

· 论 著 ·

HBV 转基因在 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU3 小鼠基因组中的整合分析

瞿晓渊¹, 张 南¹, 巴 月², 张树忠¹, 姚玉成¹, 熊 俊¹, 李建秀¹, 王新民¹, 胡以平^{1*}

(1. 第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室, 上海 200433; 2. 郑州大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 郑州 450052)

[摘要] **目的:**分析 HBV 转基因在乙肝转基因小鼠 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3 号”品系基因组中的整合特征。**方法:**以 F6~F17 代乙肝转基因小鼠 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU 为研究对象,采用基因组 DNA PCR、Southern 印迹和 DNA 测序的方法,分析 HBV 转基因在该品系转基因小鼠基因组中的整合特征。**结果:**PCR 分析显示,F6~F17 代乙肝转基因小鼠基因组中均已稳定整合了相同拷贝数的 HBV 转基因,整合的 HBV DNA 可通过生殖系在世代间稳定遗传。整合在转基因小鼠基因组中的 HBV DNA 含有 HBV *pres*、*s*、*c*、*x* 基因,Southern 印迹证实 HBV 转基因含有全长 HBV 基因组 DNA,DNA 测序结果表明,该品系转基因小鼠所整合的转基因为 *adr* 亚型的 HBV DNA。**结论:**C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3 号”品系转基因小鼠基因组中均整合有 *adr* 亚型的全长 HBV 基因组 DNA,从 DNA 水平证实该转基因小鼠品系已具备了乙肝实验动物模型的基本条件。

[关键词] 病毒,乙型肝炎;小鼠,转基因;整合

[中图分类号] R 512.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0271-04

Integration analysis of HBV transgene in genome of C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU3 transgenic mice

ZI Xiao-yuan¹, ZHANG Nan¹, BA Yue², ZHANG Shu-zhong¹, YAO Yu-cheng¹, XIONG Jun¹, LI Jian-xiu¹, WANG Xin-min¹, HU Yi-ping^{1*} (1. Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Environmental Health, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

[ABSTRACT] **Objective:** To analyze the characters of HBV DNA integration in the transgenic mice genome of C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU3 strain. **Methods:** F6-F17 C57-TgN(HBVadr2.0) SMMU3 transgenic mice were used. PCR, Southern blotting and DNA sequencing were used to analyze the characters of hepatitis B virus transgene integrated in F6-F17 transgenic mice genomic DNA. **Results:** The same copies of hepatitis B virus genomic DNA was stably integrated into the genome of F6-F17 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU3 transgenic mice and genetically transmitted from parents to offspring. The integrated transgene contained the complete HBV genomic DNA including HBV *pres*, *s*, *c* and *x* gene. DNA sequencing indicated that the HBV transgene was *adr* subtype HBV DNA. **Conclusion:** The full-long HBV genomic DNA of *adr* subtype has been integrated in the genome of the C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU3 line transgenic mice.

[KEY WORDS] hepatitis B virus; mice,transgenic; integration

[Acad J Sec Mil Med Univ,2005,26(3):271-274]

HBV 是一种有完整包膜的嗜肝性双链 DNA 病毒,可引起急、慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌,严重威胁着人类的健康。由于人类的 HBV 具有高度的种属特异性和组织特异性,在自然情况下,HBV 不感染小鼠等啮齿类动物,故以传统的方法不能制备乙型肝炎的小鼠模型。1982 年,Palmiter 等利用显微注射的方法建立了世界上第 1 只转基因小鼠——“超级小鼠”(supermouse),从此转基因技术成了制备疾病模型和研究基因功能的一个重要手段^[1]。在对 HBV 的研究中,这一技术体系部分解决了用于研究 HBV 及其相关疾病的哺乳类医学实验动物模型缺乏的问题。

