

简报

转抗冻蛋白基因鱼的研究

费云标 黄涛 于建康 夏仕玲* 李光三 阎维
高素琴 毛钟荣 李书鸿 王壬学** 张培军** 严绍颐

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

鱼类抗冻蛋白(AFP)^[1-5]或抗冻糖蛋白(AFGP)^[6],可使鱼类体液的冰点降低至-1.9℃左右,并减少冰晶的生长速度,它们的生物活性比小分子NaCl等无机盐、尿素、糖和游离氨基酸降低冰点的效果大200—300倍^[7-9]。

近年以来,对于抗冻蛋白的分子结构,抗冻作用机制,抗冻基因的分子生物学和基因工程等方面进行着极为广泛的研究^[8-11]。在转抗冻蛋白基因鱼的研究中,已获得转北美黄盖鲮抗冻蛋白基因鲑鱼,但存在的问题是获得转基因鱼的频率太低,表达效率更是极低^[8,12]。本文报道,经基因修饰,基本切除了抗冻蛋白基因表达中负调控区的高效表达的纽芬兰抗冻蛋白基因为目标基因,对模式金鱼进行转基因鱼的初步实验结果,并讨论了有关提高转基因鱼频率和表达效率的实验技术措施。

材料和方法

纽芬兰大洋条鲮抗冻蛋白基因质粒pOP5H由加拿大多伦多大学临床生化系丘才良教授实验室赠送。该质粒是纽芬兰大洋条鲮染色体DNA基因文库的抗冻蛋白基因阳性克隆,内含约为1 kb长的AFP基因,亚克隆至pUC19质粒。该质粒经限制酶EcoRI酶切线性化后,用常规微量注射法注入受体金鱼受精卵内。当受试鱼生长至1寸左右,提取每条鱼的总DNA,以纽芬兰抗冻蛋白(AFP)基因经³²P标记作为探针,进行斑点原位杂交和Southern分析^[5],以及用PCR技术检测实验鱼中是否含有AFP基因。在PCR检测中,使用的引物是:5'-GTCAGAAGTCTCAGCTACAGC-3'和5'-ATCTCAACAGTCTCCACAGGT-

3',由加拿大丘才良教授实验室提供。样品DNA在92℃,1min;60℃,1min;72℃,2min,共30个循环扩增,最后一个循环时,72℃,10min,然后,Southern分析^[13]。

结果与讨论

转抗冻蛋白基因金鱼的实验分两次进行,第一次实验,每金鱼受精卵内注入AFP基因约为 2×10^9 拷贝(DNA注射液的浓度为2μg/ml,注入量约为每卵4nl),用斑点原位杂交,检测47条实验鱼,有3条为阳性转基因金鱼(图版I-A)阳性率为6%。第二次实验,每金鱼受精卵注入AFP基因约 1×10^{10} 拷贝(DNA注射液的浓度为10μg/ml),用斑点原位杂交检测25条受试鱼,有4条为阳性(图版I-B)。

用斑点杂交检出的阳性鱼DNA,经Southern分析4号和10号实验鱼,进一步证实为阳性转基因鱼(图版I-C),经PCR扩增后的Southern分析中检出4,10和15号为阳性转基因鱼(图版I-D),故阳性率为12%。

我们的两次实验结果表明,第一次实验所获得的阳性纽芬兰大洋条鲮AFP转基因鱼频率与Fletcher^[12]和Davies^[8]使用的微量注入法获

本文于1992年5月25日收到。

*中国水产科学研究院珠江水产研究所。

**中国科学院海洋研究所,实验海洋生物学开放实验室。

此项工作得到中国高科技主要项目和中国科学院海洋研究所,实验海洋生物学开放实验室基金的资助;加拿大多伦多大学生物化学系丘才良教授赠送质粒pOP5H;中国科学院发育生物学研究所李建荣先生在照片技术上给予协助,在此一并致谢。

得北美黄盖鲽AFP转基因鱼频率相似,即5—6%,而我们的第二次实验所获得的转基因鱼频率为12%,高于第一次实验结果。除了可能由于

统计数量不多而引起的误差外,另有可能是第二次实验中,注入每受精卵的AFP基因拷贝数较高有关。

参 考 文 献

- [1] Davies, P. L. et al., *J. Biol. Chem.*, 259: 9241—9247, 1985.
- [2] Scott, G. K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82: 2613—2617, 1985.
- [3] Hayes, P. H. et al., *J. Biol. Chem.*, 64: 18761—18767, 1989.
- [4] Hew, C. L. et al., *J. Biol. Chem.*, 263: 12049—12055, 1988.
- [5] Scott, G. K. et al., *Mol. Cell Biol.*, 8: 3670—3676, 1988.
- [6] Hsiao, K. C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 9265—9269, 1990.
- [7] Devries, A. L., *Science*, 172: 1152—1155, 1971.
- [8] Davies, P. L. et al., *EASEB Journal*, 4: 2460—2468, 1990.
- [9] Mueller, G.M. et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 266: 7339—7344, 1991.
- [10] Kurkalea, S. et al., *Plant Mol. Biol.*, 15: 137—144, 1990.
- [11] Goldstein, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 283—287, 1990.
- [12] Fletcher, G. L. et al., *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 45: 362—357, 1988.
- [13] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. p.312—315, 362—389, 1982.

