

piggyBac 转座子介导的转基因叉尾斗鱼的构建

高强^① 杨国梁^① 钟伯雄^{②*} 王军毅^① 陈雪峰^① 危浩^②
庄兰芳^② 叶少群^③ 杨浩^③

① 浙江省淡水水产研究所 湖州 313001; ② 浙江大学动物科学学院 杭州 310029;

③ 浙江南太湖淡水水产种业有限公司 湖州 313001

摘要:为探讨 *piggyBac* 转座子在鱼类动物中应用的可能性,以包含家蚕 (*Bombyx mori*) 肌动蛋白 3 启动子驱动的增强型绿色荧光蛋白 (enhance green fluorescent protein, EGFP) 基因的 *piggyBac* 质粒为载体,以及一个包含 *piggyBac* 转座酶的辅助质粒,采用显微注射的方法将其导入叉尾斗鱼 (*Macropodus opercularis*) 受精卵中,利用 PCR 技术证实了 *piggyBac* 转座子能够介导 EGFP 基因进入叉尾斗鱼基因组,并能够稳定遗传到下一代,符合孟德尔遗传规律。EGFP 基因遗传到 G1 代的阳性鱼占交配鱼比率,即外源基因整合率为 12.30%。实验证明, *piggyBac* 质粒有可能成为水产动物转基因实验的新型载体。

关键词:叉尾斗鱼; *piggyBac* 转座子; 转基因鱼; 显微注射

中图分类号: Q782, Q786, Q917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2012)04-48-07

Construction of Transgenic *Macropodus opercularis* by Transposon *piggyBac*

GAO Qiang^① YANG Guo-Liang^① ZHONG Bo-Xiong^{②*} WANG Jun-Yi^①
CHEN Xue-Feng^① WEI Hao^② ZHUANG Lan-Fang^② YE Shao-Qun^③ YANG Hao^③

① Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001; ② College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029;

③ Zhejiang South Tailake Freshwater Fish Breeding Co. Ltd, Huzhou 313001, China

Abstract: In order to study the feasibility of *piggyBac* transposon application in the fish, the plasmid consisting of the *piggyBac* inverted terminal repeats flanking a fusion of the *Bombyx mori* cytoplasmic actin gene *BmA3* promoter and the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene and a nonautonomous helper plasmid encoding the *piggyBac* transposases was introduced into the zygote of the *Macropodus opercularis* through microinjection. The PCR identification indicated that the EGFP gene mediated by *piggyBac* transposon existed in the genome of the *M. opercularis*. Transgene was stably transferred to the next generation through normal Mendelian inheritance. The foreign DNA integration rate, i. e., the rate of number of G1 broods with EGFP positive fish to the number of fertile fish was 12.30%. These results prove that *piggyBac* plasmid can be a new vector for the transgenic experiment in fish. The system constructed in our experiment is feasible.

Key words: *Macropodus opercularis*; Transposon *piggyBac*; Transgenic fish; Microinjection

自 1985 年报道了第一例转基因鱼以来^[1], 国内外在水生动物中广泛开展了转基因技术应用研究,其中使用的结构基因主要有哺乳动物和多种鱼类的 *GH* 基因^[2],重组基因的启动子主要有小鼠 (*Mus musculus*) 重金属螯合蛋白基

基金项目 浙江省海洋科研专项 (No. 2007-22);

* 通讯作者, E-mail: bxzhong@zju.edu.cn;

