

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00999

Tgf2 转座子在团头鲂基因组中的插入效率

郭秀明, 黄创新, 沈睿杰, 蒋霞云, 陈杰, 邹曙明

上海海洋大学, 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306

摘要: 文章通过构建带金鱼 *Tgf2* 转座子左右臂、斑马鱼肌球蛋白轻链 2(*Mlyz2*)启动子和红色荧光蛋白(RFP)的供体质粒 *Tgf2*-*Mlyz2*-RFP, 与 *Tgf2* 转座酶 mRNA 共同显微注射入团头鲂 1~2 细胞期受精卵, 检测金鱼 *Tgf2* 转座子在团头鲂基因组中的整合效率。在团头鲂出膜仔鱼、30 d 和 180 d 幼鱼阶段, 可在鱼体背部和侧面肌肉观察到荧光, 红色荧光蛋白的表达率为 48.1%, PCR 检测结果显示, 金鱼 *Tgf2* 转座系统在团头鲂成鱼基因组中的整合效率为 31.5%; 对 5 尾阳性团头鲂进行了 RT-PCR 检测, 3 尾团头鲂在 12 个组织均能检测到较高的 RFP 基因的表达, 2 尾团头鲂仅在肌肉、皮和肾脏中存在较高的 RFP 基因的表达, 显示 RFP 基因在不同转基因团头鲂个体中的组织表达存在一定差异; 通过检测 *Tgf2* 转座子在团头鲂基因组插入位置 5'端的侧翼序列, 检测出金鱼 *Tgf2* 转座系统在转基因团头鲂中的拷贝数至少为 2 个, 每尾鱼的平均拷贝数大约为 5 个, 50%以上插入位点的侧翼序列可找出其它脊椎动物的相关同源性序列。研究结果显示金鱼 *Tgf2* 转座子可高效介导基因在团头鲂基因组中插入, 为开展团头鲂转基因和基因捕获研究奠定了一定的基础。

关键词: *Tgf2* 转座子; 基因组; 团头鲂; 插入效率

Insertion efficiency of *Tgf2* transposon in the genome of *Megalobrama amblycephala*

GUO Xiu-Ming, HUANG Chuang-Xin, SHEN Rui-Jie, JIANG Xia-Yun, CHEN Jie, ZOU Shu-Ming

Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: To study insertion efficiency of goldfish *Tgf2* transposon in the genome of *Megalobrama amblycephala*, we built *Tgf2*-*Mlyz2*-RFP donor plasmid with goldfish *Tgf2* transposon left and right arms, and then co-injected with goldfish *Tgf2* transposase mRNA into the 1–2 cell stage fertilized eggs of *M. amblycephala*. In 30 d- and 180 d-stage larval, RFP fluorescence can be observed in back and side muscle of the fish. The rate of RFP fluorescence expression was 48.1%. In adult fish, PCR results demonstrated that integration efficiency of goldfish *Tgf2* transposition system was 31.5% in *M. amblycephala* genome. RT-PCR analysis showed that RFP RNAs were highly transcribed among all the 12 tissues in three

收稿日期: 2013-01-21; 修回日期: 2013-02-07

基金项目: “十二五”国家支撑计划(编号: 2012BAD26B02)、国家自然科学基金项目(编号: 31272633, 31201760)和上海高校知识服务平台(ZF1206)资助

作者简介: 郭秀明, 硕士, 专业方向: 鱼类遗传育种。E-mail: guoxiuming_86328@163.com

黄创新, 硕士, 专业方向: 鱼类遗传育种。E-mail: 18817574724@163.com

郭秀明和黄创新为共同第一作者。

通讯作者: 邹曙明, 教授, 博士生导师, 研究方向: 鱼类遗传育种。E-mail: smzou@shou.edu.cn

网络出版时间: 2013-3-21 14:42:08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130321.1442.002.html>

transgenic fishes, while it could be highly detected only in muscle, skin, and kidney in another two individuals. Our results suggested that *RFP* expression in tissues varied among different *M. amblycephala*. By means of the inverse PCR, the copy numbers of *Tgf2* transposon were at least 2 in transgenic *M. amblycephala*. The average copy number of each fish was about 5. Over 50% of flanking sequences at the insertion site have homologous sequence in other vertebrate species. Our data suggest that goldfish *Tgf2* transposon can efficiently mediate gene insertion in *M. amblycephala*, which could be used in transgene and gene trap in *M. amblycephala*.

