

异种器官移植转基因猪检测系统的建立

陈付学¹, 魏庆信², 曹军平², 郑新民², 郭 晖³, 陈 实³, 张英汉⁴

(1 上海大学 生命科学学院, 上海 201800; 2 湖北农业科学院 畜牧所, 武汉 430064; 3 同济医科大学
附属器官移植研究所, 武汉 430030; 4 西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 以PCR、免疫荧光、细胞毒试验在DNA、表达、功能水平对转hDAF基因猪进行了检测。结果表明: 转基因猪的整合率为19.35% (18/93); 在14头转基因阳性猪中, 有7头动脉肌肉层表达了外源hDAF基因, 6头猪的外源基因表达产物可以抑制猪淋巴细胞的裂解。

[关键词] 检测系统; 转基因猪; hDAF

[中图分类号] Q 789

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)01-0019-03

随着外科手术的不断提高以及免疫抑制剂的不断发现, 同种器官移植(alb transplantation)取得了飞速发展, 但随之而来的是供体器官的严重不足^[1,2]。据美国健康资源与服务部(Health Resources and Service Administration)1996年8月的统计显示: 需要进行移植的患者就有33 000人, 每年大约有3 000名患者因不能及时获得所需器官而死亡。异种器官移植可能是解决这一问题的最有效途径。

在选择异种移植供体时, 由于猪具有繁殖率高、世代间隔短、不属保护动物、内脏器官大小与人类相近等特点而成为首选动物^[3]。然而, 这种远离种族间的移植会发生强烈的超急性排斥反应(HAR)。DAF(decay accelerating factor)是一种补体调节因子, 可以阻止经典或替代途径C3、C5转化酶的装配, 并且可通过诱导C2a或Bb的快速解离而使已形成的C3、C5转化酶失去稳定性, 从而抑制补体攻击单位的活化^[4]。因此, 转hDAF基因猪可能克服异种器官移植的最大障碍——超急性排斥反应。

转基因猪的检测是一项重要而复杂的任务, 一旦误检、漏检, 将造成极大的人力、物力浪费。作者于1997年5月将hDAF基因导入湖北白猪并结合hDAF的特点, 在各水平进行了检测, 初步建立了转hDAF基因猪的检测系统。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RAM F1640培养基(GBCO); 胎牛血清

(GBCO); 抗人CD55(DAF)/FITC单抗(Ancell); 各种酶类(华美公司); 其他试剂均为国产。

1.2 基因导入

以湖北省农科院畜牧所湖北白猪育种场VI系后备母猪为试验材料, 按魏庆信等人的方法导入外源DAF基因^[5], 共注射517枚胚(见图版1)。

1.3 整合检测

据人DAF基因序列设计一对引物, 扩增片段长度为672 bp。引物序列P1: TGGCGAGAGA GACTCAGTGATCT; P2: TGAACCTGTTGGTGGGACCTTGA。受体母猪分娩后, 取仔猪耳组织或尾组织, 提取DNA, 然后进行PCR扩增^[6]。扩增条件: 94 5 min后, 94 1 min, 62 1 min, 72 80 s, 35个循环, 最后72 10 min。在阳性对照、阴性对照同时成立的情况下, 与阳性对照一样扩增出672 bp条带的样品, 判为转DAF基因阳性猪(见图版2)。

1.4 表达检测

用无菌剪刀取整合外源hDAF基因阳性猪与阴性对照猪耳组织, 消毒并缝合伤口。耳组织块剪毛, 用生理盐水冲洗干净, 放入冰盒。CM 2020冰冻切片机制片, -20 丙酮固定15~20 min。置-20 保存。0.01 mol/L PBS清洗玻片3×5 min。3%~10% FCS封闭10 min, 倾去FCS, 用0.01 mol/L PBS稍清洗。加入抗hDAF单克隆抗体, 37 置湿盒中1~3 h。0.01 mol/L PBS清洗玻片3×10 min。滴加甘油-PBS液, 用指甲油封片。荧

