

研究简报

转抗冻蛋白基因鲮鱼的初步研究
PRELIMINARY STUDY ON TRANSGENIC MUDCARP
OF ANTIFREEZE PROTEIN GENE

朱新平 夏仕玲 张跃 刘家照

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

Zhu Xinping Xia Shiling Zhang Yue Liu Jiazhao

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, 510380)

关键词 基因转移, 抗冻蛋白基因, 鲮鱼

KEYWORDS Gene transfer, Antifreeze protein gene, Mud carp

鲮鱼 (*Cirrhina molitorella*) 是我国华南地区特有的主要养殖鱼类, 其产量约占广东池塘养殖总产量的 1/3。是我国最早也是目前淡水鱼加工附加值最高的品种(广东鹰金钱牌鲮鱼罐头海内外驰名), 其养殖性能的优越性是众所周知的。但该鱼的最大缺点是不耐寒, 限制了向岭北地区的推广。多年以来, 改良鲮鱼耐寒特性的尝试, 尚未有实质性的进展。而今已有多种转基因鱼问世^[1,3,5], 许多研究工作的目的在于提高鱼类的生长速度和抗寒能力。抗冻蛋白(AFP)存在于冷水性鱼类中, 它可使鱼类体液的冰点降低至 -1.9℃左右^[4], 而暖水性鱼类尚未发现有这种蛋白。转入冷水性鱼类的 AFP 基因, 能否提高暖水性鱼类耐低温能力, 这是值得人们探讨的问题。我们在改良鲮鱼的耐寒特性的研究中进行了转抗冻蛋白基因鲮鱼的试验, 初步研究结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

鲮鱼为本所饲养。美洲大绵鲷 (*Macrozoaces americanus*) 的抗冻蛋白基因是加拿大多伦多大学的丘才良教授赠送给中科院发育所, 由发育所提供。2.0kb 的美洲大绵鲷抗冻蛋白基因片段插在 PUC19 载体的 Hind III 位点上, 构成 4.7kb 的重组质粒。化学试剂购自德国 Boehringer Mannheim 公司和华美生物工程公司。³²P 标记的 dCTP 购自美国的 Amersham 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 AFP 基因线性化及显微注射 用限制性内切酶 ECOR I 酶切重组质粒 PUC19, 使其线性化, 并用生理盐水制成 10μg/ml 的 DNA 浓度用于显微注射。

采集刚受精的鲮鱼受精卵, 直接用显微注射器将线性化的 AFP 基因导入受精卵内, 浓度为 10μg/ml, 注入 DNA 量约为 2nl, 注射后的卵子放入大培养皿中, 自然发育。

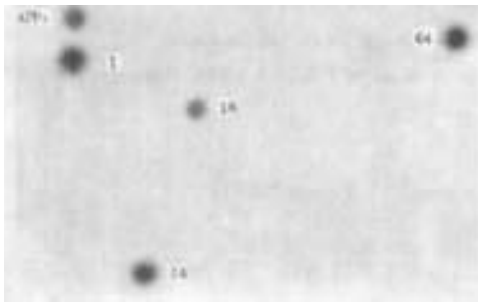
1.2.2 总 DNA 的提取及 AFP 基因的检测 在实验鱼当年长至 10cm 时, 剪取鳍条组织, 以常规酚抽提方

收稿日期: 1996-08-13。

法提取总 DNA;用斑点杂交方法^[6]检测 AFP 基因序列。³²P 标记的 2.0kb AFP 基因探针按 Random primed DNA 标记的试剂盒说明完成。斑点杂交检测 AFP 基因的工作在中科院发育所实验室完成。

2 结果与讨论

在鲑鱼的繁殖季节,采集刚受精而尚未分裂的鲑鱼受精卵,每个受精卵注入 AFP 基因约 1×10^{10} 拷贝,注射了 710 粒受精卵,最后孵化培育至 10cm 的当年鱼 105 尾。从成鱼的鳍条组织中提取总 DNA,用斑点原位杂交检测它们是否含有外源 AFP 基因。杂交结果表明,部分实验成鱼的 DNA 中出现明显的杂交点。测定的 73 个样品中有 4 个为阳性(见图版 I),阳性率为 5% 左右。实验中所获得的阳性转美洲大鲑 AFP 基因鱼频率与 Fletcher^[3]和 Davies^[2]使用的微量注入法获得的转北美黄盖鲹 AFP 基因鱼频率相似,即 5-6%。



图版 I Plate I

转抗冻蛋白基因鲑鱼的斑点杂交结果。73 个样品中,有 4 个样品显示明显的阳性。“AFP+”为美洲大鲑抗冻蛋白基因的阳性对照,“1,14,18,64”为实验鱼与 AFP 基因杂交的阳性结果。

AFP 基因是生活在南极和北极海域中某些鱼类特有的一种基因,该基因编码的产物抗冻蛋白,可以降低鱼类血液的冰点至海水的冰点以下,从而保证这些鱼类在寒冷的冬季能顺利越冬。鲑鱼的基因组中是不含有抗冻蛋白基因的,因而实验中检测到的 AFP 基因应该是导入的外源基因。转基因鱼模型理论认为,外源基因是在受体胚胎发育的原肠后期发生整合的^[1],在受体鱼苗和成鱼中检测的外源基因似已整合到受体染色体上。由此推论,AFP 基因在当年的阳性受体内亦可能是以与受体基因组整合的形式存在。当然这一结论尚需进一步的实验证明。由于鲑鱼性成熟需要 3 年,因此还未了解

导入的 AFP 基因是否可以通过性腺细胞传递给子代。

我们虽然获得了转美洲大鲑 AFP 基因鲑鱼,但由于获得转 AFP 基因鱼的频率太低,获得的数量也少,尚未能进一步研究其耐寒特性。而 AFP 基因在鲑鱼染色体组内能否正常表达,表达效率如何也尚需进一步的试验和研究。

参 考 文 献

- [1] 朱作育等,1989. 转基因鱼模型的建立. 中国科学(B 辑), (2):147-155.
- [2] Davies, P.L. and C.L. Hew, 1990. Biochemistry of fish antifreeze proteins. FASEB Journal, 4:2460-2468.
- [3] Fletcher, G.L., M.A. Shears, M. J. King, et al., 1988, Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 45(2): 352-357.
- [4] Hew, C.L., N.C. Wang, S. Joshi, et al., 1988, Multiple genes provide the basis for antifreeze protein diversity and dosage in the ocean pout, *Macrozoarces americanus*. J. Biol. Chem., 263: 12049-12055.
- [5] Hew, C. L. and Z. Y. Gong, 1992, Transgenic fish a new technology for biology and aquaculture. Biology International N. 24. 2-10.
- [6] Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, 1982, Molecular cloning. A laboratory manual. P324.