论文

转青鱼生长激素基因异源四倍体鲫鱼

冯浩[†], 傅永明[†], 骆剑, 吴慧, 刘筠, 刘少军^{*}

湖南师范大学生命科学学院, 教育部蛋白质化学与发育生物学重点实验室, 长沙 410081

[†] 同等贡献^{*} 联系人, E-mail: lsj@hunnu.edu.cn

收稿日期: 2010-12-06; 接受日期: 2011-02-24

国家公益性行业(农业)科研专项(批准号: 200903046-08)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2007CB109006)、国家自然科学基金(批准号: 30500294)和湖南师范大学青年优秀人才培养计划(批准号: ET31004)资助项目

doi: 10.1360/052010-739

摘要 生态安全性是转基因鱼走向市场的瓶颈, 通过转基因四倍体鱼同转基因二倍体鱼杂交获得不育的转基因三倍体鱼是解决该问题的有效途径之一. 本研究构建了青鱼 β -actin 基因启动子和青鱼生长激素(GH)基因精确连接的“全鱼”基因 pbcAbcGHc; 并采用显微注射法将 pbcAbcGHc 导入异源四倍体鲫鱼受精卵. 对照养殖结果表明, 150 日龄的转基因异源四倍体鲫鱼原代(P₀)的体重及体长明显大于对照组. 选择 60 尾 P₀ 代转基因异源四倍体鲫鱼, 采用 PCR 方法检测出外源青鱼 GH 基因在 P₀ 代转基因四倍体尾鳍基因组 DNA 中的整合率为 90%; 对 20 尾雄性 P₀ 代转基因四倍体精液样本的 PCR 检测发现, 13 个样本具有外源青鱼 GH 基因的整合. 在一尾生长速度显著的 P₀ 代转基因四倍体鲫鱼的肌肉、肝脏、肾脏和卵巢组织中可检测到外源青鱼 GH 基因的转录. 本研究成功获得了具有明显生长优势的 P₀ 代转青鱼 GH 基因异源四倍体鲫鱼, 为建立转青鱼 GH 基因异源四倍体鲫鱼纯系和研制不育的转基因三倍体鱼奠定了基础.

关键词转基因
异源四倍体
生长激素
青鱼
生态安全

自 1982 年 Palmiter 等人成功研制转基因“超级鼠”以来, 基因工程育种越来越显示出巨大的应用前景. 目前, 动物转基因技术已经成为生命科学领域最有效、最普遍的研究手段之一. 1985 年, 世界首例转基因鱼在中国研制成功^[1], 随后鱼类转基因研究相继在渔业应用、水环境检测和比较生物学等领域被深入开展. 转基因技术打破了传统的鱼类遗传育种观念. 它通过外源基因的导入、目的基因的定向表达和转基因鱼纯系的筛选, 得到表达外源目的基因优良性状的受体鱼新品系^[2~8].

虽然产业化前景广阔, 但转基因鱼在食品安全和生态安全方面的风险依然存在. 实验动物在喂食

转 GH 基因鲤鱼后其多项生理指标较对照组没有显著差异, 转基因鱼的食品安全风险需经过长期的研究才能被确定^[9]. 然而频发的转基因鱼危害环境的事件^[10]提示, 转基因鱼在生态安全上的风险性必须得到重视. 转基因鱼一旦逃逸到天然水体中, 一是外源转植基因的表达可能让转基因鱼获得较强的生存力和竞争力, 从而形成优势种群并挤占天然水体中其他野生鱼类的生态位, 改变鱼类群落结构和影响物种多样性; 二是转基因鱼可能与自然生态系统中的近源物种杂交, 导致外源转植基因漂移而造成野生基因库污染, 最终影响遗传多样性^[11]. 已有研究表明, 转 GH 基因鱼在模拟自然环境中, 其幼苗更容易遭到

英文引用格式: Feng H, Fu Y M, Luo J, et al. Black carp GH gene transgenic allotetraploid hybrids of *Carassius auratus* red var. (♀) × *Cyprinus carpio* (♂). SCIENTIA SINICA Vitae, 2011, 41: 202–209, doi: 10.1360/052010-739

捕食^[12,13]. 但如果没有天敌的存在, 转 GH 基因鱼在迁移能力、生长速度和抗病能力等方面与普通鱼相比具有明显的优势^[14-16]. 因此, 转基因鱼广泛应用于渔业生产的首要前提是解决其生态安全问题^[17].

