外源基因在鱼类胚胎中表达与整合的时序

赵浩斌 陈尚萍 孙永华 汪亚平 朱作言*
(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072. * 联系人)

摘要 采用细胞核移植技术, 以绿色荧光蛋白基因为报告基因, 泥鳅为试验材料, 研究了外源基因在鱼类胚胎发育过程中的表达与整合. 结果表明, 外源基因在鱼类胚胎中, 从原肠胚期开始表达, 与鱼类胚胎分化时期相吻合. 转移的外源基因的表达时间与启动调控顺序有关; 表达效率与基因构型有关, 受体胚胎早期中未整合的环形质粒的表达效率高于线性质粒. 外源基因的整合最早从囊胚期开始, 并持续相当长的时间. 两种不同结构的基因共转移时, 其整合与表达不存在一致性.

关键词 基因 整合 表达 时序 核移植 鱼 绿色荧光蛋白

1982 年 Palmiter 等人[1]获得转基因的超级鼠, 显示了转基因动物技术的巨大应用潜力, 为动物育种开辟了新途径. 1984 年朱作言等人[2]获得转人生长激素(hGH)基因的鲫鱼, 转 *hGH* 基因鱼具有快长低耗的优良特性, 有望培育成为新的养殖对象. 然而, 转基因动物研究的一些基础理论问题有待深入研究, 如外源基因整合的时序及方式, 遗传的稳定性问题等. 转基因鱼模型的研究[3]认为, 外源基因在鱼类基因组中整合是一个渐进的过程, 主要发生在胚胎发育的中期和晚期, 整合的外源基因随着胚胎发育而镶嵌于全身. 那么, 最早的整合究竟何时发生? 整合是稳定的吗? 本研究采用了鱼类胚胎细胞核移植技术. 我国学者童第周等人在本世纪 60 年代建立了鱼类核移植技术[4], 在鱼类核质关系及核质杂交育种领域进行了卓有成效的研究, 并于 80 年代初期通过肾细胞核移植克隆了鲫鱼[5]. 如果外源基因在胚胎发育某一时期稳定地整合进入基因组, 将这一时期的胚胎细胞核移植后, 就有可能克隆出纯合的转基因后代, 其各个组织和器官的细胞应含有相同的基因组成. 这不仅可以克服"转植基因"(transgene)的嵌合性问题, 而且还有助于推测其整合的时序.

绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)是深海水母所具有的发光蛋白质, 在蓝色紫外光的激发下可发出绿色荧光. 绿色荧光蛋白基因已在大多数模式生物系统中得到表达和应用, 包括细菌、酵母、果蝇、线虫、植物、斑马鱼、爪蟾和哺乳动物等[6]. 本研究以 *GFP* 基因为报告基因, 较直观地研究转植基因的存在和表达.

1 材料与方法

( ) 实验鱼. 泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus* Cantor), 购自武昌大东门集贸市场, 注射鲤鱼脑垂体匀浆液催产.

( ) 质粒. 注射的质粒有 5 种: 即 XIC[7], ccMTeGFP, pCAeGFP, pCMVeGFP 和 pMhGH[2]. 其中 ccMTeGFP 是在 pEGFP_1(GenBank Accession No: U55761)质粒 *Xho* iv和 *Bam*H iv位点间插入 660 bp 鲤鱼 MT 启动子, 由香港中文大学 Chan 教授惠赠; pCAeGFP 是在 pEGFP_1 质粒 *Hin*d ㉔和 *Sal* iv位点间插入 1.2 kb 鲤鱼肌动蛋白基因启动子, 本实验室构建; pCMVeGFP 是在 pEGFP_1 质粒 *Hin*d ㉔和 *Bam*H iv位点间插入 CMV 启动子, 本实验室构建.

( ) 卵和胚胎的处理. 采用干法受精获得受精卵, 采用朱作言等人[2]的方法进行胚胎

基因转移. 按照童第周等人[4]的方法把胚胎细胞核注入未去核的成熟卵细胞, 进行核移植.

( ) *GFP* 基因表达的观察和检测. 在倒置荧光显微镜下, 用蓝色紫外光(480 nm) 激发, 活体观察 GFP 的绿色荧光.

