

文章编号:1004-7271(2002)02-0102-04

用显微注射法将绿色荧光蛋白 基因导入金鱼受精卵中表达

刘艳红¹, 肖调义², 苏建明², 邱高峰¹

(1. 上海水产大学渔业学院, 上海 200090; 2. 湖南农业大学动物科技学院, 长沙 410128)

摘要 采用显微注射法将绿色荧光蛋白(GFP)基因重组表达质粒导入金鱼受精卵中,以期获得能发绿色荧光的金鱼。结果显示,在注射的3批金鱼受精卵中(第一批4310粒,第二批3952粒,第三批4056粒),分别孵出鱼苗543、282和266尾,出苗率为17.02%、12.53%和13.52%,其中表达绿色荧光的金鱼分别为23、24和18尾,表达率为4.24%、8.51%和6.77%。荧光表达检测发现,从肌肉效应期就开始检测得到绿色荧光。

关键词 金鱼;绿色荧光蛋白基因;转基因鱼;显微注射

中图分类号:S917 文献标识码:A

Expression of GFP gene transferred into the fertilized eggs of *Carassius auratus* by microinjection

LIU Yan-hong¹, XIAO Tiao-yi², SU Jian-ming², QIU Gao-feng¹

(1. Fisheries College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Department of Animal Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract In order to obtain *Carassius auratus* with green fluorescence, the plasmid GFP gene was transferred into the fertilized eggs by microinjection. The results showed that the three batches of fertilized eggs (4310, 3952, 4056) hatched 543, 282 and 266 fry, respectively, and the survival rates were 17.02%, 12.53% and 13.52%, respectively; there were 23, 24 and 18 fry with green fluorescence, respectively, and the expression rates were 4.24%, 8.51% and 6.77%, respectively. The detection of green fluorescence indicated that GFP gene begins to express in the muscular effect stage of gold fish embryos.

Key words *Carassius auratus*; green fluorescent protein (GFP) gene; transgenic fish; microinjection

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是1962年Shimoura和Johnson等人首先从水螅水母类动物*Aequorea victoria*中分离、纯化出来的一种荧光蛋白物质^[1]。这种蛋白质在体外只要经适当波长的光激发便可发出绿色荧光,其所发绿光用普通荧光显微镜就可检测到,因而具有检测灵敏度高和操作简便等优点。而且该蛋白对宿主细胞不存在毒性^[2],检测GFP时也无损于细胞或胚胎的完整性和活力。因此,作为基因表达的真实报告者(real-time reporter)——GFP,无疑是研究动物胚胎形成过程中基因表达动力学的理想材料^[3]。

转基因技术的出现,使遗传工作者可有目的有预见地改变动物遗传性状,创造出更优良的新品种、新品系。1982年,美国科学家Palmiter等^[4]首次采用该技术将大鼠生长激素(GH)基因导入小鼠受精卵

中获得了“超级鼠”，开创了利用基因转移技术培育动物新品系的新纪元。1984年，国内学者将人的生长激素基因导入鲫鱼受精卵中，培育出世界上第一批转基因鱼。从此，世界各国科学家们对转基因鱼做了大量工作，取得了很大进展。然而时至今日，转基因鱼的研究主要限于促进生长和提高抗性两个方面^[5,6]，其它如改变观赏鱼的体色、花纹等尚未见报道。本文在金鱼(*Carassius auratus*)受精卵中导入 GFP 基因，目的是利用 GFP 基因的发光性，尝试改变金鱼体色，提高其观赏价值；同时将 GFP 作为报告基因，用来检测外源基因在金鱼体内的整合表达。

1 材料与方法

1.1 转基因材料

绿色荧光蛋白(GFP)基因购自 Clontech 公司，pUC118、EcoR I、Sma I 和 T4DNA 连接酶等生物试剂购自华美生物工程公司，转基因 Olympus 显微注射仪购自基因公司；金鱼受精卵由湖南长沙市开福区观赏鱼基地提供。

1.2 GFP 基因的重组构建

将 pUC118 和 pGFP 分别经 EcoR I 和 Sma I 双酶切后，回收 pUC118 酶切后的大片段及 pGFP 的小片段(GFP cDNA 4.7kb)。将回收的片段先用苯酚抽提，再经等体积苯酚：氯仿纯化，两倍体积无水乙醇沉淀、干燥后，在 T₄DNA 连接酶的作用下构建重组表达质粒 GFP。

1.3 GFP 基因导入

利用显微注射法，即在金鱼繁殖季节(4-5月)，选择健康无损伤，性腺发育良好的亲鱼，用激素进行人工催产，然后在池中捞出刚产出的受精卵(1-2 细胞期)置于培养皿中，进行显微注射。注射部位为受精卵动物极，注射量为 2~5nL(10⁶~10⁷ 拷贝)。显微注射后的受精卵放在与对照组的温度、光照和水流等条件相同的孵化盆中孵化。

