

DT40 细胞 sIgM 轻链基因敲除载体的构建

游雷鸣^{1,2}, 罗俊¹, 王爱萍², 张改平¹, 卜丹², 郭亚男², 祁艳华²

(1. 河南省农业科学院, 河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002; 2. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001)

摘要:从鸡 B 淋巴 DT40 细胞系中克隆 *-actin* 启动子, 替换 pCDNA3.1(+) 载体中的 SV40 启动子, 构建 *-actin* 启动子驱动的 Neomycin 抗性基因表达框。将克隆的 *sIgM* 轻链基因两侧各约 2 kb 的序列插入到抗性表达框的两侧作为同源臂。PCR、酶切以及测序结果表明成功构建了靶向 *sIgM* 轻链基因的置换型打靶载体 pCDNA-act-neo-HR。为建立 *sIgM* 轻链基因敲除的 DT40 细胞模型, 探究 *sIgM* 轻链在 IBDV 感染 DT40 细胞过程中的作用奠定了基础。

关键词: *sIgM* 轻链; *-actin* 启动子; 基因敲除; 同源重组

中图分类号: Q782 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)03-0001-06

Construction of Knockout Vector for sIgM Light Chain Gene from DT40 Cells

YOU Lei-ming^{1,2}, LUO Jun¹, WANG Ai-ping², ZHANG Cai-ping¹,

BU Dan², GUO Ya-nan², QI Yan-hua²

(1. Henan Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: *-actin* promotor was cloned from chicken B lymph DT40 cells and used to replace the SV40 promotor of pCDNA3.1(+) vector, so as to construct the Neomycin resistance express cassette driven by *-actin* promotor. Then about 2 kb DNA sequences on each side of the locus of *sIgM* gene were inserted into the MCS of the constructed cassette, acting as the homologous arm. PCR identification, restriction enzyme digestion and sequence analysis confirmed that the targeting replacement vector pCDNA-act-neo-HR for *sIgM* gene was successfully constructed. This laid the foundation for establishing the model cell lack of *sIgM* gene, and further investigating the roles of *sIgM* light chain in the infection of IBDV to DT40 cells.

Key words: *sIgM* light chain; *-actin* promoter; Gene knockout; Homologous recombination

IBD 是由鸡传染性法氏囊病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 引起的一种急性接触性、高度致死性传染病, IBDV 主要侵害 4~6 周龄的雏鸡的体液免疫中枢器官法氏囊, 并导致大量 B 淋巴细胞损伤, 破坏免疫功能^[1]。该病最早发生于美国 Delaware 州的 Gamboro 地区, 随后在全球范围内广泛流行, 引起了世界许多课题组的关注和研究^[2-4]。随着鸡基因组测序的完成, 应用基因工程技术探究 IBDV 感染的分子机制已成为当前研究的一个热点。

sIgM (Surface IgM) 是鸡法氏囊 B 细胞主要的膜表面标志, BCR 的重要组成部分, 表面携带 sIgM 分子的 B 细胞亚群也被认为是 IBDV 最易感的宿主靶

细胞^[5]。轻链是 B 细胞轻链的主要类型, 参与 sIgM 形成, 与 B 细胞增殖分化密切相关^[6], 在 IBDV 感染法氏囊 B 细胞过程中可能有重要作用。*sIgM* 轻链基因 (Genbank GeneID 416928) 是定位于 15 号染色体上的单拷贝基因, 全长 4 365 bp, 含有 5 个外显子, 4 个内含子, CDS 全长为 639 bp。利用基因敲除技术敲除 *sIgM* 轻链基因, 探究其在 IBDV 感染过程中的作用有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

表达载体 pCDNA3.1(+), pEGFP-C1 购自 Invit-

收稿日期: 2008-11-11

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划 (2006BAD06A04+6); 河南省基础与前沿技术研究计划 (082300433201)

