

卵黄蛋白原 1 (vtg1) 启动子调控绿色荧光蛋白表达的转基因斑马鱼的构建*

陈浩 杨健 王跃祥 蒋璆 徐绘 宋后燕**

(复旦大学上海医学院分子遗传学教研室, 分子医学教育部重点实验室, 上海 200032)

摘要 环境雌激素严重危害人类的健康. 为了简便直观地检测水环境中的雌激素污染, 构建了一种转基因斑马鱼, 在这种鱼的体内, 利用卵黄蛋白原 1 (vitellogenin1, vtg1) 的启动子调控报告基因绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的表达. 用 1 ng/L 的 17 α - 炔雌醇 (17 α -ethynylestradiol, EE2) 诱导 4 天后, 仔鱼肝脏中出现绿色荧光. RT-PCR 和整体原位杂交实验证实, 仔鱼体内 EGFP 和 vtg1 的时空表达模式相同. 通过在显微镜下观察转基因鱼的绿色荧光, 可以直观判断水环境中是否含有雌激素活性物质. 该研究为环境雌激素的监测提供了一种简便直观的新型工具.

关键词 转基因斑马鱼, 绿色荧光蛋白, 卵黄蛋白原, 启动子, 环境雌激素

学科分类号 Q813, Q959146

环境雌激素 (environmental estrogens, EEs) 是环境内分泌干扰物中最重要的一种, 主要来源于各种避孕药, 农药及其代谢物, 油漆, 塑料, 防晒剂, 以及一些重金属离子^[1,2]. 随着化工业的发展, 越来越多的化学合成物质进入环境, 可能带来许多新的环境雌激素. EEs 广泛存在于水, 土壤和食物中, 通过生物富集作用, 许多生物体内的 EEs 浓度高于其在环境中浓度的几十倍. 研究表明, EEs 严重干扰了野生生物性腺发育, 导致个体生殖功能障碍, 种群数量减少. 在人类, EEs 只要有极微量 (ppb 级) 进入体内后就能对男性生殖功能产生不良作用, 表现为男性精液产量下降, 在过去 50 年中, 全球男性精子总数降低 40%, 精液量降低 20%, 精液质量的降低直接导致不育率增加, 先天畸形增多, 并是男性睾丸肿瘤、前列腺癌的病因之一^[3~5]. 本研究旨在探索一种简便直观的方法, 用于检测环境中的雌激素活性物质, 为保障人类的健康繁衍服务.

模式生物斑马鱼已经广泛应用于环境毒理学研究^[6]. 在环境雌激素诱导下, 雄鱼和幼鱼能够从无到有地表达卵黄蛋白原 (vitellogenin, vtg), 表达水平和环境雌激素的浓度呈正相关^[7,8]. 因此 vtg 是检测环境雌激素的一种标志物. 本研究构建的转基因

斑马鱼利用 vtg1 的启动子调控绿色荧光蛋白 (EGFP) 的表达, 使 EGFP 模拟 vtg1 早期的表达情况. 当水环境中含有雌激素活性物质时, 这些物质与转基因斑马鱼肝脏细胞中的雌激素受体结合, 进而与 vtg1 启动子上的雌激素顺式作用元件结合, 启动 EGFP 基因在肝脏细胞中的表达, 通过荧光显微镜能观察到转基因鱼的肝脏出现绿色荧光. 而当水环境中不含雌激素活性物质时, vtg1 的启动子不能被激活, 转基因鱼的肝脏不能观察到绿色荧光. 因此, 这种转基因鱼可用于环境雌激素的筛选和检测.

1 材料和方法

1.1 斑马鱼的养殖

野生型斑马鱼 (*Danio rerio*) 购自国际斑马鱼资源中心, 斑马鱼养殖系统从美国 Aquatic Habitats 公司引进, 喂养方案按照 *Zebrafish Book* 描述进行^[9].

1.2 vtg1 部分启动子的克隆和重组质粒的构建

根据 Trust Sanger Institute 斑马鱼数据库预测

*上海市自然科学基金重点项目 (03DZ14020).

