

文章编号: 1674 - 5566(2015)05 - 0650 - 06

## 巨核酸酶 *I-SceI* 转基因元件的构建及其在斑马鱼中转基因效率的评估

孙成飞<sup>1</sup>, 董浚键<sup>1</sup>, 田园园<sup>1</sup>, 余嘉欣<sup>1,2</sup>, 叶 星<sup>1,2</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380;  
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

**摘 要:** 巨核酸酶 *I-SceI* 是由酿酒酵母线粒体中核糖体大亚基上的 I 型内含子编码的一种核酸内切酶, 近年已被应用于转基因研究中。*I-SceI* 介导的转基因大多是将 *I-SceI* 蛋白和带有其识别位点的质粒共注射于动物的受精卵, 但注射酶蛋白前期处理耗时且工作量大, 直接用 *I-SceI* 的 mRNA 代替蛋白进行注射更为简捷。本研究应用 *I-SceI* mRNA 介导荧光蛋白基因在斑马鱼中的转植, 进一步了解其转基因效率。首先设计合成带有巨核酸酶 *I-SceI* 编码序列的辅助质粒 (pCS2-*I-SceI*), 并分别构建了带有巨核酸酶 *I-SceI* 识别位点、EF1 $\alpha$  启动子和荧光蛋白基因 (eGFP/RFP) 编码序列的供体质粒 pI-*SceI*-EF1 $\alpha$ -eGFP/RFP。辅助质粒 pCS2-*I-SceI* 体外转录成 mRNA, 以 50 ng/ $\mu$ L 供体质粒和 100 ng/ $\mu$ L 的 *I-SceI* 巨核酸酶 mRNA 共注射到斑马鱼 (*Danio rerio*) 受精卵中, 注射后 48 h 的斑马鱼 eGFP 的平均荧光表达率可达 75.86%。在斑马鱼的头部、躯干到尾部均可观察到荧光蛋白的表达, 且随着胚胎发育, 荧光信号逐渐增强。结果表明 *I-SceI* 系统在斑马鱼中可介导较高效率的转植, 具有在经济鱼类转基因研究中应用的潜力。

**研究亮点:** 本研究分别构建了巨核酸酶 *I-SceI* 的供体质粒与辅助质粒, 将体外转录的 *I-SceI* mRNA 与供体质粒共注射进斑马鱼受精卵中, 获得转荧光蛋白基因斑马鱼, 荧光表达率可达 75.86%, 研究结果说明 *I-SceI* 系统可进一步开发、应用于转基因经济鱼类的研究中。

**关键词:** 巨核酸酶; *I-SceI*; 斑马鱼; 转基因

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

*I-SceI* 是一种由 I 型内含子编码的归位内切酶 (homing endonucleases), 又称巨核酸酶 (meganuclease)。该基因序列是在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 线粒体中核糖体大亚基 (21S rRNA) 上的一个内含子中发现的<sup>[1]</sup>, 它由 235 个氨基酸编码, 有特异的核酸内切酶活性, 其识别序列长度为 18 bp, 可酶切核酸特异序列产生一个 4 bp 的切口<sup>[2]</sup>。巨核酸酶产生 DNA 双链缺口后, 诱导细胞内的修复系统进行同源重组而实现基因整合<sup>[3]</sup>。巨核酸酶 *I-SceI* 系统因其识别序列短, 构建简单且整合效率高而被应用到多种

生物的转基因中, 包括链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*)<sup>[4]</sup>、破伤风杆菌 (*Clostridium* spp.)<sup>[5]</sup>、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)<sup>[6]</sup>、冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*)<sup>[7-8]</sup>、小鼠<sup>[9-10]</sup>、牛<sup>[11]</sup>, 以及爪蟾 (*Xenopus*)<sup>[12-13]</sup>、青鳉 (*Oryzias latipes*)<sup>[14]</sup> 和斑马鱼<sup>[15-16]</sup> 等水生动物中。上述研究大多是将带有 *I-SceI* 识别位点的转基因载体和 *I-SceI* 酶的蛋白共注射到胚胎中, 耗时长且工作量大。本研究分别构建表达绿色荧光和红色荧光的质粒与体外转录的 *I-SceI* mRNA 共注射到斑马鱼的胚胎, 观察转荧光蛋白基因斑马鱼的荧光率, 评估 *I-*

