



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1756840 B

(45) 授权公告日 2010.08.04

(21) 申请号 200380110005. X

(22) 申请日 2003.12.22

(30) 优先权数据  
376555/2002 2002.12.26 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日  
2005.08.26

(86) PCT申请的申请数据  
PCT/JP2003/016496 2003.12.22

(87) PCT申请的公布数据  
W02004/058964 JA 2004.07.15

(73) 专利权人 独立行政法人理化学研究所  
地址 日本埼玉县和光市  
专利权人 独立行政法人科学技术振兴机构

(72) 发明人 太田邦史 濑尾秀宗 柴田武彦

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001  
代理人 郭文洁 刘玥

(51) Int. Cl.  
C12N 15/00(2006.01)

(56) 对比文件

Shyam S.Chauhan et al.Construction of a new universal vector for insertionalmutagenesis by homologous recombination. Gene120. 1992, 120281-286.

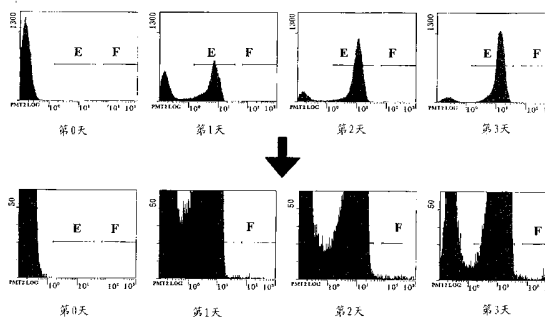
审查员 陈中伟

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 5 页

(54) 发明名称  
诱导体细胞同源重组的方法

(57) 摘要

本发明提供通过在体细胞中的基因座诱导体细胞同源重组来获得各种新基因的方法。通过调控在任意的基因座发生 DNA 同源重组的真核生物细胞中基因座中存在的基因的转录活性,在所述的基因和存在于转录启动子上游区域的具有与所述基因相似的 DNA 序列的基因之间诱导体细胞同源重组,由此有可能获得具有多种遗传信息的各种新基因。



1. 一种用于在真核生物细胞中诱导体细胞同源重组的方法,其中 DNA 同源重组发生在任意基因座,该方法的特征在于调控所述基因座的基因的转录是通过将所述基因座的基因转录用转录启动子置于与所述基因的碱基序列相似的碱基序列的 3' 下游侧,可操作地邻接所述基因,在所述基因的碱基序列和与所述基因相似的碱基序列之间诱导 DNA 同源重组,并且:

A) 其中与所述基因相似的碱基序列、转录启动子和所述的基因的顺序从 5' 侧依次为:与所述基因相似的碱基序列、转录启动子、所述的基因;所述转录启动子是以可作用于所述基因的方式插入;

B) 其中与所述基因相似的碱基序列与所述的基因的插入方向相反。

2. 权利要求 1 中所述的方法,其特征在于上述的细胞是 DT40 细胞。

3. 权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于用于上述转录调控的顺式作用区域中包含增强子和核基质附着缢痕 (MAR) 的任意一个或两者。

4. 权利要求 1 至 3 中任何一项所述的方法,其特征在于,在上述的基因和与上述基因相似的碱基序列是外源的情况下,包括下列步骤:

(a) 步骤,其中与所述基因相似的碱基序列、转录启动子和所述的基因在载体上的顺序是从 5' 侧依次为:与所述基因相似的碱基序列、转录启动子、所述的基因;并且所述转录启动子是以可作用于所述基因的方式插入;

(b) 步骤,其中将所述的载体导入细胞,并且将与所述基因相似的碱基序列、转录启动子和所述的基因整合到染色体上。

5. 权利要求 4 中所述的方法,其特征在于将增强子和核基质附着缢痕 (MAR) 的任意一个或两者以可作用于上述的转录启动子的方式插入到上述的载体。

6. 权利要求 4 或 5 中所述的方法,其特征在于上述的转录启动子是可诱导的启动子。

7. 权利要求 6 中所述的方法,其特征在于上述的可诱导的启动子是四环素诱导的启动子。

8. 权利要求 4 至 7 中任何一项所述的方法,其特征在于上述的基因是增强的蓝绿色荧光蛋白 (ECFP) 基因。

9. 权利要求 4 至 8 中任何一项所述的方法,其特征在于与上述基因相似的碱基序列是增强的绿色荧光蛋白 (EGFP) 基因序列。

10. 权利要求 4 至 9 中任何一项所述的方法,其特征在于上述的增强子是鸡抗体轻链基因增强子,即 3' 增强子,且上述的核基质附着缢痕 (MAR) 是鸡源的。

11. 制备经诱导 DNA 同源重组的细胞的方法,该方法包括由权利要求 1 至 10 中任何一项所述的方法在所述细胞中诱导 DNA 同源重组。

12. 制备经诱导 DNA 同源重组的基因的方法,该方法包括由权利要求 1 至 10 中任何一项所述的方法诱导所述基因进行同源重组。

13. 一种用于使得一种基因同与所述基因相似的碱基序列进行同源重组的载体,该载体包含所述的基因,与所述基因相似的碱基序列和用于调控所述基因转录的转录启动子,其中,与所述基因相似的碱基序列位于所述转录启动子 5' 侧的上游区域;并且

A) 其中与所述基因相似的碱基序列、转录启动子和所述的基因在载体上的顺序从 5' 侧依次为:与所述基因相似的碱基序列、转录启动子、所述的基因;所述转录启动子是以可

作用于所述基因的方式插入；

B) 其中与所述基因相似的碱基序列与所述基因的插入方向相反。

14. 权利要求 13 中所述的载体, 其中进一步将增强子和核基质附着缢痕 (MAR) 的任意一个或两者以可操作地与所述基因相连接。

## 诱导体细胞同源重组的方法

### 技术领域

[0001] 本发明总的说来,涉及在真核生物体的细胞中诱导体细胞同源重组的技术,以及更具体地涉及在体细胞中的任意基因座诱导体细胞同源重组的方法,和其中通过所述的方法诱导了体细胞同源重组的细胞。

[0002] 另外,本发明也涉及利用上述的体细胞同源重组诱导方法生产具有多种遗传信息的新基因的方法。

[0003] 进一步的,本发明涉及由上述的新基因编码的新蛋白质。

[0004] 更进一步,本发明涉及用于诱导体细胞同源重组的载体,该载体是最适于诱导体细胞同源重组的结构构建的。

### 背景技术

[0005] 对于真核生物,体细胞的同源重组是用于获得多种基因,从而产生多种蛋白质活性的最重要的 DNA 代谢反应之一。因此,体细胞同源重组的调控是用于获得多种基因的一个极为重要的问题。

