

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00275

显微介导的远缘基因渐渗技术在鲤育种中的应用

闫学春¹, 张晓峰¹, 刘翠^{1,2}, 孙效文¹, 梁利群¹, 曹顶臣¹, 李超¹, 葛彦龙¹

1. 农业部水产生物技术重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025

摘要: 以中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)为外源 DNA 供体, 运用显微介导的远缘杂交技术, 将中国明对虾总 DNA 直接导入鲤(*Cyprinus carpio* L.)受精卵内, 创建鲤外源 DNA 导入系, 并利用 AFLP 分子标记技术和肌肉营养成分分析, 对显微介导中国明对虾基因鲤进行外源 DNA 检测与蛋白质和氨基酸含量进行测定, 结果表明: (1)在 30 对 AFLP 引物中, 有 8 对所扩增带, 其显微介导中国明对虾基因鲤亲本和子代中都有和中国明对虾基因相同而对照鲤没有的带。说明受体鱼中, 肯定有一段序列与目的基因序列一致, 研究证明了亲缘关系甚远的异源 DNA 片段的超远缘杂交的可行性。(2)导入中国明对虾总 DNA 片段的显微介导中国明对虾基因鲤的蛋白质含量分别为 18.37%、18.47%、17.99%, 均高于对照组(17.06%); 而氨基酸的总量分别为 17.16%、17.56%、16.92%, 也高于对照组(16.13%), 其中天门冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸等 4 种鲜味氨基酸含量明显超过对照组, 经数理统计分析, 均有显著差异($P < 0.05$)。说明直接导入中国明对虾总 DNA 对显微介导中国明对虾基因鲤的营养成分和氨基酸含量均产生影响, 这可对鲤的品质改进, 丰富鲤的遗传基础, 为显微介导的超远缘杂交技术的应用提供思路。[中国水产科学, 2011, 18(2): 275–282]

关键词: 显微介导; 远缘基因; 总 DNA; 渐渗杂交; 中国明对虾; 鲤

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)02-0275-08

渐渗杂交(introgressive hybridization)是在植物研究中提出的, 指两物种的杂交后代与亲本之一或双亲反复回交, 把某一亲本的性状带至另一亲本^[1-2]。随着人们对渐渗杂交认识的加深, 其概念范围逐渐扩展, 包括了亚种、种和种群水平的个体杂交, 泛指某一种群的基因被整合到另一种群中^[3]。渐渗杂交的最终结果是实现外源 DNA 片段的杂交, 这和显微注射外源总 DNA 转化的机理是相同的, 渐渗杂交和显微注射技术都是使外源 DNA 片段在转化受体中整合, 因此, 显微注射外源总 DNA 是可行的, 是对鱼类进行快速改良的一种有效手段。这种注射技术与自然的渐渗杂交相比, 克服了地理区域的限制, 突破了传统选

育方法所碰到各种杂交不亲和性障碍, 并且可以有目的、有侧重地选择外源 DNA 片段的供体, 产生大量的有外源片段存在的当代和后代个体, 辅助有效的人工选择, 无疑会大大加快对鱼类的改良和选育新品种的过程^[4]。因此, 可以运用目前掌握的成熟的显微介导的远缘杂交技术, 将亲缘关系甚远的异源 DNA 导入鲤基因组, 由此, 它可以把鱼类近远属动物的优良特性, 如抗病性, 抗逆性, 高蛋白含量等导入鲤中, 从而丰富鲤的遗传基础, 再利用分子生物学的检测杂交手段, 希望能培育出鱼类抗逆的新品种。

鲤(*Cyprinus carpio* L.)是中国主要的淡水养殖鱼类, 但其品质较低(包括肉质较低、鲜味、氨

收稿日期: 2010-05-26; 修订日期: 2010-10-22.

基金项目: 国家 863 计划项目(2009AA10Z105).

作者简介: 闫学春(1964-), 男, 副研究员, 主要从事鱼类基因工程育种与分子生物学研究. E-mail: yanxc8@163.com

通讯作者: 孙效文, 研究员, 博士生导师. Tel: 0451-84842646; E-mail: sxw2002@163.com

氨基酸含量等等)。利用传统育种技术试图改良鲤科鱼类的低肉质等的育种工作早在 20 世纪 80 年代初就开始进行了,主要开展的有同种不同地理群的杂交和远缘杂交。同种内的杂交由于品质性状的低遗传力特征使传统选育技术难于获得有效的育种结果,而远缘杂交由于无法克服杂交不育从而无法进行杂交利用以得到改良品种,多个单位开展的鱼类品质改良育种研究至 20 世纪 80 年代中期基本停止。建立优良品种是养殖业的永恒主题,但是水产业优良品种培育速度较慢,使目前水产品良种率为 16%,远远低于畜禽,优良品种少也是中国养殖鱼类尤其是淡水养殖鱼类品质低、病害多的主要原因之一。利用显微介导远缘杂交技术可以克服远缘杂交障碍,外源基因的高水平表达可以克服品质性状的低遗传力特征,因此,显微介导远缘杂交技术具有获得鲤科鱼类品质改良新品种的可行途径。

