

特邀综述

汪亚平 博士，中国科学院水生生物研究所研究员。主要从事鱼类基因工程育种和鱼类功能基因组学研究，致力于鱼类重要经济性状相关基因的发掘和分子育种实践。主持和参与多项 863、973 和国家重点基金项目，在国内外刊物发表研究论文 80 余篇。作为主要成员，完成快速生长转基因黄河鲤——“冠鲤”和不育转基因三倍体——“吉鲤”的研制和品系培育。



我国转基因鱼研制的历史回顾与展望

汪亚平，何利波

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，湖北 武汉 430072

汪亚平，何利波. 我国转基因鱼研制的历史回顾与展望. 生物工程学报, 2016, 32(7): 851–860.

Wang YP, He LB. Retrospect and prospect of transgenic fish breeding in China. Chin J Biotech, 2016, 32(7): 851–860.

摘 要：中国自从诞生了首例转基因鱼以来，在后续 30 多年里取得了一系列重要研究进展。全球范围的转基因鱼研究包括多种养殖鱼类，目标性状涉及快速生长、抗病抗逆和品质改良。现在已经初步建成转基因鱼育种技术体系和安全评估体系，为转基因鱼产业化奠定了重要基础。本文以转基因黄河鲤育种研究为主线，简要回顾了转基因鱼研究的发展历程，并对转基因鱼育种面临的问题和发展前景进行了分析和展望。

关键词：转基因鱼，鱼类育种，生物技术

Received: March 24, 2016; **Accepted:** April 18, 2016

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 101-05-02-01, 101-06-02-02, 2001AA213101, 2001AA212281, 2004AA213123, 2004AA213121, 2004AA626080, 2006AA10Z131, 2007AA10Z186, 2011AA100403), National Basic Research Program of China (973 Program) (Nos. 2001CB109006, 2007CB109205, 2009CB118804, 2010CB126306), National Natural Science Foundation of China (Nos. 39823003, 30130050, 30430540, 30930069, 31325026).

Corresponding author: Yaping Wang. Tel: +86-27-68780081; Fax: +86-27-68780123; E-mail: wangyp@ihb.ac.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (Nos. 101-05-02-01, 101-06-02-02, 2001AA213101, 2001AA212281, 2004AA213123, 2004AA213121, 2004AA626080, 2006AA10Z131, 2007AA10Z186, 2011AA100403), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2001CB109006, 2007CB109205, 2009CB118804, 2010CB126306), 国家自然科学基金 (Nos. 39823003, 30130050, 30430540, 30930069, 31325026) 资助。

Retrospect and prospect of transgenic fish breeding in China

Yaping Wang, and Libo He

State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, Hubei, China

Abstract: The first transgenic fish was generated in China about 30 years ago. Since then, considerable progress has been achieved for farmed fishes breeding with improvement of target traits of growth, disease resistance, stress tolerance, and nutrition qualities. Up to now, the technology of transgenic fish breeding is almost mature and the biosafety assessment is established. In this review, a successful example of the fast-growing transgenic common carp was presented and the foreground of transgenic fish breeding was also discussed and prospected.

Keywords: transgenic fish, fish breeding, biotechnology

“转基因”一般是指利用生物技术手段,将一种生物的特定基因,又称目的基因,转移到其他物种中去,改造受体生物的特性,使其在生长速度、抗病抗逆、营养成分、消费品质等方面向人类所需要的目标转变,以获得目的性状优良的新品系^[1]。转基因技术随着基因克隆技术的发展应运而生,既可以用于基因的功能研究,又可以用于生物品种的分子改良。相对于传统杂交选育技术,转基因技术是一种快速、定向和精准的育种技术。一方面,转基因技术可将一个或多个目的基因导入受体基因组,极大地提高育种效率;另一方面,转基因技术将突破物种间的生殖隔离,拓展自然种质资源利用的范围,通过种间功能基因的优化组合,实现异源优良性状的整合,创制新的优良性状。

1982年,Palmiter等将大鼠生长激素基因通过显微注射的方法导入到小鼠受精卵内,获得了具有快速生长效应的“超级鼠”^[2]。紧随其后,中国科学院水生生物研究所(简称:水生所)朱作言等成功研制出首批转基因鱼,部分转基因个体显示出了快速生长效应^[3-4]。作为一种重要

