

DOI: 10.1360/yc-007-0570

利用 Red 同源重组系统进行牛 β 酪蛋白基因敲除

薛可^{1,2}, 李峰³, 罗光彬¹, 黄玮玮^{2,4}, 陈学进²

1. 沈阳农业大学畜牧兽医学院, 沈阳 110161;
2. 上海交通大学附属新华医院发育生物学研究中心, 上海 200092;
3. 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031;
4. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642

摘要: 利用 EL350 基因工程菌进行同源重组, 成功进行基因敲除已有报道, 但利用该系统进行乳腺生物反应器质粒构建的研究却未见报道。实验采用含有完整的牛 β 酪蛋白基因的 CSN2 质粒作为基因打靶的载体, 设计不同的同源臂, 成功地敲除了 β 酪蛋白基因的编码区。并且同时利用同源重组技术对敲除不同大小的 DNA 片段的效率进行了研究。为进一步利用 CSN2 质粒两端的调控序列, 插入新的基因, 研究其表达功能, 或者进行乳腺生物反应器的研究奠定了基础。

关键词: 同源重组; 牛 β 酪蛋白基因; *Cre-loxP* 重组系统; 基因敲除

Knock out of bovine beta casein gene by homologous recombination

XUE Ke^{1,2}, LI Feng³, LUO Guang-Bin¹, HUANG Wei-Wei^{2,4}, CHEN Xue-Jin²

1. College of Animal Science and Vet Medicine of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;
2. Shanghai Jiao Tong University Xinhua Hospital Development Biology Research Center, Shanghai 200092, China;
3. Institutes of Biochemistry and Cell Biology, SIBS, CAS, Shanghai 200031, China;
4. College of Animal Science of Huanan Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: It has been reported that homologous recombination with Red system has been successfully used for knock-out. We try to work on the construction of the expression vector of Mammary Gland with Red system. This study takes CSN2 as a vector for gene target, which contains the complete bovine beta casein gene. Different homologous arms were designed and the CDS region of the beta casein gene was successfully knocked out. The efficiency was also explored for knocking out different DNA fragment. Based on the study, it is very convenient for making a deep research of the foreign gene expression under the regulation of CSN2 flanking region.

Keywords: homologous recombination; bovine beta-casein; *Cre-loxP*; knock-out

基因敲除是自 80 年代末发展起来的一种新型分子生物学技术, 它主要是应用 DNA 同源重组的原理, 用设计的同源片段替代靶基因片段, 从而达到

基因敲除的目的。同常规的克隆操作相比该技术具有简单、易行, 无需限制性酶切等特点。

2001 年, Lee 等^[1]将基因缺陷型的 λ 噬菌体导入

收稿日期: 2006-10-30; 修回日期: 2006-11-30

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 项目)(编号: 2001AA216121)[Supported by Hi-Tech Research and Development Program of China (863 Program)(No.2001AA216121)]

作者简介: 薛可(1980—), 男, 河南西平人, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。Tel: 021-65032508 转 1026;

E-mail: xuekecocoal00@163.com

李峰(1972—)男, 河南夏邑人, 博士, 专业方向: 遗传学。E-mail: xlfeng006@163.com

薛可、李峰为共同第一作者。

通讯作者: 陈学进(1960—), 男, 河南柘城人, 博士, 副教授, 研究方向: 发育生物学。Tel: 021-65032508 转 1007; E-mail: chenxuej@yahoo.com.cn

大肠杆菌 DH10B, 构建了一株新的具有重组功能的菌株 DY380(Red 重组系统)。在此基础上, 将 *Cre* 基因(被阿拉伯糖诱导的启动子 P_{BAD} 严紧控制)诱导进入 DY380, 产生了 EL350 菌株(基因型为: DY380 [(*cro-bioA*) <> *araC-PBADcre*]), 可利用 *Cre-loxP* 位点特异性重组系统达到基因敲除的目的^[2]。

2003 年, Brophy 等^[3]成功从 DNA 文库中筛选出含有牛 β 酪蛋白基因的质粒(CSN2), 将其转染牛胎儿成纤维细胞, 核移植进入受体细胞, 产生了高水平表达 β 酪蛋白的转基因牛。本文试图利用 Red 重组系统对 CSN2 质粒进行基因敲除, 来研究乳腺生物反应器质粒的构建。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 仪器

