

线虫基因显微注射和整合技术 ——设备、操作与指南*

酒亚明 张蓉颖 吴政星**

(教育部分子生物物理重点实验室, 华中科技大学生命科学与技术学院生物物理与生物化学研究所, 武汉 430074)

摘要 秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)是研究动物遗传、个体发育和行为活动的重要模式生物, 其主要优点是能够研究从分子细胞水平到整体系统水平的相关生命活动的作用机理。其中基因显微注射和整合是该领域的核心技术, 广泛应用于研究线虫的基因表达、功能和基因间的相互作用等。显微注射技术使用尖端开口直径为微米级的玻璃微管, 将所研究的目的 DNA 注射进线虫的性腺。注射的 DNA 被成熟的卵细胞吸收, 以染色体外遗传物质的形式存在。但这种形式并不能稳定遗传, 可采用基因整合技术将外源基因整合到染色体上, 得到稳定遗传的线虫种系。显微注射是一项精细的实验技术, 影响实验成功与否的因素较多, 实际操作需要有一定的经验。在实践过程中逐步改进和完善了这项技术, 在此主要介绍线虫显微注射技术的操作过程、创新方法以及注意细节。

关键词 秀丽线虫, 基因显微注射, 基因整合

学科分类号 Q25, Q27

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00603

秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)最早被英国科学家西德尼·布雷纳作为一种模式生物用于研究发育学和遗传学, 其生活史短, 通体透明, 具有简单的生理结构, 可以在实验室内通过喂食大肠杆菌进行培养, 能够冷冻保存, 并易于进行包括基因敲除、突变和转基因等的基因操作。线虫是第一个完成全基因组测序的动物, 其全基因组编码约 20 000 个基因, 其中至少 40% 的基因在人类基因组中有明显的同源物存在。许多人类基因被转入线虫后, 都能表达并执行类似的功能。因而, 它被广泛应用于基础生物学, 特别是发育、细胞凋亡、基因组学和蛋白质组学等的研究。

显微注射技术是线虫研究领域的常用技术, 是对线虫进行转基因操作的一种高效且相对简单的方法^[1, 2]。主要用于研究线虫突变种系的功能恢复(mutant rescue)、特定基因的过表达或异位表达、标签蛋白的表达、特定蛋白质结构域的功能、DNA 或 RNA 调节元件的分析及 RNA 干扰等。此外, 这项转基因技术对于特异表型的筛选也是个强有力的工具, 并且它还可用于将人工合成的 mRNAs 或其他分子直接引入细胞^[3~7]。

本文主要从实际和实用的角度出发, 介绍线虫

显微注射的系统搭建、操作过程及注意事项, 特别总结了实验技巧和改进方案, 并对目前存在的问题进行了讨论与展望。

1 显微注射的硬件系统和材料准备

线虫显微注射所需的主要仪器包括荧光体视显微镜, 差分干涉相差(DIC)显微镜, 显微操纵器, 以及微量加压注射器等。荧光体视显微镜, 用于挑取和固定线虫, 也用于转基因后代的荧光观察与挑选, 作为此用途的体视显微镜要求有较高的光学分辨率和较大的工作距离。倒置 DIC 显微镜, 推荐配备 10×和 40×物镜(非油镜)以及一个滑动载物台, 最好选用适合厚样品观察和成像的 DIC 组件。显微操纵器, 用于注射针的显微操纵, 机械、电动或压电的均可。推荐采用德国 Eppendorf 公司的 InjectMan NI2 或 PatchMan NP2, 它们都是手柄控制, 使用方便且利于新手操作。压力注射器, 用于

* 国家自然科学基金资助项目(30670502, 30500117)。

** 通讯联系人。

Tel: 027-87792337, E-mail: ibbwuzx@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2008-09-02, 接受日期: 2008-10-13

给注射针内的溶液施加压力脉冲, 将溶液注射至线虫体内(如性腺或假体腔), 推荐使用 Eppendorf 公司的 FemtoJet.

