

# 红系特异表达载体在转基因小鼠中表达的研究\*

贾春平 颜景斌 肖艳萍 方彧聃 黄淑帧 曾溢滔\*\*

上海交通大学医学遗传研究所, 上海 200040

**摘要** 为在个体水平上研究珠蛋白基因位点控制区的 HS2, HS3 及 HS2-HS3 元件对  $\beta$ -珠蛋白基因的时空表达调控作用, 选择本实验室构建的 CMV/GFP, HS2ALL, HS3ALL, HS23ALL 等 4 种重组载体, 经限制性酶切及两步纯化, 得到了 5 种重组 DNA 片段: CMV/GFP, HS2/GFP, CMV/HS2/GFP, HS23/GFP, HS3/GFP, 并用显微注射技术获得转基因小鼠. 用流式细胞仪分析转基因各组织中绿色荧光蛋白(GFP)表达情况, 结果表明 HS2 元件及 1.7 kb 的  $\beta$ -珠蛋白启动子足以调控  $\beta$ -珠蛋白基因的组织特异性表达. 此外, 在不同的转基因小鼠中, GFP 的表达虽有明显的个体差异, 但综合分析比较可以看出, HS2 与 HS3 元件在调控  $\beta$ -珠蛋白基因表达方面, 其增强子作用基本相当, 且两者显示出显著的协同作用.

**关键词**  $\beta$ -珠蛋白基因 位点控制区 绿色荧光蛋白 转基因小鼠

人类  $\beta$ -珠蛋白基因簇的表达具有鲜明的发育阶段特异性, 即在胚胎期为  $\epsilon$  基因表达, 到胎儿期该基因逐渐关闭,  $G\gamma$  和  $A\gamma$  基因逐渐开启; 到成体期,  $\gamma$  基因趋向不完全关闭,  $\beta$  基因表达量增高, 出生 1 年后, 主要表达  $\beta$  基因, 合成珠蛋白的特异性组织器官也随发育阶段的演变而发生变化, 即胚胎期主要在卵黄囊, 胎儿期在胎肝, 到成人期则主要在骨髓的红细胞<sup>[1,2]</sup>. 因此, 各珠蛋白及血红蛋白的合成在个体发育过程中所出现的变化, 反映了珠蛋白基因在表达时空的遗传控制上具有精确的协调性, 这些都需要在个体水平才能显示出来. 为了研究调控  $\beta$ -珠蛋白基因簇各基因时空表达的顺式元件, 也需要在个体水平下进行才能反映出来.

位点控制区(LCR)是珠蛋白基因表达调控中的一个重要的顺式作用元件, 对珠蛋白基因组织及发育阶段特异性表达具有十分重要的作用<sup>[3]</sup>. LCR 位于  $\beta$ -珠蛋白基因簇上游较远处, 长约 20 kb, 在转基因鼠研究中, LCR 可保证使与其相连的外源基因进行组织特异性表达, 且不依赖整合位点, 表达量仅与拷贝数有关<sup>[4-6]</sup>. LCR 由 5 个 I 型 DNA 酶(DNase I)高敏感位点(HS)HS1 ~ HS5 组成, 各

HS 位点具有不同的功能<sup>[3,7,8]</sup>. 经过一系列研究发现, HS2 和 HS3 是 LCR 活性的重要组成部分, 其中 HS2 无论在细胞水平还是在个体水平都表现出典型的增强子活性<sup>[9-11]</sup>; HS3 在稳定整合情况下, 有增强子及开放染色质结构的活性, 并可能对各  $\beta$ -珠蛋白基因的发育阶段特异性表达具有重要作用, 而在瞬时转染中, 其功能不一<sup>[12-14]</sup>.

我们曾报道了几种红系特异表达载体在细胞水平的表达情况, 在细胞水平研究了 HS2, HS3 及 HS2-HS3 对  $\beta$ -珠蛋白基因的表达调控<sup>[15]</sup>, 这些结果能否在个体水平重现呢? 根据各种红系特异表达载体在细胞水平表达的结果, 我们选择了本实验室构建的 CMV/GFP, HS2ALL, HS3ALL, HS23ALL 等 4 种表达载体<sup>[15]</sup>, 经进一步纯化, 用显微注射技术共获得了 29 只转基因小鼠. 经流式细胞仪检测及荧光显微镜下观察各成体转基因小鼠血液, 肝脏, 骨髓, 脾脏, 肺, 肾脏, 心脏, 肠, 脑等组织中的绿色荧光蛋白(GFP)表达情况及不同重组表达载体在成体小鼠外周血中的表达情况, 为研究  $\beta$ -珠蛋白基因的时空表达, HS2 和 HS3 的功能及两者之间的相互作用提供了一定的依据.

