

利用 *Tol2* 转座子构建斑马鱼心脏组织特异表达转基因载体及其表达分析

陈婷芳, 罗娜, 谢华平, 吴秀山, 邓云

湖南师范大学生命科学学院 心脏发育研究中心, 长沙 410081

摘要: 为了制备用于在斑马鱼心脏中特异表达目的基因的转基因载体, 通过分子克隆的方法对能够在斑马鱼心脏中特异表达 *EGFP* 报告基因的 *Tol2* 载体进行了改造, 在原有的 *CMLC2* 启动子与 *EGFP* 编码区之间插入带有多克隆位点的 IRES 序列, 获得 p*Tol2-CMLC2-IRES-EGFP* 转基因表达载体, 该载体可以在同一个启动子 *CMLC2* 的驱动下分别同时表达目的基因和 *EGFP*; 为了验证该表达载体的有效性, 进一步在 *CMLC2* 启动子与 IRES 序列之间插入 *DsRed-Monome* 编码区, 利用得到的 p*Tol2-CMLC2-RED-IRES-EGFP* 转基因载体显微注射到斑马鱼单细胞期胚胎中进行表达分析, 结果表明外源目的基因 *DsRed-Monome* 和报告基因 *EGFP* 均能以相同的表达模式在斑马鱼心脏组织中特异表达。p*Tol2-CMLC2-IRES-EGFP* 转基因表达载体的成功构建对于建立心脏发育候选基因的斑马鱼转基因实验模型具有重要意义。

关键词: *Tol2* 转座子, 斑马鱼, 转基因, 心脏特异表达

Construction and expression analysis of the zebrafish heart-specific transgenic vector based on *Tol2* transposable element

Tingfang Chen, Na Luo, Huaping Xie, Xiushan Wu, and Yun Deng

College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

Abstract: In an effort to generate a desired expression construct for making heart-specific expression transgenic zebrafish, a *Tol2* plasmid, which can drive *EGFP* reporter gene specifically expressed in the heart, was modified using subcloning technology. An IRES fragment bearing multiple cloning site (MCS) was amplified directly from pIRES2-EGFP plasmid and was inserted between the *CMLC2* promoter and *EGFP* fragment of the pDest*Tol2*CG vector. This recombinant expression plasmid p*Tol2-CMLC2-IRES-EGFP* can drive any interested gene specifically expressed in the zebrafish heart along with *EGFP* reporter gene. To test the effectiveness of this new expression plasmid, we constructed p*Tol2-CMLC2-RED-IRES-EGFP* plasmid by inserting another reporter gene *DsRed-Monome* into MCS downstream of the *CMLC2* promoter and injected this transgenic recombinant plasmid into one-cell stage embryos of zebrafish. Under fluorescence microscope, both the red fluorescence and the green

Received: August 14, 2009; **Accepted:** December 16, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30671137), Postgraduate Scientific Innovation Fund of Hunan Province (No. CX2009B108).

Corresponding author: Yun Deng. Tel: +86-731-88872780; Fax: +86-731-88615078; E-mail: dengyun2008@yahoo.com.cn

国家自然科学基金 (No. 30671137), 湖南省研究生科研创新项目 (No. CX2009B108) 资助。

fluorescence produced by pTol2-*CMLC2*-RED-IRES-*EGFP* were detected specifically in the heart tissue in the same expression pattern. This novel expression construct pTol2-*CMLC2*-IRES-*EGFP* will become an important tool for our research on identifying heart development candidate genes' function using zebrafish as a model.

Keywords: *Tol2* transposon, zebrafish, transgenesis, heart-specific expression

转座子作为插入突变源和分子标签被广泛应用于基因的分离、克隆以及基因功能分析, 利用基因的转座原理可研究基因的调控模式, 可为脊椎动物细胞的分化和发育提供依据^[1]。*Tol2* 是近年发现的唯一的天然存在且具有转座活性的脊椎动物转座子, 存在于中国、韩国、日本等国的一种淡水鱼——青鳉 *Oryzias latipes* 的基因组中^[2]。Kawakami 等利用 *Tol2* 转座子构建了含有特异性启动子调节基因表达的序列 (SIX3.2:gfp) 载体, 该质粒 DNA 和体外合成的相应转座酶基因 mRNA 共注射到单细胞期斑马鱼胚胎中。插入基因组的转座子序列能高频率传递 F1 斑马鱼, 其中特异性启动子调节基因表达的序列 (SIX3.2:gfp) 可以稳定存在于转基因鱼^[3]。*Tol2* 转座子系统在脊椎动物的基因克隆和基因功能分析方面具有重要的应用前景, 对分子生物学的发展有着深远的意义。但是, 目前还没有适合斑马鱼心脏组织特异性表达外源目的基因的 *Tol2* 转座子转基因载体。