** 通讯联系人. Tel: 021-54237739, E-mail: hysong@shmu.edu.cn

收稿日期: 2006-04-08, 接受日期: 2006-05-08

的 *vtg1* 基因(ID: ENSDARG00000016825)设计引物, 并引入 *Hind*Ⅲ和 *Bam*H I 酶切位点: P1, 5' GCTGCAAGCTTACTAATAGGAAGCCAACGAAG GACC 3'; P2, 5' CTCGGATCCGCTACAGTCA-AGGCAAGCACAACAGC 3'.

以斑马鱼基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 反应条件如下: 94℃预变性 5 min, 每循环包括 94℃变性 1 min, 62℃复性 1 min, 72℃延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 1 个循环结束后再 72℃延伸 7 min. 扩增片段用 *Hind*Ⅲ和 *Bam*H I 双酶切, 和同样酶切的质粒 pEGFP-1(Clontech 公司)连接, 转化 DH5 α 感受态细菌, 挑选阳性克隆, 酶切鉴定后由上海基康生物技术公司测序.

1.3 显微注射和荧光观察

用限制性内切酶 *Bgl* II 线性化重组质粒, 纯化后溶于含酚红的 TEK 缓冲液^[9] (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L KCl), 浓度为 50 mg/L. 当受精卵发育到 1 至 2 个细胞阶段, 在解剖镜下进行显微注射, 每个受精卵注射量为 100 pg^[9]. 注射后的受精卵分 3 组: 空白组, 溶剂组, EE2 处理组 (1 ng/L), 每组 800 个卵. 28℃恒温培养, 定期在荧光显微镜下观察外源基因表达情况.

1.4 转基因鱼的鉴定

1.4.1 RT-PCR 检测 EGFP 和 *vtg1* 的 mRNA 水平.

分别取转基因后观察到荧光的鱼和未观察到荧光的鱼 (受精后 5 天 (5 dpf), 每组 15 条), 按说明书用 Trizol (Invitrogen 公司) 一步法提取总 RNA. 逆转录以 1 μ g 总 RNA 为模板, 10 mmol/L 的 OligodT 1 μ l, 70℃, 5 min; 冰上加 10 $\times$ 缓冲液 2 μ l, 25 mmol/L 的 dNTP 4 μ l, M-MLV (Promega 公司) 1 μ l (200 U), 42℃, 60 min, 95℃, 5min, 逆转录为 cDNA. 按文献[10,11]设计引物: EGFP P1, 5' ACCACATGAAGCAGCAGCT 3', EGFP P2, 5' CTTCTCGTTGGGGTCTTTGC 3'; *vtg1* P1, 5' GCT GCT GCA TCTGTC AAT GT 3', *vtg1* P2, 5' CTG CTG CTG CTTTCA GAA GA 3'.

以 1 μ l 逆转录产物为模板, PCR 扩增检测 EGFP 基因, 同时以 pEGFP-1 质粒为模板作阳性对照. 反应条件如下: 94℃预变性 5 min, 每循环包括 94℃变性 40 s, 55℃复性 30 s, 72℃延伸 40 s, 共 28 个循环, 最后 1 个循环结束后再 72℃延伸 7 min. 扩增片段进行琼脂糖凝胶电泳分析.

1.4.2 整体原位杂交检测 *vtg1* 的表达部位. 取上述

1.4.1 扩增出来的 *vtg1* 片段, 连接到 pGEM-T vector (Promega 公司) 中, 转化 *E. coli*. DH5 α 感受态, IPTG+Xgal 筛选, 挑取阳性克隆, 酶切鉴定后由上海基康生物技术公司测序. 根据测序结果, 用限制性内切酶 *Nco* I 将质粒线性化, 用 SP6 RNA 合成酶进行体外转录 (Roche 体外转录标记 RNA 试剂盒), 得到地高辛标记的 *vtg1* RNA 探针. 幼鱼从 0 dpf 开始分组处理: 溶剂 (0.001%乙醇), 1 ng/L EE2, 每 24 h 换液. 5 dpf 时用 4%多聚甲醛固定, 进行整体原位杂交^[9]. 最后在解剖镜下拍照保存实验结果.

1.4.3 PCR 检测 EGFP 在基因组中的整合. 待观察到荧光的鱼长至成熟后, 提取基因组 DNA (Promega DNA 提取试剂盒), PCR 鉴定 EGFP 的基因组整合, 引物同 1.4.1 中的 EGFP P1 和 EGFP P2, 同时以质粒 pEGFP-1 为模板作为阳性对照, 以野生型鱼基因组 DNA 为模板作为阴性对照. 反应条件为: 94℃预变性 5 min, 每循环包括 94℃变性 40 s, 55℃复性 40 s, 72℃延伸 1 min, 共 28 个循环, 最后 1 个循环结束后再 72℃延伸 7 min. 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析.