作者简介: 游雷鸣 (1981-), 男, 河南新县人, 在读硕士, 主要从事分子细胞生物学研究。

通讯作者: 王爱萍 (1970-), 女, 青海西宁人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事分子免疫学和动物生物技术研究。

rogen 公司;菌株 JM109 为河南省动物免疫学重点实验室保存;DT40 细胞系购自中国科学院上海细胞库。限制性内切酶,T4 DNA 连接酶,高保真 LA Taq 酶,质粒提取试剂盒,Universal Genomic DNA Extrac-

tion Kit 均购自 TaKaRa 生物工程公司。DMEM 培养基购自 GIBICO 公司。基因克隆引物为上海生工合成,引物名称和序列见表 1。

表 1 PCR 引物(下划线:酶切位点)

Tab. 1 Primers used for PCR(Underline :Restriction site)

Primer	Sequence	Restriction site
Pactin-F	5 -ATTGCGGCCGCTCGAGGTGAGCCCCACGTTG-3	Not I
Pactin-R	5 -ATATCTAGACCGCCGGTCACACGCCAGAA GCC-3	Xba I
PactinG-F	5 - GCGTACGATCGAGGTGAGCCCCACGTTG-3	SnaB I
PactinG-R	5 -CTGAA GCTTCCGCCGGTCACACGCCAGAA GCC-3	Hind III
Greenflur-F	5 -TAGAA GCTTACCATGGTGA GCAAGGG-3	Hind III
Greenflur-R	5 -TGA GGA TCCATTACTTGATCA GCTCGTC-3	BamH I
Neopar-F	5 - GACTCTAGAA GGA TCGTTTCGCATGA-3	Xba I
Neopar-R	5 -GCCACAGTCGATGAATCCAGAA -3	
Leftamr-F	5 -CAGAA GCTTTTCATATTGCTACAGCTCCGF-3	Hind III
Leftamr-R	5 -GCCGGA TCCAGAACCGGAGAA TCGF-3	BamH I
Rightamr-F	5 -CATGGA TCCGCCGGCTGTTTCGGTCAGGF-3	BamH I
Rightamr-R	5 -GCTGAATTCCTGCTTCTGCTCTATGAGTTGF-3	EcoR I

1.2 方法

1.2.1 -actin 启动子及 sIgM 轻链基因侧翼同源序列的克隆 按 Universal Genomic DNA Extraction Kit 的操作说明,提取 DT40 细胞基因组 DNA 作为 PCR 模板,采用高保真的 LA Taq ,用表 1 中引物 Pactin-F、Pactin-R 扩增鸡 -actin 启动子 (GenBank : E02199) ;采用引物 Leftamr-F、Leftamr-R 和 Rightamr-F、Rightamr-R 分别扩增 sIgM 轻链基因坐位两侧各约 2kb 的序列,连接 pMD19-T 载体测序鉴定。

1.2.2 Neomycin 基因部分 CDS 序列的克隆 以 pCDNA3.1(+) 质粒为模板,采用高保真的 LA Taq ,用表 1 中 Neopar-F、Neopar-R 引物扩增 Neomycin 基因的起始密码子 ATG 致下游约 653 bp 的部分编码序列,连接 pMD19-T 载体测序鉴定。

1.2.3 -actin 启动子在 DT40 细胞启动活性鉴定 以 1.2.1 中克隆好的 -actin 启动子为模板,用表 1 中 PactinG-F、PactinG-R 引物再次高保真扩增鸡 -actin 启动子,使扩增的 -actin 启动子 5' 端引入 SnaB I 位点,3 端引入 Hind III 酶切位点,经 SnaB I、Hind III 酶切后装入同酶切的 pCDNA3.1(+) 载体替换载体上的 CMV 启动子。用 Greenflur-F、Greenflur-R 引物从 pEGFP-C1 质粒上扩增绿色荧光蛋白基因,插入到 -actin 启动子后的 Hind III、BamH I 位点,构建成 -actin 启动子驱动的绿色荧光蛋白重组表达质粒。参照 Lipofectamine 2000 脂质体转染操作说明,将该重组质粒瞬时转染 DT40 细胞,48 h 后荧光显微镜检测绿色荧光蛋白的表达。