鱼类显微介导的远缘杂交(distant hybridization)技术,是指外源总 DNA 不通过遗传修饰和利用生物工程酶类等基因工程操作手段处理,直接将供体总 DNA 导入受体鱼受精卵内,并通过筛选获得目的性状的后代,再通过表型性状,选出生长快,体型宽的个体,而培育成新品种的技术。有关外源总 DNA 的导入技术,自 20 世纪 70 年代以来,已在动植物改良和创造新品种方面得到了应用。如周光宇等^[5]将外源总 DNA 导入棉花和水稻中,改变了两种植物的遗传性状;刘汉勤等^[6]将鲫总 DNA 转移到红鲤受精卵内,获得了转基因个体;梁明山等^[7]将胡子鲇总 DNA 导入长吻鲩中,使转基因长吻鲩获得了胡子鲇的一些优良遗传特性;向建国等^[8]将鲤总 DNA 片段导入草鱼受精卵获得成功;朱新平等^[9]将鲤总 DNA 转移到鲢鱼内,探讨从根本上改变鲢不耐寒的可行性。但是,利用显微介导 DNA 转移技术,将亲缘关系很远的异源 DNA 导入鲤基因组尚未见报道。本研究通过显微介导的远缘杂交技术,将中国明对虾总 DNA 导入鲤受精卵中,目的在于通过该技术来改进鲤的品质,探讨外源总 DNA 转移方法应用于鱼类在分子水平上的远缘杂交的可行性,使

基因在生物间互相转移成为可能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 中国明对虾总 DNA 的制备 取中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)尾柄附近的肌肉组织约 100 mg,滤纸吸去多余的水分,剪碎置于 1.5 mL 的离心管中,加入组织匀浆液(TE 缓冲液, pH 8.0)混匀后加入终质量浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 SDS 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的蛋白酶 K, 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化至溶液清澈透明。分别用 25:(24:1)的酚:(氯仿:异戊醇)抽提 3 次,用 2 倍体积的冷冻无水乙醇沉淀,离心 12 000 r/(18 min), 70% 的乙醇洗涤沉淀 1 次,离心 7 500 r/(5 min), 自然干燥, 600 μL TE 溶解, 基因组 DNA 浓度经由紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳 EB 染色的荧光强度双重测定, DNA 含量为 3.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 样品中 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值为 1.75, 其纯度达到各种后继实验的要求。取出其中的 1 管, 用 14 号针头抽打, 每抽打 1 次, 取出 5 μL DNA 溶液, 电泳查看片段大小, 依次向下直到从管中取出的 DNA 片段大小达到要求为止, 一般需要抽打 40 下, 目的 DNA 片段 1~2 kb, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.1.2 实验鱼基因组 DNA 提取 将剪取的约 0.1 g 鳍条加入 200 μL 裂解液(200 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白酶 K; 0.5% 十二烷基肌氨酸钠; 500 mmol/L EDTA, pH 8.0), 55 $^{\circ}\text{C}$ 消化, 中间不时地轻轻摇动, 待组织完全消化后取出, 用酚、氯仿、异戊醇(体积比为 25:24:1)混合液抽提 3 次, 加入 RNA 酶(终质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min, 再用等体积的氯仿抽提 1 次, 将基因组 DNA 进行数次透析, 直至透析液 $\text{OD}_{270} < 0.05$, 无水乙醇沉淀, 自然干燥后溶解于 TE 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 显微注射 在 5 月下旬至 6 月初鲤繁殖季节, 选择性成熟的亲鱼, 对其注射鲫脑垂体和类似物的混合物进行人工催产, 采集其质量高的卵子, 同时采集精液放在 8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。每次取一定数量的精卵进行干法受精, 并把受精卵分散黏附在培养皿上, 用显微注射器将中国明对虾总

DNA 注射到鲤受精卵的核区附近, 注射量为 1 nL。对照组的鲤受精卵不作任何处理, 培育条件与实验鱼相同。

1.2.2 取样方法 测定肌肉营养成分的实验材料是取自本课题组生产的 1 龄显微介导中国明对虾基因鲤和普通鲤,平均体质量分别为 202 g 和 206 g。各随机取 40 尾洗净, 擦干体表水分, 除去鱼鳞, 同时取鱼体的背部肌肉, 去皮, 将鱼肉切成小块、捣碎, 将捣碎的肌肉样品放在低温冰箱中保存, 以供各项分析之用。

1.2.3 主要营养成分测定 显微介导中国明对虾基因鲤与对照鱼的蛋白质和氨基酸含量的测定是由农业部谷物及制品质量监督检验测试中心(哈尔滨)测定。蛋白质测定采用凯氏微量定氮法(国家标准: GB/T5009.5-85)。17 种氨基酸用盐酸水解法(国家标准: GB/T14965-94), 经日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定氨基酸含量。色氨酸在水解过程中被破坏没有测定。

