鱼类性腺发育调控的生物技术应用前景分析

胡 炜 汪亚平 朱作言*

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072. * 联系人, E-mail: zyzhu@ihb.ac.cn)

摘要 性腺是脊椎动物精卵发生的场所, 是生命繁衍的关键器官. 本文评述了通过调控特定基因表达与鱼类性腺发育, 培育性腺发育被完全抑制的转反义 GnRH 基因鲤鱼、特异剔除鱼类性腺中的转植基因以及在鱼类性腺中特异表达外源基因的研究进展, 认为鱼类性腺有望发展成为一种实施生物技术操纵的新型载体, 并探讨了鱼类性腺发育调控在转基因鱼的遗传生态安全对策研究以及新型生物反应器的研制等方面的应用前景.

关键词 鱼 转基因 性腺

鱼类具有怀卵量大、受精及胚胎发育过程在体外完成、易于遗传操作等特点, 是研究基因表达、调控与基因功能以及进行遗传改良育种的理想材料. 自 1984 年世界上第一批转基因鱼问世以来[1], 以提供优质食品蛋白来源为目的, 具有生长速度快、饵料转化效率高、改善中间代谢、增强抵抗疾病能力等优良性状的遗传修饰改良的鱼类养殖品种被成功研制[2~6], 但迄今尚无一例公认的作为食品的商品化转基因鱼实例, 其原因在于对转基因鱼的遗传生态安全的担忧上. 建立转基因鱼的遗传生态安全控制技术, 已成为目前转基因鱼研究领域亟待解决的问题之一.

转基因鱼不仅可以作为潜在的重要食品蛋白来源, 而且亦可能提供重要医药蛋白来源, 成为新型的生物反应器. 鱼类作为生物反应器的研制已经受到研究者的关注, 国际上已经提出转基因鱼生物反应器的概念[3,7], 英国、日本等在转基因鱼生物反应器研制方面已经开始了初步的工作, 以期通过转基因鱼生产人源蛋白, 用于医疗[8,9]. 然而, 这些尝试存在诸多不足之处, 转基因鱼生物反应器的研发迫切需要新的研究思路启迪.

性腺是脊椎动物精卵发生的场所, 是生命繁衍的关键器官. 通过调控特定基因表达与鱼类性腺发育, 本实验室研制成功了性腺发育被完全抑制的转基因鱼, 同时, 初步建立了外源基因在鱼类性腺中特异剔除的方法, 有望为转基因鱼的遗传生态安全控制策略提供一个具有普遍意义的模型; 而且提出并证实了研制鱼类精巢生物反应器的可行性, 为今后建立新型、多用途、高效的鱼类精巢分泌型生物反应器奠定了基础.

1 快速生长转基因鱼及其生物安全性

1984 年, 中国科学院水生生物研究所在世界上率先开展了鱼类基因工程定向育种研究, 建立了完整的转基因鱼理论模型和完善的实验技术体系[1,10]. 在此基础上, 快速生长转“全鱼”生长激素基因鲤鱼的研究取得重要进展, 规模化养殖实验显示, 转基因鲤鱼子代群体平均体重比对照鱼增重快 42%, 饵料利用效率提高 18.5%, 池塘养殖综合经济效益提高 125.7%[11,12]. 与此同时, 欧、美等国在快速生长转基因虹鳟、大西洋鲑和罗非鱼等研究方面亦取得重要进展, 规模化养殖实验也在进行中, 但迄今尚无转基因鱼商品化实例[3].

诚然, 作为一种定向遗传改良的生物体, 转基因鱼的生物安全性受到了全社会的普遍关注. 转基因鱼的生物安全性包括作为食物的消费安全、释放的遗传安全和生态安全. 目前的转基因鱼研究均采用鱼类来源甚至自身的基因元件, 极大地消除了转基因鱼的食品安全隐患; 而且转“全鱼”基因鲤鱼的食品安全性检测结果也表明, 摄食转基因鱼对小鼠的生长、发育和生殖等均无显著影响[13]. 因此, 遗传生态安全及其控制技术已成为转基因鱼研究亟待解决的问题, 是转基因鱼实现产业化的前提.

目前对转基因鱼可能的遗传生态安全问题的担心主要集中在以下 2 方面: (i) 由于鱼的繁殖潜力强, 转基因鱼可能通过有性交配方式, 使转植基因漂移至土著群或近缘物种, 造成野生基因库污染; (ii) 转基因鱼的获得性状可能使其具有生存和竞争优势, 进而形成优势种群, 改变鱼类群落结构, 甚至影响生物多样性和导致水生态系统失衡.

