

斑马鱼心肌特异性启动子的克隆及其功能鉴定*

叶 忠 张必利[#] 徐荣良 赵仙先 秦永文 唐念中 郑 兴[△]

(第二军医大学附属长海医院心内科 上海 200433)

摘要 目的 探讨心室肌球蛋白重链(vmhc)基因启动子的心肌组织特异性。方法 利用 PCR 技术从斑马鱼基因组中克隆了 vmhc 编码区 5' 上游大小为 1952bp 的调控区域,应用酶切连接方法将 vmhc 启动子插入 pGFP-N1 质粒,成功构建 pEGFP-vmhc 重组载体。再应用高保真 DNA 聚合酶 PCR 扩增包含 vmhc 启动子序列,增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因序列及 3'UTR 序列的基因片段,经过纯化后通过显微注射将 vmhc-EGFP 基因片段导入斑马鱼受精卵中。结果 注射后的斑马鱼心脏中出现绿色荧光,而其他部位无荧光出现。结论:vmhc 启动子能够正确有效地驱动外源基因在斑马鱼心脏中特异表达,适合应用于心血管疾病的基因功能研究,基因靶向治疗等。

关键词 斑马鱼;vmhc 基因;启动子;显微注射

中图分类号:Q959.4 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)27-5204-05

Cloning and Functional Identification of the Zebrafish Cardiac-specific Promoter*

YE Zhong, ZHANG Bi-li[#], XU Rong-liang, ZHAO Xian-xian, QIN Yong-wen, TANG Nian-zhong, ZHENG Xing[△]

(Department of Cardiology, Changhai Hospital, the Second Affiliated Hospital of PLA, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To study the cardiac-specific expression of ventricular myosin heavy chain (vmhc) gene promoter. **Methods:** A 1952 bp promoter fragment of zebrafish vmhc gene 5'end deletion upstream region was amplified by PCR from zebrafish. Vmhc promoter was inserted into pGFP-N1 plasmid by enzyme digestion to construct the recombinant vector of pEGFP-vmhc. The gene fragment contain vmhc promoter sequences, enhanced green fluorescent protein gene (EGFP) sequences and 3'UTR sequences was amplified by PCR with high-fidelity DNA polymerase. The purified vmhc-EGFP gene fragment was injected into fertilized eggs of zebrafish by Microinjection. **Results:** Green fluorescence could be observed in the zebrafish heart injected the vmhc-EGFP gene fragment, but not in Non-myocardial tissue. **Conclusion:** Vmhc promoter is able to correctly and effectively drive the specific expression of exogenous genes in the zebrafish heart, and it is suitable for the study of gene function and gene therapy in cardiovascular disease.

Key words: Zebrafish; Vmhc gene; Promoter; Microinjection

Chinese Library Classification(CLC): Q959.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)27-5204-05

斑马鱼是继小鼠之后的又一个重要的模式脊椎动物,近十年来,被广泛应用于心血管疾病研究。它具有以下特点:首先,斑马鱼是一种可以用来进行无偏差和全基因组正向遗传筛选的脊椎动物,这使得人们可以鉴定心血管发育必需的基因;其次,由于斑马鱼胚胎缺乏血液循环,氧可以通过被动扩散进入胚胎到达所有组织,这就使得即使具有严重心血管系统缺陷的胚胎早期也能够继续发育;再则,由于斑马鱼胚胎是全透明的,可以全程观察和研究其心脏发育及血液流动状况^[1]。Lazic S 等通过对斑马鱼 mef2cb 表达的研究,证明斑马鱼的心脏生长比我们想象的还要与鼠类相似^[2]。

启动子根据其作用方式和功能一般可分为组成型启动子,组织特异型启动子和诱导型启动子,组织特异型启动子能使目的基因的表达产物只在一定的器官或组织积累,增加区域表达

量^[3]。本文探讨了斑马鱼心室肌球蛋白重链(ventricular myosin heavy chain, vmhc)启动子在斑马鱼心脏中的表达特性及特异性,为将来应用该启动子在斑马鱼心脏中定时、定位、定量表达外源基因奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、感受态和实验动物

载体 pEGFP-N1 由本实验室构建;大肠杆菌感受态细胞 TOP10 由本实验室制备,斑马鱼为野生型 AB 品系,取自本实验室。

1.2 引物设计

设计用于 PCR 扩增斑马鱼 1952bp vmhc 启动子的引物,交由上海英潍捷基生物科技有限公司合成。引物序列如下:

vmhcF 5'-ACTCCGCGGAGGCCATGTGTCTCTAAATTCT

* 基金项目 国家自然科学基金项目(81000038)

