

利用同源重组对酵母人工染色体左右臂 进行多基因修饰

刘丽荣¹ 卢步峰* 吕子卿 卢波 张小蕾¹ 郭礼和*

(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;
上海赛达生物技术研究中心, 上海 201203; ¹贵阳医学院, 贵阳 550004)

摘要 构建携带哺乳动物细胞筛选基因和酵母人工染色体(YAC)同源序列的载体, 利用酵母中能够发生高频率同源重组的特点对YAC分别进行左、右臂修饰, 依次将NEO、EGFP及PURO基因定点整合到YAC左右臂上。用营养缺陷筛选的方法排除酵母发生突变或随机整合等情况后, 用PCR及Southern杂交方法证实各筛选基因定点整合于YAC两臂上, 从而获得携带3个哺乳动物细胞筛选基因的YAC克隆。并且由此建立了通过同源重组将哺乳动物标记基因定点引入YAC左右臂的多基因修饰平台。

关键词 同源重组; 酵母人工染色体; 左右臂; 多基因修饰

将外源基因导入体外培养的哺乳动物细胞或组建转基因动物, 可以帮助人们达到研究某基因在细胞内或是动物发育过程中功能行使的情况。载体可以是质粒、黏粒、细菌人工染色体(BAC)、噬菌体人工染色体(PAC)以及酵母人工染色体(YAC)等。其中YAC能够承载几百kb乃至百万碱基对的DNA, 可以引入一组基因, 是迄今为止已知能够承载基因组片段的最大载体, 在基因组及染色体生物学研究中具有其他载体不可替代的作用^[1]。YAC是以pYAC系列质粒为基本载体构建而来, 含有三类基本结构元件: 复制起始点(ARS)、着丝粒(CEN)与端粒(TEL), 使得YAC能够在酵母中稳定地复制和遗传。商品化的pYAC系列穿梭质粒一般只携带TRP1和URA3等基因^[2], 虽然为含有YAC的酵母的培养和操作提供了营养缺陷筛选压力, 但是对于需要满足特殊功能要求的YAC来说是远远不够的。例如, 在我们用携带YAC的酵母原生质体与哺乳动物细胞进行融合, 筛选整合了目的基因的哺乳动物细胞克隆时, 通过对YAC进行哺乳动物细胞标记基因的修饰, 可大大提高我们的工作效率; 而在YAC左、右臂均修饰上筛选标记, 则可进一步提高对YAC完整整合克隆的筛选效率。

本研究相继在已有商品化酵母穿梭质粒pRNA4 [含新霉素磷酸转移酶基因(NEO)] 和pYAC4的基础上, 新建了携带增强绿色荧光蛋白基因(EGFP)和嘌呤霉素乙酰转移酶基因(PURO)的一系列酵母穿梭质

粒。并用醋酸锂转化法将这些线性化的携带哺乳动物标记基因的载体分别转入含有YAC的酵母细胞内, 与YAC发生同源重组, 从而将上述哺乳动物标记基因分别整合到YAC相应的臂上(图1, 图2)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 YAC克隆 YAC-Rnew(宿主为AB1380 *MATa trp1 ura3-52 ade2-1 his5 lys2-1 can-100*)是本实验室构建的重组YAC克隆^[3], 长约400 kb, 覆盖了几近全部人的免疫球蛋白κ链基因座。该YAC-Rnew左臂上携带有TRP1基因, 右臂上有URA3基因, 在普通AHC酵母培养基上能够很好地生长为红色菌落。

1.1.2 质粒 质粒pRNA4-EGFP是以购自ATCC公司的pRNA4为基本载体构建而来, 含pYAC4右臂末端的同源区URA3的一部分、Amp^R基因、EGFP基因、NEO基因、ADE基因和酵母端粒TEL等, 约13.4 kb。转化前用BamHI将其线性化。

质粒pYAC4-LPU是以本实验室构建的pYAC4-linker为基本载体构建而来, 含pYAC4左臂的同源区、CEN4和ARS1及部分TRP1、PURO基因及其

收稿日期: 2005-07-06 接受日期: 2005-08-16

上海市科委重大项目(No.024319101)

