

绿色荧光蛋白基因向花鲈胚胎的转移及其表达

刘洋^{1,2}, 沙珍霞¹, 陈松林¹, 隋少飞¹, 徐美瑜¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003)

摘要:通过显微注射的方法,将绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)基因注入花鲈(*Lateolabrax japonicus*)单细胞期受精卵动物极细胞质内。初步研究了显微注射后的花鲈胚胎的存活状况。在荧光显微镜下观察到了GFP的表达,多数胚胎表现为嵌合性表达。利用PCR技术,从花鲈尾芽期胚胎DNA中扩增出了特异片段,大小为750 bp,表明显微注射胚胎中整合了外源GFP基因。

关键词: GFP; 花鲈; 显微注射; 转基因

中图分类号: Q813; Q959.483 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)05-0385-06

在基因工程育种研究中,鱼类因其怀卵量大,受精卵体外发育,易于操作等优点^[1]而得到了广泛的关注。1984年,Maclean等将外源基因导入虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)受精卵中^[2]。1985年,朱作言等进行了转生长素基因鲤鱼的研究^[1]。此后,世界各国对转基因鱼的研究做了大量工作,并取得了很大进展。显微注射是进行鱼类基因转移的主要方法,具有操作简单,效率高的特点,得到广泛的应用。对于转基因鱼的研究多集中在淡水鱼类,如鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[3-6],鲫鱼(*Carassius auratus*)^[1,3,7],泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)^[8]等,而有关海水鱼类的转基因研究却鲜见报道,这是因为海水鱼类显微注射技术较淡水鱼类更难于建立:①海水鱼类受精卵,卵膜紧贴胚胎,不易剥落,对于显微注射有更高的要求;②海水鱼类受精卵属于浮性卵,而且动物极朝下,在海水中很难固定;③限于实验室条件,转基因实验不易开展。④由于海水经济鱼类在渔业和水产养殖中的重要地位,很有必要对其进行转基因研究,从而培育出抗逆性状优良的经济品种。鱼类显微注射技术也是基因及一些调控序列功能鉴别的有效方法。生长素基因是最早用来作为鱼类显微注射的外源DNA。朱作言等^[1]将人的生长素基因和小鼠重金属结合蛋白基因调控序列重组,然后显微注射入鲤鱼受精卵,获得了快速生长的转基因鱼。

此后在鱼类的显微注射实验中,转生长素基因鱼获得广泛的研究。此外,抗冻基因(Antifreeze Protein Genes)^[9]也获得了重视。

绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)是深海水母(*Aequorea victoria*)所具有的发光蛋白质,在蓝紫光的激发下可发出绿色荧光^[10]。由于绿色荧光蛋白基因检测上的方便性在鱼类上已被成功地转移到斑马鱼(*Dania rerio*)^[11-14]和泥鳅^[13]胚胎中以及花鲈(*Lateolabrax japonicus*)胚胎干细胞^[15]中,本实验以GFP基因为报告基因,采用显微注射方法,并研究GFP基因在花鲈胚胎中的表达情况以及显微注射胚胎的存活状况,旨在为海水鱼类转基因研究提供技术支持,为优良品种培育奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 花鲈亲鱼购自黄海水产研究所麦岛实验基地,肌肉注射LHRH-A₃ 0.2~0.5 μg/kg, HCG 100 IU/kg人工催熟,3~5 μg/kg LHRH-A₃或300~500 IU/kg HCG人工催产,以上激素均为宁波市激素制品有限公司产品。

1.1.2 受精卵的获得 将成熟卵子和精子人工挤出,干法授精获得大量花鲈受精卵,加海水激活后取

收稿日期:2004-01-07; 修订日期:2004-03-27.

