

草鱼呼肠孤病毒衣壳蛋白靶向灭活转基因 P₀ 的构建

秦 波, 程洛单, 陈 杰, 蒋霞云, 邹曙明*

(上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为探索草鱼出血病防治新技术, 实验采用衣壳蛋白靶向灭活 (capsid-targeted viral inactivation, CTVI) 策略, 利用 *Tgf2* 转座子元件, 构建了带爪蟾 EF1 α 或鲤热休克蛋白 70 两种不同启动子的 CTVI 转基因质粒 pTgf2-EF1 α -VP3-SN 或 pTgf2-Hsp70-VP3-SN。该 2 种质粒均包含 GCRV 衣壳蛋白 VP3 与金黄色葡萄球菌核酸酶 (*Staphylococcus aureus* nuclease, SN) 融合表达阅读框。通过将 2 种 CTVI 转基因质粒与体外合成的 *Tgf2* 转座酶 5' 加帽 mRNA 共同显微注射入草鱼 1~2 细胞期受精卵, 获得了带 2 种不同启动子的 CTVI 转基因草鱼群体。PCR 和测序结果显示, 2 种转基因阳性草鱼基因组中均含有外源 GCRV 衣壳蛋白 VP3 与 SN 基因片段, 阳性率分别为 40.2% 和 37.0%, 表明 *Tgf2* 转座子已成功介导 CTVI 融合表达基因整合到草鱼基因组中。本实验共获得了 120 尾 P₀ CTVI 转基因个体, 为将来构建抗出血病草鱼新品系奠定了基础材料。

关键词: 草鱼; 草鱼出血病; 呼肠孤病毒; 衣壳蛋白靶向灭活; 转基因

中图分类号: Q 785; S 941.41

文献标志码: A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国四大家鱼之一, 2012 年产量达 478.17 万 t, 在淡水养殖鱼类中最高^[1]。草鱼出血病的病原体为呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV), 属水生呼肠孤病毒^[2]。GCRV 基因组共含有 11 条编码 12 种蛋白质的双链 RNA (dsRNA), 其中, 衣壳蛋白 VP3 是构成病毒粒子内层蛋白的基本骨架, 为病毒装配所必需^[3]。养殖水温对 GCRV 病毒的增殖起着重要作用, 草鱼出血病在夏秋季节, 当水温 25~30 °C 时最易暴发流行, 而在气温较低的冬春季节或大于 33 °C 的夏季基本不暴发^[4-5]。草鱼出血病的相关研究工作虽然取得了一定的进展, 但还未培育出有效的抗病毒新品系^[6-8]。

20 世纪 80 年代初, 朱作言等^[9]建立了鱼类转基因模型, 开辟了一条鱼类遗传育种新策略。1991 年, 美国约翰霍普金斯大学的 Natsoulis 等^[10]首次提出了应用衣壳蛋白-核酸酶融合蛋

白靶向灭活病毒 (capsid-targeted viral inactivation, CTVI) 的新型抗病毒策略, 该技术是将病毒衣壳蛋白-核酸酶融合蛋白装配到病毒粒子中, 使核酸酶接触并降解病毒核酸, 从而达到抑制病毒复制的目的, 这是一种前所未有的抗病毒策略, 具有广阔的应用前景^[11-13]。CTVI 策略已成功用于乙肝病毒^[14-15]、人免疫缺陷病毒^[16]、鼠白血病病毒^[17]、登革病毒 (DenV)^[18-20] 等多种病毒的抗病毒研究, 取得了一定的效果。

本研究采用 *Tgf2* 转座子作为转基因的载体^[21-23], 分别采用鲤热休克蛋白 70 启动子和爪蟾 (*Xenopus laevis*) EF1 α 启动子, 构建 GCRV 衣壳蛋白 VP3 与金黄色葡萄球菌核酸酶 (*Staphylococcus aureus* nuclease, SN) 融合表达的 CTVI 转基因质粒, 通过显微注射技术将其注射到草鱼 1~2 细胞期受精卵内, 获得了带呼肠孤病毒衣壳蛋白靶向灭活基因的转基因草鱼 P₀, 本实验为获得草鱼抗出血病新品系奠定了基础材料。

收稿日期: 2014-07-22 修回日期: 2014-10-17

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2011AA100403); 国家自然科学基金 (31272633, 31201760); 上海高校知识服务平台 (ZF1206)

通信作者: 邹曙明, E-mail: smzou@shou.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 实验材料

草鱼催产、人工授精、孵化和养殖在上海海洋大学农业部团头鲂遗传育种中心进行。亲本为基地保存的长江水系优良草鱼家系。采用 LHRH-A2(5 μg/Kg)和 DOM(3~5 mg/kg)进行雌鱼的人工催产,雄鱼剂量减半。转基因草鱼 P₀ 的饲养管理、样品处理及检测方法等均与对照组相同。pTgf2-EF1α-eGFP 质粒和体外转录辅助质粒 pCS2-CMV-gfTP^[23] 均保存于上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室。金黄色葡萄球菌种保存于本实验室 -80 °C 冰箱。

