



转红色荧光蛋白基因 唐鱼研究

Generation of RFP Transgenic
White Cloud Mountain Minnow

白俊杰 姜 鹏 等 著



海洋出版社

转红色荧光蛋白基因唐鱼研究

Generation of RFP transgenic white cloud
mountain minnow

白俊杰 姜 鹏 等著

海洋出版社

2014 年 · 北京

内容简介

随着转基因技术的进步,越来越多的转基因鱼研究以及转基因鱼的安全性评估工作得以开展。本书正是在将红色荧光蛋白基因成功转入小型观赏鱼唐鱼体内,获得稳定遗传的转基因鱼的基础上,开展了转基因唐鱼的生物学研究和生态安全评估,获得了转基因鱼的构建和安全评估的第一手资料。全书共分四章,分别介绍了转红色荧光蛋白基因唐鱼的构建研究,遗传表达特征分析和生物安全性评价。同时还介绍了构建转基因鱼采用的技术和生态安全评价方面的研究进展。本书可供从事转基因研究的科技人员使用,亦可作为高等院校生命科学、生物工程专业的师生教学的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

转红色荧光蛋白基因唐鱼研究/白俊杰等著. —北京:海洋出版社, 2014. 1

ISBN 978-7-5027-8731-8

I. ①转… II. ①白… III. ①转基因鱼—观赏鱼类—研究 IV. ①Q789

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 267808 号

责任编辑:方菁

责任印制:赵麟苏

海洋出版社 出版发行

<http://www.oceanpress.com.cn>

北京市海淀区大慧寺路 8 号 邮编:100081

北京旺都印务有限公司印刷 新华书店发行所经销

2014 年 1 月第 1 版 2014 年 1 月北京第 1 次印刷

开本:787mm×1092mm 1/16 印张:7.75

字数:140 千字 定价:48.00 元

发行部:62132549 邮购部:68038093 总编室:62114335

海洋版图书印、装错误可随时退换



首代转红色荧光蛋白基因唐鱼呈现嵌合体



转红色荧光蛋白基因唐鱼



野生型唐鱼



可稳定遗传的转红色荧光蛋白基因唐鱼品系



转基因唐鱼饲养系统

前 言

自 1984 年我国学者在世界上获得第一批转基因鱼以来,许多研究者把转基因技术作为鱼类育种的一种新途径,以期获得快速生长、抗逆性强的转基因鱼新品种。近几年,随着组织特异性启动子和荧光蛋白的开发与应用,有学者将转基因技术应用于观赏鱼领域,利用荧光蛋白在鱼类肌肉组织中的高效表达改变鱼类本身的体色,且在紫外光照射下可自发荧光,提高了观赏价值。最为成功的是新加坡国立大学官知远团队研制的转荧光蛋白基因斑马鱼,使斑马鱼的体色改变成红色和绿色,成为独特的观赏鱼品系,并获得批准在美国部分地区的观赏鱼市场出售。

唐鱼,又名“白云金丝鱼”,是原产于我国华南地区的一种小型鲤科淡水鱼类,生活在山涧和小溪流中,由于环境和栖息地的变迁,唐鱼在野外已几乎灭绝。作为观赏鱼,唐鱼已经广泛在国内、东南亚、北美、西欧和非洲等国家和地区养殖,深受观赏鱼爱好者的喜爱。从 2003 年开始,我们在国家科技基础条件平台项目、国家高技术研究发展计划、广东省科技计划项目、广东省科技重点引导项目等的资助下,进行了转红色荧光蛋白基因唐鱼的构建,获得了可稳定遗传的转红色荧光蛋白基因唐鱼品系。开展了转基因唐鱼形态学特征、遗传学特性、外源基因遗传稳定性、繁殖能力、抗逆性以及野生型唐鱼的生存竞争力等方面的研究。本书是在这些研究工作的基础上对转红色荧光蛋白基因唐鱼遗传育种和生态安全特性的理论和实践进行总结。然而当今新的转基因理论和技术不断呈现,给科学工作者提供了新的机遇和挑战。由于我们的研究积累和水平有限,错漏在所难免,敬请广大读者批评指正。

