

• 生物技术与方法 •

## 荧光转基因斑马鱼 Tg (*ttn.2*: EGFP)的构建

陈佳乐, 曹秋香\*, 曹慧, 陈湘定, 邓云

湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410081

陈佳乐, 曹秋香, 曹慧, 陈湘定, 邓云. 荧光转基因斑马鱼 Tg (*ttn.2*: EGFP)的构建[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1804-1814.  
CHEN Jiale, CAO Qiuxiang, CAO Hui, CHEN Xiangding, DENG Yun. Construction of fluorescent transgenic zebrafish Tg (*ttn.2*: EGFP)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1804-1814.

**摘要:** 为了建立一种用于研究肌肉和心脏发育及其相关疾病的绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)转基因斑马鱼品系, 本研究使用斑马鱼 *ttn.2* 基因编码区上游启动子序列和绿色荧光蛋白基因编码序列构建了重组表达载体, 并将该载体和 *Tol2* 转座酶的加帽 mRNA 显微共注射入斑马鱼 1-细胞期胚胎, 通过荧光检测、遗传杂交筛选和分子鉴定等方法, 成功建立了能稳定遗传的 Tg (*ttn.2*: EGFP)转基因斑马鱼品系。荧光表达分析及原位杂交分析结果表明, 绿色荧光信号在斑马鱼肌肉和心脏组织中特异表达模式与 *ttn.2* 基因的 mRNA 表达一致。通过反向 PCR 鉴定转基因表达载体在 F1 代斑马鱼品系中的随机整合位点, 结果表明: No. 33 转基因品系的 EGFP 基因整合在斑马鱼的 4 号和 11 号染色体上, No. 34 转基因品系则整合在 1 号染色体上。该荧光转基因斑马鱼品系 Tg (*ttn.2*: EGFP)的成功构建为肌肉和心脏发育以及相关疾病研究提供了一个新的理想实验模型。此外, 绿色荧光强烈表达的斑马鱼品系还可以作为一种新的观赏鱼。

**关键词:** *ttn.2*; *Tol2* 转座子; 转基因; 斑马鱼

## Construction of fluorescent transgenic zebrafish Tg (*ttn.2*: EGFP)

CHEN Jiale, CAO Qiuxiang\*, CAO Hui, CHEN Xiangding, DENG Yun

College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China

**Abstract:** In order to develop a transgenic zebrafish line with green fluorescent protein (enhanced green fluorescent protein, EGFP) expressed specifically in muscle and heart, the recombinant expression vector constructed using the zebrafish *ttn.2* gene promoter fragment and

资助项目: 国家自然科学基金(31970504)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31970504).

\*Corresponding author. E-mail: qxcao@hunnu.edu.cn

Received: 2022-08-15; Accepted: 2022-11-22

EGFP gene coding sequence and the capped mRNA of *Tol2* transposase were co-injected into the zebrafish 1-cell stage embryos. The stable genetic Tg (*ttn.2*: EGFP) transgenic zebrafish line was successfully developed by fluorescence detection, followed by genetic hybridization screening and molecular identification. Fluorescence signals and whole-mount *in situ* hybridization showed that EGFP expression was located in muscle and heart, the specificity of which was consistent with the expression of *ttn.2* mRNA. Inverse PCR showed that EGFP was integrated into chromosomes 4 and 11 of zebrafish in No. 33 transgenic line, while integrated into chromosome 1 in No. 34 transgenic line. The successful construction of this fluorescent transgenic zebrafish line, Tg (*ttn.2*: EGFP), laid a foundation for the research of muscle and heart development and related diseases. In addition, the transgenic zebrafish lines with strong green fluorescence can also be used as a new ornamental fish.

**Keywords:** *ttn.2*; *Tol2* transposon; transgenesis; zebrafish

肌联蛋白(titin)是人类和所有脊椎动物中已知的最大的单链蛋白质,其分子量为3–4 MDa,表达于心肌和骨骼肌中,与粗肌丝和细肌丝构成肌肉收缩的基本单位——肌小节。Titin 跨越半个肌小节,长度约为 1  $\mu\text{m}$ ,其明带(I-带)是一个复杂的分子弹簧,由 PEVK 基序[富含脯氨酸(P)、谷氨酸(E)、缬氨酸(V)和赖氨酸(K)残基的结构基序]、免疫球蛋白(immunoglobulins, Ig)结构域以及可变 N2B 和 N2A 元素组成<sup>[1]</sup>。有研究表明, titin 参与肌原纤维的组装和维持,其表达水平的降低可能还会减少肌小节的形成,在肌小节组装和心脏发育中有着关键作用<sup>[2-3]</sup>。此外,它在肌肉收缩的被动张力和信号传导中起着重要作用<sup>[4]</sup>, Mártonfalvi 等<sup>[5]</sup>用力钳实验证明了 titin 结构域的展开与重折叠的动态过程能够产生力。Tsiros 等<sup>[6]</sup>发现 titin 的 N2A 区域以钙依赖性方式结合 F-肌动蛋白,其中负责结合的是 I80,负责钙依赖性的是 I83。titin 突变与多种肌节疾病有关,包括扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)<sup>[7]</sup>、肥厚型心肌病(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)<sup>[8]</sup>、胫骨肌营养不良(tibial muscular dystrophy, TMD)<sup>[9]</sup>、肌炎肌营养不良(muscular dystrophy

with myositis, MDM)<sup>[10]</sup>和肢带型肌营养不良 2J 型(limb girdle muscular dystrophy type 2J, LGMD2J)<sup>[11]</sup>等。

