

合浦珠母贝卵子电击脉冲参数的初步研究

喻达辉¹, 贾晓平¹, 陈素文¹, 李 夏¹, 朱嘉濠²

(1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 香港中文大学 李福善海洋科学研究中心, 香港 沙田)

摘要: 运用电脉冲转基因仪对合浦珠母贝卵子进行电脉冲处理以优化电穿孔法转基因的电击参数。实验中调制百分比: 100%; 脉冲间隔: 1.0s; 电极距离: 2mm; 脉冲个数: 5 个, 参数保持不变。用不同的电脉冲参数组合 (脉冲电压 100~400 V、脉冲持续时间 0.5~3.0 ms、脉冲频率 10~50 kHz, 共 28 个组合) 对卵子电击, 然后加入精子进行授精, 统计各组受精率和孵化率, 以受精率和孵化率达到 50% 以上为衡量指标。结果表明, 合浦珠母贝卵子对低脉冲频率和高电压非常敏感, 当频率低于 20kHz 或脉冲电压高于 400V 时对卵子损伤较大。脉冲持续时间对其影响不大, 适应范围较宽。优化的转基因电击脉冲参数组合为: 脉冲电压 1.0kV/cm, 脉冲持续时间 2.0ms, 脉冲频率 50kHz, 或者脉冲电压 1.5kV/cm, 脉冲持续时间 1.5ms, 脉冲频率 50kHz。

关键词: 脉冲参数; 合浦珠母贝; 卵子; 转基因; 电穿孔法

中图分类号: S944.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)08-0015-05

电穿孔法(electroporation)基因转移技术在水产动物中已成功用于鲍鱼 (*Haliotis rufescens* 和 *Haliotis diversicolor suptexta*)、大珠母贝 (*Pinctada maxima*)、合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*)、鲑鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*)、稀有鮑鲫 (*Gobiocypris rarus*)、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)、青鳉 (*Oryzias latipes*) 等^[1-11]。由于精子体积小, 一次电击可处理较多的精子, 因此操作效率较高。但一般在受精过程中往往需要过量的精子才能受精, 因此通过精子介导转基因会造成外源 DNA 的浪费。如果利用卵子介导进行转基因将更经济、高效。对于卵黄较多体积较大的卵子可能不适用, 但对于体积相对较小而卵黄又少的双壳贝类来说, 采用电击卵子的方法来进行转基因研究效果可能更好。

水产生物转基因所用的电击仪器主要是 Baekon2000^[1-8, 12]。但该仪器现在已不再生产了。其它电击仪器都不太适合, 因为真核细胞需要方形的电脉冲波形, 指数衰减的波形对细胞的损伤很大, 而正弦波 (Radio Frequency, RF) 比直流方波更好^[13]。Gene Pulser II 转基因仪含有一个射频模块 (RF Module), 既可以产生纯粹的直流方波, 也可以产生方波和高频正弦波的叠加波形 (FlexWave)。该模块已成功用于青鳉胚胎的电击转基因研究^[11]。Chang 等^[13]曾用 RF 电击海胆卵子并观察到半乳糖苷 (β -gal) 基因的表达, 但未进行授精等试验。

合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 是中国生产海水珍珠的主要母贝, 闻名遐尔的南珠即为该贝所产。但近年来合浦珠母贝的养殖出现大量死亡和育珠质量下降的问题, 严重影响了珍珠产业的发展。为此, 作者开展了大珠母贝和合浦珠母贝精子介导的转基因育种初步研究^[7-10]。为了验证电击卵子介导转基因的可能性, 作者用 Gene Pulser II RF Module 电脉冲转基因仪对合

