

敲除山羊胎儿成纤维细胞中的抗体重链基因*

李 蓓¹⁾ 俞慧清²⁾ 朱采红¹⁾ 谢发展¹⁾ 陈建泉²⁾ 成国祥^{1, 2)**}

(¹⁾同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; ²⁾上海转基因研究中心, 上海 201210)

摘要 在针对大动物的精确基因修饰研究中, 基于体细胞同源重组是唯一可行与有效的方法. 其中, 沉默基因位点的重组尤为困难. 为获得抗体基因功能缺失的山羊用于人源化抗体的研究, 通过体细胞同源重组技术, 首次成功地获得了抗体基因敲除的山羊胎儿成纤维细胞株, 该细胞株可用于体细胞克隆制备抗体基因功能缺失的转基因山羊. 以 35 日龄的山羊胎儿成纤维细胞(GEF88)基因组 DNA 为模板, 扩增山羊抗体重链 J-C μ 基因作为同源臂, 构建了同基因型的正负筛选打靶载体 GTIgH. 将此打靶载体经电穿孔的方法转染 GEF88 细胞, 并通过 0.8 mg/L 的嘌呤霉素进行药物筛选, 获得了 362 个抗性细胞克隆, PCR、测序及 DNA 印迹鉴定结果显示, 其中的 GT211 抗性细胞克隆为中靶细胞, 该细胞克隆中的抗体重链基因的一条等位基因已被成功敲除.

关键词 基因敲除, 体细胞基因打靶, 山羊胎儿成纤维细胞, 抗体重链基因(IgH), 沉默基因

学科分类号 Q78, Q75

基因打靶技术产生于二十世纪七八十年代, 是利用同源重组将外源基因定点整合到靶细胞基因组上某一确定位点, 以达到对细胞基因组进行定点修饰的目的. Capecchi 等三位科学家也因开创了基因打靶技术而荣获 2007 年诺贝尔生理学或医学奖. 利用小鼠胚胎干细胞(ES), 基因打靶在精确改造小鼠基因组中的应用已十分成熟. 然而大型哺乳动物的 ES 细胞因其难以分离和培养^[1], 至今尚未获得能够进入生殖系并稳定遗传的 ES 细胞^[2]. 体细胞克隆技术的开创和发展, 使得精确改造大型哺乳动物基因组成为可能^[3]. 2000 年, McCreath 等^[3]通过绵羊胎儿成纤维细胞的基因打靶, 将含有人的 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶基因的乳腺特异表达框架插入到绵羊的 $\alpha 1$ (I) 前胶原(COL1A1)基因位点. 此后, 猪和绵羊的 GGAT1 基因^[4~6], 牛和绵羊的 PRNP 基因^[6~8]也通过类似的技术路线被敲除, 获得相应的基因敲除动物. 但上述研究均发现体细胞基因打靶的效率远低于 ES 细胞, 而体细胞中的基因沉默位点的打靶效率更低. 目前只有日本 Kuroiwa 等^[9]敲除牛胎儿成纤维细胞中沉默的牛抗体重链基因(IgH)的报道, 但其打靶效率只有其他非沉默位点的十分之一. Roslin 研究所对绵羊成纤维细胞中的 β -casein 位点的打靶也一直未获得成功^[9].

为了获得抗体基因功能缺失的转基因山羊, 并以其为受体通过微细胞介导的染色体转移技术(microcell mediated chromosome transfer, MMCT)转入人的抗体基因, 用于制备完全人源化抗体, 我们拟采用体细胞基因打靶技术, 敲除山羊的抗体重链基因, 并通过核移植制备抗体基因功能缺失的转基因山羊. 我们首次克隆了山羊 IgH 基因 J-C μ 区约 10 kb 基因组片段, 测序后登录到 NCBI GenBankTM (序列号为 EU182620, EU182621). 然后根据获得的这部分山羊抗体重链序列, 构建了正负筛选型的打靶载体, 并通过电穿孔转染胎儿成纤维细胞 GEF88, 首次成功敲除了山羊胎儿成纤维细胞中的沉默基因 IgH, 此细胞可用于体细胞克隆制备抗体基因功能缺失的转基因山羊.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 妊娠 35 日龄的山羊胚胎由上海转基因研究

* 上海市科委国际合作计划资助项目(055407033).

