

动物转基因技术在转基因牛中的研究进展

张兆顺¹, 成功², 替林森²

(¹咸阳职业技术学院生物科技系, 陕西咸阳 712000; ²西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100)

摘要:本研究综述了目前应用于转基因牛中原核显微注射法、体细胞克隆法、病毒载体法等传统动物转基因技术以及具有应用前景的ZFN技术、TALEN技术和iPS技术等。概述了20年来国内外转基因牛重要的研究进展, 并就目前转基因牛在乳腺生物反应器、抗病育种、品种改良主要3个方面的应用进行了介绍。在此基础上, 就目前转基因牛育种中存在的问题及今后发展趋势进行了讨论, 以促进转基因牛技术的发展。

关键词: 动物转基因技术; 转基因牛; 乳腺生物反应器; 品种改良

中图分类号: S813.3

文献标志码: A

论文编号: 2012-0684

The Advance in Research on Transgenic Animal Technical Application to the Transgenic Cattle

Zhang Zhaoshun¹, Cheng Gong², Zan Linsen²

(¹Department of Biology Science & Technology, Xianyang Vocational Technical College, Xianyang Shannxi 712000;

²College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100)

Abstract: The article summarized the transgenic animal technology used in transgenic cattle research, such as microinjection, somatic cell nuclear transfer, virus and the more prospects technology such as ZFN, TALEN and iPS. Reviewed the progress of transgenic cattle research in Domestic and foreign, and the application of transgenic cattle research in mammary bioreactor, breeding for disease resistance and breeding improvement. Finally, transgenic cattle breeding problems and future development trends were discussed to improve the research of transgenic cattle.

Key words: transgenic animal technology; transgenic cattle; mammary bioreactor; breeding improvement

0 引言

转基因技术兴起于20世纪60年代, 经历了50年的发展, 目前已经在基因功能研究、动物新品种培育、功能性重组蛋白生产等方面发挥重要的作用。1980年, Gordon等^[1]通过显微注射的方法得到了世界首例转疱疹病毒胸苷激酶的转基因小鼠, 而随后“超级小鼠”的出现^[2], 引起了人们极大的关注, 也充分认识到了通过动物转基因技术在动物品种改良方面的巨大的潜在应用价值。1990年, Pharming公司成功培育了世界上首例转人乳铁蛋白转基因牛, 为今后转基因牛的研究开创了先河^[3]。1999年, 中国科学家曾益涛院士通过显微注射法获得了中国首例转人血清白蛋白转基因牛,

为中国转基因牛研究奠定基础。随着体细胞克隆技术、锌指核酸酶等技术的出现对转基因技术的改进, 转基因牛研究在乳腺生物反应器、抗病育种、品种改良等方面也得到了飞速的发展, 极大的加速了转基因牛新品种培育步伐^[4]。本综述就目前动物转基因技术发展、国内外转基因牛研究进展和转基因牛应用领域进行综述, 探究目前转基因牛育种中所存在的问题, 为今后转基因牛研究提供一定的借鉴。

1 转基因牛研究进展

1.1 主要动物转基因技术概况

1.1.1 原核显微注射法(Pronuclei microinjection)原核显微注射法是最早制备转基因牛的方法^[5] 这种方法

基金项目: 国家转基因重大专项“高产转基因肉牛新品种培育”(2011ZX08007-002)。

第一作者简介: 张兆顺, 男, 1964年出生, 陕西咸阳人, 副教授, 本科, 主要从事畜牧兽医专业教学与科研工作。通信地址: 712000 陕西省西咸新区沣西新城统一大道1号 咸阳职业技术学院生物科技系, E-mail: zhaoshun1964@163.com。

通讯作者: 替林森, 男, 1963年出生, 陕西扶风人, 教授, 博士, 主要从事肉牛奶牛遗传改良及产业化开发。通信地址: 712100 陕西省杨凌示范区西农路22号 西北农林科技大学动物科技学院, Tel: 029-87091923, Email: zanls@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2012-03-02, 修回日期: 2012-06-21。