的经济动物,鱼的转基因研究因其潜在的巨大应用前景而受到广泛关注,世界上多家实验室相继开展了鱼类基因转移研究。近20年来,中国、美国、加拿大、英国、挪威、日本、韩国等国家广泛开展转基因鱼育种研究,研究对象几乎涵盖所有重要养殖鱼类,研究性状涉及快速生长、高效营养和抗病抗逆。特别在快速生长性状方面,转基因鱼研究取得了一系列重要成果,呈现出巨大的产业前景^[5-6]。最近,美国食品和药物管理局批准了转基因大西洋鲑鱼上市,其成为全球第一例获准进入市场的转基因动物食品^[7],转基因鱼再次成为大众热议的话题。

1 转基因鱼的研究历史

通过遗传物质的操作进行鱼类品种改良的尝试可以追溯到1970年代,甚至更早。20世纪70年代,童第周创立了鱼类核移植研究,将一种鱼的细胞核移植到另一种鱼的去核卵细胞中,培育了“核质”杂交鱼,希望能够用于鱼类的品种改良^[8]。然而,由于核移植操作困难,且仅靠细胞质来影响物种的性状,遗传育种效果有

限。能不能将一个物种的遗传物质提取出来,直接注射到另一个物种的卵细胞或者受精卵中,引起遗传性状的改变?这是童第周团队成员朱作言的设想,他根据这一设想在水生所进行了鲮鱼 *Cirrhinus molitorella* 的总 DNA 转移以及其后的转基因鱼研究。

鲮鱼是中国广东地区的重要养殖鱼类。鲮鱼喜温,只能在广东南部有限的地区越冬,鲮鱼的抗寒育种研究被列入当时的国家科技攻关计划。有研究者将鲮鱼与习性耐寒的雅罗鱼 *Leuciscus waleckii* 杂交,但由于种间的生殖隔离,远源杂交没有成功。1977 年春,水生所的研究者们提取了雅罗鱼的总 DNA,在广东省兴宁县渔场将其直接导入鲮鱼的受精卵中,以期突破种间生殖隔离,实现外源基因簇的转移与整合。随后将实验鱼运回武汉进行养殖观察,发现 11 月中旬池塘水温降至 6–8 °C 的一周之内,对照鱼全部死亡,但仍有 8% 左右的转基因实验鱼继续存活了两周,最后一尾死亡时的水温为 5 °C (朱作言、黄文郁,未发表资料)。限于当时的实验条件,他们没能对转基因实验鲮鱼中的外源 DNA 片段进行检测。然而,这是第一次“转基因鱼”遗传改良的尝试,实验结果令人鼓舞。

严格地讲,转移总 DNA 并不完全具备现代转基因技术的特征,它操作的对象并不是一个功能已知、结构完整的基因,总 DNA 转移的效率和效果都难以把握。显然,具有明确功能的基因元件是转基因研究的重要条件。20 世纪 80 年代初我国尚无基因克隆的条件和技术,朱作言等利用馈赠的重组人生长激素基因(小鼠重金属整合蛋白启动子驱动的人生长激素基因),采用显微注射方法,将该重组基因构建体导入

鱼类受精卵,获得第一批转基因鲫鱼、泥鳅和鲤鱼,部分转基因个体表现出明显的快速生长效应^[3-4]。随后,对外源基因的整合、表达及世代传递进行了系统的研究。在显微注射的胚胎中,50% 以上整合了外源基因,成为转基因鱼。其中约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。部分外源基因有效整合到生殖细胞中,这部分转基因鱼可以通过有性生殖方式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,由此建立起转基因鱼研究模型^[9]。

重组人生长激素基因作为外源基因并不适合以育种为目的的转基因鱼研究,一方面,小鼠重金属整合蛋白启动子元件需要重金属离子的激活,水体中需要维持一定浓度的重金属离子,这样的水体显然不符合商品化养殖的要求;另一方面,携带人生长激素基因的转基因鱼存在潜在的生物伦理问题,可能造成消费者的心理负担。为此,水生所的研究团队分别克隆了鲤鱼 β -肌动蛋白基因和草鱼生长激素基因^[10],构建了由鲤鱼 β -肌动蛋白基因启动子驱动的草鱼生长激素基因表达载体,这个重组生长激素基因的结构元件分别来自鲤鱼和草鱼,是谓“全鱼”生长激素基因。以黄河鲤受精卵为对象,采用显微注射方法,研制出了快速生长的转“全鱼”生长激素基因鲤鱼——冠鲤^[11-12]。

