

红色荧光蛋白(RFP)基因在转基因青鳉中的表达

龙 华¹, 尾里 建二郎², 若松佑子², 松岛良次²

(1. 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术开放实验室, 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000; 2. 日本名古屋大学生物分子应答研究中心, 日本 名古屋 464-8601)

摘 要:以青鳉(*Oryzias latipes*)为实验动物(基因型 bR, 体色红橙色, 体长 2~3 cm), 以载体 pBluescript SK+ 为原始质粒。构建含有青鳉延伸因子-1 α -A(EF-1 α -A)基因启动子和红色荧光蛋白(RFP)基因的表达载体。用限制性内切酶 *Alu* 44 I 酶切上述载体质粒, 显微注射实验证实, 线状 DNA 比环状 DNA 在转基因青鳉受精卵和鱼苗中更易表达。立体荧光显微镜检测结果表明, RFP 基因的表达率和转基因鱼苗的存活率均较高, 与绿色荧光蛋白(GFP)基因一样, 红色荧光蛋白(RFP)基因也是一种理想的报告基因。

关键词:红色荧光蛋白(RFP)基因; 显微注射; 青鳉; 基因表达

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)02-0097-03

从水母(*Aequorea victoria*)中分离出来的绿色荧光蛋白(GFP)基因, 由于其蛋白质具有荧光(最大吸收光谱为 508 nm)而作为报告基因已被广泛用于检测特异组织基因表达和细胞中蛋白质的定位, 被称为“有生命”的荧光^[1-3]。从海葵(*Discosoma* sp.)中分离出 1 种新的荧光蛋白基因—红色荧光蛋白(RFP)基因^[4], 其蛋白质的最大吸收光谱为 583 nm。RFP 与 GFP 在一级结构上相差甚远, 但同样不需要任何预处理便可容易检测到。二者作为报告基因, 均已广泛用于转基因或核移植等研究中的基因标记, 在胚胎发育期便可容易地观察到外源基因的表达情况, 解决了同位素标记的放射性与有机染料标记的污染等问题, 也不存在遗传污染。此外, 不同颜色荧光标记基因的出现, 为多基因注射研究提供了技术基础。

青鳉(*Oryzias latipes*)是 1 种小型淡水鱼, 由于其孵化期约 10 d, 性成熟期约 1 个半月左右, 卵大且透明, 是显微注射和核移植实验最佳的实验鱼之一, 已广泛用于分子生物学研究^[5,6]。本研究以青鳉为

实验动物进行 RFP 基因表达实验, 以证实 RFP 基因可作为报告基因用于转基因或核移植等研究中。

1 材料与方法

1.1 材料

所用青鳉的基因型为 bR, 体色为红橙色, 体长 2~3 cm。将实验鱼置于多层鱼槽循环水的封闭养殖系统中, 光线、温度和水流均为该系统自动调控^[7]。从鱼苗孵出到成鱼的 4 个阶段, 分别投喂草履虫、虾苗、人工粉末饲料和颗粒饲料。

1.2 受精卵

按 Masato 等^[5]和 Takashi^[8]的实验方法, 清晨取青鳉受精卵 200 粒左右, 置 0℃ 冰上。受精卵预处理、化学试剂配方等均按文献^[5,8]进行。

1.3 外源基因及载体结构

载体 pBluescript SK+ 质粒、红色荧光蛋白(RFP)基因以及 *Alu* 44 I 限制性内切酶均购于日本化学工业公司, 青鳉 EF-1 α -A 基因启动子为日本名古屋大学生物分子应答研究中心遗传实验室所赠^[9]。质粒和 RFP 基因序列见公司产品说明书。EF-1 α -A 基因启动子序列见有关文献^[9,10]。连接后的载体结构如图 1。*Alu* 44 I 限制性内切酶反应条件为 37℃ 水浴 2 h, 按常规方法酚抽纯化, 测定 DNA 质量浓度。

收稿日期: 2001-07-30.

基金项目: 农业部“948”国际引进项目(983094).

