

1. 杂交育种
2. 多倍体育种
3. 雌核发育和雄核发育育种

↓ Vs 孤雌生殖

定义，获取的方式（人工和自然）

人工的方式有哪些？

应用：**雌核发育**和**雄核发育**可以通过控制性别，获得人们需求的某种性别个体。

古怪的大鱼

在1938年那一天，“纳丽花”号此前带回的标本还没来得及整理。但玛乔丽不忍心拂了船员们的热情，就坐上出租车去往港口。提着裙子跳上了“纳丽花”号，完全没意识到自己的博物馆将迎来轰动世界的镇馆之宝——**西印度洋矛尾鱼**。



一条1.5米长、57千克重的瑰丽大鱼

大鱼的外形极其古怪。它浑身覆盖着硬硬的鳞片，尾巴好像长牙尖端的形状，而最奇特的还是**四条像腿一样的鱼鳍**。



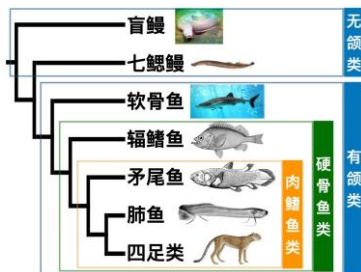
玛乔丽和她制作的西印度洋矛尾鱼标本



东伦敦博物馆内展出的西印度洋矛尾鱼，这也是人类发现的**第一条矛尾鱼**



2015年，**米兰世博会**期间展出的**印尼矛尾鱼标本**

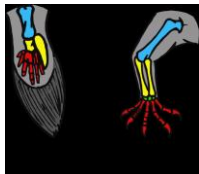


今天我们知道，辐鳍鱼包括了绝大多数我们**日常概念中的“鱼”**，它们都有着车辐条一样的鳍；

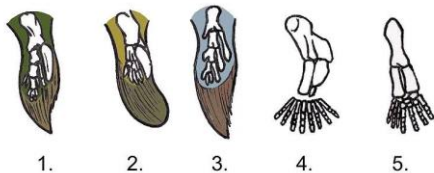
而**肉鳍鱼类**的主要组成，其实是我们这些**四足动物**。



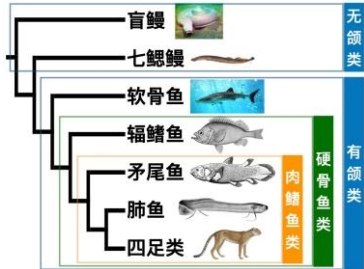
梦幻鬼鱼Guiyu oneiros，一种已经灭绝的肉鳍鱼，化石发现于**云南曲靖**



肉鳍鱼肉鳍中的骨骼和四足类动物四肢骨骼的对比



从左到右依次为：三类肉鳍鱼（提塔利克鱼、潘氏鱼、真掌鳍鱼）、棘螈（第一种有明确四肢的脊椎动物，长有八个趾）以及鱼石螈后肢（长有七个趾）的骨骼结构示意图。



今天我们知道，辐鳍鱼包括了绝大多数我们日常概念中的“鱼”，它们都有着车辐条一样的鳍；

而肉鳍鱼类群的主要组成，其实是我们这些四足动物。

除此之外，像一些比较原始的辐鳍鱼一样，矛尾鱼体内终生保留了一条充满液体的脊索，而在其他脊椎动物中，脊索会骨化成为脊椎的一部分。



2013年，矛尾鱼的全基因组测定完毕，分子演化研究表明，肺鱼与四足类的关系更为亲近，而矛尾鱼则坐稳了肉鳍鱼类的头把交椅——它们是现存的肉鳍鱼类中，最早与其他伙伴分道扬镳的一支。

黄鳝

黄鳝（学名：*Monopterus albus*）：又名鳝鱼。体细长呈蛇形，体长约20-70厘米，最长可达1米。各鳍不发达基本消失，全身只有一根三棱刺，体表有一层光滑的黏膜保护，无鳞。



黄鳝为肉食凶猛性鱼类

原产地：东亚和东南亚
引进：美国



第七章 鱼类性别控制育种

- 一、鱼类性别控制的意义
- 二、水产动物的性别决定
- 三、鱼类的性逆转
- 四、鱼类性别的人工控制
- 五、鱼类性别控制研究的重点

性别控制（sex-manipulation）：通过人工处理改变动物遗传性别所主导的发育方向，使个体或群体的性别按照人类设计的方向发展，进而形成的群体为单一性别或处于不育状态的方法。

一、鱼类性别控制的意义

1) 提高群体生长率

对于雌、雄鱼生长速度不一样的鱼类，通过性别控制，实行单性养殖将会提高产量，降低成本，获得良好的经济效益。

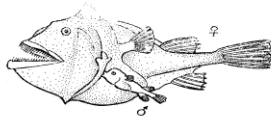


图1—11 雌角鲈雌雄及其寄生雄体。

雌鱼的体型达到雄鱼的50倍。



2) 控制过度繁殖

对于性成熟周期短，繁殖力强的鱼类，可通过单性养殖控制其过度繁殖，避免幼鱼与商品鱼争夺饵料和空间。

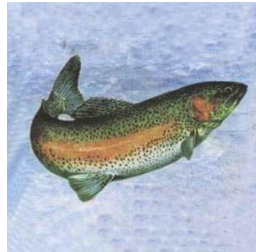


淡水养殖鱼类，且被誉为未来动物性蛋白质的主要来源之一。

3) 延长有效生长期

对于性周期较短，雌、雄性成熟年龄不同的鱼类，单性养殖可延长有效生长期，避免因性腺的发育而降低生长速度。

在年平均水温14℃的条件下，
通常满1年体重为100~200克，
满2年400~1000克，
满3年1000~2000克。
寿命一般8~11龄。最大个体可达25千克。



