

## 红色荧光蛋白基因在转基因唐鱼中遗传和表达的稳定性分析

姜 鹏, 白俊杰\*, 简 清

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380)

**摘要:** 为了评估转红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)基因唐鱼新品系的稳定性,研究了 RFP 基因在不同世代转基因唐鱼中的遗传和表达情况。荧光显微镜下观察显示, RFP 基因在 F<sub>6</sub> 和 F<sub>10</sub> 代所检测的组织器官中均有表达, 并且两个世代间相同组织部位的表达水平相似。F<sub>6</sub> 和 F<sub>10</sub> 代个体分别配对繁殖实验表明, RFP 基因在转基因唐鱼后代中的遗传仍然符合孟德尔分离规律, 而且培育出的转基因个体表型特征无显著差异。利用 PCR 技术在 F<sub>2</sub>、F<sub>6</sub> 和 F<sub>10</sub> 代转基因唐鱼基因组中扩增外源性肌球蛋白轻链 2 启动子、RFP 基因编码区和整合位点上下游侧翼区域(片段总长度为 4 883 bp), 测序结果显示, 3 个世代间的外源基因序列完全相同, 没有发生碱基缺失或突变等现象。研究表明, 红色荧光蛋白基因在转基因唐鱼传代培育过程中保持了稳定的遗传和表达。

**关键词:** 唐鱼; 红色荧光蛋白; 基因; 表达

**中图分类号:** Q 781; S 917.4

**文献标志码:** A

转基因生物成功的构建不仅要求外源基因能够稳定地整合到受体基因组内, 而且需要外源基因在转基因生物及其子代中稳定地遗传和表达。然而, Migliaccio 等<sup>[1]</sup>在转基因 K562 细胞传代培养过程中发现, 虽然外源基因能在宿主基因组上的大多数位点完成整合和表达传代, 但是其中只有少数位点可使其保持高效表达和长期稳定的遗传。另外, Franz 等<sup>[2]</sup>在研究一种转基因埃及伊蚊品系时发现, 当外源基因传至 F<sub>14</sub> 代时, 外源基因 mRNA 表达量开始下降, 并在 F<sub>17</sub> 代时完全停止表达; 同时, 多数研究报告已显示, 转基因启动子区甲基化是引起外源基因表达水平下降甚至失活沉默的关键因素<sup>[3-4]</sup>。除了上述的位置效应和 DNA 甲基化以外, 还有其他多种因素, 如转植基因的构成、组蛋白乙酰化和共抑制等都可能影响到外源基因的稳定性<sup>[5-7]</sup>。由此可见, 对培育出的转基因品系进行外源基因遗传和表达的稳定性跟踪检测是其推广应用过程中的重要环节之一。

唐鱼(*Tanichthys albonubes* Lin)又名白云金丝鱼, 隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、唐鱼属(*Tanichthys*), 是原产于我国广州白云山附近溪流的一种小型观赏鱼类<sup>[8]</sup>。2003 年, 本实验室利用显微注射技术, 将含有斑马鱼肌球蛋白轻链 2(myosin light polypeptide 2, mylz2)启动子的红色荧光蛋白表达载体(pMYL Z2-RFP)注射到唐鱼受精卵中, 开发出一种体色红艳更具观赏价值的转基因唐鱼新品系<sup>[9]</sup>。对此品系的研究发现, RFP 基因是以单位点三拷贝首尾串联的形式整合到唐鱼基因组中<sup>[10-11]</sup>, 而且 RFP 基因的遗传符合孟德尔分离定律, 不存在沉默整合个体<sup>[12]</sup>。如今, 转基因唐鱼品系已培育至第 10 代, 为了深入了解 RFP 基因在转基因唐鱼后代中的稳定状况, 本实验以不同世代的转基因唐鱼为材料, 分析了 RFP 基因在世代间的表达情况、分离规律和分子遗传结构特征。本研究也将为正在开展的转基因唐鱼生态安全风险评估、今后的品种鉴定和商品化生产