1.2 转基因质粒 pTgf2-EF1α-VP3-SN 的构建

采用 BioEdit 7.2.3 软件对 GenBank 现有不同草鱼的 GCRV 病毒株衣壳蛋白 VP3 序列 GU350742^[24]、HQ231200^[25] 和 JQ782741^[26] 进行序列比对,设计出包含起始和终止密码子的长度为 3 699 bp 的草鱼 GCRV 病毒 VP3 基因序列,委

托南京金斯瑞生物技术有限公司进行全基因合成,并亚克隆获得 pUC57-VP3 质粒,其 5'、3'端包含 *SalI*、*BamHI* 限制性酶切位点。根据 GenBank 中金黄色葡萄球菌核酸酶(SN)基因序列(GenBank 号:EF529596)设计带 *BamHI* 和 *NotI* 酶切位点的引物 SN-F 和 SN-R,在引物 SN-F 序列的 5'端添加了编码 6 个氨基酸残基序列,作为 SN 与 VP3 之间的连接序列^[14-20]。以金黄色葡萄球菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物与 pMD-19T(TaKaRa 公司)载体连接,获得 pMD-19T-SN 质粒,包含了 453 bp 的 SN 核苷酸序列。使用限制性内切酶 *BamHI* 和 *NotI* 对质粒 pMD-19T-SN 和 pTgf2-EF1α-eGFP 质粒进行双酶切,再用 T4 连接酶连接后获得 pTgf2-EF1α-SN 质粒。pTgf2-EF1α-SN 质粒和 pUC57-VP3 质粒用限制性内切酶 *SalI* 和 *BamHI* 进行双酶切、连接、转化,挑取阳性克隆,测序验证终获得 pTgf2-EF1α-VP3-SN 转基因质粒。所用引物如表 1 所示,均由上海生工生物技术有限公司合成。

表 1 质粒构建扩增及其检测引物
Tab.1 The primers for plasmid amplification and detection

引物 primer name	退火温度/°C annealing temperature	引物序列(5'-3') primer sequence
SN-F	56.2	CGCGGATCCTACTGTCTATAGCGCAACTTCACTAAAAATTACAT
SN-R		ATAAGAATGCGGGCGCTTATTGACCTGAATCAGCGTTGTCTTCGCT
VP3-F	55.0	ACGCGTCGACACCATGCATCGTCATAACAGAACACGTG
VP3-R		CGCGGATCCCTCTACTCCCGCCATAGTTCCCAAAGCA
Hsp70-F	56.2	CCGCTCGAGGAATGGATAAGGCTGAG
Hsp70-R		TTCCGCGCGCGCTATGGCCGACGTCGACGTCGTCAGCGGCTGCTTCT
VP3-F	57.0	CCGAGGCGTTAGTAGTGT
SN-R		AAGCCTTGACGAACTAAA

1.3 转基因质粒 pTgf2-Hsp70P-VP3-SN 的构建

根据斑马鱼热休克蛋白 70 序列(GenBank 号:BC171454)信息,在中国水产科学研究院基因组中心鲤全基因组测序数据库(<http://www.carpbase.org/login.php>)中查找鲤热休克蛋白 70 基因 5'端上游的序列,设计出 Hsp70 promoter 的引物 Hsp70-F 和 Hsp70-R 如表 1 所示。引物 5'端带有 *XhoI*、3'端带有 *SalI* 限制性酶切位点,以鲤基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增目的片段大小为 2 100 bp。扩增产物与 pMD-19T 载体连接,获得 pMD-19T-Hsp70 promoter 质粒。使用限制性内切酶 *XhoI* 和 *SalI* 对 pMD-19T-Hsp70 promoter 和 pTgf2-EF1α-VP3-SN 质粒双酶切,用

T4 连接酶、连接、转化,挑取阳性克隆,测序验证终后获得 pTgf2-Hsp70-VP3-SN 转基因质粒。

1.4 Tgf2 转座酶 mRNA 的体外转录

体外转录辅助质粒 pCS2-CMV-gfTP 包含 SP6 启动子和大小为 577 bp 的金鱼 *Tgf2* 转座酶开放阅读框。以 pCS2-CMV-gfTP 质粒经 *NotI* 内切酶单酶切线性化,大量 DNA 产物纯化试剂盒对线性化 pCS2-CMV-gfTP 进行回收纯化,使用 mMessage mMachine kit(Ambion)体外合成转座酶 mRNA^[23]。

1.5 显微注射

采用美国 World Precision Instrument 公司的 PV830 Pneumatic PicoPump 型号显微注射仪和 Nikon 公司的 SMZ-1500 体式显微镜,显微注射系

统通过氮气气压驱动。显微注射用针为 1 mm 毛细玻璃管经拉针器控制而成。将草鱼受精卵置于培养皿 ($\Phi = 6$ cm) 中, 吸弃水使受精卵单层排列, 占据培养皿的约 1/4。pTgf2-EF1 α -VP3-SN 或 pTgf2-Hsp70-VP3-SN 质粒 (终浓度 50 ng)、Tgf2 转座酶 mRNA (终浓度 100 ng) 与酚红混匀后, 加入显微注射用针中, 注射到草鱼 1~2 细胞期胚胎中, 每颗卵的注射量为 1~2 nL。注射完毕后, 将受精卵放置培养皿中培育, 每 4 h 换已曝过气的自来水, 定期在显微镜下观察其发育状况并拍照。

