

HLA- 类基因 DR 及 DRB₁*0401¹ 转基因小鼠的制备^{*}

余 鸥 邓军卫^{***} 吴 轰^{**,***} 游学科^{***} 李 芬^{***} 冯清泉^{***} 朱亚辉^{****} 卢光^{*****}

(湖南省临床检验中心 长沙 410011)

摘要 利用受精卵原核的显微注射技术,将人类 HLA- 类 DR 及 DRB₁*0401 两种基因,显微注射至 C57BL/6 ×DBA/1 杂交小鼠受精卵中;并移植至假孕受体鼠的输卵管内。实验先后有 8 只鼠妊娠,稳定遗传五代,经 PCR 检测 95 只 HLA-DR、DRB₁*0401 阳性。 -32P-dCTP 斑点杂交与 Southern 印迹杂交鉴定出 68 只整合含有 DR 及 DRB₁*0401 混合型的转基因小鼠,有效率为 20.9%。经 Northern 杂交^[1]和 RT-PCR 检测,其 HLA-DR、DRB₁*0401 基因在脾脏和肾脏中均有表达。结果说明,携带人类 HLA- 类 DR 和 DRB₁*0401 基因的转基因动物模型构建成功。

关键词 基因 DR 基因 DRB₁*0401 转基因小鼠 疾病模型动物

MHC(主要组织相容性复合物) 类抗原是多形细胞表面糖蛋白,亦可携带外源抗原形成复合物,并被 T 淋巴细胞识别。MHC 与人类自身免疫性疾病高度相关。为了研究人类 MHC 类抗原与自身免疫性疾病的关系及其生物学功能, Woods, A^[2], Yamamoto, K^[3] 等已用 C57BL/6 ×STL F₂ 小鼠建立了 HLA- 类基因 DR 和 DRB 及 DQ 转基因动物模型。本文采用人类 类基因 DR 和 DRB₁*0401,经显微注射法导入 C57BL/6 ×DBA/1 小鼠内建立 DR、DRB₁*0401 混合型转基因小鼠模型,旨在进一步建立人类疾病模型,尤其为建立自身免疫性疾病模型创造条件。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物:C57BL/6 及 DBA/1 两品系鼠株,购自上海中国科学院上海分院实验动物中心。质粒:pRC/CMV 由美国康奈尔大学教学医院北海岸大学医院 Jack Sliver 分子医学研究室惠赠。试剂:内切酶、蛋白酶 K、Taq DNA 多聚酶、dNTPs 及探针随机引物标记盒均购自 Promega 公司;PCR 引物由中国科学院上海细胞所合成;-32P-dCTP 购自北京亚辉生物医学工程公司。

1.2 HLA- 类 DR 和 DRB₁DNA 的制备、分离和纯化

DR 和 DRB₁*0401 经 T/A 克隆方法插入 PCR1000 质粒载体中;再用 Not、ApaI 酶切出 DR、DRB₁ 片段,然后插入 pRC/CMV 质粒相同酶位点的位置中。

1.3 基因(HLA-DR、DRB₁*0401)导入受精卵

用 TE(0.1mmol/L EDTA、8mmol/L Tris-HCl,pH8.0)将 DR、DRB₁*0401 基因溶解,调整浓度至 1.8ng/μl,用显微注射法将其解注入 C57BL/6 ×DBA/1 品系小鼠受精卵雄性前核中,注入量为卵 1~2pl。再将该受精卵移植至 6 周龄的假孕母鼠输卵管中。每侧输卵管输入 5~30 个卵细胞,待其发育,并产仔。

