

小鼠精子形成各阶段转基因效率的研究*

张鑫^{1, 2)} 苗向阳^{1)**} 尹逊河²⁾ 马艳芳²⁾ 曲朝杰^{1, 2)} 张秋婷¹⁾

(¹⁾中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094; ²⁾山东农业大学动物科技学院, 泰安 2710181)

摘要 在过去的近 30 年中, 转基因技术在哺乳动物基因表达方面研究的应用已经成为实验生物学及应用生物学领域最为显著的进展之一. 传统的制作转基因动物方法有显微注射法、逆转录病毒感染法和胚胎干细胞法等, 但每种方法都有其缺陷, 限制了其在今后转基因动物研究中的广泛应用. 对小鼠体内生殖细胞进行外源基因转染, 研究精子形成过程中制作转基因小鼠的效率. 首先运用睾丸注射法将被脂质体包裹的绿色荧光蛋白表达载体(pIRES2-EGFP)注射到小鼠睾丸及附睾内, 然后根据精子形成的不同阶段, 分别于注射后 7、16、30 和 42 天与发情母鼠合笼, 利用 PCR 和 DNA 印迹方法对新生小鼠进行基因组 DNA 检测. 在各阶段所得新生小鼠中 PCR 阳性率分别为 6.82%、0、56.86%和 42.86%, DNA 印迹检测阳性率分别为 6.82%、0、47.06%、34.69%. 经活体荧光成像系统及荧光显微镜分析, 转基因小鼠呈现绿色荧光表达. 通过比较精子生成各阶段转基因效率高低, 为以后通过用睾丸内注射法转染雄性生殖细胞高效制作转基因动物提供了理论依据.

关键词 精子形成, 睾丸注射, 转基因鼠

学科分类号 Q819

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00839

动物转基因技术是人为地将外源基因导入动物基因组, 以获得携带外源基因的动物, 从而达到对动物进行遗传修饰的一套技术的集合. 自从 1980 年 Gordon 等^[1]利用显微注射法建立转基因小鼠以来, 该技术在分子生物学、分子遗传学、分子免疫学、肿瘤工程学、医学及畜牧学等研究领域显现出无限广阔的应用前景^[2]. 其中利用动物转基因技术进行动物新品种的培育以及通过建立转基因动物制作生物反应器是目前各国关注的热点. 传统的动物转基因方法主要有 DNA 显微注射法、逆转录病毒感染法及胚胎干细胞法等, 但是, 目前利用这些方法制作转基因动物的效率都还很低, 且实验设备昂贵, 操作复杂, 从而导致生产成本过高^[3~5]. 因此, 研究人员一直在努力探索一种简便易行、经济实用而又高效的转基因方法.

通过转染雄性生殖细胞进行转基因动物的研究是近年来新兴的一种方法, 由于其简便、高效, 已越来越多地受到人们的关注. 1989 年意大利 Lavitrano 等^[6]首先通过转染精子得到了转基因小鼠, 1994 年 Brinster 等^[7]则率先进行了通过转染精原干细胞的方法进行转基因动物的研究. 精子是精原干细胞分化而来, 经历了精原干细胞的自我复

制、精母细胞的减数分裂和精子细胞变态形成精子三个阶段^[8]. 从当前的热点看, 人们多致力于通过转染精原干细胞或精子制作转基因动物的研究, 而对于精子形成中各阶段转基因效率的研究还未见报道. 为此, 我们将增强型绿色荧光蛋白(EGFP)载体与脂质体混合后注射入小鼠睾丸中, 在小鼠精子发育的不同阶段分别与正常发情母鼠交配, 通过制作绿色荧光蛋白转基因小鼠, 观察精子发育各阶段的转染效率.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物. 昆明种小白鼠, 母鼠 6~8 周龄, 公鼠 8~10 周龄, 饲养在定期灭菌的控温鼠房中, 温度控制在 22℃, 自动光控(12 h 明/12 h 暗), 自

* 国家高技术研究发展计划(863)(2008AA10Z140), 国家自然科学基金(30571339), 中国农业科学院创新基金(2004-院-1)和中国农业科学院优秀科技创新团队资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62895663, E-mail: mxy32@sohu.com

