

稀有鮡鲫 β -肌动蛋白启动子的克隆及其 驱动活性的初步检测

叶斐菲 刘 红 蔡生力* 王豪杰 李媛媛

(上海海洋大学 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 201306)

摘 要 稀有鮡鲫是一种新型的模式实验鱼,具有利用转基因技术培育开发成为观赏性鱼类的潜在可能。本实验采用 PCR 方法,从稀有鮡鲫基因组 DNA 中分离得到大小为 1 584bp 的 β 肌动蛋白 (β -actin) 基因片段。序列分析表明,该片段包括长为 1 507bp 的启动调控区和 77bp 的部分转录区序列。启动调控区包括一段长为 109bp β -actin 基因上游调控序列,不翻译的外显子 1 和内含子 1。上游调控序列中含有 TATA box, CAAT box 和 CArG box 等与转录活性密切相关的作用元件,并且在稀有鮡鲫 β -actin 基因第一个内含子中也含有 1 个 CArG 调控元件。将该启动子片段克隆到绿色荧光表达载体 (pAcGFP1-1) 上,显微注射入稀有鮡鲫的受精卵中,通过荧光显微镜能观察到绿色荧光蛋白的表达。本实验成功分离了具有驱动活性的稀有鮡鲫 β -actin 基因启动子。

关键词 稀有鮡鲫 β -肌动蛋白 启动子 序列分析 转基因 绿色荧光蛋白

中图分类号 Q344; Q959.46 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2010)02-0080-08

Cloning of β -actin promoter of *Gobiocypris rarus* and detection of its transcription activity

YE Fei-fei LIU Hong CAI Sheng-li* WANG Hao-jie LI Yuan-yuan

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aqua-cultural Ecosystem Certified by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT As a new laboratory fish in China, *Gobiocypris rarus* has the potential to develop into an ornamental fish by use of the transgenic techniques. A DNA fragment of 1,584bp of β -actin gene from *G. rarus* genome was obtained by PCR, which included a 1,507bp of a regulatory region and a 77bp of partial open reading frame (ORF). The regulatory region included a 109bp of 5' proximal promoter, an untranslated exon, and an intron of β -actin gene. The proximal promoter region contained consensus sequences of TATA box, CCAAT box and CArG box which were critical for transcription activity. Moreover, the intron also contained a typical CArG box. This promoter region fragment was inserted into green fluorescent protein gene vector (pAcGFP1-1), and the recombinant is then injected into the fertilized eggs of *G. rarus* by the method of micro-injection. The green fluorescence was observed under micro fluoroscope. This

上海市教育委员会重点学科建设项目(项目编号:J50701)资助

* 通讯作者。E-mail: slcai@shou.edu.cn, Tel: (021)61900419

收稿日期: 2009-09-23; 接受日期: 2009-12-31

作者简介: 叶斐菲, 女(1986-), 硕士研究生, 主要从事水产动物繁殖与发育生物学研究。E-mail: violetfei6@163.com, Tel: (021)61900419

study proves that the cloned β -actin promoter has effective transcription activity.

KEY WORDS *Gobiocypris rarus* β -actin Promoter Sequence analysis
Transgene Green fluorescent protein

稀有鮎鲫 *Gobiocypris rarus* 又名金白娘、墨线鱼,属鲤形目 Cypriniformes,鲤科 Cyprinidae,鮎鲫属 *Gobiocypris*,是我国特有的一种小型鲤科鱼类。由于稀有鮎鲫具有体型小、易于饲养、性成熟周期短、能周年繁殖、连续产卵、对环境因子敏感、卵膜透明等一系列特性,已作为一种新型的模式实验鱼(王剑伟 1992;曹文宣等 2003)应用于鱼病学(王铁辉等 1994)、遗传学(贾方钧等 2001)环境科学(周永欣等 1995)等多个研究领域,并具有通过转基因技术开发培育类似于斑马鱼 *Danio rerio*、青鳉 *Oryzias latipes* 等观赏鱼的潜在可能性。

