

唐鱼 β -肌动蛋白基因启动子的分离及其驱动活性的检测

王海英^{1,2}, 叶星¹, 白俊杰¹, 夏仕玲¹, 劳海华¹, 简清¹, 王琳¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380; 2. 上海水产大学生命科学技术学院, 上海 200090)

摘要: 利用 PCR 技术克隆唐鱼 (*Tanichthys albonubes*) β -actin 基因。所克隆的 β -actin 基因片段为 1 464 bp, 包含长为 1 374 bp 的启动调控区和 90 bp 的部分开放阅读框。启动调控区包括 105 bp 的 β -actin 基因上游调控序列、第一个外显子和第一个内含子。上游调控序列中含有对转录起重要作用的 CAAT Box、TATA Box、CArG Box 等元件。将唐鱼 β -actin 启动调控区克隆到红色荧光表达载体 pDsRed2-1 上, 并显微注射到唐鱼受精卵中, 荧光显微镜观察红色荧光蛋白 (RFP) 的表达。结果表明, RFP 在转基因唐鱼中的表达阳性率较高, 最高可达 51.8%, 且 RFP 的表达水平较高。PCR 检测转基因唐鱼的部分器官组织, 在被检组织器官中均能检测到外源 RFP 基因; 而 RT-PCR 以及 Southern blot 验证显示 RFP mRNA 的表达有所不同; Southern blot 检测肌肉组织基因组 DNA, 可见比阳性载体大的杂交条带。说明所检测的组织中已发生外源基因 RFP 的整合, 但有些组织存在表达水平较低或者不表达的现象。本实验分离到的 β -actin 基因启动子序列具有有效的驱动功能, 可启动外源基因在唐鱼体内的高效表达, 从而为下一步进行功能基因的转化研究奠定基础。
[中国水产科学, 2008, 15 (1): 47-54]

关键词: 唐鱼; β -肌动蛋白启动子; 红色荧光蛋白; 转基因; 显微注射; 表达

中图分类号: Q959.46

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)01-0047-08

转基因研究的一个关键内容就是外源基因在宿主中的有效表达, 而真核生物基因的表达在很大程度上取决于启动子的活性, 启动子决定了基因表达的时空以及强度。肌动蛋白 (Actin) 是真核细胞中含量丰富的细胞骨架蛋白之一, 在脊椎动物中至少发现 6 种异型体。这些异型体可分为肌肉型和非肌肉型两种, 它们的氨基酸序列差异不大, 但在机体的发育过程中却有着不同的表达调控, 这可能是通过转录因子与基因上不同的调控元件结合而实现的^[1-2]。 β -actin 是最主要的非肌肉或胞质肌动蛋白异型体, 它在真核生物的大多数非肌肉细胞以及未分化的成肌细胞中表达^[1]。与该基因转录下调相关的元件位于 3' 非翻译区, 不帶此 3' 非翻译区下调相关元件的 β -actin 启动子, 在所有研究过的细胞类型包括肌肉细胞中组成性表达^[3-4]。 β -actin 启动子具有与 SV40 早期启动子相当的或更强的启动转录活性^[5], 因此成为转基因研究的重要启动子之一。

唐鱼 (*Tanichthys albonubes* Lin), 又名白云金丝鱼, 隶属鲤形目 (Cypriniformes), 鲤科 (Cyprinidae),

鲴亚科 (Danioninae), 唐鱼属 (*Tanichthys* Lin), 为中国特有种。其分布区狭窄, 近代仅分布于广州的白云山、花都以及附近的山溪中, 目前自然生活的群体仅发现于广州从化^[6-7]。由于唐鱼的个体小、性成熟期与孵化期短、胚体透明、具有与斑马鱼 (*Danio rerio*) 等模式生物相似的特征, 适于作为分子生物学研究的受体鱼, 也是鱼类转基因研究的好材料。

本实验克隆了唐鱼的 β -actin 基因启动子, 并构建了以红色荧光蛋白 (RFP) 基因作为报告基因的重组表达载体。以唐鱼为受体鱼检测唐鱼 β -actin 基因启动子驱动基因表达的活性, 并通过 RT-PCR 技术以及 Southern blot 检测 RFP 在转基因唐鱼各组织的表达情况。

1 材料与方法

1.1 材料

DNA 提取试剂盒 (E.Z.N.A SQ Tissue DNA Kit)、质粒 DNA 提取试剂盒 (E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit) 和胶回收试剂盒 (E.Z.N.A Gel Extraction Kit)

收稿日期: 2007-04-30; 修订日期: 2007-07-24.

基金项目: 广东省科技计划项目 (2003C20310); 广东省科技重点引导项目 (2005B20301018).