1.2.4 AFLP 实验

(1) 酶切反应 每个酶切反应混合液系包括: DNA 样品 200 ng, *EcoR* I/ *Mse* I (*EcoR* I 10 U/μL, *Mse* I 5 U/μL) 1 μL, BSA 0.2 μL, Buffer 5 μL, 加无菌水至反应总体积 20 μL。于 37℃ 水浴酶切 3~6 h, 1 %的琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果, 证明 DNA 样品已被消化后, 于 65℃ 水浴 20 min, 使酶失活, 4℃ 下保存备用。

(2) 连接反应 每个连接反应混合液包括: 酶切样品 4 μL, *Mse* I 接头(50 pmol/μL) 1.0 μL, *EcoR* I 接头(5 pmol/μL)1.0μL, PEG 2 μL, Buffer

2 μL, T4-DNA 连接酶 2 μL, 加无菌水至反应总体积 20 μL, 16℃ 连接过夜(16 h)。

(3) 预扩增反应 取连接产物 2 μL, 加入 23 μL 如下反应混合液: Buffer 18 μL, *Mse* I 引物(M-C 10 mmol/L)1μL, *EcoR* I 引物(E-A 10 mmol/L)1 μL, *Taq* 酶(5 U/μL)0.3 μL, 无菌水 2.7 μL, 在 PE 9700 PCR 仪上扩增, PCR 反应条件: 72℃ 2 min, 而后按照 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 2 min, 共 30 个循环, 72℃ 10 min。预扩增完成后用无菌水稀释 40 倍, -20℃ 保存。

(4) 选择性扩增反应 取 2 μL 稀释的预扩增产物, 加入 23 μL 如下反应液: *EcoR* I 引物(10 mmol/L) 1 μL, *Mse* I 引物(10 mmol/L), Buffer 18 μL, *Taq* 酶(5U/μL)0.3 μL, 无菌水 2.7μL, PCR 反应条件: 先 94℃ 2 min , 再 94℃ 30s , 65℃ 30s (每循环退火温度降低 0. 7℃), 72℃ 90 s ,13 个循环后变为: 94℃ 30 s , 56℃ 30 s , 72℃ 90 s ,23 个循环。扩增完的样品 4℃ 保存。

1.2.5 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 AFLP 扩增产物采用 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺 19:1, 7 mol/L 尿素, 1×TBE)55 W 恒功率电泳分离 2.5 h, AFLP 扩增产物加入等体积的上样缓冲液(98%甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.25%溴酚蓝, 0.25%二甲苯青), 95℃ 变性 10 min, 立即冰浴, 每个样品上样量为 5 μL , 上样前凝胶 55W 恒功率条件下预电泳 30 min 至温度达到 55℃。电泳结束后用 1%硝酸银染色 10 min, NaOH 显色。利用 9800XL 扫描仪(中国 纷腾)扫描、成像后即可进行结果分析。表 1 为 AFLP 接头、预扩增引物和选择性引物的序列。

表 1 AFLP 接头及引物序列
Tab. 1 Adapter and primer sequence of AFLP

内切酶 enzyme	接头序列 adapter	预扩增引物序列 pre-amplification primer	选择性引物序列 selective primer
<i>EcoR</i> I	5'- CTCGTAG ACTGCGTACC - 3' 3'- CATCTG ACGCATGGTTAA - 5'	5'- GACTGCGTACCAATTC - 3'	E-AAG 5'- GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
			M-CAG 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
			M-CTA 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'
			M-CTC 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC- 3'
<i>Mse</i> I	5'- G ACGTG AGTCCTG AG-3' 3'- TACTCAGG ACTCAT- 5'	5'- GATGAGTCCTGAGTAA - 3'	M-CTT 5'- GATGAGTCCTGAGTAACTT- 3'

2 结果与分析

2.1 AFLP 检测结果

以中国明对虾和普通鲤为对照,对显微介导中国明对虾基因鲤的亲本和子代的基因组进行扫描,本研究的目的是在所获得的大量 AFLP 片段中寻找显微介导中国明对虾基因鲤的供体基因片段,即亲本和子代都有和中国明对虾基因相同的带,而对照鲤没有的带。在 30 对 AFLP 引物中,有 8 对引物在显微介导中国明对虾基因鲤的亲本和子代中共扩增出 30 个供体基因片段,表明显微介导中国明对虾基因鲤子代也具有一定的遗传稳定性。图 1 是其中的 6 对引物对显微介导中国明对虾基因鲤亲本和子代的 AFLP 扩增电泳图,箭头所标示的就是供体基因片段。其中在显微介导中国明对虾基因鲤亲本和子代中,引物 E- AAG/M-CAG、E-AAG/M-CTA 和 E-AAG/M-CTT 各在 1 个位点上扩增出 2 个供体基因片段,而 E-AGG/MCTC 在 2 个位点上扩增出 4 个供体基因片段。