1.6 转基因阳性个体的检测与筛选

抽取 2 龄转基因草鱼和同龄对照鱼的尾静脉血液, 采用天根生物有限公司的基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。根据衣壳蛋白基因 VP3 和核酸酶基因 SN 序列设计引物 VP3-F 和 SN-R (表 1), 以普通草鱼为阴性对照, 以质粒 pTgf2-EF1 α -VP3-SN 和 pTgf2-Hsp70p-VP3-SN 为阳性对照, 进行 PCR 扩增, 目的片段大小分别为 1 541 bp。扩增产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, Alpha Innotech 凝胶成像机上进行观察拍照, 割胶回收、连接、转化和测序, 每个样品选取 3 个单克隆进行测序, 将测序结果与转基因质粒序列比对, 统计相似度。

2 结果

2.1 转基因质粒 pTgf2-EF1 α -VP3-SN 和 pTgf2-Hsp70-VP3-SN 的构建

构建的转基因 pTgf2-EF1 α -VP3-SN 质粒包含金鱼 Tgf2 转座子的两个末端 L220 和 R185、EF1 α 启动子以及 GCRV 衣壳蛋白 VP3 和核酸酶 SN 序列, Amp⁺ 氨苄抗性基因序列, 包含 SpeI、XhoI、SalI、BamHI、NotI、ClaI、BglI 和 KpnI 限制性酶切位点, 转基因目的区域为质粒 2 228 bp 至 7 603 bp 区域共 5 376 bp, 质粒结构见图 1。构建的转基因 pTgf2-Hsp70-VP3-SN 载体 (图 2) 包含 Hsp70 启动子, 其他部分与 pTgf2-EF1 α -VP3-SN 质粒完全相同, 转基因目的区域为质粒 2 233 bp 至 9 226 bp 区域共 6 994 bp。

2.2 转基因草鱼阳性个体的观察与检测

将实验组与对照组在相同条件下进行孵化, 对不同时期胚胎进行拍照, 观察胚胎在 12 hpf、24 hpf、36 hpf 及一龄草鱼的发育状况, 及注射 pTgf2-EF1 α -VP3-SN 或 pTgf2-Hsp70-VP3-SN 质粒与 Tgf2 转座酶 mRNA 的转基因草鱼胚胎发育

情况 (图 3)。观察发现, 在相同的培养环境下, 注射组草鱼胚胎及幼鱼和对照草鱼胚胎及幼鱼的发育状况基本一致, 说明显微注射外源质粒和转座酶对草鱼形态和生长发育未产生影响。

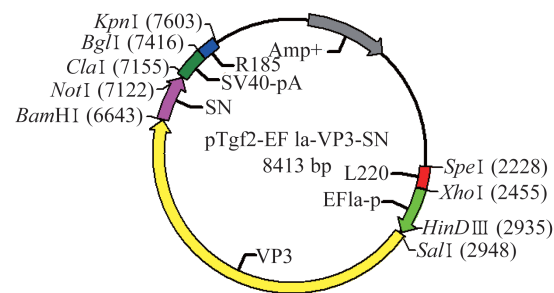


图 1 草鱼抗出血病转基因质粒 pTgf2-EF1 α -VP3-SN 的结构

Fig. 1 Structure of pTgf2-EF1 α -VP3-SN transgenic donor plasmid for grass carp hemorrhagic disease

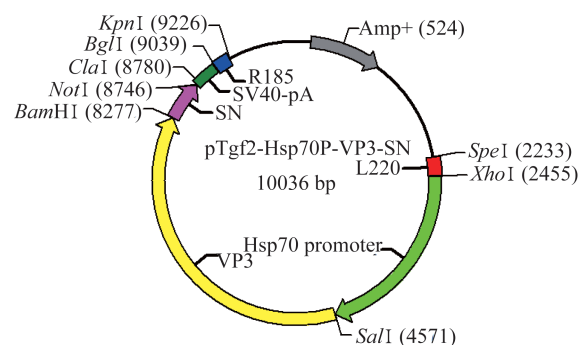


图 2 草鱼抗出血病转基因质粒 pTgf2-Hsp70-VP3-SN 的结构

Fig. 2 Structure of pTgf2-Hsp70-VP3-SN transgenic donor plasmid for grass carp hemorrhagic disease

2.3 转基因 pTgf2-EF1 α -VP3-SN 质粒草鱼阳性个体检测

在正常的草鱼中不存在 GCRV 衣壳蛋白 VP3 和金黄色葡萄球菌核酸酶 SN 基因序列, 针对该区域设计特异性引物 VP3-F 和 SN-R, 对转 pTgf2-EF1 α -VP3-SN 质粒草鱼共计 132 尾进行 PCR 检测。扩增的特异性分子条带大小为 1 541 bp, 其中 53 尾可检测出特异性条带, 阳性率为 40.2% (图 4-a)。对 4 尾样品 (2、7、8 和 14) 的阳性扩增产物进行回收、克隆和测序验证, 测序结果与 pTgf2-EF1 α -VP3-SN 质粒序列比对, pTgf2-EF1 α -VP3-SN 质粒的转基因元件已成功整合到草鱼的基因组中 (图 4-b)。

