分类号： 密 级：请注明密级及保密期限

学 号：2007201019 单位代码：10759



石河子大学

**博** 士 学 位 论 文

2A 肽介导的三荧光蛋白基因共表达系统在转基因羊中的表达及其 DNA 甲基化初步研究

学 位 申 请 人 田 永 芝

指 导 教 师 贾 斌 教授

刘 明 军 研究员

申请学位门类级别 农 学 博 士

学 科 、 专 业 名 称 遗 传 育 种

中国·新疆·石河子

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 研 | 究 | 方 | 向 | 分子遗传育种 |
| 所 | 在 | 学 | 院 | 动物科技学院 |

2013 年 5 月

Study of Expression and DNA Methylation of 2A peptide Mediated Tri-fluorescent Protein Vector in Transgenic Sheep

A Dissertation Submitted to Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements For the Degree of

Doctor of Agriculture

By

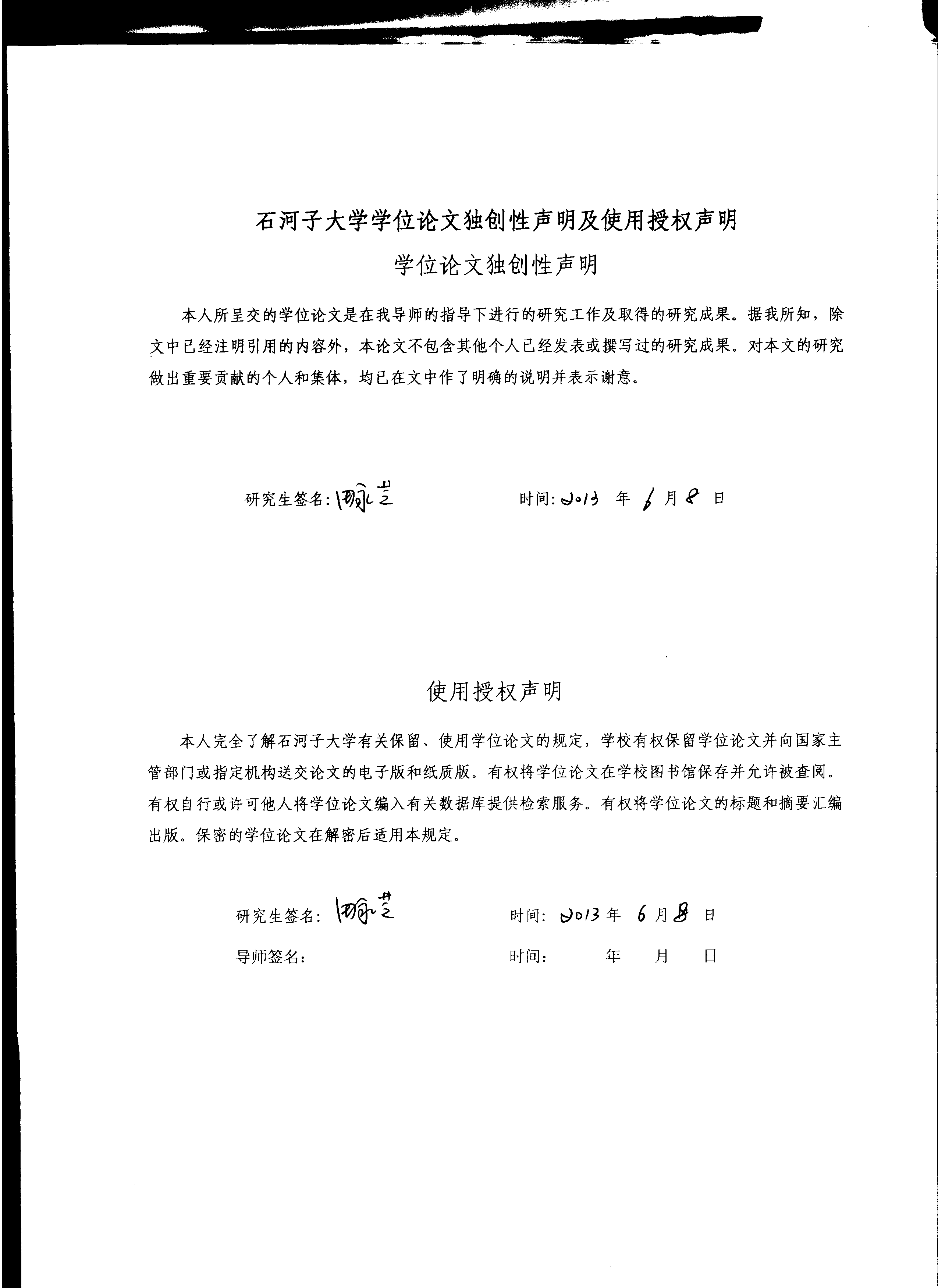
Tian yong-zhi

(Animal Genetics and Breeding)

Dissertation Supervisor: Prof. Jia Bin

Liu Ming-jun

March, 2013



本研究获国家高技术研究发展计划(863 计

划) 现代农业技术领域动植物品种分子设计专题/项目（2009AA10Z110）子课题--高效、安全的多基因共表达系统的建立的资助，在此致以衷 心的感谢。

目 录

[摘 要](#_Toc686730306) 5

[英文摘要](#_Toc686730307) 6

[中英文对照表](#_Toc686730308) 6

[第一章 文献综述](#_Toc686730309) 9

[1 2A肽在Th物医药和Th物技术中的研究进展](#_Toc686730310) 9

[1.1 2A肽的起源](#_Toc686730311) 9

[1.2 常见的2A肽及类2A肽序列](#_Toc686730312) 9

[1.3 2A肽的作用机制](#_Toc686730313) 10

[1.4 2A肽介导的蛋白的亚细胞定位](#_Toc686730314) 10

[1.5 2A肽的作用效率](#_Toc686730315) 10

[1.6 2A肽的应用](#_Toc686730316) 11

[1.7 多基因共表达构建策略](#_Toc686730317) 11

[1.8 慢病毒多基因共表达载体](#_Toc686730318) 12

[1.9 前景](#_Toc686730319) 12

[2 DNA甲基化在动物中的研究进展](#_Toc686730320) 12

[2.1 DNA甲基化的表型特征](#_Toc686730321) 12

[2.2 DNA甲基化作用机制](#_Toc686730322) 12

[2.3 DNA甲基化调控信号](#_Toc686730323) 12

[2.4 DNA甲基化的分析方法](#_Toc686730324) 12

[2.5 DNA甲基化调节因子](#_Toc686730325) 13

[2.6 DNA甲基化抑制剂](#_Toc686730326) 13

[2.7 DNA甲基化与染色质相关性](#_Toc686730327) 13

[2.8 组蛋白修饰](#_Toc686730328) 13

[2.9 组蛋白去乙酰化酶抑制剂](#_Toc686730329) 13

[2.10 甲基化在家畜中的研究现状](#_Toc686730330) 13

[第二章 三荧光基因共表达载体pLEX-2A-TYG的构建及其在真核细胞中的表达](#_Toc686730331) 14

[1 实验材料](#_Toc686730332) 14

[1.1 本实验使用的载体](#_Toc686730333) 14

[1.2 本实验使用的细胞株](#_Toc686730334) 14

[1.3 本实验主要试剂](#_Toc686730335) 14

[1.4 本实验主要仪器](#_Toc686730336) 14

[1.5 主要试剂的配制](#_Toc686730337) 15

[2 实验方法](#_Toc686730338) 17

[2.1 2A-linker的构建](#_Toc686730339) 17

[2 A-linker中T2A序列参照Georgios Trichas等的研究方法](#_Toc686730340)[[26]](#_Toc686730340)[，序列两端分别引入酶切位点](#_Toc686730340)*[Bsp](#_Toc686730340)*[EI/](#_Toc686730340)*[Hind](#_Toc686730340)*[III，送由上海生工合成。](#_Toc686730340) 17

[2.2 引物的设计](#_Toc686730341) 17

[2.3 多聚酶链式反应（PCR）](#_Toc686730342) 17

[2.4 限制性酶酶切实验](#_Toc686730343) 17

[2.5 连接反应](#_Toc686730344) 18

[2.6 克隆转化](#_Toc686730345) 18

[2.7 阳性重组子的筛选鉴定](#_Toc686730346) 18

[2.8 胶回收实验](#_Toc686730347) 19

[2.9 细胞的培养](#_Toc686730348) 19

[2.10 质粒的提取](#_Toc686730349) 19

[2.11 质粒转染实验](#_Toc686730350) 20

[2.12 荧光显微镜检测](#_Toc686730351) 20

[2.13 Western blotting检测](#_Toc686730352) 20

[3 结果](#_Toc686730353) 20

[3.1 2A肽-linker片段的获取](#_Toc686730354) 20

[2 A-linker—](#_Toc686730355)*[TCCGGA](#_Toc686730355)***[GGGGGGGGCCCCAAAAGGGGTTTTGGGGGGGGAAAA](#_Toc686730355)**[GAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGG TGACGTCGAGGAGAATCCTGGCCCA](#_Toc686730355)*[AAGCTT](#_Toc686730355)*[--经上海生工合成并克隆于](#_Toc686730355)*[p](#_Toc686730355)*[UC57载体](#_Toc686730355) 21

[3.2 质粒pacGFP1-N1的改造](#_Toc686730356) 21

[3.3 质粒ptdtomato-2A和pzsYellow1-2A的获得](#_Toc686730357) 21

[3.4 质粒](#_Toc686730358)*[p](#_Toc686730358)*[tdTomato-acGFP1和质粒](#_Toc686730358)*[p](#_Toc686730358)*[zsYellow1-acGFP1的获得](#_Toc686730358) 21

[3.5 质粒](#_Toc686730359)*[p](#_Toc686730359)*[2A-TYG的获得](#_Toc686730359) 21

[3.6 质粒pLEX-2A-TYG的获得](#_Toc686730360) 22

[3.7 质粒转染的荧光检测](#_Toc686730361) 22

[3.8 Western blotting检测结果](#_Toc686730362) 23

[4.1 Kozak consensus sequence](#_Toc686730363) 23

[4.2 2A肽介导的多基因载体在细胞中表达](#_Toc686730364) 23

[4.3 酶切位点的保护碱基](#_Toc686730365) 23

[4.4 多基因载体中三荧光蛋白基因的表达检测结果分析](#_Toc686730366) 23

[第三章 慢病毒的包装及滴毒检测](#_Toc686730367) 24

[1 实验材料和方法](#_Toc686730368) 24

[1.1 实验细胞株](#_Toc686730369) 24

[1.2 实验所用载体](#_Toc686730370) 24

[1.3 实验主要试剂](#_Toc686730371) 24

[1.4 主要试剂的配制](#_Toc686730372) 24

[1. 聚凝胺溶液](#_Toc686730373) 24

[2. Puromycin溶液](#_Toc686730374) 24

[1.5 主要实验仪器](#_Toc686730375) 24

[2.1 细胞的培养](#_Toc686730376) 25

[2.2 重组质粒的大量提取](#_Toc686730377) 25

[2.3 病毒的包装](#_Toc686730378) 25

[2.4 慢病毒滴度的测定](#_Toc686730379) 26

[2.5 慢病毒的感染](#_Toc686730380) 27

[2.6 单克隆细胞的筛选](#_Toc686730381) 27

[2.7 激光共聚焦检测](#_Toc686730382) 27

[3 结果](#_Toc686730383) 27

[3.1 质粒的质量和浓度检测](#_Toc686730384) 27

[3.2 包装病毒的滴度检测](#_Toc686730385) 27

[3.3 单克隆细胞的筛选及检测](#_Toc686730386) 28

[4 讨论](#_Toc686730387) 28

[4.1 慢病毒载体特点](#_Toc686730388) 28

[4.2 慢病毒的包装](#_Toc686730389) 28

[4.3 病毒的浓缩](#_Toc686730390) 28

[4.4 病毒滴度的测定](#_Toc686730391) 28

[4.5 提高病毒载体体外感染的能力](#_Toc686730392) 29

[4.6 实验室安全措施](#_Toc686730393) 29

[第四章 转基因羊的Th产和检测](#_Toc686730394) 30

[1 实验材料](#_Toc686730395) 30

[1.1 实验动物](#_Toc686730396) 30

[1.2 实验试剂](#_Toc686730397) 30

[1.3 主要试剂的配制](#_Toc686730398) 30

[1. Rnase A溶液（20 mg/mL）](#_Toc686730399) 30

[2. 蛋白酶K（20 mg/mL）](#_Toc686730400) 30

[3. 1: 1的酚/氯仿提取液](#_Toc686730401) 30

[1.4 主要仪器](#_Toc686730402) 30

[2 实验方法](#_Toc686730403) 31

[2.1 转基因羊的Th产](#_Toc686730404) 31

[2.2 转基因羊尾组织DNA的提取](#_Toc686730405) 31

[2.3 转基因羊的PCR检测](#_Toc686730406) 32

[2.4 Western blotting检测](#_Toc686730407) 33

[2.5 基因组DNA Southern blotting](#_Toc686730408) 33

[2 µl](#_Toc686730409) 33

[2.6 RT-PCR检测](#_Toc686730410) 34

[2.7 DNA甲基化分析](#_Toc686730411) 36

[2.8 CMV启动子转录因子结合位点分析](#_Toc686730412) 40

[2.9 统计分析](#_Toc686730413) 40

[3 结果](#_Toc686730414) 40

[3.1 三色荧光蛋白基因共表达慢病毒转基因羊的Th产情况](#_Toc686730415) 40

[3.2 转基因羊的整合检测结果](#_Toc686730416) 40

[3.3 转基因羊甲基化分析](#_Toc686730417) 40

[3.4 CMV启动子转录因子结合位点分析结果](#_Toc686730418) 41

[4 讨论](#_Toc686730419) 44

[4.1 慢病毒载体在转基因动物中的应用](#_Toc686730420) 44

[4.2 2A肽在慢病毒介导的Th物技术中的应用](#_Toc686730421) 46

[4.3 转基因羊DNA甲基化分析](#_Toc686730422) 48

[4.4 DNA甲基化检测方法](#_Toc686730423) 48

[4.5 CMV启动子转录因子结合位点](#_Toc686730424) 48

[第五章 转基因羊内外源基因DNA甲基化机制初步研究](#_Toc686730425) 48

[1 材料和方法](#_Toc686730426) 48

[1.1 实验试剂](#_Toc686730427) 48

[1.2 实验材料](#_Toc686730428) 48

[1.3 实验仪器](#_Toc686730429) 48

[1.4 主要试剂的配制](#_Toc686730430) 49

[2 实验方法](#_Toc686730431) 49

[2.1 成纤维细胞的分离](#_Toc686730432) 49

[2.2 成纤维细胞的纯化](#_Toc686730433) 49

[2.3 纤维细胞的培养](#_Toc686730434) 50

[2.4 转基因成纤维细胞的药物处理实验](#_Toc686730435) 50

[2.5 荧光显微镜检测](#_Toc686730436) 50

[2.6 流式细胞术检测](#_Toc686730437) 51

[2.7 统计分析](#_Toc686730438) 51

[3 结果](#_Toc686730439) 51

[3.1 成纤维细胞的分离和纯化](#_Toc686730440) 51

[3.2 TSA和5-azaC对成纤维细胞表观状态的影响](#_Toc686730441) 51

[3.3 流式细胞术检测结果](#_Toc686730442) 51

[4 讨论](#_Toc686730443) 54

[4.1 转基因表达的影响因素](#_Toc686730444) 54

[4.2 DNA甲基化转移酶抑制剂-5-azaC](#_Toc686730445) 54

[4.3 去乙酰化酶抑制剂-TSA](#_Toc686730446) 54

[4.4 流式细胞术检测](#_Toc686730447) 55

[第六章 小结、创新点、展望](#_Toc686730448) 55

[1 小结](#_Toc686730449) 55

[2 创新点](#_Toc686730450) 55

[3 展望](#_Toc686730451) 55

[参考文献](#_Toc686730452) 55

[附录](#_Toc686730453) 60

[作 者 简 介](#_Toc686730454) 76

摘 要

随着社会经济和科学研究的发展，多基因共表达技术在生物医药和农业生产中的作用越来越重要。目前，常用的多基因共表达方法有内核糖体进入位点(IRES)元件载体、双向或双启动子共表达、 多个质粒共转染及多病毒载体共感染等。但是这些方法都遇到了多基因共表达不平衡及表达量不足的问题，如IRES下游基因的表达对其在IRES之后的特异定位敏感，有可能造成表达沉默，或下游蛋白的表达水平远低于同一开放阅读框中上游蛋白的表达水平。2A肽则能够改善以上缺陷。2A肽属于*cis-*水解酶作用元件（CHYSELs），多基因载体在2A肽调控下各基因可独立表达。与IRES相比，2A肽序列短（54-90 bp）、能够调节多基因独立表达且表达效率高，具有其它多基因共表达技术无可比拟的优点。

目前，大多数转基因动物的制备均以单基因表达为目标，而多基因共表达制备转基因动物的研究较少。利用2A肽生产多基因修饰动物已在小鼠和猪上报道，但在绵羊上未见报道。慢病毒载体转基因技术是目前家畜生产中效率最高的转基因技术，2A肽介导的多基因共表达与慢病毒载体相结合制备转基因动物，具有转基因效率高、多基因同时表达的特点。在一个转基因动物上同时表达多个功能基因，能够通过转基因实现多个基因协同作用或多基因聚合作用，提高转基因动物的利用效率，减少转基因动物生产成本，缩短转基因动物的生产周期。本研究中，我们选用三色荧光蛋白报告基因（tdTomato、zsYellow1和acGFP1）作为2A肽连接的靶基因，以便于2A肽介导的多基因在细胞和动物体内表达的观察和检测。首先，将报告基因tdTomato、zsYellow1和acGFP1与2A肽连接，克隆构建了三基因共表达慢病毒载体（pLEX-2A-TYG）；将pLEX-2A-TYG重组慢病毒感染CHO和293T细胞，在激光共聚焦显微镜下观察三色荧光蛋白的表达；在此基础上利用慢病毒卵周隙注射方法进行绵羊转基因，首次获得了携带三色荧光的转基因绵羊，通过PCR、Western blotting、Southern

blotting、Real Time RT-PCR等方法对转基因整合、多基因表达及DNA甲基化等进行了分析；针对转基因羊出现的基因表达沉默现象，通过DNA甲基化序列分析（Bisulfite sequencing PCR, BSP），检测了转基因羊外源基因启动子区和编码区的甲基化水平，利用甲基转移酶抑制剂（5-azaC）和乙酰化酶抑制剂（TSA）分别处理分离的转基因羊成纤维细胞，对多基因共表达转基因羊的DNA甲基化机制进行了探索。本研究主要研究结果如下：

1设计并合成了长为102 bp的2A-linker片段。经PCR、酶切、克隆，成功构建了由2A-linker

连接的三色荧光蛋白基因（tdT．omato、zsY．ellow1和acG．FP1）共表达慢病毒载体（pLEX-2A-TYG）。

2利用该重组载体pLEX-2A-TYG转染293T和CHO细胞，荧光显微镜观察和Western blotting

检测结果表明，tdTomato、zsYellow1和acGFP1能够在细胞中独立、高效表达。

3运用脂质体转染法制备重组慢病毒，将pLEX-2A-TYG质粒与包膜质粒*p*MD2. G和包装质粒*p*SPAX2共转染293T细胞，获得了高滴度（3×109 IU/ml）重组慢病毒颗粒。将生产的重组慢病毒感染293T和CHO细胞，Confocal荧光显微镜检测结果显示，2A肽介导的三荧光蛋白基因可以在感染细胞中独立高效表达。

4为了检测2A肽介导的三色荧光蛋白报告基因载体是否可以在动物体内表达，我们利用慢病毒卵周隙注射技术生产转基因绵羊。选取供体羊5只，受体羊37只。利用重组慢病毒卵周隙注射获得可移植转基因胚胎37枚，移植入37只受体母羊中。出生羔羊7只，其中2只（#6和#7）经PCR检测为阳性转基因羊。

5在紫外灯下观察转基因羔羊耳部、头部、唇部、蹄部等部位，均没有观测到荧光。以转基因羔羊尾部皮肤组织为样本，对转基因羊中三色荧光蛋白基因的表达进行Western blotting及RT-PCR检测，均未检测到三种荧光蛋白。

6为了分析造成转基因表达沉默的原因，我们利用BSP法对转基因羊尾组织基因组进行了甲基化分析。结果显示，转基因启动子区甲基化水平为76.25%（#6）和64.70%（#7）；编码区甲基化水平在#6转基因羊中tdTomato、zsYellow1和acGFP1分别为97.5%、98.1%、和99.2%；#7羊中

tdTomato、zsYellow1和acGFP1分别为97.6%、99.5%和99.6%。结果表明，转基因羊外源基因存在超甲基化现象。我们推测，转基因超甲基化导致了荧光蛋白基因在转基因羊中的表达沉默。

7为了证明DNA超甲基化是否为转基因表达沉默的原因，我们利用DNA甲基转移酶抑制剂

（5-azaC）和去乙酰化酶抑制剂（TSA）对分离的转基因羊成纤维细胞进行处理。首先采取2只阳性（#6和#7）和1只阴性羔羊的尾部皮肤，分离培养了成纤维细胞，用5-azaC和TSA按不同浓度、不同作用时间，分别或同时对分离的转基因羊成纤维细胞进行处理。经荧光显微镜观察和流式细胞术分析，结果显示，经5-azaC和TSA分别处理后，部分成纤维细胞可见三色荧光的表达，且荧光细胞比例随着药物处理浓度及时间的增加而增加，两者呈一定的正相关。同时，当5-azaC和TSA共同作用时，荧光细胞数显著高于5-azaC或TSA单独作用时的荧光细胞数，表明5-azaC与TSA存在协同作用。以上结果表明，细胞中荧光蛋白报告基因的表达与DNA甲基化和组蛋白去乙酰化存在明显关联；5-azaC与TSA共同作用时存在协同作用。

综上所述，我们利用2A肽介导的多基因共表达慢病毒载体成功制备了三色荧光蛋白转基因羊，为未来多基因共表达转基因研究提供了新材料。在研究中，我们发现2A肽介导的多基因共表达慢病毒载体在体外真核细胞中能够独立高效表达，但在转基因羊中表达沉默。转基因羊成纤维细胞经5-azaC和TSA处理后，部分细胞荧光蛋白报告基因的表达被激活，提示我们DNA甲基化在转基因动物中对转基因的表达调控发挥着至关重要的作用。研究转基因表达调控机制，降低转基因DNA超甲基化水平，规避转基因表达沉默，是本实验未来研究的重点方向。

**关键词：**2A 肽； 慢病毒载体； 转基因羊； 5-azaC； TSA

# 英文摘要

With the development of economic and science research, it is often critical to make transgenic animals that express multiple genes under the control of a single promoter in biomedical research and agriculture. Now, different approaches, such as internal ribosomal entry site (IRES) elements, bidirectional or double promoters, or coinfection with multiple viral vectors are commonly used. These strategies, however, mostly suffer from the fundamental problem that coexpression of the heterologous proteins is unreliable and far from quantitative. In the case of IRES-mediated coexpression, for example, expression of the downstream cistron is sensitive to its specific positioning after the IRES and will not be come true; the upstream cistron in these bicistronic mRNA open reading frames (ORFs) is more strongly transcribed than that of downstream protein. 2A peptide could improve the above defectiveness. 2A peptide, known as *'cis*-acting hydrolase element' (CHYSEL), could mediates expression of multi-gene indepently. Compared to IRES, 2A peptide has a shorter sequence (54-90 bp), genes in the 2A based multi-gene vector could express more independently and efficiently, which owns the advantages that others couldn't gain over it.

At present, most of the production of transgenic animals are mediated by single-cistron vector, and animals mediated by multi-cistron vector are rare. In 2A peptide mediated transgenic animals, except mice and pigs, however, there is no report in sheep. Now, lentivirus vector based transgenic technology owns the highest efficiency in transgenic livestock production. Combining the lentivirus vector with 2A-mediated polycistronic co-expression, the transgene efficiency would be high and multiple genes expressed coordinately. In one animal that express multiple exogenous gene at the same time, it is feasible to make many genes synergy or polymerization, which could improve the transgene utilization efficiency, shorten the production cost and animal production cycle. In the study, we make the fluorescent reporter gene (tdTomato, zsYellow1 and acGFP1) as target gene, to facilitate testing the gene expression mediated by 2A peptide. Firstly, tdTomato, zsYellow1 and acGFP1 were linked by 2A peptide, subcloned and constructed the multi-gene vector pLEX-2A-TYG. Second, the lentiviral vector was transfected in to the 293T and CHO cells, and the expression of the vector was investigated under confocal microscope. Upon this, the first tri-gene transgenic sheep were produced by injecting the lentiviral particles into the perivitelline space of sheep zygotes. Several methods such as PCR, Western blotting, Southern blotting, Real Time RT-PCR were used to analyze the transgene integration, copy numbers, transgene expression for trangene lambs. To analyze the transgene silencing, methylation level of the promoter and coding region in the vector was examined by Bisulfite sequencing PCR, BSP. Isolated fibroblasts from transgene lambs were treated by DNMT inhibitor 5-azacytidine (5-azaC) and deacetylase inhibitor TSA, the DNA methylation mechanism

Was explored. Main points in the study were listed in the following：

1 We first constructed the fragment 2A-linker with the size of 102 bp. 2A-linker mediated tri-gene lentiviral pLEX-tdT．omato-zsY．ellow1-acG．FP1 ( pLEX-2A-TYG) was constructed successfully PCR, enzyme digestion and clone reaction.

2 The Tri-gene vector was transfected with the 293T and CHO cells, which were detected by inverted fluorescent microscope and western blotting. Results showed that fluorescent proteins genes tdTomato, zsYellow1 and acGFP1 contained in the tri-gene vector could express high efficiently and independently.

3 Lentiviral particles were produced by cotransfection pLEX-2A-TYG vector with *p*MD2. G and packaging plasmid *p*SPAX2 into 293T cells using lipofectamine 2000, with a high titre (3×109IU/ml). The

Lentivirals were used to infect 293T and CHO cells, 2A peptide mediated tdTomato, zsYellow1 and acGFP1 expressed efficiently and independently, which were detected by confocal microscope.

4 To test whether the multi-gene vector work well *in vivo*, transgenic sheep was produced by injecting the lentiviral particles into the perivitelline space of sheep zygotes. There are 5 donors and 37 recipient Merino sheep for use. 37 transgenic embryos were injected lentiviral particles, and transferred to 37 recipient rams. Of seven lambs born, two (#6 and #7) of which were identified with exogenic gene by PCR.

5 Lambs were all examined by portable UV light, no fluorescent was found in the skin of the ears, heads, lips, feet and other bodies that can be seen. The skin of the transgenic lambs were gained and used as sample, we analyzed transgene expression by western blotting and RT-PCR. Unfortunately, no signal was detected.

6 To test the cause of transgene silencing, the methylation level of genome DNA in the tails of transgenic lambs were analyzed by BSP. Results showed that methylation levels in the CMV were 76.25%

(#6) and 64.70%(#7); in the coding region of tri-gene construct, methylation levels were for lamb #6,

TdTomato 97.5%, zsYellow1 98.1% and acGFP1 99.2%; for lamb #7, tdTomato, zsYellow1 and acGFP1 were 97.6%, 99.5% and 97.6%, respectively. It denoted that the hypermethylation existed in the tails of transgenic sheep. We implied that the silencing of transgene expression would caused by DNA methylation in the transgenic sheep.

7 To test whether DNA methylation played a critical role in the transgene expression, skins of two transgenic and one non-transgenic lamb were cut, the fibroblasts of which were isolated and purified. The cells were treated with 5-azaC and TSA with different concentration and time, respectively. The results detected by inverted fluorescent microscope and FACS showed that number of the fluorescent (GFP+) cells increased with the drug concentration and incubation time increasing. When 5-azaC and TSA co-incubated in the cells, GFP+ cells were more than that treated with 5-azaC or TSA alone, which suggested that there is a co-operation between 5-azaC and TSA. Results above showed that expression of the fluorescent protein gene has an obvious negative relationship with DNA methylation and histone deacetylation; 5-azaC and TSA had a coordinated effect when they work together.

In conclusion, we successfully produced multi-gene sheep by 2A peptide mediated tri-gene vector, which would provide new materials for transgenic research. Unfortunately, reporter genes of the tri-gene mediated by 2A peptide expressed successfully in the cells, but silenced in the tails of the transgenic sheep. Expression of the reporter gene in part of fibroblasts isolated from transgenic sheep was reactivated when they were treated by DNMT inhibitor and deacetylase inhibitor, which denotes that DNA methylation plays an important role in transgene expression. The mechanism of transgene regulation, down-regulation of DNA methylation and methods of avoiding silencing of transgene would be studied in the future.

**Key words**: 2A peptide; Lentivirals; Transgenic sheep; 5-azaC; TSA

# 中英文对照表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文简写 | 英文全称 | 中文全称 |
| 5-azaC | 5-azacytidine | 5-氮杂胞嘧啶核苷 |
| 5-azadC | 5-deoxycytidine | 5-氮杂脱氧胞嘧啶核苷 |
| AA | Amino acid | 氨基酸 |
| AdoMet | S-adenosyl-L-methionine | 硫-腺苷-L-蛋氨酸 |
| AdoHcy | S-adenosyl-L-homocysteine | 硫-腺苷-L-同型半胱氨酸 |
| Amp | Ampicillin | 氨苄青霉素 |
| bp | Base pair | 碱基对 |
| cHS4 | Chicken hypersensitive site-4 | 鸡超敏位点 4 |
| CMV | Cytomegalo virus | 巨细胞病毒 |
| COBRA | Combined bisulfite restriction analysis | 重亚硫酸盐-酶联合分析 |
| DNMT | DNA methyltransferase | DNA 甲基转移酶 |
| dNTP | Deoxyribonueieoside triphophate | 脱氧三磷酸核糖核苷 |
| env | Envelope encoding gene | 膜编码基因 |
| ER | Endoplasmic reticulum | 内质网 |
| FMDV | Foot and mouse disease virus | 口蹄疫病毒 |
| gag | Gene encoding structural proteins | 基因编码结构蛋白 |
| GFP | Green fluorescent protein | 绿色荧光蛋白 |
| HAT | Histone acetyltransferase | 组蛋白乙酰转移酶 |
| HDAC | Histone deacetylase | 组蛋白脱乙酰基酶 |
| HIV | Human immunodeficiency virus | 人免疫缺陷性病毒 |
| iPSC | Induced pluripotent stem cells | 诱导性多能干细胞 |

kDa kilodalton 千道尔顿

IU Infectious units 感染单位

LB Luria Bertani culture LB 培养基

LTR long terminal repeat 长末端重复

MCS Multiple cloning site 多克隆位点

MeCP m5CpG-binding protein 甲基结合蛋白

MBD m5CpG-binding domain 甲基结合区域

Neo Neomycin 新霉素

NTC Non transgenic control 非转基因对照

ORF Open reading frame 开放阅读框

PBS phosphate-buffered saline 磷酸盐缓冲液

PCR polymerase Chain reaction 聚合酶链式反应

PS perivitelline space 卵周隙

pol gene encoding viral enzymes 基因编码病毒酶

PPT polypurine tract

Rpm Revolutions per minute 每分钟转数

SIN self-inactivating 自我灭活

Tris Tris(hydroxymethyl) aminomethane 三-羟甲基-氨基甲烷

UTR Untranslated region 非编码区

VSV G vesicular stomatitis virus glycoprotein 疱疹性口炎病毒糖蛋白

Woodchuck hepatitis B posttranscriptional

WPRE regulatory element 土拨鼠 B 型肝炎后转录调节元件

# 第一章 文献综述

## 1 2A肽在Th物医药和Th物技术中的研究进展

2A肽和类2A肽序列在过去20多年里已得到较全面地研究。同一个病毒属中，2A肽序列同源性较高，但由于进化的原因，序列间仍存在差异。然而，不同属中，2A及类2A肽序列好像是同型的[4]。目前，2A肽的功能在所有真核细胞中已被验证，且已被较广泛应用，尤其在生物技术领域，已得到较大范围的使用，从植物代谢组工程到动物T细胞受体复合物、单克隆抗体/异二聚体细胞因子的表达等[5]。

病毒已被用于许多非传统翻译策略以放大他们浓缩的遗传信息编码潜能。Leaky终止密码子将会被连读以得到预期的翻译产物，或者得到一个水平非常低的延伸的连读蛋白。重叠（如-UAAUG-; -UGAUG-; -AUGA-），或者终止子与起始子过度靠近引起的终止，将伴随着低水平的重新启动。许多情况下，一个单独的mRNA通过重新编码被翻译成两个或两个以上的蛋白，重编码规则通过mRNA中特异位点和信号如移码和连读发生改变。核糖体跳跃，首次在口蹄疫病毒（FMDV）中被发现，代表着另一个可以从有限的基本序列中转移多基因产物的翻译方法的诞生。简单地说，当一个核糖体遇到一个开放阅读框（ORF）内的2A肽序列时，一个特异肽键的合成发生“skipped”。此过程产生两个选择性结果：翻译在2A肽处终止或者2A肽下游蛋白开始翻译。这样独立表达的翻译产物就通过一个单独的ORF被合成。

### 1.1 2A肽的起源

2A肽最初于1991年被Ryan及其同事在口蹄疫病毒(FMDV)中鉴定得到，可以自裂解为小片段肽，属于小RNA病毒属小核糖核酸病毒[6]。2A肽平均长度为18～22氨基酸（AA）。‘‘2A’‘代表小RNA病毒多蛋白中的一段特异区域，源于研究者所采用的学术命名系统。在FMDV中，它可以在自己的C-端自动裂解，即核糖体跳跃，N-端被3C/3CD蛋白酶裂解或从上游壳蛋白1D处起修整的一小段肽。早期研究认为，2A肽可能是一个具有裂解作用的病毒编码的蛋白酶或宿主细胞蛋白酶[6]。

研究表明，其他小RNA病毒属诸如口蹄疫病毒、心病毒、马鼻病毒属、猪肠病毒、微小核糖核酸病毒和某些parechoviruses的裂解活性则发生在壳蛋白前体，如P1-2A口疮病毒，L-P1-2A心病毒）和2BC/P3连接处。DxExNPGP序列存在研究下几个属中，包括口蹄疫病毒、心病毒、马鼻病毒属和某些parechoviruses。尽管心病毒的2A肽片断较长，约含有133到143个AA，当研究脑心肌炎病毒（Encephalomyocarditis virus, EMCV）和Theiler小鼠脑炎病毒（Theiler's murine encephalitis virus, TMEV）的共同作用时，大

部分情况下，2A肽不具备基本的裂解活性[7,8]。早期的研究资料表明，2A肽序列也在某些非小 RNA 病毒中被发现，包括双顺反子病毒科*Dicistroviridae* 和四病毒科*Tetraviridae*属中昆虫阳性链病毒，以及Cypoviruses 和哺乳动物中C型轮状病毒[9]，在全病毒科

*Totiviridae*四个非片段dsRNA 中也有发现[10]。对翻译蛋白的分析表明，这些2A 肽均有裂解活性[11]。

除了RNA病毒2A肽外，活性类2A肽序列也分别在克氏锥虫（Trypanosoma cruzi）和T. brucei L1Tc非LTR逆转座子开放阅读框的N-末端检测到[12]。近来在紫色海胆*Stronglocentrotuspurpuratus*中也发现了 2A 肽片段，并且具有活性。另外，2A 肽出现在某些非LTR逆元件（像锥体虫） 和核酸结合寡聚体区域(NOD)样N-末端、或者

*Caterpiller*蛋白中[13]。因此，这种控制蛋白生物发生的序列不仅出现在病毒，而且出现 在与（逆元件retroelements）病毒相关的基因插入序列中。2A肽和类2A肽序列在真核细胞中广泛存在活性，从酵母到植物到昆虫到哺乳动物[14]。以2A肽为基础的裂解唯一的必须条件是需要核糖体80 S翻译。大肠杆菌*E. coli*细胞中1D-2A肽序列的蛋白酶酶解活性在同等条件下的真核系统中没有检测到[7]。尽管F2A已得到广泛成功的应用，但生物学家仍然应当警惕。其它2A肽序列也已在研究中被使用，包括马鼻炎病毒（*equine rhinitisAvirus*, ERAV," E2A"），猪圆环病毒-1 (PTV-1," P2A")和*Thoseaasignavirus*(TaV,

“T2A”）[5,15]。顺式作用水解酶元件(cis-acting hydrolase element, CHYSEL)是Pablode Felipe为反映这类小RNA病毒2A肽的特性而命名的[16]。CHYSEL序列由两部分组成：一段AA非保守序列和一段带有保守序列-D(V/I) EXNPGP的强α螺旋特性的序列[17]。翻译过程中，核糖体会跳过CHYSEL序列中甘氨酸和脯氨酸之间的肽键，终止蛋白合成，并开始下一个蛋白的翻译合成[18]。

### 1.2 常见的2A肽及类2A肽序列

虽然2A肽的调节机制在大部分真核细胞中普遍存在，但在原核细胞中尚未发现[7]。目前，除了FMDV 2A肽之外，研究者还在小RNA病毒、昆虫病毒和C型轮（螺旋）状病毒中鉴定到了2A肽的存在[3]。目前，有四个2A肽序列在生物医学研究中应用较广泛，它们分别是：FMDV 2A (F2A)、马鼻炎病毒A病毒2A(E2A)、猪圆环病毒-1 2A(P2A)和*Thoseaasignavirus* 2A (T2A)（图1）。前三个都属于小RNA 病毒，第四个属于昆虫病毒[5]。下面以FDMV为主介绍2A肽的相关结构特性：

FMDV属小核糖核酸病毒，是一种单链RNA病毒ssRNA，其mRNA约由8500个核酸组成，一个单独的长开放读码框含有2332个密码子，编码一个259 kD的多聚蛋白，但全长蛋白产物还没有发现过[6]，因为新生多蛋白经过初步裂解后，生成四个产物，即L、P1-2A、2BC和P3蛋白。

FMDV 2A RNA序列在所有口蹄疫病毒中均高度保守，而2A肽C-端最后三个氨基酸(-NPG-)和2B蛋白N-端第一个氨基酸(-Pro-)在所有已发现的病毒中也高度保守[7]。



图1已在Th物体内成功应用的2A肽序列[2]。这些序列功能已在体内外研究中被成功验证[3]。FMDV，口蹄疫病毒；ERAV，马鼻炎A病毒；PTV1，猪圆环病毒-1；TaV，*Thosea*

*asignavirus*。黑体字为各2A肽序列的保守区，箭头指示裂解位点。

Fig1 2A peptide sequences successfully used *invivo*[2]. These sequences were successfully tested *in vitro* and *in vivo*. (FMDV) Foot-and-mouth disease virus; (ERAV) equine rhinitis A virus; (PTV1) porcine teschovirus-1; (TaV) Thosea asignavirus. Conserved residues are bold with the site of cleavage noted.

