

饥饿状态下转基因鲤鱼和对照鲤鱼血清生长激素的表达研究

钟山^{1,2,3} 罗太极^{1,3,*} 汪亚平¹ 陈竹³ 管波¹ 廖兰杰¹ 朱作言¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 武汉大学生命科学学院遗传学系, 武汉 430072; 3. 武汉大学基础医学院遗传学系, 武汉 430071)

摘要: 研究采用酶联免疫吸附测定(Enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)技术, 比较分析了转GH基因鲤鱼和对照鲤鱼在饥饿和饱食状态下血清生长激素水平的变化规律, 并探讨其可能机制。实验结果表明, 在投喂实验中, 转基因鲤鱼和对照鲤鱼血清生长激素水平均无明显变化, 但转基因鲤鱼血清生长激素远高于对照鲤鱼, 分别为(142.0 ±4.9) ng/mL 和(1.6 ±0.2) ng/mL, 转基因鲤鱼体重增长速率显著高于对照鱼。在饥饿实验中, 转基因鲤鱼的血清生长激素迅速下降, 从(142.0 ±4.9) ng/mL 降至(46.0 ±3.2) ng/mL, 而后稳定在这一较低水平; 对照鲤鱼血清生长激素持续上升, 从(1.6 ±0.2) ng/mL 升至(10.9 ±1.4) ng/mL, 体重负增长速率没有显著差异。研究结果提示, 转GH基因鲤鱼血清生长激素的调控机制与对照鲤鱼的不同, 其表达水平不受脑垂体反馈抑制调控机制的影响, 而与重组GH基因中-actin基因启动子的调控模式相关。

关键词: 转基因鲤鱼; 生长激素; 饥饿; ELISA

中图分类号: Q45 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)06-1046-05

转生长激素(Growth hormone, GH)基因鱼的促生长效应明显^[1,2], 并且具有少食快长、适应性强等特点, 可为渔业带来巨大的经济效益。选择有效表达、稳定整合的转基因鱼, 经几代选择, 可望建立转基因鱼品系, 培育新的优良养殖品种^[3]。目前, 转基因鱼家系的建立主要依据转基因鱼快速生长性状的筛选和移植基因整合状态的鉴定^[4], 移植基因在受体基因组中的表达及其调控机制尚缺乏系统深入的研究。探讨移植基因表达调控机制及其与快速生长性状的相互关系, 对培育快速生长转基因鱼品系具有重要意义。

在自然及养殖条件下, 由于饵料基础、饵料的可得性及其质量等营养因素, 鱼类经常会在生活周期的某些阶段受到饥饿胁迫。饥饿是影响鱼类生理生态状况的重要因子之一^[5], 鱼类在饥饿状态下代谢发生明显的变化, 但是这种变化的调节机制目前仍不清楚。与其他脊椎动物类似, 鱼类的代谢受到多种激素的协同调节, 其中生长激素起着重要的作用^[6]。生长激素是脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的

一种单一肽链激素, 是一种具有广泛生理功能的生长调节素, 鱼类生长激素是鱼类脑垂体合成和分泌的一种分子量在22 kD左右的多肽, 对鱼类的生长和发育有重要作用^[7]。在饥饿状态下, 生长激素的调控应答及其生理作用是一个备受关注的问题, 转GH基因鲤鱼为探讨这一问题提供了一个独特的研究模型。

1 材料与方法

1.1 转基因鲤鱼获得 采用显微注射方法, 获得转“全鱼”生长激素基因(pCAGcGH)黄河鲤鱼(*Cyprinus carpio*)P0代群体。重组“全鱼”生长激素基因表达载体的基因元件包括鲤鱼(*Cyprinus carpio*) -actin基因启动子和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)生长激素基因结构基因(图1)。*EcoR* 和*Hind* 酶切片段用于基因转移。

P0代移植基因阳性个体与对照鱼杂交, 获得F1代转基因鱼, F1代阳性个体与对照鱼杂交, 得到F2代

收稿日期: 2009-03-09; 修訂日期: 2009-04-07

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(编号: 2007AA10Z186); 国家自然科学基金项目(编号: 30771652)资助

作者简介: 钟山(1963—), 男, 汉族, 湖北洪湖人; 博士, 副教授; 主要研究方向为遗传与发育生物学。Email: zhongshan@whu.edu.cn

