

综 述

中国转基因鱼研究的进展

PROGRESS ON RESEARCH OF TRANSGENIC FISH IN CHINA

楼允东

(上海水产大学, 200090)

Lou Yun-dong

(Shanghai Fisheries University, 200090)

关键词 中国, 转基因鱼

KEYWORDS China, transgenic fish

转基因动物是指用实验方法导入的外源基因在染色体基因组内稳定整合并能遗传给后代的一类动物。自从1982年 Palmiter 等首次将大鼠生长激素基因导入小鼠受精卵雄性原核中, 获得了个体比对照组大一倍的转基因“超级小鼠”以来[Palmiter 等, 1982], 这项高新技术受到各国重视, 发展迅速, 取得不少突破, 全世界已申请的工程动物专利达到八十多项。转基因猪、兔、牛、羊和鱼等相继问世, 为培养生产性状优良的超级种群、制备高增值的蛋白和激素类特效药物以及按人的需求提供理想的实验动物等方面开辟了新途径。因此, 转基因动物的研究无论对于基因调控的理论研究, 还是获得具有经济价值的转基因动物都具有重要的意义。

鱼类是研究转基因动物的良好材料, 因为一尾雌鱼就能提供成千上万个卵, 卵的体积也很大, 且它们行体外受精和体外发育, 胚胎操作较哺乳类简单。因此, 继1985年中国科学院水生生物研究所朱作言等获得第一批转基因鱼以来[Zhu 等, 1985], 世界上已有几十个实验室先后开展了这方面的研究, 并取得了相当大的成就, 培育出了生长快速的“超级鲟鱼”和“超级泥鳅”等。据认为, 转基因鱼是目前国内外获得的最成功的转基因动物之一。本文仅就我国转基因鱼研究的情况作一简要评述。

1 基因转移在生物技术中的地位与作用

生物技术(Biotechnology)又叫生物工程(Bioengineering), 它是一项以生命科学为基础, 利用生物体系(组织、细胞及其组分)和工程原理, 提供商品或社会服务的综合性科学技术。生物技术包括基因工程、细胞工程、发酵工程、酶工程、蛋白质工程、生化工程、动物胚胎工程、生

化制药和生物医学工程等,其中以前四者为主体。新近,生物技术中传统的细胞工程、发酵工程和酶工程等由于注入了崭新的基因工程技术而不断焕发出活力。因此,可以说基因工程是现代生物技术的核心。所谓基因工程,是指人们利用分子生物学技术手段,操纵、改造和重建细胞的基因组,从而使生物体的遗传性状发生定向变异。

从基因转移的角度来看,基因工程无非包括转基因微生物、转基因动物和转基因植物三大部分。其中转基因微生物也就是传统的或狭义的基因工程,是基因工程的基础,而转基因动植物则是传统基因工程的进一步发展,也是基因工程这一科学技术发展的必然趋势。

基因转移技术具有为人类造福的巨大潜力,首先受益的是医药卫生和保健事业,如基因工程药物的开发、遗传病的基因诊断和遗传保健以及基因治疗等,给医学带来划时代的变革。另外,从80年代后期开始,在农业、畜牧业和水产养殖业中,也逐渐引进了基因转移技术,出现了高产、优质、抗虫和抗病的转基因植物和转基因动物品系,显露出农牧渔业高科技革命的曙光。基因工程技术再一次证明“科学技术是第一生产力”这个真理。

2 转基因鱼的构建

2.1 概说

水产动物基因工程研究最突出的技术进步便是“转基因鱼”的诞生。转基因是一项高度综合性的技术,它涉及生命科学领域的众多学科,诸如分子生物学、细胞生物学、遗传学、胚胎学、动物生理学、发育生物学以及生物化学等。就鱼类来说,其主要技术环节有:①外源基因的分离或合成;②构建合适的表达载体;③受体(受精卵)的获得;④外源基因(目的基因)的导入;⑤转基因胚胎的培育;⑥转基因鱼的筛选与鉴定;⑦转基因鱼的养殖;⑧转基因鱼的遗传分析。

2.2 外源基因的结构

转移到受体鱼中的外源基因,其结构至少应包括三个部分:①启动子(Promoter);②编码顺序(Coding sequences);③转录终止信号(Transcriptional termination signal)。在这三部分中,转录终止信号对转基因的影响非常小,到目前为止,还没有任何文献报道其在转基因研究中的重要性[薛良义等,1995]。

