

“全鱼”M_x 基因重组构建与转导分析

周 伟¹, 肖调义¹, 苏建明², 刘巧林¹, 刘 敏¹, 姚一彬¹, 许宝红¹

(1. 湖南农业大学 动物科学技术学院 湖南 长沙 410128; 2. 湖南农业大学 动物医学院 湖南 长沙 410128)

摘要: 通过分子重组将鲫 Mx1 基因的编码序列克隆到鲤 β 肌动蛋白基因启动子下游, 构建成能在鱼体内表达的转“全鱼”M_x 基因的重组分子。采用显微注射方法, 将含有鲤 β 肌动蛋白基因启动子和鲫 Mx1 基因序列的重组片段转入草鱼受精卵中, 经人工孵化和养殖获得转全鱼 M_x 基因草鱼。经 PCR 和 Southern 杂交检测分析, 证实重组分子成功整合到 2 月龄转基因草鱼基因组中, 为草鱼抗病育种研究奠定了基础。

关键词: 基因重组; “全鱼”M_x 基因; PCR; Southern 杂交

中图分类号: Q813.7, S943.112.41

文献标志码: A

文章编号: 1674-3075(2013)01-0063-06

草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 是我国重要的淡水养殖鱼类之一, 在我国淡水养殖中占有重要地位。由于种质资源衰退、人工养殖环境恶化等原因导致草鱼抗病性能下降, 养殖成活率低, 每年病毒性和细菌性病害导致的大规模死亡, 给草鱼养殖业带来巨大的经济损失。虽然近年来在草鱼病原研究和疫苗研制方面取得了巨大的成绩, 但在运用常规选择、杂交的方法培育抗病草鱼新品系方面没有取得突破性进展。与传统的杂交选育方法相比, 转基因育种方法既克服了物种间杂交的不亲和性, 又能根据目的基因的特点和功能定向地改变养殖品种, 缩短育种周期。转基因育种的研究越来越广泛, 国内外对转基因鱼的研究目前主要是集中在促进快速生长(汪亚平等, 2001; 冯浩等, 2011)、抗冻(GONG et al, 1995; DEVLIN et al, 1995)、荧光发光(苏建明等, 2003; 简清等, 2004) 转基因和鱼类抗病育种研究(钟加玉等, 2001; Jiayu et al, 2002; Mao Weifeng et al, 2004; B Guan et al, 2011) 方面。但转“全鱼”基因的抗病育种的研究报道很少, 根据一些提高生长方面的转“全鱼”基因鱼的研究, 转“全鱼”基因鱼比非转“全鱼”基因鱼的基因效应更为明显。

抗粘液病毒蛋白 (myxovirus resistant, Mx) 是一类相对分子质量在 70 ~ 80 kD 的蛋白质, 是干扰素诱导表达的蛋白家族中的成员, 在体内由 I 型干扰

素 (Interferon, IFN) 诱导产生, 具有三磷酸尿苷酶 (GTPases) 水解活性。研究表明其具有广谱抗病毒作用, 当机体受到病毒侵染或其他因子诱导处理时, M_x 蛋白的表达量上调, 和其他干扰素诱导蛋白一起构成宿主细胞的抗病毒状态, 能达到抗病毒的目的 (Lindenmann, 1962; Staehli et al, 1986)。

很多学者先后对 M_x 蛋白的抗病毒性进行了报道和阐述(张义兵等, 2001; 吴海丽等, 2009; 孙业平等, 2010), 并且目前已在多种鱼类中发现的 M_x 蛋白具有抗病毒活性, 如黄点鲈鱼 (*Epinephelus coioides*) (Chen et al, 2006)、大菱鲆 (*Psetta maxima*) (Abollo et al, 2005)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (Trobridge et al, 1995; Trobridge et al, 1997)、大西洋鲑 (*Salmo salar* L) (Lockhart et al, 2004)、沟鲈 (*Ictalurus punctatus*) (Plant et al, 2004) 等。

