

文章编号: 1674 - 5566(2014)02 - 0161 - 06

PiggyBac 转座元件的构建及其在团头鲂基因组中的转基因效率

王 瑶, 蒋霞云, 邹曙明

(上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘 要: 鳞翅目昆虫粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 的 *PiggyBac* (*PB*) 转座子已用于模式生物小鼠的转基因及插入诱变研究, 目前, 该转座子在养殖鱼类中的转基因效率如何还不清楚。构建了带 *PiggyBac* 转座子左臂、右臂、*EF1 α* 启动子和绿色荧光蛋白 (*eGFP*) 编码框的 pPBs-*EF1 α* -*eGFP* 供体质粒。以 50 ng/ μ L 供体质粒和 100 ng/ μ L 体外转录的 *PB* 转座酶 mRNA 共同显微注射入团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 1~2 细胞期受精卵中, 团头鲂 *eGFP* 的荧光表达率可达 58.26%, PCR 检测结果显示, 该转座系统在团头鲂成鱼基因组中的整合效率为 53.04%。表明 *PiggyBac* 转座子可高效介导基因在团头鲂基因组中的插入, 为进一步开展团头鲂插入诱变研究奠定了基础。

研究亮点: 本研究构建了 *PiggyBac* 转座子的供体质粒和包含 *PB* 转座酶的辅助质粒, 共注射入团头鲂受精卵中, 获得了荧光率、阳性整合率等相关数据, 为开展团头鲂的相关研究奠定了一定的基础。

关键词: *PiggyBac* 转座子; 团头鲂; 转基因

中图分类号: S 917

文献标志码: A

DNA 转座子 (transposon) 是一种以“剪切和粘贴”机制在基因组中移动的遗传元件, 可对脊椎动物的基因进行插入修饰, 用于基因的分离、克隆及基因功能分析^[1-3]。此外, 转座子还可高效用于培育转基因动物^[4-5], 如日本学者 KOGA 等在青鳉 (*Oryzias sinensis*) 中发现的具有自主活性的 *Tol2* 转座系统^[6-7] 已广泛用于多种模式生物的转基因研究, 包括果蝇 (*Drosophila melanogaster*)^[8]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[9-11]、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)^[12]、小鼠 (*Mus musculus*)^[13-14]、鸡 (*Gus gallus*)^[15] 等。最近在金鱼中发现的 *hAT* 家族 *Tgf2* 转座子也具有自主活性, 可供在鲤科鱼类中进行转基因和基因捕获研究^[16]。鳞翅目昆虫粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 的 *PiggyBac* 转座子, 全长 2 472 bp, 两端含有 13 bp 的反向末端重复序列 (ITR), 中间有一个 2.1 kb 的转录区, 可以编码一个 594 个氨基酸的转座酶^[17], 此转座子具有转座效率高、负载容量大的

特性, 已用于模式生物小鼠的转基因及插入诱变研究, 但是, 该昆虫转座子是否也可在养殖鱼类中介导高效转座还不清楚。

本文尝试利用来自昆虫的 *PiggyBac* 转座子的自主转座特征, 构建带有 *PiggyBac* 转座子左右臂、*EF1 α* 启动子和绿色荧光蛋白 (*eGFP*) ORF 框的供体质粒以及带有 *PiggyBac* 转座酶基因的辅助质粒, 将供体质粒与编码 *PB* 转座酶的 mRNA 共显微注射到团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 受精卵中, 以期获得表达 *eGFP* 的转基因团头鲂和该转座子在团头鲂中的转座效率等相关数据, 为今后采用该转座子进行团头鲂重要性状基因的捕获奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

转座子供体质粒 pPBs-*EF1 α* -*eGFP* 和编码转座酶的辅助质粒 pCS2-PBTP 由本实验室构建保

收稿日期: 2013-10-25 修回日期: 2013-12-27

基金项目: 国家自然科学基金 (31272633, 31201760); “十二五”国家科技支撑计划 (2012BAD26B00); 上海高校知识服务平台 (ZF1206)

作者简介: 王 瑶 (1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: wangyao870719@gmail.com

