

# 外源基因在蓝太阳鱼胚胎发育过程中的表达<sup>\*</sup>

曹运长<sup>1</sup>, 李文笙<sup>1</sup>, 叶 正, 林浩然<sup>1</sup>

(1. 中山大学水生经济动物研究所 // 广东省水生经济动物繁殖重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 广东省番禺国家级罗非鱼良种场, 广东 广州 511453)

**摘 要:** 通过基因重组, 将石斑鱼生长激素基因编码序列克隆到鲤鱼  $\beta$ -actin 基因启动子下游, 构建成全鱼基因重组子。采用显微注射法将报告基因 GFP 基因导入蓝太阳鱼受精卵中, 研究了外源基因在鱼类胚胎发育中的整合与表达的时序。结果表明 GFP 在原肠末期开始表达, 一直到鱼苗期并未出现表达量的衰减, 并表现为嵌合性表达。在受体胚胎早期, 外源基因的表达与基因构型和注射的剂量有关, 环形质粒的表达要略高于线形质粒, 较高浓度的外源基因的表达效率要高。同时将 GFP 基因与全鱼基因重组子进行了共转移, 结果表明两种独立的基因在受体中的整合或表达没有必然的联系。

**关键词:** GFP; 生长激素基因; 基因重组; 基因转移; 共转移

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 03-0062-05

绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 是深海水母中一种发光的物质, 自 1995 年 Amsterdam 等<sup>[1]</sup> 最先把 GFP 基因成功转入鱼中并得到了预期表达以来, GFP 作为一个在体的活性报告基因已得到了广泛的应用。GFP 为研究基因表达调控、基因启动子或增强子功能、追踪细胞谱系和细胞迁移、突变筛选等提供了重要的研究手段<sup>[2]</sup>。

蓝太阳鱼 (Green sunfish, *Lepomis cyanellus* Rafinesque) 是我国新近从美国引进的淡水经济鱼类, 成鱼个体小 (100 ~ 200 g), 其性成熟时间短, 越冬鱼的性腺即可成熟; 为多批产卵类型, 产卵周期长, 在广东从 2 月份到 10 月份都可产卵; 成熟卵半透明, 卵膜薄, 用胰蛋白酶处理易脱离, 是鱼类转基因研究的好材料。根据已有的报道<sup>[3]</sup>, 生产转基因鱼的成功率会因鱼的种类、外源基因的构成元件等不同而不同, 为了初步了解外源基因在蓝太阳鱼中的存在、整合和表达的情况、以及在进行成功基因转移时所必须注意的问题, 如注射部位、注射剂量、外源基因的构型等对转基因成功率的影响等, 同时为了简便快速地筛选转基因阳性个体, 进行了报告基因 GFP 在太阳鱼中的转基因研究及 GFP 和生长激素基因的共转移实验。

## 1 材料与方法

### 1.1 工具酶与主要试剂

限制性内切酶 *Nco* I、*Eco* R I、*Pvu* I 和 *Ex*

Taq 酶购自 TaKaRa 公司, T4DNA 连接酶购自 Promega 公司, 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自 Omega 公司, 实验所用菌株都为大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 生长激素重组子的测序与 PCR 检测所用引物均为上海生工公司完成。

### 1.2 GFP 基因准备

GFP 基因为 pCK-EGFP-1, 启动子为表皮角蛋白基因的调控序列 CK (cytokeratin), GFP 为增强型 EGFP-1, 它的表达强度要比通常的 GFP 高 30 ~ 40 倍<sup>[2]</sup>。为新加坡国立大学 Gong Zhi yuan 博士惠赠, 详细资料见文献 Ju 等<sup>[4]</sup>。将 pCK-EGFP-1 质粒扩大培养后用质粒提取试剂盒抽提纯化质粒。一组实验为注射环形和线形两种不同构型的 pCK-EGFP-1 质粒, 线形质粒为 *Eco* R I 对 pCK-EGFP-1 质粒进行线性化, 用双蒸水分别将两者溶解为 100 ng/ $\mu$ L。同时进行另一组实验, 注射浓度为 400 ng/ $\mu$ L 的环形 pCK-EGFP-1 质粒。