作者简介: 王海英 (1981-), 女, 硕士, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: jolly8268@hotmail.com

通讯作者: 叶星. Tel: 020-81617091; E-mail: gzyexing@163.com

为 Omega 公司产品。总 RNA 提取试剂盒 (SV Total RNA Isolation System) 为 Promega 公司产品, 反转录试剂盒 *ReverTra Ace- α -TM* 为 ToYoBo 公司产品。克隆用的载体 pMD19-T Vector Systems(T 载体)、限制性内切酶、RNA 酶 (RNase) 和 PCR 扩增试剂盒 (TaKaRa LA PCR Kit Ver2.1) 购自 TaKaRa 公司。红色荧光蛋白基因载体 (pDsRed2-1) 购自 Clontech 公司。PCR 仪、半干转移电泳仪 trans-Blot[®]SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell 为 BIO-RAD 公司产品。杂交炉 600371-117 为 Thermo Electron Corporation 产品。地高辛探针标记和检测试剂盒 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 购自 Roche Applied Science(Germany) 公司。带正电尼龙膜 Magmaprobe Nylon Transfer Membrane 购自 Osmonics (USA) 公司。其他试剂和仪器其他试剂为国产分析纯产品。大肠杆菌 DH₅ α 由本实验室保存。

实验用唐鱼由中国水产科学研究院珠江水产研究所生物技术室提供。

1.2 方法

1.2.1 唐鱼 β -actin 启动子的克隆 取唐鱼肌肉组织 30 mg, 提取基因组 DNA, 具体操作参照 E.Z.N.A SQ Tissue DNA Kit 推荐的方法。提取的基因组 DNA 用 1.0% 琼脂糖电泳检测, -20℃ 保存备用。根据 GenBank 上已登录的鲤科鱼类 β -actin 基因启动子序列以及尼罗罗非鱼 β -actin 基因启动子序列^[8] 设计 1 对特异引物用于克隆唐鱼 β -actin 基因启动子 Z1、Z2, 序列见表 1。

以唐鱼基因组 DNA 为模板, 以 Z1、Z2 为引物进行 PCR 扩增, 反应条件为 94℃ 预变性 3 min 后进入循环: 94℃ 变性 50 s, 54℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。1.0% 琼脂糖电泳检测扩增产物。

PCR 扩增产物按照胶回收试剂盒使用手册所提供的方法回收后, 与 pMD19-T Vector 连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH₅ α 菌株, 提取质粒、酶切进行初步鉴定后委托上海英俊生物公司进行 DNA 序列测定。测定结果用 DNA 分析软件 VECTOR VTI 8.0 进行分析, 并通过 BLAST 软件搜索 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 的核酸数据库, 进行同源性比较。

1.2.2 表达载体的构建及显微注射 将 β -actin 启动子用 PCR 方法进行改造, 使其带有合适的限制性

内切酶酶切位点 (*EcoR* I 和 *Bam*H I), 扩增产物经酶切消化, 与经同样内切酶消化后的红色荧光表达载体 (pDsRed2-1) 连接, 连接产物转化大肠杆菌后提取阳性质粒, 命名为 pTA-DsRed。参照简清等^[9] 和朱新平等^[10] 的方法通过显微注射将重组质粒注射到唐鱼的受精卵中。受精卵进行孵化、培育, 用荧光显微镜 (带有 2072 滤光片组合) 检测 RFP 的表达情况, 并用数码相机存储检测结果。

1.2.3 转基因唐鱼 RFP 基因的检测

(1) 引物设计 将 β -actin 基因的表达作为组织表达的内参照。根据 NCBI 上已登陆的多种鱼类的 β -actin 基因序列: 斑马鱼 AF057040, 斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*, AY510710), 鲫 (*Carassius auratus*, AB039726), 武昌鱼 (*Megalobrama amblycephala*, AY170122), 青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*, AY289135), 鲤 (*Cyprinus carpio*, M24113), 草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*, M25013), 鲢 (*Cirrhinus molitorella*, DQ007446) 等, 在保守区上设计 1 对引物以扩增 β -actin 基因, 上游引物位于 β -actin 基因第 4 个外显子中, 下游引物位于第 5 个外显子中, 分别命名为 β -actin-F, β -actin-R。并根据红色荧光蛋白基因序列设计 1 对检测引物 Red-F 和 Red-R, BLAST 分析确认所选择扩增的区域为红色荧光蛋白基因所特有, 与其他基因序列同源性极低。引物序列如表 1 所示。

表 1 用于 β -actin 启动子克隆及 RFP 检测的引物
Tab.1 Primers for β -actin promoter cloning and RFP assay