淡水和海水养殖鱼类

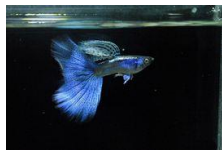
4) 提高商品鱼质量

由于消费者的消费习惯，某些和性别有关的商品价值会有明显的差别。



5) 提高观赏鱼的商品价值

大多数观赏鱼类中，性别的差异可以导致商品性能显著不同。一般情况下，雄性观赏鱼类比雌性具有更加艳丽的体色和外观，因此具有更高的商品价值。



小结：研究鱼类性别控制的意义

1. 提高增长速度
2. 控制过度繁殖
3. 延长有效生长期
4. 提高商品鱼质量
5. 提高观赏鱼的商品价值

2. 鱼类的性别分类

二、水产动物的性别决定

1. 鱼类性别决定的特点

- ◆ 性染色体缺少或处于进化的初始阶段
- ◆ 表型性别容易改变
- ◆ 性变后个体具有正常的功能
- ◆ YY型雄鱼可育

1. 生理性别

生理性别（physiological sex）：

是在遗传性别的控制下通过个体发育的生化过程而形成的，是动物性别的外在表现，是遗传性别与环境互相作用的结果。

- 1) 性腺性别
- 2) 外部性别
- 3) 行为性别

1) 性腺性别（gonada sex）：

生理性别的基础取决于原始性器官的类型，这种基础性别称为性腺性别。由它再进一步分为雌雄异体（gonochorism）和雌雄同体（hermaphroditism）

雌雄异体

◆ 雌雄异体

指一个个体内仅含有精巢或卵巢，绝大多数鱼类属于这种性别。根据性腺分化的早晚，性腺可分为：

- **未分化型**：所有个体性腺发育初期均分不出性别，当发育到一定阶段后，性腺才分化为卵巢或精巢。未分化的性腺最初发育成卵巢样性腺，然后约有一半个体变成雌性，而另一半变成雄性（如斑马鱼）
- **分化型**：性腺直接分化成精巢或卵巢（如青鳉）

大多数鱼类被认为是未分化型！

雌雄同体

◆ 雌雄同体

同一个体内同时含有可辨认的卵巢和精巢，并分别产生卵子和精子。

- 雌雄同体的个体一般是卵子和精子并不同时成熟，而是轮番地成熟，或是卵子先成熟，或是精子先成熟，从而防止自体受精
- 目前已知具有雌雄同体现象的鱼类计约300~400种，分属于8目、34科，主要发现于鲈形目鲷科和鲷科以及灯鳉目等

雌雄同体鱼类



小丑鱼：是雄性先熟的雌雄同体鱼种，即：小丑鱼生下来就为雄性，但在其生命周期里，它可以变为雌性。



低纹鲷（Hamlet）：它们是同步型的雌雄同体鱼类。这种鱼不能自体受精，但一对Hamlet鱼可以在雌性和雄性角色之间互相转换。

2) 外部性别 (external sex) :

利用许多外部特征来鉴别其雌雄, 这就是所谓的外部性别, 或雌雄异形现象 (sexual dimorphism)

◆ **第一性征:** 指那些直接与繁殖活动有关的性征, 即性附属器官。



3) 行为性别 (external sex) :

雌雄鱼产卵行为或性行为方式的不同, 称为行为性别。

尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼等都是雌鱼营口腔孵卵, 而雄鱼则没有此习性



◆ **第二性征:** 那些与繁殖活动无直接关系的性征, 但它们与性腺的发育与激素分泌有密切关系 (如**珠星**, **婚姻色**等)。

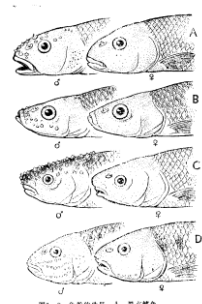


图2-2-4 角斑的性征。A, 第1性征; B, 第2性征; C, 第3性征; D, 第4性征。

2. 遗传性别

遗传性别 (genetic sex) :

遗传性别是在受精时通过一半来自卵子以及一半来自精子的染色体的结合而形成的, 因此, 遗传性别又可称为**染色体性别** (chromosomal sex)。

在遗传性别中, 性别决定的基础是遗传基因, 而在许多鱼类, 决定性别的基因并不明显地集中于性染色体上, 常染色体上的基因也参与到性别决定中, 此外, 一些外部环境因素也能在不同程度上影响鱼类的性别分化, 从而使鱼类性别决定机制显得更加复杂。

1) 性染色体的主要决定类型

◆ 雄性异配型:

➢ XX-XY型:

雄性配子异型, 产生两种不同的配子, 雌性配子同型, 只产生一种配子。大多数鱼类属于这种性染色体类型 (**虹鳟**、**莫桑比克罗非鱼**、**尼罗罗非鱼**等)



➢ XX-XO型:

雌性配子同型, 产生一种配子, 雄性配子异型, 可以产生两种配子, 但有半数配子缺少性染色体, 故用“O”表示。
(只有几种深海鱼类如星光鱼、夜灯鱼为这种性染色体类型)

胸鱼:

♀: $2A+XX=36$

♂: $2A+XO=35$



◆ 雌性异配型：

➢ ZW-ZZ型：

雌性为ZW，可以产生两种不同类型的配子，雄性为ZZ，只产生一种配子（日本鳢鲈、奥利亚罗非鱼、巨鲈罗非鱼、霍诺鲁姆罗非鱼等）



➢ ZO-ZZ型：

雌性为ZO，可以产生两种不同类型的配子，但有半数配子缺少性染色体，故用“O”表示。只有极少数鱼类属于这种染色体类型（短颌鲈等）

短颌鲈：

♀：2A+ZO=47

♂：2A+ZZ=48



3. 环境因素对性别的影响

1) 温度对性别分化的影响

- ◆ 某些蛙类的蝌蚪在20℃发育，雌雄各半，若在30℃发育，全部变成雄蛙；
- ◆ 鳖卵孵化时，25℃孵化多为雄，30℃孵化多为雌

2) 营养对性别分化的影响

- ◆ 蜜蜂受精卵发育的幼虫获取蜂王浆（其成分中的蜂乳酸有利于雌性器官的发育）较多的一个可发育为蜂王，其余的则发育为工蜂

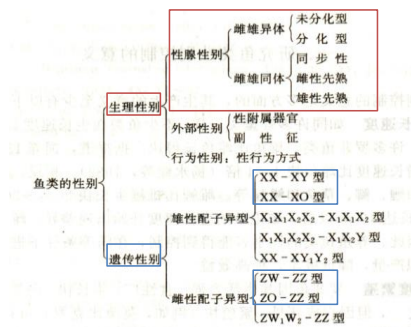
3) 日照长短对性别分化的影响

- ◆ 如大麻，在短日照，温室内，50%~80%的雌株逐渐出现性转变为雄株；缩短光照，黄瓜多开雌蕊。

4) 激素对性别分化的影响

- ◆ 日本的山本时南（1967）用雌二醇使遗传上的雄青鳉转变为功能上的雌鱼；甲基睾丸酮使雌鱼变为雄鱼

总结



雌雄异体的生物，幼体都有向雌雄两方面发育的可能，一般情况下，染色体决定了性别发育的方向，性染色体起了重要作用。但在内外环境如激素、营养、光照、温度影响下，虽不能改变性染色体（基因）的组成，也能引起表现型（性别）的改变，这表明性别表现取决于基因型和环境条件的相互作用

