

文章编号: 1674 - 5566(2014)01 - 0001 - 07

## *Tgf2* 转座子介导鲤 *Fst1* 基因元件在鲤中的转基因效率研究

闫学春<sup>1</sup>, 钟莎莎<sup>2</sup>, 徐 鹏<sup>3</sup>, 邹曙明<sup>2</sup>, 孙效文<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 淡水鱼类育种国家地方联合工程实验室 淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 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; 3. 中国水产科学研究院 水产生物应用基因组研究中心, 北京 100141)

**摘 要:** 卵泡抑素 (follistatin, Fst) 蛋白具有拮抗 TGF- $\beta$  超家族许多成员的功能, 通过直接的蛋白结合可抑制肌肉抑制素 (myostatin) 的活性, 从而恢复肌肉的生长, 表现出增肌效应。参照鲤高通量转录组测序数据的拼接结果, 筛选出鲤卵泡抑素 *Fst1* 基因的编码框 (ORF) 序列 (全长 1 260 bp, 编码 320 个氨基酸), 构建了包含金鱼 *Tgf2* 转座子左臂 (220 bp)、右臂 (185 bp)、斑马鱼 *Mylz2* 启动子和鲤 *Fst1* 基因 ORF 的供体质粒 pTgf2-Mylz2-ccfst1。通过显微注射方法, 并在体外合成的 Tgf2 转座酶 5' 加帽 mRNA 的介导下, 获得了一批转鲤 *Fst1* 基因的转基因鲤。经 PCR 检测, 转基因鲤 *Fst1* 外源基因的整合率平均为 44.7%, 对其中 4 尾转基因阳性鲤的扩增产物进行回收、克隆和测序验证, 结果表明阳性鲤中均含有转基因目的片段。说明 *Tgf2* 转座子转基因系统可在鲤中实现较高的转座效率, 为进一步研究卵泡抑素在鲤肌肉发育中的功能奠定了基础。

**研究亮点:** 通过构建包含金鱼 *Tgf2* 转座子左、右臂的鲤 *Fst1* 基因 ORF 转基因载体, 首次获得了一批转鲤 *Fst1* 基因的转基因鲤。研究表明, 通过转座酶介导转座子可实现目标基因在鲤胚胎内高效整合, 为利用 *Tgf2* 转座子新技术进行 *Fst1* 转基因鲤的研究奠定了基础。

**关键词:** *Tgf2* 转座子; *Fst1*; 鲤; 转基因效率

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

基于 DNA 转座子的基因转移系统是新一代转基因技术, 具有整合效率高、负载容量大、使用方便、通用性高等特点, 是新一代高效和通用的转基因方式<sup>[1]</sup>。但有自主转座活性的 DNA 转座子在脊椎动物中很少见。1996 年, 日本学者首次在白化青鳉 (*Oryzias latipes*) 中发现具有天然活性的脊椎动物 hAT 家族转座子, 即青鳉 *Tol2* 转座子<sup>[2]</sup>, 该转座子已在模式生物斑马鱼、罗非鱼中进行了转基因、基因和启动子捕获方面的应用<sup>[3-9]</sup>。近年来, JIANG 等发现一个新的具有天然活性的 *Tgf2* 转座子在我国一些金鱼品系中存在, 该转座子为迄今发现的第一例鲤科鱼类活性转座子<sup>[10]</sup>, 与青鳉 *Tol2* 转座子元件相同。金鱼 *Tgf2* 转座子含有末段倒位重复、亚末端重复、中间倒位重复和活性转座酶基因, 金鱼 *Tgf2* 与青鳉

*Tol2* 转座子在末段倒位重复和转座酶基因编码上存在差异, 金鱼 *Tgf2* 转座子可供构建出适合淡、海水鱼类的高效转基因元件<sup>[11]</sup>。

在脊椎动物中, 肌肉生长抑制素 (myostatin) 基因是肌肉生长、增殖和分化的负调控主效基因。卵泡抑素 (follistatin, Fst) 基因编码蛋白可通过与 myostatin 蛋白结合而拮抗其对肌肉发育的抑制作用, 从而表现出显著的增肌效应。如 REBHAN 和 FUNKENSTEIN<sup>[12]</sup> 通过原核表达获得了鱼的 Fst 纯化蛋白, 成功实现了 Fst 和 myostatin 在体外结合, 说明通过增加 Fst 蛋白提高动物肌肉产量存在一定可行性; LEE 和 MCPHERRON<sup>[13]</sup> 及 ZHU 等<sup>[14]</sup> 通过对小鼠肌肉组织中蛋白的观察, 发现卵泡抑素基因的高表达具有更强的对肌肉组织生长的促进作用;

收稿日期: 2013-09-03 修回日期: 2013-10-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (2011AA100404); 国家高技术研究发展计划项目 (2009AA10Z105)

