

## 金鱼垂体细胞谱系基因切除研究\*

常华 沈玉 王为先 于建康

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

余来宁

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000)

**摘要** 将大鳞大麻哈鱼的垂体细胞特异性表达的生长激素基因(GH)的启动子与白喉毒素基因的A链相连, 构建成融合基因GH-DTA。通过显微注射导入金鱼(*Carassius auratus*)受精卵内, 获得的实验鱼经 Southern blot 分子杂交检测表明, 少数实验鱼染色体DNA中含有导入的外源基因。胚胎的原位分子杂交和垂体的组织切片观察发现, 转基因鱼和正常鱼之间存在差异。

**关键词** 转基因鱼, 基因切除, 金鱼, 生物技术

鱼类受精卵经过分裂产生形态各异, 功能不同的细胞谱系。这些细胞谱系相互作用最终形成复杂的组织和器官。细胞谱系的发生及相互作用一直是生物学研究的热点之一。传统的研究方法主要是通过显微手术等实验胚胎学方法。这些方法只能在某些细胞谱系或胚胎发育的某一阶段上应用, 有很大局限性。近年来, 人们已将转基因技术应用于胚胎细胞谱系发生的研究, 利用显微注射或反转录病毒介导, 把外源基因引入动物生殖细胞或胚胎细胞中, 从基因水平上研究细胞谱系发生和演化。

白喉毒素是由A链和B链通过二硫键构成的多肽。经细胞内吞进入细胞, 随后将A链释放到细胞质中。A链一旦进入细胞就产生很强的毒性。一个分子就可以杀死一个细胞<sup>[3]</sup>。Martin L. Breitman 等将小鼠 $\gamma$ -晶状体蛋白基因启动子与DTA结构基因连接导入小鼠受精卵内, 成功地进行了晶体细胞基因切除, 获得了小眼畸型转基因小鼠<sup>[1]</sup>。实验用的DTA结构基因不含信号肽序列, 所以DTA仅存在于表达细胞内, 即使由于细胞破裂被释放出来, 因为没有B链协助, 也不能进入其它细胞继续发挥毒性作用。

本研究是把鱼的GH基因启动子与DTA构建成的融合基因导入金鱼受精卵内, 通过GH基因启动子驱动DTA在垂体细胞中特异性表达杀死该种细胞, 造成一种细胞缺失, 来研究垂体细胞谱系发生, 相互作用及对个体发育产生的影响。

收稿日期: 1996-05-17。

\*国家自然科学基金资助课题。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用金鱼取自本所饲养的 2-3 年龄红龙睛金鱼 (*Carassius auratus*)。GH-DTA 基因(图 1)由加拿大多伦多大学丘才良博士惠赠。一般试剂及内切酶和标记试剂盒,购自华美公司和 Promega 公司。

### 1.2 实验方法

质粒 DNA 提取,纯化,酶解和染色体 DNA 制备等均按“分子克隆”中的方法完成。

**1.2.1 外源基因导入** 将纯化的 GH-DTA 酶解成线状,溶于 Holtfreter 溶液,浓度为  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ,显微注射到金鱼受精卵内<sup>[4]</sup>。同时,取金鱼受精卵注射同样量的生理盐水作为对照组。

**1.2.2 外源基因检测** 从实验鱼和对照组金鱼提取 DNA,以 2.2kb DTA 为探针作斑点和 Southern blot 分子杂交,检测外源基因整合情形<sup>[5]</sup>。

**1.2.3 金鱼胚胎原位杂交** 取转基因鱼和对照组金鱼胚胎固定,用生物素标记的 DTA 探针作原位杂交<sup>[3]</sup>。

**1.2.4 金鱼垂体组织切片制作及观察** 取转基因金鱼和正常金鱼垂体固定,切片染色并作显微镜观察<sup>[6]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 GH-DTA 基因导入金鱼受精卵对其发育生长的影响

注射 DNA 浓度为  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ,每个卵子注射 500 $\mu\text{l}$  时,对胚胎的早期发育(原肠胚期以前)无明显影响。随胚胎的进一步发育,实验组的死亡率逐渐增加(表 1)。到孵化期时,实验组和对照组的成活率分别为 70.2% 和 91.0%。

### 2.2 导入的外源基因整合率检测

剪取实验组和对照组金鱼鳍条分别分离 DNA,用  $^{32}\text{P}$  标记的 2.2Kb DTA 作为探针进行斑点和 Southern blot 分子杂交。在检测的 80 尾实验鱼中有 6 尾显出很强的杂交阳性斑点。而对照组则无杂交斑点出现(图 2),阳性率为 7.5%。取斑点杂交阳性样品作 Southern blot 杂交(图 3),从图 3 可以看到出现了很强的杂交带,说明外源基因整合到了受体鱼的染色体 DNA 上。

