

脂质体介导鸡精子与外源 DNA 的结合

刘红林¹ 陈宜峰¹ 姜志华² 丁波² 黄月英²

(南京师范大学生物系 南京 210097)

(南京农业大学动物科学系 南京 210095)²

精子充当外源 DNA 的载体提出了一条新的基因转移途径。由于这个构想方法学非常简单,利用人工授精程序就可以生产转基因动物,因而引起人们广泛的注意^[1]。精子载体法一出现就引发了一场争论,对于这种方法的可行性人们仍持谨慎态度^[2~3]。精子在与外源 DNA 混合培养后 DNA 能否进入精子的内部,这是精子载体法是否可行的关键。本文应用 Southern 杂交技术分析精子与外源 DNA 的相互作用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

Lipofectin 购自美国 Gibco 公司,核酸酶 I 购自华美公司;Ptktpa 质粒(环状,10.6kb)由德国 Rottmann 博士赠送;地高辛试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒的转化,提取,纯化及标记:Ptktpa 质粒转化 HB101 菌株,碱裂解法提取质粒并用电透析法纯化提取的质粒^[4]。质粒在用 Pst I 消化后按试剂盒说明进行地高辛标记。

1.2.2 脂质体-DNA 复合体的制备:各取 30 μ g Lipofectin, 20 μ g Ptktpa 质粒分别用 200 μ l PBS 缓冲液稀释,混匀质粒和脂质体,室温孵育 15min 以形成脂质体-DNA 复合体。

1.2.3 精子与 DNA 共孵育:人工采集鸡射出精子(活力 0.95 以上),用 2ml 新鲜 PBS 液 800g 离心清洗两次,调整精子密度为 10⁸/ml。取上述精子悬液 0.6ml 加入 0.4ml 脂质体-DNA 混和液或加入 0.4ml 含 50 μ g/ml 质粒的 PBS 液,37 $^{\circ}$ C 孵育 3h。离心清洗 3 次,稀释成终体积 2ml。取 1ml 用于提取精子 DNA,另 1ml 用核酸酶 I(100 μ g/ml)37 $^{\circ}$ C 消化 1h,离心清洗 3 次,提取精子 DNA。在速冻致死精子的试验中,精子与 DNA 混和前,-70 $^{\circ}$ C 反复冷冻-解冻精子悬液杀死精子。

1.2.4 精子 DNA 的提取:精子经 PBS 液清洗后溶解于 500 μ l 1 \times SET 缓冲液中加入蛋白酶 K 至终浓度为 100 μ g/ml,SDS 至终浓度 2%,DTT 至终浓度 39mmol/L,55 $^{\circ}$ C 下保温 5h。用酚抽提两次,酚/氯仿,氯仿各提一次,用无水乙醇沉淀 DNA,洗涤,干燥后溶解于 TE 中。

1.2.5 Southern 杂交检测:精子 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶 40V 电泳 7~8h,然后将 DNA 转移至尼龙膜杂交,显色^[4]。

2 结果

鸡精子在与环状质粒共孵育后,DNA 能够和精子相结合,这种结合不能为多次清洗全部去除,而且冷冻致死的精子也具有与外源 DNA 相结合的能力,但用核酸酶 I 消化处理后,从精子提取的 DNA 中不

能检测到外源 DNA 的存在信号。脂质体与 DNA 形成复合体后可部分保护 DNA 免受核酸酶 I 的降解作用,但并不能促进 DNA 进入精子的内部,至少是并不能使精子内部含有 Southern 技术能够检测到的外源 DNA 量。精子在与外源 DNA 以及脂质体-DNA 复合体孵育后活力未受影响。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