1.4 仔鼠尾部组织 DNA 的制备及分析

当仔鼠长至此周龄,剪下长度 0.5~1.0cm,重约 0.2g 的鼠尾巴;剪碎置入 500μl TES L 0.5% SDS, 0.1mol/L EDTA,0.05mol/L Tris-HCl pH8.0) 中。用蛋白酶 K 50 消化过夜,酚提取一次,酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 提取 2 次,再用氯仿提取一次,无水乙醇沉淀,75%乙醇洗一次,室温干燥,溶于 TE(1mol/L, EDTA,10mol/L Tris-HCl,pH8.0) 中,DNA 浓度为 0.5~0.8g/L。

1.5 鼠尾组织 DNA 中 DR、DRB₁*0401 基因的 PCR 扩增

1.5.1 PCR 引物的设计 引物设计参考 HLA-DRB₁*0401 基因序列。两引物分别由 20bp,21bp 组成,

* 国家自然科学基金资助课题,编号 39370865; ** 本课题负责人;

*** 湖南医科大学附属第二医院; **** 湖南医科大学生殖工程研究室

(C + G) 含量为 65 %。二者之间无同源序列、不互补配对,引物 3 端不形成“二聚体”,P1 和 P2 引物序列分别为:

P1 :5 GTTCTTGGAGCAGGTTAAAC3
P2 :5 CCGCTGCACTGTGAAGCTCT3

1.5.2 HLA-DR、DRB₁*0401 基因的 PCR 扩增
在 0.5ml Eppendorf 管中加入 25μl 反应体系,其中含 KCl 5mmol/L,MgCl₂ 1.5mmol/L,Tris-HCl 10mmol/L,pH8.3,4 种 dNTPs 各为 200mmol/L,引物各为 20pmol 模板 DNA。混合后,96 变性 5 分钟;加 Taq 酶 1.5u 置于 PE 2400 PCR 扩增仪上。94 60 秒,53 60 秒,70 90 秒;30 个循环周期,70 延伸 10 分钟后,取 5μl 扩增产物在 1.5 %琼脂糖凝胶上电泳,观察结果。

1.6 Southern 印迹杂交

1.6.1 DNA 探针的制备 用 Not 及 Apa 酶切质粒 pRC/CMV,琼脂糖电泳分离出 DR、DRB₁*0401 基因片段,按文献^[4]方法回收该片段作为探针。

1.6.2 探针的标记 以 -32P-dCTP 为标记物,按随机引物标记盒说明标记探针、标记 50ng DNA,探针比放射性大于 1 ×10⁴CPm/g。

1.6.3 杂交 用 100 ~ 150u Hind Ⅲ内切酶消化 10μg 鼠尾组织 DNA,以 DNA/Hind Ⅲ分子量标记,在 0.8 %琼脂糖凝胶上电泳过夜(1 ×TBE,3 /cm)。用传统的纸巾法将凝胶中的 DNA 转移至尼龙膜上,按下述杂交方法:尼龙膜在蒸馏水中浸湿,6 ×SSC 中浸泡 10 分钟。放入 6 ×SSC、5 ×Denhart 's、0.5 % SDS、100mg/L ssDNA,10mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 中 68 预杂交 4 小时,弃预杂交液;然后换上同样的加入同位素标记探针的杂交液,68 杂交过夜。用 1 ×SSC、0.5 %SDS,37 洗膜两次,每次 10 分钟;用 0.5 ×SSC、0.1 %SDS,68 洗膜两次;再用 0.1 ×SSC,0.1 %SDS,70 洗膜两次,每次 10 分钟。放置暗匣内 - 70 过夜。取出 X 光胶片显影、定影并观察结果。

2 结果

2.1 质粒酶切结果

插入 pRC/CMV 质粒中的 DR 片段,用 Not 及 Apa Ⅲ内切酶从质粒上切下 DR、DRB₁ 片段(图 1);经 0.8 %琼脂糖凝胶电泳,回收 1.9Kb 条带^[4],纯化后溶于 10mM Tris-EDTA、pH8.0 溶液中作为转基因备用。

