

中华鳖转“全鱼”生长激素基因研究

李林春¹ 汪亚平²

(1. 厦门海洋职业技术学院, 厦门 361012 2. 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)

STUDIES OF TRANSGENIC CHINESE SOFT-SHELLED TURTLE CARRYING “ALL-FISH” GROWTH HORMONE GENE

LILin-Chun and WANG Ya-Ping

(1. Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361012 2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and
Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: “全鱼”生长激素基因; 中华鳖; 电脉冲 精子介导法; 生长

Key words: “All-fish” growth hormone gene; Chinese soft-shelled turtle; Electroporated sperm-mediated gene transfer; Growth

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)06-1207-03

自首例快速生长转基因鱼在我国诞生以来^[1], 世界上很多试验室相继开展了转基因鱼研究, 以期获得快速生长^[2-3]、抗逆^[4-5]的养殖新品系。与传统的杂交选育方法相比, 转基因育种方法摆脱了物种间遗传壁垒的桎梏, 基于对目的基因功能的认识和把握, 定向培育优良养殖品种, 大幅缩短育种周期。转基因育种方法的建立, 对养殖品种改良和动物反应器研制都具有重要意义。快速生长转基因中华鳖的育种研究是基于转基因鱼模型理论^[6], 利用用于培育快速生长转基因鱼的“全鱼”生长激素基因进行转基因中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 的育种研究, 以期获得快速生长的转基因中华鳖养殖新品系。本研究通过电脉冲处理携带有鱼类基因的中华鳖精液、人工授精和对阳性转基因鳖的生长优势的测定, 目的为研究龟鳖类动物转基因技术、探索龟鳖类育种新途径提供参考。目前该领域研究尚未见到相关报道。

1 材料与方法

1.1 试验亲鳖的准备 从市场收购体质强壮、无病无伤、平均体质量 50 g 的幼鳖, 将雌雄分开, 分别饲养于面积 2000 m² 的水泥池中, 按常规亲鳖培育方法养殖 3 年。试验时挑选体质健壮的雌雄亲鳖各 100 只, 雌性体质量 (1050 ± 26) g, 雄性体质量 (993 ± 12) g。

1.2 基因转移 采用电脉冲 精子介导法进行基因转移。

口腔注射氯仿麻醉雄鳖后解剖, 无菌操作取出精巢, 称重后将精巢切割成块, 吸取精液测量其体积, 置于 1.5 mL 无菌 eppendorf 管中 4℃ 放置, 2 h 内使用。

试验用“全鱼”生长激素基因载体 PCAGcGH⁶⁷ 由中国科学院水生生物研究所提供 (图 1)。将 PCAGcGH⁶⁷ 进行扩增、提取、纯化, 用 EcoRI 和 HindIII 酶切重组基因片段获得目的基因片段浓度为 2 μg/μL。

电脉冲仪为美国 BAEKON 公司 Beak α2000 型。首先在不加入外源 DNA 情况下, 观察电脉冲对中华鳖精子活力的影响。经显微镜目测活力对比, 随着电脉冲数值的增大, 精子泳动频率下降, 选取最佳电脉冲处理参数为: 每个循环的脉冲数 2¹⁰; 脉冲周期: 0.4 s; 脉冲循环数: 12; 电压: 10 kV。取保存精液 1000 μL 加入 20 μL 外源 DNA 加入外源基因达到终浓度为 40 ng/μL, 室温温育 20 min 按照上述电脉冲参数在室温下进行电脉冲处理。

获得携带转基因载体的精液后进行人工授精。用 70% 酒精消毒雌鳖泄殖孔, 用微量移液器将经过电脉冲处理的精液经泄殖孔分别注入雌鳖左右两侧输卵管中, 每侧注入精液量为 10 μL。同时采用同样的方法, 用未经电脉冲处理的精子进行人工授精作为对照。试验组和对照组各处理 50 只雌鳖。

