

研究简报

转人乳铁蛋白基因草鱼抗 GCHV 的初步研究

钟家玉 朱作言

(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)

RESISTANCE TO GCHV OF hLFc TRANSGENIC GRASS CARP

ZHONG Jia yu and ZHU Zu o yan

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology;

Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan, China, 430072)

关键词: 草鱼; 精子电脉冲介导转基因法; 人类乳铁蛋白; 出血病; 攻毒实验

Key words: Grass carp; Electroporated sperm-mediated gene transfer; Human lactoferrin; Haemorrhage; Artificial infection

中图分类号: S965.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2001)05-0528-03

草鱼出血病是由草鱼出血病病毒(GCHV, *Grass carp Haemorrhage Virus*)引起的爆发性疾病,在草鱼鱼种饲养阶段危害极大,迄今尚无有效的防治方法。人类乳铁蛋白(hLF, human lactoferrin)是人类非特异免疫系统中的重要成员^[1]。它不仅有抑制细菌生长乃至杀死各种细菌的功能^[2],还能提高机体抵抗病毒的能力^[3]。转 hLF 基因烟草的抗病研究已经取得可喜的进展^[4]。那么, hLF 是否具有提高低等脊椎动物鱼类的抗病毒能力,是一个具有理论和应用意义的课题。通过转人类乳铁蛋白 cDNA (hLFc)的研究,有可能就这个问题提供某些有价值的资料。草鱼卵膜十分柔韧,不易去除,而去除卵膜后的裸卵又十分脆弱,用显微注射研制转基因草鱼效果欠佳。本研究用电脉冲-精子介导转基因转移法,优化技术参数,研制转 hLFc 重组基因草鱼,并检测其抗病力。

1 材料与方法

将 hLFc 与鲤鱼 β -肌动蛋白基因启动子(pCA)构建重组基因质粒 pCAhLFc。质粒 pHLFc 由中国科学院植物生理生态研究所洪孟民研究员提供, pCA 由本实验室构建。草鱼(*Ctenopharyngodon idellus* Cuvier et Valenciennes)精子和卵子由武汉市南湖渔场提供。pCAhLFc 经 Hind III线性化后与精子混合,然后用电脉冲处理。电脉冲处理过的精子与卵子进行人工授精和孵苗,并用未处理的精子做相应对照实验。用位于 CA 和 hLFc 顺序上的一对寡聚核苷酸为引物,经 PCR 检测草鱼苗携带 pCAhLFc 的情况。取 3~4 月龄的对照组和实验组草鱼,腹腔注射稀释的 GCHV 病毒原液,进行攻毒实验。GCHV 病毒原液由湖南农业大学张学文等老师提供。统计实验组和对照组的发病死亡率,并分析转基因阳性

收稿日期: 2001-04-09; 修订日期: 2001-04-13

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(39823003)

作者简介: 钟家玉(1975-),男,四川省成都市人;在读硕士;主要从事遗传学研究

与抗病毒的相关性。

2 结果和讨论

2.1 电脉冲提高了精子介导的外源基因转移效率

将草鱼精子和 pCAhLFc 混合, 温育后进行人工授精, 3 组实验得到的转基因鱼苗占总鱼苗数的 2.3%—4.3%。而对浸浴在 pCAhLFc 中的 15 组精子进行电脉冲处理后再进行人工授精, 可以使转基因的成功率提高到 19.6%—46.8%。对两批实验组 5 月龄的草鱼尾鳍 DNA 进行 PCR 检测, 34.62%—35.71% 个体为转基因阳性。上述结果具有稳定的可重复性。此结果较以前关于电脉冲—精子介导转基因转移报道, 如谢岳峰等对泥鳅^[5]、Inoue 等^[6]和 Lu 等^[7]对青 的转基因效率要高。

2.2 部分转 pCAhLFc 基因草鱼的抗病毒能力显著提高

取 3~4 月龄的对照组和实验组草鱼, 腹腔注射稀释的 GCHV 病毒原液, 注射剂量为 0.1 mL/10g 体重, 检验其抗病毒能力。第一次攻毒实验的实验组鱼(共 23 尾)和对照组鱼(共 28 尾)在 360h 内患出血病死亡累计数如下: 实验组在攻毒后 95h 死亡为 3 尾(13.04%), 131h 为 5 尾(21.74%), 155h 为 14 尾(60.87%), 178h 为 16 尾(69.57%), 192h 为 18 尾(78.26%), 198h 为 19 尾(82.61%), 206h 为 20 尾(86.96%)。此后 3 尾(13.04%)至 360h 实验结束仍然存活。对照组在攻毒后 84h 死亡 1 尾(3.57%), 131h 为 2 尾(7.14%), 155h 为 12 尾(42.86%), 166h 为 28 尾(100.00%), 即全部死亡。