本实验室已建立了几个乙肝全基因组转基因小鼠品系^[2~4]。为了实现乙肝全基因组转基因小鼠的

大规模推广应用,我们将所建立的乙肝全基因组转基因小鼠品系进行了优选培育,从中选择了一个比较理想的品系:C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3 号”品系,对其各项生物学指标进行系统的分析。本研究对整合在 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3 号”品系转基因小鼠基因组中的 HBV 转基因进行分析,从 DNA 水平证实该品系转基因小鼠具备了进行乙肝相关生

[基金项目] 国家“九五”攻关项目(TJ99-LA01);国家自然科学基金(39670811);上海市科委基础研究重点项目(03DZ14023);上海市科学技术发展基金(994919033)。

[作者简介] 瞿晓渊(1976-),男(汉族),博士,讲师。

E-mail: xiaoyuanzi2001@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: yphu@smmu.edu.cn

物医药研究的实验动物模型的基本条件。

1 材料和方法

1.1 实验动物 正常 C57BL/6 品系小鼠和乙肝转基因小鼠 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系小鼠由本室 SPF 级转基因动物实验室繁殖和提供。

1.2 实验材料 用作 PCR 的 HBV 基因特异性引

物用 Vector NTI Deluxe 4.0 软件自行设计,小鼠 *IL-3* 基因特异性引物从文献^[5]获得,具体序列和位置见表 1 和图 1,所有引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。T 载体和连接试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司。探针标记试剂盒购自 Promega 公司。Hybond-N⁺ 尼龙膜购自 Amersham 公司。核素 α -³²P-dCTP 购自北京市亚辉生物医学工程公司。其他试剂均为国产试剂(分析纯)。

表 1 PCR 检测相关引物

Tab 1 Sequences of primers used in PCR amplification

Name	Number	Sequence	Product (bp)
Primers for <i>pres</i> gene	P1	5'-AGA GGC AAA TCA GGT AGG AGC GGG-3'	238
	P2	5'-TAG CAG AGC TTG GTG GAA TGT TGT GG-3'	
Primers for <i>s</i> gene	P3	5'-CCC AAC CTC CAA TCA CTC ACC AAC C-3'	444
	P4	5'-GGC CCC CAA TAC CAC ATC ATC CAT A -3'	
Primers for <i>c</i> gene	P5	5'- CCT CAC CAT ACC GCA CTC AGG CAA -3'	404
	P6	5'- CTA ACA TTG AGA TTC CCG A -3'	
Primers for <i>x</i> gene	P7	5'-GGA CGT CCT TTG TCT ACG TCC CGT C-3'	346
	P8	5'-CCT AAT CTC CTC CCC CAA CTC CTC C-3'	
Primers for <i>IL-3</i> gene	P9	5'-GGG ACT CCA AGC TTC AAT CA-3'	544
	P10	5'-TGG AGG AGG AAG AAA AGC AA-3'	

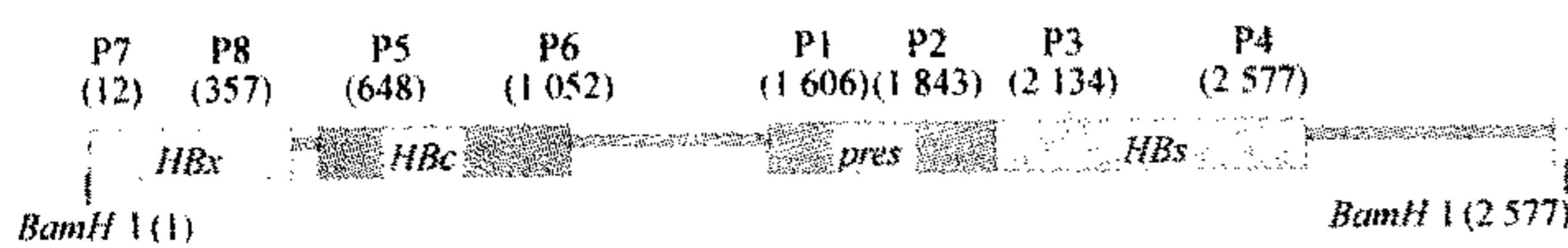


图 1 HBV adr(China) 基因组 DNA 图谱

Fig 1 Schematic representation of HBV genome (*adr* subtype, China 3 215 bp)