### 1.3 外源重组基因的构建及与 GFP 的共转移

选择全鱼基因元件构建, 启动子为鲤鱼  $\beta$ -actin 启动子 (CA), 克隆在 pUC118 质粒上 (简称为 pCAGcGH), 为中科院武汉水生所朱作言院士惠赠。编码基因为石斑鱼生长激素 cDNA 的开放读码框, 转录终止信号为 3' 非翻译区和加尾信号, 为本实验室克隆在 pGEM-T 载体上 (简称为 pGEM-TecGH)。用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Eco* R I 分别将 pCAGcGH 质粒 pEMG-TecGH 质粒双酶切, 分别回收质粒和启

\* 收稿日期: 2003-09-02

基金项目: 国家自然科学基金倾斜专项基金资助项目 (39970586); 广东省自然科学基金资助项目 (200223002)

作者简介: 曹运长 (1975 年生), 男, 博士研究生; 通讯联系人: 林浩然; E-mail: ls32@zsu.edu.cn

动子序列和生长激素 cDNA 的开放读码框和转录终止信号片段，然后用 T4DNA 连接酶进行回收片段的连接，DNA 重组子经过 PCR 鉴定、双酶切鉴定、测序鉴定。重组子扩大培养、抽提、纯化后，显微注射前用 *Pvu* I 和 *Eco* R I 双酶切切除质粒序列。共转移的 GFP 基因为线形 pCK EGFP-1，同 1.2，两种基因都用双蒸水溶解为 100 ng/μL，然后以 1:1 的比例混合。

1.4 外源基因的显微注射

采用湿法受精获得受精卵，用  $w = 0.25\%$  的胰蛋白酶进行脱膜处理，外源基因的显微注射和胚胎的培育采用朱作言等<sup>[9]</sup>的方法。

1.5 GFP 基因表达的观察和检测

在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达，绿色荧光蛋白激发波长为 480 ~ 510 nm，采用活体观察，随机选取胚胎用吸管将其置于盛有一两滴水的带凹槽的玻片上，在可见光源下把胚胎移入观测视野中，然后关闭可见光，在蓝光下观察并拍摄图片，观察完后把胚胎重新放入水中孵育。

1.6 DNA 的提取

将共转移后第 8 天的鱼苗取样，用常规的酚/氯仿方法提取：单尾鱼苗加入 150 μL DNA 提取液<sup>[9]</sup> (0.1 mg/mL 蛋白酶 K)，在 50 °C 水浴摇床中消化过夜，加入 150 μL 酚/氯仿，颠倒混匀，10 000×g 离心 10 min，取上清，再用酚-氯仿抽提一次，取上清加入 50 μL 7.5 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵和 200 μL 无水乙醇，混匀，-20 °C 沉淀 5 h，10 000×g 离心 10 min，用  $\varphi = 70\%$  乙醇洗沉淀两次，空干溶于 10 μL 双蒸水中，-20 °C 保存。

1.7 PCR 检测

对共转移的鱼苗进行转植基因 CAecGHc 基因的检测：20 μL 反应体积中含有 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.4)、50 mmol·L<sup>-1</sup> KCl、1.5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、2 种引物各 200 nmol·L<sup>-1</sup>、4 种脱氧核糖核苷三磷酸各 200 μmol·L<sup>-1</sup>、0.5 个单位的 *Ex Taq* DNA 聚合酶、模板为总 DNA 约 0.1 μg；反应液在 94 °C 预变性 4 min，然后 94 °C 变性 45 s、57 °C 退火 45 s、72 °C 延伸 1 min，共 32 个循环，最后 72 °C 保温 10 min。CAecGHc 基因的检测引物 P1 位于启动子 CA 的 3' 末端，碱基序列为 5' - GAA CCC TAT GTC TCT GCT GAG TG - 3'；引物 P2 位于 ecGHc 结构基因上，碱基序列为 5' - CGA CAA CAG CTT CAA CAC GGA G - 3'，引物之间的长度为 562 bp。 $w = 1.2\%$  琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统检测。

2 实验结果

2.1 外源重组基因的构建

构建好的外源重组质粒如图 1，命名为 pCAecGHc，包括以下 4 个部分：①CA，2.5 kb 的鲤鱼 β-肌动蛋白基因启动子及上游序列，为重组基因的启动调控部分；②ecGHc，0.61 kb 的石斑鱼生长激素 cDNA 的编码区，为重组基因的蛋白编码区部分；③ecGH 3' UTR，0.3 kb 的石斑鱼生长激素基因含加尾信号在内的 3' 端非编码区，为重组基因的转录终止信号；④克隆质粒载体，3.17 kb 的 *Hind* III/*Eco* R I 双酶切的 pUC118 片段。

