

研究简报

## 泥鳅受精卵的电脉冲基因转移

谢岳峰 刘东 邹钧 李国华 朱作言

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

## GENE TRANSFER IN THE FERTILIZED EGGS OF LOACH VIA ELECTROPORATION

Xie Yuefeng Liu Dong Zou Jun Li Guohua and Zhu Zuoyan

(Institute of Hydrobiology Academia Sinica, Wuhan)

关键词 电脉冲, 基因转移, 鱼类

**Key words** Electroporation, Gene transfer, Fish

鱼类具有怀卵量大、受精卵易得, 容易进行体外操作、人工孵化及培育等优点, 使得它成为转基因动物研究的极好材料。1985年朱作言等<sup>[1]</sup>首次发表了转基因鱼研究的初步结果, 随后又建立了较为完整的转基因鱼模型, 并获得了可遗传的转基因鱼及其子一代<sup>[2]</sup>。这一研究现已扩展到了十多个国家和地区的几十个实验室。已有的研究成果表明, 鱼类基因转移与传统育种技术相结合, 将有可能带来育种史上的革命, 并建立定向、快速的鱼类育种新技术。

已发表的转基因鱼研究, 都是采用显微注射的方法直接将外源基因导入鱼类受精卵<sup>[1,2,4-6]</sup>或卵母细胞<sup>[6]</sup>。这种方法可以大量和准确地导入外源基因, 每卵的导入量可高达  $10^6$ — $10^7$  拷贝以上。经注射发育而成的受体鱼中, 外源基因整合率在 10—50% 之间<sup>[1,2,4-9]</sup>。但是, 显微注射法也存在着明显的缺点, 如容易造成受体卵损伤、注射外源基因量不能精确控制、无法获得大量转基因个体以供选择优良性状的个体等。因此, 有必要研究新的高效外源基因转移系统, 把鱼类基因转移定向育种技术推向实用化。

电脉冲技术最初运用于原生质体的电融合研

究, 近年来人们先后成功地运用这一技术将外源基因导入植物培养细胞和动物培养细胞<sup>[10]</sup>, 最近还报道了用电脉冲进行鱼类卵细胞与囊胚细胞的融合<sup>[11]</sup>, 但鱼类卵细胞的电脉冲基因转移未见到成功的报道。我们自行设计了一个电脉冲发生系统, 实现了对泥鳅受精卵的电脉冲基因导入。

### (一) 材料和方法

#### 1. 电脉冲发生器及样品槽

样品槽为一长 3cm, 宽 0.5cm 的有机玻璃槽, 槽底部两平行边各嵌有一条铂金丝作为放电电极, 受精卵接受脉冲时, 介质为 TAE 溶液 (0.04 mol/L Tris-acetate, 0.002 mol/L EDTA), 此时整个样品槽的电阻为 32.5 kΩ (千欧)。

#### 2. 基因制备

实验用外源基因为删除了后 3 个内含子的人生长激素基因, 其 5' 端冠以大鼠 MT-1 基因的启动子顺序, 并克隆在质粒 pBR322 的 EcoRI 位点上 (命名为 pMhGH), 总长度为 7.88 千碱基对 (Kb)。pMhGH 质粒大量扩增后, 经 RNase 处理, 酚, 氯

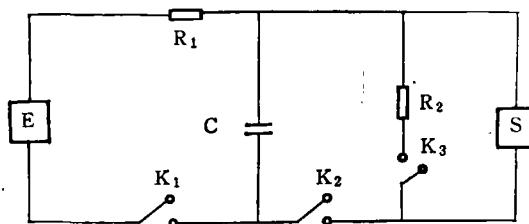


图 1 自制的电脉冲发生系统电路图

E 直流稳压电源；R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> 电阻；C 电容；S 样品槽；K<sub>1</sub>、K<sub>2</sub>、K<sub>3</sub> 开关