基金项目:国家自然科学基金(30170740); 国家“863”高技术研究发展项目资助(2002AA629180)。

作者简介:刘洋(1978-),男,硕士研究生,从事海洋生物学研究。E-mail:liuyang@ysfri.ac.cn

通讯作者:陈松林。E-mail:chensl@ysfri.ac.cn

上层优质浮卵于 10~14℃ 条件下培养,取 1~2 细胞期的胚胎用于显微注射。

1.1.3 外源基因的制备 本室保存的 pCMVGFP 质粒含有增强的绿色荧光蛋白(GFP)基因,将其转化至大肠杆菌 DH5 α 菌株中大量扩增,使用 QIA-GEN plasmid Kits 提取质粒 DNA,用限制酶 *Bgl* II 消化质粒使之线性化,纯化后用于显微注射。

1.2 方法

1.2.1 显微注射及受精卵培养 实验使用 WPI 公司的显微注射仪。每批取 1~2 细胞期的受精卵,将含有水母绿色荧光蛋白基因的线性化质粒注射于受精卵动物极细胞内,DNA 浓度为 50 ng/ μ L,注射剂量为 50 pL,含 $10^5 \sim 10^6$ 个 DNA 分子。每次注射后将受精卵置于 16~18℃ 无菌海水中培养,胚胎孵化后用新鲜洁净海水培养。

1.2.2 存活率(Survival rate) 计算公式如下:

$$\text{存活率} = \frac{\text{成活胚胎数}}{\text{总注射受精卵数}} \times 100\%$$

1.2.3 荧光检测 受精卵发育到 48 h,在 OLYMPUS 荧光显微镜下,使用蓝色滤光片,在紫外光(400 nm)激发下,观察绿色荧光蛋白是否表达。

1.2.4 胚胎 DNA 的提取 收集处于尾芽期胚胎,每 10 枚为一组,共 6 组,按照 Sonia 的方法^[16],提取胚胎的 DNA;收集 5 日龄的注射仔鱼 5 条,按照相同方法提取基因组 DNA。

1.2.5 PCR 检测 根据 GFP 基因设计特异引物,引物之间的长度为 750 bp。以同一时期的未注射胚胎和仔鱼的基因组 DNA 做为阴性对照,以 pCMVGFP 质粒做阳性对照。反应体系 25 μ L,加模板 DNA 40 ng,4 种 dNTP 各 5 μ mol/L,引物各 10 pmol, *Taq* 酶 1U,反应程序为:94℃ 预变性 5 min;30 个循环扩增 DNA,每个循环 94℃ 10 s,59℃ 30 s,72℃ 1.5 min;循环结束后 72℃ 保温 10 min。1% 的琼脂糖凝胶电泳,Bio-rad 公司的 Gel-100 凝胶成像系统检测。

2 结果

2.1 显微注射对胚胎存活率的影响

将本实验分批注射的 2 619 枚受精卵与对照组的 500 枚未注射受精卵分别培养于 16~18℃ 的过滤除菌海水中,以确定显微注射对花鲈胚胎存活的影响,结果如图 1 所示。从图 1 中可以看出,注射后的受精卵随着发育时间的延长,尤其是在注射后 48 h 内,胚胎大量死亡,只有大约 10% 的胚胎可以存活

下来,此后胚胎的死亡处于比较缓慢的状态,至胚胎发育的第 120 小时,存活的鱼苗数约占注射卵总数的 3%;注射卵的胚胎发育与对照组比较,出膜时间推迟了 12~24 h。对照卵的胚胎成活率随着发育时间的延长亦表现逐步下降的趋势。至 72 h,胚胎孵化,孵化率为 53%,此后 2 d,鱼苗的死亡率不高,培养到第 120 小时,胚胎存活率为 39%。

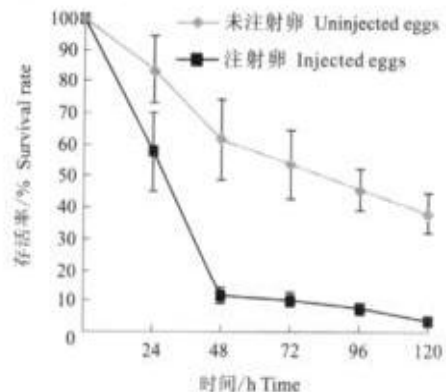


图1 花鲈胚胎和幼苗的存活曲线

Fig.1 Survival of *Lateolabrax japonicus* embryos

2.2 PCR 检测

提取尾芽期胚胎基因组 DNA,然后进行 PCR 扩增,结果如图 2。在 6 组显微注射胚胎 DNA 中,有 3 组(2、5、6 组)有与阳性对照(8)大小相同的 PCR 带出现,大小为 750 bp。5 条 5 日龄仔鱼的 DNA 提取结果如图 3(A)中显示,然后对其进行 PCR 扩增,结果如图 3(B)。结果显示有 3 条仔鱼(4、5、7 组)的基因组 DNA 中扩增出了特异片段并且与阳性对照(2)片段大小相同。

