



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102534039 A

(43) 申请公布日 2012.07.04

(21) 申请号 201210047803.3

(22) 申请日 2012.02.28

(71) 申请人 中国科学院水生生物研究所
地址 430072 湖北省武汉市武昌东湖南路 7
号

(72) 发明人 胡炜 朱作言 钟成容 宋焱龙
汪亚平

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68(2006.01)
A01K 67/027(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页
序列表 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种转基因鱼纯合子的快速鉴定方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种转基因鱼纯合子的快速鉴定方法及应用,其步骤:A:剪取约 0.5-1cm²的转基因鱼尾鳍组织,提取 DNA;B:采用常规 PCR 技术检测转植基因阳性;C:采用 SYBRGreenreal-timePCR 的 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法分析转植基因为阳性的转基因鱼的基因型,比较纯合子和半合子转基因鱼中转植基因整合的相对拷贝数,鉴定和筛选出转基因纯合子,并通过测交试验进一步确证。本发明方法易行,快速准确,操作简便。鉴定和筛选的转基因鱼纯合子对于建立转基因鱼纯系,加快转基因鱼新品种培育进程具有重要意义。

1. 一种转基因鱼纯合子的快速鉴定方法,其步骤是:

A、DNA 提取:

剪取 0.5-1cm² 的转 GH 基因鱼尾鳍组织,按血液 / 细胞 / 组织基因组 DNA 提取试剂盒操作指南,提取转 GH 基因鱼基因组 DNA;

B、阳性转 GH 基因鱼鉴定:

采用常规 PCR 技术鉴定阳性转 GH 基因鱼,PCR 体系总体积为 25ul,包括 20ng DNA, 0.5 μl dNTP, 2.5ul 缓冲液, 2.5ul MgCl₂, 1Unit T. Aquaticus DNA 聚合酶,引物各 1 μl;

上下游引物序列分别为:F:5' -CATTTACAGTTCAGCCATGGCTAGA-3' 和 R: 5' -AGCACCACCGACAACAGCACTAATG-3', 反应程序:94℃ 预变性 5min, 扩增 30 个循环: 94℃, 30s; 58℃, 30s; 72℃, 30s, 最后 72℃ 延伸 5min, 取反应产物 5ul 置于 1% g/ml 琼脂糖凝胶电泳,预期扩增的转植基因片段大小为 323bp;

C、纯合子鉴定与筛选:

转植基因 gcGH 在纯合子转基因鱼基因组中的拷贝数是其在半合子转基因鱼基因组中拷贝数的 2 倍,通过 Real-time PCR 分析转基因鱼中转植基因 gcGH 的基因型来鉴别转基因鱼纯合子和半合子;在黄河鲤鱼基因组中拷贝数恒定不变的 GnRH-III 基因为内参基因,以转植的 gcGH 为目标基因,进行实时定量 PCR;

取 20ngDNA, 50mM dNTP, 10ul SYBR Green Mix 通过荧光定量 PCR 对 gcGH 和 GnRH-III 基因进行分析,实验采用 ABI PRISM 7000 定量 PCR 仪,反应条件为 95℃, 2min, 95℃, 15s, 60℃, 30s, 72℃, 45s, 40 个循环, 20ul 反应体系包括 SYBR Green Mix PCR10ul, 20-50ng 纯化 DNA, 上下游引物各 2ul, gcGH 基因上下游引物分别为 F:5' -TGTCTGGCACATCTGAGG-3', R: 5' -GAAAGCATCATATCCATACC-3' 所扩增的片段全长为 205bp, GnRHIII 基因上下游引物分别为 F:5' -ATGGAGTGGAAACGGAAGGT-3', R:5' -CAGACAAATGAGAACAAGAGGAA-3', 所扩增的片段全长为 169bp;

D、纯合子验证:

将步骤 C 筛选出的纯合子转基因黄河鲤鱼与对照黄河鲤鱼杂交后,按步骤 A 和 B 所示方法鉴定杂交子代的阳性率,根据孟德尔遗传定律,纯合子转基因鱼与对照鱼杂交子代的阳性率为 100%,半合子转基因鱼与对照鱼杂交子代的阳性率为 50%。