1.2.4 置换型打靶载体的构建 如图 1 所示,从 DT40 细胞基因组 DNA 中克隆的 -actin 启动子经

NotI、XbaI 酶切后装入同酶切的 pCDNA3.1(+) 载体构建成 pCDNA-act 中间载体;然后将扩增的 Neomycin 基因部分 CDS 片段经 Xba I、BaL I 酶切后置入 pCDNA-act 载体的 -actin 启动子下游;最后在中间载体 pCDNA-act-neo 的 MCS (Multiple cloning sites) 上分别插入 sIgM 轻链基因的侧翼同源序列,5 端同源区插入 Hind III、BamH I 位点之间,3 端同源区插入 BamH I、EcoR I 位点之间,构建成靶向 sIgM 轻链基因的置换型打靶载体 pCDNA-act-neo-HR,构建流程见图 1。

1.2.5 打靶载体的线性化 用 BamH I 酶切打靶载体 pCDNA-act-neo-HR 使之线性化,经苯酚/氯仿抽提、乙醇沉淀大量制备。

2 结果与分析

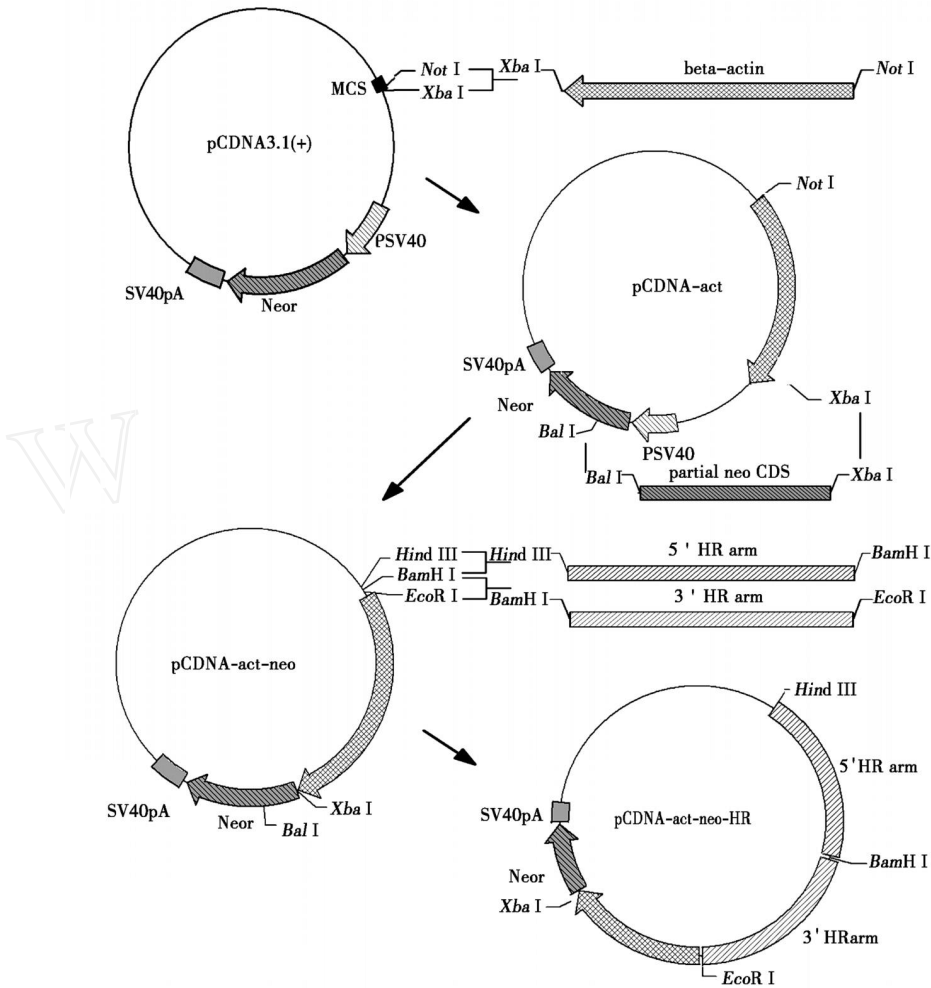
2.1 鸡 -actin 启动子的克隆与鉴定

-actin 启动子是一种 GC 含量高达 74 % ,结构复杂的启动子 DNA 序列,采用高保真 LA Taq 聚合酶结合高 GC 的 PCR 缓冲液成功地从 DT40 基因组 DNA 中扩增出 -actin 启动子,经 1 % 琼脂糖凝胶电泳检测,片段大小正确(图 2)。DNA 测序、BLAST 比对显示,与已报道的鸡 -actin 启动子 (GenBank : E02199) 序列同源性高达 99 %。

2.2 sIgM 轻链基因侧翼同源序列的克隆分析

根据已发表的 sIgM 轻链基因 (GenBank : K00678) mRNA 序列,利用 NCBI (National center for Biotechnology Information) 网站提供 Mapview 工具,对处于 15 号染色体的 sIgM 轻链基因进行染色体精确定位(1151611 - 1156227),选择 sIgM 轻链基因

