

研究简报

# 精子载体法将外源 DNA 导入草鱼受精卵 获得性状转移

## GENETIC TRAITS TRANSFERENCE AFTER EXOGENOUS DNA WAS INTRODUCED INTO GRASS CARP DURING FERTILIZATION WITH SPERM AS THE CARRIER

章怀云 张学文<sup>1</sup> 何铁林<sup>2</sup> 陈立祥 陈 韬 萧调义 李晋衡

(湖南农业大学动物科学技术学院, 长沙 410128)

(湖南省农业生物工程研究所, 长沙 410128)<sup>1</sup>

(湖南省水产局, 长沙 410005)<sup>2</sup>

ZHANG Hua-Yun, ZHANG Xue-Wen<sup>1</sup>, HE Tie-Lin<sup>2</sup>,

CHEN Li-Qiang, CHENG Tao, XIAO Tiao-Yi and LI Jin-Heng

(College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

(Hunan Agricultural Biotechnology Institute, Changsha 410128)<sup>1</sup> (Hunan Aquicultural Bureau, Changsha 410005)<sup>2</sup>

关键词 总 DNA, 精子载体, 遗传转化, 草鱼

KEYWORDS Total DNA, Sperm carrier, Genetic transformation, Grass carp

由于池塘养殖的固有特点,难以普遍推广使用药物或免疫接种防治草鱼疾病。通过对草鱼进行遗传改良,提高其抗病能力,可能是减少病害损失的最有效措施。近年来在植物遗传改良中普遍采用的总 DNA 导入法,有效地对多种农作物进行了遗传改良[周光宇等 1993],说明在未能掌握决定某些确定性状的基因的情况下,利用具有该性状的总 DNA 导入受体,有可能实现这些确定性状及基因的转移。鲤与草鱼有很近的亲缘关系,而很多草鱼罹患的疾病如出血病、肠炎等并不在鲤中发生,因此,常认为鲤具有抗病性,含有抗病的基因,可作为抗性基因的供体。分离鲤总 DNA,然后以精子载体导入草鱼受精卵,有望获得转入抗病基因的草鱼个体。精子载体进行外源基因转移最初在鼠中获得成功[Lavitrano 等 1989]。Castro 等[1990]又证明外源 DNA 能结合进鲤精细胞内部,说明鱼类精子具有结合外源 DNA 的能力,特别是鱼类具有精卵数量大、受精作用在体外完成的特点,在运用精子载体上有明显的优势。刘汉勤等[1991]便运用了这一方法对鲤受精卵进行 DNA 导入研究。本文以草鱼精子与红鲤 DNA 共培养,再与草鱼卵受精,获得了体形体色变异的个体。变异了的红色草鱼的获得证明了以总 DNA 导入,也能在鱼类中实现确定性状的转移。

## 1 材料与方法

DNA 提取:按常规 SDS 加蛋白酶 K 的方法[Sambrook 等 1989],分离野生红鲤肝脏总 DNA,经纯化干燥

的 DNA 以 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溶解在 0.4% NaCl 溶液中。

**DNA 超声波处理:** 将超声波发生器探头插入 DNA 溶液中, 50W 功率下间歇作用 30 秒, 将 DNA 断裂, 经电泳检测, 断裂后 DNA 分子大小为 7~9 kb。

**草鱼催产:** 在草鱼繁殖季节(5月初), 选择健壮亲鱼人工注射激素催产。

**受精导入:** 分别挤出发情追逐的亲鱼的精液和卵子。精液先入 DNA 溶液中振荡 30 秒, 以便 DNA 进入精细胞或被吸附, 然后再倾入卵细胞中受精。另外, 将精液加入 0.4% 的 NaCl 溶液中, 作同样处理为对照组。

## 2 结果

经 DNA 溶液激活的精子共处理卵细胞约 30 000 枚, 受精率为 96% (发育至原肠期), 与对照组受精率接近, 说明 DNA 溶液并未影响精子的受精能力。对胚胎发育进行跟踪观察, 试验组胚胎发育至神经胚期到胚囊期间, 出现大量发育受阻致死现象, 最后孵出鱼苗仅 305 尾, 孵化率约 1%, 而对照组孵化率达 80% 以上。这说明 DNA 的导入和随机整合对受精卵的发育有巨大的影响。