是通过显微注射将外源基因直接注入动物受精卵雄原核中,然后将受精卵移植到受体动物子宫中获得转基因动物。该方法至20世纪80年代成功应用以来,技术没有太大改进,因其制备转基因家畜研究中存在着成功率低(约3%)、技术难度较大、成本较高等不足逐渐被其他转基因技术所取代。由于克隆鼠难度很大,因此,目前转基因小鼠仍采用显微注射法获得。

1.1.2 体细胞克隆法 1997年克隆羊“多莉”的诞生,使体细胞克隆技术和转基因技术迅速结合,在很大程度上提高了转基因家畜的成功率,促进了转基因家畜的发展。体细胞克隆技术及将体细胞如成纤维细胞、乳腺细胞等与去核卵母细胞融合并去分化成囊胚进而通过胚胎移植获得克隆动物。体细胞克隆技术的出现,使对大动物进行更多的基因修饰成为可能。可以通过体外对体细胞进行基因修饰如转入基因、基因敲除等对经过修饰的细胞进行鉴定并通过核移植获得转基因或者基因敲除动物。相比传统显微注射方法,转基因技术结合体细胞克隆技术大大提高了转基因动物成功率,出生的动物几乎100%是转基因动物,这在很大程度上节约了转基因家畜生产成本。近些年来报道的转基因家畜多数都是通过体细胞克隆技术而获得。目前,由于对于克隆过程体细胞重编程机理尚不清楚,体细胞克隆技术普遍存在着克隆效率低、克隆动物发育异常、存活率低等不足,从重编程机理、表观遗传修饰等方面研究提高克隆效率是目前研究的一个热点^[5-6]。

1.1.3 病毒载体法 病毒载体法介导转基因动物研究中目前使用较多的病毒为慢病毒(Lentivirus)、逆转录病毒(Retrovirus)。病毒作为载体介导转基因具有感染效率高、整合效率高等优点。同时,病毒介导转基因不需原核显微注射,可以直接将包装有外源基因的病毒注射到受精卵卵周隙即可,转基因效率相比原核显微注射法总体上提高了约50倍^[7]。但是相比质粒载体,病毒载体所存在的高整合率、对转基因动物自身基因(原癌基因、抑癌基因、相邻基因启动子)影响和转基因食品安全等问题需要进一步的深入研究并改进^[8]。

1.1.4 ZFN 和 TALEN 介导法 锌指核糖核酸酶(Zinc-fingers nuclease, ZFN)和TALEN (Transcription activator-like (TAL) effector nucleases, TALEN)介导的基因组靶向修饰技术的出现是对传统转基因技术的变革。二者分别通过锌指核酸蛋白(识别3个碱基)和单胞菌属TAL蛋白(识别1个碱基)对DNA序列特异性识别的特性,构建一对由DNA识别域和一个非特异性核酸内切酶单体构成。当DNA识别域与靶序列DNA特异性结合后,核酸内切酶形成具有活性的二聚体形

式,进而对靶序列DNA切割,形成DNA双链断裂(Double strand break, DSB)。DNA DSB的形成激活体内非同源末端连接途径(Non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组途径(Homologous recombination, HR)进而对DSB进行修复。这2种途径的激活可以实现通过ZFN和TALEN介导的内源基因的敲除或外源基因的定点敲入。相比ZFN技术,新出现的TALEN技术具有更广泛的DNA序列识别特性,几乎不受DNA序列的影响,并且具有更高的识别的特异性^[9-10]。Hauschilda等^[11]利用ZFN技术,首次在猪上实现了 α -1,3半乳糖苷转移酶基因双等位基因的敲除,敲除效率最高达到1%。与传统基因打靶的方法相比较,ZFN和TALEN技术的应用,极大的提高了对家畜进行基因靶向修饰的效率(10^{-3} & 10^{-4}),在今后转基因动物研究具有重要的应用前景。

