

# 外源猪生长激素基因在金鱼体内的整合与表达研究

张志红 刘桂生 张玉廉 陈清轩

(中国科学院发育生物学研究所 北京 100080)

自 1982 年 Palmiter<sup>[1]</sup> 等人给小鼠受精卵雄原核注射大鼠生长激素基因培养成功“超级”鼠以来,由于人们认识到转基因技术导致动植物品种定向改良以及利用转基因动物作为生物反应器,大量合成和分泌贵重而安全的基因工程产品,因此转基因动物技术得到了迅速发展,相继开展了兔、鱼、猪、鸡、牛、羊等动物的转基因研究,并取得了一定的结果<sup>[2,3,4]</sup>。但是在上述具有经济价值的高等脊椎动物中从事转基因研究,成本高、操作困难,而金鱼属于低等脊椎动物,具有产卵多、易获得同步卵、可控制体外受精和体外发育等特点,因而成为转基因动物研究的方便材料。生长激素是动物脑下垂体前叶分泌的单链多肽<sup>[5]</sup>,生理功能是促进碳水化合物代谢及核酸、蛋白质合成,整体效应表现为动物生长。本文以金鱼为实验材料,探讨猪生长激素基因导入其受精卵后整合、表达以及生物效应等问题,为进一步研究外源基因在高等动物内整合和表达调控机理提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验用鱼

4~5 月份繁殖季节,选取成熟的雌雄红龙睛金鱼(*Carassium auratus*)。

### 1.2 注射基因

将羊金属硫蛋白基因(sMT)启动子与猪生长激素基因(pGH)重组,顺式连接载体 pUC19,构建成表达质粒 pSMTpGH<sup>[6]</sup>(见图 1,猪生长激素基因和重组子由本室分离和构成),用限制酶 Hind III 切成线状 6.3kb 的 DNA 片段,溶于 Niu & Tritty 溶液中,浓度为 2.5ng/ $\mu$ l。显微注射金鱼受精卵,生理盐水作注射对照。

### 1.3 斑点和 Southern 杂交

分别剪取实验组和对照组的金鱼尾鳍,提取基因组 DNA。用限制酶 Bgl I 切下重组质粒 pSMTGH 上含 pGH 的 DNA 片段(~3.5kb)作探针,经 Dig-11-dUTP 随机引物法标记(德国 B. M. 公司非同位素标记试剂盒),与基因组 DNA 进行斑点杂交。选取重复两次均呈 pGH 阳性的实验鱼,进行 southern 杂交分析。

### 1.4 转 sMT-pGH 基因金鱼有性繁殖后代

将转基因雄性鱼与正常雌鱼交配,得到 F1 代子鱼。经斑点、Southern 杂交筛选 pGH 阳性的雌雄 F1 代作亲本再杂交,得到 F2 代子鱼。

### 1.5 PCR 检测

根据 sMT<sup>[8]</sup>和 pGH<sup>[9]</sup>的已知序列,分别合成两段引物。Primer 1: GCT TGC CAC TTG TTC TGG AGC TCG GAC(sMT); Primer 2: GTG CTG GGC CCG GAG CAC GGC GTT GGC(pGH)。利用 PCR 体外扩增 sMT-pGH 阳性片段~150bp,筛选转基因鱼,并用 Southern 杂交加以验证。

本研究得到国家“863”高技术项目资助。

收稿日期:1997-01-23,修回日期:1997-07-15。

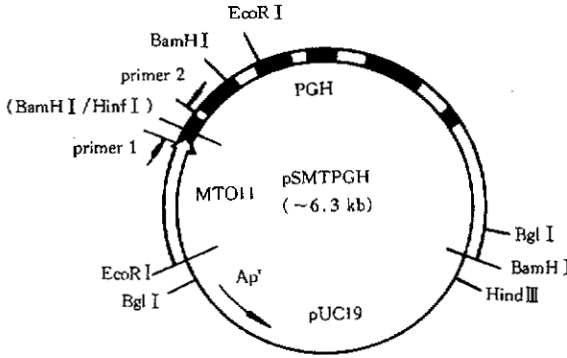


图 1 表达质粒 pSMTpGH 的物理图谱

成小鱼 42 条,最后成活 22 尾,注射生理盐水的 20 枚受精卵,孵化成小鱼 19 尾,成活 19 尾,经斑点杂交筛选,注射基因的实验鱼中有 4 尾呈 pGH 阳性(图版 I -C),对阳性鱼基因组 DNA 进一步用 EcoRI, BamHI 和 HindIII 等在 sMTpGH 上有不同切点的限制酶进行消化, Southern 杂交分析,结果显示大小不同的阳性条带(图 2),表明外源基因已整合到金鱼基因组中。

