

转*MSTN*干扰载体细胞株的获得及外源 基因整合情况的研究

刘丹 佟慧丽 李树峰 常淑伟 杨翠翠 严云勤*

(东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要 转基因细胞株的建立能够为转基因体细胞克隆技术奠定重要基础。该实验利用*MSTN*干扰载体, 转染鲁西黄牛胎儿成纤维细胞, 获得5个相应的转基因单克隆细胞株。采用Real-time PCR和高效热不对称互交式PCR(hiTAIL-PCR)技术检测细胞克隆中*MSTN*表达载体的拷贝数及其在牛基因组中的整合位点。结果表明, 荧光定量PCR有效检测到5个细胞克隆中质粒的拷贝数分别为 2.26 ± 0.32 、 1.52 ± 0.25 、 25.68 ± 1.02 、 8.43 ± 0.73 和 6.72 ± 0.10 。hiTAIL-PCR对整合位点的检测结果表明, 质粒片段在插入到基因组的过程中进行了重组, 其与基因组的结点处有2或4个共同的碱基序列。该研究探索*MSTN*干扰载体在牛胎儿成纤维细胞中的整合机制, 以期获得遗传背景清楚的转基因细胞作为体细胞核移植的重要材料, 为高产转基因肉牛新品种的培育提供重要的理论和实验基础。

关键词 *MSTN*; 转基因细胞株; 拷贝数; 整合位点; Real-time PCR; hiTAIL-PCR

Establishment of *MSTN* Interfering Plasmid Transgenic Cell Lines and Integration of Exogenous Gene

Liu Dan, Tong Huili, Li Shufeng, Chang Shuwei, Yang Cuicui, Yan Yunqin*

(College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract In this study, we used *MSTN* interference vector to transfect Luxi cattle fetal fibroblasts and obtained five transgenic monoclonal cell lines. By Real-time PCR and high-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR, we detected the expressing copies of *MSTN* plasmid and their integration sites in bovine genome. The results showed that the copy numbers of plasmid were effectively detected by quantitative PCR in the five positive cell clones which were 2.26 ± 0.32 , 1.52 ± 0.25 , 25.68 ± 1.02 , 8.43 ± 0.73 and 6.72 ± 0.1 , respectively. Integration sites detected by hiTAIL-PCR showed that there was recombination in the process of insertion of plasmid fragment into target genome. This study explored the integration mechanism of *MSTN* carrier interference in bovine fetal fibroblasts, in order to obtain the clear genetic background of transgenic cells. It is important for obtaining transfer material by somatic cell nuclear, providing important theoretical and experimental basis for cultivation of high-yielding new varieties of transgenic cattle.

Key words *MSTN*; transgenic cell lines; copy number; integration sites; Real-time PCR; hiTAIL-PCR

收稿日期: 2014-02-16 接受日期: 2014-03-28

国家转基因专项“高产优质转基因肉牛新品种培育”(批准号: 2011ZX08007-002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0451-55190846, E-mail: yanyunqin@sohu.com

Received: February 16, 2014 Accepted: March 28, 2014

This work was supported by the Breeding Program for High-quality New Varieties of Genetically Modified Bovine from the National Major Transgenic Project (Grant No.2011ZX08007-002)

*Corresponding author. Tel: +86-451-55190846, E-mail: yanyunqin@sohu.com

网络出版时间: 2014-07-02 12:17 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0043.html>

近年来, 通过体细胞核移植技术生产转基因动物得到长足的发展。人们已经获得了多种类型的转基因克隆牛^[1-2]、羊^[3-4]、猪^[5-6], 但生产的转基因动物存在成活率低^[7]、整合率低^[8], 外源基因的整合可能会造成宿主细胞基因突变出现新表现型, 也可能中断宿主细胞一些重要功能基因的转录过程, 或者激活有害基因, 导致胚胎畸形或死亡^[9]。在生产转基因动物前, 获得转基因的单克隆细胞株, 分析将用于体细胞核移植的转基因细胞株中外源基因的拷贝数和整合位点, 从而使我们对外源基因的整合机制有较深入的了解, 避免转基因动物生产过程中的盲目性。

Southern blot法是鉴定转基因拷贝数的传统方法, 但费时费力, 且需要大量的基因组DNA。实时定量PCR(Real-time PCR)法可以简便快捷地测定样品的拷贝数, 通过定量PCR标准曲线的建立能准确地计算出外源基因的拷贝数^[10]。外源基因的整合位点对表达水平有着至关重要的影响, 因此, 对整合位点序列的克隆及其序列特征的研究是十分必要的。2007年, 由Liu等^[11]设计的高效热不对称互交式PCR(high-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR, hiTAIL-PCR)可以高效获得较长的侧翼序列, 且特异性高、操作简单。