作者简介:叶忠(1975-)男,博士研究生,研究方向:冠心病的诊治研究, E-mail: yezhong20062006@sina.com

共同第一作者简介:张必利(1976-)男,博士,心内科主治医师,讲师, E-mail: zbli0026@yahoo.com.cn

△通讯作者:郑兴,教授,博士生导师, E-mail: zhengxing57530@163.com

(收稿日期:2012-02-23 接受日期:2012-03-20)

-3' ;

vmhcR 5'-ATCGGATCCGAACACCAACCATGAGATCACT-3'。

1.3 Vmhc 启动子的扩增及回收

从斑马鱼组织中提取基因组 DNA ,作为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件如下 :95℃ 预变性 5 分钟后 ,95℃ 变性 30 秒 ,53℃ 退火 30 秒 ,68℃ 延伸 2 分钟条件下进行 3 个循环 ,再 95℃ 变性 30 秒 ,62℃ 退火 30 秒 ,68℃ 延伸 2 分钟条件下进行 35 个循环 ,最后 68℃ 终延伸 5 分钟。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳 ,切取目的片段进行回收。

1.4 目的片段与 pEGFP-N1 载体连接及鉴定

取 pEGFP-N1 质粒与克隆得到的 vmhc 启动子基因片段进行限制性内切酶 *Sac* 和 *Bam*H 双酶切 ,水浴 37℃ 酶切 3 小时 ,然后用 PCR 清洁试剂盒对酶切产物进行回收 ,采取在 T4 DNA 连接酶作用下 4℃ 过夜连接的方法连接酶切产物 ,转化 Top10 感受态菌 ,涂布卡那霉素(Kan)抗性平板 ,37℃ 过夜培养。挑取转化板的单克隆 ,取 1μL 菌液作模板 ,特异引物 vmhcF/R 进行 PCR 扩增。取 5 μL 扩增产物 ,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 ,PCR 反应条件如下 :94℃ 预变性 5 分钟后 ,94℃ 变性 30 秒 ,61℃ 退火 30 秒 ,72℃ 延伸 4 分钟条件下进行 30 个循环 ,最后 72℃ 终延伸 10 分钟。挑取 PCR 鉴定正确的阳性克隆送 invitrogen 公司测序 ,测序引物序列为 :

pEGFP-N-3:CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG
CMVF 5'CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG3'

1.5 Vmhc-EGFP 基因片段的扩增

用 Axygen 质粒小提试剂盒抽提测序正确的 pEGFP-vmhc 阳性克隆质粒。根据 pEGFP-vmhc 质粒序列设计上下游引物 ,用 KOD-Plu 高保真 DNA 聚合酶扩增包含 vmhc 启动子序列、增强型绿色荧光蛋白基因 EGFP 序列及 3'UTR 序列的基因片段 ,用于下一步实验 ,引物序列为 :

EGFPF:5'-CATTAACGTCTGCCAATTGCACG-3'
EGFPR:5'-GAACAACACTCAACCCTATCTCG-3'

PCR 反应条件如下 :反应体系在冰上调制 ,混匀 ,瞬时离心后置 PCR 仪 ,95℃ 预变性 3 分钟后 ,95℃ 变性 30 秒 ,53℃ 退火 30 秒 ,68℃ 延伸 4 分钟条件下进行 35 个循环 ;最后 68℃ 终延伸 5 分钟。

1.6 斑马鱼的饲养管理

AB 品系野生型斑马鱼饲养于水族箱中 ,投喂人工饵料 ,温度恒定于 28℃ ,pH 值在 7± 0.2 ,光暗时间 12 h :12 h。繁殖时雌雄分开暂养 ,产卵前一天晚上将 1 尾雌鱼和 1 尾雄鱼配对于一小水族箱中 ,用黑布盖好遮光 ,实验当天早上揭去黑布 ,让其自然产卵。胚胎用 Egg water 在 28.5℃ 的培养箱中培养。

1.7 显微注射

Vmhc-EGFP 基因片段用试剂盒纯化 ,紫外分光光度计测定基因浓度为 56ng/μL ,参照 Rosen JN 等^[4]的方法 ,将外源基因片段注射至 1-2 细胞期的斑马鱼早期胚胎细胞质中 ,每个受精卵大约注射 2 μL。注射后 ,将受精卵收集于盛有 Egg water 的培养皿中。

