

鱼类精子携带的外源基因导入*

李国华 崔宗斌 朱作言**

黄善銓

(中国科学院水生生物研究所,武汉 430072)

(广东中山市水产研究所,中山市 528400)

提 要

将鲤鱼(或泥鳅)精子在保存液内与人生长激素(hGH)重组质粒 DNA 保温,再与鲤(或泥鳅)卵受精。由此发育的鱼苗经 DNA 分子杂交和 PCR 检测证明,33.3%(或 37.0%)的个体带 hGH 基因,其拷贝数在 4—150/细胞之间。在一定条件下,精子可作为携带外源基因的载体,通过受精作用产生转基因鱼。

关键词 鱼,精子携带,基因转移

80 年代初,本实验室用显微注射方法,将大鼠重金属螯合蛋白(MT-1)基因启动调控顺序驱动的 hGh 基因重组质粒(pMThGH)DNA 导入鲫鱼、泥鳅受精卵内,培育了首批转基因鱼,并建立了转基因鱼模型^[1-3]。显微注射的优越性在于,它可确保将外源基因导入受精卵内,在去卵壳后,甚至可以用第二极体作为参照物,将外源基因导入卵原核附近。注射的外源基因拷贝数可通过调整 DNA 浓度和注射量加以控制。显微注射方法可获得 50%左右的转基因鱼个体。但这个方法繁琐,成活率不稳定。为此,本实验室尝试过电脉冲转移法^[4]和精子携带的外源基因转移方法。关于后者,1992 年曾作了摘要报道^[5],与此同时或稍后,国内外亦有学者发表了类似的研究^[6,7,8]。本文就本实验室的进一步工作进行报道和讨论。

1 材料与方法

1.1 外源目的基因

用于被精子携带的外源目的基因为重组质粒 pMThGH,即由大鼠 MT-1 基因启动调控结构及其 5'上游端 1900 碱基对(bp)与除去了第 2—4 个内含子的 hGH 结构基因及其 3'下游端 1500bp 在 pBR322 内的重组体^[1,2]。重组质粒 DNA 按常规方法扩增、纯化,用 *EcoRI*(New England Biolabs 公司,下同)酶切回收 MThGH 片段,溶于 TE (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, PH8.0),终浓度为 0.3mg/ml DNA 分子。杂交用的探针为 hGH 基因的 *EcoRI*-*Bgl*II 片段,其长度为 800bp,经过³²p- α -dCTP 缺口转移标记(Amersham 公司试剂盒),放射比活为 10^7 — 10^8 Cpm/ng DNA。

* 国家“863”计划资助项目。本文在淡水生态与生物技术国家重点实验室完成。

** 本文联系人

1995 年 12 月 20 日收到。

1.2 实验鱼及精、卵采集

实验用镜鲤 (*Cyprinus carpio* L.) 取自本所关桥养殖场, 泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus* Cantor) 购自武昌大东门集贸市场。选取成熟的雌、雄亲鱼, 经鲤鱼脑垂体 (5mg/kg 鱼体重) 匀浆物催产后进行人工采卵、采精和授精。

1.3 精子在保存液内与 MThGH DNA 保温及受精作用

将人工采集的精液与等体积保存液 (2.9% 葡萄糖, 1% 柠檬酸三钠, 0.2% 碳酸氢钠, 0.03% 氯化钾和 30mg/ml 牛血清白蛋白) 混合后, 加入不同量的 MThGH DNA 线性分子, 使其终浓度分别为 $23\mu\text{g/ml}$, $2.3\mu\text{g/ml}$ 和 $0.23\mu\text{g/ml}$, 并在室温下保温 15、30、60 或 120min 等 4 个不同时间, 再用于人工授精。对照处理与上相同, 但加入的是不含 MThGH DNA 的 TE 溶液。人工授精的过程是, 将 $100\mu\text{l}$ 上述处理的精液加入 90mm 的无菌玻皿, 加 5ml 无菌水, 立即将鱼卵从鱼腹部挤入玻皿并摇匀。3min 后弃去玻皿内液体, 用无菌水洗去残液 3 次。受精卵在室温下孵化, 约 3—5d 出苗。

