5 Abrahem K M, Alamgir M. Room temperature polymer electrolytes and betteries based on them. Solid State Ionics, 1994, 70/71: 20
6 Croce F, Panero S, Passerini S, et al. The role of conductive polymers in advanced electrochemical technology. Electrochim Acta, 1994, 39(2): 255
7 Yao J N, Chen P, Fujishima A. Electrochromic behavior of electrodeposited tungsten oxide thin films. J Electroanal Chem, 1996, 406: 223
8 Armand M B, Duclot M. US Patent, 4748, 1978

(1997-06-17收稿, 1997-11-11收修改稿)

# 乳腺表达人凝血因子Ⅸ的转基因小鼠的研究

黄 英 张克忠④ 黄文英 卢大儒④ 黄 缨 马湛卢
任兆瑞 邱信芳④ 薛京伦④ 曾溢滔 黄淑帧*
(上海市儿童医院上海医学遗传研究所, 上海 200040; ④复旦大学遗传学研究所, 上海 200433. * 联系人)

摘要 通过正压手动显微操作技术, 将能在离体细胞和活体细胞表达的人凝血因子Ⅸ的表达载体pMCⅨDNA导入586枚昆明白种小鼠受精卵, 随后将显微注射后存活的499枚受精卵移植于假孕受体母鼠, 获得216只$F_0$代仔鼠. PCR和Southern印迹杂交分析证实有6只仔鼠(2♀, 4♂)的基因组中有外源基因阳性整合, 整合率为3%(6/216); ELISA测定2只$F_0$代转基因雌鼠的乳汁中人凝血因子Ⅸ蛋白(hFⅨ)的含量均已达100 ng/mL以上, 一期法测定其凝血活性分别为44.67%和79.43%.

关键词 人凝血因子Ⅸ 转基因小鼠 乳腺 表达

通过转基因动物技术, 建立哺乳动物乳腺生物反应器来生产贵重的药物蛋白是近年生物工程领域发展的重要方向之一. 而小鼠因其繁殖周期短, 饲养管理方便, 故常被作为动物乳腺生物反应器的经济而有效的实验动物模型. 人凝血因子Ⅸ(hFⅨ)是一种血浆凝血因子, 它的缺乏会导致一种性连锁遗传的出血性疾病——血友病B[1]. 目前, 该病的治疗主要依靠从血制品中提取的hFⅨ作替代疗法, 若能通过动物乳腺生物反应器批量生产具有生物活性的hFⅨ则对血友病B的治疗具有重大意义. 本研究通过显微注射, 将重组hFⅨ基因导入小鼠受精卵, 获得小鼠乳汁中含有hFⅨ蛋白的转基因小鼠, 从而为动物乳腺生物反应器的研究提供了科学依据.

## 1 材料与方法

(1)实验动物. 昆明白种纯系小鼠, 来自上海医学遗传研究所动物房(清洁级, 医动字第02_56号).

(2)表达载体构建. 表达载体pMCⅨ按文献[2]方法构建(图1), 并已证明该表达载体在离体细胞和活体细胞中可表达[2].

(3)转基因小鼠制备. 参照Reilly等人[3]方法作修改进行. 采用正压手动显微操作技术向每一小鼠受精卵的雄原核中注射2 pL终浓度为4.0 ng/μL的pMCⅨDNA, 然后移植于同期发情的假孕母鼠输卵管中, 得到的仔鼠称转基因小鼠$F_0$代.