收稿日期: 2008-12-07, 接受日期: 2009-02-24

由采食和饮水。所有小鼠和鼠粮均购于中国军事医学科学院实验动物中心。

1.1.2 试剂. 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 由本实验室保存; 绿色荧光表达载体 pIRES2-EGFP, 购自天泽(Tiandz)基因工程有限公司; Lipofectin2000 购自 Invitrogen 公司. 普通质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、无内毒素质粒大提试剂盒、动物组织 DNA 基因组提取试剂盒, 均购自天根生化科技(北京)有限公司; 地高辛标记和检测试剂盒购自 Roche 公司. 基因片段的合成及测序均由北京奥科生物技术有限责任公司完成。

1.2 方法

1.2.1 注射用 pIRES2-EGFP 基因的制备. 将 pIRES2-EGFP 基因转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 经卡那霉素筛选后, 进行大量培养, 所得菌液先用普通质粒小提试剂盒进行质粒小提, 经鉴定正确后, 再用无内毒素质粒大提试剂盒对质粒进行大量提取, 并用无菌 TE(10 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L EDTA, pH 7.5)稀释至 1 g/L, 分装后 -20℃ 保存备用。

1.2.2 体内转染液的配制. 体内转染液由 3 部分组成, 转染液 A: 10 μ l 脂质体+25 μ l 灭菌生理盐水; 转染液 B: 5 μ l 质粒 + 25 μ l 灭菌生理盐水; 转染液 C: 1%台盼蓝染液 5 μ l. 首先将转染液 A 加入转染液 B 中, 充分混合, 室温下作用 30 min 后, 加入转染液 C, 即可用于注射. 以上各转染液用量均为注射一只小鼠所需, 两侧睾丸各半。

1.2.3 雄性生殖细胞的体内转染. 将 5 只 8~10 周龄小鼠用 1%戊巴比妥(根据体重确定剂量, 30 mg/kg)麻醉后, 采用微创手术, 将部分新鲜配制的转染液用微量注射器缓慢注入附睾, 然后再分多点注入睾丸中, 直至整个睾丸实质绝大部分变蓝为止. 两侧睾丸均用同样的方法进行注射, 每只小鼠每侧睾丸大约需注射 35 μ l. 注射后各小鼠均单独饲养并分别于注射后 7、16、30 和 42 天与发

情母鼠合笼, 次日清晨检查阴道栓, 观察配种情况, 见栓者与小鼠隔离饲养, 待产仔后进行检测。

1.2.4 小鼠基因组 DNA 的提取及转基因小鼠的 PCR 检测. 按文献[9]所述方法, 提取小鼠尾基因组 DNA. 根据 pIRES2-EGFP 载体序列, 利用 Primer 5 软件在该载体上含 EGFP 基因部分设计合成了一对专用引物, 上游引物序列为: 5' AAAAC-ACGATGATAATATGGC 3', 下游引物序列为: 5' CTCTACAAATGTGGTATGGC 3'. 理论 PCR 产物大小为 795 bp. 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共计 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min, 1%琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.2.5 DNA 印迹检测. 首先对新构建质粒的 PCR 产物胶回收, 做随机引物标记, 并进行探针工作浓度的标定. 然后将 PCR 检测阳性的基因组 DNA 约 20 μ g, 用 *Hind* III 酶切, 37℃ 过夜, 0.8%琼脂糖凝胶电泳后, 采用文献[9]中所述方法对凝胶进行变性、中和、转膜, 最后的杂交及显色部分按照地高辛标记和检测试剂盒说明书进行。

1.2.6 转基因小鼠的观察. 选取 DNA 印迹检测阳性的小鼠, 用三溴乙醇麻醉后, 放入活体荧光成像系统的暗箱中进行拍照观察, 同时将小鼠直接置于荧光显微镜载物台上对其脚掌进行局部观察并拍照。

2 结 果

2.1 转基因小鼠的 PCR 检测

分别记录各试验鼠在不同阶段交配后出生的小鼠情况, 并将提取的尾基因组 DNA 进行 PCR 检测, 各试验鼠在注射后 7、16、30 和 42 天与发情母鼠交配所得仔鼠中平均 PCR 阳性率分别为 6.82%、0、56.86%和 42.86%。详细结果见表 1, 部分 PCR 结果如图 1。