1.4 鱼苗 DNA 提取及分子杂交

鱼苗长至 3—4cm 时, 随机取样, 逐尾匀浆制备总 DNA, 每尾取 DNA $5\mu\text{g}$, 溶于 $100\mu\text{l}$ TE 溶液, 置沸水中变性 10min, 0°C 冰水中迅速降温, 每管加 $400\mu\text{l}$ $20\times\text{SSC}$, 用斑点印迹转移器 (Bio-Red) 转移到硝酸纤维素滤膜上, 晾干, 80°C 真空烘烤 2h。在 68°C 预杂交 2h 后, 加入 $200\mu\text{l}$ ^{32}p - α -dCTP 标记的 hGH DNA 探针, 杂交过夜。杂交后的滤膜在强洗脱条件下 ($0.1\%\text{SSC}$, $0.5\%\text{SDS}$, 68°C) 处理 30min, 除去残余放射本底后, 放射自显影^[9]。

1.5 鱼苗 DNA 的 PCR 法检测

反应体系组成为: 鱼苗 DNA $0.25\mu\text{g}$, 4 种 dNTP 各 $50\mu\text{mol/L}$, 两种引物各 20pmol , 20mmol/L Tris-HCl ($\text{pH}8.3$), 25mmol/L KCl, 1.5mmol/L MgCl_2 , $100\mu\text{g/ml}$ 白明胶, 0.05% Tween-20, 2 单位 Taq DNA 聚合酶, $50\mu\text{l}$ 石蜡油。经 30 个循环的扩增, 0.8% 琼脂糖胶上电泳后于紫外灯下照相。每个循环包括, 变性 94°C 30s, 引物退火 55°C 30s, 引物延伸 72°C 2min。引物 1 序列为 $5'$ -AAGCGTCACCACGACT- $3'$, 位于 MT 启动子顺序; 引物 2 序列为 $5'$ -AAAAGCCAGGAGCAG- $3'$, 为反向引物, 位于 hGH 基因顺序上。两引物间的 DNA 长度为 450bp 左右。

2 实验结果

2.1 受精率和出苗率

鲤鱼和泥鳅卵人工受精率主要取决于卵和精子的质量。正常受精卵的孵化出苗率主要取决于环境的理化因素, 如温度, 水质和有无病菌感染等。精液存放于保存液内 5—7d, 其受精率无明显下降 (吴清江, 个人通讯)。从 1990—91 年的 6 批实验来看, 有 1 批 (包括对照组) 未受精, 显然是因为精子或卵子质量太差的缘故。另外 5 批中, 对照组和不同实验组的受精率和出苗率未呈现有规律的变化。有些组的受精率和出苗率低主要是因为玻皿内卵子未均匀散开和堆积窒息造成的结果 (表 1)。

2.2 实验组鱼苗的 MThGH 基因携带阳性率

1990 年 4 月 8 日的镜鲤实验: 镜鲤精液与等体积的保存液混合后, 分为 3 等份, 分别加入 MThGH DNA, 使其终浓度为 $0.23\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $2.3\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $23\mu\text{g}/\text{ml}$, 在室温下保温 30—120min, 然后与镜鲤卵受精。5 月 11 日, 从各组中随机取 5 尾鱼苗(全长 2—3cm)制备总 DNA。DNA 斑点杂交(图 1a)和 PCR(图 1b)结果指出, 30 尾实验镜鲤中有 10 尾为转 MThGH 基因阳性, 总体阳性率为 33.3%(表 2), 对照组均为阴性。

