

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.01327

# 将制作转基因斑马鱼的实验引入本科生基因工程实验课教学的探索与实践

袁葵洲, 邓云

湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081

**摘要:** 转基因动物的制备是基因工程的核心技术与重要成果之一, 然而目前在国内高校本科生基因工程实验课中还未见开展制备转基因动物的报道。作者利用科研平台的优势, 将转基因斑马鱼的制作引入本科生基因工程实验课教学, 并对其教学模式进行了探索与实践, 取得了较好的成效, 具有较好的推广价值。

**关键词:** 转基因动物; 转基因斑马鱼; 基因工程; 实验教学

## The exploration and practice of production of transgenic zebrafish into undergraduate student gene engineering experimental teaching

YUAN Wu-Zhou, DENG Yun

College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

**Abstract:** The preparation of transgenic animals is one of the core technology and critical achievement of gene engineering. However, it has not been reported that the gene engineering experimental course of undergraduate students in universities of mainland China has carried out the preparation of transgenic animals. In this paper, the authors took the advantage of scientific research platform, introduced the transgenic zebrafish technology to gene engineering experimental course of undergraduate students, and explored and practiced related teaching model, which had achieved good results and had great value to popularize.

**Keywords:** transgenic animals; transgenic zebrafish; gene engineering; experimental teaching

基因工程是生物技术的核心, 涉及基因片段的获取、基因克隆、基因转化、基因的体外修饰、转基因技术、基因表达及表达产物下游的大规模生产等。基因工程作为一门实践性和技术性都很强的课

程, 已经成为国内外高校生物技术、生物工程及相关专业本科生的核心专业课程。而基因工程实验教学是基因工程课程教学的重要内容。

纵观国内各高校基因工程实验课的传统教学内

收稿日期: 2013-07-15; 修回日期: 2013-08-21

基金项目: 《基因工程》国家精品课程建设项目(编号: 教高司函(2009)141号), 《基因工程》湖南省精品课程建设项目(编号: 湘教通[2008]202号)和湖南师范大学教学改革项目(编号: 校行发教字[2007]24号)资助

作者简介: 袁葵洲, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子发育遗传学与基因工程。E-mail: yuanwuzhou@aliyun.com

通讯作者: 邓云, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 斑马鱼遗传学与心血管疾病动物模型。E-mail: dengyun2008@aliyun.com

网络出版时间: 2013-9-12 1:05:49

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130912.0105.004.html>

容,一般主要包括DNA的提取、PCR扩增、感受态细胞制备与转化、质粒DNA提取以及DNA的酶切鉴定等与基因克隆技术相关的基础实验。由于生命科学领域功能基因组时代的研究成果日新月异,基因工程技术处于飞速发展的前沿,因此,对于生物技术人才培养的要求也应与时俱进。许多高校都在进行基因工程实验课教学内容的改革。例如,浙江大学采取综合大实验的模式,从DNA提取、PCR扩增、质粒提取、核酸酶切、重组质粒的构建与转化、阳性克隆的筛选至基因表达与Southern杂交的鉴定等,通过96小时的连续性实验,让学生充分理解、体会和掌握基因工程操作的完整流程(金勇丰,基因工程实验,浙江省精品课程,2009年)。又如复旦大学结合肿瘤分子遗传学的学科优势,将基因工程实验内容从原核细胞基因克隆扩充到哺乳动物细胞基因表达分析,注重实践教学与科学研究的接轨<sup>[1]</sup>。这些基因工程实验教学改革顺应了时代发展的需求,也深受学生们的欢迎,都取得了较好的成效<sup>[2-13]</sup>。

转基因动物制备是利用基因工程技术把外源目的基因导入动物的生殖细胞、胚胎干细胞或早期胚胎,使之在受体染色体上稳定整合,并能把外源目的基因传给子代个体<sup>[14]</sup>。但由于转基因动物制作的设备要求复杂、操作时间长、技术难度大、转基因得率低以及转基因后代表型鉴定周期长等原因,尚未见到国内高校的教学团队将转基因动物的制作用于本科生基因工程实验教学的报道。我们主要利用模式动物研究心脏发育的基因调控与心血管疾病发病的分子机制,研究室建立了成熟的模式动物果蝇、斑马鱼与小鼠的转基因技术平台,同时本教学团队主持的本科生基因工程课程教学项目建设也得到了省级和国家级教育部门的支持,因此,我们一直致力于将科研平台优势应用于本科生人才培养和实践教学的改革探索与实践。从2009年开始,我们尝试着将转基因斑马鱼的制作用于本科生基因工程实验教学的改革。目前,这个实践项目已经实施了3年,取得了非常好的成效,积累了较好的经验。

