文章编号:1000-5404(2008)10-0885-05

论著

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

刘 勤[1],张晋宇[2],王露露[1],刘昌峨[1],王 勇[1],万 瑛[2] (第三军医大学基础医学部:[1]动物学教研室,[2]全军免疫学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 以慢病毒作为载体,制作增强型绿色荧光蛋白(EGFP)转基因小鼠,建立慢病毒介导的转基因动物制备技术平台。**方法** 慢病毒包装采用三质粒系统。3个质粒分别为转基因质粒FUGW、病毒结构蛋白表达质粒psPAX2以及病毒包膜蛋白表达质粒pMD2.G。病毒包装时,用磷酸钙沉淀法将三质粒共转染来源于人胚肾细胞系的293FT细胞,培养48 h后,收取含病毒的上清,并通过高速离心浓缩病毒。将含浓缩病毒液作梯度稀释后感染293FT细胞,通过流式细胞计数仪测定病毒滴度。用显微注射法将浓缩的病毒液注射至FVB/N小鼠1-细胞期胚胎透明带下。在荧光显微镜下观察胚胎EGFP的表达。将注射后发育至2-细胞期的胚胎移植至假孕受体母鼠,得F0代小鼠。通过紫外光照射观测EGFP在小鼠活体内的表达水平。**结果** 病毒液浓缩前的滴度≥10^6 TU/ml(transducing unit,TU),经过高速离心对病毒进行浓缩和纯化,其滴度达到10^9 TU/ml以上。将浓缩病毒液注射至小鼠1-细胞期胚胎透明带下,注射后胚胎的2-细胞期卵裂率为81.8%(1 189/1 453),利用荧光显微镜分别在注射后60、84、132 h观察胚胎,均发现有较强荧光。在2-细胞期,每一视野下胚胎阳性率>90%,说明包装的病毒成功并高效地转染小鼠胚胎。胚胎移植后假孕母鼠妊娠率为42.9%(12/28),首建鼠阳性率为60.8%(73/120),转基因小鼠的总体研制效率(转基因小鼠数/注射胚胎数)为5.0%(73/1 453)。将F0代EGFP转基因小鼠分别与野生型小鼠交配,在其F1、F2、F3代小鼠中均获得了EGFP阳性小鼠,阳性率分别为91.4%(32/35)、93.8%(30/32)、93.1%(27/29)。**结论** 通过慢病毒载体感染小鼠1-细胞期胚胎可有效地制备转基因小鼠。我们已初步建立了慢病毒介导的转基因小鼠制备技术体系。

关键词: 慢病毒载体;增强型绿色荧光蛋白;转基因小鼠
中图法分类号: R-332;R373;R394.1 **文献标识码:** A

Production of EGFP transgenic mice by lentiviral transgenesis

LIU Qin[1], ZHANG Jin-yu[2], WANG Lu-lu[1], LIU Chang-e[1], WANG Yong[1], WAN Ying[2] ([1]Department of Laboratory Animal Science, [2]Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish an efficient and reliable method for transgenic mouse production, we performed lentiviral vector-mediated transgenesis in mice. **Methods** The leniviral vector FUGW was packaged by co-transfection of 293FT cells with two packaging vectors, psPAX2 and pMD2.G. The two packaging vectors provide structural proteins and envelope protein respectively which are necessary for the proper package of pseudotype virus. The tire of the pseudotype virus was tested by FACS after infecting 293FT cells with the solution containing the virus particles. The virus was concentrated by high speed centrifugation, and concentrated virus solution was injected into perivitelline space of mouse 1-cell eggs. EGFP expression in pre-implantation eggs was observed under fluorescent microscope, and that in mouse body under UV light. **Results** The titre of the primary virus solution was ≥10^6 TU/ml, and that after concentration was ≥10^9 TU/ml. The concentrated virus solution efficiently infected mouse eggs after injected into the perivitelline space. On 60, 84, 132 h after injection, EGFP expression was observed in the injected eggs. At 24 h after injection when the majority of the injected eggs was in 2-cell stage, more than 90% of the eggs was EGFP positive under fluorescent