通信作者: 邹曙明, E-mail: smzou@shou.edu.cn

存。团头鲂催产、人工授精、孵化和养殖在上海海洋大学青浦鱼类育种试验站进行。

1.2 实验方法

1.2.1 转座子供体质粒和辅助质粒构建以及转座酶 mRNA 制备

根据相关文献[18]设计扩增 *PiggyBac* 转座

子左右末端和 PB 转座酶的引物 PB-L-F、PB-L-R、PB-R-F、PB-R-R、PB-TP-F 和 PB-TP-R; 根据 pTgf2-EF1 α -eGFP 载体序列设计 *eGFP* 基因的 PCR 检测引物 eGFP-F178 和 eGFP-R646, 所有引物合成与测序服务由生工生物工程(上海)股份有限公司提供(表 1)。

表 1 *PiggyBac* 转座子在团头鲂基因组中插入效率研究所用引物及相关信息
Tab. 1 Primers used for the study on insertional efficiency of *PiggyBac* transposon in the genome of *Megalobrama amblycephala* and related information

引物名称	引物序列(5'-3')	用途	退火温度/°C
PB-L-F(<i>Spe</i> I)	CGACTACTTTAACCCCTAGAAAGATAATC	扩增 PB-L 片段	59
PB-L-R(<i>Xho</i> I)	CCCTCGACTAAAAGTTTGTACTTTATAG		
PB-R-F(<i>Bgl</i> II)	GGAGATCTTGATATCTATAACAAGAAAAT	扩增 PB-R 片段	59
PB-R-R(<i>Kpn</i> I)	GCGGTACCTTAACCCTAGAAAGATAGTCTG		
PB-TP-F(<i>Cla</i> I)	ATATCGATATGGGCAGCAGCCTGGAC	扩增 PB-TP 片段	65
PB-TP-R(<i>Xba</i> I)	GCTCTAGATCAGAAACAGCTCTGGCACATG		
eGFP-F178	ACCCTCGTACCACCCTGAC	阳性率检测	58
eGFP-R646	GCTTCTCCTGGGCTTTTGCTC		

注: 加下划线序列为酶切位点。

以英国癌症研究中心剑桥研究所 Adams 教授赠送的 *slingshot* PB 质粒作为模板, 用引物 PB-L-F(*Spe* I)、PB-L-R(*Xho* I)、PB-R-F(*Bgl* II)、PB-R-R(*Kpn* I)、PB-TP-F(*Cla* I) 和 PB-TP-R(*Xba* I) 分别扩增 *PiggyBac* 转座子的 5' 末端, 3' 末端以及 PB 转座酶片段。获得的 3 个片段的 PCR 产物经电泳分离、割胶回收、PCR 产物纯化等步骤后 TA 克隆进 pMD-19T 载体并且测序验证。然后, 用 *Spe* I 和 *Xho* I, *Bgl* II 和 *Kpn* I, *Cla* I 和 *Xba* I 分别双酶切 pMD-19T-PB-L, pMD-19T-PB-R 以及 pMD-19T-PB-TP 质粒, 回收目的片段备用; 将 pTgf2-EF1 α -eGFP 载体先用 *Spe* I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切产物经割胶回收后与 PB-L 片段进行过夜体外连接, 常规克隆后测序验证; 再将连接了 PB-L 片段的质粒 pPB-L-EF1 α -eGFP 用 *Bgl* II 和 *Kpn* I 双酶切, 酶切产物经割胶回收后与 PB-R 片段进行过夜体外连接, 常规克隆后测序验证, 从而构成了 pPBs-EF1 α -eGFP 的供体质粒。然后将 pCS2 + (Amp⁺) 质粒用 *Cla* I 和 *Xba* I 双酶切, 酶切产物经割胶回收后与 PB-TP 片段进行过夜体外连接, 常规克隆后测序验证, 从而构成了 pCS2-PBTP 的辅助质粒。

5' 加帽 mRNA 的体外转录采用 mMessage mMachin kit (Ambion, TX, USA), 模板为经限制性内切酶 *Not* I 线性化的 pCS2-PBTP 质粒, 体外转录出的 PB 转座酶 mRNA 存于液氮中备用。

1.2.2 显微注射与子代培育

将 pPBs-EF1 α -eGFP 质粒和 PB 转座酶 mRNA 纯化后溶于一定浓度的酚红和双蒸水, 质粒与 mRNA 的终浓度分别为 50 ng/ μ L 和 100 ng/ μ L, 存放于 -80 °C 冰箱备用。在立体解剖镜下对处于 1~2 细胞期的团头鲂受精卵进行显微注射, 每枚受精卵注射量约为 2 nL。将注射过的团头鲂受精卵放入 25 °C 左右的室温孵育, 每 4 小时换一次水。待仔鱼出膜并开口后用草履虫和卤虫培育一周左右, 再将其放入土池中饲养。