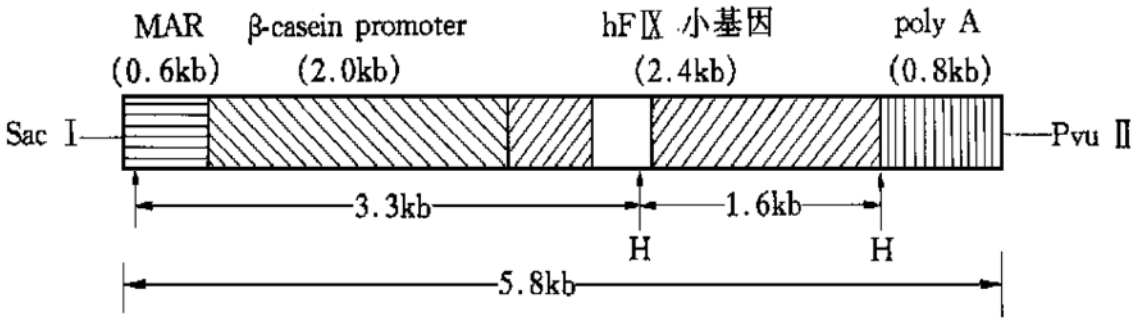



图 1　用于显微注射的表达载体(pMC 含hF) 示意图

MAR ——小鼠的 MAR 元件; β_casein promoter ——牛的酪蛋白启动子及其上游的调控序列和外显子 1; hF 含小基因 ——包括 hF 含cDNA 序列, 800 bp 经改造的内含子 iv序列和 hF 含蛋白的信号肽序列; poly A ——SV40 poly A 序列; H ——Hind 含酶切位点; 空白框 ——内含子 iv

(　) 目的基因整合的鉴定. 剪下 0.5~ 1cm 长的仔鼠尾, 抽提 DNA 进行 PCR 和Southern 印迹杂交分析, 以鉴定 hF 含基因的整合. PCR 的引物序列为 5′_ATTCTGTGTAG-GCTCTATCG_3′ 和 5′_GAAGGGCAATGTCATGGTTG_3′, 扩增片段的长度为 206 bp. 以 (α_$^{32}$P) dCTP标记的 hF 含cDNA 为探针, Southern 印迹杂交后的结果作为目的基因整合的确证.

(　) 乳汁中 hF 含蛋白的鉴定. 收集已进入泌乳期的阳性整合的转基因母鼠乳汁, 应用酶联免疫吸附法(ELISA) 测定乳汁中 hF 含蛋白的含量[4], 并用 ST4 Bio 型半自动血液凝固测定仪"一期法"直接检测 hF 含的凝血活性[5].

## 2　结果

### 2.1　外源 DNA 导入对胚胎生长发育的影响

通过显微镜注射导入 pMC 含hF DNA 后, 受精卵的存活、移植、妊娠和产仔情况见表 1.

表 1　小鼠受精卵显微注射后的实验结果

| 导入基因 | 注射受精卵数 | 移植受精卵数 | 注射后受精卵存活率 | 受体数 | 妊娠数 | 妊娠率 | 产仔鼠数 | 产仔存活率 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pMC 含hF | 586 | 499 | 85.2% (499/586) | 38 | 32 | 84.3% | 216 | 43.3% (216/499) |

### 2.2　转基因小鼠 hF 含DNA 整合的检测

采用 PCR 和 Southern 印迹杂交实验对 216 只 $F_0$ 代仔鼠进行了 hF 含DNA 整合的鉴定, 其中有 6 只转基因小鼠(2♀, 4 ♂) 的基因组中具有阳性整合(图 2). 在 Southern 印迹杂交图谱中, 各阳性整合小鼠的杂交片段的大小并不相同, 表明外源基因在小鼠基因组中的整合是非定点的. 图 3 显示的是在乳汁中有 hF 含基因表达的 2 只 $F_0$ 代转基因雌鼠的 Sourhern 图谱.

阳性整合的转基因小鼠与正常小鼠交配后已获得 30 只 $F_1$ 代小鼠, 经 PCR 和 Southern 印迹杂交鉴定, 有 17 只 $F_1$ 代小鼠的基因组中具有 hF 含DNA 的序列, 阳性小鼠占 57% (表 2).

