

人生长激素基因在转基因鲤鱼体内的遗传

魏彦章 谢岳峰 许克圣 李国华 刘东

邹钧 李金花 朱作言

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

通过有性繁殖转移人生长激素基因鲤鱼(P₁), 获得了转基因鲤鱼的子一代(F₁)和子二代(F₂); 外源基因在转基因P₁与普通鲤鱼杂交产生的F₁代和转基因F₁代自交产生的F₂代鱼中的存在率分别为45.4%和66.7%; 外源基因拷贝数在子代个体之间存在很大差异, 从每细胞2拷贝到每细胞200拷贝不等; 外源基因在转基因鱼子代中仍可表达具有生物功能的产物, 人生长激素(hGH), 并能促进鱼的生长。

关键词 人生长激素基因; 基因转移; 遗传; 鲤鱼

Palmiter 等人^[1]首先将大鼠生长激素基因用显微注射方法导入小鼠受精卵, 获得了具有快速生长效应的转基因“超级鼠”, 这一划时代的研究成果为经济动物基因工程研究奠定了坚实的基础。朱作言等人^[2]将此技术运用到鱼类, 获得了具有快速生长效应的转基因鱼^[3], 并建立了一个完整的转基因鱼模型^[4], 这一工作很快受到了广泛的重视, 世界各地许多实验室相继开展了鱼类基因转移研究。目前, 已获得了多种转基因鱼^[5], 研究表明, 转基因鱼可以将所携带的外源基因通过性腺传递给子代^[6,7], 但是, 因为外源基因在受体鱼基因组内的整合是一个非常复杂的过程^[3,4], 其遗传机制也必然是极其复杂的, 我们以获得的转基因鲤鱼为材料, 人工繁殖了F₁代和F₂代, 并对外源基因在子代鱼中的分布, 整合, 表达及促生长情况进行了较为系统的研究。

(一) 转基因鱼的人工繁殖

亲代(P₁)转基因鲤鱼(1尾, 雌), 来

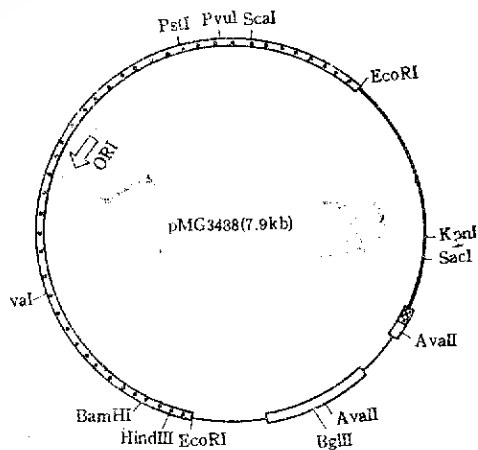


图1 pMG3488重组质粒结构图
Fig.1 Structure of the recombinant plasmid pMG3488
... pBR322
— MT flanking sequence and introns
■ MT exons
— hGH flanking sequences and introns
□ hGH exons

材料和方 法

本文于1990年10月4日收到。

自于1985年注射带有小鼠重金属结合蛋白(MT-I)基因启动子的人生长激素基因(pMG3488,7.9kb,图1)的胚胎,经DNA分子杂交鉴定,确定为转基因鱼,亲代(F_1)转基因鲤鱼(2尾,1雌,1雄)系从 F_1 代群体中经过DNA分子杂交筛选出来的,待 P_1 和 F_1 代转基因鱼分别发育至性成熟,在繁殖季节注射鲤鱼脑垂体(5mg/kg体重),进行人工催产,分别收集精液和卵子,按如下杂交组合进行体外受精:

1988年: P_1 (1雌)×对照(1雄)

对照(1雌)×对照(1雄)

1990年: F_1 (1雌)× F_1 (1雄)

F_1 (1雌)×对照(1雄)

对照(1雌)×对照(1雄)