收稿日期: 2015-02-13 修回日期: 2015-05-08

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2011AA100404); 国家自然科学基金面上项目(31272688)

作者简介: 孙成飞(1985—), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为水产生物技术。E-mail: scfsec@163.com

通信作者: 叶 星, E-mail: gzyxing@163.com

*SceI* 的转基因介导效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用 AB 系斑马鱼 (*Danio rerio*) 由中国科学院神经科学研究所、国家斑马鱼模式动物中心的杜久林研究员惠赠、珠江水产研究所水产生物技术研究室培育, 培育与孵化水温为 25 ~ 28 °C。编码 *Tgf 2* 转座酶的辅助质粒 pCS2-gfTP 和 *Tgf 2* 转座子供体质粒 pTgf2-EF1 $\alpha$ -eGFP 由上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室邹曙明教授惠赠。

### 1.2 *I-SceI* 转基因供体质粒的构建

对 pTgf2-EF1 $\alpha$ -eGFP 质粒进行 *Spe I* 和 *Xho I* 双酶切, 切开质粒的左臂, 酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并回收纯化骨架质粒片段 pTgf2 +。合成两条单链长引物 [ *I-SceI*-L-F (*Spe I*) 和 *I-SceI*-L-R (*Xho I*) ], 其两端带有粘性末端。将 2 条引物按 1:1 的比例混合后在 72 °C 下

孵育 30 min, 然后取混合液和回收纯化的骨架质粒片段 pTgf2 + 连接转化, 即获得目的质粒的左末端。同样的方法连入右末端的两条长引物, 最后得到目的质粒 pI-*SceI*-EF1 $\alpha$ -eGFP。同时将目的质粒的 eGFP 质粒替换为 RFP 即得到另一个目的质粒 pI-*SceI*-EF1 $\alpha$ -RFP。

### 1.3 巨核酸酶 *I-SceI* mRNA 的体外转录

根据 NCBI 上登录的编码 *I-SceI* 的编码区序列 (GenBank 登录号 GU575293.1), 在其编码区上游设计加上 kozak 序列和酶切位点, 由上海生物工程合成。合成序列连接到 pCS2 + 表达质粒上, 即得到巨核酸酶 *I-SceI* 的辅助质粒 pCS2-*I-SceI*。用限制性内切酶 *Not I* 酶切辅助质粒 pCS2-*I-SceI*, 酶切产物经 Cycle-Pure kit (OMEGA, USA) 纯化, 并进行电泳检测。以该回收纯化产物作为模板, 采用 SP6 mMessage mMachine kit (Ambion, USA) 试剂盒进行体外转录合成, 体外转录出的巨核酸酶 *I-SceI* 的 mRNA 存于 -80 °C 冰箱备用。

表 1 构建 *I-SceI* 转基因供体质粒所用的引物  
Tab.1 Primers used for construction of the *I-SceI* donor plasmid

引物名称 primer name	引物序列 primer sequence	用途 usage	退火温度/°C annealing
<i>I-SceI</i> -L-F ( <i>Spe I</i> )	CTAGTCCACGC TAGGGATAACAGGGTAATACCCG C	<i>I-SceI</i> 左末端	65
<i>I-SceI</i> -L-R ( <i>Xho I</i> )	AGGTGCGATCCC TATTGTCCCATTATGGGC GAGCT		
<i>I-SceI</i> -L-F ( <i>Bgl II</i> )	GATCTTCACGC TAGGGATAACAGGGTAATACGG C	<i>I-SceI</i> 右末端	65
<i>I-SceI</i> -L-R ( <i>Kpn I</i> )	AAGTGCG ATCCCTATTGTCCCATTATGCC GGTAC		

注: 加单下划线序列为酶切位点, 加双下划线序列为 *I-SceI* 识别位点。

Note: The single underline sequence is restriction enzyme sites. The double underline sequence is recognition site of *I-SceI*.