第一作者介绍 高强,男,工程师;研究方向:水产动物营养与生理; E-mail: swause@163.com。

收稿日期: 2012-02-12, **修回日期:** 2012-05-10

因、病毒基因和多种鱼类肌动蛋白基因^[1,3-5]。*piggyBac* (PB) 转座子是从粉纹夜蛾 (*Cabbage looper*) TN-368 细胞系中分离,属 II 类可移动元件,是 1 个全长 2 472 bp 的短反向末端重复序列转座子,中间是 2 374 bp 的内部结构域 (ID)^[6],包含 1.8 kb 编码分子量 64 ku 转座酶的开放阅读框^[7]。转座酶具有把 *piggyBac* 转座子“切出-插入”的功能,总是在宿主基因组的 TTAA 序列切开,插入转座子,再复制 TTAA 序列,完成转座功能。*piggyBac* 转座子的优点是:(1)载体容量较大,可以实现多基因的共表达;(2)外源基因的整合效率高及表达稳定;(3)基本不依赖宿主因子;(4)再次转座后可实现精确分离。自 *piggyBac* 转座子发现以来,研究表明其具有较广泛的适用范围,利用 *piggyBac* 转座子构成的载体——辅助质粒系统已成功地获得了转基因果蝇 (*Drosophila hydei*)^[8]、家蚕 (*Bombyx mori*)^[9-10]、土拨鼠 (*Cavia porcellus*) 和哺乳动物细胞^[11],但 *piggyBac* 转座子在水产动物转基因上未见相关报道。

叉尾斗鱼 (*Macropodus opercularis*) 属于鲈形目 (Perciformes) 攀鲈亚目 (Anabantoidei) 斗鱼科 (Belontiidae),是一种广泛分布于我国南

方及东南亚各国的内陆小型淡水观赏鱼,具有来源广、易于传代和饲养等优势^[12]。本研究以叉尾斗鱼为实验动物,将 *piggyBac* 转座子引入到水产动物转基因技术中,为转基因水产动物的研究开辟一种新的方法,同时也扩大了 *piggyBac* 转座子的研究应用领域。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼卵 叉尾斗鱼由浙江南太湖淡水水产种业有限公司提供,均为 2 龄鱼,体长 (8.0 ± 2.0) cm。挑选发育良好的叉尾斗鱼亲鱼进行配对,24 h 连续观察其交配和产卵过程。用胶头吸管将受精 1 h 内的受精卵收集于培养皿中用于显微注射。

1.1.2 转基因载体 包含 *EGFP* 标记基因的 *piggyBac* 转座子质粒 (pPIGA3GFP) 和能够提供转座酶的辅助质粒 (pHA3PIG)^[9] (图 1),其大小分别为 7 977 bp 和 6 173 bp, A3 为家蚕肌动蛋白启动子。

1.1.3 试剂及仪器 DNA 抽提试剂盒、*Taq* 酶、pMD18-T 载体、胶回收试剂盒、*EcoRI*、*HindIII* 等试剂及所有引物均购于上海生物工程有限公司;带荧光装置的体视镜 SZX16 为 OLYMPUS 公

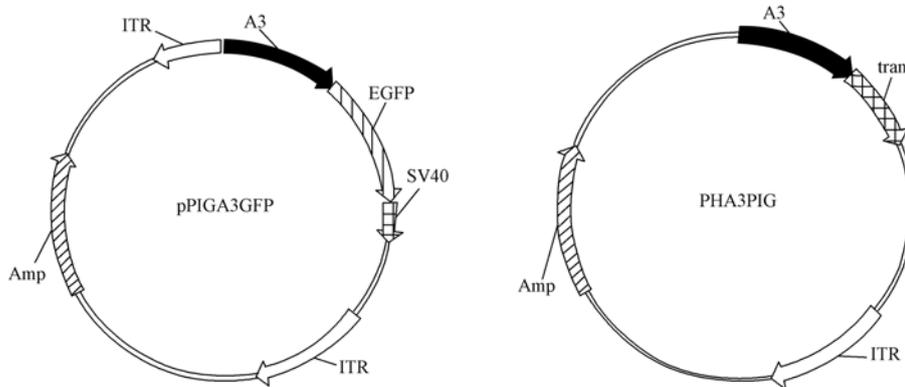


图 1 *piggyBac* 转座质粒及辅助质粒图谱^[9]

Fig.1 The map of the *piggyBac* transposon and pHA3PIG vector

A3: 家蚕肌动蛋白启动子; EGFP: 增强型绿色荧光蛋白基因序列; ITR: 转座臂; Amp: 质粒抗氨苄青霉素基因; SV40: 3'端非翻译区序列; trans: 转座酶。

A3: *B. mori* A3 cytoplasmic actin gene; EGFP: Enhanced green fluorescent protein coding sequence; ITR: Inverted terminal repeats; Amp: Ampicillin-resistance gene of the plasmid; SV40: 3' untranslated sequences; trans: *piggyBac* transposases.