三、鱼类的性逆转

1. 性逆转概念：

性逆转 (sex reversal)：鱼类在生长过程中，在一定的条件下，性腺结构发生了极大的变化，原有的性腺成分被相反性别的性腺成分逐渐所取代，导致鱼类性别的转化，这种性别的转化现象称为性反转或性逆转、性转变 (sex change)。

2. 鱼类性逆转现象



黄鲇：前半生为雌性，后半生为雄性，中间转变的阶段叫雌雄间体、这种由雌到雄的转变叫性逆转现象。



石斑鱼：是雌性先熟的雌雄同体鱼体，到6岁时才转化为雄鱼。石斑鱼可以变性，当雄鱼数量较少时，石斑鱼就会通过变性来保证产卵，例如，美国的蓝条石斑可以一天变性好几次。

四、鱼类性别的人工控制

鱼类性别的人工控制就是根据生产要求，通过人工手段，将遗传型的雌性或雄性，转变为表现型的雄性或雌性，或诱导中性不育，其控制途径包括：

1. 种间杂交技术
2. 用性激素诱导鱼类性逆转技术
3. 三系配套的生理遗传学技术
4. 诱导雌核发育技术
5. 同配精子受精 (试管婴儿)

1. 种间杂交

通过种间杂交以获得单一性别的群体进行单性养殖，这种方法主要集中在罗非鱼属内，是目前国内外产生**雄性或大部分雌性**罗非鱼的最广泛采用的一种方法。

- ◆ 莫桑比克罗非鱼 (*O. mossambicus*) ♀ × 霍诺鲁姆罗非鱼 (*O. hornorum*) ♂
- ◆ 尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*) ♀ × 奥利亚罗非鱼 (*O. aurea*) ♂

1) 罗非鱼种间杂交产生全雄鱼的机制

- ◆ 罗非鱼属中存在两种性别决定机制，雄性异型配子类型 (XX ♀-XY ♂) 以及雌性异型配子类型 (ZW ♀-ZZ ♂)；
- ◆ 雌雄鱼都是同型配子 (XX ♀-ZZ ♂) 就能产生100%的雄性后代

2) 这种理论所推测的后代应100%是雄性，但实际上雄性一般只有95%左右。两种解释：

- ◆ 罗非鱼的性别决定除性染色体外，也与常染色体有关
- ◆ 引进的罗非鱼不纯而产生的。

3) 应用

我国于1983年从美国引种奥利亚罗非鱼，试验生产杂交的全雄性罗非鱼-奥尼罗非鱼，其雄性占94.63%-97.87%，群体产量比母本高18.72%~37.05%，比父本高41.54%-85.89%；抗寒能力比母本提高2.5~3.0℃。

从现有资料来看，种间杂交是目前国内外产生全雄或大部分为雄性罗非鱼的最广泛采用的一种方法，技术简单。

2. 激素处理

鱼类的性别可以用类固醇激素加以控制。类固醇激素是各种生殖现象的诱导者，首先被诱导的是性腺分化，然后通过性腺的活动使鱼体的外部形态、内部结构、生理性状和生态行为等才能得到表达。但类固醇激素只能改变鱼类的生理性别，而不能改变鱼类的遗传性别，即它所能改变的只是生理表型，而不是基因型。

3) 各种激素给与方法及优缺点

方法	优点	缺点
口服法	最常用和最廉价的方法，几乎不需要技巧	激素在消化道中遭受降解；由于摄食不均导致效果不一
浸泡法	适用于体积比较小的种类，比口服法更为便宜	在野外条件下几乎不能用，在某些种类中无效
注射法	激素需要量少，且能保证快速性反转	工作量巨大，需要熟练的技术，易引起伤害和感染
埋植法	激素释放稳定，确定用量均匀	需要熟练的技术，对鱼体伤害大，只适用于个体大，分化比较晚的种类。

3. 三系配套技术

三系配套技术是杨永铨等（1980）应用性反转与杂交相结合的方法发展起来的一项新技术。

1) 基本原理：

鱼类的性别由性染色体决定，性逆转的鱼其生理性别与性染色体（遗传性别）决定是相反的，就是说性反转的鱼，其性别的生理功能改变了，但遗传基础并不改变，这种鱼所产生的后代仍由染色体组成来决定。

1) 常用药物

- ◆ 17- α -甲基睾酮(17- α -methymethyl-testosterone)
- ◆ 17- β -雌二醇(17- β -estradiol)

2) 处理时间

- ◆ 雌雄异体型：在仔幼鱼阶段性腺尚未分化之前进行；
- ◆ 雌雄同体型：在性腺分化之后进行处理

4) 剂量

不同浓度的甲基睾酮对鱼类具有不同的生物学效应

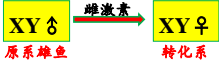
- ◆ 低剂量(1-5mg/kg饲料)可促进鲤鱼和金鱼的生长。
- ◆ 中剂量(10-500mg/kg饲料)会导致金鱼或罗非鱼等由雌性向雄性的完全性逆转。
- ◆ 高剂量(1000mg/kg饲料)则产生雄激素阉割，并可抑制性腺发育，诱导产生虹鳟、草鱼和异育银鲫中性不育。研究还表明，应用激素处理诱导的不育性是稳定且长久的