** 通讯联系人.

Tel: 021-58951015-200, E-mail: chenggx@cngenon.com

收稿日期: 2007-12-18, 接受日期: 2008-03-07

中心实验牧场提供; 质粒 pKO 913、pKO SelectPuro、pKO SelectDT 由日本鸟取大学 Mr. Oshimura 教授惠赠。

1.1.2 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、各种 DNA 聚合酶等购自 Takara 公司和 NEB 公司; pMD18-T vector 质粒购自 Takara 公司; DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒购自 Roche 公司。

1.1.3 细胞培养相关试剂, 包括 GMEM 培养基、胎牛血清、谷氨酰胺、非必需氨基酸、青霉素、链霉素、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购自 GIBCO 公司; 人白血病抑制因子(hLIF)购自 CHEMICON 公司; 嘌呤霉素(Puromycin)购自 Sigma 公司; FlexiGene DNA Kit 试剂盒购自 Qiagen 公司; 其他试剂购自 GIBCO 和 Sigma 等公司。

1.1.4 引物合成及基因测序工作均由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 原代山羊胎儿成纤维细胞的培养. 将怀孕 35 天的山羊胚胎无菌取出, 去除脑部和内脏, PBS 洗胚胎数次, 用剪刀将其剪碎, 然后用含 0.25%胰酶, 1 mmol/L EDTA 的消化液在 37℃ 水浴中消化约 15 min. 将消化后的单个细胞悬液离心, 去上清后, 将细胞团块重悬在含有 2 mmol/L 谷氨酰胺, 1 mmol/L 丙酮酸钠, 1×非必需氨基酸, 2 μg/L 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF), 1000 U/ml 人白血病抑制因子(hLIF), 10%胎牛血清, 100 U/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素的 Glasgow 基本培养基(GMEM)中, 最后将细胞悬液移入 25 cm 培养瓶中, 于 37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱内培养, 每 3~4 天换液, 在细胞密度达到 80%左右时将其冻存, 并命名为 GEF88。

1.2.2 打靶载体 GTIgH 的构建. 由于国际上尚无对山羊抗体重链基因的克隆报道, 我们首先对 GENE BANK 公布的部分牛(序列号为 AY158087, AY230207, U63637)及绵羊(序列号为 Z71572, X59994)抗体重链基因进行分析, 选择物种间保守序列设计多对引物, 以 GEF88 山羊基因组为模板扩增山羊抗体重链基因序列, 将初步获得的 PCR 产物测序, 测序结果与绵羊及牛抗体基因序列进行比对, 同源性在 95%以上. 再以首轮测序获得的山羊基因组序列(NCBI GenBank™ 序列号为 EU182620, EU182621)为模板, 设计针对山羊抗体重链基因的特异性引物, 共设计同源臂扩增引物 4

对, 序列如下: P1, CCG TCG TGA GTG TCT TTG TC; P2, GGA GGA AGA GCA CGA TGA AG; P3, GTG CCT CAG CCT GTG AGA TGC; P4, ACA GTT TGC CCA AGT CAA GCC AG; P5, CCT GGG CTT AAC TGG GGT A; P6, ACT AGC ATC ACA CGA AGA GGA CG; P7, TCA CCG TCT CCT CAG GTA AGA G; P8, ACC ACC ACC CTC CAC TCT G, 引物 P1、P2 用于扩增 3.1 kb 山羊抗体 μ 链恒定区, 作为 3'同源臂; 引物 P3、P4, P5、P6, P7、P8 用于扩增山羊抗体重链 J 区 μ 链转换区及部分恒定区, 克隆重叠群相连后获得 7.1 kb 的 5'同源臂. 以 pKO 913 质粒为载体质粒, 依次将负筛选基因白喉毒素(DTA)克隆至载体上 *Rsr* II 位点, 正筛选基因嘌呤霉素(Puromycin)表达框克隆至载体上 *Asc* I 位点, 3'同源臂克隆至 *Kpn* I、*Eco*R I 位点, 5'同源臂克隆至 *Bam*H I、*Not* I 位点构建成 GTIgH 打靶载体. 每一步连接产物均经酶切鉴定, 最终结果通过测序鉴定。