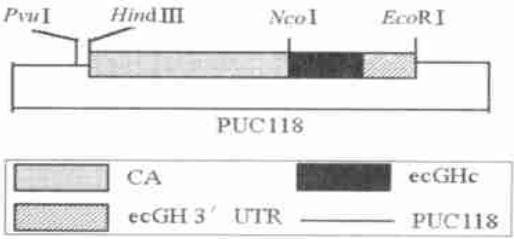


图 1 重组质粒 PCAecGHc 结构示意图

Fig. 1 Structure of the recombinant plasmid pCAecGHc

测序结果表明，构建的重组子序列与各全鱼基因构成元件序列完全相同，结构基因翻译起始密码子与启动子连接位点的测序结果见图 2。说明连接非常精确，完整地保留了鲤鱼 β-actin 基因的 Kozak 序列<sup>[7]</sup>，没有插入也没有删减任何碱基。

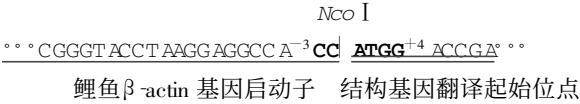


图 2 重组基因完整的 Kozak 序列

Fig. 2 Complete Kozak sequence of recombinant gene

2.2 GFP 基因在胚胎各时期的表达

将分别注射有环形和线形 pCK EGFP-1 质粒的受精卵培养于 Holtfreter 氏工作液<sup>[9]</sup>中，从受精后 5 h 开始在荧光显微镜下观察荧光蛋白的表达。环形 pCK EGFP-1 质粒显微注射入受精卵后，GFP 基因从原肠末期开始表达，一直持续到鱼苗期（受精后第 5 天开始摄食），在受精后第 8 天观察荧光蛋白的表达量都未见其衰减，线形 pCK EGFP-1 质粒导入受精卵后，胚胎也是从原肠末期出现荧光蛋白的表达，到鱼苗期还持续表达。胚胎各时期的表达情况如表 1。不同注射剂量的表达效率不同，注射浓度为 400 ng/μL 实验组的胚胎在尾芽期和鱼苗期的表达率分别为 35.5% 和 46%，其孵化率为 36.5%，注射浓度为 100 ng/μL 实验组的孵化率为 48.3%。

表 1 环形和线形 pCK-EGFP-1

在转基因蓝太阳鱼胚胎中的表达率

Tah 1 expression ratio of supercoiled and linearized pCK-EGFP-1 in transgenic *Lepomis cyanellus* embryos

| 构型与时期 | 原肠末期          | 尾芽期           | 肌肉效应期         | 鱼苗            |
|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 观察数   | 110           | 115           | 120           | 118           |
| 环形表达率 | 23<br>(20.9%) | 25<br>(21.7%) | 35<br>(29.2%) | 37<br>(31.3%) |
| 观察数   | 98            | 105           | 115           | 110           |
| 线形表达率 | 15<br>(15.2%) | 24<br>(22.8%) | 33<br>(28.7%) | 34<br>(30.9%) |

GFP 基因的启动子为表皮角蛋白基因的调控序列, GFP 在受体胚胎中的表达表现为组织特异性表达, 在荧光显微镜下只在胚胎体表表皮细胞中观察到荧光蛋白的表达, 同时观察到 GFP 基因的表达为嵌合性表达, 有的转基因胚胎或鱼苗在尾部出现绿色荧光, 有的在背部、有的在头部、腹部的表皮细胞中呈现绿色荧光蛋白的表达 (图 3), 在有绿色荧光蛋白表达的所有鱼苗中, 只有一尾表现为荧光蛋白较为均一的表达。

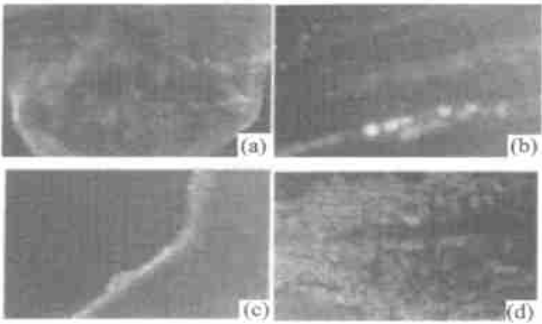


图 3 GFP 在转基因蓝太阳鱼中的表达 (33×)