2) 三系包括：

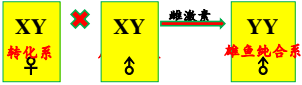
- ◆ 原系：自然群体中未经性反转的雌雄鱼，XX♀、XY♂；
- ◆ 转化系：遗传型雄鱼用雌激素诱导性转化后的表型雌鱼，即雌性化雄鱼，以XY♀表示
- ◆ 雄性纯合系：通过原系XY♂与转化系XY♀交配所获得的YY型雄鱼，或称超雄鱼，用YY♂表示

3) 三系配套具体操作（以莫桑比克罗非鱼为例）

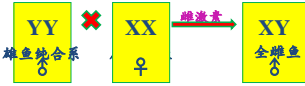
- ① 选择自然群体中雄性仔鱼用苯甲酸雌二醇（BE）诱导出雌性化雄鱼。



- ② 转化鱼成熟后与自然群体中的雄鱼交配，获得雄性纯合系（超雄鱼）。



- ③ 雄性纯合系成熟后再与自然群体中的雌鱼交配，则可获得全雄鱼。



4) 超雄鱼（YY♂）的意义

- ① 超雄性罗非鱼与原系雌性鱼交配产生的全雄性罗非鱼具有“杂种”和“全雄”的双重性优势，其生长速度比原系罗非鱼群有明显的优势，全雄性莫桑比克罗非鱼比自然两性群体生长快40.6%，产量提高46.0%；全雄性莫尼罗非鱼杂交种比自然两性群体生长快38.5%，产量提高43.4%，且比自然两性群体更容易回捕。

- ② 与直接用激素处理控制鱼类性别的方法相比，通过三系配套技术控制鱼类性别，其激素不与商品鱼直接发生关系，因而具有用药量少、成本低、没有污染怀疑以及便于推广等优点。
- ③ 生产单位只需要从制种场购买少量YY型超雄鱼，然后与原系雌鱼杂交，就能得到大批量全雄鱼。因此，这种技术对控制鱼类性别进行单性养殖具有广阔的应用前景。

4.诱导雌核（或雄核）发育获得单性鱼

诱导雌核发育的结果，就雌性配子同型（如XX-XY型和XX-XO型）鱼类来说，子代应该全部是雌性，对于雄性配子同型（如ZW-ZZ型和ZO-ZZ型）鱼类来说，诱导雌核发育的结果，子代应该全部是雄性，这为控制鱼类性别开辟了新的途径。

5.同配精子受精（试管婴儿）

把X精子和Y精子分开，则可选择受精的精子类型，从而控制性别生产单一性别的群体。

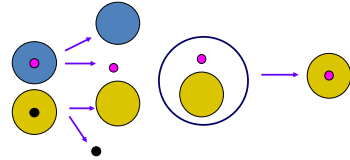
同配生殖

第八章 核移植技术与动物克隆



一、细胞核移植的概念

细胞核移植 (nuclear transplantation): 应用显微操作技术, 将一种动物细胞的细胞核, 移入到同种或异种动物的去核成熟卵内, 使其重组并发育成一个新的胚胎, 这个新的胚胎最终发育成动物个体。



◆ 核移植

- 胚胎细胞核移植: 核供体细胞来自多细胞阶段的胚胎
- 体细胞核移植: 核供体细胞来自动物体细胞

克隆羊多莉



- ◆ 世界上第一例经体细胞核移植出生的动物, 是克隆技术领域研究的巨大突破;
- ◆ 哺乳动物克隆研究的重要成果;
- ◆ 克隆羊“多莉”的诞生在全世界掀起了克隆研究热潮, 随后, 有关克隆动物的报道接连不断。



全球首只克隆狗在韩国诞生

鱼类和两栖类是研究细胞核移植的极好材料:

- ◆ 产卵量多
- ◆ 卵体积大
- ◆ 体外受精和体外发育



1. 供体与受体材料的准备

1) 供体：通常为鱼类的囊胚细胞或成体细胞

2) 受体：成熟的卵细胞

★ 卵子在接受供体核之前先要被激活以获得发育的能力

◆ 两栖类：针刺法

◆ 鱼类：鱼卵挤入水中即被激活

★ 关键点：供体与受体在发育时间上要配合好，受体卵

成熟产出时，供体受精卵正好发育到囊胚期。

◆ 用超低温保存供体囊胚细胞

◆ 用温度控制供体受精卵的发育速度

◆ 用体细胞核或经短期培养的体细胞核代替囊胚细胞核做供体

2. 受体卵去卵膜

1) 机械法：用尖头镊子在显微镜下剥开卵膜，游离出卵子。剥膜应于排卵后2-3min在盛有消毒水的培养皿内进行。

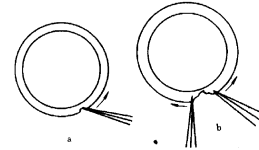


图 8-1 剥膜示意图
a. 用单针剥膜 b. 用双针剥膜
(中国科学院北京动物研究所细胞室, 1975)

3. 受体卵去卵核

- 1) 激活后的卵子，10-15min产生第二极体。极体出现时，用吸管将去膜卵移至底部涂有琼脂层、盛有郝氏液的培养皿内。
- 2) 用发圈拨动卵，当卵被拨到侧面时，即可在其动物极紧靠胚盘中央处，看到一个透亮而很小的极体。紧靠极体的胚盘表面下，就是它的卵核。
- 3) 用发圈轻轻压住卵子，同时用一玻璃微针在极体的旁边刺入卵内，再往外一挑，卵核即于少许细胞质一同流出。

2) 化学法：用郝氏（Holtfreter）液配制的0.25%-0.5%胰蛋白酶液软化卵膜，并在换液过程中辅以轻微的摇动，这样可使卵子从容脱出。

5. 核移植

- 1) 将分离的囊胚细胞尽快移至盛有去核卵的培养皿内备用。
- 2) 把盛有囊胚细胞和去核卵的培养皿置于解剖镜下，用微型吸管吸取的囊胚细胞，细胞入管并破裂，但细胞质不能分散，以免细胞核受损伤。
- 3) 用发圈拨动使去核卵朝上，把吸有细胞核的吸管对准胚盘的近中央处刺入，并把细胞核注入胚盘内。吸管刺入的深度以不超过胚盘高度1/2为宜，切勿刺得太深，以免管口穿过胚盘误入卵黄内。