引物 Primer	序列 Sequence
Z1	5'-GTGTGTGACGCTRGACC-3'
Z2	5'-AAACAGCACGAGGGGCATCATC-3'
β -actin-F	5'-GTGCCCCTCTACGAGGGTTACGC-3'
β -actin-R	5'-TGGTCTCGTGGATACCGCAAG-3'
Red-F	5'-GTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGT-3'
Red-R	5'-CTACGGAACAGGTGGTGGCGG-3'

(2) RFP 在转基因唐鱼组织中的检测 取可观察到红色荧光的 4 月龄转基因唐鱼 (A 和 B 个体) 以及野生型唐鱼 (阴性对照) 各两尾, 分别提取眼、肌、鳍、内脏组织的基因组 DNA 以及总 RNA。

基因组 DNA 的提取按 1.2.1 的提取方法。以

基因组 DNA 为模板, 以 Red-F 和 Red-R 为引物扩增红色荧光蛋白基因, 预期扩增长度为 487 bp。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min 后进入循环 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min;

总 RNA 的提取使用试剂盒 SV Total RNA Isolation System。采用 *ReverTra Ace- α* TM 试剂盒 (TOYOBO, Japan) 进行 cDNA 第一链的反转录; 并以此链为模板, 分别进行 β -actin 基因和 RFP 基因的扩增。引物 β -actin-F 和 β -actin-R 扩增得到的 β -actin 基因片段长约 350 bp, 引物 Red-F 和 Red-R 扩增得到的 RFP 基因片段长为 487 bp。扩增反应条件同上。

(3) PCR 产物的 Southern blot 验证 以红色荧光蛋白基因载体 pDsRed2-1 质粒为模板, 以 Red-F 和 Red-R 为引物, 扩增长度为 487 bp 的红色荧光蛋白基因片段, 回收并克隆测序。按照试剂盒说明进行地高辛标记。用该标记片段作为探针, 与步骤 (2) 所得的 PCR 产物和 RT-PCR 产物进行 Southern blot 验证。阳性对照为载体 pDsRed2-1 的 RFP PCR 产物, 阴性对照分别为野生型唐鱼的 PCR 产物和 RT-PCR 产物。普通琼脂糖凝胶电泳 (不加 EB) 后采用半干转移法进行转膜, 10 V 电转 1 h 后将凝胶置于含 EB 的缓冲液中浸泡 5 min 后于紫外光下检测转膜效率。转膜后用上述标记探针进行 Southern blot 杂交, 洗膜、显色等, 相关操作见《分子克隆实验指南》^[11]。

(4) 转基因唐鱼基因组 DNA 的 Southern blot 检测 取转红色荧光蛋白基因唐鱼 1 尾, 提取肌肉组织基因组 DNA, 经 *EcoRI* 酶切后纯化, 同时以质

粒 pDsRed2-1 作为阳性对照。不加 EB 的琼脂糖凝胶于 10 V 电泳 24 h 后, 采用半干转移法进行 DNA 转膜, 后用标记探针进行 Southern blot 杂交, 具体操作方法同步骤 (3)。

2 结果与分析

2.1 唐鱼 β -actin 基因启动子及部分 ORF 的克隆

采用特异引物, 以唐鱼基因组 DNA 为模板, 扩增出 1 个约 1 500 bp 的特异带。将其回收后与 pMD19-T Vector 连接, 经菌落 PCR 和酶切筛选出重组子并命名为 TA-T, 将重组子测序。序列分析结果如图 1 所示, 并登录于 GenBank (Accession No.EF026000)。序列分析表明, 所克隆到的片段长度为 1 464 bp, 含 1 374 bp 的启动调控区序列和 90 bp 的 β -actin 基因的部分开放阅读框序列, 该开放阅读框编码 30 个氨基酸。通过 BLAST 软件搜索 NCBI 的核酸数据库, 发现此多肽较为保守与其他鱼类的 β -actin 具有较高的同源性: 与斑马鱼的同源性为 100%, 与斑点叉尾鲷的同源性为 97%, 与罗非鱼的同源性为 96.7%。在 5' 端的非翻译区含有与大多数鱼类相同的与转录密切相关的几个转录元件: CAAT Box, CArG Box 和 TATA Box, 其位置分别在转录起始位点 (+1) 上游的 -89、-59、-26 处。