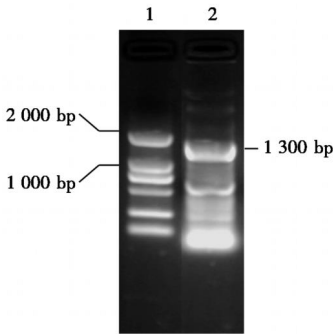
座位两侧各约 2 kb 序列作为打靶载体的同源臂。PCR 扩增 3' 同源臂 (1148470 - 1150466) 和 5' 同源臂 (1157287 - 1158847) 的电泳鉴定如图 3。DNA 测序显示克隆的同源臂序列正确无突变。



PSV40. SV40 启动子;Neor. 新霉素抗性基因;beta-actin. 鸡 γ -actin 启动子;MCS. 多克隆位点。
PSV40. SV40 promoter;Neor. Neomycin gene;beta-actin: Promoter of γ -actin gene;MCS. Multiple cloning sites.

图 1 靶向 *sIgM* 轻链基因的置换型打靶载体的构建

Fig. 1 Construction of the replacement gene knockout vector targeted to *sIgM* gene



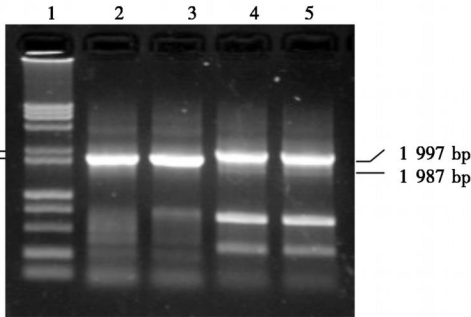
1. DL2000 Marker;2. γ -actin 启动子。
1. DNA ladder;2. γ -actin promoter.

图 2 鸡 γ -actin 启动子的克隆

Fig. 2 Clone of γ -actin promoter

2.3 Neomycin 基因部分 CDS 序列的克隆

从 pCDNA3.1(+) 质粒中扩增出 Neomycin 基因起始密码子致下游约 653 bp 的序列, DNA 测序结果显示克隆的 CDS 序列正确。



1. 广泛 DNA Marker. 2,3. 同源 3' 臂;4,5. 同源 5' 臂。
1. Wide range DNA Ladder;2,3. Homologous 3' arm;
4,5. Homologous 5' arm.