1.8 EGFP 的表达观察

在各个发育时期将观察处理组和对照组的斑马鱼胚胎置

于 LEICA 荧光显微镜(40* 加 488nm 波长光源)下活体观察 ,记录 拍照 ,计算 EGFP 基因荧光表达率。

$$\text{表达率} = \frac{\text{表达荧光的胚胎数}}{\text{导入 vmhc-EGFP 基因的总胚胎数}} \times 100\%$$

1.9 RT-PCR 检测 vmhc 启动子功能

1.9.1 引物设计 根据 EGFP 基因序列设计用于 RT-PCR 检测的引物。引物的设计按照基本的设计原则 ,退火温度为 56℃ ,PCR 产物片段大小为 750bp 左右 ,同时设计内参 β-actin 引物 ,引物序列如下 :

EGFPF:5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3'
EGFPR:5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'
actinF 5'-AGGGAAATCGTGCCTGAC-3'
actinR 5'-TGAAGGTGGACAGCGAGG-3'

1.9.2 EGFP 表达检测 受精后 48hpf(hours postfertilization) 取注射 vmhc-EGFP 基因片段的处理组与未注射的对照组斑马鱼胚胎各 100 个 ,提取 RNA ,应用 RT-PCR 合成 cDNA 第一条链 ,作为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件如下 :95℃ 预变性 5 min 然后 94℃ 变性 30s ,56℃ 退火 30s ,72℃ 延伸 30s ,进行 32 个循环 ,再 72℃ 延伸 10min。以 β-actin 作为阳性对照 ,95℃ 预变性 5min ;然后 94℃ 变性 30s ,56℃ 退火 30s ,72℃ 延伸 30s ,进行 32 个循环 ,再 72℃ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 ,EB 染色 ,160V 电压电泳 25 min 在凝胶成像系统下观察 拍照。

1.10 Western-blot 检测 vmhc 启动子功能

受精后 48hpf 取注射 vmhc-EGFP 基因片段的处理组与未注射的对照组斑马鱼胚胎各 100 个 ,提取总蛋白 ,BCA 法测定蛋白浓度。取 100 μg 蛋白上样跑 SDS-PAGE 电泳 ,转膜 ,5% 脱脂奶粉封闭液(PBST)中室温封闭 2 h ,4℃ 鼠抗 GFP 抗体孵育过夜 ,羊抗鼠二抗室温孵育 1 h ,West Pico 显色 ,压片 ,显影。

2 结果

2.1 Vmhc 的 PCR 扩增

AxyGen 基因组 DNA 抽提试剂盒抽提得到斑马鱼基因组 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 ,抽提 DNA 质量良好 ,可以用于 vmhc 基因片段扩增 ,见图 1。PCR 扩增斑马鱼心肌特异性启动子 vmhc 基因片段 ,目的条带在 1952bp 左右 ,与理论预期一致 ,表明正确扩增出 vmhc 基因片段 ,见图 2。

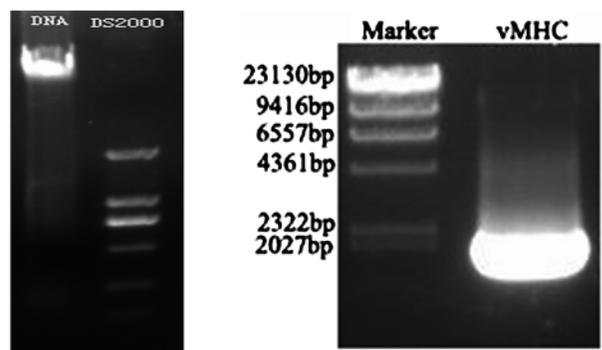


图 1 斑马鱼基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

图 2 Vmhc 扩增电泳图

Fig.1 Zebrafish genomic DNA agarose gel electrophoresis

Fig.2 Vmhc amplification electrophoresis

2.2 PEGFP-vmhc 载体的构建

以 Sac^I、Bam^{HI} 分别双酶切 pEGFP-N1 和 vmhc 基因片段,经 T4DNA 连接酶连接双酶切产物,构建 pEGFP-vmhc 重组载体。转化 Top10 感受态细菌,菌落 PCR 方法筛选阳性菌落,5 个克隆均可见 2000bp 左右的阳性片段,筛选得到 pEGFP-vmhc 重组阳性克隆,见图 3。阳性克隆质粒与未插入片段的 pEGFP-N1 空载体电泳比较,条带明显大于空载体,证实有插入片段插入,见图 4。送 Invitrogen 公司测序,结果与设计完全一致。