在鱼类抗病基因 M_x 基础上培育出草鱼抗病新品系在生产中具有巨大的应用价值和广阔的市场前景。本研究以鲫 Mx1 基因为目的基因, 克隆其编码序列, 构建转“全鱼”M_x 基因重组载体并导入草鱼受精卵中, 以期获得抗病性强的转基因草鱼。随后, 对获得的 P0 代转基因草鱼进行分子检验, 验证外源基因的整合, 为转基因草鱼抗病育种提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

鲤 β 肌动蛋白基因启动子由中国科学院水生生物研究所朱作言院士提供, 启动子被克隆在 Puc118 质粒的 Hind III 和 BamH I 位点 (Puc118-cap), 保存于本实验室。草鱼受精卵由浏阳乌龙鱼种繁殖基地提供。大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存, pEASY-T5 Zero 克隆载体购于北京全式金生物

收稿日期: 2012-11-19

基金项目: 国家“863 计划”项目 (2011AA100404); 农业部大宗淡水鱼类产业技术体系常德综合试验站资助项目 (CARS46-42)。

通讯作者: 肖调义, 男, 教授。E-mail: tyx1128@yahoo.com.cn

作者简介: 周伟, 1986 年生, 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物抗病育种研究。E-mail: zwzhouwei32@126.com

技术有限公司,限制性内切酶和 T4 连接酶购于上海生工生物公司。

1.2 方法

1.2.1 鲫 Mx1 基因开放阅读框的克隆及序列分析

参照 GenBank 中鲫 Mx1 基因的全长序列(登录号:AY303813.1),用 Primer Premier5.0 软件设计引物,上游引物 JMX-F:5'CGGGATCCATGGAGAAAT-GAGTTACAC3 和下游引物 JMX-R: 5' CGCAAT-TCCTAAAAGGTAACCAAGAGGC 3',其中上游引物含 BamH I 酶切位点(实线所标)和起始密码子,下游引物含 EcoR I 酶切位点(实线所标)和终止密码子的互补序列。

取适量鲫脾脏组织,提取总 RNA,用 Rever-tAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA,作为模板进行 PCR 扩增,程序为:94℃ 5 min; 94℃ 30 s; 48℃ 30 s; 72℃ 2 min ; 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后进行凝胶回收,将回收产物与 pEASY-T5 Zero 克隆载体连接,转化到 Trans1-T1 感受态细胞中,涂布于含有氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板,37℃ 恒温培养过夜,挑单个克隆菌落接种于含有 Amp 的 LB 液体培养基,37℃,180 r/ min 震荡培养 8~12 h。以菌液为模板,用通用引物 M13 进行 PCR 检测,阳性克隆菌液送深圳华大基因有限公司测序。

1.2.2 鲫 Mx1 基因重组载体构建 鲫 Mx1 基因重组载体构建过程见图 1。将测序正确的质粒(JMx1-T5 质粒)用限制性酶切酶 BamH I 和 EcoR I 进行双酶解,琼脂糖凝胶回收 1.9 kb 左右的片段,再将这段片段克隆到鲤 β 肌动蛋白基因启动子的 pUC118 的 BamH I 和 EcoR I 位点。连接后的分子转化到感受态大肠杆菌 DH5α 中,转化细菌涂布于加有 Amp ,X-Gal 及 IPTG 的平板上培养过夜,随机挑取白斑接种于含有 100 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 恒温培养过夜。小量制备重组质粒,用 BamH I 和 EcoR I 双酶解验证。保存阳性菌液。

1.2.3 重组子的显微注射转化 大量制备重组质粒,用限制性内切酶 Pvu II 将重组子线性化,并回收重组片段(即包含鲤启动子和鲫 Mx1 基因序列的片段,约 4.4 kb),备用。采用显微注射法,将重组片段注射到人工授精的草鱼受精卵中,人工繁育获得转基因草鱼群体。

