

外源基因导入鲤(*Cyprinus carpio*) 受精卵最佳时期的研究

梁利群 孙孝文 沈俊宝 闫学春 王 鹏

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

摘 要 本研究以鲤鱼受精卵为材料,通过显微注射技术,在受精卵的不同发育时期把鲤鱼 MT 启动子基因和大麻哈鱼 GH 基因导入受精卵中,按孵出的鱼苗数分别计算成活率,再通过斑点杂交和 Southern Blot 杂交检测整合情况,计算整合率,孵化率最高的为单细胞中期(90.83%),整合率最高的为单细胞后期和囊胚期(40%)。综合研究结果外源基因导入鲤鱼受精卵的最佳时期应选在单细胞后期。

关键词 外源基因, 受精卵, 基因导入, 鲤

自 1985 年转基因鱼研究开展起来,各国学者先后把多种基因导入鲤鱼、虹鳟鱼和鲑鱼等经济鱼类的受精卵中,如人生长激素基因、牛和羊生长激素基因、鱼类抗冻基因和鱼类生长激素基因等,以构建具有新的表型性状的转基因鱼新品系。外源基因导入鱼类受精卵多采用显微注射技术。但受精卵发育到何时注射外源基因能获得高的成活率(孵化率)和整合率一直是研究人员关心的问题。法国的 Chourout^[3]等人在 1986 年就做了虹鳟鱼受精卵不同发育时期注射外源基因与孵化率关系实验。美国的 Thomas. T. Chen^[4]等也做了鲤鱼等受精卵在不同发育时期注射外源基因对成活率、整合率影响的研究。由于外源基因对受体鱼基因组的整合机理比较复杂,不仅这方面的研究不多,而且各实验室之间的研究结果也很不一致,因此至今对某种鱼类的受精卵发育到何时是注射外源基因的最佳时期还没有形成一致意见。

材 料 和 方 法

(一)转基因材料

鲤鱼 MT 启动子基因与大麻鱼 GH 基因的融合基因由中国科学院动物研究所提供,每个受精卵的注射剂量为 1—2 微升,浓度为每微升约 100 万个基因拷贝。探针试剂盒购自美国 Promega 公司;分子生物学用的各种酶类购自华美生物工程公司和美国 NEW ENGLAND Biolabs 公司。

收稿日期:1994-11-12。

(二) 基因导入方法

在 1992 年 5 月中旬鲤鱼繁殖季节, 选择成熟的亲鱼, 经人工催产或在亲鱼池中捕获流卵的亲鱼采集质量高的卵子和精液放在 8℃ 冰箱中保存备用, 每次取少量的精、卵受精, 并使其粘附在培养皿上, 分六个时期(单细胞分前、中、后三个时期, 两细胞期, 四细胞期和囊胚期)对受精卵进行显微注射, 基因直接注射到细胞核附近。注射基因后的受精卵放在温度和光照条件相同的水族箱中孵化, 三天出苗, 实验共重复了三次, 注射外源基因的受精卵是同一父本和母本, 而且是同批的精、卵受精, 并由同一操作人员进行显微注射。

(三) DNA 样品提取方法与外源基因检测方法

待仔鱼平游后, 将三次各实验组的鱼苗分别混合后, 每组随机取样 30 尾(单细胞中期为 20 尾, 囊胚期为 10 尾), 将全鱼捣碎后, 提取样品的总 DNA, 方法参照《分子克隆》一书, 只是蛋白酶 K 的浓度改为 200 微克/毫升, 对所获得的样品先做 Dot 分析, 有阳性信号的样品经酶切后, 在琼脂糖凝胶中电泳, 用 Southern Blot 方法把 DNA 转移到 NC 膜上, 以导入外源基因做探针进行分子杂交, 经放射自显影确定外源基因的整合情况。

结 果 和 讨 论

1. 受精卵的四个发育阶段: 单细胞期、两细胞期、四细胞期和囊胚期分别注射外源基因, 其中单细胞的前期、中期和后期的孵化率(孵化率的计算: 注射外源基因的受精卵的孵化率是以对照组即未注射外源基因的受精卵在同样的孵化条件下的孵化率为 100% 计算出来的相对孵化率), 分别为 79.34%, 90.83%, 59.44%, 而两细胞期, 四细胞期和囊胚期的孵化率分别为 40.00%, 83.63% 和 65.83%。结果见表 1。由此看出单细胞中期注射外源基因, 受精卵

