

用精子载体法将 MT-hGH 基因 导入泰山赤鳞鱼*

翟玉梅 鹿培源 崔博文 王 喆
时永香 杨晓梅 赵 晶 岳永生[†]

(山东大学生命科学院 济南 250100)

[†](山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

摘要 于 1998 年 3 月—1999 年 2 月,在山东农业大学采集泰山赤鳞鱼,采用精子载体法进行 MT-hGH 基因导入的研究。将泰山赤鳞鱼的精子在保存液内与含有 MT-hGH 基因的重组质粒保温 30min,然后用于人工授精,共孵化出 363 尾幼鱼。待鱼苗长至 5cm 左右时,对其中的 39 尾进行 PCR 和 Southern 杂交检测。结果表明,有 7 尾鱼苗带有 MT-hGH 基因,转基因鱼的阳性率为 17.95%。

关键词 精子载体法,基因转移,泰山赤鳞鱼,MT-hGH 基因

中图分类号 Q812

自朱作言等培育出世界上首例转基因鱼以来(Zhu *et al.*, 1985),世界范围内的很多实验室都开展了这方面的工作,并且取得了相当大的成就。在鱼类的基因转移中,最为广泛使用的是显微注射法,该法的优越性在于可以确保外源基因导入受精卵内,成功率较高。但同时该法也具有操作难度大、成活率较低等缺点。Lavitrano 等(1989)在培育转基因小鼠时首先采用了精子载体法进行基因转移,以后一些学者将精子载体法应用于转基因鱼的研究(Muller *et al.*, 1992;于健康等,1994;李国华等,1996;Patil *et al.*,1996)。本文报道用精子载体法将 MT-hGH 基因导入泰山赤鳞鱼的研究结果。

1 材料与方 法

1.1 材 料

泰山赤鳞鱼(*Varicorhinus tracrolepis*)由山东农业大学泰山赤鳞鱼研究所提供。带有 MT-hGH 基因¹⁾的重组质粒(图 1)由中国科学院发育生物学研究所提供。蛋白酶 K 为 Merck 公司产品;Dig-High prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 为宝灵曼公司产品;Taq DNA 聚合酶、dNTP、*EcoR* I、*Bam* H I 和牛血清白蛋白为宝生物工程(大连)公司产品,PCR 引物亦由该公司合成。

* 山东省科学技术委员会攻关项目,D97060 号。翟玉梅,女,出生于 1940 年 7 月,教授,E-mail:ymz@life.sdu.edu.cn

1) MT-hGH 基因:小鼠重金属螯合蛋白基因启动子与人生长素基因

收稿日期:1999-07-12,收修改稿日期:2000-06-09

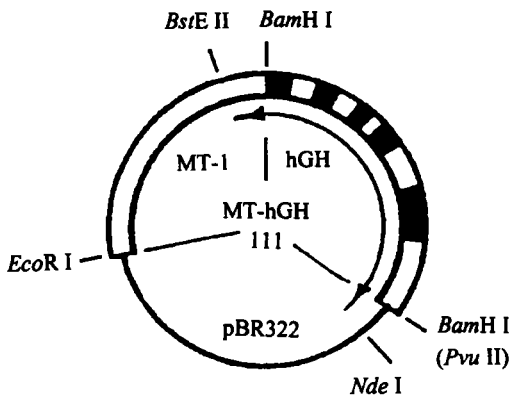


图1 带有 MT-hGH 基因的重组质粒结构图
Fig.1 Structure of the recombinant plasmid with MT-hGH gene

1.2 方法

1.2.1 MT-hGH 基因的制备 用带有 MT-hGH 基因的重组质粒转化大肠杆菌(*E. coli* HB101),碱裂解法大量提取重组质粒,PEG 沉淀法纯化,用 *EcoR* I 将重组质粒切成线形 DNA 分子,纯化后溶于 T.E(pH=8.0),浓度为 300 μ g/ml。

1.2.2 精子在保存液内与 MT-hGH 基因的保温(20—23 $^{\circ}$ C)和人工授精 参照李国华等(1996)的方法,并稍加改良。在 1.5ml 微量离心管中加入 200 μ l 精子保存液(2.9% 葡萄糖,1% 柠檬酸三钠,0.2% NaHCO_3 , 0.03% KCl, 30mg/ml

牛血清白蛋白)。取一尾性成熟的健康雄鱼,将精液挤入一平皿内。迅速吸取 200 μ l 精液,立即加到精子保存液内,混匀,然后加 4 μ l 300 μ g/ml 的 DNA 溶液,混匀后在室温(21.5 $^{\circ}$ C)下放置 30min。在另一平皿内加入 10ml 水,取一尾性成熟的健康雌鱼,将卵子挤入平皿内,立即加入 200 μ l 上述精液并摇匀,3min 后弃去平皿内的液体,用清水洗涤 3 次。受精卵在室温下孵化,约 3—4d 后出苗,鱼苗体长 0.8cm。对照处理与此相同,但在精液中加入的是不含 DNA 的 4 μ l T.E(pH=8.0)。