冠鲤中的外源生长激素基因在体内持续高水平表达,不受季节水温变化的调节,血清生长激素含量是对照鲤鱼的 2–10 倍,维持较高的营养代谢水平^[13];转基因鲤鱼的摄食能量更多地用于生长,代谢和排泄耗能明显少于对照鲤鱼,转基因鲤鱼的生长速度达到对照鱼的 2 倍,饵料转化效率提高 16.8%^[14-16],连续 5 个世代对

外源整合基因的稳定性检测结果显示,转基因鲤鱼基因组中的外源生长激素基因能够稳定遗传^[17-18];冠鲤只需养殖一年即可达到 1 kg 的上市规格,普通黄河鲤则需要养殖两年甚至更长的时间(图 1)。冠鲤的诞生为农业动物转基因育种迈出了重要的一步。

2 我国转基因鱼的现状

近 20 年来,在国家多项科技计划的支持下,以我国重要淡水和海水养殖鱼类为对象,包括鲤鱼、鲫鱼、草鱼、团头鲂、罗非鱼、黄颡鱼以及大菱鲆和大黄鱼等,进行了一系列转基因育种研究,并取得了重要研究进展^[6]。外源基因除生长激素之外,还包括抗病抗逆和鱼肉品质相关基因。

冠鲤的成功研制开启了快速生长转基因鱼的序幕。中国水产科学研究院黑龙江水产研究所利用鲤鱼金属硫蛋白启动子驱动大马哈鱼生长激素基因,通过显微注射方法,培育出转基因黑龙江鲤,其中最大个体的体重超出对照鱼

的 1 倍,外源整合基因可遗传给子代,建立了快速生长转基因黑龙江鲤核心群家系^[19-20],并开展转基因鱼食用与环境安全的各项评价实验^[21-23]。与此同时,转生长激素基因的蓝太阳鱼、黄颡鱼、白鲫等也有相关的文献报道,外源整合的生长激素基因在不同程度上发挥了促生长作用^[24-26]。

抗病抗逆和品质改善的转基因鱼研究也取得重要进展。抗病转基因鱼育种主要从两个方面入手,一方面,通过导入免疫相关基因,以提高鱼体的免疫能力,如抗菌肽基因、溶菌酶基因和转铁蛋白基因等。有研究显示,转入转铁蛋白基因的草鱼抗草鱼出血病病毒和柱状黄杆菌感染的能力显著提高^[27]。转 *Mx* 基因的稀有鮡鲫对草鱼出血病病毒的抵抗力明显提高^[28];转铁调素和抗菌肽的斑马鱼在创伤弧菌和无乳链球菌的感染下存活率明显提高^[29]。另一方面,通过干扰和抑制病原体特异基因在鱼体中的表达,提高转基因鱼的抗病能力。例如,针对草鱼出血病病毒 VP7 基因设计的小发卡 RNA 表达构建体 (shRNA),使转基因稀有鮡鲫获得了抗出血病性状^[30]。抗逆转基因鱼研究主要针对温度、盐度和溶氧等鱼类生长的胁迫因子。例如,将透明颤菌血红蛋白 (VHb) 基因导入到斑马鱼基因组中,显著提高转基因斑马鱼低溶氧耐受能力^[31]。在鱼类品质改良方面,水生所的研究者以斑马鱼作为动物模型,将 ω -3 长链不饱和脂肪酸合成途径中的两个关键基因 (ω -3 去饱和酶 *fat1* 和 Δ 12 去饱和酶 *fat2*),采用转基因技术,获得了富含 ω -3 长链不饱和脂肪酸的转基因斑马鱼^[32]。用同样方法培育的转基因黄河鲤,在肌肉和肝脏中检测到了高丰度 ω -3 长链不饱和脂肪酸(未发表资料)。



图 1 快速生长转基因黄河鲤(冠鲤)

Fig. 1 Fast-growing transgenic Yellow River carp (Champion carp).

