

研究简报

## 总 DNA 介导鱼类基因转移的初步研究

刘汉勤 郭文 王铁辉 陈宏溪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

### PRELIMINARY STUDY ON TOTAL DNA MEDIATED GENE TRANSFER IN FISH

Liu Hanqin Guo wen Wang Tiehui and Chen Hongxi

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

**关键词** 总 DNA, 鱼类, 显微注射, 精子载体, 基因转移

**Key words** Total DNA, Fish, Microinjection, Sperm vectors, Gene transfer

自七十年代我国开始将外源总 DNA 转移技术应用于棉花和水稻品种改良的研究中<sup>[1,2]</sup>, 但至今尚未见有关鱼类总 DNA 转移成功的报道。本实验采用显微注射和精子载体的方法将鲫鱼肝总 DNA 转移到红鲤受精卵, 利用鲫鱼和红鲤在孵化前后色素表达的差异来筛选转移基因个体。此方法无需克隆目的基因及 DNA 重组操作, 而且筛选简便, 目的在于探讨总 DNA 转移方法应用于鱼类品种改良的可能性。

### 材料与方法

**1. 材料鱼来源** 鲫鱼 (*Carassius auratus*) 和红鲤 (*Cyprinus carpio*, red variety) 均来自本所关桥实验基地, 红鲤亲鱼选择体表红色均匀, 没有任何杂色斑点的个体。均按常规人工催产方法获得受精卵。

**2. DNA 的提纯按赵寿元的方法<sup>[2]</sup>** 纯化后的 DNA 溶于 Tris-HCl 溶液中备用。

**3. DNA 的浓度及残留蛋白质的测定** DNA 样品稀释后在 260 nm 和 280 nm 测定光吸收。按  $OD_{260} \times 50 \times$  稀释倍数来计算样品 DNA 含量。通过计算  $OD_{260}/OD_{280}$  值, 可判断残存蛋白质的量。

**4. DNA 分子量测定及 RNA 的检测** 将

DNA 制品进行琼脂糖凝胶(0.8%)电泳, 同时点一个  $\lambda$ -Hind III 样作为标准分子量对照。可以大致判断所得 DNA 的平均分子量。同时可以检测溴酚蓝指示剂附近是否有 RNA 的荧光带。

**5. DNA 的显微注射** 用国产可作三维移动的显微操作仪, 自制玻璃注射针。用 0.25% 的胰酶脱去卵膜后的受精卵, 置于覆盖有一层琼脂, 盛有 Holfreter 液(每 1000 ml 含 0.05 g KCl, 0.1 g CaCl<sub>2</sub>, 3.5 g NaCl) 的培养皿中。在单胞期将 DNA 注射到动物极中央, 注射的 DNA 浓度为 0.1 mg/ml 和 1 mg/ml, 每个受精卵约接受 1—2  $\mu$ l 的外源 DNA, 选择受精后 7—15 min, 15—25 min 和 25 min 后 3 个注射时间。注射后的受精卵于 25 °C 孵育, 肌节出现期后转移至曝气水中培养成鱼苗。对照组除注射不含外源 DNA 的 Tris-HCl 液外, 其它处理过程与实验组相同。

**6. DNA 的精子吸附** 先挤出红鲤精液, 分别保存于 TC199 培养基, Hank's 液和 0.85% NaCl 溶液中, 每毫升保存液中加 1 ml DNA 溶液(最终浓度为 0.1 mg/ml), 吸管混匀, 置 4 °C 30 min 后, 与红鲤成熟卵进行人工受精。对照组

取部分精液于 Hank's 液中; 不加 DNA 溶液, 其他与实验组相同。

**7. 筛选指标** 用来筛选的指标是观察实验鱼在出膜后的黑色素基因的表达。

## 结 果 与 讨 论

1. 由琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)可大致估

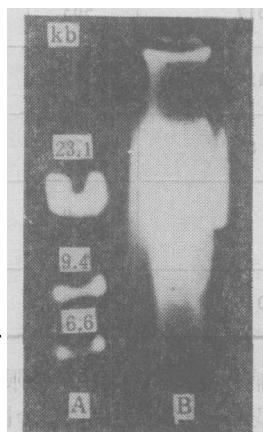


图 1 纯化鲤鱼肝总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis result of total DNA purified from *Carassius auratus* liver

- A.  $\lambda$  DNA 经 Hind III 酶切标准样品  
 $\lambda$  DNA digested by HindIII
- B. 纯化的 DNA 样品  
purified total DNA

算出从鲤鱼肝抽提出的总 DNA 平均分子量约为 30 kb, 在指示剂附近没有看到 RNA 带, 说明 RNA 已基本除去。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.88, 说明残留蛋白质很少。

