

# 精子因素对精子载体法制备转基因山羊的影响

赵永聚<sup>①②</sup>

(<sup>①</sup> 西南大学动物科技学院 重庆市牧草与草食家畜重点实验室 重庆 北碚 400716;

<sup>②</sup> 第三军医大学基础部实验动物学教研室 重庆 400038)

**摘要:** 精子具有主动结合、转运、整合外源 DNA 的能力,并在受精时导入卵母细胞,获得转基因动物。精子介导基因转移(sperm mediated gene transfer, SMGT)是目前获得转基因动物简单而高效的方法之一。精子因素是影响 SMGT 方法生产转基因动物的重要方面。本论文结合我们的研究针对转染用山羊(*Capra hircus*)精液的来源、精子质膜完整性、精液品质及发育阶段等精子因素影响精子结合外源 DNA 和 SMGT 方法生产转基因山羊的效率进行了论述,并从这些影响因素入手,提出了筛选精子供体、保持精液品质、调控质膜等措施,提高精子转染外源 DNA 能力和生产转基因动物的效率。

**关键词:** 山羊; 外源 DNA; 精子; 供体; 精子载体法

中图分类号: Q812 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2009)03-141-05

## Effect of Sperm Parameters on Exogenous DNA Binding to Goat Sperm

ZHAO Yong-Ju<sup>①②</sup>

(<sup>①</sup> College of Animal Science and Technology,

Southwest University; Chongqing Key Laboratory of Forage & Herbivore Livestock, Chongqing 400716;

<sup>②</sup> Faculty of Laboratory Animal, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** Sperm mediated gene transfer (SMGT) appears to be a simple, efficient, and inexpensive method for genome modification of animals. DNA uptake by the mammalian spermatozoa is a very specific and highly regulated phenomenon. The sperm parameters, such as sperm donor, plasma membrane, sperm quality, and the treatment methods affect not only the ability and efficiency of sperm to pick up exogenous DNA and to internalize the DNA into sperm nuclei, but also the vector type and transfection method used. The efficiency of picking up exogenous DNA by goat spermatozoa decreases with age. Different goat breeds exhibit different abilities in binding foreign genes. Selection of sperm donors and optimization of DNA uptake are the key steps for the successful outcome of SMGT. The use of frozen thawed spermatozoa is an efficient method for production of transgenic offspring.

**Key words:** Goat (*Capra hircus*); Exogenous DNA; Sperm; Donor; Sperm mediated gene transfer

精子具有主动结合、转运、整合外源 DNA 的能力,并在受精时导入卵母细胞,获得转基因动物<sup>[1,2]</sup>。精子介导基因转移(sperm mediated gene transfer, SMGT)是目前获得转基因动物简单而高效的方法之一。山羊(*Capra hircus*)分布区域广,品种和数量多,目前全世界共有 570 个品种,7.1 亿只,我国山羊饲养量居世界第一,为 1.7 亿只<sup>[3]</sup>。一些研究表明山羊是乳腺生物

反应器研究的首选动物。2006 年 6 月 2 日,随着世界上第一个利用转基因山羊乳腺生物反应

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30600430), 国家科技重大专项项目(No. 2008ZX0800 8-004), 西南大学博士后启动基金项目;