( ) DNA 的提取. 鱼苗 DNA 用常规的酚_氯仿方法提取; 胚胎 DNA 的提取稍做改进, 单个胚胎加入 100 μL DNA 抽提液[3] (含 10 μg/ mL 蛋白酶 K) , 50 ℃保温 3 h 以上, 加入 100 μL 酚_氯仿, 振荡混匀, 12 000 × *g* 离心 10 min, 取上清液加入 10 μL 3 mol/ L 乙酸钠, 200 μL 无水乙醇, 混匀, – 20 ℃保温过夜, 12 000 × *g* 离心 10 min, 干燥后溶于 20 μL TE 中, – 20 ℃保存.

( ) PCR 柬测. *hGH* 基因的 PCR 检测参照李国华等人[8]的方法进行. *GFP* 基因的 PCR 检测: 25 μL 反应体积中加入模板 DNA 约 0. 5 ng, 4 种 dNTP 各 50 μmol/ L, 引物各 20 pmol, Taq 酶 1 U. 94 ℃预变性 2 min; 30 个循环扩增 DNA, 每个循环 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min ; 循环结束后 72 ℃保温 5 min. *GFP* 基因的 PCR 引物位于其结构基因上, 正向引物为 5′_AGCAAGGGCGAGGAGCTGTT_3′, 反向引物为 5′_TCCATGCCGAGAGTGATCCC_3′, 引物之间的长度为 698 bp. 0. 8% 琼脂糖凝胶电泳, UVP GDS8000 凝胶成象系统检测.

( ) 统计分析. *t*_检验.

2 结果与分析

2. 1 *GFP* 基因在胚胎发育各时期的表达

环形 XIG 质粒注入受精卵后, 各个时期 *GFP* 基因表达情况如表 1. *GFP* 基因从原肠中期开始表达, 一直持续到鱼苗期. XIG 质粒经 *Bgl* iv线性化, 注入胚胎后的表达效率略低于环形 XIG 的表达. 线形 XIG 质粒在原肠中期、尾芽期和肌肉效应期的表达数分别为 15. 0%, 27. 5% 和 52. 5%. 线形质粒 pCAeGFP 和 pCMVeGFP 在泥鳅受精卵转移后从原肠晚期开始表达, 而线性质粒 ccMTeGFP 从肌节期才开始表达. 说明基因的表达与基因构型及启动调控顺序有关, 环形质粒的表达效率高于线形质粒. 启动子不同, 基因表达时序也不同, XIG 质粒表达最早, 其次为 pCAeGFP 质粒和 pCMVeGFP 质粒, ccMTeGFP 质粒表达最晚. 根据荧光显微镜观察, 其表达强度顺序为 pCMVeGFP> pCAeGFP> XIG> ccMTeGFP.

表 1 环形 XIG 在转基因泥鳅胚胎中的表达

时期	原肠期	尾芽期	心跳期	色素出现期	鱼苗
观察数	80	51	40	40	75
表达数(%)	54(67. 5)	43(84. 3)	38(95. 0)	39(97. 5)	74(98. 7)

GFP 基因的表达为嵌合性(图 1(a)) , 受体胚胎或幼鱼身体不同部分无规律地散布着绿色的荧光斑块, 如卵黄囊、头、胸、腹、背、尾部等, 甚至眼球也有星罗棋布的绿色荧光表达.

2. 2 转 *GFP* 基因胚胎的 PCR 检测

经 *Xho* iv线性化的 ccMTeGFP 质粒显微注射转移后, 胚胎发育各阶段的 *GFP* 基因 PCR 扩增结果如表 2 和图 2(a) . 说明注入的外源基因随着胚胎发育而逐渐降解, 只有一部分存在下去并有望与受体基因组整合.

