

## *piggyBac* 转座子在金鱼及泥鳅转基因中的应用

胡莹莹, 郭学双, 周 阳, 曹广力, 贡成良, 薛仁宇\*

(苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123)

**摘要:** 为了探讨 *piggyBac* 转座子在鲤科鱼类及鳅科鱼类转基因中的适用性, 实验通过将 PA $\beta$  启动子控制的 DsRed 表达元件插入 pigA3GFP 中, 构建转基因载体 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed。用该载体对草鱼肾脏(CIK)细胞转染, 结果显示, 通过 *piggyBac* 转座子可将外源基因导入到 CIK 细胞的基因组中, 来源于家蚕的 A3 启动子和来源于巨细胞病毒的 CMV 启动子在 CIK 细胞均具有活性。将转基因载体 pigA3GFP、pigA3GFP-A $\beta$ DsRed 分别与辅助质粒 helper-pigA3 混合后以精子介导法导入金鱼和泥鳅的受精卵后, 经荧光观察、PCR 鉴定、Dot blotting 鉴定, 证实获得了转基因金鱼和转基因泥鳅。研究表明, PB 转座子在鲤科鱼类及鳅科的一些鱼中具有转座活性。

**关键词:** 金鱼; 泥鳅; *piggyBac* 转座子; 转基因; 草鱼肾脏(CIK)

**中图分类号:** Q 782; S 917.4

**文献标志码:** A

鱼类因其产卵量大、绝大多数为体外受精、胚胎透明、体外发育等特性已成为转基因动物的最佳选择, 并为研究胚胎发育过程提供了一个理想模式<sup>[1]</sup>。转基因鱼的获得最初是通过传统的显微注射法<sup>[2]</sup>, 虽操作简单, 但外源基因的插入和表达效率低, 并经常形成嵌合体或瞬时表达<sup>[3]</sup>。转座子的发现为转基因鱼的获得提供了新的手段和方式。来源于鳞翅目昆虫粉蚊夜蛾的 *piggyBac* (PB) 转座子是一种宿主域极其广泛的转座子, 已在多种动物上用于基因转移<sup>[4-11]</sup>。而且, 在进行哺乳动物转基因研究中所表现出的整合效率高、负载容量大、稳定的整合和传代、外源基因可长期稳定表达、外源基因以单拷贝形式整合、易于确定整合位点等优点引起了科学家们的广泛关注<sup>[11]</sup>。尽管 PB 转座子在斑马鱼 (*Danio reio*)<sup>[9]</sup> 上具有活性, 但在其他鱼类中的转座活性还没有正式报道。同时将外源基因导入到斑马鱼受精卵中的主要方式是通过显微注射。本研究通过草鱼肾脏 (*Ctenpharyngoden idellus* kidney, CIK) 细胞探索 PB 转座子在 CIK 细胞中的转座活性, 证实来源于家蚕的 A3 启动子和来源于巨细胞病毒的

CMV 启动子在 CIK 细胞中均有活性; 并且通过精子介导的方法将 PB 转座子载体导入金鱼 (*Carassius auratus*) 和泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 的受精卵中, 通过荧光观察结合 PCR 和 DNA 斑点杂交鉴定, 证明 PB 转座子在金鱼和泥鳅中具有转基因作用, 研究结果为鱼类的转基因研究工作开辟了新的途径。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

大肠杆菌 TG1 菌株, pSK-sericin promoter-DsRed 质粒<sup>[12]</sup>、转座载体 pigA3GFP, 以及 A3 启动子驱动转座酶的辅助质粒 helper-pigA3、CMV 启动子驱动转座酶的辅助质粒 helper-pigCMV, 均由苏州大学医学部分子生物学实验室保存。草鱼肾脏细胞购自中国微生物典藏中心 (CCTCC), 金鱼由苏州市相城区某金鱼养殖场馈赠, 泥鳅购于苏州市斜塘镇莲花市场。

Taq DNA 聚合酶、T<sub>4</sub> DNA Ligase, 以及限制性内切酶 EcoRI、SalI、KpnI、BamHI 及配套的缓冲液均为 Fermentas 公司产品。pMD-19T 购自 TaKaRa

收稿日期:2012-01-05 修回日期:2012-06-27

资助项目:国家重大基础研究项目(2012CB114605)

通讯作者:薛仁宇, E-mail: xuery@suda.edu.cn

公司。DNA 凝胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量制备试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒均购自 V-GENE 生物公司。细胞/组织基因组 DNA 快速提取试剂盒购自 BioTeke 公司。MEM 培养基为 Invitrogen 公司产品。TC100 昆虫细胞培养基、胎牛血清(FBS)等试剂为 GIBICOBRL 公司产品。地高辛标记的

斑点杂交试剂盒为 Roche 公司产品。

### 1.2 实验引物

用于检测 *gfp* 的引物对为 DEGFP-1 和 DEGFP-2;检测 *DsRed* 的引物对为 DsRed-1 和 DsRed-2;检测  $\beta$ -*actin* 启动子的引物对为 P<sub>A $\beta$</sub> -1 和 P<sub>A $\beta$</sub> -2(表 1)。