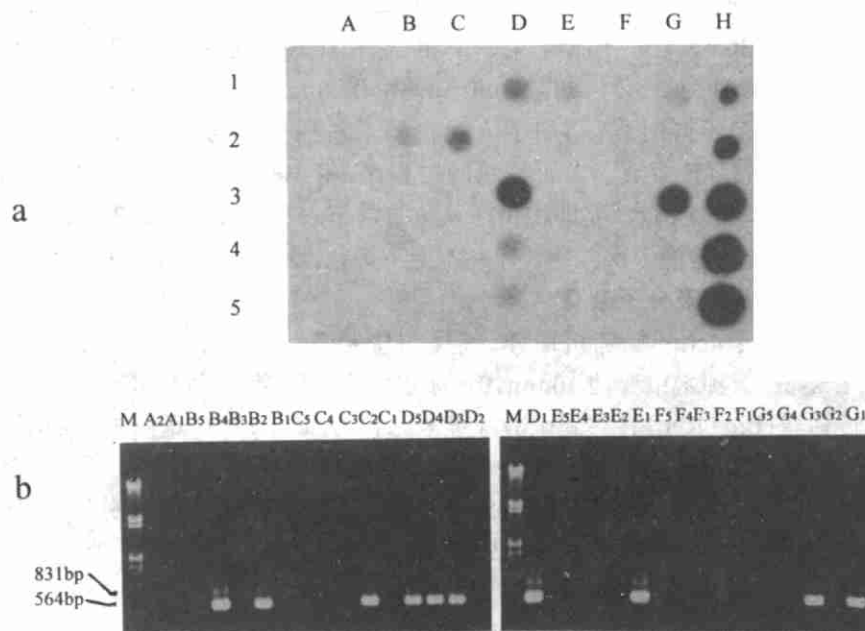


图 1 镜鲤 DNA 斑点杂交(a)和 PCR(b)实验结果。斑点杂交的 DNA 量为 $5\mu\text{g}/\text{孔}$ 。A—对照组; B—实验组 ($0.23\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pMThGH 与精子保温 120min); C—实验组 ($0.23\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pMThGH 与精子保温 30min); D—实验组 ($2.3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pMThGH 与精子保温 60min); E—实验组 ($2.3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pMThGH 与精子保温 120min); F—实验组 ($2.3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pMThGH 与精子保温 30min); G—实验组 DNA ($23\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pMThGH 与精子保温 60min); H—pMThGH (1ng, 2ng, 5ng, 10ng, 20ng); M—*Eco* RI 和 *Hin* dIII 双酶切的 λ DNA。PCR 扩增带为 450bp 左右。

Fig.1 Results of Dot blot(a) and PCR(b) of mirror carp DNA. $5\mu\text{g}$ DNA of mirror carp was used for each Dot sample. A—control; B—DNA of fry developed from eggs which were fertilized with sperms mixed with $0.23\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of pMThGH for 120 min; C—DNA of fry developed from eggs which were fertilized with sperms mixed with $0.23\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of pMThGH μl for 30min; D—DNA of fry developed from eggs which were fertilized with sperms mixed with $2.3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of pMThGH for 60 min; E—DNA of fry developed from eggs which were fertilized with sperms mixed with $2.3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of pMThGH for 120 min; F—DNA of fry developed from eggs which were fertilized with sperms mixed with $2.3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of pMThGH for 30 min; G—DNA of fry developed from eggs which were fertilized with sperms mixed with $23\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of pMThGH for 60 min; H—pMThGH DNA (1ng, 2ng, 5ng, 10ng, 20ng); M— λ DNA digested with *Eco*RI and *Hin*d III. The bands of PCR amplification were about 450bp.

