

# BPOZ 基因剔除小鼠模型的建立\*

项佑贵<sup>1,4)</sup> 孙霞<sup>2)</sup> 王龙<sup>2,3,4)</sup> 严兰珍<sup>2)</sup> 杨桦<sup>2)</sup> 刘伟<sup>2)</sup>  
许勇<sup>1,4)</sup> 徐国江<sup>2)</sup> 王一<sup>2)</sup> 费俭<sup>2)</sup> 傅继梁<sup>2)</sup> 王铸钢<sup>1,2,3,4)</sup>\*\*

(<sup>1</sup>)上海第二医科大学基础医学院医学遗传学教研室, 上海 200025; (<sup>2</sup>)上海南方模式生物研究中心, 上海 201203;

(<sup>3</sup>)上海第二医科大学附属瑞金医院医学基因组学国家重点实验室, 上海 200025;

(<sup>4</sup>)中国科学院上海生命科学研究院-上海第二医科大学健康科学中心, 上海 200025)

**摘要** BPOZ 是在卵巢癌等肿瘤组织中表达下调的细胞生长抑制基因, 建立 BPOZ 基因剔除小鼠模型, 可以在体研究 BPOZ 基因的生物学功能及其与肿瘤发生的关系创造条件. 运用生物信息学手段确定小鼠 BPOZ 基因组序列, 设计基因剔除策略, 构建完成了基因剔除载体 XpPNT-BPOZ. 以电穿孔方法将基因剔除载体导入 ES 细胞, 用 G418 和 Ganciclovir 进行正负筛选, 获得抵抗克隆, PCR 和 DNA 印迹鉴定出正确同源重组的 ES 细胞克隆. 将同源重组的 ES 细胞注入小鼠囊胚, 获得嵌合体小鼠. 嵌合体小鼠与 C57BL/6J 小鼠交配后获得 Agouti 毛色的小鼠 30 只, 其中 15 只为 BPOZ 基因剔除杂合子小鼠, 阳性率为 50%. 在雌雄杂合子交配的后代中获得纯合子小鼠. 初步的表型观察发现 BPOZ 基因剔除小鼠发育正常, 有繁殖能力, 进一步的表型分析工作正在进行之中.

**关键词** BPOZ 基因, 细胞生长抑制基因, 基因剔除

学科分类号 Q78

BPOZ 又名 ABTB1 (ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing gene 1), 2000 年由 Dai 等<sup>[1]</sup>从人类白细胞 cDNA 文库中克隆, 基因定位于染色体的 3q21.3, 其序列在不同种属间相当保守. BPOZ 蛋白的 C 端有两个 BTB 结构域, N 端有 ankyrin 重复结构域. BTB (broad-complex, tramtrack and bric a brac) 结构域是一个进化保守的结构域, 常与 C2H2 型锌指、Kelch 等不同结构域共同出现在一些与转录调控及细胞骨架相关的蛋白质中, 约 5%~10% 含 C2H2 型锌指结构域的转录因子其 N 端有 BTB 结构域. 许多含 BTB 结构域的蛋白质在发育和肿瘤发生中起重要作用, 如 Bab 调节果蝇卵巢、节肢的发育<sup>[2]</sup>, PLZF、BCL6 等与白血病、淋巴瘤的发病密切相关<sup>[3]</sup>. Ankyrin 重复结构域是一个蛋白质相互作用的结构域, 决定细胞发育命运的 Notch 基因以及控制细胞周期 G1 至 S 期转变的 P16/INK4a 基因均含 ankyrin 重复结构域, 在多种肿瘤中可见 P16/INK4a 蛋白 ankyrin 重复结构域的突变<sup>[4,5]</sup>.

BPOZ 在卵巢癌中的表达降低, 基因芯片研究发现 PTEN 可诱导子宫内膜癌细胞 BPOZ 表达升高<sup>[6]</sup>. BPOZ 能抑制子宫内膜癌、卵巢癌、结肠癌细胞的克隆形成, 转染并稳定表达 BPOZ 的结肠癌细胞生长变慢, 细胞周期的 S 期延长并有明显的 G1/S 转变延缓, 抑制内源 BPOZ 表达后则细胞的生长加速. BPOZ 在卵巢癌组织中表达下调且能抑制一

些肿瘤细胞生长, 提示 BPOZ 是一个细胞生长或肿瘤抑制基因, 并可能参与 PTEN 信号传导通路<sup>[6]</sup>.