2.3 GFP 表达的检测

通过紫外光的激发,在荧光显微镜下,观察到了 GFP 在花鲈胚胎内的表达,如图版 I 所示。从 48 h 开始,GFP 基因已经在花鲈胚胎中大量表达(图版 I-1、3),甚至整卵发出绿色荧光。在多数胚胎中,GFP 基因的表达表现为嵌合性,在胚胎中全身不同部位散布着绿色荧光斑块,与 Sonia^[16] 和赵浩斌^[14] 的报道一致。观察发现,随着胚胎的发育,表达 GFP 的胚胎数减少,胚胎孵化后观察到一条有明显表达 GFP 的仔鱼(图版 I-5、6),GFP 仅在某些部位表达,未消失的卵黄囊内也可见 GFP 表达。

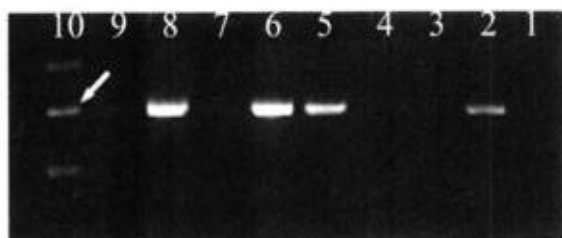


图2 PCR产物检测

1~6:注射胚胎基因组DNA的PCR检测;7:阴性对照;8:阳性对照;9:空白对照;10:1 kb分子量标准。箭头所指为750 bp片段。

Fig. 2 PCR of sea perch embryo genome

1~6:PCR of genome of injected embryos;7:negative control;8:positive control;9:PCR of no DNA;10:Gene Ruler 1 kb Maker. Arrow points to the fragment of 750 bp.

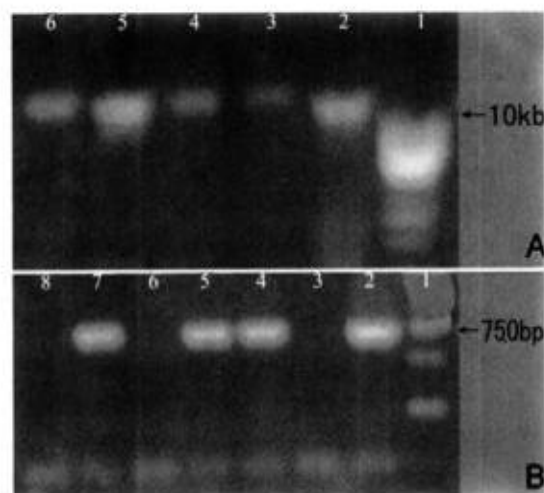


图3

A:仔鱼基因组DNA的提取

1:1 kb分子量标准;2~6:仔鱼DNA。

B:PCR产物检测

1:1 kb分子量标准;2:阳性对照;3:空白对照;4~8:注射后仔鱼DNA的PCR检测。

Fig. 3

A: Extraction of sea perch larvae genome

1:Gene Ruler 1 kb Maker; 2~6:Sea perch genome.

B:PCR of sea perch larvae genome

1:Gene Ruler 1 kb Maker; 2: Positive control; 3: Negative control; 4~8: PCR of genome of injected sea perch larvae.

3 讨论

迄今有关海水鱼类花鲈显微注射转基因的研究尚未见报道,本研究用GFP基因作为报告基因探索

了海水鱼类外源基因显微注射的技术方法,结果表明,显微注射胚胎的成活率明显低于未注射胚胎,对比金头鲷(*Sparus aurata*)的显微注射转基因研究发现,花鲈的显微注射胚胎成活率也明显低于金头鲷^[16]。原因是多方面的。首先,受精卵遇水激活后卵膜会很快变硬,因此针的硬度和尖锐度决定了胚胎受到的机械损伤程度,为此在显微注射过程中采用了70%海水使卵沉于水底,同时注射用针尖5~10 μm ,并且足够尖锐,使之能够穿透卵膜却不造成巨大伤害;其次,外源DNA对胚胎的毒性和注射剂量也是胚胎成活率的重要影响因素,经过我们的初步筛选,50 ng/ μL 的注射浓度和50 pL/embryo的注射剂量($10^5 \sim 10^6$ copies)对于花鲈胚胎比较适合(数据未出示),能够得到较多的表达胚胎且胚胎存活率较高。此外,养殖环境,包括水体、温度、氧气等,对胚胎发育也有一定影响。

