

综述

鱼类基因分子生物学及转基因鱼研究进展*

RESEARCHES IN MOLECULAR BIOLOGY OF FISH GENES AND TRANSGENIC FISH

昌永华 汤伏生

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆沙 434000)

Chang Yonghua Tang Fusheng

(Changjiang Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingsha 434000)

关键词 分子生物学, 基因, 鱼类, 聚合酶链反应, 转基因鱼

KEYWORDS Molecular biology, Genes, Fishes, Polymerase chain reaction, Transgenic fish

真核基因分子克隆技术的建立, 提供了从核苷酸水平了解鱼类基因结构的手段。鱼类基因的分子克隆始于八十年代初、中期对虹鳟(*Salmo gairdneri*)鱼精蛋白基因^[52]和美洲黄盖鲮(*Pseudopleuronectes americanus*)抗冻蛋白(AFP)基因^[22]的分子克隆, 随后扩展到其他极地鱼类 AFP 基因, 接着扩展到鱼类生长激素(GH)基因、催乳激素(PRL)基因、生长催乳素(somatolactin SL)基因等数十个基因。对这些控制鱼类重要生理机能的基因结构的认识, 无论在理论上还是在渔业实践上都具有重要意义。随着愈来愈多的有用目的基因的分子克隆及基因元件的分离, 鱼类分子生物学及基因工程正在成为当前最为活跃的科学研究领域之一。聚合酶链反应(PCR)技术的建立, 更为鱼类分子生物学研究提供了快速、有效的手段。本文拟从鱼类基因分子生物学、PCR 在鱼类基因分子生物学上的应用和转基因鱼三方面予以综述。

收稿日期: 1995-04-14。

* 本文经蒋耀青、汤懋炫、吴清江、夏德全、张兴忠、黄忠志、岑玉吉、余来宁、桂建芳和洪云汉各位先生审阅并提供修改意见, 特此致谢。

鱼类基因分子生物学

(一)激素及相关蛋白的基因

1. 生长激素(GH)基因

鱼类 GH 基因,控制鱼类的生长,直接与鱼产量密切相关。

大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)、红大麻哈鱼(*O. nerka*)、大鳞大麻哈鱼(*O. tshawytscha*)、虹鳟(*O. mykiss*)、鲑(*Salmo salar*)、鳗鲡(*Anguilla japonica*)、五条鲮(*Seriola quinqueradiata*)、金枪鱼(*Thunnus thynnus*)和鲤(*Cyprinus carpio*)有两个结构不同的 GH 基因。大麻哈鱼的两个 GH 基因,psGH-1 比 psGH-8 多 5 个限制位点,即 Kpn I、Sal I、Pvu I、Stu I 和 Hind III。银大麻哈鱼(*O. kisutch*) GHcDNA 与大麻哈鱼 psGH-1 极为类似。虹鳟 GH 基因全核苷酸序列约为 4000bp^[10]、鲑 GH1、GH2 基因全核苷酸序列分为 6500bp^[42]和 4400bp^[33],红大麻哈 GH1、GH2 基因的全核苷酸序列分别为 4138bp 和 3440bp^[23],鲤、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)GH 基因全核苷酸序列分别为 2400bp^[21]、2501bp^[30]、2484bp^[32]和 1666bp^[12]。虹鳟、鲑、红大麻哈鱼、尼罗罗非鱼、金头鲷(*Sparus aurata*)GH 基因有 6 个外显子和 5 个内含子。鲤、草鱼、鲢和斑鲃(*Ictalurus punctatus*)GH 基因有 5 个外显子和 4 个内含子。草鱼 GH 基因+1 位至 1220 位的 5' 序列中含有糖皮质激素和环腺苷酸应答元件^[30],而虹鳟帽位点上游 332 个核苷酸的 5' 序列中无糖皮质激素/甲状腺激素受体复合体的 DNA 结合位点^[10]。虹鳟 GHcDNA 序列与大麻哈鱼属的亲缘关系比与鲑属的近得多^[35]。鲤 GH 基因转录起点上游序列有两条十核苷酸 AACTCTCATG 的串联重复序列(从-85 至-62)^[21]。尼罗罗非鱼 GH 基因在-215、-186 和-49 位有类似于哺乳类 GHF-1/PIT-1 转录因子共核 DNA 结合位点的 3 条序列 CTTTACAT、ACAAACAT 和 TTAAACAT;在启动子区域,在核苷酸-193 和-186 之间及核苷酸-106 和-99 之间有八核苷酸 5'-AATGTTAA 的直接重复序列^[12]。这些序列的意义尚不清楚。鳗鲡 GHcDNA 起始密码子周围有一条反向重复序列,致使转译受抑制。金枪鱼 GHcDNA 有 3 条具 CTGTAGCCCCGCCTCTCTGATGACGT 基本序列的直接重复序列,这样的直接重复序列在大麻哈鱼、五条鲮 GHcDNA 碱基序列中尚未观察到。鲤 GHcDNA 3' 非转译区形成 3 个发夹状二级结构,二级结构离终止密码子 TAG100 个核苷酸,各发夹间的距离约 100 个核苷酸。草鱼、鳙(*Aristichthys nobilis*)和鲢的 GHcDNA 核苷酸序列,仅相差几个碱基。鲤、草鱼、鳙和鲢的 GH 有 5 个半胱氨酸残基,比其他鱼类 GH 多 1 个半胱氨酸残基,即 Cys^{123[17]}。鱼类 GH 基因组织专一性表达的遗传信息,仅与 5' 翼区的最邻近的区域有关^[12]。

鱼类 GHcDNA 特征如表 1。

表 1 鱼类 GHcDNA
Table 1 Reported fish GH cDNAs

种 Species	开读框 Open reading frame (bp)	5'-非转译区 5'-Untranslated region (bp)	3'-非转译区 3'-Untranslated region (bp)	信号肽 Signal peptide (aa)	成熟 GH Mature GH (aa)	研究者 Researcher
大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus keta</i>	630	64	426	22	188	Sekine, 1985
银大麻哈鱼 <i>O. kisutch</i>	630	64	489	22	188	Gonzalez, 1988
大鳞大麻哈鱼 <i>O. tshawytscha</i>	630	cDNA 全长 full size cDNA		1148	GH 前体 preGH 210	Hew, 1989
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	630	65	263	22	188	Agellon, 1986
鲑 <i>Salmo salar</i>	630	56	483	22	188	Lorens, 1989
鳗鲡 <i>Anguilla japonica</i>	627	52	184	19	190	Saito, 1988
五条鲷 <i>Seriola quinqueradiata</i>	615	96	174	17(19)	187(185)	Watabiki, 1988
金枪鱼 <i>Thunnus thynnus</i>	615	65	231	17	187	Sato, 1988
真鲷 <i>Pagrus major</i>	609	62	236	17	186	Momora, 1988
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	612	55	236	17	187	Funkenstein, 1991
黄鳍鲷 <i>Acanthopagrus latus</i>		cDNA 全长 full size cDNA		915	17	Tsai Huai-jen, 1991
条纹石斑 <i>Morone saxatilis</i>	612	58	239	GH 前体 preGH	240	Cheng, C. M. 1991
尼罗罗非鱼 <i>Tilapia nilotica</i>	612			17	187	Rentier- Delrue, 1989
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	630	36	498	22	188	Koren, 1989
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	630	23	518	22	188	Chang, Y. S. 1992
鳊 <i>Aristichthys nobilis</i>	630	22	500	22	188	Chang, Y. S. 1992
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	630	28	512	22	188	Chang, Y. S. 1992
白斑狗鱼 <i>Esox lucius</i>	627	cDNA 全长 full size cDNA		1227	22	187 Schneider, 1992