(二) DNA分析

幼鱼进行整体匀浆,成鱼剪鳍条匀浆或抽血,然后在匀浆液中加入DNA提取液(2%SDS,0.2mol/L NaCl,0.1mol/L Tris-HCl,0.012mol/L EDTA)和100 μ g/ml蛋白酶K(Gibco, USA),37 $^{\circ}$ C保温5h,酚、酚/氯仿、氯仿各抽提一次,乙醇沉淀,70%乙醇洗沉淀一次,干燥后溶于TE(10mmol/L Tris-Cl,1mmol/L EDTA,pH8.0)中,根据不同需要进行斑点杂交和Southern转移杂交,对于斑点杂交,首先将DNA样品在95 $^{\circ}$ C热变性15min,迅速冷却并加入4倍体积的冷20×SSC(3mol/L NaCl,0.3mol/L柠檬酸钠),然后点在硝酸纤维素滤膜(NC)上;对于Southern转移杂交,首先用适当的限制酶(本实验用的是EcoRI和BamHI)37 $^{\circ}$ C酶切2h,与总DNA一同进行0.8%琼脂糖凝胶电泳,然后将胶做如下处理:0.2mol/L HCl室温处理20min,1×碱变性液(1.5mol/L NaCl,0.5mol/L NaOH)处理1h,1×中

性液(1.5mol/L NaCl,1mol/L Tris-HCl)处理1h,最后,Southern转移到NC膜上,将带有DNA的NC膜在80 $^{\circ}$ C烤2h后,在预杂交液(6×SSC,0.5% SDS,5×Denhardt's,100 μ g/ml小牛胸腺DNA,0.012mol/L EDTA)中反应5h,加 α - 32 P-dCTP标记的探针(pMG3488/EcoRI小片段,3.488kb图1),68 $^{\circ}$ C继续杂交36h,洗膜、压片,放射自显影。

(三) 表达产物分析

分三组对 F_1 代幼鱼进行整体匀浆,每组合4条幼鱼,对22尾 F_1 代成鱼(180天)抽血,然后分别离心,收集上清液,低温保存。利用放射免疫测定技术测定生长激素含量(由北京天坛医院神经外科研究所协助测定)。

(四) 生长比较

为了测定外源基因在子代鱼中的促生长效应,对本实验中产生的 F_1 和 F_2 代鱼分别进行了生长比较,将相同数量的 F_1 代鱼和对照鱼分别饲养在条件完全相同鱼池(2亩)中;同样,将 F_1 代鱼及对照鱼分别饲养在条件完全相同的室内自动流水养鱼装置内(1.5 m^3),定期检查生长情况。

结 果

(一) 转基因鱼的性成熟和繁殖能力

一般而言,在华中地区,鲤鱼的性成熟时间为两年,从实验中发现,转人生长激素基因鲤鱼的性成熟时间与普通鲤鱼无明显差异,转基因鲤鱼的繁殖能力(怀卵量,卵的质量,授精率及孵化率等)与普通鲤鱼相比也无明显差异。

(二) 外源基因的分布与整合

在22尾180日龄 F_1 代鱼中,有10尾携带有外源基因,占45.4%(图2),外源基

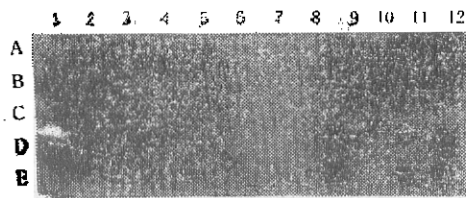


图2 转基因 P_1 鲤鱼与普通鲤鱼杂交产生的 F_1 代鱼总DNA斑点杂交分析

Fig.2 Dot blot analysis of total DNA isolated from F_1 fish

每个样品点两个孔, A, B: 1—12, D, E: 1—10为实验鱼总DNA; D, E: 11—12为阳性对照(MT hGH)

A, B: 1—12, D, E: 1—10 were the DNA samples from the F_1 fish produced from the cross between P_1 female transgenic fish and male nontransgenic fish; D, E: 11—12 were the positive controls (MT hGH)