全书共分四章,第一章概述了转基因鱼的研究进展;第二章是转红色荧光蛋白基因唐鱼的研制;第三章介绍转红色荧光蛋白基因唐鱼的遗传表达特征;第四章是转红色荧光蛋白基因唐鱼的安全性评价。参加本书的主要编著人员为:白俊杰、姜鹏、简清、叶星、樊佳佳、陈敏和吴晗;另外参与编写的人员还有夏仕玲、罗建

仁、马冬梅、劳海华、于凌云、王海英、李胜杰、高风英和田园园等。

最后我们要特别感谢夏仕玲女士在转基因操作和实验鱼的管理方面所付出的努力,是她娴熟的转基因操作技术使我们的实验得以顺利进行,感谢观赏渔业研究室胡隐昌、刘超和杨叶欣等在转基因唐鱼繁育和安全评估工作中给予的支持和帮助,感谢水产生物技术研究室黄灼明、陈小曲和刘海涌等在本书相关研究实验中所做的准备工作,以及对实验鱼饲养和管理所付出的辛勤劳动。

白俊杰 姜鹏

2013 年 6 月

目 次

第一章 概 述	(1)
第一节 转基因鱼类的应用研究	(1)
第二节 几种常用的鱼类转基因方法	(6)
第三节 转基因鱼类生态安全的研究进展	(10)
第四节 转红色荧光蛋白基因唐鱼研究背景与现状	(15)
第二章 转红色荧光蛋白基因唐鱼的研制	(24)
第一节 <i>Mylz2</i> 启动子的克隆和序列分析	(24)
第二节 红色荧光蛋白表达载体的构建	(28)
第三节 转红色荧光蛋白基因唐鱼的研制	(31)
第三章 转红色荧光蛋白基因唐鱼的遗传表达特征	(35)
第一节 红色荧光蛋白基因在转基因唐鱼组织中的表达特征 ..	(35)
第二节 转红色荧光蛋白基因唐鱼的遗传分析	(40)
第三节 红色荧光蛋白基因在转基因唐鱼中的整合分析	(43)
第四节 红色荧光蛋白基因拷贝数的测定	(50)
第五节 红色荧光蛋白基因在转基因唐鱼中遗传和表达的 稳定性分析	(56)
第四章 转红色荧光蛋白基因唐鱼的安全性评价	(66)
第一节 转红色荧光蛋白基因唐鱼的生物学特征	(66)
第二节 转红色荧光蛋白基因与野生型唐鱼耐温 限度及窒息点的比较研究	(70)
第三节 pH 对转红色荧光蛋白基因唐鱼受精卵 孵化和仔鱼存活的影响	(74)
第四节 非离子态氨对转红色荧光蛋白基因唐鱼 的毒性研究	(78)
第五节 食物供应量对转红色荧光蛋白基因唐鱼 生存和生长的影响	(82)

第六节	转红色荧光蛋白基因唐鱼与野生型唐鱼 之间集群选择行为	(87)
第七节	转红色荧光蛋白基因唐鱼对野生型唐鱼 性选择的影响	(94)
第八节	转红色荧光蛋白基因唐鱼与非转基因唐鱼 肌肉营养成分的分析和比较	(99)
第九节	转红色荧光蛋白基因唐鱼肌肉中抗生素标记 基因 <i>NPT</i> II 检测表达分析	(103)
附录:	转红色荧光蛋白基因唐鱼的繁育和养殖技术	(113)