2.2 显微注射,移卵,产子结果

按 Gorden JW^[5],报道的方法,显微注射、移卵产

仔结果:注射 1146 枚受精卵,将其中 805 枚形态完好的受精卵分别植入 28 只假孕母鼠输卵管中。先后有 8 只鼠怀孕(怀孕率为 28.5 %),共产下 326 只仔鼠。

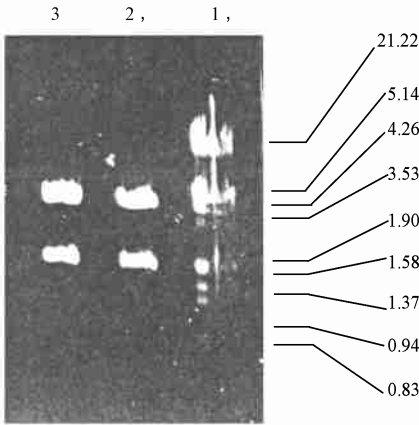


图 1 DR、DRB₁ 质粒酶切图谱

1: DNA/EcoR + Hind Ⅲ Marker
2,3:DR、DRB₁ 质粒 DNA 经酶切后大小为 1.9 Kb
Lane 1: DNA/EcoR + Hind Ⅲ Marker
Lane 2,3: DR、DRB₁ plasmid digested with Not I/Apa Ⅲ
The size of target DNA is 1.9 Kb.

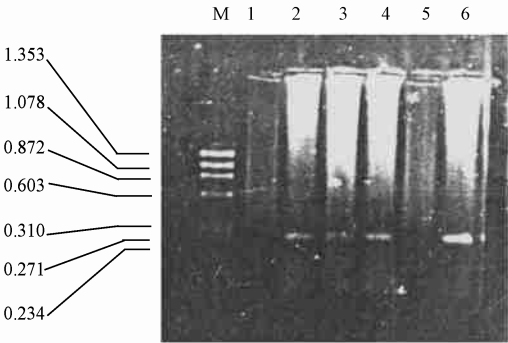


图 2 仔鼠基因组 DNA PCR 产物电泳分析

M: X174 DNA/Hae Ⅲ Marker
1,5:非转基因鼠 DNA 扩增产物
2,3,4,6:转基因鼠 DNA 扩增产物
Lane M: X174 DNA/Hind Ⅲ Marker
Lanes1,5 are amplification products from nontransgenic mouse DNA
Lanes2,3,4,6 are amplification products from transgenic mouse DNA

2.3 转基因的整合分析

按文献^[6]方法制备鼠尾组织基因组 DNA。经 PCR 扩增检测出 HLA-DR 阳性小鼠 95 只。阳性率为 29.1 % (图 2);其中首建 (Found) 鼠 5 只。为防止假阳性率,先后对子代阳性小鼠尾组织基因 DNA 进行斑点杂交和 Southern 印迹杂交检测。发现 68 只仔鼠整合有外源 DR、DRB₁*0401 基因,阳性整合

率为 20.9 % (图 3)。

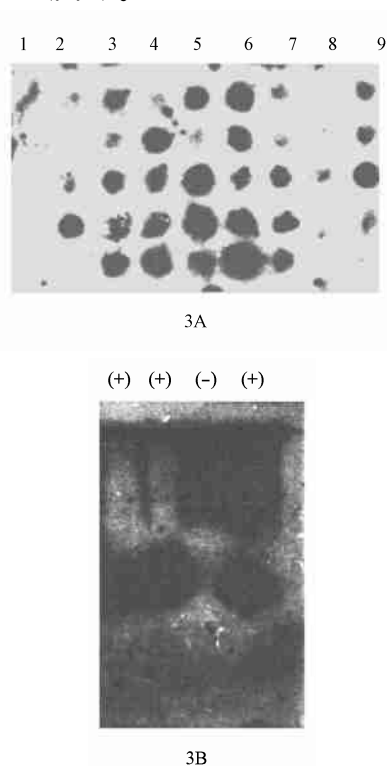


图 3 HLA-DR 转基因鼠整合图谱

3A: 斑点印迹杂交

1: 非转基因鼠尾 DNA 杂交

2 - 9: 转基因鼠尾 DNA 杂交

3B: Southern 印迹杂交

(-) 非转基因鼠尾 cDNA 杂交

(+) 转基因鼠尾 cDNA 杂交

鼠尾 DNA 经 Hind III 酶消化后, 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳, 转移至硝酸纤维素膜上。

3A: Dot blot analysis

Lane 1: Nontransgenic mouse tail DNA.