### 1.3 2A肽的作用机制

众所周知，肠病毒和鼻病毒1D/2A主要的裂解活性是由一个病毒编码的约17 kDa的蛋白酶(2Apro)调节，以胞内方式在自已N-端裂解，然后形成许多新生多蛋白。同时使用异源类2A肽序列可以有效提高多蛋白产物的共翻译效率[19]。类2A肽序列包含一个保守区(2A, Asp-Val/Ile-Glu- X- Asn- Pro-Gly; 2B, Pro)，翻译时，该保守区中2A甘氨酸和2B脯氨酸之间发生断裂。这种裂解行为被认为是由核糖体跳跃机制引起的，2A肽元件改变了核糖体活性，使其跳过甘氨酸和脯氨酸之间的肽键形成，最终多个独立表达的蛋白产物[20]。

早期使用无细胞翻译系统（兔红细胞裂解物，小麦胚芽提取物）分析2A肽调节的裂解反应时，取得重大发现。裂解仅发生在共翻译时期，翻译的未裂解产物（约占总量的1/10），在翻译结束后，不会生成裂解产物。而且，在ORF中，2A肽上游的蛋白水平高于下游的蛋白水平。研究表明，这与RNA转录或蛋白降解无关，明显是由于合成的水平不同引起的，因为一部分核糖体终止在裂解位点导致此系统表达不平衡。这一现象表明，2A肽的裂解机制不是蛋白酶酶解作用的结果[21]。

2A肽调节的翻译模型：核糖体跳跃。新生2A肽被认为与核糖体外通道相互作用，诱导翻译暂停。即外通道-DxExNPG-的2A肽将肽与tRNAGly之间的酯连接 从

prolyl–tRNA（一种空间位阻亲核因子）处移走。翻译减速，prolyl–tRNA之间不能形成肽键。新生肽与tRNAGly之间的酯键水解可能发生在核糖体内，随后释放翻译产物。当

与tRNAGly共价连接时，从未检测到新合成蛋白。2A肽和类2A肽序列被统称为顺式作用水解元件(CHYSEL)，反映了其在特异位点的酯键水解能力。尽管此系统仅部分解释了无细胞翻译体系中产物不平衡的原因，但许多细胞表达研究表明，同样的产物不平衡在培养的细胞、植物和动物中没有发现。

peptidyl: glycyl-tRNA酯连接水解的机制至今不太清楚。但近年来，裂解机制中的转换释放（终止）因子（eRF）1和3已被发现[17]。这些蛋白结合到终止密码子，负责新生肽链最后一个氨基酸和它的tRNA之间的酯键水解。当开放阅读框中存在2A肽序列时，翻译复合物在2A肽的C-端被阻滞。其主要过程如下（图2）：



图2 2A肽在多蛋白中裂解机制。

该图摘自[http: //www. st-andrews. ac. uk/ryanlab/page2. htm](http://www.st-andrews.ac.uk/ryanlab/page2.htm). Fig 2 Mechanism of self-processing in 2A peptide.

This figure is extracted from [http: //www. st-andrews. ac. uk/ryanlab/page2. htm](http://www.st-andrews.ac.uk/ryanlab/page2.htm).

首先，2A新生肽和glycyl-tRNA从A位置转位到P(步骤i & ii,).。

Prolyl-tRNA进入A位置（步骤iii），但可能其在此处不能形成肽键及存在此处（步骤

iv）。此时，eRF1进入A位置，水解酯键，释放新生肽（步骤iv & v）。

随着酯键发生水解，新生肽被释放。eRF1离开复合物，eRF3参与这一过程（步骤 v

＆vi)。

然后，出现了两个相互对立的结果。一是翻译终止在2A的C-端；二是eRF1存在于A位置，proly-tRNA重新进入A位置，并被eEF2转位到P位置，下一个氨酰tRNA进入A位置合成下游序列。（步骤vi到viii）

核糖体在2A肽C-端跳过glycyl-prolyl肽键的合成，导致2A肽与其紧连的下游蛋白的断裂[20, 22]。

### 1.4 2A肽介导的蛋白的亚细胞定位

2A肽介导的表达策略的优点是通过使用共翻译和翻译后信号序列，2A肽多蛋白的单个顺反子可以被靶定到许多不同的亚细胞位点。但是研究发现，一些蛋白的共表达产物被定位或穿过哺乳动物内质网（ER）。当2A肽的上游蛋白带有N-端信号序列，下游蛋白没有携带任何信号序列，这两个蛋白将会被转位到ER [23]。目前该问题的源头已找到，即当转位到ER时，2A反应（融合蛋白的形成）被一些上游蛋白的C-末端区抑制，引起“slipstreaming”作用发生，揭示了这种可能性[22]。GFP，N-端带有豆蔻酰化位点，

P21，一种细胞循环抑制剂，含有核定位信号（NLS），两者分别成功地在细胞膜和细胞核中表达。当该载体应用于T细胞系时，可以有效阻碍细胞循环[24]。

影响裂解的残基被认为存在于异位子内，这段距离可能增强了新生肽与核糖体的相互作用，抑制了2A反应[22]。目前，解决这个问题的方法包括：延长2A肽连接序列的长度至壳蛋白（" 1D"）序列[25]。尤其是将2A肽序列的N-端延伸至1D的5AA可以改善裂解效率，但如果延伸到1D的14AA或者更长(21和39AA)，多蛋白则可以完全裂解，上下游蛋白产物等摩尔表达[26]。核糖体外通道可以容下30-40AA，2A肽活性就是2A肽与此通道相互作用的产物，该模型与我们以前的研究报道相一致[5]。再者，需要考虑载体中各个基因的表达顺序。在一些重组多蛋白中，蛋白表达的不同顺序受2A肽上游基因的影响

[27,28].2A肽裂解活性与下游蛋白序列无关[6]。许多研究表明，2A肽裂解效率可以通过在

上游蛋白和2A肽之间加入柔性序列Gly-Ser-Gly或Ser-Gly-Ser-Gly得到改善，或加入一个短的N-短连接子（-S-R-A-），或者在2A肽C-端加入四个氨基酸（-A-P-G-S-）[14]。Yan及其同事研究证明‘Slipstreaming’转位不发生在哺乳动物细胞中，即2A肽的下游蛋白需要一个分泌或膜锚定信号序列[29]。

### 1.5 2A肽的作用效率

FMDV基因表达产物中不存在未剪切的多聚蛋白前体，因此F2A肽的天然剪切活力

可达到100％。而多数情况下，F2A肽对体外构建的多顺反子无法完全剪切，剪切效率大多在85％-95％之间[30]。但人工重组蛋白的裂解和翻译后进程并不常常如愿所至。转基因中与2A肽序列相关的顺反子的排列顺序、2A肽两端连接的核酸序列均会影响多蛋白的裂解效率。与2A肽序列相关的顺反子的排列顺序还可以改变其所编码蛋白的翻译后进程和胞内运输。2A肽的裂解效率在不同细胞和组织中不同，但总的来说，在细胞中的裂解效率高于机体组织中的裂解效率。

由2A肽连接重链和轻链的抗体在小鼠中稳定表达，两条链正确聚合，转染细胞中未检测到任何多余的抗体链，比IRES连接产生的抗体表达水平高16倍[31]。Donnelly等研究表明，T2A肽裂解活性最高，大于99%，高于E2A, P2A和F2A[9]. Szymczak等研究发现F2A和T2A裂解效率较高于E2A，接近100%[19]。而在人细胞系、斑马鱼和小鼠中，P2A裂解效率最高[32]。F2A对体外构建的多顺反子载体也无法完全剪切，剪切效率大多在85％～95％。这可能是由于体外构建的多顺反子体系中，2A肽的“裂解”活性在某种程度上受到其周围氨基酸序列或蛋白质空间结构域的影响[33]。另外，2A肽的剪切活性还可能与前体蛋白总量或体外细胞系有关。

2A肽裂解效率当前也存在着问题，一方面，2A肽前后被翻译的多蛋白裂解效率不同，前者相对较高，这与IRES等表现相似；另一方面，由于2A肽残基大部分融合到翻译蛋白的C-端，有可能会干扰上游蛋白的功能。裂解效率不高会导致大量未裂解蛋白堆积，形成毒性蛋白，积聚在转基因表达的细胞中。Ryan 等提出提高裂解效率的方法，如，在2A肽N-端加入-G-S-G- linker等可以改善裂解效率；或在2A肽N-端连入一个

1D肽C-端氨基酸序列，也可以提高裂解效率[5]。体外实验表明，在F2A N-端接入FMDV

1D肽C-端的五个氨基酸(APVKQ)可以将裂解效率提高[7]。在幼仓鼠肾细胞BHK-21和猪肺泡巨噬细胞中，当在F2A N-端接入FMDV 1D肽C-端的七个氨基酸(APVKQLL)时，可以将裂解活性提高15% [34]。但上面两个实验只检验了同一2A肽在1D肽的两个氨基酸出现与否时的裂解活性，没有说明不同病毒2A肽的裂解效率。P2A有19个AA时裂解活性高于22个AA时的肽，这表明来源于不同病毒的2A肽裂解活性，2A肽的长度不是唯一的决定因素[5]。也有研究发现，2A肽不影响多顺反子中各种蛋白的细胞定位及生物活性。Abdelhak El Amrani等人发现，多顺反子中各种蛋白质加上信号肽后，其在植物细胞中的定位不受2A肽残基的影响[35]。另外，携带双顺反子HoxB4-2A-GFP的逆转录病毒能同时表达核蛋白HoxB4和细胞质荧光蛋白，并且发现2A肽不影响蛋白质的细胞内定位[36]。S Furler等人利用腺相关病毒携带SOD-2A-EGFP，在检测到荧光蛋白高效表达的同时，发现2A肽尾巴不影响SOD酶的活性[37]。脯氨酸附着在第二个蛋白的氨基末端，像2A肽自裂解过程的一个遗物，不会明显干扰活性和引发炎症，而且会增加蛋白稳定性[25]。定点突变实验研究表明，Gly-Pro剪切位点下游序列的改变并不影响

2A肽的裂解效率，而上游序列的改变则会产生一定的影响。在2A肽上游插入FMDV

衣壳蛋白1D部分序列会使剪切效率提高到95％至100％[21]。

裂解发生在2A肽序列末端，因此大部分2A肽仍然附着在上游蛋白的C-末端，这

将会影响某些蛋白的活性（例如，他们的功能受到其他tag如Myc、His等加入的影响）。以防裂解蛋白转位进入ER，最好在上游蛋白和2A肽之间加入一个包含furin蛋白酶裂解位点(-RAKR-)的序列[31]。Furin是一种细胞内源蛋白酶，几乎存在于所有细胞的转运高尔基氏体（trans-Golgi）网中。一旦进入ER的内腔后，2A肽就会被从上游蛋白上修剪下来（这种情况发生在抗体的重链上），仅留下一个包含2个AA的C-末端延伸(-RA)。在随后的研究中，仅使用含有AA序列的选择性furin裂解序列，也可以被羧肽酶有效地切断( -RRRR-, -RKRR-, -RRKR-)，致使抗体在没有残留氨基酸的情况下表达[38]。植物转基因表达蛋白可以利用类似杂交连接肽的内源性蛋白酶去除2A肽延伸物。带有两个不同标记蛋白的多蛋白前体在拟南芥（*Arabidopsisthaliana*）中成功表达，这两个蛋 白由凤仙花*Impatiensbalsamina*( -SNAADEVAT-)序列和F2A 肽序列连接[39]。如果2A肽用于生物医药研究，2A肽序列的加入，对上游蛋白来说，此蛋白可能作为一个佐剂刺激抗2A肽免疫反应。任何潜在的佐剂作用将会通过2A肽的去除被消除。值得注意的是，2A肽尾也有存在的优点，表现为2A肽抗体已经生产出来，可以用于检测和或免疫沉淀包含2A肽的上游蛋白产物，方便转基因检测[5, 22]；如果突变蛋白和内源蛋白共表达，内源蛋白和带2A肽的蛋白大小不同将有利于将二者区分开。

### 1.6 2A肽的应用

2A肽序列片段小，当用病毒载体构建多顺反子转基因，装载能力容易受到限制，因此，小片段的Linker尤其受青睐，这也是这一技术的明显优点。2A肽最初用于治疗基因与报告基因的连接，用于抵抗流感A病毒[40]，随后，以2A肽为连接的载体在生物医药和治疗研究中逐渐被大家所接受和认同。以2A肽为连接的载体在以下几方面发挥了积极作用：

*Invivo*基因治疗

基因治疗是指将外源核酸导入靶细胞，以纠正或补偿由基因缺陷和异常引起的疾病，以达到治疗目的。与传统医药治疗相比，基因治疗提供了特异的遗传疾病的治疗方法。P2A和T2A被用于构建一个含有人艾杜糖醛酸酶(IDUA)基因、荧光素酶和DsRed2报告基因的三顺反子载体(IDUA-P2A-luciferase-T2A-DsRed)。研究中，2A肽有效地裂解，三个蛋白在体内外均有功能，治疗基因在NOD/scid小鼠中高水平表达，并且可以通过非浸入全身的荧光素和细胞水平的DsRed2标记追踪[41]。2A肽介导的包含GC1的慢病毒载体注射动物，光动反射发生，视力恢复。这表明类2A肽经过合适的优化，也能够成功导入治疗性载体，携带多蛋白到视神经[42]。

*Exvivo*基因治疗

为了提高治疗安全性和基因转移效率，靶定细胞从病人身上取下，经过基因工程改造，然后再移植到病人体内。T细胞受体(TCR)基因转移重定向T细胞特异性是当前治疗恶性病和病毒性疾病较好的方法。αβTCR、CD3δε、γε和ζζ信号亚单位，共同决定特

异性CD4+和CD8+T细胞与结合到MHC分子抗原的反应。以TCR: CD3复合物为检测体系，Szymczak及其团队报道，这四个蛋白的表达组成了CD3，组成该TCR的两个蛋白仅需要两个逆转录病毒载体(CD3δγεζ-2A和TCRαβ-F2A)[19]。随后，一些研究者报道了利用2A肽连接TCRα和β-链基因，有效地表达了TCR[15]。重定向T细胞的关键是要考虑导入的TCR基因与内源性TCRα-和β-链基因的错配趋势。同样地，“murinized”受体改善了人类T细胞HLA-A2/LMP2-TCR表达，并下调了内源性TCRs的表达[43]。治疗黑色素瘤转移性病人时，逆转录病毒载体修饰的自体同源性T细胞表达的高活性的能够识别肿瘤相关抗原MART-1 ( MART-1TCRα-furinT2A-MART-1TCRβ)和gp100 (gp100TCRα-IRES-gp100 TCRβ)的TCRs，分别有30%和19%的病人肿瘤得到抑制。该研究中，一些患者的正常皮肤、眼睛和耳朵出现中毒症状。逆转录病毒载体表达α-和β-链由furin裂解位点/SGSG/P2A连接子连接，接受治疗的患者中黑色素瘤和滑膜细胞瘤的抑制率分别为45%和67%[44]。同样，2A介导的慢病毒载体pWPXL-HF2AL可以有效抑制裸鼠皮下肿瘤的生长[45]。

诱导多能性干细胞

胚胎干细胞(ES)有能力分化形成机体任何形式的形态，在保持多能性的情况下，无限生长。众所周知，当胚胎干细胞的转录因子Oct 3/4、Sox2、KLF4和c-Myc在细胞中表达时，成年细胞可以回到新生状态。这些Yamanaka因子的递入创造了诱导多能性干细胞(iPSC)，很明显，这不但需要多个单病毒载体，也会发生插入突变和病毒重激活。Okita et al.重复使用两个质粒进行瞬时转染，成功完成了鼠胚胎成纤维细胞的重组[46]。第一个质粒载体编码Oct 3/4、Sox2、KLF4因子序列由F2A相连，第二个编码c-Myc基因。但是，尽管iPSC生产的效率较低，并没有检测到载体DNA稳定整合到细胞基因组。Sommer [47]和Carey[48]报道了用多顺反子慢病毒载体把成纤维细胞诱导成iPS细胞。

Sommer及其团队使用单独的多顺反子mRNA，包含一个IRES元件，两个融合顺反子-Oct4

和-Sox2经由F2A连接，KLF4和c-Myc经由E2A连接。另一方面，Carey等将这四个基因

Oct4、Sox2、KLF4和c-Myc通过三个不同的2A肽(P2A、T2A和E2A)连接[48]。实验结果显示，两组中的成纤维细胞均重组成类ES细胞状态，但是这两个载体都未从基因组中被删除。所以，重组过程结束后，去除插入基因以减少基因组整合的研究正在进行中。鼠和人类胚胎成纤维细胞的有效重组和通过Cre/LoxP或piggyBac转座子/逆转座子系统有效删除2A肽序列的研究为临床生产iPS细胞提供了重要的可接受的方法[18]。

基因治疗的光学成像

为了通过光学成像检测转基因传递和表达，编码区需要与荧光或者发光报告子相融合，或者通过检测表达蛋白的活性，该蛋白可以与作为荧光底物β-半乳糖苷酶β-galactosidase相转化。一系列使用2A肽连接的体内外检测系统已成功地对不同荧光蛋白和共表达及翻译后蛋白进行了亚细胞定位[49,50]。斑马鱼(*Daniorerio*) 已被证明是一个非常完美的研究基础、生物医药科学和比较基因组学的脊椎动物模型系统。斑马鱼胚胎透明，可以明显地看到所使用的荧光。为证明2A肽系统在斑马鱼中的应用，由P2A连接

报告基因eGFP和mCherry的载体被构建，在体内，可以明显区分出报告基因在细胞中的位置[51, 52]。两个荧光基团在转染胚胎中以组织特异方式表达，表明这种方法有利于监测多蛋白在斑马鱼不同发育阶段的持续表达。同样，Trichas等[26]使用T2A连接膜定位红色荧光蛋白(Myr-TdTomato)和核定位绿色荧光蛋白(H2B-GFP)构建的独立编码序列载体，检测2A肽在转基因小鼠中的功能。TdTomato和eGFP相互专一地定位于培养细胞和内源性脊椎细胞的细胞膜及细胞核，与2A肽调节的完全自裂解相一致。该实验中靶定基因在获得转基因小鼠发育、成年及数代后代的所有检测组织中均明显表达。

多基因动物的生产

通过微注射或转染克隆方法，2A肽介导的多蛋白共表达系统对哺乳动物转基因技术提供了可靠的生产多基因共表达转基因动物的有效方法[53]。目前，2A肽介导的多基因家畜的生产报道很少。2011年，Deng等首次报道了2A肽介导的转基因猪的生产。研究中，2A肽介导的双启动子表达载体同时表达四个荧光蛋白，包括黄色zsYellow1、蓝色eCFP、红色tdTomato和绿色eGFP荧光蛋白。获得的11只小猪中有7只不同组织中同时高水平表达这四种荧光蛋白[54]。以上结果表明，2A肽在较大型动物中也可以有效地发挥作用，适合用于生产多基因动物。

### 1.7 多基因共表达构建策略

通常，蛋白共表达通过简单融合或融合蛋白通过蛋白酶裂解Linker序列完成[55]。但这些方法都存在较大的局限性，如融合蛋白可能会降低各个蛋白的功能；融合蛋白只能靶定一个单独的亚细胞位点；对于蛋白酶参与的裂解反应，多蛋白底物和酶必须共表达于同一亚细胞区域。

多基因共表达方法的首次突破是内核糖体进入序列（internal ribosome entrysite,

IRES）的发现。这些序列可以在核糖体内部位点诱导mRNA翻译。但是，这些序列通常比较大，约500 bp，更重要的是，该序列连接的多蛋白载体中，ORF中IRES后一个蛋白的翻译比前一个低约10%。不同的IRES会发生竞争，引起新的问题[56]：相比之下，

2A肽序列较短，且可以等摩尔表达。

目前多基因系统主要采取两种途径：多个携带单基因的独立载体系统同时转染靶细胞，其优点是可以自由调节各种治疗基因的表达量，各基因在时间上协调组合（图3）。 缺点是效率太低、工作量大；构建多顺反子载体，即在一个载体上实现多种基因的共表达。目前构建多顺反子载体的方法主要包括：构建多启动子(multiple promotors)表达载体、构建剪切(splicing)载体、表达融合基因(fusegene)、基因之间以内部核糖体进入位点、 自剪切肽2A连接等。然而这些方法中除了前面讲到的2A肽外，大多已逐步被放弃。究其原因主要是基因起始效率低，上游基因与下游基因的表达严重不平衡。如病毒源性

IRES曾被用于构建多顺反子，但是由于存在一些缺陷严重影响了其在多顺反子载体构建中的应用，主要有：IRES介导的上、下游基因表达不平衡，通常下游基因的表达量仅是

上游的20％到50％；IRES自身结构较大，其应用常受到载体容量的限制。以细胞为基础的研究中，共表达已广泛应用于把多个外源基因整合到细胞中以方便基因功能研究、信号通路分析和靶基因效用研究[1]。为目标蛋白复合物设计一个合适的表达方法需要考虑较多的因素，如搭配选择标记、拟得到的蛋白复合物的数量、蛋白复合物的特殊应用等。



图3多基因载体及多基因共表达方式[1]**。***E. coli* 细胞中共表达载体及表达策略，矩形代表表达载体；箭头代表独立的表达盒；带阴影矩形代表单独的ORF；椭圆形代表IRES或连接子序列。每个载体可以单独应用或与其它的载体联合作用。SD，Shine- Dalgarno序列。

Fig 3 Definition of expression vectors and co-expression strategies. The diagram depicts expression vectors and strategies for co-expression in *E. coli.* Ovals represent *E. coli*cells, and rectangles represent expression vectors. Bent arrows represent individual expression cassettes, and shaded rectangles are for individual ORFs. The round dots represent either ribosome binding sites or linker sequences, as indicated. Each vector can be used alone or in combination with others. SD, Shine- Dalgarno[1].

当需要在细胞中表达两个或两个以上基因时，双顺反子或多顺反子载体成为首选。 在许多构建双顺反子或多顺反子载体的策略中，内源核糖体进入位点已被广泛使用。但是由于IRES本身序列较大及其前后连接的基因表达水平不同，因此急需一种新的策略代替它。2A肽的出现，刚好填补了这一空缺。2A肽序列短，高裂解活性。尽管拥有如此优点，应用仍受到质疑，可能有以下两方面原因：带有2A肽的克隆载体没有商品化；缺乏不同的2A肽序列在不同结构中裂解效率和活性的比较全面的数据资料[32]。

传统的方法中构建多顺反子载体包括使用IRES元件、多启动子和融合蛋白等。病毒载体含有多个启动子有许多不利作用，如启动子、启动子抑制和重排之间的干扰。

IRES为生产真核多顺反子mRNAs提供了第一次。IRES序列开启了翻译的内部起始，允许一个单独的转录体表达两个或两个以上基因[57]。因为不同的基因受同一个启动子控制，整合入基因组的同一位置，所以转基因能够协调地表达。在双顺反子系统中，如果第二个顺反子表达的产物被检测到，证明第一个顺反子也表达。这种方法已成功地应用于动物基因治疗研究中，不同病毒源性的IRES已被鉴定。

另外，使用IRES元件存在很多缺陷。首先，IRES自身结构较大，约500 bp，其应用常受到载体容量的限制，尤其是限制容量的载体和非病毒载体。例如，逆转录和慢病毒载体的包装容量为8 kb，腺相关病毒载体的容量小于5 kb。第二，IRES介导的上、下游基因表达不平衡，通常下游基因的表达量比上游基因低10倍[26]。2A肽序列的明显优势是序列较小，仅有60~70 bp，其上游和下游的随机蛋白产物可以被测量通过氯霉素乙酰转移酶（chloramphenicol acetyltransferase, CAT）和β-葡萄糖醛酸酶（β-glucuronidase，

GUS)活性[58]；体外细胞自由翻译和Western blotting检测[21]；GFP/FACS带有抗体抗性

[24]；共荧光报告[16]；荧光共振能量传递(FRET)分析[19]和转基因动物的蛋白分离[26, 51]。

还有，如果需要三个以上基因同时表达时，可以选择不同属的2A肽以打破序列同源性，协助维持外源基因插入的稳定性。

### 1.8 慢病毒多基因共表达载体

典型的慢病毒载体编码一个内启动子和一条缺少polyA的正义链。由于串行载体基因组RNAs中Rev/RRE调节的核输出，他们可以有效地转移复杂遗传结构通过把内含子放入载体中[59]。为生产慢病毒多基因载体，常见的有两种策略被用于表达多基因。一方面，通过多基因表达盒整合或构建由一个内启动子控制的多顺反子转录体。多基因表达盒允许各个单独的基因被不同的内启动子控制[60]。一些研究已成功地应用双向启动子表达多基因[61]。由于慢病毒包装能力的有限性，插入片段总长度约为9-10 kb，因此，这些方法仅适用于相对较短的表达盒。另一方面，通过一个单独的表达盒编码一个双顺反子或多顺反子转录体以转移多基因。比较典型的做法是，cDNA序列通过IRES连接，为共翻译启动吸引核糖体[62]。但IRES存在以上诸多无法避免的问题，如不同的病毒和哺乳动物IRES序列均表现为组织特异偏好表达*invitro*和*invivo*[63]。所以，作为IRES 的一个较好的替代选择方法，从一个单独的表达盒中成功得到可比较的蛋白表达，逆转录病毒载体使用编码一个由2A肽连接的多顺反子结构[19]。当2A肽整合入慢病毒载体时，顺反子转录体中各基因有效地表达，尽管每个蛋白带有从2A肽上裂解下来的短序列[15, 64]。病毒转基因中，病毒类2A肽序列的插入是在一个独立载体中获得多个功能性蛋白的有效方法[19, 42, 64]。

### 1.9 前景

近年来，许多研究成果表明2A肽在共表达技术中占有越来越重要的位置。现有的裂解机制研究结果表明2A肽不仅是控制蛋白生物源性的新奇方法，而且它的关键作用是作为翻译传感器。真核细胞的蛋白合成消耗大量的细胞能量，这些能量主要用于延伸。 在能量和（或）营养消耗过程中，2A肽以终止密码子依赖方式终止翻译，并把余下的细胞能源贡献给ORF中2A肽上游蛋白的翻译。我们相信2A肽调节的裂解作为翻译应激的报告子，将会在生物技术和农业生产中得到广泛应用。

## 2 DNA甲基化在动物中的研究进展

细胞信息通过遗传和表观遗传传递给下一代。遗传信息由DNA序列编码，表观遗传信息主要由DNA修饰（DNA甲基化）和染色质修饰（核心组蛋白甲基化、磷酸化、乙酰化和泛素化）限定。这些表型修饰共同作用，构建特色的染色质构型，辅助基因转录，以及随后的基因表达的转录调节[65]。DAN甲基化和组蛋白修饰是调节染色质结构和基因表达的两个重要机制。

胞嘧啶甲基化于1925年首次在结核菌（*tuberclebacillus*）中检测到。23年后，即

1948年，人们才在真核细胞即小牛胸腺DNA中发现。直到1970s，随着许多重要信息的发现，如CpG位点在基因组中出现的频率约为期望频率的1/5，却是甲基化的主要目标，甲基化的重要性才变得越来越明显[66]。

### 2.1 DNA甲基化的表型特征

DNA甲基化是一种广泛存在的表观调节机制，在不同生物中，基因组以不同的方式甲基化[67]。植物基因组中，DNA甲基化发生在CG和CHG（H为碱基A、T、C中任一个）中胞嘧啶上，也可以发生在CHH结构中，但后者常见于小RNA中[68]。如在*Arabidopsisthaliana*基因组中，胞嘧啶甲基化水平在CG、CHG和CHH中分别为24%、

6.7%和1.7%[69]。动物基因组中，甲基化主要发生在CG位点上。编码蛋白的基因的甲基化主要发生在外显子上，这一现象在所有真核细胞中高度保守[67]。

DNA甲基化是一种共价修饰过程，DNA 复制后，硫-腺苷-L-蛋氨 酸

（S-adenosylmethionine, AdoMet）通过酶反应把-CH3基团添加到基因组胞嘧啶上。哺乳动物中，基因组中约60-90%的CpG位点DNA甲基化，但仅发生在CpG核苷酸的5-胞嘧啶环上。通常情况下，非甲基化CpG核酸位点聚集的DNA片段称为CpG岛，即富含CpG位点。基因组中，这些岛通常约0.5-3 kb长，发生几率为1/100，人类基因组几乎一半为CpG岛。非岛内的CpGs甲基化好像没有生物学功能[70]。CpG岛常位于基因的5-端，即启动子、第一外显子或者RNA多聚酶-转录基因中约60%的3-UTR，在表

观遗传的修饰作用中，对基因调节发挥重要作用，被认为是脊椎动物的基因标记[71]。

DNA甲基化是一种稳定的可遗传表观遗传标记，影响基因表达和细胞分化[72]。CpG胞嘧啶残基是DNA甲基化作用的位点，进而调节基因表达。多数情况下，CpG序列的

DNA甲基化抑制基因的表达。CpG岛通常位于重复序列内如中心粒重复、卫星序列和核糖体RNA。对于不同物种来说，转座子和重复序列的甲基化是不一致的：陆地植物和脊椎动物中，转座子甲基化水平最高，但在蚕蛾（silk moth）和海葵（anemone）中，甲基化现象又是不存在的。DNA甲基化模式不一样，甲基化的广泛性或区域性水平不同，尤其是在不同的发育阶段或不同的组织起源。事实上，成熟的亲缘配子授精时呈现明显地甲基化。例如，精子DNA相较于卵子DNA甲基化水平更高，授精后，发生去甲基化。但印记基因和大部分逆转录基因仍然保持甲基化。异常DNA甲基化首次报道发生于克隆囊胚的不同重复序列上。另外，印迹基因和单等位基因的甲基化属于保持型甲基化，不是*denovo*甲基化，呈高度保守性[65]。

### 2.2 DNA甲基化作用机制

DNA甲基化可以改变局部染色质结构，增强任何既定位点转录活性的空间位阻，通常，抑制转录活性[73]。表达较强的基因最易于发生甲基化，表达最强和最弱的基因甲基化水平通常比较低[67]。

Base flipping是一个被许多核酸修饰酶广泛使用的保守的机制，包括DNMTase、DNA修复酶和RNA修饰酶。在哺乳动物及其它的脊椎动物中，DNA甲基化也是在这一机制下形成的[74]。首先，DNA甲基转移酶与DNA序列结合，然后，被结合的靶序列外翻，在双螺旋中突出，即base flipping，进入活性位点区。此时，被翻转的胞嘧啶与胞嘧啶C6上一个保守的亲核氨基酸Cys共价攻击，把一个甲基基团从AdoMet转移到被激活的胞嘧啶C5上。

在脊椎动物和植物中，DAN甲基化对基因表达沉默起着重要作用。DNA甲基化调节基因表达的机制表现在五个方面[73]：5-甲基胞嘧啶上的甲基基团延伸进入DNA的大沟，直接抑制了转录因子与含有CG识别位点的结合；DNA甲基结合蛋白如MeCP2募集共抑制子到甲基化区域，加大了转录因子与其调节元件结合的空间阻碍；DMNTs调节的染色质修饰，导致抑制性染色质结构的建立，永久沉默基因转录；在甲基化富集的基因体中，抑制转录延伸效率，干扰与转录因子的结合；屏蔽增强子[73]。在非人猿NHP的ssAAV载体转基因中，直接的*denovo*DNA甲基化不参与抑制基因转录[75]。转录起始位点（TSS）下游、第一外显子区甲基化比启动子上游甲基化与转录沉默之间的关系更密切[76]。

### 2.3 DNA甲基化调控信号

DNA甲基化受两种类型的信号控制，分别为*cis-*acting信号和*trans-*acting信号。

IGF2R、SNRPN、H19和RASGRF1等基因由*cis*-acting信号调节。对不同的亲缘基因组来说，广泛的DNA甲基化发生在受精后，此过程结束后，又以不同的速率发生去甲基化。细胞周期研究表明，父源去甲基化通常发生在第一个细胞周期，但母源等位基因的去甲基化则发生在几个细胞周期之后。受精后，印迹控制区域(ICRs)甲基化以性别依赖方式建立。尽管体细胞中甲基化模式属于保持型，但生殖细胞的甲基化模式需要适当地被建立，以便遗传给下一代。以上表明甲基化以性别依赖的方式调节。虽然雌性生殖系的低甲基化与性染色体没有相关性，但这种调节与性别岭（gender ridge）相关。然而，雌性生殖系中，DNA甲基化被这两种机制调控。

### 2.4 DNA甲基化的分析方法

在不同的研究中，甲基化模式分析主要集中于基因调节。多数情况下，CpGs中胞嘧啶甲基化发生在基因启动子区，导致基因表达被抑制。一些研究表明，DNA异常甲基化模式与人类的疾病相关，如癌症[77]。DNA甲基化技术包括一系列分析从基因特异性、位点特异性到整个基因组分析，分为三大类[78]：第一类通过重亚硫酸盐转化测序技术，重亚硫酸盐处理把未甲基化胞嘧啶转化为尿嘧啶U, PCR扩增后变成胸腺嘧啶T，但甲基化的胞嘧啶在此过程中是不会发生改变的。因此，经过DNA测序，并与参照序列比对后，即可分辩出序列中的甲基化和未甲基化的胞嘧啶[69,79,80]；第二类基于甲基化敏感限制性内切酶[81]，DNA甲基化水平由酶消化的甲基化DNA与高通量寡核酸杂交后评定，这种方法主要应用于早期的DNA甲基化水平研究；富集基因组中的甲基化DNA或甲基化DNA结合域-运用免疫沉淀法(MeDIP)，通过抗体识别5-甲基胞嘧啶，然后进行芯片杂交或测序以评定甲基化水平[82]。通常情况下，这些方法是联合运用。当重亚硫酸盐处理与高通量测序（Illumina、SBS、SOLID等）相结合时，基因组水平的CG甲基化水平图谱就产生了。Feng等利用next-generation技术检测了八个不同物种的DNA甲基化模式，包括绿藻、开花植物、昆虫和脊椎动物。从全基因组水平进行了甲基化比较， 结果表明DNA甲基化在真核生物中具有保守性和多样性[67]。

上述方法均可用于测定DNA甲基化水平和甲基化模式，但也存在一系列不足，如：分辨率水平、限制性酶偏好、基因组重复序列的甲基化水平不易测定，更重要的是，各方法检测单CG位点甲基化的能力[79]。

### 2.5 DNA甲基化调节因子

DNA甲基化是一种常见的表观遗传修饰现象，在一系列高度保守的酶作用下，

-CpG-序列中胞嘧啶上被加入-CH3[83]。通常情况下，DNA甲基化分为*denovo*甲基化和保持型甲基化。因此，有两类酶：*denovo*甲基转移酶和保持型甲基转移酶。哺乳动物中，在DNA甲基转移酶(DNMTs)作用下，来自S-腺苷甲硫氨酸(SAM)的甲基团转移到胞嘧啶上。DNMTs属于*trans*-acting作用因子，使用*cis*-acting 信号靶定DNA位点甲基化。从1980s起，已经有许多哺乳动物的DNMTs被鉴定出来。

常见的DNA甲基转移酶有四种，包括NDMT1、DNMT3A、DNMT3B和DNMT3L。

DNMTs控制基因组的甲基化程度。NDMT1负责甲基化的保持，DNMT3A和DNMT3B

执行*denovo*甲基化。DNMT3L虽然没有酶活性，但参与调节其他甲基转移酶的活性。

DNMT1被认为是保持型甲基转移酶，因为在DNA复制过程中其活性高，偏好半甲基化的DNA。所有的DNA甲基转移酶（DNMT3L除外）在C-末端都含有一个活性位点。DNMT1包含与增殖核抗原相互作用的其他功能区，这些区与核定位信号相邻。其N-末端有一个富含半胱氨酸丰富的HRX样区和一个赖氨酸-甘氨酸重复区。DNMT3A、

DNMT3B和DNMT3L含有一个植物同源结构域，DNMT3A和DNMT3B有一个PWWP域。这两个区域定位DNMT3A和DNMT3B到着丝粒周缘异染色质处，并通过识别组蛋白修饰协助蛋白之间的互作。一些真核细胞如酵母、蛔虫和果蝇中没有DNA甲基化修饰现象，研究表明这与进化过程中DNA甲基转移酶同源染色体丢失相关[83]。同时删除

DNMT3A和DNMT3B，或只保留DNMT1会导致胚胎死亡[84]。

### 2.6 DNA甲基化抑制剂

DNA甲基化抑制剂5-azaC (or 5AC)，及其脱氧类似物5-脱氧胞苷(5-azadC or DAC)是第一个被美国食品药物管理局FDA批准治疗骨髓增生异常综合征(MDS) [85]。因为5-azaC和Zebularine需要被整合入DNA，诱捕DNMTs，产生额外非特异毒性，诱捕结合到DNA上的DNMT1，或许诱捕其他的DNA结合蛋白。DNMT1非核酸基础的抑制剂抑制DNMT催化活性，不需整合入DNA，但它在人和动物中的作用还不清楚[85]。

异常DNA高甲基化与SCNT低成功率相关，因此，胚胎发育过程中，进行DNA甲基化调节是有必要的[86]。5-azadC，作为甲基化转移酶抑制剂，可以很容易地降低供体细胞和移植胚胎的DNA甲基化水平[86, 87]。猪供体细胞经5-azadC处理后，胰岛素样生长因子2（insulin-like growth factor 2, IGF2）表达水平显著升高，DNMT1水平明显降低[86]。但这些药物在减缓甲基化作用的同时，也存在不可避免的副作用。如高浓度的5-azadC对细胞和胚胎是有毒性的[88, 89, 90]。

