

转 pGH 基因猪外源基因染色体定位研究

牛屹东^{1**} 何 新¹ 陈清轩^{1*} 林爱星² 陈永福² 魏庆信³

¹(中国科学院发育生物学研究所 北京 100080)

²(中国农业大学生物学院 北京 100094)

³(湖北省农科院畜牧研究所 武汉 430209)

摘 要 应用地高辛标记探针转 pGH 基因(猪生长激素基因)猪染色体进行原位杂交,经胶体金抗体、银增强放大系统检测外源 pGH 基因在染色体上的整合位点。研究表明,转基因阳性个体间外源基因整合位点存在差异,但对个体而言,外源基因总是集中分布于某一特定的染色体上。本研究将为探究外源基因整合位点与其表达效率的关系及今后定点整合的研究提供理论指导。

关键词 pGH 基因 转基因猪 染色体原位杂交 基因定位

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0318-04

虽然早在 60 年代 Andresen^[1]首次报道了猪红细胞抗原 C 和 J 基因的连锁关系,但对家猪(*Sus scrofa* L.)染色体的研究,很多工作集中于核型、高分辨率带型等方面^[2-7]。随着技术的不断发展,有关猪基因定位的工作取得了长足的发展^[8-11],至 1999 年已将 285 个基因和标记位点定位于家猪 18 对常染色体和 1 对性染色体上[参阅 <http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/cyto/gene/chromo/>],然而基因定位在转基因猪研究中却鲜有报道^[12,13]。此外,在快速生长瘦肉型转基因猪研究中发现,经鉴定为转 pGH 基因阳性的个体,其表现性状也不大相同,除正常个体外,一部分猪往往有胃溃疡、嗜睡、怕热、生育力下降和食欲不振等症状。为探究其中原因,也需要对转基因猪进行外源基因定位的研究,找出外源基因整合位点及其表达与动物生理状态之间的关系,为今后定点整合的研究提供理论指导。本研究的出发点正是出于这一考虑。

1 实验材料和方法

1.1 染色体玻片制备

于耳缘静脉,无菌采集转 pGH 基因阳性猪和正常猪血液,每 0.5mL 血接于 4.5mL 含有 1mgPHA(广州医药工业研究所) 10% FBS(Gibco) 1000u/mL 青

霉素(哈尔滨制药厂) 1000 μ g/mL 链霉素(华北制药厂)的 RPMI-1640(Gibco)培养基中。37 $^{\circ}$ C 培养 72h,间或摇动,于细胞收获前 4h 加入 0.02 μ g 秋水仙碱。按常规外周血淋巴细胞染色体标本制备方法制做染色体玻片标本,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2 探针的制备

用限制性酶 *Ssp*I 切割 pSMTPGH 质粒(图 1,该质粒由本实验室构建,含有猪生长激素基因全序列 PGH 和羊金属硫蛋白基因启动子 OMT, pUC19 为载体)然后以低熔点琼脂糖凝胶回收 900bp(pUC19-OMT)片段^[14]。

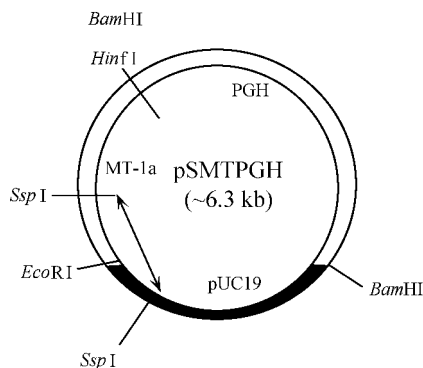


图 1 pSMTPGH 质粒图谱及 *Ssp*I 酶切位点

Fig.1 The map of plasmid pSMTPGH and the *Ssp*I cutting sites
Double arrow indicates the structure of probe

收稿日期 2000-11-06,修回日期 2001-02-15。

基金项目 国家 863 项目(863-101-05-01)及 973 项目部分资助(G200016107)。

* 通讯作者。Tel 86-10-82614427; Fax 86-10-62551951; E-mail Qingxuanchen@yahoo.com

** 现所在单位:中国科学院动物研究所。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.3 非同位素标记探针

回收的 900bp 片段用随机引物法以 Dig-11-dUTP 标记(Boehringer Mannheim 非同位素标记试剂盒)。

1.4 原位杂交

1.4.1 在染色体标本需要杂交的部位,滴加 100 μ g/mL 的 RNase 溶液,于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 1h,以除去内源性 RNA 的干扰。

1.4.2 酶消化结束后,玻片用 2 \times SSC 液洗 4 次,每次 2min。用 70%、80%、90%、95%、100% 冷乙醇于 -20 $^{\circ}$ C 逐级脱水,室温下干燥。