1.2.4 转导的阳性检测与分析 从 2 月龄转“全鱼”Mx 基因草鱼中随机取 200 尾,分别剪取尾鳍,用

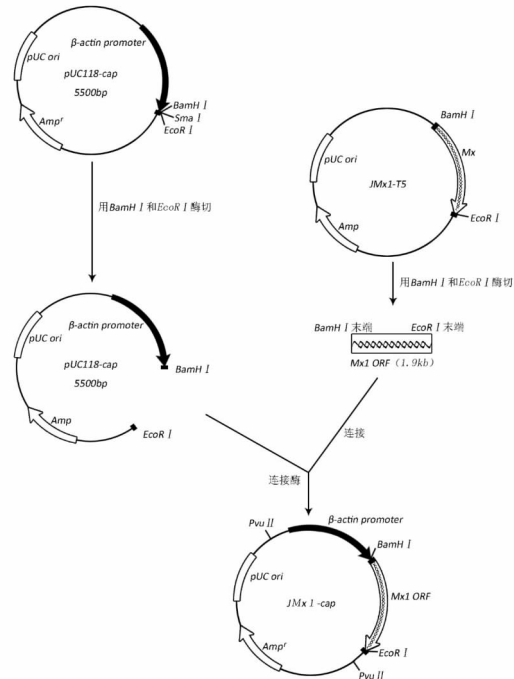


图 1 全鱼 Mx1 基因重组载体构建

Fig. 1 Construction of all-fish Mx Gene Recombinant

Dzup 基因组 DNA 抽提试剂提取基因组 DNA,根据鲫 Mx1 基因开放阅读框序列,设计 1 对特异引物, JF: 5' CATTGATGACCCAGCAGAAGTG 3'和 JR: 5' AGGCAGGGATTTCTGAATGTGA 3';对基因组 DNA 进行 PCR 扩增检测,程序为:94℃ 5min; 94℃ 30 s; 58℃ 30 s; 72℃ 1 min 30 s ; 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。根据扩增结果统计该样本群体的阳性转导率。提取并纯化经 PCR 检测为阳性的草鱼基因组 DNA,纯化回收用 PCR 扩增得到的特异产物,将其做为杂交探针,按照罗氏公司 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 的操作进行 Southern 杂交。

2 结果

2.1 鲫 Mx1 基因开放阅读框的扩增

采用引物 JMxF 和 JMxR,从鲫脾脏组织中扩增得到 1 条单一条带约 1.9kb(图 2),克隆菌液经菌液 PCR 初步检测鉴定(图 3),测序、比对分析扩增片段为鲫 Mx1 基因的开放阅读框序列。

2.2 重组载体的构建及酶切鉴定

提取重组菌液质粒,用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切检测,有 1.9 kb 片段和 5.5 kb 片段;用 Pvu II 进行单酶切检测,有 4.4 kb 片段和 3.0 kb 片段,与预期的片段大小一致。

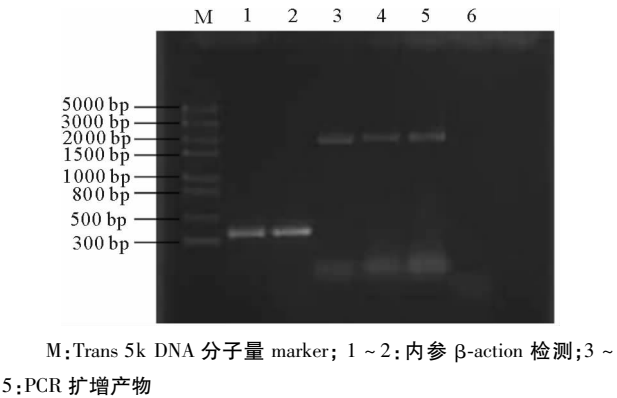


图 2 PCR 扩增鲫 Mx1 基因开放阅读框

M: Trans 5k DNA marker; 1~2:β-action ;3~5: PCR products of mx1 gene open reading frame

