

转基因动物技术及其应用

李欣¹, 刘昕昕¹, 牛铭晨¹, 赵玉民¹, 曹阳¹, 于力², 赵中利^{1*}

(1. 吉林省农业科学院畜牧兽医研究所, 吉林 公主岭 136100; 2. 公主岭市畜牧总站, 吉林 公主岭 136100)

摘要: 转基因动物技术是分子生物学前所未有的突破之一。转基因动物是一种携带其他物种基因或用于基因编辑的动物。动物特征可通过改变基因而有目的地改变。目的基因可以植入酵母人工染色体、细菌质粒和黏粒等多种载体中。热休克、电穿孔、病毒、基因枪、显微注射和脂质体转染都可以用来携带构建的质粒, 进入宿主细胞。转基因技术可以在性腺、精子、受精卵中, 利用DNA显微注射、逆转录病毒、干细胞和克隆技术来培育胚胎。目前最有效的转基因标记是荧光蛋白。转基因引发了一些伦理问题, 本研究主要关注的是动物转基因的基本原理及其在工业、医药和农业中的应用。在解决社会和伦理问题后, 未来转基因技术会更有前景。

关键词: 转基因动物; DNA显微注射; 精子介导的转基因; 体细胞核移植; 异种器官移植

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2024)06-0072-06

Transgenic Animal Techniques and Applications

LI Xin¹, LIU Xinxin¹, NIU Mingchen¹, ZHAO Yumin¹, CAO Yang¹, YU Li², ZHAO Zhongli^{1*}

(1. Institute of Animal and Veterinary Medicine, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100; 2. Gongzhuling Animal Husbandry Station, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Transgenic animal techniques is one of the unprecedented breakthroughs in molecular biology. A transgenic animal is one whose genome has been changed to carry genes from another species or to use techniques for animal genome editing for specific traits. Animal features can be changed by purposefully altering the genes. The produced gene of interest is placed into a variety of vectors, including yeast artificial chromosomes, bacterial plasmids and cosmids. Heat shock, electroporation, viruses, the gene gun, microinjection, and liposomes, are used to deliver the created vector, which includes the interesting gene, into the host cell. Transgenesis can be carried out in the gonads, sperm, fertilized eggs, and embryos through DNA microinjection, retroviruses, stem cells, and cloning. The most effective transgenic marker at the moment is fluorescent protein. Although transgenesis raises a number of ethical concerns, this review concentrates on the fundamentals of animal transgenesis and its usage in industry, medicine, and agriculture. If technology solves social and ethical problems, it will be the most promising in the future.

Key words: Transgenic animals; DNA microinjection; Sperm-mediated gene transfer; Somatic cell nuclear transfer; Xenotransplanta

转基因技术是指将外源DNA序列导入转染细胞的基因组中, 以确保DNA序列整合和传递给后代^[1-2]。转基因技术可使动物获得更强的生产和繁殖能力, 提高饲料利用率和生长速率, 改善胴体指标, 提高产奶量以及增强抗病性。其中, 生长素是用于生产转基因动物的一种最重要的候

选基因, 它能提高动物的生长速度和产奶量^[3]。通过种系基因迁移, 将亲代卵子和精子细胞的基因改变传给转基因动物的后代^[4-5]。现在, 基因构建已经被引入到大多数可食用的动物, 包括牛、绵羊、山羊、猪、兔子、鸡和鱼^[6]。在畜牧业中, 将基因稳定地插入生殖细胞系是一项卓越的技术。转基因动物能够促进生物技术与基因研究, 如对于大型单基因和多基因的调控机制研究^[3]。因此, 本文将重点综述对于生产转基因动物最为重要的动物转基因程序。

收稿日期: 2024-01-15

基金项目: 吉林省农业科学院基本科研经费项目(KYJF2023XK101)