1.2.3 绿色荧光表达的观察、eGFP 基因在团头鲂基因组中的阳性率检测

显微注射后, 在荧光显微镜下每隔 6 小时观察团头鲂绿色荧光表达情况, 当观察到鱼体有绿色荧光表达后, 统计荧光率。取饲养 150 d 的实验团头鲂右胸鳍提取 DNA, 进行 *eGFP* 基因的 PCR 检测, 所用引物为 eGFP-F178 和 eGFP-R646, 将 PCR 产物经电泳分离、割胶回收、PCR 产物纯化等步骤后进行 TA 克隆并测序验证, 团头鲂基因组中检测到 *eGFP* 基因的为阳性团头鲂, 通过统计获得 *eGFP* 基因在团头鲂基因组中的阳性率。

2 结果与分析

2.1 转基因供体质粒 pPBs-EF1 α -eGFP 和转基因辅助质粒 pCS2-PBTP 的构建

通过 PCR 方法, 分别获得长度为 242 bp 的

PiggyBac 转座子的左臂片段,314 bp 的 *PiggyBac* 转座子的右臂片段以及 1 785 bp 的 *PiggyBac* 转座子的转座酶片段,并构建了含有 *PiggyBac* 转座子的左、右臂的 *PiggyBac* 转基因供体质粒 pPBs-EF1 α -eGFP,该质粒还包含 EF1 α 启动子和绿色

荧光蛋白(*eGFP*)开放阅读框(图 1a);同时构建了转基因辅助质粒 pCS2-PBTP(图 1b),用该质粒为模板进行体外转录出编码 *PB* 转座酶的 mRNA,以介导供体质粒携带外源基因整合到团头鲂基因组中。

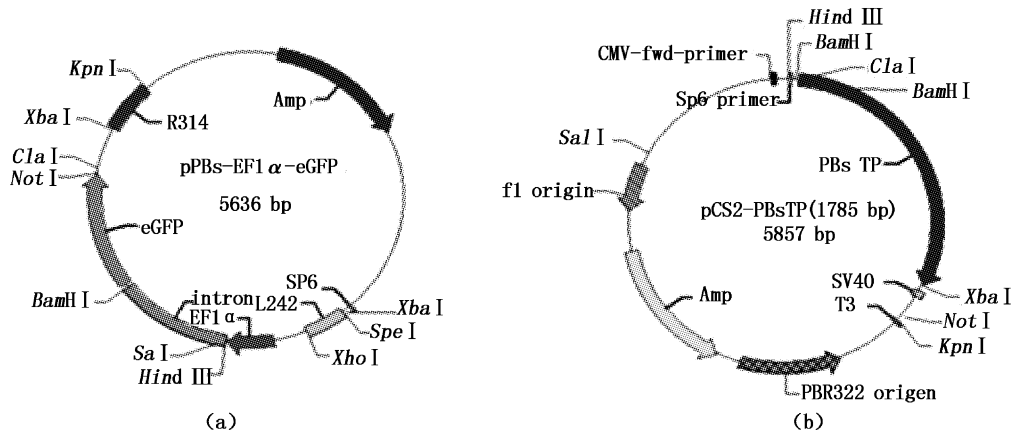


图 1 转基因供体质粒及辅助质粒示意图

Fig. 1 Schematic diagram of transgenic donor plasmid and helper plasmid

(a). 转基因供体质粒 pPBs-EF1 α -eGFP 结构示意图; (b). 转基因辅助质粒 pCS2-PBTP 结构示意图。

2.2 绿色荧光的观察及 *eGFP* 基因的 PCR 检测

由于团头鲂黏性卵的特质,其卵膜透明度较差,胚胎期的转基因团头鲂未观察到绿色荧光;待到仔鱼出膜后可在头部、背部和侧面肌肉乃至全身都能观察到绿色荧光,呈现若干个高亮度的带状斑点;随着胚胎发育和个体生长,荧光强度逐渐增加,面积不断扩大(图 2a-f)。绿色荧光在头眼部有高效表达(图 2a);荧光在肌肉部分有

高强度表达(图 2b);荧光在头眼部和肌肉部分都有高效表达(图 2c)。

经观察并计算,在显微注射存活出膜的团头鲂仔鱼中,畸形率达到 35.12%,荧光率达到 58.26%,最终存活下来的 115 尾团头鲂中,有 61 尾经过 PCR 检测为阳性个体,阳性整合率为 53.04%。

