

Л. В. Козикова, Е. А. Полтева

Экспрессия *GFP* гена у эмбрионов и мальков рыбки *Danio rerio* после микроинъекции генетических конструкций с разными промоторами

Аннотация. В работе рассматриваются проблемы, связанные с получением трансгенных эмбрионов и личинок рыб *Danio rerio* с экспрессией зеленого флуоресцентного гена (*GFP*) после введения генетических конструкций с разными промоторами. Несмотря на то, что оптимальной стадией для получения трансгенных организмов является зигота, в пронуклеусах которой активно протекает синтез ДНК, у рыб эмбрионы содержат желток, маскирующий эти пронуклеусы. Вектора вначале попадают в желточную часть эмбриона, что не позволяет чужеродному генетическому материалу попасть в период первого раунда репликации ДНК, поэтому в большинстве случаев у таких видов наблюдается мозаичный тип интеграции и экспрессии трансгена. Как правило, полностью трансгенных рыб получают в результате скрещивания потомства F1 или F2, в половых клетках которых был интегрирован трансген. В наших экспериментах использованы два типа промоторов: в одном векторе флуоресцентный зеленый белок находился под контролем промотора фактора элонгации человека (плазмида *pCEEGFP*), в другом — под контролем промотора бета актина цыпленка (плазмида *pCX-eGFP*). Для получения трансгенных эмбрионов и личинок *Danio rerio* в область blastодиска через 15–20 минут после оплодотворения при помощи микроинъектора проводили микроинъекцию генетических конструкций, содержащих ген *GFP*. Стадии развития и анализ экспрессии флуоресцентного гена проводили при использовании стереомикроскопа Lumar 12 фирмы Zeiss.

Анализу было подвергнуто 372 эмбриона. После введения двух разных генетических конструкций у большинства эмбрионов (от 80 до 88%) экспрессия флуоресцентного гена наблюдается на четвертые сутки развития и около 30% эмбрионов имеют мозаичный паттерн экспрессии на вторые сутки развития только после микроинъекции рекомбинантной плазмиды *pCEEGFP*. Обращает на себя внимание, что у более 70% эмбрионов экспрессия флуоресцентного гена выявлена в области пищеварительной системы. Начальные этапы экспрессии *GFP* гена отличались у эмбрионов рыб, полученных после введения разных векторов: самая ранняя экспрессия выявлена на стадии эпиболии (5 часов развития) при использовании конструкции *pCEEGFP*. После введения вектора *pCX-eGFP* впервые экспрессии появились на третьи-четвертые сутки развития. Наиболее часто локализация активной зоны флуоресценции располагалась в области пищеварительной системы, а также в отдельных кластерах миоцитов и эпителиальных клеток.

Таким образом, начальные этапы экспрессии *GFP* гена отличались у эмбрионов рыб, полученных после введения разных векторов.

Ключевые слова: *Danio rerio*, трансгенные животные, плазмиды, репортерные гены, экспрессия генов, *GFP*.

Авторы:

Козикова Лариса Васильевна — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики; e-mail: larkozik@list.ru;

Полтева Екатерина Андреевна — аспирантка, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики; e-mail: ketlin.liselse@yandex.ru.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, 196601, Московское шоссе, 55а.

Введение. Зигота служит оптимальной стадией для получения трансгенных организмов, в которую вводят векторные конструкции, при этом в обоих пронуклеусах активно протекает синтез ДНК [1]. Именно на этой стадии возникает ряд возможностей для интеграции экзогенной ДНК за

счет образования нековалентных связей с эндогенной ДНК в районе двухцепочечных разрывов. У таких видов животных как птицы и рыбы, эмбрионы содержат желток, маскирующий пронуклеусы у одноклеточной стадии развития, что затрудняет процесс микроинъекции необходимого