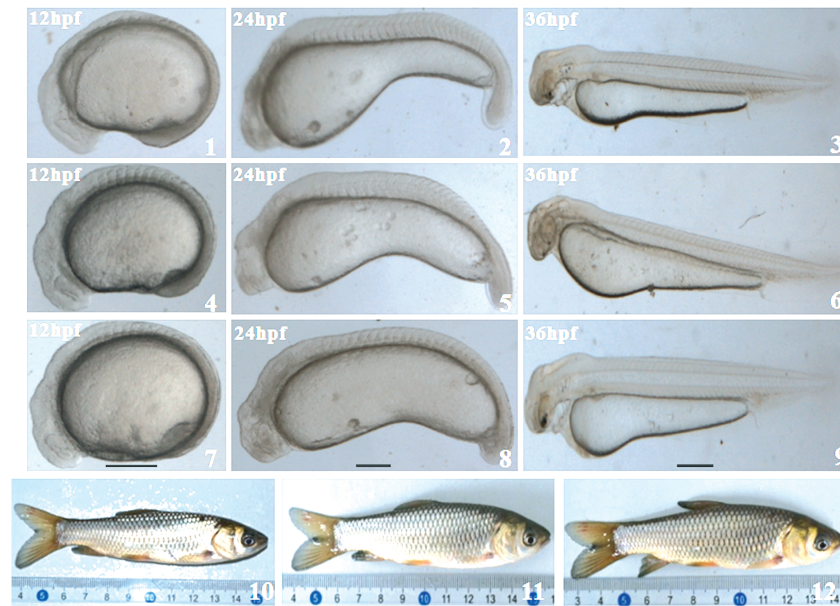


图 3 转基因草鱼不同发育时期胚胎及幼鱼

1~3,10 正常草鱼; 4~6,11 注射 pTgf2-EF1 α -VP3-SN 和 *Tgf2* 转座酶 mRNA 草鱼; 7~9,12 注射 pTgf2-Hsp70-VP3-SN 草鱼和 *Tgf2* 转座酶 mRNA,黑色线条 600 μ m

Fig. 3 The different development stage embryos and juveniles of transgenic grass carp

1-3,10 Normal grass carp; 4-6,11 Injection pTgf2-EF1 α -VP3-SN plasmid and *Tgf2* transposase mRNA of grass carp; 7-9,12 Injection pTgf2-Hsp70-VP3-SN plasmid *Tgf2* transposase mRNA of grass carp,black bar 600 μ m

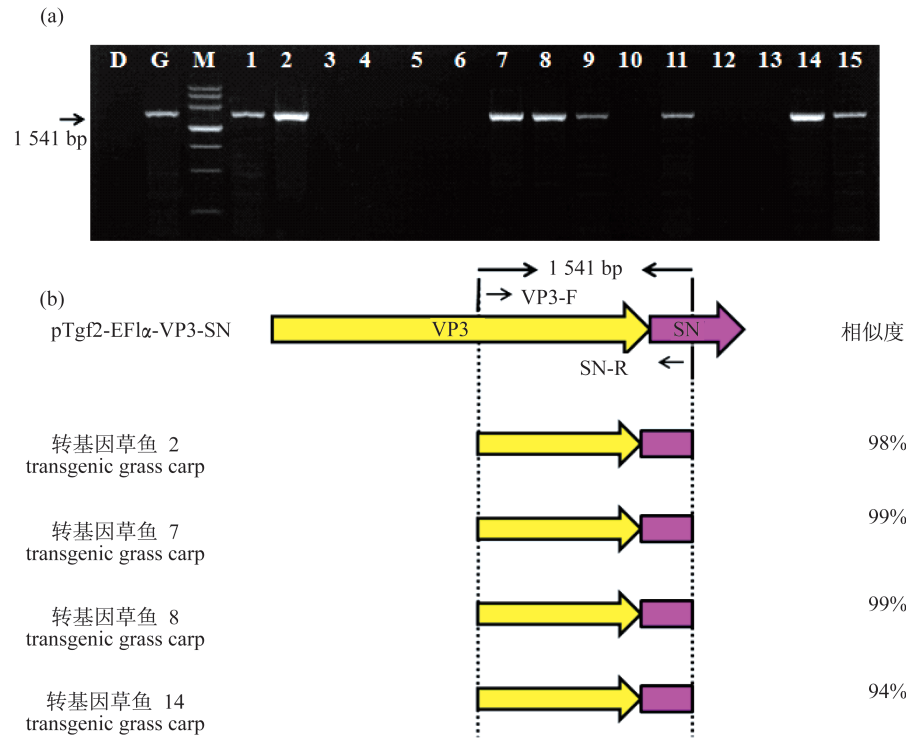


图 4 转 pTgf2-EF1 α -VP3-SN 质粒草鱼的 PCR 检测 (a) 及与供体质粒序列比对模式图 (b)

