

• 综述 •

转基因鱼研究中的若干问题

蒋耀青

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

本文综述了近年来转基因鱼研究的某些进展, 主要涉及外源基因导入的方法、基因转移提高鱼类抗性的主要内容(如: 促进生长, 提高抗冻性及抗病性等), 此外, 还对我国转基因鱼研究的主要工作进行了介绍。

关键词 鱼类, 基因转移

Some Problems in the Study on Transgenic Fishes

Jiang Yaoqing

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101)

1980年以来, Palmiter 等将外源基因注入哺乳类受精卵以产生转基因动物。最著名的例子为生长加快的小鼠。此后, 有学者利用显微注射将外源 DNA 转移入海胆、爪蟾、果蝇、小鼠, 甚至兔、羊、猪、牛中⁽²²⁾。鱼类是研究转基因动物的良好材料, 因为一条雌鱼就能提供成千上万个卵, 它们行体外受精, 胚胎注射较哺乳类简单。本文将对外源基因导入鱼类的最新进展, 以及转基因鱼在促进生长、抗低温和抗病方面的研究现状进行评述。

一、基因转移的方法

1. 显微注射 产生转基因鱼的最普通的方法是将外源 DNA 在受精后最初几个小时内(1—4 细胞阶段)注入受精卵细胞质中。1985 年以来, 不同的基因通过显微注射法被导入鱼中(表 1)。

表 1 用于转基因鱼研究的基因及鱼种

鱼种	鲤、鲫、鲇、金鱼、泥鳅、medaka、蛙、罗非鱼、虹鳟、斑马鱼等
基因	hGH、hGHCDNA、rtGHCDNA、CCR、E.coli neo、E.coli hygro、E.coli gal、fLur、fAFP 等
启动子	RSV、mMT、SV40、fLur、fAFP 等

但是, 大多鱼种注射其受精卵时常难于穿透卵壳, 解决的办法见吴清江文(1989), 本文不再赘述。此外, 也有学者采用另一种显微注射法来穿刺卵壳, 如将鸡的晶体蛋白基因注入 medaka 卵母细胞的生发泡(germinal vesicle)中⁽²⁶⁾

2. 逆转录病毒感染 因缺乏鱼类特有的特异逆转录病毒, 此法用于基因转移受限制。

3. 电击法 此法曾成功地将基因转入多种分离细胞⁽¹¹⁾。Hallerman 等(1989)最早试验用电击法将 CAT 基因转入金鱼受精卵⁽²¹⁾, 但未获成功。水生所谢岳峰等(1989)成功地用此法获得转基因泥鳅, 整合率达 10%⁽⁴⁾。近年, Inoue 等(1990)⁽²⁴⁾用电击法得到了转基因 medaka, 还检测到了 rtGH 的表达。但如何提

高整合率, 使此法成为一种新的实用技术, 是尚待研究的问题。

4. 染色体介导的基因转移 在这些研究中^(29,14,15), 正常虹鳟及鳟鱼的精子用 γ -辐射使父源 DNA 断裂。白化雌鱼的卵与处理过的精子受精后, 热休克得雌核发育二倍体鱼。2—13% 的实验鱼胚能存活并发育。这些胚胎除常规数目的染色体外, 还含有额外的染色体片段。这些父源基因能复制和保存至成体中, 还能表达。转基因亲鱼的额外染色体片段也能被子代所遗传。

5. 成熟精子作载体法 1989 年意大利 Lavitrano 等人报道⁽²⁵⁾, 他们利用成熟精子作载体, 成功地将外源 DNA 导入小鼠卵细胞, 获得转基因动物。中科院发育所于建康等⁽¹⁰⁾ 成功地以鱼精子为载体, 并得到好的结果。但由于国内外科学家未能重复出相同的结果, 因此需要更多资料来确证实验的可靠性。目前此法尚不能用于转基因鱼的研究中。

二、转基因鱼研究中基因的选择

大多研究转基因鱼的学者, 兴趣较集中于加速生长、抗低温及抗病性方面。必须强调指出, 目前水产养殖方面转基因研究尚处于早期阶段, 有些工作的设计原先并未考虑直接的实践应用意义。但选用生长激素基因及抗病蛋白基因, 无疑部分原因是因为产生的转基因动物对水产养殖业有可能产生有益的贡献。

