

# 山羊精子结合外源 DNA 能力的年龄及品种依赖性

赵永聚<sup>1,2</sup>, 李福兵<sup>1</sup>, 孙新明<sup>1</sup>, 周建华<sup>1</sup>, 魏泓<sup>1\*</sup>

1. 第三军医大学 基础部实验动物学教研室, 重庆 沙坪坝 400038

2. 西南大学动物科技学院, 重庆 北碚 400716

**摘要** 本文应用正交设计  $L_{16}(4^4)$ , 优化精子和外源 DNA 处理条件; 用建立的方法转染 1-4 岁川东白山羊和波南  $F_1$  公羊、2 岁波尔山羊和南江黄羊公羊共 149 只, 用原位杂交法检测精子结合外源 DNA 的效率, 比较不同品种、年龄的山羊 (*Capra hircus*) 精子结合外源 DNA 的能力。结果显示: 川东白山羊 1 岁时的阳性精子率为  $39.34\% \pm 13.76\%$ , 4 岁时降为  $23.40\% \pm 19.37\%$ , 与 1 岁和 2 岁时相比, 差异显著; 南江黄羊的阳性精子率最高, 波尔山羊最低; 并筛选到一种山羊精子和外源 DNA 处理方法。表明实验山羊的精子结合外源 DNA 的能力有随着年龄的增长而减少的趋势, 并表现出品种间差异 [动物学报 51(6): 1058-1066, 2005]。

**关键词** 山羊 精子 外源 DNA 发育 品种

## Age-and-breed-dependence of exogenous DNA binding to spermatozoa in goats

ZHAO Yong-Ju<sup>1, 2</sup>, LI Fu-Bing<sup>1</sup>, SUN Xin-Ming<sup>1</sup>, ZHOU Jian-Hua<sup>1</sup>, WEI Hong<sup>1\*</sup>

1. Faculty of Laboratory Animal, the Third Military Medicine University, Shapingba, Chongqing 400038

2. Animal Science College, Southwest University, Beibei, Chongqing 400716

**Abstract** The purpose of this study was firstly to establish the technical protocols on optimization of goat *Capra hircus* spermatozoa binding exogenous DNA, and then to determine the ability of goat spermatozoa to bind foreign DNA from different breeds at 1-4 year-old. The ejaculates of three to four male goats, 2-3-year-old, were obtained by the artificial vagina method of collection with the aid of a female serving as dummy and then diluted with equal volume. The seminal plasma was removed by centrifugation. The linearized DNA plasmid was end-labeled. An orthogonal experimental  $L_{16}(4^4)$  with four parameters in sperm-mediated gene transfer assays: DNA fragment sizes, the concentration of the foreign DNA, incubation time and temperature, was designed to optimize the method of goat sperm binding exogenous DNA. The positive goat spermatozoa were detected by *in situ* hybridization. A total of 149 goat sperm donors (21, 21, 19 and 10 Chuandong white goats of 1-, 2-, 3- and 4-year-old; 23, 22, 14 and 7 Boer  $\times$  Nanjiang yellow  $F_1$  goats, 6 Boer goats and 6 Nanjiang yellow goats, 2-year-old, respectively) was selected with the nearly sperm quality. The ejaculates of four breed male goats were obtained and screened by the method that established in this paper. On the condition of the seminal plasma sperm removed from freshly ejaculated semen by thorough washing,  $1.00 \mu\text{g}$  linearized end-labeled DNA plasmid and  $10^6$  spermatozoa incubated for 1 hour at room temperature, could have a good transfection rate. The efficiency of spermatozoa in picking up exogenous DNA of Chuandong white and Boer  $\times$  Nanjiang yellow  $F_1$  goats decreased with age. It was  $39.34\% \pm 13.76\%$  of Chuandong white goat at 1-year-old, and significantly decreased at 2- and 3-year-old ( $24.15\% \pm 12.46\%$  and  $23.40\% \pm 19.37\%$ ,  $P < 0.01$ ). The efficiency of Boer  $\times$  Nanjiang yellow  $F_1$  goats was  $30.61\% \pm 21.59\%$ ,  $20.75\% \pm 17.52\%$ ,  $21.16\% \pm 13.98\%$  and  $22.88\% \pm 9.31\%$  at 1-, 2-, 3- and 4-year-old, respectively. No significant difference was found among the ages ( $P > 0.05$ ). Different goat breeds at 2-year-old exhibited different sensitivity to foreign genes. The sperm from Nanjiang yellow goat had the highest ability in picking up exogenous DNA, and that from Chuandong white goat also had a higher ability in picking up exogenous DNA. The positive sperm rates were  $38.48\% \pm 17.54\%$  and  $34.62\% \pm 20.76\%$  from these two breeds, respectively. No significant difference was found between the two breeds ( $P > 0.05$ ). The sperm from Boer goat had the lowest ability in picking up exogenous DNA. The positive sperm rates were  $13.85\% \pm 8.50\%$ . The efficiency of goat spermatozoa in picking up exogenous DNA of is decreased with the age. Different goat breeds appeared to have different ability to bind foreign genes [Acta Zo-

2005-04-29 收稿, 2005-07-03 接受

\* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: weihong@mail.tmmu.com.cn

© 2005 动物学报 Acta Zoologica Sinica

*ologica Sinica* 51 (6): 1058–1066, 2005].

**Key words** Goat, Spermatozoa, Exogenous DNA, Development, Breed

大量研究证实, 几乎所有动物的精子都具有自发性结合外源 DNA 的能力; 同时也发现, 精子与外源基因的结合是受到严格调控的 (Brackett et al., 1971; Gandolfi, 1998; Spadafora, 1998)。Lavitrano et al. (1989) 利用精子为载体介导基因转移, 得到 30% 的转基因阳性小鼠。该报道因转基因手段简单、高效而引起许多研究者的极大兴趣, 并建立了一种新的转基因方法, 即精子介导基因转移 (Sperm-mediated gene transfer, SMGT)。随后, 多家实验室利用该技术获得了猪、牛、羊、兔、小鼠等哺乳动物以及鸡、鱼、蜂、蚕等转基因动物后代, 其中建立了小鼠、猪、兔表达外源基因的转基因品系 (Gandolfi et al., 1989; Milne et al., 1989; Gandolfi et al., 1992; Schellander et al., 1995; Kuznetsov and Kuznetsov, 1995; Nakanishi and Iritani, 1996; Patil and Khoo, 1996; Shamila and Mathavan, 1998; Gandolfi, 2000)。

