

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00945

人 HBV、HBx 定向敲入 p53 位点大鼠胚胎干细胞株的建立

王 艳¹, 叶真龙², 金华君¹, 刘 韬¹, 李林芳¹, 钱其军^{1,2*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室, 上海 200438
2. 浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018

[摘要] **目的** 建立人 HBV、HBx 定向敲入 p53 位点的大鼠胚胎干细胞株, 为建立相关动物模型奠定基础。**方法** 通过 PCR 方法扩增出人 p53 基因上下游同源臂、HBV 全基因组序列、HBV 的 X 蛋白编码基因 (HBx), 将其插入本实验室自主构建的基因打靶通用载体 pKO 中, 分别构建 pKO-gHBV 及 pKO-X 打靶载体。载体经 *Sal* I 酶切线性化后, 电转入状态良好的大鼠胚胎干细胞株中, 经 3 轮药物筛选, 获得单细胞克隆。通过 PCR 技术筛选获得阳性细胞克隆, 并进行支原体污染鉴定和核型分析。**结果** 成功构建 pKO-gHBV 及 pKO-X 打靶载体; 电转大鼠胚胎干细胞株, 经 3 轮药物筛选, 分别挑取若干细胞克隆, 其中 2 个 pKO-X 细胞克隆和 1 个 pKO-gHBV 细胞克隆经 PCR 鉴定、支原体检测和核型分析确定结果正确。**结论** 成功建立了人 HBV、HBx 定向敲入 p53 位点的大鼠胚胎干细胞株, 为后续建立动物模型奠定了基础。

[关键词] 乙型肝炎病毒; HBx 基因; p53 基因; 胚胎干细胞

[中图分类号] R 373.21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)09-0945-05

Establishment of human HBV/HBx-Knockin-p53 rat embryonic stem cell line

WANG Yan¹, YE Zhen-long², JIN Hua-jun¹, LIU Tao¹, LI Lin-fang¹, QIAN Qi-jun^{1,2*}

1. Laboratory of Viral and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
2. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

[Abstract] **Objective** To establish human HBV/HBx-knockin-p53 rat embryonic stem (ES) cell line, so as to lay a foundation for establishment of animal models. **Methods** First we constructed the targeting vector pKO-gHBV or pKO-X with HBV whole genome or X and p53 homologue arms by PCR and connection with common gene targeted vector pKO; then after linearized with *Sal* I the vector was transferred into rat ES cells through electroporation. And 2i ES culture medium containing puromycin was used for a three-cycle selection of puromycin resistant clones. Then PCR was used to screen the obtained positive clones; mycoplasma examination and karyotypic analysis were used to confirm targeted ES cell clones. **Results** We successfully obtained two targeted vectors: pKO-gHBV and pKO-X; then after three-cycle drug-selection we obtained 2 pKO-X clones and 1 pKO-gHBV clone, which were confirmed by PCR, mycoplasma examination and karyotypic analysis. **Conclusion** We have successfully established human HBV/HBx-knockin-p53 rat ES cells, paving a way for future establishment of HBV/HBx-knockin-p53 rat model.

[Key words] hepatitis B virus; HBx gene; p53 gene; embryonic stem cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(9):945-949]

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染与肝癌关系密切, 但其感染具有的明显的种属和组织特异性为建立理想的动物模型带来很大困难^[1-2]。2008 年人们建立了真正意义的大鼠胚胎干细胞株 (即能生殖传代的大鼠胚胎干细胞株)^[3-5], 这使得构

建基因定向敲入或敲除的大鼠模型成为可能。大鼠 p53 基因敲除后自发产生肝癌, 有别于小鼠 p53 基因敲除后很少自发产生癌症, 这也从侧面说明大鼠更接近于人类^[6-9]。本研究拟建立人 HBV、HBV 的 X 蛋白编码基因 (HBx) 定向敲入 p53 位点的大鼠胚

[收稿日期] 2012-05-16 **[接受日期]** 2012-06-29

[基金项目] 国家杰出青年科学基金 (30925037), 国家重点基础研究发展计划 (“973”计划, 2010CB529900-G)。Supported by National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (30925037), and National Program on Key Basic Research Projects (“973” Program, 2010CB529900-G)。

