

文章编号:1000-0615(2005)02-0281-04

·研究简报·

金属硫蛋白基因对转基因鲤及实验动物体内 重金属累积的影响

闫学春, 孙效文, 梁利群, 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)

关键词:金属硫蛋白基因;转基因鲤;实验动物;重金属累积

中图分类号:S917

文献标识码:A

The effect of MT gene on heavy metal accumulations in transgenic common carp and experimental animal

YAN Xue-chun, SUN Xiao-wen, LIANG Li-qun, CAO Ding-cheng

(Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Harbin 150070, China)

Abstract: One of the most important things for industry production of transgenic fish is whether the fish meal is safe to the health of human beings, which means the foreign genes and their expressed products might be harmful to fish and the animal eating this fish. For the transgenic common carp produced by injecting fusion genes which included chum salmon's growth hormone gene and common carp's metallothionein promoter, two things should be investigated. One is whether the transgenic common carp will produce excessive amounts of growth hormone in its body, and the foreign hormone how to affect the animal eating this fish. The other thing is whether this fish will accumulate excessive heavy metal in its body, what effect will be on the animal eating this fish. The investigation of the concentrations of the foreign growth hormone in transgenic carp is reported. This article examines the effect of a metallothionein transgene on the residual heavy metal concentrations in the transgenic common carp and the cat eating the transgenic carp. Using flame atomic absorption spectrophotometry, we measured the concentrations of the heavy metal elements including Zn, Cu, Cd, and Pb in the muscle, liver, kidney and gills of the transgenic common carp and non-transgenic carp. Also measured were the concentrations of Zn and Cd in the muscle, liver and kidney of the cat fed with transgenic and non-transgenic common carps. In the cat, there was no significant difference ($P > 0.05$) in tissue concentrations of heavy metals between the experimental group and the control group. The heavy metal concentrations in the non-transgenic common carp and transgenic common carp were statistically similar. The result showed that metallothionein gene as a promoter for aquaculture fish genetransfer would not bring about the heavy metal accumulations in transgenic fish and animal eating them.

Key words: metallothionein gene(MT gene); transgenic common carp; experimental animal; heavy metal accumulation

金属硫蛋白(metallothionein, 简称 MT), 又称重金属结合蛋白, 是一种低分子量富含半胱氨酸的金属结合蛋白。锌、铜、镉等多种金属元素均可在体外或体内诱导组织 MT 大量合成^[1]。已有研究表明, MT 在微量元素代谢、重金属富集、环境污染的清除等方面起重要作用^[2,3], 因此, 选择恰当的启动子是保证外源基因在转基因鱼中成功表

达的最重要因素。在转基因鱼的研究过程中, 使用的转基因材料从最初阶段的人及其它哺乳类如牛、羊等的生长激素基因发展到现在的鱼的生长激素基因^[4-7], 启动调控顺序也由小鼠的重金属螯合蛋白(MT-1)基因发展到鱼的重金属结合蛋白基因, 如虹鳟金属硫蛋白基因^[8]、鲤β肌动蛋白基因^[9]、美洲鲈抗冻蛋白基因^[10]以及鲤金属硫蛋白

收稿日期:2003-08-01

资助项目:国家 863 项目资助(863-101-05-02-01)

作者简介:闫学春(1964-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 副研究员, 主要从事鱼类基因工程育种与分子生物学研究。Tel:0451-84861321-831, E-mail:yanxc8@163.com

通讯作者:孙效文, Tel:0451-84842646, E-mail:xws1999@hotmail.com

基因^[1]等,但无论这些基因是来自鱼类本身还是其它动物,其启动子基因大都为重金属结合蛋白基因,携带这种MT启动子基因一旦整合到受体鱼组织中,是否会使得鱼体内的重金属含量增高,而在食用转基因鱼时,人体内是否有重金属的积累,这些都应是人们普遍关心的问题。因此,本研究只是对转基因鲤与未转基因鲤体内的重金属含量进行了分析,同时,也对食用该基因鱼的实验动物体内的重金属含量进行了测定,以了解因重金属在鱼体内过多的积累而对鱼和人们的健康造成严重毒害的作用。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼

实验鱼为转黑龙江野鲤的MT启动子和大麻哈鱼生长激素基因的融合基因的性成熟鲤和鱼种(以下简称实验鱼),是本课题组生产。平均体重分别为2 000 g和80 g。

1.2 对照鱼

对照鱼为正常鲤,取自黑龙江水产研究所育种研究室培育的正常性成熟鲤,平均体重为1 750 g。

1.3 实验动物

家猫出生后10~20 d从群众中购买,先喂牛奶5~10 d,同时喂少量米饭和肉食,待可以大量吃食后,每天按时投喂用转基因鱼制成的食物(大米饭加煮熟的转基因鲤,对照组为大米饭加煮熟的正常鲤),实验重复一次。实验组猫和对照组猫各5只^[12]。

1.4 生长测定

对实验组猫与对照组猫每15天称重一次,对数据进行统计分析。

1.5 重金属测定

转基因鱼与实验动物体内重金属含量的测定是由黑龙江水产研究所测定。仪器为日本岛津AA-670原子吸收火焰发射分光光度计。

1.6 实验方法

随机取10尾转基因鱼与5尾对照鱼,将鱼体解剖后分别取出肝、肾、鳃、肌肉等组织;取实验动物的肝、肾、肌肉等组织,各样品均用干法灰化。各称取3~20 g样品置于50 mL瓷坩埚中,小火炭化,然后移入马弗炉中,500℃以下灰化16 h后取出坩埚,冷却后再加少量混合酸(高氯酸和硝酸),小火加热,不使干涸,必要时再加少许混合酸,如此反复处理,直至残渣中无炭粒,待坩埚稍冷,加10 mL盐酸(1:11),溶解残渣并定容移入20 mL容量瓶中,稀释至刻度,混匀、待测。取与样品相同量的混合酸和盐酸(1:11),按同一操作方法作试剂空白实验。

2 实验结果

2.1 鱼体各部位重金属残留量的测定

实验组与对照组中肝和肾的重金属含量大小顺序是Cu, Zn, Cd, Pb, 肌肉和鳃的重金属含量的大小顺序:实验组为Cu, Zn, Pb, Cd;对照组为Zn, Cu, Pb, Cd, 经数理统计分析,两组无显著差异。实验结果见表1。

2.2 重金属在实验动物体内残留量的测定

经数理统计分析,两次实验组猫与对照组猫的肝、肾、肌肉3种组织中的重金属锌、镉的含量,组间无显著差别,且均在食品标准允许的范围内,两组实验结果见表2。

表1 转基因鲤各种组织的金属元素含量

Tab.1 The metal content in the organs of the transgenic common carp

mg·kg⁻¹

项目 item	实验鱼(n = 10) experiment fish		对照鱼(n = 5) control fish		t-检验 t-test	
	平均值 mean value	标准偏差(SD) standard deviation	平均值 mean value	标准偏差(SD) standard deviation		
Zn	肌肉 muscle	4.985 1	2.786 8	3.450 2	1.290 0	P > 0.05
	肝 liver	7.156 8	2.963 8	11.034 8	6.513 3	P > 0.05
	肾 kidney	8.099 7	2.209 7	7.986 5	0.521 5	P > 0.05
	鳃 gill	7.337 4	3.328 0	10.499 8	3.059	P > 0.05
Cu	肌肉 muscle	5.881 2	1.809 2	1.150 5	0.434 0	P > 0.05
	肝 liver	11.193	3.106 9	11.915 0	1.785 1	P > 0.05
	肾 kidney	7.641 8	2.019 1	8.161 0	3.174 3	P > 0.05
	鳃 gill	7.846 8	1.856 1	5.661 0	2.355 9	P > 0.05
Cd	肌肉 muscle	0.0518 6	0.0223 9	0.077 0	0.063 3	P > 0.05
	肝 liver	0.106 3	0.066 2	0.126 5	0.118 8	P > 0.05
	肾 kidney	0.079 7	0.063 0	0.091 5	0.0526 0	P > 0.05
	鳃 gill	0.073 2	0.017 2	0.060 7	0.043 2	P > 0.05
Pb	肌肉 muscle	0.227 0	0.313 8	0.229 0	未检出	P > 0.05
	肝 liver	未检出	未检出	未检出	0.412 0	
	肾 kidney	未检出	未检出	未检出	未检出	
	鳃 gill	0.105 6	0.075 2	0.450 0	0.267 3	P > 0.05