1.1.5 诱导性多能干细胞介导法(Induced Pluripotent Stem Cells, iPS) iPS细胞即分化细胞经过重编程因子(如OCT3/4、SOX2、c-Myc、Klf4等)体外诱导去分化而获得的一种多能干细胞。2006年Takahashi等^[12]首次报道成功诱导获得小鼠iPS细胞后,先后有人、猪、猴子、绵羊、牛等iPS细胞诱导成功^[13-15],并且已经有猪、绵羊诱导分化得到的iPS细胞获得了种系嵌合体动物,证明该细胞具有全能型^[15-16]。由于家畜的ESCs细胞一直没有分离成功,限制了家畜转基因研究特别是基因打靶的研究。而家畜iPS的出现,可以在一定程度上加快转基因动物研究。2011年,Han等^[14]利用牛6个转录因子(POU5F1、SOX2、KLF4、MYC、LIN28和NANOG)首次诱导胎儿成纤维细胞获得了牛iPS细胞,畸胎瘤实验和SCNT实验表明:iPS细胞可分化为3个胚层并具有体外形成囊胚的能力。由于iPS细胞具有全能性,可以直接通过内细胞团注射获得转基因牛种系嵌合体动物,进一步杂交而获得到纯合转基因动物。此外,将iPS细胞与SCNT技术结合起来进行转基因动物研究也具有很大的应用前景。目前,如何提高家畜iPS细胞形成效率,是亟待解决的问题,而家畜iPS细胞通过SCNT能否获得健康存活的动物也有待进一步研究。

1.2 国内外转基因牛研究进展

近20年来,随着转基因技术的发展,在众多科学家和畜牧兽医科技工作者的共同努力下,转基因牛研究取得了很多重要的成果。主要成果见表1-2。

2 转基因牛的主要应用领域

2.1 乳腺生物反应器

利用动物乳腺作为生物反应器表达外源蛋白一直

表1 国外转基因牛重要的研究进展

年份	内容	方法
1990	荷兰Pharming公司 ^[1] 获得了世界上第一头名为“Herman”的人乳铁蛋白转基因牛	Microinjection
1998	日本的科学家Cibelli等 ^[17] 利用胎儿成纤维细胞为核供体,也获得了携带 β -galactosidase的转基因克隆牛	SCNT
2002	Kuroiwa等 ^[18] 人免疫球蛋白转微染色体转基因牛	SCNT
2003	Brophy等 ^[19] 在牛乳中过表达 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白,使乳汁中 β -酪蛋白最高提高了20%, κ -酪蛋白提高了2倍	SCNT
2004	Kruoiwa等 ^[20] 通过连续基因打靶技术获得免疫球蛋白 μ 和PRNP双基因敲牛	Gene targeting/SCNT
2005	Wall等 ^[21] 获得转人溶葡萄球菌酶的转基因克隆奶牛	SCNT
2009	Kruoiwa等 ^[22] 将牛内源IgH重链敲除并通过微染色体转入人IgH和IgK	Gene targeting/SCNT
2011	Tessanne等 ^[23] 通过慢病毒介导的shRNA获得抑肌素基因(MSTN)Knockdown牛	lentivirus/SCNT

表2 国内转基因牛的研究进展

年份	内容	方法
1999	上海医学遗传研究所曾益涓院士等首次获得国内第一头带有人血清白蛋白基因的转基因牛	Microinjection
2002	陈大元院士课题组 ^[24] 获得国内首例体细胞克隆奶牛	SCNT
2003	中国农业大学李宁院士课题组 ^[25] 获得国内首例双标记基因转基因克隆牛	SCNT
2004—2011	中国农业大学李宁院士课题组 ^[25-26] 获得了乳腺特异表达人乳铁蛋白、人 α 乳清蛋白和人溶菌酶、人岩藻糖、CD20抗体转基因牛和PRNP基因敲除牛	SCNT
2009	西北农林科技大学张涌教授课题组 ^[27] 获得转人防御素、人溶菌酶转基因牛	SCNT
2010	广西大学石德顺教授课题组 ^[28] 分别利用慢病毒介导和体细胞克隆技术获得转GFP水牛	lentivirus/SCNT
2010	内蒙古大学李光鹏教授课题组 ^[29] 获得转Fat-1基因富含多不饱和脂肪酸转基因牛	SCNT
2011	李宁院士课题组 ^[30] 获得锌指核酸酶技术介导的BLG和MSTN基因敲除牛	SCNT