斑马鱼(*Danio rerio*, zebrafish)是一种常用的模式动物,具有体外受精、体外发育、早期胚胎透明等诸多优势,常被用来研究脊椎动物组织器官的发育,以及药物高通量筛选等研究。*Tol2* 是一种天然存在且具有转座活性的脊椎动物转座子。Kawakami 等<sup>[12]</sup>通过 Southern blotting 杂交,发现斑马鱼基因组不包含任何 *Tol2* 相关序列,这为 *Tol2* 转座子系统在斑马鱼中的广泛应用提供了优良的基础条件。本研究使用 *ttn.2* 基因编码区上游启动子序列,构建带有绿色荧光标签的 p*Tol2-ttn.2*-EGFP 转基因表达载体,通过显微共注射载体和 *Tol2* 转座酶的加帽 mRNA,筛选肌肉和心脏组织特异表达绿色荧光的斑马鱼嵌合体,待性成熟后与野生型斑马鱼杂交,通过荧光观察、胚胎整体原位杂交(whole-mount *in situ* hybridization)和反向 PCR 等方法对转基因斑马鱼进行分析和鉴定,获得稳定表达荧光的转基因品系,为研究肌节疾病和探索药物治疗提供良好的实验模型。

# 1 材料与方 法

## 1.1 材 料

斑马鱼(野生型 TU 品系)购自中国科学院水生生物研究所国家斑马鱼资源中心,按 Westerfield<sup>[13]</sup>的方法饲养于全自动水循环养殖系统中。动物实验已通过湖南师范大学生物医学研究伦理委员会的伦理审批(批准号:2020-394)。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、普通质粒小提试剂盒、无内毒素质粒小提试剂盒等购自康为世纪生物科技股份有限公司;凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司;高保真试剂盒、转录试剂盒、RNA 纯化试剂盒分别为 Vazyme、赛默飞世尔科技有限公司、Qiagen 公司的产品;各种限制性内切酶为 NEB 或 TaKaRa 公司的产品。各试剂均按照产品要求存放和使用。

## 1.2 pTol2-*ttn.2*-EGFP 转基因表达载体的构建

将 Tol2kit 中的 pME-MCS、p3E-EGFPpA、pDestTol2pA2 质粒与 p5E-*ttn.2* 质粒(由美国梅奥医学中心徐晓雷老师实验室惠赠,测序得知启动子位于 9 号染色体的 *ttn.2* 基因起始密码子上游 6-3 001 对应的区域)按照 Kwan 等<sup>[14]</sup>报道的方法进行同源重组,转染 DH5 $\alpha$ 感受态细胞,在氨苄培养板上挑选单克隆,提取的质粒 DNA 通过酶切、测序验证;获得斑马鱼 *ttn.2* 启动子驱动 EGFP 表达的 pTol2-*ttn.2*-EGFP 转基因表达载体。

## 1.3 转座酶 mRNA 的体外合成

pCS-TP<sup>[15]</sup>质粒携带 *Tol2* 转座酶 cDNA 序列,使用 *Not* I 限制性内切酶消化后,切胶回收酶切产物,然后使用 mMESAGE mMACHINE SP6 转录试剂盒体外转录合成加帽 mRNA。

## 1.4 显微注射

转基因表达质粒作为外源 DNA,和 *Tol2* 转

座酶的加帽 mRNA 一起,各以 60-100 ng/ $\mu$ L、300-1 000 ng/ $\mu$ L 的质量浓度,约 2 nL 的总体积注射到 1-细胞期的胚胎(约 500 颗)中。注射后的胚胎置于 28  $^{\circ}$ C E3 水(5 mmol/L NaCl, 0.17 mmol/L KCl, 0.33 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mmol/L MgSO<sub>4</sub>)中培养,使用 Leica M205 FA 荧光体视显微镜检测注射后是否出现绿色荧光信号,筛选具有绿色荧光信号的阳性个体(即嵌合体)。

## 1.5 形态学观察

培养阳性胚胎至性成熟后与野生型斑马鱼杂交,选出可稳定遗传的嵌合体斑马鱼,并将有绿色荧光信号的阳性子代个体继续培养至性成熟,再分别与野生型杂交,直到建立 EGFP 稳定表达的转基因斑马鱼 Tg (*ttn.2*: EGFP)。

选取绿色荧光信号较强的转基因斑马鱼 F1 代与野生型杂交,将子代胚胎置于 28  $^{\circ}$ C 的 E3 水中培养。分别在 10 hpf (hours post-fertilization) (尾芽期)、16 hpf (14 体节期)、24 hpf (原基-5 期)、48 hpf (长-胸鳍期)、72 hpf (突口期)选取稳定表达荧光的斑马鱼胚胎,移至滴加了 3% 甲基纤维素(methyl cellulose)的凹面载玻片中,在全自动荧光体视显微镜(Leica M205 FA)下进行 60-120 倍拍照和表达分析。

## 1.6 探针的制备和胚胎整体原位杂交

根据 NCBI 中斑马鱼序列(XM\_021479070)设计 *ttn.2* 基因的探针引物,引物序列见表 1。以斑马鱼 48 hpf 发育时期的 cDNA 作为模板,用高保真 DNA 聚合酶和上述引物分别进行扩增,使用有地高辛标记混合物(DIG RNA labeling mix, Roche)的 MAXIscript T7 试剂盒将 PCR 产物转录合成地高辛标记的反义 RNA 探针。整体原位杂交实验按照 Thisse 等<sup>[16]</sup>的方法进行:胚胎经过 4%多聚甲醛 4  $^{\circ}$ C 固定过夜、25%-100%甲醇梯度脱水及复水、蛋白酶 K 消化 1-45 min (根据胚胎发育时期调整消化时间),然后经过杂交

表 1 探针的引物序列

Table 1 Primers used to generate riboprobes

Primer name	Nucleotide sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>ttn.2</i> -ISH-F	TTGAGGGAGGGAGTGTGTC	20
<i>ttn.2</i> -ISH-R	GGTAATACGACTCACTATAGGGTCCTCTCCGTCCTCAATCAC	42

The sequences underlined are T7 promoter, which is used for *in vitro* transcription with MAXIscript T7 transcription kit.

