

早期转基因兔胚的培养及外源基因滞留的研究

陈清轩 刘 雷 宋德秀

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

范必勤 王 斌

(江苏省农业科学院, 南京 210014)

摘 要 用显微注射法导入外源 SMTPGH 基因的早期兔胚进行体外培养, 并用 PCR 技术对单个胚中的外源基因进行了检测, 以探讨 SMTPGH 基因在早期兔胚中的滞留情况。研究结果表明早期转基因兔胚在 Tc199+10%FCS 培养液中有 75%发育到囊胚期; 其外源基因在 8 细胞期前没有丢失, 随后有逐渐丢失的现象。到胚胎的发育后期, 其外源基因的滞留率接近于整合率。

关键词 兔转基因胚, SMTPGH 基因, 体外培养

以前对外源基因在早期胚胎中的行为及滞留情况研究很少, 这主要是由于以前缺少对单个胚胎中外源基因的有效检测手段。Brinster 曾对注射后 24 小时的外源 DNA 的行为进行了研究, 发现导入的基因量 24 小时内并无变化。也有报道认为外源基因在受体细胞内迅速丢失⁽²⁾, 但不知道这种丢失从何时开始。我们把羊金属硫蛋白启动子 (SMT)⁽³⁾ 和猪的生长激素结构基因 (PGH)⁽⁴⁾ 重组构建的融合基因 (SMTPGH) 作为外源基因, 用显微注射的方法导入兔原核胚, 然后进行体外培养。用 PCR 技术⁽⁵⁾ 结合非同位素杂交方法⁽⁶⁾ 对兔早期转基因胚进行检测, 以研究早期胚中外源基因的滞留情况。

1 材料与方法

1.1 试剂及设备

工具酶 EcoR I, SmaI, Bgl I, Pst I, Proteinase K, 和 DIG DNA 标记药盒购自 Boehringer Mannheim 公司; FCS 和 Tag 聚合酶为 Sino-America 公司产品; Tc199 为日本产品。pSMTPGH 质粒本实验室制备。PCR 扩增引物由北京大学生命中心合成, PCR-90A DNA 扩增仪购自中国科学院遗传所。显微注射仪 (Micromanipulator) 日本 Olypus 公司制造; CO₂ 培养箱购自 IKEMOTO RIKAKOGYO 有限公司。实验兔由江苏省农业科学院提供。

1.2 实验方法

1.2.1 注射基因的制备: 采用 Bgl I 完全酶切和 Pst I 部分酶切 pSMTPGH (图 1) 所得最大片段为注射片段。长度为 2.7kb, 包含有羊金属硫蛋白基因启动子 (SMT) 和猪生长激素基因的完整片段 (PGH)。酶切结果见图 2。把用低熔点胶电泳回收的酶切片段溶于 TE (pH 7.5) 中, 电泳定量后稀释至 1ng/ μ l。