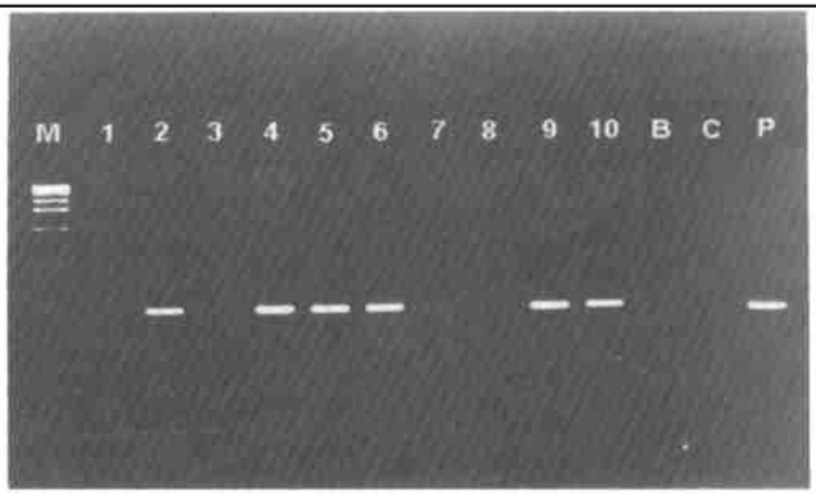



图 2 转基因小鼠外源基因(hF ㈨)整合的 PCR 检测结果

M ——1 kb 梯度 DNA 标志; 1, 3, 7, 8 ——外源基因导入后整合阴性的小鼠; 2, 4, 5, 6, 9, 10 ——外源基因导入后整合阳性的小鼠; B ——空白对照; C ——阴性对照; P ——hF ㈨基因片段(阳性对照)

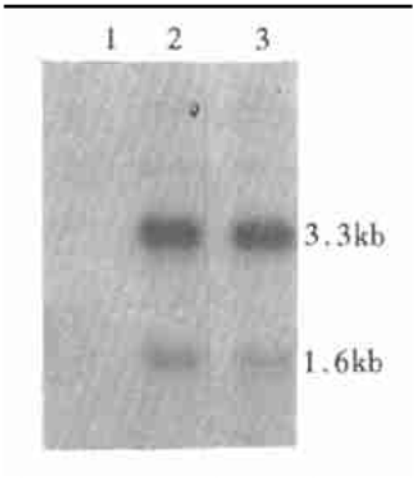



图 3 Southern 印迹杂交分析转基因小鼠的整合结果

α-$^{32}$P-dCTP 标记的 hF ㈨基因片段为探针, 小鼠基因组 DNA 用 Hind ㈣酶解. 1 ——转基因阴性小鼠; 2, 3 ——转基因阳性小鼠(在乳汁中有 hF ㈨基因表达的 2 只 $F_0$ 代转基因雌鼠)

表 2 转入 hF ㈨基因小鼠整合的检测

| 仔鼠基因 | 仔鼠数 | PCR 检测阳性数 | Southern blot 检测阳性数 | 整合率/% | 转基因总有效率/%<br>(阳性数/受精卵移植数) |
|---|---|---|---|---|---|
| $F_0$ | 216 | 6 | 6 | 3 | 1.6 |
| $F_1$ | 30 | 17 | 17 | 57(50~64) | |

## 2.3 转基因小鼠乳汁中 hF ㈨蛋白的检测

2 只 $F_0$ 代雌鼠的乳汁中 hF ㈨蛋白含量和其凝血活性的测定结果见表 3. 从表 3 中可以看到, hF ㈨蛋白在乳汁中的表达水平已高到 100 ng/mL 以上, 凝血活性的测定结果显示, 2 只

表 3 2 只 $F_0$ 代转基因雌鼠乳汁中 hF ㈨蛋白的检测结果

| 小鼠 | 检测内容 | 结果 | |
|---|---|---|---|
| | | 定性 | 定量/ng·mL$^{-1}$ |
| 非整合雌鼠(No. 1) | 鼠乳中 hF ㈨蛋白 | 阴性 | 1.55 |
| 非整合雌鼠(No. 2) | 鼠乳中 hF ㈨蛋白 | 阴性 | 1.50 |
| 阳性 $F_0$ 代雌鼠(No. 1) | 鼠乳中 hF ㈨蛋白 | 阳性 | 104.85 |
| 阳性 $F_0$ 代雌鼠(No. 2) | 鼠乳中 hF ㈨蛋白 | 阳性 | 109.6 |

$F_0$ 代小鼠的乳汁中活化的 hF ㈧分别为 44.67% 和 79.43%, 表明 hF ㈧小基因在小鼠的乳腺中已经过转译后加工(糖基化, 羧基化和肽链的剪切等), 表达出具有活性的 hF ㈧.