2 结果与分析

2.1 *vtg1* 启动子的克隆和表达载体的构建

采用 P1、P2 引物, 以斑马鱼基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 其产物用琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 1.7 kb 的特异条带 (图 1). 将该特异条带回收后与质粒 pEGFP-1 重组, 并对重组质粒 pEGFP-*vtg1* 进行限制性内切酶分析, 琼脂糖凝胶

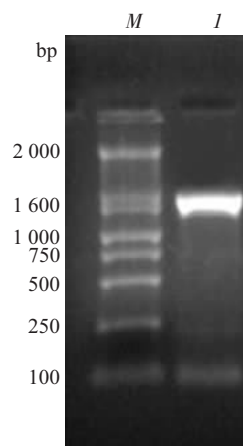


Fig. 1 Amplification of *vtg1* promoter from zebrafish genome DNA

M: DNA marker; I: PCR product (1.7 kb).

电泳, 可见约 1.7 kb 和 4 kb 的 2 条带, 与预期相符(图 2). 对重组质粒进行测序, 得到的 DNA 序列为 1 720 bp (图 3), 与 Trust Sanger Institute 斑马鱼数据库预测的 vtg1 基因比对, 发现 95% 同源. 用 TESS 软件 (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/teess/teess?RQ=MRZ-seq&job=W0535009472&is=1&nr=50&att=begin&fr=0&mask=-1>) 在线分析这段序列中所含的顺式作用元件, 发现某些元件与肝脏特异性表达有关, 如 C/EBP, HNF 等, 另外一些元件与雌激素调控有关, 如 1/2ERE, AP1, SP1(图 3).