作者简介: 闫学春 (1964—), 男, 研究员, 研究方向为分子生物学与基因工程育种。E-mail: yanxc8@163.com

通信作者: 孙效文, E-mail: sunxw2002@163.com

MEDEIROS 等<sup>[15]</sup>报道了对高表达 *Fst* 转基因虹鳟  $F_0$  的研究结果,观察到在原代转 *Fst* 基因虹鳟中,出现了明显的肌肉组织增生,促进了虹鳟肌肉的生长。本研究利用 *Tgf2* 转座子工具,对鲤进行了转鲤卵泡抑素基因的初步研究,通过鲤卵泡抑素对抑肌素的负调控作用,促进鲤肌肉的发育,为培育鲤新品种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼

采卵用实验鱼和对照鱼取自黑龙江水产研究所松浦试验场性成熟的鲤亲鱼。转基因鲤  $P_0$  的饲养管理、样品处理及检测程序等均与实验组相同。

### 1.2 转基因供体质粒 pTgf2-Mylz2-ccfst1 构建

pTgf2-Mylz2-eGFP 质粒保存于上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室,该质粒包含金鱼 *Tgf2* 转座子左臂(220 bp)、右臂(185 bp)序列、斑马鱼肌球蛋白轻链(*Mylz2*)启动子和绿色荧光蛋白(eGFP)编码基因。对 pTgf2-Mylz2-eGFP 质粒进行 *Bam* HI、*Cla* I 双酶切,酶切产物经 1.2% 琼脂糖凝胶,割胶回收目的片段,获得 pTgf2-Mylz2 质粒的双酶切产物。

参照鲤高通量转录组测序数据(GenBank 登录号:SRA050545)的拼接结果,通过同源比对方法,以斑马鱼 *Fst1* 基因(GenBank 序列号:AF084948)调取获得鲤卵泡抑素 *Fst1* 基因的编码框(ORF)序列,鲤 *Fst1* 基因 ORF 序列共 1260 bp,共编码 320 个氨基酸。根据鲤 *Fst1* 基因 ORF 序列设计带 *Bam* HI、*Cla* I 酶切位点的一对引物(5'-CGCGGATCCATGCTAAAGCGTCAGCCGCTCCA-3' 和 5'-CCATCGATTTACTTACAGTTGCAAGATCCTG-3'),引物由上海生工公司合成。以鲤肌肉 cDNA 为模板进行 PCR,PCR 扩增产物与 pMD-19T(TaKaRa 公司)载体连接,挑取阳性克隆进行测序验证,获得 pMD-ccfst1 质粒。进行 pMD-ccfst1 质粒 *Bam* HI、*Cla* I 的双酶切,酶切产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,割胶回收鲤 *Fst1* 基因双酶切产物,然后与 pTgf2-Mylz2 质粒 *Bam* HI、*Cla* I 双酶切产物连接,并转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取阳性克隆,测序验证获得 pTgf2-Mylz2-ccfst1 转基因供体质粒。

### 1.3 Tgf2 转座酶 mRNA 的体外转录

pCS2-CMV-gfTP 体外转录辅助质粒保存于上

海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室,该质粒包含原核 SP6 启动子和 577 bp 的金鱼 *Tgf2* 转座酶 ORF。以辅助质粒 pCS2-CMV-gfTP 为模板,进行 *Not* I 内切酶酶切线性化,采用 Sp6 mMessage mMachine kit (Ambion, USA) 试剂盒进行 *Tgf2* 转座酶 5'加帽 mRNA 的合成。

### 1.4 显微注射

在鲤繁殖季节,选择性成熟的亲鱼 5 组,对其注射鲫脑垂体和类似物的混合物进行人工催产,采集精液放在 4℃ 冰箱中备用。每次采集一定数量高质量的鲤卵子,取一定数量的鲤精子进行干法授精,并把受精卵分散粘附在培养皿上,以国产可三维移动的显微操作仪,用自制的玻璃注射针进行 1-2 细胞期的鲤受精卵的显微注射。每个胚胎注射转基因供体质粒 pTgf2-Mylz2-ccfst1 与 *Tgf2* 转座酶 mRNA 混合液 1 nL,供体质粒和转座酶的注射剂量各约为 50  $\mu$ g,对照鲤仅注射生理盐水。注射后的鲤受精卵于 22~23℃ 孵化,同时用气泵充气直至出膜。

### 1.5 转基因鱼基因组 DNA 提取

将幼鱼进行整体匀浆,加入 100  $\mu$ L 裂解液(200  $\mu$ g/mL 蛋白酶 K;0.5% 十二烷基肌氨酸钠;500 mmol/L EDTA, pH 8.0),55℃ 消化,中间不时地轻轻摇动,待组织完全消化后取出,用 V(酚):V(氯仿):V(异戊醇)=25:24:1 的混合液抽提 2 次,加入 RNA 酶(终浓度为 20  $\mu$ g/mL),37℃ 保温 30 min,再用等体积的氯仿抽提 1 次,将基因组 DNA 进行数次透析,无水乙醇沉淀,自然干燥后溶解于 1/10 TE 中,4℃ 保存备用。

### 1.6 外源基因整合率的检测

根据鲤 *Fst1* 基因序列设计一对引物,ccfst1-F: CGCGGATCCATGCTAAAGCGTCAGCCGCTCCA (32 bp); SV40-R: TGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCAC (27 bp),引物是由上海生工公司合成,从 ccfst1-F 到 SV40-R 的扩增条带为 1116 bp。

