

利用精子介导法建立 *hHT/hDAF* 双基因转移小鼠模型

郭战军¹, 马毅², 李三华³, 韩瑞发¹, 李胜芝¹, 孙光¹,
乔宝民¹, 马腾骧¹, 陈永福⁴

(1. 天津市泌尿外科研究所, 天津 300211; 2. 天津市奶牛发展中心, 天津 300384;
3. 遵义医学院 中心实验室, 贵州 遵义 563003; 4. 中国农业大学 生物学院, 北京 100094)

摘要: 为探讨超急排斥反应(Hyperacute rejection, HAR)及延迟性异种排斥反应(Delayed xenograft rejection, DXR)的分子调控机制, 采用优化的精子介导法(Sperm-mediated gene transfer, SMGT)对建立 *hHT/hDAF* 双基因转移小鼠模型进行了研究。结果表明, 应用树枝状聚合物(Dendrimers)优化 SMGT 后, 2 细胞胚 GFP + RFP 的阳性率达到 4.51%, 同对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。选取标记基因 GFP + RFP 双阳性的胚胎进行移植后获得 36 只小鼠, PCR 及 Southern Blot 检测结果表明, 17 只小鼠 PCR 结果呈 *hHT* + *hDAF* 双阳性, 其中 5 只小鼠 Southern Blot 结果呈 *hHT* + *hDAF* 双阳性。上述结果表明, 成功建立了 *Hht/hDAF* 双基因转移小鼠模型。

关键词: 精子介导法; 双基因; *hHT*; *hDAF*; 转基因; 小鼠

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)03-0043-04

Establishment of Double-gene Transgenic Mouse Model for *hHT* and *hDAF* through SMGT

GUO Zhan-jun¹, MA Yi², LI San-hua³, HAN Rui-fa¹, LI Sheng-zhi¹, SUN Guang¹,
QIAO Bao-min¹, MA Teng-xiang¹, CHEN Yong-fu⁴

(1. Tianjin Institute of Urological Surgery, Tianjin 300211, China; 2. Tianjin Dairy Cattle Development Center, Tianjin 300384, China; 3. Central Lab of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China;
4. College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: To explore the molecular mechanism of hyperacute rejection (HAR) and delayed xenograft rejection (DXR), double-gene transgenic mouse model expressing Human $\alpha 1$ -2-fucosyltransferase (*hHT*) and human-decay accelerating factor (*hDAF*) was established using sperm-mediated gene transfer optimized by dendrimers (SMGT). The positive rate of PCR for GFP + RFP in 2-cell embryos was 4.51% after the SMGT was optimized, which was significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$). Embryos expressing both GFP and RFP were got were transplanted to the pseudopregnant female mice. 36 offspring were got. The founder transgenic mice (G_0 mice) were identified with PCR and southern blot. The results of PCR showed that genomes from 17 mice were integrated by both *hHT* and *hDAF*. The results of southern blot for 5 mice showed a positive signal of *hHT* + *hDAF*. These results indicated that G_0 double-gene transgenic mouse model for *hHT* and *hDAF* was established.

Key words: SMGT; Double-gene; *hHT*; *hDAF*; Transgenic; Mouse

异种器官移植是当前生物学研究热点, 具有重要应用前景。异种器官移植成功的主要障碍是超急排斥反应(Hyperacute rejection, HAR)和延迟性异种

排斥反应(Delayed xenograft rejection, DXR)^[1, 2]。排斥反应涉及异种抗原、抗体、补体和血管内皮细胞等多个环节, 针对不同环节进行调节可以从不同角度

收稿日期: 2009-12-09

基金项目: 天津市自然科学基金(07JCYBJC10700; 08JCYBJC04500); 贵州省科学技术基金([2009]2173)

作者简介: 郭战军(1971-), 男, 山东淄博人, 主治医师, 在读博士, 主要从事泌尿外科研究。

通讯作者: 乔宝民(1967-), 男, 天津人, 主任医师, 博士, 主要从事泌尿外科临床及异种移植基础研究。

抑制排斥反应。异种抗原主要是半乳糖 α -1 β 半乳糖 (α -Gal)。人 α -1 β 岩藻糖苷转移酶 (hHT) 是 α -1 β GT 强有力竞争性抑制酶, 将其转入动物体内, 可使 Gal 表达显著降低。转 hHT 基因猪可抑制 HAR, 并在一定程度上抑制 DXR, 还可能削弱细胞介导的排斥反应^[3]。人衰变加速因子 (hDAF) 是一种人补体调节蛋白 (CRPs), 转 CRPs 基因猪可以较好地抑制 HAR 的发生, 也有助于抑制 DXR^[4]。为探讨联合 hHT 和 hDAF 基因对异种移植排斥反应的抑制作用, 需要建立 hHT + hDAF 双基因转移小鼠模型。

