

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00527

利用改进的手工克隆技术生产转 *GFP* 基因猪克隆胚胎

张鹏^{1,2}, 杨珍珍², 窦红伟³, 李伟杭³, 律波³, Bolund Lars², 杜玉涛^{2,3}, 谭萍萍¹, 马润林¹

1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101;
2. 深圳华大基因研究院, 深圳 518083;
3. 深圳华大方舟生物技术有限公司, 深圳 518083

摘要: 通过体细胞核移植(Somatic cell nuclear transfer, SCNT)培育转基因动物新个体是当前被广泛使用的技术之一, 但其生产成本高和转基因囊胚形成率低在很大程度上制约了该技术的应用。文章报告对该技术的一些改进以提高其成功率并降低成本。首先将增强型绿色荧光基因(*EGFP*)导入猪胎儿成纤维细胞中, 通过荧光观察 *EGFP* 的表达来筛选适合做细胞核移植的体细胞。这样避免了外源 *EGFP* 基因虽已整合至猪基因组但不表达的情况, 保证供体细胞 100%是表达目标蛋白(绿色荧光蛋白)的细胞; 然后利用新一代体细胞核移植技术——手工克隆技术(Handmade cloning, HMC)将供体细胞与卵母细胞融合生产胚胎。共收集了 4 个批次 378 个肉用家猪的卵母细胞, 经体外培养成熟后手工去核得到 266 个去核卵母细胞, 与 *EGFP* 细胞融合后获得 127 个重构胚胎, 将重构胚胎体外培养到 144 h, 得到转基因囊胚 65 个, 平均囊胚率为 $52.1 \pm 8.3\%$ 。与传统 SCNT 相比, HMC 不仅操作简便, 而且能大幅提高核移植细胞的囊胚率。更为重要的是, 改进的手工克隆技术摆脱了昂贵的显微操作仪, 为产业化生产转基因动物提供了新的实用基础。

关键词: 手工克隆; 体细胞核移植; 绿色荧光蛋白; 克隆胚胎

Production of porcine blastocysts expressed EGFP by handmade cloning

ZHANG Peng^{1,2}, YANG Zhen-Zhen², DOU Hong-Wei³, LI Wei-Hang³, LV Bo³, Bolund Lars², DU Yu-Tao^{2,3}, TAN Ping-Ping¹, MA Run-Lin¹

1. Institute of genetics and developmental biology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China;
2. Beijing Genomics Institute (BGI-Shenzhen), Shenzhen 518083, China;
3. BGI ARK Biotechnology Co., Ltd, Shenzhen 518083, China

Abstract: Production of transgenic animals via somatic cell nuclear transfer (SCNT) has been widely used worldwide. However, the application of SCNT is impeded by overall high costs and low efficiency. Here, we reported a modification of the existing technology in order to overcome some of the disadvantages associated with SCNT. Firstly, a marker gene, enhanced green fluorescent gene (*EGFP*), was transfected into pig fetal fibroblast cells, and was subsequently screened by fluorescent expression to ensure donor cells expressing *EGFP*. Porcine embryos expressing *EGFP* were then produced by a method called handmade cloning (HMC), a simplified method for micromanipulation. To demonstrate the concept, we collected a total of 378 fresh swine oocytes, from which 266 with the nucleus removed, obtained a total of 127 viable recombinant oocytes after fusion with *EGFP*-expressing cells. *In vitro* incubation of the 127 recombinant oocytes for approxi-

收稿日期: 2010-05-27; 修回日期: 2010-07-09

基金项目: 农业部动物转基因重大专项课题(编号: 2009ZX08008-005B)资助

作者简介: 张鹏(1981-), 男, 博士研究生, 专业方向: 遗传学。E-mail: pengzhang@genetics.ac.cn

通讯作者: 杜玉涛(1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 克隆与基因工程。E-mail: duyut@genomics.org.cn

马润林(1958-), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 人类与动物遗传学。E-mail: rlma@genetics.ac.cn

mately 144 hours resulted in successful generation of 65 viable embryos, with an average success rate of $52.1 \pm 8.3\%$. Compared with the traditional SCNT, the method of HMC is not only easy to operate, but also increases the rate of recombinant embryo significantly. Furthermore, the modified method no longer relies on expensive instrument like micromanipulator, facilitating the industrialization of transgenic animal production.

