

周莉,王芳,刘春,等.条件性诱导转基因斑马鱼卵细胞的凋亡和消融[J].华南农业大学学报,2016,37(3):17-22.

条件性诱导转基因斑马鱼卵细胞的凋亡和消融

周莉^{1,2},王芳¹,刘春¹,梁惜梅¹,姜兰¹,李凯彬¹

(1 中国水产科学研究院珠江水产研究所,广东广州510380;2 上海海洋大学水产与生命学院,上海201306)

摘要:【目的】构建针对斑马鱼 *Danio rerio* 卵细胞的可诱导消融品系,并了解其卵巢组织在条件诱导下的去除规律和特性,为相关领域的应用提供材料基础。【方法】利用 Tol2 转座系统建立卵细胞特异表达硝基还原酶(Nitroreductase,NTR)的转基因斑马鱼品系;通过定期采样,连续观察、解剖、组织切片等方法研究甲硝唑(Metronidazole,Mtz)对成熟雌鱼外观及卵巢结构的影响;冰冻切片结合 TUNEL 检测,了解条件性诱导对卵巢细胞凋亡的影响。【结果】获得囊胚细胞具特异荧光标记的转基因鱼,并形成稳定遗传品系。经 Mtz 诱导,该品系成熟雌鱼卵巢结构逐步退化、萎缩,卵母细胞渐渐消融,提示 NTR 在卵细胞特异表达;检测发现 Mtz 可导致卵细胞的凋亡,推测卵巢的组织变化为细胞凋亡所致;撤销 Mtz 胁迫卵巢可再生并恢复生育功能,说明卵巢的消融过程是可逆的。【结论】获得的转基因斑马鱼可通过条件诱导实现卵巢消融与再生。

关键词:斑马鱼;卵巢;卵细胞;消融;*nfkB* 基因;硝基还原酶;甲硝唑

中图分类号:Q954.43 文献标志码:A 文章编号:1001-411X(2016)03-0017-06

Conditionally induced apoptosis and ablation of transgenic zebrafish oocytes

ZHOU Li^{1,2}, WANG Fang¹, LIU Chun¹, LIANG Ximei¹, JIANG Lan¹, LI Kaibin¹

(1 Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
2 College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract:【Objective】To develop a transgenic zebrafish, *Danio rerio*, line in which oocyte ablation can be conditionally induced, study the characteristics of oocyte ablation, and provide materials for future reproduction studies. 【Method】The Tol2 transposon system was used to generate a transgenic zebrafish line which expressed nitroreductase (NTR) enzyme under control of the oocyte-specific gene promoter. The effects of metronidazole (Mtz) on appearance of mature females and internal ovary structure were evaluated by regular sampling, continuous observation, dissection and tissue sectioning. Frozen sections stained by TUNEL were used to detect the induced oocyte apoptosis. 【Result】A transgenic fish line with stable inheritance was obtained and its blastula cells showed specific mCherry fluorescence. Induced by Mtz, the transgenic mature female ovary gradually degenerated and atrophied, and the oocytes progressively ablated. The results indicated NTR expression in the oocytes. TUNEL detection confirmed that Mtz could induce oocyte apoptosis, leading to histological changes in the ovary. Furthermore, the ovarian ablation induced by Mtz was reversible. When the Mtz stress was withdrawn, the oocytes regenerated and the ovary restored its function. 【Conclusion】The transgenic zebrafish obtained in this study can implement ovarian ablation and regeneration through conditional induction.

Key words: *Danio rerio*; ovary; oocyte; ablation; *nfsB* gene; NTR; Mtz

硝基还原酶 B (Nitroreductase B, *nfsB*) 基因源于大肠埃希菌 *Escherichia coli* B, 其编码的硝基还原酶 (Nitroreductase, NTR) 蛋白能与包括甲硝唑 (Metronidazole, Mtz) 在内的含有硝基基团的化合物结合, 产生具有细胞毒性的活性物质。该产物能够有效地结合于 DNA 双链上, 抑制细胞核酸的合成, 干扰细胞的生长, 并最终导致细胞死亡^[1-2]。因而, 通过转基因等技术使某种细胞特异表达 NTR, 在 Mtz 的诱导下可对特定器官或组织进行条件性消除, 这已成为研究器官功能和再生的有效方法^[3-8]。