液(含 3 ng/μL 反义 RNA 探针) 65 °C 孵育过夜、50% 甲酰胺漂洗后, 使用酶连地高辛抗体 4 °C 孵育过夜, 最后加入新鲜配制的碱性磷酸酶显色液室温避光染色 2–6 h。显色后将胚胎置于盛放 100% 甘油的陶瓷皿中, 用全自动荧光体视显微镜和 LAS X 软件进行 60–120 倍的图像采集以及 *ttn.2* 表达模式的分析。

### 1.7 反向 PCR 和 PCR 验证

选取绿色荧光信号较强的转基因斑马鱼 F1 代, 剪取部分尾鳍置于 1.5 mL 离心管中, 加入 100 μL 组织裂解液(0.2 mol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-HCl, 0.2% SDS)和 1 μL 蛋白酶 K (10 mg/mL), 放置于 65 °C 恒温箱中裂解过夜; 然后用异丙醇和乙醇提取斑马鱼基因组 DNA。

将基因组 DNA 用 *Hae* III 限制性内切酶消化, 80 °C 热失活 20 min 后采用乙醇沉淀法回收片段, 再用 T4 DNA 连接酶自身环化。10 倍稀释连接产物, 取 1 μL 作为巢式 PCR (引物序列见表 2) 第一轮的模板, 扩增 *Tol2* 转座子 5' 端

(使用 *tol2*-L-F1 和 *tol2*-L-R1 为引物)和 3' 端(使用 *tol2*-R-F1 和 *tol2*-R-R1 为引物), 将第一轮 PCR 产物稀释 100 倍后使用 *tol2*-L-F1 和 *tol2*-L-R2 引物或者 *tol2*-R-F2 和 *tol2*-R-R1 引物进行第二轮 PCR 扩增。反向 PCR 产物通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定出有条带后, 再送至生工生物工程(上海)股份有限公司分别以 *tol2*-L-F1、*tol2*-R-F2 引物进行 Sanger 测序, 实验流程如图 1 所示。

根据对 zebrafish GRCz11 基因组序列 BLAST 结果设计整合位点检测引物 F 和 R, 各位点检测引物核苷酸序列见表 3。以基因组 DNA 为模板, 检测引物 F (N33-C4-F、N33-C11-F、N34-C1-F) 分别与 *tol2*-L-R1 扩增整合位点 5' 端序列, 检测引物 R (N33-C4-R、N33-C11-R、N34-C1-R) 分别与 *tol2*-R-F1 扩增 3' 端序列, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

## 2 结果与分析

### 2.1 成功构建 pTol2-*ttn.2*-EGFP 转基因表达载体

将 p5E-*ttn.2* 与 pME-MCS、p3E-EGFPpA、pDestTol2pA2 重组反应后, 得到的重组质粒应含有 p5E-*ttn.2* 载体的 *ttn.2* 启动子序列、p3E-EGFPpA 载体的 EGFPpA 序列, 以及 pDestTol2pA2 载体的骨架, 预计大小为 8 058 bp。根据质粒的酶切位点分析, *Stu* I 限制性内切酶只在 *ttn.2* 启动子序列和 EGFPpA 序列中各有一个酶切位点, 即在重组质粒上有 2 个酶切位点, 适合鉴定重组载体。从琼脂糖凝胶电泳图(图 2A)

表 2 反向 PCR 的引物序列

Table 2 Primers used in inverse PCR

Primer name	Nucleotide sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>tol2</i> -L-F1	GATGCGGGAAGAGGTGTATT	20
<i>tol2</i> -L-R1	TTTGAGTAGCGTGTACTGGCAT	22
<i>tol2</i> -L-R2	AATACTCAAGTACAATTTTA	20
<i>tol2</i> -R-F1	GAGTAAAAAGTACTTTTTTTTCT	23
<i>tol2</i> -R-F2	CTCAAGTAAAGTAAAAATCCCCAAA	25
<i>tol2</i> -R-R1	TTTCCCTTGCTATTACCAAACC	22

