

# 基于 BAC 同源重组高效构建小鼠胚胎干细胞 *Nanog* 基因报告体系

范彦 童攢 尤洁芳 杜立颖 邹方东\* 丁明孝\* 邓宏魁\*

( 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川大学生命科学院, 成都 610064; 细胞增殖分化调控系统研究教育部重点实验室, 北京大学生命科学学院, 北京 100871; 北京实验动物中心, 北京 100871. \* 联系人, E-mail: [fundzou@scu.edu.cn](mailto:fundzou@scu.edu.cn), [hongkui\\_deng@pku.edu.cn](mailto:hongkui_deng@pku.edu.cn))

**摘要** *Nanog* 是最新发现的一个在胚胎干细胞(ES 细胞)中特异表达, 并在保持 ES 细胞多能性的机制中有重要作用的转录因子. *Nanog* 基因的表达能非常灵敏地随 ES 细胞的分化而下调, 使之成为指示 ES 细胞多能性最理想的标志基因之一. 本研究基于细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)同源重组技术, 并改进了将报告基因嵌入目的位点的重组方案, 高效构建了小鼠 ES 细胞(mES 细胞)的 *Nanog*/EGFP 报告体系. 基因打靶后的 mES 细胞具有与其源 mES 细胞相同的特性, 并能稳定地将 *Nanog* 与 EGFP (enhanced green fluorescence protein)的表达偶联. 此报告体系能通过 EGFP 的表达有效报告 *Nanog* 基因的表达水平, 从而对 mES 细胞分化或未分化状态作出明显指示. 本研究为 mES 细胞自我更新和分化的研究提供了一个理想的实验体系, 不仅能用于进一步优化 mES 细胞的培养体系, 对研究 *Nanog* 的表达调控及其与其他维持 mES 细胞多能性的因子和途径之间的关系也有深远的意义.

**关键词** 小鼠胚胎干细胞 自我更新 *Nanog* EGFP 细菌人工染色体 同源重组

由于胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES细胞)具有自我更新(self-renew)及多向分化潜能(multipotential)两大特性 [1,2], 是细胞移植治疗手段的首选来源, 因此对ES细胞的研究成为近年研究的热点. 自ES细胞建系至今, 关于ES细胞的研究不仅仅局限于定向分化条件的摸索, 将体细胞去分化(dedifferentiation), 重塑其多能性的研究也逐渐成为了热点, 因此阐述ES细胞多能性维持的分子机制是对其深入研究的基础.

2003 年, Chambers 等人 [3] 和 Mitsui 等人 [4] 分别报道了新的转录因子 *Nanog* 在维持 mES 细胞多能性中有非常重要的作用. *Nanog* 仅在具有分化多能性的内细胞团(inner cell mass, ICM)、ES 细胞和胚胎生殖细胞(embryonic germ cells, EG)中表达, 在已分化的细胞和成体组织中不表达 [5]. 自从 *Nanog* 被报道为维持 ES 细胞多能性的关键因子后, 围绕 *Nanog* 基因的一系列研究迅速展开. 在小鼠 ES 细胞(mES 细胞)中强表达 *Nanog*, 可使 mES 细胞在不含白血病抑制因子(leukaemia inhibitory factor, LIF) [6,7] 或无饲养层细胞 [8] 的培养条件下维持其自我更新的能力; 而通过

RNAi 干涉下调 *Nanog* 的表达, 则会使得 mES 细胞向胚外内胚层分化 [9,10]. 对人 ES 细胞的相关研究也得到了类似的结果 [8,10]. 可见, *Nanog* 在维持 ES 细胞的多能性和正常的自我更新中都起到了关键的作用. 深入研究 *Nanog* 的作用机理, 详细阐述其功能途径对进一步了解 ES 的自我更新与分化机制具有深远的意义.

本研究利用基于细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)的同源重组技术 [11,12], 高效构建了 mES 细胞的 *Nanog*/EGFP 报告体系. 经过验证, 基因打靶后的 mES 细胞具有与其源 mES 相同的形态学特征、长期传代培养的能力和向分化潜能. 通过免疫细胞化学方法鉴定, 此报告体系符合 *Nanog* 的表达模式, 且 EGFP (enhanced green fluorescence protein) 能有效报告 *Nanog* 的表达水平.

## 1 材料和方法

( ) 材料. 含有 *Nanog* 的 BAC 购于 Invitrogen 公司, 编号为 RP23-180N22. 质粒 pL-253 及菌株 DY380 均由 Liu Pengtao 博士惠赠, pEGFP-N1 购于

Clontech 公司. 各种限制酶购于 NEB 公司, Large-Construct kit, RNA 提取试剂盒 RNeasy Micro kit 及反转录试剂盒 Omniscript RT kit 均购自 Qiagen, PCR 相关试剂购自 TaKaRa 公司. 小鼠胚胎干细胞培养基 DMEM 及胎牛血清(FBS)购自 GIBCO 公司, LIF 购自 Chemicon 公司, Oct4 抗体购自 Abcam 公司. 其他化学常规试剂购自 Sigma 及上海化学试剂公司. 电转化所需器材均购自 Bio-Rad.