Keywords: *Tgf2* transposon; genome; *Megalobrama amblycephala*; insertion efficiency

DNA 转座子(Transposon)可通过高效转座, 插入生物基因组特定基因的内部或邻近位点, 获得相关性状插入诱变突变体^[1-3]。转座子的插入诱变策略在鱼类重要性状主控基因的筛选^[4]、功能解释以及转基因^[3]方面有着重要的研究前景。例如, 日本学者发现的 *Tol2* 转座系统^[5]可广泛用于多种动物的转基因研究, 如果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[6]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[7-9]、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)^[10]、鸡(*Gallus gallus*)^[11]、小鼠(*Mus musculus*)^[12,13]等模式生物。金鱼 *Tgf2* 转座子属 *hAT* 转座子家族, 是在不同品系金鱼中发现的可供鲤科鱼类转基因和基因捕获研究的转座子^[14], 它有完整的 DNA 编码序列, 全长 4 720 bp, 具有中间反向重复序列和末端反向重复序列等与转座相关的结构域, 并证实该转座子具有内源性转座活性^[15]。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)俗称武昌鱼、鳊鱼, 是我国重要的草食性经济鱼类之一, 2011 年团头鲂全国产量达到 67.8 万吨, 位于我国淡水养殖鱼类第 7 位^[16]。但是与草鱼、鲤和鲫等典型的鲤科鱼类相比, 团头鲂是相对不耐低氧的种类, 单位水体养殖密度较低, 池塘养殖单产不高, 影响了其养殖产量的提高^[17]。本文利用金鱼 *Tgf2* 转座子的自主转座特征, 将带有红色荧光蛋白 *RFP* 基因的转座子供体质粒与编码转座酶的 mRNA 共显微注射导入团头鲂受精卵中, 构建出表达红色荧光蛋白的转基因团头鲂, 获得了 *Tgf2* 转座子在团头鲂中的转座效率及拷贝数等相关数据, 为以后采用该转座子进行团头鲂耐低氧性状主控基因基因捕获和转基因研究奠定了一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

构建转座子供体质粒的母体质粒 pTgf2-EF1a-

RFP 和编码转座酶的辅助质粒 pCS2-CMV-gfTP 由本实验室构建保存^[18]。团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 催产、人工授精、孵化和养殖在上海海洋大学青浦鱼类育种试验站进行。

1.2 方法

1.2.1 转座子供体质粒构建和转座酶 mRNA 制备

根据文献^[19, 20]以及 NCBI 中斑马鱼肌球蛋白轻链 2(*Mlyz2*)基因启动子序列设计扩增引物 MF、MR、MFX 和 MRB; 根据 pTgf2-EF1a-RFP 载体序列设计 *RFP* 基因的 PCR 检测引物 Red F1- F 和 SV40- R 以及 RT-PCR 检测引物 Red F231-F 和 Red R646-R; 反向 PCR 引物 :Splinkerette-L, Splinkerette-S, Splink1、Tgf2-5'P3、Splink2 和 Tgf2-5'P4, 所有引物合成与测序服务由上海生工生物工程技术有限公司提供(表 1)。

用 DNA 提取试剂盒提取斑马鱼 DNA, 用引物 MF 和 MR 进行 PCR 扩增。获得的 *Mlyz2* 基因启动子片段的 PCR 产物经电泳分离、割胶回收、克隆和测序验证。然后, 采用带有酶切位点的引物 MFX(*Xho*) 和 MRB(*BamH*)进行 PCR 扩增, 经电泳分离、割胶回收、PCR 产物纯化等步骤后 TA 克隆进 pBS-T 载体(北京天根), 再用限制性内切酶 *Xho* 和 *BamH* 双酶切 pBST-Mlyz2 promoter 质粒, 回收目的片段备用; 将 pTgf2-EF1a-RFP 载体用限制性内切酶 *Xho* 和 *BamH* 双酶切, 酶切产物经割胶回收后与 *Mlyz2* 片段进行过夜体外连接, 经转化、挑单克隆、菌液 PCR 检测后测序验证, 测序验证正确的重组质粒载体 Tgf2-Mlyz2-RFP 用于后续的转基因实验。

5'加帽 mRNA 的体外转录采用 mMessage mMachine kit (Ambion, TX, USA), 模板为经限制性内切酶 *Not* 线性化的 pCS2-CMV-gfTP 质粒, 体外转录出 *Tgf2* 转座酶 mRNA 存于液氮中备用。本研究所

有分子实验操作参照《分子克隆实验手册》^[21]。

1.2.2 显微注射与子代培育

将 *Tgf2*-*Mlyz2*-RFP 质粒和 *Tgf2* 转座酶 mRNA, 纯化后溶于一定浓度的酚红和双蒸水, 质粒与 mRNA 的终浓度均为 50 pg/nL, 存放于-20℃ 冰箱备用。在立体解剖镜下对处于 1~2 细胞期的团头鲂受精卵进行注射, 每枚受精卵注射量为 2 nL。注射后的受精卵放入 25℃ 左右的室温孵化, 4 h 换一次水。仔鱼出膜后继续培育, 待其开口后用蛋黄培育一周左右, 然后放入土池中饲养。

