

人生长激素基因在团头鲂和鲤中的整合和表达

吴婷婷 杨 弘 董在杰 夏德全

(中国水科院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

史瀛仙 季肖东 沈 玉 孙伟勇)

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

提 要 采用显微注射方法,将带有小鼠 MT-1 基因启动顺序与人生长激素 hGH 基因顺序重组的线状 DNA 片段,注入团头鲂和鲤的受精卵,获得成活的实验鱼。经斑点、Southern 杂交、Northern 杂交、放射免疫和酶联等方法检测,表明外源基因在受体鱼中得到整合、转录、翻译和表达,并具促生长效应。转基因雌鱼和雄鱼有性繁殖所获得的子鱼带有外源基因,表明外源基因能通过性细胞传递给子代,并仍具促生长效应。

关键词 人生长激素基因,整合,表达,促生长效应,团头鲂,鲤

传统的水产养殖是利用选种交配达到育种目的,但是这种方法往往需要经过数代不断选种交配,数年甚至几十年才能培育出优良品种。近十年来,重组 DNA 技术迅速发展,使人们可以在单个基因水平上进行遗传操作,对它们进行剪裁、拼接、修饰和利用,因此遗传育种工作者可以按自己的意志定向地改变生物的遗传结构,创造出自然界原来没有的新品种或品系。

Palmiter 等[1982]将大鼠生长激素基因转移到小白鼠受精卵中,育成体积比正常小白鼠大一倍的“大白鼠”,这项研究为转基因动物育种研究奠定了基础。鱼类具有产卵多,又可控制体外受精、体外发育、获得大量同步卵子等优点,是转基因动物实验研究的极好材料,所以鱼类转基因研究得到了迅速发展[Chourrout 等, 1986; Fletcher 等, 1988; Brem 等, 1988; Maclean 等, 1987; Ozato 等, 1986; Dunham 等, 1987; Zhu 等, 1986; Chen 和 Powers, 1990],其中有的实验室已获得了转基因鱼,少数转基因鱼也能表达蛋白质产物[Chen 等, 1989]。本文以团头鲂和鲤的受精卵为材料,研究人生长激素(hGH)基因在受体鱼中整合、转录、翻译及其生物效应和遗传。

一、材料与方法

1. 实验材料 4—5月繁殖季节,选成熟雌雄团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)或鲤(*Cyprinus Carpio*)注射垂体约2.5 mg/kg 催产,分别收集精液和卵子,干法受精,0.25%的胰蛋白酶消化卵膜或用镊子剥去卵膜,将裸卵移至 Holtfreter 液中,选取质好的裸卵移至手术杯中,在第一次卵裂之前用显微注射法,从受精卵的动物极处注入40ng/ μ l 的线性 MT-hGH

基因1-2nl。显微注射后,卵在 Holtfreter 液中培育,随着胚胎发育,用曝气冷开水逐渐稀释 Holtfreter 液培养胚胎。培育成鱼苗后,移至水族箱饲养约1个月,再移至野外66M²小水池中饲养,每天投饲人工饲料,投饲量为鱼体重的3%。对照组除了不注射基因外,其它处理顺序同实验组。

2. 基因制备 带有小鼠 MT-1 基因启动顺序与人生长激素(hGH)基因顺序重组的环状基因(图1)通过 EcoRI 酶切,将 pBR322 顺序除去,得到 2.6 Kb 的线状融合基因,溶于 Holtfreter 溶液中,浓度为 40ng/ μ l 作为外源基因。

3. DNA 分析 剪鳍条提取 DNA,每个 DNA 样品均取 5 μ g,MT-hGH 基因片段取 100pg 作为阳性对照,与 α -³²P-dATP 标记的 MT-hGH 片段(2.65Kb)的探针杂交(BRL 试剂盒),取斑点杂交阳性的 DNA 样品 10 μ g,用 BamHI 酶切,按常规方法进行 Southern 杂交 [Maniatis 等, 1982]。