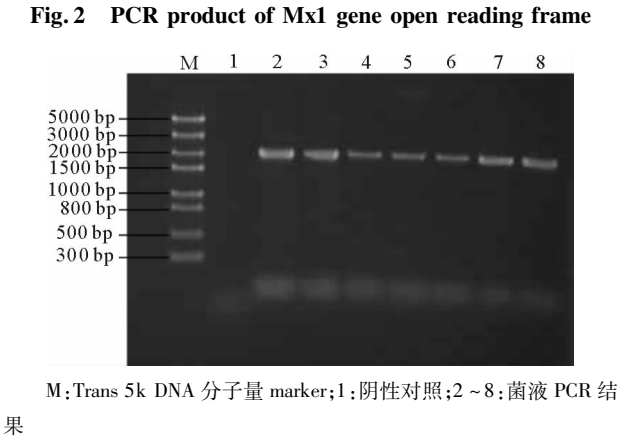


图 3 菌液 PCR 检测

M: Trans 5kDNA marker;1:negative control; 2~8: product of colony PCR

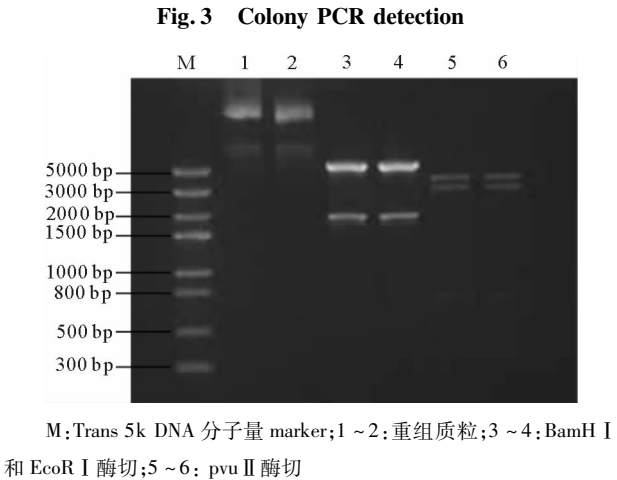


图 4 重组质粒及酶切分析

M: Trans 5k DNA Maker;1~2: recombinant plasmid;3~4:restriction enzyme digested Plasmid with BamH I and EcoR I ;5~6: restriction enzyme digested Plasmid with pvu II

2.3 全鱼 Mx 基因转导

用限制性酶切酶 Pvu II 线性化重组质粒,回收

包含鲤 β 启动子和鲫 Mx1 基因序列的片段,约 4.4 kb,显微注射转入草鱼受精卵中,人工繁育后共获得转基因鱼苗群体约 1 400 尾。

2.4 转全鱼基因草鱼的分子鉴定

2.4.1 PCR 扩增 经 PCR 扩增检测,在随机抽取的 200 尾 2 月龄转基因草鱼中共有 78 尾鱼能扩增到 625 bp 的特异片段,群体阳性率为 39%。初步说明重组片段整合到草鱼基因组中(图 5)。

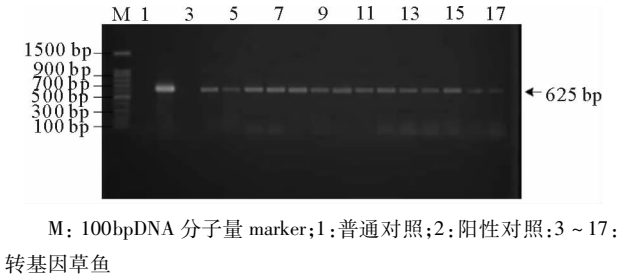


图 5 转基因草鱼基因组 DNA 的 PCR 检测

M:100bpDNA marker;1:普通对照;2:阳性对照;3~17:转基因草鱼

2.4.2 Southern 杂交 Southern 杂交结果显示阳性对照有明显的杂交条带(图 6)。3、4、6 有单一的杂交条带,外源基因至少有 1 个拷贝;5、7 出现 2 条杂交条带,说明外源基因至少有 2 个拷贝;8 没有明显的条带,说明 PCR 结果为假阳性。