PCR 扩增仪, 凝胶电泳仪, 凝胶成像分析仪, 超净工作台, 恒温培养箱, 摇床, 细菌电击仪。

1.1.2 试剂

质粒 CSN2^[3](包括 6.6 kb 的 5' 端序列, 8.5 kb 全部的编码区, 2.6 kb 的 3' 端序列, 由 Brophy 赠送, 见图 1); 质粒 PL452(见 <http://recombineering.ncicfcrf.gov/Plasmid.asp#PL452>); 质粒 pBluescript II KS (-);

耐热 DNA 聚合酶, DNA Ligation Kits, 限制性核酸内切酶 *Not*、*EcoR*、*BamH*、*Sal*, DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 抽提试剂盒及回收试剂盒购自 Qiagen 公司。

1.1.3 PCR 引物

参照 bovine-beta casein 基因序列(X14711), 设计下列引物, 序列如表 1。

1.2 实验方法^[4,5]

本实验技术路线见图 2。

1.2.1 PCR 扩增同源臂及同源臂的回收

(1) 扩增同源臂: 引物如上, PCR 反应体系: 质粒 CSN2 2 μ L、10 \times LA PCR buffer 5 μ L (Mg^{2+} plus)、dNTP (2 mmol/L)5 μ L、引物(10 μ mol/L)2 μ L、LA *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L、 H_2O 33.5 μ L, 共计 50 μ L。

(2)PCR 产物使用 1%的琼脂糖分离胶进行电泳, 对目的条带进行切胶称重, 按 Qiagen 胶回收试剂盒的说明书进行胶回收。(3)将同源臂和 pMD18-T Vector 连接, 送上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

1.2.2 同源臂和靶基因的连接

(1) 酶切同源臂、载体和靶基因: A 同源臂使

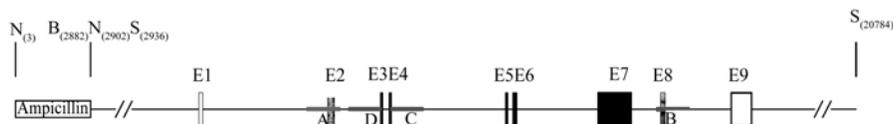


图 1 CSN2 质粒示意图

Ampicillin: 氨苄青霉素抗性基因; E1~E9: 外显子 1~9; ABCD: 同源臂 ABCD; N: *Not*; B: *BamH*; S: *Sal*。

Fig. 1 Structure of CSN2 plasmid

Ampicillin: ampicillin resistance gene; E1-E9: exon1-9; ABCD: Hom-A (homologous arm A) Hom-B Hom-C Hom-D; N: *Not*; B: *EcoR*; S: *Sal*。

表 1 引物序列表

Table 1 Information on the primers used for amplification of homologous arms

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	位点 Location	产物大小(bp) Product size(bp)	GenBank Accession no.
A arm- <i>Not</i>	Upper <u>ATAAGCGGCCGCCTTCTGTCTTCCAAAAACACT</u>	3307~3329	491	X14711
A arm- <i>EcoR</i>	Lower <u>GTCGAATTC</u> TTCTGTATTACCTCTCTTGCAA	3754~3776		
B arm- <i>BamH</i>	Upper <u>ATAGGATCC</u> TTAAGGTCTAAGAGGATTTCAAA	9122~9144	521	X14711
B arm- <i>Sal</i>	Lower <u>GTCGTCGAC</u> TCTGGACTGTGAGATTGTATTTT	9603~9625		
C arm- <i>BamH</i>	Upper <u>ATAGGATCC</u> GATAGTGTTTCATTTCAGAGGCAA	4659~4680	513	X14711
C arm- <i>Sal</i>	Lower <u>GTCGTCGAC</u> AGTTACCCGTCAGTACATAGCC	5133~5154		
D arm- <i>BamH</i>	Upper <u>ATAGGATCC</u> CTCAGATTTTTTTTGAATGCTA	3864~3885	617	X14711
D arm- <i>Sal</i>	Lower <u>GTCGTCGAC</u> TTCCACAGTCAACTCATTATT	4442~4463		

注: 画线部分为限制性核酸内切酶特异识别的核苷酸序列。

Note: The underlined is restriction endonuclease sequence.

