

# 绿色荧光蛋白在 $\alpha$ -1,3 半乳糖基转移酶敲除猪组织器官的表达分析

李智方<sup>1,2</sup>, 冯冲<sup>2</sup>, 纪慧丽<sup>1,2</sup>, 石宁宁<sup>2</sup>, 宋小凤<sup>2</sup>, 赵勤丽<sup>2</sup>, 龙川<sup>2</sup>,  
潘登科<sup>2</sup>, 杨小淦<sup>1</sup>

1. 广西大学, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530004;

2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业部畜禽遗传资源与种质创新重点实验室, 北京 100193

**摘要:** 猪是人类异种器官移植的理想供体, 然而猪-人的异种器官移植会产生剧烈的排斥反应。虽然已制备的  $\alpha$ -1,3 半乳糖基转移酶基因敲除 (Galactosyltransferase gene knockout, GTKO) 猪可有效缓解猪-人异种器官移植引起的超急性免疫排斥, 但缺少报告基因直观示踪移植后的细胞迁移及器官排斥状态。本文将 CAG 启动子驱动增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的表达载体导入 GTKO 猪耳成纤维细胞, 通过体细胞核移植技术制备了 EGFP 猪。利用双荧光蛋白观测镜、荧光显微镜及定量 PCR 扩增观察、检测和分析克隆猪各组织器官中 EGFP 蛋白和转录本的表达状况。结果显示, EGFP 蛋白及转录本在克隆猪各组织器官中均有表达, 但在肝脏和中枢神经系统中表达较弱。本文成功获得了各组织器官表达 EGFP 的 GTKO 猪, 为 EGFP 示踪异种细胞组织移植奠定了基础。

**关键词:** GTKO; 增强型绿色荧光蛋白; 猪; 异种移植

## Expression analysis of green fluorescent protein in tissues and organs in $\alpha$ -1,3 galactosyltransferase knockout pigs

Zhifang Li<sup>1,2</sup>, Chong Feng<sup>2</sup>, Huili Ji<sup>1,2</sup>, Ningning Shi<sup>2</sup>, Xiaofeng Song<sup>2</sup>, Qinli Zhao<sup>2</sup>,  
Chuan Long<sup>2</sup>, Dengke Pan<sup>2</sup>, Xiaogan Yang<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Key Laboratory of Farm Animal Genetic Resource and Germplasm Innovation of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

**Abstract:** The pig is an ideal source to provide organs because its organ size and physiology are similar to humans. However, an acute rejection will ensue after pig-to-human xenotransplantation. The  $\alpha$ -1,3 galactosyltransferase gene knockout (GTKO) pigs were generated in recent years, and could solve the problem of hyperacute rejection. But due

收稿日期: 2015-04-15; 修回日期: 2015-07-17

基金项目: 亚热带农业生物资源保护利用国家重点实验室开放课题 (编号: SKL201404) 和国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (编号: 2012AA020601) 资助

作者简介: 李智方, 硕士研究生; 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: LIZHIFANG31@163.com

通讯作者: 杨小淦, 博士, 副研究员; 研究方向: 动物繁殖生物技术。E-mail: xgyang@gxu.edu.cn

潘登科, 博士, 副研究员; 研究方向: 转基因猪模型。E-mail: pandengke2002@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.15-160

网络出版时间: 2015-8-12 9:49:52

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150812.0949.008.html>

to lack of reporting genes, the rejection status of cells and organs post pig-to-human xenotransplantation cannot be visualized. In this study, we introduced the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene driven by the CAG promoter into GTKO porcine ear fibroblasts. Then we produced transgenic pigs expressing the EGFP gene by nuclear transfer technology. Expression levels of EGFP in different tissues and organs of the cloned pig were investigated by Nightsea DFP-1 Fluorescent Protein Flashlight, fluorescence microscope and quantitative PCR assays. The results showed that the protein and transcript of EGFP were expressed in all tissues and organs of the GTKO pig, but the expression was weak in the liver and central nervous system. In conclusion, we have successfully produced the transgenic GTKO pigs expressing EGFP in all tested tissues and organs, which builds up a good basis to track transplanted cells or tissues.