вектора. Кроме того, генетическая конструкция поступает вначале в желточную область, что, как правило, не позволяет чужеродному генетическому материалу попасть в период первого раунда репликации ДНК, поэтому в большинстве случаев у таких видов наблюдается мозаичный тип интеграции и экспрессии трансгена. К достоинствам применения флуоресцентного зеленого белка можно отнести возможность визуализировать экспрессию репортерного гена под флуоресцентной микроскопией *in vivo* [2]. Как правило, полностью трансгенных рыб получают в результате скрещивания потомства F1 или F2, в половых клетках которых был интегрирован трансген [3]. Другим важным аспектом успешной интеграции и экспрессии чужеродного генетического материала является наличие промоторов, которые бывают тканеспецифичными и тканеспецифичными, работающими только в определенном типе ткани. Наиболее популярные промоторы следующие: мышечно-специфичный α -актиновый промотор [4], нейрон-специфичный промотор *isl-1* [5], эритроидно-специфический промотор GATA [6], инсулиновые промоторы [7], специфичный для печени L-FABP промотор [8], специфичный для макрофагов промотор *mfap4* [9] и специфичный для половых клеток промотор *vasa* [10].

В наших экспериментах использованы два типа промоторов: в одном векторе флуоресцентный зеленый белок находился под контролем промотора фактора элонгации человека, в другом — под контролем промотора β -актина цыпленка.

Целью данной работы было создание и изучение трансгенных эмбрионов и мальков рыб с экспрессией репортерного гена зеленого флуоресцентного белка GFP, полученных после введения двух разных генетических конструкций.

Материал и методы исследований. Взрослые особи рыб содержались в 30-литровом аквариуме с определенным режимом освещенности (13 часов — день, 11 часов — ночь) при температуре 26–27°C и при двукратном кормлении в сутки. Для получения икры взрослые особи были помещены в нерестовый 15-литровый аквариум, температуру воды поднимали до 29°C, самцов и самок в соотношении 2:3 содержали внутри сетчатой камеры. На

следующий день производители были извлечены и помещены в общий аквариум, а эмбрионы собраны при помощи сифона [11]. Для проведения микроинъекций генетических конструкций рыбам на микрокузнице были изготовлены микроиглы диаметром 12–17 микрон. В область бластодиска через 15–20 минут после оплодотворения при помощи микроинъектора проводили микроинъекцию генетических конструкций, содержащих ген *GFP*. Стадии развития, жизнеспособность и анализ экспрессии флуоресцентного гена проводили при использовании стереомикроскопа Lumag 12 фирмы Zeiss. Статистическую обработку материала проводили при использовании пакета программ Excel-10 for Windows.

Результаты исследований и их обсуждение.

Первой была применена конструкция *pCX-eGFP*, кодирующая флуоресцентный зеленый белок, которая кроме последовательностей гена *GFP* содержала β -актиновый промотор цыпленка, энхансер цитомегаловируса и поли- α сигнал β -глобина кролика (профессор М. Okabe из университета г. Осака любезно ее прислал). Сотрудники Института молекулярной генетики РАН (Москва) предоставили другую плазмиду *pCEEGFP*, содержащую репортерный ген *GFP* под контролем фактора элонгации человека с энхансером цитомегаловируса человека.

В таблице 1 представлены результаты эффективности получения трансгенных рыб и локализации экспрессии *GFP* гена в период эмбрионального развития *Danio rerio* после введения двух генетических конструкций *pCX-eGFP* (*GFP1*) и *pCEEGFP* (*GFP2*).

Анализу было подвергнуто 372 эмбриона. После введения двух разных генетических конструкций у большинства эмбрионов (от 80 до 88%) экспрессия флуоресцентного гена отмечена на четвертые сутки развития и около 30% эмбрионов имели мозаичный паттерн экспрессии на вторые сутки развития только после микроинъекции рекомбинантной плазмиды *pCEEGFP* (табл.1). Обращает на себя внимание то, что у более, чем 70% эмбрионов экспрессия флуоресцентного гена выявлена в области пищеварительной системы. Как было предварительно показано, на выживаемость, и, соответственно, получение трансгенных

Таблица 1. Эффективность получения трансгенных рыб и локализация мозаичной экспрессии *GFP* гена (n=372)

Название вектора	Всего	Транс-генных	%	Не транс-генных	%	Экспрессия в брюшной области	%	Иные проявления	%
<i>GFP1</i> , 4 сутки	165	131	79,4	34	20,6	123	74,5	8	4,8
<i>GFP2</i> , 2 сутки	126	36	28,6	90	71,4	24	19,0	12	9,5
<i>GFP2</i> , 4 сутки	81	71	87,7	10	12,3	58	71,6	13	16,0

рыб с экспрессией *GFP* гена отрицательно влияет процесс микроинъекции чужеродных генов [11]. В контрольной группе выживаемость эмбрионов и личинок, имеющих нормальное развитие, была достаточно высокой и составила от 72 до 93%.

