

- Tripier, D., Traub, P., Jost, E., 1993, *Eur. J. Biochem.*, 213(2): 659—671.
- [23] Hocevaux, B., Barbara, A., David, J. B., Alan, P. F., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 7545—7522.
- [24] Meier, J., Cambell, K. H. S., Ford, C. C., Stick, R., Hutchison, C. J., 1991, *J. Cell Sci.*, 98: 271—279.
- [25] Hoger, T. H., Krohne, G., Kleinschmidt, J. A., 1991, *Exp. Cell Res.*, 197: 280—289.
- [26] Luderus, M. E. E., Graaf A. D., Mattia, E., Blaauwen, J. L. D., 1992, *Cell*, 70(6): 949—959.
- [27] Collard, J. F., Senecal, J. L., Raymond Y., 1992, *J. Cell Sci.*, 101: 657—670.
- [28] Collard, J. F., Raymond, Y., 1992, *Exp Cell Res.*, 201(1): 174—183.
- [29] Martell, R. E., Strahler, J. R., Simpson, R. U., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267(11): 7511—7519.
- [30] Furukawa, K., Hotta, Y., 1993, *EMBO J.*, 12(1): 97—106.
- [31] Newport, J. W., Wilson, K. L., Dunphy, W. G., 1990, *J. Cell Biol.*, 111: 2247—2259.
- [32] Lourim, D., Krohne, G., 1993, *J. Cell Biol.*, 123(3): 501—512.
- [33] 曲健、张传茂、翟中和, 1994, *Cell Research*, 4(2): 163—172.

转基因的整合与表达检测技术

陈兰英 田小利

(中国医学科学院心血管病研究所 北京 100037)

转基因动物是80年代初发展起来的生物高技术,具有广泛的应用前景^[1,2]。该技术难度大,这是由于:第一转基因效率低。第二转基因技术,从方法学角度考虑,可谓“系统工程”,包括动物实验技术、转基因技术和相应的实验条件和准备工作的配套以及常规的分子生物学方法;费用昂贵。第三检测困难。当整合拷贝数极低(甚至只有一个拷贝数)时,其难度比单拷贝基因还大。另外,转基因表达效率低,甚至不表达;这也增加了表达水平的检测难度。除此,当转基因与内源性基因同源性很高时,检测也较困难。若选用检测方法不当,一旦漏检失误,则前功尽弃,由此造成人力、物力上的巨大浪费。因此,慎重选用转基因的检测方法至关重要。随着分子生物学方法的迅速发展,一些新方法不断地应用到转基因检测中,使其日臻完善,但在实际工作中,有关这些方法的具体应用还值得进一步探讨。本文将结合我们工作中的体会,扼要介绍并比较转基因

动物技术中有关转基因整合与表达的检测方法,为经济、合理选择使用这些方法提供依据。

一、基因组DNA的制备

按常规方法^[3]可从动物组织及血液分离基因组DNA。由于小型动物(如小鼠、大鼠等)放血有限,所以除PCR法外,其他检测方法所需的DNA应从组织中提取。耳尖、尾尖是较好的取材部位(出血少,对动物伤害小),一般1—2mg组织可制备1—2μg的基因组DNA。制备的DNA样品应尽可能的减少杂质污染。我们的经验是将DNA制品分别用酚、酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),氯仿/异戊醇(24:1)各抽提一次,并以乙醇(或异丙醇)沉淀后,再反复悬浮、沉淀2—3次,即可免去样品透析的繁琐操作而得到较高纯度的DNA。用于Southern印迹杂交的样品最好新鲜制备,且应注意DNA长度的完整性。对尚未检测就已死

亡的子代动物,应及时提取其DNA,如果死亡的时间较长,应提取脑组织DNA,并尽快检测。

二、外源基因的检测

染色体和基因水平

包括检测外源基因是否整合于动物体细胞的基因组,整合的位点和拷贝数。

(1) 外源基因整合的检测

1) 斑点杂交 当目的基因与内源基因组DNA无同源性时可用它^[4,6]。为避免假阴性,可同时用质粒DNA(1—10 pg)作阳性对照。本法用在分析基因组DNA时,对样品纯度要求低,快速、简便、经济,尤其对于大批子代动物的粗筛颇具优越性,应作为首选方法。缺点是易出现假阳性。

2) 多聚酶链反应(PCR) 这是近年来常用的一种快速、灵敏的检测方法^[6,7],只需极微量的DNA。本法用于转基因的检测时,要求引物特异性高。当外源基因和动物内源性基因同源性较小时,选择设计引物较容易;如二者同源性极大,可根据“引物3'-端1至几个碱基不配对则不能延伸链反应”的原理去设计引物。引物的 T_m 最好要大于65℃。此外,还应设计一对分析内源性基因组DNA的引物(作阳性对照),以监测体系的可靠性。其缺点是要求待分析的基因组DNA样品应尽可能纯化,否则会干扰本反应,降低检测的灵敏度和重复性;用于大批量检测时,费用较昂贵。