转基因技术是改变动物遗传性状,培育动物新品系的有效途径(徐美瑜等 2002),且在观赏鱼培育和市场开发上具有较好的实用价值。转基因重组表达载体构建的关键是强效启动子的克隆。肌动蛋白(Actin)是真核生物中参与构成细胞骨架的结构成分,在脊椎动物中主要有 6 种异构体,根据等电点的不同,可分为 α 、 β 、 γ 肌动蛋白(Venkatesh *et al.* 1996)。 β -actin 是主要的胞质肌动蛋白,参与细胞分裂、细胞内运动和维持细胞结构等真核生物的几乎所有生命过程(Sheterline *et al.* 1995; Welch *et al.* 1994),广泛表达于真核生物的非肌细胞和未分化的成肌细胞中(Wolfgang *et al.* 1989)。目前已成功分离了多种鱼类的 β -actin 基因启动子,并在转基因鱼的应用研究中发现其具有很强的转录活性(Liu *et al.* 1990; Liu *et al.* 1990; Hwang *et al.* 2003; Higashijima *et al.* 1997; 王海英等 2008)。有关稀有鮎鲫 β -actin 基因启动子序列的克隆和活性研究尚未见报道,本研究旨在克隆稀有鮎鲫的 β -actin 基因启动子,构建以绿色荧光蛋白为报告基因的重组真核表达载体,并检测稀有鮎鲫 β -actin 基因启动子的驱动表达活性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验用稀有鮎鲫由中国科学院水生生物研究所王剑伟教授惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器

Agarose Gel DNA Purification Kit, DNA Fragment Purification Kit, pMD19-T Vector, 限制性内切酶、DNA Marker 等购自 TaKaRa 公司。pAcGFP1-1 Vector 购自 Clontech 公司。蛋白酶 K、 $2\times$ Taq PCR mastermix 和 TOP10 *E. coli* 购自北京天根生化科技有限公司。X-Gal、氨苄西林购自上海申能博彩生物科技有限公司。其他试剂均采用国产分析纯。

冷冻离心机、梯度 PCR 仪和显微注射仪均为 Eppendorf 公司产品;荧光显微成像系统为 OLYMPUS 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

取约 0.05 g 的稀有鮎鲫肌肉组织用 SDS/蛋白酶 K 裂解、酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA,1%的琼脂糖凝胶电泳检测其纯度, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 β -actin 启动子区域片段的克隆与测序

根据 NCBI 网上公布的多种鲤科鱼类的 β -actin 基因启动子序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对特异性引物,上游为 actin-S: 5'-GTGTGTGACGCTGGACCAATCAGAG-3',下游为 actin-X: 5'-GAGCAT-CATCTCCAGCGAAT-3'(由上海生工生物技术有限公司合成)。以稀有鮎鲫基因组 DNA 为模板,以 actin-S、actin-X 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 50 μl ,包括:去离子水 23.4 μl , $2\times$ Taq PCR mastermix 25

μl , actin-S (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μl , actin-X (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μl , 模板 DNA 0.6 μl 。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min, 每循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 66.5 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min, 共 32 个循环, 最后 1 个循环结束后再延伸 7 min。扩增片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 扩增产物经胶回收试剂盒 (Agarose Gel DNA Purification Kit) 纯化回收后, 与 pMD19-T 载体 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。连接产物命名为 β -actin-pMD19-T。连接产物转化感受态大肠杆菌 TOP10 中, 经蓝白斑筛选重组子。筛选所得菌液经菌液 PCR、抽提质粒酶切鉴定后委托上海生工生物技术有限公司进行测序。

1.2.3 序列测定和分析

测序结果用 CLUSTALX (1.8) 和 BLAST 软件与 GenBank 中登录的核苷酸序列进行序列比对和同源性分析。利用在线软件 BDGP (<http://www.fruitfly.org/index.html>) 和 GenScan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>), 并结合序列比对预测转录起始位点以及外显子和内含子的拼接位点; 利用 Genomatix (<http://www.genomatix.de/index.html>) 的在线软件 MatInspector 和 Match 1.0 Public (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#match>) 对启动子的顺式调控元件进行预测分析。

1.2.4 表达载体 β -actin-AcGFP1 的构建和显微注射

对重组子 β -actin-pMD19-T 经 PCR 改造后引入 Hind III、Sac II 酶切位点。扩增产物经 Hind III 和 Sac II 双酶切、纯化后与经同样条件处理的 pAcGFP1-1 载体进行过夜连接, 连接产物命名为 β -actin-AcGFP1。产物转化 TOP10 *E. coli*、蓝白斑筛选。得到的菌液用碱裂解法质粒抽提后用 Hind III 和 Sac II 酶进行双酶切鉴定。将 β -actin-AcGFP1 用 Xho I 进行线性化、纯化回收后所得产物用 TE 溶液稀释 50 倍后电泳, 估算浓度。参照孙效文等 (1993) 的方法, 通过显微注射将线性化的表达载体导入稀有鮟鲫的受精卵中。注射过的受精卵经孵化、培育, 用荧光显微镜检测绿色荧光的表达情况, 并记录观察结果。