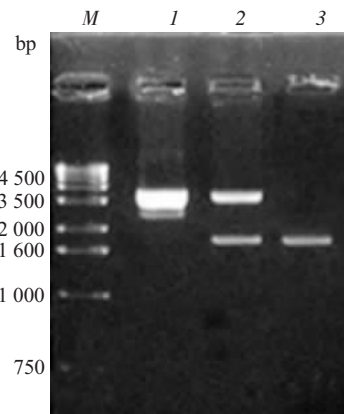


Fig. 2 Restriction analysis of pEGFP-vtg1

M: DNA marker; 1: pEGFP-vtg1; 2: pEGFP-vtg1 digested with *Hind* III and *Bam*HI; 3: PCR product.

```

-1707 ACTAATAGGA AGCCAACGAA GGACTTTAAG CAATGTGCAA CCAACTGGTT AAAAGCCTTG CAGCTGCATT CAGCACAAC
      C/EBP                                1/2 ERE
-1627 TGCAATCAAT CTACAGATGA CTATTTAGAC AAGGTACAG AACATTAAAT AGTCCAACCG TGAAGAGATA AAGGAATGAC
      API
-1547 AAGCATCTCC ATCTTTTCTT ATGAAACCAT ATTTCTAGT TTTTGCAATAT TCCTAAGATG GAAACACTT GCAAAACAG
      C/EBP                                HNF
-1467 ATTAACACAT AGAATTTAT CAAAGATGAC ATCCATATTT CTGTTCCAC TGCAATTTAA GGGTGACAGA TACAAAAATA
-1387 CTCAATCTCT GGGATGACAT TATAAAATG CAAAAATCTA CATCTCAGTT TTGTCAGGAT TAAGTTGAAA ATTGTCAGCC
-1307 ATCCATTTGT TAATGTGAC TAAACAATCC TGCAAGAACT GTAAGAAAAG TACAATAGCA TATCATCAGC ATAGCAATGA
      HNF API HNF
-1227 TAAGACACAA ATTTAAAGCT GCTAGTATTG TTGCTTAGAG AAAGTGATA CAAATGAAAC AGAAGAGAGC CTAGCACAGA
      API
-1147 AACTTGAGGC ACGCACAGGA CAGAGGAACA GAGTCTGACA TGTGAGTTCC TATGGACACA GAAAACTCC TGTCACCAAG
-1067 ATAGGAGGAT AACCAGAGCT GTCCCACTAT TCCACCAAGA GAATGCAATG TCTTTATTAA AGTGCAGTGA TCAACATTGT
      SPI
-987 CAAAATCTAC ACTAATATCC AGCAAAACCA GCACATACTA ATTACCTGCA TGCCATTAAA AGATCATACT TAAGACAAC
      API
-907 TGAACAAAC AACAAAGGTC AGTCACAAA TACCAGGTCT ACCAAACCAT TTACACCCCT TTTTATTTT TTCCAAATAC
      API
-827 ACAAACAGTT GTCAAAATGT ACATTATGTG GACAATAAAT ACAGTTAAAT ATGACTTGGT GTAAATAAAA GTTAAAAAGG
-747 CATGCTGCC CAGCTGTGTTT TTTACCTTT GCTTATAACA GGTTATTGTA GNTGTCTTGT TGTTACTTAT ATTAGGCCTA
      1/2 ERE
-667 TTTTGTGAT ATGCCAAAA CCTTGGCCAA TTATTAAGTA AAAAAAATA TTAGGCTAAC ATTGACATCA CTTATAAAAA
-587 ATAATTTCTT AAAACTCATA CATATTTGCC TTAGCCCCGG TAGAAAAATA ATTGCACAGT GCCTGGTTCC ATACCCATAC
      SPI C/EBP
-507 CATCAATGGG ATTTATGCAT TGGTTGCTAT GTAAATGAGA TGTTACATCT ACAATATGTT CTTAATTTG TGTTATCAGA
      HNF
-427 AAATCATGCA CAAAACCTTA AAACAAAATA ATGCACAAA AATTATGTAA ATCTGCCTGT TTAGTTAAAT CTGGCCTTAA
      HNF C/EBP
-347 ATGTATACAT AAAAATAAAT TTTAATTAA TTACATCTAT TTATAAGTAT CTATGTATAA AACATCTACT GCATCAGTAT
-267 TATTTTATTA CTGAAAAATA ATAACCTTTT TATATATAAA AGATTGGCGA TCATTTTACT GTGTACATTG GCAAAAAATA
-187 TGACATCATG ACAGGCCAGG TTAACCTAAC CTCTGGAGAT ATTTTGTTC AAATAACCAA GTCTTAACCT GTGTGCAGTT
-107 TTTTTTTTCT TTTGTTTAAA GACTTATGTT AATAATTAAT TTAAGAACTA ATACTTGGTC AGCAAGAAAA TCACTATAAA
      HNF
-27 AGACCCGATA CTCTCAAGAG TTCTTCAACCAACCAAGCC
      C/EBP

```

Fig. 3 Transcriptional elements at 5'-upstream of vtg1 gene

2.2 显微注射和荧光观察

重组质粒 pEGFP-vtg1 线性化后显微注射斑马鱼受精卵, 共 2 400 个, 从 0 dpf 开始分组, 养殖于含有不同物质的系统水中: 1 ng/L EE2, 等体积溶剂 (0.001%乙醇), 空白对照 (纯净系统水)。

注射后的胚胎和幼鱼每隔 12 h 在荧光显微镜下观察. 在含有 1 ng/L EE2 的系统水中养殖 5 天后, 幼鱼的肝脏部位出现绿色荧光 (图 4a, 红色箭头所指), 而溶剂对照 (图 4b) 和空白对照组 (图 4c) 均未观察到肝脏绿色荧光。

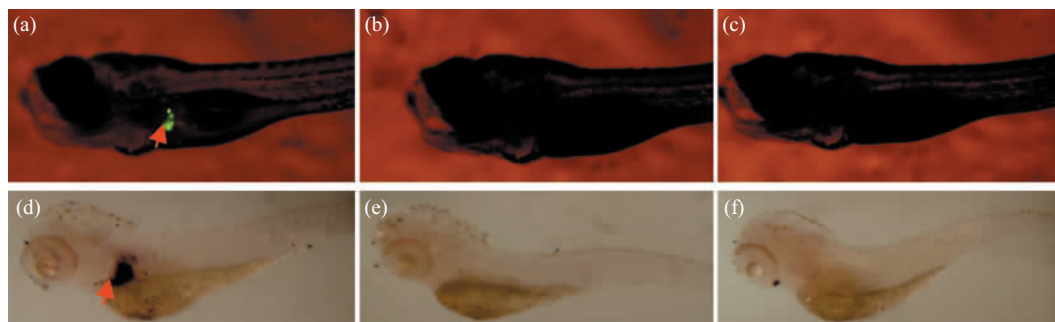


Fig. 4 Green fluorescence and vtg1 in the liver of larval zebrafish treated with EE2

