

文章编号: 1004-7271(2003)04-0353-06

·综述·

# 鱼类基因转移研究中存在的问题与对策

## Problems existed in fish gene transfer research and countermeasures

龙 华

(中国水产科学研究院长江水产研究所农业部淡水鱼类种质资源与生物技术开放实验室,湖北 荆州 434000)

LONG Hua

(Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology, Ministry of Agriculture,  
Yangtze River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Jingzhou 434000, China)

关键词 鱼类;基因转移;问题;对策

Key words fish; gene transfer; problem; countermeasure

中图分类号 S917 文献标识码: A

转基因动物技术是 20 世纪 80 年代初发展起来的一项生物领域高新技术<sup>[1]</sup>。转基因鱼模型的构建为鱼类基因工程育种奠定了理论基础,基因导入方法的成熟、胚胎干细胞技术的发展以及基因组学理论的应用为鱼类基因工程育种提供了操作平台。目前,转基因技术在外源基因片段长度、外源基因定点整合率、外源基因表达率、转基因动物存活率等技术方面都有了很大提高。转基因动物的研究内容也非常广泛,从基础理论到应用技术,从实验室到生产也都有了较大发展,如基因表达的调控、基因产品的制备、动物品种的培育等<sup>[2]</sup>。下面就鱼类基因转移研究中转基因技术与转基因产品的几个问题进行探讨。

## 1 外源基因导入方法

### 1.1 基因导入方法

转基因动物自产生后,各国实验室对转基因生物的研究迅速增加。与传统的鱼类育种方法不同,鱼类基因工程(转基因)育种必须依赖人工的实验操作技术,即外源基因导入方法,而外源基因导入方法则是转基因研究中的关键技术。外源基因导入受体细胞(细胞质或细胞核)有多种方法,主要有显微注射、电脉冲(电穿孔)、精子携带、磷酸钙共沉淀、脂质体融合、逆转录病毒转染、微弹轰击、激光介导和基因枪(粒子枪)等方法<sup>[3]</sup>。鱼类转基因研究中主要采用前三种方法。

### 1.2 基因导入方法的发展

基因或 DNA 的注射方法,从一开始就是转基因的主要研究方法。早在 20 世纪 60 年代,Munro 将具有特殊脚爪特征的矮脚鸡 DNA 注入到白色来航鸡的卵巢中,得到具有矮脚鸡脚爪特征的来航鸡后代。20 世纪 80 年代初,人们成功地用显微注射法向动物生殖细胞转移外源基因,建立了第一个转基因小鼠

模型。Yoon 于 1990 年探讨了能操作大量卵的批量转移技术<sup>[2]</sup>。

经过几十年的研究与发展和各国科学家的共同努力,显微注射方法已经从样品获取与处理、注射针制备与处理、样品的固定、注射仪结构、动力传送与缓冲系统、DNA 的注射浓度与体积、注射针的插入与定点、实时监视器和立体显微镜等方面有了明显进步与改善,相关的仪器和设备产品不断出现与改进。从转基因研究的大量文献与资料的统计数据来看,显微注射方法仍是目前使用广泛、技术成熟、效果最好的一种基因导入方法<sup>[4]</sup>。而其它转基因方法虽然也有这样或那样的优点,但仍处于初级或研发阶段,尚有很多待以改进之处。目前,各国实验室相继开展了更便利、更易于研究与观察、转基因效率更高的转基因方法研究。如基因枪(粒子枪)技术便是 20 世纪末产生的一项先进技术<sup>[5]</sup>。