Kwan 等将 *Tol2* 转座子中转座酶编码基因切除, 代之以 *CMLC2*-*EGFP*-polyA 表达序列和其他重组筛选序列, 如 *CCDB* (Control of cell death) 基因序列等, 构建了 pDestTol2CG2 质粒, 将该质粒与转座酶 mRNA 一起显微注射斑马鱼单细胞期胚胎, 观察到斑马鱼心脏组织中有绿色荧光蛋白特异表达, 同时外源片段整合效率高^[4]。但是直接将 pDestTol2CG2 质粒用于心脏发育候选基因的斑马鱼转基因载体还有许多缺陷。首先, *CMLC2* 启动子下游没有可供选择的多克隆位点以便插入一个心脏发育候选基因编码序列; 其次, 如果将 *EGFP* 编码基因切除, 代之以其他心脏发育候选基因编码序列, 失去报告基因——绿色荧光蛋白的表达对分析目的基因的表达非常不方便; 第三, 如果将心脏发育候选基因编码序列与 *EGFP* 编码基因直接连接, 在 *CMLC2* 启动子驱动下两个蛋白融合表达, 目的基因蛋白的生物活性

可能受到影响。

为了构建适用于在斑马鱼心脏中特异表达目的基因的转基因载体, 本实验利用分子克隆的方法对能够在斑马鱼心脏中特异表达 *EGFP* 报告基因的 *Tol2* 转座子载体进行了改造, 在原有的 *CMLC2* 启动子与 *EGFP* 编码区之间插入带有多克隆位点的 IRES 序列, 获得 pTol2-*CMLC2*-IRES-*EGFP* 转基因表达载体, 该载体可以实现在同一个启动子 *CMLC2* 的驱动下分别同时表达目的基因和 *EGFP*; 为了验证该表达载体的有效性, 在 *CMLC2* 启动子与 IRES 序列之间插入 *DsRed-Monomer* 编码区, 将得到的表达外源基因 *DsRed-Monomer* 的重组载体 pTol2-*CMLC2*-RED-IRES-*EGFP* 显微注射到斑马鱼单细胞期胚胎中进行表达分析: 外源目的基因 (*DsRed-Monomer*) 和报告基因 (*EGFP*) 均能以相同的模式在斑马鱼心脏组织中特异表达。pTol2-*CMLC2*-IRES-*EGFP* 转基因表达载体的成功构建为以斑马鱼作为动物模型, 研究人类心脏发育候选基因在心脏发育中的功能奠定了重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pDestTol2CG2 等质粒为日本国立遗传研究所 Kawakami 教授惠赠, *Tol2* 转座子中含有 *CCDB* (Control of cell death) 基因和 *CMLC2*-*EGFP*-polyA 表达序列, 其详细的载体结构图见 Kawakami 教授实验室网站 <http://chien.neuro.utah.edu/tol2kitwiki/index.php/PDestTol2CG>。pDsRed-Monomer-C1、pIRES2-*EGFP* 质粒以及大肠杆菌 DH5 α 菌株为湖南师范大学心脏发育研究中心保存。凝胶回收试剂盒、DNA 连接试剂盒、DNA 补平试剂盒、LA *Taq* DNA 聚合酶和各种限制性内切酶为 TaKaRa 公司产品。大肠杆菌 One Shot *ccdB* Survival Competent Cells 购自 Invitrogen 公司, -80 $^{\circ}$ C 保存。条纹斑马鱼品系购自

