

# 全鱼基因的构建及其在鲫鱼体内的整合与转录

杨隽<sup>①</sup> 孙孝文<sup>②</sup> 李云龙<sup>③</sup> 梁利群<sup>②</sup> 刘春巧<sup>④</sup> 阎学春<sup>②</sup> 徐伟<sup>②</sup>

(<sup>①</sup>黑龙江八一农垦大学动物科技学院 密山 158308; <sup>②</sup>黑龙江水产科学研究所 哈尔滨 150010;

<sup>③</sup>山东师范大学生物系 济南 250014; <sup>④</sup>中国科学院动物研究所 北京 100080)

**摘要:** 利用 PCR 技术删除大麻哈鱼生长激素基因的启动序列,通过基因重组构建出全鱼基因(鲤鱼 MT 启动子-大麻哈鱼生长激素基因);以融合全鱼基因为外源基因,通过显微注射方法将其线性片段导入鲫鱼受精卵内,研究其整合与转录效率。结果表明,全鱼基因在鲫鱼基因组中的整合率为 36.4% (16/44),对转基因阳性鱼的 RNA 样本进行 Northern 印迹杂交检测,转录率为 25% (1/4)。因此,该全鱼基因可以作为转基因鱼研究和应用的外源基因。

**关键词:** PCR; 转基因; 鲫鱼; 整合; 转录

**中图分类号:** Q78, S961.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)04-10-04

## Reconstruction of cMTsGH Gene and Its Integration and Translation in Crucian Carp (*Carassius auratus*)

YANG Jun<sup>①</sup> SUN Xiao-Wen<sup>②</sup> LI Yun-Long<sup>③</sup> LIANG Li-Qun<sup>②</sup>

LIU Chun-Qiao<sup>④</sup> YAN Xue-Chun<sup>②</sup> XU Wei<sup>②</sup>

(<sup>①</sup> Department of Animal Science, Heilongjiang August First Land Reclamation University Mishan 158308;

<sup>②</sup> Institute of Aquatic Product Science of Heilongjiang Province Harbin 150010;

<sup>③</sup> Department of Biology, Shandong Normal University Jinan 250014;

<sup>④</sup> Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences Beijing 100080, China)

**Abstract:** The promoter sequence of growth hormone gene of trout salmon was deleted by PCR, and a reconstructed gene cMTsGH was produced by combing common carp metallothionein promoter and growth hormone gene of trout salmon. The linear DNA fragment of the gene was microinjected into the fertilized eggs of crucian carp, and the rates of integration and translation were examined. The integration rate was 36.4% (16/44) in crucian carp genome. Analysis of RNA samples of the positive transgenic fish by Northern blot showed that the translation rate of the gene was 25% (1/4). It is concluded that cMTsGH, the gene reconstructed by combing common carp metallothionein promoter and growth hormone gene of trout salmon, can act as a foreign gene for the study and production of transgenic fish.

**Key words:** PCR; Transgenesis; Crucian carp; Integration; Translation

自 1985 年 Zhu 等首次将外源基因导入鱼类受精卵,并生产出转基因鱼以来,很多人进行了此项研究,并取得很大进展<sup>[1,2]</sup>。鱼类基因工程育种技术克服了传统杂交育种的缺陷,加快了育种速度,缩短育种进程。作为经济鱼类的

鲫鱼,肉嫩味美,但其生长速度较慢,通过转基

第一作者介绍 杨隽,38岁,男,硕士;主要从事动物发育生物学与分子生物学教学与研究。

收稿日期:2001-11-05,修回日期:2002-05-21

因方法可望生产出速生鲫鱼新品系。以往用于转基因鱼研究的基因元件基本上都是来自哺乳动物<sup>[3,4]</sup>,从安全和伦理方面考虑,转基因鱼的基因元件应是来自鱼类,即将鱼类基因元件剪拼后,构建出基因及启动子均来自鱼类的全鱼基因。本试验就是利用 PCR 方法构建出全鱼基因,研究其在鲫鱼体内的整合与转录效应,为鱼类基因工程育种提供实验依据,从而推进转基因鱼商业化进程。

## 1 材料与方 法

**1.1 基因材料** pUcsGH(大麻哈鱼生长激素基因质粒)、pUcMT(北方鲤鱼金属硫蛋白启动子质粒)均由中国水产科学院黑龙江水产科学研究所“863”课题组提供。

**1.2 试剂和酶** 探针标记试剂盒购于 Promega 公司; [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP 购于北京亚辉公司;酶类购于 New England Biolabs 和华美生物工程公司;其余试剂均为分析纯。