第一章 概述

第一节 转基因鱼类的应用研究

20 世纪 80 年代我国成功地培育了世界上首例转基因鱼 (Zhu, et al, 1985)。经过了 20 多年的努力,转基因鱼研究已有了长足发展。与哺乳类相比,鱼类的怀卵量大、胚胎经基因转移操作后不需放回母体内培育,且携带的与人类相关的病原体较少,因此硬骨鱼类成为脊椎动物生物学的理想模型动物之一。转基因技术极大地促进了发育生物学、遗传学与生理学等基础学科研究的纵深发展。在应用研究方面,通过转基因技术可培育经济性性状得到改善的鱼类新品种,以提高其生长速度和饲料转化率、改善品质、增强抗性等;转基因鱼可作为生物反应器表达生产重要药物或生物活性物质;通过转基因改变观赏鱼的表型,提高其观赏价值等。曾有学者预测,鱼类将是首先进行商业性应用的转基因动物 (Zbikowska, 2003)。2012 年 12 月,美国食品和药物管理局 (FDA) 公布了一份针对转 *GH* 基因大西洋鲑 (*Salmo salar* L.) 的评估草案,草案认为由美国 AquaBounty 公司研制的“转 *GH* 基因大西洋鲑”不会对人类健康或环境构成威胁,FDA 正听取公众的评议 (<http://www:AquaBounty.com>; <http://www.fda.gov>)。

相关信息说明转基因鱼成为第一种商用化的转基因动物的预言将很快成为现实。相信转基因鲑的商用化将极大地推动世界各国转基因鱼的应用研究与商用化的进程。本节就转基因鱼应用研究中相关技术的发展进行简要介绍。

一、转生长激素基因鱼与转荧光蛋白基因鱼

已报道的开展转基因研究的鱼多达 30 多种,包括经济鱼类与小型鱼类 (Beardmore, 1997)。经济鱼类的转基因研究主要集中在生长、抗寒及抗病等性状,以生长激素、抗冻蛋白、抗菌肽和溶菌酶等为目的基因,研究对象包括鲑鳟类、鲤、鲫、泥鳅、罗非鱼、斑点叉尾鲷、草鱼等;小型鱼类则以改变表型为主,红色或绿色荧光蛋白基因为常用基因,研究对象包括生命周期较短、易在实验室中饲养的小型鱼或观赏鱼,如斑马鱼、青鳉、唐鱼和神仙鱼等。在众多转基因鱼的研制中,转生长激素 (*GH*) 基因鱼和转荧光蛋白基因鱼的研制成绩斐然。

我国转 *GH* 基因鲤的研究取得了较好的进展。目前中国科学院水生生物研究所已建立了 5 个稳定遗传的、具有快速生长效应的转“全鱼”*GH* 基因黄河鲤 (*Cyprinus carpio*) 家系 (Hu, et al, 2010), 其中一个转“全鱼”*GH* 基因鲤品系 F_1 代的平均体重是对照鱼的 1.6 倍; F_2 的平均体重是对照鱼的 1.8 ~ 2.5 倍, 特定生长率比对照鱼高出 10% ~ 13%。除生长速度快之外, 转基因鲤的饵料利用率也较高 (汪亚平等, 2001; 李德亮等, 2007)。中国水产科学研究院黑龙江水产研究所使用鲤金属硫蛋白基因启动子与大麻哈鱼 *GH* 基因, 培育出转基因黑龙江鲤, 其中最大个体的体重超出对照鱼的 1 倍, 转植基因可遗传给子代 (孙效文等, 2002), 现已建立了快速生长转基因黑龙江鲤核心群家系, 并开展转基因鱼食用与环境安全的各项评价实验 (闫学春等, 2005; 耿波等, 2007; 梁利群等, 2010)。

美国将美洲大鲈 (*Macrozoarces americanus*) 的抗冻蛋白基因 *AFP* 的启动子与大鳞大麻哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*) 的 *GH* 基因转植于大西洋鲑中, 经过 15 年的时间培育了一个快长转 *GH* 基因大西洋鲑品系。养殖该转基因鲑达上市所需要的时间可比野生型鲑缩短 1 年, 并已建立了不育、全雌转基因鲑培育技术, 全雌不育个体在内陆封闭式水环境中养殖可完全解决转基因鲑的生态环境安全问题。转基因鲑目前已通过了 FDA 的一系列评估与审查, 正等候 FDA 的批文。美国转基因银大麻哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*) 的研究也获得成功, 将“全鲑”转基因构件 (pOnMTGH1), 即来自红大麻哈鱼 (*Oncorhynchus nerka*) 的金属硫 *mMT-B* 启动子与 *GH-I* 全长基因, 转植于银大麻哈鱼中, 转基因鱼的平均体重是对照鱼的 11 倍, 最大的可达 37 倍 (Devlin, et al, 1994)。古巴培育的转 *GH* 基因 (CMV-tiGH-SV40) 荷那龙罗非鱼 (*Oreochromis hornorum*) 品系 F70, 生长速度比野生型的快 60% ~ 80%, 已通过了该国有关食品安全评价并列入古巴的水产养殖计划中 (Guillén, et al, 1999)。快长转 *GH* 基因鱼的培育对于提高养殖产量与养殖经济效益、缓解世界粮食紧缺问题具有十分重要的意义。