3 转基因鱼的生物安全

从20世纪90年代开始,转基因产品的生物安全问题就受到社会各界的关注,今天,它仍然是公众的热议话题。转基因产品的生物安全涉及食品安全和生态安全。食品安全是消费者关注的焦点,生态安全则是公众、特别是环保人士的疑虑,这两个安全都是科学家要严肃面对的课题。目前,转基因食品的安全评价主要遵循“实质等同”性原则。就转基因鱼而言,食用转基因黄河鲤与食用普通黄河鲤有什么差别?评价内容涵盖营养学、毒理学、致敏性及结合其他资料进行的综合评价。转基因鱼的生态安全评价主要考虑转基因鱼在自然水体中是否可能破坏原有的种群生态平衡,甚至导致某些野生品种的灭亡,威胁物种的遗传多样性;另一方面,转基因鱼可能与野生近缘种杂交导致“基因逃逸”,造成野生物种的“基因污染”^[1,33-34]。自20世纪90年代开始,我国先后颁布了《基因工程安全管理办法》、《农业基因工程安全管理实施方法》、《农业转基因生物安全管理条例》、《转基因食品卫生管理办法》、《中华人民共和国食品安全法》等各种政策法规,来保障转基因产品的生物安全^[35]。

转基因鱼的食物安全评价必须针对携带特定“外源基因”的特定“受体鱼”。以冠鲤为例,它携带的外源基因由两部分组成,鲤鱼的启动子和草鱼的生长激素基因,重组“全鱼”基因的表达产物是草鱼的生长激素蛋白。通俗地讲,吃一条冠鲤就如同在享用黄河鲤的同时还额外获赠了一小碗草鱼汤,基于常识,这对人类的健康不会有任何影响。科学检测的结果证实,摄食转基因鲤鱼对小鼠的生长、血液常规、血生化成分、组织病理和生殖机能及对子一代幼仔的

生长和发育均无影响,食用转“全鱼”生长激素基因鲤鱼与食用普通鲤鱼同样安全^[36-37]。

评价转基因鱼生态安全的两个关键适合度参数是生存力和繁殖力。对转“全鱼”生长激素基因鲤鱼的生态安全研究发现,快速生长导致其绝对临界游泳速度和相对临界游泳速度的平均值分别比对照鱼要低22%和24%^[38-39]。游泳能力是影响鱼类的食物获取、寻找配偶、逃避被捕食等行为的关键因素,这些因素决定了鱼类在自然环境中生存力。另一方面,通过人工模拟湖泊生态系统,比较了转基因鲤鱼和野生鲤鱼在独立的水生态系统中的繁殖力和后代存活力。结果显示,在自然水体中,转“全鱼”生长激素基因鲤鱼与普通鲤鱼具有相同的繁殖竞争力,但其子代幼鱼存活力低下,即使因为偶然事件逃逸到天然水体中,也不可能形成优势种群,进而威胁鲤鱼自然种群遗传多样性,相反会因为其低下的后代存活力而逐渐消亡^[40]。

尽管已有的实验证据表明转基因黄河鲤是低风险的,但这些实验证据在时间和空间尺度上都存在局限性和不确定性。从另一个角度看,转基因鱼的繁殖力是生态安全问题的关键,一个不育的转基因鱼品系将不会对生态系统产生深远影响。中科院水生所与湖南师范大学合作,将转基因二倍体鲤鱼与异源四倍体鲫鲤杂交,通过倍间杂交的方法研制出了转基因三倍体鱼——吉鲤。吉鲤不仅保持了普通三倍体鲤鱼不育的特点,而且比普通三倍体鲤鱼生长快,饵料利用率高(图2)^[41]。不育的转基因三倍体鲤鱼从根本上规避了转基因鱼潜在的生态风险,其大规模的推广养殖不会对生态系统产生任何负面影响,这可能是加快转基因鱼实现产业化的重要途径。



图2 不育转基因三倍体鱼(吉鲤)

Fig. 2 Sterile triploid transgenic carp (Auspicious carp).