2. 催乳激素(PRL)基因

鱼类 PRL 具有调节渗透压、平衡离子的作用,且与鱼类的生殖、行为和代谢有关^[19]。

鲤 PRL 基因全长 2.8kb,具 5 个外显子和 4 个内含子,帽位点是一个鸟嘌呤残基。在帽位点上游的 -38 至 -31 位有 TATATAAT 序列,在 -79 至 -59 位有回文序列 CTCATTGCATATACAAATGAG^[19]。大鳞大麻哈鱼 PRL 基因全长 6.4kb,5' 翼区 2.4kb,5 个外显子和 4 个内含子 3.0kb,3' 翼区 0.9kb。斑鲌 PRL 基因长约 3.3kb,亦由 5 个外显子和 4 个内含子组成。鱼类 PRLcDNA 特征如表 2。PRL 氨基酸序列中,残基 46 至 51 和 160 至 180 是两个几乎相同或化学上相似序列的保守区段。这两条序列对于 PRL 的生物活性非常重要^[19]。

表 2 鱼类 PRL cDNA
Table 2 Reported fish PRL cDNAs

种 Species	开读框 Open reading frame (bp)	5'-非转译区 5'-Untranslated region (bp)	3'-非转译区 3'-Untranslated region (bp)	信号肽 Signal peptide (aa)	成熟 PRL Mature PRL (aa)	研究者 Researcher
大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus keta</i>	630	40	269	23	187	Kuwana, 1989
大鳞大麻哈鱼 <i>O. tshawytscha</i>	633	18	497	23	188	Song, S., 1988
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	630			23	187	Mercier, 1989
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	630	45	211	23	187	Chao, S. C., 1988
鲮 <i>Aristichthys nobilis</i>	630	30	510	23	187	Chang, Y. S. 1992
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	621		436	不完全信号肽 incomplete signal peptide 20	187	Chang, Y. S. 1992
尼罗罗非鱼 <i>Tilapia nilotica</i>						Rentier-Delrue, 1989
tPRL-1	636		787	24	188	
tPRL-2	600		512	23	177	

3. 生长催乳素基因

生长催乳素(SL)是生长激素/催乳激素家族中的一种垂体激素,可能具有背景适应和离子调节等功能,其生理作用待进一步确定^[53]。

大麻哈鱼 SL 基因长 16kb,由 5 个外显子和 4 个内含子组成,在转录起点上游有一个与哺乳类 PRL 基因 TATA 盒相同的 TATA 盒和 4 条与哺乳类 GH 基因或 PRL 基因表达所

必需的 Pit-1/GHF-1 结合元件相对应的共有序列。大麻哈鱼、大西洋鳕(*Gadus morhua*)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)3 种 SL 中,6 个半胱氨酸残基处于与 GH 和 PRL 半胱氨酸残基相应的位置,从 N-端起的第 3 个半胱氨酸残基是鱼类 SL 所特有的^[53]。鱼类 SLcDNA 如表 3。

表 3 鱼类 SL cDNA
Table 3 Reported fish SL cDNAs

种 Species	开读框 Open reading frame (bp)	5'-非翻译区 5'-Untranslated region (bp)	3'-非翻译区 3'-Untranslated region (bp)	信号肽 Signal peptide (aa)	成熟 SL Mature SL (aa)	研究者 Researcher
大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus keta</i>	699	11	1608	24	209	Takayama 1991
大西洋鳕 <i>Gadus morhua</i>	705	252	136	26	209	Takayama 1991
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	693			24	207	Takayama, 1991

4. 垂体专一性转录因子 Pit-1/GHF-1 cDNA

Pit-1/GHF-1 是 POU 家族(Pit-1、Oct-1、Oct-2 和 unc-86 产物序列相似性结构域)中的一个转录因子,与分泌 GH、PRL、促甲状腺激素的细胞发育有牵连。

大麻哈鱼 Pit-1cDNA 克隆 9 和 11 不含 poly(A)区的插入片段,分别长 1691bp 和 2733bp。最长的开读框(核苷酸 223—1317)含 365 个密码子。大麻哈鱼 Pit-1 cDNA3' 端与 4 个多聚腺苷酸化信号相对应,因此必定有几种具不同多聚腺苷酸化位点的 Pit-1 mRNA 在垂体中表达。大麻哈鱼 Pit-1 蛋白在其氨基酸序列的第 47—第 72 位(26 个氨基酸)、第 97—第 129 位(33 个氨基酸)和第 144—第 150 位(7 个氨基酸)比大鼠 Pit-1 蛋白多 3 个区域。鱼类 Pit-1 除有与哺乳类 Pit-1 共同的功能外,还决定 SL 基因的垂体专一性表达等^[48]。虹鳟 Pit-1 cDNA 与大麻哈鱼 Pit-1 cDNA 相差 11 个点突变,虹鳟 Pit-1 蛋白比大麻哈鱼 Pit-1 蛋白少 7 个氨基酸。

5. 促性腺激素基因

真骨鱼类促性腺激素(GTH)对配子发生和类固醇生成起重要作用。GTH-1 控制精子发生和卵黄生成,GTH-Ⅱ则调节排卵和放精。每一种都由两个不全同的亚基, α 亚基和 β 亚基构成。

大麻哈鱼 GTH Ⅱ β 基因,转录单位 1kb,含有 3 个外显子和 2 个内含子,转录起点离 Goldberg-Hogness 序列 TATAA 下游 30 个核苷酸,在转录起点上游 210bp 和 400bp 之间有几条 CAAT 序列。鲤 GTH- β 基因,转录单位 1.2kb,含有 3 个外显子和 2 个内含子。TATAA 盒离转录起点上游 21bp,3 个多聚腺苷酸化信号 AATAAA 分别离转译终止密码子下游 111bp,430bp 和 442bp。鲤有两个 GTH α 基因。两个基因都由 4 个外显子和 3 个内含子组成。鲤 GTH α 基因仅跨越一个 1.2kb 的区域。大麻哈鱼 GTHⅠ α 、GTHⅠ β 和 GTH Ⅱ β cDNA 分别编码 114、137 和 142 个氨基酸的多肽,包括 22、24 和 23 个氨基酸的信号肽。鲤 GTH Ⅱ α cDNA3'-非翻译区中 AT 重复序列很长。鲤 GTH- α 有两个潜在糖基化位点

(Asn⁵⁸、Asn⁶¹), 鲤 GTH- β 只有一个潜在糖基化位点(Asn¹⁰)^[18]。

表 4 鲤 GTH I α 、GTH II α 和 GTH β cDNA^[38]
Table 4 GTH I α 、GTH II α and GTH β cDNAs from common carp

	开读框 Open reading frame (bp)	5'-非转译区 5'-Untranslated region (bp)	3'-非转译区 3'-Untranslated region (bp)	前导肽 Leader peptide (aa)	成熟蛋白 Mature protein (aa)
GTH I α	354	36	403	23	95
GTH II α	354	30	430	23	95
GTH β	432	20	457	27	117

6. 促性腺激素释放激素基因

促性腺激素释放激素(GnRH)调节促性腺激素的生成和分泌。目前正在研究采用分子方法控制 GnRH 调节性成熟的可能性。

鲤 GnRH 信号肽编码序列、GnRH 编码序列及 GnRH 关联肽的 N-端密码子共长 7600bp^[38]。业已描述鳟(*Salmo trutta*)、虹鳟、大鳞大麻哈鱼和溪红点鲑(*Salvelinus fontinalis*)GnRH 基因的一个 1kb 区域。大西洋鲑科鱼类和太平洋鲑科鱼类间前促性腺激素释放激素原基因有 6% 的序列歧异性。

7. 卵母细胞生长和成熟的基因调控网络

17 β -雌二醇是卵母细胞生长的主要介体,17 α 、20 β -二羟-4-孕烯-3-酮(17 α 、20 β -DP)是诱导卵母细胞成熟的激素。在类固醇生成途径中,17 β -雌二醇在卵泡细胞中迅速转变为 17 α 、20 β -DP 刚好发生在卵母细胞成熟之前。这一转变是生长中的卵母细胞进入成熟相的必要步骤,需要一个复杂的、综合性的、涉及细胞专一性、激素调节和发育定型的基因调控网络。

