

显微注射外源 DNA 在早期胚胎中的命运

陈建泉 成国祥

(上海市转基因研究中心 上海 201300)

徐少甫

(扬州大学畜牧兽医学院 扬州 225009)

转基因动物作为一种试验性系统,已广泛应用于生命科学诸多研究领域。目前制备转基因动物的方法中,显微注射是应用最多的一种方法。Brinster 等^[1]对微注射法的研究表明:(1) 线状 DNA 的整合率较超螺旋 DNA 高,但整合率与注入的 DNA 片段大小无关;(2) 注射 DNA 的浓度应在 1—2 μ g/ml,过高虽可提高整合率,但对细胞有毒害;(3) 稀释 DNA 的缓冲液离子强度应低;(4) 注射钝端的 DNA 整合率低;(5) 注入核较之注入胞质的整合率要高得多;(6) 注入雄原核较之雌原核有稍高的整合率。采用微注射制备转基因动物的整合率,小鼠一般在 17%—25%之间,大动物更低,牛小于 1%;即使整合外源 DNA 的转基因动物,其不同的系列(line)之间的表现形式也各不相同。那么,微注射外源 DNA 在早期胚胎中的命运到底如何呢?现就以下三个方面作一概述。

一、微注射外源 DNA 的染色体外重组和插入宿主基因组

80 年代以来,大量转基因动物生产过程中发现以下四个基本现象:(1) 整合的外源 DNA 多拷贝的占绝大多数;(2) 整合都在某个染色体的单位点上,极少数发生多个染色体、多位点的整合;(3) 对整合的外源 DNA 作序列分析发现排列的方式有头—尾、头—头、尾—尾等排列,其中头—尾排列最常见;(4) 最终以线状 DNA 整合在宿主基因组内。由此不难推断,当线状外源 DNA 注入受精卵后必定发生一系列事件,这就是染色体外重组。

1. 多联体(concatemer)的形成 线性外源 DNA 注入原核期受精卵的细胞核或细胞质以后很快就能由单体连接形成聚合体(多联体),但注入胞质形成的这种连接比注入原核的

显著减少。在 1 小时内即可检测到这种多联体^[2-4],甚至在注射后 5—10 分钟便可检测到^[5],但未观察到类似蛙的“微核”(micronuclei)结构^[6]。

2. 多联体的形成方式有两种(1) 分子间连接:线状分子间的端—端随机连接,产生头—尾(合理连接),头—头和尾—尾连接(不合理连接)排列的线状多联体,比例约为 2:1:1^[3]。(2) 分子内连接即头尾相连成环状。线状和环状的多联体能进一步产生分子间的连接,形成更大的多联体,但环状的多联体在进一步发生连接前在核酶作用下断裂,这种断裂是随机的,最终只是以线状多联体选择性地以它的末端区采用短的同源序列作为 DNA 链交换和宿主基因组发生重组,建立转基因位点,重组频率不清楚,推测是很低的^[7]。

3. 连接过程并不是注入 DNA 单体的简单拼接,通常在连接前分子的末端要发生修饰,分子之间发生同源重组只产生头—尾的排列。在对转基因小鼠整合位点上的序列分析中发现:(1) 多联体的连接部上所有注入 DNA 的末端都发生蚕食(nibble)现象;(2) 连接过程中在连接部的序列有的发生核苷酸的缺失(数个到数十个不等);有的检测到额外的核苷酸,这些变化和在转化细胞中常见的极为相似;(3) 当把多联体和宿主基因组之间的连接部作序列分析时,可检测到一些不明来源和无关序列(从数个到数十个不等)^[7,9,10]。并推测这是出于同源重组的结果。

4. 连接能力因动物种类不同而异 在原核期受精卵内,绵羊可接近 90%连接成多联体,牛约 70%;而猪仅 20%^[4]。

根据上述情况,Tsuyoshi^[7]对线状外源 DNA 注入哺乳动物受精卵后在细胞内的经过

归纳为四个步骤：(1) 注入的线状 DNA 分子的末端发生蚕食，随后一部分分子发生分子间连接产生线状多联体(二聚体)，其游离端是重组的优选位置；一部分分子产生分子内连接，头尾相连成环状。(2) 线状分子和环状分子间经同源重组形成线状头一尾的多联体。(3) 应用短的同源序列进行重组。(4) 线状多联体当即选择性在它末端区采用短的同源序列作为 DNA 链的交换和宿主的基因组重组，建立转基因位点。