2 结果与分析

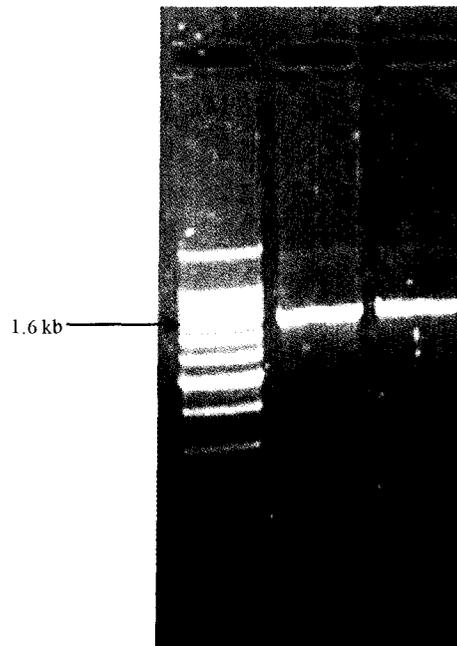
2.1 稀有鮟鲫 β -actin 基因启动子及部分开放阅读框 (ORF) 的克隆

以 actin-S、actin-X 为引物, 以稀有鮟鲫基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增的电泳结果如图 1 所示, 得到 1 条约 1 600bp 的特异性条带, 与预期相符。胶回收此片段。

2.2 β -actin 基因启动子序列测定与分析

β -actin 基因启动子序列测序结果见图 2, 并已登录于 GenBank (登录号为: GQ397462)。

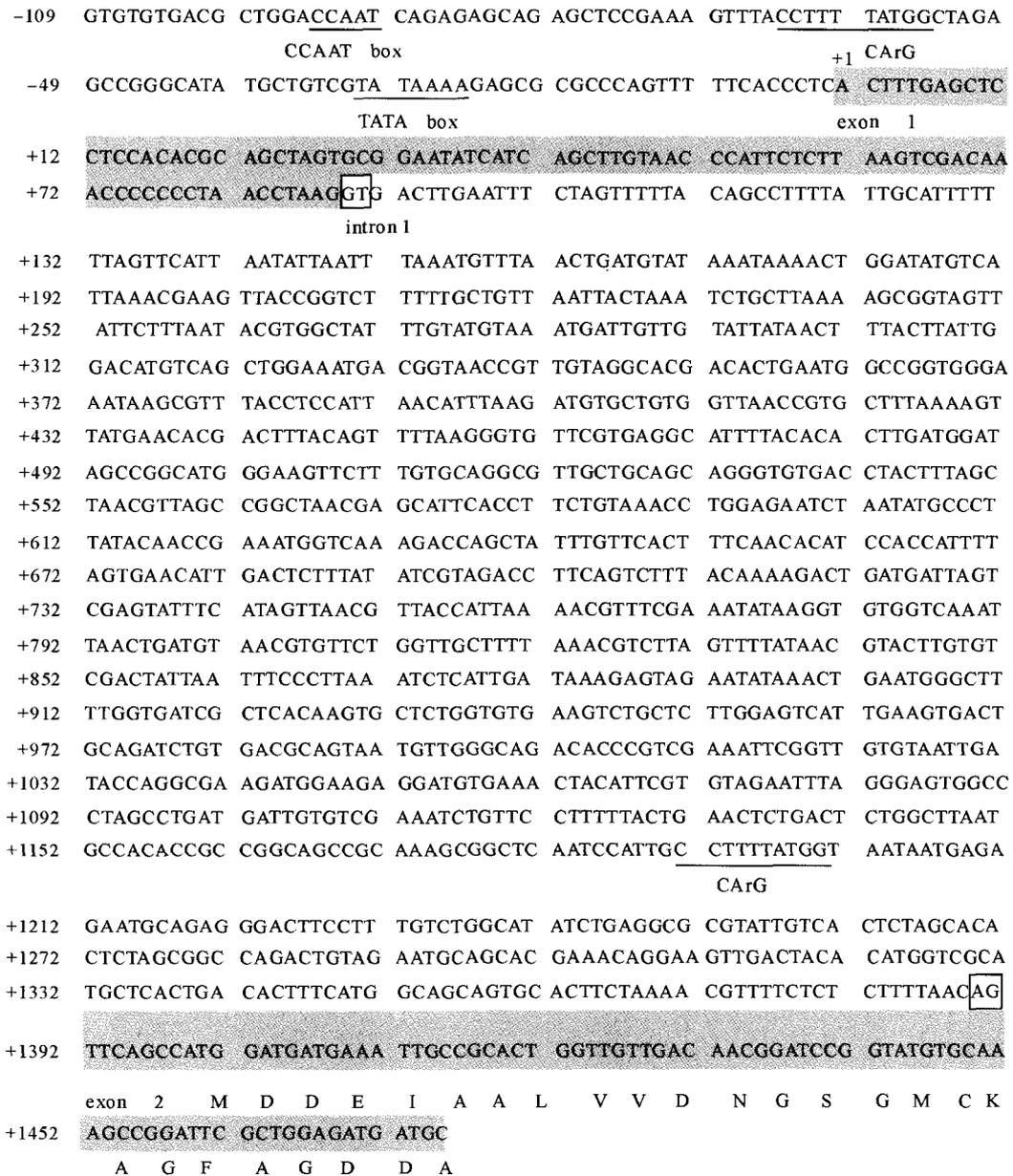
序列分析表明, 该片段全长 1 584bp, 含 1 507bp 的启动调控区序列和 77bp 的 β -actin 基因的部分编码序列。通过 BLAST 分析, 同 GenBank 中登录的核苷酸序列进行相似性比较, 发现与青鱼 (GenBank 登录号: AY289135.1) 和草鱼 (GenBank 登录号: M25013.1) 的相似性分别为 86% 和 85%, 与