Keywords: handmade cloning; SCNT; EGFP; porcine blastocyst

经基因修饰的克隆猪已引起医学领域愈来愈多的关注,与传统的实验动物相比,猪对人类的临床研究更有参考性。由于猪在生理、形态上都与人类的器官非常接近,转基因克隆猪被认为是理想的研究人类疾病的动物模型,并且可成为人类异种器官移植器官提供者。

利用体细胞核移植(Somatic cell nuclear transfer, SCNT)培育转基因克隆猪是当前被广泛使用的技术^[1~4],但因其成本高、效率低且不易推广等因素在很大程度上制约了该技术的应用。手工克隆技术(Handmade cloning, HMC)是近几年才出现的体细胞核移植新技术,与借助显微操作仪器的传统 SCNT 相比,该技术成本低廉(不需要显微操作仪)、操作简便,且效率与传统技术相当^[5],因此更易于应用在家畜等大型动物中。手工克隆技术是在克隆牛的基础上发展起来的^[6~9],并逐渐应用于克隆猪方面^[10~13],在我国深圳已建立手工克隆技术体系,但转基因方面的研究仍未见报道。

本文拟利用转有增强型绿色荧光蛋白基因(EGFP)细胞为核供体,研究手工克隆技术中转基因细胞对胚胎早期发育的影响,掌握手工克隆技术生产转基因胚胎的效率,期望将来为我国产业化生产基因组修饰克隆猪提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

除特别注明外,所有化学试剂均购于 Sigma-Aldrich 公司;细胞培养相关耗材为 BD Falcon 公司产品;卵母细胞体外成熟以及胚胎培养耗材为 Nunc 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 猪胎儿成纤维细胞系的建立

取处于妊娠期第 40 d(配种时期为 0 d)的丹麦长

白猪胎儿,用含抗生素的无钙镁磷酸盐缓冲液(DPBS)冲洗 3 遍,去除头、四肢以及内脏后,余下部分用 DPBS 冲洗 3~5 遍,然后剪成 1 mm^3 大小的组织块,将组织块均匀接种于 T-25 细胞培养瓶中,12 h 后加含 10%FBS (Hyclone)的 DMEM 培养液(Gibco)。等细胞从组织块中长出,弃培养液,用 DPBS 冲洗 2 次后用 0.25% 胰蛋白酶消化 3 min,加新鲜 10%FBS 的 DMEM 培养液终止消化,将细胞收集于 15 mL 离心管中,室温 $1\ 000 \text{ r/min}$ 离心 5 min,去除培养液,将细胞沉淀小心重悬于预冷的含 10% DMSO 的培养液中,分装至冻存管进行冻存,冻存步骤是 4 \rightarrow 30 min, -80°C 过夜,液氮长期保存。

1.2.2 猪胎儿成纤维细胞的转染和筛选

转染用质粒 pEGFP-N1 (Clontech)的提取严格按照 QIAGEN 质粒纯化试剂盒操作说明进行。转染前 24 h,将细胞接种到 6 孔板中,待细胞汇合度至 50%~80%时,按照 FuGENE 转染试剂 (Roche)操作要求,将 $1 \mu\text{g}$ 质粒 pEGFP-N1 和 $6 \mu\text{L}$ FuGENE 6 复合物逐滴加入细胞培养液中混匀。24 h 后将细胞以一定比例稀释转至 24 孔板中,贴壁后加入含 $400 \mu\text{g/mL}$ Geneticin (Gibco)的细胞培养液,筛选 2 周后,再用无 Geneticin 的细胞培养液培养,细胞经倒置荧光显微镜观察,绿色荧光细胞作为供体细胞保留,未发光细胞用细胞刮铲去除,之后根据细胞生长状态进行传代和冻存。

1.2.3 卵母细胞体外成熟(IVM)