Экспрессия *GFP* гена (*GFP1*) в эмбрионально-личиночный период развития *Danio rerio* после микроинъекции вектора *pCX-eGFP*.

После введения генетической конструкции *pCX-eGFP* в область бластодиска экспрессию наблюдали после 48 часов, чаще на третьей или четвертые сутки развития уже на стадии предличинки (рис. 1).

В большинстве случаев зоны флуоресценции располагались в области пищеварительной системы. На шестые сутки личинки подвижны, хорошо развиты и активно потребляют корм. Экспрессию *GFP* гена можно видеть в области пищеварительной системы, а также в отдельных клетках, таких как эпителиальные и миоциты.

Экспрессия *GFP* (*GFP2*) гена после микроинъекции генетической конструкции *pCEEGFP*.

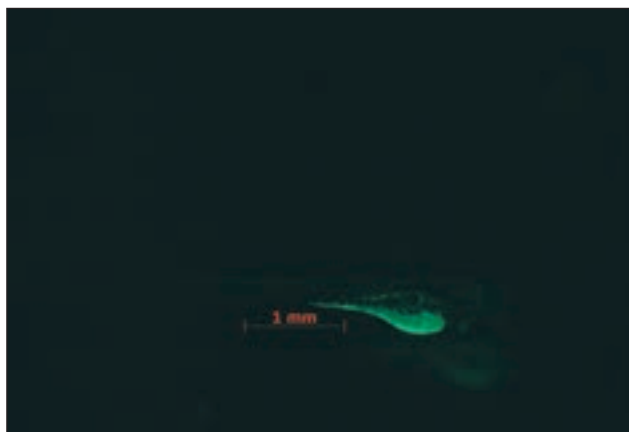


Рис. 1. Экспрессия *GFP* гена в области пищеварительной системы на стадии предличинки

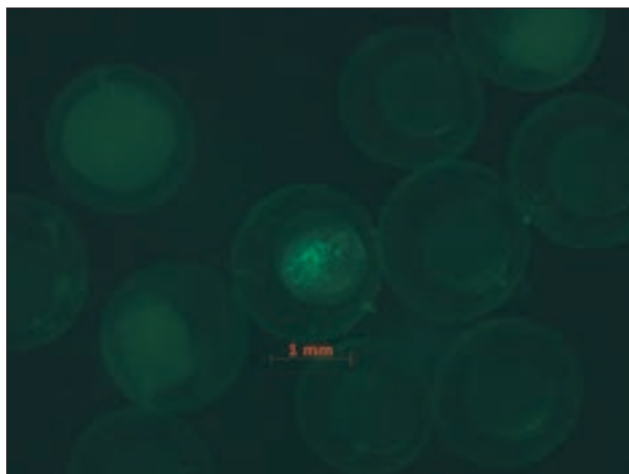


Рис. 2. Экспрессия флуоресцентного гена *GFP* на эмбриональной стадии эпиболии (5 часов развития)

Следует отметить, что на начальных этапах экспериментов первые флуоресцентные метки экспрессии гена *GFP* наблюдали только через сутки после оплодотворения, и лишь в единичных случаях наблюдали экспрессию этого гена на стадии эпиболии через 5 часов развития эмбриона (рис. 2).

У большинства эмбрионов именно через сутки развития хорошо заметна картина мозаичного паттерна экспрессии гена *GFP* на стадии фарингулы, когда ось тела выравнивается по окружности желточного мешка, появляется пигментация в коже и глазных яблоках, идет активный морфогенез системы первичных органов (рис. 3 Б). Этот период у *Danio rerio* длится сутки. Наиболее ярко экспрессия *GFP* гена выражена в области желточного мешка (рис. 3А). Следует отметить, что именно этот период развития у эмбрионов зебрафиш является критичным и сопровождается повышенной гибелью [11].

Через 48 часов развития завершается морфогенез органов, хряща, хорошо сформирован головной и грудной отделы туловища, асинхронно происходит вылупление эмбрионов из оболочек.