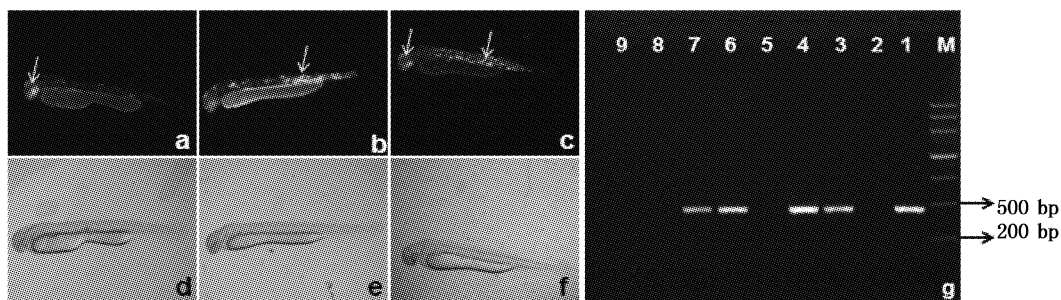


图 2 转基因团头鲂 *eGFP* 基因的荧光表达率和转座效率

Fig. 2 Fluorescent expression rate of *eGFP* gene and transposition efficiency in transgenic *M. amblycephala*

a, c, e. 显微镜透射光下出膜 24 h 的绿色团头鲂; b, d, f. 显微镜荧光下出膜 24 h 的绿色团头鲂; g. *eGFP* 基因的 PCR 检测电泳图。1-7. 注射过质粒的团头鲂; 8. 未注射过质粒的团头鲂对照; 9. 无 DNA 对照, 所用引物均为 eGFP-F178 和 eGFP-R646, 条带大小为 468 bp, Marker 为 Marker3。

3 讨论

转座子作为一种可移动的遗传元件,广泛存在于细菌和各类真核生物中。利用转座子的转座特性,可以将利于鱼类生长发育的优良基因导入到不同的鱼种中,或者通过插入诱变策略获得不同鱼类的突变体,从而筛选出影响鱼类生长发育的主控基因^[19],为培养繁育性状优良的养殖鱼类奠定基础。例如,FUJIMURA 和 KDCHER 利用 *Tol2* 转座系统成功构建了转基因罗非鱼^[20]。EREZ 等将携带有 *GFP* 基因的 *TC3* 转座子导入到斑马鱼中并进行生殖系传递^[21]。BALCIUNAS 等利用 *Sleeping Beauty* 转座子在斑马鱼中进行增强子捕获,从在不同组织或器官特异表达 *GFP* 的 90 个亲本中建立了 9 个斑马鱼家系,产生了表达 *GFP* 的子代斑马鱼^[22]。与其他基因诱变工具相比,*PB* 转座系统的优势在于:*PB* 转座子不仅可以在生殖细胞中高效转座,并且 *PB* 插入广泛分布于基因组中,且偏好于基因区,有利于被有效用于大规模的基因捕获^[17]。目前,*PiggyBac* 转座子插入诱变策略已经广泛应用于果蝇^[23]和小鼠^[24]中,如英国癌症研究中心剑桥研究所 ADAMS 等人开发了一个以 *PiggyBac* 为基础的转座系统,命名为“弹弓”,用于他莫昔芬(三苯氧胺)诱导的插入诱变,结果证明“弹弓”转座子可以在一些染色体位点中进行高效转移,并且这种转移是高诱导性与低背景的,产生的插入位点随机分布于整个基因组中^[18]。然而,关于 *PiggyBac* 转座子在鱼类中的应用研究甚少,虽然 *PiggyBac* 转座子在斑马鱼中证明具有转座活性,并获得了转基因斑马鱼胚胎^[25],但其在团头鲂等养殖鱼类中是否具有转座活性,其转座效率如何还未见报道。

本研究中将包含 *PiggyBac* 转座子的左臂(242 bp)、右臂(314 bp)、爪蟾 *EFl α* 启动子和 *eGFP* 基因的供体质粒和含有 *PB-TP* 辅助质粒体外转录出的 mRNA 共注射入团头鲂 1-2 细胞期受精卵内,构建出了表达绿色荧光的转基因团头鲂,并对所获的转基因团头鲂进行了荧光观察及 PCR 检测。*PiggyBac* 转座子在团头鲂中的插入效率为 53.04%,而在叉尾斗鱼中,该转座子的阳性率约为 10%~20%,可能与动物种类不同及操作方法有关^[26]。与荧光率相比,阳性率的降低可