### 2.7 DNA甲基化与染色质相关性

DNA 甲基化和染色质修饰是表观遗传的两个重要成分，二者相互作用，关系紧密。

Cedar & Razin研究表明灭活染色质内富集超甲基化的DNA，活性染色质与低甲基化

DNA相关。这些相关性已被对特异基因的详细分析和基因组ChIP-on-chip分析所证实。染色质和DNA甲基化的关系是相互的[85]。染色质重修饰参与DNA甲基化，更重要地是参与组蛋白修饰。DNA超甲基化通过形成致密染色质抑制转录因子的表达，进而抑制基因表达[91]。

### 2.8 组蛋白修饰

真核生物细胞核中，组蛋白通过不同修饰对基因表达的调节起着关键作用。组蛋白N-端信号可以通过乙酰化、甲基化、磷酸化和泛素化作用被修饰[92]。当致密的异染色质常与染色质之间相互转化时，转录激活或抑制就发生了。组蛋白乙酰化和甲基化是组蛋白尾最常发生的修饰方式。组蛋白乙酰化致使组蛋白与DNA相互作用减弱，与活性转录相关，但组蛋白甲基化导致基因的激活或抑制依赖被修饰的残基[73]。

### 2.9 组蛋白去乙酰化酶抑制剂

曲古抑菌素A (TSA)和异羟肟酸(SAHA)，是异羟肟酸基经典的HDACis，抑制Ⅰ和

Ⅱ级HDACis. SAHA是第一个被批准用于临床的HDACi。第二异羟肟酸类HDACis，包括(LBH589, PXD101)，当前已应用于临床发育的不同阶段，并抑制Ⅰ和Ⅱ级 HDACs。第三属于脂肪类，也抑制Ⅰ和Ⅱ级HDACs[93]。丁酸钠是最早的HDAC抑制剂之一，还有心情稳定剂和抗癫痫丙戊酸。第四类是基于一个环状肽的HDACi (FK228)，抑制Ⅰ和

Ⅱ级HDACs。第五类是以苯甲酰胺为基础的HDACis，抑制Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ级HDACs[85]。

TSA作为使用最广的组蛋白去乙酰化酶抑制剂，可以促进细胞提高组蛋白乙酰化水平，这一作用与降低DNA甲基化水平相关[86,94,95]。许多研究表明，TSA对SCNT胚胎的发育具有良好的作用，可以明显提高猪克隆胚胎的囊胚形成率[73]。当牛重构胚胎和细胞被TSA和5-azadC同时处理时，组蛋白乙酰化水平得到改善，DNA甲基化水平降低，囊胚发育率被提高[96]。以上表明，组蛋白去乙酰化酶抑制剂与DNA甲基转移酶抑制剂具有协同作用[86, 97]，也间接表明组蛋白乙酰化与DNA甲基化之间存在相互关联的。

### 2.10 甲基化在家畜中的研究现状

非转基因动物甲基化水平研究表明，甲基化水平与基因表达水平、组织特异性表达、 家畜性别等之间的关系存在一定的关系，但仍需要进一步的研究和探索。Yang等应用荧光标记甲基敏感多态性扩增（fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism, F-MSAP） 方法对猪不同组织的甲基化进行检测，结果显示，肌肉53.99%、心脏51.24%、肝脏50.18%、脾53.31%、肺51.97%、肾51.15%及胃53.39%，不同组织中甲基化水平的不同可能与组织分化、生长和发育相关[98]；Tang等运用甲基敏感扩

增多态性技术（methylation-sensitive amplification polymorphism technique, MSAP）对猪、牛、羊、大鼠、鸡和鸭基因组甲基化水平进行分析，结果表明，不同种类的动物，甲基化水平不同；同种动物不同组织的甲基化模式是特异的，且组织基因组甲基化水平远高于血液；鸟类和哺乳类动物基因组甲基化水平差异不明显，但哺乳动物的半甲基化频率较低，全甲基化频率较高[99]。赵丽霞等应用BSP法对新生绵羊肾脏和肺脏组织中的cyclin dependent kinase inhibitor 1c（Cdkn1c）基因进行分析，未发现CpG位点甲基化。研究认为，Cdkn1c基因上的CpG岛为非差异甲基化区域（differential methylated region，

DMR），且与印记基因状态的维持无关[100]。荣美洁等用同样方法对不同时期崂ft奶ft羊乳腺组织中孕激素受体（PR）基因的甲基化水平进行了分析，发现该基因甲基化水平与基因表达水平存在负相关[101]。辛鹏慧等对成年牛组织中Zygote Arrest 1（ZAR1）基因进行研究，发现ZAR1在睾丸中表达量较高，肾脏、心脏中较低，而在肝脏中不表达。

DNA甲基化检测结果表明，心脏中甲基化水平明显高于睾丸、肾脏和肝脏，显示DNA

甲基化与牛ZAR1基因的组织特异性表达相关[102]。白小青等应用高效液相色谱法

（HPLC）检测了96头30日龄荣昌猪仔猪（公、母各半）耳组织全基因组DNA的甲基化程度，结果表明：仔公猪、仔母猪的DNA甲基化含量分别为4.296％和3.902％，无统计意义。研究认为，性别不是影响荣昌猪仔猪DNA甲基化状态的主要因素[103]。Mingzhou

li等对猪脂肪和甲基化进行了系统相关分析，选取了相同饲养条件下，三个品种猪的八种不同的脂肪和两种骨骼肌组织作为样品，样品中的脂肪水平明显不同。从180个甲基化DNA免疫沉淀数据库中得到1, 381 Gb序列数据，为脂肪和肌肉研究提供了基因组水平的DNA甲基化图谱和基因表达谱。结果显示甲基化水平在品种、性别和解剖位置中存在广泛的相似性和差异性，鉴定了DMRs。通过表达抑制已知的脂肪相关基因和新发现基因，发现启动子中的DMRs与脂肪发育高度相关。这一研究为探索脂肪沉积和肌肉生长的表观机制奠定了坚实基础[72]。

目前，DNA甲基化对转基因家畜的研究相对较少。Hofmann等对转基因猪F1代研究发现，三分之一的转基因整合个体GFP表达极低，表现超甲基化，且甲基化水平与表达水平负相关[104]，这与Liu等对转基因羊的研究结果相一致[105]。Duan等对fat-1转基因羊研究表明，转基因表达沉默与启动子超甲基化相关[106]。在超甲基化CMV启动子介导的转基因羊不同组织和器官中，包括心脏、肝脏、肺、肌肉、肾脏、脑、皮肤和睾丸均未检测到转基因表达，而低甲基化启动子CAG介导的转基因羊在以上各组织中均检测到转基因表达表明转移载体携带的不同启动子将会影响转基因的表达。Yin等报道转基因猪中，不同个体、不同器官的启动子甲基化水平均不同[107]，提出位置效应也可能对甲基化起作用

# 第二章 三荧光基因共表达载体pLEX-2A-TYG的构建及其在真核细胞中的表达

2A肽，属于小RNA病毒属，首次在口蹄疫病毒中被发现具有自裂解活性。其后，研究人员陆续在口疮病毒属、心病毒属、猪肠病毒属、马鼻炎病毒属和某些副肠孤病毒属病毒中也发现了2A肽结构。目前，口蹄疫病毒2A (F2A)、马鼻炎病毒A病毒2A(E2A)、猪圆环病毒-1 2A(P2A)和*Thaseaasignavirus* 2A (T2A)已在生物医药和基因转移研究中得到较广泛的应用。

2A肽，属于水解酶作用元件（CHYSEL），由18-22个氨基酸组成[108]，包含一段非保守区和一段高度保守的序列D(V/I) EXNPGP。翻译过程中，2A肽连接的蛋白通过核糖体跳跃机制独立表达，即其保守区倒数第二个氨基酸（甘氨酸）和最后一个脯氨酸残基之间不能形成肽键。当2A肽N-端蛋白翻译遇到甘氨酸时，会自动跳过甘氨酸与脯氨酸之间的肽键合成，终止第一个蛋白的合成，并同时开始下一个蛋白的翻译[6]。编码各个蛋白的基因经2A肽连接后在同一开放阅读框（ORF）中独立表达，每个蛋白都被翻译成单个具体的产物。

研究表明，2A肽不像在病毒本身中那样，能够自我充分裂解。在重组多基因共表达载体翻译过程中，2A肽的裂解效率不如在病毒本身中高，大多数情况下，不能完全裂解，形成独立表达的蛋白[23, 29]。如果在2A肽N-端加入一段短的弹性序列，如Gly-Ser-Gly或Ser-Gly-Ser-Gly等[14,19,26,50]，或延伸2A肽长度[9, 50]，或两种方法同时使用，可以减少非裂解蛋白的形成，更好地促进2A肽在重组载体中的裂解作用[14]。

自从2A肽及其特异的裂解方式被发现，已应用到一系列真核细胞中，如酵母、植物、昆虫和哺乳动物[23,25]，但在转基因动物生产中运用较少。2A肽的出现将会为未来多基因修饰动物的生产提供更有效的的生产方法。已报道的研究表明，2A肽已在转基因小鼠和猪中成功地发挥了作用[26,32,54,109]，但在绵羊上尚未见报道。传统的显微注射法生产的多基因修饰动物需要较长时间的不同单基因修饰动物的杂交培育。但由于外源基因在转基因动物染色体上的插入随机性，即使最终成功获得了多基因修饰动物，各外源基因未必会整合到同一位置，并发挥协同作用。另一方面，由于2A肽介导的多基因共表达呈结构依赖性[5, 27]。因此，为了便于验证2A肽在真核细胞中的裂解作用，本实验使用荧光蛋白报告基因tdT．omato、zsY．ellow1和acG．FP1为目标基因，以T2A为连接子，构建了多基因共表达载体pLEX-2A-TYG。在脂质体2000作用下，该多基因载体分别转染293T和CHO细胞。利用倒置荧光显微镜观察和Western blotting检测三荧光报告基

因在293T和CHO细胞中的表达，初步分析该载体中2A肽在真核细胞中的自裂解能力。

## 1 实验材料

### 1.1 本实验使用的载体

*p*tdTomao-C1、*p*zsYellow1-C1和*p*acGFP1-N1 均购自Clontech公司；pLEX-MCS购自Open Biosystems公司；*p*MD®19-T Simple Vector购自Takara公司；

### 1.2 本实验使用的细胞株

293T细胞和中国仓鼠卵巢（CHO）细胞购自ATCC公司。

### 1.3 本实验主要试剂

限制性内切酶*Bsp*EI、*Hind*III、*Nhe*I、*Spe*I、*Xho*I、*Bam*HI和*Not*I购自Fermentas，

Thermo；T4连接酶购自NEB；感受态细胞DH5α购自上海生工；高保真酶PrimeSTARTM HS DNA Polymerase购自Takara大连宝生物公司；质粒小提试剂盒TIANprep Mini plasmid Kit(离心柱型)，DNA纯化回收试剂盒（离心柱型）均购自北京天根公司；酵母提取物、胰蛋白酶等购自Sigma；电泳凝胶、Lipofectamine™2000试剂购自Invitrogen公司；胎牛血清FBS、DMEM培养基、Opti-medium液购自Gibco公司；IRDye 680 Conjugated Goat Anti-Mouse IgG荧光二抗购自LI-COR公司；Tween 20购于Bio-rad，其它试剂均为国产分析纯。本研究中所有合成的引物、序列以及序列测序等均由上海生物工程公司完成。

### 1.4 本实验主要仪器

**仪器名称生产公司**

超净工作台上海智诚公司

离心机5810R, 5415D Eppendorf公司

紫外分光光度计HITACHI公司

恒温水浴锅北京六一公司

摇床上海智诚公司

凝胶电泳检测系统Bio-rad公司

凝胶成像系统GE公司

电子天平德国Sartonrius公司

超纯水系统密理博公司

4℃及-20℃冰箱海尔公司

超低温冰箱FORMA公司

低温高速离心机Eppendorf公司

蛋白电转仪美国Bio-Rad公司

Mini-PROTEAN Tetra细胞系统Biorad

移液枪Eppendorf公司

自动高压灭菌锅美国ICE公司

PCR仪美国thermo Hybaid公司

倒置显微镜TE2000-U日本尼康公司

正置显微镜日本OLYMPUS公司

二氧化碳培养箱德国Heraeus公司

红外线扫描仪LI-COR公司

### 1.5 主要试剂的配制

试剂配制时均用电导率小于1µs/cm的去离子水，配制方法均参考《分子克隆实验指南》第三版。高压灭菌条件为121℃，30 min。

1）LB培养基

分别称取胰蛋白胨l0 g、酵母提取物5 g和氯化钠10 g溶解于800 ml蒸馏水中，使用5 M氧氧化钠调PH值至7.2-7.4，最后蒸馏水定容至1000 ml，分装后高温灭菌，4

℃保存备用。

2）固体LB培养基

在液体LB培养基中加入1.5%琼脂粉，高压灭菌后，倒入一次性塑料培养皿，制成

LB培养板。也可以根据实验需要，在倒板前加入适当的抗生素。

3）50×TAE缓冲液

分别称取Tris 碱242 g，Na2EDTA.2H2O 37.2 g，然后加入冰乙酸57.1 ml. 最后加

蒸馏水至1000 ml，轻轻摇动至完全溶解。

4）1×TAE缓冲液

取50×TAE缓冲液10 ml，加入490 ml蒸馏水，配成500 ml 1×TAE缓冲液。该溶液可直接用作电泳液，也可用于配制电泳凝胶。

5）5M NaOH溶液

迅速称取固体氢氧化钠NaOH颗粒2 g，加蒸馏水至100 ml，轻摇混匀即配制成功。6）0.05%胰酶

称取胰酶0.05 g, EDTA 0.02 g，溶于D-hanks液中，定溶至100 ml，然后在超净工作台上用0.22µm微孔的滤膜过滤除菌。分装，-20℃保存。

7）TBS缓冲液

称取9 g NaCl，加入100 ml的去离子水中，再加入100 ml Tris-HCl缓冲液（0.5 M ,

pH 7.6），最后加去离子水定容至1000 ml。

8）TBST溶液

在1000 ml TBS溶液中加入100μl Tween 20.9）0.2 %的TritonX-100

吸取2 mL Triton X-100溶于1×PBS中，最后加去离子水定容至1000 ml。

10）50%甘油

取等体积的甘油与去离子水混合，充分搅拌。高压灭菌，4℃保存备用。配制该溶液时，由于甘油较粘稠，先确定其体积，然后再加入相等体积的去离子水即可。

11）100 mg/ml的氨苄青霉素（Amp+）溶液

取氨苄青霉素钠10 g溶解到100 ml的双蒸水中，用0.22μm的滤器过滤除菌，-20℃保存备用。

12）PBS缓冲液（pH7.2～7.4）的配制

氯化钠NaCl 137 mmol/l

氯化钾KCl 2.7 mmol/l磷酸氢二钠Na2HPO4 4.3 mmol/l磷酸二氢钾KH2PO4 1.4 mmol/l

配制时，首先取800 ml双蒸水，加入上述各试剂，溶解后调PH至7.2-7.4，最后定容至1000 ml。

13）30%丙烯酰胺溶液

丙稀酰胺29 g

N，N-亚甲叉双丙稀酰胺1 g

配制时，称量上述试剂，加入双蒸水100 ml，充分溶解后0.22μm的滤器过滤除菌。储于棕色瓶，4℃避光保存。

14）10%十二烷基硫酸钠（SDS）溶液

配制时，称取10 g SDS粉末，加入100 ml去离子水，充分搅拌混匀，室温保存。

15）分离胶缓冲液1.5 mmol/l Tris-HCL (pH8.8)配制

配制溶液时，称取18.15 g Tris base粉，加入48 ml 1mol/l HCL混合，加水至100 ml。

0.45μm的滤器过滤，4℃保存。

16）浓缩胶缓冲液0.5 mmol/l Tris-HCL (pH6.8)的配制

配制时，称取6.05 gTris base溶于40 ml双蒸水中，加入浓HCL调pH值至6.8，补水至100 ml终体积。0.45μm的滤器过滤，4℃保存备用。这两种缓冲液必须使用Tris

base制备，再用浓HCL调节PH值，而不是Tris. CL直接配制。

17）SDS-PAGE样品缓冲液

pH 6.8 0.5mol/L Tris 缓冲液 8 ml

甘油 6.4 ml

10%SDS 12.8 ml

巯基乙醇 3.2 ml

0.05%溴酚蓝1.6 ml

配制时，称取上述试剂，加入双蒸水32 ml混匀备用。按终体积1×比例与蛋白质样品混合，沸水中煮10 min，冷却至室温，上样，一般为20-25μl，总蛋白量为40-60μg。

18）10×Tris-甘氨酸电泳缓冲液

Tris base 30.3 g

甘氨酸188 g

SDS 10 g

配制时，称取上述试剂加入去离子水1000 ml溶解，常温存放。无需调pH值。使用时稀释至1×缓冲液。

19）转移缓冲液

配制时，称取以下试剂：

甘氨酸2.9 g Tris base 5.8 g SDS 0.37 g

然后，量取200 ml无水甲醇，加入，最后加去离子水定容至1000 mL。

20）封闭液5%脱脂奶粉

配制时，称取2.5 g脱脂奶粉，溶解到100 ml去离子水中。该液24 h内可重复使用。

21）10%过硫酸铵(APS)

配制时，取10 ml去离子水，加入过硫酸铵1 g，溶解混匀后，分装，4℃保存或-20℃待用。

22) D-Hanks 液

先在烧杯里加入蒸馏水800 ml左右，然后分别以下试剂溶解

氯化钠NaCl 8 g

氯化钾KCl 0.4 g

磷酸氢二钠Na2HPO4.12H2O 0.134 g

磷酸二氢钾KH2PO4 0.06 g

碳酸氢钠NaHCO3 0.35 g

蔗糖Gluose 1 g

最后，用超纯水定溶至1000 ml后，加2 ml 1%酚红，溶液后配好，进行高压灭菌。

23）3%谷氨酰胺溶液

先在烧杯里加超纯水50 ml左右，然后加入3 g L-谷氨酰胺，充分混匀后，用超纯水定容到100 ml，0.22μm滤膜过滤除菌。使用时按99 ml培养液中加入谷氨酰胺溶液1 ml，当培养基使用超过两周以上时，需补加原量的谷氨酰胺溶液。

24）10%血清DMEM完全培养液

配制100 ml完全培养基，需加入89 ml无血清DMEM培养液，10 ml胎牛血清，1 ml

3%谷氨酰胺。

25）1%琼脂糖凝胶的配制

量取100 ml 1×TAE电泳缓冲液，称取1 g琼脂糖加入，用微波加热，充分融化。待温度降至室温时，倒胶，倒胶前加入50μg溴化乙锭。

26）6X凝胶样品缓冲液

在100 ml去离子水中溶解40 g蔗糖，0.25 g溴酚蓝，充分混匀后，1 ml每管分装，

-20℃冻存备用。

## 2 实验方法

### 2.1 2A-linker的构建

## 2 A-linker中T2A序列参照Georgios Trichas等的研究方法[26]，序列两端分别引入酶切位点*Bsp*EI/*Hind*III，送由上海生工合成。

### 2.2 引物的设计

根据Oligo 6.0软件设计实验所需引物，如果后续实验中需要在目标片段两端引入酶切位点时，在设计引物时，在引物中引入适当的酶切位点及相应的保护碱基，以利于

PCR产物被有效酶切。常用酶切位点的保护碱基见附表1。

### 2.3 多聚酶链式反应（PCR）

在载体构建过程中，为了减少目标片段在扩增过程中发生碱基错配或突变，本实验主要使用高保真酶对目标产物进行扩增。

本实验使用的PCR反应体系如下，参照试剂盒说明进行：

**反应成分体积**

5×PrimeSTARTM buffer(Mg2+ plus) 5µl

上游引物（10µM）0.5µl

下游引物（10µM）0.5µl

dNTPs(各 2.5 µM) 2 µl

PrimeSTARTM HS DNA Polymerase (2.5 U/µl) 0.25µl

模板 DNA <100 ng

灭菌蒸馏水 若干

总计 25 µl

注：PCR反应总体积可以根据使用需要进行放大或缩小。

将上述样品管放入热循环仪上，选择适当地运行条件。本实验中，PCR反应条件主要参照试剂盒推荐的体系进行：

98℃10 s

68℃若干（1kbp/min）

30 cycles

反应结束后，取约6µl反应产物用于0.8-1%琼脂糖凝胶电泳检测。

### 2.4 限制性酶酶切实验

根据实验需要取适当质量的质粒进行双酶切实验，酶切体系参照Thermo公司提供的说明书进行。本实验中，质粒双酶切体系如下：

**成分体积**

质粒 2 µg

酶 1 2 µl

酶 2 2 µl

10×Fastdigest buffer 5µl

灭菌蒸馏水 若干

总计 50 µl

将上述混合液置于37℃水浴，30 min或更长时间，但最好不要超过16 h，以免酶产生星活性。

酶切结束后，取约600 ng酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，以检测酶切片段大小是否与目的片段一致。如果下一步需做连接实验，最好对目标产物进行琼脂糖凝胶回收，以纯化目标产物，提高连接效率。

### 2.5 连接反应

实验时，分别将对应的双酶切载体和目标插入片段进行胶回收，并测定浓度。在T4 DNA连接酶作用下，将回收的载体和DNA片段以摩尔比1: 3的比例共孵育，16℃，孵育30 min以上或4℃过夜。本实验反应体系参照NEB公司提供的说明书进行，具体如下：

**试剂体积**

酶切回收的载体100-300 ng

酶切回收的DNA片段50-100 ng

10×T4连接缓冲液1.5μl T4 DNA连接酶（20,000 U/ml）0.3μl

蒸馏水补足至15μl

反应结束后，可将反应混合液保存 4℃备用或立即做下一步实验，如果长时间不做，最好-20℃冻存。

### 2.6 克隆转化

转化实验主要参照感受态细胞DH5α附带的说明书进行，具体步骤如下：

1）将感受态细胞DH5α从-70℃取出，放入冰盒至全部溶解，勿摇动。

2）取10μl连接液加入溶解的细胞中，轻轻混匀内容物，冰上或4℃静置30 min。

3）将上述混合物快速放到已预加热到42℃的水浴锅中，作用90 s，期间不要摇动离心管。

3）快速将离心管转移至冰上，使之冷却1-2 min。

4)加入900μl 无抗性LB液体培养基。放入37℃摇床上，200 rpm，孵育45 min- 60

min以复苏和繁殖细菌，扩增目标质粒。

5) 4000 rpm, 3 min离心，吸弃上清液，留约50-100μl。

6）将沉淀轻轻吹起，混匀，转移到带有抗生素（根据载体携带的抗性基因进行选择）的固体LB培养基上，均匀涂板。

6）将平板正放于37℃培养箱中约30 min或更长时间至液体被吸收。不能过夜，以防平皿盖上遇热蒸发的液体倒流，影响细菌生长。

7）倒置平皿，于37℃培养12-16 h。生长的细菌可以直接扩繁或4℃保存1-2 w。

### 2.7 阳性重组子的筛选鉴定

常见的阳性重组子的筛选方法包括PCR鉴定、双酶切鉴定或直接测序，具体操作如下：

1）阳性克隆的PCR鉴定

在无菌环境中，取500μl带Amp+或Kana+的LB培养液（根据载体携带的抗性标记进行选择）于1.5 ml离心管中，小心挑取一单克隆于每管内。置于37℃摇床上，200 rpm，孵育2 h。取此时的菌液1μl作为模板，进行PCR实验。PCR反应成份及反应条件参照本章2.3。如果扩增得到的片段与目标片段大小一致，则基本可确定载体构建准确。该方法较易执行，经济方便，但缺点是假阳性结果较多。

2）阳性克隆的双酶切鉴定

在无菌环境下，挑取单克隆于5 ml抗性培养基（根据载体的抗性标记选择）中。置于37℃摇床上，200 rpm，孵育12-16 h。提取质粒，具体步骤参照本章2.10。分光光度仪测定浓度后，取适当量进行双酶切实验，详细的实验方法参照本章2.4。琼脂糖凝胶检测酶切片段的大小是否与预计目标片段大小相符，如果大小一致，则基本可断定该克隆为阳性克隆。但也有部分克隆发生插入位点错配或突变，如要避免该错误的发生， 最好对质粒进行测序。

3）测序鉴定

保存质粒的LB菌液，方法为取700µl待测序菌液，加入300µl 50%甘油，-20℃冻存或送往公司测序。由上海生工ABl377全自动测序仪对重组质粒的菌液进行序列测定，运用DNAMAN软件对测序结果进行序列分析，或在NCBI中BLAST- Align [http: //blast. ncbi. nlm. nih. gov/Blast. cgi? PAGE\_TYPE=BlastSearch& PROG\_DEF=blastn& BLAST\_PROG\_DEF=megaBlast&SHOW\_DEFAULTS=on&BLAST\_SPEC=blast2seq&LINK\_](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&amp;PROG_DEF=blastn&amp;BLAST_PROG_DEF=megaBlast&amp;SHOW_DEFAULTS=on&amp;BLAST_SPEC=blast2seq&amp;LINK_LOC=align2seq)

[LOC=align2seq](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&amp;PROG_DEF=blastn&amp;BLAST_PROG_DEF=megaBlast&amp;SHOW_DEFAULTS=on&amp;BLAST_SPEC=blast2seq&amp;LINK_LOC=align2seq) 中对结果进行比对，如果被测序列与目标序列相同，则判断该重组质粒

构建正确。

### 2.8 胶回收实验

凝胶回收可以去除许多目标片段以外的杂质，有利于实验的下一步操作。本实验中， 方法主要参照天根试剂盒说明书推荐步骤进行，具体如下：

实验中所需的试剂均为试剂盒提供。

1）柱平衡步骤：将吸附柱CP2放入收集管中，加入500µl平衡液BL, 12, 000 rpm，离心1 min，倒掉收集管中的流出液，将离心柱重新放入收集管中，备用。处理的离心柱最好在24 h内使用。

2）在紫外灯下，迅速将目标条带从琼脂糖凝胶中切下（尽量只切目标条带），放入灭菌的离心管中，称重。

3）向离心管中加入等倍体积的PC溶液，50℃水浴10 min，期间不断温和地上下翻转离心管，保证胶块充分溶解。如果回收的目标片段小于150 bp，需要加入3倍体积的

PC溶液以提高回收率。

4）将混合液冷却至室温（此时吸附柱与DNA的结合力最强）。

5）将混合液加入CP2中，12, 000 rpm，离心1 min，倒掉废液，将吸附柱重新放入收集管中。

6）向CP2中加入600µl漂洗液PW(已加入乙醇)，12, 000 rpm，离心1 min，倒掉废液，将吸附柱重新放入收集管中。重复该步骤一次。

7）12,000 rpm，离心2 min，空离离心柱，除去漂洗液。

8）将CP2放入一干净离心管中，室温放置约5 min。

9）向吸附膜中间滴加适量的洗脱缓冲液EB，室温静置2 min。

10）12,000 rpm，离心1 min，收集DNA溶液。重复该步骤以提高DNA回收率。

### 2.9 细胞的培养

293T细胞和CHO细胞在培养上区别较少，主要表现为生存环境的差别及对外界环境的敏感性不同。293T细胞培养基为1×DMEM溶液，CHO细胞则需在1×DMEM溶液中加入F12.293T细胞对温度比较敏感，传代或换液时最好先将培养基加热到37℃，而CHO细胞则不需如此。

**细胞的复苏**

1）从液氮罐中取出细胞冻存管。

2）迅速放入盛有42℃水的保温瓶中，并不时轻轻摇动，直至溶解。

3）用75％酒精擦拭消毒后，移至灭菌超净工作台上，吸出细胞悬液至培养瓶中，补加4 ml含有10%胎牛血清的1×DMEM培养基，置5％CO2, 37℃细胞培养箱中。

**4）**24 h更换一次培养基后再继续培养。**细胞的传代**

1）吸弃旧培养液，加入7 ml灭菌的D-hank's溶液，轻轻晃动，洗涤细胞生长面，然后弃去D-hank's溶液。

2）加入600μl 0.01%胰酶-EDTA消化液，置37℃，1-5 min至细胞完全消化下来。

3）加入含10％胎牛血清和1%双抗的1×DMEM培养基5 ml，用吸管吹打至单个细胞悬液。

**4）**显微镜下计数，1×106 cell/瓶，补足培养基，混匀，培养箱中继续培养。**细胞的冻存**

1）取长满瓶，即汇合率为80-90%且生长旺盛的细胞，D-hank's清洗一遍后，0.01%胰酶-EDTA混合液消化。

2）加入适当的培养基中止消化，计数。

3）加入适当体积的细胞培养液将细胞密度调成2×106-2x107 cell/ml。

4）在2 ml细胞冻存管中加入0.5 ml上述细胞悬液，400μl胎牛血清和100μl二甲基亚砜（DMSO），混匀后密封。依次置4℃，30 min→-20℃，2 h→-80℃，24 h以上→液氮长期保存，或直接放入-80℃预冷的异丙醇冰盒中，24 h后移入液氮中长期保存。

### 2.10 质粒的提取

本实验使用天根质粒小提试剂盒提取质粒，具体步骤参照试剂盒说明书进行。质粒提取步骤如下，所用试剂如非特别说明，均为试剂盒提供：

1）离心柱平衡：将吸附柱CP3放入收集管中，加入500µl平衡液BL, 12, 000 rpm，离心1 min，倒掉收集管中的流出液，将CP3重新放入收集管中，备用。每次处理的柱子最好在24 h内使用。

2）取3 ml过夜培养的细菌，加入1.5 ml离心管，常温12, 000 rpm，离心1 min，弃上清。

3）加入250µl已加入RNaseA的溶液P1（4℃存放），使用移液器或涡旋振荡器，彻底悬浮菌液沉淀。

4）加入250µl溶液P2，迅速轻柔地上下翻转，至液体成粘稠透明状。

5）继续加入350µl溶液P3，立即温和地上下翻转，充分混匀，此时有白色絮状沉淀析出。12, 000 rpm，离心10 min。

6）取上清至1）中已处理好的CP3中，12, 000 rpm，离心1 min，倒掉废液。

7）向CP3中加入600µl漂洗液PW（已加入乙醇），12, 000 rpm，离心1 min，倒掉废液。重复该步骤一次。

8）空离CP3, 12,000 rpm, 2 min。

9）将CP3放入一干净离心管中，室温下晾干约5 min。

10）在离心柱膜中央加入预热到65℃的洗脱缓冲液EB 30µl，静置5 min。如果洗脱片段小于4 Kb，则洗脱液EB常温即可。

11）12,000 rpm，离心2 min，最好重复该步骤一次，以提高质粒回收率。

### 2.11 质粒转染实验

质粒转染主要采用脂质体转染法，该方法具体操作主要参照Invitrogen公司提供的

Lipofectamine 2000试剂盒说明书进行。具体如下：

1）质粒载体的制备：以Tiangen公司的质粒提取试剂盒提取实验需要的质粒，紫外光吸收法测定其浓度及纯度，确保所提质粒DNA的A260/A280在1.7-1.9之间。

2）转染前24 h，用0.01%胰蛋白酶-EDTA消化液消化对数生长期的293T细胞或

CHO细胞，以含l0%胎牛血清的DMEM培养基调整细胞密度为2-3×105 cell/ml，接种于

六孔板，每孔约1-1.5 ml。37℃，5％CO2培养箱内培养。24 h左右待细胞汇合度达到90

％以上时即可用于转染。细胞状态和细胞密度对于转染实验的成功有着重要作用，因此需要保证良好的细胞生长状态和较少的传代次数，尤其是293T细胞。

3）转染时，取两个高温灭菌的1.5 ml灭菌离心管，并向其中各加入500μl Opti-medium液备用。向一离心管中加入已制备好的目的质粒约2μg，另一离心管中加入6μl Lipofectamine 2000，分别轻轻混合均匀，在室温下温育5 min。

4）将以上两个离心管中的液体合在一起，轻轻混匀，室温下静置20 min，以形成DNA-Lipofectamine 2000转染复合物。

5）在此期间，用2 ml Opti-medium液清洗293T细胞一次，注意动作一定要轻缓，避免细胞脱落漂起。

6)将DNA与Lipofectamine 2000混合液轻轻转移至293T或CHO细胞培养皿中，再加入1 ml Opti-medium液，混匀，于37℃，5％CO2细胞培养箱中培养。

7）培养2-4 h后吸弃含有转染混合物的培养基，每皿细胞加入2 ml含10％血清的细胞培养基DMEM，置于37℃，5％CO2细胞培养箱中继续培养。

8）24 h-48 h后，倒置荧光显微镜下观察细胞中蛋白表达情况，并拍照。

9）收取细胞，-80℃冻存用于Western blotting检测。

### 2.12 荧光显微镜检测

细胞荧光检测在尼康倒置显微镜上完成，使用DIC 20×物镜观察拍照。滤光片C-FL Epi-Fl Filter Block N B-2A (ex 450-490 nm)用于检测acGFP1(ex 475 nm)，携带该荧光蛋白基因的细胞在显微镜下显示绿色；滤光片N G-2A (ex 510-560 nm)用于检测tdTomato (ex 554 nm)和zsYellow1(ex 531 nm)，这两个荧光蛋白在显微镜下均显示红色，且无法区分。

### 2.13 Western blotting检测

当细胞汇合度超过90%时，用预冷的PBS吹散细胞，收集细胞至1.5 ml离心管中，加入100µl细胞裂解液（RIPA），收集细胞总蛋白，以β-actin基因为内参照，对细胞表达的蛋白进行相对定量，步骤如下：

1）制备5%的浓缩胶和12%分离胶，分别加入处理好的样品50μg和预染蛋白Marker 5μl，以90 V电压电泳20 min后，换110 V电压电泳110 min左右至溴酚蓝迁移至胶底部。

2）电泳结束后，将上层浓缩胶去除，测量分离胶尺寸，按照尺寸剪好滤纸和硝酸纤维素膜（NC膜），并将其与电转移装置配套的海绵垫置于转移缓冲液中平衡10 min。

3）安装电转移装置，制备转膜“三明治”：黑面即阴极电极板，在上面放一张海绵

垫、两张滤纸、凝胶、NC膜、两张滤纸、海绵垫，将滤纸和胶，膜精确对齐，用玻璃棒来回擀几遍排出所有气泡，盖上阳极电极板。

4）将电转移装置安装在电转仪中，加入1000 ml转移缓冲液，冰浴条件下3 W转移110 min。

5）转膜结束后，逐一掀去各层，将滤膜立即置于封闭缓冲液中。4℃封闭过夜或常温孵育1 h。

6)加入10 ml PBS，在摇床上轻轻震荡5-10 min。

7）用PBS稀释液按适当比例稀释目标抗体至体积10 ml-15 ml。将膜放入抗体溶液中，室温孵育2 h。

8）加入10 ml PBST，在摇床上轻轻震荡5-10 min，此步骤重复4次。

9）用PBS稀释液稀释相应的二抗至体积为20 ml，室温，避光孵育60 min。

10）加入10 mL PBST，在摇床上轻轻震荡5 min，此步骤重复4次。

11）将膜从PBST中转入PBS洗液中，室温轻轻震荡10 min。扫描拍照。

## 3 结果

### 3.1 2A肽-linker片段的获取

## 2 A-linker—*TCCGGA***GGGGGGGGCCCCAAAAGGGGTTTTGGGGGGGGAAAA**GAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGG TGACGTCGAGGAGAATCCTGGCCCA*AAGCTT*--经上海生工合成并克隆于*p*UC57载体

上。序列中斜体部分为酶切位点*Bsp*EI/*Hind*Ⅲ，黑体部分为-Gly-Ser-Gly-柔性linker，其余部分为T2A序列。带有2A肽-linker的载体经转化、克隆，提取质粒。质粒经*Bsp*EI/*Hin*III双酶切得到目的片段2A肽-linker，大小为102 bp（图4）。



图4经酶切得到的2A-linker目的片段。M1，50 bp DNA Ladder；

M2, 1 Kbp marker。

Fig 4 Target fragment 2A-linker was gained by digested with restriction enzymes. M1, 50 bp DNA Ladder; M2, 1 K bp marker.

### 3.2 质粒pacGFP1-N1的改造

以质粒*p*acGFP1-N1为模板，扩增片段acGFP1(在其5′-加入Kozak consensus

sequence），引物见表1。对扩增得到的目的片段acGFP1和载体*p*acGFP1-N1分别进行双酶切（*Nhe*I/*Not*I），分别胶回收后，将目的片段相连接，得到新载体*p*acGFP1-N1-s。

### 3.3 质粒ptdtomato-2A和pzsYellow1-2A的获得

将3.1中得到的2A-linker目的片段经*Bsp*EI/*Hind*Ⅲ双酶切后，分别亚克隆入质粒*p*tdTomato-c1和*p*zsYellow1，经克隆转化，得到载体*p*tdTomato-2A和*p*zsYellow1-2A（图

5）。



图5以质粒*p*tdTomato-2A和*p*zsYellow1-2A为模板，扩增得到的目的片段tdTomato-2A（左）和zsYellow1-2A（右）。

Fig 5 The plasmids *p*tdTomato-2A and *p*zsYellow1-2A were as template, respectively, the fragments tdTomato-2A (left) and zsYellow1-2A (right) were gained by PCR.

### 3.4 质粒*p*tdTomato-acGFP1和质粒*p*zsYellow1-acGFP1的获得

载体*p*tdTomato-2A和*p*zsYellow1-2A经PCR扩增，得到目的片段tdTomato-2A（已在其两端分别引入酶切位点*Nhe*I/*Spe*I、*Xho*I）和zsYellow1-2A（两端分别引入酶切位点*Xho*I/ *Bam*HI），所用引物见表1，并分别亚克隆入载体*p*acGFP1-N1-s，经克隆转化，得到载体*p*tdTomato- acGFP1和*p*zsYellow1- acGFP1.

### 3.5 质粒*p*2A-TYG的获得

质粒*p*zsYellow1-acGFP1经*Xho*I/ *Bam*HI双酶切，回收片段zsYellow1-2A，并亚克隆入质粒*p*tdTomato-acGFP1，经克隆转化后，得到质粒*p*tdT．omato-2A-zsY．ellow1-2A-acG．FP1 (*p*2A*-*TYG)（图6）。



图6质粒*p*2A-TYG酶切鉴定结果。质粒*p*2A-TYG经*Nhe*I/*Bam*HI 双酶切，得到2.3 kb和4.7 kb两个片段，Marker为150 bp（右2）和1 kb（右1）

Fig 6 Identification of plasmid *p*2A-TYG by enzymes digestion. *p*2A-TYG was digested by *Nhe*I/*Bam*HI, two fragments 2.3 kb and 4.7 kb were gained. Markers were 150 bp DNA ladder (right 2) and 1 kb (right 1).