2. 鲤鱼和红鲤胚胎发育过程中色素基因表达的差别表现为鲤鱼在孵化期前后沿其脊椎骨出现均匀分布的黑色素, 随发育时间延长, 逐渐扩散至全身。而红鲤在孵化期前后没有黑色素基因的表达, 直到幼鱼体表开始出现红色, 随发育时间延续, 红色逐渐加深。因此选择孵化期前后观察实验鱼色素表达情况作为筛选的指标(表 1)。

从表 1 可看出, 当单胞期注射到受精卵的外源 DNA 浓度为 0.1 mg/ml 时, 在 3 个时间实验组中, 外源 DNA 在约 1% 的注射卵中与受体卵基因组整合并有效表达, 出现黑色素的个体。各实验组的孵化率均低于对照, 表明外源 DNA 对受体卵的胚胎发育有干扰作用。当外源 DNA 浓度为 1 mg/ml 的实验组中这种干扰特别明显, 大量胚胎畸形发育及夭折, 孵化率极低, 没有出现黑色素的个体。

3. Lavitrano 等曾发现小鼠精子能够吸附加入到精子保存液中的外源 DNA 分子<sup>[1]</sup>。本实验所采用的 3 种溶液都适合短期保存鱼类精子, 其中 Hank's 液同时适合于精子对 DNA 分子的吸附(表 2)。精子对 DNA 分子的吸附及随受精过程而进行的转移是一个较复杂的物理化学过程, 其

表 1 鲤鱼肝组织 DNA 注射到红鲤受精卵实验结果

Tab.1 The results of total DNA Purified from *Carassius auratus* liver injected into fertilized eggs of red carp

注射时间 Time of injection(min)	7—15			15—25			>25		
DNA 浓度 Concentration of DNA solution (mg/ml)	0	0.1	1	0	0.1	1	0	0.1	1
注射卵数 No. of injected eggs	48	721	338	39	841	371	35	492	205
鱼苗数 No. of fry	14	137	17	10	155	8	11	109	12
孵化率 (%) Hatching rate	29	19	5	26	18	2.2	31	22	5.9
出现黑色素个体数 No. of fry showed black pigment expression	0	2	0	0	3	0	0	1	0
表达率 (%) Expression rate	/	1.46	0	/	1.94	0	/	0.9	0

注: 0mg/ml 组为对照组 Note: The 0mg/ml groups are controls.

表 2 利用红鲤鱼精子载体进行 DNA 转移实验结果

Tab. 2 The results of introducing foreign DNA into fertilized eggs by red carp sperm vectors.

保 存 液 Reserving solution	TC 199 培养基 TC199 culture medium	Hank's 液 Hank's solution	0.85% NaCl	对 照 Controls
DNA 浓度 (mg/ml) Concentration of DNA solution	0.1	0.1	0.1	0
受精卵数 No. of fertilized eggs	497	517	503	345
鱼苗数 No. of fry	408	429	397	293
孵化率(%) Hatching rate	82	83	79	85
出现黑色素个体 No. of fry showed pigment expression	0	3	0	0
表达率(%) Expression rate	0	0.69	0	/

详细机制还有待于进一步研究。

4. 总 DNA 转移所导入的外源 DNA 中所含某一特定基因的拷贝数比克隆基因转移所导入的外源基因的拷贝数( $10^6$ )低得多, 大约为  $8 \times 10^1$  拷贝。但由于所用的供体鲫鱼 DNA 与受体鲤鱼受精卵的染色体 DNA 具有很大的同源性。因此它在进入受体卵后与其染色体基因组发生整合的机率很高。而且外源 DNA 平均分子量约为 30 kb, 最大分子量接近 100 kb, 因此在受体卵内, 由于内源核酸酶的降解而对基因造成的损伤程度较单基因的情况要小得多。所以相对表达率要比克隆基因转移的高。实验共获得转移色素基因鱼 9 尾, 现存活 3 尾, 已长至 5 月龄, 外部形态特征除体色外其余都与鲤相同。

5. 目前在鱼类基因转移研究中, 由于目的基因缺乏, 使克隆基因转移技术在鱼类品种改良, 如

培育抗寒、抗病新品种的研究中受到限制。鱼类的许多性状都是由多基因控制的一个协同表达系统, 不可能简单地转移某个基因而奏效。采用总 DNA 转移的方法有可能同时转移多个基因, 对鱼类抗逆性新品种的培育具有重要意义。

## 参 考 文 献

- [1] 周光宇等, 1988。受粉后外源基因导入植物技术。中国科学 B 辑, 6: 611—614。
- [2] 赵寿元, 1987。哺乳动物高分子量 DNA 提取。遗传, 5(2): 423—438。
- [3] Marieluisa Lavitrano et al., 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice. Cell, 57:717—723.
- [4] Zhou G.Y. et al., 1983. Introduction of exogenous DNA cotton embryos, Method in Enzymology, 101:443—457.