综上所述，线性外源 DNA 注入哺乳动物的受精卵后的演变过程得到一些提示：(1) 注入的 DNA 要发生染色体外的重组过程；(2) 注入的外源 DNA 作为多联体的前体应该是线状的，在连接前末端会发生蚕食；(3) 注入 DNA 的连接是随机的，经过同源重组可产生正向头一尾的合理纵排；不合理排列整合入宿主基因组是导致不表达的重要原因之一；(4) 多联体形成过程中除线状延伸外，还可形成环状，但时间要迟，这种环状多联体在不断参与连接过程必须开裂成线状，开裂位置是随机的，最终以线状整合入宿主基因组；(5) 注入的 DNA 在连接过程中其末端会发生缺失，或连接部出现额外的核苷酸；(7) 多联体的形成是整合过程中多拷贝产生的基础；(8) 同源重组产生头一尾的正向合理纵排这一机制是可利用的，即欲导入一个长达数 10 个 Kb 的外源基因时，可分段构建，然后以共注射的方式导入，使之发生染色体外重组，随后整合入宿主基因组，产生正确表达。Frank 等^[11]把三个重迭基因组片段共同注入小鼠受精卵证实，在小鼠合子中共注射的 DNA 片段之间同源重组以高频率发生，并能用于产生有功能的转基因。在转基因小鼠中有 72% 能检测到基因表达产物。

受精卵对注入的外源 DNA 除发生上述重组外，有相当部分为细胞内酶所降解，一部分处于游离状态的分子可参与轮番地连接和断裂的动态过程，并随着受精卵的分裂被分配到各个分裂球中(见下文)，偶然也有一些在细胞分裂

过程中被整合，最终形成嵌合体，但发生频率是很低的。

二、微注射和细胞周期之间的关系

在受精卵原核阶段不同时间注射后，受精卵最终的结局不仅在死亡率和发育率上都有显著差异，而且整合率上也可以从 0—25%。可见，受精卵的细胞周期和注射时间有着紧密的联系。

1. 外源 DNA 整合的分子事件主要在第一个细胞周期的 S 期发生

受精卵复制 DNA 是在 S 期进行，且大多数分子在此期被激活。因此，整合的分子事件主要是在原核破裂和受精卵发生第一次有丝分裂之前或者期间产生。这一论点已在原核破裂之前注射受精卵所产生的后代(G₀) 70% 以上不发生嵌合现象^[12]，整合延迟会导致嵌合体动物发生，以及整合事件通常只在一个染色体的单个位点上发生等事实所证实。

2. 微注射引起的原核染色质损害的利与弊

这种微注射造成的损害对整合事件的发生有利，但必须有及时的修复机制作用以保证染色质的完整性使得注射卵的后续发育能正常进行。微注射至少有可能导致三种损害，(1) 是染色质的断裂，且二倍体的双链断裂是致死性的；(2) 是雄原核的发育是否会因 DNA 的注射和雌原核的发育失去同步；(3) 是核膜的损伤乃至破裂是否会导致死亡。

Brinster 等提出，染色体断裂的频率牵制整合事件发生的数量。因此整合通常只在一个染色体的某个位点上发生。常规的微注射转基因证实，受精卵对注射操作过程中产生的染色体损害迅速修复，并完成后续发育形成个体，这种修复能力，即抗性，其在整个 S 期的表现是不一样的。小鼠合子在 S 期的中期较早期(起始期)更具抗性^[13]，从 DNA 合成最高速率(中期)到第一次分裂(晚期)期间受精卵对辐射的抗性