2. 权利要求 1 所述的一种纯合子转基因鱼在转基因鱼纯系建立中的应用。

3. 权利要求 1 所述的一种纯合子转基因黄河鲤鱼在培育养殖鱼类品种中的应用。

一种转基因鱼纯合子的快速鉴定方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及水产动物遗传育种技术领域,更具体涉及一种鉴定转生长激素(growth hormone,GH,以下同)基因鱼纯合子的方法,还涉及纯合子转基因鱼在转基因鱼纯系建立和新品种培育中的应用。采用常规PCR和定量PCR(real-time PCR,以下同)相结合的技术,通过比较纯合子和半合子转基因鱼中转植基因整合的相对拷贝数,分析转植基因为阳性的转基因鱼的基因型,从而快速准确地鉴定出转基因鱼纯合子,对于建立转基因鱼纯系,加快转基因鱼新品种培育进程具有重要意义。

背景技术

[0002] 从第一批快速生长的转基因鱼诞生迄今,世界范围内已成功研制了30多种转基因鱼,这些转基因鱼包含了世界水产养殖的许多重要品种,如:鲤鱼、罗非鱼、鲇类及鲑鳟鱼类等(Hu Wei and Zhu Zuoyan. Integration mechanisms of transgenes and population fitness of GH transgenic fish. Science in China Ser C-Life Sci, 2010, 53: 401-408.)。采用转基因技术培育具有优良性状的养殖鱼类新品种,已成为水产养殖业可持续发展的主导性技术之一。

[0003] 在转基因鱼群体中获得具有优良性状的转基因鱼后,通过转基因鱼自交从而产生纯合子转基因鱼,从转基因鱼自交群体中筛选出遗传性状稳定的纯合子转基因鱼后,就可以以纯合子转基因鱼为亲本建立转基因鱼家系,从而培育出性状优良、遗传稳定的养殖新品种。但是,转基因鱼自交群体由纯合子转基因鱼、半合子转基因鱼和同窝非转基因鱼组成,只有纯合子转基因鱼的性状才能在子代中稳定遗传,而不会出现性状分离现象。只有纯合子转基因鱼才可以作为候选的优良养殖新品种。因此,如何快速、准确地鉴定和筛选出纯合子转基因鱼是转基因鱼育种的关键之一。

[0004] 采用Dot blot、Southern blot和半定量PCR分析转植基因整合的拷贝数后,再结合转基因鱼与对照鱼的测交结果分析,是筛选纯合子转基因鱼的常用方法,如在转基因罗非鱼和转基因泥鳅中的相关研究(Rahman, M. A., Mak, R., Ayad, H., Smith, A., Maclean, N., 1998. Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). Transgenic Res 7, 357-369; Martínez, R., Arenal, A., Estrada, M. P., Herrera, F., Huerta, V., Vázquez, J., Sánchez, T., de la Fuente, J., 1999. Mendelian transmission, transgene dosage and growth phenotype in transgenic tilapia (*Oreochromis hornorum*) showing ectopic expression of homologous growth hormone. Aquaculture 173, 271-283; Nam, Y. K., Cho, Y. S., Cho, H. J., Kim, D. S., 2002. Accelerated growth performance and stable germ-line transmission in androgenetically derived homozygous transgenic mud loach, *Misgurnus mizolepis*. Aquaculture 209, 257-270)。但是这些鉴定纯合子转基因鱼的方法不仅费时费力,而且所鉴定结果的稳定性不高。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供了一种鉴定转 GH 基因鱼纯合子的方法。该方法易行,操作简便,可以对转 GH 基因鱼自交群体中的纯合子和半合子转基因鱼进行准确、快速和高通量筛选。

[0006] 本发明的另一目的是在于提供了一种纯合子转基因鱼在转基因鱼纯系建立和转基因鱼新品种培育中的应用。筛选到转基因鱼纯合子后,可以建立转基因鱼纯系,从而培育出养殖性状优良,遗传性状稳定的养殖鱼类新品种。本发明对于加快遗传性状稳定的转基因鱼新品种的培育进程具有重要意义。

[0007] 为了达到上述目的,本发明采用以下技术措施:

[0008] 本发明利用 SYBR Green real-time PCR 的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法 (Haurogne, K., Bach, J. M., Lieubeau, B., 2007. Easy and rapid method of zygosity determination in transgenic mice by SYBR Green real-time quantitative PCR with a simple data analysis. *Transgenic Research*. 16, 127-131; Sakurai, T., Kamiyoshi, A., Watanabe, S., Sato, M., Shindo, T., 2008. Rapid zygosity determination in mice by SYBR Green real-time genomic PCR of a crude DNA solution. *Transgenic Research*. 17, 149-155.), 通过分析转基因鱼基因组中整合的转植基因的基因型,在转 GH 基因鱼自交子代群体中快速、准确地鉴定和筛选到候选的纯合子转 GH 基因鱼。该方法鉴别转基因鱼纯合子和半合子不仅准确、快速,而且简单、高通量、低廉,特别适合在转基因鱼群体中进行大规模快速筛选纯合子,可以加快遗传性状稳定的转基因鱼新品种的培育进程。

[0009] 一种转基因鱼纯合子的快速鉴定方法,其步骤是:

[0010] 1. DNA 提取:

[0011] 剪取约 0.5-1cm² 的转 GH 基因鱼尾鳍组织,按“血液 / 细胞 / 组织基因组 DNA 提取试剂盒”操作指南 (北京天根生物技术公司产品),提取转 GH 基因鱼基因组 DNA。

[0012] 2. 阳性转 GH 基因鱼鉴定:

[0013] 采用常规 PCR 技术鉴定阳性转 GH 基因鱼。PCR 体系总体积为 25ul,包括 20ng DNA, 0.5 μ l dNTP (10mM), 2.5ul 缓冲液, 2.5ul MgCl₂, 1Unit T. Aquaticus DNA 聚合酶, 引物 (10mM) (Invitrogen 公司, 下同) 各 1 μ l。

[0014] 上下游引物序列分别为: GH (F: 5' -CATTTACAGTTCAGCCATGGCTAGA-3') 和 GH (R: 5' -AGCACCACCGACAACAGCACTAATG-3')。反应程序: 94°C 预变性 5min, 扩增 30 个循环 (94°C, 30s; 58°C, 30s; 72°C, 30s), 最后 72°C 延伸 5min。取反应产物 5ul 置于 1% (g/ml) 琼脂糖凝胶电泳, 预期扩增的转植基因片段大小为 323bp。

[0015] 3. 纯合子鉴定与筛选:

[0016] 转植基因 gcGH (草鱼生长激素, 下同) 在纯合子转基因鱼基因组中的拷贝数是在半合子转基因鱼基因组中拷贝数的 2 倍。通过 Real-time PCR 分析转基因鱼中转植基因 gcGH 的基因型来鉴别转基因鱼纯合子和半合子: 以在黄河鲤鱼 (遗传资源表见附件) 基因组中拷贝数恒定不变的 GnRH-III 基因为 (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH) 内参基因, 以转植的 gcGH 为目标基因, 进行实时定量 PCR。

[0017] 取 20ng DNA, 50mM dNTP, 10ul SYBR Green Mix (TOYOBO, Japan) 通过荧光定量 PCR 对 gcGH 和 GnRH-III 基因进行分析。实验采用 ABI PRISM 7000 定量 PCR 仪 (Applied

Biosystems 公司), 反应条件为 95 °C, 2min, 95 °C, 15s, 60 °C, 30s, 72 °C, 45s, 40 个循环。20ul 反应体系包括 SYBR Green Mix PCR (TOYOBO) 10ul, 20-50ng 纯化 DNA, 上下游引物 (10mM) 各 2ul。gcGH 基因上下游引物分别为 (F: 5' -TGTCTGGCACATCTGAGG-3', R: 5' -GAAAGCATCATATCCATACC-3') 所扩增的片段全长为 205bp。GnRHIII 基因上下游引物分别为 (F: 5' -ATGGAGTGGAAACGGAAGGT-3', R: 5' -CAGACAAATGAGAACAAGAGGAA-3'), 所扩增的片段全长为 169bp。