泳道 M 表示 500 bp Marker; 泳道 1,2 表示稀有鮟鲫 β -actin 启动子
Note: Lane M; 500 bp Marker; Lane 1,2: β -actin promoter of *G. rarus*

图 1 稀有鮟鲫 β -actin 启动子

Fig. 1 β -actin promoter of *G. rarus*



注:图中下划线部分分别代表 CCAAT box、CArG、TATA box;+1 为转录起始位点;阴影部分代表外显子区域;方框代表外显子/内含子的拼接位点;大号字体代表翻译起始密码子

Note: Sequences underlined are CCAAT box, CArG and TATA box respectively. The site for initiation of transcription is indicated by “+1”. Sequences in shadow are exons. Sequences in box are the intron/exon splicing sites. Sequence in large is the initiation codon

图 2 稀有鮕鲫 β -actin 启动子及部分编码序列

Fig. 2 β -actin gene promoter and partial ORF sequence of *G. rarus*

团头鲂(GenBank 登录号:AY170122. 2)的相似性为 84%。

对稀有鮕鲫 β -actin 基因启动子区域进行在线分析发现,该启动调控区包括一段长为 109 bp 的 β -actin 基因上游调控序列,第 1 个不翻译的外显子和第 1 个内含子。内含子和外显子交界处符合典型的 GT-AG 规律,即:5' 端为 GT,3' 端为 AG。在转录起始位点(+1)上游-31、-64、-94 为 TATA box、CArG box 和 CCAAT box(图 3)。在第 1 个内含子中也发现有 1 个 CArG 调控元件,其位置为+1 191 位。

