

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00185

· 研究快报 ·

利用细菌内同源重组技术构建胰岛β细胞特异性表达Cre重组酶的基因敲入打靶载体

李玲^{1△}, 国蓉^{1,2△}, 常绪生^{1,3}, 印慨³, 张晔¹, 刘志民^{2*}, 章卫平^{1*}

1. 第二军医大学基础部病理生理学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003

3. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 构建胰岛β细胞特异性表达Cre重组酶的基因敲入打靶载体, 最终获得胰岛β细胞中特异性表达Cre重组酶的基因敲入小鼠, 为胰岛β细胞功能研究提供良好的基因敲除动物模型。**方法** 以低拷贝质粒pBR322-2s为骨架构建获取载体(retrieving vector), 应用λ噬菌体Red重组酶介导的缺口修复(gap-repair)方法, 通过细菌内的同源重组克隆长度约为12 kb的小鼠胰岛素2(*Ins2*)基因组DNA, 同时构建1个带有内部核糖体进入位点(*IRES*)序列、Cre重组酶序列和正负向筛选标记基因的微型打靶载体(mini-targeting vector), 最后通过同源重组获得*Ins2-Cre*打靶载体。**结果** 以*Ins2*基因的第3外显子为靶点, 成功构建了受内源性*Ins2*基因启动子严格调控的表达Cre重组酶的基因敲入型打靶载体。**结论** 成功构建了在胰岛β细胞中特异性表达Cre重组酶的基因敲入型打靶载体, 为获得胰岛β细胞中基因特异性敲除小鼠模型提供了关键材料。

[关键词] 胰岛分泌细胞; Cre重组酶; 基因打靶; 打靶载体; 同源重组; 内部核糖体进入位点

[中图分类号] R 349.6

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2014)02-0185-06

Generation of islet β cell-specific Cre recombinase targeting vector by homologous recombination in bacteria

LI Ling^{1△}, GUO Rong^{1,2△}, CHANG Xu-sheng^{1,3}, YIN Kai³, ZHANG Ye¹, LIU Zhi-min^{2*}, ZHANG Wei-ping^{1*}

1. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

3. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To construct a knock-in targeting vector for expressing of Cre recombinase specifically in islet β cell and provide the key material for knock-in mice with Cre recombinase expressed in islet β cells, providing a knock-out animal model for studying the function of islet β cells. **Methods** In our study, we constructed a knock-in targeting vector using the third exon of insulin 2 (*Ins2*) as a target site with λ phage Red recombination system. Through a first homologous recombination, we cloned an about 12 kb genomic DNA fragment from the bacterial artificial chromosome (BAC) which contained *Ins2* genomic DNA into a low copy vector pBR322-2s through gap repair. Meantime, a mini-targeting vector containing internal ribosome entry site (*IRES*), DNA sequences encoding Cre recombinase and positive-negative-selection (PNS) gene was generated. After second recombination, the final *Ins2-Cre* targeting vector was generated. **Results** With the third exon of *Ins2* used as the target, we successfully constructed the knock-in targeting vector expressing Cre recombinase which was controlled by endogenous *Ins2* gene. **Conclusion** We have successfully constructed the knock-in targeting vector expressing Cre recombinase, it will provide an important material for creating animal model of Cre recombinase which is specially expressed in islet β cells.

[Key words] insulin-secreting cells; Cre recombinase; gene targeting; targeting vector; homologous recombination; internal ribosome entry site

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(2):185-190]

[收稿日期] 2013-09-13

[接受日期] 2013-10-25

[基金项目] 国家自然科学基金(31025013, 81170718). Supported by National Natural Science Foundation of China (31025013, 81170718).

[作者简介] 李玲, 硕士生. E-mail: lilingll1@126.com; 国蓉, 硕士生. E-mail: rong.love.rong@163.com

△共同第一作者(Co-first authors).