3) Southern印迹杂交 当转入基因与内源基因组DNA有较高同源性时,仍可选用此法^[8-10]。本法虽然准确可靠,但对样品的质量和纯度要求较高,操作烦琐,费用也较高。

(2) 整合位点的检测—染色体原位杂交

以显微注射法所得到的转基因动物,其外源基因整合一般为“单整合位点,多拷贝数”,即在同一位点上整入一到数百个首尾相连的基因,少数出现多整合位点。用标记探针与培养转基因动物细胞的中期染色体DNA直接自显

影后,可确定转基因整合位点^[11]。

(3) 整合拷贝数的检测

可用斑点杂交(或Southern印迹杂交),但这和普通检测所用的斑点杂交不同,检查整合拷贝数的杂交是一种定量杂交,需要高度纯化和已准确定量的基因组DNA,一般点膜量为0.5、1、2、4和8 μg基因组DNA,然后用1—100 pg的梯度转基因片段为阳性对照和定量标准,最后计算出每个细胞中外源基因的拷贝数^[4]。

转录水平

在mRNA水平检测外源基因是否表达。通常在作完整检查,并有足够的子代动物数时进行。可采用Northern印迹杂交,引物延伸分析,逆转录—聚合酶链反应(RT—PCR),核酸酶 S_1 保护分析和核糖核酸酶(RNase)保护分析法,以下介绍较常用的三种方法。

1. Northern印迹杂交

当外源基因和转基因动物基因组DNA同源性较小时,Northern杂交是确定外源基因是否被转录的有效方法^[12,13]。其缺点是如果两者同源性较大,则方法受限制,且操作步骤繁琐。

2. RT—PCR

本法灵敏度高,对内、外源基因的同源性要求较低,故比Northern法有较大适用范围,还可用内标准进行定量^[14]。其缺点同PCR一样,且方法的重复性不好,难度大,费用更昂贵。本法的引物设计原理同PCR法。当外源基因和动物内源性基因的同源性较大时,要求引物3'-端不配对的碱基数至少应大于2。如果只有1—2个不配对时,则对退火的温度要求苛刻(即 $>T_m - 5^\circ\text{C}$),此时PCR效率可能较低。

3. RNase保护分析

需要体外转录合成一段与待测mRNA(转基因转录产物)顺序互补的单链RNA探针(高比放射性),方可检测。其原理是将同位素标记的RNA探针和靶RNA充分杂交^[9,15],然后

经 RNase 处理,除去未杂交的部分,将样品电泳后再显影,即可分析靶 RNA 的有无。从原理上讲,当外源基因的 RNA 和内源性 RNA 只要有一个碱基的不同,即可通过 RNase 保护分析将两者加以区分。由于该法具有高度的灵敏性,且不受同源性的限制,和 Northern 法相比,本法更为准确,故被广泛应用于转基因转录水平的检测。缺点为操作步骤繁琐。

翻译水平

在蛋白质水平检测转基因是否表达。包括 2 个方面,即转基因的 mRNA 是否被翻译和被翻译的蛋白是否具有生物功能。常用方法如下。

1. 免疫检测技术

采用涉及免疫学的一些方法,直接检测具有抗原性的蛋白质类表达产物的存在。如 Western 免疫印迹^[10],它需要有特殊的转基因蛋白产物所产生的特异性抗体;Elisa 分析(免疫酶标法),该法快速、重复、方便,如氯霉素乙酰转移酶(CAT)-Elisa 分析;放射免疫分析法^[11]和荧光免疫法等。

2. 生物化学性质和生物学活性分析

除直接测定基因表达产物外,还可通过定性或定量测定表达产物的生物化学性质和生物学活性,以鉴定表达产物的存在。其指标有酶活力测定,受体蛋白分析和激素活性的检测等。如肾素可作用于底物血管紧张素 I,使其产生血管紧张素 II(Ang II),Ang II 可与其受体结合,刺激血管平滑肌收缩,使血压升高。因此,通过分析转肾素基因动物血浆和组织肾素活性及血压水平,可鉴定转入肾素基因是否表达和表达水平。

转基因动物整体表型的观察

转入外源基因的动物,除用上述方法分析表达产物外,还需从遗传学上,在动物的整体水平观察转入外源基因后,其基因型与表型的关系,分析基因型对动物整体性状和生理功能的影响,以进一步鉴定基因的性质,包括转基因后,是否引起基因组 DNA 突变等。

三、结 语

综上所述,转基因检测方法各存在一定的利弊。所以,在开始构建外源基因时就要考虑到将来检测的方便,尽可能设计、构建包含与内源基因结构不同的部分,以增加非同源性;另外,还应考虑检测样品的数量和所需费用。