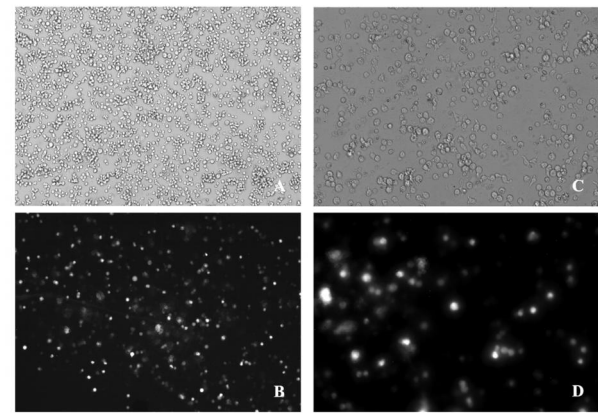
图 3 *sIgM* 轻链基因两侧 5' 端 3' 端同源序列的克隆

Fig. 3 Clone of the homologous arms on both sides of *sIgM* gene

2.4 γ -actin 启动子驱动的绿色荧光蛋白基因在 DT40 细胞中的表达

γ -actin 启动子驱动的绿色荧光蛋白重组质粒转

染 DT40 细胞 48 h 后,在荧光显微镜下可以看到绝大部分细胞都有荧光,并且荧光很强(图 4),说明 *-actin* 启动子在 DT40 细胞中有强启动活性,完全可以在靶向 DT40 细胞的基因敲除载体中作为抗性筛选标记基因的启动子。



A. 未转染(10 \times 10);B. 转染 GFP(10 \times 10);
C. 未转染(10 \times 20);D. 转染 GFP(10 \times 20)。
A. Untransfected(10 \times 10);B. Transfected by GFP(10 \times 10);
C. Untransfected(10 \times 20);D. Transfected by GFP(10 \times 20)。

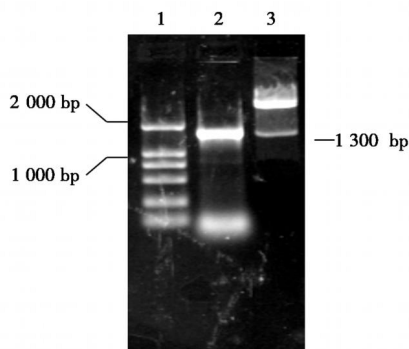
图 4 *-actin* 启动子驱动的绿色荧光蛋白基因在 DT40 细胞中的瞬时表达

Fig. 4 Transient expression of GFP gene driven by *-actin* promoter in DT40 cells

2.5 *sIgM* 轻链基因打靶载体 pCDNA-act-neo^{HR} 的构建结果

在打靶载体 pCDNA-act-neo^{HR} 构建完成之后,对其组成片段进行了系统鉴定,显示重组的靶向 *sIgM* 轻链基因的打靶载体的结构和序列符合设计要求。其鉴定结果如下。

-actin 启动子的鉴定,用 Pactin⁻F, Pactin⁻R 引物(表 1)可以从重组打靶载体中扩增出约 1 300 bp 大小的片段,以 *Not* I 和 *Xba* I 双酶切重组质粒也能切出同样大小的片段(图 5)。表明 *-actin* 启动子已在打靶载体正确装载。

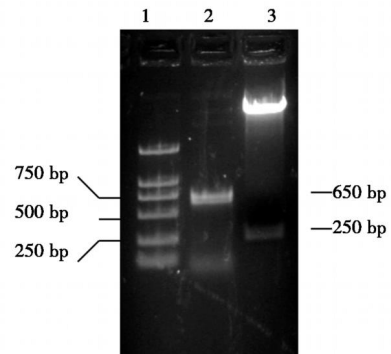


1. DL2000 Marker;2. *-actin* 片段;3. pCDNA-act 的 *Not* I, *Xba* I 酶切。
1. DL2000 Marker;2. *-actin* fragment;
3. pCDNA-act digested by *Not* I and *Xba* I。

