

学校编码: 10384  
学号: 22320141151336

密级 \_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

利用 *Tol2* 转座子体系构建观赏性转基因  
黑点青鲮家系

The generation of transgenic marine medaka (*Oryzias  
melastigma*) varieties for ornamental applications by  
*Tol2* transposon system

黄晶

指导教师姓名: 陈仕玺 副教授  
专业名称: 海洋生物  
论文提交日期: 2017年5月  
论文答辩时间: 2017年5月

2017年5月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外，该学位论文为( )课题(组)的研究成果，获得( )课题(组)经费或实验室的资助，在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

(        )1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

(        )2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年    月    日

## 目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
<b>第一章 绪论.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Tol2</i> 转座子体系及其应用.....	1
1.1.1 转座子及其类型.....	1
1.1.2 <i>Tol2</i> 转座子的发现.....	3
1.1.3 <i>Tol2</i> 转座子的结构.....	5
1.1.4 <i>Tol2</i> 转座子体系的构建.....	6
1.1.5 <i>Tol2</i> 转座子体系的应用和前景.....	9
1.2 转基因观赏鱼的研究进展.....	11
1.3 黑点青鳉.....	11
1.4 本研究的目的是和意义.....	12
参考文献.....	13
<b>第二章 构建全身细胞表达荧光蛋白的黑点青鳉家系.....</b>	<b>22</b>
2.1 材料.....	22
2.1.1 实验鱼.....	22
2.1.2 载体.....	22
2.1.3 药品试剂.....	22
2.1.4 实验仪器设备.....	23
2.1.5 溶液配制.....	24
2.2 方法.....	25
2.2.1 载体的构建.....	25
2.2.2 体外转录合成 <i>Tol2</i> 转座酶加帽 mRNA.....	33
2.2.3 显微注射.....	35

2.2.4 家系的建立.....	39
2.3 结果.....	40
2.3.1 注射玻璃针.....	40
2.3.2 全身细胞表达绿色 eGFP 荧光蛋白的家系 .....	41
2.3.3 全身细胞表达黄色 mVenus 荧光蛋白的家系.....	45
2.4 讨论.....	47
参考文献.....	48
<b>第三章 构建肌肉细胞表达 mCherry 的黑点青鲮家系.....</b>	<b>51</b>
3.1 材料.....	51
3.1.1 实验鱼.....	51
3.1.2 载体.....	51
3.1.3 药品试剂.....	52
3.1.4 实验仪器设备.....	52
3.1.5 溶液配制.....	52
3.2 方法.....	52
3.2.1 <i>mlc2f</i> 启动子的克隆.....	52
3.2.2 pminiTol2- <i>mlc2f</i> -mCherry 载体的构建.....	54
3.2.3 体外转录合成 <i>Tol2</i> 转座酶加帽 mRNA .....	58
3.2.4 显微注射.....	60
3.2.5 家系的建立.....	60
3.3 结果.....	61
3.3.1 F0 代阳性个体 .....	61
3.3.2 F1 代阳性个体 .....	61
3.4 讨论.....	63
参考文献.....	64
<b>第四章 构建鳍条细胞表达 eGFP 的黑点青鲮家系.....</b>	<b>65</b>
4.1 材料.....	66
4.1.1 实验鱼.....	66

4.1.2 载体.....	66
4.1.3 药品试剂.....	66
4.1.4 实验仪器设备.....	66
4.1.5 溶液配制.....	66
4.2 方法.....	66
4.2.1 <i>and1</i> 启动子的克隆.....	66
4.2.2 pminiTol2- <i>and1</i> -eGFP 载体的构建 .....	74
4.2.3 体外转录合成 <i>Tol2</i> 转座酶加帽 mRNA .....	77
4.2.4 显微注射.....	78
4.2.5 家系的建立.....	78
4.3 结果.....	78
4.3.1 <i>and1</i> 启动子的克隆.....	78
4.3.2 F0 代阳性个体 .....	80
4.3.3 F1 代阳性个体 .....	82
4.4 讨论.....	84
参考文献.....	84
<b>第五章 结论与展望 .....</b>	<b>87</b>
5.1 结论.....	87
5.2 创新.....	87
5.3 展望.....	87
在学期间参加的科研项目及成果 .....	88
致谢.....	89