作者简介: 李欣(1982-), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事动物干细胞研究。

通信作者: 赵中利, 男, 博士, 研究员, E-mail: zhaozhongli954@sohu.com

com

1 生产转基因动物的方法

1.1 载体介导的基因转移

1.1.1 逆转录病毒载体

逆转录病毒载体是一类利用逆转录酶由RNA逆转录生成DNA的RNA病毒。在细胞分裂过程中,能够自我复制并整合进宿主DNA^[7]。近年来,逆转录病毒被广泛用于外源基因整合进宿主基因组。虽然它们可以携带7 kb~8 kb的外源基因,但是也不足以满足转录调控长序列基因和结构域的需求^[8]。1976年,Jaenisch^[9]通过逆转录病毒和小鼠卵裂球共培养法,向小鼠基因组中成功插入莫氏白血病病毒基因。1986年,Robertson等^[10]利用逆转录病毒载体,使外源DNA引入干细胞系,成功整合入生殖细胞,从而获得了可遗传的转基因动物后代。这种方法的优点是受精卵携带外源基因的阳性率高;外源基因多单拷贝整合;操作简单,避免注射法对卵子的损害;宿主范围广;可同时感染大量胚胎,感染率及胚胎存活率高。缺点是容纳大小有限;重组逆转录病毒的长末端容易甲基化,影响外源基因的表达。

1.1.2 腺病毒相关(Adeno-associated virus, AAV)载体

腺病毒相关病毒最初是在20世纪60年代中期人体组织实验室腺病毒准备工作中发现^[11]。早期,人们只是从纯科研的角度出发,了解其生物学特性,而没有意识到它作为人类基因治疗平台的巨大潜力^[12-15]。成功克隆野生型腺病毒相关病毒AAV2并构建载体,获得了完整的AAV2基因序列,使研究其基因组布局和组成、DNA复制和转录、感染潜伏期和病毒粒子的组装成为可能^[16]。这些早期研究提供了AAV作为基因传递载体重要信息,它可以携带大约10 kb的外源DNA。

1.1.3 腺病毒

腺病毒是双链DNA载体,由于其相对容易操作和转基因的高水平表达,腺病毒广泛用作体外试验研究工具和小动物试验模型^[17-18]。腺病毒是高效基因转移载体,能够携带长约10 kb的外源DNA。结构基因如gag、pol和env的消除,有助于由逆转录病毒引起的腺病毒粒子的组装^[19]。

1.2 DNA显微注射技术

1.2.1 原核DNA显微注射

目前最常用的方法是将基因显微注射入受精卵原核中。20世纪80年代,此技术首次用于兔、猪和绵羊,随后用于山羊和奶牛中。但是这项技

术对家畜作用还很有限^[20]。这种方法的主要缺点是一些外源基因的转录本会随机整合进宿主基因组,从而引起转基因和宿主基因表达紊乱。而且,此技术操作时需要大量处于原核阶段的胚胎。因此,当外源DNA 500到5 000个拷贝时,后代只有平均1%~4%可以引入外源DNA。也就是说,100个注射细胞,只有1~4个细胞能生产转基因鼠。在牛中成功率会更低。由于其较低的整合效率和胚胎生存率,通过DNA原核显微注射进受精卵的方法生产转基因牛变得异常困难。原核DNA显微注射技术成功率较低,而且在不同物种间的成功率也不同。差异原因不得而知,但极有可能与DNA修复机制或宿主基因内在的DNA整合过程有关^[3]。这种方法的优点是外源DNA大小基本不受限制(1~50 kb),导入过程直观;整合率高。缺点是设备昂贵、环节较多,对操作人员有较高的技术要求,效率较低(尤其对大家畜),对卵子伤害大,胚胎存活率低,基因整合具有随机性,转基因的沉默。

1.2.2 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)

ESCs可以分化成任何细胞类型(包括体细胞和生殖细胞)和组织,可以在体外长期培养^[21],DNA序列可以经同源重组的方式插入到体外培养的ESCs中。这些细胞可以用于生产转基因嵌合体小鼠,在这些动物中,转基因是嵌合性的^[22]。体外培养过程中,将白血病抑制因子(Leukemia Inhibitory Factor, LIF)加入培养基中,干细胞可以保持未分化状态。如果无LIF添加,ESCs会自行分化发育成多种组织。经囊胚注射后的ESCs能够参与动物受体各组织嵌合体的生成和发育,在ESCs基因组体外改造过程中,可直接或间接发育成整个生命个体。此技术以同源重组为基本原理,外源DNA被定点整合到靶细胞的特定基因转座子上,进而对动物基因组进行修饰、重建和改造。这种方法的优点是外源基因整合情况的可控性高;可预先在细胞水平检测外源基因的拷贝数、定位、表达的水平及插入的稳定性;外源基因的导入方法多样,细胞鉴定及筛选方便。缺点是ESCs介导法在小鼠上应用比较成熟,在大动物上应用较晚。