浦珠母贝卵子进行了脉冲电击试验, 以优化电击脉冲参数组合, 为卵子介导的转基因研究提供技术参数。

1 材料和方法

1.1 实验材料

所用合浦珠母贝取自深圳澳头珍珠养殖场, 选取成熟亲贝, 解剖后采集精卵备用。实验所用仪器为 Gene pulse II RF Module 电脉冲转基因仪。

电击缓冲液: 利用仪器手册^[13]所提供的 3 种配方对海水进行了优化, 最后选用 PB-Sucrose 缓冲液作为电击缓冲液, 配方如下: 272mmol/L 蔗糖, 7mmol/L 磷酸钠, 1mmol/L 氯化镁。

1.2 实验方法

1.2.1 各电击参数概念与相互关系

Gene pulse II RF module 的电击参数包括^[13]: 脉冲总电压 (5~400V)、脉冲持续时间 (0.1~100ms)、调制百分比 (0~100%)、脉冲频率 (5~50kHz)、脉冲个数 (1~25)、脉冲间隔 (0.1~10s)。各参数的相互关系见图 1。脉冲频率决定振动次数。调制百分比决定脉冲波形 (图 2), 当调制百分比为 0 时输出波形为直流方波 (图 2A), 当调制百分比为 100% 时输出波形为正弦波 (图 2C), 类似于 Baekon2000 仪器的波形^[8]。

1.2.2 电击参数设定

根据 Gene pulse II RF Module 手册^[13], 电压和脉冲持续时

收稿日期: 2005-04-06; 修回日期: 2005-06-01

基金项目: 广东省科技计划项目 (2002B2150101)

作者简介: 喻达辉 (1963-), 男, 湖北利川人, 硕士, 副研究员, 从事海洋生物技术研究, E-mail: yudh231@21cn.com

间是待优化的最主要参数。因此首先设定脉冲频率为 50kHz 不变, 设置不同的脉冲电压: 100、200、300、400 V 和脉冲持续时间: 0.5、1、1.5、2、2.5、3 ms 的正交组合 24 个。根据实验结果再选择脉冲电压 300V 和脉冲持续时间 0.5ms 不变, 设定脉冲频率为 10、20、30、40 kHz 共 4 个组合, 总共 28 个组合并各设平行组进行电击试验。

在所有实验中, 调制百分比 (100%)、脉冲间隔 (1.0s)、电极距离 (2mm)、脉冲个数 (5 个) 保持不变, 脉冲频率 (kHz)、

脉冲电压 (V) 和脉冲持续时间 (ms) 为试验参数。

1.2.3 电击与授精

各小组以 150 μ L 卵液 (密度为 5×10^5 粒/mL) 和 100 μ L PBS 缓冲液的比例混匀后移入电击杯中, 在不同电脉冲参数下进行电击, 电击后倒入培养皿中, 加入 100 μ L 精液 (密度为 1×10^7 个/mL) 和质量分数 0.06% 氨海水 10mL 进行授精, 对照组的卵子不进行电击, 授精条件与实验组相同。

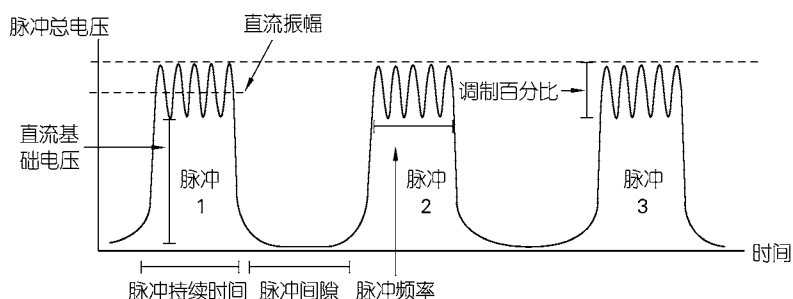


图 1 Gene pulse II RF module 的电击参数及其相互关系示意

Fig. 1 Relationship between the system variables: voltage, percent modulation, burst duration, frequency, burst interval, and number of bursts

