

## 【生物技术】

## 精子整合外源 DNA 的分子机制与转基因动物的制备

孙玉江<sup>1</sup>, 王丽<sup>2</sup>, 李兰<sup>3</sup>, 潘庆杰<sup>3</sup>

(1 东营市农业科学研究所, 2 东营市环保研究所, 山东东营 257091;

3 莱阳农学院动物科技学院, 山东莱阳 265200)

**摘要:**利用精子载体法制备转基因动物是一种简便、可行的研究和应用方法,但精子结合并内化转运外源 DNA 却具有非常复杂的机制。从精子结合外源 DNA 的物质基础及分子机制,外源 DNA 在精子细胞中的存在和降解等方面展开探讨,并着重探讨了外源 DNA 在精子基因组中的整合机制。另外,基于理论研究的进展讨论了转基因动物的制备策略。

**关键词:**转基因动物;精子载体

**中图分类号:**Q78 **文献标识码:**A

**文章编号:**1008-0864(2005)04-0038-03

精子介导基因转移就是使精子携带外源基因并通过受精过程将其导入到卵母细胞中,外源基因也因此整合到胚胎基因组中,如果外源基因能随胚胎基因组稳定遗传,就会获得转基因后代。

1989年,意大利科学家 Lavitrano 等<sup>[1]</sup>获得了首例精子介导的转基因小鼠,他使用的是线性、环状质粒与附睾精子共孵育后体外受精的方式。但其他实验室对他们的实验无法重复,因而精子介导法仍被人们所质疑。在随后的 10 余年间,人们对精子携带 DNA 的分子机制、外源 DNA 的内化转运途径及整合机制等进行了系统的研究,因而也获得了一定进展<sup>[2-8]</sup>,尤其是 1998 年 Lavitrano 研究小组与美国波士顿大学的合作又一次精子介导转基因的成功,使人们又认识到精子载体法的可行性<sup>[9-15]</sup>。1999 年, Perry 等<sup>[16]</sup>将精子破膜并与 DNA 混合处理后进行精子的胞浆内注射受精,外源基因在 20% 后代中获得了有效表达。2000 年,有研究人员从睾丸内转染的成熟精子中筛选出阳性精子进行显微受精,获得了 4 只阳性动物后代。2002 年 Lavitrano<sup>[9]</sup>利用 DNA 转染的精子进行人工授精,获得了表达具有生物活性的人衰变加速因子(hDAF)的转基因猪,阳性率 64%。

## 1 精子结合外源 DNA 的分子机制

有研究表明,绝大多数种类的动物精子有自发结

合外源 DNA 的能力,其结合率从 15% 到 40% 不等。

DNA 通常结合在精子头部顶体后区,这可能与精子膜蛋白中 30~35KD 的蛋白有关,因为该蛋白在体外可与 DNA 形成复合体,并且该蛋白集中分布在精子顶体后区,从低等动物到高等哺乳动物都存在这种蛋白,其氨基酸序列具有保守性。

有研究发现,附睾精子结合外源 DNA 的能力明显高于射出的带有精清的某些成分可能抑制 DNA 与精子膜蛋白的结合。进一步研究发现,精清中有一种分子量 20KD 的蛋白覆盖精子头部顶体后区,在体外能与膜上的 30~35KD 蛋白相互作用置换出与膜蛋白结合的 DNA 分子。另外在精清中还发现了一种  $Ca^{++}$  依赖性的 DNA 酶,在  $Ca^{++}$  激活后可对外源 DNA 产生降解。

## 2 精子整合外源 DNA 的分子机制

DNA 转染处理的精子用 DNase I 消化后,仍能检测出外源 DNA 的存在,说明外源 DNA 已经透过细胞膜进入胞质和/或细胞核中。研究发现有 15%~22% 结合在小鼠精子顶体后膜上的 DNA 可内化转运到精子核膜周围及核内,甚至整合到精子基因组中。这一发现对精子介导制备转基因动物尤为重要,因为只有内化了的外源 DNA 才有机会通过受精过程进入卵母细胞。

CD4 是质膜上的转运系统之一。CD4 是细胞膜上的跨膜蛋白,在外源 DNA 内化转运过程中起重要作用。CD4 基因敲除小鼠的精子具有与 CD4 野生型小鼠相同的结合外源 DNA 能力。但基因敲除小鼠的精子经 DNA 转染后却无法内化转运 DNA,因此转染精子经 DNase I 消化后,外源 DNA 的 Southern 杂交无信号,而野生型小鼠的精子却有 30% 以上的阳性率<sup>[13]</sup>。

收稿日期:2005-03-15;修回日期:2005-06-15。

作者简介:孙玉江,男,1963年生,研究员,副所长;主要从事动物遗传育种研究。E-mail:s36s@sohu.com

基金项目:国家高技术研究发展计划重大专项(2002AA206621)。

基于上述研究成果,1998 年 Spadafora<sup>[17]</sup> 提出了精子结合外源 DNA 及 DNA 内化的分子模型:

正常射出的精子,膜上的 DNA 结合蛋白(DBP,精子膜表面 30~35KD 蛋白)被副性腺中的 IF-1 因子封闭,从而维持物种的遗传稳定性,当精子充分洗涤或破膜后,IF-1 的封闭被解除,外源 DNA 与 DBP 相互作用形成 DNA-DBP 核蛋白复合体,DNA-DBP 复合体激活 CD4 并组装成 DNA-DBP-CD4 复合体。该复合体内化通过核孔到达核基质。在核基质区外源 DNA 被解离并与精子染色体 DNA 紧密接触。游离的蛋白复合体循环到膜上转运新的 DNA 分子。

在受精发生的前后时期,成熟卵母细胞,受精卵雌雄原核的染色体 DNA 上有单链断裂缺口,早期胚胎细胞活跃分裂增殖过程中,DNA 复制也留下了大量复制叉与复制片段,这些单链缺口为外源基因的整合提供了物质基础。另外,外源 DNA 在进入宿主细胞过程中,激活了核酶系统及 DNA 修复系统。核酶在降解外源 DNA 的同时也在自身染色体 DNA 上产生缺口,在 DNA 修复系统的作用下,外源 DNA 得以整合到基因组 DNA 中。

在精子基因组中,DNA 的 loop 环及核小体连接部位的 DNA 不受核蛋白包装,DNA 呈现裸露状态,并且该部位 DNA 双链间螺旋沟较宽,有利于核酶发挥作用,同时它与核基质紧密相连,核基质中有 DNA 结合蛋白以及核酶系统。在 DBP 作用下,外源 DNA 与精子基因组 DNA 紧密接触,再由核酶系统切断基因组 DNA,催化外源 DNA 发生整合。

### 3 外源 DNA 在精子细胞内的存在与降解

外源 DNA 在宿主基因组中的整合因发生的时期不同所产生的后代类型不同。如果外源 DNA 在受精

卵原核期或胚胎 1 细胞期整合到宿主基因组中,得到的是转基因动物,而胚胎 2 细胞期之后再整合得到的动物就是嵌合体,而那些未能整合到基因组中的外源 DNA 在胚胎细胞中就会被核酶逐步降解。对精子细胞而言,其发育过程中核酶系统也得到转录和表达,只是在成熟的精子细胞中核酶以游离的无活性的亚基形式存在。

一般情况下,外源 DNA 浓度为 1~10 ng/10<sup>6</sup> 个精子时内化的外源 DNA 分子大部分完整,当外源 DNA 浓度增加到 100~500 ng/10<sup>6</sup> 个精子时,外源 DNA 分子会受到强烈降解。精清与精细胞内的核酶系统是 Ca<sup>++</sup> 依赖性的,外源 DNA 激活了精细胞的核酶系统,核酶不仅会对外源 DNA 进行降解对自身的 DNA 也会产生断裂与降解作用,从而导致精子细胞的凋亡。

外源 DNA 是否以完整的状态整合到精子基因组中是利用精子介导法制备转基因动物的关键。研究发现,外源 DNA 在精子基因组中的整合不是随机的,而是有整合区域的选择性,且整合多发生在核基质区或拓扑异构酶 II 的识别序列附近。

### 4 精子介导制备转基因动物

如果精子介导的转基因技术能够完善的话,它将对转基因研究产生巨大的推动作用,因为与现今常用的显微注射等常规转基因技术相比,精子介导无需特殊的实验设备,并且操作简单,费用低,成功率高。现在,利用该技术已经制备了多种转基因胚胎或动物,从海贝等水生动物到哺乳动物等。精子介导制备的转基因家畜的研究结果见表 1<sup>[7-9,11,14,18]</sup>。

表 1 精子介导法制备转基因家畜的研究结果比较

Table 1 Comparison of research results about transgenic animals by SMGT

种类 Species	检查阶段 Check-upphase	后代数 Offspringnumber	阳性率(%) Positive ratio	备注 Explication
兔 Habit	仔兔 Infancy	57	19.3	PCR、Southern 检测,LacZ 表达
	仔兔 Infancy	184	48.4	脂质体或 DMSO 介导,PCR、Southern 检测
猪 Pig	成体 Grow-up	139	5.7	PCR、Southern 检测,LacZ 表达
	成体 Grow-up	80	80.0	PCR、Southern 检测,hDAF 表达
牛 Cattle	胚胎 Embryo	188	22.0	精子电穿孔,胚胎表达检测
绵羊 Sheep	成体 Grow-up	1 592	9.8	乳腺表达检测
山羊 Goat	成体 Grow-up	8	12.5	精子电穿孔,乳腺表达检测