1991 年 9 月 12 日的泥鳅实验: 在本组实验中, 与精子及保存液混合的 DNA 终浓度为 $0.23\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $2.3\mu\text{g}/\text{ml}$, 保温时间为 15—120min。10 月 4 日从各组中分别随机取 12 尾鱼苗, 其 DNA 分子杂交及 PCR 检测结果表明, 84 尾实验泥鳅中, 有 31 尾为转

MThGH 基因阳性,阳性率为 37.0%,对照组均为阴性(表 3)。

表 1 泥鳅受精卵出膜率
Tab.1 Hatching rate of fertilized eggs of loach

DNA 浓度 DNA concentra- tion(μg / ml)	保温时间 Incubating time(min)	卵子数 No.of eggs	卵堆积度 Egg over -lapping	受精卵数(率) No.of fertilized eggs(rate)	出膜数(率) Hatching No.(rate)
0(对照) (control)	15	321	—	285(88.8%)	257(90.2%)
0(对照) (control)	30	452	+	390(86.3%)	206(52.8%)
0(对照) (control)	60	386	+++	242(62.7%)	130(53.7%)
0.23	15	185	+++	123(66.5%)	85(69.1%)
0.23	30	294	+	257(87.4%)	190(73.9%)
0.23	60	262	+	221(84.4%)	168(76.0%)
2.3	15	443	+	384(86.7%)	257(66.9%)
2.3	30	562	++	412(73.3%)	321(77.9%)
2.3	60	202	—	186(92.1%)	152(81.7%)

表 2 镜 鲤 实 验
Tab.2 Experiments using mirror carp

水温 / 气温 water / weather temperature (℃)	DNA 浓度 DNA Concentration (μg / ml)	渗入时间 incubating time(min)	检测尾数 No.of assayed fish	阳性尾数 No.of positive fish	基因拷贝 gene copy / cell
18 / 20	0.23	30	5	1	60
18 / 20	0.23	120	5	2	20 / 50
18 / 20	2.3	30	5	0	0
18 / 20	2.3	60	5	4	20—150
18 / 20	2.3	120	5	1	10
18 / 20	23	60	5	2	10 / 120
18 / 20	0(对照 control)	60	2	0	0

转基因个体内 MThGH 基因的拷贝数: 在进行鱼苗 DNA 斑点印迹转移时, 转移不同量的 MThGH 系列作为标准参照。阳性个体中每个细胞的 MThGH 拷贝数(N)按以下公式计算: $N = A \times M_1 / B \times M_2$, A 为样品斑点所相对的 MThGH 量(μg), B 为样品斑点的鱼苗 DNA 总量(μg), M_1 为鱼类基因组 DNA 分子量, (鲤鱼和泥鳅约为 3.3×10^{-12} g), M_2 为 MThGH 的分子量(8.58×10^{-18} g)。从表 2 和表 3 可以看出, 转基因镜鲤

的 MThGH 拷贝数在 10—60 / 细胞之间,另有 1 例为 150 拷贝 / 细胞;转基因泥鳅中 MThGH 拷贝数在 4—30 / 细胞之间。

表 3 泥 鳅 实 验
Tab.3 Experiments Loach

水温 / 气温 water / weather temperature (℃)	DNA 浓度 DNA Concentration (μg / ml)	渗入时间 incubating time(min)	检测尾数 No.of assayed fish	阳性尾数 No.of positive fish	基因拷贝 gene copy / cell
23 / 26	0.23	15	12	8	5—10
23 / 26	0.23	30	12	4	4—15
23 / 26	0.23	60	12	4	4—10
23 / 26	2.3	15	12	7	4—15
23 / 26	2.3	30	12	4	5—30
23 / 26	2.3	60	12	3	5—20
23 / 26	2.3	120	12	1	4
23 / 26	0(对照 control)	30	4	0	0