2003-01-27 收稿, 2003-03-13 收修改稿

\* 国家自然科学基金(批准号: 39893320)和国家“八六三”计划(批准号: 2002AA206211)资助项目

\*\* 联系人, E-mail: ytzeng@stn.sh.cn

## 1 材料与方方法

### 1.1 重组 DNA 片段的纯化

分别用限制性内切酶 *Pvu* I, *Aat* II, *Sal* I 酶切 CMV/GFP, HS2ALL, HS3ALL, HS23ALL 4 种表达载体, 进行两步纯化, 具体操作方法详见 QIA quick gel extraction 试剂盒说明书 (Qiagen) 及 S/S elution 说明书 (Schleicher & Schuell).

### 1.2 转基因小鼠的制备, PCR 及 southern blot 鉴定

转基因小鼠的制备和鼠尾组织 DNA 的提取按参考文献 [16] 进行. 以小鼠基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 GFP 基因, 以鉴定外源基因是否整合.

PCR 扩增所用引物为: 5'-TGACCTACG-GCGTGCAGTGCTT-3' (上游), 5'-TCGTCCATGC-CGAGAGTGATCC-3' (下游). PCR 扩增条件为: 94 °C 5 min, 1 个循环; 94 °C 45 s, 59 °C 45 s, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 10 min. PCR 产物作电泳检测.

将 PCR 检测阳性的转基因小鼠基因组 DNA, 用 *Bam*H I 完全酶解, 进一步进行 southern blot 鉴定 [16].

### 1.3 成体转基因小鼠各组织中 GFP 表达的检测

选择年龄, 体重相当的阳性成年转基因小鼠, 处死后取其血液, 肝脏, 骨髓, 脾脏, 肺, 肾脏, 心脏, 肠, 脑等组织, 用含适量抗凝剂的生理盐水多次冲洗, 将各组织中的血液尽可能冲洗干净. 然后, 取少量组织充分匀浆, 过滤, 将获得的单细胞悬液用流式细胞仪 (Becton Dickinson FACS Calibur) 检测.

### 1.4 不同重组 DNA 的转基因小鼠外周血中 GFP 表达的检测

分别取由 HS2/GFP, CMV/HS2/GFP, HS23/GFP, HS3/GFP 重组 DNA 得到的同龄转基因小鼠的外周血, 先取一滴外周血做血涂片, 95% 乙醇固定 30 min, 以备在荧光显微镜下观察及拍照; 向其余的外周血中加适量含 2% 小牛血清的 PBS, 2000 r/min 离心 5 min, 用含 2% 小牛血清的 PBS 洗沉淀的细胞, 重复 2~3 次, 用流式细胞仪分析其荧光强度.

### 1.5 FISH 检测转基因小鼠整合位点

选取 3 只不同类型的转基因小鼠 (HS2/GFP,


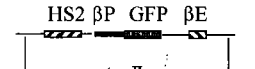
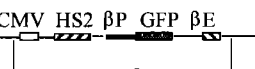
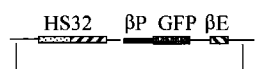

HS3/GFP 和 HS23/GFP) 和 1 只阴性小鼠, 用骨髓细胞制备染色体标本, 探针采用重组载体 HS2ALL, HS3ALL 和 HS23ALL. FISH 操作参见文献 [17].

## 2 结果

### 2.1 转基因小鼠所用 DNA 片段的纯化

CMV/GFP, HS2ALL, HS3ALL, HS23ALL 4 种重组载体经限制性内切酶 *Pvu* I, *Aat* II, *Sal* I 酶切及两步纯化, 得到了 5 种用作制备转基因小鼠的重组 DNA 片段 (表 1).

表 1 转基因小鼠所用重组 DNA 片段一览表

载体名称	片段名称	重组 DNA 片段结构示意图	长度/kb
CMV/GFP	CMV/GFP		6
HS2ALL	HS2/GFP		10
HS2ALL	CMV/HS2/GFP		11
HS23ALL	HS23/GFP		13
HS3ALL	HS3/GFP		10

### 2.2 转基因小鼠 PCR 检测结果

以小鼠尾组织 DNA 为模板, PCR 扩增 GFP 基因, 检测外源基因是否整合, 结果获得一些阳性转基因小鼠. 由 CMV/GFP, HS2/GFP, CMV/HS2/GFP, HS23/GFP, HS3/GFP 得到的原代转基因小鼠个体数分别为 3, 5, 13, 4, 4 只, 平均整合率为 10.89%, 具体 PCR 检测结果见图 1 及表 2.

