

人白介素-2 基因打靶载体的构建、转染及鉴定

王韵斐 陈秋菊 杨莎 崔易虹 杨明明 曹斌云*

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

摘要 为研究人白介素-2 基因在奶山羊胎儿成纤维细胞中的表达,构建人白介素-2 基因的山羊 β -酪蛋白位点打靶载体。以质粒 pBC1 为模板扩增山羊 β -酪蛋白上游 2.5 kb 和下游 3.5 kb 的序列作为 5' 和 3' 同源臂,将克隆得到的人白介素-2 基因和 *neo* 基因插入到 2 个同源臂之间,获得山羊 β -酪蛋白基因打靶载体 pBNI53。利用脂质体将重组质粒转染奶山羊胎儿成纤维细胞进行 G418 筛选,并采用 PCR 和实时定量 PCR 方法对人白介素-2 基因在稳定株中的表达进行验证。检测结果表明,本试验构建的打靶载体 pBNI53 成功转染奶山羊胎儿成纤维细胞,将人白介素-2 基因成功整合至奶山羊胎儿成纤维细胞基因组中,为通过体细胞核移植法制备人白介素-2 基因乳腺生物反应器的研究奠定了基础。

关键词 人白介素-2; β -酪蛋白; 基因打靶; 乳腺生物反应器

中图分类号 Q 782

文章编号 1007-4333(2011)05-0082-06

文献标志码 A

Construction, transfection and identification of human *IL-2* gene targeting vector

WANG Yun-fei, CHEN Qiu-ju, YANG Sha, CUI Yi-hong, YANG Ming-ming, CAO Bin-yun*

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract Targeting vector for the human *IL-2* gene knocking-in the goat β -casein locus was constructed to study the expression of the human *IL-2* gene in fibroblasts of the fetal dairy goat. Goat β -casein gene targeting vector pBNI53 was obtain by cloned goat β -casein upstream 2.5 kb and downstream 3.5 kb sequence as the 5' and 3' homologous arm using pBC1 as a template, with inserted human *IL-2* gene and *neo* gene. The plasmid was transiently transfected into goat fetal fibroblasts by liposome, and then the transfected cells were sieved by G418, then in the stable lines the gene expression was detected by PCR and RT-PCR. After the detection by PCR and RT-PCR, the results suggested the target vector was constructed successfully, and the human *IL-2* gene successfully integrated into the dairy goat fibroblasts, which lay a good foundation for the researching of producing human interleukin-2 gene in mammary gland bioreactor by somatic cell nuclear transfer.

Key words human interleukin-2; β -casein; gene targeting; mammary gland bioreactor

动物乳腺生物反应器是一种专门用于生产重组蛋白的活体生物反应器,是转基因动物技术的研究热点之一。随着生物技术的发展,转基因技术逐步转向利用乳腺生物反应器获取大量有临床价值的药用蛋白。而体细胞基因打靶—核移植技术由于能够将外源基因定点整合到受体细胞基因组中,克服随机整合带来的位置效应及多拷贝插入问题,实现外

源基因在动物乳腺中特异性高效表达等优势,目前已成为制备动物乳腺生物反应器的主要技术选择。近年来国内外的一些研究也证实了这种方法的可行性^[1-3]。虽然利用乳腺生物反应器生产药用蛋白的研究尚处于起步阶段,但目前已有多种重组蛋白进入临床试验,如 AAT、tPA、乳铁蛋白和人抗凝血酶 III 等。我国在这方面也取得了不少成果,如北京兴

收稿日期: 2011-03-03

基金项目: 国家“863”计划项目资助(2007AA10Z167); 陕西省 13115 重大科技创新专项(2009ZDKG-1a)

第一作者: 王韵斐, 硕士研究生, E-mail: meteor1001@163.com

通讯作者: 曹斌云, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: caobinyun@yahoo.com.cn

源生物科技中心在中国农大李宁教授等的指导下于2000年培育出4只含人AAT基因的转基因山羊;上海转基因研究中心和上海杰隆生物工程股份有限公司合作于2001年通过体细胞克隆技术生产出3只转基因羊等。2000年英国PPL公司成功利用基因打靶技术将人AAT基因定点整合到绵羊胎儿成纤维细胞的procollagen基因座,首次获得了基因打靶家畜,其乳中AAT蛋白的含量达到了650 mg/L,远高于显微注射法18 mg/L的水平^[1],初步显示出利用基因打靶技术生产转基因动物乳腺生物反应器的显著优势和广阔发展前景。