现已分离和描述虹鳟和青鳉(*Oryzias latipes*)卵巢中负责 17 β -雌二醇和 17 α 、20 β -DP 生物合成的几种酶的 cDNA。这些酶是胆固醇侧链裂解细胞色素 P450(P450_{scc})、3 β -羟类固醇脱氢酶(3 β -HSD)、17 α -羟化酶/C17、20-裂解酶细胞色素 P450(P450 c17)和 P450 芳香化酶(P450_{arom})。虹鳟 P450 c17 cDNA 含有具 1542 个核苷酸的开读框,编码的蛋白质具 514 个氨基酸残基^[46]。青鳉 P450_{arom} 基因含有 9 个外显子,5' 区段无典型的环腺苷酸应答元件,在启动子 I 的 5' 上游有两条 ad4 共有序列。

在成熟诱导激素的影响下,卵母细胞的成熟最终由成熟促进因子(MPF)触发。MPF 由裂殖酵母 cdc2⁺ 基因产物的对应物 p34^{cdc2} 和 cyclinB 构成。业已从鲫(*Carassius auratus*)成熟卵母细胞构建的 cDNA 文库中分离两种具 95% 同源性的 cyclinB 克隆^[47]。鱼类 MPF 激活的机理是:17 α 、20 β -DP 诱导卵母细胞合成 cyclinB, cyclinB 又通过其苏氨酸(可能是 Thr¹⁶¹)磷酸化激活先在的 35 千道尔顿的 cdc2,产生具有活性的 34 千道尔顿的 cdc2。鲫 cdc2 的同源变体 cdk2 的核苷酸序列也已被测定。cdk2 与一种既非 cyclinA 也非 cyclinB 的蛋白形成复合体。

8. 促肾上腺皮质激素释放因子基因

促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)是控制促肾上腺皮质激素分泌的下丘脑激素。

白亚口鱼(*Catostomus commersoni*)基因组有两个不同的 CRF 基因,编码两种独立的 162 个氨基酸的前体。两种前体都由信号序列、隐蔽肽(cryptic peptide)和激素部分组成。两

种 41 个氨基酸的 CRF 肽的差异在于氨基酸第 28 位的 1 个 Ala-Val 替换。CRF 转录本主要存在于视前核中^[45]。

9. 加压催产素基因和硬骨鱼催产素基因

鱼类加压催产素(VT)和硬骨鱼催产素(IT)可能对盐和水的代谢起作用,其生理作用待确定^[29]。

大麻哈鱼预测的 VT-I 和 VT-II 分别由 153 和 158 个氨基酸组成,有 35% 的氨基酸序列歧异性,其中一半是同功能替换。马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus masou*)VT 和 IT 的前体推导的氨基酸序列与大麻哈鱼 VT 和 IT 前体序列高度同源。红大麻哈鱼 IT-I cDNA 全长 721bp,编码的蛋白质含 157 个氨基酸。白亚口鱼 IT 前体 cDNA 691bp,开读框 462bp,编码的蛋白质 154 个氨基酸。白亚口鱼 VT 前体 cDNA 553bp,编码的蛋白质含 152 个氨基酸。上述鱼类 VT、IT 的前体都由信号肽、激素部分和后叶激素运载蛋白组成。激素部分和后叶激素运载蛋白之间由 Gly-Lys-Arg 序列连接。鱼类 VT、IT 的后叶激素运载蛋白 C-端,比哺乳类催产素(OT)和两栖类催产素(MT)后叶激素运载蛋白长 30 个氨基酸,包括一条富亮氨酸核心区段。

10. 胰岛素基因

胰岛素是一种对代谢具有广泛影响范围的合成代谢激素,刺激细胞的生长和增殖;胰岛素样生长因子 I (IGF-I) 在发育和分化中起主要作用,其功能包括刺激 DNA 合成和细胞增殖;IGF-II 主要是胎儿生长因子。

大麻哈鱼基因组含有两个非等位的胰岛素基因^[36]。大麻哈鱼第二个非等位的胰岛素基因的结构特征,与其第二类型的前胰岛素原 cDNA 的相同。大麻哈鱼 IGF-I 基因长度不到 2.0kb,IGF-I 成熟肽由 70 个氨基酸组成。在大麻哈鱼 IGF-I 基因中存在一个类似于啮齿类 IGF-I 基因“盒”式外显子 5 的附加外显子。该外显子交替拼接到外显子 3 和 4 上,可使 E-肽序列更加多样化。虹鳟 IGF-I cDNA 与银大麻哈鱼 IGF-I cDNA 有 98.7% 的核苷酸序列同源性,98.3% 氨基酸预测序列同源性。虹鳟 IGF-II cDNA 在核苷酸和预测氨基酸水平上与虹鳟 IGF-I cDNA 分别具有 46.1% 和 43.3% 的同源性^[51]。

(二) 抗冻蛋白基因

极区海水真骨鱼类产生抗冻蛋白(AFP),以免在零下温度体内结冰。抗冻蛋白包括抗冻多肽(AFP)和抗冻糖肽(AFGP)。不论是 AFP 还是 AFGP,对冰点的抑制效率比肌红蛋白大 200-300 倍。有 3 种 AFP:AFP I、AFP II 和 AFP III。美洲黄盖鲽(*Pseudopleuronectes americanus*)和短角床杜父鱼(*Short-horn sculpin Myoxocephalus scorpius*)产生 AFP I,美洲绒杜父鱼(*Hemitripterus americanus*)产生 AFP II,美洲大绵鲈(*Macrozoarces americanus*)产生 AFP III。南极鳕(*Antarctic cod Notothenia coriiceps neglecta*)等南极科鱼类和鳕科鱼类产生 AFGP。AFP 在血清中的浓度,冬季达 10-25mg/ml,AFGP 则终年恒定在 35mg/ml。AFP I 系 α -螺旋、富丙氨酸肽;AFP II 系 β -结构、富半胱氨酸肽;AFP III 在其氨基酸组成上无偏倚,或无确定的二极结构。AFGP 由许多重复的糖三肽单元,Ala-Ala-Thr 组成,二糖,半乳糖-N-乙酰半乳糖胺附着在苏氨酸残基上^[34]。

美洲黄盖鲽 AFP 是一条 11 个氨基酸串联重复 3 次的 α -螺旋序列。螺旋结构的偶极矩决定了抗冻多肽与冰核的 C-轴优先排列成直线,其亲水侧链与冰的晶格由氢键连接时,成簇的疏水侧链阻止了冰核的进一步生长,侧链扭转自由,有利于氢键对冰表面的连接^[56]。

美洲黄盖鲽 AFP 基因长 1kb,间插序列 600bp,所编码的前抗冻蛋白原有 82 个氨基酸

残基^[22]。美洲黄盖鲷基因组含有 30-40 拷贝 AFP 基因。其中绝大多数存在于多个 2.7 至 3.2 kbp 的 Sst I 片段中。这些 Sst I 片段的大多数又存在于多个 7.8 kbp 的 BamH I 片段中。BamH I 片段又被包含在 40-60 kbp 的 EcoR I 片段中。锈泥鳅(*Limanda ferruginea*)AFP 比美洲黄盖鲷多一条 11 个氨基酸的序列,但由于少 1 个冰接触点,前者的活性仅为后者的 80%。锈泥鳅基因组含有一组 10-12 拷贝连锁但间隔不规则的 AFP 基因。狼鲈(*Anarhichas lupus*)基因组含有 80-85 拷贝 AFP 基因,其中 1/3 连锁但间隔不规则,其余 2/3 形成 8 kbp 串联直接重复序列。每一条重复序列含有两拷贝方向相反的有功能基因。美洲大鲈 AFP cDNA 核苷酸序列长 491 bp,为一种 87 个氨基酸残基的蛋白质前体编码。5'-非转译区 57 bp,含有一段 31 bp 的 AT 残基。3'-非转译区 170 bp。编码区有一个碱基改变。在碱基第 145 位的改变是一个沉默的突变。美洲大鲈基因组有 150 拷贝长 0.7 kbp 的 AFP 基因,其中大多数紧密连锁但间隔不规则。基因数量与抗冻水平密切相关。目前转基因鱼研究中,用美洲大鲈 AFP 基因启动子构建全鱼基因工程鱼取得了很好的效果。但是抗冻蛋白不可能将耐寒性给予暖水性鱼类^[41]。