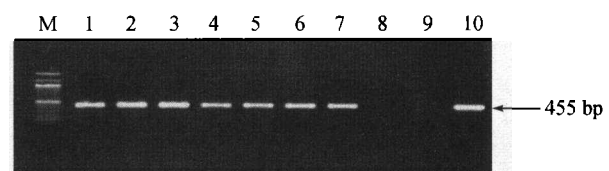


图 1 转基因小鼠的 PCR 检测结果

M 是以 100 bp 作为分子大小的单位; 1~7, HS2/GFP 转基因小鼠; 8, PCR 检测阴性小鼠; 9, 阴性对照; 10, 阳性对照

表2 转基因小鼠一览表

DNA	生产小鼠数	整合小鼠数	整合率/%	♂	♀	死仔
CMV/GFP	31	3	9.68	1	1	1
HS2/GFP	54	6	11.1	1	5	1
CMV/HS2/GFP	80	13	16.2	8	5	0
HS23/GFP	46	4	8.69	1	3	0
HS3/GFP	59	4	6.78	1	3	0

2.3 转基因小鼠 southern blot 鉴定结果

为进一步验证外源基因是否真正整合到小鼠基因组 DNA 上,进行了 southern blot 鉴定,鉴定结果与 PCR 检测结果一致,结果见图 2.

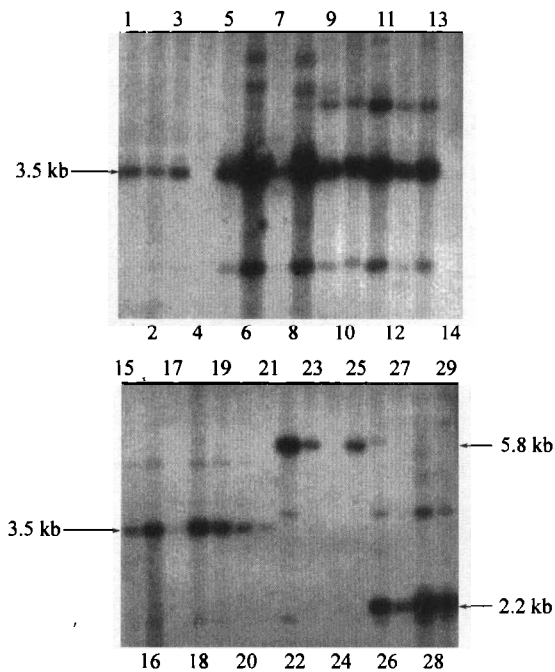


图2 转基因小鼠的 southern blot 鉴定

1~8, HS2/GFP 转基因小鼠,其中4号为阴性;9~21, CMV/HS2/GFP 转基因小鼠;22~25, HS23/GFP 转基因小鼠,其中24号为阴性;26~29, HS3/GFP 转基因小鼠

2.4 转基因小鼠各组织中 GFP 表达情况

经过流式细胞仪分析及荧光显微镜下观察各转基因小鼠中血液、肝脏、骨髓、脾脏、肺、肾脏、心脏、脑等各组织的 GFP 表达及分布情况,结果表明:在由重组体 HS2/GFP 得到的成体转基因小鼠中, GFP 在各红系组织,如骨髓、脾脏、外周血中均有表达,尤其是骨髓中表达 GFP 的阳性细胞占骨髓细胞总数的4.39%,脾脏,外周血中表达 GFP 的阳性细胞数分别占脾脏,外周血细胞总数的 2.6%, 2.44%,而在肝脏、肺、肾脏、脑等其他非红系组

织中,没有检测到 GFP 的表达,因此在该转基因小鼠中, GFP 的表达呈现出明显的红系组织特异性.在由重组体 CMV/HS2/GFP 得到的成体转基因小鼠中,也得到了类似的 GFP 表达情况,骨髓、脾脏,外周血中表达 GFP 的阳性细胞数分别占骨髓、脾脏、外周血细胞总数的 2.34%, 1.35%, 1.1%.