研究表明,外源DNA在胚胎内不会立即整合到受体染色体上,无论在淡水鱼类^[3,14,17~19]还是在海水鱼类^[16,20]转基因的研究中都发现,外源DNA在胚胎发育中有复杂的行为,并以多种形式存在,其整合过程最早从囊胚期开始,并且持续了相当长的时间,而且能够瞬时表达。选择处于尾芽期胚胎做整合检测,仅能够说明外源DNA存在于受体胚胎中。由于内源核酸酶的存在,游离的外源DNA会逐渐减少,5日龄仔鱼已经开始摄食,外源基因存在的可能极小,从其基因组DNA中仍旧扩增出了特异的片段,从而能够说明外源基因的整合。此外,显微镜下很难观察到受精卵动物极细胞的细胞核,因此采用的是胞质注射,这也会影响外源DNA的整合效率。由此看来,GFP基因在受体胚胎内的持续时间和GFP基因在受体胚胎基因组中的整合效率对其表达产生了重要影响,这是产生嵌合表达的主要原因之一,同时,这也决定了外源基因稳定表达个体的数量很少。

在基因工程育种中需要的是能够产生外源基因稳定遗传的个体,并且在这样的个体后代中整合的外源基因不是沉默的。由于外源DNA在受体胚胎内的复杂行为,实验得到的表达GFP的胚胎多为嵌合性。为了尽可能获得稳定表达的个体,最佳注射时期应该是在1~2细胞期^[21~23]。因此,在显微注射研究中,应尽量选择1~2个分裂球时期的胚胎进行显微注射。

参考文献:

- [1] Zhu Z Y, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L., 1798) [J]. J Applied Ichthyology, 1985, 1: 31 - 34.
- [2] Maclean N, Talwar S. Injection of cloned genes into rainbow trout eggs. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 1984, 82: 187.
- [3] 朱作言, 许克圣, 李国华, 等. 转基因鱼模型的建立 [J]. 中国科学 B 辑, 1989, (2): 147 - 155.
- [4] 夏德全, 吴婷婷, 杨弘, 等. 人生长激素基因在团头鲂和鲤中的整合和表达 [J]. 水产学报, 1994, 18(4): 284 - 289.
- [5] Zhang P, Hayat M, Joyce C, et al. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout GH complementary DNA in the common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus) [J]. Mol Reprod Devel, 1990, 25(1): 2 - 13.
- [6] 梁利群, 孙孝文, 沈俊宝, 等. 转基因“超级鲤”的构建 [J]. 高技术通讯, 1999, 9(4): 52 - 54.
- [7] Yoon S T, Hallerman E M, Gross M L, et al. Transfer of the gene for neomycin resistance into goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Aquaculture, 1990, 85: 213 - 223.
- [8] 朱作言, 许克圣, 李国华, 等. 人生长素基因在泥鳅受精卵显微注射转移后的生物学效应 [J]. 科学通报, 1986, 31(5): 387 - 389.
- [9] Shears M A, Fletcher G L, Hew C L. Transfer, expression and stable inheritance of antifreeze protein gene in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Mol Marine Biol Biotech, 1991, 1: 58 - 63.
- [10] Ward W W, Cody C W, Hart R C. Spectrophotometric identity of the emery-transfer chromophores in Renilla and Aequorea green-fluorescent proteins [J]. Photochem Photobiol, 1980, 31: 611 - 615.
- [11] Amsterdam A, Lin S, Hopkins N. The Aequorea Victoria green fluorescent protein can be use as a reporter in live zebra fish embryos [J]. Dev Biol, 1995, 171: 123 - 129.
- [12] Bensheng J, Yanfei X, Jiangyan H, et al. Faithful expression of green fluorescent protein (GFP) in transgenic zebrafish embryos under control of zebrafish gene promoters [J]. Developmental Genetics, 1999, 25: 158 - 167.
- [13] Higashijima S I, Okamoto H, Ueno N, et al. High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin [J]. Dev Biol, 1997, 192: 289 - 299.
- [14] 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 - 2 419.
- [15] Chen S L, Sha Z X, Ye H Q. Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos [J]. Aquaculture, 2003, 218: 141 - 151.
- [16] Sonia G, Julia B, Monica S, et al. Effect of exogenous DNA microinjection on early development response of the seabream (*Sparus aurata*) [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1998, 7(4): 248 - 258.
- [17] 谢岳峰, 刘东, 邹钧, 等. 泥鳅受精卵的电脉冲基因转移 [J]. 水生生物学报, 1989, 13(4): 387 - 389.
- [18] 邹钧, 谢岳峰, 刘东, 等. 外源基因在鲫鱼胚胎发育过程中的表达 [J]. 水生生物学报, 1991, 15(4): 372 - 374.
- [19] Tsai H J, Wang S H, Inoue K, et al. Initiation of the transgenic lac-Z gene expression in medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Mol Mar Biol Biotechnol 1995, 4: 1 - 9.
- [20] Akessio G, Gandolfi G. Riproduzione artificiale di orata, *Sparus aurata* (L.) (Osteichthyes, Sparidae) [J]. Memorie dell'Istituto Lombardo-Accademia de Scienze e Lettere, 1975, 26: Memoria 3.
- [21] Brem G, Brenig B, Horstgen-Schwark G, et al. Gene transfer in tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Aquaculture, 1988, 68: 209 - 219.
- [22] Rahman M A, Maclean N. Production of transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one-cell-stage microinjection [J]. Aquaculture, 1992, 105: 219 - 232.
- [23] 梁利群, 孙孝文. 外源基因导入鲤 (*Cyprinus carpio*) 受精卵最佳时期的研究 [J]. 中国水产科学, 1996, 3(1): 11 - 15.