肌肉抑制素(myostatin, MSTN)属于生长转化因子超家族, 能通过控制成肌细胞的大小、数量和增殖速度来实现对肌肉生长的负调控^[12]。MSTN基因的干扰载体(pGenesil-1.1-MSTN)能够促进肌肉的增殖。

据此, 实验利用MSTN干扰载体, 转染鲁西黄牛胎儿成纤维细胞, 获得转基因细胞株后, 建立了实时定量PCR和hiTAIL-PCR法检测转基因细胞株中质粒的拷贝数和整合位点的方法, 探索转基因细胞株中外源基因的整合机制, 是我们获得高效、安全的转基因细胞供体核的重要环节, 为高产转基因肉牛新品种的培育提供重要的理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 MSTN转基因单克隆细胞株的获得

用Bgl II单酶切pGenesil-1.1-MSTN载体(购自武汉市晶赛生物工程技术有限公司), 回收得到线性化的载体, 转染鲁西黄牛胎儿成纤维细胞(本实验室的传代细胞)。参照Lipofectamine 2000转染试

剂说明书的技术参数进行细胞转染。转染后的细胞传代至10 cm细胞培养皿中, 每隔3~4 d换液, 同时加入400 μg/mL的G418(Geneticin)筛选, G418是一种氨基糖苷类抗生素, 对细胞有毒性。被整合进细胞基因组的pGenesil-1.1-MSTN载体含有neo基因, 能够表达氨基糖苷磷酸转移酶, 使转染的细胞获得抗性而能够在含有G418的培养液中生长, 未转染的细胞死亡。约14 d后获得抗性克隆, 应用克隆环法(Clone Ring)^[13]获得抗性克隆细胞, 提取转基因细胞DNA。

1.2 实时定量PCR对质粒拷贝数的检测

1.2.1 实时荧光定量PCR 采用20 μL的反应体系(Power 2×SYBR Real-time PCR Premixture), 反应条件按ABI 7300仪器使用手册设置, 95 °C预变性2 min, 进入循环。循环条件为95 °C 15 s, 61 °C 30 s(30个循环)。所有样品都做3次重复, 反应结束后使用定量PCR仪的分析软件对结果进行分析。

1.2.2 标准曲线的建立 为了确定实时定量PCR扩增中C(t)值与初始拷贝数的关系, 将含有外源基因的质粒pGenesil-1.1-MSTN与野生型牛基因组DNA混合, 设置含有1、3、9、27、81和243个转基因拷贝数的标准品对照, 具体如下: 假设含有外源基因片段的质粒大小为a bp, 野生型牛基因组DNA用量为b ng, 牛基因组单倍体(haploid)大小为 2.475×10^9 bp, 外源基因片段以头头相连或者头尾相连的线性串联重复方式随机整合入一条染色体上, 那么b ng的转基因细胞DNA含有一个拷贝的质量为: $\frac{a \times b}{2.475 \times 10^9 \times 2}$ ng。用neo引物扩增neo基因片段, 以β-actin作为内参标化基因组DNA的量。neo引物的序列为: 5'-CGT TGT CAC TGA AGC GGG AAG GG-3'(上游)和5'-CGG CAG GAG CAA GGT GGG ATG-3'(下游), 扩增产物为86 bp。内参引物的序列为: 5'-GAA CGG TGA AGG TGA CAG CAG T-3'(上游)和5'-TTA TTA GAG AGA AGC GGG GTG G-3'(下游), 扩增产物为180 bp。将转基因片段检测β-actin基因的扩增C(t)_{β-actin}减去相应的引物扩增C(t)_{neo}, 得到的ΔCt, 再对样品的拷贝数的对数值作图得到标准曲线。

1.3 hiTAIL-PCR对整合位点的检测

1.3.1 引物的设计与合成 设计特异性引物, 在pGenesil-1.1-MSTN质粒单酶切位点的侧翼序列上下游约300 bp片段里各找出3条特异性引物。上游引物碱基序列为SPS1: 5'-AGT TAA CAA CAA CAA TTG CAT TCA T-3'; SPS2: 5'-CGT GGC CGA TTA