人白介素-2(human interleukin-2, hIL-2)是分子质量为14.5 ku的糖蛋白,具有广泛的生物学活性,它能促进一些免疫细胞的增殖,如细胞毒性T细胞^[4-5]和辅助T细胞^[6]等,从而有效地提高人体免疫功能。hIL-2在活化天然杀伤细胞的同时还能增强其溶胞的能力^[7]。在兽医方面因其能提高疫苗的免疫效果,尤其是能提高基因工程亚单位疫苗的免疫效果而备受重视。hIL-2在临床医学领域也具有多方面功能:可作为免疫治疗剂用于新型工程疫苗的构建、结核病和恶性肿瘤的治疗等。另外,hIL-2对于增强手术、化疗及放疗后癌症患者的机体免疫力和抗感染能力也有积极作用。因此利用动物乳腺生物反应器生产重组hIL-2具有重要的研究意义和

广阔的市场开发前景。

本研究克隆hIL-2基因及构建山羊β-酪蛋白位点打靶载体,利用脂质体将重组质粒转染至奶山羊胎儿成纤维细胞,并通过PCR及实时定量PCR方法初步验证目的基因在奶山羊胎儿成纤维细胞中的表达结果,旨在为后续利用乳腺生物反应器生产hIL-2的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

人血,购自西北农林科技大学校医院。质粒pBC1、pIRES及LipofectamineTM 2000购自Invitrogen公司。质粒pBluescript_SK+由本实验室保存。

血液总RNA提取试剂盒、TIAN Script cDNA第一链合成试剂盒、细胞基因组DNA提取试剂盒、大肠杆菌DH5α感受态细胞、Pfu DNA聚合酶、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒及普通质粒小提试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司。pGEM-T easy Vector System1购自Promega公司(美国)。DNA marker、限制性内切酶和LA-Taq聚合酶购自大连宝生物公司。G418、D-MEM/F-12等细胞试剂购自Gibco-BRL公司(美国)。试验所用引物均为自行设计,具体见表1。

表1 试验所用引物

Table 1 Primer used in the study

引物名称	引物序列(5'-3')	片段大小/bp	酶切位点
P1	F:GGGCCCGCGATGTACAGGATGCAACTCC	467	<i>Apa</i> I
	R:ACGCGTCGACGCGTCAAGTCAGTGTGAGATG		<i>Sal</i> I
P2	F:GGGGTACCTCAGGTCTAAGGTATCATCG	2 559	<i>Kpn</i> I
	R:GGGCCGAATAGGAAGGGTCC		<i>Apa</i> I
P3	F:TCCCCGCGGTGGACATTTGTTCTCTAT	3 516	<i>Sac</i> II
	R:CGAGCTCTGTATTGCAGGTGAAT		<i>Sac</i> I
P4	F:ACGCGTCGACGGTATTTTCTCCTTACGC	1 437	<i>Sal</i> I
	R:CCATCGATATCGCTATCGATTAC		<i>Cla</i> I
P5	F:TGGAGCATTTACTGCTGGAT	120	—
	R:TCAGTTCTGTGGCCTTCTTG		

1.2 方法

1.2.1 hIL-2基因的扩增

根据血液总RNA提取试剂盒说明书提取人血总RNA,以oligo(dt)为引物合成cDNA第一链,用

引物P1扩增hIL-2基因。PCR扩增程序为:预变性95℃ 5 min,变性94℃ 30 s,退火58℃ 30 s,延伸72℃ 30 s,35个循环。回收扩增片段,克隆至pGEM-T easy Vector,得到质粒pT-I,酶切鉴定并测序。

1.2.2 山羊β-酪蛋白基因5'和3'端同源臂的扩增

以质粒 pBC1 为模板,分别用引物 P2 和 P3 扩增山羊β-酪蛋白基因5'和3'端片段。PCR 扩增程序分别为:预变性 95 °C 5 min,变性 94 °C 45 s,退火 59 °C 45 s,延伸 72 °C 2 min,35 个循环;预变性 95 °C 5 min,变性 94 °C 45 s,退火 56 °C 45 s,延伸 72 °C 3 min,35 个循环。回收扩增片段,分别克隆至 pGEM-T easy Vector,得到质粒 pT-5 和 pT-3,酶切鉴定并测序。