从屠宰场取初情期前母猪卵巢,保持温度在 $32\sim 34^\circ\text{C}$,2 h 内运回实验室。用配有 14 号针头的 10 mL 真空管抽吸卵巢上 3~6 mm 的卵泡。挑选卵丘包裹 3 层以上、致密且胞质均匀的卵丘-卵母细胞复合体(COCs),用 Hepes 平衡的 TCM-199 液洗涤 2 次后,以每组 50 个转入 CO_2 培养箱中预先平衡的 IVM 溶液^[13]中, 38.5°C 、5% CO_2 培养箱中培养 41 h^[14]。

1.2.4 手工去核

IVM 终止后, 吸取卵丘细胞扩展良好的卵母细胞于预热的含 1 mg/mL 透明质酸酶的 TCM-199 中, 用移液枪吹打卵母细胞脱去卵丘细胞。从此步开始(除特别说明), 所有操作均在 39 °C 热台上, 卵母细胞处理均在用矿物油覆盖的 20 μ L 液滴中进行。卵母细胞在含 3.3 mg/mL 链霉蛋白酶的 T33(T 代表 TCM199, 数字代表小牛血清的浓度, 这里代表 33%) 中处理 20 s 后, 迅速用 T2 和 T20 进行洗涤。将仍有部分透明带^[12, 15]的卵母细胞转至含 2.5 μ g/mL 的细胞松弛素 B(CB)中, 通过卵母细胞排出的第一极体确定细胞核的位置进行手工去核切割, 去除靠近极体的细胞质(不多于 1/3), 用 T2 洗涤胞质(无细胞核)2 次, 然后收集于 T10 滴中。

1.2.5 融合和激活

接着即为体细胞和卵母细胞胞质的融合过程, 共分两次, 其中, 第二次融合也是激活步骤。将胞质在含 1 mg/mL 植物凝血素(ICN 医药品)的 T0 中处理 5 s, 与折光性强、圆形、光滑的绿色荧光细胞——结合后, 放入融合液(0.3 mol/L 甘露醇和 0.01%聚乙烯醇)中平衡 10 s, 以 10 个为一组放入已经充满融合液的融合槽内(电极宽度为 0.5 mm), 体细胞在电极远端, 100 V 9 μ s 进行融合, 之后将胞质-体细胞对移至 T10 滴中放 30 min, 观察融合情况。

第一次融合 1 h 后, 将已融合体细胞的胞质与未融合的胞质分别在激活溶液(0.3 mol/L 甘露醇, 0.1 mmol/L $MgSO_4$, 0.1 mmol/L $CaCl_2$ 和 0.01%聚乙烯醇)中平衡, 配对后以 10 个为一组进行第二次融合并同时激活, 条件为 43 V 80 μ s, 然后将细胞转入 T10 滴中。第二次融合全部结束后, 将重构胚胎放入含 5 μ g/mL CB 和 10 μ g/mL 放线菌酮的 PZM-3 溶液中^[16]于 38.5 °C、5% CO_2 、5% O_2 和 90% N_2 中处理 4 h 进行化学激活。

1.2.6 胚胎体外培养

重构胚经化学激活后转入 400 μ L 含 4 mg/mL BSA 的 PZM-3 溶液中, 无透明带的胚胎用优化的 WOW 体系^[17, 18]在于 38.5 °C、5% CO_2 、5% O_2 和 90% N_2 中进行培养(记为 0 h)。48 h 和 144 h 后观察胚胎

发育结果。

2 结果与分析

2.1 表达绿色荧光蛋白细胞的筛选

用 pEGFP-N1 转染猪胎儿成纤维细胞, 经 Geneticin 筛选后的细胞在倒置荧光显微镜下观察, 标记已表达绿色荧光蛋白的细胞克隆, 于体视镜下将未标记的细胞刮去, 得到的细胞经传代、培养, 即为下一步手工克隆的核供体细胞(图 1)。