## 2 外源基因

### 2.1 鱼类外源基因

转基因鱼研究中最初所用的目的基因基本上是非鱼类基因,但非鱼类基因并不是理想的基因,从生物安全性角度来考虑,克隆鱼类自身基因元件,生产转全鱼基因鱼,对于培育商业养殖鱼类新品系有重大意义。因此,鱼类转基因研究的核心,是选择一个有生产应用价值的外源基因。目前,已经研究的鱼类基因有鱼类生长激素基因、鱼类催乳激素基因、鱼类促生长催乳激素基因、鱼类促性腺激素基因、鱼类促性腺激素释放激素基因、鱼类加压催产素及硬骨鱼催产素基因、鱼类胰岛素基因、鱼类抗冻蛋白基因、鱼类免疫球蛋白基因、鱼类球蛋白基因、鱼类肌动蛋白基因、鱼类癌基因及肿瘤校正基因、鱼类卵黄蛋白原基因、鱼精蛋白基因、鱼类晶体蛋白基因、鱼类金属硫蛋白基因以及鱼类转铁蛋白基因等。迄今为止,通过显微注射导入鱼类外源基因的有人生长激素基因、大鼠生长激素基因、牛生长激素基因、鸡 $\delta$ -晶体蛋白基因、大肠杆菌 $\beta$ -半乳糖苷酶基因、大肠杆菌湿霉素抗性基因、美洲黄盖鲈抗冻蛋白基因及热休克基因、虹鳟生长激素基因、鲤珠蛋白基因和萤火虫光素酶基因等。有可能被转移的基因有转铁蛋白基因、生长激素释放因子基因、脂酶基因、抗癌基因及其它组织特异性启动子。其它可能的转基因鱼有无性腺发育的不育雌鱼和利用肝脏生产人胰岛素的虹鳟等<sup>[6]</sup>。

### 2.2 经济性状基因

转基因鱼使用的外源基因直接关系到转基因鱼的理论意义和实际价值,尤其是激素类基因逐渐被许多用于生产实践和开发应用的实验室所淘汰。因此,具有优良经济性状(如耐低氧、抗病、抗寒、抗盐等)的鱼类基因的确定,必须考虑外源基因的表达对鱼类生产性状、遗传性状和食用品质等的影响。近年来,鱼类转铁蛋白基因、干扰素基因、溶菌酶基因、鱼精蛋白基因、抗菌肽基因、防御素基因、金属硫蛋白基因以及 P53 基因等具有抗病抗菌的鱼类功能基因逐渐受到各国实验室的青睐<sup>①</sup>。这些源于医学界和畜牧界研究的抗病抗菌基因,在水产界,尤其是在鱼类转基因的研究中具有广阔的应用前景,对鱼类基因资源的保护和利用十分重要。

### 2.3 外源基因载体

病毒型的 DNA 载体是目前分子生物学研究中被广泛使用的载体之一。在通常的情况下,载体中含有的大量非鱼类 DNA 信息或多或少被注射到鱼类的受精卵中,我们很难估计这些外源病毒型的 DNA 载体对鱼类和人类会造成多大的影响。因此,我们还需要对外源基因载体做更加深入细致的研究。显然,在鱼类转基因研究中,这种类型的载体不适宜在以生产应用为目的转基因鱼研究中。当然,在某些鱼类转基因研究中,也可能使用其它物种的基因或经过改造过的基因。对于以鱼类为实验材料的医药和农牧学科研究中,研究胚胎的发育、遗传、免疫以及基因表达的调控和机理等,外源基因和载体的选择则另当别论。

① 龙 华. 鱼类抗病基因的研究进展. 2003.

### 3 外源基因检测技术

#### 3.1 常规的基因检测技术

转基因鱼的检测一般是依据基因整合及基因表达而采用不同的检测方法,运用斑点杂交和 PCR(聚合酶链式反应)法可检测出含有外源基因的受体鱼;采用 Southern 杂交(DNA 印迹杂交)作进一步检测来确定外源基因是否真正整合入受体鱼基因组;Northern 杂交(RNA 印迹杂交)或 RT-PCR(反转录聚合酶链式反应)可用来检测外源基因的转录;采用组织提取液酶活性或标记特异性抗体与组织提取液或血清等进行免疫学反应可推断外源基因的表达水平等<sup>[2]</sup>。

