

利用卵胞浆精子注射(ICSI)技术生产转基因小鼠

Transgenic Mice Produced by Intracytoplasmic Sperm Injection

李明, 严阿勇, 姚慧, 安晓荣, 苟克勉*

LI Ming, YAN A-Yong, YAO Hui, AN Xiao-Rong and GOU Ke-Mian*

中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 生物学院, 北京 100094

Stated Key Laboratories for Agrobiotechnologies, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China

摘要 在掌握小鼠 ICSI 技术的基础上, 进行了 ICSI 技术生产转基因小鼠的研究。来自成年 KM 小鼠附睾尾的精子, 使用未加抗冻剂的 HEPES-CZB 溶液, 在液氮中冻融 1 次后, 用于本实验。解冻精子与 DNA 混匀 1 min 后, 精子头被显微注射到 B6D2F1 小鼠成熟卵母细胞质中。精子头与 pEGFP-N1 环状 DNA 共注射生产的 ICSI 受精卵, 在 CZB 溶液中培养至囊胚期时, 39.1% (9/23) 的囊胚表达 GFP 基因。精子注射后 6h, 直接移植 ICSI 受精卵后, 7 只妊娠受体一共产仔 30 只, 效率为 23.8% (30/126)。Southern blot 分析其中 16 只小鼠发现 3 只 (18.8%) 转基因小鼠同时整合了 GFP 和 Neomycin 基因, 它们全部来自精子和线性 DNA 混合的实验组 (阳性效率为 33.3% 3/9) 相反, 精子与环状质粒 DNA 共注射生产的 7 只 ICSI 后代中, 没有检测到外源基因。转基因小鼠整合的外源基因能够传递给它们后代。结果说明, 利用 ICSI 技术可以高效地生产转基因小鼠, 宿主基因组可能更容易整合线性化的外源基因。

关键词 ICSI, 囊胚, 小鼠, 转基因, Southern blot

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0784-05

Abstract In our previous study, normal and fertile mice were successful produced from oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI). In the present study, the possibility of producing transgenic embryos and offspring with this procedure was evaluated. After freezing-thawed once using HEPES-CZB medium without cryoprotectants, the cauda sperm from KM fertile male were exposed to the circular or linear pEGFP-N1 DNA for 1 min and then co-injected into metaphase II oocytes of B6D2F1 strain. When the zygotes with two pronuclei were cultured in CZB medium to day 3.5, 39.1% (9/23) of them, derived from oocytes co-injected with sperm head and pEGFP-N1 plasmid DNA, were expressed GFP protein. After transfer of the ICSI embryos with two pronuclei from co-injection of sperm head and foreign DNA, seven recipients delivered 30 pups (23.8%, 30/126). Southern blot results revealed that three of sixteen offspring integrated with GFP and neomycin genes together (18.8%). Interestingly, all of them were produced from oocytes co-injected sperm head and linear DNA (33.3%, 3/9), while none of seven ICSI offspring integrated either GFP or neomycin gene in the group of co-injection of sperm head and circular plasmid DNA. These results indicated that the high efficiency of transgenic mouse could be produced by ICSI. It may be shown that linear DNA is more easily to integrate into host genome than circular DNA when ICSI was used to produce transgenic animals.

Key words mouse, intracytoplasmic sperm injection, blastocyst, transgenic, Southern blot

Received: March 27, 2006; Accepted: May 17, 2006.

This work was supported by the grants from NSFC (No. 30270647, 30571332), Beijing Municipal Natural Sciences Foundation, China (No. 5012007) and SRF for ROCS, SEM.

* Corresponding author. Tel: 86-10-62733463; E-mail: goukm@cau.edu.cn

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部, <http://journals.im.ac.cn>
国家自然科学基金 (No. 30270647, 30571332) 北京市自然科学基金 (No. 5012007) 和教育部留学回国人员科研启动基金资助项目。