P1-P8: Position of the primers

1.3 PCR 检测和产物的半定量分析 剪取 1.5 cm 长的鼠尾组织,用酚、酚氯仿、氯仿抽提基因组 DNA,溶解在 200 μ l 的去离子水中。采用紫外分光光度计测定 DNA 浓度,稀释至 1 μ g/ μ l。PCR 反应体系为 50 μ l:模板 DNA 均为 0.5 μ g,dNTP 5 μ mol/L,HBV 特异性引物各 0.2 μ mol/L,*IL-3* 基因引物各 0.1 μ mol/L,*Taq* 酶 5 U,PCR 缓冲液 (10 \times)5 μ l,MgCl₂0.125 μ mol/L,以 ddH₂O 补足 50 μ l 反应体系。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后按照 94 $^{\circ}$ C 40 s、61 $^{\circ}$ C 40 s、72 $^{\circ}$ C 1 min 热启动进行 35 个循环,循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。2%或 1.5%琼脂糖凝胶、5 V/cm 电压电泳,电泳后将 *IL-3* 的特异性条带作为内对照,在电泳成像系统中利用密度大小来半定量分析 PCR 产物的浓度。

1.4 PCR 产物的序列测定 PCR 扩增结束后,回收目的片段,连接入 T 载体,蓝白斑筛选,酶切鉴定

后,用 T₇ 序列通用引物对目的片段进行 DNA 序列测定,由上海联合基因公司完成。

1.5 基因组 DNA Southern 印迹分析 取 50 μ g 转基因小鼠尾组织 DNA,用限制性内切酶 *Bam*H I 消化过夜,0.8%的琼脂糖凝胶。电泳结束后,采用毛细上行法将 DNA 转移至尼龙膜上,转膜结束后,按照尼龙膜的使用说明进行预杂交、杂交和洗膜,最后于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中进行放射自显影并观察记录结果。杂交探针为 α -³²P-dCTP 标记的全长 HBV 基因组 DNA。

2 结果

2.1 HBV 转基因在转基因小鼠基因组中的稳定整合 利用 HBV *s* 基因特异性引物(P1,P2)和小鼠 *IL-3* 基因特异性引物(P9,P10),以 F6~F17 代转基因小鼠尾组织 DNA 为模板进行复合式 PCR 扩增反应,电泳结束后,用凝胶成像系统专用软件比较 HBV *s* 基因片段和 *IL-3* 基因片段的密度值,半定量分析转基因小鼠基因组中整合的 HBV DNA 的拷贝数。结果显示,从 F6~F17 的各代转基因小鼠,*s* 基因 PCR 产物密度基本一致(图 2A),表明整合在“3号”品系转基因小鼠基因组中的 HBV DNA 的拷贝数相同且能够通过生殖系稳定地遗传给下一代。进一步对转基因小鼠的遗传方式分析发现,整合在该

转基因小鼠品系中的 HBV 基因是以经典的孟德尔遗传方式传递的,杂合子小鼠其子代中约 50% PCR 阳性,表明 HBV 基因组 DNA 整合在转基因小鼠基因组的单一基因座上。

2.2 整合在转基因小鼠基因组中的转基因包含 HBV 全基因组 DNA 分别利用 HBV *s* 基因、*x* 基因、*pres* 基因和 *c* 基因的特异性引物(P1~P8)和小鼠 *IL-3* 基因特异性引物(P9,P10)进行复合式 PCR

扩增反应,结果发现,“3号”品系 HBV 全基因组转基因小鼠 F6~F17 子代小鼠各代均存在这些 HBV 基因(图 2B~2D),表明整合在转基因小鼠基因组中的 HBV 转基因包含这些基因。由于所设计的 4 对引物跨越绝大部分 HBV 基因组 DNA,这一结果初步证实整合在该品系转基因小鼠中的 HBV DNA 为全长基因组 DNA。