精子介导法 (Sperm-mediated gene transfer, SMGT) 是制备转基因动物的重要方法, 具有操作简单、高效和适用广泛等优点^[5], 该技术由意大利科学家创建^[6]。目前, SMGT 已被多家实验室在包括牛、羊、猪、兔、鼠、鸡、鱼、蛙、蜂、蚕等多种动物上被证实^[7-9]。然而, 精子介导转基因方法仍然不成熟、不稳定, 重复性较低。我们采用新型纳米材料—树枝状聚合物 (Dendrimers) 对精子介导法进行了优化, 并应用该方法制备 hHT/hDAF 双基因转移小鼠模型, 为进一步开展异种器官移植奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

克隆有 hHT 基因 cDNA 全序列的真核表达载体 pEGFP-C1-hHT, 克隆有 hDAF 基因 cDNA 序列的真核表达载体 pDsRed2-C1-hDAF 均由本实验室冻存。限制性核酸内切酶购于大连 TaKaRa 生物公司。化学发光 Southern Blot 试剂盒购自北京中杉生物技术公司。昆明白小鼠购自协和医科大学。树形高分子材料 (Dendrimer) 由天津大学化工学院合成并提供。

1.2 方法

1.2.1 DNA 与 Dendrimers 的包装 将 3 μ g DNA (pEGFP-C1-hHT 与 pDsRed2-C1-hDAF 等比例) 和 2.4 μ L Dendrimers 分别以 50 μ L 受精液 (TYH) 稀释, 然后将二者混合, 静置 5 ~ 10 min, 再加入 100 μ L TYH, 以此混合液做成获能液滴, 以矿物油覆盖, 放在 CO₂ 培养箱中平衡备用。对照组获能液滴中不加入 Dendrimers。

1.2.2 精液采集与孵育 成熟雄性昆明白小鼠, 采精前 1 周与雌鼠 1:1 交配, 颈椎脱臼法处死小鼠, 取出附睾, 用镊子挤压附睾尾部, 使精子释放到预先平衡于 CO₂ 培养箱中的获能液中, 待精子自行扩散后, 离心洗涤 3 次, 以少量获能液重悬精子, 然后加入到预先平衡的、含有 DNA 和 Dendrimers 的获能液

滴中, 放到 CO₂ 培养箱中获能孵育 1.5 ~ 2 h。

1.2.3 卵子采集与体外受精 对 4 ~ 6 周龄昆明白雌鼠腹腔内注射 10 IU 孕马血清促性腺激素 (PMSG), 48 h 后注射人绒毛膜促性腺激素 (HCG, 宁波激素厂), 14 h 后处死小鼠, 从离体输卵管内回收成熟卵母细胞。收集到的卵母细胞在获能液中洗涤 3 次, 放到预先在 CO₂ 培养箱中平衡的受精液滴中 (每滴 50 μ L, 以矿物油覆盖), 每滴 20 枚卵子。从获能液滴中吸取 5 μ L 获能精子, 加入到含有卵子的受精液滴中, 使精子密度为 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个/mL。精子和卵子在 CO₂ 培养箱内共同孵育 5 ~ 6 h。

1.2.4 胚胎培养与荧光检测 将受精孵育 5 ~ 6 h 后的卵子取出, 转移到胚胎培养液 (KSOM) 中继续培养, 在第 2 天观察胚胎卵裂情况, 并在随后几天观察胚胎发育情况。在荧光显微镜下以蓝色荧光 (激发波长 488 nm) 和绿色荧光 (激发波长 530 nm) 分别照射胚胎, 观察胚胎是否表达绿色荧光蛋白 GFP 和红色荧光蛋白 RFP。