以普通鲤为阴性对照,以鲤转基因供体质粒 pTgf2-Mylz2-ccfst1 为阳性对照,进行转基因鲤的 PCR 分析。PCR 反应总体积为 25  $\mu$ L,退火温度为 58℃,反应程序于 PE9700 上进行。PCR 扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,goldview 染色(北京赛百盛),GDS8000(UVP 公司)凝胶成像系统进行观察拍摄,割胶回收转鲤 *Fst1* 基因阳性鲤

中的目标条带,进行连接、转化和测序验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 转基因供体质粒 pTgf2-Mylz2-ccfst1 的构建

根据 JIANG 等<sup>[10]</sup>的研究结果,金鱼 *Tgf2* 转座子的左末端和右末端是进行高效转座所必需的。我们构建了包含金鱼 *Tgf2* 转座子左(220 bp)、右臂(185 bp)、斑马鱼 *Mylz2* 启动子和鲤 *Fst1* 基因的供体质粒(图 1),该供体质粒由于不包含转座酶阅读框,因此不具备自主转座能力,但可在外源 *Tgf2* 转座酶 5'加帽 mRNA 的介导下进行转基因。

### 2.2 *Tgf2* 转座酶 5'加帽 mRNA 的合成

以带有原核 SP6 启动子的 577 bp 转座酶的辅助质粒 pCS2-CMV-gfTP(图 2a)为模板,进行 *Not* I

内切酶酶切线性化,采用 Sp6 mMessage mMachine kit (Ambion, USA) 试剂盒进行 *Tgf2* 转座酶 5'加帽 mRNA 的合成,体外合成的 577 bp 转座酶加帽 mRNA 的电泳结果如图 2b 所示。

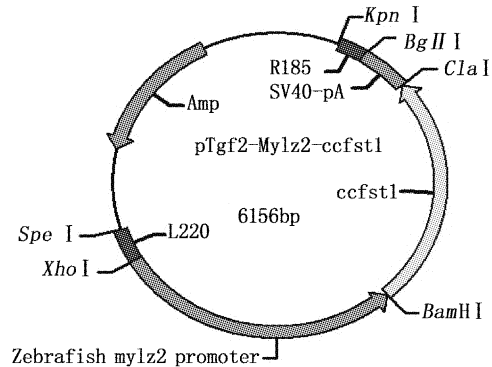


图 1 鲤 pTgf2-Mylz2-ccfst1 转基因供体质粒图谱  
Fig. 1 pTgf2-Mylz2-ccfst1 transgenic donor plasmid for *Cyprinus carpio*

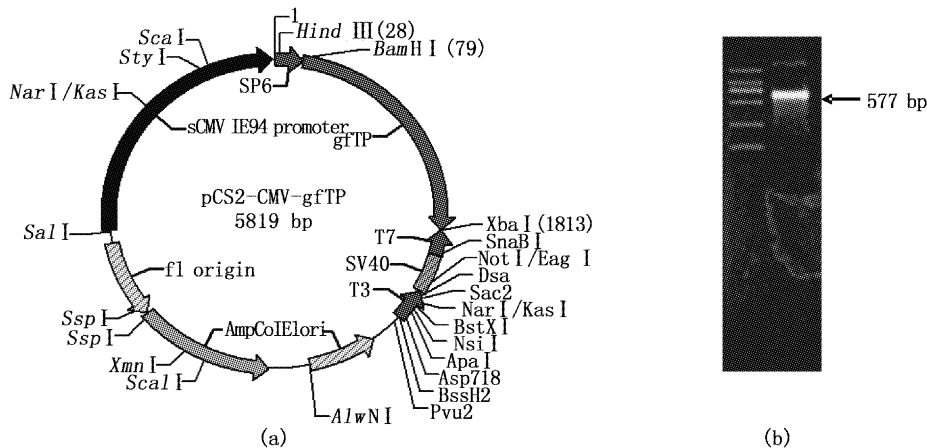


图 2 *Tgf2* 转座酶质粒 pCS2-CMV-gfTP 图谱 (a) 和体外转录的 *Tgf2* 转座酶 mRNA 电泳图 (b)  
Fig. 2 pCS2-CMV-gfTP plasmid of *Tgf2* transposition (a) and electrophoresis profile of *in vitro* transcribed *Tgf2* transposase (b)

### 2.3 鲤 *Fst1* 外源基因的转基因效果

2011 年 5-6 月期间,共进行了 8 批鲤受精卵的转基因显微注射,共注射受精卵 1 989 颗,出膜后存活 1 067 尾,转基因显微注射平均存活率为 54.1%,注射生理盐水的对照组的存活率为 93.2%(表 1)。

对转基因鱼个体的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,扩增的目的条带为 1 116 bp(图 3)。对 4 尾样品的阳性扩增产物进行回收、克隆和测序验证,测序结果如图 4 所示,表明鲤外源 *Fst1* 基因读码框成功插入鲤基因组中,转基因鲤 *Fst1* 外源