2.2 手工克隆生产表达有绿色荧光蛋白的胚胎

将表达有绿色荧光的细胞作为核供体与去核的胞质结合, 进行第一次电融合, 融合后, 在荧光显微镜下观察, 发现已融合体细胞的胞质有绿色荧光, 第二次融合即激活后, 小心将(已融合体细胞的胞质)与(未融合的胞质)对移至荧光显微镜下观察, 虽然表达量较低, 但仍能观察到绿色荧光。重构胚在体外培养 48 h 和 144 h 后观察发现, 已发育至 4-细胞期的胚胎和囊胚期的胚胎均可以表达绿色荧光(图 2), 表明, 利用手工克隆技术生产转基因胚胎是可行的。

2.3 手工克隆生产表达有绿色荧光蛋白胚胎的效率

将筛选得到的绿色荧光细胞作为核供体, 分别进行了 4 次独立的手工克隆操作(表 1), 共得到 127 个重构胚, 体外培养 144 h 后发育至囊胚的共有 65 个, 平均囊胚率为 $52.1 \pm 8.3\%$, 而且每次实验囊胚率均在 45.0% 以上, 表明手工克隆生产转基因胚胎是高效的。在体视镜下观察(图 3), 获得的表达有 EGFP 的囊胚发育状况良好, 具有较多的细胞数(内细胞团和滋养层细胞总数)。

2.4 胚胎移植获得转有 *EGFP* 基因的手工克隆猪

在得到表达有绿色荧光蛋白胚胎的基础上, 利用外科手术法, 将获得的转有 EGFP 的囊胚移植到自然发情的受体母猪的子宫内, 4 周后 B 超检测为阳性, 经过约 114 天之后顺利得到转有 EGFP 基因的手工克隆小猪仔(图 4)。