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81886821, E-mail: zmliu_yzhao@hotmail.com; Tel: 021-81871018, E-mail: wzhang@smmu.edu.cn

近年来,随着糖尿病发病率的逐年上升,胰岛β细胞基因功能研究日益成为人们关注的焦点^[1]。基于*Cre-loxP*重组系统建立的条件基因敲除模型^[2],为研究胰岛β细胞功能提供了良好的技术平台。在条件基因敲除模型的建立过程中,*Cre*工具鼠起着非常重要的作用。目前国内外研究胰岛β细胞的*Cre*工具鼠主要有受大鼠胰岛素基因启动子(RIP)调控的*Cre*(RIP-*Cre*)小鼠^[1,3-5]、受转录因子胰十二指肠同源盒基因1(pancreatic duodenum homeobox 1, Pdx1)启动子或神经元素3(neurogenin3, Ngn3)启动子调控的胰腺特异性的*Cre*转基因小鼠^[4-10],以及受雌激素类似物他莫昔芬(tamoxifen)诱导的*Cre*工具鼠(如MIP-*CreER*^[11]、Pdx1-*CreER*^[7]等)。在上述动物模型中,控制*Cre*表达的启动子均为外源性,片段较小,而且都是通过受精卵显微注射方法获得转基因小鼠。由于外源性DNA通过随机整合的方式整合至基因组中,整合的部位及拷贝数无法控制,导致*Cre*的表达水平及其重组效率难以控制。除此之外,这些*Cre*工具鼠还存在*Cre*表达的组织特异性不够理想的问题^[5],同时有文献报道一些RIP-*Cre*小鼠表现出葡萄糖耐量异常和胰岛素分泌功能障碍^[13]。这一系列问题的出现为B细胞功能研究带来了很大困扰,为此,本研究以此为出发点,通过构建受内源性胰岛素2(*Ins2*)基因严格调控、在胰岛β

细胞中特异性表达*Cre*重组酶的基因敲入型打靶载体,以期获得胰岛β细胞中基因特异性敲除小鼠模型打下重要基础,最终为胰岛β细胞研究提供理想的动物模型。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 含*Ins2*基因组DNA的BAC菌株DH10B(克隆号:365C19)购自Cell Biolabs公司;EL350菌株购自Biovector Science Lab公司;pSK-IRES-*Cre*-pA质粒由第二军医大学基础部病理生理学教研室构建及保存;pBR322-2s、pSK-II和pL451质粒由第二军医大学基础部病理生理学教研室保存。

LB培养基(胰蛋白胨10g,酵母粉5g,NaCl5g)购自上海生工生物工程技术有限公司;限制性内切酶购自NEB公司;DNA Ladder、T₄ DNA连接酶购自TaKaRa公司;DNA纯化试剂盒购自Qiagen公司;凝胶回收试剂盒购自Axygen公司;质粒小量抽提试剂盒购自Omega公司;PCR相关试剂购自北京艾德莱生物科技有限公司。

1.2 引物及测序 根据GenBank上已发表的*Ins2*基因序列设计引物,引物合成和质粒测序均由上海杰李生物技术有限公司完成。引物序列见表1。

表1 寡核苷酸引物序列

Tab 1 Primer sequences of oligonucleotide

| Primer | Sequence (5'-3') |
|--------|--|
| RA5 | Forward: cgggatccGGTAACTGAGCCCCCTGGTGTGA Reverse: ctgctcgagCATGGTGGCTGAAGTTGGTCTGT |
| RA3 | Forward: ctgctcgagCTCTCCACCCCTGCACATAGTCC Reverse: ctaagcttGATCCGCTGGCTGGGTCAATA |
| Exon3 | Forward: ctaagcttCCTGGCCTGCTCTGACACAACC Reverse: agtctagaCCCAGGGAGCCAGGAGAAAACT |
| Mutant | Forward: GAACTACTGCAACTAGAtateCCACTACCCAGCCTACCCCTC Reverse: GTAGGCTGGGTAGTGGgataTCTAGTTGCAGTAGTTCTCC |
| Linker | Forward: GGAATTCGGGATCCC Reverse: GGGATCCCGAATTCC |

RA5: 5' retrieving arm; RA3: 3' retrieving arm. Lowercase indicates the location of site modification

1.2 表达Red重组系统的BAC宿主菌EL350感受态细胞的制备

1.2.1 BAC DNA的抽提及鉴定 收集培养16h的含*Ins2*基因组DNA的BAC菌株(DH10B)单克隆菌液1.5 mL,加入质粒小量抽提试剂溶液(溶液

I/II/III分别为250、250和350 μL),13 000×g离心后取上清加入等体积的异丙醇,室温静置10 min后16 000×g 4℃离心10 min,弃上清后用1 mL 70%乙醇洗1次,室温干燥后溶于20 μL TE缓冲液中,稀释至100 ng/μL备用(注:用于电转时BAC需

