

鱼类转基因早期胚胎细胞的核移植研究*

陈尚萍 赵浩斌 孙永华 张甫英 朱作言**

(中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要 像许多转基因高等生物一样,用显微注射方法研制的转基因鱼均为转植基因嵌合体,培育纯合转基因品系已成为研究者们向往和追求的目标.以澎泽鲫(*Carassius auratus*, Pengze var.)和黄河鲤(*Cyprinus carpio*, Huanghe var.)为实验材料,以转基因囊胚细胞核或原肠胚细胞核为供体,进行了细胞核移植.检测了转植基因在所获得的移核胚胎和 5 尾澎泽鲫移核鱼及 1 尾黄河鲤移核鱼中的存在状况,分析了用转基因早期胚胎细胞核移植方法研制纯合转基因鱼的可能性.

关键词 鱼 基因转植 细胞核移植

自 1985 年转基因鱼首次在中国获得成功以来^[1],我国学者已成功地将人生长激素(hGH)基因转入到泥鳅、鲤鱼和鲫鱼,证实了转植基因(transgene)在受体鱼中的整合、表达、生物学功能和遗传规律,并建立了转基因鱼模型^[2,3].实验表明,从原肠期开始,实验胚胎中外源基因无论整合与否,均可以转录;在胚胎发育过程中,外源基因的整合是一个渐进的过程;整合了的外源基因可通过性腺传递给子代.进一步的研究发现,转生长激素基因鱼具有显著的饵料节省效应,鱼体蛋白质含量增加,脂肪、水分含量降低^[4,5].显然,转生长激素基因鱼应用于水产养殖将带来巨大的经济效益.然而,转植基因在转基因鱼体内也表现出整合镶嵌性、表达无序性和遗传不稳定性.采用基因转移和鱼类细胞核移植相结合,将是解决这些问题的有效途径^[6].最近,本实验室以绿色荧光蛋白(GFP)基因为报告基因的研究表明,外源基因在受体鱼类胚胎中的整合最早从囊胚期开始^[7].在上述研究结果的基础上,作者以转基因早期胚胎为核供体进行了核移植研究,本文报道了该研究的实验结果.

1 材料方法

1.1 实验动物

试验鱼澎泽鲫(*Carassius auratus*, Pengze var.)由武汉赛思淡水养殖工程技术研究中心提供,黄河鲤(*Cyprinus carpio*, Huanghe var.)由河南省水产研究所提供.试验鱼在产卵季节通过注射鲤鱼脑垂体匀浆液催产.

1.2 目的基因

转植的外源基因为本实验室构建的“全鱼基因”.包括重组生长激素基因构建体

2000-04-04 收稿,2000-04-24 收修改稿

* 国家自然科学基金重点项目(批准号:39730290)和中国科学院院长特别基金资助项目

** 联系人

pCAgcGH、重组生长激素 cDNA 构建体 pCAgcGHc 和重组鲑鱼胰岛素样生长因子(sIGF)cDNA 构建体 pCAsIGFc(图 1), 它们分别是由鲤鱼 β -肌动蛋白基因启动调控顺序驱动的草鱼 GH 基因组 DNA、草鱼 GH cDNA 和鲑鱼胰岛素样生长因子-1 cDNA¹⁾。