在由重组体 CMV/GFP 得到的成体转基因小鼠中, GFP 表达情况则明显不同. CMV 介导下的 GFP,在小鼠各组织中基本上都有表达,如在外周血、骨髓、脾脏、肝脏、肺、肾脏、心脏、脑等组织中,表达 GFP 的阳性细胞数分别为 0.2%, 0.83%, 0.65%, 0.72%, 0.21%, 0.18%, 0.16%, 0.14%.

2.5 HS2 与 HS3 元件协同调控 β-珠蛋白基因的表达

分别取由 CMV/GFP, HS2/GFP, CMV/HS2/GFP, HS23/GFP, HS3/GFP 重组体得到的同龄转基因小鼠的外周血,经流式细胞仪分析及荧光显微镜下观察其表达情况,结果见表 3. 当用 FACS 分析转基因小鼠 G4-34 和 G4-45 的外周血时,其 GFP 阳性细胞所在区域呈现出两个明显的峰(见图 3),表明在 GFP 阳性细胞中, GFP 的表达量有明显不同.

表3 FACS 检测转基因小鼠外周血中 GFP 表达情况

DNA	编号	小鼠年龄 /月	小鼠性别	GFP 阳性细胞/%	百分数平均值 (M ± SD)%
CMV/GFP	G1-6	6	♀	0.17	0.23 ± 0.09
	G1-20	6	♂	0.3	
	G2-12	5	♀	2	
	G2-42	3	♀	1.6	
HS2/GFP	G2-52	2	♀	0.6	1.81 ± 1.26
	G2-61	2	♀	1	
	G2-63	2	♂	1.5	
	G2-65	2	♂	4.2	
	G3-19	4	♂	2.6	
CMV/HS2/GFP	G3-43	4	♀	0.6	1.46 ± 1.33
	G3-51	4	♂	0.4	
	G3-55	3	♂	1.4	
	G3-58	3	♀	1.5	
	G3-64	3	♂	0.6	
	G3-67	3	♀	0.4	
	G3-71	3	♂	4.2	
HS23/GFP	G4-24	3	♀	4.5	44.8 ± 38
	G4-34	2	♂	80	
	G4-45	2	♀	50	
HS3/GFP	G5-17	3	♀	2.6	1.91 ± 1.38
	G5-39	3	♀	0.45	
	G5-41	3	♀	3.5	
	G5-42	3	♂	1.1	