Table 1 Results of PCR-Southern blot of the genomic DNA

Mating time	Produced number	Survival number	Positive number by PCR	Positive rate by PCR/%	Positive number by Southern blot	Positive rate by Southern blot/%
7 d	46	44	3	6.82	3	6.82
16 d	44	44	0	0	0	0
30 d	52	51	29	56.86	24	47.06
42 d	49	49	21	42.86	17	34.69

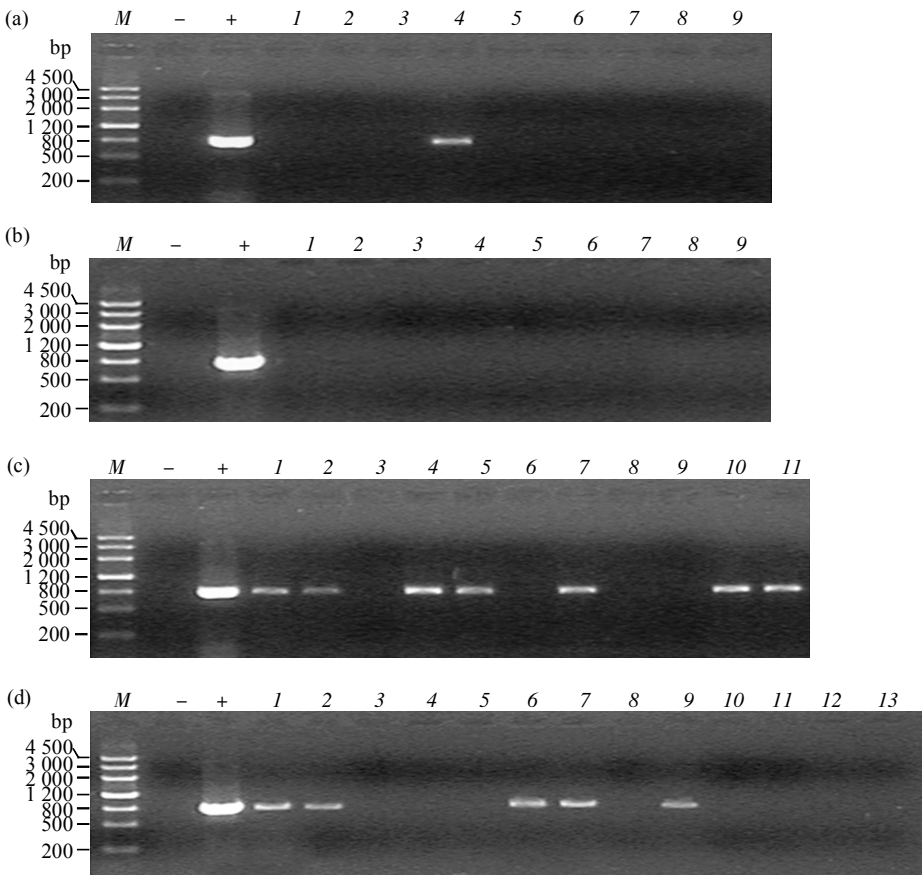


Fig. 1 PCR analysis of genomic DNA of offspring from mouse No.1

(a) Detection of offspring produced from intratesticular mice on 7th day. *M*: DNA marker; -: Negative control; +: pIRES2-EGFP plasmid; 1~3, 5~9: Negative sample of offspring; 4: Positive samples of offspring. (b) Detection of offspring produced from intratesticular mice on 16th day. *M*: DNA marker; -: Negative control; +: pIRES2-EGFP plasmid; 1~9: Negative sample of offspring. (c) Detection of offspring produced from intratesticular mice on 30th day. *M*: DNA marker; -: Negative control; +: pIRES2-EGFP plasmid; 1, 2, 4, 5, 7, 10, 11: Positive samples of offspring; 3, 6, 8, 9: Negative sample of offspring. (d) Detection of offspring produced from intratesticular mice on 42th day. *M*: DNA marker; -: Negative control; +: pIRES2-EGFP plasmid; 1, 2, 6, 7, 9: Positive samples of offspring; 3, 4, 5, 8, 10~13: Negative sample of offspring.

2.2 探针标记及 DNA 印迹检测

为进一步鉴定转基因鼠,排除 PCR 假阳性的可能,对 PCR 检测阳性的仔鼠基因组 DNA 进行 DNA 印迹检测,测得各试验鼠在注射后 7、16、30 和 42 天与发情母鼠交配后所得仔鼠中平均 DNA 印迹阳性率分别为 6.82%、0、47.06% 和 34.69%,详细结果见表 1,部分检测结果如图 2.

