

# 大菱鲆两种转基因方法的比较研究

刘婷<sup>1, 2</sup>, 刘庆华<sup>1, 2</sup>, 谭训刚<sup>1</sup>, 张培军<sup>1</sup>, 徐永立<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:** 对外源基因导入大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 的两种方法进行了研究, 采用经过改进的电脉冲方法以及哺乳动物细胞中常用的转染法导入外源基因, 并对两种方法进行比较。电脉冲最佳导入条件为: 脉冲电压为 300 V/cm, 脉冲次数为 5, 外源 DNA 质量浓度为 20 mg/L; 转染法的最佳操作时间为受精后 50 min。应用上述两种方法进行批量转基因鱼实验, 得到外源基因的导入率分别为 20%~28% 和 60%~70%。实验表明利用转染试剂 jetPEI 处理单细胞期的大菱鲆受精卵能得到较高的孵化率及较高的转基因效率。

**关键词:** 转基因效率; 电脉冲精子介导法; 转染; 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)

**中图分类号:** Q78      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3096 (2007) 11-0009-05

自 20 世纪 80 年代首批经显微注射的转基因鱼问世以来<sup>[1]</sup>, 世界范围内很多实验室都进行了一系列的转基因鱼的研究<sup>[2-6]</sup>。目前, 各国不同实验室尝试过的转基因方法有显微注射法、电脉冲基因转移法、精子介导法、磷酸钙共沉淀法、反转录病毒介导法、脂质体介导法、激光穿孔法等<sup>[7-10]</sup>。上述方法各有优点, 但普遍存在着操作不方便、受精卵损伤较大等问题。因此需要探索新的、操作简单、对受精卵破坏性较小的转基因方法以提高转基因效率。在本实验中, 作者首次使用了转染试剂 jetPEI (Qbiogene) 转染外源基因到大菱鲆的受精卵中。以往转染法主要应用在哺乳动物组织细胞的转基因实验中<sup>[11]</sup>, 而动物受精卵中的应用尚处于探索阶段<sup>[12]</sup>。将转染法应用到海水鱼卵的转基因实验, 尚属首次。

作者应用经过改进的电脉冲精子介导法和转染法进行转基因实验, 并对二者进行了比较。结果表明, 利用转染试剂 jetPEI 转染鱼受精卵的方法条件温和, 物理损伤小, 具有较高的孵化率和外源基因表达率, 是一种有效的转基因方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 由莱州市大

水产有限公司提供。质粒载体 *mylc-MSTN<sup>pro</sup>* 由美国马里兰大学海洋生物技术中心杜少军教授馈赠; dNTP, Taq 酶购自 Promega 公司; 转染试剂 jetPEI 购自 Qbiogene 公司。电脉冲仪由本实验室自主研发, 总电压 100~400 V, 脉冲次数为 1~7, 脉冲宽度为 25 ms。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 精子和卵子的获得

采用人工挤压方法将精子挤出并收集到干净烧杯中, 加入 25 倍体积的精子稀释液 (NaCl 0.65 g, KCl 0.041 g, 无水 CaCl<sub>2</sub> 0.012 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.002 g, 葡萄糖 0.2 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.02 g, 溶于 100 mL 蒸馏水中, 用一次性细胞滤器过滤), 置于冰上。卵子也采用人工挤压的方法, 用 100 mL 的无菌烧杯收集。

#### 1.2.2 电脉冲转基因实验

收稿日期: 2006-02-26; 修回日期: 2007-04-18

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2004AA628110); 国家 973 计划 (2004CB117402); 青岛市科技局资助项目

作者简介: 刘婷 (1981-), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事动物发育生物学及分子生物学研究, 电话: 0532-82898559, E-mail: nancyflower81@hotmail.com; 张培军, 通讯作者, E-mail: pjzhang@ms.qdio.ac.cn