收稿日期: 2011-11-09 修回日期: 2012-01-09

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2009AA10Z105); 广东省科技计划项目(2010B020308002); 广东省海洋渔业科技推广专项子项目(A200899F01)

通讯作者: 白俊杰, E-mail: jjbai@163.net

等提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

转红色荧光蛋白基因唐鱼取自中国水产科学研究院珠江水产研究所转基因鱼培育室。实验用不同世代转基因唐鱼均是同一品系内个体通过自交或测交繁殖获得的。配对繁殖用野生型唐鱼购自广州花鸟鱼虫市场。繁殖实验是在封闭的室内环境中完成,室温保持在 22~26 °C,光照周期为 12L : 12D。实验用水为除氯曝气后的自来水。实验用鱼暂养在 40 cm×30 cm×30 cm 的水族箱中,雌雄分开饲养。主要喂食丰年虫和人工饲料。一周换水一次,换水量为 50 %。

### 1.2 实验方法

**RFP 基因在转基因后代中的表达检测** 选取 F<sub>6</sub> 和 F<sub>10</sub> 代转基因唐鱼活体进行解剖,取其肌肉、尾鳍、眼、鳃、心脏、肠、鳔、脾和性腺等 9 个组织器官,于荧光显微镜下观察红色荧光蛋白的表达情况,CCD 拍照成像。同时对照检测两世代同胞非转基因个体是否存在荧光蛋白表达现象。

**转基因后代的配对繁殖** 配对繁殖实验共分为 3 组: (1) 转基因杂合子 F<sub>6</sub> 与野生型唐鱼的测交组。共配鱼 8 对,雌雄 F<sub>6</sub> 代转基因唐鱼各 4 尾。(2) 转基因杂合子 F<sub>6</sub> 的自交组。将产后的第一组转基因亲鱼培育一段时间后,再进行自交繁殖配对,共配鱼 4 对。(3) 转基因纯合子 F<sub>10</sub> 与野生型唐鱼的测交组。共配鱼 4 对,雌雄 F<sub>10</sub> 代转基因唐鱼各 2 尾。每组均挑选体格健壮、发育良好的性成熟唐鱼,以一缸一对分别置于 30 cm×20 cm×17 cm 的玻璃缸中进行繁殖。缸中水深 12 cm,放置少许洗净消毒后的水草。交尾产卵后,将各缸受精卵一并移至孵化缸中培养。至 2 月龄时,分别

统计红色转基因个体在 3 组培育群体中的比例,并观察比较转基因个体间的表型特征等情况。

**不同世代中转基因序列的 PCR 扩增与测序** 根据已获知的 RFP 基因在转基因唐鱼基因组上的整合序列信息<sup>[10]</sup>,应用 Primer premier 5.0 分别在整合位点上下游侧翼区、启动子区和 RFP 基因编码区设计 4 对特异性引物用于 PCR 扩增(表 1)。

随机从 F<sub>2</sub>、F<sub>6</sub>、F<sub>10</sub> 代唐鱼中分别各取 3 尾转基因和 3 尾同胞野生型唐鱼,剪取尾鳍,参照 Tiangen 试剂盒说明书提取基因组 DNA 用作模板。PCR 反应体系为 50 μL,包括 10 × PCR buffer(Mg<sup>2+</sup>) 5.0 μL, dNTP(10 μmol/L) 1 μL,上、下游引物(20 μmol/L)各 1 μL,模板 DNA 0.75 μL, Taq DNA 聚合酶 2.5 U,其余用 ddH<sub>2</sub>O 补齐。反应程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 53~60 °C 30 s(表 1), 72 °C 1 min ~ 2 min 30 s(根据目的条带的长度而定), 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送至上海生物工程技术有限公司进行测序。