## 1 制备转基因斑马鱼的优点

斑马鱼(*Danio rerio*)是属于辐鳍亚纲(Actinopterygii)鲤科(Cyprinidae)短担尼鱼属(*Danio*)的一

种硬骨鱼,原产于印度东部、巴基斯坦、缅甸以及孟加拉国的小溪、稻田及恒河中游地区,是一种常见的热带观赏鱼,因其体侧具有像斑马一样纵向的暗蓝与银色相间的条纹而得名。斑马鱼体积小,成体只有1英寸长,所需空间小、成本低、饲养条件简单;生活史短,2~3个月即性成熟,生活周期容易控制;一对成年的斑马鱼每周可产卵一次,每次可产100~400颗卵,最多可达1000颗卵,后代群体大;体外受精,体外发育,受精胚胎发育快;而且斑马鱼胚胎大,卵透明,容易在体外进行观察和操作。斑马鱼组织器官的发生发育与人类相似,遗传背景比较清楚。斑马鱼的心脏、体节清晰,且与鸟类和哺乳动物不同,斑马鱼的胚胎并不需要完全依赖于功能正常的心脏血管系统才能生存,即使在一个完全缺乏血液循环的环境中,它们也可以通过被动呼吸得到足够的氧而生存,从而使斑马鱼模型成为研究心血管系统发育和遗传调控机理的理想模型<sup>[15]</sup>。

转基因斑马鱼的制备比其他转基因动物的制备具有明显的优点。首先,相比于转基因果蝇和转基因小鼠的制备需要程控注射仪、倒置显微镜和显微操作器等昂贵复杂仪器,制作转基因斑马鱼的仪器设备要求相对简单。我国是最早进行转基因鱼模型研究的国家,朱作言院士的团队早在1989年就首先报道了转基因鲫鱼的制作成功<sup>[16]</sup>。而且国内自行研发了一种简单实用的显微注射仪用于转基因鱼的制作,这种显微注射仪体积小,操作简单,价格便宜,配合一台普通体视显微镜就可以进行斑马鱼卵的显微注射。其次,斑马鱼胚胎大,数量多,胚胎收集和注射都可以用肉眼观察,便于初学者掌握。第三,斑马鱼胚胎发育时,1-细胞期停留时间长(约45分钟),便于初学者有足够的时间显微注射外源基因;同时,外源基因整合到胚胎基因组上的效率相对较高。尤其是将Tol转座子用于转基因斑马鱼的载体构建后,外源基因随机整合效率大大提高,转基因阳性比率可以达到20%以上。第四,荧光标记技术比较成熟,将含有外源基因的荧光标记基因重组载体注射到斑马鱼1-细胞期胚胎中,F<sub>0</sub>代就可以观察到嵌合体的荧光标记基因的表达,便于转基因表型的筛选和鉴定,且周期短。因此,将转基因斑马鱼的制作作为本科生基因工程综合实验课程进行开设具有很好的可行性。

## 2 在本科生基因工程实验课堂制备转基因斑马鱼的探索与实践

在我校, 基因工程课程通常是被安排在大三第五个学期开设。在前期, 学生已经完成了生物化学、细胞生物学、分子生物学和普通遗传学等基础专业课程的学习, 并且已经掌握了基因组 DNA 的提取、PCR 扩增目的基因、感受态细胞的制备与转化以及质粒 DNA 的提取与酶切检测等基础的分子生物学实验技术。在基因工程实验课程中, 我们为本科生开设了“转基因斑马鱼的制备”综合实验项目。

“转基因斑马鱼的制备”基因工程综合实验的主要设计思路是: 在构建好转基因重组表达载体的基础上, 利用经典的显微注射技术将带有目的基因和绿色荧光标记的重组表达载体或带有 GFP (Green fluorescent protein, 绿色荧光蛋白) 标记基因的空表达载体导入斑马鱼 1-细胞期胚胎, 使外源目的基因及 GFP 标记基因能够整合到斑马鱼胚胎细胞核中的染色体上, 并使目的基因和标记基因 GFP 同时表达; 通过荧光显微镜检测是否产生绿色荧光来判断外源基因是否整合和表达成功, 从而筛选和鉴定转基因后代或转基因的嵌合体。为了使转基因斑马鱼的表型鉴定简单快捷, 特意选用含有 GFP 标记基因的表达载体。这种表达载体除了含有 GFP 标记基因外, 在启动子与标记基因之间加入了多克隆位点 (Multiple cloning site, MCS) 和 IRES (Internal ribosome entry site, 内部核糖体结合位点) 序列, 便于外源目的基因与标记基因可以同时表达但又保证了各自表达的独立性<sup>[17]</sup>。实验共使用 3 种启动子的表达载体: 一是组成型启动子 CMV; 二是心脏和肌肉组织特异表达启动子 Titin; 三是心脏组织特异表达启动子 CMLC2。由于斑马鱼胚胎心脏比较小, 对于初学者来说, 不容易识别, 因此前两类载体用于本科生转基因斑马鱼的实验效果比较好。转基因斑马鱼表达载体的另一个优势是: 外源基因整合后, 在注射胚胎的 F<sub>0</sub> 代的嵌合体中就可表达, 从而使得转基因表型的初步鉴定可以在 48~72 小时之内完成。