鱼苗入池后进行生长对比试验。试验组与对照组采取同池饲养, 用纱网隔离。试验组 305 尾, 对照组 300 尾, 0~60 天期间饲养密度为 50 尾/ $\text{m}^2$ , 60~180 天期间饲养密度为 15 尾/ $\text{m}^2$ 。每隔一定时期随机取 10 尾称体重、测体长计算平均值。经 DNA 处理后孵出的鱼苗生长速度较对照组明显加快(表 1)。

表 1 生长对比试验

Table 1 The comparing growth rate in controlled cultivating test

下池天数(d)		15	25	60	90	180
实验	体长(cm)	1.83	4.03	9.52	12.84	22.60
	体重(g)			9.32	18.65	145.40
对照	体长(cm)	1.30	3.48	7.63	9.45	18.53
	体重(g)			3.97	11.45	117.32

试验组的生长至 40 天时即观察到 4 尾体形变异鱼, 其体宽体高明显大于其余个体, 且为非草鱼型体型。与鲤体型相比亦有明显差异, 表现在腹部更突出, 唇下无须等, 所以为非鲤非草型。50 天时其中 1 尾体色开始发生变化, 自腹底开始, 先变金黄色, 尔后渐变红色, 并向背部、尾部扩展; 70 天时体色已全部变红。另外的 3 尾鱼也相继经过一相似的变色过程。整个体色变化过程约需 20 天。图 1 所示是 70 天时 4 尾个体的发育及体色变化情况。

## 3 讨论

利用精子作为载体可以有效导入外源 DNA。在草鱼精子与鲤 DNA 短时共培养后, DNA 可能进入精细胞内或者吸附于精细胞, 在受精过程中鲤 DNA 得以进入受精卵中。因为草、鲤间亲缘关系较近, 导入的鲤 DNA 可通过同源重组整合进入基因组中。

从鲤肝脏中分离的 DNA 大分子, 通常超过 100kb, 大分子 DNA 在溶液中易相互交错成凝胶状, 其活动受到限制。由于精子在 DNA 溶液中共培养时间短, 为了提高 DNA 进入精细胞的机会, 特采用超声波处理对 DNA 大分子进行随机断裂, 使 DNA 断裂至 10kb 以下, 提高 DNA 分子在溶液中的运动活性。因为断裂具有的随机性为分子群体各断裂片段间提供了重叠的机会, 不会造成特定基因的破坏而产生系统丢失。

外源 DNA 片段在草鱼受精卵基因组的整合, 可以获得转入外源 DNA 的个体, 如果整合的 DNA 具有功能性基因, 还可获得特定性状的转移。本研究中红色变异个体的出现证明外源基因可以转移。因为鲤的红色与青灰色是由两对基因控制的质量性状[吴仲庆 1991], 在草鱼中未见有红色体色的存在, 所以, 红色变异个体的获得为红鲤基因导入的结果。红色体色的表现与变异个体体型的改变有一致性, 所获得的体色变异个体均为非鲤非草的独特性状, 可能是多个基因协同转移所致。

外源 DNA 的导入, 对草鱼受精卵而言并非都是有利的, 在胚胎发育过程中大量的致死现象, 即说明了导入外源 DNA 后对胚胎发育产生了极大的影响, 仅有那些导入和整合了外源 DNA, 同时对发育过程影响不大

