

# 真鲷精子在外源 DNA 下的生理特性和转染效果

郑君飘<sup>1,2</sup>, 刘清华<sup>1</sup>, 徐世宏<sup>1</sup>, 马道远<sup>1</sup>, 肖志忠<sup>1</sup>, 林帆<sup>1</sup>, 肖永双<sup>1</sup>, 李军<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 100049)

**摘要:** 为研究真鲷(*Pagrus major*)精子在外源 DNA 下的生理特性和转染效果, 探索真鲷精子介导转基因技术, 作者通过计算机辅助分析外源 DNA 环境下(不同孵育时间、DNA 长度、DNA 浓度)真鲷精子活率和运动速度的变化, 进一步采用 PCR 和荧光探针的方法检测外源 DNA 与真鲷精子的结合情况, 并通过人工授精来评价外源 DNA 能否转染精子并传递至 F0 代。结果表明: 外源 DNA 浓度、孵育时间及 DNA 长度对精子活率无显著影响。在 5 μg/10<sup>6</sup> 个精子的高浓度 10 kb DNA 下孵育 12 h, 真鲷精子仍具有(75.89 ± 5.55)%的精子活率, 平均直线速度(70.97 ± 6.37)μm/s, 与对照组无显著差异, 但精子平均曲线速度显著下降, 比对照组低 21.85μm/s。真鲷精子与带 Fluorescein 荧光素的 DNA 片段共孵育后, 部分精子在荧光显微镜下观察到绿光。将 DNA 孵育后精子进行人工授精表明经过 1 μg DNA/10<sup>6</sup> 个精子孵育后的受精率和孵化率无显著下降, 通过 PCR 法并没有在外源 DNA 处理的精子和 F0 代中检测到目的基因, 表明外源 DNA 虽然能够吸附在真鲷精子表面, 但并不足以携带进入卵子产生转基因后代。

**关键词:** 外源 DNA; 真鲷(*Pagrus major*); 精子; 精子介导转基因

中图分类号: Q953.3 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2014)07-0001-06

doi: 10.11759/hyqx20131223002

鱼类转基因方法中使用广泛、技术较为成熟的是显微注射。然而, 除了操作繁琐、成活率低等缺点, 显微注射在许多鱼类的应用中存在受精卵不透明、卵膜较硬不易去除和原核较小等问题<sup>[1]</sup>, 加大了注射的难度。精子介导转基因技术以精子作为外源基因的载体, 使精子携带上外源基因, 通过人工授精将外源基因带入子代的基因组中, 从而实现基因转移。该技术操作简便、成本低、便于大量筛选, 同时避开了鱼类受精卵各种特性的限制, 在转基因鱼的制备中具有优势<sup>[2]</sup>, 目前已在斑马鱼(*Brachydanio rerio*)<sup>[3]</sup>、大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)<sup>[4]</sup>、平鲷(*Sparus sarba*)<sup>[5]</sup>等多种鱼类中获得成功。精子介导转基因技术的关键在于将带有目的基因的外源 DNA 转入精子内, 转入的难易程度在不同物种上差别很大。生物中普遍存在精子能够吸纳外源 DNA 的现象, 这一现象在 1989 年 Lavitrano 等<sup>[6]</sup>利用 DNA 转染的精子人工授精获得转基因小鼠株系后受到广泛关注。Sciamanna 等<sup>[7]</sup>认为几乎所有物种的精子都可以吸收 DNA 或 RNA 分子, 并将其内化入细胞核。然而, 精子介导法转基因技术现仍存在转染不稳定、重复性差等缺点。由于精子的结构和生理特性存在明显的物种差异, 物种间精子吸纳外源 DNA 的能力也有较

大差别, 加上外源 DNA 转染精子的机制至今尚不清晰, 不同物种采用精子介导法产生转基因动物的成功率差异很大。在鱼类中, 通过外源 DNA 与精子直接混合处理, 获得较好转染效果的仅对斑马鱼<sup>[3]</sup>、巴南牙鲆(*Paralichthys orbignyanus*)<sup>[8]</sup>、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)<sup>[9]</sup>等有报道, 当精子自身吸纳 DNA 的能力较弱时, 则需要利用精子冻融、脂质体、电穿孔等人为手段来提高外源 DNA 转入精子的效率。