表 1 实验中所涉及的克隆引物及验证引物  
Tab.1 Primers involved in the experiment

引物名称 primer name	引物序列 primer sequence	作用 usage	限制性内切酶 restriction endonuclease	产物大小/bp size of product
DEGFP-1	5'-TGG AATTCATGGTGAGCAAGGCGAGG-3'	检测 <i>gfp</i>	<i>EcoR</i> I	720
DEGFP-2	5'-TTGGATCC T TACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'	to detect <i>gfp</i>	<i>Bam</i> H I	
DsRed-1	5'-CCGTCGACGCCACCATGGTGCGCTCTCC-3'	检测 DsRed	<i>Sal</i> I	680
DsRed-2	5'-GGCTCGAGCTACAGGAACAGGTGGTGGC-3'	to detect DsRed	<i>Xho</i> I	
P <sub>A<math>\beta</math></sub> -1	5'-GAGAATTCGCTCTTACAGGAAACGGG-3'	检测 $\beta$ - <i>actin</i> 启动子	<i>EcoR</i> I	600
P <sub>A<math>\beta</math></sub> -2	5'-CCGATATCGTGGAGGAGCTCAAAGTG-3'	to detect $\beta$ - <i>actin</i> promoter	<i>EcoR</i> V	

### 1.3 转基因载体 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed 的构建

将从团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 基因组中克隆得到的  $\beta$ -*actin* 启动子,装入 pMD-19T 载体中,经 *Sal*I、*Eco*RI 双酶切,回收小片段并与同样酶切的 pSK-sericin promoter-DsRed 连接,获得重组质粒 pSK- $\beta$ actin promoter-DsRed。再以 *Kpn*I、*Eco*RI 双酶切 pSK- $\beta$ actin promoter-DsRed 后,回收小片段并和同样酶切的 PigA3GFP 连接,获得最终转基因载体 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed(图 1)。

### 1.4 CIK 细胞的培养、转染及启动子的活性比较

CIK 细胞培养于含 10% FBS 的 MEM 培养基中,28 °C,5% CO<sub>2</sub>,3 d 左右传代一次。将 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed 转基因载体,以及辅助质粒 helper-pigA3、helper-pigCMV,按表 2 设置 3 组实验。转染前,将 0.5 mL 密度为 1 × 10<sup>6</sup>/mL 细胞铺于直径 35 mm 的小培养皿中,细胞培养 12 h 后,取转基因载体 4 μg,辅助质粒 8 μg,转染试剂 (FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent, Roche) 8 μL,按转染试剂说明书进行操作<sup>[13]</sup>。通过观察转染后 CIK 细胞中产生的荧光细胞数量来比较来源于家蚕的 A3 启动子与来源于巨细胞病毒的 CMV 启动子在 CIK 细胞中的活性。荧光观察条件:在激发光 490/20 nm、发射光 528/38 nm 视场中观察绿色荧光;在激发光 555/28 nm、发射光 617/73 nm 视场中观察红色荧光。

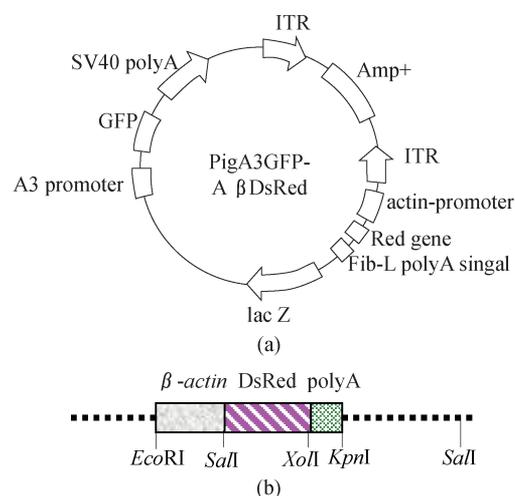


图 1 PigA3GFP-A $\beta$ DsRed 转基因载体结构

(a) pigA3GFP-A $\beta$ DsRed 转基因载体图谱;(b)  $\beta$ -*actin* 启动子驱动 DsRed 表达元件及相应的酶切位点。

Fig. 1 Construction of PigA3GFP-A $\beta$ DsRed transgenic vector

(a) The map of pigA3GFP-A $\beta$ DsRed transgenic vector; (b) Expression elements of DsRed gene driven by the  $\beta$ -*actin* promoter and corresponding restriction sites.

表 2 转染 CIK 细胞的 3 个实验组

Tab.2 Three experimental groups of the CIK cell transfection

转染系统 transfection group	转基因载体 transgenic vector	辅助质粒 helper plasmid
TS1		helper-pigA3
TS2	pigA3GFP-A $\beta$ DsRed	helper-pigCMV
TS3		with no helper

### 1.5 外源 DNA 的导入

分别用 pigA3GFP 和 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed 作为转基因载体,按表 3 设置 3 组实验进行基因导入。取性成熟的健康雄泥鳅一尾,取出精巢置于无菌平皿内迅速剪细,或是将一尾成熟雄金鱼的精液挤到无菌平皿内,然后将事先制备好的 20  $\mu$ L (1.67  $\mu$ g/ $\mu$ L) 转基因载体 (pigA3GFP-A $\beta$ DsRed 或 pigA3GFP) 与 10  $\mu$ L (1.56  $\mu$ g/ $\mu$ L) 辅助质粒 (helper-pigA3) 的混合液加入精液中混匀。取两尾健康性成熟的雌性泥鳅或金鱼,将卵子挤出放入另一无菌平皿内,随即加入上述预混精液,之后加入 0.7% 的生理盐水,用清洁过的鹅毛迅速搅匀,1 min 后用清水清洗两次,再将受精卵放入两个 55 cm  $\times$  40 cm  $\times$  20 cm 的食品承载箱中,室温静水孵化<sup>[14]</sup>。

表 3 转基因鱼的 3 个实验组

Tab.3 Three experimental groups of the transgenic fish

转基因鱼实验组 group of transgenic fish	转基因载体 transgenic vector	辅助质粒 helper plasmid
金鱼 goldfish	pigA3GFP	
	pigA3GFP-A $\beta$ DsRed	helper-pigA3
泥鳅 loach	pigA3GFP	

