

转基因小鼠的研究

史瀛仙 季肖东 李光三 舒幼敏

(中国科学院发育生物学研究所, 北京)

编码人生长激素的结构基因(hGH)与编码小鼠金属硫蛋白的基因启动子(MT-1)融合,用显微注射法将此融合基因导入小鼠受精卵的原核中,共注射了121个受精卵,将卵移入11只假孕母鼠的输卵管中,11只母鼠中的7只生了43只小鼠。在小鼠的饮水中加入锌(Zn^{2+})可诱导基因表达。小鼠长到30天时开始称体重,每隔10天记录体重,并与同时出生的对照小鼠体重比较。第一代雄性小鼠体重较对照组重,统计学分析有明显差异。小鼠长到三个月,切尾制备DNA, DNA斑点杂交法和Southern杂交法检测基因整合情况,43只小鼠中有18只有融合基因整合。用Northern、杂交法检测转录的人生长激素 mRNA。用这三种方法同样检测了第二代和第三代小鼠,发现融合基因能代代相传,而后代小鼠的表型只在个别小鼠中保留下来。绝大多数转基因小鼠后代的体重减轻。用带人生长激素基因或不带人生长激素基因的小鼠做双亲,进行不同组合的交配,所得到的后代也不相同。

关键词 人生长激素基因; 转基因小鼠; 统计学分析; 分子杂交

1982年, Palmiter^[1] 等将大鼠生长激素(rGH)基因与小鼠金属硫蛋白基因启动子连接后, 导入小鼠受精卵, 由这些卵发育成的带MT-rGH融合基因的小鼠生长速度明显加快。同样带MT-hGH融合基因、MT-bGH融合基因的小鼠也表现出快速生长的特点^[2,3]。

金属硫蛋白(MT)是一种半胱氨酸含量丰富的低分子量蛋白, 普遍存在于动物组织细胞中, 以硫键与重金属结合, 依据金属硫蛋白通过DEAE层析柱的不同洗脱位置, 在小鼠中被分为MT-I和MT-II。金属硫蛋白结构基因前面有一个约为1kb的启动子, 通过这个启动子, 重金属(如镉、锌、铜等)、激素、干扰素可以影响金属硫蛋白基因的表达^[4]。将人生长激素(hGH)与小鼠金属硫蛋白基因启动子连接后导入小鼠受精卵, 经 Zn^{2+} 诱导, hGH基因能表达并有刺激小鼠生长的作用^[2]。这对于研究GH基因调控与GH代谢及其生

物学效应, 以及生产有价值的基因产物, 都具有重要的理论意义和经济价值。

为把转基因动物技术应用于我国畜牧业和医药生产, 我们实验室开展了将MT-hGH融合基因转入小鼠的基础研究。

材料与方 法

(一) 实验材料

ICR小鼠由本所动物房提供。带MT-hGH基因的菌株为Dr. Palmiter 赠送(图1)。质粒DNA提取采用碱解法, 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离hGH基因EcoRI片段^[5]。

本文于1989年4月29日收到。

本研究得到中国科学院重点项目的资助, 并得到美国洛氏基金会RF3401的部分资助。

沈玉同志协助本工作; 余燕贞副教授协助进行统计学分析; 李建荣同志负责拍摄图片; 北京市神经外科研究所免疫生化室协助测定血清中人生长激素的含量, 特此致谢。

(二) 方法

1. MT-hGH基因的导入: 用显微注射法将MT-hGH融合基因导入ICR/ICR小鼠受精卵原核内, 再将这些卵移入假孕小鼠的输卵管中^[6]。出生的小鼠有43只。以这些小鼠为双亲进行传代, 得到的第二代、第三代小鼠分别为67只, 60只。所有小鼠出生后, 每天喂以0.38mmol/L的ZnSO₄水液。

