

网络出版时间:2015-11-11 16:16

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.12.001

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20151111.1616.002.html>

# 睾丸注射慢病毒生产转基因鸡的研究

孙国锋, 张智英, 白义春, 魏泽辉

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** **【目的】**采用睾丸注射慢病毒的方法生产转基因鸡以提高转基因效率,使转基因鸡的批量生产变得简单可行。**【方法】**用磷酸钙沉淀法包装慢病毒,对慢病毒包装体系中的质粒总量和 HN Buffer 的 pH 值进行优化,以包装出滴度较高的慢病毒;然后将慢病毒注射到受精鸡蛋的胚胎中验证其活性;最后,将慢病毒注射到 8 日龄公鸡的睾丸内,待其性成熟以后,将精液 DNA 呈阳性的公鸡与非转基因母鸡进行交配生产出转基因鸡。**【结果】**当 90 mm 培养皿中质粒总量为 50  $\mu\text{g}$ 、HN Buffer 的 pH 值为 7.05 时慢病毒的包装效率最高,在该条件下包装出的慢病毒滴度高达  $7.5 \times 10^7$  TU/mL;采用慢病毒胚胎注射途径成功地生产出增强绿色荧光蛋白(enhanced Green Fluorescent Protein, eGFP)转基因鸡;采用慢病毒睾丸注射途径生产的转基因鸡后代中能检测到 eGFP 目的基因,但未检测到其相关的表达。**【结论】**慢病毒睾丸注射途径能够将外源基因整合到精原干细胞中,并遗传给后代。

**[关键词]** 转基因鸡;慢病毒;胚胎注射;睾丸注射

**[中图分类号]** S831.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2015)12-0001-06

## Transgenic chicken generated by testis injection of recombinant lentivirus

SUN Guo-feng, ZHANG Zhi-ying, BAI Yi-chun, WEI Ze-hui

(College of Animal Science & Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** **【Objective】**We applied testis injection with recombinant lentivirus to improve transgene efficiency to make generation of transgenic chicken simple. **【Method】**Plasmid quantity and pH of HN buffer in the packaging system were optimized to produce recombinant lentiviruses by calcium phosphate precipitation with high titers. Then, the activity of recombinant lentiviruses was tested by being injected into embryos of new fresh fertilized eggs. Testis of 8-day-old male chicken was injected with lentivirus. After being sexual mature, chicken with transgenic sperm were verified by examining sperm DNA and were mated with normal female chicken to generate transgenic offspring. **【Result】**The titers of lentivirus was up to  $7.5 \times 10^7$  TU/mL when the plasmid quantity was 50  $\mu\text{g}$  in 90 mm petri dish and the pH of HN Buffer was 7.05. Transgenic chicken were successfully generated. Target eGFP gene was verified in the transgenic offspring generated by testis injection method based on lentivirus, but no protein was detected. **【Conclusion】**The exogenous gene could be integrated into spermatogonial stem cells and transferred to offspring through testis injection approach based on lentivirus.

