

## 转基因猪中外源基因拷贝数和整合位点的研究\*

孔庆然 武美玲 朱江 格日乐其木格 郇廷军 尹智 牟彦双 刘忠华\*\*

(东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

**摘要** 主要采用了绝对定量 PCR 和热不均一交错 PCR(thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR), 检测了体细胞核移植技术生产的绿色荧光蛋白转基因猪中外源基因拷贝数和整合位点, 并利用旁侧 PCR(Junction PCR)对整合位点进行确定, 同时进一步分析了整合位点的纯合性. 结果表明, 绝对定量 PCR 可以准确有效地检测外源基因拷贝数, 标准曲线为:  $\log_2 N$  (拷贝数) =  $-0.935 \Delta Ct + 3.4116$  ( $R^2=0.9974$ ,  $P < 0.001$ ), 两只转基因猪中外源基因拷贝数分别为  $30.85 \pm 1.77$  和  $18.87 \pm 1.34$ ; TAIL-PCR 能成功地克隆转基因猪中外源基因整合位点, 得到 25 条特异性条带, 经 BLAST 比对, 共获得 TgInS1 (1 440 bp)、TgInS2 (1 263 bp) 和 TgInS3 (1 861 bp) 3 个整合位点. 以整合位点侧翼序列特异性引物与外源基因特异性引物的组合引发 Junction PCR, 得到预计大小的特异性片段, 确定了整合位点上、下游侧翼序列的准确性. 采用整合位点 5' 上游和 3' 下游侧翼序列特异性引物与外源基因特异性引物的组合, 进行 Junction PCR, 在两只转基因猪中都得到与野生型猪一致的侧翼序列特异性引物扩增片段, 表明我们获得的转基因猪都为整合位点杂合子. 初步建立了绝对定量 PCR 和 TAIL-PCR 对外源基因拷贝数和整合位点检测的体系, 为今后研究外源基因在转基因猪中遗传和表达的稳定性的打下了基础.

**关键词** 转基因猪, 拷贝数, 整合位点, 绝对定量 PCR, TAIL-PCR, 纯合性

**学科分类号** Q7

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00326

近 10 年来, 通过转基因技术与体细胞核移植技术的结合使转基因动物生产得到了长足的进展. 目前, 人们已获得多种类型的转基因克隆牛<sup>[1,2]</sup>、羊<sup>[3,4]</sup>和猪<sup>[5-8]</sup>等, 本实验室也于 2006 年获得了我国首例绿色荧光蛋白转基因克隆猪<sup>[9]</sup>. 确定外源基因的拷贝数和整合位点是成功建立转基因动物模型后的首要步骤, 也是后续表型研究和基因功能探讨的前提条件.

在转基因动物中, 对外源基因拷贝数的检测一直是个难题. DNA 印迹杂交法是鉴定外源基因拷贝数的传统方法, 但费时费力, 且只能做到半定量. 实时定量 PCR 法是一种可以简单地测定样品中外源基因绝对拷贝数的方法, 通过绝对定量标准曲线的建立能准确地计算出外源基因的拷贝数<sup>[10]</sup>.

外源基因的整合位点对表达水平有着至关重要的影响, 因此, 对外源基因整合机制的研究是十分必要的, 整合位点序列的克隆及其相关序列特征研究正是其中的重要一环. 目前, 以 PCR 技术为基础的扩增外源基因整合位点的方法有很多, 如反向 PCR 法(inverse PCR, I-PCR), 连接介导 PCR 法(ligation-mediated PCR)等, 但都由于具有扩增效率

不高, 非特异反应过多, 操作复杂等问题没有被广泛应用. 热不均一交错 PCR(thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR)是由 Liu 等<sup>[11]</sup>设计的, 其利用 3 个嵌套的特异引物(SP primer)分别和一组较短的随机简并引物(AD primer)组合引发巢式 PCR 扩增. 这种方法可以高效获得较长的侧翼序列、且特异性高、操作简单.

据此, 本研究建立了实时定量 PCR(real time PCR)和 TAIL-PCR 检测绿色荧光蛋白转基因猪中外源基因拷贝数和整合位点的方法, 并进一步应用旁侧 PCR(Junction PCR)对整合位点进行确定, 分析整合位点的纯合性. 旨在准确地得到外源基因的整合情况, 为今后研究外源基因在转基因猪中遗传及表达的稳定性的打下基础.

\* 转基因生物新品种培育科技重大专项(2008ZX08006-002, 2009ZX08006-001B)和东北农业大学“创新团队”发展计划资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 0451-55191729, E-mail: liu086@yahoo.com

收稿日期: 2009-05-15, 接受日期: 2009-07-13

## 1 材料和方法

### 1.1 绝对定量 PCR 对外源基因拷贝数的检测

**1.1.1 实时荧光定量 PCR.** 采用 25  $\mu$ l PCR 的反应体系(SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>, TaKaRa)和条件按 ABI 7300 仪器使用手册设置, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s (40 个循环), 60 $^{\circ}$ C 31 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s. 反应体系在 96 孔板(MJ Research HSP29655)中混匀并用超净光盖(MJ Research TCS20803)封口. 反应结果使用 Sequence Detection System software 收集、分析. 所有的样品都在同一块板中做 3 次重复, 数值以  $\bar{x} \pm s$  表示.