D. 草鱼阴性对照; G. 供体质粒 pTgf2-EF1 α -VP3-SN 阳性对照; M. 分子量标准; 1~15. pTgf2-EF1 α -VP3-SN 质粒显微注射草鱼

Fig. 4 PCR analysis (a) and sequence alignment of pTgf2-EF1 α -VP3-SN sequences

between transgenic grass carp and donor plasmid (b)

D. negative grass carp control; G. positive control donor plasmid pTgf2-EF1 α -VP3-SN; M. molecular weight standard; 1-15. pTgf2-EF1 α -VP3-SN plasmid microinjection grass carp

2.4 转基因 pTgf2-Hsp70P-VP3-SN 质粒草鱼阳性个体检测

以特异引物对 VP3-F 和 SN-R 对注射 pTgf2-Hsp70-VP3-SN 质粒草鱼共计 181 尾进行 PCR 检测,扩增条带大小为 1 541 bp,其中 67 尾检测出特异性条带,阳性率为 37.0% (图 5-a)。对 4 尾

样品(2、5、10 和 14)的阳性扩增产物进行回收、克隆和测序验证,测序结果与 pTgf2-Hsp70-VP3-SN 质粒序列比对,结果表明,pTgf2-Hsp70-VP3-SN 的转基因元件已成功整合到草鱼基因组中(图 5-b)。

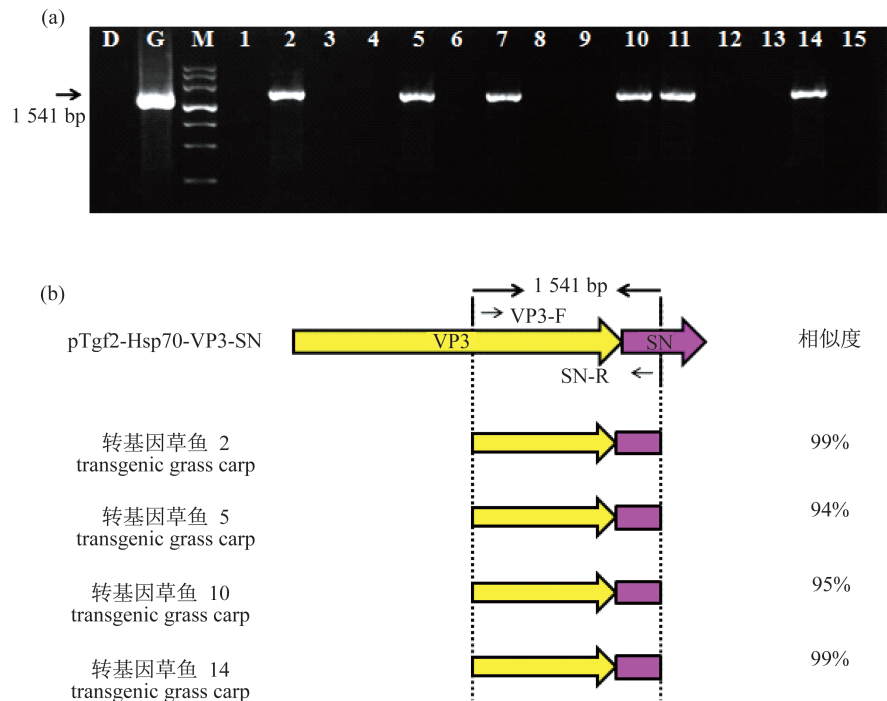


图 5 转 pTgf2-Hsp70-VP3-SN 质粒草鱼的 PCR 检测 (a) 及与供体质粒序列比对模式图 (b)

D. 草鱼阴性对照; G. 供体质粒 pTgf2-Hsp70-VP3-SN 阳性对照; M. 分子量标准; 1~15. pTgf2-Hsp70-VP3-SN 质粒显微注射草鱼

Fig. 5 PCR analysis (a) and sequence alignment of pTgf2-Hsp70-VP3-SN sequence between transgenic grass carp and donor plasmid (b)

D. negative grass carp control, G. positive control donor plasmid pTgf2-Hsp70-VP3-SN; M. molecular weight standard; 1 - 15. pTgf2-Hsp70-VP3-SN plasmid microinjection grass carp

3 讨论

3.1 选用 EF1 α 和 Hsp70 启动子构建转基因载体的原因

基因表达的组织特异性主要由调控序列特别是启动子决定,爪蟾 EF1 α 启动子和 Hsp70 启动子已运用于多种转基因鱼类的研究与载体的构建^[27-29]。研究表明,爪蟾的 EF1 α 启动子属广泛组织表达类型^[28],本实验采用爪蟾的 EF1 α 启动子构建草鱼抗出血病病毒转基因 pTgf2-EF1 α -VP3-SN 质粒,其在转基因阳性草鱼组织中应属组成性的广泛表达,能够对染病草鱼的各种组织起着保护作用,但对无病毒感染的组织而言则可