### 1.6 转基因金鱼与转基因泥鳅的荧光观察及分子鉴定

用荧光显微镜对发育到第 3 天的金鱼受精卵进行荧光观察,待发育至两月龄时再次进行荧光观察,并对其中发绿色荧光的金鱼剪取部分尾鳍,提取金鱼基因组 DNA 作为检测模板,以 DEGFP-1、DEGFP-2, P<sub>A $\beta$</sub> -1、P<sub>A $\beta$</sub> -2, DsRed-1、DsRed-2 为引物进行 PCR 检测,分别鉴定绿色荧光蛋白报告基因,  $\beta$ -actin 基因启动子与红色荧光蛋白报告基因。同时,将部分金鱼基因组 DNA 煮沸变性后,冰水中速冷,再将其直接点在 PVDF 膜上,用 DIG 标记的 *gfp* 编码序列合成探针,以正常金鱼基因组为阴性对照,以转基因质粒为阳性对照,对荧光金鱼基因组 DNA 进行斑点杂交鉴定,操作按试剂盒说明书进行。

用荧光显微镜对体长约 1 cm 的泥鳅幼鱼进行荧光观察,待泥鳅长到约 2 cm 时,对其中一尾有绿色荧光的泥鳅进行组织解剖,荧光观察其肝和鳃,并分别提取相应组织中的基因组 DNA,以 DEGFP-1、DEGFP-2 为引物进行 PCR 检测,鉴定

绿色荧光蛋白报告基因。另取部分泥鳅基因组 DNA 进行斑点杂交鉴定,操作同荧光金鱼的斑点杂交鉴定。

## 2 结果

### 2.1 转基因载体 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed 的鉴定

将构建的转基因载体 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed 经 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切,可切出一个带有团头鲂  $\beta$ -actin 启动子和 polyA 加尾信号的 DsRed 表达元件,大小在 1 600 bp 左右的片段;经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,可切出一个包含了团头鲂  $\beta$ -actin 启动子及 *DsRed* 基因 1 200 bp 左右的片段,与载体结构相符合,说明转基因载体 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed 构建正确。

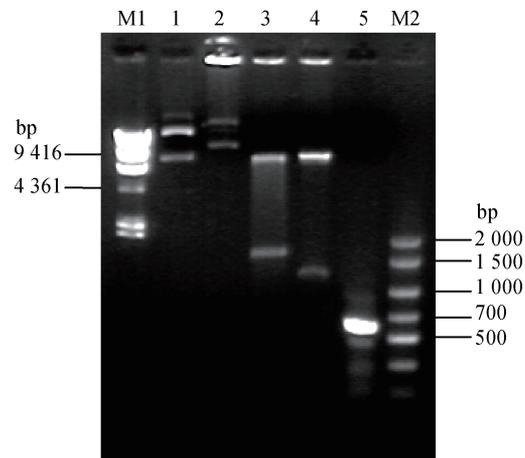


图 2 转基因载体 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed 的鉴定

1. 质粒 pigA3GFP; 2. 质粒 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed; 3. *EcoR* I/*Kpn* I 酶切 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed; 4. *EcoR* I/*Xho* I 酶切 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed; 5.  $\beta$ -actin promoter PCR 产物; M1.  $\lambda$ -DNA/*Hind* III DNA 分子标记; M2. 100 bp DNA 分子标记。

Fig.2 Identification of transgenic vector pigA3GFP-A $\beta$ DsRed

1. vector pigA3GFP; 2. vector pigA3GFP-A $\beta$ DsRed; 3. pigA3GFP-A $\beta$ DsRed digested by *EcoR* I/*Kpn* I; 4. pigA3GFP-A $\beta$ DsRed digested by *EcoR* I/*Xho* I; 5. PCR product of  $\beta$ -actin promoter; M1.  $\lambda$ -DNA/*Hind* III DNA marker; M2. 100 bp DNA marker.

### 2.2 CIK 细胞的转染及启动子活性比较

转染 48 h 后,对转染细胞进行荧光观察,结果见表 4。在 TS1、TS2、TS3 组中均可观察到同时发绿色荧光和红色荧光的转染细胞(图 3-a, b, c),说明来源于团头鲂的  $\beta$ -actin 启动子 P<sub>A $\beta$</sub>  与来源于家蚕的 A3 启动子 P<sub>A3</sub> 在草鱼肾细胞中都具

有活性,可以驱动外源基因的表达。

转染 10 d 后,再次对转染细胞进行荧光观察,发现 TS1、TS2 实验组中荧光细胞的数量随着细胞的繁殖而增加,且荧光均稳定存在,表明外源基因已插入到草鱼肾脏细胞基因组中,但在 TS3 实验组中已观察不到具荧光的细胞。上述结果表明,辅助质粒 helper-pigA3 和 helper-pigCMV 在 CIK 细胞中表达的转座酶都发挥了作用,数量不断增加并能持续发出荧光的细胞是在转座酶作用下 PB 转座子将携带的报告基因插入到细胞基因组中后细胞增殖并有效表达了报告基因的结果。而在无辅助质粒存在的情况下,荧光细胞仅在转染后的较短时间内存在,是转基因载体 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed 中的报告基因未能整合入 CIK 细胞的基因组,只产生瞬时表达,但不能持续表达荧光蛋白的结果。

通过比较不同转染系统中的 CIK 荧光细胞数,还发现在辅助质粒 helper-pigA3 存在的转染组中,荧光细胞比例高于辅助质粒 helper-pigCMV 存在的转染组(表 4),由此初步判断,在 CIK 细胞中来源于家蚕的 A3 启动子活性强于来源于巨细胞病毒的 CMV 启动子。

