

## 中国对虾(*Penaeus chinensis*)精子做载体将 生长激素基因导入受精卵的研究

刘 萍 孔 杰 李 健 王清印 杨丛海

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266003)

孙孝文 梁利群

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

**摘 要** 本实验采用卡介苗注射器将羊生长激素基因溶液注射到亲虾纳精囊中, 以精子为载体, 携带基因导入对虾受精卵, 而达到转基因对虾的目的。经 PCR 检测表明: 1. 经 STE (pH 8.0) 第一次洗涤精子的洗涤液呈阳性信号; 第 2—4 次的洗涤液呈阴性; 2. 多次洗涤后的精子抽提的 DNA 呈阳性; 3. 检测 10 个样品 100 尾仔虾中有一个样品呈阳性结果, 转基因比率在 1% 以上。同时斑点杂交结果也印证了上述结果。

**关键词** 中国对虾, 精子, 载体, 基因导入

自 1985 年转基因鱼的研究工作在我国首次报道以来\*, 科学工作者已把许多外源基因导入方法应用于转基因鱼的研究中。首先显微注射技术是目前国内外在构建转基因鱼的研究中应用的主要技术, 并取得了相当可喜的成果。但因注射技术难度大, 速度慢, 难于大批量基因转移。1992 年 Khoo H-W, Ang L-H 等<sup>[1]</sup>成功地运用精子为载体将外源基因转入鳊鲃 *Pterior volitans* (L) 鱼卵中。1991 年中科院水生所的刘汉勤等采用精子将鲫鱼肝总 DNA 转移至红鲤受精卵中<sup>[2]</sup>。1992 年开始我们初步探讨了这一技术, 将羊生长激素基因注入亲虾纳精囊中, 从培育的幼体中获得了阳性结果<sup>[3]</sup>。1994 年我们在日照市石臼海水育苗场继续进行以精子做载体的介导外源目的基因的试验工作。

### 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。

\* 费云标等, 1993。生物工程学报, 9(4): 387-388。

2. 药品 内切酶类,PCR 试剂,杂交试剂盒等购自华美公司和 Promega 公司。琼脂糖购自 SIGMA。

3. 亲虾 中国对虾亲虾为日照市石臼海水育苗场越冬亲虾。

4. PCR DNA 扩增仪购自中科院遗传所。

## (二)方法

1. 外源基因携带方法 选择 8 尾健康,性腺发育较好的亲虾。将基因溶于除菌的 30%NaCl 溶液中。使用 1ml 卡介苗注射器将基因溶液注入亲虾纳精囊内,剂量为 0.3—0.5ml/尾。注射时将针头从纳精囊的一端刺入纳精囊腔的深处,一边推入基因溶液,一边慢慢拔出针头,尽量使基因溶液与精液接触面积大一些,每只亲虾注射两针。

2. 卵子孵化和幼体培育 注射基因溶液的亲虾放入  $2 \times 2 \times 1$ M 水泥池中,遮上黑布,待每只亲虾都产卵后,收集卵及幼体进行幼体培育,日常管理按《中国对虾育苗操作规范》<sup>[3]</sup>。

3. 样品 DNA 的提取 产卵后的亲虾剪下纳精囊,用 pH8.0 的 STE 洗涤精子,5000g 离心 5 分钟,保留上清液,反复四次,将洗涤液分别用酚:氯仿(1:1),氯仿各抽提一次,将上清液中加 2 倍无水乙醇沉淀 DNA;洗涤后的精子和培育出来的仔虾按文献<sup>[4]</sup>方法提取 DNA。

4. PCR 技术检测 采用 PCR 技术检测 DNA 样品时,每个反应体积为 50ul。

|              |        |
|--------------|--------|
| 依次加入:灭菌水     | 35.5ul |
| 10×PCRBUFFER | 5ul    |
| dNTP(5mM)    | 3ul    |
| 引物 I(10PM)   | 2ul    |
| 引物 II(10PM)  | 2ul    |
| 模板(待测样品 DNA) | 1ul    |

加好样后离心混匀;94℃变性 10 分钟;每个反应管中加入 1.0u/ul 的 Taq 酶 1.5ul,混匀;加 50ul 矿物油离心分层;72℃延伸 5 分钟。

PCR 程序设置:

94℃70 秒

53℃120 秒

72℃180 秒

循环数为 35。

5. 电泳检查 1.5%琼脂糖溶化后倒平板,将 PCR 产物取 15ul 点样,50V 电泳、溴化乙锭染色,照像。

6. 斑点杂交 取样品 DNA20ul,加 0.4N NaOH 20ul,处理 5 分钟,加 40ul20×SSC 混匀即可点样。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×SSC 浸泡 10 分钟。点样后,用真空泵抽滤。杂交以及探针标记方法见杂交试剂盒使用说明。