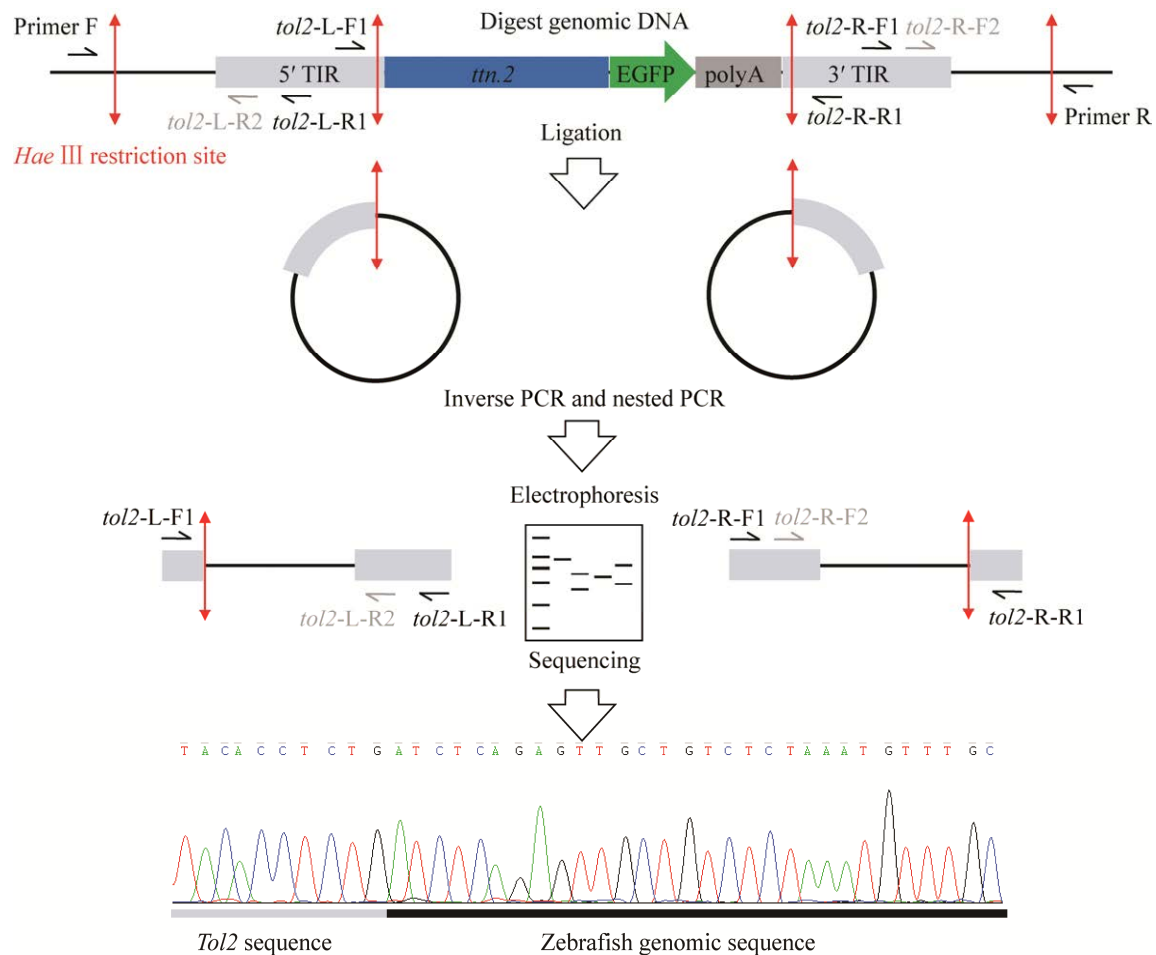


图 1 反向 PCR 示意图

Figure 1 Diagram of inverse PCR.

表 3 检测引物

Table 3 Detection primers

Primer name	Nucleotide sequence (5'→3')	Size (bp)
N33-C4-F	AACTGGGTCTAGACGCTTAAGAT	23
N33-C4-R	ATGCCTTTTCTTTTCTCTCTGGG	24
N33-C11-F	GGGGTTAAACTTTCTTTGGGC	22
N33-C11-R	TGTCCCAAAGTCTCCGTG	20
N34-C1-F	ACGCAGGGGTCTCAAAATTACC	22
N34-C1-R	AACCTGGGGAAGTAAAAATGACA	23

可以看出，重组质粒经过 *Stu* I 酶切后有 2 条条带，片段大小约为 7 kb 和 1 kb，与预期一致。测序分析结果也表明，本研究成功地构建了 pTol2-*ttn.2*-EGFP 转基因表达载体(图 2B、2C)。

## 2.2 转基因斑马鱼品系的建立

将已构建成功的转基因表达载体 pTol2-*ttn.2*-EGFP 和 *Tol2* 转座酶的加帽 mRNA 共注射到 1-细胞期的斑马鱼胚胎中，培养一段时间后在荧光显微镜下可以观察到部分胚胎具有绿色荧光信号(图 3A)。显微注射 48 h 后，成功存活了 300 颗胚胎，其中有 247 颗(82.3%)检测到肌肉组织中有绿色荧光。随后，挑选发育正常且具有荧光的阳性胚胎，培养至性成熟后与野生型斑马鱼杂交。40 条阳性鱼中有 5 条(12.5%)与野生型杂交的后代能够检测到绿色荧光信号，这 5 条阳性斑马鱼即为可遗传的转基因斑马鱼(嵌

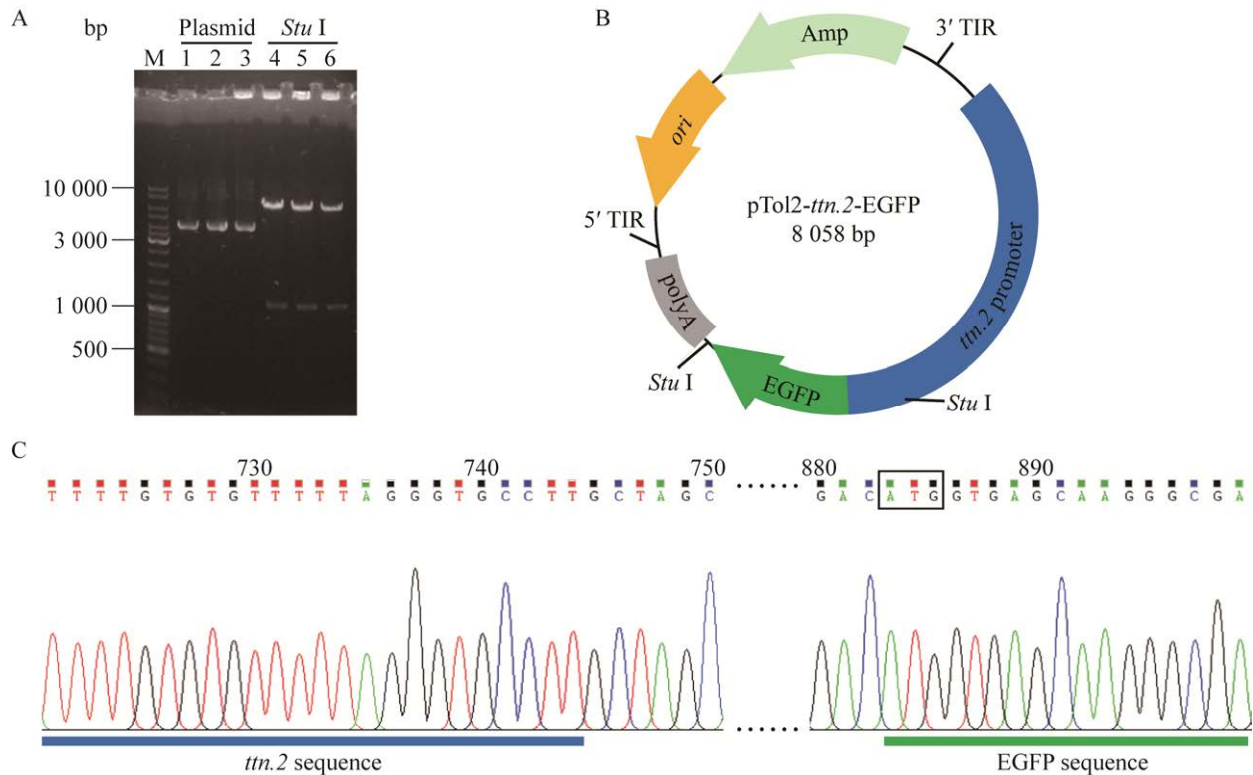


图 2 pTol2-*ttn.2*-EGFP 载体的鉴定

Figure 2 Identification of pTol2-*ttn.2*-EGFP vector. A: Digestion of plasmids with *Stu* I. M: DNA marker (GeneRuler DNA Ladder Mix). B: Map of pTol2-*ttn.2*-EGFP plasmid. C: Result of sequencing; the initiation codon of the EGFP gene is shown in black box.