**Keywords:** GTKO; EGFP; pig; xenotransplantation

猪的血液生理生化指标及器官大小和人类的接近, 是人类异种器官移植的理想供体<sup>[1]</sup>。猪器官应用于人临床试验面临着诸多难题, 其中首要的障碍是超急性排斥反应 (Hyperacute rejection, HAR), 这种反应主要是由  $\alpha$ -1,3 半乳糖基转移酶 ( $\alpha$ -1,3 galactosyltransferase) 合成的  $\alpha$ Gal (半乳糖) 表位引起的, 通过消除或减少半乳糖可有效缓解猪-人异种器官移植引起的超急性免疫排斥反应。2002 年, Lai 等<sup>[2]</sup>率先获得了  $\alpha$ -1,3 半乳糖转移酶基因敲除 ( $\alpha$ -1,3 galactosyltransferase gene knockout, GTKO) 猪。目前, 国际上已有多个课题组通过体细胞核移植技术获得了 GTKO 猪<sup>[3-6]</sup>。近 10 年来, 多个课题组开展了以 GTKO 猪为供体、非人灵长类动物为受体的异种细胞(骨髓<sup>[7]</sup>和肝细胞<sup>[8]</sup>)或器官(肾脏<sup>[9]</sup>和心脏<sup>[10,11]</sup>)移植研究, 在心脏移植领域取得了重要进展, 异种心脏移植<sup>[11]</sup>存活时间可超过 1 年。虽然 GTKO 修饰取得了较理想的效果, 但缺少报告基因, 不能直观示踪移植后的细胞迁移及器官排斥状态。

CAG 启动子是人工构建的组合启动子, 由巨细胞病毒 (Cytomegalovirus, CMV) 早期增强子 (Early enhancer element) 和鸡  $\beta$ -肌动蛋白 (Chicken beta-actin) 启动子组成, 在多种细胞中都有较强的表达活性, 经体内和体外实验证实其不易被甲基化。本研究以 GTKO 五指山小型猪<sup>[6]</sup>为供体, 向其耳成纤维细胞系中导入 CAG 启动子驱动增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced green fluorescent protein, EGFP), 利用体细胞核移植技术制备 EGFP 猪, 分析 EGFP 在克隆猪各组织和器官中的表达, 成功获得了各组织器官表达 EGFP 的 GTKO 猪, 为 EGFP 示踪异种细胞组织移植奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 载体构建

以 pIRES2-EGFP (购自 Clontech 公司) 质粒为模板, 使用 EGFP-F/R 引物扩增 EGFP 基因, 将扩增得到的 EGFP 以无缝连接技术连接到 pCAGGS-neo 载体上, 获得 pCAGGS-EGFP-neo 表达载体。引物序列为:

EGFP-F: 5'-ATTTCGCATGCGGCCGCTAGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3';

EGFP-R: 5'-CTCGATATCGGTACCTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCA-3'。

### 1.2 供核体细胞系的建立、 $\alpha$ Gal 鉴定和体细胞转染

剪取 GTKO 猪耳组织, 3~5 h 内带回实验室。采用组织块贴壁法建立猪耳成纤维细胞系, 原代细胞的培养采用添加 20% 胎牛血清 (FBS, Gibco) 和 5% 双抗 DMEM 培养基, 当细胞达到接触抑制状态时冷冻保存或传代培养, 以备后续的基因转染。传代细胞采用添加 20% FBS 的 DMEM 培养基, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。

$\alpha$ Gal 鉴定采用免疫荧光染色法, 即 FITC 绿色荧光标记的抗  $\alpha$ Gal 抗体染色 30 min 后, 荧光显微镜下观察荧光。