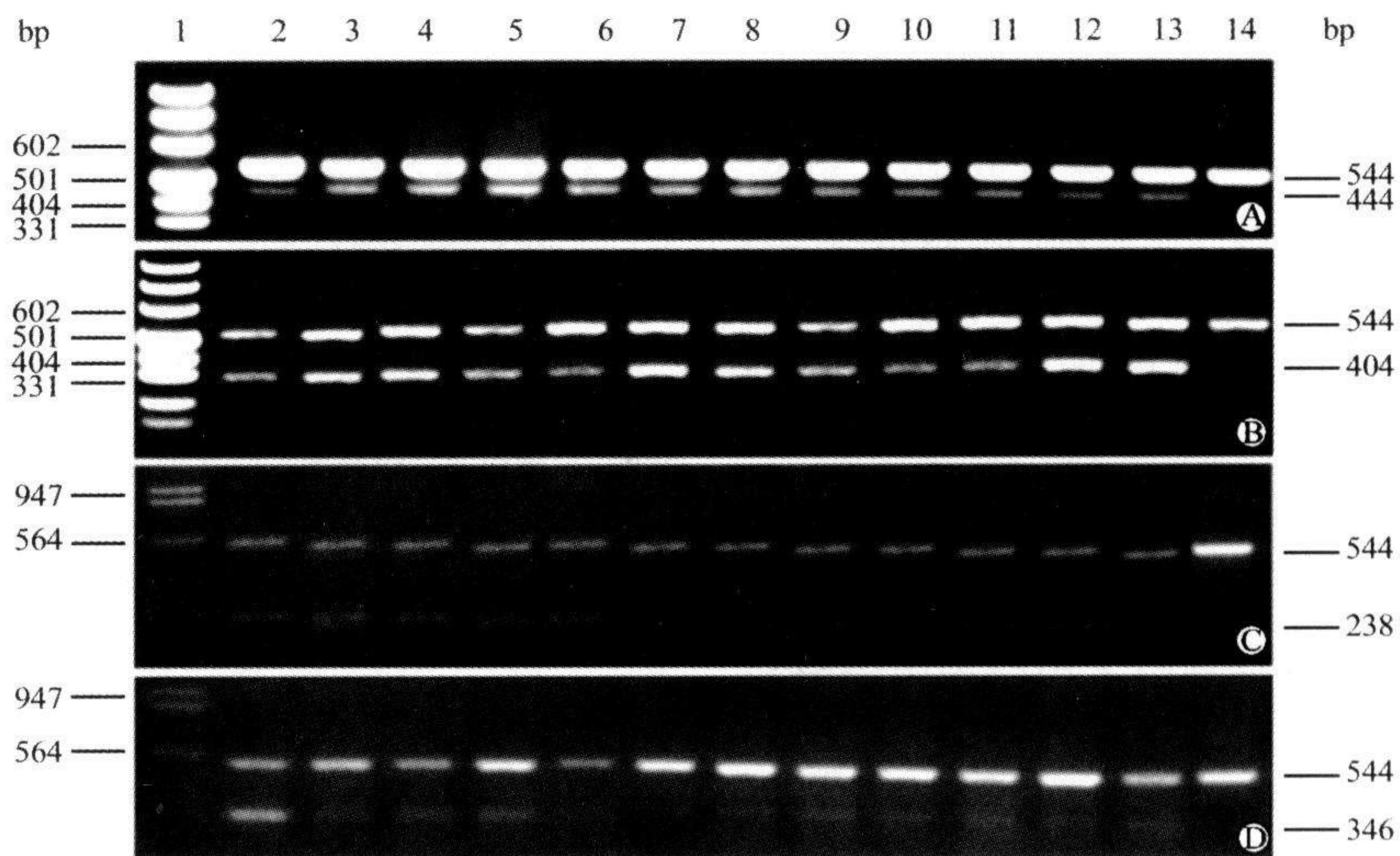


图 2 PCR 法分析 HBV 基因组 DNA 在转基因小鼠中的整合

Fig 2 PCR analysis of integration of hepatitis B virus genomic DNA in transgenic mice