( ) 同源臂的扩增. 选取 Nanog-BAC DNA 上 Nanog 启动子两端约 500 bp 的片段分别设计 PCR 引物, 并在 PCR 引物末端分别设计需要的酶切位点: A, *Not* homo 5'-ATA AGC GGC CGC CTT AAG CTG GGT TAG AGT GC-3'; B, *Hind* homo 5'-GTC AAG CTT GCG TTT CTT GCT TGC TCT TC-3', Y: *Hind* homo 5'-GTC AAG CTT GTC CAGT GGG GTC AAT ATA C-3', Z: *Spe* homo 5'-TCT ACT AGT TAG GTT AGG GGG TTA TGC TC-3'. 用 Qiagen Large-Construct kit 提取 Nanog-BAC DNA, 以 BAC DNA 作为模板扩增约 500 bp 的 AB, YZ 同源臂. 反应体系: 50  $\mu$ L PCR 体系中加入 1  $\mu$ L BAC DNA, 5  $\mu$ L 10 $\times$  Pyrobes 缓冲液, 2.5 pmol/ $\mu$ L 上游引物(A 或 Y), 2.5 pmol/ $\mu$ L 下游引物(B 或 Z), 20 mmol/L dNTP, 2 U Pyrobest, 37  $\mu$ L H<sub>2</sub>O (设置对照中不加 DNA 模板). 反应程序: 94 , 4 min; 94 , 30 s, 55 , 30 s, 72 , 1 min, 25 个循环; 72 , 7 min; 4 保存备用.

选取 pEGFP-N1 上 EGFP/Kan 片段, 设计 70 bp 的 PCR 引物, 其中 60 bp 是 EGFP 靶向重组的同源臂. E: 5'-GCC TCT CCT CGC CCT TCC TCT GAA GAC CTG CCT CTT CAA GGC AGC CCT GAT TCT TCT ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG G-3', F: 5'-CCA CTG GTT TTT CTG CCA CCG CTT GCA CTT CAT CCT TTG GTT TTG AAA CCA GGT CTT AAC CAA ACG ACC CAA CAC CGT G-3'. 提取 pEGFP-N1 DNA, 以 pEGFP-N1 DNA 作为模板, 用此 70 bp 的引物直接从 pEGFP-N1 上扩增出约 3.5 kb 带有同源臂的 EGFP/Kan 片段. 反应体系: 50  $\mu$ L PCR 反应体系中加入 1  $\mu$ L pEGFP-N1 质粒 DNA, 5  $\mu$ L 10 $\times$  Pyrobest 缓冲液, 2.5 pmol/ $\mu$ L 引物 E, 2.5 pmol/ $\mu$ L 引物 F, 20 mmol/L dNTP, 2 U Pyrobest, 37  $\mu$ L H<sub>2</sub>O (设置对照中不加 DNA 模板). 反应程序: 94 , 2min; 94 , 30 s, 56 , 30 s, 72 , 1 min, 25 个循环; 72 , 7 min; 4 保存备用.

( ) 重组质粒及 EGFP/Kan 靶向插入片段的构

建. 胶回收 PCR 得到两段 500 bp 的同源臂 AB 和 YZ. 质粒 pL253 用 *Not* 和 *Spe* 酶切. 30  $\mu$ L 的酶切体系中包含 1  $\mu$ g pL253, 1 U *Not* , 1 U *Spe* , 3  $\mu$ L 10 $\times$ 缓冲液, 23  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, 37 反应 6 h. 用 TaKaRa 的 Solution 连接 AB, YZ 及酶切后的 pL253 片段, 转化 *E. coli*, 扩大培养鉴定后的阳性克隆, 提取重组质粒备用. 直接用胶回收 PCR 得到的约 3.5 kb EGFP/Kan 片段, 纯化后备用.

( ) 转化 Nanog-BAC 至 DY380 中. 挑 BAC 单克隆在 5 mL 含有氯霉素抗性的 LB 中 37 摇培过夜, 次日收集菌液, 提质粒 DNA 备用. 制备 DY380 感受态: 挑 DY380 单克隆至 5 mL LB 中, 32 摇至 A<sub>600</sub> = 1.2, 转至 20 mL LB 中, 32 摇至 A<sub>600</sub> = 0.5, 取 10 mL 42 摇 15 min, 冰上晃动 5 min, 静置 5 min, 于 0 , 4000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀用 888  $\mu$ L 洗 3 次, 再用 50  $\mu$ L 冰水重悬. 取 BAC DNA 1  $\mu$ g 加至 50  $\mu$ L 制备好的 DY380 感受态中进行电转化. 电转化条件为: 1.75 kV, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ . 向转化产物中加 1 mL LB, 32 摇 1 h, 涂在氯霉素抗性的平板上. 32 培养 15 h.

( ) 套取 Nanog 启动子片段. 将备好的 pL253-ABYZ 质粒在 30  $\mu$ L 的酶切体系用 20 U *Hind* 切 1~2 h. 取 DY380-BAC 的阳性克隆制备感受态, 方法同上所述. 在制备好的 DY380-BAC 电转化感受态中加入 50~100 ng 线性化并经纯化的 pL253-ABYZ 质粒 DNA. 电转化条件为: 1.75 kV, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ . 电转化后向电转化产物中加 1 mL LB, 32 摇 1 h, 涂在氨苄青霉素抗性的平板上. 32 培养 15 h.

( ) 套取质粒的鉴定及 EGFP/Kan 片段的靶向插入. 挑取单克隆于含氨苄青霉素抗性的 LB 中, 32 摇培 3~5 h, 提取质粒, 直接用酶切的方法鉴定套取质粒. 以未套取 Nanog 启动子的质粒作为对照, 用 *Not* 酶切两种质粒, 通过电泳观察条带大小, 套取成功的质粒比套取前的质粒长 8 kb. 鉴定正确的质粒进一步进行 EGFP/Kan 重组. 取 DY380-pL253-Nanog 的阳性克隆制备感受态, 方法同上所述. 将回收并经纯化的 EGFP/Kan 片段 50~100 ng 加至制备好的 DY380-pL253-Nanog 感受态中, 电转化条件同上所述. 电转化后向电转产物中加 1 mL LB, 32 摇 1 h, 涂在氨苄青霉素-卡那霉素双抗性的 LB 平板上. 32 培养 15 h.