2.2 pTA-DsRed 表达质粒的构建

利用基因重组技术, 将唐鱼 β -actin 启动子 (TA) 插入红色荧光基因载体 pDsRed2-1 中, 连接产物转化大肠杆菌后提取阳性质粒测序, 结果表明, 启动子与载体连接正确, 可用于下一步的显微注射。

```

1  GTGTGTGACG CTGGA[CCAAT] CAGAGAGCAG AGTTCCGAAA GTTTCCTTT TATGGCTAGA GCCGGGCATG
71  TGGTGTCTG[TA TAA]AACAGCA CGCCAGCTT TTCTCCTCA CTTTGAGCTC CTCCACACGC AGCTAGTGCG
                                     intron 1
141  GAATATCATC AGCTTGTAAC CCATTCTCTT AAGTCGACAA CCCCCCCAA ACCTAAGGTA AGTTAGTTTC
211  TCAGCTTTTG GTGCATTTTC CTGAATTTAT TTTAAAGTT AATTAGTATT TATTAATGTA TTGCTAAAAAT
281  .....
1331 AGCGGTGCAC TAAAACTTTT TCTTTTCACA TTTACAGTTC AGCCATGGAT GATGAAATTG CCGCACTGGT
1401 TGTGACAAC GGATCCGGTA TGTGCAAGC CGGATTCGCT GGAGATGATG CCCCTCGTGC TGTT

```

图 1 唐鱼的 β -actin 基因启动子及部分 ORF 序列

注: 3 个方框依次为 CAAT、CArG 和 TATA Box; +1 为转录起始位点; 阴影部分为 β -actin 基因开放阅读框的第一个外显子; 黑体为翻译起始密码子。

Fig.1 β -actin gene promoter and partial ORF sequence of *Tanichthys albonubes*

Note: The CAAT, CArG and TATA Box were showed in box; "+1" is the site for initiation of transcription; shadow shows the first exon of β -actin gene; initiation codon was shown in bold.

2.3 pTA-DsRed表达质粒在唐鱼体内的表达

注射过线性化重组荧光表达载体 (pTA-DsRed) 的受精卵经过孵化培育, 出膜后 72 h 的仔鱼在荧光显微镜下可观察到红色荧光 (图 2)。不同批次显微注射的唐鱼其阳性率均在 20% 以上, 最高可达 51.8% (14 尾 / 27 尾)。4 月龄成鱼肉眼可见红色荧光 (图 3)。



图 2 在紫外光下的转 pTA-DsRed 唐鱼 (出膜后 72 h)

Fig. 2 Transgenic *Tanichthys albonubes* under UV light (72 hph)



图 3 在自然光下的转 pTA-DsRed 唐鱼 (4 月龄)

Fig. 3 Transgenic *Tanichthys albonubes* under normal light (4-month-old)

2.4 转基因唐鱼组织中RFP的检测

2.4.1 内参照基因片段的克隆与探针标记 以唐鱼 (野生型) 总 RNA 反转录后的 cDNA 第一链为模板, 以引物 β -actin-F 和 β -actin-R 进行扩增, 扩增产物回收后测序。序列经 BLAST 分析显示, 所克隆的序列与多种鱼类的 β -actin 基因 cDNA 序列高度同源: 与斑马鱼以及草鱼的同源性为 97%, 与泥鳅的同源性为 96%。说明所克隆的序列为唐鱼 β -actin 基因序列, 可作为 RT-PCR 的内参使用。

以红色荧光载体 pDsRed2-1 为模板, 以引物 Red-F 和 Red-R 进行扩增, 回收扩增产物并测序, 结果表明所克隆的片段为 RFP。对此片段进行地高辛标记, 标记后的探针按 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 稀释, 点膜检测, 结果显示稀释到 500 倍的探针仍可显色, 说明探针标记效率较高。

2.4.2 转基因唐鱼基因组 DNA 和 mRNA 中 RFP 基因的检测 转基因唐鱼 (A 个体和 B 个体) 的眼、肌、鳍、内脏的基因组 DNA PCR 的检测结果表明, A 个体的肌、内脏和鳍, B 个体的眼、内脏、肌和鳍以及阳性对照 (质粒 pDsRed2-1) 均能扩增出预期大小的特异带, 阴性对照没有扩增出特异带 (图 4)。

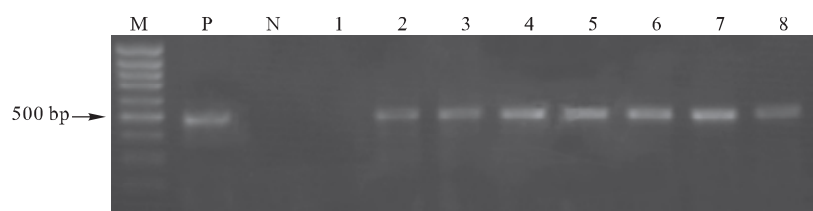


图 4 转基因唐鱼组织 RFP 基因的 PCR 检测

注: M: 100 bp 分子量标准; P: 阳性对照 (pDsRed2-1); N: 阴性对照 (野生唐鱼); 1-4: 转基因唐鱼 A 个体的眼、内脏、肌和鳍; 5-8: 转基因唐鱼 B 个体的眼、内脏、肌和鳍。

Fig. 4 PCR assay of RFP gene in some tissues of two transgenic *Tanichthys albonubes*

Note: M: 100 bp Marker; P: positive control (pDsRed2-1); N: negative control (wild *Tanichthys albonubes*); 1-4: eyes, viscous, muscle and fins of transgenic *Tanichthys albonubes* A; 5-8: eyes, viscous, muscle and fins of transgenic *Tanichthys albonubes* B.