合体)。图 3B、3C 显示其中一条嵌合体后代胚胎(48 hpf)荧光信号的位置,可以明显观察到斑马鱼全身肌肉、心脏组织部位均有荧光,尤其体节部位肌肉组织中的荧光较强,心脏组织相对较弱。

5 条嵌合体斑马鱼与野生型杂交获得阳性后代比例均大于 50%,最高可达 74%,但同一条嵌合体的杂交后代的荧光强度不一致。本研究选取荧光信号比较一致且相对较强的后代进行培养,经过多代杂交并扩大培养,建立稳定的 Tg (*ttn.2*: EGFP)转基因品系。对每一代后代进行观察,发现转基因斑马鱼成鱼均具有活力且可育,在形态和行为上与野生型没有明显的差异,发育和生长速度基本一致。此外,在转

基因斑马鱼中发现 2 条 F1 斑马鱼及其后代都高强度表达 EGFP,以至于肉眼可以明显观察到背部的绿色(图 3D)。

### 2.3 绿色荧光蛋白 EGFP 与斑马鱼内源性 *ttn.2* 的表达一致

对比转基因斑马鱼 Tg (*ttn.2*: EGFP)胚胎的绿色荧光蛋白 EGFP 与野生型斑马鱼胚胎内源性 *ttn.2* 基因的表达,结果显示,早期胚胎(10 hpf)在胚轴有荧光蛋白表达,原位杂交也观察到 *ttn.2* 在整个胚轴有表达(图 4A、4F)。随着胚胎的发育(16–72 hpf),躯干和尾部逐渐出现了体节,体节内的细胞也陆续发育为生肌节,此时荧光的表达逐渐增强。在斑马鱼胚胎 16–72 hpf (图 4G、4J)时期内,均能看到 *ttn.2* 在躯干和尾部

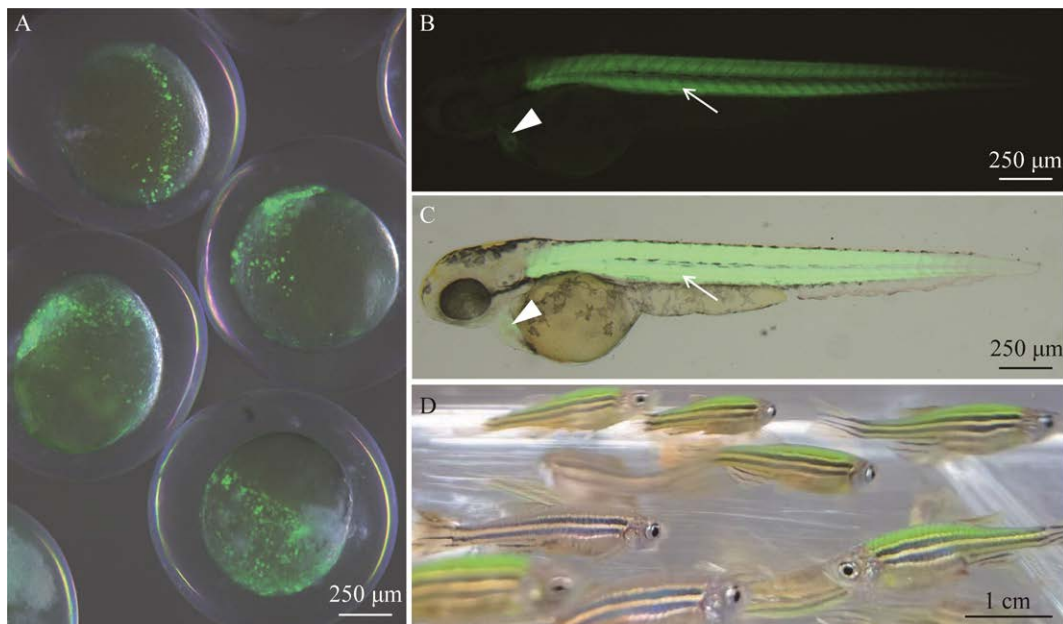


图3 斑马鱼肌肉组织中的绿色荧光信号

Figure 3 Green fluorescence signal in the muscle tissues of zebrafish. A: F0 embryos after injection. B–C: Left lateral view of whole body of F2 transgenic zebrafish Tg (*ttn.2*: EGFP) at 48 hpf. B is the fluorescence diagram, and C is the superposition of fluorescence and white light. The white arrowheads indicate the heart, and the white arrows indicate the muscle. D: Wild-type and Tg (*ttn.2*: EGFP) adult zebrafish. In the figure, the greens indicate transgenic zebrafish.

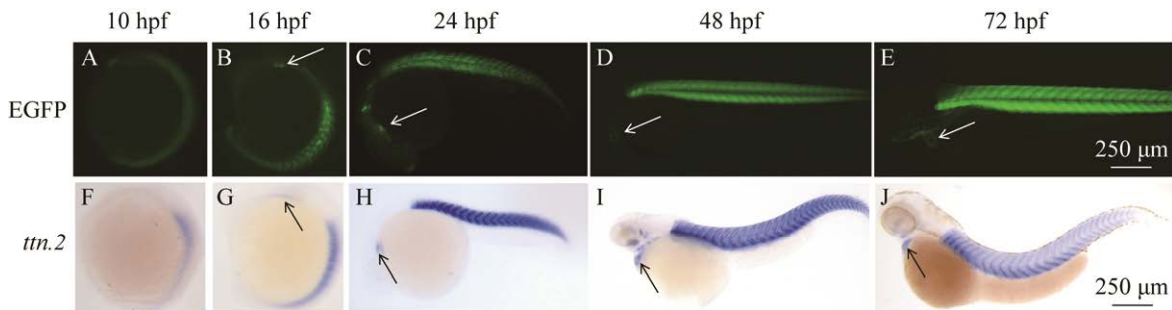


图4 EGFP 和内源 *ttn.2* mRNA 在斑马鱼胚胎中的表达

Figure 4 Expression of EGFP and endogenous *ttn.2* mRNA in zebrafish embryos. A–E: EGFP patterns in the Tg (*ttn.2*: EGFP) fish from 10 to 72 hpf. F–J: Endogenous expression patterns in wild-type of the *ttn.2* gene from 10 to 72 hpf revealed by whole-mount *in situ* hybridization. The black and white arrows indicate the heart. Embryos are viewed from left lateral.