基金项目: 国家自然科学基金(30700076)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30700076)
作者简介: 刘 勤,男,重庆市人,硕士研究生,主要从事转基因动物模型方面的研究。电话:(023)66958000
通信作者: 王 勇,E-mail: yongw7528@126.com.cn
万 瑛,E-mail: wanying2003cn2003@yahoo.com.cn
收稿日期: 2007-11-06;**修回日期:** 2008-03-03

microscope. The injected 2-cell eggs was transferred into the oviduct of pseudo-pregnant female mice, and 42.9% (12/28) of the transferred mice became pregnant. The pregnant recipient mice gave birth to 120 pups, of which 60.8% (73/120) showed visible EGFP expression under UV light. The overall transgenic mouse production efficiency (transgenic mouse/injected eggs) was 5.0% (73/1 453). The EGFP transgenic founder mice were mated with wild-type mice, and EGFP expression was detected in F1, F2 and F3 offspring, indicating that the EGFP expression can be transmitted through germline cells. **Conclusion** Lentiviral transgenesis is an efficient and reliable method to produce transgenic mice. We have established the technological system for lentiviral transgenesis in mice.

Key words: lentiviral vector; enhanced green fluorescent protein; transgenic mice

目前主要的转基因动物制作方法有原核显微注射法、逆转录病毒侵染法、精子介导法、胚胎干细胞法。自1980年Gordon等[1]首次采用原核显微注射开展动物转基因研究以来,通过原核显微注射成为制作转基因动物的主要方法,但是此法制作转基因动物存在DNA整合效率低、整合位点不定、操作繁琐等缺陷。而逆转录病毒侵染法在可操作性、胚胎发育率、移植妊娠率、整合效率等方面比其他技术均有显著的优势。

1976年,Jaenisch等[2]首次用逆转录病毒感染胚胎制作转基因动物获得成功。另据Hofmann等[3]报道,利用含有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的逆转录病毒制作转基因猪获得了较高的阳性率。增强型绿色荧光蛋白(EGFP)是由GFP人源化改造而来,含有P64L和S65T突变和改造过的密码子,拥有更强激发荧光强度,更高的哺乳动物细胞内表达量和检测灵敏度[4,5]。

本实验以EGFP作为指示物[6-8],将包装好的逆转录病毒注射在FVB/N小鼠胚胎透明带以下,利用逆转录病毒的高转染效率,获得了带有EGFP基因的转基因小鼠。并且经过不断的种系传代(目前传至第3世代),证实了EGFP在小鼠体内表达的稳定性、高效性,建立了一套病毒载体介导的,通过胚胎透明带下显微注射,以EGFP为标志蛋白的转基因小鼠可视化平台,为用逆转录病毒侵染法研制大型转基因哺乳动物[3,9]奠定了一定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

质粒小/中量提取试剂盒、DNA回收试剂盒(美国Omega公司),牛小肠碱性磷酸酶(CIAP,美国Promega公司),细胞培养基DMEM及LB培养基(美国Invitrogen公司),胎牛血清(FCS,杭州四季青生物工程公司),小牛血清(CS,杭州四季青生物工程公司),磷酸钙转染试剂为2 mol/L $CaCl_2$,0.22 μm滤器过滤后4 ℃贮存备用,2×HBS(8.0 g NaCl、0.37 g KCl、201 mg $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$、1.0 g葡萄糖、5.0 g HEPES溶于500 ml水中,调pH值到7.05,过滤后4 ℃贮存备用)。慢病毒三质粒系统包括FUGW、psPAX2和pMD2.G。大肠杆菌DH5α为本实验室保存。M-2小鼠胚胎培养基(EmbryoMax M-2,美国Chemicon公司),改进型M-16小鼠胚胎培养基(EmbryoMax M-16 Modified, 美国Chemicon公司),透明质酸酶(美国Sigma公司),以300 μg/ml溶解于M-2培养液中,凹玻片(上海机械进出口公司),硅化液Sigmacote(美国Sigma公司),G-100型毛细玻璃管(日本Narishige公司)。小鼠促排卵激素PMSG和HCG(宁波激素厂,工作浓度50 IU/ml)。

