

细小病毒非结构蛋白转基因小鼠模型建立

沈锡中 丛笑倩* [江绍基] 萧树东

(上海第二医科大学仁济医院 上海市消化疾病研究所 200001)

(* 中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

细小病毒是一组结构简单, 直径为 20—25 nm, 无包膜线状单链 DNA 病毒, 能明显抑制实验动物的自发和诱发肿瘤生长^[1]。人类流行病学研究结果表明某些细小病毒如腺联病毒(AAV)感染和一些肿瘤的低发生率有关^[2]。体外转化试验同样证明细小病毒能抑制包括肿瘤病毒和细胞癌基因在内的多种致癌物所诱导的细胞转化^[1]。有关细小病毒抗肿瘤形成的机理目前尚不明了, 研究得最多的是非结构蛋白(NS)。NS 是一种多功能核磷酸蛋白, 对多种异源性启动子具有反式调节作用^[3], 能抑制起始密码子诱导的 DNA 放大^[4]以及抑制细胞癌基因如 c-ras, c-myc 的表达。因此细小病毒的抗肿瘤形成作用可能和 NS 的这些功能有关。但目前国内外尚无直接明确的体内研究证据支持这一假设。80 年代转基因小鼠模型的制备成功, 使我们能在活体内从时间和空间角度同时观察基因表达的调控及其表型效应^[5]。本试验将小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)启动子控制的细小病毒 NS 基因, 用显微注射技术导入小鼠受精卵雄核, 制备了转基因小鼠模型, 以期从整体水平, 系统研究细小病毒抗肿瘤形成的机理。

材料和方 法

1. 细小病毒 NS 基因 DNA 的制备和纯化

质粒 pULB 3238, 含完整细小病毒 MVMp NS 基因, 原控制该基因的 P₄ 启动子被激素敏感的 MMTV 启动子取代(比利时自由大学 J. Rommalare 教授馈赠), Bam H₁ 酶切, 低熔点凝胶电泳分离出含 MMTV 启动子的 NS 基因片段(5.7 kb)。依次用酚, 酚:氯仿(1:1), 氯仿:异戊醇(24:1)常规抽提, 酒精沉淀,

将上述提取的 DNA 溶于 2.4 ml TE 缓冲液(10 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA), 加 3.0 g 氯化铯溶解。用 Beckman SW 50.1 转头离心, 40000 rpm 48 小时。分步收集离心液, 电泳确定 DNA 所在管, 集中 DNA 溶液, 于 4℃ 将 DNA 溶液对大体积显微注射用 TE 缓冲液(10 mmol Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mmol EDTA)透析 48 小时, 换液 4 次。取少量 DNA 电泳, 定量。用显微注射 TE 缓冲液稀释样品至 1—3 μg/ml, 每管分装 20 μl, -20℃ 保存。

2. 超排卵与取卵

4—6 周龄母鼠(C57 BL/SJL F₁ 代)在明暗循环动物房内饲养 3—5 天, 每只小鼠腹腔注射 5 u 孕马血清(PMS), 48 小时后腹腔注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)5 u/只。随后与单笼饲养的正常公鼠(SJL)合笼。次晨检查阴栓, 引颈处死母鼠。取出双侧输卵管至 M₂ 培养液中, 于解剖显微镜下取卵。透明质酸酶轻轻消化, M₂ 洗 3—5 次后移至 M₁₆ 培养液中, 37℃ 培养待用。

3. 显微注射

将受精卵移至显微注射槽, 用持卵管将卵固定。玻璃注射针将纯化 DNA 注入受精卵雄核(约 1—2 pl)。同时用不含 DNA 的 TE 作对照。将注射后存活的受精卵移至 M₁₆ 培养液内, 37℃、5% CO₂ 孵箱内培养待用。

4. 卵移植入假孕母鼠输卵管

显微注射前一天, 让假孕母鼠(BALB/c)与绝育公鼠交配, 取有精栓者戊巴比妥麻醉。在解剖显微镜下暴露输卵管壶腹部开口, 把注射目的基因后存活的受精卵移入假孕母鼠的输卵管壶腹部。20 天左右产仔。