**1.1.2 标准曲线的建立.** 将含外源基因的质粒 pEGFP-C1 与野生型 E32 胎猪 gDNA 混合, 设置含有 1、2、4、8 和 16 个转基因拷贝数的标准品对照, 具体如下: 假设含有转基因片段的质粒大小为  $a$  bp, 野生型猪基因组 DNA 用量为  $b$  ng, 转基因片段完全随机地头尾相连(或头头相连)插入一条染色体上, 由于猪基因组 DNA 单倍体(haploid)大小为  $3 \times 10^9$  bp, 那么  $b$  ng 的转基因阳性猪基因组 DNA 含有一个转基因拷贝的质量为:  $\frac{a \times b \times 0.5}{3 \times 10^9}$  ng.

以引物 TG-P 扩增 GFP 基因片段, 以 eT-P 扩增管家基因转铁蛋白受体(transferrin receptor, TFRC)作为内参标准化基因组 DNA 的量. TG-P 引物序列为: 5' TGAACCGCATCGAGCTGAAGGG 3' (上游)和 5' ACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTG 3' (下游), 扩增产物 110 bp. eT-P 引物序列为: 5' GAGACA-

GAACTTTCGAAGC 3' (上游)和 5' GAAGTCTGTGGTATCCAATCC 3' (下游), 扩增产物 81 bp. 将外源基因片段检测引物扩增  $C(t)$ GFP 减去相应的 TFRC 基因的扩增  $C(t)$ TFRC, 得到  $\Delta C(t)$ , 再对样品的拷贝数的对数值作图便得到绝对定量的标准曲线.

### 1.2 TAIL-PCR 对整合位点的检测

**1.2.1 引物序列.** a. 特异性引物. 上游引物碱基序列为 SPS1: 5' GCTACCCGTGATATTGCTGAA-GAGCTTGGCG 3'; SPS2: 5' GGAGGCTAAC-TGAAACACGGAAGGAGACAATACC 3'; SPS3: 5' CAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACT 3'. 下游引物碱基序列为 SPA1: 5' GTTCACCTTGA-TGCCGTTCTTCTGCTTGTC 3'; SPA2: 5' GCTAG-CGGATCTGACGGTTCATAAACCAG 3'; SPA3: 5' CGGATCTGACGGTTCATAAACCAGCTCTGC 3'. b. 简并引物 AD1: 5' NGTCGASWGANAWGAA 3'; AD2: 5' TGWGNAGSANCASAGA 3'; AD3: 5' AGWGNAGWANCAWAGG 3'; AD4: 5' STTGNTAST-NCTNTGC 3'; AD5: 5' NTCGASTWTSWGWTT 3'; AD6: 5' WGTGNAGWANCANAGA 3'.

**1.2.2 TAIL-PCR 反应体系和程序.** 方法同 Pillai 等<sup>[2]</sup>, 采用两组 3 个嵌套外源基因特异性引物 (SPS1、SPS2、SPS3 或 SPA1、SPA2、SPA3) 分别和 6 个随机的简并引物 (AD1~AD6) 组合对外源基因 3' 下游和 5' 上游侧翼序列进行 PCR 扩增. 上一级 PCR 反应的产物稀释 200 倍用于下一级 PCR 反应. 三级 PCR 反应程序为(图 1): 1st PCR 反应.

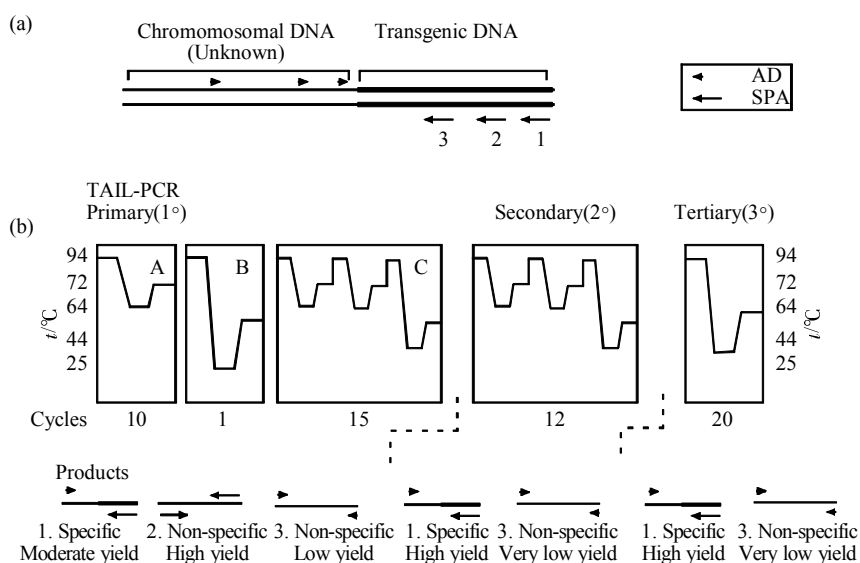


Fig. 1 TAIL-PCR primers (a) and procedure (b)

94°C 5 min; 94°C 10 s, 64°C 30 s, 72°C 3 min (10 个循环); 94°C 10 s, 25°C 3 min, 72°C 2.5 min; 94°C 10 s, 64°C 3 min, 72°C 2.5 min, 94°C 10 s, 64°C 3 min, 72°C 2.5 min, 94°C 10 s, 44°C 1 min, 72°C 2.5 min(15 个循环); 72°C 10 min, 4°C 1 h. 2nd PCR 反应. 94°C 5 min; 94°C 10 s, 64°C 3 min, 72°C 2.5 min, 94°C 10 s, 64°C 3 min, 72°C 2.5 min, 94°C 10 s, 44°C 1 min, 72°C 2.5 min (12 个循环); 72°C 10 min, 4°C 1 h. 3rd PCR 反应. 94°C 5 min; 94°C 10 s, 44°C 1 min, 72°C 2.5 min (20 个循环); 72°C 10 min, 4°C 1 h.