公司产品,IM-300 显微注射系统为日本成茂公司产品,PCR 仪为 BIORAD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 显微注射及受精卵培育 将溶解在 pH 7.0 含有 5 mmol/L 氯化钾的 0.5 mmol/L 磷酸缓冲液中的转座子质粒和辅助质粒等体积混合,采用显微注射方法将质粒注射到受精卵动物极(图 2),注射质粒的总浓度为 100 mg/L (转座子质粒浓度为 66.7 mg/L,辅助质粒浓度为 33.3 mg/L),每粒受精卵的注射量为 3 ~ 5 nl。显微注射后的受精卵在 Holffreter 溶液中培养发育,胚胎孵化的鱼为 G0 代转基因鱼,用新鲜洁净养殖水饲养至性成熟,每条转基因叉尾斗鱼与非转基因叉尾斗鱼杂交获得每个家系,为 G1 代转基因鱼。

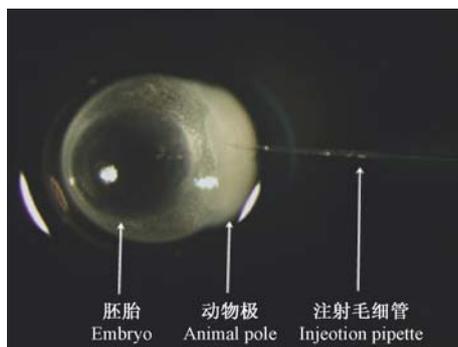


图 2 叉尾斗鱼受精卵的显微注射

Fig. 2 Microinjection of *Macropodus opercularis* embryo

1.2.2 荧光检测 采用荧光显微镜(激发波长为 460 ~ 490 nm,发射波长为 510 ~ 550 nm)对显微注射过的叉尾斗鱼受精卵进行胚胎发育跟踪观察,注意其荧光发生时间及部位,并进行记录和拍照。采用荧光显微镜对 G1 代转基因叉尾斗鱼进行观察,检测转基因阳性家系数。

1.2.3 相关计算方法

$$\text{孵化率}(\%) = \frac{\text{出苗数量}}{\text{显微注射受精卵数量}} \times 100\%;$$

$$\text{转导率}(\%) = \frac{\text{G1 代转基因阳性家系数}}{\text{显微注射受精卵数量}} \times 100\%;$$

$$\text{整合率}(\%) =$$

$$\frac{\text{G1 代转基因阳性家系数}}{\text{显微注射获得的 G0 代可交配鱼数}} \times 100\%。$$

1.2.4 PCR 检测 取 G1 代转基因叉尾斗鱼阳性个体的部分尾鳍,参照王伟等^[13]的酚氯仿抽提方法抽提基因组 DNA。取 1 μ l DNA 模板进行 PCR 扩增,以转座质粒作为阳性对照,以未进行显微注射的叉尾斗鱼作为阴性对照,进行 PCR 检测。上游引物为 5'-ACG ACG GCA ACT ACA AGA CC-3',设计在 piggyBac 转座子质粒(pPIGA3GFP)的 EGFP 基因内,下游引物为 5'-GCG GAG AAT GGG CGG AAC T-3',设计在 piggyBac 转座子质粒的转座臂区域内。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;循环程序为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60.9 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物在 0.7% 的琼脂糖凝胶上电泳,采用溴化乙锭对 DNA 进行染色。

1.2.5 PCR 片段的测序 切取 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳分离的目的条带,用胶回收试剂盒(上海生物工程有限公司)纯化,与 pMD18-T 载体(TaKaRa)连接,16 $^{\circ}$ C 过夜,转化到 HB101 感受态细胞中,采用蓝白斑挑选阳性克隆,使用 EcoR I、Hind III 双酶切验证。阳性克隆送上海生物工程有限公司测序,所得序列采用 Blast 同源搜索进行同源性分析。

2 结果与讨论

2.1 显微注射对斗鱼胚胎发育的影响 本实验进行了 10 批次显微注射的孵化实验,一共注射了 4 990 粒受精卵,同时进行了 10 批次对照实验(未显微注射的受精卵),共 1 285 粒,具体孵化情况见表 1。进行显微注射后又尾斗鱼受精卵的孵化率显著低于未进行显微注射的对照组($P < 0.05$)。据闫学春等^[14]报道,对鲤鱼(*Cyprinus carpio*)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)受精卵采用显微注射技术导入外源基因后,孵化率分别为 6.4% 和 34.0%,证明显微注射技术在虹鳟鱼和鲤鱼受精卵应用效果明显不同;据沙珍霞等^[15]报道,花鲈(*Lateolabrax japonicus*)

