

反向 PCR 鉴定 *piggyBac* 介导的哺乳动物 细胞转基因研究

郝碧芳^{1,2}, 王 猛¹

(1. 江苏科技大学 蚕业研究所, 江苏 镇江 212018; 2. 中国农业科学院 蚕业研究所, 江苏 镇江 212018)

摘要: 利用反向 PCR 技术, 研究 *piggyBac* 介导的转基因哺乳动物中外源基因整合位点信息。首先在转座子 *piggyBac* 中插入巨细胞病毒(CMV)启动子元件驱动的绿色荧光蛋白基因(*EGFP*), 构建用于转染哺乳动物细胞的转基因载体 pX_E-CMV-*EGFP*; 同时构建以 CMV 启动子驱动的转座酶基因载体。将 2 种载体以脂质体共转染 HEK293 细胞, 以单独的 pX_E-CMV-*EGFP* 转染为阴性对照, 结果表明, 2 个处理均观察到了绿色荧光蛋白的表达。通过反向 PCR 鉴定, 在共转染转座酶的细胞基因组 DNA 中检测到外源基因的整合, 而阴性对照中没有检测到, 研究结果为进一步分析整合位点的信息及转基因检测提供了依据。

关键词: *piggyBac*; 反向 PCR; 稳定表达; 转基因; 哺乳动物

中图分类号: Q812 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)10-0141-04

Determination of Transgenic Research Mediated by *piggyBac* in Mammalian Cells by Reverse PCR

HAO Bi fang^{1,2}, WANG Meng¹

(1. Sericultural Research Institute, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China;

2. Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China)

Abstract: To analyze the integration site information, reverse PCR was performed in the transgenic research. *EGFP* gene promoted by cytomegavirus virus (CMV) promoter was cloned into the insect transposon vector *piggyBac* to construct the transgenic vector pX_E-CMV-*EGFP*. The transposase gene driven by CMV promoter was also constructed. Then they were co-transfected into the human embryonic kidney (HEK) 293 cells. Transfection of pX_E-CMV-*EGFP* only was used as the negative control and the fluorescences were observed in both treatments. The results of reverse PCR showed that *EGFP* gene was incorporated into the genomic DNA of the co-transfected cells, while no objective band was detected in the controls. The results provided a basis for analysis of integration site and determination of the transgene.

Key words: *piggyBac*; Reverse PCR; Stable expression; Transgene; Mammal

piggyBac 是一种从粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 中分离到的具有 TTAA 插入位点特异性的 DNA 转座子。*piggyBac* 可在昆虫基因组中准确切离, 转化频率较高, 并且不受宿主因子的限制, 是目前转基因昆虫研究中应用最广的转座子载体。

Ding 等^[1] 研究表明, *piggyBac* 系统在哺乳动物体内也具有较高的转座活性。作为一种非病毒基因转移工具, *piggyBac* 系统具有高容量、高效率和高安全性等优势, 在动物基因工程以及基因治疗方面具有诱人的前景, 在转基因及其基因组功能研究领域

收稿日期: 2011-05-09

基金项目: 江苏科技大学科技计划项目(35180905)

作者简介: 郝碧芳(1974), 女, 陕西白水人, 助理研究员, 博士, 主要从事分子生物学研究。E-mail: bf-hao1974@163.com

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

均发挥着重要的作用^[2]。

随着转基因技术的迅速发展,许多学者已经致力于应用转基因动物进行基因组功能、基因治疗等方面的研究^[3],而转基因的稳定性、安全性以及外源基因的整合位点、整合拷贝数等均影响外源基因在转基因动物中的表达,因此,外源基因的整合位点信息对转基因及基因组功能的深入研究均具有重要意义。反向 PCR 是用反向的互补引物来扩增一段已知序列旁侧的 DNA,可用于研究与已知 DNA 区段相连接的未知染色体序列,因此又称为染色体缓移或染色体步移。基本步骤是先用在已知序列中没有酶切位点的限制性内切酶消化样品 DNA,然后用 DNA 连接酶将酶切产物连接成一个环状 DNA 分子,通过反向 PCR 引物扩增已知序列的上游片段和下游片段^[4],从而获得转基因插入位点等信息。

本研究构建了用于哺乳动物细胞的转基因载体 pXL CMV EGFP,同时构建以 CMV 启动子驱动的转座酶基因载体,将 2 种载体以脂质体共转染 HEK293 细胞,以单独的 pXL CMV EGFP 为阴性对照,通过反向 PCR 鉴定证实了共转染转座酶基因的细胞基因组 DNA 中外源基因的整合,而阴性对照中没有检测到外源基因的整合,从而验证该方法在转基因检测中的实用性,也为研究整合位点的信息提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料