中国科学院武汉水生生物研究所, 28°C 自动水循环鱼缸培养。

1.2 pTol2-CMLC2-IRES-EGFP 多克隆位点表达载体的构建

pTol2-CMLC2-IRES-EGFP 多克隆位点表达载体及其下游表达载体的构建流程见图 1。

pDestTol2CG2 转化入大肠杆菌 One Shot *ccdB* Survival Competent Cells, 氨卞青霉素筛选, 混收菌落, 提取质粒后用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Kpn* I 切除 pDestTol2CG2 质粒中的 *CCDB* 片段, 回收骨架目的片段后用 DNA 补平试剂盒补平后连接环化, 转化大肠杆菌 DH5 α , 纯化得到 pTol2-CMLC2-EGFP 质粒。

以 pIRES2-EGFP 质粒 DNA 为模板, 以 IRES-F3 (5'-3'): TCCATGGTTCGAATTCTGCAGTCGACGG (下划线部分为 *Nco* I 酶切位点) 和 IRES-R3 (5'-3'): GGTCATGATTGTGGCCATATTATCATCG (下划线部分为 *Bsp* H I 酶切位点) 为引物, 利用 LA *Taq* PCR 扩增带有 *Eco* R I、*Sal* I、*Bam* H I 等克隆位点的 IRES 序列, 克隆到 pUM18-T 质粒上, 酶切、测序鉴定获得 pUM18-T/IRES 质粒。然后用 *Nco* I/*Bsp* H I 双酶切 pUM18-T/IRES 质粒, 回收 IRES 目的片段克隆至 pTol2-CMLC2-EGFP 质粒中 *CMLC2* 启动子下游的 *Nco* I 位点。经酶切、测序鉴定获得 pTol2-CMLC2-IRES-EGFP 表达质粒。

