

大珠母贝精子介导外源基因转移研究

胡 炜¹ 喻达辉² 汪亚平¹ 吴开畅² 朱作言¹

¹(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)

²(中国水产科学研究院南海水产研究所 广州 510300)

摘 要 将大珠母贝 (*Pinctada maxima* Jameson) 精子与“全鱼”GH 基因重组体 pCAgcGH 和 pCAgcGHc 的线性 DNA 混合, 温育 30min, 经 6 次、2⁷、10kV 电脉冲处理后, 与卵子受精, 得到若干贝苗。从贝苗中提取 DNA, 经 PCR 扩增和 Southern blot 分子杂交表明, 部分受体带有外源基因, 当与精子温育的外源基因浓度分别为 2 μ g/mL, 6 μ g/mL 及 18 μ g/mL 时, 相应贝苗携带外源基因比率分别为 5.6%, 20% 和 50%。即在此范围内, 基因转移的阳性率与外源基因的浓度呈正相关。

关键词 大珠母贝, 电脉冲, 精子介导, 基因转移

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0165-04

利用显微注射方法, 中国科学院水生生物研究所于 1985 年培育了世界上首批转基因鱼, 随后又建立了较为完整的转基因鱼模型, 并获得了可遗传的转基因鱼及其子代^[1-2]。显微注射法因其直接对基因进行操作, 大量和准确地将外源基因导入受精卵内, 整合率较高, 故从其诞生至今, 一直是制作转基因动物最经典、最有效的途径。但是, 显微注射法又因其操作复杂, 受精卵易损伤, 大批量处理难以进行等不足限制了该技术的应用, 因此外源基因转移方法的探索与完善一直是转基因动物研究的焦点之一。精子介导和电脉冲法作为近年来研究的热点引起各国学者浓厚的兴趣, 目前已通过精子介导或电脉冲将外源基因成功导入鲑鱼、金鱼、泥鳅及斑马鱼等鱼类^[3-7]。本实验室亦分别于 1989 年和 1996 年报道了电脉冲和精子介导的转基因泥鳅和鲤鱼^[8,9]。然而, 在软体动物中探索精子介导的外源基因转移研究, 除 Powers 及 Tsai 等分别于 1995 年和 1997 年发表的两篇关于鲍鱼研究的文献外^[10,11], 以精子为载体制作转基因软体动物仍缺乏翔实的依据。大珠母贝 *P. maxima* (Jameson) 是一种用于珍珠养殖的经济价值极高的热带海洋贝类, 其受精卵直径仅为 60 μ m, 且卵壳坚硬, 卵不透明, 不宜显微注射操作, 为此, 开展了大珠母贝精子介导的外源基因电脉冲转移研究, 以探索制作转基因软

体动物的新方法。

1 材料与方 法

1.1 外源基因的制备

用于转移的外源基因为本实验室构建的我国鲤科“全鱼”GH 基因重组体 pCAgcGH 和 pCAgcGHc^[12]。重组质粒按常规方法扩增纯化, 用 *Eco*RI (New England Biolabs 公司产品) 酶切, 回收 DNA, 溶于 ST(88mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris-Cl, pH 7.5)。杂交用探针为 pCAgcGH 和 pCAgcGHc 所共有的 *Nco*I - *Bgl*II 片段, 长度为 800bp, 根据随机引物法, 用地高辛标记与检测试剂盒进行标记与检测 (Boehringer Mannheim 公司产品)。

1.2 试验贝类及其精卵采集和受精

试验在中国水产科学院南海水产研究所三亚热带水产研究开发中心进行, 选取成熟的马氏珠母贝 *P. martensii* (Dunker) 及大珠母贝雌雄亲贝, 解剖后进行人工采精、采卵, 然后在温度为 31 $^{\circ}$ C, 盐度为 34‰, pH 为 9.0 的含氨海水中人工授精、孵化。