TGA TCA GTT ATC T-3'; SPS3: 5'-TAA AAC GCG CCC TAT TCA GTT ACT G-3'。下游引物碱基序列为SPA1: 5'-CAT CAT TTA TCA CTC TCG GCA TGG A-3'。SPA2: 5'-ATT ATT AGA AGA ACA CCC CCA TCG G-3'。SPA3: 5'-CAT AAG AAC GGC ATC AAG GTG AAC T-3'。

参考Liu等^[11]的方法,设计用于hiTAIL-PCR的简并引物LAD1、LAD2、LAD3和LAD4,这4条简并引物的共有序列AC1,引物序列如下:LAD1: 5'-ACG ATG GAC TCC AGA GCG GCC GC(G/C/A)N(G/C/A)NN NGG AA-3'; LAD2: 5'-ACG ATG GAC TCC AGA GCG GCC GC(G/C/T)N(G/C/T)NN NGG TT-3'; LAD3: 5'-ACG ATG GAC TCC AGA GCG GCC GC(G/C/A)(G/C/A)N(G/C/A)N NNC CAA-3'; LAD4: 5'-ACG ATG GAC TCC AGA GCG GCC GC(G/C/T)(G/A/T)N(G/C/T)N NNC GGT-3'; AC1: 5'-ACG ATG GAC TCC AGA G-3'。

1.3.2 hiTAIL-PCR扩增 方法同Liu等^[11],hiTAIL-PCR反应条件见表1。第一轮PCR反应以转基因细胞DNA为模板,使用特异性引物SP(SPS1或SPA1)与4个简并引物(LAD1~LAD4)随机组合对外源基因3'下游和5'上游侧翼序列进行PCR扩增。上一级的PCR反应的产物稀释100倍用于下一级PCR反应,第二轮和第三轮分别使用特异性引物SP与AC1组合,使特异性的产物被选择性扩增。

1.3.3 扩增产物的克隆、测序与序列分析 PCR产物经胶回收得到特异性扩增片段(Easy Pure Quick Gel Extraction Kit),连接到PGEM-T Easy载体上,由Genewiz公司完成测序。利用NCBI网站上BLAST软件,将测序结果与GenBank中已知的牛核酸序列进行比对确定其在基因组上的位置。

2 结果

2.1 获得MSTN转基因单克隆细胞株

pGenesil-1.1-MSTN载体含有EGFP基因,转染pGenesil-1.1-MSTN的鲁西黄牛成纤维细胞24 h后表达EGFP蛋白,在荧光显微镜下观察转染pGenesil-1.1-MSTN的细胞(图1A),转染后的细胞经过G418筛选14 d,大部分未转染neo基因的成纤维细胞漂浮死亡,经过换液清除,转染成功的成纤维细胞逐步形成克隆,分别在普通光学显微镜和荧光显微镜下观察单个克隆(图1B和图1C)。

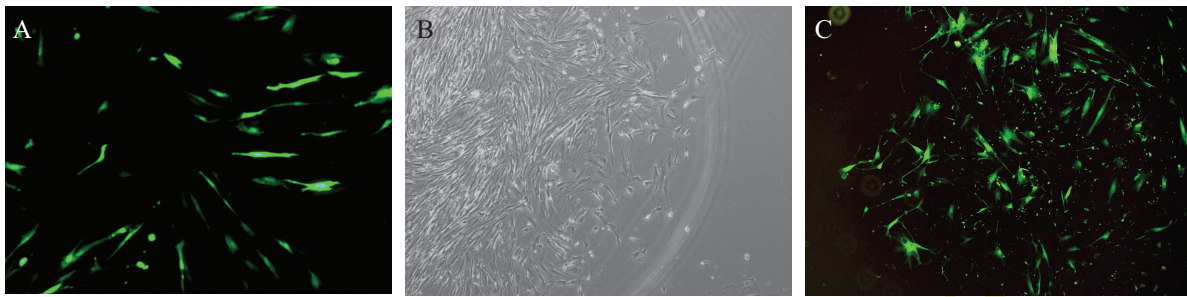
2.2 外源基因拷贝数的检测结果

2.2.1 定量PCR标准曲线 以neo引物扩增外源基因片段,以 β -actin作为内参,两个溶解曲线(图2A)有且只有一个单峰,表明两个引物扩增的特异性好,并且两个引物的阴性对照和空白对照均没有扩增峰。用 β -actin基因的扩增C(t) $_{\beta$ -actin}减去相应的外源基因片段扩增C(t) $_{neo}$,得到 Δ Ct,再对样品的拷贝数的对数值(log₃N)作图得到绝对定量的标准曲线(图2B)。

