

转“全鱼”溶菌酶基因大菱鲂的研究

纪伟¹, 张培军²

(中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071)

摘要: 用大西洋条鳕 (*Macrozoarces americanus*) 抗冻蛋白启动子 opAFP promoter 和牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) c 型溶菌酶基因构建“全鱼”溶菌酶基因元件 opAFP-ly, 首次应用电脉冲精子介导法将该基因片段导入到大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 受精卵内, 获得原代转基因大菱鲂。先后采用单因子方法和正交实验方法, 重复实验确定了最适导入条件: 脉冲电压为 400 V/cm, 脉冲次数为 5, 脉冲宽度为 25 ms, 外源 DNA 浓度为 50 mg/L。利用最适导入条件, 实现基因元件大规模转移。采用 PCR 技术对 1 月龄的原代转基因大菱鲂仔鱼的染色体 DNA 进行分析, 结果表明外源基因的整合率可达 28%。

关键词: 抗冻蛋白启动子; c 型溶菌酶基因; 大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*); 电脉冲精子介导法

中图分类号: S33; Q95 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2004)05-0008-07

品种培育是人为对野生物种和现有品种进行改良。多年来生产实践表明, 优质、高产和抗逆新品种的培育在水产养殖中发挥了极为重要的作用。随着遗传学和分子生物学的不断发展, 从 20 世纪 60 年代开始, 诱变育种、倍性育种、体细胞杂交、细胞核移植和染色体工程相继诞生, 在农作物和水生生物育种方面作出了很大贡献。20 世纪 70 年代出现的以基因工程为原理的转基因技术是育种技术的一场革命, 人们可以利用分子生物学手段, 改造和重建细胞的基因组, 打破了种间遗传信息交流的屏障, 从而能够定向地改变生物体的遗传性状。

利用基因工程技术可以实现鱼类基因转移, 达到改良鱼类品种的目的。20 世纪 80 年代以来, 世界各国进行转基因鱼的研究取得了进展。法国的 Chourrout 等^[1]把人生长激素基因导入虹鳟 (*Salmo gairdeni*) 的受精卵; 加拿大的 Fletcher 等^[2]把美洲拟鲮 (*Pseudopleuronectes americanus*) 抗冻蛋白基因导入大西洋鲑 (*Salmo salar*); 美国的 Hopkins 大学 Powers 实验室^[3]使外源生长激素基因在鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 和虹鳟体内表达并产生生物学效应; 美国的 Du^[4]和 Devlin 等^[5]用 opAFP-GHf 全鱼基因生产出具有快速生长特征的大麻哈鱼。我国淡水鱼类转基因研究已有较为成功的报道, 分别生产出转基因鲤鱼、鲫鱼 (*Carassius auratus* Linnaeus)、银鲫 (*Carassius auratus gibelio* Bloth) 和泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus* Cantor)

等^[6,7]。

海水鱼类养殖业发展相对较慢, 海水鱼类转基因工作报道较少。近年来, 一些名贵海水品种如牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、真鲷 (*Sea bream*) 和大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 等已成为海水养殖的重点。与此同时, 高密度养殖模式也导致了水产动物病害的频繁发生, 使海水经济鱼类养殖效益有所下降。通过基因转移技术将抗病相关基因导入鱼体内, 可以达到增强鱼体抵御病原微生物能力的目的。1995 年夏德全等用含 opAFP 启动子的虹鳟溶菌酶基因 (opAFP-rt-LYZ) 生产转溶菌酶基因的团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*); 2001 年 Rex^[8]等将 CMV 启动子和惜古比天蚕 (*Hyatophora cecropia*) 的抗菌肽 (cecropin B) 基因的重组 DNA 片段导入到斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*), 其子一代表现出较强的抵抗病原菌的能力。同时, 为了转基因鱼在水产养殖中得到应用, 从生物安全性角度考虑, 应克隆鱼类自身的基因, 用来转移的

收稿日期: 2004-02-20; 修回日期: 2004-03-04

基金项目: 青岛市科技局资助项目

作者简介: 纪伟 (1979-), 男, 山东青岛人, 硕士生, 研究方向: 海洋动物发育生物学和基因工程, 电话: 0532-2989559; 张培军, 通讯作者