#### 3.2 荧光标记基因检测技术

随着生物技术的发展、物理和化学等学科的渗透以及新技术的应用和新材料的发现,外源基因检测技术得到了空前的发展和提高。20 世纪末期,从水母(*Aequorea victoria*)中分离出来的绿色荧光蛋白(GFP)基因,由于其蛋白质具有荧光(最大吸收光谱为 508nm)而作为报告基因,已经广泛被用于检测特异组织基因表达和细胞中蛋白质的定位等,被称为是一种“有生命”的荧光<sup>[7-13]</sup>。最近,从海葵(*Discosoma* sp.)中分离出来的一种新的荧光蛋白基因——红色荧光蛋白(RFP)基因,其蛋白质的最大吸收光谱为 583nm。RFP 与 GFP,以及从其它生物体中分离出来的蓝色荧光蛋白(BFP)、黄色荧光蛋白(YFP)等,均作为理想的报告基因广泛用于转基因或核移植等研究中的基因标记,在胚胎发育期不需要任何预处理便可很容易地通过荧光显微镜观察到外源基因的表达情况<sup>[14]</sup>,解决了同位素标记的放射性与有机染料标记的污染问题,也不存在遗传污染等问题。此外,不同颜色荧光标记基因的出现,使得人们还可以用两种以上外源基因通过不同的荧光标记多基因显微注射到动物的受精卵中,观察不同外源基因的表达情况,为多基因注射(建立转双基因和多基因的转基因动物模型)研究提供了技术储备。同位素标记和有机染料标记等已经逐渐被实验室淘汰,相信在不远的将来会有更多更好的无公害的基因标记与检测方法出现。

### 4 转基因鱼模型

#### 4.1 转基因鱼模型建立

1985 年朱作言等率先将人生长激素(GH)基因转入泥鳅和金鱼受精卵中,成功地获得了转基因鱼,建立了第一个转基因鱼模型<sup>[15]</sup>。随后,世界各国许多实验室在短短几年中,使用多种人工构建的外源基因,在鲤(*Cyprinus carpio*)、鲫(*Carassius auratus*)、金鱼(*Carassius auratus*)、泥鳅(*Misgurnus anguillicandatus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、沟鲈(*Ictalurus punctatus*)、鳊(*Ictalurus punctatus*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、真鳊(*Pagrosomus major*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala* Yih)、斑马鱼(*Brachydanio rerio*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)等近 20 种鱼类上进行了转基因研究<sup>[15,16]</sup>。由于基因产品制备和动物优良品种的培育、从实验室走向社会、取得经济效益将成为应用研究的重点,而鱼类发育生物学特点,转基因鱼模型在胚胎发育相关基因功能和人类疾病模型研究中具有独特的优势,利用鱼类作为转基因研究的基础试验材料已经成为可能。

#### 4.2 转基因鱼的特点

鱼类所具有的许多独特的生物学性质,构成了它转基因实验的特点:①怀卵量大、体外受精、体外发育、胚胎操作简便和易于观察分析等;②某些鱼(如青鳉和斑马鱼)由于卵壳透明,显微注射过程容易实时监测,容易观察到发育的胚胎并对它进行实验操作,尤其是进行外源基因的表达调控研究;③肉眼识别鱼类受精卵的细胞核是困难的。外源基因通常被注射到卵细胞质。细胞质注射较易进行,对个体发育的损伤较小,因此注射过的鱼类胚胎存活率高;④许多鱼类有坚硬的卵壳,因而需要采用一种特殊的方法,将注射针插入卵内,定向性与定位性较好;⑤在室温下干净的水中即可完成胚胎体外发育,操作方

便,易于培养、管理和观察;⑥鱼类发育至幼鱼的时间短,可以用改变环境温度控制其发育速度,它们是研究发育过程中基因调控与表达等的理想材料;⑦鱼类是脊椎动物系统发育较原始的类群,不同种属,甚至在不同科之间,容易亲和协调,因此鱼类在接受外源基因和外源基因表达方面较高等的种类更有利<sup>[17]</sup>。