复苏 GTKO 细胞, 待其长至 80% 汇合时进行电转染, 将 8  $\mu$ g pCAGGS-EGFP-neo 线性化载体利用 Amaxa Nucleofector 转染仪进行电转染, 然后 G418 筛选 10~15 d, 获得 EGFP 阳性细胞, 为后续体细胞核移植提供供核细胞。

### 1.3 体细胞核移植和胚胎移植

按照潘登科等<sup>[12]</sup>方法进行体细胞核移植操作,

即从屠宰场收集卵巢,获得卵母细胞,在 38.5℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱,体外成熟培养 40~44 h。然后挑选排出第一极体、卵黄膜完整、卵周隙清晰的卵母细胞进行去核、注核,利用 BLS 融合仪使 GFP 阳性细胞融合到去核的卵母细胞中,获得重构胚。体外培养胚胎于第 2 d、第 6 d 观察卵裂和囊胚及荧光观察。胚胎移植即融合激活后的重构胚在培养 40 h 内进行,自然发情第 0 d 或第 1 d 的长白或大白的后备母猪作为受体母猪,移植方法为手术法输卵管深度移植。

1.4 绿色荧光蛋白在各组织器官中的表达

EGFP 转基因猪出生后,Nightsea DFP-1 双荧光蛋白观测镜检测仔猪,之后解剖取仔猪的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、脊髓、胃、肠、大脑和小脑等器官检测绿色荧光蛋白表达情况。之后石蜡切片,荧光显微镜下检测心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胰腺、大脑、小脑、脊髓、舌、胃和骨骼肌等组织的绿色荧光表达,并应用 Image J 软件对荧光切片的荧光强度进行定量分析。

1.5 实时定量 PCR 检测各组织 EGFP 的表达

常规方法提取心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肺脏、胰腺、大脑、小脑、脊髓、舌、肠、骨骼肌和耳等组织的 RNA,以 EGFP 基因序列特异引物进行实时定量 PCR 测定 EGFP 表达。引物序列为:

上游引物:5'-AAACGGCCACAAGTTCAGCG-3';  
下游引物:5'-AAGAAGATGGTTCGCTCCTG-3'。

1.6 数据分析

采用 Photoshop CS5 和 Image J 处理图片,SPSS 20.0 软件对实验数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异显著。

2 结果与分析

2.1 供核细胞  $\alpha$ Gal 鉴定和 EGFP 阳性细胞

供核细胞系 FITC 抗  $\alpha$ Gal 抗体染色结果如图 1

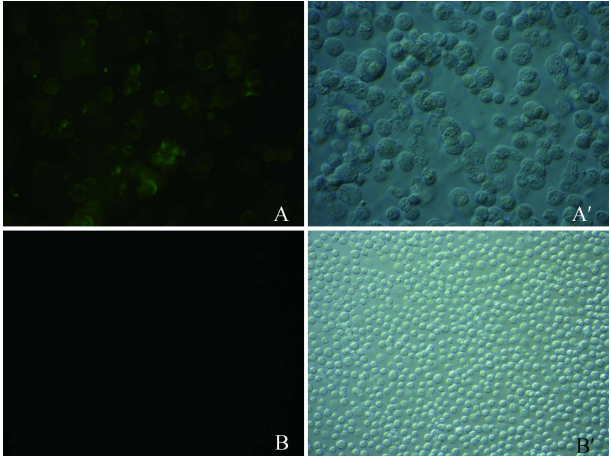


图 1 供核细胞系  $\alpha$ Gal 染色分析  
A、A':野生型(WT)猪细胞,20×;B、B':GTKO 猪细胞,10×。  
A、B 分别是显微镜下荧光观察;A'、B'为显微镜下可见光观察。

所示。结果表明,抗  $\alpha$ Gal 抗体与 Gal 抗原表位结合显示绿色,证明其是野生型(WT)猪细胞(图 1A);染色后未显示绿色,说明该细胞 Gal 抗原表位缺失即该细胞为 GTKO 猪细胞系(图 1B)。转染筛选获得 EGFP 阳性供核细胞结果见图 2 A。