### 1.3 测序与序列分析

将 15  $\mu$ l 3rd TAIL-PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收特异性片段 (TIANGel Midi Purification Kit), 由 Invitrogen 公司完成测序. 利用 NCBI 网站的 BLAST 软件与 GenBank 中的已知猪核酸序列和 ESTs 进行比对做功能和结构上的同源性分析.

### 1.4 Junction PCR 对整合位点的验证

根据得到的外源基因 5' 和 3' 侧翼序列设计位点特异性引物, 分别与外源基因特异性引物 SPA3 或 SPS3 组合 PCR 扩增外源基因侧翼序列, 验证整合位点(图 2). 位点特异性引物序列为: P-TgInS1U,

5' CTATTGCCTTGGCAGACTGACCTCT 3' , P-TgInS1D, 5' ACAGATCAATGGAATAGAACA-GAGGG 3'; P-TgInS2U, 5' CTGTTCTGCCTAA-ACCGCATCACCATG 3' , P-TgInS2D, 5' GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTT 3' ; P-TgInS3U, 5' CCCC GTGAGTCAAACCGCTATCCA 3' , P-TgInS3D, 5' TGCATTCTGTGCATACGCCACG-AGGAC 3'. PCR 反应条件为: 94°C 3 min; 94°C 30 s, 55 °C 30 s, 72°C 1 min(30 个循环); 72°C 5 min; 4°C 1 h.

### 1.5 整合位点纯合性分析

5' 上游侧翼序列特异性引物、3' 下游侧翼序列特异性引物与外源基因特异性引物 SPA3 组合进行 PCR 扩增, 分析整合位点的纯合性. PCR 反应条件为: 94°C 3 min; 94°C 30 s, 55 °C 30 s, 72°C 1 min (30 个循环); 72 °C 5 min; 4°C 1 h.

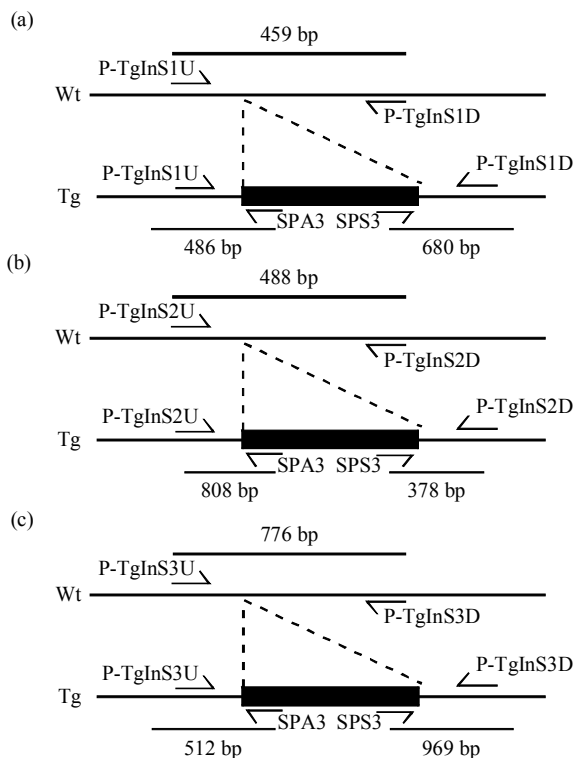
### 1.6 数据分析

采用 SPSS13.0 软件进行数据处理, 比较各组间差异.