作者介绍 赵永聚,男,副教授,医学博士;研究方向:受精生物学;E-mail: zyongju@163.com。

收稿日期: 2008-08-25, 修回日期: 2009-02-23

器生产的基因工程蛋白药物——重组人抗凝血 III(商品名: ATryn) 在欧洲获准上市, 人们更加坚信转基因山羊必定为最终解决环境、健康等影响 21 世纪人类生存的重大问题发挥出不可估量的作用<sup>[4]</sup>。采用 SMGT 方法生产转基因山羊具有较大的发展潜力和研究价值。但 SMGT 方法存在着极大的随机性和不确定性<sup>[2,5,6]</sup>。SMGT 方法主要是由外源 DNA、精子、转染方法等构成的一个有机整体。但目前研究集中在转染方法和外源 DNA 因素, 如 DNA 浓度、片段大小、序列、结构、载体类型等对 SMGT 方法的影响<sup>[6,7]</sup>。SMGT 方法离不开精子。精液来源、精液品质、精清、精子质膜和精液处理方法等构成了 SMGT 方法的精子因素。同时, SMGT 方法被认为只在制备转基因小鼠 (*Mus musculus*)<sup>[8]</sup>、猪 (*Sus domestica*)<sup>[9]</sup>、兔 (*Oryctolagus cuniculus*)<sup>[10]</sup> 上比较有效, 并建立了表达外源基因的转基因品系。一些研究表明, 山羊的精子在介导转染外源 DNA 上存在物种特异性<sup>[11]</sup>。

本文从精子因素出发, 结合本研究小组的研究内容, 综述了精子因素对精子载体法生产转基因山羊的影响, 并提出了提高精子转染外源 DNA 能力和生产转基因山羊效率的措施。

## 1 影响精子转染外源基因和生产转基因山羊的精子因素

**1.1 精子供体** 虽然发现几乎所有动物的精子都具有自发性结合外源 DNA 的能力, 但不同物种精子转染外源 DNA 及生产转基因动物的效率是不同的。猪、牛 (*Bos taurus*)、绵羊 (*Ovis aries*) 精子结合外源 DNA 的效率通常为 25% ~ 40%, 小鼠为 40% ~ 60%, 兔为 15% ~ 87%。另外, 精子摄取外源 DNA 的时间因物种不同而有差异。禽类精子与 DNA 的结合在共孵育 1 h 内发生, 反刍类只需 30 ~ 40 min, 人 (*Homo sapiens*) 精子与 DNA 结合约需要 20 min, 对鱼类来讲更快, 几分钟内便可完成<sup>[12]</sup>。为什么不同物种的实验会出现如此巨大的差异? 一些研究者将这归结为受实验方法和检测方法不同的影响。也有一些研究者认为动物品种、个体是影

响 DNA 结合及内化转运的关键因素。1989 年, Lavitrano 等使用 pSV2CAT 线状、环状质粒与小鼠附睾精子共保温, 并行体外受精, 250 个后代小鼠中有 30% 的 southern 阳性率, 并由此建立了第一个精子介导转基因小鼠株系<sup>[8]</sup>。该实验为步入困境的转基因动物研究注入了新的活力, 吸引了众多的研究小组转向大型农畜动物精子与外源 DNA 结合的研究。2003 年, 该研究小组比较了 20 头公猪精子 DNA 转染效率, 结果最低的仅为 16%, 最高为 87%, 用结合内化外源 DNA 能力高的公猪精子进行体外受精或人工授精, 后代仔猪的阳性率高达 48% ~ 80%<sup>[13]</sup>, 证明了精子供体是影响精子转染外源基因及转基因动物生产的重要因素。

我们选择体况、精子活力 (68% ~ 79%) 和精液品质综合指数 (0.71 ~ 0.77) 相近的 4 个品种的公羊共 149 只, 其中 1 岁、2 岁、3 岁和 4 岁的川东白山羊公羊各 21、21、19 和 10 只, 波尔山羊 × 南江黄羊杂交一代 (以下简称波南 F1) 公羊分别为 23、22、14 和 7 只, 2 岁波尔山羊和南江黄羊公羊各 6 只, 同时应用正交设计优化固定精子和外源 DNA 处理条件, 即用大小为 4.7 kb 的末端标记的 DNA 线性化片段, 以 1.00 μg DNA/106 个精子的比例, 在 20℃ 下孵育 60 min, 同时用固定的原位杂交检测方法, 比较不同品种、年龄的山羊精子结合内化外源 DNA 的能力。直接检测得到的阳性精子率称为结合率; 精子固定前用 DNase I 于 37℃ 消化, 目的是消化结合在膜上没有内化到精子内部的 DNA, 再检测得到的阳性精子率称为内化率。结果表明, 山羊的精子结合外源 DNA 的能力有随着年龄的增长而减少的趋势, 并表现出明显的品种间差异。川东白山羊 1 岁时的精子内化率为 39.34% ± 13.76%, 4 岁时降为 23.40% ± 19.37%, 4 岁时与 1 岁和 2 岁时相比, 差异显著 ( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ ); 南江黄羊的精子内化率最高, 波尔山羊最低<sup>[11]</sup>。2006 年叶华虎比较了 35 只纯种崂山奶山羊精子结合外源 DNA 的能力, 发现大部分个体 (71.4%, 30/35) 的精子结合率波动于 24.6% ~ 36.7%, 内化率波动于

