

密级：

论文编号：

中国农业科学院 学位论文

导入外源 GRF 基因质粒
对犊牛生长发育的影响

**The Effect of Extraneous GRF Gene
Plasmid Injection on Growth and Development of Calves**

硕 士 研 究 生：张利宇

指 导 教 师：孙宝忠 副研究员

申 请 学 位 类 别：农学硕士

专 业：动物遗传育种与繁殖

研 究 方 向：畜禽种质与产品质量

培 养 单 位：中国农业科学院畜牧研究所

提交日期 2006 年 6 月

Secret grade :

NO:

**Chinese Academy of Agricultural Sciences
Master Dissertation**

**The Effect of Extraneous GRF Gene
Plasmid Injection on Growth and Development of Calves**

Master Candidate: Zhang li yu

Advisor: Sun Baozhong

Major: Animal Genetic Breeding and Reproduction

Speciality: Animal Breeding and Product Quality

Chinese Academy of Agricultural Sciences

Submitting Time: June 2006

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间：

年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：

时间：

年 月 日

导师签名：

时间：

年 月 日

缩略语英汉对照表

缩略语	英文	中文
GRF	Growth hormone-releasing factor	生长激素释放因子
GH	Growth Hormone	生长激素
SS	Somatostatin	生长抑素
IGF-I	Insulin-like Growth Factors-I	类胰岛素样因子-I
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
BUN	Blood urea nitrogen	血液中尿素氮
TG	Triester glycerol	甘油三酯
GLU	Glucose	葡萄糖
ADG	Average daily gain	平均日增重
F/G	Feed/gain	料重比
SS 苗	SS vaccine	生长抑素基因工程活载体苗
d	day	天
kg	kilogram	千克
sec	second	秒
rpm	rounds per minute	每分转数
min	minute	分钟
g	gram	克

摘 要

本论文主要研究了导入外源 GRF 基因质粒对犊牛生长发育、血液生化指标和激素水平的影响，以及导入外源 GRF 基因质粒对生长抑素基因工程活载体苗 (SS 苗) 促进犊牛生长性能和激素水平的影响。

试验结果表明：导入不同剂量 GRF 基因质粒，整个饲养试验期中各处理组的生产性能都好于对照组。3mg、6mg、9mg 处理组的日增重分别比对照组高 14.29% ($P>0.05$)，33.33% ($P<0.05$)，26.19% ($P<0.05$)，而料重比分别比对照组降低 10.69%，24.93%，21.37%。各处理组的胸围、髻甲高、体斜长等体尺指标同对照组相比都有增加的趋势，器官比例没有显著变化 ($P>0.05$)

导入不同剂量 GRF 基因质粒，各处理组的尿素氮、甘油三酯与对照组相比有下降的趋势 ($P<0.05$)，而血中的葡萄糖有升高的趋势 ($P<0.01$)。处理组的生长激素水平同对照组相比都有不同程度的升高，其中，6mg 处理组升高的幅度最大；3mg 和 6mg 处理组生长抑素水平变化幅度较小，而 9mg 生长抑素的水平升高明显 ($P<0.05$)，各生化指标的变化有利于加强蛋白的合成作用和脂肪分解。

导入不同剂量 GRF 基因质粒对 SS 苗促进犊牛生长效果的影响研究发现：整个饲养试验期中，GRF 基因质粒同 SS 苗的共同使用要好于其单独使用。SS 苗+3mg 和 SS 苗+6mg 处理组日增重分别比 SS 苗处理组提高 37.50%，33.33% 都达到显著水平 ($P<0.05$)。料重比分别降低 25.56%，23.47%。激素水平都有明显提高 ($P<0.05$)，SS 苗和 SS 苗+3mg 处理组生长抑素水平有逐渐走低趋势，而 SS 苗+6mg 处理组有增加的趋势。

整个实验表明通过注射 GRF 基因质粒可以提高犊牛的生产性能。

关键词： GRF 基因质粒，生长抑素基因工程活载体苗，生长发育，犊牛，生化指标

ABSTRACT

The objective of this paper were to explore effect of extraneous GRF gene plasmid injection on growth and development, bio-chemical index and hormone level in blood and of both GRF gene plasmid and SS vaccine injection together on growth performance and hormone level of calves.

The results showed that the growth performance of every treatments injecting different dosage of GRF gene plasmid were better than control to some extend in whole trials. Average daily gain (ADG) of 3mg ,6mg,9mg treatments were 14.29% ($P>0.05$) ,33.33% ($P<0.05$), 26.19% ($P<0.05$) higher than control. And the feed/gain (F/G) were 10.69%,24.93%,21.37% lower than control. The body measures ,including body length,height at withers,heart girth of every treatment had the tendency to increase. And the ratio of organ hadn't change significantly ($P>0.05$) .

Injecting different dosage of GRF gene plasmid, the blood urea nitrogen (BUN) and triester glycerol (TG) level had the tendency to drop ($P<0.05$) and the glucose (GLU) had the tendency to increase ($P<0.01$). The growth hormone (GH)levels in all treatments were higher than control. And the 6mg treatments reached the maximum. SS level had the smaller change in the 3mg and 6mg treatments. The somatostatin (SS) level of the 9mg treatment increased obviously ($P<0.05$). The change of bio-chemical indexes benefited to strengthen the anabolism for protein and catabolism for fat.

The trial results showed growth performance through combination of both SS vaccine with different dosage of GRF gene plasmid injection were better than use of SS vaccine alone. The ADG of SS vaccine +3mg and SS vaccine +6mg treatments were 37.50%, 33.33% higher than SS vaccine treatment, respectively ($P<0.05$). And F/G were 25.56%, 23.47% lower, respectively. The GH level of all treatments increased significantly ($P<0.05$). The SS level of both SS vaccine and SS vaccine + 3mg treatments had the tendency to decline. But the SS vaccine +6mg treatment tended to increase.

The whole trials results showed injection of GRF gene plasmid could improve growth performance of calves.

Key words: GRF gene plasmid, SS vaccine, Growth performance, Calf, Hormone level

目 录

第一章 引 言	1
1.1 生长轴与动物生长调控的相关激素	1
1.1.1 生长激素	1
1.1.2 生长激素释放因子	2
1.1.3 生长抑素	3
1.1.4 类胰岛素样因子I	3
1.2 生长激素释放因子基因质粒	4
1.2.1 GRF基因质粒的作用机制	4
1.2.2 影响GRF基因质粒表达的因素	5
1.2.3 GRF基因质粒的构建和应用	7
1.2.4 GRF基因质粒的应用优势	8
1.2.5 GRF基因质粒对畜禽胴体品质影响以及质粒的安全性	9
1.3 生长抑素基因工程活载体疫苗（SS苗）	10
1.4 GRF基因质粒应用存在的问题	10
1.5 本研究的的目的和意义	11
第二章GRF基因质粒的鉴定和制备	12
2.1 材料和方法	12
2.1.1 试验材料	12
2.1.2 试验方法	14
2.2 结果和讨论	17
2.2.1 质粒的鉴定	17
2.2.2 质粒的大量制备和纯化	19
2.2.3 质粒定量	19
2.3 结论	19
第三章单独注射GRF基因质粒对犊牛生长发育影响	20
3.1 材料和方法	20
3.1.1 试验设计	20
3.1.2 试验动物及分组	20
3.1.3 饲养管理	20
3.1.4 试验日粮组成及营养水平	20
3.1.5 试验器材	21
3.1.6 指标测定方法	21

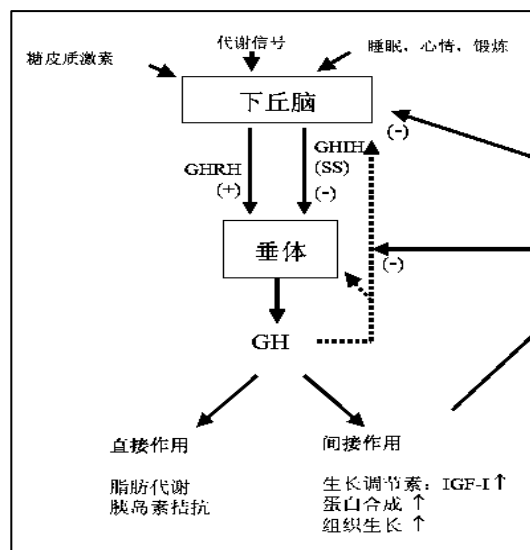
3.1.7 数据处理	22
3.2 结果和分析	23
3.2.1 导入GRF基因质粒对犊牛生长发育的影响	23
3.2.2 导入GRF基因质粒对犊牛血液生化指标和激素水平的影响	26
3.3 讨论	29
3.3.1 不同剂量GRF基因质粒对犊牛生长发育的影响	29
3.3.2 导入GRF基因质粒时间与效应关系	31
3.3.3 GRF基因质粒对激素水平变化的影响	31
3.3.4 GRF基因质粒对生化指标变化的影响	32
3.4 结论	32
第四章 GRF基因质粒对SS苗促进犊牛生长效果的影响	34
4.1 材料和方法	34
4.1.1 试验设计	34
4.1.2 试验动物及分组	34
4.1.3 饲养管理	34
4.1.4 试验日粮组成及营养水平	34
4.1.5 试验药品和器材	34
4.1.6 指标测定方法	34
4.1.7 数据处理	34
4.2 结果和分析	35
4.2.1 GRF基因质粒与SS苗共同使用对犊牛生长性能的影响	35
4.2.2 GRF基因质粒与SS苗共同使用对犊牛血液激素水平的影响	36
4.3 讨论	37
4.4 结论	38
第五章 总结论	39
参考文献	40
致 谢	46
作者简历	47

第一章 引言

随着分子生物学、遗传学等相关学科的飞速发展,人们对生命及其规律的认识也越来越深刻,与生长相关的激素的结构功能及其机理的研究已经很深入,在激素水平进行动物生长发育调控的研究也越来越深入。

1.1 生长轴与动物生长调控的相关激素

生长轴是动物体内从下丘脑—垂体—靶器官等一系列激素及其受体所组成的神经内分泌系统。在生长轴中生长激素(Growth hormone,GH)处于中心位置,是调节动物生长最重要的激素。GH的分泌是脉冲式的,主要受下丘脑释放的生长激素释放因子(Growth hormone-releasing factor,GRF)和生长抑素(Somatostatin,SS)的动态平衡调控,使体内GH维持在一种相对稳定的水平。GH和其受体(GHR)结合,这种结合作为一种信号可以刺激胰岛素样生长因子-1(Insulin-like growth factor 1,IGF-I)的合成。IGF-I又与其受体结合,诱导细胞分化,促进DNA的合成和细胞的分裂。能促进核酸和蛋白质合成,脂肪分解。这几种激素既相互促进又相互制约,最终影响着动物的生长发育。



1.1.1 生长激素

生长激素是由垂体前叶嗜酸性细胞产生分泌的,是调节动物生长发育的一种重要的多肽类激素。它是一条单链多肽,由190~191个氨基酸组成,其具有两个二硫键形成的稳定的分子结构,分子量为21000~22000道尔顿。GH是一种具有广泛生理功能的生长调节素,能影响几乎所有的组织类型和细胞,甚至包括免疫组织、脑组织及造血系统。它的生物学功能是调控新陈代谢,促进生长发育,包括促进蛋白质、核酸的合成,加快脂肪的分解;促进碳水化合物的代谢,提高血糖浓度以及促进骨的生成等。宏观表现为动物的体重增加,产毛、产奶量的上升以及胴体瘦肉率的提高等。(孙逊等,1999;梁建清,2002)

生长激素的分泌是脉冲式的,主要受GRF和SS两种激素的共同调节。GRF对GH分泌合成的促进作用是与SS抑制GH分泌的作用并存的,共同维持着GH的周期性脉冲分泌(Tannenbaum等,1984)。以1 μ g人胰腺(hp)提取的GRF-44及鼠下丘脑提取的GRF对鼠静脉注射,试验结果表明:GRF的作用存在着时间依赖性,在GH峰值,血浆GH水平对GRF反应最敏感,可引起GH分泌升高2~3倍,(115.4ng/ml);而在谷期,GH对GRF的反应不敏

感,只引起 GH 轻微升高(62.0ng/ml)($P<0.01$)。给予 GRF 单克隆抗体后, GH 分泌量下降,具体表现为 GH 脉冲式分泌完全被抑制,但对其基础水平则无影响(Wehreubery, 1982;Padmanabhan 等,1987)。此外,离体试验结果表明,SS 可抑制 GH 的自发分泌,对 GRF 刺激垂体 GH 分泌有明显拮抗作用。体内试验结果也证明:下丘脑提取的 SS 和合成的 SS 都可抑制体内 GH 的自发分泌。SS 的主动和被动免疫均可使 GH 水平明显提高(Muller 等,1979)。SS 抗血清可使 GH 的基础值明显上升,而脉冲式分泌未受影响,并增加 GH 对 GRF 在 GH 峰值时的反应(Painson JC, Tannenbaum GS, 1985)。SS 和 GRF 经下丘脑强直分泌到垂体门脉血液中,这两种激素的周期为 3~4h,相差约 180°,也就是说,两者交替节律式分泌,调节着 GH 的脉冲式分泌。但是,在不同的动物物种中, GH 的释放模式也是有所差异的,比如鼠的 GH 分泌是以脉冲为特征的,具有高频率、高峰值的特点,约 3.3h 出现一次(Tannenbaum 等, 1976),而绵羊的 GH 分泌每 3.5~5h 一个峰(Driver 等, 1981)。此外不同的品系的分泌规律也不相同,二花脸公猪的峰频率为 1.1 个峰/3h,持续时间为 42min 左右(姜礼胜, 2002)。而皮特兰与德国大白猪的杂交猪 GH 峰频率为 5.2/24h(Kraetzl 等, 1994)。除此之外,在正常的生理状况下, GH 分泌还受采食、运动、睡眠等状态的影响,也因动物的品种、年龄、性别而有所不同。

1.1.2 生长激素释放因子

生长激素释放因子主要是由下丘脑中弓状核的神经细胞分泌产生的,是一种蛋白类激素,它依动物物种的差异而有所不同,如表 1-1 六种不同动物的 GRF 的氨基酸序列。成熟的 GRF 一般含有 40-44 个氨基酸残基,是 GH 的正性调控因子,他同 SS 共同调节 GH 的分泌(刘建文等, 2003)。GRF 能特异性地增加生长激素的 mRNA,从而增加 GH 的生成,达到加快核酸和蛋白质的合成,减少脂肪沉积,进而影响动物的生产性能。

GRF 对 GH 的合成与释放的主要机理是加强了 GH 基因的转录和 GH-mRNA 的生成。而这一信号的传递是通过 GRF 受体 (GRF-RP) 实现的。人们已经证实,在垂体前叶存在 GRF 的特异性膜受体。将 GRF-RP 在转染细胞中表达,可以使它们获得与 GRF 以很高的亲和力相结合,并促使细胞内腺苷酸环化,提高胞内的 cAMP 水平(Mayo, 1992; Gaylinn 等, 1993; DeAlmeida 等, 1998)。同时,在生长激素分泌细胞中, GRF 与其上的受体结合,通过 Ca^{++} 的电压敏感型通道导致 Ca^{++} 内流(Holl 等, 1988; Lussier 等, 1991; Chen 等, 1994) 综合已有的试验结论,人们目前在 GRF 促进 GH 释放机理的认识上基本是一致的。GRF 经垂体门脉系统到达腺垂体,并与分泌 GH 的嗜酸性细胞的膜上受体 Gs 偶联受体(GCR) 结合。GRF 与受体结合后先激活一种对霍乱毒素敏感的 Gs 蛋白(Stimulatory Guanine nucleotide-binding protein, Gs),进而 Gs 激活膜上的腺苷酸环化酶(AC),使 ATP 转变为 cAMP,导致 cAMP 的水平上升。而 cAMP 水平的上升又会促进 cAMP 依赖性蛋白激酶 A 的调节亚基(R)及催化亚基(C)构象的改变并活化,促进相关蛋白的磷酸化,进而影响到细胞的活性。cAMP 引起的 GH 分泌是 Ca^{++} 依赖性的,当 GRF 作用到生长激素分泌细胞 60 秒内会提高 Ca^{++} 的浓度。

表 1-1 六种动物 GRF 的氨基酸序列

Table 1-1 GRF amino acid sequence from six kinds of animals

hGRF(人)	YDAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERGARARL-NH ₂
pGRF (猪)	YDAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGERNQEQQGARVRL-NH ₂
c,bGRF (牛)	YDAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMNRQQGERNQEQQGAKVRL-NH ₂
oGRF (绵羊)	YDAIFTNSYRKILGQLSARKLLQDIMNRQQGERNQERGARKVL-NH ₂
rGRF (鼠)	HDAIFTSSYRRILGQLYARKLLHEIMNRQQGERNQERSRFN-OH

1.1.3 生长抑素

生长抑素是由动物体内神经系统和胃肠道产生的肽类激素,广泛分布于动物各组织内,其氨基酸序列在各种动物体内都是相同的,无种属特异性。其中在下丘脑的生长抑素主要是 14 肽(SS 14),而存在于中枢及末梢神经、心脏、甲状腺、消化道及胰腺的生长抑素主要是 28 肽(SS -28)。生长抑素在哺乳动物体内以下丘脑浓度最高,而分泌量则以消化道为最多。生长抑素发挥作用后主要在肝和肾中被清除,降解部分为色氨酸 8-赖氨酸 9,体内 SS 半衰期较短,狗、猫和猪的都小于 2 min。生长抑素除具有抑制生长激素、胰岛素样生长因子、胃泌素、胰岛素等激素分泌的作用外,还可抑制胃酸及胰酶、胃蛋白酶的分泌,抑制多巴胺-β 羟化酶、肾上腺皮质 11-β-羟化酶的活性,生长抑素的这些抑制作用在一定程度上表现为机体的代谢机能下降,进而抑制动物的生长。由于生长抑素广泛存在于消化器官中,抑制消化液的分泌、胃排空、胆囊收缩和 Oddi 氏括约肌收缩,从而抑制消化道对营养物质及各种金属离子的吸收,因而该方面也可调控动物的生长。尽管生长抑素对消化功能的生理调节方面主要表现为抑制作用。

SS影响GH的主要作用机制包括:通过环化酶-cAMP系统,即SS与细胞上的特异性受体结合后,改变cAMP代谢,影响蛋白质的合成,进而抑制GH的分泌;降低膜对Ca⁺⁺的通透性,表现为关闭Ca⁺⁺的通道,减少内流Ca⁺⁺,降低细胞内游离的Ca⁺⁺,降低细胞内游离的水平Ca⁺⁺或阻断Ca⁺⁺介导的细胞内反应;抑制特异GH的mRNA转录。

1.1.4 类胰岛素样因子 I

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGFs)从发现到现在已经有 40 多年了。其中的 IGF- I 最早曾被称为硫化因子,后来又称之为生长介素。