2.2 蛋白质含量分析

分析表明在所测的 4 组实验鱼中,显微介导中国明对虾基因鲤肌肉中的蛋白质含量(质量分数)分别为 18.37%、18.47%、17.60%、17.99%,均高于对照组的 17.06%。经数理统计分析,除第 3

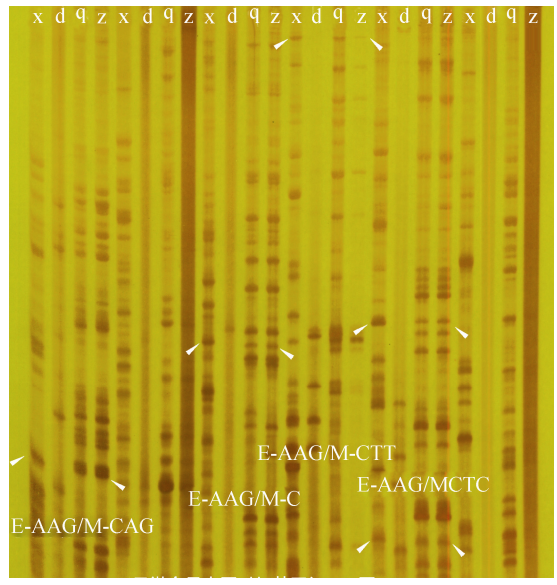


图 1 显微介导中国明对虾基因鲤亲本及子代的 AFLP 电泳图
X: 中国对虾基因, 阳性对照; d: 对照鲤, 阴性对照; q: 显微介导中国明对虾基因鲤亲本; z: 显微介导中国明对虾基因鲤子代
Fig. 1 Amplified result of AFLP primers in partial samples of in transgenic carp and constrast
x: shrimp, positive control; d: reference carp, negative control; q: transgenic carp by micro-injection; z: progenies of transgenic carp

组的蛋白质含量与对照组比较无显著差异外,1 组、2 组和 4 组的蛋白质含量与对照组相比均有显著差异($P<0.05$),并分别提高了 7.68%、8.26%、5.45%(表 2)。

表 2 显微介导中国明对虾基因鲤与普通鲤的肌肉蛋白质中氨基酸含量
Tab. 2 Amino acid content of muscle in transgenic carp and reference carp

氨基酸 amino acid	实验 1 组 Experiment 1	实验 2 组 Experiment 2	实验 3 组 Experiment 3	实验 4 组 Experiment 4	对照组 control fish
天门冬氨酸 Asp	1.83±0.026*	1.86±0.046*	1.74±0.051	1.79±0.030*	1.71±0.020
苏氨酸 Thr	0.78±0.021*	0.79±0.023*	0.74±0.015	0.76±0.012*	0.72±0.006
丝氨酸 Ser	0.68±0.015*	0.69±0.021*	0.66±0.012*	0.66±0.012*	0.63±0.006
谷氨酸 Glu	2.95±0.046*	3.02±0.084*	2.83±0.080	2.87±0.070*	2.78±0.036
甘氨酸 Gly	0.91±0.021*	0.93±0.035*	0.87±0.021*	0.91±0.017*	0.79±0.006
丙氨酸 Ala	1.07±0.017*	1.10±0.031*	1.02±0.035	1.05±0.015*	1.02±0.006
胱氨酸 Cys	0.11±0.012	0.13±0.006	0.13±0.015	0.12±0.042	0.13±0.006
缬氨酸 Val	0.90±0.015*	0.93±0.017*	0.87±0.035	0.90±0.012*	0.86±0.006
蛋氨酸 Met	0.55±0.012	0.56±0.015	0.53±0.015	0.56±0.012	0.54±0.006
异亮氨酸 Ile	0.88±0.010*	0.91±0.025*	0.84±0.025	0.87±0.021	0.83±0.010
亮氨酸 Leu	1.49±0.026*	1.53±0.036*	1.43±0.035	1.46±0.025*	1.40±0.017
酪氨酸 Tyr	0.56±0.010	0.58±0.015	0.56±0.010	0.58±0.015	0.57±0.006
苯丙氨酸 Phe	0.80±0.012*	0.81±0.017*	0.76±0.021	0.80±0.010*	0.76±0.006
赖氨酸 Lys	1.71±0.026*	1.74±0.046*	1.62±0.056	1.68±0.020	1.64±0.021
组氨酸 His	0.59±0.021*	0.60±0.006*	0.57±0.012*	0.57±0.006*	0.48±0.012
精氨酸 Arg	1.05±0.015*	1.08±0.032*	1.00±0.025	1.03±0.023	1.00±0.012
脯氨酸 Pro	0.30±0.006*	0.32±0.010*	0.30±0.006*	0.31±0.006*	0.29±0.006
氨基酸总量 total amino acid	17.16±0.298*	17.56±0.45*	16.45±0.397	16.92±0.297*	16.13±0.165
蛋白质 protein	18.37±0.242*	18.45±0.015*	17.60±0.440	17.99±0.121*	17.06±0.296

注: “*”表示同一行中各组间与对照组相比差异显著($P<0.05$).
Note: “*” indicates that significant difference at the level of $P<0.05$ compared with control.