蛋白质结构域组成及 BPOZ 抑制细胞生长的研究提示, BPOZ 与分化发育及肿瘤发生密切相关, BPOZ 可能是一个有重要功能的抑癌基因. 基因剔除 (gene knockout) 是在动物整体水平研究基因功能的一种直接有效方法. 本研究成功构建了 BPOZ 基因剔除载体, 通过 ES 细胞打靶筛选到同源重组的克隆, 囊胚注射获得嵌合体小鼠, 嵌合体小鼠育种获得 BPOZ 基因缺失的纯合子小鼠, 从而成功建立了 BPOZ 基因剔除的小鼠模型. 对于进一步研究 BPOZ 基因在分化发育以及在肿瘤发生中的作用有非常重要的意义.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1** 来源于 129S1/Sv 品系小鼠的 ES 细胞株 CJ7 及载体 X-pPNT 由本实验室保存, 129S1 和 C57BL/6J 品系小鼠由本实验室常规保种.

**1.1.2** 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、蛋白

\*国家自然科学基金资助项目 (30370793), 国家杰出青年科学基金 (39925023), 教育部“长江学者奖励计划”(O0TPJS111), 国家高技术“863”计划 (2001AA216081), 上海市科学技术发展基金 (99JC14029, 99XD14005) 资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 021-64457997 E-mail: zhugangw@shsmu.edu.cn

收稿日期: 2004-01-07, 接受日期: 2004-02-06

酶 K、各种 DNA 聚合酶、random primer labeling kit、LA PCR kit 和 RT-PCR kit 等购自 NEB 公司、Promega 公司、Takara 公司、上海生工生物工程技术公司等。质粒抽提及凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司。尼龙膜 Nytran Supercharge 及 WESTRAN PVDF 膜为 Schleicher & Schuell 公司产品, DNA 印迹杂交液为 Clontech 公司产品。羊抗 BPOZ 多抗 (ab1077) 购自 Abcam 公司, 兔抗羊二抗购自 Sigma 公司。<sup>32</sup>P dCTP、ECL blocking 试剂和 ECL Plus 蛋白质印迹检测试剂购自 Amersham Biosciences 公司。

**1.1.3** 细胞培养相关试剂, 包括 DMEM 液体培养基 (high glucose, ES-cell-qualified)、非必需氨基酸、谷氨酰胺、PBS、 $\beta$ -巯基乙醇 (2-mercaptoethanol)、胎牛血清 (ES-cell-qualified)、G418、Gancyclovir、二甲亚砜 (DMSO)、青霉素、链霉素、胰蛋白酶、胶原 (Gelatin) 等试剂均为 Gibco-BRL 公司、Sigma 公司产品, 白血病抑制因子 (LIF) 为 CHEMICON 公司产品。

**1.1.4** 引物由上海生工生物工程技术公司和上海申友生物技术公司合成。BPOZ5'armU: TACG-AATTCGCCGGATGCCCAAGCTCAAACACG; BPOZ5'armD: AGAGGTACCGGGCGGGGAAGGAGGGGAAC-AGAA; BPOZ3'armU: GTGGTCGACGGGGCAGGCT-TTGGGGAGTG; BPOZ3'armD: AATGCGGCCGCCT-GTGCTGAGGTGCTGTTGAGTC; BPOZ5'JDU: CC-AGGGCTGTCAGGGCTCTAACT; BPOZ5'JDD: TC-GCCTTCTATCGCCTTCTTGACG; BPOZ3'JDU: GC-TACCGGATGTGGAAT; BPOZ3'JDD: CTTGCTTT-TCCTCAGTGC; BPOZWT: GGAATGCCTCTGAGA-AGGGTAAGG; BPOZ5PU: GGCCTCTGCCTTTGGT-GAACTC; BPOZ5PD: AGCCAAGCACAATGATG-ATGAAG; BPOZRT5' GTGGAAGGGCAAGAGCGT-CGTG; BPOZRT3' CCAGAAGGGCCCGGAAGTAG-TCA。