迄今尚无完善的方法来评价转基因鱼对生态环境和生物多样性的可能影响和潜在威胁. 通过建立不同的模型, 有学者藉此评价转基因鱼释放后可能带来的生态安全问题[14~16]. 1999 年, Muir和Howard[15]提出了评价转基因鱼生态安全的"特洛伊基因假说(Trojan gene hypothesis)". 该假说认为, 转基因鱼后代的成活率低于野生种群, 而转基因雄鱼因相对大的个体优势具有更高的婚配成功率. 因此, 转基因鱼的释放将导致野生型种群的灭绝. 该模型提出后, 引起了学术界对转基因鱼生态安全问题的高度关注和争论[17]. 但是, 在实际情况中, 许多鱼类较大个体的雄鱼并不总是占有婚配优势[18], 因此, 该模型的前提假设可能在实际情况中并不成立, 有学者因此对该假说提出了质疑, Maclean等人[3]认为, 通过该模型获得的转基因鱼生态安全的推论, 不能适用于养殖鱼类中快速生长转基因鱼的生态安全评价.

从前述分析不难看出, 转基因鱼遗传生态安全的核心与其繁殖特性密切相关, 因此, 如果研制不育的转基因鱼, 则不仅可以控制转植基因的遗传漂移, 而且可以防止逃逸到自然水体中的转基因鱼形成优势种群, 对水生态系统产生不利影响, 从而从根本上解决转基因鱼的遗传生态安全问题. 目前, 美国等采用人工诱导三倍体方法研制不育的转基因三倍体虹鳟和罗非鱼, 但该技术一方面受人工诱导效率的限制, 另一方面, 人工诱导的不育的转基因三倍体鱼通常付出生长速度降低的代价[19,20]. 本实验室则与湖南师范大学刘筠院士实验室合作, 采用倍间杂交方法, 成功研制出不育的转基因三倍体鱼, 而且保持了转基因鱼的快速生长及饵料转化效率高等优良特性. 但必须指出的是, 四倍体鱼的获得极其困难, Liu等人[21,22]采用常规的杂交方法获得的两性可育异源四倍体鲫鲤, 在我国乃至世界上都是首次成功报道获得稳定性状的四倍体种群. 在实际的养殖鱼类品种中, 人工诱导多倍体成功的报道并不多见. 因此, 采用倍间杂交方式研制不育转基因三倍体鱼只是转基因鱼的遗传生态安全控制策略的一个特例, 在应用上不具备普遍意义.

2 性腺发育的反义转基因控制技术

性腺发育的反义转基因控制技术由两部分组成, 首先通过反义转基因技术研制转基因鱼, 阻遏与鱼类性腺发育或性成熟相关基因的表达, 进而抑制其性腺发育; 在此基础上, 恢复不育的转基因鱼的生理育性, 以最终获得遗传生态安全的育性可控的转基因鱼.

促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)是脊椎动物脑组织中一个保守的神经十肽家族, 在硬骨鱼类, 下丘脑合成的GnRH直接通过神经轴突末梢作用于垂体前叶的促性腺激素细胞, 与其膜上分布的受体结合后刺激垂体合成和释放GtH, 进而激活性类固醇激素的生成和调节性腺发育及最后的性成熟, 同时性类固醇激素对脑和垂体激素的合成和释放有反馈调节作用[23]. Mason等人[24~26]发现, 性腺发育处于幼稚状态而导致完全不育的小鼠(hypogonadal mouse, *hpg* mouse)是由于GnRH基因的部分缺失突变引起, 而通过导入完整GnRH基因及埋植雄激素的方式都能使*hpg*小鼠正常繁殖后代, 表明GnRH是小鼠性腺发育非常重要的因子. 反义转基因技术建立在反义RNA技术的基础上, 通过反向插入到启动子下游的DNA片段, 转录产生与靶基因mRNA互补的反义RNA, 互补形成的双链RNA被内源性核酸酶特异切割, 从而阻抑特定靶基因的正常表达. 反义转基因技术已在植物的种质改良、抗逆、雄性不育等基因工程育种研究中得到了广泛应用. 其中, 具有延熟保鲜特性的转基因番茄的培育是其最经典的成功范例[27]. 由此可见, 如果采用反义转基因技术导入反义重组基因, 以抑制脊椎动物性腺发育的重要相关基因——GnRH基因的有效表达, 则可能阻抑转基因鱼的性腺发育, 进而阻抑其生殖功能.