1.2.3 鱼苗 DNA 的提取 取 1g 左右活鱼苗肌肉组织,在液氮中研成粉末,取 0.5g 左右肌肉组织粉末提取基因组 DNA,提取方法参照奥斯伯等(1998)。

1.2.4 转基因鱼的 PCR 法检测 50 μ l 反应体系组成为:0.25 μ g 鱼苗基因组 DNA,4 种 dNTP 各 100 μ mol/L,两种引物各 20pmol,10mmol/L Tris·Cl(pH=8.3),50mmol/L KCl, 1.5mmol/L MgCl_2 , 2 单位 TaqDNA 聚合酶。引物 1 序列为 5'-AAGCGTCAC-CACGACT-3',位于 MT 启动子区;引物 2 序列为 5'-AAAAGCCAGGAGCAG-3',为反向引物,位于 hGH 基因区。两引物间的 DNA 长度为 500bp 左右。扩增条件为变性 94 $^{\circ}$ C 30s,退火 55 $^{\circ}$ C 30s,延伸 72 $^{\circ}$ C 2min,共进行 30 个循环。反应结束后,取 7 μ l 扩增产物,在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳检测结果。以 *EcoR* I 酶切后的线形质粒 DNA 作为阳性对照的模板。

1.2.5 转基因鱼的 Southern 杂交检测 对 PCR 法检测呈阳性的样品进一步做 Southern 杂交检测。用 *Bam*H I 切下重组质粒中的 hGH 基因片段,在 0.7% 低熔点琼脂糖凝胶上电泳后回收作为合成探针的模板。鱼苗 DNA 经 *Bam*H I 酶切后在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳,然后用毛细管转移法转移至尼龙膜上。探针的制备和 Southern 杂交均按 Dig-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 说明书完成。以重组质粒的 hGH 片段作阳性对照。

2 结果

2.1 卵子的受精率和孵化率

包括对照组在内,实验中用在精子保存液内保存 30min 后的精液共做了 4 次人工授精,总计处理卵子 1213 个(其中实验组 997 个),得到受精卵 912 个(其中实验组 755 个),孵化出幼鱼 433 尾(其中实验组 363 尾),受精率和孵化率分别为 75.19% 和 47.48%。实验组总的受精率和孵化率分别为 75.73% 和 48.21%,对照组的受精率和孵化率分别为 72.69% 和 44.58%,二者无明显差别,统计数据见表 1。

表 1 卵子的受精率和孵化率

Tab. 1 The fertilization rate and incubation rate of eggs

组别	实验卵子数(个)	受精卵数(个)	孵化出幼鱼数(尾)	受精率(%)	孵化率(%)
实验组 1	268	202	95	75.37	47.03
实验组 2	352	260	116	73.86	44.62
实验组 3	377	293	152	77.72	51.88
对照组	216	157	70	72.19	47.58
总计	1213	912	433	75.19	47.48

为了验证精子在精子保存液内保存 30min 后再用于人工授精是否会影响卵子的受精率和孵化率,作者用泰山赤鳞鱼的精液和卵子做了一次正常的人工授精,得到的受精率和孵化率分别为 77.62% 和 46.79%,与以上结果无明显差别。可见,精子在精子保存液内保存 30min 再用于人工授精不会影响其卵子受精的能力,也不会影响受精卵的孵化。

2.2 转基因鱼的阳性率

实验中共对 39 尾鱼苗的基因组 DNA 进行了检测。PCR 法检测有 12 个样品呈阳性结果(图 2a)。PCR 呈阳性的 12 个样品的 Southern 杂交结果有 7 个呈阳性(图 2b)。转基因鱼的阳性率约为 17.95%。

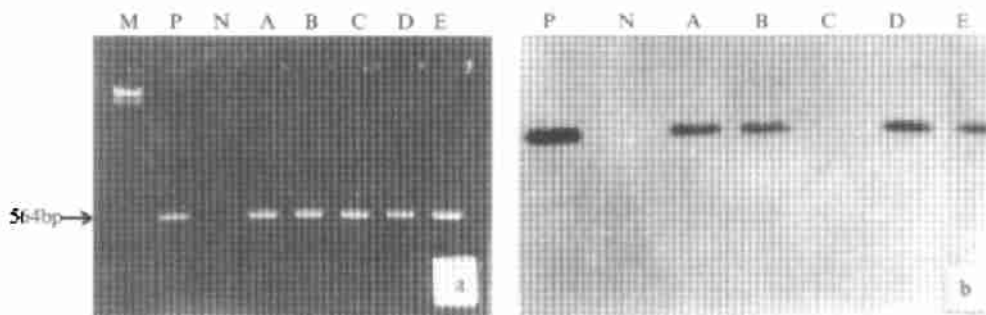


图 2 转基因鱼的 PCR 和 Southern 杂交检测结果

Fig. 2 The results of PCR and Southern blot of transgenic fish

a. PCR 检测结果;b. Southern 杂交检测结果。M: λ DNA/Hind III 分子量标准;P: 阳性对照;N: 对照组;A—E: 实验组,其中 C 的 PCR 结果为阳性,Southern 杂交结果为阴性