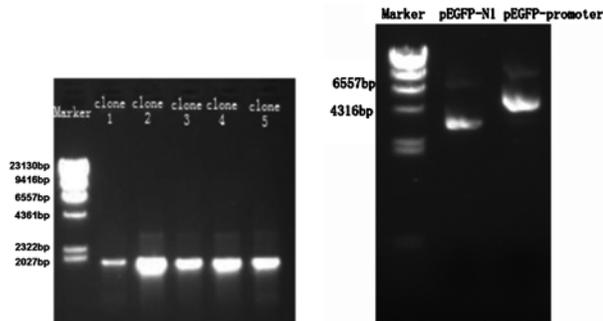


图 3 重组载体 pEGFP-vmhc 质粒电泳图

图 4 pEGFP-vmhc 重组质粒与 pEGFP-N1 空质粒电泳图

Fig.3 The recombinant vector pEGFP-vmhc agarose gel electrophoresis

Fig.4 pEGFP-vmhc recombinant plasmid and pEGFP-N1 empty plasmid agarose gel electrophoresis

2.3 Vmhc-EGFP 基因片段的扩增与纯化

PCR 扩增包含 vmhc 启动子序列,增强型绿色荧光蛋白基

因 EGFP 序列及 3'UTR 序列的基因片段,目的条带在 2600bp 左右,与理论预期一致,表明正确扩增出 vmhc-EGFP 基因片段,见图 5。胶回收试剂盒回收片段,紫外分光光度计测定基因浓度为 56ng/μL,-20℃ 保存备用。

2.4 EGFP 基因的导入及表达的荧光检测

通过显微注射技术将外源基因 EGFP 导入斑马鱼的受精卵后,根据胚胎发育的不同时期,在荧光显微镜下跟踪观察。表达率为 82.07%,发现基因导入斑马鱼受精卵后,转化胚胎在同样条件下发育时期比对照要延迟 6 小时左右,在导入外源基因 18hpf 后开始能在荧光显微镜下观察到荧光,并可持续表达 11 天,且转化胚胎之间的 EGFP 表达存在差异,随着胚胎发育时间的推移,荧光强度逐渐稳定下来,见图 6。

2.5 RT-PCR 检测 vmhc 启动子功能

以显微注射 48hpf 斑马鱼组织 mRNA 为模板 RT-PCR 扩增 EGFP 基因片段,注射有 vmhc-EGFP 基因片段的斑马鱼有阳性片段扩增,而未注射的对照组斑马鱼没有阳性片段扩增;内参 actin 基因实验组与对照组均有阳性片段扩增。由于斑马鱼自身无 EGFP 基因,说明外源 EGFP 基因在斑马鱼中成功表达,vmhc 启动子具有驱动基因表达的功能,见图 7。

2.6 Western-blot 检测 vmhc 启动子功能

Western Blot 半定量检测 vmhc-EGFP 实验组与对照组中 EGFP 的表达量,未注射 vmhc-EGFP 基因片段的对照组无 EGFP 蛋白表达,注射有 vmhc-EGFP 基因片段的实验组有 EGFP 蛋白表达。由此可以说明 vmhc 启动子可以驱动外源 EGFP 基因在斑马鱼中正常表达,vmhc 启动子具有驱动基因表达的功能,见图 8。