Fig. 1 Diagram of electroporation system

E. DC power supply; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>. Resistance; C. Capacitor; S. Chamber; K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>. Key

仿/异戊醇抽提, TE 溶液透析, 乙醇沉淀, 最后溶解在三蒸水中备用, 浓度为 1mg/ml。电脉冲实验时, 取 100μl DNA 溶液(含 100μg pMhGH) 和 900μl TAE 溶液, 配成电脉冲样品液。

### 3. 泥鳅受精卵的获得及电脉冲基因转移

泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor))

受精卵的获得及去卵膜处理同朱作言等实验<sup>[2]</sup>。

将无膜卵移入盛有 1ml 样品液的样品槽, 将 K<sub>2</sub> 断开, K<sub>1</sub> 闭合, 此时直流电源对电容充电, 可见电流表上电流逐渐减小, 直至为零, 即充电结束。断开 K<sub>1</sub>, 闭合 K<sub>2</sub>, 电容放电, 样品槽内产生一个电脉冲。电脉冲幅度可通过改变电源的输出电压控制, 而电脉冲的宽度则通过改变 R<sub>2</sub> 的电阻值控制。

### 4. 基因转移率的检测

去膜卵接受电脉冲处理后, 从样品槽中取出, 用 Holtfreter's 溶液清洗 2 次后移入盛有 Holtfreter's 溶液的琼脂铺底培养皿中继续发育。在不同发育时期取出胚胎或鱼苗, 用蒸馏水洗涤 3 次后, 制备总 DNA。以同位素标记的质粒 pMhGH 的 EcoRI/BglII DNA 片段 (800bp) 作探针, 对上述样品进行斑点杂交, 有关实验程序按 Maniatis 等<sup>[10]</sup>和朱作言等<sup>[22]</sup>的方法进行。

## (二) 结果与讨论

### 1. 电脉冲基因转移实验有关的物理参数的确定及其对泥鳅受精卵胚胎发育的影响

以泥鳅脱膜受精卵为材料, 通过改变电脉冲系统中各种物理参数来观察泥鳅受精卵对电脉冲的耐受能力。从表 1 可以看到, 对脉冲幅度为 250V 的电脉冲, 受精卵在放电时间小于 5.1ms 的

范围都能正常发育生长, 而在放电时间大于 6.6 ms 时, 胚胎发育受阻。当放电时间达 11s 时, 受精卵立即崩溃。

### 2. 外源基因在受体胚胎发育过程中的扩增与降解

选择以下条件:

电压为 250V, C 为 22μF, R<sub>2</sub> 为 20Ω 进行电脉冲基因转移实验。

在囊胚期, 原肠中期、尾芽期和肌肉效应期各固定 30 卵, 制备 DNA 后进行斑点杂交(图 2)。结果表明, 导入的外源基因在原肠期的扩增达到高峰, 到尾芽期就开始出现降解。

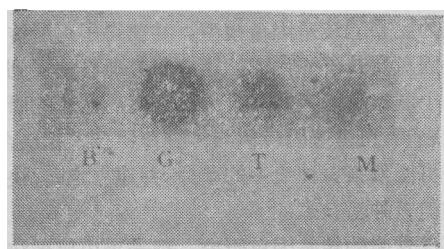


图 2 外源基因在受体胚胎发育过程中的扩增与降解

B 囊胚期; G 原肠期; T 尾芽期; M 肌肉效应期  
Fig. 2 The amplification and degradation of the foreign gene sequence during the embryogenesis of host egg of loach

B. Blastula stage; G. Gastrula stage; T. Tail-bud stage; M. Muscle reaction stage

用微量注射法进行的工作证明, 外源基因导入鱼受精卵后不久, 即行自我复制和扩增, 及至原肠期扩增达顶峰后才开始降解<sup>[11]</sup>。本实验结果与此非常吻合。说明用电脉冲法导入的外源基因在受体内的行为与用微量注射法导入外源基因基