### 1.3 全鱼基因的构建

**1.3.1 PCR 引物的设计、合成及扩增** 从序列分析可知<sup>[5]</sup>,sGH 基因 2 400 bp 处为 *Bgl* II 识别位点,编码起始区 927 bp 处为 *Eco*R I 识别位点,二位点间为 sGH 基因结构区(1 473 bp),在 *Eco*R I 和 *Bgl* II 位点设计一对引物: a, 5' CCGAATTCGGACAAGgtaaacca3'; b, 5' CTCAG-AG-ATCTGGTTCgagtttc3'。用寡聚核苷酸合成仪合成引物 a 和 b(自制),再对 a、b 进行 PCR 扩增,在小离心管中加入:DNA 模板(含 DNA 50 ng), a、b 各 20 pmol/L, Tris-Cl 2 mmol/L(pH 8.3), Mg-Cl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L, KCl 20 mmol/L, 0.05% 的 Tween 20,牛血清白蛋白 100  $\mu$ g/ml(无核酸酶),4 种 dNTP 各 12.5  $\mu$ mol, *Taq* DNA 聚合酶 2U,双蒸水使总体积达 100  $\mu$ l,混匀后覆盖 75  $\mu$ l 矿物油。循环程序设置:95 $^{\circ}$ C 60 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 50 s,总循环次数为 30,最后一次循环的链延伸时间为 10 min。

**1.3.2 sGH 启动区的删除及 cMT 启动子的插入** 将 pUcsGH 质粒用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切(双酶切缓冲液为 1  $\times$  Carlos + 1  $\times$  DTT),0.8%

凝胶电泳回收 GH 基因;将 pGEM-3Zf(+)用 *Eco*R I/*Hind* III 双酶切,酚-氯仿抽提,乙醇沉淀回收。将上述 GH 基因插入 pGEM 中:GH 基因 2  $\mu$ g, pGEM 1  $\mu$ g, 10  $\times$  连接反应缓冲液 1  $\mu$ l, 10 mmol/L ATP 0.5  $\mu$ l, T<sub>4</sub>DNA 连接酶 1  $\mu$ l, 双蒸水使总体积达到 10  $\mu$ l,混匀后置于 12 $^{\circ}$ C 过夜;转化方法参阅《分子克隆》相关介绍<sup>[6]</sup>进行,筛选 Amp<sup>r</sup>(氨苄青霉素抗性)的菌落并凝胶电泳验证。将 pGEMsGH 用 *Eco*R I/*Bgl* II 双酶切,电泳回收 7.2 kb 片段;*Eco*R I/*Bgl* II 双酶切 PCR 扩增片段后与上述 7.2 kb 片段连接、转化并筛选得到删除启动区的 GH 基因质粒(pGEMGH<sub>1</sub>)。用 *Eco*R I 酶切 p5'GH,补平粘末端并去磷酸化<sup>[7]</sup>;双酶切(*Eco*R I/*Bam*H I)MT 启动子,补平后去磷酸化。连接上述 2 种去磷酸化基因,转化并筛选出 Amp<sup>r</sup> 质粒,凝胶电泳检验,确定为全鱼基因 pcMTsGH(图 1)。

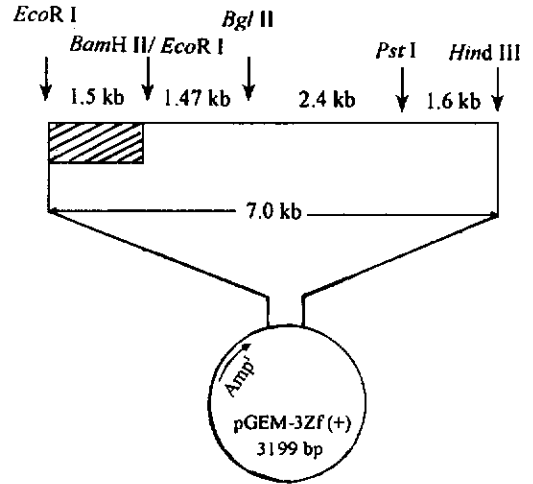


图 1 全鱼基因限制性酶切图谱

**1.4 精卵采集、基因导入及鱼苗培育** 采集精、卵用鲫鱼取自黑龙江水产所松浦实验站性成熟亲鱼。在 6 月上旬鲫鱼繁殖季节,对健康亲鱼进行人工催产,采集高质量的卵和精液,6 $^{\circ}$ C 存放。每次取适量精、卵进行受精,在受精后 10 min 至第 1 次卵裂前,将约 10<sup>5</sup> 拷贝的线性全鱼基因显微注射到受精卵核区附近。导入全鱼基因的受精卵于 23 ~ 25 $^{\circ}$ C 水族箱内孵化,3 d 左右孵出鱼苗。待鱼苗育成夏花后,随机捕