是转基因动物研究热点。动物乳腺生物反应器具有重组蛋白产量高、成本低、产物易于纯化、重组蛋白具有天然活性等优点。利用乳腺生物反应器生产药用和保健蛋白具有很高的市场价值,也是目前在转基因动物研究方面研究最多,进展最快的研究方向。乳腺生物反应器目前主要应用于三个方面:一是生产保健蛋白。1990年,Pharming公司获得了世界上第一头名为“Herman”的人乳铁蛋白转基因牛,人乳铁蛋白对于铁、锌的吸收,增强人体免疫力等具有重要作用。在随后的十几年中,分别有人溶菌酶、人胆盐刺激酯酶、人乳清白蛋白等多种具有保健功能的转基因牛等乳腺生物反应器转基因动物成功报道,并且有些已经进入临床试验,部分已经进入了产业化生产;二是生产药用蛋白。与传统制药相比较,乳腺生物反应器生产药物蛋白大大降低了生产成本。如传统的提取工艺生产1g药用蛋白,成本约需800~5000美元;而转基因动物只需0.02~0.5美元,预计到2020年,全世界90%以上的药物都将通过转基因动物生产。2008年,中国农业大学李宁院士课题组获得世界上首例转CD20抗体转基因牛,CD20抗体作为B淋巴细胞瘤等恶性肿瘤细胞表面

特异性抗体可以作为“分子导弹”携带药物实现特异性的细胞杀死,极大的提高了肿瘤治疗的有效性并降低副作用。CD20抗体也是美国FDA批准的第一个抗肿瘤单克隆抗体药物;三是生产特殊用途蛋白。2007年Pharm Athene公司获得了重组人丁酰胆碱转基因山羊,该蛋白作为神经毒剂的解毒药,可以保护人体不受神经毒剂的侵扰,该重组蛋白在2009年已经完成了一期临床试验^[31]。2003年和2010年美国NEXIA公司和怀俄明大学分别成功获得了乳腺特异表达蛛丝蛋白的转基因山羊,该蛋白被称为“生物钢”,在将来医疗和军工行业具有很大的应用前景。2006年和2009年欧盟药监局(European Medicines Agency, EMEA)和美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)先后批准了GTC公司转基因山羊乳腺生产的重组人抗凝血酶(α -antithrombin, ATrn)上市(药品名ATryn[®]),这是世界上首例乳腺生产的药物获得批准上市,预计年收益7.5亿美元。这标志着转基因药物真正迈入了产业化阶段,这也必将加速利用乳腺生物反应器生产重组蛋白的研发与应用。利用牛乳腺生物生产重组蛋白因其具有重组蛋白活性高、易于纯化,重组蛋白对动

物本身影响小、重组蛋白涉及到安全性顾虑小等优点,是今后转基因牛研究进展的一个热点,也是发展最快的一个研究应用领域。

2.2 抗病育种

动物抗病一直是转基因动物研究的一个热点。牛乳腺炎一直是畜牧业亟待解决的一个问题,据世界奶业协会统计,牛隐性乳房炎的发病率高达50%左右,平均降低奶量10%~15%,每年会给美国奶业带来20亿美元的损失。Wall等^[21]利用转基因的方法得到了牛乳腺特异表达溶葡萄球菌酶(Lysostaphin)的转基因牛,转基因牛乳房进行金黄色葡萄球菌培养物注射实验发现,与非转基因牛相比较,转基因牛乳房抗菌能力提高了5倍。同样,乳中表达L-氨基酸氧化酶(L-amino acid oxidase, LAO)、防御素(Defencin)、溶菌酶等基因都可以一定程度的提高牛抵御乳房炎的能力,为畜牧业中对于牛乳房炎的防治提供一个可行的路线。利用转基因方法制备抗疯牛病转基因牛也是目前牛抗病育种研究的一个热点。2006年,Richt等^[22]利用基因打靶的方法将引起疯牛病的PRNP基因敲除得到抗疯牛病的牛,各项生理指标检测发现,在大脑组织、外周血淋巴细胞及耳组织成纤维细胞中均没有检测到致病蛋白的存在。体外实验表明,脑组织的匀浆物没有检测到疯牛病致病因子的增殖。此外,RNA干扰技术结合体细胞克隆技术,针对引起牛布病、腹泻的布鲁氏菌和牛病毒性腹泻病毒设计干扰RNA制备转基因牛可以一定程度上增强牛抵御该病毒性疾病的能力。