启动子是调节基因的一种。选择适当的启动子是保证外源基因在转基因鱼中成功表达的重要因素。在转基因鱼中,成功的启动子应当指导外源基因在适当的时间和特定的组织中进行表达,且表达的量要达到一定程度。在转基因研究早期,使用的启动子大多为小鼠金属硫蛋白(mMT)或病毒如猿猴空泡病毒(SV₄₀)和人呼吸道合胞病毒(RSV)等,这些启动子的缺点是表达效率低,以及对其安全性的忧虑。为了使转基因鱼能安全食用,转移的外源基因不应当含有病DNA顺序或有潜在危害的DNA顺序,如金属硫蛋白等。因此,有些学者已经着手克隆鱼类自身的高效启动子,如美洲大鲮鱼(*Macrozoarces americanus*)抗冻蛋白基因的启动子(opAFP)[Du等,1992]。

编码顺序是指编码特定蛋白质的核苷酸顺序,它能使转基因鱼产生新的表现型。由于鱼类是人类的主要蛋白质来源之一,用基因转移技术获得生长快、产量高的“超级鱼”对人们具有极大的诱惑力。因此,对鱼类基因转移的研究,也是从生长激素(GH)基因开始的。首例报道的转基因鱼是人生长激素(hGH)基因,启动子是mMT[Zhu等,1985]。此后,有关这方面的报道不断增加[许克圣等,1991;邹钧等,1991;魏彦章等,1992;吴婷婷等,1994]。另外,也有使用牛

生长激素(bGH)和羊生长激素(oGH)基因的[魏彦章等,1990;孙孝文等,1995]。但从安全性和人们的心理承受能力角度考虑,国内外学者一致强调构建“全鱼基因”(All fish gene)的重要性与迫切性,而且从促进鱼类生长的效果来看,鱼类生长激素的效应是哺乳类的10—100倍[高桥明义等,1987年汉译文],因此更应该考虑使用鱼类自身的生长激素基因。为此,国内外很多实验室对鱼类生长激素基因进行了克隆,仅国内就有鲤和草鱼[朱作言等,1990],大麻哈鱼[杨学成等,1991_a],虹鳟[杨学成等,1991_b]以及大鳞大麻哈鱼[宋诗铎等,1992]等的GH基因。

继生长激素基因之后,抗冻蛋白(AFP)基因转移已成为鱼类基因转移研究的第二个热点[丘黎明等,1993]。其目的是通过转移抗冻蛋白基因以提高某些鱼类如罗非鱼、鲮和大西洋鲑等的抗寒能力,从而可以扩大这些鱼类的养殖地域以及节省越冬期间的能量消耗。目前已从美洲拟鲮(*Pseudopleuronectes americanus*)[杨志兴等,1991、1992]、黄盖鲮(*Pseudopleuronectes yokohamae*)[蒋耀青等,1989]和瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)[费云标等,1992_{a,b}]分离并克隆了AFP基因。另外,费云标等[1993]将纽芬兰大洋条鲮AFP基因,用常规微量注射法注入金鱼受精卵内,获得转抗冻蛋白基因金鱼。但从目前的研究来看,转基因鱼中AFP的量还不足以产生抗冻的效果,因此在今后的研究中要提高启动子的增强效应,或者增加基因剂量。

除了生长激素基因和抗冻基因之外,还有其它一些基因引起了人们的注意,如珠蛋白(Globin)和生长激素释放因子(GHRF)基因等。日本青木宙已克隆了鲤珠蛋白基因,并正在将该基因向虹鳟转移;以期虹鳟与鲤鱼一样,能耐低溶氧,这样不仅能在山泉流水养殖,而且也能在静水池塘中养殖[尾城隆,1990]。另外,增强抗逆性的基因,为抗病和抗污染基因等也是转基因鱼研究的方向之一,但目前人们对这些基因的了解还很少。我们实验室曾对具有广谱性的抗病毒的干扰素(Interferon)基因进行过初步研究,检测到了与人干扰素基因同源的片段,并在此基础上,又进一步将此片段在大肠杆菌中进行了无性繁殖[Zhang等,1994]。