1.2.3 红色荧光表达的观察、RFP 基因在团头鲂基因组中的阳性率检测

显微注射结束后, 每隔 6 h 在荧光显微镜下观察团头鲂红色荧光表达情况, 当观察到鱼体有红色荧光表达后, 统计荧光率。取饲养 180 d 的实验团头鲂左腹鳍提取 DNA, 进行 *RFP* 基因的 PCR 检测, 所用引物为 Red F1-F 和 SV40-R, 将 PCR 产物进行 TA 克隆并测序验证, 团头鲂基因组中检测到 *RFP* 基因的为阳性团头鲂, 通过统计获得 *RFP* 基因在团头鲂基因组中的阳性率, 即为报告基因 *RFP* 在团头鲂基因组中的整合率。

1.2.4 RT-PCR 方法检测 *RFP* 基因在团头鲂各组织中的表达

取 5 尾 PCR 检测为阳性的团头鲂提取 RNA, 进

行 RT-PCR 检测, 检测 *RFP* 基因在团头鲂不同组织的表达情况, 检测的组织共 12 个, 包括肾脏、脑、脾脏、性腺、胃、眼睛、皮、肌肉、鳃、心脏、肠和肝脏。先取 1 μg 总 RNA 反转录出 cDNA, 再以 cDNA 为模板进行 PCR 检测, 所用引物为 Red F231-F 和 Red R646-R, 将 PCR 产物进行 TA 克隆并测序验证, 电泳拍照记录 *RFP* 基因在不同鱼体各组织中的表达情况。

1.2.5 *Tgf2* 转座子在团头鲂基因组中的拷贝数及相应插入位点检测

取 5 尾 PCR 检测为阳性的团头鲂肌肉 DNA, 进行反向 PCR 检测^[22, 23], 先用限制性内切酶 *Sau3A1* 进行 37℃ 水浴酶切 12 h, 然后将酶切完全的团头鲂基因组 DNA 产物在 65℃ 水浴 20 min, 以终止限制性内切酶活性, 于-20℃ 保存备用。Splinkerette-L 与 Splinkerette-S 等浓度、等体积混合, 终浓度为 50 μmol/L, 95℃ 保温 5 min, 然后以 1℃/15 s 逐步降至 4℃, 长序列与短序列复性形成 splinkerette 接头。将该 DNA 与接头连接, 连接之后 65℃ 水浴 20 min, 并用大量 DNA 纯化试剂盒(天根)过柱纯化, 最终体积为 40 μL。

5'PCR 扩增: 第一轮 PCR 反应, 以生成的带有 splinkerette 接头的基因组酶切片段 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增引物为 *Tgf2*-5'P3 和 Splinker1。第二轮 PCR 反应, 以第一轮 PCR 产物稀释 50 倍为模板, 以引物 *Tgf2*-5'P4 和 Splinker2 进行 PCR 扩增。

表 1 *Tgf2* 转座子在团头鲂基因组中插入效率研究所用引物及相关信息

引物名称	引物序列(5'→3')	用途	复性温度(℃)
MF	TTCGCCACAGAGGAATGAGC	扩增 <i>Mlyz2</i> 启动子	59
MR	TGTCCTGTACTTGAGGGGCT		
MFX	CCGCTCGAGTTCGCCACAGAGGAATGAGC	构建含 <i>Mlyz2</i> 的载体	60
MRB	CGGGATCCTGTCCTGTACTTGAGGGGCT		
Red F1-F	ATGGCCTCCTCCGAGAACGTC	<i>RFP</i> 基因阳性率检测	61
SV40-R	TGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCAC		
Red F231-F	CGACATCCCCGACTACAAGA	<i>RFP</i> 基因 RT-PCR 检测	59
Red R646-R	CTGCTCCACGATGGTGTAGTCC		
Splinkerette-L	CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACCGTGGCTGAA TGAGACTGGTGTGACACTAGTGG	合成接头	—
Splinkerette-S	GATCCCACTAGTGTGACACCACTCTCTAATTTTTTTTTT TCAAAAAA		
Splink1	CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACC	第一轮反向 PCR	65
<i>Tgf2</i> -5'P3	TAAGTACTTTTTGACTGTAAATAAAATTGTAAGGAGT	第二轮反向 PCR	59
Splink2	GTGGCTGAA TGAGACTGGTGTGAC		
<i>Tgf2</i> -5'P4	AAGTATTGATTTTTAATTGTACTCAAGTAA AGT		

