

绿色荧光蛋白基因在大黄鱼体内的表达

鄢庆枇, 苏永全, 王军, 周化民

(厦门大学海洋学系, 厦门大学亚热带海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 以绿色荧光蛋白基因为报告基因, 以 pIRESneo 为载体质粒, 制备含有报告基因的质粒, 以肌肉注射的方式导入大黄鱼体内, 每隔一周用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白基因在鱼体不同部位的表达情况。结果表明, 绿色荧光蛋白基因可以在大黄鱼体内得到表达, 表达时间高达 28 d 以上。绿色荧光蛋白基因不仅可以在肌肉注射部位组织细胞得到表达, 而且在其它部位的肌肉、肝脏、肾脏和心脏等组织中也有表达, 但表达水平低于肌肉注射部位组织。

关键词: 绿色荧光蛋白基因; 大黄鱼; 基因表达

中图分类号: Q 786; Q 959.483

文献标识码: A

大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* (Richardson) 是福建省主要海水养殖经济鱼类之一, 2000 年, 福建省养殖大黄鱼超过 45 万箱。随着大黄鱼养殖规模的扩大, 各种病害的发生也日益频繁^[1, 2], 严重威胁着大黄鱼养殖业的健康发展。在大黄鱼的养殖过程中, 目前主要依靠抗生素等药物进行病害防治。在国外, 已有学者尝试用注射 DNA 的方法进行动物的基因免疫和基因治疗^[35], 但在水产动物方面的有关报道尚少, 在国内也尚未有有关鱼类基因免疫和绿色荧光蛋白基因在鱼体中表达的研究报道。由于外源基因在鱼体中的表达情况决定了基因免疫的效果, 但在鱼体中抗原基因表达的检测比较困难, 因此, 研究比较容易检测的报告基因在鱼体中的表达情况, 以及各种因素对外源基因表达的影响, 寻找最佳表达条件是进行鱼类基因免疫的重要的基础研究。常用的报告基因有 β -半乳糖酶基因、绿色荧光蛋白基因和氯霉素乙酰转移酶基

因等。本文以绿色荧光蛋白基因为报告基因, 以 pIRESneo 为载体质粒, 通过肌肉注射的方法研究绿色荧光蛋白基因在大黄鱼体内的表达情况, 为今后进行大黄鱼的基因免疫提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

质粒 pIRESneo 和大肠杆菌 JM109 购自 Clontech 公司。

1.2 质粒 DNA 导入大肠杆菌

参照《精编分子生物学实验指南》^[6]和《分子克隆实验指南》^[7]的方法, 用高压电转化的方法进行质粒转导, 具体步骤如下:

(16) 接种一个大肠杆菌单菌落与 5 mL LB 培养液, 37 °C 振荡培养过夜。

1. 将 2.5 mL 培养物加入到 500 mL LB 培养液, 37 °C 振荡培养至 OD_{600} 为 0.5~0.6。

20. 细菌在冰水浴冷却 10~15 min。然后于 2 °C, 5 000 g 离心 20 min, 沉淀用 5 mL 冰冷的水悬浮。

(8) 加入 500 mL 冰冷的水, 混匀, 按步骤 20. 重复离心一次, 倒去上清液, 用残余的液体重悬细胞。

(5) 将悬浮液移入预冷的 50 mL 离心管中, 2 °C, 5 000 g 离心 10 min。沉淀用等体积的冰冷水重悬, 以 200 μ L 分装于预冷的微量离心管中。

(3) 将 1 μ L 质粒加入到装有菌液的微量离心管

收稿日期: 2001-09-04

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(863-819-02-12)

作者简介: 鄢庆枇(1971—), 男, 博士生, 现在集美大学水产生物技术研究所工作。

通讯联系作者: 苏永全, Tel: 0592-2181589,

E-mail: xmsyq@public.xm.fj.cn

中,混匀.

(三)将转化混合物移入电转化池中,吸干池的外表面,后放入样品槽中.

⑩用 2.5 kV, 6 ms 进行脉冲电转化,然后取出电转化池,马上加入 1 mL SOC 培养液,移到无菌培养管中,37 °C 振荡培养 30 min.

- 取 0.1 mL 培养液涂布于含 50 µg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上,37 °C 培养 24 h.

(4)从 LB 平板挑取单菌落,在含 50 µg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上进行划线分离,直到获得纯培养物.然后提取质粒、电泳,以确定质粒已转入大肠杆菌细胞内.

1.3 细菌质粒 DNA 的提取

采用 UNIQ-10 柱离心式质粒小量抽提试剂盒进行细菌质粒的提取.试剂盒购自上海生工公司.具体抽提步骤如下:

(16)将过夜培养的细菌培养液分装于 1.5 mL 离心管,每管 1~ 1.5 mL,12 000 r/min 高速离心 15 s,彻底去除上清液.

加入 100 µL Solution iv,用旋涡振荡器充分悬浮细菌.

20. 加入 100 µL Solution ㉔,立即上下颠倒 5~ 10 次,室温放置 1 min,使细菌裂解.

