

## 斑马鱼 *Mylz2* 启动子的克隆与转绿色荧光蛋白基因鱼的构建

简清<sup>1</sup>, 白俊杰<sup>1</sup>, 叶星<sup>1</sup>, 夏仕玲<sup>1</sup>, 梁旭方<sup>2</sup>, 罗建仁<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所; 中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东广州 510380; 2. 暨南大学生命科学技术学院, 广东广州 510632)

**摘要:** 为获得能在肌肉表达绿色荧光蛋白的转基因斑马鱼 (*Brachydanio rerio*), 采用 PCR 方法, 从斑马鱼基因组 DNA 中分离了肌球蛋白轻链 2 启动子, 序列分析表明, 该启动子与国外文献报道的斑马鱼肌球蛋白轻链 2 启动子序列的相似性为 98.6%。将改造后的启动子插入绿色荧光蛋白基因载体, 构建成肌肉特异性表达载体。通过显微注射, 将线性化的表达载体注入斑马鱼的受精卵, 获得了转绿色荧光蛋白基因的斑马鱼。绿色荧光蛋白在胚胎期开始表达, 随着鱼体的生长表达量有增加的趋势, 成鱼在紫外灯下用肉眼即可观察到绿色荧光。转基因鱼绿色荧光蛋白的表达具有明显的肌肉特异性。本研究为下一步特定基因的表达研究和获得有特色的转基因观赏鱼奠定了基础。

**关键词:** 斑马鱼; 绿色荧光蛋白; 转基因; 肌球蛋白; 启动子

**中图分类号:** Q813; Q959.46 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)05-0391-05

斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 具有易于养殖、体外受精、胚胎透明等优点, 是研究脊椎动物胚胎发育的模式生物<sup>[1]</sup>, 也是常见的观赏性鱼类之一。转绿色荧光蛋白基因斑马鱼的研究在过去几年已有不少报道, 特别是绿色荧光基因, 作为报告基因用于研究特定基因的表达时序与蛋白质定位等<sup>[2-5]</sup>, 随着转基因技术的成熟, 尤其是组织特异性启动子的应用<sup>[6]</sup>, 转基因鱼的外源基因表达量不断提高, 有望成为高效的生物反应器, 也使构建具有特色的转基因观赏鱼成为可能<sup>[7]</sup>。本实验采用 PCR 方法克隆了斑马鱼肌球蛋白轻链 2 (*Mylz2*) 启动子基因, 并获得了肌肉特异性高效表达绿色荧光蛋白的转基因斑马鱼, 初步研究了荧光蛋白在转基因鱼不同时期的表达情况和变化趋势, 为下一步特定基因的表达研究和获得有特色的转基因观赏鱼奠定了基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌种与载体** *E. coli* DH5 $\alpha$  由本实验室保存, 绿色荧光蛋白基因载体 (pEGFP-1) 购自 Clontech 公司, pGEM-T Easy Vector Systems 为 Promega 公司产品。

**1.1.2 酶与化学试剂** Wizard Genomic DNA Purification Kit, Wizard PCR Preps DNA Purification System 为 Promega 公司产品; PCR 扩增试剂盒 Takara PCR<sup>TM</sup> Kit Ver 2.1 购自 Takara 公司; 引物由上海生工公司合成; 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶为华美生物工程公司产品; 其他试剂均为国产分析纯。

**1.1.3 实验动物** 斑马鱼为 AB 品系, 取自中国水产科学研究院珠江水产研究所。

**1.1.4 主要实验仪器** 荧光显微镜为 AO 120 型 (带 2071M 落射式荧光照明系统和 1053F Expostar 显微照相系统); 立体解剖镜为 OPTON 产品; 基因导入采用国产显微注射仪 (中国科医文化厂)<sup>[8]</sup>。