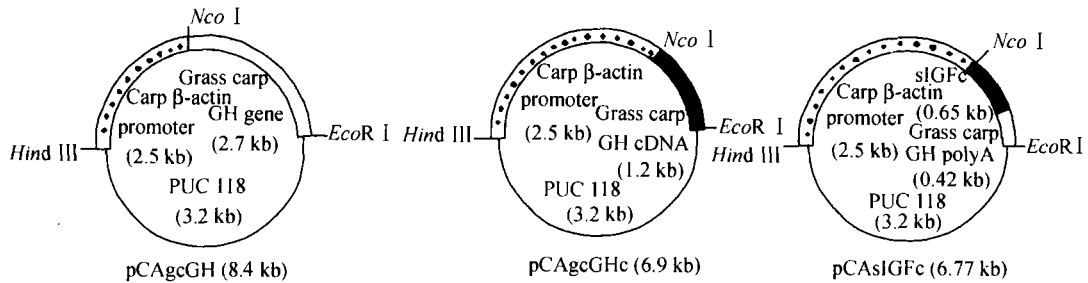


图 1 质粒结构示意图

1.3 基因转植方法

采用显微注射方法^[1]。

1.4 细胞核移植方法

分别采用显微注射^[8]和电融合^[9]两种方法进行。显微注射时参照余来宁等用不去核的成熟卵细胞作受体进行核移植, 供体为转基因的早期胚胎细胞, 即囊胚期或原肠期细胞。分离这些胚胎细胞, 显微注射到受体卵细胞的动物极, Holtfreter 液中培养 24h, 然后在曝气的冷开水中培养。观察、计数各时期胚胎发育数。电融合时将卵置于盛有 Holtfreter 液的电融合小室中, 加入分离的胚胎细胞, 施以 1 次直流脉冲, 电场强度 1kV/cm, 电脉冲发生仪为 BAEKON2000。电脉冲处理后的胚胎培养同显微注射法。

1.5 DNA 的提取

胚胎 DNA 的提取采用稍加改进的组织 DNA 提取方法。单个胚胎置于离心管中, 加入 DNA 抽提液 100 μ L 和蛋白酶 K 1 μ g/ μ L, 50 $^{\circ}$ C 保温 3h 以上, 加入等体积酚-氯仿, 振荡混匀, 12 000 r/min 离心 15 min, 收集水相, 加入 2 倍体积乙醇, 混匀, 离心收集沉淀, 干燥后溶于 20 μ L TE 中于 -20 $^{\circ}$ C 保存。鱼苗 DNA 的提取按常规方法进行^[1]。

1.6 外源基因的检测

采用 PCR 方法进行外源基因的检测。PCR 的引物分别在 5' 启动调控顺序上游和编码的结构基因顺序处, 即: 正向引物 1 为 5'-TGGCGTGATGAATGTCG-3', 位于鲤鱼 β -肌动蛋白基因启动调控顺序上; 反向引物 2 为 5'-GCAGTCATACGTGTT-3', 位于草鱼 GH 基因(包括 cDNA)编码顺序上; 反向引物 3 为 5'-AGGA ACTACCGAATGTAG-3', 位于鲑鱼 IGF cDNA 顺序上。引物 1 和引物 2 特异的 PCR 产物对于 pCAgcGHc 和 pCAgcGH 分别为 0.41kb 和 0.68kb, 引物 1 和引物 3 的 PCR 产物为 0.8kb。PCR 反应物的总体积为 25 μ L, 含引物各 1 pmol/ μ L, 4 种 dNTP 各 50 μ mol/L, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, 1U Taq 聚合酶。PCR 条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 30 个循环扩增反应, 每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min; 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 保温 5 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 UVP GDS8000 型凝胶成像系统观察记录。

1) 未发表资料

2 结果与分析

2.1 外源基因在转基因胚胎发育过程中的存在

澎泽鲫受精卵显微注射“全鱼”基因后,在胚胎发育的各个时期分别随机取 30 个样品,提取 DNA 进行 PCR 检测,结果见表 1 和图 2. 胚胎发育至肌节期,外源基因的存在率为 100%,显微注射可以准确地把外源大分子导入受精卵内. 随着胚胎继续发育,外源基因的检出率有所下降,但在鱼苗阶段检测的阳性率仍高达 70%. 由此可见,显微注射不失为最有效的鱼类基因转移方法之一.