Expression of green fluorescent protein gene transferred into newly fertilized sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos by microinjection

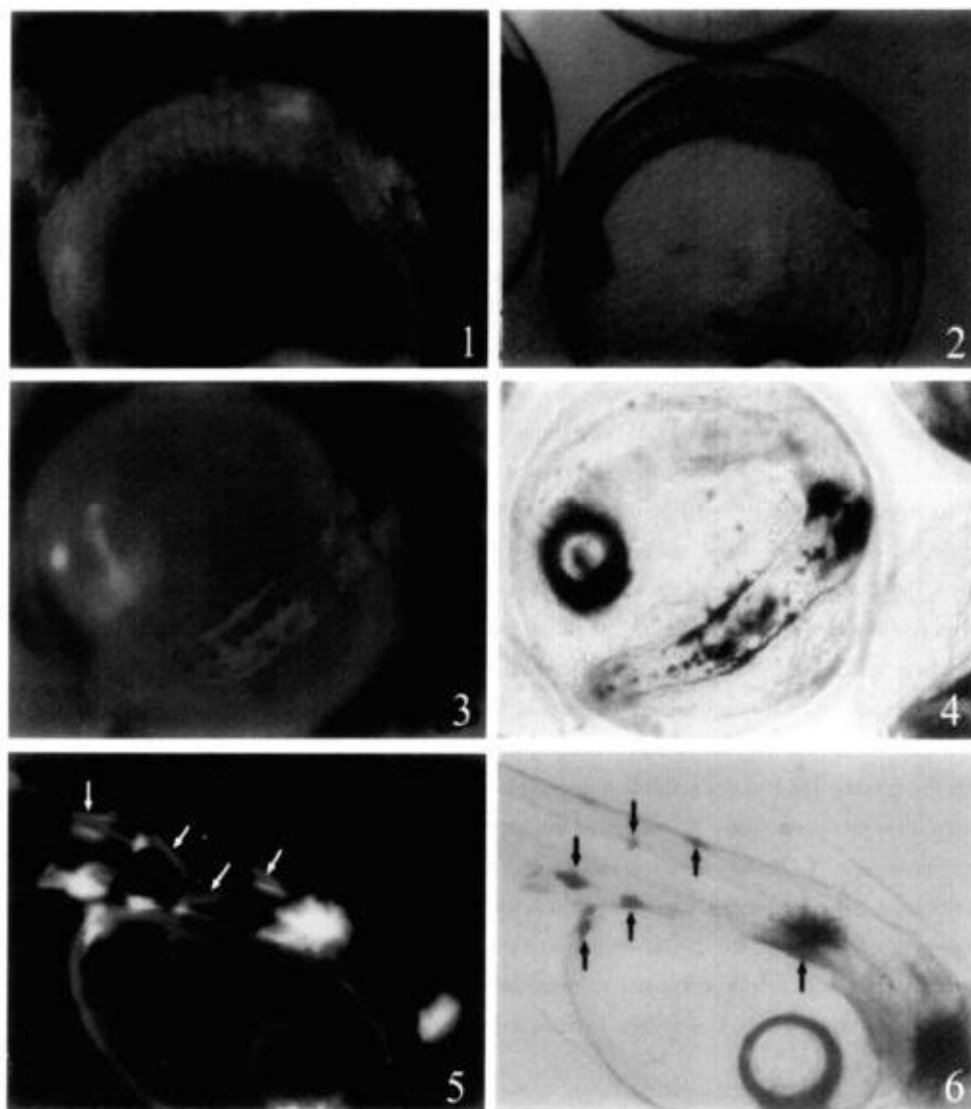
LIU Yang^{1,2}, SHA Zhen-xia¹, CHEN Song-lin¹, SUI Shao-fei¹, XU Mei-yu¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China; 2. Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Fish are suitable types of animals to use in terms of introduction of novel genes into their genomes. Transgenic fish have many potential applications in aquaculture. Many researchers have done a lot about transgenic fish in order to improve their importantly commercial phenotypes, such as growth, disease resistance, freeze resistance. A lot of methods are used to introduce novel genes to fish genomes and microinjection is a leading methods. Sea perch *Lateolabrax japonicus* is one of the most important species in the aquaculture of China. In this article, plasmid pCMVGFP containing green fluorescent protein (GFP) genes was injected into the cytoplasm of newly fertilized sea perch embryos at one cell stage. An appropriate volume of fifty picoliters of DNA solution containing $10^5 \sim 10^6$ moleculars was introduced into every egg. The mortality of both injected and uninjected embryos increased markedly in the first two days after impregnation and then increased unmarkedly. The mortality of injected embryos was higher than that of uninjected embryos at every period. The survival rate of injected embryos was only 3% after 5 days while that of uninjected embryos was 39%. A