**1.1.5** 电穿孔仪 Gene Pulser II System 及电极杯为 Biorad 公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1** 打靶载体构建: 从 UCSC Genome Bioinformatics ([www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu)) 数据库中获得小鼠 BPOZ 基因组序列。根据 BPOZ 基因组序列设计打靶方案。用 BPOZ5'armU 和 BPOZ5'armD 引物从 ES 细胞基因组 DNA 中扩增出 5'同源臂, 以 BPOZ3'armU 和 BPOZ3'armD 引物扩增出 3'同源臂, 引物末端均带

有限制性酶切位点。以 X-pPNT 质粒为母体, 先将 5'同源臂克隆至 *EcoR* I、*Kpn* I 位点, 再将 3'同源臂克隆至 *Sal* I、*Not* I 位点, 构建成打靶载体 XpPNT-BPOZ, 并用限制性酶切及测序鉴定。

**1.2.2** 滋养层细胞 (小鼠胚胎成纤维细胞) 制备: 将含有 neo 转基因的 129S1 小鼠 (怀孕 13 天) 断颈处死, 取出胚胎后去除头和内脏, 剩余组织剪碎后用 0.25% 胰酶消化收集细胞, DMEM 培养至第四代时加入丝裂霉素 C 至终浓度 10 mg/L, 37°C 孵育 2 h 后收集细胞冻存备用。

**1.2.3** ES 细胞培养: 培养皿以 0.1% Gelatin 包被后接种丝裂霉素 C 处理的滋养层细胞 (每 10 cm 盘接种  $1 \times 10^6$  个滋养层细胞), 过夜培养后即可接种 ES 细胞。ES 细胞完全培养基为 DMEM 中含  $10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -巯基乙醇, 100 U/ml 青霉素, 50 mg/L 链霉素, 15% ES-胎牛血清, 1 000 U/ml LIF。

**1.2.4** ES 细胞电穿孔 DNA 转移: 处于对数生长期的 ES 细胞加 0.1% 胰蛋白酶-EDTA 消化并计数, 加适量的 PBS 使细胞密度达到约  $1.2 \times 10^7$ /ml。取 0.8 ml 上述 ES 细胞悬液, 加入约 40  $\mu$ g 经 *Not* I 线性化的 XpPNT-BPOZ 质粒 DNA, 混匀后转移至无菌电穿孔杯中以 240 V、500  $\mu$ F 的电参数进行电穿孔, 重新悬浮后分至两个 10 cm 盘培养。

**1.2.5** 正负药物筛选: ES 细胞在电穿孔 24 h 后换含有选择药物 G418 (终浓度为 400 mg/L) 和 Gancyclovir (终浓度为 2  $\mu$ mol/L) 的培养液进行选择培养, 每天更换培养液。经 7~8 天选择性培养, 抗性 ES 细胞长成肉眼可见的克隆时即可进行挑取。

**1.2.6** 双抗性细胞克隆的挑取及培养: 挑取抗性克隆放入含有 20  $\mu$ l 0.1% 胰蛋白酶-EDTA 的 96 孔板 (凹底) 中消化约 5 min, 轻轻吹打, 使细胞分散, 转移至 96 孔培养板中培养, 传至 48 孔板后, 待细胞长满到 60%~80% 后取大部分细胞冻存, 剩余细胞继续培养至长满 100% 后用于提取基因组 DNA。

**1.2.7** ES 细胞基因组 DNA 的提取: 在长满 ES 细胞的 48 孔板中吸去培养液, 每孔加入 500  $\mu$ l 裂解液 (含 1 g/L 蛋白酶 K), 55°C 过夜消化后加入无水乙醇常规提取 DNA, 溶于 100  $\mu$ l TE 中。

**1.2.8** 同源重组克隆的 PCR 鉴定: 在 BPOZ 同源重组臂外侧分别设计 BPOZ5'JDU 和 BPOZ3'JDD 引物, 在 neo 序列上设计 BPOZ5'JDD 和 BPOZ3'JDU 引物。用 BPOZ5'JDU 与 BPOZ5'JDD 引物配对, 用

Takara 公司的 GC Buffer I 配 PCR 反应液鉴定 5'臂同源重组, 反应条件为: 95°C 5 min 变性后, 94°C 1 min, 61°C 1 min, 72°C 3 min, 进行 35 个循环后, 72°C 5 min, 同源重组克隆应扩增出 3.1 kb 片段; 用 BPOZ3'JDU 和 BPOZ3'JDD 引物配对鉴定 3'臂同源重组, 反应条件除 72°C 延伸 4 min 外, 其余同 5'臂反应条件. 同源重组克隆应扩增出 4.4 kb 片段.