1.2 实验动物

昆明小鼠(受体)、FVB/N小鼠(供体)由第三军医大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK(渝)2002007]。

1.3 主要仪器设备

显微注射仪(Micro-injector System, Nikon TE2000s),解剖显微镜(Nikon SMZ45),拉针仪(Micro-puller, Narishige PN-30),微熔炉(Micro-forge, Narishige MF-900),CO_2孵箱(Heraeus,BB5060)。

1.4 病毒载体质粒

FUGW慢病毒转基因质粒由California Institute of Technology的Baltimore博士惠赠[10]。其主要结构及其功能有来自HIV-1基因组、可提高原病毒整合率以及病毒滴度的DNA元件Flap-1,来自Wooduck virus基因组、可提高转基因表达水平的基因表达转录后调控元件WRE,此外还包含了EGFP编码序列作为标志基因,以表达GFP便于筛选,以及泛素基因启动子序列(ubiquitin promoter)。该启动子为广泛性表达的非特异性启动子,在其驱动下的EGFP基因在各个组织器官中均应该有较强的表达。

1.5 慢病毒制备

转染前1 d在10 cm培养皿中铺(2~3)×10^6的293FT细胞,第2天细胞生长达60%~70%汇合时即可用于转染。将6 μg pMD2.G、15 μg psPAX2和20 μg FUGW混匀于无菌去离子水中至终体积为1 095 μl,加入155 μl 2 mol/L $CaCl_2$,然后滴加1 250 μl 2×HBS,边滴加边混匀,滴加完毕后静置1~2 min,待沉淀形成后滴加到培养293FT的10 cm培养皿中。培养7~11 h后,吸去上清,加入10 ml新鲜的含10%小牛血清的DMEM,继续培养48 h。收集上清,1 000 r/min离心10 min,0.45 μm滤器过滤后的病毒液以20 000×g离心6 h,弃去上清,用HBSS

重悬沉淀,然后将重悬液置于含有 20% 蔗糖的 HBSS 溶液上,50 000 × *g* 离心 2 h,弃去上清,用适量 HBSS 重悬后,分装成小管置于 -70 ℃备用[9]。在接种有 293FT 细胞的 6 孔板中每孔加入一定量的病毒液,感染 48 h 后,用流式细胞仪分析绿色荧光细胞的百分比,取百分比在 20% 以下的计算滴度(TU/ml)。

1.6　显微注射法制作转基因小鼠

1.6.1　取胚　　以 4 ~ 6 周龄性成熟雌鼠为胚胎供体,腹腔注射 PMSG 和 HCG 进行超数排卵,每只 5 ~ 10 IU。超排计划为:首日 15:00 注射 PMSG,48 h 后注射 HCG,随即与公鼠合笼,次日清晨挑选出有阴栓者作为胚胎供体,于当日 9:30 - 11:00 杀鼠取胚。取胚时,将供体母鼠脱臼处死,在小鼠背脊靠近最后 1 根肋骨旁侧约 1 cm 处剪开皮肤,分离肌肉,暴露卵巢及输卵管。小心剪下输卵管,立即置于 1 滴(约 100 μl)M-2 培养液里涮洗。将涮洗后的输卵管转移至另 1 滴(约 100 μl) M-2 培养液里,于解剖显微镜下将膨大的输卵管壶腹部用显微镊轻轻撕开,轻压输卵管挤出包裹着胚胎的细胞团。然后加 50 μl (0.6 mg/ml)透明质酸酶于此滴 M-2 培养液混匀,用移液枪反复吹吸加速细胞团分散。在解剖显微镜下将已游离的胚胎细胞捡出,在 M-2 培养液中洗 5 ~ 7 遍,将洗净的胚胎细胞置于已经在孵箱中平衡 1 ~ 2 h, 覆盖有石蜡油的 M-16 微滴(50 μl)中,于 5% CO_2、37 ℃、饱和湿度条件下暂时培养,同时进行显微注射准备工作[11-14]。

1.6.2　显微注射　　显微注射于取胚当日 13:00 左右开始,在显微注射仪上,将病毒液注射至透明带以下,至见到透明带稍稍膨大即取针进行下一枚卵的注射。注射后的胚胎重新移回 M-16 培养液培养[12]。

