

金鱼单尾鳍形成的研究

II. 胚胎发育过程中外源信息核糖核酸的作用*

蔡难儿 于富才 吴贤汉 徐权汉 徐永立

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

提要 从鲤鱼卵巢中提取核酸(mRNA)注入不同发育阶段的金鱼胚胎中,观察 mRNA 对尾鳍发育的影响。观察结果表明:一次注射的或多次注射的,在胚胎早期均能使双尾鳍变成单尾鳍,但多次注射的,出现单尾鳍数要高;大剂量注射,甚至还可以使晚期胚胎(耳石期),也能形成单尾鳍;mRNA注入卵黄囊中所产生的单尾鳍鱼要比注入胚盘中为多;失活的 mRNA 不能诱导出单尾鳍的形成。

从实验所得的资料表明:鲤鱼卵巢 mRNA 能够诱导双尾鳍金鱼转变成单尾鳍^[3],但这种外源 mRNA 的作用性质,是由具有活性的 mRNA 翻译成蛋白质或者以它本身直接影响或干扰胚胎中某种“调节因子”^[4],致使双尾鳍基因不能表达,从而导致单尾鳍的形成。

双尾鳍金鱼变成单尾鳍,从目前一些实验结果表明,有多种途径可以达到这一目的。

童第周和牛满江曾用鲤、鲫鱼的精巢和卵巢提取的 DNA 和 mRNA 注入金鱼卵子胚盘中,能诱导双尾鳍金鱼变成单尾鳍,且能传递给下一代^[1-3]。其作用机理,他们认为,不论是 DNA 还是 mRNA,都得通过核中的 DNA 而发生作用。

而我们在前一篇文章中^[4],用切割金鱼卵质或分割分裂球的方法,也可以达到这个目的——出现单尾鳍鱼。实验认为,所以能出现单尾鳍,是由于卵质中存在着控制双尾鳍基因表达的“调节因子”被切除所致。

本实验的目的,设想 mRNA 不从胚盘注入,而直接注入卵黄囊中和不同发育时期的胚胎中,看它同样能否诱导出单尾鳍的形成,能否提高单尾鳍形成的频率;胚胎发育到哪个阶段,注射才失去诱导作用。

实验达到预期的目的,然而,从这个实验设计所得的结果来看, mRNA 在卵子中的作用机理,除了童第周提出的,对核中的 DNA 发生作用这个可能的途径外,还有没有其他可能的途径,这是本文所要讨论的一个问题。

一、材料和方法

1. 实验材料

金鱼 (*Carassius auratus*)——黑龙睛、红龙睛、珍珠等三个品种鱼。

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1303 号。
收稿日期: 1986 年 3 月 3 日。

2. 核酸

使用的是鲤鱼卵巢信息核糖核酸 (mRNA), 其中部分的 mRNA 是由中国科学院发育生物学研究所提供的。mRNA 的提取方法同文献[1],[3]。使用时, 用 Holtfreter 溶液稀释为 120 OD/ml, 然后, 置于 -15 — -20°C 冰箱中保存, 备用。

3. 显微注射

取已成熟的亲鱼, 挤出精、卵进行人工授精。随后, 用镊子剥去卵膜, 卵子移至 Holtfreter 溶液中, 以备核酸注射。核酸注射所用的用具和手术, 见文献[1]。

4. 方法

实验分两部分。① mRNA 一次注射。这部分卵子分 10 组, 在不同发育时期的胚胎各注射一次。② mRNA 连续注射。这部分有 5 组, 各组注射一次至五次不等。

胚胎在室温 21 — 25°C 范围内发育 6d 或 4d 后, 在解剖镜下统计双尾和单尾鳍的数量, 并用生物统计方法进行分析。

二、实验结果

1. mRNA 一次注射(见表 1)

实验共分 10 组, 其中两个组为对照组(一组不注射, 另一组注射失活的 mRNA), 其他组为不同的发育时期。注射部位, 除未分裂时期注入胚盘外, 其余组均注入卵黄囊中。注射剂量, 除第八组分别注入 $1 \times 10^{-4}\text{ml}$ 和 $1 \times 10^{-2}\text{ml}$ 外, 其它各组每个卵子注入 7.6×10^{-7} — $2.0 \times 10^{-6}\text{ml}$ 。