的受精卵得以发育成苗,而一旦成苗后则通常能生长成成鱼。由此说明导入外源 DNA 对个体的影响通常在胚胎发育期即能表现出来。

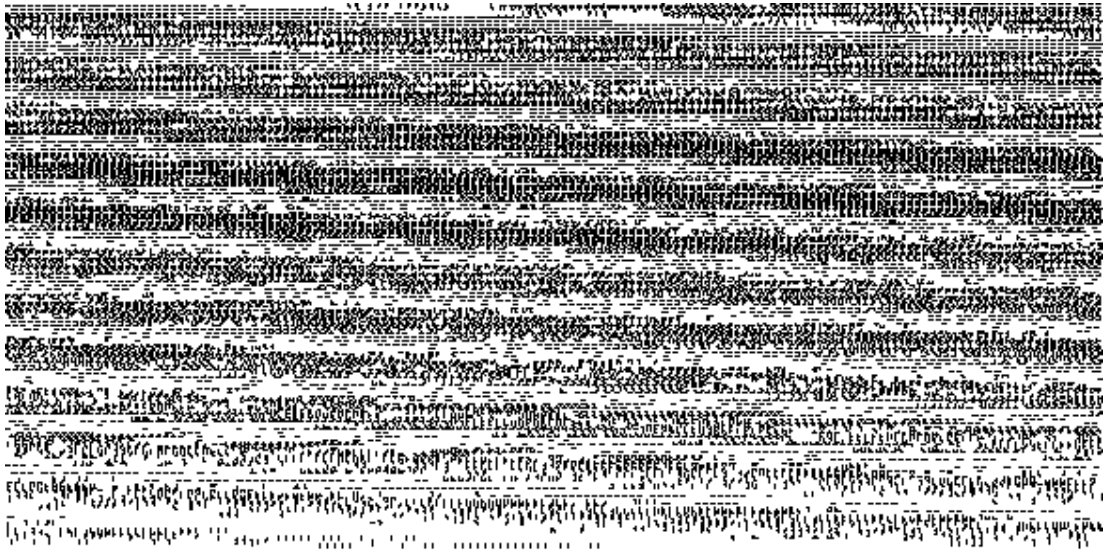


图 1 红鲤 DNA 导入草鱼受精卵获得性状变异(70 日龄)

Fig. 1 Varieties obtained from total DNA of red carp introduced into fertilized eggs of grass carp(70 d)

- A. 同龄普通红鲤 B. 对照草鱼; C. 草型变异鱼; D. 非草非鲤型变异鱼, 体色尚未变化;  
E. 体型变异鱼, 40 天时开始变红, 70 天时体色完全变红; F. G. 变色不同程度的个体

体色变异个体体色变异的时期有一定差异,个体间相差约 10 天,但体色变异的过程却极为一致。这是因为导入的红色体色相关基因与草鱼基因组整合时有“热点”现象,4 尾变异个体都在同一位点整合,同时该位点受发育调控,因而在一定的发育时期该位点基因开放时,体色变异便逐步表现出来。表现时期的不同正是由于个体发育的差异造成的。这种体色变异受发育调控的现象在 DNA 供体红鲤中并未发现。

红色体色是一种易观察的性状,若能分离该基因并与外源基因进行连锁转移,是鱼类基因工程的理想标记。红色变异个体的获得,特别是基因表现受发育过程的控制,为分离这一基因提供了理想材料。

红色性状的转移证明,采用总 DNA 导入完全可以实现特定性状的定向转移,因此,我们认为在试验组的后代中可能出现转入了抗病性相关基因的个体。参考农作物分子育种的实践,导入外源 DNA 的变异后代第二代有更广泛的分离现象,所以,抗病攻毒实验将在第二代中进行,这也便于保存试验材料、扩大群体。

## 参 考 文 献

- 刘汉勤等. 1991. 总 DNA 介导鱼类基因转移的初步研究. 水生生物学报, 15(3): 286~ 288.  
吴仲庆. 1991. 水生生物遗传育种学. 厦门大学出版社. 32~ 34.  
周光宇等. 1993. 农业分子育种研究进展. 北京: 中国农业出版社. 1~ 12.  
Castro F O, et al. 1990. The ability to integrate with DNA of sperms from several animals. Theriogenology, 34(6): 1099~ 1110.  
Lavitrano M, et al. 1989. Sperm cell as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. Cell, 57: 717 ~ 723.  
Sambrook J, et al. 1989. Molecular Cloning, 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.