1.6.3　胎移植　　次日清晨选发育良好的 2-细胞期胚胎显微注射并进行移植。前 1 d 供体雌鼠与种公鼠合笼的同时,将正常发情的 6 周龄雌鼠与结扎公鼠合笼,次日清晨挑出有阴栓者作为受体。根据当天发育至 2-细胞期的胚胎数量及受体的数量确定每只受体移植的胚胎数,但一般移植不少于 30 枚/只。移卵采用输卵管壶腹部穿刺移植法,将发育良好的 2-细胞期胚胎吸入移卵针细长端,吸入顺序为:M-2 段→气泡→含胚胎的 M-2 段→气泡→M-2 段,尽量将胚胎排列紧密以减少培养液的吸入量。用取胚的方法暴露卵巢、输卵管及部分子宫。采用输卵管壶腹部穿刺移植法,将含有胚胎的 M-2 段吹入壶腹部,见壶腹部出现 2 个气泡则表明胚胎进入正确位置[15,16]。

1.7　转基因小鼠的鉴定

1.7.1　转基因小鼠的 PCR 鉴定　　剪取约 1 cm 长鼠尾,按分子克隆第 3 版方法抽提基因组。以此基因组为模板进行 PCR 反应。所用引物序列为:上游 5′-ACCCCGACCACATGAAGCAGC-3′;下游 5′-CGTTGGGGTCTTTGCTCAGGG-3′。反应条件:94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 40 s, 72 ℃ 50 s, 35 循环; 72 ℃ 5 min。

1.7.2　首建鼠(F0 代)主要器官的荧光观察　　小鼠经引颈处死,迅速取出心、肝、脾、肾以及皮肤组织,浸入 10% 多聚甲醛(PFA)中固定,交由中心实验室制作冰冻切片,并作荧光成像观察。

1.7.3　EGFP 阳性鼠的传代　　在手提式紫外灯照射下,从 F0 代中挑选 3 只荧光最强的雄性小鼠,分别与 1 只(共 3 只)雌性野生型 FVB/N 小鼠交配,出生 3 窝小鼠(F1 代);在 3 窝 F1 代小鼠中再分别挑选 1 只荧光最强的雄性小鼠,分别与 1 只(共 3 只)雌性野生型 FVB/N 小鼠交配,出生 3 窝小鼠(F2 代);以此类推,不断繁殖。

2　结果

2.1　慢病毒载体制备结果

用磷酸钙沉淀法将三质粒共转染 293FT 包装细胞,换液后 24 h 在荧光显微镜下观察到细胞大量表达 GFP。收集上清时,细胞均呈绿色。通过观察绿色荧光,可大致判定转染的效率(95% 以上)(图 1)。用浓缩前和浓缩后的病毒感染 293FT 靶细胞,48 h 后,通过流式细胞仪分析荧光细胞百分比,计算出浓缩前病毒滴度为 2×10^6 TU/ml,浓缩后病毒滴度达到 1.6×10^9 TU/ml,能够满足感染胚胎的要求。