培育转基因鱼不育品系能从根本上消除转基因鱼的生态风险. 不育的转基因鱼不能繁殖后代形成种群, 不会影响天然水体中的物种多样性和遗传多样性. 想要得到完全不育的转基因鱼, 培育三倍体转基因鱼是行之有效的途径之一. 采用理化方法进行人工诱导三倍体, 诱导率不足 100%, 并且达不到转基因三倍体所要求的完全不育; 并且理化方法诱导量比较少, 无法满足大规模生产的需要. 于是培育出转基因四倍体, 再与转基因二倍体杂交, 获得转基因三倍体, 将成为大规模研制和生产转基因三倍体鱼的可靠途径.

世界首例雌雄均可育的异源四倍体鲫鲤在湖南师范大学培育成功, 为转基因经济鱼类走向市场提供了契机^[18]. 本工作组通过异源四倍体鲫鲤和普通二倍体杂交得到了种间三倍体湘云鲫和湘云鲤. 多年的养殖实践、组织和细胞生物学实验都充分证明湘云鲫和湘云鲤这两种三倍体鱼是彻底不育的^[19]. 本研究构建了青鱼 β -actin 基因和青鱼 GH 基因精确拼接的“全鱼”基因 *pbcAbcGHc*, 并将“全鱼”基因 *pbcAbcGHc* 用显微注射的方法导入异源四倍体受精卵, 获得了具有明显生长优势的转基因异源四倍体鲫鲤原代鱼. 该转青鱼 GH 基因异源四倍体鲫鲤原代的研制成功, 为建立转青鱼 GH 基因异源四倍体鲫鲤纯系奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究所用青鱼、雌核发育草鱼和异源四倍体鲫鲤均来自湖南师范大学四倍体鱼保护基地. 高保真 *EX Taq* DNA 多聚酶购自 TaKaRa 公司; pUCM-T 载体 T/A, UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒和 PCR 产物回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司; 各种限制性内切酶来自 New England Biolab 公司; Total RNA 提取及 cDNA 合成试剂盒来自 Promega 公司. DNA 测序由上海生工生物工程有限公司完成.

1.2 全鱼转植基因载体构建

含有青鱼 β -actin 启动子的质粒 pUCM-bcA 和青鱼 GH 基因 ORF 的质粒 *pbcGHc* 保存于本实验室^[20].

提取雌核发育草鱼尾鳍基因组 DNA. 根据鲤科鱼类的 GH 基因 3'端非翻译区序列设计简并引物: P₅(TG-TCGCTGGATCCAKGGCRRRTGTATT), P₃(TG-TCGCTCTCGAGCAGATCCTGGTCATTT), 阴影部分分别为 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点. 采用高保真 PCR 及 T/A 克隆, 筛选出含有雌核发育草鱼 GH 基因 3'UTR 的重组质粒并命名为 pUCM-GC3'. 根据青鱼 β -actin 基因启动子区域和青鱼 GH 基因序列设计搭桥 PCR 引物: Pf(ATGAATTCTGTTTGATSAAAATC-GCYT), P(dq+)(ACAGTTCAGCCATGGCTAGAGCR-TTAGTGCT), P(dq-)(AGCACTAAYGCTCTAGCCA-TGGCTGAACTGT), Pr(TGTCGCTGGATCCCTTACAGG-GTGCAGTTGGAAT), 阴影部分分别为 *Eco*R I, *Nco* I 和 *Bam*H I 位点. 以 pUCM-bcA 为模板, 引物 Pf 和 P(dq-)扩增青鱼 β -actin 基因启动调控区; 以 *pbcGHc* 为模板, 引物 P(dq+)和 Pr 扩增青鱼 GH 基因 cDNA 片段. 采用高保真 PCR 反应连接上述两个扩增片段, 引物为 Pf 和 Pr. 回收目的基因片段, 采用 pUCM-T 载体 T/A 克隆, 命名含有该搭桥连接产物的重组质粒为 pUCM-A/GH.

*Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pUCM-A/GH 和 pUCM-GC3', 电泳分离酶切产物, 将 pUCM-GC3'中草鱼 3'UTR 非编码区插入 pUCM-A/GH 载体, 构建成完整的“全鱼”基因载体 *pbcAbcGHc*.