3 讨论

利用体细胞克隆技术生产转基因动物的最大优势在于, 将靶基因转入体细胞后进行筛选鉴定, 得到

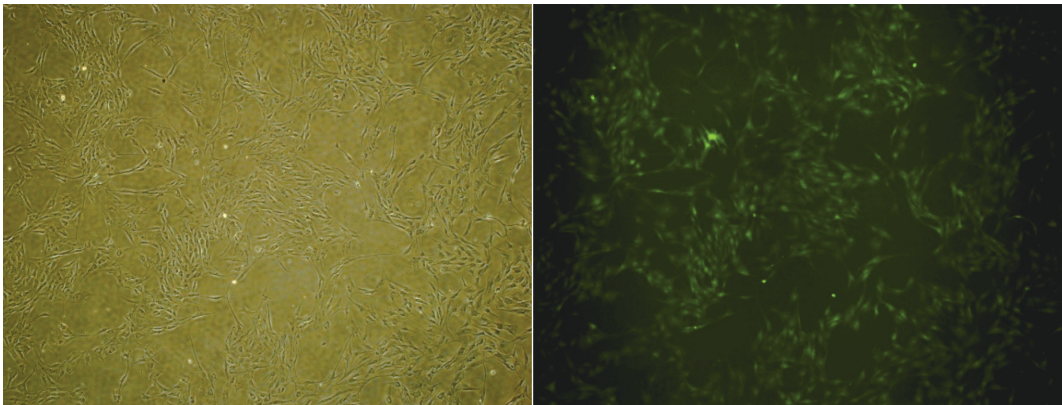


图 1 经 geneticin 筛选后得到的表达有绿色荧光蛋白的细胞在荧光显微镜下可以观察到筛选到的细胞 100%为 EGFP 细胞。

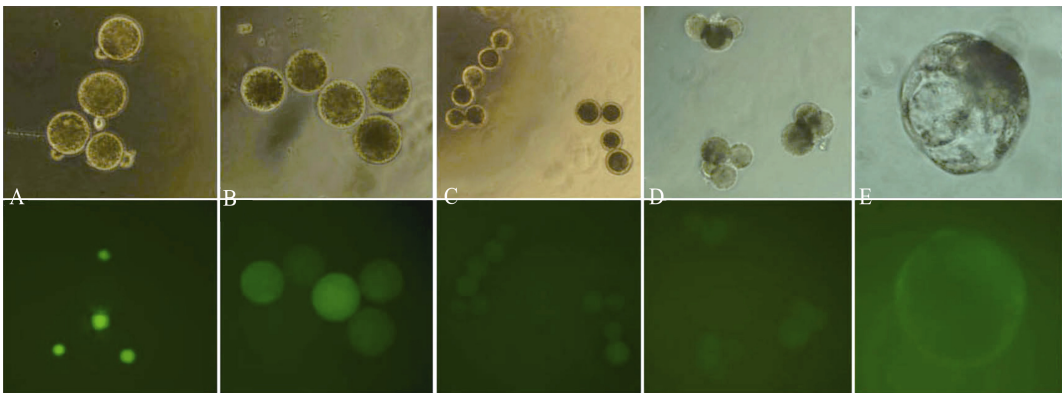


图 2 手工克隆生产表达绿色荧光蛋白的猪胚胎
A: 去核胞质结合 EGFP 体细胞; B: 胞质和体细胞融合; C: 进行第二次电融合; D: 48 h 四细胞期; E: 144 h 囊胚。

表 1 手工克隆生产胚胎的统计结果

供体细胞	卵子数(率)		重构胚数(率)	囊胚数(率)
	总卵子数	去核卵子数(极体率)		144 h 观察结果
EGFP 阳性细胞, 第 10 代	80	56 (70.0%)	26 (46.4%)	16 (61.5%)
	83	62 (74.7%)	30 (48.4%)	17 (56.7%)
	100	80 (80.0%)	40 (50.0%)	18 (45.0%)
	115	68 (59.1%)	31 (45.6%)	14 (45.2%)
总计	378	266 (70.9±8.9%)	127 (47.6±2.0%)	65 (52.1±8.3%)

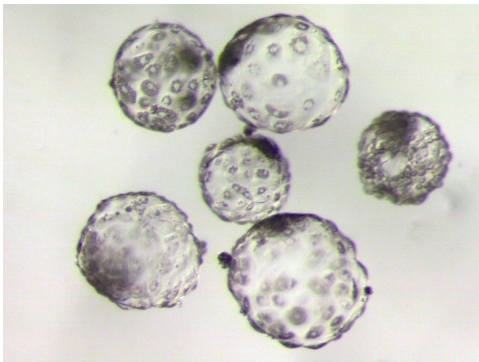


图 3 D6.5 胚胎发育结果



图 4 转有 EGFP 基因的手工克隆小猪

的转基因体细胞作为核供体用来生产胚胎, 胚胎移植后得到的后代必定为转基因动物。因此, 供体细胞的转染及筛选对转基因动物后代的获得至关重要。EGFP 是一种安全、易检测的选择性报告基因, 我们将同时含新霉素抗性基因的质粒 pEGFP-N1 转染猪胎儿成纤维细胞。理论上筛选出的细胞应全部为抗新霉素的阳性细胞, 但从荧光显微镜下观察, 并非所有细胞都能表达绿色荧光, 这有 2 种可能, 一种是 EGFP 完整表达框未能转入细胞体内; 另一种情况是 EGFP 蛋白表达沉默。这些细胞通过 PCR 方法是无法区分的, 因此, 本研究通过机械刮铲的方法将阴性细胞去除, 保证了核供体细胞均为转基因阳性细胞。在得到的手工克隆生产的胚胎的荧光观察中就足以说明这一点。但因条件制约, 未能得到克隆小猪表达有绿色荧光的图片, 不过在实际检测中能看到微弱的荧光, 确定得到的手工克隆猪为转基因阳性。