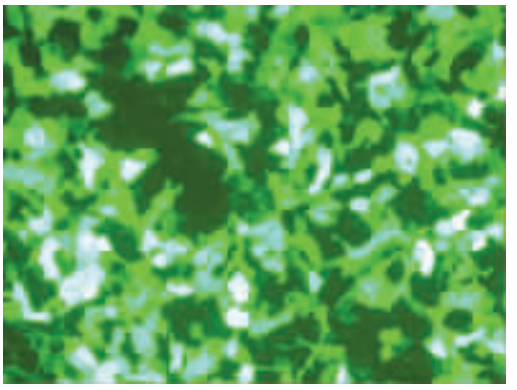


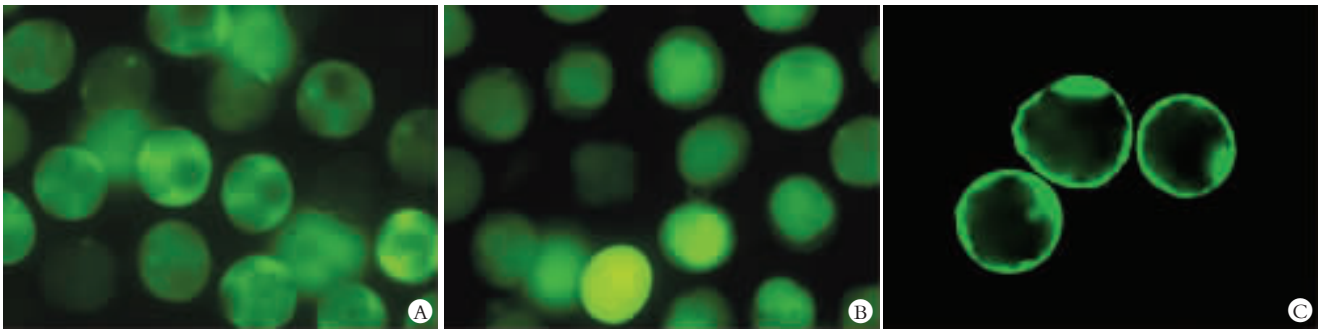
图 1　换液后 24 h 转染 293FT 细胞荧光显微镜观察结果　(×100)

2.2　胚胎荧光表达结果

通过显微注射仪将浓缩后的病毒液注入到 1-细胞受精卵卵周隙。注射后第 2 天观察受精卵注射后的卵裂率和荧光表达情况。实验显示,注射后的受精卵 2-细胞卵裂率约为 81.8%,说明小鼠胚胎经过透明带注射后其分裂发育能力未受明显影响。在 2 ~ 4 细胞期,90% 以上的胚胎在荧光显微镜下呈现出荧光,但荧光最强区域在卵裂球外(图 2A)。随着胚胎发育进程的推进,荧光的最强区域向卵裂球细胞质区域转移,到了桑椹胚或囊胚期,荧光只分布于胚胎内细胞团(图 2B、C)。

2.3　主要器官荧光分布观察结果

取 EGFP 转基因阳性小鼠(图 3),引颈处死后立即进行冰冻切片,并对冰冻切片进行荧光分布的观察。在肝脏、心脏、脾脏以及皮肤中均发现 GFP 的存在(图 4)。理论上讲,泛素启动子是呈广泛性表达的非特异性启动子,在其驱动下 GFP 在各个组织器官中均应该有较强的表达。图 3 中可见,GFP 在肝、脾以及皮肤的毛囊部位有更强的表达,其中毛囊上皮细胞所在位置表达尤甚。我们在紫外激发光源下观察肝脏和脾脏的组织切片发现,GFP 存在于细胞核外、细胞质部位(图 4B、C 箭头所指即细胞核位置),说明 GFP 为转基因小鼠体细胞内表达的内源性蛋白。观察皮肤切片(图 4D)中 GFP 的分布,发现荧光信号最强处位于毛囊的毛球部和毛囊上皮细胞。