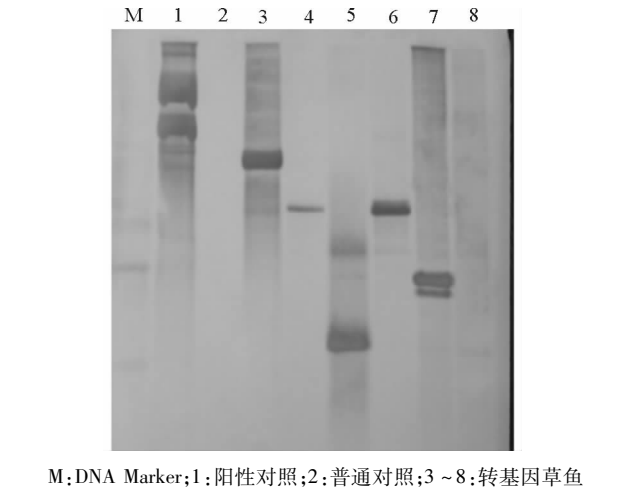


图 6 Southern 杂交结果

M:DNA Marker ;1: positive control; 2: common control ; 3~8: transgenic sample

3 讨论

随着第一批转基因鱼研制成功(朱作言等, 1985),转基因鱼逐渐成为研究热点,研究者们以期用转基因的手段来获得性状优良的鱼类品系,促进

水产养殖业的良好发展。转基因鱼研究的最初阶段主要是将不同生物体,如细菌、病毒、其他动物乃至人类的基因导入鱼体内。近年来,随着转基因鱼研究的逐渐深入,研究人员克隆了鱼类自身的高效启动子,主要为鲤 MT 启动子、鲤 β -肌动蛋白启动子和抗冻蛋白基因启动子(叶星等,2011),以及鱼类自身某种基因如生长激素基因、荧光蛋白基因、抗冻蛋白基因和抗病基因等,构建“全鱼”基因重组载体。转全鱼基因鱼的推广,不仅能提高外源 DNA 的整合和表达,并且从生物安全角度考虑,能提高转基因鱼的社会认可性和可接受性(纪伟等,2004)。

鱼类基因转移方法多种,包括显微注射法、电脉冲法、精子携带法、基因枪注射法、逆转录病毒感染法以及基因打靶法等(潘庭双等,2003)。其中,显微注射法是鱼类转基因操作的主要方法。通过显微注射法得到的转基因鱼类,外源基因在鱼体内的整合是随机的,整合位点具有随机性,但是从总体的整合方式来看,包括单个拷贝在单一位点整合、多个拷贝串联后在单一位点整合和单个或多个拷贝在多位点整合3种方式(曾凡锁等,2004)。针对这种随机性,很多学者开始了对转基因整合机制的研究(吴波等,2003;Dai J et al,2010;Hu Wei et al,2010),推测整合位点可能存在一定的位置效应,整合位点区可能具有共同的序列特征。目前最直接有效的方法就是克隆转植基因序列和整合位点序列,对转植基因整合的旁侧 DNA 碱基序列进行比较分析,以便了解转植基因的整合情况。姜鹏等(2010)对转红色荧光蛋白(RFP)基因唐鱼(*Tanichthys albonubes*)进行转植基因的整合、连接方式等的研究,结果表明,RFP 基因是以多拷贝(2~3个)在单一位点、头尾相接的串联体形式整合,应用基因组步移技术,克隆获得整合位点两侧侧翼序列,经过序列分析,5'端侧翼区为宿主唐鱼基因组序列,3'端侧翼序列与 P1 噬菌体部分基因组序列同源性达到 99%。Mitchell 等(2006)对转生长激素(GH)基因大麻哈鱼进行侧翼序列的研究分析,发现转植基因整合位点的下游序列与血吸虫(*Schistosoma japonicum*)CA 膜蛋白基因序列同源,生长激素基因与 CA 膜蛋白基因同为外源性基因并在相同位置整合连接,从而得出在宿主基因组中可能存在整合“热点”的结论。