3 讨论

3.1 外源 DNA 在受体鱼中的存在方式

用显微注射法培育转基因鱼时,外源 DNA 导入宿主细胞后,外源 DNA 常以首尾相

连的多聚体形式整合于受体鱼基因组中,故对受体鱼基因组 DNA 进行 Southern 杂交分析时,往往会得到较复杂的图谱,而对受体鱼基因组 DNA 所做的 Southern 杂交分析却得到了非常简单一致的带型,这可能是由于外源 DNA 并未整合入受体鱼的基因组内,而是存在于染色体之外的缘故。于健康等(1994)也得到了与本文相似的结果。在其它用精子载体法培育转基因动物的研究中,有的研究者得到了外源 DNA 整合入宿主基因组的转基因动物,但多数研究者得到了外源 DNA 存在于宿主基因组之外的转基因动物(刘红林等,1997)。在 Lavitrano 等(1989)的研究中,某些基因组中整合有外源 DNA 的转基因小鼠中也存在未整合的质粒 DNA。至于用精子载体法培育转基因动物时为什么外源 DNA 难以整合入宿主基因组内,有必要进一步探讨。

3.2 精子介导外源 DNA 进入卵子的可能机理

用精子载体法制作转基因动物省去显微注射法的复杂过程和设备,简化了基因导入过程,而且容易得到大量的转基因个体,所以引起了人们极大的兴趣,已经有很多实验室开展了这方面的研究(刘红林等,1997)。

作者认为,精子介导外源基因进入卵子的机理可能是:当外源 DNA 与精子一起保温时,外源 DNA 进入精子头部,精子通过受精过程将外源 DNA 导入卵子。虽然人们尚不知道外源 DNA 进入精子的确切机制,但已有许多研究者(刘红林等,1997; Patil *et al.*, 1996)通过实验证明外源 DNA 确实能与精子头部结合。一系列的研究证明,许多动物的精子头部都具有结合外源 DNA 的能力,并且用与外源 DNA 竞争结合的多阴离子聚合物洗涤以及用 DNase 消化只能除去部分与精子头部结合的外源 DNA,说明至少有一部分外源 DNA 已经进入了精子头部(Lavitrano *et al.*, 1989; Muller *et al.*, 1992)。当精子使卵子受精时,精子头部的质膜与卵子质膜融合,精子的核和胞质进入卵内,外源 DNA 即可随之进入卵子。其详细机理尚有待进一步研究。

4 结语

泰山赤鳞鱼是泰安地区所独有的一种珍稀鱼种,其肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富,并且具有一定的药用价值,但该鱼生长缓慢,鱼体较小。本实验用精子载体法成功地培育出转入 MT-hGH 基因的泰山赤鳞鱼,可为该鱼的转基因育种奠定初步的实验基础。

参 考 文 献

- 于健康,阎 维,张玉廉等,1994. 精子介导鱼类基因转移和聚合酶链反应检测技术. 动物学报,40(1):96—99
- 刘红林,陈宜峰,1997. 精子介导外源 DNA 转移的研究进展. 生物工程进展,17(2):27—30
- 李国华,崔宗斌,朱作言等,1996. 鱼类精子携带的外源基因导入. 水生生物学报,20(3):242—247
- 奥斯伯 F, 金斯顿 R, 塞德曼 J 等著,颜子颖,王海林译,1998. 精编分子生物学实验指南. 北京:科学出版社,35—36
- Lavitrano M, Camaioni A, Fazio V *et al.*, 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice. *Cell*, 57:717—723
- Muller F, Ivics Z, Erdelyi F *et al.*, 1992. Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1:276—281
- Patil J, Khoo H, 1996. Nuclear internalization of foreign DNA by zebrafish spermatozoa and its enhancement by electroporation. *J Exp Zool*, 274:121—129
- Zhu Z, Li G, Chen S, 1985. Neov gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1785). *Z Angew Ichthyol*, 1:31—34

TRANSFERRING MT-hGH GENE INTO *VARICORHINUS TRACROLEPIS* WITH SPERM AS VECTORS

ZHAI Yu-Mei, LU Pei-Yuan, CUI Bo-Wen, WANG Zhe, SHI Yong-Xiang,
YANG Xiao-Mei, ZHAO Jing, YUE Yong-Sheng[†]

(College of Life Sciences, Shandong University, Jinan, 250100)

[†](College of Animal Science, Shandong Agriculture University, Taian, 271018)

Abstract Transferring MT-hGH gene into *Varicorhinus tracrolepis* with sperms as vectors was carried out from March, 1998 to February, 1999. The *Varicorhinus tracrolepis* sperms were incubated with MT-hGH gene in dilute citrate solution for 30 minutes. Then they were used in artificial insemination. 997 eggs were inseminated with the treated sperms and 755 of them were fertilized. 363 fish were hatched in 3-4 days. When the fish grew to about 5cm, genomic DNA was isolated from 39 fish. The samples were tested by PCR and Southern blot hybridization. The result shows that 7 fish contained MT-hGH gene. The positive rate was about 17.95%.

Key words Sperm vectors, Gene transfer, *Varicorhinus tracrolepis*, MT-hGH gene