12.2%~24.8%之间,但有3只山羊的结合及内化能力出现很强或很弱的极端现象,1只公羊精子的结合率和内化率分别为4.6%和2.1%,而另2只公羊精子的结合率和内化率均在50%和40%以上,个体间差异显著。进一步分析结合率和内化率之间的差异,可将山羊分为3种类型:(1)结合率和内化率都较高;(2)结合率高而内化率低;(3)结合率和内化率都较低<sup>[14]</sup>。

至此,可以得出初步结论:不同山羊供体精子转染外源DNA的效率是不同的,并表现出明显的品种间差异,筛选合适的精子供体是提高精子载体方法效率的前提和保证。

## 1.2 精液成分和精子结构

### 1.2.1 精清

研究者发现,附睾精子结合外源DNA的能力明显高于射出的带有精清的精子;同时射出精液经充分离心洗涤后,也具有较好的结合能力。精液中存在的抑制因子1(inhibitory factor, IF-1)阻止外源DNA与精子相结合<sup>[15]</sup>。

叶华虎在研究中发现精清对外源DNA的结合及内化有明显的阻止作用,与直接稀释的原精液组相比,洗涤组的结合率和内化率分别增加了3倍和5倍;精清的阻止效应与其作用方式有关,在直接稀释的原精液中阻止效应最强,而在洗涤后的精子中再加入精清,阻止效应减弱,但加入大量精清(1/5体积),也能达到与原精液相似的抑制效果<sup>[14]</sup>。为研究精清对山羊精子转染外源基因的影响,我们对山羊精子进行3种不同的处理:未离心、离心、添加猪精清,离心后去掉精清组的结合率达到62.04%,极显著高于未离心组,添加猪精清后的山羊精子结合率仅为17.04%。精子内化率也表现出同样的趋势<sup>[16]</sup>。表明精清中存在影响精子转染外源DNA的抑制因子,抑制作用跨越物种界限。

### 1.2.2 质膜

精子质膜是外源DNA的结合位点,质膜上含有内化外源DNA的分子,同时也是阻止外源DNA内化的主要屏障。质膜破裂的死精子具有更高的结合率<sup>[14]</sup>。Shim等用

Triton X-100破坏精子膜也得到较好的转染效果<sup>[17]</sup>。我们曾研究获能处理后的山羊精子结合及内化外源DNA的效率。结果发现,获能处理降低了精子结合和内化外源DNA的能力。超微结构观察及双荧光探针检测都发现精子获能后质膜完整性降低。质膜的这种变化使精子膜上有利于结合外源DNA的物质也部分或全部损坏,从而抑制结合外源DNA的效率\*。

## 1.3 精液品质和精子发育阶段

### 1.3.1 精液品质

精液品质与其结合外源DNA的能力是互相影响的。精液品质影响精子结合外源DNA的能力。通常认为只有活精子才具有结合外源DNA的能力,而且精子活力越高结合和内化转运能力越强;死精子不能结合外源DNA,准确地说是死精子结合的DNA仅挂在细胞质膜上,不能完成外源DNA的内化过程<sup>[14]</sup>。猪某些精液品质指标,如精子生存指数与其结合外源DNA的能力是呈正相关的<sup>[13]</sup>。