4. RNA 分析 取 Southern 杂交阳性鱼的肝脏提取 RNA,每个样品取 10 μ g,按常规方法作 RNA 斑点杂交和 Northern 杂交 [Maniatis 等, 1982]。

5. 基因表达产物的测定 取 Southern 和 Northern 杂交呈阳性的鱼的血清,用放射免疫方法检测血清中人生长激素的含量。

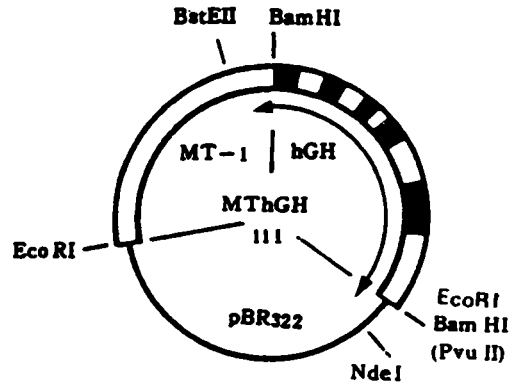


图1 带金属硫蛋白基因启动子的人生长激素基因的质粒

Fig. 1 Map of metallothionein-human growth hormone(MT-hGH) gene plasmid

二、结 果

(一) 团头鲂

以 MT-hGH 线状基因注射 1300 粒团头鲂受精卵,育成幼鱼约 500 尾,成鱼 20 多尾,并对它们进行了检测。

1. DNA 斑点杂交 随机选取 12 尾注射过外源基因的团头鲂,剪取鳍条,提取 DNA 进行斑点杂交,结果 7 号鱼和 10 号鱼呈阴性,其余 10 尾鱼显示阳性(图 2),阳性率为 83%。

2. 外源基因在团头鲂中的转录和翻译 取 DNA 斑点杂交阳性的团头鲂,提取肝脏 RNA,并进行 RNA 斑点和 Northern 杂交,结果检测出 hGH 基因的转录体(图 3),实验结果表明外源基因在受体鱼中具有转录和翻译活性。

3. 外源基因对受体团头鲂生长的影响 二龄试验鱼 13 尾,平均体重 120g,对照组鱼 20 尾,平均体重 90g,其中试验鱼中体重在 100 g 以上的占 92%,对照组仅占 30%(表 1)。生物统计检验,试验组鱼与对照组鱼生长差异显著。实验结果表明饲养二年的转基因团头鲂比对照鱼生长快,证明外源基因对受体团头鲂有促生长效应。

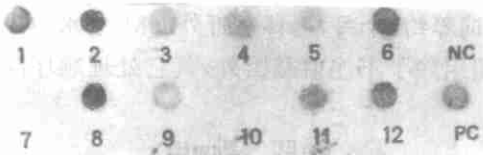


图2 团头鲂实验鱼 DNA 斑点杂交(nc, pc 为阴性及阳性对照;1-12为实验鱼 DNA 样品编号)

Fig. 2 Dot hybridization of experimental blunt-snout bream (nc, pc; negative and positive control; 1-12; samples from experimental fish)



图3 团头鲂实验鱼 RNA 斑点杂交(左)及 Northern 杂交(右)(箭头所指为杂交阳性)

Fig. 3 RNA dot hybridization(left) and Northern blot(right) of experimental blunt-snout bream (Arrows indicating the positive signal)

表1 二龄转基因团头鲂与对照组体重比较

Table 1 Comparison of body weight of transgenic bream and control (two years)

	尾数(N)	体重范围(g)	平均体重(g)	体重>100	t	p
试验鱼	13	50-170	120±28	92%	3.130	<0.01
对照鱼	20	32-160	90±26	30%		

(二) 鲤

注射外源基因的鲤受精卵,育成幼鱼900多尾,最后存活约200尾,对它们进行了斑点、Southern 和 Northern 等检测。

1. 外源基因在鲤中的整合

(1)斑点杂交 随机选取8尾注射过外源基因的鲤,剪取鳍条,提取 DNA,进行斑点杂交。结果有3尾鱼上杂交呈阳性,阳性率为38%。

(2)Southern 杂交 取 DNA 斑点杂交阳性的鲤样品,用 BamH I 酶切,并进行 Southern 杂交,结果在0.77、1.16、2.65、3.78、4.24及4.84 kb 处均有杂交带(图4),2.65 kb 处显示明显杂交带为 MT-hGH 融合基因带。

斑点杂交和 Southern 杂交结果表明,外源基因已整合到受体鱼基因组中。

2. 外源基因在受体鲤中的表达 分别提取 DNA 杂交阳性的3尾转基因鲤和3尾 DNA 杂交阴性的注射了基因的鲤血清,通过酶联法,测定其血清中 hGH 的含量(中科院细胞生物学研究所协助检测)。在 DNA 杂交阳性的3尾鱼中,在一尾鱼上未测出 hGH,其余二尾 hGH 浓度

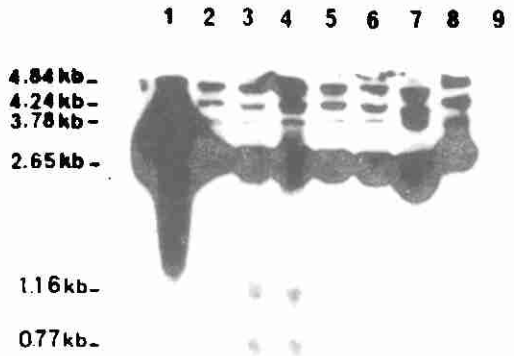


图4 实验鲤总 DNA 的 Southern 杂交 1:阳性对照; 8:阴性对照; 2-7斑点杂交阳性的实验鱼样品

Fig. 4 Southern hybridization of DNA isolated from experimental carps (1; positive control; 8; negative control; 2-7; samples from dot hybridization positive experimental carps)