1. 加速生长 世界上首例人生长激素基因的转基因鱼由朱作言于 1985 年完成于中科院水生生物所⁽³¹⁾。后又得到了转基因泥鳅、银鲫及镜鲤等^(1,2)。Chourrout 等人(1986, 1988)^(12,13) 的工作表明, 将重组于 SV40 启动子的人 GH DNA 显微注射入虹鳟鱼卵的细胞质中, 此基因能被整合入虹鳟鱼的基因组中。Zhang 等人的工作中⁽³⁰⁾, 将含有虹鳟的 GH cDNA 显微注射入鲤鱼胚胎的细胞质中, 在存活鱼中发现稳定地整合了外源的基因序列, 进而在 9 条转基因鱼的红细胞中检测到了虹鳟 GH 的表达。在 1 细胞期注入基因的转基因鱼比其对照平均要大 22%。外源基因能遗传给其后代。虽然, 世界上已有很多实验室将 GH 基因导入很多鱼种的卵中, 并在转基因鱼中观察到了外源基因的整合、表达以及遗传, 有些转基因鱼长得比对照更快, 但是, 产生快速生长转基因鱼商业品系尚处于初始阶段, 有很多问题仍未解决。这些问题为转基因小鼠的共同问题, 很可能是现有产生转基因动物的技术所造成的。

2. 抗低温性 冬季北冰洋等海域的温度常低至 -1.4°C — -1.9°C 。大多海鱼均不能忍受这种低温, 常在低于 -0.7°C 时死亡。美洲拟鲈(*Pseudopleuronectes americanus*)等鱼种却能在有冰环境中, 藉血液中产生能使血液及组织冰点降低的蛋白质而存活⁽¹⁸⁾。科学家们对美洲拟鲈的抗冻蛋白及基因进行了大量的研究。这些蛋白为螺旋状, 富有丙氨酸, 分子量为 3300—4500 道尔顿⁽⁷⁾; 而 AFP (抗冻蛋白) 基因则由含有 30—40 年成员的基因族组成。这种基因的序列已被分离。美国及加拿大的两个实验小组则企图将抗冻蛋白基因转移入鲑鱼中, 以期大西洋鲑更能抗冻。1987 年美国 Huang 等用一种药物筛选载体 (PRSVgpt), 并采用磷酸钙沉淀法、DEAE 葡聚糖、电击法等技术, 将克隆的美洲拟鲈 AFP 基因转入虹鳟鱼、鲑鱼等的细胞系中⁽²³⁾。他们观察到了细胞中 AFP DNA 的存在, 也检测到了该基因的表达。加拿大 Fletcher 小组, 先用果蝇作为模型, 将 AFP 基因—果蝇热休克启动子 (Hsp.70) 重组基因转移至果蝇中。显微注射后, 建立了 6 个转化系, 每个转化系均有其独有的染色体整合位点, 而且热休克能诱导 AFP 基因的表达。Western 印迹杂交证明, 热休克有诱导转化系血液中有 AFP 存在⁽²⁷⁾。Fletcher 等近年来又将美洲拟鲈 AFP 基因导入大西洋鲑的卵中⁽¹⁹⁾。他们用于微注射的 DNA 是基因组亚克隆 2A-7。DNA 通过卵孔于受精后 3 小时内注入鲑鱼中。注射 DNA 的 1800 个大西洋鲑卵, 约有 80% 存活孵化。注射后 8 个月的小鱼个体, 用 S 印迹杂交分析。结果 66% (2/30) 小鱼的 DNA 能与美洲拟鲈 DNA 探针杂交。其整合率相似于其它转基因鱼研究的结果。最近, 已有初步的证据表明, 美洲拟鲈 AFP 基因可在转基因鲑鱼中表达。虽其表达的水平很低, 尚不足以抵抗冰冻 (要想功能性地抗冻, 血清中 AFP 的含量至少需达到 5mg/ml), 但是, 将基因显微操作技术应用于某一已知的水产养殖业问题, 是很有发展前景的。美洲

拟蝶 *AFP* 基因是一个结构特点、蛋白质产物的特性等都了解得较清楚的一个鱼类基因，而且对它在细胞系和其它个体中的表达及导入也都研究较深。因此，*AFP* 基因可能成为未来转基因鱼研究中的热点。