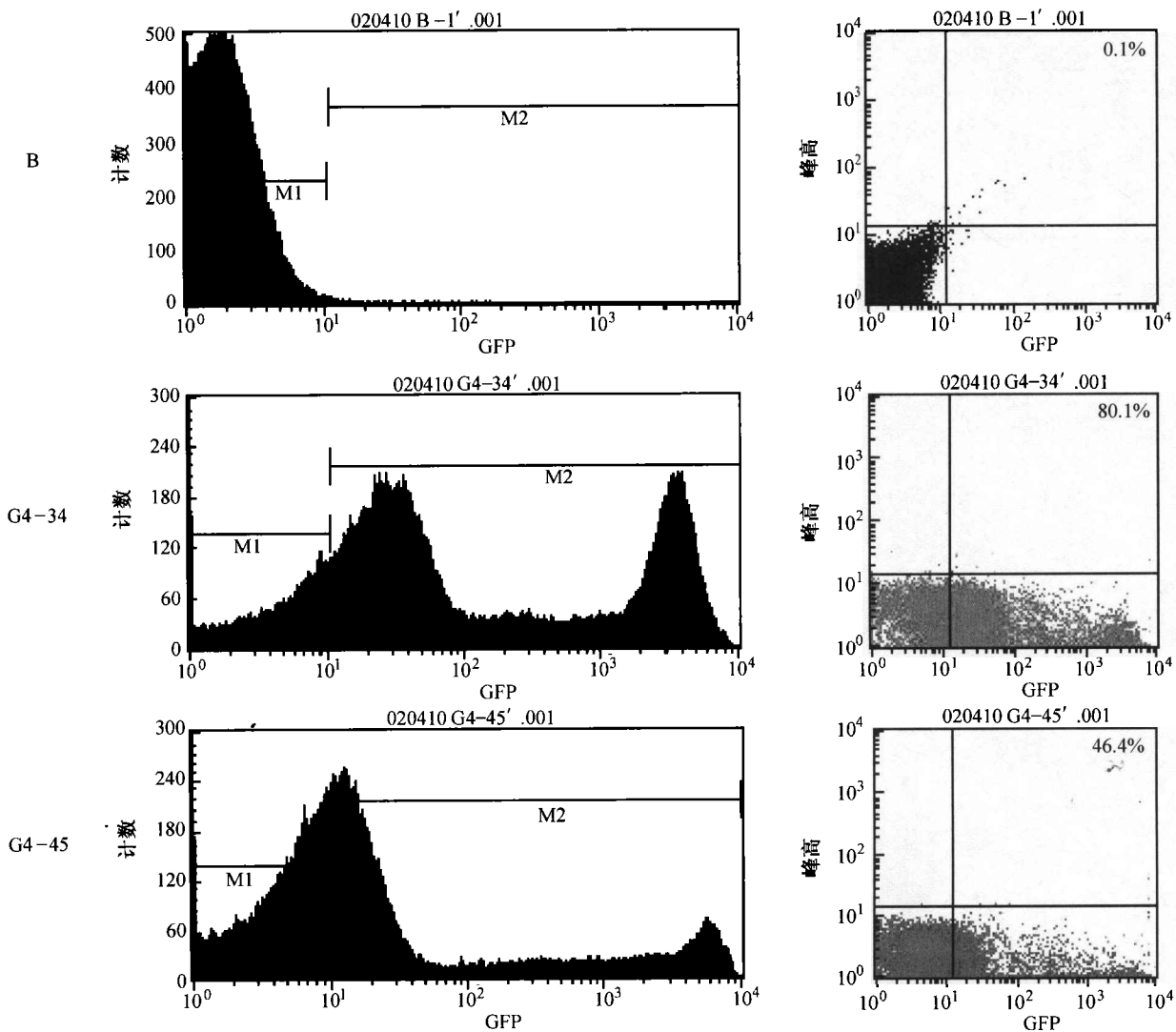


图3 FACS检测转基因成体鼠外周血中GFP的表达情况

B, 非转基因小鼠外周血; G4-34, HS23/GFP转基因小鼠34号; G4-45, HS23/GFP转基因小鼠45号

在荧光显微镜下发现,  $\beta$ -珠蛋白启动子在 HS2, HS3 组合元件的调控下, 不仅表达 GFP 的阳性红细胞个数远远多于 HS2 或 HS3 元件, 而且大多数单个细胞中的 GFP 表达水平要远远高于 HS2 或 HS3 调控下的阳性细胞的表达水平(图略)。以上结果表明: 在个体水平上 HS2 与 HS3 元件对调控  $\beta$ -珠蛋白基因表达时, 其增强子作用基本相当, 且两者显示出明显的协同作用。

## 2.6 转基因小鼠整合位点的 FISH 检测结果

FISH 结果显示 3 只(即 3 种)转基因小鼠中外源基因的整合位点各不相同。其中, 在 1 只 HS3/GFP 转基因小鼠中外源基因整合在两条不同的染色体上。而且不同小鼠间杂交信号的强度亦有很大的差别(图版 I)。

## 3 讨论

研究 LCR 中各 HS 位点的功能以及它们之间的相互作用, 对了解  $\beta$ -珠蛋白基因表达调控机制具有十分重要的作用, 这也是多年来的研究热点。通过构建一些含单独的 HS 位点或几个 HS 组合位点的珠蛋白基因表达载体, 运用细胞转染及转基因小鼠研究各 HS 位点的功能及其相互作用, 这是目前用来研究珠蛋白基因表达调控最为常用的方法。

本研究中, 在含重组体 HS2/GFP 及 CMV/HS2/GFP 的成体转基因小鼠中, GFP 在 1.7 kb 的  $\beta$ -珠蛋白启动子调控下, 可在血液、骨髓、脾脏等红系组织中特异表达, 尤其在骨髓中表达量最高, 而在肝脏、肺、肾脏、脑等非红系组织中未见表

达。CMV是真核表达载体 pcDNA3.1 上的人类巨细胞病毒增强子及启动子序列，可调控目的基因在大多数哺乳动物细胞中高效非特异表达，而在 CMV/HS2/GFP 重组体中虽然保留了 CMV，但是因为有 HS2 元件及  $\beta$ -珠蛋白启动子的存在，仍可调控 GFP 在成体转基因小鼠红系组织中特异表达，因此表明，HS2 元件及 1.7 kb 的  $\beta$ -珠蛋白启动子足以调控  $\beta$ -珠蛋白基因的组织特异性表达。