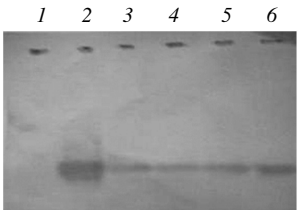


Fig. 2 Southern blot analysis for DNA of positive offspring

1: Negative control; 2: Positive control; 3~6: Positive samples.

2.3 转基因小鼠的荧光成像观察

将转基因小鼠用三溴乙醇麻醉后,放入活体荧光成像系统的暗箱内,使用 488 nm 波长蓝光激发,进行拍照观察.结果显示,转染 EGFP 基因的小鼠呈现绿色荧光(图 3a).同时将仔鼠直接置于荧光显微镜下,同样用蓝光激发对脚掌进行局部观察,结果可见清晰的绿色荧光(图 3b).

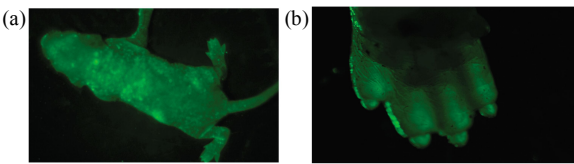


Fig. 3 Observation of transgenic mice(ten-day-old) in fluorescence imager

3 讨 论

哺乳动物精子的形成周期,即从精原干细胞发育到成熟精子所需要的时间,各物种间并不相同.小鼠的一个生精周期约为 35 天,其中精原干细胞的自我复制阶段持续 8 天,精母细胞的减数分裂持续 13 天,精子细胞变态形成精子阶段约需 14 天^[8].精子形成后,还要从睾丸进入附睾,在此进行一系列生理生化及形态方面的变化,最终发育成具有受精能力的精子,此过程大约需要 8 天,至此从精原干细胞开始分化到精子完全成熟需要约 42~43 天的时间.我们选择在注射转染液后 7、16、30、42 天与发情母鼠合笼,目的是观察精子发生各阶段转染外源基因的效率及其规律.

精子在附睾内变形成熟大约需要 8 天,试验结果显示,在注射后 7 天进行交配,此时转染液作用的应为附睾内已经完全成熟或正在变形成熟的精子.1989 年, Lavitrano 等^[6]首次利用小鼠附睾精子与 DNA 温育后制作出转基因小鼠,阳性率高达 30%.这一成果引起了众多研究小组的极大兴趣.此后, Lavitrano 等^[10]发现了在精子头部顶体后区一种可与外源 DNA 形成复合体的大小在 30~35 ku 的蛋白质,并用试验证明了 MHII 和 CD4 对 DNA 是否能与精子结合及结合后是否核内化起着重要作用^[11].利用精子作为载体制作转基因动物虽然取得了巨大进展,但是关于精子/DNA 结合的作用机理及其之间的影响因素还不是十分清楚.从近些年发表的文章来看,利用精子载体法制作转基因动物在各实验室之间的转基因效率还有很大差异^[12],甚至还时有出现阴性结果的报道^[13].本次试验我们通过直接将转染液注射入附睾中,对精子进行体内转染并获得了转基因鼠,阳性率为 6.82%,表明体内转染精子的方法制作转基因小鼠是可行的,但是其制作转基因小鼠的效率较低.

注射后 16 天,对小鼠进行第二次合笼,结果未有转基因小鼠产生.该阶段是精子细胞变态形成精子的阶段,主要是单倍体的圆形精子细胞进行一系列的形态变化,最后形成具有头、颈、尾结构的完整精子.此时,精子细胞核内染色质中的组蛋白被富含精氨酸的鱼精蛋白取代,而鱼精蛋白中含有大量正电荷,吸引着带负电荷的 DNA 发生聚集^[14].根据细胞核的这一变化可以推测,此时期应该是外源基因较易进入细胞核基因组的时期,但本次试验结果却与之相反,未产生一只转基因小鼠.

我们认为,可能由于精子细胞在精子形成过程中大部分细胞质成为残体(residual body)被抛弃^[14],而此时外源基因可能在进入细胞后而还未进入细胞核就随细胞质一起被淘汰.在此阶段内是否还存在其他一些未知因素而导致外源基因无法进入精子细胞或细胞核内,从而使外源基因不能在该时期发生转染,还需要进行更深入的研究.