注: 加下划线序列为酶切位点。

对上述步骤第二轮所获 PCR 产物进行 TA 克隆并进行测序, 对所获序列进行分析得出 *Tgf2* 转座子在团头鲂基因组中的拷贝数及相应插入位点。

2 结果与分析

2.1 *Tgf2*-*Mlyz2*-RFP 转基因供体质粒的构建

通过 PCR 方法, 获得大小为 1 937 bp 的斑马鱼肌球蛋白轻链 2(*Mlyz2*)基因启动子片段, 并构建了含有 *Mlyz2* 基因启动子的 *Tgf2* 转基因供体质粒 p*Tgf2*-*Mlyz2*-RFP, 该质粒包含 *Tgf2* 转座子的左臂(220 bp)、右臂(185 bp)和红色荧光蛋白(RFP)阅读框(图 1A)。转基因辅助质粒 pCS2-CMV-gfTP 的结构如图 1B 所示, 用该质粒为模板体外转录出编码 *Tgf2*

转座酶的 mRNA, 以介导供体质粒携带的外源基因整合到团头鲂基因组中。

2.2 红色荧光的观察及 *RFP* 基因的 PCR 检测

由于卵膜透明度较差, 转基因团头鲂在胚胎期未观察到荧光; 仔鱼出膜后可在背部和侧面肌肉观察到荧光, 呈现若干个高亮度的带状斑点; 随着胚胎发育的发展, 荧光强度有不断增加, 面积不断扩大的趋势。饲养 30 d 左右的转基因团头鲂几乎整个背部和侧面均可观察到强荧光, 部分强烈表达的部位在自然光照射下, 用肉眼即可观察到红色; 随着鱼体长大, 取饲养 180 d 左右的团头鲂观察, 部分转基因团头鲂仍可在自然光下观察到红色, 但是因为鳞片的遮挡, 红色荧光的肉眼观察存在一定难度(图 2:A~F)。

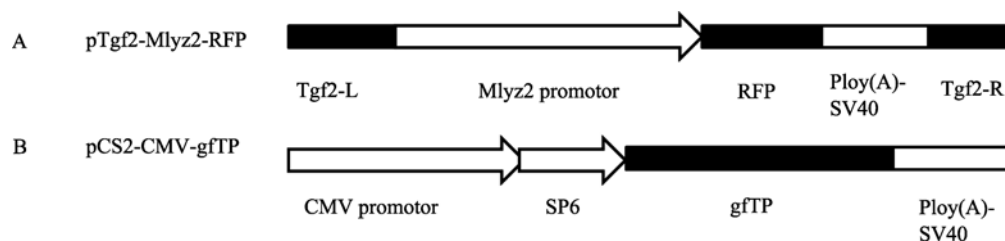


图 1 转基因供体质粒及辅助质粒示意图

A: 转基因供体质粒 p*Tgf2*-*Mlyz2*-RFP 结构示意图; B: 转基因辅助质粒 pCS2-CMV-gfTP 结构示意图。

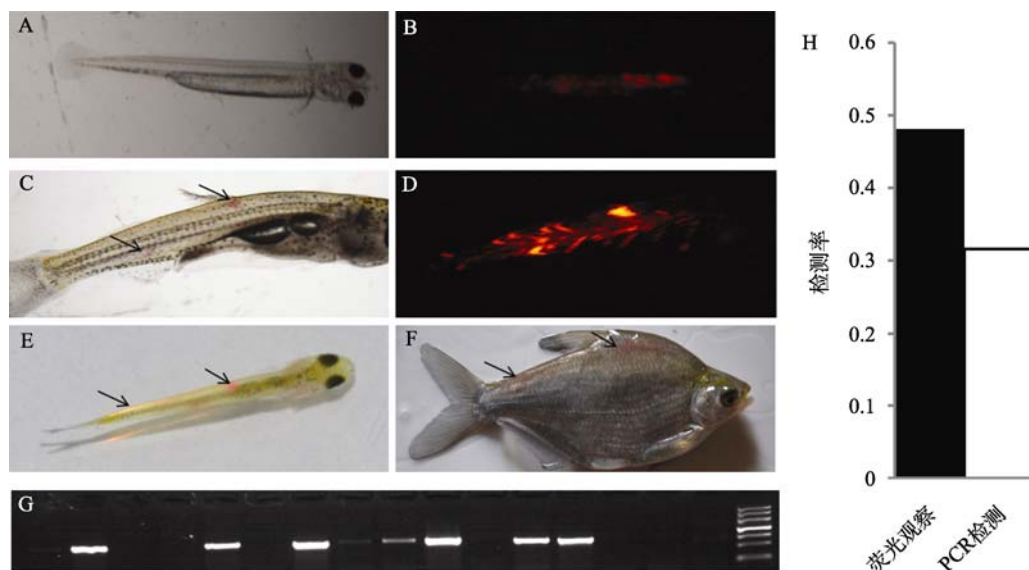


图 2 转基因团头鲂 *RFP* 基因的荧光表达率和转座效率

A: 显微镜透射光下出膜 12 h 的红色团头鲂; B: 显微镜荧光下出膜 12 h 的红色团头鲂; C: 显微镜透射光下 30 d 的红色团头鲂; D: 显微镜荧光下 30 d 的红色团头鲂; E: 自然光下 30 d 的红色团头鲂; F: 自然光下 180 d 的红色团头鲂; G: *RFP* 基因的 PCR 检测电泳图; H: 转基因团头鲂在仔鱼(黑色柱)和成鱼(白色柱)*RFP* 基因表达的检测率。