2.3 氨基酸总量

显微介导中国明对虾基因鲤肌肉中氨基酸总含量(质量分数)分别为 17.16%、17.56%、16.45%、16.92%, 也高于对照组的 16.13%。经数理统计分析, 除第 3 组的氨基酸总含量与对照组, 无显著差异外, 1 组、2 组和 4 组的氨基酸总量均显著高于对照组, 经数理统计分析, 均有显著差异($P < 0.05$), 分别提高了 6.39%、8.87%、4.90%。图 2 是显微介导中国明对虾基因鲤的氨基酸图, 图 3 是对照鲤氨基酸图。

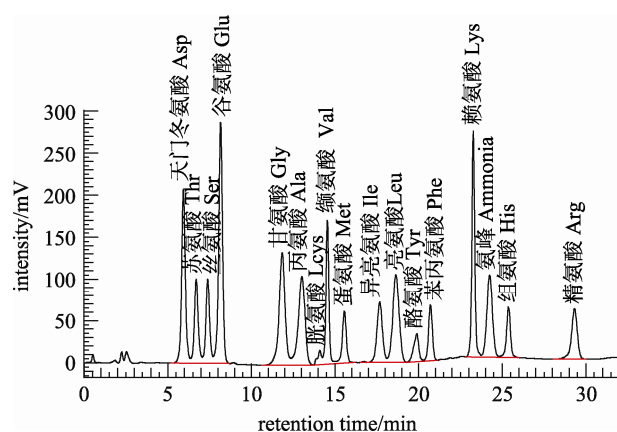


图 2 显微介导中国明对虾基因鲤的氨基酸图(实验组)

Fig. 2 Amino acid chromatogram of group

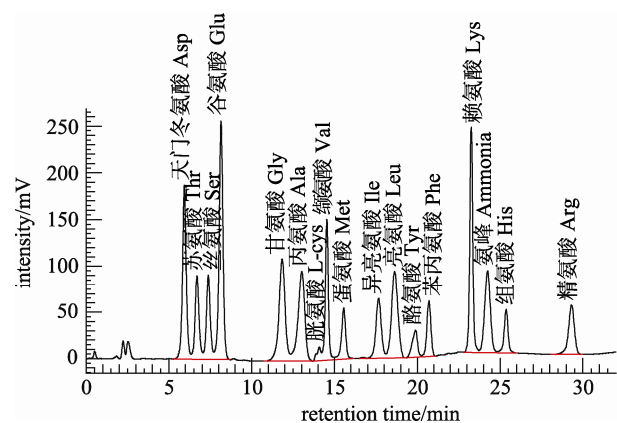


图 3 显微介导中国明对虾基因鲤的氨基酸图(对照组)

Fig. 3 Amino acid chromatogram of control group

2.4 鲜味氨基酸分析

表 2 中的 4 组显微介导中国明对虾基因鲤肌肉中与 4 种味道有关的氨基酸, 即天门冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸总含量分别为 6.76%、

6.91%、6.46%、6.62%, 均高于对照组的 6.30%, 经数理统计分析, 第 1 组和第 2 组的 4 种鲜味氨基酸总量与对照组相比均有显著差异($P < 0.05$); 第 4 组除谷氨酸外, 其他 3 种氨基酸均有显著差异; 而第 3 组除甘氨酸外, 其他 3 种均无显著差异。这 4 组中人体必须氨基酸含量均高于对照组, 除第 3 组外, 第 1 组、第 2 组和第 4 组与对照组相比均有显著差异($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 显微介导中国明对虾基因鲤的 AFLP 检测

扩增片段长度多态性(amplification fragment length polymorphism, AFLP), 是由荷兰科学家 Zabeau 和 vos^[10]发明的一项 DNA 指纹技术, 是对一个物种的全基因组的扫描, 无需预先知道被研究物种的 DNA 序列信息, 适合对遗传背景不多的种类进行分析, 为不同来源和不同复杂程度基因组的分析提供了一个有力的工具。近年来, AFLP 在大量应用于品种鉴定^[11]、遗传多样性^[12-14]、基因作图^[15]、基因表达^[16]等方面, 同时, 也逐渐在转基因检测的方面得到应用。使用 AFLP 标记技术用于转基因鱼检测也有过报道。佟广香等^[17]应用 AFLP 方法, 以野生群体鲤和养殖鲤为对照, 对混有不同比例转大马哈鱼生长激素基因鲤亲本的子一代的基因组进行扫描, 通过遗传多样性、遗传相似度和遗传距离等遗传学参数, 分析子一代基因组的变异程度, 评价转基因鲤的生态安全性。从本研究获得的 AFLP 指纹图谱来看, 显微介导中国明对虾基因鲤亲本和子代中都出现了供体基因片段, 从分子水平上进一步验证了供体基因片段已渗入到受体亲本, 且在子代中也发现与亲本相同的带, 子代的遗传也具有一定的稳定性, 说明在显微介导中国明对虾基因鲤中, 至少有一段序列与供体基因序列是一致的, 供体基因在鲤基因组中是存在的, 因为是随机插入, 肯定会插入不同的受体鱼的基因组片段中。至于所渗入的是中国明对虾基因组的哪部分, 还要将与中国明对虾相同的带切下, 回收、测序, 根据测序结果与已注释基因的编码序列比对, 以确定显微介导中

