

精子介导 GFP 基因在小鼠早期胚胎中的表达 Expression of GFP Gene in Mouse Early Embryo Produced by Sperm-mediated Gene Transfer

董焕声, 房勇卫, 李 兰, 李晓林, 孙理兰, 翟向玮, 潘庆杰*, 沈 伟*

DONG Huan-Sheng, FANG Yong-Wei, LI Lan, LI Xiao-Lin, SUN Li-Lan, ZHAI Xiang-Wei, PAN Qing-Jie* and SHEN Wei*

莱阳农学院动物科技学院 动物生殖发育与基因工程研究所, 青岛 266109

College of Animal Science and Technology, Institute of Animal Reproduction Development and Genetic Engineering, Laiyang Agricultural University, Qingdao 266109, China

摘 要 利用 DIG 末端标记技术和免疫组化技术分析了小鼠精子体外结合内化外源 DNA 的效率。试验结果表明,不同小鼠个体的精子结合外源 DNA 的阳性率有明显差异 ($P < 0.01$), 平均为 13%。利用考马斯亮蓝染色评价了小鼠精子顶体反应发生的情况, 筛选出 TYH 培养液为较合适的体外受精液。利用小鼠体外受精技术, 将体外转染 GFP 基因并获能的小鼠精子与成熟卵母细胞进行体外受精, 受精卵进行体外培养, 表达 GFP 胚胎的阳性率为 4.7%。验证了精子介导制备转基因小鼠胚胎的可行性, 并建立了利用精子载体法制备转基因小鼠胚胎的平台。

关键词 转基因动物, 精子介导基因转移, 体外受精

中图分类号 Q75 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0535-05

Abstract The efficiency of the exogenous DNA transfecting mouse sperm was studied by the DIG end labeled and immunohistochemistry technology. The results suggested that: the efficiency of transfecting positive rate of individual mouse sperm was distinct difference ($P < 0.01$), and the average rate was 13%. The acrosomal reaction was evaluated using the technology of Coomassie brilliant blue stained, and the appropriate *in vitro* fertilization (IVF) medium TYH was elected. Mouse sperms were transferred with GFP gene *in vitro*, and the mature oocytes were fertilized using IVF, and then the zygotes were cultured *in vitro*. The embryos were observed using the fluorescence microscopy, and the transgenic rate was 4.7%. The results suggested that sperm mediated gene transfer (SMGT) was an effective and feasible method.

Key words Transgenic animal, sperm-mediated gene transfer, fertilization *in vitro*

精子因在受精过程中的独特作用而被认为是转移外源 DNA 的理想载体。从 1971 年 Bracket 第一次证实精子具有结合及内化转运外源 DNA 的能力, 并能将外源 DNA 利用受精过程导入卵母细胞^[1]。

1989 年和 1998 年 Lavitrano 先后两次采用外源 DNA 与小鼠精子共孵育的方法获得了转基因小鼠, 分别得到了 30% 和 7.4% 阳性率^[2,3]。2002 年 Lavitrano 又将 DNA 处理的猪精子进行人工受精, 得到的仔猪

Received: November 13, 2006; Accepted: December 12, 2006.

This work was supported by the grants from the State 863 High Technology R&D project of China (No. 2002AA206621), the Programs for Science and Technology Development of Shandong Province (No. J05K06) and the Fund for Doctoral Scientific Research Startup of Laiyang Agricultural University (No. 630615).

* Corresponding authors. Tel: +86-532-88030451; E-mail: shenwei427@163.com.

国家高技术研究与发展项目(No. 2002AA206621), 山东省科技攻关项目(No. J05K06)和莱阳农学院博士启动基金(No. 630615)资助。

中 80% 为阳性后代, 其中 64% 的转基因猪表达具有生物活性的 hDAF 蛋白^[4]。2006 年, 我们研究所利用 DMSO 精子介导技术获得了表达外源基因的转基因小鼠和转基因家兔, 阳性率高达 46%^[5,6]。同年, 王晓梅等将金黄地鼠精子与 DNA 共孵育后进行体外受精, 得到 14.4% 的胚胎阳性率^[7]。由此可见, 动物精子能携带外源 DNA 是可以肯定的, 但是由于精子膜结构的特殊性, 在精子转染过程中还有些未知因子可能起重要作用, 因此这种简单的转基因方法要成为实用的稳定技术, 还有待于深入研究。