南极鳕 AFGP 基因序列,从核苷酸第 112 位起直至终止密码子。有 46 条串联排列的直接重复序列。头 43 条重复序列,每条长 51 个核苷酸,接着 2 条重复序列,每条 60 个核苷酸,最后一条 42 个核苷酸。51 个核苷酸和 42 个核苷酸的重复序列(总共 44 条)为最小的 AFGP,即 AFGP8 编码。两条 60 个核苷酸的重复序列为两拷贝的 AFGP7 编码。AFGP7 比 AFGP8 多 3 个残基。间隔段中 3 个氨基酸的至少两个可能充当糜蛋白酶样蛋白酶的底物。仅一个 AFGP8 多聚蛋白基因就相当于 46 个单拷贝基因^[34]。

分布在我国黄海沿岸的黄盖鲷(*Pseudopleuronectes yokohamae*)AFP cDNA 已被克隆,并在大肠杆菌中得到了表达^[4]。

(三)免疫球蛋白基因

免疫球蛋白(Ig)是一类抗体。每个 Ig 由两条轻链(L)和两条重链(H)组成。每条链都具有独特的氨基酸序列,在氨基末端约 100 个氨基酸内为可变(V)区,轻链的另一半和重链的四分之三为恒定(C)区。

斑鲷 IgM 重链 C 区基因含有编码以免疫球蛋白分泌形式表达的恒定区结构域的 4 个外显子(CH1 至 CH4)和编码以淋巴细胞膜免疫球蛋白受体形式被利用的跨膜(TM)结构域的 2 个外显子。TM1 外显子与 CH3 外显子拼接位点 3' 直接相连,而不是接入 CH4 外显子 3' 端附近的内拼接位点。斑鲷没有脊椎动物 CH4 的典型的共有 5' 拼接位点,跨越 μ m3' 端的 cDNA 序列正好适合 CH3 至 TM1 的拼接类型。斑鲷 μ m 实际上是仅由外显子 CH1-CH2-CH3-TM1-TM2 编码。斑鲷 B-淋巴细胞膜受体 μ m 链 CH4 结构域的丢失,未严重损害其作为抗原受体的效力^[55]。鲷 VH 基因显示 VH 基因调控和结构的主要特征:连接多样区的 VH5'-启动子区、分裂的疏水前导序列、3 个框架区和 2 个互补性决定区及 3'-重组信号。铅灰真鲨(*Carcharhinus plumbeus*)Ig 轻链属 λ 链,其 cDNA 全核苷酸序列长 966 bp。铅灰真鲨与东太虎鲨(*Heterodontus francisci*)在 V 区只有 36% 的同源性,在 C 区只有 42% 的同源性。这两种鱼是远缘关系^[31]。

(四)珠蛋白基因

鲤鱼呼吸能力强,从低氧的环境水中也能摄取氧。为构建耐低氧转基因虹鳟,从鲤鱼染色体 DNA 基因文库中分离了 7 类 α -珠蛋白(CaG)基因,测得第 3、6 和 7 号 CaG 基因的外显子 1、2 和 3 的编码区分别为 95 bp、208 bp 和 129 bp。第 3 号 CaG 基因的第 1、2 个内含子分

别为 159bp 和 96bp,第 6 号的分别长 179bp 和 99bp,第 7 号的长 159bp 和 92bp^[44]。在 5'-和 3'-非转译区有与表达信号的共有序列同源的序列。

(五)肌动蛋白基因

为构建全鱼基因工程鱼,使鱼类基因转移育种研究实用化,克隆了鲤和草鱼 β -肌动蛋白基因。

鲤 β -肌动蛋白基因在发育动物中的表达至少受 5 个元件的影响,业已鉴定 4 个影响表达的区段。鲤 β -肌动蛋白基因近端启动子,与劳斯肉瘤病毒-氯霉素乙酰转移酶(RSV-CAT)结构物等效。近端启动子内的 CArG 盒(血清应答元件)同第一内含子中的另一个 CArG 盒一起,是在转基因胚胎中给予充分表达所必需的。在发育动物中,删除近端的 CArG 基序,氯霉素乙酰转移酶(cat)基因降低活性 4 倍,改变 CAAT 盒和 TATA 盒间的间隔 4bp,继续降低表达又 10 倍^[40]。草鱼 β -肌动蛋白基因核苷酸序列与鲤鱼的极为相似。近端启动子元件位于核苷酸第 121—第 188 位,外显子起始于第 211 位,终止于在第 3323 位的蛋白质终止位点。在第 3860 和第 3950 位有两个 poly(A)位点。

(六)癌基因及肿瘤抑制基因

禽髓细胞瘤病毒(MC29)是一种复制缺陷性逆转录病毒,能引起多种恶性病,包括髓细胞瘤、肾瘤、肝瘤、癌、肉瘤及成红细胞增多症,负责该病毒致癌转化活性的基因元件,是约 1568bp 的 v-myc 基因。

虹鳟 c-myc 基因有两个外显子,外显子 I 664bp,外显子 II 578bp,未检出外显子 I。虹鳟 c-myc 基因具有转录活性,虹鳟与人 c-myc 原癌基因比较揭示,整个基因、外显子 I、II、A 盒和 B 盒在核苷酸水平上的同源性分别为 60%、55%、66%、77%和 83%^[54]。

p53 基因是肿瘤抑制基因,它的失活能导致细胞转化或瘤的形成。

虹鳟 p53cDNA 插入片段所含的单开读框编码的蛋白质长 396 个氨基酸,虹鳟 p53 蛋白与人和爪蟾 p53 蛋白有 47%的同源性,能与猿猴病毒 40(SV40)大 T 抗原体外结合。p53 蛋白结构域 I—V 保守,对人癌突变敏感。脊椎动物正常细胞含有与 p53 蛋白相互作用并调节其功能的 T 抗原等效蛋白。仅脊椎动物有 p53 基因^[15]。

(七)卵黄蛋白原基因

卵黄蛋白原(VG)是卵生脊椎动物卵黄主要蛋白质的前体。鱼类 VG 通常在卵子发生的成熟分裂期合成。鱼类卵黄形成是决定生殖周期成功的主要代谢过程。

虹鳟 VG 是一种分子量为 160 千道尔顿的多肽,其成熟形式分子量为 170 千道尔顿。虹鳟 VG 的卵黄高磷蛋白部分一个区段的编码序列业已被鉴定。该序列长 1475bp,编码 450 个氨基酸,3'-非转译区长 125bp^[39]。奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)VGmRNA 含 6500 个核苷酸。该种鱼含至少两组 VG 基因,具有 180 和 130 千道尔顿的两组 VG 单体。高首鲟(*Acipenser transmontanus*)的 180 和 120 千道尔顿的两种 VG,均由 5.7kb 的 mRNA 编码。业已克隆高首鲟 VGcDNA。鲟鱼卵黄形成的研究有利于养殖条件下的鲟鱼人工繁殖。

(八)鱼精蛋白基因

鱼精蛋白是一组代替体细胞组蛋白、强固成熟精子中的 DNA 的强碱性、低分子量的简单蛋白质。

虹鳟鱼精蛋白可分为 3 类,其中一类的 6 个基因已被克隆,并测定了核苷酸序列。虹鳟鱼精蛋白 C II 基因没有内含子,也不紧密成簇^[52],这一类的其他 5 个不同的基因,也不成簇且也没有内含子^[11],大麻哈鱼鱼精蛋白基因,在上游区有两个不同的重复元件。第一个重复

元件,在第 95—第 623 位之间,可能是 Alu-类反转座子。另一重复元件位于第 1706—第 1859 位,分别在其 5' 和 3' 端有三核苷酸 TGT 及其补体 ACA。同样的五核苷酸 CAGAT,在大麻哈鱼和虹鳟鱼精蛋白这一重复 DNA 家族的表示式各端重复。