### 2.3 金鱼胚胎的原位杂交

取金鱼原肠期胚胎固定,用生物素标记的 2.2Kb DTA 探针杂交,显色后用显微镜观察发现,阳性胚胎的中间胚体显示棕褐色,对照组胚胎无显色反应,仍为白色(图 4),这表明实验组胚胎中有外源 DNA 的参入。

### 2.4 金鱼垂体的组织切片分析

取 4 尾杂交呈阳性的金鱼和 4 尾对照组金鱼垂体制作石蜡切片,经苏木精-伊红染色显微镜下观察。通过对两者进行比较发现,转基因鱼和对照组金鱼垂体间叶部嗜酸性细胞

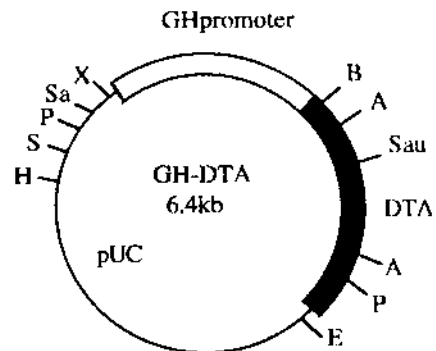


图 1 重组基因结构

Fig. 1 Structure of recombinant DNA  
GH-DTA

与嗜碱性细胞的比例有所不同,前者含有较少比例的嗜酸性细胞(图5)。

表 1 注射 GH-DTA 实验鱼和对照组金鱼成活率比较

Table 1 Comparison of survive rate between goldfish fertilized eggs injected with GH-DTA and normal goldfish eggs

胚胎发育时期 Developmental stage	实验组(%) Experiment	对照组(%) Control
受精卵 Fertilized eggs	100	100
囊胚期 Blastula	95.8	97.5
原肠晚期 Late gastrula	90.6	95.0
尾芽期 Tail bud	84.2	93.0
视色素形成期 Optic pigmentation	72.0	92.0
孵化期 Hatching	70.2	91.0

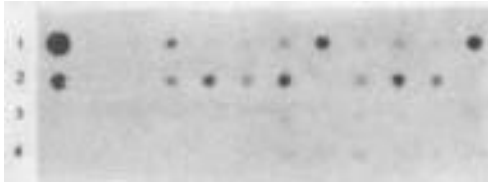


图 2 金鱼 DNA 的斑点杂交

Fig. 2 Dot hybridization of DNA from goldfish

1, 2 为阳性对照; 3, 4 为阴性对照; 其它为实验鱼  
1, 2 Positive control; 3, 4 Negative control

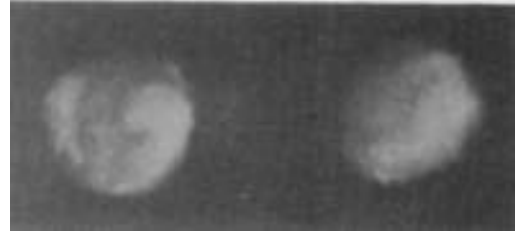


图 4 金鱼胚胎的原位杂交

Fig. 4 Hybridization in situ of goldfish embryos

左: 实验鱼胚胎; 右: 正常鱼胚胎  
Left, experimental embryos; Right, normal goldfish embryos

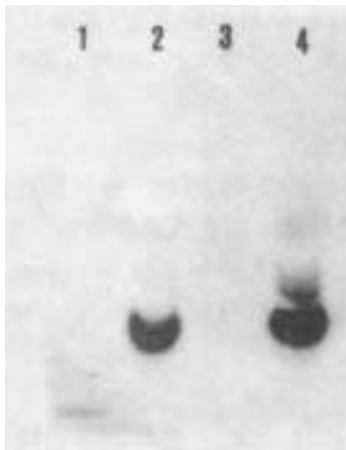


图 3 金鱼 DNA 的 Southern blot 分子杂交

Fig. 3 Southern blot hybridization of DNA from goldfish

1 为阳性对照; 3 为阴性对照; 2 和 4 为实验鱼  
Lane 1 positive control; Lane 3 negative control

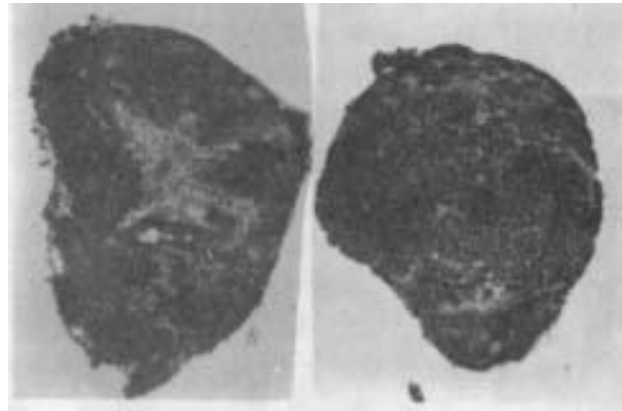


图 5 金鱼垂体组织切片(苏木精-伊红染色)