表 4 转染 CIK 细胞 48 h 后的荧光观察  
Tab.4 Fluorescence observation of the CIK cells 48 h post-transfection

转染组 transfection group	转基因载体 transgenic vector	辅助质粒 helper plasmid	荧光细胞比例/% ratio of fluorescent cells
TS1		helper-pigA3	0.112
TS2	pigA3GFP-A $\beta$ DsRed	helper-pigCMV	0.032
TS3		with no helper	0.02

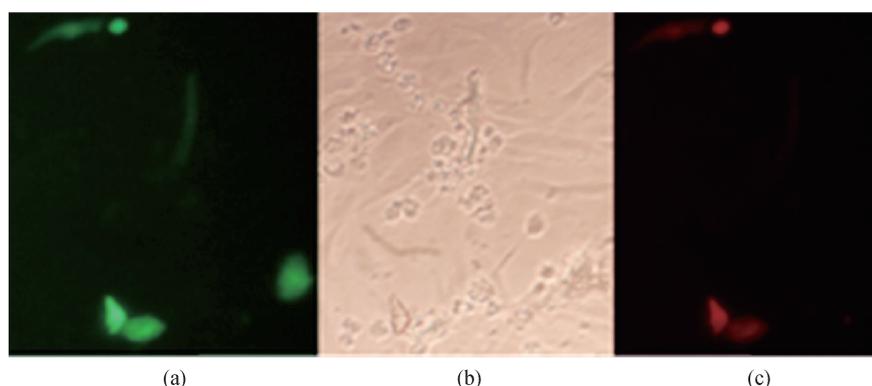


图 3 使用 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed 转染 48 h 后 CIK 细胞的荧光观察

(a) 绿色荧光视野; (b) 正常光视野; (c) 红色荧光视野。

Fig.3 Fluorescence observation of the CIK cells 48 h post-transfection

(a) under the green fluorescence field; (b) under the normal light field; (c) under the red fluorescence field.

### 2.3 转基因金鱼与转基因泥鳅的荧光观察

精子介导法得到的金鱼受精卵在 20 °C 静止水中孵化,在受精卵发育到第 3 天,对 pigA3GFP 转基因实验组受精卵进行荧光观察,发现有部分受精卵有明显的绿色荧光(图版 I-1,2),表明转基因载体进入鱼卵,并表达了 GFP。待 2 月龄时,对两实验组金鱼再次进行荧光观察,在 pigA3GFP 转基因实验组的金鱼中可以明显观察到绿色荧光(图版 I-3,4),在 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed 转基因实验组的金鱼中,可观察到同时具有绿色荧光和红色荧光的金鱼共 4 尾。对其中一尾金鱼进行解剖,从多个器官中均可观察到绿色荧光(图版 I-5,8,11,14,17,20)和红色荧光(图版 I-7,10,13,

16,19,22)。

同样,精子介导法得到的泥鳅待长到 1 cm 时,在荧光显微镜下观察,发现具有显著绿色荧光的幼鱼(图版 II-1,2),占整个孵化幼苗的 0.59%。待泥鳅长到约 2 cm 时,对其中一尾有绿色荧光的泥鳅进行组织解剖,荧光下观察其肝和鳃,发现肝和鳃也呈现出绿色荧光(图版 II-4,6)。

### 2.4 转基因金鱼的分子鉴定

以 2 月龄的 pigA3GFP 转基因处理后能发出荧光的金鱼基因组为模板,正常金鱼基因组作为阴性对照,质粒 pigA3GFP 作为阳性对照,以 DEGF1-1、DEGF1-2 为引物,对 *gfp* 进行 PCR 检测,从 15 尾荧光金鱼中均可扩增得到相同大小的

条带,并与以质粒 *pigA3GFP* 为模板扩增得到的条带大小相同(图 4-a);斑点杂交结果显示, *gfp*

探针能与荧光金鱼基因组 DNA 特异性杂交(图 4-c),表明 *gfp* 基因已整合进金鱼的基因组。

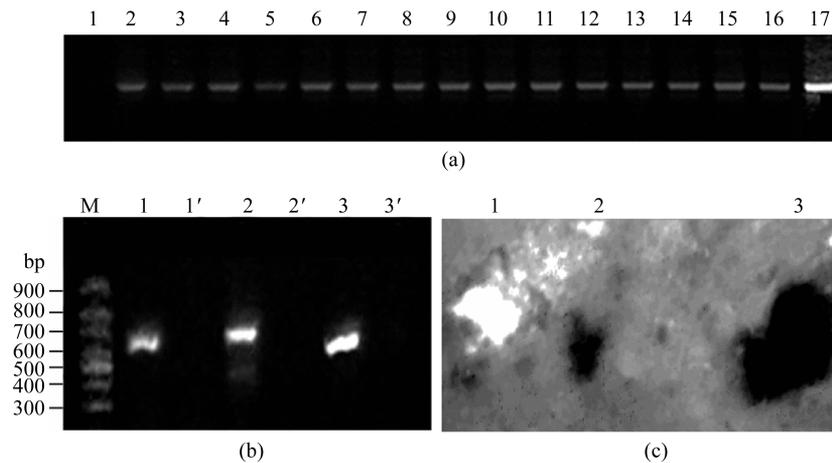


图 4 转基因金鱼的分子鉴定

(a) *pigA3GFP* 转基因金鱼中 *gfp* 的 PCR 鉴定: 1. 正常金鱼, 2 ~ 16. *pigA3GFP* 实验组金鱼, 17. 质粒 *pigA3GFP*; (b) *pigA3GFP-αβDsRed* 转基因金鱼的 PCR 鉴定: M. 100 bp DNA 分子标记, 1 ~ 3 为从实验组金鱼基因组中分别扩增 *DsRed*、*gfp* 和  $P_{\alpha\beta}$ , 1' ~ 3' 为从正常金鱼基因组中分别扩增 *DsRed*、*gfp* 和  $P_{\alpha\beta}$ ; (c) *pigA3GFP* 转基因金鱼的斑点杂交鉴定: 1. 正常金鱼, 2. *pigA3GFP* 实验组金鱼, 3. 质粒 *pigA3GFP*。

