



鱼类基因工程研究的现状和展望

魏彦章 谢岳峰 李国华 许克圣 邹 钧 刘 东 朱作言

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

THE STATUS QUO AND PROSPECT OF FISH GENE ENGINEERING RESEARCHES

Wei Yanzhang Xie Yuefeng Li Guohua Xu Kesheng Zou Jun

Liu Dong and Zhu Zuoyan

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

关键词 鱼, 基因转移, 转基因鱼

Key words Fish, Gene transfer, Transgenic fish

动物基因工程是七十年代开展起来的一门新兴遗传育种高技术。1982年, 美国科学家 Palmiter 等人^[37]首次将大鼠生长激素基因导入小鼠受精卵中, 获得了个体比对照鼠大一倍的转基因“超级鼠”, 这一开拓性的工作为动物基因工程定向育种研究领域显示了希望的曙光。继转基因超级鼠研制成功之后, 转基因猪, 兔, 羊等也相继问世。鱼类是人们的主要蛋白质食物来源之一, 但目前整个世界的鱼产品产量尚不能满足人们的这种需要, 特

表1 不同动物(包括人)来源的生长激素对鱼类的促生长效应

Tab. 1 Growth enhancement of growth hormones from different animals
(including human being) on fishes

激素来源 GH donors	鱼种类 Fish species	作用 Response	文 献 References
牛, 鱼	鳙鱼	+	Pickford, et al. ^[33]
牛	银大麻哈鱼	+	Higgs, et al. ^[22]
猪	虹鳟	+	Komourdjian, et al. ^[24]
鲤鱼, 牛	鲤鱼	+	Adelman, et al. ^[9, 10]
牛	狗鱼	+	Weatherly, et al. ^[40]
鱼, 牛	罗非鱼	+	Clark, et al. ^[16]
人*	银鲫	+	许克圣等 ^[4]
鱼*	虹鳟	+	Agellon, et al. ^[12]
牛*	银大麻哈鱼	+	Doen, et al. ^[22]

* 为克隆基因工程菌表达产物。

1991年7月4日收到。

别象在中国这样的发展中国家,其需求量就更大。因此,利用基因转移技术培育高产,优质,抗逆的鱼类新品系,将是解决这一问题的一条非常有希望的途径。其中高产(包括提高生长速度和使最终个体增大)是一个遗传背景比较清楚的性状,同时,前人的研究已表明,牛,猪,人乃至鱼类本身的生长激素注入鱼体内均能加快受体鱼的生长速度(表 1)。朱作言等于 1984 年率先在世界上开展了鱼类生长激素基因转移研究,在短短几年时间里已取得了重大进展。鱼类具有重大的经济效益,同时又有它自身的有利条件,如属较低等的脊椎动物,可对多种高等脊椎动物生长激素作出反应(表 1),产卵量大(随鱼种类的不同,一次产卵可从几百个到几百万个),体外受精,体外发育,胚胎操作简单等有利条件。因此,继 1985 年第一批转基因鱼在中国问世以来^[42],世界上已有多个国家的几十个实验室相继开展了鱼类基因工程研究工作,并取得了相当的成就(表 2)。

表 2 成功的鱼类基因转移

Tab.2 Successful gene transfer in fish

种 类 Species	启动子及基因 Promoter/Gene	文 献 References
鲫鱼	mMT/hGH	Zhu, et al. ^[1]
泥鳅	mMT/hGH	朱作言等 ¹⁾
青鳉	鸡晶体蛋白基因	Ozato, et al. ^[30]
虹鳟	SV40/hGH	Chourrout, et al. ^[15]
美国沟鲈	mMT/hGH	Dunham, et al. ^[18]
虹鳟	mMT/rGH	Maclean, et al. ^[23]
大西洋鲑鱼	mMT/hGH	Rokkones, et al. ^[34]
虹鳟	mMT/hGH	Rokkones, et al. ^[34]
大西洋鲑鱼	鱼抗冻蛋白基因	Fletcher, et al. ^[19]
斑马鱼	SV40/匀 霉素基因	Stuart, et al. ^[38]
大西洋鲑鱼	mMT/半乳糖苷酶基因	McEvoy, et al. ^[28]
罗非鱼	mMT/hGH	Brem, et al. ^[13]
斑马鱼	SV40	Stuart, et al. ^[38]
北美沟鲈	RSV/bGH	Schneider, et al.*
鲤鱼	SV40/bGH	朱作言等 ¹⁾
鲤鱼	RSV/bGH	朱作言等 ¹⁾
鲫鱼	RSV/neo	Yoon, et al. ^[41]
虹鳟	RSV/tGH(cDNA)	Powers, et al.*