表1中所列的研究大多具有较大的样本数,并探索了不同的实验方法,具有一定的代表性。在国内,军事医学科学院与莱阳农学院成立的联合攻关小组利用DMSO和脂质体为介质,通过睾丸介导基因转移获得了184只转基因兔,其中89只为阳性,新试验成功的DMSO法获得了56.2%的阳性率。该方法正在小鼠和山羊上进一步验证,其发生机制也在分析研究。

## 5 结语

转基因动物的研究一直是国内外学者关注的热点,但由于传统的转基因技术要求较多精密的仪器设备和操作熟练的实验人员,所以限制了该技术的应用。精子介导基因转移是一种简便的试验方法,该技术一旦成熟并应用于生产实践,将会对医学、农业等领域起到很大的推动作用。

### 参 考 文 献

- [1] Lavitrano M, Camaioni A, Fazio M, et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice[J]. *Cell*, 1989, (57):717~723
- [2] Aguirre A, Duenas M, Falcon V, et al. Fate of the heterologous DNA transferred by spermatozoa to murine myeloma-spermatozoa hybrids, and mouse embryos[J]. *Tansgenics*, 1995, (1):541~552
- [3] Bachiller D, Schellander K, Peli J, et al. liposome-mediated DNA uptake by sperm cells[J]. *Mol Reprod Dev*, 1991, (30):194~200
- [4] Francolini M, Lavitrano M, Lamia C L, et al. Evidence for nuclear internalization of exogenous DNA into mammalian sperm cells[J]. *Mol Reprod Dev*, 1993, (34):133~139
- [5] Gandolfi F. Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals[J]. *Transg Res*, 1998, (7):147~155
- [6] Gandolfi F. Sperm-mediated transgenesis[J]. *Theriogenology*, 2000, (53):127~137
- [7] Huguet E, Esponda P. Foreign DNA introduced into the vas deferens gained by mammalian spermatozoa[J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, (51):42~52
- [8] Kuznetsov A V, Kuznetsova I V, Schit I Y. DNA interaction with rabbit sperm cells and its transfer into ova in vitro and in vivo[J]. *Mol Reprod Dev*, 2000, (56):292~297
- [9] Lavitrano M, Bacci ML, Forni M, et al. Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation[J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(22):14230~14235
- [10] Lavitrano M, Bacci ML, Forni M, et al. Sperm mediated gene transfer in pigs: selection of donor boars and optimization of DNA uptake[J]. *Mol Reprod Dev*, 2003, (64):284~291
- [11] Lavitrano M, Forni M, Varzi V, et al. Sperm-mediated gene transfer: production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation[J]. *Transpl Proc*, 1997, (29):3508~3509
- [12] Lavitrano M, French D, Zani M, et al. The interaction between exogenous DNA and sperm cells[J]. *Mol Reprod Dev*, 1992, (31):161~169
- [13] Lavitrano M, Maione B, Forte E, et al. The interaction of sperm cells with exogenous DNA a role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules[J]. *Exp Cell Res*, 1997, (233):56~62
- [14] Lavitrano M, Stoppacciaro A, Bacci M L, et al. Human decay accelerating factor transgenic pigs for xenotransplantation obtained by sperm-mediated gene transfer[J]. *Transpl Proc*, 1993, (31):972~874
- [15] Maione B, Lavitrano M, Spadafora C, et al. Sperm-mediated gene transfer in mice[J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, (50):406~409
- [16] Perry A, Wakayama T, Kishikawa H, et al. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection[J]. *Science*, 1999, (284):1180~1183
- [17] Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation[J]. *Bioessays*, 1998, (20):955~964
- [18] Sperandio S, Lulli V, Bacci ML, et al. Sperm-mediated DNA transfer in bovine and swine species[J]. *Animal Biotechnology*, 1996, (7):59~77

## Molecular Integration Mechanism of Sperm with Outer Origin DNA and Making About Transgenic Animals

SUN Yu-jiang<sup>1</sup>, WANG Li<sup>2</sup>, LI Lan<sup>3</sup>, PAN Qing-jie<sup>3</sup>

(1. Dongying Institute of Agriculture Science, 2. Dongying Science Institute of Environment Protection, Shandong Dongying 257091, China; 3. College of Animal Science and Technology, Laiyang Agriculture University, Shandong Laiyang 265200, China)

**Abstract:** Making transgenic animal by SMGT is a very simple and feasible method for research and application, but combining and inner-transferring of outer origin DNA has very complicated mechanism. this article discussed about substance basic and molecular mechanism of integrate between sperm and outer origin DNA and probed into integrate mechanism of outer origin DNA in sperm genome. In addition, making method of transgenic animal was discussed on the basis of the development of theoretical research.

**Key words:** transgenic animal; sperm-mediated gene transfer