本研究以小鼠为对象, 通过利用 DIG 末端标记技术和免疫组化技术研究小鼠精子转染外源 DNA 的效率, 探讨精子与外源 DNA 的结合机制, 为精子载体法制备转基因动物提供理论依据并建立精子结合内化外源 DNA 的方法。

1 材料与方法

1.1 试验动物

ICR 小鼠购于北京维通利华试验动物技术有限公司, 6~8 周龄, 健康, 具有正常繁殖能力, 小鼠单独饲养。

1.2 试验试剂

Triton X-100、卡那霉素购于 Sigma 公司; DIG 标记及检测试剂盒购于武汉博士德生物公司; NaCl、MgCl₂ 等购于 Lancaster 公司; 质粒提取试剂盒、限制性内切酶等购于宝(大连)生物公司。

1.3 外源 DNA pEGFP-N1 的准备

pEGFP-N1 质粒为本实验室保存^[5,6]。用灭菌去离子蒸馏水稀释 1 μ g DNA 至总体积 16 μ L; DNA 热变性: 把 DNA 瓶置于沸水中, 水浴 10min。然后, 迅速地插入碎冰中 3min 以上; 加 4 μ L DIG Random Labeling Mix (高效) 混匀后 2000r/min 离心 5min, 置 37 $^{\circ}$ C 反应 20h; 加入 2 μ L 10mmol/L EDTA 以中止反应, 反应液置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 小鼠精子获能的评价与外源基因的转染

取性成熟并有受精能力的公鼠单独饲养 3 d 以上, 将小鼠断颈处死局部消毒, 腹下正中切开, 取出附睾及输精管, 用针挑开输精管, 释放出精子团, 将精子团放入 400 μ L 获能液中进行获能处理。

利用考马斯亮蓝染色技术评价小鼠精子顶体反应发生的情况, 从而判断体外受精液对小鼠精子获能的效果^[8]。将精子涂片置于染色液中浸染 5~7min, 染色后涂片用水冲洗, 吹干, 封片。

取获能后精子, 调节精子浓度为 1~3 $\times 10^6$ /mL;

加入外源基因 0.5、1、1.5、2 和 2.5 μ g/ml, 共孵育时间 20、40、60 和 90min。分析精子结合外源 DNA 的适宜条件。

1.5 转染精子的免疫组化检查方法^[9]

共孵育的精子分成两份, 其中一份加入 10 IU/mL DNase I 进行消化 1h, 同时对精子进行免疫组化的检测。涂片用 PBS 浸洗 2 次, 每次 5min; SSC 冲洗 2 次, 每次 10min; 缓冲液 I (Tris-HCl 100mmol/L; NaCl 150mmol/L; pH7.5) 冲洗 10min; 1% TritonX-100 作用 10~20min; 1% BSA 封闭 30 min; 缓冲液 II (Tris-HCl 100mmol/L; NaCl 100mmol/L; MgCl₂ 50 mmol/L; pH 9.5) 洗片 2 次, 每次 10min; 滴加 DIG 单抗-碱性磷酸酶复合物 (1:500~1:1000), 室温下作用 30min; 缓冲液 I 洗片 2 次, 每次 15min; 缓冲液 II 平衡 5~10min; 滴加显色液 (NBT) 显色 0.5~1h; 加缓冲液 III (Tris-HCl 10mmol/L; EDTA 1mmol/L; pH 8.0) 终止反应 5min; PBS 洗片 3 次, 每次 5min; 蒸馏水冲洗, 空气干燥后镜检。

1.6 卵母细胞的采集及体外受精

1.6.1 卵母细胞的准备: 选取 6~8 周龄健康雌性小白鼠, 下午 3:30 左右注射 PMSG 10IU/只, 47~48h 后注射 HCG 10IU/只, 16h 后, 断颈处死, 将卵巢与输卵管一同剪下, 在实体镜下找到输卵管的膨大部(壶腹部)用针挑开将 COC 团块释放出来, 利用口吸管将 COC 洗涤 3 次后置受精液中以备用。