Fig. 3 GFP expression in transgenic green

sunfish *Lepomis cyanellus* (33×)

- a: GFP 在头部表皮细胞表达;
- b: GFP 在腹部表皮细胞表达
- c: GFP 在背部表皮细胞表达;
- d: GFP 在尾部表皮细胞表达

2.3 pCK-EGFP-1 质粒和 CAecGHc 质粒的共转移

外源 DNA 注射入鱼受精卵后, 经常发现 DNA 形成头对头、头对尾、尾对尾的长串联体或形成分子多联体, 因此双基因共转移时, 两个基因很有可能发生共连接, 从而这两个基因在受体基因组中的整合就具有某种关系, 则可以用一个易于检测的报告基因的整合或表达来表示另一个外源基因的整合或表达情况, 为检测筛选转基因动物提供便捷快速的手段。本实验中, 采用报告基因 GFP (*Eco*RI 线性化) 与线形质粒 CAecGHc (*Pvu*I 和 *Eco*RI 线

性化) 以 1:1 的比例混合, 显微注射共转移, 在受精后第 8 天在荧光显微镜下检测, 挑选有绿色荧光和无绿色荧光的鱼苗各 20 尾, 提取鱼苗总 DNA, PCR 检测 CAecGHc 基因, 结果为有绿色荧光的鱼苗检测 CAecGHc 基因为阳性的有 6 尾, 无绿色荧光鱼苗检测为阳性的为 4 尾 (图 4)。



图 4 共转移鱼苗检测 CAecGHc 的 PCR 结果

Fig. 4 PCR screening of the co-transferred fry by detecting CAecGHc gene

- a: 有绿色荧光蛋白表达鱼苗检测结果;
- b: 无绿色荧光蛋白表达鱼苗检测结果
- M: 100bp+DNA ladder;
- P: 以质粒 pCAecGHc 为模板 PCR 扩增

3 分析与讨论

在对经济鱼类进行转基因研究时, 外源基因的构成元件一般采用来自鱼类自身, 即所谓的全鱼基因。重组基因中最为关键的是基因的调控元件,  $\beta$ -肌动蛋白为细胞骨架蛋白, 它的启动子是能广泛表达的启动子。基因重组中另外必须注意的问题是启动子与编码基因之间的连接必须非常精确, 编码基因不能产生缺失、移码等突变, 在翻译起始密码子 ATG 前最好是不要删减或插入其它碱基, 保留启动子完整的 Kozak 序列会大大提高 mRNA 的翻译效率<sup>[7]</sup>。

在转基因研究中, 转基因动物的检测是最为费时费力的一步, 而利用报告基因却可以简单快速的检测出转基因阳性个体。在鱼类转基因研究的初期, 使用的报告基因有  $\beta$ gal (*E. coli*)、neo (*E. coli*)、Hygromycin (*E. coli*)、CAT、Luciferase 等, 但这些报告基因往往需要使用放射性标记的反应底物, 或涉及酶促反应以及需要牺牲一部分胚胎或鱼苗, 使得检测十分麻烦。1992 年 Prasher 等<sup>[8]</sup>首次克隆了 GFP 基因, 随后 Chalfie<sup>[9]</sup>等最先利用 GFP 作为基因表达的分子标记。与 CAT、 $\beta$ gal 等报告基因相比, GFP 最为显著的特点就是它在借助荧光显微镜下可以直接进行活体观察检测, 不需要添

加任何外源的底物和辅助因子，因此在检测得到转基因个体时可以用于下一步的研究。在本研究中，利用 GFP 报告基因大致了解了外源基因在受体中的整合和表达的时序，以及两种外源基因共转移时的关系。