[作者简介] 王 艳, 硕士生。E-mail: wangyan9672@163.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81875371, E-mail: qianqj@163.com

胎干细胞株,为研究 HBV 感染与肝癌发生发展的关系、寻找 HBV 和 HBx 作用过程中新的信号通路和肝癌治疗的新靶点奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 质粒: pCAG-EGFP-ires-PAC-p53(美国南加州大学应其龙教授惠赠), pKO(实验室自建, pCAG-EGFP-ires-PAC-DTA)。细胞株: DA 大鼠胚胎干细胞株(美国南加州大学应其龙教授惠赠), L2. 2. 15 细胞株(实验室自建), 饲养层细胞(实验室自行制备)。菌株: DH5 α 及其感受态(实验室自建)。研究中所用到的引物(利用 Primer5. 0 设计, 上海生工生物工程技术有限公司合成)见表 1。

表 1 基因敲除载体构建和 PCR 鉴定所用的引物
Tab 1 Primers used in this study for HBV/HBx knock-in and PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')
3F1	AGTTGATCACCTCTGACTTATTCTTGCTC
3F2	GTCGCGATCGACAAAGTCACAGAGCCACT
X1	GTCCTCGAGGCCACCATGGCTGCTAGGCTGTGC
X2	GCTGCGCCGCTTAGGCAGAGGGGAAAAAGT
HBV1	GTCACGCGTTTTTTCACCTCTGCCTAATCA
HBV2	CGTTGATCAAAAAAGTTGCATGGTGCTGG
JD1	GCCCAGGTGCTAGACCCGGA
JD2	TGTCCCAGAACCCCGGCA
JD3	GCATAATGCCAGGCGGGCCA
JD4	CAGCGTGATGATGG TAAGG
ZYT1	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCTT
ZYT2	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC

1.2 基因打靶载体片段的获取 将 pCAG-EGFP-ires-PAC-p53 质粒转化 DH5 α 感受态, 在 Amp 抗性的平板上挑取克隆, 选用合适的限制性内切酶鉴定。鉴定正确的菌株, 重新摇菌 100 ml 扩增 14~18 h, 中量提取质粒。以提取出来的质粒为模板, 选用 3F1、3F2 引物进行 PCR 扩增。扩增程序: 98 $^{\circ}$ C 30 s; 98 $^{\circ}$ C 10 s; 55 $^{\circ}$ C 30 s; INC(每个循环梯度增加 0.6 $^{\circ}$ C); 72 $^{\circ}$ C 130 s(到第 2 步进行 12 个循环); 98 $^{\circ}$ C 10 s; 57 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 130 s(到第 6 步进行 24 个循环); 72 $^{\circ}$ C 6 s; 4 $^{\circ}$ C 4 h。根据扩增片段的不同, 退火温度有一定差异。通过合适条件, 将 3'同源臂扩增出来。扩增出来的片段电泳凝胶回收后再进行合适酶切, 重新回收待连接。pCAG-EGFP-ires-PAC-p53 质粒酶切回收 5'同源臂。肝癌细胞株 L2. 2. 15 培养后, 取上清液提 DNA, 以提取的 DNA 为模板, HBV1、HBV2 和 X1、X2 为引物, PCR 扩增 HBV 全基因组和 X 片段。酶切回收目的片段, 鉴定正确后待连接。

1.3 基因打靶载体的构建和鉴定 在通用载体 pKO 的基础上分别以 *Bcl* I-*Asi*S I 酶切连接 3'同源臂, 以 *Sal* I-*Pac* I 酶切连接 5'同源臂, 以构建成新的大鼠 p53 基因敲除载体。在新大鼠 p53 基因敲除载体的基础上, 以 *Mlu* I-*Bcl* I 酶切连接乙肝病毒全基因组序列构建 HBV 基因敲入载体(pKO-gHBV), 以 *Xho* I-*Not* I 酶切连接 X 蛋白的 DNA 序列构建 X 蛋白基因敲入载体(pKO-X)^[5,10]; 并进行酶切电泳鉴定。图 1 显示了质粒 pKO-gHBV 和 pKO-X 重要元件和基本结构。