### 1.3.2 精子发育阶段

精子发育阶段会影响DNA转染效率。成熟精子是非常稳定的不活跃细胞,本身不具有转录和翻译活性,给外源基因及精子本身基因的结合造成了困难;同时因为精清中存在IF-1,促使研究者思考在精子发生及成熟部位进行转染。有研究发现,在睾丸和附睾中转染精子在数量上较体外孵育法所获得转染精子多,所以最终获得转基因动物的机会增多<sup>[18]</sup>。

## 2 从精子因素出发提高精子载体法生产转基因山羊效率的措施

### 2.1 筛选山羊精子供体

一些研究者认为,从个体的精子转染外源DNA效率高低出发,筛选精子供体是一种方便、稳定的提高生产转基因动物效率的措施<sup>[13]</sup>。本研究组的李福兵比较12只山羊个体的精子结合和内化外源DNA能力,以及精子内化能力对制备转基因山羊胚胎阳性率的影响。发现不同山羊个体的精子结合

\* 赵永聚. 精子因素对精子介导基因转移的影响及制备转基因山羊的研究. 重庆: 第三军医大学博士学位论文, 2005.

和内化 DNA 的效率存在差异,内化效率最高为 53.7%,最低仅为 3.1%。并且精子转染效率较低的个体没有得到转基因阳性胚胎,精子转染效率高的供体得到的胚胎阳性率也高<sup>[19]</sup>。

## 2.2 优化精子和外源 DNA 处理方法,建立高效的转染体系

### 2.2.1 去除精清

去除精清可以提高精子转染外源基因的效率<sup>[20]</sup>。目前一些研究及本研 究小组主要采取精液离心洗涤,精子上游悬浮 的办法。采集的山羊精液,等量等温混合后用 TALP 液 1 000~ 1 500 r/min 离心洗涤 3 次,每次 5 min。最后溶解于适量的 TALP 液中,孵育,取 上游精子<sup>[11]</sup>。

### 2.2.2 优化转染外源 DNA 的条件

影响精子 转染效率的 DNA 因素主要有:DNA 浓度、DNA 片段大小、DNA 序列、DNA 结构形式。我们从 精子结合及内化外源 DNA 的影响因素入手,应 用正交设计  $L_{16}(4^4)$ ,因素 A、B、C、D 分别为 DNA 片段大小、精子与 DNA 共孵育时间、DNA 浓度、共孵育温度,每个因素选择 4 个水平,筛 选出山羊精子转染和检测方法。采用该方法得 到与 PCR 检测相似的结果,表明这种方法比较 有效<sup>[11]</sup>。

## 2.3 调控质膜,提高精子转染外源 DNA 效率

调控质膜,有利于提高精子转染外源 DNA 效 率。主要采用以下的一些措施。

### 2.3.1 增强质膜的通透性

增强质膜通透性 的方法很多,如电穿孔、人工破坏膜的完整性 等。电穿孔是使精细胞在瞬时高压脉冲刺激 下,增加细胞膜通透性,有利于外源 DNA 分子 迅速透过细胞膜,进入胞浆和/或胞核,但目前 该方法多用于鱼类和鸡(*Gallus*),一般能使精子 对外源 DNA 的携带率提高 10%~ 15%,在鱼中 转基因效率达 23%~ 37%,在鸡中有高达 59.3% 的报道<sup>[21]</sup>。孙新明优化了山羊精子电 穿孔转染外源 DNA 的条件,表明电穿孔导入法 可用于山羊精子介导转染外源 DNA。电场强 度、电击时间和电击次数同时影响精子活力,山 羊精子最适电穿孔条件为 400 V、200  $\mu$ s、电击 1 次。该条件下电击后精子活力和结合率、内化

率分别为 0.45 和 27.6%、22.5%;最适电穿孔 条件下电击洗涤精子比未洗涤精子的内化率提 高了 14% ( $P < 0.01$ );将洗涤精子与外源 DNA 共孵育后再电击比不孵育处理组的提高了 5.8% ( $P > 0.05$ );且电击转染的精子被内化转 运到精细胞内的外源 DNA 分布不规则<sup>[22]</sup>。