**Key words:** transgenic chicken; lentivirus; embryo injection; testis injection

**[收稿日期]** 2014-04-08

**[基金项目]** 教育部高校基本科研业务费专项资金项目(利用慢病毒建立转基因鸡动物模型的研究,项目编号:QN2009018)

**[作者简介]** 孙国锋(1987—),男,河南洛阳人,在读硕士,主要从事转基因动物研究。E-mail: sunguofeng1129@126.com

**[通信作者]** 魏泽辉(1974—),男(蒙古族),辽宁朝阳人,副教授,主要从事转基因动物研究。E-mail: weizehui7848@163.com

随着科学技术的发展,转基因技术已经成为发育生物学、行为生物学、内分泌学及其他相关领域研究的重要工具,并在许多物种,包括细菌、植物和动物中得到了广泛运用<sup>[1]</sup>。长久以来,鸡由于其卵生、饲养周期短、生产性能高以及胚胎容易获得等诸多优点成为理想的动物模型<sup>[2]</sup>,然而由于禽类独特的生理构造,使得转基因鸡的生产仍然处于相当困难的局面。因此,探索出一种高效、稳定的转基因鸡生产方法,将会对生命科学研究产生深远的影响。在过去数十年中,人们尝试了很多方法来生产转基因鸡,包括脂质体法<sup>[3]</sup>、电转染法<sup>[4]</sup>、纳米材料法<sup>[5]</sup>以及 *piggyBac* 转座子法<sup>[6-8]</sup>等。尽管人们运用这些方法已成功地生产出转基因鸡,但这些由非病毒性载体生产转基因鸡的方法由于存在着外源基因瞬时表达、转染效率低以及外源基因并未整合到宿主基因组中等缺点,一直没有得到广泛应用。而基于病毒性载体的转基因方法由于具有较强的细胞感染能力,因而在很多物种中得到了广泛应用,如利用逆转录病毒载体法生产的转基因小鼠<sup>[9]</sup>、鸡<sup>[10]</sup>、猪<sup>[11-12]</sup>和牛<sup>[13]</sup>,均显示出较强的、稳定的绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)表达,这为利用慢病毒载体法生产转基因鸡提供了理论上的支持。据报道,一些研究团队通过将慢病毒注射到新生鸡蛋的胚下腔成功地生产出了转基因鸡<sup>[14-16]</sup>;另外,Scott 等<sup>[17]</sup>利用同样的方法生产出组织特异性转基因鹌鹑,其  $G_0$  代的转基因效率为 10%(8/80), $G_0$  代与  $G_1$  代之间的传递效率在 8%~33%。这些结果证实,慢病毒胚胎注射途径是一种高效可行的转基因鸡生产方法。

为了提高转基因效率以及使转基因鸡批量生产变得简单可行,本研究尝试通过睾丸直接注射慢病毒的方法来生产转基因鸡,在对慢病毒包装体系优化之后,将包装出的慢病毒注射到新生鸡蛋的胚下腔生产转基因鸡来验证其活性,然后将慢病毒直接注射到公鸡的睾丸内,待其性成熟后,将精液 DNA 呈阳性的公鸡与非转基因母鸡交配检测外源基因的传递效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

新鲜受精伊萨鸡蛋以及 8 日龄伊萨小公鸡,由西北农林科技大学畜牧站提供。包装质粒 pMDL(表达 Gag-Pol)、pRSV-Rev(表达 Rev)和 pMDG(表达 VSV-G 包膜蛋白)均购自 Invitrogen,转移载

体质粒 pCD513B-1(含有 *eGFP* 基因,由 EF1 $\alpha$  启动子驱动)由西北农林科技大学动物脂肪沉淀与肌肉发育实验室提供,293T 细胞由西北农林科技大学动物基因组学实验室保存,GAPDH 上、下游引物以及 *eGFP* 上游引物和 3'-LTR 下游引物均由深圳华大基因合成,CaCl<sub>2</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Hepes、NaCl、蛋白酶 K 等购自 Sigma,Easy Taq DNA 聚合酶、Taq Buffer、dNTPs、Trans2K Plus DNA Marker、Protein Ruler II、EasySee Western Marker 等购自 Transgene,鼠单抗(anti-GFP)购自 Abcam,羊抗鼠(Goat anti-Mouse IgG)二抗购自 Santa,胎牛血清购自 Hyclone,DMEM 购自 Gibco,Western blot 用 PVDF 膜、ECL 显色液等购自 Millipore,RIPA 组织细胞裂解液购自北京 CellShip。

### 1.2 慢病毒包装

本研究采用 4 质粒包装系统、磷酸钙沉淀法包装慢病毒。首先将 4 种质粒 pMDL、pRSV-Rev、pMDG、pCD513B-1 按照 1:1:1:2 的质量比(90 mm 培养皿中 4 种质粒总量为 25  $\mu$ g)混合后共转染到 293T 细胞中,16~18 h 后更换培养基,48 h 后收集上清液中的病毒,同时采用液氮反复冻融法裂解下层细胞并收集细胞中的病毒,然后用等比例稀释法来计算病毒的滴度。

### 1.3 慢病毒包装体系的优化

在试验中发现,共转染 293T 细胞时 4 种质粒的总量以及磷酸钙沉淀法中 HN Buffer 的 pH 值对最终病毒的滴度影响较大。因此,设置了 6 个梯度的 pH 值,分别为 6.94,7.00,7.05,7.11,7.16 和 7.24,并且将 4 种质粒的量加倍(90 mm 培养皿质粒总量为 50  $\mu$ g,比例不变)来优化慢病毒的包装体系,以此探索包装高滴度慢病毒的最适条件。