表 2 实验动物组织的重金属测定结果

项目 item	第一组 group one		第二组 group two		<i>t</i> -检验 <i>t</i> -test		
	实验组 experiment group	对照组 control group	实验组 experiment group	对照组 control group			
Zn 肌肉 muscle	20.01	28.00	15.89	23.08	<i>P</i> > 0.05		
	23.62	25.00	18.73	21.44			
	17.48	30.00					
	肾 kidney	17.27	16.44	14.70		12.68	
		15.77	16.51	12.71		14.76	<i>P</i> > 0.05
		13.09	16.32				
肝 liver	32.23	30.48	23.11	27.47			
	22.37	32.03	24.09	24.95	<i>P</i> > 0.05		
	22.38	30.01					
Cd 肌肉 muscle	0.0455	0.061	0.192	0.550		<i>P</i> > 0.05	
	0.071	0.058	0.423	0.175			
	0.107	0.044					
	肾 kidney	0.073	0.051	0.185	0.188		
		0.071	0.041	0.187	0.337		<i>P</i> > 0.05
		0.063	0.063				
肝 liver	0.061	0.058	0.161	0.195			
	0.069	0.041	0.176	0.286	<i>P</i> > 0.05		
	0.042	0.020					

2.3 生长测定

对实验组猫与对照组猫每 15 天测定一次体重,并检查在生长过程中是否出现异常变化,测定结果见表 3 和图 1。从图 1 中可以看出,两组猫的生长曲线基本一致,只是在投喂用转基因鱼制成食物 20 d 内,对照组猫的生长速度快于实验组,20 d 以后,实验组猫的生长速度快于对照组,除此之外,未发现异常现象发生。

表 3 家猫在喂转基因鲤鱼各实验阶段的体重

Tab.3 The weight of the cat fed on the transgenic common carp

时间(d) time	试验组(n=5) experiment group 平均体重(g) mean weight	对照组(n=5) control group 平均体重(g) mean weight
	535	546.7
15	618.7	646
30	926.7	898.3
45	1 110.7	1 095
60	1 525	1 445
75	1 705	1 600
90	1 833.3	1 700

注: *P* 值为 0.3724 大于 0.05

Notes: *P* value is 0.3754 and larger than 0.05

3 讨论

3.1 鱼体各部位重金属累积

重金属在常量水平上对生物体都有致病、致畸等作

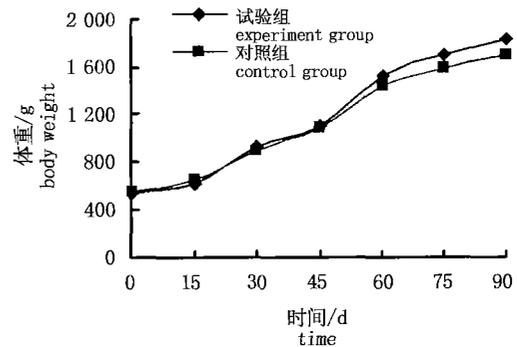


图 1 实验动物生长曲线

Fig.1 The growth curve of the experimental animal

用,因此,在考虑鱼类的营养性无机物质时,也要考虑对鱼类本身的有害性,并进一步考虑对人们食用上的安全性。鱼类对很多金属元素都有较强的富集作用^[13],由于元素的种类不同,分布到不同部位的值相差也很悬殊,其分布特点显著,一般是肝脏比肌肉高,标志了肝脏在代谢上的重要性。因此,研究鱼体金属元素的含量,既可以反映鱼类的生理特点,又可以预测水环境中重金属污染的状况。在正常鱼类的重金属元素中,研究最多的是镉、锌、铜 3 种,其次是铅、铁。本文所测的 4 种重金属元素中,铜的含量最高,除肾组织中的锌含量比铜稍高外,各组织中的重金属元素含量高低依次为铜、锌、铅、镉,从鱼体各部位重金属元素的含量看,肝、肾、鳃的含量为最大,肌肉部位的含量较低,经数理统计分析表明,实验组与对

对照组各部位的重金属含量无显著差别,说明转基因鲤尽管其外源基因含有金属硫蛋白启动子基因,并受重金属离子调控,但并没有发现鲤体内有重金属含量的增加,鲤 MT 启动子基因在鲤体内具有稳定性。所以,利用鱼类自身基因元件构建转基因鱼,可以有效避免非鱼类动物生长激素基因造成的生物不相容性,外源鱼类基因在鱼体内应比哺乳类和人的基因更稳定,同时也可顾及生态系统的相对平衡。