第一组, 未分裂卵子。共注射 245 个(三个品种的总和), 存活的幼鱼得 148 尾, 其中 123 尾为双尾鳍(占幼鱼总数 83.1%), 25 尾为单尾(占 16.9%)。实验组与不注射对照组幼鱼单尾鳍(三种鱼分别为: 黑龙睛, 7.1%; 珍珠, 5.1%; 龙睛, 3.6%)作数学显著差异统计分析, t 为 2.90, $t > t_{0.05}(1.96)$ (显著性差异临界值), 变化是显著的。

第二组, 2—4 细胞时期。206 个注射的卵子中, 得 125 尾幼鱼, 其中 93 尾双尾鳍(占 74.4%), 32 尾单尾鳍(占 25.6%)。这一组单尾出现的频率比第一组为高, 说明 mRNA 注入卵黄囊中, 能更有效地诱导出单尾鳍的形成。

第三、四、五组, 8-细胞、高囊胚和早期原肠胚三个时期。三者共注射 182 个卵子, 105 个发育成幼鱼, 其中 24 尾为单尾鳍(占幼鱼数的 22.9%), 其出现频率比第一组为高, 比第二组略低。

第六、七组, 晚期原肠胚和尾芽期。两者分别得活鱼为 74 尾和 58 尾, 其中单尾鱼, 前者 4 尾(占 5.1%), 后者为零。实验说明, 在晚期的胚胎中, 某些组织或器官已逐渐分化了, 且某些物质已流向胚盘, 小剂量的 mRNA 不足以产生影响。

第八组, 耳石期(第 22 期)。分两组注射: 一组注射量为 $1 \times 10^{-4}\text{ml}$; 另一组为 $1 \times 10^{-2}\text{ml}$ 。两者的注射量都比以上各组为多。前者 27 尾小鱼中得双尾 23 尾(占 85.2%), 单尾鱼 4 尾(占 14.8%); 后者, 15 尾小鱼中得 4 尾单尾鱼(占 26.7%)。

实验表明, 耳石期胚各种组织性质已基本决定了, 但尾鳍的分化还是比较晚的, 大剂量 mRNA 的作用, 仍有可能产生单尾鳍。

第九、十组, 前者注射失活 mRNA, 注射 1—4 细胞期卵子, 共注射 304 个, 发育幼鱼有

表 1 鲤鱼卵子 mRNA 诱导金鱼胚胎引起尾鳍的变化

Tab. 1 Changes of the caudal fin induced with carp eggs-mRNA at different stages of goldfish embryos

组 别	7.6 × 10 ⁻⁷ - 2.0 × 10 ⁻⁶										1 × 10 ⁻⁴ - 1 × 10 ⁻²			1-3, 2-, 4- 细胞																
	一	二	三	四	五	六	七	八	九	十	对 照																			
注入时期	未分裂										2-4-细胞			8-细胞 高囊胚			下包 1/3			下包结束 尾芽期			耳石期			失活 mRNA				
注入剂量 (ml)																														
金鱼品种	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③
注射卵数	119	70	56	81	70	55	82	85	29	62	60	35	15	304																
幼鱼存活数	89	41	18	60	44	21	34	58	23	51	58	27	15	231																
尾 数	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
百分数	72	36	15	44	32	17	10	26	45	22	48	23	11	229																
双 尾	80.9	87.8	83.3	73.3	72.7	81.0	76.9	76.5	77.6	95.7	94.1	85.2	73.3	99.1																
百分数	17	5	3	16	12	4	3	8	13	1	3	0	4	2																
单 尾	19.1	12.2	16.7	26.7	27.3	19.0	23.1	23.5	22.4	4.3	5.9	0	14.8	0.9																
百分数																														

① 黑龙睛; ② 珍珠; ③ 龙睛。

231 尾, 其中单尾鱼只有两条, 占幼鱼总数的 0.9%, 说明失活的 mRNA 不具有诱导产生单尾鳍的作用; 后者, 不注射的对照组, 其中单尾鱼占总数的 5.3%。

2. mRNA 连续注射(见表 2)