1.2.3 *neo* 基因的扩增

利用引物 P4 从质粒 pIRES 扩增含 SV40 启动子在内的 *neo* 基因。PCR 扩增程序为:预变性 95 °C 5 min,变性 94 °C 30 s,退火 55 °C 30 s,延伸 72 °C 1 min,35 个循环。回收扩增片段,克隆至 pGEM-T easy Vector,得到质粒 pT-N,酶切鉴定并测序。

1.2.4 *hIL-2* 基因打靶载体的构建

用 *Kpn* I 和 *Apa* I 消化质粒 pT-5,回收山羊β-酪蛋白基因5'端片段并克隆至质粒 pBluescript_SK+ 的相应位点,获得重组质粒 pB5;用 *Sac* II 和 *Sac* I 消化质粒 pT-3,将回收的山羊β-酪蛋白基因3'同源臂克隆至质粒 pB5 的相应位点得到重组质粒 pB53;用 *Sal* I 和 *Cla* I 从质粒 pT-N 中切下 *neo* 基因并克隆到质粒 pB53 的相应位点中,获得重组质粒 pBN53;用 *Apa* I 与 *Sal* I 消化质粒 pT-I,将回收的 *hIL-2* 基因克隆到质粒 pBN53 的相应位点中,获得 *hIL-2* 基因的山羊β-酪蛋白基因打靶载体 pBNI53。

1.2.5 奶山羊胎儿成纤维细胞抗性试验

解冻胎儿成纤维细胞传至第三代后,以 1×10^5 mL⁻¹ 均匀铺于 24 孔板中,每孔体积为 20 μL,37 °C 体积分数 5% 的 CO₂,饱和湿度培养 24 h 后加入 G418,质量浓度分别为 100、200、300、400、500、600、700、800、900 和 1 000 μg/mL,每个质量浓度设 3 个重复。每隔 24 h 进行活细胞计数,以第 7 天细胞全部死亡的浓度作为筛选浓度。

1.2.6 奶山羊胎儿成纤维细胞培养及质粒转染

将胎儿成纤维细胞用含 10% 胎牛血清的 D-MEM/F-12 培养液于 6 孔板中进行常规培养。当细胞达到 70%~80% 的融合时,于转染前 30 min 将完全培养基换成无血清培养基。配制溶液 1,每孔 48 μL 无血清培养基 OPTI-MEM + 2 μL

Lipofectamine™ 2 000 (总体积 50 μL),温育 5 min;配制溶液 2,每孔 49.6 μL 无血清培养基 OPTI-MEM+0.8 μg 质粒(总体积 50 μL)。将溶液 1 与溶液 2 混合,室温下放置 20 min,与此同时将 6 孔板中的细胞用无血清培养基 OPTI-MEM 冲洗细胞两遍后,加入 500 μL 无血清培养基 OPTI-MEM,6 h 后更换含有血清的完全培养基,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.7 阳性克隆的筛选及 PCR 鉴定

转染细胞培养 48 h 后,于细胞培养皿中加入 G418 母液进行筛选。一周后 G418 浓度减半,然后挑取阳性单克隆进行传代培养。待细胞长满后按照细胞基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取细胞基因组 DNA,并以此为模板利用引物 P1 扩增 *hIL-2* 基因序列进行鉴定。

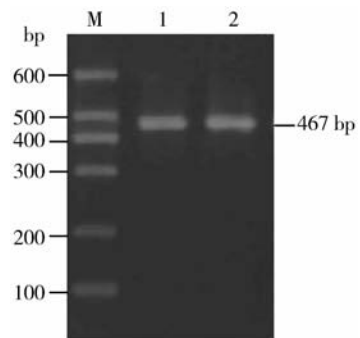
1.2.8 阳性克隆的实时定量 PCR 检测

筛选出阳性克隆后,以未转染细胞为对照组,用 Trizol 法提取细胞总 RNA 进行逆转录合成 cDNA,然后以羊 *GAPDH* 基因为内参,利用 *hIL-2* 基因特异性引物 P5 进行实时定量 PCR 检测 *hIL-2* mRNA 的表达。扩增程序为:预变性 95 °C 30 s,随后 95 °C 3 s,60 °C 30 s,40 个循环。反应结束后用 ABI7500 分析软件进行数据分析。