显微注射前需准备以下一些必要的材料. a. 琼脂糖固定垫(pad). 该固定垫能较长时间保存, 可以一次性做多个. 制做方法如下: 取约 50 μ l 加热溶解的 2% 琼脂糖(agarose)溶液滴在长宽 50 mm $\times$ 24 mm, 厚 0.13~0.17 mm 的载玻片上, 用另一载玻片轻压其上, 待琼脂糖凝固后(约 2 min), 将上面的玻片从侧面滑下即可. 制作好的固定垫室温过夜或 65 $^{\circ}$ C 干燥 1 h 后可叠放起来备用. b. 恢复缓冲液为添加了 4% 葡萄糖(glucose)的 M9 缓冲液(5.8 g Na_2HPO_4 , 3.0 g KH_2PO_4 , 0.5 g NaCl , 1.0 g NH_4Cl , 加水至 1 L, 高压灭菌), 用于注射后线虫的恢复. c. 注射针, 采用高温拉制的玻璃微管. 针的好坏至关重要, 建议用有芯玻璃微管(电极)拉制, 其芯能够使注射液迅速充满针头尖端, 避免产生气泡. 采用外径/内径为 1.2 mm/0.68 mm 的有芯硅硼玻璃电极(1B120F-4, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). 注射针的拉制非常重要, 尖端直径约 5 μ m(图 1). d. 微注射油. 为 Sigma Halocarbon Oil 700(125K1200)产品.

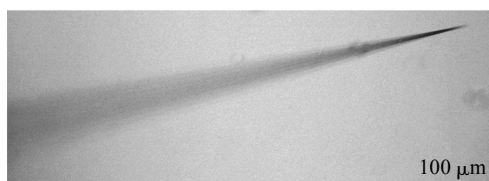


Fig. 1 A injection needle in the DIC microscope

2 显微注射的操作步骤

显微注射技术是 Kimble 等^[7]于 1982 年发展起来并应用于秀丽线虫的, 它能较高效率地产生转基因活体, 是一个相对精细的操作过程, 主要有以下操作步骤.

2.1 制备注射液

拟注射的 DNA(通常为基因表达质粒, 以下称为目的基因)是否纯净是关系到转基因效率高低的重要因素之一. 使用德国 Qiagen 公司的大量质粒提取试剂盒抽提, 为了避免蛋白质和离子等杂质的影响, 必要时还可再用酚和氯仿混合液(1:1)进一步纯化. 将纯化的 DNA 溶解在 Tris-EDTA(TE)缓冲液中即可直接用于注射. 若在注射液中加入终浓度约 10 mg/L 的线虫基因组 DNA, 则会有效地提

高转基因效率. 注射前将注射液从针尾部灌入, 等待数分钟, 观察针尖无气泡即可开始注射.

2.2 破针

破针有两种方法, 其一是用氢氟酸腐蚀, 现在已基本不用. 目前通用的是将一小玻片放在加了注射油的固定垫上, 操纵微操使注射针与玻片边缘相撞, 若针头尖端撞破, 可观察到有液泡自动渗出, 用该方法所破的针更易于刺入线虫体内.

2.3 固定线虫

我们一般挑选即将产卵或体内有少量卵的年轻成虫进行注射, 因为这个时期性腺发育成熟, 较易被 DNA 转染从而产生转基因后代. 注射时将线虫挑至琼脂糖固定垫上, 调整线虫使性腺暴露, 滴加注射油覆盖整个虫体(图 2). 固定好后的操作要迅速, 否则线虫容易脱水而死^[4].

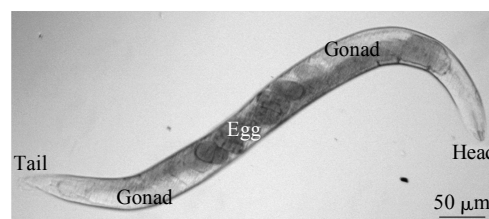


Fig. 2 A young adult worm with gonad exposed in the stereomicroscope

2.4 注射

将琼脂糖固定垫放在载物台上, 40 $\times$ 物镜下找到线虫, 调整焦距, 使形似香肠的性腺聚焦在正确的平面. 操作微操或轻移滑动载物台, 将注射针尖刺入性腺(图 3). 启动微量加压器进行注射, 能观察到注射液在性腺中快速流动, 注射后的性腺被液体充满.