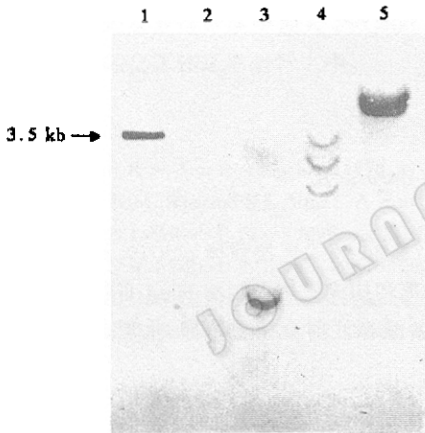


图 2 转基因金鱼 Southern 杂志

Lane 1. Positive control, pSMTpGH/BglI;  
Lane 2. Negative control, NC/HindIII;  
Lane 3~5. Genomic DNA digusted with EcoRI BamHI & Hind III, respectively.

### 1.6 pGH 基因在受体中表达的测定

在转基因鱼和对照组金鱼的尾部实行针刺脊椎采血。红细胞沉降后离心得血清,采用放射免疫法测定血清中猪生长激素的含量(其中 pGH 标准品, pGH 抗血清均由美国 USDA-ARS 动物激素研究组织赠送; pGH 含量测定由海军总医院海科锐生物技术中心协助完成。)

## 2 结果与讨论

### 2.1 pGH 基因在受体鱼中的整合

本实验显微注射了 200 枚受精卵,孵化

成小鱼 42 条,最后成活 22 尾,注射生理盐水的 20 枚受精卵,孵化成小鱼 19 尾,成活 19 尾,经斑点杂交筛选,注射基因的实验鱼中有 4 尾呈 pGH 阳性(图版 I -C),对阳性鱼基因组 DNA 进一步用 EcoRI, BamHI 和 HindIII 等在 sMTpGH 上有不同切点的限制酶进行消化, Southern 杂交分析,结果显示大小不同的阳性条带(图 2),表明外源基因已整合到金鱼基因组中。

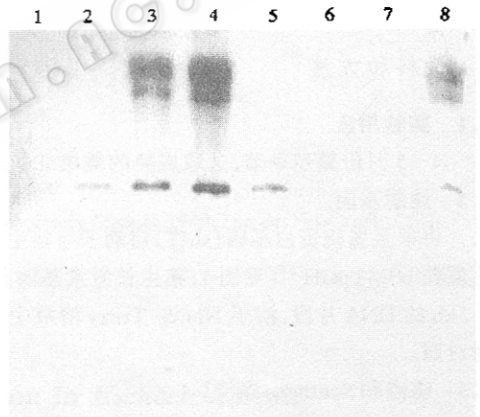


图 3 转基因鱼 F1 代 Southern 杂交

Lane 1. NC/BglI ; Lane 2. pSMTpGH/BglI ;  
Lane 3~8. Genomic DNA of F1 generation digested with BglI , respectively

### 2.2 转基因金鱼后代 pGH 基因的遗传分析

将雄性转基因鱼与正常雌性金鱼交配,得到 F1 代子鱼,经对 8 条 F1 代鱼 DNA 斑点杂交和 Southern 杂交分析,有 4 条呈 pGH 基因阳性(图版 I -D),并保留了完整的 sMTpGH 基因片段~3.5kb(图 3),符合孟德尔 1:1 分离定律,显示外源基因在亲本染色体上的整合位点是单一的,且是杂合的,说明外源基因可通过有性繁殖传递给后代,将 F1 代阳性鱼再交配,得到 F2 代,提取 13 条 F2 代鱼 DNA,经 PCR 检测,有 10 条 F2 代鱼带有 pGH 基因(图版 I -A,B),接近孟德尔 3:1 定律,虽然检测的样品量偏少,但转基因金鱼 F2 代中存在外源基因整合位点纯合的个体是可能的。

### 2.3 pGH 基因在转基因金鱼中的表达

用放射免疫法测定了转基因金鱼和对照鱼血清中的猪生长激素水平(表 1),结果表明两者间 pGH 基因表达量有明显差异( $p < 0.05$ ),但个体之间差异很大,表达量与促生长效应并不成严格的正比关系。究其原因可能是外源基因的整合位点及拷贝数不同。另外,转基因个体的生长发育还会受到生理学、营养学和环境方面的影响。

表 1 转基因金鱼血清中猪生长激素含量的测定

Goldfish	Numbers	PGH content/ng·ml <sup>-1</sup>	PGH mean value/ng·ml <sup>-1</sup>	t	P value
Trans-genic	10	0.44~2.16	0.73	2.442	<0.05
normal	6	0~0.10	0.04		