转基因唐鱼 (A 个体和 B 个体) 的眼、肌、鳍、内脏的总 RNA 反转录后, 分别进行内参照基因和 RFP 基因的扩增, 野生型唐鱼作阴性对照, 结果表

明: A 个体的肌、内脏 (图略) 以及 B 个体的肌和鳍都能扩增出 487 bp 的特异带 (图 5), 对照组 (野生型唐鱼) 均未扩增出特异带。

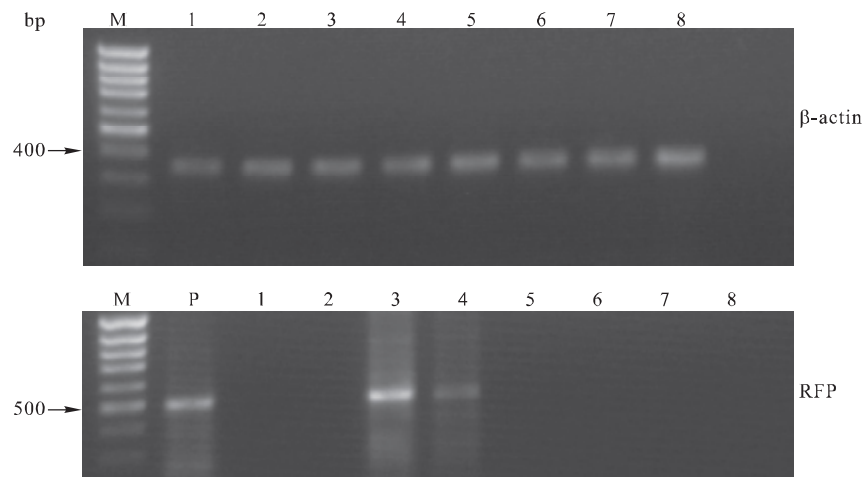


图5 转基因唐鱼 B 个体 RFP 的 RT-PCR 检测
注: M: 100 bp 分子量标准; 1~4: 转基因唐鱼 B 眼、内脏、肌和鳍; 5~8: 野生唐鱼眼、内脏、肌和鳍; P: 阳性对照 (pDsRed2-1)。

Fig.5 RFP RT-PCR assay of transgenic *Tanichthys albonubes*
Note: M: 100 bp Marker; 1 4: eyes, viscus, muscle and fins of transgenic *Tanichthys albonubes* B; 5 8: eyes, viscus, muscle and fins of wild *Tanichthys albonubes*; P: positive control (pDsRed2-1)。

2.4.3 RFP 的 Southern blot 检验

(1)PCR 产物与 RT-PCR 产物的 Southern blot 验证 PCR 产物的 Southern blot 杂交结果显示 2 个转基因鱼个体的 4 个组织器官均呈阳性; RT-

PCR 产物的 Southern blot 杂交的结果显示 A 个体的眼、内脏、肌呈现阳性, B 个体的眼、内脏、肌和鳍 4 个组织均呈现阳性, 阴性对照组均显示阴性 (图 6)。

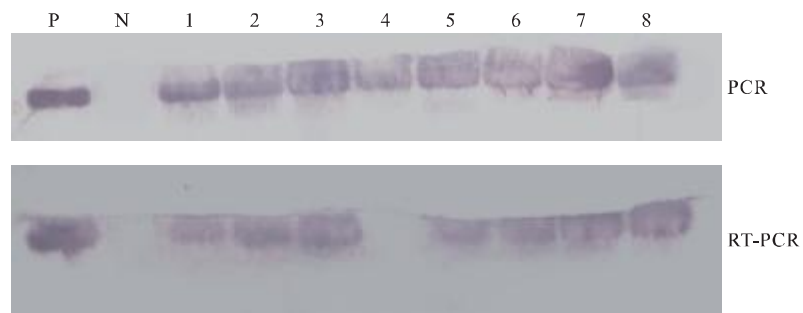


图6 RFP 基因 PCR 产物以及 RT-PCR 产物的 Southern blot 杂交验证
注: P: 阳性对照 (pDsRed2-1); N: 阴性对照 (野生唐鱼); 1~4: 转基因唐鱼 A 个体的眼、内脏、肌和鳍; 5~8: 转基因唐鱼 B 个体的眼、内脏、肌和鳍。

Fig.6 Southern blot results of RFP gene PCR and RT-PCR products of transgenic *Tanichthys albonubs*
Note: P: positive control (pDsRed2-1); N: negative control (wild *Tanichthys albonubes*); 1 4: eyes, viscus, muscle and fins of transgenic *Tanichthys albonubes* A; 5-8: eyes, viscus, muscle and fins of transgenic *Tanichthys albonubes* B.