新鲜制备)。用PCR扩增鉴定BAC DNA,引物(RA5和RA3)序列详见表1。

1.2.2 EL350感受态细胞的制备 将EL350感受态细胞接种至5 mL不含抗生素的LB培养液中,32℃摇菌至 $D_{600}=1.2$ 时收集细菌后,17 000 $\times g$ 0℃离心5 min,900 μL 冰水重悬后转移至预冷的1.5 mL离心管中,5 000 $\times g$ 室温离心20 s,弃上清,重复2次后重悬于50 μL 冰水中备用。

1.2.3 BAC DNA的转入及鉴定 取100 ng BAC DNA与EL350感受态细胞混匀,冰浴15 min后电击(BTX-ECM830电穿孔仪,电击条件:1.75 kV、171 ms、5 pulse),向其中加入900 μL LB培养液培养1 h后取适量菌液涂于氯霉素平板上,32℃培养后挑单克隆菌落抽提质粒,通过PCR扩增进行鉴定,引物(RA5和RA3)序列详见表1。

1.2.4 表达Red重组系统的EL350感受态细胞的制备 将正确导入BAC DNA的单克隆菌落在含氯霉素抗性的LB培养液中32℃培养至 $D_{600}=1.2$ 时1:1 000转接至100 mL LB培养液中继续培养,直至 $D_{600}=0.5$ 时转至42℃水浴摇床,180转/分15 min后立即置于冰水中使其迅速降温;冰浴10 min后收集细菌,冰水洗涤3次、15%甘油洗涤1次后用预冷的800 μL 15%甘油重悬,-80℃分装保存。

1.3 预打靶载体(pre-targeting vector)的构建

1.3.1 PCR扩增同源臂 以BAC DNA为模板,PCR扩增得到的RA5片段用BamH I/Xho I酶切,RA3片段用Xho I/Hind III酶切纯化后备用。

1.3.2 取获载体(retrieving vector)的构建 将RA5和RA3两段同源臂连接至BamH I和Hind III双酶切后的载体pBR322-2s上,用Hind III进行单酶切鉴定并测序(质粒编号:#454)。

1.3.3 目的基因的克隆及鉴定 取Xho I线性化的取获载体10 ng加入制备好的表达Red重组系统的BAC宿主菌中,电击转化后用氨苄青霉素抗性平板进行筛选培养,提取质粒pBR322-*Ins2*用Hind III和EcoR I分别进行单酶切鉴定并测序(质粒编号:#455)。

1.4 微型打靶载体(mini-targeting vector)的构建

1.4.1 pSK-*Ins2E3*质粒的构建 以BAC DNA为模板,常规PCR扩增*Ins2*基因的第3外显子(exon3),Hind III/Xba I双酶切后克隆至pSK-II载体上,并用这2个酶切位点进行鉴定。将正确的

质粒通过点突变在编码区和3'端非翻译区(untranslated region,UTR)之间改建一个EcoRV酶切位点,点突变所用的引物Mutant见表1,用Xho I/EcoRV双酶切进行鉴定;点突变成功的质粒用EcoRV使其线性化后与Linker EcoR I/BamH I连接,挑取单克隆菌落进行培养,质粒抽提后用EcoR I/Xho I酶切鉴定。酶切正确的质粒用M13-21引物测序确保Linker连接方向正确(质粒编号:#453)。

1.4.2 微型打靶载体的构建 pSK-IRES-Cre-pA质粒用EcoR I/Xho I酶切,电泳回收IRES-Cre-pA片段(约1.9 kb);pL451质粒用Sal I/BamH I酶切后,电泳回收FRT-pGK-*Neo*-FRT片段(约2 kb),将这两个片段连接至pSK-*Ins2E3*质粒上,并用EcoR I/BamH I酶切鉴定,酶切正确的质粒用M13-21引物测序(质粒编号:#456)。

1.5 *Ins2-Cre*打靶载体的构建 含有目的基因同时又表达Red重组系统的感受态细胞的制备方法同1.2.4。将构建正确的微型打靶载体用Xho I/Not I酶切后胶回收IRES-Cre-FRT-PGK-*Neo*-FRT片段,取约150 ng胶回收产物与制备的感受态细胞混匀,冰浴15 min后电击转化,挑取单克隆菌落培养,质粒抽提后酶切鉴定并进行测序(质粒编号:#458)。