捞一定数量鱼苗,1/2 纵向分割,提取其总 DNA (半尾)和总 RNA(半尾)<sup>[6]</sup>。

### 1.5 探针制备及分子杂交

**1.5.1 探针制备** 将全鱼基因用 *EcoR* I / *Hind* III 双酶切,电泳回收 7.0 kb 左右的 DNA 条带,纯化后用放射性同位素标记(具体步骤与 Promega 公司技术说明相同)。

**1.5.2 Dot 杂交和 Southern 杂交** 将总 DNA 样品点样于硝酸纤维素膜(NC)上进行 Dot 杂交;再将 Dot 杂交呈阳性的 DNA 样品经限制酶切后,转印到 NC 上,进行 Southern 印迹杂交。具体方法参照 J. 萨姆布鲁克的《分子克隆实验指南》。

**1.5.3 Northern 杂交** 对检测出阳性的转基因鱼的样品 RNA 以 Southern 印迹方法转膜,按文献方法<sup>[7]</sup>进行杂交。

## 2 结果

**2.1 PCR 扩增** 通过 PCR 扩增,产物走 1% 琼脂糖凝胶电泳,在 1.5 kb 左右位置有一条 DNA 带,阴性对照无 DNA 带(图 2)。

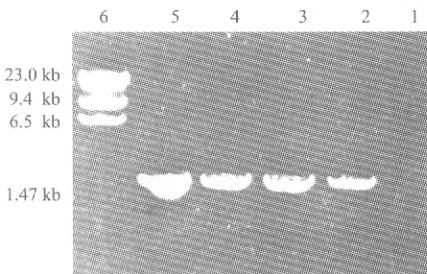


图 2 PCR 扩增产物凝胶电泳

1. 阴性对照;2~5.PCR 产物;6. 分子量对照  $\lambda$ DNA/*Hind* III

**2.2 sGH 基因启动序列的删除** 通过基因重组,将扩增的 1.47 kb 片段与 pGEMsGH 连接、转化,出现 11 个转化子;提取其 DNA,酶切、电泳分析鉴定,获得 2 个重组子,为删除 sGH 基因启动区的新建质粒 pGEMGH<sub>1</sub>。

**2.3 全鱼基因的构建** 将 pUcMT 与 pGEMGH<sub>1</sub> 进行连接、转化、筛选,获得全鱼基因 pcMTsGH (图 3)。

**2.4 全鱼基因的整合率** 试验共注射鲫鱼受

精卵 5 881 粒,孵出鱼苗(平游期)3 458 尾,平均孵化率为 58.8%;对夏花期试验鱼随机抽取 44 尾,进行 Dot 杂交和 Southern 杂交(图 4,5),有 16 尾鱼整合了全鱼基因,整合率为 36.4% (16/44)。