1.3 显微注射及对照养殖

*Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切青鱼 GH 基因表达载体 *pbcAbcGHc*, 回收纯化的目的转植基因片段(2.9 kb)溶于 ST 溶液中, 调整浓度为 100 ng/ μ L. 显微注射实验选取在异源四倍体鲫鲤繁殖的旺盛季节 4 月进行, 采用人工授精方法得到受精卵, 用 0.25%胰蛋白酶消化除去卵膜, 在受精卵进行第一次卵裂前进行显微注射, 每个受精卵注射 1~2 nL 的转植基因 DNA 溶液. 转基因异源四倍体鲫鲤以及对照组鱼饲养地点为湖南师范大学四倍体鱼保护基地, 鱼苗在面积 26 m²、水深 1.6 m 的室外水泥池中喂养至夏花阶段, 夏花时转到面积 120 m²、水深 1.6 m 的室外大水泥池饲养, 调整密度为 4 尾/m², 成鱼阶段每日 2~3 次投喂蛋白含量为 25%的鱼用配合饲料, 其他管理按常规方法.

1.4 转基因鱼的检测

(1) 转基因鱼体重及体长测量. 取 150 日龄 P₀ 代转基因异源四倍体鲫鲤及对照养殖的普通异源四

倍体鲫鱼,逐一测量体重和体长.其中转基因异源四倍体鲫鱼检测了 87 尾,普通异源四倍体鲫鱼检测了 100 尾.

(2) 转植基因整合情况检测. 选择 60 尾 150 日龄 P_0 代转基因异源四倍体鲫鱼及 20 尾对照鱼,提取尾鳍基因组 DNA,采用引物 P_1 (TGGCGTGATGAATGTCG)和 P_2 (AACACGGATGACTGCGT)来检测外源转植基因整合情况.选择 20 尾能够挤出白色精液雄性转基因异源四倍体鲫鱼个体,采用引物 P_1 和 P_2 对这 20 个精液基因组 DNA 进行 PCR 扩增检测.随机回收纯化上述 PCR 扩增目的片段测序并分析比较测序结果.

(3) 转植基因转录检测. 选择体重最大的 P_0 代转基因异源四倍体鲫鱼和体重最大的对照鱼(均为雌性,体重分别为 700 和 195 g),分别提取尾鳍、肌肉、肝脏、肾脏、脾脏、肠、心脏、性腺 8 种组织总 RNA. RT-PCR 检测外源青鱼 GH 基因在受体鱼各种组织中的转录水平.引物 P_a (ATGGCTAGAGCRTTAGTGCTGTT)位于 pbcAbcGHc 中青鱼 GH 基因编码区 5' 端, P_b (TTACAGGGTGCAAGTTGGAATCC)则位于青鱼 GH 基因编码区 3' 端.分别回收纯化上述 RT-PCR 扩增目的片段并分析测序结果.

2 结果与分析

2.1 “全鱼”转植基因的构建

通过 PCR 搭桥和克隆得到 pUCM-A/GH,该质粒含有青鱼 β -actin 基因启动调控区与青鱼 GH 基因 ORF 的连接产物(2.2 kb).测序结果显示,启动子部分同模板青鱼 β -actin 基因启动调控区同源性高达 99.8%,两个碱基位点发生了突变:312 位 A 突变为 G,934 位 T 突变为 C;目的基因青鱼 GH 基因编码区 cDNA 除了终止密码子人为突变为 TAA 外也有两处无义突变,第 10 位的 GCG 突变为 GCA,第 385 位的 GAG 突变为 GAA,同模板 DNA 序列同源性高达 99.5%;pUCM-A/GH 酶切反应验证了连接产物酶切位点的正确性,由此可见青鱼 GH 基因编码区 cDNA 已经被精确地连接到青鱼 β -actin 基因第一个编码子的位置.

高保真 PCR 扩增雌核发育草鱼 GH 基因 3' 端 UTR 序列,得到一条长度为 660 bp 的特异条带.该片段同普通草鱼 GH 基因 3' 端序列(X60988, X60419)进

行比较,具有 98.7% 以上的同源性.将含有 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点的雌核发育草鱼 GH 基因 3' 端 UTR 序列(包括多聚腺苷酸加尾信号序列和翻译终止序列)定向克隆到 pUCM-A/GH 中青鱼 GH 基因编码区 cDNA 之后,构建成完整的“全鱼”转植基因 pbcAbcGHc(2.9 kb,图 1).