国明对虾基因鲤中扩增出的供体片段是中国明对虾的哪部分基因。这都还有待进一步研究。

总之,两个物种间杂交,是染色体和染色体间的杂交,而本研究是两个基因组之间的杂交,结果表明此方法是可行的,尽管所渗入的供体基因组基因没有转目标基因那么明确,性状向哪个方面变异也尚不知道,但只要能达到改良受体亲本个别性状的目的,就对鲤科鱼类品质改良新品种有意义。

3.2 显微介导中国明对虾基因鲤主要营养成分

本研究主要是对显微介导中国明对虾基因鲤肌肉中的蛋白质和氨基酸含量进行分析,其目的是要了解所植入的供体基因对显微介导中国明对虾基因鲤的肌肉营养组成是否产生影响。营养成分分析表明,显微介导中国明对虾基因鲤肌肉中的蛋白质和氨基酸含量,均高于对照组,其中天门冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸等 4 种鲜味氨基酸含量也明显超过对照组,经数理统计分析,其中有 3 组均有显著差异($P<0.05$)。另外,人体必须氨基酸总含量分别为 7.11%、7.27%、6.79%、7.03%,均高于对照组(6.75%),说明显微介导中国明对虾基因鲤肌肉营养成分已经具备优良经济鱼类的主要特性,符合人体营养需要。有关外源基因的插入是否会影响鲤蛋白质或氨基酸组成的变化也有相关报道。如崔宗斌等^[18]报道,转人生长激素基因红鲤 F₂ 阳性鱼的蛋白质含量显著高于对照鱼。Fu 等^[19]报道了转人生长激素基因鲤体内的赖氨酸与精氨酸高于对照组。闫学春等^[20]报道了转大麻哈鱼生长激素基因鲤肌肉中的蛋白质和氨基酸含量均未发生变化。这些都说明引起蛋白质和氨基酸组成的变化,可能与基因的来源和插入的位点有关。由于外源基因的插入位点,具有很大的随机性,当外源基因插入到一个活动的基因附近时,就有可能实现表达或高效表达。反之,如果外源基因插入的位置是一个不活动的功能域,就不会表达。而外源基因的插入位点不仅对目的基因本身的表达及调控特性具有重要影响,而且对受体鱼基因组的表达及调控特性也会产生影响。至于不同外源基因是否会影响鱼体内蛋白质

合成的机制,外源基因是否可以增加个别氨基酸的表达量,其遗传机制还不清楚,也说明外源基因在受体鱼体内的精细调控机制还有待进一步研究。至于显微介导中国明对虾基因鲤的氨基酸表达量比对照组高的原因,还需要进一步的实验去验证,可以通过蛋白电泳得到蛋白片段,测定蛋白质的氨基酸序列,从氨基酸推断出所转物种的 DNA 序列,在分析这段 DNA 在供体生物中的功能是翻译哪些特定蛋白质,从而找到提高氨基酸的相关基因。也可以直接对受体鱼的全部 DNA 进行测序而直接找到遗传证据。

3.3 远缘杂交在鱼类育种上的应用

远缘杂交(distant hybridization)更多的是分子水平上的片段杂交。早在 20 世纪 70 年代,周光宇等^[21]就提出了常规远缘杂交存在着 DNA 片段杂交的假设。这种参与杂交的 DNA 片段可能带有部分亲和的远缘物种的结构基因、调控基因,甚至是断裂的无意义的 DNA 片段。周光宇等认为成功的远缘杂交大多数只能是 DNA 片段杂交,即部分与母本同源的 DNA 片段有可能重组进入母本,使杂种性状出现变异,由此提出 DNA 片段杂交假说。鱼类远缘杂交在水产养殖上的应用也是非常广泛的。主要表现在杂种优势^[22]、单性杂种^[23]、提高起捕率^[24]、抗寒育种^[25]、抗病育种^[26]、诱发雌核发育^[27]、多倍体^[28]等。特别是鲤科鱼类不同亚科的杂交中,出现许多多倍体现象,如草鱼与团头鲂^[29]、鲫与鲢^[27]的杂交都可出现三倍体,说明将远缘杂交作为生产多倍体及其他杂种已开始显示其应用价值。