“转基因斑马鱼的制备”综合实验的实验内容从构建含有外源目的基因的重组表达载体开始, 主要包括重组表达载体的构建, 重组表达载体及空表达载体的转化与酶切鉴定、表达载体质粒的大量提

取、性成熟斑马鱼的饲养与管理、斑马鱼受精卵的收集、显微注射制备转基因斑马鱼以及转基因斑马鱼的表型鉴定等, 实验总课时 34 学时, 1 周内连续完成。提前一周购买或自行准备性成熟期的雌性斑马鱼 400 条, 雄鱼 400 条, 分开饲养与环境适应管理一至两周。实验第一天将已经提前构建好的含有外源基因的重组表达载体进行转化实验, 第二天对重组质粒进行酶切鉴定, 第 3 天对重组质粒进行大量提取, 第四天进行斑马鱼雌雄鱼杂交并收集斑马鱼胚胎, 及时进行显微注射, 第六天 (显微注射 48 小时后) 对转基因后代嵌合体进行荧光表型鉴定。

为了这一综合实验项目的顺利开设, 我们在生物学实验中心专门为本科生建立了一个转基因斑马鱼实验室, 包括一个斑马鱼养殖房和一个显微注射室。斑马鱼养殖房包括斑马鱼饲养缸 12 套、水循环系统一套、制水机一套、胚胎孵化槽 12 个, 同时配备有操作台面收集鱼卵。显微注射室包括 12 套显微注射仪, 12 台体视显微镜、1 台拉针仪等。3 年来, 共对 2008 级、2009 级、2010 级 3 个年級的 6 个国家生命科学技术人才培养基地班和 3 个生物技术专业的约 270 名学生开设了这一综合实验。实验操作时, 每个实验班 30 人, 学生每 3 个人分成一组操作, 斑马鱼的管理和饲养、收集鱼卵、装针、上样、注射以及注射后胚胎的孵育与管理、转基因阳性后代的鉴定等操作由 3 个人配合完成。

## 3 转基因斑马鱼的制备引入本科生基因工程实验教学的成效

从将转基因斑马鱼的制作引入本科生基因工程实验教学实施 3 年的效果来看, 成效非常明显。首先, 学生参与的积极性很高, 兴趣非常浓厚。同学们评价说: “基因工程实验相当的吸引人”、“大家兴趣都很高”、“很神奇”等等。其次, 制备转基因斑马鱼综合实验从构建载体到质粒提取、到受体准备、再到显微注射和转基因表型鉴定等整个环节的实施使学生们对基因工程的完整流程了然于心, 通过实践加深了对理论课学习的认识。第三, 荧光心脏和荧光肌肉及通体荧光转基因斑马鱼的获得与鉴定, 快捷方便, 使学生消灭了转基因动物的神秘感, 增强了学生们从事基因工程操作的自信。这种自信从

这些学生后续研究生免试推荐和找工作的面试选拔中也得到了肯定。第四,斑马鱼卵显微注射和转基因后代荧光表型鉴定相对操作简便、成功率高、时间短、操作可行性强。第一年我们使用 CMV 启动子的转基因载体,转基因得率非常高,每个实验组都得到了显示绿色荧光的转基因阳性后代,有些实验组的阳性后代获得率达到了 20%。

当然,在转基因斑马鱼实验项目的实施过程中,也遇到了一些小问题及应当特别注意的细节与注意事项,主要表现在:第一、为得到转基因后代个体,理想的显微注射时期应该是 1-细胞期,即从斑马鱼产卵到鱼卵收集到完成显微注射,必须在 30~45 分钟之内完成。由于学生第一次操作显微注射仪,技术不熟,操作生疏,操作速度慢,绝大部分同学很难保证在规定时间内完成注射,导致转基因后代阳性率偏低。第二、显微注射有一定的技术难度,操作过程中会经常遇到针管堵塞或断针等情况,需要有经验的老师随时处理与指导。同时由于针管堵塞,也容易导致注射针和 DNA 溶液浪费比较大,要求材料准备很充分。第三,斑马鱼卵透明,周围包裹一层卵膜,尤其在 1-细胞期,细胞小,卵黄大,学生可能很难将 DNA 溶液注射进细胞中,而绝大多数同学是将 DNA 溶液注射到卵黄中。为了保证 DNA 溶液能有效进入细胞, DNA 溶液中最好加入颜色指示剂,如酚红,便于学生直接观察 DNA 注入的位置。

