

## 转基因小鼠中外源基因遗传及表达稳定性的研究

颜景斌\* 肖艳萍 方彧聃 奚鹰 黄文英 黄英

(上海市儿童医院 上海医学遗传研究所, 上海 200040)

关键词 转基因小鼠, 外源基因, 遗传, 表达

中图分类号 Q819 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0758-04

转基因动物乳腺生物反应器是一种生物制药的新方法。自从 Gordon 等首次成功应用转基因技术在哺乳期小鼠的乳腺中分泌人组织源性纤维酶原激活剂以来<sup>[1]</sup>, 人们对通过转基因技术来生产珍贵药用蛋白的可行性和优越性几乎已达成共识。

通过多年的研究, 人们发现外源基因在转基因动物中的表达取决于它的整合位点, 由于整合位置的不同, 使用相同表达载体获得的转基因动物中外源基因的表达量可相差许多倍。由于外源基因是整合于转基因动物的染色体上, 因此可以遗传给后代, 如果它能够稳定地遗传和表达, 那么将高表达的个体进行繁育就可得到大量表达水平相近的转基因动物, 这会大大提升转基因动物乳腺生物反应器的价值, 并促进其产业化的进程。

本研究以繁殖周期短、易操作、较经济的小鼠作为实验模型, 从已整合有人凝血因子 IX(hFIX)基因的小鼠中挑选两个表达量差别较大的个体来培育家系, 并对后代中 hFIX 的整合情况及表达量进行测定, 从而探讨其中的规律。

### 1 材料与实验方法

#### 1.1 实验动物

携带有人凝血因子 IX 基因的转基因小鼠(昆明白)家系(FIX-33 和 FIX-124), 为本所所有。

#### 1.2 试剂

Taq 酶购自 TaKaRa 公司; ELISA 显色底物 TMB 购自 Roche 公司; 鼠抗人 FIX 单克隆抗体 3A6 由日本奈良医学院 Yoshioka 博士惠赠; 兔抗人 FIX 抗体及 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体均购自 DAKO 公司。

#### 1.3 转基因小鼠家系的培育

从原代转基因小鼠中选取 2 个 hFIX 表达量相差较大且已知外源基因整合位点的个体 FIX-33(乳汁中 hFIX 表达量

为 52.91 $\mu$ g/mL)和 FIX-124(乳汁中 hFIX 表达量为 1.46 $\mu$ g/mL), 与正常小鼠交配获得后代, 用相同方法将两个家系分别培育至后代。

#### 1.4 转基因小鼠的 PCR 及 Southern blot 鉴定

按文献[2]的实验步骤和方法进行。

#### 1.5 外源基因完整性的鉴定

制备 hFIX 转基因小鼠所使用的乳腺特异表达载体以前已经过测序, 我们在该载体上设计了 7 对 PCR 引物(见彩版图 1)对所有原代及子代转基因小鼠的外源基因完整性进行检测, 这些引物覆盖了载体中启动子和外源基因的全部序列, 引物的序列见表 1。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 而后进入循环。循环条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 60s, 57 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90s, 32 个循环。最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。扩增获得的片段大小在 1.0~1.7kb 之间。

表 1 PCR 引物序列一览表

Table 1 PCR primer sequence

Primer name	Primer sequence
P1	5' AGCAGGAATCACAGCATCTAC 3'
P2	5' CACCGACTCAATGGACATGAG 3'
P3	5' GAACGCATAAAACCCAGAACC 3'
P4	5' CAATTGATTAAACCTACCTCAGC 3'
P5	5' TCCTGGCATTCTCTGTCCAAC 3'
F2	5' CCATATGGCACTTTGCTTCTTAC 3'
F3	5' AGATATGAGGCCAAAACCTGAGC 3'
R1	5' TGTGTGTTGTGGATGGTAATAC 3'
R2	5' TCAGTGGGTCTTTGAGATCTTG 3'
A3	5' GGATCCTTCTTGGCTCTCGATTCC 3'
BF1	5' AGGTTTCAGGATCTTGGTTC 3'
BF2	5' TGATTGGGTGCTTTGAGTGA 3'
BF3	5' GTTATGAGAGATCAGTGTGAG 3'
BF4	5' GTTAGTGAGAGGCCCTGTGA 3'