2.3 外源基因的导入

2.3.1 显微注射法

在转基因鱼的构建过程中,基因的导入是关键技术。自1985年基因鱼在我国首次报道以来,科学工作者已将许多外源基因导入的方法应用于转基因鱼研究,其中最广泛使用的是显微注射法(Microinjection),即在显微镜下,借助于显微操作器,将极细的玻璃微针(直径约 μm)直接插入受精卵的原核或动物极的细胞质中,注入一定量的特定外源基因。注射后的受精卵,于室温下在生理盐溶液中发育至心跳期,然后转入水中完成其胚胎发育。

受精卵在作显微注射前,通常应对卵壳进行处理。对于淡水鲤科和鳅科鱼类来说,由于卵壳较软,可用0.25%胰蛋白酶消化去除卵壳,或用镊子剥除。但孙孝文等[1993]对对鲤鲫受精卵未加任何去膜处理直接注射也取得良好效果。对于一些冷水性鲑鳟鱼类来说,用胰蛋白酶消化无法去除卵壳,可用三种变通的显微注射法:一是从多精孔将外源基因注入卵中,二是卵子刚受精卵壳尚未变硬时直接注射,三是先用硬金属针在卵壳上打一个孔,再进行显微注射[魏彦章等,1992]。在鲑科鱼类转基因研究中,还可用Ringer氏液或0.1mM谷胱甘肽溶液(pH为8.0)处理受精卵,以防止卵壳硬化[昌永华等,1996]。

受精卵发育到何时注射外源基因能获得高成活率和整合率一直是人们所关心的问题。据梁利群等[1996]报道,认为外源基因导入鲤受精卵的最佳时期应选在单细胞期。但考虑到鲤受精卵发育较快,仅在单细胞期注射时间太短,因此建议:①受精卵可放在14—15℃的条件下推

迟卵的发育速度,以延长注射时间;②把未受精的精卵保持在低温下,分期分批少量受精,这样可以一次取精卵而多次使用。

另外,在转基因鱼的研究中,由于受精卵的雌性原核难以在显微镜下观察到,因此一般的做法都是将外源基因注射到受精卵的细胞质中。外源基因整合率的高低与基因注射的位置以及受精卵合子核的远近有关。外源基因必须整合到细胞核内的染色体上才能获得转基因鱼,所以这种细胞质内转移的外源基因的整合率较低。Ozato等[1986]将外源基因首先注射到青鳉(*Oryzias latipes*)V期卵母细胞的核(胚泡)中,然后使这种注射了外源基因的卵母细胞在体外条件下成熟、受精,从而获得了转基因鱼。由这种方法获得的转基因鱼,其整合率较细胞质内注射要高。因此,许多学者认为,这种核内的基因转移显然是鱼类基因转移的最佳途径。但是,这种方法的运用依赖于鱼类卵母细胞体外成熟技术的建立。至今卵母细胞能够在体外条件下完全成熟的鱼类只有三种,即金鱼、斑马鱼(*Brachydanio rerio*)和青鳉(*Oryzias latipes*)。在国内,中国科学院发育生物研究所和海洋研究所正在开展这方面的研究[李书鸿,1994]。

影响基因显微注射成功的主要因素是外源DNA的浓度(一般为 $1\text{ng}/\mu\text{l}$)、外源DNA的结构(线型分子的整合率比环状分子的高出5倍)、注射位点(雄性原核>雌性原核>细胞质)以及动物品系(杂种动物的受精卵最佳)。

2.3.2 电穿孔法

电穿孔法(Electroporation)即电脉冲法。该法的基本原理是利用外部高电压短脉冲使细胞膜的结构改变,使之产生可逆的孔隙或孔洞,一定大小的分子包括DNA即可通过孔隙或孔洞进入细胞。电穿孔法已在微生物、哺乳动物和植物原生质体基因转移中得到广泛应用,现在又开始用于鱼类基因转移。谢岳峰等[1989]以泥鳅脱膜受精卵为材料,电穿孔转移外源基因,获得了10%的转基因泥鳅。Zhao等[1993]证实电穿孔导入的生长激素基因不仅被表达,影响表型,而且其性状也能遗传给后代。

电穿孔法的优点是操作简便,一次可处理大批受精卵。缺点是外源基因的导入是随机的,且转移的频率较低。然而,新近的资料表明,该方法所获得的转基因鱼的存活率及外源基因的整合率均可达到显微注射法的水平[Chen,1994]。