利用显微操作技术,直接将精子注射至成熟卵母细胞质的方法,称为胞浆内精子注射技术,简称 ICSI (intracytoplasmic sperm injection)。目前,该项技术已经成功地用于生产试管婴儿^[1]和研究哺乳动物的受精机理^[2]。1999 年和 2004 年,美国和日本科学家分别将 ICSI 技术应用于动物转基因领域,成功地获得了转基因小鼠^[3]和大鼠^[4],而且转基因的效率不低于显微注射法。这项技术简单易行、嵌合体比例低,而且还可以高效率地生产整合人工染色体等超长片段 DNA 的转基因小鼠^[5,6]。遗憾的是,国际上还没有 ICSI 方法生产转基因家畜的报道。在国内,我们在成功获得我国首例 ICSI 小鼠^[7]的基础上,本文以 GFP 为报告基因,进一步获得了采用 ICSI 技术生产的转基因小鼠,为转基因动物的研制和家畜乳腺生物反应器项目的研究提供了有益参考。

1 材料和方法

1.1 主要材料

实验用 DBA/2、C57BL/6 和昆明 (KM) 小鼠,购自中国医学科学院实验动物中心,C57BL/6 母鼠与 DBA/2 公鼠繁殖的 F1 代简记为 B6D2F1 (黑色),用于本实验。小鼠的饲养管理见文献 [7]。除特殊说明外,所有胚胎用试剂均购自 Sigma 公司。精子显微注射使用 Piezo PMM-150FU 操作系统 (生产商 PrimeTech LTD, Japan; 经销商上海明美科技有限公司)。胚胎培养溶液为 CZB + 5.56mmol/L D-glucose + 4mg/mL BSA; 操作液为 20mmol/L HEPES-buffered CZB + 5mmol/L NaHCO₃, 参照文献 [8] 所述方法配制。Taq 酶和限制性内切酶购自大连宝生物公司。分子生物学试剂全部为国产,特殊说明除外。PCR 引物由上海博亚公司合成。

1.2 方法

1.2.1 显微注射用 DNA 的制备: pEGFP-N1 质粒 (Clontech Co. Ltd, 序列见 GenBank U55762) 包含 CMV/GFP 和 SV40/Neomycin 两种报告基因结构。具体制备和纯化见文献 [9], 最后按 50 ng/ μ L 的浓度溶于 ddH₂O 配制的 20mmol/L Tris·Cl + 5mmol/L EDTA (pH8.0) 溶液中, 过滤除菌后分装, -20℃ 保存备用。

1.2.2 ICSI 程序: 参照文献 [7], 用 HEPES-CZB 溶液, 从隔离交配 4d 的 4 月龄 KM 公鼠附睾尾部收集上游精子, 30 μ L 分装, 直接投入液氮中冻存 (无抗冻剂)。使用前, 冻融 1 次的精子直接用 25℃ 水浴解冻, 室温下先与 pEGFP-N1 DNA 溶液混匀, DNA 终

浓度为 5ng/ μ L, 静置 1 min, 然后, 再用 12% PVP-360 与精子/DNA 混合液按 2:1 再混合, 准备注射。

7~8 周龄 B6D2F1 母鼠超数排卵, 成熟卵母细胞准备和精子注射详见文献 [7, 8]。简言之, 注射 hCG 后 14~15h, 收集卵丘-卵母细胞-复合体, 用 HEPES-CZB + 1 mg/mL hyaluronidase 溶液消化去除卵丘细胞, 每组 5 枚成熟卵母细胞置于 32℃ 恒温操纵台上马上注射。注射时, 用外径 8 μ m 的注射针吸取 DNA/PVP-360 溶液中的精子头, 用 Piezo 脉冲依次击穿透明带和卵子质膜, 将精子头缓慢注射至卵子细胞质深处, 轻轻退针, 完成一次注射。全部 5 枚成熟卵母细胞注射完成后, 静置 5~10min, 然后用 CZB 洗涤, 移入 CO₂ 箱培养。继续进行第二批注射。hCG 后 17h, 完成显微操作过程。

1.2.3 胚胎培养和移植: 参照文献 [7] 所述培养和移植 ICSI 胚胎。具体地, 注射后 6h, 检查原核形成和 PB2 的排出情况, 用 CZB 溶液继续培养 ICSI 受精卵或者直接移植。胚胎移植时, 约 15~20 枚受精卵移植至受体的单侧输卵管, 19~20d 时, 检查小鼠出生情况。

1.2.4 转基因小鼠及其 F1 后代的分子鉴定:

(1) PCR: 3~4 周龄的幼鼠, 剪取 1.0cm 尾尖组织, 用含有 0.4mg/mL 蛋白酶 K (Amersham) 的 SNET 盐溶液在 55℃ 水浴中消化过夜。酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 抽提 30 min 后, 12000r/min, 离心 5min, 吸取上层水相, 加入等体积异丙醇混匀, 可见 DNA 析出, 将其转移到无菌 Eppendorf 管中, 70% 乙醇洗涤并且真空干燥, 最后溶于 TE (pH8.0) 溶液中, 4℃ 储存备用。

用质粒作阳性对照, 以野生型小鼠尾尖基因组 DNA 作阴性对照, 以 0.5~1.0 μ g ICSI 小鼠 DNA 作为模板分别进行 GFP 和 Neomycin 基因片段的 PCR 扩增反应。GFP 基因片段 (正向: 5'-TCGTGACCACCCTGACCTA-3', 反向: 5'-CTTGATGCCGTCTTCTGC-3') 和 Neomycin 基因片段 (正向: 5'-TCACTGAAGCGGAAGGGACT-3', 反向: 5'-AGCGCGGATACCGTAAAGCAC-3') 的 PCR 扩增条件是 94℃, 5min; 94℃, 30s, 57℃, 30s, 72℃, 45s, 35 个循环; 72℃, 10min, 产物长度分别为 308bp 和 494bp。

(2) Southern blot: 参照 Rediprime™ II 随机引物标记试剂盒 (Amersham) 所述, 以 EcoR I + Not I 双酶切 pEGFP-N1 质粒回收的 771 bp 片段和 PCR 产物 (494 bp) 分别作为合成 GFP 和 Neomycin 基因探针的

模板,用 32 P-dCTP各标记10 ng的基因杂交探针备用。

每只小鼠的两份各10 μ g基因组DNA,分别用(*Eco*R I + *Not* I)和(*Stu* I + *Eco*O109 I)双酶切后,参照 Sambrook & Russell 等^[10]所述方法,酶切产物分别用0.8%的琼脂糖凝胶进行电泳,并碱转移至带有正电荷的两张Hybond N⁺尼龙膜(Amersham)上。结合DNA的尼龙膜用不含探针的磷酸-SDS预杂交5 h后,更换杂交液,分别换用新标记的GFP和Neomycin变性探针溶液65 $^{\circ}$ C继续杂交12~16h,然后用磷酸-SDS溶液I和II充分洗涤,并在-70 $^{\circ}$ C冰箱中用X感光胶片(Kodak)放射自显影24 h左右,显影并定影。

1.2.5 统计分析 实验数据的百分数显著性分析用*t*-检验。

2 结果

2.1 GFP基因在早期ICSI胚胎中的表达

利用Piezo操作系统,精子头和环状GFP-N1质粒DNA共注射的105枚ICSI胚胎中,90枚卵裂(85.7%),其中60和23枚发育至桑椹(57.1 vs 81.4%)和囊胚(21.9 vs 67.4%)阶段,发育率显著($P < 0.05$)低于正常受精胚胎(表1)。荧光检测发现,部分桑椹胚(图1a,b)和囊胚(图1c,d)表达GFP蛋白,其中表达GFP基因的囊胚比例为39.1%(9/23,表1)。胚胎移植后,7只妊娠受体产仔30只,占移植胚胎数的23.8%(30/126,表2)。发育至成年的16只小鼠,没有异常行为和生理病症。

表1 ICSI转基因胚胎的体外发育

Table 1 *In vitro* development of transgenic embryos produced by ICSI

	N. of Embryos at different stages/%					
	Pronucleus	2-c	4-c	Morula	Blastocyst	GFP ⁺ Blast
ICSI (<i>n</i> = 3)	105	90 (85.7)	86 (81.9)	60 (57.1 ^{**})	23 (21.9 ^{**})	9 (39.1)
Normal fertilization	43	40 (93.0)	39 (90.7)	35 (81.4)	29 (67.4)	0

* * :Values in the same columns differ significantly ($P < 0.01$).