[0018] 实时定量 PCR 的数据由 ABI Prism 7000SDS 11 软件 (Applied Biosystems 公司) 编译和收集。采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法: $\Delta Ct = Ct(\text{gcGH}) - Ct(\text{GnRH-III})$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{待检测鱼}) - \Delta Ct(\text{已知的半合子基因型鱼, 为经过测交验证的实验鱼})$, 当 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2$ 时, 则检测的实验鱼为纯合子, 当 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ 时, 检测的鱼为半合子。

[0019] 4. 纯合子验证:

[0020] 将步骤 3 筛选出的纯合子转基因黄河鲤鱼与对照黄河鲤鱼杂交后, 按步骤 1 和 2 所示方法鉴定杂交子代的阳性率。根据孟德尔遗传定律, 纯合子转基因鱼与对照鱼杂交子代的阳性率为 100%, 半合子转基因鱼与对照鱼杂交子代的阳性率为 50% (图 1)。

[0021] 一种纯合子转基因鱼在转基因鱼纯系建立和转基因鱼新品种培育中的应用。其步骤是: 将鉴定的雄性转基因黄河鲤鱼纯合子与雌性转基因黄河鲤鱼纯合子按常规方法在池塘中养殖, 待其发育到性成熟后, 按常规方法进行人工催产; 将雄性转基因黄河鲤鱼纯合子精液与雌性转基因黄河鲤鱼卵子进行人工授精; 自交得到的子代即为遗传性状稳定的转基因鱼纯合子家系, 将获得的转基因黄河鲤鱼纯合子家系按常规方法在池塘中养殖和培育, 从而培育出优良养殖鱼类新品种。

[0022] 本发明与现有技术相比, 具有以下优点和效果:

[0023] 1. 与采用 Dot blot、Southern blot 和半定量 PCR 分析转植基因整合的拷贝数后, 再结合测交结果鉴定纯合子转基因鱼技术比较, 本发明结合 SYBR Green real-time PCR 和相对定量比较 ΔCt 的方法鉴定纯合子, 不需要样品浓度一致, 也不需要复杂的数据分析, 操作简单, 快速, 准确, 而且可以高通量分析待检测转基因鱼样品。

[0024] 2. 鉴定出来的纯合子转基因鱼可以作为亲本用于建立转基因鱼纯系, 从而培育出养殖性状优良, 遗传性状稳定的养殖鱼类新品种, 加快遗传性状稳定的转基因鱼新品种的培育进程。

附图说明

[0025] 图 1 为一种纯合子和半合子转 GH 基因鱼测交子代的 PCR 阳性检测结果示意图。

[0026] 纯合子, 半合子转 GH 基因鱼及对照雄鱼分别与对照雌鱼杂交, 提取子代鱼苗基因组 DNA, PCR (30 循环) 后取 5ul 产物进行琼脂糖凝胶 (1%) 电泳, 片段长度为 323bp, 如图所示, 纯合子 (A, n = 20), 半合子 (B 和 C, n = 20) 及对照鱼 (C1, C2, C3, C4, 4 条/组), PCR 阴性对照采用无菌水做为模板 (NTC: no template control)。根据孟德尔遗传定律, 纯合子 (A) 子代的转植基因阳性率为 100%, 而半合子 (B 和 C) 子代的转植基因阳性率为 50% 左右。

[0027] 图 2 为一种纯合子 (n = 11) 和半合子 (n = 42) 转 GH 基因黄河鲤 SYBR Real-time PCR 定量分析结果示意图。

[0028] 纯合子转 GH 基因黄河鲤 $2^{-\Delta \Delta Ct} = 2.02 \pm 0.31$, 半合子转 GH 基因黄河鲤 $2^{-\Delta \Delta Ct} = 1.01 \pm 0.16$, 所扩增的转植基因相差一倍, 统计学分析具有显著差异 (Student's t-test, $p < 0.001$), 以转基因鱼 ($n = 53$) 的基因组 DNA (25-50ng) 为模板, 分别扩增 gcGH 和 sGnRH 基因片段, $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 数据分析方法如下: $\Delta Ct = Ct(\text{gcGH}) - Ct(\text{sGnRH})$, $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{待检测}) - \Delta Ct(\text{已知半合子})$, 上下误差线表示标准差。

