

转基因动物鉴定技术的研究进展

卢一凡 田 毅* 邓继先

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

(*中国医学科学院心血管病研究所生化室, 北京 100037)

摘要 转基因动物的建立, 是一项复杂的系统工程, 所涉及的环节众多, 工作量大。而其中重要的一步, 转基因动物的鉴定, 则是对在此之前所进行的工作进行检验的关键。选用有效的方法, 则能迅速、准确地鉴定出转基因。近年来, 这方面技术发展迅速, 许多新思路、新方法不断出现, 本文对此进行了综述。

关键词 转基因动物 鉴定技术

早期所采用的转基因动物鉴定的方法是 Southern blot 也是目前所采用的最具有权威的转基因动物鉴定的方法。其具体步骤为提取待检动物的组织的染色体 DNA, 一般选择导入基因中的单一限制酶位点, 消化后电泳, 转膜后选择适当的探针进行杂交, 通过放射自显影获得结果。该方法的优点是结果明确可靠, 缺点是操作繁琐、工作量大^[1]。因而目前用此方法进行转基因动物初步筛选很少见报道, 主要应用于在使用其它方法如 PCR 等初步筛选后, 做最后的确定。

另一种较为常见的方法是斑点杂交。这一方法较为简单。提取待检动物 DNA 点于硝酸纤维素膜。用探针杂交, 放射自显影获得杂交结果^[1]。这一方法存在一些问题。如动物体内整合的外源基因与内源性基因有同源性时, 往往出现假阳性。另一方面, 在技术上, 由于提取的染色体 DNA 较为浓稠, 加之整合的拷贝数低, 杂交效果有时不十分理想。因此, 这一方法虽然十分简单, 但使用于转基因动物筛选并不多。

聚合酶链式反应 (PCR) 技术在分子生物学领域的迅速应用使转基因动物的筛选工作大为简化, 只需设计一对特异性引物, 以提取的组织 DNA 为模板进行 PCR 即可^[2]。由于 PCR 方法有时存在假阳性, 特别是扩增出内源性片段, 对转基因的筛选影响较大。因此, 如何消除假阳性是一个重要问题。解决这一问题的主要途径是集中在引物的设计上。在目的基因上合成一对引物, 所遵循的原则是 (1) 尽量寻找所扩增片段与内源性基因无同源性的区域; (2) 如果目的基因与内源性基因存在有比较高的同源

性, 所设计的两条引物应保证在 3' 端有几个碱基与内源性基因不一致。在进行 PCR 扩增时通过提高退火温度来消除非特异性片段; (3) 所设计的引物的位置选择, 应选择在基因的外显子上, 而不是选择在内含子上。

尽管应用这些原则来设计引物, 但有时鉴于导入的基因与动物内源性基因的高同源性, 仍给利用 PCR 检测带来一定的假阳性, 使检测的可信度下降。为改进这一不足, 有人提出在导入基因的调控序列上合成一条引物, 在目的基因上合成一条引物, 从而排除了内源性扩增片段的可能性。但鉴于提取的染色体 DNA 的复杂度, 有时仍能扩增出一些非特异性片段, 这就要求在进行正式筛选以前, 一定要设立阴性对照和阳性对照来改进 PCR 的反应条件, 确定出 PCR 反应的最佳参数和循环参数。Drew 等 (1994)^[3] 提出三引物方法来检测体系的可靠性, 其在导入基因的调控序列上合成一条引物, 在目的基因上合成第二条引物, 同时在内源性基因上设计出一条引物, 利用三引物同时进行 PCR, 电泳检查结果阳性扩增出两条带 (引物的设计使两条带有不同分子量, 以利于观察和辨别), 而阴性结果出现一条特定的内源性电泳条带。使在检测的同时确保 PCR 体系的可靠性, 这使 PCR 筛选检测转基因动物又向前迈进一步。

常规的 PCR 模板的制备方法是, 提取染色体 DNA, 需要蛋白酶 K 消化过夜, 酚氯仿抽提, 乙醇沉淀等步骤。操作繁琐, 需更换管多次, 对于大量样品来说, 增大了交叉污染的可能性。因此, 如何制备更为简单有效的 PCR 模板用于转基因动物检测也有

许多研究者进行了探索。Abbott 等 (1994)^[4] 提出改进制备模板的方法,在蛋白酶 K 消化后,直接使异丙醇沉淀,煮沸灭活蛋白酶 K,直接做 PCR。使模板的提取在单管内完成。Goodwin 等 (1993)^[5] 利用微波裂解制备模板。Ohhara (1994) 等^[6] 利用血液及毛发做 PCR 模板,这些都获得成功,但如何利用之,仍由个人爱好所定。