斑马鱼 *Danio rerio* 个体小、养殖简单、性成熟周期短、体外发育且胚体透明, 相关的胚胎和遗传学操作技术成熟, 不仅成为重要的脊椎动物模式物种, 同时也可作为模型动物用于水产动物基础技术的相关研究^[9]。NTR/Mtz 系统在斑马鱼中也有所发展, 在肝脏、心脏、胰腺等器官消融与再生的相关机制研究得到了良好应用^[10], 与哺乳动物比较更便于对标记细胞的实时观察和追踪。

近年来, 鱼类生殖细胞移植技术有所发展, 为鱼类快速繁育和种子保存提供新的可能^[11]。以成熟个体作为“代理亲鱼”(受体鱼)时, 通常选用三倍体个体或毒物处理亲鱼的方法以去除受体本身的生殖细胞^[12-13], 利用转基因技术构建鱼类 NTR/Mtz 系统或为受体鱼的制备提供新的思路和可能。研究者利用 G4VP16/UAS 系统构建了在卵巢特异表达硝基还原酶的转基因斑马鱼, 可人为控制卵巢的消融, 对于鱼类生殖系统发育与再生研究有重要意义^[14]。在以上研究的基础上, 本研究利用 Tol2 转座系统^[15]构建斑马鱼卵细胞特异表达的转基因载体, 获得转基因斑马鱼品系 [*Tg(zpc:nfsB-mCherry)*], 在透明带蛋白 C (Zona pellucida C, *zpc*) 基因^[16]启动子控制下, 该品系在卵巢组织特异表达 NTR, Mtz 作用可使其卵细胞凋亡, 导致卵巢萎缩, 或可作为“代理亲鱼”应用于异体生殖细胞移植研究。

1 材料与方法

1.1 试验动物

斑马鱼 Tuebingen (Tu) 品系, 养于循环水养殖系统中, 水温为 28.5 ℃, 人工控制光照明暗周期为 14 h: 10 h。仔鱼先以草履虫作为开口饲料, 逐渐添加丰年虾及配合饲料, 成鱼主要喂食配合饲料, 每天早晚各投料 1 次。

1.2 主要试剂和仪器

所有限制性内切酶、pMD18-T、*Taq* 酶为 TaKaRa <http://xuebao.scau.edu.cn>

公司产品; 质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒为 Omega 公司产品; 二甲基亚砜 (DMSO)、Mtz 为 Sigma 公司产品; mMESSAGE mMACHINE® Kit 为 Life 公司产品; PCR 纯化试剂盒为 Qiagen 公司产品; 原位细胞凋亡检测试剂盒为罗氏公司产品; 体式荧光显微镜 (SMZ1270) 为 Nikon 公司产品; EVOS FL Auto 为 Life 公司产品; 显微注射仪为 NARISHIGE 公司产品; 斑马鱼养殖水槽为上海海圣生物实验设备有限公司; LRH 系列生化培养箱为上海一恒科技有限公司; 冷冻切片机、RM2135 型石蜡切片机为 Leica 公司产品。

1.3 构建转基因斑马鱼品系

1.3.1 Tol2-zpc-nfsB-mCherry 质粒构建 以斑马鱼基因组为模板, 通过 PCR 的方法扩增出 *zpc* 基因启动子片段; 分别以大肠埃希菌基因组 DNA 和含荧光蛋白基因 *mCherry* 序列的表达质粒 (购自 TaKaRa Clontech) 为模板, 通过 PCR 扩增出编码 *nfsB* 和 *mCherry* 基因的 CDS 序列, 通过重叠 PCR, 扩增 *nfsB-mCherry* 的 CDS 片段; 以含 SV40-poly (A) 序列的质粒为模板, 通过 PCR 扩增出 SV40-poly (A) 片段。利用在线分析工具 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 分析判断上述扩增片段, 无误后将上述 3 个片段接入 Tol2 骨架中, 构成 Tol2-zpc-nfsB-mCherry 质粒并测序验证 (所有引物见表 1)。

1.3.2 合成转座酶 mRNA PCS 质粒编码转座酶蛋白, 该酶催化供体质粒发生转座反应^[17]。PCS 质粒 *Not* I 酶内切线性化, 纯化试剂盒纯化后, 作为模板按 mMESSAGE mMACHINE® Kit 说明书, 体外合成 5' 帽子结构的转座酶 mRNA。