A：注射后 2 d；B：注射后 36 h；C：注射后 4 d

图 2 注射后不同时间荧光显微镜下观察胚胎中 GFP 表达情况 （×200）



图 3 EGFP 首建小鼠活体

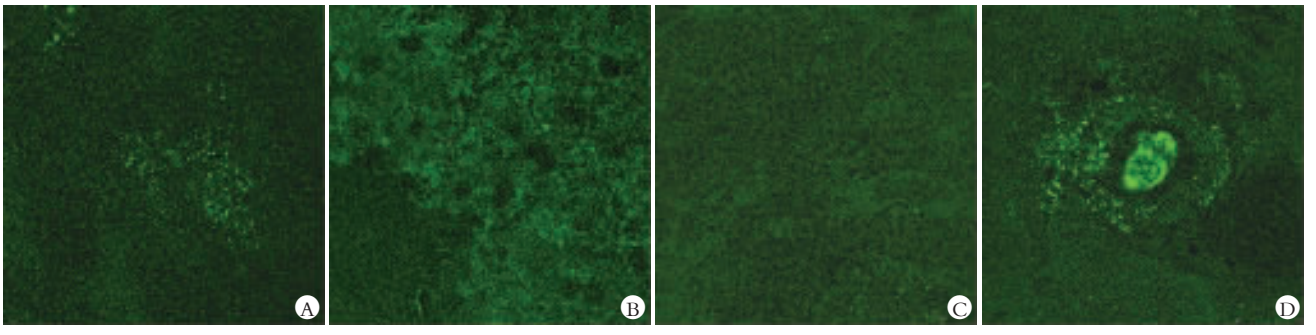
2.4 EGFP 在转基因小鼠传代中的表达

感染了慢病毒载体的小鼠胚胎细胞移植于假孕母鼠后获得了 F0 代小鼠(图 3)。将 F0 代小鼠用普通紫外灯照射筛选荧光阳性小鼠，发现在 F0 代小鼠中荧光小鼠所占比例为 60.8%(73/120)。选取荧光表达较强的荧光小鼠与野生型小鼠交配，进行杂交繁育，在 F1 ~ F3 代个体中，均获得了 EGFP 阳性小鼠，阳性率分别为 91.4%(32/35)、93.8%(30/32)、93.1%(27/29)，且其荧光强度与 F0 代个体相当，说明慢病毒介导的 EGFP 的表达在传代中保持相对稳定。此外，在 F1 和 F2 代个体中，超过 50% 的个体为 EGFP 阳性，说明慢病毒介导的转基因的整合是多位点、多拷贝的整合。

3 讨论

转基因动物技术是功能基因组时代医学生物学研究不可或缺的遗传工程技术。自 20 世纪 80 年代初 Palmiter 等[17]学者开创了转基因动物研究的先河以来，转基因动物技术取得了长足发展。在现行的转基因动物制备技术中，显微注射法是最经典，应用最广泛，并在多个物种均有成功报道的转基因动物制备技术。但显微注射法研制效率低、实验周期长、技术难度大，在转基因大动物的研制中效率更低。精子载体法技术难度较低，并在多个物种也有成功报道，但该技术重复性差，不同实验室的实验结果差异大，而且通过该技术研制的转基因动物其转基因表达水平往往较低。基于核移植的转基因动物制备技术虽可较高比例的获得转基因首建动物，并在理论上可实现对大型哺乳动物基因组位点特异性修饰，但其效率低、技术难度大、不易在不同实验室重复。

基于逆转录病毒的病毒感染法在转基因动物的研制中已有较成功的应用[10]。在最早的病毒感染法中，大都采用 oncoretrovirus 基因组改造而来的逆转录病毒载体。通过该类病毒载体尽管可实现外源基因的整合，



A：心肌组织(×400)，GFP 表达最弱；B：肝脏(×400)；C：脾(×400)；D：皮肤(×200)，毛囊横截面，GFP 在毛囊上皮细胞表达最强

图 4 EGFP 阳性小鼠主要脏器组织切片荧光显微镜观察结果

但由于此载体包含活性较强的 LTR 区,往往被宿主基因组甲基化,从而导致转基因表达的沉默;此外,由于该类载体只感染分裂细胞,而对非分裂细胞并不敏感,在很大程度上限制了转基因动物研制效率。

2002 年,Lois 等[10]首次报道了慢病毒载体在转基因动物研制中的有效性。由 HIV-1、马传染性贫血病毒(EIAV)等逆转录病毒基因组改造而来的慢病毒载体,不但能有效整合于宿主基因组中,还能有效感染处于静息期的非分裂细胞。更为重要的是,通过该病毒载体导入的外源基因可在动物体内有效表达,且转基因的表达可稳定传代。我们的实验结果表明,早期胚胎中已有 GFP 的有效表达。在 2 ~ 4 细胞期,荧光主要来自注射时病毒液携带残留的 GFP;4 细胞期至囊胚期,胚胎细胞外的 GFP 表达逐渐衰减或减少,而细胞内表达的内源性 GFP 在逐步增加;到了囊胚期,细胞外的外源性 GFP 完全消失,只观察到胚胎表达的内源性 GFP。我们的实验不但实现了 EGFP 在转基因首建鼠体内实现了高水平表达,且在 F1 ~ F3 代个体中均有强烈的荧光蛋白表达信号。此外,由于新一代慢病毒载体中除包含了部分 LTR 序列、包装与整合位点外,不包括任何病毒结构蛋白,病毒包装所需的病毒结构蛋白由包装质粒反式提供,且该类载体中残存的 LTR 序列已缺失了启动子活性,确保了该类载体的生物安全性。尽管慢病毒载体所携带的外源基因容量有限(≤8 kb),但用该载体研制基因片段不长的转基因小鼠,尤其是制备 RNA 干扰转基因小鼠是非常适宜的。