1.2.5 胚胎移植 将结扎公鼠与雌鼠交配获得假孕小鼠作为受体。把 GFP 与 RFP 同时表达的胚胎移植到受体输卵管中, 妊娠小鼠在约第 20 天分娩。

1.2.6 G₀ 小鼠的 PCR 检测 以出生后 1 月龄仔鼠的基因组 DNA 为模板, 分别 PCR 扩增 hHT 与 hDAF 基因。根据 GenBank 中 hHT 基因序列 (D82933.1), 应用 Primer 5.0 软件设计扩增引物 P1: 5'-AC-CCGCCCTTCCTTCTCCACCTT-3' 和引物 P2: 5'-TTAGTGCTTGAGTAAGGGGGACAGG-3', 反应体系 25 μ L, 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 50 s, 63 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。根据 hDAF 基因序列 (M31516.1) 设计扩增引物 P3: 5'-GTTCT-GCAATCGTAGCTGCCAGGT-3' 和引物 P4: 5'-CTA-AGTCAGCAAGCCCATGGTTACT-3', 反应体系 25 μ L, 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 45 s, 63 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.7 G₀ 小鼠的 Southern Blot 检测 对 PCR 结果呈阳性的 G₀ 小鼠进行 Southern Blot 检测。PCR 标记法制备探针, 以 pEGFP-C1-hHT 为模板时, 引物为 P5: 5'-CTGGCGATGGCATTGAGGGC-3' 和 P6: 5'-TCTGCGGCAATCCCTGTCCACT-3'。以 pEGFP-C1-hHT 为模板时, 引物为 P7: 5'-GCTGCGAGGTGC-CAACAA-3' 和 P8: 5'-GCACTCTGGCAACGGGTC-3'。取 10 ~ 12 μ g 基因组 DNA, 加 EcoRV 50 U, 制成 50 μ L 反应体系, 酶切过夜; 酶切体系上样于 0.8% 琼脂糖凝胶; 在 1 ~ 1.5 V/cm 电压下电泳 20 ~ 30 h

后,进行转膜;通过紫外铰链使 DNA 固定到膜上;膜预杂交以封闭非特异性结合;膜杂交 6 ~ 8 h;洗膜、压片,放射自显影;显影、定影后观察结果。

1.3 数据分析

试验结果以统计分析软件 SPSS V14.0 进行卡方检验。

2 结果与分析

2.1 转基因胚胎的制备

表 1 体外受精胚胎发育及 GFP 和 RFP 的表达情况

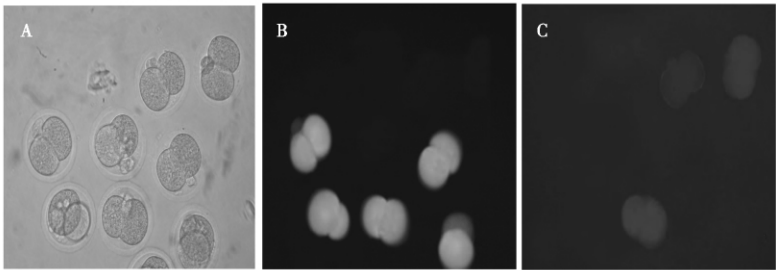
体外受精 卵子数 No. of oocyte for IVF		2 细胞胚 GFP、RFP 表达数 No. of 2-cell embryos expressing GFP or RFP				4 细胞胚数 No. of 4-cell embryos	囊胚数 No. of blastocyst
		2 细胞胚数 2-cell embryos	GFP 阳性数 GFP ⁺ embryos	RFP 阳性数 RFP ⁺ embryos	双阳性数 GFP ⁺ + RFP ⁺ embryos		
对照组 Control	1 553	1 324(85. 25%)	13(0. 98%)	9(0. 68%)	0(0%)	1 127(72. 60%)	801(51. 58%)
试验组 Experment	1 447	1 219(84. 24%)	104(8. 53%) **	101(8. 29%) **	55(4. 51%) **	1 065(73. 60%)	763(52. 73%)

注: * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$ 。

选取形态正常,发育良好的 GFP + RFP 双阳性胚胎进行移植。共移植受体鼠 9 只。总产仔数为

本研究以新型纳米材料——树枝状聚合物 (Dendrimers) 对精子介导法进行了优化。研究结果表明,在精子、DNA、Dendrimers 共同孵育后,囊胚发育率为 52. 73% ,同对照组相比差异不显著 ($P > 0. 05$) ,表明 Dendrimers 对精子受精能力及早期胚胎发育能力未造成显著伤害。但在孵育过程中增加 Dendrimers 后,GFP 和 RFP 阳性率远高于对照组,差异达极显著水平 ($P < 0. 01$) ,具体结果如表 1 所示。

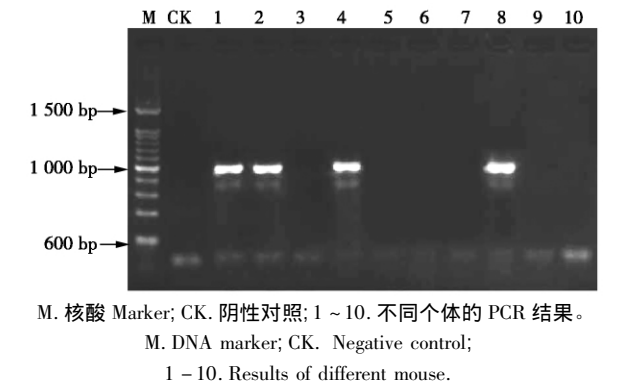
36 只,其中雌鼠 15 只,雄鼠 21 只。图 1 为在光视野及暗视野下观察到的胚胎。



A. 明视野下的胚胎; B. 暗视野下 GFP 表达的胚胎; C. 暗视野下 RFP 表达的胚胎。
A. Embryos in bright field; B. GFP⁺ embryos in dark field; C. RFP⁺ embryos in dark field.