(九)晶体蛋白基因

晶体蛋白占眼晶体可溶蛋白的 90% 以上。在免疫学中,晶体蛋白分为 α 、 β 、 γ 和 δ 4 大类。 δ -晶体蛋白仅限于鸟类和爬行类。 γ -晶体蛋白与内障发生有关^[15]。

β s-晶体蛋白是与 γ -晶体蛋白密切相关的单体变种。鲤 β s-晶体蛋白 cDNA 长 700bp,编码的多肽具 174 个氨基酸,鲤 γ -晶体蛋白基因家族有 3 个成员: γ ml、 γ m2 和 γ m3。其 cDNA 分别为 627bp、550bp 和 1067bp。3 种晶体蛋白分别含有 12.4%、14% 和 8.4% 的甲硫氨酸。甲硫氨酸含量高,对鱼类 γ -晶体蛋白的稳定性具有重要意义。 γ ml 晶体蛋白基因在 5' 翼区有一个 TATA 盒,而 γ m3 基因有 TATA 盒的两个串联重复序列。‘双’TATA 盒的存在十分罕见^[16]。

(十)金属硫蛋白基因

金属硫蛋白(MT)是在真核生物中普遍存在的一个低分子量、富半胱氨酸的金属结合蛋白家族。MT 在微量元素代谢的调节中,且可能在有毒金属如镉的解毒中起中心作用。鱼类易于受到镉和铜的毒性影响。MT 作为解毒剂的作用值得研究。

虹鳟有两种 MT:tMT-A 和 tMT-B。其 cDNA 全长分别为 368bp 和 366bp^[14]。两个 5' 区段间的同源性为 60%,编码区的核苷酸同源性为 92%,两个 3' 非编码区 80% 同源。tMT-A 基因长 1094bp,tMT-B 基因 1127bp^[32]。两个启动子的特点在于皆有二个金属应答元件(MRE)^[32,33]。二个 MRE、TATAAA 盒、转录起点和 ATG 起始密码子在二个启动子中的排列相似^[32]。此外,还克隆了美洲黄盖鲿、鲮(*Pleuronectes platessa*)、条鳅(*Nemachilus barbatulus*)和白斑狗鱼的 MTcDNA,并进行了序列分析和比较。

(十一)胚胎发育基因调控网络

同源盒蛋白是胚胎发育期间决定细胞谱系和体型形成的一类重要的转录因子。同源盒基因调节早期胚胎发育。有两类同源盒序列,触角足类(Antennapedia class)和锯齿状类(Engrailed-class)。

鲢触角足类同源盒基因 pS12-A 和 pS12-B,位于同一个克隆,相距 7.5kb,朝着同一个方向。在 DNA 和蛋白质水平上,两盒相互间有 80% 的同源性,而与触角足类另一同源盒基因 pS6 仅有 60% 的同源性。pS6 转录本 5.2kb,在鲢 1 周龄胚胎中表达。pS12-B 转录本 1.7 kb,仅在 3 和 5 周龄胚胎中检测到,且丰度低得多,pS12-A 基因表达水平极低,或在 5 周龄以后发育阶段表达。

斑马鱼(*Brachydanio rerio*)两个锯齿状同源盒基因之一,是小鼠 En-2 基因的直接对应物。斑马鱼和鲢触角足类蛋白质 8 个不同的同源结构域的序列与果蝇(*Drosophila melanogaster*)相应序列仅在第 4、7 和 41 位的 3 个位置上有氨基酸序列差异。果蝇和鱼类的同源结构域(第 30—第 51 位)最保守区段,部分在 DNA 大沟中的第二螺旋之内。第三螺旋在该同源结构域的第一部分之中。该区段是含同源结构域蛋白的相互作用位点^[26]。斑马鱼 ZF-114 基因具有与触角足类相关的同源盒。在体节形成早期(16 小时阶段),大多数体节业已形成、中枢神经系统和肌肉组织相当分化(29 小时阶段)及此后的发育阶段都检测到了 ZF-114 转录本。

斑马鱼 POU-结构域 cDNA(ZFPOU2)长 3.0kb。其编码的蛋白质具 472 个氨基酸,在

C-端附近含有POU结构域。该基因的表达可在1细胞期观测到。*t-ZFPOU2*是*ZFPOU2*的交替拼接产物。*ZFPOU-2*蛋白和*t-ZFPOU2*蛋白,与斑马鱼胚胎早期发育,如囊胚期未定态囊胚细胞的增殖和/或原肠胚期细胞定型的早期事件有关。

LIM结构域系指3种结构相似的同源盒蛋白:Lin-11、Isl-1和Mec-3。Isl-1含有两拷贝的N-端指状Cys-His基序、1个中心同源结构域和1个C-端富谷氨酰胺区域。鲑基因组含有2-4拷贝Isl-1基因,其转录本仅在仔鱼孵出之前、形态业已形成之时才能检出。Isl-1具有决定和维持垂体、胰、脑、脾、肝、心脏和肾等组织细胞,尤其是神经内分泌细胞的类型的作用。斑马鱼Isl-1基因仅在胚胎脊椎大多数节段3个初级运动神经元的最前面的一个中表达。

鱼类胚胎发育过程中存在多个发育调控网络。这些网络的最基本的分子结构和调控规律有待进一步研究。

(十二)线粒体DNA

脊椎动物线粒体基因组,在一个16.5kb至17.5kb的闭环分子中编码22种tRNA,13种mRNA和2种rRNA。仅有一个真正的非编码区-替位环区(D-环区),即控制区。

虹鳟线粒体DNA(mtDNA)控制区的总体结构为tRNA^{Thr}基因-tRNA^{Phe}基因-控制区-tRNA^{Phe}基因。虹鳟控制区右结构域有保守序列块CSB-2和CSB-3,无可识别的CSB-1;左结构域有4个TAS(终止关联核苷酸序列)元件;在右结构域,在CSB-3和tRNA^{Phe}基因之间有一条68/73bp的具77%位置同一性的不完全直接重复序列;控制区开读框仅含102个密码子;中心结构域有一个26核苷酸的多聚嘧啶块,是与线粒体单链DNA结合蛋白相互作用的位点^[24]。虹鳟tRNA基因序列显示明显的G+C偏向,tRNA^{Phe}基因序列有14个转换,仅1个颠换。

高首鲟和大西洋鳕的不完全直接重复序列在左结构域,大西洋鳕的多聚嘧啶块为17核苷酸。虹鳟、大西洋鳕和高首鲟mtDNA控制区开读框大小相当,但位置不同,也不同源。高首鲟tRNA^{Phe}基因内(靠近其5'端)有1个TAS元件。

虹鳟、大西洋鳕和高首鲟mtDNA控制区核苷酸序列长分别为1003bp、997bp和978bp^[24]。

草鱼和鲤mtDNA细胞色素氧化酶亚基I(CO I)基因已被克隆^[6]。鲤CO I基因序列全长1545bp,没有内含子。鲤CO I亚基全长515个氨基酸。鲤线粒体tRNA^{Gln}基因由65个核苷酸组成,鲤轻链复制起始区序列36个碱基,呈茎环结构。

URFA6L具有结合磷酸的活性,与线粒体内膜上ATP合成酶F₀的组装有关。鲤线粒体URFA6L基因编码序列长165个核苷酸,其上游的tRNA^{Gln}基因D-环丢失了5个以上的碱基,T-环碱基数目正常。鲤线粒体tRNA同线粒体核糖体具有不寻常的作用方式^[7]。

国内对鱼类mtDNA核苷酸长度作了很多测定工作^[8]。鲤mtDNA大小为16.4kb;草鱼16.3kb;乌鳢(*Ophiocephalus argus*)17.2kb;鲫15.54±0.14kb;方正银鲫(*Carassius auratus gibelio*)15.99±0.09kb;鲢16.82±0.09kb;鳙16.44kb;团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)16.6kb;长吻鮠(*Leiocassis longirostris*)16.69kb;鲇(*Silurus asotus*)17.54kb;胡子鲇(*Clarias fuscus*)16.68kb;黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*)16.42kb;鳊16.44kb;黄鳝(*Monopterus albus*)16.27kb。

mtDNA序列分析已应用于不同种的鱼类及同一种鱼不同种群之间的比较。现已比较6种鲢科鱼类克隆mtDNA的2214bp的序列,包括腺苷三磷酸酶亚单位6,细胞色素氧化酶