Lanes 2 - 9 are transgenic mouse tail DNA.

3B: Southern blot of mouse tail DNA.

Lane (-): Nontransgenic mouse DNA

Lane (+): Transgenic mouse DNA

DNA from tail was digested with Hind III, electrophoresed in 0.8 % agarose gel, Blotted onto nitrocellulose.

3 讨论

将外源基因导入小鼠胚胎的转基因小鼠技术, 已成为探索生物发育、细胞分化、基因表达调控等重要生命现象的分子生物学技术; 它亦为建立人类遗传性疾病模型、基因治疗、癌变的分子机制及优生、衰老方面的研究提供了一个全新的基础。生产转基因

鼠的关键之一是转基因能否表达, 尤其是能否发生组织特异性表达。大量研究表明, 基因表达强弱和组织特异性受基因调控区 (启动因子和增强因子) 控制。本文所导入转基因鼠内的 HLA-DR 和 DRB1*0401 基因主要分布在 B 淋巴细胞和巨噬细胞中。因此所建立的转基因小鼠的 HLA-DR 基因在脾脏表达。本文用原核显微注射法将 HLA-DR 和 DRB1*0401 基因导入小鼠受精卵后, 仔鼠存活率及转基因整合率分别为 87 % 和 20.9 %。说明前核显微注射法是可行的。

本文 Southern 杂交和 PCR 均证实 20.9 % 仔鼠有 DR 基因整合。影响 DNA 整合的因素较多, 主要有 DNA 形状、DNA 纯度、DNA 稀释液的成份和 pH 值及注入 DNA 量。本实验转基因 DNA 浓度为 1.8 ng/ μ l、稀释液为 0.2 mmol/L EDTA, 8 mmol/L Tris-HCl, pH7.4; 注入受精卵的体积为每个卵 1 ~ 2 pL。转基因整合鉴定一般用 Southern 杂交, 近年来也用 PCR 法监测。PCR 方法简便、快速、所需 DNA 量少, 对 DNA 纯度要求不高; 而 Southern 杂交所需 DNA 量多, 纯度高、时间长, 操作者受放射线照射。虽然 Southern 杂交有上述不足, 但某些优点是 PCR 法不能取代的。如 Southern 杂交不仅能识别有无转基因整合, 而且能获得转基因是否完整整合, 整合的拷贝数及整合形式等方面的信息。本文结果表明, PCR 方法可作为监测转基因整合的初筛方法。对于 PCR 转基因阳性转基因鼠, 可再作 Southern 杂交分析。这样既能减少监测工作量, 又不会丢掉一些重要信息。

本实验应用显微注射法成功建立了 HLA-DR 类基因 DR 在 C57BL/6 \times DBA/1 品系中的转基因小鼠, 为从整体水平探讨人类相关疾病、特别是研究人类自身免疫性疾病的发病机制、提供了良好的动物模型。

参考文献

- [1] Fukamizu A. et al. J. Biol. 1991, 5: 112 - 116.
- [2] Wood A., Hychen M E, Trambauer A, et al. J Exp Med, 1994, 180: 173.
- [3] Yamamoto K., Fukui Y., Easki T et al. J Exp Med. 1994, 180: 165.
- [4] 邓军卫, 吴轰, 余鸥等. 《湖南医科大学学报》, 1998, 23 (4): 421.
- [5] Gordon J. W. et al. Proc Natl acad, Sci. 1980, 77: 7380.
- [6] White, B. A., PCR protocols, current methods and application human press Inc, Totowa, New Jersey, 1993.