目前关于精子结合和内化外源 DNA 的研究报道差异极大, 甚至相互矛盾, 说明该方法存在着极大的随机性和不确定性 (Chan et al., 2000)。造成精子介导转基因实验结果巨大差异的根本原因是由于供体动物精子内化外源 DNA 的能力差异所致, 尚没有系统的研究。

山羊 (*Capra hircus*) 品种和数量多, 分布区域广, 是乳腺生物反应器研究的首选动物。本实验以山羊为研究对象, 从精子结合及内化外源 DNA 的影响因素入手, 优化精子和外源 DNA 处理条件, 研究和比较不同山羊的精子结合外源 DNA 的效率, 以探讨山羊精子内化外源 DNA 的能力是否存在明显的品种和年龄差异, 为准确筛选高转染山羊精子供体, 提高利用精子介导法生产转基因动物效率和与其它哺乳动物精子供体的筛选提供有价值的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒与菌种** pEGFP-N<sub>1</sub> 质粒由军事医学科学院叶华虎博士赠送, K14 表达载体由以色列 Weizman 研究院 Yangbing Zhao 博士赠送, 大肠杆菌 DH<sub>5α</sub> 为本实验室保存。

**1.1.2 实验动物与材料** 山羊卵巢在重庆市沙坪坝梨树湾屠场采集。分别选择体况、精子活力 (68%–79%) 和精液品质综合指数 (0.71–0.77, 检测方法见 1.2.2) 相近的 1 岁、2 岁、3 岁和 4 岁的川东白山羊公羊 21、21、19 和 10 只, 波尔山羊 × 南江黄羊杂交一代 (以下简称波南 F<sub>1</sub>) 公羊分别为 23、22、14 和 7 只, 2 岁波尔山羊和南江黄羊公羊各 6 只。种公羊由重庆永荣生物工程有限责任公司波尔园、四川西充县大明科技园羊场和第三军医大学基础部实验动物学教研室提供。

**1.1.3 主要药品试剂** DIG DNA 末端标记和检测试剂盒、*Apal* I、*Hind* III、*Not* I 限制性核酸内切酶购于 Roche 公司; BSA、丙酮酸、卡那霉素、钙离子载体 IA23187、M199、雌二醇 (1, 3, 5 [10]-estratrience-3, 17β-diol, E<sub>2</sub>)、促卵泡激素 (FSH)、促黄体激素 (LH) 购于 Sigma 公司; 质粒大量提取试剂盒、质粒小量提取试剂盒购于 Omega 公司; 凝胶电泳回收试剂盒购于 QIAGEN 公司; GOT 检测试剂盒购于南京建成公司; *Taq* DNA 聚合酶购于 TaKaRa 公司; 发情山羊血清 (Estrous goat serum, EGS) 自制。

**1.1.4 主要仪器设备** 2400 型 PCR 仪, 美国 PE 公司; TGL-16G 高速台式离心机, 上海第三分析仪器厂; PAC300 型电泳仪和凝胶成像系统, BIO-RAD 公司; DF-200A 型电子分析天平, 常熟市衡器厂; YJ875 型医用净化工作台, 苏杭实验动物科技发展公司; 核酸测定仪, BECKMAN 公司; 光学显微镜, 日本 Olympus 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 质粒提取与标记** pEGFP-N<sub>1</sub> 质粒转化大肠杆菌 DH<sub>5α</sub>, 卡那霉素 (50 μg/ml) 筛选阳性菌落, LB 培养基扩大培养, 按照质粒小量提取试剂盒使用方法抽提质粒, *Not* I、*Hind* III、*Apal* I 单酶切和 *Hind* III、*Not* I 双酶切鉴定。大量培养, 按照质粒大量提取试剂盒使用方法抽提。

大量提取的质粒用 *Hind* III 单酶切、*Not* I 和 *Hind* III 双酶切, 电泳回收大小为 4 700 bp、0.8 kb 和 3.9 kb 左右的线性化片段。K14 质粒转化大肠杆菌 DH<sub>5α</sub>, 氨苄 (50 μg/ml) 筛选阳性菌落, 鉴定、大量培养和抽提同上。用 *Hind* III 对含有 K14-hCTLA4/Ig 转基因表达盒的 pGEM-3Z 质粒进

行酶切,电泳回收大小为 7.8 kb 线性化片段。

以上片段溶于 pH 8.0 的 TE 缓冲液中,用核酸测定仪测定 DNA 浓度,按照 DIG DNA 末端标记和检测试剂盒使用说明末端标记。主要步骤为将适量线性化质粒溶解于双蒸水(总体积为 15  $\mu$ l),置于沸水中 10 min,冰上加 10 $\times$ Hexanucleotide 混合物 2  $\mu$ l、dNTP 标记混合物 2  $\mu$ l、Kelnov 酶 1  $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C 过夜反应。Dot blot 检测标记效率,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.2.2 采精与精液品质检测** 用假阴道法采集公羊精液,采精时间集中在在 10-11 月份。采精频率为 1 次/d,采 3 次休息 1 d。试验正式开始前,公羊先排精 3-4 次。

检查精液品质指标,主要有射精量、pH 值、精子活力、精子畸形率、顶体完整率、精子生存指数、GOT 释放量和精子密度。建立山羊精液品质模糊评定方法,计算山羊的精液品质综合指数。令论域  $U = \{\text{射精量, 密度, pH, 活率, 精子畸形率, 生存指数, 精浆中谷草转氨酶 (GOT) 活性的释放量, 顶体完整率}\}$ , 根据每项指标对精液受精能力的影响程度构建论域  $U$  的模糊向量  $B$ , 令  $B = \{0.1, 0.1, 0.1, 0.2, 0.1, 0.15, 0.1, 0.15\}$ ,  $\sum b_i = 1$  满足归一化条件。由供试公羊各指标的隶属函数值组成如下隶属关系矩阵:

$$\text{公式 } R_{in} = \begin{bmatrix} U_{11} & U_{12} & \cdots & U_{1n} \\ U_{21} & U_{22} & \cdots & U_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ U_{i1} & U_{i2} & \cdots & U_{in} \end{bmatrix}$$