具体实施方式

[0029] 实施例 1:

[0030] 一种转基因鱼纯合子的鉴定方法, 其步骤是:

[0031] 1. DNA 提取

[0032] 剪取约 0.5-1cm² 的转 GH 基因鱼尾鳍组织, 按“血液 / 细胞 / 组织基因组 DNA 提取试剂盒”操作指南 (北京天根生物技术公司产品), 提取转 GH 基因鱼基因组 DNA。

[0033] 2. 转 GH 基因鱼阳性鉴定

[0034] 采用常规 PCR 技术进行转 GH 基因鱼阳性鉴定。PCR 体系总体积为 25ul, 包括 20ng DNA, 100uM dNTP, 2.5ul Buffer (25mM), 2.5ul MgCl₂ (25mM), 1Unit T. Aquaticus DNA 聚合酶 (Fermentas, USA), 引物 (10mM) (Invitrogen 公司, 下同) 各 1μl。引物序列: GHf (5' -CATTT ACAGTTCAGCCATGGCTAGA-3') 和 GHr (5' -AGCACCACCGACAACAGCACTA ATG-3')。反应程序: 94℃ 预变性 5min, 扩增 30 个循环 (94℃, 30s; 58℃, 30s; 72℃, 30s), 最后 72℃ 延伸 5min, PCR 反应在 GeneAmp System 9600 型仪器进行。取反应产物 5ul 置于 1% (g/ml) 琼脂糖凝胶电泳。预期扩增的转植基因片段大小为 323bp (图 1)。

[0035] 3. 纯合子鉴定与筛选

[0036] 转植基因 gcGH 在纯合子转基因鱼基因组中的拷贝数是其在半合子转基因鱼基因组中拷贝数的 2 倍。通过 Real-time PCR 分析转基因鱼中转植基因 gcGH 的基因型来鉴别转基因鱼纯合子和半合子: 以在黄河鲤鱼 (遗传资源表见附件) 基因组中拷贝数恒定不变的 GnRH-III 基因为 (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH) 内参基因, 以转植的 gcGH 为目标基因, 进行实时定量 PCR。

[0037] 取 20ng DNA, 50mM dNTP, 10ul SYBR Green Mix (TOYOBO, Japan) 通过荧光定量 PCR 对 gcGH 和 GnRH-III 基因进行分析。实验采用 ABI PRISM 7000 定量 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司), 反应条件为 95℃, 2min, 95℃, 15s, 60℃, 30s, 72℃, 45s, 40 个循环。20ul 反应体系包括 SYBR Green Mix PCR (TOYOBO) 10ul, 20-50ng 纯化 DNA, 上下游引物 (10mM) (Invitrogen 公司) 各 0.5μl。gcGH 基因上下游引物分别为 (F: 5' -TGTCTGGCACATCTGAGG-3', R: 5' -GAAAGCATCATATCCATACC-3') 所扩增的片段全长为 205bp。GnRHIII 基因上下游引物分别为 (F: 5' -ATGGAGTGGAAACGGAAGGT-3', R: 5' -CAGACAAATGAGAACAAGAGGAA-3'), 所扩增的片段全长为 169bp。

[0038] 实时定量 PCR 的数据由 ABI Prism 7000SDS 1.1 软件编译和收集。采用相对定量 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 方法: $\Delta Ct = Ct(\text{gcGH}) - Ct(\text{GnRH-III})$, $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{待检测鱼}) - \Delta Ct(\text{已知的半合子基因型鱼, 为经过测交验证的实验鱼})$, 当 $2^{-\Delta \Delta Ct} = 2$ 时, 则检测的转基因鱼为纯合子, 当 $2^{-\Delta \Delta Ct} = 1$ 时, 检测的转基因鱼为半合子 (图 2)。

[0039] 4. 纯合子验证

[0040] 将步骤 3 筛选出的纯合子转基因鱼与对照鱼杂交后,按步骤 1 和 2 所示方法鉴定杂交子代的阳性率,根据孟德尔遗传定律,纯合子转基因鱼与对照鱼杂交子代的阳性率为 100%,杂合子转基因鱼与对照鱼杂交子代的阳性率为 50% (图 1)。