显微注射存活 570 尾出膜的团头鲂仔鱼, 有 274 尾观察到红色荧光, 荧光率为 48.1%。提取 295 尾团头鲂成鱼 DNA, 其中 93 尾团头鲂的 DNA 中可检测出 *RFP* 基因, *Tgf2* 转座系统在团头鲂成鱼基因组中的整合效率为 31.5%(图 2H), 该结果显示荧光率明显高于 PCR 检测出的整合率。

2.3 *RFP* 基因在转基因团头鲂不同组织中的表达情况

对 5 尾阳性团头鲂成鱼进行了 RT-PCR 检测, 检测的组织共 12 个, 包括肾脏、脑、脾脏、性腺、胃、眼睛、皮、肌肉、鳃、心脏、肠和肝脏。其中, 团头鲂个体 1 的肌肉、皮和肾脏中存在较高的 *RFP* 基因的表达, 而脑、胃、鳃和肝脏组织则仅能检测到微弱的表达(图 3A); 团头鲂个体 3 在 12 个组织均能检测到较高的 *RFP* 基因的表达(图 3B); 另外 3 尾团头鲂中, 团头鲂个体 2 所检测结果与个体 1 相似, 个体 4、5 检测结果与个体 3 相似。上述结果表明, *RFP* 基因的表达在不同转基因团头鲂个体组织中存在不同的表达模式, 一些个体在全部检测组织中均有表达, 而有些个体仅在肌肉、皮等少数组织中表达(图 3)。

2.4 *Tgf2* 转座子在团头鲂基因组中的拷贝数及插入位点的检测

采用反向 PCR 方法, 对 5 尾阳性团头鲂成鱼基

因组中 *Tgf2* 转座子的插入位点的侧翼序列进行了检测(图 4)。5'端反向 PCR 结果显示, 5 尾阳性团头鲂共检测出片段大小从 11 ~ 1 038 bp 不等的侧翼序列 23 条, 即总共为 23 个拷贝数。其中, 团头鲂个体 1 有 7 个拷贝、个体 2 有 6 个拷贝、个体 3 有 5 个拷贝、个体 4 有 3 个拷贝和个体 5 有 2 个拷贝(表 2)。经分析可知在每条鱼体内的拷贝数至少为 2 个, 平均拷贝数大约为 5 个, 另外分析与 *Tgf2* 转座子左末端相邻的侧翼序列的 8 碱基插入位点后发现, *Tgf2* 转座子在团头鲂插入位点 5'端的侧翼存在一定的偏好性(表 2)。例如在 5'端侧翼的 23 个位点中, 团头鲂个体 1 与个体 3 具有相同 CAGCCATT 的 8 碱基插入位点。对所得的侧翼序列在 NCBI 进行 Blast 比对, 50% 以上插入位点的侧翼序列可找出其它模式脊椎动物的相关同源性序列(表 2)。

3 讨论

在鱼类分子育种中, 由转座子介导的转基因技术既能将不同鱼种的优良基因进行传递, 也能使鱼体产生新的变异, 同时鱼类重要性状主控基因^[24]可以采用转座子介导的基因捕获技术进行筛选^[25]。例如 Fujimura 等^[26]利用 *Tol2* 介导转基因罗非鱼; Golling 等^[27]利用转座元件成功构建了插入诱变的斑马鱼从而迅速确定性状关键基因。金鱼 *Tgf2* 转座

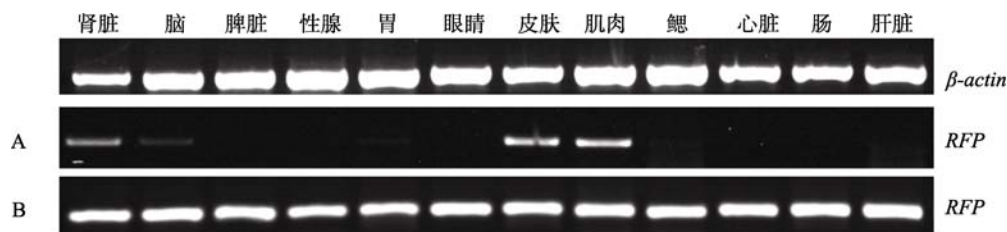


图 3 转基因团头鲂 RT-PCR 检测电泳图

A: 团头鲂个体 1 的 12 个组织的 *RFP* 基因 RT-PCR 检测; B: 团头鲂个体 3 的 12 个组织的 *RFP* 基因 RT-PCR 检测。