通过 BLAST 软件分析比对,发现该 77 bp 的部分开放阅读框与其他鱼类的 β -actin 具有高度的保守性:与

鲮(GenBank 登录号:DQ241809.1)和斑马鱼(GenBank 登录号:EF026002.1)的序列相似性为 100%,与团头鲂(GenBank 登录号:AY170122.2)的相似性为 98%。

```

CCAAT box                    CArG                                TATA box
GR GTGTGTGACGCTGGACCAATCAGAGAGCAGAGCTCCGAAAAGTTTACCTTTTATGGCTAGAGCCGGGCATATGCTGTCGTATAAAAAGAGC
GC GTGTGTGACGCTGGACCAATCAGAGGGCAGAGCTCCGAAAAGTTTACCTTTTATGGCTAGAGCCGG-CATATGCCGTCAATAAAAAGAGC
BG GTGTGTGACGCTGGACCAATCAGAGGGCAGAGCTCCGAAAAGTTTACCTTTTATGGCTAGAGCCGGGCATATGCCGTCAATAAAAAGAGC
MA GTGTGTGACGCTGGACCAATCAGAGCGCAGAGCTCCGAAAAGTTTACCTTTTATGGCTAGAGCCGGGCATATGCCGTCAATAAAAAGAGC
CC GTGTGTGACGCTGGACCAATCAGAGCGCAGAGCTCCGAAAAGTTTACCTTTTATGGCTAGAGCCGG-CATCTGCCGTCAATAAAAAGAGC
HM CTGAGTGACGCTGGACCAATCAGAGAGCAGAGCTCCGAAAAGTTTACCTTTTATGGCTAGAGCCGGGTATATGCTGTAGTATAAAAAGAGC
CM GTGTGTGACGCTGGACCAATCAGAGCGCAGAGCTCCAAAAGTTTACCTTTTATGGCTAGAGCCAAGCATATGCCGTCCATAAAAAGAGT
TA GTGTGTGACGCTGGACCAATCAGAGAGCAGAGTTCCGAAAAGTTTACCTTTTATGGCTAGAGCCGGGCATGTGGTGTCCATAAAAAGAGC
DR GTGTGTGACGCTGGACCAATCAGAGCACAGAGCTCCGAAAAGTTTACCTTTTATGGCTAGAGCCGGGTATGTGCCGTCAATAAAAAGAGC
** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** **

```

GR:稀有鮰鲫;GC:草鱼(M25013);BC:青鱼(AY289135);MA:团头鲂(AY170122);CC:鲤鱼(M24113);HM:乌苏里江(鱼骨)(EF554926);CM:鲮(DQ241809);TA:唐鱼(EF026000);DR:斑马鱼(EF026002)

GR;*G. rarus*;GC;*C. idellus*(M25013);BC; *M. piceus*(AY289135);MA; *M. amblycephala*(AY170122);CC; *C. carpio*(M24113);HM; *H. mylodon*(EF554926);CM; *C. molitorella*(DQ241809);TA; *T. albonubes*(EF026000);DR; *D. rerio*(EF026002)

图 3 稀有鮰鲫与其他鲤科鱼类 β -actin 基因近端启动子的上游调控序列比对
Fig. 3 β -actin proximal promoter of *G. rarus* and other cyprinid fishes

2.3 β -actin-AcGFP1 表达载体的构建

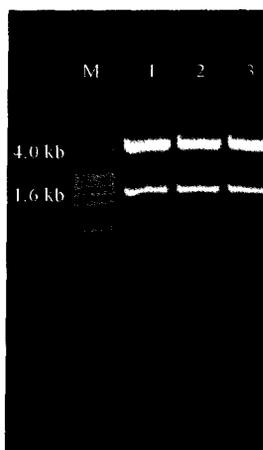
β -actin-pMD19-T 经 PCR 改造、用 Hind III 和 Sac II 双酶切后插入 pAcGFP1-1 载体(同样经 Hind III 和 Sac II 双酶切)的多克隆位点。连接产物转化大肠杆菌后提取阳性质粒。经 Hind III 和 Sac II 双酶切鉴定表明,启动子与载体连接正确(图 4)。

2.4 表达载体在稀有鮰体内的表达

用 Xho I 酶切重组质粒 β -actin-AcGFP1,使其线性化。酶切产物经纯化后,用 TE 溶液稀释 50 倍,1%琼脂糖凝胶电泳,Mass-ruler 估算浓度(图 5)。根据图 5,确定稀释后的线性化质粒浓度约为 5.5 ng/ μ l,则未稀释前的浓度约为 275 ng/ μ l,然后将线性化后的重组表达载体显微注射到稀有鮰的受精卵中。受精卵于 25 $^{\circ}$ C 孵化培育。孵出后在荧光显微镜下可观测到出膜后的仔鱼体上的绿色荧光(图 6),其中阳性率最高为 7.69%。

3 讨论

启动子是控制基因转录的起始时间和表达程度的关键性序列,是转基因研究的热点。研究发现,来自自源或近源的启动子比来自亲缘性远的外源物种的启动子具有更强的表达驱动活性(Hwang *et al.* 2003; Alam *et al.* 1996)。本