图 5 重组质粒 pCDNA-act 的 PCR 及酶切鉴定

Fig. 5 PCR and restriction analysis of pCDNA-act

Neomycin 基因的鉴定,用表 1 中的 Neopar-F, Neopar-R 引物可以从重组打靶载体中扩增出约 650 bp 的片段。用 *Xba* I, *Bal* I 也能切出约 250 bp 大小的片段,这正好和 *Neomycin* 基因 CDS 序列中起始密码子到 *Bal* I 位点之间的长度吻合(图 6),表明 *Neomycin* 基因正确地插入到 *-actin* 启动子的下游。

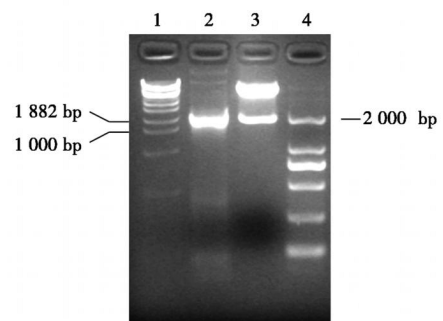


1. DNA Marker;2. *Neomycin* 片段;
3. pCDNA-act-neo 的 *Xba* I, *Bal* I 酶切鉴定。
1. DL2000 Marker;2. Partial *Neomycin* fragment;
3. pCDNA-act-neo digested by *Xba* I and *Bal* I。

图 6 重组质粒 pCDNA-act-neo 的 PCR 及酶切鉴定

Fig. 6 PCR and restriction analysis of pCDNA-act-neo

同源臂的鉴定,以重组打靶载体为模板,用 Leftarm⁻F, Leftarm⁻R 引物扩增 5'同源臂(图 7), Rightarm⁻F, Rightarm⁻R 引物扩增 3'同源臂(图 8),都能扩增出约 2 kb 的条带。当分别用 *Hind* III、*Bam* H I 和 *Bam* H I、*Eco* R I 酶切重组打靶载体也都能切出同样大小的条带,表明 3'同源臂和 5'同源臂都正确地插入到了打靶载体中(图 1),靶向 *sIgM* 轻链基因的打靶载体的结构和序列正确,符合设计要求。



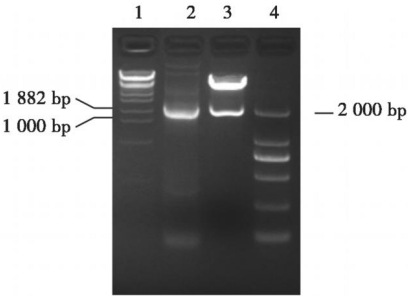
1. *Eco* T14 Marker;2. 3 同源臂;3. 3 pCDNA-act-neo^{HR} 的 *Bam* H I、*Eco* R I 酶切;4. DL2000 Marker。
1. *Eco* T14 digest Marker;2. 3 homologous arm;
3. pCDNA-act-neo^{HR} Digested by *Bam* H I and *Eco* R I;4. DL2000 DNA ladder。