作者简介: 龙 华(1964-), 男, 副研究员, 硕士, 从事鱼类分子生物学研究. E-mail: longhua0000@yahoo.com.cn

1.4 显微注射与荧光检测

显微注射按 Masato 等^[5]方法, 并使用上述大学研究中心遗传实验室显微注射系统, 注射的 DNA 质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 体积为 20~30 μl , 实验室温

度 24 $^{\circ}\text{C}$, 显微注射完后置 26 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养。用 Leica 立体荧光显微镜(带有蓝色滤光片和红色滤光片)检测 RFP 荧光, 并用该镜的 IP-Lab 数码成像系统储存实验结果。

-(pBluescript SK+) - [Medaka EF-1 α -A promoter] - [RFP gene] - (pBluescript SK+) -

图 1 RFP 基因载体结构图

Fig. 1 Construction of RFP gene vector

2 结果与讨论

2.1 RFP 基因在转基因青鳉受精卵和鱼苗中的表达

显微注射后, 受精卵发育的后桑基胚期(约 12 h)开始检测到 RFP 基因的表达, 后原肠胚期(约 20 h)也检测到 RFP 基因的表达, 检测结果表明: RFP 基因在这 2 个时期均有强烈表达。由于在红色滤光片下, 一些不含 RFP 的细胞或组织也可能显示微量红色, 本实验采用 2 种滤光片(蓝色滤光片和红色滤光片)同时检测 RFP 基因的表达情况。在红色滤光片下, RFP 显示红色; 在蓝色滤光片下, RFP 显示橙色, 经过对比, 便可检测出 RFP 在细胞或组织中的分布。图版 I 见附页 1。

从显微注射后受精卵发育的第 1~7 天及刚孵化出的鱼苗的检测结果来看(图版 I), RFP 基因的表达逐渐增强, RFP 逐渐增多。RFP 分布于鱼体的全身, 但呈斑点状, 而不是象 GFP 那样均匀分布^[2], 推测这可能是由于 EF-1 α -A 启动子表达的区域性而引起的, 与 RFP 基因的表达没有关系^[11]。另外, 在刚孵化出的鱼苗体中, RFP 斑点略有减少, 目前尚不清楚这是由于 EF-1 α -A 启动子造成的还是由 RFP 基因引起的。但可以认为, 与绿色荧光蛋白(GFP)基因一样, 红色荧光蛋白(RFP)基因也是 1 种理想的报告基因。

2.2 外源基因的显微注射以及 RFP 基因的结构与表达率

外源基因导入受精卵有多种方法, 主要有显微注射、电脉冲、精子携带、磷酸钙共沉淀、脂质体融合、逆转录病毒转染、微弹轰击和激光介导等方法。显微注射方法是目前广泛使用、效果较好的 1 种, 本研究也再次证实了这一点^[12]。在最初的实验中, 采用环状 DNA 进行显微注射, 但 RFP 基因的表达率

和转基因受精卵以及鱼苗的存活率均非常低。用限制性内切酶 *A/w* 44 I 酶切构建的质粒, 显微注射实验证实: 线状 DNA 比环状 DNA 在转基因青鳉受精卵和鱼苗中更易表达。

本实验对 2 522 粒青鳉受精卵进行了显微注射, 受精卵发育第 1 天的存活数为 2 213 粒, 存活率为 87.75%。第 7 天有 RFP 强烈表达的受精卵 242 粒, 外源基因表达率为 13.02%。孵化出有 RFP 强烈表达的鱼苗 48 尾, 占全部显微注射受精卵的 2.58%。作者认为, 本实验中 RFP 基因的表达率在高表达率范围内, 转基因鱼苗的存活率也在高存活率范围内^[13~15]。

参考文献:

- [1] Prasher D C, Eckenrode G, Ward W W, et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein[J]. *Gene*, 1992, 111:229-233.
- [2] Chalie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, 263:802-805.
- [3] Tsien R Y. The green fluorescent protein[J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67:509-544.
- [4] Matz M V, Frodlov A F, Labas Y A, et al. Fluorescent protein from nonbioluminescent Anthozoa species[J]. *Nature Biotech*, 1999, 17:969-973.
- [5] Masato Kinoshita, Kenjiro Ozato. Cytoplasmic microinjection of DNA into fertilized medaka (*Oryzias latipes*) eggs[J]. *The Fish Biol J Medaka*, 1995, 7:59-64.
- [6] Katsutoshi Niwa, Shuichi Kani, Masato Kinoshita, et al. Expression of GFP in Nuclear Transplants Generated by Transplantation of Embryonic Cell Nuclei from GFP-Transgenic Fish into Nonenucleated Eggs of Medaka, *Oryzias latipes* [J]. *Cloning*, 2000, 2 (1):23-34.
- [7] Kenjiro Ozato, Koji Inoue, Yuko Wakamatsu. Gene transfer and expression in medaka embryos[A]. *Transgenic Fish*[C]. Singapore: World Scientific Publishing Co Pte Ltd, 1992. 27-43.
- [8] Takashi Iwamatsu. Stages of normal development in the Medaka