表1 载体克隆所需的引物及扩增的片段大小

Table 1 The primers for vector clone and the sizes of the fragment by PCR

名称name引物primers Forward: CTA*GCTAGCACTAGT*CGCCACCATGGTGAG

片段长 度

size

tdTomato-2A

zsYellow1-2A acGFP1

Reverse: CCGCTCGAGTGGGCCAGGATTCTC 1555 bp

Forward: CG*CTCGAG*TTCGCCACCATGGCCCAC Reverse: CG*GGATCC*ACTGGGCCAGGATTCTCCTC 817 bp

Forward: CG*GGATCC*agccaccATGGTGAGCAAGGGCGCCGAG Reverse: GTC*GCGGCCGC*TCACTTGTACAGCTCATCCATGCCGTG 746 bp

注：上表中斜体部分均为酶切位点，其中灰色阴影部分为酶切位点*Nhe*I，小写字母为Kozak consensus sequence.

### 3.6 质粒pLEX-2A-TYG的获得

载体*p*2A*-*TYG经酶*Spe*I*/Not*I双酶切后，回收片段tdTomato-2A-zsYellow1-2A-acGFP1，并将其亚克隆入载体*p*LEX-MCS（见附表2），克隆转化后，得到*p*LEX- tdTomato-2A-zsYellow1-2A-acGFP1，即*p*LEX-2A-TYG（图7）。

A



B



图7质粒载体pLEX-2A*-*TYG的鉴定。A质粒pLEX-2A*-*TYG简图。

B质粒pLEX-2A*-*TYG的PCR（左）和酶切（右）鉴定结果。Fig 7 Identification of the vector pLEX-2A*-*TYG. A schematics of plasmid

PLEX-2A*-*TYG. B Results of PCR (left) and digested with enzymes (right) of pLEX-2A*-*TYG.

### 3.7 质粒转染的荧光检测

293T和CHO细胞经24 h、48 h转染后，使用倒置荧光显微镜DIC 20×物镜检测并拍照。蓝色滤光片检测绿色荧光细胞，绿色滤光片检测红色荧光细胞。从图8可以看出，载体pLEX-2A-TYG携带的荧光蛋白基因在细胞内高效表达，24 h和48 h时荧光细胞数无明显差别。293T细胞和CHO细胞相比，293T内荧光细胞数相对较多。





图8质粒pLEX-2A-TYG在293T和CHO细胞中表达。第一排，第二排分别为pLEX-2A-TYG在293T细胞中转染24 h和48 h时的表达情况；第三，四排分别pLEX-2A-TYG在CHO细胞中转染24 h和48 h时的表达情况。从左到右，依次为明视野、蓝色虑光片和绿色滤光片下观察到的细胞。

Fig 8 Expression of the plasmid pLEX-2A-TYG in 293T and CHO cells. The first, second panel denotes expression of pLEX-2A-TYG in 293T cells at 24 h and 48 h; the third and fourth panel denotes expression of pLEX-2A-TYG in 293T cells at 24 h and 48 h. From left to right: cells were detected under bright field, blue field and green field, respectively.

### 3.8 Western blotting检测结果

收取转染48 h的细胞，提取蛋白。分别与各自的抗体孵育后，检测到多基因载体的

各荧光蛋白均独立表达，大小与单荧光蛋白基因载体表达的蛋白大小一致（图9）。



图9质粒*p*2A-TYG在CHO细胞中的Western blotting检测。*p*2A-TYG表达的荧光蛋白经抗体anti-tdTomato、anti-zsYellow1和anti- acGFP1分别孵育得到的结果。*p*tdTomato、*p*zsYellow1和*p*acGFP1载体的荧光蛋白表达作为对照，非转染细胞为阴性对照，β-actin为内参蛋白。从左到右：*p*2A-TYG转染的蛋白表达、

*p*tdTomato、*p*zsYellow1、*p*acGFP1和非转染细胞。

Fig 9 Western blotting analysis of the expression of *p*2A-TYG construct. The expression of three fluorescent proteins of *p*2A-TYG was probed by antibodies of tdTomato, zsYellow1 and acGFP1. Expression of *p*tdTomato, *p*zsYellow1 and *p*acGFP1 was designated as control for evaluation of the coexpression of *p*2A-TYG construct. Non-transfected CHO cell was set as negative control, andβ-actin was set as loading control. From left to right: *p*2A-TYG, *p*tdTomato, *p*zsYellow1, *p*acGFP1 and non-transfected CHO cells control.

4讨论

### 4.1 Kozak consensus sequence

真核生物基因中起始密码子上、下游的最佳序列为，-3位是嘌呤碱基；+4位是

G，起始密码子AUG中的A处于+1位[110]。A/GCCAUGG被称为kozak序列或扫描序列。在真核生物中，起始密码子两端序列为：-G/N-C/N-C/N-ANNAUGG-， 如

GCCACCAUGG、GCCAUGAUGG时，转录和翻译时效率最高，特别是-3位的A对翻译效率非常重要。kozak序列在翻译起始中起着重要作用。本实验中，载体*p*tdtomato-c1和*p*zsYellow1-c1中tdtomato和zsYellow1序列均带有kozak序列。为了使各报告基因在目标多基因载体中的调控序列结构一致，我们对载体*p*acGFP1-N1进行了改造，通过PCR和酶切实验在载体*p*acGFP1-N中acGFP1序列起始处加入了

kozak序列CGCCACCATGG。

### 4.2 2A肽介导的多基因载体在细胞中表达

在当前多基因治疗和多转基因生物生产中，2A肽是IRES序列良好的选择替代品

[25,54].2A肽在许多真核细胞中具有功能活性，包括酵母、植物、昆虫和哺乳动物[23]。

2A肽作为载体中不同基因的连接子，具有较明显的优点：序列小，为20-30个氨基酸；裂解高效性；2A肽连接的前后序列能够最大限度地等摩尔表达[5, 111]；一个启动子即可启动多基因的同时表达。

2A肽介导的双或多基因在细胞中的表达多数得到了预期的结果，但不完全裂解的情况常用有发生。Kim等应用F2A、E2A、P2A和T2A肽分别连接相同的两个报告基因

（eGFP和mCherry）构建重组腺病毒载体。重组腺病毒分别作用于293T、HT1080 和

Hela细胞及斑马鱼胚胎、小鼠肝脏，荧光观察和Western blotting结果显示P2A裂解效率最高，但在不同细胞和组织中均未达到100% [32]. Deng W等应用2A肽介导的四荧光蛋白基因zsYellow1、ECFP、tdTomato和eGFP共表达载体pTGZC转染猪胎儿成纤维细胞（PFF）和胚胎，发现载体中后两个报告基因的表达远不如前两个基因的表达。但

Torres等利用延长至1D的长片段F2A肽介导报告基因的表达，结果显示2A介导的前后基因在293T细胞中的表达摩尔比接近1: 1[112]。Tang等在2A肽两端均加入额外序列，此腺相关病毒载体在神经细胞中表达，Western blotting结果显示2A介导的前、后基因在细胞中高效表达，未裂解产物甚少[14]。Ibrahimi [64]、Trichas[26] 和Szymczak[19] 等在

2A肽N-端均加入氨基酸短序列Gly-Ser-Gly，结果显示2A肽介导的荧光报告基因在细胞、小鼠不同组织中均独立高效表达。由上原因，本实验在构建2A-linker时，2A肽N-加入了柔性连接子Gly-Ser-Gly。本实验中，荧光显微镜观察和Western blotting检测结果表明，2A肽能够显著地介导tdTomato、zsYellow1和acGFP1荧光蛋白基因在真核细胞中的独立表达，这可能与2A肽N-端加入Gly-Ser-Gly序列有关。

### 4.3 酶切位点的保护碱基

载体构建时，PCR 产物的克隆，一般需在其两端设计加入一定的限制性酶切位点，经酶切后克隆至用相同酶酶切的载体中。大量的实验结果表明，大多数限制性内切酶不能切断裸露的酶切位点。必须在酶切位点裸露的那一端加上一个至几个保护碱基，才能使所用的限制性酶对其识别位点进行有效切断。

保护碱基数量的多少，可能会影响后续的实验进展。一般情况下，普通的内切酶酶切位点只需加入两个保护碱基，酶切反应就可以正常进行；而有些酶，仅仅加入两个保护碱基，其酶切反应是不能正常进行的，这是因为内切酶不能正常结合到DN段上。如

*Nde*I 及本实验中用到的*Nhe*I 就属这类，需要加入至少三或更多个保护碱基，常用的

*Hind*III也要三个。本实验中，使用的酶切位点均加入三个保护碱基（附表1）。结果显示，酶切效率均很好，能够完全切开目标片段。

### 4.4 多基因载体中三荧光蛋白基因的表达检测结果分析

如图7所示，由于Nikon荧光倒置显微镜中tdTomato和zsYellow1激发波长在同一波段，所以无法区分开，我们只能看到绿色和红色荧光细胞。AcGFP1荧光蛋白基因位于多基因载体的末端，荧光显微镜下可以看到较强的绿色荧光细胞，与明视野下的细胞相比，转染效率较高。由以上结果，我们也可以推测位于载体前端的tdTomato 和

zsYellow1荧光蛋白基因在293T和CHO细胞中是高效表达的。Wertern blotting检测结果进一步表明，2A肽介导的多荧光蛋白基因在细胞中是独立表达的，且大小与单荧光蛋白基因载体表达的蛋白大小一致（图8）。以上结果表明，2A肽在本实验中能够高效地介导多基因的独立表达，适用于下一步的实验。

# 第三章 慢病毒的包装及滴毒检测

慢病毒属于逆转录病毒科 *Retroviridae*逆转录病毒属 *retroviruses*，主要特点表现为可以利用自身反转录酶和整合酶将自身的病毒基因组信息稳定整合入宿主基因组[113]。 与其他逆转录病毒不同的是，慢病毒可以在非分裂细胞中复制[114, 115]，缓慢地诱导其特异性宿主患上程序性疾病，包括免疫缺陷、贫血、肺炎及脑炎，其宿主包括人类、猴、 猫、马、牛、ft羊和绵羊[116]。不同物种的慢病毒，其基因组结构、受体应用和致病性等有明显不同的特性[113]。因此，人免疫缺陷性病毒（HIV）-1作为人类致病因子，在进行载体设计时，我们必须要确保病毒的复制缺陷特性。

不同的的慢病毒载体都包含了这种安全特性，例如，降低生产复制全能野生型病毒的风险[117]。慢病毒载体的每一次改进都以安全性为基础。第一代复制缺陷HIV-1慢病毒载体由三个独立的元件组成：包装结构；编码病毒糖蛋白的Env质粒；转移载体。包装结构表达HIV Gag、Pol及调节/附件蛋白，由一个强大的哺乳动物启动子控制。Env质粒表达病毒糖蛋白，如VSV-G，为病毒颗粒提供了一个受体结合蛋白。转移载体表达目标转移基因及包装/逆转录/整合所必须的*cis-acting*元件，如LTRs、RRE 等，但不包含HIV蛋白。这三个质粒在不表达病毒蛋白的情况下，把目标基因整合到目标细胞。第二代病毒载体不包含病毒附件蛋白Vif、Vpu、Vpr及Nef，进一步提高了载体安全性。第三代慢病毒载体属于Tat独立载体，由四个质粒组成：只有gag和pol基因的包装载体；表达Rev的质粒；表达VSVG质粒及一个由异源启动子驱动的转基因质粒。该载体系统仅含有HIV病毒九个基因中的三个，安全性更高。自灭活（SIN）载体介于第二代和第三代慢病毒载体之间，可以说第三代也属于SIN载体。这一类载体3-LTR的U3区被删除，包括TATA盒、Sp1、NF-κB及NFAT结合位点。这类载体进一步降低了复制全能性类HIV病毒的产生、细胞癌变基因的激活、野生型慢病毒引起的载体迁移及

LTRs引起的干扰和抑制。目前，第二代及第三代包装系统、VSV-G包膜结构、自灭活元件、cPPT和WPRE元件已广泛存在于慢病毒载体中[116]。

慢病毒载体可以转导或感染不同的细胞类型，如神经元细胞、肝原细胞、血液干细胞、视网膜细胞、树突状细胞[118]、肌原细胞和胰岛细胞。慢病毒载体将介导的目的基因整合到宿主细胞基因组中，并随细胞基因组的分裂而分裂，基因表达持续稳定。以上特性使慢病毒载体与其它病毒载体相比，如不整合的腺病毒载体、整合效率低的腺相关病毒载体、只整合分裂细胞的传统逆转录病毒载体，拥有鲜明的特色。大量研究表明， 慢病毒载体介导的目的基因可以在脑、肝脏、肌肉、视网膜、造血干细胞、骨髓间充质干细胞、巨噬细胞等组织或细胞中长期表达。

上一章研究表明，多基因载体中的2A肽能够在真核细胞中有效裂解，其介导的多

荧光报告基因在细胞中独立高效表达。另外，2A肽已成功在腺相关病毒、逆转录病毒及慢病毒载体中调节不同基因的共表达[37,48,50,119]。因此，本实验利用脂质体法生产了慢病毒，通过低温超速离心获得高滴度慢病毒。使用获得的慢病毒感染293T和CHO细胞，并在Confocal显微镜下观察2A肽介导的荧光报告基因在细胞中的表达。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 实验细胞株

293T细胞和CHO细胞购自ATCC公司；DH5а感受态细胞购自北京天根公司。

### 1.2 实验所用载体

质粒*p*MD2. G、*p*SPAX2购自Open Biosystem公司；pLEX-2A-TYG为第二章3.6中所构建。

### 1.3 实验主要试剂

聚凝胺、puromycin等均购自Sigma；1×DMEM培养基、DMEM+F12培养基、Lipofectamine™2000等均购自Invitrogen；胎牛血清购自Hyclone；0.01%胰酶+EDTA消化液购自Gibco，Canada；Taq DNA聚合酶、dNTPs、胶回收试剂盒购自北京天根公司；RIPA液购自Thermo公司；质粒大提试剂盒购自德国QIAGEN公司，其它试剂等均为国产分析纯。

### 1.4 主要试剂的配制

## 1. 聚凝胺溶液

用10 ml无菌双蒸水溶解100 mg聚凝胺，浓度为10 mg/ml。0.22μm滤膜过滤除菌，分装成500μl/管。-20℃保存，可保存1 y以上。避免反复冻融，3次以上需要丢弃，否则活性受影响。该溶液在4℃可保存2 w。

## 2. Puromycin溶液

用无菌去离子水10 ml溶解Puromycin粉末10 mg，配制成浓度为10 mg/ml的溶液。

0.22μm滤膜过滤除菌，根据实验需要进行分装，该溶液在4℃可保存1 w。保存在-20℃，可存放1 y，避免反复冻融。

3. 醋酸钠溶液（3 M）

配制时，称量无水醋酸钠12.3 g，加蒸馏水40 ml溶解，然后冰醋酸调PH值至5.2，

最后定容至50 ml。高压灭菌后室温保存，备用。

4. DNA洗脱液(Elution buffer)

配制溶液时，称取以下试剂：

10 mM Tris base 1 mM EDTA

双蒸水定容。高压后室温备用。

### 1.5 主要实验仪器

仪器名称生产国家

Image Master VDS型凝胶成像仪美国Amersham Pharmacia Biotech公司共聚焦confocal-TSP5德国莱卡

倒置显微镜TE2000-U日本尼康公司

酶标仪Bio-rad

二氧化碳培养箱德国Heraeus公司

正置显微镜日本OLYMPUS公司

超净工作台上海智诚公司

低温高速离心机Effendorf公司

低温超高速离心机Backman optimal-100XP

2实验方法

### 2.1 细胞的培养

293T和CHO细胞的复苏、传代和保存参照实验方法第二章2.9。

### 2.2 重组质粒的大量提取

采用QIAfilter Plasmid Midi Kit质粒提取试剂盒(Qiagen公司)进行实验，实验中试剂如无特别说明，均为试剂盒提供。具体操作步骤如下：

1）将重组质粒接种于含有Amp+(100μg/ml)的LB琼脂平板上，37℃恒温箱培养过夜。

2)挑取单克隆菌落于1 ml含Amp+ (100μg/ml) LB培养液中，220 rpm，37℃培养 8

h. 按l:1000转种至200 ml LB培养液中扩大培养，250 rpm，37℃培养16 h。

3) 4℃，6000 rpm, 15 min离心收集细菌，加入10 ml P1液，震荡重悬菌液。

4）加入10 ml P2液，充分颠倒混匀，室温静置3 min，使菌体完全裂解。

5)加入10 ml预冷P3液，充分颠倒混匀，冰浴20 min, 12,000 rpm离心30 min

同时用10 ml QBT缓冲液平衡Qiagen-tipl00纯化柱。

6）将上清液缓慢地推入已平衡好的Qiagen-tipl00纯化柱中，待液体流尽后用30 ml

QC缓冲液洗柱两次，15 ml QF缓冲液洗脱DNA。

7）洗脱液中加入10.5 ml异丙醇混匀，4℃，15, 000 rpm，离心30 min，弃上清液，室温干燥10 min后，将DNA溶于100μl灭菌双蒸水中。

8）取适当所获DNA，使用紫外分光光度计测定OD260/OD280比值，确定浓度及纯度。浓度应在1μg/μl以上，OD比值应在1.70-1.90之间。

### 2.3 病毒的包装

本实验采用脂质体转染法制备重组慢病毒[105, 120]。实验中所用的慢病毒载体系统由pLEX-2A-TYG载体，*p*SPAX2 (gag/pol元件)载体和*p*MD2.0G (VSVG元件)载体组成。后两者含有病毒包装所必须的元件。

1）质粒载体的制备：以Qiagen公司的质粒抽提试剂盒提取慢病毒包装系统中三种质粒DNA，紫外光吸收法测定其浓度及纯度，保证所提质粒DNA的A260/A280在1.70-1.90之间。具体操作步骤见本章2.2。

2）转染前24 h，用0.01%胰蛋白酶-EDTA消化液消化对数生长期的293T细胞，以含l0%胎牛血清的DMEM培养基调整细胞密度为5-10×105cell/ml，接种于直径为100 mm细胞培养皿中。37℃，5％CO2培养箱内培养。24 h左右待细胞汇合度达到90％以上时即可用于转染。细胞状态和细胞密度对于病毒包装的成功至关重要，因此需要保证良好的细胞生长状态和较少的传代次数。

3）转染时，取两个高温灭菌的15 ml灭菌离心管，并向其中各加入1.5 ml Opti-medium液备用。向一离心管中加入已制备好的各质粒（转移载体12μg, *p*SPAX2 9μg, *p*MD2.0G 3.5μg），另一离心管中加入50μl Lipofectamine 2000，分别轻轻混合均匀，在室温下温育5 min。

4）将以上两个离心管中的液体放在一起，轻轻混匀，室温下静置20 min，以便形成DNA-Lipofectamine 2000转染复合物。

5）在此期间，用Opti-medium液清洗293T细胞一次，注意动作一定要轻缓，避免细胞脱落漂起。

6)将DNA-Lipofectamine 2000混合液轻轻转移至293T细胞培养皿中，再加入7 ml Opti-medium液，混匀，于37℃，5％CO2细胞培养箱中培养。

7）培养2-4 h后倒去含有转染混合物的培养基，每皿细胞加入8 ml含10％血清的细胞培养基，置于37℃，5％CO2细胞培养箱中继续培养。

8）24 h后，将细胞培养皿转入32℃，5％CO2细胞培养箱中继续培养。

9）继续培养24 h后，收集培养液，0.45μm滤膜过滤。

10）将滤液4℃，15, 000 rpm, 2 h离心，浓缩病毒。

11）将病毒浓缩液吸出，分装后保存在冻存管中，-80℃冰箱长期保存。取一支进行病毒滴度测定。

### 2.4 慢病毒滴度的测定

慢病毒滴度按照试剂盒lenti-XTM P24 rapid titer kit (clontech)说明进行测定，原理如下：该试剂盒使用标准ELISA方法，快速测定任何以HIV-1为基础的慢病毒上清液中的滴度。试剂盒中提供的微孔板包被有anti-HIV-1 p24抗体，可以与待测样品中的HIV-1

p24定量结合。p24是一种含量丰富的HIV-1病毒核心/壳蛋白。特异结合的p24以一种典型的“sandwich" ELISA形式被检测到，即biotinylated anti-p24二抗，streptavidin-HRP

conjugate和发光底物（图10）。分光光度计测定的颜色强度指示样品中的p24水平，通过与p24标准曲线比较被精确定量。p24值与包装细胞上清液中的病毒滴度相对应。具体如下：

**样品的准备和储存**

该试剂盒适用于检测组织培养上清液。样品可以是新鲜的，也可以是–80°C 冻存的，检测时，样品要充分溶解混匀。

**制备p24标准曲线所需的稀释液**

为了更好地检测和定量病毒滴度，首先需要制备p24标准曲线(0-200 pg/ml)。

准备p24阳性对照储备液，在980μl DMEM完全培养基中加入20μl p24 Control (10 ng/ ml), 1:50稀释得到200 pg/ml储备液。

以200 pg/ml为起点，完全培养基为稀释液，进行梯度稀释，得到100、50、25和12.5

pg/ml 标准稀释液。**微孔板的清洗步骤**

1. 用带滤膜的枪头吸尽孔中的反应液体。

2. 每孔中依次加满Wash buffer

3. 用带滤膜的枪头吸尽孔中的Wash buffer

4. 重复步骤2和3五次

**5.** 倒置微孔板，在滤纸上轻轻震荡**病毒滴度测定操作如下：**

1）首先让所有的试剂在室温下(18-25°C)平衡；

2）准备一新的微孔板；

3）每孔中加入20μl裂解缓冲液Lysis buffer；

4）再依次加入200μl标准曲线稀释液、适当体积的上清液和培养基；

5）37(±1)°C温箱中孵育60 (±5) min；

6）吸尽样品孔中所有的液体，清洗96 孔板（见微孔板的清洗步骤）；

7）每样品孔中加入100μl生物素偶联的anti-p24检测抗体anti-p24 (Biotin conjugate detector antibody)；

8）37(±1)°C温箱中孵育60 (±5) min；

9）吸尽样品空中所有的检测抗体液，清洗96 孔板（见微孔板的清洗步骤）；10）每孔中加入100μl辣根过氧化酶结合物Streptavidin-HRP conjugate；11）室温孵育(18-25°C) 30 (±5) min；

12）吸尽样品空中所有得酶偶合物，清洗微孔板（见微孔板的清洗步骤）；

13）此时避免微孔板被直接光照，室温孵育(18-25°C) 20 (±2) min；

14）每孔中加入100μl终止液Stop Solution中止反应，空白培养基对照中也要加入终止液；

15）此时蓝色液体应当变成黄色。确保每孔底部液体被吸干，且没有气泡；

16）加入终止液后，迅速在450 nm下读取数值，阴性对照空作为空白。



图10 Lenti-X p24滴度检测试剂盒检测路线**。**包装细胞上清液中的慢病毒p24核心蛋白与微孔板中包被的HIV-1 p24抗体结合。结合的p24通过biotinylated

anti-p24二抗，streptavidin-HRP conjugate和发光底物被检测到。被测样品的滴度通过与p24标准曲线比较被定量。该图源自试剂盒说明书。

Figure 10 The Lenti-X p24 Rapid Titer Kit. Lentiviral (HIV-1) p24 core protein in packaging cell supernatants is bound to wells of a microtiter plate coated with HIV-1 p24 capture antibody. The presence of bound p24 in the wells is detected using a biotinylated secondary anti-p24 antibody, a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate, and a color-producing substrate. Quantitation is performed by comparing test samples to a p24 standard curve. The figure was extracted from the manual of the Kit.

病毒滴度的计算

p24值可用于评定包装细胞培养上清中相应病毒滴度。每个病毒颗粒（lentiviral

particle，LP）大约含有2000个p24分子。

1 LP含有8 x 10-5 pg的p24 ( (2000) x (24 x 103 Da) /(6 x 1023)。

1 ng p24中约有1.25 x 107 LPs。

对一个典型的慢病毒载体来说，每100–1000 LPs可形成1 IFU。

### 2.5 慢病毒的感染

1）感染前24 h, 100 mm培养皿细胞密度为5-10×105cell/ml，置于37℃，5％CO2

细胞培养箱中培养。

2）取一定量的病毒溶液，与含l0%胎牛血清的DMEM等体积混合，约5 ml。

3）D-hank's液清洗细胞一次，加入上述混合病毒培养基，同时加入Polybrene，终浓度为1μg/ml。置于37℃，5％CO2细胞培养箱中继续培养。

4）24 h后，移去含病毒液的培养基，加入正常的含l0%胎牛血清的DMEM，37℃，

5％CO2细胞培养箱中培养24 h。

5）荧光显微镜下观察细胞或用于下一步试验。

### 2.6 单克隆细胞的筛选

本实验中单克隆细胞筛选即为Puromycin（puror）筛选，因为实验中所用的载体pLEX-2A-TYG携带该抗生素基因。

1）慢病毒颗粒感染的细胞，作用48 h后，弃上清，D-hank's清洗两遍，消化液消化。吸弃的上清液中要加入巴氏消毒液，比例为1: 50，以防残留的慢病毒颗粒污染环境。

2）细胞以1×105 cell/皿重新铺板于100 mm培养皿中，加入8 ml培养基继续培养。

3）24 h后，吸弃培养基，D-hank's清洗一次，加入8 ml新鲜培养基和8μl浓度为

1g/ml的puromycin (终浓度为1μg/ml)选择性抗生素，培养箱中继续培养。

4）每隔24 h，观察一次细胞生长状态；每隔48-72 h，换一次含有puromycin的培养基，至非转染细胞全部去除。

5）细胞经D-hank's清洗一次，消化后，重新铺板，加入正常的培养基培养。待汇合度达到80-90%s时，荧光检测。

### 2.7 激光共聚焦检测

激光共聚焦检测在莱卡TSP5上完成，tdTomato、zsYellow1和acGFP1荧光蛋白激发波长分别为543 nm、514 nm和475 nm，发射波长分别为581 nm、540 nm和505 nm，

10×物镜，DIC状态下拍摄。

## 3 结果

### 3.1 质粒的质量和浓度检测

试剂盒提取的质粒经紫外检测仪检测，260/280值均在1.85左右，符合实验要求的

1.70-1.90；质粒浓度均在2, 000-3,500 mg/ml，满足病毒包装实验的需求。

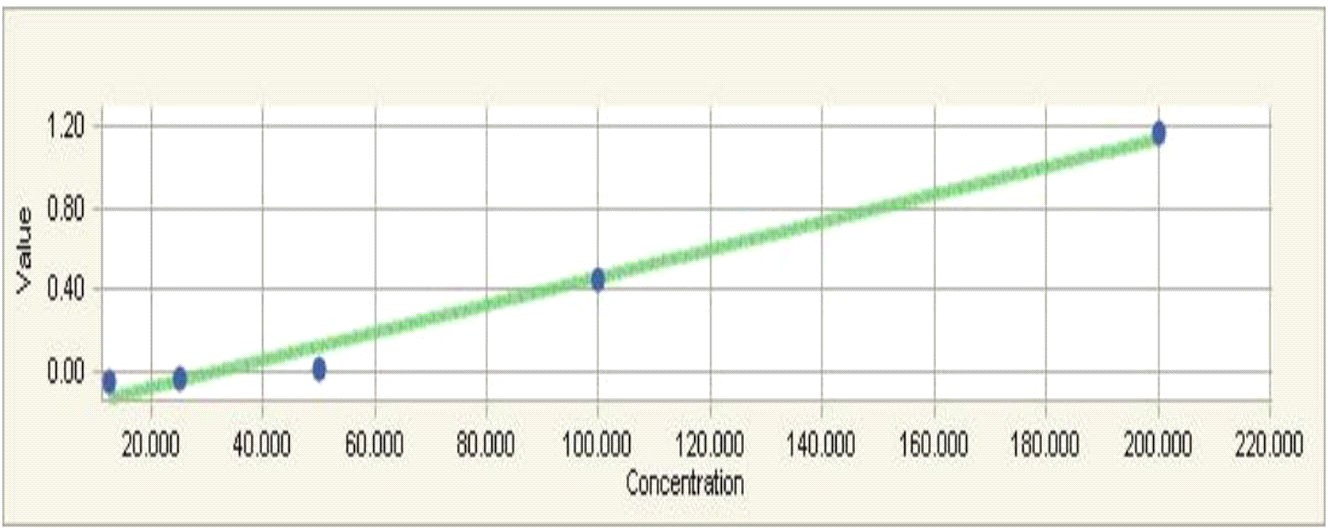
### 3.2 包装病毒的滴度检测

ELISA标准曲线如图11所示，被检样品结果为(4±1.22)×105 ng p24. 由于1 ng p24

中约有1.25 x 107 LPs，所以病毒上清中约含有病毒颗粒（4.2±0.9）×1012 LPs。而一个

典型的慢病毒载体，每100–1000 LPs形成1 IFU，所以，本实验培养上清中病毒滴度为

4×109-10 IFU/ml。



y= 0.0068 x-0.2108, R2=0.9834

图11培养上清中病毒滴度检测时的ELISA标准曲线。

Fig 11 Standard curve of ELISA in test of virals titre among the culture

supernatant.

### 3.3 单克隆细胞的筛选及检测

感染细胞经过与终浓度为1μg/ml嘌呤霉素puromycin共孵育。非阳性克隆细胞被选择性死亡，更换新的含有Puromycin培养基，直至培养基中不在有漂起的细胞，此时更换正常培养基，继续培养。荧光共聚焦Confocal检测结果表明，tdTomato、zsYellow1和acGFP1荧光蛋白在293T和CHO细胞中均高效表达（图12）。这与Deng等利用电

穿孔技术将线性多基因片段pZCpTG感染猪胎儿成纤维细胞的结果相似[54]。



图12单克隆细胞的荧光共聚焦检测**。**上：293T细胞；下：CHO细胞。从左到右依次为：tdTomato、zsYellow1、acGFP1及三者的重叠图像。10×物镜，图片中红色

标尺长度为20μm。

Fig 12 Confocal examination of the cloned cells. Upper panel: 293T cells; lower panel: CHO cells. From left to right: tdTomato, zsYellow1, acGFP1 and merge images.

The objective was 10×, red bars in the photographs represent 20μm.

## 4 讨论

### 4.1 慢病毒载体特点

慢病毒载体(Lv)，属于逆转录病毒属，不但具有一般逆转录病毒载体的优点，而且宿主范围更广泛，即不仅可以转染分裂细胞，还能转染神经元、肌细胞等多种类型非分裂细胞。慢病毒载体目前已是体内外转基因常用载体[117]。LV载体可插入的载体片段较大，达到8-10 kb[121]。

HIV基因组长度约9 kb，是由一条阳性正义链RNA构成。三个最大的ORF编码三个主要的蛋白：Gag、Pol和Env. gag基因编码病毒核心蛋白，是HIV基因组包装、病毒子聚集和出芽必须的元件。事实上，Gag中天然的可替换元件可以改变载体性能、载体滴度和感染传统载体不易感染的细胞的能力[122,123]。Pol基因编码病毒复制需要的一系列酶，是病毒子成熟、反转录和病毒整合必须的因子。Env基因编码病毒表面糖蛋白

gp160。除了这些主要蛋白外，病毒基因组也编码调节蛋白Tat和Rev，他们分别激活病毒转录，控制病毒转录体裂解和核输出。病毒基因组两侧是长末端重复（LTRs），是病毒转录反转录和整合所需要的。基因组二聚物和包装信号位于5-LTR和gag基因之间

[116]. 当前使用的大多数慢病毒载体/包装载体属于第二代或第三代慢病毒载体[116]。本实

验中使用的pLEX-MCS为SIN慢病毒载体，整个包装系统由三个质粒组成，安全性相对较好。

### 4.2 慢病毒的包装

慢病毒的生产方法包括流动电穿孔法、磷酸钙沉淀法、脂质体转染法及聚乙酰亚胺法等[124]。流动电穿孔法适用于大批量慢病毒的生产；磷酸钙沉淀法对转染试剂的PH值比较敏感，且只能用于贴壁细胞；脂质体转染法是最常用的慢病毒生产方法，受外界干扰较少，且操作简便。常见的不经过浓缩的病毒滴度为107TU（转导单位，transducing

units）/ml，通过超滤或超速离心浓缩，浓度可以达到109–1010 TU/ml。虽然瞬时转染也可以得到高滴度的慢病毒，但这种方法比较笨重，而且很难对病毒进行规模化生产和管理。 所以为了克服以上缺点，稳定的包装细胞系是必须的。293T是常用的慢病毒包装细胞系。所以，本实验使用脂质体转染293T细胞生产慢病毒，生产的量足以满足生产转基因动物的需要。

### 4.3 病毒的浓缩

许多病毒浓缩方法已成功应用于提高病毒滴度，如超速离心(1-3)×105 g, 1-4 h，4℃、使用高速离心机长时间高速离心（∼104 g, 8-12 h, 4℃）、磷酸钙沉淀或离心过滤[116]。上述浓缩效率受生产病毒时培养基中血清浓度的影响，尤其是高速离心[125]。包膜质粒水疱性口炎病毒糖蛋白(VSV-G)取代了以前的HIV包膜蛋白。VSV-G受体为广泛存在于各种细胞表面的磷脂酰丝氨酸，使慢病毒载体的宿主范围大大增加。同时VSV-G的分子结构不容易被超速离心过程中的剪切力所破坏，使得生产的病毒颗粒更完整[126]，可通过超速离心浓缩病毒。本实验中，包膜质粒即含有VSV-G结构，培养基中血清为10%。因此，使用低温超高速长时间离心时不仅能够保证病毒的完整，而且使病毒能够很好地浓缩。

### 4.4 病毒滴度的测定

病毒感染靶细胞前，需要知道其滴度以调节病毒使用剂量。病毒滴度也是评价感染效率的关键因素。病毒滴度的检测方法很多，包括：在病毒感染时，定量病毒颗粒成分， 如物理颗粒数量、RI活性和基因组拷贝数等；测量感染细胞中病毒载体的DNA拷贝数

或者通过流式细胞术或免疫染色方法测定被感染细胞的转基因表达。

许多方法已用于病毒滴度测定，如对培养基上清中的病毒成分定量已广泛应用于HIV-1研究（见表2）。这些方法的一个主要问题是感染病毒和非感染病毒的等量检测。事实上，通过病毒基因组RNA拷贝数和p24浓度测定的病毒滴度已不足以预测病毒的感染效率[127]。而通过实时PCR检测被感染细胞的病毒DNA拷贝数则可以评定感染的病毒拷贝数。如使用针对HIV-1包装信号ψ（在HIV-1载体中，相对保守性较好）特异的引物和探针序列，运用实时PCR法测定病毒拷贝数[127]。然而，有报道指出VSV-G伪足型慢病毒载体可以从293T细胞上屏蔽质粒DNA的高水平[128]，仅有一小部分反转录质粒DNA可以成功整合于宿主基因组。通过转基因表达测定被转导细胞以评价感染病毒的滴度是目前最可行的方法。这种方法适用于带有标记基因的载体，如绿色荧光蛋白

（GFP）、Puromycin抗性基因或Neo基因等。当使用该方法测定转基因表达时，病毒滴度会根据不同细胞发生变化。另外，该方法不使用于某些带有特异组织启动子的转基因表达[116]。本实验采用标准ELISA法测定培养上清中病毒的滴度，与GFP荧光法相比，病毒滴度会被高估100-1000倍。但对于本实验中测到的高浓缩病毒3×109 IU/ml来说，这些差异是不会影响实验结果。

表2 常用慢病毒滴度检测方法

Table 2 Methods of analyzing the lentiviral titres used in common

与GFP荧光

方法原理单位优缺点

ng p24/ml 、

物理（颗粒）滴度，经典方

法相比

高估102~103

p24核心蛋白定量法ELISA

RNA基因组定量法RT-qPCR

FACS（流式细

GFP荧光计数法

胞计数）

LP/ml、

TU/ml（估计

RNA/ml、

Vg/ml、

TU/ml（估计TU/ml

法，操作简单，重复性好

物理（核酸）滴度，精度高，但对仪器和操作要求高

感染滴度，经典方法，简单、重复性好

倍

高估102~104

倍

抗性克隆计数法细胞克隆计数TU/m感染滴度，克隆形成需约2w低估5~10 倍

物理（核酸）滴度，简单，

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 但属于半定量 |  |
| 感染滴度，最接近真实感染 | 约为RNA 基 |
| DNA 定量法 TU/ml | 滴度，但不同细胞感染效率  不同 | 因组定量法  的 1/1000 |

Dot-blot法RNA dot-blot RNA/ml

感染细胞后定量载体DNA

### 4.5 提高病毒载体体外感染的能力

在基因治疗和基因转移研究中，慢病毒的典型生产方式是质粒共转染包装细胞，简单地说，即含有载体基因组和编码慢病毒功能所必需的包装结构的质粒共同作用293T细胞或其他的包装细胞[129]。慢病毒载体的应用为以基因和细胞为基础的生物治疗及农业研究进行的基因转移带来了希望[130]。慢病毒载体的转染效率受许多调节元件的影响， 如启动子、增强子和多腺苷酸化信号等。可以根据不同的目标细胞类型和目标基因，设计不同的启动子[131]。许多方法已用于提高载体感染能力。如在细胞感染时，通常加入聚凝胺可以提高感染效率2~10倍。聚凝胺是带正电的小分子，其已被广泛用于提高慢病毒感染效率，因为聚凝胺可以与细胞表面的阴离子结合，降低病毒颗粒与目标细胞表面的电荷排斥力。聚凝胺有一定的细胞毒性，不同细胞对其敏感度不同，可以用1~10