( ) 打靶载体的鉴定. 从氨苄青霉素-卡那霉素双抗性的 LB 板上挑取单克隆, 扩大培养, 提取质

粒分别用 *Afl*, *BamH*, *Hind*, *Not* 及 *Spe* 进行单酶切的方法鉴定打靶载体的构建是否正确.

( ) 电穿孔法转染 mES 细胞及阳性细胞的分选. 鉴定后确定正确的克隆扩大培养, 提取质粒, 用 *Pme* 将打靶载体线性化, 纯化后备用. 采用 mES 细胞系 R1<sup>[13]</sup>, 将细胞扩增培养至  $10^7$  以上, 转化时用常规方法将细胞消化, 并转入无菌试管中, 常温下 1200 r/min 离心 3 min, 去除上清, 加 5 mL PBS 洗 1 次, 再离心 (条件同上), 去上清后将细胞重悬于 650  $\mu$ L PBS, 加入 4 预冷的电击槽中, 再加入纯化好的打靶载体 25~40  $\mu$ g, 吹吸混匀, 静置 2 min 后电击. 电击条件为: 250 V, 500  $\mu$ F. 电击后于 4 静置 10 min, 接种于 SNL 饲养层细胞的培养板上, 培养基条件与常规 mES 细胞培养条件相同, 即 DMED, 20% FBS, 1000 U/mL LIF, 37 5% CO<sub>2</sub>. 普通 mES 培养条件下培养 24 h 后, 将培养基换为含 250  $\mu$ g/mL G418 的 mES 细胞培养基. 经过 10 d 的 G418 筛选, 大多数阴性细胞因为无法适应 G418 的药性而死亡. 在显微镜下手工挑取单个 EGFP 阳性的克隆并分别扩大培养. 将细胞用常规方法消化, 打成单细胞, 用 200 目的细胞筛滤过的悬液, 进一步用流式细胞仪 (FACS) 将 EGFP 阳性的细胞分选出来.

( ) 阳性细胞分化及 EB 的形成. 用常规方法将分离得到的阳性细胞扩大培养, 消化, 用粗口滴管吹打成细胞团块, 去除饲养层细胞, 移至用 0.1% 的明胶处理后的培养皿中, 改用含 10% FBS 去 LIF 的培养基培养, 使之贴壁. 3 d 后可见其分化.

以未经打靶的 mES 细胞为对照, 将 mES 细胞消化至单细胞, 去除饲养层细胞后, 收集 mES 细胞, 将其密度调整为  $1 \times 10^5$  个/mL, 使其均匀悬浮于不含 LIF 仅含 10% FBS 的 DMEM 中. 用 20  $\mu$ L 的移液器接种于 10 cm 的培养皿盖上, 在培养皿中加入一些灭菌水, 盖上盖于 37, 5% CO<sub>2</sub> 条件下进行悬滴培养, 2 d 后 EB 形成.

( ) 免疫细胞化学分析分化细胞和未分化细胞. 去除贴壁分化的细胞中原有的培养基, 用 PBS 洗 2 次, 加入 4% 的多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗 2 次, 3 min/次, 室温封闭 30 min, 封闭液中含有 10% 羊血清, 9% PBS, 0.3% Triton X-100 及超纯水. 兔多抗的 Oct4 以 1 200 的比例加入新的封闭液, 一抗 37 孵育 2 h, PBS 洗 6 次, 3 min/次; 用罗丹明标记的羊抗兔的二抗以 1 200 混入新的封闭液中, 二抗室温孵育

1 h, PBS 洗 3 次, 3 min/次, DAPI 复染 3 min, 再用 PBS 洗 3 次, 3 min/次, 最后用 50% 的甘油封片后, 显微镜观察拍照.

( ) RT-PCR. 使用 Qiagen 公司的 RNeasy Micro kit 提取 ES 或 EB 的 RNA, 用 Omniscript RT kit 将 RNA 反转录成 cDNA 用做模板. 通过对 ES 细胞未分化状态下的标志基因 *Nanog*, *Oct4*, *Sox2* 的表达量及各胚层标志基因 *Sox17*, *Nkx2.5*, *Nestin* 的表达量进行半定量, 对打靶后 ES 细胞特性及其多向分化潜能做简单描述.

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的构建

构建流程如图 1 所示. 构建的 pL253-ABYZ (图 2(a)) 上重组所需的同源臂长度都在 500 bp 左右, 以 pL253-ABYZ 为模板, 用 A 和 Z 分别作为上、下游引物进行 PCR 扩增, 能扩增出 1 kb 的片段, 是两条小同源臂连接的长度 (图 3(a)).

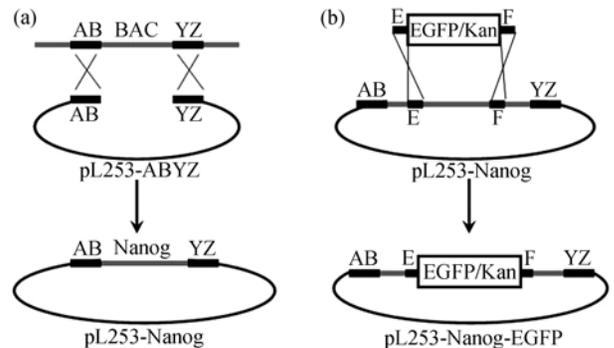


图 1 打靶载体构建流程

(a) pL253-ABYZ 从 BAC DNA 上套取 *Nanog* 启动子; (b) EGFP/Kan 插入 pL253-Nanog 中 *Nanog* 启动子后的特定位点

### 2.2 DNA 套取的结果

对在氨苄青霉素抗性的 LB 平板上长出的克隆提取质粒并进行鉴定验证. 将 pL253-Nanog (图 2(b)) 质粒用 *Not* 酶切消化后得到 14 kb 大小的线性片段, 明显超过了重组前 6 kb 左右的套取质粒, 说明重组已经发生. 为进一步验证质粒正确, 以提取的质粒作为模板进行 PCR 鉴定 (图 3(b)).