### 1.4 胚胎注射

为了验证优化后的慢病毒能否用于生产转基因鸡,对 170 枚受精鸡蛋,以每个胚胎 2.5  $\mu$ L( $7.5 \times 10^7$  TU/mL)的量注射慢病毒。首先将新鲜受精鸡蛋水平放置(鸡蛋的长轴呈水平方向)24 h 以上,使胚胎处于鸡蛋的上部。用消毒酒精和碘酒擦拭蛋壳的表面后,用手持电动打磨机在蛋壳上部打一个直径约 5 mm 的孔。然后用细胞显微注射仪将大约 2.5  $\mu$ L 的慢病毒悬液注射到胚胎的胚下腔,滴加 20  $\mu$ L 的双抗后用热熔胶对蛋壳封口。在温度为 37.8  $^{\circ}$ C、相对湿度为 65%的条件下孵化,定时自动转蛋,直至出雏。然后从孵化雏鸡的肝脏、心脏、皮肤、肌肉、小肠、大肠、眼球、脚趾以及喙等组织中用酚仿抽

提法提取基因组 DNA,用组织裂解法提取总蛋白,分别用于 PCR 检测和 Western blot 分析。同时,对相应组织做 5  $\mu\text{m}$  的冰冻切片,在倒置荧光显微镜下观察 *eGFP* 的表达。

### 1.5 睾丸注射

15 只 8 日龄的小公鸡在试验前 1 d 停止喂料,正常饮水(添加 0.2% 维生素 C、0.03% 维生素 K<sub>3</sub> 和 0.5% 的阿莫西林)。乙醚麻醉(自然吸入乙醚气体约 30 s)后沿最后一根肋骨外缘划开小公鸡皮肤(创口约 1 cm),钝性分离肌肉,打开腹腔曝露出一侧睾丸。将 30  $\mu\text{L}$  ( $7.5 \times 10^7$  TU/mL)慢病毒悬液用微量进样器分多个位点注射到睾丸中,然后缝合创口,将小公鸡正常饲养至性成熟。采集供试公鸡的精液,提取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。将精液呈阳性的公鸡与非转基因母鸡进行交配,对其后代进行 *eGFP* 转基因检测。

### 1.6 转基因鸡的 PCR 和 Western blot 分析

以 5'-CAGAACATCATCCAGCGTCCAC-3' (3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)上游引物)和 5'-CACTGGCTCCTACCTCCTGACAC-3' (GAPDH 下游引物)为引物,以提取的基因组 DNA 作为模板,使用“94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 10 min”的反应程序,扩增 116 bp 的 GAPDH 片段作为对照,以检测所提取的基因组 DNA 的品质。以 5'-CAGTGCTTCAGCCGCTACCC-3' (*eGFP* 上游引物)和 5'-ACACAACAGACGGGCACACAC-3' (3'-LTR 下游引物)为引物,以提取的基因组 DNA 作为模板,使用“94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min,35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 10 min”的反应程序,扩增 1 654 bp 的 *eGFP*&3'-LTR 片段作为目的片段,用于检测是否携带外源基因。以 *eGFP* 上游引物和 3'-LTR 下游引物为引物,以正常鸡的基因组 DNA、质粒 pCD513B-1 以及双蒸水为模板,使用“94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min,35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 10 min”的反应程序分别进行扩增,作为阴性对照(N)、阳性对照(P)和水对照(W)。PCR 反应体系均为 20  $\mu\text{L}$ :DNA 模版 1  $\mu\text{L}$ ,上游引物和下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ,Taq DNA 聚合酶 0.2  $\mu\text{L}$ ,Taq Buffer 2  $\mu\text{L}$ ,dNTPs 1.6  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 13.2  $\mu\text{L}$ 。

采用 Western blot 检测 *eGFP* 是否在雏鸡的组织中表达。用 RIPA 细胞组织裂解液对上述组织裂

解,将提取到的组织裂解产物用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后将胶上的蛋白转移到硝酸纤维素薄膜上,用 50 g/L 脱脂牛奶室温下封闭 2 h,10 mL TBST 缓冲液清洗 3 次。之后用 GFP 抗体(鼠单抗,1:500)在 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜,10 mL TBST 缓冲液清洗 3 次;再用羊抗鼠二抗(1:3 000)在室温下孵育 2 h,10 mL TBST 缓冲液清洗 3 次,最后在凝胶成像系统中观察目的条带。

