

九孔基因轉殖---

以九孔精子作為傳遞外源基因的媒介

楊鴻禧* · 蔡懷楨** · 丁雲源*

*台南分所、**台大漁科所

一、前言

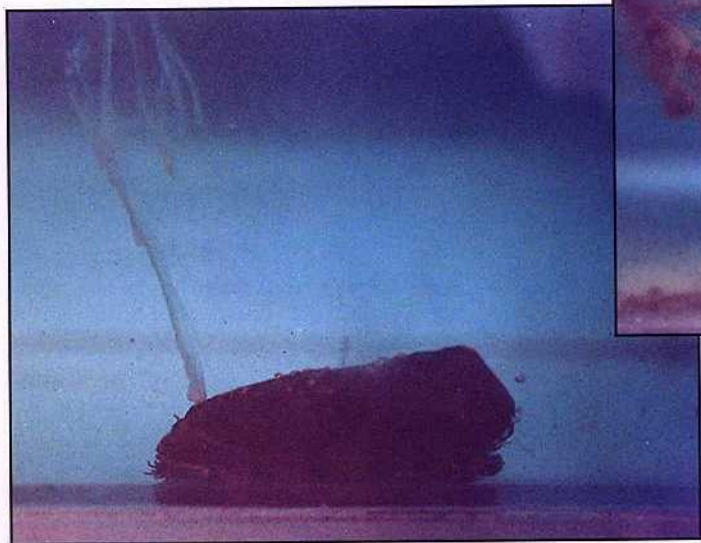
九孔(*Haliotis diversicolor supertexta*)是台灣重要的養殖貝類之一。近年來在養殖方法上有長足的改進，因而也帶動養殖的興盛。但是在養殖過程中，由於生長速度緩慢，成本因而增加，因此，促進生長速度將是研究的主要目標。生長基因是生物體內產生生長激素的基因，生長激素是脊椎動物腦下垂體前葉細胞所分泌出來調節生長及代謝的一種蛋白質激素。它會增強食慾及餌料效率以促進其生長。若生長激素基因能經由精子有效的植入九孔卵內，並表現基因的特性，則在操作及實用上均相當有利。而如果此種基因能遺傳至下一代，則有可能改變九孔之品種。

電破法是一種非常方便、快速的方式，可以把外源性基因植入細胞中，若能用電破法

將外源性基因導入精子，再經由受精過程，必能有效地得到大量的轉殖動物。然而各種電破條件對引入外源性基因，會有不同程度的影響。對於各種電破條件（電破溶液、電壓、電脈衝數、周期數和外源性基因的濃度）對九孔精子之受精能力、精子攜帶外源性基因的能力以及外源性基因導入九孔卵的成功率等，均需加以探討以作為大量基因轉殖之參考。

二、材料與方法

- 1、DNA 的製備：以大腸桿菌通透性細胞大量轉化質體 DNA 之後，再將質體 DNA 分離與純化以取得足量的外源性生長基因，做為植入之基因。
- 2、九孔配子的取得：選取成熟種貝以人工誘導方法刺激排精和排卵以取得生殖配子。

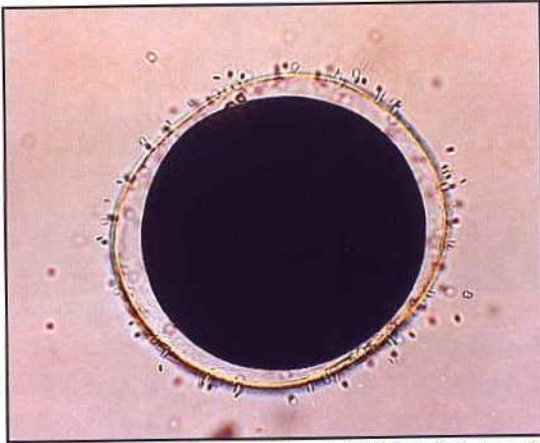


雄性九孔種貝經人工誘導後之排精情形



雌性九孔種貝經人工誘導後之排卵情形

- 3、精子電破處理及受精：利用電破儀 Baekon Rec-2000 在不同的電破條件（電壓、周期數、脈衝數、基因濃度）下電破精子以導入外源性基因進入精子內，再以經電破之精子與卵受精，以導入外源性基因進入九孔卵核內。