表1 hiTAIL-PCR反应条件

Table 1 Thermal conditions for hiTAIL-PCR

第一次PCR			第二次PCR			第三次PCR		
Pre-amplification			Primary TAIL-PCR			Secondary TAIL-PCR		
步骤	温度(°C)	时间(min:s)	步骤	温度(°C)	时间(min:s)	步骤	温度(°C)	时间(min:s)
Step	Temperature (°C)	Time (min:s)	Step	Temperature (°C)	Time (min:s)	Step	Temperature (°C)	Time (min:s)
1	93	2:00	1	94	0:20	1	94	0:20
2	95	1:00	2	65	1:00	2	68	1:00
3	94	0:30	3	65	3:00	3	65	3:00
4	60	1:00	4	Go to step 1	1time	4	94	0:20
5	65	3:00	5	94	0:20	5	68	1:00
6	Go to step 3	10 times	6	68	1:00	6	65	3:00
7	94	0:30	7	65	3:00	7	94	0:20
8	25	2:00	8	94	0:20	8	50	1:00
9	Ramping to 65	0.5 °C/s	9	68	1:00	9	65	3:00
10	65	3:00	10	65	3:00	10	Go to step 1	6~7 times
11	94	0:20	11	94	0:20	11	65	5:00
12	58	1:00	12	50	1:00	12	End	
13	65	3:00	13	65	3:00			
14	Go to step 11	25 times	14	Go to step 5	13 times			
15	65	5:00	15	65	5:00			
16	End		16	End				

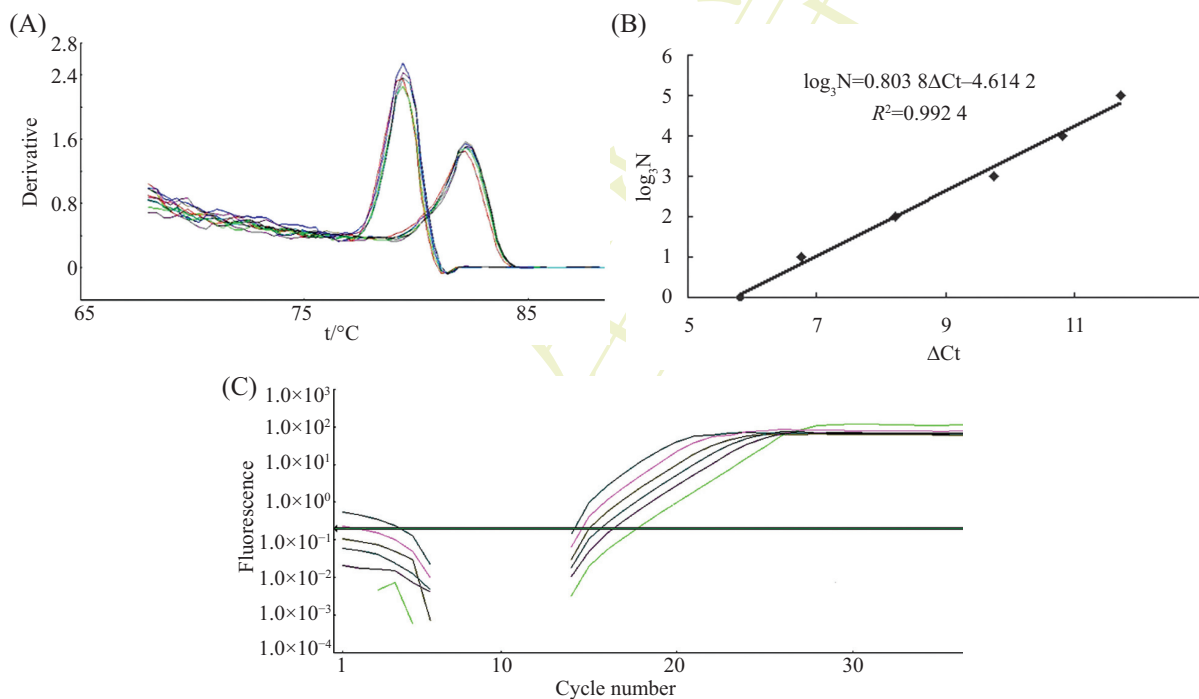


A: 荧光显微镜中观察转染pGenesil-1.1-MSTN载体24 h后的成纤维细胞; B: 普通光学显微镜观察转染pGenesil-1.1-MSTN载体筛选后得到的细胞团; C: 荧光显微镜中观察转染pGenesil-1.1-MSTN载体筛选后得到的细胞团。

A: observation of fibroblast 24 h after infection with pGenesil-1.1-MSTN under fluorescence microscopy; B: observation of cell mass infected with pGenesil-1.1-MSTN obtained after G418 selection under Optical microscopy; C: observation of cell mass infected with pGenesil-1.1-MSTN obtained after G418 selection under fluorescence microscopy.

