

转基因猪外源生长激素基因的定位研究 ——非同位素标记染色体原位杂交技术

邓辉南¹ 陈清轩¹ 魏庆信² 陈永福³

(中国科学院发育生物学研究所 北京 100080)¹

(湖北省农业科学院畜牧研究所 武汉 430209)²

(北京农业大学生物学院 北京 100094)³

近几年来发展起来的染色体原位杂交技术是进行基因定位研究的重要手段^[1-3]。它为进一步进行基因定点整合研究提供依据。本文采用非同位素标记染色体原位杂交技术对经显微注射得到的转基因猪进行了内源和外源猪生长激素 (PGH) 基因在染色体上定位的研究。

用 Bgl I 对 pSMTPGH 注射基因 (本室制备) 进行单酶切, 选取 3.5kb 片段以 Dig 进行标记。为了提高灵敏度, 我们采用了胶体金标记抗体技术并结合使用银增加试剂。利用染色体的组型分析, 对杂交点的分布进行了统计学分析, 发现内源 PGH 基因位于 12p¹¹, 与国外 Thomsen, P. D. [4] 等报道的一致。插入的外源 PGH 基因呈随机分布, 但对某一转基因猪来说, 外源基因的插入是集中在某一染色体上。这一结果的发现为进行转基因猪外源基因定点整合提供了依据, 也为研究外源基因整合位点和转基因猪表现性状的关系准备了条件。

1 材料和方法

1.1 染色体的制备

挑选经 Dot, Southern blot 检测为阳性的转基因猪 6 头, 以无菌手术自耳静脉抽取 5ml 血, 放入盛有肝素 (1000u/ml) 的盐水瓶中, 摇匀, 4℃ 静置, 使红血球沉降。取上层血浆层 0.5ml 接种于含有 PHA、青霉素、链霉素和 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 (Gibco) 5ml 中。为得到具有一定长度和良好形态的染色体, 我们在 Yunis [5] J. J., 以及 B. Dutrillaux [6] 等人方法的基础上进行了改进。37℃ 培养 60h 后, 加入 100μg/ml 5'-BrdU, 继续培养 12h。细胞经洗涤后, 重新悬浮在新鲜的含有 2.5μg/ml 胸腺嘧啶的培养基中, 37℃ 再培养 6h。收获前 30min 加入秋水鲜素 (Sigma) 0.04μg/ml。按常规方法制备外周血淋巴细胞染色玻片标本。置 4℃ 待用。

1.2 地高辛标记探针

用 Bgl I 对 pSMTPGH 注射基因进行单酶切, 选择 3.5kb 片段, 将 Dig-11-dUTP 用随机引物法进行探针标记 (Boehringer Mannheim 非同位素标记试剂盒)。

1.3 变性与杂交

1.3.1 杂交液的配制: 杂交液中含有 1ng/μl 标记探针, 50% 甲酰胺, 10% 硫酸葡萄糖, 0.5mg/ml 鲑鱼精子 DNA, 2×SSC。

1.3.2 染色体玻片标本预处理: 为减少非特异吸附, 在每张玻片上加 100μl RNA 酶 (100μg/ml) 盖上盖片, 置于潮湿皿中, 37℃, 1h。去除盖片, 用 2×SSC 洗片 5 次。再用乙醇 (70%, 80%, 90%, 100%) 逐级脱水, 空气干燥。

1.3.3 探针和染色体共变性与杂交: 在每张玻片上加杂交液 100μl, 盖上盖玻片, 72℃ 变性 10min, 迅

速置于碎冰上。将共变性的玻片置于潮湿皿中, 42℃杂交 16h。

1.3.4 脱水: 杂交反应后的玻片用 50% 甲醛胺, 2×SSC 洗涤 5 次, 每次 5min。

1.4 用免疫胶体金的方法进行基因定位

将 2×SSC 洗涤过的杂交玻片标本在 PBS 中洗 1 次。去除多余的 PBS, 但不要使玻片完全干燥。在玻片上加上 10μl 胶体金标记的抗 Dig 抗体 (按 Boehringer Mannheim 公司提供的试剂盒中的说明, 1:30 稀释在 PBS 中, 并加入 1mg/ml 的 BSA), 盖上盖玻片, 室温下反应 30min。用 PBS 洗涤一次, 然后每次用 200ml 去离子水至少洗 5 次, 以去除氯离子。在每张玻片上加上新鲜配制的银增加试剂 100μl。在潮湿皿中, 室温, 避光作用 30min, 用去离子水洗涤数次以终止反应。

1.5 染色体 G-显带

用荧光-Giemsa 方法进行染色体显带, 在玻片上加 5μg/ml Hoechst33258 (Sigma), 室温避光作用 30min。2×SSC 洗涤 3 次, 紫外灯照射 60min, 用去离子水洗涤玻片。10% Giemsa 染液 (用 0.06mol/L PB, pH6.8, 洗释) 染色 10min, 用去离子水洗去多余的染液, 自然干燥后镜检。

2 结果和讨论

2.1 结果

油镜下选择染色体数目完整、带型清楚的中期相进行分析。只计数统计与染色体接触的银颗粒。图 1 示原位杂交后经 G-显带的中期相。经统计分析, 在 30 个分裂相中 26% 的细胞 (8/30) 在 9q¹⁵ 上有银颗粒分布, 16% (8/30) 的细胞在 3q¹¹ 上有银颗粒分布, 其余银颗粒在其染色体上呈随机分布。共检测阳性转基因猪 3 头, 对另外两头转基因猪显影银颗粒在其染色体上分布的计数统计表明, 外源基因分别定位在 2p¹² 和 10p¹¹。