## 2 结果

### 2.1 RFP 基因在转基因唐鱼后代中的表达特征

在普通光照下, F<sub>6</sub> 和 F<sub>10</sub> 代转基因唐鱼的表型特征保持一致,体型和体色相近(图版-1)。荧光显微镜下观察结果显示: RFP 基因在 F<sub>6</sub> 和 F<sub>10</sub> 代转基因唐鱼所检测的 9 个组织器官中均有表达,其中肌肉和鳃部的表达量相对较高(图版-2, 5), 鳍条和脾脏相对较低(图版-3, 9)。虽然不同组织 RFP 表达量有差别,但是两个世代间相同组织部位的 RFP 表达量相似(图版-2~10)。同时,在两世代同胞非转基因个体的组织器官中未检测到有荧光表达。结果表明,外源性 RFP 基因在转基因唐鱼传代过程中的表达分布及表达水平保持稳定。

表 1 PCR 扩增引物序列

Tab. 1 Primers used for PCR amplification

扩增区域 amplified regions	引物序列(5'-3') primer sequence	预期片段/bp expected length	退火温度/°C annealing temperature
上游侧翼区 upstream flank	F: GTTGCTGCCAAACAGAGGACCATCG R: CATTGTTTGTCTTCTTGATTTTCCC	1 155	60
启动子区 promoter	F: TTCGCCACAGAGGAATGAGC R: TGTCTGTACTTGAGGGGCT	1 936	53
RFP 基因编码区 RFP coding	F: ATCAGTATCAGATTCATCCCATTCC R: ACCTCTACAAATGTGGTATGGCTG	963	55
下游侧翼区 downstream flank	F: CGGGTTGGACTCAAGACGATAG R: TGAGCCGACCAATGCAGAGATAGC	829	55

## 2.2 *RFP* 基因在转基因唐鱼后代中的分离规律

第一组  $F_6$  代测交共培育出 253 尾唐鱼, 其中红色个体数为 138 尾, 红色表型率占 54.5%, 转基因与野生型两种表型性状之比接近 1:1; 第二组  $F_6$  代自交共培育出 58 尾唐鱼, 其中红色个体数为 44 尾, 红色表型率占 75.9%, 转基因与野生型两种表型性状之比接近 3:1, 而且在这两组中转基因和野生型个体的体色特征差异明显, 无杂色、褪色等变异个体出现。第三组  $F_{10}$  代纯合子测交共培育出 103 尾唐鱼, 全部为红色转基因个体且体色特征一致。以上配对繁殖结果表明: *RFP* 基因的遗传仍然符合孟德尔单显性基因分离规律。

## 2.3 转植基因分子遗传结构的稳定性分析

4 对引物在  $F_2$ 、 $F_6$  和  $F_{10}$  代转基因唐鱼基因组中均扩增出与预期大小相符的特异性单一条带, 而在对应的同胞野生型唐鱼中未扩增出条带(图 1)。结果表明, 转基因序列在传代过程中未发生重要的修饰或缺失, 也不存在基因沉默现象。将测序

结果与先前已知转基因整合序列信息相比较, 结果显示: 转植基因-宿主 DNA 上下两端连接点, 表达载体-*mylz2* 启动子始末两端连接点和 *RFP* 基因-表达载体连接点序列均保存完好, 而且所检测的 4 个片段(共 4 883 bp)在 3 个世代的转基因唐鱼基因组中均未发现有碱基突变或缺失。

## 3 讨论

虽然显微注射用 pMYLZ2-*RFP* 表达载体中斑马鱼 *mylz2* 启动子具有调控基因在骨骼肌特异性表达的功能<sup>[13-14]</sup>, 但是荧光显微镜下观察显示, *RFP* 基因在  $F_6$  和  $F_{10}$  代转基因唐鱼的 9 个组织器官中均有表达, 表现出一种异位表达现象。这与陈敏等<sup>[15]</sup> 对  $F_3$  代同品系转基因唐鱼的观察结果一致, 由此可说明转基因唐鱼在传代过程中 *RFP* 基因的表达模式未发生改变。而且在两个世代间相同组织部位的荧光亮度相似, 即基因表达量相近, 表明 *RFP* 基因的表达水平在世代传递中也未发生改变。*RFP* 基因