## CONTENTS

Abstract in Chinese .....	I
Abstract .....	III
Chapter 1 Introduction .....	1
1.1 The <i>Tol2</i> transposon system and its application.....	1
1.1.1 Transposon and types .....	1
1.1.2 Discovery of <i>Tol2</i> transposon.....	3
1.1.3 Structure of <i>Tol2</i> transposon.....	5
1.1.4 Construct of <i>Tol2</i> transposon system .....	6
1.1.5 Application and prospection of <i>Tol2</i> transposon system.....	9
1.2 The development of transgenic fish for ornamental .....	11
1.3 Marine medaka.....	11
1.4 Objectives and significance of this study.....	12
References.....	13
Chapter 2 Generation the transgenic marine medaka lines expressing fluorescent protein in body cells.....	22
2.1 Materials .....	22
2.1.1 Experimental fishes.....	22
2.1.2 Vectors.....	22
2.1.3 Chemicals and reagents.....	22
2.1.4 Instruments.....	23
2.1.5 Solution preparation.....	24
2.2 Methods.....	25
2.2.1 Construct of vector.....	25
2.2.2 Transcription of <i>Tol2</i> transposase mRNA <i>in vitro</i> .....	33

## CONTENTS

---

2.2.3 Microinjection.....	35
2.2.4 Construct of transgenic lines.....	39
2.3 Results.....	40
2.3.1 Grass needles .....	40
2.3.2 Transgenic lines expressing eGFP in body cells.....	41
2.3.3 Transgenic lines expressing mVenus in body cells.....	45
2.4 Discussion.....	47
References.....	48
Chapter 3 Generation the transgenic marine medaka lines expressing mCherry in muscle cells .....	51
3.1 Materials .....	51
3.1.1 Experimental fishes.....	51
3.1.2 Vectors.....	51
3.1.3 Chemicals and reagents.....	52
3.1.4 Instruments.....	52
3.1.5 Solution preparation.....	52
3.2 Methods.....	52
3.2.1 Cloning the promoter of <i>mlc2f</i> .....	52
3.2.2 Construct of pminiTol2-mlc2f-mCherry vector.....	54
3.2.3 Transcription of <i>Tol2</i> transposase mRNA <i>in vitro</i> .....	58
3.2.4 Microinjection.....	60
3.2.5 Construct of transgenic lines.....	60
3.3 Results.....	61
3.3.1 Generation of F0 .....	61
3.3.2 Generation of F1 .....	61
3.4 Discussion.....	63
References.....	64
Chapter 4 Generation the transgenic marine medaka lines expressing	



---

eGFP in fin fold cells .....	65
4.1 Materials .....	66
4.1.1 Experimental fishes.....	66
4.1.2 Vectors.....	66
4.1.3 Chemicals and reagents.....	66
4.1.4 Instruments.....	66
4.1.5 Solution preparation.....	66
4.2 Methods.....	66
4.2.1 Cloning the promoter of <i>and1</i> .....	66
4.2.2 Construct of pminiTol2-and1-eGFP vector.....	74
4.2.3 Transcription of <i>Tol2</i> transposase mRNA <i>in vitro</i> .....	77
4.2.4 Microinjection.....	78
4.2.5 Construct of transgenic lines.....	78
4.3 Results.....	78
4.3.1 Cloning the promoter of <i>and1</i> .....	78
4.3.2 Generation of F0 .....	80
4.3.3 Generation of F1.....	82
4.4 Discussion .....	84
References.....	84
 Chapter 5 Conclusions and prospects .....	 87
5.1 Conclusions.....	87
5.2 Prospects .....	87
5.3 Innovations.....	87
 Research projects and achievements.....	 88
 Acknowledgements.....	 89

## 摘要

观赏鱼产业由于其具有低耗水量、低土地要求、技术密集以及高单位产量等特性，具有良好的发展前景。根据联合国粮食与农业组织的估计，全球观赏鱼零售市场预计年销售额约 60 亿美元，观赏鱼整体的产业及其附属器材等产业所带动的总产值估计约达到 150 亿美元。近年来，观赏鱼由传统的蓄养模式向更加精致化、生活化以及艺术化发展，而具有靓丽色彩的转基因观赏鱼也打开了新的市场，带来了大量的商机。目前，美国的 Yorktown Technologies 公司、台湾的邝港科技和芝林企业是全球主要研发转基因荧光观赏鱼的公司。但是他们现阶段的研究主要以淡水鱼为主。