#### 1.2 方法

**1.2.1 *Mylz2* 启动子的克隆** 取 20 mg 新鲜斑马鱼肝脏, 按 Wizard Genomic DNA Purification Kit 使用手册提供的方法提取基因组 DNA; 根据国外已发表的斑马鱼 *Mylz2* 启动子基因序列<sup>[9]</sup>, 设计 1 对特异引物: P1 5'-ttegccacag aggaatgagc, P2 5'-tgctctgtac ttgaggggct, 以斑马鱼基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 反应条件如下: 94℃ 预变性 3 min, 每循环包括 94℃ 变性 1 min, 55℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 4 min, 共 30 个循环, 最后 1 个循环结束后再 72℃ 延伸 7 min。扩增片段经 Wizard PCR Preps DNA Purification System 纯化后连入 pGEM-T Easy Vector, 在

收稿日期: 2004-02-09; 修订日期: 2004-04-09.

基金项目: 广东省科技计划项目 (2003C20310).

作者简介: 简清 (1973-) 男, 助理研究员。从事鱼类生物技术研究。E-mail: jianqing2@21cn.com

ABI PRISM™ 377 全自动荧光测序仪上进行序列测定。DNA 分析软件 Vector NTI Suit 6.0 分析测定结果。

**1.2.2 表达载体的构建** 为了适合启动子在绿色荧光蛋白基因载体的特定位置插入,设计另一对引物:P3 5' tgaattcttcgccacagaggaatgagc, P4 5' tatggatctgtcctgtacttgaggggct, 对克隆到的 Mylz2 启动子基因进行 PCR 改造,反应条件与启动子的克隆相同。扩增产物经 *EcoR* I 和 *Bam* H I 限制性内切酶消化后与经相同的限制性内切酶消化的载体 pEGFP-1 连接,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 酶切、电泳法筛选重组转化子。操作方法参照 Sambrook 等的《分子克隆实验手册》<sup>[10]</sup>。

**1.2.3 斑马鱼的饲养管理** 实验用斑马鱼饲养于水族箱中,投喂人工饵料,温度恒定于 25~26℃。繁殖时雌雄分开暂养,产卵前一天晚上将 1 尾雌鱼和 1 尾雄鱼配对于一小水族箱中,用黑布盖好,实验当天早上揭去黑布,让其自然产卵。

**1.2.4 基因导入与转基因鱼的检测** 用 *bgl* II 线性化 Mylz2-eGFP 载体,纯化后溶于双蒸水,质量浓度为 0.15  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,参照朱新平等<sup>[11]</sup>的方法,在立体解剖镜下挑选高质量的受精卵注射,每受精卵注射量为 2 nL。注射后的受精卵放入 25~26℃ 水体,自然发育,定期在荧光显微镜(使用 2072 滤光片组合)下观察荧光表达情况。仔鱼出膜后继续恒温培育,定期检查荧光蛋白基因的表达情况。

## 2 结果

### 2.1 Mylz2 启动子的克隆

采用 P1、P2 引物,以斑马鱼基因组 DNA 为模板,扩增出一大小约 1.9 kb 的特异带;将该特异带回收后插入 pGEM-T Easy Vector。经酶切和电泳检测筛选得到重组子,将该重组子命名为 Mylz2-T。酶切与电泳的分析结果见图 1。序列分析表明,该序列与国外文献报道的 Mylz2 启动子序列<sup>[9]</sup>的相似率为 98.6%,且几个重要调控元件如 TATA 框、E-框和 MEF2 结合位点等无论是数量还是位置均非常相似,说明所克隆的序列为斑马鱼 Mylz2 启动子序列。所克隆的斑马鱼 Mylz2 启动子序列见图 2。

### 2.2 肌肉特异性绿色荧光蛋白表达载体的构建

Mylz2 启动子基因经 PCR(使用引物 P3、P4)改造后,两端分别引入 *EcoR* I 和 *Bam* H I 位点,经这 2 种内切酶消化后插入 pEGFP 载体的多克隆位点,酶