GH/IGF- I 轴:生长激素通过肝脏生长激素受体促进肝脏 IGF- I 基因的表达从而促进 IGF- I 的合成和释放;IGF- I 反馈抑制垂体生长激素的释放。血清 IGF- I 的浓度和血清生长激素水平在 24 小时内大致平行(Dunger D B, 1996)。IGF- I 能促进细胞增殖、分化、成熟,并可抑制细胞凋亡;介导生长激素的大部分作用;促进生长和合成代谢;并且有降低血糖、调节免疫等作用。器官、组织局部也可产生 IGFs。在禁食时,它可逆转负氮平衡,阻止肌肉蛋白分解。它们通过自分泌、旁分泌的方式发挥作用。这种局部的 IGFs 在肾脏、骨骼和神经等器官、系统有着重要作用。在肾脏,IGF- I 扩张微阻力血管、增加肾小球滤过率、增加肾小管钠、磷的吸收。动物试验发现:IGF- I 在慢性肾衰可延缓肾衰进展;在急性肾衰,能加速肾功能的恢复(Hirschberg R 等, 1998)。

营养状态影响 IGF- I 浓度,它是循环和组织 IGFs 系统的重要调节因子(Estivariz C F, 1997)。

空腹和营养不良时, 尽管生长激素正常或升高, 但血清 IGF- I 水平降低, 肝脏、肠道等组织 IGF- I mRNA 及 IGF- I 水平降低。这是由 GH 拮抗、IGF- I 基因转录和翻译缺陷及 mRNA 不稳定等引起的。进食和营养状态的改善能恢复 IGF- I 水平。营养状态影响生长激素和 IGF- I 的治疗作用。在其它状态, 如严重创伤和败血症时, 也有 GH 拮抗, 此时血清 IGF- I 浓度也降低。

IGF- I 具有广泛的生物学效应, 它促进骨形成、蛋白合成、肌肉糖摄取、神经生存及髓鞘合成。

1.2 生长激素释放因子基因质粒

GRF 基因质粒是利用基因重组技术将 GRF 基因的 cDNA 序列与表达载体重组后, 直接导入动物细胞内, 并通过宿主细胞的转录系统合成 GRF, 生成的 GRF 通过血液到达靶细胞发挥作用。

1.2.1 GRF 基因质粒的作用机制

1990 年, Wolff 将编码 β -半乳糖糖苷酶报告基因注入小鼠后腿肌肉中, 经过组织化学染色发现, 注射区约有 10~30%肌纤维染成兰色, 纵向染色深度可达 400 μ m, 说明肌纤维可以摄取并表达外源基因产物。用编码虫荧光素酶的质粒 DNA 免疫小鼠后发现, 表达的酶活性呈 DNA 剂量依赖关系, 而且报告基因可持续表达 19 个月之久。进一步的定量 PCR 结果发现, 大多数的质粒 DNA 载体可以在肌纤维内稳定持续存在并表达; 而 mRNA 转录产物及表达的蛋白稳定性较差, 不能持续存在 (Wolff 等, 1990)。Buttrick 将质粒 DNA 表达载体注入小鼠左心室壁中, 发现心肌组织与骨骼肌一样, 能够摄取外源基因, 持续表达至 60 天左右 (Buttrick 等, 1992)。但与骨骼肌不同, 心肌组织对启动子的组织特异性限制较骨骼肌明显, 且表达量常受激素调节 (Leinwand 等, 1991)。

目前, 肌纤维对外源质粒摄取的具体机制还不十分清楚, 但是凭借人们对肌肉结构的已有认识, 一系列相关的实验结果为人们解释这一机制提供了一些线索。首先, 质粒 DNA 载体进入肌组织后, 在肌纤维外间质内扩散, 影响扩散的主要屏障是肌束膜。灵长目动物肌组织中肌束膜较啮齿类动物厚且致密, 因此灵长目动物中肌注外源性 DNA 的表达率较啮齿类动物低 (Wolff 等, 1992)。骨骼肌具有丰富的 T 小管系统和肌浆网结构, T 小管中有较多的细胞外液, 这些结构上的特殊性有可能使骨骼肌肌纤维直接摄取外源 DNA。研究发现预先注射心肌毒素使肌纤维处于再生状态, 只有当肌纤维分裂处于多核状态时, 才可摄取质粒 DNA, 而单核的未成熟肌纤维则无摄取质粒 DNA 的功能, 说明只有当肌纤维分化形成 T 小管系统后, 才能摄取外源 DNA (Davis 等, 1993)。人们认识肌纤维摄取 DNA 机制的过程中有三种假设:

- 1、首先, 认为质粒可被处于分裂活跃状态的肌卫星细胞摄取, 然后相互融合分化成新的肌细胞。但是 目前来看, 心肌组织和骨骼肌都能同样有效地在体内摄取外源 DNA, 而心肌组织中并不存在肌卫星细胞, 因此可以认为肌卫星细胞介导的 DNA 摄取过程不是必需的。

- 2、认为注射过程中液体流的冲击作用或针头直接损伤了肌纤维的肌膜, 使外源 DNA 沿破口进入肌浆中。骨骼肌具有多核、体积大的特点, 可以修复肌膜而存活下来表达 DNA 产物。但多数学者不支持该种观点 (Davis 等, 1993)。因为心肌细胞虽然缺乏如骨骼肌的修复能力, 但这

并不影响对外源 DNA 的表达。同时发现对肌组织多部位针头刺扎反而减少了质粒 DNA 的表达。将金颗粒包被的质粒 DNA、多聚赖氨酸或多聚谷氨酸三种颗粒共同转染骨骼肌，电镜下仅见结合有质粒 DNA 的金颗粒穿过肌纤维膜进入 T 小管及膜穴样内陷，其它两种金颗粒均存在于肌纤维基膜外的间质中，进一步证实了肌纤维对质粒 DNA 的摄取不可能是通过肌膜破口 (Wolff 等, 1992)。

3、认为骨骼肌在收缩过程中肌浆网中 Ca^{++} 外流进入肌浆中，致使肌纤维胞液中正电荷增加，导致带负电荷的 DNA 穿过基膜进入 T 小管和膜穴样内陷中，这一过程不需能量介导，但存在质粒尺寸限制。质粒 DNA 与 T 小管腔膜或膜穴样内陷的包膜之间有特殊亲和力，在肌注 100-500 μ g 质粒 DNA 五分钟后，电镜观察显示，质粒出现在完整肌纤维的 T 小管系统及膜穴样内陷中。进入膜穴样内陷中的 DNA 通过胞饮作用消耗能量穿过肌膜进入肌浆中 (Wolff 等, 1992)。膜穴样内陷与有被凹陷不同，没有笼蛋白存在，其内包含的特异受体通过糖基磷脂酰肌醇 (glycosyl phosphatidyl inositol, GPI) 锚定于膜穴样内陷的内侧包膜上，DNA 进入呈开放状态的膜穴腔内后与受体结合，穴腔关闭向肌浆内迁移，腔内低 pH 环境便于 DNA 与受体分离，通过浓度梯度利用穴腔肌浆侧包膜内的载体蛋白进入肌浆中。穴腔与包含的受体再循环至肌纤维表面，呈开放状态以携带其它的 DNA 分子 (Anderson 等, 1992)。Potocytosis 仅能摄取分子量小于 1000~2000Da 的小分子，而 DNA 的环状构型横向直径仅为 2nm \times 4mm，可以通过 potocytosis 途径进入肌浆中。人们指出，DNA 利用的可能是其它分子的 potocytosis 通道，而非 DNA 特异性的，这种通道特异性存在于横纹肌内。将一定量的质粒 DNA 和非编码 DNA (如鲑精 DNA) 一起肌注免疫时，当逐渐增加非编码 DNA 量时，质粒 DNA 摄取明显受到抑制，这种竞争性抑制现象提示 DNA 的摄取是由受体介导的 (Cox 等, 1993)。但也有学者认为，DNA 的摄取是通过胞饮作用，或有被凹陷中的特异受体介导。Hagstrom 认为 DNA 可通过肌浆网而进入肌浆中，在肌浆网的膜结构中存在特异 DNA 结合蛋白，分子量为 60 和 90KDa，可与双链 DNA 结合，而不与单链结合。同时也指出，共价闭环的外源质粒 DNA 载体较线状质粒更利于表达。(Hagstrom 等, 1996)。这一假说开始受到越来越多的重视。

质粒进入到动物细胞后，编码 GRF 的基因在强启动子的作用下高水平地表达，生成的 GRF 经血液携带到腺垂体刺激生长激素分泌细胞释放 GH。试验还表明 GRF 促进 GH 合成的机理可能是加强了 GH 基因的转录和 GH-mRNA 的生成。垂体前叶存在 GRF 受体，GRF 与受体结合激发一系列反应，由 cAMP 和 Ca^{++} 介导刺激了 GH 释放，GH 再促使肝脏产生调节生长的物质。而 GH 促进动物生长是通过类胰岛素生长因子 I (IGF-I) 实现的。GH 通过与受体结合，诱导肝细胞产生 IGF-I，而 IGF-I 能直接作用于动物体内的各种组织，促进蛋白质的合成，促进细胞增殖，从而促进肌肉、内脏和骨骼的生长。

1.2.2 影响 GRF 基因质粒表达的因素

影响 GRF 基因质粒的表达的因素较多，基因质粒的结构，基因质粒导入的方式以及佐剂等的使用等都可影响到质粒的表达的效率。

1.2.2.1 GRF 基因质粒的构建对表达效率的影响

GRF 基因质粒的构建主要包括核心基因的选择和真核载体的构建,为提高合成蛋白作用的有效性,选择核心基因时要以作用的动物物种的角度做出针对性的选择,从某种意义上讲也是为了减少免疫。真核载体要保证具有强的表达操纵区,在动物细胞内能高水平地表达目的基因,要求活性蛋白的表达能够实现组织器官的特异表达,因此需要以特异表达的操作元件构建载体,比如使用肌肉的 α -肌动蛋白的调控序列以实现肌肉的特异表达;作为促生长的核酸制剂产物,如 GRF 其作用位点是在垂体,因此在异位表达的核酸产品的分泌并进入血液就显得至关重要了,一个好的分泌引导肽是必须的。M-cadherin 可以很好的实现这一点。在选择质粒时对于能长期高效表达对机体无副作用的基因,则选择 CMV 启动子、RSV 启动子操纵下的真核表达载体。但如果高水平的表达产物对机体有毒性,则选择 SV40 启动子更为合适。还有鼠白血病病毒长臂末端重复序列(LTR)等启动子也被用于载体的构建。此类启动子具有较强的转录激活作用,还可包含一些合适的增强子、终止子、内含子、多聚腺苷酸信号(孟庆勇,2003)。

1.2.2.2 基因质粒导入方式

不同的导入方式可以影响到质粒在体内的表达,目前主要的导入方式有三种直接肌肉注射、基因枪注射以及无针喷射器喷射。

1.2.2.2.1 直接肌肉注射

是指用注射器直接将质粒 DNA 的盐溶液注入动物体内,我们知道肌肉在动物体上的分布是相当广泛的;其次,肌肉细胞特别是横纹肌细胞还具有细胞体积大、多核的特点。这样使得肌肉组织具有体积大、容量大以及方便操纵的优点(Reecy 等,1996);此外,实验表明肌肉注射的方法也是安全的,肌注的外源 DNA 以非甲基化的方式存在于细胞染色体外,并不与染色体发生整合,也不进行复制,并且表达水平受肌细胞有丝分裂率影响,分裂加速的肌细胞,对外源基因丢失亦加速,表达水平下降(Danko 等,1994a),使其更为安全,鉴于此肌肉多被用来进行 DNA 质粒注射。但是直接肌肉注射缺点是,在注入肌肉的质粒中,肌肉吸收并表达的不到 0.01%。注入的裸质粒大部分被包外的核酸酶降解了。使得需要的质粒用量较大,一般为毫克级,同时,肌肉对质粒利用率低导致基因的低水平表达。尽管如此,由于肌内注射操作的便利性,更易于研究及生产推广,因此,肌内注射途径仍然是一种普遍关注的方法。也是本试验所采用的方法。

1.2.2.2.2 基因枪

通过粒子轰击技术可将疫苗 DNA 导入动物体各个组织,这是目前用作基因免疫的最常用最有效的转移方法。其基本程序是:先将质粒 DNA 包被在金微粒子表面,用基因枪将被 DNA 包着的金颗粒加速,有效地将 DNA 带入靶器官、组织或单个细胞,可以使质粒以金颗粒的形式沉积于靶器官内。基因枪给药相比肌注给药有明显的优点,该方法效率高,所需的 DNA 量比其他方法低 250~2500 倍。该方法也有其不足,缺点是制备 DNA 包被的金颗粒操作较复杂,并有特殊的设备要求。由于诸如价格和便利性方面的障碍,基因枪技术的推广还需技术的不断完善。

1.2.2.2.3 无针喷射器喷射

通过高压设备也可称为无针注射器将通过高压气体携带外源 DNA 穿透皮肤进入肌肉组织, 由于外力的使用使 DNA 质粒个容易直接进入肌肉细胞, 从而有助于提高 DNA 的转移效率通常表达效率是直接注射的 15~20 倍, 此种方法便于推广使用, 同时又可以成倍提高表达效果, 将是一种值得发展的方向。(Vahlsing 等,1993;Lawrence Baizer 等, 2000; Sujata Manam 等, 2001)

1.2.2.3 提高基因质粒表达效率的其他因素

由于在肌细胞摄取质粒的效率较低以及质粒在进入细胞之前被核酸酶分解, 造成进入的质粒表达率相对较低, 表达时间相对较短。研究表明对质粒进行适当的包裹, 以及导入部位的预处理的都能够在一定程度上提高质粒的表达效率。

张永亮等人进行了质粒包裹研究。就是以乳酸-乙醇酸共聚物为载体, 采用蒸发法制备的载生长激素释放因子的真核表达质粒 pcDNA3-GRF(1-32)的微球。同裸质粒相比它能更好的保持 DNA 结构的完整性, 抵抗核酸酶的降解。任晓慧等 2003 年做了关于微球包裹基因质粒同裸质粒对比的实验, 结果表明释放 GRF 表达质粒在小鼠肌肉内存在并表达的时间至少为 30 天, 增重效果同其他对照组比差异极显著, 比裸质粒组、质粒和空白微球混合物组、生理盐水组分别高 12.87%、19.72%、58.58%, 试验表明载 pcDNA3-GRF(1-32)微球具有缓释作用, 并可实现 GRF 基因体内局部基因转染、表达并发挥其相应的生物学作用(任晓慧等, 2003)。

由于肌肉摄取 DNA 与肌肉的横管和细胞膜有关, 在肌肉损伤和再生的过程中, 这些横管和细胞膜很活跃, 再生的肌纤维较脆弱, 细胞膜易破损, 从而使他们对外源 DNA 的摄取更加容易(Wells 等, 1993)。如果在注射前对肌肉进行预处理, 人为地造成肌肉的损伤, 就能提高基因的转染效率。布比卡因能够选择性地破坏肌细胞, 引起肌细胞再生, 而再生肌细胞表达外源 DNA 的能力高于成熟肌细胞。从而提高基因的转染和表达效率。通过动物实验结果表明: 用布比卡因处理过的基因质粒给动物注射后的生长速度显著高于对照组。(张永亮等, 2003, 孟庆勇, 2004)

Davis 等在给小鼠接种质粒 DNA 前 15-30 分钟注射高渗蔗糖溶液(25%W/V, 用 PBS 溶解)结果外源基因表达水平高于对照组。Davis 认为高渗蔗糖可导致组织水肿而使肌束间隙变大, 肌纤维通透性增加, 这都有助于 DNA 在组织内扩散和进入到肌纤维。将质粒溶于 10%的甘油溶液也可以提高表达的水平, 降低个体间表达水平的差异。

增大外源 DNA 和肌纤维的接触面积可以提高 DNA 的转染效率。施娅雪等(1998)在兔上的研究表明增大注射体积有助于降低表达的变异系数, 可能是由于注射体积的增大更有利于质粒 DNA 向肌肉组织中迅速分布, 促进肌细胞对 DNA 的摄取(施娅雪等, 1998)。

此外还有基因缝针、基因球囊导管、基因支架、基因电针等肌肉基因转移方法, 也都具有提高质粒 DNA 转染效率的作用。Draghia-Akli (1999)在给猪注射 pSP-HV-GRF 质粒时就曾采用过电刺的方法, 由于没有设对照组, 所以他并没有报道这种方法是否增加了目的基因的表达效率

1.2.3 GRF 基因质粒的构建和应用

1.2.3.1 几种动物的 GRF 的基因结构

1983年, 首次报道了人的GRF1-44的cDNA序列:

TATGCAGATGCCATCTTCACCAACTGCTACCGGAAGGTGCTGGGCCAGCTGTCCGCCGCAA
GCTGCGCCAGGACATCATGAGCAGGCAGCAGGGAGAGCAACCAAGAGCGAGGAGGAG
CAAGGGCACGGCTTT。

以后又报道猪成熟型GRF1-44的cDNA序列:

TATGCAGATGCCATCTTCACCAACAACACTACCGGAAGGTGCTGGGCCAGCTCTCTGCCCGAAA
GCTCCTCCAGGACATCATGAGCAGGCAGGCAGCAGGGGAGAGAAACCAGGAGCAAGGA
GCAAGGGTACGGCTT。

成熟型牛GRF1-44的cDNA序列:

TACCCAGATGGCATCTTCACTAACAGCTACCGGAAGGTTCTGGGCCAGCTGTCTGCCCGCAA
GCTACTCCAGGATATCATGAACAGGCAGCAGGGAGAGAGAAACCAGGACCAAGGAGCAAA
GCTACGGCTT。

在上述cDNA序列中,人GRF编码序列与猪相差13个碱基,同源性的90.15%,猪与牛GRF的编码序列相差8个碱基,同源性的91.58%。可见编码氨基酸的核苷酸序列同源性很高。

1.2.3.2 GRF 基因质粒的构建和应用

1997年 Draghia-Akli R 等首次将人的生长激素释放因子的基因与肌源性表达载体连接后注给小鼠,2周内刺激小鼠体内GH释放增加3-4倍,生长速度提高10%(Draghia-Akli,等,1997)。随后,Draghia-Akli等(1999)将人工构建的pSP-HV-GHRG基因质粒10mg于半腱肌部位注射给3-4周龄的四元杂交猪,14天后血浆GRF浓度增加1.5倍,60天后增加2-3倍,证明了肌肉注射基因质粒可以得到有效表达。

张永亮等人将改造后猪的生长激素释放因子GRF(1-32)克隆到表达质粒载体中,构建了pcDNA3-GRF(1-32)基因表达质粒。通过在新西兰大耳白兔进行对生长发育影响的试验证明:注射组同对照组相比平均日增重提高了34.62%(冯立文,1998;张永亮,2003)。