All of the fish were 5 days post fertilization. (a, d) Treated with 1ng/L EE2 for 4 days; (b, e) Treated with 0.001% alcohol for 4 days as solvent control; (c, f) In the system water as blank control; (a, b, c) Observed through fluorescence microscope, as red arrow indicating, only (a) had green fluorescence in liver; (d, e, f) Whole amount *in-situ* hybridization with the digoxigenin labeled RNA probe, as red arrow indicating, only (d) was stained in liver.

2.3 转基因斑马鱼的鉴定

2.3.1 RT-PCR 检测 EGFP 和 vtg1 的共表达. 从这些转基因操作后的斑马鱼中, 分别取观察到肝脏荧光的鱼和未观察到荧光的鱼 15 条, 均为 5 dpf. 提取总 RNA, 进行逆转录, 同时用 EGFP 和 vtg1 特异性引物进行 PCR 扩增, 检测 EGFP 和 vtg1 的共表达, 并设内参 PO. RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳如图 5, 图 5a 为 EGFP 的扩增产物, 图 5b 为 vtg1

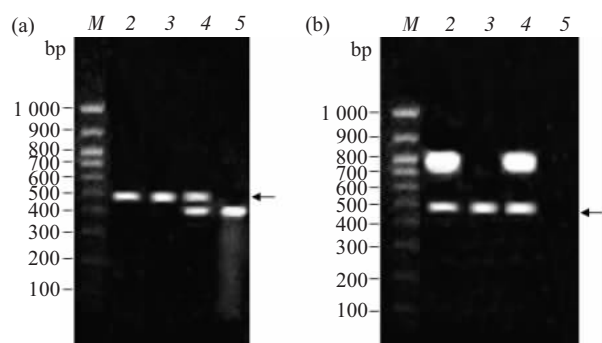


Fig. 5 RT-PCR analysis of the co-expression of vtg1 and EGFP genes

(a) Expression of EGFP gene; (b) Expression of vtg1 gene. M: DNA marker; 2: RT-PCR product from zebrafish treated with 1ng/L EE2 without fluorescence; 3: RT-PCR product from zebrafish treated with solvent; 4: RT-PCR product from zebrafish treated with 1ng/L EE2 with fluorescence; 5: PCR product of pEGFP-1 as positive control; the arrows indicate the RT-PCR products of acidic ribosomal phosphoprotein which was used as an internal control.

的扩增产物, 箭头所指为内参 PO. 结果显示, 以观察到荧光鱼的 cDNA 为模板, 2 种引物分别扩增出约 400 bp 和 800 bp 的片段, 与预期 EGFP 和 vtg1 的扩增产物大小相符 (图 5a、b 中泳道 4); 而未观察到荧光的鱼, 无论是用溶剂还是 EE2 处理, 均未能扩增出 400 bp 的 EGFP 片段 (图 5a 泳道 2, 3), 尽管后者扩增出 800 bp 的 vtg1 片段 (图 5b 泳道 2). 这说明两点: a. 观察到荧光的鱼表达 EGFP 基因, 未观察到荧光的鱼不表达 EGFP 基因, 即肝脏的绿色荧光是由于 EGFP 的表达而产生; b. 表达 EGFP 的同时, vtg1 也表达, 而且是在 EE2 处理后特异性地表达, 即二者的表达模式是一致的. 因此绿色荧光是 EGFP 表达的结果, 并且受到 EE2 的调控。

2.3.2 整体原位杂交检测到 vtg1 在肝脏表达, 与观察到荧光的部位一致. 设计 vtg1 特异性 RNA 探针, 对野生型斑马鱼进行整体原位杂交, 定位 vtg1 的表达部位. 如图 4 所示, 用 1 ng/L EE2 处理 5 天后, 幼鱼 (5 dpf) 的肝脏部位特异性地结合探针并显色 (图 4d); 而用等体积溶剂处理 (图 4e) 或无处理 (图 4f) 的同时期幼鱼未能和探针结合. 这进一步证实了 EE2 能诱导 vtg1 在 5 dpf 的幼鱼中表达, 与转基因斑马鱼 EGFP 的表达时间相同. 另外, 本实验还发现 vtg1 在幼鱼中的表达部位是肝脏 (图 4d 中红色箭头所指), 这和 EGFP 的表达部位一致 (图

4a中红色箭头所指). 因此, 本实验进一步证明, 在较早的幼鱼时期, 转基因斑马鱼 EGFP 的表达和野生型斑马鱼 *vtg1* 的表达时空模式一致.