切方法筛选出重组子,将其命名为 Mylz2-EGFP。酶切结果见图 1。

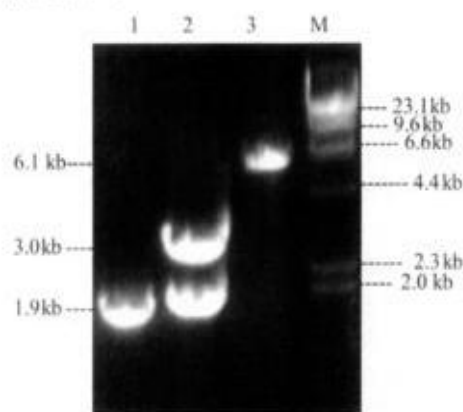


图1 PCR产物鉴定与载体酶切分析

Fig.1 Identification of PCR product and restriction mapping analysis of plasmid

1: PCR Product; 2: Mylz2-T/*EcoR*I; 3: Mylz2-EGFP/*bgl* II;  
M:  $\lambda$  DNA/*Hind* III

### 2.3 转基因鱼的表达检测

在注射的 150 粒受精卵中,64 粒在低囊胚期和原肠早期死亡,86 尾仔鱼出膜,注射存活率为 57.33%。在荧光显微镜下,最早观察到绿色荧光时胚胎处于血液循环期。荧光主要出现在背部肌肉,呈现几个亮点状。仔鱼出膜后可在背部和侧面肌肉观察到荧光,呈现若干个高亮度的带状斑点。86 尾出膜的仔鱼有 7 尾(8.14%)观察到荧光。荧光强度有不断增加,面积不断扩大的趋势,至成鱼期,几乎整个背部、尾部和侧面均可观察到强荧光,在暗处紫外灯照射下,用肉眼即可观察到绿色荧光。图 3 为不同时期的转绿色荧光基因斑马鱼。

## 3 讨论

自从 1982 年 Palmiter 等<sup>[12]</sup>首次将大鼠生长激素基因导入小鼠受精卵雄性原核中,获得了个体比对照组大一倍的转基因“超级小鼠”以来,转基因动物的研究虽然在技术上已取得了许多突破,但真正成功地应用到生产上还不多。在技术上主要存在转入的基因保持沉默、效率低<sup>[13]</sup>、表达量低等问题,有人推测这可能与使用异源启动子有关<sup>[6]</sup>。近年来,不少学者应用斑马鱼自身的启动子来研究外源基因的表达,取得了良好效果<sup>[5-7,9,14]</sup>。在本研究中,绿色荧光蛋白的表达率达 8.14%,高于前几年转基因



实验的表达率,表达量也较高,在荧光显微镜下清晰可见,这可能与使用了斑马鱼自身的启动子有关。本实验所克隆的启动子序列与国外文献报道的斑马鱼肌球蛋白轻链2启动子序列的相似率为98.6%,仍有27个碱基的差异,这可能与所用的斑马鱼来自不同的品系有关。但对表达起重要调控作用的顺式元件如TATA框、E-框和MEF2结合位点等不仅数量相同,而且所处位置也非常相似,仅在5'端527

