

转 基 因 鱼

——生物及技术方面的若干问题

Kenjiro Ozato, Koji Inoue, Yuko Wakamatsu

Ozato, K., 张林

Q959.4

随着 70 年代基因工程的迅猛发展,人们可以得到真核细胞的基因,通过体外实验也积累了结构与功能方面的大量信息。然而基因存在并起作用于活体内,仅仅依靠体外实验显然是不足取的。到 80 年代早期,产生了一项革命性的技术,这就是将外源基因显微注射到受精卵,产生携带外源基因的动物品系,并追踪该基因在体内的功能。这种携带有外源基因的动物称为“转基因动物”。目前已有多种转基因动物:线虫、果蝇、海胆、两栖动物、小鼠以及家养动物。对小鼠和果蝇而言,此项技术发展得尤为完善,现已作为一种可行手段,用来研究发育生物学、免疫学、神经生物学和肿瘤学的遗传过程,产生有益于生物学和医学研究的新的实验动物。转基因技术应用到鱼类是近年来才开始的,尽管人们的兴趣日渐浓厚,迄今尚未得到令人满意的结果。1987 年曾发表过一篇有关初始阶段研

究的综述文章,此后鱼类转基因技术有了明显的进展,表明可解决水产学和基础生物学的一系列问题。在此,我们综述了转基因鱼的研究现状,首先简单概述鱼类转基因实验的特点,提出水产学和基础生物学研究的四条途径,最后根据作者近来的研究,描述用青鳞研究发育过程中基因表达的可行性。

(一) 鱼类转基因研究的特点

我们总结了由 11 个工作小组完成的 12 篇研究报道。有 10 份与水产学有关,其中 7 篇涉及到将哺乳动物生长激素基因转入鱼类,刺激鱼类生长。另外两篇是促进鱼类生长的方法学报道。小鼠及其它家养动物如兔子、山羊和猪都已产生了携带有外源生长激素基因的转基因动物。通过导入大鼠生长激素基因产生的“超级小鼠”,是正常小鼠大小的两倍。将抗冻蛋白基因导入鲑鱼,使它具有抵抗低温的能力,能在冰

水中生活。这类实验皆可赋予动物具有抵抗环境的能力,从而扩大其栖息地,特别适用于鱼类。仅有两篇涉及到基础生物学,即发育遗传学和发育生物学的报道,是用小型淡水鱼作研究材料的。因此,目前转基因鱼研究主要侧重于水产学,很明显它可作为选育有重要经济价值鱼类的一项水产生物技术,这显然不同于其它动物,因为后者主要侧重于基础生物学研究。

除了抗冻蛋白基因,鱼类的任何基因和启动子至今尚未得到应用,这反映了鱼类基因分子生物学研究相当肤浅,极少量的基因和启动子可用于转基因实验。

小鼠转基因实验技术的发展经历了三个阶段:整合到宿主染色体,表达以及外源基因种系传递,后者在80年代早期已经完成。至今没有一个鱼类实验将三者结合起来,许多实验停留在整合阶段,少数做到表达乃至种系传递。注射到卵的外源基因,在胚胎、鱼苗和成体组织内均可检测到,被称为“整合型”。但是,并不能排除注入基因染色体外复制的可能性。尽管小鼠很少有这种现象,线虫、海胆和两栖动物均有染色体外复制的报道。

鱼类所具有的许多独特生物学性质构成了它转基因实验的特点。

1. 鱼类通常行体外受精,这简化了胚胎实验,不需象小鼠进行培养受精卵并移置到养母这类复杂的操作。某些鱼种的卵具有透明的卵壳,在胚胎发生过程中,很容易观察到发育的胚胎并对它进行实验操作。

2. 小鼠实验中,DNA显微注射到受精卵的雄性原核,每个卵几百个拷贝基因。然而,鱼类实验中,肉眼识别受精卵的核是困难的。显微注射通常注射到卵细胞质,基因用量相当大,某些情形下,达到每个卵几亿拷贝数。细胞质注射较易进行,对个体发育的损伤较小,因此注射过的鱼类胚胎存活率也比小鼠高得多。细胞质注射的唯一例外是青鳉,它在显微镜下可清楚地分辨出卵母细胞的核泡(germinal vesicle),显微注射可直接注入核泡。