1.3 电脉冲试验

电脉冲仪 Baekon 2000 型为美国 BAEKON 公司产品。实验时下列电脉冲参数保持不变; 脉冲周期 (a burst time) 1.6s, 脉冲宽度 (Pulse width) 120 μ s, 电极距离 1mm, 1mL 脉冲皿中脉冲试验液 100 μ L。

收稿日期: 1999-01-27, 修回日期: 1999-11-01。

基金项目: 淡水生态与生物技术国家重点实验室资助项目。

1.3.1 脉冲幅度、循环数及每循环的脉冲数对马氏珠母贝精子活力的影响: 进行大珠母贝精子介导的外源基因电脉冲转移研究前,首先在6个脉冲循环,每循环 2^7 脉冲次数条件下,研究了4kV、6kV、8kV及10kV脉冲幅度对马氏珠母贝精子活力的影响;在10kV脉冲幅度,6个脉冲循环数条件下,研究了 2^4 、 2^6 、 2^8 及 2^{10} 等不同脉冲次数/循环作用下马氏珠母贝精子的受精能力;此外,保持10kV脉冲幅度及每循环 2^7 脉冲次数不变,研究了6、8、10及12个不同脉冲循环数作用对马氏珠母贝精子活力的影响。

1.3.2 大珠母贝精子介导外源基因的电脉冲转移: 将pCAgcGH和pCAgcGHc线性分子按1:1比混合,加入到人工采集的大珠母贝精液(1.6×10^9 cells/mL)中,使外源基因的总浓度分别为: $2\mu\text{g/mL}$ (C组), $6\mu\text{g/mL}$ (D组), $18\mu\text{g/mL}$ (E组)和不含外源基因组(B组,模拟试验),在室温下温育30min后,按10kV脉冲幅度,6个脉冲循环,每循环 2^7 脉冲次数,进行电脉冲处理。同时,另设一对照组(A组),既不加外源DNA也不经任何处理。处理完毕,各组的大珠母贝精子分别与卵细胞(9×10^4 cells/mL)按1:2体积比混合,依前述条件进行人工授精,孵化,并统计相应的孵化率。

1.4 贝苗DNA提取

随机取60日龄的各试验组和对照组的贝苗,分别加DNA抽提液(10mmol/L Tris-Cl, pH7.5, 10mmol/L EDTA, 150mmol/L NaCl, 0.5% SDS及0.3mg/mL蛋白酶K)匀浆,37℃保温1h,酚、酚/氯仿,氯仿/异戊醇抽提,乙醇沉淀,溶于TE(10mmol/L Tris-Cl, 1mmol/L EDTA, pH8.0)。

1.5 PCR检测

在 $25\mu\text{L}$ 反应体系中,加贝苗DNA15~20ng,4种dNTP各 $200\mu\text{mol/L}$,两种引物各为 $1\mu\text{mol/L}$, $2.5\mu\text{L}$ 缓冲液及2单位TaqDNA聚合酶(华美公司产品),在9600型PCR仪(PE公司产品)上扩增。扩增过程为94℃预变性2min,进行35个循环,每个循环包括:94℃变性30s,60℃引物退火30s,72℃引物延伸1min。最后在72℃保温5min结束反应。扩增产物上样于0.8%琼脂糖凝胶,电泳后经EB染色,CA91786型UVP系统(Upland公司产品)成像分析。引物P1:5'-TGGCGTGATGAATGTCG-3',位于CA启动子顺序;引物P2:5'-AACACGTATGACTGC-3',位于GHgene的第二个外显子上。两引物间的距离为:650bp(以pCAgcGH为模板)和380bp(以pCAgcGHc为模板)。

1.6 Southern blot分析

用785型真空转移仪(Bio-Rad公司产品),将PCR产物从0.8%琼脂糖凝胶上转移到尼龙膜(Sigma公司产品)上,晾干后,80℃烤膜2h,68℃预杂交1h,加入标记探针,68℃杂交过夜。杂交后的滤膜分别经 $2 \times \text{SSC}$,0.1% SDS室温10min, $0.1 \times \text{SSC}$,0.1% SDS,68℃,30min。按地高辛标记与检测试剂盒说明进行显色、检测,结果经UVP系统成像分析。