人工授精 8 周后雌鳖开始产卵, 每天清晨采集鳖卵, 在室内控制孵化温度 35℃、相对湿度 80%—85%, 经过 40—

收稿日期: 2008-03-03 修订日期: 2009-01-09

基金项目: 河南省自然科学基金项目 (编号: 0124040022) 资助

作者简介: 李林春 (1964—), 男, 汉, 河南光山人; 硕士; 研究方向为水产技术研究。E-mail: lilinchun@sohu.com

通讯作者: 汪亚平, E-mail: wangyp@ihb.ac.cn

50 d出壳。统计孵化率, 同时在相同条件下与自然受精鳖卵进行孵化对照。观察胚胎是否发育以判断是否受精, 统计受精率; 通过孵出幼鳖量统计孵化率。

1.3 转植基因检测与幼鳖饲养 稚鳖孵出后即进行转植基因检测。剪取 F_0 代稚鳖裙边组织, 按常规方法制备样品 DNA。PCR 扩增检测转植基因。PCR 引物序列分别为 PII: 5'-TGGCGTGATGTAATGTCG-3' 和 Pc: 5'-AACACGTATGACTGC-3'; PCR 反应体系组成: 对 F_0 代进行 dNTP 各 0.2 mmol/L, 模板 DNA 100—500 ng, 引物各 1 μ mol/L, 10 倍缓冲液 2.5 μ L, Taq 酶 0.5 U, 反应总体积 25 μ L。反应程序: 94℃ 预变性 2 min, 扩增 20 个循环 (94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min), 最后 72℃ 延伸 5 min。反应产物置于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳缓冲系统 TAE。

检测的阳性鳖 (通过剪取脚爪作为标记) 与相同数量的对照鳖同池饲养于 200 m² 养殖鳖池中, 养殖池水温控制在约 30℃, 按常规管理措施饲养。鳖用粉状饲料, 粗蛋白 (CP) 42%、总能 (GE) 3.9 Mcal/kg, 粗纤维 (CF) 0.85%、粗脂肪

(EE) 5.2%、无氮浸出物 (NFE) 28.8%, 投喂率为鳖体质量的 5%, 投喂时加水调制成面团状, 置于饲料台上。每 15 天将转基因阳性鳖与对照鳖全部称重记录一次, 共进行了 60 d 的生长试验。试验期间阳性转基因鳖和对照鳖均无死亡。试验结束后, 将阳性中华鳖全部处死, 可用于外源基因整合和表达分析, 并防止对普通中华鳖构成基因污染。

2 结果

2.1 鳖卵的受精率与孵化率

精子经电脉冲处理的试验组共获得鳖卵 2682 枚, 对照组获得鳖卵 2577 枚。试验组的受精率比对照组的受精率低, 但试验组的孵化率与对照组的孵化率基本一致 (表 1)。这说明电脉冲处理对精子的活力有一定的影响, 降低了受精率, 但受精后对胚胎发育无不利影响。

2.2 阳性检测结果

PCR 检测转基因 F_0 代幼鳖共 2110 只, 其中阳性个体 56 只, 阳性率 2.65%。部分阳性检测电泳图 (图 2)。

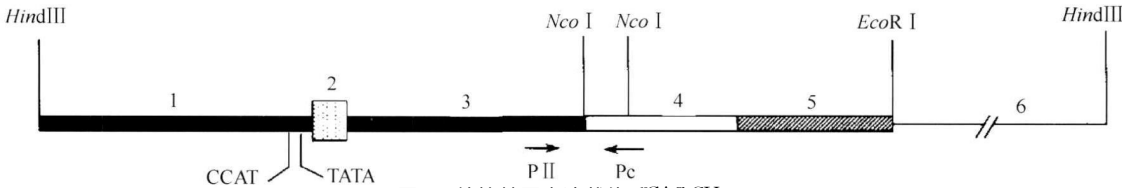


图 1 转植基因表达载体 pCAGGHc

Fig 1 Transgenic expression vector pCAGGHc

1 示鲤鱼 β -actin 基因 5' 侧翼顺序; 2 示鲤鱼 β -actin 基因第 1 外显子; 3 示鲤鱼 β -actin 基因第 1 内含子; 4 示草鱼 GH 基因 DNA 编码顺序; 5 示草鱼 GH 基因 3' 侧翼顺序; 6 示质粒 pUC118。PII, PC 示转植基因 PCR 检测引物

1 5' Flanking sequence of common carp β -actin gene; 2 The first exon of common carp β -actin gene; 3 The first intron of common carp β -actin gene; 4 The coding region of grass carp GH gene DNA; 5 3' flanking sequence of grass carp GH gene; 6. Plasmid pUC118. PII and Pc were detective PCR primers