1.6.2 体外受精与受精卵体外培养: 将与 pEGFP-N1 质粒共孵育的精子 10 μ L 缓慢加入含有 15 个成熟卵母细胞的 60 μ L 受精液滴中, 然后置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、湿度 99% 条件下的 CO₂ 培养箱中进行培养, 受精时间为 4~6h。将第二极体排出的受精卵洗涤数次, 去除附着精子和脱落卵丘后, 转移到 CZB 液(低糖培养基)培养, 每 24h 观察胚胎发育情况。48h 后将 4 细胞期受精卵转移到含葡萄糖 (1mg/mL) CZB 液中继续培养。经体外受精得到的早期胚胎(2~4 cell 期)以荧光显微镜 488 nm 蓝色激发光下观察 GFP 表达。

2 结果

2.1 pEGFP-N1 质粒鉴定及纯化

提取质粒 pEGFP-N1, 用 *Ase* I、*Eco*R I 和 *Sac* II 酶切分别得到特异性片段(图 1)。质粒 pEGFP-N1 利用 *Ase* I 单酶切得到 4.7kb 的酶切产物, 用 *Ase* I 和 *Eco*R I 双酶切得到 623bp 和 4.1kb 两个片段, 用 *Ase* I 和 *Sac* II 双酶切得到 643bp 和 4.1kb 两个片

段。这些结果表明质粒 pEGFP-N1DNA 序列是正确的。

2.2 精子体外获能的评价

利用考马斯亮蓝染色评价小鼠精子顶体反应发生的情况,从而判断获能液的效果。考马斯亮蓝染色后,未获能的精子头部顶端顶体区呈深蓝色,获能后的精子顶体区不着色,反差明显,容易辨别(图2)。小鼠经 KSOM、TYH 和 HTF 三种体外受精液 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中孵育 40min、90min、150min,其顶体反应率见表 1。由表 1 显示,最终选择 TYH 体外受精液作为精子获能液用于小鼠体外



图 2 精子获能的评价

Fig.2 Estimation of capacitated sperms

Dark blue acrosome of uncapacitated sperm stained with Coomassie brilliant blue, Unstained acrosome capacitated sperm stained with Coomassie brilliant blue.

表 1 小鼠精子在不同体外获能液中的获能情况

Table 1 *In vitro* capacitation of mouse sperm in different capacitation fluid

Nutrient fluid	Rate of sperm acrosome reaction		
	40 min	90 min	150 min
KSOM	31.6 ± 3.57	56.1 ± 2.81	57.7 ± 2.73
TYH	34.0 ± 3.32	58.2 ± 2.68	60.2 ± 2.59
HTF	32.7 ± 3.78	57.7 ± 3.21	59.7 ± 3.03

2.3 外源基因转染精子的免疫组化检测

获能后的精子经过免疫组化检测,确定精子结合外源基因的能力及结合位置。结果显示:小鼠的精子具有结合外源 DNA 的能力,结合部位集中在精子顶体后区(图 3)。利用 DNase I 消化前后精子结合外源 DNA 的比例来分析精子内化外源 DNA 的情

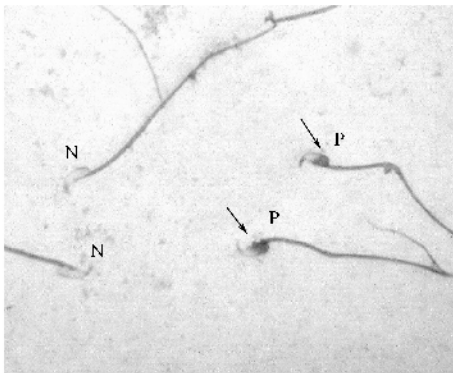


图 3 转染后的阳性精子顶体后躯着色

Fig.3 Stained postacrosomal region of positive sperm after transfection

The positive sperms marked by "P", negative sperms marked by "N" in the figure.