其中  $i = 1, 2, \dots, 149$ ;  $n = 1, 2, \dots, 8$ 。

计算每头种公山羊的综合得分:  $C_i = B \cdot R_{ij}$ , 根据  $C_i$  对供试公羊进行综合评分。

**1.2.3 转染精子的检测** 在优化山羊精子和外源 DNA 处理条件时,为尽量避免个体的影响,用假阴道法采集 3-4 只公羊精液,等量等温混合后取 50  $\mu$ l 用 TALP 液离心洗涤 3 次,每次 1 000-1 500 r/min $\times$ 5 min。最后溶解于 200  $\mu$ l TALP 液中,按照正交实验设计的要求加入定量的末端标记的线性化质粒,调整精子密度,共同孵育转染,转染后的精子用原位杂交法检测结合效率。

用假阴道法分别采集筛选的公羊精液,利用正交设计优化的精子和外源 DNA 处理条件,进行共同孵育,比较和分析转染效率。

转染效率检测。共孵育的精子生理盐水充分洗

涤 3 次,等分为两份,其中 1 份用 4% 的多聚甲醛 PBS 缓冲液固定 20-30 min,生理盐水洗涤 3 次,PBS 悬浮、涂片于 0.1% 多聚赖氨酸处理的载玻片,按照 DIG DNA 末端标记和检测试剂盒提供的方法进行原位杂交检测。另一份除在固定前加入 10 IU/ml DNase I 于 37 $^{\circ}$ C 消化 1 h 外,处理与上同。镜检(至少数 300 个精子),计算阳性精子的比例(图 1),统计转染效率。一个样品涂 2-3 张片,涂片差异不超过 10%。

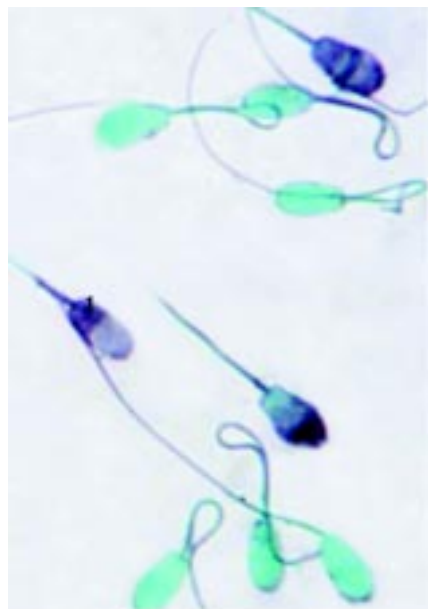


图 1 精子转染地高辛标记线性 DNA 检测  
 $\times 1 000$ , 1 为阳性转染精子。

**Fig.1 Goat spermatozoa cells binding linearized end-labeled DNA  $\times 1 000$**

1: Labeled DNA localized to the sperm head.

**1.2.4 体外胚胎生产和转染检测**

**1.2.4.1 体外胚胎生产** 将采集的卵巢放入添加双抗的 30-35 $^{\circ}$ C 生理盐水中,4 h 内送回实验室。卵巢组织用灭菌生理盐水冲洗 3 次,除尽周围脂肪和结缔组织,在 mPBS 中收集直径  $> 2$  mm 卵泡的卵母细胞。卵母细胞经 mPBS 洗涤 3 次,于预平衡 1-3 h、100  $\mu$ l 的 M199 (含 20% EGS、1  $\mu$ g/ml E2、15 IU/ml FSH、30 IU/ml LH) 中,每滴培养液含 20-25 枚卵母细胞,于 38.5 $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$ 、饱和湿度条件下培养 27 h。成熟卵母细胞轻轻吹打去除部分卵丘细胞,与转染外源 DNA 并已获能的精子行体外授精历时 16-20 h,然后检查卵母细胞的穿透率,部分受精后的卵母细胞继续在改良的合成输卵管培养液 (mSOF) + 10% EGS 中继续培养 48

h, 倒置显微镜观察卵裂率 (Cognié et al., 2003)。

**1.2.4.2 胚胎 DNA 的提取和 PCR 检测** 2-4 细胞胚胎用 0.1% 胰蛋白酶消化 2-3 min 以除去胚胎表面残留的卵丘细胞, mPBS 洗涤 3 次, 灭菌去离子蒸馏水快速洗涤 3 次, 将胚胎移入 10-15  $\mu\text{l}$  灭菌去离子蒸馏水中, 反复冻融 3 次, 添加 10-15  $\mu\text{l}$  裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl; 100 mmol/L EDTA; 100 mmol/L NaCl; 1% SDS); 加入蛋白酶 K, 终浓度为 100-200 ng/ml; 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴 2 h, 100 $^{\circ}\text{C}$  3 min 灭活蛋白酶 K, -20 $^{\circ}\text{C}$  保存。

利用电子引物设计方法, 得上游引物 ACG GCC ACA AGT TCA GC; 下游引物 CGT CGC CGA TGG GTGG TGT TCT。理论扩增片段长度为 507 bp。制备总体积为 25  $\mu\text{l}$  的 PCR 反应体系 (灭菌去离子蒸馏水 15  $\mu\text{l}$ , 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu\text{l}$ , Mg-Cl<sub>2</sub> 2.5  $\mu\text{l}$ ; dNTP 2  $\mu\text{l}$ , P1, P2 各 0.5  $\mu\text{l}$ , Taq 酶 0.5  $\mu\text{l}$ , 模板 DNA 1.5  $\mu\text{l}$ )。PCR 的反应程序为:

94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 75 s, 共进行 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。70 V 电压, 电泳 45 min, 凝胶成像系统成像。

**1.2.5 统计分析** 用 SPSS for Windows (11.0) 软件对实验结果统计分析, 统计数据用 ( $\bar{x} \pm SD$ ) 表示, LSD 方法进行多重比较。

## 2 结果

### 2.1 转染方法筛选

应用正交设计 L<sub>16</sub> (4<sup>4</sup>), 因素 A、B、C、D 分别为 DNA 片段大小、精子与 DNA 共孵育时间、DNA 浓度、共孵育温度, 每个因素选择 4 个水平 (见表 1)。用假阴道法采集 3-4 只公羊精液, 等量等温混合后, 用 TALP 液离心去除精清, 按表 1 的处理进行转染, 原位杂交方法检测转染外源 DNA 的效率, 结果见表 1。