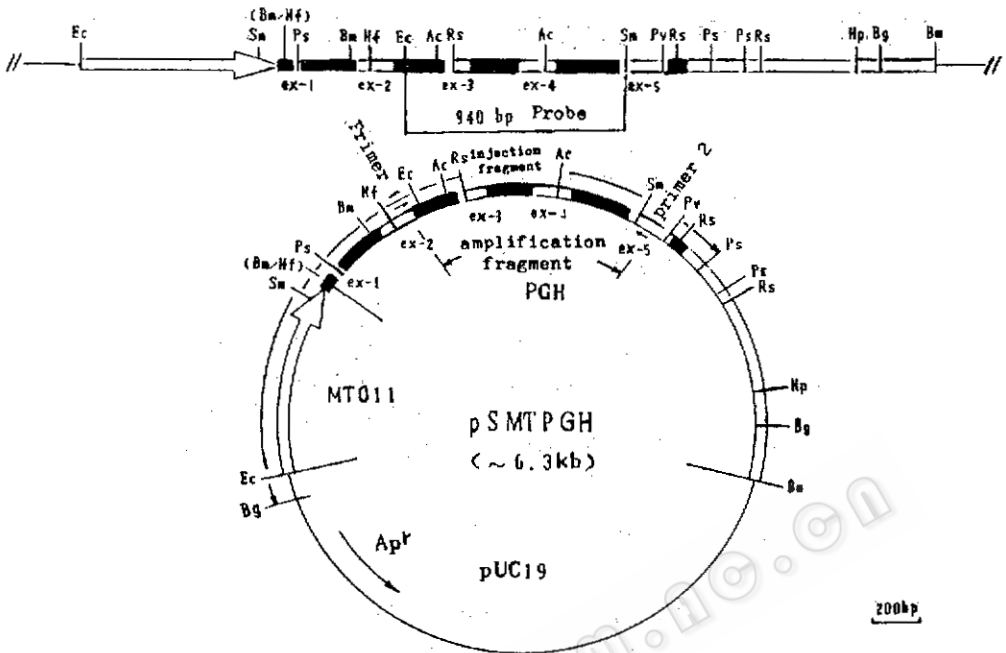


图1 pSMTPGH 物理图谱
Fig. 1 physical map of pSMTPGH

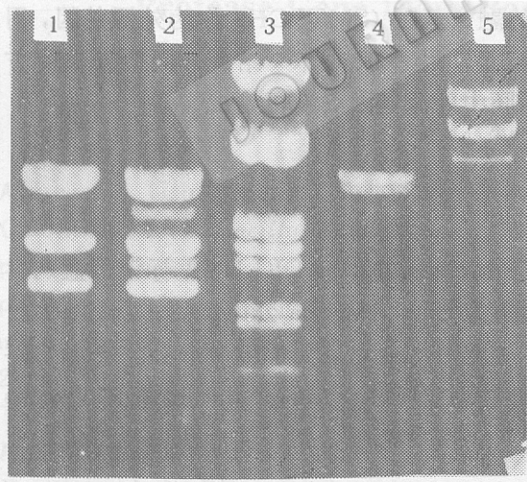


图2 SMTPGH 片段的低融点琼脂糖电泳分离
Fig. 2 The SMTPGH fragment was separated by low melting temperature agarose gel electrophoresis

1. Completely digested with Bgl I;
2. Completely digested with Bgl I + partly digested with Pst I; 3. DNA marker λ ;
4. Recovered fragments, 5. Partly digested with Pst I

1.2.2 兔卵的超排^[7]: 供体母兔每天8点和17点两次皮下注射FSH 10u, 连续3天; 最后一次注射FSH 10小时后交配, 同时耳缘静脉注射100u HCG。于次日13点手术收集输卵管内原核胚。冲卵液为PBS。

1.2.3 导入SMTPGH片段的兔原核胚的体外培养: 在显微操作仪上将约400—1000拷贝片段导入原核胚的雄原核中。将转基因的兔胚及对照组兔胚(未导入外源基因)在改进的Tc199培养液(Tc199+25mmol/L HEPES+1mmol/L glutamine+10% FCS+5 mmol/L Na-pyruvate+25mmol/L Na-lactate pH 7.4—7.5)中, 在5% CO₂, 38.5℃和一定湿度的条件下培养, 直至胚胎发育至囊胚期。其间每12小时观察一次胚胎发育情况。用PBS+FCS培养液作同样的实验, 作为对照。

1.2.4 单个兔胚胎中的外源基因的扩增: 将

不同发育阶段的兔胚胎在超纯灭菌水中迅速洗两次, 将含有单个胚胎的 $10\mu\text{l}$ 超纯水加到 $10\mu\text{l}$ $2\times$ 消化液中 ($2\times$ PCR buffer, 40mmol/L DTT, $3.4\mu\text{mol/L}$ SDS, $100\mu\text{g/ml}$ Proteinase K), 于 37°C 保温 1 小时, 然后加热至 85°C 立即进行扩增^[6]。在 $20\mu\text{l}$ 样品中顺序加入无菌超纯水 $58.5\mu\text{l}$, $10\times$ buffer $8\mu\text{l}$, dNTPS $7.5\mu\text{l}$, 引物 I 和引物 II 各 $1\mu\text{l}$, *E. coli* DNA $5\mu\text{l}$ ($0.1\mu\text{g}$ DNA), 总体积为 $100\mu\text{l}$ 。加入 $60\mu\text{l}$ 石蜡油, 短暂混匀及离心后, 置 95°C 变性 10 分钟, 加入 2u Tag 聚合酶, 离心混匀进入循环, 以 $20\mu\text{l}$ 第一次扩增产物为模板按上述步骤再扩增一次。产物经氯仿抽提后 2°C 保存备用。

1.2.5 探针的制备: 把 pSMTPGH 质粒经 EcoR I 和 SmaI 双酶切 (见图 1) 低融点胶回收 940bp 作为探针。探针的非同位素标记, Dot 杂交及显色反应参照文献^[6]。