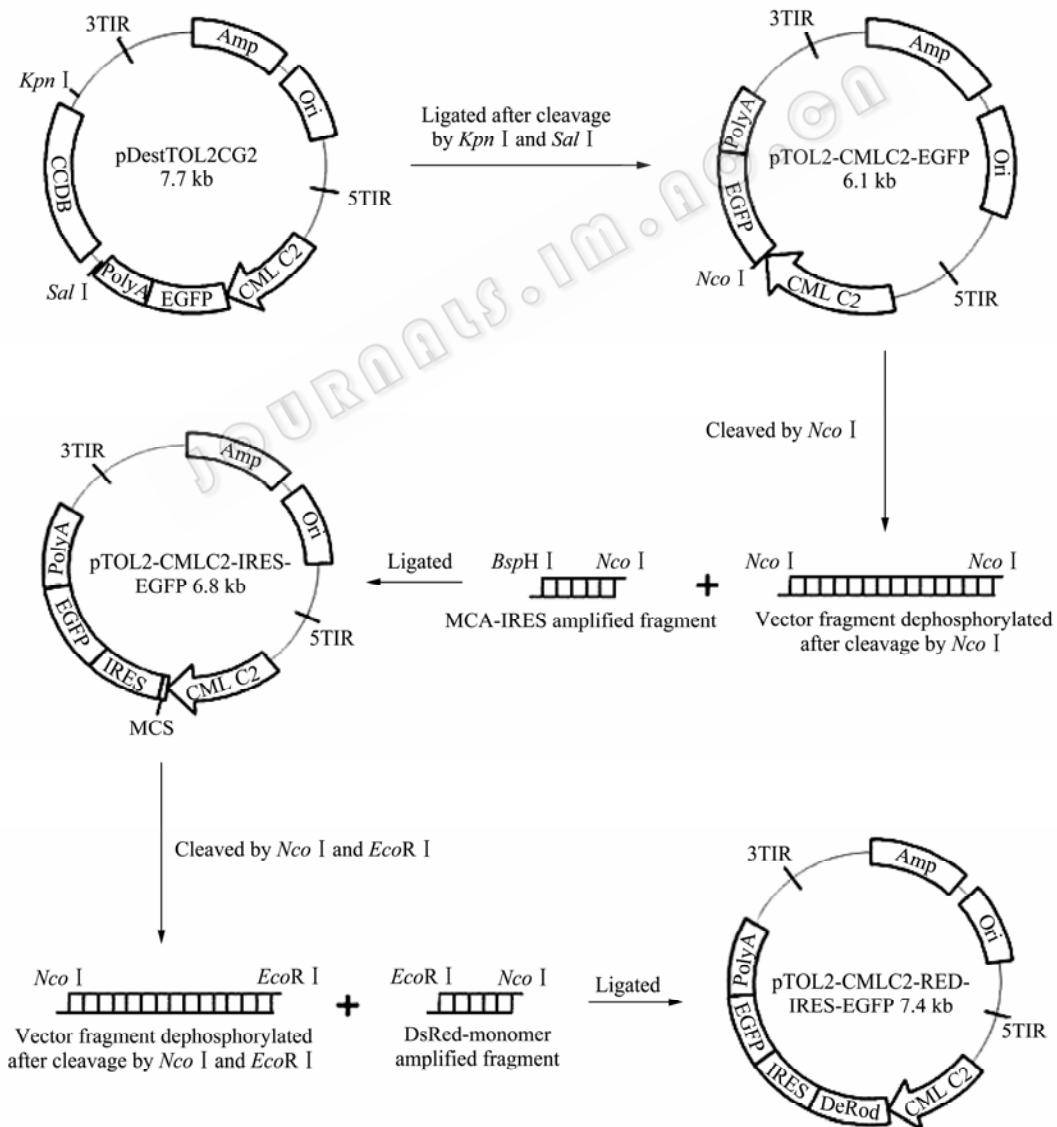


图1 斑马鱼心脏组织特异表达转基因载体的构建

Fig. 1 Construction of the zebrafish heart-specific transgenic vector.

1.3 pTol2-CMLC2-RED-IRES-EGFP 表达载体的构建

根据红色荧光蛋白的表达序列, 设计 PCR 扩增引物 DSRED-F(5'-3'): GCCATGGACAACACCGAG GACGTC (下划线部分为 *Nco* I 酶切位点) 和 DSRED-R (5'-3'): GGAATTCTTACTACTGGGAGCC GGAGTGG (下划线部分为 *Eco*R I 酶切位点)。利用引物 DSRED-F/DSRED-R, 以 pDsRed-Monomer-C1 质粒 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增出 *DsRed-Monomer* 编码序列的 DNA 片段, 克隆到 pUC18-T 质粒上, 经酶切, 测序鉴定得到 pUC18-T/DsRed-Monomer 质粒。*Nco* I/*Eco*R I 双酶切 pUC18-T/DsRed-Monomer 质粒后, 将回收到的 *DsRed-Monomer* 编码序列的 DNA 片段克隆到 pTol2-CMLC2-IRES-EGFP 多克隆位点表达质粒中。经 PCR、测序鉴定获得 pTol2-CMLC2-RED-IRES-EGFP 表达质粒。

1.4 斑马鱼心脏特异表达转基因载体的表达分析

斑马鱼受精卵的获取: 受精前将雌雄亲鱼分开饲养 2~3 d 后按 1:1~2 比例放入产卵池中进行产卵受精。分选和洗净的卵移到有琼脂糖的表面皿中, 注射外源 DNA 浓度为 0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, DNA 体积约 2 nL。受精卵的动物极注射完毕后, 慢慢抽出注射针, 将受精卵放入装有无菌水的培养皿中, 使其恢复发育; 25 $^{\circ}\text{C}$ ~28 $^{\circ}\text{C}$ 培养胚胎, 分别在 24 h、48 h、72 h 后, 荧光显微镜下观察筛选心脏组织具有荧光蛋白的胚胎个体。有绿色荧光的个体表示成功载入报告基因 EGFP 的嵌合个体。

2 结果与分析

2.1 pTol2-CMLC2-IRES-EGFP 多克隆位点表达载体的鉴定

pDestTol2CG2 质粒是把 *Tol2* 转座子中转座酶切除后, 将 *CCDB* (Control of cell death) 基因和 *CMLC2-EGFP-polyA* 表达序列并入到 *Tol2* 转座子中, 其中 *CCDB* 基因的上游和下游均带有同源重组臂。如果没有外源 DNA 片段同源重组置换 *CCDB* 片段, *CCDB* 基因则会表达蛋白, 会破坏细菌的 DNA gyrase, 造成细菌染色体的降解导致细菌死亡, 因此不能转入 DH5 α 中进行扩增。pDestTol2CG2 质粒经