采用冰冻切片观察目的蛋白的表达。将相应的组织块经中性固定液固定 24 h 以上后,分别用质量分数 10%,20% 和 30% 的梯度蔗糖溶液脱水 24 h,冰冻后切片,厚度 5  $\mu\text{m}$ ,选取不同位置的切片在荧光倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 慢病毒包装及其体系的优化

采用磷酸钙沉淀法,当 HN Buffer 的 pH 值为原始的 7.10、90 mm 培养皿中质粒总量为 25  $\mu\text{g}$  时,获得的慢病毒最高滴度为  $8.0 \times 10^4$  TU/mL。在 pH 值维持不变,4 种质粒的量加倍后(90 mm 培养皿中质粒总量为 50  $\mu\text{g}$ )慢病毒包装效率明显提高,滴度为  $9.5 \times 10^5$  TU/mL,结果如图 1-I,II 所示。在 90 mm 培养皿中质粒总量为 50  $\mu\text{g}$  条件下,慢病毒包装效率在不同 pH 值(6.94,7.00,7.05,7.11,7.16,7.24)下有很大差异,结果如图 1-A-F 所示,其中在 pH 值为 7.05 时包装效率最高,滴度为  $7.5 \times 10^7$  TU/mL。

### 2.2 胚胎注射生产转基因鸡

注射的 170 枚受精鸡蛋共孵化出 21 只雏鸡(12.4%)。对其组织样提取基因组 DNA 进行 PCR 检测,结果显示 6 只鸡(28.3%)能检测到 1 654 bp 的目的基因 *eGFP*&3'-LTR,其编号分别为 2、6、10、11、17 以及 19 号(图 2-A)。提取这 6 只鸡的组织总蛋白进行 Western blot 分析,发现其中 3 只鸡(14.3%)能够检测到 *eGFP* 的表达,编号分别为 2、10 和 19 号(图 2-B)。通过组织冰冻切片观察,发现在 2 号鸡的皮肤和肌肉、10 号鸡的肝脏以及 19 号鸡的眼球中均能观察到绿色荧光(图 2-C)。

### 2.3 睾丸注射生产转基因鸡

供试公鸡精液 DNA 的 PCR 检测结果显示,编号为 02502 和 02506 的 2 只鸡的精液呈阳性(图 3-A)。将这 2 只公鸡与非转基因母鸡交配,产生了 80 只 G<sub>1</sub> 代,对其进行 PCR 和 Western blot 分析检测,结果显示 02506 号鸡的 38 只 G<sub>1</sub> 代中仅有 1 只(编

号为 02506-35)能检测出 *eGFP* 目的基因(部分结果如图 3-B),但没有检测到 *eGFP* 的表达(图略); 02502 号鸡的 42 只  $G_1$  代中均没有检测到 *eGFP* 目的基因及其表达(图略)。

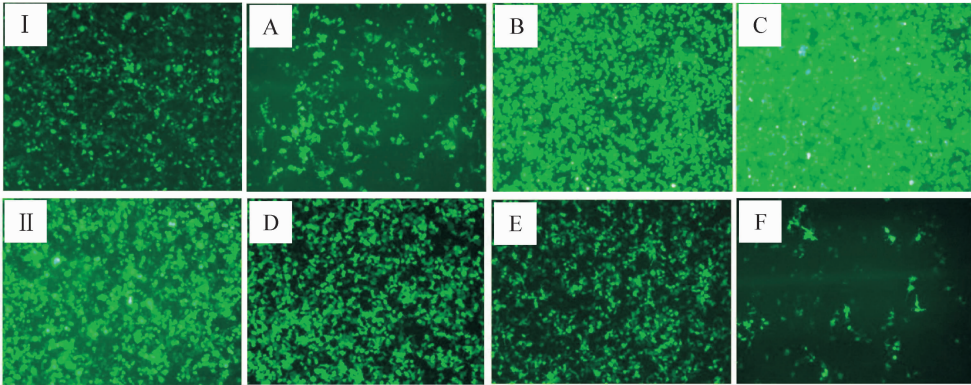


图 1 质粒总量和 HN Buffer 的 pH 值对慢病毒包装效率的影响(×100)