碱基处少1个MEF2结合位点。此外,本实验克隆和采用的启动子为肌球蛋白轻链2启动子,其作用是调控外源基因在肌肉组织的表达,实验结果表明所表达的绿色荧光蛋白主要存在于肌肉组织,而在其他组织中没能观察到,这与Ju等<sup>[9]</sup>的结果一致,也进一步说明了肌球蛋白轻链2启动子的肌肉特异性。

```

1      5' TTCCGCACAG AGGAATGAGC CACCACTCA TCCAGTGTAT TTTTATGCA GCGGATGCCU ATCCAGTTGC
71      AGCCCTACAC TGGGAACAC CCAATCTGT CTTTAAATT AATATTTTA ATAGGAAGCT ATACAATGTT
141     ATATTTGTGC ATATACATTA GATTAGTCAG TACACTCTCA GAAATAAAGG TCCGCAAGCT GTCACGCCG
211     TGGTACCTTT TCAAAAGGTA CATATTTGTA CTTAAAGGGT CCATATIGAT ACCTCAAAAG TATATATTAG
281     TGCCTAAAAA TTTTAAGAGA AACACTTTTG TACTTTTATG GTACTAATAT ATACCTTGA GGTTTTATTA
351     TGGACCTTTA AGGTACAAAT TTTTATCATT TGGAAAGGTA CCACCCAGT GACAGTTTAC ACCCTTTATT
421     TCTGAGAGTG AAGCTAAATC TGGAGCTTAT TTAACAAAAT AACCTATGAT AACGGTCCAA AAACCTACTAC
491     ACCCATATTT ATATGTTATT GAAAAATATT AAATACAAAT TTTAAACAG GCAAAATCA AGAGAAGCAA
561     AACATGGAA AAAAAATTGT TCAAAATTTG TAGGTTGTAA TTTTITGTT GCAATATTTA CTTTATTTA
631     ATTGTTT TCAATTT TGTGACTAA AATATTTT TAATAATAT AGCTGTTTAA TAAATCTGTT
701     TTGTTTAAAT GCACCAAAAT ACATTGCCTA TATTAAGTGA GAGATGGAGA AAAATATTCA TTTTCAAAAT
771     GGGCTGACT CAATTACTCT GAGCACTGTA ATTATCTGTT TTTCTAGGTA CTGTAAAATA ATGCTAATCT
841     TAAACAATTT TGGAAACAGA AGGAGCAAAA CAAGCCGACA GACTCACAGG ATATCAAAAT AGCTTAAAGA
911     AAGAAGGGAA TGCACAACAA ACTCAAGGGG GACAAAACAG TGACTGATGA ATTAGACAAG AAAAGAGAG
981     CAAGGAGCGC TCAAGATTGT TTAGCTATTT TGGTACCCCA CAGCTGTTCC TTATGCCCTGC CTTCCCAAAA
1051    AAAAACTGTC TTAAGCCTCA AATTTCTCTT CATGAGGGTC CAACATCAAC CACTCAGAGG GCTGTAGTGT
1121    GCTGACATC TAAAACTGG GAAAAAGGGT TAAITACGTG CTTGTCCACA GGGCAGCTTC CCACAAATGG
1191    CACCTCACAG TCACTGAAGT GACCGGGTGA GGTATAGGTT CGATCGGCAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1261    AGAGAGAGTG CTGAATATGG GCATGGCCTAT GTGGACGGGT GTGGTGGGGG CACCTGAACC GAAATCTTAC
1331    AGCATCTACT TACTAGGAAA AGCATTAAAA CTTATTTTCG ATTAGGGCTG ATTGAAATA AGGGTTAAGA
1401    CACCAGAACG TCCTCTATA TATGAGCCAG GGGCGTGAAC AAATATGAAC AACATAATCA TTGGCTCAAA
1471    AAATCTCTGG ATTGAAATCC ATCAGGATCT ATCACTGCAA CCCTCCCAT CCAACAAGTA ATCTGCAAG
1541    ATAAGCCAGT ATTGATCTGC TGCTAATCTA ACTTTAGGG AGGGAGTTGC GTCCCTTTA GACTCAGTGG
1611    CTACAGCTCA TTCATTTCAA ATTGAGTTAT GTGATTGTAT GAAGTCAAAA CAGTCCCTTA CGTCCCATG
1681    TCCTTATTAG TCAACCGGAG ACATGCAGGC CGCTGCCATC AGTATCAGAT TCATCCATT CCAAGACTCC
1751    AATAGCTATT TCTGAGCACT GTAAGATGAT AGTACATCCC AGCCGGTGTG CTCCATCAC TTTCCCTTA
1821    CCTCATAGTT TTTCTCTTT CTCTCTCGGT CTGCTATTTT CCAAACTCA CTTAAGGTTG GGTATATAAT
1891    TAGCAAGGGG CTTCTGTCAG TATATAAGCC CTCGAAGTAC AGGACA 3'
  
```

图2 斑马鱼 Myl2 启动子序列

粗体表示 TATA 框,方框表示 MEF2 结合位点,下划线表示 E-框

Fig. 2 Sequence of Myl2 promoter of zebrafish

Sequences in bold are putative TATA box, boxed are MEF2 binding sites, underlined are putative E-box