图1 显微镜观察G418筛选前后的转染细胞(40×)

Fig.1 Observation of the transfected cells of before and after G418 selection by minicroscopy (40×)



A: *neo*和 β -*actin*扩增产物的溶解曲线; B: 计算拷贝数的标准曲线, 决定系数 $R^2=0.9924$; C: 倍比稀释标准品的*neo*扩增曲线。

A: melting curve analyses for the product of *neo* and β -*actin* PCR product; B: standard curve for calculating transgene copy number; C: amplification curves obtained from a dilution series of the pGenesil-1.1-MSTN template from 1 to 243 copies pre-reaction.

图2 实时定量PCR检测转基因细胞拷贝数的方法建立

Fig.2 Generation of the absolute quantitative standard curve for examining the transgene copy number of transgenic cells

获得pGenesil-1.1-MSTN基因的计算公式为: $\log_3N=0.8038\Delta Ct-4.6142$, 决定系数为 $R^2=0.9924$ 。

2.2.2 转基因细胞系拷贝数的鉴定 定量PCR对转基因细胞株拷贝数鉴定结果如表2所示, 标准差在0.1到1.02之间, 表明结果准确可信。

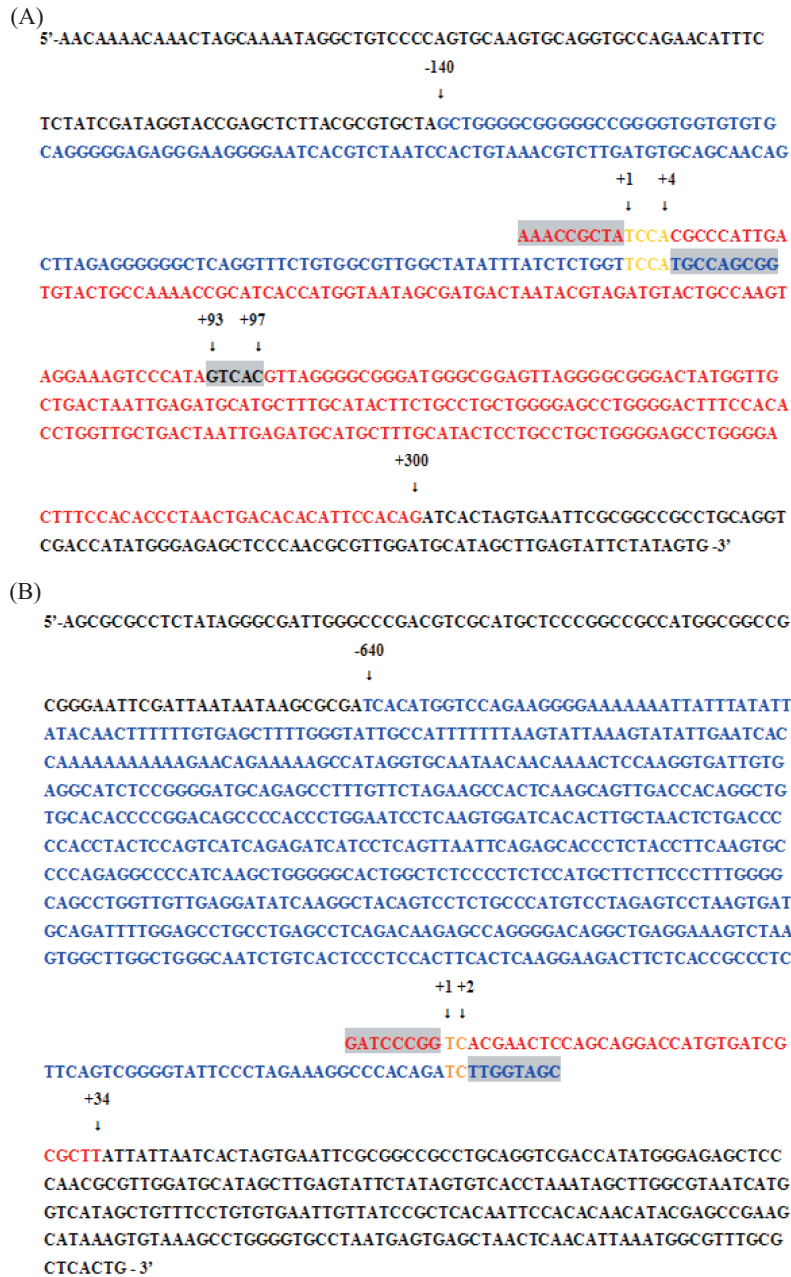
2.3 整合位点的序列分析

经过hiTAIL-PCR扩增。将扩增所得片段的测序结果与GenBank中已知的牛核酸序列进行比

表2 转基因细胞系中外源基因拷贝数

Table 2 Copy number of exogenous gene in transgenic cell line

编号 Number	拷贝数 Number of copies
1	2.26±0.32
2	1.52±0.25
3	25.68±1.02
4	8.43±0.73
5	6.72±0.10



A: 经过测序得到长度为440 bp的转基因细胞株DNA的hiTAIL-PCR扩增片段序列。碱基序列(-140~+4)与牛基因组16号染色体的基因组克隆(NW_003104426.1)上599 835~599 979 bp 100%同源。序列5'-TCCA-3'(+1~+4)是外源基因与染色体序列共用的非常短的同源臂。外源基因被增加的5个碱基GTCAC(+93~+97)分为两部分: +1~+92与质粒序列(1 496~1 523) 100%同源; +98~+300与质粒序列(2 715~2 917) 100%同源。说明外源基因随机插入基因组的过程中进行了重组; B: 经过测序得到长度为677 bp的转基因细胞株DNA的hiTAIL-PCR扩增片段序列。长度为641 bp的碱基序列(-640~+2)与21号染色体上30 728 719~30 729 365 bp相似性为99%, 长度为34 bp的碱基序列(+1~+34)与质粒序列(732~765) 100%同源, 二者共用长度为两个碱基(5'-TC-3')的同源臂。结点处灰色框里的碱基不是转基因细胞株DNA的序列, 以上对准的方式列出整合位点附近外源基因(红色碱基)和宿主基因(蓝色碱基)。

