

文章编号: 1000- 0615(2003)05- 0409- 06

绿色荧光蛋白基因重组子的构建及其 在鱼类受精卵中的表达

苏建明¹, 章怀云², 肖调义¹, 张学文¹, 陈 韬¹, 苏建通³, 王跃智³

(1. 湖南农业大学动物科技学院, 湖南 长沙 410128; 2. 中南林学院, 湖南 长沙 412006;

3. 北京市水产科学研究所, 北京 100075)

摘要: 通过体外重组, 将绿色荧光蛋白基因编码序列克隆到鲤鱼肌动蛋白基因启动子下游, 构建成能在鱼体内表达绿色荧光蛋白的重组分子。用限制性内切酶 *Pvu*I 酶切线性化后, 通过显微注射法导入金鱼受精卵内, 在转化后 48h, 可观察到绿色荧光, 经 PCR 初步筛选后, 对显阳性个体进行 Southern 杂交检测, 结果表明, 转化个体表现出较强的杂交信号。这说明绿色荧光蛋白基因能在金鱼体内整合、表达。

关键词: 绿色荧光蛋白; 基因重组; 金鱼; 表达

中图分类号 Q784: 文献标识码: A

Construction of green fluorescent protein gene recombinant and its expression in fishes zygotes

SU Jian-ming¹, ZHANG Hua-yun², XIAO Tiao-yi¹, ZHANG Xue-wen¹,
CHEN Tao¹, SU Jian-tong³, WANG Yue-zhi³

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. College of Mid-Southern Forestry, Changsha 412006, China; 3. Beijing Fisheries Research Institute, Beijing 100075, China)

Abstract: The coding sequence of green fluorescent protein gene was cloned under the control of carp β -actin gene promoter. A fish expression of green fluorescent protein gene recombinant was constructed. The recombinant gene was transferred into fertilized zygotes of goldfish (*Carassius auratus*) via microinjection after *Pvu*I linearizing. The green fluorescence was visualized within 48 h following transformation. The transformation and expression of green fluorescent protein was demonstrated by PCR and Southern blotting. In Southern hybridization analysis, transformations got positive signals. The results indicated that the green fluorescent protein gene had integrated into goldfish genome.

Key words: green fluorescent protein; gene recombinant; *Carassius auratus*; expression

荧光现象在海洋无脊椎动物中普遍存在, 这些动物在受到外界适当刺激时可以发出荧光。绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 由 Shimomura 等^[1] 首先从海洋无脊椎动物水母 (*Aequorea victoria*)

收稿日期: 2002-11-25

资助项目: 北京市水产科学研究所合作课题, 北京市计委资助项目 (2001JJN230)

作者简介: 苏建明 (1974-) 男, 湖南长沙人, 助教, 硕士, 主要从事分子生物学与基因工程研究。Tel: 0731- 4617969, E-mail: sjnauhn@

yahoo.com.cn

中分离、纯化出来,它在体外经适当波长的光激发后便可发出绿色荧光,这种荧光用普通荧光显微镜或荧光激活细胞分选器均可检测到。Chalfie等^[2]首次报道了绿色荧光蛋白在大肠杆菌中的表达,用蓝光照射产生明显的绿光,将它转入线虫体内,观察某些神经节的荧光反应而定位了 β 微管蛋白(tubulin)基因。由此,GFP基因作为一种新型的分子生物学报道基因,被广泛应用于基因表达和蛋白质定位研究。

鱼类作为生物界数量最大、多样性最丰富的脊椎动物,以其独特的繁殖特性成为理想的转基因操作模式动物。将GFP作为报告基因来研究转基因在宿主细胞内的分子生物学特性,及其基因整合和表达被广泛采用^[3-7]。为此,我们将GFP基因亚克隆到一个组成型表达载体上,然后将该融合基因显微注射到金鱼受精卵中,以研究其在金鱼体内的整合与表达。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和鱼受精卵

质粒pGFP购自Clontech公司;鲤 β 肌动蛋白基因启动子(carp β -actin promoter, A)由中科院武汉水生生物研究所朱作言院士赠送,克隆在质粒pUC118A上;大肠杆菌INVaF', TOP10F'为本室保存;本研究以金鱼(*Carassius auratus*)为材料,受精卵由长沙开福区观赏鱼养殖基地提供。

1.2 工具酶及主要试剂

限制性内切酶和T₄DNA连接酶购自美国Promega公司;dNTP混合物,Taq DNA聚合酶和DNA标准分子量购自MBI公司;DNA凝胶回收试剂盒购自QiaGen公司,Southern杂交试剂盒购自Ambion公司。