1.3 基因转移配子

1.3.1 精子介导的基因转移技术(Sperm-mediated gene transfer technique, SMGT)

Brackett等^[23]研究首次发现,外源DNA可以整合进未经处理的精子中。Lavitano等^[24]研究首次

证实:(1)小鼠附睾精子可以自发结合质粒DNA分子;(2)经遗传修饰的后代可以通过使用含有精子细胞的质粒并经体外受精操作产生;(3)外源DNA序列可以在祖细胞中表达;(4)精子携带的外源DNA可以被整合进入受精卵。

SMGT可以通过人工授精(Artificial Insemination, AI)的方法用于家畜,如牛和猪^[25]。从供体动物体内采集的新鲜精液,清洗后离心去除精浆。动物人工授精,精子细胞悬液与外源DNA质粒共孵育,然后经适宜浓度的DMSO和Triton X-100稀释,可以提高精液中DNA提取质量^[6]。精膜的不稳定使外来DNA完全进入精子。此外,在精子冻融的过程中也有类似的发现^[26]。

另一种替代方法是胞浆内精子注射,包括注射精子经过外源DNA的处理和培养后直接进入卵母细胞(ICSI)。ICSI已被成功用于小鼠中转移长片段DNA,还可以用在酵母菌、细菌和其他人工染色体片段(YACs, BACs和MACs)^[27]。Keejone等^[28]证实了利用精子和示踪的外源DNA和单克隆抗体(mAb C)共孵育的方法来生产转基因动物。mAb C是一种简单的蛋白质,可以通过离子互作附着在DNA上,从而使外源DNA选择性地与精子相连。值得注意的是,外源DNA摄取介导机制是研究有性繁殖生物学的一个重要方面^[29-30]。这种方法的优点是精子与卵细胞之间的自然融合过程减少人为操作对胚胎的损伤,整合效率较高。缺点是整合尚且不够稳定。

1.3.2 体外精子前体

精子细胞可以在体外分离,经短时间培养后转移到受体睾丸。转移的细胞可以继续分化,最终产生有功能的精子。治疗不育的男性患者,可以服用一种可以阻碍睾丸干细胞发育的药物—丁硫芬,能够显著增强移植干细胞产生的精子细胞数量。这种方法在培养干细胞过程中可以成功将基因注入干细胞。这项技术可以用于研究精子干细胞成熟过程中基因的生物效应和创造转基因动物。

1.3.3 睾丸介导的基因转移技术(Testis-mediated gene transfer technique, TMGT)

此种方法不涉及体外受精或胚胎转移。睾丸被视为一种免疫特权器官。它在体内具有将基因转移到特定睾丸细胞类型的能力,提供了一种用于研究精子发生的分子调控的工具^[31]。基因可以通过DNA转染复合物转移到附睾精子从而进入睾丸。外源DNA插入睾丸,通过睾丸网转移至附

睾管,在附睾管整合至附睾的上皮细胞和附睾精子^[32]。将腺病毒载体溶液注入小鼠睾丸的间质空间(睾丸内注射)或输精管(管内注射)是引入外源基因的另一种方法。研究表明,腺病毒携带的基因转移对于转染睾丸体细胞更为有效,而且这种方法未来可用于体内治疗男性不育,事实上这种方法会引起一些问题,例如精子发生的轻微受损和炎症性反应。研究表明,TMGT可用于胎儿的基因治疗和转基因动物生产^[33]。

1.4 体细胞核移植(Somatic cell nuclear transfer, SCNT)

核移植后代的发育是低效的,成功率从0.5%到5.0%不等。发育异常通常发生在怀孕、分娩后的几个星期和几个月里。引起异常的原因不明,可能是由不适当或不充分的重编程引起,甚至是印记基因的问题^[34-35]。这项技术将体细胞核移入去核的细胞,经卵子细胞质重编程成为受精卵^[36]。在哺乳动物中,受精卵需要人工移植到代孕体的子宫^[37-38]。1986年,Willadsen第一次成功进行了核移植,从胚胎细胞核的8~16细胞期中克隆出羔羊。开启了动物转基因新的篇章。胚胎重建所用的细胞核来自经过基因改造的细胞,通过核移植产生的动物可视为一个群体转基因动物(添加、替代或改变某些基因)。