1.4 受精率、出苗率计算

$$\text{受精率}(\%) = \frac{\text{原肠胚中期受精卵数}}{\text{总卵粒数}} \times 100$$

$$\text{出苗率}(\%) = \frac{\text{出苗数}}{\text{总受精卵数}} \times 100$$

1.5 GFP 基因的表达检测

采用体视镜(15×，加 470~510nm 波长紫外光源)对显微注射过的金鱼受精卵进行胚胎发育跟踪观察，注意其荧光发生部位，记录、拍照，计算荧光表达率。

$$\text{表达率}(\%) = \frac{\text{表达荧光的鱼苗数}}{\text{导入 pGFP 的总出苗数}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 GFP 基因的重组构建

随机挑取重组菌落，提取质粒 DNA，用 EcoR I/Sma I 进行酶切鉴定，结果在 10 个菌落中发现有 2 个重组子(C 和 I)，证明 GFP 基因已插入 CAP 下游(图 1)。

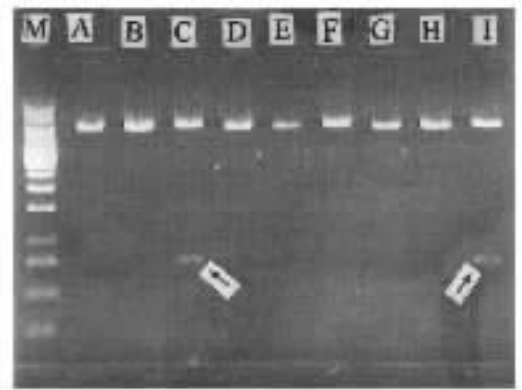


图 1 绿色荧光蛋白重组子酶切图谱

Fig.1 Electrophoresis pattern of GFP recombinant
C, I: 含插入片段(GFP 基因)的重组子, 用箭头表示;
M: λDNA/Hind III + EcoR I

2.2 GFP 基因的导入

采用显微注射法,将重组构建好的 GFP 基因先后导入 3 批金鱼受精卵中,共 12 318 粒,最后孵出鱼苗 1 091 尾(表 1)。结果发现,注射过 GFP 的受精卵发育良好,其胚胎发育与对照组比较,出膜时间推迟 18~36h,这可能与注射操作对卵膜和卵内各种组织的机械损伤有关。加之实验期间水温变幅大,出苗率均较低。

2.3 GFP 基因的表达检测

在对导入了 GFP 基因的金鱼胚胎发育跟踪观察中,发现在胚胎早期检测不到 GFP 基因的表达产物,一直到肌肉效应期才能明确检测出来。在导入的 12 318 粒金鱼受精卵中,出苗 1 091 尾,其中有 65 尾得到了表达(表 2)。在表达荧光的 65 尾鱼苗中,又有很多是属于嵌合体(mosaics),其荧光主要分布在金鱼的头部、尾部或胸鳍、背鳍和尾鳍等处。例如在第 1 批显微注射 GFP 基因的金鱼受精卵中,23 尾得到表达,但其中就有 13 尾为嵌合体,只有 10 尾为全身表达。其原因可能是:

(1) 显微注射 GFP 基因后,基因在受精卵中的整合具有随机性;一般认为外源 DNA 常常是在刚完成复制或正在进行复制的染色体区段整合;

(2) 显微注射操作时,由于注射 GFP 基因的部位(受精卵动物极)不同,GFP 基因在组织间的分布呈嵌合状态,为不稳定的嵌合性整合,从而出现嵌合体^[7,8];

(3) 只有当 GFP 基因整合到金鱼卵的基因组中时,才会出现全身荧光,得到全身表达。

3 讨论

3.1 转基因操作对胚胎成活率的影响

相对哺乳动物来说,鱼类受精卵显微注射后胚胎存活率要高。因为鱼类是体外受精和体外发育动物,显微注射后的胚胎不需要象哺乳动物那样操作(如移植给受体);另外,鱼类细胞质注射(鱼类细胞核很难定位)较细胞核注射对胚胎损伤小,存活率高,虽然其整合率较细胞核注射低。

3.2 基因的嵌合表达

显微注射法有两个重大缺点:需要昂贵的设备和因嵌合体比例太高致使总的转基因效率低下。至于怎样最大限度地避免嵌合型转基因鱼的出现,目前还尚无定论。Rahman 和 Maclear^[9]报道,在罗非鱼受精卵发育到单细胞期注射外源基因,可避免嵌合型转基因鱼的出现;梁利群等^[10]认为外源基因导入受精卵的最佳时期应选在单细胞后期。结合我们的实验,考虑到鱼的受精卵发育很快,仅仅在单细胞末期注射的话,时间太短不利实验进行,因而建议:

(1) 显微注射时间可适当延至 2 细胞期;

(2) 受精卵在进行显微注射操作前,可置于低于室温(14~18℃)的条件下,以延缓其发育速度。

3.3 转基因的安全性

GFP 作为一种效果很理想的选择标记,已在转基因动物研究中广泛应用,然而对于 GFP 基因对宿主动物是否具毒副作用,还是一个需要慎重回答的问题,尤其是当转基因表达水平过高时,其不仅可能会影响到宿主动物本身的健康,还可能会影响转基因产品的质量^[11]。另外,转 GFP 基因的鱼,一旦被释放到天然水域中,它会在多大程度上影响水体生态平衡;人若是食用了转 GFP 基因的鱼是否安全^[12,13];

表 1 导入 pGFP 基因的金鱼卵受精率与出苗率

Tab.1 The fertilized rates and survival rates of *C. auratus* after microinjection of pGFP

批次	注射卵数(粒)	受精率(%)	出苗数(尾)	出苗率(%)
I	4 310	74	543	17.02
II	3 952	57	282	12.53
III	4 056	48.5	266	13.52

表 2 导入 pGFP 基因的金鱼荧光检测结果

Tab.2 Detection results of green fluorescent in *C. auratus* after microinjection of pGFP

批次	出苗数(尾)	发荧光鱼苗数(尾)	表达率(%)
I	543	23	4.24
II	282	24	8.51
III	266	18	6.77

人们对这种“发绿光”转基因鱼持何种态度等等,我们都还不明确。因此,在将 GFP 基因用于转基因研究时,这些都是需要审慎考虑的问题。

承蒙上海水产大学楼允东教授阅读全文,并提出修改意见,特此致谢。

参考文献：

- [1] Ward W W, Cody C W, Hart R C. Spectrophometric identity of the energy-transfer chromophores in *Renilla* and *Aequorea* green-fluorescent proteins[J]. Photochem Photobiol, 1980, 31 : 611 - 615.
- [2] 刘建忠,李 宁,陈永福,等.绿色荧光蛋白及其在转基因动物研究中的应用[J].生物工程进展,1998,18(6):41-44.
- [3] Davis I. Rapid communication: A nuclear GFP that marks nuclear in living *Drosophila* embryos; maternal supply overcomes a delay in the appearance of zygotic fluorescence[J]. Develop Biol, 1995, 170 : 726 - 729.
- [4] Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs micro-injected with metallothionein growth hormone fusion genes[J]. Nature, 1982, 300 : 611 - 615.
- [5] 楼允东.中国转基因鱼研究的进展[J].上海水产大学学报,1997,1(1):42-49.
- [6] 赵浩斌,陈尚萍,朱作言.转基因鱼的研究进展[J].农业生物技术学报,1999,7(3):301-306.
- [7] 朱作言,许克圣,谢岳峰,等.转基因鱼模型的建立[J].中国科学(B辑),1989(2):147-155.
- [8] Brinster R, Chen A, Trumbauer M. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjection eggs[J]. Proc Acad Natl Sci USA, 1985, (82) : 4 438 - 4 442.
- [9] Rahman M A, Maclean N. Production of transgenic tilapia by one-cell-stage microinjector[J]. Aquac, 105 : 219 - 232.
- [10] 梁利群,孙效文,沈俊宝,等.外源基因导入鲤受精卵最佳时期的研究[J].中国水产科学,1996,13(1):11-15.
- [11] 李思发.转基因水生生物研制及其安全问题[J].中国水产科学,2000,17(1):99-102.
- [12] 闫学春,孙效文,张利民.转基因鱼对食用动物影响的研究[J].水产学杂志,1996,19(1):12-15.
- [13] 夏德全.鱼类基因工程进展[J].遗传,1997,19(增刊):14-16.

下期文章摘要

不同营养盐浓度下微绿球藻的生长 及水体中氮磷的变化

王丽卿, 黄旭雄

(上海水产大学渔业学院 200090)

摘 要 在单胞藻培养池中,以 $f/2$ 为基本培养配方(其主要成分为 NaNO_3 74.8mg, NaH_2PO_4 4.4mg, $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3.9mg),在经消毒的天然河口中,分别添加 1 倍、2 倍、3 倍 $f/2$ 配方的营养盐浓度培养微绿球藻 (*Nannochloropsis oculata*)。结果表明,添加 2 倍营养盐浓度组,微绿球藻的生长最快,其相对生长常数显著大于添加 1 倍营养盐浓度组。在培养过程中,水体中 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N、总氮及 PO_4^{3-} -P 含量下降,而 NO_2^- -N 含量在培养过程中先降后升。在高浓度营养条件直,生产单位产量的微绿球藻需要消耗更多的氮肥。

关键词 微绿球藻,生长,氮,磷