表 1 受精卵发育的不同时期注射外源基因卵的孵化率

Table 1 The incubation rate of transgenic eggs in different developing period of zygote

注射时期 Inject period incubation rate (%)	注射卵数(粒) Transgenic egg (grain)	死亡数(尾) Death (grain)	成活率(尾) Survival (tail)	孵化率(%) Hatching rate (%)
1 细胞前期 One-cell earlier stage	488	202	286	79.34
1 细胞中期 One-cell middle stage	313	103	210	90.83
1 细胞后期 One-cell later stage	624	350	274	59.44
2 细胞期 Two-cell stage	748	521	227	40.00
4 细胞期 Four-cell stage	641	245	396	83.63
囊胚期 Blasulal stage	290	149	141	65.87
对照组 Contral group	555	145	410	73.87

的孵化率最高,这显然与这一时期的卵的性质有关,由于这一时期的卵已经膨胀,卵膜具有一定的弹性,在玻璃针的推压下,不易破碎,而单细胞前期由于卵膜较嫩,易破碎,所以孵化率低;而其它时期,由于卵膜膨胀硬度增加,在注射时针刺卵膜极易造成卵膜破碎,同时注射了基因的卵的孵化率显然还与不同发育阶段卵膜对机械损伤的修复能力和卵内各种组织在不同发育阶段对机械损伤的承受能力有关,从注射基因时的手感来看,我们认为单细胞中后期的受精卵较适于显微操作。

2. 用大麻哈鱼生长激素基因中 PstI 酶切片为探针对提取的总 DNA 样品做分子杂交(见图 1)和进一步对阳性信号样品做 Southern Blot 杂交(见图 2),发现不同发育阶段注射外源基因其整合情况差异很大(整合率的计算:外源基因的整合率是指成活的转基因实验鱼群体内外源基因已整合到受体鱼基因组中的转基因鱼占实验鱼群体总数的百分比),单细胞后期和囊胚期外源基因的整合率高,均在 40% 以上,而单细胞前期和中期整合率很低,低于 20%,这一结果说明外源基因在受体鱼基因组中的整合可能在染色体的复制期进行,而单细胞中期以前是染色体的非复制期,故在这一时期注射外源基因其整合率不高;外源基因整合率高低与外源基因导入受精卵内到受精卵的染色体的下一个复制开始这段时间的长短有关,这段时间越长,受到内源 DNA 酶类消化的机会就越大,其在受体鱼基因组中整合的几率就越低,在单细胞前期和中期注射外源基因其整合率低于单细胞后期就说明了这一点。



图 1 转大麻哈鱼生长激素基因的 Dot 杂交结果,左箭头所指为阳性对照,右箭头所指为阴性对照。

Fig. 1 The result of Dot hybridization of the fishes transfered salmon growth hormone genes, left arrow is possitive control, right arrow is negative control.

图 2 转大麻哈鱼生长激素基因 Southern Blot 杂交结果,E 为 EcoRI 酶切,B 为 Bgl II 酶切,P 为 PstI 酶切,U 表示没有酶切的样品,C 为阳性对照。

Fig. 2 The result of Southern Blot analysis of the fishes transfered salmon growth hormone genes, E—EcoRI, B—Bgl II, P—PstI U means the samples was not digested by emzyme, C is possitive control.