表 1 精子经电脉冲处理后人工受精的受精率、孵化率

Tab 1 Fertilization rate and hatch rate in artificial insemination using sperm treated by electric pulse

	受精卵 (枚) Number of fertilized egg	未受精卵 (枚) Number of unfertilized egg	受精率 Fertilization rate (%)	孵化数量 (只) Number of hatched larva	受精卵孵化率 Hatch rate (%)
实验组 Experimental group	2142	540	79.8	2110	98.5
对照组 control	2253	324	85.6	2221	98.6

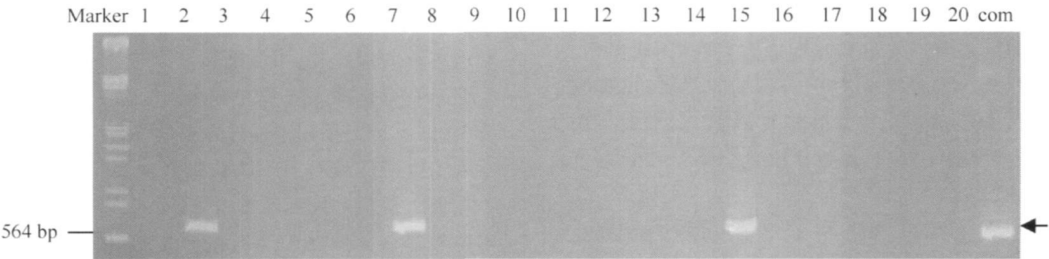


图 2 PCR 检测转基因后代的部分电泳结果

Fig 2 Result of PCR detection for transgenic individuals

图中的 Marker 为 λ /HindIII + EcoRI 分子量条带如图所示, 1—20 为 PCR 检测结果, 阳性扩增条带约 700 bp 如箭头所示, 与质粒扩增对照 (con) 一致

The marker was λ /HindIII + EcoRI, 1—20 were PCR detection results and the positive fragment was about 700 bp

2.3 阳性 F₀代转基因鳖生长情况

开始饲养时阳性转基因鳖和对照鳖的平均体质量分别为 3.5 g 和 3.6 g 饲养 15 d 后阳性转基因鳖的平均体质量开始高于对照鳖, 分别为 10.6 g 和 8.5 g 饲养 60 d 后试验结束时, 阳性转基因鳖和对照鳖的平均体质量分别为 65.2 g 和 54.8 g 阳性转基因鳖的体质量高于对照鳖 18.97% (图 3)。由此可知, 阳性转基因鳖的生长速度快于对照鳖, 具有一定的生长优势。

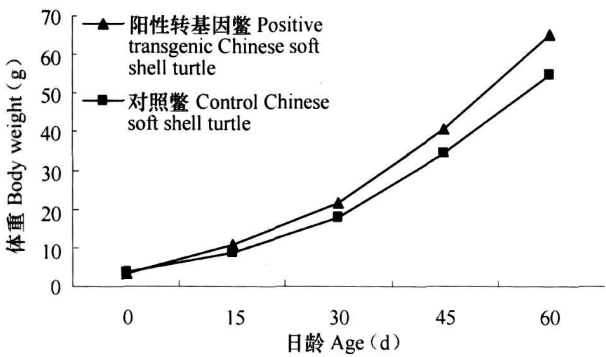


图 3 阳性转基因鳖生长情况

Fig 3 Growth performance of positive transgenic Chinese soft shell turtle

3 讨论

3.1 电脉冲-精子介导法是一种有效的转基因方法

本研究共获得受精卵 2142 枚, 共检测到 56 个阳性后代, 阳性率达到 2.65%, 尽管阳性率较低, 但电脉冲介导外源基因掺入精子, 无需昂贵的显微注射仪器。同时, 经电脉冲处理精子后的受精率 (79.8%) 与非电脉冲处理精子的受精率 (85.6%) 仅存在少许差异, 说明本试验中电脉冲对鳖精子处理的损伤较小 (这也可能是导致阳性率偏低的一个重要原因), 而二者的孵化率不存在差异, 因此大批量处理应具有较高的效率。同时电脉冲介导转基因法的机制研究已表明, 电脉冲处理会使外源基因穿过精子细胞膜进入精子细胞内部而不是仅仅附着在精子的表面^[8-11], 这样, 基因首先是整合到生殖细胞中, 基因整合后发生嵌合体的可能性低, 一旦整合以后其性状一般可以遗传到后代, 容易建成具有一定优异特性的品系。这对于选育高产的转基因品种具有重要的意义。

