

文章编号: 1000- 0615(2002)05- 0391- 05

转生长激素基因鲤的快速生长效应及传代

孙效文, 梁利群, 闫学春, 曹顶臣
(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 报道了转生长激素基因鲤阳性群体的建立和“超级鲤”的获得。给出了“超级鲤”和对照组连续 4 年的生长实验结果及“超级鲤”子代连续 3 年的生长对照的体重数据。结果显示, 外源生长激素基因对受体鲤具有快速生长效应, 但具有这种超速生长作用的个体在转基因鲤群体中占极少数。此效应能传递给子代, 子代中快速生长个体的比例大大高于转基因实验群体。

关键词: 鲤; 生长激素基因; 快速生长效应

中图分类号: S917 文献标识码: A

The faster growth effect of transgenic common carp with growth hormone gene and its progenies

SUN Xiao-wen, LIANG Li-qun, YAN Xue-chun, CAO Ding-chen
(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Harbin 150070, China)

Abstract: A big group of transgenic *Cyprinus carpio* with salmon growth hormone gene was constructed. A “super fish” with very faster growth rate was selected from more than 10 000 transgenic common carps. The results of four years sequential growth experiments of the “super fish” and its controls were reported. The result of three years sequential growth experiments of the progenies of the “super fish” was reported, and the data of the weight of those progenies and their controls were also reported here. The statistical analysis of those data showed that the effect of salmon growth hormone gene for the transgenic common carp was positive, but only a few in those transgenic fish with this faster growth effect. The weight of the “super” fish was about two times the weight of the biggest fish in control. The faster growth effect could be transmitted to next generation, and the ratio of faster growth fish in progenies was much higher than that in transgenic *Cyprinus carpio* population. 43% progenies had foreign genes, but only 14% progenies had the fast growth feature and kept this fast growth trait in their three year old. Some progenies was 5 kg at three year old. In the paper, the future of transgenic fish was also discussed. Gene transfer is a very powerful tool for scientists to create new aquaculture species with good trait, although this technique needs to be developed further. Gene transfer methods will benefit from other basic researches such as genome research and molecular biology technology. Transgenic fish would be used in farm after it is tested to be no harm to ecosystem and human beings. For this, more researches on ecosystem testing should be done from now on.

收稿日期: 2002-02-22

资助项目: 国家 863 计划资助项目(863- 101- 05- 02- 01)

作者简介: 孙效文(1955-), 男, 吉林人, 研究员, 主要从事鱼类基因工程育种与分子生物学研究。Tel: 0451- 484246, E-mail: xws1999

@hotmail.com

Key words: *Cyprinus carpio*; growth hormone gene; faster growth effect

使受体生物获得目标性状并使之稳定遗传是基因工程育种的主要目的,也是养殖鱼类基因工程育种的技术难点之一^[1]。水产养殖鱼类基因工程育种研究已有十几年的研究历史^[2],但还没有获得目标性状比较突出且此优良性状能稳定遗传的转基因鱼纯系。本文报道了建立转生长激素基因鲤纯系的阶段性研究进展和外源生长激素基因对转基因鲤个体及子代的促生长效应。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼

本所松浦实验场养殖的黑龙江鲤性成熟个体,体重 3kg 左右,取材前分塘培育。

1.1.2 外源基因

所转基因为一融合基因,启动子为黑龙江鲤 MT 基因上游区约 1.5kb 的 DNA 片段,结构基因为大麻哈鱼生长激素基因编码区约 3.5kb 的 DNA 片段。此基因由中国科学院沈孝宙研究员提供^[3]。

1.2 方法

1.2.1 受精卵的获得与基因转移

1995 年春在鲤繁殖季节,选择成熟的体型好的黑龙江鲤亲鱼,胸腔注射 LRH-A 和鲫垂体等促进亲鱼排卵。待有产卵迹象时,捕获亲鱼,用手轻压雌鱼腹部收集高质量的卵。同样方法收集精液。收集的精、卵用干法受精,受精后的卵粒均匀地分散粘附在平皿上,在第 1 次卵裂发生前按孙效文等^[4]的方法将外源基因注入受精卵。