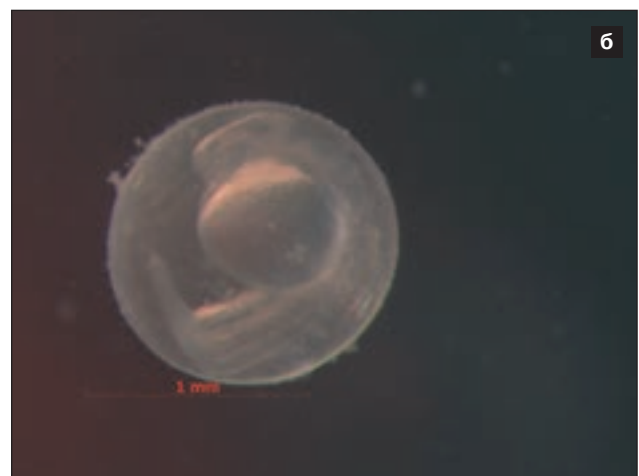
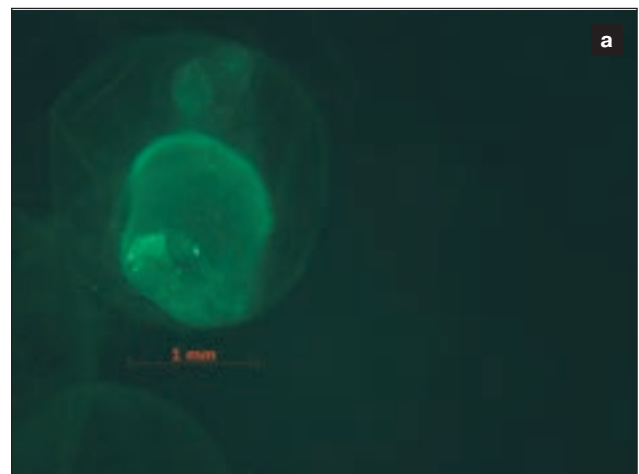


Рис. 3. Суточный эмбрион *Danio rerio* (Б). Экспрессия флуоресцентного гена *GFP* на эмбриональной стадии фарингула перед вылуплением из оболочки (А)

Завершается морфогенез органов, хряща, хорошо сформирован головной и грудной отделы туловища, асинхронно происходит вылупление эмбрионов из оболочек (рис. 4А). В этот период мозаицизм экспрессии флуоресцентного гена хорошо выражен. Параллельно с активной экспрессией в области желточного мешка заметны кластеры флуоресцентных клеток в области головного мозга, иногда глаз (рис. 4Б). Вдоль туловища встречаются отдельные участки мышечной ткани и эпителиальные клетки с экспрессией зеленого флуоресцентного белка.

К 72 часам развития плавательный пузырь надувается, начинаются поиски еды, появляется активная подвижность малька. В этот период паттерн экспрессии *GFP* гена сохраняется. На четвертые сутки у рыбок начинается личиночная стадия с активной формой питания (рис. 5А). Экспрессия у некоторой части клеточного состава приобретает транзистентный характер, сохраняется интенсивная флуоресценция в области пищеварительной системы (рис. 5А), в некоторых миоцитах и клетках кожного покрова (5Б), появляются отдельные

кластеры светящихся чешуек в области головы и туловища. У всех исследованных мальков следует отметить мозаичный паттерн экспрессии репортерного гена.

Таким образом, начальные этапы экспрессии *GFP* гена отличались у эмбрионов рыб, полученных после введения разных векторов: самая ранняя экспрессия выявлена на стадии эпиболии (5 часов развития) при использовании конструкции *pCE-EGFP*; после введения вектора *pCX-EGFP* первые экспрессии появились на стадии трех-четырех суток развития. При введении двух разных генетических конструкций у большинства эмбрионов экспрессия флуоресцентного гена наблюдается на личиночной стадии. Наиболее часто локализация активной зоны флуоресценции располагалась в области пищеварительной системы, а также в отдельных кластерах миоцитов и эпителиальных клеток.