香港领前基因公司将猪GRF基因克隆到PUC19质粒载体中构建了GRF基因质粒,张勇给6公斤仔猪注射1.0mg的GRF基因质粒,到100公斤出栏时屠宰背膘厚降低33%,眼肌面积增大25%(张勇,2001)。辜玉红给10公斤仔猪注射2.0mg的GRF基因质粒可降低屠宰背膘厚6.2%,增大眼肌面积11.81%,提高胴体瘦肉率3.59%(辜玉红,2001)。

2004年孟庆勇等在牛的一个DHFR-GRF融合蛋白cDNA的基础上设计了羊的生长激素释放因子编码序列,以及用牛的 α -肌动蛋白为启动子,pGEM-T vector为载体构建了羊的GRF基因质粒pM-GRF并且在羊上使用日增重率达到 $0.84\pm 0.01\%$ ($P<0.01$)(孟庆勇,2004)。

1.2.4 GRF 基因质粒的应用优势

最初人们直接向动物体内注射GH或GRF。每日最大有效剂量($\geq 100\mu\text{g}/\text{bw}/\text{day}$)向生长猪注射GH30-77天,提高平均日增重10%-20%,提高饲料转化率13%-33%,降低脂肪沉积率70%,提高蛋白沉积量62%。(Etherton T D 等,1998)。Peticlere等研究表明,给小公牛和猪分别注射hGRF(1-29)NH₂和hGRF(1-44)NH₂血浆中生长激素的含量与注射剂量呈正相关(Peticlere D,1987)。Enright等给小公牛注射20mg/kg的GRF,其血清GH由 $3.1\mu\text{g}/\text{L}$ 提高到 $170\mu\text{g}/\text{L}$ (Enright

等,1984)。Lapierre 等给肉用牛注射 GRF,可增加 N 储留率达 10.8% (Lapierre 等, 1988)。Hodate 等用 GRF 类似物给奶牛注射,可提高 GH 的浓度,连续注射 24 小时,产奶量增加 30%。Dubreuil 等将人工合成的人的生长激素释放因子类似物 hGRF -AN(1-29)NH₂ 以 1.66, 3.33, 6.66 μ g/日的剂量,每天分三次给体重为 49.5kg 的生长猪注射至猪体重达到 110kg,结果表明血浆 GH 浓度、平均日增重、胴体长、瘦肉率与注射剂量呈正相关;耗料量、背膘厚度、背最长肌脂肪含量与注射剂量呈负相关 (Dubreuil 等, 1990)。

虽然直接注射 GH 或 GRF 在促进动物生长及改善胴体品质方面取得很好的效果,且无种属特异性。但 GH 或 GRF 在机体内的半衰期非长短,只有 10-20min,需要每日注射,这给具体操作带来了很大的不便,同时增加了动物的应激,不利于动物发挥生产潜能。另外,直接注射还可能导致内脏器官异常增大。(chung 等, 1985; machlin 等, 1972; dubreuil 等, 1990)

随着基因技术的发展,人们通过将改造后的含有 GH 或 GRF 的目的基因用显微注射等技术注入到动物受精卵,而后再将其植入受体动物的输卵管或子宫内使其发育成携带由外源基因的转基因动物。1982 年 Palmiter 等人将小鼠金属硫蛋白-1 基因启动子与大鼠生长激素基因融合后用显微注射技术导入小鼠受精卵细胞获得生长速度为对照鼠 4 倍 (Palmiter 等, 1982)。GRF 基因也曾成功地被导入到猪的受精卵细胞中 (Pursel V C 等,1989)。

但是转基因动物现在存在着很大的争议,可能会表现出健康异常。例如关节炎、应激敏感性增加、肝脏与肾脏炎症等;遗传的稳定性也不能保证。

GRF 基因质粒的应用解决了这些问题,一次注射可以持续表达 2 个月左右,甚至更长的时间,同时由于其选用特别表达载体在动物体内不进行复制,有研究表明 GRF 基因质粒也不会插入到动物基因组内。保证了其遗传的安全性。另外其在体内缓慢表达,不会造成体内激素水平瞬间升高而影响到器官的发育。

1.2.5 GRF 基因质粒对畜禽胴体品质影响以及质粒的安全性

同直接注射 GRF 和 GH 类似,肌肉注射 GRF 基因质粒具有降低背膘厚,皮脂率,提高眼肌面积和瘦肉率的作用。张勇给 6 公斤仔猪注射 1.0mg 的 GRF 基因质粒,到 100 公斤出栏时屠宰背膘厚降低 33%,眼肌面积增大 25%。辜玉红给 10 公斤仔猪注射 2.0mg 的 GRF 基因质粒可降低屠宰膘厚 6.2%,增大眼肌面积 11.81%,提高胴体瘦肉率 3.59%。张勇经生长肥育猪骨骼肌注射 GRF 基因质粒可明显降低超声波测膘厚及屠宰测膘厚,增大眼肌面积。

现有结果表明:注射 GRF 基因质粒对屠宰猪的肉色、pH 值和系水力都没有影响,未发现 PSE 肉和 DFD 肉 (辜玉红, 2001)。

直接注射 GRF 和 GH 可导致内脏器官异常增大。而转生长激素基因动物可出现关节炎、肝脏和肾脏的炎症和胃溃疡等病症。现有结果未发现注射 GRF 基因质粒对动物的发育和健康存在不良影响。Draghia-Akli 等 (1997) 综合双能 X 线吸收剂量法、中子激活分析以及器官的重量测定的结果显示,受试猪接受肌肉 GRF 基因质粒注射后,组织和器官等比例均衡发育,动物具有正常的生理形态。孟庆勇、辜玉红和张勇注射的仔猪屠宰时也未发现有异常器官的出现。孟庆勇等提取各实验组的心、肝、注射部位肌肉的组织基因组,PCR 检测质粒的残留,均没有发现质粒残留 (孟庆勇, 2003; 王立志, 2003)。血样 GRF, IGF-I, GH 含量也在正常的生理水平范围内。

Wolff 等试验也都证明肌肉注射的裸露质粒 DNA 不会整合到宿主染色体上,不会改变动物的遗传特性。

1.3 生长抑素基因工程活载体疫苗 (SS 苗)

生长抑素除具有抑制生长激素、胰岛素样生长因子、胃泌素、胰岛素等激素分泌的作用外,还可抑制胃酸及胰酶、胃蛋白酶的分泌,抑制多巴胺- β 羟化酶、肾上腺皮质11- β -羟化酶的活性,生长抑素的这些抑制作用在一定程度上表现为机体的代谢机能下降,进而抑制动物的生长。主动免疫动物体内的SS可以提高动物的生产性能。免疫中和SS的研究表明:雄性大鼠接受抗SS血清处理,可使基础TSH和TRH刺激的TSH水平分别提高250%和200%;血清GH含量明显升高。动物的生长速度加快,许多资料还表明,无论在生长快速型,还是缓慢型动物,中和SS均能不同程度地促进家畜生长。Spencer (1981) 等首次报道了这一结果。他们发现,4只3周龄羔羊接受SS主动免疫后,生长速度提高17.6%,血清IGF水平显著升高。之后,进一步的实验结果表明,SS主动免疫使羔羊日增重明显增加,对胴体质量无明显影响。

随着研究的进一步深入,核酸疫苗的原理被应用于生长抑素基因工程疫苗的构建。比如生长抑素基因工程活载体苗产品“激生1号”就是这样一种产品,在这里我们简称为(SS苗)。SS苗利用激素免疫调控机理,通过疫苗免疫动物,产生生长抑素(SS)抗体,中和动物体内生长抑素,使内源性的促生长的激素整体水平提高,从而促进动物的生长。将合成的SS基因连接于乙肝表面抗原(HBsAg)基因上,构建成HBs/SS融合基因。然后将其克隆到痘苗病毒表达载体(pGJP-5)中,与痘苗病毒同源重组,筛选出能表达HBsAg/SS融合蛋白的重组痘苗病毒(vv-HBs/SS)。将此基因工程体在鸡胚绒毛尿膜上增殖后,制成生长抑素基因工程活载体疫苗。试验结果表明,该疫苗不造成环境污染,免疫猪、牛、羊等家畜安全有效。使用效果明显,属国家863高科技成果,处于国际领先水平。下表的数据为SS苗在动物上的应用效果。

表 1-2 SS 苗的动物生长试验

Table 1-2 Animal growth experiment for SS 苗

试验动物	猪	牛	山羊	绵羊
头数	31700	9000	18000	6900
平均增重提高率	15%	18%	16%	21%

1.4 GRF 基因质粒应用存在的问题

肌肉注射 GRF 基因质粒是一种新兴的动物生长调控手段,初步的研究表明该方法具有明显改善动物生产性能的作用。为了进一步挖掘动物的生长潜力,深入了解 GRF 基因的作用机制及影响因素,如何在不同动物生产中合理高效利用 GRF 基因质粒还有许多问题需要解决。

(1) 不同动物上使用基因质粒的剂量不一样,在犊牛中因为还没有进行试验所以还不知道确切的使用量。

- (2) 不同的注射剂量对犊牛相关激素的影响变化规律还不清楚。
- (3) 注射 GRF 基因质粒对犊牛血液生化指标影响还不清楚。
- (4) GRF 基因质粒对 SS 苗促进犊牛生长效果的影响还没人进行过研究。

1.5 本研究的目的和意义

犊牛肉是一种高蛋白、低脂肪、低胆固醇产品，与一般牛肉相比具有营养价值高、肉味鲜美、肉质细嫩等美食特点，是受市场欢迎的高档奢侈肉制品。犊牛肉的生产所用原料牛主要是奶牛产业中不作种用的公犊牛或淘汰的母牛。随着肉牛业的发展，一些肉用品种也逐渐用来生产犊牛肉，如皮埃蒙特、西门塔尔杂交牛等。目前通常将犊牛肉分为三种类型，分别是特殊饲喂犊牛（Special—fed veal）、bob 犊牛和谷物饲喂犊牛（Grain—fed veal）。bob 犊牛仅喂牛奶，大约 3 周龄、体重在 150 磅（68kg）以内便屠宰出售，肉质松软，呈微红色（优质犊牛白肉）。特殊饲喂犊牛全部饲喂代乳料，到 18~20 周龄体重为 400~450 磅（182~204kg）时屠宰出售，肉色为白色或粉红色，肉质柔软，有韧性，肉味鲜美，这种肉占全美小牛肉生产的 85%（犊牛白肉）。谷物饲喂犊牛先喂牛奶，再喂谷物、干草加添加剂。肉色较暗，并有大理石纹，常有脂肪可见。这种犊牛通常饲喂至 5~6 月龄、体重 450~600 磅（204~270kg）时出售（犊牛红肉）。（欧宇，2002）目前国内所需的大部分犊牛肉需要进口，我国犊牛肉生产发展缓慢，相应的生产配套技术不完善，犊牛日增重较低，饲料报酬不高，生产成本较高。

目前已经研究出几种 GRF 基因质粒的形式，并且在猪，羊，鼠，兔等动物上面作了试验都取得了一定的促生长效果。但是该类产品始终没有在牛上面进行应用试验，本试验主要是研究注射不同剂量 GRF 基因质粒对犊牛生长发育的影响，以及从血液激素和相关生化指标的变化规律来研究其促生长的机制，找出 GRF 基因质粒在犊牛上应用得最佳剂量。另外，本试验也初步的研究 GRF 基因质粒对 SS 苗促进犊牛生长效果的影响。通过本试验的研究希望能够研究出新的育肥技术来提高犊牛生产性能，为我国犊牛肉产业的发展提供技术支持。

第二章 GRF 基因质粒的鉴定和制备

2.1 材料和方法

2.1.1 试验材料

2.1.1.1 质粒, 引物

GRF 基因质粒由中国农业大学李宁实验室提供,

上游引物: up5' ctggggaggagggttctgtatgt 3'

下游引物: down 5' ctgatgcattcccgcctcctcccacct 3'

上下游引物由中国农业大学李宁实验室孟庆勇博士设计, 由赛百盛公司合成。

2.1.1.2 主要仪器

GDS-8000 凝胶成像系统 (美国)

10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l 移液器 (法国 Gilson) (Eppendorf)

Thermo Hybaid HBPX II 220 PCR 扩增仪(英国)、

SANYO MDF-192 超低温冰箱 (日本)

WD-9403C 紫外分析仪 (北京)

HZS-H 恒温水浴振荡器 (哈尔滨)

2002 型 ZW-A 微量振荡器 (江苏)

SYQ ZDX-35BI 自动座式压力蒸汽灭菌器 (上海)、

Thermo IEC Multirf 8467 冷冻高速离心机 (美国)

SPS2001F 电子天平 (上海)

SE2020 电子精密天平 (上海)

HQ-60 型漩涡混合器 (北京)

100090ECA-LVD 电泳仪(美国)、

NN-MX20WF 微波炉 (日本)

超净工作台, 北京净化设备厂

摇床 (北京)

2.1.1.3 感受态细胞、酶及化学试剂

感受态细胞 DH5 α 购自天为时代, EB (10mg/ml) 购自天为时代实验中所使用的各种限制性内切酶、RNaseA、RNA 酶抑制剂等分别购自 Promega 公司 Takara 公司、世纪华林公司等。

总 RNA 提取试剂盒 TRIZOL、cDNA 合成试剂盒来自 GIBCOL 公司。dNTP (dATP、dTTP、dCTP、dGTP): 天为时代。琼脂糖 (Agrose): 三泰兴隆公司。三氯甲烷 (Chloroform): 北京

鼎国生物技术发展中心。无水乙醇 (Ethanol): 北京化工厂。IPTG、X-gal、氨苄青霉素 (Amp): 天为时代。DNA MarkerIV: 赛百盛。其他常规化学试剂均为国产分析纯来自华绿渊生物制品公司。

2.1.1.4 培养基

LB 液体培养基: 蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, NaCl 10g, 水溶解后, 用 NaOH 调 pH 至 7.0, 加水定容到 1L, 15 lbf/in² 高压蒸汽灭菌 20 分钟。

LB 固体培养基: 在 LB 液体培养基中加入 15g/L 琼脂, 15 lbf/in² 灭菌 20 分钟。

2.1.1.5 溶液的配制

TE 溶液: 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH8.0, 高压灭菌。高压灭菌条件为 1.034×10⁵Pa, 20min。

50X TAE 缓冲液: Tris 碱 242g, 冰乙酸 57.1ml, 0.5MEDTA(pH8.0)100ml, 加水至 1L。

STE 缓冲液: 0.1M NaCl, 10mM Tris.Cl, 1mM EDTA pH8.0, 高压灭菌。

5×TBE 缓冲液: Tris 碱 54g, 硼酸 27.5g, 0.5M EDTA (pH8.0)20ml, 加水至 1L。

1M Tris-Cl: 121.14g Tris 碱溶于 800ml 双蒸水中, 用盐酸调 pH 值至 8.0, 定容至 1000ml, 高压灭菌。

0.5M EDTA: EDTA 186.1g 溶于 800ml 双蒸水中, 用 NaOH 调 pH 值至 8.0, 定容至 1000ml, 高压灭菌。

5M NaCl: 150ml 水中加入 58.44g NaCl, 加水定容至 200ml, 高压灭菌。

3M NaAc(pH7.0): NaAc·3H₂O 408.1g 溶于 800ml 双蒸水中, 用冰乙酸调 pH 至 7.0, 定容至 1000ml, 高压灭菌。

3M NaAc(pH5.2): NaAc·3H₂O 408.1g 溶于 800ml 双蒸水中, 用冰乙酸调 pH 至 5.2, 定容至 1000ml, 高压灭菌。

PBS 磷酸缓冲盐溶液: 在 800ml 双蒸水中溶解 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄ 和 0.24g KH₂PO₄, 调 pH 值至 7.4, 加水定容至 1L, 高压灭菌。

10% SDS: SDS 100g 溶于 900ml 双蒸水中, 加热至 68℃助溶, 用 HCl 调 pH 值至 7.2, 定容至 1000ml。

质粒 DNA 提取溶液 I: 50mM 葡萄糖, 2.5mM Tris-Cl(pH8.0), 10mM EDTA (pH8.0), 高压灭菌 10 磅 15min, 贮存于 4℃。

质粒 DNA 提取溶液 II: 0.2M NaOH, 1% SDS, 现配现用。

质粒 DNA 提取溶液 III: 5M 乙酸钾溶液 60ml, 冰乙酸 11.5ml, 灭菌水 28.5ml。

IPTG 溶液: IPTG1g 溶于 5ml 双蒸水中, 过滤除菌, 分装成 1ml 小份储存于-20℃。

氨苄青霉素: 50mg/ml (溶于水), -20℃保存

酚仿混合液: 等体积的苯酚和氯仿混合, 保存于 4℃棕色瓶中

1M CaCl₂: CaCl₂·6H₂O 27g 加水至 100ml, 过滤灭菌, 贮存于-20℃。

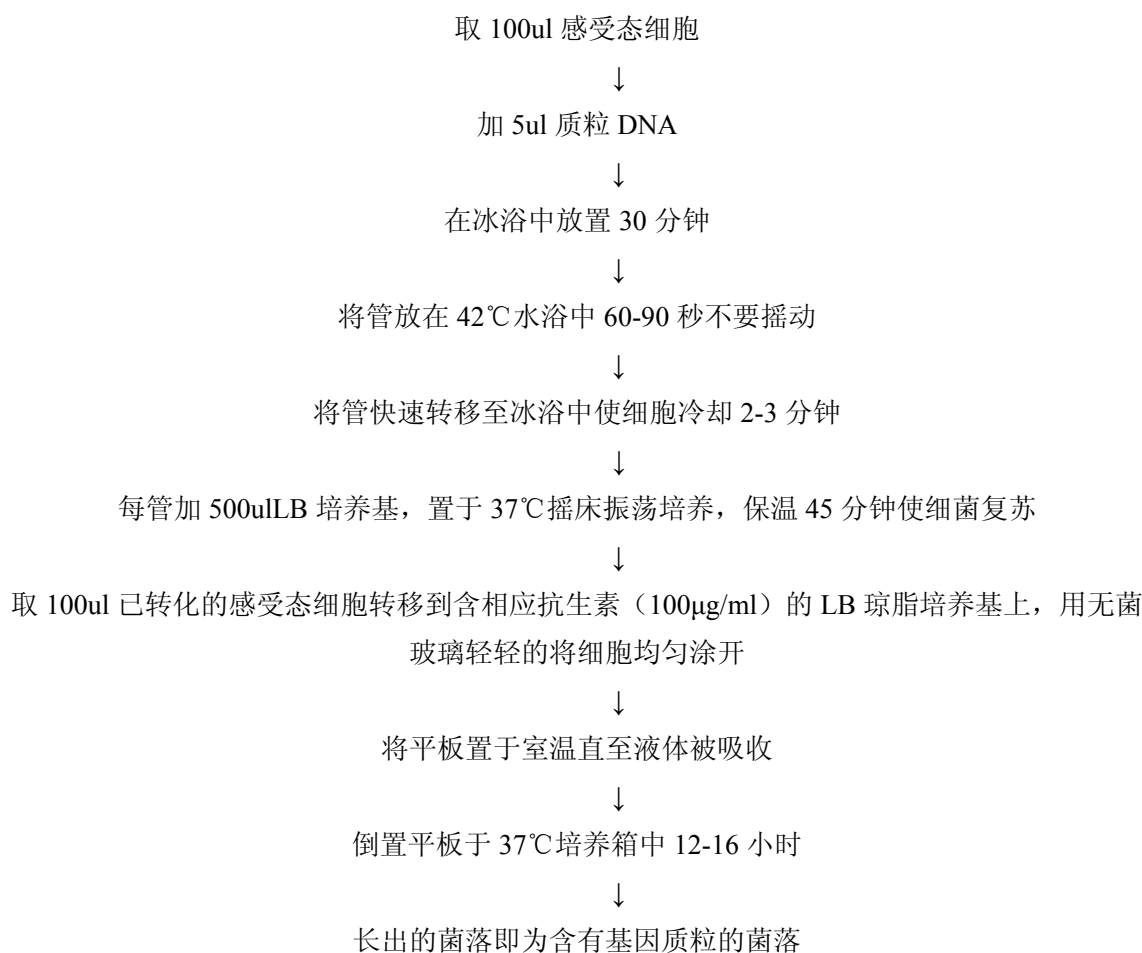
RNaseA 溶液: 100mg/ml 溶于 10mM Tris-Cl(pH7.5), 15mM NaCl 中 100℃煮沸 10min, 室温冷却后, 贮存于-20℃。