Establishment of HLA-DR ,DRB₁ *0401 transgenic mice model

She Ou Deng Junwei Wu Hong

(Hunan Provincial Central for Clinical Labs Hunan ,Changsha 410008)

Abstract HLA-DR and DRB₁ *0401 transgenic mice model was constructed by pronucleus microinjection technique. The DR and DRB₁ *0401 were microinjection into the fertilized eggs of C57BL/6 ×DBA/1 F1 mice. The total integrational rate and efficient rate of transgene were 29.1 % and 20.9 % assessed by PCR ,Dot blot and southern blot ,respectively at the same time ,These results demonstrated that HLA-DR4 molecule participated in murine immune regulation. It can enhance our understanding of the pathophysiological rule of human MHC molecules ,although its association with disease remains poorly understood ,greatly benefit to the study of human autoimmune disease.

Key words Gene DR , Gene DRB₁ *0401 , Transgene mice , Disease model

农业生物技术发展论坛

大力发展生物技术 ,加快实现产业化 ,是世界各国科技发展的战略重点。当今 ,我国生物技术及其产业迅猛发展 ,生物技术已在传统农业及相关产业中广泛应用 ,一批由技术创新突破带动的新兴产业迅速崛起 ,成为改造传统农业 ,振兴农业和农村经济强大的动力。为进一步推动我国农业生物技术的研究和产业化开发 ,由科技部农村与社会发展司主办 ,浙江省科学技术厅、科技部中国农村技术开发中心、中国生物工程开发中心等单位承办的“农业生物技术发展论坛”将于 2002 年 7 月在浙江杭州举行。本次论坛将邀请有关权威专家和产业界人士共同探讨我国农业生物技术今后研究发展的方向 ,引导产、学、研建立广泛合作 ,共同推进农业生物技术的研究和产业化开发 ,培育和壮大相关产业 ,实现我国农业和农村经济跨越式发展。

论坛主题:农业生物技术创新及产业化

主要内容:

1. 国际农业生物技术的发展前沿与发展趋势
2. “十五”及今后一段时期我国农业生物技术发展方向和产业化开发重点
3. 我国发展农业生物技术及其产业的政策措施、机制与模式
4. 产业界在农业生物技术开发中的地位和作用

本次论坛将采取大会专题报告、交流讨论、实地参观等形式。

主办单位:

科技部农村与社会发展司农业处 联系人:王逢天

具体联系:浙江省科技厅农村科技处 张咸益

电话:0571 - 87054057 ,传真:0571 - 87054033

实时定量 PCR 在乙型肝炎(HBV) 诊断中的应用

林灼锋¹ 李校坤¹ 吴帆² 许华¹

(1. 暨南大学医药生物技术研究开发中心 广州 510632; 2. 中山医科大学达安基因诊断中心 广州 510089)

摘要 随着对乙型肝炎治疗的深入研究,对乙型肝炎病毒(HBV-DNA)数量的确诊显得尤其重要。本文采用 Real Time Quantitative PCR(简称 RQ-PCR)方法,对 284 例经 ELISA 检定的乙型肝炎患者血清标本进行 HBV-DNA 定量检测。结果有 96 例 HBsAg(+)/HBeAg(+)/HBcAb(+) 的血清标本 RQ-PCR 阳性率为 100%,病毒平均量 5.02×10^5 拷贝/ μ l;87 例 HBsAg(+)/HBeAb(+)/HBcAb(+) 的血清标本 RQ-PCR 阳性率为 44%(38 例),病毒平均量 1.02×10^3 拷贝/ μ l,53 例 HBsAg(+)/HBcAb(+) 的血清标本 RQ-PCR 阳性率为 58%(31 例),病毒平均量 6.69×10^4 拷贝/ μ l;而 46 例正常对照组经检测全为阴性。可见 RQ-PCR 的检测结果反映了不同患者的病情,对乙型肝炎的诊断、治疗具有临床指导价值。