## 2 结 果

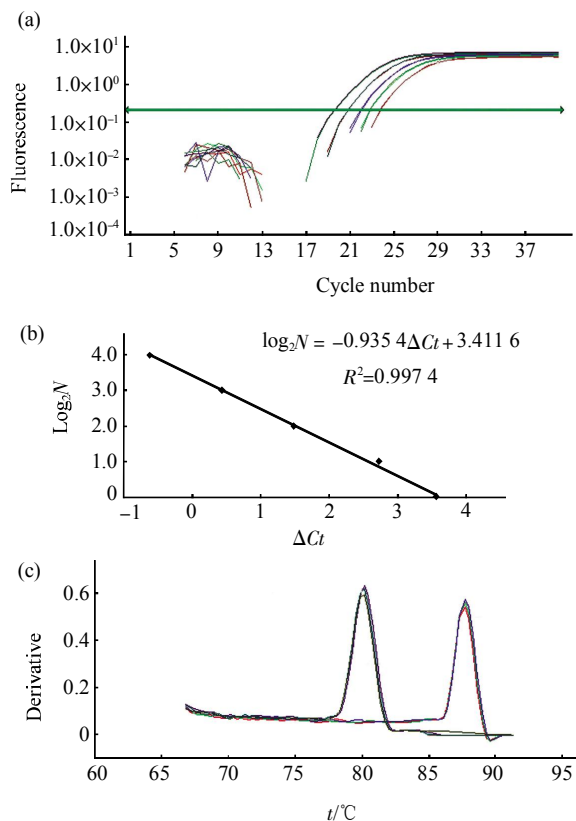
### 2.1 外源基因拷贝数的检测结果

**2.1.1 绝对定量标准曲线.** 为了确定 Real-time PCR 扩增中  $C(t)$  值与初始拷贝数的关系, 我们将转基因质粒与野生型猪基因组 DNA 混和, 设置了分别含有 1、2、4、8、16 个拷贝的标准品对照, 以 TG-P 扩增外源基因片段(110 bp), 以 eT-P 扩增管家基因 TFRC 作为内参(81 bp), 每个反应重复 3 次(扩增曲线见图 3a), 取平均  $C(t)$  值, 将外源基因片段检测引物扩增  $C(t)_{\text{GFP}}$  减去相应的 TFRC 基因的扩增  $C(t)_{\text{TFRC}}$ , 得到  $\Delta C(t)$ , 将  $\Delta C(t)$  对样品拷贝数的对数 ( $\log_2 N$ ) 作图得到改进型的绝对定量标准曲线(图 3b). 本实验的实时分析精确度高、重复性好, 同一标准品的 3 次重复  $C(t)$  值变化很小. 以  $\Delta C(t)$  与拷贝数的对数 ( $\log_2 N$ ) 做标准曲线, 决定系数也很高 ( $R^2 = 0.9974$ ), 计算公式为:  $\log_2 N$  (拷贝数) =  $-0.9354\Delta Ct + 3.4116$  ( $R^2 = 0.9974$ ,  $P < 0.001$ ). 为了评估反应的特异性并鉴定产物, 我们在扩增后进行了两个引物扩增产物的融解曲线分析(图 3c). 负导数计算表明, 两个融解曲线分别在大约 88°C 和 80°C 附近有且只有一个单峰, 表明两个引物扩增的特异性非常好, 并且两个引物的阴性对照和空白对照均没有扩增峰.



**Fig. 2 Junction-PCR primers and products**

(a), (b), (c) Integration sites TgInS1, TgInS2, TgInS3.



**Fig. 3 The establishment of absolute quantitative standard curve**

(a)The amplification plot of GFP. (b) The absolute quantitative standard curve. (c) The association curve of GFP and TFRC.

**2.1.2 转基因拷贝数的鉴定.** Real-time PCR 对转基因猪拷贝数鉴定结果如表 1 所示, 标准差在 1.77 到 1.34 之间, 表明结果准确可信.

**Table 1 Copy number of GFP in transgenic pigs**

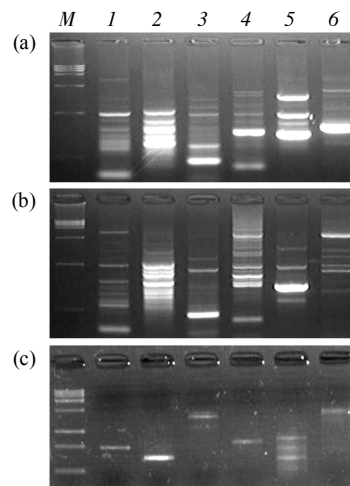
Pigs	No. of copies
K25-2	18.87 ± 1.34 <sup>a</sup>
K25-3	30.85 ± 1.77 <sup>b</sup>

Different superscripts indicate statistical difference ( $P < 0.05$ ).

**2.2 TAIL-PCR 对整合位点的克隆**

以转基因猪基因组 DNA 为模板, 上游特异引物(SPS1、SPS2 和 SPS3)和下游特异引物(SPA1、SPA2 和 SPA3)分别与 6 个简并引物(AD1~AD6)组成引物组合对整合位点的下游和上游侧翼序列进行 TAIL-PCR 扩增. 结果: 在对 K25-2 的检测中, 得到 9 条上游和 6 条下游特异条带; 在对 K25-3 的检

测中, 得到 7 条上游和 3 条下游特异条带. 条带的大小在 750~5 000 bp 之间(图 4).



**Fig. 4 The electrophoresis of TAIL-PCR products**

(a) The products of first TAIL-PCR cycle. (b) The products of second TAIL-PCR cycle. (c) The products of third TAIL-PCR cycle. M: DL15000; 1~6: PCR products by AD1~AD6.

**2.3 序列测序和分析结果**

胶回收后, 对所获的 DNA 片段进行测序, 然后将得到的序列在 NCBI 网站上与 GenBank 中猪的已知核酸序列和 EST 序列进行 BLAST 比对, 在 K25-2 和 K25-3 中各得到 2 个整合位点, 分别命名为: TgInS1、TgInS2、TgInS3, 其中 TgInS2 为两只转基因猪共有. 整合位点序列如下.

TgInS1 (1 440 bp): TACCTCCATACTGTTTTCCATAGTGGTTGTACCAATTTATATTCCACC-AATAGTGCAAGAGGGTTGCCTTTTCCCCACAGCTTCTTTAGCATTGTATTGTA GAATTATTAATGATGACCATTCTGAATGGTGTGAAGTGGTATTTCATTGTAGTTTTGTTTTGCATTTCTCAAAT-AGTTACTGATGTTGAACATTGTTTTACTCATGTGCTACTGGCCATCCATGTGTCTTCTTTGGG-GAAATGTTTTATTTAGGTCCTTCTGCCCGAGATT-AAGCCCTTGTCATTTGTATTGTTTGCAATGAT-TTCTCCATTCCATTGGTTGTATTTGTTTGT-TTATGGTGTCCCTTGTCTGTGCAAAGCTTGTAAGTTTGATTCGGTTCAATTGGTTTATTTTGT-TTTATTTCTATTGCCCTGGCAGACTGACCTCTGAAAATATTTGTATGGTTTATGTCACCACACA-TTTGCCTATGTTCTCTTCTATAGCTTTATGGT-