囊胚发育率低一直是制约体细胞克隆技术生产转基因动物的一个重要因素, 猪的妊娠需要有 4 个以上的囊胚着床^[19], 虽然有研究者将通过孤雌激活的胚胎与克隆胚胎混合移植, 增加了有效囊胚的数量, 在一定程度上提高了怀孕率。但这方法却不能有效提高产仔数, 因此并不能改善转基因动物的生产效率。本研究中, 我们利用手工克隆技术得到的转基因囊胚, 囊胚率最高可达到 60% 以上, 远远高于传统 SCNT 最多不足 30% 的结果^[20,21]。考虑到供体细胞不同, 而且两种方法中融合和激活的条件也不完全相同, 因此, 囊胚率提高的原因不能归结为单一条件的改变。但由于 HMC 过程中融合了两个去核的胞质, 在发育过程中得到了更多的营养和能量, 这对于胚胎发育成囊胚还是起着比较重要的作用。较高的囊胚率增加了每次胚胎移植的囊胚数, 这对于怀孕率并为提高窝产仔数提供了保证, 将有助于提高生产转基因动物的效率。

生物医学领域在阐明疾病及疗效机制的实验过程中, 常常需要建立动物模型。一直以来, 小鼠因其制作方法简便、实验条件比较简单、其他因素容易控制、短时间内可大量复制等诸多优点被认为是理想的动物模型, 然而小鼠作为人类的疾病动物模型却有很多缺点, 如组织胚胎发育程度及生理内环境

与人类相差甚远, 不能模仿人类发病状态时的组织形态学的变化等等。由于猪在生理、形态上较小鼠都与人类的器官更加接近, 而且猪的正常解剖生理、疾病的发生发展等方面与人非常相似, 因此, 转基因克隆猪已成为近年来研究人类疾病的动物模型。目前, 囊胞性纤维症^[22,23]疾病的克隆猪模型已建立, 这将有助于了解该疾病的发病机理, 从而采取有效的预防和治疗措施。

手工克隆技术不需要昂贵的显微操作仪器, 易于操作, 因此可进行大范围的应用和推广; 同时, 与已报道的利用传统克隆技术得到绿色荧光的胚胎, 该技术得到的囊胚效率明显提高。手工克隆技术与转基因操作相结合, 为高效生产人类疾病的克隆猪模型提供了可能, 丹麦已成功利用手工克隆技术将阿尔茨海默疾病相关基因导入猪体内^[24], 得到了患有老年痴呆疾病的猪模型, 为研究阿尔茨海默疾病的发生发展提高了可能。然而我国在这一方面的研究仍是一项空白。

本研究利用手工克隆技术建立了高效生产转基因囊胚体系, 为我国产业化生产转基因克隆猪、尤其是人类疾病的动物猪模型奠定了坚实的基础。

参考文献(References):

- [1] Lai LX, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295(5557): 1089-1092.
- [2] Dai YF, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL. Targeted disruption of the 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(3): 251-255.
- [3] Lai LX, Kang JX, Li RF, Wang JD, Witt WT, Yong HY, Hao YH, Wax DM, Murphy CN, Rieke A, Samuel M, Linville ML, Korte SW, Evans RW, Starzl TE, Prather RS, Dai YF. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(4): 435-436.
- [4] Park KW, Choi KM, Hong SP, Han GS, Yoo JY, Jin DI, Seol JG, Park CS. Production of transgenic recombined piglets harboring the human granulocyte-macrophage colony