2. DNA提取及斑点杂交: 用乙醚麻醉小鼠、切尾、剪碎、消化。酚-氯仿抽提、乙醇沉淀。TE (10mmol/L Tris-HCl, pH7.6, 1mmol/L EDTA) 缓冲液溶解, 变性后在H₂ bond膜(尼龙膜, Amersham公司)上点样, 室温中干燥, 2×SSC溶液浸泡2—3min, 空气干燥, 紫外短波固定5min, 用保鲜膜包好H bond膜。4℃待用。

3. DNA电泳及Southern转移: 10μg DNA经BamH I (Boehringer Mannheim公司)酶切后, 乙醇沉淀, 用1%琼脂糖凝胶, 30V电泳过夜, 按Southern法^[7]转移, 将电泳后的DNA转移到H₂ bond膜上, 紫外短波固定5min。

4. RNA提取及Northern转移: 小鼠肝脏, 用异硫氰酸胍溶液匀浆, 氯化铯离心制备RNA, 1%琼脂糖-甲醛电泳, 转移方向同Southern法。转有RNA的硝酸纤维素膜(Millipore公司)经80℃, 烘干2h, 密封于做杂交的塑料袋内, 4℃保存。

5. 缺口翻译及DNA杂交、RNA杂交: 以hGH基因EcoR I片段2.6kb为探针, 用α-³²P-dATP(3000Ci/mmol, ICN公司), 缺口翻译法标记探针(BRL试剂盒)。DNA杂交参见Maniatis^[5], RNA杂交参见Ray Wu^[8]。

6. 小鼠血清中人生长激素的测定: 放射免疫法测定小鼠血清中人生长激素的

含量。由北京市神经外科研究所免疫生化室测定。

结 果

(一) 第一代转基因小鼠的鉴定

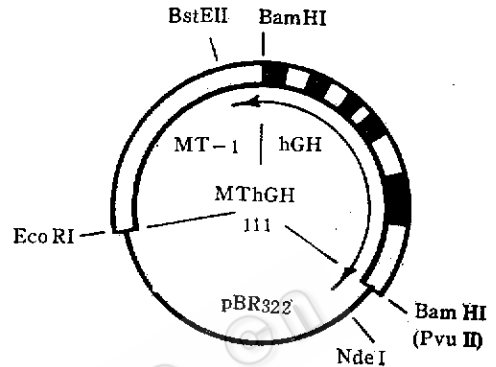


图1 带金属硫蛋白基因启动子-人生长激素基因的质粒

Fig. 1 Construction of metallothionein-human growth hormone(MT-hGH) plasmid

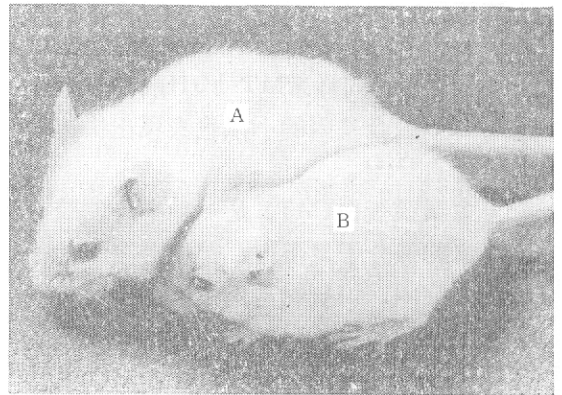


图2 带MT-hGH基因的转基因小鼠(A)与对照小鼠(B)

Fig.2 Transgenic mouse carrying MT-hGH gene(A) and the control(B)

编码人生长激素(hGH)的结构基因与编码小鼠金属硫蛋白(MT-1)基因的启动子融合成融合基因(MT-hGH), 将此基因微量注入小鼠受精卵的原核内。我们共注

射了121个卵, 将这些卵输入 11 只假孕母鼠的输卵管中, 其中 7 只母鼠生下43只幼鼠, 幼鼠出生后, 在饮水中加入锌喂养, 锌的浓度是 0.38mmol/L 硫酸锌, 正常情况下, 锌能诱导MT-1基因的表达, 因此, 也能诱导融合基因表达。幼鼠长到三个月时, 切尾, 用尾端制备 DNA, 用斑点杂交、Southern 杂交法检测融合基因的整合情况。43只幼鼠中有18只幼鼠(占41.9%)带有融合基因。其中有些个体较对照组大(图2), 我们用这18只带人生长激素基因的小鼠作为第一代。