2. 3 XIG 质粒和 pMhGH 质粒的共转移

双基因共转移时, 若 2 个基因的整合具有某种关系时, 则可以用一个易于检测的报告基因

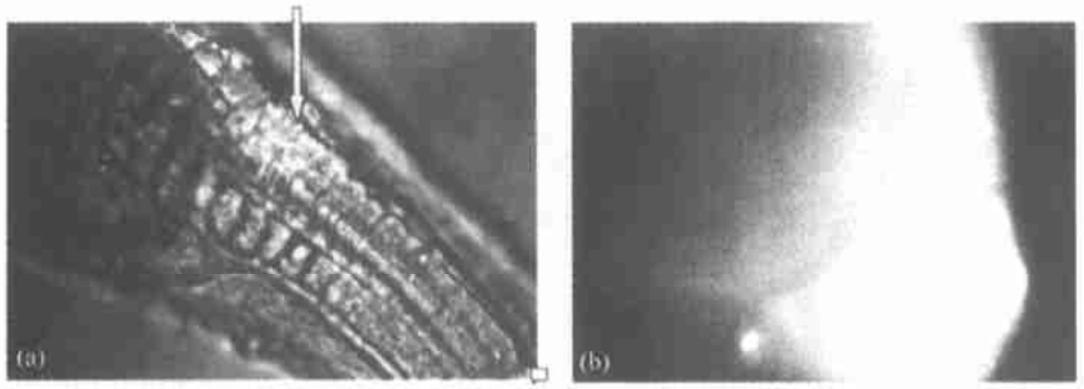

图 1 *GFP* 基因在转基因胚胎和核移植胚胎中的表达

(a) 转基因胚胎, 箭头示 *GFP* 表达的绿色荧光; (b) 核移植胚胎

表 2 转 ccMTeGFP 胚胎 PCR 检测结果

时期	囊胚期	肌肉效应期	心跳期	鱼苗
样品数	10	10	10	10
PCR 阳性数(%)	10(100)	9(90)	8(80)	8(80)

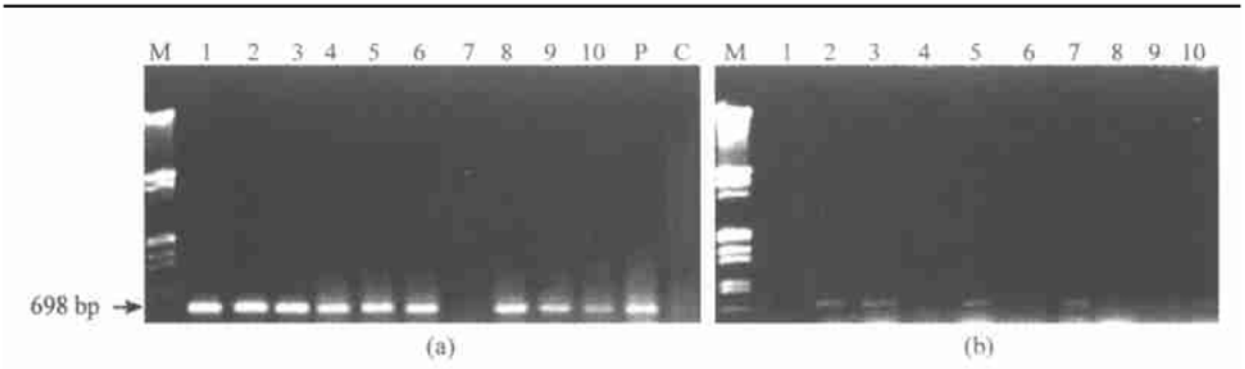

图 2 转 *GFP* 基因胚胎和核移植胚胎 PCR 检测结果

a) 肌肉效应期转 *GFP* 基因胚胎 PCR 电泳图; (b) 移核胚囊胚期 PCR 电泳图. M ——*Hin*d ㉔和 *Eco*R iv 双酶切的 λDNA, P ——质粒, C ——对照, 1~ 10 为样品

的整合或表达表示另一个目的基因的整合或表达, 为转基因动物的检测提供一种捷径. 本试验中, 线形质粒 DNA XIG(*Bgl* iv 线性化) 和 pMhGH (*Bam*H iv线性化) 以 1∶1 比例混合, 显微注射基因转移, 在胚胎发育后期挑选有绿色荧光和无绿色荧光的胚胎分别饲养, 提取鱼苗 DNA, PCR 检测 *hGH* 基因(表 3, 图 3) .