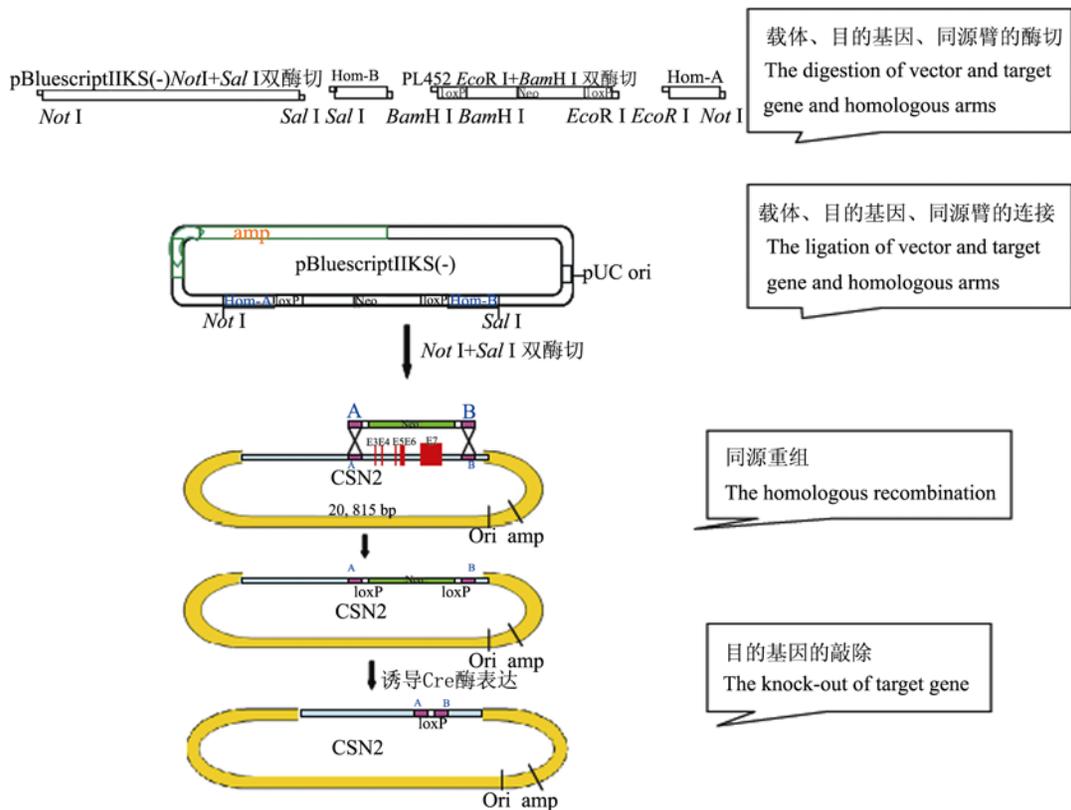


图 2 本实验流程图(图中只显示利用 A 同源臂和 B 同源臂进行同源重组)

E3-E7: 第三个外显子-第 7 个外显子; A、B: 同源臂 A、B。

Fig. 2 The procedure for knock-out of the beta casein CDS (Displaying the homologous recombination with Hom-A and Hom-B)
E3-E7: The third exon to the seventh exon; A, B: Hom-A or Hom-B.

用 *Not* 和 *EcoR* 进行酶切; B、C、D 同源臂使用 *BamH* 和 *Sal* 进行酶切; pBluescript KS(-) 使用 *Not* 和 *Sal* 进行酶切; PL452 使用 *BamH* 和 *EcoR* 进行酶切。(2) 酶切产物的回收: 酶切产物使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 按 Qiagen 胶回收试剂盒的说明书进行胶回收。(3) 同源臂和靶基因及载体的连接: 使用 T4 DNA Ligase 将酶切后的 A、B 或 C 或 D 同源臂、pBluescript KS(-) 和 *Neo* 基因 16 连接 16 h 后, 连接产物纯化后进行电击转化^[6], 37 倒置培养平板过夜。