GTCTTGCTTCTGTTCACCTTTGTTAAGCCATT-  
TTGAGCTTGTATTATTGTGCATGGTGGGCGGAT-  
GTATTCTAGTTTCACTGATGGACATGCAGCTG-  
TCCAGTTTTCTGAAAAAATATCCAGAAGAG-  
ATTGTCTTTTCCCATTTTATATTCCTTCATCT-  
TTTATTAAAGATTAATTGACCATAGGTATCTG-  
GGTTATTTCTGGGCCCTCTGTTCTATTCCATT-  
GATCTGTATGTCTGTTTTTGTAAACAGTGCCAT-  
ATTGTCTTGATTACTATAGCTTTGTAAGAAAC-  
ACCAAATGTCTGAAGTCTGGAAGAGTTATG-  
CCTCCAGCTTGCTTATTTTCTTTCCCTCCCTCAG-  
GAATATTTGGCAATTCTGGGTCTTTCATAGTT-  
CCATCAACAATTTTGGATTATTTGTTCTAGTTC-  
TGTA AAAAATGTGGGGTACTTTGTTGTGGTTT-  
GTATTAATCTGTAGATTGCTTTGGGTAATAT-  
GGCCATTTAGCAATATTAGTTCCTCCAAGCC-  
AGGAGCATGTGATATCTTCCATTTCTTTGAA-  
TCCTCTTTATTTTCTTGATTGATGTTTTATAG-  
TTCTCTGAGTATAATTCTCTCACCCCTTGGA-  
CAGATGTACTAGGTCTTTTATTTTGGGGGTG-  
AATCTTTAAAAGGTATTGCTTTAATTTTAATT-  
CATTTTCTAATATTTTATTGTTAATATAAGA-  
AATGCAGTTGATTTCTGAATATTAATCTTGTA-  
TCCTGATACTTTGCTGAATTTTTTGA CT CAGG-  
AAGTAGTTTGTGTGTCAGAGTCCTTAGGGT-  
TTTCTATATATCATATCATGTTATTCAACTGA-  
GTGACAATTTTACCTCTTGTTTTCCAATTTAG-  
ATACCTGTTCTTTCTTTTATTTGTCTGATTTCT-  
GTGGCTAGGACTTCCAATACTATATAAAAGC-  
AGTGAG

此段序列为 K25-2 中整合位点, 经 BLAST 比对, 发现其为一段长散在重复序列(long interspersed nuclear elements, LINE)——L1M LINE, 与猪第四号染色体上 92 224 bp 到 93 714 bp 之间的序列同源 (94%)。经分析后, 外源基因插入位点在 575 bp 处, 而且插入造成其间大约 115 bp 的核苷酸序列的丢失。

TgInS2 (1 263 bp): TTA CT AT GGGAACATA -  
CGTCATTATTGACGTCAATGGGCGGGGGTTCG-  
TTGGGCGGT CAGCCAGGCGGGCCATTTACCG-  
TAAGTTATGTAACGCGGA ACTCCATATATGGG-  
CTATGAACTAATGACCCCGTAATTGATTACTA-  
TTAATAACTAATGCATGAAGCTGGGTACGCG-  
TAAGCTTGGGCCCTCGAGAGCCTGCTGAAG-

CTGGGTACGCGTAAGCTTGGGCCCTCGAGA-  
GCCTGCTTTTTTGTACAAACTTGTCTATAGT-  
GTCACCTAAATAGGCCTATCCCGCGGCCTAT-  
GCTAGAGTCCGGAGGCTGGATCGGTCCCGGT-  
GTCTTCTATGGAGGTCAAACAGCGTGGATG-  
GCGTCTCCAGGCGATCTGACGGTTC ACTAAA-  
CGAGCTCTGATTATAGGGACCTCCCCACCGTA-  
CACGCGTTCTTAAAATGTTTTATTTGTAAACG-  
GGCAATCATTGCTTTACATGGGAAAAAAAAAA-  
AAAATCCCGTTAAAGTTACTGTGAAAAATACT-  
CAAAGAGAGGGAGGAGGAAAAAGAAAACAA-  
CGAAAACAAACACTACAAAAA AAAAAAAAAA-  
AAAGGGCGGCCGCCCGCGATCTAAA ACTAGT-  
CCGGACGCGTGGGTGACGATATAGCCTGCTT-  
TTTTGTACAACTTGTCTATAGTGTACCTA-  
AATAGGCCTATCCCGCGGCCTAGGCTAAAGT-  
CCGGAGGCTGGATCGGTCCCGGTGTCTTCTAT-  
GGAGGTCAAACAGCGTGGATGGCGTCTCCA-  
GGCGATCTGACGGTTC ACTAAACGAGCTCTGC-  
TTATATAGACCTCCACCGTACACGCCTACCG-  
CCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACG-  
ACATTTTGGAAAGTCCCGTTGATTTTGGTGCC-  
AAAACAACTCCCATTTGACGTCAATGGGGTG-  
GAGACTTGGAATCCCGTGAGTCAAACCGC-  
TATCCACGCCCATTTGATGTACTGCCAAAACCG-  
CAAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATG-  
TGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACC-  
GTAATAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTATTCCAT-  
AGGCTCCGCCTCCCTGACGAGCATCACAAA-  
ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC-  
GACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCC-  
CTTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTC-  
GACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCT-  
TTCTCCCTTTGCTACTCCACACA

