

显微注射法制备转基因小鼠模型的研究*

刘薇 卢光秀 卢惠霖

(湖南医科大学人类生殖工程研究室 长沙 410078)

摘要 将外源基因 MT-LMP, pZipNeoSV(X_1)-LMP 及 HLA-DR α 分别注入昆明小鼠受精卵雄原核中, 结果得到有这三种外源基因整合的三个转基因小鼠系, 导入基因的整合率分别为 8%, 80% 及 66.7%, 它们的子一代(F_1)及子二代(F_2)基因组中也均有外源基因整合, 并且导入 pZipNeoSV(X_1)-LMP 基因后经反转录聚合酶链式反应(RT-PCR), 检测 mRNA 发现有该基因的表达, 说明本法制备转基因小鼠是可行的。应用荧光原位杂交技术(FISH), 对子四代(F_4)部分小鼠进行了整合定位研究, 结果发现外源基因在体内为随机整合。本文对以上结果进行了讨论。

关键词 显微注射法 转基因小鼠 模型

转基因小鼠模型的诞生为动物育种等研究提供了新的手段。在各种转基因小鼠模型的制备方法中, 显微注射法是最常用的一种。显微注射是一种精细的转基因实验操作技术, 即在显微镜下使用显微操作器通过毛细玻璃管将目的基因直接导入小鼠受精卵的雄原核内, 1980 年美国耶鲁大学的 Gorden 首次成功地用这种技术制备出转基因小鼠^[1]。目前, 该法已广泛应用于各种转基因小鼠模型的制备^[2]。从 1991-1995 年, 本文应用显微注射法, 将 EB 病毒潜伏膜蛋白基因的两种构建形式 MT-LMP 和 pZipNeoSV(X_1)-LMP 及主要组织相容性复合体 II 类抗原 HLA-DR α 基因分别注入昆明小鼠受精卵雄原核内, 其整合率分别为 8%, 80% 及 66.7%, 它们的子一代(F_1)及子二代(F_2)小鼠基因组中也均有这些外源基因的整合, 并且导入 pZipNeoSV(X_1)-LMP 基因后, 经 RT-PCR 检测 mRNA 发现有该基因的表达。应用荧光原位杂交技术(FISH), 对 F_4 代部分小鼠进行了整合定位研究, 发现外源基因为随机整合, 说明导入的外源基因已经稳定地整合进了小鼠的基因组中, 并且能够传给下一代。通过这三组实验, 对显微注射法制备转基因小鼠的方法进行了研究。

1 材料和方法

1.1 实验设备 显微操作系统为日本 Nikon

公司 TMD-NT2 倒置显微镜和显微操作器及 MF-9 微熔炉、PB-7 垂直拉针器、SMZ-10 体视显微镜等; 小鼠胚胎培养基使用 M_2 , M_{16} ^[3]

1.2 实验对象 昆明小鼠, 由本校动物学部提供。在自设动物饲养一周以适应人工昼夜周期(昼:晨 5:00-晚 7:00, 夜:晚 7:00-次日晨 5:00)后使用。

1.3 实验方法及测指标

1.3.1 建立用于实验的小鼠体系和获取受精卵 该系包括四部分小鼠, 即结扎雄鼠、假孕雌鼠、种雄鼠和供卵雌鼠等。

选取自然动情周期中的动情供卵雌鼠与种雄鼠以 1:1 同笼, 次日上午以颈椎脱臼法处死见栓鼠, 取出输卵管, 置含有透明质酸酶(3 μ g/ml)的 M_2 培养基中。在体视镜下撕开透明壶腹部, 其中的卵细胞团流入培养基中, 待卵丘细胞从受精卵表面移去后, 观察卵的受精情况, 仅将已受精的卵移入另一皿 M_2 培养基中, 轻轻洗涤 3 次后, 移入盛有 M_{16} 的表皿中, 置 CO_2 培养箱中, 培养 30-60min, 待注射。

1.3.2 显微注射和移植 将注射针及固定针分别装至左右操作臂上, 再将培养了 30-

* 本文获国家自然科学基金及中华医学基金会资助

收稿日期:1995-09-05, 修回日期:1996-05-16

60min 的受精卵放到倒置镜下, 聚焦, 吸卵针吸住一个受精卵, 将注射针插入雄原核中, 注入 DNA 后迅速退出(注入标志为原核核膜膨胀); 体视镜下挑选注射后仍完整的受精卵(即核、质膜、透明带完整, 卵周隙清晰, 细胞质均匀者), 移入 M_{16} 培养皿中, 置 CO_2 培养箱中培养 30min 后, 再次挑选完整受精卵, 移入 M_2 培养基中, 待移植。

于当日, 将自然动情期的雌鼠与结扎雄鼠同笼。次日挑选出见栓雌鼠, 即假孕雌鼠; 将假孕雌鼠麻醉, 分别在左右背部肋缘脊柱交界处作一纵切口直到腹腔内, 提住卵巢周围脂肪球将卵巢及输卵管带出体外; 撕开包膜, 找到输卵管开口, 将已装入移卵管内的受精卵轻轻吹入; 将卵巢及输卵管放回腹腔, 缝合伤口, 待其产仔。