特定的外源基因经转染可以进入体细胞,然后转移至多能细胞(桑葚胚或囊胚细胞)。嵌合体后代能够继承并稳定遗传外源基因^[20,39]。这种技术可以将DNA随机整合进入基因组。虽然重构胚胎的发育能力有所下降,但这种方法生产转基因动物比原核显微注射技术更为有效。体细胞核移植技术大大提高了动物转基因效率,并可以创造基因工程动物,实现基因的同源重组。这种方法的优点是对体细胞进行基因改造后,用于核移植可以提高转基因的效率,不仅具有“ESCs细胞途径”的全部优点,而且物种适用面广,无需经过嵌体育种就可获得纯合个体,周期短,效率高。缺点是技术难度大、成功率低,胚胎死亡率高,一般实验室很难开展。

2 转基因动物的应用

2.1 动物生产

转基因动物生产应用包括多产性、繁殖力、高饲养消耗和生长速率、产奶量和抗病力等。提高转基因家畜生长速率和产奶量最为重要的候选基因是生长激素^[40]。肌生成抑制蛋白是肌肉细胞增

殖的负调控因子。众所周知,失活突变在包括牛在内的许多物种中,导致了肌肉的过度生长^[41]。虽然增加的肌肉被认为是一种阳性性状,但却加大了小牛出生时难产的概率,在农业生产中限制了这些自然发生的肌肉生长抑制素的突变。

转基因技术可以改变牛奶的成分或是在奶中制造出新的蛋白质。牛奶成分的改变可能会增加家畜生长和存活概率。乳糖、脂肪和蛋白质是牛奶的三大营养成分,可以通过改变任一成分影响后代的生长发育。提高产奶量或成分利于牛、羊的饲养和肉类生产。

2.2 医疗

2.2.1 营养补充剂和药物生产

牛奶成分可以经多种方式改变:如改变不饱和脂肪酸的浓度、降低乳糖含量、去除 β -乳蛋白或加入营养物质。通过加入营养物质和遗传干预,研究人员寄希望于生产药用性牛奶,富含有益于健康的营养成分。1997年,第一头转基因牛罗西诞生,它产的奶中含有人类的 α -乳清蛋白2.4 g/L。这种转基因牛奶营养更均衡,比天然牛乳要好,更适于有特殊营养或消化需求的婴儿或老人^[42]。

2.2.2 异种器官移植

随着细胞移植和器官移植技术的不断发展,人类的寿命也随之延长。患者自体或异体移植的需求不断攀升,然而器官捐献者却寥寥无几。异种器官移植可以缓解这种压力。需求与可得性(适配性)之间的鸿沟是人体器官临床移植的障碍^[43]。然而,异种器官移植可以解决这一医学难题。对于人体对异种器官的免疫排斥问题,可以通过经人源化修饰和改造动物器官,利用转基因动物技术培育出对人体基本无免疫排斥反应的克隆动物而解决。由此可见,动物转基因技术对异种器官移植并最终应用于临床仍具有深远意义。

2.3 药用动物

药用蛋白的编码基因插入表达载体,转染进细胞或者器官可以产生大量的蛋白质。人的胰岛素可以从基因改造的细菌中制造出来。用重组的胰岛素而不是猪来源胰岛素来治疗糖尿病患者。在纯度和结构上重组激素与人胰岛素无异。这种技术虽然有效但有其缺点:(1)某些蛋白质很难由细菌合成,并很难纯化;(2)许多药用蛋白质特别是人来源的蛋白质是糖基化的,其生理功能必须经转录后修饰才能发挥作用。

经遗传改造的动物细胞可以作为重组蛋白质

的来源。转基因家畜的血液、乳汁和体液可以分泌外源蛋白质。在兔、绵羊、山羊和奶牛中的临床试验中均可检测到乳蛋白基因启动子与 β -乳蛋白编码区结合^[44]。临床上,由母兔产生的一种葡萄糖苷可以改善婴儿的庞贝病。人的乳腺可以产生胶原蛋白、纤维蛋白和EC超氧化物歧化酶等外源蛋白^[45]。