分别为0.42和0.92ng/ml;3尾阴性对照鱼中,只有一尾鱼上测出hGH的浓度为0.4ng/ml,血清中的hGH浓度反映基因表达水平,这结果表明了注射外源基因的转基因鲤鱼具有合成人生长激素的能力。

3. 外源基因对受体鱼的生长影响 转基因鲤和对照鱼饲养二年后,试验鱼15尾,平均体重为513 g,对照组21尾,平均体重为354 g,试验鱼约为对照鱼体重的1.5倍,其中试验鱼体重在400 g以上的占73%,对照组只占10%(表2)。生物统计检验,试验鱼与对照组鱼生长差异显著。实验结果表明外源生长激素基因对鲤具有显著的促生长效应。

表2 二龄转基因鲤与对照鱼体重比较

Table 2 Comparison of body weight of transgenic carps and control (two years)

	尾数 (N)	体重范围 (g)	平均体重 (g)	体重>350g	体重>400g	t	p
试验鱼	15	280-940	513±199	87%	73%	3.068	<0.01
对照鱼	21	300-420	354±36	52%	10%		

(三) 鲤鱼一代(F₁)

1. 外源基因在子一代上整合 转基因鲤雌鱼和雄鱼有性繁殖后,在子一代中取23尾作DNA斑点杂交,结果有17尾鱼呈杂交阳性,阳性率为74%。

随机选取子一代斑点杂交阳性的6个样品作Southern杂交,在2.6kb处均呈杂交带(图5)。

从实验中看到,转基因鲤的子一代中,具有斑点杂交和Southern杂交均呈阳性的个体。这表明转基因鲤通过性细胞能把外源基因遗传给子代。

2. 外源基因在子代中保持转录的活性 随机选取呈Southern杂交阳性的鱼,从其肝脏提取RNA作RNA斑点杂交和Northern杂交,检测外源基因能否在子一代中保持转录的活性。实验结果呈阳性(图6),这表明转基因鲤不但能将外源基因传给子代,而且外源基因在子一代中仍保持转录活性。

3. 外源基因在子一代中的表达 取转基因鲤鱼子一代血清,用放射免疫法测定血清中人生长激素(hGH)浓度(北京神经外科所协助检测),分析外源基因能否在子代中表达。子一代血清中hGH浓度为11.64ng/ml,这比对照组鱼0.22ng/ml浓度高,这表明转基因鲤鱼子一代能合成人的生长激素,证实了外源基因能在子一代中表达。

4. 转基因鲤鱼子一代快速生长效应 饲养一年半的转基因鲤鱼子一代20尾,体重在230-500 g,平均体重为356 g;对照鱼21尾,体重为170-280 g,平均体重223 g,这表明转基因鲤鱼子一代比对照鱼生长快。实验结果表明外源基因可通过性腺细胞传递给子代,对子代鱼具有促生长效应。

- catfish. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **116**:87-91.
- [5] Fletcher, G. L. *et al.*, 1988. Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aqua. Sci.*, **45**:352-357.
- [6] Maclean, N. *et al.*, 1987. Introduction of novel genes into fish. *Bio/Technology*, **5**:257-261.
- [7] Maniatis, T. *et al.*, 1982. Molecular Cloning—a laboratory manual, 199-205, 387-389. Box, 100. Cold Spring Harbor, New York.
- [8] Ozato, K. *et al.*, 1986. Production of transgenic fish; Introduction and expression of chicken α -crystalline gene in medaka embryos. *Cell Differ. Dev.*, **19**:237-244.
- [9] Palmiter, R. D. *et al.*, 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein growth hormone fusion gene. *Nature (London)*, **300**:611-615.
- [10] Zhu, Z. *et al.*, 1986. Biological effects of human growth hormone gene microinjected into the fertilized eggs of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Kexue Tongbao, Academia Sinica*, **31**:988-990.

THE INTEGRATION AND EXPRESSION OF HUMAN GROWTH GENE IN BLUNT SNOUT BREAM AND COMMON CARP

Wu Tingting, Yang Hong, Dong Zaijie and Xia Dequan

(*Freshwater Fisheries Research Center, CAFS, Wuxi 214081*)

Shi Yingxian, Ji Xiaodong, Shen Yu and Sun Weiyong

(*Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

ABSTRACT Linealized DNA fragments recombined out of the mouse gene promotor MT-1 and human growth hormone gene were microinjected into the fertilized eggs of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) and common carp (*Cyprinus carpio*) respectively. By the inspecting methods of the dot blot, the Southern blot, the radioactive immunities and the enzymelinked immunosorbent assay, the integration, transcription, expression and growth promoting effect of the foreign genes in the receptive fish were confirmed. The sexually-reproduced F₁ offsprings from transgenic male carps and female carps carry the foreign genes, thus showing that the foreign genes can be transmitted into F₁ offsprings and have growth promoting effect.

KEYWORDS human growth hormone gene, integration, expression, growth promoting effect, blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*, common carp, *Cyprinus carpio*