转基因观赏鱼方面, 转荧光蛋白基因斑马鱼 (*Danio rerio*) 作为第一种上市的转基因动物已于 2004 年获批在美国市场作为观赏鱼销售 (Beardmore, et al, 2003); 中国水产科学研究院珠江水产研究所的转红色荧光蛋白基因唐鱼 (*Tanichthys albonubes*) 也已获得成功, 由斑马鱼 *Mylz2* 启动子驱动红色荧光蛋白基因在唐鱼中高水平表达, 普通光下肉眼即可观察到转基因鱼体表的红色荧光, 目前已建立转红色荧光蛋白基因唐鱼可遗传品系, 并已获得农业部环境释放和生产性试验的批准。最近有消息报道台湾的转荧光蛋白基因神仙鱼 (*Pterophyllums carale*) 也已获得成功, 通过转植荧光蛋白基因提高了观赏鱼的观赏性同时也显著地提高了其经济价值。

二、转植基因的整合特征

经显微注射获得的转基因鱼常导致外源基因以不同拷贝数目整合于染色体的多个位点,而且外源基因整合到受体基因组的时间多不在单细胞阶段的胚胎,导致外源基因只是整合到某些组织或组织中的部分细胞中,即嵌合性整合,导致转植基因的低遗传率(Gross, et al, 1992; Hackett, 1993)。另一方面,整合位点对基因的表达与功能的发挥有着直接影响,因此随机整合可使转基因首代及子一代产生多种不同的表型,从中有可能挑选到适合的表型。如使用相同的转基因元件获得的转基因银大麻哈鱼的平均体重是对照鱼的11倍,但体重增长的分布范围从零增长到最大的37倍(Devlin, et al, 1994),这可能就与整合位点效应有关。随着对转植基因结构与功能的了解,增加某些元件如边界元件(Border elements)可对宿主染色体位置效应起缓冲作用。

应用普通显微注射方法时,转植基因在整合前易于末端连接形成多拷贝,一个整合位点上转植基因的拷贝数可由1个到上千个不等,连接方式除了“头—尾”连接外,其他方式也均有出现(Zhu, et al, 1985; Tewari, et al, 1992; Devlin, et al, 2009),转植基因可整合于染色体的单个位点或多个位点上。对一例转GH基因大西洋鲑的转植基因序列分析显示有两个重排拷贝整合在35 bp重复序列中(Yaskowiak, et al, 2006),整合的序列与注射的序列相同,并且传4代后也没有发生改变。在银大麻哈鱼中发现整合的基因由4个完整的转植基因序列和两个部分序列以随机方式(头—尾)连接组成(Uh, et al, 2006)。但多拷贝的插入常会导致表达效率的下降,甚至对宿主有害(Devlin, et al, 2009; Garrick, et al, 1998)。对转“全鱼”基因鲤的分析也显示较低拷贝数的基因整合可有较高水平的基因表达,且较易获得稳定遗传(Hu, et al, 2010)。对转基因露斯塔野鲮(*Labeo rohita*)整合位点的分析中发现:有两尾转基因鱼具有极相似的整合位点,此位点可能是该物种偏好的位点(Rajesh, et al, 2005),表明受体基因组可能存在外源基因的插入热点(hot-spots)。