2.2 转基因鱼的体重及体长

依照转基因鱼体重理论模型^[21],对 150 日龄 P_0 代转基因异源四倍体鲫鱼和对照异源四倍体鲫鱼的体重、体长进行检测. P_0 代转基因异源四倍体鲫鱼检测了 87 条,平均体重 296.3 g,平均体长 21.7 cm,最大个体体重 700 g,对照组异源四倍体鲫鱼检测了 100 条,平均体重 104.2 g,平均体长 16.1 cm,最大个体体重 195 g;转基因异源四倍体鲫鱼平均体重是对照组的 2.8 倍,平均体长是对照组的 1.3 倍;转基因异源四倍体鲫鱼中最大个体为最大对照鱼的 3.6 倍.较对照鱼而言, P_0 代转青鱼 GH 基因异源四倍体鲫鱼表现出明显的生长优势(表 1 和图 2). P_0 代转基因异源四倍体鲫鱼中出现生长速度特别显著的个体,其背部肌肉明显增厚,在头部后方形成明显的隆起形状(图 3).87 条 150 日龄 P_0 代转基因异源四倍体鲫鱼中,有 32 条雄性个体可以挤出少量精液,而 150 日龄对照四倍体鱼无此现象.

2.3 转植基因的整合与转录

共检测了 60 个 P_0 代转基因异源四倍体鲫鱼个体,以引物 P_1 及 P_2 对其尾鳍基因组 DNA 进行 PCR 扩增.其中 20 个能够挤出白色精液的雄性个体都能扩增出 411 bp 左右的特异性条带,说明该 20 个雄性个体 100% 具有外源青鱼 GH 基因的整合.余下的 40 个样本中有 34 个可扩增出 411 bp 左右的条带,因而外源青鱼 GH 基因在 P_0 代转基因异源四倍体鲫鱼尾鳍中的整合率为 90%.对上述 20 个精液样本的 PCR 检测中发现只有 13 条鱼的精液在 411 bp 左右有扩增条带,所有对照异源四倍体鲫鱼尾鳍基因组 DNA 都没有扩增出该特异性条带,部分扩增结果见图 4.

分别提取最大体重 P_0 代转基因异源四倍体鲫鱼(体重 700 g,雌性)和最大体重对照鱼(体重 195 g,雌性)尾鳍、肌肉、肝脏、肾脏、脾脏、肠、心脏、卵巢 8 种组织总 RNA,采用引物 P_a 和 P_b 来检测外源转植青鱼 GH 基因在受体鱼中的转录. RT-PCR 检测结

图 1 “全鱼”转植基因 *pbcAbcGHc*

(A) 整个“全鱼”转植基因序列. 方框中的基因序列为青鱼 GH 基因编码区 cDNA 部分, 大写的 CCAAT 和 TATA 分别代表青鱼 β -actin 基因启动调控区 CCAAT 盒和 TATA 盒, 阴影部分序列为 *Nco* I 和 *Bam* H I 酶切位点; (B) 转植基因表达载体 *pbcAbcGHc*. 1: 青鱼 β -actin 基因启动调控区; 2: 青鱼 GH 基因可读框; 3: 雌核发育草鱼 GH 基因 3'端 UTR 序列; P_1/P_2 和 P_a/P_b 分别为转植基因整合和转录检测引物

表 1 150 日龄 P_0 代转基因异源四倍体鲫鲤和对照鱼的体重及体长^{a)}

	体重(g)			体长(cm)		
	最大值	最小值	平均值	最大值	最小值	平均值
转基因异源四倍体鲫鲤	700	70	296.3±70.3	30	14.5	21.7±2.4
异源四倍体鲫鲤对照	195	35	104.2±37.4	21.5	11.2	16.1±1.8
检测结果	$P<0.01$ (差异显著)			$P<0.01$ (差异显著)		

a) 150 日龄 P_0 代转基因异源四倍体鲫鲤检测了 87 尾, 对照组 100 尾

图2 150日龄P₀代转基因异源四倍体鲫鱼与对照鱼体重及体长分布图

果显示, P₀代转基因异源四倍体鲫鱼肌肉、肝脏、肾脏、卵巢4种组织的RNA可以扩增出630 bp左右的特异性条带(图5);而对照鱼的上述8种组织总RNA均没有扩增出该特异性条带(图片未显示)。