**1.2.9 DNA 杂交:** 取 30 μl 基因组 DNA, 用 *Hind*III 限制性内切酶消化过夜, 按常规转膜. 用 BPOZ5PU 和 BPOZ5PD 扩出 5'同源重组臂外 483 bp 的 DNA 片段作为探针, 按 NEB 公司的 random primer labeling kit 的说明标记 <sup>32</sup>P, 杂交按 Clontech 公司 Expresshyb 杂交液使用说明书进行. X 光片置于 -80°C 冰箱中放射自显影.

**1.2.10 囊胚注射:** C57BL/6J 品系小鼠怀孕 3.5 天时处死采集囊胚. 每个囊胚显微注射 8~15 个 ES 细胞, 注射后的囊胚移植给假孕小鼠 (每侧子宫移植囊胚 4~8 个), 产下的后代即是嵌合体小鼠.

**1.2.11 PCR 鉴定小鼠基因型:** 在小鼠 BPOZ 基因组被剔除的区域设计引物 BPOZWT, 与 BPOZ5'JDU 配对, 可在野生型基因组中扩增出 2.9 kb 片段. 因此 BPOZ5'JDU 与 BPOZ5'JDD、BPOZWT 在同一体系内进行 PCR 反应时, 野生型小鼠仅能扩增出 2.9 kb 片段, 纯合子小鼠仅能扩增出 3.1 kb 条带, 而杂合子小鼠能同时扩增出这两条带. 用 Takara 公司的 GC Buffer I 配 PCR 反应液体, 扩增条件为: 95°C, 5 min 变性后, 95°C 1 min, 61°C 1 min, 72°C 3 min, 进行 35 个循环后, 72°C 5 min.

**1.2.12 RT-PCR:** 提取三种基因型的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 的 mRNA 逆转录成 cDNA, 用

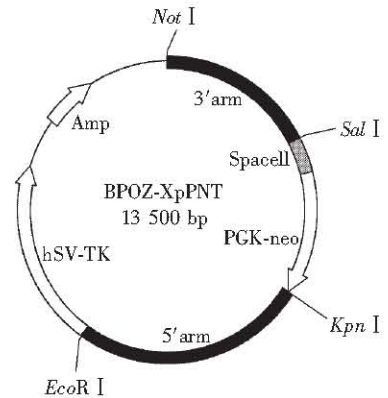
BPOZRT5'和 BPOZRT3'引物行 RT-PCR 检测 BPOZ 的表达.

**1.2.13 蛋白质印迹:** 取三种基因型小鼠的心、肾等组织, 用新加蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液匀浆, 离心取上清用 G250 比色法定量蛋白质浓度. 取相同量的总蛋白上样, 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 结束后半干法转膜, 用 5% 的 ECL blocking agent-TBST 4°C 封闭过夜, 加 TBST 稀释的抗 BPOZ 一抗 (1:600) 工作液室温孵育 2 h, 洗膜后加 TBST 稀释的二抗 (1:8 000) 室温 1 h, 洗膜后按 ECL plus 试剂盒的说明进行化学发光检测.

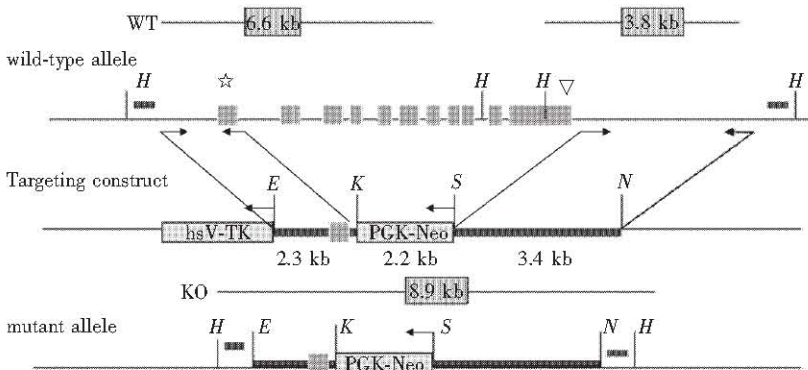
**2 结 果**

**2.1 质粒构建及打靶策略**

完成构建的打靶质粒用酶切及测序鉴定同源臂插入及方向, 打靶质粒图谱见图 1. 用 *Not* I 线性化后用于 ES 细胞打靶, 打靶策略见图 2.