HEK293 细胞、pXL Bac II EGFP 及 pCasper hsc orf 由江苏科技大学蚕业研究所重点实验室保存(载体序列见 <http://piggyBac.bio.nd.edu/>),pEGFP N1 载体购自 Clontech 公司,真核表达载体 pcDNA3.1(+) 购自 Invitrogen 公司。

1.2 载体构建

1.2.1 pXL CMV EGFP 的构建 用 *Nco*I 和 *Afl*II 酶切 pEGFP N1 载体(用 Klenow 酶补平),回收包含 *EGFP* 与 *SV40* 在内的约 960bp 的片段;将片段连接于由 *Nco*I 和 *Not*I 酶切的 pXL Bac II EGFP 载体上(Klenow 酶补平),用 *EGFP* 基因取代原来载体上的 *EGFP*,*Nco*I 和 *Eco*R V 酶切,鉴定正确后命名为 pXL Bac II EGFP。同时设计一对引物:CMV-PF (5'-GGGGAATTTCGTTGACATTGATTATTGACTAG 3',下划线示 *Eco*R I 酶切位点)和 CMV-PR (5'-GGG CCAATGGGAGCTCTGCTTATATAGACG 3',下划线示 *Nco*I 酶切位点),以 pcDNA3.1(+) DNA 为模板,扩增 CMV 启动子,将获得的 PCR 产物连接到

pXL Bac II EGFP 载体上,用 *Eco*R I 和 *Eco*R V 酶切鉴定正确后命名为 pXL CMV EGFP。

1.2.2 pCMV PBase 的构建 用 *Bgl*II 和 *Xba*I 酶切 pcDNA3.1(+) DNA(Klenow 酶补平),回收约 0.8kb 的 CMV 启动子片段。然后将片段连接于由 *Xho*I 和 *Xba*I 消化的 pCasper hsc orf 载体上(Klenow 酶补平),用 CMV 启动子取代原来载体上的 hsp70 启动子,PCR 鉴定及测序正确后,命名为 pCMV PBase,用于瞬时转染 HEK293 细胞时转座酶的表达。

1.3 细胞转染

将 HEK293 细胞接种到 35 mm 的小皿中,每皿 5×10^5 个细胞,过夜培养后用于转染。取 Lipofectamine 2000 脂质体(Invitrogen)6 μ L,按试剂说明书进行转染,将 pXL CMV EGFP 和 pCMV PBase 按等比例各 2 μ g 混合共转染 HEK293 细胞,同时以单独 2 μ g 的 pXL CMV EGFP 转染 HEK293 细胞作为对照。转染后每隔 12h 用荧光显微镜(Nikon TS100)观察报告基因 *EGFP* 的表达情况。

1.4 细胞 DNA 提取及反向 PCR 检测

在转染后 60h 分别收集细胞,用高盐沉淀法^[5]提取转染细胞基因组 DNA,参照分子克隆实验指南^[4]进行反向 PCR。主要步骤如下:取 3 μ g DNA,用 *Hae*II 限制性内切酶消化 2h 后,再补加 1 μ L 的酶继续酶切 2h,应用酚/氯仿和氯仿各抽提样品 1 次,用无水乙醇沉淀 DNA 样品。再将 *Hae*II 酶切的基因组 DNA 进行自连,连接体系为:DNA 100 ng,10 \times 连接缓冲液 10 μ L,T4 DNA 连接酶 4 μ L,10mmol/L ATP 10 μ L,加 ddH₂O 补足 100 μ L。连接产物于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜后,用酚/氯仿和氯仿各抽提样品 1 次,以无水乙醇再沉淀 DNA 样品,溶于 20 μ L ddH₂O 中。

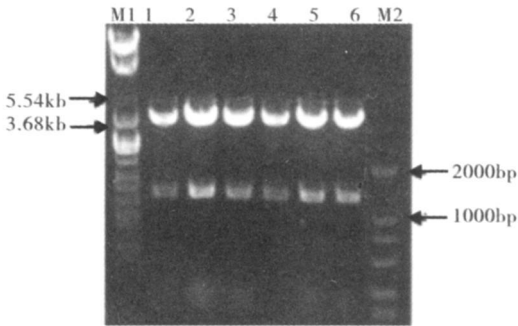
根据 *piggyBac* 的序列,设计一对引物:DF (5'-CCTCGATATACAGACCGATAAAACACATGC 3'),DR (5'-CAGTGACACTTACCGCATTCACAAGCACGG 3')。取上述环状 DNA 5 μ L 作为模板,以 DF/DR 为引物,反向 PCR 检测报告基因 *EGFP* 整合到基因组的情况,以单独转染 pXL CMV EGFP 的细胞 DNA 模板作为对照。