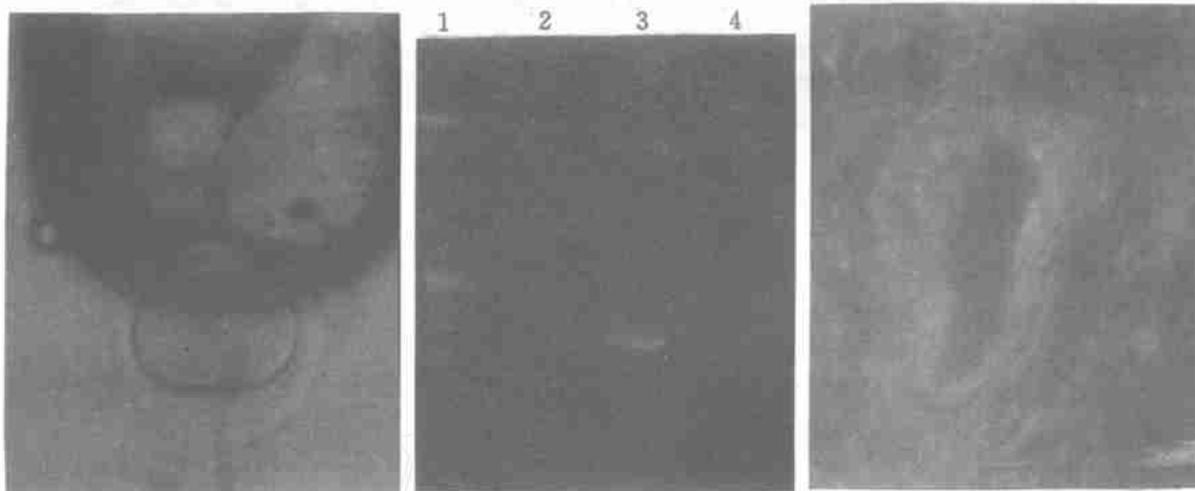
[收稿日期] 2000-06-13

[基金项目] 国家“863”项目(101-05-05-01)

[作者简介] 陈付学(1970-), 男, 河南濮阳人, 博士, 主要从事神经分子生物学方面的研究。

光显微镜观察并照相(见图版 3)。把免疫荧光照片输入电脑进行图文分析。采用 M P A S-500 多媒体彩

色病理图文分析系统, 选取像素点长 $0.785 \mu\text{m}$, 测量商 $1.718 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ 。



1. 显微注射法将外源 hDAF 基因注入雄原核; 2. 转基因猪 PCR 检测: marker, 转基因阳性猪, 阳性对照, 阴性; 3. hDAF 基因在动脉肌肉层中的表达

1. Exogenous hDAF was injected into the male pronuclei by microinjection; 2. Transgenic pigs detected by PCR: Marker, Transgenic pigs, Positive control, Negative pigs; 3. The expression of exogenous hDAF in the vascular smooth muscle

1.5 功能检测

自 14 头阴性猪和 2 头阳性猪耳静脉采血各 5 mL, 肝素抗凝, 混匀。用常规法分离淋巴细胞, 适当调整淋巴细胞的浓度, 取 72 孔微量淋巴细胞毒试验反应板, 每孔加入混合人血清 $1 \mu\text{L}$, 猪淋巴细胞悬液 $1 \mu\text{L}$, 充分混匀, 然后于 24 保温 30~45 min。每孔加 5% 伊红 $2\sim 3 \mu\text{L}$, 染色 2~5 min。每孔加 12% (L/L) 福尔马林 $8 \mu\text{L}$, 固定。置 4 h, 待细胞充分沉入孔底, 再于倒置相差显微镜下读结果。

2 结果

2.1 hDAF 基因在受体猪中的整合

本试验共注射 517 枚受精卵, 仔猪 93 头, 成活 61 头, PCR 整合鉴定, 其中有 18 头发现特异的 672 bp 扩增带。在同一检测过程中, 阴性对照未扩增出任何带。转基因猪的整合率为 19.35%。

2.2 转 hDAF 基因猪外源基因的表达

取转基因阳性猪耳组织冰冻切片, 然后进行免疫荧光试验(如果有 hDAF 基因表达, 就会与抗人 CD55 单抗结合而在荧光显微镜下观察到荧光)。在荧光显微镜下的观察表明, 转基因猪耳组织中的静脉、动脉肌肉层、鳞状上皮、毛囊、外分泌腺及散状纤维组织中均有荧光发现。在 14 头整合有 hDAF 基因阳性猪中, 有 7 头在动脉肌肉层中有荧光, 只有 6015# 猪静脉发现有荧光, 其灰度为 149.1。

表 1 转基因猪动脉肌肉层荧光平均灰度

Table 1 The average grey-scale of fluorescence of transgenic pig vascular smooth muscle

猪号 Pig number	动脉肌肉层 平均灰度 Average grey-scale	猪号 Pig number	动脉肌肉层 平均灰度 Average grey-scale
6084	131.3	6083	127.3
6008	167.8	6053	154.0
6061	157.8	6010	170.6
6011	169.0		

2.3 外源 hDAF 基因在受体猪中的功能

在相差显微镜下, 被杀伤的淋巴细胞显橙红色, 而活细胞四周透明, 有良好的结构。观察并计数每孔活细胞与死细胞数, 计算活细胞数与总细胞数的百分比。有 hDAF 基因整合的 14 头阳性猪中, 7 头有活细胞存在, 其他 7 头阳性猪与 2 头对照均未发现有活细胞存在。

表 2 细胞毒试验结果

Table 2 The result of microlymphocytotoxicity

猪号 Pig number	活细胞数/ 总细胞数 $\times 100$ Live cell No. / total No. $\times 100$	猪号 Pig number	活细胞数/ 总细胞数 $\times 100$ Live cell No. / total No. $\times 100$
6061	44.44	6008	14.29
6011	34.15	6053	11.11
6001	30.77	6084	8.00
6083	14.95		