鉴于慢病毒载体在转基因动物制备中的有效性,我们建立了慢病毒载体的三质粒包装系统,优化了病毒浓缩技术流程,并利用该病毒载体研制了转基因小鼠。结果表明,通过我们建立的病毒包装系统,病毒滴度可达 1.6×10^9 TU/ml。利用该病毒感染胚胎,胚胎 GFP 阳性率可达 95%。将感染后胚胎移植于假孕母鼠输卵管后,出生的首建小鼠中有 60.8% 的个体为 GFP 阳性。将 GFP 阳性首建个体与野生型小鼠交配,发现转基因的表达可稳定传代。上述结果表明,本实验室所建立的慢病毒载体包装系统以及胚胎操作系统是有效的,利用该系统可利用慢病毒载体有效研制转基因小鼠。

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]. Proc Natl Acad Sci USA, 1980, 77(12): 7380 - 7384.

[2] Jaenisch R, Dausman J, Cox V, *et al*. Infection of developing mouse embryos with murine leukemia virus: tissue specificity and genetic transmission of the virus[J]. Hamatol Bluttransfus, 1976, 19: 341 - 356.

[3] Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, *et al*. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors[J]. EMBO Rep, 2003, 4(11): 1054 - 1060.

[4] Seibel N M, Eljouni J, Nalaskowski M M, *et al*. Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers[J]. Anal Biochem, 2007, 368(1): 95 - 99.

[5] Sakai T, Tochio H, Inomata K, *et al*. Fluoroscopic assessment of protein leakage during Xenopus oocytes in-cell NMR experiment by co-injected EGFP[J]. Anal Biochem, 2007, 371(2): 247 - 249.

[6] Hayashi Y, Toda K, Saibara T, *et al*. Assessment of anti-estrogenic activity of tamoxifen in transgenic mice expressing an enhanced green fluorescent protein gene regulated by estrogen response element[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1760(2): 164 - 171.

[7] Rae F, Woods K, Sasmono T, *et al*. Characterisation and trophic functions of murine embryonic macrophages based upon the use of a Csf1r-EGFP transgene reporter[J]. Dev Biol, 2007, 308(1): 232 - 246.

[8] Lee G S, Kim H S, Hyun S H, *et al*. Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein[J]. Theriogenology, 2005, 63(4): 973 - 991.

[9] 李小月, 何金生, 沈继龙, 等. 增强型绿色荧光蛋白真核表达载体的构建和表达[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2005, 18 (1): 12 - 15.

[10] Lois C, Hong E J, Pease S, *et al*. Germline and transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors[J]. Science, 2002, 295(5556): 868 - 872.

[11] 王　勇, 刘　勤, 倪　勇, 等. 通过双原核显微注射提高转基因小鼠研制效率的实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(3): 159 - 162.

[12] 孙青原, 陈大元, 译. 小鼠胚胎操作实验手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 251 - 256.

[13] 魏　泓. 医学实验动物学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1999: 451 - 456.

[14] 王　龙, 杨　桦, 徐国江, 等. 显微注射法制备遗传工程小鼠模型的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(11): 63 - 67.

[15] Brinster R L, Chen H Y, Trumbauer M E, *et al*. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(13): 4438 - 4442.

[16] Hasegawa A, Mochida N, Ogasawara T, *et al*. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by *in vitro* growth, *in vitro* maturation, and *in vitro* fertilization[J]. Fertil Steril, 2006, 86(Suppl 4): 1182 - 1192.

[17] 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(5893): 611 - 615.

(编辑　王　红)