3.6%NaOH: 100ml 水中加 3.6gNaOH。

ACD 抗凝剂: 在 80ml 双蒸水中溶解 0.48g 柠檬酸, 1.32g 柠檬酸钠, 1.47g 葡萄糖, 加水至 100ml, 高压灭菌。

2.1.2 试验方法

2.1.2.1 质粒 DNA 的转化



2.1.2.2 质粒 DNA 的小规模制备—碱裂解法

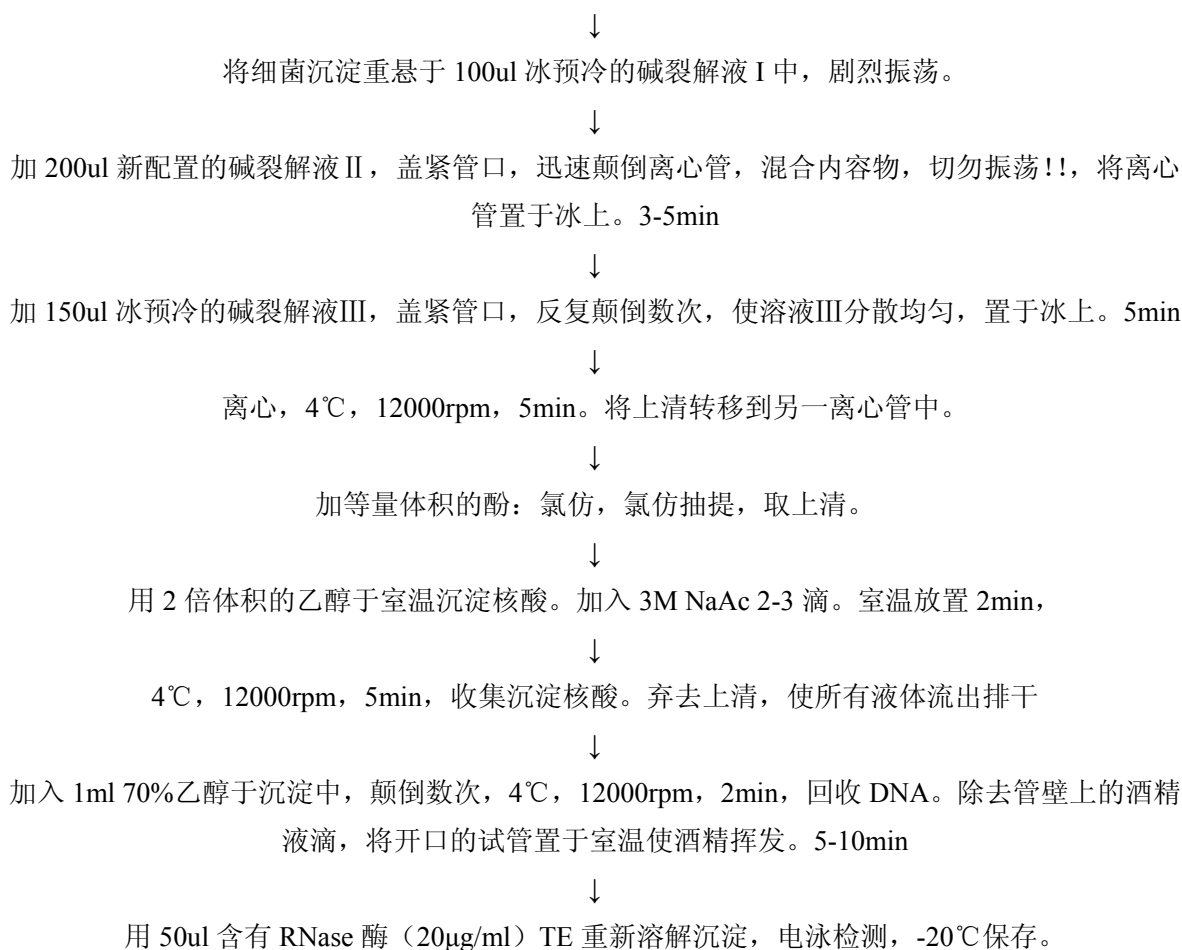
将转化后的单菌落, 接种到 10ml 含有氨苄 (70μg/ml) 的 LB 培养基上, 37℃, 220rpm, 振摇下培养过夜

↓

将 1.5ml 培养的菌液倒入微量离心管, 4℃, 12000rpm, 1min, 离心。将剩余的菌液置于 4℃ 冰箱保存

↓

离心结束, 尽可能吸干菌液。用冰预冷的 STE (菌液体积的 0.25 倍) 重悬沉淀, 离心。4℃, 12000rpm, 5min



2.1.2.3 质粒的鉴定

表 2-1PCR 方法鉴定质粒反应体系

Table2-1 Reaction system about identification method of PCR

质粒 DNA	2ul
5'端引物 (0.1μg/ul)	1ul
3'端引物 (0.1μg/ul)	1ul
5mMdNTP	1ul
10×扩增缓冲液	5ul
TaqDNA 聚合酶	1ul
PCR 染料	5ul
H ₂ O	34ul
总计	50ul

引物：up 5' ctggggaggagggttcgtatgt 3'
down 5' ctgatgcattcccgcctcctccacct 3'

循环条件：94℃变性 40 秒，66℃退火 60 秒，72℃延伸 80 秒,扩增 30 个循环。

PCR 反应后进行 0.8%的琼脂糖凝胶电泳，如果质粒正确会出现 1kb 的特异性条带。

2.1.2.4 质粒 DNA 的大量制备

将转化后的单菌落（或用 0.1-1.0ml单菌落的培养物），接种到 30ml含有氨苄（70μg/ml）的LB培养基上，37℃，220rpm，振摇下培养直至对数生长晚期（OD₆₀₀约为 0.6）

↓

在含有 500mlLB（预热到 37℃）及适当抗生素的三角瓶中接种 25ml对数生长晚期的菌液。37℃，300rpm，剧烈振摇，2.5h后测定OD₆₀₀值，达到 0.4。

↓

取部分菌液（1-2ml）到离心管中，4℃贮存。其余培养物，4℃，4000rpm，15min，离心。弃上清，倒置离心管使残余的上清流出。

↓

离心结束，尽可能吸干菌液。用冰预冷的 STE（菌液体积的 0.25 倍）100ml 重悬沉淀，离心。4℃，4000rpm，15min，离心。收集细菌，可贮存于-20℃。

↓

将贮存的 1-2ml 菌液提取质粒，采取酶切和琼脂糖电泳分析此小量，质粒，以确定大量培养液中正确的质粒已得以扩增。

↓

将冻存细菌沉淀室温下放置 5-10min 使其解冻，重悬于 10ml 冰预冷的碱裂解液 I 中，剧烈振荡。

↓

加入 1ml 新配置的 10mg/ml 溶菌酶

↓

加 20ml 新配置的碱裂解液 II，盖紧管口，轻轻颠倒离心管，混合内容物，切勿振荡!!，室温放置 5-10 min

↓

加 15ml 冰预冷的碱裂解液 III，盖紧管口，反复颠倒数次，使溶液 III 分散均匀，置于冰上（此时不再有分离的两个液相）。10min

↓

离心，4℃，12000rpm，30min。将上清转移到另一离心管中。（若细菌碎片不能形成紧密的沉淀，再次离心 15min）。转移的时候使用四层纱布过滤上清可除去粘稠的基因组 DNA 和蛋白质沉淀残余。

↓

量取上清体积，将其连同 0.6 倍体积的异丙醇一起移入一只洁净离心管中并将其充分混匀，室温放置 10min

↓

室温，8000rpm，15min 回收核酸沉淀

↓
小心弃去上清，室温用 70%乙醇刷洗管底与管壁，倒掉乙醇，并除去管壁的液滴。10-15min
↓
用 3mlTE 溶解核酸沉淀

2.1.2.5 质粒的纯化

Sepharose CL-4B 柱纯化质粒，依据分子克隆第二版 p 444 制备 Sepharose CL-4B(Pharmacia Biotech, Sweden)柱，以至少 2 倍柱体积的缓冲液 (pH8.0 TE、0.1% SDS) 以 30 cm/h 流速平衡该柱,并在表面铺 1ml 的水。

↓
以常规大提碱裂解法提取粗质粒 DNA
↓
质粒浓度低于 5mg/ml 浓度经过 0.45um 的滤膜过滤
↓
过滤产物，以一次上样体积不超过柱体积的 5%的标准上样
↓
用上述缓冲液以低于 30 cm/h 的流速流过柱体，柱流出液在 260nm 波长的监控下每 0.5ml/份收集 洗脱产物
↓
合并监控得到的 DNA 峰对应的收集管溶液，以 10ul 上琼脂糖胶检测纯化效果；用 2 倍柱体积的 0.5 M NaOH 清洗柱子保存。
↓
2 倍体积的无水乙醇沉淀，离心 12000rpm×30min。
↓
所得质粒沉淀再经 70%乙醇洗涤 1-2 遍，离心 12000×10min，干燥备用。
↓
测定 OD，电泳检查

2.2 结果和讨论

2.2.1 质粒的鉴定

我们知道，从外部获得的质粒，第一步就是进行质粒的鉴定，以保证所获得质粒的正确性。质粒的鉴定包括：质粒的转化，质粒的制备，酶切或 PCR 检测三步。

2.2.1.1 质粒的转化

按照质粒转化操作步骤将质粒转到感受态细胞中铺平板，37℃培养过夜。我们发现平板上有

一些白色菌落如图 2-1 所示。由于该质粒DNA选择了Promega的pGEM-T 载体,其上带有细菌复制子, 能在大肠杆菌-内高效稳定的复制, 同时含有lacZ筛选和Amp^r选择标记, LB培养基中含有70μg/ml氨苄, 没有转入带有Amp^r选择标记的质粒不能在上面生长。所以出现的白色菌落初步判断是含有我们所需要的目的质粒。

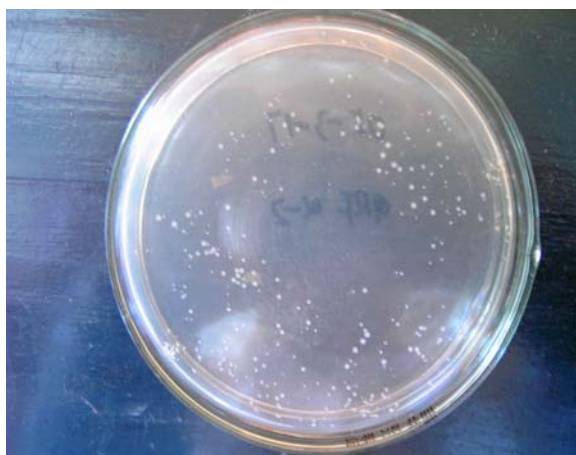


图 2-1 基因质粒转化后长出的菌落

Figure 2-1 The bacterial colony after gene plasmid transform

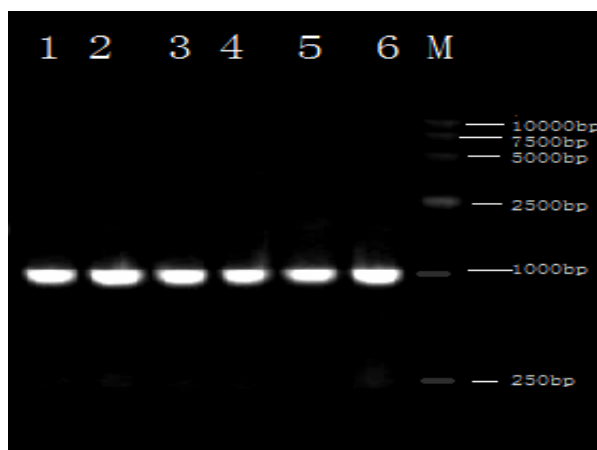


图 2-2: GRF 基因质粒的 PCR 鉴定

六个不同菌落提取的质粒 PCR 结果, 扩增条带为 1kb

Figure2-2 PCR identification for GRF gene plasmid

The band marked 1kb was the GRF gene plasmid from six bacterial colony

2.2.1.2 质粒特定序列的 PCR 扩增

将制备得到的质粒进行 PCR 反应, 我们做了六个不同菌落经细菌培养获得的质粒样品, PCR 结束后进行 0.8%的琼脂糖电泳, 如图 2-2 所示我们发现电泳图 1-6 道中都出现了 1kb 的扩增带,

质粒在设计的时候包含了一段 1kb 的特异条带，加入特定的上下游引物可以扩增出该条带，我们可以断定该质粒即我们所需的 GRF 基因质粒。

2.2.2 质粒的大量制备和纯化

由于我们下一步进行的动物试验所需要的质粒是以毫克为单位来计算的，对于质粒来说，这已经是非常高的量了，所以我们就需要进行质粒的大量制备。制备和纯化后的质粒，通过一定配比形成注射液。质粒的纯度是以每针注射剂为单位进行衡量的：在每只针剂中，细菌基因组 DNA 的含量要少于 0.01 μ g；细菌蛋白含量低于 0.01 μ g；RNA 的含量以通过 0.8% 的琼脂糖胶电泳检测不到为准；更为重要的是每 μ g 质粒 DNA 中，内毒素的含量要低于 0.1 个单位(Horn 等, 1995)。如下图 2-3 经过纯化后的质粒达到了转染所要求的纯度。

2.2.3 质粒定量

广泛用于测定制备物中质粒的含量的方法有两类。若样品较纯(即蛋白质、酚、琼脂糖及其他核酸等杂质含量较低时)，可通过分光光度法测定碱基吸收紫外线的量，既简便又准确。若样品中 DNA 或 RNA 含量较低或含有较多杂质，则可通过溴化乙锭或 Hoechst 33258 发出的荧光估测质粒含量。由于本试验中质粒比较纯，所以采用第一种方法，利用分光光度计测定 260nm 处吸光度来计算质粒浓度，具体计算为：1 个 OD_{260nm} 单位等于 50 μ g/ml 质粒 DNA。

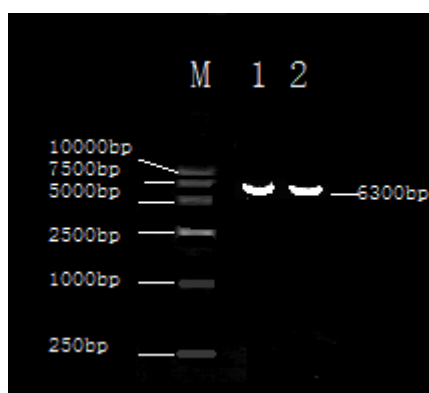


图 2-3: 纯化后质粒的 0.8% 琼脂糖电泳图

Figure2-3 0.8% agarose gel image for the purified GRF gene plasmid

2.3 结论

- (1) 鉴定的质粒就是我们所需要的 GRF 基因质粒
- (2) 大量制备后的质粒的纯度达到了肌肉注射的要求。

第三章单独注射 GRF 基因质粒对犊牛生长发育影响

动物自身通过生长轴中的各激素进行自身生长发育的调控，改变其中的任何一种激素的水平，都会引发一系列相关激素的变化，进而引起血液中相关生化指标的变化。表观上观测就是动物的生长加快或降低等。

本部分试验是通过外源导入 GRF 基因质粒，来观察其对犊牛生长发育的影响，并通过进一步测定相关激素水平和血液中生化指标，来研究其对犊牛生长发育影响的规律和机理。

3.1 材料和方法

3.1.1 试验设计

采用单因子实验设计，试验分为 4 个处理，每个处理 6 头牛，各处理组随机注射 5ml 含 0mg、3mg、6mg、9mg 质粒，布比卡因浓度为 0.25% 的生理盐水溶液，注射部位为在犊牛半肌腱处。

3.1.2 试验动物及分组

选取 24 头平均体重为 100.63kg 的西门塔尔牛杂交牛，把体重相近的犊牛随机平分到四个试验组中。犊牛由科尔沁牛业股份有限公司提供。

3.1.3 饲养管理

本试验于 2005 年 10 月至 2006 年 1 月在内蒙古通辽市北甘旗牧场进行，试验前已完成犊牛的疫苗注射和驱虫，并将犊牛进行拴养。由专人进行犊牛饲养，早晚 7:00 各喂一遍精料，粗饲料为青干草和氨化秸秆，牛舍定期清理打扫。

3.1.4 试验日粮组成及营养水平

表 3-1 试验精料组成和营养水平

Table 3-1 Composition and nutrient level of tested diet

原料	日粮%	原料	日粮%
玉米	42.00	石粉	1.00
大麦	19.00	食盐	1.00
豆粕	33.00	小苏打	1.50
磷酸氢钙	1.50	预混料	1.00
		营养水平	
净能 (MJ/kg)	8.2	钙 %	0.92
粗蛋白 %	21	磷 %	0.65

注：预混料包含了犊牛所需的各种微量元素和维生素

Note: Premix contains various vitamins and mineral elements needed for calves growth

3.1.5 试验器材

测杖、皮卷尺、注射器、磅秤、超低温离心机、离心管、FH-408 自动定标器，电子秤

3.1.6 指标测定方法

3.1.6.1 日增重和饲料采食量的测定

试验开始后 0 天, 30 天和 60 天各称量一次体重和每个处理组的总采食量, 体重在早上空腹时进行称量, 根据增重和采食量计算每组平均日增重和料重比。

3.1.6.2 体尺的测定

髻甲高: 又称体高, 自髻甲最高点到地面的垂直距离。 (测杖)