注: mMT = 小鼠重金属结合蛋白; hGH = 人生长激素基因; bGH = 牛生长激素基因; rGH = 大鼠生长激素基因; tGH = 虹鳟生长激素基因。

* 私人通讯

1) 朱作言等, 1988, 牛生长激素基因在鲤鱼体内的整合及促生长效应, “863”生物技术领域 1987—1988 年会议摘要汇编。

鱼类基因转移的几种主要方法

1. 显微注射法^[4]

显微注射法是目前世界上广泛使用, 效果较好的一种基因导入方法, 其主要程序如下: (1) 亲鱼人工催产, 分别收集卵子和精液, 体外人工受精; (2) 受精后 3—5min, 用胰蛋

白酶消化去除卵壳,将裸卵移入盛有赫氏液的平皿中;(3)将外源基因用内切酶线性化,溶于 ST 溶液中;(4)将外源 DNA 装入玻璃微针,同时将上述平皿中的裸卵用胎儿发圈拨至胚盘向上,在解剖镜下注射。由于看不清受精卵的细胞核,将外源 DNA 直接注入动物极的细胞质中,注射在胚胎第一次卵裂之前进行。每卵注射 1—2nl 的 DNA 溶液,约含 1×10^6 外源 DNA 拷贝;(5)注射后的胚胎,于室温下在赫氏液中室温发育至心跳期,再转入水中完成其胚胎发育。在胚胎发育过程中,需精心管理,及时挑出死胚。

上述方法主要适用于一些卵壳较软,易于去除的淡水鲤科鱼类。对于一些冷水性鲑鳟鱼类来说,用蛋白酶消化无法去除卵壳。因此发展了三种变通的显微注射方法。一是从受精孔将 DNA 溶液注入卵中,简称 MP 法^[13,16,19],二是在虹鳟受精卵刚受精后卵壳尚未变硬时直接注射,简称 EI 法^[33]。三是先用硬金属针在卵壳上打一个孔,再进行显微注射,简称 LI 法^[19,32]。

2. 电脉冲法^[6]

电脉冲法进行鱼类受精卵基因转移的前三步与显微注射法相同。不同的是,胰酶消化后的裸卵与外源 DNA 溶液一同放入一特制的电脉冲处理槽中,然后向这一体系施加一定强度的电脉冲。在电脉冲处理下,外源 DNA 可进入已去除卵壳的受精卵,其中部分外源 DNA 可整合到受精卵的基因组内而成为转基因鱼。这一方法的优点是,操作比较简单,可同时处理大量的受精卵。缺点是外源 DNA 导入无定向性,转移率较低等,这一方法已在我所基因工程组取得成功。与此同时,日本科学家也报道了类似的成功实验^[23]。关于外源基因在电脉冲处理下进入受精卵的机制目前尚不十分清楚。在仅有的两例成功的鱼类电脉冲基因转移报道中,使用的电压都较低(几百伏)。有人认为,在这样的电压下,受精卵膜不会发生变态,因此外源基因的进入机制也就不同于培养细胞。分析是在鱼类受精卵膜上天然存在一些小孔,在低电压下,外源基因就通过这些小孔进入受精卵。