*通讯作者。Tel: 021-50805425, Fax: 021-50803194, E-mail:

yjzx@celstar.com.cn

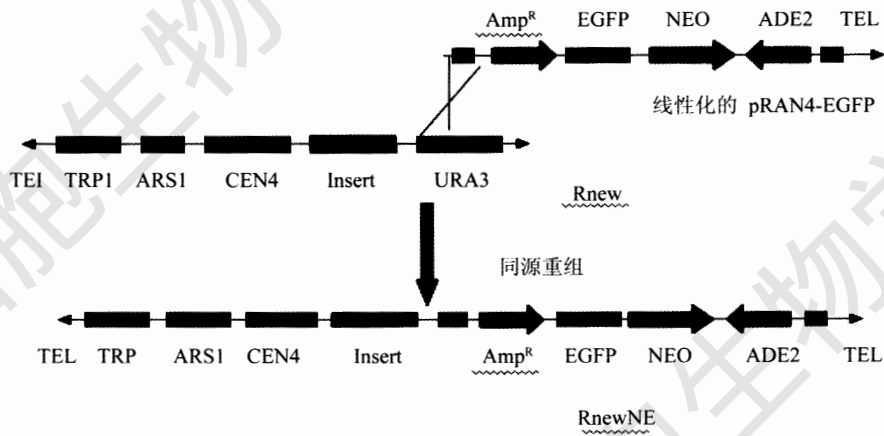


图1 同源重组修饰 YAC 右臂示意图

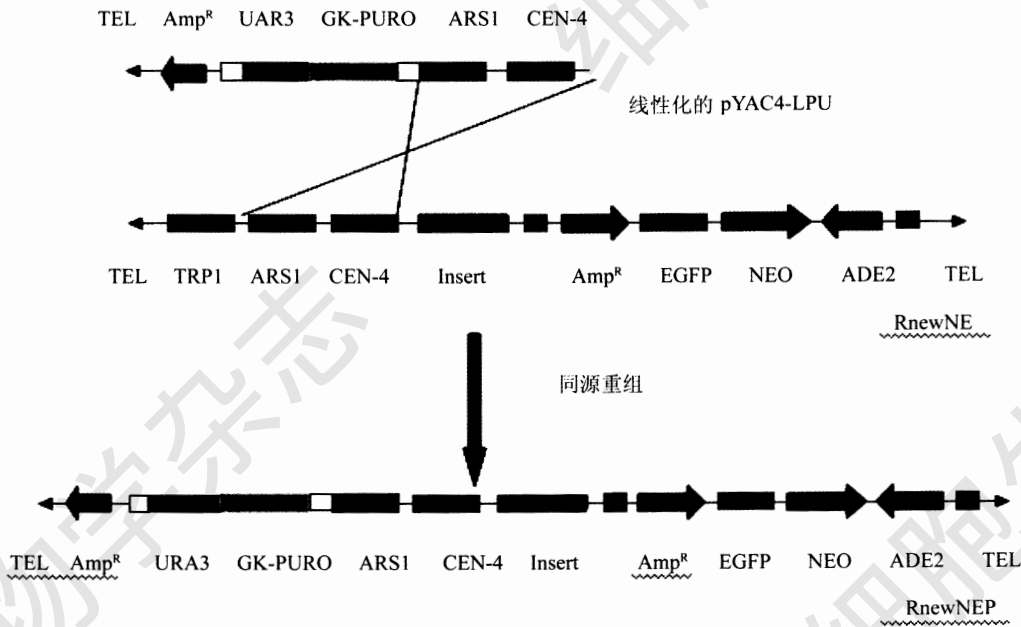


图2 同源重组修饰 YAC 左臂示意图

启动子序列、URA3 基因、Amp^R 基因和酵母端粒 TEL 等，约 9.6 kb。转化前用 *Sal*I 将其线性化。

1.1.3 培养基 各正、负营养缺陷筛选培养基均以普通 AHC(-trp -ura +ade)培养基为基础培养基，通过省缺 ade 和添加 trp 或 ura 等营养成分而产生不同的营养缺陷而来，AHC-A: AHC(-trp -ura -ade); AHC-B: AHC(-trp +ura -ade); AHC-C: AHC(+trp -ura -ade)。

1.1.4 用于 PCR 鉴定及 Southern 杂交鉴定的探针引物 C_κ 基因引物: 5'-ACTGTGGCTGCACCATC-TGTCCTTC A-3', 5'-CTAACACTCTCCCCTGTT-GAAGCT C-3'; 左臂(L)引物: 5'-GGCGAATCATG-GACATAC-3', 5'-TTAAACCAACTTGGCTAC-3'; 右臂