精母细胞的减数分裂阶段是精子形成的重要阶段,此阶段的特点是细胞进行了两次减数分裂,而 DNA 只复制一次,产生了单倍体的精子细胞.小鼠注射转染液后 30 天与发情母鼠合笼,意在观察外源基因在此期的转染效率,结果此期内产生的转基因小鼠的阳性率最高,可达到 47.06%. Lu 等^[15]在研究聚乙烯亚胺(PEI)作为外源基因载体进行转基因效率的试验中,将 PEI/DNA 混合物注入小鼠睾丸内,3 天后将睾丸切片在荧光显微镜下观察,也发现在初级精母细胞中外源基因的表达率最高.我们认为,在减数分裂过程中,由于同源染色体间 DNA 进行重组,这不仅增加了子代发生遗传变异的机会,也增加了转染外源基因的几率,而且在减数分裂过程中核膜会出现暂时性的消失,这也大大增加了外源基因进入细胞核的机会,从而在此期内转染效率最高.

精原干细胞是形成精子的前体细胞,具有高度自我更新能力和分化潜能,它能向子代传递遗传信息,是雄性成体内唯一可复制的二倍体永生细胞^[16].体内精原干细胞始终处于不断地分裂增殖状态,理论上讲一个精原干细胞携带有外源 DNA,可生成多个阳性的子细胞,随着分裂还可生成更多带有外源 DNA 的精子,而这些精子与卵子结合后即可产生转基因动物个体,这种放大效应是其他转基因方法无法比拟的.因此,利用精原干细胞进行转基因动物的制作成为目前各国在转基因研究领域的热点之一.选择在公鼠交配前 42 天注射转染液,此时转染的正是精原干细胞及其有丝分裂阶段,而对处于有丝分裂期的细胞而言,由于核膜已经破裂,质粒 DNA 则容易进入核内^[17]. Kim 等^[18]先用白消安(一种烷化剂)处理睾丸组织,以杀灭睾丸组织中发育的初级精母细胞、次级精母细胞和精子细胞,而精原干细胞和精原细胞不被杀灭,然后将脂质体和外源基因混合物注入小鼠曲细精管内,结果有 8.0%~14.8%的新生成睾丸精子和 7%~13%的附睾精子表达了外源基因,从而证明了用外源基因转染精原干细胞的可行性.

一直以来,研究人员都是通过腹腔手术的方法打开腹腔暴露出睾丸进行注射操作,何新等^[19]则建立了一种非常简便、高效的方法,无需进行手术,直接用注射器针头穿透阴囊刺入睾丸中,将转染液分多次多点注射到雄性小鼠的睾丸内,大大降低了由于手术操作对小鼠造成的巨大应激,提高了手术的成功率和小鼠的成活率。但是,由于该方法不暴露睾丸,操作人员无法对注射过程进行监视,若操作不熟练可能会造成注射失败。为此,本次试验对这种方法又进行了改进,采用微创手术进行操作,注射完毕后只需对切口进行常规消毒,无需缝合,这样就解决了以上问题。这种方法适合进行大量制备转基因动物,也非常适合大家畜的转基因操作。本次试验注射的5只小鼠全部成活,且在注射操作后7天全部交配成功并获得后代,表明对小鼠的身体状况和生殖力均未有任何影响。

如何进一步提高雄性生殖细胞的转染效率,提高外源基因的整合和表达率是研究人员一直追求的目标。而此次试验通过比较精子生成过程中各阶段转染外源基因后转基因小鼠的阳性率,发现在精子生成的第二阶段,即精母细胞的减数分裂阶段,转基因小鼠的阳性率最高。这为以后通过用睾丸内注射法转染雄性生殖细胞高效地制作转基因动物提供了理论依据,也提供了新的方案,如研究人员可以通过转染精子生成的第二阶段进行转基因动物的制作,或者间隔10天左右进行两次睾丸注射,以便对精子生成的第一和第二阶段同时进行转染以提高转基因效率。