μg/ml的范围筛选合适的浓度，以24 h内细胞无明显毒性反应为佳。本实验中，使用的

CMV启动子已见于许多慢病毒报道研究[50, 105]。纤维连接蛋白也可用于提高慢病毒，尤其是γ-逆转录病毒对血液干细胞的感染。除了聚凝胺和纤维连接蛋白，spinoculation，载体被重力降到单层细胞上，这种方法也广泛应用于提高载体在不同细胞中的转染力[116]。 本实验中，使用polybrene提高慢病毒对细胞的感染力。荧光显微镜观察结果表明，细胞培养基中加入polybrene，能够极显著提高慢病毒感染力，荧光细胞数极显著高于不加

polybrene的细胞。

### 4.6 实验室安全措施

慢病毒载体已经在全世界许多实验室应用，没有出现过任何意外，但仍具有潜在的产生复制型慢病毒（RCL）和致癌的风险，操作者在实验中仍需要保持高度警惕！所有操作均应尽量在BSL2级生物安全柜中进行，并佩戴一次性口罩和手套，尤其要避免病毒接触口、眼、鼻、耳、伤口等身体开放性区域，避免产生气溶胶，tip头一定要选择带有滤芯的。必须高度注意被污染的尖锐物品，包括注射器、移液管等。每次实验后， 立即清理所有接触过病毒的器具，均应高压消毒再进行下一步处理。显微镜台、生物安全柜台面等使用后，用70%乙醇擦拭。意外洒落的含病毒的液体，用卫生纸吸干后，用

0.6%次氯酸钠溶液浸泡被污染处1 h。装盛慢病毒载体的实验用品，要单独放置，标示清楚，并标注“危险品”字样。尽量使用培养瓶，不要使用培养板来感染病毒，以防意外洒落。对共用实验室的人员进行慢病毒安全培训或提示。

# 第四章 转基因羊的Th产和检测

绵羊性格温和，大小适中，易于管理，且可以满足连续采样和多次实验的需求。20世纪以来，绵羊研究主要集中在以下四个方面。第一，农业方面，突出的性能研究，包括营养、繁殖、生产、遗传、疾病和羊毛性能；第二，由于绵羊的某些生理特性与人类相似，如器官大小等，被用作整形外科和外科手术模型以及生理研究模型[132]；第三，在常见的生物学研究中，绵羊是非常好的代谢研究模型，如营养学、血液学、免疫学和内分泌学；第四，20世纪60年代，胎羊在慢性浸入性外科手术中发挥较大的作用。绵羊胎儿被用于研究人类的胎儿生理学模型。绵羊是外科手术的模型，其胎儿比大多数成年实验室动物要大，因此在子宫手术过程中需要更高的管理[133]。

利用转基因技术将外源基因导入动物受精卵内，形成一个新的融合基因，使其在动物体内整合、表达，产生具有新遗传特性动物的技术。目前转基因羊育种主要体现在改善羊毛性状、羊奶质量[134]、抗病能力[135]及作为动物乳腺生物反应器生产药用蛋白[136]等。绵羊的大多数重要经济性状属于数量性状。从遗传基础来看，数量性状通常由染色体上的大量基因控制。因此，我们在为改善绵羊某个经济性状而进行转基因动物生产时， 同时转入多个基因，效果会优于单基因修饰动物。传统的微注射方法生产多基因修饰动物需要较长时间的单基因修饰动物的杂交培育。即使最终得到了多基因修饰动物，也不能保证各基因协调作用。因为外源基因在基因修饰动物染色体中是随机插入的，然后又随机分配遗传给后代。这种方法生产的多基因修饰动物中，不同外源基因整合在同一位置的可能性很少，而且基因修饰动物的生产效率也相对较低。因此，2A肽的出现为多基因修饰动物的生产提供了更有效的方法。另外，虽然转基因技术已取得较大进展，但诸如基因打靶技术、人工染色体技术、RNAi技术、病毒载体技术等在国内还没得到熟练和普遍掌握。

2009年，Ritchie等人利用慢病毒感染卵母细胞成功获得了2只eGFP转基因绵羊[137]，

2010年，本实验室利用慢病毒受精卵卵周隙注射法成功获得8只eGFP转基因绵羊。转基因羊阳性率在新生羔羊和胚胎中分别为61.5%和17.4%，显著高于目前报道的其他转基因方法[105]。后者慢病毒卵周隙直接注射法体外操作简便，具有更大的优势。2010年，不同疾病的临床治疗中，慢病毒介导的基因转移临床实验已占1.8%[131]，到2012年，已达到3.2% ([http: //www. wiley. com/legacy/wileychi/genmed/clinical/](http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/))，但在所有病毒载体和质粒载体占比例最低。目前报道的转基因绵羊均为单基因修饰动物，为了更好地改善绵羊某些经济性状，实际生产中需要同时转移多个基因至绵羊体内。因此，本实验利用前面构建的2A肽介导的多基因共表达载体，重组成慢病毒，注射绵羊受精卵卵周隙，然后将

胚胎移植入受体羊，生产慢病毒多基因修饰羊。运用PCR、Western blotting、Southern

blotting、Real time (RT) -PCR、重亚硫酸盐测序技术（Bisulfite Sequencing PCR, BSP）等方法对多基因修饰羔羊的转基因效率、蛋白表达、DNA甲基化水平等进行了分析，初步报道了多基因修饰动物的基本情况。

## 1 实验材料

### 1.1 实验动物

实验所用新疆细毛羊及受精卵均来自新疆畜牧科学院中澳绵羊育种中心实验羊场。

### 1.2 实验试剂

EpiTect@Bisulfite Kit、SYBR Green I荧光PCR mix kit购自德国QIAGEN公司；Rnase A购自BBI公司；蛋白酶K购于生工公司；RNA酶抑制剂、随机六聚体引物、100 bp DNA Marker、1 kbp DNA Marker、M-MLV逆转录酶、限制性内切酶购自Takara公司；Trizol试剂购自Invitrogen公司；感受态细胞大肠杆菌DH5α、胶回收试剂盒购自北京天根公司；dNTPs、Tris-HCl饱和酚溶液购于北京鼎国公司；pMD®19-T Simple Vector购自Takara公司；Prestained Protein Ladder购自Thermo公司，其它试剂均为国产分析纯。

### 1.3 主要试剂的配制

## 1. Rnase A溶液（20 mg/mL）

10 ml去离子水中加入200 mg Rnase A粉末，室温过夜溶解，混匀后分装成1ml/管，

-20℃保存待用。

## 2. 蛋白酶K（20 mg/mL）

10 ml去离子水中加入200 mg蛋白酶K，4℃溶解过夜，混匀分装成1 ml/管。最后

-20℃保存待用。

3 组织裂解液

配制时，称取以下试剂于100 ml蒸馏水中：

Tris base 0.1213 g EDTA 0.0372 g

SDS 0.1 g

## 3. 1: 1的酚/氯仿提取液

100 ml的Tris-HCl饱和酚（不含水层）与100 ml的氯仿混合，配制时，先确定Tris-HCl

饱和酚的体积。最后，溶液用黑色或棕色塑料袋罩住于4℃下保存待用。

### 1.4 主要仪器

**仪器名称生产厂家**

低温离心机Effendorf公司

离心机Effendorf公司

自动高压灭菌锅日本SANYO公司

核酸定量仪德国Eppendorf公司

Realtime PCR仪－Light Cycler 480 Roche公司

THZ-C恒温振荡器江苏太仓

水平电泳槽、电泳仪美国Bio-Rad公司

Image Master VDS型凝胶成像仪美国Amersham Pharmacia Biotech公司红外线扫描仪LI-COR公司

蛋白电转仪美国Bio-Rad公司

显微操作显微镜日本尼康nikon

## 2 实验方法

### 2.1 转基因羊的Th产

本实验室采用慢病毒卵周隙注射方法生产转基因绵羊[105, 138]，即在自然的发情季节， 对供体绵羊和受体羊进行同期发情处理，供体绵羊自然受精，取卵后，体外培养，待发育到2-4细胞期时，将受精卵细胞固定，显微注射针吸取足够量（50-100 pl）的慢病毒，轻轻刺破透明带，将一定量的慢病毒缓慢注射进透明带下。随后将胚胎移入同时进行发情处理的供体羊体内发育，最后生出转基因羊（图13）。具体的操作步骤如下：

1）超数排卵

选择约2周岁的新疆细毛羊，体重至少50 kg。春季绵羊繁殖季节在四月到五月间，

对其进行超数排卵处理。母羊诱导发情期前3天，进行卵泡雌激素肌肉注射，每12 h

注射一次，持续3 d。第一天，注射40 IU雌激素两次；第二天，注射30 IU雌激素两次；第三天，注射20 IU雌激素两次。检查发情供体母羊，12 h后，与公羊进行交配，间隔12 h后进行第二次交配。受体母羊的处理与此相同。

2）胚胎收集

交配后60 h，进行手术，使用37℃含2%胎牛血清的磷酸盐缓冲液（PBS）作为冲胚液，找出母羊卵巢，进而找到输卵管伞部，使用注射器将冲胚液缓慢推入伞部，然后将受精卵缓慢吸出，置于含3 mg/mL BSA的SOF培养基中，并立即进行慢病毒注射。

3）慢病毒注射

使用Nikon公司ECLipse TE2000-U显微操作仪，吸取约50-100 pl滴度> 1×109 U/ml

的慢病毒注入一或两细胞阶段受精卵的卵周隙。

4）胚胎移植

将受体母羊全身麻醉，进行中线剖腹手术。小心拉出输卵管，将慢病毒注射过的胚胎置于冲胚液中，使用微细管将胚胎缓慢的吹入卵巢中。放回输卵管，缝合，消毒处理。约130 d后，怀孕受体母羊生产。



图13 三荧光基因共表达慢病毒转基因羊的Th产流程图

Fig 13 Schematic diagram of producing transgenic sheep by lentivirus-mediated trifluorescent protein transgenesis.

### 2.2 转基因羊尾组织DNA的提取

称取约30 mg尾组织，碾钵内碾成粉末，参照常规酚氯醛提取法提取尾基因组DNA。具体步骤如下：

1）取适量的液氮，用于研磨尾组织样本，尽量磨碎，然后将其转入1.5 ml离心管中；

2）往离心管中加入1 ml的组织裂解液，20μl蛋白酶K（20 mg/ml）和3μl Rnase A

溶液（20 mg/ml），弹起管底沉淀，轻柔的摇匀；

3）置于55℃振荡水浴锅中振荡过夜，以裂解组织，消化蛋白质和RNA；

4）取出消化的混合液，将其冷却至室温，向管内加入600μl Tris-HCl饱和酚溶液，上下轻柔颠倒混匀10 min，于12, 000 rpm离心10 min；

5）减去1 ml枪头头部，使其变钝。用其将上清液小心吸出，约600μL-650μl，移至一新的1.5 ml灭菌离心管中。加入1: 1的酚/氯仿溶液600μl，轻柔的摇匀10 min，于

12,000 rpm离心10 min；

6）同上处理1 ml枪头将上层清液小心吸出，此时约有500μl左右，移至一新的灭菌离心管中，加入氯仿溶液600μl，轻柔的摇匀10 min，于12, 000 rpm 离心10 min；

7）同上处理1 ml枪头，将上层清液小心吸出，约350μl左右，移至一新的灭菌离心管中，加入无水乙醇1 ml，轻柔的摇匀2 min，此时可看到悬浮的絮状物即为DNA，

于12,000 rpm离心10 min；

8）将管内的上清混合液倒掉，加入70%乙醇200μl，弹起管底DNA沉淀，于12, 000

rpm 离心 5 min；9）将管内的上清液弃去，放置于超净工作台上自然风干或过夜晾干；

10）向管内加入适量灭菌超纯水50-100μl，将干燥的DNA弹起混匀，室温或4℃保存直至DNA完全溶解；

11）用分光光度计检测基因组DNA的浓度和纯度。其纯度应在1.7-1.9之间，基因组DNA质量才符合后续试验要求；

12）也可以用0.8%的琼脂糖凝胶（溴化乙锭EB的含量为0.5μg/ml）检测提取好的基因组DNA原液的质量，配凝胶的溶剂及电泳液都为1×TAE缓冲液；

实验时，将DNA样品稀释至50 ng/μl左右，用于PCR鉴定及Southern blotting检测。

### 2.3 转基因羊的PCR检测

生产下来的羊羔，提取其尾组织的基因组DNA，首先使用PCR技术进行阳性羔羊鉴定。为了避免污染及假阳性，选用2×PCR Master (Promega) 进行PCR扩增。2×PCR

Master中含有dNTPs、镁离子、Tap酶及PCR反应缓冲液。以600 ng基因组DNA为模板。运用Oligo 6.0软件设计tdTomato、zsYellow1和acGFP1引物，引物序列及反应条件见表3，进行PCR扩增。

表3 鉴定转基因羔羊需要的引物和反应条件

Table 3 Primers for identification of transgenic lambs

基因PCR primers Product size

TdTomato forward 5'- GTGACCGTGACCCAGGACTC -3'

Reward 5'- GGGCCAGGATTCTCCTCGAC -3'

482 bp

ZsYellow1 forward 5'- CCCACAGCAAGCACGGCCTG -3'

Reward 5'- GGCCGTCGGCGGGGAAGTTC -3'

AcGFP1 forward 5'- TTCGAGGGCGATACCCTG -3'

Reward 5'- ATATAGACAAACGCACACCGGCCT -3'

402 bp

500 bp

反应体系如下：

**反应液成份需要量**

2×PCR Master mix 12.5µl

DNA template 6µl

Primers各0.5µl

Nuclease-Free Water 5.5µl

Total 25µl

PCR反应条件为94℃变性5 min，94℃30 s，60℃45 s，72℃1 min共35个循环，最后72℃延伸7 min。

### 2.4 Western blotting检测

为了检测转基因羊内三色荧光的表达情况，我们利用Western blotting检测

tdTomato、zsYellow1和acGFP1在转基因羊尾组织中的表达情况。冷冻尾组织在液氮中被磨成粉状，100 mg的样本转移至1.5 ml的离心管中，加入100μl的RAPI裂解液及 1

μl蛋白酶抑制剂（HaltTMProtease Inhibitor Cocktail）。4℃作用过夜。4℃下，12, 000 rpm离心15 min，取上清即蛋白溶液。总蛋白变性后上样量约100μg进行电泳，蛋白电转至NC膜上，使用抗tdTomato、zsYellow1和acGFP1抗体，对转基因蛋白表达进行检测。具体操作步骤同第二章2.13。

### 2.5 基因组DNA Southern blotting

利用Southern blotting同位素法检测初生羔羊尾组织中转基因的拷贝数。方法如下：

(1)用于随机引物法标记的放射性探针

1)以pLEX-2A-TYG质粒为模板，针对CMV启动子为目标序列，使用CMV引物：上游5´- CGAGGGCGATGCCACCTAC -3´和下游5´- CTCCAGCAGGACCATGTGATC

-3´，进行PCR扩增，获得430 bp的探针。反应条件及体系同1.2.3。

2）取430 bp的CMV探针(25 ng-50 ng)，加入一定量的灭菌水，混匀，于95~100℃加热5~10 min，冰上迅速冷却；

3）按下表依次加入：

**反应成份总体积**

5×Labeling Buffer 10µl

Mix of the unlabeled dNTPs (0.5 Mm each)

## 2 µl

Nuclease-Free BSA 4µl

α32P-Dctp 5µl

Klenow(10 U/Μl) 2µl

ddH2O 27µl

Total 50µl

4）混匀后，于37℃反应1 h；

5）杂交前于98℃加热5~10 min，进行探针变性。

(2)杂交

1）基因组DNA的大量酶切，如下表所示：

**反应成份**试剂量

基因组DNA 20µg

EcoRI (10 U/µl) 12µl

10×Buffer 30µl

ddH2O补足至100µl

2）混匀后于37℃酶切过夜；

3）取10µl酶切反应产物进行凝胶电泳，检查酶切效果；

4）2倍体积无水乙醇（-20℃预冷），混匀后，于-20℃放置0.5~1 h；

5) 12,500 rpm，4℃离心20 min，弃上清，沉淀加入500µl 70%的乙醇，12,500 rpm

离心2 min弃上清，抽干后沉淀溶于30µl ddH2O中；

6）制备0.7%的琼脂糖凝胶，电泳分离DNA，采用低电压1.5 v/cm, 30 V电泳过夜；

7）溴氛蓝跑至凝胶的2/3处时，停止电泳；

8）把凝胶浸在0.2 M HCl中脱嘌呤，轻轻晃动15 min；

9）去离子水漂洗两次，加入0.5 mol/l NaOH, 1.5 mol/l NaCl中，室温变性30 min，轻轻晃动；

10）去离子水漂洗两次，将凝胶放置于10×SSC中平衡凝胶至少10 min；

11）剪取与凝胶相同大小的杂交尼龙膜（Amershan），放置于10×SSC中平衡凝胶至少10 min；

12）在转印仪上铺一张3 mm的滤纸，将尼龙膜附上，添加转印仪配置的塑料窗

口，合上卡框，打开真空泵，将凝胶缓慢的放置于窗口上，使之与尼龙膜刚好对应。

13）倒入10×SSC液，以5 mmHg的真空吸压转膜90 min；

14）转膜结束后将尼龙膜置于2×SSC中，轻轻晃动10 min以洗去附着在上的凝胶，用两张滤纸吸去多余的水，置干燥箱中80℃30 min进行DNA固定；

15）将膜置于6×SSC中浸泡5 min后，将尼龙膜有DNA的一面朝内，卷成筒状放入杂交管中，加入10 ml预杂交液：6×SSC，5×Denhardt's试剂，0.5%SDS，50%(v/v)[甲酰胺](http://baike.baidu.com/view/831260.htm)，ddH2O，100μg/ml[鲑鱼](http://baike.baidu.com/view/31716.htm)精变性DNA变性。65℃预杂交3 h；

16）加入经过加热变性的探针和新鲜杂交液，65℃杂交12~16 h；

17)杂交完毕，进行洗膜：50 ml 2×SSC+0.5% SDS，65℃洗膜30 min; 50 ml 1×SSC+0.5% SDS，65℃继续洗膜30 min；在洗膜过程中，不时采用放射性检测器对杂交膜进行检测，以控制洗膜的程度，如背景较高可用0.5×SSC+0.1% SDS和0.1×SSC+0.1% SDS继续洗膜；

18）洗膜结束后，取出尼龙膜，用保鲜膜包好，将滤膜正面向上，放入暗盒中（加双侧增感屏）。

19）在暗室内，将1张[X光](http://baike.baidu.com/view/31173.htm)底片放入曝光暗盒，并用透明胶代固定，合上暗盒。将暗盒置-70℃低温冰箱中放置24 h；

20）从冰箱中取出暗盒，置室温5 h，使其温度上升至室温，然后分别放入显影剂

中1-2 min，去离子水5-10 s，定影剂中2-3 min进行放射性自显影检测；

21）放射性自显影胶片使用蛋白2D电泳成像仪扫描成像。

### 2.6 RT-PCR检测

取新生羔羊尾部皮肤，迅速投入液氮中，采用Trizol法提取RNA。然后将提取的

RNA测定浓度，取少于20μg的RNA进行DNAaseI处理。同上运用Oligo 6.0软件设计tdTomato、zsYellow1、acGFP1和ß-actin扩增引物，序列及反应条件见表4，进行PCR反应，并根据软件计算各报告基因mRNA的相对表达水平。

**羊尾组织总RNA的提取**，具体步骤如下：

1）组织的研磨将研钵和研棒用液氮迅速冷却。从液氮中迅速取出组织，放入研钵中快速碾磨成碎末，分装入1.5 ml离心管中。

2）向离心管中加入l ml Trizol，轻轻吹打后室温静置10 min.3）12,000 rpm, 10 min，4℃。

4)吸取上清，加入200µl氯仿，用手上下颠倒Eppendorf管15 s，室温静置15 min.3) 4℃，12,000 rpm，离心15 min。

4） 吸取上清移至新的1.5 ml离心管，加入等体积预冷的异丙醇（约550µl），颠倒混匀后静置10 min。

5) 4℃，12,000 rpm离心10 min。

6）弃上清液，加入至少l ml 75％乙醇（用DEPC处理过的水新鲜配制），洗涤沉淀。

7) 4℃，10,000 rpm离心5 min. 重复该步骤一次。

9）室温干燥。

10）待RNA基本透明时，加入20µl DEPC水，至完全溶解，紫外分光光度计分析测定所抽提的RNA的浓度。

**RT-PCR检测用cDNA的制备**

测定总RNA浓度，对纯度和完整性符合要求的样品进行反转录。

1）取2μg总RNA与2μL随机六聚物引物混合后，70ºC温育10 min；

2）迅速冰浴1 min后瞬时离心；

3）每反应管加入RNA Inhibitor 1μl，5×buffer 8μl，10 mmol/l dNTPs 4μl, M-MLV 2μl, Rnase free 水补足至40μl，混合均匀；

4）PCR仪继续孵育，反应条件为30ºC 10 min, 42ºC 60 min, 70ºC 15 min，将cDNA

放置-20ºC备用，或直接用于下一步实验。**荧光定量引物设计**

针对多基因载体携带的荧光蛋白基因tdTomato、zsYellow1、acGFP1和β-actin基因，参照荧光定量引物设计原则，实验Oligo 6.0软件设计实验用引物（表4）。由于设计的引物除β-actin引物外均不跨内含子，所以RNA提取时一定要加入DNAseI消除残余的

DNA，避免实验结果不准确。

表4 基因定量检测引物序列

Table 4 Amplification primers for Realtime RT-PCR.

基因引物序列primer sequences

TdTomato Forward: TGGTGAGCAAGGGCGAGGAG Reverse: GGCCGCCCTTGGTCACCTTC

ZaYellow1 Forward: ACAGCAAGCACGGCCTGAAG Reverse: GCCGGCGCTCAGGATGTC

AcGFP1 Froward: GTGAGCAAGGGCGCCGAG Reverse: CAGGGTGGGCCAGGGCAC

β-actin Forward: CTGCTACGTGGCCCTGGACTT Reverse: TTTCGTGAATGCCGCAGGATT

**目的基因标准品的制备**

1）目的基因的扩增

目的基因PCR反应体系：*Taq*DNA聚合酶1.5 U，10 pmol/l上、下游引物各1μl，

10×缓冲液(含Mg2+) 2μl, 2.5μmol/l dNTPs 2μl, cDNA 2μl，超纯水补足到20μl。

PCR反应条件：95℃预变性5 min；95℃变性30 s，60℃退火30 s以及72℃延伸30 s共35个循环；72℃延伸5 min，用2 %的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

2）目的基因胶回收（DNA纯化回收试剂盒）具体操作方法参照第二章 2.8.3）目的基因与T载体连接

具体操作步骤同第二章2.5，本实验中pMD 20-T载体为商业化克隆载体。因此参照其说明书，连接反应体系：

**反应成份**反应体积

pMD 20-T载体1μl

目的片段50 ng

SolutionⅠ5μl

超纯水补足至10μl

16℃水浴连接过夜。

4）蓝白斑筛选及菌落PCR

取出蓝白菌的平板，用10μl枪头小心挑取单个白色单菌落，先在PCR管中轻轻粘下(PCR管中先加入10μl超纯水)，PCR体系中其它成分随后加入，进行菌落PCR检测；然后将枪头直接放于已加了500μl LB培养基（含氨苄）的1.5 ml离心管中，于37℃摇床中震摇培养3 h。

PCR反应条件：95℃预变性5 min，95℃变性30 s，60℃退火30 s以及72℃延伸30 s共35个循环，72℃延伸5 min。用2%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物，能扩增出特异性目的条带的样品初步定为阳性克隆。

5）菌液扩增培养、保存及测序

取50μl含阳性克隆的菌液加入有5 ml 氨苄LB培养基的15 ml离心管中，于37℃摇床中震摇培养12-16 h。取700μl菌液与300μl 50%的甘油混匀，每个各3管，其中一管送上海生工测序，其余-20℃保存待用。对测序结果正确的克隆扩大培养，用来提取质粒。

6）目的基因质粒的提取

具体实验步骤参照第二章2.10.7）质粒线性化及产物的纯化

使用NEB在线软件NEBcutter v2.0 [http: //tools. neb. com/NEBcutter2/](http://tools.neb.com/NEBcutter2/)，分析质粒上的酶切位点，选择目的基因片段上不存在而质粒上存在的酶切位点，本试验选择的是*Sal*I内切酶将质粒线性化。

单酶切反应体系：

**反应成份** **反应量**

*Sal*I 20 U

10×Buffer 5μl

质粒DNA 2 μg

加水 补足50 μl

37℃水浴过夜孵育。

1%琼脂糖凝胶电泳检测，酶切彻底后进行纯化。酶切产物用DNA纯化回收试剂盒进行纯化，步骤同第二章2.8。

8）对纯化的标准品进行稀释

测定纯化后质粒的浓度，然后按1μg/ml、100 ng/ml、10 ng/ml、1 ng/ml、100 pg/ml、10 pg/ml和1 pg/ml七个浓度做梯度稀释，制成各个基因的标准品。

**标准曲线生成及样品**Quantitative Real-Time PCR

1）制作各个基因的标准曲线：

以1μg/ml、100 ng/ml、10 ng/ml、1 ng/ml、100 pg/ml、10 pg/ml和1 pg/ml七个浓度的标准品为模板进行Quantitative Real-Time PCR，通过软件自动生成各个目的基因的标准曲线。

2）cDNA定量检测：

取制备的cDNA为模板，并在样品中加标准品作为定量标准，以超纯水为模板作为阴性对照进行Quantitative Real-time PCR。每个样品重复3次，以减少随机误差。

Quantitative Real-Time PCR反应程序：95℃15 min; 95℃30s- 60℃30s- 72℃30s, 55 cycles; melting curve: 99℃0 s- 40℃15 s- 99℃0.1℃/s; cooling: 40℃, 30 s。

反应体系：2×Master mix 10µl；primers (10μM) mix 2µl；cDNA 2µl；RNase free water

补足至20µl。

### 2.7 DNA甲基化分析

DNA甲基化是表观遗传学最重要的研究内容之一。DNA甲基化是指生物体在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的催化下，以s-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体，将甲基转移到特定的碱基上的过程。在哺乳动物中DNA甲基化主要发生在5’-CpG-3’的C上生成5-甲基胞嘧啶。为了研究转基因表达与DNA甲基化之间的调控关联，使用重亚硫酸氢钠测序法对转基因羊尾组织转基因CMV启动子和编码区区域的甲基化水平进行分析。

组织基因组DNA按照本章2.2方法提取。重亚硫酸盐甲基转化处理方法如下：

DNA(A260/A280 比值为1.7-1.9) 1 ng-2μg，最大体积不超过20μl. 每个Bisulfite

Mix可用于8个转化反应。如果实验样品不足8个，稀释的Bisulfite Mix可在–20°C存放4 w以上。所有的离心过程均在室温(15-25°C)下进行。重亚硫酸盐转化具体操作参

照QIAGEN公司的EpiTect@Bisulfite Kit试剂说明进行。实验中所用试剂如无特别说明均为试剂盒内本身携带。

**试验准备**

在Buffer BW中加30 ml乙醇(96–100%)，室温保存。使用时上下颠倒混匀。

在Buffer BD中加27 ml乙醇(96–100%)，2–8°C保存。使用时颠倒混匀，使用后立即盖好。存放一段时间后，该溶液会有白色沉淀产生，但不影响Buffer BD的作用。使用时，避免将沉淀转移到EpiTect spin column上。

在冻干的Carrier RNA (310μg)中加入310μL RNase-free水，得到1μg/μl溶液。如果一次性做48个样品，可以将所有的Carrier RNA溶液加入Buffer BL中。如果不足48个样品，可以将Carrier RNA溶液分装，–20°C保存，达一年以上。如果2 w内做，可以准备足够的Buffer BL–Carrier RNA溶液，其配制比例参照下表。Carrier RNA能够提高DNA与EpiTect spin-column膜的结合，尤其当样品中目的片段特别少的时候。如果

DNA量大于100 ng，则没必要加入Carrier RNA。如果Buffer BL中含有沉淀，加热（最大温度70°C）溶解，轻摇。

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **样品数** | **1** | **4** | **8** | **16** | **24** | **48** |
| **Buffer BL** | 620 μl | 2.5 ml | 5 ml | 10 ml | 15 ml | 31 ml |
| **Carrier RNA** | 6.2 μl | 25 μl | 50 μl | 100 μl | 150 μl | 310 μl |

注：使用时，首先将样品和缓冲液在室温中平衡。

**操作步骤**

1)解冻DNA. 在此过程中Bisulfite Mix中加入800μl RNase-free water，涡旋振荡至完全溶解，此过程大概需要5 min. 可以在60°C加热Bisulfite Mix-RNase-free水，并涡旋。

注意：不要将溶解的Bisulfite Mix放在冰上。

2）在250μl PCR管中准备重亚硫酸盐反应液，按下表先后顺序加入。DNA样品和

RNase-free水共20μl。

**Component体积**

DNA solution (1 ng- 2μg) Variable（最大20μl）

RNase-free water Variable

Bisulfite Mix 85μl

DNA Protect Buffer 35μl

总体积（total volume）140μl

3)加完后，混合均匀，室温存放。当DNA Protect Buffer加入DNA-Bisulfite Mix

后，如果溶液颜色从绿色变为蓝色，提示此时溶液混合均匀，且反应混合液PH值正确。

4）DNA重亚硫酸盐转化需要在热循环仪上进行，具体反应条件参照下表B，整个过程需要大约5 h。转化完成的DNA在热循环仪上过夜不会影响产物质量。

如果目的片段中含有丰富的CpG位点，可增加表A中所列的步骤：

A.基因组DNA重亚硫酸盐补充反应条件

A. Supplement of Bisulfate reaction condition for genome DNA

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Step | Time | Temperature(℃) |
| Denaturation | 5 min | 95°C |
| Incubation | 2 h | 60°C |
| hold | 时间不限 indefinite | 20°C |

B基因组DNA重亚硫酸盐反应条件

B Bisulfate reaction condition for genome DNA

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Step | Time | Temperature(℃) |
| Denaturation | 5 min | 95 |
| Incubation | 25 min | 60 |
| Denaturation | 5 min | 95 |
| Incubation | 85 min | 60 |
| Denaturation | 5 min | 95 |
| Incubation | 175 min | 60 |
| Hold | indefinite | 20 |

5）反应完成后，瞬离PCR管，将反应产物全部转入1.5 ml离心管中。反应产物中的沉淀不影响反应产物质量和得率。

6)加入新鲜配制的560μl Buffer BL（根据实验需要，加入终浓度为10μg/ml carrier RNA），涡旋，瞬离后，全部转入EpiTect spin colum中。

7）最大转速离心1 min，弃废液，将spin columns放回收集管。

8)加入500μl Buffer BW，以下操作同步骤7)。

9）加入500μl Buffer BD，室温孵育15 min。如果Buffer BD中有沉淀，不要将其转移到spin column中。Buffer BD溶液加完后，要立即盖上，避免被空气中CO2酸化。孵育前应将spin columns盖好。

10）重复步骤7）、8）两次。

11）将spin columns 放入新的收集管，最大转速离心1 min，彻底清除残留液。或

56℃挥发5 min（建议）

12)将spin columns放入1.5 ml离心管中，取20μl洗脱液EB放在膜中央，离心

1 min, 15,000 g (12,000 rpm)。

注意：为了提高DNA得率，可重复步骤12一次。如果DNA在24 h内继续下一步试验，可存放于2–8°C，超过24 h，最好存于–20°C。

13）利用在线软件methprimer（[http: //www. urogene. org/methprimer/](http://www.urogene.org/methprimer/)）设计扩增载体启动子区和编码区的引物，引物及扩增片段大小见表5。

14）以步骤12）中获得的目标产物为模板，使用步骤13）设计的引物进行PCR扩增。PCR体系及条件同第二章2.3。

15）将凝胶回收14）中的PCR产物，克隆到pGEM-T载体中。克隆步骤参见第二章2.6。

16）将克隆送交上海生工测序，其中每个样本至少送交10个克隆。测序结果与转化后的目标序列同时提交BIO-analyser（[http: //biq-analyzer. bioinf. mpi-sb. mpg. de/](http://biq-analyzer.bioinf.mpi-sb.mpg.de/)）在线软件进行分析。统计甲基化的CpGs数量在序列总CpGs中所占的比例，以此作为甲基化水平的数值。图例显示时，甲基化胞嘧啶使用“●”表示，未甲基化“○”表示。

表5 重亚硫酸盐测序使用的引物和PCR反应条件

Table 5 Primers and PCR conditions for bisulfite sequencing

Name PCR primers and condition product size outer forward 5′- GGGTTATTAGTTTATAGTTTATATATGG -3′

Reverse 5′- GATTCACTAAACCAACTCTACTTA -3′

CMV

Inner forward 5′-ATTAGTTTATAGTTTATATATGGAGTTTC -3′reverse 5′- CAACTCTACTTATATAAACCTCCC -3′

40 cycles of 95℃, 30 sec, 50℃, 30 sec, 72℃, 40 sec

540 bp

Tdtomato

Outer forward 5′- GAGGAGGTTATTAAAGAGTTTATG -3′Reverse 5′- ACCATATAAATAATCTTAAACTCCAC - 3′

Inner forward the same as outer forward

Reverse 5′- CTTCAACTTCAAAACCTAATAAATC -3′

40 cycles of 95℃, 30 sec, 52℃, 30 sec, 72℃, 40 sec

492 bp

zsYellow1

Outer forward 5′- GGAGATGATTATGAAGTATTATATGGAG -3′reverse 5′- TCCTTCAACAACAAATACATACTCAC -3′

489 bp

Inner forward 5′- GGTTTGAAGGAGGAGATGATTATG -3′reverse the same as the outer reward

40 cycles of 95℃, 30 sec, 55℃, 30 sec, 72℃, 40 sec

acGFP1

Outer forward 5′- GGATTTAGTTATTATGGTGAGTAAG -3′reward 5′- CCTTAATACCATTCTTAACCTTATC -3′

Inner forward the same as the outer forward

Reverse 5′- TCCATCTTATTACCCAAAATATTAC-3′

PCR condition the same as Tdtomato

441 bp

### 2.8 CMV启动子转录因子结合位点分析

根据TFSEARCH ver.1.3 [http: //www. cbrc. jp/research/db/TFSEARCH. html](http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html)在线软件，利用同源序列分析CMV启动子上转录因子结合的*cis*-元件，估算序列中蛋白结合motifs的定位。

### 2.9 统计分析

统计分析使用SPSS13.0软件。数据以平均值±标准误表示。

## 3 结果

### 3.1 三色荧光蛋白基因共表达慢病毒转基因羊的Th产情况

37枚受精卵经过慢病毒卵周隙注射，注射胚胎被转移到37只受体羊中。10只怀孕母羊出生了7只羔羊。这7只新生羔羊中，经过PCR鉴定，2只转基因羊被确定为阳性

（图14）。转基因羊阳性率在新生羔羊和胚胎中分别为28.6%（2/7）和5.41%（2/37）。与本实验室生产的eGFP慢病毒转基因羊相比，阳性率和胚胎率都明显降低[105]。两者除了生产季节不同外，其它如慢病毒生产、受精卵处理和病毒注射、胚胎移植等方法都是相同的。本实验是在春季做的胚胎移植，后者则在秋季-绵羊正常的发情季节进行。这是否表明季节对受体羊和供体羊的影响，致使转基因羊阳性率降低，有待进一步的实践验证。



图14多荧光蛋白基因共表达转基因羊的PCR检测。左：7只新生羔羊#1 to #7的PCR检测结果。#6 and #7转基因羊被检测为转基因阳性。Plasmid，pLEX-2A-TYG质粒作为阳性对照；ntc，非转基因羊作为模拟对照；neg，没有加模板DNA作为阴性对照。M，150 bp DNA marker. tdTomato, zsYellow1 and acGFP1检测片段大小分别为482 bp, 402 bp和458 bp。右：携带三荧光蛋白基因的转基因羊，#6 和

#7.

Fig 14 Identification of transgenic sheep by PCR. Left: PCR screening of seven new born lambs numbered by #1 to #7. Two transgenic lambs (#6 and #7) were identified carrying transgene. Plasmid, pLEX-2A-TYG vector as positive control; ntc, non-transgenic sheep as mock control; neg, no DNA as negative control. M,150 bp DNA ladder. The sizes of PCR products of tdTomato, zsYellow1 and acGFP1 gene

Were 482 bp, 402 bp and 500 bp respectively. Right: Photo of #6 and #7 transgenic

Lambs carrying tricistronic gene.

### 3.2 转基因羊的整合检测结果

紫外灯直接检测新生羔羊耳部、唇部、下颚、牙齿、皮肤、尾巴、蹄部及可视粘膜部位等，均未检测到绿色荧光。Western blotting和RT-PCR也未检测到报告基因的相应表达。位置效应、广泛启动子的甲基化等易导致转基因表达沉默[104,106,139,140]，因此，我们下一步检测了转基因羊基因组内慢病毒载体的甲基化状态。

### 3.3 转基因羊甲基化分析

尾部基因组DNA甲基化检测结果表明（表6，图15），转基因羊#6和#7启动子甲基化水平分别为76.25%和64.70%；载体中荧光蛋白基因各编码区显示超甲基化，甲基化水平在97.5%-99.5%之间。由此可以推断，基因表达的沉默很大程度上是由高水平甲基化引起的。

表6 三荧光蛋白共表达基因载体启动子和各顺反子在转基因羊基因组DNA中的甲基化水平

Table 6 Methylation levels of promoter and cistrons of trifluorescent protein gene construct in the transgenic lamb

Promoter ( CMV) (%) Cistrons in the encoding region (%)

|  | | tdTomato | zsYellow1 | acGFP1 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| #6 | 76.25±0.17 | 97.50±0.03 | 98.10±0.02 | 99.20±0.02 |
| #7 | 64.70±0.35 | 98.10±0.02 | 97.60±0.02 | 99.50±0.01 |



图15三荧光蛋白基因共表达转基因羊的甲基化检测结果。上：三荧光蛋白基因载体上启动子和各顺反子内CpG岛（紫红色横线）及分别被分析的CpG位点的数量。下：启动子和各顺反子内被分析的CpG位点的甲基化情况，黑色实心圆表示该CpG位点甲基化，空心则表示未甲基化。

Fig 15 Methylation status of trifluorescent protein construct in transgenic lambs. Upper panel: number of CpG island and analysed CpG sites in the promoter and cistrons of the construct; lower panel: methylation status of the promoter and cistrons, black circles indicate methylated CpG site, white circles indicate non-methylated CpG site.