A: the nucleotides from -140 to +4 were the same as the genomic sequence of 599 835~599 979 bp nucleotides of *Bos Taurus* on chromosome 16. Four nucleotides, from +1 to +4 (5'-TCCA-3'), were shared by the transgene and the 16 chromosome as a very short homologous arm. Transgenic sequences were divided into two classes based on the presence of five additional nucleotides (GTCAC). The sequence from +1 to +92 was 100% identical to the foreign sequence (from 1496 to 1523). The sequence from +98 to +300 was 100% identical to the foreign sequence (from 2 715 to 2 917). The results indicated that foreign genes were restructured into the genome by random insertion; B: the nucleotides from -640 to +2 were the same as the sequence of 30 728 719~30 729 365 bp nucleotides of *Bos taurus* on chromosome 21. The sequence from +1 to +34 was 100% identical to the foreign sequence (from 732 to 765). Two nucleotides (5'-TC-3') were a very short homologous arm. The sequences in grey shading is surrounding the junction sites. Listed foreign gene (red nucleotide) and the host genome (blue nucleotide) nearby the integration sites with aligned manner.

图3 整合位点序列分析

Fig.3 Sequence analysis of integration sites

对。序列分析如图3所示。A和B片段都包含外源基因和牛基因组序列, 同源性分析表明, A片段外源基因侧翼序列与16号染色体的基因组克隆(NW_003104426.1)中599 835~599 979 bp同源性为100%, B片段外源基因侧翼序列与21号染色体上30 728 719~30 729 365bp同源性为99%。另外, 发现外源基因插入到基因组过程中发生了重组; 外源基因插入到基因组上, 二者有一个非常短的同源臂。

3 讨论

生产转基因动物时, 目的基因定点整合的方法是应用基因打靶技术通过受精卵显微注射完成。近年来, TALEN、CRISPR-Cas系统在青鳉^[14]、大鼠^[15]、小鼠^[16]、斑马鱼^[17]等动物的基因敲除研究中已获得了成功。但显微注射法对受精卵损伤较大, 遗传不稳定。体细胞核移植制备转基因动物的效率高于原核显微注射法, 转基因动物的遗传稳定性也较高^[7]。然而基因打靶技术构建的载体分子大, 转染效率低, 转入打靶载体的细胞增殖困难, 细胞系难以建立。所以本研究应用pGenesil-1.1-MSTN载体, 转染鲁西黄牛胎儿成纤维细胞, 获得随机整合的转基因细胞株。