三、转基因构件与转基因的生物效应

外源基因转植到受体鱼中需要的转基因构件包括启动子及相关调节序列、目的基因和终止信号3个基本结构。与哺乳类相似,鱼类的生长调控主要由生长激素(GH)——胰岛素样生长因子I轴(GH-IGF-I axis)调节。鱼类GH具有调节生长和影响蛋白质、糖及脂肪代谢等作用,此外对免疫系统、生殖生理及海水适应性也有着重要的作用(朱作言等, 1989)。提高养殖鱼类的生长速度意味着提高养殖的效益,因此GH基因是转基因鱼类研究中最主

要的目的基因。许多养殖鱼类品种对 *GH* 基因的转植或处理均可产生强烈的促长反应,而家养的哺乳动物转植 *GH* 基因只能小幅提高生长速度,且易导致生理或形态上的异常。有观点认为这主要是由于家养动物经历了对生长性状的长期选择而限制了其对 *GH* 的进一步的反应(Devlin, et al, 2009; Guyomard, et al, 1989)。

转 *GH* 基因鱼的研究过程也反映了转基因构件的发展历史。早期的转 *GH* 基因鱼的研究多使用哺乳类的 *GH* 基因,后来发现,使用由小鼠金属硫启动子与大鼠 *GH* 基因构建的转基因元件可使转基因小鼠个体增大 1 倍,但转植于鱼类却没有或仅有极弱的促长作用(Devlin, et al, 1995),说明远源基因在受体鱼细胞中可能存在着表达调控与生物学效应的限制。另一方面由于经济鱼类转 *GH* 基因的最终目的是食用,需考虑其食用安全与生态安全问题,因此出现了“全鱼”基因构件的概念并开始了开发研究(Devlin, et al, 1994; 朱作言等, 1989)。将由美洲大鲈的抗冻蛋白基因 *AFP* 的启动子与大鳞大麻哈鱼的 *GH* 基因构建的转基因构件,转植于银大麻哈鱼,养殖 15 个月 after 转基因鱼的平均规格是对照鱼的 10 倍,最大的达 30 倍;使用相同的转基因构件转植于虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、克氏鳟(*Oncorhynchus clarki*)和大鳞大麻哈鱼也均显著提高了受体鱼的生长速度(Rahman, et al, 1998)。但上述相同的转基因构件转植于尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*),在所构建的多个品系中,只有一个整合单拷贝 *GH* 基因的品系养殖 7 个月后体重显著增大,为对照鱼的 2.5 倍(Martínez, et al, 1996);使用哺乳类巨细胞病毒 CMV 启动子和罗非鱼 *GH* cDNA 获得的转基因鱼养殖 7 个月后其生长速度为对照鱼的 1.8 倍(王海英等, 2008);转植鲤 MT 启动子与大麻哈鱼 *GH* 的转基因鲤,其中一尾转基因鱼的生长速度是对照鱼的 2 倍,转植基因可遗传给子代,子代也显示快速生长效应(孙效文等, 2002)。这些结果提示转基因构件须考虑与受体鱼的亲缘关系,使用同源或亲缘关系较近的转基因构件将有助于转植基因的有效表达。已知鱼类的 *GH* 序列分析显示,分类上亲缘关系较近鱼类间 *GH* 基因序列具有较高的同源性,如鲤科鱼类种间 *GH* 基因编码区的相似性高达 84% ~ 93%, 5'调控序列的相似性也高达 73%。亲缘关系较远的鱼类序列的同源性则明显较低,如罗非鱼和虹鳟的相似性为 66%,草鱼和鲢鳙类的相似性仅为 43.4% ~ 82.5%。转植的 *GH* 基因在受体鱼中能否发挥其预期的生物学效应与转录表达水平有关,也可能与表达产物能否与受体鱼特定受体有效结合有关,因此在选择目的基因来源时应考虑与受体鱼的亲缘关系。

启动子作为转基因构件的重要元件之一,与目的基因相似也经历了从异源、远源到近源、自源序列的变化。早期使用的启动子多为哺乳类或病毒来源,如小鼠金属硫蛋白(mMT)、猴空泡病毒(SV40)和劳氏肉瘤病毒