2 结果和讨论

2.1 早期转基因兔胚的体外培养

转基因兔胚及对照组兔胚的体外培养结果见表 1。结果表明不同的培养液对兔胚的发育有显著的影响。本研究发现在 PBS + 10% FCS 培养液中兔胚仅发育到 8—16 细胞期, 随后全部退化; 而在改良的 Tc199 + 10% FCS 培养液中胚胎在发育到 8—16 细胞期时也有小部分 (20%) 胚胎退化, 16 细胞期后则不再有退化现象。培养至 96 小时全部发育到囊胚期。影响兔胚胎体外培养发育的因素很多, 以培养液的成份, 血清的含量及 CO_2 的浓度影响最大。1986 年 Brinster 用氨基氮为代谢成份的培养液将 2 细胞兔胚培养至桑椹胚^[9]; 1969 年 Kane 用简单合成的培养液加血清将 2 细胞胚培养至囊胚期, 并研究了血清及血清提取物对培养的影响^[10], 发现血清成份是早期兔胚体外培养中不可缺少的。我们的研究也证明了这一点。有资料表明早期卵裂中胚胎代谢速率迅速上升, 新合成的 mRNA 只有囊胚和桑椹胚中分离得到^[11]。这说明 8—16 细胞期对胚胎的体外培养是关键阶段, 在这个阶段胚胎细胞开

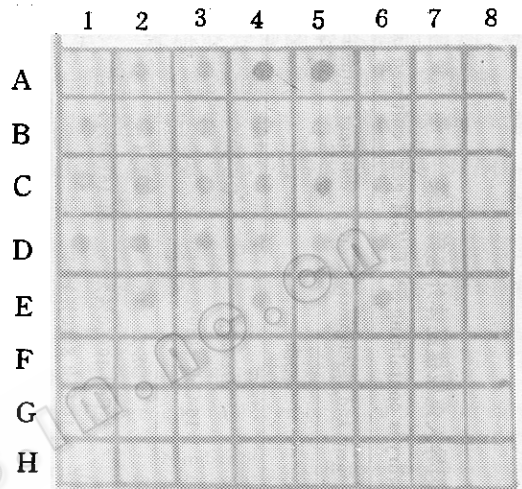


图 3 早期兔胚中 SMTPGH 基因的斑点杂交
Fig. 3 Dot blot of SMTPGH gene in the early rabbit embryos

- A1—A5. Gradient control of SMTPGH gene of 0.1pg , 1.0pg , 10pg , 100pg , $1\mu\text{l}$
A6. Positive control 1: The PCR amplification of injective SMTPGH gene ($400\text{—}1000$ copies)
A7. Positive control 2: The PCR amplification of mixture of SMTPGH gene and DNA extracted from uninjected single embryo
B1—B7. The PCR amplification of single 1-cell embryo
C1—C7. The PCR amplification of single 2-cell embryo
D1—D7. The PCR amplification of single 8-cell embryo
E1—E7. The PCR amplification of single morula embryo
F1—F7. The PCR amplification of single Blastocyst
A8, E8. Negative controls without adding Taq polymerase
G1. The control of Primers (each 50pmol)
G2—G4. The control of amplification system (without adding extracts from embryo).
G5—G8. The PCR amplification of single pronucleic, 2-cell, 8-cell, and morula embryo without being introduced SMTPGH gene.
H1—H8. The PCR amplification of the embryos at different stage, which was incubated in cultural medium containing SMTPGH gene and then washed two times quickly with superpurified water

表 1 SMTPGH 基因导入兔原核胚体外培养结果

Table 1 Result of rabbit pronuclear embryos containing SMTPGH gene cultured *in vitro*

		Development and developmental rate at different cultural stages					
Cultural system		3h	18h	24h	48h	72h	96h
Experimental groups	PBS+SERUM	DE 4 2-Cell 16(80%)	DE 8 8-Cell 12(80%)	DE 16 16-Cell 4(80%)	DE 20	—	—
	"199" MEDIA +SERUM	2-Cell 20(100%)	4-Cell 4(20%) 8-Cell 15(80%)	DE 2 8-Cell 10(50%) 16-Cell 8(40%)	DE 4 M 16(80%)	DE 4 EB 6(30%) MB 10(50%)	DE 4 HB 15 (75%) B 1(5%)
	"199" MEDIA +SERUM	2-Cell 12(100%)	8-Cell 12(100%)	DE 1 8-Cell 2(17%) 16-Cell 9(75%)	DE 2 M 10(83%)	DE 2 MB 10(83%)	DE 2 HB 10(83%)

Number of cultural embryos in experimental and control groups are 20 and 12 respectively.