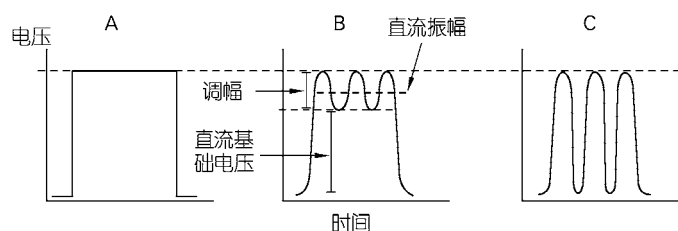


图 2 脉冲调制百分比的作用

Fig. 2 Effect of changing percent modulation on the output waveform

A: 调制百分比为 0, 输出方波; B: 调制百分比为 30%, 正弦波振幅为总电压的 30%; C: 调制百分比为 100%, 输出振幅为 100% 的正弦波。

A: 0% modulation produces a square wave; B: 30% modulation produces a sine wave with a peak-peak voltage; C: 100% modulation produces a sine wave with a maximum voltage (the DC base is 0 V)

1.2.4 受精率与孵化率计算

在 28 $\times$ 下培养 30min 后检测各组受精率, 8h 后测定孵化率。以显微镜一个视野中受精卵所占的百分比计算受精率, 观察 4 个视野, 取其平均值。孵化率的计算类同。

1.3 数据统计分析

对各组参数结果参照文献[14]用秩和检验进行显著性检验分析。

2 结果

2.1 电压与脉冲持续时间对合浦珠母贝卵子的影响

在脉冲频率为 50kHz、脉冲个数 5 个保持不变的条件下, 不同电压与脉冲持续时间对合浦珠母贝卵子的影响通过电击处理后卵子的受精率和孵化率来衡量, 其结果如表 1、表 2 所示。

从表 1 可看出电压越高,脉冲时间越长,其受精率越低。当脉冲持续时间为 0.5ms,电压 100V 时,受精率最高,达 87%;电压 400V,持续时间 3.0ms 时,受精率最低,仅有 10%;当电压 300V 时,脉冲持续时间不超过 2.5ms 其受精率都在 50%以上。

从表 1 可看出孵化率的变化趋势与受精率相同。当脉冲持续时间为 0.5ms,脉冲电压 100V 时,其孵化率最高,达到 80%;脉冲持续时间为 3ms,脉冲电压 400V 时孵化率最低,只有 10%。当脉冲电压低于 300V,脉冲持续时间不超过 2.5ms 时其孵化率都在 48%以上。

用孵化率数据进行秩和检验,结果显示,不同脉冲持续时间之间的孵化率差异不显著, P 值处于 0.05~0.10 之间,仅 0.5ms 与 3.0ms 组之间处于临界值 $P=0.05$,表明脉冲持续时间最好要低于 3.0ms。但不同脉冲电压之间的孵化率差异除了 100V 和 200V 之间没有显著性差异外其它各组之间均有显著性差异,其中 400V 电压组与其它各组之间的差异达到极高显著性 ($P<0.01$)。这一结果表明,脉冲电压是一个非常敏感的参数,其值应不超过 300V。

表 1 不同脉冲电压和脉冲持续时间电击合浦珠母贝卵子后的受精率(%) / 孵化率(%)

Tab.1 Rates of fertilization (%) and hatch (%) of electroporated eggs with normal sperm of *Pinctada fucata* under different volts and burst durations

脉冲电压 (V)	脉冲持续时间 (ms)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0	93/92	-	-	-	-	-	-
100	-	87/80	86/77	83/72	83/71	71/69	56/60
200	-	82/73	85/71	86/73	86/71	70/65	49/46
300	-	80/71	84/71	83/55	58/53	50/48	30/28
400	-	75/67	36/32	32/30	30/30	15/12	10/10