(8)加入 430 µL Solution ㉕,立即上下颠倒 5~ 10 次使之充分中和,室温放置 1 min 后 12 000 r/min 高速离心 2~ 5 min.

(5)将 UNIQ-10 柱放入 2 mL 收集管,将离心管中的上清液转移到 UNIQ-10 柱,室温高速离心 15 s.

③倾去收集管中的废液,将 UNIQ-10 柱放回收集管中,吸取 450 µL Wash Solution 到 UNIQ-10 柱,室温高速离心 15 s.如此重复离心 1 次.

(三)将 UNIQ-10 柱放入 1.5 mL 离心管中,加入 50 µL Elution Buffer,37 °C 放置 2 min 后高速离心 1 min.离心管中的离心液即为细菌质粒,保存于 4 °C 冰箱备用.

1.4 质粒 DNA 的注射

用微量注射器从大黄鱼背鳍前端下方肌肉将质粒 DNA 注入鱼体内,每尾注射 50 µL.

1.5 绿色荧光蛋白的检测

质粒 DNA 注射到大黄鱼体内后,在不同时间取大黄鱼 2 尾,从注射处肌肉、其它部位肌肉,心脏、肝脏、肾脏等部位取材,经研磨后涂于载玻片,荧光显微镜镜检.

2 结果与讨论

试验结果表明,绿色荧光蛋白基因可以在大黄鱼体内所有被检测的组织中表达,表达持续时间在 28 d 以上,表达水平与时间有密切关系:在注射 DNA 后第 1 d 的样品中,仅在注射部位肌肉出现较弱的荧光,其它组织样品均未见荧光.注射后第 7 d 的样品中,在被检所有组织中都出现荧光,以注射部位肌肉组织的荧光最强,肾脏组织次之.注射后第 14 d 的检测结果表明为注射部位肌肉和肾脏组织中的荧光强度下降,其余组织维持原有水平.注射后第 21 d 的样品中,除了肝脏组织的荧光消失外,其余组织的荧光表达同注射后 14 d 水平.注射后第 28 d 的样品中,仅在注射部位肌肉仍有荧光表达.可见肌肉注射绿色荧光蛋白基因 7 d 左右可在大黄鱼体内达到最大表达,尔后表达强度逐渐降低.试验结果还表明,绿色荧光蛋白基因在大黄鱼体内不同组织的表达是不均匀的,其中以注射部位肌肉的表达最明显,而在肝脏、心脏和非注射部位肌肉的表达水平较低,尤其是肝脏组织,表达持续时间最短(表 1).

表 1 试验时期大黄鱼体内各组织荧光的强度
Tab.1 The fluorescent intensity of different tissue in *Pseudosciaena crocea* at different time postinjection

注射后时间/d	1	7	14	21	28
注射部位肌肉	+	+++	++	++	+
其他部位肌肉	-	+	+	+	-
心脏	-	+	+	+	-
肝脏	-	+	+	-	-
肾脏	-	++	+	+	-

注:+++ 表示荧光非常明显;++ 表示荧光明显;+ 表示荧光不明显;- 表示没有荧光

鱼类基因免疫是通过将抗原基因导入鱼体,使之在鱼体内得到表达,从而使鱼体获得对特定抗原的免疫力.与传统免疫方法相比,基因免疫毒副作用小、免疫效果好、持续时间长,是今后鱼类疾病免疫防治的重要手段.如果要对鱼类进行基因免疫或基因治疗,外源抗原基因在鱼体内要能维持一段较长的时间.外源基因能在动物体内得到长时间表达是很不容易的,因为肌肉细胞表达的外源蛋白质会被识别而被攻击,这将导致表达细胞最终被识别进而被效应淋巴细胞消灭^[4].当然,并非所有注入的 DNA 表达

的蛋白质都会被免疫或消灭. 本试验的结果表明, 绿色荧光蛋白基因在大黄鱼体内的表达时间在 28 d 以上. E D Anderson 等^[8]的研究发现荧光素酶基因在彩虹鲷体内的表达时间长达 115 d, 而直接注射 DNA 在小鼠中的表达可以长达几个月^[9, 13], 用微粒轰击进行导入的表达时间更可长达 1.5 年^[11]. 绿色荧光蛋白在海水鱼的骨骼肌中的半衰期不足 24 h^[9], 而在鱼体中能够长时间检测到绿色荧光蛋白是该基因在鱼体内持续表达的结果.