2.3.3 精子载体法

该法又叫精子介导基因转移(Sperm-mediated gene transfer)。以精子为载体介导外源基因进入卵内的技术,首先是由意大利学者Lavitrano等[1989]在研究转基因小鼠时报道的。由于用这种方法构建转基因动物省去了显微注射的复杂过程和设备,简化了基因导入过程。因此,引起了人们的极大兴趣。有不少实验室开展了这方面的研究,但其后却很少再见到成功的报道,于是人们对这一技术产生了怀疑。究其原因,其中最主要的限制因素是难以高效地将外源基因导入到精子细胞中。最近,精子载体研究上出现了新的突破。1992和1993年,德国慕尼黑大学的Rottmann和加拿大圭尔夫大学的Squires等先后报道了经脂质体(Liposome)处理的DNA可以有效地导入精子细胞内[章岩,1995]。Khoo等[1992]用经环状或线性化质粒PUSVCAT温育的斑马鱼精子,使成熟的斑马鱼卵受精,分别获得23.33%和37.5%的转基因鱼,并获得了转基因 F_1 和 F_2 。

我国学者应用这种方法也获得了阳性个体。沈孝宙[1989]用鲤鱼精子作载体,成功地将人的生长激素基因导入成熟的鱼卵,受精后孵出数千尾幼鱼。经放射免疫检测,50%以上为明显表达出人生长激素的转基因鱼,且幼鱼的生长速度是无表达幼鱼的两倍多;李国华等[1996]用

精子作为载体而获得的转基因鱼,阳性率为25—80%;李晶等[1994]以精子为载体,将美洲拟鲮抗冻蛋白基因导入罗非鱼卵中,获得了18.1%的整合率;于建康等[1994]曾报道,用该法将美洲大绵鳊的抗冻蛋白基因成功地转移到金鱼卵子,阳性率为26%。

另外,刘汉勤等[1991]利用显微注射和精子载体的方法,将鲫鱼肝总DNA转移到红鲤受精卵,利用鲫鱼和红鲤在孵化前后色素表达的差异来筛选转基因个体。此法无须克隆目的基因及DNA重组操作,而且筛选简便,目的在于探讨总DNA转移方法应用于鱼类品种改良的可能性。目前在鱼类基因转移研究中,由于目的基因缺乏,使克隆基因转换技术在鱼类品种改育的研究受到限制。鱼类的许多性状都是由多基因控制的,采用总DNA转移的方法可能同时转移多个基因,因此对鱼类抗逆性新品种的培育具有重要意义。

精子介导外源基因进入卵内可能有如下两种机理:①当外源基因与精子一起保温时,外源基因进入精子内。通过受精作用将外源基因导入卵内;②外源基因与精子保温时,它粘附在精子表面,通过受精作用将外源基因带入卵内。目前,对其详细机理还有待进一步研究。

2.3.4 基因枪法

该法又叫高速钨微粒子轰击法或粒子枪法(Particle gun)。基因枪法是利用DNA包裹在钨微粒子上面,通过高速轰击受体细胞以达到把外源DNA转移的目的。该法在植物细胞中使用得较多,鱼类也有成功的报道。例如Zelenin等[1990]用含一半乳糖苷酶和新霉素磷酸转移酶基因序列的质粒DNA包裹钨微粒子,高速轰击欧洲泥鳅(*Misgurnus fossilis*)、虹鳟和斑马鱼受精卵,有70%的卵受轰击后存活。PCR扩增和Southern杂交结果,在G418处理后存活的斑马鱼总DNA中检测到了新霉素磷酸转移酶基因序列。国内还没有这方面的报道。

在鱼类基因转移中,还有几种其它的方法,如染色体介导法、脂质体融合法和激光处理法等,但都还没有成功的报道。

3 我国转基因鱼研究的现状、存在问题和对策

3.1 现状

鱼类是人们的主要蛋白质来源之一,但目前全世界的水产品产量尚不能满足人们的这种需要,特别象中国那样的发展中国家,其需求量就更大。因此,应用基因转移技术生产高产、优质和抗逆的鱼类新品种,将是解决这一问题的一条非常有希望的途径。