关键词 RQ-PCR 乙肝免疫标志物 HBV-DNA

乙型肝炎是一种世界性的传染性疾病,在我国也是几种高发病之一。对于乙型肝炎的发病机理、临床表现和预后等方面均研究得比较清楚^[1]。有关流行病学调查显示^[2,3]:在我国南方乙肝携带者高达 15%左右。临床医学诊断研究表明:乙型肝炎的免疫标志物表现和 HBV-DNA 病毒的复制表达有很大的差别^[4];不同的病毒数量反映了乙肝病毒在患者肝脏中的复制情况,同时也与 ALT 相关。为了确立 HBV-DNA 病毒量对临床治疗的指导价值,我们采用 RQ-PCR 对 HBsAg(+)/HBeAg(+)/HBcAg(+) 的标本(以下简称大三阳标本)、HBsAg(+)/HbcAb(+) 的标本和 HBsAg(+)/HbeAb(+)/HbcAB(+) 的标本(以下简称小三阳标本)进行 HBV-DNA 定量检测,同时选择 46 例 HBsAg(+) 或全阴性的对照组进行实验,其结果报道如下:

1 材料与方法

1.1 病例标本:收集于 1999 年 9 月至 10 月上海长征医院住院或门诊病人血清标本,经 ELISA 检测得乙肝免疫标志物大三阳血清标本 96 例,HBsAg、HbcAb 阳性血清标本 53 例,小三阳标本 87 例,同时选择 48 例正常人血清标本作为对照组。

1.2 试剂与仪器:ELISA 试剂购于华美公司或科华公司;HBV-DNA 定量分析试剂盒由中山医科大学达安基因诊断中心提供,配有 DNA 提取液及 DNA 模板的阳性对照,仪器采用 Perkin Elmer(PE)公司 Gene Amp5700 Sequence detection system 全自动荧光定量

PCR 分析仪,水平凝胶电泳仪。

1.3 检测方法:按试剂盒说明进行。取标本血清 40 μ l,加入等体积的 DNA 提取液,100 煮沸 10 分钟,10000rpm 离心 5 分钟,取 2 μ l 加入 RQ-PCR 反应管,按 93 2 分钟变性,93 25 秒,55 45 秒,进行 40 个热循环,反应结果由 5700 全自动 PCR 仪自动分析,直接由电脑得出标本的病毒拷贝数。

1.4 取出 PCR 扩增产物 8 μ l 进行 2%凝胶电泳(电压为 5~10V/cm),并与阳性模板作对照,紫外灯下观察,出现与阳性模板位置相同的特异性条带的标本判断为阳性。

2 结果

96 例大三阳血清标本经过 RQ-PCR 检测 HBV-DNA 全部显阳性,病毒平均量为 7.80×10^5 copies/ μ l,病毒量分布在 $4.03 \times 10^3 \sim 8.96 \times 10^6$ copies/ μ l;87 例小三阳血清标本经检测,有 54 例检出 DNA,检出率为 63%,病毒量分布在 $4.03 \times 10^3 \sim 1.24 \times 10^4$ copies/ μ l,病毒平均量为 1.02×10^3 / μ l,51 例乙肝标志物 HBsAg/HbcAb 阳性血清,有 31 例检出 DNA,检出率为 58%,病毒量分布在 $2.42 \times 10^3 \sim 9.60 \times 10^5$ copies/ μ l,病毒平均量为 6.69×10^4 拷贝/ μ l。结果表 1 所示。

以上的结果表明,RQ-PCR 可以清楚地反映乙肝患者的病情,对于临床诊断、治疗方案的选择及疗效控制有较高的应用价值,具有相当的指导意义。这也是 ELISA 酶学方法不能提供的。