受精。

M1 *AseI* *AseI/EcoRI* *AseI/SacII* M2

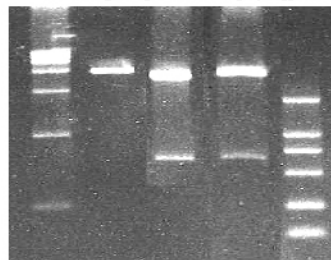


图 1 pEGFP-N1 酶切鉴定

Fig.1 Identification of endonuclease cutting of pEGFP-N1

况。经 5 次免疫组化实验,检测结果表明,消化前阳性精子率为 14.9% ± 0.49%,消化后阳性率降为 9.7% ± 0.29%。这说明精子结合的外源 DNA 有 65.1% 被内化转运到精核内。

2.4 孵育时间及 DNA 浓度对外源基因转染精子的影响

小鼠的精子与外源 DNA 孵育时间分别为 20min、40min、60min、90min 时检测精子阳性率。研究表明,在 60min 内外源 DNA 与精子的结合率随着时间的延长而增加,90min 精子的阳性率与 60min 差异不大(图 4)。小鼠精子分别与 0.5μg、1μg、1.5μg、2μg、2.5μg (1 × 10⁶ ~ 3 × 10⁶) 个精子共孵育后,结果随着 DNA 浓度的增加精子的转染阳性

率呈上升趋势(图5),但是 $1.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上的浓度精子存活的时间明显缩短,以致减少了受精率。

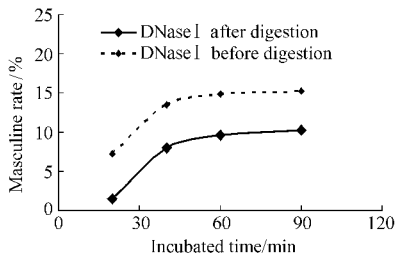


图4 精子与DNA共孵育时间对转染阳性率的影响

Fig.4 Effect of co-incubated time about sperm and DNA on transfecting positive rate

2.5 体外受精及体外培养结果

5次重复试验中,共采卵母细胞总数为370枚,得到胚胎总数为128枚,平均受精率为34.6%,受精卵的平均发育率为59.2%。

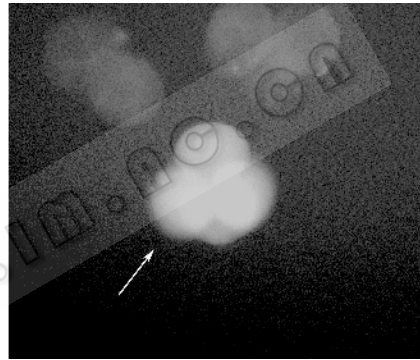
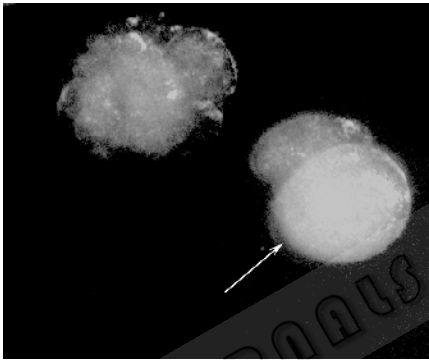


图6 转移EGFP基因的小鼠胚胎

Fig.6 EGFP transgenic mouse embryos

Two-cell embryos of expressing GFP, Four-cell embryos of expressing GFP.

3 讨论

精子介导基因转移的试验研究中,外源DNA能否进入细胞并整合到染色体基因组上是转基因成功的关键。因为哺乳动物精子在穿透卵母细胞前,必须完成获能和顶体反应,即精子质膜在受精时不能进入卵母细胞。可见,只有被内化转运到精子细胞核内或与核膜紧密相连的外源DNA才能在受精时随精子导入卵母细胞,获得与合子基因组整合的机会,最终获得转基因动物。王晓梅利用荧光原位杂交(FISH)技术对金黄地鼠精子转染外源DNA定位研究发现,未经DNaseI处理的精子样本中,阳性的信号在精子头部后区呈点状分布,经DNaseI处理的样本中,阳性信号较弱集中在头部后区中央^[7]。Atkinson对牛精子转移外源基因的放射自显影定位研究发现,DNaseI消化后的阳性信号90%位于核周区^[10]。本试验结果都显示,小鼠精子结合外源基因具有位置专一性,外源DNA结合位点集中于精子后区,表明精子结合外源DNA的部位是顶体后区,

体外受精后的早期胚胎(2~4细胞),荧光显微镜488nm波长蓝色激发光直接观察GFP在早期胚胎中的表达,试验共检查了43枚早期胚胎,结果2枚表达绿色荧光蛋白,表达率为4.7%,但GFP散在分布,强弱不均(图6)。