基因的整合率平均为 44.7%(表 1),表明 *Tgf2* 转座子转基因系统可在鲤中实现较高的转座效率。

## 3 讨论

金鱼 *Tgf2* 是一个新的具有天然活性的 hAT 转座子,其序列全长为 4 720 bp,与青鳉 *Tol2* 的相似度为 97%,包括 4 个阅读框。金鱼 *Tgf2* 转座子左右末端含有丰富的 A/GACTA 基序,其中左末端含有 17 个,而右末端含有 18 个,预示着金鱼 *Tgf2* 转座子的左右臂将在转座中起重要作用。金鱼 *Tgf2* 转座子具有转座子的一些主要的特征

表 1 转鲤 *Fst1* 基因鲤幼鱼存活率和阳性率检测

组合	注射卵数/枚	出膜后存活数/尾	存活率/%	检测幼鱼数/尾	阳性幼鱼数/尾	阳性率/%	
实验组	1	185	112	60.5	20	9	45.0
	2	276	150	54.3	25	12	48.0
	3	250	136	54.4	30	14	46.7
	4	270	128	47.4	32	14	43.8
	5	219	129	58.9	15	6	40.0
	6	241	130	53.9	-	-	-
	7	262	137	52.3	-	-	-
	8	286	145	50.7	-	-	-
	平均	248.6	133.4	54.1	24.4	11.0	44.7
对照组	248	231	93.2	-	-	-	

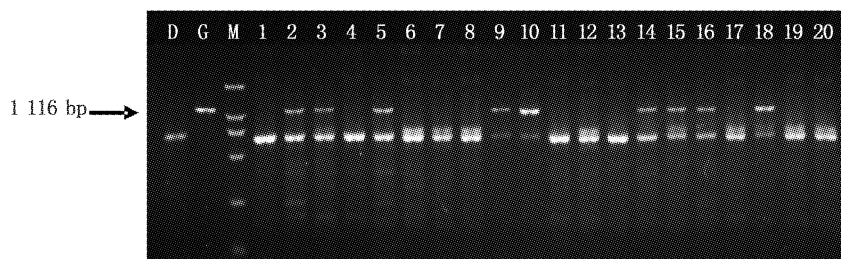
图 3 转鲤 *Fst1* 基因鲤的 PCR 检测分析

Fig. 3 PCR analysis of transgenic carp

D. 正常鱼,阴性对照; G. 供体质粒 pTgf2-Mylz2-ccfst1,阳性对照; M. 分子量标准; 1-20. 转鲤 *Fst1* 基因鲤。

区域,比如说末端反向重复序列,亚末端重复序列区域等。金鱼 *Tgf2* 转座子介导的转基因整合效率要高于第一代线性化质粒注射方法的 10 倍,具有整合位点检测方便等特点,是目前进行鱼类转基因研究中的高效和先进方法<sup>[16]</sup>。如 SUMIYAMA 等<sup>[17]</sup>将 *Tol2* 转座子载体携带的外源基因与转座酶 mRNA 共注射入鼠受精卵细胞质中,使显微注射法的整合率从 3% 提高到 20% 以上。XUE 等<sup>[18]</sup>也通过 *Tol2* 转座子介导的大规模增强子诱捕筛选到 26 个血管特异表达绿色荧光蛋白报告基因的转基因斑马鱼系。本研究通过构建包含金鱼 *Tgf2* 转座子左、右臂的鲤 *Fst1* 基因 ORF 转基因载体,获得了一批转鲤 *Fst1* 基因的转基因鲤,这对利用转座子新技术进行转基因鲤的研究具有一定的实际应用价值。通过转座酶可以帮助转座子更好地整合到鲤基因组上,提高转座子的转座效率,并通过显微注射在鲤胚胎内高效转座。我们在 *Tgf2* 转座子转基因的研究中,通过对鲤的一系列实验,并对获得的转鲤 *Fst1* 基因鲤进行检测,外源基因的整合率在 40% ~ 48% 之间,与青鳉 *Tol2* 转座元件在不同脊椎动物

的转基因整合率相近<sup>[1]</sup>,均为 50% 左右。说明 *Tgf2* 转座子转基因系统可以在鲤中实现较高的转座效率,这为进一步筛选、培育出肌肉生长迅速的转基因鲤奠定了物质基础,为今后利用金鱼 *Tgf2* 转座子进行转基因鲤研究提供了基础数据。总之,随着对转座子机理认识的不断深入,转座子技术体系将更加完善,对转座子转座的可控性和操作性逐渐增强。目前,鱼类转座子转基因技术正在成为鲤科鱼类的基因组改造和遗传操作的主要工具之一,对提高鲤的转基因效率,加快鲤转基因研究的进程起到了促进作用<sup>[19]</sup>。