基因元件组成成分应来自鱼类。作者利用电脉冲精子载体法将“全鱼”溶菌酶基因元件转移到大菱鲆受精卵中,以期培育出抗病力强的大菱鲆新品系。

1 材料和方法

1.1 材料

15月龄健康牙鲆,由中国科学院海洋研究所提供;大菱鲆,由莱州市大华水产有限公司提供。*Escherichia coli* DH5 α 菌株由本实验室保存;克隆载体PMD-T购自上海生工生物公司;TRIROL™试剂盒购自LIFE TECHNOLOGY公司,表达载体opAFP由美国马里兰州海洋生物分子发育实验室馈赠;dNTP, Taq酶, DNase I, T4 DNA连接酶, Wizard PCR Preps DNA Purification System购自Promega公司;电脉冲仪由本实验室自主研制,脉冲宽度为25 ms。

1.2 方法

1.2.1 基因元件的构建

1.2.1.1 牙鲆c型溶菌酶基因的分离

根据TRIROL™试剂盒说明提取牙鲆外周血总RNA,用DNase I消化RNA中的痕量DNA。按照牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)c型溶菌酶cDNA序列,设计一对RT-PCR引物:P1 5' gtagctgcagctgtggagac; P2 5' aatcaccggagatgtrttcag。P1 5'端带Pst I酶切位点。引物由中科开瑞生物公司合成。根据逆转录试剂盒(Promega公司)进行RT-PCR, PCR反应参数为95℃变性30 s, 54℃退火30 s, 72℃延伸45 s;循环30次, 72℃延伸10 min。

1.2.1.2 构建“全鱼”溶菌酶重组质粒

PCR产物与PMD-T载体在T4DNA连接酶的作用下进行连接,并转化*Escherichia coli* (DH-5 α)感受态,铺于加氨苄青霉素的LB平板上,37℃生长过夜。挑取6个克隆分别接种于含有氨苄青霉素的LB液体培养基中,37℃振荡过夜。收集菌体,PCR方法检测确定阳性克隆PMD-T-ly,并测序进行核苷酸序列分析。

用Sma I和Hind II双酶切PMD-T-ly,用Hpa I酶切表达载体opAFP,胶回收ly基因片段和线性化表达载体opAFP在T4DNA连接酶作用下进行平末端连接,并转化*E. coli* (DH-5 α)感受态,铺于加氨苄青霉素的LB平板上,37℃生长过夜。挑取6个克隆分别接种于含有氨苄青霉素的LB液体培养基中,37℃振荡过夜。收集菌体,PCR方法检测确定阳性克隆

opAFP-ly,进行核苷酸序列分析。PCR检测引物A、B分别参考opAFP中5'、3'调控序列,A5' atctcaacagctctccacaggt; B5' tctgctgatgccagtcttact(图2)。PCR反应参数为95℃变性30 s, 56℃退火30 s, 72℃延伸60 s;循环30次,72℃延伸10 min。按照常规方法小量抽提6个重组质粒opAFP-ly,利用P1和opAFP载体自身所带有的Pst I酶切位点,经过Pst I酶切确定插入片段为正向的阳性克隆。按照常规方法大量抽提所需阳性克隆质粒,经EcoRI酶切后,用作转移的基因片段(E-opAFP-ly)。

1.2.2 转基因实验方法的建立

1.2.2.1 精子的获取和人工授精

为提前大菱鲆产卵以延长其生长季节,采用人工诱导和强化培育的方法,使其产卵期提前到3月上、中旬。精子采用人工挤压方法用吸管吸出至干净烧杯中,加入25倍体积的精子稀释液R(NaCl 0.65g, KCl 0.041 g, 无水CaCl₂ 0.012 g, Na₂HPO₄ 0.002 g, 葡萄糖0.2 g, NaHCO₃ 0.02 g,溶于100 mL蒸馏水中,用一次性细胞滤器过滤),置于冰上。将外源DNA(E-opAFP-ly)和精子混合,按照下述实验设计实施电脉冲,然后进行人工授精,立即将精子和适量的等份卵混合,加入适量海水,轻轻搅拌至混匀,静置5 min后转入15℃海水孵化。

1.2.2.2 单因子实验

在脉冲宽度为25 ms的情况下,分别对脉冲电压、脉冲次数和外源DNA的浓度进行单因子实验。此三因素的单因子实验所用的精子和卵均取自同一条雄鱼和雌鱼,且都有一个对照组。按时在显微镜下观察各组受精卵的发育情况,各实验组随机选取500粒悬浮受精卵,分别计算各组原胚成活率S(%)、孵化率H(%)和2周后成活仔鱼的外源DNA的导入率T(%)。每个单因子实验均重复3次。