精子质量也是决定精子介导法转基因效果的重要因素, 经外源 DNA 转染的精子必须具有较好的活率和受精能力, 才能保证获得足够数量的后代进行筛选。在一些鱼类中, 外源 DNA 的存在会明显降低精子的活力<sup>[10-11]</sup>, 此外, 人为处理精子的过程也会对精子造成损伤, 因此, 检测精子生

收稿日期: 2013-12-23; 修回日期: 2014-02-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31072212, 41076100); 海洋经济创新发展区域示范项目(12PY001SF08); 国家科技基础条件平台建设运行项目-水产资源平台运行服务

作者简介: 郑君飘(1988-7), 男, 福建诏安人, 硕士研究生, 主要从事海水鱼类遗传育种研究, 电话: 15963011682, E-mail: zjp2408@163.com; 李军, 通信作者, E-mail: junli@qdio.ac.cn; 刘清华, 通信作者, E-mail: qinghualiu@qdio.ac.cn

理特性和筛选处理条件是鱼类精子介导转基因的一个重要环节。

真鲷作为一种海水经济鱼类,已发展成为海水养殖的重点品种。转基因是改良鱼种性状、培育高产、优质和抗逆鱼类品系的有效手段。本研究运用计算机辅助分析系统检测外源 DNA 对真鲷精子活力的影响,通过人工授精来评价转染精子的授精能力变化,并用荧光探针和 PCR 的方法检测外源基因在精子和 F0 代中的整合情况,为真鲷精子介导转基因技术的探索提供一些理论依据和技术资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

真鲷精子由青岛通用水产养殖有限公司提供,取样时间为 2011 年 5 月,经程序降温仪冷冻保存于液氮。质粒 pPmvasGFP(10 kb)为本实验室林帆博士构建,其结构由真鲷 *vasa* 基因的启动子调控序列与 pGFP-N1 载体重组构成,功能在于用绿色荧光蛋白(GFP)标记生殖细胞<sup>[12]</sup>。人工授精实验于烟台芳华海珍品苗种场进行。海洋动物组织提取试剂盒、无内毒素质粒大提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自天根升华科技有限公司;HiFi Taq(含 dNTPs 和 10× buffer)、PCR SuperMix, DNA marker、感受态细胞 DH5 $\alpha$  购自北京全式金生物技术有限公司;Fluorescein-12-dUTP 购自 Life technologies 公司;引物由上海生物工程公司合成。计算机辅助精子分析采用清华同方精子分析 MX7 系统。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 精子解冻与精浆去除

真鲷冻精在 35℃ 下水浴解冻 2 min,检测精子活力,选取精子活率大于 80% 的样品用于实验。精液与 Hanks 液<sup>[13]</sup>按 1 : 6 混合于 1.5 mL 离心管,充分振荡,1000 g 下离心 10 min,重复洗涤 3 次去除精浆和抗冻剂。Hanks 液重悬的精子通过血球计数板法在普通光学显微镜下测量密度,调整精子密度至 10<sup>9</sup> 个/mL。

#### 1.2.2 外源 DNA 制备

pPmvasGFP 质粒转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 卡那(50 $\mu$ g/ $\mu$ L)筛选阳性菌落, LB 培养基扩大培养,按照试剂说明书抽提质粒。以 pPmvasGFP 为模板,设计引物分别扩增得到长度为 0.5 和 3 的 DNA 片段。通

过酚抽提和乙醇沉淀法对质粒和 DNA 片段进行纯化富集,沉淀干燥后用 Hanks 液溶解,测定 DNA 浓度,调整质量浓度为 1  $\mu$ g/ $\mu$ L。

用 Fluorescein-12-dUTP 代替 dTTP,以 pPmvas-GFP 为模板,通过 PCR 的方法扩增得到带 Fluorescein 荧光素标记的 6 kb Fluorescein-DNA 探针,聚合酶采用 HiFi Taq。避光环境下经试剂盒纯化除去残余的 Fluorescein-12-dUTP。测得 Fluorescein-DNA 浓度为 300 ng/ $\mu$ L,荧光显微镜下发绿光。