2.3 品种改良

牛品种改良主要涉及到牛的产肉量(包括肉质)和产奶量(包括牛乳品质)等。通过转基因技术进行品种改良,可以极大的加速动物品种改良进程,同时品种改良的目标性更强。因此,利用转基因技术进行品种改良也是目前转基因牛研究的一个热点。被称为“美臀基因”的抑肌素基因(Myostatin, MSTN)是一个肌肉生长抑制因子,小鼠上研究发现该基因的敲除对于增加产肉量具有重要作用^[23]。2011年,中国农业大学李宁院士课题组首次获得了MSTN双等位基因敲除牛,该牛臀部肌肉明显比对照普通牛增加。同样,作为MSTN拮抗蛋白的卵泡抑素(Follistatin, FST)转基因小鼠和鲮鱼肌肉量明显增加,这提示该基因可能作为产肉量相关的重要候选基因^[24]。增加产肉量的同时如何改善肉品质也是育种中关注的一个点。2010年,内蒙古大学李光鹏教授课题组获得了转线虫Fat-1转基因牛,经检测肌肉和乳汁中n-3/n-6多不饱和脂肪酸比值得到明显提高^[25]。食用这种富含n-3多不饱和脂肪酸

的牛肉对于改善人体不饱和脂肪酸组成,预防心脑血管疾病等具有重要作用。此外,人磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)、脂肪型脂肪酸结合蛋白(Fatty acid binding protein4, A-FABP4)等与脂肪合成相关的重要基因研究发现对于增加肌内脂肪含量有重要作用^[26],因此,通过在肌肉中过表达上述基因对于改善牛肉嫩度具有重要应用前景。近年来,在牛奶品质改良方面也取得了一定的进展。2003年,Brophy等^[19]首次培育的转基因牛牛奶中 β -酪蛋白的含量提高了20%, κ -酪蛋白的含量也增加了2倍,很大程度上提高了牛乳乳蛋白含量,增加了牛乳的营养价值。2011年,中国农业大学李宁院士课题组首次获得了牛乳中 β -乳球蛋白基因敲除牛,该基因的敲除牛乳更适合于对 β -乳球蛋白过敏的消费人群^[20]。同样,通过转基因的方法在乳汁中表达半乳糖苷酶从而降低牛乳汁中乳糖可以很好的缓解部分人群的乳糖不耐症。通过动物转基因技术进行品种改良具有重要的应用前景,也是将来转基因牛育种的一个重要发展方向。

3 讨论

随着动物转基因技术的发展,转基因牛研究也取得了许多重要的成果。但是,目前转基因牛研究仍有许多问题亟待解决。一是体细胞克隆效率有待提高。目前,转基因牛研究中主要是采用体细胞克隆技术,但是目前体细胞克隆技术存在转基因效率低、克隆牛死亡率高、成本较高等不足,上述问题的解决也许能从根本上加快转基因牛研究的发展。Inoue等^[26]研究发现,抑制小鼠X染色体上Xist基因,使克隆小鼠出生率提高了8~9倍。这提示在体细胞在重编程过程中表观修饰的变化可能很大程度上影响着体细胞克隆效率。同时,近年来iPS细胞体外诱导去分化机理研究地深入将促进并明晰体细胞重编程过程机理,为今后提高体细胞克隆效率提供一定的借鉴;二是转基因研究逐渐向精细化发展。近年来,随着动物转基因技术的发展,转基因研究由过去随机插入逐渐向定点整合发展。外源基因的随机插入,可能出现多拷贝整合、外源基因表达沉默、干扰动物自身基因表达、转基因可控性较差等问题,这些问题是需要转基因研究中避免的。而随着最近几年ZFN和TALEN技术的出现,使得转基因家畜的靶向基因修饰成为可能,也提高了基因打靶的效率。利用该技术可以实现对家畜进行精确的基因敲除和定点敲入,很大程度上提高了转基因的可控性,也提高了转基因动物的成功率,这也是今后转基因育种技术的发展方向。目前,进一步提高ZFN和TALEN识