**Fig. 1 BPOZ gene targeting vector**



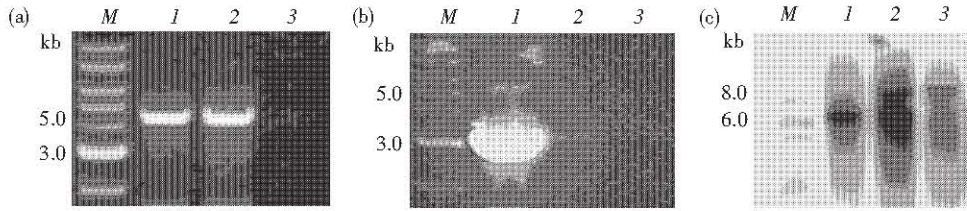
**Fig. 2 BPOZ gene targeting strategy**

Thick lines denote homologous arms, black horizontal arrows denote the primer pairs used for amplification of homologous arms. The homologous arms are 2.3 kb and 3.4 kb respectively, part of intron 1 and exon 2 to exon 12 were deleted. ■: exon; ☆: ATG; ▽: TGA; E: *EcoR* I; K: *Kpn* I; S: *Sal* I; N: *Not* I; H: *Hind*III.

## 2.2 同源重组 ES 细胞克隆鉴定

第一次打靶共获得抗性克隆 80 个, PCR 及测序结果表明 14 号克隆仅 3' 臂发生了同源重组。第二次打靶共获得抗性克隆 42 个, 其中 36 号为正确同源

重组克隆。PCR 鉴定结果见图 3a、3b, 同源重组的 ES 细胞克隆 DNA 印迹鉴定见图 3c, 其中 BPOZ 基因剔除的纯合型 ES 细胞克隆, 是杂合型 ES 细胞经高浓度 G418 筛选得到 (未发表的资料)。



**Fig. 3 Identification of targeted ES cell clones by PCR and Southern blot**

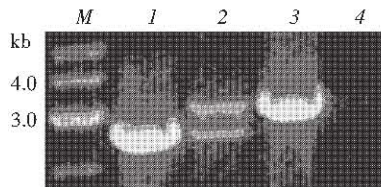
(a) Recombined event at 3' terminal end should be expected with 4.4 kb fragment in PCR reaction. *M*: NEB 1 kb DNA ladder; *I*: ES cells clone #36; 2: ES cells clone #14; 3: Negative control. (b) Recombined event at 5'-end should be expected with 3.1 kb fragment in PCR reaction. *M*: NEB 1 kb DNA ladder; *I*: ES cells clone #36; 2: ES cells clone #14; 3: Negative control. (c) Southern blot analysis with 5' probe (genomic DNA was digested with *Hind*III) shows that the fragment derived from the wild type allele is 6.6 kb and that from targeted allele is 8.9 kb. *M*: NEB 1 kb DNA ladder; *I*: Wild type ES cells clone; 2: Heterozygous ES cells clone; 3: Homozygous ES cells clone.

## 2.3 嵌合体育种

显微注射共获得毛色嵌合率大于 50% 的雄性鼠 18 只。用雄性嵌合小鼠与 C57BL/6J 纯系小鼠交配, 共获得 ES 细胞来源的灰鼠 30 只。经鉴定, 其中 15 只为阳性杂合小鼠, 符合孟德尔遗传定律。

## 2.4 杂合子小鼠育种及基因剔除小鼠基因型鉴定

BPOZ 杂合子小鼠相互交配进行育种。对 2~3 周龄的小鼠剪尾巴提取基因组 DNA 用 PCR 进行基因型鉴定, 结果表明新生小鼠中有纯合子, 说明 BPOZ 基因剔除没有导致纯合子小鼠胚胎致死, PCR 鉴定结果见图 4。