3. 精子携带法

在鱼类的受精过程中,精子进入卵子,与受精卵的雌性原核结合,成为受精卵,随后发育成个体。如果将目的基因设法结合到精子上,由精子将这一基因带入卵内不失为一条有效的基因转移途径。据悉,中国科学院动物研究所已成功的利用这一方法将外源基因导入了鱼类受精卵,并获得了转基因鱼(私人通讯),世界上也有其它几个实验室在用这一方法进行鱼类基因转移的研究。

在鱼类基因转移中,还有几种其它的方法,如脂质体融合法,激光处理法等,但还没有成功的报道。

转基因鱼模型的建立

自从 1985 年首次报道转基因鱼成功以来,朱作言等人已通过对从外源基因的转移,整合,表达,生物学效应到外源基因的遗传等各个方面的研究建立了一个完整的转基因鱼模型^[2],其要点如下:运用显微注射方法,把带有小鼠重金属结合蛋白(MT-I)基因启动顺

序与人生长激素基因顺序的重组 DNA 片段,注入鲤鱼,鲫鱼和泥鳅等的受精卵内,在由此发育的受体中,50%以上整合了外源基因,成为转基因鱼。其中约有一半左右的转基因个体具有表达外源基因,合成人生长激素的能力,并显示出不同程度的快速生长效应。转基因鱼已通过有性生殖将外源基因传递给子代,后者亦具有表达人生长激素的能力。这一模型的建立无论在理论上,还是在实际应用中都具有重要意义。现就有关的几个问题讨论如下:

1. 外源基因在鱼类受精卵胚胎发育过程中的行为

许多研究表明,外源基因在鱼类受精卵的胚胎发育过程中普遍经历了一个从复制,扩增到降解,整合(或消失)的过程^[2,7]。较新的研究资料表明¹⁾: 注入的线性外源 DNA,不论携带质粒载体顺序与否,均可以线性单体,超环和松散环状分子,及多聚体形式存在,其中多聚体为主要存在形式,以线性二聚体,多聚体形式注入的外源 DNA 则是以大量分子量的多聚体随受体总 DNA 一同迁移。而注入的环状分子构型未发生变化;注入受体卵的不同物理构型外源 DNA,在受精卵的胚胎发育过程中均经历不同程度的复制扩增,至原肠期达到峰值后逐渐降解的过程;线型外源 DNA 分子能在卵裂早期形成分子量大,头尾相连或尾尾相连的多聚体,并主要以此形式进行有效复制;外源 DNA 复制量与注入外源基因拷贝数在一定范围内(10^5-10^7 /卵)成正相关关系;与线型 DNA 分子片段长短也有关联;线型外源 DNA 的最大扩增倍数可达 100/细胞倍以上。

2. 外源基因在鱼类基因组内的整合

外源基因注入受精卵后可与受体基因组整合,整合率与注入方式,注入 DNA 的构型及其剂量有关^[27],不同的作者所获得的结果也有很大差异,Chourrout^[19] 等用 MP 注射法注射虹鳟得到的整合率高达 75%。他认为这是由于卵核处在受精孔的下方,MP 法导入的外源基因更容易发生整合。而 Penman 发现在虹鳟基因转移中同样条件下 MP 法的整合率最低(0%,检测 19 尾),LI 法(受精后 2—4h)和 EI 法的整合率都在 10% 左右,但 LI 法的存活率只有 EI 法的 20%。在受精 8h 后用 LI 法注射则整合率降为 0^[32]。整合率随着导入的 DNA 拷贝数的增加而上升,但过高的 DNA 导入将使受体胚胎中毒,成活率下降^{2),[19]}。导入的外源基因的构型对整合率也有影响,一般认为,线性 DNA 分子的导入可以获得较高的整合率,朱作言等的研究表明,用相同的基因,相同的方法,其整合率也随鱼的种类的不同而不同^[2](表 3)。