3. 我们在构建转牛生长激素基因鲤鱼时,检测到外源基因在受体鱼基因组的整合率在 8% 左右,美国的 Mark. L. Gross 等人对显微注射构建的转基因鱼做分子分析时得到外源基因

的整合率(1398尾实验鱼有88尾阳性鱼)约6%左右。表2为本研究所得到的外源基因的整合率远远高于上述结果,原因可能是取样方法不同而使测到的外源基因的整合率有很大差别。在构建转基因鱼研究中,由于要保留实验鱼,只能在不伤害实验鱼的前提下取某一组织(如鳍条等),从这一组织中抽提DNA,由于基因嵌合体鱼的存在,即外源基因可能在所取组织中不存在则使外源基因的整合率偏低,在本研究中,目的是探讨受精卵发育在什么时期导入外源基因其整合率较高,无须保留实验鱼,所以在出苗15天左右,杀死鱼苗,从全鱼体内提取DNA,由于不受基因嵌合体的影响,所以测到的外源基因的整合率要高于从单一组织提取DNA所测到的整合率(M. L. Gross等人研究,在单细胞注射外源基因,仍有基因嵌合体出现)。

表2 受精卵发育不同时期注射外源基因获得的转基因鱼外源基因的整合率

The integrated rate of foreign genes in the piscine genome produced by microinjection on different developing period of fertilized eggs.

注射时期 Inject period	取样数量(尾) Sample (tail)	阳性信号数量(尾) Positive signal (tail)	整合率(%) Integration (%)
1 细胞前期 One-cell earlier stage	30	6	20.00
1 细胞中期 One-cell middle stage	20	3	15.00
1 细胞后期 One-cell later stage	30	12	40.00
2 细胞期 Two-cell stage	30	17	56.67
4 细胞期 Four-cell stage	30	13	43.33
囊胚期 Blastula stage	10	4	40.00

4. 构建转基因鱼品系需要外源基因在受体鱼基因组中的整合是非嵌合型的,以便后代仍具有转外源基因基因型和表现型。在鱼类受精卵发育到什么阶段注射外源基因可以获得最大比例的非嵌合型转基因鱼,目前还无定论。Md. Rahman等人报道,在罗非鱼受精卵发育到单细胞期注射外源基因,可以避免嵌合型转基因鱼的出现;而M. L. Gross等人研究狗鱼的转基因鱼的结果指出,在受精卵发育到单细胞期注射外源基因,转基因鱼中仍有很高比例的嵌合体鱼出现。虽然这方面的研究有待进一步深入下去,但根据细胞遗传学和分子生物学原理,为减低嵌合体鱼在转基因鱼群体中的比例,还应在受精卵发育的单细胞期注射外源基因,结合我们的实验结果,注射外源基因的最佳时期是单细胞后期,虽然在我们的实验中这个时期注射外源基因受精卵的孵化率低一些,但外源基因的整合率高,这可以减少大量的外源基因的检测工作。考虑到鲤鱼受精卵发育很快,仅在单细胞后期注射时间太短,建议:1、受精卵可放在14—15℃的条件下推迟卵的发育速度,延长注射时间;2、把未受精的精子、卵保存

在低温下,分期分批少量受精,这样可一次取精卵多次使用。

参 考 文 献

- (1) 徐洵、刘震乾,1990:DNA 重组技术,83—89。科技出版社。
- (2) Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E., et al. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein growth hormone fusion genes. *Nature*, 300:611—615.
- (3) Chourout D., GuYomard R., Houdebine L. M. . 1986. High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich) by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture*, (51):143—150.
- (4) Thomas. T. Chen and Dennis A. Powens, 1990. Transgenic fish.
- (5) Md. Azizur Rahman, et al. 1992. Production of transgenic tilapia by one—cell stage microinjection. *Aquaculture*, 105: 219—232.
- (6) Mark L. Gross, et al. 1992. Molecular analysis and growth evaluation of northern pike microinjected with growth hormone genes. *Aquaculture*, 103:253—273.

THE RESEARCH OF THE OPTIMUM PERIOD TRANSFERED EXOGENOUS GENES INTO COMMON CARPS ZYGOTE

Liang Liqun Sun Xiaowen Shen Junbao Yan Xuechun Wang Peng

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

ABSTRACT Microinjection is main gene transfer technique in constructing transgenic fish. The egg survival rate and the ratio of the exogenous gene integration in genomic DNA is different in different development period of fertilized egg. Here, it was reported that the relation of the fertilized egg survival rate. The ratio of exogenous gene integration in genomic DNA to the microinjection time in different development period of zygote.

KEYWORDS Exogenous, Genes, Zygote, Gene introduction, *Cyprinus carpio*