Впервые в 2003 году в лаборатории Цая была создана трансгенная линия медаки, в которой повсеместно обнаруживалась зеленая флуоресценция

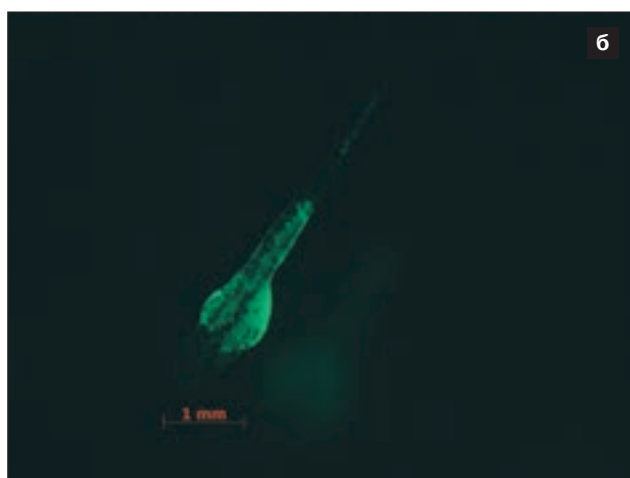


Рис. 4. 2-х суточный эмбрион зебрафиш (А). Б — Экспрессия *GFP* гена через 48 часов после оплодотворения

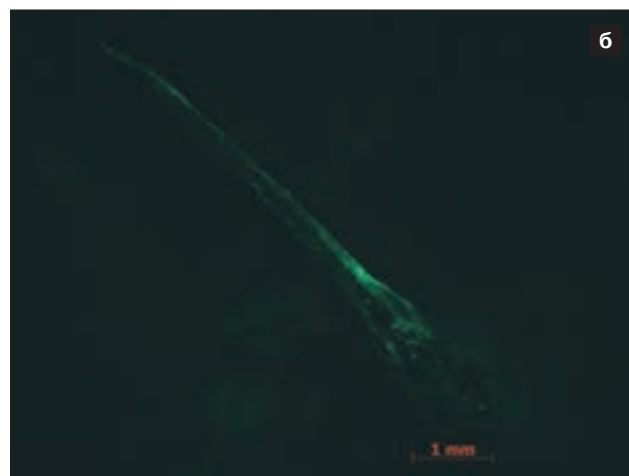


Рис. 5. Экспрессия *GFP* гена в области пищеварительной системы на четвертые сутки развития *Danio rerio* (А) и в некоторых эпителиальных клетках и миоцитах (Б).

вокруг всей рыбы от поколений *F0* до *F2* в соответствии с менделевским наследованием [12]. В цитированной работе был использован промотор β -актина медаки. Последовательности ДНК вышеупомянутых промоторов размером от 0,5 до 6,5 т.п.н. достаточны для того, чтобы заставить репортер *GFP* имитировать тканеспецифическую экспрессию гена. В наших исследованиях длина векторов составляла 5,5 т.п.н. и 4,2 т.п.н., а в ряде работ указано, что требуется более длинная регуляторная последовательность ДНК, такая как более 20 т.п.н., для полного повторения характерных профилей экспрессии эндогенных генов. С целью увеличения размеров векторов стали использовать бактериальную искусственную хромосому (BAC). Интересные результаты были получены группой исследователей под руководством профессора Чен, которые сконструировали клон BAC размером 150 кб с промотором рыбок данио *myf5*, и сгенерировали трансгенную линию Tg (*myf5: gfp*) [13]. Эта трансгенная линия способна повторять специфическую для сомитов и зависящую от стадии экспрессию эндогенного *myf5* на ранней стадии развития, что играет важную роль для изучения регуляции генов, начиная с раннего эмбриогенеза.

Известно, что ген *Tbx5* является фактором транскрипции *T-box*, ответственным за спецификацию типа клеток и морфогенез. Фенотипы мутанта *tbx5* очень похожи у млекопитающих и рыбок данио. Таким образом, трансгенная рыба со специфической для сердца флуоресценцией могла бы обеспечить скрининг лекарств от сердечно-сосудистых заболеваний. Данио рерио становится популярным экспериментальным животным для исследований рака человека, отчасти потому, что идентифицированы гомологи рыб человеческих онкогенов и ге-

нов-супрессоров опухолей, а отчасти потому, что сигнальные пути, регулирующие развитие рака, сохраняются [14]. Гистологические исследования ряда опухолей рыб и человека оказались похожими [15], при этом трансгенная линия рыбок *Danio rerio* с кожно-специфической красной флуоресценцией может быть использована для обнаружения опухолей кожи [16]. Генетически измененные организмы могут служить экологическим индикатором для обнаружения загрязняющих веществ, при этом, эти исследования сосредоточены на показателях смертности и аномалиях эмбрионального развития. К основным загрязнителям окружающей среды для животных относятся ароматические углеводороды, тяжелые металлы и эстрогены [17]. Применение трансгенных рыб позволит ответить на ряд вопросов: вызывают ли токсиканты дефекты в генах во время эмбриогенеза; как влияют загрязняющие вещества на экспрессию репортерных генов, находящихся под контролем тканеспецифических промоторов; как зависит влияние загрязнителей на эмбриональное развитие от дозировки?