### 2.3 打靶载体的结构

对在氨苄青霉素-卡那霉素双抗性的 LB 平板上长出的克隆提取质粒并进行鉴定验证. 分别用 *Hind*, *Not*, *Afl*, *BamH* 和 *Spe* 进行单酶切鉴定. *Afl*

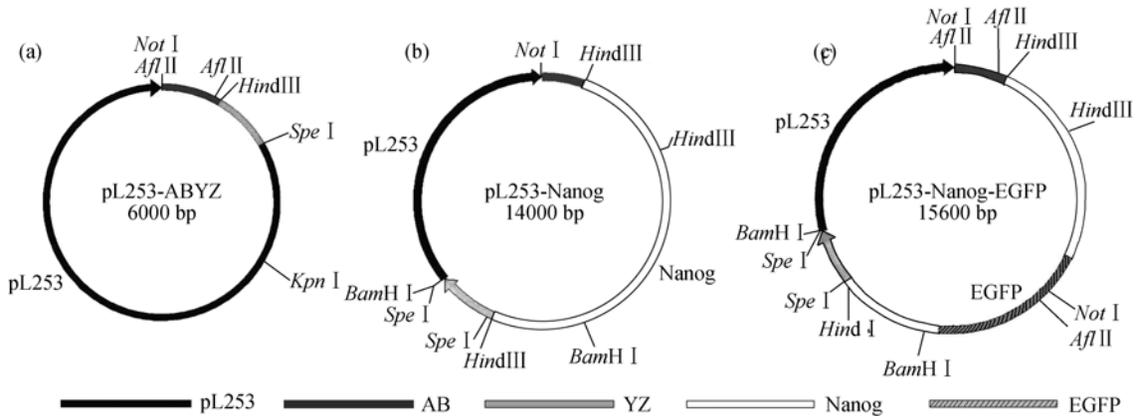


图2 构建过程中各载体的结构图

(a) pL253-ABYZ 结构图; (b) pL253-Nanog 结构图; (c) pL253-Nanog-EGFP 结构图. 根据图示, 黑色区域为 pL253 骨架, 浅灰及深灰色区域为包含于白色区域中的 AB、YZ 同源臂, 白色区域为从 BAC 上套取的包含 *Nanog* 启动子的片段, 斜线区域为插在 *Nanog* 启动子后的 EGFP/Kan 片段

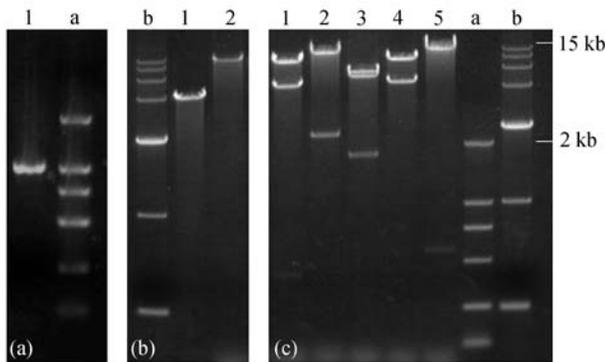


图3 PCR 及酶切检测打靶载体的构建

(a) ABYZ 片段的扩增. 1, 以 pL253-ABYZ 为模板, A 和 Z 分别作为上、下游引物 PCR 扩增, 得到 1 kb 的 ABYZ 片段. (b) *Not* I 酶切. 1, pL253-ABYZ; 2, pL253-Nanog. (c) 打靶载体 pL253-Nanog-EGFP 进行单酶切鉴定. 1, *Afl* I 酶切; 2, *Bam*H I 酶切; 3, *Hind* III 酶切; 4, *Not* I 酶切; 5, *Spe* I 酶切. a, DNA Marker DL2000, 从上至下条带大小分别为 2 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp; b, DNA Marker DL15000, 从上至下条带大小分别为 15 kb, 10 kb, 7.5 kb, 5 kb, 2.5 kb, 1 kb, 250 bp.

酶切后获得 9.2 kb, 6.0 kb 及 400 bp 的片段; *Bam*H I 酶切后获得 13.2 和 2.4 kb 的片段; *Hind* III 酶切后获得 7.1, 6.7 和 1.8 kb 的片段; *Not* I 酶切后获得 9.9 和 5.7 kb 的片段; *Spe* I 酶切后获得 15 kb 及 600 bp 的片段. 与预期相符, pL253-Nanog-EGFP (图 2(c)) 构建正确 (图 3(c)). 经过重组后, EGFP/Kan 片段接于 *Nanog* 启动子之后, EGFP 的表达在 *Nanog* 启动子控制下表达.