### 3.4 CMV启动子转录因子结合位点分析结果

本实验中载体CMV启动子全长为589 bp，共有32个CG位点。根据在线软件

TFSEARCH估算CMV启动子内的转录因子结合位点。选定默认阈值（Threshold score）

85.0（总分为100）时，CMV启动子序列内有111个转录结合位点，部分转录因子结合序列内包含CG位点（表7），或一个CG位点包含于多个转录结合序列内（资料未显示）。甲基化影响转录因子与靶序列的结合，增加二者结合的空间位阻，进而影响转基因的表达。转基因羊内载体启动子甲基化分析显示，CMV 启动子并未全部甲基化。第 2-7、10、

16、18-21及19-31位CG位点在所测的克隆中甲基化水平接近100%，而这些位点包含在鼠S8同源盒基因、Cap信号元件、YY1及GATA家族等转录因子结合序列中（表7）。由以上结果，我们推测CMV启动子内某些CG位点甲基化可能导致了转基因表达被抑制。

表7 CMV启动子中部分蛋白结合位点

Table 7 Partial protein-binding sites within the CMV promoter

| Sequence | Position | Binding TF | Species |
| --- | --- | --- | --- |
| CCCATATATGGA | -43, -54 | SRF | Chick, cat, clawed frog, human, mouse, rat |
| TTACGGGGT | -21, -29 | Nkx-2.5 | mouse |
| AGTAATCAATTACGGG | -12, -27 | S8 | mouse |
| ACATAACTTAC | -65, -75 | E4BP4 | human |
| CGGTAAATG | -75, -83 | CdxA | chick |
| TGACGTCA | -120, -127 | CREB | Human, rat, mouse |
| TGACGTAT | -132, -139 | CREB | Human, rat, mouse |
| TCAATAATGACG | -125, -136 | Oct-1 | Human, rat, mouse, clawed frog, monkey, chick, gibbon ape, hamster |
| CCGCCCATTG | -112, -121 | Sp1 | human |
| TGACGTCA | -173,-180 | CREB | Human, rat, mouse |
| TTGGCAG | -212, -218 | Nkx-2.5 | mouse |
| TGACGTCA | -256, -263 | CREB | Human, rat, mouse |
| GGTGATGCGG | -364, -373 | GATA-1 | mouse |
| TGCGGT | -369, -374 | AML-1a | human |
| GGGGATTTCC | -417, -426 | c-Rel | Human, rat chick |
| CTCACGGG | -411, -419 | AP-1 | Clawed frog, human, monkey, chick, gibbon ape, hamster, fruit fly, mouse, rat |
| CGGGACTTTCCA | -479, -490 | NF-kap | Human, rat, mouse |
| TCCAAAATGTCG | -486, -499 | C/EBPbeta | Human, mouse, rat |
| CGCCCCATT | -508, -516 | Sp1 | human |
| CTATATAAGCAGAGC | -553, -567 | TATA | Human, mouse, fruit fly |
| TF, transcription factor，转录因子。 |  |  |  |

## 4 讨论

### 4.1 慢病毒载体在转基因动物中的应用

转基因动物生产的显著特点是效率低、时间长、高成本和大量的劳动量，主要是因为胚胎发育早期比较难于管理。以受精卵和胚胎为基础的慢病毒基因转移明显地改善了转基因动物的生产效率，但此方法仍需要昂贵的显微操作仪器。目前，常见的转基因动物生产方法有原核内显微注射法、精子载体法、脂质体转染法、逆转录病毒载体法、及细胞核移植方法，但这些方法均表现为成本高、转基因效率低及插入片段小等缺点而限制了其广泛的发展运用。慢病毒载体法的出现，不仅克服了以往逆转录病毒表达沉默的缺陷，而且转基因的效率远远高于传统的显微注射法，所花费用只及前者的1/10，因此慢病毒载体日益广泛地运用于转基因动物研究。慢病毒载体不仅为基因和细胞治疗的基因转移系统带来了巨大希望，高效地感染/转染分裂或静止细胞，而且也为转基因动物的生产带来了光明。在生产转基因动物时，慢病毒被认为优于质粒DNA。慢病毒可以有效稳定地整合入基因组。慢病毒整合偏好活性转录区，随机性小于质粒。研究发现，基于慢病毒载体的整合发生在转录单位内。慢病毒载体越来越受转基因动物研究的青睐， 因其具备整合入基因组的能力和高有效性。另外，慢病毒介导的转基因表达可以被稳定遗传给下一代[104, 141]。在许多动物中，慢病毒转导后的胚胎生命力非常高，通常为70%，包括小鼠、大鼠、羊、猪和牛[142]。

慢病毒载体技术，是将目的基因重组到慢病毒载体上，制成高滴度的病毒颗粒，感染着床前或着床后的胚胎，也可以将去除透明带的胚胎与慢病毒共孵育，胚胎移植后获得转基因动物。通常情况下，慢病毒转基因小鼠中转基因表达，二细胞期胚胎高于成年组织[143]。大多数情况下，整合发生在一细胞或者是二细胞期，此时小鼠G0期嵌合体通常非常低[143]。2002年，Pfeifer等首先利用GFP慢病毒感染小鼠ES细胞，获得了稳定表达GFP的转基因仔鼠[144]。同年，Lois等利用慢病毒受精卵周隙注射法成功制备转基因小鼠和大鼠[145,146]。此后，Brandt等也利用同样方法成功制备了转基因大鼠，其中46

％的仔鼠稳定整合转基因，90%小鼠血液中白细胞获得荧光蛋白的表达，转基因效率与

Lois等报道的相似，且传代稳定[145]。2003年，Hofmann等人利用慢病毒载体法首次成功制备绿色荧光蛋白转基因猪。他们将病毒液进行卵周隙注射，移植后所产仔猪74％

（30/46）整合有GFP基因，其中表达率为94％（30/32）[147]。显微注射法制备转基因猪阳性率仅有约9.2%，可以看出慢病毒载体法转基因效率显著高于显微注射法的转基因效率。同年，Clark等利用慢病毒载体制备转基因动物的效率可达80%~100%，生产1只转基因绵羊只需5只受体母羊，而传统的显微注射法则需70只受体母羊[148]。以上研究表明，慢病毒载体介导的转基因动物阳性率高，能够在短时间内生产较多地带有靶基因的转基因动物，更好地服务于生产生活。尤其是本实验中生产的多基因共表达转

基因动物，对快速改进家畜经济性状具有重要意义。如表3-6所示，本实验中生产的多外源基因共表达慢病毒转基因羊，是已报道慢病毒转基因大动物生产中阳性率较低的， 但相对于显微注射法生产的转基因动物，转基因阳性率仍然较高。

在本实验及以前的慢病毒转基因动物生产中，慢病毒注射受精卵（卵母细胞）或卵周隙或早期胚胎以获得转基因动物是较常见的方法[105,146]。但有报道表明，应用低滴度5×105 IFU/ml慢病毒与精子共孵育，获得的转基因猪的阳性率为10.17% [149]。虽然此方法不如慢病毒直接注射稳定，但此种方法操作更简便，花费更低。精子介导的转基因始于1989年，在多种动物中有报道，包括小鼠、大鼠、兔和猪等，但这种方法一直存在争议，随着慢病毒的加入将会改变这一趋势[149]，这一方法将在未来的转基因生产中发挥重要作用。

综上所述，慢病毒引入动物的方法会影响转基因阳性率。比如，卵周隙注射法在转基因羊和猪生产中都得到了高比例的转基因阳性动物，但在转基因牛生产中，4只小牛均为阴性，但利用慢病毒卵母细胞注射法生产的转基因牛阳性率则为100%[142]（表8）。本实验中2A肽介导的多基因共表达载体阳性转基因效率较低，是否也与慢病毒引入方法不适当有关，这需要进一步的实验研究。但总体而言，慢病毒卵周隙注射法还是目前相对较好的生产转基因动物的方法。

表8 慢病毒载体介导的大家畜动物

Table 8 Large transgenic farm animals produced by lentivirals

| 种类 | 载体 | 动物（只） | 转基因阳性率 | 生产方式 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 猪 | LV-PGK(eGFP) | 32 | 70% | 受精卵卵周隙注射法[147] |
|  | LV-K14(eGFP) | 2 | 100% | 同上 |
|  | EIAV-eGFP | 37 | 92% 同上[150] | |
|  | LV-shRNA-eGFP | 6 | 10.17% | 慢病毒与精子共孵育[149] |
| 牛 | LV-eGFP | 4 | 100% | 卵母细胞透明带注射法[142] |
|  | LV-eGFP | 0 | 0 | 受精卵卵周隙注射法[142] |
|  | FIV-eGFP | 10 | 100% | MII 卵母细胞卵周隙注射法[151] |
|  | pLenti-Pβcas5-hFIX | 2 | 100% | 慢病毒转染法与胚胎核移植结合[152] |
| 羊 | pLEX-eGFP | 8 | 61.5% | 受精卵卵周隙注射法[105] |
|  | pgk-eGFP  EF1-а-GFP | 3 | 27.3% | 卵母细胞卵周隙注射[137]  受精卵卵周隙注射法[153] |
|  | CMV-GFP |  |  | 同上 |

*pLEX-2A-TYG* *2* *28.6%*受精卵卵周隙注射法

注：斜体部分为本实验中生产的转基因羊。

### 4.2 2A肽在慢病毒介导的Th物技术中的应用

慢病毒载体介导的转基因对细胞损伤较小，可获得60%以上转基因高效率。除可以侵染分裂细胞外，它还可以侵染常规方法转染效率较低的非分裂期细胞，如神经细胞、 肝细胞、心肌细胞等。但是病毒载体也存在一些局限，如病毒载体序列在宿主基因组中易被超甲基化而使外源基因表达沉默；病毒载体对外源DNA大小有限制，通常小于8 kb；病毒载体对动物安全存在一定的潜在风险[116]。因此，在达到目的基因转移的情况下，插入的片段越小越好。2A肽已在腺相关病毒载体[37]、逆转录病毒和慢病毒载体[27]中参与调节不同基因的共表达。尤其在慢病毒载体中，多个目标基因由2A肽连接，将体细胞成功诱导成多能性干细胞。研究报道，四个以上的重组因子Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc由2A连接，在同一个启动子作用下，使小鼠胚胎成纤维细胞、人角质细胞成功转化成诱导性多能性干（iPS）细胞[18,48]。Cesar A. Sommer等通过联合应用2A肽和IRES连接构建的慢病毒载体实现了从新生儿成纤维细胞到诱导性多能性细胞的转化[47]，Chiawei

Chang等则将以上四个因子通过2A肽直接相连，利用Hit和Run技术，将皮肤成纤维细胞转化为iPS细胞[18]。以上研究表明，2A肽与慢病毒载体的有效结合，增强了目标基因重组效率和安全性，有效地减少了插入目标载体的长度[116]，有利于更多更好地生产转基因动物或应用于基因治疗，更好地满足生产生活的需求。因此，2A介导的多基因慢病毒载体技术将是未来多基因动物生产的关键技术[53](表9)。本实验中，我们首次利用2A肽介导的多基因慢病毒载体生产了2只转基因羊，为2A肽介导的转基因动物的生产提供新的研究材料，使其在转基因大动物生产方面又有了新的突破。

表9 2A肽介导的多基因载体Th产的转基因动物

Table 9 Transgenic animals produced using 2A peptide mediated multicistronic vector

| 载体类型 | 动物 | 数量（只） | 阳性率 | 生产方式 | 目标基因 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 慢病毒载体 | 小鼠[48] | —— | —— | 诱导性多能性干细胞注射 | Oct4, Sox2, Klf4 及  c-Myc |
|  |  |  |  |  | Egfp、 |
| 非慢病毒载体 | 小鼠[154] | —— | —— | —— | Cre recombinase、  human DTR 及 |
|  |  |  |  |  | CBG99 luciferase |
|  | 小鼠[109] | 4 | 12.9% | 显微注射法 | TFAT-1、FAT-2 和 Hcat |
|  |  |  |  |  | My r-TdTomato、 |
|  | 小鼠[26] | —— | —— | 原核注射 | H2B-GFP |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 猪[54] | 7 | 63.6% | 胚胎核移植 | ZsYellow1, ECFP, tdTomato and EGFP |

注：“——”表示文献中未提到。

### 4.3 转基因羊DNA甲基化分析

在大多数真核生物中，如植物、动物和真菌，胞嘧啶甲基化是一种常见的DNA修饰[68]。慢病毒载体可以有效地转染胚胎干细胞，与传统的逆转录病毒载体相比，慢病毒载体对转基因沉默的抵抗力较强[144]。在转基因动物中，甲基化水平与转基因表达呈负相关[105]，在不同的组织表达中也表现相似的趋势。本实验中，紫外灯直接检测、Western

blotting、RT-PCR等均未在转基因羊表面可视部位检测到相应荧光报告基因表达，表明转基因很可能表达过低或沉默[155]。

May et al等报道慢病毒载体可以导致转基因沉默，对转基因进行表观遗传学修饰

[156]. 病毒整合位置也会影响转基因的表达，即位点作用效应（position effect variegation,

PEV）。当基因整合到染色体的特定位置时，会引起转基因表达的改变[157]。本实验中，多基因慢病毒载体在基因组中的整合是随机的，因此有可能整合异染色质区域，基因不表达，继而沉默。

广泛的启动子甲基化可以导致小鼠转基因沉默[140]。CMV启动子介导的转基因在不同的组织中表达水平差异很大，表达最高的组织是心脏、胃和脾脏组织[105, 158]。在机体内，CMV启动子是一个在转基因中广泛使用的启动子，但许多研究表明CMV启动子介导的转基因易于发生沉默[106, 158, 159]。与CAG启动子相比，CMV不适合用于生产转基因细胞或动物[49, 106]。本实验中，载体启动子为CMV启动子，我们并未对其作任何修改。以上研究结果表明，转基因沉默也许与CMV启动子甲基化存在一定的相关性，但本实验DNA甲基化分析表明，CMV启动子在两只羊中分别为76.25%和64.70%，不足以导致转基因的沉默。但在本实验中，报告基因的甲基化均显示超甲基化，表明转基因沉默与报告基因本身的超甲基化关系更密切。以上结果是否表明报告基因的沉默独立于启动子甲基化，这需要进一步的研究。下一步，本实验还将会对羊尾组织中转基因插入位点进行分析，以其获得更全面的研究数据，为基因沉默原因提供更有利的证据。

### 4.4 DNA甲基化检测方法

自从1970s, DNA甲基化在真核细胞中被发现，其重要性就越来越受到关注。DNA甲基化的研究方法不断涌现，尤其是在全基因水平上的DNA甲基化分析。但这些方法多会以敏感性甲基酶酶切反应及重亚硫酸氢盐转化为基础，然后进行芯片测序、抗体抓捕等方法分析DNA甲基化水平。本实验主要采用重亚硫酸氢盐测序法对基因组DNA甲基化进行分析。重亚硫酸氢盐测序法是检测给定基因扩增序列上单个CG甲基化状态

的‘金标准’方法。这种方法的原理是重亚硫酸氢盐可以把基因组中未甲基化的胞嘧啶残基经脱氨作用变成尿嘧啶，甲基化的胞嘧啶对这种修饰是有抗性的。经过PCR扩增，尿嘧啶变成胸腺嘧啶。经过克隆测序及序列比对，DNA序列上每个胞嘧啶的甲基化状态就清楚了。通常情况下，这种方法适用于任何含有CG位点的DNA序列的甲基化检测。它的优势就在于可以对单个CG位点的甲基化进行分析。但这种方法也存在较多的缺陷，如工作量大；PCR引物是否能扩增出目的片段；对DNA完整性要求较高，微分割或石蜡包埋组织的DNA不适于用此方法分析。本实验中，由于样品量比较少，所有采用重亚硫酸氢盐测序法。首先利用试剂盒从尾组织中提取DNA，荧光光度计测定DNA

260/280值均在1.7-1.9之间；琼脂糖凝胶电泳显示提取DNA完整性好，无抹带现象，满足实验的要求。每个样品挑十个克隆进行测序，然后序列比对，结果表明本实验使用的巢式引物也是符合实验要求的。

### 4.5 CMV启动子转录因子结合位点

转录因子可能参与DNA甲基化调节[160]。CMV启动子转录结合位点分析显示，序列中第二个CG位点位于鼠S8同源盒基因中，在胚胎和中胚层细胞中以间质特异方式进行表达[161]。尽管该结合位点的甲基化与转录活性之间的关系尚未见报道，但该结合位点可能与胚胎成纤维细胞增殖相关。Cap信号元件是转录起始需要的，CMV启动子中第一个CG位点紧挨着Cap信号元件，第11和20个CG位点则包含在该元件中。研究表明GC-box、TATA-box及cap信号元件等是POL II启动子最常见的元件，存在于主要编码蛋白基因中。主要作用是把RNA多聚酶精确定位到目标基因，而不是影响转录活性[162]。同样，腺病毒启动子的活性也会因其cap信号元件甲基化而受到抑制[163]。第三个CG位点处于YY1结合基序中。YY1是一个多功能转录调节子，能够激活、抑制或起始转录[164]。近年来，一项研究发现，癌症的正常血细胞中YY1的DNA结合活性与*denovo*甲基化的消失严格相关[165]，表明该结合位点可能影响DNA甲基化状态。

GATA家族转录序列包含了第21-23个CG位点。脊椎动物中，GATA家族基因在组织和细胞系中以明显的或重叠方式进行表达。GATA-1存在红细胞系中，包括造血祖细胞。GATA-2也存在于祖细胞中，如肥大细胞、巨核细胞、胚胎脑细胞、原始有核红细胞、内分泌细胞、胚胎干细胞及其他细胞或组织中[166]。鼠逆转录病毒中U3-LTR的甲基化干扰GATA-1和GATA-2及位点之间的结合。基于以上研究，在本实验中，我们推测转录活性与启动子区CG位点的甲基化可能相关。如图3-3所示，以上各CG位点在CMV启动子甲基化水平接近100%，进一步表明报告基因的表达沉默可能与转录活性被抑制相关。

# 第五章 转基因羊内外源基因DNA甲基化机制初步研究

表观遗传指基因组DNA序列没有发生变化的可遗传的改变[167]。DNA甲基化是表观遗传学的重要标志之一，正常的DNA甲基化是哺乳动物发育、基因调节、基因组印记和染色质结构必须的表观修饰[168]。DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶的作用下，以S-腺苷酸-L-甲硫氨酸(SAM)为甲基供体，将甲基转移到特定嘧啶碱基上的过程。真核细胞的

DNA甲基化通常见于基因组序列CpG位点的胞嘧啶上。CpG二核苷酸在人类基因组中占

10％，其中70％-80％呈甲基化状态。非甲基化CpG二核苷酸区域仅占基因组的1-2％。

CpG双核苷酸位点大部分分布在基因5-端，又称为CpG岛。CpG岛长度一般为0.5-2 Kb，通常位于基因的启动子区、5-端和第一外显子区。

异常的DNA甲基化明显提高了C→T突变率，引起许多遗传疾病的发生，如癌症、免疫缺陷，中心粒不稳定等[169]。DNA超甲基化导致致密染色质的形成，进而抑制转录因子的结合，最终导致基因表达沉默[91]。DNA甲基转移酶抑制剂可以激活转基因动物中外源基因的表达[139]。甲基转移酶抑制剂5-azaC、5-azadC及zebularine (ZEB)等均是胞嘧啶类似物，且作用机制相似[170]。5-azaC、5-azadC和ZEB在体内经代谢被激活，经DNA复制过程整合入DNA。由于化学作用的发生，甲基转移酶与DNA共价连接，引起基因组范围的蛋白-DNA相互作用[170]，降低了可溶性甲基转移酶的蛋白水平，致使复制依赖的广泛去甲基化和基因激活[171]。二者皆已在临床上用于治疗骨髓增生异常综合症

（myelodysplastic syndrome, MDS）及某些白血病治疗[93]。同样也已用于改善动物细胞的表观遗传状态[87, 104]。更重要的是，DNA甲基化可与染色质重修饰中的组蛋白乙酰化互相作用，调节基因的表达。TSA是常见的去乙酰化酶抑制剂。它可以激活沉默的转基因表达，且激活作用不会在短时间内消失[97, 107]。目前，TSA也已用于改善供体细胞的表观修饰状态[86, 87, 95]，也可逆转转基因猪成纤维细胞内报告基因的表达[104]。

广泛的甲基化可以导致转基因沉默，这在小鼠[140]、猪[104]、羊[106]上已有报道。上一章实验结果表明，外源荧光报告基因在羊尾组织中没有检测到相应的表达，但DNA甲基化检测结果表明转基因羊内报告基因编码区超甲基化。由此我们推测DNA超甲基化很可能导致了转基因沉默。为了验证上述推论，我们对从转基因羊尾部分离得到的成纤维细胞进行甲基转移酶抑制剂和去乙酰化酶抑制剂处理。通过倒置荧光显微镜观察和流式细胞检测，分析甲基转移酶和去乙酰化酶抑制剂对转基因成纤维细胞的作用。通过检测结果分析细胞中报告基因的表达与药物浓度、作用时间之间的关系，对转基因羊内外源基因DNA甲基化机制进行了初步探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验试剂

Trichostatin A(T1972)、5-Azacytidine (A1287-1vl)、二甲亚砜（DMSO）均购自Sigma；青链霉素混合液100×购自北京鼎国公司；DMEM培养液、胎牛血清FBS均购自Invitrogen公司；其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验材料

pLEX-2A-TYG转基因羊尾部皮肤成纤维细胞。

### 1.3 实验仪器

**仪器名称生产厂家**

流式细胞仪BD公司

倒置荧光显微镜日本NIKON

二氧化碳培养箱德国Heraeus公司

超净工作台上海智诚公司

### 1.4 主要试剂的配制

1）500μM 5-azaC溶液

试剂瓶中加入10 ml细胞完全培养基，轻轻混匀。分装，4℃短期存放，-20℃可保存一年。该试剂避免重复冻融。

2）500μM TSA溶液

取5 mM TSA溶液10μl，加入990μl DMEM完全培养基，轻轻吹打混匀，分装，

-20℃保存备用。

3）500 nM TSA溶液

取500μM TSA溶液10μl，加入990μl DMEM完全培养基，轻轻吹打混匀，分装，

-20℃保存备用。

4）细胞冻存液

取900μl胎牛血清与100μl DMSO轻轻混匀，该溶液最好现用现配。

5）0.05%胰蛋白酶/EDTA消化液

先在烧杯里加超纯水150 ml左右，然后分别加入以下试剂溶解。

氯化钠 NaCl 1.6 g

碳酸氢钠 NaHCO3 0.1 g

氯化钾 KCl 0.08 g

葡萄糖 glucose 0.2 g

EDTA 0.04 g

胰蛋白酶 0.1 g

混合均匀后，用超纯水定容至200 ml，最后0.22μm滤膜过滤除菌。

6）青链霉素溶液抗菌液

先在烧杯里加PBS液80 ml左右，然后分别溶解青霉素粉剂200万单位和链霉素粉剂100万单位，最后定容至100 ml，0.22μm滤膜过滤除菌，分装于灭菌的1.5ml离心管中。-20℃保存，使用时按1%量加入。

## 2 实验方法

### 2.1 成纤维细胞的分离

转基因羔羊尾部皮肤用75%的酒精消毒处理后，取样部位刮除羊毛，75%酒精再次处理后，剪取适当大小的体积，迅速装入含双抗的D-hanks液中。用组织块培养法[172]进行原代成纤维细胞的培养。

1）剪取75%的酒精处理后的羊尾皮肤0.2 cm×0.2 cm大小块，放入含2%双抗的D-hanks缓冲液中。

2）在超净工作台上操作，D-hanks液清洗组织块4-6次。

3）将组织块用儿科剪剪成约1 mm3大小，加入300µl血清，混匀。

4）将剪好的组织块均匀排列于培养瓶中，放入37℃，5% CO2培养箱中培养。

5）待组织块稳定贴到培养瓶上（约需10 h）时，轻轻加入5 ml DMEM+10% FBS培养基继续培养。一般情况下，4-5 d后就能看到成纤维细胞贴壁生长。每天观测细胞的形态变化，每两天换一次培养基。

### 2.2 成纤维细胞的纯化

在组织块分离细胞培养法中，围绕组织块最先长出来的细胞是上皮细胞，上皮细胞外周为成纤维细胞。成纤维细胞的纯化就是根据成纤维细胞和上皮细胞对胰酶的敏感性不同和二者贴壁时间的不同（差速贴壁法）进行纯化。

1）新生细胞沿着组织块长出，此时细胞的生长速度较慢。

2）待成纤维细胞汇合度达到60％-70％时，用0.05％胰蛋白酶-EDTA在37℃条件下消化细胞3 min。加入完全DMEM培养基5 ml 终止消化，轻轻吹打细胞后，补足8 ml

完全培养基置于培养箱中培养。

3）2-3 h后，待细胞贴壁时，轻轻晃动，倒掉培养基。重新加入5 ml DMEM+10% FBS

培养基继续培养。

4）待细胞汇合度达到80%左右，胰酶消化，取3 min内消化下来的细胞继续培养。

5）2-3 h后，待细胞贴壁时，轻轻晃动，倒掉培养基。重新加入5 ml DMEM+10% FBS

培养基继续培养。

6）重复步骤4）、5）一次，如果细胞纯度仍然不够纯，可再次重复上述步骤，直至获得纯的成纤维细胞。

### 2.3 纤维细胞的培养

1）成纤维细胞的复苏

从液氮中取出冻存的成纤维细胞，置于42℃水浴锅中融化；

取一无菌15 ml离心管，加入8 ml D-Hanks液，然后将融化的细胞悬浮液加入，轻轻吹打混匀，切忌时间过长；

800 rpm离心7 min，小心丢弃上清；

加入5 ml DMEM完全培养基将细胞小心吹打混匀，然后把培养基移入培养瓶，置于37℃，5% CO2 培养箱中培养。

2）成纤维细胞的传代

细胞生长至汇合度80%需要传代时，首先用10 ml D-Hanks液轻柔洗涤细胞一次；然后加入0.05%的胰酶600μl，把培养瓶置于37℃，5% CO2培养箱中消化3 min；轻轻拍打瓶底以分散细胞，然后加入2 ml完全培养基终止消化，吹打细胞以尽可

能分散细胞；

取1/3瓶细胞转入新的培养瓶中，加入5 ml培养基轻轻将细胞吹打混匀，置于37℃，5% CO2 培养箱中培养。

3）成纤维细胞的冻存

细胞生长至汇合度80%时，用10 ml D-Hanks液轻柔洗涤细胞；

加入0.05%的胰酶600μl，把培养瓶置于37℃，5% CO2培养箱中消化3 min；轻轻拍打瓶底以分散细胞，然后加入2 ml细胞完全培养基以终止消化；

取一无菌15 ml离心管，加入8 ml D-Hanks液，然后把上述细胞悬浮液加入，轻轻吹打，混匀；

800 rpm离心7 min，小心丢弃上清；

在细胞团内加入2 ml冻存液（90%FBS + 10%DMSO混合而成），吹打细胞以尽可能分散细胞；

取0.5 ml细胞液于细胞冻存管中，放于正丁醇盒内，置于-80℃，存放24 h。然后转入液氮中，长期保存。

### 2.4 转基因成纤维细胞的药物处理实验

**成纤维细胞在同一药物浓度下作用不同的时间**

分离纯化的成纤维细胞，生长至对数生长期时，经胰酶消化，2×105 cell/孔铺于六孔板。

24 h后，细胞汇合率达到30-40%，吸弃培养基。

每孔细胞中分别加入2 ml含有终浓度40µM 5-azacytidine、40 nM TSA及二者同时作用的DMEM培养基。

放入37℃，5% CO2培养箱中，分别培养24、48、72和96 h。注意：5-azaC在37℃不稳定，易发生化学变化，每隔24 h需要更换一次含有该药物的新培养基。

在荧光显微镜下观察用药24 h、48 h和72 h的细胞荧光表达情况，并拍照。

PBS冲洗细胞两遍，胰酶消化，离心，沉淀用0.5 ml 1×PBS重悬，流式细胞术检测不同处理条件下的荧光细胞百分比。

**同一作用时间下，不同药物浓度对成纤维细胞的作用检测**

同上一实验，分离纯化的成纤维细胞，生长至对数生长期时，经胰酶消化，2×105 cell/

孔铺于六孔板。

24 h后，细胞汇合率达到30-40%，吸弃培养基。

每孔细胞中分别加入2 ml含有终浓度0、10、20、40、80µM 5-azaC和0、10、20、

40、80 nM TSA及二者共同作用的DMEM培养基。

放入37℃，5% CO2培养箱中培养48 h。注意：5-azaC在37℃不稳定，易发生化学变化，每隔24 h需要更换一次培养基。

在荧光倒置显微镜下观察不同浓度药物作用下的细胞荧光表达情况，并拍照。

胰酶消化细胞，PBS重悬后进行流式细胞术检测，分析不同药物浓度下荧光细胞数量。

### 2.5 荧光显微镜检测

在不同的培养时间和药物浓度下，荧光显微镜下直接观察细胞中荧光报告蛋白基因的表达。细胞荧光检测在本实验室尼康倒置荧光显微镜上完成，使用DIC 20×物镜观察。蓝光滤光片C-FL Epi-Fl Filter Block N B-2A (ex 450-490 nm)用于检测acGFP1(ex 475

nm)，带该基因的细胞在显微镜下显示绿色；绿光滤光片C-FL Epi-Fl Filter Block N G-2A (ex 510-560 nm)用于检测tdTomato (ex 554 nm)和zsYellow1(ex 531 nm)，这两个荧光蛋白在显微镜下均显示红色，且无法区分。

### 2.6 流式细胞术检测

细胞经荧光显微镜观察后，为了进一步从整体水平评价药物对成纤维细胞的作用， 我们对细胞进行进一步的分析-流式细胞术检测。具体操作步骤如下：

**上机样品的处理**

1）吸弃旧培养基，D-Hanks溶液清洗一遍；

2）每孔加入50μl胰酶，放入二氧化碳培养箱中；

3）约3 min后，每孔加入含有少量血清的D-Hhanks溶液中止消化；

4）轻轻吹打细胞，放入15 ml离心管中；

5）再在离心管中加入6 ml D-Hhanks溶液，轻轻颠倒混匀；

6）800 rpm，离心5 min，小心倒掉上清液。

7）加入5 ml 1×PBS重悬细胞，轻轻吹打，同上离心；

8）倒掉上清后，加入0.5 ml 1×PBS重悬细胞，混匀后，4℃保存24 h或直接上机检测。

**样品上机检测**

上机检测前，样品经200目滤网过滤，以去除未打散的细胞团或大颗粒培养物，避免流式检测时管道阻塞；

将过滤后的细胞转入流式专用上机试管，放入检测样品座上；

开启488 nm激发棒，选择收集FITC发射光信号，以检测总量10, 000个细胞为标准，未处理细胞为阴性对照，设其荧光细胞比例为2%作为参照。

### 2.7 统计分析

统计分析使用SPSS13.0软件。数据以平均值±标准误表示。

## 3 结果

### 3.1 成纤维细胞的分离和纯化

细胞的分离方法一般有酶消化法和组织块培养法。前者常用胶原酶、胰蛋白酶和

EDTA等消化液处理细胞，易破坏细胞，不易贴壁生长，甚至导致细胞死亡。另外，该方法受酶浓度、处理温度和处理时间的影响较大[173]。而组织块培养法则避免了以上缺点，尽可能地降低操作过程中对细胞的损伤，保持细胞存活力，促进细胞贴壁生长。本实验采用组织块培养法，组织贴壁5 d作用时，细胞开始沿组织周围长出。先是上皮细胞，然后是长索状的成纤维细胞在其外周长出。带生长的成纤维细胞汇合度达60%左右

时，胰酶消化细胞，经多次差速贴壁将成纤维细胞纯化出来。纯化的成纤维细胞生长3-4

d，汇合度达到80%左右时，消化传代。如图16所示，传代的细胞生长48 h在倒置显微镜下的观察情况：明视野下，成纤维细胞形态正常，生长旺盛，成典型的梭型。但在绿色和蓝色滤光片视野下，没有观察到红色和绿色荧光细胞，这与紫外灯直接检测转基因羊可视粘膜和皮肤的结果相一致。



图16转基因羊成纤维细胞的分离**。**左：#6成纤维细胞；中：#7成纤维细胞；右：非转基因羊成纤维细胞。

Fig 16 Fibroblasts isolated from transgenic lambs. Left: fibrolblasts of

#6; middle: fibroblasts of #7; right: fibroblasts of non-transgenic sheep.

### 3.2 TSA和5-azaC对成纤维细胞表观状态的影响

如图17＆18所示，分离的成纤维细胞经组蛋白去乙酰化酶抑制剂和DNA甲基转移酶抑制剂作用。荧光显微镜观察发现：转基因羊成纤维细胞中有荧光细胞出现图，但在非转基因羊成纤维细胞中，未发现荧光细胞。以上结果表明，转基因羊成纤维细胞经组蛋白去乙酰化酶抑制剂和DNA甲基转移酶抑制剂作用后，荧光报告基因的表达被激活。

### 3.3 流式细胞术检测结果

#6转基因羊成纤维细胞经80 nM TSA、80μM 5-azaC及二者同时作用48 h后，荧光显微镜观察均可看到荧光细胞，但在空白对照和DMSO对照组中，没有看到荧光细胞（图18）。当TSA与5-azaC共同作用时，可观察到的荧光细胞数显著多于TSA、5-azaC单独作用时的荧光细胞数。



图17 #6转基因羊成纤维细胞在荧光显微镜下的部分观察结果。细胞分别与5-azaC、TSA和5-azaC/TSA共孵育48 h的观察结果。未处理细胞（PC）和DMSO处理的细胞作为对照。上排图片为在显微镜蓝色滤光片下看到的成纤维细胞，中排：tdtomato和zsYellow1，绿色滤光片下看到的细胞；下排：明视野下观察到的细胞。纵排图片均为在同一视野下观察到的结果。物镜为DIC 20×。

Fig 17 Partial images of fibroblast cells of #6 under fluorescent microscope. Cells were visualized under fluorescent microscope after treatment with 5-azaC, TSA and 5-azaC/TSA together. Parental cells (PC) and DMSO treated cells were set as control. The upper panel (GFP) is the cells visualized with blue filter. The middle panel (Tomato/Yellow) is the cells visualized with green filter. The lower panel is the cells visualized under bright field. All images were taken under the objective 20×.

图18显示，#7转基因羊成纤维细胞经80 nM TSA、80μM 5-azaC及二者同时作用48 h后，荧光显微镜观察均可看到荧光细胞，但细胞数明显少于相同药物浓度下#6中的荧光细胞数；与#6观察的结果相似，在空白对照和DMSO对照组细胞中，仍然没有看到荧光细胞。从图中可以看出，TSA与5-azaC共同作用时，可观察到的荧光细胞数也多于TSA、5-azaC单独作用时的荧光细胞数。但80 nM TSA、80μM 5-azaC及二者同时作用时，荧光细胞数均不如相同浓度下#6荧光细胞数多。

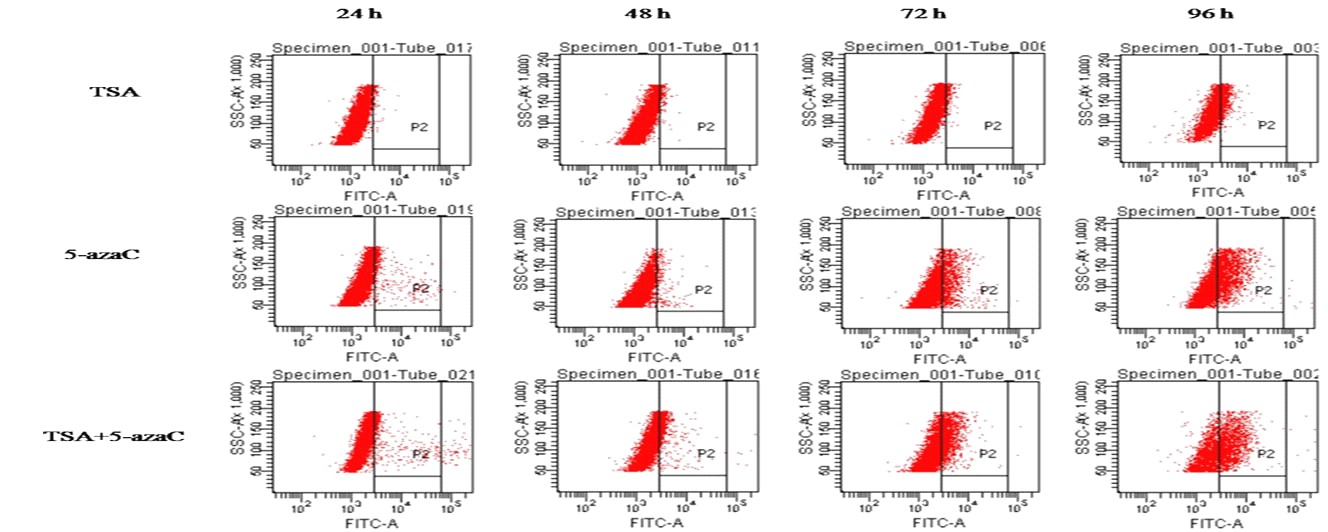


图18 #7转基因羊成纤维细胞在荧光显微镜下的部分检测结果。细胞的处理方式与#6羊细胞相同。

Fig 3 Partial images of fluorescent cells of #7 under microscope. Cells were treated and visualized the same as that of #6. Cells were visualized under fluorescent microscope after treatment with 5-azaC, TSA and 5-azaC/TSA together. Parental cells (PC) and DMSO treated cells were set as control. The upper panel (GFP) is the cells visualized with blue filter. The middle panel (Tomato/Yellow) is the cells visualized with green filter. The lower panel is the cells visualized under bright field. All images were taken under the objective 20×.