在 HS2-HS3 元件的调控下， $\beta$ -珠蛋白启动子的活性远远大于在 HS2 或 HS3 元件单独调控下的活性，由此表明，HS2 和 HS3 元件在调控  $\beta$ -珠蛋白启动子时，在个体水平呈现出明显的协同作用。Sargent 等人的研究表明，HS2 与 HS3 元件在调控珠蛋白基因发育阶段特异性表达方面是具有一定的协同作用的，尤其对协助  $\gamma$ -珠蛋白与  $\beta$ -珠蛋白基因在胎儿时期的竞争表达起的作用更明显<sup>[18]</sup>。Mollete 等人<sup>[19]</sup>利用同源重组的方法，在稳定整合的 MEL 细胞系中，研究各 HS 位点的相互作用。他们发现，HS2, HS3, HS4 核心序列的组合元件(共 1 kb)作用于人的  $\beta$ -珠蛋白启动子时无明显增强活性，其功能只相当于各 HS 元件的水平，无明显的叠加或协同作用；而带有侧翼序列的较大片段组合 HS2-HS3-HS4(共 3.5 kb)增强作用较明显，并显示出明显的协同作用。尽管他们的实验同时表明，0.4 kb 的 HS2 核心序列，0.2 kb 的 HS3 核心序列的功能分别与 1.4 kb HS2 元件及 1.9 kb 的 HS3 元件相当，因此推测各 HS 位点的侧翼序列对它们的协同作用是必需的。因为各 HS 核心之间分布着一系列的在系统进化上非常保守的序列。虽然这些序列本身无增强子活性，但是它们可以结合一些特殊的蛋白因子，起着“操纵子”的作用，通过调整各 HS 元件的作用方向来增强它们之间的协同作用。

本研究中所用 HS2, HS3 元件的 DNA 片段均较长，而且保留了它们之间的间隔序列，这可能对于它们之间的协同作用是非常重要的。而我们前面的文献报道<sup>[15]</sup>，各红系特异表达载体在胚胎型 K562 及胎儿/成年型 MEL 细胞的瞬时表达中，HS2 和 HS3 元件并没显示出协同作用及叠加作用。至于同样的元件，为什么在体外的瞬时表达与体内稳定表达中的活性明显不同，可能是由于在稳定整合情况下，HS3 元件为重组体中目的基因的表达提供了一个开放的染色质结构环境，隔绝了整合位点附近小鼠基因组染色质的影响作用，为 HS3 和 HS2

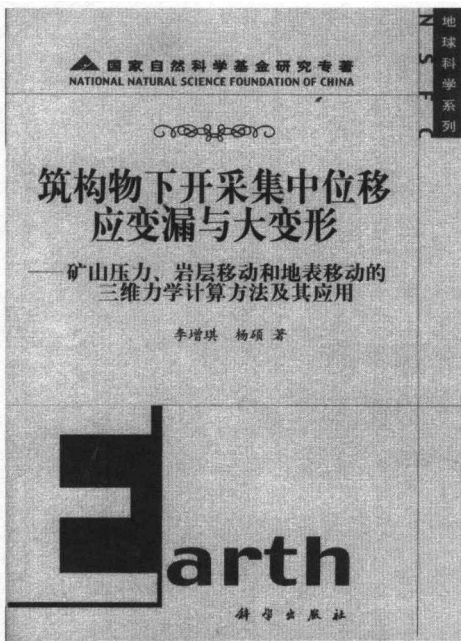
元件的增强子功能的发挥提供了有利条件<sup>[13]</sup>。此外，HS3 元件在瞬时表达及转基因水平呈现出不同的功能，即在瞬时转染中，HS3 元件在 K562 细胞中对  $\beta$ -珠蛋白启动子无增强子活性，仅在 MEL 细胞中有增强作用，且增强子活性远低于 HS2 元件，而在成体转基因小鼠水平 HS3 元件的增强子活性基本与 HS2 元件相当<sup>[15]</sup>，这也说明了 HS3 元件开放染色质结构的活性，可能需在稳定整合的情况下才能体现出来，同时推测 HS3 元件可能对  $\beta$ -珠蛋白基因发育阶段特异性表达起一定的调控作用<sup>[14,20]</sup>。