表 1 正交试验设计 L<sub>16</sub> (4<sup>4</sup>) 和试验结果

Table 1 Experimental results of the orthogonality design (L<sub>16</sub> 4<sup>4</sup>)

实验号 Treated	A		B		C		D		R <sub>1</sub> /%	R <sub>2</sub> /%
T1	1 (0.8kb)		1 (15 min)		1 (0.25 $\mu\text{g}$ )		1	1 (0 $^{\circ}\text{C}$ )	29.37 $\pm$ 6.11	13.33 $\pm$ 6.11
T2	1 (0.8 kb)		2 (30 min)		2 (0.50 $\mu\text{g}$ )		2	2 (4 $^{\circ}\text{C}$ )	20.67 $\pm$ 3.06	12.00 $\pm$ 4.00
T3	1 (0.8 kb)		3 (60 min)		3 (1.00 $\mu\text{g}$ )		3	4 (37 $^{\circ}\text{C}$ )	44.00 $\pm$ 12.49	31.00 $\pm$ 5.57
T4	1 (0.8 kb)		4 (120 min)		4 (2.00 $\mu\text{g}$ )		4	3 (20 $^{\circ}\text{C}$ )	47.67 $\pm$ 10.60	31.00 $\pm$ 5.20
T5	2 (3.9 kb)		1 (15 min)		2 (0.50 $\mu\text{g}$ )		3	4 (37 $^{\circ}\text{C}$ )	29.33 $\pm$ 6.11	13.67 $\pm$ 5.09
T6	2 (3.9 kb)		2 (30 min)		1 (0.25 $\mu\text{g}$ )		4	3 (20 $^{\circ}\text{C}$ )	26.33 $\pm$ 4.93	11.67 $\pm$ 3.51
T7	2 (3.9 kb)		3 (60 min)		4 (2.00 $\mu\text{g}$ )		1	2 (4 $^{\circ}\text{C}$ )	31.33 $\pm$ 3.06	17.67 $\pm$ 6.03
T8	2 (3.9 kb)		4 (120 min)		3 (1.00 $\mu\text{g}$ )		2	1 (0 $^{\circ}\text{C}$ )	40.33 $\pm$ 5.69	29.00 $\pm$ 3.00
T9	3 (4.7 kb)		1 (15 min)		3 (1.00 $\mu\text{g}$ )		4	2 (4 $^{\circ}\text{C}$ )	33.67 $\pm$ 7.77	18.00 $\pm$ 6.00
T10	3 (4.7 kb)		2 (30 min)		4 (2.00 $\mu\text{g}$ )		3	1 (0 $^{\circ}\text{C}$ )	35.67 $\pm$ 2.08	24.67 $\pm$ 2.89
T11	3 (4.7 kb)		3 (60 min)		1 (0.25 $\mu\text{g}$ )		2	4 (37 $^{\circ}\text{C}$ )	29.00 $\pm$ 2.65	16.00 $\pm$ 8.00
T12	3 (4.7 kb)		4 (120 min)		2 (0.50 $\mu\text{g}$ )		1	3 (20 $^{\circ}\text{C}$ )	47.33 $\pm$ 9.87	31.33 $\pm$ 3.06
T13	4 (7.8 kb)		1 (15 min)		4 (2.00 $\mu\text{g}$ )		2	3 (20 $^{\circ}\text{C}$ )	25.00 $\pm$ 7.55	22.00 $\pm$ 4.58
T14	4 (7.8 kb)		2 (30 min)		3 (1.00 $\mu\text{g}$ )		1	4 (37 $^{\circ}\text{C}$ )	31.00 $\pm$ 13.08	27.67 $\pm$ 1.53
T15	4 (7.8 kb)		3 (60 min)		2 (0.50 $\mu\text{g}$ )		4	1 (0 $^{\circ}\text{C}$ )	32.00 $\pm$ 4.36	13.67 $\pm$ 8.96
T16	4 (7.8 kb)		4 (120 min)		1 (0.25 $\mu\text{g}$ )		3	2 (4 $^{\circ}\text{C}$ )	25.00 $\pm$ 2.65	16.33 $\pm$ 8.64
水平 Level	R <sub>1</sub> /%	R <sub>2</sub> /%	R <sub>1</sub> /%	R <sub>2</sub> /%	R <sub>1</sub> /%	R <sub>2</sub> /%	R <sub>1</sub> /%	R <sub>2</sub> /%	R <sub>1</sub> /%	R <sub>2</sub> /%
I	35.41 <sup>a</sup>	21.83	29.33 <sup>A</sup>	16.75 <sup>A</sup>	27.42 <sup>a</sup>	14.33 <sup>A</sup>	34.75	22.50	34.33	20.17
II	31.83	18.00	28.42 <sup>A</sup>	19.00 <sup>a</sup>	32.33	17.67 <sup>A</sup>	28.75	19.75	27.67 <sup>a</sup>	16.00 <sup>a</sup>
III	36.42	22.50	34.08	19.58	37.25 <sup>b</sup>	26.42 <sup>B</sup>	33.50	21.42	35.67 <sup>b</sup>	24.00 <sup>b</sup>
IV	28.25 <sup>b</sup>	19.92	40.08 <sup>B</sup>	26.92 <sup>Bb</sup>	34.92	23.83 <sup>B</sup>	34.92	18.58	34.25	22.08
R	8.17	4.50	10.75	10.17	9.83	12.09	6.00	3.92	8.00	8.00

A: DNA 片段大小; B: 精子与 DNA 共孵育时间; C: DNA 浓度 ( $\mu\text{g}$  DNA/10<sup>6</sup> 个精子); D: 共孵育温度; R: 极差; R<sub>1</sub>: DNase I 消化前阳性精子率; R<sub>2</sub>: DNase I 消化后阳性精子率。

同列大写字母不同表示同项目之间差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

A: DNA fragment length; B: incubation time; C: the ratio of foreign DNA into sperm; D: incubation temperature; R: range from minimum to maximum. R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>: the positive sperm rates before and after DNase I digestion.