2.2 EGFP 克隆胚的体外发育及胚胎移植

利用 EGFP 阳性细胞为供核细胞进行体细胞核移植实验,获得 208 枚重构胚进行体外观察,EGFP 与未转 EGFP 的胚胎的卵裂率、囊胚率差异不显著(79.8% vs. 80.57%, $P > 0.05$ 和 19.23% vs. 19.42%, $P > 0.05$ ,表 1、图 2B 和 C)。以 EGFP 阳性细胞进行体细胞核移植构建 599 枚重构胚,移植到 3 头受体母猪,其中 1 头母猪妊娠并产下 2 头克隆仔猪。

2.3 EGFP 在克隆猪各组织器官中的表达情况

用 Nightsea DFP-1 双荧光蛋白观测镜检测心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胰腺、胃、肠、大脑和小脑等器官,均表达绿色荧光(图 3),但肝脏中表达弱或无荧光表达。在荧光显微镜下观察心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胰腺、大脑、小脑、脊髓、舌、胃和骨骼肌等组织切片绿色荧光蛋白的表达情况(图 4),结果表明骨骼肌肉和舌头荧光表达强,

表 1 EGFP 克隆胚体外发育

供体细胞	重构胚数	重复次数(n)	卵裂数(%)	囊胚数(%)
EGFP-EF	208	3	166 (79.80±0.26) <sup>a</sup>	40 (19.23±0.26) <sup>a</sup>
EF	62	3	50 (80.57±0.85) <sup>a</sup>	12 (19.42±0.85) <sup>a</sup>