脉冲电压单因子实验:在脉冲次数为5,外源DNA的浓度为50 mg/L的条件下,脉冲电压分别为200, 300, 400, 500, 600 V/cm。

脉冲次数单因子实验:在脉冲电压为400 V/cm,外源DNA的浓度为50 mg/L的条件下,脉冲次数分别为1, 2, 5, 8, 10。

外源DNA浓度单因子实验:在脉冲电压为400 V/cm,脉冲次数为5的条件下,外源DNA浓度分别为0, 50, 100, 150, 200 mg/L。

1.2.2.3 正交实验

依照上述三项单因子实验结果选取适宜因素的三个值作因素水平表(表 1),并按 $L_9(3^4)$ 正交实验表进行如表 2 的分组实验。各实验组所用的精子和卵均

表 1 基因转移三因素水平表

Tab.1 different levels of three factors influencing the up-take of foreign gene

水平	脉冲电压 (V/cm)	脉冲次数	外源 DNA 浓度(mg/L)
1	300	2	50
2	400	5	100
3	500	8	150

表 2 基因转移正交实验分组表

Tab.2 orthogonal design of gene transfer

水平	脉冲电压 (V/cm)	脉冲 次数	外源 DNA 浓度(mg/L)
1	300	2	50
2	300	5	100
3	300	8	150
4	400	2	100
5	400	5	150
6	400	8	50
7	500	2	150
8	500	5	50
9	500	8	100
对照	-	-	-

取自同一条雄鱼和雌鱼。按时在显微镜下观察各组受精卵的发育情况,各实验组随机选取 500 粒悬浮受精卵,分别计算各组 S, H 和 2 周后成活仔鱼的 T 。此实验均重复 3 次。

1.2.3 转基因实验操作

按照正交实验结果确定最适导入条件和上述人工授精的方法,实行大规模电脉冲基因转移。

1.2.4 外源基因整合和表达分析

取 2 个月龄仔鱼的 DNA 样品进行 PCR 检测。取 100 尾 1 月龄仔鱼的少许尾鳍,按照常规方法提取基因组 DNA,PCR 反应并进行凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 全鱼基因元件的构建

通过 RT-PCR 扩增出约为 486bp 的片段(图 1A),经 TA 克隆连接到 PMD-T 载体中,通过 PCR 筛选出阳性克隆 PMD-T-Ly,经序列分析,与公开发表文献的牙鲆溶菌酶序列完全一致。再将经 *Sma* I 和 *Hind* II 双酶切得到的平末端 Ly 与经 *Hpa* I 酶切的 opAFP 体外连接,通过 PCR 筛选出阳性克隆 opAFP-Ly(图 1B),得到约为 692 bp 的片段,经序列分析,opAFP 与牙鲆溶菌酶序列连接无误。经 *Pst* I 酶切阳性克隆 opAFP-Ly 后,酶切片段中有长度约为 1.8 kB(图 1C)的为正向插入的阳性克隆。经 *EcoR* I 酶切的全鱼基因元件(E-opAFP-ly)如图 2 所示。

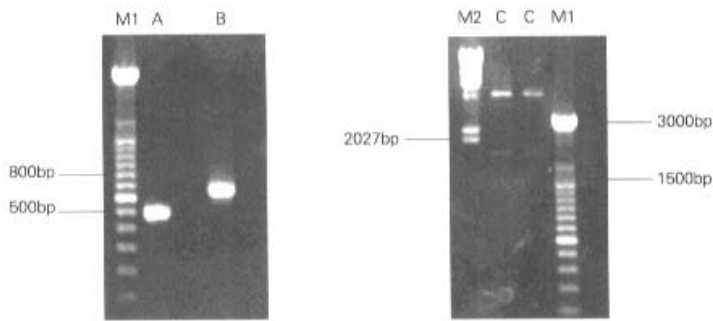


图 1 表达质粒 opAFP-ly 的构建

Fig. 1 Construction of expression of plasmid opAFP-ly

A 示 RT-PCR 扩增出的长度约为 486 bp 的 Lysozyme 基因;B 示 引物 A、B 筛选克隆 opAFP-Ly 扩增出的长度约为 692 bp 的阳性带;C 示 *Pst* I 酶切阳性克隆 opAFP-Ly,酶切片段长度约为 1.8 kB(图 1C)的为插入片段为正向的阳性克隆;M1, M2 为 DNA size markers, M1 为 λ DNA/*Hind* III, M2 为 100 bp DNA ladder plus.