2 结 果

2.1 电脉冲条件对马氏珠母贝精子活力的影响研究

在保持脉冲周期1.6s,脉冲宽度 $120\mu\text{s}$,电极距离1mm,脉冲试验液 $100\mu\text{L}$ 及1mL脉冲血恒定不变的前提下,研究了脉冲幅度、循环数及脉冲次数/循环对马氏珠母贝精子活力的影响,结果如图1~3所示。经10kV的高场强处理后,马氏珠母贝精子仍保持有较高的活力,其受精率仍达到67.4%。当每循环脉冲次数在 2^4 、 2^6 和 2^8 变化时,马氏珠母贝受精率分别为60.98%,58.82%和69.05%,没有显著差异。但经过 2^{10} 处理后,其受精率仅为22.85%;同样,当马氏珠母贝精子经12个脉冲循环数处理后,其受精率只有29.23%,根据上述结果,为保证大珠母贝精子经电脉冲处理后仍具有一定的活力以完成受精和外源基因介导,本试验确定大珠母贝精子介导外源基因转移的电脉冲参数为:6个脉冲循环,每循环 2^7 脉冲次数,10kV脉冲幅度。

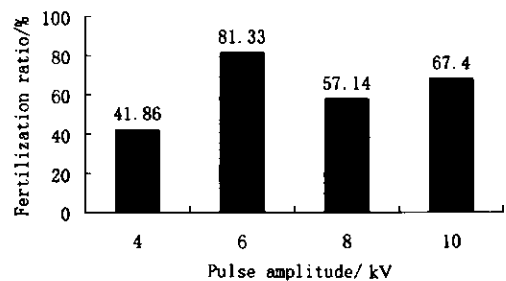


图1 脉冲幅度对马氏珠母贝受精率的影响

Fig.1 Effect of pulse amplitude on fertilization ratio of *P. martensii* (Dunker)

2.2 大珠母贝孵化率、试验组贝苗外源基因携带阳性率

大珠母贝精子分别与 $0\mu\text{g/mL}$ 、 $2\mu\text{g/mL}$ 、 $6\mu\text{g/mL}$ 和 $18\mu\text{g/mL}$ 的线状外源基因温育并经电脉冲处理后与卵子混合受精,结果表明,各转基因组的孵化率相差不大,但显著低于对照组(表1)。PCR扩

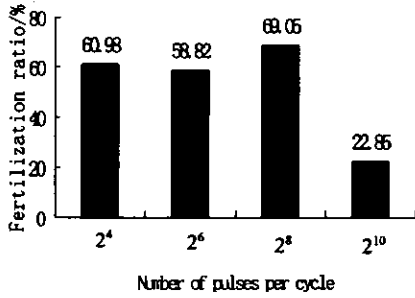


图2 脉冲次数/循环对马氏珠母贝受精率的影响

Fig.2 Effect of number of pulses per cycle on fertilization ratio of *P. martensii* (Dunker)

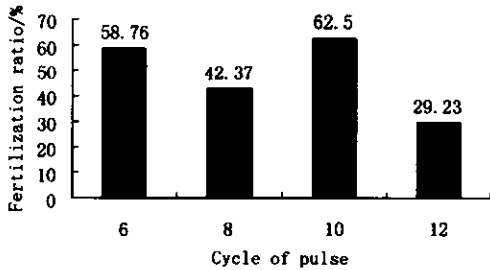


图3 循环数对马氏珠母贝受精率的影响

Fig.2 Effect of cycles on fertilization ratio of *P. martensii* (Dunker)

表1 大珠母贝孵化率、试验组贝苗外源基因携带阳性率

Table 1 Hatching ratio and transgenic ratio of *P. maxima* (Jameson)

Group	DNA Concentration / (μg/mL)	Hatching ratio/%	No. of assayed molluscs	No. of transgenic molluscs	Transgenic ratio/%
A	0	47.5	18	0	0
B	0	0.8	16	0	0
C	2	1.7	18	1	5.6
D	6	4.17	20	4	20
E	18	2.5	20	10	50