DE. Degraded embryos; M. Morula, EB. Early blastocyst,

MB. Middle blastocyst, B. Blastocyst, HB. Hatched blastocyst

始分化^[12]。兔胚在 PBS+10%FCS 培养液中停止在这个发育阶段, 可能是该培养液中缺少某种营养成分造成的。另外在 Tc199+10%FCS 培养液中培养的转基因兔胚和对照兔胚其发育率并无显著的差异, 这说明显微注射对胚胎体外培养的发育影响较小。

2.2 不同发育时期的转基因兔胚中 SMTPGH 基因滞留情况

对不同发育阶段转基因兔胚中 SMTPGH 基因检测结果见表 2 和图 3。8 细胞期之前, 外源基因在胚胎中没有丢失, 滞留率为 100%; 到桑椹胚期在有些胚胎中已测不到外源基因, 滞留率为 43%; 发育到囊胚期时仅有少数胚胎带有外源基因, 滞留率为 18%。Brinster 曾对注射后 24 小时的外源基因行为进行了研究^[1], 发现导入的基因量在 24 小时内无变化; 也有报道认为外源基因在受体中迅速丢失^[2]。本研究发现随着胚龄的增加, 外源基因有逐渐丢失的现象, 滞留率变小。一般认为外源基因在胚胎发育过程中不被整合则被慢慢丢失, 也就是说越到胚胎发育的后期滞留率越接近于整合率。有资料表明外源基因的整合发生在 1 细胞期, 而且仅在一个整合位点发生一次^[13]; 但由于嵌合体的存在, 这说明整合也可能发生在 1 细胞期之后。我们的研究表明, 若在囊胚期外源基因仍有滞留则说明其已经整合或即将整合。因此将这种胚胎移植到假孕动物, 其子代的外源基因整合率一定很高。所以早期转基因胚的体外培养及其外源基因滞留的研究, 在今后以转基因技术改造动物品种的实践中有一定的理论指导意义。

表 2 不同发育时期 SMTPGH 基因在体外培养兔胚胎中的存留结果

Table 2 During developmental stage the retention of SMTPGH gene in rabbit embryos cultured *in vitro*

Embryonic stages	Number of embryos injected gene	Developmental rate	Number of detected embryos	Retention rate of gene
1-Cell	10	10 (100%)	7	7 (100%)
2-Cell	10	10 (100%)	7	7 (100%)
3-Cell	10	10 (100%)	7	7 (100%)
MORULA	8	7 (87.5%)	7	3 (43%)
Blastocyst	20	16 (80%)	16	3 (18%)

参 考 文 献

- [1] Brinster E L. Proc Nat Acad Sci USA, 1985, 82 : 4438-4447.
- [2] Gordon J W *et al.* Proc Nat Acad Sci USA, 1980, 77 : 7380-7384.
- [3] Peterson M G *et al.* Eur J Biochem, 1988, 174: 417-424.
- [4] 寇 蔻等. 生物工程学报, 1991, 7 (2): 120-123.
- [5] Saiki R K *et al.* Science, 1988, 239 : 487-491.
- [6] Boehringer Mannheim Biochemica, 1991, 2 : 5-7.
- [7] 范必勤等: 中国养兔杂志, 1986, 1: 25-30.
- [8] Li H *et al.* Nature, 1988, 335 : 414-417.
- [9] Brister R L *et al.* J Reprod Fert, 1970, 21 : 17-22.
- [10] Kane M T *et al.* Biology of Reprod, 1970, 2 : 245-250.
- [11] Kane M T. J Reprod Fert, 1977, 49 : 261-266.
- [12] Moore N W *et al.* J Reprod Fert, 1986, 17 : 527.
- [13] Gordon J W *et al.* Dev Biol, 1986, 4 : 10-12.
- [14] Laoy E *et al.* Cell, 1983, 34 : 343-358.

Study on the Culture of Early Transgenic Rabbit Embryos *in vitro* and the Retention of Foreign Gene

Chen Qingxuan Liu Lei Song Dexiu

(*Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Fan Biqin Wang Bin

(*Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014*)

Abstract We studied the culture of early transgenic rabbit embryos containing the SMTPGH gene with different medium. The retention of foreign gene in the embryo was detected with PCR and nonradioactive labeling method. The early transgenic rabbit embryos can develop into blastocyst stages with 75% of developmental rate in the cultural medium of Tc199+10%FCS. There were not any apparent changes found before 8-cell stage. After 8-cell stage, the foreign gene either was integrated on chromosomes or was lost gradually. But finally, the retention rate of foreign gene should be equal to the integration rate of the gene.

Key words Rabbit transgenic embryo; SMTPGH gene; culture *in vitro*