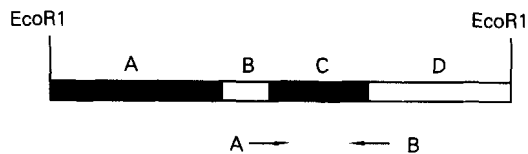


图2 全鱼基因元件 (E - opAFP - ly)

Fig.2 "All fish" lysozyme gene construct

A 示 opAFP promoter; B 示 opAFP 5' untranslated sequence; C 示 lysozyme gene; D 示 opAFP 3' sequence

2.2 电脉冲最佳导入条件的确定

2.2.1 单因子实验结果

三项单因子实验中, 各实验组的 *S*, *T*, *H* 数值均为 3 次重复实验结果的平均值。

2.2.1.1 脉冲电压单因子实验结果

如表 3 所示, 脉冲电压对 *S* 影响不大; 脉冲电压为 500, 600 V/cm 时, *H* 有所下降; 脉冲电压为 400, 500, 600 V/cm 时, *T* 维持在较高水平。兼顾 *H* 和 *T*, 该因子的适宜范围是 300, 400 和 500 V/cm, 推测其最

表 3 脉冲电压与原肠胚成活率、孵化率及导入率的关系

Tab.3 The relationship of between field strength and the gastrula stage, hatch level, efficiency of gene transfer

组号	脉冲电压 (V/cm)	脉冲次数	外源 DNA 浓度 (mg/L)	<i>S</i> (%)	<i>H</i> (%)	<i>T</i> (%)
1	200	5	50	91.3	75.8	0.0
2	300	5	50	92.8	79.5	16.7
3	400	5	50	85.5	73.3	26.7
4	500	5	50	88.5	61.5	30.0
5	600	5	50	86.3	46.8	23.3
对照	-	-	-	90.0	82.3	0.0

适脉冲电压为 400 V/cm。

2.2.1.2 脉冲次数单因子实验结果

如表 4 所示, 脉冲次数为 8, 10 时, *S* 和孵化率均有所下降, *H* 下降的幅度较大。兼顾 *T*, 该因子的适宜范围是 2, 5 和 8, 推测其最适脉冲次数为 5。

2.2.1.3 外源 DNA 浓度实验结果

如表 5 所示, 外源 DNA 浓度对 *S* 影响不大, *H* 随着外源 DNA 浓度的增加有逐渐下降的趋势, 而 *T* 变化不大。外源 DNA 浓度为 0 mg/L 时, *S* 和 *H* 最高。该

因子的适宜范围是 50, 100 和 150 mg/L。

2.2.2 正交实验结果

将实验结果填入正交实验统计表 (表 6), 各实验组的 *S*, *T*, *H* 数值均为 3 次重复实验结果的平均值,

表 4 脉冲次数与原肠胚成活率、孵化率及导入率的关系

Tab.4 The relationship between the number of pulses and the gastrula stage, hatch level, efficiency of gene transfer

组号	脉冲电压 (V/cm)	脉冲次数	外源 DNA 浓度 (mg/L)	<i>S</i> (%)	<i>H</i> (%)	<i>T</i> (%)
1	1	400	50	95.3	80.5	6.7
2	2	400	50	92.8	73.8	13.3
3	5	400	50	89.5	78.7	23.3
4	8	400	50	61.3	52.8	20.0
5	10	400	50	56.8	24.5	33.3
对照	-	-	-	92.7	86.3	0.0

表 5 外源 DNA 浓度与原肠胚成活率、孵化率及导入率的关系

Tab.5 The relationship between the concentration of foreign DNA and the gastrula stage, hatch level, efficiency of gene transfer

组号	外源 DNA 浓度 (mg/L)	脉冲电压 (V/cm)	脉冲次数	<i>S</i> (%)	<i>H</i> (%)	<i>T</i> (%)
1	0	400	5	94.3	80.5	0.0
2	50	400	5	91.8	71.5	23.3
3	100	400	5	89.5	76.3	23.3
4	150	400	5	92.7	68.8	26.7
5	200	400	5	85.8	53.3	30.0
对照	-	-	-	93.3	86.3	0.0

