

研究快报

带有猪生长激素基因的转基因鼠

陈清轩 刘 雷 曹 颀 宋德秀

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

关键词 猪生长激素基因, PCR, 转基因鼠

为研究外源基因在转基因动物中的整合及表达调控的机制, 我们首先进行了转基因鼠的研究。(a) 外源基因片段的制备: 把羊金属硫蛋白启动基因 (SMT) 和猪生长激素基因 (PGH) 与载体质粒 pUC19 相连接, 构建成 pSMTPGH 表达质粒^[1]。用 BglII 全酶切和 PstI 部分酶切; 从低融点胶电泳回收含有完整的 SMT 和 PGH 基因的片段作为外源基因 (2.7kb)。(b) 受精鼠卵的收集^[2]: 选择 30g 左右的供体雌鼠 16:00 时腹腔注射 PMSG 8IU, 第 3 天 16:00 腹腔注射 HCG 25IU; 并立即进行交配。检查有阴道栓的供体雌鼠于当天下午 2:00 时处死, 冲卵收集 (此时为原核胚期)。(c) 外源基因的导入: 在显微操作仪上将 400—1000 拷贝基因片段注射进原核胚的雄核中; 然后将该胚移植到假孕鼠的输卵管中, 经 18—21d 转基因鼠出生。(d) 转基因鼠的鉴定: 小鼠出生 2—3d 剪取 3mm 尾组织, 消化后提取 DNA 作为模板。在比较猪和小鼠生长激素基因同源性的基础上, 将引物选择在编码区, 既可以检测 PGH 基因在转基因动物中的整合情况, 又可以检测外源基因在转基因动物中的表达情况^[3]。以人工合成的 5' CATCACTGCGCA-AGTTTGTG 3' 和 5' AGCCTATTTGCCA-ACGCC 3' 为引物, 用 PCR 系统扩增。在 100 μ l 体系中顺序加入灭菌超纯水, 10 $\times$ 缓冲液 (Tris-HCl 100 mmol/L, pH8.3, MgCl₂ 25 mmol/L, KCl 500 mmol/L), dNTPs (每种

200 μ mol/L), 引物, 从组织中提取的总 DNA 约 1 μ g, 再加入 60 μ l 石蜡油, 于 95 $^{\circ}$ C 变性 10min, 加入 Taq 酶后进入循环。93 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1.5min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 共 30 个循环; 循环结束后在 72 $^{\circ}$ C 保温 7min。然后用等体积的氯仿/异戊醇抽提扩增物, 取上清 20 μ l 于 0.8% 琼脂糖电泳检查扩增结果。以 EcoRI 和 SmaI 双酶切 pSMTPGH 质粒, 回收 940bp 片段作为探针, 进行斑点印迹和 DNA 印迹鉴定。图 1 为 PCR 检测猪生长激素基因在小鼠中的整合结果。第 7 号新生小鼠呈阳性反应。

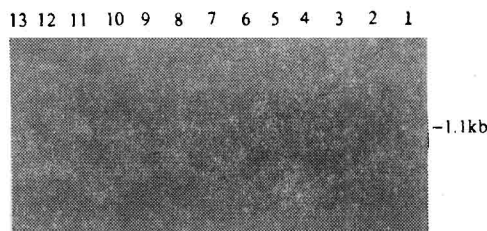


图 1 PCR 检测猪生长激素基因在小鼠中的整合结果

- 1—10: 导入外源基因的新生小鼠;
11: 阳性对照 (从猪肝组织提取的 DNA)
12: DNA 分子量标准 (DNA marker III, 即 λ DNA 用 EcoRI 和 HindIII 双酶酶切的 DNA 片段);
13: 阴性对照 (从非转基因鼠尾组织中提取的 DNA)

本研究结果如表 1 所示。30 日龄整合有 SMTPGH 基因的小鼠体重为 30g, 而未整合的小鼠体重仅为 20 ± 2.4 g。很明显 SMTPGH 基因有促进转基因小鼠生长的作用。

表 1 导入 SMTPGH 基因获得转基因小鼠结果

受体号	DNA 浓度 ng/ μ l	受 体	胚 期	移入胚数		产仔数	整合仔数
				左输卵管	右输卵管		
1	1.0	假 孕	原 核	15	14	8 ¹⁾	1
2	1.0	假 孕	原 核	9	0	0	—
			2-细胞	0	10		
3	1.0	发情小鼠注射 LH ²⁾	原 核	8	10	0	—
4	1.0	发情小鼠注射 LH ²⁾	原 核	12	9	0	—
5	1.0	假 孕	原 核	13	12	0	—
6	1.0	假 孕	原 核	16	16	5	0
7	1.0	假 孕	原 核	15	15	5	1
8	0.5	假 孕	原 核	11	12	0	—
总 计				197		18	2

妊娠率 37.5%(3/8) 出生率 9.1%(18/197) 整合率 11.1%(2/18)

1) 出生一天后,母鼠死亡

2) LH: 促黄体素

2 范必勤等. 中国养兔杂志, 1986; 1: 25

3 Erlich H A. PCR Technology. Stockton Press, 198

参 考 文 献

1 寇寇等. 生物工程学报, 1991; 7(2): 120

用磁性分离 RNA 直接进行逆转录 PCR

王 升 启 马 立 人

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

关键词 RT-PCR, 登革热病毒, 亲和素-磁性球

逆转录 PCR(RT-PCR) 技术是将提取的 RNA 先逆转录为 cDNA, 然后再对该 cDNA 进行 PCR 扩增。该技术不仅可用于各种内源及外源性正常及异常 RNA 的分析或检测, 而且还常用于 cDNA 文库的构建及特定基因的制备。RT-PCR 所用 RNA 模板一般是未经纯化的总 RNA, 若 RNA 模板含量较低便难以检出, 增加扩增次数虽然可以提高灵敏度但同时也增加了错误掺入的几率^[1], 最近建立的 RNA 磁性分离技术^[2] 解决了从大体积复杂材料中富集或分离特定 RNA 的问题, 在此基础上我们又发展了一种用磁性分离 RNA 直接进行 RT-PCR 的新技术, 该技术集 RNA 纯化、逆转录及 PCR 于一体, 不仅解决 RNA 模板

的富集问题而且操作简便——所有操作可在一个管内进行。

该技术包括以下三步关键操作:

a. 靶 RNA 的磁性分离^[2-3] 将 5'-生物素化的靶 RNA 特异寡核苷酸探针 (最好是待扩增片段的下游引物) 与总 RNA 中的靶 RNA 杂交并用链亲和素-磁性球 (SA-PMPs, Promega) 捕获该杂交体, 低盐缓冲液洗去未结合的非特异 RNA 等杂质即得亲和素-磁性球结合的靶 RNA。

b. 靶 RNA 的逆转录 以上述结合于亲和素磁性球上的靶 RNA 为模板并补加 PCR

收稿日期: 1992-01-31

修回日期: 1992-03-03