1.3.3 显微注射 分光光度计测定 Tol2-zpc-nfsB-mCherry 质粒及转座酶 mRNA 的浓度, 分别调整为 200 ng · μL⁻¹、100 ng · μL⁻¹, 等量混合, 显微注射至一细胞期斑马鱼胚胎, 注射部位在卵黄囊与胚体交汇处, 每个胚胎注射约为 1 ~ 2 nL。

1.3.4 转基因品系筛选 经注射胚胎孵化的斑马鱼为 F₀ 代。F₀ 饲养至性成熟挑选母鱼, 与野生型公鱼交配, F₁ 胚胎发育至囊胚期时, 于荧光显微镜下挑选出现特异红色荧光的胚胎继续培育。F₁ 至 2 月龄时剪尾鳍, 提取 DNA, 用针对 *nfsB* 基因特异引物 (*nfsBS*, *nfsBA*, 见表 1) 进行检测, 阳性个体用于品系构建或后续研究。取 2 ~ 3 月龄上述个体, 卵巢组织于荧光显微镜下观察其荧光标记状况。

表1 质粒构建及品系筛选 PCR 引物

Tab.1 PCR primers for plasmids construction and strain screening

引物名称	引物序列(5'→3')
zpcF	CTCGAGCCTGAAAATCCCCATG
zpcR	GGTACCACCGGTATTGCCTGCTGACTAA
nfsBF	ACCGGTGCCACCATGGATATCATTTCT
nfsBR	TGCTCACCATCACTTCGGTTAAGGTG
mCherryF	TTAACCGAAGTGATGGTGAGCAAGGG
mCherryR	GGTACCGAATTCTTACTTGTACAGCTCGT
SV40-poly(A) F	GAATTCCTCCCGGATCTTTGTGAAGGAA
SV40-poly(A) R	GGTACCTTGATGAGTTTGGACAAA
nfsBS	CATTCCACTAAGGCATTTGA
nfsBA	GTTTTGCGGCAGACGAGATT

1.4 NTR/Mtz 系统处理转基因斑马鱼品系

5 mmol · L⁻¹ Mtz 用养殖水配置, φ 为 0.2% 的 DMSO 助溶,随配随用。20 尾转基因及 4 尾野生型雌性成鱼,在 1 L 养殖水槽中饲养,野生型剪掉部分尾鳍,以便区分。试验过程温度保持在(28 ± 1) °C,并注意避光以免 Mtz 分解。整个试验过程每天投喂 1 次,喂食结束,各组换用新鲜配置的 Mtz 溶液。

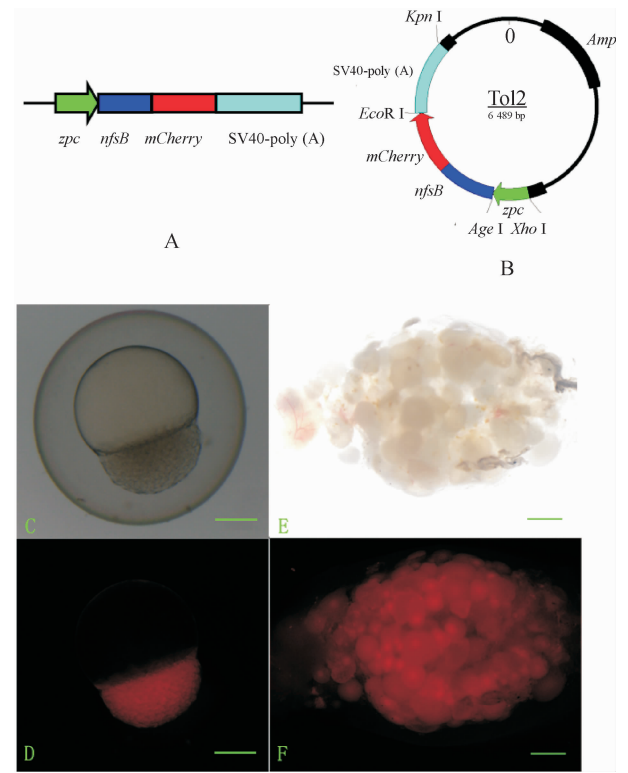
外观及解剖观察:采样时间分别为转基因鱼在处理第 0、4、8、12 天及撤销 Mtz 后第 10、20 天,野生型在处理第 0、12 天,每次 1 尾,用 Tricaine 麻醉,观察腹部大小变化;然后,将鱼的单侧腹部皮肤剪掉,暴露卵巢位置,观察卵巢的大小、形态。组织切片观察:用 Bouns 固定液固定处理 0、4、8、12 d 转基因鱼,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,横向连续切片(厚度约 3 μm),H&E 染色,脱水封片,显微镜观察卵巢结构及卵细胞变化。TUNEL 细胞凋亡检测:对处理 1 d 的野生型及转基因鱼用 0.04 g · mL⁻¹ 多聚甲醛固定,PBST 冲洗,蔗糖脱水,取卵巢部位放入包埋剂,调整到合适位置,置于 -20 °C 条件下,包埋剂凝固后进行冰冻切片(厚度约 10 μm)。根据原位细胞凋亡检测试剂盒说明对冰冻切片进行 TUNEL 细胞凋亡检测。