前已叙及,转基因鱼是目前国内最早成功的一种转基因动物。早在1985年,中国科学院水生生物研究所朱作言等就率先在世界上获得转基因鲫,并初步证明了外源基因在50日龄受体鱼基因组内的整合作用[Zhu等,1985]。接着他们又进行显微注射人生长激素基因到泥鳅受精卵后的生物学效应的研究。DNA分子杂交的结果,在受体泥鳅卵发育过程中,外源基因的行为基本上与受体鲫鱼卵中的行为一致[朱作言等,1986]。此外,在对鲤、团头鲂和鲢的试验也获得相似结果。这说明,某些高等脊椎动物的生长激素具有加快鱼类生长的生物学效应。后来,他们通过对外源基因的转移、整合、表达和生物学效应直到外源基因的遗传等方面的研究,建立了一个完整的转基因鱼模型[朱作言等,1989]。转基因鱼模型的建立为鱼类基因工程定向育种新技术奠定了实验基础。

由于鱼类分子生物学研究水平较哺乳类分子生物学研究水平低,因此在转基因鱼研究初期多采用人及牛、羊等的基因为基因转移的元件,即将人或哺乳类的GH基因拼接到mMT启

动子上,然后用注射法、电穿孔法和精子载体法导入金鱼、鲫、鲤、泥鳅和团头鲂的受精卵内而构建了多种转基因鱼[薛良义等,1995]。但从实际应用的角度出发,用转移 MT-hGH 基因的方法进行经济鱼类育种是欠妥的,把含有人生长激素的鱼商品化,势必会增加一般消费者的心理负担。为此,从90年代初起,我国学者开始构建全部基因元件来自鱼类自身的“全鱼转基因鱼”,如中国科学院水生生物研究所用鲤的肌动蛋白(Actin)启动子和草鱼的生长激素基因[Zhu,1992]以及水科院黑龙江水产研究所用鲤的 MT 启动子和大麻哈鱼生长激素基因[孙孝文等,1993_b]构建的全鱼转基因鲤,并已从实验室研究进入中试阶段,可望不久推向市场。

另外,在基因转移的方法和效率、外源基因定点整合、表达调控以及转基因鱼的检测技术等基础理论研究方面也取得了长足的进展。

3.2 存在问题

虽然自1985年以来,转基因鱼的研究已取得了重要的进展,但这一技术尚存在许多问题。因而,在近期内还难以形成高效、不污染环境且可安全食用的转基因鱼产业[蒋耀青,1993;中国农业科学院文献信息中心等,1995]。

3.2.1 成本高、效率低

基因转移不仅要配置基因工程所必须的实验装置,以进行体外目的基因的分离、纯化和重组,一般研究单位和生产单位不具备这种条件。而且,目前转基因效率还不高。根据现有资料,外源基因在鱼类基因组内的整合率仅为0—50%,一般为20%左右,较低的在10%以下。另外,研究发现外源基因与受体整合后并不能稳定遗传,而很容易从受体基因组中消失。

3.2.2 外源基因在转基因鱼体内的表达不理想

已经成功整合的基因,其表达率很低。如转抗冻蛋白基因鲑鱼虽已获得子二代,但表达的抗冻蛋白水平仅0.07—20ng/ml,为提供足够的抗冻保护所需含量的1%。

3.2.3 转移基因所带来的突变和机体机能紊乱

由于转移基因整合的随机性,所转移的基因很可能被整合到含有非常重要基因所有区域内,从而引起插入突变。如果产生突变的基因在发育过程中非常重要,将会引起遗传性缺陷产生的先天性疾病,甚至死亡。据估计插入突变率为10—20%。

3.2.4 转基因鱼的管理及可食性问题

转基因鱼因导入外源基因,增加该物种基因库中基因的数量,是否会加快物种的进化以及对人类有何影响,目前还很难下结论。因此,在转基因动物群体的管理方面应严格圈养,这对于转基因鱼来说恐怕是最值得注意的。另外,关于转基因鱼的可食性问题也值得深入研究。