## 3 讨论

hF ㈧是人体中重要的血浆凝血因子, 由肝脏细胞合成. 最初在肝脏中生成的 hF ㈧是一种酶原, 经过在第 157 和 167 位门冬酰胺部位的糖基化, N 端第 7, 8, 15, 17, 20, 21, 26, 27, 30, 33, 36 和 40 共 12 个谷氨酸的羧基化, 以及在肽链中 $Arg^{145}$_$Ala^{146}$和 $Arg^{180}$_$Val^{181}$处精氨酰键断裂, 剪除掉第 146~ 180 位共 35 个氨基酸的肽段, 生成一条由 145 个氨基酸(第 1~ 145 位)构成的短链和另一条有 236 个氨基酸(第 181~ 416 位)构成的重链, 并由二硫键连接起来, 最终形成了具有丝氨酸蛋白酶活性的活化 hF ㈧[1]. 正因为 hF ㈧因子在体内代谢的这一特点, 故被认为是采用动物乳腺生物反应器的途径批量生产的最佳候选蛋白.

本文通过小鼠受精卵显微注射导入 hF ㈧基因的途径, 获得了在小鼠乳汁中的表达 hF ㈧蛋白并能在种系中传代的转基因小鼠品系. 研究结果表明, 牛酪蛋白基因 5′端包括启动子及其上游调控序列和外显子 1 共 2.0 kb 的结构框架, 能指导 hF ㈧小基因在活体小鼠的乳汁中表达出有相当生物活性的 hF ㈧蛋白, 显示出该基因在分泌信号肽序列, 活性位点序列等的完整性, 我们在另一组实验中, 将 hF ㈧小基因表达载体注射入小鼠尾静脉后, 通过对各器官组织总 RNA 的 RT_PCR 检测和免疫组织化学的测定, 证实 hF ㈧小基因在乳腺中专一的转录表达[2]. 所有这些结果为进一步在大型家畜中进行乳腺生物反应器的研究和培育提供了较好的模式.

尽管目前利用显微注射技术培育转基因动物的总体效率还不尽人意, 外源基因的整合率和表达率较低, 但与其他基因导入技术, 如反转录病毒法, 胚胎干细胞法, 电转移法和精子载体法等相比, 在最终育成能够整合和表达外源基因的真正意义上的转基因哺乳动物方面, 尤其是对转基因实验小动物的制备, 它仍不失为最经典而有效的方法[6]. 此外, 如何提高转基因动物的乳汁中目的基因产品的水平也是一个重要的问题. 最近, Yull 等人[7]在 hF ㈧转基因小鼠的研究中, 就通过去除 hF ㈧基因的前体 mRNA 中隐匿的 3′端剪切位点来增加乳汁中 hF ㈧蛋白的表达作了有意义的尝试. 由于许多有经济价值的家畜的受精卵的核常常不能清晰地显示, 故近年来已逐步发展起将显微注射与家畜卵母细胞体外成熟、体外培养以及胚胎移植前的外源基因整合的分子鉴定等相结合的综合技术. 无疑, 这对于转基因动物的成功率将起到积极的推动作用.

致谢 上海市儿童医院上海医学遗传研究所孙 琼、陈美珏、陈 坚、沈宇青、顾小锋医师等参加部分工作. 本工作为国家“八六三”计划(课题编号: 101_05_04_01)和上海市科技发展基金(批准号: 955419001)资助项目.