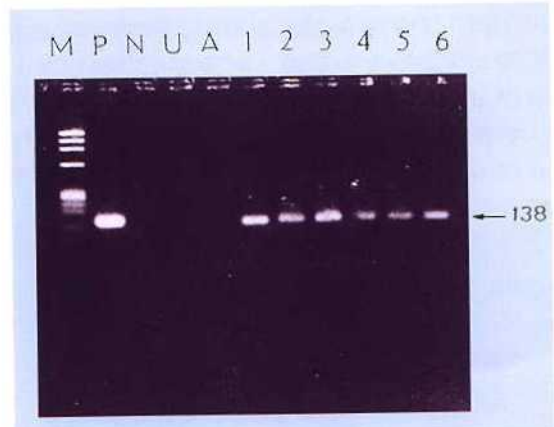
經由電破法而攜有外源性基因之九孔精子正藉由人工受精急欲穿透卵膜之情形

- 4、精子基因組 DNA 萃取以及 PCR 和南方氏吸乾法（Southern blot）檢測。
- 5、九孔浮游幼生的基因組 DNA 萃取以及 PCR 和南方氏吸乾法檢測。

三、結果

- 1、九孔精子在海水和無脊椎生理食鹽水的電破液中活動力均佳。
- 2、若固定 200 個卵，精卵比值在 2×10^4 至 2×10^5 ，經電破處理仍可得到九成以上的受精率。
- 3、以不同電壓（2—10 kv）、周期數（6 或 12）、電脈衝數（ 2^7 或 2^{11} ）電破處理精子，其受精率與控制組的受精率相比沒有顯著之差異性（ $p > 0.05$ ）。
- 4、精子在含不同濃度 opAFP-2000CAT DNA 的海水電破液中，利用 10 kv 電壓、6 個周期數和 2^7 電脈衝數經電破法處理，其受精率與控制組的受精率沒有顯著之差異（ $p > 0.05$ ）。
- 5、將含有 opAFP-2000CAT 及 opAFP-GHc 外源性基因之精子經 DNase 處理之後，以 PCR 檢測分析精子的染色體，結果可

以得到一條 138bp 的 DNA 片段，該片段為外源性基因所擁有。再經由南方氏吸乾法，於原電破 DNA 片段 4.6 kb 相同大小的位置上雜合反應。以 PCR 檢測單一浮游幼生九孔，在 10 kv、6 個周期和 2^7 電脈衝數下，電破法處理含有 32mg/ml 外源性基因 opAFP-2000CAT 之精子，於浮游幼生九孔可得到 60% 的轉殖率。經南方氏吸乾法確認可以增加偵測之敏感度。



PCR 分析九孔幼生基因組；M:marker, P:positive control, N:negative control, A:untransgenic abalone larvae, 1-6:transgenic abalone larvae

四、結論

- 1、九孔精子在不同電壓（2—10 kv）、周期數（6 或 12）和電脈衝數（ 2^7 或 2^{11} ）之間的電破條件對卵的受精率沒有顯著差異。
- 2、將含有 opAFP-2000 CAT 外源性基因以電破法轉殖入精子之後，以 PCR 檢測精子的體染色體 DNA，有一條 138 bp 的 DNA 片段，該片段為外源性基因所擁有。再以 opAFP-2000 CAT 為探針，經由南方氏吸乾法檢測，在 4.6 kb 相同大小位置上有雜合反應。
- 3、以 32mg/ml 外源性基因 opAFP-2000 CAT，在 10 kv、6 個周期和 2^7 電脈衝數電破處理的精子與九孔卵受精，該處理卵發育至浮游幼生期，再以 PCR 檢測發現有 60% 的轉殖率，以南方氏吸乾法確認可以增加偵測敏感度。
- 4、本試驗證實以電破法可以將外源性基因經由精子帶入九孔卵核。