2.3.3 PCR 检测基因组中的 EGFP 基因. 待幼鱼时观察到荧光的斑马鱼长至成鱼(90 dpf), 取 3 条鱼的基因组 DNA, 以此为模板, PCR 扩增 EGFP 基因, 琼脂糖凝胶电泳可以看到清晰条带, 约 400 bp, 和阳性对照大小一致; 而未观察到荧光的鱼, 以其基因组为模板进行 PCR 扩增, 未能得到同样的产物 (图 6). 说明外源基因 EGFP 已经整合到这些荧光鱼的基因组中.

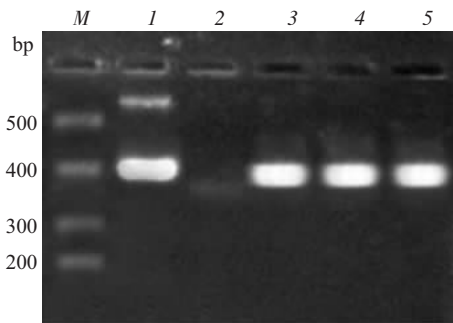


Fig. 6 Amplification of EGFP gene from genome DNA of transgenic zebrafish

M: DNA marker; 1: PCR product of pEGFP-1 as positive control; 2: Amplification from the genome DNA of wild type fish as negative control; 3, 4, 5: PCR products of EGFP gene from the genome DNA of transgenic zebrafish.

3 讨 论

卵黄蛋白原(vitellogenin, *vtg*)是几乎所有卵生动物卵黄蛋白的前体, 特异地存在于成熟卵生雌性动物血液中, 为正在发育的胚胎提供氨基酸、脂肪、碳水化合物、维生素、磷和硫等营养和功能性物质. 斑马鱼的 *vtg* 分为 7 种亚型, *vtg1*~*vtg7*, 生理情况下主要在成熟雌鱼肝脏表达. 受到一定浓度的环境雌激素作用后, 雄鱼和幼鱼中也有 *vtg* 表达, 而且 *vtg1* 的 mRNA 水平比其他亚型高得多 (100~1 000 倍)^[12]. 近年来, *vtg1* 成为筛选和检测环境雌激素的重要指标^[7].

本研究构建的 *zvtg1:egfp* 转基因斑马鱼, 由 1.7 kb 的 *vtg1* 启动子调控绿色荧光蛋白的表达, 用 0.1 ng/L 的 EE2 处理后, 于 5 dpf 即可观察到肝脏出现绿色荧光, 在时间和空间上与内源性 *vtg1* 的早期表达一致. 这说明 *vtg1* 基因的 5'上游约 1.7 kb 的序列中含有调控其早期表达的顺式作用元件. 通

过软件分析, 发现在这段序列中含有 2 个 1/2ERE, 以及数个 AP1 和 SP1 位点, 这些位点都和雌激素调控有关^[13, 14]. EE2 对 *vtg1* 早期表达的调控究竟是通过哪些顺式作用元件和反式作用因子来实现, 尚待进一步深入研究.

本研究构建的转基因鱼, 幼鱼时期即可在环境雌激素 (EE2) 诱导下发出绿色荧光, 在时间和空间上与内源性 *vtg1* 的早期表达一致. 此时鱼体仍为透明, 从而可以用活体直观检测环境水体中存在的雌激素活性物质. 目前正在检测其对各种不同环境雌激素的敏感性, 以期尽快投入应用.