的表达, V 形分节明显, 分节距离也随着发育逐渐增大。

在心脏中, 荧光信号最早可在 16 hpf 胚胎的前侧板中胚层(anterior lateral plate mesoderm, ALPM)观察到, 但原位杂交只显示 *ttn.2* 有极少

量的表达(图 4B、4G)。随着胚胎发育到 24 hpf, ALPM 部分细胞随后迁移到中线融合形成心锥, 此时心脏部位的荧光开始变得强烈, *ttn.2* 在心脏处也表达明显(图 4C、4H)。随后, 心锥管腔延长发育成线性心管, 开始出现了搏动,

最后环化形成心脏，这期间 EGFP 均有表达，但荧光弱于躯干和尾部(图 4D、4E)；原位杂交也能观察到 *ttn.2* 基因相似的表达模式(图 4I、4J)。

由上述结果可知，斑马鱼内源性 *ttn.2* 的表达主要在肌肉和心肌中表达，与骨骼肌和心脏生理功能相关，转基因斑马鱼 Tg (*ttn.2*: EGFP) 的绿色荧光蛋白 EGFP 同样也在肌肉和心脏中表达，它们的时空表达模式始终一致。因此，Tg (*ttn.2*: EGFP)转基因斑马鱼模型可以通过荧光检测，分析内源性 *ttn.2* 在肌肉和心肌中的表达水平，且可以分析药物或生理病理条件下骨骼肌和心脏形态的改变。

#### 2.4 反向 PCR 鉴定整合位点及 PCR 验证

将 F1 代基因组 DNA 的反向 PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳，结果见图 5。No. 7 品系 5' 端和 3' 端都只有一条亮带，可能为单个转座子插入品系；No. 33 和 No. 34 品系的 5' 端和 3' 端都至少有 2 条条带，可能有多个转座子插入。切胶回收较亮的条带，送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序。

根据 BLAST against zebrafish GRCz11 (genomic sequence) 分析各个品系的测序结果(表 4)，No. 7 品系没有检测到斑马鱼基因组序列，

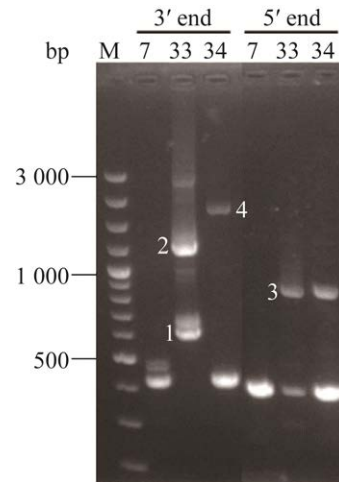


图 5 反向 PCR 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 5 Agarose gel electrophoresis of inverse PCR. Red number is the successfully sequenced. M: DNA marker (generuler 100 bp plus DNA ladder).

只有质粒的序列，这可能是由于反向 PCR 使用的是四碱基的限制性内切酶(*Hae* III)，只扩增了载体两端 *Tol2* 及其中间序列，扩增的基因组 DNA 片段较少，难以识别整合位点，造成了反向 PCR 失败。其余 2 个品系均检测到斑马鱼基因组序列，其中 No. 33 品系的转座子整合到 4 号和 11 号染色体，No. 34 品系插入 1 号染色体上；所有品系插入的位置均在基因间区域，并且在 *Tol2* 插入的目标位点均生成不同的 8 bp 重复序列，且没有任何碱基偏好，详细结果见表 5。

表 4 测序比对结果

Table 4 BLAST result of sequencing

Band description	Max score	Total score	Query cover (%)	E value	Percent identity (%)	Accession length	Accession No.
1 <i>Danio rerio</i> strain Tuebingen chromosome 4, GRCz11 Primary Assembly	464	464	37	$1e^{-128}$	100.00	78 093 715	NC_007115.7
2 <i>Danio rerio</i> strain Tuebingen chromosome 11, GRCz11 Primary Assembly	1 347	1 347	77	0	100.00	45 484 837	NC_007122.7
3 <i>Danio rerio</i> strain Tuebingen chromosome 11, GRCz11 Primary Assembly	1 607	1 607	72	0	99.89	45 484 837	NC_007122.7
4 <i>Danio rerio</i> strain Tuebingen chromosome 1, GRCz11 Primary Assembly	1 363	1 363	93	0	99.73	59 578 282	NC_007112.7

The band number corresponds to electrophoresis bands of figure 5.



表 5 *Tol2* 整合位点分析Table 5 Analysis of the *Tol2* insertions

Line	Target sequence	Chromosome	Putative features	Accession No.
33	ACATGTTAGAAACCCACA	4:25 364 227	Intergenic region, between <i>sfmt2</i> and <i>prkcq</i>	NC_007115.7
	GTAATATCTCAGAGTTGC	11:34 540 802	Intergenic region, between <i>pfkfb4a</i> and <i>zmat3</i>	NC_007122.7
34	TGCTATTTTCATTATAA	1:33 784 242	Intergenic region, between ENSDARG00000106311 and LOC101886777	NC_007112.7

The 8 bp sequences underlined are duplicated on integration.