将外源 DNA 和精子混合,按照下述实验设计实施电脉冲处理,在脉冲间隔时间为 1 s 的情况下,分别对脉冲电压,脉冲次数和外源 DNA 的浓度进行单因子实验,每个实验重复 3 次,每次实验所用的精子或卵子均取自同一条雄鱼或雌鱼,且都设 1 个对照组。

脉冲电压单因子实验:在脉冲次数为 5,外源 DNA 质量浓度为 50 mg/L 的条件下,脉冲电压分别为 100, 200, 300, 400 V/cm 时对电脉冲导入率和孵化率的影响。

脉冲次数单因子实验:在外源 DNA 质量浓度为 50 mg/L,脉冲电压为 300 V/cm 的条件下,脉冲次数为 3, 5, 7 时对电脉冲导入率和孵化率的影响。

外源 DNA 质量浓度单因子实验:在脉冲次数为 5,脉冲电压为 300V/cm 的条件下,外源 DNA 质量浓度为 10, 20, 30 mg/L 时对电脉冲导入率和孵化率的影响。

导入率与孵化率的计算公式如下:导入率=PCR 阳性样品数目/总样品数量;孵化率=孵化出的仔鱼数量/受精卵数量。

处理后的精子与卵子混合温浴 50 min 后,将受精卵转移到含有 1 L 无菌海水的大烧杯中进行孵育。24~36 h 后转移到含有 40 L 海水的玻璃缸中继续培养。对照组的实验鱼给予相同的处理方法,但是在混合共温浴时并不加入质粒表达载体。

### 1.2.3 利用转染试剂 jetPEI 进行转染

转染试剂使用参数的确定根据 Qbiogene 公司用户手册上的使用说明进行。具体步骤如下:取 2 mL 大菱鲆卵子转移到一个大的培养皿中,加入精液进行人工授精,随即加入 1 μg 质粒表达载体和 1.2 μL 转染试剂 (7.8 mmol/L),最终反应体积达到 2.5 mL;混合温浴 50 min 后,将受精卵转移到含有 1 L 无菌海水的大烧杯中进行孵育。24~36 h 后转移到含有 40 L 海水的玻璃缸中继续培养。对照组的实验鱼给予相同的处理方法,但是在混合共温浴时并不加入质粒表达载体。

### 1.2.4 转基因实验操作

按照上述实验结果确定电脉冲最适导入条件和上述转染的方法,实行大批量电脉冲基因转移。

### 1.2.5 外源基因整合和表达分析

随机选取 1 月龄的转基因实验鱼 100 尾,每尾剪取少量尾鳍,按照常规方法提取基因组 DNA,PCR 反应扩增目的片断。引物序列 1 为:5' -CTGCAGCCC-

GGATCCAACATGCAT-3' ;引物序列 2 为:5' -CTGCC-AAGACGTGACTCCTGCGTTCA-3'。两引物间的 DNA 长度为 580 bp 左右。PCR 反应参数为 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s; 循环 35 次, 72 °C 延伸 10 min。反应结束后,取 8 uL 扩增产物,进行琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果

### 2.1 电脉冲最佳导入条件的确立

#### 2.1.1 脉冲电压单因子实验结果

如表 1 所示,随着脉冲电压的升高,导入率逐渐升高,但是受精卵孵化率降低。兼顾导入率与孵化率,其最适脉冲电压为 300 V/cm。

表 1 脉冲电压对导入率和孵化率的影响

Tab. 1 The effect of field strength on the hatch level and efficiency of gene transfer

| 脉冲电压<br>(V/cm) | 导入率<br>(%) | 孵化率<br>(%) |
|----------------|------------|------------|
| 100            | 7          | 61         |
| 200            | 17         | 60         |
| 300            | 27         | 58         |
| 400            | 28         | 40         |
| 对照             | 0          | 75         |