表 1 外源基因在澎泽鲫受精卵不同发育时期的检测率

发育期	囊胚	神经胚	肌节期	肌肉效应期	心跳期	鱼苗
检测数	30	30	30	30	30	30
PCAsIGFc/%	100	100	90	80	80	70
PCAgcGH/%	100	90	90	80	70	70
PCAgcGHc/%	100	100	100	90	80	70

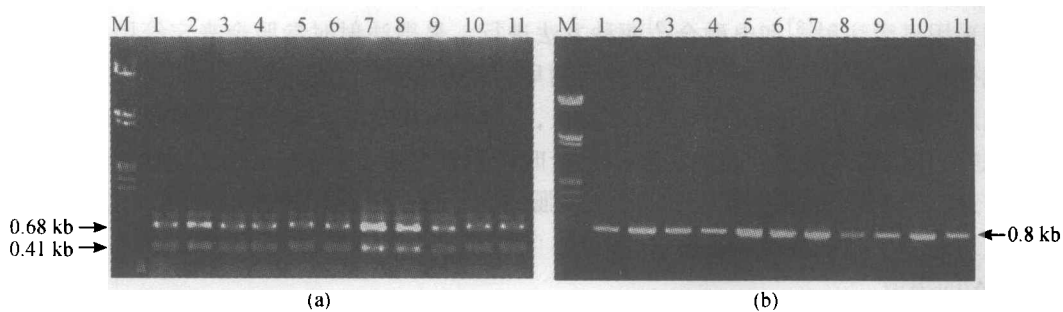


图 2 显微注射 pCAGcGH, pCAGcGHc(a) 和 pCAsIGFc(b) 基因的澎泽鲫囊胚 PCR 扩增结果
M 为 *Eco*R I 和 *Hind*III 双酶切的 λ DNA; 1~11 为样品

2.2 转基因胚胎细胞核移植体的发育

转基因胚胎细胞核移植发育的结果见表 2. 用两种鱼卵为受体,转基因(pCAGcGH 和 pCAGcGHc)囊胚或原肠胚细胞核为供体,共移植 908 例. 移核胚发育至囊胚、原肠胚、神经胚、肌节胚和鱼苗的比率分别为 12.8%, 2.3%, 2.0%, 0.7% 和 0.4%. 共得到澎泽鲫核移鱼 3 尾,其中 1 尾 1 月龄时死亡;黄河鲤移核鱼 1 尾,出苗 5 天后卵黄囊破裂死亡;用针刺澎泽鲫成熟卵细胞为对照,其囊胚发育率为零. 以囊胚细胞核或原肠胚细胞核作供体,移核胚的发育率差异不显著($p > 0.05$).

用不同参数进行了 26 批电融合核移植,受体卵 1 335 枚,其中仅在脉冲强度为 1 kV/cm,处理时间分别为 40 和 160 μ s 两组实验中各获得 1 尾移核澎泽鲫(表 3). 然而,电融合核移植的最佳参数较难确定,实验重复率低.

2.3 外源基因在核移植胚胎及移核鱼中的存在

为了检测细胞核移植后外源基因在核移植体中的传递,本实验取转基因澎泽鲫囊胚细胞核移植体,以 PCR 技术测定,其结果为外源基因 pCAsIGFc, pCAGcGH 和 pCAGcGHc 在移核胚囊

胚期中存在的比例分别为 40%、80% 和 70% (各取 10 枚胚胎)(图 3(a)和(b)). 实验表明囊胚细胞携带的外源基因经核移植能够传递到新的重构胚中. 同样采用 PCR 检测技术,对转基因胚胎核移植所得到的 6 尾个体检测外源基因,只从其中一尾发现了 pCAgcGHc 的存在,其阳性率仅为 16.7%,远低于核移植体囊胚时期外源基因的检测阳性率(图 3(c)). 实验表明核移植囊胚细胞所携带的外源基因可能大部分尚未整合进基因组,处于游离状态,经过再次分裂增殖,细胞中的外源基因丢失;或者外源基因在囊胚期各个细胞中分布不均匀,仅部分细胞含有(整合有)外源基因,而大部分细胞中已不存在外源基因.