2.4 工业

澳大利亚Nexia公司研发了一种来自西非的矮山羊,在自然繁殖和泌乳早期,与传统方式繁殖的绵羊、奶牛和山羊相比,缩短了转基因蛋白的产生周期。这种雄性山羊15周龄即可达到性成熟,传统雄性山羊性成熟需30周龄,进而大大缩短了生产转基因种群的时间^[46]。2001年,两位加拿大科学家将蜘蛛的基因整合进山羊细胞。这种山羊奶丝可以制造世界上最坚韧的材料,命名为生物钢铁。科学家可以制造出一种由高分子化合物分离而成的轻质、耐用的柔性材料,可用于军事装备、医疗缝合和网球拍线^[47]。

2.5 转基因动物应用的风险

涉及转基因动物的主要环境争议是基因逃逸。由于所转基因和物种的不同,基因逃逸的风险差别很大。转基因动物可用于研究基因和生物学功能。转基因动物是研究人和动物疫病的良好模型,同时也是检验临床药物疗效和人体器官的来源^[48]。所涉及的技术在生产转基因动物方面占有很大优势,在农业和生物医学方面有良好的应用前景,但也存在潜在风险。在生物安全的大框架下研究转基因动物的生态效应是新兴的热点问题^[49]。由于转基因过程需要高成本的投入,现在只有几种小型动物可以应用这项技术。如果使这项技术经济可行,有必要借助辅助生殖技术,如人工授精结合胚胎移植或试管技术。利用转基因动物研究人类疾病最受关注的是伦理问题和对环境的影响问题。由于其对动物福利的负面影响,这同样也是动物作为药用蛋白或器官移植的来源所面临的问题^[50]。

3 展望

随着科技的持续发展和进步,转基因动物在畜牧业、生物医药等研究领域具有巨大的经济价值和应用前景。基因工程技术可将外源基因整合进入动物基因组,使外源基因得以在后代中继承和表达。转基因动物技术在农业技术、食物供应和食品消费管理中是必需的。随着抗病动物和其

他提高动物生产能力的措施的发展,未来动物转基因会替代传统药物,此技术也可以用于弥补器官的缺陷从而改善人类的健康和生产抗病毒药物。但动物伦理的限制是转基因技术应用的难题,并且转基因的效率有待进一步提高。

从生物安全的角度出发,单纯实现外源基因的高效表达是远远不够的,还应关注基因衍生的问题,尤其是外源基因整合过程中引入的选择性基因标记,它的残留可能会引起生物安全的问题,故在设计表达方案之初,就需充分考虑标记的处理问题,以满足生物安全的要求^[51]。另外,转基因动物也不得不面对社会大众的接纳和社会伦理、动物福利等问题。转基因技术研究过程中对动物造成的健康损害问题不容小觑^[52]。

随着对基因沉默机理研究的不断深入,不断挖掘出更多的友好基因位点,以及转基因技术的进步和创新,以基因编辑技术为主导的多种系统技术的综合、灵活运用,动物转基因研究必将会不断向纵深推进,未来一定会有更为广阔的应用前景^[53-54]。

参考文献:

- [1] Houdebine L M. Cloning by numbers[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(12): 1451-1452.
- [2] 闫艳霞,李紫聪,董亚铮,等. 基因修饰技术及其在动物育种和生物医药领域的应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2024, 51(2): 659-667.
- [3] Shakweer W M E. A review of transgenic animal techniques and their applications[J]. *Journal of Genetic Engineering Biotechnology*, 2023,21(1):55.
- [4] Makarevich A V, Chrenek P, Zilka N, et al. Preimplantation development and viability of in vitro cultured rabbit embryos derived from in vivo fertilized gene-microinjected eggs: apoptosis and ultrastructure analyses[J]. *Zygote*, 2005, 13(2):125-137.
- [5] Miao Xiangyang. Recent advances in the development of new transgenic animal technology[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013,70(5): 815-828.
- [6] Shakweer W M E, Hafez Y M, Ei-sayed A A, et al. Construction of ovine GH-pmKate2N expression vector and its uptake by ovine spermatozoa using different methods[J]. *Journal of Genetic Engineering Biotechnology*, 2017, 15(1):13-21.
- [7] Wang Lingbo, Li Jinsong. Artificial spermatid-mediated genome editing[J]. *Biology of Reproduction*, 2019, 101(3): 538-548.
- [8] Ng P, Parks R J, Cummings D T, et al. An enhanced system for construction of adenoviral vectors by the twoplasmid rescue method[J]. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 2000, 11(5): 693-699.
- [9] Jaenisch R. Germ line integration and mendelian transmission of the exogenous moloney leukemia virus[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 1976,73(4): 1260-1264.
- [10] Robertson E, Bradley A, Kuehn M, et al. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector[J]. *Nature*, 1986, 323, 445-448.
- [11] Whitelaw C B A, Sang H M. Disease-resistant genetically modified animals[J]. *Revue Scientifique Et Technique(International Office of Epizooties)*, 2005, 24(1): 275-283.
- [12] Barrie J C. Adeno-associated virus and the development of adeo-associated virus vectors:a historical perspective[J]. *Molecular Therapy*, 2004,10(6):981-989.
- [13] Berns K I. My life with adeno-associated virus: a long time spent studying a short genome[J]. *DNA and Cell Biology*, 2013, 32(7):342-347.
- [14] Hastie E, Samulski R J. Adeno-associated virus at 50: a golden anniversary of discovery, research, and gene therapy success a personal perspective[J]. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 2015, 26(5): 257-265.
- [15] Rajvinder K, Ahad A R, Andrew M S W, et al. Generation of light-producing somatic-trans-genic mice using adeno-associated virus vectors[J]. *Scientific Reports*, 2020,10(1): 2121.
- [16] Linden R M, Ward P, Giraud C, et al. Site-specific integration by adeno-associated virus[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 1996, 93(21):11288-11294.
- [17] Tetsuji H, Hiroyuki M, Kazufumi K, et al. Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference[J]. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 2004,15(8):813-819.
- [18] Gang Shen, Yanmei Li, Yongcheng Zeng, et al. Related epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells: a novel protagonist in age-related macular degeneration [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2023, 64(12): 15.
- [19] 孙启鑫,吴秉毅,姚倩倩,等. 靶向人 c-Cbl 基因重组干扰慢病毒与过表达腺病毒载体的构建、鉴定以及病毒功效研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2024, 32(1): 274-281.
- [20] Wolf E, Scherthner W, Zakhartchenko V, et al. Transgenic technology in farm animals-progress and perspectives[J]. *Experimental Physiology*, 2000, 85(6): 615-625.
- [21] Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy-promise and challenges[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(4):523-531.
- [22] Gi B K, David RFP, David S, et al. Rapid generation of somatic mouse mosaics with locus-specific, stably integrated transgenic elements[J]. *Cell*, 2019, 179(1): 251-267.
- [23] Brackett B G, Baranska W, Sawicki W, et al. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 1971, 68(2): 353-357.
- [24] Lavitrano M, Camaioni A, Fazio V M, et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice[J]. *Cell*, 1989, 57(5): 717-723.
- [25] Federico P B, Alejandro G, M C, et al. Efficiency of sperm-mediated gene transfer in the ovine by laparoscopic insemination, in vitro fertilization and ICSI[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2011, 57(2): 188-196.