I. 质粒总量为 25  $\mu\text{g}$  时(90 mm 培养皿)慢病毒的包装效率,滴度为  $8.0\times10^4$  TU/mL; II. 质粒总量为 50  $\mu\text{g}$  时(90 mm 培养皿)慢病毒的包装效率,滴度为  $9.5\times10^5$  TU/mL; A. pH 值为 6.94,滴度为  $5.9\times10^3$  TU/mL; B. pH 值为 7.00,滴度为  $4.4\times10^6$  TU/mL; C. pH 值为 7.05,滴度为  $7.5\times10^7$  TU/mL; D. pH 值为 7.11,滴度为  $9.0\times10^5$  TU/mL; E. pH 值为 7.16,滴度为  $8.6\times10^4$  TU/mL; F. pH 值为 7.24,滴度为  $7.8\times10^2$  TU/mL

Fig. 1 Effect of plasmid quantity and pH of the HN buffer on lentivirus packaging efficiency(×100)

I. Lentivirus packaging efficiency when the total amount of the four plasmids was 25  $\mu\text{g}$  in each 90 mm petri dish,the titer was  $8.0\times10^4$  TU/mL; II. The double amount of plasmids,the titer was  $9.5\times10^5$  TU/mL; A. HN buffer's pH=6.94,titer was  $5.9\times10^3$  TU/mL; B. pH=7.00,titer was  $4.4\times10^6$  TU/mL; C. pH=7.05,titer was  $7.5\times10^7$  TU/mL; D. pH=7.11,titer was  $9.0\times10^5$  TU/mL; E. pH=7.16,titer was  $8.6\times10^4$  TU/mL; F. pH=7.24,titer was  $7.8\times10^2$  TU/mL

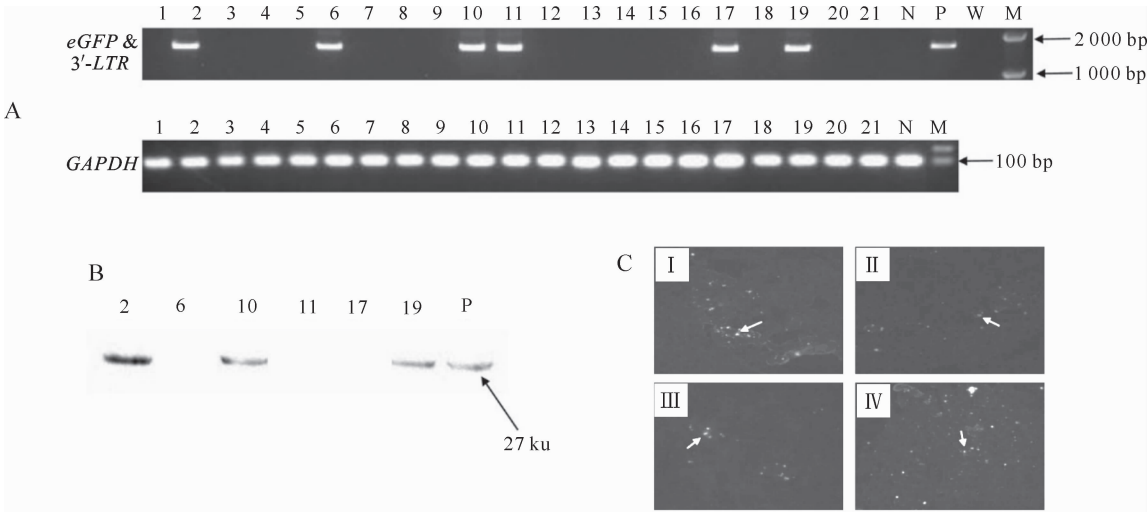


图 2 嵌合体转基因鸡的 PCR、Western blot 分析及冰冻切片检测结果

A. 嵌合体转基因鸡的 PCR 分析;N. 非转基因鸡(阴性对照);P. 阳性对照;W. 水对照;M. Trans2K Plus Marker  
B. 嵌合体转基因鸡的 Western Blot 分析;P. 阳性对照(目标条带 27 ku)。1~21. 鸡只编号  
C. 嵌合体转基因鸡的组织冰冻切片检测: I—IV 分别为皮肤(2 号)、肌肉(2 号)、肝脏(10 号)和眼球(19 号)(×200)

Fig. 2 PCR, Western blot and tissues freezing section analysis of chimera chicken

A. PCR analysis of chimera chicken;N. Non-transgenic chicken (negative control);  
P. Positive control;W. Water control;M. Trans2K Plus Marker  
B. Western blot analysis of chimera chicken;P. eGFP positive control (target band 27 ku). 1—21. The numbers of chicken  
C. Tissues freezing section analysis of chimera chicken: I—IV were skin (2 #), muscle (2 #), liver (10 #) and eyeball (19 #) respectively (×200)