如何利用 PCR 进行有效的鉴定,一些学者仍在不断探索。Mc Knight 等 (1992)^[7] 在转基因鼠的鉴定中,对显微注射的基因构件的调控序列上合成一条引物和目的基因上合成第二条引物,进行 PCR 扩增,由于所扩增的片段中存在有人为加入于构件中的限制酶位点,对 PCR 产物进行消化后,对产物的分子量进行判定,从而建立了 5 个转基因鼠系。尽管这一方法可行,但有时 PCR 产物在用限制酶消化后,会出现一些难以解释的结果,如多出一条或两条电泳带。作者在鉴定人 G GSF 转基因小鼠中,对 PCR 产物进行酶切鉴定时就曾出现这一问题,为了进一步判定是否是阳性转基因鼠,又对 PCR 产物进行了 Southern blot 分析,从而确定出其正确性^[8]。与提取的染色体 DNA 做 Southern blot 分析的权威的转基因鼠鉴定结果获得一致的结论。这一方法的可靠性也已为一些作者所采用^[9]。该方法的优势显而易见,(1)方便快捷,以往的方法在 PCR 获得阳性鼠的基础上需做基因组 Southern blot 分析,这要求从鼠尾提取的 DNA 不仅纯度高、质量好,而且量大。有时往往不易做到。限制酶消化的好坏也影响 Southern 杂交的结果,这些为鉴定工作带来不便。(2) PCR 扩增产物产量一般比较高,方便做酶切分析和 Southern 杂交。(3) PCR 所扩增的外源基因片段同内源性片段序列比较,一般总可以寻找到单一的酶切位点,这要求在引物的设计时要充分地考虑到检测问题,从而使后序工作简单化。

与此同时,一些新的鉴定转基因动物的方法也在不断出现。尽管这些方法仍有待进一步研究和完善,但无疑有了新的开端。Kuipers 等 (1996)^[10] 利用染色体原位杂交的方法鉴定转基因猪。有人用此方法鉴定转基因鼠的杂合子和纯合子。这一方法虽然操作较为复杂,但其独到之处在于其能确定出外源基因在染色体上的整合位点以及整合状态。He 等 (1996)^[11] 利用 PCR 筛选转基因鼠的同时,将阳性转基因鼠的 PCR 产物克隆于载体,对 PCR 产物进行了序列分析。尽管繁琐,但其可以完整无误地鉴定出转基因的整合,同时又可以确定出在整合时

一些碱基所发生的突变,以及导入的基因由于动物体内特定机制的作用导致的导入片段的缺失等。其优点不言而喻。卢一凡等 (1998)^[12] 提出利用琼脂糖凝胶直接杂交鉴定低拷贝数转基因的方法,消除了常规 Southern blot 方法中因转膜不完全而造成的低拷贝数转基因鼠的丢失。Kuipers 等 (1993)^[13] 在 PCR 扩增初步筛选出转基因鼠的情况下,利用 RT-PCR 对转基因鼠进行鉴定,从 RNA 水平确定出转基因的存在。

最近,几个研究小组已克隆出酪氨酸酶的编码基因,绘制的图谱表明该基因位于鼠的 C 位点。该酶是黑色素生物合成链中的一个关键酶,该基因可援救 C 位点的突变以及阻滞白化的发生。当对几个白化鼠品系进行显微注射后,产生的转基因鼠在皮肤和眼的颜色上与非转基因鼠表现出差别。在出生后即可肉眼鉴定。一些研究小组现已用这一特性做为转基因整合的一个标记。将酪氨酸酶的编码基因与其他目的基因共注射可导致两者在染色体单位点共整合。利用白化品系的试验表明,70% 或更多的转基因鼠表现出颜色反应^[14]。这一方法结合 PCR 将使转基因动物的筛选和鉴定工作强度得到降低。然而面临的问题是,表现的皮肤颜色与该基因的表达量有关,有时难以分辨。同时转基因鼠的后代该基因是否发生分离以及表达情况如何还在深入研究。