总之，同一种表达载体在不同的研究模型(细胞水平及个体水平)上会得到不同的结果，这可能与它所在的表达环境有密切关系，即受各种蛋白因子，顺式元件及染色质结构等因素的影响，尤其是染色质结构的影响。因此，对于不同实验获得的结果，应该针对其所用的研究方法和实验模型进行具体的分析和讨论，要考虑到在细胞及个体水平上的差异，综合分析研究才能得到更客观的结论。

### 参 考 文 献

- 1 Weatherall D J, et al. The Thalassemia Syndroms. 3rd ed. Oxford: Blackwell, 1981
- 2 曾溢滔. 血红蛋白分子病与遗传. 孟德尔逝世一百周年纪念文集. 北京: 中国遗传学会, 科学出版社, 1985. 66
- 3 Forrester W C, et al. A developmentally stable chromatin structure in the human beta-globin gene cluster. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(5): 1359
- 4 Talbot D, et al. A dominant control region from the human beta-globin locus conferring integration site-independent gene expression. Nature, 1989, 338(6213): 352
- 5 Grosveld F, et al. Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. Cell, 1987, 51(6): 975
- 6 Porcu S, et al. The human beta globin locus introduced by YAC transfer exhibits a specific and reproducible pattern of developmental regulation in transgenic mice. Blood, 1997 90(11): 4602
- 7 Dhar V, et al. Erythroid-specific nuclease-hypersensitive sites flanking the human beta-globin domain. Mol Cell Biol, 1990, 10(8): 4324
- 8 Fraser P, et al. Each hypersensitive site of the human beta-globin locus control region confers a different developmental pattern of expression on the globin genes. Genes Dev, 1993, 7(1): 106
- 9 Collis P, et al. Definition of the minimal requirements within the human beta-globin gene and the dominant control region for high level expression. EMBO J, 1990, 9(1): 233
- 10 Curtin P T, et al. Human beta-globin gene expression in transgenic mice is enhanced by a distant DNase I hypersensitive site. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(18): 7082

- 11 Bungert J, et al. Hypersensitive site 2 specifies a unique function within the human beta-globin locus control region to stimulate globin gene transcription. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(4): 3062
- 12 Ellis J, et al. A dominant chromatin-opening activity in 5' hypersensitive site 3 of the human  $\beta$ -globin locus control region. *EMBO J*. 1996, 15(3): 562.
- 13 Bender M A, et al. Independent formation of Dnase I hypersensitive sites in the murine beta-globin locus control region. *Blood*, 2000, 95(11): 3600
- 14 Xu D D, et al. *In vivo* DNA-protein interactions at hypersensitive site 3.5 of the human beta-globin locus control region. *Biochem Cell Biol*, 2001, 79(6): 747
- 15 贾春平,等. 基因座控制区元件 HS2、HS3 对  $\beta$ -珠蛋白基因表达的调控. *遗传学报*, 2002, 7: 565
- 16 黄英,等. 乳腺表达人凝血因子 IX 的转基因小鼠的研究. *科学通报*, 1998, 43(15): 1294
- 17 肖艳萍,等. 应用荧光原位杂交检测人凝血因子 IX. 在转基因小鼠染色体上的整合. *遗传*, 2002, 24(3): 232
- 18 Sargent T G, et al. The roles of 5'-HS2, 5'-HS3, and the gamma-globin TATA, CACCC, and stage selector elements in suppression of beta-globin expression in early development. *J Biol Chem*, 1999, 274(16): 11229
- 19 Molete J M, et al. Sequences flanking hypersensitive sites of the beta-globin locus control region are required for synergistic enhancement. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(9): 2969
- 20 Tewari R, et al. Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) is active in primitive and definitive erythroid cells and is required for the function of 5' HS3 of the beta-globin locus control region. *EMBO J*, 1998, 17(8): 2334