3. 许多鱼有坚硬的卵壳,因而需要采用一种特殊的方法,将显微针插入卵内。插入显微针之前,虹鳟鱼和鲑鱼的卵上可用粗针开一个口。大西洋鲑鱼和罗非鱼卵上有一开口,是受精时精子进入的通道,显微针可由此插入。金鱼和泥鳅的卵壳用胰蛋白酶可消化除掉,斑马鱼的卵壳用镊子可人工除去。某些种类的鱼,如鲑鱼和鳟鱼,它们的卵壳是不透明的,显微针插入细胞质很难确证。相反,青鳉和斑马鱼由于卵壳透明,显微注射过程很容易观察到。

(二) 水产学和基础生物学研究

目前转基因鱼研究主要侧重于刺激生长,低温抗性、插入诱变和发育基因表达四个方面。本节选择典型实验及其数据概述四个方面的研究现状,以转基因小鼠作对照。

1. 刺激生长 Chourrout 等人应用基因转移技术将哺乳动物生长激素基因转移到鱼类,刺激鱼类生长,这是一项典型实验。该研究小组于1986年报道了将哺乳动物生长激素 cDNA 整合到虹鳟鱼体内。实验中,人工受精的卵和精子取自3—4年的成体鱼,受精后2—6小时这段时间内,卵介于形成胚盘和第一次分裂前期的中间状态。此时将外源基因显微注射到卵细胞质的动物极。第二步显微注射法可克服卵壳的坚硬:首先要直径50微米的微量吸管在卵壳上钻一大小10微米的狭孔,通过它10微米的显微针可插入细胞质内。20纳升溶液中含有200皮克DNA,即 SV_{10} 启动子——人生长激素的融合基因,在5秒钟内也就随之注入了。采用这种方法,每小时可处理30个卵。孵化注射过的胚胎,存活率达77%,所检测到的外源基因的比率也相当高,使用线状质粒时,存活率中的75%可检测到;使用环状质粒时,有40%可检测到。外源基因注射到细胞质,基因在小鼠体内的整合频率不高,虹鳟鱼的高整合频率或许是由于注射了大量的DNA的缘故。

最近该研究小组报道,在卵内注射2亿拷贝哺乳动物生长激素基因,其中60%发育成鱼,50%以上的成体鱼保留了外源基因。15个被分析的雄性鱼中,有8个将外源基因传递到

约 20% 的子代中。他们根据这些数据指出：质粒整合到母体基因组是镶嵌式的，发生在发育早期。实验中所测鱼体内均未发现生长激素。因此，将外源基因导入虹鳟鱼及其品系转移这项研究的成功，为产生具有重要经济价值的转基因动物开辟了道路。

2. 低温抗性 抗冻蛋白 (AFP) 基因是唯一的用于鱼类转基因实验的鱼类本身的基因。生活在北极冰水中的冬比目鱼可防止血液结冰，甚至温度降到零下时，也可通过产生一系列抗冻蛋白而存活下来。与此相反，鲑鱼类由于缺乏这种基因，在如此低的温度下，根本无法存活下来。美国和加拿大的两个研究小组曾尝试将 AFP 基因转移到鱼细胞或胚胎，以改良后者的抗冻性。

自然条件下，冬比目鱼的 AFP，秋季存在血清内，春秋就消失了。约翰·霍普金斯大学的 Huang 等人在夏季时将比目鱼放在低温下，诱导合成 AFP mRNA，肝脏组织和离体肝脏核在体外也有类似的冷诱导。在这些研究的基础上，他们将克隆的 AFP 基因导入虹鳟鱼、蓝鳃太阳鱼和鲑鱼这些其它鱼种的细胞株，采用检测 AFP mRNA 合成的方法，观察到这些细胞的基因表达。克隆的 AFP 基因可导入异种鱼类的细胞中并能表达，这个发现使得该基因用于产生转基因鱼成为可能。转基因小鼠的许多成功实验就是以体外细胞水平的基因转移和表达为基础的。