虽然目前有关外源基因在动物基因组中的整合机制尚未完全研究清楚,但已有了良好的开端。随着生物技术的进步和研究水平的不断提高,转基因整合位点的研究将有较大发展,这也将为解决转基

因研究中的整合机制、基因的表达调控等瓶颈问题带来重大突破,转基因最终将做到人为控制、诱导和筛选并获得符合人类改造目标的优良性状生物新品种,成为一种高效的人为遗传改良手段。

本研究通过分子重组的方法构建转“全鱼”基因重组载体,利用显微注射的方法将外源鲫 Mx1 基因编码序列导入草鱼体内,获得转“全鱼”基因草鱼,并通过 PCR 和 Southern 杂交验证外源基因整合到 P0 代草鱼基因组中,为下步继续研究转“全鱼”Mx 基因草鱼的抗病性打下基础,其最终目标是获得转“全鱼”Mx 基因抗病草鱼品系,为在满足食用安全、生态安全和环境释放等条件下进行转“全鱼”Mx 基因抗病草鱼的产业化应用准备好材料。

参考文献

- 冯浩,傅永明,吴慧,等. 2011. 转青鱼生长激素基因日本白鲫原代的研制[J]. 生命科学研究, 15(2):158-164.
- 纪伟,张培军. 2004. 转“全鱼”溶菌酶基因大菱鲆的研究[J]. 海洋科学,28(5):8-14.
- 简清,白俊杰,叶星,等. 2004. 转红色荧光蛋白基因斑马鱼的构建[J]. 动物生物技术通讯, 9(1):317-320.
- 姜鹏,陈敏,白俊杰,等. 2010. 外源性红色荧光蛋白基因(RFP)在转基因唐鱼中的整合分析[J]. 农业生物技术学报,18(5):968-974.
- 苏建明,章怀云,肖调义,等. 2003. 绿色荧光蛋白基因重组子的构建及其在鱼类受精卵中的表达[J]. 水产学报,27(5):409-414.
- 潘庭双,龙良启. 2003. 转基因鱼的研究进展[J]. 水利渔业, 23(5):35-37.
- 孙业平,高福. 2010. 天然免疫抗病毒效应分子 Mx 蛋白的结构与功能研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,37(7):699-706.
- 汪亚平,胡炜,吴刚,等. 2001. 转“全鱼”生长激素基因鲤鱼及其 F1 遗传分析[J]. 科学通报, 46(3):226-229.
- 吴海丽,刘莉. 2009. 鱼类 Mx 蛋白的研究进展[J]. 安徽农业科学, 37(28):13655-13657.
- 吴波,朱作言. 2003. 转基因动物整合位点的研究进展[J]. 遗传,25(1):77-80.
- 叶星,田园园,高凤英. 2011. 转基因鱼的研究进展与商业化前景[J]. 遗传 HEREDITAS(Beijing), 33(5):494-503.
- 曾凡锁,詹亚光. 2004. 转基因植物中外源基因的整合特性及其研究策略[J]. 植物学通报, 21(5):565-577.
- 张义兵,桂建芳. 2001. 干扰素诱导的鱼类 Mx 蛋白[J]. 中国病毒学,16(4):291-298.
- 钟加玉,朱作言. 转人乳铁蛋白基因草鱼抗 GCHV 的初步研究[J]. 水生生物学报,2001, 25:528-530.