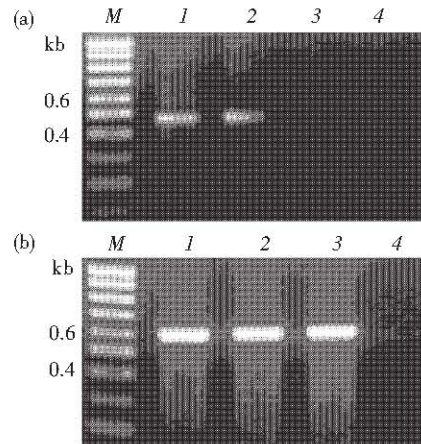
**Fig. 4 PCR for genotyping of BPOZ gene knockout mice**

Only 2.9 kb fragment could be amplified in wild type mice, 3.1 kb fragment in homozygous mice, 2.9 and 3.1 kb fragments in heterozygous mice. *M*: NEB 1 kb DNA ladder; *I*: Wild type mice; 2: Heterozygous mice; 3: Homozygous mice; 4: Negative control.

## 2.5 BPOZ 基因剔除小鼠半定量 RT-PCR 分析

杂合子与杂合子交配的雌鼠怀孕 13.5 天时处死, 分离胚胎成纤维细胞, 如上所述鉴定基因型后, 半定量 RT-PCR 分析 BPOZ 基因的表达情况。

结果表明, BPOZ 基因剔除的纯合型胚胎成纤维细胞无 BPOZ mRNA, 在 RNA 水平证明 BPOZ 基因剔除的纯合小鼠已无 BPOZ 基因的表达。



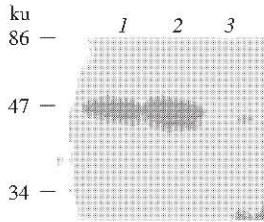
**Fig. 5 Semiquantitative RT-PCR analysis of BPOZ expression in gene knockout MEF cells**

A 464 bp fragment could be amplified in wild type MEF cells and heterozygous MEF cells but not in homozygous MEF cells. (a) Expression of BPOZ in MEF cells. *M*: NEB 1 kb DNA ladder; *I*: Wild type MEF; 2: Heterozygous MEF; 3: Homozygous MEF; 4: Negative control. (b) Expression of  $\beta$ -actin in MEF cells as control. *M*: NEB 1 kb DNA ladder; *I*: Wild type MEF; 2: Heterozygous MEF; 3: Homozygous MEF; 4: Negative control.

## 2.6 蛋白质印迹

用羊抗 BPOZ 多克隆抗体检测三种基因型小鼠肾、心等组织 BPOZ 蛋白的表达, 野生型和杂合子

小鼠能检测到 47 ku 左右的 BPOZ 蛋白带, 与制备该抗体的 Abcam 公司提供的小鼠肾的阳性检测结果一致. 而纯合子小鼠则检测不到该 BPOZ 蛋白带. BPOZ 基因剔除小鼠肾的蛋白质印迹结果见图 6.



**Fig. 6 Western blot analysis of BPOZ protein from BPOZ gene knockout mice**

BPOZ protein could be detected in wild type mice and heterozygous mice, but not in homozygous mice. 1: Wild type mice; 2: Heterozygous mice; 3: Homozygous mice.

## 2.7 BPOZ 基因剔除小鼠的初步表型观察

BPOZ 基因剔除的嵌合体、杂合子、纯合子小鼠能正常交配繁殖, 至断奶时杂合子和纯合子小鼠与野生型小鼠相比在外观和行为上未见明显异常, 但雄性纯合子到二月龄左右即易发生皮肤炎症或溃疡, 病理检查显示常伴有肺炎或肠炎, 提示 BPOZ 基因剔除的纯合子小鼠有免疫功能的损伤或缺陷. 进一步的研究正在进行中.