Means with different superscripts of capital letters in the same column are most significantly different ( $P < 0.01$ ); different superscripts of small letters mean significantly different ( $P < 0.05$ ).

$$\sum_{j=1}^{16} R_{1j}^2 = 978.04$$

$$\sum_{j=1}^{16} R_{2j}^2 = 827.94$$

从表1可以看出,在精子转染的各因素中,对DNase I消化前转染效率影响最大的是共孵育温度,其次是共孵育时间。4个因素影响精子活力的顺序是B>C>A>D。方差分析表明,共孵育时间对DNase I消化前转染效率影响极显著( $P < 0.01$ ),其余3因素影响显著( $P < 0.05$ )。进一步

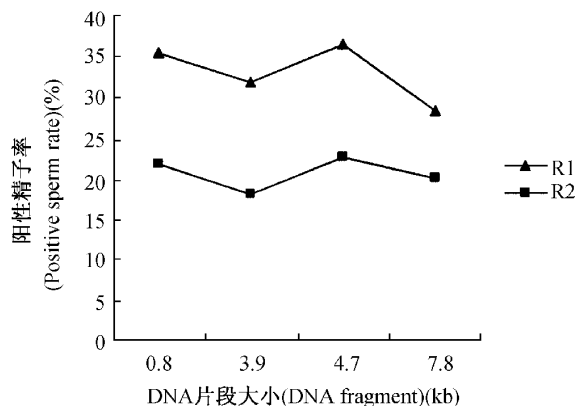


图2 外源DNA片段大小(kb)对阳性精子率的影响

Fig.2 Effect of exogenous DNA fragment length (Kb) on the positive sperm rate

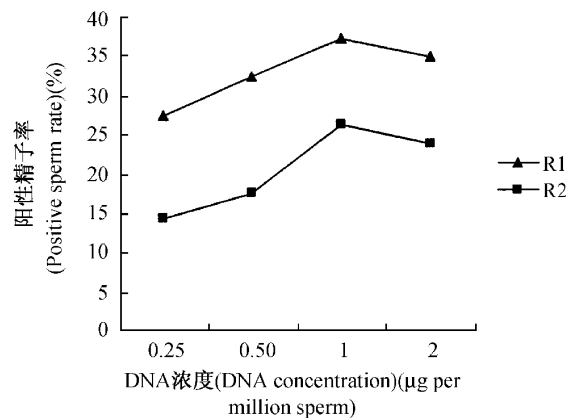


图4 DNA浓度(μg/10<sup>6</sup>个精子)对阳性精子率的影响

Fig.4 Effect of the ratio of foreign DNA (μg/10<sup>6</sup> sperm) on the positive sperm rate

转染后的精子用DNase I消化,检测转染效率,发现对转染效率影响最大的是DNA浓度。4个因素影响的顺序是C>B>D>A。方差分析表明,DNA浓度和共孵育时间对DNase I消化后转染效率影响极显著( $P < 0.01$ ),温度影响显著( $P < 0.05$ )。进一步多重比较,显示随着DNA浓度增加,转染效率升高,但达到2.00 μg DNA/10<sup>6</sup>个精子时,转染效率有所下降,但与1.00 μg DNA/10<sup>6</sup>个精子的转染效率没有显著差别( $P >$

多重比较,随着共孵育时间的延长,转染效率增加,孵育120 min的转染效率极显著大于孵育15 min和30 min的转染效率( $P < 0.01$ )。小片段显著高于大片段,DNA浓度增加,则转染效率升高,在20℃下孵育高于在4℃下的转染效率( $P < 0.05$ ),见图2、3、4、5。

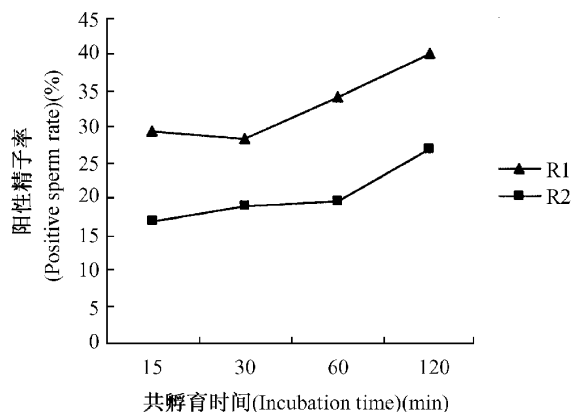


图3 共孵育时间(min)对阳性精子率的影响

Fig.3 Effect of incubation time (min) on the positive sperm rate

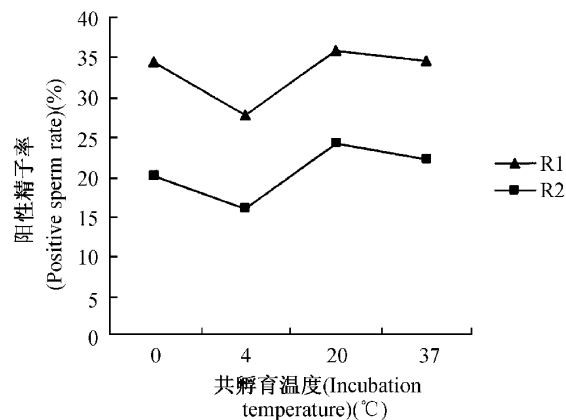


图5 共孵育温度(°C)对阳性精子率的影响

Fig.5 Effect of incubation temperature (°C) on the positive sperm rate

0.05);共孵育时间的延长,转染效率增加,孵育120 min的转染效率极显著大于孵育15 min( $P < 0.01$ ),显著大于共孵育30 min的转染效率( $P < 0.05$ );在20℃下孵育高于在4℃下的转染效率( $P < 0.05$ )。

用上述实验筛选出的山羊精子与外源DNA转染方法转染的精子,未转染组(对照组)与转染组(处理组)的山羊精液品质、卵裂率和早期胚胎转基因阳性率的影响见表2。转染后的精液品质、卵

裂率与对照组没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。用建立的转染方法与精子共浴, 胚胎 PCR 阳性率为 33.33% (图 6、7)。

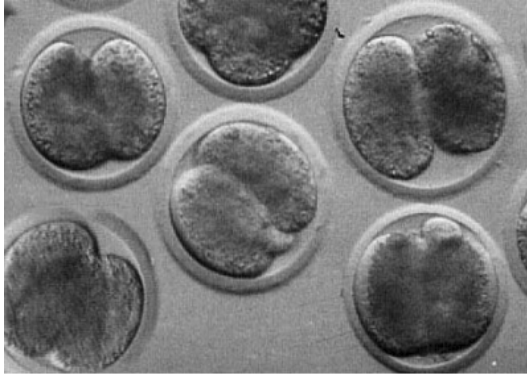


图 6 受精后 2-cell 胚胎 ( $\times 400$ )  
Fig.6 2-cell stage embryos ( $\times 400$ )