图 1 GFP 和 RFP 在胚胎中的表达(200 ×)

Fig. 1 Expression of GFP and RFP in embryos(200 ×)



M. 核酸 Marker; CK. 阴性对照; 1 ~ 10. 不同个体的 PCR 结果。
M. DNA marker; CK. Negative control;
1 ~ 10. Results of different mouse.

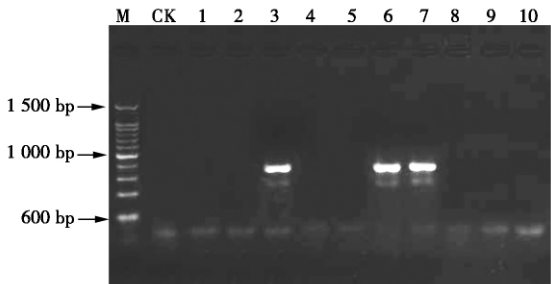
图 2 *G₀* 小鼠 *hHT* 的 PCR 检测

Fig. 2 Results of PCR for *hHT* in *G₀* mouse

2.2 *G₀* 小鼠的 PCR 检测

提取 *G₀* 小鼠的基因组 DNA ,用 PCR 初步检测具有转基因 *hHT* 与 *hDAF* 的阳性个体。*G₀* 有 36 个样品,其中 29 只小鼠检测到约 1 000 bp 的阳性条带(图 2) 27 只小鼠检测到约 900 bp 的阳性条带(图

3) ,17 只小鼠同时检测到上述条带。初步表明 *hHT* 与 *hDAF* 基因已整合入小鼠基因组中,其中 17 只呈 *hHT* + *hDAF* 双阳性。图 2、图 3 所示为 *G₀* 小鼠基因组的部分 PCR 检测结果。



M. 核酸 Marker; CK. 阴性对照; 1 ~ 10. 不同个体的 PCR 结果。
M. DNA marker; CK. Negative control;
1 ~ 10. Results of different mouse.

图 3 *G₀* 小鼠 *hDAF* 的 PCR 检测

Fig. 3 Results of PCR for *hDAF* in *G₀* mouse

2.3 G₀ 小鼠的 Southern Blot 检测

对 G₀ 小鼠经过 PCR 初步检测后,对 *hHT* + *hDAF* 双阳性小鼠进行 Southern Blot 检测。结果 5 只小鼠出现 *hHT* + *hDAF* 杂交带,进一步表明 *hHT* 与 *hDAF* 基因已同时整合入小鼠基因组中,建立了 *hHT* + *hDAF* 双基因转移小鼠模型。图 4、图 5 所示为 G₀ 小鼠基因组的部分 Southern Blot 检测结果。

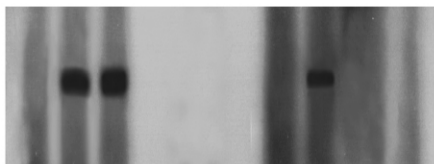


图 4 G₀ 小鼠 *hHT* 的 Southern Blot 检测

Fig. 4 Results of Southern Blot for *hHT* in G₀ mouse

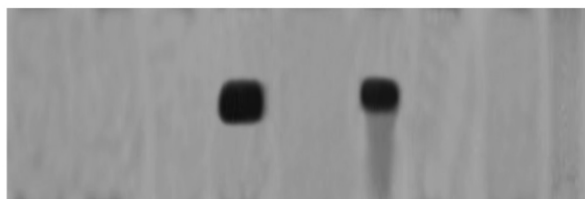


图 5 G₀ 小鼠 *hDAF* 的 Southern Blot 检测

Fig. 5 Results of Southern Blot for *hDAF* in G₀ mouse

3 讨论

自 1989 年意大利学者 Lavitrano 首次报道以精子作载体生产转基因动物以来,精子介导基因转移技术(Sperm mediated-gene transfer, SMGT)已得到广泛认可^[6-10]。为了提高该方法的转基因效率,研究者对精子结合外源 DNA 的影响因素及作用机制进行了大量探索,许多提高精子结合外源 DNA 能力的有效途径也应运而生^[11]。