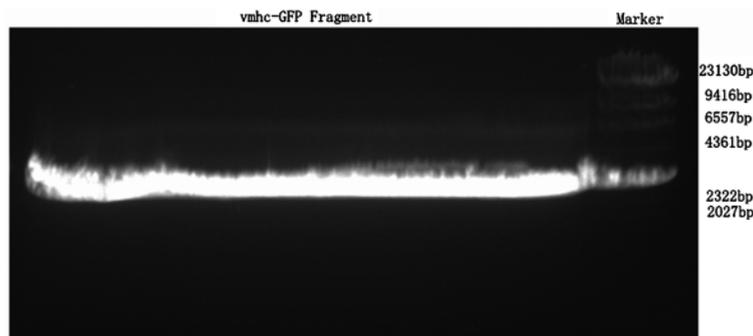


图 5 Vmhc-EGFP 基因片段扩增电泳图

Fig.5 Vmhc-EGFP gene fragment amplified electrophoresis

3 讨论

在对许多心血管疾病致病基因的研究中,要求基因载体具有靶器官定向表达的能力,以提高基因表达的效率,观察致病基因导致的靶器官功能改变。目前研究发现许多基因,如心肌肌球蛋白重链(myosin heavy chain, mhc)^[5]、α-肌动蛋白^[6]、脑钠素^[7]等,其启动子的活性只限于心血管组织,具有良好的靶器官特异性,适合开发出具有靶器官特异性表达的基因表达载体。心脏肌球蛋白由 2 条重链和 4 条轻链构成,斑马鱼 mhc 有心房(atrial myosin heavy chain, amhc)和心室(ventricular myosin heavy chain, vmhc)两种亚型^[8]。vmhc 基因只在心室的心肌细胞

中表达^[9],而心房肌细胞则表达相应的 amhc 基因(atrial myosin heavy chain)^[10]。斑马鱼基因 vmhc 最先在心室的心肌前体细胞中表达,是心脏发育早期的标志基因。2009 年,靳大庆等克隆了基因 vmhc 上游片段的启动子区(1952bp),鉴定了 vmhc 启动子能够充分驱动 EGFP 基因在斑马鱼心室中特异表达,而不在体节中表达^[11]。GFP 最早由下村修等于 1962 年在一种学名 Aequorea victoria 的海洋生物水母中发现,其基因所产生的蛋白质,在蓝光波长范围的光线激发下,会发出绿色荧光^[12]。GFP 是常用的报告基因,转化入宿主细胞后很稳定,对多数宿主的生理无影响。目前应用较多的是 GFP 的突变体 -EGFP(64 位苯丙→亮),发射出的荧光强度比 GFP 大 6 倍以上,更适合作为

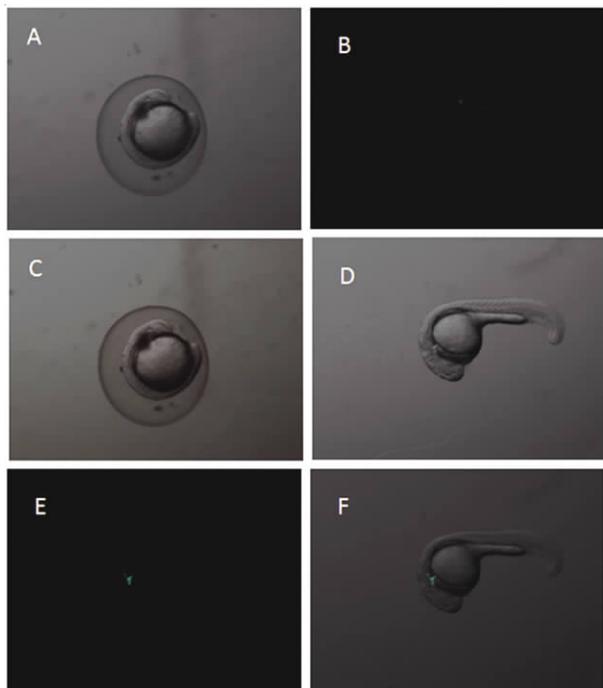


图 6 导入外源基因片段 vmhc-EGFP 的斑马鱼照片(40×)

A: 18hpf(普通光源);B: 18hpf(激发光);C: 18hpf(合并);D: 28hpf(普通光源);E: 28hpf(激发光);F: 28hpf(合并)

Fig. 6 Microinjection of exogenous gene fragment vmhc-EGFP zebrafish photos(40×)

A: 18hpf (ordinary light);B: 18hpf (excitation light);C: 18hpf(merge);D: 28hpf(ordinary light);E: 28hpf(excitation light);F: 28hpf(merge)

研究基因表达、调控及蛋白质在生物体内定位等的报告基因^[13]。EGFP 是目前最佳标记分子,具有荧光特异性高、易于检测等独特的优势。运用组织特异性启动子驱动 EGFP 表达的转基因斑马鱼可以作为有用的工具应用于追踪细胞运动,观察动态基因表达模式,剖析活体胚胎的调控转录元件等领域的研究^[14-16]。