2000 年, Uzbekova等人[28]报道, 以大西洋鲑sGnRH基因启动子为调控顺序, 以虹鳟sGnRH基因部分编码区序列为靶位, 构建反义RNA表达载体Pas-sGnRH-antisense, 进而研制转反义基因鱼, 试图通过抑制内源sGnRH基因的表达来控制转基因鱼的性腺发育, 但结果发现, 转基因虹鳟杂交后代的性腺发育和性成熟并没有产生预期的抑制效应, 失败原因在于其构建的反义靶位载体不当. 本实验室研究发现, 鲤科鱼类GnRH前体存在多基因编码现象, 并从鲤鱼脑组织中克隆得到两种促性腺激素释放激素基因(salmon GnRH, sGnRH和chicken type-Ⅱ GnRH, cGnRH-Ⅱ)及其cDNA[29,30]. 在此基础上, 分别研究了sGnRH和cGnRH-Ⅱ两种不同基因在鲤鱼幼鱼期、性成熟期和排卵后的脑组织、性腺和垂体中的表达模式, 认为在鲤鱼下丘脑特异高水平表达的

sGnRH基因是对鲤科鱼类下丘脑-垂体-性腺轴发挥作用的关键信息分子，由此确定了反义抑制鱼类性腺发育的靶向位点，依此精心构建了泛组织表达的强启动子(鲤鱼β-actin基因启动子)驱动的反义sGnRH mRNA表达载体 —— pCAsGnRHc-antisense，显微注射法制备转基因鱼，对转基因鱼P0 代群体中转基因鱼的繁殖生物学功能分析、血清中促性腺激素(gonadotropin hormone, GtH)含量检测、目的基因表达水平测定及性腺的组织学观察等研究发现，性腺发育被完全抑制即性腺完全不发育的转基因鱼比例约为 30%[31]. 研究结果表明，采用反义转基因技术，在鲤鱼脑水平抑制GnRH基因的表达，可以获得性腺败育的转基因鱼. 为下一步通过基因治疗或补充外源性激素的方式恢复性腺败育的转基因鱼的生理育性，从而获得遗传上是不育的，但生理上是可育的转基因鱼新品系，为解决转基因鱼的遗传生态安全提供一个具有普遍意义的模型奠定了基础.

3 性腺特异性的两性互补外源基因剔除技术

性腺特异性的两性互补外源基因剔除技术指将外源基因从转基因鱼生殖细胞中特异剔除，从而使转基因鱼产生的子代中不含转植基因的技术. 该技术由 T7 RNA 聚合酶/启动子系统和 Cre/LoxP 系统 2 个核心元件，以及 1 个在鱼类精巢特异表达的启动子 —— 鱼精蛋白启动子组成.

T7RNA聚合酶是T7 噬菌体*gene1* 编码的一条单链酶，能特异、严格地识别T7 启动子，高效转录mRNA[32]. T7 噬菌体共有 17 种启动子，但最常用的是强启动子Φ10[33]. 利用T7 RNA聚合酶/启动子的特性，Studier等人[34]先后建立了高效的原核表达系统 —— T7 RNA聚合酶/启动子系统. 此后，在真核生物中，T7 启动子作为一个受T7 RNA聚合酶控制的诱导型启动子而被加以广泛应用[35,36].

Cre/LoxP是来源于P1 噬菌体的一个位点特异性重组体系，由Cre重组酶及识别序列LoxP位点组成. LoxP位点是一种典型的回文序列结构，包括两端各 13 bp的反向重复序列与位于其中间的 8 bp非对称的核心序列: 5′-ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT-3′. 其中，非对称的 8 bp间隔区决定着LoxP的方向；位点特异性重组酶Cre由 343 个氨基酸残基组成，识别并催化LoxP位点之间的重组：或者剪切掉两个同向Loxp位点间的片段，或者将两个反向Loxp位点间的序列倒置[37]. 根据Cre/LoxP系统的特点，如果将转植基因置于两个同向排列的LoxP位点间，当转植基因整合后，通过诱导共转移的Cre酶表达或注射外源Cre酶，则可促使两个LoxP位点间外源基因被剔除. Cre/LoxP系统剔除转基因个体中的外源基因最先在植物中实现突破，Cre酶受组织特异性和/或诱导型表达的启动子控制，并与其他外源基因片段一并置于两个同向的Loxp位点间，通过化学诱导，从而实现特定组织中外源基因的自剔除[38~40]. 外源基因被自剔除消除了转基因生物的遗传生态安全隐患，但由于生殖细胞中剔除了外源基因，导致转基因个体获得的优良性状无法通过有性繁殖再传递给下一代.