参 考 文 献

- 1 Lenz K, Beck V, Fuerhacker M. Behaviour of bisphenol A (BPA), 4-nonylphenol (4-NP) and 4-nonylphenol ethoxylates (4-NP1EO, 4-NP2EO) in oxidative water treatment processes. *Water Sci Technol*, 2004, **50** (5): 141~147
- 2 Henson M C, Chedrese P J. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med* (Maywood), 2004, **229** (5): 383~392
- 3 Anway M D, Cupp A S, Uzumcu M, *et al.* Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 2005, **308** (5727): 1466~1469
- 4 Storgaard L, Bonde J P, Olsen J. Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure A review of published epidemiological studies. *Reprod Toxicol*, 2006, **21** (1): 4~15
- 5 Safe S. Endocrine disruptors and human health: is there a problem. *Toxicology*, 2004, **205** (1~2): 3~10
- 6 Ankley G T, Johnson R D. Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. *ILAR J*, 2004, **5** (4): 469~483
- 7 Marin M G, Matozzo V. Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Mar Pollut Bull*, 2004, **48** (9~10): 835~839
- 8 Nilsen B M, Berg K, Eidem J K, *et al.* Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening. *Anal Bioanal Chem*, 2004, **378** (3): 621~633
- 9 Westerfield M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 4th. Eugene: University of Oregon Press, 2000. 1~27
- 10 Krovat A V, Olsen L C. Expression of a vas::EGFP transgene in primordial germ cells of the zebrafish. *Mech Dev*, 2002, **116** (1~2): 141~150
- 11 Islinger M, Willmski D, Volkl A, *et al.* Effects of 17 α -ethinylestradiol on the expression of three estrogen-responsive genes and cellular ultrastructure of liver and testes in male zebrafish. *Aquat Toxicol*, 2003, **62** (2): 85~103
- 12 Wang H, Tan J T, Emelyanov A, *et al.* Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene*,

- 2005, **15** (356): 91~100
- 13 Safe S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm*, 2001, **62**: 231~252
- 14 Fujimoto N, Honda H, Kitamura S. Effects of environmental estrogenic chemicals on AP1 mediated transcription with estrogen receptors alpha and beta. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004, **88**(1): 53~59

Development of a Transgenic Zebrafish in Which The Expression of EGFP Is Driven by vtg1 Promoter*

CHEN Hao, YANG Jian, WANG Yue-Xiang, JIANG Qiu, XU Hui, SONG Hou-Yan**

(Department of Molecular Genetics, Shanghai Medical School and Key Laboratory of Molecular Medicine,
Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract Environmental estrogens (EEs) are synthetic chemical compounds and plant-derived substance that are capable of imitating the functions of natural *in vivo* estrogen hormones. It has been known that estrogenic endocrine disrupters, which can cause intersexuality and reproduction decline in animals and human, can also induce synthesis of female-specific proteins such as vitellogenin (vtg) in male and juvenile fish. To establish a novel *in vivo* test system for rapidly detection of estrogenic chemicals, a transgenic zebrafish has been developed. First, the expression vector pvtg1-EGFP by ligating a 1.7 kb zebrafish vtg1 promoter to a reporter gene EGFP (enhanced green fluorescent protein) was constructed. Next, the pvtg1-EGFP DNA was microinjected into one-cell stage embryos of the zebrafish. Then the embryos were raised and divided into three groups: group one (blank control) remained in embryo media; group two (solvent control) and group three were subject to continuous exposure of 0.001% alcohol and 1ng/L 17 α -ethinylestradiol (EE2), respectively. The three groups were observed for GFP expression with fluorescent microscopy every 12 h. Green fluorescence was first observed on day 5 in the livers of group three larvae, while it was observed neither in group one nor group two. Furthermore, RT-PCR and whole *in situ* hybridization experiments were performed and concurrent accumulation of vtg1 and EGFP mRNAs in larvae after EE2 exposure were observed, which indicated that the expression of EGFP transgene was driven by the vtg1 promoter. Last, by amplifying EGFP gene from the genomic DNA of fluorescent fish, it was verified that the EGFP transgene had been inserted into the genomic DNA of these fish. Through observing green fluorescence in these transgenic fish, the presence of estrogenic substance in the water can be easily detected. The transgenic zebrafish offers an easy to use tool for effective monitoring of environmental estrogens.

Key words transgenic zebrafish, green fluorescent protein, vitellogenin, promoter, environmental estrogens

*This work was supported by a grant from Shanghai Municipal Science and Technology Commission (03DZ14020).

**Corresponding author . Tel: 86-21-54237739, E-mail: hysong@shmu.edu.cn

Received: April 8, 2006 Accepted: May 8, 2006