亚单位 3、NADH 脱氢酶亚单位 3、NADH 脱氢酶亚单位 4L、tRNA^{Gly}和 tRNA^{Arg}的基因。在蛋白质编码基因的 338 个沉默位置和 23 个非沉默位置及两个 tRNA 基因序列的 10 个位置上发现了变异,还检测到 1 个仅 3bp 的长度差异。mtDNA 序列分析揭示了维多利亚湖丽鱼科鱼类起源的单源性,确定了狭鳕(明太鱼)(*Theragra chalcogramma*)东白令海 Donut 洞、博戈斯洛夫岛和埃达克岛及阿拉斯加湾舍利科夫海峡种群间的遗传关系。对黑线鳕(*Melanogrammus aeglefinus*)西北大西洋种群 mtDNA 分化的研究表明,种群间的基因流动是受限制的,仅存在分隔的种群。mtDNA 序列分析表明,苏必利尔湖和密执安州及纽约州 7 个内陆湖的湖白鲑(*Coregonus artedii*)及 *C. hoyi* 之间存在着线粒体 DNA 多样性,从而阐明了长期困扰鱼类分类学家和渔业生物学家仅根据形态鉴定白鲑亚物种和确定种群的疑难问题。mtDNA 序列分析还揭示了鲑、鳟、虹鳟和溪红点鲑的澳大利亚塔斯马尼亚种群 mtDNA 的多样性。

聚合酶链反应在鱼类基因分子生物学上的应用

聚合酶链反应(PCR)是近年提出的体外基因扩增技术,通过使用一对寡聚核苷酸引物,在耐热 *Taq* DNA 聚合酶的作用下,成百万倍地扩增靶序列的特异性片段,该技术操作简便、快速,已成为鱼类基因分子生物学研究的重要手段。

尼罗罗非鱼、鲢、金头鲷、斑鲷的 GH cDNA、斑鲷 PRL cDNA、鲤珠蛋白 cDNA、白亚口鱼 VT、IT、红大麻哈鱼 IT-1 cDNA 以及虹鳟 IGF-1 cDNA 的分子克隆都采用了 PCR 技术。在虹鳟 MT-A、MT-B 基因的分离和序列测定中也采用了 PCR 技术^[32,33]。用逆转录酶-PCR 法,继之以囊胚 cDNA 文库的筛选,分离了斑马鱼 POU-结构域 cDNA(*ZFPOU2*)。PCR 可以克隆一般大小的目的基因。应用 PCR 技术改造鲑鱼 GH cDNA,成功地扩增出编码鲑鱼 GH 成熟肽的序列^[5]。用 PCR 检测到了外源基因在转基因鱼中的存在^[25],还用反向 PCR 检测到了 *Isl-1* mRNA 在胚胎发育晚期的表达。

使用根据氨基酸共有序列设计的简并引物,还可用 PCR 制作多基因家族基因的基因组探针。现已用 PCR 制作红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)肌动蛋白基因、同源结构域蛋白基因、酪氨酸激酶基因、磷酸酶基因及多巴胺受体基因等的基因组探针,以研究这些基因在人体中的功能。

PCR 已应用于鱼类种群结构的遗传分析。PCR 和直接序列分析测定鲑线粒体细胞色素 b 基因一个 295 核苷酸区段的遗传变异量表明,有 3 种在一、二个核苷酸位置上互不相同的基因型,鲑的种内变异水平极低,鳟与鲑在该区段有 16 个核苷酸不同,但两种鱼的氨基酸序列相同^[43]。PCR 产物的限制酶分析检测了不同水系大鳞大麻哈鱼和大麻哈鱼 mtDNA 的种内变异。用 PCR 扩增了大麻哈鱼 mtDNA 分子的 NADH 脱氢酶-1(ND-1)、ND-5/6 和 ND-3/4 3 个区段及大鳞大麻哈鱼 ND-1、ND-5/6 和 D-环区 3 个区段,然后用至少 19 种限制酶消化。单倍型间的种内序列歧异性小于每个核苷酸 0.01 碱基替换。该技术在种群鉴定中是有效的,但用于种群鉴定的 mtDNA 定量分析需要增加样本量。PCR 对 6 种鲑科鱼类线粒体基因组几个基因序列分析提供的分辨率足以确定种间或隔离种群间的遗传关系^[13]。

转 基 因 鱼

采用重组 DNA 技术,进行显微注射,制作转基因鱼,获得了相当大的成功、率先在世界

上获得转基因鱼的是我国学者朱作言^[20,60]。随后法国、日本、英国、美国、加拿大、德国、爱尔兰、以色列、挪威、印度、印度尼西亚、匈牙利、马来西亚、泰国和前苏联相继开展这一方面的研究。目前转基因鱼研究主要旨在提高鱼的生长性能、抗冻能力和耐低氧水平,也做过色素基因、 δ -晶体蛋白基因、萤火虫荧光素酶基因、 β -半乳糖苷酶基因、卵黄蛋白原基因、氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因和新霉素抗性基因转移的基础性研究,涉及的鱼类包括鲤科、鲢科、鳙科、胡鲇科、鲴科、丽鱼科、鳅科、狗鱼科、鲈科、箭鱼科和梭鲈及斑马鱼等。

转生长激素(GH)基因鱼的构建,经历了一个由非全鱼基因工程鱼到全鱼基因工程鱼的过程,最初注射的外源 GH 基因是人 GH 基因,后来是大鼠 GH 基因,近来普遍注射鲑科鱼类 GHcDNA,使用的启动子最初是小鼠 MT、后来是 SV40、RSV-LTR,近来用美洲大绵鳬 AFP 基因启动子^[25]或野鲤 MT 启动子^[22],从而实现了全鱼基因工程鱼的构建。鲤 β -肌动蛋白基因启动子和大鳞大麻哈鱼 GH 基因 poly-A 信号和细菌 CAT 编码序列组成的 DNA 序列也已显微注射入尼罗罗非鱼。

线性化质粒的转化率高于环状质粒,因而普遍注射线性 DNA,注射的基因剂量一般为 10^6 拷贝,实际上各实验室使用的剂量为 10^5 — 10^9 拷贝。在转抗冻蛋白金鱼制作中,甚至达到 1×10^{10} 拷贝。外源基因的整合率与基因剂量有相关关系。DNA 浓度与转基因频率间的相关系数为 0.998($P < 0.01$)。但是存活率随 DNA 浓度增高而下降。使用 NT 缓冲液(88mM NaCl、10mM Tris-HCl, pH7.5)而不使用 TE 缓冲液(10mM Tris-HCl, pH7.5, 0.125mM EDTA)能提高存活率^[49]。

卵壳处理或用二步法或通过受精孔注射,或直接用针刺穿卵壳和质膜,或用镊子剥膜,或用 0.25% 胰蛋白酶消化。在鲑科鱼类转基因鱼研究中,还用 Ringer 氏溶液或谷胱甘肽溶液(pH8.0)处理受精卵,防止卵壳硬化。

外源基因的注射部位是受精卵动物极处的细胞质^[3]。理论上,1 细胞期为最佳注射时间。研究表明,斑鲷在 1 细胞后期、鲤在 2 细胞期注射,外源 DNA 整合率最高。为最有效和最大量制作转基因个体,斑鲷应在 1 细胞后期,鲤应在 2 细胞期注射^[28]。

外源 DNA 注射后,转化成高分子量形式,并在原肠胚形成前的早期胚胎初始快速分裂期间扩增。在斑马鱼中扩增 10 倍,在鲤、鲫、泥鳅中扩增 10^3 倍^[3],在青鳉中扩增 10^2 — 10^3 倍。外源 DNA 被核酸内切酶降解的部分与扩增的拷贝数相比微不足道。外源 DNA 经过重组后才整合入宿主基因组。每个基因组整合 1 至数个外源 DNA 分子。在转珠蛋白(CaG)基因虹鳟子代中达 50 拷贝,在转 CAT 基因斑马鱼中达 100 拷贝。整合方式有二种:多位点单拷贝整合和不同位点的头对尾、头对头和尾对尾排列整合^[57]。