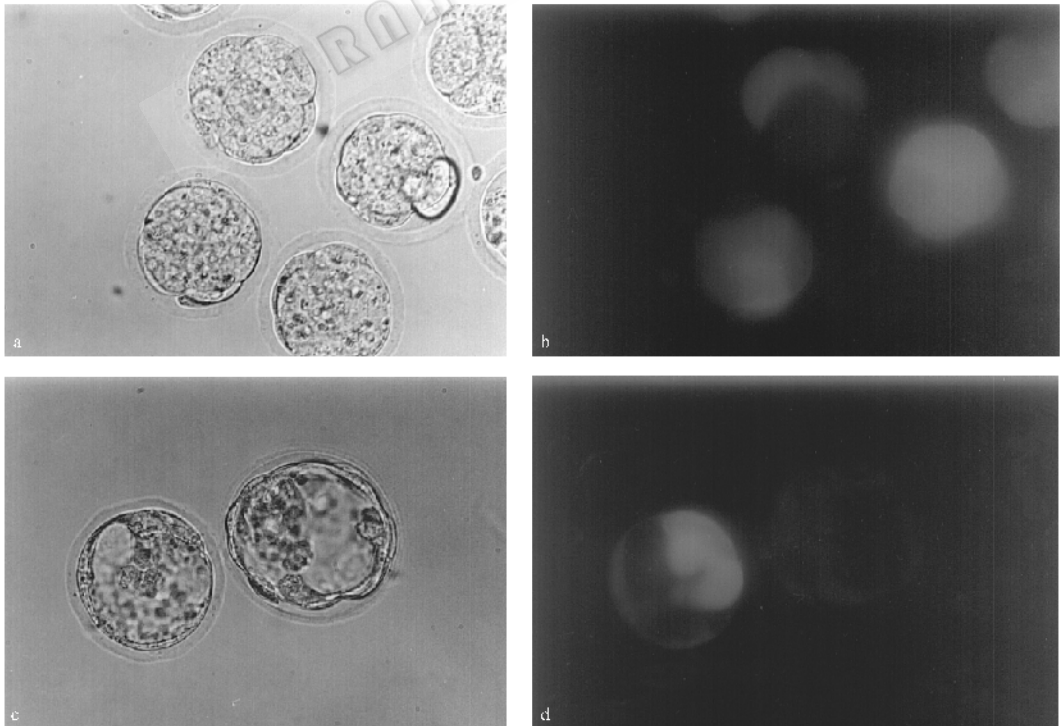


图1 ICSI转基因胚胎

Fig.1 Transgenic embryos produced by ICSI

Oocytes were microinjected with frozen sperm head that had been preincubated with circular pEGFP-N1 DNA. The embryos at the morulae (b) and blastocyst (d, the left was positive and the right was negative) stages were shown GFP expression under UV light. a and c are light field ($\times 200$).

2.2 转基因小鼠的分子鉴定

PCR 发现,检测的 16 只 ICSI 小鼠中(1~9 号为线性 DNA/精子共注射组,10~16 为环状 DNA/精子共注射组),各有 7 只小鼠为 GFP (2, 3, 5, 6, 8, 9, 16; 图 2) 和 Neomycin 阳性小鼠(1, 2, 3, 6, 8, 10, 16; 图 2)。分别用³²P-dCTP 标记的 pEGFP-N1 质粒

酶切片段和 PCR 产物(494bp)作为探针检测全部 16 只 ICSI 小鼠, Southern blot 结果发现, 3 只 ICSI 小鼠(2, 3 和 8 号)同时整合了 1~10 拷贝的 GFP (774bp) 和 Neomycin(1277bp) 基因(图 3), 总效率为 18.8% (3/16)。它们全部来自线性 DNA 与精子共注射的实验组。

表 2 ICSI 转基因小鼠的结果统计

Table 2 Summary of transgenic mice by ICSI

DNA	Recipients	Embryos transferred	Total pups	Offspring analyzed	GFP ⁺ /Neo ⁺ /%
Linear	4	65	12	9	3(33.3)
Circular	3	61	18	7	0
Total	7	126	30	16	3(18.8)

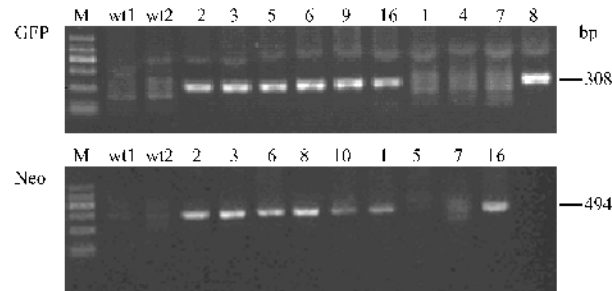


图 2 ICSI 转基因小鼠的 PCR 分析

Fig.2 The patterns of PCR analysis on transgenic mice produced by ICSI

PCR analysis of total DNA from control B6D2F1 (wt1 and wt2), mice 2, 3, 5, 6, 9, 16, 1, 4, 7 and 8 for GFP gene integration (upper), and mice 2, 3, 6, 8, 10, 1, 5, 7 and 16 for Neomycin gene (lower).