- [26] Garcia-Vazquez F A, Ruiz S, Grullón L A, et al. Factors affecting porcine sperm mediated gene transfer[J]. *Research in Veterinary Science*, 2011, 91(3): 446-453.
- [27] Satoshi A, Kazuhisa H, Akane O, et al. Construction of stable mouse artificial chromosome from native mouse chromosome 10 for generation of transchromosomal mice[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 20050.
- [28] Keejone Chang, Qian Jin, Jiang Meisheng, et al. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer[J]. *BMC Biotechnology*, 2002, 2:5.
- [29] Monika A S, Stefan M, W Steven Ward, et al. Expression of foreign DNA is associated with paternal chromosome degradation in intracytoplasmic sperm injection-mediated transgenesis in the mouse[J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 68(5):1903-1910.
- [30] Cheryl C, Weiguo Shu, Amy L R, et al. Standardized in vitro models of human adipose tissue reveal metabolic flexibility in brown adipocyte thermogenesis[J]. *Endocrinology*, 2023, 164(12): bqad161.
- [31] Blanchard K T, Boekelheide K. Adenovirus-mediated gene transfer to rat testis in vivo[J]. *Biology of Reproduction*, 1997, 56(2):495-500.
- [32] Masahiro S, Aki I, Minoru K, et al. Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible in vivo gene transfer system via epididymal spermatozoa[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2002, 61(1):49-56.
- [33] Yonezawa T, Furuhashi Y, Hirabayashi K, et al. Detection of transgene in progeny at different developmental stages following testis-mediated gene transfer[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2001, 60(2): 196-201.
- [34] Young L E, Sinclair K D, Wilmut I, et al. Large offspring syndrome in cattle and sheep[J]. *Reviews of Reproduction*, 1998, 3(3): 155-163.
- [35] Young L E, Fairburn H R. Improving the role of embryo technologies: possible role of genomic imprinting[J]. *Theriogenology*, 2000, 53(2): 627-648.
- [36] Li Zhiqiang, Zhang Kaiyan, Zhou Yuming, et al. Role of melatonin in bovine reproductive biotechnology[J]. *Molecules*, 2023, 28(13): 4940.
- [37] Yao Yujun, Yang Ailing, Li Guangdong, et al. Melatonin promotes the development of sheep transgenic cloned embryos by protecting donor and recipient cells[J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(13): 1360-1375.
- [38] Denning C, Burl S, Ainslie A, et al. Deletion of the $\alpha(1,3)$ galactosyltransferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(6): 559-562.
- [39] Kimiko I. Mouse somatic cell nuclear transfer: what has changed and remained unchanged in 25 years[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2023, 69(3): 129-138.
- [40] Shakweer W M E, El-Rahman H H A. Cloning, nucleotides-sequencing, and bioinformatics analyses of growth hormone mRNA of Assaf sheep and Boer goats reared in Egypt[J]. *Journal of Genetic Engineering Biotechnology*, 2020, 18(1): 30.
- [41] McPherron A C, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 1997, 94(23):12457-12461.
- [42] 董艳娇, 王建华, 李天泉, 等. 通过数据透视国内外兽药研发现状与趋势[J]. *东北农业科学*, 2022, 47(6): 134-140.
- [43] Abul H E, Cordelia S M, Xu Xiaoliang, et al. Targeted pharmacologic inhibition of S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2) mediated cell cycle regulation in lung and other RB-Related cancers: A brief review of current status and future prospects[J]. *Advances in Biological Regulation*, 2023, 88:100964.
- [44] Eduardo O M, Aurea M O C, Foanco M M, et al. Animal transgenesis: state of the art and application[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2007, 48(1): 47-61.
- [45] 赵玉娟, 段翠翠, 高磊, 等. 乳清中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白分离制备技术研究[J]. *东北农业科学*, 2017, 42(2): 53-59.
- [46] Denning C, Burl S, Ainslie A, et al. Deletion of the $\alpha(1,3)$ galactosyltransferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(6): 559-562.
- [47] Pietr S B, Nelcio A T de Carvalho, Bianca G, et al. Development, adoption, and impact of assisted reproduction in domestic buffaloes[J]. *Animal*, 2023, suppl 1:100764.
- [48] John Clark, Bruce Whitelaw. A future for transgenic livestock[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2003, 4(10): 825-833.
- [49] Xu Jianxiang, Zhao Jie, Wang Jianwu, et al. Molecular-based environmental risk assessment of three varieties of genetically engineered cows[J]. *Transgenic Research*, 2011, 20(5): 1043-1054.
- [50] Wang Ming, Sun Zhaolin, Yu Tian, et al. Large-scale production of recombinant human lactoferrin from high-expression, marker-free transgenic cloned cows[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 10733.
- [51] 赵旭东, 黄永志, 毕延霞, 等. 动物转基因高效表达策略研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2020, 36(3): 45-53.
- [52] 卢军锋, 李晓, 杨公社, 等. 我国转基因动物及其安全性评价发展现状[J]. *中国兽医杂志*, 2018, 54(2): 62-64.
- [53] 王彤, 高元鹏, 韩静, 等. CRISPR/Cas9基因编辑技术在家畜中的应用研究进展[J]. *动物医学进展*, 2021, 42(11): 78-84.
- [54] 高晗, 钟蓓. 转基因技术和转基因动物的发展和应[J]. *现代畜牧科技*, 2020(6): 1-4, 18.

(责任编辑:王 昱)