3. 抗病性 长期以来，水产养殖业中基因操作方面，如何提高鱼的抗病性是个极重要的问题。虽然抗生素和化学药物被用于控制某些鱼类病原体的扩散，但目前尚缺乏防治鱼类病毒的有效抗病毒药物或疫苗。疾病的抗性在很多情况下取决于获得特殊的目的基因。但目前，尚没有这种基因被确证，而对特殊疾病有抗性的转基因鱼，只是今后的努力目标。IHNV（传染性造血机能坏死病毒）是一种鱼类的棒状病毒，它能引起鲑及鳟鱼的毁灭性疾病。由于它会造成水产养殖业的严重经济损失，因而发展抗 IHNV 的疫苗就具有极重要的意义。IHNV 有子弹形的形态，包有核蛋白壳，并有糖蛋白突起。它的基因组编码 5 种蛋白：N（核蛋白壳）， M_1 及 M_2 （基质蛋白），G（O 糖蛋白）及 T（聚合酶）。Leong 等（1988, 1989）曾证明^(16,20)，糖蛋白 G 是得到中和抗体的唯一必需的抗原。分别制备 G、N、 M_1 及 M_2 的特异的兔抗血清，仅抗整个病毒及抗 G 的抗血清显示离体情况下的病毒中和性。用提纯的 G 蛋白作为疫苗免疫鱼，并测试其抗病能力。用虹鳟或鲑鱼进行了 6 组实验。免疫 30 天后，用致死剂量 IHNV 处理，所有实验组的鱼都具有抗病性。在低浓度的 IHNV 下（这种浓度的病毒通常类似于疾病流行时的情况），免疫能使鱼 100% 得到保护。鲑及鳟鱼达到 LD_{50} 的病毒数量，在免疫过的鱼中，分别比对照鱼高 54 倍（浸泡法免疫）或 166 倍（注射法免疫）。Gilmore 及 Leong⁽²⁰⁾ 将 IHNV 表面糖蛋白基因的 cDNA 克隆并测序，将表达 IHNV 糖蛋白基因的抗原决定子构建质粒载体。他们成功地生产出大量的生物合成疫苗，在用 IHNV 的攻击实验中，免疫鱼的死亡率显著地降低达 50—70%。此外，有学者认为，将结合于适当启动子的外源 DNA 导入鱼体，以保证反义病毒 RNA 序列的表达，这样，由于病毒的复制受阻而病毒的感染受到抑制。或者，将病毒外壳蛋白基因转移到鱼体中，使鱼能抵抗病毒。这些方法为提高鱼种的抗病能力提供了光明的前景。

三、中国的转基因鱼研究

水生所朱作言在基因鱼方面的研究，不仅为中国，而且为世界的遗传工程研究开创了新纪元⁽³¹⁾。现在，国内已有很多实验室热衷于将基因转移技术应用于各种鱼种。在朱作言的早期工作中，哺乳类的 *GH* 基因拼接到 *MT* 启动子上，然后注射入鲤、金鱼、泥鳅、鲫鱼等鱼中，他们得到的整合率为 50—80%。

青岛海洋所周晶⁽⁸⁾ 将 *MT-hGH* 注射入金鱼，整合率为 22%（注入细胞质）和 43%（注入卵母细胞发生泡）。外源 *MT-hGH* 可在转基因金鱼中表达，表达率约为 50%。同一所的王壬学⁽⁷⁾，将美洲 ocean pout 的抗冻蛋白基因 (*opAFP*) 注射入金鱼卵，*opAFP* 的整合率为 19.7%。实验证明，某些 F_0 转基因金鱼及一条 F_1 的血清及组织中都存在有 *AFP*。从 1986 年开始，我们实验室以生活于黄海沿岸的黄盖鲈 (*Pseudopleuronectes yokohamae*) 为材料，成功地将它的 *AFP* 基因分离克隆，并在 *E.coli* 中得到了表达^(5,6)。很明显，将新基因导入水生动物会对水产养殖业作出巨大贡献。虽然 1985 年以来，在转基因鱼的研究方面已取得了重要的进展，但仍有很多问题未能解决。鱼类基因的分子生物学研究始终较薄弱，而能用于转基因实验的鱼的基因和启动子等也很少。实际上，利用全部鱼的元件进行转基因鱼研究是有重要意义的。最近，加拿大学者⁽²⁸⁾ 用全部鱼的基因构件 (*opAFP* 启动子连接到一种鲑鱼的 *GH* cDNA 上) 通过受精孔导入大西洋鲑卵中。在所得的转基因鱼中，很多都生长加强，一年龄时转基因鱼平均增重为对照的 2—6 倍，最大的可达 13 倍。由此可见，用全部鱼的元件研究转基因鱼的积极意义。最近，朱作言和动物研究所的沈孝宙致力于鱼类基因元件的分离。朱作言等已将草鱼及鲤鱼的 *GH* 及肌动蛋白基因分离出来⁽³⁾。但是，在转基因鱼的研究方面，只有非常有限的有关外源基因整合和遗传的资料。我们认为，目前的研究重点不仅应改进基因转移的方法和效率、研究基因整合的位点、限定转入基因的表达及遗传等，而更应该花大力气研究鱼类的基本分子生物学和分子遗传学问题，以及分离鱼类的有用基因及各种基因元件。