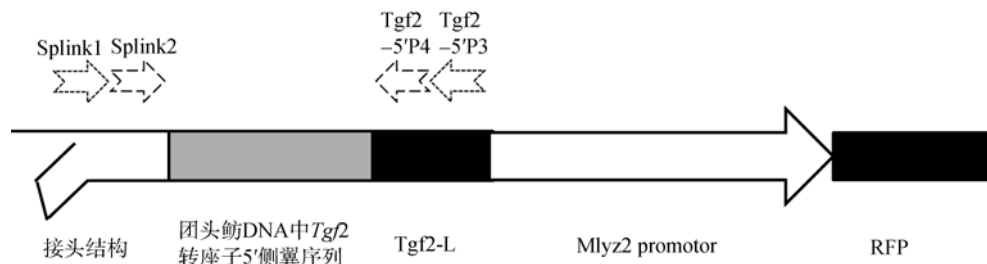


图 4 *Tgf2* 转座子在团头鲂基因组中插入位点检测示意图

表 2 *Tgf2* 转座子在转基因阳性团头鲂基因组中的 5'插入位点

个体	拷贝数	5'端 8 bp 序列	插入位置(5'→3')及对应同源序列
1	1	CCAAAGGTCAGAGGTG	未知
	2	CAGCCATT CAGAGGTG	未知
	3	GATGAAACCAGAGGTG	未知
	4	GGTACTAGCAGAGGTG	<i>Cyprinus carpio</i> clone 830457 microsatellite sequence94-222; <i>Ictalurus punctatus</i> toll-like receptor 5 (TLR-5) gene, complete cds95-218
	5	GTGATAAGCAGAGGTG	未知
	6	ACAGATGGCAGAGGTG	未知
	7	CTCGCACTCAGAGGTG	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-80M2 in linkage group 21, complete sequence208-867
2	1	GTTACTGGCAGAGGTG	未知
	2	CTCACAGGCAGAGGTG	未知
	3	CCGTTTAT CAGAGGTG	未知
	4	ATTTTTC CAGAGGTG	未知
	5	CAAAAGACCAGAGGTG	未知
	6	ATGTTCTG CAGAGGTG	<i>Cyprinus carpio</i> clone 198949 microsatellite sequence Length=1415 231-835
3	1	CTGATGTGCAGAGGTG	<i>Cyprinus carpio</i> clone 482703 microsatellite sequence 1-89;
	2	CTTGTTCAGAGGTG	<i>Dicentrarchus labrax</i> chromosome sequence corresponding to linkage group 1, top part, complete sequence 295-557
	3	TTGGTCTGCAGAGGTG	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-190A18 in linkage group 23, complete sequence1-215;
	4	CAGCCATT CAGAGGTG	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-196G2 in linkage group 59-121
	5	ATAGACACCAGAGGTG	未知
4	1	CCCATCAGCAGAGGTG	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-134D6, complete sequence Length=197991 125-489
	2	GTTGTATA CAGAGGTG	<i>Cyprinus carpio</i> clone 663886 microsatellite sequence 8-42
	3	ATTACGCACAGAGGTG	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-240E14 in linkage group 16, complete sequence Length=137574 1-240
5	1	GTAAAAATCAGAGGTG	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-158N5 in linkage group 25 contains the 5' part of a gene for a novel protein (zgc:63541), complete sequence Length=44830 46-519
	2	TGTGTAATCAGAGGTG	<i>Mus musculus</i> BAC clone RP23-351K24 from chromosome 16, complete sequence Length=175409 1-20

注：加下划线序列为 *Tgf2* 左末端 8 bp 序列，相同背景的为相同的插入位点侧翼序列。

子属 *hAT* 转座子家族，具有自主转座活性，它有完整的 DNA 编码序列，全长 4 720 bp，具有末端反向重复序列和亚末端重复序列等与转座相关的结构域，可供进行鱼类转基因和基因捕获研究^[14,15]。由于金鱼 *Tgf2* 转座子是 *hAT* 转座子家族中的新成员，利用金鱼 *Tgf2* 转座子进行鲤科养殖鱼类转基因以及基因整合效率和整合特征的研究还未见报道。

本文将包含金鱼 *Tgf2* 转座子的左臂(220 bp)、右臂(185 bp)、斑马鱼 *Mlyz2* 启动子和 RFP 基因的供体质粒和辅助质粒转录出的 mRNA 共导入团头鲂受精卵内，构建出了表达红色荧光的团头鲂，并对获得的转基因团头鲂进行了观察及检测。本研究转基因团头鲂出膜仔鱼的荧光率为 48.1%，与青鳉中发现的 *Tol2* 转座子在不同脊椎动物中的荧光表达率