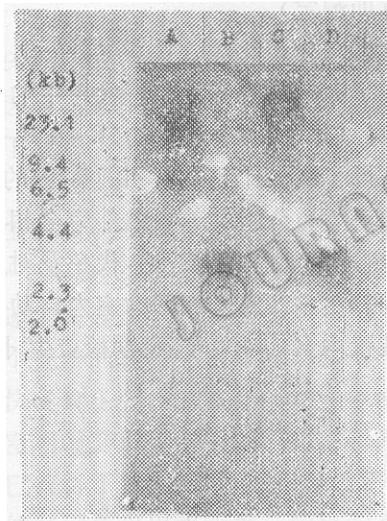


图3 转基因 F_1 鲤鱼总DNA Southern 转移分析

Fig.3 Southern blot analysis of total DNA isolated from F_1 transgenic fish

探针为 MT hGH(3.488kb)片段, A, C: 为经内切酶BamH I 酶切后的总DNA; B, D: 为经内切酶EcoR I 酶切后的总DNA

The probe was MT hGH (3.488 kb) fragment, A, C: were the total DNA digested with BamH I; B, D: were the total DNA digested with EcoR I

因的拷贝数在不同阳性个体之间存在较大差异, 从每细胞 5 个拷贝到每细胞 200 个

拷贝不等, 有意义的是, 在转基因阳性群体中, 有两尾恰恰是群体中体重最大的个体(350g和330g)。将这两尾鱼的总DNA分别用BamH I 和EcoR I 酶切, Southern blot 结果(图3)可以看出: (1)外源DNA是以整合入受体基因组的形式存在的。(图3-A, C), 其中部分是以整合的多聚体形式存在的(图3-A); (2)外源DNA的线性末端被修饰了, 这种修饰可能发生在整合之前, 也可能发生在整合之后, 但其中的功能片段(MT hGH)确是完整的(图3-B, D)。

在18尾20龄 F_2 代鱼(转基因 F_1 代鱼自交产生的子代)中, 有12尾携带有外源DNA, 占66.7%, 其拷贝数也不等, 从

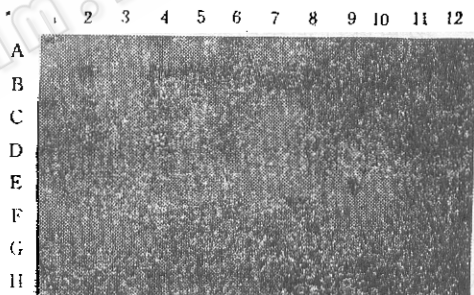


图4 F_2 代鱼总DNA 斑点杂交分析

Fig.4 Bot blot analysis of total DNA isolated from F_1 fish

A, B: 1—12; C, D: 1—6为转基因 F_1 代自交产生的 F_2 代鱼总DNA 样品; D: 7—12对阴性对照; E, F: 1—12; G, H: 1—6为转基因 F_1 代与普通鲤鱼杂交产生的 F_2 代鱼总DNA 样品; H: 8—11为阳性对照(MT hGH)

A, B: 1—12, C, D: 1—6 were the DNA samples from the F_2 fish produced from the cross between F_1 female and male transgenic fish; D: 7—12 were the negative controls; E, F: 1—12 G, H: 1—6 were the DNA samples from the F_2 fish produced from the cross between F_1 female transgenic fish and common fish; H: 8—11 were positive controls (MT hGH)

每细胞 2 个拷贝到每细胞 80 个拷贝 (图 4)。

(三) 表达产物

在子一代幼鱼匀浆液和成鱼血清中, 均检测到了人生长激素(hGH)。三组幼鱼匀浆液中的 hGH 含量分别为: >500ng/

g(bw), >500ng/g (bw) 和 371.5ng/g(bw)。而在 22 尾成鱼血清中, hGH 含量在 1.8ng/ml 血清以上的有 11 尾(1.8ng/ml 血清以下为本底), 但含量较低(1.8—6.2ng/ml 血清)(表 1)。

(四) 生长比较

表 1 F_1 代转基因鱼中外源基因表达产物(hGH)的量(ng/ml)
Table 1 Quantity of hGH in F_1 transgenic carp

序号(No.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
hGH	<1.6	<1.6	<1.6	<1.6	<1.6	1.6	1.7	<1.6	<1.8	<1.6	1.75
序号(No.)	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
hGH	1.8	1.75	2.85	2.1	2.3	6.2	2.65	3.4	1.8	6.0	4.8

在转基因 P_1 和对照鱼杂交产生的 F_1 代群体(15尾)中, 个体间的生长速度存在很大差异。180天时, 体重从 85g 到 350g 不等, 平均为 223g。而对照鱼群体中重量差异(100g 到 200g, 平均为 146.6g)则明显小于实验组。实验组中个体体重在对照组平均体重以上的有 11 尾, 而对照组仅有 6 尾, 实验组中个体体重在对照组最大个体体重(200g)以上的有 8 尾。