分别选择上述PCR与RT-PCR扩增的条带进行测序。结果表明,随机所选择的8个P₀代转基因异源四倍体鲫鱼基因组DNA(引物P₁和P₂)PCR扩增条带DNA序列同转基因*pbcAbcGHc*的序列同源性都达到98%以上,在该8个测序结果中都可以找到Nco I酶切位点。4条P₀代转基因异源四倍体鲫鱼RT-PCR(引物P_a和P_b)所扩增出的条带(肌肉、肝脏、肾脏、卵巢)同青鱼GH基因编码区cDNA同源性都在98%以上,全部RT-PCR产物测序结果中都存在青鱼GH基因编码区cDNA上的Sac I酶切位点。

3 讨论

生态安全性是转基因经济鱼类走向商业化的主

图3 150日龄P₀代转基因异源四倍体与对照四倍体鲫鱼
(A) 对照异源四倍体鲫鱼; (B) 转基因异源四倍体鲫鱼

要瓶颈。而解决该问题的有效方式之一是研制不育的转基因三倍体鱼。转基因三倍体本身不能繁殖形成新的种群,而且不能产生可育的配子同其他鱼类杂交,无法干扰自然界其他物种遗传的多样性。研制转基因四倍体和转基因二倍体鱼,二者进行杂交得到种间三倍体转基因鱼,是大规模生产不育转基因三倍体的行之有效的途径之一。上述策略的关键环节则是转基因四倍体鱼的获得,然而四倍体的获得极其困难。湖南师范大学经过数十年的育种研究,得到了世界上首例雌雄均可育的异源四倍体鲫鱼;在此基础上又研制成功完全不育的种间三倍体——湘云鲫和湘云鲤。该研究系统为大规模研发不育的转基因三倍体鱼提供了契机。本研究的开展正是建立在这个特有的研究平台之上。

青鱼是中国“四大家鱼”之一,生长速度快、个体大、肉味鲜美,但是关于青鱼的分子生物学研究还很少。本实验室已成功克隆和表达了青鱼GH基因、制备了抗青鱼GH血清、成功地克隆了青鱼β-actin基因启动子调控区域基因。显微注射实验表明,带有β-actin基因启动子的绿色荧光蛋白在泥鳅胚胎的各个发育时期和各器官中均有强烈表达,证明了该启动子的广泛表达性和强启动性^[20,22,23]。本研究选择青鱼作为“全鱼”基因的主要元件来源,结果证明青鱼β-actin基因启动子同自身的GH基因精密结合的转基因在受体鱼中有着强烈的表达和明显的生物学效应。

通过对150日龄P₀代转青鱼GH基因异源四倍体鲫鱼和对照鱼的检测,可以得出P₀代转青鱼GH基因异源四倍体鲫鱼生长速度明显快于普通异源四倍

图 4 雄性 P_0 代转基因异源四倍体鲫尾鳍及精液 DNA 扩增结果

(A) 尾鳍扩增结果; (B) 精液扩增结果. P: 阳性对照(pbcAbcGHc); N: 阴性对照(异源四倍体鲫鱼); 1~20: 雄性 P_0 代转基因异源四倍体鲫鱼

图 5 P_0 代转基因异源四倍体鲫鱼 RT-PCR 结果

(A) RT-PCR 结果; (B) NO-RT 对照. 1: 脾脏; 2: 肌肉; 3: 肝脏; 4: 肾脏; 5: 肠; 6: 心脏; 7: 卵巢; 8: 尾鳍

体鲫鲤的结论. Devlin 等人^[24]发现, 在生长速度较慢的野生虹鳟鱼品系中, 转鲑鱼 GH 基因鱼同对照组的生长速度差别非常大; 但在已驯化的品系中, 转基因鱼同对照组的生长速度没有差别, 转植基因对野生品种同家养品系的杂交种的促生长效果也明显优于家养品系. 异源四倍体鲫鲤的亲本是湘江野鲤和红鲫, 湘江野鲤是野生鲤鱼品种, 就转青鱼 GH 基因促生长效果而言, 转青鱼 GH 基因异源四倍体鲫鲤原代生长速度出现了较明显的增幅, 这种结果同 Robert 等人的结果有相似之处.