## 参 考 文 献

1 曾溢滔. 人类因子 ㈧的分子生物学研究. 中华血液学杂志, 1987, 8: 694~ 696

2 张克忠, 崇 松, 陈 光, 等. 人凝血 ㈧因子乳腺特异性表达载体在离体细胞和活体细胞中表达的初步研究. 复旦学报, 1998, 4

3 Reilly M P, McCune S L, Ryan T M, et al. Preparation of recombinanthemoglobin in transgenic mice. In Methods in Enzymology. 1994, 271: 403~ 405

4 Dai Y F, Qiu X F, Hsneh J L, et al. High efficient transfer and expression of hF ⑨cDNA in cultured human skin fihroblasts from hemophilia B patient by retrovirus vectors. Science in China, Series B, 1992, 35: 182~ 193
5 孙 萌, 冯仁丰, 王鸿利, 主编. 实用临床检验年册. 上海: 上海科技教育出版社, 1990
6 陈学进, 陈永福, 张克诚. 家畜转基因研究进展. 上海畜牧兽医通讯, 1997, 4: 7~ 11
7 Yull F, Harold G, Wallace R, et al. Fixing human facter ⑧(f ⑧): correction of a cryptic RNA splice enable the production of biologically active f ⑧in the mammary gland of transgenic mice. Proc Natl Acad USA, 1995, 92: 10 899~ 10 903

(1998-02-23 收稿, 1998_03_09 收修改稿)

# 大麦染色体的激光微束切割、片段分离及体外扩增

王 槐 周奕华 党本元 胡赞民 王兰岚 李良材 陈正华
(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要 用 Nd: YAG 激光微束对大麦 7H 染色体进行切割并利用玻璃针分离了 7HS 端部片段, 对获得的染色体片段 DNA 进行了 2 次 LA_PCR(linker adaptor PCR) 体外扩增, 扩增片段长度为 500~ 3 000 bp, 大多数集中在 1 000 bp, 经 Southern 杂交分析证实扩增片段来自大麦基因组. 与前人报道相比, 本研究具有以下特点: ( ) 切割染色体细致准确、易于操作, 且费用较低. ( ) 所需底物量少, 用单一染色体片段即可进行有效扩增.

关键词 **大麦 染色体微切割 Nd: YAG 激光微束 LA-PCR**

特定染色体或染色体片段的显微切割、分离和体外扩增对于基因组研究意义十分重大. 这项技术自 1981 年建立以来[1], 经过不断发展, 现已成功地应用于人类及动物的基因组研究[2, 3]. 但是由于植物细胞与染色体的特殊性, 1991 年才首次将此技术用于植物染色体的研究[4], 而且进展相对缓慢, 到现在为止仅有十几篇报道, 主要原因是植物染色体的显微切割、分离及体外扩增技术尚不够完善, 难度较大.

目前, 微切割、微分离植物染色体的方法主要是玻璃针法[4~ 8]和 Fukui[9] 等人建立的激光法. 前者是分离植物染色体较为成熟的方法, 但难以对染色体进行准确的定位切割; 后者切割细致, 但需要底部带有特殊薄膜的小皿, 费用高且步骤繁琐. 另外, 以往报道中多用几条甚至几十条相同染色体作为模板[4, 5]进行体外扩增. 如果没有特殊材料( 如端体、三体、单体等), 同时挑取几十条相同染色体不仅费时费力, 也极难保证每次挑取染色体的准确性, 该项工作难以进行.

针对上述问题, 在本实验室工作基础上[7, 10, 11], 本研究以大麦为材料, 探索出一条简便有效的用 Nd: YAG 激光微束切割植物染色体、借助玻璃针分离染色体片段, 并用单一染色体片段作为底物进行体外扩增的程序, 为大麦染色体片段 DNA 文库的构建奠定了基础.

## 1 材料与方法

(1) 材料. 以大麦 (*Hordeum vulgare* L. )“沪麦 6 号”为实验材料, 种子由中国科学院遗传研究所李义文先生馈赠.