表 6 正交实验统计表

Tab.6 The result of orthogonal design experiment

组号	脉冲电压 (V/cm)	脉冲次数	外源 DNA 浓度 (mg/L)	<i>S</i> (%)	<i>H</i> (%)	<i>T</i> (%)
1	300	2	50	93.3	86.5	6.67
2	300	5	100	80.0	73.8	16.70
3	300	8	150	66.7	60.0	23.33
4	400	2	100	86.7	68.5	20.00
5	400	5	150	75.0	71.3	26.67
6	400	8	50	62.8	58.3	30.00
7	500	2	150	65.5	60.7	16.67
8	500	5	50	63.0	54.8	26.67
9	500	8	100	46.7	32.3	36.67
对照	-	-	-	90.0	80.0	0.00

表 7 正交实验结果方差分析

Tab.7 Variance analysis of orthogonal design experiment

因素	S		H		T	
	F	显著性	F	显著性	F	显著性
脉冲电压	61.086	0.016	57.582	0.017	22.930	0.042
脉冲次数	64.965	0.015	48.116	0.020	37.349	0.026
外源 DNA 浓度	1.890	0.346	6.854	0.127	1.778	0.360

注:脉冲电压、脉冲次数和外源 DNA 浓度分别对 S、H 和 T 的 F 值和显著性水平。

并进行方差分析(表 7),分别计算脉冲电压、脉冲次数和外源 DNA 浓度对 S、H 和 T 的 F 值和显著性水平。由表 6,7 可知,脉冲电压和脉冲次数对 S、H 和 T 的影响在 5% 水平上具有显著性差异,外源 DNA 浓度则没有显著性差异。实验组 5,6,8,9 的 T 较高,兼顾 S 和 H,实验组 5 的 S 和 H 比实验组 6,8,9 的高,故实验组 5 的 3 因素组合为最佳。由于外源 DNA 浓度对 T 的影响没有显著性差异,故选取脉冲电压为 400 V/cm,脉冲次数为 5,外源 DNA 浓度为 50 mg/L 为电脉冲最优导入条件。

2.3 外源基因的整合率

按照常规方法提取基因组 DNA,PCR 反应并进行凝胶电泳检测(图 3),其中有 28 个样品扩增出特异性电泳带,表明有 28 尾鱼的染色体中已经整合了外

电脉冲导入外源基因能够一次性大批量操作,得到数量可观的原代转基因大菱鲂,表明该方法能够快速培育抗逆性强鱼类新品系,是一种能够用于实际生产的行之有效的实验模式。

在鱼体的非特异性免疫系统中,以抗菌类物质(抗菌肽、溶菌酶等)介导的体液免疫是鱼体抵御病原微生物的第一道防线。其中,溶菌酶的研究较为透彻。它是一种广谱性的抗菌因子,可以破坏细菌细胞壁并能够对真菌细胞壁及昆虫的外骨骼进行有限的水解^[9]。故本研究的目的基因是牙鲆的 c 型溶菌酶基因。同时,本研究所采用的大西洋条鳉抗冻蛋白启动子是表达适度的组织特异性启动子,能够在真核生物中有效地启动非抗冻蛋白基因的转录。1994 年夏德全等^[10]用含有该启动子的大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)生长激素基因(opAFP-GHc)生产转基因团头鲂(*Megalobrama amblycephala*),其整合率在 20% 以上,生长速度比对照组快 15% 以上。由于采用了“全鱼”溶菌酶基因元件,使其在海水鱼类基因工程育种中的应用成为可能。

Inoue 等^[11]首次将电脉冲导入法应用于转基因青鳞(*Oryzias laticeps*)育种实验操作,将外源基因成功地导入青鳞受精卵。与显微注射法相比,电脉冲导入法具有操作简便、节省时间等优点。尤其对于卵壳较硬的海水鱼类,显微注射法操作较为困难,而电脉冲导入法更显示出优越性。而单纯依靠精子作为载体实现基因转移已生产出许多转基因的胚胎和转基因动物,包括低等水生生物和高等哺乳动物^[12-15]。但两种方法所共有的缺点是外源基因整合率低、实验可重复性较差。本实验结合上述两种方法的优点,采用电脉冲精子载体法成功地实现外源基因的转移。采用该方法也已有成功的报道^[16-18],生产出转基因斑马鱼(*Danio rerio*)和大西洋鲑(*Salmo salar*)。其较为明显的优点是:可以在生产季节大规模实现外源基因的转移;外源基因可以通过受精过程直接到达受精卵的胚盘附