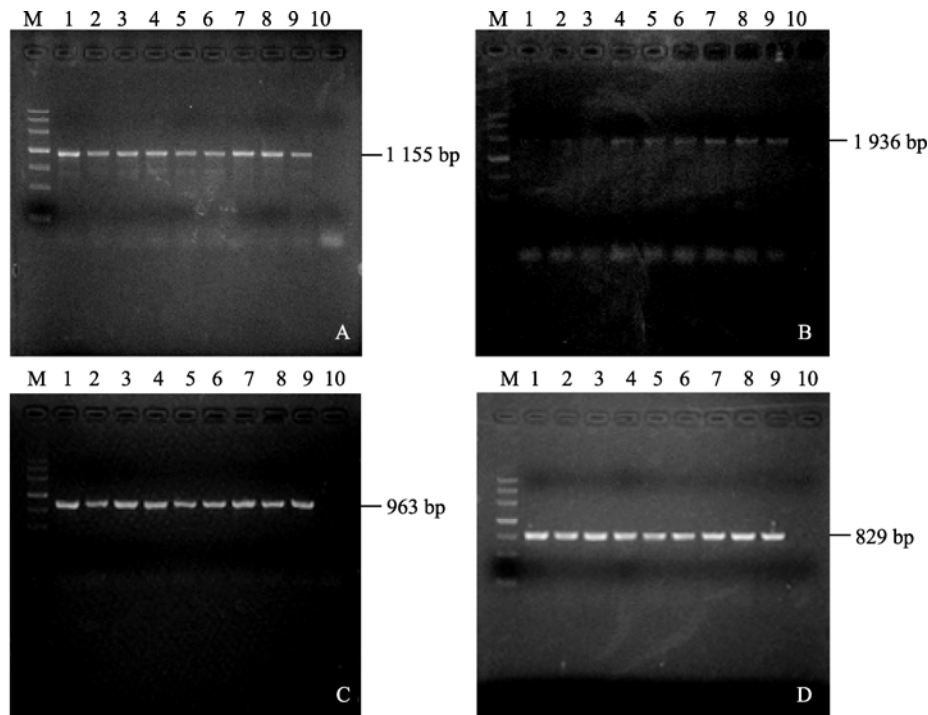


图 1 转植基因序列在不同世代唐鱼中的 PCR 扩增

A. 上游侧翼区域; B. *mylz2* 启动子; C. *RFP* 基因编码区; D. 下游侧翼区域。

M. Marker III; 1~10.  $F_{2A}$ ;  $F_{2B}$ ;  $F_{2C}$ ;  $F_{6A}$ ;  $F_{6B}$ ;  $F_{6C}$ ;  $F_{10A}$ ;  $F_{10B}$ ;  $F_{10C}$ ; 对照组(三尾野生型唐鱼混合基因组 PCR 扩增结果)。

Fig. 1 Amplification of transgene sequences in different generation *T. albonubes* by PCR

A. upstream flanking region; B. *mylz2* promoter region; C. *RFP* gene coding region; D. downstream flanking region.

M. Marker III; 1-10.  $F_{2A}$ ;  $F_{2B}$ ;  $F_{2C}$ ;  $F_{6A}$ ;  $F_{6B}$ ;  $F_{6C}$ ;  $F_{10A}$ ;  $F_{10B}$ ;  $F_{10C}$ ; control group (a template mixture containing three wild-type fish genome DNA was used for PCR amplification).