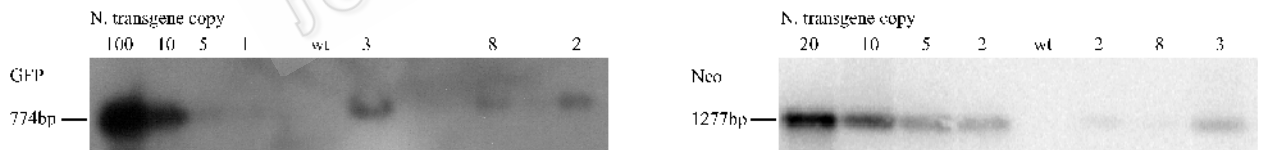


图 3 ICSI 转基因小鼠的 Southern blot 分析

Fig.3 Southern blot analysis of total DNA from control B6D2F1 (wt), mice 3, 8, and 2 using different probes for GFP (pEGF-N1 fragment, 774bp, upper) and Neomycin genes (PCR product, 494bp, lower), in which the expected integrated band was 1277bp

Estimated transgene copy numbers per genome were shown in the left lanes.

These results shown that mice 2, 3, and 8 were transgenic founders produced by ICSI.

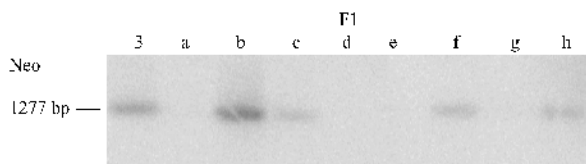


图 4 外源基因遗传的 Southern 分析

Fig.4 Southern blot analysis of neomycin transgene of F1 offsprings from transgenic founder 3
The result showed that 50% (4/8) of F1 mice harboring the foreign gene (lane a~h).

Southern blot 印迹分析转基因小鼠的正常 F1 后代发现, 外源基因随机传递给子一代, 符合孟德尔遗传规律。如图 4 所示, 3 号转基因小鼠染色体中整合的 neomycin 基因, 能够正常的传递给一窝 8 只 F1 代中的 4 只 (lane a~h)。

3 讨论

在不转移外源基因的小鼠 ICSI 前期实验中, 我们使用新鲜精子头生产小鼠的效率为 23.3%^[7], 与本文的生产效率相近(23.8%)。本文结果发现, 即使不使用抗冻剂, 精子直接用 HEPES-CZB 在液氮中冻融 1 次也不影响精子 DNA 的空间结构, 精子传递

雄性遗传物质的能力没有被破坏, 这与国外的研究结果相似^[11-13], 暗示精子的 DNA/精蛋白结构稳定性非常强, 不会被轻易破坏, 为研究精子的冷冻方法和保存精液提供了有益的参考。

本文结果显示, ICSI 生产转基因小鼠的总效率为 18.8%, 如果单纯看线性 DNA 的整合效率, 则可以达到 33.3%, 远高于环状 DNA 的效率, 这是动物转基因领域的一个共识, 但是, 本文的结果不能作为这个观点的证据, 还不能简单的认为, 环状 DNA 的

整合效率显著低于线性化的 DNA, 本文的数据还不够充分, 缺乏严格的可比性。对于 ICSI 转基因和传统的原核期受精卵的显微注射法来说, 由于外源基因整合时存在差异, 由此暗示我们, ICSI 转基因技术更有利于线性化 DNA 的整合过程, 目前, 还没有这方面的具体比较, 无法明确的下结论。本文清楚的是, 这项技术的转基因效率不低于本课题组利用显微注射生产转基因小鼠的效率, 而且外源基因的整合拷贝数也没有明显的区别, 整合到小鼠染色体的外源基因能够正常地遗传给后代, 符合孟德尔遗传规律。