转基因鱼中外源基因常以多聚体形式整合于基因组中,Dunham 等发现,导入的外源 DNA 以首尾相连的方式进行整合^[18],Guyomard 等检测到 6 月龄的实验组鱼中有 50% 的个体携带有随机连接的外源基因多聚体,电泳时与基因组 DNA 一同迁移^[21]。

1) 刘东,1990。不同构型外源 DNA 在鱼类胚胎发育过程中的行为。中国科学院水生生物研究所硕士研究生毕业论文。
2) 谢岳峰,朱作言,1989。鱼类受精卵基因转移中的剂量效应,中国鱼类学会第三届会员代表大会及学术讨论会论文摘要汇编: 33—34。

表 3 几种受体鱼外源基因检测率*

Tab. 3 Frequencies of novel gene existence in microinjected fishes

种 类 Species	检测尾数 No. of fish assayed	阳性尾数 No. of positive fish	阳性率(%) Frequency
鲫鱼	64	33	51.6
镜鲤	89	46	61.7
泥鳅	10	4	40
红鲫	66	28	42.4
银鲫	23	16	69.6
红鲤	8	7	87.5

* 本表引自朱作言等^[2]。

Rokkones 等将 73 日龄的转基因鲑鱼和虹鳟的 DNA 酶解后进行 Southern 吸印转移杂交,结果表明与染色体DNA一同迁移的外源DNA 可能已整合入基因组中,但也不能排除以大分子形式独立存在^[34]。Penman 等认为整合的 DNA 分子大部分没有被修饰过,只有少部分发生了重排。有些转基因鱼中携带着未整合的环状 DNA,可能以染色体外形式存在^[32],有些作者检测到了少于一个拷贝/细胞的外源基因整合,说明这些转基因鱼是外源基因嵌合体^[18,41]。魏彦章等分析了外源基因在转基因鱼子一代及子二代中的情况,发现外源基因是以多聚体形式整合在基因组中的,但其末端被修饰了^[8]。Ozato 等将 DNA 注入鲮鱼卵母细胞后,固定胚胎,切片后进行 DNA 原位分子杂交,发现所有组织都整合有外源基因,但每一种组织均有一半以上的细胞核没有发生整合^[30]。Guyomard 等则分别检测了转基因鱼的不同组织,发现外源基因在组织间的分布呈嵌合状态^[21],谢岳峰等的研究指出,在 F2 代转基因鱼中各组织器官所携带的外源基因的拷贝数/细胞存在差异,表明转基因鱼子二代仍存在嵌合体现象。另外,他们还认为在转基因鱼中外源基因有可能以核外形式稳定存在^[1]。

3. 外源基因在受体鱼体内的遗传

转基因鱼所携带的外源基因可以通过性腺传递到子代^[2,8,21],但子代鱼个体间外源基因的拷贝数存在很大差异,分析是由于外源基因整合位点较多和外源基因嵌合体的缘故^{[2],[8,43]}。Guyomard 等发现,所有在精子中可检测到外源基因的转基因虹鳟都能将外源基因传到子代,而子代群体中转基因鱼的比例总是小于 50%,他认为这是由于外源基因在亲本的整合发生于第一次卵裂之后,并可能整合于不同位点^[21]。也有其他作者同意这种观点^[2,8],Stuart 等也报道了外源基因在转基因斑马鱼的性腺遗传^[38],魏彦章等^[8]的研究已使外源基因在鲤鱼遗传了两代,其规律在 F1 和 F2 代是相似的。