2 结果与分析

2.1 转座载体 pXL CMV EGFP 的鉴定

用 *Nco*I 和 *Afl*II 酶切 pEGFP N1 载体,回收包含 *EGFP* 与 *SV40* 片段(约 960bp),纯化后将其

连接到转座载体 pXL Bac II-EGFP 上。对获得的载体进行酶切分析(*Nco*I 和 *Eco*R V),电泳观察到约 960 bp 的酶切片段,表明转座载体第一步构建成功。为了分析转座载体在哺乳动物细胞的转座特性,用 CMV 启动子取代了载体原来的 3×P3 启动子,用 *Eco*R I 和 *Eco*R V 双酶切鉴定(图 1),切出了一条约 1500 bp 条带,与预期结果一致,其中包括上述 960 bp 的片段和 600 bp 左右的 CMV 启动子片段,表明载体构建正确。

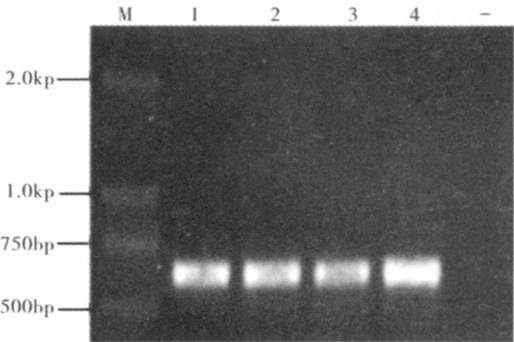


M1.λ 噬菌体 DNA *Bam*H I、*Eco*R I 及 *Hind*III 酶切消化条带;
M2. DL2000 Marker; 1-6. pXL CMV EGFP 重组质粒

图 1 转座载体 pXL CMV EGFP 的鉴定图谱

2.2 表达转座酶的 pCMV Pbase 载体的鉴定

由于构建载体时将 *Bgl* II 位点补平,因此采用引物 CMV-PF 和 CMV-PR 对重组载体 pCMV-PBase 进行 PCR 鉴定,如图 2 所示,获得了 600 bp 左右条带,与预期大小一致,表明载体构建成功。

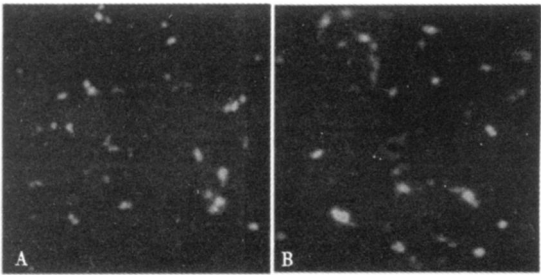


M. DL2000 M arker; 1-4. 重组克隆子的
PCR 结果; - 空白对照

图 2 pCMV PBase 载体的 PCR 鉴定图谱

2.3 EGFP 基因在 HEK293 中的表达情况

采用脂质体介导法将质粒 pXL CMV EGFP 和 pCMV PBase 共转染或单独用 pXL CMV EGFP 转染 HEK293 细胞。36h 后用荧光显微镜观察到 EGFP 在 HEK293 细胞中表达(图 3),表明 pXL CMV EGFP 可以在哺乳动物细胞中表达,但 EGFP 是否插入基因组 DNA 中尚未确定。

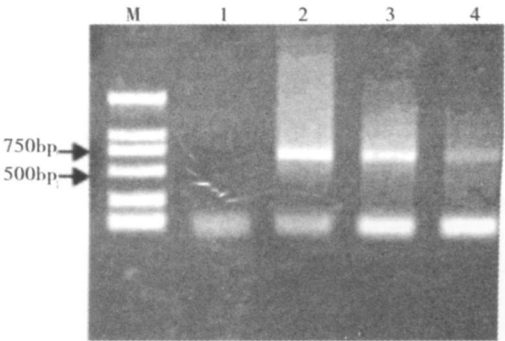


A. pXL CMV EGFP 和 pCM V PBase 共转染的细胞;
B. pXL CMV EGFP 单独转染的细胞

图 3 EGFP 基因在 HEK293 中的表达情况(200×)

2.4 反向 PCR 鉴定结果

以转染细胞的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增后,检测到约 730 bp 的阳性条带(图 4),而未加编码转座酶载体的对照则没有扩增条带,从而表明在 *piggyBac* 与转座酶共转染的 HEK293 细胞中,外源基因已插入细胞基因组中。