2 结果

2.1 BAC宿主菌EL350中Red重组系统的建立 在本实验中我们选择具有Red同源重组系统的EL350,以抽提的BAC DNA为模板,用RA5和RA3引物常规PCR扩增微型打靶载体的5'和3'两个同源重组臂,大小分别为270 bp和488 bp。

将BAC DNA电转至EL350中后进行质粒抽提,用RA5和RA3 PCR引物扩增得到大小分别为270 bp和488 bp的条带。此时BAC宿主菌可直接通过温度诱导制备成表达Red重组系统的感受态细胞。

2.2 预打靶载体构建结果 常规PCR扩增的目的片段越长就越难得到PCR产物,PCR产物越大产生突变的概率也越高。由于Red重组系统可以对长达80 kb的DNA进行亚克隆,所以用其进行打靶载体构建时可以按需要改变同源区的长度。在本实验中

克隆目的片段全长约 12 kb,预打靶载体构建示意图如图 1 所示。为了保证重组过程中质粒的稳定性,本实验中将两端同源臂直接连接至选择具有负性筛选标记的低拷贝载体 pBR322-2s 上。

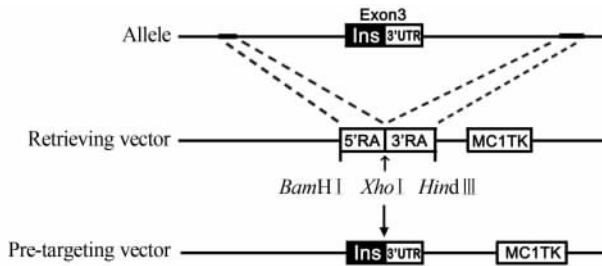


图 1 预打靶载体构建示意图

Fig 1 Procedure for constructing pre-targeting vector

Ins: Insulin 2; UTR: Untranslated region; RA: Retrieving arm; TK: Thymidine kinase

将 *Xho* I 线性化的取获载体电转至表达 Red 重组系统的 BAC 感受态细胞中,利用细菌内 Red 重组酶介导的缺口修复(gap-repair)的方法,载体两端的同源臂与 BAC DNA 上的同源序列发生交换,目的片段交换至取获载体上。克隆成功后的质粒大小约为 18 kb,酶切位点分析发现目的片段第 231、4 870、6 309 位处有 *Hind* III 酶切位点,同时取获载体在 3'同源臂连接处也有 1 个 *Hind* III 酶切位点,因此酶切后理论上会有 4.5、1.4 kb 和 2 条 6 kb 左右的条带,*Hind* III 酶切后电泳图见图 2A。由于酶切后的 2 条 6 kb 左右的条带相隔较近不能很清楚地看到,因此用 *Eco* R I (共 4 个酶切位点,分别位于第 1 885、2 718、10 511、11 617 位处)进一步酶切鉴定,电泳图如图 2B 所示。条带的大小与理论相符,初步说明目的片段克隆成功。

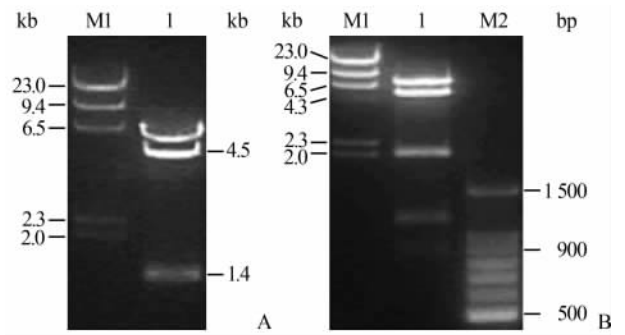


图 2 质粒 pBR322-Ins2 酶切鉴定结果

Fig 2 Digestive identification of plasmid pBR322-Ins2

A: *Hind* III digestion of pre-targeting vector (M1: Marker; 1: *Hind* III digestion of pBR322-Ins2); B: *Eco* R I digestion of pre-targeting vector (M1 and M2: Markers; 1: *Eco* R I digestion of pBR322-Ins2)

2.3 微型打靶载体构建结果 pSK-Ins2E3 质粒构建示意图如图 3A 所示。PCR 扩增得到 405 bp 大小的 *Ins2* 基因第 3 外显子连接至 pSK- II 载体上后,在第 3 外显子的编码区和 3'UTR 区之间改建一个 *Eco* RV 酶切位点再与 Linker 连接。