### 1.2.3 外源 DNA 孵育精子与检测观察

#### 1.2.3.1 精子活力检测

将真鲷精子与质粒、DNA 片段在 4℃ 下共孵育,检测在不同条件下(孵育时间、DNA 浓度、DNA 长度)精子活力的变化。孵育时间单因子影响实验:取 10  $\mu$ L 精子与 1.5 mL 离心管中,加入 5  $\mu$ g pPmvas GFP 质粒(终浓度为 0.5  $\mu$ g/10<sup>6</sup> 个精子),对照组加等体积的 Hanks 液,孵育终体积补至 50  $\mu$ L 后用轻弹混匀。24 h 内每隔 2 h 取 1  $\mu$ L 检测精子活力,实验组和对照组各设 3 个平行。DNA 长度和浓度单因子影响实验:取 5  $\mu$ L 精子于 1.5 mL 离心管中,分别加入 0、2.5、10、25  $\mu$ g 的 0.5 kb DNA 片段,3 kb DNA 片段和 pPmvasGFP 质粒(终浓度为 0、0.5、2、5  $\mu$ g/10<sup>6</sup> 个精子),Hanks 液补齐至 60  $\mu$ L,4℃ 下孵育 12 h,重复测 3 次精子活力。

#### 1.2.3.2 荧光观察与 PCR 检测

取真鲷精子于不同浓度(0.05、0.3、1  $\mu$ g/10<sup>6</sup> 个精子)的 Fluorescein-DNA(避光操作)和 pPmvasGFP 质粒下孵育 2 h 后,加入 Hanks 液重复洗涤 3 次。Fluorescein-DNA 处理组精子在荧光显微镜下压片观察。pPmvasGFP 质粒处理的精子,加入 10 U Dnase I 酶于 37℃ 下消化 10 min,重复洗涤 3 次后于 70℃ 下使 Dnase I 酶失活。用试剂盒提取基因组 DNA,通过 PCR 检测外源 DNA 是否转入精子。检测引物为 GFP 上的序列,预期产物长度为 303 bp,上游引物 5'-CGTGACCACCCTGACCTA-3',下游引物 5'-ATGCCGTTCTTCTGCTTG-3'。以真鲷 *Vasa* 调控序列上的引物扩增作为阳性对照,产物为上游引物 5'-TCCAAAGGTGGTCAGTCATAAGG-3',下游引物 5'-AACCATCTCAGAGGAACGAAGT-3'。PCR 扩增反应体积为 20  $\mu$ L,其中包括 DNA 模板 2  $\mu$ L,上下游引物(20  $\mu$ mol/L)各 0.4  $\mu$ L,PCR SuperMix 10  $\mu$ L,加 ddH<sub>2</sub>O 补足体系。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min,94℃ 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 2 min 延伸,30 个循环,72℃ 总延伸 10 min。

### 1.2.4 人工授精和取样固定

预先在不同的 pPmvasGFP 质粒浓度和孵育时间下处理真鲷精子后进行人工授精。用少量丁香酚麻醉性腺发育成熟的雌鱼, 通过挤压腹部的方法获得卵子。人工授精过程在 25 mL 烧杯中进行, 先置少量海水于烧杯底部后加入 10  $\mu$ L 处理过的精子, 精子激活过程加入 2 mL 的真鲷卵子, 摇匀使其充分受精, 之后每隔数分钟加入少量海水, 最后将上层浮卵倒入盛满海水的塑料碗中进行孵化, 孵化过程测受精率与孵化率, 实验组和对照组 3 个平行。取一部分孵化 3 d 后的仔鱼用 70%酒精保存, 其余带回实验室观察。

### 1.2.5 仔鱼 DNA 提取和目的基因检测

将酒精固定的仔鱼在常温下干燥后用生理盐水清洗, 试剂盒提取基因组 DNA, PCR 法检测目的基因在 F0 代的转入情况, 检测方法同上。将取回实验室的初孵 4 d 仔鱼在荧光体视镜下观察是否有 GFP 的表达。