此段序列为 K25-2 和 K25-3 共有的整合位点, 经 BLAST 比对, 发现其与猪 ESTs 中 CV877820 序列 (98%) 和 CV877787 序列 (97%) 同源, 这两段 ESTs 都与鼠 Embigin 基因同源。插入位点在 809 bp 处。

TgInS3 (1 861 bp): TCACCATGGTAATAGC-  
TTACCGTAAATACTCCACCCATTGACGTCAAT-  
GGAAAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAACA-  
TACGTCAATTATTGACGTCAATGGGCGGGGGTG-  
TACCGGGCCATAAGGCCCTATAGTGAGTCGT-

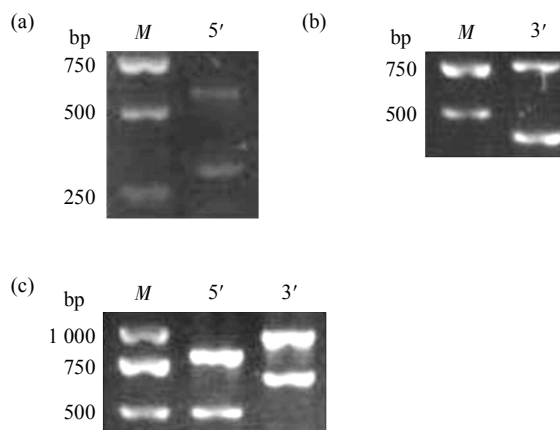
ATTAAGTCGACCATGGTTTTTTCCTCCTGTGT-  
 GAAATGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACA-  
 TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTG-  
 GGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTA-  
 TTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCG-  
 GGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAA-  
 TCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCG-  
 TATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTG-  
 ACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCG-  
 AGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATA-  
 CGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAG-  
 GAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAA-  
 GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTG-  
 GCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGA-  
 GCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGG-  
 TGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACC-  
 AGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGC-  
 TCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATA-  
 CCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGTTGGGCGTAG-  
 ATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATC-  
 AATCTAAAGTATATATGAGTAACCTGAGGCTA-  
 TGGCAGGCCTGCCGCCCGACGTTGGCTGCG-  
 AGCCCTGGGCCTTCACCCGAACCTGGGGGGT-  
 GGGGTGGGGAAAAGGAGAAACGCGGTGTAT-  
 TGGCCCCAAGGGGTCTCTCGTGGCGTATCGAC-  
 AGAATGCAGCCCTGGAACCGACCCACGCGTT-  
 TATGAACAACGATCCAACACCGGCGTTTTTAT-  
 TCTATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAA-  
 AGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAG-  
 GCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCG-  
 CCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGC-  
 TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC-  
 TATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGC-  
 TCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCC-  
 GCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTT-  
 CGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGC-  
 TGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCG-  
 CTCCAAGCTGGGCTGGGTGCACGAACCCCC-  
 GTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA-  
 CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACG-  
 ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAC-  
 AGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTG-  
 CTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTAC-  
 GGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTG-

CGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAA-  
 GAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACC-  
 ACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAA-  
 GCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCT-  
 CAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTT-  
 CTGACGCTCAGTGGAACGCCTTTTATTGGCGT-  
 TGTCAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAAAGTTT-  
 ATGTAACGCGGAACTCCATATATGGGCTATGT-  
 AACTAATGACCCCGTAATTGATTACTATTAAT-  
 TAACTAATGCATGGCGGTAATACGGTTATCCT-  
 ACAGAATCAGGGGGAAA

此段序列为 K25-3 中整合位点，经 BLAST 比  
 对，发现其与猪 ESTs 中 EW560169(99%)序列和  
 EV932945(99%)序列同源，这两段 ESTs 分别与鼠  
 Ski 和 Che 基因同源。插入位点在 680 bp 处，位于  
 EW560169 和 EV932945 同源序列之间。

**2.4 整合位点的验证结果**

5' 上游或 3' 下游侧翼序列特异性引物分别与外  
 源基因特异性引物 SPA3 或 SPS3 组合进行 PCR 扩  
 增验证整合位点，结果如图 5 所示。采用的引物组  
 合方式分别为：P-TgInS1U、P-TgInS2U 与 SPA3  
 (图 5a)；P-TgInS1D、P-TgInS2D 与 SPS3(图 5b)；  
 P-TgInS2U、P-TgInS3U 与 SPA3 和 P-TgInS2D、  
 P-TgInS3D 与 SPS3(图 5c)。结果在两只转基因猪中  
 都得到了位点特异性扩增产物，进一步确定了整合  
 位点克隆的准确性。

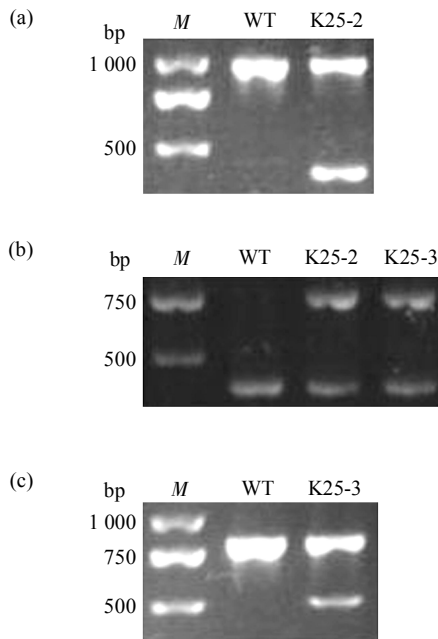


**Fig. 5 Determining integration site by Junction-PCR**

- (a) Determining 3' chromosomal regions of integration sites in K25-2.
- (b) Determining 5' chromosomal regions of integration sites in K25-2.
- (c) Determining integration sites in K25-3. M: DL2000.