为克服上述不足，本实验室提出了建立性腺特异性的两性互补外源基因剔除系统的新思路，并利用转基因斑马鱼成功进行了尝试. 其基本原理是，结合Cre/Loxp系统和T7 RNA聚合酶系统的特性，将诱导物和受诱导的启动子相分离，分别培育出在鱼类性腺特异表达的鱼精蛋白启动子控制下，表达T7 RNA聚合酶的一个转基因斑马鱼品系，以及在T7 启动子控制下，表达Cre蛋白酶的另一个转基因斑马鱼品系，两个构建体中外源基因部件全部置于LoxP之间，外源基因分别以RFP和GFP作为报告基因. 当上述转基因斑马鱼系相互杂交时，在鱼精蛋白启动子的作用下，T7 RNA聚合酶在杂交子代性腺中特异表达，并因此诱导T7 启动子工作，驱动Cre酶基因表达，随后介导杂交后代性腺中位于LoxP位点间的所有外源基因被剔除[41]. 该系统摒弃了单系自剔除不能控制亲本中转植基因遗传的弊端，转植基因的优良性状可通过维持两个不同品系而保持，杂交后代因其性腺中的转植基因被特异剔除而无遗传生态安全之虞.

4 鱼类性腺分泌型生物反应器初步探索

经 10 多年的发展，以乳腺生物反应器为代表的转基因动物生物反应器的研究取得了重要进展，在转基因绵羊乳汁中人抗胰蛋白酶得到了表达，最高表达量超过了乳汁总蛋白含量的 50%，高达 37.5 g/L[42]；转基因猪乳汁中乳清酸蛋白(WAP)的表达量达到 1 g/L[43]，人蛋白C(hpc)的表达量也达到 1 g/L的水平[44]. 转基因动物反应器研制成为转基因技术研究的热点领域，受到社会各界的关注. 但是，用转基因动物乳腺生物反应器生产药物蛋白，迄今只有 1

例进行了 3 期临床, 2 例进入了 2 期临床实验. 乳腺生物反应器研制面临的困难主要表现在: 哺乳动物的受精和胚胎发育在体内完成, 受精卵数量有限、转基因操作困难、成功率低、研制成本巨大; 由于转移基因在受体基因组中的随机整合, 其表达受到"位置效应"的影响, 在有限的转基因个体中筛选到有效表达个体的概率极小, 研究风险增大; 扩群速度慢、研制周期长也是限制乳腺生物反应器研发的重要因素[45].

鱼类的受精和胚胎发育过程通常在体外进行, 是进行基因转移研究的良好材料. 与哺乳动物生物反应器相比, 转基因鱼生物反应器研究具有受精卵易于获得、基因转移技术成熟、研发周期短、扩群速度快和研制成本低廉等优点. 英国、日本等国学者在转基因鱼生物反应器研制方面已经开始了初步的工作, 以期通过转基因鱼鱼卵、胚胎及鱼体肌肉等生产人源蛋白, 用于医疗[8,9,46]. 但这些尝试除反应器载体选为鱼外, 其他研发思想并没有跳出以往动物生物反应器研制的巢臼, 研制的转基因鱼都是表达单一外源蛋白的载体, 如果需要表达新的外源蛋白种类, 必须重新制备新的转基因鱼, 并重新开始培育性腺整合有外源基因的转基因鱼品系, 研制周期不得不延长, 没有充分挖掘转基因鱼生物反应器研发周期短的潜力; 而且, 外源蛋白的获得还受到转基因鱼产卵季节等的限制.