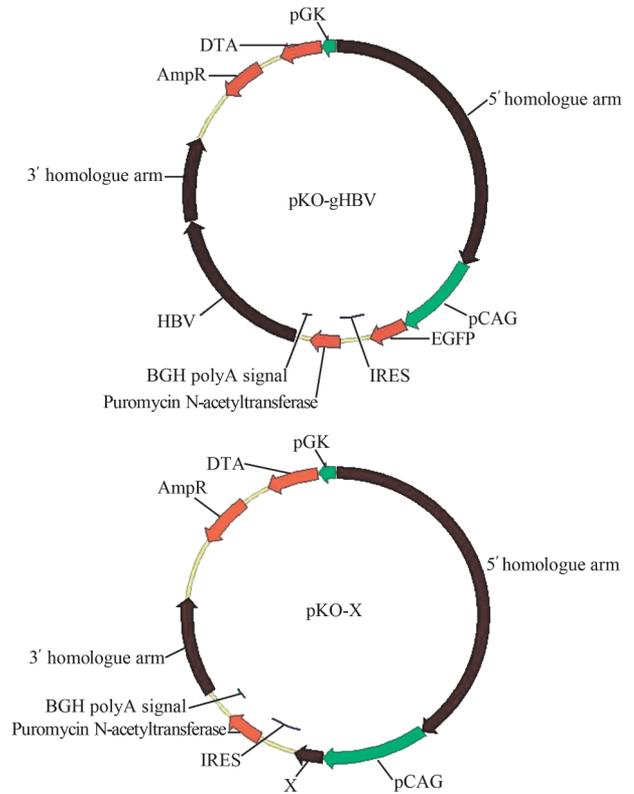


图 1 质粒 pKO-gHBV、pKO-X 模式图
Fig 1 Plasmid pKO-gHBV and pKO-X

1.4 胚胎干细胞培养和药物筛选 选择已经建系的 DA 大鼠胚胎干细胞株, 在 MEF 饲养层细胞上以 2i 无血清体系(准备无血清 N2B27 培养液, 并于其中加入 3 μ m CHIR99021 和 0.4 μ m PD0325901)进行培养。MEF 细胞取自 13.5 d 小鼠胚胎, 预先用丝裂霉素处理以抑制其生长。选择培养状态良好的大鼠胚胎干细胞用于电转。用于电转的质粒以单酶切 *Sal* I 线性化。建立稳定大鼠胚胎干细胞电转条件。约 10⁶~10⁷ 个胚胎干细胞和 20 μ g 线性化 pKO-X、pKO-gHBV 质粒用不含钙镁离子的 PBS 液混匀, 冰浴 5 min 后在 200 V 电压、脉冲时间 5 ms、脉冲次数为 1 的条件下进行电转, 电转后再冰浴 5 min, 再将细胞转入铺好 MEF 细胞的 6 孔板中培养。24 h 后加 0.5

$\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素进行筛选。3 d 左右换一次液,隔天加药培养,重复筛选 3 轮,通过观察荧光等确定细胞生长状态。直到绝大部分胚胎干细胞克隆均发绿色荧光,挑选生长状态良好者置于 96 孔板中培养。将目的抗性克隆细胞扩大培养,以供后续鉴定。

1.5 胚胎干细胞 PCR 鉴定、支原体检测和核型分析

1.5.1 基因组 PCR 鉴定 挑选出来的目的单克隆细胞扩增培养后,提取其基因组 DNA 序列先进行 PCR 电泳检测,并取阴性胚胎干细胞基因作对照。在 3'同源臂下游靠近外源整合序列处设计 PCR 鉴定上游引物 JD1,并在原有序列和外源整合序列处分别设计 PCR 鉴定下游引物 JD2、JD3 和 JD4。利用 JD1、JD2 和 JD3 检测 pKO-X 整合情况;用 JD1、JD2 和 JD4 检测 pKO-gHBV 整合情况。