确定外源基因拷贝数是获得转基因细胞株后的首要步骤。有研究表明, 外源基因拷贝数和基因的表达水平没有呈现出明显的相关性^[18-19], 外源基因的整合位点所起的作用可能更为重要^[18]。本实验应用定量PCR法准确高效地检测了转基因细胞中外源基因拷贝数。关于外源基因拷贝数的检测, 通过近年来绝对定量PCR和DNA印记杂交的相互比较验证, 发现两种方法检测转基因拷贝数的结果十分接近^[20], 并且绝对定量PCR法灵敏度高、需要DNA样品少、省时省力、结果精确度高、重复性好^[10]。本实验选取的内参基因检测引物和外源质粒片段检测引物片段大小相近, Tm值基本相等, 很好地起到了内参的作用。通过溶解曲线证明了引物扩增产物的特异性, 保证实验结果真实可信。当然, 本文的方法也有一定不足, 如果对检测引物和内参引物用不同的荧光基团标记, 使荧光标记基团直接进入PCR扩增产物, *neo*基因和 β -*actin*基因能够在同一个PCR反应体系中扩增, 那么定量的结果将更准确。

外源基因的整合受到很多因素的影响, 包括DNA构型、进入宿主细胞的方式、DNA的浓度等。

一般认为, 外源基因的整合位点对其表达水平有至关重要的影响, 存在“有效整合”、“沉默整合”和“毒性整合”三种整合状态, 其表达水平也非均一^[21]。有研究表明, 只有当 β -球蛋白基因整合在小鼠第3号染色体上时, 才可在转基因小鼠的骨骼肌中表达, 其他转基因动物如转基因鱼、转基因奶牛中外源基因的整合与表达也有类似表现^[19]。如何选择出外源基因有效表达的转基因细胞株, 整合位点序列的克隆及其序列特征研究是十分重要的。本研究应用hiTAIL-PCR方法克隆外源基因整合位点, 分析外源基因整合情况。

有研究表明, 线性外源DNA分子进入细胞后会进行迅速的环化, 重新环化后的质粒随机断裂并进行重组^[22]。此外, 重组的方式以头—尾相连的串联体形式为主^[23], 在两个串联的片段之间有碱基的插入或缺失^[24-26]。在本实验中, 外源基因随机插入到基因组的过程中进行了重组, 重组的两段外源基因序列之间增加了5个碱基(GTCAC)。重组后的外源DNA分子最终通过不完全序列识别随机地非同源重组到宿主基因组中^[22]。在本实验中, 外源基因通过非同源重组随机整合到基因组上, 外源基因和基因组的连接处有2或4个共同的碱基序列, 相同的碱基序列作为2个DNA结点。这个DNA结点可能是识别外源基因和基因组的同源臂, 因为这个同源臂很短, 只有几个相同的碱基组成, 它们更容易定位在宿主基因组中。以前的转基因小鼠研究也发现这样的碱基片段(3~5 bp)^[23,25]。外源基因通过细胞的DNA修复机制将外源DNA分子整合进入基因组中^[27]。

综上, 实验获得MSTN干扰载体转基因细胞株后, 通过实时定量PCR法检测了质粒的拷贝数, 并应用hiTAIL-PCR技术克隆转基因细胞株中外源基因在基因组上的整合位点。分析外源基因整合情况, 为高产转基因肉牛新品种的培育提供重要的理论和实验基础。

参考文献 (References)

- 1 Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, *et al.* Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998; 280(5367): 1256-8.
- 2 Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannerman DD, Pursel VG, *et al.* Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol* 2005; 23(4): 445-51.
- 3 McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke

- AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cell. *Nature* 2000; 405(6790): 1066-9.
- 4 Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, *et al.* Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997; 278(5346): 2130-3.
- 5 Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, *et al.* Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002; 295(5557): 1089-92.
- 6 Hao YH, Yong HY, Murphy CN, Wax D, Samuel M, Rieke A, *et al.* Production of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) over-expressing piglets. *Transgenic Res* 2006; 15(6): 739-50.
- 7 沈子龙, 廖建民, 徐寒梅. 转基因动物技术与转基因动物制药. *中国药科大学学报*(Shen Zilong, Liao Jianmin, Xu Hanmei. *Technology of transgenic animal and transgenic animal pharmaceutical. Journal of China Pharmaceutical University*) 2002; 33(2): 81-6.
- 8 杨慧婷, 王洪梅, 孙涛, 高运东, 仲跻峰, 何洪彬. 动物转基因研究进展. *现代农业科技*(Yang Huiting, Wang Hongmei, Sun Tao, Gao Yundong, Zhong Jifeng, He Hongbin. *Research progress of animal transgenic. Modern Agricultural Sciences and Technology*)2011; (2): 323-6.
- 9 王继英, 杜立新. 转基因动物制作及提高外源基因表达的策略. *中国畜牧兽医*(Wang Jiying, Du Lixin. *Production of transgenic animal and the measures for increasing efficiency of gene expression in transgenic animal. Animal Science Abroad*) 2002; 29(2): 30-4.
- 10 王晓建, 杨旭, 宋晓东, 张禅那, 刘继斌, 邸冉, 等. 实时荧光定量PCR法检测转基因小鼠拷贝数. *中国实验动物学报*(Wang Xiaojian, Yang Xu, Song Xiaodong, Zhang Channa, Liu Jibin, Di Ran, *et al.* *Absolute quantitative Real-time PCR assay for determining transgene copy number in transgenic mice. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*) 2007; 15(3): 170-4.
- 11 Liu GY, Chen Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. *Bio Techniques* 2007; 43: 649-56.
- 12 McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 1997; 387(6628): 83-90.
- 13 吴信生, 何先红, 戴建明, 田智泉, 杨海燕, 徐琪, 等. 鸡胚胎干细胞分离培养和单细胞克隆的制备. *中国家禽*(Wu Xinsheng, He Xianhong, Dai Jianming, Tian Zhiquan, Yang Haiyan, Xu Qi, *et al.* *Isolation and cultivation of chicken embryonic stem cell and production of single-cell clone. China Poultry*) 2008; 30(22): 30-4.
- 14 Lei Y, Guo X, Liu Y, Cao Y, Deng Y, Chen X, *et al.* Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(43): 17484-9.
- 15 Tesson L, Usal C, Ménoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, *et al.* Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol* 2011; 29(8): 695-6.
- 16 Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013; 153(4): 910-8.
- 17 Chang N, Sun C, Gao L, Zhu D, Xu X, Zhu X, *et al.* Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos. *Cell Res* 2013; 23(4): 465-72.
- 18 杨继山, 董晓, 潘庆杰. 抗凝血酶III转基因山羊外源基因拷贝数及其蛋白表达量的测定. *生物技术通讯*(Yang Jishan, Dong Xiao, Pan Qingjie. *Determination of exogenous gene copy number and protein expression in antithrombin III transgenic goat. Letters In Biotechnology*) 2010; 21(3): 393-6.
- 19 孔庆然, 刘忠华. 外源基因在转基因动物中遗传和表达的稳定性. *遗传*(Kong Qingran, Liu Zhonghua. *Inheritance and expression stability of transgene in transgenic animals. Hereditas*) 2011; 33(5): 504-11.
- 20 Weng HB, Pan AH, Yang LT, Zhang CM, Liu ZL, Zhang DB. Estimating number of transgene copies in transgenic rapeseed by real-time PCR assay with HMGI/Y as an endogenous reference gene. *Plant Mol Biol Rep* 2004; 22: 289-300.
- 21 吴波, 朱作言. 转基因动物整合位点的研究进展. *遗传*(Wu Bo, Zhu Zuoyan. *Integration sites of transgenes in transgenic animals. Hereditas*) 2003; 25(1): 77-80.
- 22 Yan B, Li D, Gou K. Homologous illegitimate random integration of foreign DNA into the X chromosome of a transgenic mouse line. *BMC Mol Biol* 2010; 11:58.
- 23 Allen MJ, Jeffreys AJ, Surani MA, Barton S, Norris ML, Collick A. Tandemly repeated transgenes of the human minisatellite MS32 (D1S8), with novel mouse gamma satellite integration. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(15): 2976-81.
- 24 Merrihew RV, Marburger K, Pennington SL, Roth DB, Wilson JH. High-frequency illegitimate integration of transfected DNA at preintegrated target sites in a mammalian genome. *Mol Cell Biol* 1996; 16(1): 10-8.
- 25 Hamada T, Sasaki H, Seki R, Sakaki Y. Mechanism of chromosomal integration of transgenes in microinjected mouse eggs: Sequence analysis of genome-transgene and transgene-transgene junctions at two loci. *Gene* 1993; 128(2): 197-202.
- 26 Rohan RM, King D, Frels WI. Direct sequencing of PCR-amplified junction fragments from tandemly repeated transgenes. *Nucleic Acids Res* 1990; 18(20): 6089-95.
- 27 Würtele H, Little KC, Chartrand P. Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Ther* 2003; 10(21): 1791-9.