表 1 显微注射对叉尾斗鱼孵化的影响

Table 1 Effects of microinjection on hatch of *Macropodus opercularis*

批次 Serial number	受精卵(粒) Number of fertilized eggs		出膜量(尾) Number of hatched(ind)		孵化率(%) Hatching rate		孵化时间(h) Hatching time		获鱼苗量(尾) Number of fry(ind)	
	注射组 EG	对照组 CG	注射组 EG	对照组 CG	注射组 EG	对照组 CG	注射组 EG	对照组 CG	注射组 EG	对照组 CG
1	396	119	28	108	7.07	90.76	37.5	31.5	17	106
2	581	149	66	131	11.36	87.92	36.5	32.0	45	129
3	612	156	85	147	13.89	94.23	37.0	31.0	78	146
4	408	123	90	116	22.06	94.31	36.5	31.5	85	115
5	510	115	92	107	18.04	93.04	37.5	32.0	88	107
6	477	120	54	109	11.32	90.83	37.0	32.0	48	106
7	320	116	35	106	10.94	91.38	37.0	32.5	30	102
8	735	110	68	94	9.25	85.45	36.5	32.0	54	90
9	610	162	47	129	7.70	79.63	37.0	32.5	36	120
10	341	115	22	82	6.45	71.30	37.5	33.0	16	76
平均 Average	499	128.5	58.7	112.9	11.81 ^a	87.89 ^b	37.0 ^b	32.0 ^a	49.7 ^a	109.7 ^b
合计 Total	4 990	1 285	587	1 129					497	1 097

上标字母不同,表示差异显著 ($P < 0.05$)。Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)。

EG:Microinjection group; CG:Control group.

胚胎经过显微注射后存活率可以达到 56.8%, 表达 EGFP 嵌合体的胚胎比率为 13%。本次实验的孵化率为 11.81%, 介于以往相关报道的中间水平, 这除了与转座质粒不同有关外, 还可能与叉尾斗鱼本身的繁殖习性也有一定关系, 这有待今后进一步深入研究。

显微注射后受精卵的胚胎发育时间与对照组相比, 出膜(胚胎发育)时间延迟了 4~6 h, 这一结果与金鱼(*Carassius auratus*)、花鲈和鲤鱼等显微注射实验时间延迟结果相似^[16], 这说明显微注射对叉尾斗鱼胚胎造成的机械损伤和受精卵对外源基因排斥影响还是比较大, 但小于虹鳟、鲤鱼等鱼类显微注射实验的延迟时间, 这可能是与叉尾斗鱼本来的胚胎发育时间和过程有关。另外, 显微注射后的受精卵除了发育速度相对较慢外, 其出膜仔鱼的活力也明显比未注射的对照组仔鱼差, 表现为游泳能力低下和畸形等症状, 显微注射后孵化出来的仔鱼在发育过程中成活率较对照组低, 尤其是在仔鱼的卵黄内营养阶段向开口外营养阶段的转化过程中死亡率明显较大, 而未注射的对照组中死亡发生较少, 基本都能顺利完成营养转化, 这可

能是由于显微注射时受精卵受到了机械损伤、部分内营养物质流失和对外源基因的排斥作用等^[17]原因造成。而注射组和对照组斗鱼在完成了向外营养阶段转化后存活率均较高, 分别为 84.67% (497/587) 和 97.17% (1 097/1 129)。这说明显微注射对叉尾斗鱼后期的发育影响相对较小, 这与闫学春等人^[18]的研究结论一致。