(R)引物: 5'-CTCGCCACTTCGGGCTCATGA-3', 5'-ATCATCGTCGCGCTCCAGCGA-3'; NEO 基因引物: 5'-ATTTCGGCTATGACTGGGCACAACA-3', 5'-AATCGGGAGCGGCGATACCGTAAA-3'; PURO 基因引物: 5'-GAAGCGGGGGCGGTGTT-3', 5'-TCGGC-GGTGACGGTGAA-3'。

1.1.4 其他 酸水解的酪蛋白培养基、腺嘌呤(adenine, ade)、尿嘧啶(uracil, ura)、色氨酸(tryptophan, trp)、溶壁酶(lyticase)、低熔点琼脂糖凝胶、脉冲电泳凝胶、DNA 提取试剂均为 Sigma 公司产品; PCR 试剂为上海申能博彩公司产品; DNA 胶回收试剂盒为上海华舜生物工程公司产品; *Sal*I、PCR 标准参照物为 TaKaRa 公司产品; CHEF-

DRII 型脉冲电泳仪为 Bio-Rad 公司产品; Yeast chromosome PFGE Marker 为 Biolabs 公司产品; Southern 杂交试剂盒为 Promega 公司产品; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 酵母转化 本实验使用醋酸锂转化法^[4]。右臂修饰时以 pRNA4-EGFP 为供体, Rnew 为受体, 获得右臂修饰了 NEO 和 EGFP 基因的 YAC 克隆, 命名为 YAC-RnewNE; 而左臂修饰时则以 pYAC4-LPU 为供体, YAC-RnewNE 为受体, 获得了左臂修饰了 PURO 基因的 YAC 克隆, 命名为 YAC-RnewNEP。

1.2.2 营养缺陷筛选 右臂修饰: 正筛平板为 AHC-B; 负筛平板为 AHC-A。酵母转化后 3 天可以在正筛平板上看到有白色菌落长出。分别挑取单菌落转接于已划格并有具体编号的正筛平板小格内和对应编号的负筛平板小格内, 30 °C 培养箱培养过夜; 在正筛平板上可以看到所有的克隆生长良好, 而负筛平板上有的克隆却不能生长(成干瘪状)。对负筛所得克隆分别进行 PCR 鉴定和 Southern 鉴定。

左臂修饰: 正筛平板为 AHC-C; 负筛平板为 AHC-A。正、负筛过程同上。

1.2.3 PCR 鉴定 用牙签挑取酵母菌于 50 μ l 无菌水中作为模板。PCR 扩增反应^[5]在一个 25 μ l 的总体系中完成, 其中包括 2.5 μ l 10 \times PCR 缓冲液、2.0 μ l dNTP、3.0 μ l 引物、0.2 U *Taq* 酶、2.0 μ l 模板以及 15 μ l 去离子水。95 °C 30 s, 60 °C 1 min、72 °C 1 min, 共 35 个循环。扩增产物用 1.5% 琼脂糖电泳, 0.5 μ g/ml EB 染色, 在紫外下观察电泳条带。

1.2.4 Southern 杂交鉴定 将在负筛平板上不能生长, 而正筛平板上能够生长的对应克隆作为候选的阳性克隆扩增培养, 制备成低熔点琼脂糖小胶

块^[6], 进行脉冲电泳, 电泳参数为: 14 °C、6 V/cm、10~100 s、24 h。脉冲电泳后的脉冲胶用 0.5 μ g/ml 浓度的 EB 染色 1 h, 紫外交联仪中将 DNA 打断, 将脉冲胶中的 DNA 转印迹至尼龙膜上^[7], 用同位素 ³²P 标记的各种探针进行杂交鉴定, 普通 X 感光胶片曝光。

