

用电融合结合继代移核方法构建草鱼 抗病体细胞工程鱼

余来宁 左文功 方耀林 郑卫东

(长江水产研究所,荆沙市 434000)

摘要 选择对草鱼出血病病毒(FRV)不敏感的草鱼肝组织进行细胞培养,建立了草鱼肝细胞株,命名为GLA。对GLA进行攻毒,发现其对FRV有抗性。采用电融合结合继代移核的方法,将GLA细胞(核),移植于草鱼未受精卵内,获得开口前的幼鱼8尾和存活仔鱼1尾,说明此方法能提高细胞的发育能力。通过比较体细胞工程鱼与供体、受体亲本草鱼的形态特征,发现体细胞工程鱼可数性状与供体草鱼的基本一致,初步推断体细胞工程鱼的遗传信息,是由供体细胞核提供的。

关键词 草鱼,电融合,继代移核,细胞工程鱼

草鱼具有生长快、产量高、草食性等优点,是我国传统的优良养殖对象。但草鱼最大的缺点是抗病力低,特别在鱼种阶段受草鱼出血病危害严重,一般存活率只有40%左右。多年来,人们主要采用草鱼与团头鲂、鲤等鱼杂交及诱导四倍体的方法来培育抗病草鱼[中国科学院水生生物研究所二室家鱼小组,1976;吴维新等,1981、1988](长江水产研究所,1973),虽都有不同程度的进展,但由于杂交育种的局限性,始终没有取得理想的结果。能否用细胞工程育种的方法,培育抗病草鱼,是本文探讨的主要问题。1982年陈宏溪等[1986]用培养的鲫肾细胞移核成功获得存活的体细胞工程鱼,使鱼类细胞水平上的遗传育种成为可能。在前人工作的基础上,作者采用电融合与继代移核相结合的新方法,将具抗性的草鱼肝培养细胞(核)移植于草鱼未受精卵内,获得了一批不同发育期的胚胎和存活的仔鱼。

1 材料与方法

1.1 草鱼肝细胞株(GLA)的建立

选材:根据毛树坚等(1987)草鱼出血病病理细胞电镜研究资料,将健康草鱼的肝脏作为建株材料。

细胞培养:取室内暂养较长时间的2龄健康草鱼肝脏组织,采用细胞悬液静置法进行细胞培养,培养温度28℃,培养液用含有20%小牛血清的Eagle MEM(日本制茶株式会社生产),pH 7.2~7.4。原代细胞培养过程中曾换培养液2次,培养30天。细胞生长茂密即进行第一次传代,第一次传代后细胞增殖旺盛,生长稳定,一般3~4天即可传代。

GLA细胞株染色体分析:按余先觉等[1989]培养细胞制片方法进行。

收稿日期:1995-07-13。

(1)长江水产研究所,1973。草鱼和团头鲂人工杂交试验。湖南水产科技情报,(1):9~11。

(2)毛树坚等,1987。草鱼出血病病理细胞电镜观察。鉴定会材料。

GLA 细胞株抗性检验:用本所保存的 FRV-854 和 FRV-836 二个毒株对传代第 8 代和第 14 代 GLA 细胞进行攻毒,未出现细胞致病作用 CPE,然后盲传一次亦未出现 CPE,同时将细胞固定进行超薄切片,电镜观察未见 FRV。

1.2 体细胞工程鱼构建

受体:用本所试验场饲养的性成熟草鱼,经人工催产后,获得质量优良的未受精卵,经过 0.25% 胰酶脱膜后的裸卵,置于盛有赫氏液的培养皿中备用。

供体:用胰酶将 GLA 细胞从培养瓶上消化下来,用蒸馏水膨胀 6 分钟。

电融合结合继代移核的操作程序:将上述供体细胞和受体卵同置于电融合小槽内进行电融合,参照易泳兰等[1988]方法稍加修改。电融合的卵子移入赫氏液中,放 24℃ 培养箱,待其发育至囊胚期。选择发育良好、囊胚分离下囊胚细胞作为继代移核的供体。用显微注射法将囊胚细胞核移植于草鱼未受精卵内(图版-2)[余来宁等,1989]。移核后的卵放入 50% 赫氏液中,24℃ 培育至幼鱼。