在整合位点上下游约 500 bp 的基因组区域设计检测引物，与 *Tol2* 序列上的 2 条引物来验证测序的分析结果。从检测引物的 PCR 结果(图 6)来看，No. 33 品系的整合位点两端都扩增出条带，且是唯一的条带，跟预计片段大小一致，说明反向 PCR 鉴定出了 No. 33 的插入位置；No. 34 品系只有测序成功的 3'端扩增出预计的条带，5'端扩增失败。

### 3 讨论与结论

显微注射外源质粒 p*Tol2-ttn.2*-EGFP 和 *Tol2* 转座酶的加帽 mRNA 到斑马鱼 1-细胞期胚胎中，翻译成功的转座酶蛋白识别并切下转座

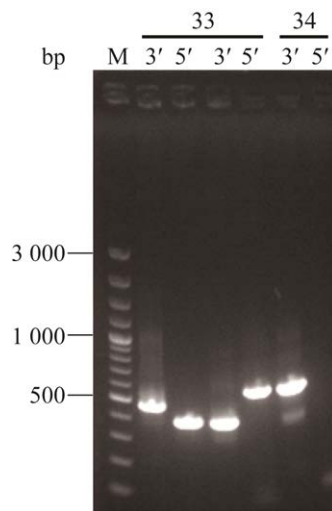


图 6 反向 PCR 的检测结果

Figure 6 Detection results of inverse PCR. No. 33 inserted in chromosome 4 and chromosome 11. No. 34 inserted in chromosome 1.

子 DNA，并将切除的 DNA 整合进入胚胎基因组中。当整合反应发生在生殖系细胞时，就有可能遗传给后代，并且产生含有新基因的稳定品系<sup>[17]</sup>。*Tol2* 系统可用于实现长期的转基因表达并且高效转座高达 11 kb 的转基因载体<sup>[18-19]</sup>。有研究报道<sup>[20-21]</sup>转基因注射鱼中有 50%–70% 可以遗传，而本文中可遗传的只有 12.5%，这可能是由于注射的载体及转座酶 mRNA 浓度过高导致。注射载体比报道使用的终浓度 25 ng/μL 至少高 2 倍，并且为了提高遗传效率，转座酶 mRNA 最高时达到了 1 000 ng/μL，是文献报道的 10 倍。Rezaei 等<sup>[22]</sup>报道了重组 *Tol2* 载体和转座酶 mRNA 的最佳质量浓度分别为 50 ng/μL 和 100 ng/μL，并且胚胎质量和注入载体的数量对转座效率有着重要影响。本研究注射浓度过高导致大部分阳性斑马鱼都出现了不同程度的畸形，难以存活到性成熟，从而导致遗传比例下降。EGFP 的高强度表达，使斑马鱼体表呈现肉眼可见的漂亮绿色，可能是由于 *ttn.2* 启动子具有与 Rezaei 等<sup>[22]</sup>报道的 *mylpfa* 启动子相似的强活性导致，但更可能的原因是插入位置的特殊性，因为出现这类 F1 代斑马鱼的数量较少，后续拟进一步探讨这种品系中 *Tol2* 转座子整合导致的位置效应。

在斑马鱼的肌肉和心脏中，转基因斑马鱼 Tg (*ttn.2*: EGFP) 的 EGFP 表达模式始终与内源性 *ttn.2* 相一致。斑马鱼中有 2 个与人类 *TTN* 基因高度同源的 *titin* 基因(*ttn.2* 和 *ttn.1*)，它们串联

于9号染色体上。Seeley等<sup>[2]</sup>发现斑马鱼2个同源基因 *ttn.2* 和 *ttn.1* 的表达并不完全相同, *ttn.2* 的2个亚型 N2B 和 N2A 在心脏中表达, 而 *ttn.1* 只有 N2B 亚型在心脏中表达; 此外, 他们还发现 *ttn.2* 不同亚型的表达模式不一样, 比如 24 hpf 之后的体节不表达 N2B 亚型, 而 N2A 的 mRNA 信号位于肌节边缘, 发育后期逐渐降低。

Kawakami 等<sup>[23]</sup>发现 *Tol2* 是单个拷贝插入的, 除了生成 8 bp 的重复, 并不会在目标位点插入多个拷贝, 也不会目标位点周围引起任何的重排或突变, 利用反向 PCR 和接头介导的 PCR (linker-mediated PCR) 很容易分析转座子的整合位点, BLAST 分析发现大约 75% 的基因可以被定位到基因组上。Ivics 等<sup>[24]</sup>和 Sumiyama 等<sup>[25]</sup>分别报道了 *Tol2* 转座子没有明显的靶位点特异性和碱基倾向性。基因测序及 BLAST 分析成功鉴定出 No. 33 品系和 No. 34 品系的整合位点, 而 No. 7 品系没有找到基因组的序列, 这可能是由于反向 PCR 使用的是四碱基内切酶 (*Hae* III), 扩增的 DNA 片段较少, 难以识别整合位点。然而, 鉴定成功的所有品系插入的位置都不在已知基因的内部, 而是在 2 个基因之间的区域, 这些就可能会是有功能的未知基因, 也有可能是非编码区。Kotani 等<sup>[26]</sup>用 5'-RACE (cDNA 的 5'末端快速扩增)和候选外显子 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 方法鉴定 T2KSAG 插入位置时, 也发现 80% 的被捕获序列是以前未注释的转录本。Kawakami 等<sup>[20]</sup>发现了已知基因(如 *hoxc3a*)的一个未被鉴定的非编码外显子。此外, 利用 Southern blotting 杂交检测 *Tol2* 插入的最大拷贝数目, 能更准确地判断反向 PCR 是否检测出全部的插入位置, 才能筛选获得纯合突变体, 为肌肉疾病遗传研究和药物治疗提供很好的动物模型。