### 1.4 显微注射和荧光蛋白的检测

显微注射前一晚, 将循环水缸中分开饲养的雌雄斑马鱼亲鱼按雌雄比例 2:1 放入产卵盒中暂养, 用挡板将雌雄分开。第二天清晨显微注射前抽去挡板, 让斑马鱼进行交配、产卵受精。将受精卵吸出后整齐排列到琼脂糖制作的平板凹槽中。以显微操作仪和玻璃注射针对处于 1-2 细胞期的斑马鱼受精卵进行显微注射, 在受精卵的动物极注射。每个胚胎注射供体质粒 pI-*SceI*-EF1 $\alpha$ -eGFP (或 pI-*SceI*-EF1 $\alpha$ -RFP) 和 *I-SceI* 酶 mRNA 混合液 2 nL, 供体质粒浓度约为 50 ng/ $\mu$ L, *I-SceI* 酶 mRNA 100 ng/ $\mu$ L。注射后的受精卵放入装有无菌水的培养皿中, 25 ~ 28 °C 孵育。每隔 4 h 挑除死胚胎, 加换新水。

### 1.5 荧光蛋白表达的观察和胚胎荧光率的统计

受精卵注射 24 h、48 h 和 3 d 后, 在激光共聚焦显微镜 (Carl-Zeiss, Germany) 下观察胚胎荧光蛋白和红色荧光蛋白的表达情况, 并统计注射 48 h 后胚胎的荧光率。

## 2 结果

### 2.1 *I-SceI* 转基因供体质粒和辅助质粒

通过设计长引物直接退火的方式, 将 *I-SceI* 的 2 个序列识别位点连入酶切好的骨架质粒即得到 *I-SceI* 转基因供体质粒 pI-*SceI*-EF1 $\alpha$ -eGFP 和 pI-*SceI*-EF1 $\alpha$ -RFP, 此供体质粒的结构包含巨核酸酶的 2 个识别位点, 其识别区域共 18 bp。在 2 个识别区域之间是 *EF1 $\alpha$*  启动子和目的基因 eGFP (或 RFP), 见图 1a。