(二) 第一代转基因小鼠的生长情况

1. 转基因小鼠的平均体重: 第一代转基因雄鼠的平均体重高于同日龄对照雄鼠的平均体重(表1)。第一代转基因雄小鼠在60日龄的平均体重为 33.2g, 较同日龄对照雄小鼠平均体重27.5g, 重20.7%, 差异显著($P < 0.05$)。而第一代转基因雌小鼠在60日龄的平均体重 25.2g 仅比对照组雌小鼠平均体重24.3g重3.7%, 差异不显著($P > 0.05$)。

2. 转基因小鼠平均体重的性别差异: 同日龄的正常雄小鼠平均体重高于雌小鼠。60日龄的第一代转基因小鼠中雄小鼠平均体重为 33.2g, 雌小鼠平均体重为 25.7g, 差异极显著($P < 0.01$)。第二代转基因小鼠、第三代转基因小鼠也具有这个特点, 差异都很显著(第二代为 $P < 0.01$, 第三代为 $P < 0.05$)。

(三) 第二代小鼠的情况

第二代小鼠由第一代小鼠交配得到, 来自以下几个组合(图3):

1. 雌雄小鼠均不带MT-hGH 基因, 所得子代也不带MT-hGH基因。这组作为以下几组的对照组。

2. 雌小鼠带MT-hGH基因, 雄小鼠不带此基因, 交配后所得到子代, 部分带

有MT-hGH基因。其中个别雄小鼠较对照高, 有两只60日龄小鼠为41.8g, 39.1g, 对照组为28.3g。

3. 雄小鼠带MT-hGH基因, 雌小鼠不带此基因, 交配后得到子代, 部分带有

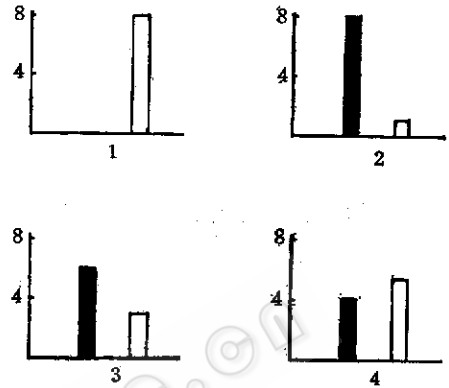


图3 第一代小鼠的四种交配

Fig.3 Four mating groups of the first generation

1. Female and male mice without MT-hGH gene, all of descendants without MT-hGH gene
 2. Female and male mice carrying MT-hGH gene, most descendants carrying MT-hGH gene
 3. Male mice carrying MT-hGH gene, female mice without MT-hGH gene, some descendants carrying MT-hGH gene
 4. Male mice without MT-hGH gene, female mice carrying MT-hGH gene, some descendants carrying MT-hGH gene
- : Mice carrying MT-hGH gene
□: Mice without MT-hGH gene