由于中国明对虾和鲤在分类学上亲缘关系较远,按一般远缘杂交的规律,它们之间很难进行杂交,但基因导入方式突破了这种传统杂交选育方法所碰到各种杂交不亲和性障碍,使这项技术在提高鱼类用远缘杂交来创造新类型、新品种方面存在着巨大的应用前景。而中国明对虾肉质细嫩,味道鲜美,营养丰富,并含有多种维生素及人体必需的微量元素(镁、磷、钙等),是高蛋白营养的水产品,是一个优良的遗传资源,如果能够利用显微介导的远缘杂交技术,将这些有益的营养

养特性导入鲤,创造出新的鲤品种,会给鲤育种工作带来强进的推动力,因此,该技术的应用具有潜在的生产应用价值。而本研究采用显微介导的远缘杂交方法进行实验,在受体鱼中明显出现的供体 DNA 片段,从作者进行转基因鱼研究的角度看,外源 DNA 应该和基因一样,是可以整合到受体鱼的基因组中,只是转基因有确切的目标,而总 DNA 没有确切目标,又由于基因组中,非基因 DNA 比例太高,因此获得新性状的机会太少,但仍会有一些机会。鱼类育种的成功经验,也证明需要不断地扩大和丰富鱼类育种的基因库,引入异种的有利基因,因而能够创造出前所未有的新变异种类,甚至合成新的物种^[30]。

依靠显微介导远缘杂交技术改进鲤的品质,虽然在整个研制过程中,相对基因工程鱼,其研究简单而且目标基因尚不清楚,但由于所转基因是基因组 DNA,而且这些 DNA 是没有经过人工遗传修饰的(或没有做试管内的)基因工程操作,因此这种方法得到的鱼还属于远缘杂交范畴,即属于在基因组水平的远缘杂交而不是精卵细胞水平上的杂交,因此可避免转基因生物的安全评价。DNA 检测技术的进步使鉴定优良性决定基因成为可能,本技术借助于 DNA 检测新方法有望成为鱼类育种的实用手段。

参考文献:

- [1] Anderson E, Hubricht. Hybridization in Tradescantia. The evidence for introgressive hybridization[J]. Amer J Botany, 1938, 25: 396-402.
- [2] 杨志松, 刘适发. 渐渗杂交的研究进展及其理论实践意义[J]. 四川动物, 2008, 27(4): 703-707.
- [3] Rieseberg LH, Wendel J. Introgression and its consequences in plants[C]//Hybrid Zone and the Evolutionary Press. New York: Oxford University Press, 1993: 70-103.
- [4] 卞坡, 霍裕平, 秦广雍, 等. 离子束介导外源全 DNA 转化对作物改良的原理初探[J]. 河南农业科学, 2002(12): 8-10.
- [5] Guangyu-zhou. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos[J]. Meth Enzym, 1983, 101: 433-446.
- [6] 刘汉勤. 总 DNA 介导鱼类基因转移的初步研究[J]. 水生生物学报, 1991, 15(3): 286-288.
- [7] 梁明山, 赵邦炯, 游育信, 等. 胡子鲶总 DNA 转化长吻鮠鱼的初步研究[J]. 西南农业学报, 1994, 7(1): 97-101.
- [8] 向建国, 章怀云, 唐必会. 导入鲤鱼总 DNA 的草鱼种与普通草鱼种生长的比较[J]. 内陆水产, 1999, 9: 7-8.
- [9] 朱新平, 刘家照, 夏仕玲, 等. 鲤鱼 DNA 对鲢鱼耐寒性能的影响[J]. 淡水渔业, 1996, 26(3): 14-16.
- [10] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting[J]. Eur Pat Publ No.0534656 A1, 1993.
- [11] Negrini R, Nijmani J, Milanese E, et al. European cattle genetic diversity consortium: Differentiation of European cattle by AFLP fingerprinting[J]. Anim Genet, 2007, 38(1): 60-66.
- [12] 赫崇波, 陈妹君, 高祥刚, 等. 斑点叉尾鲷中国养殖群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中国水产科学, 2008, 15(5): 722-728.
- [13] 王志勇, 王艺磊, 林利民, 等. 福建官井洋大黄鱼 AFLP 指纹多态性的研究[J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 198-202.
- [14] 佟广香, 匡友谊, 尹家胜. 野生哲罗鱼种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(6): 833-841.
- [15] 王伟继, 孔杰, 董世瑞, 等. 中国明对虾 AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建[J]. 动物学报, 2006, 52(3): 575-584.
- [16] Rubinstein AL, Lee D, Luo R, et al. Genes dependent on zebrafish Cyclops function identified by AFLP differential gene expression screen[J]. Genesis, 2000, 26: 86-97.
- [17] 佟广香, 匡友谊, 梁利群, 等. 转基因鲤的生态安全检测[J]. 吉首大学学报: 自然科学版, 2010, 31(1): 96-103.
- [18] 崔宗斌, 朱作言, 崔奕波, 等. 转人生长激素基因红鲤 F2 代阳性鱼的摄食及代谢研究[J]. 科学通报, 1995, 40(16): 1514-1517.
- [19] Fu C, Cui Y, Hung S S, Zhu Z. Whole-body amino acid pattern of F4 human growth hormone gene-transgenic red common carp (*Cyprinus carpio*) fed diets with different protein levels[J]. Aquaculture, 2000, 189: 287-292.
- [20] 闫学春, 梁利群, 曹顶臣, 等. 转基因鲤与普通鲤的肌肉营养成分比较[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(4): 528-532.
- [21] 周光宇. 远缘杂交分子基础-DNA 片段杂交假说的一个例证[J]. 遗传学报, 1979, 4: 405-412.
- [22] 楼允东, 张克俭, 徐庆登, 等. 高邮杂交鲫及亲本遗传性状的比较研究[J]. 遗传, 1992, 14(4): 18-20.
- [23] 王楚松, 夏德全, 胡玫, 等. 奥尼鱼(*S.nilotica* ♀ × *S.aurea* ♂)杂种优势利用的研究[J]. 淡水渔业, 1989, 6: 14-15.
- [24] 张建森, 马仲波, 王楚松. 元江鲤 ♀ × 柏氏鲤 ♂ 杂交一代(柏元鲤)的研究和利用[J]. 淡水渔业, 1979, 2: 14-18.
- [25] 王祖熊, 黄文郁, 鲢鱼混精受精的育种试验[J]. 水产学报,