近年来,在基因治疗领域将一种新型纳米材料——树枝状聚合物(Dendrimers)应用于基因转移^[12,13]。Dendrimers 与 DNA 分子相互接触形成复合物,Dendrimers-DNA 复合物通过其表面所携带的正电荷阳离子,与细胞膜表面带有负电荷的糖蛋白及磷脂结合而进入细胞^[14]。基因治疗同动物转基因技术的原理相似,这提示 Dendrimers 可以提高精子介导的转基因效率,有助于外源基因在精子细胞的稳定整合。在前期工作中,将 *hHT* cDNA 与猪精子共孵育后,发现 Dendrimers 可以提高 *hHT* cDNA 进入精子内的效率 70% 以上^[15],这一结果初步证实了上述推断。该试验中,应用 Dendrimers 改进了精子介导法。在精子/DNA 共孵育体系中添加 Dendrimers 后,其 GFP/RFP 阳性胚胎均显著增加。同时,其胚胎发育率同对照相比差异不显著,表明 Dendrimers 可显著提高基因转移效率,而且不影响

胚胎发育能力。

异种器官移植给人体后,首先引起超急排斥反应(HAR),渡过 HAR 后即出现延迟性异种排斥反应(DXR)^[1,2]。目前认为,从多个环节干预异种移植排斥反应才有可能使动物器官应用于临床。本研究采用精子介导法将 α -1,2 岩藻糖苷转移酶基因(*hHT*)、人衰老加速因子基因(*hDAF*)导入到小鼠基因组中,获得了 G₀ 小鼠,对 G₀ 小鼠进行了分子遗传学检测,其中 5 只为 *hHT* + *hDAF* 双基因转移阳性。表明成功建立了 *hHT/hDAF* 双基因转移小鼠模型,这将为进一步阐明 HAR 及 DXR 的机制,提高异种器官移植的成功率奠定基础。

参考文献:

- [1] Li S, Waer M, Billiau A D. Xenotransplantation: role of natural immunity [J]. *Transpl Immunol* 2009 21(2): 70-74.
- [2] Ekser B, Rigotti P, Gridelli B *et al.* Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model [J]. *Transpl Immunol* 2009 21(2): 87-92.
- [3] Ramsoondar J J, Machty Z, Costa C *et al.* Production of α 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human α 1,2-fucosyltransferase [J]. *Biol Reprod* 2003 69(2): 437-445.
- [4] Chen R H, Naficy S, Logan J S *et al.* Hearts from transgenic pigs constructed with CD59/DAF genomic clones demonstrate improved survival in primates [J]. *Xenotransplantation* 1999 6(3): 194-200.
- [5] Webster N L, Forni M, Bacci M L *et al.* Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer [J]. *Mol Reprod Dev* 2005 72: 68-76.
- [6] Lavitrano M, Camaioni A, Fazio V M *et al.* Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice [J]. *Cell* 1989 57(5): 717-723.
- [7] Lavitrano M, Forni M, Bacci M L *et al.* Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake [J]. *Mol Reprod Dev* 2003 64: 284-291.
- [8] Smith K S, Spadafora C. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications [J]. *Bioessays* 2005 27(5): 551-562.
- [9] Carballada R, Esponda P. Regulation of foreign DNA uptake by mouse spermatozoa [J]. *Exp Cell Res* 2001 262(1): 104-113.
- [10] Lavitrano M, French D, Zani M *et al.* The interaction between exogenous DNA and sperm cells [J]. *Mol Reprod Dev* 1992 31(3): 161-169.
- [11] Wall R J. New gene transfer methods [J]. *Theriogenology* 2002 57(1): 189-201.
- [12] 郭晨莹, 王恒, 鞠亚晖, 等. 应用 PAMAM dendrimers 作为 DNA 运送载体的体外研究 [J]. *生物化学与生物物理进展* 2004 31(9): 804-811.
- [13] Fu H L, Cheng S X, Zhang X Z *et al.* Dendrimer/DNA complexes encapsulated functional biodegradable polymer for substrate-mediated gene delivery [J]. *J Gene Med* 2008 10(12): 1334-1342.
- [14] Kaneshiro T L, Lu Z R. Targeted intracellular codelivery of chemotherapeutics and nucleic acid with a well-defined dendrimer-based nanoglobular carrier [J]. *Biomaterials* 2009 30(29): 5660-5666.
- [15] 杨惠祥. 以生殖细胞为外源基因载体建立异种器官移植转基因动物供体动物的研究 [D]. 天津: 天津医科大学 2007.