限制性内切酶 *Sal* I 和 *Kpn* I 切除其中的 *CCDB* 片段, 回收骨架目的片段用 DNA 补平试剂盒补平后连接环化; 限制性内切酶 *Sal* I 的酶切位点在得到的 pTol2-CMLC2-EGFP 质粒中并未消失, 该位点位于 poly A 序列的下游。将带有 *Eco*R I、*Sal* I、*Bam*H I 等克隆位点的 IRES 序列正确连接到 pTol2-CMLC2-EGFP 质粒的 *Nco* I 位点, 得到 pTol2-CMLC2-IRES-EGFP 重组质粒。本实验共制备了 6 个重组质粒 DNA, 经 *Sal* I 酶切后电泳结果见图 2, 有 5 个质粒酶切片段的大小与预期大小一致 (5044 bp 和 1779 bp)。结果表明, 带有 *Eco*R I、*Sal* I、*Bam*H I 等克隆位点的 IRES 序列已成功地克隆到 pTol2-CMLC2-EGFP 质粒中, 该结果经进一步的测序分析得到证实。

2.2 pTol2-CMLC2-RED-IRES-EGFP 表达载体的鉴定

用引物 DSRED-F/DSRED-R 从质粒 pDsRed-Monomer-C1 克隆到 *DsRed-Monomer* 编码序列的 DNA 片段, 经测序鉴定后连接到 pTol2-CMLC2-IRES-EGFP 表达质粒的 *Nco* I/*Eco*R I 位点, 获得 pTol2-CMLC2-RED-IRES-EGFP 表达质粒。用 *Nco* I/*Eco*R I 双酶切的方法鉴定获得 pTol2-CMLC2-RED-IRES-EGFP 表达质粒, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析双酶切产物, 结果如图 3 所示。质粒双酶切后 DNA 片段的大小与预期的 *DsRed-Monomer* 编码序列片段 (687 bp) 和表达载体片段 (6823 bp) 的大小一致。结果表明, 已成功地构建了 pTol2-CMLC2-RED-IRES-EGFP 表达载体, 也进一步证实了测序结果。

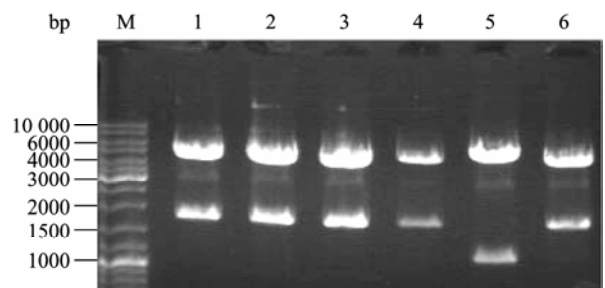


图2 pTol2-CMLC2-IRES-EGFP质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pTol2-CMLC2-IRES-EGFP plasmid by enzyme digestion. M: DNA marker; 1-6: agarose electrophoresis of the six different pTol2-CMLC2-IRES-EGFP plasmids digested with *Sal* I. 1, 2, 3, 4 and 6 are the positive plasmids.

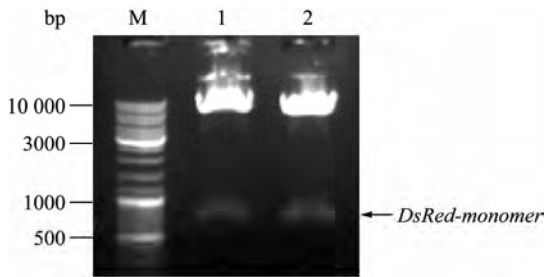


图3 pTol2-CMLC2-RED-IRES-EGFP质粒的Nco I和EcoR I双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pTol2-CMLC2-RED-IRES-EGFP plasmids by enzyme digestion with Nco I and EcoR I. M: DNA marker; 1, 2: agarose electrophoresis of the two different pTol2-CMLC2-RED-IRES-EGFP plasmids digested with Nco I and EcoR I. 1 and 2 are both the positive plasmids.