外源基因显微注射入鱼类受精卵后，在受体胚胎的发育过程中，外源基因要经过复制、降解、聚合、和整合的复杂行为。朱作言等<sup>[9]</sup>的实验发现，外源基因与受体基因组的整合发生在胚胎发生的晚期，在受体胚胎发育到原肠末期时，外源基因即出现转录本，但此时大多数外源基因尚未与受体基因组整合，因此推测这些转录本为胚胎细胞核外“游离”外源基因的转录本，同时认为，摄食阶段的鱼苗中已不存在“游离”外源基因。作者在本实验中观察到，GFP 在原肠末期就开始表达，说明此时外源 GFP 基因应已进入受体胚胎细胞的细胞核中，不可能“游离”于胚胎细胞核外，因为在细胞质中，不存在 DNA 转录所需的各种酶。然而这时的 GFP 基因是否与受体基因组发生了整合？在转基因鱼类中，在早期胚胎中经常观察到外源基因以额外染色体（extra chromosome）的状态进行广泛的复制<sup>[10]</sup>，因此此时 GFP 是以额外染色体的形式存在于细胞核中或是整合在受体基因组中还很难确定。同时观察到，随着受体胚胎的发育，表达 GFP 的胚胎数逐渐增加，而早期表达 GFP 的胚胎在鱼苗期并未见表达出现衰减。作者认为这应该是外源基因 GFP 发生了整合的结果，并且每个胚胎之间发生整合的时期有早有晚，即使在同个胚胎的各个不同的细胞之间，整合的时间也有先后。本实验中还观察到一个普遍的现象是 GFP 的表达具有很高的嵌合性，在观察所有表达荧光蛋白的鱼苗中，只有一尾在全身表皮细胞中表现较为均一的表达，其余要么在头部、背部、腹部、尾部表达，或者在全身的表皮细胞中零星表达。这也说明 GFP 基因在受体中的整合表现为嵌合性整合，即受体有些组织或细胞发生了外源基因的整合，而有些就未发生整合。

外源基因在转基因受体中的整合表达效率与基因的构型有关，Brinster 等<sup>[11]</sup>在转基因鼠中观察到，注射线性的 DNA 能够以头对尾多聚体的形式整合到受体基因组中，其整合效率要比环形 DNA 高。Chong 和 Vielkind 等<sup>[12]</sup>在转基因鱼中对外源基因的构型与其在受体中的行为之间的关系作了比较全面的研究，认为线形与环形 DNA 在受体中的命运相同，都经过复制、降解、聚合、整合，并能通过性腺传递给子代，两种构型之间并没有哪一种比另一

种更具有优越性<sup>[13]</sup>。本研究中环形质粒的表达率要略高于线形质粒，但并没有表现出显著差异，这可能与环形质粒在细胞中不易降解，大量拷贝游离存在于细胞核中，容易自我复制等有关。同时观察到外源基因的转移成功率与外源基因的浓度（即注射剂量）有关，浓度越高，转基因阳性率越高，但高浓度外源基因的转基因胚胎在发育过程中的死亡率要比低浓度的高。

Beemann 等将酪氨酸酶（tyrosinase）基因作为标记基因，与另一基因在小鼠中进行共转移实验，发现两种基因在染色体的单一位点上发生了整合，因此认为可以用一个标记基因的表达来帮助鉴别另一基因的整合或表达，并推测另一基因与酪氨酸酶基因发生了连接<sup>[14]</sup>。Clark 等把两种基因共注射入小鼠时，结果两种基因发生了共整合，并且高水平表达的基因促进了另一低表达水平基因的表达，因此认为共整合技术也许是改善异源基因在转基因动物中表达效率的一种有效的手段<sup>[15]</sup>。Rahman 等<sup>[16]</sup>在研究转基因鱼时，把两种基因共注射入罗非鱼受精卵中，发现两种基因发生共连接（co ligation）并以多聚体的形式整合在受体基因组上的单一位点上，并且整合率较高的一种基因促进了另一整合率较低的基因的整合率，认为这是两种基因发生共连接的结果。在本研究中，两种等量混合的基因 GFP 与 CAeGHC 都具有共同的 *EcoR* I 黏性末端，从理论上更有可能发生共连接而整合在同一位点上，但结果表明表达 GFP 基因的鱼苗整合 pCAgGHC 的几率只略高于未表达 GFP 的鱼，这说明对蓝太阳鱼进行基因共转移时，两种分离的基因的整合相互之间没有必然的联系，一个基因的整合与表达并不能反映出另一基因的整合或表达。这与在泥鳅上进行的共转移实验结果一致<sup>[17]</sup>。要实现这一点只有把一个基因与另一报告基因进行体外连接，然后再进行基因转移。

参考文献:

[ 1 ] AMSTERDAM A, LIN S, HOPKINS N. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos[ J ] . Dev Biol, 1995, 171: 123—129.