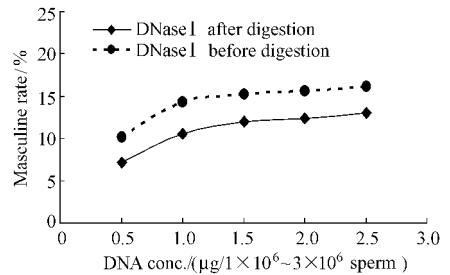


图5 DNA浓度对转染阳性率的影响

Fig.5 Effect of DNA concentration on transfecting positive rate

这也与其他动物类似^[11,12]。精子结合外源DNA的位点一致性表明精子膜上存在外源DNA结合位点。1992年Lavitrano利用SDS-PAGE电泳分离精子膜蛋白得到小于30kD、30~35kD和大于37kD三条主带,其中30~35kD蛋白在体外能够与DNA形成复合体,免疫组化证实,该蛋白主要分布于精子顶体后区,与外源DNA的结合位置一致,而且在各种动物中非常保守^[13]。上述结果表明,精子转染外源DNA包括两个过程,即精子与外源DNA的结合及其内化转运。结合是一个较快的过程,大约在40min内基本完成,结合的外源DNA首先挂在精子膜表面,随后被内化转运到精细胞内并整合到染色体上,内化转运的过程相对复杂,需要60min左右,这一结果报道结果一致^[14,15]。精子与DNA孵育60min后,结合和内化基本都已完成,但经DNaseI消化后的阳性率比消化前低7%左右,表明一部分DNA只是结合在精子膜表面而没有被内化转运。

精子结合外源DNA影响因素很多。本试验发现,不同动物个体的精子结合外源DNA能力存在较

大差异。在试验中,对不同的小鼠精子进行处理时结果个体之间差异较大,这一结果与叶华虎的结论一致^[9,16]。关于精子转染后的阳性率,研究者报道的结果差异很大,Hirabayashi 的研究结果仅有 1.6% 精子结合 DNA^[17],而 Lavitrano 等报道高达 90%^[18]。一些学者将此差异归因于试验方案、处理措施、精子活力等因素。根据本试验结果分析动物个体间差异可能是一个原因,有关结合机理方面的影响因素有待于进一步研究。

在小鼠的体外受精研究中,目前多采用 HTF, TYH, KSOM 等培养基为基础液,同时加入 FSH、E2 及必须氨基酸等^[19,20]。在本试验中,通过考马斯亮蓝染色技术选择 TYH 为体外受精液。但是与国内外报道的结果相比得到的体外受精率较低,这可能与试验条件及操作水平有关系。研究表明,去卵丘细胞可导致体外受精率下降。Germond 等推测,经过透明质酸酶去卵丘细胞的卵其透明带的结构发生改变,从而导致其体外受精率下降^[21]。本试验采用直接法体外受精以减少透明质酸酶对透明带的影响,从而减少影响受精率的因素。本试验采用的体外培养液为 CZB,研究表明,CZB 可以克服小鼠胚胎体外发育的 2 细胞期阻断,含葡萄糖的 CZB 能支持 4 细胞期胚胎发育到囊胚阶段。关于胚胎发育率较低的影响因素较多,我们认为主要是由于外源 DNA 转染时对精子的影响造成的。通过体外受精可以获得大量的受精卵,这在制备转基因动物的工作中具有非常重要的意义。通过对早期胚胎的选择,通过胚胎移植可使出生动物的转基因阳性率相对提高,大大减少了筛选和鉴定工作。

在本试验中,通过体外受精得到 43 枚胚胎中阳性率仅为 4.7%,这一结果与前面受精率较低及胚胎发育率低有直接的关系。外源 DNA 的侵入可能激活精细胞内的核酶,引起外源 DNA 和精子基因组降解,精子受精能力和早期胚胎发育率也有所降低^[22]。总之,我们认为,造成精子载体法转基因试验结果差异的根本原因可能是动物精子内化转运外源 DNA 的能力有差异所致,而提高受精率和胚胎成活率是提高精子载体法转基因成功率的关键。

REFERENCES (参考文献)

[1] Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, *et al.* Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, **68**: 353 - 357.

[2] Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, *et al.* Sperm cells as vector for introduction foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, 1989, **57**: 717 - 723.