综上所述,表明转基因鱼研究的复杂性要远远超过我们所想象的程度。虽然国内外对此进行了十多年的研究,但迄今并未能真正获得通过转基因技术改良的鱼类品种。

3.3 对策

尽管转基因技术存在这样那样的问题,但它毕竟为现代鱼类育种研究提供了崭新的手段。要使这一技术在鱼类育种中付诸实用,尽快建立转基因鱼品系,需要在下列六个方面有重大突破[吕永华等,1996]:①建立高效、批量的基因转移技术。②建立转基因鱼的快速检测技术。③建立将外源基因定点整合入鱼类基因组的方法。上述显微注射法、电穿孔法和精子载体法都不能进行定点整合,而这正是外源基因不能稳定遗传的原因。④确定驱动外源基因表达的合适启动子。⑤确定能使转基因个体生产性能达到最大值的生理、营养、免疫及环境因子。⑥评定转基因鱼对人类健康及环境的影响。

从总体上看,我国鱼类基因转移技术已达到世界先进水平。但与国外相比,在基础研究和开发应用方面还有一定差距。为迅速改变这种局面,今后应加大基础研究的力度,重点研究两个“热点”基因的转移,一是鱼类生长激素基因;二是鱼类抗冻蛋白基因。重点解决两个“瓶颈”技术,一是实现有效的定点整合;二是提高整合效率。另外,在加强基础研究的同时,还要加快开发研究的步伐,使鱼类基因转移技术尽快转化为生产力,让我们这个最早获得转基因鱼的国家成为最早实现转基因鱼商品化的国家之一。

参 考 文 献

- [1] 于建康等,1994.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,40(1):96-99.
- [2] 中国农业科学院文献信息中心等,1995.转基因动物育种(7).转基因动物通讯,2(9):2.
- [3] 丘黎明等,1993.转基因鱼的研究策略.生物工程进展,14(3):35-41.
- [4] 刘汉勤等,1991.总 DNA 介导鱼类基因转移的初步研究.水生生物学报,15(3):286-288.
- [5] 朱作言等,1986.人生长激素基因在泥鳅受精卵显微注射转移后的生物学效应.科学通报,31(5):387-389.
- [6] ——,1989.转基因鱼模型的建立.中国科学(B辑), (2):147-155.
- [7] ——,1990.鲤鱼和草鱼基因文库的构建及其生长激素和肌动蛋白基因的筛选.水生生物学报,14(2):176-178.
- [8] 许克圣等,1991.转移人生长激素基因和注射人生长激素对促进银鲫生长的研究.水生生物学报,15(2):103-109.
- [9] 孙孝文等,1993.用直接注射法生产转基因鱼.生物技术,3(3):12-14.
- [10] ——,1993.全鱼基因工程鱼的构建.高技术通讯,3(9):23-26.
- [11] ——,1995.转牛(羊)生长激素基因工程鲤鱼的研究.中国水产科学,2(2):23-33.
- [12] 吴婷婷等,1994.人生长激素基因在团头鲂和鲤中的整合和表达.水产学报, 18(4):284-289.
- [13] 宋诗铎等,1992.鲑鱼生长激素 cDNA 的分子克隆和序列分析.遗传学报,19(4):308-315.
- [14] 沈孝宙,1989.转基因动物的研究及其发展.北京实验动物科学,(6):6-9.
- [15] 李 晶等,1994.精子做载体的转基因鱼研究.生物技术,4(3):20-22.
- [16] 李书鸿,1994.一种鱼类基因转移新技术.转基因动物通讯,1(1):3.
- [17] 李国华等,1996.鱼类精子携带的外源基因导入.水生生物学报,20(3):242-247.
- [18] 杨学成等,1991.大麻哈鱼基因文库的构建及其生长激素基因的克隆.生物技术1(1):13-16.
- [19] ——,1991.虹鳟鱼(*Salmo gairdner*)基因文库的构建及生长激素基因的克隆和亚克隆.生物技术,1(6):10-14.
- [20] 杨志兴等,1991.美洲鱈抗冻蛋白基因的克隆及在 *E. coli* 中的表达.生物技术,1(4):11-16.
- [21] ——,1992.美洲拟鱈抗冻蛋白基因在 *E. coli* 中表达的研究.遗传,14(1):12-15.
- [22] 邹 钧等,1991.外源基因在鲫鱼胚胎发育过程中的表达.水生生物学报,15(4):372-374.
- [23] 吕永华等,1996.鱼类基因分子生物学及转基因鱼研究进展.中国水产科学,3(1):112-128.
- [24] 费云标等,1992.淡水瓦氏雅罗鱼基因文库的构建和抗冻蛋白基因同源序列的筛选.生物工程学报,8(2):192-196.
- [25] ——,1992.抗冻蛋白基因结构与基因工程.生物工程进展,12(3):33-36.
- [26] ——,1993.转抗冻蛋白基因鱼的研究.生物工程学报,9(4):387-388.
- [27] 高桥明义等(罗德珍译),1987.鲑鱼的生长激素和促生长作用.国外水产,(2):24-26.
- [28] 梁利群等,1996.外源基因导入鲤(*Cyprinus carpio*)受精卵最佳时期的研究.中国水产科学,3(1):11-15.
- [29] 章 岩,1995.精子载体.转基因动物通讯,2(4):2.
- [30] 蒋耀青,1993.转基因鱼研究中的若干问题.遗传,15(3):40-43.
- [31] 蒋耀青等,1989.黄盖鲮抗冻蛋白的分离与 cDNA 克隆.遗传,11(6):33.
- [32] 谢岳峰等,1989.泥鳅受精卵的电脉冲基因转移.水生生物学报,13(4):387-389.
- [33] 薛良义等,1995.转基因鱼研究概况.浙江水产学院学报,14(2):123-132.
- [34] 魏彦章等,1990.牛生长激素基因向“缩骨鲫”受精卵转移的初步研究.水产科技情报,17(4):100-103.
- [35] ——,1992.鱼类基因工程研究的现状和展望.水生生物学报,16(1):71-78.
- [36] ——,1992.人生长激素基因在转基因鲤鱼体内的遗传.生物工程学报,8(2):140-144.