2 实验结果

2.1 GLA 细胞染色体分析结果

从 GLA 细胞株第 14 代细胞的 100 个分裂中期的染色体来看,该细胞株为二倍体细胞株,其中 $2n = 48$ 的分裂相数占 77.0%, $2n = 48$ 的分裂相数占 23.0%。核型公式为: $18m + 24sm + 6st$, $NF = 88$ 。与草鱼正常染色体核型基本一致,可作为构建细胞工程鱼的供体(图版-1)。

2.2 移核结果和胚胎发育能力比较

以 GLA 培养细胞(8~14 代)作为供体,以草鱼未受精卵为受体,进行了 24 批电融合,共得到 248 枚电融合卵,其中 112 枚发育至囊胚期(占 45.2%),16 枚发育至原肠期(占 6.5%),4 枚发育至尾芽期(占 1.6%)。随后便停止发育,胚胎开始崩溃(图版-4,6,7)。

取电融合后发育良好的囊胚,分离囊胚细胞作为供体,进行继代移核。将囊胚细胞(核)再移植入草鱼未受精卵中。共移植 364 枚卵,有 191 枚(占 52.5%)发育到囊胚期,52 枚(14.3%)发育到原肠期,14 枚(3.8%)发育到尾芽期,8 枚(2.2%)发育至开口前的幼鱼,最后获得仔鱼 1 尾(占 0.3%)(表 1,图版-2,5,8)。

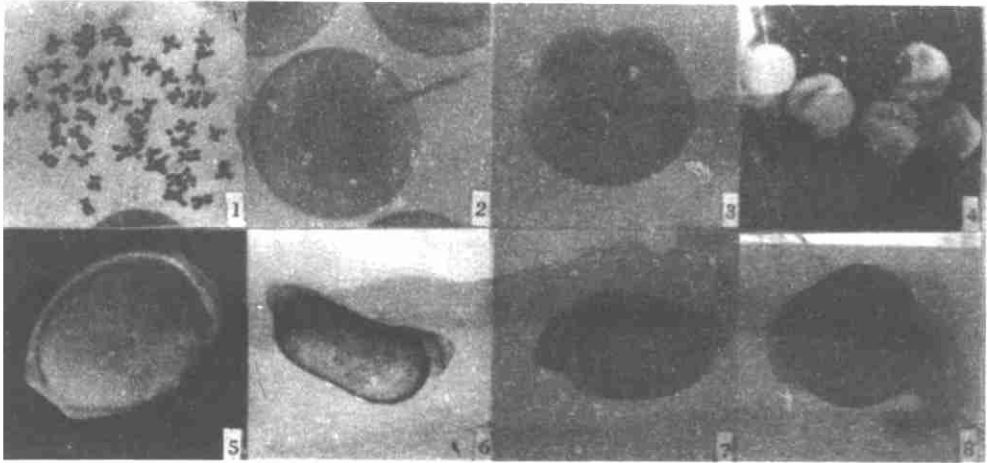
表 1 草鱼肝培养细胞的发育能力

Table 1 Development capacity of subcultured cell nuclei derived from grass carp liver

胚胎发育期	电融合	占融合卵(%)	继代移核	占移核卵总数(%)
电融合、移核卵总数	248	100	364	100
囊胚期	112	45.2	191	52.5
原肠期	16	6.5	52	14.3
尾芽期	4	1.6	14	3.8
开口前幼鱼	0	0	8	2.2
摄食仔鱼	0	0	1	0.3

从表 1 看,仅进行电融合和电融后进行继代移核所得的卵发育能力有差异,发育到囊胚期

的百分比前者为45.2%,后者为52.5%。发育到原肠期的前者为6.5%,后者为14.3%。发育至尾芽期的前者为1.6%,后者为3.8%。发育至幼鱼和仔鱼期的前者为0,后者分别为2.2%和0.3%。从发育到各时期的比例看,继代移核比电融合的高。说明继代移核能提高培养细胞的发育能力。



图版 Plate

1.草鱼肝细胞株(第14代)染色体中期分裂相; 2.细胞核移植显微注射; 3.继代移核卵发育至两细胞期; 4.电融合卵发育到囊胚期; 5.继代移核的卵发育至神经胚期; 6,7.电融合卵发育至尾芽期; 8.继代移核卵发育至肌肉效应期。