[0006] 通常,作为获得具有新的功能或性质的多种基因的方法,存在 DNA 改组(shuffling)的技术(参见,例如 Cramer 等人,1998)。这个技术通过混合多个同源的基因序列,适当地用 DNase I 消化,利用所得到的的小片段作为引物,以及以原始的基因作为模板进行 PCR 模拟同源重组。然而,在将扩增片段与表达载体连接并转化入细菌后,广泛进行重组产物的分析,一般认为直接分析该产物在高等真核生物中将具有何种特征可能是困难的。另外,检验动物细胞内的表达需要成功确认由转入新载体和密码子的利用引起的表达相容性。

[0007] 另一方面,作为在动物细胞内诱导遗传重组的系统,存在在细胞内活化重组的系统,例如利用位点特异的重组酶 Cre-lox 的系统(参见例如,DiSant 等人,1995),和利用序列特异的核酸内切酶 I-SceI 的系统(参见例如,Rouet 等人,1994)。Cre-lox 系统使用来自细菌噬菌体 P1 的 Cre,38kDa 的位点特异的重组酶,并且在称为 loxP 位点的特异位点之间导入重组。另外,I-SceI 系统利用来源于芽殖酵母的核酸内切酶,I-SceI 在其识别位点切割 DNA 双链的活性,并且诱导 DNA 同源重组。然而,在这些系统中,因为重组只限于特异的序列之间,并且重组事件是单触发的,原则上可获得的重组体只是一个类型。另外,由于必须预先向染色体中导入与重组调控相关的序列,使 Cre 或 I-SceI 等重组酶在细胞中表达,所以诱导染色体的重组并不容易。

[0008] 发明公开

[0009] 本发明的发明人考虑了上述状况,进行深入研究是否存在用于在受控的条件下诱导体细胞同源重组的方法,结果是出乎意料地发现通过在需要重组的基因座调控转录,有可能在相似的碱基序列之间诱导体细胞同源重组。

[0010] 因此,总的说来本发明的目的是提供用于在体细胞内的基因座诱导体细胞同源重组的方法。

- [0011] 另外,本发明的目的是提供通过上述的方法诱导了体细胞同源重组的细胞。
- [0012] 进一步的,本发明的目的是提供具有多种遗传信息的新基因和利用在细胞内诱导的体细胞同源重组来生产所述新基因的方法。
- [0013] 更进一步的,本发明的目的是提供由所述的新基因编码的新蛋白质。
- [0014] 另外,本发明的目的是提供具有为所需转录调控而构建的结构、并用于诱导体细胞同源重组的载体。
- [0015] 进一步的,本发明提供诱导以真核生物体细胞的体细胞同源重组为特征的体细胞同源重组方法,其中 DNA 同源重组可在任意的基因座发生,通过调控存在于所述基因座的基因的转录,在所述的基因和相似的碱基序列之间诱导 DNA 同源重组。另外,也提供其中通过所述的方法诱导了体细胞同源重组的细胞。
- [0016] 另外,本发明提供通过真核生物细胞的体细胞同源重组获得具有多种遗传信息的新基因的方法,其中 DNA 同源重组可在任意的基因座发生,通过调控在所述基因座的基因的转录,在所述的基因和相似的碱基序列之间诱导 DNA 同源重组。另外,也提供通过所述的方法产生新的基因。
- [0017] 更进一步,也提供由所述的新基因编码的新蛋白质。
- [0018] 另外,本发明提供具有所需转录调控所必需结构的构建载体,用于诱导体细胞同源重组。
- [0019] 利用本发明说明书公开的技术,在多种位置上连续诱导 DNA 同源重组,有可能增加所获得的重组体的多样性。另外,利用本说明书公开的技术,在目的细胞内自发地形成具有遗传多样性的目的基因,而不用产生为 DNA 改组技术所需的用于重组的 DNA 文库,可在所述细胞内进行筛选,以获得所需新基因。因此,可用比传统技术更短的时间获得多种新基因。
- [0020] 对于可用于本发明的真核生物细胞,可使用其中可能在任意的基因座发生体细胞同源重组的任何细胞,但优选地,使用鸡衍生的 DT40 培养细胞。
- [0021] 被诱导的体细胞同源重组基因可以是内源的基因或外源的基因。另外,在与所述基因相似的碱基序列中包括例如,天然存在的基因序列,不具有基因形式的天然存在的碱基序列,以及人造的序列。
- [0022] 就内源的基因而言,如果有下述的基因座存在则该基因可以利用,其中所述基因座中在临近促进该基因转录活性的启动子的上游临近处存在与该基因类似的序列,举例而言可以利用抗体轻链或重链等基因座。
- [0023] 另外,就外源的基因而言,任何基因都是可利用的,只要它构建在适当的载体上,所述载体具有包括产生同源重组的基因上游的转录启动子,和所述基因上游临近处与所述基因类似的序列的结构。
- [0024] 在此,与目的基因相似的碱基序列位于目的基因转录起始位置上游大约 1bps 至 100kbps 的区域是足够的,但是更优选地其位于上游大约 500bps 至 50kbps 的区域,以及更优选地位于上游大约 3kbps 至 25kbps。
- [0025] 作为外源的基因没有限制,但是包括荧光蛋白基因(例如 GFP 基因、CFP 基因等)、抗药性基因(例如潮霉素抗性基因、或嘌呤霉素抗性基因)等。
- [0026] 本发明中所使用的“与被诱导体细胞同源重组的基因相似的碱基序列”,是与所

述基因的全部或部分相似的碱基序列。在此,相似的是指与被诱导体细胞同源重组的基因的全部或部分具有 60%或更高的序列同一性,优选 70%以上的序列同一性,以及更优选地 80%至 99%,包括 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、以及 99%的序列同一性。