参 考 文 献

- Gordon J W, Scangos G A, Plotkin D J, *et al.* Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77**(12): 7380~7384
- Chisari F V, Pinkert C A, Milich D R, *et al.* A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science*, 1985, **230**(4730): 1157~1160
- Wilmot I, Schnieke A E, McWhir J, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385**(6619): 810~813
- Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M, *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, **394**(6691): 369~374
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, *et al.* Eight calves cloned from somatic cell nuclear transfer. *Science*, 1998, **282**(5396): 2095~2098
- Lavitrano M, Camaioni A, Fazio V M, *et al.* Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, 1989, **57**(5): 717~723
- Brinster R L, Ararbock M R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(24): 11303~11307
- 张红卫, 王子任, 张士曜. 发育生物学. 北京: 高等教育出版社, 2001. 19
- Zhang H W, Wang Z R, Zhang S C. *Developmental Biology*. Beijing: Higher Education Press, 2001. 19
- Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002. 481~509
- Lavitrano M, French D, Zani M, *et al.* The interaction between exogenous DNA and sperm cells. *Mol Reprod Dev*, 1992, **31**(3): 161~169
- Lavitrano M, Maione B, Forte E, *et al.* The interaction of sperm cells with exogenous DNA: a role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules. *Exp Cell Res*, 1997, **233**(1): 56~62
- Maione B, Lavitrano M, Spadafora C, *et al.* Sperm-mediated gene transfer in mice. *Mol Reprod Dev*, 1998, **50**(4): 406~409
- Brinster RL, Sandgren EP, Behringer RR, *et al.* No simple solution for making transgenic mice. *Cell*, 1989, **57**(5): 239~241
- 杨增明, 孙青原, 夏国良. 生殖生物学. 北京: 科学出版社, 2005. 34~35
- Yang Z M, Sun Q Y, Xia G L. *Reproductive Biology*. Beijing: Science Press, 2005. 34~35
- Lu L, Lin M, Xu M, *et al.* Gene functional research using polyethylenimine-mediated *in vivo* gene transfection into mouse spermatogenic cells. *Asian J Androl*, 2006, **8**(1): 53~59
- Schlatt S. Spermatogonial stem cell preservation and transplantation. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, **187**(1~2): 107~111
- Gorlich D, Mattuj I W. Nucleocytoplasmic transport. *Science*, 1996, **271**(5255): 1513~1518
- Kim J H, Jung-Ha H S, Lee H T, *et al.* Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. *Mol Reprod Dev*, 1997, **46**(4): 515~526
- 何新, 齐冰, 刘桂生, 等. 体内系统转基因新方法. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33**(7): 685~690
- He X, Qi B, Liu G S, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(7): 685~690

Study of The Transgenic Efficiency in Different Spermiogenesis Stages in Mice*

ZHANG Xin^{1,2)}, MIAO Xiang-Yang^{1)**}, YIN Xun-He²⁾, MA Yan-Fang²⁾, QU Zhao-Jie^{1,2)}, ZHANG Qiu-Ting¹⁾

¹⁾*Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;*

²⁾*Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University; Taian 271018, China)*

Abstract In the past 30 years, the research and application of transgenic technology in gene expression of animal had become a noticeable advancement in experimental biology and applied biology. Microinjection, retrovirus mediated method and embryonic stem cells method were all the traditional methods of producing transgenic animals. But these methods had defects and limited application in the research of transgenic animals in the future. Exogenous gene was transferred into germ cells of male mice, in order to study efficiency of transgenic mice in different spermiogenesis stages. The green fluorescence protein expression plasmid(pIRES2-EGFP) and liposomes were mixed and injected into male mouse testis and epididymis. Then the intratesticular mice were mated with female at day 7, 16, 30 and 42 after infection. Polymerase chain reaction(PCR) and Southern blot were applied to identify transgenic mice. The positive ratio was 6.82%, 0, 56.86%, 42.86% by PCR analysis and 6.82%, 0, 47.06%, 34.69% by Southern blot analysis. The transgenic mice showed green fluorescence in fluorescence imager and fluorescent microscope under EGFP excitation light (488 nm). Through comparing efficiency of transgenic mice in different spermiogenesis stages, it could provided an important theoretic foundation for efficient production of transgenic animals by testis mediated gene transfer.

Key words spermiogenesis, intratesticular injection, transgenic mice

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00839

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2008AA10Z140), The National Natural Science Foundation of China(30571339), The Innovation Research Foundation of CAAS(2004-CAAS-1) and The Project of Excellent Science and Technology Innovation Team, CAAS.

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62895663, E-mail: mxy32@sohu.com

Received: December 7, 2008 Accepted: February 24, 2009