2.2 讨论

传统的分子杂交技术中, 标记探针使用的是含有放射性同位素的标记化合物, 它的优点是: (1) 精确度和灵敏度高; (2) 方法稳定, 重复性好。但也有它难以克服的缺点: (1) 存在放射性污染的潜在危险; (2) 有些放射性同位素半衰期短, 不利于贮存和运输; (3) 放射自显影需要较长时间, 且需要一定的



图 1 阳性转基因猪染色体中期相与 3.5kb pSMTPGH 探针原位杂交后 G 显带, 箭头示银颗粒位于 9q¹⁵

设备和条件。因此, 选用安全、稳定、灵敏度高的非同位素标记化合物代替放射性同位素已被国内外许多实验室所接受。本文采用德国 Boehringer Mannheim 公司的地高辛标记试剂盒并结合使用胶体金标记抗体及银增加试剂取得了较好的效果。胶体金标记抗体技术的应用提高了免疫反应的灵敏度, 银增加试剂的作用是将银颗粒随着在金颗粒表面, 起信号放大作用, 使用普通光学显微镜即可直接观察到染色体上银颗粒。实验中只观察到一例分布在 12p¹¹ 的银颗粒, 与国外 Thomsen^[1], P. D. 等报道的猪内源生长激素基因的定位相一致。由于整合在染色体上的外源 PGH 基因拷贝数远远高于内源 PGH 基因, 这可能是银颗粒分布差异并导致检出率差异的原因。

利用显微注射的方法进行转基因动物研究, 发现注入的外源基因是随机整合在宿主基因组中^[6]。由于整合的随机性以及因此而产生的对于宿主基因组中正常结构基因的破坏给转基因动物研究带来了麻烦。我们在进行转基因猪的研究中也常发现死胎、畸胎、出生后生长不良等现象。因此, 研制转基因猪的定点整合载体已成为必要。本文旨在利用染色体原位杂交技术为转基因猪定点整合载体的研制提供一些依据, 也为研究外源基因整合位点和转基因动物表现性状的关系准备了条件。

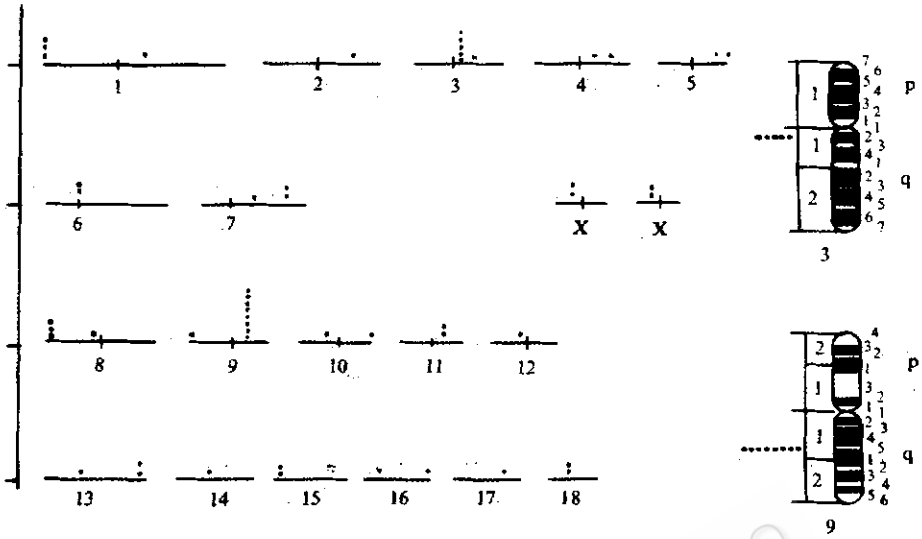


图2 原位杂交后银颗粒在阳性转基因猪染色体上分布的直方图
每个黑点代表在某染色体上观察到的一个银颗粒

参 考 文 献

- [1] Thomsen P. D., Fredholm M., Christensen K *et al.* *Cytogenet. Cell Genet.*, 1990, **54**: 92~94.
- [2] Bhatt B., Burns J., Flannery D *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1988, **16** (9): 3951~3962.
- [3] Chan V. T., Fleming K. A., McGee J. O'D. *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1985, **13** (22): 8083~8091.
- [4] Yunis J. J., Sawyer J. R., Ball D. W. *et al.* *Cytogenet. Cell Genet.*, 1978, **22**: 679~683.
- [5] Dutrillaux B., Viegas-Pequignot E. *Human Genetics*, 1981, **57**: 93~95.
- [6] 史瀛仙, 顾方舟. 见: 卢圣栋主编, 生物技术的现状与未来, 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1990, pp. 67~83.

Studies on Exogenous Growth Hormone Gene Localization of Transgenic Pigs —The Techniques of Nonisotopic in Situ Hybridization on Chromosomes

Deng Huinan¹ Chen Qingxuan¹ Wei Qingxin² Chen Yongfu³

(Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing 100080)¹

(Institute of Animal Husbandry, Hubei Agricultural Academy, Wuhan 430209)²

(Biological Institute, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)³

Abstract It was the first time to localize the exogenous PGH gene on chromosomes of transgenic pigs using nonisotopic in situ hybridization. The endogenous PGH gene was localized at 12p¹¹, and the exogenous PGH genes were localized at 9q¹⁵, 2p¹² and 10p¹¹ respectively for different transgenic pigs. This study has demonstrated that foreign genes can be integrated in chromosomes randomly.

Key words Gene location, PGH gene, transgenic pigs