[0027] 本发明中所使用的转录调控方法,可使用本领域技术人员众所周知的任何方法,但是利用内源转录启动子的方法,或利用内源可诱导的转录启动子的调控方法是优选的。另外,为了促进转录活性,可使用适合于目的基因的增强子和核基质附着缢痕(MAR)。为了调控转录,必须以可操作的方式排列转录启动子、增强子、和核基质附着缢痕(MAR)。在此,“可操作”是指转录启动子、增强子、和核基质附着缢痕(MAR)可实现各自的功能,并且可根据需要调控目的基因的转录。例如,就转录启动子而言,没有特别的限制,但是它应该位于在目的基因转录起始位置的上游大约 100bps 内的区域中,并且就增强子而言,没有限制,但是通常它可能存在于自转录起始点的 100bps 以上,或数千个 bps 以上,并且可能在目的基因的 5' 侧或 3' 侧。另外,核基质附着缢痕(MAR)邻近于增强子,并且可能在增强子的 3' 侧或 5' 侧。

[0028] 附图简述

[0029] 图 1 显示用于在载体上构建为诱导转录所必需的顺式作用区域的方法概要。

[0030] 图 2 显示在 FACS 下荧光强度随时间的变化。认为门 E 是 ECFP,而将具有更强荧光强度的群体作为门 F。

[0031] 图 3 显示在 FACS 下荧光强度随时间的变化。通过获得 E 的荧光强度和 F 的荧光强度的比率进行定量。

[0032] 图 4 显示在荧光显微镜下观察到的细胞的成像,其中在 ECFP 基因和 EGFP 基因之间诱导了同源重组。这是诱导 ECFP 转录 5 天后的荧光显微镜成像。在 CFP 发荧光的细胞(A)中,观察到其中认为 GFP 发荧光的细胞(B)的(C)。

[0033] 图 5 显示新的基因序列的分析结果。作为直接在具有强荧光强度的细胞群的 TRE 下分析序列的结果,发现 4 个新类型的重组体,类型 1、类型 2、类型 3 和类型 4。进一步,在 4 个类型的序列上下显示 ECFP 和 EGFP 序列。进一步,除了 ECFP,只记录下不同于 EGFP 和 ECFP 的序列。

[0034] 本发明的最佳实施方式

[0035] 因为增强的蓝绿色荧光蛋白(ECFP)基因的同源重组方法部分地使用根据本发明的诱导体细胞同源重组的方法,下文中详细说明增强的蓝绿色荧光蛋白(ECFP)基因的同源重组方法。

[0036] 如上所述,在本发明的增强的蓝绿色荧光蛋白(ECFP)基因的同源重组方法中,选择和培养其中发生 DNA 同源重组的细胞,以及当诱导同源重组时,通过可诱导的启动子调节所述细胞的 DNA 同源重组,以诱导与具有类似于 ECFP 的碱基序列的增强绿色荧光蛋白(EGFP)基因序列进行同源重组。

[0037] 因此,在下文中,按顺序说明细胞的选择和培养、用于诱导转录调控的载体的构建、确认被诱导同源重组的新基因的表达、以及确认被诱导同源重组的新基因序列。

[0038] 1. 选择被诱导体细胞同源重组的细胞

[0039] 本发明中的“真核细胞”是指其中以某种频率发生体细胞同源重组的细胞,优选

是人、小鼠、羊、大鼠、兔、或鸡的 B 细胞或其细胞系,更优选是人 Burkitt' s 淋巴瘤衍生的 Ramos 细胞系、或鸡 B 细胞衍生的 DT40 细胞系,以及最优选地是 DT40 细胞系。

[0040] 用于本发明的“DT40 细胞系”包括衍生的细胞系和亚系,其中已经以某种方式对所述细胞的染色体进行了修饰(例如,特定基因的重组、插入、缺失等)。

[0041] 以所述技术领域公知的方式实施本发明的培养条件,自不必说,这应在适合于所选择细胞的培养基和培养条件(培养温度、CO<sub>2</sub> 浓度)中进行。作为培养基,一般可考虑使用,例如 RPMI1640 培养基或 DMEM 培养基,或已经加入胎牛血清的上述培养基等。通常在存在 5% CO<sub>2</sub> 时,在适合于所利用细胞的温度(例如 25 摄氏度至 40 摄氏度)下培养 1 至 30 天。在培养期间,如需要可向培养基加入抗生素,例如卡那霉素和青霉素。另外,如果利用可诱导的启动子进行调控,可加入用于诱导转录的药物(例如四环素)。因此,如果选择的免疫细胞是 DT40 细胞,使用例如 IMDM(Invitrogen) 作为培养基,培养温度是例如 39.5 摄氏度,并且在 5% 的 CO<sub>2</sub> 浓度中进行培养。

[0042] 2. 构建用于转录调控的载体

[0043] (1) 顺式作用区域

[0044] 作为用于本发明的转录调控的方法,可使用任何方法,只要其是本领域技术人员众所周知的技术,但优选使用的方法是,将用于转录调控的顺式作用区域构建在适当的载体上,将所述的载体导入细胞,使其整合到染色体上的特异基因座。在此,“顺式作用区域”是指为特定基因的转录调控所必需的 DNA 序列,是邻近于所述基因存在的区域。“顺式作用区域”包括转录启动子、增强子、核基质附着缢痕(MAR),以及为调控转录活性所必需的其他任意序列。

[0045] 对于转录启动子,可使用组成型启动子或可诱导的启动子,但是就易于转录调控而言,优选可诱导的启动子。可诱导的启动子包括应答  $\alpha$ -干扰素、热休克、重金属离子、例如糖皮质激素(Kaufman, 1990) 的类固醇、和四环素的启动子。其它合乎需要的可诱导启动子包括当从外部加入启动子的活化因子时在细胞内产生应答的启动子。优选例如,可使用四环素诱导的启动子等。

[0046] 可使用任何增强子和核基质附着缢痕(MAR),只要它们在所选择细胞内起调控转录活性的作用即可,但是如果使用 DT40 细胞,优选使用鸡抗体轻链基因增强子(3' 增强子)和鸡衍生的核基质附着缢痕。

[0047] 在构成顺式作用区域的成分中,如果可诱导启动子、增强子、和核基质附着缢痕(MAR) 的序列是公众已知的,则可以制备引物以便根据这个序列通过 PCR 等方法扩增所述的序列,以及从适当的 cDNA 文库或基因组文库直接获得这些序列。优选设计所使用的引物,使之便于在克隆时加入到克隆载体上的限制性内切酶位点中。可利用适当的限制性内切酶位点将所获得的增强子和核基质附着缢痕(MAR) 以下述顺序或其相反的顺序克隆到已构建了被诱导同源重组的基因和与所述基因相似的 DNA 序列的载体中,所述顺序指所述基因和与其类似的 DNA 序列之间的启动子、所述基因的 3' 方向下游核基质附着缢痕(MAR),和增强子的顺序。