1.2.2 转基因鱼的培育

注射了外源基因的受精卵放在水温控制在 22~23℃ 的水族箱中,3~4d 可孵出鱼苗。待鱼苗平游后将其放入网箱中投喂轮虫饲养,长到约 2cm 左右放入有防逃措施的池塘中饲养至鱼种,同时对对照鱼苗放在饲养条件相同的另一池塘中饲养。第 2 年春经标记后与对照鱼放在同塘饲养。

1.2.3 转基因鲤的筛选和超级鲤的获得

整合检测:剪取实验鱼的鳍条,同时将鱼作上标记,从剪取的鳍条中提取 DNA 样品,用标记了同位素³²P 的大麻哈鱼生长激素基因的特异片段做探针对样品做斑点杂交和 Southern 杂交;优势性状个体的选择:从分子杂交获得阳性信号的实验鱼群体中筛选出生长速度快的个体作为有目标性状的转基因鲤,进行下一代繁殖研究。我们从近 1.5 万尾转基因实验鱼当中选到 1 尾生长速度特别快的个体,命名为“超级鲤”^[5]。

1.2.4 “超级鲤”的持续生长观察

发现“超级鲤”具有超常的生长效应后,连续 4 年在同池塘饲养“超级鲤”和其同胞转基因鲤并记录体重。

1.2.5 繁殖“超级鲤”子代并对子代进行生长测定

1999 年这尾雌性“超级鲤”达到性成熟,用本文 1.2.1 的方法,将“超级鲤”与正常鲤配组繁殖子代,同时用正常鲤繁殖得到的仔鱼为对照鱼。获得的子代与对照鱼在 1 龄时在不同池塘饲养并测定其体重等数据(分别为 30 尾);2 龄时仍在不同池塘饲养,同时每个池塘均加入相近体重的红鲤 30 尾作为参照鱼并测定其体重等数据。

1.2.6 子代的外源基因检测和生长测定

标记 100 尾子代鱼,如 1.2.3 所述方法标记并提取每尾鱼的 DNA 样品,样品经斑点杂交分析,测定子代含外源基因的百分比,并测定阳性鱼和非阳性鱼的体重。

2 结果

2.1 转基因鲤的筛选和超级鲤的获得

1993–1996年, 每年3次对2龄鱼进行外源基因的整合检测, 每年测得阳性鱼体重数据(为50尾)并进行统计分析, 结果显示转基因鲤最大个体均大于对照鱼的最大个体, 最小个体也小于对照组最小个体(表1), 表示外源基因及表达产物不仅对生长有促进效应, 也有不利的效应, 其中1996年获得的最大个体超过对照鱼最大个体的比例最高, 其体重是对照组最大个体的1倍以上, 因此被确定为“超级鲤”。

表1 转生长激素基因阳性二龄鱼和对照鱼的体重

Tab. 1 The weight of two years old transgenic fish and controls

(g)

| | 1993年 | | 1994年 | | 1995年 | | 1996年 | |
|------------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | 阳性鱼 positive | 对照鱼 control | 阳性鱼 positive | 对照鱼 control | 阳性鱼 positive | 对照鱼 control | 阳性鱼 positive | 对照鱼 control |
| 平均值 mean weight | 913 | 862 | 839 | 805 | 1126 | 973 | 953 | 941 |
| 标准差 standard deviation | 194.6 | 158.2 | 170.3 | 135.3 | 382.9 | 128.2 | 286.3 | 106.7 |
| 最大个体 max individual | 1445 | 1125 | 1250 | 1025 | 2040 | 1215 | 2150 | 1150 |
| 最小个体 min individual | 350 | 550 | 400 | 510 | 450 | 750 | 420 | 750 |