1.4.3 染色体标本变性:将变性液(10% 20 \times SSC、20% ddH₂O、70% 甲酰胺)滴加在染色体标本上,70 $^{\circ}$ C 保温 2min。

1.4.4 快速转移到 70% 冷乙醇中,重复 1.4.2 的脱水步骤。

1.4.5 在干燥后的玻片上滴加含有经 70 $^{\circ}$ C 变性探针的杂交液(50% 硫酸葡聚糖甲酰胺、10% 20 \times SSC、500 倍于探针的鲑精 DNA、20ng/ μ L 标记探针),覆以盖片,37 $^{\circ}$ C 水浴杂交 16h。

1.4.6 杂交后的标本用 50% 甲酰胺、2 \times SSC 洗涤 5 次,每次 5min。

1.5 原位杂交信号的增强与放大(免疫金胶抗体法)
经 2 \times SSC 洗涤的玻片在 PBS 中洗 1 次,并保持

玻片湿润。在玻片上加入 10 μ L 胶体金标记的抗 Dig 抗体(具体步骤按 Boehringer Mannheim 公司的试剂盒说明书进行),盖上盖片,室温反应 1h。用 PBS 洗片 1 次,200mL 去离子水充分洗片 5 次,以去除氯离子。在玻片上滴加新鲜配制的银增强试剂(Boehringer)100 μ L,于潮湿器皿内室温、避光反应 30min,结束时以去离子水洗片数次以终止反应。玻片自然风干。

1.6 染色体 G-显带

将染色体标本用 0.025% 胰酶溶液(pH7.0),于 37 $^{\circ}$ C 消化 1min。用 pH6.8 的 PBS 缓冲液冲洗数次后,以 10% 姬姆萨液染色 15min。用去离子水冲洗干净后于室温空气干燥,镜检。选择分散良好的分散相进行拍照、记录,将所得数据作统计分析。

2 实验结果

实验处理后的染色体标本在油镜下观察,选择染色体平直、分散良好、带型清晰的中期相进行分析。由于材料所限,我们仅对 3 头转基因阳性猪作了分析,通过计数不同染色体上银颗粒的数量,按下式计算出每条染色体上银颗粒分布的机率(如表 1 所示):

$$\text{银颗粒分布机率}(\%) = \frac{n \text{ 号染色体上银颗粒总数}}{\text{基因组全部染色体上银颗粒数}} \times 100\%$$

表 1 转 pGH 基因猪外源基因定位结果

Table 1 The data of in situ hybridization for the exogenous pGH gene localization of the positive transgenic pigs

No.	Sex	Data							Location
		No. of chr.							
2323	♂	No. of chr.	2	6	7	12	13	15	
		No. of grains	1	3	6	1	2	2	7q ¹⁴
		Grain Ratio(%) [*]	7	20	40	7	13	13	
1904	♀	No. of chr.	1	2	5	6	11		
		No. of grains	3	2	1	7	2		6p ¹²
		Grain ratio(%)	20	13	7	47	13		
6044	♀	No. of chr.	2	5	6	8	13	16	
		No. of grains	1	3	2	5	2	2	8p ²²
		Grain ratio(%)	7	20	13	33	13	13	

* Grain ratio = Grains of single chrom/Grains of total chrom($\times 100\%$)

根据统计结果,外源 pGH 基因分别定位于 7q¹⁴(2323 号猪)、6p¹²(1904 号猪)和 8p²²(6044 号猪)。图 2 是 2323 号雄性转基因猪原位杂交后染色体中期相,箭头给出了杂交位点;图 3 是银颗粒在 1904 号阳性母猪染色体上分布的直方图。

3 讨论

虽然国内外许多学者应用基因定位技术研究了染色体上基因的位置及数量^[15,16],但很少将之用于转基因动物外源基因定位的研究,根据本室以往的

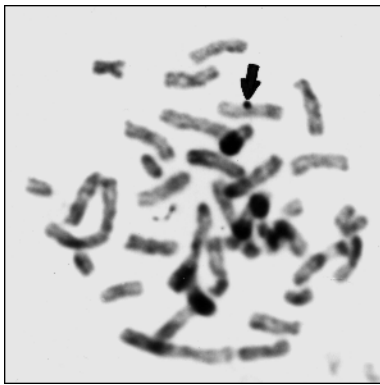


图 2 2323 号阳性猪染色体中期相与 900bp pUC19-OMT 探针原位杂交后 G 显带

Fig. 2 *In situ* hybridization with the probe of 900bp MT-pUC19 in a metaphase spread of No. 2323 transgenic pig. The silver grain indicated by an arrow were located on the 7q¹⁴, Arrow indicates silver grain located on 7q¹⁴