图19 显示＃6羊成纤维细胞在40 nM TSA、40μM 5-azaC及二者共同作用24 h、48

h、72 h和96 h的流式细胞检测结果。该结果表明，随着药物作用时间的延长，荧光细胞数量百分比增大，这与倒置荧光显微镜观察结果相一致。24 h时，TSA和5-azaC作用下的细胞在显微镜下几乎看不到荧光细胞，流式结果也显示此时荧光细胞的比例很低；48 h时，除TSA单独作用时仍看不到荧光细胞，5-azaC及TSA+5-azaC作用的细胞中均可看到较多的荧光细胞，此时细胞形态基本正常；72 h时，TSA作用的细胞可见较多的荧光细胞，溶液中悬浮的死亡细胞也较少，5-azaC及两者共同作用的细胞荧光数更多，但死亡的细胞增加；96 h时，各药物浓度下均可看到较多的荧光细胞，尤其在二者共同作用时，死亡细胞也较多。以上结果表明，随着药物作用时间的延长，荧光细胞数逐渐增多，百分比增加，其中TSA增长最慢，5-azaC居中，二者共同作用时增长最快。



A

但从72 h向后，死亡细胞开始增多。72 h时，TSA与5-azaC共同作用时荧光细胞数较多，细胞形态正常，显示此孵育时间较佳。

B



图19 ＃6成纤维细胞在不同作用时间下的流式细胞术检测结果。A从左到右：TSA 40

nM、5-azaC 40μM及TSA+5-azaC分别作用细胞24 h、48 h、72 h和96 h. 上排：作用药物为40 nM TSA；中排：40μM 5-azaC；下排：40 nM TSA+ 40μM 5-azaC. 激发波长为FITC 488

nM. B对A流式细胞术检测结果的定量。

Fig 19 FACS analyze of the fibroblasts＃6 in different time with different treatment. A **f**rom left to right: TSA 40 nM, 5-azaC 40μM, TSA+5-azaC incubation with the fibroblasts for 24 h, 48 h, 72 h and 96 h, respectively. Upper panel: 40 nM TSA; middle panel: 40μM 5-azaC; lower panel: 40 nM TSA+ 40μM 5-azaC. The length of the excited light was FITC 488 nm. B quantization of the GFP+ cells analyzed by FACS.

图20 结果表明，＃6羊成纤维细胞在不同浓度TSA、5-azaC及二者共同作用下48 h

时荧光细胞百分比情况。在相同的作用时间下，药物浓度越高，荧光细胞数越多，显示报告基因表达对药物浓度有一定的依赖性；另一方面也表明，细胞的表观遗传状态与药物浓度呈一定的相关性。



A

B



图20＃6成纤维细胞在不同药物浓度下作用48 h的流式细胞术检测结果。**A**从左到右，上排：TSA药物浓度分别为10、20、40、80 nM；中排：5-azaC浓度分别为10、20、

40、80μM；下排：TSA+5-azaC共同作用的浓度分别为10+10、20+20、40+40、80+80(nM

+μM）。B对流式细胞术检测结果的定量。1，2，3，4分别代表A中从左向右四列图。

Fig 20 FACS results of＃6 fibroblasts at different concentration for 48 h. A from left to right, upper panel: the concentration of TSA was 10, 20, 40, 80 nM; middle panel: the concentration of 5-azaC was 10, 20, 40, 80μM; lower panel: the concentration of TSA+5-azaC was 10+10, 20+20, 40+40, 80+80 (nM+μM). B quantization of the GFP+ cells analyzed by FACS. 1,2,3,4 denote figures from left to right in A.

从图21可以看出，＃7羊成纤维细胞在TSA 40 nM、5-azaC 40μM及TSA+5-azaC

作用不同时间后，荧光细胞百分比随着作用时间的增加在逐渐增大。尽管在不同作用时

间下，其荧光细胞百分比与＃6羊相差较多，但药物作用时间与荧光细胞百分比的关系与在＃6中的表现是一致的。

A





B

图 21 ＃7成纤维细胞在不同作用时间下的流式细胞术检测结果。A从左到右：TSA 40

nM、5-azaC 40μM及TSA+5-azaC分别作用细胞24 h、48 h、72 h和96 h. 上排：作用药物为40 nM TSA；中排：40μM 5-azaC；下排：40 nM TSA+ 40μM 5-azaC. 激发波长为FITC 488 nM. B对流式细胞术检测结果的定量。

Fig 21 FACS analyze of the fibroblasts＃7 in different time with different treatment. From left to right: TSA 40 nM, 5-azaC 40μM, TSA+5-azaC incubation with the fibroblasts for 24 h, 48 h, 72 h and 96 h, respectively. Upper panel: 40 nM TSA; middle panel: 40μM 5-azaC; lower panel: 40 nM TSA+ 40μM 5-azaC. The length of the excited light was FITC 488 nm. B quantitation of the GFP+ cells analyzed by FACS.

图22结果表明，＃7成纤维细胞在不同药物浓度下作用48 h的荧光细胞数。荧光细胞百分比随药物浓度的增加而增大。与图21结果相似的是，药物浓度与荧光细胞数

虽呈一定的相关性，但总的荧光细胞数依然不如相同浓度下＃6中的荧光细胞数。



A

B



图22＃7成纤维细胞在不同药物浓度下作用48 h的流式细胞术检测结果。**A**从左到右，上排：TSA药物浓度分别为10、20、40、80 nM；中排：5-azaC浓度分别为

10、20、40、80μM；下排：TSA+5-azaC 共同作用的浓度分别为 10+10、20+20、40+40、

80+80(nM +μM)。B对流式细胞术检测结果的定量。1，2，3，4分别代表A中从左向右四列图。

Fig 22 FACS results of＃7 fibroblasts at different concentration for 48 h. A from left to right, upper panel: the concentration of TSA was 10, 20, 40, 80 nM; middle panel: the concentration of 5-azaC was 10, 20, 40, 80μM; lower panel: the concentration of TSA+5-azaC was 10+10, 20+20, 40+40, 80+80 (nM+μM). B quantitation of the GFP+ cells analyzed by FACS. 1,2,3,4 denote figures from left to right in A.

## 4 讨论

### 4.1 转基因表达的影响因素

许多研究表明，在转基因动物表观遗传修饰过程中，慢病毒载体易于导致转基因沉默。如病毒载体上的各元件、载体在宿主基因组内的整合位点及载体在基因组中整合的copy number等均会影响转基因表达。

**载体结构元件**

人巨病毒(CMV)极早期启动子/增强子是一个体外强大的启动子，在许多哺乳动物细胞系中广泛用于驱动表达。例如，在培养的人肌细胞中，CMV驱动的人心肌利阿诺定受体（cardiac ryanodine receptor, RyR）功能蛋白的表达。在转基因兔中，CMV驱动靶定基因EGFP-hRyR, RyR蛋白表达在心肌和非心肌组织中均未检测到。研究表明，

CMV驱动的标记基因在转基因小鼠和转基因猪[147]不同组织中广泛表达。CMV启动子在转基因小鼠神经、睾丸和其他组织中是有活性的。随着转基因研究逐渐增多，在转基因动物中，CMV启动子表达表现组织依赖性。转基因仅在睾丸中表达，或者主要在胰脏中表达。转基因牛中，CMV活性在心脏、肝脏、脾脏、肺、肾、皮肤和肌肉中没有检测到活性[149]。CMV驱动的报告基因在不同组织中差异显著，在心脏、胃和脾脏中表达水平最高。有时，CMV启动子在机体内不是广泛存在的，其驱动的基因在转基因动物中会发生沉默[149]。大鼠肌肉组织中CMV-PE 序列中CG和非CG位点在注射病毒24

h后均检测到甲基化，截止第7 d，甲基化水平一直呈持续升高。甲基化有效地阻断了启动子在鱼胚和转染细胞中的活性[174]。

靶定细胞中的病毒LTRs与靶定细胞或整合病毒和侧翼宿主细胞DNA序列中CpG

位点甲基化的反式作用因子结合可以调节基因沉默。LTRs甲基化可以引起人HIV-1

LTRs病毒沉默，并进一步影响病毒潜伏期[140]。**位置效应**

位置效应是指转基因整合在特异染色体区域引起的特异的转基因表达[175]。位置作用中，序列在转基因染色体中的插入位置可以影响转基因的表达，以正调节或负调节的方式进行。当插入位点在异染色质附近如端粒和着丝粒区域时，转基因活性变得不稳定， 导致表达水平发生变异，即出现嵌合体或variegation。在基因组DNA序列中，转基因表达良好的插入位置，当换成另一转基因的时候，该转基因也能很好地表达，如小鼠

ROSA26位点[176]。控制这种作用的现象更加复杂，转基因与基因组DNA序列的微妙关系看起来可以影响转基因表达。因此，位置效应（PEV）经常是影响细胞系中转基因稳定表达的一个障碍，在转基因动物中也存在相似的问题。这也揭示了PEV是从异染色质到邻近转基因序列扩散，形成致密染色质，进而影响转基因表达，这一过程被染色质重修饰调节[107]。Mehta等的研究表明，整合入小鼠非活性区域的转基因易导致转基因沉

默，而整合入基因间则不会影响转基因的表达[177]。**染色质绝缘序列**

慢病毒调节的基因转移、利用位点特异核酸酶表达载体的目标整合、工程细胞系中重组酶介导的靶基因的整合，使用携带染色质开放元件或者矩形附件区域等可以避免转基因沉默。如果慢病毒载体整合入染色体的转录灭活区，转基因表达也将会被周围的染色质抑制。另外，表观遗传位置效应也会影响转基因表达水平[107]。上述绝缘序列的插入可以使外源载体中的增强子和启动子免于被临近染色质激活或沉默[178]。因此，整合入慢病毒载体中的染色质绝缘序列可以提高转基因表达效率。鸡超敏位点-4 (cHS4)绝缘子已被用于提高载体转基因表达[179, 180]，但一些研究表明这种元件的修饰作用非常有限

[181]. 相似的研究，还有用于抑制载体沉默的元件是增强作用较少的染色质广泛开放元

件(UCOEs)。研究表明，在造血干细胞中，人HNRPA2B1-CBX3 UCOE (A2UCOE)元件高度可复制性和稳定转基因表达，可以阻断慢病毒载体中由于DNA甲基化调节引起的基因基因沉默[113]。本实验中使用的pLEX-MCS载体属于商品化载体，使用时除了在

MCS处插入目标序列，并没有加入上述提到的绝缘序列。

综上所述，转基因表达受多种因素的影响，本实验仅分析了DNA甲基化对转基因沉默的作用。因此，位置效应及转移载体中其它元件对转基因沉默的作用有待进一步研究。

### 4.2 DNA甲基化转移酶抑制剂-5-azaC

5-氮杂胞嘧啶核苷5-azaC及其脱氧类似物5-氮杂脱氧胞嘧啶核苷（5-azadC）均是有效的DNA甲基转移酶抑制剂。5-azaC对基因表达、基因激活和沉默具有重要的调节机制。5-azaC可以整合入DNA和RNA，引起DNA、RNA和蛋白质合成的复杂抑制作用[170]，5-azadC则可以整合入S期的DNA，随后仅仅抑制DNA甲基化，但对于细胞核动物来说，其毒性约为5-azaC的十倍。在体细胞核移植前，用甲基化转移酶抑制剂5-aza-dC处理供体细胞，可以改变细胞的特性，但不能改善细胞的体内、外发育[73, 89]。

5-azaC最早用于治疗慢性髓性白血病。早期研究表明，5-azaC是一种染色体断裂和突变诱导剂。由于该药物在三磷酸核苷作用下，可以整合入DNA和RNA，抑制治疗细胞的

DNA、RNA和蛋白质合成。当5-azaC与tRNA融合时，抑制tRNA甲基转移酶，干扰

tRNA甲基化及其合成，导致缺陷性受体功能出现。由于甲基化在核糖体RNA(rRNA)

中起着重要作用，5-azaC 在RNA功能和稳定上的整合作用与其对蛋白合成的作用相似。

A. Hofmann等用5-azaC对猪分离的成纤维进行研究表明，5-azaC具有明显去甲基化作用[97, 104]。本实验中, 5-azaC也可以激活转基因羊成纤维细胞中报告基因的表达。实验结果表明5-azaC浓度越大，作用时间越长，荧光细胞数越多；对细胞表观遗传状态的改善能力优于TSA，这可能与5-azaC同时作用DNA和RNA有关。

### 4.3 去乙酰化酶抑制剂-TSA

丁酸钠[182, 183]、TSA[87]、scriptaid[184]、丙戊酸[87]等是常见的去乙酰化酶抑制剂

（HDACi），可以通过抑制去乙酰化酶的活性来提高组蛋白的乙酰化程度。TSA诱导核心组蛋白高乙酰化，致使染色质结构改变，使转录因子更易于与DNA序列结合，以促进外源基因的表达。HDACi 可以改善克隆效率，这可能与随着组蛋白乙酰化水平升高，刺激新生mRNA合成的能力增强有关[73]。组蛋白乙酰化通常发生在活性染色质区域，参与调节移植胚胎的发育转录[185]。如TSA可以明显改善小鼠繁殖克隆效率[94]，提高成年公鼠和母鼠远交群的克隆成功率[94]。尽管TSA可以很大程度上促进小鼠体细胞克隆效率及猪、牛和兔子的胚胎移植发育，但其对克隆效率的作用仍存在争议。因为TSA处理对SCNT胚胎的体外发育存在不利作用。如TSA处理的兔子胚胎，其后代在存活19 d时死亡，而未处理组的四只兔子均长到成年，其中三只产下了自己的后代[186]。50

ng/mL的TSA处理可以明显降低牛囊胚发育率(9.9 vs 20%)[95]. TSA处理的细胞24 h后体积增大，立体感降低，轮廓模糊，但核型没有发生变化[187]。相对于未处理组细胞， 处于S期的细胞数减少，G1/G2/M期细胞数增加[187]。TSA处理有助于猪、牛克隆胚胎发育到囊胚阶段，及提高小鼠的生仔数量[94]，但对正常融合的胚胎没有作用[73]。另外，

TSA致畸性众所周知，当TSA浓度过高或作用时间过长，可以明显降低正常胚胎的发育和克隆成功率，甚至出现严重的胎儿巨大现象[73,94]。TSA可以促进转基因猪成纤维细胞中转基因的表达[104]。本实验中，TSA（10、20、40和80 nM）作用的细胞在高浓度时，培养基中细胞有少量漂起；40 nM处理72 h以上时，细胞死亡较多，这可能与其细胞毒性相关。转基因成纤维细胞中，随着药物浓度的增大和作用时间的延长，荧光细胞数在增多，尽管效果逊于5-azaC。

### 4.4 流式细胞术检测

流式细胞术（Flow Cytometry, FCM）是一种可以对细胞或亚细胞结构进行快速测量的新型分析技术和分选技术。具有明显的优点，如测量速度快，可在1 s内计测数万个细胞；可进行多参数测量，可以对同一个细胞做有关物理、化学特性的多参数测量。流式细胞术是一门综合性的高科技方法，它综合了激光技术、计算机技术、流体力学、细胞化学、图像技术等从多领域的知识和成果；既是细胞分析技术，又是精确的分选技术。 本实验中，我们对GFP+荧光细胞进行了分析，更精确地验证了TSA和5-azaC对细胞表观遗传修饰的调节。图19-22表明，不同药物浓度和作用时间下，荧光细胞所占的百分比不同。药物浓度越高，孵育时间越长，可检测到的荧光细胞比例越大，荧光细胞百分比与药物浓度和作用时间呈正相关。虽然＃7成纤维细胞中的荧光细胞比率，与相同药物浓度和作用时间下的＃6荧光细胞相比，显著较低。但在＃7成纤维细胞中，荧光细胞的百分比随药物浓度和作用时间的增加而增多，呈现正相关性。我们推测之所以出现

以上情况，可能与转基因羊本身的某些特性有关，致使分离得到的成纤维细胞对作用药物的敏感性不同。

# 第六章 小结、创新点、展望

## 1 小结

1). 设计合成了2A-linker片段。设计的2A-linker大小为102 bp。

2). 以2A-linker为连接子，构建了通用型三荧光蛋白共表达慢病毒载 体

pLEX-tdT．omato-zsY．ellow1-acG．FP1（pLEX-2A-TYG）。

3）. 利用该载体转染293T细胞和CHO细胞，结果表明2A肽介导的荧光报告基因

tdTomato、zsYellow1和acGFP1均在细胞中独立地高效表达。

4）. 将pLEX-2A-TYG质粒与包膜质粒*p*MD2. G和包装质粒*p*SPAX2共转染293T细胞，获得了重组慢病毒颗粒，病毒滴度为3×109 IU/ml。

5）. 利用重组慢病毒卵周隙注射获得可移植转基因胚胎37枚，出生羔羊7只，其中

2只（#6和#7）经PCR检测为阳性转基因羊。转基因羊阳性率在新生羔羊和胚胎中分别为28.6%和5.41%。

6）. 7只羔羊经紫外灯直接检测，在小羊的耳部、头部、唇部、蹄部等部位，均未检测到荧光。对转基因羊尾部皮肤进行了Western blotting及mRNA检测，也均未检测到荧光蛋白的相应表达。

7）. BSP法分析转基因羊尾部基因组DNA甲基化水平。结果显示，多基因编码区显示超甲基化。#6羊中，tdTomato甲基化水平为97.5%±0.03%，zsYellow1为98.1±0.02%，

acGFP1为99.2±0.02%；#7羊中tdTomato、zsYellow1和acGFP1分别为97.6±0.02% 、

99.5±0.02%和99.6±0.01%。以上表明，超甲基化很可能导致了多荧光蛋白基因在转基因羊中的沉默。

8）. 分离2只转基因阳性（#6和#7）和1只阴性羔羊的尾部皮肤成纤维细胞，荧光倒置显微镜下未观测到荧光细胞。阳性和阴性羔羊成纤维细胞在明视野下未见明显差别。

9）. 利用甲基转移酶抑制剂和去乙酰化酶抑制剂处理分离的成纤维细胞，荧光显微镜观察和流式细胞术分析表明，荧光细胞的百分比与药物浓度和作用时间呈一定的正相关。以上结果显示，成纤维细胞中报告基因的表达与DNA甲基化和组蛋白去乙酰化存在明显关联。当5-azaC与TSA共同作用时，荧光细胞百分比显著高于5-azaC与TSA单独作用。这表明5-azaC与TSA存在一定的协同作用，也从侧面反映了DNA甲基化与组蛋白乙酰化之间是相互作用的。

## 2 创新点

1）. 首次生产了两只三荧光蛋白基因tdTomato、zsYellow1和acGFP1共表达转基因绵羊，为多基因共表达转基因家畜的生产提供了转基因新材料。

2）. 首次对多基因共表达转基因羊内载体启动子和各荧光蛋白基因甲基化水平进行了检测，为以后多基因共表达转基因表观研究提供了数据资料。

3）. 首次对多基因共表达转基因羊成纤维细胞进行了甲基转移酶抑制剂和去乙酰化酶抑制剂处理，初步验证了表观遗传状态与转基因表达的相关性。

## 3 展望

1）. 我们下一步将对转基因羊乙酰化水平进行分析，探索转基因羊内DNA甲基化与组蛋白乙酰化之间的关系。以期获得更多的与表观遗传状态相关的研究数据，为以后的相关研究打下基础。

2）. 鉴于位置效应对转基因表达的重要影响，我们下一步将研究多基因载体在转基因羊基因组中的插入位置，以期对DNA甲基化、位置效应和转基因表达之间的相互关系研究提供更多的数据。

参考文献

[1] J. J. Kerrigan, Q. Xie, R. S. Ames, Q. A. Lu, Production of protein complexes via co-expression, Protein Expression and Purification 75 (2011) 1-14.

[2] A. L. Szymczak-Workman, K. M. Vignali, D. A. A. Vignali, Design and Construction of 2A Peptide-Linked Multicistronic Vectors, Cold Spring Harb Protoc (2012) 199-204.

[3] A. L. Szymczak, D. A. Vignali, Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors expert opin. biol. ther. 5 (2005) 627-638.

[4] G. A. Luke, P. de Felipe, A. Lukashev, S. E. Kallioinen, E. A. Bruno, M. D. Ryan, Occurrence, function and evolutionary origins of" 2A-like" sequences in virus genomes, Journal of General Virology 89 (2008) 1036-1042.

[5] P. de Felipe, G. A. Luke, L. E. Hughes, D. Gani, C. Halpin, M. D. Ryan, *E unum pluribus*: multiple proteins from a self-processing polyprotein, Trends in biotechnology 24 (2006) 68-75.

[6] M. D. Ryan, A. King, M., G. P. Thomas, Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence, J Gen Virol 72 (1991) 2727-7273.

[7] M. L. L. Donnelly, G. David, M. Flint, S. Monaghan, M. D. Ryan, The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins, Journal of General Virology 78 (1997) 13-21.

[8] H. Hahn, A. C. Palmenberg, Mutational analysis of the encephalomyocarditis virus primary cleavage Journal of Virology 70 (1996) 6870-6875.

[9] M. L. Donnelly, L. E. Hughes, G. Luke, H. Mendoza, E. Dam, D. Gani, M. D. Ryan, The" cleavage" activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring'2A-like'sequences, J Gen Virol 82 (2001) 1027-1041.

[10] H. Isawa, R. Kuwata, K. Hoshino, Y. Tsuda, K. Sakai, S. Watanabe, M. Nishimura, T. Satho, M. Kataoka, N. Nagata, H. Hasegawa, H. Bando, K. Yano, T. Sasaki, M. Kobayashi, T. Mizutani, K. Sawabe, Identification and molecular characterization of a new nonsegmented double-stranded RNA virus isolated from Culex mosquitoes in Japan, Virus Research 155 (2011) 147-155.

[11] G. A. Luke, P. de Felipe, A. Lukashev, S. E. Kallioinen, E. A. Bruno, M. D. Ryan, The Occurrence, Function, and Evolutionary Origins of" 2A-like" Sequences in Virus Genomes, Journal of General Virology 89 (2008) 1036-1042.

[12] S. R. Heras, M. C. Thomas, M. García-Canadas, P. de Felipe, J. L. García-Perez, M. D. Ryan, M. C. Lopez, L1Tc non-LTR retrotransposons from Trypanosoma cruzi contain a functional viral-like self-cleaving 2A sequence in frame with the active proteins they encode, Cellular and Molecular Life Sciences 63 (2006) 1449-1460.

[13] J. D. Brown, M. D. Ryan, Ribosome" Skipping": “Stop-Carry On" or" StopGo" Translation. In: Recoding: Expansion of Decoding Rules Enriches Gene Expression, Eds 5 (2010) 101-122.

[14] W. Tang, I. Ehrlich, S. B. Wolff, A. M. Michalski, S. Wölfl, M. T. Hasan, A. Lüthi, R. Sprengel, Faithful expression of multiple proteins via 2A-peptide self-processing: a versatile and reliable method for manipulating brain circuits, J Neurosci 29 (2009) 8621-8629.

[15] S. Yang, C. J. Cohen, P. D. Peng, Y. Zhao, L. Cassard, Z. Yu, Z. Zheng, S. Jones, N. P. Restifo, S. A. Rosenberg, R. A. Morgan, Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition, Gene Ther 15 (2008) 1411-1423.

[16] P. de Felipe, Skipping the co-expression problem: the new 2A" CHYSEL" technology, Genetic Vaccines and Therapy 2 (2004) 1-7.

[17] V. A. Doronina, P. de Felipe, C. Wu, P. Sharma, M. S. Sachs, M. D. Ryan, J. D. Brown, Dissection of a co-translational nascent chain separation event, Biochemical Society Transactions 36 (2008) 712-716.

[18] C. W. Chang, Y. S. Lai, K. M. Pawlik, K. Liu, C. W. Sun, C. Li, T. R. Schoeb, T. M. Townes, Polycistronic lentiviral vector for" hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells, Stem Cells 27 (2009) 1042-1049.

[19] A. L. Szymczak, C. J. Workman, Y. Wang, K. M. Vignali, S. Dilioglou, E. F. Vanin, D. A. Vignali, Correction of multi-gene deficiency *invivo* using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector, Nature biotechnology 22 (2004) 589-594.

[20] M. L. L. Donnelly, G. Luke, A. Mehrotra, X. J. Li, L. E. Hughes, D. Gani, M. D. Ryan, Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip', Journal of General Virology 82 (2001) 1013-1025.

[21] M. D. Ryan, J. Drew, Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein, EMBO J 13 (1994) 928-933.

[22] d. F. Pablo, A. L. Garry, D. B. Jeremy, D. R. Martin, Inhibition of 2A-mediated'cleavage'of certain artificial polyproteins bearing N-terminal signal sequences, Biotechnol. J. 5 (2010) 213-243.

[23] P. de Felipe, M. D. Ryan, Targeting of proteins derived from self-processing polyproteins containing multiple signal sequences, Traffic 5 (2004) 616-626.

[24] J. B. Lorens, D. M. Pearsall, S. E. Swift, B. Peelle, R. Armstrong, S. D. Demo, D. A. Ferrick, Y. Hitoshi, D. G. Payan, D. Anderson, Stable, stoichiometric delivery of diverse protein functions, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 58 (2004) 101-110.

[25] G. A. Luke, Translating 2A Research Into Practice, Innovations in Biotechnology (2011) 161-186.

[26] G. Trichas, J. Begbie, S. Srinivas, Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice, BMC Biol 6 (2008) 1-13.

[27] D. Chinnasamy, M. D. Milsom, J. Shaffer, J. Neuenfeldt, A. F. Shaaban, G. P. Margison, L. J. Fairbairn, N. Chinnasamy, Multicistronic lentiviral vectors containing the FMDV 2A cleavage factor demonstrate robust expression of encoded genes at limiting MOI, Virol J 3 (2006) 1-16.

[28] D. G. Rothwell, R. Crossley, J. S. Bridgeman, V. Sheard, Y. Zhang, T. V. Sharp, R. E. Hawkins, D. E. Gilham, T. R. McKay, Functional expression of secreted proteins from a bicistronic retroviral cassette based on FMDV 2A can be position-dependent, Human Gene Therapy 21 (2010) 1631-1637.

[29] J. Yan, H. J. Wang, Q. Xu, N. Jain, V. Toxavidis, J. Tigges, H. Yang, G. H. Yue, W. D. Gao, Signal sequence is still required in genes downstream of" autocleaving" 2A peptide for secretary or membrane-anchored expression, Analytical Biochemistry 399 (2010) 144-146.

[30] N. M. Mattion, E. C. Harnish, J. C. Crowley, e. al., Foot and mouth disease virus 2A protease mediates cleavage in attenuated sabin 3 poliovirus vectors engineered for delivery of foreign antigens, J. Virol 70 (1996) 8124-8127.

[31] J. M. Fang, J. J. Qian, S. L. Yi, T. C. Harding, G. H. Tu, M. VanRoey, K. Jooss, Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide, nature biotechnology 23 (2005) 584-590.

[32] J. H. Kim, S. R. Lee, L. H. Li, H. J. Park, J. H. Park, e. al, High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice, PLoS ONE 6 (2011) e18556.

[33] M. F. Ypma-Wong, D. J. Filmann, J. M. Hoglell, B. L. Semler, Structural Domains of the Poliovirus Polyprotein Are Major Determinants for Proteolytic Cleavage at Gln-Gly Pairs, the journal of biological chemistry 263 (1998) 17846-17856.

[34] B. V. M. H. Groot, P. J. Rottier, J. J. Meulenberg, Expression of a foreign epitope by porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Virology 278 (2000) 380-389.

[35] E. l. A. Abdelhak, B. Abdellah, M. A. Barak, X. J. Li, G. R. Alison, M. D. Ryan, C. Halpin, Coordinate Expression and Independent Subcellular Targeting of Multiple Proteins from a Single Transgene, Plant Physiol 135 (2004) 16-24.

[36] H. Klump, B. Schiedlmeier, B. Vogt, M. Ryan, W. Ostertag, B. C., Retroviral vector-mediated expression of HoxB4 in hematopoietic cells using a novel coexpression strategy, Gene Therapy 8 (2001) 811-817.

[37] S. Furler, J. C. Paterna, M. Weibel, H. Büeler, Recombinant AAV vectors containing the foot and mouth disease virus 2A sequence confer efficient bicistronic gene expression in cultured cells and rat substantia nigra neurons, Gene Ther 8 (2001) 864-873.

[38] J. Fang, S. Yi, A. Simmons, G. Tu, M. Nguyen, T. C. Harding, M. VanRoey, K. Jooss, An Antibody Delivery System for Regulated Expression of Therapeutic Levels of Monoclonal Antibodies In Vivo Molecular Therapy 15 (2007) 1153-1159.

[39] I. E. J. A. François, W. van Hemelrijck, A. M. Aerts, P. F. J. Wouters, P. Proost, W. F. Broekaert, B. P. A. Cammue, Processing in Arabidopsis thaliana of a heterologous polyprotein resulting in differential targeting of the individual plant defensins, Plant Science (2004) 113-121.

[40] N. Percy, W. S. Barclay, A. García-Sastre, P. Palese, Expression of a foreign protein by influenza A virus, Journal of virology 68 (1994) 4486-4492.

[41] M. J. Osborn, A. P. Mortari, R. T. McElmurry, S. K. Bell, D. A. A. Vignali, M. D. Ryan, A. C. Wilber, R. Scott McIvor, J. Tolar, B. R. Blazar, A Picornaviral 2A-Like Sequence-Based Tricistronic Vector Allowing for High-Level Therapeutic Gene Expression Coupled to a Dual-Reporter System, moleculer therapy 12 (2005) 569-574.

[42] J. D. Verrier, I. Madorsky, W. E. Coggin, M. Geesey, M. Hochman, E. Walling, D. Daroszewski, K. S. Eccles,

R. Ludlow, S. L. Semple-Rowland, Bicistronic lentiviruses containing a viral 2A cleavage sequence reliably

Co-express two proteins and restore vision to an animal model of LCA1, PLOS one 6 (2011) e20553.

[43] D. P. Hart, X. S-A., S. Thomas, M. Cesco-Gaspere, A. Tranter, B. Willcox, S. P. Lee, N. Steven, E. C. Morris, H. J. Stauss, Retroviral transfer of a dominant TCR prevents surface expression of a large proportion of the endogenous TCR repertoire in human T cells, Gene Therapy 15 (2008) 625-631.

[44] P. F. Robbins, Y. F. Li, M. El-Gamil, Y. Zhao, J. A. Wargo, e. a.. Single and Dual Amino Acid Substitutions in TCR CDRs Can Enhance Antigen-Specific T Cell Functions, The Journal of Immunology 180 (2008) 6116-6131.

[45] M. Li, Y. M. Wu, Y. H. Qiu, Z. Y. Yao, S. L. Liu, Y. X. Liu, J. Shi, D. X. Zheng, 2A Peptide-based, Lentivirus-mediated Anti-death Receptor 5 Chimeric Antibody Expression Prevents Tumor Growth in Nude Mice, Mol Ther 20 (2012) 46-53.

[46] K. Okita, H. Hong, K. Takahashi, S. Yamanaka, Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors, Nature Protocols 5 (2010) 418-428.

[47] C. A. Sommer, M. Stadtfeld, G. J. Murphy, K. Hochedlinger, K. N., M. Mostoslavsky, Induced Pluripotent Stem Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette, stem cells 27 (2009) 543-549.

[48] B. W. Carey, S. Markoulaki, J. Hanna, K. Saha, Q. Gao, M. Mitalipova, R. Jaenisch, Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector, Proc Natl Acad Sci U S A 106 (2009) 157-162.

[49] S. Y. Gao, M. M. Jack, C. O'Neill, Towards Optimising the Production of and Expression from Polycistronic Vectors in Embryonic Stem Cells, plos one 7 (2012) e48668.

[50] K. C. Liu, H. Wang, Y. Long, J. Ye, L. Yuan, Coordinate Lentiviral Expression of Cre Recombi nase and RFP/EGFP Mediated by FMDV 2A and Analysis of Cre Activity, Journal o f Cellular Biochemistry 113 (2012) 2909-2919.

[51] E. Provost, J. Rhee, S. D. Leach, Viral 2A Peptides Allow Expression of Multiple Proteins From a Single ORF in Transgenic Zebrafish Embryos, Genesis 45 (2007) 625-629.

[52] C. M. Akitake, M. Macurak, M. E. Halpern, M. G. Goll, Transgenerational analysis of transcriptional silencing in zebrafish, Developmental Biology 352 (2011) 191-201.

[53] J. F. P. Anthony, P. J. Cowan, Gene-modified pigs, Xenotransplantation 15 (2008) 87-90.

[54] W. Deng, D. Yang, B. Zhao, Z. Ouyang, J. Song, N. Fan, Z. Liu, Y. Zhao, Q. Wu, B. Nashun, J. Tang, Z. Wu,., W. Gu, L. Lai, Use of the 2A Peptide for Generation of Multi-Transgenic Pigs through a Single Round of Nuclear Transfer, PLoS One 6 (2011) e19986.

[55] P. de Felipe, Polycistronic viral vectors., Curr. Gene Ther. 2 (2002) 355-378.

[56] V. Douin, e. al., Use and comparison of different internal ribosomal entry sites (IRES) in tricistronic retroviral vectors, BMC Biotechnol. 4 (2004) 1-3.

[57] A. A. Komar, M. Hatzoglou, Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence, Journal of Biological Chemistry 280 (2005) 23425-23428.

[58] C. Halpin, C. E. Cooke, A. Barakate, A. E. I. Amrani, M. D. Ryan, Self-processing 2A-polyproteins - a system for co-ordinate expression of multiple proteins in transgenic plants, The Plant Journal 17 (1999) 453-459.

[59] R. Pawliuk, K. A. Westerman, M. E. Fabry, E. Payen, R. Tighe, E. E. Bouhassira, S. A. Acharya, J. Ellis, I. M. London, C. J. Eaves, e. al., Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy, Science 294 (2001) 2368-2371.

[60] X. Yu, X. Zhan, J. DCosta, V. M. Tanavde, Z. Ye, T. Peng, M. T. Malehorn, X. Yang, C. I. Civin, L. Cheng, Lentiviral vectors with two independent internal promoters transfer high-level expression of multiple transgenes to human hematopoietic stem-progenitor cells, Mol. Ther. 7 (2003) 827-838.

[61] M. Amendola, M. A. Venneri, A. Biffi, E. Vigna, L. Naldini, Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters, Nat. Biotechnol. 23 (2005) 108-116.

[62] Y. Zhu, G. Feuer, S. L. Day, S. Wrzesinski, V. Planelles, Multigene lentiviral vectors based on differential splicing and translational control, Mol. Ther. 4 (2001) 375-382.

[63] M. Licursi, S. L. Christian, T. Pongnopparat, K. Hirasawa, *In vitro* and *in vivo* comparison of viral and cellular internal ribosome entry sites for bicistronic vector expression, Gene Ther. 18 (2011) 631-636.

[64] A. Ibrahimi, V. G. Vande, V. Reumers, J. Toelen, I. Thiry, C. Vandeputte, S. Vets, C. Deroose, G. Bormans, V. Baekelandt, Z. Debyser, R. Gijsbers, Highly efficient multicistronic lentiviral vectors with peptide 2A sequences, Hum Genet Ther 20 (2009) 845-860.

[65] S. Golbabapour, M. A. Abdulla, M. Hajrezaei, A concise review on epigenetic regulation: insight into molecular mechanisms, Int J Mol Sci 12 (2011) 8661-8694.

[66] P. Lee, R. C. Alan, The Roles of the Methyl-CpG Binding Proteins in Cancer, Genes & Cancer 2 (2011) 618- 630.

[67] T. F. Lee, J. X. Zhai, B. C. Meyers, Conservation and divergence in eukaryotic DNA methylation, pnas 107 (2010) 9027-9028.

[68] J. A. Law, S. E. Jacobsen, Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals, Nat Rev Genet. 11 (2010) 204-220.

[69] S. J. Cokus, e. a. l., Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning, Nature 452 (2008) 215-219.

[70] X. Q. Li, Y. Y. Guo, W. De, DNA methylation and microRNAs in cancer, World J Gastroenterol 18 (2012) 882-888.

[71] X. Du, L. Han, A. Y. Guo, Z. M. Zhao, Features of Methylation and Gene Expression in the Promoter-Associated CpG Islands Using Human Methylome Data, Comparative and Functional Genomics 2012 (2012) 1-8.

[72] M. Li, H. Wu, Z. Luo, Y. Xia, J. Guan, T. Wang, e. al., An atlas of DNA methylomes in porcine adipose and muscle tissues, Nat Commun 3 (2012) 1-11.

[73] J. G. Zhao, J. Whyte, R. S. Prather, Effect of epigenetic regulation during swine embryogenesis and on cloning by nuclear transfer, Cell Tissue Res 341 (2010) 13-21.

[74] X. D. Cheng, H. Hashimoto, J. R. Horton, X. Zhang, Mechanisms of DNA Methylation, Methyl-cpG recognition, and Demethylation in Mammals, Chapter 2 (2011).

[75] A. Le´ger, C. Le Guiner, M. L. Nickerson, I. K. McGee, N. Ferry, e. al., Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Transgene Expression Is Independent of DNA Methylation in Primate Liver and Skeletal Muscle, PLoS ONE 6 (2011) e20881.

[76] F. Brenet, M. Moh, P. Funk, E. Feierstein, A. J. Viale, e. al., DNA Methylation of the First Exon Is Tightly Linked to Transcriptional Silencing, plos one 6 (2011) e14524.

[77] S. Sharma, T. K. Kelly, P. A. Jones, Epigenetics in cancer, Carcinogenesis 31 (2010) 27-36.

[78] P. W. Laird, Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis, Nature Reviews Genetics 11 (2010) 191-203.

[79] R. Lister, J. R. Ecker, Finding the fifth base: Genome-wide sequencing of cytosine methylation, Genome Res 19 (2009) 959-966.

[80] L. L. Shen, Y. Kondo, G. Guo, J. X. Zhang, L. Zhang, S. Ahmed, J. M. Shu, X. L. Chen, R. A. Waterland, J. P. J. Issa, Genome-Wide Profiling of DNA Methylation Reveals a Class of Normally Methylated CpG Island Promoters, PLoS Genet 3 (2007) e181.

[81] Z. Lippman, A. V. Gendrel, V. Colot, R. Martienssen, Profiling DNA methylation patterns using genomic tiling microarrays, Nat Methods 2 (2005) 219-222.

[82] D. Zilberman, M. Gehring, R. K. Tran, T. Ballinger, S. Henikoff, Genome-wide analysis ofArabidop-sis thaliana DNA methylation uncovers an interdepen-dence between methylation and transcription., Nat Genet 39 (2007) 61-69.

[83] M. G. Goll, T. H. Bestor, Eukaryotic cytosine methyl-transferases, Annu Rev Biochem 74 (2005) 481-514.