别的特异性,避免“脱靶效应”的出现是该技术需要解决的问题;三是转基因动物的安全性有待提高。转基因动物安全性包括两个方面:第一,动物自身安全,从动物福利角度考虑转入外源基因不应干扰动物自身生理代谢,尽可能降低外源基因转入对动物产生的潜在危害,而实现外源基因的定点敲入对于提高动物自身安全具有一定作用;第二,转基因动物食品的安全性也是转基因育种需要考虑的问题。转基因育种更多的是从“育种”角度出发,因此在制备转基因动物时我们应从长远考虑,尽可能的提高转基因动物的安全性(包括转基因动物性食品),如标记基因(新霉素基因、绿色荧光蛋白)等非功能基因的去除等。同时,加强转基因牛后期检测,如外源基因的表达及稳定性,基因漂移分析,转基因动物自身生理代谢水平、营养成分分析、毒理分析等进一步对转基因动物进行安全性进行评价,提高转基因动物的实际应用价值。

4 结论

随着国家转基因动物育种重大专项的提出,中国转基因牛育种也取得了重要的研究进展,出生了许多有重要育种价值的转基因牛。尽管目前对于转基因动物安全性存在着很大的争议,但相信随着转基因技术的不断更新,转基因动物育种不断发展,上述顾虑将逐渐被消除。在美国,转植酸酶的“环保猪(EnviroPig™)”和转生长激素的转基因鲑鱼(AquaAdvantage® Salmon)已经经过一系列严格地审批后有望近1—2年进入市场。如果最终得到美国FDA批准,这将使转基因动物性食品首次进入人们餐桌,也必将在很大程度上促进今后转基因牛的研究。

参考文献

- [1] Gordon J W, Scangos G A, Plotkin D J, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980, 77 (12): 7380-7384.
- [2] Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein - growth hormone fusion genes[J]. *Nature*, 1982, 300: 611-615.
- [3] Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone W, et al. Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production[J]. *Nature biotechnology*, 1991, 9(9): 844-847.
- [4] 黄淑敏, 黄英, 陈美玉, 等. 转人血清白蛋白基因试管牛的研究[J]. *遗传学报*, 2000, 27(7): 573-579.
- [5] Whitworth K M, Prather S. Somatic cell nuclear transfer efficiency: How can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming?[J]. *Molecular reproduction and development*, 2010, 77(12): 1001-1015.
- [6] Wang L J, Zhang H, Wang Y S, et al. Scriptaid Improves *In Vitro* Development and Nuclear Reprogramming of Somatic Cell Nuclear Transfer Bovine Embryos[J]. *Cellular Reprogramming*, 2011, 13(5): 431-439.
- [7] Reichenbach M, Lim T, Reichenbach H D, et al. Germ-line transmission of lentiviral PGK-EGFP integrants in transgenic cattle: new perspectives for experimental embryology[J]. *Transgenic research*, 2010, 19(4): 549-556.
- [8] Mingozzi F, High K A. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges[J]. *Nature reviews genetics*, 2011, 12(5): 341-355.
- [9] Smith F, Rouet P, Romanienko P J, et al. Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells[J]. *Nucleic acids research*, 1995, 23(24): 5012-5019.
- [10] De Francesco L. Move over zFNs[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 681-684.
- [11] Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, et al. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(29): 12013.
- [12] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [13] Wu Z, Chen J, Ren J, et al. Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2009, 1(1): 46-54.
- [14] Han X, Han J, Ding F, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from bovine embryonic fibroblast cells[J]. *Cell research*, 2011, 21(10): 1509-1512.
- [15] Sartori C, DiDomenico A I, Thomson A J, et al. Ovine-Induced Pluripotent Stem Cells Can Contribute to Chimeric Lambs[J]. *Cellular Reprogramming*, 2012, 14(1): 8-19.
- [16] West F D, Uhl E W, Liu Y, et al. Brief Report: Chimeric Pigs Produced from Induced Pluripotent Stem Cells Demonstrate Germline Transmission and No Evidence of Tumor Formation in Young Pigs[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(10): 1640-1643.
- [17] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts[J]. *Science*, 1998, 280: 1256-1258.
- [18] Kuroiwa Y, Kasinathan P, Choi Y J, et al. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin[J]. *Nature biotechnology*, 2002, 20(9): 889-894.
- [19] Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, et al. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of bold beta-casein and kappa-casein[J]. *Nature biotechnology*, 2003, 21: 157-162.
- [20] Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H, et al. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-μ and prion protein in cattle [J]. *Nature genetics*, 2004, 36(7): 775-780.
- [21] Wall R J, Powell A M, Paape M J, et al. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection[J]. *Nature biotechnology*, 2005, 23(4): 445-451.
- [22] Kuroiwa Y, Kasinathan, Sathiyascelan T, et al. Antigen-specific human polyclonal antibodies from hyperimmunized cattle[J].