注:脉冲频率为 50kHz,脉冲个数为 5

2.2 不同脉冲频率对合浦珠母贝卵子的影响

在电压 300V、脉冲持续时间 0.5ms 的条件下,用不同电脉冲频率电击合浦珠母贝卵子,电击后的受精率及孵化率见图 3。从图 3 可看出随着脉冲频率的增加,受精率和孵化率随之提高,相关系数达 0.83。当脉冲频率低于 20kHz,其受精率和孵化率都很低 (<40%)。表明低频率对卵子的损伤很大。而当脉冲频率等于或大于 20kHz 时受精率和孵化率均高于 60%,表明合浦珠母贝卵子对高频的适应范围较宽。

3 讨论

3.1 电击参数的优化选择

在电脉冲法转基因中,影响转基因效率的因素很多,包括电脉冲参数、外源 DNA 的浓度^[2-3, 7, 9, 15]、结构^[16]以及辅助试剂(如 PEG 等)的用量等。其中电脉冲参数是最重要的影响因素,其衡量标准应以其对实验对象存活率的影响为准。如果电击后的卵子受精率很低,即使基因转进去了,其作用也不大。为了使电击处理后的卵细胞既有较高的存活率,又有较高的基因转移效率,处理后的受精率和孵化率以 50%为下限是合适的和可接受的。

Gene pulser II RF Module 电脉冲仪的电击参数有电压、脉冲持续时间、脉冲频率、脉冲个数、调制百分比、脉冲间隔。

作者实验结果表明,电压是最重要、最敏感的参数,电压值应

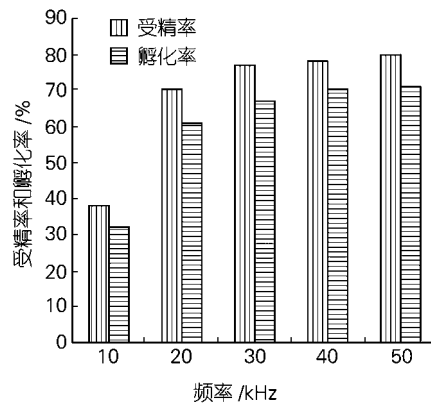


图 3 不同频率参数电击后的受精率和孵化率(%)

Fig. 3 Rates of fertilization and hatch (%) of eggs after electroporation at different frequencies
电压 300V, 脉冲持续时间 0.5ms

The volt was 300 V and burst duration was 0.5 ms

表2 Baekon 2000 和 Bio-Rad gene pulser II RF module 两台仪器的参数比较

Tab. 2 Comparisons of pulse parameters in Baekon 2000 and Bio-Rad gene pulser II RF module apparatus

仪器	脉冲个数	持续时间 (ms)	脉冲间隔 (s)	脉冲数	脉冲幅度 (kV/cm)	电击距离 (mm)	资料来源
Baekon2000	6	327.68 ^a	0.472 ^b	2048	100 ^d	1.0	[1]
	6	15.36 ^a	1.585 ^b	128	100 ^d	1.0	[2]
	6	30.72 ^a	1.569 ^b	256	60 ^d	1.0	[8]
	6	15.36 ^a	1.585 ^b	128	100 ^d	1.0	[7]
Bio-Rad gene pulser II RF module	1, 3	2.0	0.1, 1.0	5, 15	0.8~1.4	1.0	[13]
	3	10	1.0	350 ^c	0.0625 ^d	4.0	[11]
	5	1.0	1.0	30~50 ^c	1.0 ^d	2.0	[10]
	5	2.0	1.0	60~100 ^c	1.0 ^d	2.0	本文

注：持续时间=脉冲数×脉冲宽度；脉冲间隔=脉冲时间-持续时间；脉冲数=脉冲频率×持续时间；脉冲幅度=脉冲电压/电击杯间隔。标注 a, b, c, d 的是通过参数之间的关系换算而来。