## 结 果 和 讨 论

在鱼类转基因研究中有许多成功的例子,李晶等<sup>[5]</sup>以精子为载体,构建了美洲拟鲈抗冻蛋白基因导入罗非鱼卵中,获得了 18.1%的整合率。我们以亲虾纳精囊中精子做载体,期望外源目的基因能够被精子携带,并完成受精过程,而获得转基因的中国对虾 *Penaeus chinensis*。PCR 检查结果表明:1. 第一次洗涤液检测为阳性,第二至四次的洗涤液检测为阴

性;2. 洗涤后的精子检测为阳性;3. 注射基因溶液的亲虾产卵, 孵化的幼体长到 1.5cm 后, 取样 100 尾, 每 10 尾为一样品, 检测有一个阳性信号, 整合率至少在 1% 以上。见图 2。

本实验中使用的基因—羊生长激素基因是已知序列, 见图 1。引物之间的片段大小为 960bp。在 PCR 检测过程中, 产物经电泳表明: 扩增片段用  $\Phi 174$ /HaeIII 分子量标记, 在 827—1078 之间, 与原基因序列大小是一致的。

```

GGAGCGACGACCCAGCTTAGACCTAGGTGGGTGCTTCTTCCTCCTAGGAGCGCACCTACATCC
CGGAGGAGAGAGATACCTCACTAGAACACCCAGGTGGCGCTCTGCTTCTCTGAAACCATCCG
GGCCCCCAGGAGCAAGATGAGCCCCAGGAGANATCAGTGAATGGCCACCTAGAAACCGAGGAGG
AGGACCTCCTTCATCCTAAGTAGGCTGCCCCAGCTCTCTGACCGGGGCTGGGGCTCTCTTCT
TCCGAGGTGGCAGAGGGTGTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTTGGTGGTGGTGGCAGGAGGT
CTCGGGCAGAGGGGAGCTGGCAGGGCTGCCCGAGCGGGGAGCCAGCCAGCCAGCCATCTG
CGAGCAGGAGCTTGGAGCTGCTTCGCACTCTGAGTGGCTCTTATCCAGTCTGGCTTGGGCCCTG
CAGTCTCTCAGCAGAGTCTTCAACCAAGCCTGGTGTGTGGCAGCTCGGAGCTGGTCAATGAGA
AGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCTGGCCCTGATGCGGTGAGGATGGCTTGTGGTTC
CTTCAGTGTGGGGGCCATGCTCAGCCCTTCTCGGCTTAGCCAGGAGAACACACCTGGGGGGG
GGAGAGAGATCCCTGCTCTTCTTCTCTGTGTGAGGAGCCAGGCTGGAGCCAGGAGAACTCT
TCCCTTTGGAAACCTCCTTCTCCTCCCTTCTCCTCAAGCTATAGGGGAGGGTGGAAATGGAGC
GGGCATGAGGGAGCGCTCTCTCAGGCTTCCGGCTCTCTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GAGATGTTACCCCGGGGCTGGGCAGATCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTACACAAACA
TGGCAGTGTATGATGATGCGCTGCTCAAGAACTATGGTCTGCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GCACAGGAGGAGAGTACCTGAGGCTCATGAGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TTCTACTTGGCAGCATCTGCTGTATCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT

```

图 1 羊生长激素基因序列

Fig. 1 Sequence of sheep growth hormone gene

I: 引物 I Primer I

II: 引物 II Primer II

同时将羊生长激素基因用光敏生物素标记后, 制备成探针, 做斑点杂交显示, 见图 3, 也证明了 PCR 检测的结果的可靠性, 第一次洗涤液、精子、仔虾呈紫色斑点, 为阳性, 与虾样 DNA 无交叉反应。因此采用对虾纳精囊的精子做转基因的载体是可行的, 多次产卵后亲虾的精子仍可以检测出阳性信号, 就是最好的说明, 同时培育的仔虾中也检测出阳性信号, 与前人的鱼类精子携带结果是一致的, 所以通过分子生物学技术和传统育种技术相结合的综合技术, 完全可以建立起转基因繁育体系, 对转基因子代进行强化选择。

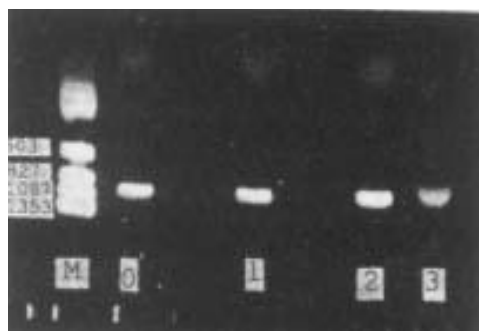


图 2 PCR 检测精子介导外源基因的电泳结果

Fig. 2 PCR results of sperms incubated with foreign DNA

M. Marker,  $\Phi 174$ /HindIII

0. 阳性对照.