注:EGFP-EF 为 GTKO 阳性克隆,EF 为 GTKO 细胞,n=3;同一列间具有不同字母上标为差异显著, $P < 0.05$ 。



图 2 显微镜观察 EGFP 细胞和囊胚图

A: 荧光显微镜观察 EGFP 细胞, 20 ×; B: 普通光学显微镜下的囊胚; C: 荧光显微镜下的囊胚, 40 ×。

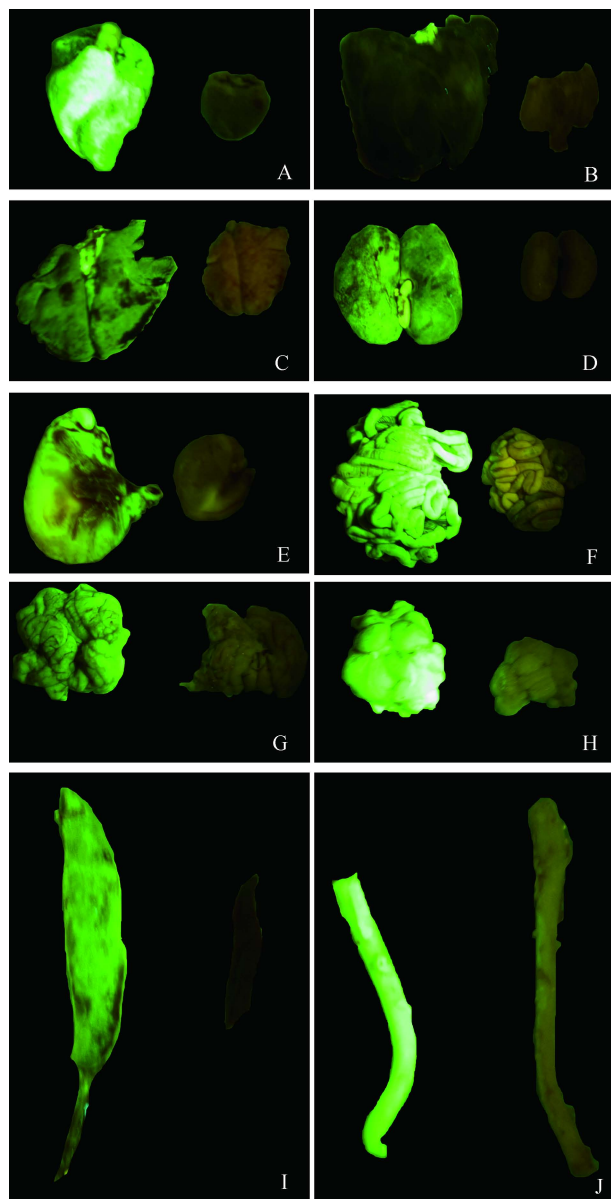


图 3 荧光观测镜观察各器官的荧光图

A: 心脏; B: 肝脏; C: 肺脏; D: 肾脏; E: 胃; F: 肠; G: 大脑; H: 小脑; I: 脾脏; J: 脊髓。左侧为 EGFP 组, 右侧为对照组。

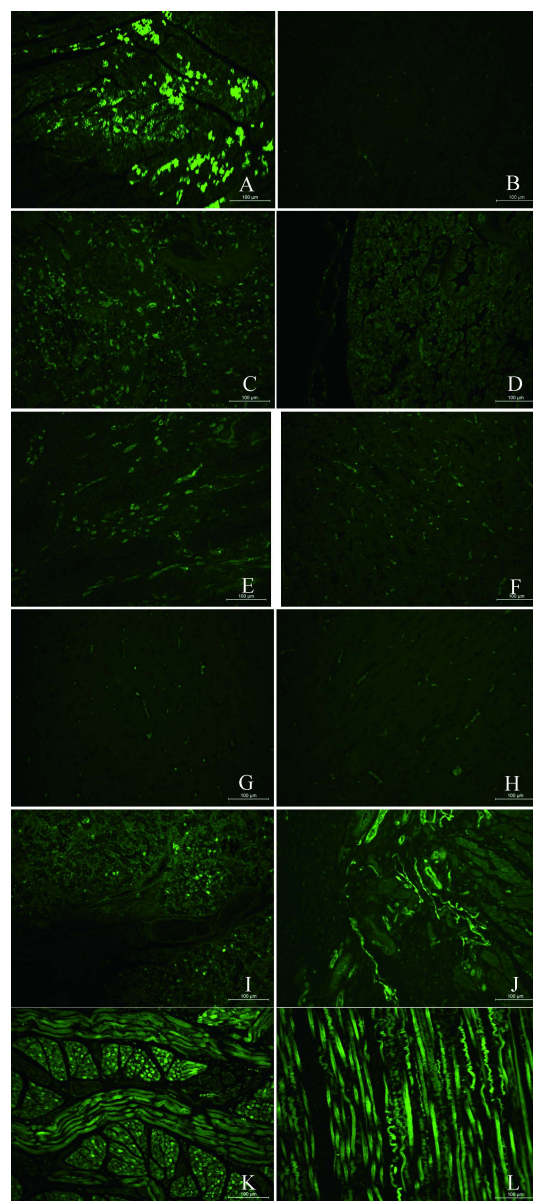


图 4 组织切片荧光图

A: 心脏; B: 肝脏; C: 脾脏; D: 肺脏; E: 肾脏; F: 脊髓; G: 大脑; H: 小脑; I: 胰腺; J: 胃; K: 舌; L: 骨骼肌。标尺: 100 μm。



肝脏中表达极低。Image J 定量分析发现, 绿色荧光蛋白在各组织中均有表达, 在骨骼肌和舌头中表达强, 但在肝组织和中枢神经系统 (大脑、小脑和脊髓) 中表达较低 (图 5)。

#### 2.4 实时定量分析 EGFP 在各组织中的表达情况

实时定量 PCR 检测心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肺脏、胰腺、大脑、小脑、脊髓、舌、肠、骨骼肌和耳等组织中 EGFP 的表达, 结果见图 6。在肺脏和耳组织中 EGFP 表达强, 但在大脑、小脑和脊髓为代表的中枢神经系统中表达较低。