4. 外源基因的表达及生物学效应

外源基因在鱼体内能正常表达有生物学活性的产物, hGH 基因导入鲫鱼,鲤鱼受精

1) 谢岳峰等,1990. 转基因镜鲤子二代(G2)体内外源基因的分布。“863”生物技术领域 1989—1990 年会论文摘要汇编: 84。

2) 谢岳峰,朱作言,1989. 鱼类受精卵基因转移中的剂量效应。中国鱼类学会第三届会员代表大会及学术讨论会论文摘要汇编: 33—34。

卵后,在原肠胚即有 hGH 转录本出现^[2,6],在幼鱼组织匀浆液和成鱼血清中均可测到 hGH^[2]。转 hGH 基因鲤鱼的子一代和子二代也能表达 hGH,生长结果表明,这些 hGH 是有生物学功能的,即促进受体鱼的生长^[1,2,8,43]。McEvoy 等将线性的 *E. coli* β -LG/mMT 基因导入大西洋鲑鱼的受精卵中,9—14 周后在转基因鱼中可测到 β -LG 的酶活性^[28]。Yoon 等在转 Neo 基因的鲫鱼中检测到了该基因的 mRNA^[41],Rokkones 等用放射免疫法在转 mMTThGH 基因的鲑鱼和虹鳟中检测到表达的 hGH^[34]。Ozato 等将鸡晶体蛋白基因导入鲑鱼的卵母细胞核内,固定发育 7d 的胚胎,切片并进行蛋白质原位分子杂交,证明导入的基因可表达正常的蛋白产物,并且这种表达无组织特异性^[30]。

邹钧等的结果说明,外源基因无论以游离形式存在,还是整合到受体基因组中都可被表达,过量的外源基因拷贝积累和表达产物的存在,都可能导致受体胚胎的异常或夭折。他的研究结果同时说明,鱼类胚胎确有可能作为一个稳定的表达载体系统,用以研究发育过程中基因的表达和调控^[9]。

鱼类基因工程展望

转基因鱼模型的建立使我们对鱼类基因工程这一崭新的鱼类高技术遗传育种新途径更加充满了信心。目前,仅美国就有约翰霍普金斯大学,马里兰大学和俄本大学联合研究小组,明尼苏达大学,南依力诺依斯大学,俄力岗大学等多个研究机构正在从事虹鳟,鲤鱼,鲫鱼,斑马鱼,鲑鱼,北美狗鱼,鲶鱼等的基因转移研究工作。另外,加拿大,英格兰,法国,爱尔兰,德国,以色列,日本,挪威,印度,印度尼西亚,匈牙利,马来西亚,泰国及苏联等国家和地区的几十个实验室也相继开展了鱼类基因转移的研究工作。

但是,由于目前鱼类基因转移所使用的元件多是哺乳动物的基因,如人生长激素基因,牛生长激素基因等,启动调控顺序使用最普遍的是小鼠的重金属结合蛋白(MT)基因启动子,或者是来自于病毒的启动子,如 SV40, RSV 等。很显然,用这些元件的重组体培育具有实用价值的转基因鱼是欠妥当的。因为,这种转基因鱼如释放到天然水体中不会造成自然环境的破坏,人对于食用含人生长激素的转基因鱼有多大的心理承受能力,常用的病毒基因启动子是否会诱发人的恶性肿瘤,这些都是有待解决的问题。专家们正在考虑利用全部都是来自于鱼类本身的基因元件培育转基因鱼。目前已克隆了多种鱼的生长激素基因及有关的基因,如虹鳟^[11],鲷鱼^[14],大麻哈鱼^[36],银大麻哈鱼^[20,29],大鳞大麻哈鱼^[37],鲈鱼^[39],金枪鱼^[35],鲤鱼和草鱼^[3]等的生长激素基因,以及大麻哈鱼的催乳素基因^[37],美洲拟鲈(Winter flounder)的一种抗冻蛋白基因^[19]。最近,朱作言等成功的克隆了鲤鱼和草鱼的肌动蛋白基因并获得了具有调节功能的肌动蛋白基因启动子,沈孝宙也获得了鲤鱼金属结合蛋白(MT)基因的启动子(私人通讯),将这些完全来自鱼类本身的元件装配好后,进行基因转移,获得的转基因鱼将是更实用的。

另一个值得考虑的问题是,无论用哪种基因转移方法,目前都还达不到外源基因的定点整合。因此,外源基因在受体鱼中的整合是一个随机的过程,很难想象在受体鱼同源染色体的同源位点同时整合,同时表达的外源基因,这就为培育转基因鱼纯系造成了困难。如选用常规的遗传选种方法,将需要相当长的时间(十年乃至几十年)才能选出一个优良