(2) 肌肉基因组 DNA 的 Southern blot 检测 将转基因唐鱼肌肉组织基因组 DNA 酶切后的纯化产物进行电泳、转膜, Southern blot 检验显示有阳性

杂交带。杂交带的分子量明显大于阳性质粒, 未发现小分子的杂交带 (图 7)。

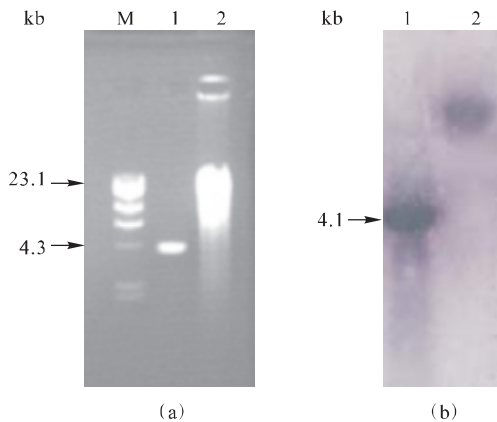


图7 转基因唐鱼基因组 DNA RFP 基因的 Southern blot 杂交

(a) 转膜前 (琼脂糖凝胶电泳) (b) 转膜后

注: 1: 阳性对照 pDsRed2-1 (4.1kb); 2: 肌肉组织基因组 DNA 酶切产物; M: λ Hind III 分子量标准。

Fig.7 Southern blot of transgenic *Tanichthys albonubes* genomic DNA

(a) before trans-bolt (gel electrophoresis) (b) after trans-blot

Note: 1: positive control (pDsRed2-1, 4.1kb); 2: genomic DNA from muscle of transgenic *Tanichthys albonubes*; M: λ Hind III Marker.

3 讨论

已有多个研究结果表明, β -actin 的 5' 侧翼区包含了 3 个与转录相关的重要调控元件: CCAAT Box、TATA Box 和 CArG Box, 这些元件是维持启动子有效启动活性以及保持高水平转录活性所必需的, 它们的缺失会导致转录活性的明显降低, 甚至会使 β -actin 启动子的活性完全丧失^[1-5, 12-14]。LIU 等分析了鲤的 β -actin 基因启动子的序列, 发现由长度为 1.1 kb 的上游侧翼序列和不翻译的第 1 个外显子与第 1 个内含子组成的 2.5 kb 启动调控序列, 其转录氯乙酰转移酶 (CAT) 的活性要比仅含 1.1 kb 的上游侧翼序列的活性高出 4 倍。其中在第 1 个内含子中的长度为 304 bp 的 *Pst* I 片段对于转录的活性尤为重要, 这段序列的反转和缺失都会使启动子的转录活性几乎为零^[2]。本实验克隆了总长为 1.3 kb 的唐鱼 β -actin 启动调控序列, 包含 108 bp 的 5' 的上游近端启动子序列, 其中有 3 个与转录相关的重要调控元件: CCAAT Box、TATA Box 和 CArG Box, 以及下游的不翻译的第 1 个外显子以及第 1 个内含子, 转基因结果显示所克隆的此段启动子序列具有有效的驱动转录的活性。但此 5' 侧

翼区的上游是否还有更重要的启动元件从而具有更有效的启动转录活性还需进一步的研究。

Alam 认为, 转基因构件中启动子和编码基因应尽可能源于同源物种, 以有利于基因的表达^[15]。Rahman 等在转基因罗非鱼研究中发现, 外源生长激素基因与受体鱼生长激素基因的同源性越高, 其促生长的作用越明显^[16-17]。Beardmore 提出了转自源基因 (Autotransgenic) 的概念, 他认为启动子和结构基因从受体鱼或与受体鱼同一物种中获得, 可最大程度降低安全性方面的风险, 而且转自源生长激素基因对转基因鱼的生长有显著的促生长效应^[18]。Nam 等将源自泥鳅的 β -actin 启动子和 GH 编码基因融合转入泥鳅中获得超大个体转基因泥鳅^[19]; 本研究使用唐鱼自身的 β -actin 启动子序列能使外源基因得到有效的表达, 推测该启动子序列也可有效地驱动转植唐鱼自源功能基因的表达。