2.2 “超级鲤”的持续生长观察

1997–2000年连续4年在同池塘饲养“超级鲤”和其同胞转基因鲤并记录体重(40尾), 同时测定并记录对照组鲤(40尾)的生长情况(表2)。结果表明这尾“超级鲤”不但在2龄时具有快速生长效应, 在3龄以后仍具有较快的生长特点, 6龄时较同胞转基因鱼和对照鱼的体重仍高出1倍以上; 多数体重较大的转基因鲤在3龄或4龄时基本上与对照组鲤的体重趋于一致, 但这尾“超级鲤”在3~6龄时体重还远大于对照组最大个体。

表2 “超级鲤”及阳性群体和对照鲤3~6龄体重

Tab. 2 Body weight of “super carp” and positive transgenic fishes and controls at 3–6 years old

(g)

| | 1997年 | | 1998年 | | 1999年 | | 2000年 | |
|------------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | 阳性鱼 positive | 对照鱼 control | 阳性鱼 positive | 对照鱼 control | 阳性鱼 positive | 对照鱼 control | 阳性鱼 positive | 对照鱼 control |
| 平均值 mean weight | 1450 | 1414 | 2461 | 2449 | 3414 | 3396 | 4404 | 4256 |
| 标准差 standard deviation | 344.5 | 264.5 | 322.5 | 306.8 | 255.9 | 239.5 | 359.6 | 272.5 |
| 最大个体 max individual | 3925 | 2075 | 5700 | 3230 | 7850 | 3815 | 9650 | 4975 |
| 最小个体 min individual | 1025 | 1075 | 1960 | 1980 | 2890 | 2595 | 3425 | 3780 |

2.3 “超级鲤”子代的检测结果

100尾“超级鲤”子代经斑点杂交检测有43尾为阳性, 52尾为阴性, 标记丢失7尾。阳性鱼与阴性鱼的体重数据的统计结果见表3。阳性鱼平均体重较阴性鱼平均体重高30%, 这100尾鱼中体重最大的7尾都是阳性鱼。

2.4 子代鱼的持续生长观测

对子代鱼的生长情况连续3年做了测定。1龄子代与对照鱼在不同塘饲养并测定其体重等数据(各组测定数据分别为30尾, 统计结果见表4); 2龄时仍在不同塘饲养, 同时每个池塘均加入相近体重的红鲤30尾作为参照鱼并测定其体重(各组测定数据分别为30尾, 统计结果见表5)。

表3 “超级鲤”子代阳性鱼与非阳性鱼体重

Tab. 3 The weight of the progenies

with foreign gene and non foreign gene (g)

| | 阳性子代 progeny with foreign gene | 阴性子代 progeny with non foreign gene |
|------------------------|--------------------------------------|--|
| 平均值 mean weight | 290 | 235 |
| 标准差 standard deviation | 109.0 | 25.8 |
| 最大个体 max individual | 630 | 308 |
| 最小个体 min individual | 184 | 190 |

表4 “超级鲤”子代鱼与对照鱼体重

Tab. 4 The weight of the one year

old progenies and controls (g)

| | 超级鲤子代 progenies of “super” fish | 对照鱼 controls |
|------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| 平均值 mean weight | 164 | 117 |
| 标准差 standard deviation | 42.1 | 26.0 |
| 最大个体 max individual | 440 | 190 |
| 最小个体 min individual | 120 | 76 |

表5 “超级鲤”2龄子代鱼、对照鱼、对照组红鲤的体重

Tab. 5 The weight of the two years old progenies, controls, and reference fish

(g)

| | 超级鲤子代 progenies of “super” fish | 参照红鲤 1 reference fish 1 | 对照鱼 controls | 参照红鲤 2 reference fish 2 |
|------------------------|------------------------------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|
| 平均值 mean weight | 1909 | 1027 | 1030 | 1083 |
| 标准差 standard deviation | 954.3 | 143.1 | 177.3 | 188.8 |
| 最大个体 max individual | 3300 | 1340 | 1330 | 1540 |
| 最小个体 min individual | 730 | 690 | 680 | 750 |