Fig. 4 Molecular identification of the transgenic goldfish

(a) Identification of *pigA3GFP*-transgenic goldfish by PCR: 1. normal goldfish, 2 - 16. the *pigA3GFP* experimental group goldfish, 17. vector *pigA3GFP*; (b) Identification of *pigA3GFP-αβDsRed*-transgenic goldfish by PCR: M. 100 bp DNA ladder marker; 1 - 3. PCR detection of *DsRed*, *gfp*,  $P_{\alpha\beta}$  in the *pigA3GFP-αβDsRed* experimental group goldfish; 1' - 3'. PCR detection of *DsRed*, *gfp*,  $P_{\alpha\beta}$  in the normal goldfish; (c) Identification of *pigA3GFP*-transgenic goldfish by Dot blot: 1. normal goldfish, 2. *pigA3GFP* experimental group goldfish, 3. vector *pigA3GFP*.

以 2 月龄的 *pigA3GFP-αβDsRed* 转基因处理后能发出荧光的金鱼基因组为模板, 正常金鱼基因组作为阴性对照, 分别以 *DsRed*-1、*DsRed*-2, *DEGFP*-1、*DEGFP*-2 和  $P_{\alpha\beta}$ -1、 $P_{\alpha\beta}$ -2 为引物, 对 *DsRed*、*gfp*、 $P_{\alpha\beta}$  进行 PCR 检测, 得到了大小分别约为 680、720、600 bp 的条带, 与 *DsRed*、*gfp*、 $P_{\alpha\beta}$  理论分子量大小一致(图 4-b), 表明得到同时含有 GFP 表达元件和 *DsRed* 表达元件的转基因金鱼。

### 2.5 转基因泥鳅的分子鉴定

以 *pigA3GFP* 转基因处理后能发出荧光的泥鳅基因组为模板, 正常泥鳅基因组作为阴性对照, 质粒 *pigA3GFP* 作为阳性对照, 以 *DEGFP*-1、*DEGFP*-2 为引物, 对 *gfp* 进行 PCR 检测, 可扩增出 720 bp 的特异性 PCR 产物, 与以质粒 *pigA3GFP* 为模板扩增的 PCR 产物分子量相同(图 5-a); 斑点杂交结果显示, *gfp* 探针能与荧光泥鳅基因组 DNA 特异性杂交(图 5-b), 表明 *gfp* 基因已整合进泥鳅的基因组。

### 3 讨论

用来产生转基因动物的显微注射是把重组过的 DNA 注入受精卵的原核中<sup>[2]</sup>。转基因鱼最初也是通过显微注射将基因片段导入鱼的卵母细胞或者受精卵中所获得。这种方法的实现需要专门的仪器, 尽管操作不是非常复杂, 对于转入的外源基因也没有长度上的限制, 但是对卵的损伤较大, 每次只能注射有限的细胞, 难于大规模生产转基因鱼, 且外源基因的插入和表达效率很低, 还经常形成嵌合体或是瞬时表达<sup>[3]</sup>。因此探索新的转基因系统及规模化基因导入方法成为主要研究方向。

目前, 基因转移的技术主要还有反转录病毒载体法、精子介导法等。反转录病毒载体法不仅要重组反转录病毒, 且仍旧要用到显微操作技术。相对而言, 精子介导法存在不少优势, 如操作简单、成本低廉、一次可以同时大批量卵进行基因导

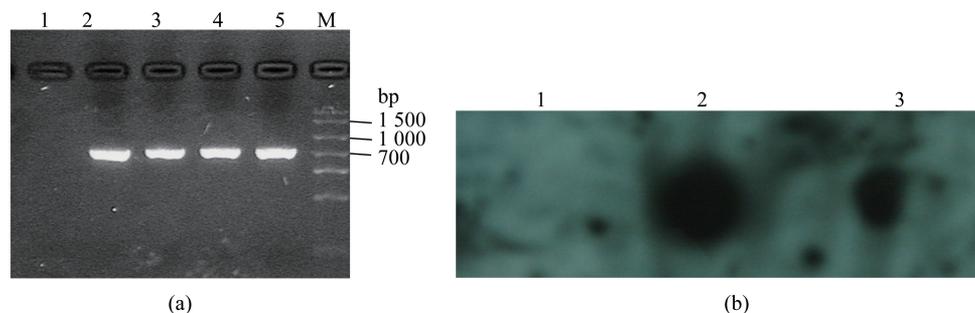


图5 转基因泥鳅的分子鉴定

(a) pigA3GFP 转基因泥鳅中 *gfp* 的 PCR 鉴定: 1. 正常泥鳅; 2~4. pigA3GFP 实验组泥鳅的肌肉、肝脏和鳃; 5. 质粒 pigA3GFP; M. 100 bp DNA 分子标记。(b) pigA3GFP 转基因泥鳅的斑点杂交鉴定: 1. 正常泥鳅; 2. 质粒 pigA3GFP; 3. pigA3GFP 实验组泥鳅。

Fig. 5 Molecular identification of the transgenic loach

(a) Identification of pigA3GFP-transgenic loach by PCR: 1. normal loach; 2-4. muscle, liver and gill of pigA3GFP experimental group loach; 5. vector pigA3GFP; M. 100 bp DNA Marker. (b) Identification of pigA3GFP-transgenic loach by Dot blot. 1. normal loach; 2. vector pigA3GFP; 3. pigA3GFP experimental group loach.