图 7 重组质粒 pCDNA-act-neo^{HR} 的 PCR 及酶切鉴定

Fig. 7 PCR and restriction analysis of recombinant plasmid pCDNA-act-neo^{HR}

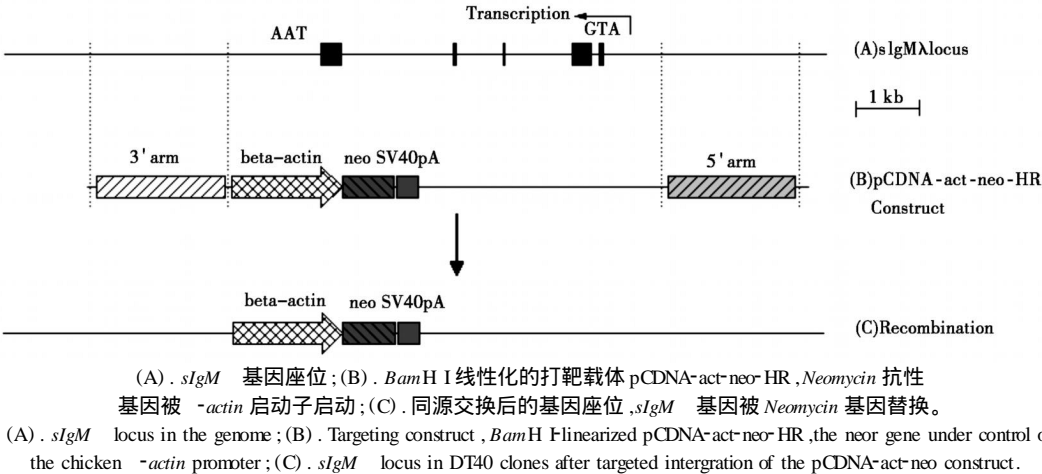
2.6 打靶载体的线性化

打靶载体 pCDNA-act-neo^{HR} 经 *Bam* H I 酶切线性化, *-actin* 启动子驱动的 *Neomycin* 抗性筛选标记



1. *Eco*T14 Marker ;2. 5 同源臂 ;3. pCDNA-act-neo-HR 的 *Bam*H I, *Hind* III 酶切 ;4. DL2000 Marker。
1. *Eco*T14 digest Marker ;2. 5 homologous arm ;
3. pCDNA-act-neo-HR digested by
Hind III and *Bam*H I ;4. DL2000 DNA ladder.

图 8 重组质粒 pCDNA-act-neo^r HR 的 PCR 及酶切鉴定
Fig. 8 PCR and restriction analysis of
recombinant plasmid pCDNA-act-neo^r HR



(A) . *sIgM* 基因座位 ;(B) . *Bam*H I 线性化的打靶载体 pCDNA-act-neo-HR ,*Neomycin* 抗性基因被 β -actin 启动子启动 ;(C) . 同源交换后的基因座位 ,*sIgM* 基因被 *Neomycin* 基因替换。
(A) . *sIgM* locus in the genome ;(B) . Targeting construct , *Bam*H I linearized pCDNA-act-neo-HR ,the neo^r gene under control of the chicken β -actin promoter ;(C) . *sIgM* locus in DT40 clones after targeted intergration of the pCDNA-act-neo construct .

图 9 同源重组置换 *sIgM* 基因示意图

Fig. 9 Schematic diagram of the homologous recombination resulting in the deletion of *sIgM*

的受体,但目前并无文献报道 *sIgM* 就是 IBDV 感染的受体。轻链是 B 细胞轻链的主要类型,参与 *sIgM* 形成^[6],敲除 *sIgM* 轻链基因,构建 *sIgM* 轻链缺失的 B 细胞模型,是深入探究 *sIgM* 在 IBDV 感染 B 细胞过程中作用的重要基础。

DT40 细胞是鸡 B 淋巴细胞的一个肿瘤细胞系,具有与鸡法氏囊前 B 淋巴细胞完全相同的生物学特性,对多种不同毒力的 IBDV 毒株均具有易感性,是研究 IBDV 感染 B 细胞的良好模型^[9]。本研究利用 DT40 细胞内源 β -actin 启动子的恒定高表达活性,建立 β -actin 启动子驱动的 *Neomycin* 抗性筛选标记表达框,保证了靶向 DT40 细胞 *sIgM* 轻链基因的置换型打靶载体的抗性筛选。打靶载体的同源臂序列选择在 *sIgM* 轻链基因 CDS 序列两侧,可以在载体 DNA 与染色体 DNA 同源重组后,将 *sIgM* 轻链基因从基因组上完全敲除,避免了残留 CDS 对后期基因缺失细胞株筛选和鉴定的影响。虽然同源臂越长,同源重组的机率越高^[10,11],但长的同源臂会