能造成能量浪费或产生毒性。为了避免外源基因的广泛表达对草鱼生长发育产生潜在的影响,本实验还选用了鲤热休克蛋白 70 启动子来控制 VP3-SN 融合蛋白的条件表达,当水温在 27 °C 左右时,热休克蛋白 70 启动子可驱动下游目的基因的表达^[29],而此温度条件下 GCRV 也最易暴发,VP3-SN 融合蛋白则可能在热休克 70 启动子的调节下产生继而发挥融合蛋白的功能。尽管如此,未来还需进一步开展转基因草鱼的攻毒试验,以验证 2 种抗出血病转基因系统的有效性。

3.2 Tgf2 转座系统可提高草鱼 CTVI 转基因的效率

在正常草鱼基因组中,不应存在 GCRV 衣壳

蛋白 VP3 和金黄色葡萄球菌核酸酶(SN)序列。在 2 种不同启动子的转基因阳性 P₀ 草鱼基因组中,均含有外源 GCRV 衣壳蛋白 VP3 与 SN 基因片段,阳性率分别为 40.2% 和 37.0%。金鱼 *Tgf2* 是一个新的具有天然活性的 *hAT* 转座子,基于金鱼 *Tgf2* 转座子的二元转座系统在金鱼、鲫、鲤和团头鲂中的转座效率超过 30%~60%,并可实现大片段基因序列的精切插入^[23,30-32]。草鱼转基因质粒 pTgf2-EF1 α -VP3-SN 和 pTgf2-Hsp70-VP3-SN 的目标转移区域分别长达 5 376 bp 和 6 994 bp,如采用注射线性化质粒的方式,转基因效率通常低于 5%,并会产生大量的不精确插入^[33],而 *Tgf2* 转座系统作为转基因的载体,则能够实现携带较长外源基因在受体基因组中的精确整合^[22-23]。

3.3 抗草鱼出血病转基因 P₀ 构建的潜在价值

GCRV 会引起草鱼出血病的暴发,对草鱼养殖业危害极大,科学家们进行了大量 GCRV 的基础生物学研究,迄今尚无有效的防治措施^[34-36]。衣壳蛋白靶向灭活(CTVI)策略是将病毒衣壳蛋白-金黄色葡萄球菌核酸酶(SN)的融合蛋白装配到病毒粒子中,使核酸酶接触并降解病毒核酸,从而达到抑制病毒复制的目的。目前 CTVI 策略已用于多种哺乳动物病毒的抗病毒研究,SN 是 CTVI 策略中应用最为广泛的抗病毒核酸酶,该酶结构简单(仅一条单肽链),其活性严格依赖于 Ca²⁺ 离子浓度,对 RNA 或 DNA 都具有降解作用,是一种对核酸非专一性的核酸酶^[10]。SN 与 GCRV 衣壳蛋白 VP3 融合蛋白通常对细胞不产生毒性,该新型的抗病毒 CTVI 策略为研究抗出血病转基因草鱼提供了一种新策略。1995 年, Natsoulis 等^[10]利用 SN 和衣壳蛋白融合蛋白靶向定位到小鼠白血病病毒粒子中,结果证明白血病病毒的拷贝数降低了 30~100 倍。本实验采用 *Tgf2* 转座子介导,根据 GCRV 衣壳蛋白 VP3 读码框序列,分别连入爪蟾的 EF1 α 启动子或鲤热休克蛋白 70 启动子,首次构建出 120 尾 P₀ CTVI 转基因草鱼,为将来构建抗出血病转基因草鱼品系奠定了基础。

本文部分实验设计得到上海海洋大学吕利群教授的帮助,特此致谢。

参考文献:

- [1] Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Chinese Fisheries Yearbook [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2013: 30 - 31. [农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2013: 30 - 31.]
- [2] Xu W H, Coombs M K. Conserved structure function of the orthoreovirus major core proteins [J]. Virus Research, 2009, 144: 44 - 57.
- [3] Herskowitz I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations [J]. Nature, 1987, 329 (6136): 219 - 222.
- [4] Fang Q. Construction and co-expression of grass carp reovirus VP6 protein and enhanced green fluorescence protein in the insect cells [J]. Virologica Sinica, 2007, 22 (5): 397 - 404.
- [5] Zhou Y, Fan Y D, Xu J, et al. Construction of plant-based expression vector of grass carp reovirus VP6 gene [J]. Freshwater Fisheries, 2009, 39 (4): 40 - 44. [周勇, 范玉顶, 徐进, 等. 草鱼呼肠孤病毒 VP6 蛋白基因植物表达载体的构建. 淡水渔业, 2009, 39 (4): 40 - 44.]
- [6] Chen L X, Zhang X W, Xiao T Y, et al. Expression of Hu-IFN- α gene in transgenic grass carp [J]. Journal of Hunan Agricultural University, 2001, 27 (3): 177 - 178. [陈立祥, 张学文, 肖调义等. 人 α -干扰素基因在转基因草鱼中的表达. 湖南农业大学学报, 2001, 27 (3): 177 - 178.]
- [7] Zhong J Y, Zhu Z Y. Resistance to GCRV of hLFC-Transgenic garss carp [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2001, 25 (5): 528 - 530. [钟家玉, 朱作言. 转人乳铁蛋白基因草鱼抗 GCHV 的初步研究. 水生生物学报, 2001, 25 (5): 528 - 530.]
- [8] Su J M, Zhang H Y, Zhang X W, et al. Molecular verification of transgenic grass carp of Hu-IFN- α gene and disease resistance [J]. Journal of Hunan Agricultural University, 2003, 29 (5): 412 - 414. [苏建明, 张怀云, 张学文, 等. 转 Hu-IFN- α 基因草鱼的分子验证及抗性研究. 湖南农业大学学报, 2003, 29 (5): 412 - 414.]
- [9] Zhu Z Y, Xu K S, Xie Y F, et al. The establishment of the model of transgenic fish [J]. China Science, 1989, 2: 147 - 155. [朱作言, 许克圣, 谢岳峰, 等. 转基因鱼模型的建立. 中国科学, 1989, 2: 147 - 155.]
- [10] Boeke J D, Hahn B. Destroying retroviruses from within [J]. Trends in Microbiology, 1996, 4 (11): 421 - 426.
- [11] Wang Z H, Qiu H J, Chen W D. Capsid-targeted