表6 “超级鲤”3龄子代鱼与对照鱼体重

Tab. 6 The weight of the three years old progenies and controls (g)

| | 超级鲤子代 progenies of “super” fish | 对照鱼 controls |
|------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| 平均值 mean weight | 3300 | 1627 |
| 标准差 standard deviation | 1270.1 | 388.0 |
| 最大个体 max individual | 5750 | 2550 |
| 最小个体 min individual | 1050 | 1025 |

3龄子代与对照鱼的体重数据(各30尾)见表6。3年的生长对照表明“超级鲤”子代具有明显的快速生长效应,尤其至是3龄时最大个体仍比对照组最大个体体重高出1倍以上,显然“超级鲤”已将其快速生长的特征传给大部分子代,但在阳性子代中仍有生长速度较慢的个体。

3 讨论

3.1 外源生长激素基因对受体鲤的促生长效应

转生长激素基因鲤在生长上一般有两个特点:(1)受体鱼群体呈两极分化,与对照组比较在1~2龄时最大个体是外源基因阳性鱼,最小个体也基本上是外源基因阳性鱼。由于基因组各个区域的功能还没有搞清楚,目前还无法确切研究外源基因在基因组整合的区域效应。推测一些阳性个体生长速度明显低于正常鲤的原因是外源基因的整合使一些与生长相关的功能基因或相关基因的表达受阻所致;(2)在1~2龄具快速生长特征的转基因鲤多数在3龄以后失去了快速生长的特征,其体重与对照鲤趋于一致(表2)。在我们近15年的转生长激素基因鲤的研究中发现多数在1~2龄具有快速生长特征的阳性个体在3~4龄后就消失了。可能的原因一是快速生长的个体抗病力较差,死亡率高,这在超级鲤的子代中有所表现;二是外源基因表达产物随着年龄增长而减少,促生长作用消失了,其体重与对照组也就趋于一致。这些都需要进一步精确的实验加以验证。

3.2 “超级鲤”及子代确有明显的快速生长特征

经过近十年的转基因鲤研究,在1997年终于发现1尾转基因鲤具有明显的快速生长效应,我们把它确定为“超级鲤”。它在3龄时仍具有较对照组最大个体高出近1倍的体重。目前,此“超级鲤”在生长上有如下几个特点:(1)“超级鲤”至6龄时仍较对照组最大个体的体重高出1倍以上,这在本课题组1万多尾的转基因鲤中还是比较突出的;(2)其与正常鲤交配获得的子代,外源基因的整合率在43%,符合孟德尔遗传规律,即单基因整合其子代约50%与母本基因型一致。其阳性子代较阴性子代在生长上有明显的优势也证实该“超级鲤”确实将快速生长的特征遗传给了子代;(3)1~3龄的生长对照实验

都显示出“超级鲤”子代较对照组有明显的快速生长优势。其中 2 龄鱼的生长对照实验不仅有对照鱼, 还在实验池与对照池中加入了参考品系即红色鲤鱼, 子代鱼相对于参考品系红鲤的生长速度为 185%, 对照鱼相对于参考品系红鲤的生长速度为 -4%, 即“超级鲤子代”较对照鱼的生长速度高出 89%; (4)“超级鲤”子代在 3 龄时其体重仍较对照组高出很多, 也较池塘养殖鲤 3 龄时的正常体重高出很多, 在哈尔滨地区池塘养殖的 3 龄鲤一般体重在 2 000~3 000g 左右, 而表 6 中 3 龄“超级鲤”子代的体重很多超过 4 000g, 最大个体为 5 750g。“超级鲤”子代由于快速生长的个体多, 有了考察 3 龄个体能否保持快速生长特征的条件, 前面讨论中提出多数阳性个体在 3 龄以上时快速生长特征消失的一个原因可能是快速生长个体死亡, 但由于没有使用电子标记, 也由于阳性鱼较多没有每尾鱼分池饲养, 因此无法检测出体重大的转基因鲤是否已死亡, 由于“超级鲤”子代快速生长的个体较多, 我们观察到生长速度极快的个体得病率、死亡率都较对照组高, 一些生长速度更快的个体在养殖过程中死亡(依实验记录推测, 一些快速生长子代如果不死, 在 3 龄时其体重可能超过 7 000g)。这也提示过去多年获得的转生长激素基因阳性鱼中生长极快的个体在 3 龄以上失去了快速生长效应, 并与对照鲤的体重趋于一致的现象可能的原因是快速生长转基因鱼个体已死亡。这尾“超级鲤”没有死可能是个特例, 也可能是外源基因整合部位较适宜, 这些都是今后探索的课题。