在唐鱼体内稳定高效的表达可能与转植基因的整合方式、整合位点等密切相关。有研究表明,单拷贝或有限的几个拷贝的整合形式可能更利于外源基因的表达<sup>[16]</sup>,而且整合的位置效应对于外源基因的表达也有着重要影响,能使外源基因正常表达的位点多为非编码 RNA 转录区域<sup>[5]</sup>。在对转基因唐鱼的研究发现,外源性红色荧光蛋白基因是以较简单的单位点三拷贝首尾串联的形式插入到唐鱼基因组中,而且整合位点未靠近已知的功能基因区域<sup>[10-11]</sup>。这些内在特征可能是保证 *RFP* 基因稳定高效表达的重要因素。

虽然不同世代转基因唐鱼显性个体在表型上无显著性差异,但这并不足以证明外源基因在子代群体中具有遗传稳定性。例如, Meyer 等<sup>[17]</sup>对矮牵牛花转化植入玉米 *Al* 基因后,矮牵牛花由原来的白色变为红色,而在进行田间试验时发现红色的转基因矮牵牛花后代中总是夹杂着杂色和白色个体,分析表明,内外在的环境因素导致外源基因中玉米 *Al* 基因的缺失和启动子的甲基化,从而引起了这些变异个体的出现<sup>[18]</sup>。不过,本研究通过繁殖配对实验首先得出, *RFP* 基因在转基因唐鱼后代中的遗传仍然符合孟德尔分离规律,与陈敏等<sup>[12]</sup>对  $F_3$  代转基因唐鱼的实验结果相同,其次在培育出的所有唐鱼幼鱼中未发现体色变异个体。以上这些结果表明, *RFP* 基因保持了稳定的遗传和表达,长期的室内饲养环境和传代繁育并没有引起转植基因发生显著差异。

外源基因在整合到宿主基因组之初,在整合位点区域总会伴随着宿主基因组片段的缺失、未知序列的填充以及转植基因的部分删除或复制等现象<sup>[19-21]</sup>。因此有学者猜测,在长期传代培育过程中,这些位点或区域与内源基因序列相比可能更易于突变或趋于不稳定<sup>[22]</sup>。本研究采用 PCR 方法在不同世代转基因唐鱼基因组中扩增 *mylz2* 启动子、*RFP* 基因编码区和上下游侧翼区域(片段总长度为 4 883 bp),测序结果显示,没有发生碱基缺失或突变,说明转基因序列可在传代过程中保持稳定。同样, Yaskowiak 等<sup>[23]</sup>比较了  $F_2$  和  $F_4$  代转生长激素基因大西洋鲑的外源基因及其侧翼区的序列信息,结果发现两个世代间的相关序列保持一致。 Papazova 等<sup>[24-25]</sup>对多个转基因拟南芥品系后代的侧翼序列进行 PCR 扩增,也未发现任何碱基的缺

失或突变。而在对商品化种植多年的转基因大豆和玉米样品检测中,虽然发现外源基因存在少数碱基突变的情况,但是与内源基因相比,二者的突变率并无显著差异<sup>[22, 26]</sup>。由此可以看出,当外源基因稳定整合到宿主基因组后,它们并不会成为突变的热点区域,而是与内源基因一样共同经受着各种自然条件下引起的基因变异。

综上所述,由 *mylz2* 强启动子和 *RFP* 基因组合成的转基因构件在成功整合到唐鱼基因组中后, *RFP* 在唐鱼体内获得了高效稳定的表达,不过这没有影响宿主唐鱼正常的生理机能<sup>[12, 27-29]</sup>,而且,由此形成的红色体色表现为一种显性性状,并以孟德尔遗传方式稳定地传代。在传代过程中,外源基因功能序列保持完好,未发现拷贝数缺失<sup>[11]</sup>、碱基突变等现象。这些稳定特征将为正在开展的转基因唐鱼生态安全风险评估、今后的品种鉴定和商品化生产等提供积极作用。