## 2.5 整合位点纯合性分析结果

采用 5'上游侧翼序列特异性引物、3'下游侧翼序列特异性引物和外源基因特异性引物 SPA3 的组合进行 PCR 扩增, 对外源基因整合位点的纯合性进行分析, 结果如图 6 所示. 结果表明, 在野生型对照组中, 只得到一条由 2 条侧翼序列特异性引物扩增得到的特异性条带, 而在实验组中, 还得到了一条由 5'上游侧翼序列特异性引物与 SPA3 扩增得到的特异性条带, 因为在实验组中没有得到只有一条由 5'上游侧翼序列特异性引物与 SPA3 扩增得到的特异性条带的个体(预计的纯合子), 因此可以推测我们得到的转基因猪都为整合位点杂合子.



**Fig. 6 Analysis of zygosity by Junction-PCR**

(a)(b) and (c) show the zygosity determination of TgInS1, TgInS2 and TgInS3, respectively. *M*: DL2000; *WT*: Wild-type control.

## 3 讨 论

在转基因动物中, 对外源基因拷贝数的检测一直是个难题. 与其他技术如 DNA 印迹杂交相比, 绝对定量 PCR 法灵敏性高(可定量检测一个拷贝数的转基因样品)、需要 DNA 样品少、省时省力、不需进行放射性试验, 而且结果精确度高、重复性好<sup>[10]</sup>. 据此, 本实验建立了绝对定量 PCR 法对转基因猪中外源基因拷贝数进行检测. 由于我们采用的荧光染料 Sybr Green 能广泛地结合双链 DNA,

不能特异性地检测某一特定模板, 因此, 引物的高特异性是实验成功的决定性因素. 本实验通过融解曲线证明了引物扩增产物的特异性, 保证实验结果真实可信. 此外, 对于绝对定量的 Real-time PCR 法, 内参的选择也是关键. 我们选取猪高度保守基因 TFRC(每个基因组只有一个拷贝)作为内参, 对基因组 DNA 浓度进行标化. 内参基因检测引物和外源基因片段检测引物的扩增片段大小相近,  $T_m$  值基本相等, 扩增效率基本一致, 很好地起到了内参的作用. 总之, 本研究应用绝对定量 PCR 法准确高效地检测了转基因猪中外源基因拷贝数, 为今后相关研究奠定了基础.

外源基因的整合受很多因素的影响, 包括 DNA 的构型、进入宿主细胞的方式、DNA 的浓度等. 其特点为: a. 多拷贝的外源基因以头尾成串的方式整合到宿主细胞的染色体上, 一般为单位点整合, 有时为多位点整合; b. 整合一般具有稳定性, 大部分以孟德尔方式遗传给后代, 但有时外源基因未整合到染色体上, 而是以附加体形式存在, 不稳定; c. 目前认为, 基因表达的强弱与整合的拷贝数无关, 而与整合位置有关; d. 整合会引起外源基因位点的侧翼序列发生重排、缺失、重复或异位现象; e. 外源基因的整合可能会造成宿主细胞基因突变出现新表现型, 也可能中断宿主细胞一些必需基因的转录过程, 或激活有害基因, 导致胚胎畸形或死亡<sup>[13]</sup>. 一般认为, 外源基因的整合位点对其表达水平有着至关重要的影响, 有时同样一个外源基因可在一定的整合位点正常表达, 而在另一些位点不表达或低水平表达. 因此, 外源基因整合位点的检测是对后续研究和探讨外源基因表型和功能以及选择适当的个体扩群是十分重要的<sup>[14]</sup>.

目前, 以 PCR 技术为基础的扩增外源基因整合位点的方法有很多, 本研究建立 TAIL-PCR 克隆外源基因整合位点的方法. TAIL-PCR 法在两只转基因猪中共得到 16 个上游边界扩增产物和 9 个下游边界扩增产物, 而且扩增片段能达到 5 kb. TAIL-PCR 法中简并引物对结果的影响较大, 发现不同简并引物与特异性引物组合扩增所得的特异性片段有很大差异. 将得到的序列经过 BLAST 比对后, 共获得 3 个整合位点, TgInS1、TgInS2 和 TgInS3. 我们进一步采用 Junction PCR 对整合位点进行确定, 得到特异性扩增片段, 证明了结果的准确性.

我们应用的转基因猪外源基因整合是随机的,

一般来说,在不同的原代转基因猪中整合位点应该是不同的,但本研究发现,两只转基因猪(K25-2和K25-3)共有一个外源基因整合位点——TgInS2,这可能预示着在猪基因组中这段DNA序列是易于外源基因插入的,但具体机制还需要进一步研究,相信对该现象的揭示对外源基因整合机制的研究和转基因效率的提高有重大意义.本研究还发现,在我们获得的转基因猪中外源基因以多拷贝的形式插入到猪基因组的两个位点中,而且外源基因的插入造成了侧翼序列不同程度的丢失,这种丢失是否导致了内源基因表达的异常还需要进一步探讨.目前为止,一只转基因猪(K25-2)生理正常并获得了多批次后代,而另一只转基因猪(K25-3)并不能正常繁殖,这种生理上的异常是与外源基因的插入和表达相关,还是与整合位点侧翼序列的丢失相关,我们还不得而知.