[0048] 另外,可将靶基因、与所述基因相似的碱基序列、增强子、核基质附着缢痕(MAR) 等克隆到可商购的载体上,例如其上已经预先克隆入可诱导启动子的 pTRE2hyg(Clontech)。

[0049] (2) 获得基因 (ECFP)

[0050] 被诱导同源重组的基因可以是内源的基因,但其也可以是分离的外源基因。为了便于转录调控,外源的基因是优选的。

[0051] 通过本领域技术人员众所周知的方法克隆被诱导同源重组的基因,但可通过用于扩增所述基因的引物对(例如设计成可在所述基因的5'末端和3'末端扩增该基因的引物对)、和具有高准确性的DNA聚合酶(例如,Pyrobest DNA聚合酶(TaKaRa))来扩增所述的基因。

[0052] 可将获得的基因克隆到适当的克隆载体(例如,pBlueScriptII、pUC19等)中。

[0053] 如果被诱导同源重组的基因是ECFP基因,则利用可商购的载体(pECFP-C1)进行克隆。

[0054] 通过类似的方法,可获得与ECFP基因的全部或部分相似的碱基序列。可使用与ECFP基因相似的任何序列,但优选EGFP基因序列等。

[0055] 如上所述,将获得的ECFP基因和与ECFP基因类似的序列以可操作的方式插入到已构建了“顺式作用区域”的载体上ECFP基因的上游侧(即,5'侧),转录启动子位于上述两者之间。类似的DNA序列的插入方向可以是正向或相反的方向。“正向”是指如果目的DNA序列是天然存在的,则是天然存在的方向,而如果该序列是人造的,可选择任一方向作为“正向”。

[0056] 3. 构建转录因子表达载体

[0057] 为了诱导基因的体细胞同源重组,促进或抑制转录启动子活性所必需的转录因子的表达是必须的。例如,就四环素诱导的启动子而言,转录因子(例如,与Tet阻遏物融合的VP16转录活化结构域)通过结合四环素应答区域调节转录。用于表达这些转录因子的载体可包括例如,可操作连接的与所述转录因子表达功能相关的启动子(例如,人巨细胞病毒立早启动子),和适当的选择性标记物(例如,新霉素抗性标记、潮霉素抗性标记等)。

[0058] 另外,作为用于调控启动子的载体,可使用可商购的载体,例如pTet-Off或pTet-On载体(Clontech)。

[0059] 4. 确认被诱导同源重组的新基因的表达

[0060] (1) 诱导所选择基因的同源重组

[0061] 为了诱导所选择基因(在此,ECFP基因)的同源重组,需要将进一步调节与ECFP基因可操作连接的作用于启动子的转录因子的活性。根据所选择的转录启动子确定所述的因子,这可在无需过量试验的情况下由本领域技术人员进行选择。例如,如果选择的启动子是四环素诱导的启动子,可使用四环素或强力霉素等作为所述的因子。

[0062] 另外,必须将用于转录调控的载体和转录因子表达载体导入到所选择的细胞中。作为将载体导入到细胞中的方法,可使用本领域技术人员众所周知的任何方法,例如,可使用磷酸钙方法(Chen和Okayama,1988)、或阳离子脂类的方法(Elroy-Stein和Moss,1990)、电穿孔方法(Neumann等人,1982)等。

[0063] 将上述的两类载体导入细胞后,通过向培养基添加或除去为活化该转录启动子所必需的因子(例如四环素、强力霉素等)而活化目的转录启动子。由此,诱导所选择基因的同源重组。

[0064] (2) 确认被诱导同源重组的新基因的表达

[0065] 可在重组诱导前根据基因产物的特征,利用本领域技术人员众所周知的方法确认



由同源重组的诱导所产生的新基因的表达。例如,如果所选择的基因具有特异的抗药性,通过比较同源重组诱导前的细胞和诱导后的细胞、对特定药物的耐受浓度等,可预测新基因的表达。另外,就 ECFP 基因而言,可通过荧光发射波长等的变化确认新基因的表达。

[0066] 5. 被诱导同源重组的新基因的序列分析

[0067] 可进一步通过在同源重组的新基因上进行序列分析,以及通过同源重组的实际发生来确认新基因的产生。

[0068] 通过已知的方法提取将确认其进行了同源重组的细胞的基因组 DNA,利用可用于扩增待确定基因的特异 DNA 引物(例如,为了包括全部的目的遗传区域,所述基因 5' 侧附近设计的正向引物,所述基因 3' 侧设计的反向引物)通过 PCR 方法扩增目的基因。

[0069] 可商购的 DNA 聚合酶进行扩增,但优选使用高准确性的 DNA 聚合酶。进行扩增的条件取决于所使用 DNA 引物的退火温度,和所使用 DNA 聚合酶的特性,例如,在 98 摄氏度反应 2 分钟后,进行 26 个下述循环:98 摄氏度 30 秒,58 摄氏度 30 秒,72 摄氏度 1 分钟,以及进一步在 72 摄氏度反应 5 分钟。通过琼脂糖凝胶电泳分离反应后的扩增产物,切下包含目的基因的 DNA 条带,回收 DNA,然后整合到测序载体中。用于测序的载体可以是用于所述技术领域的任何载体,例如可使用 pCR2.1-TOPO(Invitrogen)。可根据已建立的方法确定上述制备的测序载体中的基因 DNA 序列。

[0070] 下文中描述实施方案,但本发明不局限于此。

[0071] 实施方案 1:构建用于诱导的转录调控载体

[0072] 为了将诱导性调控基因表达的启动子导入到细胞中,在载体上构建为转录诱导所必需的顺式作用区域(图 1)。

[0073] ECFP 基因结合在四环素诱导启动子(TRE 和人巨细胞病毒小启动子)的下游,并且 MAR 和增强子(3')结合在更远的下游。上游放置大约 3kb 的间隔序列(Arg4 酵母基因,3kb PstI 片段),并且进一步,EGFP 与 ECFP 以反向结合。

[0074] 使用 PCR 方法克隆 MAR 和 3' 增强子。使用 Roche 制造的 Exp 和高保真 PCR 系统进行 PCR,所使用的引物设计如下,利用 DT40 基因组 DNA 作为模板。

[0075] MAR:

[0076] 正向检测引物

[0077] 5' -GCTGCAGTGTCTTGGGGGTGAAATTCAG-3' (序列号:1)