外源 GH 基因对鱼类具有明显的促生长效应。2 年龄转人 GH 基因团头鲂比对照鱼增重 33.3%,2 年龄转人 GH 基因鲤增重 44.9%^[3]。125 日龄转人 GH 基因银鲫增重为 17.7%。1 年龄全鱼基因工程鲢增重 2—6 倍,最大 13 倍。全鱼基因工程鲢之所以有如此显著的生长优势是由于同源 GH 比异源 GH 能更好地被 GH 受体识别;AFP 启动子使转移基因在肝中优先表达,有利于 GH 基因与肝细胞膜上的 GH 受体的相互作用,诱导胰岛素样生长因子的表达,刺激外周组织的生长;鲑科鱼类比暖水养殖鱼类对 GH 更敏感^[25]。

有证据表明外源基因的遗传符合孟德尔定律。子一代转基因鲤增重 20—60%,全鱼基因工程鲢子一代平均增重 5.2 倍。但由于在总基因型、外插入位点、外源基因拷贝数和表达水平上的差异,转基因鱼子代的转基因频率,往往低于 50% 或 75% 的期望值,生长实验中出现负增长。

目前,在大多数情况下,外源基因尚未稳定地传递至子二代,快速生长的转基因商品鱼品系仍处于研制阶段。要解决这一问题需要在下列 6 个方面有重大突破:

1. 建立高效的批量基因转移技术;
2. 建立转基因鱼的快速鉴定程序;
3. 建立将外源基因定点整合入鱼类基因组的方法;
4. 确定驱动外源基因表达的合适启动子;
5. 确定能使转基因个体生产性能达到最大值的生理、营养、免疫及环境因子;
6. 评定转基因鱼的安全及环境影响^[20]。

转 AFP 基因鲑虽已获得子二代,但表达的 AFP 水平仅为 0.07 至 20ng/ml,为提供足够的抗冻保护所需含量的 1%。拟改用美洲大鲈 AFP 基因,或增加基因剂量。增加基因剂量的另一方法是使用南极鳕 AFGP 基因。亦拟增强启动子,或用蛋白质工程设计更具活性和更稳定的抗冻蛋白^[27]。

除显微注射法外,还用精子载体法、电穿孔法、脂质体融合法和高速钨微粒子轰击法进行了基因转移研究。

H. W. Khoo 用经环状或线性化质粒 pUSVCAT 温育的斑马鱼精子,使成熟的斑马鱼卵受精,在建立者代中分别获得 23.33% 和 37.5% 的转基因鱼,并获得了转基因鱼子一代和子二代。导入的外源基因似乎存在于染色体外,尚需探讨将导入的外源基因整合入鱼类基因组的方法^[37]。

谢岳峰以泥鳅脱膜受精卵为材料,电穿孔转移外源基因。获得了 10% 的转基因泥鳅^[9]。Powers 采用电穿孔法和显微注射法,将线性化 pRSVrtGH1 cDNA 或 pRSVrtGH2 cDNA 导入斑马鱼、斑鲷和鲤受精卵。两种方法获得的存活率相似。但电穿孔法产生的转基因鱼数量比显微法的多。Zhao 证明电穿孔导入的 GH 基因不仅被表达,影响表型,而且其性状也能遗传^[39]。Powers 采用电穿孔法获得的转基因斑马鱼和鲤的子一代约一半携带外源基因并表达其表型性状^[50]。电穿孔可能是处理大量配子的理想方法。

Zelenin 用含 β -半乳糖苷酶和新霉素磷酸转移酶基因序列的质粒 DNA 包裹钨微粒子,高速轰击欧洲泥鳅 (*Misgurnus fossilis*)、虹鳉和斑马鱼受精卵,70% 的卵受轰击后存活。PCR 扩增和 Southern 杂交在 G418 处理后存活的斑马鱼总 DNA 中检测到了新霉素磷酸转移酶基因序列^[58]。

尚无脂质体融合法转移基因成功的报道。

上述显微注射法、电穿孔法、精子载体法及高速钨微粒子轰击法中,无论哪一种都不能进行定点整合,而这正是外源基因不能稳定地遗传的原因。要解决上面提及的 6 个方面的重大突破,建立转基因商品鱼品系,需要至少 10 年的艰苦努力。然而,胚干细胞技术的建立及鱼类基因分子生物学取得的丰硕成果,为解决这些问题提供了钥匙。

结 束 语

随着鱼类基因分子生物学的不断发展,鱼类分子遗传研究的日益深入,鱼类胚干细胞技术的建立,转基因方法的日臻完善,以及愈来愈多有用基因和基因元件的分离,结合以核移植、雌核发育或雄核发育、多倍体诱导和性反转,鱼类将先于哺乳类和鸟类获得转基因技术的实际应用。水产养殖必定能为人类造福做出更大的贡献。由于鱼类生物技术有着巨大的

应用前景,有关部门应重视应用基础研究,在资金投入和人才方面制定相关政策,组织协作攻关,使我国这个最早获得转基因鱼的国家成为最早实现转基因鱼商品化的国家之一。

参 考 文 献

- [1] 朱作言等,1989. 转基因鱼模型的建立. 中国科学(B 辑),2:147-155.
- [2] 孙孝文、沈俊宝等,1993. 全鱼基因工程鱼的构建. 高技术通讯,9:23-26.
- [3] 吴婷婷、夏德全等,1994. 人生长激素基因在团头鲂和鲤中的整合和表达. 水产学报,18(4):284-289.
- [4] 蒋耀青等,1989. 黄盖鲂抗冻蛋白的分离与 cDNA 克隆. 遗传,6:33.
- [5] 宋诗铎等,1992. 应用聚合酶链反应改造鲑鱼生长激素 cDNA. 遗传,5:1-4.
- [6] 吴乃虎等,1991. 草鱼和鲤鱼线粒体 DNA 的分离纯化及其 Cyt b 基因的分子克隆. 动物学报,37(4):375-381.
- [7] 王钢锋等,1991. 鲤鱼线粒体 URFA6L 基因和 tRNA^{Leu} 基因的结构分析. 中国科学(B 辑),6:609-614.
- [8] 戴建华等,1994. 鲢鱼线粒体 DNA 的酶切图谱. 水产学报,18(4):312-320.
- [9] 谢岳峰等,1989. 泥鳅受精卵的电脉冲转移. 水生生物学报,13(4):387-389.
- [10] Agellon L. B. et al, 1988. Structure of a fish (rainbow trout) growth hormone gene and its evolutionary implication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5136-5140.
- [11] Aiken, J. M et al, 1983. Sequence homologies in the protamine gene family of rainbow trout. Nucleic Acids Res., 10: 7581-7592.
- [12] Ber, R. et al. 1992. Structure and sequence of the growth hormone-encoding gene from *Tilapia nilotica*. Gene, 113 (2): 245-250.
- [13] Bechenbach, A. T. et al, 1991. Rapid mtDNA sequence analysis of fish population using the polymerase chain reaction (PCR). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 48. suppl. 1: 95-98.
- [14] Bonham, K. et al, 1987. The rainbow trout metallothioneins: Molecular cloning and characterization of two distinct cDNA sequences. DNA, 6(6): 519-528.
- [15] Caron de Fromental, C. et al. 1992. Rainbow trout p53: cDNA cloning and biochemical characterization. Gene, 112 (2): 241-245.
- [16] Chang, T. et al, 1991. γ -Crystallin genes in carp: Cloning and characterization. Biochim. Biophys. Acta, 1090: 261-264.
- [17] Chang, Y. S. et al, 1992. The primary structure of growth hormones of three cyprinid species: Bighead carp, silver carp and grass carp. Gen. Comp. Endocrinol., 87: 385-393.
- [18] Chang, Y. S. et al, 1988. Primary structure of carp gonadotropin subunits deduced from cDNA nucleotide sequence. Int. J. Peptide Protein Res., 32: 556-564.
- [19] Chang, Y. S. et al. 1992. Molecular cloning of silver carp and bighead carp prolactin. Gen. Comp. Endocrinol., 87: 260-265.
- [20] Chen, T. T. et al, 1992. Integration, expression and inheritance of foreign fish growth hormone gene in transgenic fish. In: Transgenic Fish. Hew, C. L. and Fletcher, G. L. (eds.), pp. 164-175. Publ. by: World Scientific Singapore (Singapore).
- [21] Chiou Chien-shun et al, 1990. The complete nucleotide sequence of the growth hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*). Biochim. Biophys. Acta, 1087: 91-94.
- [22] Davies, P. L. et al, 1984. Antifreeze protein genes of the winter flounder. J. Biol. Chem., 259 (14): 9241-9247.
- [23] Devlin, R. H. et al. 1993. Sequence of sockeye salmon type 1 and 2 growth hormone genes and the relationship of rainbow trout with Atlantic and Pacific salmon. Can J. Fish. Aquat. Sci., 50: 1738-1748.
- [24] Digby, T. J. et al, 1992. Rainbow trout mitochondrial DNA sequence and structural characteristics of the non-coding control region and flanking tRNA genes. Gene, 118 (2): 197-204.
- [25] Du, S. J. et al, 1992. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of "all fish" chimeric growth