1.2.3 打靶载体转染山羊胎儿成纤维细胞. 将约 1×10⁷ 个处于对数生长期的 GEF88 胎儿成纤维细胞与 10 μg 经 *Not* I 线性化的 GTIgH 质粒 DNA 混合, 吹吸均匀后转移至 0.4 cm 电转杯, 在 220 V, 950 μF 条件下电穿孔. 然后将细胞分至含 GMEM 培养液的 10 cm 培养皿, 48 h 后, 换含有筛选药物 0.8 mg/L Puromycin 的培养液. 每 2~3 天更换培养液, 大约 7~8 天后, 可见有细胞克隆形成. 选取独立的、边缘清晰、生长旺盛的克隆, 用克隆环挑取后转移至 48 孔细胞培养板中. 待细胞克隆长至 80%~90%密度时, 消化、分离出 2/3 的细胞抽取基因组 DNA, 用于 PCR 和 Southern blot 鉴定, 其余细胞继续培养, 隔日冻存。

1.2.4 胎儿成纤维细胞克隆的 PCR 鉴定. 根据获得山羊抗体重链基因组序列(NCBI GenBank™ 序列号为 EU182621)设计 5'同源臂内引物 P9 和 3'同源臂外引物 P11, P10 为 puromycin 抗性基因表达框架内特异性引物, 序列如下: P9, GGT AAC GGC AAT AGC AAG TC; P10, GTT GCC AGC CAT CTG TTG TT; P11, TTG AGG TTC TCG AAG CCT TC. 使用 2 组引物: P9 和 P11, P10 和 P11, 对抗性细胞克隆进行 PCR 鉴定. 用 FlexiGene DNA Kit 试剂盒抽取细胞克隆的基因组 DNA 为模板, 用 TAKARA LA Taq 体系(2×GC 缓冲液 I)进行 PCR 扩增. 反应条件分别为: 94℃, 30 s; 59℃, 30 s; 72℃, 5 min, 30 个循环. 94℃, 30 s; 59℃, 30 s;

72℃, 3.5 min, 30 个循环. 筛选得到的阳性克隆重新用引物 P10 和 P11 进行扩增并回收产物送测序.

1.2.5 同源重组细胞克隆的 Southern blot 鉴定. 取约 10 μ g 抗性细胞克隆的基因组 DNA, 经 *Sac* I 酶切后进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 0.8%), 再通过毛细管法将 DNA 转移到尼龙膜上(参照《分子克隆实验指南》第三版), 紫外交联法固定. 根据获得的山羊抗体重链基因组序列(NCBI GenBank™ 序列号为 EU182621)设计引物 Ps, GAT GGA AAG CGG ATA GTG TCT G, 和 Pas, AGG AAG ATG TCG GCA AAG GAT, 扩增 3'同源臂内 503 bp 基因片段作为探针, 32 P 标记后与结合有基因组 DNA 的尼龙膜 42℃ 过夜杂交, 洗膜后于 -70℃ 用 X 光片曝光 72 h 以获得放射自显影图像.

2 结 果

2.1 原代山羊胎儿成纤维细胞的培养

图 1 为原代培养的山羊胎儿成纤维细胞, 胞体呈梭形或不规则三角形, 细胞生长状况良好, 可见中期分裂球细胞(图 1 中箭头所示亮圆点).