1.2.3 连接产物的鉴定

挑取单克隆菌, 接种到含氨苄青霉素(终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 2 mL LB 中, 过夜培养。使用 Qiagen plamid mini kit 试剂盒进行抽提, 分别使用 *EcoR* + *BamH* 和 *Not* + *Sal* 进行酶切鉴定。37 酶切 2 h 后, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.4 同源重组

Not + *Sal* 酶切连接产物, 1% 的琼脂糖凝胶

进行电泳, 按 Qiagen 胶回收试剂盒的说明书进行胶回收。然后依照 Recombineering protocol # 2(见 <http://recombineering.ncifcrf.gov/Protocol.asp>) 进行同源重组。细菌涂在含氨苄青霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和卡那霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的平板上, 32 倒置培养过夜。

1.2.5 同源重组后质粒的鉴定

挑取单克隆菌, 接种到含氨苄青霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和卡那霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 2 mL LB 中, 过夜培养。使用 Qiagen plamid mini kit 试剂盒进行抽提, 用 *Not*、*BamH* 分别进行酶切鉴定。同时记录克隆数和鉴定正确的克隆数。

1.2.6 诱导 Cre 酶表达, 敲除 *Neo* 基因

使用 10% 的阿拉伯糖诱导 Cre 酶表达敲除 *Neo* 基因。具体步骤见 Recombineering protocol#2 (<http://recombineering.ncifcrf.gov/Protocol.asp>)。抽提质粒后使用 *Not*、*BamH* 分别进行酶切鉴定。同时记录克隆数和鉴定正确的克隆数。

2 结果

2.1 PCR 扩增同源臂

使用如上引物, 以 CSN2 质粒为模板, 进行 PCR 扩增。扩增出的产物以 1% 的琼脂糖凝胶电泳后, 得到预期大小的目的片段(图 3)。

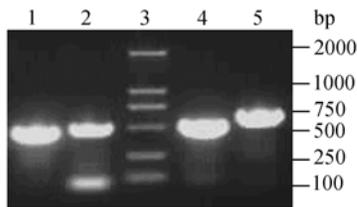


图 3 PCR 扩增同源臂

1: A 同源臂; 2: B 同源臂; 3: DL2000 DNA ladder; 4: C 同源臂; 5: D 同源臂。

Fig. 3 The PCR of homologous arms

1: Hom-A; 2: Hom-B; 3: DL2000 DNA ladder; 4: Hom-C; 5: Hom-D.

2.2 连接产物的鉴定

分别使用 *EcoR* + *BamH* 和 *Not* + *Sal* 进行双酶切后, 1% 的琼脂糖凝胶电泳出现目的条带(图 4)。

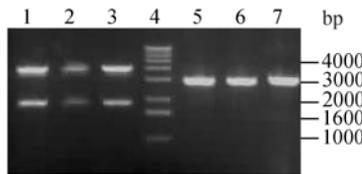


图 4 同源臂、目的基因、载体连接产物酶切鉴定

1~3: 分别使用 AB、AC、AD 同源臂进行连接的产物(*EcoR* + *BamH* 酶切鉴定); 4: 1 kb DNA ladder; 5~7: 分别使用 AB、AC、AD 同源臂进行连接的产物(*Not* + *Sal* 酶切鉴定)。

Fig. 4 The identification of ligation product with restriction endonucleases

1~3: The ligation product used Hom-A and Hom-B or Hom-A and Hom-C or Hom-A and Hom-D(*EcoR* + *BamH*); 4: 1 kb DNA ladder; 5~7: The ligation product used Hom-A and Hom-B or Hom-A and Hom-C or Hom-A and Hom-D(*Not* + *Sal*).

2.3 同源重组后质粒的鉴定

CSN2 质粒大小为 20.8 kb, 在其上存在两个 *Not* 酶切位点(3 和 2902), 故使用 *Not* 进行酶切目的条带为 2.9 kb 和 17.9 kb。使用同源臂 A 和 B 进行同源重组, 筛选基因(*Neo* 基因)替代 CSN2 质粒的整个 CDS 区, 重组后质粒大小应为 17.3 kb。由于重组对 *Not* 位点分布无影响, 故使用 *Not* 进行酶切目的条带应该为 2.9 kb 和 14.4 kb。同理, 使用同源臂 AC、AD 进行同源重组得到的质粒大小应分别为 21.8 kb 和 22.6 kb, 使用 *Not* 进行酶切均应出现 2.9 kb 的