### 1.2.6 数据分析

不同处理组下的精子活力、受精率、孵化率采用 SPSS 软件进行方差分析, LSD 法多重比较。

## 2 结果

### 2.1 外源 DNA 对精子活力的影响

精子活率(Percentage of motile sperm, MOT)、平均曲线速度(Curvilinear velocity, VCL) 和平均直线速度(Straight line velocity, VSL)是反映精子活力的 3 个重要指标。孵育时间影响实验(图 1A): 在 0.5 $\mu$ g/10<sup>6</sup> 精子的 pPmvasGFP 质粒浓度下孵育 24 h, 精子 MOT, VCL 和 VSL 值分别从(83.91  $\pm$  2.90)%, (123.63  $\pm$  5.90)  $\mu$ m/s, (98.90  $\pm$  4.10)  $\mu$ m/s 下降至(73.03  $\pm$  2.83)%, (89.83  $\pm$  4.23)  $\mu$ m/s 和(79.46  $\pm$  5.49)  $\mu$ m/s。随着孵育时间的增加, 外源 DNA 处理组与对照组(非处理组)精子的 3 个活力指标变化趋势一致, 无显著差异( $P > 0.05$ )。外源 DNA 长度和浓度影响实验(图 1B): 0.5kb 和 3kb 的 DNA 片段处理 12 h 后, 不同浓度(0.5、2、5  $\mu$ g/10<sup>6</sup> 个精子)处理组和对照组(0  $\mu$ g/10<sup>6</sup> 个精子)的 MOT, VCL, VSL 值无显著差异( $P > 0.05$ ); 2、5  $\mu$ g/10<sup>6</sup> 个精子的高浓度 pPmvasGFP(10 kb)质粒处理 12 h 后, 处理组精子 VCL 值比对照组分别低 14.26 和 21.85  $\mu$ m/s, 差异显著( $P < 0.05$ ), VSL 值无显著差异( $P > 0.05$ ); 对等浓度下不同长度 DNA 片段的处理结果进行单因素分析, 当 DNA 浓度达到 5  $\mu$ g/10<sup>6</sup> 个精子, pPmvasGFP(10 kb)对 VCL, VSL 的影响均显著大于 0.5 kb 和 3 kb 的 DNA 片段( $P < 0.01$ )。

### 2.2 荧光观察与 PCR 检测

Fluorescein-DNA 与真鲷精子共孵育, 充分洗涤后在荧光显微镜下观察到部分精子带有绿色荧光(图 2)。随机选取 5 个视野计数统计, 带有绿色荧光的精子比例与 Fluorescein-DNA 浓度呈正相关。0.05、0.3、1  $\mu$ g/10<sup>6</sup> 精子的 Fluorescein-DNA 浓度处理下, 带绿色荧光的精子比例分别为(23.48  $\pm$  7.90)%, (26.53  $\pm$  6.35)%, (31.90  $\pm$  5.65)%。pPmvasGFP 质粒处理的精子, 经 Dnase I 酶消化和洗涤后, 提取的 DNA 并未检测到目的基因, 通过 PCR 并未能扩增出 pPmvasGFP 上特异的 GFP 序列(图 3)。

### 2.3 人工授精和子代检测

共进行两个批次的人工授精, 受精率和孵化率的统计如下(表 1)。外源 DNA 处理组与对照组的受精率均在 70%~80%, 无显著差异( $P > 0.05$ )。批次 1 中, 1  $\mu$ g/10<sup>6</sup> 个精子处理 2、4 h 组的孵化率为(33.42  $\pm$  9.00)% 和(43.40  $\pm$  8.04)%, 与对照组(65.45  $\pm$  2.99)%显著差异( $P < 0.05$ ), 但在批次 2 孵化率均无差异。各个实验组提取 30 尾仔鱼基因组 DNA, 用 PCR 法并未能检测到 pPmvasGFP 上特异的 GFP 序列, 阳性率均为 0%(表 1)。每个实验组除固定外, 剩余活体(约 700 尾)在荧光体视镜下观察, 未发现仔鱼身上有绿色荧光蛋白表达。