### 参 考 文 献

- 1 Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E. *Nature*, 1982, **300**: 611~615
- 2 Hammer R E, Pursel V G, Rexroad C E. *Nature*, 1985, **315**: 680~683
- 3 张树庸. *科学导报*, 1990, **2**: 38~41
- 4 Hammer R E, Pursel V G, Rexroad C E, *J Anim Sci*. 1986, **63**(1): 269~278
- 5 Andrews P, *Nature*, 1966, **209**: 155~157
- 6 寇 蔻, 曹 杰, 宋德秀. *生物工程学报*, 1991, **7**(2): 120
- 7 Peterson M G, Mercer J F B. *Eur J Biochem*. 1986, **160**: 579~585
- 8 Vize P D, Wells J R E. *Gene*, 1987, **55**: 339~344

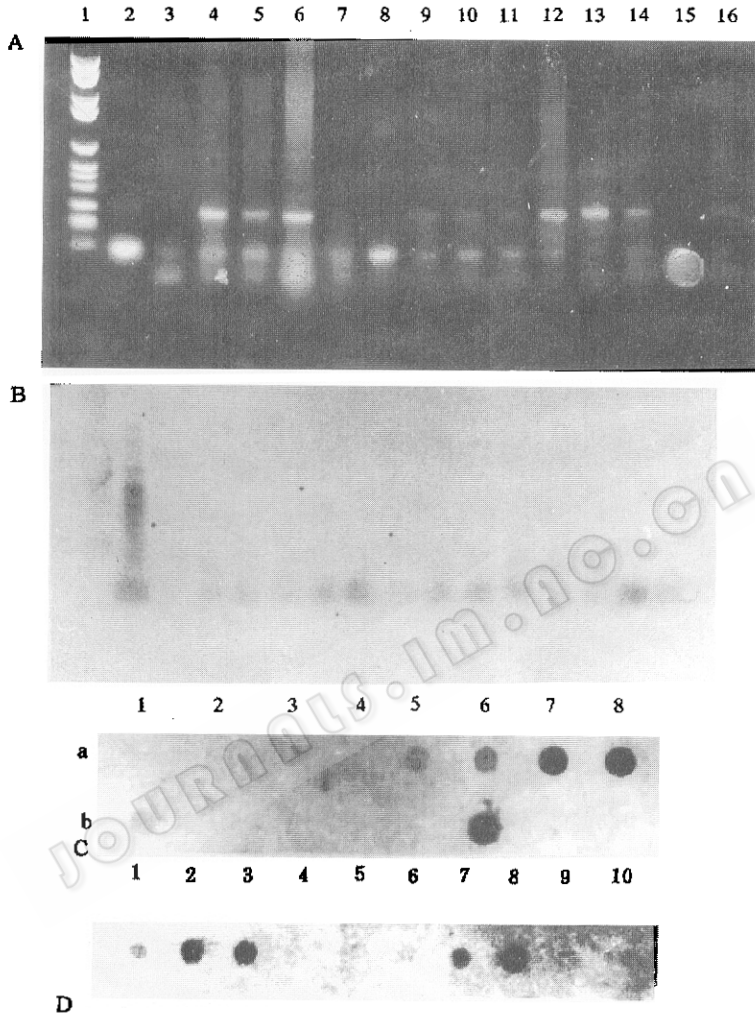
## The Study on Integration and Expression of Porcine Growth Hormone Gene in Transgenic Goldfish

Zhang Zhihong Liu Guisheng Zhang Yulian Chen Qingxuan

(*Institute of Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

**Abstract** A linear recombinant plasmid, consisting of sheep metallothionein gene promoter and porcine growth hormone gene, was microinjected into goldfish fertilized eggs. The experimental goldfishes were detected and screened by using dot blotting and Southern blotting to obtain foreign gene integration- positive transgenic goldfish, which were further used for mating each other. F1 and F2 generations were detected by using PCR, respectively. Our data, including PGH expression level in transgenic goldfish serum detected radioimmunoassay, showed that foreign genes have been integrated and expressed in some transgenic goldfish, and passed into next generation through sex reproduction.

**Key words** Porcine growth hormone gene, transgenic goldfish, integration, expression



PCR analysis and Southern blotting of transgenic goldfish F2 generation

A. Agarose gel electrophoresis of PCR products;

Lane 1. Marker  $\lambda$  (purchased from Boehringer Mannheim);

Lane 2. Positive control, pSMTPGH/Hind III as used as a amplification template;

Lane 3. Negative control;

Lane 4~16. Experimental goldfish genomic DNA.

B. Southern blotting for A, pSMTPGH/Bgl I used as a probe.

C. DNA dot blotting of some goldfish microinjected with pSMTPGH

a1,2. Control goldfish microinjected with 0.9% NaCl

a3,4. Negative control;

a5~8 Positive control, containing 0.5pg, 1pg, 5pg, 10pg pSMTPGH, respectively;

b1~8. Experimental goldfish genomic DNA.

D. DNA dot blotting of transgenic goldfish F1 generation

1. Positive control;

2~9. Genomic DNA of transgenic goldfish F1 generation 10. Negative control