增显示,在转基因试验组的部分DNA样品中出现650bp和/或380bp特异的阳性片段,而模拟试验组和对照组均为阴性(图4)。为了进一步验证PCR合成的产物是否就是“全鱼”GH基因重组体,我们将其转移到尼龙膜上,用地高辛标记的特异探针进行Southern blot分子杂交,如图5所示,除11、12号分别为模拟试验组和对照组不出现杂交带外,其余各试验组均出现与阳性对照10号相似的杂交带。其中,E组和D组各检测了20个样品,阳性率分别为50%和20%,C组检测了18个样品,阳性率为5.6%。在本实验条件下,精子介导的外源基因电脉冲转移与外源基因的浓度呈正相关(表1)。

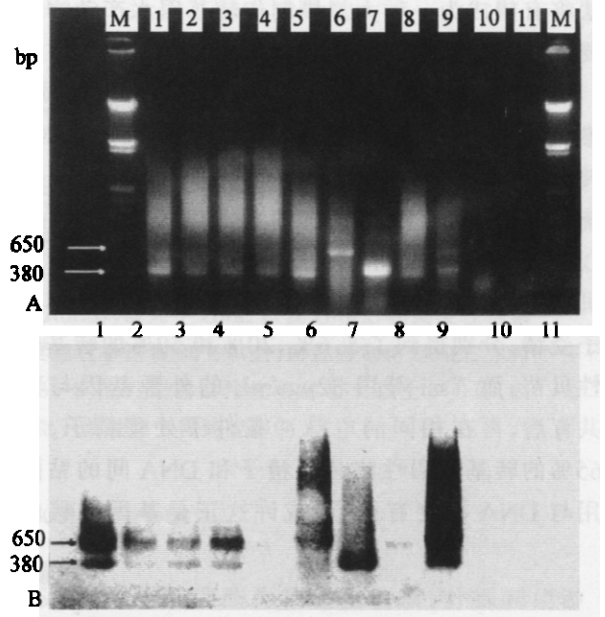


图4 大珠母贝PCR(A)和Southern blot(B)分析结果

Fig.4 Results of PCR (a) and Southern blot (b) of *P. maxima* (Jameson).

M. λDNA digested with *Eco*RI and *Hind*III; 1~8. Test groups. 9. Positive control; 10. Mock treated group; 11. Control. The bands of PCR amplification were about 650bp and 380bp.

3 讨论

早期的研究结果表明,只需将受体鱼精子与外源基因进行简单的温育处理,即有可能实现外源基因的转移。然而,有学者采用相似的方法处理鼠、鸡和虹鳟(Rainbow trout)时,却未获成功^[13-14]; Sin等将大鳞大麻哈鱼的精子与外源基因温育,经电脉冲处理后再受精,得到了5%~10%的转基因阳性率,而未经电脉冲处理的试验组没有检测到外源基因的导入^[15]。随后,Tsai进一步证实了Sin的研究结果并提出,只有经过电脉冲处理后的精子作为载体才可以介导外源基因转移^[5]。精子介导外源基因进入卵子的机理较为复杂,推测当外源基因与精子一起保温时,部分外源基因粘附在精子表面,然后通过受精作用将外源基因导入卵子;而部分外源基因先进入精子内,再通过受精作用将外源基因导入卵子。电脉冲的作用在于显著增强精子和外源基因的结合^[3];或者高电场暂时性地破坏精子质膜,使外源基因较容易进入细胞内,从而导致外源基因的转移。有鉴于此,本试验对精子为载体加电脉冲处理的基因转移方法进行了肯定。上述不同的研究结果表明,用精子为载体介导外源基因转移的机制需更深入的研究,而一旦明晰了这种机制,精子载体