#### 参考文献:

- [1] Migliaccio A R, Bengra C, Ling J, *et al.* Stable and unstable transgene integration sites in the human genome: extinction of the green fluorescent protein transgene in K562 cells[J]. *Gene*, 2000, 256: 197-214.
- [2] Franz A W, Sanchez-vargas I, Piper J, *et al.* Stability and loss of a virus resistance phenotype over time in transgenic mosquitoes harbouring an antiviral effector gene [J]. *Insect Molecular Biology*, 2009, 18(5): 661-672.
- [3] Morel J B, Mourrain P, Béclin C, *et al.* DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in Arabidopsis [J]. *Current Biology*, 2000, 10(24): 1591-1594.
- [4] Kong Q R, Wu M L, Huan Y J, *et al.* Transgene expression is associated with copy number and cytomegalovirus promoter methylation in transgenic pigs[J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6679.
- [5] 孔庆然, 刘忠华. 外源基因在转基因动物中遗传和表达的稳定性的[J]. *遗传*, 2011, 33(5): 504-511.
- [6] Stam M, Mol J N M, Kooter J M. The silence of genes in transgenic plants[J]. *Annals of Botany*, 1997, 79(1): 3-12.
- [7] Choi T, Huang M, Gorman C, *et al.* A generic intron increases gene expression in transgenic mice[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(6): 3070-3074.
- [8] Liang X F, Chen G Z, Chen X L, *et al.* Threatened fishes of the world: *Tanichthys albonubes* Lin 1932 (Cyprinidae)[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2008, 82: 177-178.

- [9] 简清, 白俊杰, 叶星, 等. 斑马鱼 *MyIz2* 启动子的克隆与转绿色荧光蛋白基因鱼的构建[J]. 中国水产科学, 2004, 11(5): 391-395.
- [10] 姜鹏, 陈敏, 白俊杰, 等. 外源性红色荧光蛋白基因(RFP)在转基因唐鱼中的整合分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(5): 968-974.
- [11] 樊佳佳, 白俊杰, 马冬梅, 等. 转红色荧光蛋白基因唐鱼外源基因拷贝数的测定[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(1): 61-65.
- [12] 陈敏, 白俊杰, 何小平, 等. 转红色荧光蛋白基因唐鱼的遗传分析和生物学研究[J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(6): 649-654.
- [13] Ju B, Chong S W, He J, *et al.* Recapitulation of fast skeletal muscle development in zebrafish by transgenic expression of GFP under the *mylz2* promoter [J]. *Developmental Dynamics*, 2003, 227: 14-26.
- [14] Zeng Z, Liu X, Seebah S, *et al.* Faithful expression of living color reporter genes in transgenic medaka under two tissue-specific zebrafish promoters[J]. *Developmental Dynamics*, 2005, 234: 387-392.
- [15] 陈敏, 白俊杰, 姜鹏, 等. 红色荧光蛋白基因在转基因唐鱼中的表达[J]. 大连水产学院学报, 2009, 24: 59-63.
- [16] McBurney M W, Mai T, Yang X, *et al.* Evidence for repeat-induced gene silencing in cultured mammalian cells: inactivation of tandem repeats of transfected genes [J]. *Experimental Cell Research*, 2002, 274(1): 1-8.
