

文章编号:1000-0615-(2001)05-0408-05

大珠母贝基因转移的电击参数

喻达辉¹, 汪亚平², 吴开畅¹, 胡 炜², 朱传华¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;

2. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要:将大珠母贝精子经不同脉冲循环数、脉冲数和不同脉冲幅度处理后,与卵子受精,然后观察受精和发育情况并进行统计分析,根据受精率确定最佳参数组合为:脉冲循环数 6、脉冲数 2⁸ 和脉冲幅度 6kV。此前用电击参数为脉冲循环数 6、脉冲数 2⁷ 和脉冲幅度 10kV 进行了大珠母贝转基因实验,获得转基因阳性贝。

关键词:大珠母贝;基因转移;电脉冲;电击参数

中图分类号:Q813;S917 文献标识码:A

Parameters of electroporation in transgene of *Pinctada maxima*

YU Da-hui¹, WANG Ya-ping², WU Kai-chang¹, HU Wei², ZHU Chuan-hua¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Guangzhou 510300, China)

2. Institute of Hydrobiology, CAS, Wuhan 430072, China)

Abstract: The sperms of *Pinctada maxima* were electroporated with different parameters of electric pulses: changing cycles of pulses, numbers of pulses in one cycle, or amplitude of pulse. The treated sperms were fertilized with the eggs subsequently. The fertilization and development were observed and the ratios of fertilization were statistically counted, by which the optimal combination of these three parameters was determined. The results were as follows: cycles of pulses being 6, numbers of pulses in one cycle being 2⁸, amplitude of pulse being 6kV. Before this experiment, the gene transfer was conducted through electroporation with the parameters of cycles of 6, numbers of pulses of 2⁷ in one cycle and amplitude of 10kV, and positive transgenic pearl oysters were obtained. The parameters were basically identical with those of this study. The application further testified the fitness of parameters quantified by the rates of fertilization in this study.

Key words: *Pinctada maxima*; gene transfer; electric pulse; parameter of electroporation

显微注射法因其直接对受精卵进行基因操作,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的方法^[1-3]。但是,显微注射法因其操作复杂,受精卵易损伤等缺点限制了该技术的应用。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,目前已有通过电脉冲实现鲤、鲈、罗非鱼、鲑、金鱼、泥鳅及斑马鱼等鱼类的外源基因导入的成功报道^[4-9]。Poweres 等报道了鲍的电穿孔法转基因研究^[10]。

大珠母贝 *Pinctada maxima* (Jameson) 是我国生产大型珍珠的唯一母贝,经济价值极高。南海水产研

收稿日期:2000-03-21

基金项目:广东省自然科学基金(991044)和淡水生态与生物技术国家重点实验室资助项目

第一作者:喻达辉(1963-),男,湖北利川人,副研究员,主要从事增养殖与生物技术研究。E-mail:yudh231@21cn.com

究所分别于 1970 年和 1981 年获得人工育苗^①和插核育珠成功^[11],最大一颗珍珠直径达 19.2mm,重 6.85g,被称为“珍珠王”。大珠母贝属热带海洋贝类,在我国的分布数量少,属国家二类保护动物。在生产开发中,近几年来出现了 3~6mm 幼贝海区养殖大量死亡的现象,严重阻碍了大珠母贝的增殖保护和开发利用。因此,有必要进行种质改良。由于大珠母贝卵径仅为 60 μm ,且卵壳坚硬,卵不透明,显微注射操作难度大。为此,1998 年进行了大珠母贝转基因^[12]和大珠母贝精子的电击参数研究,为电穿孔法制作转基因软体动物提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验贝类及其精卵采集

试验于 1998 年 5 月 20 日在中国水产科学研究院南海水产研究所三亚热带水产研究开发中心进行,选取成熟的大珠母贝亲贝,解剖后进行人工采精、采卵,备用。

1.2 电脉冲试验

1.2.1 电击参数概念

电击参数见图 1,其中 a 表示脉冲宽度(μs),b 中的锯齿数为脉冲数(用 2^x 表示),c 为一个脉冲周期(cycle),d 为脉冲幅度(kV)。

电击中保持下列电脉冲参数恒定不变:脉冲周期 1.6s,脉冲宽度 120 μs ,电极距离 1mm,1mL 脉冲皿中脉冲试验液 100 μL 。

1.2.2 脉冲幅度、循环数及脉冲数组合设计

第 1 组:脉冲循环数为 6 个,脉冲数为 2^7 ,脉冲幅度分别为 4kV、6kV、8kV 及 10kV;

第 2 组:脉冲幅度 10kV,6 个脉冲循环数,脉冲数分别为 2^4 、 2^6 、 2^8 及 2^{10} ;