### 4.3 纯系实验模型鱼

转基因鱼模型的建立不仅为转基因研究提供了方法和依据,还为其生产应用提供了理论基础。目前用于转基因的实验模型鱼主要是斑马鱼和青鳉,并且已经建立了纯系。另外,箱鲀(*Ostracion stellifer*)、鮡鱼(*Gobio gobio*)、剑尾鱼(*Xiphophorus helleri* Heckel)和红鲫(*Carassius auratus*)等品系也在开发之中。转基因鱼研究虽稍晚于哺乳类,但由于鱼类基因工程育种本身所具有的潜在经济价值和作为转基因研究所具有的良好条件而取得重大进展,转基因鱼是目前国内外获得最成功的转基因动物之一。

## 5 转基因鱼的生态安全

### 5.1 传统杂交育种与转基因鱼的生态安全

自从人们认识到“杂种优势”现象后,作为品种改良的重要手段,杂交育种长期以来一直被普遍采用,在推动农业进步中发挥了非常重要作用。鱼类品系、品种间的近缘杂交和种间甚至属间的远缘杂交,在我国有丰富的实践和广泛应用。传统的杂交育种在技术上是成熟的,其对遗传和生态所造成的巨大影响并没有让人们产生恐惧,反而为大众所接受。因为杂交育种技术实际上推动了整个社会的进步。

基因转移定向育种是一种特殊形式的杂交育种方式,即以—个重组基因与另一物种全套基因组的“杂交”。这种特殊的“杂交”技术,是现代生物学理论和技术集成的产物,具有明确的定向性和可控制性。鱼类经过基因转移,受体鱼基因组改变的程度仅相当于杂交的十万分之一左右<sup>[18]</sup>,它对生态系统的威胁作用是轻微的,更谈不上基因污染问题,充其量可视为与相应杂交鱼实质等同。在实际操作过程中,更有筛选和培育等有效手段来保证转基因鱼的优势、质量和品系<sup>[19]</sup>。

### 5.2 建立生态安全的保证体系

某种转基因鱼环境释放后可能对鱼类种质资源和生态环境造成破坏,培育多倍体转基因鱼,建立不育多倍体转基因鱼繁育体系则是当前生态安全的保证体系之一<sup>[20-23]</sup>。目前得到的转基因鱼普遍存在外源基因整合呈嵌合型,整合率和表达率低、阳性个体筛选繁琐和获得纯系转基因个体周期长等问题。提高外源基因整合率、在较短时间建立纯系转基因鱼类是国内外鱼类转基因研究焦点。生长周期短的动物(如昆虫等)比较容易建立转基因品种的纯系,鱼类中的实验模型鱼(斑马鱼和青鳉)也建立了各自不同的纯系,但养殖鱼类的转基因纯系品种的建立,目前尚无突破。

应用胚胎干细胞制作转基因鱼纯系是一个全新的尝试<sup>[2]</sup>。第一步获得全能转基因细胞,第二步通过核移植产生同质转基因鱼,第三步应用雌核发育、性反转和传统选育,由同质转基因个体制作转基因鱼纯系。因此,诱导与培育不育的多倍体转基因鱼,是彻底解决转基因鱼遗传和生态安全问题的可靠途径之一。与此同时,还要开展外源基因在宿主体内转录表达和调控的研究,开展转基因鱼的生理、营养、发育、免疫和生殖应答的研究等,从生理生化以及遗传等角度解决转基因鱼的生态安全问题。