### 3 讨论

GTKO 模型猪在异种移植研究中克服了超急性免疫排斥反应, 但是目前所构建的 GTKO 猪都缺少报告基因, 不能直观示踪移植后的细胞及器官的排斥状态。目前已有较多的实验室采用 CMV 广谱性表达的启动子获得了绿色荧光转基因猪<sup>[13-24]</sup>, 但是 CMV 启动子容易甲基化, 可使转入的外源基因沉默。因此, 本文选用 CAG 广泛性全身表达的启动子来制备 EGFP 示踪的转基因猪。

本研究通过双荧光蛋白观测镜、荧光显微镜及定量 PCR 技术, 对 EGFP 在转基因猪的组织器官中的表达进行了系统的分析。检测到猪的组织器官均有 EGFP 表达, 但是各种组织和器官之间的表达差异比较大, 其中肝脏和中枢神经系统荧光表达弱。这与 EGFP 示踪报告基因模式动物 (小鼠<sup>[25]</sup>、大鼠<sup>[26]</sup>、兔子<sup>[27]</sup>) 的研究相似, 即各组织均有表达, 但组织间表达差异比较大且均有表达弱的组织, 如在大鼠和兔子中 EGFP 在肝脏中都有表达弱的迹象, 这与本实验结果相似。本文推测 EGFP 在肝脏表达弱, 这可能是因为肝脏对来自体内和体外的许多非营养性物质如药物、毒物及体内某些代谢产物, 具有生物转化作用, 通过新陈代谢将它们彻底分解或以原形排出, 因此肝脏的这种“解毒功能”不利于绿色荧光蛋白这种报告基因的表达。另外, 在本实验中 qPCR 检测胰腺组织 RNA 表达极弱, 这是由于胰腺是一个混合性分泌腺体, 主要有外分泌和内分泌两大功能。其中外分泌腺分泌的主要成分是胰液 (含各种消化酶), 很容易发生自溶, 且胰腺组织含有大量内源性 RNA 酶, 故胰腺组织 RNA 的提取较