表 2 显微注射核移植胚胎的发育结果

细胞核供体	核移植数	发育时期/%					
		囊胚期	原肠胚	神经胚	肌节期	鱼苗	
彭泽鲫	囊胚	330	39(11.8)	14(4.2)	10(3.0)	3(0.9)	2(0.6)
	原肠胚	412	49(11.9)	2(0.5)	2(0.5)	1(0.3)	1(0.3)
	总和	742	88(11.9)	16(2.2)	12(1.6)	4(0.5)	3(0.4)
	对照	570	0				
黄河鲤	囊胚	77	20(26.0)	4(5.2)	1(1.3)	1(1.3)	0
	原肠胚	89	8(9.0)	1(1.1)	1(1.1)	1(1.1)	1(1.1)
	总和	166	28(16.9)	5(3.0)	2(1.2)	2(1.2)	1(0.6)

表 3 电融合彭泽鲫核移植结果(脉冲强度:1 kV/cm)

处理	脉冲处理时间/ μ s				对照
	20	40	80	160	
处理数	44	43	42	41	63
囊胚	0	1	0	1	0
鱼苗	0	1	0	1	0
见苗率/%	0	2.3	0	2.4	0

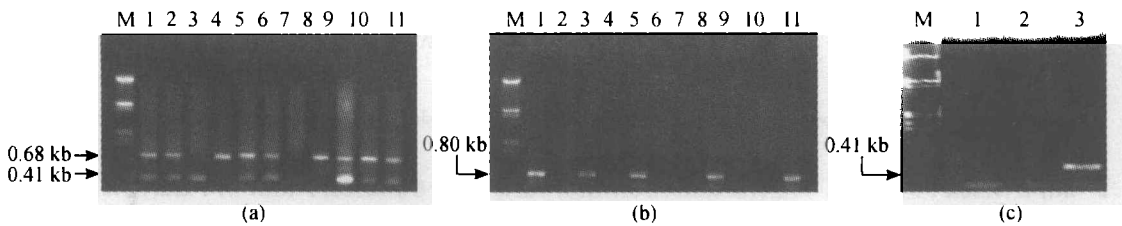


图 3 核移植体中外源基因的 PCR 检测结果

(a) 移核彭泽鲫囊胚 pCAgcGH 和 pCAgcGHc 的检测; (b) 移核彭泽鲫囊胚 pCAsIGFc 的检测; (c) 移核彭泽鲫(2月龄) pCAgcGH 和 pCAgcGHc 检测. (M, λ DNA/*EcoR*I + *Hind*III; 1, 质粒对照, 2~11, 核移植样品)

3 讨论

经 PCR 检测,外源基因在转基因胚胎肌节期之前的存在率为 100%. 然而,用转基因受体囊胚细胞或原肠胚细胞核移植所得到的移核鱼并不全是转基因鱼. 有两点值得讨论:(1) 移

核鱼是否由供体细胞核提供的遗传信息发育而来? (2) 外源基因在移核鱼中存在和整合的几率问题。

首先,以前有许多实验证明,供体细胞核参与用不去核卵细胞为受体的移核个体的发育。以不去核方法进行的昆虫的核移植,可得到发育正常的昆虫,而卵原核没有与注入的核融合^[10,11]。在两栖类,不去核方法核移植得到了三倍体,即卵原核和供体细胞核共同参与发育^[10,12]。余来宁等通过种间核移植,研究了对不去核鱼卵进行核移植获得的移核鱼染色体及血红蛋白多样性,发现移核鱼的染色体组成及血红蛋白多样性与供体相同,认为用不去核卵做核移植受体时,其单倍体卵原核在发育过程中已被供体核排斥^[8]。齐福印和许桂珍进行的鳙鱼和团头鲂之间核移植研究^[13],支持了余来宁等的结论。Niwa 等以不去核卵为受体进行了青鳉囊胚细胞核移植,同工酶和染色体分析表明所得移核鱼为三倍体^[14]。无论移核个体是三倍体还是二倍体,都说明供体细胞核遗传物质完整的保留了下来,支持核质重构胚的个体发育。本研究以针刺澎泽鲫卵 570 例为对照,无一例发育至囊胚(表 2),亦说明,核移植体的发育是供体核再程序化后发育的结果。