DNA 注射后, 在鱼体不同的部位其表达水平有很大的差别, 本实验结果表明绿色荧光蛋白基因不仅能在大黄鱼注射部位组织细胞得到表达, 而且在其它不同部位也有一定的表达. 在注射部位肌肉荧光最强, 在肝脏中的荧光较弱, 且持续时间最短. 在彩虹鲷中, 外源基因在注射部位肌肉表达最强, 肠和胃的表达最弱^[8]. 在远离注射部位的组织器官也有外源基因的表达, 说明鱼类细胞可以直接将 DNA 摄入细胞. DNA 注射导致注射部位的肿胀, 这可能会造成一些组织细胞的损伤, 这种损伤可能使得 DNA 的吸收更为方便^[12], 因此在注射部位肌肉的绿色荧光蛋白的量要高于非注射部位肌肉. 外源 DNA 在不同组织器官中表达水平受到许多因素的影响, 其中包括 DNA 的注射浓度和位置、细胞对 DNA 的吸收、外源 DNA 在细胞内的稳定性、DNA 在细胞内转录和翻译的效率等.

直接注射 DNA 后外源基因的表达水平与多种因素有关. 其中 DNA 的注射量是一个重要因素. E D Anderson 等^[8]用不同剂量含有荧光素酶基因的 pCMV4EAL 质粒注射到彩虹鲷体内, 结果发现, 注射 25 μg 质粒的基因表达水平最高, Wolf 等^[9]、Hansen 等^[10]、Chang 等^[11]的研究结果也表明不同注射剂量在小鼠和鲤鱼体内有不同的表达. 在鲤鱼, 鱼体的大小也直接影响着外源基因的表达水平^[10]. 个体较小、生长较快的鲤鱼(体长 10 cm)的表达水平要高于个体较大、生长较慢的鲤鱼(体长 20 cm). 而在彩虹鲷, 个体的大小对荧光素酶基因的表达并无明显影响^[8]. 注射同样剂量不同体积的 DNA 也会影响表达效果, 注射 200 μL 质粒在彩虹鲷中的表达效果要好于 100 μL ^[8]. 这可能是由于注射较大体积的 DNA 溶液会使组织肿胀, 改变渗透压, 或造成组织损伤从而促进 DNA 的吸收^[12]. 同时, 较大体积的注射量还会促进 DNA 在鱼体的扩散.

通过肌肉注射可以使绿色荧光蛋白基因在大黄

鱼体内得到较长时间的表达, 这说明 DNA 直接注射是将鱼类病原抗原基因导入鱼体的有效手段之一. 本课题组拟在现有研究基础上, 研究不同载体、不同导入方式、DNA 剂量、DNA 体积、鱼体大小等因素对报告基因在大黄鱼体内表达的影响, 以确定外源基因在大黄鱼体内的最佳表达条件, 为今后的大黄鱼基因免疫确定免疫方案提供重要理论依据.

参考文献:

- [1] 鄢庆彬, 苏永全, 王军, 等. 网箱养殖大黄鱼弧菌病研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2001, 6(3): 1-6.
- [2] 王军, 苏永全, 张朝霞, 等. 闽南地区养殖大黄鱼细菌性疾病的病原生物学研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(1): 85-91.
- [3] Ulmer J B, Donnelly J J, Parker S E, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein[J]. Science, 1993, 259: 1745-1749.
- [4] Xiang Z Q, Spitalnik S, Tran M, et al. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus[J]. Virology, 1994, 199: 132-140.
- [5] Raz E, Watanabe A, Baird S m, et al. Syatemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 4523-4527.
- [6] 奥斯特伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E 等著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社. 1999.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 著. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社. 1999.
- [8] Eric D Anderson, Dan V Mourich, Leong J C, et al. Gene expression in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) following intramuscular infection of DNA[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1996, 5(2): 105-113.
- [9] Wolf J A, Malone R W, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo[J]. Science, 1990, 247: 1465-1468.
- [10] Hansen E, Fernandes K, Golspink G, et al. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle[J]. FEBS Lett, 1991, 90: 73-76.
- [11] Cheng L, Ziegelhoffer P R, Yang N S. In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 4455-4459.
- [12] Davis H L, Whalen R G, Demeneix B A. Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of

- transfer and stability of expression[J]. Hum Gene Ther, 1993, 9: 151– 159.
- [13] Zhu N, Liggitt D, Liu Y, et al. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice[J]. Science, 1993, 261: 209– 211.
- [14] Wolf J A, Williams P, Ascadi G, et al. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo[J]. Bio Techniques, 1991, 4: 474– 485.

Expression of Green Fluorescent Protein Gene in *Pseudosciaena crocea*

YAN Qing-pi, SU Yong-quan, WANG Jun, ZHOU Hua-min
(Dept. of Oceanog. & Institute of Subtropical Oceanog.,
Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

Abstract: Plasmid DNA pIRESneo containing green fluorescent protein gene was injected into the skeletal muscle of *Pseudosciaena crocea*, and the expression of green fluorescent protein gene in different tissue of these tested fish was weekly examined by fluorescent microscope after injection. The results showed that the expression of green fluorescent protein gene in *P. crocea* lasted as long as 28 days postinjection. Expression of injected DNA was found not only in the muscle cells at the injection site, but also in the muscle cells far from the injection site and the other organs such as liver, heart and kidney. The expression level was higher in the muscle cells at the injection site than those in other tissues.

Key words: green fluorescent protein gene; *Pseudosciaena crocea*; gene expression