加拿大小组的 Fletcher 等人试图将冬比目鱼克隆的 AFP 基因导入大西洋鲑鱼中，他们设计了一个巧妙的显微注射方法，即将直径 3—5 微米的显微针通过卵壳插入卵，受精后 3 小时内，卵孔位于卵核区附近。罗非鱼的卵也采用了相似的显微注射方法。Fletcher 和同事将 2—3 纳升 DNA 溶液，其中含 10^6 拷贝的线状 DNA，在受精 2 小时后注射到卵。与 Chorrouf 的虹鳟鱼实验相比，Fletcher 所用的基因拷贝数相当少。对具有坚硬卵壳的卵而言，通过卵孔显微注射到核区可能是一种有效的方法。

1800 个注射的卵中，孵化时约有 80% 能存活。孵化 8 个月后，30 条检测的小鱼中有 2 条含有 AFP 基因，表明冬比目鱼的 AFP 基因可导入大西洋鲑鱼。目前仍未确定这个基因在鲑鱼中的表达。但是研究人员将在受体鱼生长到合适大小时，通过测定 AFP 是否存在于血清来检测表达。该研究小组也将此比目鱼 AFP-果蝇热休克启动子 (Hsp-70) 融合基因，通过 P 因子导入果蝇，在血淋巴中检测到 AFP。冬比目鱼 AFP 基因是一种结构和产物蛋白质性质鉴定的鱼类基因，导入该基因到其它鱼种的细胞株和个体内可获得表达。这些因素使得 AFP 基因今后将成为转基因鱼研究的热点。

3. 插入诱变 斑马鱼是一种小型淡水鱼，作为实验动物，它有许多优点：世代时间较短，只有 3—4 个月；成熟雌鱼每隔一星期产几百个卵；卵是透明的；裂球同步分裂；发育快，孵化只要 3 天即可完成。Oregon 大学的研究小组对斑马鱼的遗传学、神经生物学和发育生物学进行了深入的研究。1981 年 Streisinger 等人发明了一种简单方法，即通过人工单性生殖产生斑马鱼纯合子；使得斑马鱼成为脊椎动物遗传学的独特的实验动物。最近，Kimmel 和 Warge 用注射染料的方法在卵裂期间追踪裂球的发育命运，了解到只有到原肠胚期，胚胎细胞的命运才能确定。斑马鱼卵的卵球大而透明，在发育中可进行实验操作，脊椎动物发育中的这些重要发现，使得应用这种卵球成为可能。因此斑马鱼以其独特的生物学特性成为转基因实验的引人注目的材料。

人们已很清楚将外源基因导入宿主染色体可产生隐性突变或显性突变，至少在高于几个百分点的转基因小鼠中如此。某些插入突变使得发育异常，而导致肢体畸型。转基因技术引起的插入突变现在正成为一种有潜力的手段，对缺乏适当发育突变体的脊椎动物的发育过程进行遗传分析。Oregon 小组的 Stuart 等人将外源基因导入斑马鱼以产生携带插入突变的转基因鱼稳定品系。实验中，斑马鱼受精卵在受精 1 小时内，分别在 1、2 和 4 个细胞期，人工去

掉卵壳,注射含 30 皮克 DNA 的 300 纳升溶液(浓度 0.1 微克/纳升)到细胞质,注射体积可通过在溶液中加入酚红来测定。DNA 是线状的,5.2Kb 大小的细菌质粒,SV₄₀-hygro 包含与 SV₄₀ 启动子连接的湿霉素抗性基因。这种质粒可望在宿主体内产生湿霉素磷酸转移酶,因此可对转基因鱼进行抗生素选择。这样一来,每天可处理 200 个卵。转基因实验中,通常使用 1 细胞期的胚胎,以使外源 DNA 传到所有子代细胞中。尽管有降低导入频率的风险,鉴于斑马鱼发育迅速,2、4 细胞期的胚胎也同 1 细胞期的胚胎一样用来显微注射。注射 3 星期后,外源基因可在大多数鱼体内检测到,然而 4 个月,分析鱼鳍,仅有 5% 的鱼被检测到。用 20 条鳍阳性鱼同未注射的鱼杂交时,有一条将外源序列传到约 20% 的 F₁ 子代。用其中一条携带外源序列的 F₁ 鱼进行第二次异型杂交,18 条中有 9 条(约 50%)F₂ 子代鱼遗传获得该序列。因此 Stuart 指出导入斑马鱼的外源基因按孟德尔定律传递到后代,导入基因的表达尚未检测到。