在 200V 范围内。根据 Chang 等^[13]的实验，电压增加，转基因效率提高但存活率下降。因此需要找一个平衡点。从提高转基因效率角度出发，兼顾存活率 50% 的阈值，电压值的高限可取 300V。脉冲持续时间和脉冲频率的适应范围较宽，但脉冲频率应不低于 20kHz，考虑到低频对细胞的高损伤特性，可取高限值 50 kHz。如果电压取值 300V (1.5kV/cm)，脉冲持续时间应在 2.0ms 内，如果电压取值 200V (1.0kV/cm)，脉冲持续时间应在 2.5ms 内。悬浮细胞转化效率最高的电压值为 0.8kV/cm^[13]，因此综合考虑，比较优化的参数组合为：电压 200V 即 1.0 kV/cm，脉冲频率 50 kHz，持续时间 2.0ms；或电压 300V (1.5 kV/cm) 脉冲频率 50 kHz，持续时间 1.5ms。调制百分比 (100%)、脉冲间隔 (1.0s)、电极距离 (2mm)、脉冲个数 (5 个) 保持不变。其中电击距离是由电击杯 (cuvette) 决定的，不同电击杯应相应调整电压值。另外，脉冲间隔和脉冲个数仍有待优化。脉冲间隔的可变空间较大，Chang 等^[13]曾用 0.1s，脉冲间隔的缩短可能会有助于转基因效率的提高。而脉冲个数的变化空间则较小。在青鳉胚胎的转基因中持续时间较长^[11]，可能与胚胎的耐受能力较强有关。上述参数的优化是以孵化率指标来考虑的，有待于用报道基因验证和进一步优化。

3.2 不同文献报道的电击参数比较

作者对不同研究者用 Baekon 2000 和 Bio-Rad gene pulser II RF module 两台仪器进行转基因时所用的电击参数进行了比较。发现不同仪器之间电击参数变异较大，其主要差异在持续时间和脉冲电压 (表 2)。尤其 Baekon 2000 的电压 (脉冲幅度) 要比 RF module 高很多，Baekon2000 达到 100kV/cm，而 RF module 只有 1.0kV/cm 左右，相差 100 倍。持续时间从 300ms (Baekon2000) 到 1ms (RF module)。此外，不同研究者所用的脉冲数变异也较大。Baekon2000 一直是水产生物转基因研究

最钟爱的转基因仪，而据本实验，电压是一个非常敏感的参数，达到一定值后死亡率升高^[13]。

对于 RF module，不同研究者和不同实验材料 (包括精子、卵子、培养细胞、胚胎) 所得到的参数变化不大，比较一致。但 Hostetler^[11]所用的电压特别低 (25V, 4mm 的电击杯)，脉冲持续时间较长 (10ms)，死亡率也较高。而 Baekon2000 的脉冲数 (no. of oscillations) 和脉冲个数 (no. of bursts) 变化范围较大，但对结果影响不大^[2]。这是因为仪器的不同而异或是因为实验材料的不同而异，有待进一步研究。使用 RF module 时，贴壁细胞 (attached cells) 与悬浮细胞 (suspended cells) 的最佳参数有所不同^[13]。

作者的实验结果与合浦珠母贝精子的参数范围基本一致^[9, 10]。表明合浦珠母贝卵子对电击的适应能力也较强，有潜力用于电击转基因的研究。

参考文献：

- [1] Powers D A, Kirby V L, Cole T, *et al.* Electroporation as an effective means of introducing DNA into abalone (*Haliotis rufescens*) embryos[J]. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, 1995, 4: 369–375.
- [2] Tsai H J, Lai C H, Yang H S. Sperm as a carrier to introduce an exogenous DNA fragment into the oocyte of Japanese abalone (*Haliotis divorsicolor suportexta*) [J]. **Transgenic Research**, 1997, 6: 85–95.
- [3] Symonds J E, Walker S P, Sin F Y T. Electroporation of salmon sperm with plasmid DNA: evidence of enhanced sperm/DNA association[J]. **Aquaculture**, 1994, 119: 313–327.
- [4] Symonds J E, Walker S P, Sin F Y T, Sin I. Development of a