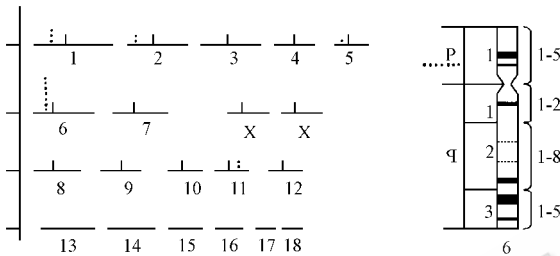


图 3 染色体原位杂交后, 银颗粒在 1904 号阳性转 pGH 基因猪染色体上分布的直方图

Fig. 3 The histogram showing the distribution of silver grains on the metaphase spreads of the No. 1904 transgenic pig. Each dot represented a grain observed on a specific chromosome, and the exogenous pGH gene was located on the 6p¹²

经验与研究成果^[12,13],我们再次选用该方法对转 pGH 基因猪进行外源基因定位研究。而染色体原位杂交是进行基因定位的核心工作,该技术自 1969 年开始用于动物和人类的 DNA 特异性片段及基因定位以来^[17]发展很快,特别是近十余年来非放射性探针染色体原位杂交技术已广泛用于基因和特异性 DNA 序列定位、染色体片段鉴定、远缘杂种分析以及物种系统发育等方面的研究^[18~22]。其中,选择适当的探针标记方法是这一工作成败的关键。鉴于 DIG 标记系统可以提供与同位素相同的敏感性,且快速、安全、方便,所标记的探针可保存超过 1 年,经过 Anti-digoxigenin-gold 和 Silver enhancement reagents 显色后,可在光镜下直接观察,标本可长期存放,而且经 DIG 标记的探针其灵敏度比其他非同位素法(如光敏生物素标记法)为高,杂交背景浅,显色深^[22]因而成为我们首选的探针标记系统。

鉴于猪内源性 pGH 基因定位于 12p¹⁴ 位置^[10,23~25],而实验结果未发现在 12 号染色体上有银颗粒分布,说明所设计的探针具有很高的特异性,完全排除了内源性 pGH 基因的干扰。从实验结果看,外源 pGH 基因在转基因猪的染色体上是随机整合的,但对某一个体而言,外源基因的整合总是集中于某一号染色体上,而且不存在同一条染色体不同位置有多处插入位点的现象。另外,外源基因总是整合于一对同源染色体中的一条上,是随机整合还是对某条染色体有偏倚,还需实验证明。比较而言,转基因阳性个体体型均较对照为大,生理指标与对照有差别(pGH、性激素等),这可能与外源 pGH 基因的整合及表达有关。根据目前情况,应用染色体原位杂交技术来研究转基因动物外源基因整合及其效应的关系,以基因定位结果来探讨外源基因整合位点周围 DNA 序列的结构与功能,一方面可为将来外源基因定点整合的研究提供参考,另一方面也为深入探讨为外源基因整合所导致的生理变化等基因理论研究打下基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Andresen E, Baker L N. The C blood group system in pigs and the detection and estimation of linkage between the C and J systems. *Genetics*, 1964 **49**: 379 ~ 386
- [2] Chandler M E, Yunis J J. A high resolution *in situ* hybridization technique for the direct visualization labeled G-banded early metaphase and prophase chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 1978 **22**: 352 ~ 356
- [3] CHEN W Y (陈文元), WANG Z S (王子淑), WANG X Z (王喜忠). High resolution chromosome G-banding pattern of domestic pig of China. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 1991 **18**(2): 120 ~ 126
- [4] Ingemar G. Standard karyotype of the domestic pig. *Hereditas*, 1988, **109**: 151 ~ 157
- [5] Nicole L, Régen D, Claude-Lise R. High-resolution dynamic and morphological G-bands (GBC and GTG): a comparative study. *Hum. Genet.*, 1990 **85**: 261 ~ 266
- [6] Cannizzaro L A, Emanuel B S. An improved method for G-banding chromosomes after *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 1984, **38**: 308 ~ 309
- [7] Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Péquignot E. A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence *in situ* hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet Cell Genet*, 1992 **59**: 311 ~ 312
- [8] Heath P, Elvin P, Jenner D *et al.* Localization of a cDNA clone for human cytokeratin 18 to chromosome 17p¹¹ ~ p¹² by *in situ* hybridization. *Hum Genet*, 1990 **85**: 669 ~ 670
- [9] Echard G, Milan D, Yerle M *et al.* The gene map of the pig *Sus scrofa domestica* L. A review. *Cytogenet Cell Genet*, 1992 **61**: 146 ~ 151
- [10] Chowdhary B P, Thomsen P D, Harbitz I *et al.* Precise localization of