体斜长: 通常指体长, 肩端前缘至尻尖的软尺距离。 (卷尺)

胸围: 肩胛后缘胸部的圆周长度。 (卷尺) (蒋洪茂, 1995)

3.1.6.3 器官重量的称量

屠宰后立即称量心、肝、脾、肺、肾重量

3.1.6.4 血液指标的测定

血样的前处理: 早晨犊牛空腹颈静脉取血, 将离心管中收集的的血样在 2000g 低温离心制备血浆, 制得血浆分三份, 其中两份保存于与-70℃冰箱用于生长激素和生长抑素浓度的测定。另外一份进行血液中葡萄糖, 甘油三酯和尿素氮等生化指标浓度的测定。取血分别在注射 GRF 基因质粒后的 0 天, 15 天, 30 天, 45 天, 60 天。其中 15 天, 45 天进行的采血仅用于激素的测定。GH 和 SS 测定采用放射免疫分析方法测定, 具体操作依照试剂盒说明进行。试剂盒购自大连泛邦化工技术开发有限公司。

GH 测定

(1)试剂准备

A.冻干 GH 标准样品七瓶:0, 0.5, 1.5, 3, 8, 20, 和 50ng/ml, 零管加蒸馏水 2 毫升, 其余各标准管加蒸馏水 1 毫升。

B.冻干¹²⁵I-GH两瓶, 每瓶加蒸馏水 5.5 毫升。

C.冻干 GH 第一抗体一瓶, 加蒸馏水 10.5 毫升。

D.冻干 GH 分析试剂一瓶, 加蒸馏水 10.5 毫升。

E.冻干 GH 第二抗体两瓶, 每瓶加蒸馏水 5.5 毫升。

(2)操作方法

- A. 分别在新的干净试管中加入 0.1 ml 的标准样品或 0.1ml 的待测血样, 再加入 0.1ml 的第一抗体。混匀后放置在 37°C 水浴 1 小时。
- B. 加入 0.1ml 的¹²⁵I-GH, 混匀后放置 37°C 水浴 2 小时。
- C. 依次加入分析试剂和第二抗体各 0.1ml, 混匀后放置 37°C 水浴 30-60 分钟。
- D. 出现絮状沉淀后离心, 3500r/min 离心 15 分钟。倒掉上清液, 并用吸水纸吸净上清液。
- E. 用国营二六一厂生产的 FH-408 自动定标器测定各管的沉淀的 CPM 值。

(3) 绘制标准曲线及样品含量的测定

$$B/B_0 = \text{每管沉淀的CMP} / \text{零管沉淀的CMP} \times 100\%$$

以各标准管结合率 BB_0 为纵坐标, 相应的 GH 含量为横坐标, 用半对数坐标绘制标准曲线, 根据各样品管的结合率, 从坐标曲线中查出待测样品 GH 含量。

SS 的测定步骤

(1) 试剂准备

- A. ¹²⁵I 标记物 150 万 CPM, 加入 12ml 缓冲溶液配制成每 100u1 含 12500CMP 的溶液。
- B. SS 抗体一瓶, 每瓶加缓冲溶液 10.sml 复溶。
- C. SS 标准样品 25.6ng 加入 2ml 缓冲溶液充分混匀, 即为每 100ul 含 1280pg 的标准样品, 然后吸取 500ul 标准样品再用 500ul 缓冲溶液稀释即为 640pg 浓度, 依次倍比稀释至到每 100u1 含 2.5pg。

(2) 操作方法

- A. 分别在新的干净试管中加入 100ul 的标准样品或 100ul 的待测样品。
- B. 再加入 100u1 的 SS 抗血清和 200ul 的缓冲溶液, 混匀后放置于 4°C 孵化 24 小时。
- C. 每管加入 100ul 的¹²⁵I-SS, 混匀后放置 4°C 孵化 24 小时。
- D. 每管加分离剂 500u1, 混匀后室温放置 45 分钟, 4000r/min 离心 15 分钟倒掉上清液, 并用吸水纸吸净上清液。
- E. 用国营二六一厂生产的 FH-408 自动定标器测定各管的沉淀的 CPM 值。

(3) 制作标准曲线及样品含量的测定

$$B/B_0 = \text{每管沉淀的CMP} / \text{零管沉淀的CMP} \times 100\%$$

以各标准管结合率 BB_0 为纵坐标, 相应的 SS 含量为横坐标, 用半对数坐标绘制标准曲线, 根据各样品管的结合率, 从坐标曲线中查出待测样品 SS 含量。

其他血液生化指标的测定

取制备好的血清, 使用 OLYMPUS AU640 自动分析仪进行甘油三酯, 葡萄糖和尿素氮分析。

3.1.7 数据处理

采用 SPSS11.0 软件对数据进行方差分析, 并用 Duncan 法进行多重比较, 试验结果用平均值 \pm 标准差。

3.2 结果和分析

3.2.1 导入 GRF 基因质粒对犊牛生长发育的影响

本试验在研究 GRF 基因质粒对犊牛生长发育的影响时主要考察了日增重、料重比、体尺和器官变化等指标。日增重和料重比可以从生长性能方面了解 GRF 基因质粒对犊牛的影响；体尺和器官的变化可以从发育方面了解 GRF 基因质粒对犊牛的影响。

3.2.1.1 导入 GRF 基因质粒对日增重和料重比的影响

表 3-2 不同注射剂量的 GRF 基因质粒对犊牛日增重和料重比的影响

Table3-2 Effect of different dose of GRF gene plasmid injection on ADG and F/G

	0mg	3mg	6mg	9mg
始体重(kg)	101±11.31 ^a	100.33±11.08 ^a	101±10.66 ^a	100.17±10.63 ^a
终体重(kg)	126.33±11.60	128.83±12.31	134.83±10.02	131.67±11.12
第一个月				
每组采食量(kg)	516.1	522.34	526.89	522.88
料重比	7.94	6.37	5.79	6.88
平均日增重(kg)	0.36±0.06 ^a	0.46±0.09 ^{ab}	0.51±0.08 ^b	0.42±0.05 ^{ab}
第二个月				
每组采食量(kg)	635.97	634.57	628.32	633.66
料重比	7.31	7.13	5.61	5.37
平均日增重(kg)	0.48±0.09 ^a	0.49±0.08 ^a	0.62±0.09 ^b	0.63±0.08 ^b
全期				
全期每组采食量(kg)	1152.07	1156.91	1155.21	1156.54
料重比	7.58	6.77	5.69	5.96
平均日增重(kg)	0.42±0.07 ^a	0.48±0.06 ^{ab}	0.56±0.09 ^c	0.53±0.07 ^{bc}

注：同一行中的标有不同小写字母者为差异显著（P<0.05）

Note: values with different lower case superscripts within the same column indicates difference significantly(P<0.05)

由表 3-2 可以看出：整个饲养试验期中各处理组的日增重都不同程度的高于对照组，而料重比都比对照组低。其中 6mg 组效果最好日增重为 0.56kg 显著高于对照组 33.33%（P<0.05），料重比为 5.69 比对照组低 24.93%；9mg 组的日增重同对照组相比也达到了显著的水平（P<0.05），比对照组高 26.19%，料重比同对照组比降低了 21.37%；3mg 组同对照组相比没有显著变化日增重仅比对照组高出 14.29%，料重比降低 10.69%。

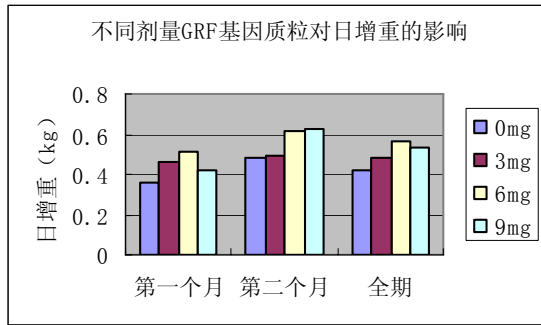


图 3-1 不同剂量 GRF 基因质粒对日增重的影响

Figure3-1 Effect of different dose of GRF gene plasmid on ADG

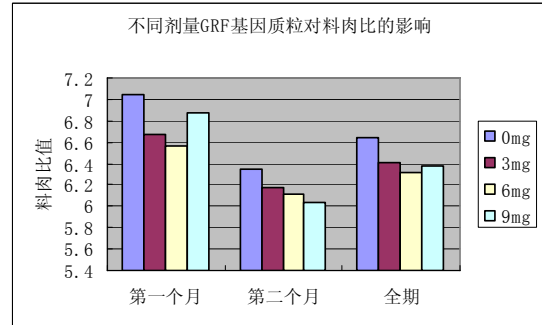


图 3-2 不同剂量 GRF 基因质粒对料重比的影响

Figure3-2 Effect of different dose of GRF gene plasmid on F/G

另外，从图 3-1 和图 3-2 中也可以看出，不饲养阶段各处理组的日增重和料重比的结果也不尽相同。从第一个月可以看出，6mg 处理组效果最好，3mg 处理组其次，9mg 处理组再次，但效果都要好于对照组，其中 6mg 组达到了显著水平 ($P<0.05$)；而第二个月 3mg 组与对照组相比已没有太大的差异，此时 9mg 组的日增重和料重比的效果都得到了较大的提升，甚至已经超过了全期增重效果最好的 6mg 组，日增重达到 0.63 比对照组高出 31.25% 达到显著水平 ($P<0.05$) 料重比降低 26.54%。

3.2.1.2 导入 GRF 基因质粒对体尺变化的影响

表 3-3 注射不同剂量 GRF 基因质粒对体尺变化的影响

Table 3-3 Effect of different dose of GRF gene plasmid injection on body measurements

	0mg	3mg	6mg	9mg
体斜长(cm)	100.5±2.51 ^a	101.83±5.36 ^a	106.33±5.43 ^a	104.00±5.02 ^a
胸围(cm)	121±6.32 ^a	123.83±6.54 ^a	126.33±4.89 ^a	124.67±3.97 ^a
髻甲高(cm)	90.33±3.87 ^a	91.50±3.28 ^a	92.33±1.63 ^a	91.83±3.71 ^a

注：同一行中的标有不同小写字母者为差异显著 ($P<0.05$)

Note: values with different lower case superscripts within the same column indicates difference significantly ($P<0.05$)

从表 3-3 可以看出，从统计的角度来看，注射 GRF 基因质粒对犊牛的体斜长，胸围，髻甲高没有显著性影响。但是通过图 3-3 我们可以看出随着质粒的注射量的增加，各体尺指标均有不同程度升高的趋势，其中体斜长和胸围增加的趋势明显，髻甲高的增势比较缓慢。当过了 6mg 的注

射剂量后，曲线又有下降的趋势，说明剂量过高就不能很好的促进体斜长和胸围的增加。

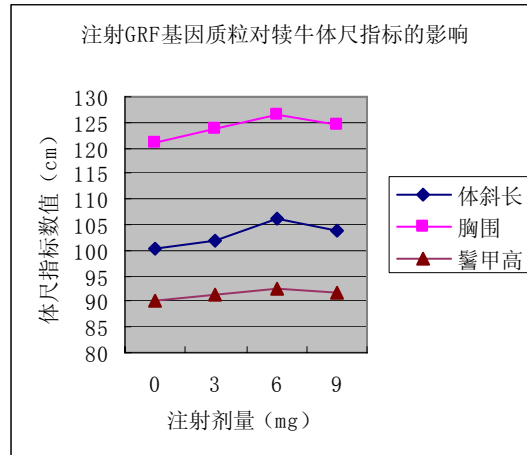


图 3-3 注射 GRF 基因质粒对犊牛体尺影响

Figure 3-3 Effect of different dose of GRF gene plasmid injection on body measurements

3.2.1.3 导入 GRF 基因质粒对内脏器官的影响

有研究表明，直接注射生长激素或生长激素释放因子的蛋白形式，会导致器官的异常增大（chung 等，1985；machlin 等，1972；dubreuil 等，1990）。为了观察各处理组的器官占体重的比例同对照组相比是否有差异，我们计算求得各器官占宰前活重的百分比如下表所示，通过统计分析我们得到各处理组的器官比例同对照组相比没有显著差异，因此我们可以得到结论注射 GRF 基因质粒没有导致器官的异常增大或减小。

表 3-4 注射 GRF 基因质粒对犊牛器官所占体重比例的影响

Table 3-4 Effect of different dose of GRF gene plasmid injection on proportion of calves' organ

	0mg	3mg	6mg	9mg
心	0.46±0.04	0.44±0.02	0.45±0.06	0.41±0.03
肝	1.3±0.18	1.24±0.06	1.28±0.13	1.23±0.06
肾	0.38±0.04	0.39±0.03	0.35±0.04	0.36±0.01
肺	0.72±0.12	0.69±0.05	0.71±0.07	0.67±0.06
脾	0.18±0.10	0.18±0.02	0.20±0.04	0.17±0.02

3.2.2 导入 GRF 基因质粒对犊牛血液生化指标和激素水平的影响

血液的生化指标和激素水平可以微观的表现动物机体的变化，通过这些指标的测定，我们可以掌握注射 GRF 基因质粒对犊牛血液各指标的影响和变化规律，进而研究其促生长的机制。

3.2.2.1 导入 GRF 基因质粒对血液生化指标的影响

表 3-5GRF 基因质粒注射后血液生化指标变化

Table3-5 Change of bio-chemical index in blood after GRF gene plasmid injection

	0mg	3mg	6mg	9mg
0 天				
尿素氮(mmol/L)	8.03±0.13 ^a	7.97±0.11 ^a	7.91±0.10 ^a	7.83±0.10 ^a
血糖(mmol/L)	3.43±0.24 ^a	3.47±0.20 ^a	3.44±0.29 ^a	3.45±0.28 ^a
甘油三酯(mmol/L)	0.22±0.06 ^a	0.23±0.10 ^a	0.23±0.04 ^a	0.20±0.15 ^a
30 天				
尿素氮(mmol/L)	7.87±0.19 ^a	7.63±0.21 ^{ab}	7.45±0.17 ^b	7.54±0.20 ^{ab}
血糖(mmol/L)	3.77±0.13 ^{Aa}	4.07±0.10 ^{ABb}	4.51±0.09 ^{Cc}	4.29±0.07 ^{BCbc}
甘油三酯(mmol/L)	0.23±0.05 ^a	0.21±0.03 ^{ab}	0.16±0.03 ^b	0.19±0.02 ^{ab}
60 天				
尿素氮(mmol/L)	7.68±0.25 ^a	7.57±0.24 ^a	7.41±0.26 ^a	7.12±0.27 ^b
血糖(mmol/L)	3.88±0.16 ^a	3.91±0.13 ^a	4.09±0.12 ^{ab}	4.31±0.13 ^b
甘油三酯(mmol/L)	0.21±0.04 ^a	0.21±0.04 ^a	0.19±0.03 ^a	0.16±0.03 ^b

注：同一行中的标有不同小写字母者为差异显著（P<0.05）大写字母为差异极显著（P<0.01）

Note: values with different lower case superscripts within the same column indicates difference significantly(P<0.05) and capital case indicates difference very significant (P<0.01)

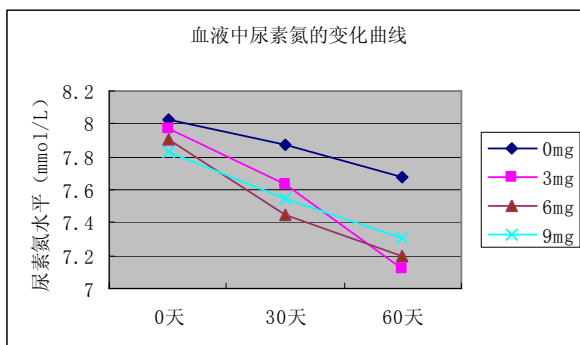


图 3-4 注射基因质粒对血液中尿素氮的影响

Figure 3-4 Effect of different dose of GRF gene plasmid injection on urea in blood

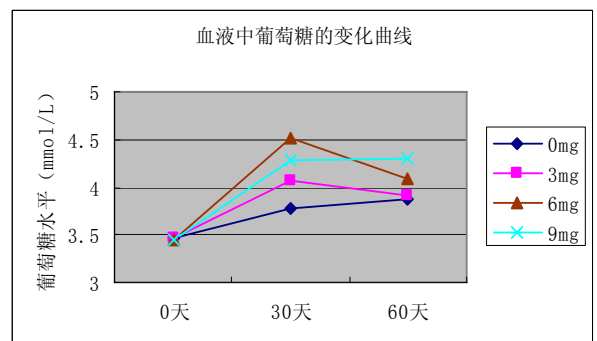


图 3-5 注射基因质粒对血液中葡萄糖的影响

Figure 3-4 Effect of different dose of GRF gene plasmid injection on glucose in blood

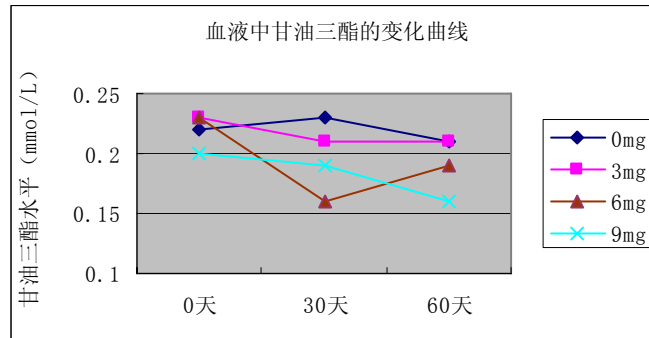


图 3-6 注射 GRF 基因质粒对血液中甘油三酯变化的影响

Figure 3-6 effect of different dose of GRF gene plasmid injection on TG in blood

由表中我们可以看到，在基因质粒注射前各生化指标没有显著差异 ($P>0.05$)，但是在注射后 30 天再进行测定时发现各处理组同对照相比都不同程度的差异，有些处理组的差异达到了显著水平。

(1) 尿素氮的水平各处理组同对照组相比呈下降趋势，我们从表中 30 天时尿素氮同对照相比可以看到这一点，6mg 组下降最多，同对照组相比达到了显著水平 ($P<0.05$)，虽然 3mg 和 9mg 组与对照组相比没有达到显著水平 ($P>0.05$)，但是从图 3-4 中我们可以看到他有一个下降的趋势。60 天的测定结果我们现，3mg 组同对照组相比已没有差异，6mg 组的水平仍比对照组水平低，但已经没有显著差异，此时 9mg 的尿素氮水平比 6mg 组要低，同对照组相比达到了显著水平 ($P<0.05$)。