MT-hGH基因。其中个别雄小鼠体重较对照组高, 有两只小鼠在60日龄的体重分别为 40.6g, 39.4g。对照组为 30.0g。

4. 雌雄小鼠都带MT-hGH基因, 交配后所得到子代大多数带有 MT-hGH 基因, 但少数仍不带此基因。

第二代雌雄转基因小鼠平均体重与对照组平均体重无显著差异。

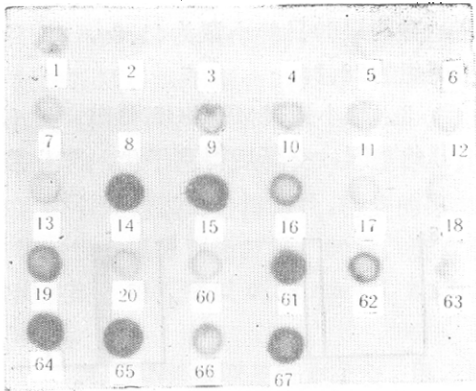


图4 第二代小鼠 DNA 斑点杂交

Fig. 4 Dot hybridization of DNA from mice tail (the second generation, No. 6: control; No. 14, 15, 61, 65, 67: positive)

(四) 第三代小鼠的情况

第三代小鼠由第二代带MT-hGH的雌雄小鼠交配而得。60只中只有2只不带MT-hGH基因。其中平均体重与对照组平均体重比较无显著差异。

(五) DNA 斑点及 Southern 杂交结果

1. 第一代出生小鼠共43只, DNA斑点杂交阳性的18只, Southern杂交检测到hGH-DNA BamH I酶切片段(2.15kb), 这说明MT-hGH基因已与小鼠基因组整合。

2. 第二代小鼠共得到67只, 其中23只斑点杂交显示阳性(图4), Southern杂交分析, 检测到hGH-DNA的BamH I片段(2.3kb, 图版I-A), 说明外源基因可以传到子代。

3. 第三代小鼠共60只, 其中58只带外源基因, 只有两只不带外源基因, DNA斑点杂交证实了这点, 任意取带MF-hGH基因的小鼠进行Southern分析, 发现BamH I片段的杂交带已改变, 约为13kb(图版I-B), 这比第一代、第二代转基因小鼠的DNA-BamH I片段都大, 这证明

外源基因不仅可以传到第二代, 也能传到第三代。

(六) RNA杂交结果

取第一、二、三代转基因小鼠的肝脏, 分别提取RNA, 做Northern杂交。结果表明第一代转基因小鼠肝脏中有hGH-mRNA存在, 其杂交带明显可见。第二代转基因小鼠肝中hGH-mRNA含量减少, 其杂交带不如第一代的明显, 非常浅, 说明含量不高。第三代转基因小鼠几乎检测不出hGH-mRNA, 这表明经过传代, hGH基因的转录水平下降(图版I-C)。

(七) 血清中人生长激素(hGH)的含量

我们测得转基因小鼠血清中人生长激素最高含量是4.18ng/ml, 但这不是第一代小鼠的血清中的含量, 因第一代转基因小鼠, 我们留作各种实验, 未能做血清学分析。对照组血清中人生长激素0.45ng/m为本底, 也能说明注入的MT-hGH基因不但整合到小鼠的基因组, 而且转录成mRNA, 进而转译成蛋白质, 也就是人生长激素。

讨 论

(一) MT-hGH融合基因的整合

本实验的转基因雌小鼠和雄小鼠都能把外源基因传给子代, MT-hGH基因的遗传没有表现出孟德尔式遗传特点, 由此推测其亲本中有的转基因小鼠为嵌合体, 即部分体细胞或生殖细胞带有外源基因MT-hGH。此外, 也有可能是带MT-hGH基因的亲本在传代时丢失了外源基因或是带MT-hGH基因的生殖细胞的正常功能受到抑制, 这些推测还需要实验来证实。以第二代转基因小鼠为亲本繁殖得到的第三代转基因小鼠, 经过斑点杂交, 几乎均为