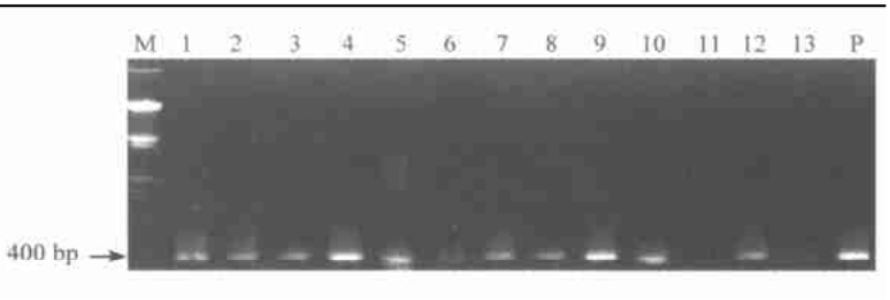

图 3 转混合基因泥鳅 *hGH* 基因 PCR 结果电泳图

M ——*Hin*d ㉔和 *Eco*R iv双酶切的 λDNA, P ——质粒, 1~ 7 ——有荧光的鱼苗, 8~ 13 ——无荧光的鱼苗

结果说明, 用 XIG 质粒表达的 GFP 荧光不能代表共转移的 *hGH* 基因在鱼苗阶段的整合水平, 与 Beermann 等人[9] 在转基因鼠实验得到的结果不一致.

表 3 共转移鱼苗的 *hGH* PCR 检测结果

荧光	总数	*hGH* 阳性数	阳性率/%
有	31	25	80.6[a)]
无	35	22	62.8[a)]

a) $P > 0.05$

2.4 *GFP* 基因在核移植胚胎中的表达

受精卵进行 *GFP* 基因转移后, 在胚胎发育的各个时期, 选取有 GFP 表达的泥鳅胚胎, 分离胚胎细胞进行核移植, 核移植胚胎发育结果见表 4.

表 4 转 *GFP* 基因胚胎核移植后的发育

质粒	供体发育时期	移植数	囊胚期数 (%)	原肠胚 (%)	神经胚 (%)	尾芽期 (%)	肌肉效应期 (%)	鱼苗 (%)
XIG	囊胚	389	152(39.1)	11(2.8)	8(2.1)	4(1.0)	2(0.5)	2(0.5)
ccMTeGFP	原肠胚	90	30(33.3)	1(1.1)	1(1.1)	1(1.1)	0	
	肌节期	91	45(49.5)	2(2.2)	1(1.1)	1(1.1)	1(1.1)	0
	肌肉效应期	113	20(17.7)	2(1.8)	0			
pCMVeGFP	原肠胚	75	17(22.7)	2(2.7)	2(2.7)	0		
	肌节期	110	28(25.5)	2(1.8)	1(0.9)	1(0.9)	0	

转 XIG 泥鳅受精卵发育至囊胚, 取其囊胚细胞核移植后, 其中 1 枚核移植的尾芽期胚胎表达 *GFP*, 绿色荧光分布均匀, 见图 1(b). 转 ccMTeGFP 的泥鳅受精卵发育至肌节期, 取其肌节期胚胎细胞核为供体, 其中 1 枚核移植的神经胚期胚胎有绿色荧光表达, 但不均一; 转 pCMVeGFP 的泥鳅受精卵发育至肌节期, 取其肌节期胚胎细胞核为供体核移植后, 其中 1 枚核移植的肌节期胚胎不均一地表达 *GFP*. 说明在有些情况下, 囊胚期已发生外源基因的整合; 而在另一些情况下, 肌节期的外源基因仍处于非整合状态.

取转 ccMTeGFP 泥鳅原肠胚期细胞核移植, 对所发育的囊胚进行了 *GFP* 基因 PCR 检测 (图 2(b)), 结果 40% 为阳性, 说明转基因的原肠胚 40% 左右细胞含有外源基因, 由此发育的转基因个体必然是嵌合体.

3 讨论

3.1 外源基因表达的时序

外源基因转入鱼类受精卵后, 从原肠胚期开始表达. 基因的表达时序与启动子有直接关系, 早期启动子所调节的基因表达早于晚期启动子所调节的基因. 如 XIG 质粒的表达最早, 从原肠中期开始; 其次为 pCAeGFP 和 pCMVeGFP, 从原肠晚期开始表达; 最晚的是 ccMTeGFP, 从肌节期开始表达. XIG 质粒中, *GFP* 基因与延长因子 *EF1*α 基因启动子构成融合基因[6]. 原肠胚期细胞已开始分化, 这时细胞中的基因开始转录, 而延长因子是蛋白质合成过程不可缺少的因子之一, 因此延长因子基因启动子驱动 *GFP* 基因首先表达是可想而见的.

基因的表达率与基因的构型有相关性, 本研究中环形质粒的表达率高于线形质粒的表达率, 可能与环形质粒在细胞中不易降解, 有大量游离拷贝存在于细胞中, 易于与细胞中的各种转录因子结合有关, 目前还不清楚其确切机制.