### 2.4 基因打靶阳性 mES 细胞的筛选

因为打靶载体上带有新霉素抗性基因和 EGFP 报告基因, 电转化后的 mES 通过 G418 药物筛选并挑

取到标号为 R2, R3, R4, R5 的 4 个单克隆, 分别扩大培养. 用流式细胞仪(FACS)分别分离 EGFP 阳性细胞. 用 FACS 分选的 4 个克隆细胞中, EGFP 阳性率分别为 0.78%, 3.13%, 2.96% 和 18.45%. 选取其中阳性率最高的标号为 R5 的 *Nanog*-EGFP mES 细胞进行扩大培养(图 4). 基因打靶后的 mES 细胞能在 mES 细胞的培养条件下传代培养. 在对 *Nanog*-EGFP mES 细胞 R5 进行验证过程中传代次数大于 10 次. 并且, 通过光学显微镜观察, R5 细胞具有 mES 细胞的形态(图 5(a)).

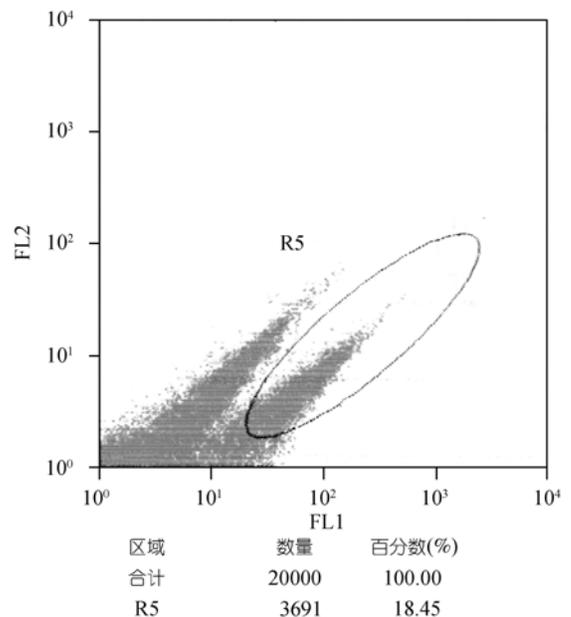


图4 FACS 分选 EGFP 阳性细胞  
圈内为分选得到的 EGFP 阳性细胞

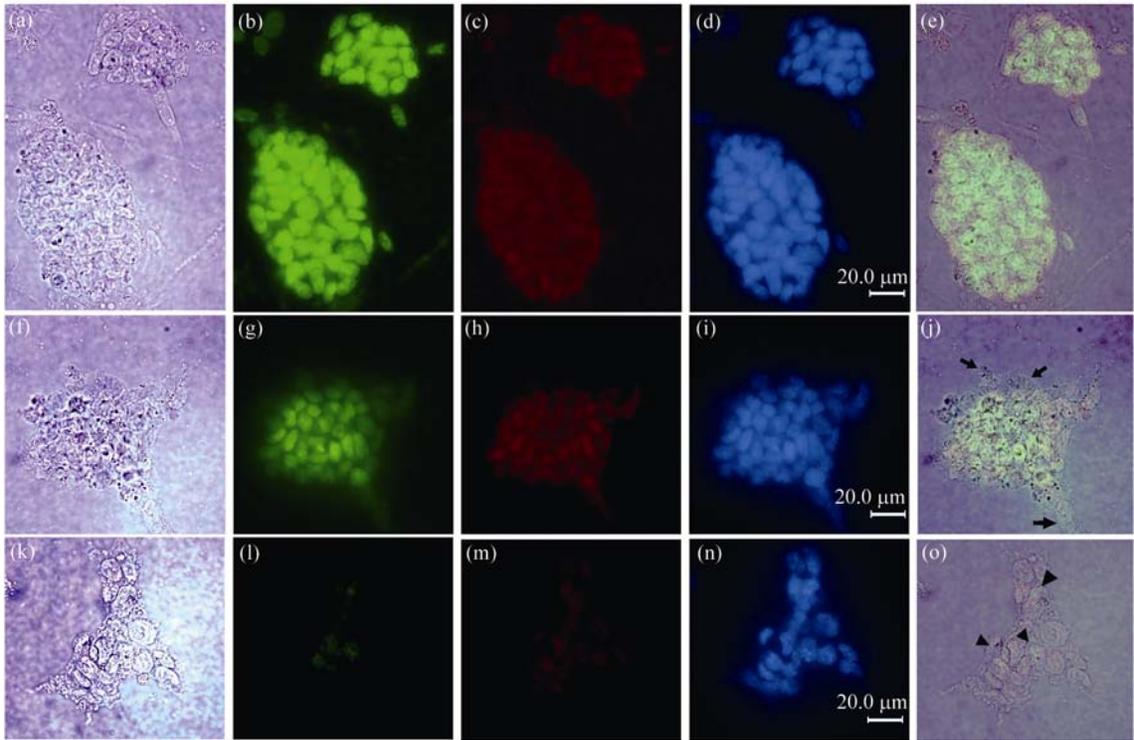


图 5 免疫组织化学方法鉴定细胞未分化和分化后 EGFP 和 Oct4 的表达

(a)~(e) 未分化的 R5 细胞; (f)~(j) 贴壁培养 3 d 后部分分化的 R5 细胞; (k)~(o) 贴壁培养 8 d 后大部分分化的 R5 细胞. (a), (f)和(k)为明场观察到的 R5 细胞形态; (b), (g)和(l)显示 EGFP; (c), (h)和(m) 显示 Oct4 染色; (d), (i)和(n)为 DAPI 染色; (e), (j)和(o)为明场细胞形态、EGFP 及 Oct4 图像重合. (j)中黑色箭头指示部分分化细胞; (o)中黑色箭头指示部分未分化细胞

### 2.5 Nanog-EGFP 报告体系的检测

分别提取 mES 细胞 R1 及 Nanog-EGFP mES 细胞 R5 的 mRNA, 通过半定量 RT-PCR 检测 *Oct4*, *Nanog* 和 *Sox2* 这 3 个未分化细胞的标志基因的表达情况, 结果表明, R1 及 R5 中 *Oct4*, *Nanog* 和 *Sox2* 的表达相似(图 6(a)).