## 3 讨论

精子介导转基因技术仅在少数几种海水鱼获得成功。Lu 等<sup>[5]</sup>利用电穿孔和精巢内注射转染的方法将虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)生长激素基因(rtGH)导入平鲷精子, 人工授精后获得转基因平鲷; Liu<sup>[14]</sup>等将外源基因在直接孵育、超声波、低温冷冻、DMSO 几种环境中处理金头鲷(*Sparus aurata*)精子, 通过 PCR 和斑点印迹(Dot Blots)技术发现所有处理组的精子中都能检测到目的基因信号, 这种信号在胚胎孵化后消失。无论采用何种方式对鱼类精子进行处理, 了解外源 DNA 对精子生理特性的影响都显得尤为必要。鱼类精子的质量是决定人工授精效果, 胚胎和子代能否正常发育的重要因素。在一些鱼类的研究报道中, 外源 DNA 能使精子的活力下降: 克林雷氏鲉(*Rhamdia quelen*)<sup>[11]</sup>精子在 50 ng/10<sup>6</sup> 个精子的外源 DNA 下活力降低, 当外源 DNA 的浓度达到 100 ng/10<sup>6</sup> 个精子时, 精子的活力完全丧失; 巴南牙鲮精子<sup>[8]</sup>在 500 ng/10<sup>6</sup> 个精子的外源 DNA 下完全失活。本研究中 500 ng/10<sup>6</sup> 个精子

的 pPmvasGFP 质粒对精子活力没有影响, 只有当 pPmvasGFP 质粒达到  $2 \mu\text{g}/10^6$  个精子的高浓度时, 精子活力才有所下降。  $5 \mu\text{g}/10^6$  个精子的 pPmvasGFP 质粒下, 精子 VCL 值相较于对照组低 22.0%, 而 MOT 值和 VSL 值并无差别, 这就意味在高浓度外源 DNA 下, 虽然精

子的运动速度有所减慢, 但能被激活的精子总数并没有减少。人工授精实验中, 外源 DNA 处理组与非处理组的受精率无显著差异, 外源 DNA 对精子运动能力的削弱并不影响精子的受精能力。所以, 从总体上讲外源 DNA 对真鲷精子的质量影响不大。