2.3 斑马鱼心脏特异表达转基因载体的表达分析

将目的基因序列连接到 pTol2-CMLC2-IRES-EGFP 质粒的多克隆位点 (MCS), 得到目的基因的表达载体; 该载体在 CMLC2 启动子作用下, 可以在心脏组织中特异转录目的基因的 mRNA; 该 mRNA 实际上也包括 IRES 转录序列和报告基因 EGFP 转录序列。因此, 该 mRNA 能在细胞中翻译成目的蛋白和绿色荧光蛋白, 绿色荧光蛋白在心脏组织中的表达时空模式可以间接地反映外源蛋白的时空表达模式。为了分析 IRES 序列或克隆位点插入的目的基因对绿色荧光蛋白表达的影响, pTol2-CMLC2-IRES-EGFP 和 pTol2-CMLC2-RED-IRES-EGFP 表达质粒纯化后显微注射到斑马鱼单细胞期胚胎, 在 24 h 后, 在荧光显微镜下可以观察到绿色荧光蛋白在显微注射了 pTol2-CMLC2-IRES-EGFP 表达质粒的斑马鱼胚胎心脏组织中特异表达 (图 4)。显微注射 pTol2-CMLC2-RED-IRES-EGFP 表达质粒的斑马鱼胚胎心脏组织中既有红色荧光蛋白又有绿色荧光蛋白特异表达, 且绿色荧光蛋白的时空表达模式与红色荧光蛋白相同; 绿色荧光的荧光强度比红色荧光弱 (图 5)。

3 讨论

Koga 等^[5]将 Tol2 转座子中 119 kb 的转座酶编码基因切除, 代之以 GFP 基因, 将改造后的片段与转座酶 mRNA 一起显微注射到基因组不含 Tol2 转座元件的菲律宾青鳉受精卵中。将存活的成年青鳉与未

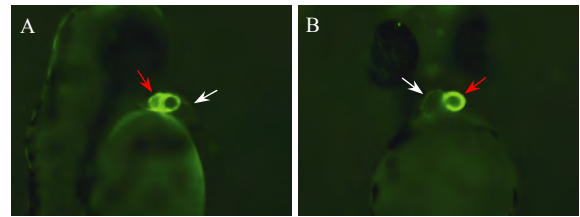


图4 绿色荧光蛋白在斑马鱼心脏组织中的表达分析

Fig. 4 EGFP protein was specifically expressed in the heart tissue of the zebrafish embryos microinjected with pTol2-CMLC2-IRES-EGFP. Lateral (A) and ventral (B) side observation was performed with Nikon fluorescence microscope, and green fluorescence was detected in the heart of the zebrafish embryos using green light excited. Ventricle marked by red arrow and atria marked by white arrow.

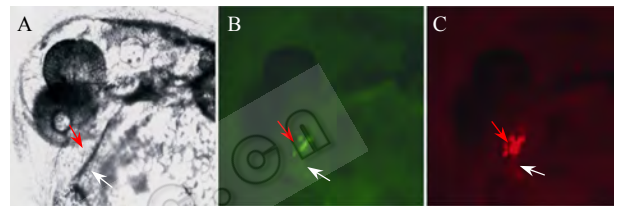


图5 绿色和红色荧光蛋白在斑马鱼心脏组织中的表达分析

Fig. 5 EGFP protein and RED protein were specifically and coinstantaneously expressed in the heart tissue of the zebrafish embryos microinjected with pTol2-CMLC2-RED-IRES-EGFP. Observation of fluorescence of the heart tissue of the zebrafish embryos microinjected with pTol2-CMLC2-RED-IRES-EGFP was performed with a Nikon fluorescence microscope. The green fluorescence (B) and red fluorescence (C) was displayed specifically and coinstantaneously in the heart tissue of the zebrafish embryos (A) microinjected and excited by blue light and red light respectively. Ventricle marked by red arrow and atria marked by white arrow.