5. 转基因小鼠鉴定

幼鼠基因组 DNA 提取: 幼鼠编号标记后剪下 1.5 cm 尾巴置 0.7 ml 裂解液(50 mmol Tris-HCl, 100 mmol EDTA, 100 mmol NaCl, 1% SDS)内加 35 μl 蛋白酶 K(10 mg/ml) 55℃ 消化过夜(18 小时), 依次用酚, 酚:氯仿(1:1), 氯仿:异戊醇(24:1)抽提, 酒

精沉淀, 溶解于 TE 缓冲液中, 定量。

PCR 检测 NS 基因 DNA 整合^[6]: 将上述小鼠尾巴抽提的基因组 DNA 过 Sphadex G-50 柱, 去除 PCR 抑制物。在 50 μ l 反应体积中分别加入去离子超纯水 20 μ l, 10 \times dNTP 5 μ l, 5 \times Buffer 10 μ l, 引物 1 μ l (含 3' 和 5' 端引物各 100 ng, 3' 分端为 TGATGGCTCA-ACCAGGTGGA, 5' 端为 TGGTGTGCTCCAAGG-CTCTA, 由复旦大学罗祖玉教授设计, 能特异性扩增细小病毒 NS 基因中 908 bp 的片段), 处理后的小鼠 DNA 模板 10 μ l (0.5 μ g), 混匀, 覆盖 50 μ l 石蜡油。置 95 $^{\circ}$ C 5 分钟后加入 Taq DNA 聚合酶 (复旦大学) 4 μ l (1.5 u)。94 $^{\circ}$ C 30 秒, 56 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 90 秒为一循环, 共计 35 循环, 最后一个循环 72 $^{\circ}$ C 延长 10 分钟。扩增结束后取下层水相 10 μ l 电泳。

Southern blot: 将 PCR 扩增产物电泳后转移至尼龙膜, 用 α -³²P-ATP (Amersham UK) 标记的细小病毒 NS 基因探针 (5.7 kb, 2.8 \times 10⁸ cpm/ μ g DNA) 杂交。探针标记用随机标记试剂盒 (Amersham UK), 按试剂盒推荐步骤标记。

结 果

1. 受精卵注射目的 DNA 后的存活率和两细胞分裂率

四次实验共注射 720 多枚受精卵, DNA 注入雄核后受精卵存活 500 余枚, 存活率在 70% 左右。将注射目的 DNA、TE 和未注射的受精卵, 于 M 16 中培养过夜, 两细胞分裂率分别为 25% (12/50), 70% (35/50) 和 92% (46/50)。说明将细小病毒 NS 基因 DNA 注入受精卵雄核后能明显抑制卵细胞的两细胞分裂。TE 也能抑制部分卵细胞分裂。

2. 卵移植后的受胎率和产仔率

将注射目的 DNA 后存活的受精卵, 于注射当天植入假孕母鼠单侧输卵管。每只母鼠植入 25 枚卵, 共移植 9 只母鼠。其中 4 只怀孕 (44%), 共产仔 15 只, 产仔率约 7% (15/225)。