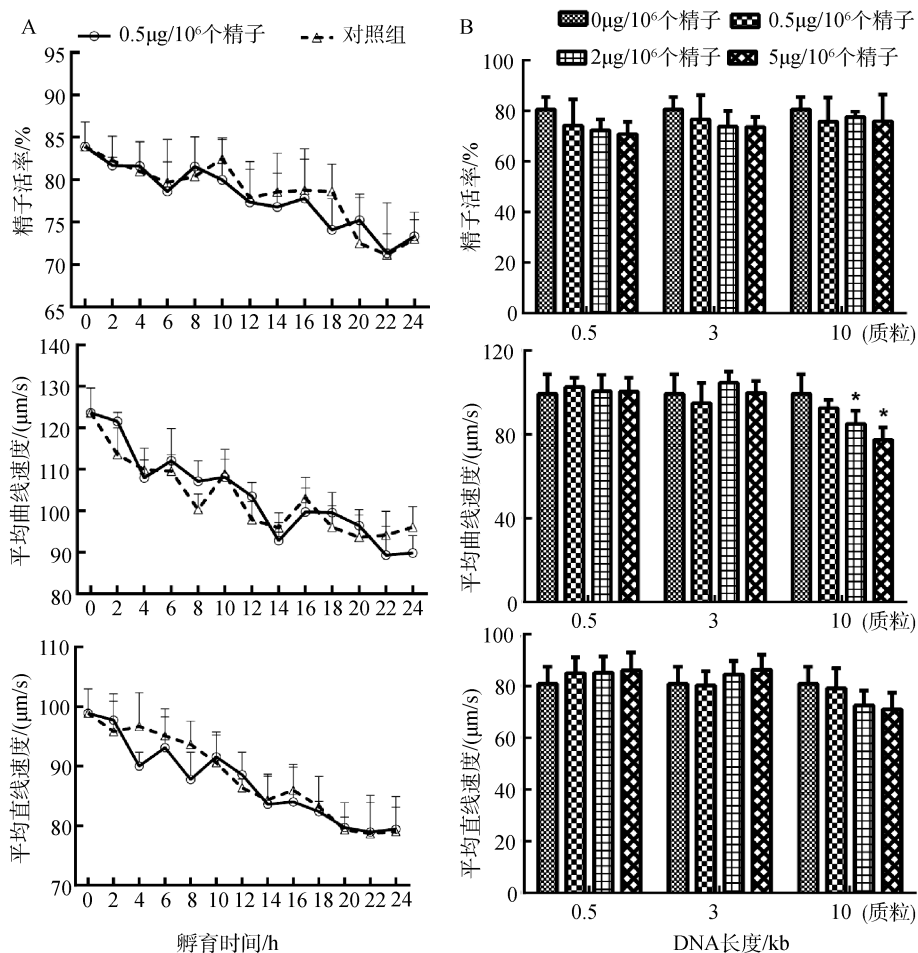


图 1 外源 DNA 对真鲷精子活力的影响

Fig.1 Sperm motility evaluation after incubation with exogenous DNA

A. 孵育时间影响实验; B. 外源 DNA 长度和浓度影响实验; \*. 差异显著

A. Effect of the incubation time on the sperm motility; B. Effect of the length and concentrations of exogenous DNA fragment on sperm motility; \*.  $P < 0.05$

目前外源 DNA 对精子的损伤机制尚无报道。Maione 等<sup>[15]</sup>在小鼠的研究中发现, 在  $100\sim 500 \text{ ng}/10^6$  个精子的外源 DNA 下精子内会应激产生核酸酶, 核酸酶的存在不仅会裂解进入精子内的外源 DNA, 同时也会降解自身的基因组 DNA, 使精子失活。Maione 认为这是小鼠精子在高浓度的外源 DNA 环境下, 通过自身凋亡以确保遗传物质不受外来基因修改的自我保护机制。精子内存在核酸酶活性物质的现象在猪、牛等物种中也有报道<sup>[16]</sup>。本研究中, 将带 Fluorescein 荧光素的 DNA 片段与真鲷精子共孵育后, 发现在荧光显微镜下部分精子带有绿光, 标志着有 DNA

片段与精子结合。然而, 经洗涤和 Dnase I 酶消化后, 从精子中提取出的基因组 DNA 通过 PCR 法并不能检测到目的基因。由此结果可做两种推测: (1)真鲷精子吸纳外源 DNA 的能力较弱, 进入精子的 DNA 被内源核酸酶裂解。但内源核酸酶的存在也会破坏精子, 与精子活率不受影响的结果不符, 由此说明有外源 DNA 进入精子内的可能性较小; (2)真鲷精子自身并不具备吸纳外源 DNA 片段的能力, 外源 DNA 只是吸附在精子表面。从子代的检测结果阳性率为 0 来看, 吸附在精子表面的 DNA 片段会在受精过程被除去, 并不足以携带进入卵子产生转基因后代。

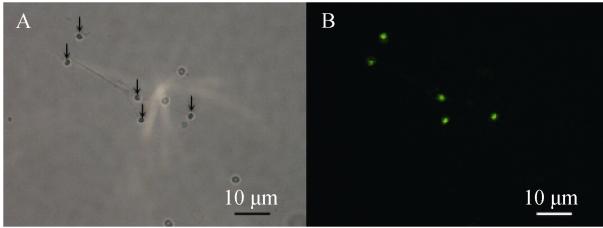


图 2 荧光显微镜下(1000×)带荧光素标记的精子

Fig.2 Fluorescence microscopy. A representative picture of red seabream spermatozoa (1000×)