总之,新技术与新方法的不断出现,转基因动物的鉴定研究也一定能够取得更新的进展。也许某一天,我们无需鉴定,就可以获得出生的 100% 为转基因动物。

参考文献

- [1] Hogan B, Costantini F, et al. Manipulation the Mouse Embryo. Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
- [2] Winberg G. PCR Methods and Application, 1991, 2, 72 - 74.
- [3] Drews R, Drohan W N et al. Bio Techniques, 1994, 17: 866 - 867.
- [4] Abbott C, et al. TIG, 1988, 4: 325.
- [5] Goodwin D C et al. Bio Techniques, 1993, 15: 438 - 444.
- [6] Ohhara M, et al. Bio Techniques, 1994, 17: 726 - 729.
- [7] McKnight R A, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89: 6943 - 6947.
- [8] 卢一凡, 邓继先, 肖成祖等. 生物技术通讯, 1998, 2: 2 - 27.
- [9] 胡以平, 邱信芳, 薛京伦. 科学通报, 1994, 5: 461 - 465.
- [10] Kuipers H W, et al. Fluorescence in-situ hybridisation to analyse transgenic pigs. The First International Conference on Transgenic Animal, Beijing, 1996: 107 - 108.

(下转第 54 页)

实验具有 95 %的可信度,初步证实 DOLL Y 来自 6 岁母羊的哺乳细胞。

3.2 DNA 指纹分析

用微卫星技术证实只是第一步,尚需进行 DNA 指纹分析来确定供体细胞的血统。

用 DNA 指纹技术对冰冻保存的供体乳腺组织细胞与 DOLL Y 的血液样进行对照比较。在结果不能明显区分的情况下用四种不同的探针,进行 Southern Blot 杂交,显示出 DOLL Y 的 DNA 与 12 只同种绵羊 DNA 样品有广泛的变异性,与提供体细胞的母羊也有部分带型的差异。总计共有 58 条不同的带。在这些带型中,仅有 38 %的带型在两个个体之间基本吻合。

结果证实与 DOLL Y 无亲本关系的绵羊其相同的概率仅为 6×10^{-9} 。为区分 DOLL Y 来自胚胎细胞? 还是供体体细胞的克隆产物? 要进行带分享数据处理以计算供体胚胎细胞出现在供体后代中 22 条带的概率,其结果概率很低 (8.6×10^{-5}) 随之减少到 3.5×10^{-7} 。综上所述,DOLL Y 来自供体乳腺细胞并非胚胎细胞。

参考文献

- [1] Wilmot ,L. et al. Nature 1997. 385 ,810 - 813.
- [2] Sgaramella. V. & Zinder ,M. D. Science 1998. 279 ,635 - 636.
- [3] Goldberg, J. D. Am. J. Hum Genet. 1997. 61 ,806 - 809.
- [4] Campbell. K. H. S. et al. Science 1993. 279 ,636 - 637.
- [5] Bois ,P. Williamson ,et al. J. Genomics 1998. 49 ,122 - 128.

Research Advances on Cloned Sheep-Dolly

Zhou Zhaoping et al.

(Shangdong Medical University Jinan 250012)

Abstract Dolly ,the first animal cloned from a big type of adult mammal ,was produced by somatic cell nuclear transfer from a cell population derived from mammary tissue taken from a 6-years old Finn Dorset ewe. Some researchers asserted that Dolly was derived from embryonic or fetal cells from ewe. Since the ewe was killed in 1995 ,a sample of the tissue that had been stored ,frozen ,at the Hannah Research Institute and DNA from the original cell populations. Microsatellite amplification was done using three of the primer ,therefore they have carried out a DNA fingerprint analysis to determine the origin of the donor cell used in nuclear transfer and have confirmed the authenticity of Dolly they conclude that Dolly is derived from the nucleus of cell from mammary gland of the adult donor.

Key words Dolly ,DNA microsatellite analysis DNA fingerprinting

(上接第 61 页)

- [11] He Q, Wang F F, et al. A new method of screening transgenic animal PCR and products sequencing. The First International Conference on Transgenic Animal, Beijing, 1996:112.

- [12] 卢一凡,邓继先. 生物化学与生物物理进展,1998,3:269 -

271.

- [13] Dobrowsky V N, et al. FEBS Lett. 1993,319:181 - 184.

- [14] Beermann F S, et al. EMBO J, 1990,9:2819 - 2826.

Progress of Identifying Transgenic Animal in Technology

Lu Yifan Tian Chai * Deng Jixian

(Institute of Biotechnology ,Academy of Military Medical Science ,Beijing 100071)

* (Cardiovascular Institute ,Academy of Medical Science ,Beijing 100037)

Abstract Southern blot and dot blot were normal methods of identifying transgenic animal. Some new technology such as PCR, sequence and FISH were reviewed in this paper.

Key words Transgenic animal ,Identification