[ 2 ] GONG Z, JU B, WAN H. Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications[ J ] . Genetica, 2001, 111: 213—225.

[ 3 ] RAHMAN M A, MAK R, AYAD H, et al. Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia ( *Oreochromis niloticus* ) [ J ] . Transgenic Research, 1998, 7: 357—369.

- [4] JU B, XU Y, HE J, et al. Faithful expression of green fluorescent protein (GFP) in transgenic zebrafish embryos under control of zebrafish gene promoters[J]. Dev Genet, 1999, 25: 158—167.
- [5] 朱作言, 许克圣, 谢岳峰, 等. 转基因鱼模型的建立[J]. 中国科学(B), 1989(2): 147—155.
- [6] (美) 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998: 35—36.
- [7] KOZAK M. An analysis of 5' noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs[J]. Nucleic Acids Res, 1987, 15: 8125—8148.
- [8] PRASHER D C, ECHENRODE G, WARD W W, et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein[J]. Gene, 1992, 111: 229—233.
- [9] CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science, 1994, 263: 802—805.
- [10] IYENGAR A, MÜLLER E, MACLEAN N. Regulation and expression of transgenes in fish— a review[J]. Transgenic Res, 1996, 5: 1—19.
- [11] BRINSTER R L, CHEN, H Y, TRUMBAUER M E, et al. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 4438—4442.
- [12] CHONG S S C, VIELKIND J R. Expression and fate of CAT reporter gene microinjected into fertilized medaka (*Oryzias latipes*) eggs in the form of plasmid DNA, recombinant phage particles and its DNA[J]. Theor Appl Genet, 1989, 78: 369—380.
- [13] STUART G W, VIELKIND J R, MCMURRAY J V et al. Germ-line transmission and variegated expression of a foreign gene in transgenic zebrafish[J]. Development, 1990, 109: 577—584.
- [14] BEERMANN F, RUPPERT S, HUMMLER E, et al. Tyrosinase as a marker for transgenic mice. Nucleic Acids Res[J], 1991, 19(4): 958.
- [15] CLARK A J, COWPER A, WALLACE R, et al. Rescuing transgene expression by co-integration[J]. Biotechnology, 1992, 10(11): 1450—1454.
- [16] RAHMAN M A, IYENGAR A, MACLEAN N. Co-injection strategy improves integration efficiency of a growth hormone gene construct, resulting in lines of transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) expressing an exogenous growth hormone gene[J]. Transgenic Res, 1997, 6: 369—378.
- [17] 赵浩斌, 陈尚萍, 孙永华, 等. 外源基因在鱼类胚胎中表达与整合的时序[J]. 科学通报, 1999, 44(22): 2414—2419.

## Foreign Gene Expression in Green Sunfish, *Lepomis cyanellus* During Embryonic Development

CAO Yun chang<sup>1</sup>, LI Wen sheng<sup>1</sup>, YE Wei<sup>2</sup>, LIN Hao ran<sup>1</sup>

- (1. Institute of Aquatic Economical Animal & Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economical Animal, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;  
2. National Tilapia Breeding Farm of Guangdong Province, Guangzhou 511453, China)

**Abstract:** The coding sequence of grouper *Epinephelus coioides* growth hormone gene was cloned under the regulation of Carp  $\beta$  actin gene promoter and enhancer, so a all fish recombinant pCAecGhc was constructed. GFP gene was microinjected into eggs of green sunfish *Lepomis cyanellus* in order to investigate the integration and expression of a foreign gene in host fish during embryonic development. The results indicated that GFP gene expression began at the end of gastrula stage, and lasted to fry at a stable expression level. GFP gene expression was relative to the configuration and dosage of foreign gene. In addition, GFP gene expression of mosaic fashion was observed. At the same time, co injection of GFP gene with a growth hormone gene construct into it was conducted, showing that the integration or expression of one foreign gene into host genome cannot suggests the integration or expression of the other gene.

**Key words:** GFP; growth hormone gene; genetic recombination; gene transfer; co transfer