## 6 转基因鱼的市场化

### 6.1 转基因产品的商品化

转基因研究,正如当初选择其外源基因具有生产应用价值一样,一开始就考虑到其商品化和市场化问题。1993年我国第一例转基因作物抗病毒烟草进入大田试验。1997年,全球转基因植物种植面积达 $1280 \times 10^4 \text{hm}^2$ ,并正以年均3~4倍的速度增加。1996年至2000年间,全球转基因作物的种植增加了25倍多。今天,全球转基因植物的产值达100亿美元,所增加的收益达20~30亿美元<sup>[24]</sup>。就世界范围而

言 转基因动物的产业化进程远远落后于转基因植物。到 20 世纪末,美、英、德、澳、加以及中国等国家能够系统地生产出转基因的各种家畜,而在水产养殖中具有推广应用潜力的转基因鱼尚未成熟,距离鱼类转基因育种技术的产业化还相差甚远。

## 6.2 转基因食品安全与立法

目前,普遍公认的生物技术食品安全性评价原则是 1993 年欧洲经济合作与发展组织(OECD)提出的“实质等同性”原则,即生物技术食品(主要指转基因食品)及食品成分是否与目前市场上销售的传统食品具实质等同性。1995 年,世界卫生组织(WHO)提出转基因植物食品的安全性评价原则时,采用了实质等同性原则。1996 年,第二次联合国粮农组织(FAO)及 WHO 专家联席会议,建议该原则适用于所有转基因植物、动物和微生物的安全性评价。在此基础上,欧洲新食品领导小组根据由学术界、政府机构和食品行业组成的专家小组的建议,制定了对这类食品安全性评价的具体实施办法<sup>[23]</sup>。2001 年,欧盟取消推迟销售 14 种转基因食品的禁令,而美国食品和药物管理局于 2001 年也制定了一系列关于转基因产品的法规,这不仅方便了消费者的认证,也为转基因食品的购买提供了法律指导。

在基因工程立法方面,我国明显滞后于欧美发达国家。至今,我国只有 1993 年原国家科委颁布的《基因工程安全管理办法》、1996 年农业部颁布的《农业生物基因工程安全管理办法》以及 2001 年 5 月国务院总理朱镕基签署公布的《农业转基因生物安全管理条例》(第 304 号令)<sup>[25]</sup>。对于转基因生物对人类及环境有无危害及如何正确对待等,人们往往缺乏足够的了解和认识。因此,必须建立转基因鱼对渔业及生态影响分析体系和转基因鱼市场化评估体系,从理论和实践上帮助人们更多更好更全面地了解这一高新技术的内涵,消除人们对转基因产品的疑虑。

## 7 展望

转基因鱼作为养殖品种,必须考虑其具有优良性状而带来经济效益,考虑其营养品质和安全性,考虑环境释放后的遗传安全和对生态的胁迫作用,同时还要考虑生产方式、社会伦理和生活习惯对这种崭新变革的认可程度和承受能力<sup>[18 22 25]</sup>。资源与环境为人类生存发展提供了最基本的条件,渔业可持续发展依赖于人类能否对渔业资源可持续地开发与利用,依赖于人类生产的所作所为。利用鱼类基因工程技术提高鱼类生长速度、抗逆性和改善品质,选育和培育生长优势明显、多抗性(抗病、抗寒、抗高盐碱、耐低氧等)、品质好和饲料转化率高(改变其对必需氨基酸等的要求)的鱼类新品种,解决主要养殖对象的退化和病害问题,恢复我国养殖“当家”品种的优良性状,调整我国鱼类增、养殖业种类结构,以达到降低投入、提高产量和效益的目的,实现经济、生态、社会三大效益统一的重要战略意图。相信在不远的将来,转基因鱼将会随着科学技术的发展和转基因产品的产业化而逐渐投放市场,实现造福人类的理想。