收稿日期: 2002-05-24, 修回日期: 2002-08-10。

基金项目: 国家“863”高技术项目 基金资助(No. 2001AA213011); 上海市现代生物与新药产业发展基金资助(No. 99431904); 上海市卫生局青年基金资助(No. 004Y10)。

\* 通讯作者。Tel: 86-21-62472308; Fax: 86-21-62475476; E-mail: ytzeng@stm.sh.cn 或 yanjingbin@sina.com

### 1.6 外源基因遗传稳定性的分析

对 1.4 和 1.5 分析获得的结果进行统计,分别计算两个家系  $F_1$  至  $F_4$  代中阳性小鼠所占的比率。

### 1.7 乳汁中 hFIX 的检测

于母鼠分娩后 15 天收集乳汁,ELISA 测定其中 hFIX 蛋白含量,测定方法参见文献 [3]。

### 1.8 转基因小鼠后代中 hFIX 整合位点的荧光原位杂交 (Fluorescence in situ hybridization, FISH) 分析

具体方法参见文献 [4]。

## 2 结果

### 2.1 转基因小鼠家系的培育

FIX-33 和 FIX-124 家系用常规育种方法培育至  $F_4$  代。

### 2.2 外源基因完整性的鉴定

彩版图 2 中的 PCR 扩增结果显示所有的原代及子代转基因小鼠中外源基因的整合均是完整的,未发现可见的片段丢失。

### 2.3 外源基因遗传稳定性的分析

两个家系的  $F_1$  至  $F_4$  代中阳性小鼠的比率与理论值 50% 没有显著性差异 ( $P > 0.05$ ),具体数值见表 2。这表明外源基因在两个家系中均得到了稳定的遗传。

表 2 转基因小鼠家系中阳性个体的比率

Table 2 Rate of positive mice in the transgenic strain

	FIX-33 strain			FIX-124 strain		
	Number of positive mice	Total	Positive rate/%	Number of positive mice	Total	Positive rate/%
$F_1$	4	10	40	6	11	54.55
$F_2$	7	14	50	10	19	52.63
$F_3$	27	46	58.70	47	88	53.41
$F_4$	5	16	31.25	59	104	56.73
Total	43	86	50	122	222	54.95

### 2.4 转基因小鼠乳汁中 hFIX 的含量

FIX-33 家系小鼠乳汁中 hFIX 的表达量稳定在  $40\mu\text{g/mL}$  左右(范围  $37.73 \sim 52.91\mu\text{g/mL}$ ,  $M \pm SD$   $43.32 \pm 5.41\mu\text{g/mL}$ ), FIX-124 家系小鼠乳汁中 hFIX 的表达量在  $1\mu\text{g/mL}$  左右(范围  $0.53 \sim 1.74\mu\text{g/mL}$ ,  $M \pm SD$   $1.16 \pm 0.45\mu\text{g/mL}$ )。t 测验结果表明两个家系之间的表达量差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

### 2.5 FISH 分析结果

FISH 结果显示同一家系的小鼠中每一代的 hFIX 整合位点均一致,而不同家系中 hFIX 整合位点则不相同。彩版图 3A 显示 FIX-33 家系小鼠外源基因整合在一条大染色体的长臂末端,而彩版图 3B 则显示 FIX-124 家系小鼠外源基因整合在一条小染色体的着丝粒附近,整合位置均与原代鼠相同<sup>[4]</sup>。该结果提示外源基因在这两个家系中的遗传是稳定的,而家系间 hFIX 表达水平的不同可能与整合位点有关。