基因水平的检测。可选用 Southern 印迹杂交(或在子代动物数量较少时,可直接选 Southern 杂交)结合斑点杂交和 PCR 检测。若转基因与内源性基因的同源性较小,且检测数量大,首先选斑点杂交进行粗筛,然后作 Southern 印迹杂交,以便对完整的外源基因进行鉴定和确定其是否整合,再用染色体原位杂交和定量斑点杂交分别作整合位点和拷贝数的鉴定。若转基因与内源性基因有较高同源性,只要选用适当的限制性内切酶进行酶切后,也可采用 Southern 杂交分析。例如,我们曾将小鼠的肾素-2 基因导入大鼠基因组中,两者有 85% 的同源性,但当用 ECOR I 进行酶切时,则肾素-2 基因可产生 9.2 和 4.4 kb 的两个片段,而大鼠的肾素基因则产生 6.5、4.4、2.4、1.1 和 0.45 kb 的杂交带,显然用 ECOR I 酶切后所得 9.2 kb 片段为转基因的特征片段;除此,还可设计有高特异性引物的 PCR 法作外源基因是否整合的鉴定。

转录水平的检测。目前所用的方法中,以 RT-PCR 和 RNase 保护分析法最灵敏,核酸酶 S₁ 保护分析次之,再者引物延伸法,最后为 Northern 印迹杂交。由于方法的操作上繁简不同和转基因的同源性差异,在应用时可根据具体情况进行选择。若转基因与内源性基因同源性较小,可选 Northern 印迹杂交;若两者同源性较大,则选 RT-PCR 或 RNase 保护分析。

蛋白质水平检测。由于转入的基因不同,蛋白的功能也不一样,因此,可根据所表达蛋白的种类、性质和功能,选择相应的方法进行检测,此不赘述。

摘要

本文着重介绍并比较转基因研究中外源基因整合(染色体及基因水平)与表达(转录及翻译水平)的各种检测方法,并就它们的适用范围、优缺点等作了比较。

参考文献

- [1] 田小利等, 1993, 细胞生物学杂志, 15(4): 164—167.
 [2] 田小利等, 1993, 中国循环杂志, 8(7): 434—435.
 [3] Hogan, B. et al., 1986, In *Manipulating the mouse embryo—a laboratory manual*, 2nd ed. pp 174—176, Cold Spring Harbor, New York.
 [4] Hochi, S-i. et al., 1990, *Anim. Biotech.*, 1(2): 175—184.
 [5] White, B. A. et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257: 8569—8572.
 [6] Saiki, R. K. et al., 1985, *Science*, 230,

1950—1354.

- [7] Wittwer, C. T. et al., 1991, *BioTechniques*, 10(1): 76—83.
 [8] Southern, E. M., 1978, *J. Mol. Biol.*, 98: 1218—1222.
 [9] Mullins J. J. et al., 1990, *Nature*, 344: 541—544.
 [10] Tronik, D. et al., 1987, *EMBO J.* 6: 983—987.
 [11] Buder, M. et al., 1992, *J. Hypertension*, 10: 9—16.
 [12] Fukamizu, A. et al., 1991, *J. Biol. Regulators and Homeostatic Agents*, 5: 112—116.
 [13] Ohkubo, H. et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 5153—5157.
 [14] Makino, R. et al., 1990, *Technique—J. Methods in Cell Mol. Biol.*, 2(6): 295—301.
 [15] Fukamizu, A. et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165: 826—832.
 [16] Towbin, H. et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 76: 4350—4354.

内皮素受体的研究进展

丁莉莉* 李兴隆

(滨州医学院 山东 256603)

内皮素(endothelin, 简称 ET)有强烈和长效的缩血管作用。ET的许多作用是通过受体介导的。自1988年发现ET以来,对ET及其受体的基因、蛋白质结构、作用机理、生理学功能以及病理学意义做了大量的研究。

一、内皮素受体的分布

至今已发现三种ET异构肽(ET-1, ET-2, ET-3),估计应存在多种ET受体亚型。目前认为至少存在两种ET受体,分别称为ETA和ETB。ET受体的分布非常广泛,但仍有组织特异性。

人乳腺内动脉和静脉、兔肺动脉血管平滑肌、猪冠状动脉的血管平滑肌同时具有ETA和ETB两种受体^[1,2]。另一些研究证明,血管

中膜平滑肌细胞(但不包括内皮细胞)存在高浓度、均一的ETA mRNA。而血管内膜平滑肌细胞的ETAmRNA浓度低且不均一^[3]。

用兔抗牛ET受体血清确定ETB受体在组织中的分布时,发现各种组织ETB受体的含量不同:肺ETB受体占总ET受体的70%,脑55%,垂体50%,肾25%,肾上腺10%,睾丸<2%。此结果意味着在肺中ETB受体占优势,在睾丸ETA受体占优势^[4]。犬肾的研究表明,肾皮质、髓质和肾乳头的ETA与ETB比例分别为22:28, 39:61, 50:50^[5]。牛内皮细胞上仅有ETB受体^[6]。在兔虹膜括约肌的平滑肌上,ETA约占总受体数的80%,

* 现在金沢大学遗传子实验施設, 日本, 920.