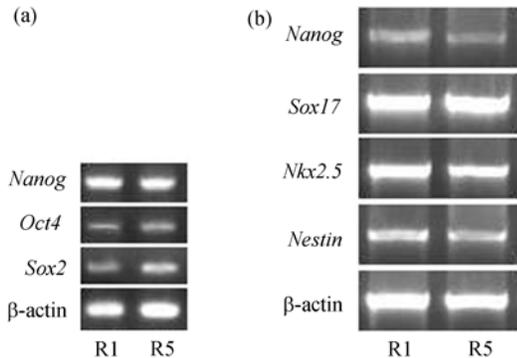


图 6 R1 及 R5 细胞未分化时及 EB 形成时相关因子 RT-PCR 结果

(a) ES-R1 及 ES-R5 中 *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* 的表达情况; (b) EB-R1 及 EB-R5 中 *Sox17*, *Nkx2.5*, *Nestin*, *Nanog* 的表达情况

用 mES 细胞的特异标记 Oct4, 采用免疫细胞化学方法对未分化和分化后的 R5 进行染色, 结果发现, 在未分化的 R5 中, 细胞在荧光激发下呈绿色的细胞并能被 Oct4 染色(图 5(a)~(e)); 将 R5 贴壁分化 3 d 后, 部分未分化的 R5 仍保持 EGFP 阳性, 且能与 Oct4 共染, 分化后的 R5 在荧光激发下为 EGFP 阴性, 且不能被 Oct4 染色(图 5(f)~(j)). 贴壁分化 8 d 后保持 EGFP 阳性比 3 d 时明显变少, 部分能与 Oct4 共染(图 5(k)~(o)). 从而证实 R5 细胞符合 *Nanog* 基因的表达模式.

通过 EB 形成实验, 分别观察 R1 及 R5 形成 EB 的形态, 及 R5 形成的 EB 在 2 及 4 d 时 EGFP 的表达. 可见, R1 及 R5 都具有 EB 形成能力, 且形成的 EB 形态上无明显差异(图 7(a), (c)和(e)). 通过荧光显微镜观察 EGFP 的表达, 发现 R1 形成的 EB 无 EGFP 表达, R5 在 2 d 时形成的 EGFP 强度明显比在 4 d 时更强, 符合预期结果(图 7(b), (d)和(e)).

提取 R1 及 R5 在 4 d 时形成 EB 的 mRNA, 同样通过半定量 RT-PCR 检测内胚层标志基因 *Sox17*, 中胚层标志基因 *Nkx2.5* 及外胚层标志基因 *Nestin* 的表

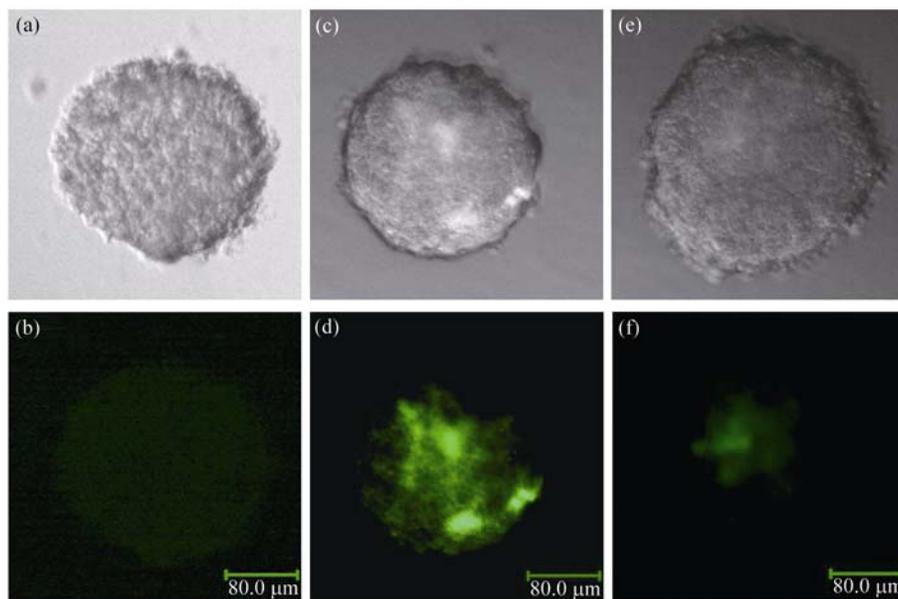


图7 R1及R5细胞EB的形成

(a)和(b) R1形成的EB在明场(a)及荧光(b)下的形态; (c)和(d) R5形成的EB 2 d时在明场(c)及荧光(d)下的形态;  
(e)和(f) R5形成的EB 4 d时在明场(e)及荧光(f)下的形态

达情况。结果发现, R1及R5形成的EB在4 d时均表达此3个胚层的标志基因, 且弱表达Nanog(图6(b)), 此结果与一些文献曾经报道过的结果相似<sup>[14]</sup>。