卵子共分 5 组, 其中一组为对照组, 不注射 mRNA; 其它各组在不同的发育时期, 作三次至五次的连续注射。每个卵子每次注射量为 7.6×10^{-7} — 2.0×10^{-6} ml, 三次注射量为 3 乘上述剂量; 四、五次注射量, 依此类推。注射部位, 第一次注入胚盘中, 其它各次均注入卵黄囊中。

第一组, 一次注射。注射 35 个卵子, 其中发育成幼鱼的有 26 尾, 24 尾是双尾鳍(占幼鱼总数的 92.3%), 单尾只有两尾。比对照组略高一点。

第二组, 三次连续注射。注射 25 个卵子, 得幼鱼 12 尾, 其中 7 尾为双尾鳍(占 58.3%), 5 尾为单尾鳍(占 41.7%)。实验组出现的单尾与对照组的单尾比较, 有显著的差异; 另一方面也说明逐渐增加 mRNA 剂量, 可以提高单尾鳍形成频率。实验还表明, 几次注射量(体积)作一次注入, 结果所有的胚胎在中途都会夭折死亡。

第三、四组, 四至五次连续注射。分别注射 38 个和 43 个卵子。两者存活的鱼分别得 24 尾和 18 尾, 其中单尾鳍, 前者为 7 尾(占 29.2%), 后者为 5 尾(27.8%)。这两组单尾鳍数略有下降, 继续增加剂量, 仍不能提高变化频率。

表 2 鲤鱼卵子 mRNA 连续注射金鱼胚胎所引起尾鳍的变化

Tab. 2 Changes of the caudal fin induced with carp eggs-mRNA injecting goldfish embryos successively

组 别	一	二	三	四	五
未分裂 8-细胞 高囊胚 下包 1/3 下包结束	一次注入	第一次注入 第二次注入 第三次注入	第一次注入 第二次注入 第三次注入 第四次注入	第一次注入 第二次注入 第三次注入 第四次注入 第五次注入	对 照 (不注射)
注射卵数	35	25	38	43	
幼鱼存活数	26	12	24	18	355
尾数 百分数	100	100	100	100	100
双尾鱼	24	7	17	13	333
尾数 百分数	92.3	58.3	70.8	72.2	93.8
单尾鱼	2	5	7	5	22
尾数 百分数	7.7	41.7	29.2	27.8	6.2

三、讨论与结论

1. mRNA 在卵子中的作用性质

外源信息核糖核酸(mRNA)在卵细胞中的翻译, 在国外人们已作了不少的工作^[5-8]。实验表明, mRNA 在卵内能得到翻译, 产生新的蛋白质。那些 mRNA 既无细胞种类的

特异性,也无种的特异性。

童第周应用鲤、鲫鱼卵巢中的 mRNA 诱导金鱼实验,发现能使双尾鳍变成单尾鳍。这个现象在我们的实验中得到了验证,这是客观事实。但是对其作用性质,本文却持有不同的分析。其所以如此,或许是由于实验方法不同的缘故所致。

童第周认为, mRNA 是通过逆转录对 DNA 发生作用。这是一种可能的途径。然而,我们认为,其作用机理还不应排除有另一种可能性的途径,即它只影响卵质中的某种物质,导致单尾的形成。其根据是:

(1) 用同样小剂量的 mRNA 注入早期不同时期的胚胎中,都能有单尾鳍的形成;大剂量的注射,甚至还可以使晚期胚胎(耳石期胚)也会有一部分形成单尾。耳石期胚胎,胚层早已形成,某些器官也基本上已分化了,在这种情况下, mRNA 是不太可能通过逆转录进入各个细胞核之中来改变基因结构的。因此,可以考虑它是由另一途径来实现的。

(2) 我们在前一篇文章中已指出^[4]: 卵质中存在着控制双尾鳍基因表达的“调节因子”,只要影响或切除去这种物质(调节因子),便可以使双尾变成单尾。

基于上述的认识,对 mRNA 的作用性质作如下分析:外源 mRNA 在卵子中不是影响于细胞核,而是通过具有活性的 mRNA 翻译成蛋白质,或者以它本身直接影响或干扰了控制双尾鳍基因表达的“调节因子”,使双尾鳍基因不能正常表达,导致单尾鳍的形成。至于小剂量在原肠胚之后注入,不能出现单尾,那是因为“调节因子”已流进胚盘而没有受到足够的剂量影响所致。当大剂量注入后,甚至可使晚期胚胎也会出现单尾,这是由于合成大量的蛋白质,有一部分随胞质流入胚盘干扰了那种“调节因子”所造成的。