入的处理。特别是针对体外受精的鱼类,它可以依靠人工授精过程进行外源基因的导入操作,大大降低了对细胞的损伤,受精卵成活率较高<sup>[15]</sup>。当然,精子介导法也存在着一些缺点,如转基因阳性率低、转移率不稳定等<sup>[16]</sup>。本研究中,尽管通过精子介导获得了转基因鱼,但效率很低,因此提高精子介导法的转基因效率也值得探讨。

来源于鳞翅目昆虫粉纹夜蛾的 *piggyBac* (PB) 转座子,自发现之日起就因其转座活性不局限于宿主而引起关注<sup>[17]</sup>。PB 转座子元件末端是长 13 bp 的反向重复序列,两端还不对称的分布着 19 bp 长的内部反向重复序列。其开放读码框长 1 738 bp,编码 594 个氨基酸残基组成的蛋白,大小约为 68 ku<sup>[18-19]</sup>。PB 转座子具有整合效率高<sup>[20]</sup>、负载容量大<sup>[11]</sup>、无偏好基因区<sup>[21]</sup>、可稳定整合与传代<sup>[22]</sup>、易于确定整合位点<sup>[23]</sup>等优点。比较基因组分析表明,在多种生物的基因组序列中具有 *piggyBac*-like 元件<sup>[24-25]</sup>,暗示 *piggyBac* 转座子元件可能在多种生物体内都具有转座活性。已有报道称,PB 转座子在斑马鱼胚胎<sup>[8]</sup>具有活性,但在其他重要的商业经济鱼类中的转座活性仍有待分别证明。通过转座获得转基因鱼,有可能在短时间创造新品种或品系,这是常规育种难以办到的。

本研究中,我们将来源于团头鲂的  $\beta$ -actin 启动子控制红色荧光蛋白基因 (*DsRed*) 的表达元件插入到 pigA3GFP 中,构建了转基因载体 pigA3GFP-A $\beta$ DsRed。将该载体分别与辅助质粒

helper-pigA3 或 helper-pigCMV 共转染进 CIK 细胞,48 h 后可观察到同时发绿色荧光和红色荧光的转染细胞,表明 A3 启动子和  $\beta$ -actin 启动子在 CIK 细胞中均显示了活性,使得所驱动的相应的绿色和红色荧光报告基因得到了表达。10 d 后再次观察,发现荧光细胞的数量大为增加。相反,在不加辅助质粒的转染实验组中,转染 48 h 后能观察到荧光细胞,表明导入的外源基因也得到了表达,而在 10 d 后没能再次观察到荧光细胞的存在,表明先前的荧光是由于导入的外源基因表达元件所产生的瞬时表达所致,但由于此表达元件没能整合到 CIK 细胞的基因组中,结果随着细胞的分裂及逐渐被降解的二重作用下,最终导致荧光彻底消失。这个对比的综合结果表明了辅助质粒在 PB 转座子介导的转基因过程中起不可或缺的作用,辅助质粒 helper-pigA3 和 helper-pigCMV 中的 A3 启动子和 CMV 启动子在 CIK 细胞中也都具有活性,它们可以驱动转座酶基因表达并使 PB 转座子发挥相应的转座作用,荧光细胞之所以数量增加且能稳定存在,正是由于在转座酶的作用下,PB 转座子将携带的报告基因插入到了 CIK 细胞的基因组中,随着细胞分裂得到扩增,并有效表达了报告基因的结果。此外,在转化细胞中同时长期存在的绿色荧光和红色荧光还表明 A3-GFP,CMV-DsRed 元件都已经整合进细胞基因组中,这两个元件的合计大小约 3 kb,说明 PB 转座子在转染草鱼肾脏细胞时至少能携带 3 kb 的外源基因。

在用 *piggyBac* 转座子进行转基因鱼的实验中,我们通过精子介导法将转基因载体与辅助质粒一起导入鱼卵中,经正常孵化、发育后,对其进行荧光观察,可观察到明显发荧光的个体。对荧光鱼的 DNA 鉴定结果也验证了荧光鱼中确实存在外源基因。进一步对荧光鱼的各个组织解剖后观察,也发现具有荧光。对这些组织的 DNA 进行 PCR 鉴定的结果再次证实了在不同的组织中都存在相同的外源 DNA 片段。这些结果表明,在人工授精过程中转基因载体和提供转座酶的辅助质粒均伴随精子进入了鱼卵,在转座作用发生后,外源报告基因被整合到鱼的基因组中,随着鱼卵的发育及细胞分化而存在于鱼的各个组织中,并得到正确表达,从而使鱼的各个组织均能发出特定的荧光。诚然,当这些外源报告基因没能整合到鱼的基因组中时,也会产生瞬时表达,使得鱼卵在一段时间内产生一定强度的荧光,但由于该转基因载体不含真核生物的复制起始位点,无法在真核鱼中得到复制,这种荧光会伴随着鱼卵的细胞分裂而逐渐减弱直至消失。换言之,只有当这些外源报告基因被整合进鱼的基因组中时,才有可能随着细胞的分裂和分化而分配到各子细胞当中,导致生长到一定阶段的鱼的各个组织还能持续发出荧光。