第 3 组:脉冲幅度 10kV, 2^7 脉冲数,脉冲循环数分别为 6、8、10 及 12 个。

1.2.3 大珠母贝精子电击试验方法

将解剖获得的精子取 100 μL (浓度为 1.6×10^9 cells $\cdot\text{mL}^{-1}$)放入电击杯中,按上述设计电击参数进行电击,然后与 200 μL 卵(浓度为 9×10^4 cells $\cdot\text{mL}^{-1}$)受精,统计受精率。受精条件为:盐度 34,水温 31 $^{\circ}\text{C}$,氨海水 pH 9.0。对照组不经电击处理。电脉冲仪为 Baekon 2000 型。

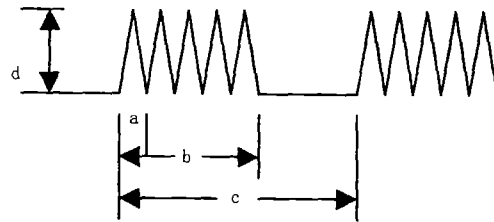


图 1 电击参数图解

Fig.1 A graphic show of parameters of electric pulse

2 结果

2.1 电脉冲条件对大珠母贝精子的影响

2.1.1 不同脉冲幅度对精子的影响

本试验中电击对精子的影响主要是通过受精率来衡量。在循环数为 6,脉冲数为 2^7 的条件下,不同脉冲幅度电击大珠母贝精子后的受精率见图 2。经 10 kV 的高场强处理后,大珠母贝精子仍保持有较高的活力,其受精率仍达到 67.7%。脉冲幅度为 6kV 时,受精率最高,达 81.6%,接近对照组的 88.6%。

2.1.2 不同脉冲数对精子的影响

当脉冲幅度为 10kV,循环数为 6 时,不同脉冲数电击大珠母贝精子后的受精率见图 3。从图中可见,脉冲数为 2^4 、 2^6 和 2^8 时,受精率变化不大,没有显著差异。但经过 2^{10} 处理后,其受精率仅为

①曹家禄. 大珠母贝人工育苗的研究. 1971.

18.2%；而脉冲数为 2^8 时受精率最高，达69%。

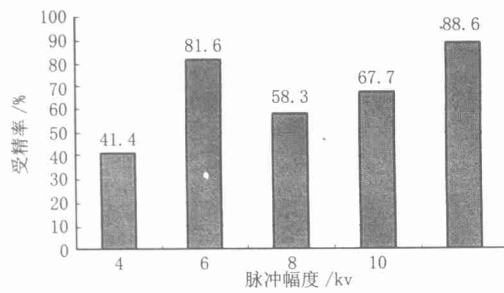


图2 不同脉冲幅度电击处理的受精率
Fig.2 Rate of fertilization by different pulse amplitudes of electroporation

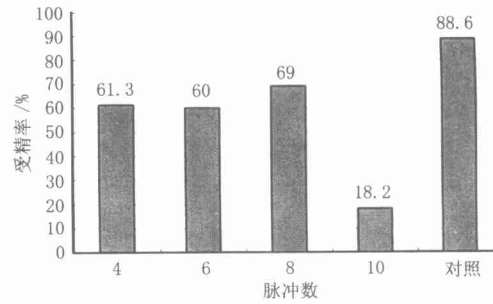


图3 不同脉冲频率电击处理的受精率
Fig.3 Rate of fertilization by different numbers of pulse of electroporation

2.1.2 不同脉冲循环数对精子的影响

当脉冲幅度为10kV,脉冲数为 2^7 的条件下,大珠母贝精子经不同脉冲循环数处理后,其受精率见图4。脉冲循环数为6和10个时,受精率较高,分别为58.8%和62.5%。

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导入,大珠母贝电击的最佳参数为脉冲幅度6kV,脉冲数 2^8 ,循环数6个。

2.2 转基因大珠母贝的生物学分析

大珠母贝转基因实验方法见文献[12]。处理组和对照组的幼体数量、出苗数量和个体大小等基本情况见表1。A、B(电击处理,未加DNA)组为对照组,C、D、E组为实验组,所加DNA浓度分别为 $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $6\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $18\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,外源基因整合的阳性率分别为5.6%、20%和50%^[12]。从表1数据来看,E组出苗量(率)最高,成活率最高,但由于其密度高,个体较其他组的小。经过处理的B~E组孵化率均较低,可能与受精时的精子和卵的密度较低有关,因为当时是用2mL精子(约 $1.6\times 10^9\text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$)与4mL卵(约 $9\times 10^4\text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$)于2000mL海水中受精的。