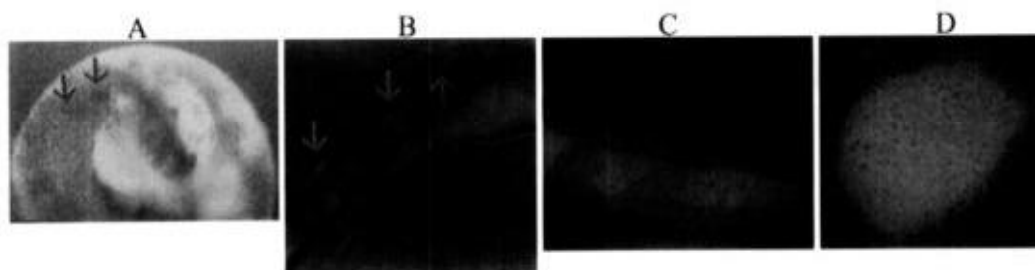


图3 转绿色荧光蛋白斑马鱼

A. 胚胎; B. 仔鱼; C. 1月龄成鱼(背部俯视); D. 1月龄成鱼(侧面)

Fig. 3 Sequence of Myl2 promoter of zebrafish

A. Embryo; B. Fry; C. One-month-old adult fish (from the top); D. One-month-old adult fish (from one side)

在有关转荧光蛋白基因鱼的研究中,所获得的转基因鱼在胚胎期均有较强的荧光表达,但较少提

及成鱼的表达情况或是荧光在仔鱼出膜后逐渐减弱<sup>[2-5,15]</sup>。本实验中,绿色荧光有随着转基因鱼的生长而增强的趋势,无论是荧光强度还是发出荧光的部位都在不断增强或扩大。这可能是随着鱼体的生长,肌肉含量增加,表达的外源蛋白也相应增加,即当表达的荧光蛋白积累到一定的量后,即使是单位表达量极低的部位也能检测到荧光。另一推测是随着鱼的生长,外源基因并未发生“沉默”或被肌体排斥。这也提示了使用肌肉特异性启动子可能是获得高表达量的原因,为今后利用转基因鱼高效“生产”特定蛋白提供了可能。

本实验获得的转基因鱼成鱼在暗处紫外灯照下,肉眼即可见绿色荧光,这为培育具有荧光的观赏鱼打下了基础。但有关荧光基因是否能稳定遗传,遗传后荧光量是否会减弱等问题仍需进一步实验研究。

#### 参考文献:

- [1] 桂建芳. 分子发育生物学研究的理想模式—斑马鱼[J]. 生物工程学报, 1995, 15(3): 30-33.
- [2] Yoav Gohil, Reiko Toyama, Steven Coon, et al. Pineal-specific expression of green fluorescent protein under the control of the serotonin-N-acetyltransferase gene regulatory regions in transgenic zebrafish[J]. *Developmental Dynamics*, 2002, 225: 241-249.
- [3] Shao Jundu, Mary Dienhart. Zebrafish *tiggy-winkle* hedgehog promoter directs notochord and floor plate green fluorescence protein expression in transgenic zebrafish embryos[J]. *Developmental Dynamics*, 2001, 222: 655-666.
- [4] 孟安明, 林 颖. 利用 GATA-2 调控成分制备组织特异性表达 GFP 的转基因斑马鱼[J]. 科学通报, 1999, 44(21): 2283-2287.
- [5] Gong Zhiyuan, Ju Bensheng, Wang Xukun, et al. Green fluorescent protein expression in germ-line transmitted transgenic zebrafish under a stratified epithelial promoter from Keratin8 [J]. *Developmental Dynamics*, 2002, 223: 204-215.
- [6] Shin-ichi Higashijima, Hitoshi Okamoto, Naoto Ueno, 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]. *Developmental Biology*, 1997, 192: 289-299.
- [7] Gong Zhiyuan, Wan Haiyan, Tuan Leng Tay, et al. Development of transgenic zebrafish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 308: 58-63.
- [8] 中国科学院北京动物研究所细胞室. 鱼类细胞核移植技术[J]. 动物学杂志, 1975, (2): 44-47.
- [9] Ju B S, Chong S W, He J Y, et al. Recapitulation of fast skeletal muscle development in zebrafish by transgenic expression of GFP under the Myl2 promoter[J]. *Developmental Dynamics*, 2003, 227: 14-26.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd ed) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] 朱新平, 夏仕玲, 张 跃, 等. 转抗冻蛋白基因鲤鱼的初步研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(2): 79-80.
- [12] Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes [J]. *Nature*, 1982, 300: 611-615.
- [13] 刘建忠, 李 宁, 丁 翔, 等. 转基因动物研究进展[J]. 农业生物技术学报, 1998, 6(3): 269-276.
- [14] Wan H Y, He J Y, Ju B S, et al. Generation of two-color transgenic zebrafish using the green and red fluorescent protein reporter genes *gfp* and *rfp*[J]. *Mar Biotechnol*, 2002, 4: 146-154.
- [15] 龙 华, 尾里建二郎, 若松佑子, 等. 红色荧光蛋白(RFP)基因在转基因青鳉中的表达[J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 97-99.