#### 2.1.2 脉冲次数单因子实验结果

如表 2 所示,随着脉冲次数的增大,受精卵孵化率逐渐降低,当脉冲次数由 5 上升到 7 时受精卵孵化率下降幅度明显,对受精卵物理损伤加大。外源基因导入率随脉冲次数的增多逐渐升高,当脉冲次数由 3 上升到 5 时导入率有较大的提高,当脉冲次数由 5 上升到 7 时导入率则变化不大。综合考虑导入率与受精卵孵化率,脉冲次数单因子实验在脉冲次数为 5 时为最适条件(表 2)。

#### 2.1.3 外源 DNA 浓度单因子实验结果

外源 DNA 浓度对电脉冲导入率和孵化率的影响结果见表 3。当 DNA 质量浓度由 10 mg/L 升到 20 mg/L 时,外源基因导入率有明显的升高,当由 20 mg/L 升到 30 mg/L 时,外源基因导入率变化不大。

根据以上实验,选取脉冲电压为 300 V/cm,脉冲次数为 5,外源 DNA 质量浓度为 20 mg/L 为电脉冲最优导入条件。

表 2 脉冲次数对受精卵孵化率及外源基因导入率的影响

Tab. 2 The effect of the number of pulse on the hatch level and efficiency of gene transfer

| 脉冲电压<br>(V/cm) | 脉冲<br>次数 | 外源 DNA<br>质量浓度<br>(mg/L) | 孵化率<br>(%) | 导入率<br>(%) |
|----------------|----------|--------------------------|------------|------------|
| 300            | 3        | 50                       | 55         | 20         |
| 300            | 5        | 50                       | 60         | 26         |
| 300            | 7        | 50                       | 40         | 27         |

表 3 外源 DNA 质量浓度对电脉冲导入率和孵化率的影响结果

Tab. 3 The effect of the concentration of foreign DNA on the hatch level and efficiency of gene transfer

| DNA 质量浓度<br>(mg/L) | 孵化率<br>(%) | 导入率<br>(%) |
|--------------------|------------|------------|
| 10                 | 60         | 17         |
| 20                 | 60         | 30         |
| 30                 | 59         | 30         |
| 对照                 | 75         | 0          |

### 2.2 外源基因整合率的分析

采用上述两种方法实现较大批量的基因转移,各获得了 500 尾 1 月龄的大菱鲆。按照常规方法各提取 100 尾仔鱼少许尾鳍的基因组 DNA,PCR 反应并进行凝胶电泳检测(图 1)。采用最优条件下的电脉冲方法,有 28 个样品扩增出特异性电泳带,表明有 28 尾鱼的染色体中已经整合了外源基因,外源基因的整合

表 4 电脉冲精子介导法与转染法比较

Tab. 4 Comparison between electroporation and transfection reagent delivering DNA into fish zygotes

| 方法       | 孵化率<br>(%) | 存活率<br>(%) | PCR 阳性率<br>(%) | 一次处理的受精卵数量<br>(个) | 复杂程度    |
|----------|------------|------------|----------------|-------------------|---------|
| 电脉冲精子介导法 | 50~60      | 15~20      | 28             | 5 000~10 000      | 需要最优化参数 |
| 转染法      | 60~70      | 35~50      | 70             | 30 000~50 000     | 简单      |
| 对照       | 60~70      | 40~50      | 0              | 空白                | 空白      |

### 3 讨论

鱼类是研究转基因动物的良好材料。与哺乳动物相比,1 尾雌鱼能提供成千上万个卵,取材相对容易,实验周期较短;而且,鱼类在体外受精和体外发育,卵的体积也大小适中,因此胚胎操作较哺乳动物简单