1.5.2 支原体检测 取培养 2 d 或 3 d 的大鼠胚胎干细胞上清 1 ml, $1\ 000\times g$, 4°C 离心 10 min,小心移除上清,加入 1 ml STE 缓冲液洗一次。加入 20 μl STE + 1% Triton X-100 重悬, 100°C 加热 10 min。以此为模板做 PCR 扩增,以 STE+1% Triton X-100 作阴性对照,支原体作阳性对照。电泳观察条带确定是否发生支原体污染。

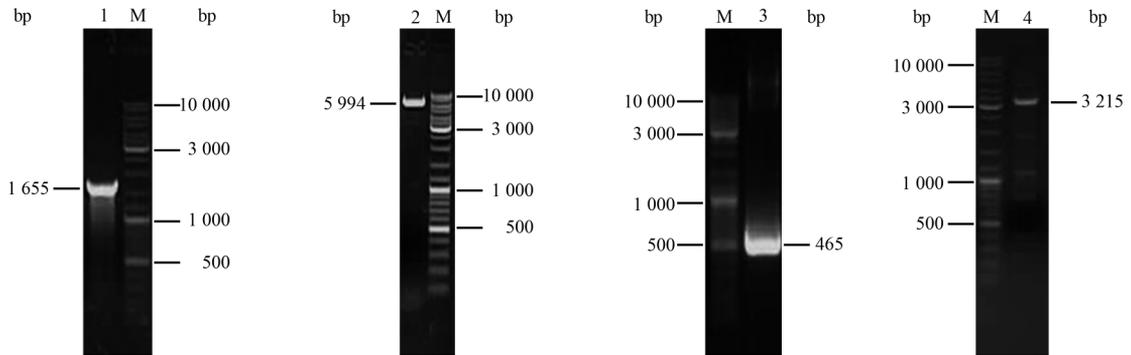


图 2 打靶亚克隆片段电泳鉴定图谱

Fig 2 Electrophoresis of products of targeted vectors

1: 3'homologue arm; 2: 5' homologue arm; 3: *HBx* gene; 4: HBV whole genome. M: Marker

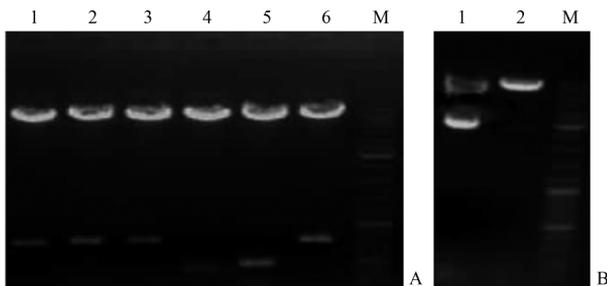


图 3 pKO-X 和 pKO-gHBV 酶切电泳鉴定结果

Fig 3 Agarose analysis of pKO-X and pKO-gHBV

A: pKO-X, clone 1, 2, 3, 6 have 12 196 bp and 465 bp fragments; clone 4, 5 have 12 196 bp and 845 bp fragments; clone 6 as negative result. B: pKO-gHBV, clone 1 has 12 196 bp and 3 215 bp fragments; clone 2 has negative result. M: Marker

1.5.3 核型分析 实验前,于培养细胞中加入秋水仙素处理;收集细胞时,用枪头吹打使细胞完全悬浮,再置于刻度离心管中 $1\ 000\times g$ 离心 8 min;弃上清,加入 37°C 预温的 $0.075\ \text{mol/L}$ KCl 溶液 8 ml,用吸管轻轻吹打细胞团混匀后,置 37°C 恒温水浴箱低渗处理 25 min;加入 1 ml 新配制的固定剂(甲醇:冰乙酸=3:1),用吸管小心吹打混匀, $1\ 000\times g$ 离心 8 min;弃上清,加入 8 ml 固定液,吹打细胞团制成细胞悬液后,室温下固定 20 min,并 $1\ 000\times g$ 离心 8 min;弃上清,反复固定 3 次;吸取少量细胞悬液,滴 2~3 滴于冰水浸泡过的载玻片上,吹散,气干;将标本置于 Giemsa 染液中染色 8 min,水洗去浮色,气干;显微镜下观察染色体标本分散情况。