作为一种新型的动物转基因技术, 利用 ICSI 生产转基因动物在国际上获得了巨大的成功, 不仅可以生产整合小片段外源 DNA 的小鼠(20%)^[3]和大鼠(16.7%)^[4], 而且可以生产分子量高达 250 kb 的 BAC 等人工染色体的转基因小鼠, DNA 不会被注射针剪切, 效率更是高达 35% ~ 47%^[5,6], 这一点才是 ICSI 转基因技术的魅力所在, 它为转基因动物, 特别是转基因家畜的生产展现了诱人的前景, 可以克服技术效率低, 费用昂贵, 耗时耗人等缺点^[14]。综合来看, ICSI 转基因技术的主要优点是: ①简单易行、转基因效率不低于显微注射技术, 技术上不存在种间差异; ②外源 DNA 直接注射到卵母细胞质中, 获得纯合后代的比例明显提高; ③精子注射针的尖端截面积约为显微注射针的 100 倍左右, 对 DNA 没有任何剪切, 尤其适合基因组 DNA、BAC 或 YAC 等大片 DNA 转基因动物的制备。鉴于 ICSI 转基因技术的优越性, 国际上有多家实验室进行了 ICSI 技术生产转基因家畜的尝试, 截至到我们写稿时为止, 还没有成功的报道^[15,16]。我们也曾进行过 ICSI 技术生产转基因绵羊的尝试, 只是获得了发育早期的转基因胚胎^[17], 同样没有得到转基因绵羊, 对小鼠的成功实验, 有利于我们进一步探讨绵羊 ICSI 转基因技术中存在的问题。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Schultz RM, Williams CJ. The science of ART. *Science*, 2002, **296**: 2188 - 2190
- [2] Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection experiments using the mouse as a model. *Hum Reprod*, 1998, **13** (Suppl): 1 : 87 - 98
- [3] Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*, 1999, **284**: 1180 - 1183
- [4] Kato M, Ishikawa A, Kaneko R, Yagi T, Hochi S, Hirabayashi M. Production of transgenic rats by ooplasmic injection of spermatogenic cells exposed to exogenous DNA: a preliminary study. *Mol Reprod*, 2004, **69**: 153 - 158
- [5] Perry AC, Rothman A, las Heras JI, Feinstein P, Mombaerts P, Cooke HJ, Wakayama T. Efficient metaphase II transgenesis with different transgene archetypes. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 1071 - 1073
- [6] Moreira PN, Giraldo P, Cozar P, Pozueto J, Jimenez A, Montoliu L, Gutierrez-Adan A. Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod*, 2004, **10**, 1095/biolreprod, 104.032904
- [7] Yan AY, Li M, An XR, Hou J, Guan H, Chen YF, Gou KM. Development normal mice from oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Chin J Biotechnol*, 2004, **21**: 305 - 310
- [8] Szczygiel MA, Yanagimachi R. Assisted Reproduction: Protocol 5. Intracytoplasmic Sperm Injection. In: Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R (eds.), *Manipulating the Mouse Embryo: a laboratory manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2003, pp. 565 - 597
- [9] An XR, Gou KM, Chen YF. Production of transgenic blastocyst of sheep by somatic cell cloning. *Chin Sci Bull*, 2001, **48**: 1630 - 1634
- [10] Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [11] Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG, Yanagimachi R. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, **98**: 13501 - 13506
- [12] Ward MA, Kaneko T, Kusakabe H, Biggers JD, Whittingham DG, Yanagimachi R. Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. *Biol Reprod*, 2003, **69**: 2100 - 2108
- [13] Wakayama T, Whittingham DG, Yanagimachi R. Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. *J Reprod Fertil*, 1998, **112**: 11 - 17
- [14] Gou KM, An XR, Tian JH, Chen YF. Transgenic animals bioreactors. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2002, **18**: 144 - 148
- [15] Lai L, Sun Q, Wu G, Murphy CN, Kuhholzer B, Park KW, Bonk AJ, Day BN, Prather RS. Development of porcine embryos and offspring after intracytoplasmic sperm injection with liposome transfected or non-transfected sperm into *in vitro* matured oocytes. *Zygote*, 2001, **9**: 339 - 346
- [16] Chan AW, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho-Santos J, Simerly CR, Hewitson L, Schatten G. TransgenICSI reviewed: Foreign DNA transmission by intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkey. *Mol Reprod Dev*, 2000, **56**: 325 - 328
- [17] Gou KM, An XR, Tian JH, Chen YF. Sheep transgenic embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. *Acta Biologica Experimentalis Sinica*, 2002, **35**: 103 - 108