DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.02.035

科研简报

乙型肝炎病毒 X基因转基因小鼠的初步建立*

Prelimenary establishment of transgenic mice harboring gene X of hepatitis B virus

朱焕章** 史景泉 成国祥*** 陈建泉*** 旷双运**** 孙 强*** 成 勇*** 张新立 李厚达***
徐少甫*** 钱耕苏**** 顾建人**** (第三军医大学基础医学部病理学教研室) 重庆, 400038

HBx基因为 HBV基因组上的一个开放读框,可编码具有转录反式激活作用的蛋白(HBxAg)。已证实在体外 HBxAg可使哺乳细胞株发生恶性转化[1]。为了探索在体内 HBxAg转化细胞的作用,国外数个实验室已相继建立了 HBx转基因鼠模型[2,3]。为研究 HBx基因在肝细胞癌变过程中的确切作用提供有效的动物模型,我们初步建立了携带乙型肝炎病毒 X基因的转基因小鼠,现报道如下。

1 材料与方法

C57BL/6(清洁级)小鼠购自上海实验动物中心。

限制性内切酶 EcoRⅠ、HindⅢ、BamHⅠ、T_4 DNA连接酶、dNTP、Taq DNA聚合酶及 MMLV反逆录酶等分别为 Promega Sangon和 Sigma公司产品。

采用 DNA重组技术,获得了含有 X基因(HBV adr亚型)的重组逆转录病毒载体质粒 PXSHD42,长 6 787 bp,见图 1。

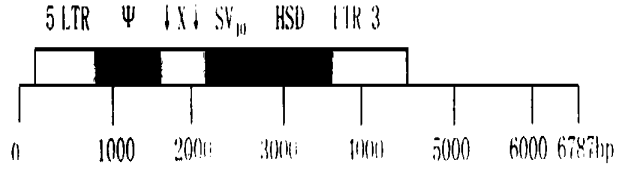


图 1 重组质粒 **PXSHD42**的结构

Fig 1 Structure of recombinant plasmid PXSHD42

X: HBx gene; ↓: BamHⅠ

1.1 HBx转基因小鼠的产生

重组质粒 PXSHD42经酶切、纯化后用显微注射方法[4]导入小鼠受精卵的雄性原核,然后移入假孕母鼠的输卵管内,生产仔鼠。

1.2 转基因整合的鉴定

DNA的准备:将 2~3周龄的转基因小鼠尾(长 1~1.5 mm)组织,按 Sambrook[5]方法进行 DNA抽提。

Nested-PCR据人类 HBV亚型 X基因序列进行引物设计,引物由美国赛百胜公司合成。引物序列如下:

外引物 1: 5′-CATGGCTGCTCGGGTG TGCT-3′

2: 5′-ATTAGGCAGAGCTGA AAAG-3′

内引物 3: 5′-CTTTGTCTACGTCCCGTCGGCGTCGA ATG-3′

4: 5′-CATTCTTTGAAGTATGCCTCAAGGTC GGT-3′

PCR反应总体积为 50μl(含 10× Buffer 5μl, 25 mmol/L Mg^{2+} 3μl, 15 mmol/L dNTP 3μl, 20 pmol外引物 1、2各 1.5μl, Taq DNA聚合酶 2 U, DNA样品 1μg)。PCR反应Ⅰ程序为:首先 95℃变性 5 min,然后进行 30个循环,循环参数为 94℃ 50 s, 55℃ 60 s, 72℃ 60 s。PCR反应Ⅱ体系包括 10× Buffer 5μl, 25 mmol/L Mg^{2+} 3μl, 15 mmol/L dNTP 3μl, 10 pmol内引物 3、4各 3μl, Taq DNA聚合酶 2.5 U, PCR反应Ⅰ 1~2μl。PCR反应Ⅱ为: 94℃变性 5 min,然后进行 30个循环,循环参数为 94℃ 50 s, 60℃ 50 s, 72℃ 60 s;最后,72℃延伸 10 min。以 PCRⅡ产物 10μl在 1.8%凝胶上点样,电泳 70 min,观察电泳结果。