罗太极(1981—), 男, 汉族, 湖北荆门人; 博士, 讲师; 主要研究方向为遗传与发育生物学。Email: luodaji@whu.edu.cn; *表示同等贡献

通讯作者: 汪亚平(1963—), 男, 汉族, 湖北大冶人; 博士, 研究员; 主要研究方向为遗传与发育生物学。Email: wangyp@ihb.ac.cn

转基因鱼,同样方法得到 F3代。以转基因鲤鱼 F3代成熟雄性个体为父本,与对照鲤鱼杂交,获得实验鱼群体,鱼苗饲养于武汉多福转基因鱼实验基地。

1.2 转植基因检测 剪取尾鳍,采用酚/氯仿/异戊

醇抽提方法制备样品 DNA, PCR 扩增检测转植基因,转植基因特异 PCR 引物为 p_I: 5' TGGCGTGA T-GAA TGTGCG3', pc: 5' AACACGTA TGACTGC3', 扩增片段理论大小为 693 bp(图 2)。

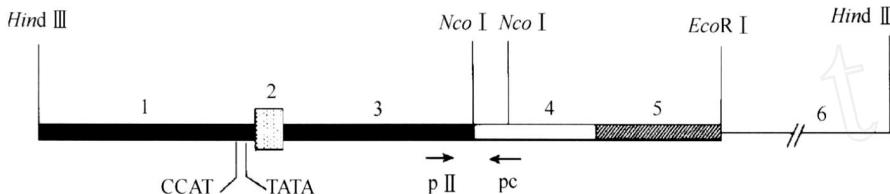


图 1 转植基因表达载体 pCA gcGH

Fig. 1 Transgenic expression vector pCA gcGH

1. 鲤鱼 *-actin* 基因 5 侧翼序列; 2. 鲤鱼 *-actin* 基因第 1 外显子; 3. 鲤鱼 *-actin* 基因第 1 内含子; 4. 草鱼 *GH* 基因 DNA 编码顺序; 5. 草鱼 *GH* 基因 3 侧翼顺序; 6. 质粒 pUC118; p_I, pc. 转植基因 PCR 检测引物

1. 5 flanking sequence of common carp *-actin* gene; 2. first exon of common carp *-actin* gene; 3. first intron of common carp *-actin* gene; 4. DNA sequence of grass carp *GH* gene; 5. 3 flanking sequence of grass carp *GH* gene; 6. pUC118; Arrows (p_I and pc) indicate the primers for PCR

图 2 转基因阳性鲤鱼与阴性鲤鱼的 PCR 分析

Fig. 2 PCR analysis of the positive transgenic carp

1. Marker; 2, 5, 7. 阳性鲤鱼; 3, 4, 6, 8. 阴性鲤鱼

Lane 1: marker; lane 2, 5, 7: transgenic individuals; lane 3, 4, 6, 8: non-transgenic controls

1.3 实验分组及采样 取 6 月龄转基因鲤鱼和对照鲤鱼,饲养于室内循环水养鱼系统,水温 12℃。转基因鲤鱼和对照鲤鱼各 60 条,饱食投喂 15d 后,各分为 2 组,每组 30 条,4 组分别为转基因鲤鱼饥饿组、转基因鲤鱼投喂组、对照鲤鱼饥饿组和对照鲤鱼投喂组。分组时及分组饲养后 1、2、4、6 和 8 周,全部样本称量体重,同时采集尾动脉血液 0.5 mL,静置 4h 后,6000 r/min 离心 4 min,取上层血清于 -70℃ 冰箱中保存备用。

1.4 血清生长激素水平检测

1.4.1 试剂 0.15 mol/L, pH7.4 PBS; 包被缓冲液: 0.05 mol/L, pH9.6 Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液; 洗涤液: 0.05% Tween 20-PBS; 封闭液: 1% BSA-PBS; 稀释液: 0.1% BSA-PBS; 2 mol/L H₂SO₄; OPD 显色液。