近年来, 本实验室独辟蹊径, 进一步提出了建立转基因鱼生殖腺(精巢)分泌型生物反应器的概念, 并开展了相关探索研究. 转基因鱼精巢分泌型生物反应器研制战略由两个相对独立但又互相呼应的研究组成: (ⅰ) 为方便筛选并缩短实验周期, 以报告基因 GFP 为外源基因, 大样品筛选, 培育性腺(精巢)特异表达外源基因的转基因鱼纯系; (ⅱ) 建立鱼类位点特异性基因打靶(基因置换)技术. 在此基础上, 一旦需要表达不同的外源蛋白, 即可将欲表达的目的基因通过基因打靶, 在精巢中特异置换转基因鱼纯系中的 GFP 标记基因, 避免精巢特异表达外源基因转基因鱼纯系的重新培育过程, 从而建立多用途高效生物反应器平台, 以响应市场需求, 快速培育特定蛋白的精巢生物反应器.

鲤鱼是中国水产养殖业的主导性养殖品种之一, 生长快, 天然养殖条件下, 雄性个体在大多地区一年即可性成熟, 精液平均产量 10~20 g/尾, 并可多次采集, 每公顷水面养殖的雄性鲤鱼生产精液可达约 750 kg, 在人工控制环境下, 鲤鱼可多季节, 甚至常年生产精液. 此外, 精液蛋白组成简单, 欲表达的外源蛋白易于纯化. 基于此, 我们以鲤鱼为研究对象尝试转基因鱼精巢生物反应器的探索. 以GFP为报告基因, 将虹鳟鱼鱼精蛋白启动子驱动的、带有lox71 位点的打靶载体导入红鲤受精卵, PT-PCR证实, 性成熟的P0 代转基因红鲤的精巢能够转录出GFP mRNA; 经GFP 多克隆抗体进行Western blot, 显示绿色荧光蛋白在精子中有表达, 并可通过荧光显微镜直接观察到这种表达, 充分表明鱼类精巢可以成为外源基因的表达载体, 证实了转基因鱼性腺分泌型生物反应器的可行性[1]. 与此同时, 本实验室利用Cre/loxp系统, 研制出以GFP为报告基因、基因组中稳定整合lox71 位点的转基因斑马鱼品系; 而后, 通过显微注射体外转录加帽的Cre mRNA, 以RFP为报告基因且带有lox66 位点的打靶载体, 成功获得 RFP标记基因整合到指定位点的斑马鱼, 证实lox71/lox66 左右突变体能在鱼类中发生不可逆重组反应, 从而建立了鱼类位点特异性基因打靶技术[1]. 上述研究为鱼类精巢分泌型生物反应器的研制奠定了坚实的基础.

5 展望

采用反义转基因技术, 控制与鱼类性成熟和性腺发育相关基因的表达, 以研制具有遗传生态安全的育性可控的转基因鱼, 通过组织特异性的两性互补外源基因剔除技术, 特异剔除转基因鱼性腺中的转植基因, 克服了转基因鱼遗传生态安全的传统控制技术的种种不足, 为解决转基因鱼乃至其他转基因动物的生态安全问题提供了新的思路和技术方案.

随着人类功能基因组研究的迅速发展, 市场对各种珍稀和/或药用蛋白产品的需求将日益扩大, 而且这种需求将是多样性的和动态变化的. 与哺乳动物不同, 鱼类与人没有共同的病原, 其表达的外源蛋白具有生物安全性, 而且由于鱼类与人类相对遥远的亲缘关系, 以鱼为生物反应器载体, 其表达人类所必需的重要外源蛋白不易饱和. 对于某些冷水

1) 刘维一. 建立鱼精巢生物反应器的可行性研究. 中国科学院研究生院硕士学位论文, 2005

性鱼类而言，其作为载体表达某些 37℃不稳定的特异蛋白更具有哺乳类所无法比拟的优势. 此外，转基因鱼作为生物反应器没有猪、牛等哺乳动物因为宗教原因的禁忌. 可以预见，转基因鱼生物反应器作为动物生物反应器家族中的重要一员，具有非常广阔的应用前景.

然而，通过分子水平调控，实施鱼类性腺发育和性腺特异表达基因的生物技术操纵还有很多关键性问题需要解决，如采用反义转基因技术可以在脑水平阻断鱼类繁殖系统，但如何恢复性腺败育的转基因鱼的生理育性，以培育出真正育性可控的转基因鱼尚在摸索中；性腺特异性的两性互补外源基因剔除技术迫切需要找寻新的组织特异性启动子，该启动子既能在雄性鱼，也能在雌性鱼中特异表达，而且能在鱼类胚胎发育的早期作用，以获得 100%的剪切效率；不仅如此，能指导在鱼类精巢中特异高水平表达的启动子还能有效应用于转基因鱼精巢生物反应器的研制. 此外，目前所建立的鱼类位点特异性基因打靶技术属于插入型打靶，在鱼类精巢生物反应器研制中更具实际应用意义的置换型打靶技术目前仍在探索之中. 尽管如此，我们充分相信，鱼类性腺有望发展成为一种实施生物技术操纵的新型载体，在现代生物技术研究开发中发挥其巨大作用.