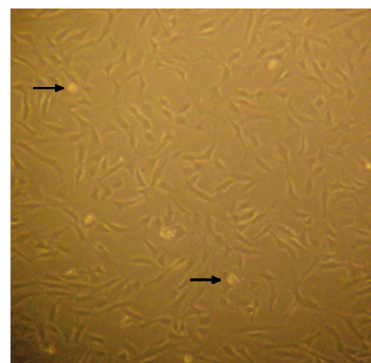


Fig. 1 Goat fetal fibroblasts

The cells in M phase are shown by arrows. Magnification, 40 $\times$.

2.2 正负筛选型打靶载体的构建

GTIgH 打靶载体见图 2. 其同源臂由基因组中连续的 7.1 kb 的长臂片段和 3.1 kb 的短臂片段构成, 长臂包括部分 J 区序列, 转换区(S_{μ}), 及部分 C_{μ} 区, 短臂包括部分 C_{μ} 区序列. PGK 为启动子的 Puromycin 表达框架被插入到 C_{μ} 区外显子 CH2 中的 *Bgl* II 位点, 为正筛选基因, 重组后可起到破坏 C_{μ} 阅读框的作用, 3'同源臂外 DTA 为负筛选基因. 构建完成的载体经酶切及测序证实正确.

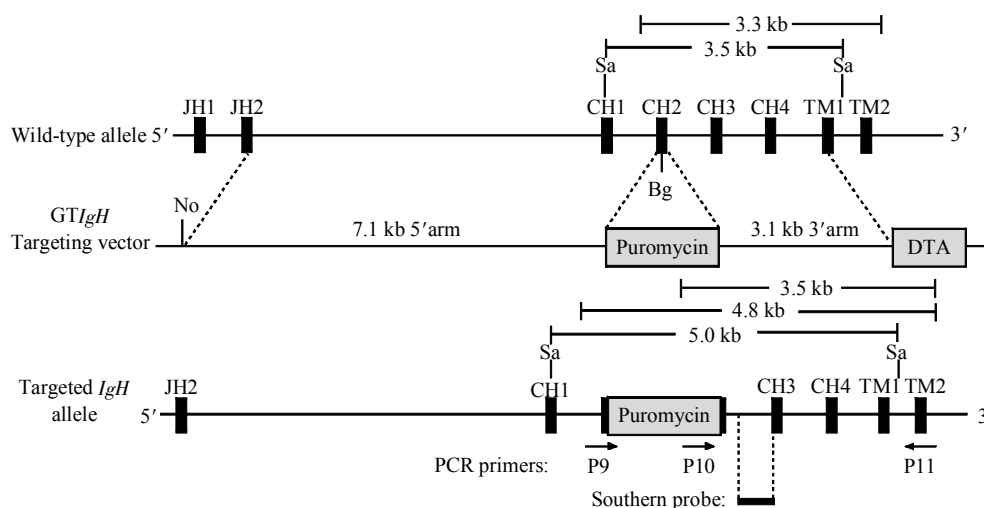


Fig. 2 Targeting of *IgH* in goat fibroblast

PCR primers and Southern blot probes are indicated in the map of targeted *IgH* locus. The length of PCR products of GT211 by P9 plus P11 primers are 3.3 kb and 4.8 kb, while the wild type is 3.3 kb. PCR amplification of GT211 by P10 plus P11 primers yielded a 3.5 kb fragment. When digested with *Sac* I, the predicted size of Southern blot of GT211 are 3.5 kb and 5.0 kb, while the wild type is 3.5 kb. Restriction enzyme sites: Bg, *Bgl* II; Sa, *Sac* I; No, *Not* I.