(RSV)等的启动子,后来采用鱼源的启动子,如鱼 β 肌动蛋白(β -actin)、抗冻蛋白(AFP)、鲤金属硫蛋白(mMT)等基因的启动子(Liu, et al, 1989)。 β -actin 基因为管家基因,其启动子具有广泛启动表达功能,是研究与使用最多的启动子之一。作为第一个被分离到的鱼类强启动子,鲤 β -actin 启动子的结构与转录活性的研究较深入(Moav, et al, 1995)。研究显示,除了位于转录起始位点上游 100 bp 左右的 CAAT、TATA 框等基本调控元件外, β -actin 基因可能还有更多的正调控或负调控元件,分布于近端或远端序列的不同区域,因此不同长度的 β -actin 启动调控序列具有不同的启动活性。如 1.5 kb 的鲤 β -actin 启动子(c β AP)的活性强于 4.7 kb 鲤 β -actin 启动子(c β AP)(Liu, et al, 1990; Hwang, et al, 2003),而 3.0 kb 的唐鱼 β -actin 基因启动子则比长度为 1.7 kb 的启动调控序列具有更强的驱动活性(王海英等, 2008)。美洲大鲈的抗冻蛋白基因启动子 *op5a* 应用于大西洋鲑转 *GH* 基因研究中,其中一个品系具有显著的促长作用。对转基因鲑外源基因的整合研究显示长度为 2 115 bp 的启动子序列的前 1 579 bp 被删除并重置于 *GH* 编码序列的下游。通过报告基因比较了启动子长度变化对转录活性的影响,发现除了长度小于 266 bp 的启动子序列在鲑细胞的表达远强于人细胞外,其他各种长度的启动子的活性相似,说明存在于启动子的转录上调或控制区域,使得基因表达的调控可发生于多个位点。同时发现删除前端 1 579 bp 导致报告基因的表达量下降 70%,而将此删除片段连接于报告基因的下游只能恢复大约 10%,说明转植基因在受体鱼内的表达是依靠 5' 残缺的启动子序列与重置于下游的 5' 启动子序列的共同作用(Butler, et al, 2009)。由于启动子的转录因子结合位点与数量、种类及增强子位置等的不同物种、不同基因可有很大变化,因此需要通过转录活性检测加以确定。

由于启动子的驱动强度受多个调控因子的影响,使用异源启动子可能会导致外源基因表达量低下(Higashijima, et al, 1997; Kinoshita, et al, 2003),如上面提到的使用红大麻哈鱼 *mMT-B* 启动子和全长 *GH-I* 基因虽可显著提高鲑的生长速度,却未能提高尼罗罗非鱼的生长速度(闫学春等, 2005);使用鲤 β -actin 基因启动子和荷那龙罗非鱼内含子的 *GH* 基因作为转基因构件进行转基因斑马鱼研究,转基因鱼 F_1 的生长速度提高不明显(Morales, et al, 2001)。自源转基因(Autotransgenic)和异源转基因(Allotransgeneic)概念是为了规范转植基因的名称而提出(Beardmore, 1997),近年自源转基因鱼的研究也已取得进展。如使用来自于泥鳅(*Misgurnus mizolepis*)的 β -actin 启动子和 *GH* 基因的“全鱼”基因构件,进行自源基因转植,得到了个体大小是非转基因泥鳅 30 倍的转基因泥鳅(Nam, et al, 2001)。使用来自露斯塔野鲮的 *histone3* 启动子和 *GH* 基因的转基因构件,获得转自源基因露斯塔野鲮(Rajesh, et al, 2005)。使用唐鱼 β -actin 基因启动子和唐鱼

GH 基因组成的转基因构件获得个大快长的转自源 *GH* 基因唐鱼。养殖 100 d 实验组最大个体体重是对照组最大个体体重的 2.1 倍,是对照组平均体重的 3.0 倍(Yu, et al, 2010)。