2.2 EGFP 基因在转基因叉尾斗鱼受精卵和鱼苗中的表达 显微注射后, 通过紫外光的激发, 在荧光显微镜下能够观察到 EGFP 在叉尾斗鱼各发育阶段内的表达(图 3)。

检测结果表明, 从注射后 6 h 开始, EGFP 基因已经在叉尾斗鱼胚胎中得以表达, 不同卵的表达亮度存在着差异, 有的没有表现出绿色荧光, 有的部分表达出绿色荧光, 有的表达亮度比较低, 有的表现出鲜艳的绿色荧光, 这可能与注入的外源荧光蛋白基因的表达部位和表达剂量有关。在 18 h 后, EGFP 基因就能在叉尾斗鱼胚胎中大量表达, 甚至整个胚胎都发出绿色荧光。在胚胎和仔鱼中, EGFP 基因的表达多为嵌合性, 在胚胎中全身不同部位散布着绿色

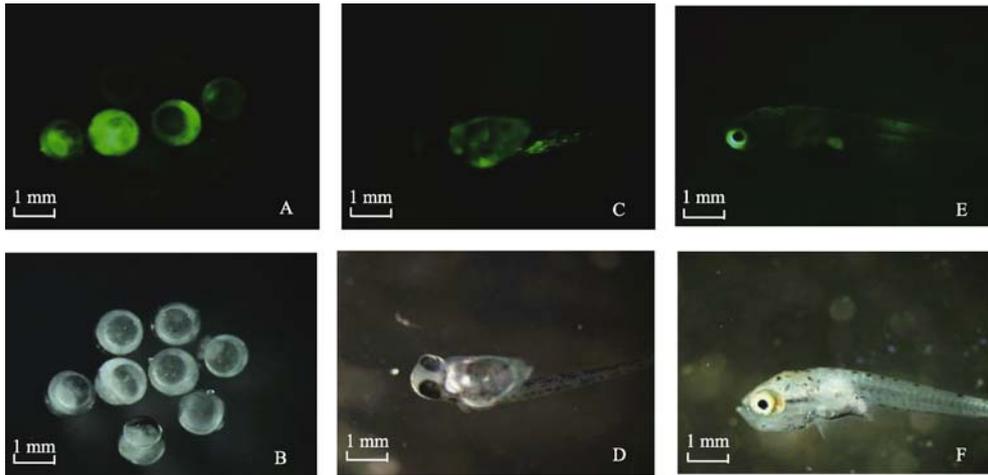


图3 绿色荧光蛋白在叉尾斗鱼胚胎及幼鱼中的表达

Fig 3 Expression of EGFP in embryos and larvae of *Macropodus opercularis*

A、C和E: 紫外光源下的斗鱼; B、D和F: 普通光源下的斗鱼; A和B为胚胎; C和D为胚后期; E和F为鱼苗。

A, C and E: *Macropodus opercularis* under UV light; B, D and F: *Macropodus opercularis* under common light;

A, B: Embryos; C, D: Post-embryo phase; E, F: Fry.

荧光斑块,尤其是在未消失的卵黄囊和油球中可以清晰地观察到EGFP的表达,这与Sonia等^[19]、赵浩斌等^[20]和Gong等^[21]的报道一致。本实验证明,通过显微注射转基因技术能够将包含EGFP标记基因的piggyBac转座子质粒转入到叉尾斗鱼体内,并能够在家蚕肌动蛋白3启动子的驱动下表达绿色荧光蛋白。

2.3 绿色荧光蛋白基因的整合 外源基因能否稳定遗传和表达,即外源基因能否整合到动物的染色体上是转基因动物能否在生产实践中应用的重要因素。近年来,不少学者应用绿色荧光蛋白基因作为标记基因来研究外源基因的表达,取得了良好效果^[4-5,16,21]。在本研究中,通过显微注射方法将包含EGFP标记基因的piggyBac转座子质粒注射到叉尾斗鱼受精卵内,一共显微注射了4990粒叉尾斗鱼受精卵,G0代共获得了497尾叉尾斗鱼,占注射受精卵数的9.96%(显微注射孵化率),通过荧光观察发现,有358尾叉尾斗鱼有荧光表达,但表达的亮度和部位有所不同,表现为嵌合体的情况比较多,主要的荧光表达部位有眼睛、油球、肌肉、内脏、鳃盖等部位。通过1年的饲养后,有317尾叉尾斗鱼(202尾雌和115尾雄)达到性成