4. 发育基因的表达 动物发育是与胚胎发生期间基因连续表达的结果相伴随的,受时间和组织特异性方式的调控。转基因技术是阐明发育过程中基因表达调控机制的最有力的工具。应用转基因鱼我们研究了脊椎动物晶状体蛋白基因的表达,这将在以后章节中详细介绍。

(三) 青鳉作为模型系统

1. 显微注射到卵母细胞核 青鳉是一种小型、产卵、淡水硬骨鱼,被广泛用作实验动物。它是唯一建立了几株纯系的鱼种。对其卵子发生、受精和胚胎发育都有人进行过深入的研究。我们总结了青鳉的与转基因实验相关的生物学特性。青鳉身长 3 厘米,属于已知脊椎动物中最小的一类。同斑马鱼和小鼠相比,世代时间很短,只有 2—3 个月,人工条件下,终年产卵,产卵周期为 24 小时。产卵时间也受光照控制。另外,它的卵是透明的,易于胚胎学操作。

我们于 1982 年开始用青鳉做转基因实验,首先要解决的难题是坚硬的卵壳以及用肉眼难

以确定受精卵的核。我们用卵母细胞取代受精卵使困难迎刃而解。青鳉卵母细胞的卵壳柔软,在成熟的某一阶段,核大而易于辨别。实验中,养殖的桔红色青鳉品系在 26℃ 可控光照安排下,(14 小时光照,10 小时黑暗)繁殖。青鳉在光照开始时产卵。预计排卵时间 9 小时之前,卵母细胞处在第二次减数分裂前期。卵母细胞直径为 900—1000 微米,在透明的细胞质内,在动物极处,含有核(核泡),直径 120—150 微米。收集这些卵母细胞,在上午进行显微注射,光照时间是 16:00。在这段时间,收集腹部带有卵的雌性鱼。因为青鳉的排卵周期是 24 小时,期望这些雌性鱼到第二天能排出卵母细胞。第二天早晨 6:00(预计排卵时间 10 小时之前),取出滤泡内的卵母细胞,在加有 2% 小牛血清蛋白,1.78 毫摩尔浓度 NaHCO₃ (pH8.0) 的 Earle's 199 培养基上培养。卵母细胞放置在由载玻片制成的玻璃装置上,玻片上充满培养基,卵母细胞朝一个方向固定,使核与显微针正对。使用锋利针头,内径 3—4 微米的显微针,在放大倍数为 100 的显微镜下进行显微注射。注射体积从核的膨胀程度来估算。当核开始膨胀,停止注射,此时注射体积是 20—30 纳升,如果注射体积较之偏大,将导致囊胚期前胚胎退化。随着培养基上卵母细胞的成熟,核逐渐变平,致使核膜降解,妨碍对核进行显微注射。显微注射的时间控制在约 2 小时,此间可处理 60—100 个卵母细胞。注射过的卵母细胞在同一培养基上培养约 8 小时,直到预计排卵时间。某些成熟的卵母细胞培养期排出小囊(滤泡),剩下的小囊可用精细的镊子人工除去。之后卵母细胞用精液授精,受精率 70%。在一个小塑料容器里,受精卵分散在蒸馏水中,26℃ 保温。

2. 外源基因的转移与表达 晶状体蛋白是脊椎动物晶状体的主要可溶性蛋白。有四种类型: α - β - γ -和 δ -晶状体蛋白。 α - β - γ -晶状体蛋白存在于鱼类、两栖类和哺乳类。爬行类和鸟类中 γ -晶状体蛋白被 δ -晶状体蛋白取代。为研究脊椎动物晶状体蛋白基因表达的调控,我们将鸡 δ -晶状体蛋白基因导入青鳉胚胎。由