2.3 抗性克隆的获得及 PCR 鉴定

将经 *Not* I 线性化的打靶载体转染 GEF88 成纤维细胞, 经过两批次转染、药物筛选后共获得 362 个抗性细胞克隆. 抽取细胞克隆基因组 DNA 后通

过两对引物进行 PCR 鉴定, 第一对引物为位于 5' 同源臂内的 P9 和 3' 同源臂外侧的 P11, PCR 扩增后未中靶细胞克隆中会产生一条 3.3 kb 片段, 中靶细胞克隆会产生两条带: 一条来自野生型的 *IgH* 等

位基因的 3.3 kb 片段, 另一条来自于中靶的 *IgH* 等位基因的 4.8 kb 片段(图 3)。第二对引物为位于 Puromycin 表达框架内的 P10 和位于 3'同源臂外侧的 P11, PCR 反应后未中靶的细胞克隆无条带产生, 中靶细胞克隆会产生一条 3.5 kb 片段。两组引物的 PCR 鉴定结果显示, 在获得的 362 个细胞克隆中, GT211 为阳性克隆, 结果见图 3。GT211 细胞经引物 P9、P11 扩增后, 产生的 4.8 kb 条带比 3.3 kb 条带稍弱, 可能原因有二: 一是 PCR 扩增较长的等位基因难度大于较短的等位基因, 而且由于 Puromycin 阅读框中 GC 含量较高, GT211 的中靶等位基因相对于未中靶野生型等位基因 PCR 较难扩增, 因竞争性抑制作用而出现 4.8 kb 条带比 3.3 kb 条带稍弱; 二是由于 GT211 细胞克隆为混合克隆, 其中仍混有少数未中靶细胞, 数量上野生型等位基因多于中靶等位基因, 因而 PCR 扩增时出现 4.8 kb 条带比 3.3 kb 条带稍弱的现象。

将经 PCR 筛选为阳性的 GT211 细胞克隆再次

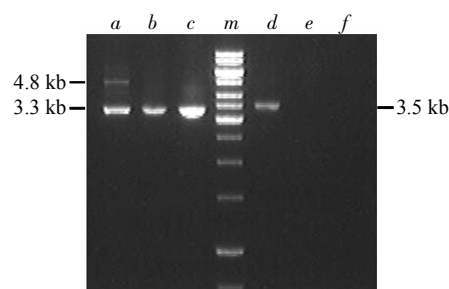


Fig. 3 PCR analysis of Puromycin-resistant colonies

a: Primers P9 plus P11, template GT211 DNA; b: Primers P9 plus P11, template GT210 (untargeted) DNA; c: Primers P9 plus P11, template GEF88 DNA; d: Primers P10 plus P11, template GT211 DNA; e: Primers P10 plus P11, template GT210 DNA; f: Primers P9 plus P11, template GEF88 DNA. M: 1 kb DNA marker.

用引物 P10、P11 扩增, 回收的 PCR 产物送测序, 结果表明, 该产物确为正确重组片段, 两侧分别为重组进入山羊抗体重链基因的 Puromycin 抗性基因及同源臂内外接头序列。测序结果见图 4。