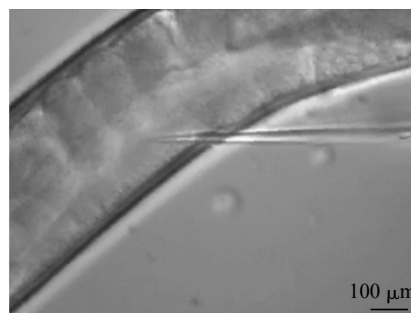


Fig. 3 A needle inserted into the gonad of a worm in the DIC microscope

2.5 恢复

在体视显微镜下, 滴加恢复缓冲液至注射后的线虫正上方, 由于与油互不相溶, 缓冲液会渗入油下使线虫浮起. 一般等待 2~5 min, 使线虫活力恢复, 即头部左右摇摆, 身体开始游动, 即可挑至培养板上, 20℃ 常规培养.

2.6 观察结果

注射后约 3 天, 观察孵出的 F1 代是否有目的 DNA 表达. 目前, 线虫外源基因表达的标记通常采用: a. 荧光蛋白与目的蛋白形成融合蛋白, 但需要确定荧光蛋白的连接不影响目的蛋白的功能; b. 目的基因与荧光标记基因共注射; c. 目的基因与具有明显表型的标记基因共注射. 我们通常使用易观察的 *pmyo-3::TDimer II* 作为荧光标记(图 4), 它在所有体壁肌肉细胞表达, 转基因效率高且本身对线虫的行为和功能没有影响. 另外, 也常用 *pRF4(rol-6)* 作为标记, 其可在 F1 代幼虫期出现卷曲(*roller*)表型. 每一只 F1 个体都是一个独立种系, 要单独培养. 一般注射 30 只 P0 会产生 3~300 只转基因 F1, 但注射不同的浓度 DNA 产生转基因的效率有很大差别, 要根据具体情况确定注射浓度和注射线虫的数量.

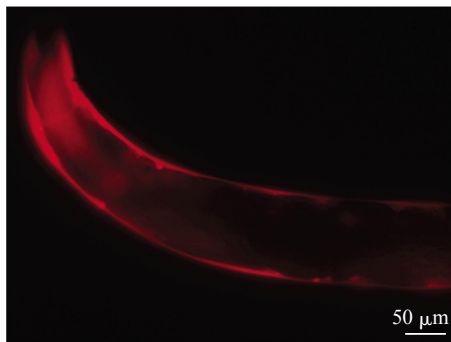


Fig. 4 A worm expressed coinjection marker *pmyo-3::TDimer II*

有时候我们并不想让转基因线虫带有显性的卷曲表型, 即不想用 *rol-6* 作为标记. 这种情况下可以用隐性标记物与目的 DNA 共注射, 观察能否恢复突变种系的表型. 这种标记物一般需要符合以下几个条件: a. 表型容易辨识, 最好在发育的任何阶段都有表现; b. 必须有健康的性腺便于注射; c. F1 代有明显的恢复表型, 易于观察和挑取; d. 恢复后必须是真正的野生型. 符合条件的标记物有 *unc-76*, *dpy-20*, *lin-15*. 其中 *lin-15* 较常用,

但其缺点是恢复的表型只能在成虫期观察. 突变虫系 *lin-15* (n765ts) 注射前在 15℃ 培养, 注射后移至 20℃, 恢复的线虫很容易识别, 即没有了多阴门(*multi-valva*)的表型. 目前, 我们已成功研制了一种荧光蛋白与目的基因共表达的非融合蛋白基因表达载体. 该载体等量并分别表达目的基因和荧光蛋白基因, 既可解决融合蛋白中荧光蛋白对目的蛋白表达和功能的可能影响, 又排除了共注射所造成的目的基因表达的不确定性和可能的高估(详细数据未发表).