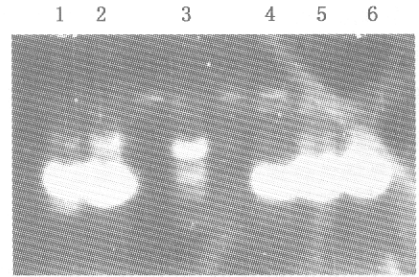


图 3 全鱼基因凝胶电泳

1,2. *Pst* I 酶切; 3. 分子量对照  $\lambda$ DNA/*Hind* III; 4~6. *Hind* III 酶切



图 4 Dot 杂交

1. 阴性对照/pg 级; 2. 阳性对照/pg 级; 其余黑点为阳性信号鱼

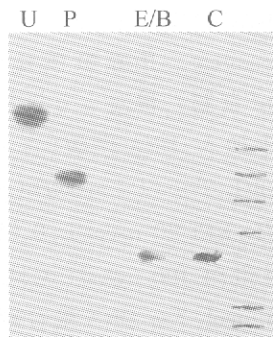


图 5 Southern 印迹杂交

U. 未酶切样品; P. *Pst* I 酶切; E/B. *EcoR* I / *Bgl* II 酶切; C. 阳性对照

**2.5 全鱼基因的转录** 抽取 4 尾 Southern 印迹杂交呈阳性的 RNA 样本进行 Northern 印迹杂交,结果有 1 尾鱼总 RNA 样本显示强阳性(图

6), 金鱼基因整合后有 25% (1/4) 发生转录。

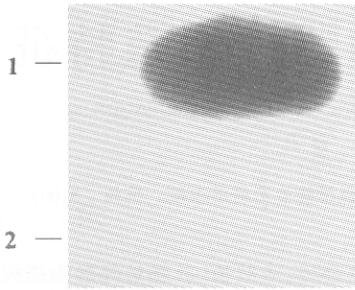


图 6 Northern 印迹杂交

1. 阳性信号鱼总 DNA; 2. 阴性对照

### 3 讨论

本试验的关键是 PCR 引物的设计和扩增。引物是根据沈孝宙<sup>[5]</sup>测序的大麻哈鱼 GH 基因图谱设计的, G-C 含量均为 48%, T<sub>m</sub> 值约为 68℃, 经检索未见有二级结构。PCR 扩增片段的特异性及扩增效率取决于 2 个主要因素, 其一是引物与模板结合的牢固程度, 其二是多聚酶对底物的有效延伸<sup>[8]</sup>。本文设计的引物 T<sub>m</sub> 值较高, 参考 PCR 操作规则, 进行多次试验摸索, 最终选择退火温度为 55℃, PCR 扩增产物只有一条特异性 DNA 带, 效果比较好。在全鱼基因构建过程中, 本文采用混合酶切缓冲液, 既省事省时, 又避免了 DNA 损失, 酶切效果比较理想。对于 DNA 去磷酸化, 由于牛小肠碱性磷酸酶通常是溶于硫酸铵悬液中, 为了防止硫酸铵被一同沉淀, 采用了 70% 乙醇多次洗涤沉淀物的方法。这一程序非常重要, 因为硫酸铵是多种核酸酶的抑制剂。

外源基因的整合率取决于鱼的品种、注射时期、外源基因的形态、拷贝数以及基因的导入方式<sup>[4]</sup>。在本研究中 Dot 杂交呈阳性的 DNA 样本, 经 Southern 杂交也都呈阳性, 这说明全鱼基因已整合到部分受体鱼基因组中。外源基因导入受精卵后, 通常以首尾连接方式形成多聚体, 再整合到受体基因组中。整合外源基因后的受体能否表达, 主要取决于外源基因在受体基因组中整合位点及外源基因的整合方式。本研究结果只有 25% 发生转录, 并不是所有的整合都

能转录出 mRNA, 亦即只有在基因组适宜位点整合外源基因, 才有可能进行转录并翻译出外源基因产物, 这就是所谓的有效整合<sup>[4]</sup>。

启动子选用北方鲤鱼 MT 基因启动子, 其原因是: 构建具有优良性状转基因鱼的关键是目的基因的表达要适量, 目的基因是 GH 基因更是如此; 北方鲤鱼 MT 启动子在 Zn<sup>2+</sup> 的诱导下, 能够使结构基因适量表达, 从而达到促生长作用<sup>[9]</sup>。删除 sGH 基因的启动区, 在其上游冠以 cMT 启动子, 使 sGH 基因的转录不受正常的体内反馈调节, 而受控于外界金属离子的诱导来提高转录水平, 从而翻译出目的蛋白质 (GH), 促使鱼体生长发育, 达到选育鱼类速生新品系之目的。以往转基因鱼所使用的目的基因大都是 hGH 基因或家畜 GH 基因<sup>[10]</sup>, 启动子多为小鼠 MT 启动子或病毒启动子, 为了消除人们对食用转基因鱼的恐慌心理, 应该使用全鱼基因, 这对转基因鱼的研究和育种具有现实意义。同时, 对其它转基因动物的研究具有一定的指导意义。

### 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 ~ 34.
- [2] 孙孝文, 阎学春, 梁利群等. 用直接注射法生产转基因鱼. *生物技术*, 1993, 3(3): 12 ~ 14.
- [3] 朱作言, 许克圣. 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: 988.
- [4] 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 ~ 155.
- [5] Shen X Z. Entire DNA sequence of chum salmon growth hormone gene. NCBI (National Center for Biotechnology Information Bethesda, MD 20984 USA). GenBank Data Base ENTREZ under the Accession Number L 04688, Locus Name ONH-GROHOR, Published on Oct. 9 1992.
- [6] T. 曼尼阿蒂斯, E. 弗里奇, J. 萨姆布鲁克. 分子克隆. 北京: 科学出版社, 1987. 126 ~ 164.
- [7] 徐洵, 刘震乾. DNA 重组技术. 北京: 科学出版社, 1988. 70 ~ 89.
- [8] 杨隽, 李云龙, 孙孝文. PCR 技术改造基因的研究. *山东生物医学工程*, 1995, 14(3 ~ 4): 44 ~ 47.
- [9] 孙孝文. 转基因工程鲤鱼的构建. *高技术通讯*, 1993, 9: 23 ~ 26.
- [10] 曾志强, 朱作言. 转 pMT<sub>h</sub>GH 基因红鲤 F4 代鱼体内转植基因存在的分子多态性. *科学通报*, 2000, 45(18): 1 957 ~ 1 962.