В заключение следует отметить, что модель трансгенных рыб обеспечивает эффективный подход *in vivo* для идентификации регуляторных последовательностей ДНК, а также для определения функции генов, кроме этого, их можно использовать для скрининга лекарств и в качестве экологических индикаторов для выявления загрязняющих веществ в окружающей среде. Становится популярным использование трансгенных рыбок *Danio rerio* в качестве модельных организмов для изучения этиологии ряда болезней человека, т.к. отмечен консерватизм генов, а также механизмов регуляции контроля развития тканей и органов у большинства позвоночных организмов [18].

*Настоящая работа была выполнена в рамках выполнения государственного задания
AAA-A18-118021590132-9. № темы: 0445-2019-0026*

Литература

1. Козикова Л. В. Трансгенные животные. СПб. Изд-во Проспект науки. 2017. 224 с.
2. Amsterdam A. The Aequorea victoria green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos / A. Amsterdam, S. Lin, N. Hopkins // Dev Biol. — 1995. — V.71. — P. 123–129.
3. Hrytsenko O. Production of transgenic tilapia homozygous for a humanized insulin gene / O. Hrytsenko, B. Pohajdak, R. James, Jr. Wright // Transgenic Research. — 2010. — V.19. — Issue 2. — P. 305–306.
4. Higashijima S. High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin / S. Higashijima, H. Okamoto, N. Ueno, Y. Hotta, G. Eguchi // Dev Biol. — 1997. — V.192. — P. 289–99.
5. Higashijima S. Visualization of cranial motor neurons in live transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under the control of the islet-1 promoter/enhancer / S. Higashijima, Y. Hotta, H. Okamoto // J. Neurosci. — 2000. — V.20. — P. 206–18.
6. Long Q. GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene / Q. Long, A. Meng, H. Wang, J. R. Jessen, M. J. Farrell, S. Lin // Development. — 1997. — V. 124. — P. 4105–11.
7. Huang H. Analysis of pancreatic development in living transgenic zebrafish embryos / H. Huang, S. S. Vogel, N. Liu, D. A. Melton, S. Lin // Mol Cell Endocrinol.

8. Her G. M. 435-bp liver regulatory sequence in the liver fatty acid binding protein (L-FABP) gene is sufficient to modulate liver regional expression in transgenic zebrafish. / G. M. Her, Y. H. Yeh, J. L. Wu // *Dev Dyn.* — 2003. — V. 227. — P. 347–56.
9. Walton E.M. The macrophage-specific promoter mfap4 allows live, long-term analysis of macrophage behavior during mycobacterial infection in zebrafish / E.M. Walton, M. R. Cronan, R. W. Beerman, D. M. Tobin // *PLoS One.* — 2015. — V.10. — e0138949.
10. Krimmel A. V. Expression of a vas::EGFP transgene in primordial germ cells of the zebrafish / A. V. Krimmel, L. C. Olsen // *Mech. Dev.* — 2002. — V. 116. — P. 141–50.
11. Kozikova L. The viability of *Danio rerio* embryos and larvae after GFP fluorescent gene microinjection / L. Kozikova, E. Polteva, K. Plemyashov // *Reproduction in Domestic Animals.* — 2018. — V. 53. — № S2. — P. 153.
12. Chou C. Y. Uniform GFP-expression in transgenic medaka (*Oryzias latipes*) at the F0 generation / C. Y. Chou, L. S. Horng, H. J. Tsai // *Transgenic Res.* — 2001. — V. 10. — P. 303–15.
13. Chen Y. H. Multiple upstream modules regulate zebrafish *myf5* expression / Y. H. Chen, Y. H. Wang, M. Y. Chang, C. Y. Lin, C. W. Weng, M. Westerfield // *BMC Dev Biol.* — 2007. — V. 7. — P. 1.
14. Stoletov K. Catch of the day: zebrafish as a human cancer model. / K. Stoletov, R. Klemke // *Oncogene.* — 2008. — V. 27. — P. 4509–20.
15. Amatruda J. F. Zebrafish as a cancer model system / J. F. Amatruda, J. L. Shepard, H. M. Stern, L. I. Zon // *Cancer Cell.* — 2002. — V. 1. — P. 229–31.
16. Wang Y. H. A keratin 18 transgenic zebrafish Tg (k18 (2.9): RFP) treated with inorganic arsenite reveals visible over proliferation of epithelial cells / Y. H. Wang, Y. H. Chen, T. N. Wu, Y. J. Lin, H. J. Tsai // *ToxicolLett.* — 2006. — V. 163. — P. 191–7.
17. Schwarzenbach R. P. Global Water Pollution and Human Health / R. P. Schwarzenbach, T. Egli, T. B. Hoftetter, U. Von Gunten, B. Wehrli // *Annu Rev EnvResour.* — 2010. — V. 35. — P. 109–36.
18. Garrity D. M. The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin *Tbx5* deficiency syndrome / D. M. Garrity, S. Childs, M. C. Fishman // *Development.* — 2002. — V. 129. — P. 4635–45.