- stimulating factor (hGM-CSF) gene from porcine fetal fibroblasts by nuclear transfer. *Theriogenology*, 2008, 70(9): 1431–1438.
- [5] Vajta G. Handmade cloning: the future way of nuclear transfer? *Trends Biotechnol*, 2007, 25(6): 250–253.
- [6] Vajta G, Lewis IM, Hyttel P, Thouas GA, Trounson AO. Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*, 2001, 3(2): 89–95.
- [7] Vajta G, Bartels P, Joubert J, de la Rey M, Treadwell R, Callesen H. Production of a healthy calf by somatic cell nuclear transfer without micromanipulation and carbon dioxide incubators using handmade cloning (HMC) and submarine incubation system (SIS). *Theriogenology*, 2004, 62(8): 1465–1472.
- [8] Vajta G, Kragh PM, Mtango NR, Callesen H. Hand-made cloning approach: potentials and limitations. *Reprod Fertil Dev*, 2005, 17(1-2): 97–112.
- [9] Tecirlioglu RT, French AJ, Lewis IM, Vajta G, Korfiatis NA, Hall VJ, Ruddock NT, Cooney MA, Trounson AO. Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand made cloned embryo. *Reprod Fertil Dev*, 2003, 15(7-8): 361–366.
- [10] Kragh PM, Vajta G, Corydon TJ, Purup S, Bolund L, Callesen H. Production of transgenic porcine blastocysts by hand-made cloning. *Reprod Fertil Dev*, 2004, 16(3): 315–318.
- [11] Kragh PM, Du Y, Corydon TJ, Purup S, Bolund L, Vajta G. Efficient in vitro production of porcine blastocysts by handmade cloning with a combined electrical and chemical activation. *Theriogenology*, 2005, 64(7): 1536–1545.
- [12] Du Y, Kragh PM, Zhang X, Purup S, Yang H, Bolund L, Vajta G. High overall *in vitro* efficiency of porcine hand-made cloning (HMC) combining partial zona digestion and oocyte trisection with sequential culture. *Cloning Stem Cells*, 2005, 7(3): 199–205.
- [13] Du Y, Kragh PM, Zhang Y, Li J, Schmidt M, Bøgh IB, Zhang X, Purup S, Jørgensen AL, Pedersen AM, Villemoes K, Yang H, Bolund L, Vajta G. Piglets born from handmade cloning, an innovative cloning method without micromanipulation. *Theriogenology*, 2007, 68(8): 1104–1110.
- [14] Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. The submarine incubation system, a novel tool for in vitro embryo culture. *Theriogenology*, 1997, 48(8): 1379–1385.
- [15] Li J, Du Y, Zhang YH, Kragh PM, Purup S, Bolund L, Yang H, Xue QZ, Vajta G. Chemically assisted handmade enucleation of porcine oocytes. *Cloning Stem Cells*, 2006, 8(4): 241–250.
- [16] Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM, Iwamura S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod*, 2002, 66(1): 112–119.
- [17] Vajta G, Peura TT, Holm P, Páldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Mol Reprod Dev*, 2000, 55(3): 256–264.
- [18] Feltrin C, Forell F, dos Santos L, Rodrigues JL. *In vitro* bovine embryo development after nuclear transfer by handmade cloning using a modified WOW culture system. *Reprod Fertil Dev*, 2006, 18(2): 126.
- [19] Vajta G, Zhang YH, Macháty Z. Somatic cell nuclear transfer in pig: recent achievements and future possibilities. *Reprod Fertil Dev*, 2007, 19(2): 403–423.
- [20] 张运海, 潘登科, 孙秀柱, 孙国杰, 王晓波, 刘晓辉, 李燕, 戴蕴平, 李宁. 利用体细胞核移植技术生产表达绿色荧光蛋白的猪转基因克隆胚胎. *中国科学(C 辑)*, 2005, 35(5): 439–445.
- [21] Hyun S, Lee G, Kim D, Kim H, Lee S, Nam D, Jeong Y, Kim S, Yeom S, Kang S, Han J, Lee B, Hwang W. Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. *Biol Reprod*, 2003, 69(3): 1060–1068.
- [22] Rogers CS, Hao YH, Rokhlina T, Samuel M, Stoltz DA, Li YH, Petroff E, Vermeer DW, Kabel AC, Yan ZY, Spate L, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Linville ML, Korte SW, Engelhardt JF, Welsh MJ, Prather RS. Production of *CFTR*-null and *CFTR*-*F508* heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. *J Clin Invest*, 2008, 118(4): 1571–1577.
- [23] Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA, Kabel AC, Wohlford-Lenane CL, Davis GJ, Hanfland RA, Smith TL, Samuel M, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Uc A, Starner TD, Brogden KA, Shilyansky J, McCray PB Jr, Zabner J, Prather RS, Welsh MJ. Disruption of the *CFTR* gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science*, 2008, 321(5897): 1837–1841.
- [24] Kragh PM, Nielsen AL, Li J, Du YT, Lin L, Schmidt M, Bøgh IB, Holm IE, Jakobsen JE, Johansen MG, Purup S, Bolund L, Vajta G, Jørgensen AL. Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. *Transgenic Res*, 2009, 18(4): 545–558.