2 结果与分析

2.1 获得 Tg(zpc:nfsB-mCherry) 转基因斑马鱼

对每个片段测序,斑马鱼 zpc 启动子长 416 bp, nfsB-mCherry 融合蛋白 cDNA 序列长 1 362 bp,SV40-poly(A) 加尾信号长 833 bp(图 1A),通过在线分析工具 BLAST 对测序结果进行核苷酸和氨基酸的序列比对分析,与预期完全吻合,并接入 Tol2,形成 Tol2-zpc-nfsB-mCherry 转基因表达载体(图 1B)。

筛选了 20 尾 F₀ 雌鱼,其中 2 尾产的胚胎囊胚期能观察到红色的特异荧光(图 1D);在 2 尾鱼产的 400 多颗卵中,共获得阳性胚胎 76 个;阳性个体培育至 2 月龄,通过 PCR 鉴定确认其已转入 nfsB 基因;选取部分经上述鉴定鱼,取卵巢,荧光下观察到卵巢组织有明显的特异荧光(图 1F)。



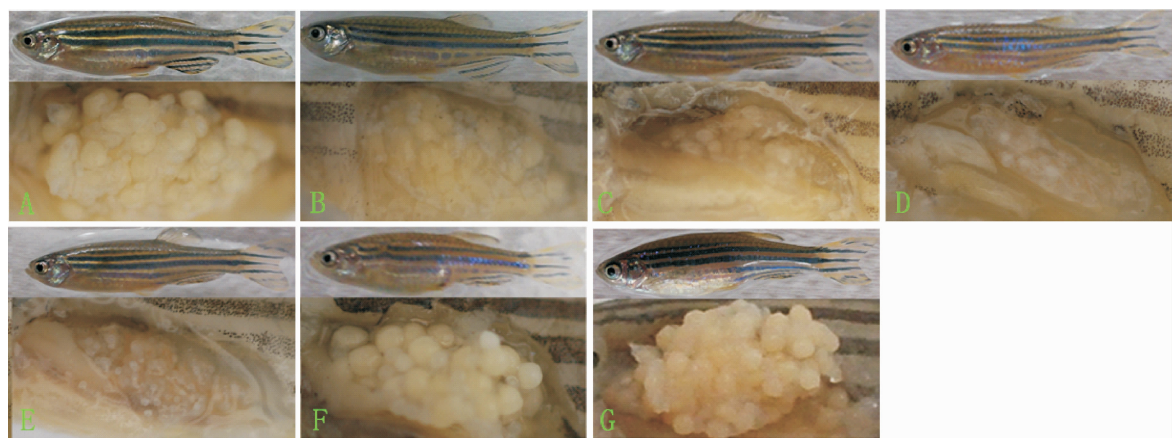
A: 转基因表达元件;B: Tol2 转基因表达载体;C、D 分别为转基因 F₁ 代囊胚期自然光与荧光下图片;E、F 分别为转基因 F₁ 代性成熟卵巢自然光与荧光下图片;标尺 = 50 μm。

图1 转基因鱼质粒构建及荧光观察

Fig. 1 Transgenic fish plasmid construction and fluorescence observation

2.2 转基因斑马鱼卵巢消融与再生的外观及解剖观察

转基因鱼 Mtz 处理之前卵巢中卵粒充盈,形态、大小与野生型类似(图 2A);4 d 腹部外观大小基本无变化,卵巢轻度萎缩,卵粒轻微塌陷(图 2B);8 d 鱼腹部明显变小,卵巢严重萎缩,卵粒变小,数量也明显减少(图 2C);12 d 鱼腹部变小更加明显,甚至有些凹陷,基本没有卵粒,整个消融的卵巢形成明显的空腔(图 2D);撤销 Mtz,恢复 10 d 鱼腹部开始隆起,解剖发现卵粒开始增加(图 2E);20 d 鱼腹部已经恢复到浸泡之前的大小,解剖发现卵粒基本恢复正常(图 2F)。Mtz 浸泡 12 d 的野生型鱼外观大小基本无变化,解剖发现卵巢中充满粗大卵粒(图 2G)。