相近^[2]，均为 50%左右。而 PCR 检测 180 d 的团头鲂显示 *Tgf2* 转座子的转基因整合率为 31.5%，明显高于采用线性化质粒注射方式获得的检测率(低于 10%)^[18,28]。游离供体质粒 p*Tgf2*-*Mlyz2*-RFP 的存在可能是造成团头鲂出膜仔鱼体内荧光表达率高的原因，而 180 d 的团头鲂细胞内的游离 p*Tgf2*-*Mlyz2*-RFP 供体质粒已降解，此时 PCR 检测为阳性的团头鲂均是 *RFP* 基因已经插入基因组中的团头鲂；另外，一些转基因整合阳性团头鲂也可能会因转座子插入到一些重要功能基因，导致其在早期死亡，从而造成转基因整合效率的下降。

转基因团头鲂红色荧光的表达起初均为亮斑，随着发育的进展，红色荧光强度不断增加，面积不断扩大，几乎整个背部和侧面均可观察到强荧光，

转基因团头鲂红色荧光的表达特征是否是因嵌合体引起的? 转基因团头鲂红色荧光的时空表达可能与供体质粒中所包含的肌肉特异性的 *Mlyz2* 启动子有关, 尽管在鱼体大部分组织和器官细胞中都存在肌球蛋白, 但是在肌肉组织的肌球蛋白数量最多^[19,20,29], 因此转基因团头鲂红色荧光的时空表达特征与肌肉细胞的发育和生长到达的区域紧密相关。进一步的 RT-PCR 检测显示, 2 尾团头鲂个体在肌肉、皮和肾脏中存在较高的表达, 3 尾团头鲂在所检测的所有 12 个组织中均能检测到较高的 *RFP* 表达, 在抽样转基因个体的不同组织均能检测到 *RFP* 的转录, 表明该基因在不同组织或器官细胞内基因组中均存在整合, 证明这些转基因个体应该是以非嵌合体的形式存在, 我们获得的转基因团头鲂红色荧光表达与转基因斑马鱼绿色荧光表达^[19,30]、转基因青鳉、唐鱼的红色荧光表达存在大致相同的情况^[29,31]。

采用反向 PCR 技术对转基因团头鲂基因组中金鱼 *Tgf2* 转座子的插入位点的侧翼序列进行了检测, 通过序列分析可知在每条阳性团头鲂基因组内 *Tgf2* 转座子的拷贝数至少为 2 个, 平均拷贝数大约为 5 个, 与青鳉 *Tol2* 转座元件在子代中的整合拷贝数相近^[24]。因为团头鲂未进行全基因组测序, 其插入位点的具体基因不得而知, 但是经过在 NCBI 进行 Blast 比对, 获得了与插入位点侧翼序列同源性在 50% 以上的相关基因, 为以后利用金鱼 *Tgf2* 转座子进行转基因插入诱变研究提供了基础数据; 同时经分析可知 *Tgf2* 转座子在插入团头鲂基因组时具有一定的特异喜好位点, 关于金鱼 *Tgf2* 转座子插入基因组的插入位点是否存在广泛的偏好性还有待进一步的研究考证。

参考文献(References):

- [1] Csaba M, Zsuzsanna I, Ronald HP, Zoltan I. The *Frog Prince*: a reconstructed transposon from *Rana pipiens* with high transpositional activity in vertebrate cells. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(23): 6873–6881. DOI
- [2] Kawakami K. *Tol2*: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol*, 2007, 8(Suppl. 1): S7. DOI
- [3] 邹曙明, 杜雪地, 蒋霞云. 鱼类活性 DNA 转座子的发掘与应用概况. 上海海洋大学学报, 2012, 21(5): 656–661. DOI
- [4] Standford WL, Cohn JB, Cordes SP. Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(10): 756–768. DOI
- [5] 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), 1989, (2): 147–155. DOI
- [6] Urasaki A, Mito T, Noji S, Ueda R, Kawakami K. Transposition of the vertebrate *Tol2* transposable element in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 2008, 425(1–2): 64–68. DOI
- [7] Kawakami K, Shima A. Identification of the *Tol2* transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous *Tol2* element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene*, 1999, 240(1): 239–244. DOI
- [8] Kawakami K, Koga A, Hori H, Shima A. Excision of the *Tol2* transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*. *Gene*, 1998, 225(1–2): 17–22. DOI
- [9] Kawakami K, Shima A, Kawakami N. Identification of a functional transposase of the *Tol2* element, an *Ac*-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(21): 11403–11408. DOI
- [10] Kawakami K, Imanaka K, Itoh M, Taira M. Excision of the *Tol2* transposable element of the medaka fish *Oryzias latipes* in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Gene*, 2004, 338(1): 93–98. DOI
- [11] Sato Y, Kasai T, Nakagawa S, Tanabe K, Watanabe T, Kawakami K, Takahashi Y. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. *Dev Biol*, 2007, 305(2): 616–624. DOI
- [12] Kawakami K, Noda T. Transposition of the *Tol2* element, an *Ac*-like element from the Japanese medaka fish *Oryzias latipes*, in mouse embryonic stem cells. *Genetics*, 2004, 166(2): 895–899. DOI
- [13] Balciunas D, Wangenstein KJ, Wilber A, Bell J, Geurts A, Sivasubbu S, Wang X, Hackett PB, Largaespada DA, McIvor RS, Ekker SC. Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates. *PLoS Genet*, 2006, 2(11): e169. DOI
- [14] 邹曙明, 杜雪地, 袁剑, 蒋霞云. 金鱼 hAT 家族转座子 *Tgf2* 的克隆及其结构. 遗传, 2010, 32(12): 1263–1268. DOI
- [15] Jiang XY, Du XD, Tian YM, Shen RJ, Sun CF, Zou SM. Goldfish transposase *Tgf2* presumably from recent horizontal transfer is active. *FASEB J*, 2012, 26(7): 2743–2752. DOI
- [16] Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Chinese Fisheries Yearbook. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2012: 30–31. DOI
- [17] Shen RJ, Jiang XY, Pu JW, Zou SM. HIF-1 α and -2 α genes in a hypoxia-sensitive teleost species *Megalobrama amblycephala*: cDNA cloning, expression and different re-