微型打靶载体构建示意图见图 3A。此载体构建的目的就是将 IRES-Cre-pA 片段和 *Neo* 基因插入到 *Ins2* 基因第 3 外显子的 3'UTR 之前。两个片段和载体之间如果连接顺序正确,质粒上共有 3 个 *Hind* III 酶切位点,除载体上的 1 个,另外 2 个分别位于插入片段的第 413 位和第 2 177 位,这样酶切理论上可以切出 420 bp 和 1.8 kb 左右的条带。实际酶切鉴定如图 3B 所示,条带大小与预期一致,说明载体初步构建成功。

将酶切正确的质粒用 M13-21 引物测序,测序所得序列与预期一致,进一步表明载体构建成功。

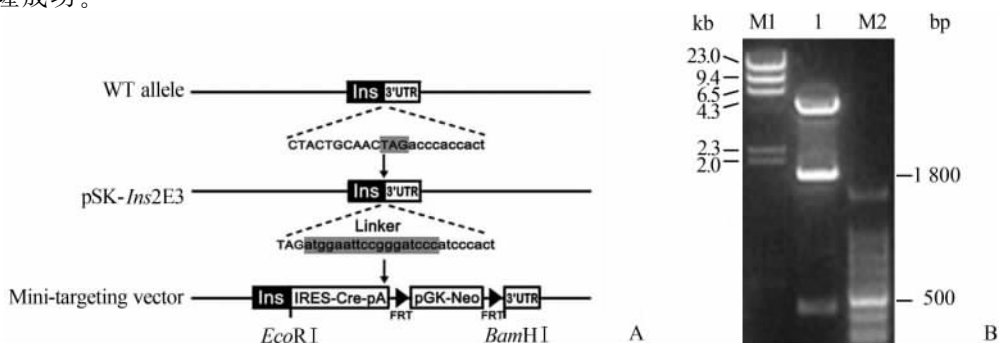


图 3 微型打靶载体的构建

Fig 3 Constructing a mini-targeting vector

A: Diagram of the strategy to generate mini-targeting vector (WT: Wild type; Ins: Insulin 2; UTR: Untranslated region; Neo: Neomycin; pGK: Phosphoglycerine kinase); B: Identification of plasmid mini-targeting vector digested by *Hind* III. (M1 and M2: Markers; 1: *Hind* III digestion of mini-targeting vector)

2.4 *Ins2-Cre* 打靶载体的构建 载体构建的示意图如图 4 所示。用 *Xho* I / *Not* I 酶切微型打靶载体后回收 5' UTR-*Ins2-Cre-Neo*-3' UTR 片段(约 4.3 kb), 通过电转使片段两端与 *Ins* 基因组两端的同源序列发生同源重组。通过此次的同源重组, 将 IRES-Cre-pA-FRT-pGK-Neo-FRT 片段插入到 *Ins2* 基因的第 3 外显子中翻译区和 3' UTR 之间。如果同源重组成功, 在质粒的第 1 885、2 718、3 342、5 346、14 417 和第 15 523 位分别有 *Eco*R I 酶切位点, 理论上可以切出 833 bp、624 bp、2 004 bp、9 071 bp 和 1 106 bp 大小的条带, 酶切结果见图 5。用 *Eco*R V 和 *Hind* III 分别单酶切, 切出条带大小均与预期一致。利用引物 MC1-R 和 RA3 的反向引物分别对酶切正确的质粒进行测序, 测序所得的序列通过与预期重组后基因组序列进行对比, 发现实际序列一致无突变, 表明载体构建成功。

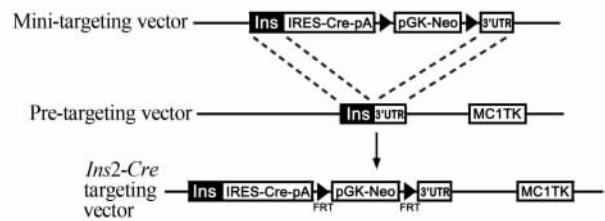


图 4 *Ins2-Cre* 打靶载体构建示意图

Fig 4 Diagram for generating *Ins2-Cre* targeting vector

pGK: Phosphoglycerine kinase; UTR: Untranslated region; Ins: Insulin 2; Neo: Neomycin