关于卵泡抑素 (follistatin, Fst) 生物学功能的研究,国内外已有相关报道,但关于在金鱼 *Tgf2* 转座子介导下的转鲤 *Fst1* 基因鲤的研究未见报道。有研究结果发现卵泡抑素对动物的肌肉生长具有重要的调节作用,可与肌肉生长抑素 (myostatin) 的 C 端结合,从而抑制 myostatin 与受体的结合,进而促进骨骼肌发育<sup>[20-21]</sup>。目前,在鱼类和哺乳动物中克隆卵泡抑素基因已有一些报道。如李胜杰等<sup>[22]</sup>成功获得了加州鲈 Fst 融合蛋白,并在大肠杆菌中成功表达了重组卵泡抑

```

pTgf2-ccfst1 -CCCCGGGGTA-TGATTTTATTACTC--TTATGGCTCTGTTATTGATTGAAGATCAAAAAGTGAAGCTGGTAAGCTGCTGGCTACAGCAAGGCA
转基因鲤2 --CCCCGGGGTA-TGATTTTATTACTC--TTATGGCTCTGTTATTGATTGAAGATCAAAAAGTGAAGCTGGTAAGCTGCTGGCTACAGCAAGGCA
转基因鲤3 -CCCCGGGGGA-TGATTTTATTACTC--TTATGGCTCTGTTATTGATTGAAGATCAAAAAGTGAAGCTGGTAAGCTGCTGGCTACAGCAAGGCA
转基因鲤5 CCACGGGGGGCA-TGATTTTATTACTC--TTATGGCTCTGTTATTGATTGAAGATCAAAAAGTGAAGCTGGTAAGCTGCTGGCTACAGCAAGGCA
转基因鲤10 TCAACGGGGCAATGATTTTATTACTCTTTATGGCTCTGTTATTGATTGAAGATCAAAAAGTGAAGCTGGTAAGCTGCTGGCTACAGCAAGGCA
*****
pTgf2-ccfst1 AGAACGGGAGATGTCAGGTCTCTACATGCCTGGGATGAGTCGAGAGAAATGCTGCCGGAGTGGGAGGCTCGGAACATCTTGGACTGAGGAAGATG
转基因鲤2 AGAACGGGAGATGTCAGGTCTCTACATGCCTGGGATGAGTCGAGAGAAATGCTGCCGGAGTGGGAGGCTCGGAACATCTTGGACTGAGGAAGATG
转基因鲤3 AGAACGGGAGATGTCAGGTCTCTACATGCCTGGGATGAGTCGAGAGAAATGCTGCCGGAGTGGGAGGCTCGGAACATCTTGGACTGAGGAAGATG
转基因鲤5 AGAACGGGAGATGTCAGGTCTCTACATGCCTGGGATGAGTCGAGAGAAATGCTGCCGGAGTGGGAGGCTCGGAACATCTTGGACTGAGGAAGATG
转基因鲤10 AGAACGGGAGATGTCAGGTCTCTACATGCCTGGGATGAGTCGAGAGAAATGCTGCCGGAGTGGGAGGCTCGGAACATCTTGGACTGAGGAAGATG
*****
pTgf2-ccfst1 TGCCAAACAGCACATTATTCAGGTGGATGATCTTCAATGGCGGGCTCCAAACTGCATACCTTGTAAAGAGACATGTGATAATGTGGACTGTGGCC
转基因鲤2 TGCCAAACAGCACATTATTCAGGTGGATGATCTTCAATGGCGGGCTCCAAACTGCATACCTTGTAAAGAGACATGTGATAATGTGGACTGTGGCC
转基因鲤3 TGCCAAACAGCACATTATTCAGGTGGATGATCTTCAATGGCGGGCTCCAAACTGCATACCTTGTAAAGAGACATGTGATAATGTGGACTGTGGCC
转基因鲤5 TGCCAAACAGCACATTATTCAGGTGGATGATCTTCAATGGCGGGCTCCAAACTGCATACCTTGTAAAGAGACATGTGATAATGTGGACTGTGGCC
转基因鲤10 TGCCAAACAGCACATTATTCAGGTGGATGATCTTCAATGGCGGGCTCCAAACTGCATACCTTGTAAAGAGACATGTGATAATGTGGACTGTGGCC
*****
pTgf2-ccfst1 CTGGGAAGAAATGTAATAATGAACAGGAGGAGTAAGCCTCGCTGCGCTCCAGACTGCTCCAACATCCTTGGAGGGGCTGTGTGGCT
转基因鲤2 CTGGGAAGAAATGTAATAATGAACAGGAGGAGTAAGCCTCGCTGCGCTCCAGACTGCTCCAACATCCTTGGAGGGGCTGTGTGGCT
转基因鲤3 CTGGGAAGAAATGTAATAATGAACAGGAGGAGTAAGCCTCGCTGCGCTCCAGACTGCTCCAACATCCTTGGAGGGGCTGTGTGGCT
转基因鲤5 CTGGGAAGAAATGTAATAATGAACAGGAGGAGTAAGCCTCGCTGCGCTCCAGACTGCTCCAACATCCTTGGAGGGGCTGTGTGGCT
转基因鲤10 CTGGGAAGAAATGTAATAATGAACAGGAGGAGTAAGCCTCGCTGCGCTCCAGACTGCTCCAACATCCTTGGAGGGGCTGTGTGGCT
*****
pTgf2-ccfst1 CAGACGGGAAAACATACCGAGATGAATGTGCCCTTTTGAATAATCCAAATGCAAAAGGGCACCCAGATCTGGAGGTGACAGTACCAGGCAGATGCAAAA
转基因鲤2 CAGACGGGAAAACATACCGAGATGAATGTGCCCTTTTGAATAATCCAAATGCAAAAGGGCACCCAGATCTGGAGGTGACAGTACCAGGCAGATGCAAAA
转基因鲤3 CAGACGGGAAAACATACCGAGATGAATGTGCCCTTTTGAATAATCCAAATGCAAAAGGGCACCCAGATCTGGAGGTGACAGTACCAGGCAGATGCAAAA
转基因鲤5 CAGACGGGAAAACATACCGAGATGAATGTGCCCTTTTGAATAATCCAAATGCAAAAGGGCACCCAGATCTGGAGGTGACAGTACCAGGCAGATGCAAAA
转基因鲤10 CAGACGGGAAAACATACCGAGATGAATGTGCCCTTTTGAATAATCCAAATGCAAAAGGGCACCCAGATCTGGAGGTGACAGTACCAGGCAGATGCAAAA
*****
pTgf2-ccfst1 AGACGTGTCGTGATGTCGTGTGTCCGGGAAGCTCGACTTGGCTGGTGACAGCAAAACAATGCATACTGTGTGACATGCAACCCCATATGCCAG