- [17] Meyer P, Linn F, Heidmann I, *et al.* Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype[J]. *Molecular and General Genetics*, 1992, 231(3): 345-352.
- [18] Linn F, Heidmann I, Saedler H, *et al.* Epigenetic changes in the expression of the maize A1 gene in *Petunia hybrida*: role of numbers of integrated gene copies and state of methylation[J]. *Molecular and General Genetics*, 1990, 222: 329-336.
- [19] 吴波, 朱作言. 转基因动物整合位点的研究进展[J]. *遗传*, 2003, 25(1): 77-80.
- [20] Uh M, Khattri J, Devlin R H. Transgene constructs in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) are repeated in a head-to-tail fashion and can be integrated adjacent to horizontally-transmitted parasite DNA[J]. *Transgenic Research*, 2006, 15: 711-727.
- [21] Nakano A, Suzuki G, Yamamoto M, *et al.* Rearrangements of large-insert T-DNAs in transgenic rice [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2005, 273: 123-129.
- [22] Ogasawara T, Chikagawa Y, Arakawa F, *et al.* Frequency of mutations of the transgene, which might result in the loss of the glyphosate-tolerant phenotype, was lowered in roundup ready soybeans[J]. *Journal of Health Science*, 2005, 51(2): 197-201.
- [23] Yaskowiak E S, Shears M A, Agarwal-Mawal A, *et al.* Characterization and multi-generational stability of the growth hormone transgene (EO-1 $\alpha$ ) responsible for enhanced growth rates in Atlantic salmon[J]. *Transgenic Research*, 2006, 15(4): 465-480.
- [24] Papazova N, Windels P, Depicker A, *et al.* Sequence stability of the T-DNA - plant junctions in tissue culture in *Arabidopsis* transgenic lines[J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25(12): 1362-1368.
- [25] Papazova N, Ghedira R, Van Glabeke S, *et al.* Stability of the T-DNA flanking regions in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants under influence of abiotic stress and cultivation practices[J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(4): 749-757.
- [26] La Paz J L, Pla M, Papazova N, *et al.* Stability of the MON 810 transgene in maize[J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 74(6): 563-571.
- [27] 樊佳佳, 白俊杰, 简清, 等. 食物供应量对转红色荧光蛋白基因唐鱼生存和生长的影响[J]. *动物学杂志*, 2011, 46(2): 108-113.
- [28] 樊佳佳, 白俊杰. 转红色荧光蛋白基因唐鱼与非转基因唐鱼肌肉营养成分的分析和比较[J]. *海洋渔业*, 2011, 33(1): 15-19.
- [29] 姜鹏, 白俊杰, 樊佳佳. 转基因与野生唐鱼耐温限度及窒息点的比较研究[J]. *水生态学杂志*, 2010, 3(6): 92-95.