## REFERENCES

- [1] 张敏, 战丽, 李爱秀, 张欣. 肌巨蛋白影响肌肉收缩的分子结构基础[J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2015, 24(8): 601-604.  
ZHANG M, ZHAN L, LI AX, ZHANG X. The molecular structure basis of muscle contraction[J]. Journal of Logistics University of PAP (Medical Sciences), 2015, 24(8): 601-604 (in Chinese).
- [2] SEELEY M, HUANG W, CHEN ZY, WOLFF WO, LIN XY, XU XL. Depletion of zebrafish titin reduces cardiac contractility by disrupting the assembly of Z-discs and A-bands[J]. Circulation Research, 2007, 100(2): 238-245.
- [3] YOTTI R, SEIDMAN CE, SEIDMAN JG. Advances in the genetic basis and pathogenesis of sarcomere cardiomyopathies[J]. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2019, 20: 129-153.
- [4] THARP CA, HAYWOOD ME, SBAIZERO O, TAYLOR MRG, MESTRONI L. The giant protein titin's role in cardiomyopathy: genetic, transcriptional, and post-translational modifications of TTN and their contribution to cardiac disease[J]. Frontiers in Physiology, 2019, 10: 1436.
- [5] MÁRTONFALVI Z, BIANCO P, NAFTZ K, FERENCZY GG, KELLERMAYER M. Force generation by titin folding[J]. Protein Science: a Publication of the Protein Society, 2017, 26(7): 1380-1390.
- [6] TSIROS C, PUNCH E, SCHAFFTER E, APEL S, GAGE MJ. Identification of the domains within the N2A region of titin that regulate binding to actin[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2022, 589: 147-151.
- [7] MORI V, SAWHNEY JPS, VERMA IC, MEHTA A, SAXENA R, PASSEY R, MOHANTY A, KANDPAL B, VIVEK BS, SHARMA M, JAIN AK, KATARE D. Molecular studies in familial dilated cardiomyopathy-a pilot study[J]. International Journal of Cardiology Heart & Vasculature, 2022, 40: 101023.
- [8] ZHANG C, ZHANG HJ, WU GX, LUO XL, ZHANG CN, ZOU YB, WANG H, HUI RT, WANG JZ, SONG L. Titin-truncating variants increase the risk of cardiovascular death in patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. Canadian Journal of Cardiology, 2017, 33(10): 1292-1297.
- [9] HACKMAN P, VIHOLA A, HARAVUORI H, MARCHAND S, SARPARANTA J, de SEZE J, LABELLE S, WITT C, PELTONEN L, RICHARD I,

- UDD B. Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in *TTN*, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2002, 71(3): 492-500.
- [10] MISHRA D, NISHIKAWA KC. Residual force enhancement is reduced in permeabilized fiber bundles from mdm muscles[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2022, 225(10): jeb243732.
- [11] WANG GY, LV XQ, XU L, ZHANG R, YAN CZ, LIN PF. Novel compound heterozygous mutations in the *TTN* gene: elongation and truncation variants causing limb-girdle muscular dystrophy type 2J in a Han Chinese family[J]. *Neurological Sciences*, 2022, 43(5): 3427-3433.
- [12] KAWAKAMI K, KOGA A, HORI H, SHIMA A. Excision of the *Tol2* transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*[J]. *Gene*, 1998, 225(1/2): 17-22.
- [13] WESTERFIELD M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*[M]. Eugene, Or.: [M. Westerfield?], 1995.
- [14] KWAN KM, FUJIMOTO E, GRABHER C, MANGUM BD, HARDY ME, CAMPBELL DS, PARANT JM, YOST HJ, KANKI JP, CHIEN CB. The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for *Tol2* transposon transgenesis constructs[J]. *Developmental Dynamics: an Official Publication of the American Association of Anatomists*, 2007, 236(11): 3088-3099.
- [15] 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*[J]. *Gene*, 1999, 240(1): 239-244.
- [16] THISSE C, THISSE B. High-resolution *in situ* hybridization to whole-mount zebrafish embryos[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(1): 59-69.
- [17] FELKER A, MOSIMANN C. Contemporary zebrafish transgenesis with *Tol2* and application for *Cre/lox* recombination experiments[J]. *Methods in Cell Biology*, 2016, 135: 219-244.
- [18] TSUKAHARA T, IWASE N, KAWAKAMI K, IWASAKI M, YAMAMOTO C, OHMINE K, UCHIBORI R, TERUYA T, IDO H, SAGA Y, URABE M, MIZUKAMI H, KUME A, NAKAMURA M, BRENTJENS R, OZAWA K. The *Tol2* transposon system mediates the genetic engineering of T-cells with CD19-specific chimeric antigen receptors for B-cell malignancies[J]. *Gene Therapy*, 2015, 22(2): 209-215.
- [19] MULIAWAN HS, NAKAYAMA K, YAGI K, IKEDA K, YAGITA K, HIRATA KI, EMOTO N. Stable somatic gene expression in mouse lungs following electroporation-mediated *Tol2* transposon delivery[J]. *The Kobe Journal of Medical Sciences*, 2015, 61(2): E47-E53.
- [20] KAWAKAMI K, TAKEDA H, KAWAKAMI N, KOBAYASHI M, MATSUDA N, MISHINA M. A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish[J]. *Developmental Cell*, 2004, 7(1): 133-144.
- [21] URASAKI A, MORVAN G, KAWAKAMI K. Functional dissection of the *Tol2* transposable element identified the minimal *cis*-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition[J]. *Genetics*, 2006, 174(2): 639-649.
- [22] REZAEI M, BASIRI M, HASANI SN, ASGARI B, KASHIRI H, SHABANI A, BAHARVAND H. Establishment of a transgenic zebrafish expressing GFP in the skeletal muscle as an ornamental fish[J]. *Galen Medical Journal*, 2019, 8: e1068.
- [23] 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[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(21): 11403-11408.
- [24] IVICS Z, LI MA, MÁTÉS L, BOEKE JD, NAGY A, BRADLEY A, IZSVÁK Z. Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(6): 415-422.
- [25] SUMIYAMA K, KAWAKAMI K, YAGITA K. A simple and highly efficient transgenesis method in mice with the *Tol2* transposon system and cytoplasmic microinjection[J]. *Genomics*, 2010, 95(5): 306-311.
- [26] KOTANI T, NAGAYOSHI S, URASAKI A, KAWAKAMI K. Transposon-mediated gene trapping in zebrafish[J]. *Methods*, 2006, 39(3): 199-206.

(本文责编 陈宏宇)