## 3 讨 论

BPOZ 基因有 12 个外显子, 第二外显子的不同剪接形成 BPOZ-1、BPOZ-2、BPOZ-3 共 3 种异构型, ankyrin 重复结构域在 BPOZ-1、BPOZ-3、BPOZ-2 这 3 种异构型中分别为无、1 个和 2 个, BPOZ-2、BPOZ-3 表达水平较高并受 PTEN 的诱导表达. Ankyrin 重复结构域是一个介导蛋白质相互作用的区域, Notch 蛋白就是通过其 ankyrin 重复结构域与 Deltex 结合并发挥其调控分化发育的功能<sup>[4]</sup>. BPOZ 三种剪接形式编码的蛋白 ankyrin 重复结构域有无和数目不同, 可能与其在不同组织及不同时间的不同功能有关. 我们在克隆 BPOZ cDNA 时发现, 3' 端也有不同的剪接形式, 但这种不同剪接并未影响到 C 端的 BTB 结构域, 其生物学意义需要进一步研究. 本研究设计的基因剔除方案除保留启动子区和第一外显子外, 将其余的外显子全部剔除, 可以保证对 BPOZ 基因不同剪接形式的完全灭活. 本研究通过 ES 细胞基因打靶获得一

个两条同源臂都发生重组的阳性克隆, PCR 和 DNA 印迹均证实, 该同源重组的阳性克隆一条染色体上的 BPOZ 基因从第二外显子开始被外源的 PGK-neo 序列替换, 成功实现了基因组水平的基因剔除. 该阳性克隆经显微注射后获得嵌合体小鼠, 嵌合体小鼠传代获得杂合子和纯合子小鼠, 半定量 RT-PCR 和蛋白质印迹证实, 在纯合子小鼠中已无 BPOZ 基因的表达, 进一步在基因转录水平和蛋白质水平证明纯合子小鼠 BPOZ 基因已被剔除. 总之, 本研究成功建立了 BPOZ 基因剔除的小鼠模型, 为 BPOZ 基因功能的在体研究奠定了基础.

BPOZ 蛋白含 BTB 和 ankyrin 重复两个结构域, 虽然含 ankyrin 重复或 BTB 结构域的蛋白质有很多, 但与 BPOZ 类似同时含这两个结构域的蛋白质却并不多见, 对这类蛋白质的功能目前也知之甚少. 研究较多的只有植物拟南芥的 NPR1 基因, NPR1 与含碱性亮氨酸拉链结构域的转录因子结合调节 PR (pathogenesis-related) 基因表达, 是拟南芥由水杨酸诱导系统获得性免疫 (systemic acquired resistance, SAR) 过程中的一个关键基因<sup>[7]</sup>. 从与 BPOZ 结构域组成相似的 NPR1、PLZF、Notch 等基因的生物学功能及作用机制推测, BPOZ 可能通过其 ankyrin 重复和 BTB 结构域与其他蛋白质结合并调节一些与细胞分化、发育、细胞增殖、细胞周期相关靶基因的转录, 从而发挥其生理功能及细胞生长抑制作用.

已有的研究显示, BPOZ 可能是一个肿瘤抑制基因<sup>[6]</sup>, 但对于 BPOZ 在肿瘤发生中的确切作用和抑制肿瘤细胞生长的分子机制, 以及 BPOZ 在 PTEN 信号途径中的位置和作用等均需进一步研究. 我们用基因剔除技术建立了 BPOZ 基因缺失的小鼠模型, 通过对 BPOZ 基因缺失小鼠的肿瘤易感性分析将可以明确 BPOZ 与肿瘤发生的关系.

综合 BPOZ 所在的染色体 3q21 在一些白血病及淋巴瘤中常有染色体断裂易位, BPOZ 在白细胞中高表达, BPOZ 抑制肿瘤细胞生长, ankyrin 重复和 BTB 结构域的功能以及 NPR1 在植物免疫中的作用<sup>[1-7]</sup>等信息来分析, BPOZ 可能与白细胞的分化成熟并与免疫系统密切相关. BPOZ 基因剔除的纯合子小鼠出现较高比例的皮肤溃烂, 可能就是小鼠免疫功能低下的一个表现. 有趣的是, PTEN 是一个重要的抑癌基因, 其基因剔除的杂合子小鼠也有自身免疫病等免疫功能缺陷<sup>[8]</sup>. 下一步我们将结合体内和体外的研究, 重点对本研究建立的