M. DL2000 Marker; 1. pXL CMV EGFP 单独转染 HEK293 细胞;
2-4. pXL CMV EGFP 和 pCM V Pbase 共转染 HEK293 细胞

图 4 反向 PCR 检测 HEK293 中 EGFP 基因整合情况

3 讨论

piggyBac 转座子来源于鳞翅目昆虫,是目前转基因昆虫中最有应用前景的转座子载体,而 CMV 启动子/增强子被广泛应用于构建高效真核表达载体,用于基因工程、基因治疗和 DNA 免疫^[6]。本研究成功构建了 CMV 启动子驱动的 EGFP 基因,并将其插入 *piggyBac* 转座载体中,同时构建了 CMV 启动子驱动的转座酶基因的辅助质粒,从而获得可以用于转染哺乳动物细胞的转基因载体。通过共转染观察到了 EGFP 的成功表达,并通过进一步的反向 PCR 分析发现,EGFP 基因已经成功整合到转染细胞基因组中,而单独转染转座载体的细胞基因组中没有检测到 EGFP 外源基因的整合,说明构建的载体可以用于进一步的动物试验。在许多稳定表达外源基因的细胞系或者转基因动物中,一般用普通 PCR 检测外源基因的整合。(下转第 152 页)

面,规范完善的资源基础数据信息设置,完善高效的模糊检索,精确快速的精准查询,完善安全的资源数据管理,支持对数据库应用的开发,为我国从事小麦遗传改良、栽培技术研发、种子企业、推广服务的技术人员和种植户等提供品种资源信息。

本项目构建的河南省小麦品种信息数据库,其年度跨越、品种数量及涵盖信息量在国内同类型数据库中较为少见,数据库信息设置及操作界面也较为先进,可为国内从事小麦品种选育、生产技术、推广服务等工作的人员提供翔实可靠的信息支撑。

但农作物品种数据库的构建与更新是一个动态过程,随着相关学科的发展,数据库查询管理系统还有较大发展空间,例如,可将数据库扩展至其他区域和作物,操作界面设计可继续优化,数据库可增加品种图片支持等,均有待于进一步完善。

参考文献:

[1] 严洪冬,张月学,唐凤兰,等.黑龙江省农作物种质资源

数据库的建立[J].黑龙江农业科学,2005(1): 1 3.

[2] 陈伟英,王晓娟,窦有恒,等.甘肃省农作物种质资源数据库及查询系统的建立[J].甘肃农业科技,2003(4): 22 25.

[3] 雷波,曹艳,李晓.基于 JSP 技术的四川小麦种质资源信息系统的设计和实现[J].贵州农业科学,2009, 37 (10): 242 245.

[4] 党玉梅,古立刚.基于 Web 的小麦资讯和小麦种质资源文献查询系统建立的研究[J].农业网络信息,2007 (9): 81 83.

[5] 林丽娜.基于 Spring+ Struts+ Hibernate 的轻型架构实现生产数据采集系统[J].电脑编程技巧与维护,2008(13): 5 6, 19.

[6] 张伟,赵浩婕.基于 Spring+ Struts+ Hibernate 框架的高校科研量管理平台的设计与实现[J].现代计算机(专业版),2009(7): 198 200.

[7] 郭伟,席磊,马新明.基于 J2EE 的无公害农产品数字认证系统的设计与实现[J].中国农学通报,2009, 25 (13): 246 249.

(上接第 143 页) 由于提取转染细胞基因组 DNA 时,一般转染的真核表达载体基因组也可以被提取出来,因此,通过普通 PCR 检测整合情况有出现假阳性的可能.反向 PCR 由于其引物设计是特异性载体引物,而模板则是环化的基因组,因此保证了结果的可靠性.随着转基因新方法的出现,转基因检测方法也多样化,该方法为转基因技术检测提供了有效途径,也可以通过进一步测序分析来获知外源基因整合位点的具体信息,为进一步深入研究外源基因表达、基因功能提供依据。

参考文献:

[1] Ding S, Wu X H, Li G, *et al*. Efficient transposition of the *piggyBac* resource (PB) transposon in mammalian

cells and mice[J]. Cell, 2005, 122(3): 473 483.

[2] Zhuang L F, Wei H, Lu C D, *et al*. The relationship between internal domain sequences of *piggyBac* and its transposition efficiency in BmN cells and *Bombyx mori* [J]. Acta Biochim Biophys Sinica, 2010, 42(6): 426 431.

[3] 秦粉菊,金萍,徐项桂.转基因动物技术在畜牧生产上的应用[J].河南农业科学,2005(1): 64 66.

[4] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版.黄培堂,译.北京:科学出版社,2002: 671 675.

[5] Aljanabi S M, Martinez I. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR based techniques[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(22): 4692 4693.

[6] 殷俊磊,周碧君,文明,等.山羊痘病毒 P32 基因重组真核表达载体的构建与鉴定[J].河南农业科学,2010, 39 (9): 132 134.