转基因鲤2 AGACGTGTCGTGATGTCGTGTGTCCGGGAAGCTCGACTTGGCTGGTGACAGCAAAACAATGCATACTGTGTGACATGCAACCCCATATGCCAG
转基因鲤3 AGACGTGTCGTGATGTCGTGTGTCCGGGAAGCTCGACTTGGCTGGTGACAGCAAAACAATGCATACTGTGTGACATGCAACCCCATATGCCAG
转基因鲤5 AGACGTGTCGTGATGTCGTGTGTCCGGGAAGCTCGACTTGGCTGGTGACAGCAAAACAATGCATACTGTGTGACATGCAACCCCATATGCCAG
转基因鲤10 AGACGTGTCGTGATGTCGTGTGTCCGGGAAGCTCGACTTGGCTGGTGACAGCAAAACAATGCATACTGTGTGACATGCAACCCCATATGCCAG
*****
pTgf2-ccfst1 ATGTTACCTCTCCGGATCAGTACCTTTTGGCAATGACGGGATTTGTTACGCCAGCGCGTCCATTTGAGGAGAGCCACATGCTTGTGTGTAGAT
转基因鲤2 ATGTTACCTCTCCGGATCAGTACCTTTTGGCAATGACGGGATTTGTTACGCCAGCGCGTCCATTTGAGGAGAGCCACATGCTTGTGTGTAGAT
转基因鲤3 ATGTTACCTCTCCGGATCAGTACCTTTTGGCAATGACGGGATTTGTTACGCCAGCGCGTCCATTTGAGGAGAGCCACATGCTTGTGTGTAGAT
转基因鲤5 ATGTTACCTCTCCGGATCAGTACCTTTTGGCAATGACGGGATTTGTTACGCCAGCGCGTCCATTTGAGGAGAGCCACATGCTTGTGTGTAGAT
转基因鲤10 ATGTTACCTCTCCGGATCAGTACCTTTTGGCAATGACGGGATTTGTTACGCCAGCGCGTCCATTTGAGGAGAGCCACATGCTTGTGTGTAGAT
*****
pTgf2-ccfst1 CCATTGGAGTGGCATAATGAAGGAAAATGCATCAAGGCCAAGTCAATGACGATATCCAGTGCAGTGTGGAAAAGAGTGTCTATGGGATTTCAAGA
转基因鲤2 CCATTGGAGTGGCATAATGAAGGAAAATGCATCAAGGCCAAGTCAATGACGATATCCAGTGCAGTGTGGAAAAGAGTGTCTATGGGATTTCAAGA
转基因鲤3 CCATTGGAGTGGCATAATGAAGGAAAATGCATCAAGGCCAAGTCAATGACGATATCCAGTGCAGTGTGGAAAAGAGTGTCTATGGGATTTCAAGA
转基因鲤5 CCATTGGAGTGGCATAATGAAGGAAAATGCATCAAGGCCAAGTCAATGACGATATCCAGTGCAGTGTGGAAAAGAGTGTCTATGGGATTTCAAGA
转基因鲤10 CCATTGGAGTGGCATAATGAAGGAAAATGCATCAAGGCCAAGTCAATGACGATATCCAGTGCAGTGTGGAAAAGAGTGTCTATGGGATTTCAAGA
*****
pTgf2-ccfst1 TGGTTCGGGGCGCTGTGCAGITTCATGGAGACATGCCAGAAAAGTTCATCGGAGGAGGCGGTGTGCCAGCGCAACACCAGTATCCACGG
转基因鲤2 TGGTTCGGGGCGCTGTGCAGITTCATGGAGACATGCCAGAAAAGTTCATCGGAGGAGGCGGTGTGCCAGCGCAACACCAGTATCCACGG
转基因鲤3 TGGTTCGGGGCGCTGTGCAGITTCATGGAGACATGCCAGAAAAGTTCATCGGAGGAGGCGGTGTGCCAGCGCAACACCAGTATCCACGG
转基因鲤5 TGGTTCGGGGCGCTGTGCAGITTCATGGAGACATGCCAGAAAAGTTCATCGGAGGAGGCGGTGTGCCAGCGCAACACCAGTATCCACGG
转基因鲤10 TGGTTCGGGGCGCTGTGCAGITTCATGGAGACATGCCAGAAAAGTTCATCGGAGGAGGCGGTGTGCCAGCGCAACACCAGTATCCACGG
*****
pTgf2-ccfst1 AGTGCCTATGAAGCAGGCCGCTTGCTCTTTGGGGTTCTCCTGGAGATTAAGCATTAGGATGATGATCCAGACATGATAAGATACATTTGATGAG
转基因鲤2 AGTGCCTATGAAGCAGGCCGCTTGCTCTTTGGGGTTCTCCTGGAGATTAAGCATTAGGATGATGATCCAGACATGATAAGATACATTTGATGAG
转基因鲤3 AGTGCCTATGAAGCAGGCCGCTTGCTCTTTGGGGTTCTCCTGGAGATTAAGCATTAGGATGATGATCCAGACATGATAAGATACATTTGATGAG
转基因鲤5 AGTGCCTATGAAGCAGGCCGCTTGCTCTTTGGGGTTCTCCTGGAGATTAAGCATTAGGATGATGATCCAGACATGATAAGATACATTTGATGAG
转基因鲤10 AGTGCCTATGAAGCAGGCCGCTTGCTCTTTGGGGTTCTCCTGGAGATTAAGCATTAGGATGATGATCCAGACATGATAAGATACATTTGATGAG
*****
pTgf2-ccfst1 TTTGGACAAACCACAACAGAAATGCAAGTGAAGAAAA--TGCTTTATTT-GTGAATTTTGTG-ATGCTATTGCTTATTTTTGTTAAACCA--
转基因鲤2 TTTGGACAAACCACAACAGAAATGCAAGTGAAGAAAA--TGCTTTATTT-GTGAATTTTGTG-ATGCTATTGCTTATTTTTGTTAAACCA--
转基因鲤3 TTTGGACAAACCACAACAGAAATGCAAGTGAAGAAAA--TGCTTTATTT-GTGAATTTTGTG-ATGCTATTGCTTATTTTTGTTAAACCA--
转基因鲤5 TTTGGACAAACCACAACAGAAATGCAAGTGAAGAAAA--TGCTTTATTT-GTGAATTTTGTG-ATGCTATTGCTTATTTTTGTTAAACCA--
转基因鲤10 TTTGGACAA-CCACAACAGAAATGCAAGTGAAGAAAAATGCTTTATTT-GTGAATTTGCTGATGCTTATTGCTTATTTGCT--AACACGT----
*****