至此,我们证实通过 PB 转座子获得了转基因金鱼与转基因泥鳅,在 CIK 细胞上也验证了 PB 转座子的转座活性,推测 PB 转座子在其它鲤科鱼类及鳅科鱼类中也会有较好的转座活性。该转基因系统在转基因鱼的研究和应用中具有一定的开发潜力。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Grabher C, Wittbrodt J. Meganuclease and transposon mediated transgenesis in medaka [ J ]. *Genome Biology*, 2007, 8(1) : S10.
- [ 2 ] 朱作言,许克圣,谢岳峰,等. 转基因鱼模型的建立 [ J ]. *中国科学*, 1989, B(2) : 147 - 155.
- [ 3 ] Cha Y R, Weinstein B M. Visualization and experimental analysis of blood vessel formation using transgenic zebrafish [ J ]. *Birth Defects Research*, 2007, 81(4) : 286 - 296.
- [ 4 ] Mitra R, Fain-Thornton J, Craig N L. piggyBac can bypass DNA synthesis during cut and paste transposition [ J ]. *European Molecular Biology Organization Journal*, 2008, 27(7) : 1097 - 1109.
- [ 5 ] Balu B, Shoue D A, Fraser M J, et al. High-efficiency transformation of *Plasmodium falciparum* by the lepidopteran transposable element piggyBac [ J ]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(45) : 16391 - 16396.
- [ 6 ] Grossman G L, Rafferty C S, Clayton J R, et al. Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the piggyBac transposable element [ J ]. *Insect Molecular Biology*, 2001, 10(6) : 597 - 604.
- [ 7 ] Handler A M, Harrell R A. Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the piggyBac transposon vector [ J ]. *Insect Molecular Biology*, 1999, 8(4) : 449 - 457.
- [ 8 ] Tamura T, Thibert C, Royer C, et al. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector [ J ]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(1) : 81 - 84.
- [ 9 ] Lobo N F, Fraser T S, Adams J A, et al. Interplasmid transposition demonstrates piggyBac mobility in vertebrate species [ J ]. *Genetica*, 2006, 128(1 - 3) : 347 - 357.
- [ 10 ] Hikosaka A, Kobayashi T, Saito Y, et al. Evolution of the *Xenopus* piggyBac transposon family TxpB: domesticated and untamed strategies of transposon subfamilies [ J ]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(12) : 2648 - 2656.
- [ 11 ] Ding S, Wu X, Li G, et al. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice [ J ]. *Cell*, 2005, 122(3) : 473 - 483.
- [ 12 ] 诸成娴,曹广力,薛仁宇,等. 家蚕丝胶蛋白基因 1 (ser-1) 启动子的克隆及其活性分析 [ J ]. *科技通报*, 2007, 23(6) : 828 - 834.
- [ 13 ] 赵浩斌,朱作言. 脂质体介导的鲫 CAB 细胞转化及转化细胞的核移植 [ J ]. *水产学报*, 2001, 25(5) : 402 - 407.
- [ 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 ] 于健康,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.
- [ 16 ] 徐美瑜,陈松林,戴继勋. 鱼类基因转移技术研究进展 [ J ]. *海洋水产研究*, 2002, 23(3) : 50 - 57.
- [ 17 ] 王建军,王常春,韩召军. piggyBac 转座子及其在转基因昆虫中的应用 [ J ]. *昆虫知识*, 2009, 46(5) : 665 - 672.

- [18] 杨欢欢,魏峰,刘全. piggyBac 转座子应用研究进展[J]. 动物医学进展,2010,31(12):91-94.
- [19] 唐丽莉,陈斌,何正波,等. piggyBac 转座子及其转基因昆虫的应用[J]. 安徽农业科学,2010,38(6):2809-2811.
- [20] Liu Z J, Zhu Z Y, Roberg K, *et al.* Isolation and characterization of  $\beta$ -actin gene of carp (*Cyprinus carpio*) [J]. DNA Sequence, 1990, 1(2):125-136.
- [21] Maragathavally K J, Kaminski J M, Coates C J. Chimeric Mos1 and piggyBac transposases result in site-directed integration [J]. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, 2006, 20(11):1880-1882.
- [22] Cary L C, Goebel M, Corsaro B G, *et al.* Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses [J]. Virology, 1989, 172(1):156-169.
- [23] Fraser M J, Ciszczon T, Elick T, *et al.* Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera [J]. Insect Molecular Biology, 1996, 5(2):141-151.
- [24] Sarkar A, Sim C, Hong Y S, *et al.* Molecular evolutionary analysis of the widespread piggyBac transposon family and related "domesticated" sequences [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2003, 270(2):173-180.
- [25] de Boer J G, Yazawa R, Davidson W S, *et al.* Bursts and horizontal evolution of DNA transposons in the speciation of pseudotetraploid salmonids [J]. BioMed Central Genomics, 2007, 8(11):422.

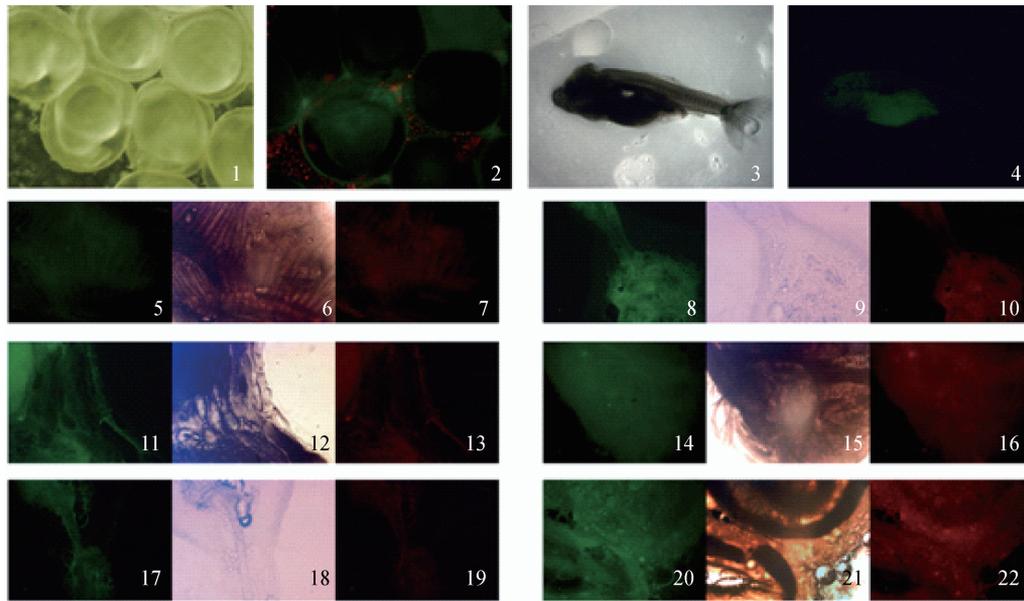
## Exploration of transgenic method for goldfish and loach with the *piggyBac* transposon