2 结果

2.1 转化及营养缺陷筛选

2.1.1 右臂修饰 YAC-Rnew 本身由于缺少 ADE 基因, 不能在 AHC-B 平板上生长, 当质粒 pRNA4-EGFP 整合进其宿主酵母后, 如果质粒与 YAC 在右臂发生正确同源重组将 URA3 基因破坏, 并引入了 ADE、NEO 和 EGFP 基因, 则能够在 AHC-B 平板上生长, 而不能在 AHC-A 平板生长。因此以 ADE2 为正筛基因, URA3 为负筛基因, 使用正筛平板 AHC-B 排除原菌(即未整合质粒的酵母不能生长); 负筛平板 AHC-A 排除质粒随机整合的克隆(即正确整合质粒的酵母克隆不能生长)。本实验通过正筛所得的 106 个转化子克隆, 经过负筛后获得 5 个候选克隆。

2.1.2 左臂修饰 YAC-RnewNE 克隆本身在 AHC-C 平板上不能生长, 当转入质粒 pYAC4-LPU 后, 如果质粒与 YAC 左臂发生正确同源重组, 左臂 TRP1 基因就被 URA3 基因置换掉, 并引入目的 PURO 基因, 则能够在 AHC-C 平板生长, 而不能在 AHC-A 平板生长; 因此以 URA3 为正筛基因, TRP1 为负筛基因, 使用正筛平板 AHC-C 能排除原菌, 负筛平板 AHC-A 能排除质粒随机整合的克隆。本实验通过正筛得到的 480 个克隆, 经过负筛后获得 5 个候选克隆。

2.2 PCR

分别以 NEO 基因和 YAC-Rnew 插入片段人免疫

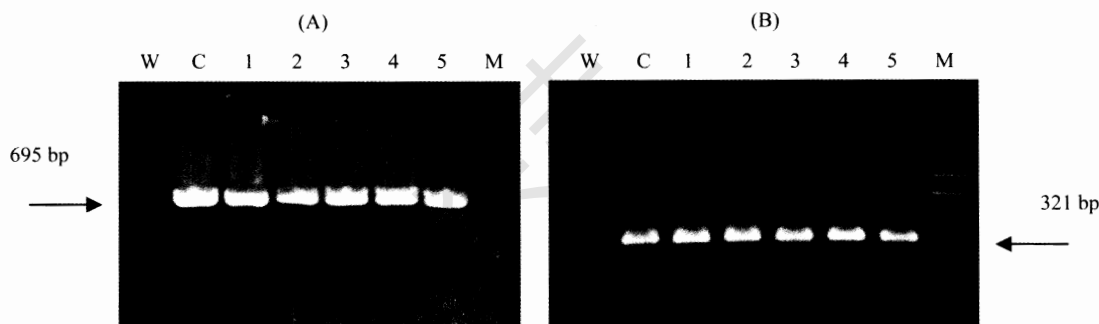


图3 右臂修饰 PCR

A: NEO 基因引物的 PCR 产物; B: C κ 基因引物的 PCR 产物。1-5: RnewNE 候选克隆; C: 阳性对照; W: 以无菌水代替模板 DNA; M: marker。

球蛋白轻链C κ 基因的引物对5个YAC-RnewNE候选克隆进行PCR初筛,结果均为阳性提示这5个候选克隆里含有YAC-Rnew的插入片段和NEO基因(图3)。

2.3 Southern 杂交

2.3.1 右臂修饰和RnewNE的获得 以C κ 基因的PCR产物为探针对5个YAC-RnewNE候选克隆进行杂交(以YAC-Rnew作对照),结果可显示YAC-Rnew重组修饰前后的相对大小和位置;以NEO基因的PCR产物为探针进行杂交的结果则证实了YAC-RnewNE候选克隆都整合了NEO基因(图4)。

2.3.2 左臂修饰和RnewNEP的获得 同上,以C κ 基因和YAC左臂(L)基因的PCR产物为探针与5个YAC-RnewNEP候选克隆进行杂交(以YAC-Rnew、YAC-RnewNE作对照),结果显示YAC-RnewNE重组修饰前后的相对大小和位置;以NEO基因的PCR产物为探针杂交,结果验证了RnewNE和5个RnewNEP候选克隆均为携带NEO基因的;最后以PURO基因的PCR产物为探针杂交,结果证实了5个RnewNEP候选克隆均整合了PURO基因(图5)。

2.3.3 酶切图谱分析 虽然上述实验证明了NEO和PURO基因都已整合到YAC中,但是该结果尚不能明确这些基因是否正确整合在相应的YAC臂上,为此我们分别以NEO和PURO基因的PCR产物为探针,对Rnew、RnewNE和RnewNEP的SalI酶切图谱进行杂交分析(以YAC左臂L和右臂R探针进行杂交作为对照),结果证实:NEO和PURO基因均正确地分别修饰在YAC-Rnew的右臂和左臂上(图6)。