众所周知,精液冷冻破坏精子质膜完整性, 但是否影响精子结合及内化外源 DNA 的效率? 我们优化了一种提高精子转染外源 DNA 效率的 山羊精液冷冻-解冻方法<sup>[23]</sup>,比较了鲜精和冻精 转染外源基因的效率,发现冻精显著提高了结合 率和内化率(81.60%  $\pm$  16.59% vs. 32.95%  $\pm$  2.93%,  $P < 0.01$ ; 41.80%  $\pm$  6.26% vs. 27.89%  $\pm$  8.64%,  $P < 0.05$ )。PCR 和 Southern blotting 检测表明,外源 DNA 已经整合到冷冻精子基因 组上<sup>[24]</sup>。冷冻破坏精子质膜完整性,解除质膜 的阻碍作用,是提高外源 DNA 内化效率的一个 主要原因。

### 2.3.2 改变 DNA 进入质膜的方式

如以阳离 子脂质体先行包裹 DNA,再利用脂质体与细胞 膜的相容性以及细胞对脂质体的吞噬作用,将 外源 DNA 导入精细胞。该方法不仅提高 DNA 转运效率,而且可保护核酶对 DNA 的降解,已 在鸡、兔、小鼠上获得成功<sup>[25]</sup>。孙新明研究表 明,脂质体介导法可用于山羊精子转染外源 DNA,还比较了该方法转染山羊精子的效果及 其影响因素<sup>[26]</sup>。

## 2.4 睾丸内注射

精清中的 DNA 结合抑制因 子促使研究者思考在精子发生及成熟部位进行 转染。李福兵选择 4 头山羊,双侧睾丸注射不 同剂量的质粒 DNA,注射后用 PCR 和 Southern 杂交方法检测外源 DNA 在精子中的整合,探讨 了睾丸内注射法在精细胞的整合和在早期胚胎 中表达。发现转染效率最高发生在注射后第 40 d,转染阳性率最高为 81%;绿色荧光蛋白在 精子及其体外受精的部分胚胎中表达,胚胎阳 性率最高的达 66.7%。睾丸内注射法可能是一 种可行、简单并利于推广的制备转基因山羊 的方法<sup>[18]</sup>。