注射转座元件的青鳉交配, 后代中有约 1/5 的基因组中带有 GFP 基因, 表明 GFP 基因在当代通过 Tol2 的转座整合到基因组中了。已经有研究表明, Tol2 可携带长达 9.7 kb 的外源标记基因, 整合到受体基因组的染色体上^[6]。

Kwan 将 Tol2 转座子中转座酶编码基因切除, 代之以 CMLC2-EGFP-polyA 表达序列, 构建了 pDestTol2CG2 质粒, 将该质粒与转座酶 mRNA 一起显微注射斑马鱼单细胞期胚胎, 观察到斑马鱼心脏组织中有绿色荧光蛋白特异表达, 同时外源片段整合效率高^[4]。正如上述所言, 直接将 pDestTol2CG2 质粒用于心脏发育候选基因的斑马鱼转基因载体还有许多缺陷。内部核糖体进入位点 (IRES) 序列来

源于脑心肌炎病毒^[7], 它可翻译一条 mRNA 上的两个开放阅读框, 由其连接的两个基因的表达效率相同^[8-9]。本实验切除了 pDestTol2CG2 质粒中的 *CCDB* 片段, 同时将带有多克隆位点的 IRES 片段克隆到质粒中 *CMLC2* 启动子下游的 *Nco* I 位点。改造后的表达质粒 pTol2-*CMLC2*-IRES-*EGFP* 在斑马鱼心脏组织中有绿色荧光蛋白特异表达 (图 4); 同时, 绿色荧光在心房和心室中表达的强度有差异, 心室荧光信号很强, 而心房的荧光信号很弱; 该结果与其他文献报道的结果一致^[4], 这种情况可能是与 *CMLC2* 启动子特性有关^[10]。因此, 插入 IRES 片段后对绿色荧光蛋白特异表达没有影响。

根据基因工程原理将目的基因和报告基因 (如 *EGFP*) 通过 IRES 序列连接起来, 两个基因在同一个启动子作用下转录成单链 mRNA, 但翻译时又是相互独立的, 不会形成嵌合蛋白^[8-9], 保证了目的基因蛋白的生物活性, 并且理论上只要有报告基因 (如 *EGFP*) 的表达, 目的基因也肯定会表达, 因此便于通过检测报告基因 *EGFP* 的表达来进行转基因生物个体的筛选^[11]。对于 pTol2-*CMLC2*-RED-IRES-*EGFP* 表达质粒来说, 在 *CMLC2* 启动子作用下, 在心脏组织中特异转录目的基因 *DsRed-Monomer* 的 mRNA 实际上也包括 IRES 转录序列和报告基因 *EGFP* 转录序列。该 mRNA 能在细胞中翻译出目的蛋白——红色荧光蛋白和报告基因蛋白——绿色荧光蛋白; *EGFP* 蛋白与 *DsRed-Monomer* 蛋白的编码框是独立的, 均有各自的起始位点 ATG 和终止位点 TGA 或 TAA 等, 核糖体与该 mRNA 的 5'端前导序列结合翻译成目的蛋白——红色荧光蛋白后脱离, 同时, 核糖体也可以与该 mRNA 的 IRES 序列结合翻译下游的绿色荧光蛋白。因此, 在细胞中红色荧光蛋白和绿色荧光蛋白是两个独立蛋白, 而不是融合蛋白。同时, 只要有绿色荧光蛋白的表达就可以证明 IRES 在斑马鱼胚胎中的有效性。将质粒纯化后显微注射到斑马鱼单细胞期胚胎, 24 h 后, 在荧光显微镜下观察斑马鱼胚胎心脏组织中红色荧光蛋白和绿色荧光蛋白均同时特异表达, 绿色荧光的荧光强度比红色荧光弱 (图 5)。因此, 在 *CMLC2* 启动子的驱动下, 与 IRES 序列相连接的双基因可同时表

达, 绿色荧光蛋白表达时空模式可以间接地反映 RED 基因的表达时空模式。

根据已有的文献报道共注射编码转座酶 mRNA 整合率高达 50%^[3], 在向单细胞期斑马鱼胚胎中注射实验中, 本实验曾尝试表达质粒与转座酶 mRNA 共注射和表达质粒单独注射两种方法, 结果表明: 表达质粒与转座酶 mRNA 共注射和表达质粒单独注射均能观察到红色荧光和绿色荧光在斑马鱼心脏组织中特异表达, 并且两者的时空模式相同 (图 4); 且有无转座酶 mRNA 的显微注射, 阳性个体之间红色荧光和绿色荧光在心脏组织中分布和均一性等均有不同程度的差异, 并未发现共注射阳性个体的均一性明显优于单独注射阳性个体; 只是共注射编码转座酶 mRNA 的斑马鱼胚胎表达红色荧光和绿色荧光的阳性率高达 18%, 单独注射 *Tol2* 转座子重组表达载体只有 3%~6%, 但表达阳性率的高低并不影响转基因表达载体的定性分析^[12]。