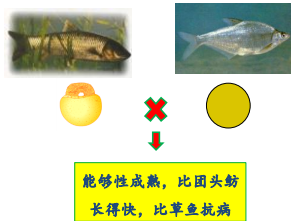
4. 供体细胞的准备

将已经发育到囊胚期的受精卵去膜，然后置于底部涂有琼脂、盛有细胞分离液的培养皿内，置于解剖镜下，用玻璃针切下位于动物极的囊胚细胞团，细胞团在2-3min内就能分散成单个的细胞。

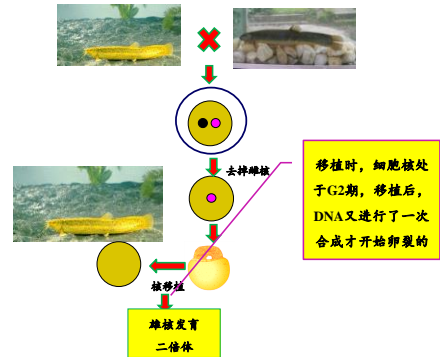


四、核移植在鱼类育种中的应用

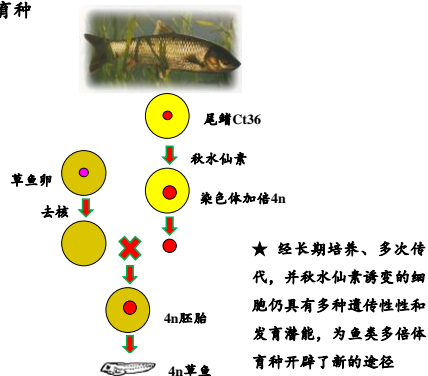
1. 获得核质杂种鱼



2. 产生鱼类雄核发育纯合二倍体



3. 多倍体育种

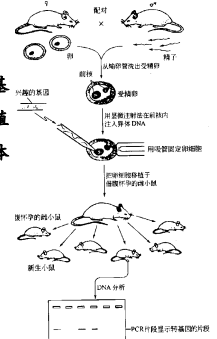


第九章 基因转移技术

一、基因转移的概念

基因转移 (gene transfer)：借助基因工程技术将确定的外源基因通过生殖细胞或早期胚胎导入到动物体的染色体上，称为基因转移；

转基因动物 (transgenic animal)：含有转基因的动物称为转基因动物。



二、转基因动物的研究历史



Palmiter R. D.
University of Washington

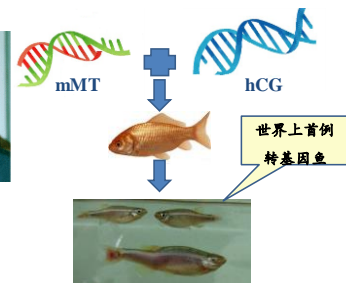
1982年，美国华盛顿大学，Palmiter 将大白鼠生长激素基因转移到小白鼠受精卵中，培育成一种个体比正常小白鼠大一倍的超级小鼠。



三、转基因动物的研究历史



朱作言 院士
中科院水生生物研究所





2004年初，新加坡研制的**特红色荧光蛋白基因斑马鱼**获准进入美国宠物市场，成为世界上首个实现商品化的转基因鱼

四、转基因鱼的研究

- (一) 鱼类作为转基因研究的有利条件
- (二) 转基因鱼的构建
- (三) 外源基因转入鱼卵的方法

(一) 鱼类作为转基因研究的有利条件

- 1. 体外授精，特别是可以人工授精
- 2. 鱼卵易得、数量多、卵径大、便于注入外源DNA
- 3. 受精卵容易培养
- 4. 发育速度快

(二) 转基因鱼的构建

- 1. 外源基因的结构
- 2. 转基因鱼的构建

1. 外源基因的结构

- ◆ 启动子 (promoter) : mMT、SV40、RSV
- ◆ 编码序列 (coding sequences) : GH、AFP
- ◆ 转录终止信号 (transcriptional termination signal)



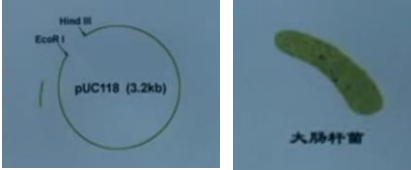
2. 转基因鱼的构建

- ① 获得目的基因 从基因文库中得到一个含侧翼调控序列的合适的**目的基因**。侧翼调控序列包括位于基因编码序列上游的启动子及位于编码序列上游或下游的组



2. 转基因鱼的构建

- ② 基因克隆 将获得的基因序列克隆到**质粒或噬菌体**中，并在合适的菌株中扩增。然后从培养的细菌中提取这种重组质粒或噬菌体DNA，用合适的限制性内切酶酶切分离出插入载体的**外源基因序列**。



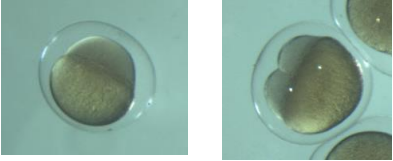
2. 转基因鱼的构建

- ③ 受体鱼（受精卵）的获得 在鱼类繁殖季节，选取成熟的雌、雄鱼，注射垂体或激素催产，分别收集精液和卵子，干法授精。受精卵去膜，将裸卵移至Holtfreter溶液中，选取质好的裸卵移至手术杯中作基因转移。



2. 转基因鱼的构建

- ④ **注射基因** 显微注射法是目前最常用和比较有效的基因导入的一种方法，经人工催产、授精，受精卵用镊子去膜或在0.25%-0.5%胰蛋白酶中处理3-5min，消化去膜，将裸卵移至Holtfreter溶液中，在第一次卵裂前进行显微注射操作导入外源基因。



2. 转基因鱼的构建

⑤ 注射后鱼卵的管理

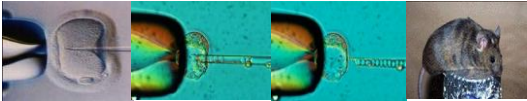
（三）外源基因转入鱼卵的方法

1. 显微注射法（microinjection）
2. 电穿孔法（electroporation）
3. 精子载体法（sperm-mediated gene transfer）
4. 基因枪法（particle gun）