### 3 讨论

基因打靶技术已经被广泛地应用于基因功能的研究。基因打靶的基础是构建正确有效的打靶载体。目前, 打靶载体的构建主要依赖于PCR扩增技术和酶切反应。一般先通过酶切或PCR扩增的方法获得目的基因片段, 再分别与用于筛选的标记基因和打靶质粒的骨架进行多次的连接和转化<sup>[15,16]</sup>, 操作非常繁琐。一方面, 通过PCR扩增获取目的基因容易造成的碱基突变和缺失, 导致基因表达不稳定, 表达模式不正确; 另一方面, 由于受到酶切位点的限制, 需要对骨架质粒进行反复的重组, 操作繁琐。基于细菌BAC的同源重组技术是近来广泛应用且稳定的基因打靶载体构建方法。此方法可在任意位点设计同源臂, 通过在DY380菌体内进行同源重组, 从包含有目的基因的BAC上直接套取大片段目的基因, 不仅避免了传统构建过程中通过PCR扩增的方法获得目的基因可能带来突变, 还受限制酶切位点的局限。

构建mES细胞的Nanog/EGFP报告体系可以用做多方面研究的材料。mES细胞的体外培养体系从mES细胞的分离至今已经是一种常规技术<sup>[17]</sup>。但是在常

规ES的培养体系中的饲养层细胞存在传代有限、不耐药、引入异体或异种细胞的缺点, 然而血清的加入带来了未知因素<sup>[18]</sup>。无层饲养或无血清培养是ES细胞培养体系的发展趋势。由此, 饲养层细胞或者血清的加入和拆除对mES细胞生长及分化的影响可以通过EGFP与Nanog基因的偶联, 从EGFP的表达情况指示mES细胞的分化状态, 从而直观地描述mES细胞在培养过程中的生长情况, 有助于无饲养层细胞、无血清的mES细胞的培养体系的研究。Nanog在维持mES细胞多能性的调控网络中有至关重要的作用。Nanog和其他重要的维持自我更新的重要因子也有着密切联系, 在整个网络中处于相对独立却又不完全独立的地位<sup>[19]</sup>。Nanog与LIF/Stat3, BMPs/Smads, Wnt以及Oct4, Sox2等与ES细胞多能性维持相关的信号通路和基因之间有着错综复杂的联系<sup>[20]</sup>。Loh等人<sup>[21]</sup>阐述了Nanog和另外一个重要的细胞多能性标志基因Oct4在维持mES细胞多能性中的重要性及协同作用。Boiani等人<sup>[22]</sup>及Rodda等人<sup>[7]</sup>论述了Oct4, Sox2和Nanog之间的密切联系。Friel等人<sup>[23]</sup>研究发现Nanog和Stat3信号没有直接联系, 但Boyer<sup>[24]</sup>的研究表明Nanog, Oct4和Sox2协同调节着Stat3, 并且揭示这3个转录因子位于细胞多能性调控网络顶端。2003年, Ying等人<sup>[25]</sup>发现, BMP/Smads信

号通路与 LIF/Stat3 协同作用对 ES 细胞的多能性进行维持, 但 Nanog 与 BMP 信号通路没有确切联系. 后来, Suzuki 等人<sup>[26]</sup>认为, Nanog 与 Stat3 绑定后能上调其表达, 通过和 Smad1 的互作抑制 BMP 诱导的 ES 向中胚层的分化. 2006 年, Takao 等人<sup>[27]</sup>又通过 Wnt 信号通路的组成成分  $\beta$ -catenin, 将此信号作用与 Nanog 联系起来. 通过 Nanog 还使以往认为和 ES 细胞多能性无关的 PI3K<sup>[28]</sup>, p53<sup>[29,30]</sup>等信号通路与 ES 细胞多能性的维持关联起来. 此报告体系能直观地反映 Nanog 在 mES 细胞中的表达情况, 为进一步研究维持 mES 细胞多能性的分子机制提供了便利.

基于 BAC 同源重组的方法构建的 p1253-Nanog-EGFP 载体也具有实用意义. 近来有研究表明, 体细胞能通过核移植或与 ES 细胞进行融合, 恢复其多能性, 此过程称为体细胞重编程. 体细胞重编程必定伴随着 Nanog 上调表达<sup>[31]</sup>. 在神经干细胞和胚胎干细胞融合过程中加入 Nanog, 能够使杂合细胞恢复多能性的效率大幅度地提升<sup>[32]</sup>, 因此, Nanog 一直被认为是体细胞重编程中必不可少的备选因子. 然而, 最新的研究发现, 通过排除法筛选的包括 Nanog 在内的 24 个候选因子中, 最终确定在 mES 细胞的培养体系中加入 Oct4, Sox2, c-myc, Klf4 等 4 种因子, 能使小鼠纤维原细胞恢复多能性, 说明 Nanog 在体细胞重编程中并非必不可少的结论. 出乎意料的是, c-myc 和 Klf4 在卵母细胞中并不表达. 这两个与癌症相关的因子通过其他的途径对 Nanog 起到了调节作用, 从而参与到体细胞的重编程中<sup>[33]</sup>. 研究指出, Nanog 虽然没有直接参与体细胞重编程, 但是在体细胞恢复全能性的过程中确实有上调表达, 并且在以往的研究中证明体细胞的分化状态将直接影响其重编程的效率. 由此, 我们推断将此 p1253-Nanog-EGFP 打靶载体转入各种体细胞中, 就能及时反映各种体细胞在重编程中 Nanog 基因表达情况, 指示重编程过程中各种外源因子对体细胞的影响, 从而能够更精细的对体细胞重编程所必需的因子进行描述. 近来 Hart 等人<sup>[34]</sup>, Høi-Hansen 等人<sup>[35]</sup>及 Ezech 等人<sup>[36]</sup>分别报道了 Nanog 与睾丸原位瘤等生殖细胞肿瘤之间有密切的联系, Nanog 在肿瘤发生过程的研究中将作为非常有价值的分子标记. Nanog-EGFP 偶联标记的癌细胞系在研究肿瘤发生过程及药物筛选中有及其深远的意义.