- hormone gene construct. *Biotechnology*, 10 (2): 176—181.
- [26] Fjose, A. et al. 1990. Homeobox sequence of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Aquaculture*, 85 (1—4): 51—60.
- [27] Fletcher, G. L. et al. 1992. Genetic engineering of freeze-resistant Atlantic salmon. In: *Transgenic Fish*, Hew, C.L. and Fletcher, G. L. (eds.), pp. 190—208. Publ. by: World Scientific, Singapore (Singapore).
- [28] Hayat, M. et al. 1991. Survival and integration rate of channel catfish and common carp embryos microinjected with DNA at various developmental stages. *Aquaculture*, 99(3/4): 249—255.
- [29] Hiraoka, S. et al. 1993. Divergence of gene expression in neurohypophysial hormone precursors among salmonids. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 92 (2): 292—301.
- [30] Ho, W.K.K. et al. 1991. Cloning and sequencing of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) growth hormone gene. *Biochim. Biophys. Acta*, 1090: 245—248.
- [31] Hohman, V. S. et al. 1992. Complete sequence of a cDNA clone specifying sandbar shark immunoglobulin light chain; Gene organization and implication for the evolution of light chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(1): 276—280.
- [32] Hong Yunhan. 1993. Expression vectors for gene transfer in fish; Structure, expression and evolution of the two rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) metallothionein genes and the silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) growth hormone gene. Doctoral Dissertation, Univ. Wurzburg, Germany.
- [33] Hong, Y. and Schartl, M. Structure of the rainbow trout metallothionein A gene. *Gene*, 120 (2): 277—279.
- [34] Hsiao, K. C. et al. 1990. An antifreeze glycopeptide gene from the antarctic cod *Notothenia coriiceps neglecta* encodes a polypeptide of high peptide copy number. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9265—9269.
- [35] Johanson, B. et al. 1989. The complete nucleotide sequence of the growth hormone gene from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gene*, 77 (2): 317—324.
- [36] Kavson, V. M. et al. 1993. Two insulin genes are present in the salmon genome. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 1993: 1375—1378.
- [37] Khoo, H. W. et al. 1992. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. *Aquaculture*, 107 (1): 1—19.
- [38] Klungland, H. et al. 1993. The gonadotropin releasing hormone gene in Atlantic salmon (*Salmo salar*). In: *Physiology and Biological Aspects of Fish Development*, Walther, B. T. and Fyhn, H. J. (eds.), pp. 47—49. Publ. by: Univ. Bergen. Bergen (Norway).
- [39] Le Guellec, K. et al. 1988. Vitellogenin gene expression in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71(3): 359—371.
- [40] Liu, Z. et al. 1991. Importance of the CArG box in regulation of β -actin—encoding genes. *Gene*, 108 (2): 211—217.
- [41] Maclean, N. et al. 1990. The application of gene manipulation to aquaculture. *Aquaculture*, 85(1—4): 1—20.
- [42] Male, R. et al. 1992. The complete nucleotide sequence of the Atlantic salmon growth hormone 1 gene. *Biochim. Biophys. Acta*, 1130(3): 205—208.
- [43] McVeigh, H. P. et al. 1991. Polymerase chain reaction/direct sequence analysis of the cytochrome b gene in *Salmo salar*. *Aquaculture*, 95(3—4): 225—233.
- [44] Miyata, M. et al. 1993. Analysis of α -globin gene structure of No. 3, No. 6 and No. 7. *Jap. Soc. Sci. Fish.*, 59 (6): 1077—1083.
- [45] Morley, S. D. et al. 1991. Corticotropin-releasing factor (CRF) gene family in the brain of the teleost fish *Catostomus commersoni* (white sucker); Molecular analysis predicts distinct precursors for two CRFs and one urotensin I peptide. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1(1): 48—57.
- [46] Nagahama, Y. et al. 1992. Rainbow trout cytochrome P—450c17 (17 α -hydroxylase/17,20-lyase) cDNA cloning, enzymatic properties and temporal pattern of ovarian P—450 c17 mRNA expression during oogenesis. *FEBS LETT.*, 301(1): 60—64.
- [47] Nagahama, Y. et al. 1992. Cyclin B in fish oocytes; Its cDNA and amino acid sequences, appearance during

- maturation, and induction of p34^{cdc2} activation. Mol. Reprod. Dev. , 33(2): 131—140.
- [48] Ono, M. et al, 1992. Structures of cDNAs encoding chum salmon pituitary-specific transcription factor, Pit-1/GHF-1. Gene, 116: 275—279.
- [49] Penman, D. J. et al, 1990. Factors affecting survival and integration following microinjection of novel DNA into rainbow trout eggs. Aquaculture, 85 (1—4): 35—50.
- [50] Powers, D. A. et al, 1992. Electroporation: A method for transferring genes into the gametes of zebrafish, *Brachydanio rerio*, channel catfish, *Ictalurus punctatus* and common carp, *Cyprinus carpio*. Mol Mar. Biol. Biotechnol. , 1(4/5): 301—308.
- [51] Shambloz, M. J. et al, 1992. Identification of a second insulin-like growth factor in a fish species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89(19): 8913—8917.
- [52] States, J. C. et al, 1982. Nucleotide sequence of a protamine component C I gene of *Salmo gairdneri*. Nucleic Acids Res. , 10: 4553—4563.
- [53] Takayama, Y. et al, 1991. Greater conservation of somatolactin, a presumed pituitary hormone of the growth hormone/prolactin family, than of growth hormone in teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol. , 83(3): 366—374.
- [54] Van Beneden, R. J. et al, 1986. Cellular myc (c-myc) in fish (*rainbow trout*): Its relationship to other vertebrate myc genes and to the transforming genes of the MC29 family of viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3698—3702.
- [55] Wilson, M. R. et al, 1990. The immunoglobulin M heavy chain region gene of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*; an unusual mRNA splice pattern produces the membrane form of the molecule. Nucleic Acids Res. , 18(17): 5227—5233.
- [56] Yang, D. S. C. et al, 1988. Crystal structure of an antifreeze polypeptide and its mechanistic implication. Nature, 333(19): 232—237.
- [57] Yoshizaki, G. et al, 1991. Germ line transmission of carp α -globin gene introduced in rainbow trout. Jap. Soc. Sci. Fish. , 57(12): 2201—2209.
- [58] Zelenin A. V. et al, 1990. The delivery of foreign genes into fertilized fish eggs using high velocity microprojectiles. FEBS LETT. , 287(1—2): 118—124.
- [59] Zhao, X. et al, 1993. Application of Baekonization: A new approach to produce transgenic fish. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. , 2(1): 63—69.
- [60] Zhu, Z. et al, 1985. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus*) Z. Agnew. Ichthyol. , 1: 31—34.