1.3 转基因表达的检测

将 8周龄整合的 F1代转基因小鼠的肝脏取出,冻存于液氮中,按 Sambrook[5]方法进行总 RNA抽提。

RT-PCR:前述外引物 1、2做为 RT-PCR的引物序列。第Ⅰ链 cDNA合成按如下程序: RT反应总体积为 50μl(含 RNA

* 国家"九五"攻关项目, No. 969060107 军队医药科研基金资助项目, No. 96M092 江苏省重点开放实验室基金资助项目
** 朱焕章,男, 34岁,讲师,博士生
*** 扬州大学农学院江苏省生物工程重点实验室 扬州, 225000 **** 上海肿瘤研究所 上海, 200032
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1μg, 10× Buffer 5μl, 15 mmol/L dNTP 3μl, RNasin (80 U/μl) 1μl, 10 pmol外引物 1或 22μl, MMLV 1μl)。RT反应 37℃ 1 h。RT反应产物被直接用于 PCR反应,再加 Taq DNA聚合酶 2 U, 10 pmol外引物 1、2各 3μl。PCR反应程序按上述 PCR1的条件。

2 结果

重组逆转录 DNA片断被显微注入 514枚 C57BL/6的雄性原核,存活的 368枚被植入假孕受体小鼠的输卵管内,其中 8只受体小鼠怀孕并产生 20只仔鼠。合子存活率分别为 71% (368/514)和 5.4% (20/368),对 20只仔鼠尾组织进行抽提 DNA和 PCR扩增的整合检测,结果显示 4只雄性和 2只雌性小鼠有外源基因的整合,见图 2。4只雄性小鼠被命名为首建鼠, X1, X5, X9和 X15。总的整合率和转基因的有效率分别为 30% (6/20)和 1.1% (6/514)。



图 2　Nested PCR, RT-PCR扩增产物电泳分析

1:正常小鼠尾组织 DNA(阴性对照); 2、3:转基因小鼠尾组织 DNA显阳性带 (280 bp); 4:正常小鼠肝组织 cDNA; 5、6:转基因小鼠肝组织 cDNA显阳性带 (439 bp); M: PCR标准 Marker(SABC产品)。

Fig 2　Electrophoresis analysis of Nested PCR and RT-PCR products

lane 1: normal mouse tail tissue DNA (negative control); lane 2 and 3: transgenic mice tail tissue DNA showed positive bands (280 bp); Lane 4: normal mouse liver tissue cDNA (negative control); lane 5 and 6: transgenic mice liver tissue cDNA showed positive bands (439 bp); M: PCR standard marker (SABC).

为了产生 F1代,将首建鼠 X1, X5, X9和 X15分别与近交 C57BL/6或转基因的同窝杂交, X1产生 20只 F1仔鼠,用 PCR方法进行整合检测显示有 9只整合; X5产生 18只 F1仔鼠,有 8只整合; X9产生 17只 F1仔鼠,有 7只整合;但首建鼠 X15的 F1代仔鼠,用 PCR进行整合检则,均为阴性。

应用 RT-PCR检测 HBx基因在首建鼠 X1、X5和 X9的 F1代整合小鼠肝组织的表达情况,显示 PCR产物 (439 bp)表达于 X1、X9的 F1代小鼠,而在 X5的 F1代小鼠则未见阳性产物,见图 2。

3 讨论

本实验将含有 X基因 (HBV adr亚型)及其调控元件的重组逆转录病毒载体质粒的 DNA片段,用显微注射方法导入肝癌自发率较低的近交 C57BL/6品系的受精卵,其合子存活率和生育率分别为 71%和 5.4%,转基因的有效率是 1.1%。在本研究中,多数首建鼠的 F1代小鼠,其整合检测的结果论证了外源基因能稳定地按孟德尔规则传递到下代。至于在首建鼠 X15的 F1代仔鼠中,未见 HBx基因的整合,认为首建鼠 X15可能是一个嵌合体。

本研究中, HBx基因是处于逆转录病毒的长末端重复序列的启动子 /增强子和 SV40启动子的调控之下,并在部分转基因小鼠的肝脏表达。此结果说明了调控序列的有效性以及 HBx基因的表达可能受整合位点等因素的影响。

关键词　乙型肝炎病毒 X基因;转基因小鼠

中图法分类号　R512.62

参考文献

1　Feitelson M A, Duan L X. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. Am J Pathol, 1997, 150(4): 1141

2　Kim C M, Koike K, Saito I, *et al*. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. Nature, 1991, 351(3): 317

3　Koike K, Moriya K, Iino S, *et al*. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. Hepatology, 1994, 19(6): 810

4　Hhogen B, Costantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986. 80~82

5　Sambrook J, Fristch E F, Maniatris T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 112~115

(收稿: 1998-08-10;修回: 1998-12-27)

(编辑　冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net