2 结果

2.1 *hIL-2* 基因的扩增结果

利用 RT-PCR 扩增 *hIL-2* 基因编码区(CDS),经琼脂糖凝胶电泳检测,条带约为 467 bp 与预期相符(图 1)。测序结果经 BLAST 分析(<http://blast>。



M 为 Marker I;1,2 为 *hIL-2* CDS 区扩增产物。

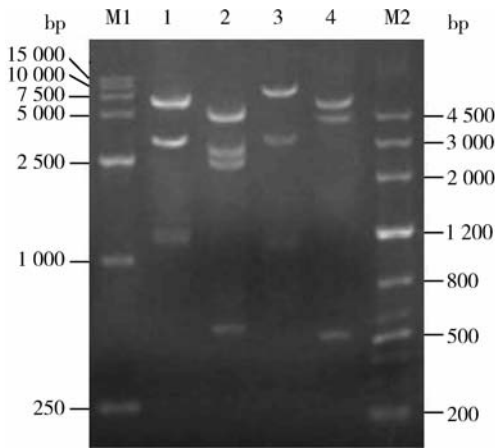
图 1 *hIL-2* CDS 区 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoretic result of *hIL-2* CDS amplified by PCR

ncbi.nlm.nih.gov), 表明所克隆 *hIL-2* 片段与 GenBank 报道的(NM_000586)序列完全一致。

2.2 *hIL-2* 基因打靶载体 pBNI53 的酶切鉴定

对构建的 *hIL-2* 基因打靶载体 pBNI53 进行 *Kpn* I 和 *Cla* I 双酶切, 分别获得 1.3、3.1 和 6.5 kb 3 条片段; 经 *Kpn* I、*Apa* I 和 *Sac* I 三酶切, 分别获得 0.6、2.5、2.9 和 4.9 kb 4 条片段; 经 *Kpn* I 单酶切, 分别获得 3.1 和 7.8 kb 2 条片段; 经 *Xba* I 单酶切, 分别获得 0.5、4.4 和 6.0 kb 3 条片段。以上结果均与预期相符(图 2)。测序表明骨架载体上各片段连接正确, 载体 pBNI53 结构如图 3 所示(测序图略)。



M1 为 D15000 Marker; 1 为 *Kpn* I / *Cla* I 双酶切; 2 为 *Kpn* I / *Apa* I / *Sac* I 三酶切; 3 为 *Kpn* I 单酶切; 4 为 *Xba* I 单酶切; M2 为 Marker III。

图 2 打靶载体 pBNI53 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction analysis of targeting vector pBNI53

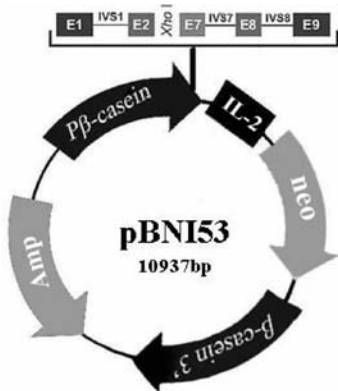


图 3 打靶载体 pBNI53 结构示意图

Fig. 3 Structure of targeting vector pBNI53

2.3 质粒转染奶山羊胎儿成纤维细胞后的筛选结果

G418 质量浓度为 500 μ g/mL 时细胞在 7 d 内全部死亡, 所以选择 500 μ g/mL 对转染细胞进行加压筛选, 然后以 250 μ g/mL 的终质量浓度进行细胞的维持培养。转染质粒胎儿成纤维细胞筛选培养 7 d 后结果如图 4。只存留少量细胞存活, 说明重组质粒已转染至胎儿成纤维细胞中并成功表达了 *neo* 基因。之后挑取阳性单克隆, 进行传代培养 7 d 后增殖长满(图 5), 表明得到的细胞能够正常存活, 可以进行下一步检测。



图 4 转染后的细胞筛选结果 (10×20)

Fig. 4 Screening results of transfected cell

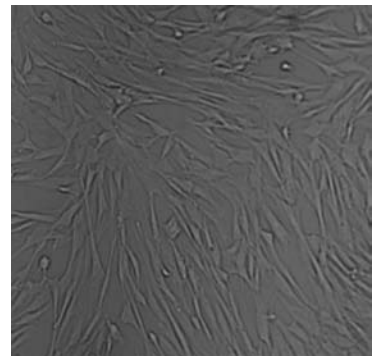
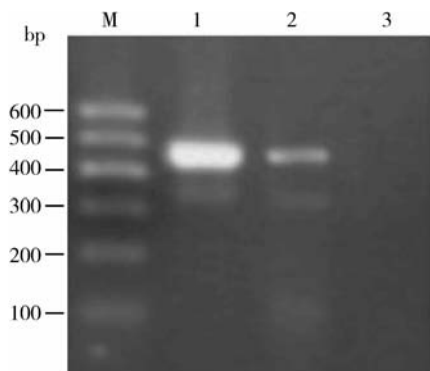