熟,与非转基因叉尾斗鱼配对传代至G1代,占注射受精卵数的6.35%。在杂交产生的G1代中,有39个家系具有EGFP阳性个体,表明这39个家系所对应的39尾G0代叉尾斗鱼是转绿色荧光蛋白基因叉尾斗鱼,且已稳定遗传至G1代,转基因阳性鱼占G0代的比率即整合率为12.30%,转基因阳性鱼占总注射受精卵数量的比率即转导率为0.78%。Koga等^[22]将Tol2转座子显微注射到菲律宾青鳉(*Oryzias latipes*)的受精卵中,显微注射后的成活率大约有10%,将这些成年的青鳉与未注射转座子的青鳉配种,G1代中有约20%的基因组中带有EGFP标记基因,即转导率为2%左右,相对高于本次研究中piggyBac转座子的转导率,这可能与动物种类不同及操作技术水平等有关。但本实验结果证实,外源基因已整合到叉尾斗鱼生殖细胞的基因组中,可通过piggyBac转座子进行水产动物转基因研究。

本研究的piggyBac转座子的转导效率要相对低于报道的家蚕转基因转导率^[23],比果蝇^[8]和斑马鱼(*Brachydanio rerio*)^[24]高。另外,通过提取杂交G1代转基因阳性家系鱼中部分组织的DNA进行PCR检验,经对PCR产

物的琼脂糖凝胶电泳分离,获得 1 条长度为 1 498 bp 的扩增条带,与期望的理论长度的条带吻合(图 4)。为进一步验证 PCR 产物的真实性,我们采用酶连接、克隆和酶切等分子生物学实验技术对该条带进行了处理和测序,对所得序列进行 Blast 同源性检索,确证片段跨 *piggyBac* 转座子质粒(pPIGA3GFP)的 *EGFP* 基因序列、SV40 序列和转座臂区域,与期望的序列完成吻合,进一步证明了绿色荧光蛋白基因已整合到叉尾斗鱼基因组中。

以上实验结果表明,采用 *piggyBac* 转座子质粒能够控制 *EGFP* 整合到叉尾斗鱼的染色体基因组内,可以将其作为一个有效的转基因转座子用于水产动物(如叉尾斗鱼)的转基因研究。

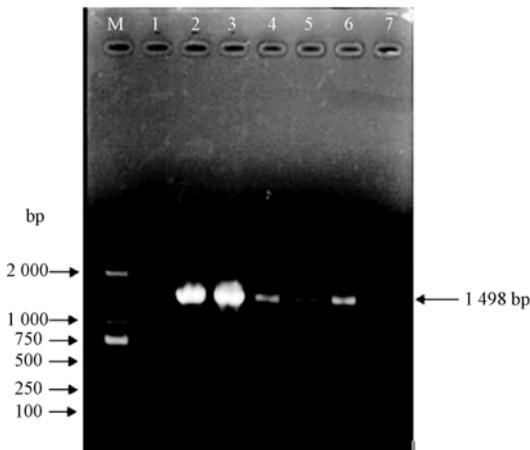


图 4 G1 代家系阳性鱼 PCR 检测结果

Fig. 4 Polymerase chain reaction verification of positive individuals from G1 broods transformed fish

M:DL2000 DNA 分子量标准; 1:阴性对照;

2,3:pPIGA3GFP 质粒; 4~7:4 个 G1 代家系中阳性个体。

M:DL2000 DNA marker; 1:Non-injected control;

2,3:pPIGA3GFP; 4-7:Positive individuals from the four G1 broods transformed fish.

3 小 结

实验证明 *piggyBac* 质粒可以作为水产动物转基因实验的新型载体,能够引导外源基因插入水产动物基因组内,达到稳定的遗传和表达。通过显微注射方法将 *piggyBac* 质粒导入

受精卵的动物极,是水产动物转基因实验的成功方法。通过建立的这一转基因技术,将 *EGFP* 基因导入到叉尾斗鱼基因组中,能够形成色彩艳丽的叉尾斗鱼转基因新品种,从而提高这一野生土著鱼类的观赏价值。