[84] M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, E. Li, DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development, Cell 99 (1999) 247-257.

[85] M. Szyf, Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs, Annu Rev Pharmacol Toxicol 49 (2009) 243-263.

[86] S. F. Ning, Q. Y. Li, M. M. Liang, X. G. Yang, H. Y. Xu, Y. Q. Lu, S. S. Lu, K. H. Lu, Methylation characteristics and developmental potential of Guangxi Bama minipig (*Susscrofa* domestica) cloned embryos from donor cells treated with trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine, Zygote 22 (2012) 1-9.

[87] Y. S. Wang, J. M. Su, L. J. Wang, W. B. Xu, F. S. Quan, J. Liu, Y. Zhang, The Effects of 5-Aza-2'- Deoxycytidine and Trichostatin A on Gene Expression and DNA Methylation Status in Cloned Bovine Blastocysts, Cellular Reprogramming 13 (2011) 297-306.

[88] B. P. Enright, L. Y. Sung, C. C. Chang, X. Yang, X. C. Tian, Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine, Biol Reprod 72 (2005) 944-948.

[89] Y. Tsuji, Y. Kato, Y. Tsunoda, The developmental potential of mouse somatic cell nucleatransferred oocytes treated with trichostatin A and 5-ada-2-deoxycytidine, Zygote 17 (2009) 109-115.

[90] M. B. Kumar, H. F. Jin, J. G. Kim, H. J. Song, Y. Hong, S. Balasubramanian, S. Y. Choe, G. J. Rho, DNA methylation levels in porcine fetal fibroblasts induced by an inhibitor of methylation, 5-azacytidine Cell Tissue Res 325 (2006) 445-454.

[91] T. B. Miranda, P. A. Jones, DNA methylation: the nuts and bolts of repression, J. Cell Physiol. 213 (2007) 384-390.

[92] E. Li, Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development, nature 3 (2002) 662-673.

[93] M. Szyf, DNA Methylation and Demethylation as Targets for Anticancer Therapy, Biochemistry 70 (2005) 533-549.

[94] S. Kishigami, E. Mizutani, H. Ohta, T. Hikichi, N. V. Thuan, S. Wakayama, H. T. Bui, T. Wakayama, Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer, Biochemical and Biophysical Research Communications 340 (2006) 183-189.

[95] X. Wu, Y. Li, G. P. Li, D. s. Yang, Y. L. Yue, L. L. Wang, K. H. Li, P. H. Xin, S. H. Bou, H. Q. Yu, Trichostatin A improved epigenetic modifications of transfected cells but did not improve subsequent cloned embryo development, Animal Biotechnology 19 (2008) 211-224.

[96] Y. S. Wang, X. R. Xiong, Z. X. An, L. J. Wang, J. Liu, F. S. Quan, S. Hua, Y. Zhang, Production of cloned calves by combination treatment of both donor cells and early cloned embryos with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A, Theriogenology 75 (2011) 819-825.

[97] Q. R. Kong, M. L. Wu, Z. Wang, X. Zhang, L. Li, X. Liu, Y. Mu, Z. Liu, Effect of trichostatin A and 5-Aza-2'-deoxycytidine on transgene reactivation and epigenetic modification in transgenic pig fibroblast cells, Mol Cell Biochem 355 (2011) 157-165.

[98] C. Yang, M. J. Zhang, W. P. Niu, R. J. Yang, Y. H. Zhang, J. Y. Qiu, B. X. Sun, Z. H. Zhao, Analysis of DNA Methylation in Various Swine Tissues, PLoS ONE 6 (2011) e16229.

[99] S. Q. Tang, Y. Zhang, Q. Xu, D. X. Sun, Y. Yu, Comparison of methylation level of genomes among different animal species and various tissues, Chinese Journal of Agricultural Biotechnology 4 (2007) 75-79.

[100] 赵丽霞, 赵高平, 郭荣启, 王丙萍, 周欢敏., 绵羊Cdkn1c的DNA甲基化分析, 中国畜牧兽医37 (2010) 85-88.

[101] 荣美洁, 李兰, 董文娟, 闵令江, 潘庆杰, 崂ft奶ft羊乳腺中孕激素受体基因甲基化与基因表达关系的研究, 青岛农业大学学报27 (2010) 186-190.

[102] 辛鹏慧, 岳永莉, 李燕, 于海泉, 牛4种组织中ZAR1基因表达及DNA甲基化修饰, 畜牧与兽医41 (2009) 40-42.

[103] 白小青, 王金勇, 陈英, 潘红梅, 刘文, 李军峰, 荣昌猪仔猪性别间DNA甲基化水平的差异研究, 中国畜牧杂志46 (2010) 12-14.

[104] A. Hofmann, B. Kessler, S. Ewerling, A. Kabermann, G. Brem, E. Wolf, A. Pfeifer, Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model, Mol Ther 13 (2006) 59-66.

[105] C. X. Liu, L. Q. Wang, W. R. Li, X. M. Zhang, Y. Z. Tian, N. Zhang, S. G. He, T. Chen, J. C. Huang, M. J. Liu, Highly Efficient Generation of Transgenic Sheep by Lentivirus Accompanying the Alteration of Methylation Status, PLOS one 8 (2012) e54614.

[106] B. Duan, L. Cheng, Y. Gao, F. X. Yin, G. H. Su, Q. Y. Shen, K. Liu, X. Hu, X. Liu, G. P. Li, Silencing of fat-1 transgene expression in sheep may result from hypermethylation of its driven cytomegalovirus (CMV) promoter, Theriogenology 78 (2012) 793–802.

[107] Z. Yin, Q. R. Kong, Z. P. Zhao, M. L. Wu, Y. S. Mu, K. Hu, Z. H. Liu, Position effect variegation and epigenetic modification of a transgene in a pig model, genet Mol Res 11 (2012) 355-369.

[108] A. L. Szymczak-Workman, K. M. Vignali, D. A. A. Vignali, Generation of 2A-Linked Multicistronic Cassettes by Recombinant PCR, Cold Spring Harb Protoc (2012) 251-254.

[109] R. Fang, Y. Q. Peng, M. Zheng, Q. Y. Meng, Muscle-specific expression of delta-12 and omega-3 fatty acid desaturases and human catalase using" self-cleaving" 2A peptides in transgenic mice, Prog. Biochem. Biophys 39 (2012) 175-180.

[110] M. Kozak, An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs, Nucleic Acids Res. 15 (1987) 8125-8148.

[111] C. A. Hasegawa K, Nakatsuji N, Suemori H., Efficient multi-cistronic expression of a transgene in human embryonic stem cells, Stem Cells 25 (2007) 1707-1712.

[112] V. Torres, L. Barra, F. Garcés, K. Ordenes, S. Leal-Ortiz, C. C. Garner, F. Fernandez, P. Zamorano, A bicistronic lentiviral vector based on the 1D/2A sequence of foot-and-mouth disease virus expresses proteins stoichiometrically, Journal of Biotechnology 146 (2010) 138-142.

[113] F. Zhang, S. I. Thornhill, S. J. Howe, M. Ulaganathan, A. Schambach, J. Sinclair, C. Kinnon, H. B. Gaspar, M. Antoniou, A. J. Thrasher, Lentiviral vectors containing an enhancer-less ubiquitously acting chromatin opening element (UCOE) provide highly reproducible and stable transgene expression in hematopoietic cells, Blood 110 (2007) 1448-1457.

[114] M. I. Bukrinsky, S. Haggerty, M. P. Dempsey, N. Sharova, A. Adzhubel, L. Spitz, P. Lewis, D. Goldfarb, M. Emerman, M. Stevenson, A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells, Nature 365 (1993) 666-669.

[115] E. O. Freed, M. A. Martin, HIV-1 infection of non-dividing cells, Nature 369 (1994) 107-108.

[116] S. Toshie, A. B. Michael, I. Yasuhiro, Lentiviral vectors: basic to translational, Biochem. J. 443 (2012) 603-618.

[117] J. Mátrai, M. K. L. Chuah, T. VandenDriessche, Recent Advances in Lentiviral Vector Development and

Applications, Molecular Therapy 18 (2010) 477-490.

[118] M. Pincha, G. Salguero, D. Wedekind, B. S. Sundarasetty, A. Lin, N. Kasahara, M. H. Brugman, A. C. Jirmo, U. Modlich, R. Gutzmer, G. Büsche, A. Ganser, R. Stripecke, Lentiviral vectors for induction of self-differentiation and conditional ablation of dendritic cells, Gene Ther 18 (2011) 750-764.

[119] P. de Felipe, V. Martı´n, M. L. Corte´s, M. Ryan, M. Izquierdo, Use of the 2A sequence from foot-and-mouth disease virus in the generation of retroviral vectors for gene therapy, Gene Therapy 6 (1999) 198-208.

[120] C. X. Liu, W. R. Li, X. M. Zhang, N. Zhang, S. G. He, J. C. Huang, Y. B. Ge, M. J. Liu, The critical role of myostatin in differentiation of sheep myoblasts, Biochem Biophys Res Commun 422 (2012) 381-386.

[121] S. F. De Meyer, K. Vanhoorelbeke, M. K. Chuah, I. Pareyn, V. Gillijns, R. P. Hebbel, e. al., Phenotypic correction of von Willebrand disease type 3 blood-derived endothelial cells with lentiviral vectors expressing von Willebrand factor, Blood 107 (2006) 4728-4736.

[122] N. A. Kootstra, C. Munk, N. Tonnu, N. R. Landau, I. M. Verma, Abrogation of postentry restriction of HIV-1-based lentiviral vector transduction in simian cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (2003) 1298-1303.

[123] Y. Ikeda, Ylinen, L. M., Kahar-Bador, M. and Towers, G. J., Influence of gag on human immunodeficiency virus type 1 species-specific tropism, J. Virol. 78 (2004) 11816-11822.

[124] S. R. Witting, Efficient Large Volume Lentiviral Vector Production Using Flow Electroporation, Human gene therapy 23 (2012) 243-249.

[125] L. Pham, H. Ye, F. L. Cosset, S. J. Russell, K. W. Peng, Concentration of viral vectors by co-precipitation with calcium phosphate, J. Gene Med. 3 (2001) 188-194.

[126] F. T. Burns J C, Driever W, Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells, Proc Natl Acad Sci USA 90(17) (1993) 8033- 8037.

[127] M. Geraerts, S. Willems, V. Baekelandt, Z. Debyser, R. Gijsbers, Comparison of lentiviral vector titration methods, BMC Biotechnol. 4 (2006) 1-10.

[128] A. Pichlmair, S. S. Diebold, S. Gschmeissner, Y. Takeuchi, Y. Ikeda, M. K. Collins, C. R. Sousa, Tubulovesicular structures within vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped lentiviral vector preparations carry DNA and stimulate antiviral responses via Toll-like receptor 9, J. Virol. 81 (2007) 539-542.

[129] L. Naldini, U. Blömer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma, D. Trono, In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector, Science 272 (1996) 263-267.

[130] J. Z. K. Khattak, S. Rauf, Z. Anwar, H. M. Wahedi, T. Jamil, Recent Advances in Genetic Engineering-A Review, Current Research Journal of Biological Sciences 4 (2012) 82-89.

[131] S. C. Ngai, R. Ramasamy, S. Abdullah, Production of Lentivirus Carrying Green fluorescent Protein with Different Promoters for *invitro*Gene Transfer, Pertanika J. Sci. & Technol 20 (2012) 269 - 281.

[132] J. C. Jacobsen, C. S. Bawden, S. R. Rudiger, C. J. McLaughlan, S. J. Reid, H. J. Waldvogel, M. E. MacDonald, J. F. Gusella, S. K. Walker, J. M. Kelly, G. C. Webb, R. L. M. Faull, M. I. Rees, R. G. Snell, An ovine transgenic Huntington's disease model, Human Molecular Genetics 19 (2010) 1873-1882.

[133] M. S. Rand, Farm animals as models for biomedical research University of Arizona (2011) 1-20.

[134] E. A. Maga, C. F. Shoemaker, J. D. Rowe, e. al, production and processing of milk from transgenic goats expessing human lysozyme in the mammary gland, Journal of diary science 89 (2006) 518-524.

[135] C. J. Q. Yu G H, Yu H Q, et al, functional disruption of the prion protein gene in cloned goats journal of general virology 87: 1019-1027 (2006).

[136] G. Wrignt, A. Garver, D. Cottom, High level expression of active human a-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep Biotechnology 9 (1991) 830-834.

[137] W. A. Ritchie, T. King, C. Neil, A. J. Carlisle, S. Lillico, G. McLachlan, C. B. Whitelaw, Transgenic Sheep Designed for Transplantation Studies, Mol Reprod Dev 76 (2009) 61-64.

[138] 汪立芹, 刘晨曦, 王静, 黄俊成, 卵周隙内注射慢病毒生产转基因绵羊的方法, 中国实验动物学报19 (2011) 12-16.

[139] H. J. Jang, J. W. Choi, Y. M. Kim, S. S. Shin, K. Lee, J. Y. Han, Reactivation of transgene expression by alleviating CpG methylation of the Rous sarcoma virus promoter in transgenic quail cells Mol Biotechnol 49 (2011) 222-228.

[140] F. Herbst, C. R. Ball, F. Tuorto, A. Nowrouzi, W. Wang, O. Zavidij, S. M. Dieter, S. Fessler, F. van der Hoeven, U. Kloz, F. Lyko, M. Schmidt, C. von Kalle, H. Glimm, Extensive methylation of promoter sequences silences lentiviral transgene expression during stem cell differentiation in vivo., Mol Ther 20 (2012) 1014-1021.

[141] M. Reichenbach, T. Lim, H. D. Reichenbach, Germ-line transmission of lentiviral PGK-EGFP integrants in

Transgenic cattle: new perspectives for experimental embryology, Transgenic Res 19 (2010) 549-556.

[142] A. Hofmann, V. Zakhartchenko, M. Weppert, H. Sebald, H. Wenigerkind, G. Brem, E. Wolf, A. Pfeifer, Generation of Transgenic Cattle by Lentiviral Gene Transfer into Oocytes, Biology of reproduction 71 (2004) 405-409.

[143] M. O. Sauvain, A. P. Dorr, B. Stevenson, A. Quazzola, F. Naef, M. Wiznerowicz, F. Schu¨tz, F. Jongeneel, D. Duboule, F. Spitz, D. Trono, Genotypic Features of Lentivirus Transgenic Mice, Journal of virology 82 (2008) 7111-7119.

[144] A. Pfeifer, M. Ikawa, Y. Dayn, I. M. Verma, Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99 (2002) 2140-2145.

[145] J. van den Brandt, D. P. Wang, S. H. Kwon, M. Heinkelein, H. M. Reichardt, Lentivirally Generated eGFP-Transgenic Rats Allow Efficient Cell Tracking In Vivo, genesis 39 (2004) 94-99.

[146] C. Lois, E. J. Hong, S. Pease, E. J. Brown, D. Baltimore, Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors, Science 195 (2002) 868-872.

[147] A. Hofmann, B. Kessler, S. Ewerling, M. Weppert, B. Vogg, H. Ludwig, M. Stojkovic, M. Boelhauve, G. Brem, E. Wolf, A. Pfeifer, Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors, EMBO Rep 4 (2003) 1054-1060.

[148] J. Clark, B. Whitelaw, A future for transgenic livestock, Nat Rev Genet 4 (2003) 825-833.

[149] Y. L. Zhang, Q. Y. Xi, J. H. Ding, W. G. Cai, F. M. Meng, J. Y. Zhou, H. Y. Li, Q. Y. Jiang, G. Shu, S. B. Wang, X. T. Zhu, P. Gao, Z. Wu, Production of Transgenic Pigs Mediated by Pseudotyped Lentivirus and Sperm, plos one 7 (2012) e35335.

[150] C. B. Whitelaw, P. A. Radcliffe, W. A. Ritchie, A. Carlisle, F. M. Ellard, R. N. Pena, J. Rowe, A. J. Clark, T. J. King, K. A. Mitrophanous, Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector, FEBS Lett 571 (2004) 4.

[151] Y. N. Xu, S. J. Uhm, B. C. Koo, M. S. Kwon, J. Y. Roh, J. S. Yang, H. Y. Choi, Y. T. Heo, X. S. Cui, J. H. Yoon, D. H. Ko, T. Kim, N. H. Kim, Production of Transgenic Korean Native Cattle Expressing Enhanced Green Fluorescent Protein Using a FIV-Based Lentiviral Vector Injected into MII Oocytes, Journal of Genetics and Genomics 40 (2013) e43.

[152] P. S. Monzani, J. R. Sangalli, T. H. C. De Bem, F. F. Bressan, P. Fantinato-Neto, J. R. V. Pimentel, E. H. Birgel-Junior, A. M. Fontes, D. T. Covas, F. V. Meirelles, Breeding of transgenic cattle for human coagulation factor IX by a combination of lentiviral system and cloning, Genet. Mol. Res. (2013).

[153] K. Cornetta, K. Tessanne, C. Long, J. Yao, C. Satterfield, M. Westhusin, Transgenic sheep generated by lentiviral vectors: safety and integration analysis of surrogates and their offspring, Transgenic Res (2012).

[154] A. P. Tittel, C. Heuser, C. Ohliger, C. Llanto, S. Yona, G. J. Hämmerling, D. R. Engel, N. Garbi, C. Kurts, Functionally relevant neutrophilia in cd11c diphtheria toxin receptor transgenic mice, nature methods 9 (2012) 385-391.

[155] Q. R. Kong, M. L. Wu, Y. Huan, L. Zhang, H. Liu, G. Bou, Y. Luo, Y. Mu, Z. Liu, Transgene expression is associated with copy number and cytomegalovirus promoter methylation in transgenic pigs, Plos One 4 (2009) e6679.

[156] C. May, S. Rivella, J. Callegari, G. Heller, K. M. Gaensler, e. al., Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin, Nature 406 (2000) 82-86.

[157] G. H. Karpen, Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin, Curr Opin Genet 4 (1994) 281-291.

[158] P. A. Furth, L. Hennighausen, C. Baker, B. Beatty, R. Woychick, The variability in activity of the universally expressed human cytomegalovirus immediate early gene 1 enhancer/promoter in transgenic mice, Nucleic Acids Res 19 (1991) 6205-6208.

[159] Y. Zhan, J. L. Brady, A. M. Johnston, A. M. Lew, Predominant transgene expression in exocrine pancreas directed by the CMV promoter, DNA Cell Biol 19 (2000) 639-645.

[160] H. Stower, Dynamic DNA methylation, Nature Reviews Genetics 13 (2012) 1.

[161] R. de Jong, J. van der Heijden, e. al., DNA-binding specificity of the S8 homeodomain, Nucleic Acids Research 21 (1993) 4711-4720.

[162] P. Bucher, Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unre-lated promoter sequences, Journal of Molecular Biology 212 (1990) 563-578.

[163] W. Doerfler, The significance of DNA methylation patterns: Promoter inhibition by sequence-specific methylation is one functional consequence, Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 326 (1990) 253-265.

[164] A. Shrivastava, K. Calame, An analysis of genes regulated by the multi-functional transcriptional regulator Yin Yang-1, Nucleic Acids Research 22 (1994) 5151-5155.

[165] C. Gebhard, C. Benner, e. al., General transcription factor binding at CpG islands in normal cells correlates with resistance to *denovo*DNA methylation in cancer cells, Cancer Research 70 (2010) 1398-1407.

[166] M. Merika, S. H. Orkin, DNA-binding specificity of GATA family transcription factors, Molecular and Cellular Biology 13 (1993) 3999-4010.

[167] M. Braunschweig, V. Jagannathan, A. Gutzwiller, G. Bee, Investigations on Transgenerational Epigenetic Response Down the Male Line in F2 Pigs, PLOS ONE 7 (2012) e30583.

[168] A. Bird, DNA methylation patterns and epigenetic memory, Genes Dev 16 (2002) 6-21.

[169] P. A. Jones, Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond, nature reviews (2012).

[170] J. K. Christman, 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy, Oncogene 12 (2002) 5483-5495.

[171] S. S. Palii, B. O. Van Emburgh, U. T. Sankpal, K. D. Brown, K. D. Robertson, DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B, Mol Cell Biol 28 (2008) 752-771.

[172] L. Rittié, G. J. Fisher, Isolation and Culture of Skin Fibroblasts, Methods in Molecular Medicine 117 (2005) 83-98.

[173] 李桂芳, 李岩, 赵宗胜, 李大全, 绵羊耳成纤维细胞的体外培养, 中国草食动物23 (2003) 5-7.

[174] A. R. Brooks, R. N. Harkins, P. Y. Wang, H. S. Qian, P. X. Liu, G. M. Rubanyi, Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle, J Gene Med 6 (2004) 395-404.

[175] Vezf1 regulates genomic DNA methylation through its effects on expression of DNA methyltransferase Dnmt3b, (2008).

[176] M. M. Pillai, G. M. Venkataraman, S. Kosak, B. Torok-Storb, Integration site analysis in transgenic mice by thermal asymmetric interlaced (TAIL) -PCR: segregating multiple-integrant founder lines and determining zygosity, Transgenic Res 17 (2008) 749-754.

[177] A. K. Mehta, S. S. Majumdar, P. Alam, N. Gulati, V. Brahmachari, Epigenetic regulation of cytomegalovirus major immediate-early promoter activity in transgenic mice, Gene 428 (2009) 20-24.

[178] J. Hejnar, P. Hájková, J. Plachy, D. Elleder, V. Stepanets, J. Svoboda, CpG island protects Rous sarcoma virus-derived vectors integrated into nonpermissive cells from DNA methylation and transcriptional suppression, Proc Natl Acad Sci USA. 98 (2001) 565-569.

[179] J. K. Kang, K. W. Park, Y. G. Chung, J. S. You, Y. K. Kim, S. H. Lee, S. P. Hong, K. M. Choi, K. N. Heo, J. G. Seol, J. H. Lee, D. I. Jin, C. S. Park, J. S. Seo, H. W. Lee, J. W. Han, Coordinated change of a ratio of methylated H3-lysine 4 or acetylated H3 to acetylated H4 and DNA methylation is associated with tissue-specific gene expression in cloned pig, Exp Mol Med 39 (2007) 84-96.

[180] V. E. MacDonald, L. J. Howe, Histone acetylation, Epigenetics 4 (2009) 139-143.

[181] W. E. Maalouf, R. Alberio, K. H. S. Campbell, Differential acetylation of histone H4 lysine during development of in vitro fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine embryos, Epigenetics 3 (2008) 199-209.

[182] C. L. Kien, C. P. Peltier, S. Mandal, J. R. Davie, R. Blauwiekel, Effects of the In Vivo Supply of Butyrate on Histone Acetylation of Cecum in Piglets, JPEN J Parenter Enteral Nutr. 32 (2008) 51-56.

[183] C. -l. hsieh, Dependence of Transcriptional Repression on CpG Methylation Density, Molecular and cellular biology, 14(8), 5487-5494 (1994).

[184] J. Zhao, Y. Hao, J. W. Ross, L. D. Spate, E. M. Walters, M. S. Samuel, A. Rieke, C. N. Murphy, R. S. Prather, Histone deacetylase inhibitors improve in vitro and in vivo developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos, Cellular Reprogram 12 (2010) 75-83.

[185] L. Lin, Q. Li, L. Zhang, D. S. Zhao, Y. P. Dai, N. Li, Aberrant epigenetic changes and gene expression in cloned cattle dying around birth, BMC Developmental Biology 8 (2008) 1-10.

[186] Q. Meng, Z. Polgar, J. Liu, e. al., Live birth of somatic cell-cloned rabbits following trichostatin A treatment and co-transfer of parthenogenetic embryos, Cloning Stem Cells 11 (2009) 203-208.

[187] G. Wee, J. J. Shim, D. B. Koo, J. I. Chae, K. K. Lee, Y. M. Han, Epigenetic alteration of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos, Reproduction 134 (2007) 781-787.

附录

附表1 PCR引物设计时酶切位点的保护碱基表

Supplement table 1 Protected bases of enzyme sites for creating PCR primers

| 酶 | 寡核苷酸序列 | 链长 | 切割率% | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 2 hr | 20 hr |
| Acc I | GGTCGACC | 8 | 0 | 0 |
|  | CGGTCGACCG | 10 | 0 | 0 |
|  | CCGGTCGACCGG | 12 | 0 | 0 |
| Afl III | CACATGTG | 8 | 0 | 0 |
|  | CCACATGTGG | 10 | >90 | >90 |
|  | CCCACATGTGGG | 12 | >90 | >90 |
| Asc I | GGCGCGCC | 8 | >90 | >90 |
|  | AGGCGCGCCT | 10 | >90 | >90 |
|  | TTGGCGCGCCAA | 12 | >90 | >90 |
| Ava I | CCCCGGGG | 8 | 50 | >90 |
|  | CCCCCGGGGG | 10 | >90 | >90 |
|  | TCCCCCGGGGGA | 12 | >90 | >90 |
| BamH I | CGGATCCG | 8 | 10 | 25 |
|  | CGGGATCCCG | 10 | >90 | >90 |
|  | CGCGGATCCGCG | 12 | >90 | >90 |
| Bgl II | CAGATCTG | 8 | 0 | 0 |
|  | GAAGATCTTC | 10 | 75 | >90 |
|  | GGAAGATCTTCC | 12 | 25 | >90 |
| BssH II | GGCGCGCC | 8 | 0 | 0 |
|  | AGGCGCGCCT | 10 | 0 | 0 |
|  | TTGGCGCGCCAA | 12 | 50 | >90 |
| BstE II | GGGT(A/T)ACCC | 9 | 0 | 10 |
| BstX I | AACTGCAGAACCAATGCATTGG | 22 | 0 | 0 |
|  | AAAACTGCAGCCAATGCATTGGAA | 24 | 25 | 50 |
|  | CTGCAGAACCAATGCATTGGATGCAT | 27 | 25 | >90 |
| Cla I | CATCGATG | 8 | 0 | 0 |
|  | GATCGATC | 8 | 0 | 0 |
|  | CCATCGATGG | 10 | >90 | >90 |
|  | CCCATCGATGGG | 12 | 50 | 50 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 酶 | 寡核苷酸序列 | 链长 | 切割率% | |
| 2 hr | 20 hr |
| EcoR I | GGAATTCC | 8 | >90 | >90 |
|  | CGGAATTCCG | 10 | >90 | >90 |
|  | CCGGAATTCCGG | 12 | >90 | >90 |
| Hae III | GGGGCCCC | 8 | >90 | >90 |
|  | AGCGGCCGCT | 10 | >90 | >90 |
|  | TTGCGGCCGCAA | 12 | >90 | >90 |
| Hind III | CAAGCTTG | 8 | 0 | 0 |
|  | CCAAGCTTGG | 10 | 0 | 0 |
|  | CCCAAGCTTGGG | 12 | 10 | 75 |
| Kpn I | GGGTACCC | 8 | 0 | 0 |
|  | GGGGTACCCC | 10 | >90 | >90 |
|  | CGGGGTACCCCG | 12 | >90 | >90 |
| Mlu I | GACGCGTC | 8 | 0 | 0 |
|  | CGACGCGTCG | 10 | 25 | 50 |
| Nco I | CCCATGGG | 8 | 0 | 0 |
|  | CATGCCATGGCATG | 14 | 50 | 75 |
| Nde I | CCATATGG | 8 | 0 | 0 |
|  | CCCATATGGG | 10 | 0 | 0 |
|  | CGCCATATGGCG | 12 | 0 | 0 |
|  | GGGTTTCATATGAAACCC | 18 | 0 | 0 |
|  | GGAATTCCATATGGAATTCC | 20 | 75 | >90 |
|  | GGGAATTCCATATGGAATTCCC | 22 | 75 | >90 |
| Nhe I | GGCTAGCC | 8 | 0 | 0 |
|  | CGGCTAGCCG | 10 | 10 | 25 |
|  | CTAGCTAGCTAG | 12 | 10 | 50 |
| Not I | TTGCGGCCGCAA | 12 | 0 | 0 |
|  | ATTTGCGGCCGCTTTA | 16 | 10 | 10 |
|  | AAATATGCGGCCGCTATAAA | 20 | 10 | 10 |
|  | ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTAT | 24 | 25 | 90 |
|  | AAGGAAAAAAGCGGCCGCAAAAGGAAAA | 28 | 25 | >90 |
| Nsi I | TGCATGCATGCA | 12 | 10 | >90 |
|  | CCAATGCATTGGTTCTGCAGTT | 22 | >90 | >90 |
| Pac I | TTAATTAA | 8 | 0 | 0 |
|  | GTTAATTAAC | 10 | 0 | 25 |
|  | CCTTAATTAAGG | 12 | 0 | >90 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 酶 | 寡核苷酸序列 | 链长 | 切割率% | |
| 2 hr | 20 hr |
| Pme I | GTTTAAAC | 8 | 0 | 0 |
|  | GGTTTAAACC | 10 | 0 | 25 |
|  | GGGTTTAAACCC | 12 | 0 | 50 |
|  | AGCTTTGTTTAAACGGCGCGCCGG | 24 | 75 | >90 |
| Pst I | GCTGCAGC | 8 | 0 | 0 |
|  | TGCACTGCAGTGCA | 14 | 10 | 10 |
|  | AACTGCAGAACCAATGCATTGG | 22 | >90 | >90 |
|  | AAAACTGCAGCCAATGCATTGGAA | 24 | >90 | >90 |
|  | CTGCAGAACCAATGCATTGGATGCAT | 26 | 0 | 0 |
| Pvu I | CCGATCGG | 8 | 0 | 0 |
|  | ATCGATCGAT | 10 | 10 | 25 |
|  | TCGCGATCGCGA | 12 | 0 | 10 |
| Sac I | CGAGCTCG | 8 | 10 | 10 |
| Sac II | GCCGCGGC | 8 | 0 | 0 |
|  | TCCCCGCGGGGA | 12 | 50 | >90 |
| Sal I | GTCGACGTCAAAAGGCCATAGCGGCCGC | 28 | 0 | 0 |
|  | GCGTCGACGTCTTGGCCATAGCGGCCGCGG | 30 | 10 | 50 |
|  | ACGCGTCGACGTCGGCCATAGCGGCCGCGGAA | 32 | 10 | 75 |
| Sca I | GAGTACTC | 8 | 10 | 25 |
|  | AAAAGTACTTTT | 12 | 75 | 75 |
| Sma I | CCCGGG | 6 | 0 | 10 |
|  | CCCCGGGG | 8 | 0 | 10 |
|  | CCCCCGGGGG | 10 | 10 | 50 |
|  | TCCCCCGGGGGA | 12 | >90 | >90 |
| Spe I | GACTAGTC | 8 | 10 | >90 |
|  | GGACTAGTCC | 10 | 10 | >90 |
|  | CGGACTAGTCCG | 12 | 0 | 50 |
|  | CTAGACTAGTCTAG | 14 | 0 | 50 |
| Sph I | GGCATGCC | 8 | 0 | 0 |
|  | CATGCATGCATG | 12 | 0 | 25 |
|  | ACATGCATGCATGT | 14 | 10 | 50 |
| Stu I | AAGGCCTT | 8 | >90 | >90 |
|  | GAAGGCCTTC | 10 | >90 | >90 |
|  | AAAAGGCCTTTT | 12 | >90 | >90 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 酶 | 寡核苷酸序列 | 链长 | 切割率% | |
| 2 hr | 20 hr |
| Xba I | CTCTAGAG | 8 | 0 | 0 |
|  | GCTCTAGAGC | 10 | >90 | >90 |
|  | TGCTCTAGAGCA | 12 | 75 | >90 |
|  | CTAGTCTAGACTAG | 14 | 75 | >90 |
| Xho I | CCTCGAGG | 8 | 0 | 0 |
|  | CCCTCGAGGG | 10 | 10 | 25 |
|  | CCGCTCGAGCGG | 12 | 10 | 75 |
| Xma I | CCCCGGGG | 8 | 0 | 0 |
|  | CCCCCGGGGG | 10 | 25 | 75 |
|  | CCCCCCGGGGGG | 12 | 50 | >90 |
|  | TCCCCCCGGGGGGA | 14 | >90 | >90 |

注：不同内切酶对识别位点以外最少保护碱基数目的要求，在本表中没有列出的酶，则通常需在识别位点两端至少加上六个保护碱基，以确保酶切反应的进行。红色字母为酶切位点，黑色字母为酶切位点需要加的保护碱基。

87

**附表2** **本实验使用的载体简图**

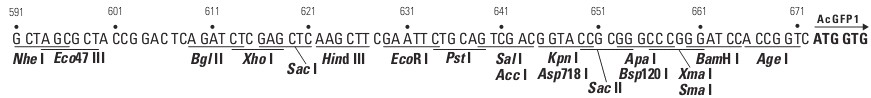


载体 *p*tdTomato-C1 简图（左）和多克隆位点（上） *p*Tdtomato-C1 Vector Map (left) and Multiple Cloning Site (MCS, upper panel)





载体 *p*zsYellow1-C1 简图（左）和多克隆位点（上） *p*zsYellow1-C1 Vector Map (left) and Multiple Cloning Site (MCS, upper panel)



载体 *p*acGFP1-N1 简图（左）和多克隆位点（上）

*p*acGFP1-N1 Vector Map (left) and Multiple Cloning Site (MCS, upper panel)



慢病毒包装载体*p*sPAX2简图，，，

该图摘引自网页[http: //www. addgene. org/12260/](http://www.addgene.org/12260/)

Schematic of the lentiviral packaging plasmid psPAX2, this figure was extracted from [http: //www. addgene. org/12260/](http://www.addgene.org/12260/)



慢病毒包膜载体pMD2. G简图，该载体的插入基因为VSV-G. 该图摘自[**http: //www. addgene. org/12259**](http://www.addgene.org/12259/)**/ 。**

Schematic of the envelope plasmid pMD2. G, the inserted gene of which was VSV-G, this figure was extracted from the website [http: //www. addgene. org/12259/](http://www.addgene.org/12259/).





pLEX MCS简图（上）和载体多克隆位点图（下）。

Schematic(upper panel) and Multiple cloning site (lower panel)

Of pLEX MCS.

# 作 者 简 介

田永芝，女，生于1983年10月，籍贯河南。主要教育经历：

2001-2005年，就读于石河子大学动物科技学院兽医学专业，获农学学士学位。

2005-2007年，就读石河子大学动物科技学院临床兽医学专业，攻读硕士研究生。

2007年至今，石河子大学动物科技学院遗传育种学专业学习，提前攻博研究生。

**在学期间主要参与的研究项目**

1. 国家高技术研究发展计划（863计划）子课题--高效、安全的多基因共表达系统的建立，课题编号：2009AA10Z110，主要完成人。

**在学期间发表的文章**

1. **Yongzhi Tian**, Wenrong Li, Liqin Wang, Chenxi Liu, Jiapeng Lin, Xuemei Zhang, Ning Zhang, Sangang He, Juncheng Huang, Bin Jia, Mingjun Liu. Expression of 2A mediated Multifluorescent protein gene was regulated by epigenetics in transgenic sheep. BBRC, 434(2013): 681–687.

2. C. X. Liu, L. Q. Wang, L. W. R., X. M. Zhang, **Y. Z. Tian**, N. Zhang, S. G. He, T. Chen, J. C. Huang, M. J. Liu, Highly Efficient Generation of Transgenic Sheep by Lentivirus Accompanying the Alteration of Methylation Status, plos one 8 (2012) e54614.

致 谢

从硕士到博士，我用了漫漫的八年时光。一路走来，有快乐、忧伤、感动、郁闷……随着时间的推移，此时，唯有快乐和感动仍历历在目！八年时间，经历虽然不算丰富， 但是遇到了很多可亲可敬可爱的人们，在我的人生即将开始新的篇章时，在此向他们表示衷心的感谢！

首先，我要感谢我的两位导师贾斌教授和刘明军研究员。两位导师学识渊博、治学严谨，尤其是对科学研究工作的热情和激情、勇于探索的精神深深地感染和鼓励着我， 令我无限景仰。从导师身上不仅学到了知识，而且学会了做人的道理，从他们的身上我深深体会到“要做事先做人”的道理，要真诚地对待每一个人、踏实地做好每一件事， 导师是我一生为人的楷模。导师在我学习、实验和生活等方面都给予了亲切的关怀、谆谆教诲和精心的指导，在这即将毕业之际，谨向两位导师致以最崇高的敬意和最衷心地感谢！

衷心感谢李文蓉研究员从实验设计到实施给予的精心指导，使我的论文得以完成。 感谢贺三刚、张雪梅、张宁老师在实验中给予的指导和帮助，感谢刘晨曦师兄、安静、 陈红玲、郑怡、孙亚伟、刘书东、袁征、刘志龙在试验过程中给予的热心帮助。特别感谢在转基因实验中付出了辛勤汗水的汪立芹、林嘉鹏、陈童、谭立新、郭梅英、李彪、 韩冰、杨帆，以及尊敬的黄俊成老师，有了你们无私的奉献才有转基因羊顺利的诞生。 特别感谢申红老师、曾献存师兄、杜迎春师姐、李洪涛一直以来的支持和帮助！感谢实验室的所有师姐、师兄、师弟和师妹，我们永远在一起！

衷心感谢我的家人，感谢父母的养育之恩。你们的理解和支持是我坚持的动力，使我顺利完成学业。

再次向所有热情帮助过我的老师、同学和朋友们致以最崇高的敬意和最诚挚的感谢！



[**2A肽介导的三荧光蛋白基因共表达系统在转基因羊中的表达及其DNA甲基**](http://d.wanfangdata.com.cn/Thesis_D415592.aspx) ****[**化初步研究**](http://d.wanfangdata.com.cn/Thesis_D415592.aspx)

作者：[田永芝](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?q=Creator%3a%22%e7%94%b0%e6%b0%b8%e8%8a%9d%22%2BDBID%3aWF_XW)

学位授予单位：[石河子大学](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?q=School%3a%22%e7%9f%b3%e6%b2%b3%e5%ad%90%e5%a4%a7%e5%ad%a6%22%2BDBID%3aWF_XW)

引用本文格式：[田永芝](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?q=Creator%3a%22%e7%94%b0%e6%b0%b8%e8%8a%9d%22%2BDBID%3aWF_XW)[2A肽介导的三荧光蛋白基因共表达系统在转基因羊中的表达及其DNA甲基化初步研究](http://d.wanfangdata.com.cn/Thesis_D415592.aspx)[学位论文]博士2013