辅助质粒 pCS2-I-SceI 含有巨核酸酶 *I-SceI* 的编码区,可在体外转录 *I-SceI* 酶的 mRNA,注射

到胚胎内可翻译成蛋白、介导供体质粒的切割与整合。

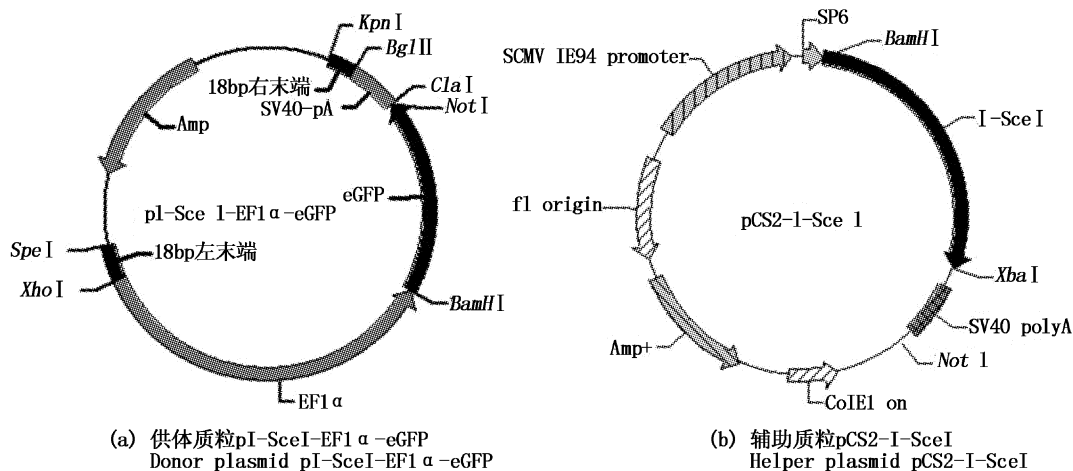


图 1 巨核酸酶 *I-SceI* 转基因供体质粒和辅助质粒示意图

Fig. 1 Schematic diagram of *I-SceI* transgenic donor plasmid and helper plasmid

## 2.2 显微注射与胚胎中荧光蛋白检测

受精卵进行供体质粒 pI-SceI-EF1 $\alpha$ -eGFP/RFP 与 *I-SceI* mRNA 的共注射,注射 24 h、48 h 和 3 d 后,在胚胎中可分别观察到绿色荧光蛋白和

红色荧光蛋白的表达。2 种荧光蛋白的表达均遍布全身,从头部、躯干到尾部均可观察到荧光信号。且随着胚胎的发育,荧光信号逐渐增强,红色荧光尤为明显(图 2)。

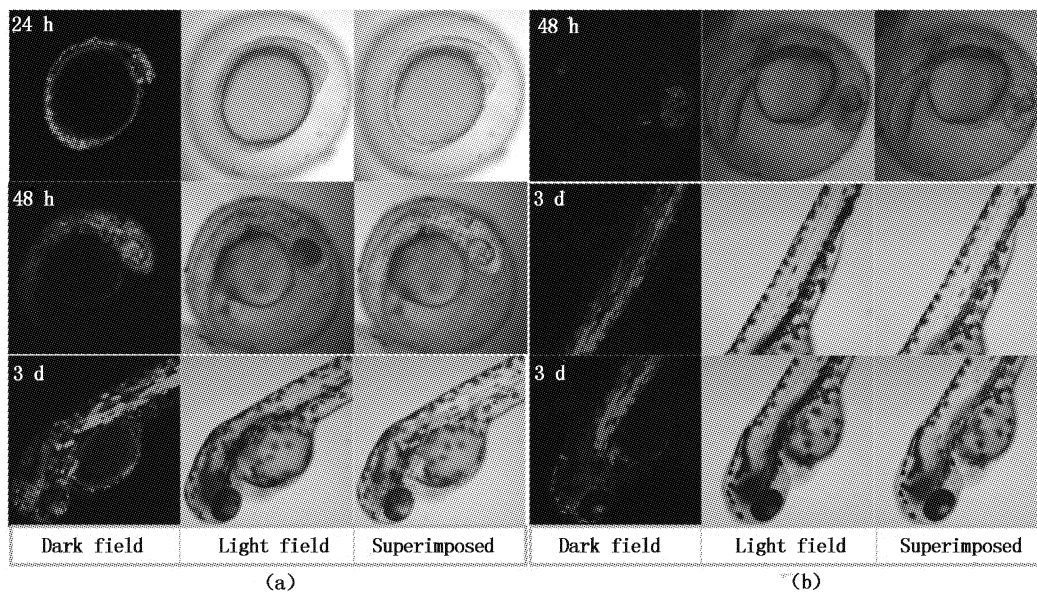


图 2 激光共聚焦显微镜观察斑马鱼胚胎的荧光

Fig. 2 Fluorescent protein detection of zebrafish embryo by confocal laser scanning microscope

(a) 注射供体质粒 pI-SceI-EF1 $\alpha$ -eGFP 和 *I-SceI* 的 mRNA; (b) 注射供体质粒 pI-SceI-EF1 $\alpha$ -RFP 和 *I-SceI* 的 mRNA。

(a) Microinjecting of donor plasmid pI-SceI-EF1 $\alpha$ -eGFP and *I-SceI* mRNA; (b) Microinjecting of donor plasmid pI-SceI-EF1 $\alpha$ -RFP and *I-SceI* mRNA.