4 展望

目前,转基因鱼育种研究主要针对快速生长、抗病抗逆等少数经济性状,经济性状相关基因的发掘是转基因鱼育种研究的根本前提,转基因鱼育种策略的制定同样依赖于对相关功能基因的深刻理解。随着基因组时代的到来,高通量DNA测序技术不断完善,生物信息学日渐成熟,为大规模发掘功能基因、深度解析网络调控机制提供了技术条件。最近,我国重要的经济鱼类如半滑舌鳎、鲤鱼、大黄鱼、草鱼等的基因组测序均已完成,并已完成大量功能基因的注释和基因组框架图的组装^[42-46],这将为鱼类经济性状相关基因的克隆及其调控机制研究提供重要的基础平台。基于这些平台,可望发掘一批鱼类重要经济性状相关基因,揭示其网络调控机制,为广泛开展转基因鱼育种研究奠定基础。

转基因鱼模型研究揭示,外源基因在受体鱼基因组中的整合具有随机性和嵌合性,提高外源基因的整合效率,建立外源基因的定点整合技术是转基因技术发展的关键。转座子和巨

核酸酶介导的基因转移方法,能够明显提高基因转移的效率,并已在鱼类转基因工作中广泛应用^[47]。最近几年发展起来的TALENs和CRISPR/Cas9技术,使基因组水平上的定点缺失、插入或单碱基突变成为可能^[48-49]。有研究报道,TALENs和CRISPR/Cas9技术已经开始应用于鱼类的基因功能研究^[50-52]。高效率的外源基因定点整合技术将在鱼类转基因育种研究中发挥重要作用。

三倍体吉鲤模式提供了一种规避转基因鱼生态风险的有效途径,但通过倍间杂交获得不育三倍体只是一个特例,这种策略在其他转基因鱼品系中难以实施。“解铃还须系铃人”,运用转基因技术来解决转基因鱼的育性控制则是一个更具普遍意义的策略。有研究发现,携带反义*GnRH*基因的转基因鲤鱼,其脑区*GnRH*基因表达信号明显减弱,一龄转基因鲤鱼血清促性腺激素平均水平显著下降,部分转基因鲤鱼性腺发育被抑制或完全败育^[53-54]。进一步的研究发现,利用GAL4/UAS基因表达调控系统和反义RNA技术,研究者在斑马鱼中建立了两个转基因家系,这两个品系的杂交后代丧失生殖能力^[55]。随着对鱼类生殖机制和转基因技术的深入研究,将有望建立一套完备的鱼类育性控制系统,杜绝转基因鱼的生态风险,为转基因鱼的产业化铺平道路。

我们不妨回顾一下重组DNA技术的发展过程,短短的40年成功地开启了一个全新的服务于人类社会生活各个方面的现代生物技术产业。可是,它出现之初所面临的是社会对它的疑虑、恐惧甚至声讨和封杀。从这个角度审视今天转基因技术面临的情况,研究者们感到似曾相识而豪情满怀。从根本上解读转基因育种

技术,就是以分子生物学为后盾的精准的物种间“分子杂交育种技术”,是人类育种史上的采集、驯化、选育、杂交发展历程的又一新的更高的发展阶段。这一技术不仅可以服务于育种实践,而且更能够解决传统育种技术所不能解决的育种难题,更好地服务于人类文明社会发展的需要。