3.2 鱼生长激素基因对中华鳖的促生长作用

草鱼属于鲤科鱼类, 而中华鳖属于爬行类, 它们的进化关系是相当远的。但我们的试验表明其生长激素的结构很可能非常相似, 具有类似的促进生长作用, 生长激素基因可能具有广泛增产效应。该试验的结果使我们有信心将生长激素基因以提高产量的努力由鱼类推广到爬行类动物, 这对于龟、鳖、蛇等动物的人工饲养和相关产业的发展具有重要的意义, 也为理论上进一步探索生长激素促进生长的生理机制提供了有益的启示^[12]。由该研究的结果可以推想, 将已经构建好的鱼类生长激素转基因载体直接整合到多种其他高等脊椎动物基因组中, 也应该能够发挥其应有的促进生

长的作用, 这样可以节省大量的研究经费并在最短时间内产生经济效益, 具有一定的应用价值。

本研究结果初步表明转“全鱼”生长激素基因的 F₀代幼鳖具有一定的生长优势, 但在生产上是否具有增产潜力, 还有待深入研究。

参考文献:

[1] Zhu Z, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into the fertilized eggs for goldfish (*Carassius auratus* L.) [J]. *Zhongguo Shuixu* 1985, 1: 31—34

[2] Dunham R A, Eash J, Askins J, et al. Transfer of the mouse thymic lymphoma growth hormone gene into channel catfish [J]. *Trans Amer Fish Soc*, 1987, 116: 87—91

[3] Perman D J, Beeching A J, Penn S, et al. Factors affecting survival and integration following microinjection of novel DNA into rainbow trout eggs [J]. *Aquaculture* 1990, 85: 35—50

[4] Fletcher G L, Sheas M A, King M J, et al. Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Can J Fish Aquat Sci* 1988, 45: 352—357

[5] Sheas M A, Fletcher G L, Hew C L, et al. Transfer, expression and stable inheritance of antifreeze protein genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1991, 1(1): 58—63

[6] Zhu Z Y, Xu K S, Xie Y F, et al. A model of transgenic fish [J]. *Scientia Sinica (B)*, 1989, 2: 147—155 [朱作言, 许克圣, 谢岳峰, 等. 转基因鱼模型的建立. *中国科学 (B 辑)*, 1989, 2: 147—155]

[7] Zhu Z. Growth hormone gene and the transgenic fish [G]. *You C B, Chert Z L (Eds), Agricultural Biotechnology Beijing: China Science and Technology Press* 1992, 106—116

[8] Zhong J Y, Mao W F, Zhu Z Y. Introduction of foreign DNA into the genome of rainbow trout by sperm electroporation [J]. *Acta Genetica Sinica* 2002, 29(2): 128—132 [钟家玉, 茅卫锋, 朱作言. 电脉冲作用将外源基因导入稀有鱼句鲫精子的研究. *遗传学报*, 2002, 29(2): 128—132]

[9] Knight D E, Scrutton M C. Effects of guanine nucleotides on the properties of 5-hydroxytryptamine secretion from electroporated human platelets [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1986, 160: 183—190

[10] Sowers A E, Lieber M R. Electropore diameters, lifetimes, numbers and locations in individual erythrocyte ghosts [J]. *FEBS Letters* 1986, 205: 179—184

[11] Tsong T Y. Voltage modulation of membrane permeability and energy utilization in cells [J]. *BioScience Rep* 1983, 3: 487—505

[12] Han J S, Long Y, Meng X L, et al. Fusion, expression and bioactivity analysis of carp growth hormone gene and envelope protein VP28 of Penaeus monodon wssv [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica* 2008, 32(3): 308—313 [韩建山, 龙燕, 孟小林, 等. 鲤鱼生长激素和对虾白斑病毒囊膜蛋白 VP28 的融合表达及功能研究. *水生生物学报*, 2008, 32(3): 308—313]