A. 普通光学显微镜; B. 荧光显微镜

A. Sperm view in light microscope; B. Fluorescein-DNA signals on sperm

表 1 外源 DNA 处理精子人工授精和 F0 代检测

Tab.1 Artificial insemination and detection of pPmvasGFP vector in F0

批次	质粒浓度( $\mu\text{g}/10^6$ 个)	孵育时间(h)	受精率(%)	孵化率(%)	阳性率(%)
1	0.5	2	75.76 $\pm$ 2.64 <sup>a</sup>	49.52 $\pm$ 6.79 <sup>ab</sup>	0
1	1	2	74.69 $\pm$ 6.01 <sup>a</sup>	33.42 $\pm$ 9.00 <sup>b</sup>	0
1	1	4	74.72 $\pm$ 4.62 <sup>a</sup>	43.40 $\pm$ 8.04 <sup>b</sup>	0
1	0	0	76.74 $\pm$ 5.04 <sup>a</sup>	65.45 $\pm$ 2.99 <sup>a</sup>	0
2	0.5	2	78.11 $\pm$ 7.45 <sup>a</sup>	71.30 $\pm$ 11.97 <sup>a</sup>	0
2	1	2	75.69 $\pm$ 7.81 <sup>a</sup>	64.71 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup>	0
2	1	4	78.25 $\pm$ 9.99 <sup>a</sup>	64.23 $\pm$ 8.67 <sup>a</sup>	0
2	0	0	77.78 $\pm$ 5.00 <sup>a</sup>	65.45 $\pm$ 3.03 <sup>a</sup>	0

注:表中英文字母分别代表差异水平( $P < 0.05$ )

有关转基因真鲷的研究很少,沙珍霞等<sup>[17]</sup>最早提到通过显微注射的方法,获得 GFP 呈嵌合性表达的真鲷胚胎。此方法工作量大,注射的 1100 个胚胎中仅有 54 个存活,其中只有 3 个带有目的基因,进一步的筛选和培养的难度较大。精子介导法是制备转基因真鲷的有力途径之一,从本研究的结果来看,真鲷精子自身吸纳外源 DNA 的能力较弱,实验中的所采用的真鲷精子为保存于液氮的冻精,在一定程度上说明冻融的方法并不能产生较好的转染效果。需通过其他人为手段使精子携带上外源基因,如脂质体,电穿孔等。真鲷精子的活力受外源 DNA 的影响较小,在高浓度外源 DNA 下结合其他方法,有助于进一步探索更加有效的真鲷转基因方法。同时,研究结果中外源 DNA 降低精子运动速度的现象,以及第一批人工授精中,实验组的孵化率降低是否是由外源 DNA 引起,需要进一步的研究与验证。

参考文献:

[1] Hostettler H A, Peck S L, Muir W A. High efficiency production of germ-line transgenic Japanese medaka (*Oryzias latipes*) by electroporation with direct current- shifted radio frequency

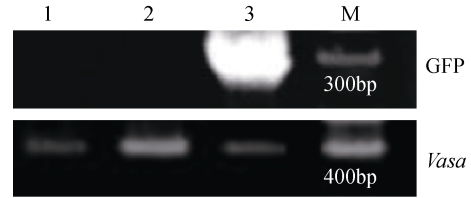


图 3 PCR 检测 pPmvasGFP 质粒处理的精子

Fig.3 Detection of pEGFP vector in sperm incubate with pPmvasGFP

1. pPmvasGFP 质粒处理组精子 DNA; 2. 对照组精子 DNA; 3. pPmvasGFP 质粒; M. Marker

1. Sperm incubated with pPmvasGFP; 2. Negative control; 3. pPmvasGFP; M. Marker

pulses[J]. Transgenic Research, 2003, 12(4): 413-424.

[2] Tsai H J. Electroporated sperm mediation of a gene transfer system for finfish and shellfish[J]. Molecular Reproduction and Development, 2000, 56(2): 281-284.

[3] Khoo H W, Ang L H, Lim H B, et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish[J]. Aquaculture, 1992, 107(1): 1-19.

[4] Sin F Y T, Bartley A L, Walker S P, et al. Gene-transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus-tshawytscha*) by electroporating sperm in the presence of pRSV-lacZ DNA[J]. Aquaculture, 1993, 117(1-2): 57-69.

[5] Lu J K, Fu B H, Wu J L, et al. Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods[J]. Marine Biotechnology, 2002, 4(3): 328-337.

[6] Lavitrano M, Camaioni A, Fazio V M, et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice[J]. Cell, 1989, 57(5): 717-723.