Fig. 5 The section of adenohypophysis of a transgenic goldfish and a normal goldfish

左: 正常金鱼垂体; 右: 转基因鱼垂体  
Left, a normal goldfish; Right, a transgenic goldfish.

### 3 讨论

金鱼受精卵注射 GH-DTA 和生理盐水后, 都出现个别胚胎不能正常发育而死亡现象。原肠胚以前两者的差别不大, 这主要是由于卵子的质量好坏和因实验操作引起的损伤造成的。当胚胎发育到尾芽期至视色素形成期时, 实验组胚胎死亡率明显增加。分析其原因很可能是由于在该发育阶段垂体激素基因开始表达, GH 基因启动子带动 DTA 表达产生毒素, 对胚胎造成毒性的缘故。

非同位素原位杂交是一种非常灵敏的检测外源基因的方法。图 4 是用生物素标记的 DTA 探针与转基因鱼胚胎和正常金鱼胚胎杂交的结果。图中左边实验鱼胚胎的中间胚体部分杂交后呈现出染色现象, 而右边对照组胚胎的中间胚体部分不出现染色, 其边缘部分的深色是因为拍照时的阴影造成的。

金鱼的脑垂体由前叶、间叶和后叶三部分构成。前叶有产生 ACTH, PRL 和 TSH 激素的细胞, 间叶有产生 GH 和 GtH 的细胞, 后叶有产生 MSH 的细胞。苏木精-伊红染色后, GH 和 PRL 细胞呈嗜酸性细胞, TSH, ACTH 和 GtH 呈嗜碱性细胞。在垂体的石蜡切片中, 转基因鱼垂体间叶中嗜酸性细胞与嗜碱性细胞的比例小于正常金鱼, 这种现象可能是由于导入的外源 DNA 在转基因鱼细胞中的整合是嵌合型的, 或者至少在垂体 GH 分泌细胞中是嵌合的, 使得在发育过程中部分分泌 GH 的细胞被 DTA 杀死的缘故。虽然肯定的结论还有待进一步的实验才能得出, 但转基因鱼和正常金鱼垂体间叶结构的差异, 与转 GH-DTA 的相关性是很明显的。

### 参 考 文 献

- [1] 马海飞, 1993. 荧光原位杂交及其应用. 细胞生物学杂志, 15: 45-48.
- [2] 朱作言等, 1986. 人生长激素基因在泥鳅受精卵显微注射后的生物学效用. 科学通报, 32(5): 387-389.
- [3] 芮菊生等, 1987. 组织切片技术, 92-108, 高等教育出版社.
- [4] Breitman M.L. et al., 1987. Genetic Ablation: Targeted expression of a toxin gene causes microphthalmia in transgenic mice. Science, 238: 1563-1565.
- [5] Collier, R.J. et al., 1975. Diphtheria Toxin: Mode of action and structure. Bact. Rev., 39: 54-85.
- [6] Southern, E.J., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by Gel Electrophoresis. J. Mol. Biol., 98: 503-517.

## GENETIC ABLATION OF CELL LINEAGE IN DENOHYPOPHYSIS OF GOLDFISH (*CARASSIUS AURATUS*)

Chang Hua Shen Yu Wang Weixian Yu Jiankang

(Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Yu Laining

(Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Jingzhou 434000)

**ABSTRACT** A hybrid gene GH-DTA, constructed with the promoter of Growth Hormone (GH) from *Oncorhynchus tshawytscha* and the "A" chain of diphtheria toxin, was introduced

into the fertilized eggs of goldfish (*Carrasius auratus*) by microinjection. Southern blot and hybridization in situ were done to analyze the genomic DNA from the experimental goldfish. The results showed that GH - DTA was integrated into the chromosomal DNA of some goldfishes. Four adenohipophysis of the transgenic fish were sectioned and dyed with homotoxylin - eosin. It showed that the structure of the meso - adenohipophysis of the transgenic fish was different from that of the negative control goldfish. .

**KEY WORDS** Transgenic fish, Genetic ablation, Gold fish, Biotechnology