率为 28%。采用转染法,有 70 个样品扩增出特异性的电泳带,表明外源基因的整合率为 70%。

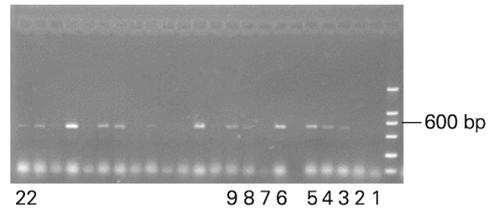


图 1 转基因鱼 PCR 检测结果

Fig.1 The analysis result of transgenic turbot larvae by PCR

1,2. 示阴性对照,3,4. 示阳性对照,模板为质粒 *mylc-MSTN<sup>pp</sup>*; 5~22. 实验组

Lane 1,2 is negative control groups; Lane 3,4 is positive control groups of plasmid DNA *mylc-MSTN<sup>pp</sup>*; Lane 5~22 is treatment groups

### 2.3 转染法与电脉冲精子介导法的比较

虽然电脉冲精子介导法是一种普遍采用的转基因方法,但是转染法可以较高效地导入外源基因,且具有同时处理大批量受精卵、操作简单等优势(表 4)。转染试剂 jetPEI 介导的转染法提供了一个条件温和,物理损伤较小的方法将外源基因转移到大菱鲆受精卵中。实验结果表明此种方法处理的鱼受精卵有着较高的孵化率及外源基因的表达率(表 5)。

易行。转基因鱼是目前国内外获得的最成功的转基因动物之一。

常用的基因转染技术是将纯化的含有靶基因的质粒 DNA 送入细胞内,并在细胞内表达。转染方法有多种,根据不同的细胞,贴壁或悬浮细胞可选用不同的方法,其目的是要达到设置转染效率。影响转染

表 5 PCR 方法检测目的基因在大菱鲆体内的表达  
Tab. 5 Detection of target gene in experimental fish Turbot (*Scophthalmus maximus*) by PCR

| 方法       | 实验鱼数量<br>(尾) | 阳性数量<br>(尾) | 效率<br>(%) |
|----------|--------------|-------------|-----------|
| 电脉冲精子介导法 | 100          | 28          | 28        |
| 转染法      | 100          | 70          | 70        |

产率的因素有多种,包括转染方法、操作技术、质粒 DNA 的纯度、靶细胞的生长状态等。通过转染的方法将外源质粒 DNA 导入鱼类受精卵中是一种相对较新的、物理损伤较小的转基因方法。本实验表明与裸露 DNA 经过一段时间的孵育,大菱鲆受精卵可以成功地被转染。这与在其他物种中的实验结果相吻合。Spadafora<sup>[11]</sup>1998 年发现动物精子在体外可以很容易被转染。Huguet 和 Esponda<sup>[13]</sup>也在 1998 年发现老鼠的精子无论是在体外还是在输精管中都被很容易被转染。

Calderon 和 Sun<sup>[14]</sup>近期通过将表达载体转染到虾的受精卵中,测试了 4 种转染试剂,包括 Effectene (Qiagen), SuperFect (Qiagen), Lipofectamine 2000 (GibcoBRL), 和 jetPEI (Qbiogene)。在该实验中,Effectene 和 jetPEI 显示了阳性结果。但使用 Effectene 的步骤较繁琐,因此作者在本实验中选择了 jetPEI。

Horbinski<sup>[15]</sup>在 2001 年研究发现,转染试剂 jetPEI 具有很低的细胞毒性。Ahn<sup>[16]</sup>在 2002 年研究发现 jetPEI 是可以被生物自身所分解的。

本实验所采用的电脉冲及转染法所获得的两组转基因实验鱼,放置在 10 L 的水箱中继续饲养,监控其生长情况,并定期进行比较观察,包括体长、体质量、畸形率、死亡率等。比较结果可以看出,转染法对鱼受精卵的损伤较小,并且可以获得较高的外源基因表达率。此外,转染法操作步骤较简单,所需的实验设备较少,适合大批量的转基因鱼实验及生产,是一种值得推广应用的有效的转基因方法。

参考文献:

[1] Zhu Z, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Z Angew Ichthyol*,1985,1:31-34.  
[2] Chourrout D G, Houdebine L, 1987. High efficiency gene

transfer in rainbow trout(*Salmo gairdneri*) by microinject into egg cytoplasm[J].*Aquaculture*, 51:143-150.  
[3] Fletcher G L, Shears M A, King M J. Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Can J Fish Aquat Sci*,1988,45:352-357.  
[4] Du S J, Gong Z, Tan C H, et al. Development of an "all fish" Gene cassette for gene transfer in aquaculture[J]. *Mol Marine Biol Biotech*,1992,1:290-300.  
[5] Devlin R H, Yesaki T Y, Donaldson E M, et al. Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1995,23:123-129.  
[6] 孙孝文, 沈俊宝, 阎学春, 等. 转牛(羊)生长激素基因工程鱼的研究[J]. *中国水产科学*, 1995,2(2):23-33.  
[7] Arenal A, Pimentel R, Guimaraes M. Gene transfer in shrimp (*Litopenaeus schimitti*) by electroporation of single-cell embryos and injection of naked DNA into adult muscle[J]. *Biotechnol*,2000,17:247-250.  
[8] Preston N P, Baule V J, Leopold R, et al. Delivery of DNA to early embryos of the Kurama prawn *Penaeus japonicus*[J]. *Aquaculture*,2000,181:225-234.  
[9] Tseng F S, Tsai H J, Liao I C, et al. Introducing foreign DNA into tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by electroporation[J]. *Theriogenology*,2000,54:1 421-1 432.  
[10] Gendreau S, Lardans V, Cadoret J P and Miahle E. Transient expression of a luciferase reporter gene after biolistic introduction into *Artemia franciscana* (Crustacea) embryos [J]. *Aquaculture*,1995,133:199-205.  
[11] Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation[J]. *BioEssays*, 1998,20:955-964.  
[12] Atkinson P W, Hines E R, Beaton S, et al. Association of exogenous DNA with cattle and insect spermatozoa[J]. *Mole Reprod*,1991,29:1-5.  
[13] Huguet E, Esponda P. Foreign DNA introduced into the vas deferens is gained by mammalian spermatozoa[J]. *Mol Reprod*,1998,51:42-52.  
[14] Calderon R F, Sun P S. Selection of transfection reagents for foreign DNA delivery into Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* embryos[A]. World Aquaculture Society. World Aquaculture Conference[C]. Salvador, Brazil: World quaculture Society,2003.46.  
[15] Horbinski C, Stachowiak M K, Higgins D, et al. Polyethy-

lenimine-mediated transfection of cultured postmitotic neurons from rat sympathetic ganglia and adult human retina[J].*BMC Neurosci*,2001,2:1 471-2 202.

[16] Ahn H, Chae S Y, Bae Y H, *et al.* Biodegradable poly(ethyleneimine) for plasmid DNA delivery[J].*J Control Release*, 2002,80:273-282.

## Using electroporation and transfection methods to transfer foreign gene into Turbot (*Scophthatmus maximus*)

LIU Ting<sup>1,2</sup>, LIU Qing-hua<sup>1,2</sup>, TAN Xun-gang<sup>1</sup>, ZHANG Pei-jun<sup>1</sup>, XU Yong-li<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Received:** Feb., 26, 2006

**Key words:** transgenic efficiency, electroporation, transfection, *Scophthatmus maximus*

**Abstract:** This paper explores the relative efficiency of gene transfer into Turbot (*Scophthatmus maximus*) zygotes by electroporation and transfection reagent. The electroporation conditions (field strength of 300 V/cm, 5 pulse and foreign DNA concentration of 20 mg/L) were applied for mass gene transfer. Transfection experiments were performed at the one-cell stage (within 50 min postspawning) of fertilized fish eggs. Efficiency rates of foreign gene in the mass gene transfer were about 20%~28% and 60%~70% for electroporation and transfection methods, respectively. This study demonstrates that treating the fish zygotes with the DNA/jetPEI complex at the one-cell stage exhibits a higher gene transfer efficiency in fish.

( 本文编辑: 刘珊珊 )