```

图 4 转 *Fst1* 基因鲤片段序列与供体质粒基因序列比对  
 Fig. 4 Sequence alignment of *Fst1* sequences between transgenic carp and donor plasmid

素;莫毅等<sup>[23]</sup>获得了猪卵泡抑素 cDNA 序列,并成功表达了 *Fst* 融合蛋白;在卵泡抑素转基因研究中,李西等<sup>[24]</sup>通过转斑马鱼 *Fst1* 基因质粒 DNA,证明了鱼类 *Fst1* 在肌肉组织中的高表达,并可促进斑马鱼肌肉的生长。结果表明抑制肌抑素对鱼类肌肉促生长的效果可能与哺乳动物类似。研究发现转 *Fst* 基因小鼠的体型较对照组的大,骨骼肌纤维的数量也显著增多,这种肌肉增加是由于肌细胞增生和肥大共同造成的。

在低等脊椎动物中,研究 *Fst* 基因对肌肉发育的功能的报道较少,仅在斑马鱼和蓝鲶中有报道。本实验针对鲤卵泡抑素 *Fst1* 读码框序列,克隆鲤 *Fst* 基因,采用 *Tgf2* 转座子介导了带斑马鱼 *Mylz2* 启动子的鲤 *Fst1* 基因在鲤中的高效转座研究,经检测,获得了一批转鲤 *Fst1* 基因的转基因鲤,但仍有许多工作要做。如鲤 *Fst1* 基因是否具有可遗传能力?是否能抑制鲤 myostatin 的活性从而促进转基因鲤后代肌肉的生长?通过池塘的强