黑点青鳉 (*Oryzias melastigma*) 又叫印度青鳉或海水青鳉，属于颌针目、异鳉科、青鳉属。鱼体色透明，体长约 3.5~4 cm，具有较强的环境耐受能力，容易在实验室条件下进行大规模饲养。本研究以黑点青鳉为研究对象，利用 *Tol2* 转座子体系构建出具有一定观赏性的转基因荧光黑点青鳉家系。主要研究成果如下：

(1) 针对黑点青鳉受精卵的卵膜较硬，难于进行显微注射这一技术难点，我们不断优化制针参数，摸索注射条件，最终成功构建了可适用于黑点青鳉的显微注射技术体系。再应用 *Tol2* 转座子体系，分别将外源基因片段 *ef1a-eGFP* (绿色荧光蛋白) 和 *ef1a-mVenus* (黄色荧光蛋白) 转入黑点青鳉的基因组中。所获得的阳性 F0 代个体，全身呈现马赛克式的荧光表达模式。将 F0 代与野生型侧交后，所获得阳性 F1 代个体，则呈现全身所有细胞均表达荧光蛋白的表型。但不同 F1 代个体之间呈现显著的荧光强度差异。其中绿色荧光表达最强的家系，在蓝光灯下呈现淡绿色，使该转基因荧光黑点青鳉具备了一定的观赏性。

(2) 通过克隆获得斑马鱼肌细胞特异表达基因——肌球蛋白轻链 2 基因 (*myosin light chain 2 gene, mlc2f*) 上游 1084 bp 的启动子序列，再将该序列片段与 *mCherry* (红色荧光蛋白) 基因片段以及 *pminiTol2* 骨架进行连接，构建 *pminiTol2-mlc2f-mCherry* 载体。再应用 *Tol2* 转座子体系，将外源基因片段

*mlc2f*-mCherry 转入黑点青鲮的基因组中。所获得的阳性 F0 代个体，全身呈现马赛克式的荧光表达模式。将 F0 代与野生型侧交后，所获得阳性 F1 代个体，则呈现所有骨骼肌细胞均表达荧光蛋白的表型。该家系在普通光照条件下就呈现出鲜艳的紫红色，极具观赏性。

(3) 通过克隆获得黑点青鲮角质鳍条组分 *actinodin1* 基因 (*and1*) 上游 2011 bp 的启动子序列，再将该序列片段与 eGFP 基因片段以及 pminiTol2 骨架进行连接，构建 pminiTol2-*and1*-eGFP 载体。再应用 *Tol2* 转座子体系，将外源基因片段 *and1*-eGFP 转入黑点青鲮的基因组中。筛选所获得阳性 F1 代个体，角质鳍条和鳞质鳍条均表达绿色荧光蛋白。更为有趣的是，与鱼鳍活动相关的肌肉也表达 eGFP，如背鳍倾肌、尾鳍腹收肌、尾鳍条间肌、臀鳍倾肌、臀鳍缩肌、腹鳍缩肌、腹鳍引肌、肩带深层展肌和肩带浅层展肌等。但该转基因荧光鱼家系无法在普通光照条件下观察到绿色荧光。

综上所述，本研究成功构建了 4 种转基因荧光黑点青鲮家系，其中 *mlc2f*-mCherry 家系表达的荧光强度最高，具备推广应用前景，今后可进一步利用 *mlc2f* 启动子与其他荧光蛋白基因结合，构建更多绚丽多彩的转基因荧光黑点青鲮家系。

关键词：观赏鱼；黑点青鲮；*Tol2* 转座子体系；荧光蛋白

## Abstract

The ornamental fish industry is quite promising due to its advantages of low water consumption, less land requirements, technology-intensive and high yield. According to the estimates of Food and Agriculture Organization (FAO), the annual sales of global ornamental fish market is expected to about six-billion-dollar, and the gross annual output of other related industry is expected to about fifteen-billion-dollar.

Recently, the ornamental fish industry has changed from traditional stock model to a more refinement, and artistic model. Meanwhile, aquarium fish genetically modified to fluoresce in different bright colours has opened a new market and brought ample opportunities. Now, three companies, Yorktown Technologies, Taikong Corp and Jy Lin Trading Company, focus on transgenic fish, but only on freshwater fish.