2.3 体细胞工程鱼的形态特征

按常规形态学检测法,测定了体细胞工程鱼的形态学可数性状,并与供体、受体亲本草鱼的形态进行了比较(表2)。结果如下:(1)体细胞工程鱼的背鳍条为3,7;胸鳍条为1,16;臀鳍条为3,8;腹鳍条为2,8;侧线鳞数为42;侧线上鳞6;侧线下鳞5。(2)供体草鱼(提供细胞培养用肝组织的草鱼)的背鳍条为3,7;胸鳍条为1,16;臀鳍条为3,8;腹鳍条为2,8;侧线鳞为41;侧线上鳞6;侧线下鳞5;(3)受体草鱼(提供未受精卵的草鱼)的背鳍条为3,8;胸鳍条为1,18;臀鳍条为3,9;腹鳍条为2,8;侧线鳞数为43;侧线上鳞7;侧线下鳞6。由此可见,体细胞工程鱼的形态学可数性状与供体草鱼基本一致。仅侧线鳞一项间于供体、受体草鱼之间。

表2 体细胞工程鱼供体、受体草鱼形态学特征

Table 2 The morphological characteristics of cell-engineering fish, donor and recipient grass carp

鱼名	形态学可数性状						
	背鳍条	胸鳍条	臀鳍条	腹鳍条	侧线鳞	侧线上鳞	侧线下鳞
体细胞工程鱼	3,7	1,16	3,8	2,8	42	6	5
供体草鱼	3,7	1,16	3,8	2,8	41	6	5
受体草鱼	3,8	1,18	3,9	2,8	43	7	6

由于怕伤害体细胞工程鱼,没有检查它的咽喉齿、脊椎骨和鳃耙数等性状。至于抗病性能的检查,只有等获得更多数量的体细胞工程鱼后,待性成熟繁殖 F_1 代,进行攻毒试验才能得出结论。

3 讨论

3.1 培养细胞核的发育潜能

细胞核的发育潜能问题,一直是许多学者关注和争议的焦点。自 1952 年 Briggs 和 King 首先在两栖类进行细胞核移植获得成功以及 60 年代初我国童弟周等[1963]建立鱼类细胞核移植技术之后,细胞核移植技术即成为研究核质关系和细胞核发育潜能的有效手段。随后人们进行了大量的实验。将处于不同分化时期的细胞核移植到成熟卵中,得到了处于不同发育时期的胚胎,同时也发现,不同分化时期的细胞核其发育能力不同,越是分化期晚的细胞核发育能力越差。并认为只有用原肠期之前的细胞(核)进行核移植才能获得成活的个体。但随着研究的深入,许多学者提出了新的看法并拿出了很多有力的实验证据。1980 年陈宏溪等首先用鲫囊胚的继代培养细胞核作供体,移入鲫去核卵中,获得了存活的仔鱼。1982 年、1984 年他们又分别用短期培养的鲫、金鱼肾细胞核作供体,移入同种鱼的去核卵中,得到了达性成熟的成鱼[陈宏溪等,1986]。与此同时,陆仁后等[1982]用长期培养并经秋水仙素诱变的四倍化草鱼尾鳍细胞核进行移核,获得了肌肉效应期的胚胎。张念慈等[1990]用经 16 次传代培养的草鱼胚胎细胞和传代 15 次培养的青鱼囊胚细胞,移入团头鲂卵中,进行属间和亚科间核移植,得到了肌肉效应期和体节出现期的胚胎。综上所述,体外培养细胞核仍具发育能力,移核可以获得存活的个体,但发育能力存在差别。作者曾选用草鱼不同分化程度的胚胎细胞核(囊胚、原肠、神经胚)和体外培养的肝细胞以及未经培养的成鱼肾细胞核进行细胞核移植试验,比较了不同分化程度细胞核的发育潜能,发现分化期晚的细胞核,发育潜能较差,但只要进行适当的激活(如继代移核)后,发育能力可以恢复(余来宁等,1990)。这可能是由于分化的细胞核,在卵子细胞质作用下,那些被抑制的基因重新活动所致。因此,连续两次将细胞核移入卵子中,细胞核的发育能力就更加增强。本次实验也说明了这一点。