## 2.3 胚胎荧光率统计

在显微注射供体质粒 pI-SceI-EF1 $\alpha$ -eGFP 和

*I-SceI* 的 mRNA 48 h 后,随机抽取 3 组胚胎,在荧光显微镜下统计其荧光率。每组抽检 50 ~ 70 个

胚胎进行统计,其荧光率在 70.59% ~ 78.79% 之间,3 组胚胎的平均荧光率为 75.86% (表 2)。

表 2 *I-SceI* 介导的转 eGFP 基因  
斑马鱼的荧光率检测

Tab. 2 Positive rate in eGFP gene transferred  
*Danio rerio* mediated by *I-SceI*

组别 group	48 h 时存活 胚胎数 the number of survival embryo in 48 h	带荧光的 胚胎数 fluorescence embryo number	荧光阳性率/% positive rate in fluorescence
A	57	43	75.44%
B	51	36	70.59%
C	66	52	78.79%
平均 mean	58	44	75.86%

### 3 讨论

早期获得的转基因动物都是通过向刚受精的胚胎中直接注入环状或线性化的质粒 DNA,这种方法容易产生嵌合体且后代的可遗传率偏低(普遍低于 5%),因此获得转基因动物的成功率很低,需要进行大量的转基因注射与筛选<sup>[17]</sup>。为了提高转基因动物的基因整合效率和可遗传率,需寻求新的转基因介导方法。近年来转座子和巨核酸酶 *I-SceI* 等新的转基因介导方法受到关注<sup>[18]</sup>。转座子或巨核酸酶 *I-SceI* 注射到受精卵后可促使转植基因与宿主基因组更早的发生融合,从而提高转植基因在转基因首代中的表达效率与整合率<sup>[19]</sup>。巨核酸酶 *I-SceI* 在裂解反应产生 DNA 双链缺口后仍留在识别位点上,减弱了细胞体内连接酶的活性,避免移植基因自连形成多聚体的效应,所以移植基因可大量地在细胞中以线性、短序列状态存在。同时巨核酸酶还可以诱导细胞内的修复系统聚集在 DNA 双链缺口处进行同源重组而达到基因整合的目的<sup>[20]</sup>,因此巨核酸酶 *I-SceI* 可提高转基因效率。此外与转座子系统相比,巨核酸酶 *I-SceI* 的识别序列更短,只有 18 bp,便于构建<sup>[3,14]</sup>。

普通限制性内切酶的识别序列很短,一般 3 到 8 个碱基,而巨核酸酶的识别序列在 12 到 40 碱基,一般为 18 个碱基,因此理论上,每七百亿个碱基才会出现一个酶切位点,所以鱼类基因组一般都不会出现巨核酸酶 *I-SceI* 的酶切位点,可避免受巨核酸酶 *I-SceI* 的酶切。在基因转植时,将巨核酸酶 *I-SceI* 以及带有其识别位点的供体质

粒一起注射到鱼受精卵中,巨核酸酶 *I-SceI* 会切开供体质粒、产生双链缺口,然后再诱导宿主中的修复系统对酶切产生的片段进行同源重组,从而达到整合进鱼类基因组的目的<sup>[20]</sup>。

自 1988 年 COLLEAUX 等开发巨核酸酶 *I-SceI* 以来<sup>[2]</sup>,该系统已在不同物种的转基因上应用,但相关研究大多是将带有 *I-SceI* 识别位点的转基因载体和 *I-SceI* 酶的蛋白共注射到胚胎中来获得转基因动物,耗时长且工作量大。BABARYKA 等在应用酵母双杂交系统构建转基因斑马鱼的相关研究中,将体外合成 *I-SceI* 的 mRNA,与带有 *I-SceI* 识别位点与 GAL4 基因的表达载体,共注射于斑马鱼胚胎,筛选获得 GAL4 转基因斑马鱼,然后再向转基因斑马鱼子代胚胎中注射带有 UAS-GFP 的质粒或者 UAS-RFP 的质粒,即可得到转绿色荧光和红色斑马鱼<sup>[16]</sup>。本研究直接将 *I-SceI* 识别位点加在目标基因 eGFP 和 RFP 的表达载体上,通过一次注射即可产生带荧光的斑马鱼,而且对用 *I-SceI* mRNA 取代巨核酸酶 *I-SceI* 蛋白进行注射的转基因效果的验证也更加直观和简洁。