Marine medaka (*Oryzias melastigma*) is also known as Indian medaka, belongs to beloniformes, adrianiichthyidae, *oryzias*. The fish body is nearly transparent and the body length is about 3.5~4 cm. Due to the strong environment tolerance, it is easy to rear this species on a large scale culture under the laboratory environment. Therefore, the present study is to transgenic marine medaka varieties for ornamental applications by *Tol2* transposon system. The results are shown as below:

(1) One factor influencing the microinjection procedure is the thickness of *O. melastigma* egg chorion (outer envelope). Therefore, we first generated glass needles that were strong enough to penetrate extremely thick and robust chorion of *O. melastigma* eggs, and thin enough to allow injection of solutions into the cytoplasm of the egg at one-cell stage. By using *Tol2* transposon system, the foreign DNA fragments: *ef1a-eGFP* (green fluorescent protein) or *ef1a-mVenus* (yellow fluorescent protein), were integrated into the genome of *O. melastigma*. We observed the mosaic eGFP pattern in founder fish. By crossing with wild type, we get the F1 fish which

showed all cells expressing fluoresce proteins. EGFP expression in the F1 fish varied in intensity, and the green fluorescent colour of the strongest intensity individuals can be seen by the unaided eyes under the aquarium blue light conditions, which makes ornamental value.

(2) We cloned 1084 base pair (bp) promoter of myosin light chain 2 gene (*mlc2f*) of zebrafish, then builded the pminiTol2-*mlc2f*-mCherry vector by ligating three DNA fragments: *mlc2f* promoter, mCherry (red fluorescent protein) gene, pminiTol2 vector backbone. Using *Tol2* transposon system, we successfully integrated foreign DNA fragment: *mlc2f*-mCherry into the genome of *O. melastigma*. We observed the mosaic mCherry pattern in founder fish. By crossing with wild type, we get the F1 fish which showed muscle cells expressing mCherry. This transgenic lines produced a strong and vivid red-purple fluorescent color that was easily seen with the unaided eye under normal daylight condition.

(3) The 2011 bp promoter sequence of *actinodin1* (*and1*) gene from *O. melastigma* was cloned. The pminiTol2-*and1*-eGFP vector was builded by ligating DNA fragments of *and1* promoter, eGFP gene and pminiTol2 vector. By using *Tol2* transposon system, the foreign DNA fragment: *and1*-eGFP was integrated into the genome of *O. melastigma*. In F1 transgenic fish, the eGFP were expressed in both actinotrichia and lepidotrichia. More interestingly, muscles closed to basement of fins expressed eGFP as well. Unfortunately, this transgenic lines exhibited a weak fluorescent color that impossiblly be seen with the unaided eye under normal daylight condition.

In summary, we have successfully built four different transgenic marine medaka varieties, and the *mlc2f*-mCherry line has a highly brilliant red-purple fluorescent color over whole skeletal muscles, which might be sufficient for ornamental application. The results from the present study indicated that other varieties of transgenic marine medaka lines can be built under the promoter of *mlc2f* together with other fluorescent protein gene.

Key Words: ornamental fish, *oryzias melastigma*, *Tol2* transposon system, fluorescent protein

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 第一章 绪论

### 1.1 *Tol2* 转座子体系及其应用

#### 1.1.1 转座子及其类型

转座子 (transposon) 或称转座元件 (transposable element), 是存在于基因组中可以从一个位置直接转移到另一个位置的 DNA 片段<sup>[1]</sup>。因为它们具有移动的性质, 转座子也被称之为跳跃基因 (jumping genes)。20 世纪 50 年代初, 著名的植物学家和遗传学家 Barbara McClintock 教授在研究玉米染色体的重排和缺失时首次发现了转座子的存在<sup>[2-3]</sup>。随后, 在其他生物中也陆续发现了转座子<sup>[4]</sup>, 例如细菌的 Transposon 3 (Tn3)<sup>[5]</sup>和 Transposon 5 (Tn5)<sup>[6]</sup>、真菌的 I 型和 II 型因子<sup>[7]</sup>、昆虫的 P 因子 (P element)<sup>[8]</sup>、Hobo 因子 (Hobo element)<sup>[9]</sup>等。近几年来研究表明, 转座子几乎存在于所有生物的基因组中, 是基因组突变的主要来源之一, 对基因组结构和进化有着重要影响<sup>[10-11]</sup>, 在物种进化过程中起到了关键作用<sup>[12-13]</sup>。