阳性, 这表明带MT-hGH基因的小鼠是可以把外源基因传递下去的, 经过两次传代, 能得到带MT-hGH基因的小鼠品系。

对第一代到第三代的小鼠进行DNA检测, 发现MT-hGH基因能整合在小鼠基因组中。带MT-hGH基因的小鼠可以把所带的外源基因传到子代, 但在传代过程中MT-hGH融合基因并不稳定, Southern杂交显示的BamH I酶切片段在第一代转基因小鼠为2.15kb, 而在第二代、第三代转基因小鼠中则分别为2.3kb, 13kb。hGH基因酶切片段杂交带在传代后变大的原因尚不清楚, 推测可能的原因是外源基因本身受到某种修饰, 如甲基化。Jahner^[9]在研究带莫洛尼氏白血病病毒(Mo-MuLV) DNA的转基因小鼠胚胎发育早期的DNA甲基化与基因表达的关系时发现, 精子中病毒DNA的非甲基化位点在胚胎发育前12天以内发生甲基化, 而12天以后这些位点又呈去甲基化状态, 并且去甲基化程度与所处的染色体位置有关。如果MT-hGH基因在胚胎发育早期也发生了甲基化反应, 那么我们进一步推测: 由于外源基因的插入使得所在部位的染色质结构发生了变化, 这种变化又促使在胚胎发育后期应该去甲基化的位点仍然保持甲基化状态, 结果经过传代的MT-hGH基因BamH I酶切片段变大。这种推测是否正确, 尚需进一步研究。

(二) MT-hGH基因对小鼠的促生长作用

MT-hGH基因对第一代转基因小鼠表现出促生长作用, 尤其是转基因雄小鼠与对照雄小鼠的体重差异显著。我们用带MT-hGH基因的雌雄转基因小鼠双亲繁殖后代, 希望得到的子代也具有其双亲快速生长的特点, 而结果却出乎意料。得到

的子代, 其中被检测出带MT-hGH基因的小鼠只有1—2只表现出原有的生长快的特点, 而大多数并没有表现出快速生长的特点。同样, 以第二代转基因小鼠为亲本进行传代, 所得到的第三代转基因小鼠也没有快速生长的特点。这表明, 经过传代的MT-hGH基因的表达受到阻抑。Northern杂交显示的hGH-mRNA水平在子代低于亲本的现象也证实了这点。MT-hGH基因表达在传代后受到抑制很可能与DNA-BamH I酶切片段变大有关系, 也许是那些本不该存在的甲基化位点抑制了转录。

一般正常小鼠自出生后到断奶前这一时期(约30天), 生长速度较快, 在断奶后, 小鼠GH水平降到很低, 小鼠的生长速度也将随之降到一个缓慢水平^[10]。外源的MT-hGH融合基因对第一代小鼠的促生长作用表现在两个方面: (1) 使哺乳期的小鼠生长速度在原有水平上有所提高; (2) 使断奶后的小鼠生长速度继续保持较快的生长速度, 约20天。这以后, 生长速度也降到比较低的水平(图5)。这也表明MT-hGH基因对小鼠的促生长作用是有限的。

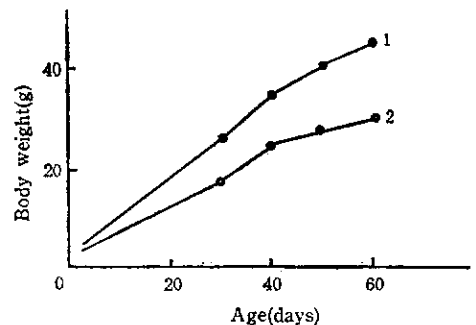


图5 转基因小鼠与对照小鼠的生长比较
Fig. 5 Weight comparison of transgenic mouse and the control
1. Transgenic mouse
2. The control