逐渐降低^[13,14]。这表明受精卵在整个S期对微注射的抗性有一个由低变高又降低的过程;牛也有类似结果^[15]。即合子在DNA合成最高的时期对损伤(包括DNA断裂)的抗性最强。Lehmann等^[16]认为,DNA链断裂和复制子起始作用之间的一种直接关系是早期低抗性的原因;事实上,DNA复制起始在DNA受到损害的细胞中是最敏感的调控点之一^[17]。中期,活跃的DNA复制作用使修复作用在保持染色质生理学上的完整性所需的机制中,在数量上和质量上都能胜任,这也在注射的胚胎仍具有较大发育能力上得到反映,同时也表明在活跃地复制染色质中较之有丝分裂的染色质中存在使DNA更迅速修复的若干系统。因此,晚期,随着DNA复制的减弱,抗性相应降低也就不难理解了。至于胞质膜和核膜的破裂,并不降低牛胚胎的发育率^[18]。

3. 受精卵由微注射引起的损害通过胞质的作用得到修复

总体而言,受精卵内原核的形成、DNA合成的时间安排都是受卵严格控制的,也就是说由胞质激活后产生了一系列事件,以一种胞质的时钟效应对原核的演变经过实行调控,由此推断,胞质对微注射损害的修复发挥重要作用。

含有多种酶和辅助蛋白的一种蛋白复合物催化细胞内的DNA复制作用^[19]。尽管两种特殊蛋白(称细胞周期蛋白,cyclins)的激活在受精后很快起始并陆续合成,但已表现出周期性行为并发现是和DNA复制速率紧密相连的^[20,21,22]。

胞质中某些产物的激活直接或间接地影响到执行DNA复制和修复的一些蛋白质的激活。从而引出这样的一个概念,确定胚胎对微注射抗性的时间应该用胞质的S期代替原核期,这个概念从Marc Gagne等^[15]的试验获得进一步的引伸。根据有关研究结果他们认为:(1)当用蚜肠毒素(Aphidocolin)处理使合子的DNA复制同步,又用放线菌酮处理通过胞质控制原核的发育并使核质重新同步,则在受精后21小

时注射的受精卵其成活率会达到和正常受精后18小时注射的一样。(2)在受精后21小时注射的合子成活率极低,这似乎反映了处于S期期间的胚胎,它对微注射具有的抗性因子在mRNA翻译之前就是十分活跃的。这就表明,合子对微注射损伤的抗性其基础是早已存在的胞质因子的一种时间特异的激活作用,这也和Saxena等^[23]观察到的,DNA修复不需要蛋白的合成结果相一致。

雄原核经过微注射受到损害,在胞质调控下同样能使其发育和雌核同步的事实证实雄原核经微注射后与雌原核的发育仍同步。

4. 原核DNA复制时间的确定和持续时间

Marc Gagne等^[15]应用³H-胸苷嘧啶掺入的方法对牛体外受精卵原核DNA复制的时间进行了测定。结果,DNA复制起始是在受精后12-13小时,于17-19小时达到最高峰;于22小时基本完成,此时两个原核彼此靠近;在相当于受精后28小时核膜破裂、染色质聚缩成有丝分裂的染色体。DNA复制的持续时间约10小时左右。试验还表明,蚜肠毒素的加入能有效地发生DNA合成的抑制,一旦这种抑制剂去除,DNA合成继续发生。

5. 控制好微注射时间是提高转基因效率的关键

动物受精卵进入S期的整过持续时间只有不足10小时,其中属于最佳微注射时间只有4个小时(DNA合成盛期)。这样一个短暂的时间即使对于啮齿类动物这种刺激性排卵也可因精子穿入卵母细胞的时间不同而使得在同一个体内获得的受精卵进入S期的时间各异。对于在超排情况下的牛、羊等动物其排放可持续相当一段时期,这就给确定最佳微注射时间带来极大的困难,直接影响转基因效率。Marc Gagne等^[15]提出,牛体外受精卵在受精后9-18小时处用蚜肠毒素处理使DNA复制休止而不影响原核形成和胚胎发育,继而用放线菌酮使之核质重新同步,微注射在受精后18小时进行,证实合子的发育率最高(培养5天),并且外源性