3. 小鼠细小病毒 NS 基因整合率

抽取小鼠尾巴 DNA, 对 10 只小鼠的基因组 DNA 作 PCR 检测及 Southern blot 杂交。



图 1 PCR 产物与 NS 特异性探针 Southern 杂交

+ 阳性对照, C 阴性对照
1-10 待检小鼠 DNA, 6, 8, 9, 10 为杂交阳性

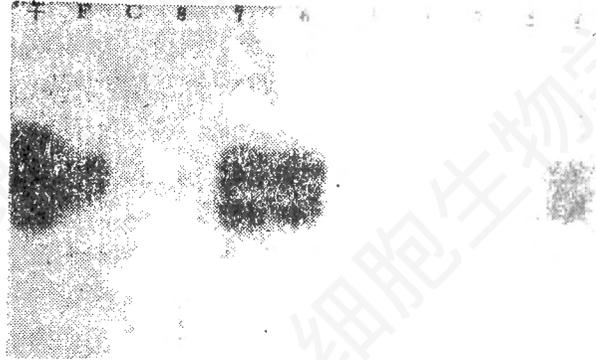


图 2 子代小鼠 DNA PCR 产物与 NS 特异性探针 Southern 杂交

+ 阳性对照, FB 6 (δ), C 阴性对照
1-8 待检子代小鼠, 1, 6, 7 为杂交阳性

结果证实其中 4 只小鼠整合有 NS 基因 (图 1) 占检测小鼠的 40%。

4. 转基因的遗传

把首建 (G_0) 代 NS 基因整合的小鼠 B_6 (σ^7) 与正常的 C 57 BL/SJL F_1 小鼠交配, 产仔 8 只。PCR 和 Southern blot 证实其中 3 只 (G_1 代) 为阳性 (图 2) 即基因组整合有 NS 基因, 说明整合的 NS 基因能传代。

讨 论

转基因动物是从分子水平入手, 实现对动

物基因的定向改变,然后从活体动物的不同层次和不同时间,观察基因表达的调控和表型效应。在医学科学研究中,应用转基因动物模型已很大程度上加深了我们对人体生理和病理现象以及疾病防治的认识,如免疫球蛋白基因重排机理^[7],生长因子基因,癌基因,抑癌基因在个体生长发育和肿瘤发生、发展过程中的作用^[8];病毒如乙型肝炎病毒的致病机理等^[9]。建立转基因动物的方法,目前使用最广泛也是最有效的就是将外源性基因通过显微注射技术直接导入受精卵原核。这一方法能使10—40%存活受精卵的染色体稳定地整合有导入的目的基因。但影响转基因效率的因素很多。如溶解DNA的缓冲液,用于显微注射的缓冲液一般含5—10 mmol Tris (pH 7.4)与0.1—0.25 mmol EDTA,增加EDTA能降低注射后受精卵的两细胞分裂率,但如不用EDTA则又会降低整合效率^[11]。我们实验中EDTA浓度为0.1 mmol,注射TE后的两细胞分裂率为70%,稍低于对照的92%。导入受精卵原核的DNA量对基因整合也很重要,DNA浓度低于1 µg/ml时,转移基因在染色体上的整合效率低,DNA浓度高于3 µg/ml时,受精卵注射DNA后两细胞分裂率显著降低;当DNA浓度为1—3 µg/ml时,对5 kb左右的DNA而言相当于200—600分子/p1,其整合效率可达20—40%^[11]。我们实验中采用的DNA浓度为3 µg/ml,注射后两细胞分裂率为25%,产生的小鼠经PCR和southern blot鉴定,基因整合率为40%,与国外报道相近^[11]。利用细小病毒NS转基因小鼠模型可以进一步做如下几方面工作。1. NS基因表达研究。整合于小鼠染色体的外源性基因的表达受诸多因素影响,如整合部位,所用的启动子,外源性基因是否含内含子,载体以及甲基化程度等。我们选择的MMTV启动子,应该在乳腺、颌下腺、前列腺等组织有高表达^[10]。在我们的随后实验中利用RT-PCR证实,整合的NS基因能在乳腺、颌下腺、肺等多种组织和器官中高表达

(未发表资料)。2. 细小病毒抗肿瘤机理研究。体外实验证明NS在细小病毒抗肿瘤过程中起着关键作用。NS基因在体内表达是否能抑制化学、生物致癌物诱导的肿瘤发生。利用该转基因小鼠模型我们已证实NS基因表达能明显抑制乌拉坦诱导的小鼠肺癌发生(未发表资料)。3. NS基因表达对细胞内重要基因转录,表达的影响。体外研究表明,NS能抑制c-ras, c-myc癌基因的表达,增强甲状腺素受体基因的表达。NS基因在体内表达后是否具有同样的作用,以及其在抗肿瘤过程中所起的作用有待进一步研究。