1.3 GFP基因的重组构建

用EcoRI / SmaI双酶切消化pGFP质粒DNA,回收GFP ORF 0.7 kb片段,再将此片段克隆到质粒pUC118A上的鲤 β 肌动蛋白启动子下游。连接后的分子转化,重组表达质粒的制备和酶切鉴定按Sambrook等^[8]方法进行。

1.4 GFP基因的转导

重组质粒经大量分离后,以限制性内切酶PvuI将重组分子线性化,利用DNA凝胶回收试剂盒,回收含GFP和 β 肌动蛋白启动子片段,溶解在无菌水中备用。在4月中下旬金鱼繁殖季节,采用人工授精得到受精卵供显微注射用,显微注射按朱作言等^[9]方法进行。

1.5 GFP基因的表达检测

在紫外光下,用立体式显微镜对胚胎发育各期进行跟踪,观察荧光发生的时期和产生的部位,并计算表达率,出苗前期表达率的计算除去死亡胚胎数。

$$\text{表达率}(\%) = \frac{\text{表达荧光的受精卵数或鱼苗数}}{\text{转导GFP基因后总胚胎或鱼苗数}} \times 100$$

1.6 转化个体的PCR检测和Southern杂交

分别抽取实验组和对照组的血样,按Sambrook等^[8]方法提取基因组DNA。根据已知的pGFP序列,利用GeneRunner引物设计软件设计出两段引物。Primer 1: 5' - GGGTGAAGGTGATGCAACATACC - 3', Primer 2: 5' - CGAAAGGGCAGATTGTGTGGACA - 3', PCR扩增的条件为: 94℃变性45s, 58℃退火40s, 72℃延伸50s, 反应体积为30 μ L, 32个循环。以生物素标记GFP cDNA的全长序列作为杂交探针, Southern杂交过程按Ambion公司提供的杂交试剂盒进行。

2 结果与分析

2.1 GFP 表达载体的重组构建

用限制性内切酶 *Sma* I 首先将质粒 pGFP 酶切成为一平末端分子, 再用 *Eco*R I 酶切产生出一 0.7kb 左右的 GFP cDNA 分子片段。该片段 5' 端为 *Sma* I 平末端, 3' 端为 *Eco*R I 粘性末端。pUC118A 质粒经 *Sma* I 和 *Eco*R I 依次酶切, 在鲤 β -肌动蛋白基因启动子下游产生一个 5' 平末端和一个 3' 粘性末端。将回收的 GFP cDNA 与其混合连接, 可使 GFP cDNA 分子定向地插入到启动子下游, 构建成重组表达质粒 pAGFP(图 1)。