致谢 本工作为国家高技术研究发展计划（批准号：2004AA213121）、国家自然科学基金(批准号：30430540, 30130050)和国家重点基础研究发展规划(批准号：2001CB109006)资助项目.

参 考 文 献

1 Zhu Z, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L 1758). Z Angew Ichthyol, 1985, 1: 31~34

2 Wang R, Zhang P, Gong Z, et al. Expression of the antifreeze protein gene in transgenic goldfish (*Carassius auratus*) and its implication in cold adaptation. Mol Mar Biol Biotechnol, 1995, 4(1): 20~26

3 Maclean N, Laight R J. Transgenic fish: An evaluation of benefits and risks. Fish and Fisheries, 2000, 1: 146~172[DOI]

4 Nam Y K, Noh J K, Cho Y S, et al. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach, Misgurnus mizolepis. Transgen Res, 2001, 10(4): 353~362[DOI]

5 Zhong J Y, Wang Y P, Zhu Z Y. Introduction of the human lactoferrin gene into grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) to increase resistance against GCH virus. Aquaculture, 2002, 214: 93~101[DOI]

6 Mao W F, Wang Y P, Wang W B, et al. Enhanced resistance to *Aeromonas hydrophila* infection and enhanced phagocytic activities in human lactoferrin-transgenic grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Aquaculture, 2004, 242: 93~103[DOI]

7 Rudolph N S. Biopharmaccutical production in transgenic livestock. Trends Biotechnol, 1999, 17: 367~374[DOI]

8 Morita T, Yoshizaki G, Kobayashi M, et al. Fish eggs as bioreactors: The production of bioactive luteinizing hormone in transgenic trout embryos. Transgen Res, 2004, 13: 551~557[DOI]

9 Hwang G, Müller F, Rahman M, et al. Fish as Bioreactors: Transgene expression of human coagulation factor Ⅶ in fish embryos. Mar Biotechnol, 2004, 6: 485~492[DOI]

10 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, 2: 147~155

11 汪亚平，胡炜，吴刚，等. 转“全鱼”生长激素基因鲤鱼及其 F1 代遗传分析. 科学通报, 2001, 46(3): 226~229

12 朱作言，胡炜，汪亚平. 转基因安全与对策建议. 见：中国科学院，编. 2001 年中国高技术发展报告. 北京：科学出版社, 2001. 114~119

13 张甫英，汪亚平，胡炜，等. 摄食转全鱼基因黄河鲤小鼠的生理和病理分析. 高技术通讯, 2000, 7: 12~17

14 Knibb W. Risk from genetically engineered and modified marine fish. Transgen Res, 1997, 6: 59~67[DOI]

15 Muir W M, Howard R D. Possible ecological risks of transgenic organism release when transgenes affect mating success: Sexual selection and the Trojan gene hypothesis. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(24): 13853~13856[DOI]

16 Muir W M, Howard R D. Assessment of possible ecological risks and hazards of transgenic fish with implications for other sexually reproducing organisms. Transgen Res, 2002, 1(2): 101~114[DOI]

17 Stokstad E. Engineered fish: Friend or foe of the environment? Science, 2002, 297: 1797~1798[DOI]

18 Gage M J G, Stockly P, Parker G A. Effects of alternative male mating strategies on characteristics of sperm production in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Philos Trans R Soc London, Ser B, 1996, 350: 391~399

19 Suresh A V, Sreenan R J. Biochemical and morphological correlates of growth in diploid and triploid rainbow trout. J Fish Biol, 1998, 52: 588~599[DOI]

20 Razak S A, Hwang G, Rahman M A, et al. Growth performance and gonadal development of growth enhanced transgenic tilapia *Oreochromis niloticus* following heat-shock-induced triploidy. Mar Biotechnol, 1999,1: 533~544

21 Liu S J, Liu Y, Zhou G, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. Aquaculture, 2001, 192(3-4): 171~186[DOI]