[7] Sciamanna I, Vitullo P, Curatolo A, et al. Retrotransposons, reverse transcriptase and the genesis of new genetic information[J]. Gene, 2009, 448(2): 180-186.

- [8] Lanes C F C, Sampaio L A, and Marins L F. Evaluation of DNase activity in seminal plasma and uptake of exogenous DNA by spermatozoa of the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*[J]. Theriogenology, 2009, 71(3): 525-533.
- [9] 李国华, 崔宗斌, 朱作言, 等. 鱼类精子携带的外源基因导入[J]. 水生生物学报, 1996, 3: 242-247.
- [10] Collares T, Campos V F, Seixas F K, et al. Transgene transmission in South American catfish (*Rhamdia quelen*) larvae by sperm-mediated gene transfer[J]. Journal of Biosciences, 2010, 35(1): 39-47.
- [11] Campos V F, Amaral M G, Seixas F K, et al. Exogenous DNA uptake by South American catfish (*Rhamdia quelen*) spermatozoa after seminal plasma removal[J]. Animal Reproduction Science, 2011, 126(1-2): 136-141.
- [12] Lin F, Liu Q H, Li M Y, et al. Transient and stable GFP expression in germ cells by the vasa regulatory sequences from the red seabream (*Pagrus major*)[J]. International Journal of Biological Sciences, 2012, 8(6): 882-890.
- [13] Liu Q H, Li J, Xiao Z Z, et al. Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*)[J]. Aquaculture, 2007, 263(1-4): 20-25.
- [14] Liu X Y, Zohar Y, Knibb W. Association of foreign DNA with sperm of gilthead seabream, *Sparus aurata*, after sonication, freezing, and dimethyl sulfoxide treatments[J]. Marine Biotechnology, 1999, 1(2): 175-183.
- [15] Maione B, Pittoggi C, Achene L, et al. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA[J]. DNA and Cell Biology, 1997, 16(9): 1087-1097.
- [16] Alderson J, Wilson B, Laible G, et al. Protamine sulfate protects exogenous DNA against nuclease degradation but is unable to improve the efficiency of bovine sperm mediated transgenesis[J]. Animal Reproduction Science, 2006, 91(1-2): 23-30.
- [17] 沙珍霞, 陈松林, 刘洋, 等. 显微注射技术在制备鱼类嵌合体和转基因海水鱼上的应用[J]. 海洋水产研究, 2005, 3: 86-90.

## Effect of exogenous DNA on sperm of red seabream (*Pagrus major*)

ZHENG Jun-piao<sup>1,2</sup>, LIU Qing-hua<sup>1</sup>, XU Shi-hong<sup>1</sup>, MA Dao-yuan<sup>1</sup>, XIAO Zhi-zhong<sup>1</sup>, LIN Fan<sup>1</sup>, XIAO Yong-shuang<sup>1</sup>, LI Jun<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Received:** Dec., 23, 2013

**Key words:** Exogenous DNA; pagrus major; sperm; sperm-mediated gene transfer

**Abstract:** The effect of exogenous DNA ((DNA concentrations, DNA length and incubation time)) on the motility of red seabream (*Pagrus major*) sperm was studied using computer-assisted sperm analysis (CASA). Sperm fertility was evaluated by artificial insemination (AI). The polymerase chain reaction (PCR) and sperm treatment with Fluorescein-DNA were performed to assess the ability of spermatozoa to bind and internalize exogenous DNA. There was no significant difference in the percentage of motile sperm (MOT) between the DNA treated group and control group. The MOT was maintained at  $(75.89 \pm 5.55)\%$  after treatment with high concentrations of DNA ( $5 \mu\text{g}/10^6$  spermatozoa), whereas the curvilinear velocity and straight line velocity of sperm were decreased by  $30.78 \mu\text{m}/\text{s}$  and  $20.52 \mu\text{m}/\text{s}$ , respectively. Green fluorescence was observed in sperm incubated with Fluorescein-DNA, however, no transgene signal was found in DNA treated sperm and embryos after AI through PCR. This result indicates that the exogenous DNA binding to the sperm of red seabream can't be carried into the egg and transgenic offspring.

(本文编辑: 谭雪静)