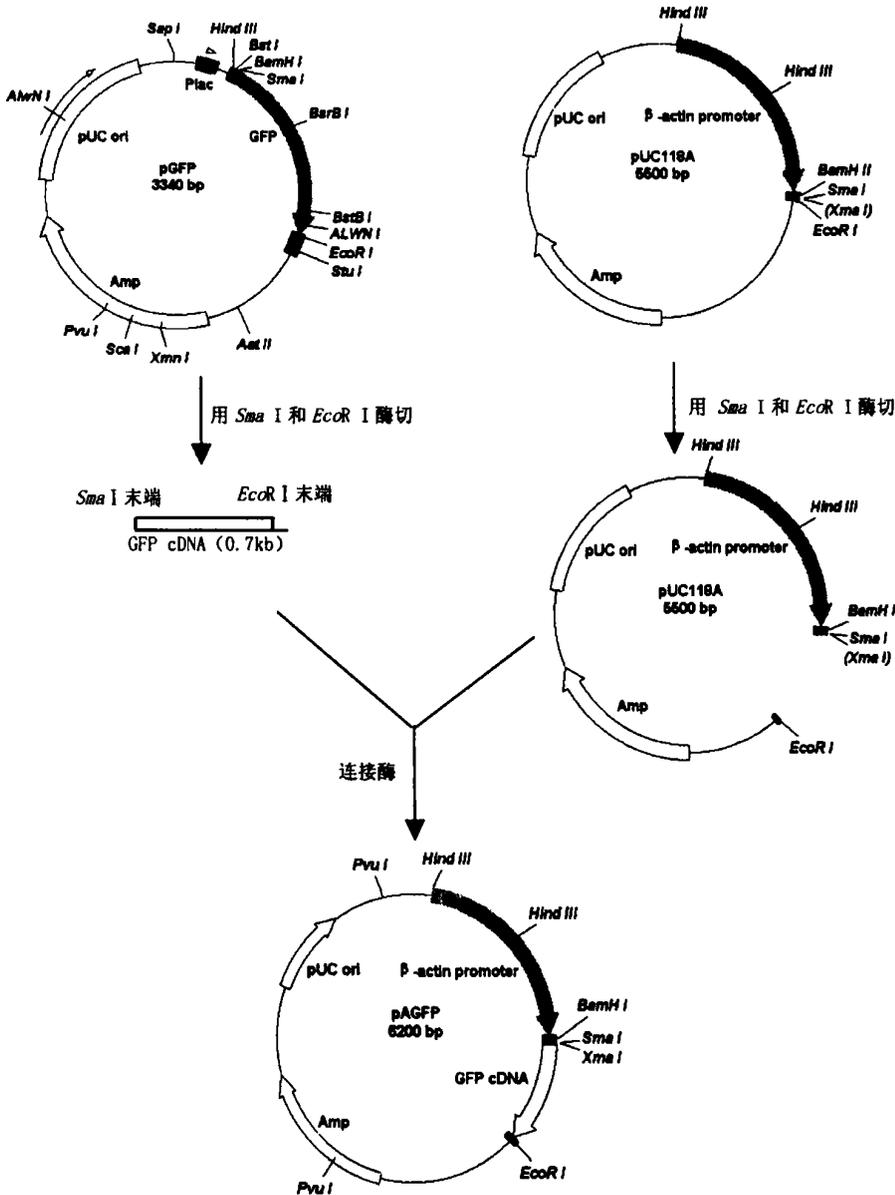


图 1 表达质粒 pAGFP 的构建

Fig. 1 Construction of expression of plasmid pAGFP

根据 Liu 等^[10]对鲤 β -肌动蛋白基因结构研究认为, 鲤 β -肌动蛋白基因在转录起始位点的外显子下游, 有一段长为 1.3kb 的内含子。这一内含子结构对基因的表达有很强的增强功能, 所以, 在克隆鲤 β -

肌动蛋白基因启动子以及将其构建重组表达基因时,都保留了这一内含子结构。因此,转录时在有利于 β -肌动蛋白基因启动子在RNA聚合酶的作用下,高效地诱导了外源重组基因的表达。

2.2 GFP 基因的表达检测

实验中,将线形重组分子导入金鱼受精卵后,在胚胎发育的不同阶段,进行跟踪观察,发现在融合基因导入受精卵约48 h后,可在受精卵中检测到荧光。前期观测到发荧光受精卵发育有异常现象:在囊胚期、原肠期相继出现大量胚胎发育终止,而荧光出现在肌肉效应期后的胚胎发育相对较稳定。主要原因很可能是囊胚期前受精卵处于一高度分裂复制期,细胞内蛋白质的合成与DNA的复制比较活跃,而细胞自身修饰酶系统还处于不完善状态,此时细胞对外界刺激的抵抗力较弱,显微注射对胚胎的刺激以及外源基因瞬间表达产物的积累影响了胚胎发育,甚至造成胚胎的死亡,在肌肉效应期胚胎的生理机能逐渐完善,外源基因的表达也趋向正常规律。对仔鱼前期的543尾转基因鱼进行逐个检测,获得发荧光鱼23尾,表达率为4.24%(表1)。紫外光下观察,可以看到转基因鱼发出荧光的部位存在差异,除有10尾鱼苗发通体荧光外,荧光点出现部位多在躯干部,头部较少。

表1 紫外灯下观察结果

Tab. 1 Observed result under UV light

分期 stage	胚胎/鱼苗(ind) embryo/larva	发荧光数(ind) fluorescent number	荧光率(%) fluorescent ratio
囊胚期 blastula stage	832	53	6.37
原肠期 gastrulation stage	1090	262	24.0
肌肉效应期 muscle effect stage	651	54	8.29
仔鱼前期 prolarva stage	543	23	4.24

2.3 转基因个体的分子鉴定

对获得的转基因鱼,进行PCR检测,结果显示(图2),以转基因鱼总DNA为模板可扩增出478bp的特异性片段,而非转基因个体未扩增出任何片段,初步表明这些转基因个体中有外源基因的插入。