- Oryzias latipes* [J]. Zoological Science, 1994, 11: 825 - 839.
- [9] Kinoshita M, Nakata T, Yabe T, et al. Structure and transcription of the gene coding for polypeptide chain elongation factor 1 α of medaka *Oryzias latipes* [J]. Fisheries Sci, 1999, 65: 765 - 771.
- [10] Masato Kinoshita, Shuichi Kani, Kenjiro Ozato, et al. Activity of the Medaka translation elongation factor 1 α -A promoter examined using the GFP gene as a reporter [J]. Develop Growth Differ, 2000, 42: 469 - 478.
- [11] Keiko Hamada, Kana Tamaki, Takao Sasado, et al. Usefulness of the medaka β -actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Molec Mar Biol Biot, 1998, 7(3): 173 - 180.
- [12] 朱作言, 汪亚平. 转基因鱼 [J]. 生物学通报, 1999, 34(5): 1 - 3.
- [13] 陈兰英, 方福德. 转基因研究的现状 [J]. 生命的化学, 1996, 16(1): 7 - 9.
- [14] Shigeru Takagi, Takao Sasado, Gen Tamiya, et al. An efficient expression vector for transgenic medaka construction [J]. Molec Mar Biol Biot, 1994, 3(4): 192 - 199.
- [15] Tsai Huai-Jen, Wang Shu-Huei, Koji Inoue, et al. Initiation of the transgenic *lacZ* gene expression in Medaka (*Oryzias latipes*) embryos [J]. Molec Mar Biol Biot, 1995, 4(1): 1 - 9.

Expression of red-fluorescent protein (RFP) gene in transgenic medaka *Oryzias latipes*

LONG Hua¹, Denjiro Ozato², Yuko Wakamatsu², Matsushima Ryoji²

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology of Agriculture Ministry, Jingzhou 434000, China;

2. Division of Freshwater Fish Stocks, Bioscience Center of Nagoya University, Furou-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464 - 8601, Japan)

Abstract: The medaka *Oryzias latipes* with body length 2 - 3 cm and body color orange red were employed. An expression vector with the promoter containing the medaka elongation factor gene and red-fluorescent protein (RFP) gene was constructed based on pBluescript SK+. Using restriction endonuclease *Alw* 44 I to cut the vector, the microinjection experiment proves that the linear form of DNA from the foreign gene expresses more easily than the circular form of DNA in the oosperms and fry of transgenic medaka. The detection results of stereo-fluorescence microscope show that RFP gene is also a kind of ideal reporter gene just as the green-fluorescent protein (GFP) gene from *Aequorea victoria*. The expression rate of RFP gene and the survival rate of the transgenic fry are both high that at the first day of fertilizing, the survival rate of the eggs is 87.75%, and at the 7th day, the gene expressing rate of the eggs is 13.02%; and the numbers of the larvae hatched with RFP expression make up 2.58% of the whole numbers of the injected fertilized eggs.

Key words: red-fluorescent protein (RFP) gene; microinjection; *Oryzias latipes*; gene express

图版 I 说明 Caption for Plate I

(图版见附页 1 For Plate I see attached Page 1)

A, B 一分别为显微注射实验后受精卵发育的后桑葚胚期和后原肠胚期红色滤光片检测结果。The detection results of the late morula stage and the late gastrula stage of oosperms after microinjection under red filter, respectively.

C ~ I 一分别为显微注射后受精卵发育的第 1 ~ 7 天检测结果。The detection results of the first day to the seventh day of oosperms after microinjection, respectively.

J—孵化出的鱼苗。The hatched fry.

右下标阿拉伯数字 1 表示蓝色滤光片检测结果, 阿拉伯数字 2 表示红色滤光片检测结果(同条件同时刻)。The Arabic numeral 1 of the right subscript shows the detection results of the blue filter. The Arabic numeral 2 of the right subscript shows the detection results of the red filter (at the same conditions and the same time). A ~ I 的比例为 25:1, J 的比例 80:1。The photo ratio from A to I is 25:1. The photo ratio of J is 80:1.