表1 电脉冲对泥鳅受精卵胚胎发育的影响(电压为250 V)

Tab. 1 The effect of electroporation on the embryogenesis of host egg of Ibach.  
(the voltage was set at 250V)

实验组号 Group number	电脉冲时间(毫秒) Width of electric pulse (ms)	电路参数 Factor of circuit		胚胎发育情况 Case of embryogenesis	
		(微法) $C(\mu F)$	(欧) $R_2(Q)$	囊胚早期 Early blastula	原肠晚期 Late gastrula
1	0.97	22	20	正常	正常
2	3.3	0.047	$\infty$	正常	正常
3	5.1	0.07	$\infty$	正常	正常
4	6.6	150	20	略有异常	异常
5	8.7	22	180	略有异常	异常
6	48.4	22	1000	异常	死亡
7	59.4	150	180	异常	死亡
8	165	150	500	异常	死亡
9	$1.1 \times 10^4$	150	$\infty$	单胞时已崩溃	

本上是一致的。

### 3. 外源基因整合率

用总DNA斑点杂交法检测接受电脉冲基因转移处理后发育而成的1月龄泥鳅, 在三批实验所检测的共96尾幼鱼中, 有10尾携有外源基因, 阳性率约为10%。泥鳅二倍体基因组大约为 $3 \times 10^9$ 碱基对, 以斑点杂交强度估算, 这10尾鱼苗基因组中所携带的外源基因拷贝数在1—77拷贝之间。

转基因鱼模型理论认为, 外源基因是在受体胚胎发育的原肠后期发生整合的<sup>[2]</sup>, 在受体鱼苗和成鱼中检测的外源基因似已整合到受体染色体上。由此推论, 电脉冲基因转移实验中, 外源基因在1月龄的阳性受体内亦可能是以与受体基因组整合的形式存在。当然这一结论尚需进一步的实验证明。由于泥鳅性成熟需要一定的时间, 因此

- [4] Zhu, Z., Li, G., He, L. and Chen, S., 1985. Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish. *J. Applied Ichthyology*, 1: 31—34.
- [5] Maclean, N. and Talwar, S., 1984. Injection of cloned genes into rainbow trout eggs, *J. Emb. Exp. Morph.*, 82: 187.
- [6] Chourrout, D., Guyomard, R. and Houdebine, L., 1986. High efficiency gene transfer into rainbow trout by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture*, 51: 143—150.
- [7] Kenjiro Ozato, Hisato Kondoh, Hiroyuki Inohara, Takashi Iwamaatsu, Yuko Wakamatsu and Okaka, T. S., 1986. Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken  $\delta$ -crystalline gene in Medaka embryos. *Cell Differentiation*, 19: 237—244.
- [8] Maclean, N., Penman, D. and Zhu, Z., 1987. Introduction of novel genes into fish. *Bio/Technology*, 5: 257—261.
- [9] Potter, H., Weir, L. and Leder, P., 1984. Enhancer-dependent expression of human  $\kappa$  immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 7161—7165.
- [10] Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., 1982. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 387—389.

我们还未能了解电脉冲所导入的外源基因是否可以通过性腺细胞传递给子代。

我们虽然获得了电脉冲产生的转基因鱼, 但这一方法还有待完善, 如通过改变物理参数来提高整合率等, 使电脉冲基因转移成为一种新的实用技术。

### 参 考 文 献

- [1] 朱作言、许克圣、李国华、谢岳峰、何玲, 1986. 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, 31(5): 387—389。
- [2] 朱作言、许克圣、谢岳峰、李国华、何玲, 1989. 转基因鱼模型的建立, 中国科学, (2): 147—155。
- [3] 易泳兰, 刘需霖, 刘汉勤, 陈宏溪, 1988. 鱼类囊胚细胞和卵的电融合。水生生物学报, 31(2): 189—192。