- 1985, 9(2): 203–206.
- [26] 吴维新, 李传武, 刘国安, 等. 鲤与草鱼杂交四倍体及其回交三倍体草鱼杂种的研究[J]. 水生生物学报, 1988, 12(4): 355–363.
- [27] 桂建芳, 梁绍昌, 朱蓝菲, 等. 鱼类远缘杂交正反交杂种胚胎发育差异的细胞遗传学分析[J]. 动物学研究, 1993, 14(2): 171–177.
- [28] 张 纯, 刘少军, 孙远东, 等. 远缘杂交形成的二倍体鱼和多倍体鱼生殖细胞染色体研究. 分子细胞生物学报, 2008, 41(1): 53–60.
- [29] 吴清江, 傅洪拓, 叶玉珍. 酶的基因剂量效应及其对鱼类远缘杂交的影响[J]. 水生生物学报, 1997, 21(2): 143–151.
- [30] 楼允东, 李小勤. 中国鱼类远缘杂交研究及其在水产养殖上的应用[J]. 中国水产科学, 2006, 13(1): 151–158.

Introgressive hybridization of exogenous gene by micro-injection in carp (*Cyprinus carpio* L.) breeding

YAN Xuechun¹, ZHANG Xiaofeng¹, LIU Cui^{1,2}, SUN Xiaowen¹, LIANG Liquan¹, CAO Dingchen¹, LI Chao¹, GE Yanlong¹

1. Key Laboratory of Aquatic Biotechnology, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. Collage of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China

Abstract: Introgressive hybridization is a movement of a gene from one species into the gene pool of another by repeated backcrossing an interspecific hybrid with one of its parent species. It is an important source of genetic variation in natural population. But the natural introgressive does not have the human direct interference while the exotic introgression is induced intentionally and very slowly. Transgenic technique is an extreme example of introgression verified as a successful hybridization from a transgenic plant to a wild relative. Carp is an important species of fish, but has low muscle quality. The study that focused on the feasibility improves the quality of muscle of carp by introgressive hybridization technology. In this study, transgenic carp progenies were constructed by transferring all-fish gene of shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) to the zygote of common carp (*Cyprinus carpio* L.) using mature micro-injection technology. AFLP technology was used to identify the transgenic zygote. The results of genotype of 30 pairs of AFLP markers and analysis of nutrient content of muscle showed that: (1) The gene of shrimp were detected in genome of transgenic carp by 30 pairs of primers of AFLP of shrimp which confirmed that the genomic fragment of shrimp exists in transgenic carp and has no found in contrast ones, then indicates that it should be feasible to transmit genetic material between two distant related species by transgenic method at molecular level. (2) The statistic analysis showed that the contents of crude protein of transgenic carps were 18.37%, 18.47% and 17.99%, which were higher than those in non-transgenic ones(17.06%). Total amino acids contents were 17.16%, 17.56% and 16.92% respectively, also higher than that of control (16.13%), of which 4 kinds of amino acids contents in transgenic carp related to taste were higher than those in common carp significantly($P<0.05$), such as aspartic, glutamic, glycine and alanine. So, the effects of shrimp gene directly transmitted to the carp genome gives rise to increase nutrient content and amino acids. This method would be useful in improving carp muscle quality and heredity base, and was a very powerful technology for exogenous DNA transferred between distant related species. In the future, more and more good trait of fish or other species would be improved by this technology, although this technique needs developing further. Transgenic fish will be used in farm after it is tested no harm to ecosystem and human beings. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 275–282]

Key words: micro-injection; exogenous gene; total genome DNA; introgressive hybridization; *Fenneropenaeus chinensis*; *Cyprinus carpio* L.

Corresponding author: SUN Xiaowen. E-mail: sunxw2002@163.com