HU Ying-ying, GUO Xue-shuang, ZHOU Yang, CAO Guang-li, GONG Cheng-liang, XUE Ren-yu\*  
(School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract:** Development of transgenic fish techniques and application will promote traits improvement of fish and benefit exploration of its gene function. To investigate the applicability of the transposon *piggyBac* in Cyprinidae and Cobitidae fish, the expression element of *DsRed* under the control of  $P_{A\beta}$  promoter was inserted into the plasmid pigA3GFP to generate transgenic vector pigA3GFP-A $\beta$ DsRed. The results of the CIK cell transfected with pigA3GFP-A $\beta$ DsRed showed that the transposon *piggyBac* could transfer exogenous genes into CIK genome, and both of the promoter A3 from silkworm and the promoter CMV from CMV have the bioactivity. Moreover, the pigA3GFP-A $\beta$ DsRed and pigA3GFP were mixed with helper plasmid helper-pigA3 respectively, and then were introduced into the eggs of goldfish and loach by sperm-mediated transfer. The results of fluorescence observation, PCR and Dot blotting verified that both transgenic goldfish and loach were obtained. Therefore, PB transposon was considered to be active in some fishes of Cyprinidae and Cobitidae.

**Key words:** *Carassius auratus*; *Misgurnus anguillicaudatus*; *piggyBac* transposon; transgene; *Ctenopharyngoden idellus* kidney (CIK)

**Corresponding author:** XUE Ren-yu. E-mail: xuery@suda.edu.cn

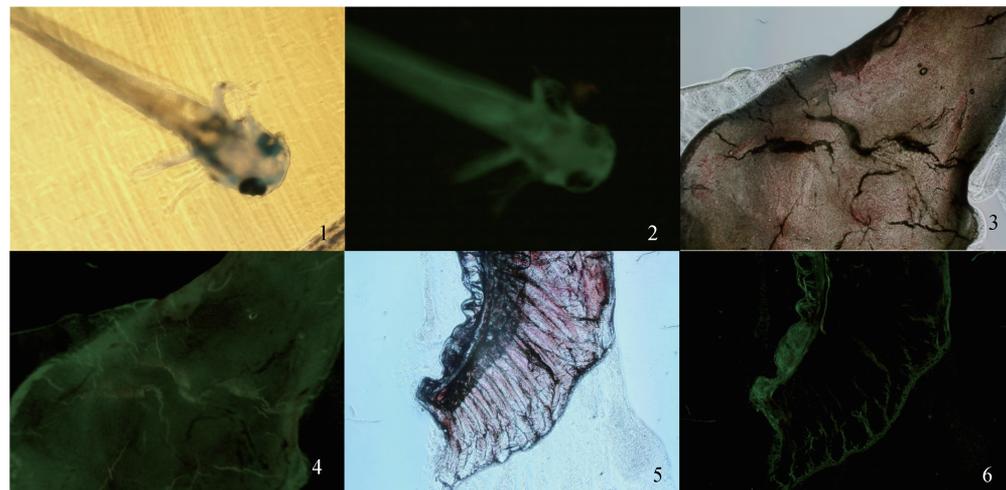


图版 I 转基因金鱼的荧光观察

pigA3GFP 导入鱼卵 3 d 后:1. 正常光视野下,2. 绿色荧光视野下;pigA3GFP 实验组金鱼 2 月龄时:3. 正常光视野下,4. 绿色荧光视野下;pigA3GFP- $\alpha\beta$ DsRed 实验组金鱼 2 月龄时的鳃耙(5~7)、肾(8~10)、胃(11~13)、鳔(14~16)、肝胰脏(17~19)、肠(20~22)分别在绿色荧光视野、正常光视野、红色荧光视野下观察。

### Plate I Fluorescence observation of the transgenic goldfish

3 days after pigA3GFP conducted into the eggs;1. under normal light image,2. under green fluorescent image; 2-month-old pigA3GFP experimental group fish;3. under normal light image,4. under green fluorescent image; One of the 2-month-old pigA3GFP $\alpha\beta$ DsRed experimental group goldfish was dissected and its gill raker (5 - 7), kidney (8 - 10), stomach (11 - 13), gas bladder (14 - 16), hepatopancrea(17 - 19), intestine (20 - 22) were respectively observed under green fluorescent image, normal light image and red fluorescent image.



图版 II 转基因泥鳅的荧光观察

1,3,5. 正常光下的泥鳅幼鱼,幼鱼肝脏,幼鱼鳃;2,4,6. 绿色荧光视野下的泥鳅幼鱼,幼鱼肝脏,幼鱼鳃。

### Plate II Fluorescence observation of the transgenic loach

1,3,5. the pigA3GFP loach, its liver, its gill under normal light image; 2,4,6. the pigA3GFP loach, its liver, its gill under green fluorescent image.