在转基因研究中, 利用报告基因可简单快速的检测出转基因阳性个体。红色荧光蛋白 (RFP) 和绿色荧光蛋白 (GFP) 作为在体的活性报告基因在研究基因表达调控、基因启动子或增强子功能等方面得到了广泛的应用。借助荧光显微镜可以直接进行活体观察检测, 转基因个体可以用于后续的研究。但使用荧光蛋白作为标记基因存在的一个缺点就是不能精确定量, 若表达水平较低则观察不到荧光, 而且在鱼体不透明的组织器官中很难观察到荧光。本实验采用 PCR 检测与 Southern blot 结合的方法检测外源基因在转基因个体组织中的整合和表达情况。Zhu 等的研究表明, 外源基因在鱼类基因组中的整合是一个渐进的过程, 线性外源 DNA 在胚胎发生的晚期与受体基因组发生了整合作用^[20]。在原肠末期以后, 内源核酸酶的大量表达或由于器官分化而失去了“游离”基因自主复制的条件使得外源 DNA 片段总量减少, 最终只有少量与受体基因组整合, 至摄食阶段的鱼苗样品中已不存在“游离”的外源基因^[20-21]。本实验进行了 4 月龄转基因唐鱼肌肉基因组 DNA 的 Southern blot, 结果检测到比阳性质粒分子大的杂交带, 而没有检测到游离的小分子存在, 表明外源基因 RFP 已整合到肌肉基因组大分子中。

由于外源基因的整合发生在胚胎主要器官分化以后, 因而导致在首代转基因鱼绝大部分是外源基因的嵌合体^[22-23], 即不同组织或器官之间, 同一器官的不同细胞之间所整合的外源基因在数量和

质量(整合位点)是不均一的^[21]。外源基因在受体基因组中的整合是随机的,整合的位点对外源基因的表达产生位置效应(position effect)。外源基因的整合可分有效整合、沉默整合和毒性整合,当外源基因整合于受体染色体的异染色质区就会导致不表达,即为沉默整合^[21]。本实验A个体的眼、内脏和肌肉中检测到RFP mRNA,而在鳍条中虽检测到RFP DNA但未检测到mRNA,这可能是转基因的“位置效应”导致表达量过低或是不表达。

在大部分转基因鱼研究中,通过显微注射法得到的转基因鱼阳性率通常在10%左右^[24]。阳性率高低受多个方面的影响,如:操作技术的熟练程度、注射的部位及时期、受精卵的质量以及注射基因的浓度、构型等。本实验通过荧光显微镜检测出膜72h的仔鱼,其阳性率均在20%以上,最高的可达51.8%,还未含部分可能外源基因已经转化但表达水平较低未能观察到荧光的转基因鱼,高阳性率的原因可能与使用受体自身的启动子有关。实验结果表明所克隆的启动子序列具有有效的驱动基因表达的功能,可驱使外源基因在唐鱼体内得到高效表达,为下一步进行功能基因的转化打下了基础。

参考文献:

- [1] Wolfgang W, Quitschket, Ze-Yu Lin, et al. The β -actin Promoter [J]. J Biol Chem, 1989, 264 (10): 9 539-9 546.
- [2] Liu Z J, Boaz M, Anthony J, et al. Functional Analysis of Elements Affecting Expression of the β actin Gene of Carp [J]. Mol Cell Biol, 1990, 10 (7): 3 432-3 440.
- [3] Liliana D Z, Anne S T, Bruce M P. A 40-base-pair sequence in the 3' end of the β -actin gene regulates β -actin mRNA transcription during myogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 85: 1 389-1 393.
- [4] Anne S T, Juanita D E, Bruce M P. Expression and Regulation of Chicken actin genes introduced into mouse myogenic and nonmyogenic cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 2 980-2 984.
- [5] Robert M, Frederickson, Monette R, et al. 5' flanking and first intron sequences of the human β -actin gene required for efficient promoter activity [J]. Nucl Acids Res, 1989, 17 (1): 254-270.
- [6] 中国水产科学研究院珠江水产研究所. 广东淡水鱼类志 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1991: 77 78.
- [7] 陈国柱, 方展强, 马广智. 唐鱼胚胎发育观察 [J]. 中国水产科学, 2004, 11 (6): 489-495.
- [8] Gyu-Lin H, Rabman M A, Shaheerudin A R, et al. Isolation and characterization of tilapia beta-actin promoter and comparison of its activity with carp beta-actin promoter [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1625 (1): 11-18.
- [9] 简清, 白俊杰, 叶星, 等. 斑马鱼 Mylz 启动子的克隆与转绿色荧光蛋白基因鱼的构建 [J]. 中国水产科学, 2004, 11 (5): 391-395.
- [10] 朱新平, 夏仕玲, 张跃, 等. 转抗冻蛋白基因鲮鱼的初步研究 [J]. 中国水产科学, 1997, 4 (2): 79-80.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南: 第2版 [M]. 北京: 科学出版社, 1993.
- [12] Ponte P, Ng S, Engel J, et al. Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA [J]. Nucl Acids Res, 1984, 12: 1 687-1 696.
- [13] Noh J K, Cho K N, Ham E H, et al. Genomic cloning of mud loach *Misgurnus mizolepis* (Cypriniformes, Cobitidae) beta-actin gene and usefulness of its promoter region for fish transgenesis [J]. Mar Biotechnol (NY), 2003, 5 (3): 244-252.
- [14] Feng H, Cheng J, Luo J, et al. Cloning of black carp β -actin gene and primarily detecting the function of its promoter region [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33 (2): 133-140.
- [15] Alam M S, Popplewell A, Maclean N. Gwemline transmission and expression of a lacZ containing transgene in tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Transgenic Res, 1996, 5: 87-95.
- [16] Rahman M A, Mak R, Ayad H, et al. Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Transgenic Res, 1998, 7: 357 369.
- [17] Rahman M A, Maclean N. Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene [J]. Aquaculture, 1999, 173: 333 346.
- [18] Beardmore J A. Transgenics: autotransgenics and allotransgenics [J]. Transgenic Res, 1997, 6: 107-108.
- [19] Nam Y K, Noh J K, Cho Y S, et al. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis* [J]. Transgenic Res, 2001, 10: 353-362.
- [20] 朱作言, 许克圣, 谢岳峰, 等. 转基因鱼模型的建立 [J]. 中国科学 (B 辑), 1989 (2): 147-155.
- [21] 赵浩斌, 陈尚萍, 孙永华, 等. 外源基因在鱼类胚胎中表达与整合的时序 [J]. 科学通报, 1999, 44 (22): 2 414 2 418.