- mass gene transfer method in Chinook salmon: optimization of gene transfer by electroporated sperm[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3: 104 – 111.
- [5] 钟家玉, 茅卫锋, 朱作言. 电脉冲作用将外源基因导入稀有鮠鲫精子的研究[J]. 遗传学报, 2002, 29(2): 128 – 132.
- [6] 谢岳峰, 刘东, 邹钧, 等. 泥鳅受精卵的电脉冲基因转移[J]. 水生生物学报, 1989, 13(4): 387 – 389.
- [7] 胡炜, 喻达辉, 汪亚平, 等. 大珠母贝精子介导外源基因转移研究[J]. 生物工程学报, 2000, 16(2): 165 – 168.
- [8] 喻达辉, 汪亚平, 吴开畅, 等. 大珠母贝基因转移的电击参数[J]. 水产学报, 2001, 25(5): 408 – 412.
- [9] 江世贵, 喻达辉, 蔡云川, 等. 合浦珠母贝精子携带-电脉冲法转基因[A]. 贾晓平. 南海海洋渔业可持续发展研究[C], 北京: 科学出版社, 2003.307 – 311.
- [10] 蔡云川, 江世贵, 林黑着, 等. 转基因电击参数对合浦珠母贝精子激活率及受精率的影响[A]. 贾晓平, 南海海洋渔业可持续发展研究[C]. 北京: 科学出版社, 2003. 385 – 390.
- [11] Hostetler H A, Peck S L, Muir W M. High efficiency production of germ-line transgenic Japanese medaka (*Oryzias latipes*) by electroporation with direct current-shifted radio frequency pulses[J]. *Transgenic Research*, 2003, 12: 413 – 424.
- [12] Zhao X, Zhang P J, Wong T K. Application of baekonization: a new approach to produce transgenic fish[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1993, 2: 63 – 69.
- [13] Chang D C, Leung D S Y, Ehrlich M, et al. Rapid loading of molecules into animal cells using a radio-frequency electric field[J]. *Biological Bulletin*, 1992, 183:364 – 365.
- [14] 四川医学院主编. 卫生统计学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985.80 – 86.
- [15] Sin F Y T, Bartley A L, Walker S P, et al. Gene transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by electroporating sperm in the presence of pRSV-lacZ DNA[J]. *Aquaculture*, 1993, 117:57 – 69.
- [16] Khoo, H W, Ang L H, Lim H B, et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish[J]. *Aquaculture*, 1992, 107:1 – 19.

Optimization of pulse parameters in electroporation of *Pinctada fucata* eggs

YU Da-hui¹, JIA Xiao-ping¹, CHEN Su-wen¹, LI Xia¹, ZHU Jia-hao²(CHU Ka-hou)

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Simon F. S. Li Marine Science Laboratory, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, Hong Kong)

Received : Apr., 6, 2005

Key words: electroporation; pulse parameter; *Pinctada fucata*; egg; transgene

Abstract: The electroporation of *Pinctada fucata* eggs was carried out to determine optimal pulse parameters for gene transfer by using electroporation apparatus. The eggs of *P. fucata* were electroporated with 28 combinations of parameters (voltages: 100-400 V with 100 V interval, burst duration: 0.5-3.0 ms with 0.5ms interval, and radio frequency: 10-50 kHz with 10 kHz interval) while keeping the following parameters constant: 100% modulation, burst interval 1.0s and 5 bursts, and subsequently fertilized with the sperm. The rates of fertilization and hatch of each combination were calculated after 30-min fertilization. The results indicate that the eggs are sensitive to low radio frequency and high voltage. The rates of fertilization and hatch were low when radio frequency was lower than 20 kHz or voltage higher than 400 V. In contrast, the eggs could tolerate a wide range of burst duration time. These observations suggest that the optimal combination of electroporation parameters are as follows: voltage 300V, burst duration 1.5msec and radio frequency 50kHz, or voltage 200V, burst duration 2.0msec and radio frequency 50kHz, under the requirements of no less than 50% rates of fertilization and hatch.

(本文编辑: 张培新)