1.4.2 鲤鱼生长激素单克隆抗体的制备 实验中所用鲤鱼生长激素单克隆抗体(包被抗体和酶标抗

体)由中国科学院水生生物研究所与第四军医大学免疫学系联合研制:从鲤鱼脑垂体中提取生长激素;用鲤鱼生长激素免疫小鼠;采用 B 淋巴细胞杂交瘤技术得到 14 株鲤鱼生长激素单克隆抗体杂交瘤细胞株,其中 12 号作为包被抗体,6 号作为辣根过氧化物酶标记的酶标抗体^[8]。

1.4.3 检测方法 将稀释(1:600)的包被抗体加入 ELISA 板,4℃ 静置过夜;洗涤 ELISA 板,1% BSA-PBS 37℃ 静置封闭 2 h;洗涤 ELISA 板,加待测样品及标准品(复孔),37℃ 静置 1 h;洗涤 ELISA 板,加稀释的酶标抗体,37℃ 静置 0.75 h;加 OPD 显色液,37℃ 显色 0.25 h, H₂SO₄ 终止显色;用 ELISA 分析仪测 490 nm 处每孔 OD 值,绘制标准曲线,将所测样品 OD 值转为 GH 浓度。

以 OD 值(490 nm)为横坐标、生长激素标准品浓度纵坐标绘制标准曲线(图 3)。样品测定浓度小于 200 ng/mL 时,标准曲线呈线性,线性回归方程为 $y = 141.87x - 4.8237, R^2 = 0.999$ 。根据标准曲线和样品测定 OD 值计算样品血清生长激素浓度。

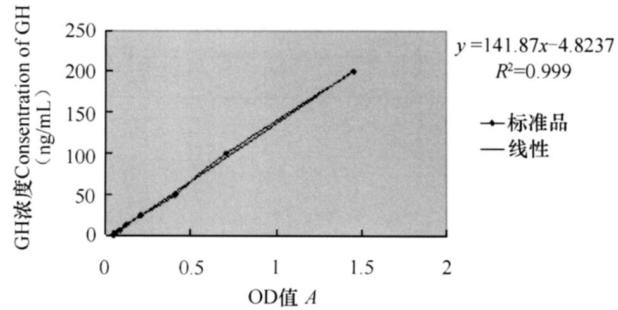


图 3 血清 GH 水平检测的标准曲线

Fig. 3 Standard curve of the serum GH level

1.5 统计方法 实验中所得平均值均表示为平均值±标准误的形式。采用体重和血清生长激素水平值单因素方差分析方法,分别比较转GH基因鲤鱼和对照鲤鱼,在投喂和饥饿状态下,体重与血清GH水平的差异。在无差异假设情况下,当 $P < 0.05$ 时,表示假设不成立,两者存在显著性差异。

2 结 果

2.1 投喂和饥饿状态下转基因鲤鱼和对照鲤鱼的体重变化

在投喂状态下,转基因鲤鱼的体重持续增长,从起始体重(345.0 ± 12.6)g到终止体重(452.6 ± 19.4)g,特定生长率为 1.93 g/d;对照鲤鱼也保持体重的增长,从起始体重(239.7 ± 3.3)g到终止体重(278.3 ± 3.4)g,特定生长率为 0.68 g/d,显著小于转基因鱼的生长速度($P < 0.05$) (图 4)。

在饥饿状态下,转基因鲤鱼和对照鲤鱼的体重都出现负增长。实验开始1周后,转基因鲤鱼投喂组的平均体重为(350.4 ± 12.6)g,饥饿组的平均体重为(341.9 ± 16.6)g,差异显著,在整个实验周期中,饥饿组的负增长速率为 0.59 g/d;实验开始1周后,对照鲤鱼投喂组的平均体重为(246.8 ± 3.3)g,饥饿组的平均体重为(230.2 ± 6.1)g,差异显著,在整个实验周期中,饥饿组的负增长速率为 0.64 g/d。