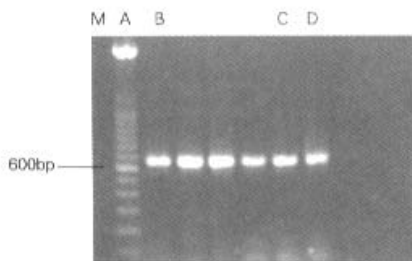


图 3 转基因鱼苗 PCR 检测结果

Fig.3 PCR detective result

A 示阳性对照,模板为质粒 opAFP-ly; B-C 示阳性特异性 PCR 产物;D 示阴性对照

源基因,外源基因的整合率为 28%。

3 讨论

本实验结果表明,利用电脉冲精子载体法能够成功地将“全鱼”溶菌酶基因元件转移到大菱鲂受精卵中,外源基因的整合率为 28%。以精子为载体通过

近;精子在低温下可以长期保存,其供应不受季节限制。本研究在单因子实验和正交实验中各实验组外源基因的导入率大部分在20%以上,表明电脉冲精子载体法所生产的转基因个体中,外源基因的导入率较高并且相对稳定,实验的可重复性较高。

在确定最适导入条件的实验中,作者采用了单因子实验和正交实验相结合的方法。实验结果表明,两者的结合能够有效地确定导入率较高的最适导入条件。对电脉冲导入条件进行了新的尝试,采用了低电压高脉宽(脉冲宽度为25 ms)。首先进行脉冲电压、脉冲次数和外源基因的单因子实验,找出各因素影响孵化率和导入率的关系及其影响的适宜范围。依此适宜范围分别选取3因素的3个水平,采用正交方法进行正交实验,获得3因素组合的最佳值,即最适导入条件。在脉冲电压单因子实验中,当电压为600 V/cm时,孵化率较为明显地下降,表明电压过高直接影响孵化率;在外源DNA浓度单因子实验中,外源DNA浓度为0 mg/L时,原肠胚成活率和孵化率最高,而孵化率随着外源DNA浓度的增加有逐渐下降的趋势,而导入率变化不大,表明外源基因可能对胚胎发育造成不良影响,从而导致孵化率下降。正交实验结果表明,电脉冲最优导入条件为脉冲电压为400 V/cm,脉冲次数为5,外源DNA浓度为50 mg/L。

外源基因的定点整合、适量表达和稳定遗传是转基因研究的重点和难点。本研究所采用的电脉冲精子载体法,是以精子为载体将外源基因输送到受精卵中,使外源基因与精子的雄原核同时进入受精卵,增加了外源基因与精卵雌原核接触的机会^[19],能够使其较早地与受精卵基因组发生重组,减少了原代转基因大菱鲂嵌合体的几率,虽然这种重组还不是定点整合。由此可见,该方法能够增加了原代雌雄大菱鲂性腺中含有外源基因的可能性,提高了外源基因遗传的几率,使快速建立纯系转基因大菱鲂成为可能。本研究外源基因整合率是28%,但是否是真正意义上的转基因大菱鲂还需后期检测才能确定。适量表达的标准是使转基因鱼获得所需性状又不产生生理畸形,其一个主要影响因素是外源基因的启动子。本研究所采用的是大西洋条鳉抗冻蛋白启动子,该启动子是肝脏组织特异性表达的启动子^[4],将启动外源溶菌酶基因在肝脏中表达,增加外周血中溶菌酶的含量,从而提高原代转基因大菱鲂的抗病能力。

转基因鱼的遗传和生态安全性问题是目前转基

因研究领域的热点。携带者外源基因的转基因动物对遗传多样性、物种多样性和生物群落与生态环境多样性可能产生不同程度的胁迫作用。目前还没有大量详实的相关实验证据来证实这种可能性,而行之有效的解决办法包括使基因元件由鱼类自身的基因成分构成和让转基因鱼不育。本研究所采用的“全鱼”溶菌酶基因元件均来自鱼类,因此可以运用到养殖业生产实践中。多倍体诱导技术的运用是下一步的研究方向。将转基因技术和多倍体诱导技术相结合,以不育获得的转基因三倍体大菱鲂,从而排除转基因鱼可能对鱼类种质资源和生态环境的破坏。