[0078] 反向检测引物

[0079] 5' -GCTCTAGAACTGCCCCATTA AAAACTTTC-3' (序列号:2)

[0080] 3' 增强子:

[0081] 正向检测引物

[0082] 5' -GCTCTAGAAGGCACAGCGCTGTCAGGGTGC-3' (序列号:3)

[0083] 反向检测引物

[0084] 5' -CCGCGGCCGCGTGGTGGGAGCGGGCAGGGG-3' (序列号:4)

[0085] 将 PCR 产物 TA 克隆至 pCR2.1 载体后,随后用适当的限制性内切酶(MAR:PstI、XbaI,3' 增强子:XbaI、NotI)消化,将其再克隆到 pBluescriptII 中。对于四环素诱导的启动子,将来自 pTRE2hyg(Clontech)的包含 TRE 的 XhoI EcoRI 片段克隆到 pBlueScriptII 中。将 ECFP 基因插入到这个包含 TRE 的质粒中。对于 ECFP 基因,将来自 pECFP-C1 质

粒 (Clontech) 的包含 ECFP 的 *Nhe*I、*Mu*I 片段钝末端连接到用 *Eco*RI 消化的 pHS305 中 (pHS344)。进一步的,将克隆到 pBluescriptII 中的 MARs 插入到 pHS344 ECFP 的下游部分 (pHS345)。如上所述,使用 ARG4 酵母基因作为间隔序列。这是由 *Pst*I 附着于 pUC119 产生的 3kb 片段,但将 EGFP 片段 (pEGFP-C1 的 *Nhe*I、*Bsp*EI 片段) 钝末端连接至这些质粒的 *Sna*BI 片段。由此处,从 *Pst*I 切下包含 EGFP 和 ARG4 基因的序列,通过 pHS345 *Xho*I 片段的钝末端连接获得 pHS346。进一步的,通过将克隆到 pBlueScriptII 中的 3' 增强子插入到用 *Xba*I 和 *Not*I 消化的 pHS346 中产生 pHS347。

[0086] 实施方案 2:制备被诱导 DNA 同源重组的细胞

[0087] (1) 细胞培养

[0088] 在 CO<sub>2</sub> 恒温箱中,在 5% CO<sub>2</sub> 和 39.5 摄氏度下培养 DT40 细胞。使用 IMDM 培养基 (Invitrogen) 作为培养基,加入 10% FBS、1% 鸡血清、每 ml 100 单位的青霉素、100 μg/ml 的链霉素、和 55 μM 的 2-巯基乙醇。

[0089] (2) 转染

[0090] 用 *Hind*III 使 30 μg 的表达四环素诱导的转录因子的表达载体 pTA-Hyg (clontech) 线性化,另外用 *Xmn*I 使 60 μg 的 pHS347 线性化,并且根据已知的方法 (Buerstedde 等人,1991) 转染到 DT40 细胞中。同时,向培养基加入 2.5 mg/ml 的潮霉素和 100ng/ml 的强力霉素并进行选择。结果在潮霉素抗性的克隆中,能够获得在缺乏强力霉素时表达 ECFP 的克隆 (HS101 细胞系)。

[0091] 实施方案 3:确认新的基因产物

[0092] 在缺乏强力霉素的情况下培养 HS101,用 EPICS ELITE ESP (由 Beckman Coulter 制造) 测量荧光强度后,观察到认为是发射 ECFP 荧光的群体 (图 2:门 E)。继续培养时,观察到比 ECFP 荧光强度更强的群体 (图 2:门 F)。计算 E 对于 F 的比率时,可以看出从诱导开始 F 的存在比率随着培养时间增加 (图 3)。进一步的,当用荧光显微镜观察诱导后培养第五天的细胞时,在发射 ECFP 荧光的细胞中,观察到认为是发射 GFP 荧光的细胞 (图 4)。

[0093] 实施方案 4:分析新的基因序列

[0094] (1) 提取基因组 DNA

[0095] 在 FACS 中分拣控制门 F 附近的细胞,用 EPICS ELITE ESP (由 Beckman Coulter 制造) 在硅酮包被的 1.5ml 试管中集聚 5000 个细胞。通过离心 (1000g, 10 分钟) 回收悬浮在鞘膜液体中的细胞,将 100 μl 的基因组提取缓冲液直接加入沉淀颗粒 (100mM Tris-HCl (pH8.0), 5mMEDTA, 0.2% SDS, 200mM NaCl, 和 100 μg/ml 的蛋白酶 K), 并在 50 摄氏度消化过夜。次日,加入 250 μl 的乙醇,温和摇动并颠倒混合。通过离心 (1000g, 10 分钟) 回收基因组,用 70% 乙醇洗涤,空气干燥。加入 100 μl 的 TE (10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA), 在 50℃ 静置 30 分钟后,在 4 摄氏度溶解过夜。

[0096] (2) 分析 TRE 的下游序列

[0097] 从提取的基因组,通过 PCR (Perkin Elmer 9600) 经 TA 克隆扩增四环素诱导启动子的下游直接序列,并分析该序列。

[0098] 用 5 μl 的基因组 DNA 液体 (相当于 5000 个细胞) 作为模板,使用各 10pmol 的上游 (5' -CCATAGAAGACACCGGGACCGATCC-3') (序列号:5) 和下游引物 (5' -TGCACGCTGCCGTCCTCGATGTTG-3') (序列号:6)。利用 Pyrobest DNA 聚合酶 (由

TaKaRa 制造),以 50  $\mu$ l 规模进行反应。反应条件是 98 摄氏度 2 分钟后,进行 26 个下述循环:98 摄氏度 30 秒,58 摄氏度 30 秒,72 摄氏度 1 分钟,以及最后在 72 摄氏度反应 5 分钟。随后加入 1  $\mu$ l 的 ExTaq DNA 聚合酶(由 TaKaRa 制造),在 72 摄氏度反应 15 分钟后,通过琼脂糖凝胶电泳分离全部的反应液体。切下相应于轻链基因可变区的条带,通过凝胶提取试剂盒(由 Qiagen 制造)回收 DNA 后,将其整合到 pCR2.1-TOPO 载体中并转化入大肠杆菌。提取质粒,利用 ABI PRISM 377 DNA 测序仪(由 Perkin Elmer 制造)测序。结果如图 5 所示,显然已经产生 ECFP 和 EGFP 的嵌合体。在 4 类嵌合体中,分别获得 36 个克隆的类型 1、1 个克隆的类型 2、4 个克隆的类型 3 和 1 个克隆的类型 4。另外,也获得认为是来自分拣污染的 18 个克隆的 ECFP。