参 考 文 献

- [1] Zhu Z, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L. 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, 1985, 1(1): 31-34.
- [2] 于健康, 阎维, 张玉廉, 等. 精子介导鱼类基因转移和聚合酶链反应检测技术. *动物学报*, 1994, 40(1): 96-99.
- [3] Shike H, Shimizu C, Klimpel K S, et al. Expression of foreign genes in primary cultured cells of the blue shrimp *Penaeus stylirostris*. *Marine Biology*, 2000, 137(4): 605-611.
- [4] 简清, 白俊杰, 叶星, 等. 斑马鱼 Myl2 启动子的克隆与转绿色荧光蛋白基因鱼的构建. *中国水产科学*, 2004, 11(5): 391-395.
- [5] 陈敏, 白俊杰, 姜鹏, 等. 红色荧光蛋白基因在转基因唐鱼中的表达. *大连水产学院学报*, 2009, 24(增刊 1): 59-63.
- [6] Li X, Harrell R A, Handler A M, et al. *piggyBac* internal sequences are necessary for efficient transformation of target genomes. *Insect Molecular Biology*, 2005, 14(1): 17-30.
- [7] Handler A M. Use of the *piggyBac* transposon for germ-line transformation of insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32(10): 1211-1220.
- [8] Lobo N, Li X, Fraser M J Jr. Transposition of the *piggyBac* element in embryos of *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti* and *Trichoplusia ni*. *Molecular and General Genetics*, 1999, 261(4/5): 803-810.
- [9] Tamura T, Thibert C, Royer C, et al. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(1): 81-84.
- [10] Zhong B X, Li J Y, Chen J E, et al. Comparison of transformation efficiency of *piggyBac* transposon among three different silkworm *Bombyx mori* strains. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2007, 39(2): 117-122.
- [11] Ding S, Wu X H, Li G, et al. Efficient transposition of the *piggyBac* (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, 2005, 122(3): 473-483.
- [12] 丁瑞华. 四川鱼类志. 成都: 四川科学技术出版社,

- 1994; 532 - 536.
- [13] 王伟, 尤锋, 高天翔, 等. 山东近海牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 自然和养殖群体 10 个微卫星基因座位的遗传多态性分析. *海洋与湖沼*, 2004, 35(6): 530 - 537.
- [14] 闫学春, 孙效文, 梁利群, 等. 用显微注射技术导入外源 DNA 对鲤鱼和虹鳟鱼受精卵孵化率的影响. *水产学杂志*, 2002, 15(1): 57 - 60.
- [15] 沙珍霞, 刘洋, 陈松林, 等. 花鲈胚胎干细胞移植及嵌合体的构建. *高技术通讯*, 2006, 16(2): 186 - 190.
- [16] 苏建明. 绿色荧光蛋白基因的重组构建及在金鱼体内的整合与表达. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2002.
- [17] Hanazono Y, Yu J M, Dunbar C E, et al. Green fluorescent protein retroviral vectors: low titer and high recombination frequency suggest a selective disadvantage. *Human Gene Therapy*, 1997, 8(11): 1313 - 1319.
- [18] 闫学春, 孙效文, 梁利群, 等. 几种鱼类的受精卵注射外源基因后孵化率的比较研究. *大连水产学院学报*, 2003, 18(2): 145 - 148.
- [19] García-Pozo G, Béjar J, Shaw M, et al. Effect of exogenous DNA microinjection on early development response of the seabream (*Sparus aurata*). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1998, 7(4): 248 - 258.
- [20] 赵浩斌, 陈尚萍, 孙永华, 等. 外源基因在鱼类胚胎中表达与整合的时序. *科学通报*, 1999, 44(22): 2414 - 2419.
- [21] Gong Z Y, Ju B S, Wang X K, et al. Green fluorescent protein expression in germ-line transmitted transgenic zebrafish under a stratified epithelial promoter from *Keratin8*. *Developmental Dynamics*, 2002, 223(2): 204 - 215.
- [22] Koga A, Hori H, Sakaizumi M. Gene transfer and cloning of flanking chromosomal regions using the medaka fish *Tol 2* transposable element. *Marine Biotechnology*, 2002, 4(1): 6 - 11.
- [23] Dai H J, Xu G J, Thomas J L. Efficient and stable generation of transgenic silkworm, *Bombyx mori* with the lepidopteran derived transposon *piggyback*. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50(15): 1617 - 1621.
- [24] Gong Z Y, Wan H Y, Tay T L, et al. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 308(1): 58 - 63.