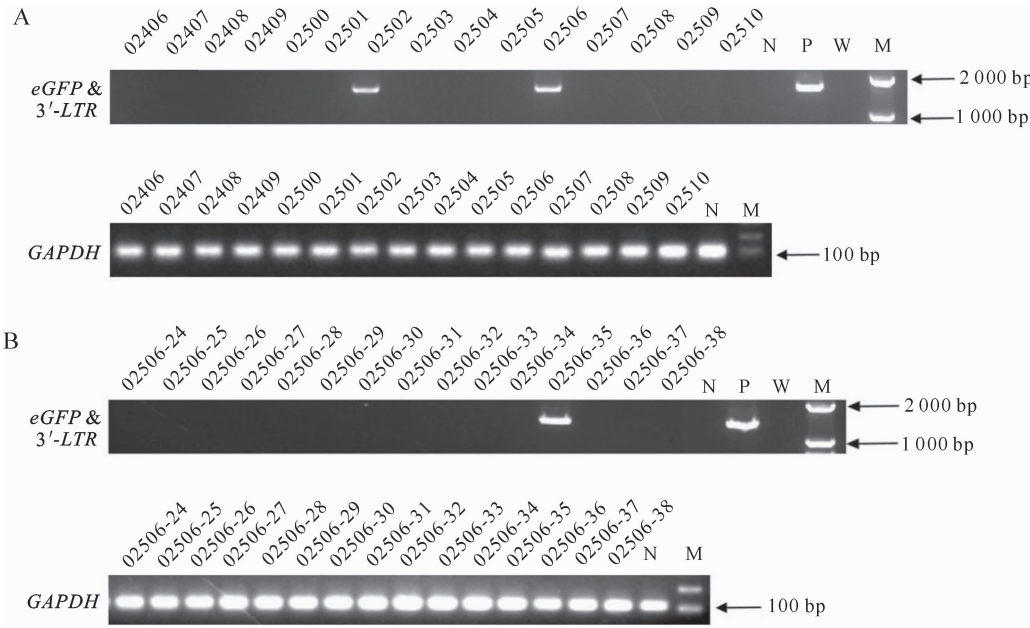


图 3 睾丸注射生产的 G<sub>0</sub> 和 G<sub>1</sub> 代鸡的 PCR 检测

A. G<sub>0</sub> 代鸡精液的 PCR 检测;N. 非转基因鸡(阴性对照);P. 阳性对照;W. 水对照;M. Trans2K Plus Marker;02406—02510 为鸡只编号

B. 02506 号公鸡 G<sub>1</sub> 代的 PCR 检测(部分结果);02506-24—02506-38 为鸡只编号

Fig. 3 PCR detection of G<sub>0</sub> and G<sub>1</sub> chicken generated by testis-injection

A. PCR analysis of testis-injected chicken semen;N. Non-transgenic chicken (negative control);P. Positive control;  
W. Water control;M. Trans2K Plus Marker;02406—02510 are the numbers of chicken

B. PCR detection of G<sub>1</sub> offspring of 02506 chicken (partial results);02506-24—02506-38 are the numbers of chicken

3 讨 论

近年来,有很多关于病毒载体通过胚胎注射法成功生产转基因鸡的报道<sup>[14-18]</sup>,说明慢病毒能够感染活体内具有分裂和分化能力的细胞。在此基础上,本研究着重探索了通过睾丸注射慢病毒来生产转基因鸡的方法。

应用磷酸钙沉淀法将慢病毒载体 4 质粒系统共转染入 293T 细胞进行包装,是慢病毒包装的常用方法,但细胞转染过程中的质粒总量和 HN Buffer 的 pH 值会严重影响到慢病毒的包装效率。本研究发现,90 mm 培养皿中质粒总量为 50 μg、HN Buffer 的 pH 值为 7.05 时收获的慢病毒滴度最高。将包装好的慢病毒注射到鸡受精蛋胚胎中,发现孵化得到的鸡雏中 28.3% 的个体能检测到外源基因,14.3% 的个体能够检测到外源蛋白表达,说明利用慢病毒进行胚胎注射可以获得较高的转基因效率<sup>[14-18]</sup>。