注:泳道 M 表示 200 bp Marker;泳道 1,2,3 表示 β -actin-AcGFP1 表达载体经 Hind III 和 Sac II 双酶切
Note: Lane M; 200 bp Marker; Lane 1,2,3; β -actin-AcGFP1/ Hind III and Sac II

图 4 β -actin-AcGFP1 表达载体双酶切鉴定
Fig. 4 β -actin-AcGFP1 digested by enzymes

实验旨在克隆稀有鮟鲫的自源 β -actin 基因启动子,为构建相应的表达载体以及有效启动目的蛋白的表达打下基础。



注:泳道 M 表示 massruler™ express DNA ladder 10 μ l;

泳道 1 表示 50 倍稀释后线性化的 β -actin-AcGFP1 10 μ l

Note: Lane M; Massruler™ express DNA ladder, HR reverse

10 μ l; Lane 1; Linear plasmid β -actin-AcGFP1 diluted 10 μ l

图 5 线性化质粒 β -actin-AcGFP1 浓度测定

Fig. 5 The concentration of linear plasmid β -actin-AcGFP1



图 6 β -actin 启动子驱动的 AcGFP1 基因在稀有鮟鲫体内的表达(出膜后第 10 天)

Fig. 6 The expression of AcGFP1 in *G. rarus* promoted by β -actin promoter (10 dph)

3.1 鱼类 β -actin 启动子核酸序列相似性比较

实验采用 PCR 方法,成功地从稀有鮟鲫基因组 DNA 中分离得到大小为 1 584 bp 的 β 肌动蛋白基因启动子片段。利用 BLAST 软件比对分析 GenBank 核酸数据库后发现,该片段在该区域与青鱼(GenBank 登录号: AY289135. 1)、草鱼(GenBank 登录号: M25013. 1)和团头鲂(GenBank 登录号: AY170122. 2)具有较高的相似性。本研究中还发现,所克隆片段与多数物种在上游调控序列、外显子 1、部分开放阅读框区域有着高度的保守性,而内含子 1 为差异主要发生的区域。稀有鮟鲫 β -actin 基因 5'侧翼区与罗非鱼(GenBank 登录号: AY116536)及青鳉(GenBank 登录号: S74868)比对,其相似度分别为 50.3%和 49.2%。但如果仅仅比对上游调控序列和外显子 1,则相似性分别为 72.3%和 72.4%。这与 Hwang 等(2003)对罗非鱼 β -actin 启动子的研究结果相似。这可能是由于内含子较之外显子而言,所承受的进化压力相对较小,因而其变异发生的频率更高。

3.2 稀有鮟鲫 β -actin 启动子上游调控序列分析

鱼类 β -actin 基因启动子上游调控序列一般包含 3 个转录调控元件,即 1 个 TATA box, 1 个 CArG 序列和 1 个 CCAAT box(Liu *et al.* 1990; Noh *et al.* 2003)。本实验所得到的 β -actin 启动子也具有这 3 个重要的元件,具有典型的脊椎动物 β -actin 启动子特征(图 3)。

TATA box 是 RNA 聚合酶 II 的识别位点,指导转录起始位点的选择,为基因的正确启动表达所必须(O'Shea-Greenfield *et al.* 1992)。本实验所获序列含 1 个 TATA box,位于转录起始位点上游 -31 处,符合真核生物启动子 TATA box 的一般规律(Lagrange *et al.* 1997)。

CCAAT box 已经被发现对于转录活性有着非常重要的影响(Robert *et al.* 1989)。在对鼠、人和鸡的 β -actin 启动子序列的比对中发现,CCAAT box 具有高度的保守性,主要由 GCCAATCAG 这 9 个碱基所组成。而对该区域进行的突变研究发现,决定活性的主要是 GCCAAT 这 6 个碱基的区域(Wolfgang *et al.* 1989)。王海英等(2006)在对多种鱼类 β -actin 启动子的比对中发现,多数鱼类的 CCAAT box 临近的 9 个碱基处主要为 ACCAATCAG,即在第一个碱基处多为 A,这与其他脊椎动物存在一定的差异。本实验设计引物时采用的