## 3 讨论

目前的研究认为整合的位置效应对于外源基因的表达水平有着十分重要的影响, MAR、LCR 和绝缘子可能对克服位置效应和增强表达有着一定的作用<sup>[5]</sup>。本文中所选用的两个转基因小鼠家系经 FISH 分析证实外源基因整合在不同的染色体上,其 hFIX 在乳汁中的表达水平亦有显著性差异,这可能和其附近存在染色质开放区域或 LCR、绝缘子有关。邻近的开放染色体结构有利于整合基因的表达,而绝缘子成分则会消除邻近异染色质的抑制效应。若能获知高表达小鼠的侧翼序列,再结合现在刚刚发展起来的 Cre/LoxP 定点整合技术<sup>[6]</sup>,则有望得到大量高表达的转基因动物,并用于生产药物蛋白。

与其他生物制药方法相比,转基因动物乳腺生物反应器的一大特点是其具有可遗传性。外源基因通过一定的途径被导入体内后整合于动物的染色体上,成为其基因组中的一个组成部分,从理论上说该基因及其表达特性应该可以稳定地遗传给子代,但有些实验中却发现了与之相反的现象。通过长期的研究,我们认为影响转基因小鼠后代中外源基因遗传及表达稳定性的因素可能包括(1)外源基因的表达影响到了个体的正常生长发育,从而导致不育的发生。(2)原代中外源基因同时整合在不同的染色体上,后代中它们发生了分离,而使其表达量与原代有了明显的差异。(3)外源基因在传代时出现了片段丢失现象,结果大大影响了表达量。

Al-Shawi 等<sup>[7]</sup>在他们制备的带有 HSV tk 基因的转基因小鼠中发现雄性个体均为不育,后代中亦有这种情况发生,后来人们发现是 HSV tk 的表达影响到了雄性生殖细胞的生成<sup>[8]</sup>。我们的实验结果表明,转有 hFIX 基因的小鼠可以稳定遗传且雌雄个体间生殖能力没有明显差异,这可能是由于我们所用的乳腺特异表达载体使外源基因的表达仅限于乳腺组织<sup>[9]</sup>,而不会影响到生殖细胞的生成。综合以前的研究可以看出外源基因的类型及表达载体的构建会对遗传的稳定性产生一定的影响。

由于按本文方法获得的转基因小鼠外源基因整合是随机的,因此其在不同的转基因小鼠中整合位点是不同的,也可能同时整合在不同的染色体上,即形成双重杂合子。根据分离和自由组合规律,后代中便会产生不同的基因型和不同表达水平的转基因小鼠,我们以前的实验发现双重杂合子的表达量明显高于单重杂合子<sup>[2]</sup>,所以其后代与原代的表达水平将会有较大的差别。

本文的结果还显示外源基因在两个家系的实验小鼠中的遗传不仅是稳定的而且是完整的,未发现可见的片段丢失现象,这说明通过正常的繁育能够获得大量同一谱系的转基因小鼠。当然传代中一些位点特别是重要转录因子结合位点的部分丢失或突变也有可能影响外源基因的表达,这方面的研究还需深入地进行。

外源基因的表达是一个十分复杂的过程,个体的遗传背景、体质状况、年龄大小都可能会对其产生影响。现在对遗

传背景是否影响表达还有争议,Allen等<sup>[10]</sup>在研究中发现在DBA/2和129品系的小鼠中外源基因的表达被增强,而在BALB/c品系的小鼠中表达则被抑制;Dobie等<sup>[11]</sup>的实验则认为遗传背景不会对表达量产生影响,因此尚需更多的实验才能对此下一个明确的结论。我们在实验中曾发现同一小鼠个体不同胎次的哺乳期中外源基因的表达量是较为接近的(数据未显示),这与Dobie等的结果一致,而同一哺乳期前后几天的乳汁中外源基因表达量亦没有明显差异(数据未显示)。这些结果暗示个体的年龄大小、体质状况可能对表达量的影响不大。

以上这些因素很大程度上决定着转基因动物中外源基因遗传和表达的稳定性,而将其中的机理研究透彻、掌握其规律则会有力地推动转基因动物乳腺生物反应器的产业化进程。

#### REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Gordon K , Lee E , Vital J A *et al.* Production of human plasminogen activation in transgenic mice milk. *Bio/Technology* ,1987 **5** :1183 ~ 1187