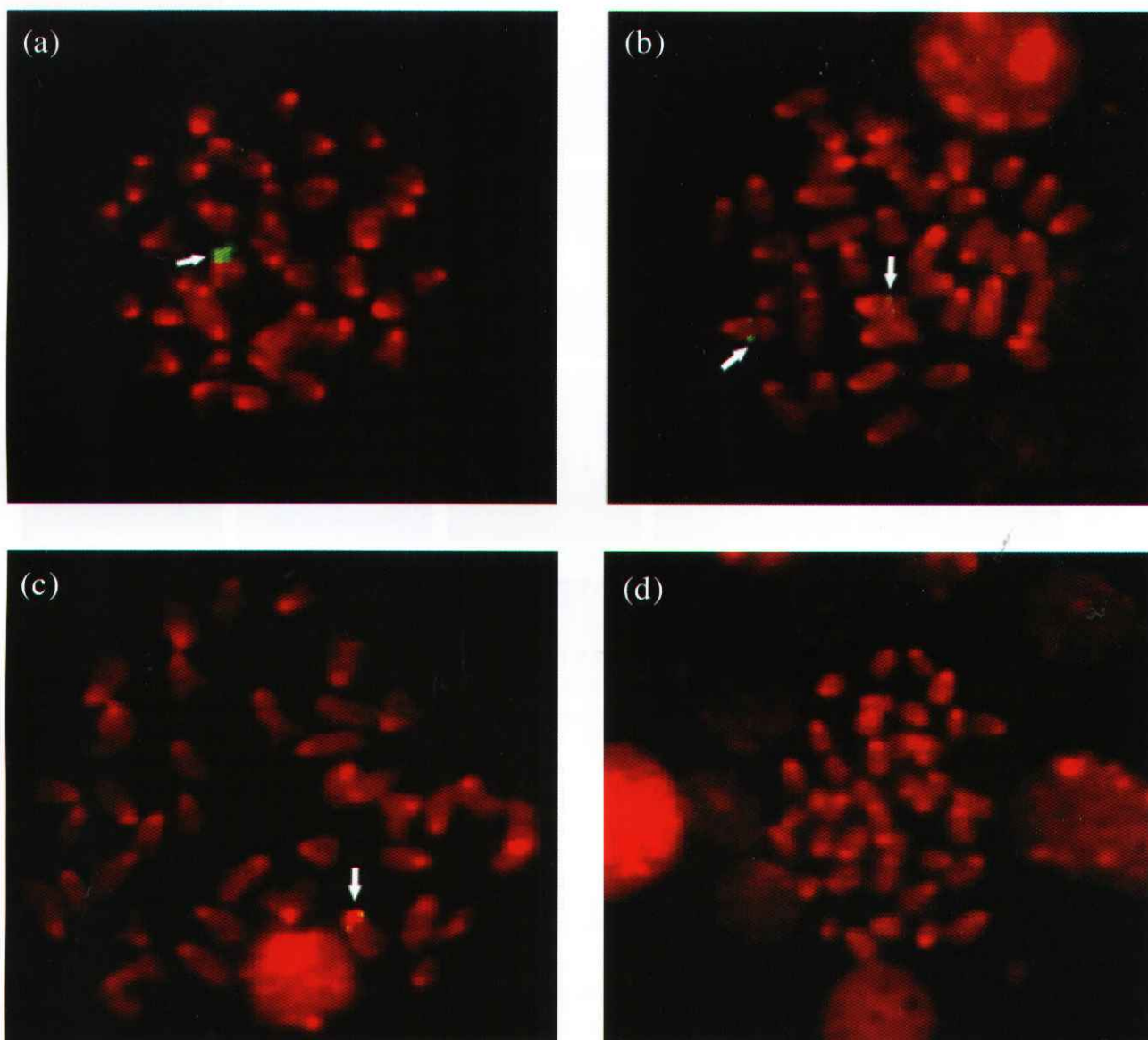


### 国家自然科学基金研究专著

《筑构筑物下开采集集中位移应变漏与大变形》李增琪等 编著  
科学出版社 定价：48.00 元

本书应用的矿山压力、岩层移动和地表移动的三维力学计算方法，是一个世纪以来相邻领域各国专家学者共同追求的目标，是我国自主知识产权的煤矿生产基础理论的重大突破。有限元法的症结是视层间黏固，而此法层间可自由错动并有一定摩擦力，这是对弹性力学的一个贡献。1990年以来，力学预测法在中硬煤层、巨厚富水松散层、巨厚坚硬片麻岩推覆体、三软煤层及综采、放顶煤和炮采中的应用情况，可从本书得到了解。至于力学预测法的效果如何，实用者自然可以得到证实。

本书适用于矿山工程技术人员及有关高等院校师生阅读使用。



转基因小鼠整合点的FISH检验结果

(a) HS2/GFP转基因小鼠: 一条染色体近着丝粒处出现大而强的杂交信号; (b) HS3/GFP转基因小鼠: 两条染色体上出现小而弱的杂交信号, 分别为染色体长臂近中部和近末端; (c) HS23/GFP转基因小鼠: 一条染色体近着丝粒处出现小而弱的杂交信号; (d) 阴性小鼠: 染色体上未出现杂交信号