3.2 实验动物体内重金属累积

转基因鲤的外源基因的启动是由金属硫蛋白基因的启动子来调控的,虽然启动子部分的存在是不会大量增加受体鱼体内的重金属含量,因为实验动物在摄入外来 DNA 后,经消化,已被分解为很细小的片段,这些片段无法包含完整的基因。另外,进入动物体内的基因要起作用,还必须使摄入的外源 DNA 整合到食用动物体内,只有做到这一点,才能使获得的外源基因进行工作,这是很困难的。但为了得到正确的结果,测定了实验动物的重金属含量,结果表明,两组实验动物猫的重金属锌、镉含量无显著差别,这也证实了转基因鲤不仅没有增加鲤自身体内的重金属含量,也没有增加食用动物体内的重金属含量。由此可见,转大麻哈鱼生长激素基因鲤对食用动物生理影响的实验结果显示,摄食转“全鱼”基因鲤,对猫在生长、病理解剖、血液参数分析、细胞化学检测和重金属含量的累积等方面没有显著性影响^[13],转大麻哈鱼生长激素基因鲤对食用它的动物或人的生理是没有直接损害的。

通过上述实验,并未发现携带 MT 启动子的大麻哈鱼生长激素基因,在转基因鲤及食用动物猫体内有重金属累积现象,说明金属硫蛋白除了与重金属离子具有高度亲和性和能被重金属离子诱导外,并没有增加转基因鱼体内的重金属含量,重金属在鱼体内的累积主要还是与生活的水环境有关,在同一水体,鱼类因种类、规格、重金属污染物及生存条件不同,累积状况也不同。鱼生活在

水中,可以通过鳃和皮肤与周围水体进行离子交换,从水体中吸收的某些重金属离子,一旦进入体内累积成为内毒,就会破坏鱼体内酶的活性,造成鱼畸变或死亡,这一点,转基因鱼和正常鱼是一样的。因此,如果鱼生活的水体被环境污染,就会威胁影响鱼类的生存,同时也会影响人类的生存。所以,以鱼类的健康状态为标准,了解转基因鱼体内的重金属含量是有必要的。

参考文献:

- [1] 吴乃虎. 基因工程原理[M]. 北京:科学出版社,2001. 218-219.
- [2] 林 芄,任宏伟,茹炳根. 鱼体内金属硫蛋白与水环境关系的研究[J]. 北京大学学报(自然科学版),2001,37(6): 779-784.
- [3] 朱 毅,徐 虹. 分子生物学在渔业环境保护中的运用[J]. 环境导报,1999,(3):13-16.
- [4] 朱作言,许克圣,谢岳峰,等. 转基因鱼模型的建立[J]. 中国科学(B辑),1989,2:147-155.
- [5] 朱作言,许克圣,李国华,等. 人生长激素基因在泥鳅受精卵显微注射转移后的生物学效应[J]. 科学通报,1986,31(5):387-389.
- [6] 孙效文,梁利群,同学春,等. 全鱼基因工程鱼的构建[J]. 高技术通讯,1993,3(9):23-26.
- [7] 孙效文,沈俊宝,同学春,等. 转牛(羊)生长激素基因工程鲤鱼研究[J]. 中国水产科学,1995,2(2):23-32.
- [8] Zafarullah M M, Bonham K, Gedamu L. Structure of the rainbow trout metallothionein B gene and characterization of its metal-responsive region[J]. Mol Cell Biol,1988,8(4):469-476.
- [9] Liu Z J, Zhu Z Y, Roberg K, et al. Isolation and characterization of beta-action gene of carp (*Cyprinus carpio*)[J]. DNA Seq, 1990,1:125-136.
- [10] Gong Z, King M J, Fletcher G L, et al. The antifreeze protein genes of the flounder, *Pleuronectes americanus*, are differentially regulated in liver and non-liver tissues[J]. Biochem Biophys Res Commun,1995,206:387-392.
- [11] 李 辉,刘东梅,刷冬红,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.
- [12] 孙效文,梁利群,同学春,等. 转基因鲤鱼作为食物的研究[J]. 高技术通讯,1998,8(3):45-49.
- [13] 陈其晨,张克俭,徐关文. 重金属对鱼类毒性的综合研究[J]. 水产学报,1988,12(1):21-31.