在转基因 F_1 代鱼自交产生的 F_2 代群体(29尾)中, 个体间生长速度也存在很大差异, 45 天时, 其个体体重从 4.2g 到 21.8g, 平均为 9.79g, 而对照鱼群体中的差异要小得多(4.6g 到 12.2g, 平均为 7.98g)。实验组中个体体重在对照组平均体重以上的个体有 14 尾, 而对照组仅有 8 尾。实验组中个体体重在对照组最大个体体重以上的有 7 尾。

讨 论

已有实验表明, 转基因鱼可以将所携带的外源基因通过性腺传递给子代^[6,7]。但是, 这些基因是如何遗传的? 其在子代中的分布如何? 目前都不十分清楚, 从理论上讲, 如果只有一个外源基因拷贝整合

在染色体的一个位点, 那么, 应该有 50% 的配子(精子或卵子)含有这个基因; 如果有多个外源基因拷贝整合在不同染色体的不同位点上, 含有外源基因的配子的百分率就明显高于 50%, 而这样的个体与普通鲤鱼杂交应该产生相同比例带有外源基因的子代。在我们的实验中, 在转基因 P_1 与普通鲤鱼杂交子代中有 45.4% 的个体带有外源基因, 这一比例基本符合上述理论值, 而在转基因 F_1 代鱼自交产生的 F_2 代群体中, 有 66.7% 的个体带有外源基因, 这与理论值不符。因为, 即使只是单一拷贝基因整合在染色体的单一位置, 那么, 在这个杂交产生的子代群体中, 外源基因的携带率应为 75%, 究其原因, 可能是多方面的。首先, 从前人的研究中我们知道^[4], 外源基因在鱼类基因组内的整合最早发生在胚胎发育的中期(原肠期)之后。因此, 转基因鱼很可能是外源基因嵌合体, 即在部分组织中带有外源基因, 而在另一部分组织中则无外源基因。由此可以推测, 转基因鱼的性腺组织也是嵌合体。这样, 在产生的配子中, 外源基因的携带率就明显低于理论值了。受体系统对外源基因的修饰作用(见后面讨论)也可能是使外源基因携带率降低的原因之一。

外源基因的拷贝数也很不一致, 除计算误差之外的最明显的原因是修饰作用, 其机理还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Palmiter, et al., *Nature*, 300:611—615, 1982.
- [2] Zhu, Z., et al., *Angew. Z. Ichthyol.*, 1:32—34, 1986.
- [3] Zhu, Z., et al., *Kexue Tongbao, Academia Sinica*, 31:988—990, 1986.
- [4] 朱作言等, *中国科学(B)*, (2):147—155, 1989.
- [5] Maclean, N., et al., *Aquaculture*, 85:1—20, 1990.
- [6] Stuart, G. W., *Development*, 103:403—412, 1988.
- [7] Guyomard, R., et al; *Proceedings of VCLA Symposium on Gene Transfer and Gene Therapy*, Febuary, 1988.
- [8] Pursel, et al.; *Science*, 244 (16):1281—1288, 1989.

Heridity of Human Growth Hormone Gene in Transgenic Carp (*Cyprinus carpio* L)

Wei Yanzhang Xie Yuefeng Xu Kesheng Li Guhua Liu Dong
Zou Jun Li Jinhua Zhu Zuoyan

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan*)

F_1 and F_2 transgenic fish were produced from the cross between the transgenic fish and transgenic fish and the cross between the transgenic fish and nontransgenic fish. 45.4% of the offsprings from the cross between transgenic P_1 fish and nontransgenic fish contained the novel gene, while 66.7% of the decendants from the cross between F_1 transgenic female and male fish contained the novel gene. The number of novel gene copies in transgenic offsprings varied from 2 to 200. It was demonstrated that the novel gene in the descendants could express biological functional product(hGH) that could accelerate the growth rate of the fish. Modifications of the novel gene by the recipient cell system were also confirmed in the paper.

Key words

Human growth hormone gene; gene transfer; heredity; carp