

研究简报

鲤鱼和草鱼基因文库的构建及其生长激素基因和肌动蛋白基因的筛选*

朱作言 何玲 谢岳峰 李国华

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

CONSTRUCTION OF GENOMIC LIBRARY OF CARP (*CYPRINUS CARPIO*) AND GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*) AND ISOLATION OF THEIR GROWTH HORMONE GENE AND ACTIN GENE

Zhu Zuoyan He Ling Xie Yuefeng and Li Guohua

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

关键词 基因文库, 生长激素基因, 肌动蛋白基因

Key words Genomic library, Growth hormone gene, Actin gene

用显微注射方法, 把由小鼠重金属螯合蛋白(MT)基因启动子驱动的人生长激素(hGH)基因导入鲤鱼等的受精卵内, 由此发育而成的一部分鱼的基因组内携带有 MThGH 基因, 这些鱼称之为“转基因鱼”^[1]。这一模型研究结果进一步指出, MThGH 基因与受体鱼基因组整合之后, 可表达人生长激素, 促进鱼类的生长。另一方面, MThGH 基因可随转基因鱼的性腺传递给子代。所以, 转基因鱼模型研究为鱼类定向育种奠定了实验基础^[1]。但是, 从实际应用的角度出发, 用转移 MThGH 基因的办法进行经济鱼类育种是欠妥的。这是因为: ① MThGH 基因均为鱼类本身所不具有的遗传信息载体, 目前尚无法全面判断它被嵌入鱼类基因组后的遗传、生理效应, 更无法估计这种鱼放养到天然水体后对生态环境的影响。② MT 基因启动子的功能受重金属离子激活, 即 MThGH 基因在转基因鱼体内的高表达作用要求养殖水体有一定的重金属离子浓度, 这样的水体

显然是不符合商品鱼养殖质体要求的。③ 虽然证实了转移 MThGH 基因鱼的促生长效应, 但把含有人生长激素的鱼商品化, 势必会增加一般消费者的心理负担。鉴于上述原因, 有必要寻求所有“元件”都是来自鱼类自身的、可高效表达的生长激素基因重组顺序。为此, 我们构建了鲤和草鱼基因文库, 克隆了其生长激素基因和肌动蛋白基因。

基因文库构建 实验用鲤和草鱼分别取自湖北省嘉鱼县三湖连江水库和本所官桥实验基地。实验鱼急性处死后, 从肝脏制备基因组 DNA, 获得了大于 100 千碱基对 (kbp) 的 DNA 线性片段。基因组 DNA 经限制性核酸内切酶 MboI 部

* 国家七·五科技攻关和 863 高技术计划资助课题。基因文库过筛在美国明尼苏达大学 P. Hackett 教授实验室进行, 作者对他的真诚合作和提供实验方便表示衷心感谢。
1989年9月27日收到。

分酶解,用蔗糖密度梯度离心,富集和回收 12—20 kbp 部分,作为克隆的插入片段备用。基因克隆载体为 λ 噬菌体 EMBL3A DNA。 λ -EMBL3A 在宿主菌 *E. coli* NM538 侵染扩增,经氯化铯密度梯度离心后制备其 DNA。 λ -EMBL3A DNA 由限制性核酸内切酶 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切后,用蔗糖密度梯度离心去除其中部的可替代片段,制备带 *Bam*HI 粘性末端的左臂和右臂 DNA 克隆载体。将鱼的基因组插入片段 (12—20kbp, 具 *Mbo*I 粘性末端)与 λ -EMBL3A 左、右臂 DNA (具 *Bam*HI 粘性末端以 3:1 和 5:1 两种不同浓度混合、连接和体外包装。重组噬菌体体外包装蛋白按 Maniatis 等^[3]方法,从 *E. coli* 突变株 BHB₂₆₈₈ 和 BHB₂₆₉₀ 制备,此包装蛋白对 λ EMBL3A DNA 的包装效率为 8×10^7 pfu/ μ g。DNA 对

重组 λ DNA 的包装效率见表 1。

结果指出,较高的插入片段与克隆载体臂之比,有利于提高重组噬菌体 DNA 连接和体外包装的效率。最后,将两种鱼的重组 λ 噬菌体 EMBL3A 基因文库在宿主菌 NM539 中扩增备用。根据 Clarke 和 Carbon 的公式:

$$N = \ln(1-p)/\ln(1-f/G)$$

其中 N 为库中包含的重组体个数; P 为某基因在该库中的存在机率; f 为插入片段平均 bp 数; G 为该物种体细胞基因组 bp 数,鲤为 3×10^9 bp,草鱼为 1.5×10^9 bp。

$$P_{\text{鲤}} = 1 - e^{1.25 \times 10^6 \ln(1-1.5 \times 10^4/3.0 \times 10^9)} = 0.999;$$

$$P_{\text{草鱼}} = 1 - e^{1.95 \times 10^6 \ln(1-1.5 \times 10^4/1.5 \times 10^9)} \\ = 0.999999。$$