1. 显微注射法（microinjection）



- ◆ 受体细胞主要是卵细胞，现在也用培养的贴壁细胞；
- ◆ 成功率与操作者的熟练程度有关；
- ◆ 主要用于转基因动物



2. 电穿孔法 (electroporation)



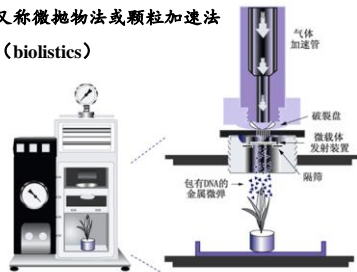
- ◆ 在高压电场的瞬时作用下，细胞膜出现可逆的微小孔洞，外源DNA可以通过这些孔洞进入细胞内；
- ◆ 可用于真核、原核细胞的转染；
- ◆ 优点：简单、重复性好、转移率高；
- ◆ 缺点：对细胞有损伤

3. 精子载体法 (sperm-mediated gene transfer)

在受精过程中，精子能自动找到卵子中的雌核，其准确性之高远非至今任何精密仪器所能比拟。因此，精子是比较理想的基因导入的运载工具。该法又叫精子介导基因转移。

4. 基因枪法 (particle gun)

- ◆ 又称微抛物法或颗粒加速法 (biolistics)



五、转基因鱼的应用潜力

1. 快速育种
2. 改良养殖性能
3. 生产医药生物制品

延伸和拓展

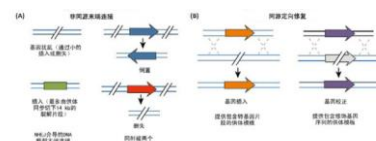
一、基因组编辑三大技术:CRISPR、TALEN和ZFN

转录激活样效应因子核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 技术与锌指核酸酶 (Zinc-finger nuclease, ZFN) 技术组成了一大类强有力的基因组编辑工具，这一大类技术的发展重新划定了生物学研究的边界。这些嵌合核酸酶由两部分组成——一个可编码的序列特异性DNA结合模块与一个非特异性的DNA切割结构域。通过诱导DNA双链断裂 (DNA double-strand break) 来刺激容易出错的非同源末端连接或在特定基因所在的位置进行的同源定向修复，TALEN和ZFN能够完成一系列遗传学编辑修饰操作。

成簇规律间隔短回文重复 (clustered regulatory interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 技术是最新出现的一种基因组编辑工具，它能够完成RNA导向的DNA识别及编辑。与其它基因组编辑工具相比，CRISPR技术更易于操作，具有更强的可扩展性。

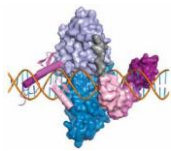
TALE效应因子 (TALE effector, TALE) 最初是在一种名为黄单胞菌的植物病原体中作为一种细菌感染植物的侵袭策略而被发现的。这些TALE通过细菌 III 类分泌系统 (bacterial type III secretion system) 被注入植物细胞中，通过靶定效应因子特异性的基因启动子来调节转录，来促进细菌的聚落形成。由于TALE具有序列特异性结合能力，研究者通过将FokI核酸酶与一段人造TALE连接起来，形成了一类具有特异性基因组编辑功能的强大工具，即TALEN。

近年来，TALEN已广泛应用于酵母、动植物细胞等细胞水平基因组改造，以及拟南芥、果蝇、斑马鱼及小鼠等各类模式研究系统。2011年《自然·方法》(Nature Methods) 将其列为年度技术，而2012年的《科学》(Science) 则将TALEN技术列入了年度十大科技突破，针对该文的评论更是给予它基因组的巡航导弹技术的美誉。

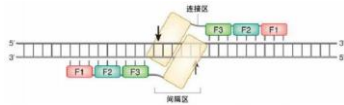


TALEN进行基因组编辑的原理

锌指核酸酶 (Zinc-finger nuclease, ZFN) 又名锌指蛋白核酸酶 (ZFPN)，它是一类人工合成的限制性内切酶，由锌指DNA结合域 (zinc finger DNA-binding domain) 与限制性内切酶的DNA切割域 (DNA cleavage domain) 融合而成。研究者可以通过加工改造ZFN的锌指DNA结合域，靶向定位于不同的DNA序列，从而使得ZFN可以结合复杂基因组中的目的序列，并由DNA切割域进行特异性切割。此外，通过将锌指核酸酶技术和胞内DNA修复机制结合起来，研究者还可以自如地在生物体内对基因组进行编辑。目前，在大量植物、果蝇、斑马鱼、蛙、大小鼠及牛等物种中，ZFN技术已被广泛应用于靶向基因的突变，通过人工修改基因组信息可以产生遗传背景被修改的新物种。该技术在医学领域也具有非常重大的价值，对于疾病的基因治疗有潜在意义，具有非常广泛的应用前景。



ZFN的结构



ZFN特异性识别DNA并与DNA结合示意图

Resource

Systematic genome editing of the genes on zebrafish Chromosome I by CRISPR/Cas9

Yonghui Sun,¹ Bo Zhang,² Lingfei Luo,³ De-Li Shi,⁴ Han Wang,⁵ Zongbin Cui,¹ Honghui Huang,³ Ying Cao,⁶ Xiaodong Shu,⁸ Wenqing Zhang,⁸ Jianfeng Zhou,⁹ Yun Li,⁹ Jiulin Du,¹⁰ Qingshun Zhao,¹¹ Jun Chen,¹² Hanbing Zhong,¹³ Tao P. Zhong,¹⁴ Li Li,¹ Jing-Wei Xiong,¹⁵ Jinrong Peng,¹² Wuhan Xiao,¹ Jian Zhang,¹⁶ Jihua Yao,¹⁷ Zhan Yin,¹ Xianming Mo,¹⁸ Gang Peng,¹⁹ Jun Zhu,²⁰ Yan Chen,²¹ Yong Zhou,²² Dong Liu,¹³ Weijun Pan,²² Yiyue Zhang,⁸ Hua Ruan,³ Feng Liu,²³ Zuoyan Zhu,¹ Anming Meng,²⁴ and The ZAKOC Consortium²⁵

¹State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Innovation Academy for Seed Design, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei, 430072, China; ²Key Laboratory of Cell Proliferation and Differentiation of the Ministry