品系。值得庆幸的是, 鱼类雌核发育技术已经成熟, 利用鱼类单性发育的优点, 将使这一选育工作所花的时间大大缩短, 我们在这方面已经取得了一定的进展。

参 考 文 献

- [1] 朱作言, 许克圣, 李国华, 谢岳峰, 何玲, 1986. 人生长激素基因在泥鳅受精卵显微注射后的生物学效应. 科学通报, **31**(5): 387—389.
- [2] 朱作言, 许克圣, 谢岳峰, 李国华, 何玲, 1989. 转基因鱼模型的建立. 中国科学 (B), (2): 147—155.
- [3] 朱作言, 何玲, 谢岳峰, 李国华, 1990. 鲤鱼和草鱼基因文库的构建及其生长激素基因和肌动蛋白基因的筛选. 水生生物学报, **14**(2): 176—178.
- [4] 许克圣, 魏彦章, 郭礼和, 朱作言, 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.
- [5] 邹钧, 刘东, 谢岳峰, 朱作言, 1991. 外源基因在鱼类胚胎发育过程中的表达. 水生生物学报, **15**(4): 372—374.
- [6] 谢岳峰, 刘东, 邹钧, 李国华, 朱作言, 1989. 泥鳅受精卵的电脉冲基因转移. 水生生物学报, **13**(4): 387—389.
- [7] 魏彦章, 许克圣, 俞豪祥, 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.
- [8] 魏彦章等, 1992. 人生长激素基因在转基因镜鲤体内的遗传分析. 生物工程学报. (待出版)
- [9] Adelman, I. R., 1977. Effects of bovine growth hormone on growth of carp (*Cyprinus carpio*) and the influences of temperature and photoperiod. *J. Fish Res. Board Can.* **34**: 509—515.
- [10] Adelman, I. R., 1982. Enhancement of growth of common carp by injection of a homogenate of carp pituitary glands. *Proc. Fish-Cult.*, **44**(2): 94—97.
- [11] Agellon L. B. and Chen, T. T., 1986. Rainbow trout growth hormone: Molecular cloning of cDNA and expression in *E. coli*. *DNA* **5**: 463—471.
- [12] Agellon, L. B., et al., 1988. Promotion of rapid growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by a recombinant fish growth hormone. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **45**: 146—151.
- [13] Brem, G., Brenig, B., Horstgen-Schwark, G. and Winnacker, E. L., 1988. Gene transfer in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, **68**: 209—219.
- [14] Cavari, B., Funkenstein, B., Chen, T. T. and Powers, D. A., 1988. Cloning the growth hormone gene from the seabream fish (*Sparus aurata*). Abst. 3rd International Symposium of Genetics in Aquaculture, Norway.
- [15] Chourrout, D., Guyomard, R. and Houdebine, L., 1986. High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture*, **51**: 143—150.
- [16] Clarke, W. C., Farmer, S. W. and Hartwell, K. M., 1977. Effect of teleost pituitary growth hormone on growth of *Tilapia mossambica* and on growth and seawater adaptation of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*), *gen. Comp. Endocrinol.*, **33**: 174—178.
- [17] Down, N. E., et al., 1989. A potent analog of recombinant bovine somatotropin accelerates growth in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **46**: 178—183.
- [18] Dunham, R. A., Eash, J., Askins, J. and Townes, T. M., 1987. Transfer of the metallothionein-human growth hormone fusion gene into channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* **116**: 87—91.
- [19] Fletcher, G. L., Shears, M. A., King, M. J., Davies, P. L. and Hew, C. L., 1988. Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, **45**: 352—357.
- [20] Gonzalez-Villasenor, L. I., Zhang, P., Chen, T. T. and Powers, D. A., 1988. Molecular cloning and sequencing of coho salmon growth hormone cDNA, *Gene*, **65**: 239—246.
- [21] Guyomard, R., Chourrout, D. and Houdebine, L. M., 1988. Gene transfer by microinjection into fertilized trout eggs: Efficient integration and germ line transmission. Abst. 3rd, International Symposium of Genetics in Aquaculture: 20. Norway.
- [22] Higgs, D. A., Donaldson, E. M., Dye, H. M. and McBride, J. R., 1975. A preliminary investigation of the effect of bovine growth hormone on growth and muscle composition of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **27**: 240—253.
- [23] Koji Inoue, et al., 1990. Electroporation as a new technique for producing transgenic fish. *Cell Differentiation and Development*, **29**: 123—128.
- [24] Komourdjian, M. P., Saunders, R. L. and Fenwick, J. C., 1976. The effect of porcine somatotropin on growth, and survival in seawater of Atlantic Salmon (*Salmo salar*), *Parr, Canad. J. Zool.*, **54**: 531—535.
- [25] Maclean, N. and Talwar, S., 1984. Injection of cloned genes into rainbow trout eggs, *J. Embryol. Exp.*