- release channel (CRC), hormone sensitive lipase (LIPE) and growth hormone (GH) in pigs, using *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 1994 **67**: 211 ~ 214
- [11] Gary A R, Leeson J A, Zhiliang H *et al.* A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Research*, 1996 **6**: 371 ~ 391
- [12] HE X (何新), CHEN Q X (陈清轩). Localization of PLF gene at porcine chromosome 2q¹² band by *in situ* hybridization. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1998, **14** (1): 96 ~ 100
- [13] HE X (何新), LIU G S (刘桂生), CHEN Q X (陈清轩). Exogenous gene localization on chromosomes of transgenic pig. *Acta Zoologica Sinica* (动物学报), 1998 **44** (2): 241 ~ 243
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [15] Chen Q X, He X *et al.* Localization of an exogenous GH gene on chromosomes of transgenic pig by *in situ* hybridization. *Developmental & Reproductive Biology*, 1997 **1** (1): 51 ~ 56
- [16] DENG H N (邓辉南), CHEN Q X (陈清轩), WEI Q X (魏庆信) *et al.* Studies on exogenous growth hormone gene localization of transgenic pigs—the techniques of nonisotopic *in situ* hybridization on chromosomes. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1996 **12** (1): 91 ~ 93
- [17] Gall J G, Pardue M L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1969, **63**: 378 ~ 383
- [18] Langer-Safer P R, Levine M, Ward D C. Immunological method for mapping genes on *Drosophila polytene* chromosomes. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1982 **79**: 4381 ~ 4385
- [19] Pinfel D, Straume T, Gray J W. Cytogenetic analysis using quantitative high-sensitivity fluorescence hybridization. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1986 **83**: 2934 ~ 2938
- [20] Lichter P, Chang Tang C J, Call K *et al.* High-resolution mapping of human chromosome 11 by *in situ* hybridization with cosmid clones. *Science*, 1990 **247**: 63 ~ 69
- [21] Leith A R, Schwarzachner T, Mosgöller W *et al.* Parental genomes are separated throughout the cell cycle in a plant hybrid. *Chromosomes*, 1991 **101**: 206 ~ 213
- [22] Jiang J, Gill B S. Different species-specific chromosome translocation in *T. timopheevii* and *T. turgidum* supports dipyletic origin of polyploid wheat. *Chromosome Res.*, 1994 **2**: 59 ~ 64
- [23] Thomsen P D, Hindkjaer J, Christensen K. Assignment of the porcine growth hormone gene to chromosome 12. *Cytogenet Cell Genet*, 1990, **61**: 152 ~ 154
- [24] Arichibald A L, Brown J F, Haley C S *et al.* Linkage mapping in the domestic pig (*Sus scrofa*). 23rd International Conference on Anim. Genet, *Anim Genet*, 1992 **23** (Suppl. 1): 88
- [25] Yerle M, Lahbib-Mansais Y, Thomsen P D *et al.* Localization of the porcine growth hormone gene to chromosome 12p¹² ~ p¹⁵. *Anim Genet*, 1993 **24**: 129 ~ 131

Exogenous pGH Gene Localization on Chromosomes of the Transgenic Pigs

NIU Yi-Dong HE Xin CHEN Qing-Xuan*

(Institute of Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

LIN Ai-Xing CHEN Yong-Fu

(Biology college, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

WEI Qing-Xin

(Institute of Animal Husbandry, Hubei Agricultural Academy, Wuhan 430209, China)

Abstract The pUC19-OMT plasmids were cut by *Ssp1* and the products in 900bp were recovered from low-melting agarose gel and used as probes which were labeled by Digoxigenin. After being denatured, the probes were dropped on the chromosome samples which were also denatured to anneal with them. The anti-digoxigenin antibodies labeled with colloidal golds were used to act with the chromosome samples. In order to localize the exogenous pGH genes (porcine growth hormone gene) on chromosomes detected with optical microscope and improve the sensitivity, digoxigenin gold signals are amplified by silver precipitation. After calculating the number of silver grains on every chromosome under the optical microscope, we analyzed the data with statistical methods. The results show that the integrating sites of exogenous pGH genes are very different among the positives. However, it is clear that the exogenous genes in one are always of the tendency to integrate in one specific site on a certain chromosome. These data are of great significance for studying the site-specific integration and the expression efficiency of exogenous genes in the future research.

Key words pGH gene, transgenic pig, gene localization, *in situ* hybridization on chromosome

Received: November 6, 2000

This work was supported by grant from National "863" Program (863-101-05-01) and Partly from "973" Program (G200016107).

* Corresponding author. Tel: 86-10-82614427; Fax: 86-10-62551951; E-mail: Qingxuanchen@yahoo.com