3.2 外源基因整合的时间

已有研究表明, 外源基因在胚胎发育期存在扩增与降解、聚合和整合的复杂行为, 外源基因能以多聚体形式整合于基因组, 有的首尾相连, 有的随机连接, 甚至以大分子形式独立存在.

显微注射转移的线性 DNA 分子以多种构型复制和扩增, 至胚孔封闭期达到峰值; 尾芽期之后, 外源基因拷贝数递减, 但分子量却越来越大, Southern 杂交显示外源基因与基因组 DNA 一同迁移[3, 10, 11], 推测外源基因的整合发生在胚胎发育的后期. 本研究中, PCR 检测显示 *GFP* 基因在胚胎中存在的比率在囊胚期为 100%, 随后下降, 也说明在囊胚期后, 外源基因降解丢失. 同一胚胎不同细胞中, 基因存在的情况也有差异. 如在一原肠胚胎中, 只有 40% 细胞检测出含有外源基因, 说明该胚胎另外的细胞也许本来就没有外源基因分布, 也许曾有过的外源基因已经发生降解, 因而形成一个外源基因存在的嵌合体胚胎. 以转 XIG 囊胚细胞为供体核移植得到 1 尾表达较为均匀的胚胎, 说明这个核供体细胞中的外源基因已经整合, 基因的整合在囊胚期就已经开始. 据我们所知, 这是迄今为止对外源基因在囊胚期发生整合的第一次证实. 以肌节期细胞为供体得到了表达 GFP 的核移植鱼, 但 GFP 的表达不均一, 说明这个供体细胞中的外源基因还没有整合进入基因组, 或者说整合不稳定. 因此, 基因的整合过程可能从囊胚期开始, 并持续较长时间.

3.3 共转移基因间整合的关系

Beermann 等人[9] 认为两种基因共转移时, 整合发生在染色体的单一位点上, 可以用一个基因的表达如色素出现来检出另一个基因的整合. 本研究用 *hGH* 基因(*Bam*H iv线性化) 和 *GFP* 基因(*Bgl* iv线性化) 等量混合进行基因转移, 结果表明表达 GFP 的鱼整合 *GH* 基因的几率高于未表达 GFP 的鱼, 但统计上差异不显著($P > 0.05$) . 说明在鱼类基因转移时, 共转移外源基因的整合互相之间没有必然联系, 一个基因的整合或表达不能反映另一个基因的整合. 因为鱼类基因转移时, 外源基因注入的部位为细胞质, 而哺乳动物基因转移时基因被直接注入细胞核: 另外. 鱼类胚胎细胞分裂快. 发育迅速. 而哺乳动物胚胎细胞的分裂较慢. 发育迟缓: 所以外源基因在鱼类和哺乳动物胚胎发育过程的行为不同, 造成的结果也不相同. Beermann 等人[9] 使用的两种基因结构具有共同的 *Sal* iv粘性末端, 共转移的基因整合前就极可能连接起来, 造成 2 种基因整合在同一位点; 而本研究采用的 2 种基因没有相同的粘性末端. 还因为外源基因的整合可能有 1 个或多个整合位点, 单一的插入位点上也可有多拷贝转植基因[12], 造成共转移基因整合或表达的不一致.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 39730290) 和中国科学院院长基金资助项目.

参 考 文 献

1 Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein_growth hormone fusion genes. Nature, 1982, 300: 611~ 615
2 Zhu Z, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*caassius auratus* L 1758) . Z Angew Ichthyol, 1985, 1: 31~ 34
3 朱作言, 许克圣, 谢岳峰, 等. 转基因鱼模型的建立. 中国科学, B 辑, 1989(2) : 147~ 155
4 童第周, 吴尚勤, 叶毓芬, 等. 鱼类细胞核的移植. 科学通报, 1963, 13(7) : 60~ 61
5 陈宏溪, 易泳兰, 陈敏容, 等. 鱼类培养细胞核发育潜能的研究. 水生生物学报, 1986, 10(1) : 1~ 6
6 Misteli T, Spector D L. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. Nature Biotech, 1997, 15: 961
7 Amsterdam A, Lin S, Hopkins N. The *aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. Dev Biol, 1995, 171: 123~ 129
8 李国华, 崔宗斌, 朱作言, 等. 鱼类精子携带的外源基因导入. 水生生物学报, 1996, 20(3) : 242~ 247
9 Beermann F, Ruppert S, Hummler E, et al. Tyrosinase as a marker for transgenic mice. Nucleic Acids Res, 1991, 19(4) : 958
10 谢岳峰, 刘 东, 邹 钧, 等. 泥鳅受精卵的电脉冲基因转移. 水生生物学报, 1989, 13(4) : 387~ 389
11 邹 钧, 谢岳峰, 刘 东, 等. 外源基因在鲫鱼胚胎发育过程中的表达. 水生生物学报, 1991, 15(4) : 372~ 374
12 Devlin R H, Yesaki T Y, Donaldson E M, et al. Production of germline transgenic pacific salmonids with dramatically increased growth