表 1 鲤和草鱼基因组 DNA 在 λ EMBL3A 的克隆及体外包装结果

Tab. 1 Package efficiencies of the recombinant with different ratio of EMBL3A arms/inserts of Carp or Grass Carp

材料鱼 Species of fish	克隆载体 DNA (λ -EMBL3A 左、右臂) Vector DNA (λ -EMBL3A arms)	基因组 DNA 插入片 段 (12—20kbp) Inserts (12—20kbp)	重组 DNA 体外 包装值 (pfu) Package effici- encies (pfu)	基因组文库中重组体总 数(几次包装总值) Total number of recombinants
鲤 Carp	3 μ g	1 μ g	3.3 $\times 10^7$	9.4 $\times 10^5$
	5 μ g	1 μ g	4.7 $\times 10^7$	
草 鱼 Grass Carp	3 μ g	1 μ g	2.5 $\times 10^7$	1.7 $\times 10^6$
	5 μ g	1 μ g	8.5 $\times 10^7$	

表 2 鲤和草鱼生长激素基因及肌动蛋白基因的筛选

Tab. 2 Screening of growth hormone gene and actin gene of Carp and Grass Carp

基因种类 Species of gene	过筛重组体总数 Number of recombi- nant screened	阳性克隆数 (3—4次核实) Number of positive clone	每个体细胞内拷贝数 Number of copies in 2n cell
鲤生长激素基因 Carp GH gene	3 $\times 10^5$	4	2
草鱼生长激素基因 Grass Carp GH gene	4 $\times 10^5$	3	1
鲤肌动蛋白基因 Carp Actin gene	3 $\times 10^5$	41	24
草鱼肌动蛋白基因 Grass Carp Actin gene	2.3 $\times 10^5$	29	11

也就是说,这两个基因文库覆盖了鲤基因组的 99.9% 和草鱼基因组的 99.9999%,属于非常完整的基因文库。

基因筛选 取经过扩增后的鲤和草鱼基因组重组噬菌体,分别侵染宿主菌 LE392,涂琼脂平

板,待形成噬菌斑之后,向硝酸纤维素滤膜转移和进行噬菌斑 DNA 原位分子杂交。用大西洋鲑生长激素基因(加拿大多伦多大学 C. L. Hew 博士赠送)和鸡肌动蛋白基因(美国明尼苏达大学 P. Hackett 博士提供)为探针,分别筛选鲤和草鱼的

两种基因克隆,阳性信号经 3—4 次反复核实和纯化,结果见表 2。

从结果可以看出: ① 鸡肌动蛋白基因探针可从鲤、草鱼基因组文库中钓出很强的阳性信号,即使非常严谨的洗涤条件 ($0.1 \times \text{SSC}$, $0.1\% \text{SDS}$, 65°C),也不能除去杂交信号。DNA 顺序测定结果 (GENE, 待发表)证明,鲤和草鱼肌动蛋白基因一级结构基本上一致,两者与鸡肌动蛋白基因也十分吻合,说明该基因在物种进化过程中十分保守。肌动蛋白是组成所有动物体的一种最普遍、最基本的蛋白质,在不同动物体和不同组织器官内行使相同功能,因而在物种进化过程中保持其基因结构的稳定性是必然的。② 大西洋鲑生长激素基因探针可从鲤、草鱼基因文库中钓出阳性信号,尽管大部分信号易被严谨的洗涤条件去除,但经 3—4 次洗涤后仍保留少数阳性信号;用人生长激素基因探针尚未钓出真正的阳性信号,说明生长激素基因在进化过程中有一定变化。两种鱼生长激素基因的碱基顺序正在测定之中。③ 在单个基因组内,肌动蛋白基因有许多个拷贝,而生长激素基因似仅为 1—2 个拷贝。更值得

指出的是,无论肌动蛋白基因还是生长激素基因,鲤的基因组内的拷贝数大约比草鱼多 1 倍。该结果进一步支持了这样一种观点,即鲤在长期演化过程中染色体组加倍,形成了天然四倍体。

一旦上述基因的碱基顺序分析完成,我们将进行基因拼接,即分别把鲤和草鱼肌动蛋白基因启动子顺序与生长激素基因编码顺序组装,构建完全由鱼自身“元件”组成的高效表达的生长激素基因重组 DNA 顺序,以用于鱼类基因转移育种的实用化研究。

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] Maniatis, T., Fritsch, E. and Sambrook, J., 1982. Molecular Cloning (a laboratory manual). Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 387—389。