转录终止子是转基因构件中的另一个元件。商品化的转基因表达载体常使用 SV40 终止信号序列,如 pDsRed2-1、pEGFP 等。使用鲤 β -actin 基因终止子和 *GH* 基因终止子分别构建了“全鱼”转基因元件并进行显微注射,转“全鱼”*GH* 基因鲤可快速生长,且使用 *GH* 基因终止子比使用 β -actin 基因终止子具有更强的促生长活性(钟山等, 2009)。综上所述,转基因元件选择“全鱼”基因或“自源”基因,可降低生态安全与食品安全方面的顾虑,也可提高基因表达效率与生理功能的发挥。随着鱼类基因组测序、转录组及蛋白质组等研究工作的开展,目标基因的鉴定将更加便利,可促进对更多性状进行转基因研究。

转基因鱼转植 *GH* 基因的促长效应主要是通过提高胰岛素样生长因子 *IGF-1* 的水平来实现的。在转基因罗非鱼的肝中 *IGF-1* 合成细胞较多、*IGF-1* 蛋白与 mRNA 水平均较高,肌肉中 mRNA 水平是对照鱼的 2 倍;同时肝和血液中有高水平结合状态的 *IGF-1*,而结合状态的 *IGF-1* 降低了游离 *IGF-1* 与其受体的结合,说明 *IGF-1* 能以自分泌和旁分泌的形式激活而促进生长(Eppler, et al, 2010),而转 *GH* 基因银大麻哈鱼血液中 *IGF-1* 的水平则只有轻微改变;对另一个转基因银大麻哈鱼品系的研究显示血液和肝 *IGF-1* mRNA 持续增加,在肝外组织中也发现有 *IGF-1*(Raven, et al, 2008),可能与转 *GH* 基因罗非鱼一样可以自分泌/旁分泌的形式起作用。另一方面,*GH* 水平的升高可能会干扰 *GH* 受体信号的传导,导致难于起到促长效应。血液循环中过高的 *GH* 水平会抑制具有生物活性的二聚体的形成,进而阻碍具活性的 *GH* 受体复合体的形成。低水平 *GH* 能较好地结合受体从而达到较高的促长活力,当然也不能排除存在 *IGF* 受体或 *GH* 和 *IGF* 的结合蛋白方面的调节机制。因此转 *GH* 基因鱼中 *GH* 水平升幅较小的个体可能比升幅较大的个体有更好的生长表现,*GH* 的过量表达会由于多效性导致存活率下降或畸形,在抗病、代谢、内分泌、器官结构及游泳能力等方面出现异常(Raven, et al, 2008),因此转基因鱼品系的挑选与建立还需综合考虑 *GH* 的表达水平、插入基因的拷贝数等,实际操作上工作量较大。

第二节 几种常用的鱼类转基因方法

上一节介绍了转基因鱼研究中相关技术的发展,这一节对常用的鱼类转基因方法进行介绍。鱼类转基因的方法有物理、化学和生物学方法,包括显微注射法、精子载体介导法、电转移法、基因枪法(又称微弹轰入法)、染色

体片段显微注入法、胚胎干细胞介导法、病毒介导法(包括反转录病毒法和 DNA 病毒法)、磷酸钙共沉淀法、脂质体融合法、DEAE-葡聚糖法、激光处理法等(楼允东, 1997)。其中显微注射法、精子载体介导法和电转移法等鱼类转基因研究中使用较多。

一、显微注射法

显微注射法是将重组 DNA 通过特制的显微注射装置直接注射到受精卵的雄性原核(哺乳动物)或第一次卵裂前的受精卵动物极胞质内(鱼类),是目前使用最广泛、效果最好的一种方法。该方法最早由 Gordon 发明(Gordon, et al, 1980)。“超级小鼠”和首例转基因鱼都是采用该方法得到的。其优点是所转移的基因大小不受限制,其生殖系遗传和转基因表达效率均较好,经显微注射后存活胚胎中约有 5% 的整合效率。缺点是操作技术要求高、工作量大、操作的最适时机短,不适于向发育后期的胚胎转移基因(Palmiter, et al, 1985)。用这种方法转基因时,外源基因的整合行为最复杂,因此对整合位点顺序较难于克隆和分析。