3 显微注射的注意事项

显微注射的操作过程中有许多细节影响实验的成功率, 需要特别关注. 根据我们的经验, 主要注意事项包括: a. 固定垫的好坏. 若线虫在琼脂糖固定垫上短时间内死亡, 则说明固定垫过于干燥, 可在其表面呵气或换琼脂糖层稍薄的固定垫, 因为琼脂糖的主要作用是吸收线虫的水分; 若线虫无法粘牢, 则说明固定垫太湿或太薄, 可在烘箱内放一段时间或将线虫先粘在固定垫上后加油. b. 注射 DNA 的质量和浓度. 注射 DNA 使用前要混匀并离心以避免杂质阻塞针头. 注射 DNA 的总浓度一般控制在 200 mg/L 以下. 若用于恢复突变种系的表型, 则一般采用较低浓度, 约 5~10 mg/L, 因为较高浓度的 DNA 可能产生毒性或过量表达, 从而影响下一代的表型恢复. c. 注射针与性腺最好呈锐角, 推荐与头部或尾部几乎平行或呈 15° 角. d. 用来注射的线虫一定要食物充足生长健康. 对于有产卵障碍的突变虫系, 最好选择稍早的时期注射, 如晚期 L4. e. 培养板要避免染杂菌, 最好在使用前一天涂大肠杆菌. f. 注射后等待恢复的时间若太短, 则线虫没有完全恢复, 很容易在挑至培养板后死亡, 时间若太长, 缓冲液蒸发使渗透压增加也会导致线虫死亡. g. 若注射后线虫死亡率较高, 可能是注射针尖太粗或注射 DNA 被污染, 可使用稍细的注射针且每次只注射一边性腺, 若注射操作正确, 但不产生转基因线虫, 则可能是转基因致死或注射 DNA 污染, 可将 DNA 重新纯化.

4 显微注射后的整合

带有染色体外 DNA 片段的线虫称为嵌合体线虫, 染色体外的 DNA 片段在有丝分裂时有一定几率的丢失. 通过微注射进入线虫体内的 DNA 即属于染色体外的片段, 会随着线虫传代次数的增加而

丢失, 且各个体的表达水平也可能不同. 所以有必要将目的 DNA 片段整合到染色体上, 得到稳定的表达种系. 目前常用的整合方法有: 用 γ 射线和 X 射线照射, 或用光敏剂补骨脂素加长波紫外线照射整合(TMP/UV integration). 基本策略是大量筛选经射线照射过的转基因线虫, 一般挑取数百只 F1 代单克隆, 筛选 F4 代, 检测是否有 100% 的转基因表达, 若是则说明整合成功. 一般一次整合能得到若干个独立种系, 可选择最好的一个进行实验.

TMP/UV 整合无需 γ 或 X 射线源, 可在普通实验室进行. 诱变剂 TMP (Trioxsalen 或 4, 5', 8-Trimethylpsoralen, 三甲基补骨脂素), 剧毒, 光敏, 对其操作都需避光进行. TMP/UV 的处理可使线虫 DNA 发生随机断裂, 从而使染色体外的 DNA 片段整合至染色体上. TMP/UV 整合法的流程为: a. 用 M9 缓冲液将同步好的 L4 龄线虫从培养板中清洗下来, 加 TMP(溶于 DMSO, 现用现配, 存于 -80°C)使其终浓度为 50 mg/L. b. 室温下轻柔振荡 15 min, 将线虫转至未铺菌的 9 cm 培养板上紫外线照射, 照射能量为 35 000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, 换算成瞬时功率即 350 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 100 s. c. 照射完毕后, 在培养板上加大肠杆菌 OP50, 室温避光培养 5 h, 使线虫活力恢复. d. 挑取 15~25 只状态较好的 P0 代个体, 每板 1 只, 等待大肠杆菌被吃完, 挑 100~300 只 F2 代, 每板 1 只, 观察 F4 代是否全部表达注射 DNA. 根据我们的经验, 如果经紫外线照射后, 后代出现很多具有短粗、致死表型的线虫, 甚至 1/4 没有后代, 则预示整合成功. 整合成功的标准是 F4 代全部表达目的基因, 若没有, 一般没必要继续筛选, 可认为该克隆的整合不成功.