A: *Tg(zpc:nfsB-mCherry)* 鱼处理前; B、C、D 分别为 *Tg(zpc:nfsB-mCherry)* 鱼浸泡 $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mtz 4、8、12 d; E、F 分别为 *Tg(zpc:nfsB-mCherry)* 鱼撤销 Mtz 恢复 10、20 d; G: 野生型鱼浸泡 $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mtz 12 d。

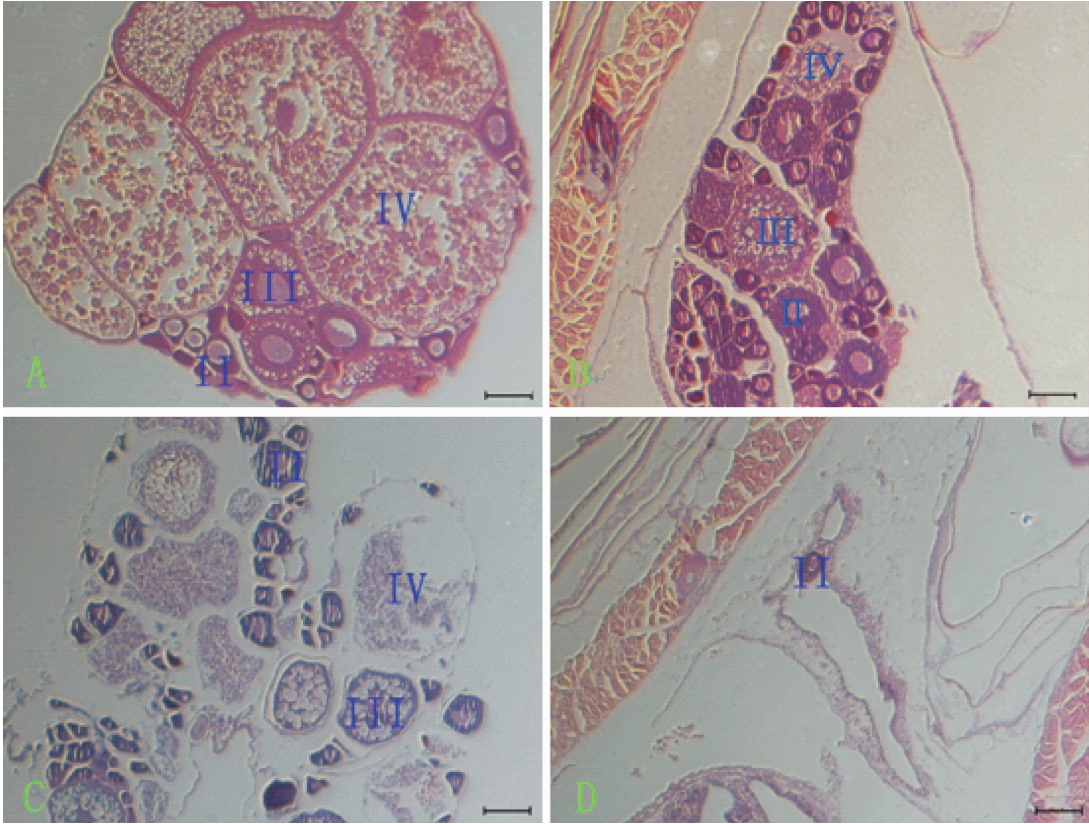
图 2 转基因斑马鱼卵巢消融与再生的外观及解剖图

Fig. 2 External appearance and internal ovarian morphology of *Tg(zpc:nfsB-mCherry)* female during the process of ovarian ablation and regeneration

2.3 转基因斑马鱼卵巢消融的石蜡切片 H&E 染色

未经 Mtz 处理 *Tg(zpc:nfsB-mCherry)* 成鱼卵巢存在第 II、III、IV 时相细胞, 以 IV 时相细胞为主, 第 IV 时相卵母细胞已充分发育, 呈圆球形, 细胞质中充满粗大的卵黄颗粒(图 3A); Mtz 处理 3 d 后, 第 IV