pair of primers was synthesized to detect whether novel GFP genes were integrated into sea perch genome by polymerase chain reaction (PCR) technology. A specific GFP segment of 750 bp was amplified from the DNA of sea perch embryos at tail-bud stage, and three groups showed positive. This specific segment was also amplified from the genome DNA of sea perch five-day-old larvae, and showing that exogenous GFP genes were integrated into three larvae genomes. We observed the expression of GFP in the sea perch embryos through a fluorescence microscope. GFP was expressed largely after 48 hours. Embryos that expressed GFP decreased with the development. The expression was mostly mosaic. The embryos that expressed GFP althrough the bodies were observed before hatch, but the larvae that expressed GFP partly in the bodies were observed after hatch.

Key words: GFP; *Lateolabrax japonicus*; microinjection; transgene

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn



图版 I GFP 基因在鲈鱼胚胎中的表达

1-2: 胚孔封闭期胚胎; 3-4: 出膜前期胚胎; 5-6: 4 日龄仔鱼; 1,3,5: 加蓝色滤光片照片; 2,4,6: 未加蓝色滤光片照片。1-2,3-4,5-6 相互对应; 黑色箭头指向色素沉积区, 在蓝色滤光片下发黄色荧光; 白色箭头指向 GFP 表达部位。

Plate 1 Expression of GFP gene in sea perch embryos

1-2: Embryo in closure stage of blastopore $\times 40$; 3-4: Embryo in pre-hatching stage $\times 40$; 5-6: 4-days larva $\times 40$. 1,3,5: Blue filter was added; 2,4,6: Blue filter was not added. 1,3,5 is corresponding to 2,4,6 respectively. Black arrows point to pigment, which emits yellow fluorescence when blue filter was added. White arrows point to expression of GFP gene.