总之,转基因动物技术虽然是基因工程技术中最难和最复杂的技术之一,但是制备转基因斑马鱼相对来说操作难度系数不大,容易被初学者快速学习和掌握,条件要求不高,建立实验室所需的设备和仪器花费相对便宜。转基因斑马鱼载体的丰富的荧光标记基因使得转基因后代鉴定快捷直观,学生参与兴趣浓厚。此外,本科生转基因斑马鱼制作基因工程综合实验也可以与科研相结合,通过构建与课题相关的目的基因的载体,由本科生在实验课堂完成显微注射和转基因阳性后代表型筛选和鉴定,后续回交建系就可以得到稳定的转基因斑马鱼的品系。本科生在基因工程实验课堂掌握了转基因斑马鱼的操作技术之后,还可以提前进入相关研究室开展创新实验和毕业论文的研究工作。综上,将转基因斑马鱼的制备引入基因工程实验课堂教学的可行性和

实用性都非常强,可以在有条件的院校推广应用。

#### 参考文献(References):

- [1] 吴燕华,郭滨,姜慧玲,崔玉良,顾惠娟,乔守怡. 从基因克隆到表达分析——改革基因工程实验课程的实践与体会. 遗传, 2012, 34(2): 248-252. [DOI](#)
- [2] 张玉山,张麟飞,关伟雄,黎嘉文. 基因工程实验教学改革的实践探索. 实验科学与技术, 2011, 9(2): 94-96. [DOI](#)
- [3] 袁葵洲. 讨论式教学法在基因工程课堂教学中的应用. 中国科教创新导刊, 2009, (32): 53-54. [DOI](#)
- [4] 黄秀梅,王雅英,叶子坚. 基因工程综合实训教学改革与创新. 微生物学通报, 2012, 39(1): 117-120. [DOI](#)
- [5] 吴杨,王继华. 基于创新人才培养模式的大学基因工程理论教学改革探索. 广东农业科学, 2011, 38(1): 214-216. [DOI](#)
- [6] 马利兵,王凤梅. 基因工程教学改革的探索与实践. 新课程研究(高等教育), 2011, (1): 100-101. [DOI](#)
- [7] 唐培安. 《基因工程》教学方法改革的探索. 安徽农学通报, 2011, 17(23): 179-180, 185. [DOI](#)
- [8] 李雅轩,赵昕,张飞雄,胡英考,晏月明,蔡民华,李小辉. 案例在遗传与优生教学中的应用. 遗传, 2012, 34(5): 647-650. [DOI](#)
- [9] 雷小英,向安,刘永兰,汪钦,梁平,赵锦荣,郭曼海,张菊,颜真. 本科生基因工程教学改革初探. 基础医学教育, 2012, 14(9): 669-671. [DOI](#)
- [10] 张继星,陈永胜,黄凤兰. 基因工程课程教学改革现状及对策研究. 淮海工学院学报(人文社会科学版), 2012, 10(7): 85-86. [DOI](#)
- [11] 魏麟,刘胜贵,付明,邹娟,向孙军,牛友芽. 基因工程实验教学改革的实践探析. 怀化学院学报, 2012, 31(2): 94-96. [DOI](#)
- [12] 齐凤慧,詹亚光. 《基因工程》实验教学改革的探索. 实验科学与技术, 2008, 6(1): 111-113, 140. [DOI](#)
- [13] 许崇波,迟彦,高凤山. 基因工程实践教学改革的探索. 实验科学与技术, 2008, 6(4): 109-112. [DOI](#)
- [14] 袁葵洲主编. 基因工程. 北京: 化学工业出版社, 2010. [DOI](#)
- [15] 姜孝成主编,莫湘涛,刘如实,邓学建,袁葵洲副主编. 生物学实验教程——现代生物技术与应用实验. 北京: 中国科学技术出版社, 2011. [DOI](#)
- [16] 朱作言,许克圣,谢岳峰,李国华,何玲. 转基因鱼模型的建立. 中国科学(B辑), 1989, (2): 147-155. [DOI](#)
- [17] 陈婷芳,罗娜,谢华平,吴秀山,邓云. 利用 Tol2 转座子构建斑马鱼心脏组织特异表达转基因载体及其表达分析. 生物工程学报, 2010, 26(2): 230-236. [DOI](#)