22 孙远东，刘少军，张纯，等. 异源四倍体鲫鲤 F9-F11 染色体和

性腺观察. 遗传学报, 2003, 30(5): 414~418
23 Fernald R D, White R B. Gonadotropin-releasing hormone genes: Phylogeny, structure and functions. Front Neuroendocrinol, 1999, 20: 224~240[DOI]
24 Mason A J, Hayflick J S, Zoeller R T, et al. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the *hpg* mouse. Science, 1986, 234: 1366~1371
25 Mason A J, Pitts S L, Nikolics K, et al. The hypogonadal mouse: Reproductive functions restored by gene therapy. Science, 1986, 234: 1372~1378
26 Singh J, O'Neill C, Handelsman D J. Induction of spermatiogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (*hpg*) mice. Endocrinology, 1995, 136: 5311~5321[DOI]
27 Oeller P W, Lu M W, Tanlor P L, et al. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. Science, 1991,254: 437~439
28 Uzbekova S, Chyb J, Ferriere F, et al. Transgenic rainbow trout expressed sGnRH-antisense RNA under the control of sGnRH promoter of Atlantic salmon. J Mol Endocrinol, 2000, 25: 337~350[DOI]
29 黎双飞, 胡炜, 汪亚平, 等. 鲤鱼两个 *cGnRH-*Ⅱ基因的发现及其在成熟个体的表达分析. 中国科学, C 辑, 2004, 34(1): 88~95
30 黎双飞, 胡炜, 汪亚平, 等. 鲤鱼 *sGnRH* 基因克隆及其在成熟个体的表达分析. 遗传学报, 2004, 31(10): 1072~1081
31 Hu W, Li S, Tang B, et al. Generating controlled reversible sterile transgenic fish by antisense GnRH stratery in common carp (*Cyprinus caprio*). 5th International Symposium on Fish Endocrinology. Spain: Castellón, 2004
32 Moss B, Elroy-Stein O, Mizukami T, et al. New mammalian expression vectors. Nature, 1990, 348: 91~92[DOI]
33 Rosenberg A H, Studier FW. T7 RNA polymerase can direct expression of influenza virus cap-binding protein (PB2) in *Escherichia coli*. Gene, 1987, 59(2-3): 191~200[DOI]
34 Studier F W, Moffatt B A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol, 1986, 189(1): 113~130. [DOI]
35 McBride K E, Schaaf D J, Daley M, et al. Controlled expression of plastid transgenes in plants based on a nuclear DNA-encoded and plastid-targeted T7 RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(15): 7301~7305
36 Tornaletti S, Patrick S M, Turchi J J, et al. Behavior of T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymeraseⅡ at site-specific cisplatin adducts in the template DNA. J Biol Chem, 2003, 278(37): 35791~35797[DOI]
37 Hoess R H, Wierzbicki A, Abremski K. The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. Nucleic Acids Res, 1986, 14(5): 2287~2300
38 Zuo J, Niu Q W, Moller S G, et al. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. Nat Biotechnol, 2001, 19(2): 157~161[DOI]
39 Hoa T T, Bong B B, Huq E, et al. Cre/lox site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome. Theor Appl Genet, 2002, 104: 518~525[DOI]
40 Mlynárová L, Nap J P. A self-excising Cre recombinase allows efficient recombination of multiple ectopic heterospecific lox sites in transgenic tobacco. Transgen Res, 2003, 12(1): 45~57[DOI]
41 Wu G, Sun Y H, Mao W F, et al. Co-excision of transgenes in zebrafish by using a combination of T7 and Cre/loxP systems. International workshop on fish genetics and development, Chinese Academy of Sciences. China: Wuhan, 2004. 86
42 Wright G, Carver A, Cottom D, et al. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. Biotechnology(NY), 1991, 9(9): 830~834[DOI]
43 Wall R J, Pursel V G, Shamay A, et al. High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(5): 1696~1700
44 Velander W H, Johnson J L, Page R L, et al. High-level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(24): 12003~12007
45 李宁, 李青, 刘建忠, 等. 生物医药中的转基因动物研究与开发. 高技术通讯, 2000, 11: 106~110
46 Gong Z, Wan H, Tay T L, et al. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. Bioch Biophys Res Commun, 2003, 308: 58~63[DOI]

(2005-07-05 收稿, 2005-10-26 收修改稿)