能是由于阳性个体生存率降低和显微注射入受精卵的质粒 DNA 分布不均,并没有整合到基因组中,而是作为游离质粒存在于细胞中造成的^[27]。而生长到 150 d 的团头鲂细胞内的游离供体质粒早已降解,此时 PCR 检测到的阳性个体应该都为 *eGFP* 基因整合到团头鲂基因组中的个体。对插入诱变阳性个体进行观察分析,发现了很多明显的突变体,大多表现为肌肉和体轴发育异常。这种高畸形率可能与 *PiggyBac* 转座子插入到团头鲂基因组的一些与生长相关的基因中有关。当然,还有一些阳性个体畸形表现不甚明显,这可能是由于 *PiggyBac* 转座子插入到基因组内含子、非编码区中或者一些与生长发育无关基因中造成的。

本研究证实了 *PiggyBac* 可以在团头鲂中成功转座,并且有较高的阳性率,说明我们可以利用 *PiggyBac* 转座系统进行团头鲂乃至一些鲤科养殖鱼类的插入诱变的研究工作。但我们的研究还有很多工作要完成,如需开展转基因阳性个体的传代,进而证实 *PiggyBac* 转座子是否可以高效整合到团头鲂配子基因组中,从而利用 *PiggyBac* 转座子继续获得更多的插入诱变突变体。还可以与金鱼 *Tgf2* 转座子这类鱼类转座子构建复合转座系统,发挥各个转座子的优点,同时弥补彼此的不足,从而建立饱和的养殖鱼类的插入诱变体库。对插入诱变体库进行深入分析,寻找出各个突变体的侧翼整合位点,研究其插入位点是否具有偏好性,从而建立表型与基因型的对应关系,达到挖掘团头鲂耐低氧功能基因和揭示基因功能的目的,为团头鲂的分子育种奠定更深厚的基础。

参考文献:

- [1] NI J, CLARK K J, FAHRENKRUG S C, et al. Transposon tools hopping in vertebrates [J]. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2008, 7(6): 444-453.
- [2] XUE Y L, XIAO A, WEN L, et al. Generation and characterization of blood vessel specific *EGFP* transgenic zebrafish via *Tol2* transposon mediated enhancer trap screen [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2010, 37(7): 720-727.
- [3] IVICS Z, KAUFMAN C D, ZAYED H, et al. The sleeping beauty transposable element: evolution, regulation and genetic applications [J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2004, 6: 43-56.