(图 4)。转基因鲤鱼和对照鲤鱼的饥饿负增长率没有显著差异。

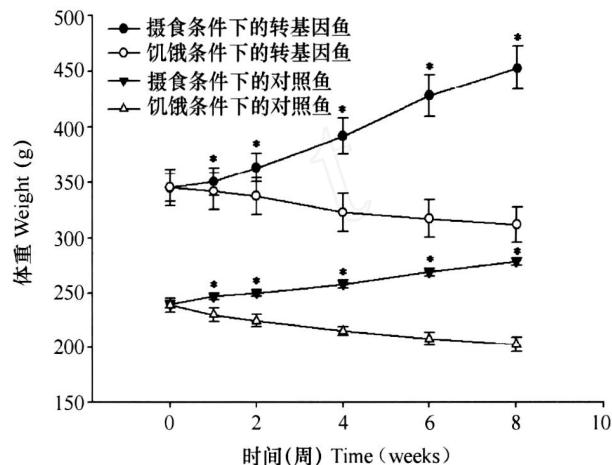


图 4 转基因和对照鲤鱼饥饿和投喂状态下体重随持续时间的变化 (* : $P < 0.05$)

Fig. 4 The body weight change of transgenic and control caps with consecutive time under starvation and normal condition (* : $P < 0.05$)

2.2 投喂和饥饿状态下转基因鲤鱼和对照鲤鱼的血清生长激素水平变化

在投喂状态下,转基因鲤鱼和对照鲤鱼的血清生长激素表达保持在一个稳定的水平,血清生长激素平均浓度分别是(142.0 ± 4.9)ng/mL和(1.6 ± 0.2)ng/mL,转基因鲤鱼血清生长激素浓度是对照鲤鱼的88.7倍(图 5)。

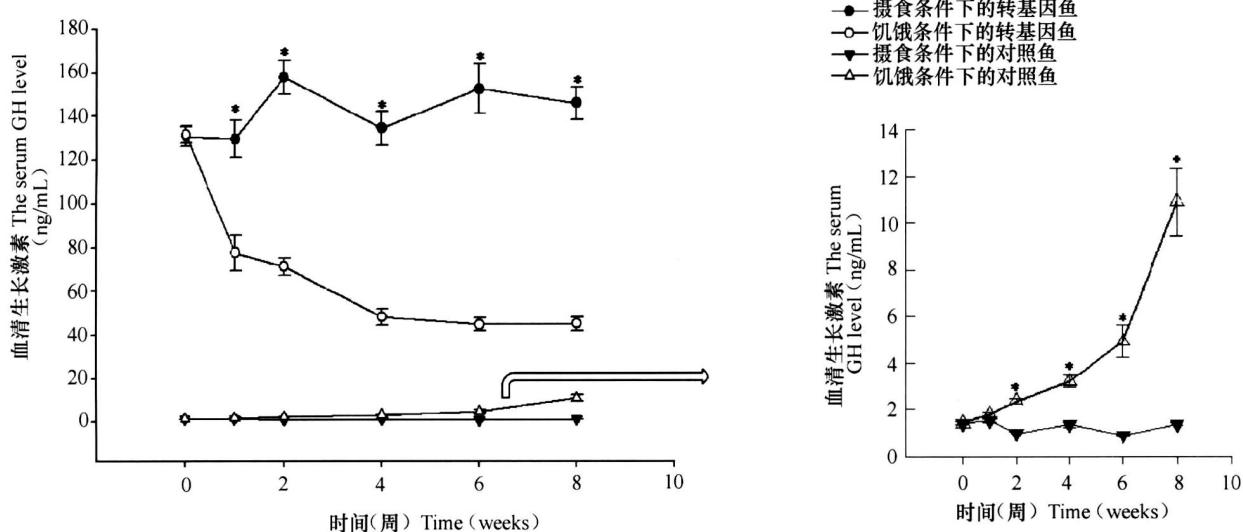


图 5 转基因和对照鲤鱼饥饿和投喂状态下血清生长激素随持续时间的变化 (* : $P < 0.05$)

Fig. 5 The serum GH level change of transgenic and control caps with consecutive time under starvation and normal condition (* : $P < 0.05$)

在饥饿状态下,转基因鲤鱼血清生长激素浓度逐渐下降,从第1周开始,饥饿组的血清生长激素浓度就显著低于投喂组的浓度,分别是(77.7 ± 8.2) ng/mL和(129.7 ± 8.6) ng/mL($P < 0.05$);从第4周开始,转基因鲤鱼血清生长激素水平处于一个较低水平的稳定状态,第4、第6和第8周,血清生长激素浓度分别是(48.2 ± 3.7) ng/mL、(44.7 ± 3.0) ng/mL和(45.2 ± 3.1) ng/mL,没有显著差异,平均浓度为(46.0 ± 3.2) ng/mL(图5)。