1.3.3 转基因鼠的检测 剪下 0.5 - 1cm 长的仔鼠尾, 抽提 DNA, 进行 PCR 及 Southern 杂交分析。对有外源基因整合的小鼠进一步抽提 mRNA 进行反式聚合酶链式反应(RT-PCR), 分析其外源基因表达情况。荧光原位杂交按苗聪秀等的方法进行, 使用卡方(X^2)检验。

2 结果

本实验将环形重组逆病毒 pZipNeoSV (X_1)-LMP 及线形重组基因 MT-LMP 和 HLA-DR α 分别以显微注射法导入昆明小鼠受精卵内, 分别研究了各实验中的注射后受精卵的存活率、幼仔出生率及外源基因整合率的差异及影响因素。实验分组及结果见表 1 - 5。

表 1 各种显微注射条件

实验组别	A	B	C
注入基因名称	pZipNeoSV(X_1)-LMP	MT-LMP	HLA-DR α
注入基因构型	环形	线形	线形
注入基因浓度	8ng/ μ l	2ng/ μ l	2ng/ μ l

表 2 注射后受精卵的存活率

实验组别	注射卵数	存活卵数	存活率(%)
A	46	42	91.30
B	413	294	71.19
C	43	39	90.70

表 3 各组幼仔出生率

实验组别	移植卵数	出生卵数	幼仔出生率(%)
A	22	15	68.18
B	221	25	11.13
C	11	7	63.63

表 4 各组外源基因整合率

实验组别	检测仔鼠数	阳性仔鼠数	整合率(%)
A	15	12	80.0
B	25	2	8.0
C	6*	4	66.7

* 其中一只在检测前死亡

表 5 各组结果的统计分析($\alpha=0.05$)

比较内容	X^2	P 值
存活率		
A 与 B	8.54	<
C 与 B	7.53	<
A 与 C	0.01	>
幼仔出生率		
A 与 B	56.97	<
C 与 B	24.13	<
A 与 C	0.07	>
外源基因整合率		
A 与 B	21.89	<
A 与 C	15.72	<
B 与 C	64.01	>

从表 2、3、4 中可以看出: 注入 pZipNeoSV (X_1)-LMP 基因后受精卵的存活率为 91.30%, 幼仔出生率为 68.18%, 外源基因整合率为 80% (见图 1); 注入 MT-LMP 后受精卵的存活率、幼仔出生率及外源基因整合分别只有 71.19%、11.13% 及 8%; 而注入 HLA-DR α 后的受精卵存活率、幼仔出生率和外源基因整合率为 90.7%、63.63% 和 66.7%。以上三种基因导入昆明小鼠受精卵后均在发育成的仔鼠基因组中整合并且能遗传给它们的后代, 其中尚有一系具有外源基因的表达(见图 2), 说明本方法是成功的。

进一步应用荧光原位杂交法(FISH), 对经 PCR 及 Southern 杂交证实, 有外源基因整合的

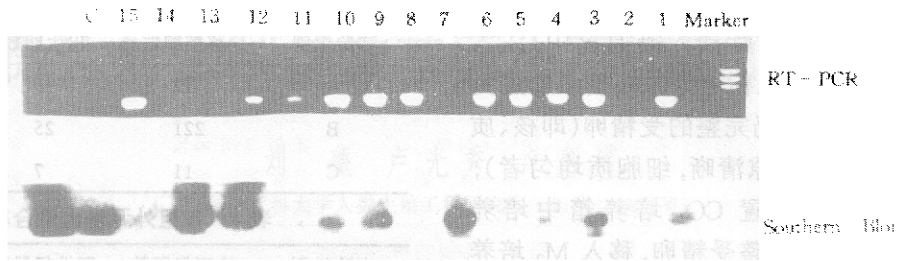


图1 部分仔鼠整合的检测

1、3、4、5、6、8、9、10、11、12、14、15 为有整合鼠；2、7、13 为无整合鼠

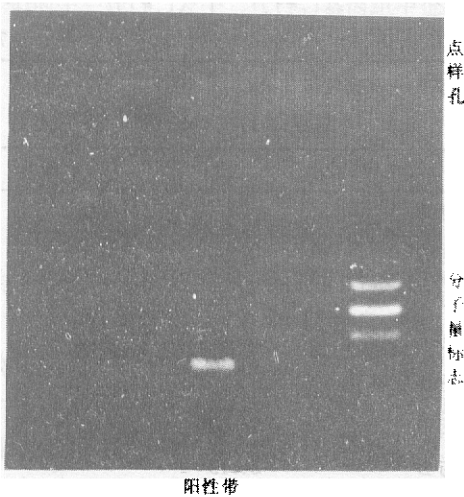


图2 RT-PCR 检测的部分仔鼠 mRNA 的结果

- 1: 分子量标志
- 2: 9号鼠 RNA 检测结果, 无表达
- 3: 10号鼠 RNA 检测结果, 有表达
- 4 与 5: 11, 12 号鼠 RNA 检测结果, 无表达