显微注射技术(microinjection)是利用管尖极细(0.1 至 0.5 μm)的玻璃微量注射针,将外源基因片段直接注射到原核期胚或培养的细胞中,然后藉由宿主基因组序列可能发生的重组(rearrangement)、缺失(deletion)、复制(duplication)或易位(translocation)等现象而使外源基因嵌入宿主的染色体。这种技术的优点在于任何 DNA 在原则上均可转入任何种类的细胞内,目前已成功运用于包括小鼠、鱼、大鼠、兔子及许多大型家畜,如牛、羊、猪等基因转殖动物。应用显微注射技术导入外源基因时,对 DNA 的大小无限制,整合率高,且可直接产生转基因动物^[17],是目前广泛使用、效果较好的一种方法^[18]。而与哺乳动物相比,外源基因导入鱼类受精卵的细胞质时,其与鱼类细胞染色体 DNA 发生整合的几率要高得多^[19]。这是因为鱼类受精卵内有一种细胞质流,有助于导入的外源基因与受精卵原核 DNA 接触,此外,鱼类受精卵分裂快,分裂过程中核膜消失,染色体散开,增加了外源基因与染色体 DNA 接触的机会,有利于外源基因的整合^[20]。

本实验通过报告基因 EGFP 观察了斑马鱼心肌特异性 vmhc 在斑马鱼体内的表达特性及组织特异性,发现转化胚胎

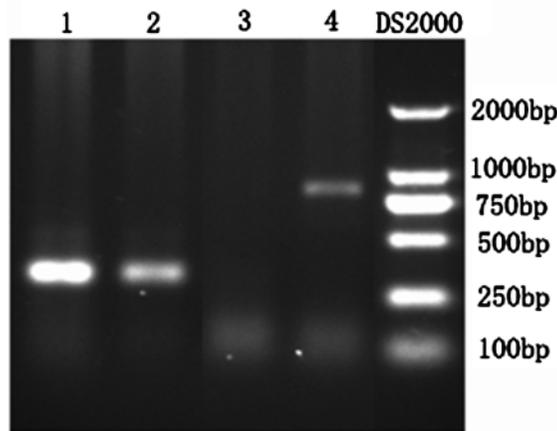


图 7 Vmhc-EGFP 表达的 RT-PCR 结果琼脂糖凝胶电泳图

条带 1 对照组内参 actin 扩增,条带 2 实验组内参 actin 扩增;条带 3 对照组 EGFP 扩增,条带 4 实验组 EGFP 扩增

Fig.7 Vmhc-EGFP expression by RT-PCR agarose gel electrophoresis

Band 1:Internal reference actin amplification of the control group;

Band 2:Internal reference actin amplification of the experimental group;

Band 3:EGFP amplification of the control group;

Band 4: EGFP amplification of the experimental group

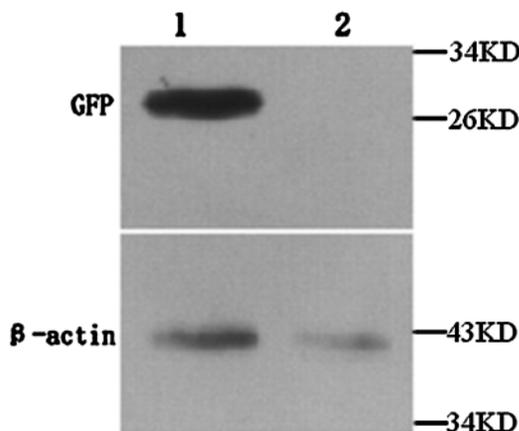


图 8 Vmhc-EGFP 表达的 Western-blot 检测图

条带 1 实验组,条带 2 对照组

Fig. 8 Vmhc-EGFP expression by western-blot

Band 1: the experimental group;

Band 2: the control group

在同样条件下发育时期比对照要延迟 6 小时左右,导入外源基因 18hpf 后开始能在荧光显微镜下在斑马鱼胚胎心脏区域观察到荧光,28hpf 时可以观察到明显的荧光集中在斑马鱼心脏区域,并可持续表达 11 天。本实验还通过对 48hpf 的斑马鱼心肌组织的 RT-PCR 扩增 EGFP 基因片段及 EGFP 蛋白的 western-blot 检测,验证了外源 EGFP 基因及 EGFP 蛋白在斑马鱼中的成功表达,说明 vmhc 启动子可以驱动外源 EGFP 基因在斑马鱼中正常表达,vmhc 启动子具有驱动基因表达的功能。