第二次攻毒实验的对照组鱼(共 29 尾)和实验组鱼(共 25 尾)在 360h 内患出血病死亡累计数如下: 实验组在攻毒后 96h 死亡为 3 尾(12.00%), 128h 为 5 尾(20.00%), 168h 为 6 尾(24.00%), 172h 为 8 尾(32.00%), 176h 为 18 尾(72.00%), 200h 为 19 尾(76.00%), 208h 为 20 尾(80.00%), 216h 为 21 尾(84.00%), 此后 4 尾(16.00%)至 360h 实验结束仍然存活。对照组在攻毒后 88h 死亡为 1 尾(3.45%), 128h 为 3 尾(10.34%), 152h 为 5 尾(17.24%), 168h 为 8 尾(27.59%), 172h 为 12 尾(41.38%), 176h 为 17 尾(58.62%), 184h 为 24 尾(82.76%), 192h 为 28 尾(96.55%), 此后 1 尾(3.45%)至 360h 实验结束仍然存活。

和对照组比较, 实验组鱼在攻毒后开始出现死亡的时间长, 群体中死亡发生的时程长, 最终存活的比例高(13.04%对 0.00%, 16.00%对 3.45%)。

2.3 实验组中攻毒存活的个体均为转 pCAhLFc 阳性

按死亡出现的次序, 取尾鳍制备 DNA 进行 PCR 检测。第一次攻毒实验中的实验组鱼 23 尾中, 转基因阴性的号码为 2—10, 12—15, 19; 阳性的号码为 1, 11, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23(其中最后三尾为存活鱼)。第二次攻毒实验中的实验组鱼 25 尾中, 转基因阴性的号码为 1—5, 7—16; 阳性号码为 6, 17—25。随机取对照组鱼 10 尾进行 PCR 检测, 结果均为阴性。由此可见, 转基因阳性鱼发病死亡的时间比阴性鱼要晚, 且实验组中存活的 7 尾都是转基因阳性。

实验组群体中, 转基因阳性只占 34.62%—35.71%。统计攻毒后的草鱼在单位时间内的死亡率的变化, 对照组草鱼的死亡曲线近似正态曲线, 而实验组鱼的死亡曲线则与正态曲线有明显的差别。这是由于实验组群体内实际上含有两个群体, 即转基因鱼和非转基因鱼, 它们的抗病力表现出明显不同。

在第二次攻毒实验中有 1 尾对照组鱼存活下来, 这是个体差异的一种极端显现。在第一次攻毒的实验组中, 有 1 尾转基因阳性鱼比阴性鱼发病死亡还早, 这和 1989 年提出的三种整合的理论(即外源基因在宿主基因组的整合可能是毒性的、沉默的和有效的)是吻合的^[8], “毒性整合”和“沉默整合”都有可能引起这种情况出现。

总之, 转 CAhLFc 基因实验的部分阳性个体具有抗草鱼出血病的能力, 提示人乳铁蛋白有提高草鱼抗病毒的潜力, 其基因转移有培育抗病草鱼的可能性。

参考文献:

- [1] Kawasaki Yoshihiro, Sato, Kaoru, Shinmoto, Hiroshi; et al. Role of Basic Residues of Human Lactoferrin in the Interaction with B Lymphocytes [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, **64**(2): 314—318
- [2] Groenink J. Cationic amphipathic peptides, derived from bovine and human lactoferrins, with antimicrobial activity against oral pathogens [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **179**(2): 217—222
- [3] Marchetti M, Superti, F, Ammendolia, MG. et al. Inhibition of poliovirus type 1 infection by iron, manganese and zinc saturated lactoferrin [J]. *Medical Microbiology and Immunology*, 1999, **187**(4): 199—204
- [4] Zhang Zhanyuan, Coyne DP, Vidaver, AK, et al. Expression of human lactoferrin cDNA confers resistance to *Ralstonia solanacearum* in transgenic tobacco plants. *Phytopathology*, 1998, **88**(7): 730—734
- [5] 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
- [6] F. Y. T. Sin, U. K. Mukherjee, L. Walker, et al. The application of gene transfer techniques to marine resource management: recent advances, problems and future direction [J]. *Hydrobiologia*, 1997, **352**: 263—278
- [7] Chen, LT, Lu L, Broxmeyer HE. Effects of purified iron saturated human lactoferrin on spleen morphology in mice infected with Friend virus complex [J]. *American Journal of Pathology*, 1987, **126**(2): 285—292
- [8] 朱作言, 许克圣, 谢岳峰, 等. 转基因鱼模型的建立 [J]. 中国科学, 1989, **2**: 147—155