A: 544 bp *IL-3* gene fragment and 444 bp *s* gene; B: 404 bp *x* gene; C: 238 bp *pres* gene; D: 346 bp *c* gene fragment; 1: pUC Mix marker (A, B) or λ /*EcoR* I + *Hind* III marker (C, D); 2-13: F6-F17 transgenic mouse; 14: Normal C57 mouse

从 PCR 检测阳性的 F6~F17 代转基因小鼠中随机挑取 24 只(每代 2 只),对其尾组织 DNA 进行 Southern 印迹分析,结果发现,不用限制性内切酶酶切组在大于 20 kb 处出现阳性信号,*Bam*H I 酶切组在 3.2 kb 处出现阳性信号(图 3 显示 F17 代结果),进一步证实整合在转基因小鼠中的 HBV DNA 包含全长 HBV 基因组 DNA。

2.3 转基因 DNA 序列与 *adr* 亚型的 HBV DNA 序列一致 分别对 P1~P8 引物扩增的 PCR 产物进行 DNA 序列测定,测序结果用 DNASIS 软件与文献^[6]报道的 HBV 基因组 DNA 序列比对,结果发现各 PCR 产物序列与 *adr* 亚型的 HBV DNA 序列一致(结果未显示),证实整合在“3号”品系转基因小鼠中的 HBV DNA 是 *adr* 亚型。