慢病毒的胚胎注射法虽然已被证明是生产转基因鸡的高效可行办法<sup>[14-18]</sup>,但这种方法获得的嵌合体其生殖细胞的转染率却并不稳定。如果能够将慢病毒直接注射到公鸡的睾丸中,使其在睾丸发育的

早期就能对精原干细胞的基因组进行修饰,就可以提高后代中携带外源基因的比例。本研究通过对 15 只 8 日龄的小公鸡进行睾丸注射,发现性成熟后有 2 只公鸡(13.3%)的精液呈阳性,其中从 1 只公鸡的 38 只后代中筛选到 1 只(2.6%)携带外源基因,略低于 McGrew 等<sup>[14]</sup>报道的胚胎注射获得 G<sub>0</sub> 代嵌合体到 G<sub>1</sub> 代的传递效率(4%~45%),但本研究结果初步证明,通过在小公鸡睾丸内注射慢病毒可以将外源基因整合到精原干细胞,并可通过精子将外源基因传递到下一代中。另外,利用睾丸注射生产转基因动物可以缩短研究周期,减少转基因个体的筛选数量。如果能够通过进一步研究提高慢病毒对精原干细胞的感染效率并增加后代中携带外源基因的个体比率,利用睾丸注射慢病毒的方法必将对转基因鸡生产的研究起到促进作用。

[参考文献]

[1] Jenner H L. Transgenesis and yield: What are our targets? [J]. Trends Biotechnol, 2003, 21: 190-192.

[2] Cogburn L A, Porter T E, Duclos M J, et al. Functional genomics of the chicken-a model organism [J]. Poult Sci, 2007, 86: 2059-2094.

[3] 李碧春,孙国波,孙怀昌,等. 体内外精原干细胞介导大群生产

- 转基因鸡 [J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2008, 38(7): 626-634.
- Li B C, Sun G B, Sun H C, et al. Efficient generation of transgenic chicken using the spermatogonial stem cells *in vivo* and *ex vivo* transfection [J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2008, 38(7): 626-634. (in Chinese)
- [4] Sato Y, Kasai T, Nakagawa S, et al. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos [J]. Dev Biol, 2007, 305: 616-624.
- [5] Tseng C L, Peng C L, Huang J Y, et al. Gelatin nanoparticles as gene carriers for transgenic chicken applications [J]. J Biomater Appl, 2013, 27: 1055-1065.
- [6] Lu Y, Lin C, Wang X. *PiggyBac* transgenic strategies in the developing chicken spinal cord [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37: e141.
- [7] Liu X, Li N, Hu X, et al. Efficient production of transgenic chickens based on *piggyBac* [J]. Transgenic Res, 2013, 22: 417-423.
- [8] Park T S, Han J Y. *PiggyBac* transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109: 9337-9341.
- [9] 刘 勤, 张晋宇, 刘露露, 等. 慢病毒载体介导的增强型绿色荧光蛋白转基因小鼠的建立 [J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10): 885-889.
- Liu Q, Zhang J Y, Liu L L, et al. Production of eGFP transgenic mice by lentiviral transgenesis [J]. Journal of Third Military Medical University, 2008, 30(10): 885-889. (in Chinese)
- [10] Koo B C, Kwon M S, Choi B R, et al. Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector [J]. FASEB J, 2006, 20: 2251-2260.
- [11] Dieckhoff B, Petersen B, Kues W A, et al. Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs [J]. Xenotransplantation, 2008, 15: 36-45.
- [12] Cabot R A, Kuhholzer B, Chan A W, et al. Transgenic pigs produced using *in vitro* matured oocytes infected with a retroviral vector [J]. Anim Biotechnol, 2001, 12: 205-214.
- [13] Brink M F, Bishop M D, Pieper F R. Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk [J]. Theriogenology, 2000, 53: 139-148.
- [14] McGrew M J, Sherman A, Ellard F M, et al. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors [J]. EMBO Rep, 2004, 5: 728-733.
- [15] Chapman S C, Lawson A, Macarthur W C, et al. Ubiquitous *GFP* expression in transgenic chickens using a lentiviral vector [J]. Development, 2005, 132: 935-940.
- [16] Motono M, Yamada Y, Hattori Y, et al. Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector [J]. J Biosci Bioeng, 2010, 109: 315-321.
- [17] Scott B B, Lois C. Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 16443-16447.
- [18] Kwon M S, Koo B C, Roh J Y, et al. Production of transgenic chickens expressing a tetracycline-inducible *GFP* gene [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 410: 890-894.