参 考 文 献

- (1) 朱作言等: 1986. 科学通报, 31:988-990.
- (2) 朱作言等: 1989. 中国科学 (B), 2:147-155.
- (3) 朱作言等: 1990. 水生生物学报, 14:176-178.
- (4) 谢岳峰等: 1989. 水生生物学报, 13 (4):387-389.
- (5) 陈雄风, 蒋耀青: 1989. 遗传学报, 16 (5):367-373.
- (6) 蒋耀青等: 1990. 遗传学报, 17 (3):202-209.
- (7) 王壬学: 1989. 中国科学院海洋生物研究所博士论文.
- (8) 周 晶: 1989. 中国科学院海洋生物研究所博士论文.
- (9) 吴清江: 1989. 生物工程进展, 9(6):20-25.
- (10) 于建康: 1993. 发育生物学报, 印刷中.
- (11) Andreason, G.L. and G.A. Evans: 1988. *Biotechniques*, 6:650-660.
- (12) Chourrout, D. et al.: 1986. *Aquaculture*, 51:143-150.
- (13) Chourrout, D. et al.: 1988. *J. Cell Biochem., Suppl.* 12B:188.
- (14) Disney, J.E. et al.: 1987. *J. Exp. Zool.*, 244:151-158.
- (15) Disney, J.F. et al.: 1988. *J. Exp. Zool.*, 248:335-344.
- (16) Engelking, H.M. and Leong J.C.: 1989. *Virus Res.*, 13:213-230.
- (17) Fletcher, G.L. et al.: 1985. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 21:205-212.
- (18) Fletcher, G.L. et al.: 1986. *Can. J. Zool.*, 64:1897-1901.
- (19) Fletcher, G.L. et al.: 1988. *Can. J. Fish Aqua., Sci.*, 45:352-357.
- (20) Gilmore, R.D. et al.: 1988. *Bio-Technology*, 6:295-300.
- (21) Hallerman, E.M. et al.: 1989. *J. Cell Biochem. Suppl.* BB:170.
- (22) Hamner, R.E. et al.: 1985. *ure don*, 315:680-128.
- (23) Huang, R.C. et al.: 1987. *Fed. Proc.*, 46:2238.
- (24) Inoue, K. et al.: 1990. *Cell Differ. Dev.*, 29(2):123-128.
- (25) Lavitrano, M. et al.: 1989. *Cell*, 57:717-723.
- (26) Ozato, K. et al.: 1986. *Cell Differ.*, 19:237-244.
- (27) Rancourt, D.E. et al.: 1987. *Mol. Cell Bio.*, 7 (6):2188-2195.
- (28) Shao, J.D. et al.: 1992. *Bio/Technology*, 10:176-181.
- (29) Thorgaard, G.H. et al.: 1985. *Theor. Appl. Genet.*, 71:119-121.
- (30) Zhang, P. et al.: 1990. *Mol. Reprod. Dev.*, 25:3-13.
- (31) Zhu, Z. et al.: 1985. *Z. Agnew. Ichthyol.*, 1:31-341.

本文于 1991 年 5 月 21 日收到。

* * * * *

(上接第 34 页)

参 考 文 献

- (1) 戴维斯, R.W. et al.: 1984. 高级细菌遗传学--遗传工程手册, 天津科学技术出版社, pp.61.
- (2) Beringer, J.E. et al.: 1978. *Nature*, 276:633.
- (3) Hideki, Matsumoto et al.: 1986. *J. Gen. Microbiol.*, 132:2583.
- (4) Johnston et al.: 1984. *J. Bacteriol.*, 160(1):483.
- (5) Kowalski, M.: 1967. *Acta Microbiologica Polonica*, 16:7.
- (6) Selvaraj, G. et al.: 1984. *J. Bacteriol.*, 158:580.
- (7) Shah, K.S. et al.: 1981. *Arch. Microbiol.*, 130:262.
- (8) Stuttand, C. et al.: 1987. *J. Bacteriol.*, 169(8):3814.
- (9) Vicky Buchanan-Wollaston: 1979. *J. Gen. Microbiol.*, 112:135.
- (10) Zora Svab, Z.A. et al.: 1978. *J. Gen. Microbiol.*, 106:321.

本文于 1989 年 12 月 11 日收到, 1992 年 2 月 18 日修回。