- viral inactivation: A new antiviral strategy [J]. *China Biotechnology*, 2007, 27(3): 88 - 92. [王忠华, 仇华吉, 陈维多. 衣壳蛋白靶向灭活 - 一种新型抗病毒策略. *中国生物工程杂志*. 2007, 27(3): 88 - 92.]
- [12] Chen Y, Zhu Z Y. Application of RNA interference (RNAi) in virus resistance [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(3): 356 - 359. [陈芸, 朱作言. RNA干扰在抗病毒研究中的应用. *水生生物学报*, 2006, 30(3): 356 - 359.]
- [13] Guo S, Li J L, Lv L Q. Molecular pathogenesis of grass carp reovirus and novel anti-viral strategies [J]. *Fishery Modernization*, 2010, 37(1): 37 - 42. [郭帅, 李家乐, 吕利群. 草鱼呼肠孤病毒的致病机制及抗病毒新对策. *渔业现代化*, 2010, 37(1): 37 - 42.]
- [14] Beterams G, Borchers B, Nassal M. Pack aging of up to 240 subunits of a 17 kDa nuclease into the interior of recombinant hepatitis B virus capsids [J]. *FEBS Letters*, 2000, 481: 169 - 176.
- [15] Beterams G, Nassal M. Significant interference with hepatitis B virus replication by a core nuclease fusion protein [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(12): 8875 - 8883.
- [16] Ding J, Liu J, Xue C F, *et al.* Anti-HBV effect of TAT-HBV targeted ribonuclease [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2003, 9(7): 1525 - 1528.
- [17] Natsoulis G, Sessaiah P, Federspiel M J, *et al.* Targeting of a nuclease to murine leukemia virus capsids inhibits viral multiplication [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(2): 364 - 368.
- [18] Qin C F, Qin E D. Capsid-targeted viral inactivation can destroy dengue 2 virus from within *in vitro* [J]. *Archives of Virology*, 2006, 151(2): 379 - 385.
- [19] Qin C F, Qin E, Yu M, *et al.* Therapeutic effects of dengue 2 virus capsid protein and staphylococcal nuclease fusion protein on dengue-infected cell cultures [J]. *Archives of Virology*, 2005, 150(4): 659 - 669.
- [20] Qin C F, Qin E D. Development of cell lines stably expressing staphylococcal nuclease fused to dengue 2 virus capsid protein for CTVI [J]. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*, 2004, 36(8): 577 - 582.
- [21] Zou S M, Du X D, Yuan J, *et al.* Cloning of goldfish hAT transposon *Tgf2* and its structure [J]. *Hereditas*, 2010, 32(12): 1263 - 1268. [邹曙明, 杜雪地, 袁剑, 等. 金鱼 hAT 家族转座子 *Tgf2* 的分布及其结构. *遗传*, 2010, 32(12): 1263 - 1268.]
- [22] Cheng L D, Jiang X Y, Tian Y M, *et al.* The goldfish hAT-family transposon *Tgf2* is capable of autonomous excision in zebrafish embryos [J]. *Gene*, 2014, 536(1): 74 - 78.
- [23] Jiang X Y, Du X D, Zou S M, *et al.* Goldfish transposase *Tgf2* presumably from recent horizontal transfer is active [J]. *FASEB Journal*, 2012, 26(7): 2743 - 2752.
- [24] Zhang C, Wang Q, Shi C, *et al.* Molecular analysis of grass carp reovirus HZ08 genome segments 1 - 3 and 5 - 6 [J]. *Virus Genes*, 2010, 41(1): 102 - 104.
- [25] Ye X, Tian Y Y, Deng G C, *et al.* Complete genomic sequence of a reovirus isolated from grass carp in China [J]. *Virus Research*, 2012, 163(1): 275 - 283.
- [26] Su J, Heng J, Huang T, *et al.* Identification, mRNA expression and genomic structure of TLR22 and its association with GCRV susceptibility/resistance in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 36(2): 450 - 462.
- [27] Ming J, Xie J, Xu P, *et al.* Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(3): 407 - 418.
- [28] Lan K, Feng X L. Preliminary study on tissue-specific expression of promoter by using *Xenopus* [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2002, 23(2): 57 - 58. [蓝轲, 冯湘玲. 爪蟾用于启动子组织特异性表达检测的初步研究. *动物医学进展*, 2002, 23(2): 57 - 58.]
- [29] Huang Q, Li C Y. Using Hsp70 promoter to regulate target gene expression in tumor [J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2001, 30(3): 198 - 201. [黄倩, 李川源. 使用热休克蛋白基因启动子调控靶基因在肿瘤局部表达. *中华病理学杂志*, 2001, 30(3): 198 - 201.]
- [30] Guo X M, Huang C X, Shen R J, *et al.* The study on insertion efficiency of *Tgf2* transposon in the genome of *Megalobrama amblycephala* [J]. *Hereditas*, 2013, 35(8): 999 - 1006. [郭秀明, 黄创新, 沈睿杰, 等. *Tgf2* 转座子在团头鲂基因组中的插入效率研究. *遗传*, 2013, 35(8): 999 - 1006.]
- [31] Yan X C, Zhong S S, Xu P, *et al.* Study on transgenic efficiency of Fst1 gene element mediated by *Tgf2* transposon in common carp [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(1): 1 - 7. [闫学春, 钟莎莎, 徐鹏, 等. *Tgf2* 转座子介导鲤 Fst1 基