时相卵母细胞出现萎缩, 数量减少, 其余细胞变化不明显(图 3B); 8 d 时, 第 III 时相、IV 时相细胞皱缩, 导致卵巢结构变得松散, 边缘不整(图 3C); 12 d 时, 各时期细胞基本消失, 仅存极少数第 II 时相细胞, 可见卵巢的支撑结构(图 3D)。



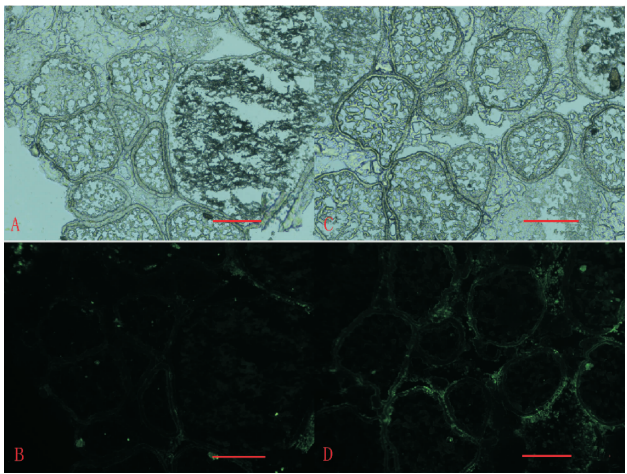
II、III、IV 分别代表第 II、III、IV 时相卵母细胞; A 为 *Tg(zpc:nfsB-mCherry)* 鱼 Mtz 处理前; B、C、D 分别为 *Tg(zpc:nfsB-mCherry)* 鱼浸泡 $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mtz 4、8、12 d; 标尺 = $100\text{ }\mu\text{m}$ 。

图 3 转基因斑马鱼卵巢消融的石蜡切片 H&E 染色

Fig. 3 Images of *Tg(zpc:nfsB-mCherry)* female ovarian paraffin sections with H&E staining during ovarian ablation

2.4 转基因斑马鱼卵巢消融的 TUNEL 检测

通过 TUNEL 细胞凋亡检测,凋亡细胞 DNA 断裂产生的大量黏性 3′—OH 末端,可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)的作用下,被荧光素染成绿色小点。荧光显微镜下,虽然对照组(图 4B)和处理组(图 4D)均可观察到绿色荧光,但处理组的荧光强度远比对照组明显,且密集分布于卵壳位置,勾勒出卵细胞的基本形状,说明经 Mtz 处理 1 d 的转基因鱼卵细胞透明带位置出现了明显的细胞凋亡。对照组也能观察到微弱的荧光,表明卵巢作为代谢活跃的器官,存在正常的细胞凋亡现象。而转基因鱼在 *zpc* 启动子驱动下于透明带特异表达 NTR,与 Mtz 结合导致大量卵细死亡;随着 Mtz 作用时间增加,凋亡细胞为组织重新吸收利用,卵巢便成为由支持细胞组成的空腔结构(图 2D)。



A、B 分别为野生型鱼卵巢自然光、荧光图片;C、D 分别为 *Tg(zpc:nfsB-mCherry)* 鱼卵巢自然光、荧光图片;标尺 = 100 μm。

图 4 转基因斑马鱼 Mtz (5 mmol · L⁻¹) 处理 1 d 卵巢的 TUNEL 检测

Fig. 4 TUNEL detection of *Tg(zpc:nfsB-mCherry)* female ovarian after 1 d exposure to Mtz (5 mmol · L⁻¹)

3 讨论与结论

本研究获得了稳定遗传的转基因斑马鱼品系 *Tg(zpc:nfsB-mCherry)*,该品系可在卵巢组织特异表达 NTR,因而可通过 Mtz 胁迫的方法实行对卵巢的条件性去除。Mtz 作为一种抗厌氧菌和杀原虫药物,大剂量或长时间作用或对鱼体造成不良影响,故其作用时间和剂量是条件去除过程的关键问题^[18]。斑马鱼关于 Mtz 的使用浓度相关报道集中于 5 ~ 10 mmol · L⁻¹^[19-20],笔者也就 Mtz 对幼鱼的毒性进行预试验,发现 10 mmol · L⁻¹时短暂浸泡对斑马鱼的影响不太明显,而长期胁迫甚至可导致少量鱼的死亡,故若使用 10 mmol · L⁻¹的高浓度时应尽量缩短浸泡