条带, 另一条带应分别为 18.9 kb 和 19.7 kb(图 5)。在 CSN2 质粒上仅存在一个 *BamH* 位点(2882), 故使用 *BamH* 进行酶切仅有一 20.8 kb 的条带。但在打靶基因下游同源臂的前端引入了一个 *BamH* 位点。故使用 AB、AC、AD 三组同源臂进行同源重组后使用 *BamH* 酶切均应得到 10.7 kb 的条带, 另一条带应分别为 6.6 kb、11.1 kb、11.9 kb(图 6)。

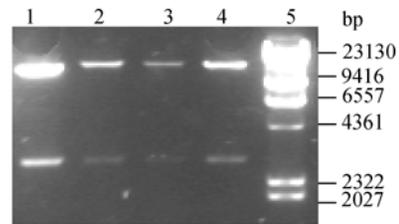


图 5 同源重组后质粒 *Not* 酶切鉴定

1~3: 使用 AB、AC、AD 同源臂同源重组的产物; 4: CSN2 质粒; 5: λ -*Hind* DNA ladder。

Fig. 5 The identification of homologous recombination product with *Not* I restriction endonucleases

1-3: The homologous recombination product used Hom-A and Hom-B or Hom-A and Hom-C or Hom-A and Hom-D; 4: CSN2 vector; 5: λ -*Hind* DNA ladder.

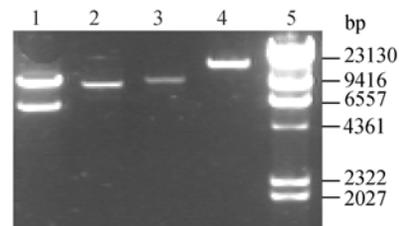


图 6 同源重组后质粒 *BamH* I 酶切鉴定

1~3: 分别使用 AB、AC、AD 同源臂同源重组的产物; 4: CSN2 质粒; 5: λ -*Hind* DNA ladder。

Fig. 6 The identification of homologous recombination product with *BamH* I restriction endonucleases

1~3: The homologous recombination product used Hom-A and Hom-B or Hom-A and Hom-C or Hom-A and Hom-D; 4: CSN2 vector; 5: λ -*Hind* DNA ladder.

2.4 敲除 *Neo* 基因后质粒的鉴定

使用 10% 的阿拉伯糖诱导 *Cre* 酶表达, 敲除插入的筛选基因(*Neo* 基因), 在两个同源臂之间仅留下了一 *loxP* 位点。相对于 CSN2 质粒来说, 成功地敲除了 AB、AC、AD 同源臂之间的序列, 所得质粒大小应分别为 15.5 kb、20 kb、20.8 kb。故使用 *Not* 进行酶切除了均有 2.9 kb 的条带, 剩下的一条带应该比同源重组后进行该酶切小, 分别为 12.6 kb、17.1 kb、17.9 kb(图 7)。同理进行基因敲除后仍有 *BamH*

位点在下同源臂前端, 故使用 *Bam*H 进行酶切除了共同的 10.7 kb 的条带, 另一条带应分别为 4.8 kb、9.3 kb、10.1 kb(图 8)。

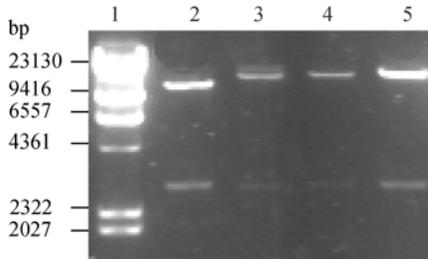


图 7 敲除 *Neo* 基因后质粒 *Not* I 酶切鉴定

1: λ -*Hind* DNA ladder; 2-4: 分别使用 AB、AC、AD 同源臂进行同源重组后又敲除 *Neo* 基因的产物; 5: CSN2 质粒。

Fig.7 The identification of homologous recombination product knocked out *Neo* gene with *Not* I restriction endonucleases

1: λ -*Hind* DNA ladder; 2-4: The homologous recombination product knocked out *Neo* gene used Hom-A and Hom-B or Hom-A and Hom-C or Hom-A and Hom-D; 5: CSN2 vector.