[ 2 ] HUANG Y(黄纓),YAN J B(颜景斌),SUN Q(孙琼)*et al.* Expression of exogenous genes in offspring milk of transgenic mice by breeding. *Chinese Journal of Veterinary Science*(中国兽医学报), 2001 **21**(1) :17 ~ 20

[ 3 ] Anson D S , Austen D E , Brownlee G G *et al.* Expression of active human clotting factor IX from recombinant DNA clones in mammalian cells. *Nature* ,1985 **315** :683 ~ 685

[ 4 ] HUANG X(黄赞),YAN J B(颜景斌),HUANG Y(黄纓)*et al.* High expression of human FIX(hFIX) in transgenic mice directed by goat  $\beta$ -casein gene promoter. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 2002 **29**(3) :206 ~ 211

[ 5 ] Gerasimova T I , Corces V G. Boundary and insulator elements in chromosomes. *Curr Opinion in Genetics and Development* ,1996 **6** : 185 ~ 192

[ 6 ] Furth P A. Conditional control of gene expression in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* ,1997 **2**(4) :373 ~ 383

[ 7 ] Al-Shawi R , Burke J , Jones C T , Simons J P *et al.* A mup promoter - thymidine kinase reporter gene shows relaxed tissue-specific expression and confers male sterility upon transgenic mice. *Mol Cell Biol* ,1988 **8**(11) :4821 ~ 4828

[ 8 ] Wilkie T M , Braun R E , Ehrman W J *et al.* Germ-line intrachromosomal recombination restores fertility in transgenic MyK-103 male mice. *Genes Dev* ,1991 **5** :38 ~ 48

[ 9 ] CAO X(曹新),ZENG Y T(曾溢滔).The tissue specific expression of human serum albumin gene using goat  $\beta$ -casein gene promoter in the mouse tissue. *Hereditas(Beijing)*(遗传),2001 **23**(6) :522 ~ 524

[ 10 ] Allen N D , Norris M L , Surani M A. Epigenetic control of transgene expression and imprinting by genotype-specific modifiers. *Cell* , 1990 **61**(5) :853 ~ 861

[ 11 ] Dobie K W , Lee M , Fantes J A *et al.* Variegated transgene expression in mouse mammary gland is determined by the transgene integration locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,1996 **93**(13) :6659 ~ 6664

## The Study on the Stable Inheritance and Expression of Foreign Gene in Transgenic Mice

YAN Jing-Bin\* XIAO Yan-Ping FANG Yu-Dan XI Ying HUANG Wen-Ying HUANG Ying  
(Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai Children's Hospital, Shanghai 200040, China)

**Abstract** Two transgenic mouse strains, in which the expression of human factor IX(hFIX) in the milk were different significantly, were bred, and the foreign gene integration as well as the content of hFIX in the milk were detected by PCR, Southern blot, FISH and ELISA, respectively. The results showed that approximately 50% offsprings were transgenic positive. Foreign gene integrated in mouse chromosomes was intact. The hFIX expression of each mouse in the same strain was different, the content of hFIX in the milk was  $(43.32 \pm 5.41) \mu\text{g}/\text{mL}$  in FIX-33 transgenic strain and  $(1.16 \pm 0.45) \mu\text{g}/\text{mL}$  in FIX-124 transgenic strain. Meanwhile, the hFIX gene expression between the two strains was different remarkably ( $P < 0.01$ ). We conclude that the characteristics of inheritance and expression in the founder were able to be transferred to their offsprings stably.

**Key words** transgenic mice, foreign gene, inheritance, expression

Received : 05-24-2002

This work was supported by Grant from National High-tech 863 Project of China(No. 2001AA213011), Shanghai Developing Foundation for Modern Biomedical and Pharmaceutical Industry(No. 99431904) and Shanghai Health Bureau research Grant for Young Scientists(No.004Y10).

\* Corresponding author : 86-21-62472308 ; Fax 86-21-62475476 ; E-mail : ytzeng@stn.sh.cn or yanjingbin@sina.com