2 结果

2.1 基因打靶载体的鉴定 从图 2 中可以看出,成功获得了 3'同源臂、5'同源臂、*HBx* 基因、HBV 全基因组片段,而且这些片段的两端带有多克隆位点,便于连入骨架质粒。图 3 显示 *HBV* 基因敲入载体 pKO-gHBV 和 X 蛋白基因敲入载体 pKO-X 构建成功。

2.2 基因打靶细胞药物筛选结果 经过 3 轮药物筛选后得到绿色荧光表达率高达 90% 的胚胎干细胞克隆群,从中挑选 20 个克隆分开培养,得到 3 个 pKO-X 克隆和 1 个 pKO-gHBV 克隆(图 4)。

2.3 基因打靶细胞 PCR 鉴定、支原体检测和核型分析结果 将筛选得到的细胞克隆扩大培养后,提取 DNA 进行 PCR,结果显示 pKO-X 细胞克隆出现 323 bp 和 586 bp 条带, pKO-gHBV 细胞克隆出现 634 bp 和 323 bp 条带,正常胚胎干细胞仅有 323 bp 条带(图 5A、5B);支原体检测结果显示 2 种打靶细胞克隆和阴性对照均未出现阳性条带(图 5C);

体核型分析结果,1个 pKO-X 打靶细胞克隆显示核型成多倍体(图 5D),而另外 2 个 pKO-X 打靶细胞克

隆和 1 个 pKO-gHBV 打靶细胞克隆核型均染色正常。

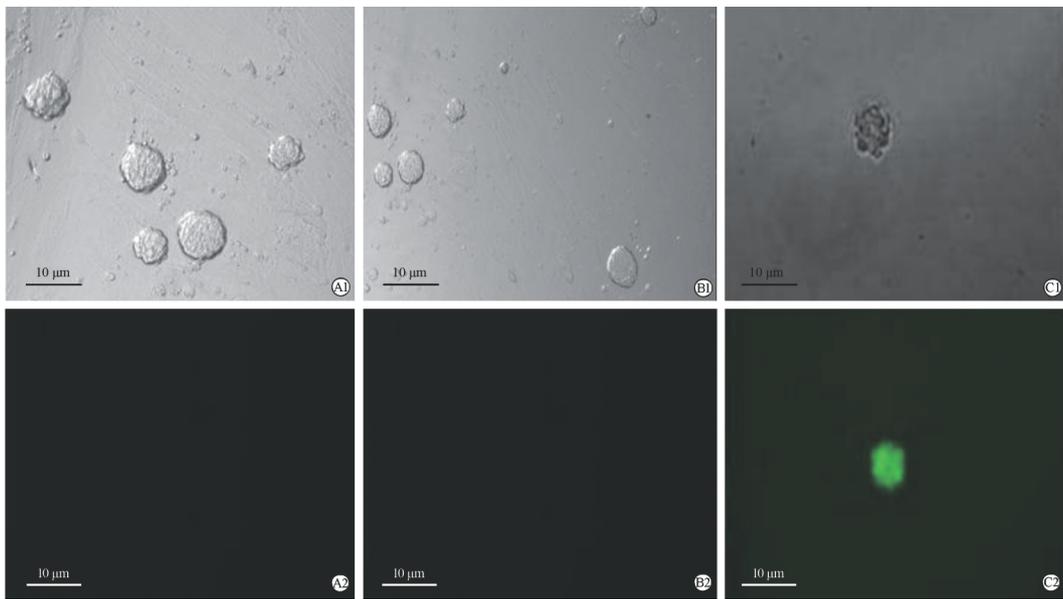


图 4 电转前后胚胎干细胞图

Fig 4 Fluorescent results of gene-targeted rat ES cells before and after electroporation

A1,A2: Rat embryonic stem cells before electroporation; B1,B2: The drug-selected rat embryonic stem cells after pKO-X plasmid was electroporated; C1,C2: The drug-selected rat embryonic stem cells after pKO-gHBV plasmid was electroporated. A1,B1,C1: Results under optical microscope; A2,B2,C2: Results under fluorescence microscope