- Abollo E, Ordas C, Dios S, et al. 2005. Molecular characterisation of a turbot Mx cDNA [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 19 (2): 185 – 219.
- B Guan, H Ma, Y P Wang, et al. 2011. Vitreoscilla Hemoglobin (VHb) Overexpression Increases Hypoxia Tolerance in Zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Marine Biotechnology*, 13: 336 – 344.
- Chen YM, Su YL, Lin JH, et al. 2006. Cloning of an orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) Mx cDNA and characterisation of its expression in response to nodavirus [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 20(1): 58 – 71.
- Dai J, Cui X, Zhu Z, Hu W. 2010. Non-Homologous End Joining Plays a Key Role in Transgene Concatemer Formation in Transgenic Zebrafish Embryos [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 6: 756 – 768.
- DEVLIN R H, YESAKI T Y, DONALDSON E M, et al. 1995. Production of germline transgenic pacific salmonids with dramatically increased growth performance [J]. *Can J Fish Aquaculture*, 52: 1376 – 1384.
- GONG Z, HEW C L. 1995. Transgenic fish in aquaculture and developmental biology. *Current topics in developmental biology* [J]. Academic Press, 30: 177 – 214.
- Hu Wei and Zhu Zuoyan. 2010. Integration mechanisms of transgenes and population fitness of GH transgenic fish [J]. *Science in China Ser C-Life Sci*, 53: 401 – 408.
- Jiayu Zhong, Yaping Wang, Zuoyan Zhu. 2002. Introduction of the human lactoferrin gene into grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) to increase resistance against GCH virus [J]. *Aquaculture*, 214: 93 – 101.
- Lindenmann J. 1962. Resistance of mice to mouse adapted influenza A virus [J]. *Virology*, 16: 203 – 204.
- Lockhart K, Gahlawat SK, Soto-Mosquera D, et al. 2004. IPNV carrier Atlantic salmon growers do not express Mx mRNA and poly I:C-induced Mx response does not cure the carrier state [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 17(4): 347 – 352.
- Mao Weifeng, Wang Yaping, Wang Wenbo, et al. 2004. Enhanced resistance to *Aeromonas hydrophila* infection and enhanced phagocytic activities in human lactoferrin-transgenic grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Aquaculture*, 242: 93 – 103.
- Mitchell U, Jaswinder K, Robert H D. 2006. Transgene constructs in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) are repeated in a head-to-tail fashion and can be integrated adjacent to horizontally-transmitted parasite DNA [J]. *Transgenic Research*, 15: 711 – 727.
- Plant KP, Thune RL. 2004. Cloning and characterisation of a channel catfish (*Ictalurus punctatus*) Mx gene [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 16(3): 391 – 405.
- Staehli P, Haller O, Boll W, et al. 1986. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus [J]. *Cell*, 44(1): 147 – 158.
- Trobridge GD, Leong J C. 1995. Characterization of a rainbow trout Mx gene [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 15: 691 – 702.
- Trobridge GD, Chiou P P, Leong J C. 1997. Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells [J]. *J Virol*, 71: 5304 – 5311.
- Zhu Z, Li G, He L, et al. 1985. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L.) [J]. *Z Angew Ichthyol*, (1): 31 – 34.

(责任编辑 张俊友)

Construction and Transference of “all-fish” Mx Gene Recombinant

ZHOU Wei¹, XIAO Tiao-yi¹, SU Jian-ming², LIU Qiao-ling¹, LIU Ming¹, YAO Yi-bin¹, XU Bao-hong¹

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China;
2. College of Animal Medical, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract: The coding sequence of Mx1 gene of *Carassius auratus* was cloned under the control of carp β -actin gene promoter by molecular restructuring, then an all-fish Mx gene recombinant was constructed. The recombinant gene was transferred into fertilized zygotes of grass carps by micro-injection. A group of all-fish transgenic grass carps were obtained. Polymerase chain reaction (PCR) technology and Southern blot were carried out on treated grass carps fry (two months). It verified that all-fish Mx gene had integrated into the genome of grass carps. It settled the stage for disease-resisted breeding for grass carps.

Key words: Gene recombinant; “All-fish” Mx gene; PCR; Southern blot