3.3 获得基因工程鱼的技术关键

从技术和安全角度分析, 转基因鱼从研究到应用必须解决 3 个技术问题: 一是外源基因在受体鱼基因组的稳定整合、有效表达和向后代稳定传递即可建立有目标优良性状的转基因纯系; 二是转基因鱼经动物实验证明是食用安全的; 三是转基因鱼经实验证实是生态安全的。目前, 国内外都还没有一个转基因鱼能达到该目标。本课题组和其它转生长激素基因的研究结果^[6,7]显示鱼类基因工程育种是获得新优良性状的效果较好的育种技术。理想化的育种技术要求“既能获得新的性状又无有害或不利性状产生”, 从这点分析, 至目前为止, 基因工程育种从理论上分析是符合这个理想要求的育种技术。基因工程育种技术还有几个重大技术障碍需要克服, 一是外源基因定向整合问题, 也就是使外源基因在受体鱼基因组的插入位点即不破坏原有基因还可以有效表达的区域, 这个问题的解决除了提高定点整合技术效率外, 还有待基因组信息的大量积累, 定点整合先要知道定点整合的位点。在这两个根本技术没有解决之前, 鱼类育种学家主要通过分子检测与常规育种相结合的技术获得外源基因既可稳定遗传又能有效表达的个体, 再对此个体进行常规遗传操作如自交获得 F₂ 外源基因纯合体。本课题组正是按这个育种方向培育“超级鲤”的纯系。

参考文献:

- [1] Li S F. The research and produce of transgenic aquatic organisms and its safety issues[J]. J Fish Sciences China, 2000, 7(1): 99-102. [李思发. 转基因水生生物研制及其安全问题[J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 99-102.]
- [2] Zhu Z Y, Li G H, He L, et al. Nover gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Z Angew Ichthyol, 1985, 1: 31-34.
- [3] Li H, Liu D M, Ju D H, et al. Studies on the function of the promoter of cap (*Cyprinus carpio*) metallothionein gene[J]. Acta Zoologica Sinica, 1997, 43(2): 197-202. [李辉, 刘冬梅, 尉冬红, 等. 鲤鱼金属硫蛋白基因启动区功能的研究[J]. 动物学报, 1997, 43(2): 197-202.]
- [4] Sun X W, Yan X C, Liang L Q, et al. The Production of transgenic fish by direct microinjection[J]. Biotechnology, 1993, 3(3) 12-17. [孙效文, 闫学春, 梁利群, 等. 用直接注射法生产转基因鱼[J]. 生物技术, 1993, 3(3) 12-17.]
- [5] Liang L Q, Sun X W, Shen J B, et al. Production of transgenic “super common carp” [J]. High Technology Letters, 1999, 9(4): 52-54. [梁利群, 孙效文, 沈俊宝, 等. 转基因“超级鲤”的构建[J]. 高技术通讯, 1999, 9(4): 52-54.]
- [6] Du S J, Gong G, Fletcher G L, et al. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an “all fish” chimeric growth hormone gene construct [J]. Bio/Technology, 1992, 10: 176-181.
- [7] Zhu Z Y, Xu K S, Xie Y F, et al. Construction of model in transgenic fish [J]. Science in China (Ser B), 1989, 2: 147-155. [朱作言, 许克圣, 谢岳锋, 等. 转基因鱼模型的建立[J]. 中国科学(B 辑), 1989, 2: 147-155.]