**2.2 山羊精子结合外源 DNA 的能力发育性变化**  
选择体况、精子活力和精液品质综合指数相近的 1 岁川东白山羊公羊 21 只以及波尔山羊  $\times$  南江

黄羊杂交一代 (以下简称波南  $F_1$ ) 公羊 23 只, 2 岁、3 岁、4 岁的分别为 21 只和 22 只, 19 只和 14 只, 10 只和 7 只, 用假阴道法采集精液, 用上述建立的方法转染, 用原位杂交法检测, 结果见图 8。可以看出波南  $F_1$  代和川东白山羊精子结合外源 DNA 的能力随着年龄的增大而有减少的趋势。波南  $F_1$  代山羊在 1 岁、2 岁、3 岁和 4 岁时阳性精子率分别为  $30.61\% \pm 21.59\%$ 、 $20.75\% \pm 17.52\%$ 、 $21.16\% \pm 13.98\%$  和  $22.88\% \pm 9.31\%$ , 差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

川东白山羊 1 岁时的阳性精子率为  $39.34\% \pm 13.76\%$ , 2 岁时略有降低, 为  $34.62\% \pm 20.76\%$ , 差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 3 岁时为  $24.15\% \pm 12.46\%$ , 极显著低于 1 岁组 ( $P < 0.01$ ); 4 岁时为  $23.40\% \pm 19.37\%$ , 与 1 岁和 2 岁时相比, 差异分别为极显著和显著 ( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ )。

**2.3 不同品种山羊精子结合外源 DNA 的能力比较**

选择 2 岁波尔山羊和南江黄羊公羊各 6 只, 按建立的方法处理和检测, 检测结果和 2 岁的波南  $F_1$  代、川东白山羊阳性精子率比较见图 9。可见, 各品种山羊精子结合外源 DNA 的能力也是不同的。2 岁时, 南江黄羊的阳性精子率最高, 其次是

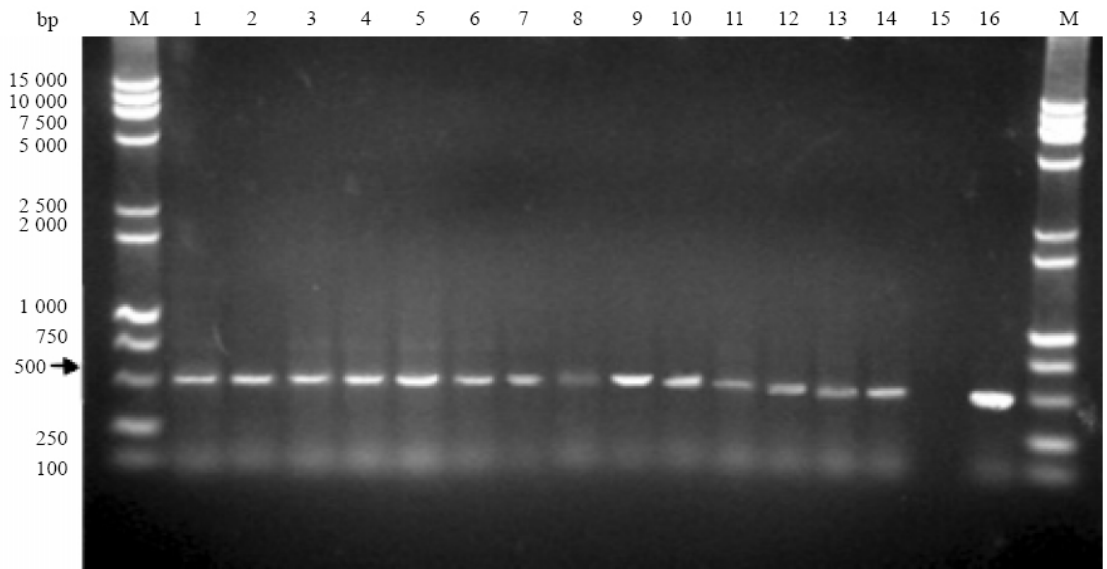


图 7 用转染外源基因的精子体外受精生产的胚胎 PCR 检测凝胶电泳图  
M: DNA Marker DL2000 + DL15000。1 - 14: 体外受精生产的胚胎; 15: 阴性对照; 16: 阳性对照。

**Fig.7 PCR analysis of DNA from goat embryos after in vitro transformation at two-cell stages**

M: DNA Marker DL2000 + DL15000. Lane 1 - 14, PCR-amplified fragment the DNA extracted from goat embryos; lane 15, negative control; lane 16, positive control.

表 2 转染外源 DNA 对山羊精液品质的影响和生产胚胎 PCR 阳性率检测结果

Table 2 Effect of incubation with exogenous DNA on the sperm quality and positive blastocysts produced

组别 Group	精液品质 Sperm quality				卵裂 Cleavage		PCR 检测 Screened by PCR	
	转染前活力 Sperm motility before transfection (%)	转染后活力* Sperm motility after transfection (%)	生存指数 Live index	顶体完整率 rate of Intact acrosome(%)	卵母细胞 (No)	卵裂率* Cleavage rate (%)	胚胎 (No)	阳性率** Positive rate (%)
对照组 Control	71.43 ± 10.69	-	1.72 ± 0.28	78.77 ± 10.70	34	20.59 (7)	-	-
处理组 Treatment	71.43 ± 10.69	61.67 ± 16.02	1.55 ± 0.20	76.35 ± 9.52	121	34.71 (42)	42	33.33 (14)

\* : 括号内为卵裂细胞数; \*\*: 括号内为 PCR 阳性胚胎数。

\* : The number of cleavage cells; \*\*: the number of PCR positive embryos.