表 1 转基因小鼠与对照小鼠的体重*
Table 1 The body weight of transgenic mice and controls

| | | 1st generation | | 2nd generation | | 3rd generation | |
|------------|---|----------------|----------|----------------|----------|----------------|----------|
| | | 雄(M) | 雌(F) | 雄(M) | 雌(F) | 雄(M) | 雌(F) |
| 30 days | E | 20.2±4.3 | 19.0±3.2 | 20.7±1.1 | 17.5±1.1 | 16.4±2.9 | 15.6±2.5 |
| | C | 16.9±1.4 | 17.0±3.0 | 20.0±4.2 | 17.7±3.4 | 15.7±3.9 | 11.7±2.6 |
| 40 days | E | 28.6±5.0 | 23.3±4.9 | 25.4±1.7 | 19.5±2.5 | 24.6±3.0 | 21.0±2.1 |
| | C | 24.3±2.4 | 23.2±2.8 | 24.9±4.1 | 19.1±4.3 | 24.7±2.5 | 20.7±5.3 |
| 50 days | E | 32.0±5.6 | 24.9±5.0 | 26.9±2.9 | 21.2±1.8 | 27.9±2.3 | 22.5±2.2 |
| | C | 26.3±3.1 | 24.1±3.9 | 26.8±4.0 | 22.8±2.9 | 29.8±0.8 | 23.9±5.3 |
| 60 days | E | 33.2±6.5 | 25.2±6.0 | 29.8±3.4 | 23.5±2.0 | 30.1±2.9 | 24.1±2.1 |
| | C | 27.5±2.7 | 24.3±4.3 | 30.0±4.8 | 24.7±2.8 | 33.1±1.1 | 25.7±4.5 |

以克(g)为单位, E. 转基因小鼠 Transgenic mice, C. 对照小鼠 Controls, M. Male, F. Female

参 考 文 献

- [1] Palmiter, R.D. et al.: *Nature*, 300:315, 1982.
- [2] Palmiter, R.D. et al.: *Science*, 222: 809, 1983.
- [3] Hammer, R.E. et al.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 50:379, 1985.
- [4] Hamer, D.H.: *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 913, 1986.
- [5] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [6] Hogan, B. et al.: *Manipulation of the Mouse Embryo: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
- [7] Southern, E.M.: *J. Mol. Biol.*, 98: 503, 1975.
- [8] Ray Wu et al.: *Methods in Enzymology*, Vol. 100, Academic Press, 1983.
- [9] Jahner, M. et al.: *Mol. Cellular Biol.*, 5:2212, 1985.
- [10] Sinha, Y.N. et al.: *Endocrinology*, 91: 784, 1972.

THE GENETIC ANALYSIS OF TRANSGENIC MICE

Shi Yingxian Ji Xiaodong Li Guangsan Shu Youmin
(Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing)

The structural gene coding for human growth hormone (hGH) was fused to the promotor of the mouse gene for metallothionein-1. These fusion genes were introduced into pronuclei of the fertilized eggs of mice by microinjection. We have injected MThGH genes into 121 mouse eggs and transferred into oviducts of eleven pseudomother. Seven of eleven mothers gave birth. Fourty three litters was born.

These litters was grown up for three months. The tail was cut to isolate the DNA. DNA was examined by dot hybridization and Southern blotting. Eighteen mice incorporated the fusion genes and grew larger than control mice. Synthesis of human growth hormone was induced further by Zinc, which normally induce metallothionein gene expression. We also isolated the RNA from the liver of transgenic mice. These RNA were hybridized with hGH gene. This was showed that on the transcription level hGH gene was transcribed into mRNA in the transgenic mice. Using the same method to examine the second and third generation of the transgenic mice. We have found that incorporated gene can inherit to the generations. But the body weight of transgenic mice seems to decrease in the progeny. The offsprings which obtained from different combinations of parents (carrying or not carrying hGH gene) were different.

Key words

Human growth hormone; transgenic mice; hybridization

图 版 说 明

Explanation of Plate I

A. 第二代转基因小鼠 DNA-Southern 分析, 1-4 号分别表示四只小鼠 DNA Southern hybridization of DNA from four mice of the second generation

B. 第三代转基因小鼠 DNA-Southern 分析, 1-8 号分别表示八只小鼠 DNA Southern hybridization of DNA from eight mice of the third generation

C. 三代转基因小鼠的 RNA-Northern 分析

Northern hybridization of RNA from three generations

0; a control 1-4; the first generation

5-6; the second generation 7; the third generation