亦是鱼类的一般模式。

和许多高等的真核生物一样,鱼类的 β -actin启动子中也存在一种血清反应因子,即CArG调控元件。该序列高度保守,也是维持启动子活性的必需元件。当缺失该元件时,基因可能失去转录功能(Liu *et al.* 1990;Subramaniam *et al.* 1989;Danilition *et al.* 1991)。本实验克隆得到的稀有鮎鲫 β -actin启动子的上游调控区-64位也具有1个CArG序列。

3.3 内含子与基因表达调控

占真核生物基因组大部分的非编码的内含子区功能的研究已越来越受到重视。目前已在许多基因的内含子区域,特别是第一内含子中发现有增强基因表达的调控序列(李华等 2002;Rose *et al.* 2000)。

在人类的 β -actin启动子的研究中发现,内含子1中的1个CArG元件对基因表达起正调控的作用(Robert *et al.* 1989)。鲤鱼的 β -actin启动子的内含子1中存在一段长304 bp的单向转录调控原件PstI片段,这段片段的倒置或移除甚至会直接导致启动子转录活性的几乎消失,而在该片段中存在一段与上游调控序列相同的10 bp的CArG调控元件(Liu *et al.* 1990)。在鲮和泥鳅 β -actin基因内含子1也各具有一个保守的CArG调控元件(张殿昌等 2007;Noh *et al.* 2003)。Liu等(1991)发现在鲤鱼 β -actin的转录中,上游调控序列中的CArG元件通过和内含子1中的CArG元件相互作用而激活转录。本实验中,在稀有鮎鲫 β -actin的第一个内含子区域也发现了一个典型的CArG序列,推测其与 β -actin表达正调控有关。

3.4 启动子的长度与启动活性

鱼类 β -actin启动子5侧翼区的上游序列的长度不同,其启动活性也有所不同。在转基因罗非鱼的研究中发现,1.6 kb罗非鱼 β -actin启动子和1.5 kb鲤鱼 β -actin启动子的活性要高于4.7 kb鲤鱼 β -actin启动子(Hwang *et al.* 2003)。王海英等(2008)应用红色荧光蛋白(Red fluorescent protein,RFP)表达载体,通过构建重组表达载体显微注射入唐鱼的受精卵中,比较近端与远端 β -actin启动子的活性发现,3.0 kb的唐鱼 β -actin启动子要明显高于1.3 kb的唐鱼 β -actin启动子。本实验中通过荧光显微镜可以检测到绿色荧光的表达,证明所克隆的稀有鮎鲫 β -actin启动子序列具有有效的驱动活性,但对于该启动子5侧翼区的上游是否还存在重要的启动元件,将在进一步的研究中探讨。

参 考 文 献

- 王剑伟. 1992. 稀有鮎鲫的繁殖生物学. 水生生物学报, 16(2): 165~174
- 王铁辉, 刘沛霖, 陈宏溪, 刘汉勤, 易咏兰, 郭文. 1994. 稀有鮎鲫对草鱼出血病毒敏感性的初步研究. 水生生物学报, 18(2): 144~149
- 王海英, 叶星, 劳海华, 夏仕玲, 白俊杰, 简清. 2008. 唐鱼 β -actin基因近端和远端启动子的鉴定及其启动活性分析. 生物工程学报, 24(10): 1768~1775
- 王海英, 叶星, 白俊杰, 劳海华, 简清, 夏仕玲. 2006. 3种鱼类 β -actin启动子的序列比较及唐鱼 β -actin启动子功能的初步检测. 实验动物科学与管理, 23(增刊): 57~62
- 孙效文, 闫学春, 梁利群, 王鹏, 沈俊宝. 1993. 用直接注射法生产转基因鱼. 生物技术, 3(3): 12~14
- 李华, 王吉贵, 刘维全, 王苹, 董婉维, 齐顺章. 2002. 第一内含子对人胰岛素基因在BHK细胞中表达的影响. 中国实验动物学杂志, 12(5): 257~262
- 张殿昌, 邵艳卿, 苏天凤, 江世贵. 2007. 鲮 β -肌动蛋白基因和启动子的克隆及序列特征分析. 中国水产科学, 14(3): 345~351
- 周永欣, 成水平, 胡炜, 孙美娟. 1995. 稀有鮎鲫——一种新的鱼类毒性试验材料. 动物学研究, 16(1): 59~63
- 贾方钧, 魏芸. 2001. 稀有鮎鲫的染色体核型初报. 水生生物学报, 25(4): 425~426
- 徐美瑜, 陈松林, 戴继勋. 2002. 鱼类基因转移技术研究进展. 海洋水产研究, 23(3): 50~56
- 曹文宣, 王剑伟. 2003. 稀有鮎鲫——一种新的鱼类实验动物. 实验动物科学与管理, 20(suppl): 96~99
- Alam, M. S., Lavender, F. L., Iyengar, A., Rahman, M. A., Ayad, H. H., Lathe, R., Morley, S. D., and Maclean, N. 1996. Comparison of the activity of carp and rat β -actin gene regulatory sequences in tilapia and rainbow trout embryos. Mol. Reprod. Dev. 45(2): 117~122
- Danilition, S. L., Frederickson, R. M., Taylor, C. Y., and Miyamoto, N. G. 1991. Transcription factor binding and spacing constraints in the human β -actin proximal promoter. Nucleic Acids Res. 19(24): 6913~6922