performance. Can J Fish Aquat Sci, 1995, 52: 1376~ 1384

(1999-05-24 收稿, 1999-08-09 收修改稿)

人外周血单个核细胞不同亚群对猪内皮细胞的粘附作用

张晓峰 冯志民 丰美福* 王宏芳 班立勤
(中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100080. * 联系人)

摘要 细胞介导的免疫应答是异种器官移植面临的主要障碍, 细胞粘附是细胞间相互识别的第一步. 采用流式细胞术粘附测定法研究了人外周血单个核细胞(PBMC) 中单核细胞(Mo)、自然杀伤细胞(NK) 和 T 淋巴细胞(T) 对猪主动脉内皮细胞(PAEC) 粘附的差异性, 以及人细胞因子 γ-干扰素(hIFN-γ) 或/和肿瘤坏死因子-α(hTNF-α) 预刺激 PAEC 24 h 对 PBMC 不同亚群粘附的影响. PBMC 不同亚群对 PAEC 粘附能力的大小以 Mo, NK 和 T 细胞为序, 其中 T 细胞的粘附作用极其微弱; hTNF-α 具有种间交叉活性, 可使 Mo, NK 和 T 细胞的粘附率分别提高 40%, 110% 和 3 倍. 这些结果在细胞水平上直接证实了宿主 Mo 和 NK 细胞是异种移植细胞性排斥反应的主要参与者, 为进一步研究人 Mo/NK 与 PAEC 间的作用机制打下了基础.

关键词 人外周血单个核细胞(PBMC) 猪主动脉内皮细胞(PAEC) 人肿瘤坏死因子-α(hTNF-α) 细胞粘附表型分析

异种器官移植是生物医学研究的一个重要热点, 它将从根本上解决人供体器官严重缺乏问题. 猪器官由于在尺寸大小、解剖结构和生理功能等方面均具有与人器官的相似性而成为异种移植的首选对象. 异种移植物植入受体后首先会遇到超急性排斥反应, 这是由宿主体内存在的与异种移植物反应的天然抗体所致[1]. 虽然通过使用转基因猪和去除预存抗体可以克服这种体液免疫应答, 但是移植物还将受到宿主强烈的细胞性免疫排斥作用, 即延缓性异种排斥反应[2], 目前就这一排斥反应的机制仍不甚明了.

内皮细胞是血液和组织之间的主要屏障, 具有重要的生理和病理功能, 而白细胞对内皮细胞的粘附在细胞免疫系统的传入及传出途径中起着至关重要的作用. 本研究采用流式细胞术测定了人外周血单个核细胞(PBMC) 中单核细胞(Mo)、自然杀伤细胞(NK) 和 T 淋巴细胞(T) 对猪主动脉内皮细胞(PAEC) 的粘附作用, 比较了各亚群对 PAEC 粘附的差异性, 并探讨了人促炎症性细胞因子 ——γ-干扰素(hIFN-γ) 或/和肿瘤坏死因子-α(hTNF-α) 预刺激 PAEC 对效靶细胞相互粘附的影响.

1 材料与方法

( ) 试剂. PAEC 培养液: M199(Gibco), 15% 灭活胎牛血清(FCS), 0.01 mmol/L 胸腺嘧啶和 30 μg/mL 内皮细胞生长因子(ECGF, Boehringer Mannheim) 等. PBMC 培养液: RPMI1640 (Gibco) 和 10% FCS 等, 用于粘附培养. 细胞因子: 重组的人 γ-干扰素(rhIFN-γ) 为 Boehringer