子四代(F₄)小鼠进行了整合定位研究, 结果发现外源基因为随机整合(见图3)。

3 讨论

显微注射法是将外源基因直接注入小鼠受精卵的原核内。注射针的插入及 DNA 溶液的注入对受精卵, 尤其是原核都造成不同程度的损伤, 注入后受精卵存活率的高低是衡量显微操作成功与否及熟练程度的直接指标。而存活受精卵的质量又在很大程度上影响移植后的幼仔出生率。在实验过程中, 操作者操作的熟练程度对显微注射效果的影响较大。

在制备转基因动物的显微注射操作中, 操作者在熟练程度集中体现在每个受精卵注射所

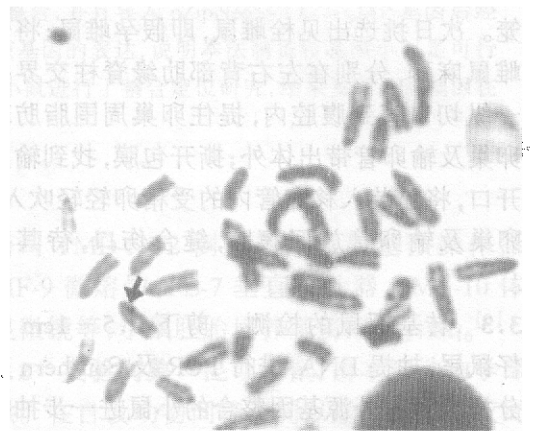


图3 一只转基因小鼠的 FISH 结果(杂交后显带) 箭头示杂交信号

需的时间上。对于每一批受精卵来说, 每次注射时间以控制在 25min 以内较好。因显微操作是在模拟体内生理环境的体外培养基中进行的, 长时间的注射使受精卵过度暴露在室温及空气中, 培养基 pH 值及渗透压改变, 也即受精卵生存的微环境发生改变, 从而影响受精卵的质量。本文报道的 B 组实验是在早期刚开始进行显微操作时的实验结果, 因操作熟练程度较差, 每次注射持续时间较长, 与 A、C 两组后期实验结果相比, 其受精卵的注射后存活率明显较低 ($P < 0.05$), 而移植后的幼仔出生率则更是显著低于 A、C 两组结果 ($P < 0.05$)。后期的两组实验, 由于操作者技术熟练度的提高, A、C 两组受精卵注射后存活率及其后的幼仔出生率均有明显提高 ($P < 0.05$) 并且 A、C 两组的以上两率也没有明显差异 ($P > 0.05$)。说明注入不同的基因, 不同的基因浓度及形式对受精卵注射后存活率及幼仔出生率均没有影响。

在转基因动物实验中,导入的外源基因有无整合及整合率的高低是整个实验是否成功的关键环节。1989年,Brinster等对显微注射法制备转基因小鼠实验中影响外源基因整合的因素作了专题研究^[4]。在实验中发现注入基因的浓度和量、缓冲液成分、DNA分子状态及小鼠品系等均为整合率产生影响。本文的三组实验中,导入基因的量控制在1-3 μ l,缓冲液的成分与一般转基因动物实验中所用的相一致;所用小鼠均为湖南医科大学动物中心提供的纯系昆明小鼠,因此以上因素均认为对本文所叙实验的外源基因整合率没有影响。

从表4结果中可以看到:三组实验的整合率高低间存在明显差异(A, B间; $P < 0.05$; A, C间; $P < 0.05$; B, C间; $P < 0.05$)。其中A组实验导入的基因为带逆病毒载体序列的环形DNA,基因浓度为8ng/ μ l,其整合率高达80%,并且有外源基因的表达,这与Brinster等的对照实验结果不一致(Brinster等的结果显示:线性DNA整合效率5倍高于环形DNA),提示pZipNeoSV(X₁)逆病毒载体中的长末端重复序列(Long Terminal Repeats, LTR)能明显提高外源基因的整合效率。可以认为:在显微注射

实验中,应用环状重组的逆病毒载体可获得较高的整合率。但该系表达率仅为8.33%,其低表达率可能与甲基化失活有关。因此,在制备转基因小鼠的实验中,究竟使用哪种载体及哪种形式的基因须认真权衡利弊后决定。

应用FISH技术对四代(F₄)进行整合定位研究,结果发现外源基因为多位点,随机整合,与文献报道的相一致,^[5]从而进一步确认了外源基因整合的稳定性和可传递性。

参 考 文 献

- 1 Gorden, J. W., G. A. Scangos and D. J. Plotkin et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1980, **77**: 7380 - 7384.
- 2 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 高等教育出版社, 1993. 13 - 14.
- 3 Hogan, B. F. Constantini and E. Lacy. *Manipulating the Mouse Embryo: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1986.
- 4 Brinster, RL, Chen H. Y. and M., Trumbaur et al. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1989, **82**: 4438 - 4442.
- 5 Palmiter, R. D. and R. L. Brinster. Germline transformation of mice. *Annu Rev Genet*, 1985, **20**: 465 - 499.