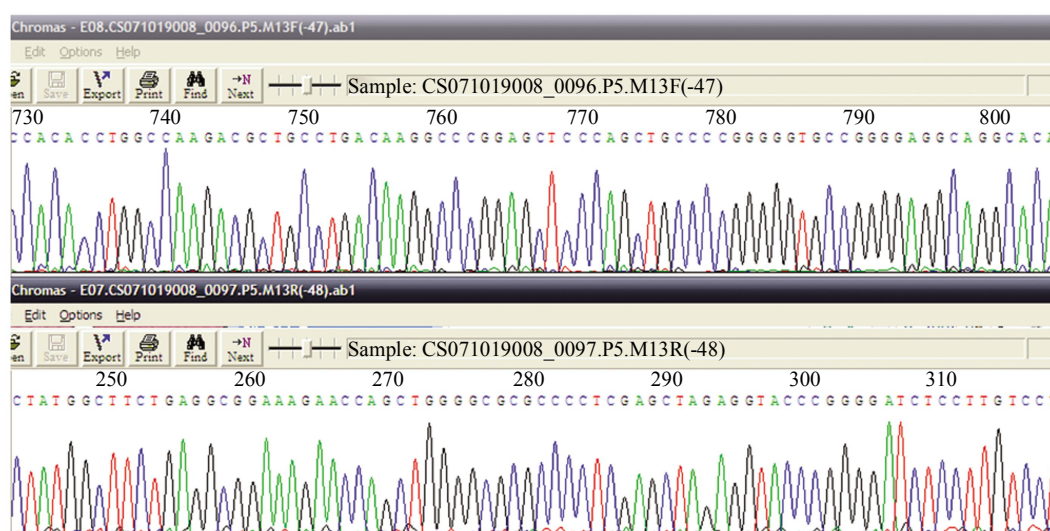


Fig. 4 DNA sequencing result of GT211 cell clone

Two primers P10 and P11 were used for PCR to detect the recombination on the Puromycin and 3' homologous arm of GTIgH-targeted vector in GT211 cell clone.

2.4 基因组 Southern blot 进一步鉴定中靶细胞

为了进一步确证中靶细胞的正确性, 采用基因组 Southern blot 的方法来进行验证。具体如下, 用 *Sac* I 分别酶切野生型 GFF88 细胞和 GT211 细胞基因组 DNA, 以 3'同源臂内 503 bp 片段作为探针(图 2), 若发生了同源重组, 将在抗体重链 C μ 区的第二个外显子内插入 1.5 kb Puromycin 基因。因

此中靶细胞的基因组 DNA 用 *Sac* I 酶切并与探针杂交后, 将会出现两条条带: 一条来自野生型 *IgH* 等位基因的 3.5 kb 片段, 另一条来自中靶 *IgH* 等位基因的 4.8 kb 片段。Southern blot 结果进一步证明了 GT211 细胞克隆为正确的同源重组克隆, 结果见图 5。

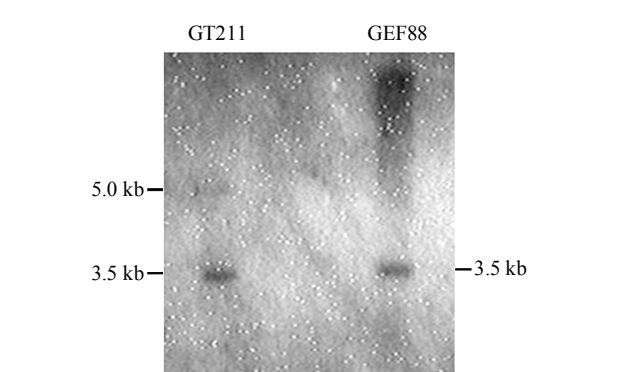


Fig. 5 Southern blot analysis of GT211 cell clone
Genomic DNA purified from wild-type GEF88 cells or GT211 cells was digested with *Sac* I and was hybridized with a 503 bp probe.

根据两次细胞转染实验及检测结果分析 *IgH* 位点的打靶效率为 0.27%，结果见表 1。

Table 1 Targeting efficiency of <i>IgH</i> locus of GEF			
Transfection time	No.1	No.2	Total
Number of resistant clones	98	264	362
Number of targeted clones	0	1	1
Targeted ratio (%)	0	0.38	0.27