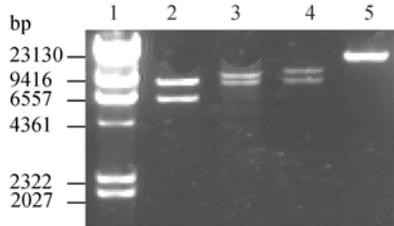


图 8 敲除 *Neo* 基因后质粒 *Bam*H 酶切鉴定

1: λ -*Hind* DNA ladder; 2-4: 分别使用 AB、AC、AD 同源臂进行同源重组后又敲除 *Neo* 基因的产物; 5: CSN2 质粒。

Fig. 8 The identification of homologous recombination product knocked out *Neo* gene with *Bam*H I restriction endonucleases

1: λ -*Hind* DNA ladder; 2-4: The homologous recombination product knocked out *Neo* gene used Hom-A and Hom-B or Hom-A and Hom-C or Hom-A and Hom-D; 5: CSN2 vector.

3 讨论

利用 EL350 的重组功能, 我们首先 knock-in *Neo* 基因, 而后又 knock-out *Neo* 基因, 成功地敲除了 CSN2 质粒上的 β 酪蛋白基因的编码区, 为下一步插入新的基因, 利用其调控序列及启动子来研究新插入基因的功能奠定了基础。同时也为制作转基因动物, 进行乳腺生物反应器的研究提供了可能。

目前的研究表明, 牛酪蛋白基因的 5 端和 3 端都存在重要的调控序列^[7]。因此在构建乳腺生物反应器表达质粒时, 相应的保留牛酪蛋白基因的 5 端和 3 端序列有利于目的基因的高效表达^[3,8], 利用目前的基因克隆技术很难达到这个目的。但是利用同源重组技术却能克服传统的基因操作技术的缺点,

在有效插入目的基因片段地同时完全保留牛酪蛋白基因两端的调控序列。本文的研究为探索一种新的构建乳腺生物反应器质粒的方法奠定了基础。

本研究初步探索了利用同源重组技术进行基因敲除的效率。敲除了不同大小片段(从几十个 bp 到 6 kb 长的 DNA 片段), 结果表明敲除 1 kb、6 kb 的效率基本相似, 但敲除 100 bp 以内的效率远低于 1 kb、6 kb 的效率。同时也证实了利用阿拉伯糖诱导 *Cre* 基因表达, 敲除两个同向排列的 loxP 位点之间的基因片段是可行的, 并且效率比较高。

与传统的基因操作方法相比, 该方法避免了难以寻找合适的酶切位点, 需要进行长片段 PCR 和复杂的连接、纯化等缺点。具备重组效率高, 适用范围广和操作策略灵活等特点。又因为同源重组发生在细胞内, 大肠杆菌的复制、修复系统保证了克隆分子完全忠实于亲代分子, 使突变的发生率几乎为零^[9], 所以说该技术是一类更为广泛和精确的克隆技术, 是传统基因工程和 PCR 技术的一种很好补充。

参考文献(References):

- [1] Lee EC, Yu D, Martinez de Velasco J, Tessarollo L, Swing DA, Court DL, Jenkins NA, Copeland NG. A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics*, 2001, 73 (1): 56-65.
- [2] Liu P, Jenkins NA, Copeland NG. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Research*, 2003, 13(3): 476-484.
- [3] Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, Wells D, L'Huillier P, Laible G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of β -casein and κ -casein. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(2): 157-162.
- [4] Yu D, Ellis HM, Lee EC, Jenkins NA, Copeland NG, Court DL. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11): 5978-5983.
- [5] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [6] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [7] Rijnkels M, Kooiman PM, Krimpenfort PJ, de Boer HA, Pieper FR. Expression analysis of the individual bovine β -, α _{S2}- and κ -casein genes in transgenic mice. *Biochem J*, 1995, 311(Pt3): 929-937.
- [8] Rijnkels M, Kooiman PM, Platenburg GJ, van Dixhoorn M, Nuijens JH, de Boer HA, Pieper FR. High-level expression of bovine α _{S1}-casein in milk of transgenic mice. *Transgenic Research*, 1998, 7(1): 5-14.
- [9] Muylers JPP, Zhang Y, Francis A. Recombinogenic engineering-new options for cloning and manipulating DNA. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(5): 769-779.