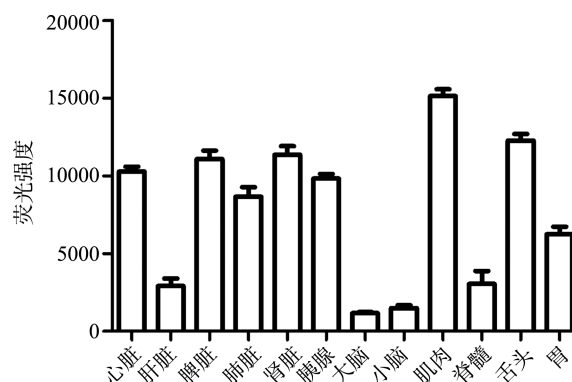


图 5 定量分析 EGFP 在不同组织中的表达

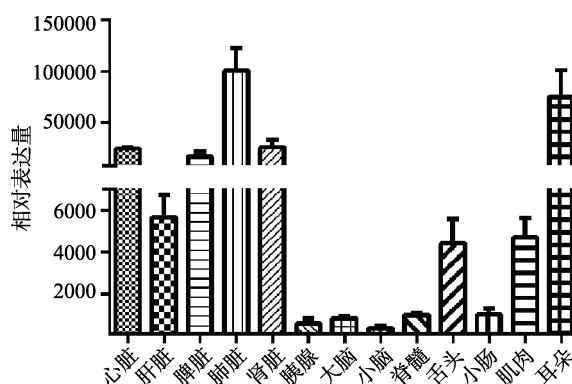


图 6 qRT-PCR 检测 EGFP 基因在不同组织中的表达

为困难, 所以推测胰腺中表达较弱可能是胰腺中 RNA 较易降解。

总之, 本研究成功获得了各组织器官表达 EGFP 的 GTKO 猪, 为 EGFP 示踪异种细胞及组织移植奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] Pierson RN III, Dorling A, Ayares D, Rees MA, Seebach JD, Fishman JA, Hering BJ, Cooper DKC. Current status of xenotransplantation and prospects for clinical application. *Xenotransplantation*, 2009, 16(5): 263–280. [DOI]
- [2] Lai LX, Kolber-Simonds D, Park K-W, Cheong H-T, Greenstein JL, Im G-S, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of  $\alpha$ -1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295(5557): 1089–1092. [DOI]
- [3] Dai YF, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Co-well-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA,

- Ayares DL. Targeted disruption of the  $\alpha 1$ , 3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(3): 251–255. [DOI]
- [4] Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai YF, Ayares DL. Production of  $\alpha 1$ , 3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 2003, 299(5605): 411–414. [DOI]
- [5] Kolber-Simonds D, Lai LX, Watt SR, Denaro M, Arn S, Augenstein ML, Betthausen J, Carter DB, Greenstein JL, Hao YH, Im G-S, Liu ZH, Mell GD, Murphy CN, Park K-W, Rieke A, Ryan DJ, Sachs DH, Forsberg EJ, Prather RS, Hawley RJ. Production of  $\alpha$ -1, 3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with lasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(19): 7335–7340. [DOI]
- [6] 郑道山, 冯冲, 朱彦宾, 龙川, 冯书堂, 潘登科, 马文丽. 利用启动子缺陷型打靶载体敲除五指山小型猪 *GGTA1* 基因. *生物技术通讯*, 2011, 22(4): 458–462. [DOI]
- [7] Tseng Y-L, Dor FJMF, Kuwaki K, Ryan D, Wood J, Denaro M, Giovino M, Yamada K, Hawley R, Patience C, Schuurman H-J, Awwad M, Sachs DH, Cooper DKC. Bone marrow transplantation from  $\alpha 1$ , -3galactosyltransferase gene-knockout pigs in baboons. *Xenotransplantation*, 2004, 11(4): 361–370. [DOI]
- [8] Shigeta T, Hsu H-C, Enosawa S, Matsuno N, Kasahara M, Matsunari H, Umeyama K, Watanabe M, Nagashima H. Transgenic pig expressing the red fluorescent protein kusbira-orange as a novel tool for preclinical studies on hepatocyte transplantation. *Transplant Proc*, 2013, 45(5): 1808–1810. [DOI]
- [9] Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, Iwanaga T, Hisashi Y, Nuhn M, O'Malley P, Nobori S, Vagefi PA, Patience C, Fishman J, Cooper DKC, Hawley RJ, Greenstein J, Schuurman H-J, Awwad M, Sykes M, Sachs DH. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of  $\alpha 1$ , 3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat Med*, 2005, 11(1): 32–34. [DOI]
- [10] Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJMF, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, Lancos CJ, Prabharasuth DD, Cheng J, Moran K, Hisashi Y, Mueller N, Yamada K, Greenstein JL, Hawley RJ, Patience C, Awwad M, Fishman JA, Robson SC, Schuurman H-J, Sachs DH, Cooper DKC. Heart transplantation in baboons using  $\alpha 1$ , 3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med*, 2005, 11(1): 29–31. [DOI]
- [11] Cooper DKC. A milestone in xenotransplantation research. *Xenotransplantation*, 2014, 21(1): 13–15. [DOI]
- [12] 潘登科, 张莉, 周艳荣, 冯冲, 龙川, 刘晓, 董恩球, 王树臣, 万荣, 张健, 陈红星. 体细胞核移植生产转  $\omega$ -3 脂肪酸去饱和酶基因 *sFat-1* 克隆猪. *中国科学(C辑: 生命科学)*, 2009, 39(3): 295–302. [DOI]
- [13] Park K-W, Lai LX, Cheong H-T, Cabot R, Sun QY, Wu GM, Rucker EB, Durtschi D, Bonk A, Samuel M, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS. Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. *Biol Reprod*, 2002, 66(4): 1001–1005. [DOI]
- [14] Naruse K, Ishikawa H, Kawano H-O, Ueda H, Kurome M, Miyazaki K, Endo M, Sawasaki T, Nagashima H, Makuuchi M. Production of a transgenic pig expressing human albumin and enhanced green fluorescent protein. *J Reprod Dev*, 2005, 51(4): 539–546. [DOI]
- [15] Cabot RA, Kühholzer B, Chan AWS, Lai LX, Park K-W, Chong K-Y, Schatten G, Murphy CN, Abeydeera LR, Day BN, Prather RS. Transgenic pigs produced using in vitro matured oocytes infected with a retroviral vector. *Anim Biotechnol*, 2001, 12(2): 205–214. [DOI]
- [16] Lai LX, Park K-W, Cheong H-T, Kühholzer B, Samuel M, Bonk A, Im G-S, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS. Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells. *Mol Reprod Dev*, 2002, 62(3): 300–306. [DOI]
- [17] Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogt B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhauve M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep*, 2003, 4(11): 1054–1058. [DOI]
- [18] 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. *Bio Reprod*, 2003, 69(3): 1060–1068. [DOI]
- [19] Whitelaw CB, Radcliffe PA, Ritchie WA, Carlisle A, El-lard FM, Pena RN, Rowe J, Clark AJ, King TJ, Mitrophanous KA. Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Lett*, 2004, 571(1–3): 233–236. [DOI]
- [20] Watanabe S, Iwamoto M, Suzuki S-I, Fuchimoto D, Honma D, Nagai T, Hashimoto M, Yazaki S, Sato M, Onishi A. A novel method for the production of transgenic cloned pigs: electroporation-mediated gene transfer to non-cultured cells and subsequent selection with puromycin.