(2) 从图 3-5 中我们可以直观地看到血中葡萄糖的变化曲线同尿素氮的变化正好相反，呈上升趋势。30 天时，各处理组均高于对照组的水平，其中 6mg 和 9mg 组同对照组相比均达到了极显著水平 ($P<0.01$)，分别比对照组高出 19.63% 和 13.79%，60 天时 9mg 组的血中葡萄糖含量已高出 6mg 组，与对照组相比达到显著水平 ($P<0.05$) 而此时 3mg 组同对照组相比已没有明显差异。

(3) 甘油三酯的变化曲线与尿素氮的变化趋势基本相同，从图 3-6 中可以看出整体呈下降趋势，同对照组相比，30 天时 6mg 组下降幅度最大 ($P<0.05$)，而 60 天时 9mg 组的下降幅度最大 ($P<0.05$)。试验结束时 3mg 和 6mg 组同对照组相比已经没有明显差异。

3.2.2.2 导入 GRF 基因质粒对激素水平的影响

GRF 基因质粒进入到体内进行表达生成 GRF 蛋白，GRF 可以促进 GH 的释放，同时如果 GH

的量过多就会引起机体的负反馈引起 SS 分泌增多。从而抑制 GH 的分泌，生长激素释放因子和生长抑素共同调节生长激素的动态平衡。通过测定生长激素和生长抑素水平我们就可以得出 GRF 基因质粒是否表达，以及表达的量如何。

表 3-6 不同注射剂量对生长激素水平的影响 单位: ng/ml

Table 3-6 Effect of different dose GRF gene plasmid injection on GH level unit: ng/ml

	0mg	3mg	6mg	9mg
0d	1.07±0.05 ^a	1.09±0.03 ^a	1.08±0.04 ^a	1.05±0.05 ^a
15d	1.08±0.04 ^{Aa}	1.23±0.04 ^{Bb}	1.47±0.04 ^{Cd}	1.34±0.05 ^{Bc}
30d	1.12±0.04 ^{Aa}	1.17±0.09 ^{ABa}	1.32±0.02 ^{Bb}	1.28±0.04 ^{Bb}
45d	1.09±0.03 ^a	1.12±0.09 ^a	1.20±0.05 ^b	1.24±0.06 ^b
60d	1.07±0.03 ^{Aa}	1.09±0.02 ^{Aa}	1.11±0.04 ^{ABa}	1.20±0.06 ^{Bc}

注：同一行中的标有不同小写字母者为差异显著（P<0.05）大写字母为差异极显著（P<0.01）

Note: values with different lower case superscripts within the same column indicates difference significantly (P<0.05) and capital case indicates difference very significant (P<0.01)

通过表 3-6 可以看出：15 天左右时各处理组生长激素水平同对照组相比都有不同程度的升高，其中 6mg 处理组提高的幅度最大，是对照组的 1.37 倍达到了极显著水平（P<0.01）9mg 处理组次于 6mg 处理组，是对照组的 1.24 倍（P<0.01），3mg 处理组是对照组的 1.14 倍（P<0.01）。由图 3-7 可以看出 15 天是生长激素分泌的一个高峰，30 天时我们看到生长激素的水平已经有所降低，其中 6mg 组的降低幅度最大，但此时该组的生长激素水平仍为最高，比对照组高出 17.86%

（P<0.01）9mg 处理组的生长激素水平下降比较缓慢，生长激素水平比对照组高 14.29%（P<0.01），而此时 3mg 处理组虽然比对照组高 4.46%，但是统计结果表明此时已没有显著差异（P>0.05）。到第 45 天时，最显著的变化是 9mg 处理组的激素水平已经超过 6mg 组，同对照组达到显著水平（P<0.05），此时 6mg 和 3mg 处理组与对照组都没有显著差异（P>0.05），60 天时即屠宰前进行生长激素测定发现 3mg 和 6mg 和对照组没有显著差异，而 9mg 处理组与对照组和 3mg 组达到极显著差异，与 6mg 组达到显著差异（P<0.05）。

表 3-7 不同注射剂量对生长抑素水平的影响 单位: pg/ml

Table 3-7 Effect of different dose of GRF gene plasmid injection on SS level unit: pg/ml

	0mg	3mg	6mg	9mg
0d	82.37±1.95a	80.52±0.79a	81.51±1.35a	80.28±1.48a
15d	80.58±0.86 ^{Aa}	83.84±1.59 ^{Aab}	85.61±2.24 ^{Ab}	95.97±2.73 ^{Bc}
30d	79.42±0.99 ^{Aa}	81.88±1.13 ^{Aab}	83.18±2.20 ^{Ab}	90.83±2.69 ^{Bc}
45d	79.93±1.61 ^{Aa}	82.64±1.47 ^{ABab}	84.78±2.36 ^{ABb}	86.31±1.96 ^{Bb}

60d	81.23±0.96 ^a	81.09±2.19 ^a	81.41±2.60 ^a	83.85±2.98 ^a
-----	-------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------

注：同一行中的标有不同小写字母者为差异显著 (P<0.05) 大写字母为差异极显著 (P<0.01)

Note: values with different lower case superscripts within the same column indicates difference significantly (P<0.05) and capital case indicates difference very significant (P<0.01)

由表 3-7 可以看出，随着 GRF 基因质粒的注射剂量的增加生长抑素的水平呈直线上升，随着时间的推移同一注射剂量的处理组有下降达到对照组水平的趋势，最终在对照组水平基础上下浮动。15 天时可以看到 9mg 处理组的生长抑素水平同对照组相比达到了极显著的水平 (P<0.01) 6mg 处理组与对照组达到了显著水平 (P<0.05)；在整个试验过程中，3mg 处理组同对照组没有差异 (P>0.05) 6mg 组在 60 天时与对照已没有显著差异 (P>0.05)。由图 3-8 可以看到不同处理组生长抑素的变化趋势。

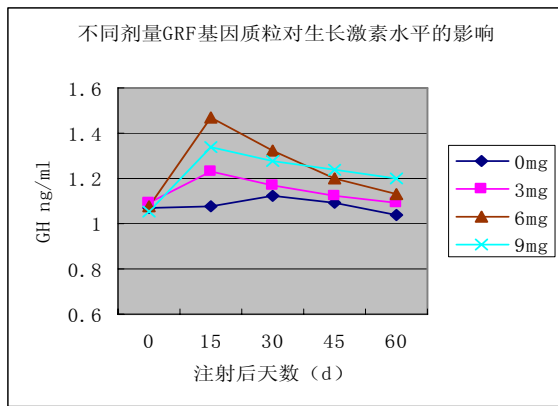


图 3-7 不同剂量对生长激素分泌水平的影响

Figure 3-7 Effect of different dose of GRF gene plasmid on GH level

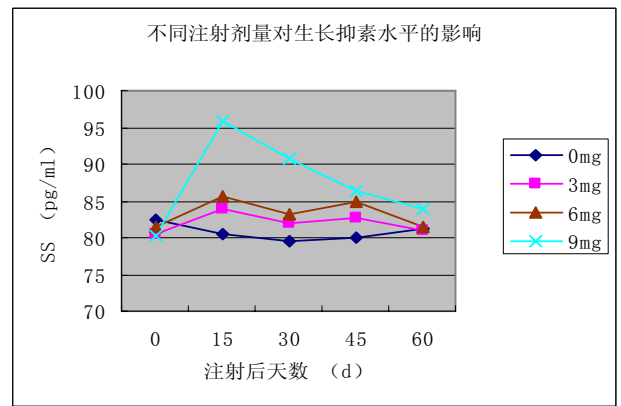


图 3-8 不同剂量对生长抑素水平的影响

Figure 3-8 Effect of different dose of GRF gene plasmid on SS level

3.3 讨论

3.3.1 不同剂量 GRF 基因质粒对犊牛生长发育的影响

由表 3-2 看出在整个饲养期中 3mg、6mg、9mg 处理组的日增重为 0.48kg、0.56kg、0.53kg 分别比对照组的 0.42kg 高出 12.50%、33.33%、26.19%。料重比 6.77、5.69、5.96 分别比对照组 7.58 降低了 10.69%、24.93%、21.37%，这与 Draghia-Akli 等(1999)，张勇(2001)，辜玉红(2001)，陶青燕(2002)等人的试验结果一致。Draghia-Akli 等(1999)给 3 周龄仔猪注射含 GRF 基因的质粒，饲养 65 天后，可以使试验猪的体重增加 38%，料重比降低 20%。张勇(2001)给 5-10 公斤阶段的仔猪注射 1.0mg 的 GRF 基因质粒，结果使仔猪最终体重增加了 20% (p<0.01)、日增重提高 43% (p<0.01)、料重比降低 14% (p<0.05)。辜玉红(2001)给 10 公斤的仔猪注射 2mg 的 GRF 基因质粒，到 100 公斤出栏时生长速度提高 8.8%，饲料利用率提高 15.77%。陶青燕(2002)给 7 公斤仔猪注射 2.2mg 的 GRF 基因质粒，到 100 公斤出栏时，全期日增重提高 4.6% (p>0.05)，料重比降低 5.4% (p<0.05)，出栏日龄缩短 8.4 天 (p>0.05)。以上结果表明注射 GRF 基因质粒可以加快动物生长，提高饲料利用率。大量免疫化学证明，含 GRF 的细胞位于弓状核，其纤维延伸到正中隆起，GRF

被分泌到门脉系统,经血液携带到腺垂体刺激生长激素分泌细胞释放 GH。试验还表明 GRF 可促进 GH 合成,其机理可能是加强了 GH 基因的转录和 GH-mRNA 的生成。垂体前叶存在 GRF 受体,GRF 与受体结合激发一系列反应,由 cAMP 和 Ca^{++} 介导刺激了 GH 释放,GH 再促使肝脏产生调节生长的物质。而 GH 促进动物生长是通过 IGF-I 实现的。GH 通过与受体结合,诱导肝细胞产生 IGF-I,而 IGF-I 能直接作用于动物体内的各种组织,促进蛋白质的合成,促进细胞增殖,从而促进肌肉、内脏和骨骼的生长。本试验通过肌肉注射 GRF 基因,GRF 基因在体细胞内不断表达、释放,增加了血液中 GRF 浓度,刺激了 GH 水平的提高。进而引起一系列的生理生化反应,提高了的动物生产性能。

基因治疗上的研究表明,DNA 药物的使用剂量直接影响作用的效果(JeeHian, 1997)。Wolff 等(1990)第一次将质粒 DNA 用作肌肉注射时就曾注意到了剂量一效应关系的存在。10 倍量 DNA 的注射会引起虫荧光素的量 10 倍的增加,从注射 $10\mu\text{gDNA}$ 得到 $33\mu\text{g}$ 虫荧光素酶到注射 $100\mu\text{gDNA}$ 得到 $320\mu\text{g}$ 虫荧光素酶。这说明注射 GRF 基因质粒的量越多,其相应在体内表达的量越多。

是不是注射剂量越大犊牛的生产性能就越好呢?我们从本试验也观察到,并非注射剂量最高的 9mg 处理组取得了最好增重效果,我们从图 3-1 和图 3-2 页可以直观地看到 6mg 处理组取得了全期的最好效果,不同试验组的效果由好到差的顺序为 $6\text{mg}>9\text{mg}>3\text{mg}>0\text{mg}$ 。陶青燕(2002)也发现了相似的规律,她使用 2.2mg 的注射剂量,试验猪全期(6-100 公斤)的日增重和饲料转化率还能有明显的改善,使用 4.4mg(针注)的注射剂量后这种改善效果已经不能观察到了。同样王立志也观察到注射高注射剂量 6mg 和 9mgGRF 基因质粒的处理组没有比 3mg 的注射剂量的效果好,甚至比对照组的效果还要差。张勇(2001),辜玉红(2001)也有相同的结果。但从表 3-2 也可以看出,不同阶段其效果也是不同的,尤其是 6mg 处理组和 9mg 处理组的比较可以看到,第一个月 6mg 组表现效果最好,9mg 组在第二个月表现效果最好。产生这种效果的原因与身体内各激素的变化有关系。我们知道动物的生长受内源激素的作用和调控,各种激素间通过促进、协同、抑制等作用相互联系,交织成网,以维持动物生长的相对稳定。GH 和 IGF-I 作为效应因子,直接发挥着促进生长的作用,而 GRF 和 SS 作为高位调节因子,是通过调控 GH 和 IGF-I 进而达到促生长的作用。肌肉注射高剂量的 GRF 基因质粒,一方面使外源 GRF 在肌肉组织中获得大量表达,促进内源 GH 和 IGF-I 的合成,另一方面,肌肉组织中的外源 GRF 释放进入血液可以使血液 GRF 的浓度升高,通过负反馈作用对内源 GRF 的合成和分泌产生抑制,同时可引起下丘脑 SS 分泌的增加,对动物体内 GH 和 IGF-I 的合成与分泌以及动物的消化系统产生广泛的抑制作用。当外源生长激素释放因子表达量引起生长激素的浓度在机体生理允许范围内时,此时 GRF 基因质粒的注射剂量表现的为正效应即日增重增加,饲料转化率提高。但是当外源生长激素释放因子的表达量继续增加时,就会引起生长激素的量继续增加,当生长激素增加到的浓度已经超过了机体的允许范围时,就会引发生长抑素的大量分泌,从而抑制内源性生长激素释放因子的释放和生长激素对生长激素释放因子的敏感性,从而降低生长激素的分泌量,此时过量的 GRF 基因质粒的表现就是负相应,即日增重和饲料转化率降低,甚至低于对照组的水平。但是随着 GRF 基因质粒的消耗,机体血容量的增加,可能会解除生长抑素对生长激素释放因子和生长激素的抑制,使得 GRF 基因质粒又发挥其促生长的作用。本试验发现 6mg 组在 2 个月的饲养期中的表现效果最好,但是如果随着饲养时间的增加,9mg 组就会表现出后效应。具体效果还需要进一步的试验验证。

有研究表明,给猪直接注射 GH 或 GRF 可使猪肝脏 (Chung 等, 1985; Machlin 等, 1972)、肾脏和心脏 (Chung 等, 1985; Enright 等, 1993)、肺 (Dubreuil 等, 1990) 的重量增加,但是,我们在试验中没有发现类似的现象,在 2 个月的饲养其中,注射 GRF 基因质粒没有对犊牛的体尺和器官占体重的比例造成显著性的影响,这可能由于生长激素和生长激素释放因子的半衰期非常短只有 10-20min,直接注射 GH 或 GRF 会导致体内生长激素的浓度瞬间升高,从而造成内脏器官的变化。而 GRF 基因质粒进入到体内后是一个缓慢释放的过程,是渐进式表达。在注射剂量不是太过量的情况下,对内脏器官就不会有显著的影响。

3.3.2 导入 GRF 基因质粒时间与效应关系

质粒 DNA 通过肌肉注射入动物体内以后,目的基因需要经过一段时间才可能进行表达生成 GRF 蛋白,而达到最大表达效率的时间则会更长。这种时间跨度可因目的基因的种类、质粒载体、注射方式的不同而不同。Wolff 等(1990)将含荧光素酶基因的 DNA 质粒注射入老鼠的骨骼肌,2 天后能在骨骼肌中检测到荧光素酶的活性,15 天后酶的活性达到最高。朱小君等(1994)采用缝线法将 pN2-LacZ 基因质粒转入大鼠的股四头肌,2 天后 LacZ 基因开始有明显的表达,7 天时达到最高峰。郑润等(1998)将含人生长激素的重组真核表达质粒直接注射入小鼠的后肢肌肉,20 天后表达水平达到最高。

本试验发现生长激素水平在 15 天左右时,各处理组都产生了一个高峰说明 15 天附近时质粒的表达量,达到了最大值,随着时间的推移 3mg 组在 45 天左右时生长激素的量与对照组已没有差异,说明此时 3mg 组的质粒已经耗尽或量已经非常少。在试验结束时,6mg 组的质粒还有促进生长激素分泌增加的作用但是作用已经非常微弱。而 9mg 组在试验结束前还有很强的促生长激素分泌的作用,由于试验时间的限制还有待进一步考察。

3.3.3 GRF 基因质粒对激素水平变化的影响

注射生长激素释放因子基因质粒可以使其在动物体内表达 GRF 蛋白,这与 (Drghia-Akli 等, 1999; 张永亮等, 2000; 张勇 2001; 王立志 2002) 研究一致,研究认为:注射 GRF 基因质粒后血液中 GRF 蛋白的提高是由于其进入体内后进行表达的结果。张永亮等 (2000) 给大鼠肌肉注射 GRF 基因质粒 30 天后用 PCR 和 RT-PCR 检测到质粒及其表达得到的阳性结果,同时对注射处肌肉进行免疫组化分析可检测到 GRF 蛋白,说明质粒在大鼠肌肉内存在和表达。

由于试验的限制,本试验并没有测定与此密切相关的所有激素,而是选取了生长激素和生长抑素两种激素来检测表达的情况,我们知道,生长激素释放因子和生长抑素在高位控制低位的生长激素和 IGF-I 的分泌。生长激素释放因子分泌量的增加会引起生长激素和 IGF-I 的增加,但是同时也会引发生长抑素分泌的增加来平衡生长激素的浓度,所以可以通过生长激素和生长抑素的浓度变化来观察其他几个重要激素的变化。

通过本试验可以观察到,随着注射量的增加,生长激素的分泌量在 6mg 的剂量处有一个高峰,也就是说在 6mg 以下的注射剂量生长激素的分泌量在增加,当注射剂量超过 6mg 时,生长激素的分泌量开始有所下降。伴随着生长抑素的变化我们发现,6mg 的注射剂量已经轻微引发生长抑素分泌的增加,随着量的继续加大 9mg 处理组生长抑素的量已经显著增加($P < 0.01$)。张勇(2001)给 6-10 公斤仔猪注射 0.25-2.0mg 的 GRF 基因质粒时也发现在 1mg 之前生长激素一直在增长,生

长抑素的量没有变化,当超过 1mg 的量时,生长抑素的分泌量开始增加,生长激素的浓度增加缓慢,随着进一步的增加注射量,生长激素有下降的趋势,生长抑素有继续增加的趋势。说明随着注射量的增加生长激素释放因子的表达量也在增加(wolff, 1990)生长激素的量也在增加,当增加到一定程度时,引发了机体的负反馈机制,使生长抑素的量逐渐增加。来抑制内源性生长激素释放因子的释放。但是随着质粒的逐渐消耗和犊牛身体血容量的增加,会逐渐解除抑制,生长激素的量会有所增加,生长抑素的量降低。与辜玉红(2001)的研究结果相似高注射剂量的生长抑素浓度在中后期逐渐降低到对照组的水平,直到没有显著性差异。

3.3.4 GRF 基因质粒对生化指标变化的影响

本试验进行了尿素氮、甘油三酯和葡萄糖三种血液生化指标的测定,他们在一定程度上代表了蛋白质、脂肪和糖代谢的变化趋势。研究表明,激素水平的变化会引起血液生化指标的相应变化。