报告基因的表达是最高的。

三、外源 DNA 在着床前胚胎细胞中的嵌合性分布

外源 DNA 注入受精卵原核后,其整合入基因组事件的发生必须在第一个细胞周期的 S 期结束后完成。按此推理,一旦整合事件发生,在随后的细胞分裂过程中,只要检测其中一个细胞中外源 DNA 的情况就应能反映整个胚胎的情况。但若干实验均证实,即使在受精卵的 S 期注入 DNA 也并非均匀地分布到每个细胞,而是大多数呈现嵌合现象,其证据如下:

1. 对注入外源 DNA 的受精卵、胚胎以及初生仔鼠经 PCR 检测,小鼠在四细胞期以前胚胎阳性率达 100%,进入桑椹期下降到 44%,进入囊胚期只有 26%,转基因小鼠整合阳性率稳定在 17%左右^[5]。牛在囊胚期的阳性率达 54%^[24],然而出生的转基因牛远低于此值。

2. 对胚胎内单个细胞的检测结果表明,小鼠在 2 细胞期已有近 1/3 的胚胎只有一个分裂球含外源 DNA,呈现嵌合现象;至 4 细胞期这种嵌合现象发生率达 69%,含外源 DNA 的分裂球仅总数的 62%^[25],在 4 个分裂球中全部检测出外源 DNA 的仅占 16%;2-3 个分裂球中检测出外源 DNA 的占 59%;4 个分裂球根本不含外源 DNA 的占 11%;当进入 8 细胞期,所有 8 个分裂球中都含外源 DNA 的占 10%,3% 的胚胎所有分裂球均不含外源 DNA,8 个分裂球中有 1-7 个含外源 DNA 的要占 87%^[26]。这种结果,Burdon 和 Wall 等^[27]也有类似的报道。于是 Whitelaw 等^[28]提出,G₀ 代转基因小鼠中大多数来自嵌合胚胎。

上述现象表明:(1) 注入的外源 DNA 中约大部分并未整合进基因组,在小鼠以及在偶蹄兽的胚胎中可保持若干天^[6,25,29,30],并被胞内核酶逐步降解。(2) 注入的外源 DNA 在着床前的胚胎内的不均匀分布使整合事件有可能发生在第一个细胞周期之后,导致原代转基因动物中嵌合体的形成^[26]。

外源 DNA 在胚胎中嵌合体形式分布,与注射时期有关。小鼠胚胎在受精后 12-14 小时开始合成 DNA,而目前所采用的微注射时间大部分在受精后 12 小时以后(此时两原核较大,清楚易注射),因此,微注射时基因组的复制通常在进行中。如果微注射 DNA 整合在未复制的基因组位点上,那么在细胞分裂成双倍体且在发育过程中胚胎的每一个分裂球将获得一个拷贝的整合的转基因 DNA,然而,如整合前整合位点已经复制,那么这个胚胎将是一种可遗传的嵌合体,由转基因和非转基因的细胞组成。当 DNA 复制一个周期发生后整合,那么当代转基因小鼠中 50% 是嵌合体,小鼠在发育过程中各种组织中转基因与非转基因的相对分布可能发生改变。

摘 要

应用显微注射法制备转基因动物时,外源 DNA 早期在胚胎的命运比较复杂,但对一些基本问题已有所了解。外源 DNA 在早期胚胎中发生着一系列的事件:染色体外重组,最终以线性 DNA 的形式整合入宿主基因组内;不同的细胞周期进行的微注射决定整合的频率及嵌合的比例,整合事件发生于第一个细胞周期 S 期,大多数呈现非嵌合现象。

参 考 文 献

- [1] Brinster R. L., et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:4438-4442.
- [2] Arturo B., et al., 1992, *Mol Reprod And Dev.* 33:124-130.
- [3] Bishop J. O., et al., 1989, *Mol Biol Med.* 6: 283-289.
- [4] Powell D. J., et al., 1992, *J Reprod Fertil.* 95:211-220.
- [5] Thomas G. B., et al., 1992, *Mol Reprod And Dev.* 33:436-442.
- [6] King D., et al., 1988, *Mol Reprod Dev.* 1: 59-62.
- [7] Tsuyoshi H., et al., 1993, *Gene*, 128:197-202.
- [8] Paul Hasty et al., 1992, *Mol And Celluar Biol.* 2464-2474.
- [9] Wilkie T. M., et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1646-1655.

