的克隆奠定基础。

REFERENCES

- [1] Yin J, Li JQ, Zhang YJ, et al. Sequence analysis and expression of a type I hair keratin gene in goat skin. *Acta Veterinar Zootech Sin*, 2006, 37(1): 18-22 (in Chinese).
尹俊, 李金泉, 张燕军, 等. 一个山羊型毛角蛋白基因的序列及其在皮肤中的表达. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(1): 18-22.
- [2] Rogers MA, Langbein L, Winter H, et al. Characterization of a first domain of human high glycine-tyrosine and high sulfur keratin-associated protein (KAP) genes on chromosome 21q22.1. *J Biol Chem*, 2002, 277(50): 48993-49002.
- [3] Yin J, Hu TM, Li JQ, et al. Cloning and analysis of six full-length cDNA similar to sheep KAP6-1 from cashmere goat. *Acta Genet Sin*, 2004, 31(5): 502-507 (in Chinese).
尹俊, 扈廷茂, 李金泉, 等. 与绵羊 KAP6-1 相似的 6 个绒山羊全长 cDNA 的克隆与序列分析. *遗传学报*, 2004, 31(5): 502-507.
- [4] Langbein L, Rogers MA, Winter H, et al. The catalog of human hair keratins. II. Expression of the six type II members in the hair follicle and the combined catalog of human type I and II keratins. *J Biol Chem*, 2001, 276(37): 35123-35132.
- [5] Liu GF, Tian KC, Zhang EP, et al. Candidate gene analysis of high quality merino sheep. *Hereditas*, 2007, 29(1): 70-74 (in Chinese).
刘桂芬, 田可川, 张恩平, 等. 优质细毛羊羊毛细度的候选基因分析. *遗传*, 2007, 29(1): 70-74.
- [6] Jin M, Wang L, Li S, et al. Characterization and expression analysis of KAP7.1, KAP8.2 gene in Liaoning new-breeding cashmere goat hair follicle. *Mol Biol Rep*, 2010, 38(5): 3023-3028.
- [7] Gong H, Zhou H, Hickford JGH. Diversity of the glycine/tyrosine-rich keratin-associated protein 6 gene (KAP6) family in sheep. *Mol Biol Rep*, 2010, 38(1): 31-35.
- [8] Matsunaga R, Abe R, Ishii D, et al. Bidirectional binding property of high glycine-tyrosine keratin-associated protein contributes to the mechanical strength and shape of hair. *J Struct Biol*, 2013, 183(3): 484-494.
- [9] Parsons YM, Cooper DW, Piper LR. Evidence of linkage between high-glycine-tyrosine keratin gene loci and wool fibre diameter in a Merino half-sib family. *Anim Genet*, 1994, 25(2): 105-108.
- [10] Zhao M, Chen H, Wang X, et al. aPCR-SSCP and DNA sequencing detecting two silent SNPs at *KAP8.1* gene in the cashmere goat. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(6): 1387-1391.
- [11] Plowman JE, Bryson WG, Jordan TW. Application of proteomics for determining protein markers for wool quality traits. *Electrophoresis*, 2000, 21(9): 1899-1906.
- [12] Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 1988, 242(4885): 1528-1534.
- [13] Hu XZ, Wang YJ. Research progress on the periodic development and molecular regulation of

- hair follicles in cashmere goats. *Acta Ecolog Anim Domast*, 2012, 33(3): 1–6 (in Chinese).
- 胡秀芝, 王永军. 绒山羊毛囊的周期性发育及其分子调控研究进展. *家畜生态学报*, 2012, 33(3): 1–6.
- [14] Urasaki A, Morvan G, Kawakami K. Functional dissection of the *Tol2* transposable element identified the minimal *cis*-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics*, 2006, 174(2): 639–649.
- [15] Kawakami K, Takeda H, Kawakami N, et al. A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Dev Cell*, 2004, 7(1): 133–144.
- [16] Kawakami K, Shima A, Kawakami N. Identification of a functional transposase of the *Tol2* element, an *Ac*-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(21): 11403–11408.
- [17] Kawakami K, Imanaka K, Itoh M, et al. Excision of the *Tol2* transposable element of the medaka fish *Oryzias latipes* in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Gene*, 2004, 338(1): 93–98.
- [18] Wu SC, Meir YJ, Coates CJ, et al. *piggyBac* is a flexible and highly active transposon as compared to *Sleeping Beauty*, *Tol2*, and *Mos1* in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(41): 15008–15013.
- [19] Bird AW, Erler A, Fu J, et al. High-efficiency counterselection recombineering for site-directed mutagenesis in bacterial artificial chromosomes. *Nat Methods*, 2012, 9(1): 103–109.
- [20] Nakazawa Y, Huye LE, Dotti G, et al. Optimization of the *PiggyBac* transposon system for the sustained genetic modification of human T-lymphocytes. *J immunother*, 2009, 32(8): 826–836.
- [21] Yusa K, Rad R, Takeda J, et al. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 363–369.
- [22] Geurts AM, Yang Y, Clark KJ, et al. Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system. *Mol Ther*, 2003, 8(1): 108–117.
- [23] Suster ML, Abe G, Schouw A, et al. Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish. *Nat Protoc*, 2011, 6(12): 1998–2021.
- [24] Suster ML, Sumiyama K, Kawakami K. Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish and mice. *BMC Genomics*, 2009, 10: 477.

(本文责编 陈宏宇)