随机整合会导致外源基因以单位点或多位点的形式插入到宿主细胞的一个或多个染色体上,即形成整合位点的纯合子、杂合子和多重杂合子.在获得转基因动物后,分析外源基因整合位点的纯合性,选择纯合子进行传代,则能大大提高转基因动物的扩群效率<sup>[12]</sup>.传统的方法只有原代转基因动物获得第一代后,才能选择外源基因单一整合位点的纯合子进行扩群,这种方法既容易造成时间和财力的浪费,又容易受到多重杂合子的干扰.本研究采用外源基因5'上游侧翼序列特异性引物、3'下游侧翼序列特异性引物和外源基因特异性引物的组合进行PCR,通过与野生型基因组的扩增结果比较,可以有效地区分单一整合位点的纯合子和杂合子.这种方法简单准确,节约成本,相信能为今后相关研究提供新的思路.

获得转基因动物后,确定外源基因拷贝数和整合位点是十分必要的.本研究采用绝对定量PCR法检测了外源基因的拷贝数,并应用TAIL-PCR法成功地克隆了外源基因整合位点,为下一步研究外源基因在转基因猪中遗传和表达的稳定性的奠定基础.

## 参 考 文 献

1 Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, *et al.* Cloned transgenic calves

- produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, **280**(5367): 1256~1258
- 2 Wall R J, Powell A M, Paape M J, *et al.* Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(4): 445~451
- 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**(29): 1066~1069
- 4 Schnieke A E, Kind A J, Ritchie W A, *et al.* Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, **278**(5346): 2130~2133
- 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 Dai Y, Vaught T D, Boone J, *et al.* Targeted disruption of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotech*, 2002, **20**(6): 251~255
- 7 Hao Y H, Yong H Y, Murphy C N, *et al.* Production of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) over-expressing piglets. *Transgenic Research*, 2006, **15**(10): 739~750
- 8 Phelps C J, Koike C, Vaught T D, *et al.* Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 2003, **299**(5605): 411~414
- 9 Liu Z H, Song J, Wang Z K, *et al.* Green fluorescent protein (GFP) transgenic pig produced by somatic cell nuclear transfer. *Chin Sci Bull*, 2008, **53**(5): 556~560
- 10 王晓建, 杨旭, 宋晓东, 等. 实时荧光定量PCR法检测转基因小鼠拷贝数. *中国实验动物学报*, 2007, **15**(3): 170~174  
Wang X J, Yang X, Song X D, *et al.* *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2007, **15**(3): 170~174
- 11 Liu Y G, Whittier R F. Thermal asym metric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 1995, **25**(801): 674~681
- 12 Pillai M M, Venkataraman G M, Kosak S, *et al.* Integration site analysis in transgenic mice by thermal asymmetric interlaced (TAIL)-PCR: segregating multiple-integrant founder lines and determining zygosity. *Transgenic Res*, 2008, **17**(4): 749~754
- 13 王继英, 杜立新. 转基因动物制作及提高外源基因表达的策略. *中国畜牧兽医*, 2002, **29**(2): 30~34  
Wang J Y, Du L X. *Animal Science Abroad*, 2002, **29**(2): 30~34
- 14 吴波, 朱作言. 转基因动物整合位点的研究进展. *遗传*, 2003, **25**(1): 77~80  
Wu B, Zhu Z Y. *Hereditas(Beijing)*, 2003, **25**(1): 77~80



## Transgene Copy Number and Integration Site Analysis in Transgenic Pig\*

KONG Qing-Ran, WU Mei-Ling, ZHU Jiang, BOU Gerelchimeg,  
HUAN Yan-Jun, YIN Zhi, MU Yan-Shuang, LIU Zhong-Hua\*\*  
(College of Life Science, Northeast Agricultural University of China, Harbin 150030)

**Abstract** Transgene copy number and integration site were checked in transgenic pigs produced by somatic cell nuclear transfer (SCNT), moreover, Junction PCR was employed to confirm the integration site and analyze zygosity. The results showed that: absolute quantitative PCR could calculate transgene copy number efficiently. The parameters of the standard curve was:  $\log_2 N = -0.9354 \Delta Ct + 3.4116$  ( $R^2 = 0.9974$ ,  $P < 0.001$ ), and copy number were  $30.85 \pm 1.77$ ,  $18.87 \pm 1.34$ , respectively, in two transgenic pigs; transgene integration site was successfully cloned by TAIL-PCR, and 25 bands were obtained. Three integration sites, named TgInS1 (1 440 bp), TgInS2 (1 263 bp) and TgInS3 (1 861 bp), were detected by BLAST; Junction PCR combining with integration site and transgene specific primers was performed and specific bands confirmed the integration site; Junction PCR combining with 5' and 3' integration site and transgene specific primers was performed to analyze integration site zygosity. Bands amplified by 5' and 3' integration site specific primers just as WT control were obtained to determine the heterozygosity of integration site. Absolute quantitative PCR, and TAIL-PCR were established to check transgene copy number and integration site, and it has laid the foundation to study the inheritance and expression stability of transgene in transgenic animals.

**Key words** transgenic pig, copy number, integration site, absolute quantitative PCR, TAIL-PCR, zygosity

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00326

---

\*This work was supported by grants from The State Transgenic Research Program of China (2008ZX08006-002, 2009ZX08006-001B) and Innovative Research Team of NEAU.

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-451-55191729, E-mail: liu086@yahoo.com

Received: May 15, 2009 Accepted: July 13, 2009