本实验构建的 pTol2-*CMLC2*-IRES-*EGFP* 的斑马鱼转基因表达载体引入一个多克隆位点片段, 能方便插入一个心脏发育候选基因; 与转座酶 mRNA 一起显微注射斑马鱼单细胞期胚胎, *Tol2* 转座子整合效率高可以实现心脏发育候选基因表达序列的高效整合, 通过荧光显微镜观测报告基因 *EGFP* 有无表达, 即能准确分析目的基因的表达情况, 且方法简单易行。因此, 该载体的成功构建对于建立心脏发育候选基因的斑马鱼转基因实验模型具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Ni J, Clark KJ, Fahrenkrug SC, *et al.* Transposon tools hopping in vertebrates. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2008, 7(6): 444-453.
- [2] Inagaki H, Koga A, Bessho Y, *et al.* The tyrosinase gene from medakafish: transgenic expression rescues albino mutation. *Pigment Cell Res*, 1998, 11(5): 283-290.
- [3] Kawakami K, Takeda H, Kawakami N, *et al.* A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Dev Cell*, 2004, 7(1): 133-144.
- [4] Kwan KM, Fujimoto E, Grabher C, *et al.* The Tol2 kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Dev Dyn*, 2007,

- 236(11): 3088–3099
- [5] Koga A, Hori H, Sakaizumi M. Gene transfer and cloning of flanking chromosomal regions using the medaka fish Tol2 transposable element. *Mar Biotechnol (NY)*, 2002, 4(1): 6–11.
- [6] Yant SR, Meuse L, Chiu W, *et al.* Somatic integration and longterm transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 35–41.
- [7] Martínez-Salas E. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10(5): 458–464.
- [8] Hennecke M, Kwissa M, Metzger K, *et al.* Composition and arrangement of genes define the strength of IRES driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(16): 3327–3334.
- [9] Li T, Zhang J. Stable expression of three genes from a tricistronic retroviral vector containing a picornavirus and 9-nt cellular internal ribosome entry site elements. *J Virol Methods*, 2004, 115(2): 137–144.
- [10] Huang CJ, Tu CT, Hsiao CD, *et al.* Germ-line transmission of a myocardium-specific GFP transgene reveals critical regulatory elements in the cardiac myosin light chain 2 promoter of zebrafish. *Dev Dyn*, 2003, 228(1): 30–40.
- [11] Xiao T, Roeser T, Staub W, *et al.* A GFP-based genetic screen reveals mutations that disrupt the architecture of the zebrafish retinotectal projection. *Development*, 2005, 132: 2955–2967.
- [12] Fisher S, Grice EA, Vinton RM, *et al.* Evaluating the biological relevance of putative enhancers using Tol2 transposon-mediated transgenesis in zebrafish. *Nat Protoc*, 2006, 1: 1297–1305.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

植物光合、蒸腾与水分利用的生理生态学

于贵瑞 王秋凤 等著

978-7-03-026045-1 ¥128.00 2010年1月出版

本书以气孔行为控制的植物光合、蒸腾和水分利用为主线，系统地论述了植物光合、蒸腾和水分利用的生理生态学基础，介绍了生态系统的的光合、蒸腾和水分利用效率变化特征及其模型模拟的基础知识和主要的研究进展。本书在论述生物圈与其他圈层间关系的基础上，着重论述了植物的气孔行为及气孔导度的模拟模型，植物光合作用及其模拟方法，植物蒸腾及其模拟方法，植物的水分利用及其模拟模型，以及基于植物光合、蒸腾和水分利用相互作用关系的生态系统碳、水和能量平衡综合模型。

本书是作者研究团队多年科研工作的总结，归纳分析了国内外本研究领域的重要进展，其目的是为国内从事相关领域研究的科技人员提供关于植物光合、蒸腾和水分利用效率方面的参考资料，本书也可作为相关领域的研究生基础教材。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：李韶文（010-64000849） 周文字（010-64031535）

网上订购：www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>，欢迎致电索要书目