化培育,能否筛选出与虹鳟类似,也具有促进肌肉生长的后代等。这些问题都还有待于今后试验中进行深入地分析检测。随着分子生物学发展和 *Fst* 基因的深入研究,将会设计出更多高效的基因元件用于基因改良,从而使鱼类的转基因研究具有更广阔的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] KAWAKAMI K. *Tol2*: a versatile gene transfer vector in vertebrates[J]. *Genome Biology*, 2007, 8(s1): S7.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] PARINOV S, KONDRICHIN I, KORZH V, et al. *Tol2* transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes *in vivo* [J]. *developmental dynamics*, 2004, 231(2): 449-459.
- [6] BALCIUNAS D, WANGENSTEEN K J, WILBER A, et al. Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates [J]. *PLoS Genetics*, 2006, 2(11):169.
- [7] KOTANI T, NAGAYOSHI S, URASAKI A, et al. Transposon-mediated gene trapping in zebrafish[J]. *Methods*, 2006, 39(3): 199-206.
- [8] FISHER S, GRICE E A, VINTON R M, et al. Evaluating the biological relevance of putative enhancers using *Tol2* transposon-mediated transgenesis in zebrafish [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(3): 1297-1305.
- [9] ASAKAWA K, SUSTER M L, MIZUSAWA K. Genetic dissection of neural circuits by *Tol2* transposon-mediated *Gal4* gene and enhancer trapping in zebrafish [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(4): 1255-1260.
- [10] JIANG X, DU X, TIAN Y, et al. Goldfish transposase Tgf2 presumably from recent horizontal transfer is active [J]. *FASEB Journal*, 2012,26(7):2743-2752.
- [11] 邹曙明,杜雪地,袁剑. 金鱼 hAT 家族转座子 Tgf2 的克隆及其结构[J]. *遗传*, 2010, 32(12): 1263-1268.
- [12] REBHAN Y, FUNKENSTEIN B. Inhibition of fish myostatin activity by recombinant fish follistatin and myostatin prodomain: Potential implications for enhancing muscle growth in farmed fish[J]. *Aquaculture*, 2008, 284(1/4): 231-238.
- [13] LEE S J, MCPHERRON A C. Regulation of myostatin activity and muscle growth [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(16): 9306-9311.
- [14] ZHU X, HADHAZY M, WEHLING M, et al. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle[J]. *FEBS LETTERS*, 2000, 474(1): 71-75.
- [15] MEDEIROS E F, PHELPS M P, FUENTES F, et al. Overexpression of follistatin in trout stimulates increased muscling[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, 297: 235-242.
- [16] 孙效文,徐鹏. 水产基因组技术与研究进展[M]. 北京: 海洋出版社, 2011: 188-199.
- [17] SUMIYAMA K, KAWAKAMI K, YAGITA K. A simple and highly efficient transgenesis method in mice with the *Tol2* transposon system and cytoplasmic microinjection [J]. *Genomics*, 2010,95(5): 306-311.
- [18] XUE Y, 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.
- [19] 谢维欣,武建明,王洪梅,等. 转座子在动物转基因研究中的应用[J]. *家畜生态学报*, 2011, 32(5): 87-90.
- [20] 何新,齐冰,何立千,等. 猪 follistatin cDNA 克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. *生物工程学报*, 2006, 22(4): 677-681.
- [21] KOSTEK M A, ANGELOPOULOS T J, GLARKSON P M. Myostatin and follistatin in polymorphisms interact with muscle phenotypes and ethnicity [J]. *Medicine Science Sports Exercise*, 2009, 41(5): 1063-1071.
- [22] 李胜杰,白俊杰,叶星,等. 加州鲈卵泡抑素 cDNA 的克隆、分析和原核表达[J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15(5): 783-788.
- [23] 莫毅,郭亚芬,梁方方,等. 广西巴马小型猪卵泡抑素的克隆及原核表达[J]. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(10): 49-52.
- [24] 李西,聂芬,殷战,等. 转基因高表达卵泡抑素 1 对斑马鱼肌肉生长促进作用研究[J]. *中国科学:生命科学*, 2011, 41(1): 53-60.

## Study on transgenic efficiency of *Fst1* gene element mediated by *Tgf2* transposon in common carp

YAN Xue-chun<sup>1</sup>, ZHONG Sha-sha<sup>2</sup>, XU Peng<sup>3</sup>, ZOU Shu-ming<sup>2</sup>, SUN Xiao-wen<sup>1</sup>

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, National Local Joint Engineering Laboratory of Freshwater Fish Breeding, Key Laboratory of Freshwater Aquatic Biotechnology and Genetic Breeding, Harbin 150070, Heilongjiang, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. The Centre of Applied Aquatic Genomics, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China)

**Abstract:** Follistatin (FST) could antagonize the TGF- $\beta$  superfamily members and inhibit the activity of endo-myostatin via direct protein-protein interaction, thereby restoring muscle growth. Here, according to the splicing results of the high-throughput transcriptome sequencing data for *Cyprinus carpio*, we cloned the open reading frame (ORF) sequence of the *Fst1* gene, which was 1 260 bp in length and encodes a protein of 320 amino acids. We then constructed a pTgf2-Mylz2-ccfst1 donor plasmid carrying both the left (220 bp) and right (185 bp) arms of goldfish *Tgf2* transposon, the promoter of zebrafish *Mylz2* and the ORF of carp *Fst1*. Transgenic carps were obtained via co-microinjection of the donor and the capped mRNA of the *Tgf2* transposase synthesized *in vitro*. The average integration rate of the exogenous gene in transgenic carp was 44.7% as measured by PCR. The amplified products of four positive transgenic carp were recovered, cloned and sequenced to confirm that all of them contained the target fragment. Our results demonstrated the high transgenic efficiency of the *Tgf2* transposon in *C. carpio*, which laid the foundation for further studies on the function of FST during carp muscle development.

**Key words:** *Tgf2* transposon; *Follistatin 1*; common carp; transgenic efficiency