本研究通过体外转录获得巨核酸酶 *I-SceI* mRNA,代替巨核酸酶 *I-SceI* 蛋白进行注射,操作更方便、成本更低,也取得了较好的转植效率。*I-SceI* 介导的转基因斑马鱼胚胎在 48 h 的平均荧光率达到 75.86%,与 *Tgf2* 转座子在斑马鱼中的荧光率(76.6%)相近<sup>[21]</sup>。后期观察胚胎在发育到 3 ~ 10 d 期间,仍有荧光的表达,排除了是游离质粒的瞬时表达<sup>[22]</sup>。

本研究证实了巨核酸酶 *I-SceI* mRNA 可介导斑马鱼中的转基因,并提高基因转植效率。下一步将对首代的转基因斑马鱼进行基因组水平上的检测,确定其整合位点和拷贝数,并进行传代,对其可遗传性进行验证等,以便对此转基因方法做更全面准确的评估。

### 参考文献:

- [1] JACQUIER A, DUJON B. An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene[J]. Cell, 1985, 41(2): 383-394.
- [2] COLLEAUX L, D' AURIOL L, GALIBERT F, et al. Recognition and cleavage site of the intron-encoded omega transposase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, 85(16):

- 6022 – 6026.
- [3] PLESSIS A, PERRIN A, HABERT J E, et al. Site-specific recombination determined by *I-SceI*, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus [J]. *Genetics*, 1992, 130(3): 451 – 460.
- [4] SIEGL T, PEITZKE L, WELLE E, et al. *I-SceI* endonuclease: a new tool for DNA repair studies and genetic manipulations in streptomycetes [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(4): 1525 – 1532.
- [5] ZHANG N, SHAO L J, JIANG Y, et al. *I-SceI*-mediated scarless gene modification via allelic exchange in *Clostridium* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 108: 49 – 60.
- [6] BELLAICHE Y, MOGILA V, PERRIMON N. *I-SceI* endonuclease, a new tool for studying DNA double-strand break repair mechanisms in *Drosophila* [J]. *Genetics*, 1999, 152(3): 1037 – 1044.
- [7] WINDBICHLER N, PAPATHANOS P A, CATTERUCCIA F, et al. Homing endonuclease mediated gene targeting in *Anopheles gambiae* cells and embryos [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(17): 5922 – 5933.
- [8] WINDBICHLER N, MENICHELLI M, PAPATHANOS P A, et al. A synthetic homing endonuclease-based gene drive system in the human malaria mosquito [J]. *Nature*, 2011, 473(7346): 212 – 215.
- [9] COHEN-TANNOUJJI M, ROBINE S, CHOULIKA A, et al. *I-SceI*-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, 18(3): 1444 – 1448.
- [10] CHOULIKA A, PERRIN A, DUJON B, et al. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the *I-SceI* system of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15(4): 1968 – 1973.
- [11] BEVACQUA R J, CANEL N G, HIRIART M I, et al. Simple gene transfer technique based on *I-SceI* meganuclease and cytoplasmic injection in IVF bovine embryos [J]. *Theriogenology*, 2013, 80(2): 104 – 113.
- [12] PAN F C, CHEN Y L, LOEBER J, et al. *I-SceI* meganuclease-mediated transgenesis in *Xenopus* [J]. *Developmental Dynamics*, 2006, 235(1): 247 – 252.
- [13] NEDELKOVSKA H, ROBERT J. Optimized transgenesis in *Xenopus laevis/gilli* isogenetic clones for immunological studies [J]. *Genesis*, 2012, 50(3): 300 – 306.
- [14] THERMES V, GRABHER C, RISTORATORE F, et al. *I-SceI* meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish [J]. *Mechanisms of Development*, 2002, 118(1/2): 91 – 98.
- [15] GRABHER C, JOLY J S, WITTBRODT J. Highly efficient zebrafish transgenesis mediated by the meganuclease *I-SceI* [J]. *Methods in Cell Biology*, 2004, 77: 381 – 401.
- [16] BABARYKA A, KUHN E, KOSTER R W. In vivo synthesis of meganuclease for generating transgenic zebrafish *Danio rerio* [J]. *Journal of Fish Biology*, 2009, 74(2): 452 – 457.
- [17] SOROLDONI D, HOGAN B M, OATES A C. Simple and efficient transgenesis with meganuclease constructs in zebrafish [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 546: 117 – 130.
- [18] 邹曙明, 杜雪地, 蒋霞云. 鱼类活性 DNA 转座子的发掘与应用概况 [J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(5): 656 – 661.
- ZOU S M, DU X D, JIANG X Y. Overview of fish DNA transposon discovery and into application [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(5): 656 – 661.
- [19] 叶星, 田园园, 高风英. 转基因鱼的研究进展与商业化前景 [J]. *遗传*, 2011, 33(5): 494 – 503.
- YE X, TIAN Y Y, GAO F Y. Progress in transgenic fish techniques and application [J]. *Hereditas*, 2011, 33(5): 494 – 503.
- [20] GRABHER C, WITTBRODT J. Meganuclease and transposon mediated transgenesis in medaka [J]. *Genome Biology*, 2007, 8(s1): S10.
- [21] 吴芳, 叶星, 邹曙明, 等. *Tgf2* 转座系统在转 RFP 基因斑马鱼上的应用 [J]. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 647 – 654.
- WU F, YE X, ZOU S M, et al. Application of the *Tgf2* transposon system to RFP transgenic *Danio rerio* construction [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 647 – 654.
- [22] 王瑶, 蒋霞云, 邹曙明. *PiggyBac* 转座元件的构建及其在团头鲂基因组中的转基因效率 [J]. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(2): 161 – 166.
- WANG Y, JIANG X Y, ZOU S M. The study on transgenic efficiency of *PiggyBac* transposon in the genome of *Megalobrama amblycephala* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(2): 161 – 166.