### 参考文献:

- [1] 陈兰英,方福德.转基因研究的现状[J].生命的化学,1996,16(1):7-9.
- [2] 陈永福.转基因动物[M].北京:科学出版社,2002.1-175.
- [3] 朱作言,汪亚平.转基因鱼[J].生物学通报,1999,34(5):1-3.
- [4] Masato Kinoshita, Kenjiro Ozato. Cytoplasmic microinjection of DNA into fertilized medaka (*Oryzias latipes*) eggs [J]. The Fish Biology Journal, 1995, 7: 59-64.
- [5] Masatake Yamauchi, Masato Kinoshita, Motoe Sasanuma, et al. Introduction of a foreign gene into Medakafish using the particle gun method [J]. Journal of Experimental Zoology, 2000, 287: 285-293.
- [6] 昌永华,汤伏生.鱼类基因分子生物学及转基因鱼研究进展[J].中国水产科学,1996,3(1):1-16.
- [7] Tsien R Y. The green fluorescent protein [J]. Annu Rev Biochem, 1998, 67: 509-544.
- [8] Prasher D C, Eckenrode G, Ward W W, et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein [J]. Gene, 1992, 111: 229-233.
- [9] Katsutoshi Niwa, Shuichi Kani, Masato Kinoshita, et al. Expression of GFP in nuclear transplants generated by transplantation of embryonic cell nuclei from GFP-transgenic fish into nonenucleated eggs of medaka, *Oryzias latipes* [J]. Cloning, 2000, 3(1): 23-34.

- [ 10 ] 刘艳红,肖调义,苏建明,等.用显微注射法将绿色荧光蛋白基因导入金鱼受精卵中表达[J].上海水产大学学报,2002,11(2):102-105.
- [ 11 ] Chalie M,Tu Y,Euskirchen G,et al.Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J].Science,1994,263:802-805.
- [ 12 ] Masato Kinoshita,Shuichi Kani,Kenjiro Ozato,et al.Activity of the Medaka translation elongation factor 1 $\alpha$ -A promoter examined using the GFP gene as a reporter[J].Develop Growth Differ,2000,42:469-478.
- [ 13 ] Keiko Hamada,Kana Tamaki,Takao Sasado,et al.Usefulness of the medaka  $\beta$ -actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka (*Oryzias latipes*)[J].Molecular Marine Biology and Biotechnology,1998,7(3):173-180.
- [ 14 ] 龙 华,尾里 建二郎,若松佑子,等.红色荧光蛋白(RFP)基因在转基因青鳉中的表达[J].中国水产科学,2002,9(2):97-99.
- [ 15 ] 朱作言,许克圣,谢岳峰,等.转基因鱼模型的建立[J].中国科学,1989,18(2):147-155.
- [ 16 ] 王进科.鱼类转基因研究[J].生物工程进展,2001,21(3):30-33.
- [ 17 ] Kenjiro Ozato,Koji Inoue,Yuko Wakamatsu.Gene transfer and expression in medaka embryos.Transgenic fish[C].Singapore:World Scientific Publishing Co.,Pte.,Ltd,1992,27-43.
- [ 18 ] 朱作言,曾志强.转基因鱼离市场还有多远[J].生物技术通报,2000(1):1-6.
- [ 19 ] 李新辉,郑光明,赖子尼,等.我国水产生物工程产业化的突破方向[J].珠江水产,1999,7:61-65.
- [ 20 ] 宫知远,Sudha P M,巨本胜,等.转基因技术在鱼类及对虾中的应用[J].青岛海洋大学学报,1999,29(4):649-657.
- [ 21 ] 张德福,王建荣.转基因克隆动物研究[J].生物技术通报,1999,4:16-18.
- [ 22 ] 李 宁.生物技术食品的安全性评价[J].国外医学卫生学分册,1998,25(2):93-96.
- [ 23 ] 李 馨,李云龙,胡铁军,等.全鱼基因在鲫鱼体内的整合与转录[J].中国兽医学报,1997,17(5):457-459.
- [ 24 ] 雷茂良,程金根.全球转基因植物发展现状[J].生物技术通报,1998(6):30-32.
- [ 25 ] 李 宁,刘 信.农业生物基因工程安全管理与实践[J].生物技术通报,1999,2:35-36.