2. mRNA 在卵子中的作用特点

(1) 要使双尾鳍变成单尾鳍鱼, mRNA 必须具有活性,失去活性的 mRNA 注入后,不引起单尾的形成。

(2) 注入卵黄囊中比注入胚盘中,更能提高单尾鳍出现的频率。在发育一定阶段内的多次注射,可以更多地形成单尾鳍。

(3) 随着胚胎的发育,同样小剂量的 mRNA,不足以改变晚期胚胎单尾鳍的形成,只有加大剂量才能起到一定的效果。

参 考 文 献

- [1] 童第周、牛满江,1973. 核酸诱导金鱼性状的变异。中国科学 4: 389—394.
- [2] 童第周、牛满江,1975. 由核酸诱导所产生的单尾鳍金鱼的子代。中国科学 3: 295—301.
- [3] 童第周、牛满江,1977. 鲤鱼卵信息核糖核酸对金鱼尾鳍变异的作用。中国科学 2: 146—148.
- [4] 蔡健儿,1989. 金鱼单尾鳍形成的研究 I. 卵质对尾鳍发育的影响。海洋与湖沼 20(5): 453—459.
- [5] Gurdon, J. B., J. B. Lingrel and G. Marbaix, 1973. Message stability in injected frog oocyte: long life of mammalian and globin message. *J. Mol. Biol.* 80: 539—551.
- [6] Gurdon, J. B., H. R. Woodland and J. B. Lingrel, 1974. The translation of mammalian globin mRNA injected into fertilized egg of *Xenopus laevis*. 1. Message stability in development. *Develop. Biol.* 39: 125—133.
- [7] Huez, G., G. Marbaix, D. Gallwitz, E. Weinberg, R. Devos, E. Hubert and Y. Cleater, 1978. Functional stabilization of HeLa cell histone messenger RNA injected into *Xenopus* oocytes by 3'-OH polyadenylation. *Nature* 271: 572—573.
- [8] Woodland, H. R. and F. H. Wilt, 1980. The stability and translation of sea urchin histone messenger RNA molecules injected into *Xenopus laevis* eggs and developing embryos. *Develop. Biol.* 75: 214—221.

STUDIES ON THE FORMATION OF SINGLE CAUDAL FIN OF CARSSIUS AURATUS I. THE EFFECT OF CARP EGG- mRNA ON THE DEVELOPMENT OF THE GOLDFISH EMBRYO*

Cai Nan'er, Yu Fucai, Wu Xianhan, Xu Quanhan and Xu Yongli
(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao*)

ABSTRACT

Poly (A) mRNA obtained from carp eggs was injected into goldfish embryo at different developmental stages to study the effect of the mRNA on the caudal fin development. The experiment consisted of two parts:

I. Microinjection of mRNA was made only once. The fertilized but uncleaved eggs were injected with carp egg-mRNA in the blastoderms, while all the other embryos were injected in the yolk sacs. The experimental result demonstrated that (1) the caudal fin transformation from the double to the single occurred in the embryos injected with the mRNA at 1-cell stage and in those injected with the mRNA at gastrula stage, or even at the auditory vesicle forming stage; (2) the embryos introduced the mRNA into the yolk sacs gave rise to more single caudal fin goldfish than those introduced the mRNA into the blastoderm.

II. Microinjection of mRNA was made several times. Some embryos were successively injected three times, some four times, and some five. It showed that the embryos injected with the mRNA successively formed more larva fish with single caudal fin than those injected with the mRNA only once.

The available data show that the carp egg-mRNA did induce the transformation of caudal fin from double to single in the goldfish. The foreign mRNA did not influence the host nucleus, but, by translating into new proteins in the cytoplasm, it interferes in the factor regulated the double formation, resulting in the single caudal fin formation.

* Contribution No. 1303 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.