

显微注射生长激素基因导入中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 受精卵的研究

刘 萍 孔 杰 王清印 李 健 杨丛海

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

梁利群 孙孝文

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

摘 要 本实验采用显微微量注射方法, 将羊生长激素基因导入中国对虾受精卵, 受精卵发育到蚤状幼体第三期后采样检测。PCR 检测结果表明: 7 个样品共 93 尾幼体, 有 3 个样品呈现阳性信号, 基因转移比率至少在 3% 以上。同时斑点杂交结果也证明有两个明显阳性斑点。

关键词 显微注射法, 生长激素基因, 中国对虾, PCR 检测, 斑点杂交

转基因技术被认为是动植物品种改良中最快捷最有效的手段之一, 1982 年美国 Palmiter, R.D 等^[4]把大鼠生长激素基因转入小白鼠, 构建了比小白鼠生长快一倍的“超级鼠”, 把这一技术推向高潮。目前在国内外水产领域中, 主要是应用于转生长激素基因鱼, 即“超级鱼”的构建研究, 其次是进行提高鱼类抗逆性和获得次级代谢产物及探讨水产动物饲料途径等探索性研究。1992 年我们首先将这一技术引入海水养殖中经济效益最大的支柱性品种中国对虾(*Penaeus chinensis*)中, 成功地运用精子介导外源基因转移到中国对虾卵子中, 基因转移比率在 1% 以上^[1]。初步探讨了改良中国对虾在常规育种中难以解决的问题的可能性。1994 年, 我们又采用常规的显微注射技术, 成功地将羊生长激素基因转入中国对虾受精卵中, 并获得了转基因虾幼体。现将实验结果报道如下:

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 基因 羊金属硫蛋白基因启动子—羊生长激素基因由澳大利亚 CSIRO 的动物分部提供。

收稿日期: 1995-01-24。

2. 药品 内切酶类和 PCR 所用试剂及杂交试剂盒购自华美公司和 Promega 公司, 琼脂糖购自 SIGMA。

3. 仪器 PCR DNA 扩增仪由中科院遗传所研制。

4. 亲虾 显微注射用受精卵为 1994 年春季海捕虾。

(二) 方法

1. 显微注射外源基因 首先配制 1.5% 琼脂 30ml, 溶化后倒入一个 9cm 直径平皿中, 冷却凝固后, 将 $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ 的 100 目筛绢网铺放在上面, 做为固定和支撑受精卵用。选取发育正常的第一次细胞分裂之前和囊胚期的受精卵 3-5 粒, 将其移到平皿的小筛绢上, 在解剖镜下实施显微注射, 每个卵子显微注射基因溶液的剂量为 $0.1 \sim 0.2 \mu\text{l}$, 然后用镊子轻轻夹起小筛绢, 放入盛有过滤海水的 1000ml 烧杯中, 使受精卵孵化。胚胎发育和幼体培养按常规方法进行。

2. 样品 DNA 制备 转基因受精卵孵化成幼体后变态发育到蚤状幼体第三期后采样, 用 DNA 抽提缓冲液固定 (10mMol/L Tris - Cl pH8.0, 0.1Mol/L EDTA pH8.0, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 胰 RNA 酶, 0.5% SDS), 抽提 DNA 时, 首先将幼体研碎 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 分钟, 加蛋白酶 K 至终浓度 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $^{\circ}\text{C}$ 消化 3 小时, 冷却至室温, 用等体积酚抽提 3 次, 酚: 氯仿 (1:1), 氯仿各抽提一次, 加入 1/10 体积乙酸钠 (pH5.2), 及 2 倍无水乙醇沉淀 DNA, 沉淀溶于灭菌水 30 μl 。

3. PCR 技术检测 每个反应中为 50 μl , 依次加入以下试剂:

灭菌水	35.5 μl
10 $\times$ PCR Buffer	5 μl
dNTP (5MM)	3 μl
引物 I (10PM)	2 μl
引物 II (10PM)	2 μl
模板 (待测样品 DNA)	1 μl

离心混匀, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 分钟, 每个反应管中加入 1.0 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ 的 Tap 酶 1.5 μl , 50 μl 矿物油, 离心分层, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 分钟。

PCR 程序设置:

94 $^{\circ}\text{C}$ 70 秒

53 $^{\circ}\text{C}$ 120 秒

72 $^{\circ}\text{C}$ 180 秒 循环数为 35。

4. 电泳检查 1.5% 琼脂糖溶化后倒平板, 将 PCR 产物取 20 μl 点样, 50V 电泳、溴化乙锭染色, 照像。

5. 斑点杂交 取待测样品 DNA 20 μl , 加 0.4N NaOH 溶液 20 μl , 处理 5 分钟, 再加 40 μl 20 $\times$ SSC 溶液即可点样。硝酸纤维素膜夹在点样器上之前, 先用蒸馏水浸泡 15 分钟, 2 $\times$ SSC 浸泡 10 分钟。点样后, 用真空泵抽滤。杂交以及探针标记见杂交试剂盒使用说明。

结 果 和 讨 论

显微注射羊生长激素基因的中国对虾受精卵, 共孵化出无节幼体 132 尾, 孵化率为 30%, 无节幼体发育到蚤状第三期的幼体共 93 尾, PCR 检测和斑点杂交结果见表 1。