CRISPR/Cas9

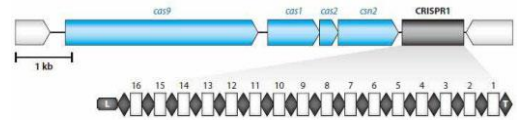
从表型到基因型”的正向遗传学筛选

斑马鱼

斑马鱼1号染色体全基因组敲除计划

CRISPR/Cas系统

不论是TALEN技术还是ZFN技术，其定向打靶都依赖于DNA序列特异性结合蛋白模块的合成，这一步骤非常繁琐费时。而CRISPR/Cas技术作为一种最新涌现的基因组编辑工具，能够完成RNA导向的DNA识别及编辑。CRISPR/Cas技术使用一段序列特异性向导RNA分子 (sequence-specific guide RNA) 引导核酸内切酶到靶点处，从而完成基因组的编辑。CRISPR/Cas系统的开发为构建更高效的基因定点修饰技术提供了全新的平台。



斑马鱼1号染色体上的1333个基因进行系统性基因敲除，成功敲除了其中1029个基因，获得针对636个基因的1039个可遗传的突变型，所有突变品系和遗传信息全部通过国家水生生物种质资源库

持续6年多的研究，首次实现了脊椎动物整条染色体的系统性基因敲除

国际首次敲除水产养殖鱼类基因

肌抑素缺失鱼的性状可通过外观表型直接分辨。该新品系黄颡鱼的肌肉组织生长高效，至30日龄时就开始出现明显的双肌表型，表现为头部和背鳍之间形成两个明显突出的肌肉团，且随着日龄增长而变得更加明显。在第80天和210天时，体重分别比同胞野生型的增大27%至37%。

肌抑素基因 (mstn) 是一个控制动物生长的重要基因。多种定向选育获得的优良品系家养动物，如牛、绵羊和狗等都携带了肌抑素基因的自发突变。携带这些自发突变的家养动物均呈现出“双肌”表型，肌肉含量比肌抑素基因正常的品系显著增高。



锌指核酸酶(zinc-finger nucleases,简称ZFN)

水产遗传育种

截至2016年，我国已审定168个水产改良新品种：

- 选育品种(品系) 92个
- 杂交种 47个
- 引进种或其它 29个

这些鱼类良种的育成，主要是通过筛选获得优良性状个体，加以选择、固定，从而选育出优良品系；或通过携带优良性状亲本间杂交等获得。

传统育种技术(选育、杂交和多倍体育种)：从本质而言，是利用自然界已存在的突变体，它们携带有优良性状基因，在此基础上选育出优良品系。

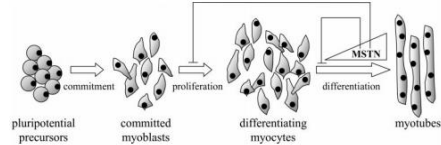


水产育种的关键问题

- 然而，养殖鱼类的自发突变频率很低，通常低于 10^{-6} ，需要在很长的时间或很大的群体中才可能存在，即便自然产生，也很难筛选获得。
- 因此，带有重要经济性状相关基因的突变家系往往可遇不可求，严重阻碍了鱼类的良种选育的步伐。
- 另外养殖鱼类性成熟时间长，通常需要3年左右，选育到F6代需要近20年，育种时间漫长，迫切需要建立快速育种技术。

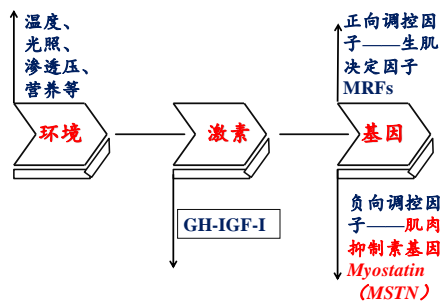
动物肌肉生长特征

- 哺乳动物：肌纤维增加肌纤维数量（增生：hyperplasia）和增加肌纤维横截面（增大：hypertrophy）
- 哺乳动物和鱼类的不同
 - 哺乳动物：出生后肌纤维的生长主要是指肌纤维的增大。
 - 鱼类：肌纤维在整个生长过程中都会增加。



Amthor, et al., 1978. Nature 351, 360-363.

影响鱼类肌肉的分化、生长和发育的因素



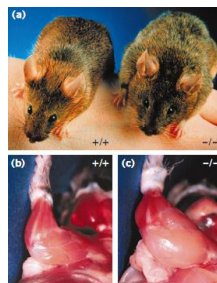
Lee, S. J., McPherron, A. C., 2001. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 9306-9311.

Myostatin(MSTN)对肌肉发育的负调控作用

- 1997年在小鼠中获得TGF- β 超家族的一个新基因，当时命名为生长分化因子8(GDF8)，生肌调节因子家族在肌细胞分化和增殖过程中起到了重要作用。
- 后经研究发现，GDF8对骨骼肌的生长具有负调控作用，因此改名为肌肉生成抑制素 Myostatin (MSTN)。
- MSTN能够通过结合Smad蛋白调控Myogenin使成肌细胞停留在G0/G1和G2期，从而阻碍成肌细胞的分化和增生。

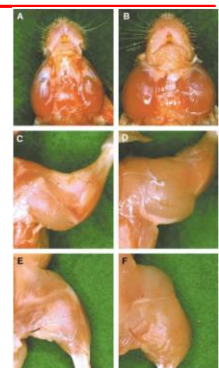
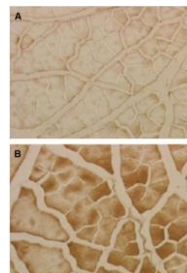
MSTN对小鼠肌肉发育的负调控作用