## Construction of *I-SceI* transgenic elements and assessment of its transgenic efficiency in zebrafish

SUN Chengfei<sup>1</sup>, DONG Junjian<sup>1</sup>, TIAN Yuanyuan<sup>1</sup>, YU Jiaxin<sup>1,2</sup>, YE Xing<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Tropic & Subtropic Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, Guangdong, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Meganuclease *I-SceI* is an endonuclease, which is derived from the intron of mitochondrial 21S rRNA gene of *Saccharomyces cerevisiae* and has been applied to transgenic study in recent years. Usually, to use this system, target plasmid and *I-SceI* protein were microinjected together. However, preparation of the *I-SceI* protein for microinjection is laborious and time consuming. Replacing the protein by *I-SceI* mRNA would be more convenient. In this study, the transgene of fluorescence protein was mediated by *I-SceI* mRNA to assess its transgenic efficiency in zebrafish. First, helper plasmid with *I-SceI* coding sequence pCS2-*I-SceI* was constructed and *I-SceI* mRNA was transcribed in vitro. Donor plasmid, pI-*SceI*-EF1 $\alpha$ -eGFP and pI-*SceI*-EF1 $\alpha$ -RFP donor plasmid with *I-SceI* recognition sites, EF1 $\alpha$  promoter and eGFP (RFP) gene were constructed, and co-injected with *I-SceI* mRNA into the 1-2 cell stage fertilized eggs of *Danio rerio*. The concentrations of donor plasmid and *I-SceI* mRNA were 50 ng/ $\mu$ L and 100 ng/ $\mu$ L respectively. The eGFP fluorescence expression rate was 75.86% in 48 h. The fluorescence can be observed in the head, body and tail of zebrafish and became stronger and stronger with the development of embryos. Our data suggest that *I-SceI* can efficiently mediate gene transfer and has the potential to apply in the transgene of economic fish.

**Key words:** meganuclease; *I-SceI*; *Danio rerio*; transgene