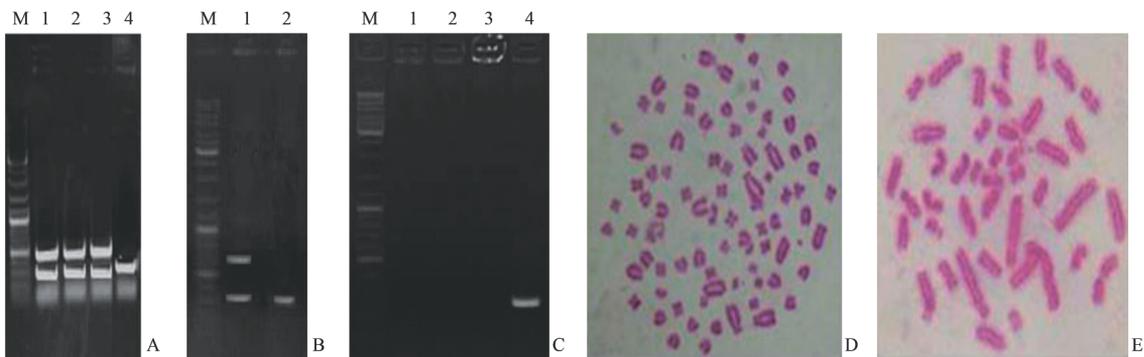


图 5 基因打靶细胞 PCR 鉴定及支原体检测

Fig 5 PCR products and Mycoplasma examination of gene-targeted rat ES cells

A: Agarose analysis of PCR products of ES, pKO-X. From 1 to 3, PKO-X targeted cell lines have 323 bp and 586 bp fragments; normal embryonic stem cell (4) only has 323 bp fragments; B: Agarose analysis of PCR products of pKO-gHBV targeted cell line, in which there are 634 bp and 323 bp fragments (1); normal embryonic stem cell has 323 bp fragments (2); C: Mycoplasma examination by PCR, from 1 to 4 are X-targetted cell lines, HBV-targetted cell lines, negative result and 220 bp positive result; D,E: Karyotypic analysis, D is abnormal and ploidyp and E is normal. M: Marker

3 讨论

HBV 是一种嗜肝非细胞毒性 DNA 病毒,因其感染具有种属和组织特异性,致使理想的 HBV 感染动物模型的缺乏,严重制约了对 HBV 发病机制和抗病毒治疗的深入研究。通过对与肝 DNA 病毒

感染相关的动物模型以及转基因小鼠模型的研究发现,转基因小鼠肝脏组织出现了类似人慢性乙型肝炎携带者的病理变化,60.77%(79/130)的乙肝小鼠出现比较明显的肝细胞变性坏死、单个核细胞浸润和纤维增生^[11-12]。有研究将 HBsAg、HBx 基因定向敲入 p21 位点建立转基因小鼠,HBV 基因表达情

况显示 HBsAg 和 HBx 在 HBV 引起的肝癌发生发展中发挥重要作用^[13]。但是转基因小鼠对 HBV 主要基因产物处于免疫无应答反应状态,不能全面反映 HBV 的致病机制,而大鼠相比小鼠,与人的生理特性更接近^[14]。大鼠胚胎干细胞株的建立使得构建基因定向敲入或敲除的大鼠模型成为可能。继第 1 例 p53 敲除大鼠模型的建立^[6],我们成功建立人 HBV、HBx 定向敲入 p53 位点的大鼠胚胎干细胞株,为成功建立动物模型奠定了基础。