- Nature biotechnology,2009,27(2):173-181.
- [23] Tessanne K, Golding M C, Long C R, et al. Production of transgenic calves expressing an shRNA targeting myostatin[J]. Molecular reproduction and development,2012,79(3):176-185.
- [24] 陈大元,李劲松,韩之明,等.体细胞克隆牛:供体细胞和受体的影响[J].科学通报,2002,48(8):768-773.
- [25] 龚国春.利用体细胞核移植技术生产转基因牛[D].中国农业大学博士论文,2005.
- [26] 王少华.利用无启动子打靶载体研制肌蛋白基因敲除奶[D].北京:中国农业大学博士论文,2009.
- [27] Ma J J, Wang Y S, He X N, et al. Transfection of Bovine Fetal Fibroblasts with β -defensin (hBD3) Gene and Construction of Transgenic Cloned Embryos[J].Journal of Agricultural Biotechnology,2010,18(4):707-712.
- [28] Huang B, Cui K, Li T, et al. Generation of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Transgenic Chimeric and Nuclear Transfer Embryos Using Embryonic Germ - Like Cells Expressing Enhanced Green Fluorescent Protein[J].Reproduction in Domestic Animals,2010,45(1):103-108.
- [29] Wu X, Ouyang H, Duan B, et al. Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids[J].Transgenic research,2011: 1-7.
- [30] Yu S, Luo J, Song Z, et al. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (*BLG*) gene via zinc-finger nucleases in cattle[J]. Cell research,2011,21:1638-1640.
- [31] Huang Y J, Huang Y, Baldassarre H, et al. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning[J].Proceedings of the National Academy of Sciences,2007,104(34):13603-13608.
- [32] Richt J A, Kasinathan P, Hamir A N, et al. Production of cattle lacking prion protein[J].Nature biotechnology,2006,25(1):132-138.
- [33] McPherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member[J]. Nature,1997,387:83-90.
- [34] Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, et al. Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice[J]. The FASEB Journal,2008,22(2):477-487.
- [35] Franckhauser S, Muñoz S, Pujol A, et al. Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance[J].Diabetes,2002,51(3): 624-630.
- [36] Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, et al. Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer[J].Science,2010,330(6003):496-499.

作者: [张兆顺](#), [成功](#), [咎林森](#), [Zhang Zhaoshun](#), [Cheng Gong](#), [Zan Linsen](#)
作者单位: [张兆顺, Zhang Zhaoshun\(咸阳职业技术学院生物科技系, 陕西咸阳, 712000\)](#), [成功, 咎林森](#), [Cheng Gong, Zan Linsen\(西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌, 712100\)](#)
刊名: [中国农学通报](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名: [Chinese Agricultural Science Bulletin](#)
年, 卷(期): 2012, 28(20)

参考文献(36条)