## Inheritance and expression stability of red fluorescent protein gene in transgenic (*Tanichthys albonubes*)

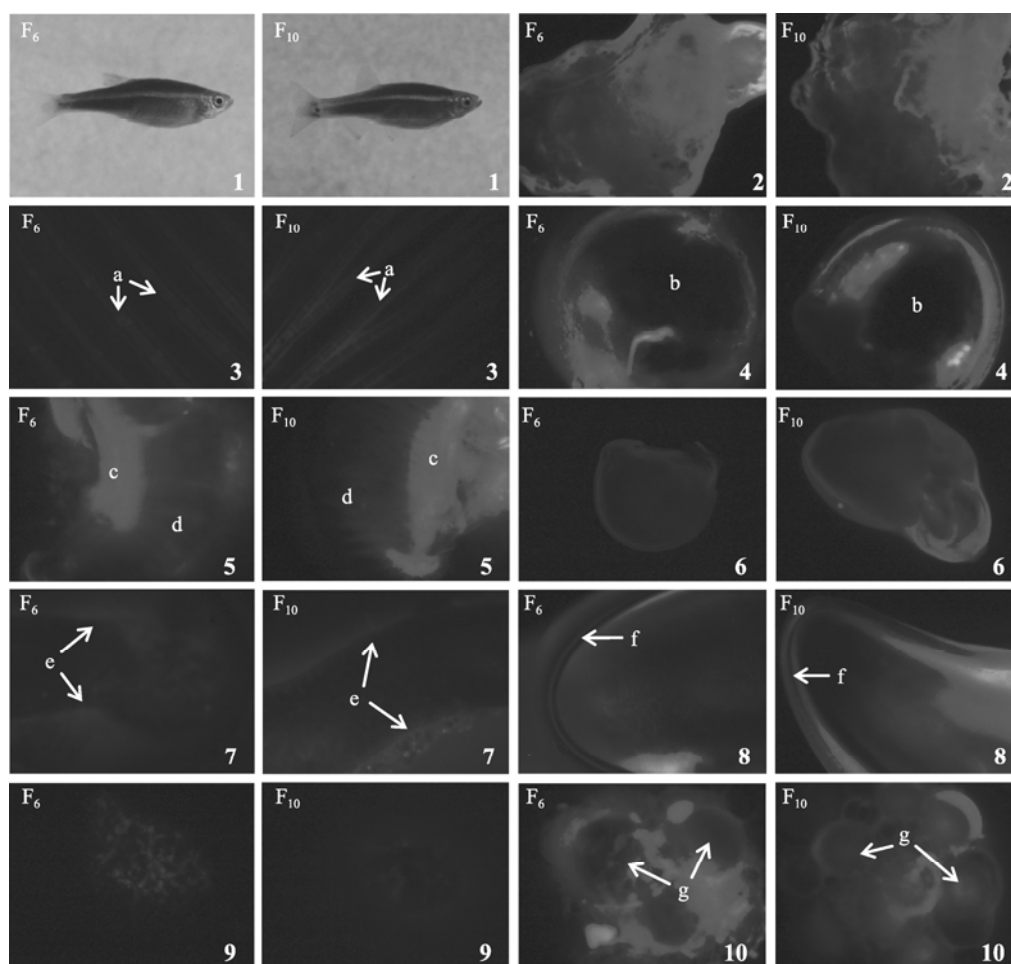
JIANG Peng, BAI Jun-jie\*, JIAN Qing

(Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

**Abstract:** The stability of the red fluorescent protein (RFP) transgenes is important for application of the transgenic *Tanichthys albonubes* line. This paper investigated comparatively the inheritance and expression of *RFP* gene in different transgenic *T. albonubes* generations. Under the observation of fluorescence microscope, *RFP* gene was expressed in almost all body tissues, and both F<sub>6</sub> and F<sub>10</sub> generations had a similar expression pattern. Results of self-cross and test-cross breeding experiments of transgenic F<sub>6</sub> and F<sub>10</sub> individuals indicated that segregation of *RFP* gene still followed Mendelian single-gene inheritance, and their transgenic progenies had a uniform phenotype. The regions including myosin light polypeptide 2 promoter, *RFP* gene coding sequence and transgene flanking junctions were amplified by PCR from genomic DNA of F<sub>2</sub>, F<sub>6</sub> and F<sub>10</sub> generations. Sequence alignment analysis showed that these important regions were well preserved in transgenic fish, and any kind of alteration at nucleotide level was not found. These results suggested that, *RFP* gene in transgenic *T. albonubes* maintained stable inheritance and expression through successive generations.

**Key words:** *Tanichthys albonubes*; red fluorescent protein; gene; expression

**Corresponding author:** BAI Jun-jie. E-mail: jjbai@163.net



图版 荧光显微镜下观察 *RFP* 基因在转基因唐鱼体内的表达情况

1. 普通光照下待解剖的  $F_6$  和  $F_{10}$  代转基因唐鱼; 2. 肌肉; 3. 尾鳍; 4. 眼; 5. 鳃; 6. 心脏; 7. 肠道; 8. 鳔; 9. 脾脏; 10. 卵巢。  
a. 鳍条; b. 玻璃体; c. 鳃弓; d. 鳃丝; e. 肠壁; f. 鳔壁; g. 卵。

**Plate Expression of *RFP* gene in transgenic *T. albonubes* observed under fluorescence microscopy**

1.  $F_6$  and  $F_{10}$  transgenic fish under normal daylight; 2. muscle; 3. caudal fin; 4. eye; 5. gill; 6. heart; 7. intestine; 8. swim bladder; 9. spleen; 10. ovary.  
a. fin rays; b. vitreous body; c. gill arch; d. gill filaments; e. intestinal wall; f. bladder wall; g. eggs.