二、精子载体介导法

精子载体介导法是利用动物精子具有自发结合和内化转运外源 DNA 能力的特点,并使其在受精时导入卵母细胞,获得转基因动物。精子能准确地与雌性原核结合,若以精子为载体就可以将外源基因定向地导入受精卵的细胞核。精子能将外源 DNA 带入受精卵的现象 1971 年就被 Brackett 等发现(Brackett, et al, 1971),后由 Lavitrano 等发展为一种新的基因转移技术(Lavitrano, et al, 1989)。与显微注射法相比,该方法操作比较简单,但存在阳性率低、转移率不稳定等不足之处(李国华等, 1996)。Zoraqi 等对此进行过研究,发现外源基因与小鼠精子的核骨架紧密相连,整合到了精子的基因组,整合过程属于非同源重组(Zoraqi, et al, 1997)。Mabnano 等也进行过类似的研究,同样发现外源 DNA 与小鼠精子核骨架相连,已与精子染色体 DNA 发生重组,外源基因整合在精子基因组的单一位点。外源基因能整合到小鼠精核,这是无疑的了,但整合过程是否同源重组,整合位点专一还是随机的,有待进一步研究。

三、电转移法

电转移法也称电脉冲法或电场转移基因法,其原理是短时电脉冲可引起细胞膜产生短暂的微孔, DNA 由此进入细胞内。电脉冲转移法最初用于向动物和植物的培养细胞导入外源基因,后来有研究者将之应用于鱼类转

基因研究(谢岳峰等, 1989; Sin, et al, 1995)。具体有两种操作方法:一是将 DNA 直接导入受精卵;二是先将 DNA 导入精子,然后用这种精液受精。用这两种方法都可以得到转基因鱼。这种方法操作简便,重复性好,适于大规模生产。胡炜等(1999)将此方法应用于海水贝类的转基因研究,取得了满意的成果。但这种基因转移的确切机制还不明了,也未对外源基因的整合情况做深入研究。

四、胚胎干细胞法

胚胎干细胞(ES 细胞)是能体外培养并保持未分化状态的早期胚胎细胞,将其注射到受体早期胚胎的囊胚腔,ES 细胞就可以参与胚胎发育并形成嵌合体(Stewart, et al, 1981)。如果 ES 细胞的基因组用定点整合方法进行了修饰,这种策略就叫“基因打靶”。基因打靶在小鼠已经广泛开展(McPherron, et al, 1997),但未能适用于其他物种,因为到目前为止只建立了小鼠的 ES 细胞系。基因打靶代表了转基因技术的发展方向,研究者们正在尝试建立各种动物的 ES 细胞系,并取得了可喜的进展,Hong 等(1996)获得了青鳉的类 ES 细胞。一旦鱼类 ES 细胞系建立起来,结合定点整合技术,各种转基因鱼纯系就可以方便地建立起来。

五、体细胞核移植

某些已经分化的体细胞和培养细胞的细胞核在卵细胞环境中可以再程序化(reprogram),指导去核卵子的发育。核移植后代继承了供体核所携带的遗传信息。如果供体核来自于转基因动物体细胞或转基因的培养细胞,核移植后代就是纯合的转基因动物,这种策略类似于 ES 细胞法。虽然核移植的效率很低,只有千分之几,但对于尚未建立 ES 细胞系的大多数动物及产卵量巨大、核移植操作相对容易的鱼类来说,是建立转基因动物纯系的有效途径之一。鱼类的核移植在我国有悠久的历史 and 雄厚的技术基础(童第周等, 1963; 陈宏溪等, 1986)。核移植转基因鱼是纯合子,但外源基因的整合位置仍然由供体核内外源基因的整合状态决定,因此建立外源基因定点整合的转基因鱼纯系还需要定点整合的培养细胞。

六、其他方法

磷酸钙-DNA 共沉淀法的原理是改变细胞膜的通透性,以增强细胞从培养液中摄取外源 DNA 的能力。此方法优点是操作简单,缺点是转移效率低。李金花等利用此方法成功地将抗新霉素基因转移到了草鱼肾细胞中(李金花等, 1991)。