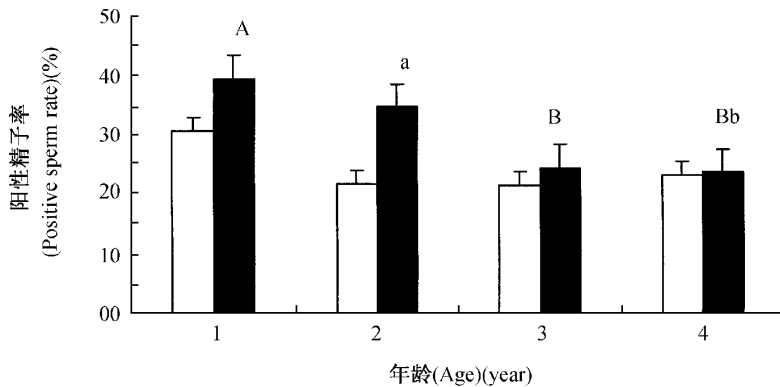
□ 波南 F<sub>1</sub> (Boer × Nanjiang goat)    ■ 川东白山羊 (Chuangdong White goat)图 8 1-4 岁波南 F<sub>1</sub> 和川东白山羊精子结合外源 DNA 的能力大写字母不同表示同项目之间差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

Fig.8 The ability of spermatozoa to pick up exogenous DNA of Boer × Nanjiang and Chuandong white goat in 1-4 year-old

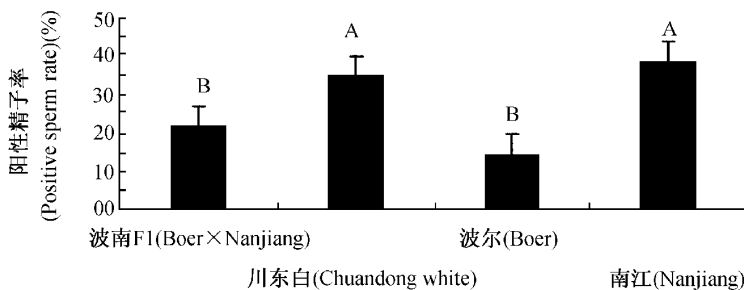
Means with different superscripts of capital letters are most significantly different ( $P < 0.01$ ). Different superscripts of small letters mean significantly different ( $P < 0.05$ ). The same below.

图 9 各品种山羊 2 岁时精子结合外源 DNA 能力

Fig.9 Ability to pick up exogenous DNA of spermatozoa in four goat breeds at 2-year old

川东白山羊, 分别为  $38.48\% \pm 17.54\%$  和  $34.62\% \pm 20.76\%$ , 差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 波南 F<sub>1</sub> 稍低, 波尔山羊最低, 为  $13.85\% \pm 8.50\%$ , 与波南 F<sub>1</sub> 差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 但波南 F<sub>1</sub> 和波尔山羊精子转染外源 DNA 的效率与南江黄羊和川东白山

羊相比, 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

动物的精子具有自发性结合外源 DNA 的能力, 同时, 这种结合是受到严格调控的。不同物种

的精子与外源 DNA 结合过程和能力是不同的，猪、牛、羊精子的阳性率通常为 25% - 40%，小鼠为 40% - 60%，兔为 15% - 87%，禽类的精子与 DNA 的结合在共孵育 1 h 内发生，反刍类只需 30 - 40 min，与人精子结合约需要 20 min，鱼类几分钟内便可完成 (Gandolfi, 1998)。利用精子介导方法生产转基因动物的效率也是不同的，Lavitrano et al. (1989) 的实验曾产生了 30% 的转基因小鼠；Brinster et al. (1989) 曾利用此法在 1 300 小鼠中进行实验，经检测无一只为转基因小鼠；Maione et al. (1998) 在所进行的 75 组小鼠 (1 755 只) 实验中，有 130 只为转基因小鼠，转基因效率为 7.4%，其中有 13 个组的平均转基因效率约为 36%。在 13 组实验中，有 5 个组转基因效率达 85% 以上，其中 3 个组转基因效率达 100%。

为什么不同批次的实验会出现如此巨大的差异？一些研究者将这归结为受实验方法和检测方法不同的影响 (Castro et al., 1991; Horan et al., 1991; Camaioni et al., 1992)。也有一些研究者认为动物个体、品系是影响 DNA 结合及内化转运的关键因素 (Kuznetsov et al., 2000; Jose and Cibelli, 2002)。Lavitrano et al. (2003) 比较了 20 头公猪精子 DNA 转染效率，结果最低的仅为 16%，最高为 87%，以高结合及内化转运能力的公猪精子体外受精或人工授精，后代仔猪的阳性率高达 48% - 80%。

本实验表明：不同品种、甚至同一品种的不同年龄阶段的个体，精子结合及转运外源 DNA 的能力存在显著差异。第一，本实验优化了山羊精子和外源 DNA 处理条件。从精子结合及内化外源 DNA 的影响因素入手，应用正交试验设计  $L_{16}(4^4)$ ，筛选出转染和检测方法。研究结果发现，当 DNA 浓度在 0 - 1.0  $\mu\text{g}/10^6$  个精子范围内，随 DNA 浓度升高，阳性精子率增加，大于 1.0  $\mu\text{g}/10^6$  个精子阳性率增加不明显。与一些研究结果是一致的，分析原因，可能与 DNA 浓度升高导致的精子死亡或凋亡有关 (Maione et al., 1997; Huang et al., 2000)。据报道，较长的 DNA 片段 (7 kb) 比短片段 (150 - 750 bp) 更容易被精子摄取，可能是由于长链 DNA 带有较大的负电荷作用所致 (Gandolfi, 1998)。我们发现在 DNA 片段大小的 4 个水平中，4.7 kb 更容易被精子摄取。温度主要影响转染后精液的活力，对精子转染结合外源 DNA 效率也有明显影响。我们采用原位杂交方法得到与

PCR 检测相似的结果，表明这种检测方法比较准确、客观。第二，在优化转染方法时，采集不同品种、年龄的精液混合，避免了品种、年龄和个体的影响，使建立的方法更具有代表性。第三，选择生理阶段、精液品质一致的实验山羊。本实验选择年龄一致、体况相近的山羊；同时，也尽量保证精液品质的相同。研究发现，精液品质与其与结合外源 DNA 的能力是互相影响的。只有活精子才具有结合外源 DNA 的能力，而且精子活力越高，结合和内化转运能力越强 (Gandolfi, 1998)。季节和采精频率影响精液品质 (Leboeuf et al., 2000)，我们将采精时间集中在 10 - 11 月份，采精频率固定，试验正式开始前，公羊先排精 3 - 4 次。衡量精液品质的指标很多，如射精量、密度、pH、活率、精子畸形率、生存指数、精浆中谷草转氨酶 (GOT) 的释放量、顶体完整率等，本文用根据每项指标对精液受精能力的影响程度，用模糊数学方法，计算山羊的精液品质综合指数，保证实验山羊精液品质的一致。