3 讨论

早在 1985 年 4 月,作者曾直接将 MThGH 混在刚从成熟雄鲫鱼腹部挤出的精液中,并立即用人工授精。由此发育的 250 尾鱼苗中,取 84 尾进行斑点杂交,除 2 尾有较弱的杂交信号之外,其余均为阴性。因结果可疑暂时放弃了这一方法的探讨。1989 年, Lavifrano 等^[10]报道精子在等渗液与外源基因保温后授精并获得转基因小鼠成功的结果,重新激发了作者用鱼继续探索的兴趣。精子携带外源基因的机制尚不明确,无论是精子表面吸附还是精子细胞的摄取均需一定时间。将精液置于保存液内以延长精子在体外存活时间,并有充分时间吸附或摄取外源基因,其转基因阳性率结果比以前直接混合授精的结果大为提高,在鲤鱼和泥鳅的实验中高达 33.3%和 37.0%。从这两种鱼的实验看来,精子在 2.3μg / ml 外源 DNA 保温 15—30min 后受精,可以得到较好的携带转移结果。

近年来,用精子携带法研制转基因鱼已陆续有了成功的报道。Khoo^[6]等在斑马鱼转移的阳性率为 23.3%(携带环状质粒 DNA)和 37.5%(携带线状质粒 DNA)。Sin^[7]等将大鳞大麻哈鱼的精子与外源基因混合,经电脉冲处理后再授精,获得了 5—10%的转基因阳性率。于建康等^[8]在金鱼实验中得到了 26%的转基因阳性率。加上我们的实验,有 5 种鱼和 4 种不同外源基因 DNA,所用的精子携带具体处理方法虽各有不同但都得到用分子杂交或 PCR 检测的阳性结果,而且除 Sin 等的结果外,其它三个实验室的阳性率均在 23—38%之间。另一方面,从作者其它三次同类的实验结果来看,转基因阳性率很低(<1%),其它实验室也出现过类似的转移率不稳定现象,其原因有待进一步研究。一旦找出了原因,克服了转移效率的不稳定性,精子携带法技术可望取代显微注射和电脉冲方

法或者有可能成为研制转基因鱼的一个重要方法。

参 考 文 献

- [1] Zhu, Z. et al., Novel gene transfer into fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L., 1758), *Z. angew Ichthyol.*, 1985, (1): 31—34
- [2] 朱作言等. 人生长激素基因在泥鳅受精卵显微注射转移后的生物学效应. 科学通报. 1986, 3(5): 307—309
- [3] 朱作言等. 转基因鱼模型的建立. 中国科学. 1989, B(2): 147—155
- [4] 谢岳峰等. 泥鳅受精卵的电脉冲转移. 水生生物学报, 1990, 13(4): 307—309
- [5] Li, G. et al., Sperm-mediated gene transfer in fish. Society for Experimental Biology Lancaster Meeting, England. 1992, pp.17
- [6] Khoo, H. W. et al., Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into Zebrafish. *Aquaculture*, 1992, 107: 1—19
- [7] Sin, F. Y. T. et al., Gene transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by electroporating sperm in the presence of pRSV lacZ DNA. *Aquaculture*, 1993, 117: 57—69
- [8] 于建康等. 精子介导鱼类基因转移和聚合酶反应检测技术. 动物学报. 1994, 40(1): 96—99
- [9] Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, 1982, pp.28—281
- [10] Lavitrano, M. et al., Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, 1989, 57: 747—723

INTRODUCTION OF FOREIGN GENE CARRIED BY SPERMS

Li Guohua^①, Cui Zongbin^①, Zhu Zuoyan^① and Huang Shanxian^②

(^① Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072) (^② Zhong Shan Institute of

Fisheries, Guangdong 528400)

Abstract

Mature eggs from carp (*Cyprinus carpio* L.) and loach (*Misgurnus anguillicaudatus* Cantor) were inseminated with the same species sperms which had been incubated with recombinant plasmid DNA containing human GH gene in a solution containing 2.9% glucose, 1% sodium citrate, 0.2% sodium bicarbonate, 0.03% potassium chloride and 30mg/ml bovine albumin. Individuals of 33.3% carp fry and 37.0% loach fry showed to carry the foreign gene with 4—150 copies per cell by dot blot hybridization and PCR analysis. The studies indicated that sperm could be a vector to carry and introduce foreign gene into fish eggs in the course of fertilization.

Key words Fish, sperm-mediated, gene transfer