本试验发现注射 GRF 基因质粒会降低血液中尿素氮的水平,这与辜玉红(2001),张勇(2001), Pearson 等(1991),Bauman 等(1993),Etherton 等(1998)的试验结果相同,由于生长激素分泌的增加,会直接增加 IGF-I 分泌的增加,研究表明:IGF-I 能促进细胞增殖、分化、成熟,并可抑制细胞凋亡;介导生长激素的大部分作用;促进生长和合成代谢;阻止肌肉蛋白分解。血液水尿素氮在一定程度上可以说明蛋白质的代谢状况,注射 GRF 基因质粒可以降低血液中尿素氮含量,使蛋白质合成速度加强,外在的表现就是动物生长加快,饲料利用率提高,通过这也证明了生长激素的增加进一步促进了 IGF-I 的增加。

注射 GRF 基因质粒后使血液中的葡萄糖的浓度有上升的趋势 6mg 和 9mg 处理组达到极显著水平($P<0.01$),这与张勇(2001),Pearson 等(1991),Bauman 等(1993),Etherton 等(1998)研究结果相一致,研究表明生长激素具有抗胰岛素及抑制糖原分解和葡萄糖进入细胞氧化的作用(沈同等,1981)。由于注射 GRF 基因质粒使得生长激素含量的增加,进而影响到胰岛素合成糖原的过程,提高了血糖的水平。

注射 GRF 基因质粒会导致血液中甘油三酯水平的下降。30 天时 6mg 组下降幅度最大($P<0.05$),而 60 天时 9mg 组的下降幅度最大($P<0.05$)这与沈同(1981)的理论相一致。研究表明生长激素水平的增加会加快一系列的反应,使得甘油三酯分解成为脂肪酸和甘油。并最终导致降低血液中甘油三酯的含量。在生产中的变现为降低脂肪含量,提高瘦肉率。

综上所述,注射 GRF 基因质粒可以增加血液中生长激素的含量,生长激素含量的增加从两个渠道来影响体内物质的代谢,(1)通过自身直接作用达到加快脂肪分解,提高血液中血糖的水平;(2)通过增加 IGF-I 的含量,间接提高蛋白质合成。

3.4 结论

(1)在两个月的饲养期中,注射 3mg, 6mg, 9mg 剂量的 GRF 基因质粒都能提高犊牛的日常增重和降低料重比,其中注射剂量 6mg 达到了最好的增重效果,高于或低于 6mg 达不到最佳效果。

(2)GRF 基因质粒注射到犊牛半肌腱部位,15 天左右达到表达高峰。

(3) 注射三种剂量的 GRF 基因质粒都能够提高生长激素的水平, 其中 6mg 剂量 GRF 基因质粒使犊牛生长激素的水平提高的幅度最大, 比对照组高 1.37 倍。

(4) 生长抑素的分泌量同 GRF 基因注射剂量成正比。

(5) 注射 GRF 基因质粒可以降低血液中尿素氮和甘油三酯的水平, 提高血中葡萄糖的浓度, 最终体现为蛋白质合成作用的加强, 脂肪分解加快, 犊牛的瘦肉率提高。

(6) 注射 GRF 基因质粒对犊牛的器官的比例没有显著影响。

(7) 注射 GRF 基因质粒可以增加犊牛体斜长、胸围和鬃甲高。

第四章 GRF 基因质粒对 SS 苗促进犊牛生长效果的影响

生长抑素基因工程活载体苗 (SS 苗) 是通过降低动物体内的生长抑素水平来达到增加生长激素基础水平的目的, 而 GRF 基因质粒的作用机理是通过 GRF 基因质粒在体内的表达, 生成 GRF 蛋白, 进而提高 GH 分泌时的峰值, 从而达到提高生长激素的水平。

本试验通过研究两种不同增加生长激素水平的作用机制, 来研究 GRF 基因质粒对 SS 苗促进犊牛生长效果的影响。

4.1 材料和方法

4.1.1 试验设计

采用单因子实验设计, 试验分为 3 个处理, 每个处理 6 头牛, 各处理组各注射一针生长抑素基因工程活载体苗 (蚀斑单位为 5×10^7 PFU/g) (SS 苗), 并随机选择两组在犊牛半肌腱部位注射 5ml 含 3mg 和 6mg 质粒, 布比卡因浓度为 0.25% 的生理盐水溶液

4.1.2 试验动物及分组

选取平均体重为 150.50kg 西门塔尔牛杂交牛 18 头, 把体重相近的犊牛随机平分到三个试验组中。犊牛由科尔沁牛业股份有限公司提供。

4.1.3 饲养管理

同 3.1.3

4.1.4 试验日粮组成及营养水平

同 3.1.4

4.1.5 试验药品和器材

生长抑素基因工程活载体苗 (SS 苗) 购自南京南农高科技股份有限公司, 其他药品和器材同 3.1.5

4.1.6 指标测定方法

相关指标测定方法同 3.1.6

4.1.7 数据处理

同 3.1.7

4.2 结果和分析

4.2.1 GRF 基因质粒与 SS 苗共同使用对犊牛生长性能的影响

表 4-1 GRF 基因质粒和 SS 苗共同作用对犊牛日增重和料重比的影响

Table 4-1 effect on ADG and F/G SS using both GRF gene plasmid and SS vaccine altogether

	SS 苗	SS 苗+3mg	SS 苗+6mg
始体重(kg)	151±48.79	150.5±49.92	150±49.11
终体重(kg)	180.17±54.99	190.33±53.20	188.67±45.54
第一个月			
每组总采食量(kg)	588.12	601.02	596.16
料重比	7.54	5.67	6.21
平均日增重(kg)	0.43±0.11 ^a	0.59±0.14 ^b	0.53±0.12 ^{ab}
第二个月			
每组总采食量(kg)	672.21	679.63	682.72
料重比	6.93	5.11	5.02
平均日增重(kg)	0.54±0.14 ^a	0.74±0.12 ^b	0.75±0.11 ^b
全期			
每组总采食量(kg)	1260.33	1280.65	1278.88
料重比	7.20	5.36	5.51
平均日增重(kg)	0.48±0.12 ^a	0.66±0.14 ^b	0.64±0.10 ^b

注：同一行中的标有不同小写字母者为差异显著 (P<0.05)

Note: values with different lower case superscripts within the same column indicates difference significantly(P<0.05)

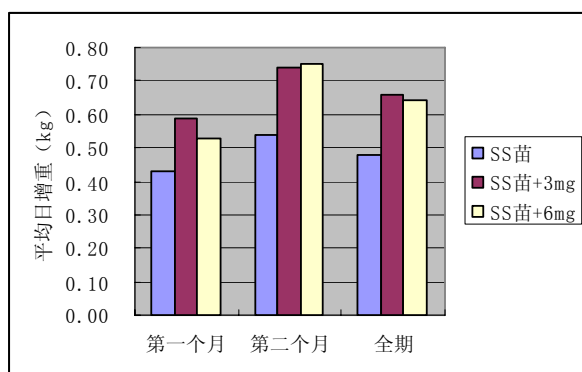


图 4-1GRF 基因质粒与 SS 苗共同作用对日增重的影响

Figure 4-1 Effect of use of both GRF gene plasmid and SS vaccine on ADG

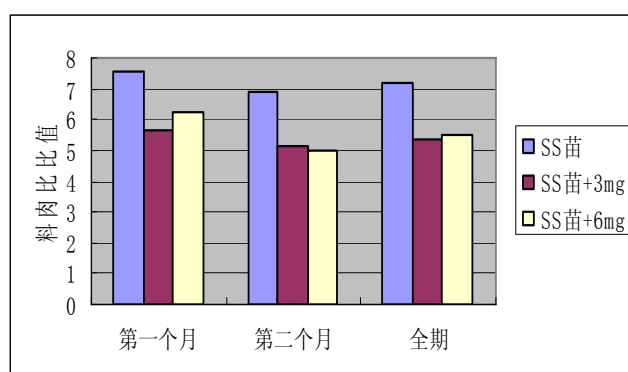


图 4-2GRF 基因质粒与 SS 苗共同作用对料重比的影响

Figure4-2 Effect of use of both GRF gene plasmid and SS vaccine on F/G

由表 4-1 看出 GRF 基因质粒与 SS 苗共同作用要好于 SS 苗的单独注射。SS 苗+3mg 取得了最好的日增重比 SS 苗组增加 37.50%，料重比降低 25.56%。达到了显著水平 (P<0.05)，SS 苗+6mg

组比 SS 苗组日增重增加了 33.33%，料重比降低了 23.47%。各阶段日增率的变化由图 4-1 和图 4-2 可以看出，第一个月各处理组的效果为 SS 苗+3mg 组>SS 苗+6mg 组>SS 苗组，而第二个月情况有所变化各处理组的效果为 SS 苗+6mg 组>SS 苗+3mg 组>SS 苗。第二个月时 SS 苗+6mg 组的效果要好于 SS 苗+3mg 组。

4.2.2 GRF 基因质粒与 SS 苗共同使用对犊牛血液激素水平的影响

表 4-2 犊牛激素水平变化

Table4-2 the change of GH level of calves

	注射后时间	SS 苗	SS 苗+3mg	SS 苗+6mg
生长激素 (ng/ml)	0d	1.07± 0.05 ^a	1.05± 0.04 ^a	1.09± 0.03 ^a
	15d	1.15± 0.04 ^A	1.45± 0.05 ^B	1.36± 0.04 ^B
	30d	1.21± 0.02 ^A	1.37± 0.07 ^B	1.19± 0.03 ^A
	45d	1.27± 0.02 ^a	1.28± 0.05 ^a	1.34± 0.07 ^a
	60d	1.22± 0.03 ^a	1.23± 0.05 ^a	1.24± 0.05 ^a
生长抑素 (pg/ml)	0d	82.33± 1.07 ^a	81.05± 1.95 ^a	83.27± 1.40 ^a
	15d	71.48± 1.65 ^A	71.31± 1.81 ^A	87.02± 1.55 ^B
	30d	62.93± 1.99 ^A	65.85± 1.21 ^A	102.31± 3.61 ^B
	45d	60.29± 1.04 ^A	65.88± 2.62 ^A	82.76± 4.48 ^B
	60d	62.93± 1.75 ^A	63.55± 2.47 ^A	70.04± 1.75 ^B

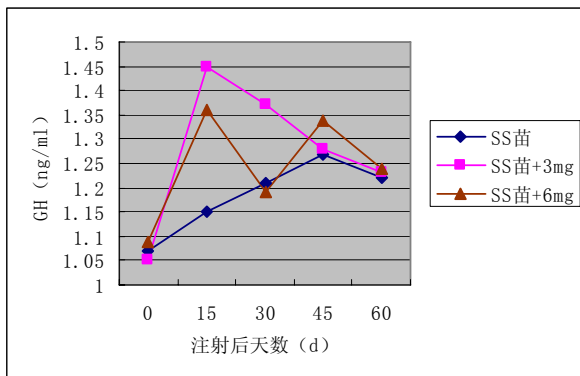


图 4-3GRF 基因质粒与 SS 苗共同作用对生长激素的影响

Figure 4-3 Effect of use of both GRF gene plasmid and SS vaccine on GH level

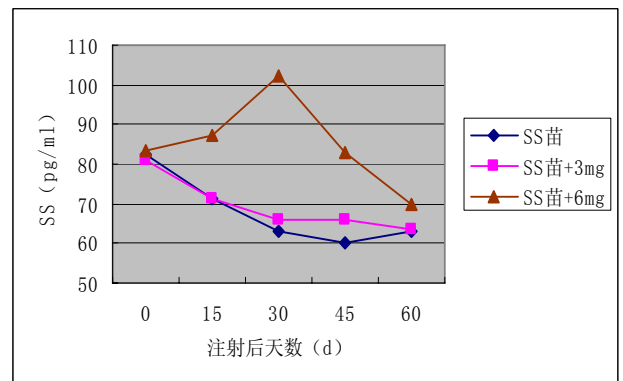


图 4-4GRF 基因质粒与 SS 苗共同作用对生长抑素的影响

Figure 4-4 Effect of use of both GRF gene plasmid and SS vaccine on SS level

由表 4-2 和图 4-3 可以看出：不同的处理组生长激素在注射后 15 天左右都有由升高的趋势

其中, SS 苗+3mg 组升高的幅度最大同单独注射 SS 苗组相比提高了 26.09%, 达到了极显著水平 ($P<0.01$)。SS 苗+6mg 组生长激素增加幅度没有 SS 苗+3mg 组大,但同 SS 苗组相比也增加了 18.26%, 到 30 天时可以看到 SS 苗组生长激素水平在增加, SS 苗+3mg 组在缓慢下降, 而 SS 苗+6mg 组下降幅度较大生长激素水平同 SS 苗组的水平相当。45 天时 SS 苗组的激素水平还在缓慢上升, 此时 SS 苗+3mg 组的水平与 SS 苗组相当, 而 SS 苗+6mg 组此时生长激素水平又达到了一个小高峰, 到 60 天时三个处理组的激素水平相当, 但同注射前的激素水平相比较, 各处理组的水平仍然高于试验前水平 14.95%。

生长抑素的变化可以从由表 4-2 和图 4-4 看出: 注射后 30 的时间内 SS 苗+3mg 和 SS 苗组生长抑素的水平一直在缓慢下降, 过了 30-60 天阶段, 生长抑素的水平稳定在 62pg/ml 左右。而对于 SS 苗+6mg 组, 生长抑素在注射后 15 天内有缓慢上升趋势, 30 天时有一个高峰, 此后生长抑素开始下降, 最终下降到同另外两个处理组相近。

4.3 讨论

GH 的分泌是脉冲式的, 主要受 GRF 和生长激素抑制素 (也称生长抑素 Somatostatin, SS) 两种激素的共同调节。GRF 对 GH 分泌合成的促进作用是与 SS 的抑制 GH 分泌的作用并存的, 共同维持着 GH 的周期性脉冲分泌 (Tannenbaum 等, 1984)。此外, 离体试验结果表明, SS 可抑制 GH 的自发分泌, 对 GRF 刺激垂体 GH 分泌有明显拮抗作用。体内试验结果也证明: 下丘脑提取的 SS 和合成的 SS 都可抑制体内 GH 的自发分泌。SS 的主动和被动免疫均可使 GH 水平明显提高 (Muller 等, 1979)。SS 抗血清可使 GH 的基础值明显上升, 而脉冲式分泌未受影响, 并增加 GH 对 GRF 在 GH 峰值时的反应 (Painson JC, 1985)。SS 和 GRF 经下丘脑强直分泌到垂体门脉血液中, 这两种激素的周期为 3~4h, 相差约 180°, 也就是说, 两者交替节律式分泌, 调节着 GH 的脉冲式分泌。本试验中的 GRF 基因质粒能够增加犊牛 GRF 的浓度, 而 SS 苗可以起到中和体内部分生长抑素的作用。通过二者的共同使用我们发现, 在生长抑素注射量一定的时候, 注射不同剂量的 GRF 基因质粒在一定范围内可以进一步改善犊牛的生长性能。在本试验中 SS 苗+3mg 组同单独注射 SS 苗相比取得了较好的增重效果。SS 苗+6mg 组效果相对较差, 这与上一个试验相反。说明 SS 苗与 3mgGRF 基因质粒共同使用促进了动物生长性能的改善, 具有协同作用, 从生长激素和生长抑素的变化量我们可以看出, SS 苗+3mg 组从生长激素的基础水平和峰值分泌量的增加提高了生长激素在体内的整体水平, 而此时的水平正好在机体的生理允许范围之内。而 SS 苗与 6mgGRF 基因质粒共同使用没有超过 SS 苗+3mg 组的效果, 反而还有所下降, 主要由于两者共同作用所产生的生长激素的量已经超过了机体的允许范围, 引起了机体的负反馈, 虽然 SS 苗可以中和部分生长抑素, 但其中和的能力不是无限的, 这样就会变现出生长抑素的浓度大量增加, 此时二者的作用就不是协同作用, 而是变成了拮抗作用, 即两者都不发挥作用了, 或者说作用相抵消了, 外部的表现生长变慢, 生长性能下降。而这种拮抗也并总是存在, 我们在图 4-3 可以看到在 45 天左右时 SS 苗+6mg 组的生长激素的分泌量有一个高峰, 出现这种现象的原因有可能是, 此时随着 GRF 基因质粒的消耗其表达生成的 GRF 也随之降低, 解除了负反馈。同时由于 SS 苗的作用使得生长抑素的量明显降低, 这一点由图 4-4 也可以看出。所以生长激素的量有一定的上升。随着质粒的消耗生长激素升高主要是由 SS 苗的作用带

来的。

4.4 结论

(1) GRF 基因质粒同 SS 苗共同作用可以起到进一步提高犊牛生长性能的作用, 其中 SS 苗+3mg 组合的效果最好, 比单独使用 SS 苗的日增重增加 37.50%, 料重比降低 25.56%。

(2) 在 SS 苗注射剂量不变的情况下, GRF 质粒注射量达到 6mg 以上剂量时, 两者有拮抗作用, 使用效果降低。

(3) 在 SS 苗注射量 (蚀斑单位为 5×10^7 PFU/g) 不变时, 注射 3mg GRF 基因质粒可以进一步增加犊牛血液中生长激素水平, 注射 6mg GRF 基因质粒时, 犊牛生长激素水平已经开始下降; 生长抑素的水平随着 GRF 基因质粒注射量的增加而升高。

第五章 总结论

1. 在两个月的饲养期中，单独注射 3mg, 6mg, 9mg剂量的GRF基因质粒都能提高犊牛的日常增重和降低料重比，其中注射剂量 6mg达到了最好的增重效果，高于或低于 6mg达不到最佳生产性能。在与SS苗（蚀斑单位为 5×10^7 PFU/g）共同使用时，3mgGRF基因质粒使犊牛达到了最好的生长性能。6mgGRF基因质粒的注射剂量由于与SS苗发生拮抗而导致犊牛生产性能下降；本试验中两种剂量的GRF基因质粒与SS苗共同使用的增重结果都好于SS苗单独使用。
2. GRF 基因质粒注射到犊牛半肌腱部位，15 天左右 GRF 基因质粒表达达到高峰。
3. 单独注射 GRF 基因质粒以及 GRF 基因质粒与 SS 苗共同注射都可以提高犊牛生长激素的水平，其中单独注射 6mgGRF 基因质粒提高幅度最大是对照组的 1.37 倍 ($P < 0.01$)，GRF 基因质粒与 SS 苗共同使用，3mg+SS 苗组提高幅度最大，是单独注射 SS 苗的 1.26 倍 ($P < 0.01$)。
4. 生长抑素的分泌量随着 GRF 基因注射剂量的增加而升高。
5. 注射 GRF 基因质粒可以降低血液中尿素氮和甘油三酯的水平，提高血中葡萄糖的浓度，最终体现为蛋白质合成作用的加强，脂肪分解加快，犊牛的瘦肉率提高。
6. 注射 6mgGRF 基因质粒时，犊牛体斜长、胸围和鬃甲高增加的幅度最大。
7. 注射 GRF 基因质粒对犊牛的器官的比例没有显著影响。