- [4] GOLLING G, AMSTERDAM A, SUN Z, et al. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development[J]. *Nature Genetics*, 2002, 31(2): 135–140.
- [5] SIVASUBBU S, BALCIUNAS D, AMSTERDAM A, et al. Insertional mutagenesis in zebrafish [J]. *Genome Biology*, 2007, 8(s1):9.
- [6] INAGAKI H, BESSHO Y, KOGA A, et al. Expression of the tyrosinase encoding gene in a colorless melanophore mutant of the medaka fish, *Oryzias latipes*[J]. *Gene*, 1994, 150(2):319–324.
- [7] INAGAKI H, KOGA A, BESSHO Y, et al. The tyrosinase gene from medakafish; transgenic expression rescues albino mutation[J]. *Pigment Cell Research*, 1998, 11(5):283–290.
- [8] URASAKI A, MITO T, NOJI S, et al. Transposition of the vertebrate *Tol2* transposable element in *Drosophila melanogaster*[J]. *Gene*, 2008, 425(1/2): 64–68.
- [9] KAWAKAMI K, SHIMA A. Identification of the *Tol2* transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous *Tol2* element in zebrafish *Danio rerio* [J]. *Gene*, 1999, 240(1): 239–244.
- [10] KAWAKAMI K, KOGA A, HORI H, et al. Excision of the *Tol2* transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*[J]. *Gene*, 1998, 225(1/2):17–22.
- [11] KAWAKAMI K, SHIMA A, KAWAKAMI N. Identification of a functional transposase of the *Tol2* element, an *Ac*-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(21):11403–11408.
- [12] KAWAKAMI K, IMANAKA K, ITOH M, et al. Excision of the *Tol2* transposable element of the medaka fish *Oryzias latipes* in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*[J]. *Gene*, 2004, 338(1): 93–98.
- [13] KAWAKAMI K, NODA T. Transposition of the *Tol2* element, an *Ac*-like element from the Japanese medaka fish *Oryzias latipes*, in mouse embryonic stem cells[J]. *Genetics*, 2004, 166(2): 895–899.
- [14] BALCIUNAS D, WANGENSTEEN K J, WILBER A, et al. Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates[J]. *PLOS Genet*, 2006, 2(11): 1715–1724.
- [15] SATO Y, KASAI T, NAKAGAWA S, et al. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos [J]. *Developmental Biology*, 2007, 305(2):616–624.
- [16] JIANG X Y, DU X D, TIAN Y M, et al. Goldfish transposase *Tgf2* presumably from recent horizontal transfer is active [J]. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2012, 26(7): 2743–2752.
- [17] 丁昇. *piggyBac* 转座系统——哺乳动物遗传分析的新工具 [D]. 上海: 复旦大学, 2007.
- [18] KONG J, WANG F, BRENTON J D, et al. Slingshot; a *PiggyBac* based transposon system for amoxifen-inducible ‘self-inactivating’ insertional mutagenesis [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(18): e173.
- [19] KOGA A, SUZUKI M, INAGAKI H, et al. Transposable element in fish[J]. *Nature*, 1996, 383: 30.
- [20] FUJIMURA K, KOCHER T D. *Tol2*-mediated transgenesis in tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture*, 2011, 319(3/4): 342–346.
- [21] EREZ R, HENRI G L, BARBARA S, et al. Transposition of the nematode *Caenorhabditis elegans Tc3* element in the zebrafish *Danio rerio*[J]. *Current Biology*, 1997, 8(2):82–88.
- [22] BALCIUNAS D, DAVIDSON E A, SIVASUBBU S, et al. Enhancer trapping in zebrafish using the *Sleeping Beauty* transposon[J]. *BMC Genomics*, 2004, 5:62.
- [23] CHRISTOPHER P B, RICHARD S M. A *piggyBac* transposon gene trap for the analysis of gene expression and function in *Drosophila* [J]. *Genetics Society of America*, 2004, 167(4):1801–1811.
- [24] WANG W, BRADLEY A, HUANG Y. A *PiggyBac* transposon-based genome-wide library of insertionally mutated *Blm*-deficient murine ES cells [J]. *Genome Research*, 2009, 19: 667–673.
- [25] NEIL F L, TRESA S F, JOHN A A, et al. Interplasmid transposition demonstrates *PiggyBac* mobility in vertebrate species[J]. *Genetica*, 2006, 128(1/3):347–357.
- [26] 高强, 杨国梁, 钟伯雄, 等. *PiggyBac* 转座子介导的转基因叉尾斗鱼的构建[J]. *动物学杂志*, 2012, 47(4): 48–54.
- [27] STUART G W, MCMURRAY J V, WESTERFIELD M. Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos [J]. *Development*, 1988, 103: 403–412.

The study on transgenic efficiency of *PiggyBac* transposon in the genome of *Megalobrama amblycephala*

WANG Yao, JIANG Xia-yun, ZOU Shu-ming

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *PiggyBac* (*PB*) transposon is derived from *Trichoplusia ni* of lepidopteran and has been widely used in transgenic and insertion mutagenesis studies in mouse. Currently, relevant research about *PiggyBac* transposons used in farmed fish has not yet been reported. To study insertion efficiency of *PiggyBac* transposon in the genome of *M. amblycephala*, we built pPBs-EF1 α -eGFP donor plasmid with *PiggyBac* transposon left and right arms, EF1 α promoter and eGFP gene, then co-injected with *PiggyBac* transposase mRNA into the 1–2 cell stage fertilized eggs of *M. amblycephala*. The concentrations of donor plasmid and transposase mRNA were 50 ng/ μ L and 100 ng/ μ L respectively. The eGFP fluorescence expression rate was 58.26%. In adult fish, PCR results demonstrated that integration efficiency of *PiggyBac* transposition system was 53.04% in *M. amblycephala* genome. Our data suggest that *PiggyBac* transposon can efficiently mediate gene insertion in *M. amblycephala*, which could be used in insertional mutagenesis in *M. amblycephala*.

Key words: *PiggyBac* transposon; *Megalobrama amblycephala*; transgene