在敲除该基因后，小鼠骨骼肌迅速增加。3-6个月实验组比对照组体重增加30%。表现出肌纤维的增加和肌纤维增大。

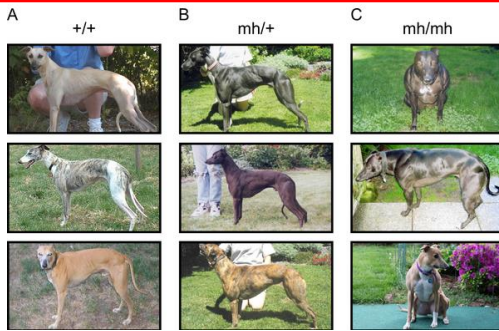


双肌型小鼠

- 肌纤维增生
- 非肌纤维增大

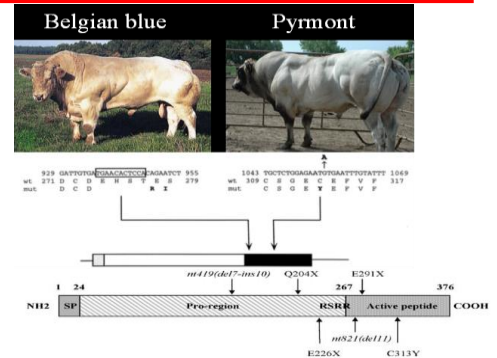


犬类中的类似现象



Plos Genetics: A Mutation in the Myostatin Gene Increases Muscle Mass and Enhances Racing Performance in Heterozygote Dogs.

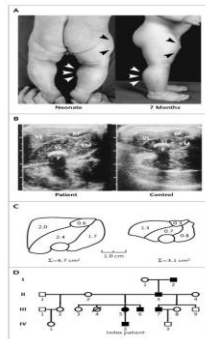
MSTN突变导致肌肉增生——双肌型肉牛



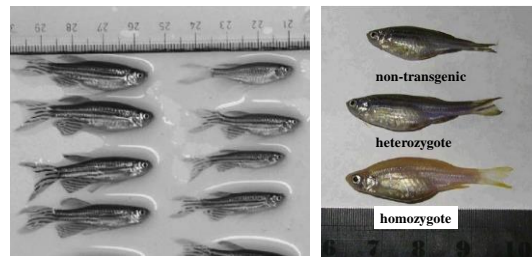
人类MSTN的肌肉负调控作用

由于基因突变，德国柏林一个仅5岁的男孩不幸成为“肌肉男”。肌肉组织的发育程度是同龄孩子的两倍，但脂肪组织却只有同龄孩子的一半。能够举起成年人未必都能举起的70磅重物。这种MSTN基因突变是全球首例记录在案的发生在人类身上的例子。

Schuelke M et al., 2004. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. N Engl J Med 350:2682-2688.



反义RNA干扰MSTN的转基因斑马鱼

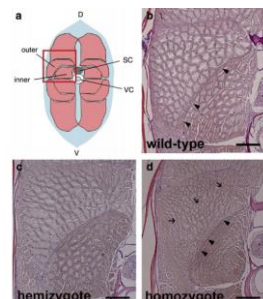


Acosta et al., 2005. Journal of Biotechnology 119 (2005) 324-331

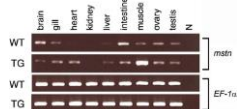
Lee et al., 2009. Biochemical and Biophysical Research Communications 387:766-771

青鳉MSTN转基因突变主要为肌纤维增加

cattle PKRYKANYCS GECEPVFLQK YPHITLHVQA
medaka PKRYKANYCS GECEMYLQK YPHITLVNKA

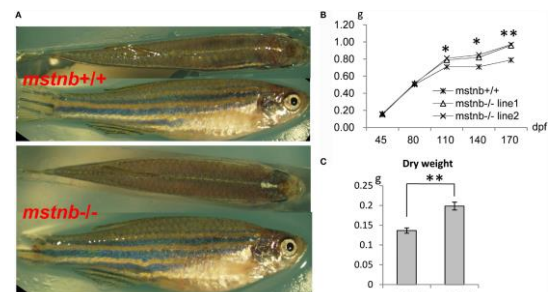


按照在皮埃蒙特牛，在313位置半胱氨酸残基取代酪氨酸，而在青鳉中，相应的半胱氨酸残基的位置位于315。



Chisada et al., 2011. Myostatin-deficient medaka exhibit a double-muscling phenotype with hyperplasia and hypertrophy. Dev. Biol. 359, 82-94.

斑马鱼mstnb-b敲除(TALENs)纯合子有促生长作用



Gao Y, Dai Z, Shi C, Zhai G, Jin X, He J, Lou Q and Yin Z (2016) Depletion of Myostatin b Promotes Somatic Growth and Lipid Metabolism in Zebrafish. Front. Endocrinol. 7:88.

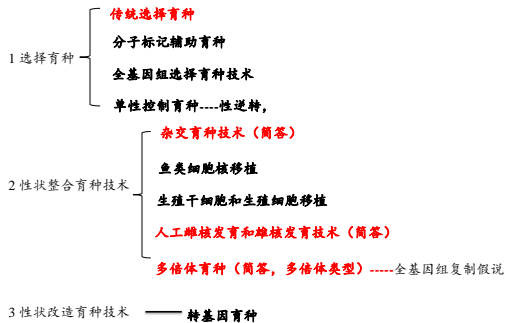
考试题型：

名词解释：10个，3分一题，共30分

简答题：5个，8分一题，共40分

论述题：2个，15分一题，共30分

- 1、考试过程全程必须要在摄像头下操作，腾讯会议，如果中途断网，需要重新考试其他试卷，试卷将更晚；
- 2、90分钟考试，考试时间结束前，需要用“全能扫描王”软件，将答题试卷发送到邮箱：450897148@qq.com，发送成功后会受到回复确认；
- 3、发送试卷到群里面后，每位同学利用空白A4纸进行作答，只需要标识好题号，不需要抄写题目。

常见的育种方法**回顾重点**

鱼：品种，良种，原种等定义，四大家鱼的种类，重要的淡水经济鱼类的特征，特别的水产物种的习性。

繁殖：重要经济鱼类的繁殖时期，性腺（精巢和卵巢）发育时期特征，性别决定方式，影响性别的因素，人工繁殖的催产剂，繁殖相关的一些重要名词定义，

育种技术：

育种的目标

总目标：高产、稳产、优质、低消耗

- 具体目标：**
1. 食物转化率（food conversion efficiency）
 2. 生长率（growth rate）
 3. 抗性（resistance）：抗病、抗寒、耐低氧
 4. 繁殖力（fecundity）
 5. 肉质（meat quality）
 6. 成熟年龄（age at maturation）
 7. 起捕率（harvesting rate）
 8. 适应性（adaptivity）