Kozikova L., Polteva E.

Expression of *GFP* gene in embryos and larvae *Dania rerio* fishes after microinjection of genetic vectors with different promoters

Abstract. *The paper deals with the problems associated with obtaining Danio rerio transgenic embryos and larvae with the expression of the green fluorescent gene (GFP) after the introduction of genetic constructs with different promoters. Despite the fact that the optimal stage for obtaining transgenic organisms is a zygote, in the pronuclei of which DNA synthesis is actively proceeding, in fish, embryos contain a yolk that masks these pronuclei. The vectors initially fall into the yolk part of the embryo, which does not allow foreign genetic material to enter the period of the first round of DNA replication, therefore, in most cases, these species show a mosaic type of transgene integration and expression. As a rule, fully transgenic fish are obtained by crossing the offspring F1 or F2, in the germ cells of which the transgene was integrated. In our experiments, two types of promoters were used: in one vector, the fluorescent green protein was under the control of the human elongation factor promoter (plasmid pCEEGFP), in the other, under the control of the chicken beta actin promoter (plasmid pCX-eGFP). To obtain transgenic embryos and Danio rerio larvae, in the blastodisc area, 15–20 minutes after fertilization, a microinjector was used to microinject genetic constructs containing the GFP gene. The developmental stages and analysis of the expression of the fluorescent gene were performed using a Lumar- 12 stereomicroscope from Zeiss.*

372 embryos were analyzed. After the introduction of two different genetic constructs in most embryos (from 80 to 88%), expression of the fluorescent gene is observed on the fourth day of development, and only about 30% of embryos have a mosaic pattern of expression on the second day of development only after microinjection of the recombinant plasmid pCEEGFP. It is noteworthy that in more than 70% of embryos, expression of the fluorescent gene was detected in the area of the digestive system. The initial stages of GFP gene expression differed in fish embryos obtained after the introduction of different vectors: the earliest expression was detected at the epibolia stage (5 hours of development) using the pCEEGFP construct. After maintaining the pCX-EGFP vector, expression first appeared on the third to fourth day of development. Most often, the localization of the fluorescence core was located in the region of the digestive system, as well as in separate clusters of myocytes and epithelial cells.

Thus, the initial stages of expression of the GFP gene differed in fish embryos obtained after the introduction of different vectors. Transgenic fish are widely used. The models of transgenic fish allow in vivo to identify regulatory DNA sequences, as well as to determine the functions of genes, and serve as indicators for identifying pollutants in the environment, they can be used for screening drugs. Danio rerio transgenic fish are used as model organisms in the development of a number of human diseases, because most genes and their regulation to control the development of tissues and organs are conservative.

Keywords: Danio rerio, transgenic animals, plasmids, reporter genes, gene expression, GFP.

Authors:

Kozikova L. — Dr. Habil. (Biol. Sci), a leading researcher at the Laboratory of Molecular Genetics; e-mail: larkozik@list.ru;

Polteva E. — Post-graduate student, junior researcher at the Laboratory of Molecular Genetics; e-mail: ketlin.liselse@yandex.ru.