图 5 阳性单克隆传代培养结果 (10×20)

Fig. 5 Subculture results of positive monoclonal

2.4 阳性克隆 PCR 检测结果

提取阳性细胞基因组 DNA 进行 PCR 检测, 结果如图 6。其中 1 为阳性对照, 以质粒 pT-I 为模板扩增结果, 2 为转染细胞经 PCR 扩增结果, 3 为阴性对照, 以未经转染细胞基因组 DNA 为模板扩增结果。表明 *hIL-2* 基因已成功整合至转染细胞基因组中。



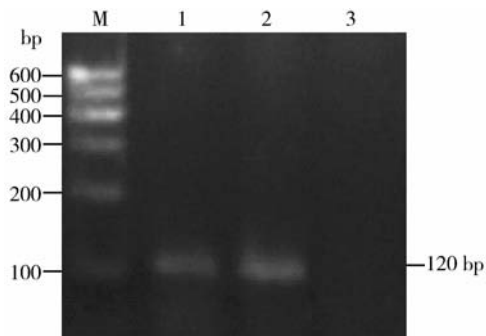
M 为 Marker I ; 1 为阳性对照; 2 为转染细胞 PCR 检测结果; 3 为阴性对照。

图 6 转染细胞 PCR 产物电泳结果

Fig. 6 Electrophoretic result of transfecting cell amplified by PCR

2.5 实时定量 PCR 检测结果

实时定量 PCR 检测阳性克隆中 *hIL-2* mRNA 的表达, 结果如图 7 所示, 可见目的条带清晰单一, 大小与预期一致, 表明 *hIL-2* 基因在细胞中得到了成功表达。



M 为 Marker I ; 1 为转染细胞中 *hIL-2* mRNA 表达结果; 2 为 GAPDH; 3 为未转染细胞中 *hIL-2* mRNA 表达结果。

图 7 *hIL-2* mRNA 表达结果

Fig. 7 Results of *hIL-2* mRNA expression

3 讨论

1) 基因打靶与体细胞克隆技术的结合是动物乳腺生物反应器的发展趋势。利用同源重组原理进行基因打靶技术能够将目的基因定位整合于乳蛋白基因座, 充分利用天然乳蛋白固有的高效表达调控机制, 克服拷贝数依赖和随机整合的位置效应, 保证目的基因在乳腺中的特异性表达, 并能取得与乳蛋白一致的表达水平。基因打靶是一种基于同源重组的外源 DNA 导入技术, 它能将含已知序列 DNA 片段整合到受体细胞基因组中, 并使外源基因得以表

达^[8-9], 故基因打靶的实质是同源重组。目前国内外有很多关于打靶载体构建的研究, 其中同源重组效率一直是研究的重点。一般来说 ES 细胞同源重组率为 $10^{-5} \sim 10^{-7}$, 在体细胞中则还要低 2 个数量级, 并且非同源重组率会比同源重组高出几个数量级^[10]。在生产转基因动物过程中, 由于大动物 ES 细胞的分离至今仍未有获得成功的报道, 因此通常用胎儿成纤维细胞做打靶受体。胎儿成纤维细胞活力好, 分化程度低, 进行细胞转染及筛选后可作为核供体细胞生产转基因动物^[11-13], 从而获得定点整合转基因乳腺生物反应器。这就需要行之有效的富集方法来提高同源重组效率, 虽然本试验构建的打靶载体采用了启动子诱捕策略, 但由于乳蛋白基因的打靶无法在成纤维细胞中使用启动子诱捕策略也无法通过激素诱导进行进一步的蛋白检测, 因此本试验采用正向筛选策略来获得阳性重组子。