综上所述, 由于此报告体系能通过 EGFP 有效报

告 Nanog 基因的表达水平, 对 mES 细胞分化或未分化状态作出明显指示, 因此为 mES 细胞自我更新和诱导分化的研究提供了一个理想的实验体系. 本研究所构建的 mES 细胞系不仅能用于优化 mES 细胞的培养体系, 还可以用于研究 Nanog 的表达调控、Nanog 与其他维持 mES 细胞多能性的因子和途径之间的关系. 另外, p1253-Nanog-EGFP 载体可以作为良好的报告载体用于小鼠体细胞重编程因子的研究.

致谢 感谢 Liu Pentao 博士惠赠 pL-253 质粒及 DY380 菌株. 感谢赵扬、曲秀霞、谭磊、徐君及曾博协助修改手稿. 特别感谢庆婷婷、杨炜峰一直以来提供的技术支持.

## 参 考 文 献

- 1 Donovan P J, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, 2001, 414: 92—97[DOI]
- 2 Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol*, 2002, 12: 432—438 [DOI]
- 3 Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of *Nanog*, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 2003, 113: 643—655[DOI]
- 4 Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein *Nanog* is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 2003, 113: 631—642[DOI]
- 5 Hart A H, Hartley L, Ibrahim M, et al. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting *Nanog* genes in mouse and human. *Dev Dyn*, 2004, 230: 187—198[DOI]
- 6 Yates A, Chambers I. The homeodomain protein *Nanog* and pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33: 1518—1521[DOI]
- 7 Rodda D J, Chew J L, Lim L H, et al. Transcriptional regulation of *Nanog* by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*, 2005, 280: 24731—24737[DOI]
- 8 Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. Overexpression of *Nanog* in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development*, 2006, 133: 1193—1201[DOI]
- 9 Hough S R, Clements I, Welch P J, et al. Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of OCT4 and *Nanog*. *Stem Cell*, 2006, 24: 1467—1475[DOI]
- 10 Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, et al. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cell*, 2005, 23: 1035—1043[DOI]
- 11 Lee E C, Yu D, Martinez de Velasco J, et al. A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics*, 2001, 73: 56—65[DOI]

- 12 Liu P, Jenkins N A, Copeland N G. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res*, 2003, 13: 2190—2194[DOI]
- 13 Nagy A, Rossant J, Nagy R, et al. Derivation of completely cell culture derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 8424—8428[DOI]
- 14 Guan K, Nayernia K, Maier L S, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 2006, 440: 1199—1203[DOI]
- 15 Liu H, Dai J, Yu W, et al. Progress on gene targeting. *Hereditas*, 2002, 24: 707—711
- 16 Gong Z, Li J, Fu J. p16<sup>INK4a</sup> exon 1 $\alpha$  knockout in mouse embryonic stem cells. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29: 21—25
- 17 Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292: 154—156[DOI]
- 18 Huang B, Huang W G, Zhong N Q, et al. A study on six kinds of cell culture system for mouse embryonic stem cells. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2000, 8: 1—6[DOI]
- 19 王庆忠, 刘以训, 韩春生. 胚胎干细胞多潜能性维持的分子机制. *科学通报*, 2005, 50: 1556—1566
- 20 刘娜, 陆敏. 胚胎干细胞自我更新相关信号转导途径及信号分子. *科学通报*, 2005, 50: 623—628
- 21 Loh Y H, Wu Q, Chew J L, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*, 2006, 38: 431—440[DOI]
- 22 Boiani M, Scholer H R. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6: 872—884 [DOI]
- 23 Friel R, van der Sar S, Mee P J. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signaling. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57: 1894—1903[DOI]
- 24 Boyer L A, Lee T I, Cole M F, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 2005, 122: 947—956[DOI]
- 25 Ying Q L, Nichols J, Chambers I, et al. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 2003, 115: 281—292[DOI]
- 26 Suzuki A, Raya A, Kawakami Y, et al. Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 10294—10299[DOI]
- 27 Takao Y, Yokota T, Koide H. Beta-catenin up-regulates Nanog expression through interaction with Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353: 669—705[DOI]
- 28 Paling N R, Wheadon H, Bone H K, et al. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem*, 2004, 279: 48063—48070[DOI]
- 29 Lin T, Chao C, Saito S, et al. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol*, 2005, 7: 165—171[DOI]
- 30 Xu Y. A new role for p53 in maintaining genetic stability in embryonic stem cells. *Cell Cycle*, 2005, 4: 363—364[DOI]
- 31 Do J T, Scholer H R. Cell-cell fusion as a means to establish pluripotency. In: Morser J, Nishikawa S I, Schöler H R. eds. *Stem Cells in Reproduction and in the Brain*. Erst Schering Foundation Symposium Proceedings, Vol 60, 2006. 35—45[DOI]
- 32 Silva J, Chambers I, Pollard S, et al. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature*, 2006, 441: 997—1001[DOI]
- 33 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663—676[DOI]
- 34 Hart A H, Hartley L, Parker K, et al. The pluripotency homeobox gene Nanog is expressed in human germ cell tumors. *Cancer*, 2005, 105: 2092—2098[DOI]
- 35 Hoei-Hansen C E, Almstrup K, Nielsen J E, et al. Stem cell pluripotency for Nanog is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germcell tumours. *Histopathology*, 2005, 47: 48—56[DOI]
- 36 Ezech U I, Turek P J, Reijo R A, et al. Human embryonic stem cell genes OCT4, Nanog, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer*, 2005, 104: 2255—2265