从表 1 中可以看出, PCR 检测结果 (见图 1) 较斑点杂交 (见图 2) 有差别, PCR 检测显微

微量注射转基因比率在 3% 以上, 斑点杂交结果转基因比率在 2% 以上, 但这并不意味着 PCR 结果可能出现假阳性, 而是两种检测方法的灵敏度存在差异。因为虽然 PCR 反应和斑点杂交都具有很高的灵敏度和特异性, 但 PCR 在最理想的反应体系中, 30 次循环扩增, 从来自相当于百万个细胞的高度复杂的核酸成分中, 可测出 1 到 10 个 DNA 分子^[5]。而用探针进行杂交时对敏感性的影响因素较多, 一般在探针过剩, 用膜杂交时, ^{32}P 标记探针, 可检测出 10^6 个病毒颗粒; 就是较为敏感的原位杂交, 也需要 500 拷贝以上的靶序列^[2]。因此, PCR 检测方法要比杂交方法敏感。

表 1 显微注射受精卵孵化幼体检测结果

Table 1 Examination results of transgenic shrimp via microinjection

组别 Groups	1	2	3	4	5	6	7	质粒 DNA Plasmid
幼体数(尾) Larval Number	10	10	10	10	10	-	-	对照 Control
PCR 检测 PCR results	-	-	+	-	+	+	-	+
斑点杂交 Dot blot	-	-	+	-	-	+	-	+

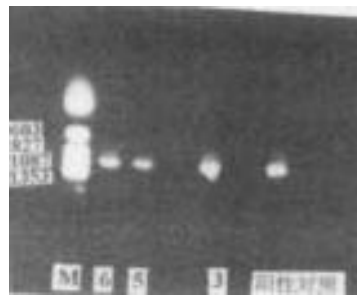


图 1 PCR 检测显微注射法转基因虾的电泳照片

Fig. 1 PCR electrophoresis results of transgenic shrimp via microinjection

M. Marker, Φ 174/Hae III, 阳性对照 Positive control

图 2 斑点杂交检测结果

Fig. 2 Dot Blotting Results

阳性对照 Positive control

本实验中使用的生长激素基因是已知序列^[3], 这段序列两端的引物为:

—GAGGGACAGAGATACTCCATCCAGA—(引物 I)

—ACGTACCTGAGGGTCATGAAGTCTC—(引物 II)

两引物之间的片段大小为 960bp, PCR 检测时, 将待测样品 DNA 为模板, 设置 35 个循环后, 经电泳证明: 见图 1, 用 Φ 174/Hae III 分子量标记, 扩增的 DNA 片段和阳性对照(插入

羊生长激素基因片段的质粒模板)的片段大小一致,在 827—1078bp 之间,与原序列大小相同。所以,通过显微注射方法,完全可以获得转基因虾。

显微微量注射技术是目前国内外在构建转基因鱼研究中的应用的主要转基因技术。虽然应用此技术有时也可以得到很高的外源基因整合率,但由于显微微量注射技术难度很大,加之中国对虾受精卵比鱼类受精卵要小得多,且产卵时间多在夜间,根据第二极体位置确定卵原核的位置,在操作上造成极大困难,且带有较大盲目性。

如果设想中国对虾卵能在体外培养成熟,可以在受精之前进行显微注射,再通过人工受精技术获得转基因虾,对此我们还要进一步进行研究。

我们在实验中还发现,受精卵在未经卵裂之前进行显微注射,受精卵几乎不孵化,或立即解体或发育畸形,卵裂后到原肠胚的受精卵则情况有所好转,孵化率可达 30% 以上。这可能是局部细胞受损伤,不足以影响受精卵发育,也可能注射时根本就是将基因溶液注入细胞之间,而并没有注入某个细胞中,但有一点,那就是这些幼体携带有外源基因,至于由此获得的转基因个体是否是嵌合体,这些个体命运如何,尚待进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] 孔杰等,1992。中国对虾的精子介导外源基因转移的初步研究。海洋水产研究,13:139—142。
- [2] 林万明,1991。核酸探针杂交实验技术,6—8。中国科学技术出版社。
- [3] 刘萍等,1996。中国对虾精子做载体将生长激素基因导入受精卵的研究。中国水产科学,3(1):6—10。
- [4] Palmiter R. D., hen H. Y. & Brinster R. L., 1982. Differential regulation metallothionein—thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. Cell, 29: 701—710.
- [5] Saiki. R. K. et al, 1988. Primer—directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239: 487—491.

THE STUDIES ON THE FERTILIZED EGG OF *PENAEUS CHINENSIS* WITH MICROINJECTION OF THE GROWTH HORMONE GENE

Liu Ping Kong Jie Wang Qingyin Li Jian Yang Conghai

(Yellow sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Liang Liqun Sun Xiaowen

(Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070)

ABSTRACT Sheep growth hormone gene was introduced into fertilized eggs of shrimp (*Penaeus chinensis*) by microinjection. Samples of Z_3 were collected and tested by PCR. Test results showed that three of the groups (total larval number is 93) were positive. and therefore, it is believed that the gene transfer efficiency is more than 3%. The two positive samples were tested by dot blot and the results were just the same as the two of the three mentioned above.

KEYWORDS Microinjection, Growth hormone gene, Shrimp, PCR, Dot blot