表达框处于两同源臂之间,且 *Neo* 基因方向与 *sIgM* 轻链基因相反。当载体 DNA 依靠同源臂序列与染色体 DNA 发生同源重组时,染色体上的 *sIgM* 轻链基因被 *Neomycin* 抗性筛选标记基因替换,从而敲除 *sIgM* 轻链基因,同时赋予 DT40 细胞新霉素抗性(图 9)。基因敲除的细胞克隆可以在 G418 抗性培养基中筛选。

3 讨论

病毒感染细胞的关键步骤是依赖于自身的吸附蛋白对易感细胞表面受体的特异性,不可逆的吸附^[7,8],携带 *sIgM* 的细胞又是 IBDV 的最易感靶细胞^[5],这也提示 *sIgM* 很可能就是 IBDV 感染 B 细胞

造成打靶载体过大,造作不便,也会给中靶细胞的 PCR 筛选和鉴定带来麻烦^[12,13]。综合考虑并结合已报道打靶载体的设计,每个同源臂不少于 0.5 kb^[14],最终将 *sIgM* 轻链基因打靶载体的 5 同源臂和 3 同源臂都设计成约 2 kb。打靶载体的成功构建为后续电转化,筛选 *sIgM* 轻链基因缺失的 DT40 细胞克隆,探 *sIgM* 轻链基因在病毒感染过程中功能,奠定了基础。

参考文献:

[1] Cosgrove A S. An apparently new disease of chicken-ravian nephrosis [J]. Avian Dis,1962,6:385 - 389.
[2] Hirai K,Calnek B W. In vitro replication of infectious bursal disease virus in established lymphoid cell lines and chicken B lymphocytes [J]. Infect Immun,1979,25(3) :964 - 970.
[3] Lin T W,Lo C W,Lai S Y, et al. Chicken heat shock protein 90 is a component of the putative cellular receptor complex of infectious bursal disease virus [J]. J Virol,2007,81(16) :

- 8730 - 8741.
- [4] Nieper H, Muller H. Susceptibility of chicken lymphoid cells to infectious bursal disease virus does not correlate with the presence of specific binding sites [J]. *J Gen Virol*, 1996, 77: 1229 - 1237.
- [5] Ogawa M, Yamaguchi T, Setiyono A, *et al.* Some characteristics of a cellular receptor for virulent infectious bursal disease virus by using flow cytometry [J]. *Arch Virol*, 1998, 143 (12): 2327 - 2341.
- [6] Yamaguchi T, Iwata K, Kobayashi M, *et al.* Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of IBDV [J]. *Archives of Virology*, 1996, 141: 1493 - 1507.
- [7] Bergelson J M, Cunningham J A, Droguett G, *et al.* Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5 [J]. *Science*, 1997, 275 (5304): 1320 - 1323.
- [8] Berger E A, Murphy P M, Farber J M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease [J]. *Annu Rev Immunol*, 1999, 7: 657 - 700.
- [9] Terasaki K, Hirayama H, Kasanga C J, *et al.* Chicken B lymphoma DT40 cells as a useful tool for in vitro analysis of pathogenic infectious bursal disease virus [J]. *J Vet Med Sci*, 2008, 70 (4): 407 - 410.
- [10] Thomas K R, Capecchi M R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells [J]. *Cell*, 1987, 51 (3): 503 - 512.
- [11] 李若楠, 张彦. 转基因动物技术及其应用 [J]. *华北农学报*, 2007, 22: 181 - 184.
- [12] 徐永华, 常万存, 丛笑情, 等. 动物细胞工程 [M]. 第 1 版. 北京: 化学工业出版社, 2003: 96 - 97.
- [13] 杨晓, 黄培堂, 黄翠芬, 等. 基因打靶技术 [M]. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 2003: 19 - 20.
- [14] Thomas K R, Deng C, Capecchi M R. High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors [J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12 (7): 2919 - 2923.