### 3 小 结

精子因素是影响 SMGT 方法生产转基因动物的重要方面。转染用山羊精液的来源、精子质膜完整性、精液品质和发育阶段等精子因素影响精子结合外源 DNA 及 SMGT 方法生产转基因动物的效率。从这些影响因素入手, 优化精子和外源 DNA 处理方法, 对提高精子载体法生产转基因山羊效率是比较有效的措施。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Brackett B G, Boranska W, Sawicki W, *et al.* Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *PNAS*, 1971, **68**(1): 353 ~ 357.
- [ 2 ] Gandolfi F. Sperm-mediated transgenesis. *Theriogenology*, 2000, **53**, 127~ 137.
- [ 3 ] 赵有璋. 羊生产学(第二版). 北京: 中国农业出版社, 2002, 1~ 14.
- [ 4 ] 崔文涛, 靳二辉, 李奎等. 转基因羊研究进展. 农业生物技术学报, 2007, **15**(3): 519~ 525.
- [ 5 ] Brinster R N, Sandgren E P, Behringer R R, *et al.* No simple solution for making transgenic mice. *Cell*, 1989, **59**: 239~ 241.
- [ 6 ] Spadafora C. Sperm mediated gene transfer: mechanisms and implications. *Soc Reprod Fertil Suppl.*, 2007, **65**: 459~ 467.
- [ 7 ] Garcia Vazquez F, Gutierrez Adan A, Gadea J. Sperm mediated gene transfer (SMGT): effect of culture medium on porcine spermatozoa binding to the exogenous DNA. *Reproduction in Domestic Animals*, 2008, **43**: 67.
- [ 8 ] Lavitrano M, Camaioni A, Fazio V M, *et al.* Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, 1989, **57**: 717~ 723.
- [ 9 ] Lavitrano M, Stoppiacciaro A, Bacci M L, *et al.* Human decay accelerating factor transgenic pigs for xenotransplantation obtained by sperm mediated gene transfer. *Transplant Proc*, 1999, **31**( F2): 972~ 974.
- [ 10 ] Li L, Shen W, Min L, *et al.* Human lactoferrin transgenic rabbits produced efficiently using dimethylsulfoxide sperm mediated gene transfer. *Reprod Fertil Dev*, 2006, **18**(6): 689 ~ 695.
- [ 11 ] 赵永聚, 李福兵, 孙新明等. 山羊精子结合外源 DNA 能力的年龄及品种依赖性. 动物学报, 2005, **51**(6): 1 058 ~ 1 066.
- [ 12 ] Gandolfi F. Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals. *Transgenic Res*, 1998, **7**(3): 147~ 155.
- [ 13 ] Lavitrano M, Fomi M, Bacci M L, *et al.* Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol Reprod Dev*, 2003, **64**(3): 284~ 291.
- [ 14 ] 叶华虎, 刘彦, 刘珠果等. 山羊精子结合和内化外源 DNA 的特征及影响因素. 遗传, 2006, **28**(6): 659~ 664.
- [ 15 ] Zani M, Lavitrano M, French D, *et al.* The mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells: factors controlling the DNA uptake. *Exp Cell Res*, 1995, **217**(1): 57~ 64.
- [ 16 ] 赵永聚, 郑双艳. 山羊精子介导转染外源 DNA 的研究. 西南大学学报, 2007, **29**(6): 46~ 50.
- [ 17 ] Shim S W, Kim Y H, Lee H T, *et al.* Effects of sperm membrane disruption and electrical activation of oocytes on *in vitro* development and transgenesis of porcine embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2008, **21**(3): 358 ~ 363.
- [ 18 ] 李福兵, 魏泓, 孙新明等. 睾丸内注射 pEGFP-N1 体内转染精子并在山羊早期胚胎成功表达. 中国实验动物学报, 2005, **13**(2): 110~ 113.
- [ 19 ] 李福兵, 赵永聚, 周建华等. 不同山羊个体的精子结合和内化外源 DNA 能力的差异性研究. 中国比较医学杂志, 2005, **15**(6): 346~ 349.
- [ 20 ] Kang J H, Hakimov H, Ruiz A, *et al.* The negative effects of exogenous DNA binding on porcine spermatozoa are caused by removal of seminal fluid. *Theriogenology*, 2008, **70**: 1 288~ 1 296.
- [ 21 ] Rieth A, Pothier F, Sirard M A. Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events. *Mol Reprod Dev*, 2000, **57**, 338~ 345.
- [ 22 ] 孙新明, 魏泓. 山羊精子电穿孔转染外源 DNA 影响因素及最适条件的研究. 井冈山学院学报(综合版), 2008, **29**(2): 67~ 71.
- [ 23 ] 赵永聚, 李福兵, 孙新明等. 提高精子转染外源 DNA 效率的山羊精液冷冻方法的优化. 中国实验动物学报, 2007, **15**(2): 49~ 51.
- [ 24 ] 赵永聚, 王勇, 王剑等. 冷冻对山羊精子转染内化外源 DNA 和体外制备转基因胚胎的影响. 动物学报, 2008, **54**(6): 1 089~ 1 097.
- [ 25 ] Ball B A, Sabour K, Allen W R. Liposome mediated uptake of exogenous DNA by equine spermatozoa and applications in sperm mediated gene transfer. *Equine Veterinary Journal*, 2008, **40**: 76~ 82.
- [ 26 ] 孙新明, 魏泓, 赵永聚等. 脂质体介导山羊精子转染外源 DNA 最适条件的研究. 西南大学学报(自然科学版), 2007, **29**(6): 77~ 82.