[3] Maione B, Lavitrano M, Spadafora C, *et al.* Sperm-mediated gene transfer in mice. *Mol Reprod Dev*, 1998, **50**(4): 406 - 409.

[4] Lavitrano M, Laura M, Fomi M, *et al.* Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(22): 14230 - 14235.

[5] Shen W, Li L, Pan QJ, *et al.* Efficient and simple production of transgenic mice and rabbits using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method. *Mol Reprod Dev*, 2006, **73**: 589 - 594.

[6] Li L, Shen W, Min LJ, *et al.* Human lactoferrin transgenic rabbits produced efficiently using DMSO-sperm mediated gene transfer. *Reprod Fertil Dev*, 2006, **18**: 689 - 695.

[7] Wang XM(王晓梅), Ruan Y(阮焯), Xie QD(谢庆东), *et al.* Research on gene transfer by spermatozoa. *Hereditas(遗传)*, 2005, **27**(2): 195 - 200.

[8] Moller CC, Bleil JD, Kinloch RA, *et al.* Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Dev Biol*, 1990, **137**(2): 276 - 286.

[9] Ye HH(叶华虎). Study on Gene Transfer Goat Using Spermatozoa as Vector. *Acta Adademiae Medicinae Militari(第三军医大学博士学位论文)*, 2003.

[10] Atkinso P, Hines E, Beaton R, *et al.* Association of exogenous DNA with cattle and inset spermatozoa *in vitro*. *Mol Rprod Dev*, 1991, **29**: 1 - 5.

[11] Trarbach T, Greifenberg S, Bardenheuer W, *et al.* Optimized retroviral transduction protocol for human progenitor cells utilizing fibronectin fragments. *Cytotherapy*, 2000, **2**(6) 429 - 384.

[12] Herraiz M, Beraza N, Solano A, *et al.* Liver failure caused by herpes simplex virus thymidine kinase plus ganciclovir therapy is associated with mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA depletion. *Hum Gene Ther*, 2003, **14**(5) 463 - 72.

[13] Lavitrano M, French D, Zani M, *et al.* The interaction between exogenous DNA and sperm cells. *Mol Reprod Dev*, 1992, **31**(3): 161 - 169.

[14] Celebi C, Auvray P, Benvegnu T, *et al.* Transient transmission of a transgene in mouse offspring following *in vivo* transfection of male germ cells. *Mol Reprod Dev*, 2002, **62**: 477 - 482.

[15] Lavitrano M, Busnelli M, Cerrito MG, *et al.* Sperm-mediated gene transfer. *Reprod Fertil*, 2006, **18**: 19 - 23.

[16] Ye HH(叶华虎), Gou BF(苟本富), Liu LS(刘芦生), *et al.* Effects of acrosome reaction on mammalian sperm by coomassie blue G-250 staining. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae(第三军医大学学报)*, 2003, **4**: 582.

[17] Hirabayashi M, Kato M, Ishikawa A, *et al.* Factors affecting production of transgenic rats by ICSI-mediated DNA transfer: Effect of sonication and freeze-thawing of spermatozoa, rat strains for sperm and oocyte donors, and different constructs of exogenous DNA. *Mol Reprod Dev*, 2005, **70**: 422 - 428.

[18] Lavitrano M, Fomi M, Bacci M, *et al.* Sperm mediated gene transfer in pig: selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol Reprod Dev*, 2003, **64**: 284 - 291.

[19] Liu J, der Elst JV, den Broecke RV, *et al.* Live Offspring by *in vitro* fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential *in vivo* transplantation and *in vitro* maturation. *Biol Reprod*, 2001, **64**: 171 - 178.

[20] Michael C, Lynda K, Joel A, *et al.* IVF of mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids. *Hum Reprod*, 2000, **11**: 1791 - 1801.

[21] Germond M, Nocera D, Senn A, *et al.* Improved fertilization and implantation rates after nontouch zona pellucida microdrilling of mouse oocytes with a 1.48μm Diode laser beam. *Hum Reprod*, 1996, **11**: 1043 - 1048.

[22] Celebi C, Guillaudeux T, Auvray P, *et al.* The making of transgenic spermatozoa. *Biol Reprod*, 2003, **68**: 1477 - 1483.