本研究在构建载体的时候考虑到打靶效率受同源臂长度的影响,但同源臂太长会增加整个载体的长度,为得到最理想的打靶效率,扩增的 5'同源臂和 3'同源臂长度分别为 5 994 bp 和 1 655 bp。同时我们采用嘌呤霉素基因和白喉毒素毒性 A 肽链基因来进行正负双向筛选,以大幅度提高基因打靶的效率。经过 3 轮药物筛选后我们得到了绿色荧光表达率高达 90% 的胚胎干细胞克隆群,从中挑选 20 个克隆分开培养,得到 3 个 pKO-X 克隆和 1 个 pKO-gHBV 克隆,其子代胚胎干细胞克隆荧光表达率几乎 100%。其他克隆荧光表达率也均在 50%~80%,荧光表达率没有达到 100% 的最主要原因是因为挑取的胚胎干细胞克隆不是单克隆,而是 2 个甚至 2 个以上的胚胎干细胞克隆共同生长形成的克隆,一般这一类克隆会在体积上超过单个的胚胎干细胞克隆,而且有文献认为这一类大型克隆即使是由单个胚胎干细胞生长形成的,也极大可能是因为染色体畸变从而获得生长优势的克隆^[15],所以在挑取胚胎干细胞克隆时可以选择性地挑取体积上较小的克隆。对这 3 个 pKO-X 克隆和 1 个 pKO-gHBV 克隆进行 PCR 鉴定、支原体检测和核型分析,确定获得 2 株 X 蛋白敲入 p53 位点的大鼠胚胎干细胞和 1 株 HBV 全基因组敲入 p53 位点的大鼠胚胎干细胞。

HBV 全基因组或 X 蛋白定向敲入 p53 位点大鼠胚胎干细胞株的成功建立为后续建立动物模型、分析 HBV 的致病机制等奠定了基础,具有重要意义。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] 邓家刚,郭宏伟,郝二伟,周程艳. 乙型肝炎病毒小鼠动物模型建立的研究现状[J]. 中国中西医结合杂志,2008,2:183-185.
- [2] 程 亮,王盛典. 从动物模型看乙型病毒性肝炎致病机制的研究进展[J]. 生命科学,2010(4):338-344.
- [3] Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts[J]. *Cell*, 2008, 135:1287-1298.
- [4] Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts[J]. *Cell*, 2008, 135:1299-1310.
- [5] Geurts A M, Cost G J, Freyvert Y, Zeitler B, Miller J C, Choi V M, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases[J]. *Science*, 2009, 325:433.
- [6] Tong C, Li P, Wu N L, Yan Y, Ying Q L. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells[J]. *Nature*, 2010, 467:211-213.
- [7] Wang Y, Cui F, Lv Y, Li C, Xu X, Deng C, et al. HBsAg and HBx knocked into the p21 locus causes hepatocellular carcinoma in mice[J]. *Hepatology*, 2004, 39:318-324.
- [8] Yun C, Lee J H, Park H, Jin Y M, Park S, Park K, et al. Chemotherapeutic drug, adriamycin, restores the function of p53 protein in hepatitis B virus X (HBx) protein-expressing liver cells[J]. *Oncogene*, 2000, 19:5163-5172.
- [9] Chen G, Lin W, Shen F, Illoeje U H, London W T, Evans A A. Past HBV viral load as predictor of mortality and morbidity from HCC and chronic liver disease in a prospective study[J]. *Am J Gastroenterol*, 2006, 101:1797-1803.
- [10] Torres R M, K hn R. Laboratory protocols for conditional gene-targeting[M]. Oxford: Oxford University Press, 2005:378-392.
- [11] Manno M, Camm C, Schepis F, Bassi F, Gelmini R, Giannini F, et al. Natural history of chronic HBV carriers in northern Italy: Morbidity and mortality after 30 years[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127:756-763.
- [12] Roche B, Feray C, Gigou M, Roque-Afonso A M, Arulnaden J L, Delvart V, et al. HBV DNA persistence 10 years after liver transplantation despite successful anti-HBS passive immunoprophylaxis[J]. *Hepatology*, 2003, 38:86-95.
- [13] Bouchard M J, Wang L, Schneider R J. Activation of focal adhesion kinase by hepatitis B virus HBx protein: multiple functions in viral replication[J]. *J Virol*, 2006, 80:4406-4414.
- [14] 邹移海,徐志伟. 实验动物学[M]. 北京:科学出版社,2012:236-252.
- [15] Hughes E D, Qu Y Y, Genik S J, Lyons R H, Pacheco C D, Lieberman A P, et al. Genetic variation in C57BL/6 ES cell lines and genetic instability in the Bruce4 C57BL/6 ES cell line [J]. *Mamm Genome*, 2007, 18:549-558.

[本文编辑] 孙 岩