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L. K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry. St. Petersburg, Russia, 196601 Moscow highway, 55a.

References

1. Kozikova L.V. Transgenic animals. St. Petersburg Prospect of Science. 2017. 224 p.
2. Amsterdam A. The Aequorea victoria green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos / A. Amsterdam, S. Lin, N. Hopkins // Dev Biol. — 1995. — V.71. — P. 123–129.
3. Hrytsenko O. Production of transgenic tilapia homozygous for a humanized insulin gene / O. Hrytsenko, B. Pohajdak, R. James, Jr. Wright // Transgenic Research. — 2010. — V.19. — Issue 2. — P. 305–306.
4. Higashijima S. High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin / S. Higashijima, H. Okamoto, N. Ueno, Y. Hotta, G. Eguchi // Dev Biol. — 1997. — V.192. — P. 289–99.
5. Higashijima S. Visualization of cranial motor neurons in live transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under the control of the islet-1 promoter/enhancer / S. Higashijima, Y. Hotta, H. Okamoto // J. Neurosci. — 2000. — V. 20. — P. 206–18.
6. Long Q. GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene / Q. Long, A. Meng, H. Wang, J. R. Jessen, M. J. Farrell, S. Lin // Development. — 1997. — V. 124. — P. 4105–11.
7. Huang H. Analysis of pancreatic development in living transgenic zebrafish embryos / H. Huang, S. S. Vogel, N. Liu, D. A. Melton, S. Lin // Mol Cell Endocrinol.
8. Her G. M. 435-bp liver regulatory sequence in the liver fatty acid binding protein (L-FABP) gene is sufficient to modulate liver regional expression in transgenic zebrafish. / G. M. Her, Y. H. Yeh, J. L. Wu // Dev Dyn. — 2003. — V. 227. — P. 347–56.
9. Walton E.M. The macrophage-specific promoter mfap4 allows live, long-term analysis of macrophage behavior during mycobacterial infection in zebrafish / E.M. Walton, M. R. Cronan, R. W. Beerman, D. M. Tobin // PLoS One. — 2015. — V. 10. — e0138949.
10. Krümel A. V. Expression of a vas::EGFP transgene in primordial germ cells of the zebrafish / A. V. Krümel, L. C. Olsen // Mech. Dev. — 2002. — V. 116. — P. 141–50.
11. Kozikova L. The viability of Danio rerio embryos and larvae after GFP fluorescent gene microinjection / L. Kozikova, E. Polteva, K. Plemyashov // Reproduction in Domestic Animals. — 2018. — V. 53. — № S2. — P. 153.
12. Chou C. Y. Uniform GFP-expression in transgenic medaka (Oryzias latipes) at the F0 generation / C. Y. Chou, L. S. Horng, H. J. Tsai // Transgenic Res. — 2001. — V. 10. — P. 303–15.
13. Chen Y. H. Multiple upstream modules regulate zebrafish myf5 expression / Y. H. Chen, Y. H. Wang, M. Y. Chang, C. Y. Lin, C. W. Weng, M. Westerfield // BMC Dev Biol. — 2007. — V. 7. — P. 1.
14. Stoletov K. Catch of the day: zebrafish as a human cancer model. / K. Stoletov, R. Klemke // Oncogene. — 2008. — V. 27. — P. 4509–20.
15. Amatruda J. F. Zebrafish as a cancer model system / J. F. Amatruda, J. L. Shepard, H. M. Stern, L. I. Zon // Cancer Cell. — 2002. — V. 1. — P. 229–31.
16. Wang Y. H. A keratin 18 transgenic zebrafish Tg (k18 (2.9): RFP) treated with inorganic arsenite reveals visible over proliferation of epithelial cells / Y. H. Wang, Y. H. Chen, T. N. Wu, Y. J. Lin, H. J. Tsai // ToxicolLett. — 2006. — V. 163. — P. 191–7.
17. Schwarzenbach R. P. Global Water Pollution and Human Health / R. P. Schwarzenbach, T. Egli, T. B. Hofstetter, U. Von Gunten, B. Wehrli // Annu Rev EnvResour. — 2010. — V. 35. — P. 109–36.
18. Garrity D. M. The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome / D. M. Garrity, S. Childs, M. C. Fishman // Development. — 2002. — V. 129. — P. 4635–45.