3 讨论

PCR 是灵敏度非常高的一种分子生物学技术,

如果 1 μg 总体 DNA 经扩增后, 电泳分析出特异性带, 说明 1 μg 总体 DNA 含有 pg 级被扩增的特异性序列, 相当于每个细胞中具有至少 1 个拷贝的特异性序列。因此, 若在转基因动物个体(或转基因胚)中检测出有特异性带存在, 说明被扩增序列在个体细胞中存在至少 1 个以上的外源基因拷贝。所以把 PCR 技术用于转基因动物研究是完全切实可行的。

在异种器官移植临床实践中, 受体血浆首先接触的是供体血管内皮细胞。其内皮细胞被分隔开, 且被一些间质紧密连接, 当发生细胞毒效应时, 人补体会接触到动脉肌肉层。如果外源 hDAF 基因在猪动脉肌肉层表达时, 它会抑制人补体活性, 进而达到保护组织的目的。所以, 笔者认为应将动脉肌肉层作为研究转基因猪外源 hDAF 基因表达的主要指标之一。本试验中发现, 14 头转基因猪中 7 头动脉肌肉层有 hDAF 基因表达产物, 用平均灰度表示其表达强度。而其他 7 头猪未观察到动脉肌肉层荧光, 其原因可能与基因结构的甲基化, 外源基因与内源基因的共抑制, 整合位点等因素有关。统计结果表明, 外源 hDAF 基因在猪耳组织的动脉肌肉层、鳞状上皮、毛囊、外分泌腺、散状纤维组织中染有荧光, 而在软骨组织中没有, 这与 Rosengard 的研究结果一

致^[8]。本试验只发现 6015# 猪静脉表达有 hDAF 基因, 而 Rosengard 所检测全部 27 头猪中则未发现一例^[8], 因此对 6015# 猪有待进一步研究。经检查, 对照组鳞状上皮、毛囊、外分泌腺、散状纤维组织有荧光, 而其动脉肌肉层却未发现。这与 Rosengard 的研究结果一致, 但他未对这一现象作进一步解释。这是由于这些组织强有力的非特异性吸附造成的。

中国人 DAF 基因在猪体内表达后, 通过抑制补体攻击单位的活化, 最终使猪的淋巴细胞未全部被杀伤, 而且活细胞存活最多者达到 44.44%, 这提示 hDAF 基因的表达产物在一定程度上起避免超急性排斥反应发生作用, 具有生物学功能。对比表 1, 2 可见, 在 7 头动脉肌肉层表达 hDAF 基因的转基因猪中有 6 头在不同程度上表现出抗异种排斥功能, 表明其基因结构, 整合入猪基因组中的构象等都相对较理想, 也在实践中证明了动脉肌肉层可以作为转基因猪外源 hDAF 基因表达的主要指标之一。

1999 年 12 月, 同济医科大学附属同济医院器官移植研究所用本检测系统检测出的转 hDAF 基因猪进行了猪-猴心脏移植并获得成功, 验证了该试验初步建立的转 hDAF 基因猪检测系统的可行性与可靠性。

[参考文献]

- [1] Sachs D H. Xenotransplantation—challenge and opportunity[J]. Xenotransplantation, 1994, (1): 1- 5
- [2] Jeffregl P J. Use of transgenic animals in xenotransplantation[J]. Transplantation Reviews, 1996, 10(4): 67- 69.
- [3] Platt J L. Xenotransplantation: recent progress and current perspectives[J]. Current opinion in Immunology, 1996, (8): 721- 728
- [4] Brodbeck W G, Liu D, Sperry J, et al Localization of classical and alternative pathway regulatory activity within the decay accelerating factor [J]. J Immunol, 1996, 156(7): 2528- 2533
- [5] 魏庆信, 樊俊华, 郑新民, 等. 猪导入生长激素基因的研究[J]. 湖北农业科学, 1995, (6): 64- 68
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [7] 王子淑. 人体及动物细胞遗传学实验技术[M]. 成都: 四川大学出版社, 1987.
- [8] Rosengard T tissue expression of human complement inhibitor decay-accelerating factor, in transgenic decay accelerating factor, in transgenic pigs [J]. Transplantation, 1995, 59(9): 1325- 1333

The foundation of xenotransplantation transgenic pig detection system

CHEN Fu-xue¹, WEI Qing-xin², CAO Jun-ping², ZHENG Xin-min²,
GUO Hui³, CHEN Shi³, ZHANG Ying-han⁴

(1 School of Life Science, Shanghai University, Shanghai 201800, China; 2 Institute of Animal Husbandry, Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, Hubei 430064, China; 3 Institute of Organ Transplantation, Tongji Medical University, Wuhan, Hubei 430030, China; 4 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract By using PCR, immunofluorescence, microlymphocytotoxicity, transgenic pigs were detected in levels of DNA, expressing and function. The results indicated that the integration ratio was 19.35% (18/93). Of the 14 transgenic pigs, 7 pigs' vascular smooth muscle expressed exogene of hDAF, and the expressing products of hDAF in 6 transgenic pigs could delay pigs' lymphocyte cleaving.

Key words detection system; transgenic pigs; hDAF