- [22] Stuart G W, McMurray J V, Westerfield M. Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos [J]. Development. 1988, 103 (2): 403-12.
- [23] 曹运长, 李文笙, 叶卫, 等. 外源生长激素在蓝太阳鱼中的整合、表达和遗传 [J]. 动物学报, 2005, 51 (2): 299-307.
- [24] 夏德全, 吴婷婷, 杨弘. 鱼类转基因研究现状和存在的问题及解决方法 [J]. 农业生物技术学报, 2000, 8 (3): 205-210.

Isolation of white cloud mountain minnow β -actin promoter and assay of its transcription activity

WANG Hai-ying^{1,2}, YE Xing¹, BAI Jun-jie¹, XIA Shi-ling¹, LAO Hai-hua¹, JIAN Qing¹, WANG Lin¹

(1. Pearl River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: β -actin gene is a house-keeper gene and its promoter has been reported to be an efficient ubiquitous regulator. The β -actin 5' flanking region and the initiation intron demonstrate a high level of constitutive promoter activity, and its activity is comparable to, or greater than, that of the SV40 early promoter. White cloud mountain minnow (*Tanichthys albonubes*) is a small cyprinid fish and also a popular ornamental fish which was originally found only in Guangzhou, China. Through PCR amplification, 5' flanking regions and partial open reading frames of the β -actin gene of white cloud mountain minnow were obtained. The 1 464 bp-long sequence includes 90 bp of partial ORF which encodes a 30 amino acids peptide, and 1 374 bp regulatory sequence which contains the 5' proximal promoter, the first untranslated exon and the initiation intron of β -actin gene. The partial ORF of the β -actin gene shares a high degree of sequence conservation. The similarity of the deduced amino acids was 100% between white cloud mountain minnow and zebrafish, and 96.7% between white cloud mountain minnow and Nile tilapia. The proximal promoter region contains elements that were critical for transcription activity, including the CCAAT Box, TATA Box, CARG Box. The regulatory sequence was inserted into the promoterless pDsRed2-1 vector. The linearized recombinant plasmids (pTA-DsRed) were microinjected into the fertilized eggs of white cloud mountain minnow. RFP expression of the transgenic fish was observed by micro fluoroscope. High-frequency generation of transgenic fish which expresses RFP was obtained with the highest positive rate of 51.8%. RFP was expressed at high level in transgenic fish and red fluorescence could even be observed by externals in some fishes. RFP gene could be detected by amplification of the genomic DNA of different organs and tissues of the 4-month-old transgenic fish. The RFP gene transcripts were also analyzed by RT-PCR and Southern blot. Hybridized molecule larger than positive vector was displayed by Southern blot of the transgenic fish genomic DNA. The results showed that the β -actin gene promoter possess effective transcription activity and could promote high level expression of foreign gene. The present study lays foundation for further function gene transfer researches. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (1): 47-54]

Key words: *Tanichthys albonubes*; β -actin gene promoter; red fluorescent protein (RFP); transgene; microinjected; expression detection

Corresponding author: YE Xing. E-mail: gzyexing@163.com