法将有望成为一种大规模制作转基因水产动物的重要方法。

影响精子载体法转移效率的因素较多, Sin 等推测以鱼类精子作为载体进行外源基因转移时, 其转移效率可能与 DNA 量有关^[12], 但迄今尚未见系统研究以证明上述推断的报道。本试验将外源 DNA 分别按 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与大珠母贝精子在室温共育 30min, 经电脉冲处理后, 再与卵子受精, 分别得到了 5.6%, 20% 和 50% 的转基因阳性贝苗; 而 Tsai 等用 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的外源基因与精子共育后, 再在相同的电脉冲条件下处理精子, 得到 65% 的转基因阳性鲍鱼。精子和 DNA 间的粘附作用与 DNA 浓度有关^[3], 或许这正是基因转移的效

率与 DNA 浓度呈正相关的原因之一。可以推测: 在本试验条件下, 以精子为载体制作转基因软体动物时, 转移效率与外源基因浓度呈正相关, 相应的模型为: $y = -13.6 + 50.35\text{Lg}(x)$, $r = 0.99$; y : 基因转移效率(%); x : 外源基因浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)。尽管该模型有待进一步验证, 但作者认为, 以精子为载体制作转基因软体动物不仅切实可行, 而且适当调整转移基因的用量, 并探索适宜的电脉冲条件, 外源基因转移率将可能进一步提高。

致谢: 本研究得到了南海水产所江世贵、朱传华同志的大力帮助, 谨表谢意。

参 考 文 献

- [1] Zhu Z Y, G Li, L He et al. *Zangew Ichthyol.*, 1985, 1(1): 31~34
- [2] 朱作言, 许克圣, 谢岳峰等. 中国科学 B 辑, 1989, 19(2): 147~155
- [3] Symonds J E, Walker S P, F Y T Sin. *Aquaculture*, 1994, 119: 313~327
- [4] 于建康, 阎维, 张玉廉等. 动物学报, 1994, 40(1): 96~99
- [5] Tsai H J, Tseng F S, Liao I C. *Can. J Fish Aquat Sci.* 1995, 52: 776~787
- [6] Khoo H W, Ang L H, Lim H B et al. *Aquaculture*. 1992, 107: 1~19
- [7] Patil J G, Khoo H W. *J Exp Zool.* 1996, 274: 121~129
- [8] 谢岳峰, 刘东, 周钧等. 水生生物学报, 1990, 13(4): 307~309
- [9] 李国华, 崔宗斌, 朱作言等. 水生生物学报, 1996, 20(3): 242~247
- [10] Powers D A, Kirby V L, Cole T et al. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1995, 4: 369~375
- [11] Tsai H J, Lai C H, Yang H S. *Transgenic Res.* 1997, 6: 85~95.
- [12] Zhu Z Y, Growth Hormone Gene and the Transgenic Fish. In: *Agricultural Biotechnology*. Edited by You C B and Chen Z L. China Science and Technology Press, Beijing, 1992, pp. 106~116
- [13] Gavora J S, Benkel B, Sasada H et al. *Can J Anim Sci.* 1991, 71: 287~292
- [14] Chourrout D, Perrot E. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1992, 1: 282~285
- [15] Sin F Y T, Bartley A L, Walker S P et al. *Aquaculture*, 1993, 117: 57~69

Electroporation of Sperm to Introduce Foreign DNA into the Genome of *Pinctada maxima* (Jameson)

HU Wei¹ YU Da-Hui² WANG Ya-Pin¹ WU Kai-Chang² ZHU Zuo-Yan¹

¹(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072)

²(South China Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510300)

Abstract Gene transfer was investigated in marine molluscs via electroporated sperm. Sperm of *P. maxima* (J.) was incubated with linear "all-fish" growth hormone gene (pCAGcGH and pCAGcGHc) for 30min. Then, mature eggs were in-vitro fertilized with the sperm cells treated with electroporation at 10kV and 2⁷ pulses for six cycles. DNA was extracted from spat and analyzed by PCR and southern blot. The results indicated that the foreign DNA had been transferred into the genome of experimental molluscs. The transgenetic ration was 5.6%, 20% and 50% when 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of foreign DNA was used, respectively. It is suggested that the transferred efficiency is correlated with the amount of the foreign DNA.

Key words *Pinctada maxima* (Jameson), electroporation, sperm-mediated, gene transfer