3 讨 论

细胞中外源基因与内源基因的重组效率受较多因素的影响，主要有：a. 是否为同基因型，提高外源基因序列与靶位基因序列的同源性有助增加重组效率。b. 同源臂的长度。一般认为较长的同源臂有利于 DNA 分子间的同源识别和杂合 DNA 链的形成。本实验中打靶载体同源臂长度适宜(10 kb)，并采用了同基因型的同源臂，有助于同源重组事件的发生。c. 靶位点的特异性，不同靶位点因其在染色体中结构的不同也会出现不同的重组倾向，基因的转录活性也有利于外源 DNA 链与内源基因的配对识别过程。在细胞中转录活性高的基因，较易于发生同源重组。本实验中胎儿成纤维细胞是已分化的体细胞，其中基因的转录与表达都与 ES 细胞存在较大差异，呈现出更低的重组效率。至今为止，在体细胞中发生同源重组的位点屈指可数：绵羊的 *COLIA1*^[3]，猪和绵羊的 *GGTA1*^[4~6]，牛和羊的 *PRNP*^[6~8]，牛的 *IgH* 位点。一般胎儿成纤维细胞重组效率要比 ES 细胞低两个数量级，Denning 等^[10]发现绵羊成纤维细胞的打靶效率仅为 0.8%~9%。这是基于成纤维细胞中转录活性基因重组效率的研

究而得出的结论，沉默基因的重组效率表现更低，甚至为零^[9, 11]。Thomson 等认为，由于乳蛋白等非表达基因存在于异染色质中，发生重组的细胞由于抗性基因位于异染色质而不表达，导致细胞在药物筛选的过程中死亡。本研究中 *IgH* 位点在成纤维细胞中为非表达基因，能够获得成功的原因可能在于抗体基因的特殊性，推测它在成纤维细胞中并非存在于染色质致密区，较伸展的结构有利于其发生重组及重组后的抗体基因的表达。我们在克隆的筛选过程中一直保持 0.8 mg/L 的药物筛选浓度，而并非 Kuroiwa 等采用的只加入抗性药物筛选 48 h 方法。体细胞的同源重组还受到细胞状态与细胞传代次数的影响，制作的胎儿原代细胞必须至少能够传代 45 次才可完成整个打靶事件，否则多数发生重组的细胞会在抗性基因筛选过程中衰亡，由此可见用于转染的原始细胞株的选择也很重要。本试验所用胎儿成纤维细胞经过预试验能够传代 120 次，完全可以用于重组克隆的筛选及扩增。

抗体基因的敲除是基因打靶领域研究的热点之一，因其序列和结构复杂，并与抗体的产生和疾病治疗密切相关而备受关注。在有关人源化抗体的研究中，已获得内源抗体重链及轻链分别敲除并转入人抗体基因的小鼠，可成功表达人的抗体^[12~14]，转入人抗体基因的内源抗体基因失活的小鼠相对野生型小鼠可表达更高的人源抗体。在敲除小鼠抗体基因时，往往选择 J 区及 C μ 为靶位点^[15~17]。整个 J 区基因的敲除可阻断抗体基因的重排，B 细胞发育受阻，C μ 基因的敲除可使 B 细胞无法形成膜型 IgM，B 细胞无法成熟。本实验选择 C μ 基因作为靶位点，在第 2 个外显子中插入 puromycin 基因，重组后插入的 puromycin 基因的终止密码子及 PolyA 序列可阻断其表达，实现失活内源抗体基因的目的。获得的抗体重链单基因敲除细胞株可用于制备 Ig 缺陷型克隆山羊，用于人源化抗体工程的研究，也可用作抗体缺失的大动物疾病模型。

参 考 文 献

- 1 Piedrahita J A. Gene targeting in domestic species: a new beginning. *Transgenic Res*, 2000, 9(4~5): 261~262
- 2 Clark A J, Burl S, Denning C, *et al*. Gene targeting in livestock: a Preview. *Transgenic Res*, 2000, 9(4~5): 263~275
- 3 McCreath K J, Howcroft J, Campbell K H, *et al*. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, 405(6790): 1066~1069
- 4 Dai Y, Vaught T D, Boone J, *et al*. Targeted disruption of the alpha 1, 3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol*, 2002,