[0041] 实施例 2:

[0042] 筛选出来的一种纯合子转基因黄河鲤鱼在培育优良养殖鱼类品种中的应用。其具体过程是:

[0043] A、将鉴定的雄性转基因黄河鲤鱼纯合子与雌性转基因黄河鲤鱼纯合子按常规方法在池塘中养殖,待其发育到性成熟后,按常规方法进行人工催产;

[0044] B、将雄性转基因黄河鲤鱼纯合子精液与雌性转基因黄河鲤鱼卵子进行人工授精;

[0045] C、自交得到的子代即为遗传性状稳定的转基因鱼纯合子家系,将获得的转基因黄河鲤鱼纯合子家系按常规方法在池塘中养殖和培育,从而培育出优良养殖鱼类新品种。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院水生生物研究所

<120> 一种转基因鱼纯合子的快速鉴定方法及应用

<130> 一种转基因鱼纯合子的快速鉴定方法及应用

<140> 2012100478033

<141> 2012-02-28

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 1

catttacagt tcagccatgg ctaga

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 2

agcaccaccg acaacagcac taatg

25

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 3

tgtctggcac atctgagg

18

<210> 4

<211> 20

[0002]

<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 4	
gaaagcatca tatccatacc	20
<210> 5	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 5	
atggagtgga acggaaggt	19
<210> 6	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 6	
cagacaaatg agaacaagag gaa	23

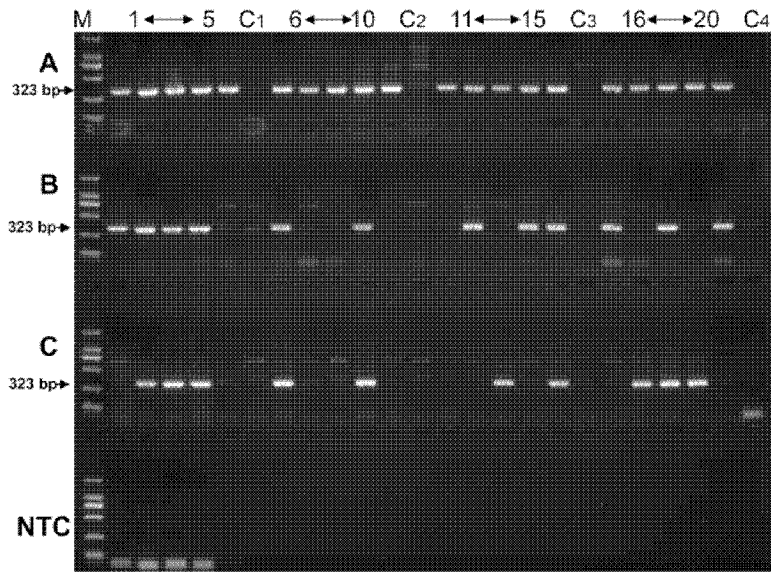


图 1

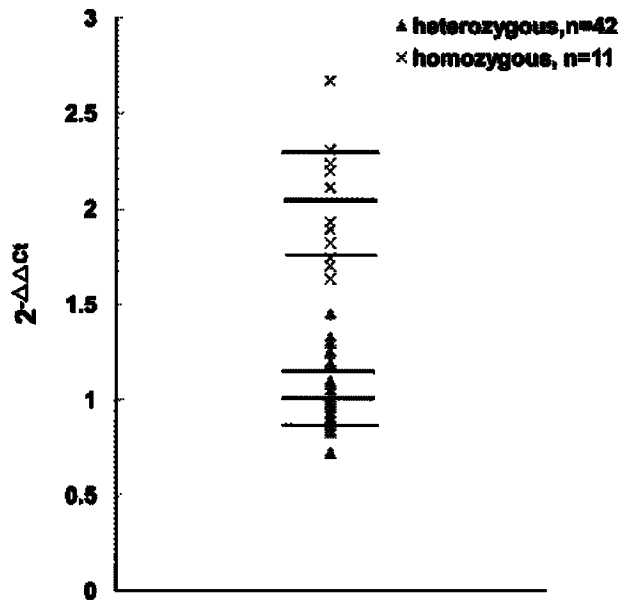


图 2