20 尾 P_0 代转青鱼 GH 基因异源四倍体雄性尾鳍 PCR 扩增结果表明, 该 20 尾个体 100% 具有外源基因 pbcAbcGHc 的整合, 而这些雄性个体的精液 PCR 扩增中只有 13 尾呈阳性. 这可能是由于鱼胚胎细胞分裂迅速, 外源基因整合较晚而导致转基因鱼中只有部分细胞带有转植基因, 因而表现出“转基因鱼模型”所揭示的转植基因的镶嵌性^[25]. 由于原代转基因鱼是嵌合体, 转植基因在传代鱼个体之间的整合情况是不一致的. 即使到了更远的世代, 由于转植基因发生多拷贝多位点整合的缘故, 该现象还可能继续存在, 这就造成了个体之间表型的差异. 挑选转植基因最适合表达、性状优良的个体, 用传统的近交或雌核发育方法来建立转青鱼 GH 基因异源四倍体鲫鲤纯系是可行的^[26].

87 条 150 日龄 P_0 代转基因异源四倍体鲫鲤中, 有 32 条雄性个体可以挤出少量精液, 而 150 日龄对照鱼无此现象. 类似实验结果在转草鱼 GH 基因异源四倍体鲫鲤中也曾出现过^[26]. 但迄今为止, 所有转草鱼 GH 基因的二倍体鲤鱼, 不管是 P_0 代还是其随后的 5 个不同子代, 转 GH 基因鲤鱼的第一次性成熟时间明显比对照鲤鱼晚(朱作言, 私人通讯). 该现象说明外源转植 GH 基因对于受体鱼生殖发育的影响同受体鱼基因组的倍性有密切的关联. 为什么转 GH 基因鲤鱼的第一次性成熟时间比对照鲤鱼晚, 而转 GH 基因异源四倍体鲫鲤第一次性成熟时间比对照早? 本实验室将深入研究该现象, 希望能找到合理的解释.

本研究成功构建了青鱼 β -actin 基因和青鱼 GH 基因精确拼接的“全鱼”基因 pbcAbcGHc, 通过显微注射和对照养殖得到了具有明显生长优势的 P_0 代转青鱼 GH 基因异源四倍体鲫鲤. 为进一步筛选和建立转青鱼 GH 基因异源四倍体鲫鲤纯系奠定了坚实的基础, 同时也为研究青鱼和异源四倍体鲫鲤的分子生物学提供了材料. 将转青鱼 GH 基因异源四倍体鲫鲤纯系与转基因二倍体正反杂交, 可望筛选出性状优良的转基因三倍体鱼. 这种完全不育的、环保型转基因三倍体鱼将从根本上解决转基因鱼潜在的生态安全问题, 具有巨大的市场潜力.

参考文献

- 1 Zhu Z, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus*). J Appl Ichthyol, 1985, 1: 31-34