3 讨论

在基因通过同源重组进行定点打靶的实验中,无论是用质粒DNA转化酵母或哺乳动物细胞,其中绝大部分的质粒DNA都是随机整合到宿主的染色体DNA上,只有极少部分发生定点整合,这为正确整合克隆的获得带来了很大困难。因此设法提高正确整合克隆的筛选效率成为首要的问题。增大同源区是提高定点整合效率的有效方法之一,而利用正、负筛选营养缺陷酵母重组子、抗药性或特殊表型筛选整合的哺乳动物细胞则是解决筛选效率问题的有效途径。例如在酵母中,不管是利用减数分裂还是有丝分裂使YAC之间进行同源重组都必须要从大量的克隆中筛选正确重组的重组体,仅仅通过PCR进行筛选相当繁重。如果在YAC上修饰了不同的营养基因(如TRP、URA、HIS、LYS、ADE基

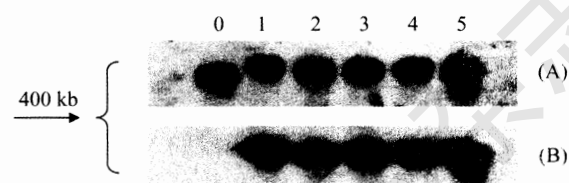


图4 右臂修饰 Southern 杂交

A: 以C κ 基因的PCR产物为探针; B: 以NEO基因的PCR产物为探针。0: Rnew; 1-5: RewNE 候选克隆。

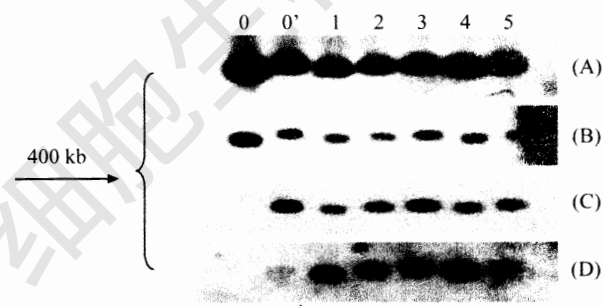


图5 左臂修饰 Southern 杂交

A: 以C κ 基因的PCR产物为探针; B: 以YAC左臂(L)基因的PCR产物为探针; C: 以NEO基因的PCR产物为探针; D: 以PURO基因的PCR产物为探针杂交。0: Rnew; 0': RewNE; 1-5: RewNEP 候选克隆。

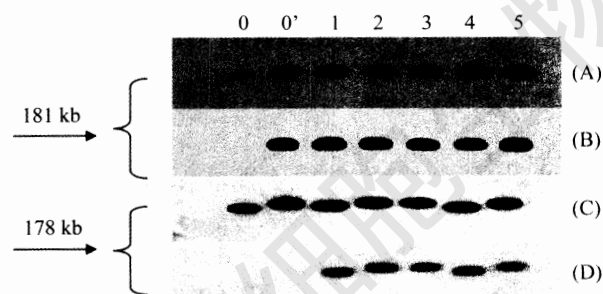


图6 YAC右、左臂修饰的SalI酶切 Southern 杂交

A: 以YAC右臂(R)基因的PCR产物为探针; B: 以NEO基因的PCR产物为探针; C: 以YAC左臂(L)基因的PCR产物为探针; D: 以PURO基因的PCR产物为探针杂交。0: Rnew; 0': RewNE; 1-5: RewNEP 候选克隆。

因等),就可以通过改变培养基的营养成分,使正确重组子有别于其他相关克隆,经过正筛、负筛或正、负筛从而将没有发生正确重组的克隆排除在外。营养筛选不仅大大减少了PCR筛选和Southern鉴定的工作量,而且有极高的效率。在本实验中,经过正负营养缺陷筛选后得到阳性克隆的效率达到了100%。