图 1 Southern 检测鸡精子与外源 DNA 的结合

- 1 质粒 DNA(2ng)
- 2~4 精子与质粒混合培养后,经 3 次清洗提取的 DNA
- 5 精子与质粒混合培养后最后 1 次清洗的上清液
- 6 精子与质粒混合培养并用核酸酶消化后提取的 DNA
- 7 冷冻致死精子与质粒混合培养后,经 3 次清洗提取的 DNA
- 8 死精子与质粒混合培养后最后 1 次清洗的上清液
- 9 死精子与质粒混合培养并用核酸酶消化后提取的 DNA
- 10 质粒 DNA(1ng)
- 11 质粒与 Lipofectin 混合液经核酸酶消化后提取的质粒 DNA
- 12 精子与 Lipid-DNA 复合体培养并 3 次清洗提取的 DNA
- 13 精子与 Lipid-DNA 复合体培养后最后 1 次清洗的上清液
- 14 精子与 Lipid-DNA 复合体混合培养并用核酸酶消化后提取的 DNA
- 15 阴性对照(未经处理精子的基因组 DNA)

3 讨 论

已有研究认为精子具有摄取外源 DNA 的能力^[5~7]。高分辨的电子显微放射性自显影和荧光原位杂交证明,多次清洗以及用核酸酶消化只能去除部分与精子相结合的 DNA,这表明至少有一部分 DNA 进入了精子的内部。然而 Rottmann 等^[8]研究发现,在无脂质体介导的情况下,鸡精子与 DNA 共培养后,DNA 只是吸附在精子的表面,不能进入精子内部,本研究与该结果一致。

Lipofectin 为一种阳离子脂类,能够自发地与 DNA 形成复合体,这种复合体能够容易地与细胞膜融合从而进入细胞内部^[9]。有报道认为,在脂质体介导的条件下,外源 DNA 能够进入精子的头部^{[8][10]}。然而本研究发现脂质体的介导,未能有效地促进 DNA 进入鸡精子的内部。Nakinishi 等(1993)^[11]采用荧光原位杂交研究发现,鸡精子与外源 DNA 混合培养后只有 6.3% 的精子结合有外源 DNA,脂质体介导后比率增加至 51.6%。地高辛标记的 Southern 杂交技术灵敏度可达到 1pg,本研究如果有百分之一的精子含有一个拷贝的外源质粒 DNA 就可以检测出阳性信号。

参 考 文 献

- [1] Birnstiel M L, Busslinger M. *Cell*, 1989, **57**:701~702.
- [2] Lavitrano M, Camaion A, Fazio V M *et al.* *Cell*, 1989, **57**:717~723.
- [3] Brinster R L, Sandgrin E P, Behringer R R *et al.* *Cell*, 1989, **59**:239~241.
- [4] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *molecular clone. A L aboratory Manual*, 1982.
- [5] Brackett B G, Baranska W, Sawick W *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, **68**:353~357.
- [6] Camaioni A, Russo M A, Odorisi T *et al.* *J Reprod Fertil*, 1992, **96**: 203~212.
- [7] Castro F O, Hernandez O, Uliver C *et al.* *Theriogenology*, 1990, **34**:1099~1110.
- [8] Rottmann O J, Antes R, Hofer P *et al.* *J Anim Breed Genet*, 1992, **109**: 64~70.
- [9] Felgner P L, Gadek T R, Holm M *et al.* *Proc natl Acad Sci USA*, 1981, **84**:7413~7417.
- [10] Bachiller D, Schellander K, Peli J *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1991, **30**: 194~200.
- [11] Nakanishi A, Iritani A. *Mol Reprod Dev*, 1993, **36**:258~261.

Association of Exogenous DNA with Chicken Spermatozoa Mediated by Lipofectin

Liu Honglin¹ Chen Yifeng¹ Jiang Zhihua² Ding Bo² Huang Yueying²

(*Department of Biology Nanjing Normal University, Nanjing 210097*)¹

(*Department of Animal Science Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095*)²

Abstract Exogenous DNA can associate with mature chicken sperm cells either in the presence or in the absence of lipofectin during their incubation period. Several washs could not remove all DNA bound at the surface of the sperm cells, but no positive signals could be detected using Southern blot after DNase I treatment. We also found there were exogenous DNA on the surface of dead sperm cells killed by cold-shocking.

Key words Lipofectin, Southern blot