- 2 曾志强, 朱作言. 转 pMThGH 基因红鲤 F4 代鱼体内转植基因存在的分子多态性. 科学通报, 2000, 18: 1957–1962
- 3 Cachot J, Law M, Pottier D, et al. Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the λ transgenic medaka. Environ Sci Technol, 2007, 41: 7830–7836
- 4 Fu C, Li D, Hu W, et al. Fast-growing transgenic common carp mounting compensatory growth. J Fish Biol, 2007, 71sb: 174–185
- 5 Rosa C E, Figueiredo M A, Lanes C F, et al. Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008, 149: 209–214
- 6 Abad Z, Gonzalez R, Mendoza I, et al. Production of a high percentage of male offspring in growth-enhanced transgenic tilapia using *Oreochromis aureus* ZZ selected pseudofemales. Aquaculture, 2007, 270: 1–4
- 7 朱作言, 曾志强. 转基因鱼离市场还有多远. 生物技术通报, 2000, 1: 1–6
- 8 Reynold M, Maria T H, Amilcar A, et al. Tilapia chromosomal growth hormone gene expression accelerates growth in transgenic zebrafish (*Danio rerio*). Electron J Biotechnol, 2001, 4: 1–7
- 9 孙效文, 梁利群, 闫学春, 等. 转基因鲤鱼作为食物的研究. 高技术通讯, 1998, 8: 50–55
- 10 王加连. 转基因生物和生物安全. 生态学杂志, 2006, 25: 314–317
- 11 胡炜, 汪亚平, 朱作言. 转基因鱼生态风险评价及其对策研究进展. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2007, 37: 377–381
- 12 Sundström L F, Löhmus M, Johnsson J I, et al. Growth hormone transgenic coho salmon pay for growth potential with increased predation mortality. Proc R Soc Lond B, 2004, 271: 350–352
- 13 Li D L, Fu C Z, Hu W, et al. Rapid growth cost in “all-fish” growth hormone gene transgenic carp: reduced critical swimming speed. Chinese Science Bulletin, 2007, 52: 1501–1506
- 14 Sundström L F, Löhmus M, Devlin R H. Migration and growth potential of coho salmon smolts: implications for ecological impacts from growth-enhanced fish. Ecol Appl, 2010, 20: 1372–1383
- 15 Sundström L F, Löhmus M, Tymchuk W E, et al. Gene-environment interactions influence ecological consequences of transgenic animals. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 3889–3894
- 16 Jhingan E, Devlin R H, Iwama G K. Disease resistance, stress response and effects of triploidy in growth hormone transgenic coho salmon. J Fish Biol, 2003, 63: 806–823
- 17 Devlin R H, Sundström L F, Muir W M. Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish. Trends Biotechnol, 2006, 24: 89–97
- 18 Liu S J, Liu Y, Zhou G J, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp $\times$ common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. Aquaculture, 2001, 192: 171–186
- 19 刘少军, 胡芳, 周工健, 等. 三倍体湘鲫繁殖季节的性腺结构观察. 水生生物学报, 2000, 24: 301–306
- 20 Feng H, Chen J, Luo J, et al. Cloning of black carp β -actin gene and primarily detecting the function of its promoter region. Acta Genetica Sinica, 2006, 33: 133–140
- 21 汪亚平, 胡炜, 吴刚, 等. 转“全鱼”GH 基因鲤鱼及其 F1 代遗传分析. 科学通报, 2001, 46: 226–229
- 22 冯浩, 成嘉, 刘妍, 等. 青鱼生长激素的重组表达及其多克隆抗体的制备. 遗传, 2005, 27: 729–734
- 23 冯浩, 曾志强, 成嘉, 等. 青鱼生长激素基因的克隆及序列分析. 激光生物学报, 2002, 11: 407–411
- 24 Devlin R H, Biagi C A, Yesaki T Y, et al. Growth of domesticated transgenic fish. Nature, 2001, 409: 781–782
- 25 朱作言, 许克圣, 谢岳峰, 等. 转基因鱼模型的建立. 中国科学 B 辑, 1989, 19: 147–155
- 26 冯浩, 曾志强, 刘少军, 等. 转基因异源四倍体鲫鱼 F1 的研究. 遗传学报, 2002, 29: 434–437

Black Carp GH Gene Transgenic Allotetraploid Hybrids of *Carassius auratus* red var. (♀) × *Cyprinus carpio* (♂)

FENG Hao, FU YongMing, LUO Jian, WU Hui, LIU Yun & LIU ShaoJun

Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology of Ministry of Education of China, College of Life Sciences,
Hunan Normal University, Changsha 410081, China

The ecological risk is the “bottleneck” for commercialization of transgenic fish. The sterile transgenic triploid fish derived from hydrating the transgenic tetraploid fish and transgenic diploid fish is one of the keys to solve this problem. The “all fish” gene construct (pbcAbcGHc) containing Black Carp B-actin gene promoter and cDNA of growth hormone (GH) gene from the same species was introduced into the fertilized eggs of the allotetraploid fish through microinjection. The contrast cultivation results show that the weight and body length of P0 of the transgenic allotetraploid fish of 150 days were much larger than those of the controls. PCR assay was applied among 60 transgenic allotetraploid fish of 150 days and the integration ratio of the exogenous transplant gene in the genome of the caudal fin is 90%. The transplant gene could be detected in 13 of 20 samples from the sperm of the male transgenic tetraploid fish. The RT-PCR result demonstrates that the transcription of exogenous GH gene could be found in the muscle, liver, kidney and oval of the biggest transgenic allotetraploid fish. This study has developed P0 of the Black Carp GH gene transgenic tetraploid fish with outstanding growth rate, which made the solid foundation for the pure line establishment of the transgenic tetraploid fish and for developing the sterile transgenic triploid fish.

transgene, allotraploid, growth hormone, black carp, ecological safety

doi: 10.1360/052010-739