[0099] 工业实用性

[0100] 在本发明中,由于自发地形成具有遗传多样性的目的基因而没必要制备文库,就可能在动物细胞内立即进行筛选,以便大大地节约获得目的基因的时间。

[0101] 另外,在本发明中,由于在多个位置连续地诱导同源重组,就原理上而言可能增加所获得重组体的多样性,并且这适用于作为产生具有新的活性和功能的基因的技术。

[0102] 引用文献:

[0103] Buerstedde, J. M. 和 Takeda, S. 1991. Cell 67 :179-88

[0104] Chen, C. 和 Okayama, H. 1988. BioTechniques 6 :632-638

[0105] Cramer 等人., 1998. Nature 391 :288-291

[0106] DiSanto 等人., 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 :377-381

[0107] Elroy-Stein, O. 和 B. Moss. 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87 :6743-6747

[0108] Kaufman, R. J. 1990. Methods Enzymol. 185 :487-511

[0109] Neumann, E., M. 等人, 1982. EMBO J. 1 :841-845

[0110] Rouet 等人, 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :6064-6068。

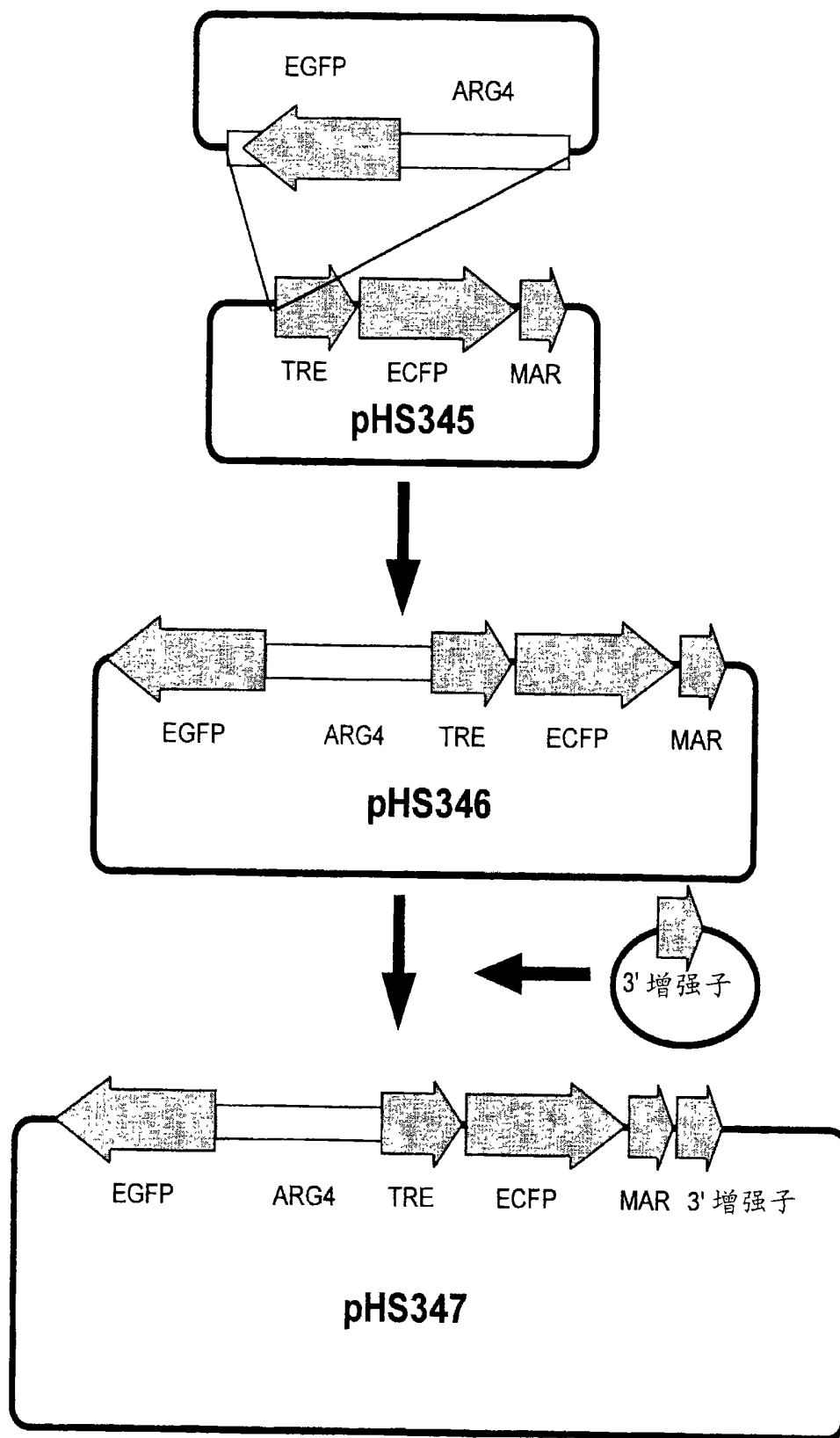


图 1

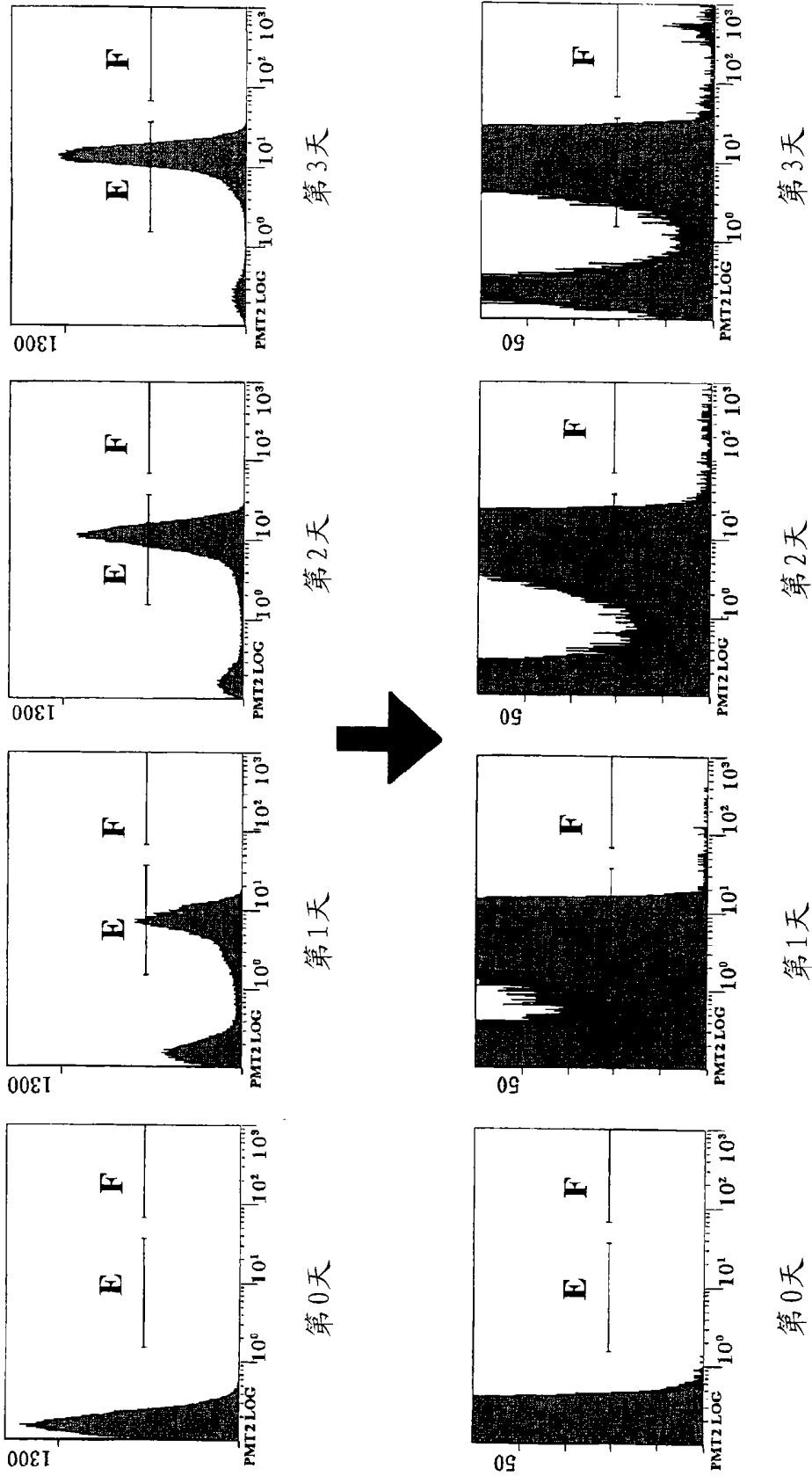
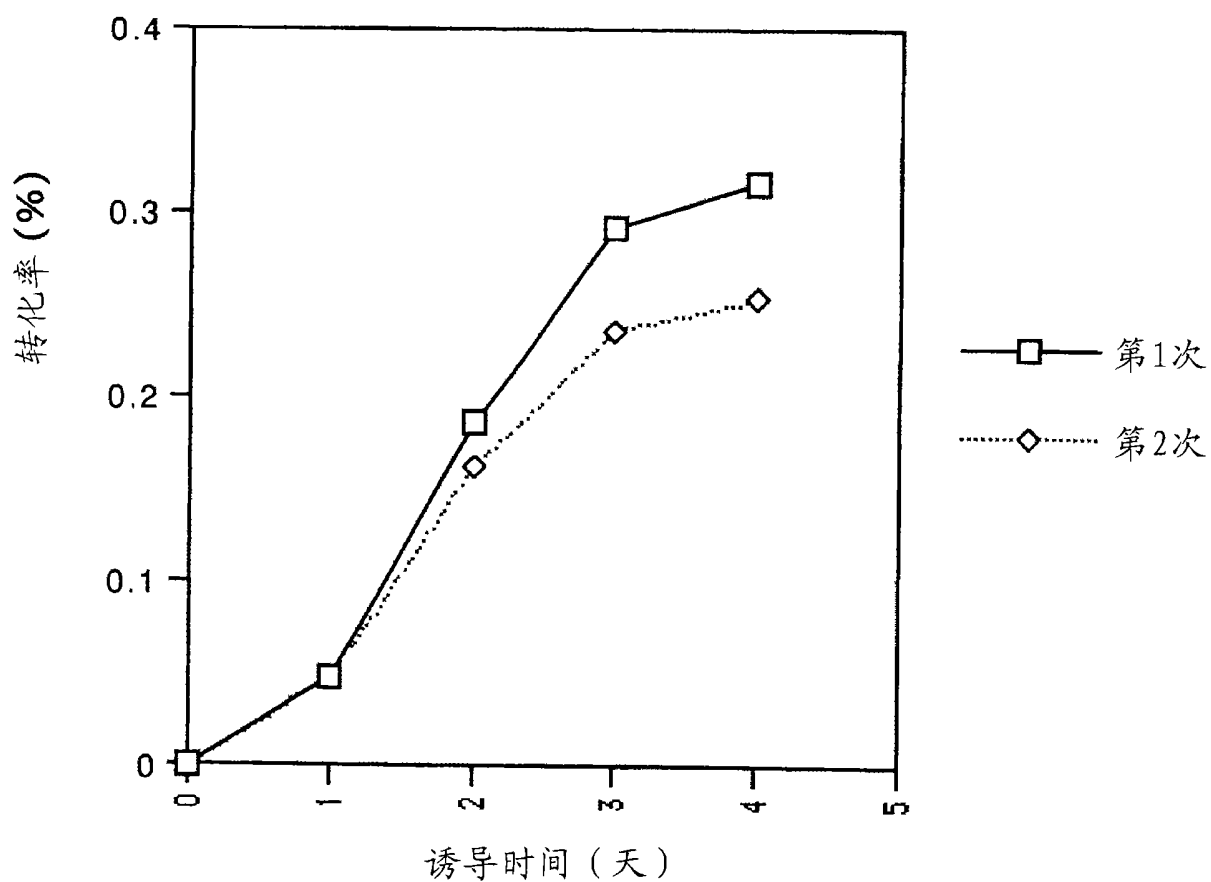


图 2



转化率 = F/E (%)

