

研究快报

转基因猪体内外源基因的整合鉴定

刘桂生 陈清轩 王 菁

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

魏庆信

(湖北省农业科学院畜牧兽医研究所, 武汉 430209)

陈永福

(中国农业大学生物技术学院, 北京 100094)

摘要 外源猪生长激素基因被导入湖北白猪. 为避免羊、猪之间在金属硫蛋白启动子上的同源性而造成 PCR 检测结果的假阳性, 分别将 PCR 合成反应的两个引物设计在羊金属硫蛋白基因启动子一侧和猪生长激素一侧, 使 PCR 合成反应的结果特异地反映外源基因的整合性, 准确地鉴定出转基因猪. DNA 印迹分析结果表明, 43 头待检仔猪中有 6 头呈外源基因整合阳性.

关键词 猪生长激素基因, PCR, DNA 印迹, 转基因猪

从理论上讲, 转猪生长激素基因的猪具有生长速度快、瘦肉含量高以及饲料转化率高等特点, 因此, 我们开展了这方面的研究工作. 但以前多使用非同位素方法对外源基因的整合进行鉴定, 发现其特异性差、假阳性多, 严重影响了我们进一步的分析. 本文中我们改用 PCR 法, 特别是将引物设计在上游启动区 (羊金属硫蛋白基因启动子) 与下游猪生长激素基因间, 避免了猪和羊之间由于一定的同源程度引起的假阳性, 而 PCR 结果再进行 DNA 印迹分析进一步确证鉴定结果的可靠性. 其主要方法与结果如下.

1 显微注射

将由羊金属硫蛋白启动子 (SMT)、猪生长激素基因 (GH) 和质粒 PUC19 构成的表达载体 pSMTGH^[1] 用 Sal I 切成线形, 注射入猪受精卵雄原核, 然后移回假孕母体.

2 转基因猪的鉴定

a. 仔猪出生后剪取尾组织供提取高分子

DNA 所用. b. PCR 引物的设计和合成: 考虑到羊和猪在金属硫蛋白启动子上的同源程度, 我们将 PCR 的 5' 端引物设计在上游 MT 上, 而 3' 端引物则在生长激素基因上, 这样合成的 PCR 引物长度为 350 bp. 本实验中两个引物分别为 5'-TCTGCCCATCACTTACAACGATGC3' 和 5'-GCTTGCCACTTGTTCTGAAGCTCGGAC 3'. c. PCR 循环: 取仔猪尾组织 DNA 1.5 μ g 作为 PCR 反应的模板, 加入 10 $\times$ 缓冲液、4 种 dNTP、引物各 15 pmol/L, 3 U Taq 酶 (以上反应试剂盒购自华美生物工程公司), 加重蒸水至 50 μ l, 外加约 30 μ l 液体石蜡. 在 PCR 合成仪 (Perkin Elmer 产品) 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后, 进入 PCR 循环 (94 $^{\circ}$ C, 1 min; 58 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 2 min), 共 25 个循环. 最后在 72 $^{\circ}$ C 延温 7 min. 取 5 μ l 反应产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳. 结果见图 1. d. DNA 印迹分析: 将 PCR 阳性产物转移到杂交用尼龙膜上, 以 α -P³²-dCTP 标记 MT 片段

* 国家“863”计划资助项目.

收稿日期: 1996-02-08, 修回日期: 1996-03-27

作为杂交用探针, 对 PCR 反应产物进一步确证 (图 2)。

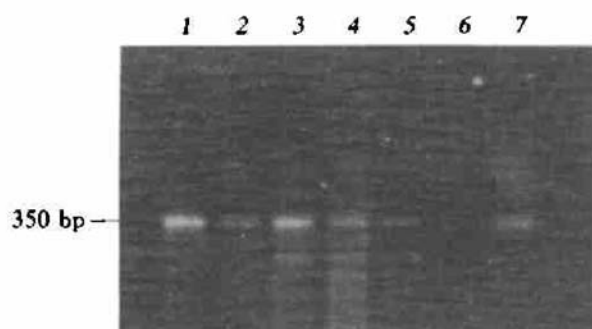


图 1 转基因猪 PCR 实验结果

1: 阳性对照 (pSMTGH 作模板); 2~7: 整合外源 pSMTGH 的仔猪。

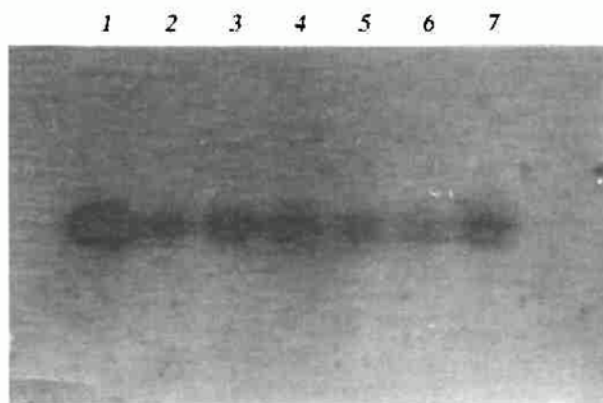


图 2 转基因猪 DNA 印迹分析

阳性产物经电泳, 转移以 α - P^{32} -MT 为杂交探针进行杂交。1: 阳性对照; 2~7: 整合外源基因的仔猪。

实验结果表明, 供检测的 43 头仔猪中, 有 6 头呈阳性, 即外源基因的整合率达到 14%。较之 Hammer 等^[2,3]的结果要高, 而且 PCR 检测结果与 DNA 印迹结果十分吻合。这些呈阳性整合的仔猪将作进一步的鉴定以及传代之用。

此外, 我们也作了血清蛋白的比较分析。用猪生长激素单克隆抗体对阳性仔猪和正常仔

猪 (未转基因猪) 血清比较分析结果显示部分阳性整合仔猪血清生长激素含量高于正常仔猪, 有些则无明显差异, 可能由于整合片段不完全, 亦或其他未知因素影响所致。

参 考 文 献

- 1 寇 寇, 曹 颖, 宋德秀, 生物工程学报, 1991; 7 (2): 120
- 2 Hammer R E, Pursel V G, Rexroad C E *et al.* J Anim Sci, 1986; 63: 269
- 3 Pursel V G, Miller K F, Pinkert C A *et al.* Vet Immunol Immunopathol, 1987; 17: 303

Identification of Integration of Foreign Gene in Transgenic Pigs. Liu Guisheng, Chen Qingxuan, Wang Jing (*Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing 100080, China*); Wei Qingxin (*Institute of Animal Husbandry, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430209, China*); Chen Yongfu (*Institute of Biotechnology, Agricultural University of China, Beijing 100094, China*).

Abstract Foreign porcine growth hormone genes were introduced into Hubei white pigs. In order to avoid possible homology in metallothionein-Ia gene promoter between sheep and porcine, two PCR primers were designed and located on the regions of sheep metallothionein-Ia gene promoter and porcine growth hormone gene, respectively. This reflects the exact results by PCR detection. The results of DNA blotting indicated that 6 of 43 offsprings showed positive integration.

Key words porcine growth hormone gene, PCR, DNA blotting, transgenic pig