3 讨论

转基因技术是研究基因功能的良好手段^[7],能否成功制备一个转基因小鼠的关键因素之一是转基因载体的结构,在制备 HBV 全基因组转基因小鼠

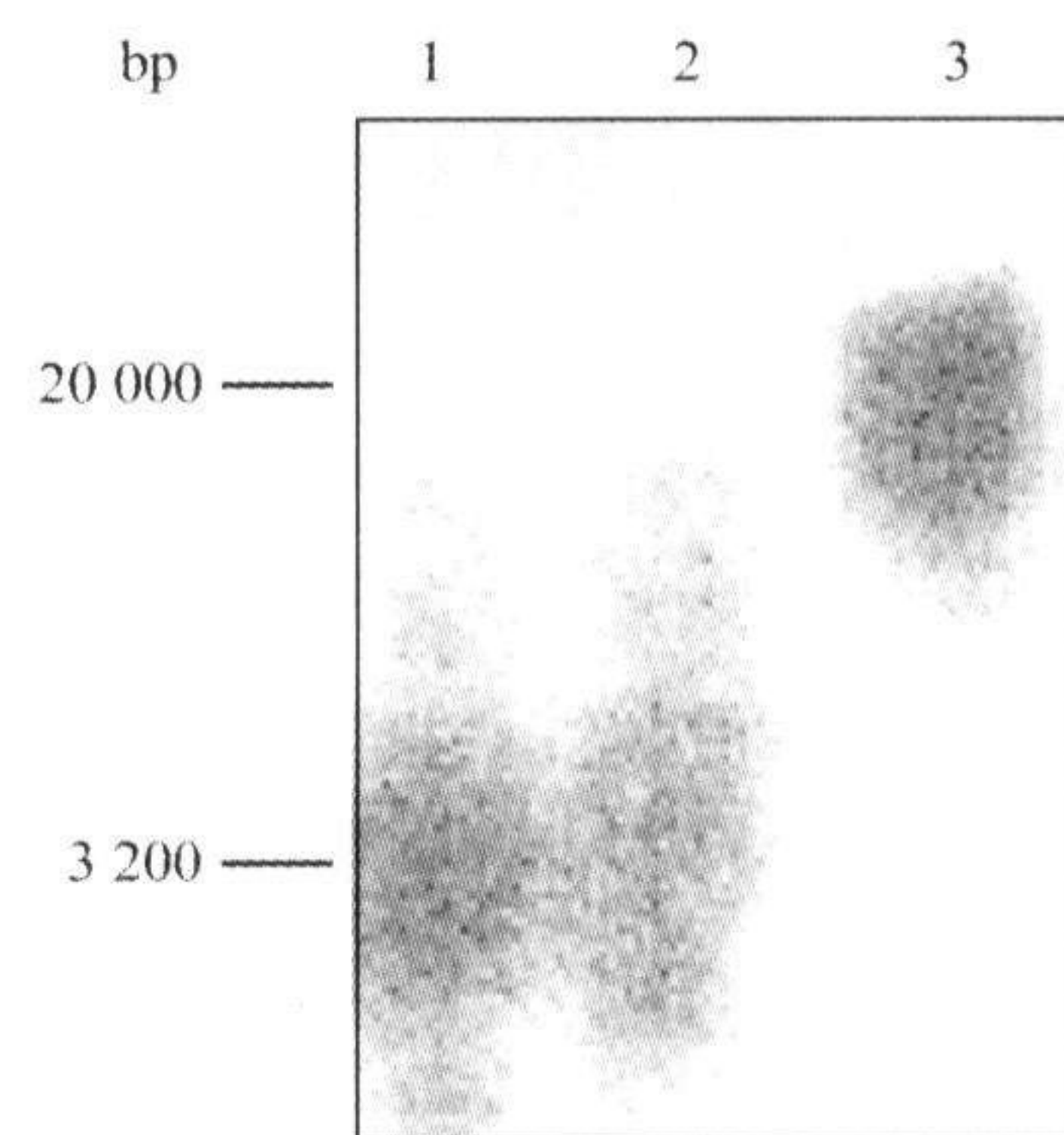


图 3 Southern 印迹分析 HBV 转基因的整合

Fig 3 Southern blotting analysis of integration of HBV transgene

1, 2: Digestion with *Bam*H I; 3: Without digestion

时,选择怎样的目的基因结构显得尤其重要,因为全基因组 HBV 转基因小鼠不但要求各种病毒蛋白的表达和分泌,还要求病毒的复制、病毒颗粒的包装和分泌。目前由于对 HBV 的生活周期了解的还不够清楚,为了能成功制备全基因组 HBV 转基因小鼠,

国内外使用过的 HBV 转基因有单拷贝、1.1 拷贝、1.2 拷贝、1.3 拷贝、2.0 拷贝和 3.0 拷贝的 HBV DNA^[8~12],成功的是 1.2 拷贝、1.3 拷贝和 2.0 拷贝 HBV DNA 这 3 种转基因,其中 2.0 拷贝的 HBV DNA 在制备转基因小鼠前,就已成功用于 HBV 的体内和体外研究中,该 DNA 稳定转染 HepG2 细胞后,可检测到 HBV 的复制并可产生完整的病毒颗粒。转染入小鼠 L 细胞和 HeLa 细胞后,可表达和分泌 HBsAg 和 HBeAg,但无 HBV 的复制^[13,14]。注射入黑猩猩体内可引起黑猩猩感染乙型肝炎^[15,16]。本研究中所用的转基因小鼠 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系整合的转基因是 *adr* 亚型的 2.0 拷贝 HBV 基因组 DNA,通过 PCR、Southern 印迹和 DNA 测序证实,各代转基因小鼠基因组中均整合有 *adr* 亚型的全长 HBV 基因组 DNA,从 DNA 水平肯定该转基因小鼠品系已成功建立。

关于外源基因是如何整合到小鼠的基因组这一问题,目前还没有足够实验证据能够说明^[17],但有证据表明外源基因的整合有一定的热点位置^[18],且多在小鼠基因组的单一基因座上。本研究发现,C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系转基因小鼠在传代过程中,HBV 基因组 DNA 以孟德尔遗传方式传递,杂合子小鼠的子代中约 50% 阳性,表明该品系转基因小鼠中,HBV 基因组 DNA 整合在小鼠基因组的单一基因座上,但我们对其在小鼠基因组中的整合位点未进行检测,还不清楚其在染色体上的具体位置。