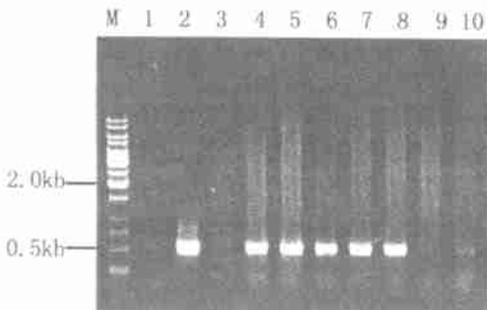


图2 转GFP基因鱼苗PCR检测结果

Fig. 2 PCR detective result

M: DNA分子量标准参照物; 1: 空白对照; 2: pGFP PCR产物; 3: 未转化鱼苗PCR产物; 4~10: 转化鱼苗PCR产物

M: 1kb DNA ladder marker; 1: blank control; 2: positive control; 3: common control; 4~10: transformation fish PCR product

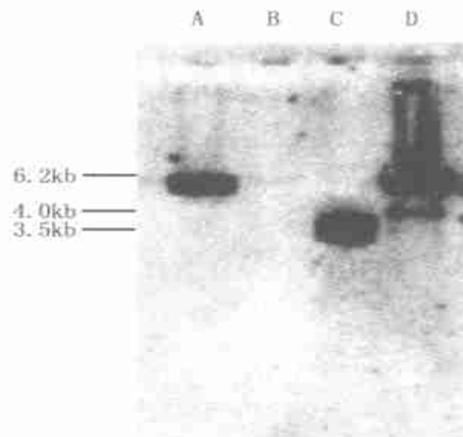


图3 Southern杂交结果

Fig. 3 Southern blot result

A: pAGFP/EcoRI 阳性对照; B: 普通对照 C, D: 转基因样品

A: pAGFP/EcoRI positive control; B: common control with EcoRI; C, D: transgenic sample

为最终证实 GFP 基因在金鱼染色体中的整合,对转基因鱼的染色体 DNA 进行了 Southern 杂交,结果表明,转基因个体 DNA 的 EcoR I 酶解产物与 GFP cDNA 基因探针可产生 6.2kb, 4.0kb 及 3.5kb 3 条杂交带,从图 3 可以看出转基因个体(D)除了在近 6.2kb 处有 1 条分子杂交带外,在 4.0kb 处也有 1 条分子杂交带;转基因个体(C)只在 3.5kb 处有 1 条分子杂交带,说明转基因个体(D)的基因组上至少整合了两个拷贝的 GFP 基因,转基因个体(C)的基因组上至少整合了 1 个 GFP 基因拷贝,而且整合在转基因个体上的 GFP 基因不在同一位点上。这一结果不但证明外源 GFP 基因已整合到金鱼染色体上,而且表明它们整合的位点没有固定区域。

3 讨论

绿色荧光基因作为一种新型的选择标记,具有操作简便,不需添加任何底物或辅因子的优点,目前在细胞基因工程及转基因动物、植物研究中得以广泛应用。Takada 等^[11]将 GFP 基因导入小鼠受精卵,经过几天的体外培养,待胚胎发育至囊胚期,经荧光显微镜检测,在转导的 383 个胚胎中表达 GFP 的有 59 个。将阳性胚胎植入假孕母鼠子宫,获得较高比例的转基因鼠。Cha 等^[12]将 GFP 和人白细胞介素(IL-2)在昆虫幼体中的表达特性进行了比较,认为两者在 *Trichoplusiani* 幼虫的表达特性类似。我们将绿色荧光基因导入金鱼受精卵中,得到转基因个体,说明 GFP 作为异源蛋白表达的报告物具有较好的相关性。

通过对转基因胚胎发育整个过程的跟踪观察,发现胚胎发育的时间比对照组要迟 1~2d,而且基因的表达存在差异,这不但与外界因素有关,而且与外源基因的瞬时表达和整合时序有一定的关系。值得注意的是,前期表达的大部分胚胎在囊胚期和原肠期就停止发育,而从肌肉效应期开始表达的胚胎大多存活,主要认为在原肠前期基因复制速度大于降解速度,导致过量表达的 GFP 在胚胎中积累,从而对胚胎正常发育产生扰乱。而在原肠后期,胚胎的修饰酶系统已经逐渐完善,细胞对外源基因的修饰能力增强,胚胎发育相对稳定,我们选用的鲤 β -肌动蛋白基因启动子是一组成型表达启动子,它在肌肉组织中表达的活性相当高,这与肌肉效应期荧光稳定表达相对应。荧光点在不同的部位出现,说明转基因嵌合体现象普遍存在。