BPOZ 基因剔除小鼠的免疫功能及与肿瘤发生的关系进行研究。

### 参 考 文 献

- 1 Dai K S, Wei W, Liew C C. Molecular cloning and characterization of a novel human gene containing ankyrin repeat and double BTB/POZ domain. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **273** (3): 991 ~ 996
- 2 Coudere J L, Godt D, Zollman S, *et al.* The bric a brac locus consists of two paralogous genes encoding BTB/POZ domain proteins and acts as a homeotic and morphogenetic regulator of imaginal development in *Drosophila*. *Development*, 2002, **129** (10): 2419 ~ 2433
- 3 Ahmad K F, Engel C K, Prive G G. Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (21):

12123 ~ 12128

- 4 Matsuno K, Ito M, Hori K, *et al.* Involvement of a proline-rich motif and RING-H2 finger of Deltex in the regulation of Notch signaling. *Development*, 2002, **129** (4): 1049 ~ 1059
- 5 Rocco J W, Sidransky D. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res*, 2001, **264** (1): 42 ~ 55
- 6 Unoki M, Nakamura Y. Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene*, 2001, **20** (33): 4457 ~ 4465
- 7 Zhang Y, Fan W, Kinkema M, *et al.* Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (11): 6523 ~ 6528
- 8 Di Cristofano A, Kotsi P, Peng Y F, *et al.* Impaired Fas response and autoimmunity in Pten +/- mice. *Science*, 1999, **285** (5436): 2122 ~ 2125

## Generation of BPOZ Gene Knock-out Mouse Model\*

XIANG You-Gui<sup>1,4)</sup>, SUN Xia<sup>2)</sup>, WANG Long<sup>2,3,4)</sup>, YAN Lan-Zhen<sup>2)</sup>, YANG Hua<sup>2)</sup>, LIU Wei<sup>2)</sup>,  
XU Yong<sup>1,4)</sup>, XU Guo-Jiang<sup>2)</sup>, WANG Yi<sup>2)</sup>, FEI Jian<sup>2)</sup>, FU Ji-Liang<sup>2)</sup>, WANG Zhu-Gang<sup>1,2,3,4)</sup>\*\*

<sup>(1)</sup>Laboratory of Medical & Molecular Genetics, Department of Medical Genetics, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China;

<sup>(2)</sup>Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 201203, China;

<sup>(3)</sup>State Key Laboratory for Medical Genomics, Rui-Jin Hospital Affiliated to Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China;

<sup>(4)</sup>Health Science Center of Shanghai Institute of Biological Science of The Chinese Academy of Sciences and Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China)

**Abstract** BPOZ is one protein containing ankyrin repeat and BTB (POZ) domain which gene is located at 3q21.3 in human genome. It was found that the expression of BPOZ gene is down-regulated in human ovary tumors, suggesting it is potentially a cell growth or tumor suppressor gene. BPOZ gene knockout mouse model was established for further *in vivo* study of its normal function and the role of BPOZ in tumorigenesis. The mouse genomic DNA sequence of BPOZ gene was verified through bioinformatic analysis. According to the BPOZ genomic DNA sequence, the strategy of gene targeting and constructing of knockout vector (XpPNT-BPOZ) were established to delete the region of mouse genome, which spans from exon 2 to 12 of BPOZ gene. The gene knockout vector XpPNT-BPOZ was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. Electroporation of ES cells with XpPNT-BPOZ and screening of both G418 and Ganciclovoir resistant clones were performed according to common protocol. The homologous recombined ES cell clones were identified by PCR and confirmed by Southern blot analysis. After transplantation of homologous recombined ES cells into blastocysts through microinjection and mating of chimeras with C57BL/6J mice, 30 offspring with Agouti fur in color were acquired. 15 of them (50%) show genotype heterozygous for BPOZ. The BPOZ heterozygotes were intercrossed to generate mutants homozygous. Finally, the cohort of mutants homozygous for BPOZ was established. The mutants are fertile, and further phenotype analysis is under way.

**Key words** BPOZ gene, cell growth suppressor gene, gene knockout

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30370793), National Project for Young Scientists Fund (39925023), Ministry of Education "Project for Chang Jiang Scholar Encouragement" Fund (OOPJ5111), State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA216081) and Shanghai Science & Technology Developing Fund (99JC14209, 99XD14005).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-21-64457997, E-mail: zhugangw@shsmu.edu.cn