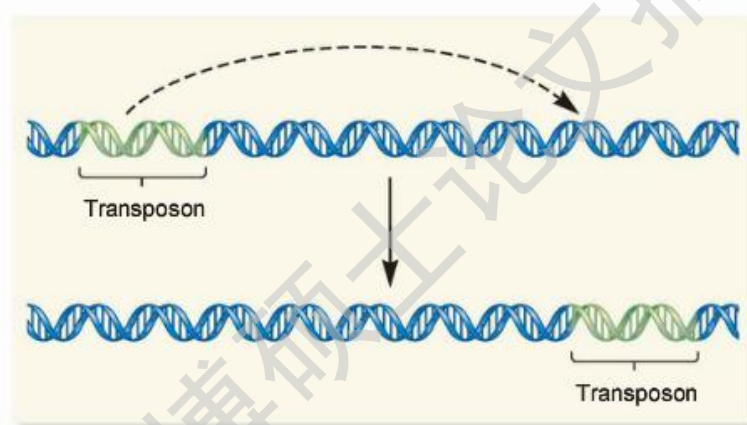
转座子根据其活性不同可以分为两类: 自主性转座子和非自主性转座子。第一类可以通过自身编码的转座酶识别转座子上的序列, 从而进行自主剪切和转座连接; 第二类由于突变等原因不能自身编码转座酶, 即处于失活状态, 需要同一家族转座酶的作用下才能进行转座。例如, 玉米的 Activator (Ac) 转座子为自主性转座子, Dissociation (Ds) 转座子为非自主性转座子<sup>[2]</sup>。

根据转座元件移动的机制不同, 转座方式可以分为以下三大类<sup>[14]</sup> (如图 1-1 所示):

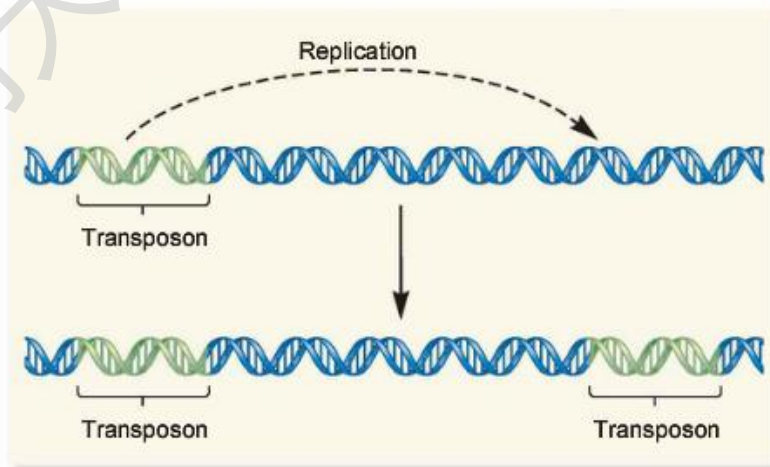
- (1) 简单型转座 (simple transposition, 或 conservative transposition): 转座元件直接从原始位置转移到新的目标位置, 这种转座方式在细菌和真核生物中较为常见。
- (2) 复制型转座 (replicative transposition): 转座元件首先复制一个新的拷贝,

接着新的拷贝插入染色体的其他位置，而原始片段仍留在原始位置，这种转座方式仅在细菌中发现。

- (3) 反转录型转座 (retrotransposition)：前两种转座元件都是直接以 DNA 分子进行转移，即 DNA-DNA 的方式，而第三种需要通过 RNA 作为中间媒介进行转移。原始位点的转座因子首先转录为 RNA，然后通过逆转录酶，以 RNA 为模板合成新的 DNA 片段，最后该 DNA 片段整合到基因组的新的目标位置从而完成转座过程。这个过程即 DNA-RNA-DNA 的方式。这种转座方式在真核生物中较为普遍。



(A) 简单型转座 (simple transposition)



(B) 复制型转座 (replicative transposition)



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库