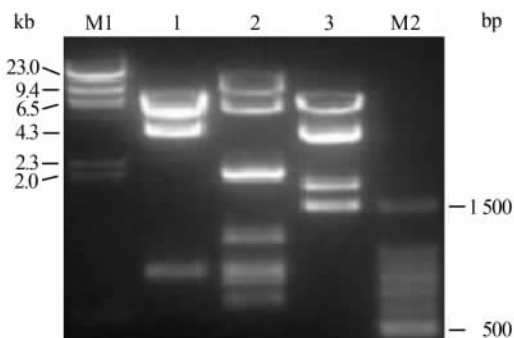


图 5 *Ins2-Cre* 打靶载体酶切鉴定结果

Fig 5 Digestive identification of plasmid *Ins2-Cre* targeting vector

M1: λ /Hind III DNA marker; 1-3: *Eco*R V, *Eco*R I and *Hind* III digestion of plasmid *Ins2-Cre*, respectively; M2: DNA ladder. Ins: Insulin 2

3 讨论

基因敲除小鼠模型的应用为基因功能研究提供

了良好的实验手段。利用 *Cre-loxP* 位点特异性重组系统能够有效避免基因在发育过程中导致胚胎死亡的现象, 因此在条件性基因敲除中得到广泛应用^[14]。*Cre-loxP* 系统介导的条件基因敲除模型包含 2 种小鼠, 一种是目的基因两侧插入 *loxP* 位点小鼠, 另外是受各种组织或细胞特异性启动子调控的 Cre 工具鼠。2 种小鼠交配后 Cre 重组酶介导的重组能够有效切出 2 个 *loxP* 位点间的序列, 从而达到基因敲除的目的。目前能够用于实现条件敲除、在不同组织中表达 Cre 重组酶的 Cre 小鼠世系已经有很多种^[15], 如用于胰腺组织基因特异性敲除的 RIP-Cre、Pdx1-Cre 和 Ngn3-Cre 小鼠, 在启动子调控下的 Cre 重组酶在下丘脑不同部位均有不同程度的表达; RIP 启动子调控下的 Cre 重组酶主要在下丘脑弓状核表达, Pdx1 和 Ngn3 启动子调控下的 Cre 重组酶分别在下丘脑的腹内侧与核群等部位有活性^[12]。理想动物模型的缺失给研究胰岛 β 细胞基因功能带来很大困扰。

转基因动物模型的建立主要有 DNA 显微注射和基因打靶两种方法。DNA 显微注射具有外源基因随机整合、拷贝数无法控制且整合效率较低等缺点, 因此目前转基因动物模型的建立常用基因打靶技术。IRES(内部核糖体进入位点) 是 mRNA 5' UTR 的一段特殊序列, 允许核糖体直接在此序列处结合 mRNA 并起始翻译。在打靶载体的设计过程中, 我们将编码 Cre 重组酶的 DNA 序列置于 IRES 序列之后, 再定点整合于 *Ins2* 基因第 3 外显子 3' UTR 之前。利用 IRES 能独立启动不依赖 5' 帽子结构翻译这一特点, *Cre* 与 *Ins2* 的翻译各自独立, 同时 Cre 的表达受到内源性 *Ins2* 基因的严格调控, 实现了外源基因 *Cre* 与 *Ins2* 的共表达。本研究中打靶载体的构建是利用 λ 噬菌体 Red 系统介导的同源重组技术对靶基因组 DNA 进行直接修饰^[16-18], 这种基于 BAC 同源重组的方法减少了为克隆目的基因寻找合适的限制性酶切位点所花费的精力, 同时也简化了传统打靶载体构建工作, 具有高效、省时、灵活的特点。

Red 重组系统构建法包含两种方式: 一种是构建诱导表达型质粒, 再将这种质粒导入到需要进行同源重组的细胞中, 表达相应的重组系统; 另一种是通过将突变失活的噬菌体有关序列整合到大肠杆菌的染色体中, 构建具有同源重组功能的菌株, 然后在使用时将需要进行同源重组的 DNA 导入到这些菌