- Hwang, G. L., Rahman, M. A., Razak, S. A., Sohm, F., Farahmand, H., Smith, A., Brooks, C., and Maclean, N. 2003. Isolation and characterisation of tilapia β -actin promoter and comparison of its activity with carp β -actin promoter. *Biochim. Biophys. Acta*, 1625(1): 11~18
- Higashijima, S., Okamoto, H., Ueno, N., Hotta, Y., and Eguchi, G. 1997. High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably expression GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Dev. Biol.* 192(2): 289~299
- Lagrange, T., Gauvin, S., Hye-Jeong, Yeo., and Mache, R. 1997. S2F, a leaf-specific trans-acting factor, binds to a novel cis-acting element and differentially activates the RPL21 gene. *Plant Cell*, 9(8): 1469~1479
- Liu, Z. J., Zhu, Z. Y., Roberg, K., Faras, A., Guise, K., Kapuscinski, A. R., and Hackett, P. B. 1990. Isolation and characterization of beta-actin gene of carp (*Cyprinus carpio*). *DNA Seq.* 1(2): 125~136
- Liu, Z. J., Moav, B., Faras, A. J., Guise, K. S., Kapuscinski, A. R., and Hackett, P. B. 1990. Functional analysis of elements affecting expression of the β -actin gene of carp. *Mol. Cell Biol.* 10(7): 3432~3440
- Liu, Z. J., Moav, B., Faras, A. J., Guise, K. S., Kapuscinski, A. R., and Hackett, P. 1991. Importance of the CARG box in regulation of β -actin-encoding genes. *Gene*, 108(2): 211~217
- Noh, J. K., Cho, K. N., Han, E. H., Kim, A., Lee, J. S., Kim, D. S., and Kim, C. G. 2003. Genomic cloning of mud loach *Misgurnus mizolepis* (*Cypriniformes, Cobitidae*) beta-actin gene and usefulness of its promoter region for fish transgenesis. *Mar. Biotechnol.* 5(3): 244~252
- OShea-Greenfield, A., and Smale, S. T. 1992. Roles of TATA and initiator elements in determining the start site location and direction of RNA polymerase II transcription. *J. Biol. Chem.* 267(2): 1391~1402
- Robert, M. F., Monette, R. M., Aikichi, I., and Neil, G. M. 1989. 5'-flanking and first intron sequences of the human β -actin gene required for efficient promoter activity. *Nucleic Acids Res.* 17(1): 254~270
- Rose, A. B., and Beliakoff, J. A. 2000. Intron-mediated enhancement of gene expression independent of unique intron sequences and splicing. *Plant Physiol.* 122: 535~542
- Sheterline, P., Clayton, J., and Sparrow, J. 1995. *Actin. Protein Profile*, 2(1): 1~103
- Subramaniam, M., Schmidt, L. J., Crutchfield, C. E., and Getz, M. J. 1989. Negative regulation of serum-responsive enhancer elements. *Nature*, 340: 64~66
- Venkatesh, B., Tay, B. H., Elgar, G., and Brenner, S. 1996. Isolation, characterization and evolution of nine pufferfish (*Fugu rubripes*) actin genes. *J. Mol. Biol.* 259: 655~665
- Welch, M. D., Holtzman, D. A., and Drubin, D. G. 1994. The yeast actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 110~119
- Wolfgang, W. Q., Lin, Z. Y., Liliana, D. Z., and Bruce, M. P. 1989. The β -actin promoter. *J. Biol. Chem.* 264: 9539~9546