图 3

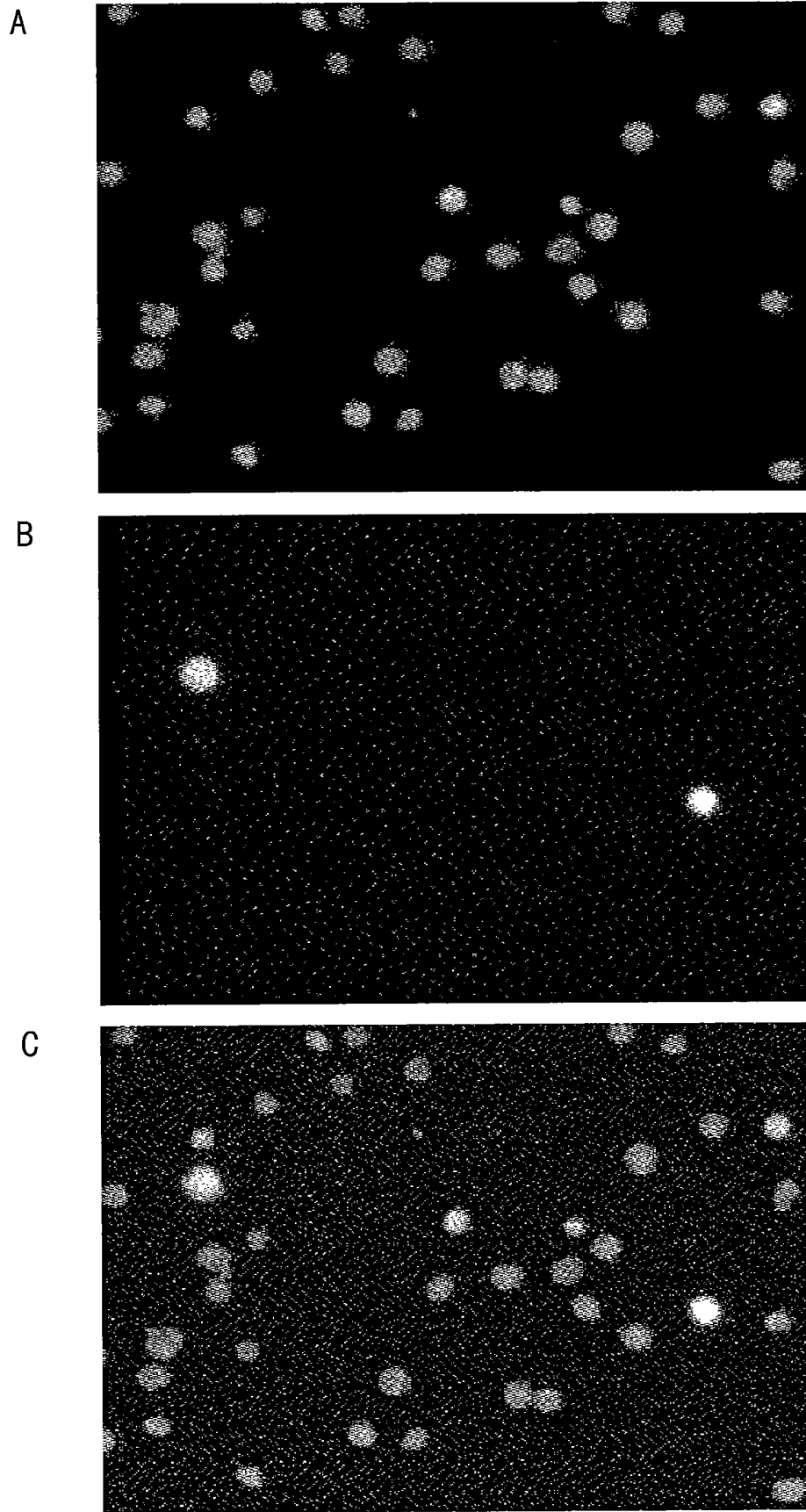


图 4

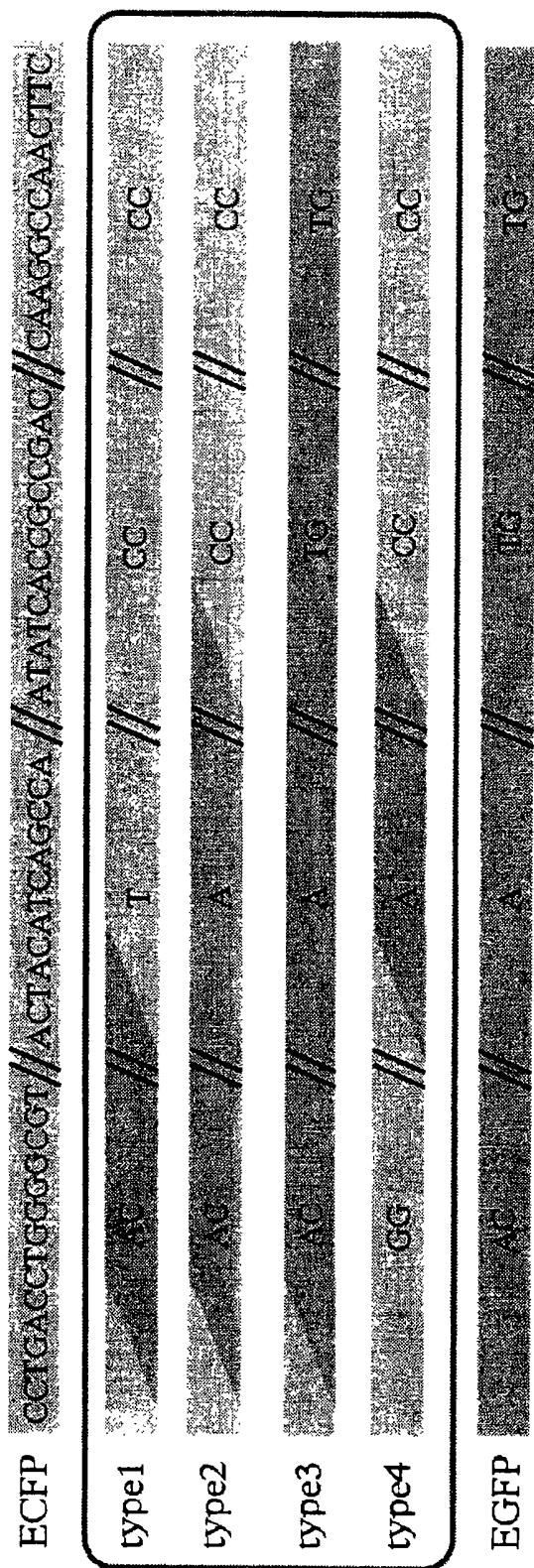


图 5