株中。比较而言后者重组效率较高,应用较广泛,目前常用的方法是将 BAC 载体转入到有重组酶的细菌(如 EL250 和 EL350 等)中。本实验构建的基因敲入型打靶载体是将修饰后 *Ins2* 基因第 3 外显子直接导入到含有 BAC 的 EL350 中,操作简单快捷。在构建的过程中我们首先通过 PCR 扩增 *Ins2* 基因两端的同源臂,借助 λ 噬菌体 Red 系统介导的同源重组反应从 BAC 中成功取获了 *Ins2* 基因组 DNA 序列,由于重组反应的整个过程都是在大肠杆菌细胞内部完成,因此碱基突变的频率也非常低。为了不影响 *Ins2* 基因的正常功能,在实验设计时选择在第 3 外显子的终止密码子和 3' UTR 之间插入 *IRES-Cre* 序列,这样既不影响 *Ins2* 基因的表达,又能独立翻译出 Cre 重组酶,保证了 Cre 重组酶表达的特异性。

本实验利用 λ 噬菌体 Red 重组酶系统构建了 *Ins2-Cre* 敲入型打靶载体,为获得胰岛 β 细胞中特异性表达 Cre 重组酶小鼠模型打下重要基础,同时为进一步构建 B 细胞基因特异性敲除小鼠,研究相关基因的生物学功能奠定了基础。

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] Xu Y, Wang L, He J, Bi Y, Li M, Wang T, et al; 2010 China Noncommunicable Disease Surveillance Group. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. *JAMA*, 2013, 310: 948-959.
- [2] Sauer B, Henderson N. Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome [J]. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17: 147-161.
- [3] Postic C, Shiota M, Niswender K D, Jetton T L, Chen Y, Moates J M, et al. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using *Cre* recombinase [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 305-315.
- [4] Magnuson M A, Osipovich A B. Pancreas-specific cre driver lines and considerations for their prudent use [J]. *Cell Metab*, 2013, 18: 9-20.
- [5] Herrera P L. Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages [J]. *Development*, 2000, 127: 2317-2322.
- [6] Desgraz R, Herrera P L. Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors [J]. *Development*, 2009, 136: 3567-3574.
- [7] Gu G, Dubauskaite J, Melton D A. Direct evidence for the pancreatic lineage; NGN3⁺ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors [J]. *Development*, 2002, 129: 2447-2457.
- [8] Gannon M, Herrera P L, Wright C V. Mosaic Cre-mediated recombination in pancreas using the pdx-1 enhancer/promoter [J]. *Genesis*, 2000, 26: 143-144.
- [9] Yoshida S, Takakura A, Ohbo K, Abe K, Wakabayashi J, Yamamoto M, et al. Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis [J]. *Dev Biol*, 2004, 269: 447-458.
- [10] Schonhoff S E, Giel-Moloney M, Leiter A B. Neurogenin 3-expressing progenitor cells in the gastrointestinal tract differentiate into both endocrine and non-endocrine cell types [J]. *Dev Biol*, 2004, 270: 443-454.
- [11] Wicksteed B, Brissova M, Yan W, Opland D M, Plank J L, Reinert R B, et al. Conditional gene targeting in mouse pancreatic-cells; analysis of ectopic Cre transgene expression in the rain [J]. *Diabetes*, 2010, 59: 3090-3098.
- [12] Song J, Xu Y, Hu X, Choi B, Tong Q. Brain expression of Cre recombinase driven by pancreas-specific promoters [J]. *Genesis*, 2010, 48: 628-634.
- [13] Lee J Y, Ristow M, Lin X, White M F, Magnuson M A, Hennighausen L. RIP-Cre revisited, evidence for impairments of pancreatic beta-cell function [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 2649-2653.
- [14] Kühn R, Schwenk F. Advances in gene targeting methods [J]. *Curr Opin Immunol*, 1997, 9: 183-188.
- [15] Nagy A, Mar L. Creation and use of a Cre recombinase transgenic database [J]. *Methods Mol Biol*, 2001, 158: 95-106.
- [16] Zhang Y, Buchholz F, Muyrers J P, Stewart A F. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli* [J]. *Nat Genet*, 1998, 20: 123-128.
- [17] Zhang Y, Muyrers J P, Testa G, Stewart A F. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli* [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1314-1317.
- [18] Zhang Y, Muyrers J P, Rientjes J, Stewart A F. Phage annealing proteins promote oligonucleotide-directed mutagenesis in *Escherichia coli* and mouse ES cells [J]. *BMC Mol Biol*, 2003, 4: 1.