在饥饿状态下,对照鲤鱼血清生长激素的变化表现出不同的趋势。在实验进程中,对照鲤鱼的血清生长激素浓度持续上升,从第2周开始,饥饿组血清生长激素浓度显著高于投喂组的浓度,分别是(2.4 ± 0.1) ng/mL和(1 ± 0.1) ng/mL($P < 0.05$),到第8周,饥饿组的血清生长激素浓度达到(10.9 ± 1.4) ng/mL(图5)。

3 讨论

3.1 鲤鱼生长激素含量检测技术

本研究采用鲤鱼生长激素单克隆抗体,建立了鲤科鱼类生长激素检测技术,鲤鱼血清生长激素检测灵敏度达到0.07 ng/mL,大幅提高了生长激素的检测灵敏度^[8]。本研究的实验结果进一步证实了该检测系统良好的稳定性和可操作性。生长激素灵敏、稳定检测技术的建立,为研究转GH基因鲤鱼移植基因蛋白水平的表达调控奠定了重要基础。

3.2 饥饿及投喂状态下转基因鲤鱼和对照鲤鱼的体重生长

转基因鲤鱼和对照鲤鱼的生长对比实验结果显示,在正常投喂时,转基因鲤鱼体重增长速率显著高于对照鲤鱼,而在饥饿状态下,转基因鲤鱼和对照鲤鱼的体重负增长速率没有显著差异,这一结果提示,鲤鱼体重的增长和负增长遵循不同的生理机制。正常投喂状态下,转基因鲤鱼血清生长激素浓度显著高于对照鲤鱼,体重增长速率是对照鲤鱼的2.8倍,表明鲤鱼体重的增长与血清生长激素水平显著相关;在饥饿状态下,尽管转基因鲤鱼血清生长激素水平有所下降,但仍然保持较高水平[(46.0 ± 3.2) ng/mL],显著高于对照鲤鱼[(10.9 ± 1.4) ng/mL],数据显示两者体重负增长速率并无显著差异,表明鲤鱼血清生长激素水平的高低对体重饥饿负增长没有影响,鲤鱼体重饥饿负增长受其他机制的调节。

3.3 饥饿及投喂状态下转基因鲤鱼和对照鲤鱼血清生长激素的表达调控

在正常投喂的状态下,转基因鲤鱼血清生长激素浓度是对照鲤鱼的88.7倍,表现出显著的快速生长效应,Tsukasa, et al.采用RT-PCR方法,在mRNA水平上间接证实转生长激素基因大麻哈鱼生长激素水平大约是对照组的40倍^[9]。有趣的是,在饥饿状态下,转基因鲤鱼血清生长激素表达水平显著下降,而对照鲤鱼的血清生长激素表达却上调表达。从重组生长激素基因的结构来看,草鱼生长激素基因是在鲤鱼 β -actin基因启动子的驱动下表达,因此,转基因鲤鱼血清生长激素的表达水平主要与 β -actin基因的表达水平相关。在饥饿条件下,机体的营养代谢水平相应下降,尽管 β -actin是细胞的重要组成性蛋白,它的表达仍然可能受到下调调控,这可能就是转基因鲤鱼血清生长激素在饥饿状态下出现下调表达的原因;对照鲤鱼的生长激素表达受脑垂体调控,是机体对内外环境变化的响应,在饥饿状态下,动物血清生长激素水平升高的机制尚未完全清楚,一般认为与IGF-1的负反馈效应减弱有关^[10],生长激素在一定程度上的上调表达,可能有利于机体维持必要的生理代谢。上述研究结果显示,转基因鲤鱼和对照鲤鱼生长激素表达调控机制不尽相同,转基因鲤鱼生长激素的表达主要与 β -actin基因启动子的调控模式相关。

参考文献:

- [1] Li D L, Fu C Z, Hu W, et al. Rapid growth cost in "all-fish" growth hormone gene transgenic carp: Reduced critical swimming speed [J]. Chinese Science Bulletin, 2007, 52(11): 1501—1506 [李德亮, 傅萃长, 胡伟, 等. 快速生长导致转“全鱼”生长激素基因鲤鱼临界游泳速度的降低. 科学通报, 2007, 52(8): 923—926]
- [2] Hew C L, Fletcher G L, Davies P L. Transgenic salmon: tailoring the genome for food production [J]. Journal of Fish Biology, 1995, 47(Suppl. A): 1—19
- [3] Yang X M, Zhan L, Jiang H S. Progress in transgenic fish breeding research [J]. Guangxi Sciences, 2006, 13(1): 76—80 [杨学明, 张立, 蒋和生. 转基因鱼的研究及其发展前景. 广西科学, 2006, 13(1): 76—80]
- [4] Wang Y P, Hu W, Wu G, et al. Genetic analysis of "all-fish" growth hormone gene transferred carp (*Cyprinus carpio* L.) and its F1 generation [J]. Chinese Science Bulletin, 2001, 46(14): 1174—1178 [汪亚平, 胡伟, 吴刚, 等. 转“全鱼”生长激素基因鲤鱼及其F1代遗传分析. 科学通报, 2001, 46(3): 226—229]
- [5] Qiao Z G, Zhang J P, Niu J Y, et al. Effects of starvation and

- refeeding on the blood indices of *Silurus asotus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(5): 631—636 [乔志刚, 张建平, 牛景彦, 等. 饥饿和再投喂对鮀血液生化指标的影响. 水生生物学报, 2008, 32(5): 631—636]
- [6] Evans D H. The Physiology of Fishes [M]. New York: CRC Press 1997, 65—97
- [7] Wei J Y, Xue L Y. A Survey of Studies on Fish Growth Hormone [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2004, **23**(1): 56—59 [韦家永, 薛良义. 鱼类生长激素的研究概况. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2004, 23(1): 56—59]
- [8] Wu G, Chen L H, Zhong S, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay of changes in serum levels of growth hormone (cGH) in common carps (*Cyprinus carpio*) [J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2008, **51**(2): 157—163 [吴刚, 陈丽华, 钟山, 等. 鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 血清生长激素变化的酶联免疫吸附测定. 中国科学 C辑, 2008, 38(1): 28—35]
- [9] Tsukasa M, Robert H. Devlin. Transgene and host growth hormone gene expression in pituitary and nonpituitary tissues of normal and growth hormone transgenic salmon [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1999, 129—139
- [10] Hua YM, Lin H R. Effects of different nutritional status on expression of Igf- mRNA in immature common carp liver [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, **47**(1): 94—100 [华益民, 林浩然. 营养状况对幼年鲤鱼肝脏 IGF- mRNA 表达的影响. 动物学报, 2001, 47(1): 94—100]

STUDY ON SERUM GH EXPRESSION OF TRANSGENIC AND CONTROL COMMON CARP UNDER HUNGRY CONDITION

ZHONG Shan^{1, 2, 3}, LUO Da-Ji^{1, 3, *}, WANG Ya-Ping¹, CHEN Zhu³, GUAN Bo¹, LIAO Lan-Jie¹ and ZHU Zuo-Yan¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Department of Genetics, College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072; 3. Department of Genetics, Basic Medical School of Wuhan University, Wuhan 430071)

Abstract: This study comparatively analyzed the change regulation of serum growth hormone of transgenic fish and control under starvation and feeding condition by using the Enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA technology, and discussed its possible mechanism. The result showed that there was no obviously change in serum growth hormone level of both transgenic fish and the control in feeding experiment, but serum growth hormone level of the former was extremely higher than the latter, which were (142.0 ±4.9) ng/mL and (1.6 ±0.2) ng/mL respectively, body weight growth rate of the former was also higher than the latter. In starvation experiment, the concentration of serum growth hormone in transgenic fish descended from (142.0 ±4.9) ng/mL to (46.0 ±3.2) ng/mL rapidly, and then kept at this lower level, while the concentration of serum growth hormone in the control rose up from (1.6 ±0.2) ng/mL to (10.9 ±1.4) ng/mL continuously, there was no significant difference in body weight minus growth rate between transgenic fish and the control. The study result revealed that the regulatory mechanism of serum growth hormone of transgenic common carp was different with that of the control, because its expression level was not impacted by pituitary feedback inhibition mechanism but related to the control mode of β -actin gene promoter in the transgene.

Key words: Transgenic common carp; Growth hormone; Starvation; ELISA