- [10] Rohan R. M., et al., 1990, *Nucleic Acid Res.*, **18**:6089-6095.
- [11] Frank R. P., et al., 1992, *Nucleic Acid Res.*, **20**(6):1259-1261.
- [12] Wilkie T. M., et al., 1986, *Dev Biol.*, **118**:9-18.
- [13] Domon M., et al., 1982, *Cell Tissue Kinet.*, **15**:89-98.
- [14] Dufraim Q. R. J., et al., 1975, *Rad Res.*, **63**:494-500.
- [15] MARC GACNE et al., 1955, *Mol reprod Dev.*, **41**:184-827.
- [16] Lehmann A. R., et al., 1992, *Mut. Res.*, **273**:1-28.
- [17] Harland R. M., et al., 1983, *Nature*, **302**:38-43.
- [18] Puera T. T., et al., 1994, *Theriogenology*, **41**:273.
- [19] Baran V., et al., 1992, *Reprod Nutri Dev.*, **32**:241-248.
- [20] Bravo R., et al., 1986, *Exp Cell Res.*, **163**:287-293.
- [21] Celis J. E., et al., 1985, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **82**:3262-3266.
- [22] Downey K. M., et al., 1990, *Bioassays*, **12**:231-236.
- [23] Saxena J. K., et al., 1990, *Nucleic Acid Res.*, **18**:7425-7431.
- [24] Behboodi E., et al. 1993, *J. Dairy Sci.*, **76**(pp):3392-3399.
- [25] Naish S. J., et al., 1987, *Biol Reprod.*, **36**:253-255.
- [26] Cousens C., et al., 1994, *Mol. Reprod. And Dev.*, **39**:384-391.
- [27] Burdon T., et al., 1992, *Mol Reprod Dev.*, **33**:436-442.
- [28] Whitelaw C. B. A., et al., 1993, *Transgenic Res.*, **2**:29-32.
- [29] Ninomiya T., et al., 1990, *J. Reprod Fertil.*, **41**(suppl):222.
- [30] Cousens C., et al., 1993, *J. Reprod. Fertil.*, **14**:47(abst).

hedgehog 基因家族与果蝇和脊椎动物的发育*

毛炳宇 张红卫

(山东大学生命科学院 济南 250100)

果蝇的 hedgehog (hh) 基因是 1980 年由 Nusslein-Volhard 和 Weieschus 通过突变筛选发现的, 于 1992 年被克隆。随后, 在不同脊椎动物(包括斑马鱼、爪蟾、鸡、小鼠和人)中均发现了 hh 同源基因, 构成一个基因家族。hh 家族基因编码一类信号分子, 广泛参与了果蝇和脊椎动物的多种发育过程^[1]。本文就 hh 基因家族在果蝇和脊椎动物发育过程中的功能及其作用机制作一简要论述。

一、hedgehog 基因与果蝇的发育

1. hh 基因与果蝇胚胎体节的图式形成

果蝇胚胎体节的形成是由分节基因控制的, 体节极性基因(segment polarity gene)是其中的一组。hh 和 wingless(wg)是体节极性基因中的两个关键基因。这两个基因均编码分泌性

信号分子, 它们的正确表达是胚胎体节正常发育所必需的。在胚胎发育早期, 体节极性基因的表达区域沿胚胎前后轴形成一系列重复的带型, 将胚胎划分为许多重复单位, 即副节(parasegment), 每一副节包含前一体节的后部与后一体节的前部。hh 在每一副节前部的 1-2 列细胞中表达, 分别与前一副节后部 wg 的表达区域相邻, 它们之间的界线恰好确立了各副节的界线。这一区域是调控果蝇胚胎各副节图式形成的信号中心^[2]。

在果蝇胚胎发育的原肠胚和胚带伸展期, hh 和 wg 的表达是相互依赖的: wg 表达的维持需要相邻细胞带中 hh 基因的表达, 反之亦

* 本文由国家自然科学基金支持, 批准号 39670357。