摘 要

将小鼠乳腺癌病毒启动子控制的细小病毒非结构蛋白基因(长5.7 kb)氯化铯超速离心,纯化透析后用显微注射法导入C57 BL/SJL F₁小鼠受精卵雄核,植入假孕母鼠输卵管,得成活小鼠15只。抽取鼠尾DNA,对其中10只小鼠作PCR和southern blot鉴定,其中4只(40%)整合有目的基因。对首建者B₆(♂)的8只子代小鼠鉴定,3只(37.5%)整合有目的基因。说明导入的目的基因能传代。

关键词: 细小病毒 非结构蛋白 转基因小鼠

参 考 文 献

- [1] Rommelaere, J. et al., 1991, *J. Virol. Methods*, 33: 233—251.
- [2] Mayor, H. D. et al., 1976, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 126: 100—104.
- [3] Labow, M. A. et al., 1987, *Mol. Cell Biol.*, 7: 1320—1325.
- [4] Heilbronn, R. et al., 1990, *J. Virol.*, 64: 3012—3018.
- [5] Hanahan, D., 1989, *Science*, 246: 1265—1275.
- [6] 黄青山等, 1995, *中国病毒学*, 10: 323—331.
- [7] Lee, M. S., 1992, *Curr. Opin. Immunol.*, 4: 723—727.

- [8] Adams, J. M. et al., 1991, *Science*, 254: 1161—1167.
- [9] Kim, G. M. et al., 1991, *Nature*, 351: 317—320.
- [10] Stewart, T. A. et al., 1984, *Cell*, 38: 627—637.
- [11] Brinster, R. L. et al., 1985, *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, 82: 4438—4442.

PREPARATION OF PARVOVIRAL NONSTRUCTURE PROTEIN TRANSGENIC MICE

SHEN Xi Zhong CONG Xiao Qian JIANG Shao Ji XIAO Shu Dong

(Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai Second Medical University Ren Ji Hospital, Shanghai 200001)

ABSTRACT

DNA containing the genes of parvoviral nonstructure protein was microinjected into the male pronucleus of fertilized ovum (C₅₇BL/SJL F₁), the injected eggs (225) were implanted into the fallopian tube of 9 pseudopregnant foster mothers (BABL/C). After a normal gestation ensues (approximately 3 weeks), 4 out of 9 foster mothers delivered 15 viable pups. DNA was extracted from tails of the 10 of 15 pups. PCR and Southern blot were performed to confirm the presence of the NS gene. 4 out of the 10 mice were showed the integration of the NS gene. The 8 offspring of founder B 6 (♂) were also checked by PCR and Southern blot, 3 out of the 8 mice were found the integration of NS gene, the results suggested that the integrated NS gene are inheritable.

Key words: Parvovirus Nonstructure protein Transgenic mice

脊髓内源性物质对脊髓神经元在体外存活的影响

梁 喆 杨 浩 农 艺 鲍 璿 鞠 躬

(第四军医大学神经科学研究所 西安 710032)

神经生长因子(Nerve Growth Factor, NGF)是第一个被发现的神经营养因子^[1],它在神经系统的发育期、成年期及损伤修复期都起着重要的作用,它可以诱导神经纤维的定向生长,控制神经元存活的数量,促进神经元的分化^[2]。以后,随着研究的深入,又发现了许多神经营养因子,有的可以促进神经元存活,有的可以促进神经突起的生长,有的既可以促进神经元存活又可以促进神经突起生长,有的则对不同的神经元有不同的作用^[3]。

脊髓损伤后脊髓自身是否会分泌一种或一

些神经营养因子,以促进脊髓自身神经元功能的恢复,这是长久以来未引起重视的问题。发育中的胚胎脊髓可以促进成年脊髓损伤后运动神经元功能的恢复,这已有许多实验可以证明^[4],表明胚胎脊髓中存在有促进运动神经元功能恢复的物质,但是是否可以促进脊髓神经元的存活尚无直接的实验证据。我们以人胚胎脊髓为材料制备脊髓提取液,研究了脊髓内源性物质对体外培养小鼠脊髓神经元存活的影响。