- 20(3): 251~255
- 5 Lai L, Kolber-Simonds D, Park K W, *et al.* Production of alpha-1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, **295**(5557): 1089~1092
 - 6 Denning C, Burl S, Ainslie A, *et al.* Deletion of the alpha (1, 3) galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**(6): 559~562
 - 7 Yu G, Chen J, Yu H, *et al.* Functional disruption of prion protein in cloned goats. *J Gen Virol*, 2006, **87**(pt 4): 1019~1027
 - 8 Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H, *et al.* Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. *Nat Genet*, 2004, **36**(7): 775~780
 - 9 Thomson A J, Marques M M, McWhir J. Gene targeting in livestock. *Reprod Suppl*, 2003, **61**: 495~508
 - 10 Denning C, Dickinson P, Burl S, *et al.* Gene targeting in primary fetal fibroblasts from sheep and pig. *Cloning Stem Cells*, 2001, **3**(4): 221~231
 - 11 Marques M M, Thomson A J, McCreath K J, *et al.* Conventional gene targeting protocols lead to loss of targeted cells when applied to a silent gene locus in primary fibroblasts. *J Biotechnol*, 2006, **125** (2): 185~193
 - 12 Magadán S, Valladares M, Suarez E, *et al.* Production of antigen-specific human monoclonal antibodies: comparison of mice carrying IgH/ κ or IgH/ κ/λ transloci. *Biotechniques*, 2002, **33**(3): 680~690
 - 13 Mendez M J, Green L L, Corvalan J R, *et al.* Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat Genet*, 1997, **15**(2): 146~156
 - 14 Tomizuka K, Yoshida H, Uejima H, *et al.* Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice. *Nat Genet*, 1997, **16**(2): 133~143
 - 15 Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, *et al.* Double trans-chromosomal mice: Maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and K loci and expression of fully human antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(2): 722~727
 - 16 Chen J, Trounstein M, Alt F W, *et al.* Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *Int Immunol*, 1993, **5**(6): 647~656
 - 17 Jakobovits A, Vergara G J, Kennedy J L, *et al.* Analysis of homozygous mutant chimeric mice: deletion of the immunoglobulin heavy-chain joining region blocks B-cell development and antibody production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(6): 2551~2555

Knockout of The Gene Encoding Immunoglobulin-mu in Goat Fetal Fibroblasts*

LI Bei¹⁾, YU Hui-Qing²⁾, ZHU Cai-Hong¹⁾, XIE Fa-Zhan¹⁾, CHEN Jian-Quan²⁾, CHENG Guo-Xiang^{1,2)}**

(¹⁾School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; ²⁾Shanghai Transgenic Research Center, Shanghai 201210, China)

Abstract Gene targeting in livestock fibroblasts has proven extremely difficult to achieve, particularly on silent gene locus. To obtain IgH functional disruption goats used for humanized antibody research, the goat *IgH* gene, which is transcriptionally silent in fibroblast, was knocked out and the targeted fibroblasts can be used to produce goats with *IgH* disruption through somatic cell clone. The goat immunoglobulin heavy chain J-C μ fragment was amplified from the genomic DNA of goat fetal fibroblasts GEF88 through PCR and used as homologous arm to construct an isogenic Positive-Negative Selective targeting vector GTIgH. Then the GEF88 were transfected with the linearized targeting vector GTIgH through electroporation and selected in cell culture medium with 0.8 mg/L puromycin. 1 of the 362 drug-resistant clones was positive for targeting events through PCR screen, and the targeted clone was further confirmed by sequencing and Southern blotting. This suggests that one allele of *IgH* gene has been successfully knocked out in goat fetal fibroblasts.

Key words gene knockout, gene targeting in somatic cell, goat fetal fibroblast, immunoglobulin heavy chain gene(*IgH*), silent gene

*This work was supported by a grant from Science and Technology Commission of Shanghai Municipality International Collaborative Project(055407033).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-58951015-200, E-mail: chenggx@cngenon.com

Received: December 18, 2007 Accepted: March 7, 2008