5 展 望

显微注射技术对于研究线虫基因的功能和调节机制有重大意义, 但显微注射后的基因位于染色体外, 必须通过人为的操作进行整合, 且往往是随机

地整合到任何一条染色体上. 众所周知, 许多 DNA 转化会通过同源重组产生靶向基因置换. 将 DNA 注射至线虫的性腺, 也可观察到转基因同源重组到内源基因中, 有人曾在线虫中筛选到同源染色体的整合种系, 但发生这种同源重组的概率很低, 一般仅为 0.5%~7%, 并且目前还不清楚什么因素会影响重组率^[8~10]. 也许在不久的将来能够发展出一种有效提高重组率的方法, 并将其与线虫的转基因技术结合起来, 作为更加强大的工具用于生命科学的研究.

参 考 文 献

- 1 Mello C, Fire A. DNA transformation. *Methods Cell Biol*, 1995, **48**: 451~482
- 2 Mello C C, Kramer J M, Stinchcomb D, *et al*. Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J*, 1991, **10**(12): 3959~3970
- 3 Bossinger O, Schierenberg E. Cell-cell communication in the embryo of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 1992, **151**(2): 401~409
- 4 Nott A, Le Hir H, Moore M J. Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes Dev*, 2004, **18**(2): 210~222
- 5 Evans T C, Crittenden S L, Kodoyianni V, *et al*. Translational control of maternal *glp-1* mRNA establishes an asymmetry in the *C. elegans* embryo. *Cell*, 1994, **77**(2): 183~194
- 6 Maniatis T, Reed R. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature*, 2002, **416**(6880): 499~506
- 7 Kimble J, Hodgkin J, Smith T, *et al*. Suppression of an amber mutation by microinjection of suppressor tRNA in *C. elegans*. *Nature*, 1982, **299**(5882): 456~458
- 8 Broverman S, MacMorris M, Blumenthal T. Alteration of *Caenorhabditis elegans* gene expression by targeted transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(10):4359~4363
- 9 Berezikov E, Bargmann C I, Plasterk R H. Homologous gene targeting in *Caenorhabditis elegans* by biolistic transformation. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(4): e40
- 10 Praitis V, Casey E, Collar D, *et al*. Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2001, **157**(3): 1217~1226

Gene Microinjection and Integration in *C. elegans*: Equipments, Processes and Guidance*

JIU Ya-Ming, ZHANG Rong-Ying, WU Zheng-Xing**

(Key Laboratory of Molecular Biophysics/Ministry of Education, Institute of Biophysics & Biochemistry,
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract *Caenorhabditis elegans* is one kind of the most important modal animals for studying heredity, development and behaviors, and for investigating the mechanisms underlying from molecular to systematic levels. Gene microinjection and integration are the most important ways to make transgenic animals in *C. elegans*. They are widely used in the studies of expression, function and interaction of genes. Briefly, a DNA construct (plasmid or cosmid) or PCR product which carried gene(s) of interest is mixed with a co-injection marker and injected into the distal gonad (syncytium) through a micropipette. The DNA injected is taken up into the mature oocytes and exists as an unintegrated extrachromosomal array, which segregates randomly and can be lost. The extrachromosomal arrays are integrated optionally into chromosomes by irradiation of γ rays, X rays, or by TMP/UV integration method. Here, the detail processes and key points of microinjection and gene integration in *C. elegans* was introduced and the know-how in these techniques was offered.

Key words *Caenorhabditis elegans*, gene microinjection, gene integration

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00603

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30670502, 30500117).

**Corresponding author.

Tel: 86-27-87792337, E-mail: ibbwuzx@mail.hust.edu.cn

Received: September 2, 2008 Accepted: October 13, 2008