我们发现波南  $F_1$  代和川东白山羊精子结合外源 DNA 的能力随着年龄的增大而有减少的趋势。目前还没有这方面的报道。波南  $F_1$  代和川东白山羊一般在 8 - 12 月龄时性成熟，18 - 24 月龄才具有稳定的配种能力。这时山羊的射精量较大而稳定，精子畸形率低，山羊已逐渐达到体成熟，精子是非常稳定而不活跃的细胞，又由于这些因素的影响，给外源基因与精子本身基因的结合造成了困难。本文的研究结果表明这时的山羊精子结合外源 DNA 的能力处在一个较低而稳定的水平。

本文的研究结果表明山羊精子结合外源 DNA 的能力同时存在品种差异。南江黄羊和川东白山羊的精子结合外源 DNA 的能力相近，而且较高；波尔山羊最低。这与这些山羊品种的遗传距离有一定的关系。南江黄羊和川东白山羊分布区域相近，主要分布在四川省的北部和重庆市，南江黄羊在培育过程中也引进了川东白山羊的血液。波尔山羊原产于南非 (Malan, 2000)，是我国从 1995 年才引进的山羊品种。

准确筛选精子供体对提高利用精子介导法生产转基因动物效率是十分重要的 (Lavitrano et al., 2003)。本实验优化了山羊精子与外源 DNA 的转染条件，发现品种和不同年龄间转染效率不同，说明这种差异不是实验操作造成的，而是有山羊品种的遗传基础。是哪些分子在起作用？有哪些机制？



这些为今后的研究提出了新的课题。

## 参考文献 (References)

- Brackett BG, Boranska W, Sawicki W, Koprowski H, 1971. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68 (1): 353-357.
- Brinster RN, Sandgren EP, Behringer RR, Palmiter RD, 1989. No simple solution for making transgenic mice. *Cell* 59: 239-241.
- Camaioni A, Russo L, Odorisio T, Gandolfi F, Fazio VM, Siracusa G, 1992. Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa: specific localization of DNA on sperm heads. *J. Reprod. Feril.* 96: 203-212.
- Castro FO, Hernandez O, Uliver C, Solano R, Milanés C, Aguilar A, Perez R, De Armas R, Herrera N, Fuente JDL, 1991. Introduction of exogenous into the spermatozoa of farm animals. *Theriogenology* 34: 1 099-1 110.
- Chan AW, Luetjens CM, Schatten GP, 2000. Sperm-mediated gene transfer. *Curr. Top. Dev. Biol.* 50: 89-102.
- Cognié Y, Baril G, Poulin N, 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59: 171-188.
- Gandolfi F, Lavitrano M, Camaioni A, Spadafora C, Siracusa G, Lauria A, 1989. The use of sperm-mediated gene transfer for the generation of transgenic pigs. *J. Reprod. Fertil. Abstr. Ser.* 4: 10.
- Gandolfi F, 2000. Sperm-mediated transgenesis. *Theriogenology* 53 (1): 127-137.
- Gandolfi F, Passoni L, Modina S, Brevini TAL, Lauria A, 1992. Intracellular localization of exogenous DNA molecules in sperm cells of domestic animals. *Atti. SISVET.* 46: 411-415.
- Gandolfi F, 1998. Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals. *Transgenic Res.* 7 (3): 147-155.
- Horan R, Powell R, McQuaid S, Gannon F, Houghton JA, 1991. Association of foreign DNA with porcine spermatozoa. *Arch. Androl.* 26: 83-92.
- Huang ZY, Tamura M, Sakurai T, 2000. *In vivo* transfection of testicular germ cells and transgenesis by using the mitochondrially localized jellyfish fluorescent protein gene. *FEBS Letters* 487 (2): 248-251.
- Jose B, Cibelli DMV, 2002. Sperm Mediated transgenesis rushes "back to future". *Molecular Therapy* 6 (6): 699-670.
- Kuznetsov AV, Kuznetsov IV, Schit IY, 2000. DNA interaction with rabbit sperm cells and its transfer into ova *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Reprod. Dev.* 56: 292-297.
- Kuznetsov AV, Kuznetsov IV, 1995. Binding of exogenous DNA pRK3 lacZ by the rabbit spermatozoa, its transfer in the oocytes and expression in the preimplantation embryos. *Ontogenez.* 26: 300-309.
- Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C, 1989. Sperm cells as vector for introduction foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 57: 717-723.
- Lavitrano M, Forni M, Bacci ML, DI Stefano C, Varzi V, Wang H, 2003. Sperm mediated gene transfer in pig: selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol. Reprod. Dev.* 64 (3): 284-291.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S, 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 113-141.
- Maione B, Lavitrano M, Spadafora C, Kiessling AA, 1998. Sperm-mediated gene transfer in mice. *Mol. Reprod. Dev.* 50 (4): 406-409.
- Maione B, Pittoggi C, Achene L, Lorenzini R, Spadafora C, 1997. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell Biol.* 16 (9): 1 087-1 097.
- Malan SW, 2000. The improved Boer goat. *Small Ruminant Research* 36 (2): 165-170.
- Milne CP, Elschen FA, Collis JE, Jensen TL, 1989. Preliminary evidence for honeybee sperm mediated DNA transfer. *International Symposium on Molecular Insect Science,* 120-125.
- Nakanishi A, Iritani A, 1996. Gene transfer in the chicken by sperm mediated methods. *Mol. Reprod. Dev.* 36 (2): 258-261.
- Patil JG, Khoo HW, 1996. Nuclear internalization of foreign DNA by zebrafish spermatozoa and its enhancement by electroporation. *J. Exp. Zool.* 274: 121-129.
- Schellander K, Peli J, Schmoll F, Brem G, 1995. Artificial insemination in cattle with DNA-treated sperm. *Anim. Biotech.* 6: 41-50.
- Shamila Y, Mathavan S, 1998. Sperm-mediated gene transfer in the silkworm *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 37: 168-177.
- Spadafora C, 1998. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *BioEssays* 20: 955-964.