致谢:感谢朱作言先生仔细阅读全文并提出宝贵意见。

REFERENCES

- [1] Bawa AS, Anilakumar KR. Genetically modified foods: safety, risks and public concerns-a review. *J Food Sci Technol*, 2013, 50(6): 1035–1046.
- [2] Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 1982, 300(5893): 611–615.
- [3] Zhu ZY, Li GH, He L, et al. Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L. 1758). *J Appl Ichthyol*, 1985, 1(1): 31–34.
- [4] Zhu ZY, Xu KS, Li GH, et al. Biological effect of the human growth hormone gene in the fertilized egg of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) after microinjection. *Chin Sci Bull*, 1986, 31(5): 387–389 (in Chinese).
朱作言, 许克圣, 李国华, 等. 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*, 1986, 31(5): 387–389.
- [5] Maclean N, Laight RJ. Transgenic fish: an evaluation of benefits and risks. *Fish Fisheries*, 2000, 1(2): 146–172.
- [6] Ye X, Tian YY, Gao FY. Progress in transgenic fish techniques and application. *Hereditas* (Beijing), 2011, 33(5): 494–503 (in Chinese).
叶星, 田园园, 高风英. 转基因鱼的研究进展与商业化前景. *遗传*, 2011, 33(5): 494–503.
- [7] Ledford H. Salmon approval heralds rethink of transgenic animals. *Nature*, 2015, 527(7579): 417–418.
- [8] Tong DZ, Ye YF, Lu DY, et al. Transplantation of nucleus between two subfamilies of teleost. *Acta Zoolog Sin*, 1973, 19(3): 201–212 (in Chinese).
童第周, 叶毓芬, 陆德裕, 等. 鱼类不同亚科间的细胞核移植. *动物学报*, 1973, 19(3): 201–212.
- [9] Zhu ZY, Xu KS, Xie YF, et al. Build of the modern of transgenic fish. *Sci China: Ser B*, 1989, (2): 147–155 (in Chinese).
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.
- [10] Zhu ZY, He L, Xie YF, et al. Construction of genomic library of carp (*Cyprinus carpio*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and isolation of their growth hormone gene and actin gene. *Acta Hydrobiol Sin*, 1990, 14(2): 176–178 (in Chinese).
朱作言, 何玲, 谢岳峰, 等. 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*, 1990, 14(2): 176–178.
- [11] Zhu ZY, Zeng ZQ. Open a door for transgenic fish to market. *Biotechnol Inf*, 2000, (1): 1–6 (in Chinese).
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.
- [12] Wang YP, Hu W, Wu G, et al. Genetic analysis of "all-fish" growth hormone gene transferred Yellow River carp (*Cyprinus carpio*. L) and its F1 generation. *Chin Sci Bull*, 2001, 46(14): 1174–1177.
- [13] Zhong S, Wang YP, Pei DS, et al. A one-year investigation of the relationship between serum GH levels and the growth of F4 transgenic and non-transgenic common carp *Cyprinus carpio*. *J Fish Biol*, 2009, 75(5): 1092–1100.
- [14] Li DL, Fu CZ, Hu W, et al. Advance on bioenergetics of growth hormone transgenic fishes. *Acta Hydrobiol Sin*, 2010, 34(1): 204–209 (in Chinese).