参考文献

1. 白忠斌, 张永亮, 田宝磊等. 原生质体介导的外源性 GRF 基因对小鼠增重的研究. 动物医学进展, 2003, 24 (5): 76-77
2. 陈主初. 一种有效的基因转移技术[J]. 湖南医科大学学报, 1990, (2): 189-193
3. 邓柏林, 张永亮, 籍玉川, 张维. 生长激素释放因子在动物骨骼及的表达. 中国生物工程杂志. 2003, 23 (1) 78-80
4. 范志勇, 王康宁. 猪生长激素释放因子基因对早期断奶仔猪生产性能免疫功能及消化道发育的影响. 中国畜牧杂志, 2003, 39 (3) 16-17
5. 冯立文, 张永亮, 张玉静. GRF 的基因改造, [J] 中国兽医学报, 1998, 18 (6): 520-522
6. 辜玉红. 2001. pGRF 基因质粒对猪生产性能, 胴体品质及血液生化指标影响的研究. 四川农业大学硕士学位论文.
7. 韩正康, 等. 生长抑素抑制剂--半胱胺促进肉鸡生长的研究. 畜牧兽医学报, 1992, 23(4):314
8. 冀一伦主编, 实用养牛科学. 北京: 中国农业出版社, 2001
9. 姜礼胜, 陈杰, 陈伟华. 半胱胺对生长猪生长激素脉冲释放及有关代谢激素的影响. 中国兽医学报, 2002, 22: 262-264
10. 蒋洪茂. 优质牛肉生产技术. 北京: 中国农业出版社, 1995, 47-48
11. 梁建清. 生长激素的作用与应用. 四川生理科学杂志, 2002, 24:39-40
12. 欧宇, 欧洲小牛肉生产现状. 中国草食动物. 2002, 22 (6): 44
13. 任晓慧, 张永亮, 刘松财等. 微球包裹 pcDNA3-GRF(1-32) 在小鼠肌肉组织的表达及对生长的影响. 生物工程学报, 2004, 20 (4): 615-618
14. 沈同, 王镜岩. 生物化学第二版下册. 北京: 高等教育出版社, 1981, 127-209
15. 施娅雪, 何天源. 兔骨骼肌直接注射质粒 DNA 的生物效应. 外科理论与实践, 1998, 228.
16. 孙逊, 朱尚权. 生长激素的结构与功能. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 1999, 19: 6-9
17. 唐胜球, 邹晓庭, 董小英. 畜禽生长激素释放因子 (GRF) 的研究进展. 中国兽医学报, 2004, 24 (3): 310-312
18. 陶青燕. 不同方式注射高剂量 pGRF 基因质粒在猪体内的表达效果的研究. 雅安: 四川农业大学, 2002
19. 王珏, 赵澎. 人酪氨酸羟化酶基因在猴骨骼肌直接注射后的表达. 解剖学报, 1998, 29(4): 347-350
20. 王立志. 高剂量 pGRF 基因质粒对猪生长的影响, 雅安: 四川农业大学, 2003
21. 张继峰, 秦阳君, 付爱华. 电针介导的基因转移. 中国科学 (C 辑), 1999, 29 (1): 89
22. 张永亮, 连继勤, 刘松财等. 家兔肌肉组织表达外源性生长激素释放因子对增重的影响. 中国兽医学报, 2003, 23 (1): 56-58
23. 张勇, 周安国, 吴德等. 仔猪骨骼肌注射 pGRF 基因质粒的促增长及代谢调控效应的研究. 畜牧兽医学报, 2003, 34 (2): 147-151
24. 张勇. pGRF 基因质粒对猪生产性能与蛋白质代谢利用的调控. 雅安: 四川农业大学博士学位

- 论文, 2001
25. 朱小君,姚阿卿,刘勃.外源基因在大鼠体内不同组织的表达.中华医学杂志, 1994, 74(3).158
 26. Anderson R G, Kanmen B A, Rothberg K G, et al. Potocytosis: Sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science*, 1992, 255:410~411
 27. Anwer K, Earle K A, Shi M,et al. Synergistic effect of formulated plasmid and needle-free injection for genetic vaccines. *Pharm Res*,1999,16:889-895.
 28. Bagnato A, Moretti C, Ohnishi J,et al. Expression of the growth hormone-releasing hormone gene and its peptide product in the rat ovary. *Endocrinology* ,1992,130:1097-1102.
 29. Buttrick P M, Kass A, Kitsis R N, et al. Behavior of genes directly injected into the rat heart in vivo. *Circ. Res*,1992,70:193-198.
 30. Chungm.C.S.,T.D.Etherton,J.P.Wiggins. Stimulation of swine growth by porcine growth hormone.*J.Anim.Sci*,1985,60:118
 31. Cohen J. Naked DNA points way to vaccines. *Science* ,1993,259:1691-1692
 32. Connor E E, Barao S M Douglass. L W et al.Predicting bull growth performance andcarcass compositon from growth hormone responses to growth hormone-releasing hormones. *J. Anim. Sci*,1999, 77:2736-2741.
 33. Connor E E, Barao S M, Russek-cohen E. et al. A two-sample method for assessing growth hormone response to growth hormone-releasing hormone challenge: Use as a predictor of gain in beef bulls. *J. Anim. Sci*,2000,78:1954-1959.
 34. Cox G J, Zamb T J, Babiuk L A. Bovine herpesvirus immune response in mice and cattle injected with plasmid DNA. *Jvirol*,1993,67:5664~5667
 35. Danko I,Wolff J A. Direct gene transfer into muscle. *Vaccine* ,1994a, 12:1499~1502
 36. Davis H L, Demeneix BA, Quantin B, et al. Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle.*Human Gene Therapy*,1993b, 4, 159-163.
 37. Davis H L, Whalen R G, Demeneix B A. Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Hum Gene Ther*,1993,4:151-159.
 38. Draghia-Aki R, Fiorotto M L, Hill L A, Malone P B et al. Myogenic expression of an injectable protease-resistant growth hormone-releasing hormone augments longterm growth in pigs.*Nature Biotechnology*,1999,1179-1183.
 39. Draghia-Akli R, Li X G, Schwartz R JI.Enhanced growth by ectopic expression of growth hormone releasing hormone using an injectable myogenic vector[J].*Nature Biotechnol* ,1997,(15):1285-1289
 40. Dubreuil P, Coutrrre Y et al. Effect of porcine growth hormone-releasing factor (1-29)NH2 and thyrotropin-releasing factor on pig growth performance. *Canadian Journal of animal science* , 1990c,70:459-476.
 41. Dubreuil P, Couture Y et al..Effect of long-term administration of porcine growth hormone-releasing factor and (or) thyrotropin-releasing factor on growth hormone, prolactin and thyroxine concentrations in growing pigs .*J. Anim. Sci*, 1990b, 68:95-99.

42. Dubreuil P, Pelletier G et al. Influence of growth hormone-releasing factor and (or) thyrotropin-releasing factor on sow blood components, milk composition and piglet performance. *Canadian Journal of animal science*, 1990, 70: 821-832.
43. Dubreuil P, Petitclerc D, Pelletier G, et al. Effect of dose and frequency of administration of a potent analogue of human growth hormone-releasing factor on hormone secretion and growth in pigs. *J. Anim. Sci*, 1990, 68: 1254-1259.
44. Dunger D B, Cheetham T D. Growth hormone insulin-like growth factor I axis in insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm Res*, 1996, 46: 2-6.
45. Enright W J, Zinn S A, Chapin L T, et al. Growth hormone (GH) release in bull. *Kensinger R S, McMunn L M, Stover R K, Schrick B R, Maccicchini M L, Harpster H W, Kavavaugh J F*. 1987. Plasma somatotropin response to exogenous growth hormone releasing factor in lambs. *J. Anim. Sci* 1984, 64: 1002-1007.
46. Estivariz C F, Zieyler T R. Nutrition and the insulin-like growth factor system. *Endocrine*, 1997, 7: 65-71.
47. Etherton T D, et al. *J. Physiological Reviews*, 1998, 78(3): 745-761
48. Frantz A V, Bonneau M. Growth factors and productivity in swine breeding. Growth hormone-releasing factor and perinatal growth Hormone releasing factor, steroids, beta-agonists somatotropin. *J. Biofutur Jun*, 1962, 18(5): 95-97
49. Frantz A V, Heimer E P, Felix A M, et al. There was a factor increases growth hormone levels in the rat. *J. Proc Natl Acad Sci USA*, 1964, 91(2): 782-786
50. Hagstrom JE, Rybakova IN, Staeva T, Wolff JA, Ervasti JM. Nonnuclear DNA binding proteins in striated muscle. *Bioch Mol Med*, 1996, 58: 113-117
51. Hirschberg R, Adler S. Insulin-like growth factor system and the kidney. physiology, pathophysiology and therapeutic implication. *Am J Kidney Dis*, 1998, 31: 901-919.
52. Lapierre, H., G. Pelletier, D. Petitclerc, et al. Couture and P. Brazeu. Effect of human growth hormone-releasing factor (1-29)NH₂ on growth hormone releasing and milk production in dairy cows. *H. Dairy Sci*, 1988, 71: 92
53. Lawrence Baizer, R. R. Stout, Georg Widera, et al. Biojector needle-free injection enhance immune responses to a DNA vaccine, 2002, [www. bioject.com./clinic/index.html](http://www.bioject.com/clinic/index.html)
54. Leinwand L A, Leiden J M. Gene transfer into cardiac myocytes in vivo. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 1991, 1: 271-276.
55. Ling N, Esch F, Bohlem P, et al. Isolation, primary structure and synthesis of human hypothalamic somatocrinin. *J. Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 4302-4306
56. Machlin, J. L. Effect of porcine growth hormone on growth and carcass composition of the pig. *J. Anim. Sci*, 1972, 35: 794
57. Mathiesen I. Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo. *Gene Therapy*, 1999, (6): 508-514
58. Mayo K E, Godfrey P A, Suhr S T, et al. Growth hormone-releasing hormone: synthesis and

- signaling. *Recent Progress in Hormone Research*, 1995, 50: 35–73.
59. Mayo KE, Cerelli GM, Rosenfeld MG, and Evans RM (1985) Characterization of cDNA and genomic clones encoding the precursor to rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature* 314:464–467.
 60. Moseley W M, Krabill L F, Freedman A R, et al. Administration of synthetic human pancreatic growth hormone releasing factor for five days sustains raised serum concentrations of growth hormone in steers. *Endocrinol*, 1985, 104:433-438.
 61. Padmanabhan V, Enright W J, Zinn S A, et al. Modulation of growth hormone-releasing factor-induced release of growth hormone from bovine pituitary cells. *Domest Anim Endocrinol*, 1987, 4:243-252
 62. Painson J C, Tannenbaum G S. Effects of intracellular glucopenia on pulsatile growth hormone secretion: mediation in part by somatostatin. *Endocrinology*, 1985, 117:1132-8
 63. Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 1982, 300:611-5.
 64. Pasquini S, Xiang Z, Wang Y, et al. Cytokines and costimulatory molecules as genetic adjuvants. *Immunol Cell Biol*, 1997, 75:397-401
 65. Petitclerc D, Pelletier G, Lapierre H, et al. Dose response of two synthetic human growth hormone-releasing factors on growth hormone release in heifers and pigs. *Anim.Sci*, 1987, 65: 996-1002.
 66. Polge E J C, Barton S C, Surani M A H, et al. Induced expression of a bovine growth hormone construct in transgenic pigs. In *Biotechnology in Growth Regulation. Human Gene Therapy*, 2000, 11:909-916
 67. Pursel V C, et al. Heap R B, et al. *Biotechnology in Growth Regulation. Butterworths. London*, 1989, 181.
 68. Pursel V G, Miller K F, Bolt D J, et al. Insertion of growth hormone genes into pig embryos. In *Biotechnology in Growth Regulation. Butterworths. London.*, 1989, 181
 69. Pursel VG, Pinkert CA, Miller KF, Bolt DJ, Campbell RG, Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE. Genetic engineering of livestock. *Science*, 1989, 244:1281-8.
 70. Q. Y. Meng, Z. Q. Chen, Z. Q. YU, et al. Increased body weight via injecting myogenic expression growth hormone-releasing hormone (GHRH) plasmid DNA into sheep. *animal biotechnology*, 2004, 15(2):175-192
 71. Raz E, Carson DA, Parker S E, et al. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91:9519-9523.
 72. Reecy J M, Bidwell C A, Briley G P, et al. Structure and regulation of the porcine skeletal alpha-actin-encoding gene. *Gene*, 1996, 180:23-8.
 73. Rivier J, Spiess J, Thorner M, et al. Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour [J]. *Nature*, 1982, 300:276-278

74. Ross G, Erickson R, Knorr D, et al. Gene therapy in the United States: a five-year status report. *Hum Gene Ther*,1996,7:1781-1790.
75. Roy K, Mao H Q, Huang S K, et al. Oral gene delivery with chitosan--DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med*,1999,5:387-391.
76. Sambrook Jm/Fritsch EF,Manitatis T.分子克隆实验实验指南第2版.北京: 科学出版社, 1999: 798
77. Schally R S,Hashizume T,Kanematsu S.Effects of growth hormone-releasing factor on the of growth hormone in pigs[J].*Domest Anim Endocrinol*,1971,7(4):451-456
78. Sedegah M, Jones T R, Kaur M, et al. Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1998,95:7648-7653.
79. Spencer G S G, W illiam son E D. Increased growth of lambs following immunization against somatostatin preliminary observations [J]. *Animal Production*,1981, 32: 376.
80. Spiess J ,Rivier J ,Vale W.Characterization of rat hypothalamic growth hormone releasing factor[J].*Nature*,1983,303:532-535
81. Sujata Manam, J L.Brian, B.B.Amy, et al.. Plasmid DNA vaccines:tissue distribution and effects of DNA sequence adjuvants and delivery method on integration into host DNA.*Intervirolgy* , 2001, 43:273
82. Tannenbaum G S, Ling N The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology*,1984,115:1952-1957
83. Tripathy S K. et al. Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector.*Proc. Natl-Acad. Sci. USA*,1996, 93,10876-10880.
84. Ulmer JB, Donnelly J J, Parker S E, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* ,1993,259: 1745-1749.
85. Vicat J M.Muscle Transfection by Electroporation With Hight-Voltage and Short-Pusle Currents Provides High-Level and Longg-Lasting. *Nature*,1991,300:276-278
86. Vicini J L, Clark J H, Hurley W L, Bahr J M. The effect of immunization against somatostatin on growth and concentration of somatotropin in plasma of Holstein calves.*Domest Anim Endocrinol*, 1988,5(1):35-39.
87. Vitadello MmSchiuaffrino M.V,Picard Amet al. Gene transfer in regenerating muscle.*Hum gene Ther*,1994,5(1):11-18
88. Vize P D, Michalska A E, Ashman R, Lloyd B, Stone B A, Quinn P, Wells J R E, Seamark R F. Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth.*J. Cell Sci*, 1988, 90:295-297.
89. Wang B, Ugen K E, Srikantan V, et al. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1993,90: 4156-4160.

90. Wehrenberg W B, Brazeau P, Luben R, Bohlen P, Guillemin R Inhibition of the pulsatile secretion of growth hormone by monoclonal antibodies to the hypothalamic growth hormone releasing factor (GRF). *Endocrinology*, 1982a, 111:2147-2148
91. Wells D J, Goldspink G. Age and sex influence expression of plasmid DNA directly injected into mouse skeletal muscle. *FEBS Letters*, 1992, 306:203-205.
92. Wells D J. Improved gene transfer by direct plasmid injection associated with regeneration in mouse skeletal muscle. *FEBS Letters*, 1993, 332:1-2. 179-182.
93. Wolff J A, Acsadi G, Jiao S et al. Conditions affecting direct gene transfer into skeletal muscle in vivo. *Biotechniques*, 1991, 11:474-485.
94. Wolff J A, Dowty M E, Jiao S, et al. Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle. *J Cell Sci*, 1992, 103:1249-1259.
95. Wolff J A, Ludtke J J, Acsadi G, et al. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet*, 1992, 1(6):363-369
96. Wolff J A, Malone R W, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 1990, 247:1465-1468
97. Yoshida A, Nagata T, Uchijima M, Higashi T, Koide Y. Advantage of gene gun-mediated over intramuscular inoculation of plasmid DNA vaccine in reproducible induction of specific immune responses. *Vaccine*, 2000, 18:1725-1729.

致 谢

本论文是在恩师孙宝忠副研究员的悉心指导下完成的。从课题确定、试验设计到试验实施、论文撰写等环节都倾注孙老师了大量的心血。在我整个研究生学习期间，导师严谨的治学态度、渊博的学识和谦虚谨慎的学者风范使我受益匪浅。同时在生活上面也给予了我无微不至的关怀。

感谢内蒙古科尔沁牛业股份有限公司李和董事长，贾恩堂老师和王春荣老师在试验中给予的指导和帮助，使得试验得以顺利完成。感谢李海鹏老师和种京华老师在试验和生活方面给予的帮助。感谢中国农大李宁试验室的孟庆勇博士，为本试验提供技术上的支持。

衷心感谢中国农业科学院畜牧所的许尚忠研究员、王立贤研究员、杜立新教授、张敏红研究员、颜华副研究员，华谷公司的郑姗姗，张晓娟，科尔沁牛业股份有限公司的聂河厂长，金东瑞厂长在我做论文的过程中提供帮助以及生活上的关心。感谢中国农业科学院畜牧所的王涌鑫、王敏、张守勇、郭艳青、李晗、陈若愚、乔莉娟、狄冉、董敏、方华，河北农大的于辉，王杨，内蒙古大学的马菊、张红梅、高文霞等同学，他们在试验过程中给予我大量的帮助。

我要特别感谢我的亲人们，尤其是我的父母亲和我的爱人，多年来是他们一直在给予我物质和精神上的支持，我所取得的每一个成绩都是他们支持的结果。我只有更加勤奋地工作，才能不辜负他们的殷切期望。

再次向所有帮助过、关心过我的师长、同学、家人和朋友致以诚挚的谢意！

张利宇

二零零六年六

作者简介

姓名：张利宇 男 生于 1979 年 2 月

专业：动物遗传育种与繁殖

方向：畜禽种质和产品质量

教育经历

2003.9-2006.7 中国农业科学院畜牧研究所

1997.9-2001.7 东北农业大学

工作经历

2001.7-2003.9 哈药集团制药总厂

获奖情况

2004 年获得“第 15 届国际植物保护大会”志愿者荣誉证书

2004 年获得社会实践优秀个人

2001 年获得东北农大优秀毕业生称号

2000 年获得优秀学生干部称号

1999 年获得“科普之冬”社会实践活动优秀个人

发表文章

《导入外源 GRF 基因质粒对犊牛生长性能的影响》 中国农学通报 待刊