2) 同源臂的长度也是影响同源重组效率的重要因素之一^[14-15]。Thomas 等曾报道: 当同源臂的长度在 4~9 kb 之间, 随着同源臂长度的增加, 中靶效率将增加 10 倍, 随机整合效率增加 40 倍^[16]。本研究以 β -酪蛋白上游第一、第二、第七外显子及第一内含子 2.5 kb 的调控序列作为 5' 同源臂, 以下游第九外显子及第八内含子 3.5 kb 序列作为 3' 同源臂, 成功构建长度为 6.0 kb 的同源臂。试图在同源重组效率允许范围内, 经适当缩短同源臂的长度, 从而缩短整个打靶载体的长度, 提高了阳性细胞的筛选效率^[17]。

3) 构建合理的载体是实现目的基因在细胞中成功表达的基础^[18]。而构建能够保证外源基因在乳腺组织中高效表达的载体是成功获得乳腺生物反应器的关键之一, 本研究所构建的山羊 β -酪蛋白基因打靶载体, 经 PCR 及实时定量 PCR 检测证明已成功整合到奶山羊胎儿成纤维细胞中, 以期能够充分利用 β -酪蛋白基因固有的高效表达调控机制, 实现 *hIL-2* 基因在乳腺组织中的高效稳定表达, 从而为通过体细胞核移植法制备 *hIL-2* 基因乳腺生物反应器的研究初步奠定了基础。

4 结论

本研究将 *hIL-2* 基因插入到山羊 β -酪蛋白 5' 同源臂第七外显子下游, 成功构建出 *hIL-2* 基因的定点整合载体; 然后转染至奶山羊胎儿成纤维细胞, 并经 G418 筛选后对阳性克隆进行 PCR 及实时定量

PCR检测,验证了*hIL-2*基因在DNA和mRNA水平上的成功表达,表明打靶载体已经成功整合至奶山羊胎儿成纤维细胞基因组中,从而为生产转*hIL-2*基因奶山羊提供核供体细胞奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] McCreath K J, Howcroft J, Campbell K H S, et al. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells[J]. *Nature*, 2000, 405(6790):1066-1069
- [2] Lan Guo-cheng, Chang Zhong-le, Luo Ming-jiu, et al. Production of cloned goats by nuclear transfer of cumulus cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2006, 73(7):834-840
- [3] 黄赞, 颜景斌, 黄纓, 等. 山羊β酪蛋白基因启动子指导的转基因小鼠乳汁高效表达人凝血因子Ⅸ[J]. *遗传学报*, 2002, 29(3):206-211
- [4] Moller G. T-cell stimulating factors[J]. *Immunology Reviews*, 1980, 51:338-357
- [5] Kasaian M T, Biron C A. The activation of IL-2 transcription in L3T4+ and Lyt-2+ lymphocytes during virus infection *in vivo* [J]. *Journal of Immunology*, 1989, 142:1287-1292
- [6] Mosmann T R, Coffman R L. Two types of mouse helper T-cell clone: Implications for immune regulation [J]. *Immunology Today*, 1987, 8:223-227
- [7] Grimm E A, Mazumder A, Zhang H Z, et al. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1982, 155:1823-1841
- [8] Smithies O, Gregg R G, Boggs S S, et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination[J]. *Nature*, 1985, 317(6034):230-234
- [9] Capecchi M R. Gene targeting[J]. *Scientific American*, 1994, 270(3):34
- [10] Karen M V, Kathleen M, Zsofia I, et al. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:8403-8410
- [11] Denning C, Burl S, Ainslie A, et al. Deletion of the α(1,3) galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(6):559-562
- [12] Yu G, Chen J, Yu H. Functional disruption of the prion protein gene in cloned goats[J]. *J Gen Virol*, 2006, 87(4):1019-1027
- [13] Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-μ and prion protein in cattle[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(7):775-780
- [14] Shulman M J, Nissen L, Collins C. Homologous recombination in hybridoma cells: dependence on time and fragment length [J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10:4466-4472
- [15] 李兰, 沈伟, 邓继先, 等. 影响动物细胞同源重组发生与基因打靶效率的分子机制[J]. *生物技术通讯*, 2006, 17(1):88-91
- [16] Thomas K R, Capecchi M R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells[J]. *Cell*, 1987, 51:503-512
- [17] 孟瑛, 李树浓, 黄绍良. 新的β2m基因打靶载体构建方法的建立[J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(7):889-893
- [18] 褚文辉, 赵海平, 杨福合, 等. 梅花鹿*Col X*基因的RNAi重组慢病毒载体的构建及鉴定[J]. *中国农业大学学报*, 2009, 14(4):29-34

(责任编辑: 苏燕)