- cin. *Bio Reprod*, 2005, 72(2): 309–315. [DOI]
- [21] Webster NL, Forni M, Bacci ML, Giovannoni R, Razzini R, Fantinati P, Zannoni A, Fusetti L, Dalpra L, Bianco MR, Papa M, Seren E, Sandrin MS, Mc Kenzie IFC, Lavitrano M. Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev*, 2005, 72(1): 68–76. [DOI]
- [22] Yong HY, Hao YH, Lai LX, Li RF, Murphy CN, Rieke A, Wax D, Samuel M, Prather RS. Production of a transgenic piglet by a sperm injection technique in which no chemical or physical treatments were used for oocytes or sperm. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73(5): 595–599. [DOI]
- [23] 刘忠华, 宋军, 王振坤, 田江天, 孔庆然, 郑重, 尹智, 高力, 马海鹏, 孙爽, 李玉田, 王洪斌. 体细胞核移植生产绿色荧光蛋白转基因猪. 科学通报, 2008, 53(5): 556–560. [DOI]
- [24] 张鹏, 杨珍珍, 窦红伟, 李伟杭, 律波, Lars B, 杜玉涛, 谭萍萍, 马润林. 利用改进的手工克隆技术生产转 GFP 基因猪克隆胚胎. 遗传, 2011, 33(5): 527–532. [DOI]
- [25] Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. Green mice as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*, 1997, 407(3): 313–319. [DOI]
- [26] Hakamata Y, Tahara K, Uchida H, Sakuma Y, Nakamura M, Kume A, Murakami T, Takahashi M, Takahashi R, Hirabayashi M, Ueda M, Miyoshi I, Kasai N, Kobayashi E. Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 286(4): 779–785. [DOI]
- [27] Takahashi R-I, Kuramochi T, Aoyagi K, Hashimoto S, Miyoshi I, Kasai N, Hakamata Y, Kobayashi E, Ueda M. Establishment and characterization of CAG/EGFP transgenic rabbit line. *Transgenic Res*, 2007, 16(1): 115–120. [DOI]

(责任编辑: 任军)