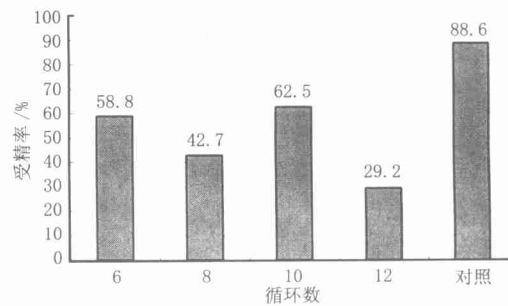


图4 不同脉冲循环数电击处理的受精率
Fig.4 Rate of fertilization by different pulse cycles of electroporation

表1 大珠母贝转基因贝孵化、出苗情况

Tab.1 Larval and hatching data of *P. maxima* from treated and control groups

组别	孵化率 (%)	幼体数 (ind)	出苗量 (ind)	出苗率 (%)	重量 (g)	个数/克 (ind/g)	百粒重 (g)	壳长 (mm)	壳高 (mm)
A	47.5	171 000	1 119	0.658 2	9.1	123	0.81	3.8~9.0(6.1)	3.5~7.0(4.9)
B	0.8	3 000	431	11.03	4.38	98.4	1.02	3.1~10.0(6.9)	2.5~8.0(5.2)
C	1.7	6 000	1 756	29.26	14.5	121.1	0.83	5.2~8.8(6.9)	4.1~8.2(5.6)
D	4.17	15 000	1 108	7.32	11.75	94.3	1.06	3.5~9.0(6.5)	2.5~7.5(5.0)
E	2.5	9 000	7 822	86.91	21.35	366.4	0.27	2.0~6.0(4.6)	1.5~5.0(3.2)

3 讨论

电穿孔法是比较新的转基因方法。这一方法需要电穿孔仪,细胞悬浮在石英池内,将外源基因加入池内的介质中,池的两边各有一个电极,外接高压电源,给予一个极其短暂的高压脉冲电场,在细胞膜两边产生一个高于其阈电位的膜电压势能,使细胞膜被打碎,形成许多可逆的微小孔洞,允许外源 DNA 分子进入受体细胞而实现基因转移。应用这一技术,可将大至 150kb 的 DNA 分子转入动物细胞中。这一方法可广泛用于不同类型细胞的基因转移,操作简单方便,重复性好,基因的转移效率也较高,一次可以处理大量细胞。其缺点是对细胞的损伤较大。一般降低电压可减少对细胞的损害。石英池中缓冲液的组成、细胞的生长状态,以及 DNA 分子的构象和浓度也对基因转移的效率产生一定的影响^[13]。

从上述原理可以看出,电穿孔法转基因的关键是要使受体细胞产生一定大小的孔并维持一段时间以便外源基因得以进入。而“开孔”的关键因子主要有脉冲幅度(强度)、脉冲数(影响放电时间)和循环数,这 3 个因子的开孔效果与细胞膜的结构有关。因此,不同种细胞其值不同,而同类细胞则很相近。大珠母贝精子和合浦珠母贝的电击参数具有高度的一致性。

从电击后的受精率来看,大珠母贝精子的生命力很强。在脉冲幅度达到 10kV 时受精率仍很高。在脉冲数为 2⁸ 以下,循环数 10 以下受精率均较高。说明大珠母贝精子很适合于电穿孔法转基因。另外,大珠母贝等贝类的精子在人工解剖取得的情况下不活动,处于静态,也有利于进行电击诱导外源 DNA 进入。

本实验所确定的电击参数是以其对精子活力的影响为标准进行确定的。从转基因的角度来讲还要考虑外源 DNA 的导入效果。从理论上推测,上述 3 个因子的值越大,越有利于 DNA 分子的导入,但要获得有效导入,则不能超过受体细胞所能忍受的限度。因此,本实验所确定的参数具有重要的指导意义。

在实质性的转基因实验中最高获得 50% 的阳性率^[12],其所用电击参数和本实验结果基本一致,进一步验证了上述所确定的参数的正确性,但外源基因的作用尚不能肯定。由于精子本身不通过电击也能携带外源 DNA 进入^[14-20],而珍珠贝类方面尚未有这方面的报道,因此,电击作用的“净效率”有待于进一步探讨。

Sin 等^[9]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,但迄今尚未见系统研究以证明上述推断的报道。Poweres 等^[10]用 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的外源基因与精子共育后,再用电脉冲处理精子,得到 65% 的转基因阳性鮑。在大珠母贝转基因实验中,电击诱导 DNA 进入的效率与 DNA 的浓度有很大关系。外源 DNA 的浓度越高,转基因的阳性率也越高,呈正相关关系^[12]。

上述不同的研究结果表明,用精子作为载体结合电穿孔法介导外源基因转移的机制需更深入的研究,而一旦阐明了这种机制,电穿孔—精子载体法将有望成为一种大批量制作转基因水产动物的实用方法。

参考文献:

- [1] Zhu Z, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L. 1758)[J]. *Z Angew Ichthyol*, 1985, (1):31-34.
- [2] 朱作言,许克圣,谢岳峰. 转基因鱼模型的建立[J]. *中国科学*, 1989, B(2):147-155.
- [3] Zhu Z. Growth hormone gene and the transgenic fish[A]. You C B, Chen Z L, eds: *Agricultural Biotechnology*[M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1992. 106-116.
- [4] Symonds J E, Walker S P, Sin F Y. Electroporation of salmon sperm with plasmid DNA: evidence of enhanced sperm/DNA association[J]. *Aquac*, 1994, 119:313-327.
- [5] Symonds J E, Walker S P, Siu F Y T. Development of a mass gene transfer method in chinook salmon: optimization of gene transfer by electroporated sperm[J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3:104-111.
- [6] Müller F, Ivics Z, Erdelyi F, et al. Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier[J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*,

- 1992, 1:276-281.
- [7] Tsai H J, Tseng F S, Liao I C. Electroporation of sperm to introduce foreign DNA into the genome of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1995, 52:776-787.
- [8] 谢岳峰, 刘东, 邹钧, 等. 泥鳅受精卵的电脉冲基因转移[J]. *水生生物学报*, 1989, 13(4):387-389.
- [9] Sin F Y T, Bartley A L, Walker S P, et al. Gene transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by electroporating sperm in the presence of pRSV-lacZ DNA [J]. *Aquac*, 1993, 117:57-69.
- [10] Powers D A, Kirby V L, Cole T, et al. Electroporation as an effective means of introducing DNA into abalone (*Haliotis rufescens*) embryos [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1995, 4:369-375.
- [11] 蒙钊美, 黎学章. 大珠母贝外套膜小片移植和珍珠囊形成的研究 [A]. 贝类学论文集 [C]. 北京: 科学出版社, 1983. 1:97-100.
- [12] 胡炜, 喻达辉, 汪亚平, 等. 大珠母贝精子介导外源基因转移研究 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16(2):165-168.
- [13] 陈惠黎. 生物大分子的结构和功能 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999. 489.
- [14] 李国华, 崔宗斌, 朱作言, 等. 鱼类精子携带的外源基因导入 [J]. *水生生物学报*, 1996, 20(3):242-247.
- [15] Tsai H J, Lai C H, Yang H S. Sperm as a carrier to introduce an exogenous DNA fragment into the oocyte of Japanese abalone (*Haliotis diversicolor*) [J]. *Transgenic Res*, 1997, 6:85-95.
- [16] Lavitrano M, Camaioni A, Fazio A, et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice [J]. *Cell*, 1989, 57:717-723.
- [17] Gavora J S, Benkel B, Sasada H, et al. An attempt at sperm-mediated gene transfer in mice and chickens [J]. *Can J Anim Sci*, 1991, 71:287-292.
- [18] Patil J G, Khoo H W. Nuclear internalization of foreign DNA by zebrafish spermatazoa and its enhancement by electroporation [J]. *J Exp Zool*, 1996, 274:121-129.
- [19] 于建康, 阎维, 张玉廉, 等. 精子介导鱼类基因转移和聚合酶链反应检测技术 [J]. *动物学报*, 1994, 40(1):96-99.
- [20] Khoo H W, Ang L H, Lim H B, et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish [J]. *Aquac*, 1992, 107:1-19.

欢迎订阅 2002 年《淡水渔业》

《淡水渔业》杂志由中国水产学会和长江水产研究所主办, 1971 年创刊, 已连续办刊 31 年, 本刊 2002 年仍为国际流行的大 16 开, 正文与封面纸张质量、印刷质量将有较大提高, 正文 64 页, 刊登内容仍然以渔业实用生产技术为主, 适当报道具有实用价值的科研新成果及渔业动态信息, 更加贴近渔业生产, 贴近渔民。

《淡水渔业》2002 年为双月刊, 每单月 5 日出版, 每册定价仍为 5 元, 全年 6 期 30 元。为方便读者, 仍采用两种订阅方式: ①可在当地邮局订阅 (本刊发行代号为 38-32, 国内统一刊号为 CN42-1138); ②可直接汇款到杂志社订阅 (可随时订阅全年杂志)。为感谢广大新老读者对本刊的厚爱, 凡订阅 2002 年《淡水渔业》杂志者, 凭订单复印件或汇款单, 可在本刊免费刊登一条供求信息 (50 字以内)。

淡水渔业杂志社地址: 湖北省荆州市江汉北路, 邮政编码: 434000, 电话: (0716) 8212277-3017, 传真: (716) 8228212。欢迎新老读者订阅, 欢迎广大作者惠寄稿件, 欢迎新老客户刊登各种广告 (本刊改为大 16 开后, 广告价格不变)。