Morphol., 82: 187.

- [26] Maclean, N., Penman, D. and Zhu, Z., 1987a. Introduction of novel genes into fish. *Bio Technology*, 5: 257—261.
- [27] Maclean, N. and Penman, D., 1990. The application of gene manipulation to aquaculture, *Aquaculture*, 85: 1—20.
- [28] McEvoy, T., et al., 1988. The expression of a foreign gene in salmon embryos. *Aquaculture*, 68: 27—37.
- [29] Nicoll, C. S., et al., 1987. The primary structure of coho salmon growth hormone and its cDNA. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 68: 387—399.
- [30] Ozato, K., et al., 1986. Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken crystallin gene in medaka embryos. *Cell Differ.*, 19: 237—244.
- [31] Palmiter, R. D., et al., 1982. Dramatic growth of Mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* (London), 300: 611—615.
- [32] Penman, D. J., Beeching, A. J., Penn, S. and Maclean, N., 1990. Factors affecting survival and integration following microinjection of novel DNA into rainbow trout eggs. *Aquaculture*, 85: 35—50.
- [33] Pickford, G. E., 1984. The response of hypophysectomized male killifish to purified fish growth hormone as compared with the response to purified beef growth hormone. *Endocrinology*, 55: 274—287.
- [34] Rokkones, E., Alestrom, P., Skjervold, H. and Gautvik, K. M., 1988. Expression of human growth hormone gene in fertilized eggs from Atlantic salmon and rainbow trout. Abst. 3rd. International Symposium of Genetics in Aquaculture, Norway.
- [35] Sato, N., et al., 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of tuna growth hormone cDNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 949: 35—42.
- [36] Sekine, S., et al., 1985. Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *E. coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4306—4310.
- [37] Song, S., et al., 1988. Cloning of chum salmon prolactin gene cDNA. *Eur. J. Biochem.* 172: 279—285.
- [38] Stuart, G. W., McMurray, J. V. and Westerfield, 1988. Replication, integration and stable germline transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development*, 103: 403—412.
- [39] Watahiki, M., et al., 1988. Cloning of growth hormone gene of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 70: 401—406.
- [40] Weatherly, A. H. and Gill, H. S., 1987. Growth increases produced by bovine growth hormone in grass pike, *Esox americanus verimaculatus* (Lesueur), and the underlying dynamics of muscle fiber growth, *Aquaculture*, 65: 55—66.
- [41] Yoon, S. J., et al., 1990. Transfer of the gene for neomycin resistance into goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 85: 21—23.
- [42] Zhu, Z., Li, G., He, L. and Chen, S., 1985. Neol gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1785). *Z. Angew. Ichthyol.*, 1: 31—34.
- [43] Zhu, Z., Xie, Y., Xu, K., He, L. and Li, G., 1988. The production of transgenic mirror carp and its heritability. Abst. 3rd. International Symposium of Genetics in Aquaculture, Norway.