3.2 构建体细胞工程鱼方法的改进

虽然体外培养细胞具有发育全能性,但构建体细胞工程鱼的成功率却非常低。也就是说,要在体外培养细胞上进行遗传操作(如抗病诱变等),然后将这些定向培育的细胞核移植于卵中使之发育成鱼难度很大,仍有许多具体问题亟待解决。为提高体细胞工程鱼的成活率,本次实验在方法上作了些改进:(1)培养细胞在电融合前,进行低渗膨胀处理,其目的是让细胞膜在电融合时更易被击破。(2)采用电融合结合继代移核的方法,其优点是两次将核移入卵中,能提高细胞发育潜能,电融合一次能处理多个卵,特别是培养细胞小而生多,用显微注射进行移核难度极大情况下,采用电融合取代第一次移核,提高了效率。(3)采用了未去核卵作受体,使移核手术简捷。以上改进一方面提高了细胞的发育潜能,另一方面也提高了成功率。

3.3 体细胞工程鱼的遗传信息

从体细胞工程鱼与供体、受体草鱼的形态学比较中发现,体细胞工程鱼的形态学可数性状与供体草鱼的基本一致。这说明体细胞工程鱼的遗传信息是由供体细胞核提供的。体细胞工

(3)余来宁等,1990. 草鱼不同分化程度细胞核移入未受精卵后的发育能力比较. 863 计划生物技术领域年会论文摘要。

程鱼与普通有性繁殖的鱼不同,前者得到的2倍体细胞核是与供体鱼的核完全一致,即供体鱼的体细胞核,是经多代无性繁殖后传给它的。而不象普通有性繁殖鱼的那样细胞核分别来自父母本。因此,体细胞工程鱼与供体亲本可以非常相似。

许映芳同志参加细胞培养工作,谨致谢意。本文为863计划攻关项目和“八五”农业部生物技术攻关项目(85农-11-02-05)的研究内容之一。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院水生生物研究所二室家鱼小组,1976。用理化方法诱导草鱼×团头鲂及草鱼三倍体、四倍体。水生生物学集刊,6(1):111~114。
- [2] 陆仁后等,1982。四倍化草鱼细胞株的获得,特性和移核实验的初步试探。遗传学报,9(5):381~387。
- [3] 余先觉等,1989。中国淡水鱼类染色体,140~141。科学出版社(京)。
- [4] 余来宁等,1989。用未去核卵作受体的鱼类细胞核移植研究。淡水渔业,(3):3~7。
- [5] 陈宏溪等,1986。鱼类培养细胞核发育潜能的研究。水生生物学报,10(1):1~8。
- [6] 吴维新等,1981。一个四倍体杂种——兴国红鲤×草鱼。水生生物学集刊,7(3):433~436。
- [7] 吴维新等,1988。鲤和草鱼杂交四倍体及其回交三倍体草鱼杂种的研究。水生生物学报,12(4):355~363。
- [8] 张念慈等,1990。草鱼、青鱼体外培养细胞的属间、亚科间核移植。水产学报,14(4):344~346。
- [9] 易泳兰等,1988。鱼类囊胚细胞和卵的电融合。水生生物学报,12(2):189~192。
- [10] 童第周等,1963。鱼类细胞核的移植。科学通报,(7):60~61。

CELL-ENGINEERING GRASS CARP PRODUCED BY THE COMBINATION OF ELECTRIC FUSION AND NUCLEAR TRANSPLANTATION

Yu Laining, Zuo Wengong, Fang Yaoling and Zheng Weidong

(*Yangtze River Institute of Fisheries, Jingshashi 434000*)

ABSTRACT The somatic cell from grass carp liver cell strain (GLA) which is resistant to grass carp hemorrhage virus (FRV) and which also has the same chromosome number as that of grass carp was transferred into unfertilized eggs of grass carp by means of electric fusion. When the treated eggs develop at blastula stage, the cell from blastula was isolated and microinjected into unfertilized eggs of grass carp again. Using the above methods the cell-engineering grass carp was produced, and eight fry before mouth - open stage and one big sized fingerling were obtained. The morphological studies shown that no differences were found between cell-engineering fish and donor grass carp, which suggested that nucleus of cell-engineering grass carp may possibly originate from somatic cell of GLA. This study also suggested that the technique may have the potential to produce cell-engineering fish for aquaculture and basic biological research. Further study on disease resistance of cell-engineering fish to FRV will be conducted.

KEYWORDS Grass carp, Electric fusion, Nuclear transplantation, Cell-engineering fish