Transgenic Goldfish of Antifreeze Protein Gene

Fei Yunbiao Huang Tao Yu Jiankang Xia Shiling*

Li Guangsan Yan Wei Gao Suqin Mao Zhongrong

Li Shuhong Wang Renxue** Zhang Peijun** Yan Shaoyi

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

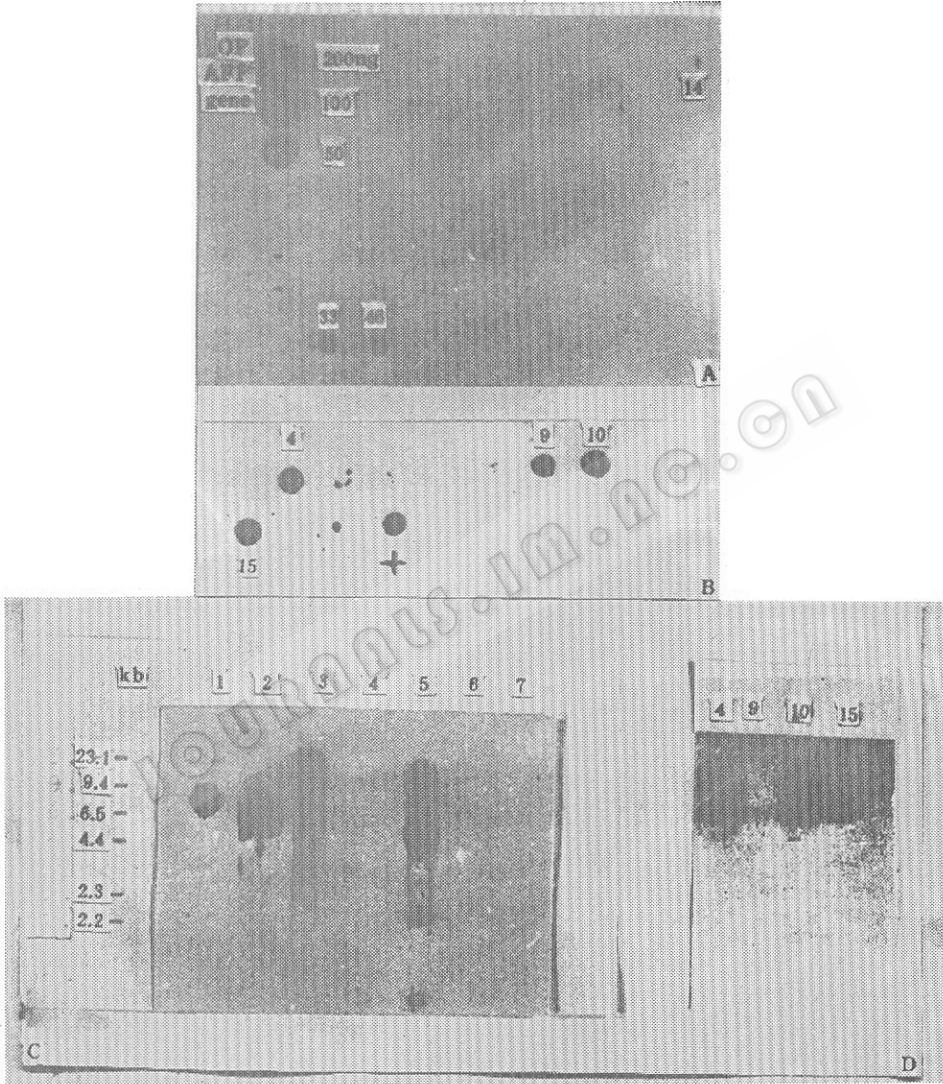
New foundland ocean pout antifreeze protein (AFP) gene after removing negative regulation sequence were microinjected into goldfish fertilized eggs. Individual fingerlings were analyzed for AFP gene by Dot hybridization and Southern blotting. DNA from 3 out of 47 in experiment 1 and from 4 out of 25 fingerlings in experiment 2 showed Dot hybridization to the AFP gene. Southern analysis of DNAs from 2 positive Dot hybridization showed also all positive hybridization bands to the AFP gene probe. After PCR amplification of the DNAs from 4 positive Dot hybridization, there were 3 positive DNA Southern hybridization samples. These hybridization signals were absent in the DNA from control fish.

We discussed also here the methodology of increasing positive frequency and expression level of transgenic fish.

Key words antifreeze protein (AFP) gene; transgenic fish

*Pearl River Fisheries Research Institute, The China Fisheries Academy

**EMBL, Institute of Marine Sciences, Academia Sinica



A, B. 转纽芬兰抗冻蛋白基因金鱼 DNA 的斑点杂交 A 右上角示纽芬兰抗冻蛋白基因的阳性对照,“14,33 和 46”为实验鱼 DNA 与 AFP 基因杂交的阳性结果;B,“+”为阳性对照,“4,9,10 和 15”为实验鱼 DNA 的阳性杂交结果

C, D. 转纽芬兰大洋条鲮抗冻蛋白基因金鱼 DNA 的 Southern 分析 C 中 1 为阳性对照,2 和 3 分别为 4 号实验鱼 DNA EcoRI 和 Hind III 酶切片段,4 和 5 分别为 10 号实验鱼 DNA 的 EcoRI 和 Hind III 酶切片段,6 和 7 分别为对照鱼 DNA EcoRI 和 Hind III 酶切片段 D 为经 PCR 扩增后 4,9,10,15 号鱼 DNA 的 Southern 分析结果