绿色荧光蛋白在表达时可自身催化形成荧光基团,而且不需要添加任何底物或辅助因子,这样它就可以免除在检测时底物对细胞造成的一些物理、化学损伤,降低了添加的辅因子在对转基因个体进行观察时造成的假象,同时又降低了检测成本,简化了繁琐操作。我们直接从发荧光的转化个体中,进行分子检测,获得较高比例的转基因鱼,因此利用 GFP 作报告基因,可以减少转基因个体筛选和鉴定方面的工作量。

参考文献:

- [1] Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea* [J]. *J Cell Comp Physiol*, 1962, 59: 223-227.
- [2] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. *Science*, 1994, 263: 802-805.
- [3] Xie L, Liu M M, Wang Y Z. Application of green fluorescent protein in expression product of *een* gene [J]. *Acta of Biotech*, 2000, 7(2): 125-126. [谢玲, 刘孟珉, 王玉芝. 绿色荧光蛋白在 *een* 基因表达产物的应用 [J]. *生物技术通报*, 2000, 7(2): 125-126.]
- [4] Zhu F X, Qi Y P, Huang Y X. Clone and expression of green fluorescent protein gene in cells of insect [J]. *Acta Microbiol Sin*, 1997, 37(1): 15-20. [朱反修, 齐义鹏, 黄永秀. 绿色荧光蛋白基因在昆虫细胞中的克隆与表达 [J]. *微生物学报*, 1997, 37(1): 15-20.]
- [5] Wang S, Hazelrigg T. Implications for *bal* mRNA localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila oogenesis* [J]. *Nature*, 1994, 369: 400-403.
- [6] Yeh E, Gustafson K, Boulianne G L. Green fluorescent protein as a vital marker and gene expression in *Drosophila* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7036-7040.
- [7] Moss J B, Price A L, Raz E, et al. Green fluorescent protein marks skeletal muscle in marine cell lines and zebra fish [J]. *Gene*, 1996, 173: 89-98.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

- [9] Zhu Z, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1758) [J]. *Z Angew Ichthyol*, 1985, 1: 31- 34.
- [10] Liu Z, Mou B, Faras J A, et al. Functional analysis of elements affection expression of the β -actin gene of carp[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1990, 10(7):3432- 3440.
- [11] Takada T, Iida K, Awaji T, et al. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker[J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15: 458- 461.
- [12] Cha H J, Pham M Q, Rao G, et al. Expression of green fluorescent protein in insect larva and its application for heterologous protein production [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 56: 239- 247.

欢迎订阅 2004 年《水产文摘》

《水产文摘》1963年创刊,是由中国水产科学研究院南海水产研究所主办的中国水产行业外文文摘信息的权威检索刊物,文摘信息源刊包括美、英、荷兰、加拿大、日、法、德、俄、澳大利亚、印度、以色列、韩等十多个国家的140多种核心期刊、论文汇编、专著等,学科包括水产总论、渔业生物学、水产资源与捕捞技术、水产养殖、水产生物病害及防治、渔业生态环境及水产品加工等类目。年终编辑出版本年度主题索引。自2004年起本刊增设水产综述及文摘、世界水产信息等栏目,以全面、及时报道世界各地渔业科研、生产的新技术、新成就、新水平和新动向。

本刊月刊,每月10日出版,国内外公开发售,邮发代号:46-65。每期定价8.00元,全年12期96.00元(含邮费)。读者可到当地邮局订阅,也可直接将汇款至《水产文摘》编辑部订购。

编辑部地址:广州市新港西路231号,邮编:510300

联系电话:020-84458694,传真:020-84451442

E-mail: scwz@163.net

欢迎订阅 2004 年《海洋渔业》

《海洋渔业》是中国水产学会和中国水产科学研究院东海水产研究所主办的中级水产科技期刊。主要刊登海洋渔业管理、资源开发与捕捞技术、远洋渔业、海水养殖与增殖、海洋资源与环境保护、水产品加工与保鲜技术等各类文章。

本刊季刊,大16开48页,国内外公开发售。国际标准刊号:ISSN 1004-2490,国内统一刊号:CN 31-1341/S,邮发代号:4-630,逢季中月25日出版,每期订价5.50元,全年22.00元。全国各地邮局(所)均可订阅,也可直接汇款到编辑部订阅。

编辑部地址:上海市军工路300号,邮编:200090

联系电话:021-65680116,021-65684690×8048

E-mail: haiyangyuye@tom.com