- 李德亮, 傅萃长, 胡炜, 等. 转生长激素基因鱼的生物能量学研究进展. 水生生物学报, 2010, 34(1): 204–209.
- [15] Fu CC, Li DL, Hu W, et al. Growth and energy budget of F2 “all-fish” growth hormone gene transgenic common carp. J Fish Biol, 2007, 70(2): 347–361.
- [16] Duan M, Zhang T, Hu W, et al. Elevated ability to compete for limited food resources by ‘all-fish’ growth hormone transgenic common carp *Cyprinus carpio*. J Fish Biol, 2009, 75(6): 1459–1472.
- [17] Wu B, Sun YH, Wang YP, et al. Sequences of transgene insertion sites in transgenic F4 common carp. Transgenic Res, 2004, 13(2): 95–96.
- [18] Wu B, Sun YH, Wang YW, et al. Characterization of transgene integration pattern in F4 hGH-transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). Cell Res, 2005, 15(6): 447–454.
- [19] Liang LQ, Sun XW, Shen JB, et al. Production of transgenic “Super Common Carp”. High Technol Lett, 1999, (4): 52–54 (in Chinese).
梁利群, 孙效文, 沈俊宝, 等. 转基因“超级鲤”的构建. 高技术通讯, 1999, (4): 52–54.
- [20] Sun XW, Liang LQ, Yan XC, et al. The faster growth effect of transgenic common carp with growth hormone gene and its progenies. J Fisheries China, 2002, 26(5): 391–395 (in Chinese).
孙效文, 梁利群, 闫学春, 等. 转生长激素基因鲤的快速生长效应及传代. 水产学报, 2002, 26(5): 391–395.
- [21] Geng B, Liang LQ, Guan YT, et al. Ecological safety assessment of the transgenic carp containing a growth hormone gene using genetic markers. Acta Ecol Sin, 2007, 27(3): 1139–1144 (in Chinese).
耿波, 梁利群, 关云涛, 等. 转大麻哈鱼生长激素基因鲤生态安全性检测与分析. 生态学报, 2007, 27(3): 1139–1144.
- [22] Cao DC, Geng B, Liang LQ, et al. The Effect on the teratogenicity of mouse sperms fed with transgenic carps transferred salmon growth hormone gene. Chin J Fisheries, 2009, 22(3): 40–42 (in Chinese).
曹顶臣, 耿波, 梁利群, 等. 转“大麻哈鱼”生长激素基因鲤对小鼠精子致畸性的影响. 水产学杂志, 2009, 22(3): 40–42.
- [23] Liang LQ, Wang J, Cao DC, et al. Toxicity analysis of common carp transferred Salmon growth hormone gene. Food Sci, 2010, 31(5): 261–265 (in Chinese).
梁利群, 王静, 曹顶臣, 等. 转大麻哈鱼生长激素基因鲤食用安全毒性分析. 食品科学, 2010, 31(5): 261–265.
- [24] Cao YC, Li WS, Ye W, et al. Integration, expression, and inheritance of foreign growth hormone gene in *Lepomis cyanellus*. Acta Zool Sin, 2005, 51(2): 299–307 (in Chinese).
曹运长, 李文笙, 叶卫, 等. 外源生长激素基因在蓝太阳鱼中的整合、表达和遗传. 动物学报, 2005, 51(2): 299–307.
- [25] Feng H, Fu YM, Wu H, et al. The development of P0 of black carp GH gene transgenic Japanese crucian carp. Life Sci Res, 2011, 15(2): 158–164 (in Chinese).
冯浩, 傅永明, 吴慧, 等. 转青鱼生长激素基因日本白鲫原代的研制. 生命科学研究, 2011, 15(2): 158–164.
- [26] Ge JC, Song W, Dong ZJ, et al. Generation of “all fish” growth hormone gene transgenic yellow catfish founders. J Nanjing Univ: Nat Sci, 2013, 49(1): 123–131 (in Chinese).
葛家春, 宋伟, 董张及, 等. “全鱼”转生长激素基因黄颡鱼首建者的建立. 南京大学学报: 自然科学, 2013, 49(1): 123–131.
- [27] Zhong JY, Zhu ZY. Resistance to GCHV of hLFC-transgenic grass carp. Acta Hydrobiol Sin, 2001, 25(5): 528–530 (in Chinese).
钟家玉, 朱作言. 转入乳铁蛋白基因草鱼抗 GCHV 的初步研究. 水生生物学报, 2001, 25(5): 528–530.
- [28] Su JG, Yang CR, Zhu ZY, et al. Enhanced grass carp reovirus resistance of Mx-transgenic rare minnow (*Gobiocypris rarus*). Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(6): 828–835.