时间。

本研究主要针对成鱼卵巢,考虑到该器官相对于鱼体而言是较大的成熟组织,故采用低浓度(5 mmol · L⁻¹)长时间(12 d)的浸泡,也取得了预期的效果。Curado 等^[10]用 10 mmol · L⁻¹的 Mtz 作用由不同启动子驱动 NTR 的转基因斑马鱼幼鱼,24 h 后心脏、胰腺、肝脏等出现细胞消融,并伴随相应的功能缺陷;White 等^[14]采用 5 mmol · L⁻¹的 Mtz 作用转基因动物,也可导致卵巢的条件性去除;Hsu 等^[19]也是用 5 mmol · L⁻¹的 Mtz 处理转基因斑马 14 d,精巢被完全或部分破坏,这与笔者的试验结果相吻合,说明 5 ~ 10 mmol · L⁻¹浸泡是较为合适的作用方式。本研究作用对象为成熟雌鱼,Mtz 的给药方式除了浸泡,也可通过投喂方式给药。口服方法可使鱼体内 Mtz 保持合适浓度,减少体外高剂量药剂对鱼体鳃等组织的长期胁迫,可能是我们模型后续应用的更好选择。

在哺乳动物上,透明带除了作为受体防止多精入卵外,还能为卵细胞的发育提供营养,发育到一定阶段的卵母细胞营养物质靠其微绒毛和放射冠细胞的突起伸入透明带来获取^[21-22]。本研究获得的转基因鱼在 *zpc* 启动子驱动下于卵细胞透明带特异表达 NTR,在 Mtz 的作用初期,通过 TUNEL 检测可发现卵细胞透明带位置出现凋亡,推测 NTR 与 Mtz 形成复合物,结合细胞 DNA 双链发挥功能。透明带消融可能断绝卵母细胞发育的物质来源,随着卵细胞的逐渐消失造成整个卵巢的萎缩^[23]。当撤销 Mtz 的胁迫,斑马鱼恢复 20 d 后,外观上卵巢基本恢复,30 d 后与正常雄鱼交配仍可产生健康后代(结果在文章未体现),表明由于环境中没有 Mtz,生殖相关干细胞发育成的卵细胞虽还表达 NTR,但不会因复合物作用而凋亡,能逐渐发育成成熟卵细胞并恢复生殖功能。从目前研究分析,NTR/Mtz 系统对成熟细胞的条件性去除都是可逆的,而针对于干细胞的消融可能对个体的影响更为复杂,因而,Mtz 对我们获得的转基因品系发育早期的影响还值得进一步研究。

目前,提高鱼类异体(种)生殖细胞移植成功和转化效率可从供体和受体 2 方面入手:保障供体生殖细胞或干细胞的浓度、纯度、活力等;有效移除受体自身功能细胞,减少此类细胞对发育的影响。以斑马鱼作为受体的相关研究中,通常采用 Morpholino 方法在胚胎期针对 *dnd*、*vasa* 等早期发育基因干扰斑马鱼原始生殖细胞(PGC)的形成以去除受体本身生殖细胞^[24]。研究又发现,PGC 的缺失或减少可使鱼体趋向于雄性化发展^[25],故在以成鱼作为受体的移

植应用上或只能获得雄鱼个体,一定程度上限制了应用。本研究获得的斑马鱼品系能条件性消融生殖系用的功能性细胞——卵细胞,但仍保留卵巢的支持结构,作为受体应可接受外来的生殖原细胞甚至于PGC,或可作为雌性受体系统发展,为鱼类“代理亲鱼”技术的发展提供材料基础和技术思路。

参考文献:

- [1] 孔德明,秦帅,李珊珊. 构建甲硝唑诱导转基因斑马鱼胰岛 β 细胞的破坏模型[J]. 贵阳中医学院学报, 2013, 35(3): 45-47.
- [2] FELMER R N, CLARK J A. The gene suicide system Ntr/CB1954 causes ablation of differentiated 3T3L1 adipocytes by apoptosis[J]. Biol Res, 2004, 37(3): 449-460.
- [3] 李心乐. 斑马鱼松果体对视觉敏感性生物钟的维持作用及长时记忆缺陷突变体的筛选[D]. 天津:南开大学, 2013.
- [4] CHEN C F, CHU C Y, CHEN T H, et al. Establishment of a transgenic zebrafish line for superficial skin ablation and functional validation of apoptosis modulators *in vivo* [J]. Plos One, 2011, 6(5): e20654-e20654.
- [5] CHUNG A Y, KIM P S, KIM S, et al. Generation of demyelination models by targeted ablation of oligodendrocytes in the zebrafish CNS[J]. Mol Cells, 2013, 36(1): 82-87.
- [6] MATHIAS J R, ZHANG Z, SAXENA M T, et al. Enhanced cell-specific ablation in zebrafish using a triple mutant of *Escherichia coli* nitroreductase[J]. Zebrafish, 2014, 11(2): 85-97.
- [7] SHIMIZU Y, ITO Y, TANAKA H, et al. Radial glial cell-specific ablation in the adult zebrafish brain[J]. Genesis, 2015, 53(7): 431-439.
- [8] WILLEMS B, BUTTNER A, HUYSEUNE A, et al. Conditional ablation of osteoblasts in medaka [J]. Dev Biol, 2012, 364(2): 128-137.
- [9] 贾顺姬,孟安明. 中国斑马鱼研究发展历程及现状[J]. 遗传, 2012, 34(9): 1082-1088.
- [10] CURADO S, STAINIER D Y R, ANDERSON R M. Nitroreductase-mediated cell/tissue ablation in zebrafish: A spatially and temporally controlled ablation method with applications in developmental and regeneration studies [J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 948-954.
- [11] SAITO T, GOTO-KAZETO R, KAWAKAMI Y, et al. The mechanism for primordial germ-cell migration is conserved between Japanese eel and zebrafish[J]. Plos One, 2011, 6(9): e24460.
- [12] 覃钦博,戴婧,刘少军,等. 异源三倍体鲫的遗传组成和生殖特性观察[J]. 水产学报, 2014, 38(3): 356-361.
- [13] 王群. 双酚A诱导小鼠睾丸生殖细胞凋亡的分子机制[D]. 安徽:安徽医科大学, 2011.
- [14] WHITE Y A R, WOODS D C, WOOD A W. A transgenic zebrafish model of targeted oocyte ablation and de novo oogenesis[J]. Dev Dynam, 2011, 240(8): 1929-1937.
- [15] 陈婷芳,罗娜,谢华平,等. 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[J]. 生物工程学报, 2010, 26(2): 230-236.
- [16] ONICHTCHOUK D, ADUROJA K, BELTING H G, et al. Transgene driving GFP expression from the promoter of the zona pellucida gene *zpc* is expressed in oocytes and provides an early marker for gonad differentiation in zebrafish [J]. Dev Dynam, 2003, 228(3): 393-404.
- [17] PENG K C, PAN C Y, CHOU H N, et al. Using an improved Tol2 transposon system to produce transgenic zebrafish with epinecidin-1 which enhanced resistance to bacterial infection[J]. Fish Shellfish Immun, 2010, 28(5): 905-917.
- [18] BURTIN P, TADDIO A, ARIBURNU O, et al. Safety of metronidazole in pregnancy: A meta-analysis[J]. Am J Obstet Gynecol, 1995, 172(2): 525-529.
- [19] HSU C C, HOU M F, HONG J R, et al. Inducible male infertility by targeted cell ablation in zebrafish testis[J]. Mar Biotechnol, 2010, 12(4): 466-478.
- [20] HUANG J, MCKEE M, HUANG H D, et al. A zebrafish model of conditional targeted podocyte ablation and regeneration[J]. Kidney Int, 2013, 83(6): 1193-1200.
- [21] 国玉蕊,黄国宁,王亚平,等. 透明带结构与受精结局的关系分析[J]. 生殖医学杂志, 2010, 19(2): 154-156.
- [22] 徐丽. 卵透明带蛋白ZPC免疫抗受精机理的研究[D]. 北京:中国科学院动物研究所, 2006.
- [23] HU S Y, LIN P Y, LIAO C H, et al. Nitroreductase-mediated gonadal dysgenesis for infertility control of genetically modified zebrafish[J]. Mar Biotechnol, 2010, 12(5): 569-578.
- [24] SLANCHEV K, STEBLER J, GOUDARZI M, et al. Control of dead end localization and activity-implications for the function of the protein in antagonizing miRNA function [J]. Mech. Dev, 2009, 126(3): 270-277.
- [25] DRANOW D B, TUCKER R P, DRAPER B W. Germ cells are required to maintain a stable sexual phenotype in adult zebrafish[J]. Dev Biol, 2013, 376(1): 43-50.

【责任编辑 庄延柴 焰】