其次,以 GFP 基因作报告基因的研究表明,外源基因在转基因鱼中的整合最早从囊胚期开始^[7]。然而此时整合有外源基因的细胞可能只是极少一部分,大多数细胞中的外源 DNA 还是以游离形式存在,外源基因的整合主要发生在胚胎发育的较后期^[3]。因此,以转外源基因的早期胚胎细胞进行核移植得到纯合转基因鱼的几率非常低。另一方面,虽然早期受体胚胎作为一个总体可检测到外源基因的存在,但并非每个早期胚胎细胞都含有外源基因。而且,就含有外源基因的单个早期胚胎细胞而言,外源基因的拷贝数远远少于转基因时所注射的拷贝总量(约 10^6 拷贝),以含游离外源基因且拷贝数有限的早期胚胎细胞进行核移植,获得转基因鱼的比例就不会很高。由此看来,纯合转基因鱼的研制有可能以转基因晚期胚胎细胞或转基因的体细胞通过核移植途径而获得。此外,某些模式鱼类中的胚胎干细胞研究取得了一定进展^[15-17],结合胚胎干细胞的基因转移和细胞核移植技术,也将为纯合转基因鱼研制提供有效途径^[18]。

参 考 文 献

- 1 Zhu Z, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1758). *Z Angew Ichthyol*, 1985, 1: 31
- 2 朱作言,许克圣,李国华,等. 人生长激素基因在泥鳅受精卵显微注射转移后的生物学效应. *科学通报*, 1986, 31(5): 387
- 3 朱作言,许克圣,谢岳峰,等. 转基因鱼模型的建立. *中国科学, B 辑*, 1989, (2): 147
- 4 崔宗斌,朱作言,崔奕波,等. 转人生长激素基因红鲤 F₂ 代阳性鱼的摄食及代谢研究. *科学通报*, 1995, 40(16): 1 514
- 5 Fu C, Cui Y, Hung S S O, et al. Growth and feed utilization by F₄ human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. *J Fish Biol*, 1998, 53: 115
- 6 Zhu Z. Generation of fast growing transgenic fish: methods and mechanisms. In: *Transgenic Fish*, Singapore: World Scientific Publishing, 1992, 92 ~ 119
- 7 赵浩斌,陈尚萍,孙永华,等. 外源基因在鱼类胚胎中表达与整合的时序. *科学通报*, 1999, 44(22): 2 414
- 8 余来宁,杨水铨,柳 凌,等. 用未去核卵作受体的鱼类细胞核移植研究. *淡水渔业*, 1989, (3): 3
- 9 易咏兰,刘沛霖,刘汉勤,等. 鱼类囊胚细胞和卵的电融合. *水生生物学报*, 1988, 12(2): 189
- 10 Gurdon J B. Nuclear transplantation in eggs and oocytes. *J Cell Sci Suppl*, 1986, 4: 287

- 11 Schubiger M, Schneiderman H A. Nuclear transplantation in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 1971, 230: 185
- 12 Kroll K L, Gerhart J C. Transgenic *X. laevis* embryos from eggs transplanted with nuclei of transfected cultured cells. *Science*, 1994, 266: 650
- 13 齐福印, 许桂珍. 鳙团移核鱼的遗传性状与个体生长. *动物学报*, 1997, 43(2): 211
- 14 Niwa K, Ladygina T, Kinoshita M, et al. Transplantation of blastula nuclei to non-enucleated eggs in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Growth Differ*, 1999, 41(2): 163
- 15 Wakamatsu Y, Ozato K, Sasado T. Establishment of a pluripotent cell line derived from a medaka (*Oryzias latipes*) blastula embryo. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3(4): 185
- 16 Sun L, Bradford C S, Ghosh C, et al. ES-like cell cultures derived from early zebrafish embryos. *Mol Mar Biol Dev*, 1995, 4: 193
- 17 Hong Y, Scharl M. Establishment and growth responses of early medakafish (*Oryzias latipes*) embryonic cells in feeder layer-free cultures. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1996, 5(2): 93
- 18 Zhu Z, Sun Y. Embryonic and genetic manipulation in fish. *Cell Research*, 2000, 10(1): 17