- [29] Pan CY, Peng KC, Lin CH, et al. Transgenic expression of tilapia hepcidin 1–5 and shrimp chelonianin in zebrafish and their resistance to bacterial pathogens. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 31(2): 275–285.
- [30] Liao S, Chen Y, Du FK, et al. Resistance of siGCRV transgenic rare minnow (*Gobiocypris rarus*) to grass carp reovirus. *Acta Hydrobiol Sin*, 2010, 34(4): 837–842 (in Chinese).
廖莎, 陈芸, 杜富宽, 等. 抗草鱼出血病病毒转基因稀有鮡鲫的初步研究. *水生生物学报*, 2010, 34(4): 837–842.
- [31] Guan B, Ma H, Wang YP, et al. *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) overexpression increases hypoxia tolerance in Zebrafish (*Danio rerio*). *Mar Biotechnol*, 2011, 13(2): 336–344.
- [32] Pang SC, Wang HP, Li KY, et al. Double transgenesis of humanized *fat1* and *fat2* genes promotes omega-3 polyunsaturated fatty acids synthesis in a zebrafish model. *Mar Biotechnol* (NY), 2014, 16(5): 580–593.
- [33] Kapuscinski AR. Current scientific understanding of the environmental biosafety of transgenic fish and shellfish. *Rev Sci Tech*, 2005, 24(1): 309–322.
- [34] Hu W, Wang YP, Zhu ZY. Progress in the evaluation of transgenic fish for possible ecological risk and its containment strategies. *Sci China Ser C: Life Sci*, 2007, 50(5): 573–579.
胡伟, 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(4): 377–381.
- [35] Yu Z. Management Model and Policy of Transgenic Food in Different Countries. Beijing: Military Medical Science Press, 2012 (in Chinese).
于洲. 各国转基因食品管理模式及政策法规. 北京: 军事医学科学出版社, 2012.
- [36] Zhang FT, Wang YP, Hu W, et al. Physiological and pathological analysis of the mice fed with “all-fish” gene transferred Yellow River Carp. *High Technol Lett*, 2000, 10(7): 12–17 (in Chinese).
张甫英, 汪亚平, 胡伟, 等. 摄食转“全鱼”基因黄河鲤小鼠的生理和病理分析. *高科技通讯*, 2000, 10(7): 12–17.
- [37] Fu CC, Hu W, Wang YP, et al. Developments in transgenic fish in the People's Republic of China. *Rev Sci Technol*, 2005, 24(1): 299–307.
- [38] Li DL, Fu CC, Hu W, et al. Rapid growth cost in “all-fish” growth hormone gene transgenic carp: reduced critical swimming speed. *Chin Sci Bull*, 2007, 52(11): 1501–1506.
李德亮, 傅萃长, 胡伟, 等. 快速生长导致转“全鱼”生长激素基因鲤鱼临界游泳速度的降低. *科学通报*, 2007, 52(8): 923–926.
- [39] Li DL, Hu W, Wang Y, et al. Reduced swimming abilities in fast-growing transgenic common carp *Cyprinus carpio* associated with their morphological variations. *J Fish Biol*, 2009, 74(1): 186–197.
- [40] Lian H, Hu W, Huang R, et al. Transgenic common carp do not have the ability to expand populations. *PLoS ONE*, 2013, 8(6): e65506.
- [41] Yu F, Xiao J, Liang XY, et al. Rapid growth and sterility of growth hormone gene transgenic triploid carps. *Chin Sci Bull*, 2011, 56(16): 1679–1684.
于凡, 肖俊, 梁向阳, 等. 转生长激素基因三倍体鲤鱼的快速生长与不育特性. *科学通报*, 2010, 55(20): 1987–1992.
- [42] Chen SL, Zhang GJ, Shao CW, et al. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nat Genet*, 2014, 46(3): 253–260.
- [43] Xu P, Zhang XF, Wang XM, et al. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nat Genet*, 2014, 46(11): 1212–1219.
- [44] Wu CW, Zhang D, Kan MY, et al. The draft genome of the large yellow croaker reveals well-developed innate immunity. *Nat Commun*, 2014, 5: 5227.
- [45] Ao JQ, Mu YN, Xiang LX, et al. Genome sequencing of the perciform fish *Larimichthys crocea* provides insights into molecular and genetic mechanisms of stress adaptation. *PLoS Genet*,

- 2015, 11(4): e1005118.
- [46] Wang YP, Lu Y, Zhang Y, et al. The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation. *Nat Genet*, 2015, 47(6): 625–631.
- [47] Grabher C, Wittbrodt J. Meganuclease and transposon mediated transgenesis in medaka. *Genome Biol*, 2007, 8 Suppl 1: S10.
- [48] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [49] Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(1): 49–55.
- [50] Auer TO, Del Bene F. CRISPR/Cas9 and TALEN-mediated knock-in approaches in zebrafish. *Methods*, 2014, 69(2): 142–150.
- [51] Auer TO, Duroure K, De Cian A, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res*, 2014, 24(1): 142–153.
- [52] Li J, Zhang BB, Ren YG, et al. Intron targeting-mediated and endogenous gene integrity-maintaining knockin in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Res*, 2015, 25(5): 634–637.
- [53] Hu W, Li SF, Tang B, et al. Antisense for gonadotropin-releasing hormone reduces gonadotropin synthesis and gonadal development in transgenic common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 2007, 271(1/4): 498–506.
- [54] Xu J, Huang W, Zhong CR, et al. Defining global gene expression changes of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in female sGnRH-antisense transgenic common carp (*Cyprinus carpio*). *PLoS ONE*, 2011, 6(6): e21057.
- [55] Zhang YS, Chen J, Cui XJ, et al. A controllable on-off strategy for the reproductive containment of fish. *Sci Rep*, 2015, 5: 7614.

(本文责编 陈宏宇)