- sponses to hypoxia. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2010, 157(3): 273–280. [DOI](#)
- [18] 孙效文, 徐鹏. 水产基因组技术与研究进展. 北京: 海洋出版社, 2011: 188–202. [DOI](#)
- [19] 简清, 白俊杰, 叶星, 夏仕玲, 梁旭方, 罗建仁. 斑马鱼 *Mylz2* 启动子的克隆与转绿色荧光蛋白基因鱼的构建. *中国水产科学*, 2004, 11(5): 391–395. [DOI](#)
- [20] Ju BS, Chong SW, He JY, Wang XK, Xu YF, Wan HY, Tong Y, Yan T, Korzh V, Gong ZY. Recapitulation of fast skeletal muscle development in zebrafish by transgenic expression of GFP under the *Mylz2* promoter. *Dev Dyn*, 2003, 227(1): 14–26. [DOI](#)
- [21] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. [DOI](#)
- [22] Chun KT, Edenberg HJ, Kelley MR, Goebel MG. Rapid amplification of uncharacterized transposon-tagged DNA sequences from genomic DNA. *Yeast*, 1997, 13(3): 233–240. [DOI](#)
- [23] Uren AG, Mikkers H, Kool J, van der Weyden L, Lund AH, Wilson CH, Rance R, Jonkers J, van Lohuizen M, Berns A, Adams DJ. A high-throughput splinkerette-PCR method for the isolation and sequencing of retroviral insertion sites. *Nat Protoc*, 2009, 4(5): 789–798. [DOI](#)
- [24] Koga A, Suzuki M, Inagaki H, Bessho Y, Hori H. Transposable element in fish. *Nature*, 1996, 383(6595): 30. [DOI](#)
- [25] Li YY, Zhang JP. Gene trapping techniques and current progress. *Acta Genet Sin*, 2006, 33(3): 189–198. [DOI](#)
- [26] Fujimura K, Kocher TD. *Tol2*-mediated transgenesis in *tilapia* (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 2011, 319(3–4): 342–346. [DOI](#)
- [27] Golling G, Amsterdam A, Sun Z, Antonelli M, Maldonado E, Chen W, Burgess S, Haldi M, Artzt K, Farrington S, Lin SY, Nissen RM, Hopkins N. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet*, 2002, 31(2): 135–140. [DOI](#)
- [28] 龙华, 尾里建二郎, 若松佑子, 松岛良次. 红色荧光蛋白(RFP)基因在转基因青鳉中的表达. *中国水产科学*, 2002, 9(2): 97–99. [DOI](#)
- [29] Moutou KA, Canario AV, Mamuris Z, Power DM. Molecular cloning and sequence of *Sparus aurata* skeletal myosin light chains expressed in white muscle: developmental expression and thyroid regulation. *J Exp Biol*, 2001, 204(17): 3009–3018. [DOI](#)
- [30] Gothilf Y, Toyama R, Coon SL, Du SJ, Dawid IB, Klein DC. Pineal-specific expression of green fluorescent protein under the control of the serotonin-N-acetyltransferase gene regulatory regions in transgenic zebrafish. *Dev Dyn*, 2002, 225(3): 241–249. [DOI](#)
- [31] 陈敏, 白俊杰, 姜鹏, 叶星. 红色荧光蛋白基因在转基因唐鱼中的表达. *大连水产学院学报*, 2009, 24(增刊): 59–63. [DOI](#)