- 因元件在鲤中的转基因效率研究. 上海海洋大学学报, 2014, 23(1): 1-7.]
- [32] Wang Y, Jiang X Y, Zou S M. The study on transgenic efficiency of *PiggyBac* transposon in the genome of *Megalobrama amblycephala* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2014, 23(2): 161-166. [王瑶, 蒋霞云, 邹曙明. *PiggyBac* 转座元件的构建及其在团头鲂基因组中的转基因效率. 上海海洋大学学报, 2014, 23(2): 161-166.]
- [33] Du X D, Jiang X Y, Zou S M. Research of transposons using in fish transgenic and gene trap [C]. The annual academic conference of China Society of Fisheries, 2010: 126-126. [杜雪地, 蒋霞云, 邹曙明. 鱼类转座子在鱼类转基因和基因捕获中的研究. 中国水产学会学术年会论文集, 2010: 126-126.]
- [34] Wan Q, Su J, Chen X, *et al.* Gene-based polymorphisms, genomic organization of interferon- β promoter stimulator 1 (IPS-1) gene and association study with the natural resistance to grass carp reovirus in grass carp *Ctenopharyngodon idella* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2013, 41(4): 756-765.
- [35] Su J, Zhu Z, Wang Y. Molecular cloning, characterization and expression analysis of the PKZ gene in rare minnow *Gobiocypris rarus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(1-2): 106-113.
- [36] Rao Y, Su J, Yang C, *et al.* Characterizations of two grass carp *Ctenopharyngodon idella* HMGB2 genes and potential roles in innate immunity [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2013, 41(2): 164-177.

Construction of transgenic P₀ grass carp by capsid-targeted viral inactivation of reovirus

QIN Bo, CHENG Luodan, CHEN Jie, JIANG Xiayun, ZOU Shuming*

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To explore new methods to prevent the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) hemorrhage, the capsid-targeted viral inactivation (CTVI) strategy was developed in the present study. By combination with *Cyprinus carpio* heat shock protein 70 or *Xenopus* EF1 α promoters, two different transgenic plasmids pTgf2-EF1 α -VP3-SN and pTgf2-Hsp70-VP3-SN were constructed harboring with efficient *Tgf2* transposon element. Both transgenic plasmids contain open reading frame (ORF) fusion with GCRV capsid protein VP3 and *Staphylococcus aureus* nuclease (SN). The transgenic grass carp was produced by co-injection pTgf2-EF1 α -VP3-SN or pTgf2-Hsp70P-VP3-SN plasmids into 1-2 cell fertilized eggs with *in vitro* synthesized *Tgf2* transposase mRNA. The PCR and sequencing analysis have proved that the anti-GCRV transgenic systems have successfully been integrated into the genome of grass carp. The transgene positive rates of pTgf2-EF1 α -VP3-SN or pTgf2-Hsp70P-VP3-SN plasmids are 40.2% and 37.0%, respectively. Our results demonstrated *Tgf2* transposon can efficiently mediate transgenesis in grass carp for fusion ORF of GCRV capsid protein VP3 and SN. Total 120 transgenic grass carp individuals have been obtained in the present study. The construction of anti-GCRV transgenic P₀ will provide the materials for future transgenic breeding to prevent grass carp hemorrhage.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; hemorrhage; reovirus; capsid-targeted viral inactivation; transgenesis

Corresponding author: ZOU Shuming. E-mail: smzou@shou.edu.cn