- [37] 尾城隆, 1990. 遺傳子導入によるマス類の品種改良. 養殖, (1):113-117.
- [38] Chen, T., 1944. Making transgenic fish. *Biotechnology*, 12(4):249.
- [39] Du, S. J. *et al.*, 1992. Development of an "all fish" gene cassette for gene transfer in aquaculture. *Mol. Marine Biol. Biotech.*, (1):290-300.
- [40] Khoo, H. W. *et al.*, 1992. Sperm cell as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. *Aquaculture*, 107(1):1-19.
- [41] Lavitrano, M. *et al.*, 1989. Sperm cell as vectors for introducing foreign DNA into eggs; Genetic transformation of mice. *Cell*, 57:717-723.
- [42] Ozato, K. *et al.*, 1986. Production of transgenic fish: Introduction and expression of chicken δ -crystallin gene in medak embryos. *Cell Differ.*, 19:237-244.
- [43] Palmiter, R. D. *et al.*, 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 300:611-615.
- [44] Zelenin, A. V. *et al.*, 1990. The delivery of foreign genes into fertilized fish eggs using high velocity microprojectiles. *FEBS LETT.*, 287(1-2):118-124.
- [45] Zhang, Y. P. *et al.*, 1994. A preliminary study on fish interferon system. *J. of Shanghai Fisheries University*, 3(1-2):57-62.
- [46] Zhao, X. *et al.*, 1993. Application of Baekonization: A new approach to produce transgenic fish. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 2(1):63-69.
- [47] Zhu, Z. Y. 1992. Growth hormone gene and the transgenic fish. *Agricultural Biotechnology*, 106-116. China Science and Technology Press, Beijing.
- [48] Zhu, Z. Y. *et al.*, 1985. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus*). *Z. Angew Ichthyol.*, 1:31-34.

J OF SFU. Vol. 5, Nos. 1-4, 1996

勘 误 表

期	页	行/表	误	正
1	封二	12	亚西港	亚丁港
	1	5	病源体	病原体
	5	6	病源体	病原体
	7	10	1995届	1991届
	44	23	(wintrobe tube)……[shi 等, 1988]	(Wintrobe tube)……[Shi 等, 1988]
2	105	倒6	259(14)9241-9247.	259(14):9241-9247.
	137	7	A cademic Press	Academic Press
4	241	13	Forms and supplemental conlents	Forms and supplemental contents
	242	表2	…Allogynogenetio oruoian carp	…Allogynogenetic crucian carp
		表3	…Allogynogenetio erucian carp	…Allogynogenetic crucian carp
	294	2	…FDUCATION	…EDUCATION
本卷	封四	倒10	JSHU	JSFU