## Cloning of Myl2 promoter and generation of green fluorescence transgenic zebrafish

JIAN Qing<sup>1</sup>, BAI Jun-jie<sup>1</sup>, YE Xing<sup>1</sup>, XIA Shi-ling<sup>1</sup>, LIANG Xu-fang<sup>2</sup>, LUO Jian-ren<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** Zebrafish (*Brachydanio rerio*), as a model animal widely used on embryo development study of vertebrate, is also a kind of ornamental fish for its multi-species and elegance body. During the last decade, there were many research reports on green fluorescence transgenic zebrafish, but most of them which expressed green fluorescence protein are acted as a reporter in study on embryo development and expression location of special protein. Recently with the development of transgenic technique, especially progress on promoter studies, the expression level of transgenic-target protein was upgraded a lot, and it is now possible to construct transgenic fish as bioreactors as well as to breed transgenic fish as ornamental fish. In this paper, the construction of green fluorescence transgenic zebrafish is reported.

The genomic DNA of a zebrafish was extracted from liver tissue and the myosin light chain2 (Myl2) promoter DNA was amplified from the DNA by Polymerase chain reaction (PCR) with two special primers. After purified, the amplified fragment was ligated into pGEM-T Easy Vector and transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ . The sequencing and analysis of cloned gene showed the similitude between the cloned fragment and the zebrafish myosin light chain2 (Myl2) promoter reported by Ju B. S. is 98.6% and all of the important cis-elements such as TATA-Box, E-box and MEF2 binding sites are the same not only on the numbers but also at the location, except for the MEF2 binding site at the 527th base position from 5' end, which indicates that the cloned fragment is Myl2 promoter. The cloned Myl2 promoter was inserted into the vector (pEGFP-1) to construct the green fluorescence protein expression vector. The linearized expression vector was delivered into one or two cells stage zebrafish embryo by micro-injection. Under fluorescence microscope, green fluorescence has been observed in muscle tissue as early as embryo blood-circling stage, and in one-month-old fish, the fluorescence is strong enough to be seen with naked eyes under ultraviolet light in the dark.

For constructing transgenic ornamental zebrafish, the amount of expressed foreign protein is a critical factor. In 1997, Shin-ichi Higashijima drew the conclusion in his experiment on transgenic zebrafish that consistent expression can be achieved by the use of zebrafish-origin promoters. In 2003, Zhi-yuan Gong succeeded in raising the foreign protein expression level to 17% in transgenic zebrafish by using a strong muscle-specific and zebrafish-origin promoter. In our experiment, the fluorescence in transgenic zebrafish tended to be increased with the growth of the fish, which may be also due to the muscle-specific promoter too, for the majority of fish body is muscle tissue and thus more fluorescence protein is expressed when the amount of muscle tissue increase, even though the expression level is not so high.

**Key words:** *Danio rerio*; green fluorescence protein; transgenic; myosin; promoter