于鱼不是天生具有 δ -晶状体蛋白基因, 导入这种基因对研究外源基因在青鳉胚胎中的状况和表达可能是有益的。另外该基因在转基因鼠、嵌合鼠和小鼠细胞内按组织特异性方式进行表达已被证明是完全可行的。显微注射的质粒是 p δ -c-IB, 含有 11.4kb 鸡 δ -晶状体蛋白序列和 3.0kb PAT 153 序列。在 10—20 纳升 0.1 毫摩尔浓度的 Tris 和 0.01 毫摩尔浓度的 EDTA 溶液中约有 5×10^3 — 10^4 拷贝的环状质粒(DNA 含量 10 微克/微升), 将它显微注射到每个核。注射的基因拷贝比其它鱼类实验中用于细胞质的注射量小得多。

用 7 天的胚胎分析外源基因的导入和表达, 约有 50% 注射过的卵母细胞正常发育到这个阶段。与其它许多进行细胞质注射的情形相比, 这个存活率是较低的。用 Southern 杂交分析, 所试胚胎中约有一半可检测到 δ -晶状体蛋白序列。单个青鳉胚胎中, 每个细胞的平均基因拷贝数在 1—100。通过免疫印渍分析, 所测胚胎中有 30% 可检测到 δ -晶状体蛋白, 但每个胚胎的含量变化较大。因此, 通过生物化学实验, 表明鸡 δ -晶状体蛋白基因在青鳉胚胎中能有导入和表达。

为研究外源基因的组织特异性表达, 分别采用 DNA—DNA 原位杂交和免疫组织染色来测定序列及其产物蛋白的组织定位。从组织分布来看, 序列存在于全部组织的核, 然而并不是 100%, 而是 50% 或更少的核中有序列存在。因而, 携带或不携带 δ -晶状体蛋白基因的细胞在每种组织中是镶嵌分布的。这种镶嵌现象表明显微注射的基因结合到基因组发生在 2 细胞期或更晚些。鸡 δ -晶状体蛋白序列的增殖拷贝稳定地遗传到子代细胞。在斑马鱼和鳉鱼中也发现了镶嵌现象, 甚至在由显微注射到 1 细胞期的雄性原核而产生的转基因小鼠中, 这种现象也非罕见。

根据基因表达的组织特异性, δ -晶状体蛋白基因在视网膜、脑、脊髓、肌肉、鳃和肠内均有表达。但在晶状体内几乎不表达, 在晶状体内

该基因本应该率先表达的。这种组织特异性不强的可能的原因之一是胚胎发育期间基因表达受时间调控, 而所选择的分析时间又不太合适。事实上, 7 天的胚胎中, 晶状体形成就完成了。因而基因表达要在更年轻的胚胎中进行。用 2—7 天内各个不同时期的胚胎来测定, 晶状体内基因的表达只发生在 3 天的胚胎中, 在此前后都没有发现表达现象。因此, 这表明鸡 δ -晶状体蛋白基因表达的组织特异性在青鳉胚胎内依赖于发育时间, 受时间调控。通过 DNA 和蛋白质原位杂交分析, 结果表明 δ -晶状体蛋白并不是在携带该基因的所有细胞中都能检测到。外源基因这种明显的镶嵌式表达在转基因小鼠中也是很普遍的。

我们的实验显示了青鳉为转基因鱼研究提供了许多有利条件: 核的显微注射性能, 相对较高的注射胚胎存活率以及外源基因的有效导入和表达。更重要的是, 导入的鸡基因按组织、时间特异式方式调控。所有事实表明: 青鳉是研究脊椎动物发育期间基因表达的很有潜力的实验系统。

结 束 语

1. 转基因鱼研究主要在以下四个方面展开: 刺激生长、低温抗性、插入诱变和发育过程中的基因表达。

2. 同果蝇和小鼠相比, 鱼的转基因技术还不太成熟, 虽然已将外源基因导入数种鱼中, 但能够表达和进行种系传递的还很少。

3. 应用现行的转基因技术、转基因鱼也同转基因小鼠一样, 存在着许多问题, 如整合基因拷贝数不一、整合镶嵌型、基因表达效率不同。

4. 现在转基因鱼使用的大多数外源基因来自哺乳动物, 对转基因鱼进行深入的研究将取决于鱼类本身基因的克隆和选用适合于鱼类基因表达的启动子与增强子。

5. 青鳉, 一种小型淡水鱼, 是最适合转基因研究的材料之一。

(张林译自 «Zoological Sciences»
6 (1989), 445—457. 沈孝宙校)