1. [Gordon J W;Scangos G A;Plotkin D J](#) [Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA](#) 1980(12)
2. [Palmiter R D;Brinster R L;Hammer R E](#) [Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein growth hormone fusion genes](#) 1 98
3. [Krimpenfort P;Rademakers A;Eyestone W](#) [Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production](#) 1991(09)
4. 黄淑帧;黄英;陈美珏 [转人血清白蛋白基因试管牛的研究\[期刊论文\]-遗传学报](#) 2000(07)
5. [Whitworth K M;Prather S](#) [Somatic cell nuclear transfer efficiency:How can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming](#) 2010(12)
6. [Wang L J;Zhang H;Wang Y S](#) [Scriptaid Improves In Vitro Development and Nuclear Reprogramming of Somatic Cell Nuclear Transfer Bovine Embryos](#) 2011(05)
7. [Reichenbach M;Lim T;Reichenbach H D](#) [Germ-line transmission of lentiviral PGK-EGFP integrants in transgenic cattle:new perspectives for experimental embryology](#) 20 1(04)
8. [Mingozzi F;High K A](#) [Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV:progress and challenges](#) 2011(05)
9. [Smih F;Rouet P;Romanienko P J](#) [Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells\[外文期刊\]](#) 1995(24)
10. [De Francesco L](#) [Move over zFNs](#) 2011
11. [Hauschild J;Petersen B;Santiago Y](#) [Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases](#) 2011(29)
12. [Takahashi K;Yamanaka S](#) [Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors\[外文期刊\]](#) 2006(04)
13. [Wu Z;Chen J;Ren J](#) [Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system](#) 2009(01)
14. [Han X;Han J;Ding F](#) [Generation of induced pluripotent stem cells from bovine embryonic fibroblast cells\[期刊论文\]-Cell Research](#) 2011(10)
15. [Sartori C;DiDomenico A I;Thomson A J](#) [Ovine-Induced Pluripotent Stem Cells Can Contribute to Chimeric Lambs](#) 2012(01)
16. [West F D;Uhl E W;Liu Y](#) [Brief Report:Chimeric Pigs Produced from Induced Pluripotent Stem Cells Demonstrate Germline Transmission and No Evidence of Tumor Formation in Young Pigs](#) 2011(10)
17. [Cibelli J B;Stice S L;Golueke P J](#) [Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal](#)

18. Kuroiwa Y;Kasinathan P;Choi Y J Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin[外文期刊] 2002(09)
19. Brophy B;Smolenski G;Wheeler T Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of bold beta-casein and kappa-casein 2003
20. Kuroiwa Y;Kasinathan p;Matsushita H Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin- μ and prion protein in cattle[外文期刊] 2004(07)
21. Wall R J;Powell A M;Paape M J Genetioally enhanced cows resist intramammary Staphylococcus aureus infection[外文期刊] 2005(04)
22. Kuroiwa Y;Kasinathan;Sathiyaseelan T Antigen-specific human polyclonal antibodies from hyperimmunized cattle[外文期刊] 2009(02)
23. Tessanne K;Golding M C;Long C R Production of transgenic calves expressing an shRNA targeting myostatin 2012(03)
24. 陈大元;李劲松;韩之明 体细胞克隆牛:供体细胞和受体的影响 2002(08)
25. 龚国春 利用体细胞核移植技术生产转基因牛 2005
26. 王少华 利用无启动子打靶载体研制肌蛋白基因敲除奶 2009
27. Ma J J;Wang Y S;He X N Transfection of Bovine Fetal Fibroblasts with β -defensin (hBD3) Gene and Construction of Transgenic Cloned Embryos[期刊论文]-Journal of Agricultural Biotechnology 2010(04)
28. Huang B;Cui K;Li T Generation of Buffalo (Bubalus bubalis) Transgenic Chimeric and Nuclear Transfer Embryos Using Embryonic Germ-Like Cells Expressing Enhanced Green Fluorescent Protein 2010(01)
29. Wu X;Ouyang H;Duan B Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids 2011
30. Yu S;Luo J;Song Z Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle 2011
31. Huang Y J;Huang Y;Baldassarre H Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning[外文期刊] 2007(34)
32. Richt J A;Kasinathan P;Hamir A N Production of cattle lacking prion protein 2006(01)
33. McPherron A C;Lawler A M;Lee S J Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member 1997
34. Nakatani M;Takehara Y;Sugino H Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice[外文期刊] 2008(02)
35. Franchhauser S;Mufioz S;Pujol A Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance[外文期刊] 2002(03)
36. Inoue K;Kohda T;Sugimoto M Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer 2010(6003)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgnxtb201220001.aspx