在转基因小鼠中,外源基因以多拷贝形式整合的现象是很常见,多拷贝转基因的排列方式有头-尾、头-头和尾-尾等排列形式,但以头-尾排列最常见,这种拷贝串联体可能是在整合之前通过同源重组的机制形成的。在对转基因小鼠进行品系建立的过程中,由于同源重组的关系,其拷贝数会不断地降低,但最后至少能有一个完整的拷贝被稳定地保留下来^[19]。本研究通过复合式 PCR 的方法,对 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系 F6~F17 代转基因小鼠基因组 DNA 的分析显示,整合在该品系小鼠中的 HBV DNA 的拷贝数在传代中保持稳定,但对其整合的拷贝数没有明确。

总之,本研究通过对 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系 F6~F17 转基因小鼠的研究表明,该品系转基因小鼠基因组中已稳定整合了 *adr* 亚型的全长 HBV 基因组 DNA,对于 HBV 转基因的整合拷贝数、整合位置和侧翼序列还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, *et al.* Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes [J]. *Nature*, 1982, 300(5893): 611-615.
- [2] 雷章恒,李建秀,余宏宇,等.乙型肝炎病毒(*ayw*型)转基因小鼠的建立[J].第二军医大学学报,1997,18(3):201-204.
- [3] 胡卫江,李建秀,余宏宇,等.乙型肝炎病毒(*adr*亚型)转基因小鼠的研究[J].第二军医大学学报,1999;20(4):212-215.
- [4] Hu YP, Hu WJ, Zheng WC, *et al.* Establishment of transgenic mouse harboring hepatitis B virus (*adr* subtype) genomes [J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7(1): 111-114.
- [5] Lambert JF, Benoit BO, Colvin GA, *et al.* Quick sex determination of mouse fetuses [J]. *J Neurosci Methods*, 2000, 95(2):127-132.
- [6] Gan RB, Chu MJ, Shen LP, *et al.* The complete nucleotide sequence of the cloned DNA of hepatitis B virus subtype *adr* in pADR-1 [J]. *Sci Sin [B]*, 1987, 30(5):507-521.
- [7] 胡以平,曾溢滔.后基因组时代的基因工程小鼠[J].第二军医大学学报,2003,24(2):117-119.
- [8] Farza H, Hadchouel M, Scotto J, *et al.* Replication and gene expression of hepatitis B virus in a transgenic mouse that contains the complete viral genome [J]. *J Virol*, 1988, 62(11): 4144-4152.
- [9] Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, *et al.* High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice [J]. *J Virol*, 1995, 69(10): 6185-6189.
- [10] Araki K, Miyazaki J, Hino O, *et al.* Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(1):207-211.
- [11] Yamamura K, Tsurimoto T, Ebihara T, *et al.* Methylation of hepatitis B virus DNA and liver-specific suppression of RNA production in transgenic mouse [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1987, 78(7):681-688.
- [12] Larkin J, Clayton M, Sun B, *et al.* Hepatitis B virus transgenic mouse model of chronic liver disease [J]. *Nat Med*, 1999, 5(8):907-912.
- [13] Summers J. Three recently described animal virus models for hepatitis B virus [J]. *Hepatology*, 1981, 1(2):179-183.
- [14] Sureau C, Romet-Lemonne JL, Mullins JL, *et al.* Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA [J]. *Cell*, 1986, 47(1):37-47.
- [15] Marion PL. Use of animal models to study hepatitis B viruses [J]. *Prog Med Virol*, 1988, 35:43-75.
- [16] Will H, Cattaneo R, Koch HG, *et al.* Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees [J]. *Nature*, 1982, 299(5885): 740-742.
- [17] Bishop JO, Smith P. Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA [J]. *Mol Biol Med*, 1989, 6(4):283-298.
- [18] Nakanishi T, Kuroiwa A, Yamada S, *et al.* FISH analysis of 142 EGFP transgene integration sites into the mouse genome [J]. *Genomics*, 2002, 80(6):564-574.
- [19] Palmiter RD, Brinster RL. Germ-line transformation of mice [J]. *Annu Rev Genet*, 1986, 20: 465-499.

[收稿日期] 2004-10-20

[修回日期] 2004-12-13

[本文编辑] 尹 茶