Positive control

1. 精子第一次洗涤液

Solution derived from 1st sperm washing.

2. 洗涤后的精子.

Sperms after washing.

3. 转基因的仔虾

Transgenic shrimp postlarva.

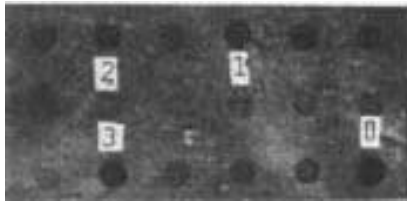


图3 斑点杂交检测结果

Fig. 3 Dot blotting results

0. 阳性对照

Positive control

1. 精子第一次洗涤液

Solution derived from 1st sperm washing.

2. 洗涤后的精子

Sperms after washing.

3. 转基因的仔虾

Transgenic shrimp (postlarva).

1989年意大利 Lavi-rano 等人以成熟精子做载体,成功地将外源 DNA 导入小鼠卵细胞,获得了转基因动物<sup>[6]</sup>。但是,在鱼类转基因技术的研究中,国内外主要应用显微注射来获得转基因后代,在受精卵第二极体放出后,细胞分裂之前将外源基因注射到卵原核中。但中国对虾的受精卵则有所不同。首先,卵膜韧性很大,难于剥离;其次受精卵发育早期,因卵黄覆盖,看不到卵原核,此时进行显微注射具有很大盲目性,况且处于此发育阶段的受精卵非常脆弱,显微注射后,难于孵化,或卵黄外溢立即解体,或发育畸形,大多不能进行正常分裂。所以采用精子携带外源基因入卵,完成受精过程,成功地获得转基因仔虾,无疑将给对虾品种改良带来广阔前景,也给海产经济动物种改良奠定技术基础。至于精子携带外源基因入卵,获得转基因个体,是否能够整合,遗传性状是否有所改变,有待于今后继续进行探讨。相比之下,用精子携带外源基因的转基因技术方法简便。因此,今后要继续深入进行这方面的研究工作。

### 参 考 文 献

- [1] 刘汉勤等,1991. 总 DNA 介导鱼类基因转移的初步研究. 水生生物学报,15(3):286-288.
- [2] 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.
- [3] 中国对虾养殖,1992. 中国科学技术出版社.
- [4] 华美生物工程公司,1991. 现代分子生物学研究技术.
- [5] 李晶等,1994. 精子做载体的转基因鱼研究. 生物技术,4(3):20-22.
- [6] Lavi-rano M et al, 1989. Sperm Cells as Vectors for Introducing Foreign DNA into Eggs; Genetic Transformation of Mice. Cell. 57: 719-723.
- [7] Muller. Felal; Mol. Marine Biol. Biotechnol (415)276-281.
- [8] Khoo H-W., Ang L-H., Lim H-B. and Wong K-Y, 1992. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. Aquaculture, 107: 1-19.

## STUDIES ON THE SPERMATOOZOA AS VECTOR TO INTRODUCE GROWTH HORMONE GENE INTO THE EGG OF SHRIMP (*PENAEUS CHINENSIS*)

Liu Ping Kong jie Li jian Wang qingyin Yang conghai

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

Sun Xiaowen Liang Liqun

(Hei longjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences Harbin 150070)

**ABSTRACT** The sheep growth hormone gene solution is injected directly into the thelycum of shrimp, *Penaeus chinensis* by bdcillus Calnlette — Guerin syringe, and the sperm is tested to be used as exogenous DNA vector. PCR results are as follows: 1. The STE lotion of the first time is positive, but the STE lotions of the second to forth time are negative respectively. 2. DNA extracted from washed sperms is positive. 3. About 100 postlarvae are divided into 10 groups and one of those 10 groups is positive. The gene transfer ratio, examined to the test results, is more than or at least 1%. The results mentioned above are also proved by dot blot.

**KEYWORDS** *Penaeus chinensis*, Sperm, Vector, Gene introduction