综上所述,本实验克隆的斑马鱼 vmhc 启动子能够正确地驱动外源基因在斑马鱼心脏中特异表达,而在心脏外表达很低,适合应用于基因功能研究,基因靶向治疗等领域,可以成为心血管疾病遗传学及发育生物学研究的重要工具。

参考文献(References)

- [1] Bakkers J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease[J]. *Cardiovasc Res*,2011,91:279-288
- [2] Lazic S, Scott IC. Mef2cb regulates late myocardial cell addition from a second heart field-like population of progenitors in zebrafish[J]. *Dev Biol*,2011,354:123-133
- [3] 宋扬,周军会,张永强.植物组织特异性启动子研究[J].*生物技术通报*,2007,6:22-24
Song Yang, Zhou Jun-hui, Zhang Yong-qiang. Research on plant tissue-specific promoters[J]. *Biotechnology bulletin*,2007,6:22-24(In Chinese)
- [4] Rosen JN, Sweeney MF, Mably JD. Microinjection of zebrafish embryos to analyze gene function [J]. *J Vis Exp*,2009,25. pii:1115. doi: 10.3791/1115
- [5] Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner[J]. *Science*,1986,231:597-600
- [6] LaPointe MC, Wu G, Garami M, et al. Tissue-specific expression of the human brain natriuretic peptide gene in cardiac myocytes[J]. *Hypertension*,1996,27:715-722
- [7] Kitsis RN, Buttrick PM, McNally EM, et al. Hormonal modulation of a gene injected into rat heart in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991,15(88):4138-4142
- [8] Deborah Yelon. Cardiac patterning and morphogenesis in zebrafish[J]. *Dev Dyn*,2001,222:552-563
- [9] Yelon D, Horne SA, Stainier DY. Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish[J]. *Dev Biol*,1999,214:23-37
- [10] Berdoudo E, Coleman H, Lee DH, et al. Mutation of weak atrium-/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish [J]. *Development*,2003,130: 6121-6129
- [11] Jin D, Ni TT, Hou J, et al. Promoter analysis of ventricular myosin heavy chain (vmhc) in zebrafish embryos [J]. *Dev Dyn*,2009,238: 1760-1767
- [12] Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*[J]. *J Cell Comp Physiol*,1962,59:223-239
- [13] Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence[J]. *Nature*,1995,373:663-664
- [14] Long Q, Meng A, Wang H, et al. GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene [J]. *Development*,1997,124:4105-4111
- [15] Motoike T, Loughna S, Perens E, et al. Universal GFP reporter for the study of vascular development[J]. *Genesis*,2000,28:75-81
- [16] Zhang XY, Rodaway AR. SCL-GFP transgenic zebrafish: in vivo imaging of blood and endothelial development and identification of the initial site of definitive hematopoiesis [J]. *Dev Biol*,2007,307: 179-194
- [17] 王英,张德福,刘丽君,等.影响小鼠显微注射对胚胎质量的若干因素[J].*动物科学与动物医学*,2000,17(3):25-26
Wang Ying, Zhang De-fu, Liu Li-jun, et al. Factors on mice microinjected embryo quality[J]. *Animal science & veterinary medicine*, 2000,17(3):25-26(In Chinese)
- [18] 朱作言,汪亚平.转基因鱼[J].*生物学通报*,1999,34:1-3
Zhu Zuo-yan, Wang Ya-ping. Transgenic fish[J]. *Biotechnology bulletin*, 1999,34:1-3(In Chinese)
- [19] 杨隽,杨东亚,郭志光,等.全鱼基因在鲤鱼体内的整合行为的研究[J].*黑龙江八一农垦大学学报*,1997,9:57-59
Yang Jun, Yang Dong-ya, Guo Zhi-guang, et al. The study on the integration action of all-fish gene in common CARP [J]. *Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University*,1997,9:57-59 (In Chinese)
- [20] 史瀛仙,张玉廉,沈玉,等.人生长激素基因导入金鱼受精卵内的整合,表达和促生长效应研究[J].*生物化学杂志*,1995,11:180-183
Shi Ying-xian, Zhang Yu-lian, Shen Yu, et al. The study of integration, expression and the biological effect of MT-hGH gene injected into the fertilised eggs of goldfish [J]. *Biochemical Journal*,1995,11: 180-183(In Chinese)