为了研究人类某些基因座(如Ig)在动物体内的功能表达情况,首先需要通过质粒载体将这些外源

基因导入体外培养的哺乳动物细胞(如胚胎干细胞)。将某个巨大基因座或是一组基因转入哺乳动物细胞中, YAC 是最为理想的载体, 通常采用的方法是从已有 YAC 库筛选含有该基因座的 YAC 克隆, 必要时还须利用同源重组构建尽可能完整的较大 YAC, 然后将含有此 YAC 的酵母原生质体与哺乳动物细胞进行融合, 最终使目的基因整合到哺乳动物细胞的染色体中。然而, 一般的 YAC 都不含在哺乳动物细胞水平上进行筛选所需的抗药基因或其他一些哺乳动物细胞表观筛选标记基因。因此, 对 YAC 进行哺乳动物细胞筛选标记基因修饰, 继而利用标记基因对整合了目的基因的哺乳动物细胞进行有效筛选十分必要。目前国内外对 YAC 的修饰大多是在 YAC 的右臂修饰上 NEO 基因^[8], 虽然这也基本可以满足一般阳性克隆的筛选, 但是却不能保证导入的目的基因的完整性。而在 YAC 左、右臂均修饰上筛选标记基因, 可以进一步提高对含完整 YAC 的克隆的筛选效率。本研究成功地对 YAC 右臂修饰了 NEO 基因(编码产生的新霉素磷酸转移酶使宿主细胞具有 G418 抗性)和 EGFP 基因(编码产生的绿色荧光蛋白使宿主细胞可以在荧光显微镜下发出强绿色

荧光)、左臂修饰了 PURO 基因(编码产生的嘌呤霉素乙酰转移酶使宿主细胞具有嘌呤霉素抗性), 这样可以与目的基因座一起引入上述抗药基因和细胞表型筛选标记基因, 使宿主哺乳动物细胞获得 G418 和嘌呤霉素双重抗性以及能够在荧光显微镜下发出强绿色荧光等, 从而大大提高了正确整合完整目的基因座的阳性哺乳动物细胞的筛选得率。同时也建立了通过同源重组将外源基因定点引入 YAC 左右臂的多基因修饰平台。

参考文献 (References)

- [1] Buke DT *et al.* *Science*, 1987, **236**: 806
- [2] 奥斯伯 F 等。精编分子生物学实验指南, 北京: 科学出版社, 1999, 495
- [3] 聂志妍等。实验生物学报, 2003, **36**: 130
- [4] 亚当斯 A 等。酵母遗传学方法实验指南, 北京: 科学出版社, 2000, 81
- [5] Huxley C *et al.* *Trends Genet.*, 1990, **6**: 236
- [6] 萨姆布鲁克丁 J 等。分子克隆实验指南, 第三版, 北京: 科学出版社, 2002, 438
- [7] 萨姆布鲁克丁 J 等。分子克隆实验指南, 第二版, 北京: 科学出版社, 1996, 474
- [8] 任功一等。生物化学与生物物理学报, 1999, **31**: 317

Modification of YAC Both Arms with Three Genes by Homologous Recombination

Li-Rong Liu¹, Bu-Feng Lu^{*}, Zi-Qing Lv, Bo Lu, Xiao-Lei Zhang¹, Li-He Guo^{*}

(*Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; Shanghai Cel-star Institute of Biotechnology, Shanghai 201203, China; ¹Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China*)

Abstract Yeast artificial chromosome (YAC) was widely used in genomic and chromosome relative researches due to its extraordinary capacity of loading large DNA segments (megabase pairs, Mbp). In this experiment, different vectors bearing YAC homologous sequences and mammalian cell selective genes, such as NEO, EGFP, PURO, were transferred into yeast. By means of homologous recombination, the YACs, which were modified by the genes mentioned above on certain fragments of both arms, were selected and pooled on nutrition-deficient medium, excluded mutation and random integration. Then, the integration of NEO, EGFP and PURO into YAC DNA were identified using PCR and Southern blotting methods. The results indicated that such integration was successfully carried out and the YAC bearing mammalian selective genes was obtained. At the same time, the method, which mammalian selective genes integrated on YAC arms using homologous recombination, was constructed.

Key words homologous recombination; yeast artificial chromosomes; arms; genes modification

Received: July 6, 2005 Accepted: August 16, 2005

This work was supported by the Major Program of the Science and Technology Committee of Shanghai (No.024319101)

*Corresponding author. Tel: 86-21-50805425, Fax: 86-21-50803194, E-mail: yjzx@celstar.com.cn