参考文献:

- [1] Chourrout D G, Houdebine L. High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by microinject into egg cytoplasm[J]. *Aquaculture*, 1987, 51: 143 - 150.
- [2] Fletcher G L, Shears M A, King M J. Evidence for an -tifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1988, 45: 352 - 357.
- [3] Powers D A. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV - rainbow trout GH - cDNA in the common carp [J]. *Mol Repro Dev*, 1990, 25: 3 - 13.
- [4] Du S J, Gong Z, Tan C H, et al. Development of an "all fish" gene cassette for gene transfer in aquaculture [J]. *Mol Marine Biol Biotech*, 1992, 1: 290 - 300.
- [5] Devlin R H, Yesaki T Y, Donaldson E M, et al. Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1995, 23: 123 - 129.
- [6] Zhu Z, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Z Angew Ichthyol*, 1985, 1: 31 - 34.
- [7] 孙孝文,沈俊宝,阎学春,等. 转牛(羊)生长激素基因工程鱼的研究[J]. *中国水产科学*, 1995, 2(2): 23 - 33.
- [8] Rex A D, Dregory W W. Enhanced bacterial disease resistance of transgenic Channel Catfish *Ictalurus punctatus* processing cecropin genes [J]. *Marine Biotech*, 2002 (4): 338 - 344.
- [9] 张永安,聂品. 鱼类体液免疫因子研究进展[J]. *水产学报*, 2000(4): 115 - 120.
- [10] 夏德全,吴婷婷,杨弘,等. 人生长激素基因在团头鲂和鲤中的整合和表达[J]. *水产学报*, 1994, 18(4): 284 - 289.
- [11] Inoue K. Electroporation as a new technique for producing

- transgenic fish[J]. *Cell Differentiation and Development*, 1990, 29: 123 - 128.
- [12] Lavitrano M, Camaioni A, Fazio V, *et al.* Sperm cells of vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice[J]. *Cell*, 1989, 57: 717 - 723.
- [13] Symonds J, Walker S, Sin F, *et al.* Development a mass gene transfer method in chinook salmon: optimization of gene transfer by electroporated sperm[J]. *Mol Mar Biol Biotech*, 1994, 3: 104 - 111.
- [14] Schellander K, Peli J, Schmall F, *et al.* Artificial insemination in cattle with DNA treated sperm[J]. *Anim Biotech*, 1995, (6): 41 - 50.
- [15] Patil J, Khoo H. Nuclear internalization of foreign DNA by zebrafish spermatozoa and its enhancement by electroporation[J]. *Exp Zool*, 1996, 274: 121 - 129.
- [16] Khoo H W, Ang L H, Wong K Y. Sperm cell as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish[J]. *Aquaculture*, 1992, 107: 1 - 9.
- [17] Muller E, Ivics Z, Erdelyi F, *et al.* Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier [J]. *Mol Mar Biol Biotech*, 1992, 1: 276 - 281.
- [18] Symonds J E, Walker S P, Sin F Y. Electroporation of salmon sperm with plasmid DNA: evidence of enhanced sperm/DNA association[J]. *Aquaculture*, 1994, 119: 313 - 327.
- [19] Huai J T. Electroporated sperm mediation of a gene transfer system for finfish and shellfish [J]. *Mol Reprod Dev*, 2000, 56: 281 - 284.

Electroporated sperm mediation of an “whole fish” lysozyme gene construct into *Scophthalmus maximus*

JI Wei, ZHANG Pei - jun

(Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China)

Received: Feb., 20, 2004

Key words: opAFP promoter; c - type lysozyme gene; *Scophthalmus maximus*; electroporated sperm mediation

Abstract: Lysozyme gene from the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), driven by the opAFP promoter, was first transferred to turbot (*Scophthalmus maximus*) eggs by electroporated sperm mediation. The treated fry were sampled and analyzed by polymerase chain reaction (PCR). Single - factor experiment and orthogonal design experiment were used to determine the optimal parameters for the uptake of foreign DNA into the turbot sperm cells during electroporation. The electroporation conditions (field strength of 400V/cm, 5 pulses, pulse length of 25ms and foreign DNA concentration of 50 mg/L) was applied for mass gene transfer. As high as 28% of treated 1 - month - old turbot fry contained foreign genes by PCR analysis.

(本文编辑:刘珊珊)